池田ゲノム動態プロジェクトの研究成果

目次

1.	染色体領域特異的デノミツク DNA ライブラリーの作製・・・・・・・・	2
2.	染色体特定領域の遺伝子(転写配列)の分離と解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	4
3.	シングルユニークプライマーPCR(SUP-PCR)法による	
	酵母人工染色体 DNA の増幅・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	6
4.	細胞内分裂期染色体3次元構造の観察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	8
5.	迅速な Whole Cells FISH 法の開発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	9
6.	脊髄性筋萎縮症(SMA)原因候補遺伝子の単離・・・・・・・・・・・・	1 0
7.	細胞の硬さを測る-計測装置の開発と細胞活動の評価-・・・・・・・	1 2
8.	ゲノム情報の意味づけ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	1 4
9.	ヒト4番染色体短腕に特異的な新規反復配列の分離と解析・・・・・・・	1 5
10.	微小核染色体の由来・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	1 6

1. 染色体領域特異的ゲノミック DNA ライブラリーの作製

高等真核生物の任意の染色体特定領域のゲノム DNA を取り出し、そこから染色体領域特異的ゲノミック DNA ライブラリーを作製する方法を開発した。

研究成果の概要

ヒト染色体特定領域のゲノミック DNA ライブラリーを作製するため、2 つの新たな方法を開発した。

- 1)レーザー染色体切断装置(C3144:浜松フォトニクス)による染色体微細切断法(図 1)および染色体断片の回収法
- 2)配列不明の極微量染色体全塩基配列の増幅法(SUP-PCR:Single Unique Primer Polymerase Chain Reaction)

以上の2種類の方法を併用し、図2に示すような手順で、ヒト4番染色体短腕先端部(4p16)、およびX染色体長腕先端部(Xq26-28)の2つの領域特異的なゲノミックDNAライブラリーを作製した(表)。

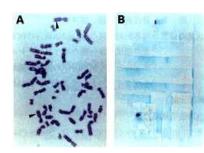


図 1 レーザー染色体切断装置によるヒト X 染色体長腕末端部の単離 A;切断前 B;切断後

染色体標本の作製 染色体微細切断 染色体断片の回収 染色体DNAの抽出 染色体DNAの増幅(SUP-PCR) DNAライブラリーの構築

4p16 および Xo	Xq26-q28 DNAライブラリーの特性	
	4p16	Xq26-q28
Recombinant clones	5×10	2x10
Independent clones	1000~3000	750
Average size	350 bp	234 bp
Contents		
Single copy	44%(30/68)	30%(30/100)
Highly repetitive	31%(21/68)	39%(39/100)
Mildly repetitive	25%(17/68)	23%(23/100)
No signal	0% (0/68)	8% (8/100)
Clones from the target region	61%(11/18)	56%(10/18)
Dissected chromosomal region	~20 Mbp	~27 Mbp
Average spacing of the clones	10~30 Kbp	65 Kbp

表

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 医学、特に遺伝性疾患の分子遺伝学的解析。
- 2) ゲノムプロジェクト

特許出願

1) 遺伝子増幅方法

特 願:平 4-232262(平 4.8.31) 出 願 人:新技術事業団、横井治彦 請求の概要:塩基配列情報のない DNA 断片の PCR 増幅に際し、反応溶液中で熱変性させた鋳型 DNA の任意の領域に単一種のオリゴヌクレオチドをアニールさせ、このオリゴヌクレオチドをプラ イマーとして鋳型 DNA の種々の領域の DNA 配列を合成し、次いで上記オリゴヌクレオチドをプライマーとしてこれらの DNA 配列の各々を PCR 増幅する。

《外国出願》

1) 遺伝子増幅方法

米国出願 : US936831('92.8.28)US294606('94.8.23)

カナダ出願 : CA2077135-6('92.8.28) EPC(英,仏)出願 : EPC92307898.4('92.8.28)

出願人 : 新技術事業団

請求の概要 : 特願平 4-232262 に同じ。

報告書他

- Hadano, S., Watanabe, M., Yokoi, H., Kogi, M., Kondo, I., Tsuchiya, H., Kanazawa, I., Wakasa, K. and Ikeda, J.-E. (1991) Laser microdissection and single unique primer PCR allow generation of regional chromosme DNA clones from a single human chromosome. Genomics 11, 364-373.
- 2) 横井治彦、池田穣衛(1991)ヒト染色体特異的 DNA ライブラリーの構築と遺伝子単離.組織培養 17,496-500.
- 3) Hadano. S., Ishida, Y., Bates, G. P., Nagayama, T., Kanazawa, I., Lehrach, H. and Ikeda, J.-E. (1993) Generation of high-density DNA markers from yeast artificial chromosome DNA by single unique primer poly-merase chain reaction. Genet. Anal. Techn. Appl. 10, 105-108.
- 4) 池田穣衛(1993)ヒト染色体のマイクロダイセクションと機能、構造遺伝子の解析.実験医学(増刊)11,174-179.
- 5) Yokoi, H., Hadano, S., Kogi, M., Kang, X., Wakasa, K. and Ikeda, J.-E. (1994) Isolation of expressed sequences encoded by the human Xq terminal portion using microclone probes generated by laser microdissection. Genomics 20, 404-411.
- 6) 秦野伸二、池田穣衛(1994)部位特異的ゲノムライブラリーの作製法.実験医学別冊バイオマニュアル シリーズ 2、遺伝子ライブラリーの作製法、野島博編、羊土社、東京、P175-183.

