

# 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

近年の塩基配列決定能力の向上により、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、膨大な遺伝情報が蓄積されつつある。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き、遺伝子材料を利用し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、基礎研究からイノベーション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重要かつ有用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。

Recently, enormous amount of genome information of human and various model organisms has been accumulating because their entire genome sequences can be readily determined by the dramatic improvement of the DNA sequencing ability. In the current life science research, the usage of the genetic materials based on the accumulated genome information becomes 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. 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 sciences, from basic research to innovation.

The Gene Engineering Division collects important and valuable 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

### (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。このために日本人著者の学術論文やプレス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、大阪バイオサイエンス研究所・所長の中西重忠先生から、神経回路の制御機構研究に使用される神経受容体等の遺伝子クローン50株が譲渡された。また、徳島大学シオサイエンス研究部の大政健史先生から、タンパク質生産に多用されるチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を染色体識別により品質管理するために行う蛍光 in situ ハイブリダイゼーション用BACライブラリー 304株が寄託された。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末に3,807,779株に達した。

## (1) Collection of Genetic Materials

To comprehend the trends and to grasp the 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 journals and press releases in Japan. We also collect sets of genetic materials developed by national projects. These resources provide valuable opportunities for progress not only in basic sciences but also in the fields of medical sciences, drug discovery and biomass engineering. As consequences, our bioresources have been frequently requested and utilized by scientists all around the world.

In this year, 50 clones for the study of the integrative regulation of the neural network such as neural receptor protein genes have been deposited by Dr. Shigetada Nakanishi of the Director of the Osaka Bioscience Institute. In addition, 304 BAC library clones derived from the Chinese hamster ovary (CHO) cell, which is utilized for the production of proteins, have been deposited by Dr. Takeshi Omasa of the Institute of Science and Technology at the University of Tokushima. These BACs are to be used for the fluorescent in situ hybridization for chromosome identification for the quality control of the CHO cell.

By continuous support from the scientific community and efforts of our Division, genetic materials have been accumulated to a total of 3,807,779 items.

## (2) 遺伝子材料の保存・整備

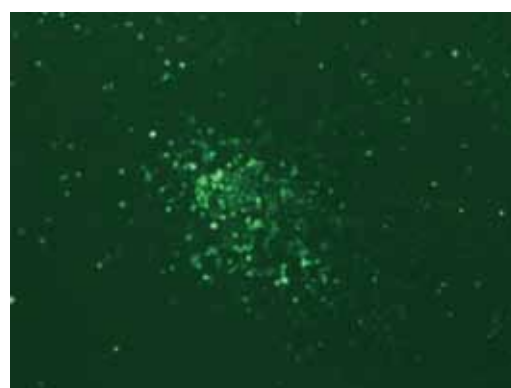
個々の研究者から収集した遺伝子材料は増殖性、制限酵素地図、塩基配列などの品質を確認した後、保存した。アデノウイルスについては力価測定、自律増殖可能アデノウイルスの存在否定試験等の品質管理を行い、超低温槽へ保存した。一方、クローンセット等の一括大量寄託されたリソースについては、一旦保存し、提供依頼が発生した後、依頼クローンについて上記の品質検査を行い提供することとしている。平成26年9月より、提供中のバイオリソースの利用および品質にかかわる不具合、付随情報の追加・修正、提供形態の変更等をウェブに表示し、収集時ならびに提供前に実施する品質検査項目をウェブに表示、検査結果をウェブカタログから公開している。収集したリソースには約10%に誤り（取違い、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10%が無駄に費やされていることを意味する。平成26年度は、寄託されたリソースの9%に誤りを検出し、不具合を持つリソースを排除もしくは是正して、真正なリソースを提供した。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

The genetic materials deposited by individual scientists are examined for their qualities 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 when request comes, the quality tests on the requested individual clone are performed before shipping. Since September 2014, announcements about corrections in usage, quality and relevant information have been posted in the web site. The items of quality control tests performed at deposition and before provision are shown in the web site and results of the quality control test of clones are also shown in the web catalog. In our experience, about 10% of collected clones have some errors such as mis-identification or wrong information. These errors reflect the fact that resources used in research community contain 10% of errors. This is problem not only in Japan but also in the world. In other words, more than 10% of time, effort and funds are wasted because of these defects. In this year, we detected errors in 9% of deposited resources. We provided authentic resources after correction of defects or deletion of resources with defects. Our Division provides materials with ensured reproducibility under rigorous quality control to improve the quality and efficiency of scientific researches.

