

記載例（カテゴリー 1）

宿主：GILSP（市販されている組換え大腸菌）

供与核酸：GILSP でない（protein A 遺伝子全長）

様式第一 （第 7 条関係）

第二種使用等拡散防止措置確認申請書

年 月 日

経済産業大臣 殿

氏名 ○○株式会社

申請者 代表取締役社長 ○○ ○○

住所 東京都○○区○○ 1－2－3

遺伝子組換え生物等（遺伝子組換え微生物）の第二種使用等をする間に執る拡散防止措置の確認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第 13 条第 1 項の規定により、次のとおり申請します。

遺伝子組換え生物等の種類の名称		Staphylococcus aureus 由来 Protein A 遺伝子を移入した Escherichia coli (菌株名称: E. coli BL21 (DE3)-pETXX-SPA1)	
第二種使用等を行うとする場所	名称	〇〇株式会社〇〇事業所 〇〇棟2階 〇〇室	
	所在地	〇〇県〇〇市〇〇1丁目1番-1号	
第二種使用等の目的及び概要		I. 第二種使用等の目的 1. 当該遺伝子組換え微生物は、産業用タンパク質 Protein A (以下 SPA1) の生産を目的として使用する。 2. 当該遺伝子組換え微生物の概要は次のとおり。黄色ブドウ球菌 Staphylococcus aureus 由来の Protein A 遺伝子 (以下 spa1) を pETXX のプロモーターの下流に挿入して発現ベクターを作成、これを宿主改変株 Escherichia coli BL21 (DE3) 株に導入して遺伝子組換え微生物 E. coli BL21 (DE3)-pETXX-SPA1 を作成する。これを培養することにより SPA1 を菌体内に大量発現させる。 II. 第二種使用等の概要 1. 製品 (SPA1) の種類は、試薬である。 2. 製品は、抗体精製用担体の研究開発等に使用される。 ※経済産業省における試薬とは、「検査、試験、研究、実験など試験・研究的な場合において、測定基準、物質の検出・確認、定量、分離・精製、合成実験、物性測定などに用いられるものであって、それぞれの使用目的に応じた品質が保証され、少量使用に適した供給形態の化学薬品」という概念に基づいている。 ※「体外診断用医薬品」は厚生労働省の所管となるため、経済産業省への申請は不可。 3. 容量OLのタンクを用いた培養を行い、1回の生産あたりOKgの菌体から約OgのSPA1を得る。一年間におよそO回の生産を行い、年間約OgのSPA1を生産する。 4. 最終的な産物は、孔径0.22μmのフィルター濾過により、生きた遺伝子組換え微生物を除去する。菌体残渣・廃液はオートクレーブ(121℃ 20分)処理により不活化する。器具等はオートクレーブ(121℃ 20分)処理または薬剤処理(O%の〇〇溶液にO分間浸漬)により不活化する。 ・拡散防止措置は、〇年〇月〇日、確認番号〇〇〇で確認済みのものと同一である。 ・遺伝子組換え生物等は、〇年〇月〇日、確認番号〇〇〇で確認済みのものと同一である。 ※該当する大臣確認がなければ記載不要	
遺伝子組換え生物	宿主又は宿主の属する分類学上の種	分類学上の位置及び自然環境における分布状況	宿主: Escherichia coli BL21 株 BL21 株は、Escherichia coli B 株由来である。 本申請では、BL21 株にλファージ DE3 が染色体上に溶原化している BL21 (DE3) 株を〇〇社より購入して使用する。
		使用等の歴史及び現状	弊社において、BL21 株については産業上の使用実績はないが、BL21 (DE3) 株については、組換え微生物による産業用生産用宿主と

