

1. 第二種使用等確認申請書記入例

<個別確認(個別申請、合併申請、一括申請)>

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 ○○ ○○ 印
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		<p><i>Bacillus subtilis</i>由来のリパーゼ産生用 <i>lipA</i> 遺伝子を入れた遺伝子組換え <i>Escherichia coli</i> JM109 (pKK223-3/<i>lipA</i>)</p> <p>【一括申請の場合】 ・名称ごとに①、②、③・・・というように番号を付して併記してください。</p>
使用等をしようとする場所	名称	工場名、事業所名を記入。 (複数の場合は併記して記入)
	所在地	工場、事業所の所在地を記入。 (複数の場合は併記して記入)
第二種使用等の目的及び概要		<p>I. 第二種使用等の目的</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 当該遺伝子組換え微生物は、産業用酵素の生産工程で使用され、培養し発現させた酵素を取り出して生産する目的で使用する。 2. 遺伝子組換え生物等の概要として、<i>Bacillus subtilis</i> 168 株由来のリパーゼ遺伝子を pKK223-3 のプロモーターの下流に挿入する。これを宿主 <i>Escherichia coli</i> JM109 株に導入して遺伝子組換え微生物 <i>Escherichia coli</i> JM109 (pKK223-3/<i>lipA</i>) を作成する。これを培養することによりリパーゼを菌体内に大量発現させる。 <p>II. 第二種使用等の概要</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 製品（リパーゼ）の種類は、工業用酵素であり、その利用形態は主に油脂を原料とした脂肪酸の生産に用いられる。 2. 製品の利用形態は、最終的には研究用試薬用原料に使用。反応工程終了後は、遺伝子組換え微生物は死滅。 3. 生産規模 容量 1 m³ のタンクを用いた培養を行い、1 回の生産あたり 100 k g の菌体から約 1 g のリパーゼを得る。一年間におよそ 1 2 回の生産を行う。年間に生産されるリパーゼの量はおよそ 1 2 g である。 <ul style="list-style-type: none"> ・ 拡散防止措置は、○年○月○日、確認番号○○○、○○○○（* 遺伝子組換え生物等の名称）で確認済みのものと同一である。 ・ 遺伝子組換え生物等は、○年○月○日、確認番号○○○で確認済みのものと同一である。
遺伝子組換え生物等の特	宿主又は宿主の属する分類学上の種	<p>分類学上の位置及び自然環境における分布状況</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 学名：<i>Escherichia coli</i> JM109 株 ・ 分与機関名：（独）製品評価技術基盤機構から分与。NBRC 株番号は 99999 である。 ・ また、JM109 は K-12 株由来株であり、G I L S P リストに存在する。
	使用等の歴史及び現状	<ul style="list-style-type: none"> ・ 同上。 <p><GILSP リストに掲載されていない宿主の場合の記載例></p> <ul style="list-style-type: none"> ・ ○○○株は弊社において組換え微生物による工業用酵素生産用宿主としておおむね 1 0 年以上の継続的利用実績がある。（大臣確認番号○○○）。

