

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

ヒトおよび種々のモデル生物の全ゲノム配列が解読され、さらに近年の塩基配列決定技術および機器の開発により、遺伝情報は安価かつ迅速に取得できるようになった。近年のライフサイエンスにおいては、これらの情報に基づいて、高次生命現象の機序、疾患発症機序の解明、疾患の治療法及び治療薬を開発することが中心的な方法となっている。このような研究方法は、今後も加速すると予想される。従って、ゲノムDNAやcDNAクローン、発現ベクターなどの遺伝子材料は、基礎から応用まで全てのライフサイエンスにおいて、最も基本的な研究材料である。

当室では、ヒト、動物および微生物由来の有用かつ重要な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、基礎学術研究からライフイノベーション・グリーンイノベーションまでの幅広い分野の研究開発の発展に貢献することを目指している。

The entire genome sequences of human and various model organisms have been determined. Furthermore, recent dramatic advancement of technologies and equipments for DNA sequencing has allowed inexpensive and quick acquisition of genome information. In the current life science research, the main approach to elucidate mechanisms of sophisticated biological phenomena, to discover causes of diseases mechanisms, and to development of therapeutic methods and drug discovery are based on the genome information. Such trends are expected to accelerate further. Thus, genetic materials such as genomic DNA, cDNA clones and expression vectors are the most fundamental and essential research tools in the almost all fields of the life science, from basic research, to innovation.

The Gene Engineering Division collects valuable and important genetic materials of human, animal and microbe origins developed in Japanese and international scientific community, and distributes these materials to scientists after rigorous quality control in order to ensure the reproducibility of experimental results. By these activities, we aim to accelerate not only basic academic research but also innovation for improvement of human health and environment.

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 BioResource Center (BRC) was established in 2001, the Bank was merged as Gene Engineering Division of the BRC. Since 2002, the Division has been designated as a core facility of DNA resources in the National

BioResource Project (NBRP) funded by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT). We have been conducting collection, quality control, preservation and distribution of genetic materials of human, animal and microbe origins.

(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。これらの成果をあげたリソースは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、バイオマス工学等のイノベーションの発展も期待でき、

また研究コミュニティからも要望が大きい。

本年度は、実験動物中央研究所から寄託されたコモンマーモセット *Callithrix jacchus* EST クローン をヒト染色体上の位置と対応付けしたゲノムブラウザ (Tatsumoto, S. *et al.*, *DNA Res.*, 2013; <http://marmoset.nig.ac.jp/>) が公開され、当室ではクローンの提供を開始した。このクローンセットは5ライブラリー (肝臓、脳及び脊椎、脾臓、精巣、胚性幹細胞) に由来する cDNA 247,000 クローン から構成されている。

研究コミュニティの理解と支援、またこれまでの収集活動により、遺伝子材料の保存数は今年度1月末で3,807,263株に達している。

(1) Collection of Genetic Materials

To comprehend the trends and needs in the community of life science, we are trying to collect valuable genetic materials developed by Japanese and international researchers. For this purpose, we directly ask researchers for deposition of their materials which were reported in scientific meetings in Japan. We also collected sets of genetic materials developed by national projects. Usage of these resources provides valuable opportunities for progress not only in basic sciences but also in the fields of medical sciences, drug discovery and bio-mass engineering. As consequences, our bioresources have been frequently requested and utilized by scientists.

In this year, a genome browser of common marmoset (*Callithrix jacchus*) EST clones deposited by the Central Institute for Experimental Animals has been published (Tatsumoto, S. *et al.*, *DNA Res.*, 2013; <http://marmoset.nig.ac.jp/index.html>), in which each common marmoset EST sequence is mapped onto and we have begun distribution of these clones. There are 247,000 clones derived from five different tissues (liver, brain and spinal cord, spleen, testis, and embryonic stem cells).

By continuous support from the scientific community and efforts of our Division, genetic materials have been accumulated to a total of 3,807,263 items at the end of this January of 2014.

(2) 遺伝子材料の保存・整備

個々の研究者から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。一方、クローンセット等の一括大量寄託されたリソースについては、一旦保存し、提供依頼が発生した後、依頼クローンについて上記の品質検査を行い提供することとしている。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。

当開発室では、網羅的解析のためのセットとして理研放射光科学総合研究センター / 大阪大学の倉光成紀博士が構築した大腸菌での高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の組換

えタンパク質発現用ならびに理研吉田化学遺伝学研究室吉田稔博士が構築した分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の3種のクローンセットを提供している。本年度は、両セットの寄託者の連絡に基づき、提供済みのセットを是正するため、高度好熱菌の遺伝子発現用クローンセットは、セットを提供した利用者22名に229株の追加・差し替え用クローンを送付し、220株の削除の依頼をした。分裂酵母のクローンセットは、14名に2,650株の追加・差し替え用クローンを送付し、177株を削除した。これらの活動により、研究の質の向上と効率化を図っている。

