

Medaka TILLINGの概要

Medaka TILLINGとは？

TILLINGとは、自分の興味のある遺伝子の変異体を取得するための方法です。

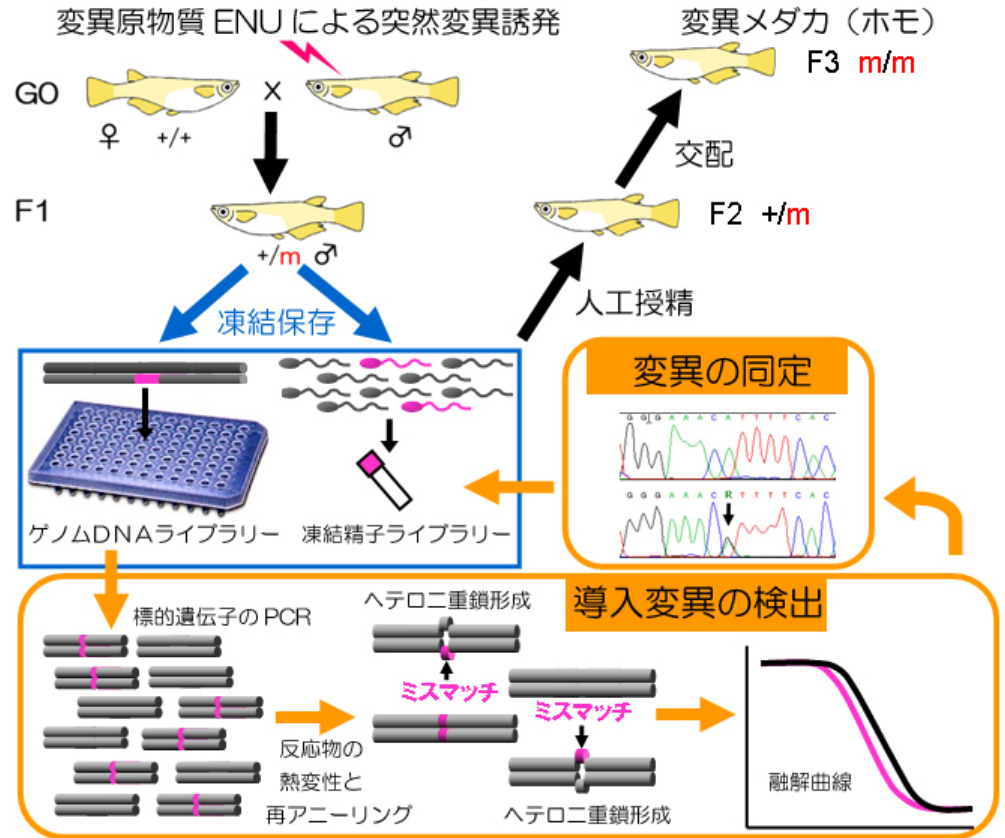
この目的のために、基生研では後述するようにさまざまな遺伝子に変異しているメダカライブラリーを保管しています。研究者はNBRPで自らこのライブラリーをスクリーニングして、目的の変異体を見つけます。変異は点変異なので、早期終止コドンによる完全破壊体になることも、アミノ酸置換体になることもあります。

(ライブラリーの説明やスクリーニング法などの詳細は後述していますので参照して下さい。)

費用と期待値

初めての方なら、原則2人1組、所要5日間@基生研、費用は、消耗品費18万円、プラス宿泊費・旅費となり、500bpの領域の変異探索を行って、アミノ酸置換変異体が約5つ、30%の確率でヌル変異体(KOメダカ)が取得できます。

TILLING 法による変異メダカ作製手順 Targeting Induced Local Lesion IN Genome (TILLING)

