

遺伝子材料開発室

Gene Engineering Division



室長 小幡 裕一 (理博)
Yuichi OBATA, Ph.D.

ミッションと事業概要

プラスミド、BAC などのクローンセット、組換えアデノウイルス、発現ベクター、宿主などの遺伝子材料は、最も基本的な研究材料であり、基礎から応用までほとんど全てのライフサイエンス研究分野において用いられている。当室では、有用かつ重要なヒト、動物および微生物由来の遺伝子材料を国内外の研究コミュニティから収集し、厳格な品質管理を行い、実験の再現性を確保した信頼性の高い研究材料として国内外に提供している。このことにより、健康や環境に関する重要な課題を解決し、人類の持続的発展に貢献することを目指している。

Genetic materials such as plasmids, clone sets of bacterial artificial chromosome (BAC), recombinant adenoviruses, expression vectors, and host bacteria are the most fundamental and essential research tools. They are used in the almost all fields of the life science, from basic to applied researches. The Gene Engineering Division collects valuable genetic materials of human, animal and microbe origin developed in the domestic and international scientific community, conducts strict quality control on genetic materials and provides domestic and international scientific community with the materials of ensured reproducibility of experimental results. By these activities, we aim to promote life science researches for improvement of human welfare and for solution of environmental problems and hope to contribute to the sustainable development of our race.

バイオリソースの収集・保存・提供 Collection, Preservation and Distribution

当開発室は昭和62年より理研ジーンバンク事業として活動を開始し、平成13年より理研BRCの発足に伴い遺伝子材料開発室として改組され、さらに平成14年度からは文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)「遺伝子材料」(ヒト、動物および微生物)の中核機関として、遺伝子材料を収集し、品質管理、保存、提供事業を行っている。

Our Division was established in 1987 as the RIKEN Gene Bank. When the RIKEN BioResourceCenter was established in 2001, the Bank was re-organized as Gene Engineering Division. Since 2002, the Division has been selected as a core facility of DNA resources by National BioResource Project (NBRP) funded by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), Japan for collection, quality control, preservation and distribution of genetic materials of human, animal and microbe origin.

(1) 遺伝子材料の収集

研究動向を的確に把握し、国内外の大学・研究機関の研究者が開発した遺伝子材料の収集を行っている。このために国内学会発表から遺伝子材料開発情報を検索し、遺伝子

材料の寄託願いを送付している。また、数々の研究成果を生み出してきた国家プロジェクトで確立したバイオリソースの収集も行っている。これらのリソースを研究者が利活用することで、基礎研究のみならず、医療・創薬開発等の応用研究の発展が期待でき、また研究コミュニティからも要望が大きい。

平成23年8月に、国立障害者リハビリテーションセンター研究所(NRCD)の加藤誠志博士のグループによってヒト網膜細胞のトランスクリプトーム解析を目的として作製されたNRCD Human Full-Length cDNA クローンセットのデータベース(7,000遺伝子、39,600クローン)が公開され、当開発室からクローンの提供を開始した。網膜細胞の変性や再生メカニズムを解明するための材料としてのみならず、ヒト遺伝子の多様性に関する研究を行うための完全長cDNAリソースとしての活用が期待される。

当開発室では、平成22年3月から、文部科学省ゲノムネットワークプロジェクト(GNP)によって作製ならびに収集されたヒト完全長cDNAコレクションを提供している。今回のNRCD Human Full-Length cDNAクローンセットの公開により、ヒト遺伝子約2万のうち80%に当たる16,000遺伝子分のクローンが提供可能となった。さらに8,800遺伝子分は、使いやすい発現ベクターpCMV SPORT6、pGCAP1もしくはpGCAP10にクローニングされており、哺乳動物細胞を用いた実験にすぐに使用可能な利便性の高いものであり、今後、提供が急増するものと予想している。各々の遺伝子のクローンは<http://dna.brc.riken.jp/>

search/RDB_hum/RDB_hum_A.html から検索可能である。加えて、国立がん研究センター研究所の中釜斉博士ならびに落合雅子博士が樹立したラットF344/Jcl系統ならびにACI/NJcl系統のBACクローン化ライブラリーをNBRPラットの中核機関との協議の上、収集した。F344/Jcl系統はすでに当開発室から提供を開始しているBACクローン化ライブラリーのF344/Stm系統とは異なる亜系統である。それゆえ、亜系統間の遺伝的相違およびそれぞれの特異的な表現型の原因遺伝子の探索に利用が見込まれる。もう一つのACI/NJcl系統は、遺伝子解析が進んでいるBN系統やF344系統と遺伝的に離れており、発がん感受性、偏腎症の発症、独自の主要組織適合遺伝子複合体(RT1)タイプを持つこと等が挙げられ、疾患モデルとして非常に有用な系統である。このように利用できるラットゲノムリソースと情報が充実し、ラットコミュニティの期待も大きい。