等 の 特 性		しておおむね10年以上の利用実績がある。 研究用としては、一般に20年以上使用されている。
	繁殖又は増殖の様式	BL21 株の遺伝子型は以下のとおりである。 F⁻, <i>ompT</i>, <i>hsdS_B</i> (r_B⁻m_B⁻), <i>gal</i>, <i>dcm</i> 増殖温度域は約〇～〇℃であり、至適温度域における増殖速度はおよそ〇分に1回分裂する。 増殖には〇〇を必要とし、抗生物質（〇〇、〇〇）に対して薬剤感受性を示す。 接合に関与するF因子を保有しない。 BL21 (DE3) 株は、上記の性質について BL21 株と同等である。 (参照：〇〇)
	病原性	BL21 株は、非病原性 <i>Escherichia coli</i> B 株由来であり、日本細菌学会の病原微生物の BSL レベルによると BSL1 であり、人への病原性はない。また、その他動植物への病原性の報告もない。 本宿主は、病原性に関係のあるウイルス及びプラスミドを保持していない。 BL21 (DE3) 株には、λ ファージ DE3 が染色体上に溶原化されており、外来遺伝子として T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子が組み込まれているが、それ以外の性質は宿主 BL21 株と同等である。T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子は供与核酸欄に示すとおり、病原性はない。
	その他の情報	BL21 株に有害な影響を及ぼす生理活性物質等の産生性は知られていない。
供与核 酸	構成及び構成要素の由来	(1) <i>spaI</i> (〇塩基) ・ <i>Staphylococcus aureus</i> 由来の〇残基の Protein A をコードする配列のうち2～36番目のシグナルペプチドをコードする部分及び終止コドンを除いた〇bp を Ac 番号〇〇の情報を参考に合成したものの。 ・ 5' 側に BamHI 及び 3' 側に XhoI の制限酵素サイトを付加している。 ・ 翻訳時には、C 末端側にベクター由来の His タグ 6 残基が付加される。 ・ 塩基配列及びアミノ酸配列を図〇に示す。 ・ <i>Staphylococcus aureus</i> は日本細菌学会の病原微生物の BSL レベルによると BSL2 であり、その病原因子は毒素、付着因子および免疫回避因子等がある。 (2) T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子 (〇塩基) ・ T7 ファージ由来の RNA ポリメラーゼをコードする配列で、市販の <i>E. coli</i> BL21 (DE3) 株に導入されていたもの。 ・ Ac 番号〇〇の情報による塩基配列及びアミノ酸配列を図〇に示す。 ・ T7 ファージは、大腸菌を宿主とし、人・動植物への病原性は無い。 各供与核酸について、ORF 検索を行ったところ、Protein A 以外には、現在までに知られている有害な遺伝子と相同性の高い配列は含まれていなかった。その結果を図〇に示す。(確認日：〇年〇月〇

