

(様式1-1)

計画申請番号

第二種使用等遺伝子組換え実験計画申請書【**新規**・変更】

平成19年〇月〇日

久留米大学学長 殿

氏名 ○○○○

印

申請者

所属 感染医学臨床感染医学部門

第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置が定められている実験の**実施**を、次のとおり申請します。
計画変更

変更事項は【**実験責任者 実験従事者 宿主・ベクターの変更 実施期間の延長 その他**】である。

(注)・変更事項を○で囲み、以下に第二種使用等の名称と変更事項のみを記入してください。

- ・宿主・ベクターの変更の場合は大臣確認実験の有無を記入してください。
- ・その他の場合は別紙に変更事項を具体的に記入してください。

第二種使用等の名称		C型肝炎ウイルス(HCV)における非翻訳領域の機能解析と蛋白質の性状解析				
実験実施期間		平成 19 年 5 月から平成 22 年 4 月まで				
第二種使用等をする場所	名称	久留米大学医学部感染医学講座臨床感染医学部門P2実験室				
	所在地	郵便番号 (830-0011) 久留米市旭町67				
		電話番号0942-31-7549				
大臣確認実験の有無		有 ・ 無				
P1B1及びP1B2実験以外の 遺伝子組換え実験予定の有無		有 ・ 無				
事務連絡先	実験責任者	所属名及び職名	感染医学講座臨床感染医学部門・助教			
		氏名	○○○○			
			連絡先 0942-31-7549			
			電子メールアドレス ○○○○@med.kurume-u.ac.jp			
	実験従事者 (実験責任者を含む)	氏名	所属名・職名	教育訓練受講の有無 (有りの場合は受講終了番号)	病原微生物取扱経験(1年以上)の有無	遺伝子組換え実験経験(1年以上)の有無
		0 0 0 0	久留米大学医学部感染医学講座臨床感染医学部門・助教	有(○○○○)	有(MRSA分離など)	有
	0 0 0 0	久留米大学医学部感染医学講座臨床感染医学部門・准教授	有(○○○○)	有(ポリオウイルス強毒株など)	有	

第二種使用等の 目的及び概要	種類	<ol style="list-style-type: none"> ① 微生物使用実験 2. 大量培養実験 3. 動物使用実験 <ol style="list-style-type: none"> (1) 動物作成実験 (2) 動物接種実験 4. 植物等使用実験 <ol style="list-style-type: none"> (1) 植物作成実験 (2) 植物接種実験 (3) きのこと作成実験 5. 細胞融合実験 <p style="text-align: right;">該当するものに○を付けて下さい。</p>
	目的	C型肝炎ウイルスの各種蛋白質の性状解析と非翻訳領域の機能解析
	概要	患者検体よりRT-PCR法にてcDNAを得（蛋白質名C, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b：非翻訳領域名IRES, X-region, Poly U/C）、各種蛋白質を発現させ、酵素活性などの性状解析を行う。非翻訳領域においては各種蛋白質との相互作用を細胞内および試験内にて検討する。
遺伝子組 換え生物 等の特性	核酸供与体の特性	C型肝炎ウイルス。ウイルス性肝炎に関与している。高率に慢性化し、20-30年の歳月を経て、肝硬変、肝細胞癌へと進行する。
	供与核酸の特性	患者検体において遺伝子型1bを選択しており、HCV-J (D90208) に類似している。
	ベクター等の特性	pT7Blue-2(TA Cloning用ベクター)、pETBlue-1(大腸菌用発現ベクター) pVL1392/1393 (Baculovirus発現用ベクター)、pCMV-Tag(培養細胞用発現ベクター)、pEF1/Myc-His(培養細胞用発現ベクター)
	宿主等の特性	K12株由来DH5 α (認定系)、Tuner (DE3)pLacI (BL21由来)、SF21細胞(Baculovirus発現系用株化昆虫細胞)、Huh-7(株化ヒト細胞)、HLE(株化ヒト細胞)、Hep-G2(株化ヒト細胞)、HeLa(株化ヒト細胞)
	遺伝子組換え生物等の特性(宿主等との相違を含む。)	遺伝子産物はC型肝炎ウイルスの一部であり、各種蛋白質の危険な細胞毒性などの報告はない。また非翻訳領域が特別な細胞毒性なども報告されていない。
遺伝子組換え生物等を保有している動物、植物又は細胞等の特性	なし	
拡散防止 措置	区分及び選択理由	P2 (当該核酸供与体などの拡散防止措置が省令などに定められている)
	施設等の概要	感染医学講座臨床感染医学部門P2実験室。安全キャビネット、オートクレーブ、手洗い用の流し。見取り図は別紙参照。入口には「P2レベル実験中」の掲示、組換え体を保管するフリーザーには「遺伝子組換え体保管中」の掲示をおこなう。
	遺伝子組換え生物等を不活性化するための措置	患者血清、組換え大腸菌、培養細胞、実験器具などは、すべて終了後、オートクレーブにより完全不活性化処理を行う。
その他	久留米大学遺伝子組換え実験安全委員会 (委員長 法医学・人類遺伝学教授 神田芳郎)	

