

## 線虫の網羅的な温度感受性変異株ライブラリーによる生命システムの理解

●中村 邦明

大阪大学微生物病研究所

### <研究の目的と進め方>

多細胞生物体が構築されるためには受精卵がプログラム通りの細胞分裂、細胞分化、形態形成を行なう必要がある。しかし、プログラムを構成する遺伝子ネットワークは複雑なため、単純な遺伝子破壊法による解析だけでは、発生プログラムの理解はむずかしい。この問題に取り組む一つの方法論として、我々は線虫の温度感受性変異株の網羅的解析を行う。発生過程では、1つの遺伝子が複数のターゲットを持つ場合や複数のステージで機能している場合が多く存在する。温度感受性変異株はステージ特異的な機能の解析、サプレッサーの解析ができるだけでなく、ドミナントネガティブな表現型を呈したり、複数の基質の中でアリアル特異的に特定の基質への活性を失う等、シグナル経路の分別、特定に有用であり、空間的、時間的に複雑に絡み合った発生プログラムを紐解く強力なツールとなる。

我々は4000株の線虫の胚発生致死温度感受性変異株を取得している。これは、網羅的RNAiスクリーニングにより胚発生致死になることが報告されている遺伝子数(約1000)の4倍にあたる。この変異株ライブラリーの検証のために予備的な遺伝子クローニングを行なったところ、このライブラリーは飽和に近く、シグナル経路の多くの遺伝子を含むため、解析に値することが示唆されている。我々は温度感受性変異株の特性を利用して、多細胞体の構築という複雑な生命現象における遺伝子ネットワークの解明をめざす。

本研究課題の目的は、網羅的に取得された線虫の温度感受性胚発生変異株をアーカイブ化し、すべての表現型を解析することによって線虫の胚発生のプログラムの全貌を明らかにすることである。現実的には、1つの研究室ですべての発生プログラムを明らかにすることは不可能であるので、温度感受性変異株のデータベースを構築し、他の研究者が閲覧、使用できるようにし、共同研究によりそれぞれの研究分野の発生プログラムを局面ごとに明らかにしていく。そのために温度感受性変異株ライブラリーを線虫研究の有用な研究基盤として整備する。

我々も解析する局面をしばり、その変異株クラスターの原因遺伝子のクローニングを行なう。同定された遺伝子についてはGFPマーカーを指標にして遺伝子間相互作用について解析を行ない、解析する表現型における遺伝子ネットワークを明らかにしていく。

### <研究開始時の研究計画>

本研究期間内に線虫の胚発生致死温度感受性変異株のデータベースを構築、公開し、依頼に応じて変異株を供与するシステムを確立することにより、4000株からなる温度感受性変異株ライブラリーを線虫研究の新しい研究基盤とする。

具体的には、取得されている4000株の変異株の表現型をある程度詳細に記述し、他の研究者が使用できるようにデータベース化する。さらに、温度感受性変異株の原因遺伝子のマッピング、

クローニングをできる限り進めて、その情報をデータベースへ登録する。逆遺伝学の局面を迎えた研究者が、解析に必要な遺伝子変異株を検索するために、データベースを参照し、温度感受性変異株を供与と依頼することが見込まれる。このデータベースの対象者および予想される使用法を考慮して、データベースには自身で遺伝子クローニングを行なった変異株に加えて、これまで報告されている温度感受性変異株のデータも登録する。2007年度までにデータベースを構築し、2008年度からデータベースを公開、運用を開始する。

同時に、温度感受性変異株ライブラリーのデータベースのための基礎情報として、できる限り多くの変異株について遺伝子クローニングを行う。これまで遺伝子クローニングを行なった結果、通常の方法で変異株を取得しやすい初期発生に関しては、かなりの数の変異株が既に取得されていると考えられたので、特に、温度感受性変異株を用いなければ解析が難しい後期発生過程に異常を示す温度感受性変異株を中心にクローニングを行なっていく。例えば、原腸貫入が正常に行なえず、結果的に腸管が胚の外側に位置してしまう表現型と、原腸貫入後の形態形成異常を示す表現型に関して、順に網羅的に遺伝子クローニングを進めていく予定である。このように我々も線虫の胚発生過程の一面ではたらく遺伝子ネットワークの解明にも取り組む。