			日)
		構成要素の機能	(1) Protein A は、細菌壁の表面タンパク質である。免疫グロブリン（特に IgG）の Fc 領域に特異的に結合する。Protein A は抗体に結合することから、Protein A が菌体表面にあることは黄色ブドウ球菌の感染を成立させる上で重要な役割を果たしている。グラム陽性菌で異種発現させた場合に菌体表面に固定される可能性があるため、病原因子の一つといえる。 (2) T7 RNA ポリメラーゼ (EC 2.7.7.6) は、T7 プロモーター配列特異的に DNA を鋳型として RNA を合成する。
	ベクター	名称及び由来	pETXX ・ pBR322 ベクターを由来とする大腸菌での発現ベクターである。 ・ pBR322 の ori は、大腸菌 ColE1 プラスミドを由来とする。 ・ pETXX は〇〇社より購入して使用する。
		特性	・ pETXX は、Obp からなり、T7 プロモーターの下流にマルチクローニングサイト、His タグ及び T7 ターミネーターが存在する。また、マーカー遺伝子としてアンピシリン耐性遺伝子を有し、pBR322 の ori を有する。 ・ pETXX の構成図及び塩基配列を図〇に示す。 ・ 由来生物大腸菌にはヒトへの病原性示す株が存在するが、ColE1 プラスミドの ori はその病原性には関与しない。 ・ pETXX について、動植物に対する伝染性、病原性及び伝達性を示すとの報告はこれまでにない。
	遺伝子組換え微生物	調製方法	・ 宿主改変株 BL21 (DE3) 株内に移入する核酸は、pETXX の遺伝子組込み領域中に、spa1 を挿入することで得られた発現ベクター pETXX-SPA1 である。 ・ pETXX-SPA1 構築フロー図及び最終構築図を図〇に示す。 ・ 形質転換は塩化カルシウム法によって行い、アンピシリンを含む培地を用いた培養を行うことによって形質転換体の選択を行った。
		細胞内に移入した核酸の存在状態及び発現の安定性	・ BL21 (DE3) 株に移入した pETXX-SPA1 は、細胞質内に存在する。 ・ 継代を繰り返した <i>E. coli</i> BL21 (DE3)-pETXX-SPA1 内のプラスミドの存在量を〇〇により確認したところ、継代による減少は認められないことから、安定的に存在していると考えられる。
		宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	・ <i>E. coli</i> BL21 (DE3)-pETXX-SPA1 は、宿主 BL21 株に λ ファージ DE3 が溶原化されており、Protein A 及び T7 RNA ポリメラーゼ生産能並びにアンピシリン耐性が付与されている。 ・ Protein A は病原因子であるが、当該遺伝子組換え微生物においては菌体内に蓄積されるため、菌体表面に固定されることは無く、<i>E. coli</i> BL21 (DE3)-pETXX-SPA1 に新たに病原性を与える可能性は低い。 ・ 培養試験の結果、<i>E. coli</i> BL21 (DE3)-pETXX-SPA1 の増殖能は、BL21 (DE3) 株と同等である。BL21 (DE3) 株の増殖能は宿主 BL21 株と同等であるため、<i>E. coli</i> BL21 (DE3)-pETXX-SPA1 は宿主 BL21 株より増殖能が高くなることはない。
	拡	使用区分	・ 供与核酸 spa1 は病原因子であるため、備考 16a の (2) アの「有

散 防 止 措 置			害と認められる塩基配列を含まないこと」を満たさないため、GILSPに含まれない。 ・当該遺伝子組換え微生物においては、Protein A は菌体内生産を行うため、宿主等の菌体表面に固定されることは無く、当該遺伝子組換え微生物の病原性は低いと言える。 ・以上のことより、<i>E. coli</i> BL21 (DE3)-pETXX-SPA1 は、備考 16b の「遺伝子組換え微生物が病原性がある可能性が低く、かつ GILSP に含まれないもの」に該当するため、カテゴリー 1 であると判断した。 ※（参考）備考 16 「使用区分」については、以下の区分に分類し、別表の上欄に掲げる遺伝子組換え生物等の区分に応じて、別表の下欄に定める拡散防止措置を実施する旨を記載すること。なお、以下の区分に該当しないものは「その他」と記載し、予定している拡散防止措置の内容を別紙に記載すること。 a. GILSP（宿主、供与核酸、ベクター及び遺伝子組換え微生物が次の基準を満たすもの） （1）宿主 （ア）病原性がないこと （イ）病原性に関係のあるウイルス及びプラスミドを含まないこと （ウ）安全に長期間利用した歴史がある又は特殊な培養条件下では増殖するがそれ以外では増殖が制限されていること （2）供与核酸及びベクター （ア）性質が十分明らかにされており、有害と認められる塩基配列を含まないこと （イ）伝達性に乏しく、かつ、本来耐性を獲得することが知られていない生細胞に耐性マーカーを伝達しないこと （3）遺伝子組換え微生物 （ア）病原性がないこと （イ）宿主と比べて増殖する能力が高くないこと b. カテゴリー 1（遺伝子組換え微生物が病原性がある可能性が低く、かつ GILSP に含まれないもの。）。
	作業区域の位置		産業利用二種省令別表の第二項の拡散防止措置を満たす措置を執る。
	設備	配置	同上
		構造	同上
生産工程		同上	
その他			・遺伝子組換え微生物を含む微生物の使用に関する生産業務を管理するために事業所ごとに「〇〇安全委員会」を組織している。安全委員会委員の氏名、役職、専門分野と従事経験の有無は図〇のとおり。 ・事故時の緊急時における対処方法は「〇〇マニュアル」に定めている。 ・責任者及び現場担当者の氏名及び連絡先： - 責任者：〇〇事業所長 〇〇 〇〇（電話番号・E-mail） - 担当者：〇〇 〇〇（電話番号・E-mail）

