

2017年度 ナショナルバイオリソース事業「カタユウレイボヤ」運営委員会 議事録

日時：2017年5月24日（水） 13:00~15:30

場所：京都大学東京オフィス 大会議場 A

出席者：日下部岳広（甲南大学・委員長）、佐竹炎（公益財団法人サントリー生命科学財団 生物有機科学研究所）、稲葉一男（筑波大学）、成瀬清（国立基礎生物学研究所）、荻野肇（広島大学）、川本祥子（国立遺伝学研究所）、佐藤ゆたか（京都大学）、吉田学（東京大学）、荒武里衣（東京大学）、笹倉靖徳（筑波大学）、桑名良寿（ナショナルバイオリソースプロジェクト広報室）、笹土隆雄（日本医療研究開発機構）、落合雅子（日本医療研究開発機構）、鈴木隆弘（日本医療研究開発機構）

議題：

- ・運営委員会委員と委員長の承認と紹介
- ・第4期 NBRP 事業の紹介と進捗
- ・新料金設定について
- ・アンケートについて
- ・その他

議事録：

参加者の挨拶を行った。

笹倉委員より、運営委員会委員長として日下部岳広委員を推薦することが提案され、承認された。

笹倉委員より、第4期カタユウレイボヤ事業の説明があった。筑波大学は、トランスジェニックシステムの収集・保存。提供の各業務と、DNA コンストラクトの収集・保存・提供の各業務を執り行う。DNA コンストラクトに関する事業は第4期から新たに行う試みであること、目的はシステムを作製する際に利用された DNA を NBRP として収集しておいて所在を明らかにしておくこと、海外のように GMO の関係でシステムを提供しづらいところにもリソースを提供できるようにすることを目指すことであることが説明された。

アンケートを年度初めに取ることにした。システムは提供可能になるのに時間がかかるが、ユーザーはどうしても実験の直前で提供希望を入れてくる。このため、あらかじめユーザーにこちらから尋ねることで対応しようという目的がある。

収集系統についてもユーザーに意見を聞き参考にするが、これについては現実的に存在しない系統を挙げる例があるため、参考にする。

数値目標について、系統については毎年度 2 系統を収集するが、保存系統は 130 系統の維持であり系統の増加を目標にしていない。これは、ほぼ使われることがない系統が現実問題として存在するが、それらの系統は論文発表もされておらず、またその見込みもない上に、同等のものを再度形質転換により作製することが可能である。このため、使われない系統については NBRP での取り扱いを止めることを見据えている。また、飼育維持の過程で蛍光の発現が暗くなる系統が出てきており、これらのマーカー系統については同じベクターでより明るい蛍光発色を持った系統ができれば、そちらに交換することを検討している。これらの理由から、系統を収集しても増加しない可能性があるためである。

・成瀬：ホヤは凍結精子で保存できると聞いているが、その保存についてどれぐらい stable になっているのか？

・笹倉：凍結後、受精能を維持できるかどうかは系統に依存するという経験は今のところなく、むしろ凍結精子に持って行くまでのところ、特に精子を大量に持つかどうかは系統の強さ・弱さに依存するように感じている。例えば、弱い系統は成長が悪いため、精子を大量に持ちづらく、結果として凍結精子に持って行きづらい。

・成瀬：バイアルチューブは 1 本で保存しているのか？複数に分注して、受精能をチェックするなどの確認はしているか？

・笹倉：複数のチューブに分注して保存し、1 ヶ月以上経過して後に受精能力があるかどうかを確認している。

・成瀬、佐藤：系統をたたむ可能性があることが触れられたが、その際に凍結精子を取ってから飼育保存を止めてはどうか？

・笹倉：まず、挿入箇所が唯一無二の系統(エンハンサートラップや変異体など)については基本的に飼育維持を続ける。マーカー系統で、ベクターをゲノムに挿入させて系統化さえしてしまえば実験上問題ない系統が飼育維持を止める対象となる。その場合も原則としては、飼育保存を止める前に凍結精子を取っておくことにしている。但し、例えば弱い系統で凍結精子をとるだけに何年も失敗して

いる場合には、挿入箇所がかなりよくないことをしていると考えられるので、同等の別の系統を作った方が早いと考えることができ、凍結精子を取ることなく系統を取りやめる可能性はある。また、凍結精子のタンクのキャパシティをいたずらに増やすことは、液化窒素の価格を考えると下田では予算的にできない。このため、いずれは凍結精子保存においても系統を選別する事態が出てくる可能性がある。その理由もあり、系統数を減らす可能性を見据えた目標になっている。