(1) Collection of Genetic Materials

By comprehending the newest trends and needs of life science, we collect genetic materials developed in the domestic and international scientific community. To collect such valuable genetic materials, we ask researchers for depositing their genetic materials at our Division by searching through abstracts of scientific meetings in Japan. We also collected compiled genetic materials produced by the national projects. These resources offer a valuable opportunity for researchers to make key advancements in not only basic sciences but also medical sciences and drug discovery. Consequently they are frequently requested and utilized by scientific community.

In August 2011, a database of the National Rehabilitation Center for Persons with Disabilities (NRCD) Human Full-Length cDNA Clone Set (7,000 genes, 39,600 clones) was opened to public and we begun to distribute these clones. The clone set was produced for the transcriptome analysis of human retinal cells by Dr. Seishi Kato of the Research Institute of NRCD. The clones are full-length cDNAs and facilitate studies for not only degeneration and reproduction mechanism of retina cells but also for genetic variation of human.

We have already distributed full-length human cDNA clones deposited by the MEXT "Genome Network Project" since March 2010. By addition of the NRCD Human Full-Length cDNA clone set, we are now able to distribute human cDNA clones which covers 80 percent (16,000 genes) of all human genes. Furthermore, of the human full-length cDNA clones collected, clones containing 8,800 genes are cloned into expression vector either pCMV SPORT6, pGCAP1 or pGCAP10 which are effective for experiments using cultured mammalian cells. We expect to receive many requests for them. Clones can be searched in the Human Gene A to Z List at http://dna.brc.riken.jp/search/RDB_hum/RDB_hum_A.html.

In addition, BAC libraries of F344/Jcl and ACI/NJcl rat strains were deposited by Drs. Masako Ochiai and Hitoshi Nakagama of the National Cancer Center Research Institute after discussion

with the NBRP Rat Core Facility on the value of these libraries in research. The F344/Jcl is a different substrain than the F344/Stm which we started distribution already. The clones are expected to be used for comparison and discovering genes in phenotypic differences between two substrains. The ACI/NJcl is genetically distant from well characterized BN and F344 strains and is known as a disease model rat featured by cancer susceptibility, ipsilateral renal disease and unique major histocompatibility complex (RT1). Consolidation of the rat genome resource and information draws high hope from a rat community.

(2) 遺伝子材料の保存・整備

収集した遺伝子材料は増殖性、制限酵素地図、塩基配列などの品質を確認した後、保存した。アデノウイルスについては力価測定、自律増殖可能アデノウイルスの存在否定試験等の品質管理を行い、超低温槽へ保存した。収集したリソースには約5%に誤り(取違い、突然変異、付随情報の齟齬等)が存在している。これは研究コミュニティで流通、利用されているリソースにおける誤りが反映されているものであり、我が国だけではなく世界的な問題であり、放置されれば研究費、労力、時間の5%が無駄に費やされていることを意味する。遺伝子材料開発室では、品質を確認し、実験の再現性を保証するリソースの整備を進め、研究の質の向上と効率化に貢献している。

(2) Preservation and Maintenance of Genetic Materials

Prior to preservation, quality of genetic materials are examined for growth rate, restriction enzyme mapping and nucleotide sequencing. Recombinant adenoviruses are examined for infectious titer and contamination of replication competent adenoviruses.

About 5% of collected clones has some errors such as misidentification of clones, undesirable mutations or wrong information. These errors reflect the fact that circulated resource in research community contains 5% of errors and that the problem is not unique to Japan but world-wide. This also means that 5% of money, man power and time spent for experiment and research is wasted. Our Division provides with the materials of ensured reproducibility of experimental results by our strict quality control and consequently improves the quality and efficiency of research.

