

# NBRC における寄託時の問題点への取り組み —ファージと組換え体を例に—

藤田克利

独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NBRC)  
〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足 2-5-8

## Problems on deposition of biological resources in NBRC

Katsutoshi Fujita

Biological Resource Center (NBRC), National Institute of Technology and Evaluation  
2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818, Japan

### 1. はじめに

NITE Biological Resource Center (NBRC) は、我が国のバイオテクノロジー分野の産業界のニーズに対応した、微生物を中心とした生物遺伝資源とそれらの情報からなる知的基盤の整備のため、また、生物多様性条約 (CBD) に対応する BRC として財団法人発酵研究所 (IFO) が保有する株を継承し、千葉県のかずさアカデミアパーク内に平成 14 年に設立された。日本薬局方や日本工業規格 (JIS) などの公定試験で指定された株、分類学的基準株等の微生物を中心に収集 (寄託)・分譲している。設立から数年間は継承した約 15,000 株 (NBRC 番号 10 万番未満) がほとんどであったが、平成 26 年度末現在では、設立後受け入れた生物遺伝資源 (NBRC 番号 10 万番以降) が半数を占めるほどになった。

現在 NBRC が保有している生物遺伝資源の内訳は日本微生物資源学会誌第 31 巻 1 号の平成 26 年度事業報告 (保有株数) に掲載されているので参照していただきたい。本実績報告内の「その他」のカテゴリーに

分類されている生物遺伝資源を NBRC は他の BRC と比較しても多く所有していることがわかる。これはヒト関連 cDNA クローンで、NBRC 保有生物遺伝資源の合計数 128,975 株のうち、実に 98,966 株 (約 8 割) を占めており、NBRC 番号とは別の番号で管理されている。これらの株は実績表の括弧内の数字と同数であることからわかるように、遺伝子組換え体であり、cDNA クローンの一次保存容器として大腸菌を使用している。この多量のクローンは新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の各プロジェクト成果産物として NBRC に寄託された物であり、プロジェクト毎に 4 種類に分けられる (表 1)。筆者はこれらのクローンを担当しており、またバクテリアに感染するウイルスであるバクテリオファージ (ファージ) も担当している。これらの生物遺伝資源は他の菌株と性質が異なるために若干手続きが異なる点がある。そのため前半は NBRC の生物遺伝資源の寄託受け入れ手順と品質確認の一般的な流れを説明し、後半はファージとその他のヒト関連 cDNA クローンの寄託時や品質確

表 1 ヒト関連 cDNA クローン内訳

クローンの種類	由来 NEDO-PJ	クローン数
ヒト完全長 cDNA クローン	完全長 cDNA 構造解析プロジェクト	30,300
ヒト Splicing-variant cDNA クローン	タンパク質機能解析・活用プロジェクト	25,099
ヒト Gateway エントリークローン	タンパク質機能解析・活用プロジェクト	43,417
ヒト糖鎖 Gateway エントリークローン	糖鎖遺伝子ライブラリ作製プロジェクト	150
合計		98,966

保の問題点について述べたい。

## 2. 生物遺伝資源の寄託受け入れ手順と問題点

NBRCにおける生物遺伝資源の寄託受け入れの手順については、過去に第14回日本微生物資源学会大会に「微生物材料の受入から配付まで、特に『同定・信頼性・安全性』の確保について」というテーマで開催された実務担当者会議にて紹介され、本誌でも説明している(川崎, 2008)。今回、前回の説明以降に品質確認のために加わった手順を含めて再度説明したい。寄託の際に気をつける品質としては、生物遺伝資源自体の品質と関連する情報の品質がある。生物遺伝資源自体の品質として問題となる点は、別種の入れ替わりやコンタミネーション、成育不良、遺伝子組換え体であるのにも関わらず、通常の菌株として送られてくる等が挙げられる。また、関連情報の品質としては、分子情報(16S rRNA 遺伝子配列など)の精度、寄託に必要な原産国の書類等の不備、地理情報の不足、遺伝子組換えの情報不足・未提供等が挙げられる。NBRCではこれら2種類の品質に対して寄託を受け入れる前から留意するよう心がけている。