[備考] (注:この部分は申請時には添付しないで下さい。)

- 1 氏名を記載し、押印することに代えて、本人が署名することができる。
- 2 「第二種使用等の名称」については、当該第二種使用等の目的及び概要を簡潔に表す名称を記載すること。
- 3 「名称及び所在地」については、当該第二種使用等に用いるすべての実験室、実験区画、実験区域、飼育区画及び網室についてそれぞれ記載すること。
- 4 「実験責任者」については、当該第二種使用等をする場所において当該第二種使用等を直接管理する者について記載すること。「実験従事者」は本学において当該第二種使用等を行うものに限る。
- 5 「種類」については、当該第二種使用等が該当するすべての項目を選ぶこと。
- 6 「概要」については、当該第二種使用等に係るすべての遺伝子組換え生物等及び当該第二種使用等をする間に執るすべての拡散防止措置の区分について、当該第二種使用等の過程がわかるように記載すること。このほか、当該第二種使用等をする間に執る拡散防止措置の区分の中に特定飼育区画又は特定網室がある場合には、次に掲げる項目についても併せて記載すること。
 - (1) 当該第二種使用等に係る組換え動物等又は組換え植物等の系統数又は個体数
 - (2) 当該第二種使用等に用いる飼育区画又は網室の面積
 - (3) 当該第二種使用等に係る組換え動物等の飼育又は当該第二種使用等に係る組換え植物等の栽培の方法
- 7 「核酸供与体の特性」については、当該第二種使用等に係る遺伝子組換え生物等の核酸供与体に関し、次に掲げる項目について記載すること（遺伝子組換え実験の場合に限る。）。ただし、薬剤耐性遺伝子その他のマーカー遺伝子及び発現調節遺伝子（目的遺伝子に係るものを除く。）である供与核酸が由来する核酸供与体に関しては、次に掲げる項目についての記載を省略することができる。
 - (1) 分類学上の位置及び実験分類
 - (2) 病原性、有害物質の産生性その他の特性
- 8 「供与核酸の特性」については、当該第二種使用等に係る遺伝子組換え生物等の供与核酸に関し、次に掲げる項目について記載すること（遺伝子組換え実験の場合に限る。）。ただし、薬剤耐性遺伝子その他のマーカー遺伝子及び発現調節遺伝子（目的遺伝子に係るものを除く。）である供与核酸に関しては、次に掲げる項目についての記載を省略することができる。
 - (1) 種類（ゲノム核酸、相補的デオキシリボ核酸、合成核酸等）及び一般的名称
 - (2) 構成要素（目的遺伝子、発現調節遺伝子等）の機能、大きさ及び構成
 - (3) 塩基配列情報又は日本DNAデータベース等の塩基配列データベースのアクセッションナンバー（供与核酸が同定済核酸である場合に限る。）
- 9 「ベクター等の特性」については、当該第二種使用等に係る遺伝子組換え生物等のベクターに関し、次に掲げる項目について記載すること（遺伝子組換え実験の場合に限る。）。このほか、薬剤耐性遺伝子その他のマーカー遺伝子の特性についても併せて記載すること。
 - (1) 名称、由来する生物の分類学上の位置及び実験分類
 - (2) 構成
 - (3) 伝達性及び宿主特異性
 - (4) 染色体組込み型かエピゾーム型かの区別
- 10 「宿主等の特性」については、遺伝子組換え実験の場合には当該第二種使用等に係る遺伝子組換え生物等の宿主に関し、細胞融合実験の場合には当該第二種使用等に係る遺伝子組換え生物等の親生物（法第2条第2項第2号に掲げる技術の利用により得られた核酸又はその複製物が由来する生物をいう。以下同じ。）に関し、次に掲げる項目について記載すること。
 - (1) 分類学上の位置及び実験分類
 - (2) 自然環境における分布状況及び生息又は生育が可能な環境
 - (3) 繁殖又は増殖の様式
 - (4) 病原性、有害物質の産生性その他の特性
 - (5) 栄養要求性、薬剤耐性及び至適生育条件（微生物（ウイルス又はウイロイドであるものを除く。）である遺伝子組換え生物等の使用等をする場合に限る。）
 - (6) 9に掲げる項目（宿主がウイルス及びウイロイドである場合に限る。）