性		また、弊社実験室では研究用として更に20年以上の使用履歴がある。
	繁殖又は増殖の様式	<ul style="list-style-type: none"> ・ 同上。 <p><GILSP リストに掲載されていない宿主の場合の記載例></p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 遺伝子型は以下の通りである。 <i>recA1, endA1, . . .</i> ・ 増殖温度域は約 10～50℃であり、至適温度域における増殖速度はおよそ 20 分に 1 回分裂する。 ・ また、栄養要求性はチアミン要求性であり、カナマイシン、アンピシリンなどの薬剤感受性を有する。また、<i>recA1</i> 変異が導入されているため、組換え能が低下している。
	病原性	<ul style="list-style-type: none"> ・ 同上。 <p><GILSP リストに掲載されていない宿主の場合の記載例></p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 独立行政法人製品評価技術基盤機構 微生物有害情報リスト及び、日本細菌学会が公開する「病原細菌のバイオセーフティレベル」によると、<i>Escherichia coli</i> K-12 株誘導体はレベル 1（個体及び地域社会に対する低危険度）に分類される。
	その他の情報	<ul style="list-style-type: none"> ・ 同上。 <p><GILSP リストに掲載されていない宿主の場合の記載例></p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 有害な影響を及ぼす生理活性物質等の産出は知られていない。
供与核酸	構成及び構成要素の由来	<ul style="list-style-type: none"> ・ <i>Bacillus subtilis</i> 由来のリパーゼ遺伝子 (<i>lipA</i>) <i>lipA</i> 遺伝子は 639 塩基であり、212 残基、分子量 23,000 のリパーゼをコードする。 ・ 図 1 に供与核酸の塩基配列、それにコードされるアミノ酸配列を図示する。 ・ <i>lipA</i> 遺伝子は PCR 法によって <i>Bacillus subtilis</i> 染色体よりクローニングされた。開始コドンの上流に 9 塩基からなるリボソーム結合配列 (<i>rrb</i>) が付加されている。ベクターの制限酵素部位に挿入させるために 5' 末端側と 3' 側にそれぞれ 3 塩基ずつの配列が付加されている。供与核酸について ORF 検索を行ったところ、目的遺伝子である <i>lipA</i> 以外の ORF と相同性を示す全てのタンパク質に毒性若しくは病原性を示すものは認められなかった。その結果を図 2 に示す。（確認日：○年○月○日）に示す。 ・ <i>Bacillus subtilis</i> は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 微生物有害情報リスト及び、日本細菌学会が公開する「病原細菌のバイオセーフティレベル」によると、レベル 1（個体及び地域社会に対する低危険度）に分類される。したがって <i>Bacillus subtilis</i> 由来のリパーゼ遺伝子およびその発現産物は有害性・病原性を有しない。 <p>【一括申請の場合】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 種類の名称欄の番号に応じて、①、②、③ . . . というように番号を付して記入してください。

	構成要素の機能	<ul style="list-style-type: none"> ・トリアシルグリセロール (脂質) を加水分解して、グリセリンと脂肪酸を生成する反応を触媒する。 ・EC 番号は 3. 1. 1. 3 である。 ・この機能を利用して、脂質を原材料として脂肪酸を生産するための工業用酵素として用いる。概要を別紙○に示す。 <p>【一括申請の場合】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・種類の名称欄の番号に応じて、①、②、③・・・というように番号を付して記入してください。
ベクター	名称及び由来	<ul style="list-style-type: none"> ・名称：pKK223-3 pKK223-3 は pBR322 に由来する大腸菌の発現用ベクターである。(参考文献;Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 6929-) ・宿主用のベクターとして、最新の G I L S P リストに記載されている。
	特性	<ul style="list-style-type: none"> ・同上。 <p><GILSP リストに掲載されていないベクターの場合の記載例></p> <ul style="list-style-type: none"> ・○○○は 4586 塩基からなり、<i>tac</i> プロモーターの下流にマルチクローニングサイトが存在し、その下流には <i>rrnB</i> 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、その他 pBR322 の <i>ori</i> を有する。 ・○○○に存在する主要な制限酵素部位及び遺伝子の構成図を図○に示す。 ・動植物に対する伝染性、病原性、及び他の微生物への伝達性は知られていない。
遺伝子組換え微生物	調製方法	<ul style="list-style-type: none"> ・挿入遺伝子のクローニングと構築方法のフロー図及び最終構築図は別添図 3 のとおりである。 ・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	<ul style="list-style-type: none"> ・細胞内に移入した核酸は大腸菌の細胞質内に存在する。 ・継代を繰り返した組換え大腸菌内のプラスミドの存在量及びリパーゼ発現量を測定したところ、継代による減少は認められなかった。したがって細胞内に移入した核酸の脱落はなく、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	<ul style="list-style-type: none"> ・遺伝子組換え微生物 <i>Escherichia coli</i> JM109 (pKK223-3/lipA) は宿主 <i>Escherichia coli</i> JM109 株に新たに <i>Bacillus subtilis</i> リパーゼを生産する能力とアンピシリンに対する耐性が付与された以外の性質は同一である。 ・宿主 <i>Escherichia coli</i> JM109 株に病原性はなく、挿入遺伝子である <i>Bacillus subtilis</i> リパーゼにも有害性はない。したがって遺伝子組換え微生物 遺伝子組換え微生物 <i>Escherichia coli</i> JM109 (pKK223-3/lipA) は新たに病原性を持つものではなく、宿主の <i>Escherichia coli</i> JM109 株と同等の安全性を有する。
拡散防	使用区分	<ul style="list-style-type: none"> ・上記の判断により、遺伝子組換え微生物 <i>Escherichia coli</i> JM109 (pKK223-3/lipA) の拡散防止措置の使用区分は G I L S P であると判断