・日下部：実際には、保存系統の目標数は130より増えることはあるのか？

・笹倉：凍結保存のみの系統も保有系統としてカウントするので、実際には増えると予想している。

・成瀬、笹土：スペースの問題に関して、クライオチューブだとスペースがかかる。キャピラリーがよいのではないか？非常にコンパクトである。

・笹倉：ホヤの凍結精子を媒精に利用する場合、精子液を短時間に海水に溶かす必要があり、そのテクニックがキャピラリーに応用できるかどうかを含め、検討したい。

・荻野：一旦たたんだ系統や、蛍光が暗くなった系統について、再度作ることはNBRPで出来るか？

・笹倉：NBRPでは系統の作製は出来ないため、その系統を必要とする研究者が作製し、それをNBRPへと寄託してもらう流れとなる。

・成瀬：継代飼育の過程で暗くなる系統があるということだが、それらの系統がまだ暗くなる前に凍らせたら、明るい蛍光発色が見られるか？実は植物の例で、凍結を介すると epigenetic な遺伝子のサイレンシングが解消されるという報告があり、凍結が何らかの刺激になっているのではないか？

・笹倉：暗くなってしまってから凍結を取ったにも関わらず、その凍結精子から新しく子孫を得ると明るく光った例があり、似たような現象がある可能性がある。

・桑名：暗くなるのは、レポーター遺伝子が失われるということかどうか？

・笹倉：そういうことではなく、レポーターは発現しており、またその発現パターンも変化がないが、単に暗くなる。Epigenetics 的な制御だろう。

・笹土：挿入は1カ所か？

・笹倉：系統を観察するタイミングに依存する。Founder から単離して早い段階では、複数挿入を持つ可能性はある。継代の過程で多くの挿入は落ちていき、シングルになるだろう。維持のときは明るく光る個体を選別することが普通であり、暗い挿入が誤って維持されてしまったということではないだろう。

・笹土：DNA コンストラクトについてだが、理研 BRC への寄託は検討されたか？また、このリソースと生き物リソースの間で相乗効果が出るだろうか？

・笹倉：議論を重ねたことであるが、コンストラクトのほとんどがホヤ研究者のみで利用されるものであるため、理研 BRC よりも本リソース事業で扱うのがふさわしいと考えている。相乗効果としては、系統とコンストラクトをセットにして利用するような実験システムの導入を検討しており、成功すればではあるが相乗効果が得られるだろう。

・日下部：海外からのリクエストについて、日下部：のところに分譲依頼が来ることがあるが、NBRP に回して良いか？

・笹倉：回答は2方向から可能である。まず、ホヤ研究の全ての DNA コンストラクトを網羅することは現実的に不可能であり、その規模では考えていない。NBRP で扱うのは系統と関連のあるコンストラクトに絞る予定である。このため、そのカテゴリーに該当しないベクターの分与については対応できない。逆に、系統と関連のある DNA コンストラクトについては是非とも回していただきたい。

・成瀬：ベクターとしてはどれぐらいの数があるか？

・笹倉：1年目の目標値は180の収集である。NBRP 情報サイトに既に集めている DNA コンストラクトのデータは277あるが、マニアックで NBRP リソースとしてふさわしくないものなどは収集対象から除去している。

・荻野：保存の130系統には、凍結保存のみの系統は含まれるのか？

・笹倉：含まれる。

・荻野：AMED の説明会などで、MTA の取り交わされた数で評価されるという意見が出ていたが、ユーザーの利便性を考慮すると同じリソースを提供する場合、MTA をその都度取り交わすようなことはしていない。結果として提供件数は多いが MTA transfer の回数は少なくなり、MTA ベースでの評価は実情に合わないように思う。評価を提供件数でしていただいてもよいか？

・笹土：提供件数など、評価項目は実情に合わせて判断してもらってよいと考えている。

・笹倉：ホヤも似たような状況にあり、例えば野生型は同一ユーザーに繰り返し送付するが、MTA は年度毎に 1 回のみ取り交わしている。このため、提供件数で評価をいただくのが実情に合っていると考えられる。なお、この年度毎の MTA 取り交わしは大学か何かの制約か？

・佐藤、吉田：野生型の MTA については、年度毎に 1 回は更新したほうがよいという指導が文科省からあった。年度毎に 1 回取り交わした後は、注文依頼に応じて (MTA なしに) 配布している。

笹倉委員より、野生型 (クローズドコロニー) に関する事業についての説明があった。実験に標準的に利用される野生型を配付していること、野生型はクローズドコロニーとして維持することで遺伝的バックグラウンドを均質に保ち、再現性の高い実験結果を出すことに役立っていること、クローズドコロニーは完全なものではなく、年に一度、日本の特定の場所 (宮城県女川と福島県小名浜) から野生集団個体を採取し、掛けあわせていること、クローズドコロニーの有するゲノム配列を解読し、ユーザーの実験に利する情報として提供すること、真夏には海中養殖個体が減るので、その対策として室内飼育と組み合わせた養殖法が進められておりうまく機能していること、が説明された。

