

マンソン住血吸虫における全 BAC クローン
の染色体マップの完成
(13557021)

平成 1 3 年度～平成 1 6 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (B) (2))

平成 1 7 年 6 月

研究代表者 平 井 啓 久

(京都大学霊長類研究所)

はしがき

本研究課題はマンソン住血吸虫のゲノムプロジェクトの一環として、BACクローンの染色体マッピングの技術開発を行い、全クローンの住所録を完成させることを目標に推進してきた。計画期間内に実施した項目を下記に列挙する。

- (1) 染色体標本を適格に作成する技術、マッピングに伴うクローンDNAの標識ならびに染色体DNAの変性方法、シグナルの位置を染色体模式図に記入する方法等を開発した。これによって、染色体マッピングのFISH（蛍光インシットーハイブリダイゼーション）技術が確立した。この技術は住血吸虫類だけではなく、フィラリアの染色体マッピングにも利用できた。
- (2) 小型染色体、第5、6、7は染色体の形態から同定することは、マンソン住血吸虫の染色体に習熟していなければ非常に難しく、汎用性が低く客観性に乏しい。そこで、客観性の高い染色体同定法を確立するために、各染色体に特異的な彩色プローブを作製した。
- (3) BACクローンの染色体マッピングを可能にしたことで、幾つかの特異的遺伝子の染色体上の座位を決定することに成功した。例えば、adenylosuccinate lyase, HOX geneなど。
- (4) 染色体マッピングを補足する技術として、染色体上でPCRを行うPRINS法を、住血吸虫類の染色体でも実施できる方法を改良した。
- (5) 今回のプロジェクトで開発した技術は、霊長類の染色体を用いた遺伝子マッピングにも利用でき、遺伝子のマッピングや染色体分化解析に応用された。

当初の目標であった20000個のBACクローンをマッピングすることは、残念ながらまだ達成できていないが、今回のプロジェクトで安定した技術を確立したので、今後は他研究機関の協力も得て、全クローンのマッピング完成は不可能ではない。我々の技術は、日本住血吸虫のゲノムプロジェクトを行っている中国チームにも、現在技術移転されつつあり、世界的な寄生虫ゲノムプロジェクトの発展に寄与するものと思われる。

研究組織

研究代表者：平井啓久（京都大学霊長類研究所）

（研究協力者：田口尚弘（高知大学大学院黒潮圏海洋科学研究科））

（研究協力者：平井百合子（京都大学霊長類研究所））

（海外共同研究者）：Phil LoVerde（ニューヨーク州立大学）

交付決定額（配分学）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	7,100	0	7,100
平成14年度	2,200	0	2,200
平成15年度	2,200	0	2,200
平成16年度	2,400	0	2,400
総計	13,900	0	13,900

研究発表

(1) 学会誌等

Foulk, B.W., Pappas, G., Hirai, Y., Hirai, H., and Williams, D.L.: Adenylosuccinate lyase of *Schistosoma mansoni*: gene structure, mRNA expression, and analysis of the predicted peptide structure of a potential chemotherapeutic target. *International Journal for Parasitology* 32: 1487-1495, 2002.

Taguchi, T., Akimaru, K., Hirai, H., Hirai, Y., Mwenda, J.M., and Yuri, K. A probe generated by chromosome microdissection useful for analyzing Y chromosome evolution in Old World monkeys. *Chromosome Research* 11: 147-152, 2003.

Iwase, M., Satta, Y., Hirai, Y., Hirai, H., Imai, H.T., and Takahata, N. The amelogenin loci span an ancient psuedoautosomal boundary in diverse mammalian species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 5258-5263, 2003.

Guillen, A.K.Z., Hirai, Y., Tanoue, T., and Hirai, H.: Transcriptional repression mechanisms of nucleolus organizer regions (NORs) in humans and chimpanzees. *Chromosome Research* 12: 225-237, 2004.