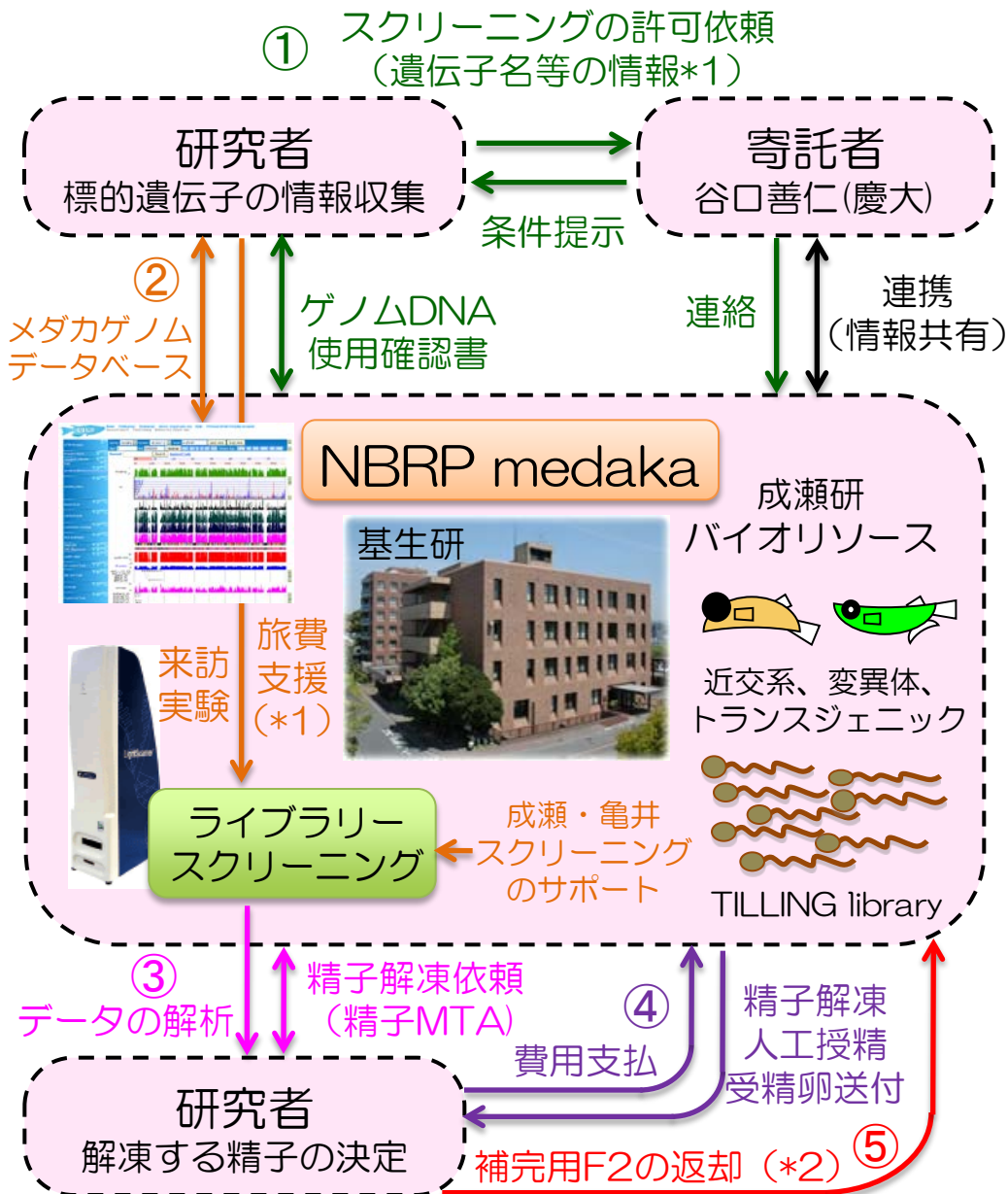


Modified from Dr. Deguchi's Home Page

ライブラリーの規模 (質)

凍結精子・ゲノムDNA=5760 F1分 (96穴プレート60枚)
 変異導入率=1変異/60bp (個体あたり 1/350kb)
 1.5kbのコード領域に約25変異相当 (ナンセンスは1/25)

TILLING変異体を得る方法



どうすれば変異体を手にできるか？

基生研で研究者自身がスクリーニングします

Step ① (緑色)

TILLINGライブラリーは、谷口善仁博士(慶應義塾大学)より寄託されています。まずはスクリーニングしたい旨を谷口博士に連絡し、許可を得てください。その際は遺伝子名を伝えて下さい(*1: 谷口・亀井・成瀬以外には許可なく公表しません)。許可されましたら基生研成瀬までご一報下さい。ゲノムDNA使用に関する確認書を作成します。

Step ② (橙色)

基生研亀井とスクリーニング計画を立てて下さい(メール等)。メダカゲノムのエクソン/イントロン構造と配列等が必要になります。計画に従って基生研でHRM法でのスクリーニングを行って頂きます>(*2: 事前に基生研の「個別共同利用申請」がある場合は旅費の支給が可能です。)成瀬研・亀井研が技術的サポートを致します。ライブラリー、消耗品、機器は基生研にセットアップされていますので、プライマーのみを持参下さい。