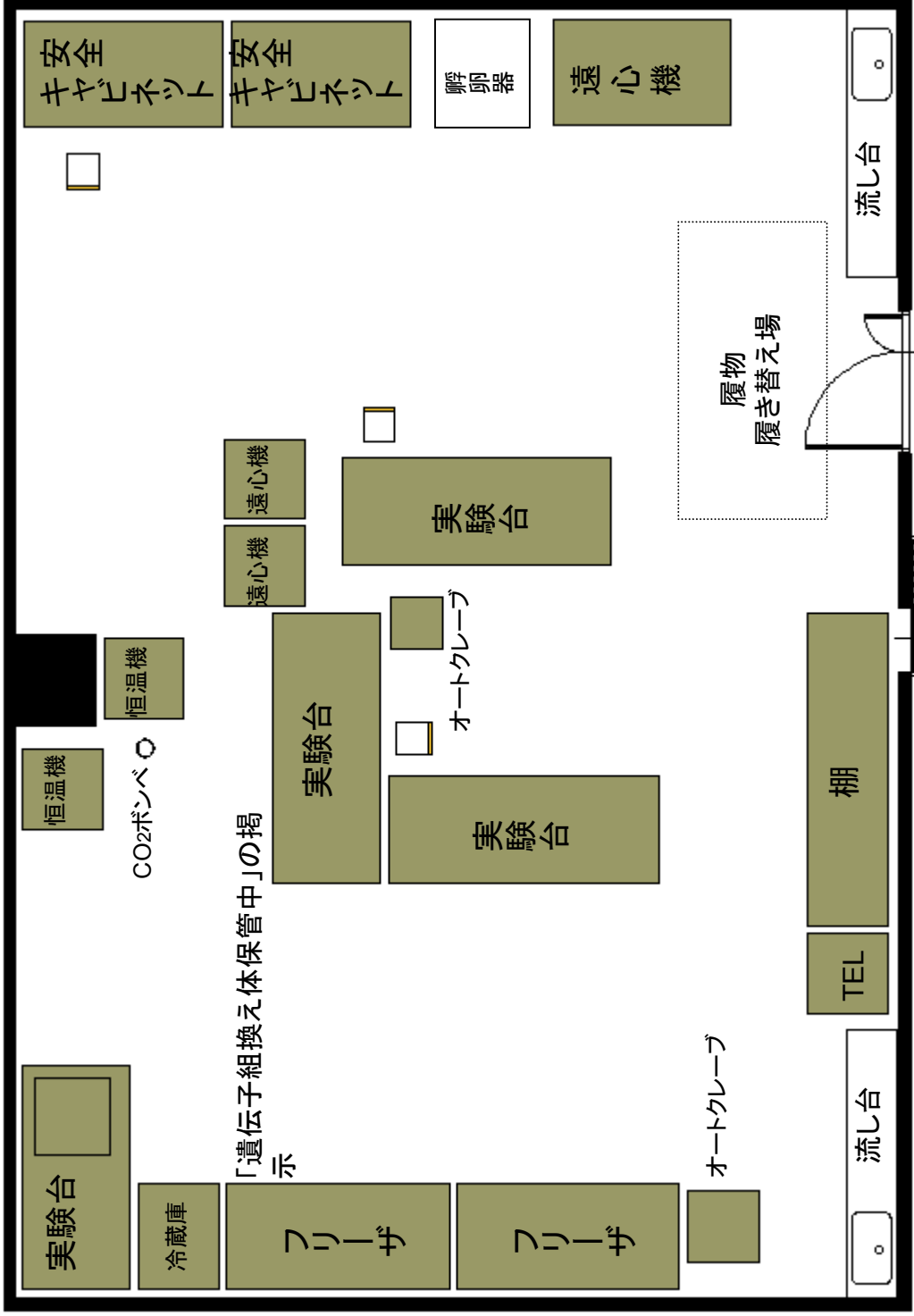
- 11 「遺伝子組換え生物等の特性（宿主等との相違を含む。）」については、遺伝子組換え実験の場合にあっては当該第二種使用等に係る遺伝子組換え生物等の宿主と比べて、細胞融合実験の場合にあっては当該第二種使用等に係る遺伝子組換え生物等の親生物と比べて、当該第二種使用等に係る遺伝子組換え生物等に新たに付与されることが予想される又は付与された特性を記載すること。このほか、当該第二種使用等をする間に執る拡散防止措置の区分の中に特定飼育区画又は特定網室がある場合には、当該第二種使用等に係る遺伝子組換え生物等に関し、次に掲げる項目についても併せて記載すること。
 - (1) 組換え核酸の移入方法及び育成の経過（継代数を含む。）
 - (2) 供与核酸の存在状態及び供与核酸による形質の発現の安定性（遺伝子組換え実験の場合に限る。）
 - (3) 繁殖又は増殖の様式
 - (4) 生育又は生存に対し、第二種使用等をする場所における気象条件によって受ける影響
 - (5) 微生物である遺伝子組換え生物等の残存性及び当該遺伝子組換え生物等の他の生物への伝播性（当該第二種使用等に係る植物である遺伝子組換え生物等の作成に微生物である遺伝子組換え生物等を用いた場合に限る。）
- 12 「遺伝子組換え生物等を保有している動物、植物又は細胞等の特性」については、10の(1)から(4)までに掲げる項目のうち関係する項目を記載することに加え、当該第二種使用等に係る遺伝子組換え生物等を保有していない動物、植物又は細胞等と比べて、当該第二種使用等に係る遺伝子組換え生物等を保有している動物、植物又は細胞等に新たに付与されることが予想される又は付与された形質について記載すること。