(3) 遺伝子材料の提供

遺伝子材料に加えて、それらに付随する特性情報並びに技術情報もホームページで公開し提供している。平成23年7月にGFPリソースのライセンス契約を結ぶに至ったこと(後述)により、利便性の高いリソースを研究コミュニティに提供できるようになった。例えば、京都大学武藤誠先生から寄託していただいたNotchシグナルを可視化するGFP発現クローンpRBS-GFPや埼玉大学脳科学融合研究センター中井淳一先生から寄託していただいたカルシウムシグナルを可視化するGFP-カルモジュリン融合タンパク質発現クローンである。

1-1-1 Culture

Materials

Plasmid name	pET21c-Tr-egf1-His
RDB #	8288
Alternative name	pET21c-Tr003-His
Hosts (E. coli)	BL21(DE3) or Rosetta-gami B(DE3)
Media	LB media or Overnight Express

Rosetta-gami B(DE3): (Cat # 71136, Novagen)
Overnight Express: Overnight Express instant LB Medium (Cat # 71757, Novagen)

Culture conditions

Volume (ml)	10
Temperature (°C)	37
Duration (hr.)	20

Making of cell lysates

Materials

Bug buster 10X Protein Extraction Reagent (Cat. # 70921, Merck)
Complete, EDTA-Free (Cat # 1873580, Roche Applied Science)
Lysis buffer: 1X Bugbuster, 1X complete, 50 mM Sodium Acetate (pH 6.0)

Procedure

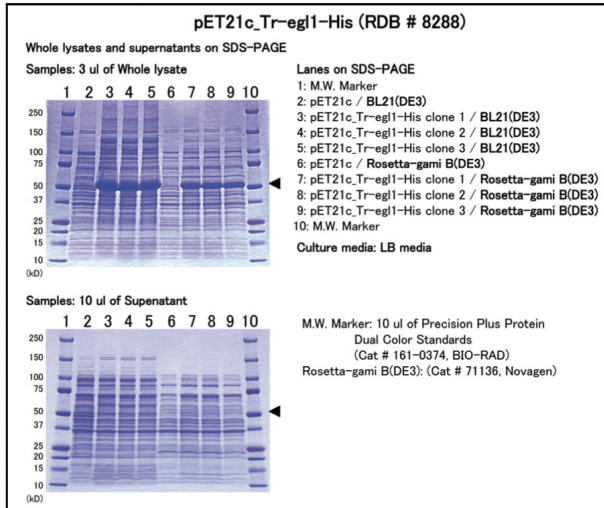
Cultured E. coli
↓
add 1 ml of Lysis buffer and suspend well
↓
Rotate for 20 min. at R.T.
↓
Whole lysate
Centrifuge at 14,000 rpm (17800 g) for 20 min.
↓
supernatant
ppt

SDS-PAGE

Samples

- 3 ul of Whole lysates
- 10 ul of Supernatants

Gel conc.: 5 to 20%



<http://dna.brc.riken.jp/en/biomass.html>

大腸菌で発現させる組換えタンパク質の発現プロトコルは、ホームページでの公開に向けて準備をしている。
We are preparing protocols of production of recombinant proteins for dissemination from our web site.

(3) Distribution of Genetic Materials

Associated information and technical comments of genetic materials are also provided on the web site of the RIKEN BRC. As RIKEN BRC concluded an agreement for the transfer of bioresources containing green fluorescent protein (GFP) as mentioned later, we have opened a path of the deposition to and provision from the RIKEN BRC of useful genetic materials contains GFP. For example, the plasmid pRBS-EGFP deposited by Prof. Makoto Taketoh of Kyoto University and the G-CaMP expressing plasmid clones deposited by Prof. Jun-ichi Nakai of the Brain Science Institute of Saitama University are useful to visualize Notch signal and calcium signal, respectively.

平成23年度の成果 Development of Technology in 2011-2012

植物バイオマスを原材料として新材料を創造するバイオプロセス開発ならびにエネルギー生産に関心が高まる中、横浜研究所生命分子システム基盤研究領域NMRパイプライン高度化研究チームの木川隆則先生、渡部暁先生および当センターの微生物材料開発室 (JCM) との共同で、遺伝子材料開発室ではバイオマス利用に使用される酵素の遺伝子の収集と評価を行った。木質バイオマスを分解し、糖化する過程に関わる酵素について、JCMが保有する糸状菌 *Trichoderma reesei* ならびにシロアリの共生原生動物 (*Spirotrichonympha leidyi*, *Holomastigotoides mirabile*, *Pseudotrichonympha grassii*) から20遺伝子とその大腸菌発現

用クローンを樹立した。このうち9遺伝子のクローンを用いて、大腸菌で発現させた組換えタンパク質に酵素活性があることを確認しており、発現と精製のプロトコルの公開に向けて準備をしている。これらの実績により、今年度より理化学研究所が推進する社会知創成事業バイオマス工学研究プログラムに参加することになった。

