〔ミニレビュー〕

ウシゲノム解析用ツールの開発とゲノム解読の現状

高須賀晶子

(社)畜産技術協会附属動物遺伝研究所

Development of bovine genomic tools and the progress of the bovine genome sequencing project

Akiko TAKASUGA

Shirakawa Institute of Animal Genetics

1. はじめに

ゲノム解析のツールとして、連鎖地図、RH 地図、BAC 整列地図など(後に詳述する)があげられるが、究極は全ゲノム塩基配列の決定である。2001 年にヒトゲノムドラフト配列が決定されて以降、哺乳動物としては、マウス(2002 年)、ラット(2004 年)、チンパンジー(2005 年)、イヌ(2005 年)のゲノム配列が決定され、次いで、今、ウシのゲノム配列が決定されつつある。家畜の中では、ニワトリに次ぐ2 番手となり、3 番手にはブタの配列決定が予定されている。ウシのゲノム塩基配列決定は、米国テキサス大学ベイラー校のヒトゲノムシーケンシングセンターで行われているが、ここは、一ヶ月で一つの哺乳動物種ゲノムの塩基配列を読む力を持っているようだ。が、実際は、最初にあげたような地図(それも、多数のマーカーを持つ高密度のもの)がなければ、染色体上の位置のわからない、短い配列断片が大量にできるだけ、ゲノム配列にはならない。

動物遺伝研究所では、ウシゲノムプロジェクトが始まる以前から、研究を効率良く進めるにはゲノム解析用ツールの充実が必須と考え、米国農務省肉畜研究センター(USDA-MARC)と共同で高密度連鎖地図の作成に、また、ネバダ大との共同で高密度 RH 地図の作成に着手した。その後、米国を中心とした国際コンソシアム(日本の研究機関は参加していない)が結成され、BAC フィンガープリント整列地図などが作成されつつある。ウシゲノム塩基配列については、2004 年9 月に、3 x WGS (Whole Genome Shotgun) 配列(全ゲノムを断片化した配列を、のべで全ゲノムの3 倍に相当する長さになるまで読んだもの)が、ついで、2005 年3 月に、6 x WGS 配列が公開された。ここでは、私たちの作成

した高密度連鎖地図および RH 地図を、ウシゲノム解読の現状とともに紹介したい。また、ゲノム解析に詳しくない方のために、次項で各地図の特長と役割について記したので、参照していただければと思う。

2. 各々の地図の特徴と役割

地図には、連鎖地図と物理地図(RH 地図や BAC 整列地図)とがあり、連鎖地図は、マーカー間の距離を遺伝的な物差し(連鎖の度合い、すなわち遺伝上の組み換え頻度)で測り、並べたものであるのに対して、物理地図は DNA の長さという物理的な物差しの上にマーカーを並べたものである。

(1) 連鎖地図

減数分裂の過程において、相同染色体間の組み換えが起こることが知られているが、その際、ある2 マーカーの位置(座位という)が同一染色体上で近くにあればあるほど、その間で組み換えの起こる確率は低くなり、ともに親から子に受け継がれる(連鎖する)確率が高くなる。一方、距離が遠ければ、その間で組み換えの起こる確率は高く、連鎖しない。多数の減数分裂が観察できる大きな家系で、各マーカーの伝わり方を調べると、マーカー間の組み換え頻度が算定でき、遺伝的尺度上にマーカーを並べることができる。

連鎖地図のマーカーには、相同染色体間を識別でき

連絡先: 高須賀晶子、(社)畜産技術協会 附属動物遺伝研究所
〒961-8061 福島県西白河郡西郷村大字小田倉字小田倉原一
(e-mail: takasuga@siag.or.jp)

る多型性が必要である。ゲノム上には、マイクロサテライトと呼ばれる短い塩基配列の繰り返しから成る反復配列((CA)_nなど)が散在しており、その繰り返し数 n は各相同染色体に固有であるので、連鎖地図のマーカーとして汎用される。

連鎖地図の役割には、大きく2つがあり、ひとつは、遺伝病や経済形質などの座位をマッピングするためのマーカーの提供、もう一つは、物理地図作成のための足場の提供である。

(2) RH 地図

RH 地図は、放射線照射体細胞雑種(Radiation Hybrid)地図のことで、一定量の放射線照射で切断されるゲノム DNA の長さが尺度となっている。正常細胞(私たちの場合は、ウシ正常細胞)の染色体を放射線照射により断片化した後、ハムスターなどの齧歯類由来の細胞(宿主細胞)と融合させ、100 種類程度の融合細胞から各々 DNA を回収してセットとした「RH パネル」を用いて、地図を作成する。RH パネルを構成する各 DNA には、断片化された正常細胞(ウシ)由来の染色体の一部が宿主細胞の染色体内に組み込まれて保持されているので、任意のマーカーを PCR 増幅することで、どの融合細胞 DNA がそのマーカーを含む染色体領域を保持していたか否かを知ることができる。ある2つのマーカーが近接していれば、各 RH パネルにおける PCR 増幅の有無のパターンは相似し、離れていれば相似しない。このような原理で、各マーカーの順番とマーカー間距離が算定できる。

RH 地図のマーカーは、連鎖地図のマーカーのように多型性を必要としないため、遺伝子配列からマーカーを設計してマッピングすることにより、遺伝子地図を作ることができる。一方で、RH マッピングは PCR 増幅の有無のみに依拠するため、エラーを除くことが難しい。そこで、RH 地図の信頼性を確保するためには、連鎖地図の情報を基本にしなければならない。つまり、連鎖地図上で染色体上の位置が特定されているマーカー、通常はマイクロサテライトマーカー、の並ぶ順番の情報を用いて、RH 地図のフレームワークを構築する(枠作りを行う)。照射放射線量が高いほど、染色体は細かく分断されて RH 地図の解像度は上がるものの、これらを正確につなぐためには、数多くのマーカーが必要になる。したがって、解像度の良い RH 地図を作るためには、高密度連鎖地図の作成が不可欠である。

RH 地図の有用性は、第一に、遺伝子地図を作るこ

とができるということで、これによって、他の種、例えばヒトとのゲノム比較地図を作成することができ、比較地図を通じて、ヒトなどの豊富な遺伝子情報をはじめとするゲノム情報を利用できるようになることである。連鎖地図との統合によって、遺伝病などをマッピングした染色体領域が、ヒトのどの染色体領域に相当するのか、そこにはどのような候補遺伝子があるか、を一時に知ることができる。第二に、BAC 整列地図の作成やゲノム配列を染色体上に並べる際の足場として、重要である。

(3) BAC 整列地図

染色体 DNA を 150–200 kb 程度の大きさに切断して、大腸菌細胞内で複製できるように人工染色体に組み込んだものを BAC クローンといい、これを染色体上の順番で並べたものが BAC 整列地図である。BAC クローン DNA を特定の制限酵素で切断したパターン(フィンガープリント)同士を比較し、パターンの相同性に基づいてつなぎ合わせることによって、染色体上の順番に BAC クローンを並べることができる。このようにして並べた BAC クローンの一群をコンティグと呼ぶ。コンティグに含まれるマーカーを用いて、RH 地図と統合することにより、コンティグを染色体上に並べた BAC 整列地図ができる。

BAC 整列地図があるか否かは、ゲノム配列決定の質を左右する。ゲノム配列決定には、通常、全ゲノムを断片化した配列を全ゲノムの6倍長読んだものと、整列化した BAC クローンを全ゲノムの2倍長読んだものとを合わせて用いる。後者を加えることにより、配列間のギャップやつなぎ間違いの少ないゲノム配列が得られる。

3. 高密度連鎖地図の作成

ウシでは、1997 年に米国農務省肉畜研究センター(USDA-MARC)らのグループが、1,250 個の DNA マーカーを含む連鎖地図を作成したが(Kappes ら 1997)、その後は、形質のマッピングにはこの程度の密度でも差し支えないことと、マーカーの開発には多大な労力と費用がかかることから、連鎖地図の更新はなされていなかった。しかし、疾病や経済形質をマッピングした後の原因遺伝子の同定を視野に入れた時、マッピングした領域ごとにマーカーを高密度に開発するのでは、大変に効率が悪い。そこで、全ゲノムを対象にランダムにマーカーを開発し、3,000 個のマイクロサテライトマーカーを含む連鎖地図を作ることを目標とし

図1. Shirakawa-USDA 連鎖地図
第1番染色体から第3番染色体(BTA 1-3)までを示した。その他の染色体およびマーカー情報は、<http://www.marc.usda.gov/genome/cattle/cattle.html> で閲覧できる。

— 34 —

て作成に取りかかった。そして、2,293 個のマイクロサテライトを USDA-MARC の連鎖地図に追加することによって、3,802 個のマイクロサテライトマーカーを含む 3,960 個のマーカーから成る地図を作成し、Shirakawa-USDA 連鎖地図として発表した (Ihara ら 2004)。

連鎖地図の解像度は、マッピングに用いる標準家系の規模に依存するので、USDA-MARC のウシ標準家系では、解像度の限界は 0.8 cM (= 約 800 kb) である。Shirakawa-USDA 連鎖地図の 3,960 個のマーカーは、2,423 ポジションの「点」であり、マーカー間隔は平均 1.4 cM であった。連鎖地図の更新により、マーカー間隔が 10 cM を超えるギャップは、X 染色体の一箇所のみとなり、全ゲノムの 51 % はマーカー間隔 2 cM 以下で、また、91 % は 5 cM 以下でカバーされた。この結果、疾病や経済形質のファインマッピングに十分なマーカー密度となり、また、RH 地図の足場としても十分なものが作成できた。

4. 高密度 RH 地図とウシ-ヒトゲノム比較地図の作成

2000 年に米国テキサス A&M 大学の Womack らのグループが最初のウシ全ゲノム RH 地図 (5,000-rad 放射線照射 RH パネルによる) を報告した (Band ら 2000)。これは、319 個のマイクロサテライトと 768 個の遺伝子から成り、ウシ-ヒトゲノム比較地図において 105 以上のシンテニーが観察されることがわかった。2002 年には、英国のロスリン研究所やフランスの国立農業研究機構 (INRA) などの共同で 3,000-rad 放射線照射 RH パネルを用いた地図が報告された (Williams ら 2002)。これは、当時の連鎖地図にマップされていたマーカーから、できるだけ多くのマーカーを用いてフレームワークを構築しようとしたもので、1,148 個のマイクロサテライトと 90 個の遺伝子から成っていた。前者の Womack らの RH パネルについては、イリノイ大の Lewin らのグループが 1,913 個のマーカー (うち、667 個をフレームワークマーカーとして使用) から成る第 2 世代の全ゲノム RH 地図を作成し、2004 年に報告した (Everts-van der Wind ら 2004)。しかしながら、これらのウシ RH 地図では、フレームワークに用いたマーカー数が充分とはいえず、信頼性および解像度に限界があると思われた。

私たちは、米国ミネソタ大 (現、ネバダ大) の Beattie 教授と共同で、7,000-rad 放射線照射 RH パネルを作成した。この RH パネル (SUNbRH パネル) を用いて、Shirakawa-USDA 連鎖地図上にマップされたマイ

クロサテライトマーカー 3,216 個を用いてフレームワークを作成した。図 2 をみると、連鎖地図と比較して、マーカー同士がよく分離しており、RH 地図の解像度のよいことが一目でわかる。

このフレームワーク上に、2,377 個の遺伝子または EST をマップした。EST とは、ゲノム上で発現している配列 (遺伝子) の一部分について塩基配列を決定したもののことをいう。ここで用いたほとんどの EST は、私たちが過去に開発したものである (Takasuga ら 2001; Itoh ら 2003)。

このようにして、計 5,593 マーカーから成る RH 地図 (SNUbRH 地図) が完成した (Itoh ら 2005)。このうち 1,716 マーカーについて、ヒトゲノム上に相同配列を見いだすことができ、これらを用いてウシ-ヒトゲノム比較地図を作成した (図 3)。少なくとも 161 個のシンテニーが観察され、特に 4 番、8 番、10 番、13 番、19 番などの染色体について、過去の報告と比べて、より複雑なシンテニーが観察された。私たちの比較地図で観察された全シンテニーは、ウシ RH 地図の 79 %、ヒトゲノムの 72 % をカバーしていた。また、RH 地図 1cR は、約 114 kb に相当すると算定された。

5. BAC フィンガープリント地図との統合

私たちの作成した RH 地図が物理的な実体のある染色体地図を作成する上でどの程度有効かを、4 番染色体を例に検証した (Itoh ら 2005)。前述のように、国際コンソシアムでは、BAC フィンガープリント地図を作成中で、随時、データをウェブサイトで公開している (<http://www.bcgsc.ca/lab/mapping/bovine>)。そこで、4 番染色体のマイクロサテライトマーカーおよび EST について BAC クローンのスクリーニングを行い、ウェブサイトでこれらのクローンの属する BAC コンティグを検索し、BAC クローンの末端塩基配列とヒトゲノム塩基配列との相同性の情報も含めて、ウシ染色体上に並べてみた (図 4)。その結果、私たちの RH 地図は、BAC コンティグをウシ染色体上に並べていくのに十分なマーカー数を持つことが確認された。また、私たちの比較地図は、BAC クローンの末端塩基配列を相同性に基づいてヒトゲノム上に並べた結果と、よく一致しており、私たちの比較地図は十分な解像度をもつ、信頼性の高い地図であることが確認された。

6. ウシゲノム解読の現状

ウシゲノムプロジェクトは、Phase I と Phase II から成り、Phase I は、ウシゲノムの塩基配列決定から

図 3. ウシーヒトゲノム比較地図

第1番染色体から第6番染色体までを示した。ウシ染色体（黒太線、数字の単位はcR）上に、ヒト染色体との相同領域（シンテニー）を、□で示した。□の右側の数字は、ヒト染色体の塩基配列番号（単位は、bp）を示し、□内の矢印は、シンテニーの向きを示す。その他の染色体については、Itohらの文献(2005)を参照されたい。また、これらの詳細は、<http://www.animalgenome.org/cattle/maps/RHMap3/>で閲覧できる。

図 4. SUNbRH 地図を用いた BAC コンティグの整列化

ウシ第 4 番染色体上の霜降りの肉質に関する領域について (Mizoshita ら 2004)、SUNbRH 地図と BAC フィンガープリント地図の情報を用いて、BAC コンティグの整列化を行った。SUNbRH 地図上のマーカーでスクリーニングした BAC クローンの BAC コンティグ内での位置を線で結んでいる。左端は SUNbRH 地図の、右端はコンティグに含まれる BAC クローンの末端塩基配列を用いた場合のヒトゲノムとの比較地図を示す。BAC コンティグを整列化することによって、ヒトゲノムとのシンテニーが、より詳細に明らかになった。また、この時点で用いた BAC コンティグの情報には誤りがあることも明らかになったが、(contig8087 は contig3584 の間に入る)、その後の改訂で修正されている。

Annotaiion までを、Phase II は、SNP 検索と各品種の HapMap の作成を目的としている。

Phase I については、先に触れたように、すでに、ゲノムの 6 倍長の WGS 配列が公開されているが、現在、ゲノムの 2 倍長の BAC skim (フィンガープリントで整理化した BAC クローンを、単一、もしくは、プールして、配列を読んだもの) が進行中である (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/bovine/>)。現在用いられているゲノム塩基配列決定の手法は、WGS と BAC skim を組み合わせたもので、BAC skim により、配列間のギャップが埋まり、また、リピート配列によるつなぎ間違いが改善されることが期待される。実際、現在公開されている 6 x WGS 配列は、92 % の EST と 96 % の BAC 末端配列を含んでいて、遺伝子の Annotation にはほぼ十分であると考えられているが、WGS 配列の半分は 434 kb 以下の長さで、特に、遺伝子のプロモーター領域に相当する CpG island 部分はギャップになっていることが多い。

WGS 配列と BAC skim 配列は、アセンブルされて scaffold 配列となった後、scaffold 配列が含むマーカーによって、地図を通してウシ染色体上に配列される。ウシゲノムプロジェクトにおいて、高密度地図の必要性が認識されるのに伴い、前出の 5,000-rad と 3,000-rad の RH 地図の充実も図られている。Lewin らのグループは、2005 年 12 月に、3,484 個のマーカーから成る第 3 世代の RH 地図を報告した (Everts-van der Wind ら 2005)。これは、2,516 個の BAC 末端マーカーを含んでおり、BAC フィンガープリント地図との統合を図ったものである。また、カナダの Moore らのグループは、3,000-rad の RH 地図に、多数の SNP をマッピングし、WGS 配列との統合を図っている (McKay ら 2006)。また、米国ミズーリ大の Taylor らは、14 世代から成るアンガス種の家系を用いて、多数の SNP をマッピングした連鎖地図を作成している。国際コンソシアムでは、現在これらすべてを含んだ統合地図 (Composite map) を作成中である。この統合地図を用いて、scaffold 配列がウシゲノム上にアセンブルされる見込みである。

一方、Phase II は、SNP 検索と HapMap の作成を目的としている。すでに、WGS (ヘレフォード種を使用) と、その他 6 品種 (アンガス、ブラーマン、ホルスタイン、ジャージー、リムジン、ノルウエーレッド) のゲノムシーケンシングにより、一万個以上の SNP が見出されている。今後、これらの SNP が各品種でタイピングされ、ハプロタイプブロック等が明らかに

されていく予定である。

7. おわりに

動物遺伝研究所が取り組んできたゲノム解析用ツールの開発は、時代の流れに沿って、ウシゲノムプロジェクトへ受け継がれた。連鎖地図の高密度化を行い、その結果を利用して構築したフレームワークに基づいた RH 地図の作成は、ウシゲノム配列決定へのきわめて重要な貢献であったと位置付けられるだろう。Phase I で完成度の高いウシゲノム配列が得られることが、Phase II のウシ HapMap の作成にも重要である。SNP の正しい位置が得られなければ、ハプロタイプブロックの解析などできないからである。Phase II が完了する数年後には、ウシ品種間の差が、SNP レベルで明らかにされ、ヒトと同じように、ウシにおいても SNP アレイを用いて全ゲノムを対象にした相関解析を行える基盤ができるだろう。その時には、ゲノム解析に関して、皆が同じスタートラインに立つことになる。今、その先を見通した戦略が必要とされている。

謝辞

本研究は、全国競馬・畜産振興会から助成を受けて造成された基金によって遂行された。

引用文献

- Band MR, Larson JH, Rebeiz M, Green CA, Heyen DW, Donovan J, Windish R, Steining C, Mahyuddin P, Womack JE, Lewin HA. 2000. An ordered comparative map of the cattle and human genomes. *Genome Research*, 10: 1359–1368.
- Everts-van der Wind A, Kata SR, Band MR, Rebeiz M, Larkin DM, Everts RE, Green CA, Liu L, Natarajan S, Goldammer T, Lee JH, McKay S, Womack JE, Lewin HA. 2004. A 1463 gene cattle-human comparative map with anchor points defined by human genome sequence coordinates. *Genome Research*, 14: 1424–1437.
- Everts-van der Wind A, Larkin DM, Green CA, Elliott JS, Olmstead CA, Chiu R, Schein JE, Marra MA, Womack JE, Lewin HA. 2005. A high-resolution whole-genome cattle-human comparative map reveals details of mammalian chromosome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 18526–18531.
- Ihara N, Takasuga A, Mizoshita K, Takeda H, Sugimoto M,

- Mizoguchi Y, Hirano T, Itoh T, Watanabe T, Reed KM, Snelling WM, Kappes SM, Beattie CW, Bennett GL, Sugimoto Y. 2004. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Research*, 14: 1987–1998.
- Itoh T, Takasuga A, Watanabe T, Sugimoto Y. 2003. Mapping of 1400 expressed sequence tags in the bovine genome using a somatic cell hybrid panel. *Animal Genetics*, 34: 362–370.
- Itoh T, Watanabe T, Ihara N, Mariani P, Beattie CW, Sugimoto Y, Takasuga A. 2005. A comprehensive radiation hybrid map of the bovine genome comprising 5593 loci. *Genomics*, 85: 413–424.
- Kappes SM, Keele JW, Stone RT, McGraw RA, Sonstegard TS, Smith TP, Lopez-Corrales NL, Beattie CW. 1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research*, 7: 235–249.
- McKay SD, Murdoch BM, Williams JL, Gill C, Aerts J, Law A, Wang Z, Moore SS. 2006. An Illumina based whole genome bovine-human comparative map constructed with high throughput methodology. *Plant & Animal Genome XIV*, P540.
- Mizoshita K, Watanabe T, Hayashi H, Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Sugimoto Y. 2004. Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a half-sib family of purebred Japanese Black (Wagyu) cattle. *Journal of Animal Science*, 82: 3415–3420.
- Takasuga A, Hirotsune S, Itoh R, Jitohzono A, Suzuki H, Aso H, Sugimoto Y. 2001. Establishment of a high throughput EST sequencing system using poly(A) tail-removed cDNA libraries and determination of 36,000 bovine ESTs. *Nucleic Acids Research*, 29: E108.
- Williams JL, Eggen A, Ferretti L, Farr CJ, Gautier M, Amati G, Ball G, Caramorr T, Critcher R, Costa S, Hextall P, Hills D, Jeulin A, Kiguwa SL, Ross O, Smith AL, Saunier K, Urquhart B, Waddington D. 2002. A bovine whole-genome radiation hybrid panel and outline map. *Mammalian Genome*, 13: 469–474.