

(記載例：内容は架空のものです)

ゲノム編集技術の利用により得られた生物であってカルタヘナ法に規定された「遺伝子組換え生物等」に該当しない生物を拡散防止措置の執られていない環境中で使用するに当たっての情報提供

令和〇年〇〇月〇〇日

経済産業省商務・サービスグループ

生物化学産業課生物多様性・生物兵器対策室長 殿

氏名 〇〇株式会社

提出者 代表取締役社長 〇〇 〇〇 印

住所 〇〇県〇〇市〇〇 〇-〇-〇

ゲノム編集技術を利用して得られた生物であってカルタヘナ法に規定された「遺伝子組換え生物等」に該当しない生物を拡散防止措置の執られていない環境中（いわゆる「開放系」）で使用するので、使用等に先立ち次のとおり情報提供します。

ゲノム編集生物の名称	炭化水素生産能を向上した <i>Botryococcus braunii</i> ●●株	
使用する場所についての情報	名称	〇〇株式会社 屋外培養設備 (具体的な地域名又は施設の名称を記入)
	所在地	〇〇県〇〇市〇〇〇〇 (地域名又は施設の所在地を記入)
改変した生物の分類学上の種*	宿主の属名及び種名	<i>Botryococcus braunii</i> ●●株 D1/D2 及び 18S rDNA 配列は、 <i>Botryococcus braunii</i> NBRC xxxxxx との間に〇%の相同性を認めたことから本種であると同定した。
	宿主の自然環境における分布状況に関する情報	<i>Botryococcus braunii</i> は緑藻類に属する真核藻類で、世界各地の淡水から汽水域に生息することが知られており、●●株は xx 県 xx 市の xx 池より採取されたものである。
	宿主の使用の歴史及び現状	本宿主は当社実験室において研究用として〇年間の屋内での使用実績がある。また、過去に 1500 平方メートル規模の野外大規模培養（〇〇県〇〇町）に成功している。
	宿主の生理学的及び生態学的特性	本宿主は 10-20 μm の径の細胞が集合し、30~500 μm の大きさのコロニーを形成する。トリアシルグリセロールではなく、バイオ燃料への転換が可能な長鎖炭化水素を細胞外マトリクスに分泌する特徴を有する。その量は細胞乾燥重量の 70~80%にも及ぶことがあり、そのためコロニーは水面に浮遊するようになる。一般的に

		<p><i>B. braunii</i> は、生産する炭化水素の炭素数により race A, B, L の 3 つの系統に分類される。本宿主は、25～31 個の奇数の炭素数を有し、分子内に 2 又は 3 個の二重結合を有する直鎖炭化水素を産生する A タイプである。自生孢子により無性的な増殖を行う（有性生殖はこれまでに確認されていない）。<i>B. braunii</i> については時折野外でブルームと言われる大量発生が起こることが知られているが、●●株についてはこれまでにブルーム形成の報告はない。本生物種が病原性を持つとの報告もしくはマイクロシスチンなどの藻類毒素を産生するとの報告もない。</p>
ゲノム編集生物の作出方法	<p>使用したゲノム編集ツール（人工ヌクレアーゼ）</p> <p>人工ヌクレアーゼを細胞内に移入した方法及び人工ヌクレアーゼ又はその発現系の全体の構成等</p>	<p>CRISPR-Cas9</p> <p>（例 1：人工ヌクレアーゼ等を直接細胞に移入して変異を導入した場合）標的遺伝子○○の一部と相補的なガイド RNA (sgRNA) と Cas9 タンパク質の複合体（リボヌクレオタンパク質）をエレクトロポレーションで宿主細胞に移入し、標的遺伝子をノックアウトした。（複合体の構成については別添図 1 参照。）</p> <p>（例 2：人工ヌクレアーゼ等の発現遺伝子を、プラスミドベクター等にクローニングして細胞内に移入し、一過性に発現させて変異を導入した場合）○○遺伝子（標的遺伝子）の特定の配列を認識する Cas9 タンパク質をコードする遺伝子を搭載したプラスミド（p△△；プレオマイシン（ゼオシン）耐性遺伝子を搭載）を、エレクトロポレーションで宿主細胞に移入し標的遺伝子をノックアウトした。その後ゼオシンを除いた培地中で継代培養することによりプラスミドを脱落させた。（※脱落したことの確認結果について、以下の「残存していないことの確認とその根拠」の欄に、『継代培養後の細胞より DNA を抽出し、プラスミド DNA 領域をカバーするプライマーセット（1～30）を用いて PCR を行った結果、プラスミド上の配列に由来する PCR 増幅産物が検出されないことを確認した（詳細は別添図 2 参照）。』等の要領で記載。）</p>
カルタヘナ法に規定される細胞外で加工した核酸又はその複製物が残存していないことの確認とその根拠		<p>※遺伝子配列の解析方法は早いペースで進歩しているため、新たに開発された手法も含め、利用可能な最良の科学的見に基づき判断する観点から、特定の具体例を提</p>