(2) Preservation and Maintenance of Genetic Materials

The genetic materials deposited by individual scientists, their qualities are examined by the growth rate, restriction enzyme mapping and nucleotide sequencing, prior to preservation. Recombinant adenoviruses are examined by their infectious titer and contamination of replication competent adenoviruses. On the other hand, for large clone sets and numerous clones of package deposition, materials are stored first. Only after request comes, the quality tests on the requested individual clone are performed before shipping. In our experience, about 5% of collected clones have some errors such as mis-identification, undesirable mutations or wrong information. These errors reflect the fact that resources used in research community contain 5% of errors. This is not unique problem in Japan but world-wide, therefore more than 5% of time, effort and funds are wasted because of these genetic errors. Our Division provides materials under rigorous quality control and with ensured reproducibility so that researchers can improve the quality and efficiency of their experiment.

We have distributed plasmid clones for production of *Thermus thermophilus* proteins in recombinant *E. coli* established by Dr. Seiki Kuramitsu of RIKEN SPring-8 Center/Osaka University and three clone sets of *Schizosaccharomyces pombe* established by Dr. Minoru Yoshida of Chemical Genetics Laboratory, RIKEN. We sent 229 clones needed to be added and replaced and informed 220 clones needed to be deleted to 22 researchers who have *T. thermophilus* clone sets. We also sent 2,650 clones needed to be added and replaced and informed 177 needed to be deleted to 14 researchers to whom have distributed *S. pombe* clone sets. By these activities, we have improved the quality of researches and efficiency.

(3) 遺伝子材料の提供

当室では、ヒトの全遺伝子の80%をカバーするcDNAクローンを整備、提供している。さらに、ヒトの全遺伝子の50%をカバーする発現cDNAクローンを整備しており、利用しやすいリソースとなっている。代表的なリソースは、文部科学省「ゲノムネットワークプロジェクト」及び国立障害者リハビリテーションセンター研究所のヒト Full-Length cDNA クローンである。ヒトcDNAが利用される研究分野は、非常に多岐にわたっており、利用が拡大している。各々の遺伝子のクローンは <http://dna.brc.riken.jp/en/search.html> から検索可能である。これらの整備の結果、今年度の提供は、2,517件、25カ国、延べ575機関に達している。



図 再構成した日本語ウェブページ。ページ上部のプルダウンメニューから各ページに移動できる

Fig. Reconstructed web page. Users can move smoothly from the top of each web page by using pull down menu set at the head of each page

(3) Distribution of Genetic Materials

We have maintained and distributed cDNA clones corresponding to 80% of all human genes. We also have expression cDNA clones corresponding to 50% of all human genes. They are ready to be used. The representative are the full-length human cDNA clones developed by the MEXT Genome Network Project, and by Dr. Seishi Kato of the Research Institute of National Rehabilitation Center for Persons with Disabilities. These clones have provided excellent opportunity to scientists in various fields. The clones can be searched in the Human Gene A to Z List at <http://dna.brc.riken.jp/en/search.html>. By these efforts, 2,517 items of genetic materials have been distributed cumulatively to 575 organizations in 25 countries at the end of this fiscal year.

平成25年度の成果

Development of Technology in 2013-2014

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への関心が高まる中、理研バイオマス工学研究プログラム (BMPE) の支援の下、当センターの微生物材料開発室 (JCM) と共同で、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、シロアリの共生原生動物から遺伝子を取得し、その大腸菌発現用クローンを樹立した。また、大腸菌で発現させた幾つかのパイロコッカス属由来もしくはシロアリ共生原生生物由来の糖化酵素について特性を明らかにした。これまでに 10 種の生物に由来する 46 種類の酵素のプラスミドクローン 133 株を構築した。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 (<http://dna.brc.riken.jp/en/biomass.html>)。

組換えアデノウイルスベクターの操作性を向上するため 2A 自己開裂型ペプチドを搭載した GFP 共発現型ユニバーサルコスミドベクターを構築した。これはクローニングサイトに発現させたい遺伝子を挿入すると GFP と目的遺伝子を共発現が可能になる構造になっている。このベクターを HEK293

に導入するとウイルスの増殖が蛍光観察できるのみならず、産生させたウイルスをターゲット細胞に感染させると感染した細胞を判別することができ、アデノウイルスを用いた遺伝子導入法の新規利用者にも使いやすいシステムとなることが期待される。

また、アデノウイルス技術の適用範囲の拡大を目指して遺伝子導入による細胞分化への応用を試みている。直接心筋誘導系 (iCM) はファイブプロプラストに Gata4, Mef2C と Tbx5 の 3 つの必須ファクターを導入することにより直接心筋細胞に変換できる技法である。我々はこの 3 つの遺伝子を同時に発現するアデノウイルス (Ad-GMT) を構築し、これをマウス胎児ファイブプロプラストに感染させ FACS を用いて機能性を評価したところ、心筋マーカーの cardiac troponin T や sarcomeric actinin を発現する