## (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



増殖中のGFP発現組換えウイルス感染HEK293細胞蛍光像。隣接する細胞に感染しやすい為、ウイルス産生成功時はGFP陽性コロニーとして観察される。(図1)

Fluorescent microscopic view of HEK293 cells with proliferating recombinant adenovirus expressing GFP. Adenovirus tends to infect neighboring cells, thus observation of GFP positive colony is a sign of successful virus production. (Fig. 1).

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加藤誠志先生のヒト 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当開発室検索ページ <http://dna.brc.riken.jp/en/search.html> や、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) を介して検索することが可能である。これらの整備の結果、今年度の提供は、1,251 件、25 カ国、延べ 494 機関に達した。

### (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 is 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> and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) database. By these efforts, 1,251 items of genetic materials were distributed to 494 institutions in 25 countries in this fiscal year.

## 平成26年度の技術開発の成果 Development of Technology in 2014-2015

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が必要な中、理研バイオマス工学研究プログラム (BMEP) の支援の下、当センターの微生物材料開発室 (JCM) と共同で、木質バイオマスを分解する糖化酵素について、これまでに 11 種の生物に由来する 51 種類の酵素のプラスミドクローン 141 株を構築した。今年度は、シロアリの腸内共生微生物由来糖化酵素の

組換えタンパク質発現と酵素活性の評価を行った。さらに、アルカリ性域に至適 pH を持つ新規糖化酵素を得るため、好アルカリ性細菌より遺伝子単離を進めている。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>)。

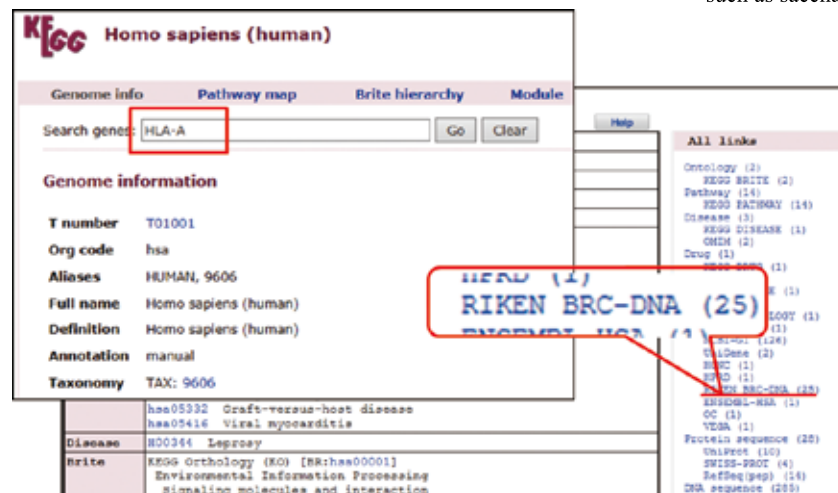
アデノウイルスベクター系は広範囲の宿主をターゲットとする効率の高い遺伝子導入法であるが、一方で組換えアデノウイルスの調製が難しいなどの技術上も難点がある。我々は世界で唯一のアデノウイルスベクターを提供しているバンクとして、初心者でもアデノウイルスを用いた実験を遂行できるようにプロトコルの充実とともに扱いやすいベクター系の開発を行っている。本年度は外来遺伝子挿入部位上流の loxP 配列の間に GFP 等をスタッフターとして挟んだ Cre-loxP 発現制御型ユニバーサルアデノウイルスベクターを開発した。このベクターより作られたウイルスは、増殖を蛍光モニターできかつ外来遺伝子の影響を受けずにウイルスを迅速に大量調製できる利点がある。現在我々は実際にこのウイルスベクターを用いて、遺伝子導入による心筋細胞の誘導の効率化を図っている。