		示することは控えさせていただきます。なお、細胞外で加工された核酸又はその複製物が残存していないことを確認する方法の具体例については、参考資料の2. をご確認ください。
改変した遺伝子及び当該遺伝子の機能		〇〇遺伝子（脂質合成を負に制御する転写制御因子）。期待される効果：脂質合成を負に制御している当該遺伝子の働きを抑制することで、炭化水素の生産効率を向上させる
当該改変により生じた形質の変化*		乾燥藻体重量あたりの炭化水素の蓄積が約〇%上昇した。
上記以外に生じた形質の変化の有無（ある場合はその内容）		無 ・ 有 （「有」の場合の記載例）藻体コロニーが大型化し、浮上性が向上した。
当該生物の用途*		バイオ燃料生産を目的とする。
当該生物を使用した場合に生物多様性影響が生ずる可能性に関する考察*	他の微生物を減少させる性質	●●の環境下において、宿主と比較して生残性に特段の変化が認められない。宿主には抗生物質など他の微生物の生育を阻害する物質の生産は知られていない。また、今回導入した変異により新たな阻害物質が生産される可能性もない。作出の過程でブレオマイシン耐性遺伝子を導入しているが、最終的なゲノム編集生物では耐性遺伝子が除去されていることを確認している。
	病原性	宿主にはこれまでに知られている病原性は存在しない。観察された形質変化は、病原性に関与するとは考えられない。ゲノム編集の標的遺伝子は、近縁種を含めて病原性に関与するという報告はない。
	有害物質の産生性	宿主にはこれまでに知られている有害物質の産生性はない。観察された形質変化は、有害物質産生性に関与するとは考えられない。ゲノム編集の標的遺伝子は、近縁種を含めて有害物質の産生に関与するという報告はない。
	核酸を水平伝達する性質	作出の過程で使用した人工ヌクレアーゼ遺伝子、およびベクターの配列は全て除去されているため、異種核酸が水平伝達することはない。
	その他の性質	上記のほかに、生物多様性に影響を与え得る性質はないと判断した。
	上記に基づく生物多様性影響が生じる可能性に関する考察	以上の検討結果から、観察された形質は生物多様性に影響を及ぼさないと考察できる。

別添図 1

(例 1) 人工ヌクレアーゼ等を直接細胞に移入して変異を導入した場合：

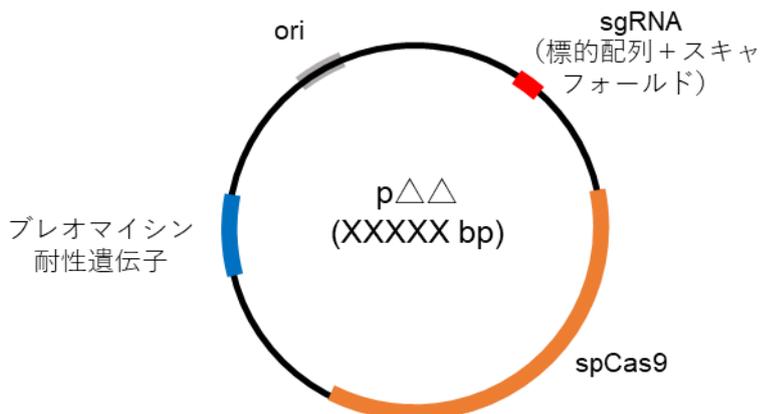
- 宿主に移入したもの（細胞外で加工した核酸および人工ヌクレアーゼ）のリスト：

構成名	備考（由来、配列情報、機能など）
sgRNA	<p>5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC-3'</p> <p>赤字：<i>Botryococcus braunii</i> の〇〇遺伝子（xxxx - xxxx）に相補的な配列 黒字：スキヤフォールド配列</p>
人工ヌクレアーゼ	化膿レンサ球菌 (<i>Streptococcus pyogenes</i>) 由来 Cas9 タンパク (〇〇社より購入)

別添図 2

(例 2) 人工ヌクレアーゼ等の発現遺伝子を、プラスミドベクター等を用いて細胞内に移入して一過性に発現させて変異を導入した場合：

- ○○遺伝子ノックアウト用 Cas9/sgRNA 発現プラスミド p△△構築図
(○○社製 p○○○○ベクター (製品コード xxxx) に標的配列を挿入した)



- プラスミド構成表

構成名	配列位置	備考 (由来生物、配列情報、機能など)
ori	X - XXX	○○由来複製開始領域。
プロモーター①	XXX - XXX	sgRNA の転写制御用○○由来 U6 プロモーター
sgRNA	XXX - XXX	5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCT AGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAA CTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC -3' 赤字: <i>Botryococcus braunii</i> の○○遺伝子 (xxxx - xxxx) に 相補的な配列 黒字: スキヤフォールド配列
プロモーター②	XXXX - XXXX	Cas9 発現制御用○○由来○○プロモーター
人工ヌクレアーゼ	XXXX - XXXX	化膿レンサ球菌 (<i>Streptococcus pyogenes</i>) 由来 Cas9 (spCas9)
ブレオマイシン (ゼ オシン) 耐性遺伝子	XXXXXX - XXXXXX	<i>Streptoalloteichus hindustanus</i> 由来 ble 遺伝子 (選抜用薬剤 耐性マーカー)
:	:	:

- プラスミド残存確認のために使用するプライマー情報

プライマーセット名	配列位置	増幅断片サイズ (bp)
1 F/1R	X - XXX	xxx
2 F/2R	XXXX - XXXX	xxx
:	:	: