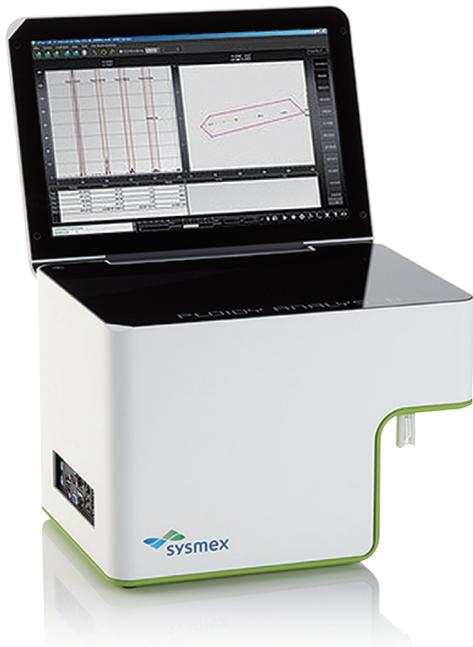


User Report



理化学研究所 生命機能科学研究センター
分子配列比較解析ユニット

ユニットリーダー 工樂 樹洋
技師 門田 満隆
研究員 宇野 好宣

使用機種：CyFlow Ploidy Analyser[※]

主な用途：脊椎動物のゲノムサイズ(核ゲノムDNA量)の推定

1. はじめに

神戸にある理化学研究所生命機能科学研究センターの分子配列比較解析ユニットでは、次世代シーケンスをはじめ、DNAとタンパク質の配列情報の取得と解釈に関わる様々な技術を培ってきた。その対象は、生命科学の主流であるヒト、そしてマウスなどの伝統的な実験動物から、重要でありながら分子情報の乏しい生物まで多様である。最近では、爬虫類の中で実験動物としてのポテンシャルが高い種の全ゲノムシーケンス解析の報告¹⁾や、ゲノム配列の評価方法の提案²⁾を行った実績がある。

超並列DNA解析技術の進歩により、大規模配列情報取得のハードルは確実に下がったといっていよう。一方で、取得した大規模データを鵜呑みにせず、データ内容の妥当性に正当な評価を与えることの重要性は増え続けるばかりである。そういった評価のニーズに対し、核ゲノムDNA量測定は、配列情報に依存せずに、取得すべきデータのサイズ、いわば到達目標を示してくれる究極的に唯一の方法であるといえる。

2. 研究内容について

当研究室では、脊椎動物の進化の初期に我々ヒトの祖先から分岐し、独特の多様化を果たした生物群として、軟骨魚類板鰓類(サメ・エイ類)についての研究も行っている。サメ・エイ類は、水産学上の興味は小さいが、一部の種は上位捕食者として生態学的に重要な位置を占めている。さらに、長寿命や発電などの形質も注目されている。近年では、危険生物としてよりも、保全対象とみなす機運が高まっており、海洋環境のバロメーターと言われることもある。しかし、サメ類がどのように生まれ、育ち、死んでいくのかについては未だ不明な点が多い。

サメ類については、これまで包括的なゲノム解析の報告は皆無であったが、ごく最近になって、当研究室により卵生種イヌザメとトラザメの全ゲノム解析が行われたばかりである³⁾。この研究においては、既存ゲノム情報が断片的であった現生で最大の魚類ジンベエザメのゲノム配列の改善も行われた。脊椎動物のなかでも、最もゲノム・遺伝子の情報整備が遅れていたサメ類の分子研究は今後加速するに違いない。

3. イヌザメのゲノムサイズ推定

本ユーザーレポートでは、フローサイトメーター CyFlow Ploidy Analyserを用いて、イヌザメのゲノムサイズを推定した。サメ類のゲノムサイズは一般に大きめで、10 Gbp(100億塩基対)を超える種もいとされている。我々自身が行った先行研究において、血球細胞を使用して他社フローサイトメーターで測定することにより、イヌザメの核ゲノムDNA量は4.832 pgという結果を得ていた³⁾。これは、塩基配列長としては4.73 Gbp ($0.978 \times 10^9 \times \text{DNA含量 (pg)}$ により算出⁴⁾)に相当する。