寄託者との対応は基本的に各生物遺伝資源担当者が実施しており、受け入れ予定の生物遺伝資源が複数の担当に分かれる場合には、代表者一名が窓口となって対応する。寄託受け入れ可能か判断するために、先ず原産国・採取時期・学名を確認している。NBRCの寄託の8割は国内からだが、海外産の生物遺伝資源を国内から寄託する場合があるので、国内からの寄託の場合でも同様に確認する必要がある。海外産の場合は、採取時期がCBD発効後であるかを確認することが重要である。CBD発効後に採集した場合、原産国以外の出身もしくは所属の研究者が寄託の打診をしてきた場合は、原産国の許可を得ているか確認している。文書による許可が無い場合は、原産国のBRCに一度寄託してもらい、そこから送ってもらう場合もある。また、原産国の研究者であっても名古屋議定書(NP)が発効している現在では注意が必要である。NPに関する国内法が整備されていないか、もし整備されている場合は、その法に則った手順を踏んだ寄託なのか事前に確認することが必要である。国内法が整備されているインドから事前の連絡もなく送られてきた生物遺伝資源が、国内での手続きを経ないことが判明し、寄託者の同意の上で廃棄している事例が生じている。CBD以外に注意すべきは日本の国内法である。生物遺伝資源名や関連情報から植物防疫法、家畜伝染病予

防法、及び、カルタヘナ法により制限されていないか事前に確認し、場合によっては必要な手続きをとり輸入する必要がある。このような受領までの事前対応は各担当者の負担となっている。

事前のやりとりの末、晴れてNBRCに到着した生物遺伝資源の状態を確認し、培養を実施する。並行してDBに情報を入力し、受け入れ事務手続きに入る(図1)。手続きの際に添付された情報を総合的に判断し、最終的に受け入れ可能か判断する。この時点で書類の不足等が見つければ、各担当者が寄託者に速やかに連絡して対応することになる。またDBに入力した情報の入力ミスや情報不足等を排除するために、複数人でデータのチェックを行っており、この時点でも情報の不足があれば各担当者が寄託者に確認している。このような手順を踏み、できるだけ情報の品質を高めるように取り組んでいる。生物遺伝資源自体の品質の確保について、事例としてバクテリアについて述べる(図2)。受領直後の培養で生育不良やコンタミネーションが判明した場合は、寄託者に連絡し対応してもらい、培養が問題無ければ、MALDI TOF-MSのデータを取得する。MALDI TOF-MSメーカーが作製したライブラリーに同種のデータが既に登録されている場合は、学名の確認がこの段階でも可能だが、ライブラリーに登録されていない場合には新規データとして登録し、内部での品質確認に用いる。バクテリアでは約1,700株のNBRC株をライブラリーに登録している(平成27年10月末現在)。次に16S rRNA 遺伝子配列を決定し、寄託者から提供を受けた配列と照らし合わせ、学名が間違っていないか、コンタミネーションや別種と入れ替わっていないかを確認する。ただし、提供を受けた配列の精度(品質)が低い場合やゲノム上に複数のタイプの16S rRNA 遺伝子が存在する場合は配列が一致しないため、寄託者に確認する必要がある。学名に問題が無ければ、永久保存標品として凍結保存品を作製し、次にL-乾燥標品などの分譲用標品を作製する。標品の品質確認において、生残性とMALDI TOF-MSによる株の同一性(コンタミネーション・菌株の取り違いが無い)を検査し、合格したものをシート標品と分譲標品として保存している。以前は分譲標品作製後の同一性確認に16S rRNA 遺伝子配列の確認を実施していたが、MALDI TOF-MSの導入により品質確認の時間を大幅に削減できている。菌株に問題がある場合は、そのほとんどが最初のMALDI TOF-MSや遺伝子配列の確認で判明しており、分譲用標品作製時での問題は保存時の生残性がほとんどで