- 13 「区分及び選択理由」については、定められた拡散防止措置の区分をすべて記載する。
- 14 「施設等の概要」については、選択した拡散防止措置に関し、次に掲げる項目について記載すること。
 - (1) 主要な施設、設備及び機器の位置及び名称
 - (2) 培養設備等の総容量（大量培養実験の場合に限る。）
 - (3) 施設等の確認状況
 - (4) 実験室、実験区画、実験区域、飼育区画又は網室内において当該第二種使用等に関係しない動物が飼育され、又は植物が栽培されている場合には、当該動物の飼育又は植物の栽培の状況
 - (5) 第二種使用等をする場所の周辺における組換え植物等と交雑する植物の存在の有無及び当該交雑を防止する措置（第二種使用等をする間に執る拡散防止措置の区分を特定網室とする場合に限る。）
- 15 「遺伝子組換え生物等を不活化するための措置」については、当該第二種使用等をする間に執る拡散防止措置に関し、当該第二種使用等に係る遺伝子組換え生物等を含む廃棄物並びに当該第二種使用等に係る遺伝子組換え生物等が付着した機器及び器具についての遺伝子組換え生物等を不活化するための措置並びにその有効性を記載すること。
- 16 「その他」については、次に掲げる項目について記載すること。
 - (1) 遺伝子組換え生物等の安全な取扱いについて検討する委員会等の設置状況及び当該委員会等の委員長の職名及び氏名等
 - (2) 動物を飼育する施設等の管理者による確認状況（動物使用実験の場合に限る。）
 - (3) 事故時等緊急時における対処方法（大量培養実験の場合に限る。）
- 17 関連する文献がある場合には、様式中に「参考文献」と記載し、引用番号を付して、当該文献のうち、重要な図等のみをの写しを添付する。