2008年度からは、温度感受性変異株ライブラリーのデータベース化事業の律速段階となっている変異株の原因遺伝子のクローニング方法に関する技術の開発を始める。変異株の原因遺伝子はこれまではSNP解析を用いた従来の方法でクローニングしてきたが、温度感受性変異株のライブラリー数は4000株と膨大であるので、より効率的な遺伝子クローニング法を開発する必要がある。そこで2008年からの当研究課題では、Tilling (Targeting induced local lesions in genomes)法を用いて変異株の原因遺伝子を効率よく同定できる手法の開発を試みる。Tilling法は特定遺伝子の変異株を単離するために使用されている技術であるが、これとジーンチップを組み合わせることで当研究課題の遺伝子クローニングに応用する研究計画である。新規の遺伝子クローニング法の開発には各段階に困難な点が存在すると考えられるので、2008年度においては既知の変異株を用いて各段階の条件検討を行ない、プロトコルを確立する予定である。DNAマイクロアレイ解析における最大の困難は、蛍光色素検出時の高いバックグラウンドと予想される。そこで、最終的には通常の変異株マッピング法により狭めることが可能である200～300kbの範囲の狭い領域において遺伝子が同定できる技術の確立を2009年度の到達目標とする。

### <研究期間の成果>

温度感受性変異株の遺伝子クローニングのための環境を整備するため、初めにSNP解析のためのプライマーを線虫のゲノム全

領域で設定した。この SNP 情報を用いて温度感受性変異株の遺伝子クローニングを行い、ライブラリーの変異株 60 株 (44 遺伝子) について原因遺伝子の同定に成功した。この中の多くのものはこれまで欠損変異株等がとられているものであったが、新規の変異株、温度感受性変異株として初めてのものも多く含まれており、この温度感受性変異株ライブラリーは有効に機能することが示された。また、たとえ遺伝子破壊株が作成されていても、温度感受性変異株はその特性から新規の有効な解析ツールとして機能した。以下にクローニングされた遺伝子をカテゴリー別に列記する。

細胞運命決定異常を示す変異株として、従来から温度感受性変異株として取得されていた *cdk-1*(cyclin-dependent kinase)、*par-2*、*apx-1/delta* 分子の変異株に加えて、複数の DNA polymerase が取得された。特に、DNA polymerase  $\epsilon$  は触媒サブユニットと調節サブユニットの両方の遺伝子が取得されたが、これらは報告例のない変異株であった。また、Nuclear Pore Complex の構成分子である *npp-13/Nup-93* やスプライソームの構成分子である *crooked neck-like protein 1* も新規の変異株であった。これらの分子は細胞機能の根幹に関わる分子であり、このような分子の機能異常も深刻な細胞運命決定異常を引き起こすことが判明し、多細胞体の構築は予想以上に複雑に制御されていると考えられた。

形態形成異常を示す変異株として、*gex-3/Nap*、*gex-4* (新規)、*gad-1*、*spt-6*(transcription elongation factor)、受容体型 protein tyrosine phosphatase がクローニングされた。*gad-1* は WD モチーフを持つヒトから植物まで保存された分子であるが、未だ研究の進んでいない分子であるので、この分子がどのようなシグナル伝達を担うのかについても解析を進めている。

細胞分裂異常を示す変異株としては、*let-99*、*mei-1*、*div-2*、*cathepsin L*、*vacuolar protein sorting 33A(vps33A)* 分子がクローニングされている。*let-99* は細胞分裂時の極性決定に関与する分子であり、*cathepsin L* と *vps33A* は細胞内輸送に関与する分子である。特に、*vps33A* はヒトの Hermansky-Pudlak Syndrome の原因遺伝子として報告されているものであり、興味深い遺伝子である。変異株の原因遺伝子のほとんどはヒトと高い相同性を示す分子であり、疾病や生物に共通した生命現象に関する有効な解析系を提供すると考えられた。また、胚発生において細胞分裂は時空間的に厳密に制御されており、その破綻にこれらの分子の変異がどのように関与するのか非常に興味を持たれる。

