

安全主任者		安全管理室確認		安全管理室受付	平成 年 月 日
-------	--	---------	--	---------	----------

## 遺伝子組換え実験承認申請書

提出：平成 年 月 日

公益財団法人高輝度光科学研究センター理事長 殿

(実験責任者) <sup>1)</sup>

所属機関の名称

所属部署及び身分

氏 名

印

(管理者) <sup>2)</sup>

氏 名

印

遺伝子組換え実験の実施について、遺伝子組換え実験実施安全管理規程第 17 条第 1 項の規定により、下記のとおり申請します。

### 記

受付番号 <sup>3)</sup>	
申請の種類 <sup>4)</sup>	<input checked="" type="checkbox"/> 新規 <input type="checkbox"/> 継続 (前回受付番号 ) <input type="checkbox"/> 変更 (前回受付番号 )
実験課題名 <sup>5)</sup>	昆虫細胞にて発現したリゾチームの結晶化・結晶回折実験
種類 <sup>6)</sup>	<input checked="" type="checkbox"/> 微生物使用実験 <input type="checkbox"/> 大量培養実験 <input type="checkbox"/> 動物使用実験 ( <input type="checkbox"/> 動物接種実験・ <input type="checkbox"/> 動物作成実験 ) <input type="checkbox"/> 植物等使用実験 ( <input type="checkbox"/> 植物接種実験・ <input type="checkbox"/> 植物作成実験・ <input type="checkbox"/> きのご類作成実験 )
目的	昆虫細胞およびバキュロウイルスにて発現した蛋白質溶液を用い、結晶化・結晶回折実験により構造解析を行う。
概要 <sup>7)</sup>	<p>卵白リゾチームの構造機能解析のため、効率よく精製標品を得るために昆虫細胞での発現系を作成し、それによって得られた蛋白質溶液を結晶化およびその結晶を X 線回折実験に用いる。蛋白質溶液はカラムクロマトグラフィーや超遠心処理等によって精製されるが、感染性を有するバキュロウイルス粒子の残存が否定できないため本課題を申請する。</p> <p>目的蛋白質は卵白リゾチームであり、その塩基配列・機能が同定済みである。得られる蛋白質は酵素であり、感染性を持たない。</p>
実験実施予定期間 <sup>8)</sup>	平成 年 月 日 ~ 平成 年 月 日
実験責任者連絡先	住所 (〒 - ) 電話番号 (内線/PHS) FAX 番号 E-mail アドレス
実験責任者代理者連絡先	所属部署及び身分 住所 (〒 - ) 電話番号 (内線/PHS) FAX 番号 E-mail アドレス

事務担当者の連絡先 <sup>9)</sup>	事務担当者の所属機関名及び所属部署
	事務担当者氏名
	住所 (〒 - )
	電話番号 (内線/PHS)
	FAX 番号 E-mail アドレス

実験実施場所 (動植物の飼育・栽培場所) <sup>10)</sup> / 遺伝子組換え生物等の保管場所 <sup>11)</sup>		拡散防止措置等						
建物	室	P1	P1A	P1P	P2	P2A	P2P	保管
実験ホール	<input type="checkbox"/> BL20B2 実験ハッチ内							
	<input type="checkbox"/> BL20B2 動物処置室							
	<input type="checkbox"/> BL28B2 実験ハッチ内							
	<input checked="" type="checkbox"/> BL38B1 実験ハッチ内	○						
	<input type="checkbox"/> BL40XU 実験ハッチ内							
	<input checked="" type="checkbox"/> BL41XU 実験ハッチ内	○						
実験動物維持施設	<input type="checkbox"/> マウス飼育室							
	<input type="checkbox"/> 遺伝子実験室							
	<input type="checkbox"/> 処置室							
中尺ビームライン実験施設 (研究棟)	<input type="checkbox"/> フリーザー室 101 号室							
	<input type="checkbox"/> 104 号室							
	<input type="checkbox"/> 遺伝子実験室							
	<input type="checkbox"/> 相互作用解析室							
	<input type="checkbox"/> プロテオミクス準備室							
	<input type="checkbox"/> タンパク質精製室							
	<input type="checkbox"/> 昆虫細胞培養室							
	<input type="checkbox"/> 生化学実験室 1 <input type="checkbox"/> 生化学実験室 2							
SACLA	<input type="checkbox"/> 実験ハッチEH3							
	<input type="checkbox"/> XFEL 生物試料準備室							
	<input type="checkbox"/>							
上記以外 (建物名・室名を右欄に記入)								

