

4. 住血吸虫染色体における遺伝子マッピングの意義

平井啓久

(掲載決定:平成3年8月7日)

はじめに

遺伝子マッピングは、ゲノム構成を知る上で非常に有効な手段であり、基礎および応用的な研究への有用性が高い。それゆえ、マッピングは遺伝学の初期より重要な課題のひとつであった。しかし、初期のマッピングは、ショウジョウバエのように詳細な遺伝実験が可能な生物に限られており、交配実験が不可能であったり、世代時間の長い生物では手の届かない研究であった。最近の組み換え DNA 法の発展は、その障壁を取り除く突破口となった。種々の遺伝子のクローニングや染色体 DNA 断片の分離が行われ、そのクローン化 DNA をプローブとしたマッピングが可能となったからである。特に、ヒトを含む哺乳類の細胞培養系の確立は、染色体マッピングの著しい進展をもたらした。10年前までは、寄生虫類の遺伝子マッピングなど思いも及ばなかったが、最近の目覚ましい分子寄生虫学および染色体技術の発展はそれを可能にした。今回は、我々が行っている *in situ* ハイブリダイゼーションを用いた Manson 住血吸虫の染色体上遺伝子マッピングについて紹介する。

In situ ハイブリダイゼーション法

染色体マッピングには、染色体標本とプローブとするクローン化 DNA が必要である。染色体標本の良否は *in situ* ハイブリダイゼーションの結果を左右するので、標本作製は最も重要なステップである。標本は伸張した多くの中期像が要求される。住血吸虫類では、Short and Grossman (1981) の改良法 (Hirai *et al.* 1989) が、簡便であり伸張した染色体を得易いことから現在のところ最も良いと思われる。プローブ (DNA) の作製法については多くの他の出版物に譲りたい。Gall and Pardue (1969) および Pardue and Gall (1969) が *in situ* ハイブリダイゼーション法を開発して以来、多くの改良法が工夫されて来た。

当初、住血吸虫の染色体 *in situ* ハイブリダイゼーションは、いくつかの方法が試みられたが、最終的に図 1 に示したようなビオチン-アビジン結合系を用いた非アイソトープ法 (Pinkel *et al.* 1986) が最も良いことが明

かになった (Hirai *et al.* 1989)。

プローブ DNA はランダムプライム法を用いてビオチン化ヌクレオシド (例えば bio-dATP, bio-dUTP など) で標識する。染色体標本は RNase と Proteinase K で前処理する。後者の過程は、住血吸虫の場合、核型を温存するために重要である。これは貝組織の蛋白が標本上に付着しているためと思われる。染色体 DNA 変性は、アルカリ処理 (pH12.5, 2 xSSC, 室温 4 分間処理) の方が哺乳類でよく用いられる 70%ホルムアミド処理 (70°C, 2分) より、核型を温存するために有利である。標識 DNA プローブは、ハイブリダイゼーション混合液と共に熱処理 (100°C, 5分) によって変性する。その混合液は、最終的に、標識 DNA プローブ液 0.4-0.6 μg/ml, ホルムアミド 45%, 硫酸デキストラン 9%, サケ精子 DNA 1.65 μg/ml, および BSA (20 mg/ml) を含む 1.9 xSSC の構成になっている。プローブ DNA の実質濃度は DNA の性質によって変更する必要がある。硫酸デキストランはプローブ DNA うちのネットワーク形成を誘発する。

ハイブリダイゼーション液 30-50 μl を染色体標本上に滴下しパラフィルムで覆う。2 xSSC で湿らせた濾紙を敷いた大型プラスチック製シャーレに入れ、37°C 多湿恒温器内に一晩静置する。ハイブリダイゼーション終了後、スライド標本は 40%ホルムアミドを含む 2 xSSC, 45°C, 2 xSSC 室温, 1 xSSC 室温にて 30 分間ずつ洗浄する。

ビオチン-アビジン結合系を使用したハイブリダイゼーションでは 2 通りの検出法が考えられる。第 1 は FITC-アビジンによる蛍光法、第 2 はアルカリ性ホスファターゼ (AP)-アビジン複合体による酵素法である。前者は抗アビジン抗体などを使用すれば陽性部位の検出を増幅できる。