【試薬・装置】

- PI/RNase staining buffer
(BD Pharmingen : 550825)
- フローサイトメーター : CyFlow Ploidy Analyser※

※本品は医療機器ではありませんので、診断には使用できません。

【方法】

イヌザメのゲノムサイズ推定には成魚(図1a)の尾静脈より分取した末梢血中の血球細胞(図1b)を使用した。ゲノムサイズ推定の際の基準にはマウス細胞(C57BL/6マウスの肺組織由来の初代培養繊維芽細胞をトリプシン処理により分散させたもの)を使用した。

それぞれ $1 \sim 5 \times 10^6$ 個を1.5 mlチューブに回収し、マウス細胞については0.1%のTriton X-100を含むPBS(-)に、イヌザメ細胞については浸透圧調整のために尿素と塩化ナトリウムを高濃度に含んだPBS(-)⁵⁾中で裸核化処理を行った。Propidium Iodide (PI) とRNaseを含むPI/RNase staining buffer中にて室温で15分間染色後、CyFlow Ploidy Analyserで測定した。

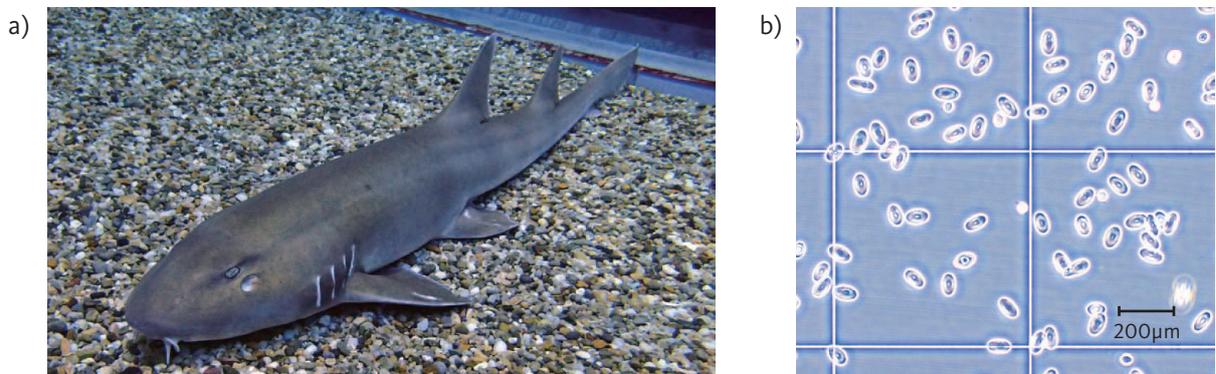


図1. イヌザメ(*Chiloscyllium punctatum*)の血液サンプルの調製

- 血液を採取した個体と同程度の体長のイヌザメ成魚(大阪海遊館にて撮影)。
- ゲノムサイズ測定に使用した血球細胞。血液はヘパリンを含むシリンジに採取したあと、尿素を含むPBS(-)に希釈してから血球計算盤で血球細胞数のカウントを行い、CyFlow Ploidy Analyserを用いたゲノムサイズ測定に使用した。

【結果】

最初にイヌザメの血球細胞とマウス細胞を別々に測定し、CyFlow Ploidy Analyserの測定条件(Gain値、Signal cut off値など)を調整した。その測定条件を用いて、両細胞を混合し再度測定を行った。PI蛍光強度ヒストグラムのピークにリージョンを設定し(図2a)、各ピークの統計データを取得した(図2b)。

内部標準として使用したマウスのG0/G1期の細胞(2c)、G2/M期の細胞(4c)のPI蛍光強度の平均値と既知のマウス核ゲノムDNA量(3.25 pg)⁶⁾をもとに検量線を作成し、イヌザメの核ゲノムDNA量を算出した(図3)。その結果、イヌザメの核ゲノムDNA量は4.825 pg、塩基配列長は4.72 Gbpと推定された。CyFlow Ploidy Analyserにより得られたゲノムサイズは、フルスペックの他社フローサイトメーターで測定した結果と近接した値を示した。