2008 年度からは、30 ~ 50 細胞期で細胞分裂を停止してしまう表現型を示す一群の変異株の遺伝子クローニングを行なった。その結果、2 種類のミトコンドリアの電子伝達系の還元酵素と低分子型 GTP 結合たんぱく質 Rho の GAP 分子が同定された。また、これらの変異株は、同時に受精卵の卵殻が通常より浸透圧力に弱く、極性形成にも異常が見られた。これまで、このような表現型を示す分子として、上記とは別のミトコンドリアの電子伝達系の還元酵素と APC 複合体の構成分子が報告されている。今回の結果から卵殻の形成および極性形成の際に、ミトコンドリアの電子伝達系、APC によるたんぱく質分解系および Rho シグナルが関与していることが示唆され、これらのシグナルがどのようにクロストークしているのか非常に興味深い。以上のように有用な温度感受性変異株が多数同定され、それらが関与する遺伝子ネットワークの一部が明らかとなった。温度感受性変異株のクローニングされた遺伝子のほとんどはヒトと高い相同性を示す分子であり、温度感受性変異株ライブラリーは疾病や生物に共通した生命現象に関する有効な解析系を提供することが示された。

続いて、外部の研究者がこの温度感受性変異株ライブラリーを閲覧できるように、我々は基盤ゲノム支援班の支援をうけて温度感受性変異株のデータベース (WorTS: Worm TS mutant Database) を構築し、そのデータベースを公開した (<http://worts.biken.osaka-u.ac.jp>)。このデータベースには逆遺伝学の研究局の線虫研究者がアクセスし、ある特定の遺伝子の変異株を検索することが期待される。このようなデータベースの対象者および予想される使用法を考慮して、データベースにはこれまでクローニングした 60 変異株 44 遺伝子に加え、既存の温度感受性変異株の情報も登録し、現在、150 変異株、98 遺伝子を収録している。公開後は実際に国内外から供与依頼があり、温度感受性変異株を供与している。また、海外からの温度感受性変異株に対する問合せに端を発して、ある特定の発生段階で発生を停止する温度感受性変異株から生殖前駆細胞を分離し、網羅的な遺伝子発現プロファイルを解析するという共同研究も開始した。

温度感受性変異株のライブラリー数は 4000 株と膨大であるので、より効率的な遺伝子クローニング法を開発する必要がある。そこでゲノム DNA から直接的に遺伝子クローニングを行なうためのプロトコルの確立をはかった。2008 年度には Tilling (Targeting induced local lesions in genomes) 法を用いて変異株の原因遺伝子を効率よく同定できる手法の開発を試みた。Tilling 法は特定遺伝子の変異株を単離するために使用されている技術であるが、これとジーンチップを組み合わせることで当研究課題の遺伝子クローニングに応用する計画であった。しかし、2009 年度には次世代シーケンサーが実用的に稼働するようになったことから、解析の迅速性や経済性を考慮して、次世代シーケンサーを用いた方法論の確立をすすめることに計画を変更した。次世代シーケンサーは 1 度に解読できる情報量が多いため、1 種類の線虫変異株のゲノムから遺伝子変異を同定することは可能である。しかし、1 度の解析で相当のコストがかかるため、4000 株の変異株ライブラリーに対して通常の方法を適用することはできない。そこで 20 株程度の遺伝子変異を同時に解析できるようにするために、通常はゲノム DNA をそのまま次世代シーケンサーで解析するところを、本研究課題ではゲノムから PCR 増幅したサンプルを解析するという戦略をとった。

変異誘発剤はゲノムに複数の遺伝子変異を誘起してしまうため、変異株の原因遺伝子の同定のためには、どのようなクローニング手法においても最低 1 度は交配して原因遺伝子のゲノム上の位置を知る必要がある。この点を考慮して、最初の交配で原因遺伝子のゲノム上のおよその位置を決定した後、その領域のゲノム部分を次世代シーケンサーで解読することによって遺伝子変異を同定するプロトコルを考案した。そのための第 1 段階として、既知の変異株の原因遺伝子付近の 200kB くらいのゲノム領域を 20kB くらいの小領域に分けて PCR 増幅し、それらを混合した試料を次世代シーケンサー SOLEXA でシーケンスして既知の遺伝子変異が見いだせるかについて検討を行った。その際、1 度の試行で 5 ~ 10 の複数の変異株の原因遺伝子を同定することができるかについても検討を行うために、原因遺伝子がゲノム上の異なる位置に存在するいくつかの変異株の候補領域のゲノムの PCR 産物を混合したサンプルで測定を行った。例えば、変異株 A の候補領域から遺伝子変異がみつければ、その部位は変異株 A のゲノムからのみ増幅されているため、変異株 A の遺伝子変異だと断定できる。この原理で 1 度の試行で同時に多数の変異株を解析することを試みた。