蛍光法は、PI (propidium iodide) で染色体を染色後、落射式蛍光顕微鏡 (FITC B 励起フィルター) で観察する。ハイブリダイゼーション部位は黄緑色に光り、染色体は朱色に発色する。同時に C-バンド部位も識別できる。酵素法はギムザ液で染色体を染色後、光学顕微鏡 (フィルターなし) で検鏡すると、薄青紫色の染色体上に茶あるいは黒の陽性部位が観察できる。次に反復 DNA と比較的大小の小さい DNA における実験例を

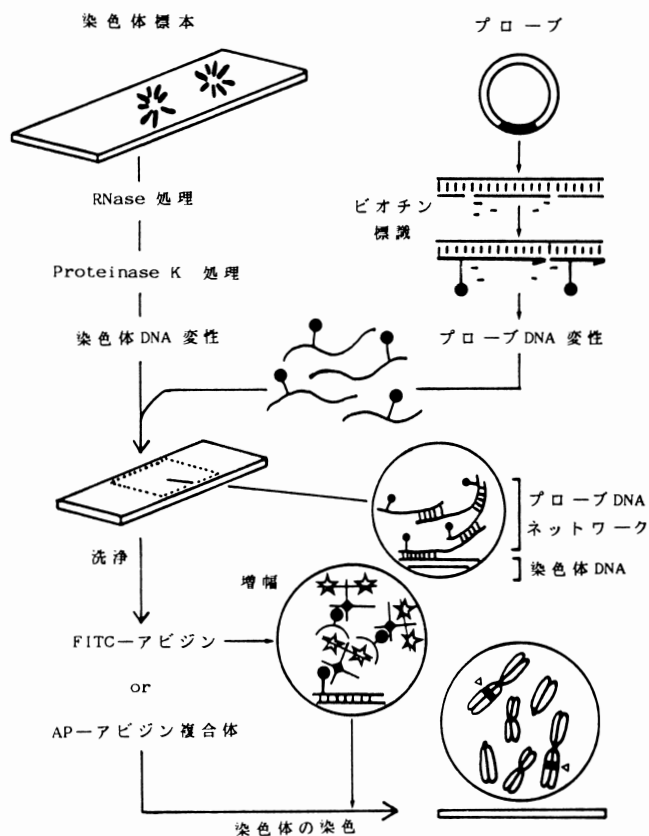


図1 *In situ* ハイブリダイゼーション法の簡略説明図。

紹介する。

雌特異性を有する反復 DNA $SM\alpha$

$SM\alpha$ は、マンスン住血吸虫のゲノム全体に分散していると思われる反復 DNA ファミリーである。ファミリー内のいくつかのメンバーはリトロポゾンの特徴を示し、ゲノム内に7,000–10,000回繰り返す、そして雌虫体の大きな断片と相同性を示す (Spotila *et al.* 1989)。Hirai *et al.* (1989) はこのファミリー内の $pSM\alpha t-2$ をプローブとして染色体上のマッピングを行った。 $SM\alpha t-2$ はサイズ335bp の *Sau 3 A* 断片で上記の特性を示す (Spotila *et al.* 1989)。図2にこのプローブの *in situ* ハイブリダイゼーションの状況を示した。蛍光法の場合、染色体はまず G 励起フィルター (FITC を発色しない) を用いて、PI 染色された核型と C-バンド部位 (より白く見える部位) によって同定される (図2a)。同定後、直ちにフィルターを B 励起に変え、FITC が発光している部位 (ハイブリダイゼーション部位) を観察する。図2b に示すように、 $SM\alpha t-2$ は

常染色体および性染色体いずれにも存在し、ゲノム全体に分散していた。しかし、もっとも注目されることは、ある特定の部位だけに顕著なスポットが見られた (鏤印)。これは、G 励起フィルターで観察された W 染色体短腕の C-バンド部位内に位置していた。このことは前中期像の染色体の観察においてより明確になった。図2c は W 染色体の大きな C-バンド (より白い部分) とその中に存在する小さな真正染色質のギャップ (矢印) を示している。一方、図2d はその同じ細胞のギャップ部位に顕著な FITC の発光を示した (鏤印)。観察した43個の全雌細胞が上記と同じ状況を呈した。Z 染色体は W におけるような顕著なスポットは決して示さなかった。

即ち、この部位における $SM\alpha$ 断片が、雌特異性を示す要因になっていると思われる。以上のことをより簡潔に説明してくれたのが、減数分裂の移動期におけるハイブリダイゼーションであった。図2e は C-バンド染色された ZW 染色体の対合状態を示している。右側の W 染色体は大きな C-バンドとその内部の真正染色質のギャップ (大矢印) を明確に示している。また、両染色体の相