Step ③ (桃色)

HRM法では変異を含む候補を絞り込み、変異自体はシーケンシングで確認します。変異が同定され、それが表現型の変化をもたらすと予想できるものは精子解凍を依頼し、精子供与MTAを締結します。

Step ④ (紫色)

人工授精卵を送付します。支払方法を基生研成瀬と相談の上、発生した費用をお支払い下さい。

Step ⑤ (赤色)

凍結精子ライブラリーは有限ですので、補完の為にF2雄5匹を返却して頂き、NBRPでバックアップ用精子凍結を行います(*2)。

Medaka TILLINGの詳細 1：ライブラリー

Medaka TILLINGライブラリーに関して

ERATO/SORST近藤プロジェクト（1998-2003/2003-2007）ではメダカの順遺伝学による大規模変異体スクリーニングが行われ、多くの変異体が採られました。2004-2006にかけて、武田研・藤堂研（京都大学）は、近藤プロジェクトの大規模ミュータジェネシス技術を生かし、逆遺伝学的アプローチであるMedaka TILLINGライブラリーを作製しました（[文献1](#)）。このライブラリーが現在NBRPに寄託されています。

ライブラリーは「Cab」系統の102匹の雄にENU処理（1週間毎に3回）を行い、1ヵ月のインターバル後に生存した雄（87匹）と、野生型雌と交配して得られたF1卵を26,224個を3-5ヵ月かけて性成熟させたF1雄5760匹を元にした、F1精子凍結と、そのゲノムDNAからなります。

ライブラリーの質（変異導入率）を検証するために特定遺伝子座交配試験を行い、高頻度変異導入を確認しました。実際のスクリーニング「Direct Sequencing法」

（[文献1](#)）、「TGCE法(temperature gradient capillary electrophoresis)」、「HRM法 (high-resolution melting curve analysis)」（[文献2](#)）を通じて、変異導入率がおよそ1/360kbであることも確認しました。これは1匹のF1魚のゲノム360kbの中に1つの点突然変異が入っている＝ライブラリー全体（5760個体分）では約60bpに1つの変異ということです。これは1.5kbのコード領域について、全ライブラリー（5760個体分）をスクリーニングしたとすると、24個の点突然変異が見つかることを意味します。ランダム変異が24個あれば確率的には1つのナンセンス変異を含みます。

ライブラリーのバックアップに関して

Medaka TILLINGライブラリーは1F1当たり6本の凍結精子キャピラリーを、3本で1チューブの状態で保管しています。1セット（5760チューブ）がNBRPに寄託され、もう1セットは大阪大学藤堂研究室で保管されています。天災・事故等で失われた際のバックアップの意味もあります。

凍結精子を解凍した場合は、そのバックアップの為に、人工授精で得られたF2の雄5匹を凍結保存しています。F2雄5匹のバックアップは、F1に含まれる変異を約97%補完するものです。従って、基生研NBRPでスクリーニングを行い、凍結精子を解凍し、人工授精卵を受け取った場合は、各ID毎に飼育し、生育後に雄5匹（最低1匹は該当する遺伝子変異を含むヘテロ個体）を責任を持ってNBRPに返却して頂きます。精子凍結はNBRPが行います。

また、実際のスクリーニングはゲノムDNAを使用しますが、およそ1万回PCRできる量しかありません。無駄に使用すること無く、コンタミネーションさせないよう取り扱いにも十分注意して下さい。

ライブラリーの使用許可に関して

寄託されているライブラリーを使用したスクリーニングを開始するにあたっては、慶應義塾大学の谷口善仁博士に許可を得て下さい。〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学教室 03-5363-3758、taniguchi[at]a8.keio.jp

（青字は「用語解説」のページを参照下さい。）

Medaka TILLINGの詳細 2：スクリーニング

スクリーニングの実際

基礎生物学研究所におけるメダカTILLINGライブラリーのスクリーニング法は、HRM法 (high-resolution melting curve analysis)です (文献2)。ゲノムDNAライブラリーを標的遺伝子増幅用プライマーでPCRし、最後に変性/再結合反応 (加温/冷却) を行います。変異が含まれる場合はヘテロデュプレックスが形成されますので、その後、温度を上昇させると、変異を含まない大多数に対して変異を含むIDが先に解離を始めます。蛍光インターカレーターを使って融解温度曲線を測定し解析します。先に (低温で) 融解するIDを変異導入候補として次のステップに進みます。