遺伝子組換え生物等及び拡散防止措置の一覧表

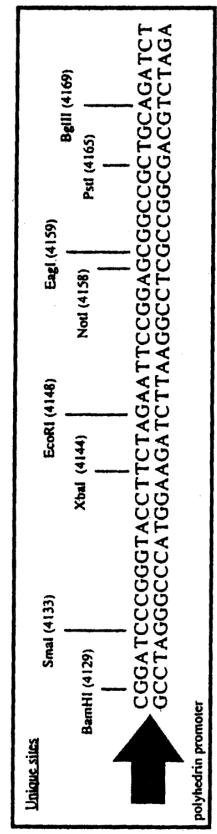
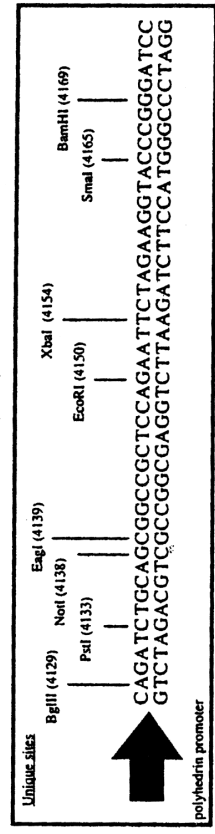
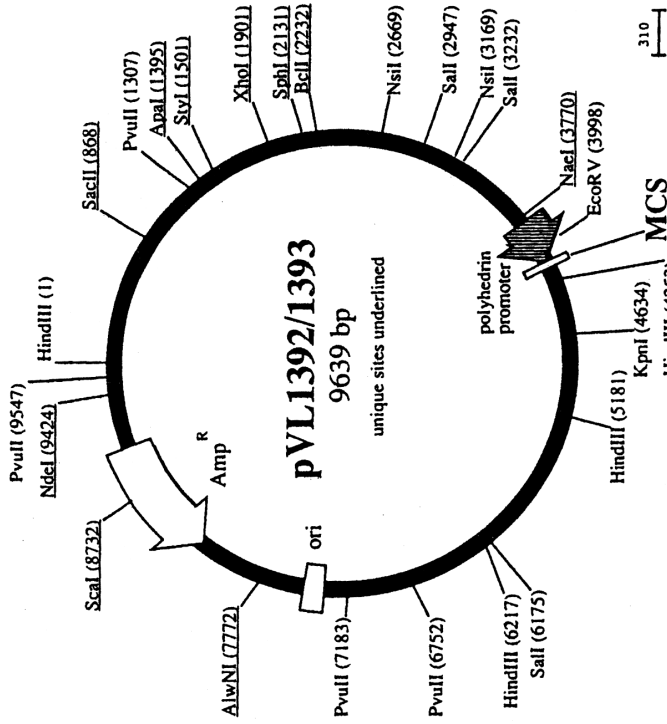
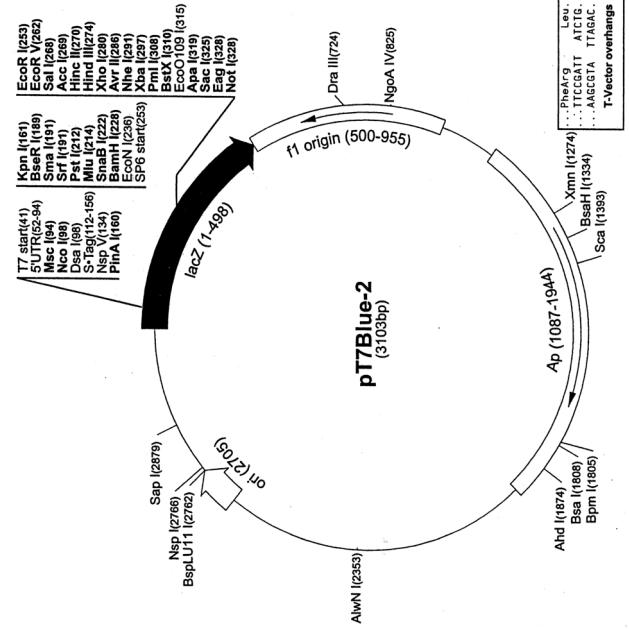
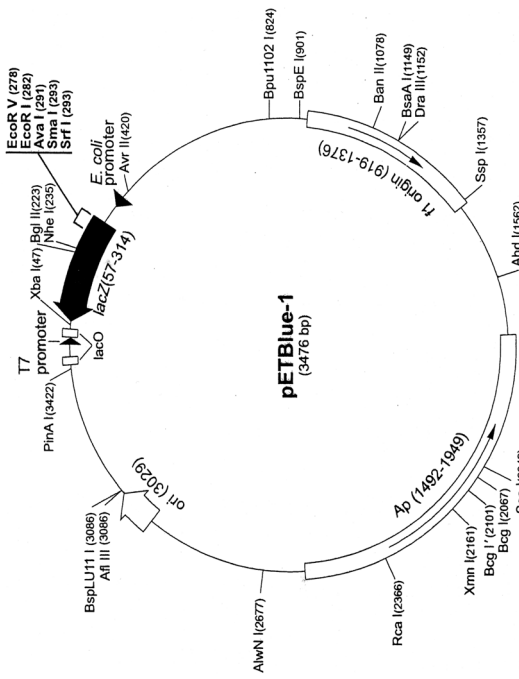
核酸供与体	供与核酸	ベクター	宿主等	保有動植物等	拡散防止措置の区分	備考
C 型肝炎ウイルス	cDNA (PC 産物) (翻訳領域: C, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b) (非翻訳領域: IRES, X-region, Poly U/C)	pT7Blue-2 (Novagen) pETBlue-1 (Novagen) pVL1392/1393 (PharMingen)	DH5 α (認定系) Tuner(DE3)pLacI	なし	P2	大腸菌でのプラミド増殖及び蛋白質発現 Tuner(DE3)pLacI は BL21 を Origin とする宿主である。
		pCMV-Tag (Stratagene) pEF1/Myc-His (Invitrogen)	Baculovirus SF21(株化昆虫細胞) Huh-7(株化ヒト細胞)、HLE(株化ヒト細胞)、Hep-G2(株化ヒト細胞)、HeLa(株化ヒト細胞)	なし	P2	バキュロウイルスを用いた細胞培養系での蛋白質発現。 pVL1392/1393 の違いは Multi Cloning Site の挿入方向の違いのみである。 SF21 は Baculovirus 発現系用の株化昆虫細胞である。 pCMV はサイトメガロウイルスプロモーターを有するベクターであり、Tag には Myc や FLAG などのバリエーションがある。pEF1 は EF-1alpha プロモーターを有しており pCMV 同様、培養細胞内 (特に肝細胞) における高発現が期待できる。