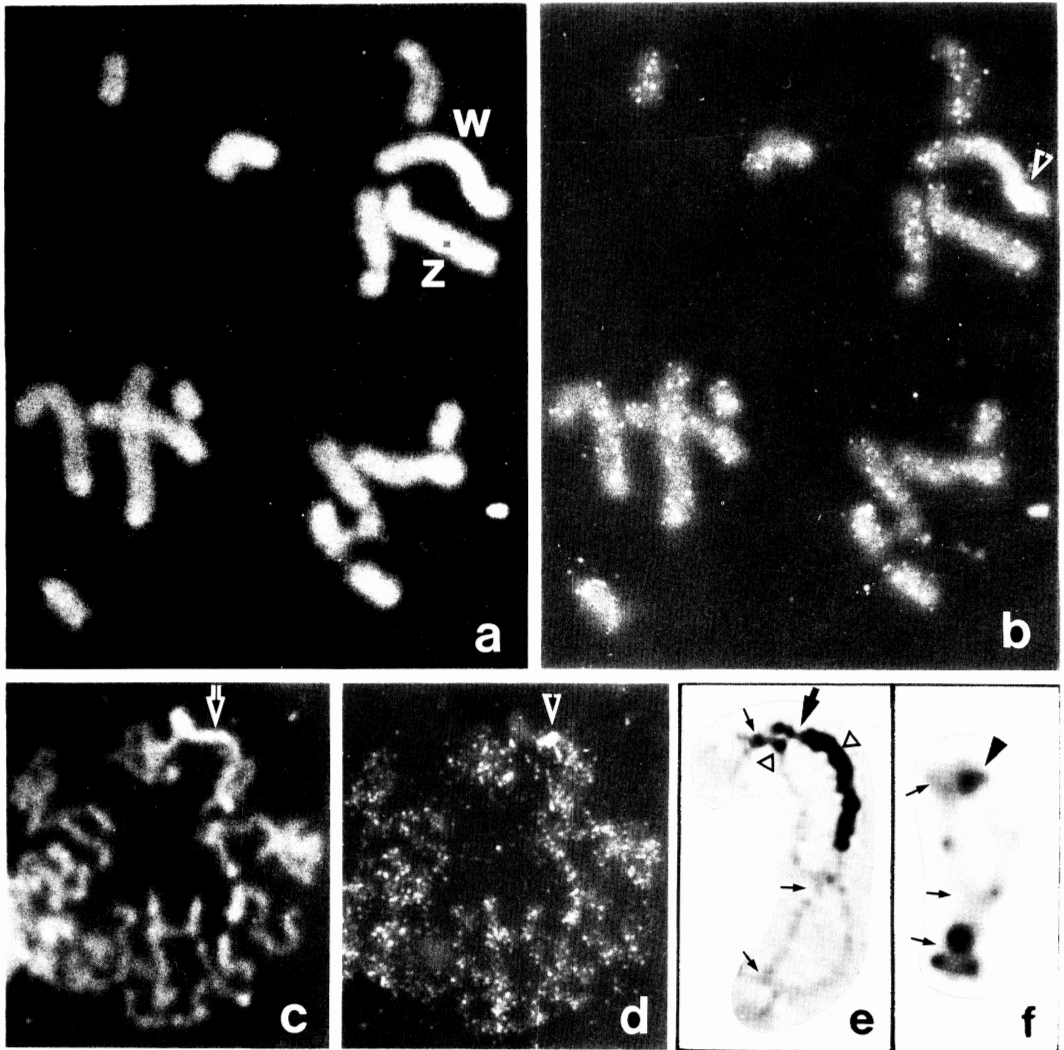


図2 雌特異的反復 DNA $SM\alpha$ のマンソン住血吸虫染色体における *in situ* ハイブリダイゼーション。a) G 励起 (TRITC) フィルターで観察した雌の中期染色体。b) a) と同細胞を B 励起 (FITC) フィルターで観察したもの。c) G 励起フィルターで観察した雌の前中期染色体。d) と同細胞を B 励起フィルターで観察したもの。ハイブリダイゼーション陽性部位が FITC の蛍光を発している (b, d)。e) C-バンド染色された減数分裂移動期における ZW 二価染色体。f) ZW 二価染色体 (移動期) における酵素法によるハイブリダイゼーションの検出。Z: Z 染色体。W: W 染色体。大矢印: 構成的異質染色体内の真正染色質ギャップ部位。鏃印: 顕著なハイブリダイゼーション陽性部位。小矢印: キアズマ形成部位。三角形: 動原体部位。