融解温度曲線解析は、HRM専用機Lightscannerと、専用ソフトを使用します。プライマーデザインも同ソフトを使用します。蛍光特性、PCR条件等様々な関係で、96穴プレートや、ポリメラーゼ等も検討したものを使用して頂きます。スクリーニングシステムは上記解析装置ならびに、サーマルサイクラー (現在7台使用可能) からなるので、研究者自らが基生研でPCRと融解温度曲線解析をして頂かねばなりません。(各研究室に相当の装置がある場合は別途ご相談下さい。)

PCR時間は60~90分です。プレミックス調製、分注時間も考慮し、さらに解析時間も考慮した場合、サーマルサイクラー6~8台を使用し、人員2名で行うと、通常1アンプリコンを60枚 (5760ID) スクリーニングするのに3日ほど掛ります。条件検討、一部配列の解析などを行うことを考慮するとちょうど5日間が一つの目安です。

スクリーニングの流れとサポート体制

基本的には2名で来所し、作業を分担して行います。

○プライマーデザイン

基生研光学解析室亀井とメールによるやりとりで事前にデザインに関して打合せ、各研究者がプライマーを設計・発注をします。

○PCR条件検討

各研究者がある程度PCR条件の検討を行います。ただし、実際に来所して行うPCRは特殊な条件 (インターカレーターやオイルが入っています) ですので、来所時にまず確認の条件検討を行います。これは通常半日で完了します。基生研バイオリソース原がサポート致します。

○PCRとHRM解析 (本スクリーニング)

溶液調製、分注作業、HRM測定・解析は各自が行います。トラブルシューティングには亀井・原がサポート致します。

○2次スクリーニングとシーケンシング

通常は本スクリーニングで得られた候補のシーケンシングを行い、導入変異を同定します。これは基生研で行うことも可能ですし、研究室にお帰りになってから各自行って頂いても結構です。融解曲線が複雑な場合は2次スクリーニングを行う場合もあります。

変異同定の後

シーケンシングで変異を同定し、[有益な変異](#)があった場合はそれを起こします（次ページに詳細なフロー）。

ライブラリーは有限で貴重なコミュニティの資源です。必要以上の依頼は避けて下さい。ただし、同じ変異を複数のIDから得られた場合は、「すでに過去に人工授精を行ったことがあるID」を起こせば、F1凍結精子を解凍する必要がないことがあります。このような場合は「亀井」までご一報下さい。また、[F2雄成魚の返却の義務](#)もありますので、各自が安全に飼育できる許容範囲内の依頼をお願いします。人工授精が完了したら通常は[F2受精卵](#)を送付致します。

費用に関して

○消耗品等費用

スクリーニングに掛った費用は各研究者に「実費」をお支払い願います。1アンプリコン当たりの通常のスクリーニング費用はおよそ[18万円](#)です。これに加えて、変異確認用のシーケンシング費用や、人工授精費用などが別途必要です（各項目の単価は用語解説を参照）。

○来所費用（旅費・宿泊費）

来所費用に関しましては、事前に[基礎生物学研究所の共同利用研究（個別共同研究）申請](#)をし、採択されますと、支給することが可能です。例年12月ごろに公募しますが、年度途中の随時申請も受け付けます。審査には2カ月ほど掛りますので早めに申請して下さい。院生・学部学生の来所費用も支給可能です。