LoVerde, P.T., Hirai, H., Merrick, J.M., Lee, N.H., and El-Sayed, N. *Schistosoma mansoni* genome project: an update. *Parasite International* 53: 183-192, 2004

Hirai, H., Matsubayashi, K., Kumazaki, K., Kato, A., Maeda, N.: Chimpanzee chromosomes: retrotransposable compound repeat DNA organization (RCRO) and its influence to meiotic prophase and crossing over. *Cytogenetic and Genome Research* 108: 248-254, 2005

Pierece R.J., Wu W., Hirai H., Ivens A., Murphy L.D., Noel C., Johnston D.A., Artiguenave F., Adams N., Cornette J., Viscogliosi E., Capron M., and Balavoine G.: Evidence for a dispersed Hox gene cluster in the platyhelminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Mol Biol Evol* 22 (12): 2491-2503, 2005

(2) 口頭発表

Hirai H. Chromosome mapping. Schistosome Genome Network Meeting. January 2002, Washington, USA.

平井啓久、平井百合子、Phil T LoVerde；マンソン住血吸虫のゲノムプロジェクト：BAC クローンの染色体マッピング。第74回日本寄生虫学会大会 2005年4月8日～9日

(3) 出版物

Hirai, H. and Hirai, Y.: FISH for helminth genome. In *Methods in Molecular Biology, Vol. 270: Parasite Genomics Protocols*. (Melville S. E., ed.) Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2004, pp 379-394.

染色体マッピング

今回開発したマンソン住血吸虫の BAC クローン DNA の染色体マッピングのあらましを記す。

(1) 染色体基本情報

染色体マッピングを正確に行うには、まずその生物種の染色体情報を正確に把握し、マッピングした遺伝子なり DNA の位置を示すための台帳を作る必要がある。最初の情報は染色体のサイズで、大きい方から小さい方へ順に並べる。次に、染色体の形から染色体の長腕と短腕の比率によって形の特徴をきめる。さらに、染色体内の DNA 4 塩基ヌクレオチドの存在様式によってきまるバンドを検出し、それに番地にあたる番号を振り当てる。例えば、ヒトの 7q31.1 は第 7 染色体長腕 3 の 1 の 1 に存在するバンド番号である。

しかし、このようなバンドが検出できるのは恒温動物の鳥類と哺乳類である。変温動物は情報量の多いバーコード状の染色体バンド (G-および R-バンドのような) は存在しないのが普通である。したがって、寄生性住血吸虫類もそういったバンドは得られない。そこで、住血吸虫類の染色体を正確に同定するために有効なバンドは、すべての真核生物に構成的に存在するヘテロクロマチン (C-バンド) である。染色体はユークロマチンとヘテロクロマチンの 2 種類のクロマチンによって形成されているので、真核生物の染色体を比較する場合や染色体の特徴付けには重要な標識となる。したがって、住血吸虫類は先にふれたバーコード状バンドは持たないものの、C-バンドを用いて各染色体を同定することはできる。

そこで、マンソン住血吸虫の染色体台帳は、染色体のサイズ、形、C-バンドによって下記のように作成された。この模式図 (図 1) は全染色体 (1~Z まで) の総長を 100% ととして、各染色体の相対長を決め、セントロメア (短い横棒)