同性部位である真正染色質域では3個のキアズマが観察される (小矢印) が、非相同性域 (W の C-バンド域) にはそれが存在しない (図3)。ちなみに、ZZ 対合の場合は4個のキアズマが形成される。従って、W 染色体の構成的異質染色質はキアズマ形成を抑制していると思

われる。このような特性を持つ ZW 二価染色体に対して *in situ* ハイブリダイゼーションを試みると、片側染色体 (w) だけに陽性部位 (鏃印) が観察された (図2 f)。この部位は、前述した体細胞分裂の前中期像で見られたと同じように、図2 e で観察されたギャップ部位に

相当するものと思われる。

以上のことを総合すると、雌特异性を有する $SM\alpha$

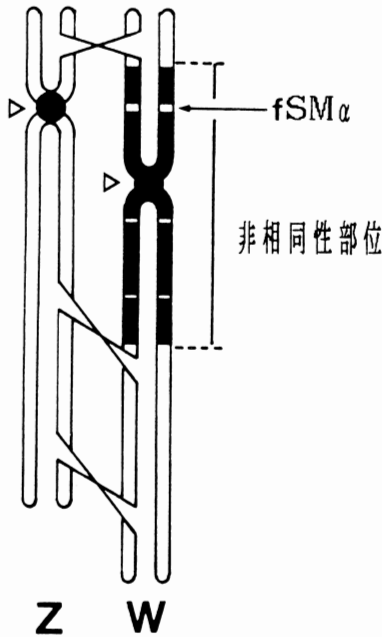


図3 雌特異的 $SM\alpha$ ($fSM\alpha$) とマ
ンソン住血吸虫性染色体 (ZW)
の特性との関係。三角形：動原
体部位。

($fSM\alpha$) は W 短腕の C-バンド内ギャップ域に位置し、構成的異質染色質のキアズマ抑制によって W 染色体に系統維持されて来たことが明かになった。さらに、この部位の $fSM\alpha$ は、W 染色体短腕の構成的異質染色質の縦列倍加と関連して、反復の増幅を行ったと推測される。なぜなら、W 染色体のその部位だけが Z 染色体より約 15% 長くなっているからである (図 3)。

卵殻形成蛋白をコードする遺伝子 P14 および P48

P14 および P48 はマ Manson 住血吸虫の成熟雌虫体だけに見出され、しかも発育過程にともなって調節される mRNA から相補的に形成された cDNA クローンである。この mRNA は、未成熟な雌、雄、および卵では確認されないが、正常な両性感染では、感染 30 日前後から認められ 45 日ごろまで増加を続ける (Bobek *et al.* 1986; Chen 1991)。両 cDNA のサイズは、P14 が約 950 bp の 5 コピーそして P48 が約 2 kbp の単コピーである。その DNA 配列から推測されるアミノ酸組成は、前者がグリシン (44%) そして後者はチロシン (26%) およびリジン (17%) が最も多かった (Bobek *et al.* 1986; Chen 1991)。

この両 cDNA をプローブとしてマッピングを行った (Hirai *et al.* 未発表)。図 4 に示したように、P14 (図 4 a) は第 3 染色体長腕の末端部に位置することが明かになった。109 個の細胞を観察したところ 79 個 (72%) の核板 (Spread) がこの部位に陽性を示した。一方、P48 (図 4 b) は同じ第 3 染色体長腕の基部に存在した。観察した 63 個の細胞の内 52 個 (82%) がこの部位に陽性