核酸供与体/供与核酸 <sup>12)</sup>				
核酸供与体	実験分類	供与核酸 (核酸の種類)	同定	備考
(目的遺伝子) ニワトリ (Gallus gallus)	クラス 1	Lysozyme C (cDNA)	済	
(発現調節遺伝子) バキュロウイルス (宿主)	クラス 1	IE1 promoter (ゲノム DNA)	済	(pIEx/Bac-3) (pVL1392, pVL1
バキュロウイルス (宿主)	クラス 1	ポリヘドリンプロモータ (ゲノム DNA)	済	393, pORB, pAcS ec1, pAcIRES)

(選択マーカー遺伝子) エンテロバクテリア科 大腸菌	クラス 1	アンピシリン薬剤耐性遺伝子 (ゲノム DNA)	済	大腸菌でのサブクロニング用
宿主/ベクター <sup>13)</sup>				
宿主	実験分類	ベクター	種類	備考
バキュロウイルス Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV)	クラス 1	pVL1392, pVL1393, pORB, pAcSec1, pAcIRES, pIEx/Bac-3 (バキュロウイルストランスファーベクター; いずれもポリヘドリンプロモータ下流に目的遺伝子をクロニングする. 大腸菌でのサブクロンのため Amp 耐性を持つ.)	微生物	野生型ではポリヘドリン (多角体) を有するため不活化が困難であるが、組換え体は当該遺伝子を削除してあり容易に不活化できる。
遺伝子組換え生物等を保有している動物、植物または細胞等 <sup>14)</sup>	組換えバキュロウイルス作成時には昆虫細胞 Sf9、発現時には昆虫細胞 HighFive を使用しているが、これらの細胞は細胞破碎および目的タンパク質精製後は残存しない。			
遺伝子組換え生物等及び拡散防止措置の一覧表 <sup>15)</sup>	別紙			
遺伝子組換え生物等の不活化の方法 <sup>16)</sup>	オートクレーブ処理 (121℃, 20 分), 次亜塩素酸ナトリウム (0.1%, 30 分) あるいは 70%エタノールにより不活性化する。			
備考 <sup>17)</sup>	なお、本件は、発現に用いた組換え型バキュロウイルスが完全には除去できない可能性があるため、カルタヘナ法対象品として「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置を定める省令」(平成 16 年文部科学省・環境省令第 1 号) に従い、P1 レベル拡散防止措置を執って実施するものです。			