図〇 供与核酸の塩基配列及びアミノ酸配列

(1) spa1

<塩基配列> (○塩基)

taatacgactcactataggggaattgtgagcggataacaattcccctctagaataattttgtttaactttaagaaggag
T7 プロモーター
atatacatatggctagcatgactggtggacagcaaatgggtcgc

GGATCCATGAAAAAGAAAAACATTTATTCAATTCGTAACTAGGTGTAGGTATTGCATCTGTAACTTTAGGTACATTACT
BamHI
TATATCTGGTGGCGTAACACCTGCTGCAAATGCTGCGCAACACGATGAAGCTCAACAAAATGCTTTTTATCAAGTCTTAA
.....
CTGCAGATAACAAATTAGCTGATAAAAACATGATCAAACCTGGTCAAGAACTTGTTGTTGATAAGAAGCAACCAGCAAAC
CATGCAGATGCTAACAAAGCTCAAGCATTACCAGAACTGGCGAAGAAAATCCATTCATCGGTACAACGTATTTGGTGG
ATTATCATTAGCCTTAGGTGCAGCGTTATTAGCTGGACGTCGTCGGAACACTCGAGcaccaccaccaccaccactga
XhoI His タグ

大文字：供与核酸

小文字：ベクター

□：開始コドン、終止コドン

<アミノ酸配列> (○残基)

MKKKNIYSIRKLGVGIASVTLGTLLISGGVTPAANAQHQDEAQQNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKDDPSQSANVLG
.....
EDGNKPGKEDGNKPGKEDGNGVHVVKPGDTVNDIAKANGTTADKIAADNKLADKNMIKPGQELVVDKKQPANHADANKAQ
ALPETGEENPFI GTTVFGGLSLALGAALLAGRRRELHHHHHH
His タグ

(2) T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子

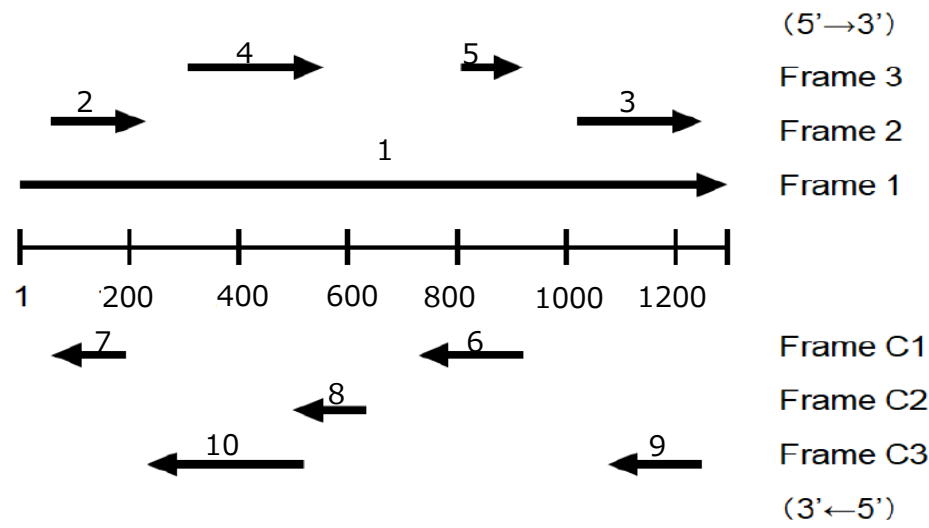
<塩基配列> (○塩基)

.....