佐藤委員より、2017 年度の野生型 (クローズドコロニー) に関する事業の進捗について説明があった。京都における事業体制の説明、今期から舞鶴水産試験所が協力機関として加わっていること、第 3 期までは提供目標数が 22000 匹であったが今年度からは 19000 匹になっていること、京都と東京からの過去 4 年分の提供実績と本年度 4 月と 5 月の比較、今年度はこれまでに 2217 匹を提供し

たが、4月がやや少なかったことが説明された。

引き続き吉田委員より、2017年度の野生型（クローズドコロニー）に関する事業の進捗について説明があった。第3期では年度あたり13000匹を目標にしていたが本年度からは15000が目標数になったこと、本年度はこれまで1419匹を提供したこと、女川と小名浜由来の個体群に性質の違いがあり、後者は前者と比較して夏場に強いと感じられること、が説明された。

・荻野：クローズドコロニーの維持について、どのようなスケジュールで行っているのか、またゲノム解読のタイミングなどはどのようなものか？（回答は下記のゲノム解読の説明を参照のこと）

・佐竹：小名浜など系統や血統による性質の違いについて、何か情報があると良いのだが。お送りいただいているホヤの出自や受精日時などの情報は訊ねたら入手可能か？また育てているホヤの実験結果（発生の善し悪しや、薬剤に対する応答性などについて）はホヤ個体間や季節などにより変化するように感じる。そのような基本的な情報について、ユーザー間でシェアするようなシステムがあるとよいのだが、可能だろうか？英語でそのような情報が公開されていれば、その部分を引用することで論文にも引きやすくなる。

・佐藤：現在、ホヤを送った際の水温やおおざっぱな状態についてはユーザーからフィードバックをもらうようにしている。この際に、例えば発生の善し悪しを連絡してくれるユーザーもいる。そのような情報を共有できるような、例えば掲示板のようなシステムを組めればよいが、導入すると義務のようにも捉えられることなど躊躇もある。慎重に検討したい。

・成瀬：特にホヤの研究に慣れていない新規参入の方は、その様な基本情報があると自分の実験がうまくやっている目安になるのでやりやすく、実験が持続するモチベーションにもなる。メダカにおいても同じように、発生率が良くないと感じていたがそれは **strain** の問題で自分たちの腕の問題ではないことが分かったことがあり、そのときには技術的な問題がないことが分かったこと自体は実験を進める上で非常に参考になった。

・吉田：三崎からのホヤの由来や受精日の情報はシャーレに書かれている。一方で季節による差については、なかなかパラメータの設定は難しいかもしれない。

・笹倉：発生については、例えばコリオン除去した時の発生率はシェアする価値はあるかもしれない。ただ、実験の時にいちいち定量はしておらず、習慣つけることは大変かもしれない。

・佐藤：確かに、発生の善し悪しは一目見たときの感覚的なもので行っていることが多い。

・佐竹：おそらくデータはきっちりしたものである必要は必ずしも無く、感覚的なものでよいだろう。

・成瀬：そのような基礎データの公開は、新しいユーザーを引き止めるためには必要かもしれない。

佐藤委員よりゲノム解読についての解説が行われた。野生集団からの新規個体は毎年度秋に 25～50 個体が採取されること、クローズドコロニー個体との掛け合わせは行うことも、掛け合わせをせずに新たに新規個体間で掛け合わせを行って集団を樹立することもあること、そのスケジュールに伴い、新しい個体のゲノム解析を秋に行い、半年ほど経過した春に、クローズドコロニーの個体のゲノムを解読して集団に維持されているゲノム配列を調べることで、得た情報は **Ghost** とリンクする形で、**Jbrowser** を用いて京都大学において公開することが説明された。

・成瀬：野生のカタユウレイボヤの地域集団間の遺伝的差異を調べた公開されたデータはあるか？

・佐藤：知る限りはほとんどないはずだ。

・笹倉：ゲノム解読は共同研究ベースということだが、第 4 期 NBRP の期間中継続できるだろうか？

・佐藤：今のところ継続する予定である。

・成瀬：永久には配列決定しなくても、5 年間のデータの蓄積から、各地域の集団がどのような遺伝的バックグラウンドを持つことを予測することは可能になるだろう。その後は、2～3 年に 1 回の解析で良さそうだ。

・笹倉：クローズドコロニーを毎年度総入れ替えするのか、掛け合わせにより血統を残すのかを決めておく必要があるのではないか？

・成瀬：クローズドコロニーでは深刻な問題が出たりするのか？

・佐藤、吉田：クローズドコロニーとして1年～2年維持すると、受精率の低下など深刻な問題が出てくることが多く、そのため掛け合わせをするときにはクローズドコロニーから良い親個体を抛出できないことがある。結果として、総入れ替えを基本とするのがよいと考えている。