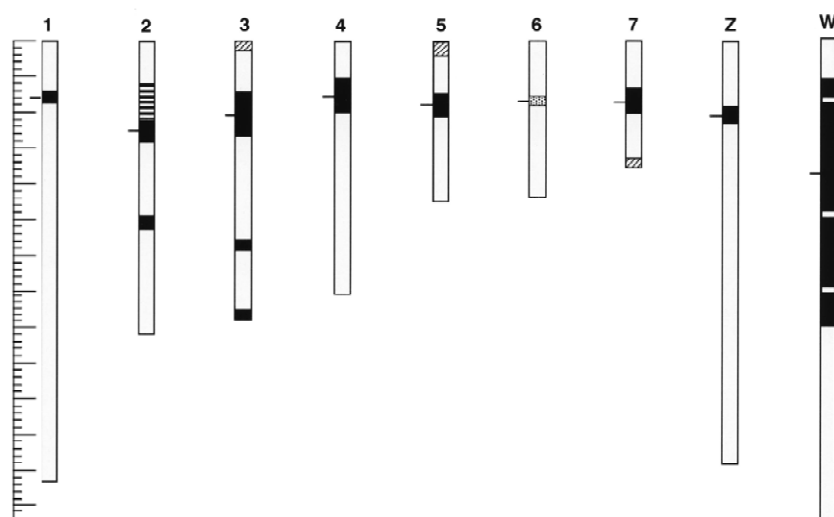


図 1. マンソン住血吸虫の染色体模式図

と C-バンド領域 (黒色) を示したものである。各染色体の相対長は各染色体のゲノムサイズ (DNA 量) とも相当しているので、総ゲノムサイズ 2.7×10^8 を各染色体のサイズに振り分けると下記の表のように、各染色体の DNA 量が推

定できる。

表 1. 各染色体のサイズから割り出した各染色体の DNA 量.

Chromosome	Relative length (%)	DNA contents (Mb)
1	20.8	56.16
2	13.7	36.99
3	13.6	36.72
4	11.7	31.59
5	7.2	19.44
6	7.1	19.17
7	5.7	15.39
Z	20.2	54.54
W	23.1	62.37
Total	100	270

(2) 蛍光インシットーハイブリダイゼーション (FISH)

染色体標本作製法は後述する FISH Mapping for Helminth Genome に詳細に記

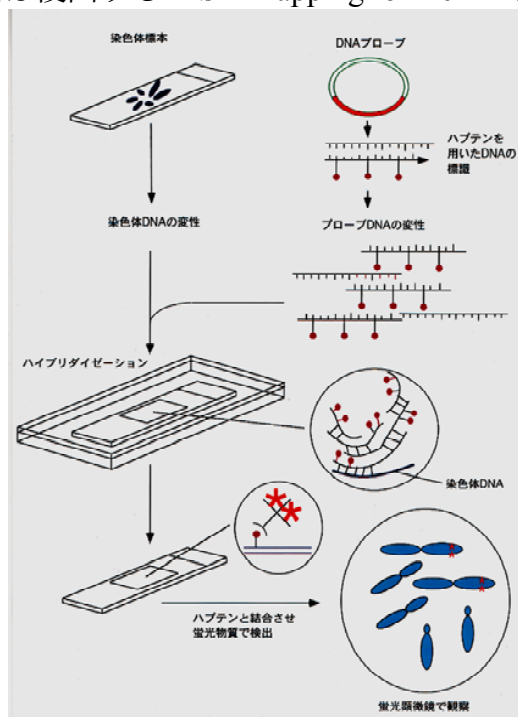


図 2. FISH 法の模式図

載した。その方法で作製したスライドガラス染色体標本と適当なハプテンを用

いて標識した DNA クローン（ここでは BAC クローン）をハイブリダイゼーションさせ、そのハプテンを認識する蛍光色素で検出する（図2）。DNA の標識は挿入している DNA のサイズによって、標識キットを変える必要があるが、BAC クローンの場合は Klenow エンザイムを使ったランダムプライム法が最もよかった。詳細は先に上げた文献を参照されたし。

（３） FISH 解析

FISH によって染色体上に検出されたシグナルは、蛍光顕微鏡で観察すると図3のように見える。観察データは画像解析装置でコンピュータに取り込まれ、デジタルデータとして保管される。図3に見られるように、クローンによって