<記入上の留意事項>

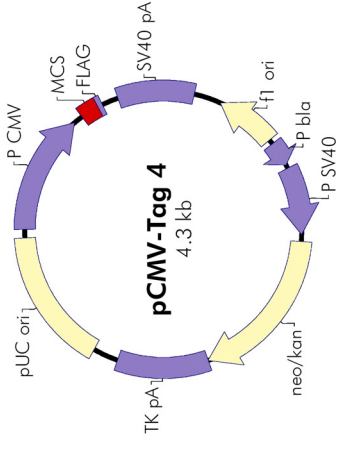
- 1 本表には、当該第二種使用等に係るすべての遺伝子組換え生物等及び当該第二種使用等をする間に執る拡散防止措置の区分について記載する。また、核酸供与体、供与核酸、ベクター、宿主等、保有動植物等及び拡散防止措置の区分の個々の組合せ並びに実験の一連の流れがわかるように記載する。
- 2 「核酸供与体」の欄には、核酸供与体となる生物の種類、系統名等を記載する。
- 3 「供与核酸」の欄には、ゲノムDNA、相補DNA等の供与核酸の種類や名称等を記載する。
- 4 「ベクター」の欄には、ベクターの名称を記載すること。なお、ウイルスは、ベクターとして用いる場合であっても、宿主として扱われるので、宿主等の欄に記載する。
- 5 「宿主等」、「保有動植物等」の欄には、それぞれ、宿主、遺伝子組換え生物等を保有している動物、植物及び細胞等の種名、系統名等を記載する。
- 6 「拡散防止措置の種類」の欄には、別表第二、別表第三、別表第四又は別表第五の上欄に掲げる拡散防止措置の区分を参考に、実験を実施する間に執る拡散防止措置の区分を記載する。
- 7 「備考」の欄には、以下の事項を記載する。
 - (1) 遺伝子組換え生物等及び拡散防止措置の組合せのうち大臣確認実験に該当する場合には、その旨
 - (2) 認定宿主-ベクター系を用いる場合には、その区分
 - (3) 各段階における主な目的等