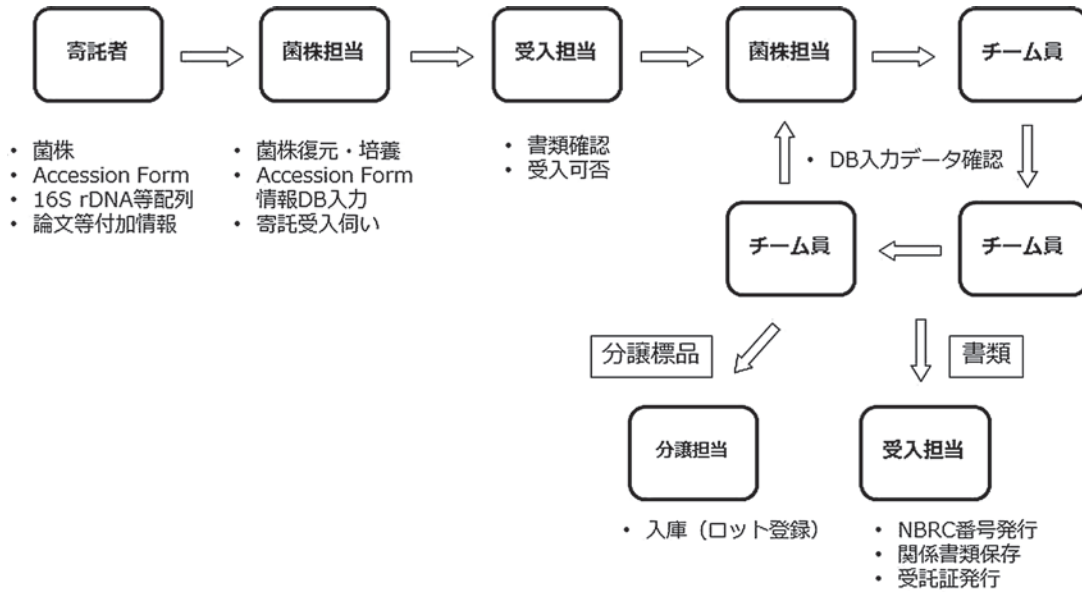


図1 NBRCにおける菌株寄託受け入れの流れ—一般寄託受入株—

受領した菌株の復元・培養を行い、並行して菌株情報をDBに仮登録し、受け入れ続きを進める。菌株担当チーム内で修正が無くなるまで菌株情報を確認する。複数箇所でも菌株情報を確認することで、精度の高い菌株情報にしている。

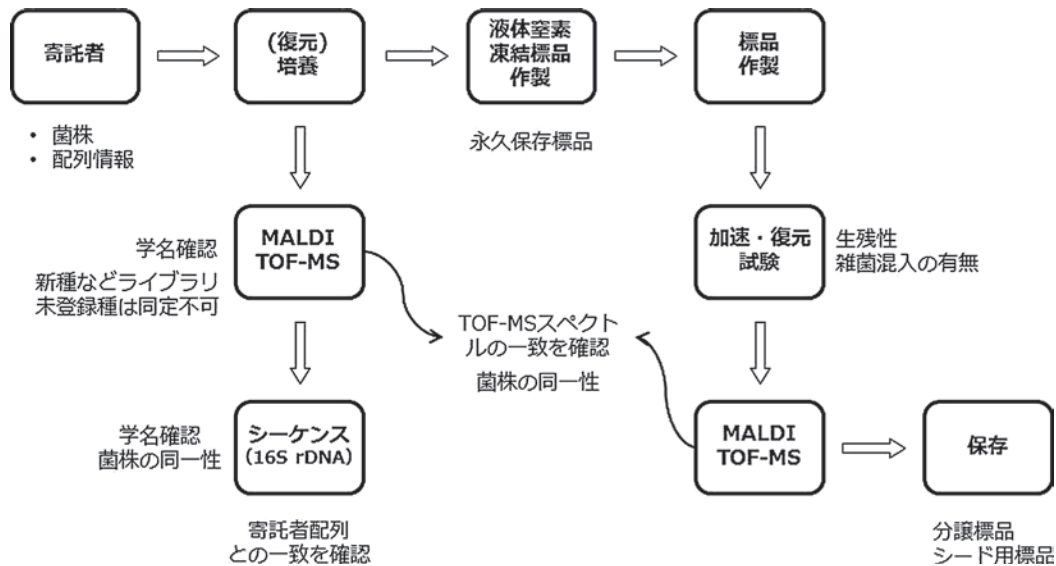


図2 NBRCにおける菌株保存・品質管理の流れ—新規受入株（バクテリア）—

受領直後に培養した菌株をMALDI TOF-MSとシーケンスで解析し、寄託された菌株の学名を確認する。問題の株の多くがこの段階で見つかる。問題無い株から最初に得たMALDI TOF-MSデータをライブラリー化し、分譲用標品作製後や補充で作製した分譲用標品との株の同一性確認に使用する。

