別記様式（第９条関係）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ※整理番号 |  |  |

第二種使用等拡散防止措置確認申請書

令和　　年　　月　　日

　文部科学大臣　殿

氏名　○○○○

　　 申請者　学長　○○○○　　　　　　　　　　印

住所　○○○○

　遺伝子組換え生物等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。

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 第二種使用等の名称 | | | SARS-CoV-2蛋白質発現プラスミドによるウイルス増殖過程機構解析-（申請者名） |  | |
| 第二種使用等をする場所 | | 名称 | ○○○○大学  ○○○○研究センター　大学○号館○階  ○○研究施設；○○ 培養室 P2  ○棟○階  ○○○○講座；細胞培養室および細胞生物実験室 P2 |  |
| 所在地 | 郵便番号（○○○○）　○○○○ |
| 電話番号　○○○○　(内線　○○) |
| 事  務  連  絡  先 | 実験の管理者 | 所属機関の名称及び職名 | ○○○○大学　○○ |
| 氏名 | ○○○○ |
| 住所 | 郵便番号（○○○○）　○○○○ |
| 電話番号　○○○○(内線　○○) |
| ファクシミリ番号　○○○○ |
| E-mail　○○○○ |
| その他の連絡先 | 所属機関の名称及び職名 | ○○○○大学  大学事務局　研究推進課　事務員 |
| 氏名 | ○○○○ |
| 住所 | 郵便番号　（○○○○）　○○○○ |
| 電話番号　○○○○（内線　○○） |
| ファクシミリ番号　　　○○○○ |
|
|  |  |  |  |  | o |
| 電子メールアドレス　　○○○○ |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 第二種使用等の目的及び概要 | | 種類 | １．微生物使用実験  　２．大量培養実験  　３．動物使用実験  　　（１）動物作成実験  　　（２）動物接種実験  　４．植物等使用実験  　　（１）植物作成実験  　　（２）植物接種実験  　　（３）きのこ作成実験  　５．細胞融合実験 |  |
| 目的 | 新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)は、ウイルス感染のメカニズム及びウイルスゲノム複製機序など解明すべき点が多い。本研究では、SARS-CoV-2の４種類の構造蛋白質であるS蛋白質、E蛋白質、M蛋白質及びN蛋白質、７種類のORFであるORF1a/b、ORF3a、ORF6、ORF7a、ORF7b、ORF8及びORF10遺伝子発現プラスミドを作製し、SARS-CoV-2蛋白質機能解析を、各種培養細胞を用いて検討する。  本申請は、東京慈恵会医科大学・鐘ヶ江裕美教授が申請し、令和2年7月2日に確認された大臣確認申請「SARS-CoV-2蛋白質発現プラスミドによるウイルス増殖過程機構解析」と文章は同一である。この申請書と本申請書が異なる部分を赤で表示した。 |
| 概要 | 【実験１】（非遺伝子組換え実験および大臣確認実験）  ・ウイルスRNAの入手は、国立感染症研究所より入手あるいは患者検体より分離（事前に倫理委員会にて承認を得る）  ・SARS-CoV-2蛋白質遺伝子PCR  SARS-CoV-2のRNAを抽出し、逆転写反応を行う。  その後、構造タンパク質であるS蛋白質、E蛋白質、M蛋白質及びN蛋白質、ORF1ab、ORF3a、ORF6、ORF7a、ORF7b、ORF8及びORF10のATGから終止コドンまでをPCRにより増幅して蛋白質遺伝子を得る。PCRのプライマーにはクローニング用制限酵素サイトを付ける。遺伝子組換え実験ではないが、P3対応の実験室にて行う。（別紙１）  ・供与を受けたSARS-CoV-2のcDNA断片をもつプラスミドの増幅  SARS-CoV-2のcDNA断片をもつプラズミドは国立感染症研究所等（または○○大学〇〇学部〇〇教授)から供与を受ける（別紙１）。