

(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)
<input checked="" type="checkbox"/> 新規 <input type="checkbox"/> 継続 ( 年 月 号) <input type="checkbox"/> 変更 ( 年 月 号)	1) 微生物使用実験 <input checked="" type="checkbox"/> 2) 動物使用実験 作成(使用) <input type="checkbox"/> 接種 <input type="checkbox"/> 3) その他(上記以外) ・大量培養実験 <input type="checkbox"/> ・植物等使用実験 作成(使用) <input type="checkbox"/> 接種 <input type="checkbox"/> きのこ作成 <input type="checkbox"/> ・細胞融合実験 <input type="checkbox"/>	1) <input checked="" type="checkbox"/> P 1 <input type="checkbox"/> P 2 <input type="checkbox"/> P 3 2) <input type="checkbox"/> P 1 A <input type="checkbox"/> P 2 A <input type="checkbox"/> P 3 A 3) <input type="checkbox"/> 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 <input type="checkbox"/> 2) 倫理委員会申請中又は申請準備中 <input type="checkbox"/> 3) 倫理委員会の承認を要しない <input checked="" type="checkbox"/> (理由：個人情報扱う研究でなく、本研究で使用するヒトの遺伝子は、市販の cDNA ライブラリーから得られたものであるため…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		タンパク質 A またはタンパク質 B とタンパク質 C との相互作用解析			
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 1			
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。

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。

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。

実験の目的	がん細胞で発現量が増加する分子としてタンパク質 A、タンパク質 B を見出した。これらのタンパク質が別のタンパク質 C と相互作用して、... することが本研究の目的である。
実験の概要 (注 6)	<p>1. GFP タグのついたタンパク質 A またはタンパク質 B を哺乳類培養細胞で発現させるため、それぞれのタンパク質の遺伝子 A、遺伝子 B の cDNA を市販の cDNA ライブラリーから PCR で増幅した後、pEGFP-C1 ベクターにクローニングする。その後、それぞれの cDNA を組み込んだ pEGFP-C1 ベクターを大腸菌に導入してトランスフォームし、ベクターを増幅する (P1 レベル)。</p> <p>2. FLAG タグのついたタンパク質 C を哺乳類培養細胞で発現させるため、1.と同様にタンパク質 C の遺伝子 C の cDNA を増幅し、pFLAG-CMV5 ベクターにクローニングした後、大腸菌に導入してトランスフォームし、ベクターを増幅する (P1 レベル)。</p> <p>3. 1.および2.で作製・増幅した発現ベクターを、pEGFP-C1-遺伝子 A と pFLAG-CMV5-遺伝子 C、または、pEGFP-C1-遺伝子 B と pFLAG-CMV5-遺伝子 C の組合せで哺乳類培養細胞にトランスフェクションし、...。なお、各発現ベクターを培養細胞にトランスフェクションする実験は遺伝子組換え実験ではない。</p>

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)					
ヒト (クラス 1)	遺伝子 A (XXXXXXXX)		pEGFP-C1	大腸菌 DH5α 株 (クラス 1)	B1	P1	
ヒト (クラス 1)	遺伝子 B (YYYYYYYY)						
ヒト (クラス 1)	遺伝子 C (ZZZZZZZZ)		pFLAG-CMV5	大腸菌 DH5α 株 (クラス 1)	B1	P1	

核酸供与体の特性 (注 16)	ヒト (クラス 1) で、病原性はない。
供与核酸 (その産物を含む) の特性 (注 17)	<p>遺伝子 A、遺伝子 B、遺伝子 C それぞれの産物であるタンパク質 A、タンパク質 B、タンパク質 C はヒト体内の細胞で発現しており、これまでに病原性や毒性を示すとの報告はない。</p> <p>Accession No. 遺伝子 A: XXXXXXXXX          遺伝子 B: YYYYYYYYY          遺伝子 C: ZZZZZZZZZ</p>
プラスミドベクターの特性 (注 18)	本研究で用いる pEGFP-C1、pFLAG-CMV5 ベクターは、それぞれ市販され、生命科学で汎用されており、安全性の確立されたものである。それぞれのベクターの遺伝子構成マップを別紙 1 および 2 に添付する。

<p>宿主の特性(注 19)</p>	<p>本研究で用いる大腸菌 DH5α 株 (クラス 1) は、<i>E. coli</i> K12 株由来で区分は B1 である。</p> <p>この株の大腸菌は自然環境中では原則として生育しない。基本的に無害と考えて良いが、条件によって疾患の原因、例えば、可能性は極めて低いものの、人体の血液中や尿路系に侵入した場合には、内毒素を産生しエンドトキシンショックを引き起こすことがあるので十分注意して取り扱う。</p>
<p>組換え生物等の特性 (宿主等との相違を含む) (注 20)</p>	<p>遺伝子 A、遺伝子 B または遺伝子 C を挿入したそれぞれの組換えベクターでトランスフォームされた大腸菌は、導入されたベクター内にカナマイシンまたはアンピシリン耐性遺伝子があるため、カナマイシンまたはアンピシリンに対して耐性を持つ。一方、供与核酸はヒトの生体由来のものであるため、元の大腸菌と比べて、病原性、伝達性は変化しないと考えられる。</p>

(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
---	------

<p>拡散防止措置</p>	<p>区分及び選択理由(注 24)</p>	<p>組換えベクターでトランスフォームされた大腸菌: P1 レベル</p> <p>理由: 核酸供与体であるヒトはクラス 1 で、宿主である大腸菌もクラス 1、B1 認定系である。また、本研究で用いるベクターにはクラス 2 由来の核酸が含まれているが、同定済であり病原性や伝達性に影響を与えないと推定される。したがって、物理的封じ込めレベルは P1 にて安全性は確保できると考えられる。なお、本研究で作製される組換え生物 (大腸菌) において、供与核酸の性質から考えて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>
	<p>組換え生物等を不活化するための処置 (注 25)</p>	<p>本研究で作製した組換え生物 (大腸菌) はオートクレーブ装置を用いて不活化する。</p>

<p>物理的封じ込めに係る施設・設備(注 26)</p>	<p>基礎研究棟 X 階・XXXXXX 学・実験室 1 (P1) (許可年月日: 20XX 年 XX 月 XX 日)</p>
------------------------------	--

<p>その他</p>	<p>特になし</p>
------------	-------------

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 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。