ある。どれだけ迅速に最初の解析を行い、問題ある株を見つけられるかがNBRC株としての品質を保つのに肝要となっている。

NBRC開所からこれまで、様々な問題に直面し対応してきた経験を活かして、現在の寄託受付や品質管

理の流れを構築してきている。菌株のコンタミネーションや別種の入替わりについては、できるだけ早期に見つけ寄託者に対応をお願いすることが重要である。寄託株の確認のために寄託者に16S rRNA遺伝子配列などの分子情報の提供をお願いしているが、遺

伝子組換え体の場合は、カルタヘナ法で定められた拡散防止措置がとれるように、核酸供与体・供与核酸・作製方法・宿主情報等も提供してもらっている。成育不良については担当者が寄託者と連絡を密にし、培地の検討や菌株の再送付などで対応している。また海外からの寄託の場合、問題の対応に時間がかかる場合が多く、解決せずに寄託を受けられないこともある。

### 3. ファージの問題点

ファージを含むウイルスは、宿主、ゲノムを構成する核酸の種類と形態（膜を含む）で分類される。International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) 2011: 9th Reportで報告されたファージの分類を表2に示した。ファージは3つの科(*Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*)が1つの目(*Caudovirales*)にまとめられているが、その他の科については目が決められていない。ウイルスはゲノムを構成する配列の多様性が大きいと、同じ科であっても共通プライマーの設計が難しく、菌株のような16S rRNA 遺伝子などの統一された分子情報での分類体系の整備が困難である。*Leviviridae* 科では共通のプライマーが報告されているが (Vinjé *et al.*, 2004), RNA ウィルスのため、先ずRNAをDNAに逆転写する反応が必要となる。また全長ゲノム塩基配列を決定できた場合でも相同性検索により既存のファージの配列に似ていれば科の判定に使える場合もあるが、全く似ていない場合もあり、分子情報だけでは分類できないのが現状である。NBRCに寄託されたファージを幾つかドラフトゲノム解析しているが、BLASTにより相同性が高いファージが見つからない場合や、分類的には unclassified であるファージにのみ相同性が高い場合もある。以上のことから寄託の際に分類情報が不足し

ていることがあるが、ファージはバクテリアのみに感染するため作業者の安全性に問題はなく、作業時のバイオセーフティレベルは分類が容易な宿主のレベルに合わせれば良い。ただし、宿主に病原性を付与することが明らかな場合は注意が必要である。また全長ゲノム配列等の分子情報が寄託時に提供されれば、バクテリア同様の品質管理が行えるが、無い場合が多い。その場合は感染宿主の範囲、プラークの形状などで行うしかない。MALDI TOF-MSについても事例が少なく、品質管理には使用していない。分譲標品の補充時に寄託受入れ時や前ロット株との同一性を確認する手段としては、独自にゲノムの全長もしくは部分配列を取得する以外なく、NBRCではゲノムDNAの制限酵素パターンで同一性確認をできないか検討を進めている。

### 4. ヒト関連 cDNA クローンの問題点

NEDO 受託事業などの国家プロジェクトで cDNA クローン等の生物遺伝資源が多量に作製・整備されてきた。プロジェクト終了後に国家予算を投入した貴重な生物遺伝資源の散逸を防ぐためにもできるだけBRCが保存すべきで、NBRCやNBRPに参加している各BRCなどで保存されてきている。ただし多量な遺伝子組換え体の品質確認には相当な期間と予算が必要となるため、寄託受け入れ時に実施するのは現実的ではない。そのためNBRCでは先ず受け入れ手続きを完了し、保存まで完了している。品質確認は二重保管のためのバックアップコピーを作製する際や依頼時等に実施しており、問題のあるクローンが見つかった場合の対応は、その都度対処療法的に実施することになる。ヒト完全長 cDNA クローンに関しては、一般寄託されたクローンをセット販売している。その準備のために約3万個のクローンの品質確認が必要とな

表2 バクテリオファージの分類 (ICTV 2011: 9th Report より抜粋)