線虫の標準株 (N2) の亜種である CB4856 株 (Hw) ゲノムの合計約 2MB の領域を 20kB のフラグメント 1000 本に分けて

PCR増幅、そのPCR産物を次世代シーケンサー SOLEXA でシーケンスした。N2株とHw株のゲノムシーケンスを比較すると、高頻度で一塩基置換 (SNP) が存在する。その SNP をこのシステムでどの程度検出できるかを調べた結果、以下の①～③の事項が明らかとなった。

① PCRで個別に増幅する領域に繰返し配列等がなければ、再現性よく 20kb の PCR 産物を得ることができる。

② このシステムにおける SOLEXA の DNA 配列解読の精度は非常に高い。たとえある領域を 1 回あるいは 2 回の厚み (Depth) でしか読めなくても、SNP を検出することができた。SNP を検出できなかったのは、その部位をカバーしていない場合 (Depth=0) であった。

③ SNP の検出頻度は PCR フラグメントでカバーできた領域に比例する。候補領域を 90% 以上の割合でカバーできた場合、比較的容易に遺伝子変異を見いだすことが期待される。

これらの結果は、実験条件を最適化すれば、次世代シーケンサー SOLEXA を用いたこのシステムがハイスループットの遺伝子クローニング方法として充分使用に耐えうることを示している。現在、プロトコル確立の第 2 段階として、未知の変異遺伝子がこのシステムで同定できるかについて解析を行っているところである (2009 年 12 月現在)。2009 年度内には、膨大な温度感受性変異株ライブラリーのデータベース化を促進するための遺伝子クローニング法の確立に技術的な目処がつけられると考えている。

#### <国内外での成果の位置づけ>

この温度感受性変異株は研究代表者が University of Massachusetts Medical School の Craig Mello 研究室で取得したものであり、許可を得てデータベース構築を行なっている。その意味では、この研究課題は Craig Mello 教授との共同研究である。しかし、Mello 研究室ではこのようなプロジェクトは行われていない。また、それ以外の研究室でこのようなゲノムワイドの規模での研究プロジェクトは世界中でも存在しない。他の多細胞モデル生物では温度感受性変異株を網羅的にそろえることが技術的に難しいと考えられ、知る限りにおいて、このような計画は他にない。多くのゲノムワイドのプロジェクトが線虫で先駆けて達成されているので、この研究課題も他のモデル生物の先駆けとなるように努めたい。

本研究は、網羅的な線虫の胚発生致死の温度感受性変異株ライブラリーのデータベース化を図り、次世代の研究基盤を創出しようとするものである。データベースは遺伝子名で検索することが可能であり、依頼に応じて変異株を供与する体制をとっている。この温度感受性変異株ライブラリーでクローニングされた遺伝子数は現在のところ少ないが、包含する遺伝子数が増えれば、日本発の貴重な研究基盤としてインパクトを与えられられる。実際、国内外で発表した際には、幾つかの温度感受性変異株について供与の依頼がなされている。このデータベースが保有する変異株数の増加に応じて、当研究は線虫研究の貴重な研究基盤として線虫研究分野全般の発展に貢献する。

我々が温度感受性変異株ライブラリーの原因遺伝子同定のために開発しているハイスループットの遺伝子クローニング法は、これまでの方法を変えてしまうほどの革新的な方法である。ここで示した結果は、20kb フラグメントを増幅するための PCR プライマーの組み合わせを全ゲノムに対して決めてしまえば、いつでもどのような変異株に対しても遺伝子クローニングに適用できることを示している。将来的には、このプライマー情報が線虫研究界で共有され、次世代シーケンサーで遺伝子変異を同定するという

遺伝子クローニング法が一般的になると思われる。

さらに、このシステムはシンプルなプロトコルの組合せからなり、高い再現性が得られることから、この方法は線虫に限らず、他のモデル生物でも使用され得ると考えられる。多くのゲノムワイドの研究は、線虫で最初に試行、達成されてから他のモデル生物に波及していったように、この新しいシステムも他の生物の様々な研究局面で応用され、有効に機能することが期待される。遺伝子クローニングはモデル生物を用いた順遺伝学的研究の大きな障壁となってきた。次世代シーケンサーを用いたこのシステムで研究のボトルネックが解消されれば、線虫に限らず、ショウジョウバエ、シロイヌナズナ、イネなど様々なモデル動物/植物において表現型に立脚して変異株を網羅的に分離するという研究の流れが形成されると考えられる。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