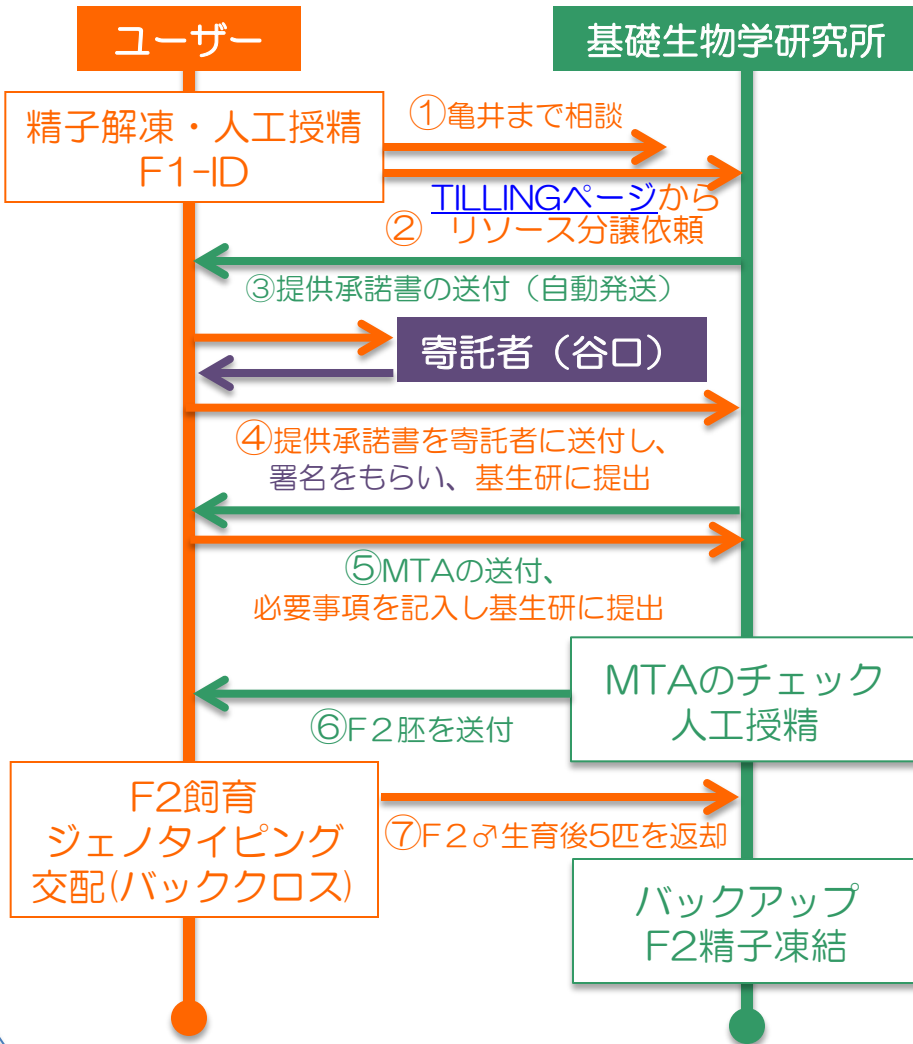
F2受精卵を受け取った後

ランダムミュタジェネシスした変異体ライブラリーからスクリーニングしていますので、F2でも相当数の[バックグラウンドの変異](#)（標的遺伝子の変異以外）が入っています。1回の野生型との交配でバックグラウンドは半分になります。通常さらに2回以上の野生型との交配（戻し交配）を行って下さい。標的遺伝子以外の変異は確率に従って除去されていきますが、性染色体を野生型へ置き換えたり、（致死遺伝子でないのに）胚性致死となる個体を取り除くことにより積極的に不要な変異を除くことが可能です。

[F2が育ったら必ず雄5匹を返却下さい](#)。最低1匹は標的遺伝子のヘテロ個体（それを含む染色体のバックアップを行うため）を含めて下さい。次世代（F3）を取った後でもOKですが、交尾・受精可能な時期にお願いします。F3が送付された場合には返却の必要はありません。連絡先：nbrc@nibb.ac.jp

標的遺伝子の変異の追跡は通常はシーケンシングで可能です。ただし、数が多い場合には費用の問題からプライマーの3' 端の違い（mut / wt）によるデザインで識別可能です（allele-specific PCR）。また、制限酵素サイトの有無で識別可能な場合もあります（RFLP）。これら場合でも、次世代のファウンダーにする個体に関してはシーケンシングによる確認を行うべきです。

TILLING変異体 分譲依頼のフロー



人工授精の依頼方法

ユーザが同定した変異のF1-ID (KT-No., Well-No.) を元に精子解凍・人工授精を依頼する場合、まず、同じ変異が複数ある時は亀井 (ykamei@nibb.ac.jp) までご相談下さい①。すでに過去に人工授精済みのIDの場合は、F1凍結精子を解凍せずに、F2バックアップ精子で人工授精することでF1精子を減らさずに済みます。また、ユーザーの手元にはバッククロスが1回完了したF3が届くことになります。この場合、5匹のバックアップF2ゲノムをジェノタイプングして変異が入っている個体を同定する作業を行って頂きます。

