

# 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。

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 last few years. In the current life science research, the usage of the genetic materials based on the 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 contribute not only to the basic academic research but also the 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、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。

今年度は、急速に利用が進むゲノム編集技術用クローンの収集を精力的に進めた。大阪大学の伊川正人先生等のゲノム編集効率検証用プラスミドとKOマウス作製用ガイドRNA用ベクター、同大学の真下知土先生ならびに国立遺伝学研究所の吉見一人先生等のゲノム編集効率を向上させたCas9-poly(A)発現プラスミド、コーネル大学の久野悠先生、山梨大学の川原敦雄先生等のゼブラフィッシュ用ノックインマーカーを収集した。また、新しい技術リソースとして、生命システム研究センターの高井啓先生、岡田康志先生等の高光度発光タンパク質Nano-lanternを収集し、提供可能とし

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平成27年度末までに3,808,264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 have been collecting 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 their published papers 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.

We focused on resources for genome editing technology this year: plasmid clones testing genome editing efficiency and expressing guide RNA for establishing KO mice developed by Dr. Masato Ikawa of the Osaka University, an expression vector of Cas9-poly(A) with improved efficiency of the editing developed by Dr. Tomoji Mashimo of the Osaka University and Dr. Kazuhito Yoshimi of the National Institute of Genetics, a knock in marker for the zebrafish developed by Drs. Yu Hisano of the Cornell University and Atsuo Kawahara of the University of Yamanashi. In addition, as the novel technological resources, brighter luminescent proteins Nano-lantern were deposited by Drs Akira Takai and Yasushi Okada of the RIKEN QBiC.

By continuous support from the scientific community, genetic materials have been accumulated to a total of 3,808,264 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、付随情報の食い違い等)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27年度

は、検査した寄託リソース936のうち104のリソース(約11%)に誤りを検出した。誤りが見つかった71(約8%)のリソースについては是正を行い、提供を可能とした。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 as a package deposition, materials are stored first without quality tests. Only when request comes, the quality tests on the requested individual clone are performed. Since September 2014, we have posted in our web site the announcements about corrections in usage, quality and relevant information. 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 records, approximately 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 a 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 104 (11%) out of tested 936 deposited resources. We corrected 71 (8%) resources of these. Our Division provides materials with ensured reproducibility under rigorous quality control to contribute to the quality and efficiency of scientific researches. 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。

本年度は、国立遺伝学研究所の鐘巻将人先生が開発したタンパク質の分解による新規の発現制御法(オーキシンデグロン法)に使用するクローンであるpNHK60(RDB08468)、



図1. 組換えアデノウイルスの取扱いに関する技術研修

Figure 1. Lecture and demonstration course for handling recombinant adenovirus.

pMK106 (RDB08469)、pMK107 (RDB08470)の提供依頼が集中した。今年度の提供は、1,247件、22カ国、延べ480機関に達した。

### (3) Distribution of Genetic Materials

We have 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. Some of these 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> and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) database.

In this year, requests for pNHK60 (RDB08468), pMK106 (RDB08469) and pMK107 (RDB08470) developed by Dr. Masato Kanemaki of the National Institute of Genetics increased. These clones are useful for a novel regulation technology of protein expression by the Auxin degron method.

By these efforts, 1,247 items of genetic materials were distributed to 480 institutions in 22 countries in the year.

## 平成27年度の技術開発の成果 Development of Technology in 2015-2016

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とされている。理研の環境資源科学研究センター (CSRS) の連携の下、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12種の微生物に由来する74種類の酵素のプラスミドクローン187株を構

築した。今年度は、主にアルカリ性域で生育するシロアリ腸内共生生物 (*Paenibacillus* sp. strain JCM 10914) よりセルラーゼやヘミセルラーゼの新規糖化酵素遺伝子23種を単離取得し、発現ベクターの構築を進めた。得られた酵素遺伝子の大腸菌でのタンパク質発現確認と発現酵素の活性検討も進めている。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/ja/ja/biomass\\_resource](http://dna.brc.riken.jp/ja/ja/biomass_resource))。

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。また、アデノウイルス技術の応用系としてアデノウイルスを用いたCRISPR/Cas9による細胞内ゲノム編集系や、遺伝子導入による細胞分化誘導系の開発を行っている。

平成26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ている。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ている。平成28年3月末までに、48遺伝子を標的とする累計143株のガイドRNA発現用プラスミドを構築し、37遺伝子の欠失変異型ノックアウトマウスを樹立した。

Needs and interests in the development of bioprocess for novel materials and energy production from plant biomass have been growing. We have constructed total 187 plasmid clones of 74 enzymes originated from 12 microbes for utilization in the bioprocess such as saccharification of plant biomass by the collaboration with RIKEN BRC Microbe Division (Japan Collection of Microorganisms: JCM) and the RIKEN Center for

Sustainable Resource Science (CSRS). In this year, we mainly worked on collecting the genes for biomass engineering. Twenty three genes for enzymes, e.g. cellulases and hemicellulases were obtained from *Paenibacillus* sp. strain JCM 10914, intestinal symbiotic alkaliphilic bacteria in termites. We are also analyzing the gene expression using newly cloned enzyme genes on *E. coli* and assay the enzymatic activity of recombinant saccharification enzymes. These genes and associated information and technical comments are available from our web site (<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 transfer. On the other hand, certain technical difficulties for obtaining infectious virus are problemsome. As the unique institution for adenovirus banking in the world, we are improving and providing protocols so that even beginners can access to adenoviral technology. At the same time, we are developing a convenient vector system. In addition, we are developing new applications using adenovirus, including the CRISPR/Cas9 genome editing system and the induction of cell differentiation by introducing defined groups of genes.

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. At the end of March of 2016, we constructed 143 plasmid clones for 48 target genes and established knock out mice corresponding 37 genes.

## 平成27年度のトピックス Topics in 2015-2016

本年度は、「組換えアデノウイルスの取り扱い」について、ウイルスの取り扱い技術の基礎であるシャトルベクターの構築法、組換えウイルスの産生方法と精製法の実習を実施した。参加者は、国内大学、企業に所属する研究者、技術職員の他、英文のメールニュースにより研修を知り、参加することとなったタイ王国の大学から研究者である。今後とも、リソース関連情報の発信に努め、利用の拡大につなげていきたい。

We gave a lecture and demonstration course for handling recombinant adenovirus such as construction of shuttle vectors, production and purification of the recombinant adenovirus. Participants were from a university and companies in Japan and a university in Thailand, who is a subscriber of our English mail news. We will continue dispatching information in English and promote use of our resources by more researchers.

## 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]  
久次米 夕佳里 Yukari KUJIME  
栗原 千登勢 Chitose KURIHARA  
益崎 智子 Satoko MASUZAKI  
大久保 将人 Masato OKUBO  
酒寄 めぐみ Megumi SAKAYORI  
山崎 孝仁 Takahito YAMASAKI

---

- 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.

---

- 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]  
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  
木村 明子 Akiko KIMURA