Needs and interests in the development of bioprocess of novel materials and energy production from plant biomass have been growing. Our Division has begun collecting and evaluating genetic materials that code enzymes utilized for the bioprocess such as saccharification process of plant biomass. We have collected and analyzed clones corresponding to 20 genes of enzymes of filamentous fungi *Trichoderma reesei* and symbiotic in the intestines of termites (*Spirotrichonympha leidyi*, *Holomastigotoides mirabile*, *Pseudotrichonympha grassii*) by the collaboration with RIKEN BRC Microbe Division (Japan Collection of Microorganisms: JCM) and Drs. Satoru Watanabe and Takanori Kigawa of the NMR Pipeline Methodology Research Team of the RIKEN Systems and Structural Biology Center. Of these 20 genes, we confirmed that recombinant proteins of 9 genes have enzymatic activities. Protocols of production and purification of recombinant proteins will be available soon on our web site. We are going to participate in the RIKEN Biomass Engineering Program of the Research Cluster for Innovation starting this fiscal year.

平成23年度のトピック Topics in 2011-2012

Green Fluorescent Protein (GFP) は、緑色の蛍光を発するタンパク質である。GFPと調べたいタンパク質を融合タンパク質として発現させ、GFPが光っているのかを観察することで、目的のタンパク質がどこで作用しているのかを調べることができる。このGFPの画期的な有用性により、2008年のノーベル化学賞は、下村脩博士と、Martin Chalfie博士、Roger Y. Tsien博士の3氏に授与された。

理研BRCは、2011年7月12日にGE Healthcare Bio-Sciences社 (GE社) の厚意によって、オワンクラゲのGFP及びその変異体遺伝子が組み込まれたバイオリソース (GFPリソース) について、ライセンス料なしで利用できることを実現し、GFPを用いた多くのクローンが死蔵されることなく、当センターへの寄託、また当センターから非営利・学術研究への提供が可能となった。GFPリソースには、GFP及びその変異体遺伝子が組み込まれたマウス、シロイヌナズナ、細胞、遺伝子クローンが含まれる。今後、活発な寄託と利用が期待される。

GFP is a protein which radiates green fluorescence. GFP can be fused to a protein to be investigated can be used for study where the fusion protein has shone and the target protein is functioning. For the epoch-making usefulness of GFP, Drs. Osamu Shimomura, Martin Chalfie and Roger Y. Tsien win the Nobel Prize in Chemistry in 2008.

RIKEN BRC and GE Healthcare Bio-Sciences (GE) concluded an agreement for the transfer of bioresources containing GFP (GFP bioresources) to investigators at academic institutions, on July 12, 2011. By generosity of GE, RIKEN BRC is able to collect and distribute the GFP bioresources to non-profit and academic researches without license fee. GFP bioresources include mice, Arabidopsis thaliana, cell lines, and genetic clones that incorporate GFP. We expect active deposit and use of these GFP bioresources by research community.

職員とメンバー構成 Members

●室長 [Head of Gene Engineering Division]
小幡 裕一 Yuichi OBATA, Ph.D.

●専任研究員 [Research Scientist]
村田 武英 Takehide MURATA, Ph.D.

●協力研究員 [Contract Researcher]
中出 浩司 Koji NAKADE, Ph.D.

●開発技師 [Technical Scientist]
岸川 昭太郎 Shotaro KISHIKAWA, Ph.D.

●テクニカルスタッフ II [Technical Staff II]
山崎 孝仁 Takahito YAMASAKI
益崎 智子 Satoko MASUZAKI
久次米 夕佳里 Yukari KUJIME
酒寄 めぐみ Megumi SAKAYORI
大久保 将人 Masato OKUBO
栗原 千登勢 Chitose KURIHARA

●アシスタント [Assistant]
上野 和子 Kazuko UENO

●客員研究員 [Visiting Scientist]
安部井 誠人 Masato ABEI, M.D., Ph.D.
潘 建治 Jianzhi PAN, Ph.D.
濱田 洋文 Hirofumi HAMADA, M.D., Ph.D.

●研修生 [Student Trainee]
長谷川 直之 Naoyuki HASEGAWA

●派遣職員 [Agency Staff]
金原 明代 Akiyo KIMPARA
坂本 優 Yutaka SAKAMOTO
中村 宣篤 Nobuatsu NAKAMURA
相馬 早紀 Saki SOMA
柏瀬 幸 Yuki KASHIWASE

●パートタイマー [Part-Timer]
木村 明子 Akiko KIMURA
平栗 麻奈美 Manami HIRAGURI
古谷 昭江 Terue FURUYA
服部 ひとみ Hitomi HATTORI
町田 由紀 Yuki MACHIDA
勝谷 敦子 Atsuko KATSUYA
高原 祐子 Yuko TAKAHARA
中島 緑 Midori NAKAJIMA
藤澤 久江 Hisae FUJISAWA

