

# セルフクローン申請

## 表紙

- ・ タイトル
- ・ 年月日
- ・ 企業名（申請者、開発者）

## 【目次】

- ・ はじめに
- ・ x x x 生産菌 x x x 株の構築方法
  - 系統図（野生株、宿主、生産菌を明示し、各段階の操作を端的に記載）
  - 使用プラスミドおよびベクターの一覧表
  - 遺伝子型または表現型の略号と機能一覧表
  - 構築方法の詳細
    - ステップ1: ○○株の構築
    - ステップ2: ○○株の構築
      - 1) 発現プラスミド x x x の構築
      - 2)
- ・ その他
- ・ 添付資料一覧

## 【はじめに】

- ・ 申請の目的（「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」の第1章総則の第3の「対象となる添加物及び目的」に記載されている「組換え DNA 技術によって最終的に宿主に導入された DNA が、当該微生物と分類学上同一の種に属する微生物の DNA のみである場合に該当する微生物を利用して製造されたもの」に該当し、よって本基準に含まれないと考える旨）
  - ・ 添加物の概要（添加物名、既存添加物に該当すること、使用目的・効果、食経験および許可状況（国内外））
  - ・ 宿主の概要（種名（学名）・株名等、添加物製造への利用経験または食経験）
  - ・ 挿入 DNA または遺伝子の概要（性質・機能[コードするタンパク質、プロモーターやターミネーターなどの制御系機能など]および由来）
  - ・ 組換え生産菌株構築の目的（生産性向上等）
  - ・ 目的 DNA または遺伝子以外の外来性の DNA 配列（ベクター配列や抗生物質耐性遺伝子等）の不在
  - ・ 生産菌株中に、宿主自身及び当該微生物と分類学上同一の種に属する微生物の菌株由来の配列しか存在しない旨
- （・ 他国におけるセルフクローン認定）

## 【×××生産菌 ×××株の構築方法】

### 系統図

生産菌構築の流れを示す図（野生株 → 宿主 → 生産菌株）  
変異を入れた遺伝子名及び用いられた遺伝子操作技術\*も記載する。

\*遺伝子操作技術の例

変異： 変異原（UV, ニトロソグアニジンなど）  
遺伝子導入技術： 形質転換（プロトプラスト法）、形質転換（天然コンピテンス法）、形質導入など  
その他： プラスミド除去（キュアリングなど）  
遺伝子欠失 など

### 遺伝子型または表現型の略号と機能の一覧表

（※利用した遺伝子が多い場合に記載）

表〇 生産菌×××株構築図中の遺伝子型及び表現型

遺伝子型 または表現型の略号	日本語表記
Ampicillin	アンピシリン耐性遺伝子
<i>bla</i>	$\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子
×××	××遺伝子

### 使用プラスミドおよびベクターの一覧表

（※利用したベクターが多い場合に記載）

表〇 発現プラスミド p×××の構成・機能

遺伝子	位置	コードするものとその機能
TRP1	3538-4212	<i>S. cerevisiae</i> 由来の選択マーカー
アンピシリン耐性 遺伝子	4271-6265	アンピシリン耐性遺伝子を含む <i>E. coli</i> JM109 株由来の pUC8 ベクターの一部
×××	×××	×××

## 生産菌株の構築方法の詳細

野生株 → 宿主 → 生産菌株の流れで、どのように構築したかをステップごとに説明する。

説明に加える事項を以下に示す。

### 宿主（遺伝子操作前の株）

- 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）
- 添加物製造への安全な利用経験または食経験等
- 公的機関による安全性評価（国立感染衛生研究所のバイオセーフティーレベル等）
- 野生株からの構築方法（変異の導入方法）

### ベクター

- 名称および由来
- 塩基数およびその塩基配列（添付資料：塩基配列番号順に配列の性質を記述）
- 制限酵素による切断地図
- 薬剤耐性遺伝子の性質

### 挿入 DNA または遺伝子とその供与体

- 名称および由来
- 供与体
- クローニング若しくは合成方法
- 塩基数および塩基配列（添付資料：塩基配列番号順に配列の性質を記述）
- 制限酵素による切断地図
- 性質および機能（コードするタンパク質、プロモーターやターミネーター等の制御系機能等）

### 発現ベクターの構築方法

- プロモーターの由来と性質
- ターミネーターの由来と性質
- その他、発現制御に関わる塩基配列等を組み込んだ場合には、その由来および性質
- 塩基数及び塩基配列
- 制限酵素による切断地図
- 発現ベクターへの挿入 DNA または遺伝子の組み込み方法

### DNA または遺伝子の宿主への導入方法

- DNA または遺伝子の宿主への導入方法（形質転換、形質導入、エレクトロポレーション法等）
- DNA または遺伝子の宿主ゲノムへの組み込み方法および組み込まれた抗生物質耐性遺伝子等の除去方法
- 選抜方法（DNA または遺伝子が導入された宿主を選抜する方法）

### 抗生物質耐性遺伝子およびその他の選択マーカー遺伝子

- 生産菌におけるこれらの不在を示す実験的データ
  - ※サザンブロット等を用いた場合、プローブの配列情報、ポジティブおよびネガティブコントロール、遺伝子バンドの位置およびサイズ、レーン毎のサンプル名、示したい情報の補足説明等を記載する。
  - ※ゲノムシーケンシングを用いた場合、解析条件（サンプルの種類、リード長、カバレッジ等）も記載する。

### 組換え生産菌株に関して

- 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）
- 宿主との差異（配列の相違等）
- DNA または遺伝子を複数挿入している場合には、そのコピー数を示す実験的データ
- 目的 DNA または遺伝子以外の外来性の DNA 配列の不在

結語として、生産菌株中に、セルフクローンに該当すると判断する根拠（宿主自身及び当該微生物と分類学上同一の種に属する微生物の菌株由来の配列しか存在しない旨）を記載する。

## 【その他】

- 諸外国における許可状況および食経験（特にアメリカ、EU、オーストラリア/ニュージーランド）

## 【添付資料一覧】

※あまり一般的でないと考えられる手法を用いて遺伝子操作を行う場合には、適宜図説を加えること。

※英語以外の言語の参考文献を添付する場合には、英訳または和訳を付けること。