図〇 供与核酸における ORF 検索

検索対象：供与核酸内に存在する〇AA 以上の ORF を対象とした。
（なお、終止コドンが同一のものについては最も長いもののみを検索対象とした。）
検索方法：上記 ORF について、NCBI blastp デフォルト設定条件にて検索を行った。
検索結果：「ヒットせず」相同性を示すタンパク質はなかった。
：「* 1」病原性・毒性への関与が疑われるタンパク質との相同性は認められなかった。

(1) spa1



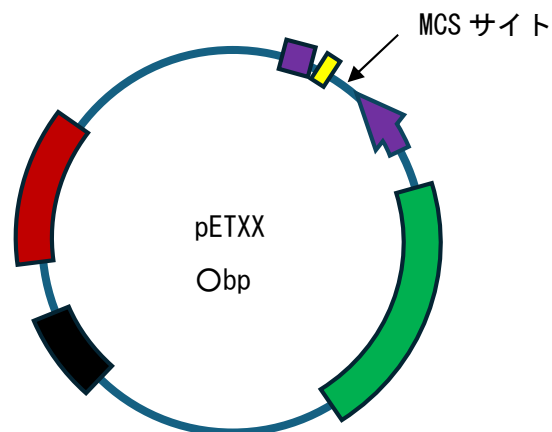
No.	Frame	Start	Stop	NA size	AA size	検索結果
1	1	1	13xx	13xx	4xx	〇〇（目的産物名）
2	X	X	X	X	X	ヒットせず
3	Y	.	.	.	.	* 1
.						

(2) T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子

...

図〇 ベクターの構成図及び塩基配列

(1) 構成図



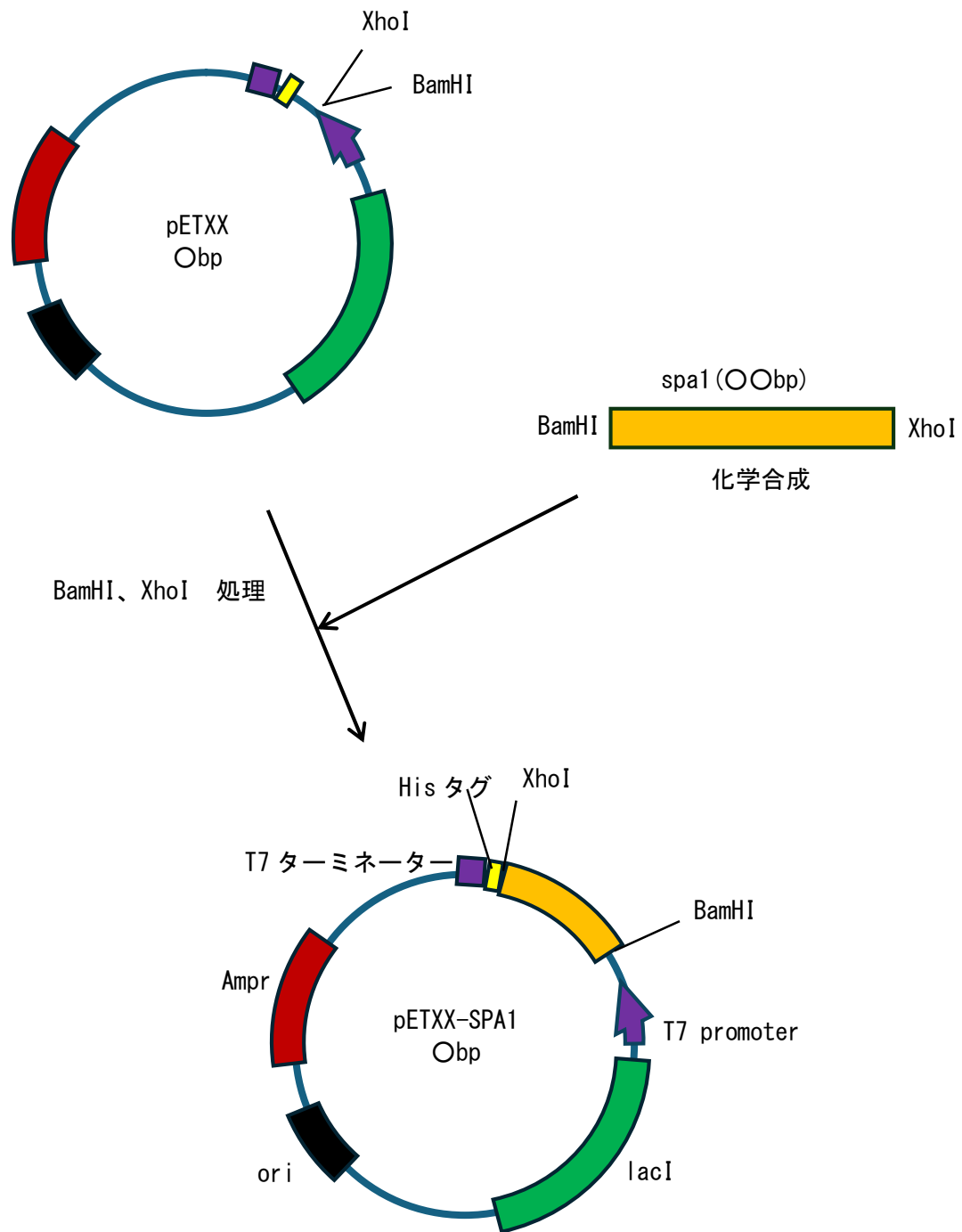
	26..73	T7 ターミネーター (〇〇由来)
	140..157	His タグ (人工合成)
	158..203	MCS サイト
	309..327	T7 プロモーター (〇〇由来)
	...	lacI (大腸菌由来)
	...	pBR322 ori
	...	アンピシリン耐性遺伝子 (〇〇由来)
		スペーサー等