・日下部：夏の室内飼育のシステムについて、餌はどうしているか？

・荒武：珪藻を購入して与えている。三崎ではそれ以外にテトラセルミスという緑藻も自家培養して与えている。また、珪藻の購入と質向上についての議論があった。

笹倉委員より、価格改定についての説明があった。まずDNAコンストラクトを扱う関係で、新しく価格を設定する必要がある。またそれに付随して、既に提供を進めている系統リソースにかかる消耗品についても、年数が経ったことがあり新たに見積もりを取り直して設定し直した。また、固定サンプルの提供を導入する可能性を考えておりその価格の設定、ゲノム編集の **genotyping** 依頼が来る可能性があるためその価格の設定、MTAにかかる手数料をこれまで含めていなかったためこれを設定、という改定を進めたい。今回配布した資料にさらなる変更が加わる可能性があるため、その事も含めて今回の委員会では方向性として承認をいただき、大学の関係者とも検討した後、最終案をメール会議で回すこととしたい旨が説明され、了承された。

・笹倉：MTAの送付料金については、野生型のほうでも検討してもよいかもと思われるがどうか？

・佐藤、吉田：価格設定の時に検討したときに、その送料はNBRPから出ておらず大学の予算から計上されているため設定しなかった。このためNBRPの価格に含めることは、各大学の事情をよく検討して慎重に進める方がよいだろう。

・笹倉：筑波大学の事務ともよく検討して、慎重に進めることとする。他のリソースではどうしているか？

・成瀬：メダカでは、MTA の作製に研究員がかなりの時間をかけており、そのためかなり高額になっている。

・笹倉：筑波の場合、書類作成はダウンロードしてユーザーが書き込んでこちらに送ることから始まっており、それを笹倉が確認するためその点では料金は発生しない。

・佐竹：DNA コンストラクトについて、prep をする価格を含めないのか？

・笹倉：既存の DNA 溶液から一部を取り分けて提供するため、現状ではその価格を含めることは考えていない。

・成瀬：将来的には、既存の DNA 溶液が無くなる可能性も十分あるので、その際に新たに価格を見直してはどうか？

・笹倉：提供依頼の様子を見つつ、DNA 溶液がなくなるような事態が現実的なものになってきた場合に、価格改定を検討したい。

・笹土：価格設定について、原則は赤字にならないように設定し、恒久的なリソース事業を目指すことが必要である。このため価格設定の範囲も見直されているため、その原則には注意を払っていただきたい。

・笹倉：現在の価格設定は、取るべきところは取っているものになっているが、その点は慎重に進めたい。

笹倉委員より、アンケート結果について説明があった。系統の収集希望については未だ存在しない系統がほとんどであり、実現可能性を慎重に検討する。講習会について、ゲノム編集の講習会の希望が多くあり、これについては行う方向で検討する。基本的な実験技術の講習会の希望も 3 割弱であり、これも検討しても良いかもしれない。野生型事業についての要望がいくつかあり、ほとんどは上で検討内容と重複するが、MTA の締結までが煩雑だという意見があった。

・笹倉：煩雑という意見を踏まえ、野生型の MTA について、ユーザーはどのような感想を持たれているか？

・日下部：確かに複雑なところはあるが、毎年度のことでもあり、慣れてしまえばそれほどではない。ただ、京都と東京とで書類が少し異なるのが複雑さを増やしているため、なんとかならないか？

・佐藤：・吉田：各大学の事情も含めて作成した書式なので、統一は難しいだろう。

・吉田：東大のほうにおいて、代表などが交代になったことで、書式の変更などをユーザーに依頼するような事態になったことが、そのような要望が出た一因であろう。逆に言えば、来年度からは大丈夫ではないだろうか。

・日下部：ほとんどの場合において、野生型の MTA は年度の開始時か前年度の終わり近くに締結しているが、年度の途中で新規参入されたユーザーの MTA はどうなっているのか？

・佐藤、吉田：その都度出してもらえばよい。但し、締結に 1 ヶ月程度かかるのでその点は注意しておいてもらいたい。

・成瀬：講習会について、プラクティカルコースが基礎生物学研究所で行うことが可能である。特にホヤは基生研に研究グループが居るので、やりやすいのではないか。

・笹倉：検討したい。ただゲノム編集の講習会については、材料の運搬などの問題があり、おそらく下田開催になるだろう。

・笹倉：次回の開催について、関西に近い委員が多いのでそちらでの開催を検討する。また時期はどのぐらいがよいだろうか？

・成瀬：おそらく年度末に近い頃、ある程度結果が固まってからがよいだろう。

(文責：日下部岳広)