「P2レベル実験中」の掲示



pCMV-Tag 4 Vector Map

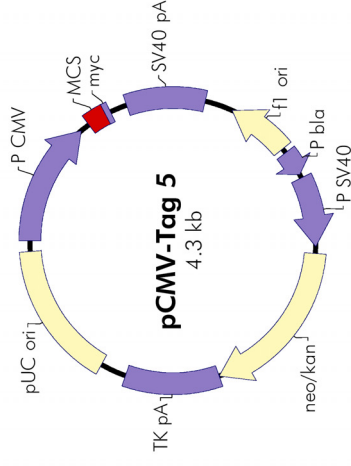


pCMV-Tag 4 Multiple Cloning Site Region (sequence shown 620-839)

T3 promoter
 A. ATT AAC CCT CAC TAA AGG GAA CAA AAG CTG GAG CTC CAC CGC GGT GGC CGC TCT A...
 Sfi I BamHI Pst I EcoR I Hind III Xho I
 ...GC CCG GGC GGA TCC CCC GGG CTG CAG GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC*...

FLAG tag
 D Y K D D D K
 ...CTC GAG GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG TAG GGC CGG TACCT...
 Xho I T7 promoter
 ...TAATTAATTAAGGTACCAGGTAAGTACCACCAATTCGCCCTATAGTGGTGCATTA

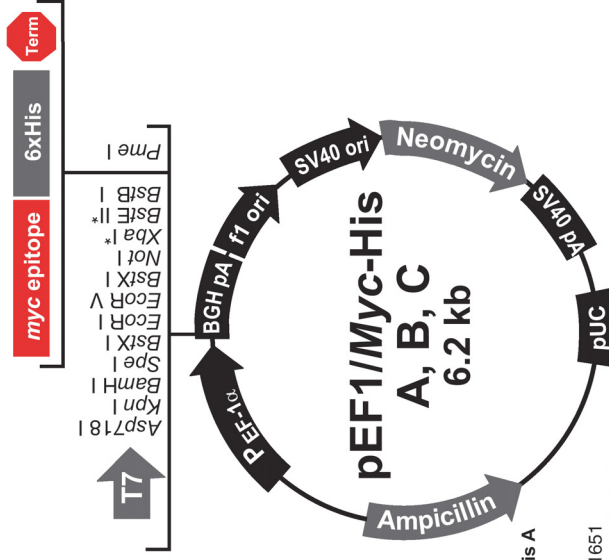
pCMV-Tag 5 Vector Map



pCMV-Tag 5 Multiple Cloning Site Region (sequence shown 620-842)

T3 promoter
 A. ATT AAC CCT CAC TAA AGG GAA CAA AAG CTG GAG CTC CAC CGC GGT GGC CGC TCT A...
 Sfi I BamHI Pst I EcoR I Hind III Xho I
 ...GC CCG GGC GGA TCC CCC GGG CTG CAG GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC*...

myc tag
 E Q K L I S E E D L
 ...CTC GAG CAG AAA CTC TCT GAA GAG GAT CTG TAG GGC CGG TACCT...



Comments for pEF1/Myc-His A 6165 nucleotides

- EF-1 α promoter: bases 473-1651
- T7 promoter/priming site: bases 1668-1687
- Multiple cloning site: bases 1713-1804
- myc epitope: bases 1802-1831
- Polyhistidine tag: bases 1847-1864
- BGH reverse priming site: bases 1887-1904
- BGH polyadenylation signal: bases 1890-2179
- f1 origin: bases 2163-2591
- SV40 promoter and origin: bases 2618-2926
- Neomycin resistance gene: bases 3001-3795
- SV40 polyadenylation signal: bases 3970-4100
- pUC origin: bases 4484-5146
- Ampicillin resistance gene: 5291-6151

* There is a unique BstE II site, but no Xba I site in version C.