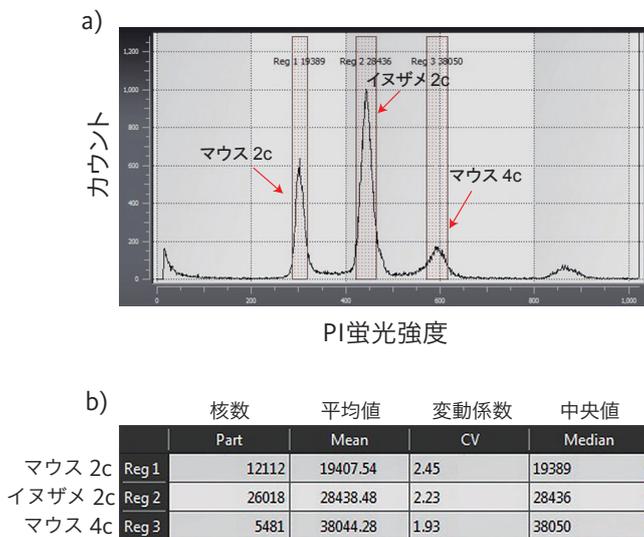


図2. イヌザメのゲノムサイズ測定結果
(CyFlow Ploidy Analyserの画面の一部を切り取ったもの)

- a) イヌザメ血球細胞を使用したゲノムサイズ測定におけるPI蛍光強度ヒストグラム。イヌザメの血球細胞とマウス細胞を別々に測定した結果と比較し、各ピークにリージョンを設定した。
- b) 各ピークの統計データ。

【参考文献】

- Hara, Y. et al. Madagascar ground gecko genome analysis characterizes asymmetric fates of duplicated genes. BMC Biology 16, 40 (2018).
- Nishimura, O. et al. gVolante for standardizing completeness assessment of genome and transcriptome assemblies. Bioinformatics 33, 3635-3637 (2017).
- Hara, Y. et al. Shark genomes provide insights into elasmobranch evolution and the origin of vertebrates. Nat. Ecol. Evol. 2, 1761-1771 (2018).
- Dolezal, J. et al. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. Cytometry A. 51, 127-8 (2003).
- Maddock, M. et al. Elasmobranch cytogenetics: methods and sex chromosomes. Bull. Mar. Sci. 58, 147-155 (1996).
- Vinogradov, A. E. Genome size and GC-percent in vertebrates as determined by flow cytometry: the triangular relationship. Cytometry 31, 100-9 (1998).