温度感受性変異株のライブラリー数は 4000 株存在するが、そのうち複数の変異株が同一の原因遺伝子 (相補グループ) として同定される。我々は、ある特徴的な表現型をモデルとした予備実験により、同じ相補グループに属するものは多くても 10 株くらいと見積もっていた。しかし実際に遺伝子クローニングを始めたところ、遺伝子によっては 1 つの相補グループが多数の変異株を含むことがわかり、想像以上に温度感受性となる遺伝子には偏りがあることが考えられた。現在のところ、我々は、このライブラリーに含まれる遺伝子数は 1 相補グループあたり 5 ~ 10 遺伝子として、400 ~ 800 遺伝子と考えている。(ゲノムワイドの RNAi 実験により、1000 弱の遺伝子が胚発生に必須であることが判明している)。胚発生致死変異株を飽和させるにはこのライブラリーの少なくとも 2 ~ 3 倍の変異株数が必要であると考えられた。

温度感受性変異株のライブラリーが飽和に達していないとしても、その数は 4000 株と膨大であるので、できるだけ効率よく変異株の原因遺伝子のクローニングを行なう必要がある。そのため、本研究では通常の遺伝子クローニング方法の最適化を行い、より迅速に遺伝子クローニングを行なった。しかし、個体の遺伝学を基礎とした通常の方法では、取り扱える数に限りがあるため、目標の数値を達成できなかった。今後、取り扱える変異株数を増やすためには、個体を用いた SNP 解析からではなく、ゲノム DNA から直接的に原因遺伝子に迫る方法論の開発が必要である。

ハイスループットの遺伝子クローニングのために、当初の研究計画では、Tilling 法を用いて変異株の原因遺伝子を効率よく同定できる手法の開発を予定していた。しかし、次世代シーケンサー SOLEXA が実用的に稼働し始めたことで、その迅速性及び経済性を検討して、SOLEXA を用いて特定部位のゲノム配列を直接シーケンスし遺伝子クローニングする方向に軌道修正した。そのため、ゲノム DNA から直接的に原因遺伝子に迫る方法論の開発が遅れたが、現在、鋭意取り組んでいるところである。

温度感受性変異株のデータベース構築のため、変異株の表現型を詳細に記述し、且つ原因遺伝子のマッピングを行なう計画にしていたが、原因遺伝子が同定されない曖昧な情報だけでは他の研究者が変異株を使用できないのではないかと判断から、原因遺伝子のクローニングを行なうことに変更した。このため、温度感受性変異株のデータベースは表現型に基づいたものというよりは、遺伝子情報に立脚したものとなった。表現型にねざした温度感受性変異株ライブラリーに関しては、標準株に予め GFP マーカー分子を発現させ、その変異表現型によって記述することが得策だと考えられる。将来的には、例えば、細胞分裂を評価するた

めのマーカー分子、ある特定の組織への分化を評価するためのマーカー分子等を導入した標準株から温度感受性変異株を順次取得することが望まれる。

#### <今後の課題、展望>

データベースには現在、150変異株、98遺伝子を収録しており、実際に国内外から供与依頼があり、温度感受性変異株を供与している。しかし、このデータベースの世界における認知度はまだ低いと思われるので、公開するデータベースの量と質を充進させ、外部の研究者の注目度を高めていかなければならない。

データベースの「質」を高めるためには、アーカイブの情報量をふやすことが挙げられる。これまでに構築したデータベースは表現型に基づいたものというよりは、遺伝子情報に立脚したものとなった。今後は、表現型に基づいた情報もデータベースに組み込んでいきたい。ただ、表現型の記述としてDICイメージ像のみではデータの信頼性が低いと考えられるため、標準株に予めGFPマーカー分子を発現させ、その分子動態の変化をもとに変異表現型を記述する必要がある。そのため、細胞分裂を評価するためのマーカー分子やある特定の組織への分化を評価するためのマーカー分子等を導入した標準株から温度感受性変異株を順次取得することを計画している。