## ※記入上の注意

- 1) 「実験責任者」は、遺伝子組換え実験経験年数が1年以上の者とし、SPring-8 で実際に実験に携わる者の中から選出すること。但し、学生を実験責任者とすることはできない。
- 2) 「管理者」の承認を受けること。  
公益財団法人高輝度光科学研究センター職員 → 部門長等  
外部職員（理研・原研） → 所属長等  
ユーザー → 利用業務部長（提出する際は、空欄で構わない。）
- 3) 「受付番号」は、安全管理室が本申請書を受理した際に交付するので、申請時は空欄とする。受付番号は以後の手続きにおいて課題を特定する番号となるので、交付された番号を手元に控えておくこと。
- 4) 「申請の種類」については、新規・継続・変更のいずれかを選択する。継続・変更の場合は、前回受付番号も記入する。（承認された課題の有効期間が満了に伴う、実験実施期間の延長を「継続」とする。）  
本実験計画に従事する者の登録は、実験開始前の教育訓練の記録とあわせて「様式-第8 遺伝子組換え実験従事者届出書／変更届出書兼教育訓練実施報告書」により行う。
- 5) 「実験課題名」は、遺伝子組換え実験の目的及び概要を簡潔に表すものとする。
- 6) 「種類」については、当該遺伝子組換え実験が該当する全ての項目を選ぶ。
- 7) 「概要」については、当該遺伝子組換え実験の一連の流れについて、実験段階がわかるように記載する。各実験段階における拡散防止措置についても記載すること。
- 8) 実験課題の有効期間は承認日より最長3年間である。実験の開始希望日～終了予定日を記入すること。
- 9) 「その他の連絡先」については、実験責任者の不在時等に実験責任者以外に事務連絡先がある場合は、当該事務連絡先を記載すること。
- 10) 「実験実施場所（動植物の飼育・栽培場所）」については、当該遺伝子組換え実験に係る実施場所と当該実施場所で行う拡散防止措置を選ぶ。リストにない場合は、「上記以外」の欄に建物名・室名を記入し、その実験実施場所について以下の項目を記載した説明書類を添付すること。（遺伝子組換え生物等によっては、実験実施場所を特定する場合があるので注意すること。）  
① 主要な施設、設備及び機器の位置（実験区画の詳細図）  
② 実験室、実験区画内において当該遺伝子組換え実験に関係しない動物が飼育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
- 11) 「遺伝子組換え生物等の保管場所」については、当該遺伝子組換え実験の過程で遺伝子組換え生物等を保管する全ての保管場所を選ぶこと。リストにない場合は、「上記以外」の欄に建物名・室名を記入し、その保管場所の説明書類を添付すること。（遺伝子組換え生物等によっては、保管場所を特定する場合があるので注意すること。）
- 12) 「核酸供与体/供与核酸」については、当該遺伝子組換え実験に係る遺伝子組換え生物等の核酸供与体/供与核酸を目的遺伝子、発現調節遺伝子、マーカー遺伝子の別にそれぞれ以下の点に留意して記載する。  
① 「核酸供与体の名称・分類学上の位置」については、科・属・種名等を記載し、必要に応じて系統名を記入すること。  
② 「核酸の種類」については、（ ）内にゲノム DNA、cDNA、合成 DNA 等の別を記入すること。  
③ 「同定」については、同定済または未同定の別を記入すること。
- 13) 「宿主/ベクター」については、当該遺伝子組換え実験に係る遺伝子組換え生物等の宿主及びベクターに関し、以下の点に留意して記載すること。  
① 「宿主」については、科・属・種名等を記載し、必要に応じて系統名を記入すること。  
② 「ベクター」については、「pUC119（大腸菌用クローニングベクター）」のように、付与された記号番号の他に簡単な説明をつけること。  
③ 「種類」については、微生物、動物または植物の別を記入すること。
- 14) 「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、下記に掲げる項目を記載することに加え、当該遺伝子組換え実験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、当該遺伝子組換え実験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。  
① 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成育が可能な環境  
③ 病原性、有害物質の産生性及びその他の特性
- 15) 「遺伝子組換え生物等及び拡散防止措置の一覧表」については、核酸供与体、供与核酸、ベクター、宿主等、保有動植物等の組み合わせ及び当該実験段階において執る拡散防止措置を実験の一連の流れが分かるように記載すること。  
① 「核酸供与体」欄には、核酸供与体となる生物の種名、系統名を記載すること。  
② 「供与核酸」欄には、供与核酸の種類や名称等を記載すること。  
③ 「ベクター」欄には、ベクターの名称を記載する。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。

- ④「宿主等」、「保有動植物等」欄には、それぞれ種名、系統名等を記載する。
  - ⑤「拡散防止措置の区分」欄には、二種省令の別表第二から別表第五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。
- 16)「遺伝子組換え生物等の不活化の方法」については、当該遺伝子組換え実験をする間に執る拡散防止措置に関し、当該遺伝子組換え実験に係る遺伝子組換え生物等を含む廃棄物並びに当該遺伝子組換え実験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。
- 17) 公益財団法人高輝度光科学研究センターとして公的経費（文部科学省科学研究費等）の交付を受けている場合は、備考欄にその旨を記入すること。

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
ニワトリ	Lysozyme C (cDNA)	pVL シリーズ (市販品: Allele Biotechnology) pORB (市販品: Allele Biotechnology) pAcSec1 (市販品: Allele Biotechnology) pAcIRES (市販品: Allele Biotechnology) pIEx/Bac-3 (市販品: Novagen)	バキュロウイルス (市販品: Allele Biotechnology, Oxford Expression Technologies, BD, Sigma, Novagen)	なし (蛋白質発現時は HighFive 細胞)	P1	作成された組み換えバキュロウイルスと HighFive 細胞により発現されたタンパク質を、精製した後に結晶化して X線回折試料とする。