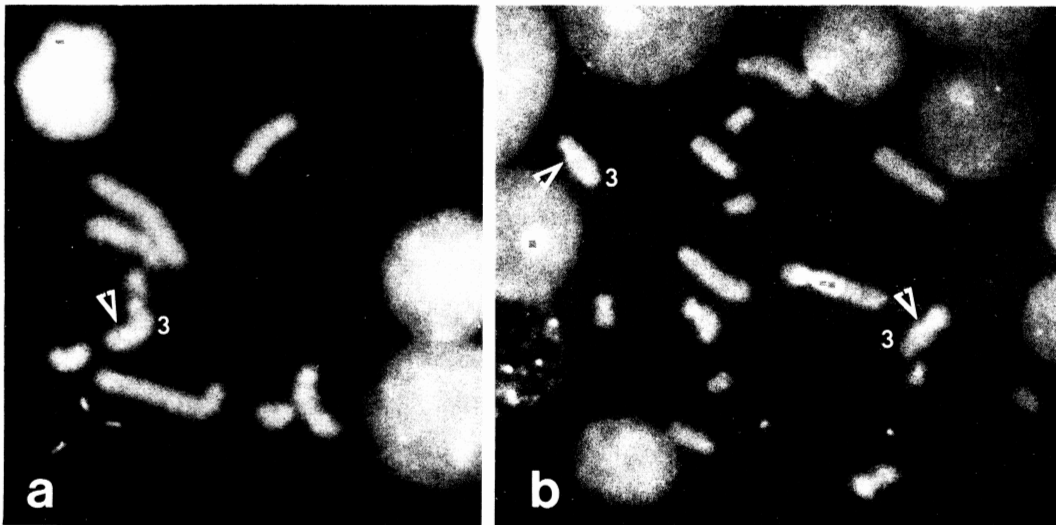


図 4 卵殻形成蛋白遺伝子 P14 (a) および P48 (b) の蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション。鏢印：ハイブリダイゼーション陽性部位。3：第 3 染色体。

を示した。即ち、両遺伝子は同染色体上で連鎖関係にある。両者とも遺伝子レベルでは各々雌雄の差はなく、両性とも第3染色体の各部位に陽性を示した。

おわりに

以上のように、染色体遺伝子マッピングは、DNAの分子生物学的および細胞遺伝学的な情報をより詳細なものにし、遺伝子の性状を考える上で非常に有効であった。今回紹介した *in situ* ハイブリダイゼーション法は、遺伝子の染色体上の位置をより直接的に検出できる点で非常に有用性が高く、住血吸虫では現在のところ最も良い遺伝子マッピング法と言える。

住血吸虫の場合、ラジオアイソトープ法は核型を温存できない点で不利である。手技の煩わしさや危険性を削減するためにも、非アイソトープ法の方が多くの生物において今後使用頻度が高くなると思われる。ピオチン-アビジン結合系では、今回紹介したように2 kbp単コピーサイズのDNAまでは分析可能だが、これ以下のサイズの単コピーは現在のところ非常に困難である。今後より一層の検出感度の増幅の工夫が要求される。ピオチン-アビジン結合系の中では、蛍光法の方が増幅可能なことから酵素法より分析力が高く有効である。しかし、染色体標本の性質によっては後者を必要とする場合もある。

今後より多くの遺伝子がマッピングされ、染色体地図が充実すれば、その成果は住血吸虫症の基礎および応用的な研究に対して多くの示唆を与えるものと期待される。

参考文献

- 1) Bobek, L., Rekosh, D. M., van Keulen, H., and LoVerde, P. T. (1986): Characterization of a female-specific cDNA derived from a developmentally regulated mRNA in the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 5544-5548.
- 2) Chen, L. L. (1991): The characterization of a *Schistosoma mansoni* female-specific gene that encodes a 48KDa eggshell protein. Ph. D. thesis of the state University of New York at Buffalo.
- 3) Gall, J. G., and Pardue, M. L. (1969): Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63, 378-383.
- 4) Hirai, H., Spotila, L. D., and LoVerde, P. T. (1989): *Schistosoma mansoni*: Chromosomal localization of DNA repeat elements by *in situ* hybridization using biotinylated DNA probes. Exp. Parasitol., 69, 175-188.
- 5) Pardue, M. L. and Gall, J. G. (1969): Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 64, 600-604.
- 6) Pinkel, D., Straume, T., and Gray, J. W. (1986): Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2934-2938.
- 7) Short, R. B., and Grossman, A. I. (1981): Conventional giemsa and C-banded karyotypes of *Schistosoma mansoni* and *S. rodhaini*. J. Parasitol., 67, 661-671.
- 8) Spotila, L. D., Hirai, H., Rekosh, D. M., and LoVerde, P. T. (1989): A retroposon-like short repetitive DNA element in the genome of the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. Chromosoma (Berl.), 97, 421-428.