供与を受けたプラズミドを大腸菌に導入し培養後、プラズミドDNAを調製する。  [大臣確認実験：拡散防止措置　P2  ↓  【実験２】（大臣確認実験）  ・SARS-CoV-2蛋白質遺伝子搭載プラスミドの作成  実験１で得られた4種類のウイルス構造蛋白質、7種類のORF遺伝子をプライマーに付加していた制限酵素サイトを用いてpBSSK(-)にクローニングする。クローニング後、大腸菌を用いて増幅し、シークエンスにて塩基配列を確認する (別紙２)。  ・SARS-CoV-2 cDNA断片搭載サブクローングプラスミドの作成  実験１で得られたSARS-CoV-2のcDNA断片を制限酵素で切断しpBSSK(-)にクローニングする。クローニング後、大腸菌を用いて増幅しする (別紙２)。  [拡散防止措置　P2]  ↓  【実験３】（大臣確認実験）  ・SARS-CoV-2蛋白質遺伝子発現用プラスミドの作成  実験２で得られた4種類のウイルス構造蛋白質、7種類のORF遺伝子を、ヒトEF1αプロモーターまたはCAGプロモーター（トリβ-actinプロモーターとCMVエンハンサー）とウサギβ-globin poly(A)配列の間にクローニング用制限酵素サイトを有するプラスミド(pxEFwG又はpxCAwG)にクローニングし大腸菌を用いて増幅する(別紙３)。  [拡散防止措置　P2]  ↓  【実験４】（プラスミド導入実験であり、遺伝子組換え実験ではない）  ・SARS-CoV-2蛋白質遺伝子発現プラスミドの細胞への導入  実験３で作製された4種類のウイルス構造蛋白質、7種類のORF遺伝子を発現するプラスミドを単独あるいは複数の組み合わせでサル腎臓細胞由来VeroE6細胞株あるいはヒト肝細胞がん由来のHuH-7細胞へトランスフェクションあるいはエレクトロポレーションで遺伝子導入し、SARS-CoV-2蛋白質を単独あるいは複数の組み合わせで各種培養細胞で発現させる（別紙４）。  　遺伝子組換え生物等及び拡散防止措置の一覧、実験の流れは別表１に、実験の概要は別紙１、２、３、４に示した。 |
| 確認を申請する使用等 | 本実験で用いる供与核酸はSARS-CoV-2由来であり、クラス未分類であるため、二種省令別表第一第一号イに該当し、大臣確認を要する。 |
| 遺伝子組  換え生物  等の特性 | 核酸供与体の特性 | | SARS-CoV-2（クラス未定）：  分類：ニドウイルス目コロナウイルス科。  伝達性：主に飛沫を介して感染。  宿主域：ヒトを宿主とする。コウモリのSARS様コロナウイルスと相同性がある。  病原性：主に呼吸器疾患、肺炎。現在確立された治療法はない。 |  | |
| 供与核酸の特性 | | SARS-CoV-2　Wuhan-Hu−１：Accession No. NC\_045512.2  ゲノムマップは別紙１のとおり  SARS-CoV-2 S蛋白質遺伝子：スパイク蛋白質をコード: 3821 bp  (21563-25384 bp)  SARS-CoV-2 E蛋白質遺伝子：エンベロープ蛋白質をコード: 227 bp  (26245-26472 np)  SARS-CoV-2 M蛋白質遺伝子：membrane蛋白質をコード: 668 bp  (26523-27191 bp)  SARS-CoV-2 N蛋白質遺伝子: nucleocapsid蛋白質をコード：1259 bp (28274-29533 bp)  SARS-CiV-2 ORF1ab遺伝子：ORF1ab: 21286 bp (266-21552 bp)  SARS-CoV-2 ORF3a遺伝子：ORF3a: 827 bp (25393-26220 bp)  SARS-CoV-2 ORF6遺伝子: ORF6: 185 bp (27202-27387 bp)  SARS-CoV-2 ORF7a遺伝子:ORF7a: 365 bp (27394-27759 bp)  SARS-CoV-2 ORF7b遺伝子:ORF7b: 131 bp (27756-27887 bp)  SARS-CoV-2 ORF8遺伝子: ORF8: 365 bp (27894-28259 bp)  SARS-CoV-2 ORF10遺伝子: ORF10: 116 bp (29558-29674 bp)  SARS-CoV-2蛋白質。細胞伝播を担うS蛋白質、エンベロープ蛋白質であるE蛋白質、膜蛋白質であるM蛋白質及びウイルスRNAに結合しているNP蛋白質。ORFについては、蛋白質コード可能領域である。 |