今年度から、実験動物開発室と連携し、ゲノム編集技術 (CRISPR/Cas9 システム) を利用したノックアウトマウス作製を行った。これらのマウスは国際連携である IMPC (International Mouse Phenotyping Consortium) の一環として表現型解析を行い、提供される予定である。選定した遺伝子に対応する配列の設計とプラスミドクローンの構築を遺伝子材料開発室が担当し、ガイド RNA の受精卵への注入からノックアウトマウス作出までを実験動物開発室が担当した。本年度は 25 遺伝子分のプラスミドを構築した。

Needs and interests in the development of bioprocess for novel materials and energy production from plant biomass have been growing. We have constructed total 141 plasmid clones of 51 enzymes originated from 11 species for utilization in the bioprocess such as saccharification of plant biomass by the collaboration with

RIKEN BRC Microbe Division (Japan Collection of Microorganisms: JCM) funded by the RIKEN Biomass Engineering Program (BMEP). In this year, we analyzed expression and activity of recombinant saccharification enzymes of the intestinal symbiotic bacteria in termites. We are also collecting the genes for saccharification enzyme from alkaliphilic bacteria to obtain the enzymes that have the optimum pH in alkaline region. Associated information and technical comments for genetic materials are available from the web site of our Division (<http://dna.brc.riken.jp/en/biomass.html>).

Recombinant adenovirus can efficiently infect a wide range of cells, thus this system is one of the useful method for gene introduction. On



KEGGと当室リソースリストのリンクが、LinkDB に追加された。KEGGのデータを利用し、リソースにアクセスできる。(図 2)

The link between our resources and KEGG database are listed in the LinkDB. Our genetic resources can be searched in the KEGG (Fig. 2).



the other hand, some technical difficulties for obtaining infectious virus are problem. As the sole institution for adenovirus banking in the world, we are improving and providing protocols so that even beginners can access to adenoviral technology. In addition, we are developing a convenient vector system. The major topic of this year is the “Cre-loxP-dependent universal adenoviral vector system”. The vector has a gene coding fluorescent protein, as a stuffer, between two loxP sequences in the upstream of cloning site. The proliferation of this virus can be observed as fluorescence-positive cell. The vector helps to get high titer of virus in a short period without inhibitory effect of inserted gene product. Using this virus system, we are now trying to improve the efficiency of cardiomyocyte induction from fibroblast by gene introduction.

By the collaboration with the Experimental Animal Division, we are establishing knock out mice by the genome editing technology CRISPR/Cas9 system. These mice will be subjected to phenotypic analysis under the IMPC (International Mouse Phenotyping Consortium) and provided around the world. Our Division designs guide RNA sequences and constructs plasmid clones, and the Experimental Animal Division injects synthesized guide RNA to fertilized eggs and produces knock out mice. In this year, we constructed plasmid clones for 25 target genes.

## 平成26年度のトピックス Topics in 2014-2015

京都大学化学研究所の五斗進先生のご協力により、当室リソースと KEGG のリンクが LinkDB に追加された。これにより、様々な生命現象のパスウェイに関連付けされたヒト約 16,000 遺伝子、マウス約 11,000 遺伝子、分裂酵母約 5,000 遺伝子、好熱微生物 *Aeropyrum pernix* 約 400 遺伝子、*Sulfolobus tokodaii* 約 650 遺伝子のリソースや、相同遺伝子リソースが容易に検索できるようになった ([http://dna.brc.riken.jp/ja/kegg\\_pr140503](http://dna.brc.riken.jp/ja/kegg_pr140503))。

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に加え、英語ページの再構成を進めている。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ように改善された。

By the generous contribution by Dr. Susumu Goto of the Bioinformatics Center at the Institute for Chemical Research of the Kyoto University, link between our genetic resources and KEGG database are listed in the LinkDB. Genetic resource of 16,000 of human, 11,000 of mouse, 5,000 of fission yeast, 400 of *Aeropyrum pernix* and 650 of *Sulfolobus tokodaii* can be searched through the KEGG associated with pathways and orthologs. ([http://dna.brc.riken.jp/en/kegg\\_pr140503en.html](http://dna.brc.riken.jp/en/kegg_pr140503en.html)). We renewed our English as well as Japanese web pages to improve accessibility for 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.

## 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.

●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  
金藤 由希子 Yukiko KANETO

●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  
河島 明美 Akemi KAWASHIMA