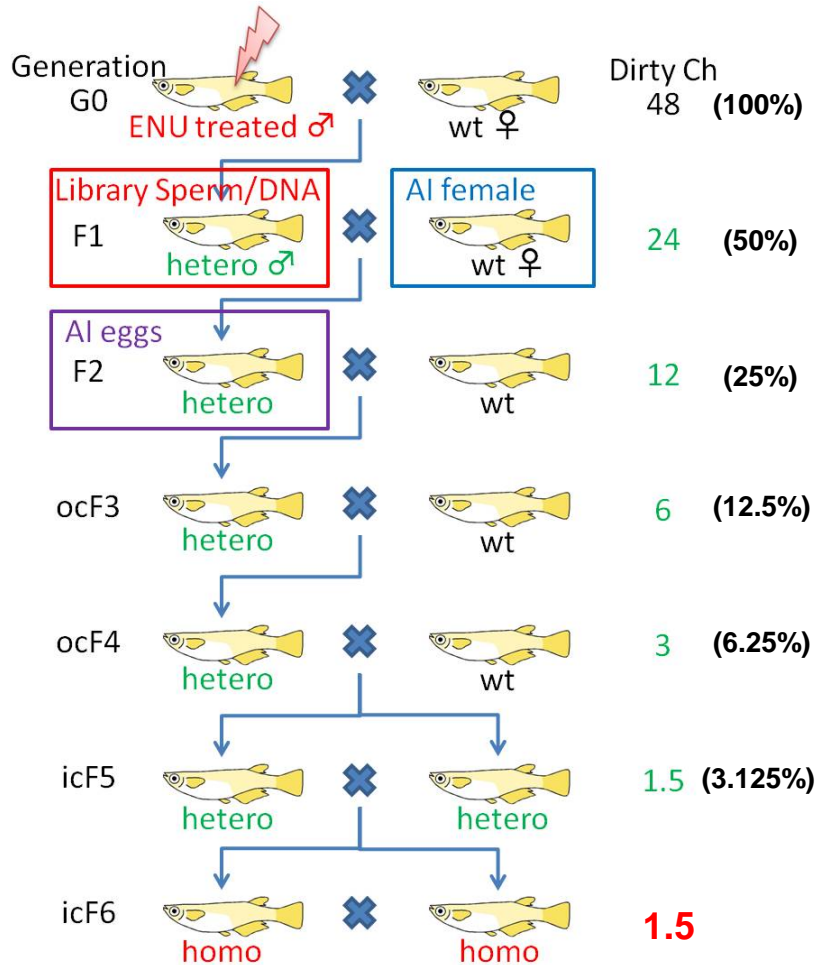
② ①の場合以外はNBRPメダカHPの「[TILLING系統申し込み](#)」ページからF1-IDを入力し、「精子状態」を確認して下さい。一度に10系統まで注文できます。(精子状態が悪い場合は人工授精が上手くいかない可能性があります。がご了承下さい。) 入力・確認等ブラウザの指示で注文の登録手続きを行って下さい (NBRPユーザー登録が必要)。

③、④、⑤ 提供承諾書およびMTA締結手続きを行って下さい。(nbrc@nibb.ac.jpとやりとりして下さい。)

⑥ 人工授精が完了したらF2受精卵 (標的遺伝子の変異をヘテロで持つ個体が半数含まれる) を送付します。(①の状況の場合はF3受精卵を送付することになります。)

⑦ 3ヶ月間大切に育てて下さい。ジェノタイプングでヘテロ判定された場合もオスは返却に回して下さい。バッククロスを行って下さい。バッククロス後最低1匹のヘテロF2オスを返却して下さい。(F2オス返却に関しては、前ページを良く読んで適切に返却して下さい。)

Medaka TILLINGの詳細 5 : バッククロス法 (参考1)



バッククロス (戻し交配)

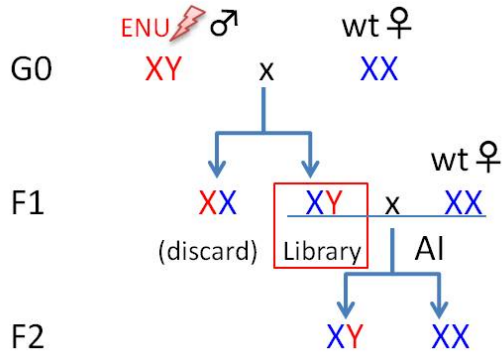
TILLINGはライブラリー作製時にENUを使って「ランダムミュータジェネシス」を行っているので、標的遺伝子の変異を含む個体 (F1) は異なる染色体上に多数のバックグラウンド変異を含みます。従ってwt (ENU処理を行っていない系統) を使ってバッククロスする必要があります。