細胞を得ることができた。このことより Ad-GMT には心筋誘導能があることが示された。

Needs and interests in the development of bioprocess for novel materials and energy production from plant biomass have been growing. Our Division has been collecting and evaluating genetic materials that code enzymes utilized for the bioprocess such as saccharification of plant biomass. We have collected and analyzed clones coding enzymes of *Pyrococcus* and symbiotic in the intestines of termites by the collaboration with RIKEN BRC Microbe Division (Japan Collection of Microorganisms: JCM) funded by the RIKEN Biomass Engineering Program (BMPE). We have constructed 133 plasmid clones of 46 enzymes derived from 10 species. Associated information and technical comments for genetic materials are also provided on the web site of our Division (<http://dna.brc.riken.jp/en/biomass.html>).

In order to improve the operativeness of recombinant adenoviral vector, we are focusing on the 2A-self cleavage peptide-based GFP co-expression system. We constructed universal adenoviral vector so that one can co-express GFP and an inserted gene. This system helps to monitor the proliferation of adenovirus in HEK293 cells, as well as confirm and discriminate the infected target cells by observing the expression of GFP. Thus, this GFP co-expression system is expected to be a powerful tool for researchers who wish to begin adenoviral gene introduction technique.

We are also focusing the induction of differentiation by gene introduction using adenoviral vector in order to enlarge application of the technology. The induced Cardiomyocytes system (iCM) is the technique to generate directly cardiomyocytes from fibroblast by expressing three essential factors, Gata4, Mef2C and Tbx5. We developed polycistronic adenoviral vector which express these iCM related genes (Ad-GMT). In order to investigate the ability of this adenoviral vector, we infected mouse embryo fibroblast. The FACS analysis showed that we successfully generated the cells expressing cardiac marker proteins such as cardiac troponin T and sarcomeric actinin, suggesting that the adenoviral vector functions as an inducer of cardiomyocyte.

平成25年度のトピックス Topics in 2013-2014

NBRP 情報中核機関の山崎由紀子先生のご支援により、NCBI の PubMed の Abstract 下に Research Materials という項目が新たに設置された。これにより、PubMed で文献を検索した利用者が、その論文で使われている当室を含む NBRP リソースのカタログを閲覧できるようになった。

利用しやすいページ構成を目指し、当センター情報解析技術室と連携し、日本語ウェブページを再構成した。利用者はページ上部に配置したプルダウンメニューからウェブ内の各ページにスムーズに移動することができる。

本年度は、2つの技術研修事業を国内大学、研究機関、企業に所属する学生、研究者、技術職員を対象として行った。1つ目は、「組換えアデノウイルス」について、ウイルスの取扱い技術の基礎であるシャトルベクターから組換えアデノウイルスに変換する技術、組換えアデノウイルスの精製法の実習を開催した。2つ目は、生命科学研究を行う上で非常に重要なタンパク質の解析技術のうち、細胞溶解液中の組換えタンパク質の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) での分離と、Coomassie Brilliant Blue 色素によるゲル中タンパク質の染色 (CBB 染色) によるタンパク質検出に加え、大腸菌で発現させた組換えセルロース分解 (糖化) 酵素の活性測定法の研修を実施した。

By the efforts of Dr. Yukiko Yamazaki of the NBRP Information Center, "Research Materials" section was newly created under the Abstract section of the PubMed of NCBI. This section allows researchers visiting a catalog of corresponding resources of NBRP including our division appeared in searched research papers by using PubMed.

We reconstructed our Japanese web pages to improve accessibility by users in cooperation with the Bioresource Information Division. Users can move smoothly from the top to each web page by using pull down menu set at the head of each page.

In this fiscal year, we gave two training course to students, researchers and technicians from academic institutes and industry. First, we conducted for a basic technique of use of recombinant adenovirus such as conversion of recombinant viruses form a shuttle vector and purification of virus particles. Second, we conducted for protein analysis methods such as analysis of enzyme activity of recombinant cellulose degradation (saccharification) enzymes produced by recombinant E. coli as well as SDS-PAGE and Coomassie Brilliant Blue staining to detect recombinant proteins in cell lysate.

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]
潘 建治 Jianzhi PAN, Ph.D.
安部井 誠人 Masato ABEI, M.D., Ph.D.

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

●派遣職員 [Agency Staff]
中村 宣篤 Nobuatsu NAKAMURA, Ph.D.
中島 謙一 Kenichi NAKASHIMA, Ph.D.
笹沼 俊一 Shunichi SASANUMA
柴本 理宏 Yoshihiro SHIBAMOTO
長谷川 聡 Satoshi HASEGAWA, Ph.D.

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