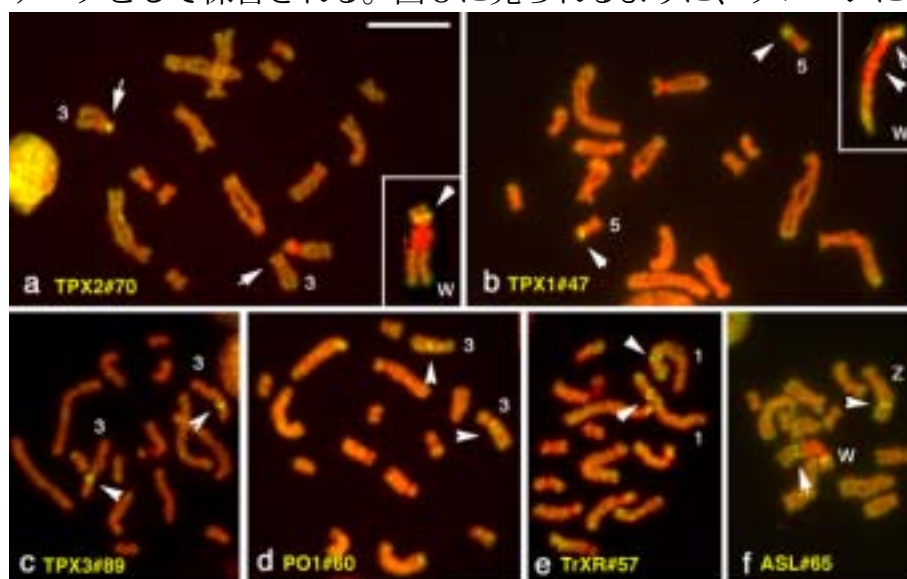


図3. FISH マッピングの例.

1本の染色体に特異的だったり、幾つかの染色体に反応するキメラ状態のものがあったりする。この情報がクローンの性質を明確し、その後の遺伝子解析等に重要な基礎情報となる。例えば、特異的遺伝子を BAC クローンライブラリーでスクリーニングして、反応したクローンの染色体上の座位が明らかになっていれば、その遺伝子の存在位置が明らかになる（図3参照）。

（４） シグナル位置の測定

先のもふれたように、住血吸虫類には G-および R-バンドのようなバーコードのようなバンドがないので、C-バンドで染色体を同定している。しかし、C-バンドではシグナルに番地を与えるバンド番号までは得られないので、シグナル位置を何らかの方法で測定する必要がある。そこで、画像解析ソフトを使って、デジタルデータ画像上で染色体の短腕末端からシグナルの位置を測定し（図4）、染色体長に比例したシグナルの相対位置を割り出している。誤差を是正するために、1クローンにつき3～5個の核板を用意し、その平均値を染色体の模式図にプロットしている。その一例を図5に示した。

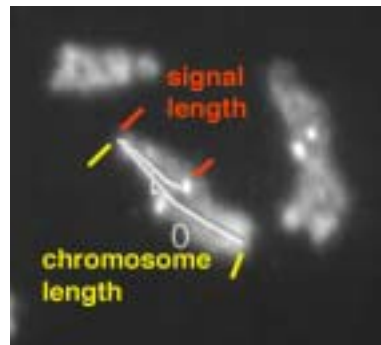


図 4 . シグナル位置の測定. 第 1 染色体上のシグナル位置を計測している例.