| ベクター等の特性 | | 【実験２】  pBSSK(-)（別紙５−１）(BlueScript)：  大腸菌プラスミド。β-ガラクトシダーゼをコードする。E.co.liK12株又はその誘導体を宿主とし、接合能力がなく他の菌に伝達されない。すべて病原性および毒性はない　(別紙５)。  【実験３】  pxEFwG又はpxCAwG（別紙５−２）  大腸菌プラスミド。pBR327のoriを持ち、アンピシリン耐性遺伝子をコードする。pxEFwGはヒトEF1αプロモーター、pxCAwGはCAGプロモーター（トリβ-actinプロモーターとCMVエンハンサー）を持ち、ウサギβ-globin poly(A)配列との間にクローニングサイトを持つ。病原性および毒性はない。 |
| 宿主等の特性 | | 大腸菌DH5（クラス１）：  認定宿主ベクター系（B1-EK1）。  非病原性のK12株より派生  F-, Φ80d*lacZ*⊿M15, ⊿（*lacZYA-argF*）U169, *hsdR*17（rk- mk+）,  *recA*1, *endA*1,*relA*1,*deoR*,*supE*44,*thi*-1,*gyrA*96, λ- |  | |
| 遺伝子組換え生物等の特性（宿主等との相違を含む。） | | 組換え大腸菌：  作製される大腸菌はアンピシリン耐性となる。挿入されたSARS-CoV-2遺伝子は大腸菌内では発現しない。 |
| 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 | | | HuH-7細胞：ヒト肝細胞がん由来細胞株  VeroE6細胞：サル腎臓由来細胞株  であり、遺伝子交換や組換えは知られていない。  このような科学的知見より、これらの細胞が*in vitro*でのみ生育可能である性質は遺伝子導入後も変化しないと考えられる。 |  |
| 拡散防止措置 | 区分及び選択理由 | | 拡散防止措置の区分：P2レベル（大臣確認実験）  選択理由：  宿主である大腸菌はクラス１である。  核酸供与体及び供与核酸であるSARS-CoV-2はクラス未分類であるが、部分断片のみを使用するため大臣確認を要するがP2レベルであると考える。 |  | |
| 施設等の概要 | | ○○○○大学　○○○○研究センター及び○棟  別紙６：建物配置図  別紙７ : 遺伝子組換え実験室見取り図  ○○　培養室 P2：クラスII安全キャビネットおよびオートクレーブを設置  別紙８、９：遺伝子組換え実験室見取り図  細胞培養室および細胞生物実験室 P2:クラスII安全キャビネットおよびオートクレーブを設置  実験室の構造および設備等は別紙に記載した。  遺伝子組換え実験室承認日：○○ 培養室 平成○年○月○日、細胞培養室および細胞生物実験室は平成○年○月○日に○○○○大学遺伝子組換え生物専門委員会の認可を受けている。  申請を行った時点において、設備等の変更が無く、実験室としての要件を満たしていることを確認している。 |
| 遺伝子組換え生物等  を不活化するための  措置 | | 大腸菌の不活化はオートクレーブにて行う。プラスミドDNAの生成はアルカリ法にて行う。  遺伝子組換え生物等が付着した器具及び廃棄物等はオートクレーブ（121℃、20分）、または次亜塩素酸ナトリウム（0.1%、30分）により組換え生物の不活化を行う。 |
| その他 | | | 実験実施期間；大臣確認通知書受領後から5年以内  (令和○年○月○日まで)  安全委員会：遺伝子組換え生物専門委員会  　　委員長：○○○○　 （○○○○大学・○○）    確認日：令和○年○月○日 |  | |