データベースの「量」を高めるためには、遺伝子クローニングを続けていき、胚発生に必要とされる1000弱の遺伝子数をカバーする割合をできるだけ上げなければならない。そのために、現在取り組んでいるハイスループットの遺伝子クローニング法を確立する必要がある。そのための課題としては、線虫の全ゲノムに対するプライマーセットを整備し、PCRによって候補領域ゲノムの90%以上をカバーすることである。実験条件が最適化できたら、次世代シーケンサーを用いて未知の変異株の遺伝子変異を検出できるかについて試行を始める。このハイスループットの遺伝子クローニング法が確立できれば、温度感受性変異株ライブラリーのデータベース化の大きな障壁が解消され、迅速な遺伝子クローニングにつながる事が期待される。さらにSOLEXAが扱える情報量が莫大であるため、一度に解析できる変異株数も多く、それに応じて一株あたりの解析コストが減少する。その結果、本研究課題の膨大な温度感受性変異株ライブラリーのデータベース化が促進されることが期待される。

この温度感受性変異株データベースに対する外部の研究者の注目度を高めるためには、上記の方法でデータベースを充実させる必要がある。さらに、外部の研究者との連携を深め、それらの共同研究により、遺伝子情報がフィードバックされるような軌道にのせなければならない。

温度感受性変異株ライブラリーは、胚発生過程にとどまらず、広く線虫研究のための研究基盤を創出する。胚発生致死に至る遺伝子のうち、約半数近くが胚発生後にもさまざまな表現型を示すことが示されている。成虫で機能する遺伝子が胚発生に必須である場合は、遺伝子欠損変異株の成虫は存在し得ず、解析には温度感受性変異株を必要とする。RNAiによる遺伝子ノックダウンが難しい組織である神経系をはじめとして、寿命、生殖、行動、後期発生等の様々な研究対象に温度感受性変異株は有効である。また、温度感受性変異株は、サプレッサー変異株解析、協調的に働く分子の探索、薬剤（低分子化合物）に対する感受性株等の2次的なスクリーニングに広く応用され、遺伝子ネットワークの解析にも有効なツールとなると期待される。将来的には、上記のような使用方法ができる有用な研究基盤としてデータベースを整備、線虫研究者の誰もが参照するデータベースとしたい。

#### <研究期間の全成果公表リスト>

##### 1) 論文/プロシーディング

0701122219

Shirayama, M., Soto, M., Ishidate, T., Kim, S., Nakamura, K., Bei, Y., Heuvel, S., Mello C. C. : The conserved kinases CDK-1, GSK-3, KIN-19, and MBK-2 promote OMA-1 destruction to regulate the oocyte-to-embryo transition in *C. elegans*. *Current Biology* 16 47-55 (2006)

0701122224

中村邦明 Wntシグナルによる極性形成機構-線虫胚を例として-  
生化学 78, 1073-1077 (2006)

0701122211

Nakamura, K., Kim, S., Bei, Y., Ishidate, T., Pang, K., Shirayama, M., Trzepacz, C., Brownell, D., Mello C. C. : Wnt signaling drives WRM-1/ $\beta$ -catenin asymmetries in early *C. elegans* embryos. *Genes & Dev.* 19 1749-1754 (2005)

##### 2) 学会発表

中村邦明、目加田英輔 The analysis of dynactin complex in cell-polarizing mechanism in early *C. elegans* embryos 日本細胞生物学会、2009年6月3日、名古屋

中村邦明、目加田英輔 The analysis of cell-polarizing mechanism in early *C. elegans* embryos. 日本細胞生物学会、2008年6月30日、横浜

中村邦明、Craig Mello、目加田英輔 Wnt signaling drives cortical and nuclear WRM-1/beta catenin asymmetries in early *C. elegans* embryo. 国際生化学・分子生物学会議、2006年6月20日、京都

中村邦明、Craig Mello、目加田英輔 Wnt signaling drives cortical and nuclear WRM-1/beta catenin asymmetries in early *C. elegans* embryo. 日本発生生物学会、2006年6月3日、広島

##### 3) データベース/ソフトウェア

0801281653

WorTS: 線虫の胚発生致死温度感受性変異株のデータベース  
<http://worts.biken.osaka-u.ac.jp>  
表現型および遺伝子名から温度感受性変異株が検索可能