

平成 27 年度ナショナルバイオリソースプロジェクト 成果報告書（公開）

補助事業 代表機関管理者 (所属機関・氏名)	東京女子医科大学医学部 第二生理学教室 教授 三谷 昌平
補助事業課題名	線虫欠失変異体の収集・保存・提供

1. 補助事業の目的

東京女子医科大学医学部・第二生理学教室（三谷研究室）では、線虫ゲノム上にランダムな欠失変異を導入した凍結保存バンクを作成済みであり、そこから、任意の遺伝子の変異体を見つけ出して収集を行う技術に秀でている。凍結保存バンクは 140 万ゲノム以上を保有しており、2 万個程度あると言われる線虫遺伝子についてほぼ全てのものに数百ベース程度の欠失が入ったバンクとなっている。線虫欠失変異体は、線虫のゲノム情報によって知られている遺伝子構造から遺伝子機能を理解する上で不可欠のツールである。他の生物でも同様であるが、遺伝子機能を理解する最もオーソドックスな方法は、その機能を欠損させた場合と、過剰にした場合の表現型を調べ、それが既知の遺伝子機能とどのように関係するかを明らかにすることである。本リソースは、扱っている遺伝資源が欠失変異体であることから、基本的には、機能欠損個体を使用する最も有効なツールと言える。

第3期ナショナルバイオリソースプロジェクト平成27年度では引き続き（1）線虫研究者コミュニティのリクエストに応じて、保有する凍結バンクより欠失変異体を見つけ出して収集する。（2）混在する他の変異体を取り除くことで純化し、必要に応じてバランサ導入を行い、凍結保存を行う。

（3）研究者コミュニティの要望に従い、MTAを受け取ったストレインに関して、ユーザーより送付料を徴収し（課金作業は外部委託）、郵送により提供を行う。（4）これらの保存済みの変異体の品質管理を行い、得られた情報および提供によって得られた成果をインターネットを介して公表することなどによって、リソースの利用を促進し、かつ、広い意味でのライフサイエンスへの情報などの還元を行う。

2. 補助事業の概要

「変異体の収集」、「変異体の保存」、「変異体の提供」および「プロジェクトの総合的推進」を実施する。なお、変異体の保存の中には、遠隔地に液体窒素容器を保管することで、災害対策を行うことを含み、総合的推進の中には、「変異体の品質管理」、「バランサ導入」を含む。収集は、本申請機関で既に保有している、線虫全ゲノムをカバーする欠失変異体の凍結保存バンクとその一部の DNA を用いて、PCR 法によって、リクエストされた遺伝子の欠失を有する変異体株を同定し、解凍して純化して保存する。平成 24 年度より、「致死・不妊変異体のバランサ」という項目を実施している。この方法により、ユーザーの利便性が向上しているので、継続する（120 株／年度）。

従来は、変異体の品質管理として最も主要な作業は、欠失部位の塩基配列を調べた上で、ホモ接合体で増殖する株について、確実にその配列が除去されているかを新規のプライマーを設計して PCR 法等で行ってきた。この方法では個体毎にプライマーの設計や実験を行う必要がある。これに代わる方法として、ION Proton という新型シーケンサーを用いて全ゲノム配列を解読している。すなわち、ホモ接合体の目的の欠失部位の塩基配列が存在しなければ、組換え等で野生型配列が残っていて使用できない株をハイスループットで除外できる。さらに、我々の欠失変異体バンクの変異体は目的の遺伝子部分のみの PCR スクリーニングとシーケンスのみ行ってきたため、染色体の他の部分に side mutations が入っていても不明のままであったが、全ゲノムシーケンスで得られた情報を提供することで、研究者は戻し交配などを行う際に、効率良く研究が可能になるし、場合によっては、今まで見落としていた有用な変異体アリルを二次的に収集することが可能になる。解析中に、転座等の従来は発見できなかった染色体異常も見つけられることが判明し、これを使って品質の向上を行う。

平成 27 年度は、「変異体の収集」は、目標を第 3 期当初目標数に比して上方修正している（従来は 400 株／年度であったが、700 株／年度）。「変異体の保存」の新規分は収集数と同じであるが、過去の保存数（5,707 株）に加えることで、総保存数は 6,407 株とする。提供は、1,200 株／年度、バランサ導入は 120 株／年度を目標として実施した。「プロジェクトの総合的推進」としては、リソースの周知を目的として、国立遺伝学研究所の山崎研究室のご支援をいただき、線虫変異体データ

ベースを公開している。また、線虫研究者の統合データベース(WormBase;<http://www.wormbase.org>)にも同様のデータを送付している。線虫の変異体は約2割程度が致死あるいは不妊の表現型を呈するため、ホモ接合体で維持することができない。ヘテロ接合体で飼育すると、徐々に希釈されていき、変異体を失うことになる。そのため、蛍光標識したバランサー株との交配を行い(致死変異を持つ染色体とバランサー染色体を各々1本ずつもつ株を作成し)、再度保存している(年間120株を目標とする)。

3. 補助事業の成果(平成27年度)

(1) リソースの収集: 欠失変異体を700株収集することを目標とした。実際には、新規収集数は805株で、目標を達成することができた。

(2) リソースの保存: 新規保存目標数は700株としていた。実績は新規保存数は805株である。第1期からの総数は、6,988株となり、目標数(6,407株)を達成することができた。さらに、リソースのバックアップとして、広島県福山市の企業に液体窒素容器を保管してもらい、約1,000株の新規欠失変異体のバックアップを行った。

(3) リソースの提供: 欠失変異体を1,200株提供することを目標とした。提供実績は、1,689株であり、目標を達成することができた。

(4) プロジェクトの総合的推進: 上述のように次世代シーケンサーによる全ゲノムシーケンス法を行い、品質管理をすると同時に、新規変異体の収集も行ったことで、収集・保存数を増やすことができた。また、リソースの周知を目的として、平成27年の分子生物学会等での展示を行った。一方で、国立遺伝学研究所の山崎研究室のご支援をいただき、線虫変異体データベースを日本語と英語で公開している。本中核機関が実施している線虫欠失変異体は、基本的には線虫遺伝子のノックアウト株として使用されており、野生型と変異体の表現型の比較による遺伝子の機能を解明するために有用である。研究者は、中核機関より欠失変異体入手し、表現型解析を行い、科学論文を発表するという流れで貢献している。NBRPが提供する欠失変異体は我が国独自に収集したものであり、外国の一流研究者も日本政府の支援で実施されている本プロジェクトに対して高い評価をしていると思われる。