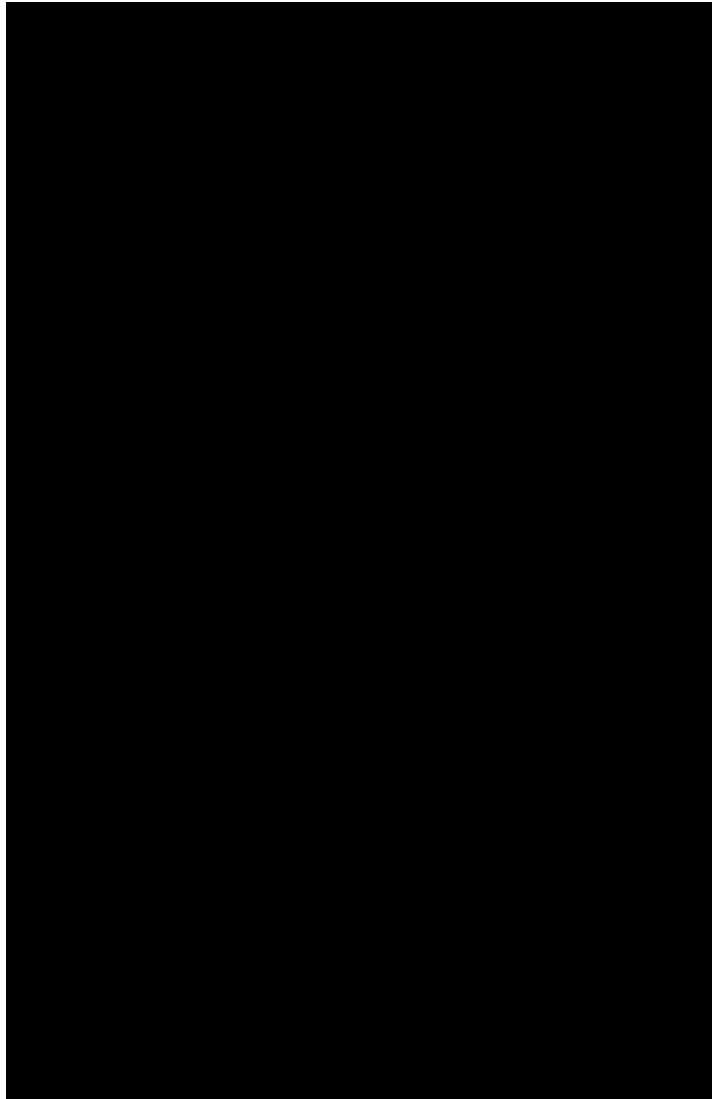


図 5 . 第 1 染色体に存在する BAC クローンの位置

(5) 染色体彩色プローブの作製

第1～4染色体ならびに性（Z, W）染色体はサイズ、形、C-バンド特性によって、比較的簡単に同定ができる。しかし、小型染色体の第5～7染色体はサイズ、形、C-バンドが良く似ているので、同定は非常に難しい。そこで、より客観的な同定を可能にするために、各染色体を特異的に彩色するプローブを作製した（田口尚弘氏の協力による）。図6に第5～7染色体を特異的に染めている彩色プローブの例を示した。方法は、第1に各染色体を約10本ずつ顕微鏡の下でマイクロマニピュレータを使って削り、PCR増幅後、その染色体に特異的な配列を持ったPCR産物を集めて標識し、彩色プローブとしたものである。

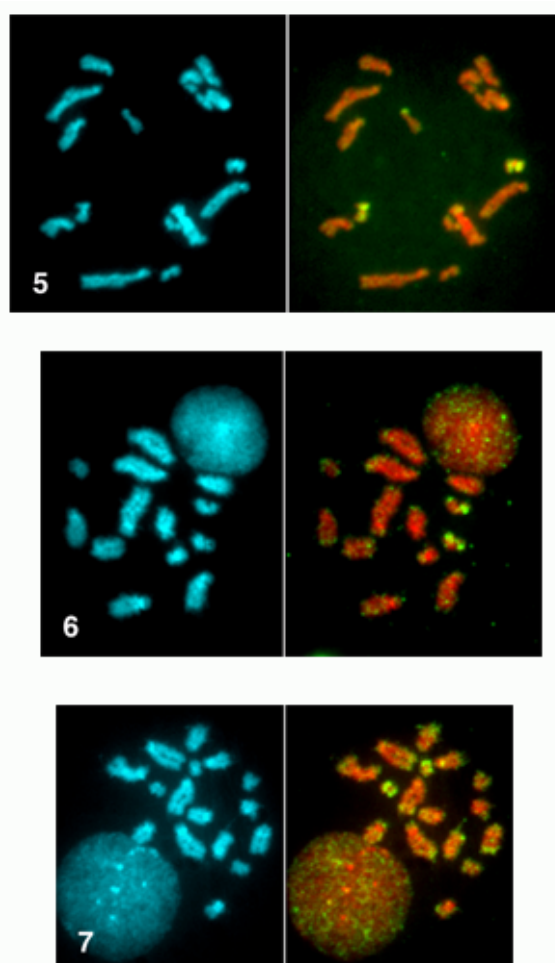


図6. 第5、6、7染色体の彩色プローブ.

これらの染色体マッピング技術がととのったことで、マンスン住血吸虫のBACクローンのマッピングが、以前にくらべると比較的速やかに行えるようになった。