1回のバッククロスでバックグラウンド変異は「確率的」に半分に減ります。F5ヘテロ個体を得るまでバッククロスするとバックグラウンド変異は3.1%まで減ります (左図)。このF5ヘテロ同士 (雌雄) を交配することでバックグラウンド変異の影響の少ないホモのデータ (表現型) を得ることが可能です。

バッククロスを漫然と行っても確率的にはF5で3.1%まで減りますが、積極的に不要な変異を取り除く方法が幾つかあります。1つは性染色体 (Y) のクリーニング、もう一つは有害変異キャリアーをつかった有害変異排除法です。次ページに詳細を紹介します。

Figure. Cleaning of back ground mutations.

Medaka TILLINGの詳細 5：バッククロス法（参考2）



Y染色体クリーニング

ENU処理した♂（G0）とwt♀とを交配し、得られたF1のうち♂（XY）のみをライブラリーに使用している。従ってこのF1♂のY染色体はENU処理により変異を多く含むDirtyな染色体である。一方Xはwt♀由来であるのでCleanである。DirtyYを排除するためには、バッククロス過程のどこかでヘテロ♀を元にしてwt♂と交配するステップを入れれば良い。

有害変異クリーニング

バッククロスする時はまず、複数のヘテロ同士を交配して「予想される表現型」を確認します。通常はそれ以外の「有害な変異による表現型」も見られます。例えば右図のように3ペアのヘテロ♂、ヘテロ♀がいた場合、ヘテロ同士の交配（incross）1♂ x 1♀、2 x 2、3 x 3を行って2 x 2①だけが1/4致死が出たとすると、この表現型（致死）は目的遺伝子の変異の表現型ではなく、有害なバックグラウンド変異に由来する表現型であるとわかります。この変異は次世代（バッククロス系統）に伝えるべきではありません。

	♀	Non-lethal carrier ④	lethal carrier ②	lethal carrier ④
♂		F2f01(hetero)	F2f02(hetero)	F2f03(hetero)
	♀	ic11 1/4 Δ		
	♀	ic21 1/4 Δ	ic22 ① 1/4 lethal	ic23 ③ 1/4 lethal
	♀			ic33 1/4 Δ
	♀	F2m01(hetero)	F2m02(hetero)	F2m03(hetero)

2♂、2♀共にこの有害変異をヘテロで持つキャリアーであるわけです②×。今度はこのキャリアーをテスト魚として、例えば2♂ x 1♀や、2♂ x 3♀③を行います。2 x 3は1/4で致死が出る状況で、これは3♀も有害変異キャリアー④×ということになり、次世代の親にふさわしくないわけです。2 x 1では致死表現型が出ないので、1♀は「有害変異を持たない」ため次世代の親として良いという判断ができます④○。（♂1、♂3の検定は1 x 2、3 x 2を実施すれば判断できます。）この交配は少々面倒ですが、できるだけ早い時期に行っておいた方があとあと面倒が無くて良いです。

Medaka TILLINGの現状：これまでの実績等

NBRP（基生研）でのTILLINGスクリーニングはすでにパイロットスクリーニングを開始しています。2010年末までに、6研究グループが基生研において、8遺伝子をスクリーニングしています。

研究グループ名、遺伝子名は伏せますが、具体的なスクリーニング塩基数や、スクリーニングにより取られた変異数や、滞在日数の一覧を下に示します。

2010年7月～11月実施の実績値（2011年2月2日集計）

Table NBRP（基生研）来所した研究グループのMedakaTILLINGスクリーニング結果

大学・研究所名		S大学	K大学	N大学	T大学	N大学		平均
研究代表者名（人数）		Sさん（2名）	Tさん（3名）	Fさん（3名）	Oさん（1名）	Hさん（3名）		
Target	Target gene	<i>gene A</i>	<i>gene B</i>	<i>gene C</i>	<i>gene D</i>	<i>gene E</i>		-
	Amplicon数	1	1	1	1	2		-
	塩基長(bp)	495	400	192	396	253	227	327.2
Result	プレート数	60	60	60	60	60	60	-
	解析塩基数(bp)	29700	24000	11520	23760	28800		19630.0
	検出変異数	15	7	5	12	3	2	7.3
	変異導入率 (1/bp)	33.0	57.1	38.4	33.0	84.3		44.6 理論値60
滞在期間（合計）		15日	13日	5日	4日	10日		7.8日