止 措 置			した。
	作業区域の位置		図4を参照のこと
	設備	配置	<ul style="list-style-type: none"> 各設備等の配置は、図5のとおり。 本申請で使用する遺伝子組換え微生物と非組換え体の識別をするための分析機器としてPCR装置、アガロースゲル電気泳動装置、DNAシーケンサーを作業区域内に備えている。設置場所及びその設備等は図6のとおり。 本申請で使用する遺伝子組換え大腸菌(<i>Escherichia coli</i> JM109 (pKK223-3/lipA))のグリセロールストックは、図6のとおり、ディープフリーザーの限定されたスペースに保管されており、非組換え体及び他の遺伝子組換え大腸菌とは隔離している。
		構造	図7及び図8を参照のこと
	生産工程	図9を参照のこと	
<p>その他</p> <ul style="list-style-type: none"> 拡散防止措置は、○年○月○日、確認番号○○○で確認済みのものと同一である。 弊社では事業所ごとに遺伝子組換え微生物を含む微生物の使用に関する業務安全委員会を組織し、生産に関わる業務を管理している。業務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10のとおり。 事故時の緊急時における対処方法を示す（別紙○のとおり）。 責任者及び現場担当者の氏名及び連絡先： <ul style="list-style-type: none"> 責任者：○○ ○○（電話番号・E-mail） 担当者：○○ ○○（電話番号・E-mail） <p>【合併申請の場合】</p> <ul style="list-style-type: none"> 合併申請 No.1 ※遺伝子組換え生物等の種類ごとに本様式を記入し、番号を付してください。 			

注)

- 【一括申請の場合】「遺伝子組換え生物等の種類の名称」に名称ごとに①、②、③・・・というように番号を付し、「供与核酸」の「構成及び構成要素の由来」、「構成要素の機能」の両欄にも、同様に種類の名称に応じて、①、②、③・・・というように番号を付して記入してください。
- 【合併申請の場合】遺伝子組換え生物等の種類ごとに本様式を記入してください。その際、「その他」欄に「合併申請 No.1」というように番号を付すとともに、次頁の様式を添付してください。
- 以降に説明資料、参考文献等を添付してください。なお、一括申請及び合併申請の場合、各生物等の種類共通の資料は1部のみ添付してください。

【合併申請の場合のみ】

申請する遺伝子組換え生物等の一覧（※申請書様式の最後に添付）

番号	遺伝子組換え生物等の種類の名称	宿主		ベクター (複数ある場合は列記)	供与核酸 (複数ある場合は列記)	
		種名	株名		挿入DNA	由来生物
1	<i>Bacillus subtilis</i> 由来のリパーゼ産生用 <i>lipA</i> 遺伝子を入れた遺伝子組換え <i>Escherichia coli</i> JM109 (pKK223-3/ <i>lipA</i>)	<i>Escherichia coli</i>	JM109	pKK223-3	リパーゼ遺伝子 (<i>lipA</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> 168
2	○○○					