

(別紙様式1)

### 遺伝子組換え実験計画書

提出年月日：令和 3 年 4 月 1 日

■機関承認                      □大臣確認 (            年    月            号)

申請の種類 (注1)	実験の区分 (注2)	拡散防止措置の区分 (注2)
■新規 □継続 ( 年 月 号) □変更 ( 年 月 号)	1)微生物使用実験 □ 2)動物使用実験 作成(使用) ■ 接種 □ 3)その他(上記以外) ・大量培養実験 □ ・植物等使用実験 作成(使用) □ 接種 □ きのこ作成 □ ・細胞融合実験 □	1) □ P 1 □ P 2 □ P 3 2) ■ P 1 A □ P 2 A □ P 3 A 3) □ その他 (            )

倫理委員会の承認 (ヒトの遺伝子を用いる実験計画の場合) (注3)	1)倫理委員会承認済 □ 2)倫理委員会申請中又は申請準備中 □ 3)倫理委員会の承認を要しない ■ (理由：ヒト遺伝子を使用しないため…など)
---	---

実験実施機関	所在地	(〒520-2192) 大津市瀬田月輪町			
	名称	国立大学法人滋賀医科大学			
	代表者の職名・氏名	学長・上本 伸二			
課題名	心筋細胞で発現する分子 A の心不全に対する分子作用機序				
実験実施期間(注4)	安全委員会の承認日から                      令和 8 年 3 月まで				
実験責任者	所属部局の所在地	(〒520-2192) 大津市瀬田月輪町			
	所属機関・部局・職名	滋賀医科大学・XXXXXX 学・教授			
	氏名	XX XX TEL:077-548-21XX FAX:077-548-21XX E-mail:xxx@belle.shiga-med.ac.jp			
実験場所	所在地	(〒520-2192) 大津市瀬田月輪町			
	名称	滋賀医科大学・XXXXXX 学・実験室 A 滋賀医科大学・動物生命科学研究所センター・X 階動物飼育室 (XXX 号室)			
実験従事者	氏名	所属機関・職名	経験年数		
			微生物実験 (注5)	動(植)物実験 (注5)	遺伝子組換え実験
	XX XX	滋賀医科大学・教授	大腸菌・20年	マウス・18年	20年
	YY YY	滋賀医科大学・助教	大腸菌・10年	マウス・10年	10年
ZZ ZZ	滋賀医科大学・大学院生	大腸菌・1年	マウス・1年	1年	

承認日から5年以内です。

非専門家にも理解できるよう分かりやすい記載をお願いします。

実験の目的

最近、マウス心臓に圧ストレスをかけ心不全を引き起こさせると分子 A の発現が増加することを申請者らは見出した。しかし、この分子 A が心臓に対してどのように作用しているか明らかになっていない。本研究では、... .. するため、Cre-loxP システムを用いて、心筋細胞特異的に分子 A の発現が欠失するコンディショナルノックアウトマウスを作製し、心不全において、分子 A が担っている作用機序を解析することが目的である。

予定されている実験内容について、具体的かつ要領よく記載下さい。

実験の概要 (注 6)

①心筋細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウス (Myh6-Cre マウス) を Jackson Laboratory 社より購入する (P1A レベル)。Jackson Laboratory 社のホームページよりダウンロードしたこのマウスの情報を別紙 1 に添付する。

②分子 A 遺伝子のエクソン 1 を含む領域の両側に loxP を挿入したマウス (分子 A-flox マウス) は、共同研究先の〇〇大学△△研究室より譲り受ける (P1A レベル)。このマウスの作製に関する情報が記載されている論文を別紙 2 に添付する。

各実験について P1、P1A、P2 など、どの封じ込めレベルが必要か明記して下さい。

③本学動物生命科学センター内で、Myh6-Cre マウスと分子 A-flox マウスを掛け合わせることで、心筋特異的分子 A コンディショナルノックアウトマウスを作製し、心不全状態下での解析を行う。具体的には、マウスを安楽死させた後、心臓を摘出し、... .. を行う。

組換え生物等の詳細：供与体・供与核酸・プラスミドベクター・宿主の組み合わせ (注 7)

宿主に導入される核酸		宿主から除去される核酸	プラスミドベクターの名称 (注 11)	宿主 (実験分類) (注 12)	認定宿主ベクター系 (B1、B2) (注 13)	物理的封じ込めレベル (注 14)	備考 (注 15)
核酸供与体 (実験分類) (注 8)	供与核酸の名称 (注 9)	核酸の名称 (生物種) (注 10)					
マウス (クラス 1)	Myh6 遺伝子プロモータ領域 (NM_00116417 1.1)			マウス (C57BL/6 系統) (クラス 1)		P1A	Myh6-Cre マウス (Jackson Laboratory 社より購入)
Bacteriophage P1 (クラス 1)	Cre リコンビナーゼ (X03453.1)						
Bacteriophage P1 (クラス 1)	loxP 配列 [分子 A 遺伝子エクソン 1 を含む領域の両側に挿入] (E14740.1)			マウス (C57BL/6 系統) (クラス 1)		P1A	分子 A-flox マウス (〇〇大学 △△研究室より譲り受け)
マウス (クラス 1)	Myh6 遺伝子プロモータ領域 (NM_00116417 1.1)	心筋細胞から分子 A 遺伝子 (XXXXXX XX) エクソン 1 を含む領域		マウス (C57BL/6 系統) (クラス 1)		P1A	Myh6-Cre マウスと分子 A-flox マウスを掛け合わせてできる心筋特異的分子 A コンディショナルノックアウトマウス
Bacteriophage P1 (クラス 1)	Cre リコンビナーゼ (X03453.1)						
Bacteriophage P1 (クラス 1)	loxP 配列 (E14740.1)						

核酸供与体の特性 (注 16)	マウス (クラス 1) については病原性はなく、Bacteriophage P1 (クラス 1) の病原性も報告されていない。
供与核酸 (その産物を含む) の特性 (注 17)	Cre リコンビナーゼは loxP 配列を認識して DNA 組換えを行う酵素で、loxP 配列はその特定の遺伝子配列である。共に Bacteriophage P1 に由来する遺伝子であるが、Bacteriophage P1 の病原性は報告されていないことから、これらの遺伝子の毒性もないと考えられる。 心筋細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現させるため、Myh6 のプロモータ領域を利用するが、この遺伝子はマウスに由来するものであり、病原性や毒性はないと考えられる。 Accession No. Cre リコンビナーゼ: X03453.1 loxP 配列: E14740.1 Myh6: NM_001164171.1
プラスミドベクターの特性 (注 18)	今回の研究で使用する遺伝子改変マウスを作製する際に使用されたターゲッティングベクターは、マウス ES 細胞または受精卵に導入する際にリニアライズされており、マウス中にプラスミドベクターの形では存在しない。
宿主の特性 (注 19)	C57BL/6 系統マウス (クラス 1) は遺伝子改変モデル実験によく使用される近交系マウスであり、染色体に挿入された遺伝子は遺伝的に子孫のみに伝達し、他に流出することはないと考えられる。
組換え生物等の特性 (宿主等との相違を含む) (注 20)	<b>Myh6-Cre マウス</b> : Bacteriophage P1 に由来する Cre 遺伝子とその上流にマウス Myh6 遺伝子プロモータ領域を有し、心筋で Cre 遺伝子産物を発現する。Myh6 遺伝子はマウス由来であり、Cre 遺伝子に病原性があったとの報告はなく、野生型マウスと比較して病原性、伝達性に変化はないと考えられる。 <b>分子 A-flox マウス</b> : Bacteriophage P1 に由来する loxP 遺伝子に病原性があったとの報告はなく、また、loxP に挟まれる領域はマウス由来のゲノムであり、野生型マウスと比較して病原性、伝達性に変化はないと考えられる。 <b>これらのマウスを掛け合わせてできる心筋細胞特異的分子 A コンディショナルノックアウトマウス</b> : 心筋で分子 A 遺伝子エキソン 2 を含む領域が除去されることで、分子 A 遺伝子が不活性化され、分子 A の発現が欠失する。このことによって心臓の機能・形態に対して影響が生じる可能性があるものの、野生型マウスと比較して病原性、伝達性に変化はないと考えられる。

(組換え)微生物の(組換え)動植物への接種実験 (注 21)

(組換え)微生物	(組換え) 動植物	物理的 封じ込めレベル (注 22)	備考
該当なし	該当なし	該当なし	

(組換え) 微生物を保有している (組換え) 動物、植物等の特性 (注 23)	該当なし
---	------

拡散防止措置	区分及び選択理由(注24)	<p>上記の遺伝子改変マウス:P1A レベル</p> <p>理由: 核酸供与体であるバクテリオファージはクラス1であり、宿主であるマウスもクラス1である。組換え動物は原則として宿主の実験分類に従って定められるので、物理的封じ込めレベルはP1Aにて安全性は確保できると考えられる。なお、供与核酸は全て同定済であり、供与核酸の性質から考えて、組換え動物の物理的封じ込めレベルを上昇させなければならない理由は見当たらない。</p>
	組換え生物等を不活化するための処置(注25)	<p>本研究で作製した遺伝子改変マウスは頸椎脱臼により安楽死させ、動物生命科学研究センターに処分を依頼する。</p>

物理的封じ込めに係る施設・設備(注26)	<p>基礎研究棟 X 階・XXXXXX 学・実験室 A (P1A) (許可年月日: 20XX 年 XX 月 XX 日)</p> <p>滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・X 階動物飼育室 (XXX 号室) (P1A) (許可年月日: 20XX 年 XX 月 XX 日)</p>
----------------------	--

その他	特になし
-----	------

安全主任者確認欄	<p>上記実験計画は、<input type="checkbox"/>大臣確認実験 <input type="checkbox"/>機関承認実験</p> <p>であり、実験計画書に不備のないことを認めます。</p> <p>令和    年    月    日</p> <p>安全主任者の部局・職    生化学・分子生物学講座 (分子病態生化学部門)・教授</p> <p>氏 名    扇田 久和    印</p>
	付記

## 計画書記入要領

### 1) 機関承認実験-項目にチェックを入れる。

本様式の各項目に記入する。余白が不足して記入できない場合は、適宜、枠を縦に拡大するか、あるいは別紙を添付し該当項目に別紙番号を記入する。

### 2) 大臣確認実験-項目にチェックを入れ、大臣確認を受けた年月及び確認番号を記入する。

大臣確認実験は、第二種使用等拡散防止措置確認申請書を文部科学大臣に提出し大臣確認を受ける。その後、大臣確認申請書の写しと本申請書を提出する。ただし、本申請書は、1 ページ目を記入するだけでよい。

注 1. 該当項目にチェックを入れる。

注 2. 本計画において該当する項目すべてにチェックを入れる。

注 3. 該当項目にチェックを入れる。

注 4. 予定している実験実施期間（5 年を限度とする）を記入する。

注 5. 宿主名（大腸菌、マウスなど）とその取扱い経験年数を記入する。

注 6. 実験が複数のステップからなる場合、実験番号をつける。

注 7. 作成（使用）する組換え生物等毎に、核酸供与体、供与核酸、プラスミドベクター、宿主の組み合わせを記入する。

注 8. 核酸供与体となる生物の種名又は系統名を実験分類とともに記入する。

注 9. 同定済み核酸のときは、その名称と GenBank accession number を記入する。そうでないときは、未同定核酸と記入する。ベクターの中に存在する供与核酸は、物理的封じ込めレベルに影響を与えない限り、この欄には記入しない。

注 10. 宿主から核酸が除去される場合（ノックアウト動物やノックアウトウイルスなど）は、その核酸の名称と GenBank accession number、そしてその核酸の由来する生物種名を記入する。

注 11. 宿主に遺伝子を導入するときプラスミドベクターを利用する場合はその名称を記入する。ウイルスベクターは組換えウイルスなので、ベクター欄には記入しないこと。

注 12. 宿主の種名、系統名を実験分類とともに記入する。ここでいう宿主は感染実験の宿主ではなく、遺伝子が導入される生物（多くの場合、大腸菌、ウイルス、マウス等が該当）のことです。

注 13. 封じ込めのレベルダウンを要求する場合は、認定宿主ベクター系の各々の組み合わせについてその区分（B1 か B2）を記入する。

注 14. 作成（使用）される組換え生物等が複数の場合、順に番号をふる。各々の組換え生物等毎に物理的封じ込めレベルを記入する。

注 15. 組換え生物等を作成する過程が複雑な場合、備考欄にその説明を簡潔に記入する。

注 16. 核酸供与体の実験分類と病原性（毒素産生性及び発がん性など）及び伝達性について記入する。

注 17. 哺乳類動物等に対する供与核酸又はその産物の病原性（毒素産生性及び発がん性など）及び伝達性について記入する。同定済み核酸の場合は GenBank accession number とその機能に関する文献資料を引用する。毒素遺伝子の場合は、LD50 及びその構造についても記入する。

注 18. プラスミドベクター（複製起点）について各々の由来を記入する。プラスミド中の各種プロモータ・ターミネータ等は、宿主由来の核酸でない場合は供与核酸となるので、それらの由来についても記入する。これらを記入する代わりに、プラスミドベクターの遺伝子構成マップを添付してもよい。

注 19. 宿主について実験分類を記入する。特に微生物や寄生虫等を宿主とする場合は、病原性（毒素産生性及び発がん性など）および伝達性についても記入する。

注 20. 導入された供与核酸の特性によって、宿主にどのような形質が新たに付与されるかについて考察し記入する。

注 21. 前欄で記述した組換え微生物を組換え動（植）物に接種する実験（感染実験）を行う場合に記入する。組換え微生物と組換え動（植）物、組換え微生物と通常の動（植）物、通常の微生物と組換え動（植）物のいずれかの組み合わせで接種（感染）実験を行う場合が該当する。

注 22. 接種（感染）実験の組み合わせ毎に物理的封じ込めレベルを記入する。

注 23. （組換え）微生物の接種により新たに獲得することが予想される宿主の特性について記入する。また、（組換え）微生物の病原性（毒素産生性及び発がん性など）や感染性などが変化すると予想される場合は、その旨明記する。

注 24. 作成（使用）する組換え生物等各々について、拡散防止措置の区分とその選択理由を記入する。接種実験を行う場合は、その拡散防止措置の区分と選択理由も記入する。

注 25. 具体的な不活化の方法を記入する。

注 26. 物理的封じ込めに係る施設・実験室の名称と安全委員会による認可年月日を記入する。