用語解説

有益な変異：TILLINGで得られる変異はすべて点変異ですが、遺伝子機能が変化する変異には、3種類があります。1つ目は、終止コドンに変化することによるもの、2つ目は、スプライス部位の変異（これには、splice donorのGTの変異と splice acceptorのAGの変異が含まれます）、3つ目は、アミノ酸置換変異です。前2者は、タンパク機能が喪失する可能性が高いですが、アミノ酸置換変異でも、そのアミノ酸がタンパク質機能に重要であることがわかっていたり、ヒトを含む他の生物種で疾患の原因になることが知られていたり、種間で高度に保存されている場合には、なんらかの機能変化があると考えて人工授精の対象となります。またタンパク質の合成量による表現型がシビアであると考えられる場合には、レアな codon usageへの塩基置換も表現型が現れる可能性があるかもしれません。

F2受精卵：NBRPに凍結保存されている精子は、変異を導入したG0世代の子にあたり、F1世代です。これを人工授精したものがF2受精卵です。世代数は後述する戻し交配と関係します。通常はF2世代が提供されますが、過去に精子解凍・人工授精を行った個体である場合には、一つ世代が進んだF3で供給されることがあります。この場合戻し交配数を減らすことができます。

18万円：平成23年1月現在。1アンプリコン60枚スクリーニングに要する消耗品の内訳は以下のとおりです。実際に使用したプレート数で計算します。酵素を半量で使用した場合などはその分を割引致します。ただし、消耗品の納入価格により請求価格を変更する場合があります。

SYTO9：	5,000円	シーケンシング費用（参考）	
KOD plus：	105,000円	16サンプル単位	
チップ：	25,000円	試薬	1,600円
プレート；	33,000円	Run	2,800円（2012年4月現在）
合計；	168,000円	合計	4,400円

バックグラウンドの変異：メダカゲノムは700Mb、ライブラリーの変異頻度は350kbに一つなので、F2には、2000個のENUによる点変異があると考えられます。これを減らすために、つまり、標的遺伝子の変異に伴う表現型変化を確認するために、戻し交配（野生型との交配）が必要となります（詳細はTILLING概要5バッククロス法を参照）。最終的にはトランスジェニックによるレスキュー等の結果も必要となります。

文献

- 1： Taniguchi *et al.* Genome Biology 7, R116, (2006)
- 2： Ishikawa *et al.* MBC Mol. Biol. 11, 70, (2010)

ご不明な点などは基生研光学解析室亀井までご連絡下さい（ykamei@nibb.ac.jp）。

Medaka TILLINGの協力者

ライブラリーの作製、管理、スクリーニング法の確立、ライブラリー分注、基生研でのスクリーニング系確立から補助に至るまで多くの研究者や技術支援員の方に協力して頂きました。（敬称略。所属は当時のもの。2012年4月作製。）

1、ライブラリー作製

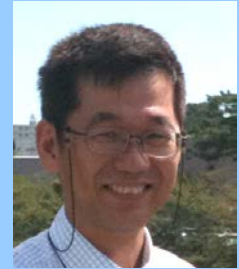
- ・管理、運営
藤堂 剛、武田 俊一（京大）近藤 寿人（ERATO）、
- ・ENU処理
谷口 善仁、亀井 保博、藤堂 剛（京大）出口 友則（E）、
- ・飼育、技術的サポート
古谷-清木 誠、ERATO/SORST近藤プロジェクトの方々（E）
- ・精子凍結、技術的サポート
谷口 善仁、亀井 保博（京大）、松尾 典子、笹土 隆雄（E）
- ・ゲノムDNA抽出
石川 智子、谷口 善仁、京大藤堂研・武田研の方々（京大）

2、スクリーニング法（HRM）の確立と技術的サポート

石川 智子、亀井 保博、藤堂 剛（阪大）、吉浦 康寿（水総研セ）

3、基生研におけるMedaka TILLINGスクリーニングサービス運営

- ・システムセットアップ
亀井 保博（基生研）、鈴木 雅一（静岡大）、殿山 泰弘（慶大）、
原 郁代、成瀬 清、木村 哲晃、竹花 佑介、成瀬研の方々（基生研）、
谷口 善仁（慶大）
- ・運営、来訪者サポート
成瀬 清、亀井 保博、原 郁代、蟹江裕太、石川裕恵、成瀬研の方々（基生研）
- ・人工授精、精子凍結
笹土 隆雄（基生研）



成瀬清



亀井保博



谷口善仁