核酸の種類	形態	目	科	種の例
Linear dsDNA	Non-enveloped, contractile tail	<i>Caudovirales</i>	<i>Myoviridae</i>	<i>Enterobacteria phage T4</i>
	Non-enveloped, long non-contractile tail		<i>Siphoviridae</i>	<i>Enterobacteria phage lambda</i>
	Non-enveloped, short non-contractile tail		<i>Podoviridae</i>	<i>Enterobacteria phage T7</i>
	Non-enveloped, isometric		<i>Tectiviridae</i>	<i>Enterobacteria phage PRD1</i>
Circular dsDNA	Non-enveloped, isometric	<i>Corticoviridae</i>	<i>Pseudoalteromonas phage PM2</i>	
	Enveloped, pleomorphic	<i>Plasmaviridae</i>	<i>Acholeplasma phage L2</i>	
Circular ssDNA	Non-enveloped, isometric	<i>Microviridae</i>	<i>Enterobacteria phage phiX174</i>	
	Non-enveloped, filamentous	<i>Inoviridae</i>	<i>Enterobacteria phage M13</i>	
Segmented dsRNA	Enveloped, spherical	<i>Cystoviridae</i>	<i>Pseudomonas phage phi6</i>	
Liner ssRNA	Non-enveloped, isometric	<i>Leviviridae</i>	<i>Enterobacteria phage MS2</i>	

り、クローンの増幅、DNA 精製とシーケンスによる末端配列の確認を実施した。シーケンスデータを解析したところ 1/30 にあたる約 1,000 クローンにおいて、別のクローンがコンタミネーションしていることが判明し、純化・保存作業が終了するまでに約 2 年を要した。個別の依頼時には末端配列のシーケンス確認に加えて、制限酵素パターンの確認を品質確認に採用している。制限酵素パターンにより二重にクローンの同一性を確認でき、IS 配列がクローンに挿入していることが判明したケースもある。クローンは通常大腸菌 K-12 株由来の IS 挿入が起こりにくい株に形質転換され保存されているが、非常に低い確率ではあるが IS が挿入することがあるようだ。ヒト関連 cDNA クローンで使用している K-12 株由来の 2 種類の株 (DH10B, DH5alpha) で共に IS の挿入が確認されたことから、株ではなくクローンの配列によると考えられる。IS が挿入したものと完全に置き換わっていた場合は依頼者に説明し、用途に問題ない場合に分譲している。IS 挿入も含めて、クローンが不安定な場合には、別の K-12 由来株に切り替える必要がある。NBRC では複数の株を試した結果、上記 2 株以外では JM109 株を使用しており、不安定なクローンを維持できている。また末端配列確認において、DDBJ 登録配列と異なる場合もあるが、プロジェクト解散後の現在では、当時のシーケンスデータを入手することは不可能なため、その違いがクローンの保存や増幅中に起こった変異によるものか、当時のシーケンス精度により登録配列に間違いがあるのか判断できない。そのため IS 挿入と同様に依頼者に説明した上でクローンを提供している。またクローンの全長配列を確認していないため、他にも異なる箇所がある可能性は否定できない。ここ 1, 2 年のうち、クローンの配列が登録配列と異なった場合の保証はあるのかという問い合わせを数件受け

ているが、上述のように判断できないこと、また全長配列の確認はしていないことを説明し理解していただけるように努めている。別のクローンと置き換わっていた場合には、現在は寄託者と密に連絡して対応しているが、今後寄託者の異動や退官等で対応が困難になることが想定される。

## 5. おわりに

NBRC が IFO から菌株を継承してから 13 年余りが経過し、この間に生物遺伝資源に関連する質を含む様々な問題に直面してきた。その度に受け入れ体制や品質確認手順の見直し等を行ってきたが、未だ改良すべき点はあり、他の BRC 機関を参考に更により良いものとしていきたいと考えている。NP に基づいて対応しなければならない生物遺伝資源の寄託が今後増えることが想定されるが、NBRC では寄託制度や寄託同意書の文言を含めて見直していく予定である。生物遺伝資源自体の質だけでなく、NP に批准した国内法の動向など情報の質が NP に対応できるかの鍵となってくるため、NBRC の国際関係の部署と綿密に連携して対応していきたい。

## 文献

- Vinjé, J., Oudejans, S.J., Stewart, J.R., Sobsey, M.D. & Long S.C. 2004. Molecular detection and genotyping of male-specific coliphages by reverse transcription-PCR and reverse line blot hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5996-6004.
- 川崎浩子 2008. 生物遺伝資源の安全な取り扱いに関する NBRC の取り組み. *日本微生物資源学会誌* **24**: 137-141.