(2) 塩基配列

```

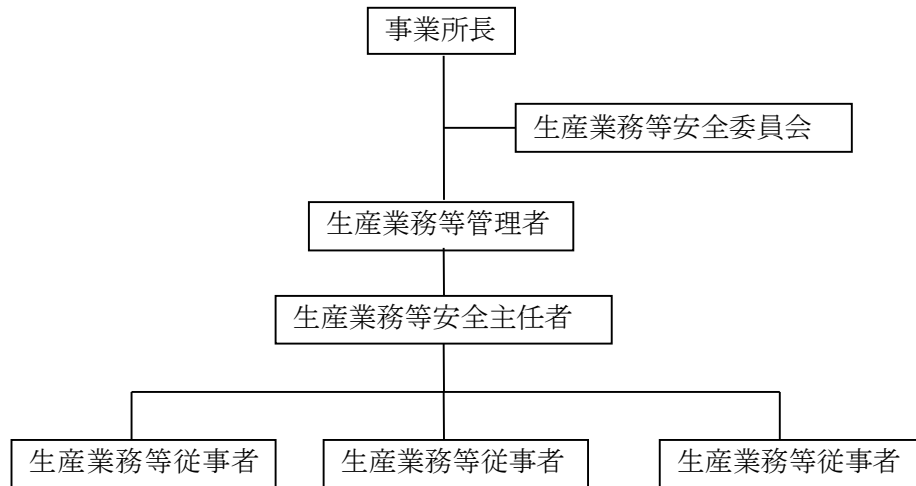
TCCCAAGAC AAGTTCATGG CCCAATCATG ACTCGAACAA AGGTGTAACG GCAGCATGTC CTCATGCTGG AGCAAAAAGC      80
TTCTACAAA ATTAAATATG GCTAGTTAAA AAAGGAAATT CATACCCAAA GCTCAGCAAA TCCTACATTA ATGATAAAGG      160
GAAAGAAGTC CTCGTGCTAT GGGGCATTCA CCATCCATCT ACTAGTGCTG ACCAACAAAG TCTCTATCAG AATGCAGATG      240
...
  
```

図〇 発現ベクターの構築フロー図



図〇 安全管理体制

〇組織図



〇生産業務等安全委員会構成

担当	職名	氏名	専門分野	組換え生物取り扱い経験
生産業務等安全委員会委員長	工場長	〇〇 〇〇	化学	有
生産業務等管理者	副工場長	〇〇 〇〇	発酵	有
生産業務等安全主任者	研究所長	〇〇 〇〇	微生物	有
委員	研究員	〇〇 〇〇	動物	無
委員	研究員	〇〇 〇〇	微生物	有