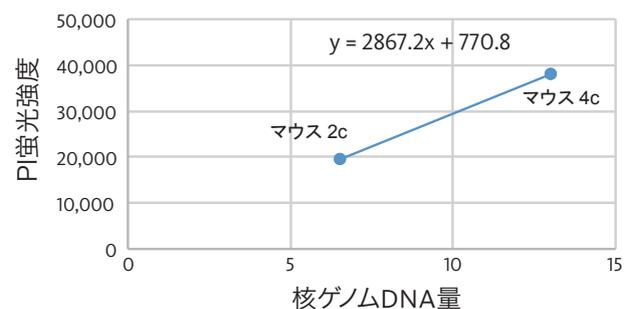
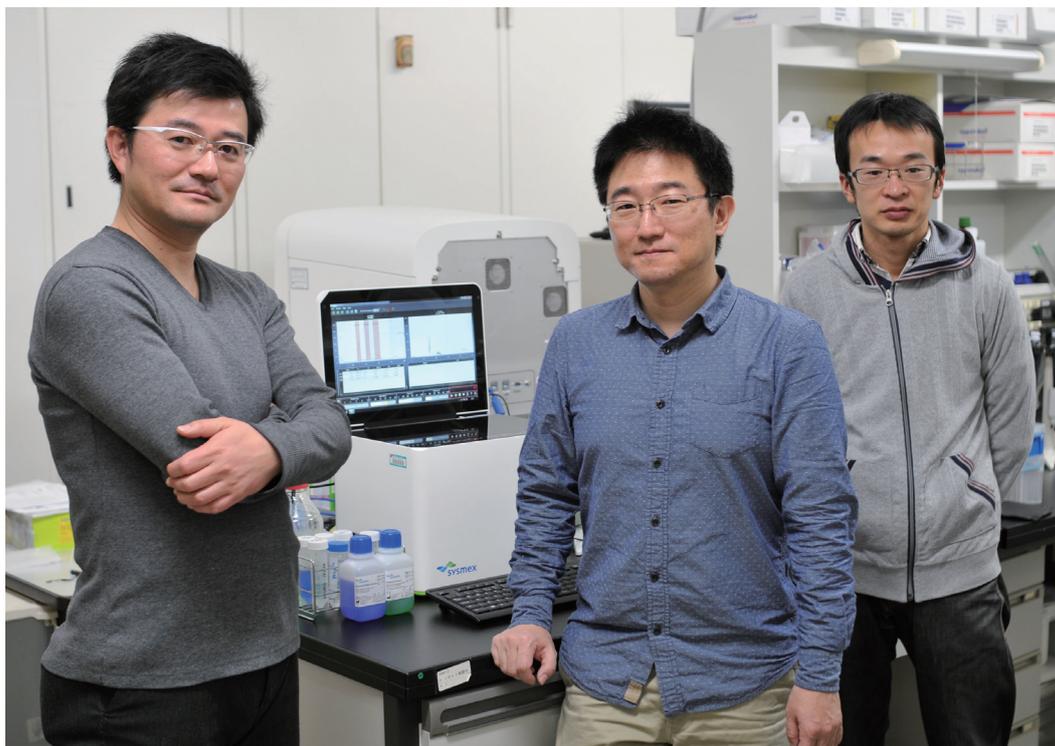


図3. イヌザメのゲノムサイズの算出
内部標準であるマウスのG0/G1期の細胞(2c)、G2/M期の細胞(4c)におけるPI蛍光強度の平均値と核ゲノムDNA量(3.25 pg)をもとに検量線を作成。検量線から推定されたイヌザメの核ゲノムDNA量は4.825 pgであり、塩基配列長は4.72 Gbp($0.978 \times 10^9 \times \text{DNA含量 (pg)}$ により算出)と推定された。

4. シスメックスの装置の導入背景および使用感について

CyFlow Ploidy Analyserは、我々がこれまで使用していたフルスペックのフローサイトメーターに比べて安価であること、小型・軽量で移動が容易であること、そしてPI色素を使用した測定に適したグリーンレーザー（532 nm）を搭載していること、などの理由から購入を決定しました。バッファー類（Cleaning solution、Decontamination solutionなど）はわかりやすく色付けされており、取り違い等を抑える配慮もされています。本ユーザーレポートで報告した実験では使用しませんでした。様々な動植物細胞に対応したキット（CyStainシリーズ）が用意されていることもCyFlow Ploidy Analyserの利点です。簡便さと迅速性を備えつつも、高精度に核ゲノムDNA量を測定することが可能なCyFlow Ploidy Analyserを導入することができ、そのパフォーマンスには満足しています。



工樂 ユニットリーダー

門田 技師

宇野 研究員

本誌の内容を無断で複写・複製・転写すると、著作権・出版権の侵害となることがありますのでご注意ください。

販売元

シスメックス株式会社

本 社 神戸市中央区脇浜海岸通1-5-1 〒651-0073

お問合せ先

日本・東アジア地域本部 R&I事業推進部

リレーショナルセンター 神戸市西区室谷1-3-2 〒651-2241 Tel 078-991-2091 Fax 078-997-9976

東京支社 東京都品川区大崎1-2-2 〒141-0032 Tel 03-5434-8556 Fax 03-5434-8557

sysmex-fcm.jp