〔研究者名〕秦野伸二、横井治彦

2. 染色体特定領域の遺伝子(転写配列)の分離と解析

高等真核生物の染色体特定領域からタンパク質情報をコードしている遺伝子(転写配列)を 選択的に分離する方法を開発した。

研究成果の概要

染色体の特定領域の遺伝子を分離するために、染色体領域特異的ゲノミック DNA ライブラリーを利用した。まず、ヒト染色体領域特異的ゲノミック DNA ライブラリー中の単一コピークローンを大量に分離し、それらをまとめたクローンプールを作製した。

次に、それらをプローブしてヒト脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、脳で発現しており、しかも目的とした染色体特定領域にある遺伝子を分離した。

以上の手順(図)を用いることにより、特定領域の 遺伝子を高い効率で分離することができるように なった(文献参照)。

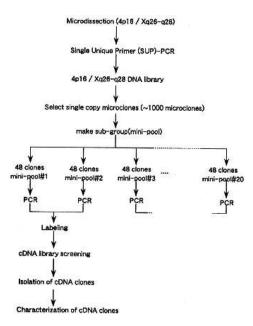


図 染色体特定領域の遺伝子分離法

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 医学、特に遺伝性疾患の原因遺伝子の分離・同定。
- 2) ゲノムプロジェクト

特許出願

なし

報告書他

- 1) Yokoi, H., Hadano, S., Kogi, M., Kang, X., Wakasa, K. and Ikeda, J.-E. (1994) Isolation of expressed sequences encoded by the human Xq terminal portion using microclone probes generated by laser microdissection. Genomics 20, 404-411.
- 2) Ishida,Y.,Hadano,S.,Nagayama,T.,Tomiyasu,H.,Wakasa,K.and Ikeda,J.-E.(1994) Isolation and characterization of 21 novel expressed DNA sequences from the distal region of the human chromosome 4p. Genomics 22, 302-312.
- 3) Hadano, S., Ishida, Y., Tomiyasu, H., Muramatsu, W., Wakasa. K., Bates, G. P., and Ikeda.J.-E. (1994) Generation of a high density transcription map of the 1 Mbp region in human chromosome 4pl6.3 containing Huntington's disease gene. Abstracts of paper

- presented at the 1994 meetiong on GENOME MAPPING & SEQUENCING, P84,Cold Spring Habor / New Yoek.
- 4) Hadano, S., Ishida, Y., Tomiyasu. H., Muramatsu, W., Wakasa, K., Bates, G. P., and Ikeda, J.-E. (1994) Highresolution mapping and sequence analysis of 597 cDNA clones transcribed from the 1 Mb region in human chromo-some 4pl6.3 containing Huntington disease gene. Am. J. Hum. Genet. 55(3) suppl. A371(2176), 44th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Montreal / Quebec.

〔研究者名〕横井治彦、石田由和、秦野伸二

3. シングルユニークプライマーPCR(SUP-PCR)法による酵母人工染色体 DNA の増幅 酵母人工染色体(Yeast Artificial Chromosome; YAC)によりクローン化された巨大ゲノム DNA の全塩基配列を増幅する方法を開発した。

研究成果の概要

YAC にクローン化された巨大 DNA 断片の全塩基配列を増幅するため、以下の 2 つの方法を併用した。

- 1) プレパラテイブパルスフイールドゲル電気泳動法による YAC-DNA の分離
- 2) Single Unique Primer Polymerase Chain Reaction (SUP-PCR)法による、染色体 DNA の 全塩基配列の増幅

図 1 に示すような手順により、ハンチントン舞踏病遺伝子を含むおよそ 2 メガ塩基対の ゲノム DNA をカバーする 7 種類の YAC-DNA の増幅を行った(図 2;レーン $1\sim7$)。また、 増幅産物をクローン化することにより、YAC-DNA に特異的なマイクロクローン DNA ライブラリーを構築することも可能である(図 1)。

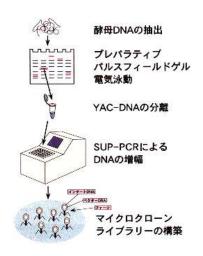


図1 YAC-DNA の増幅法

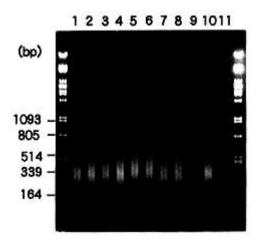


図 2 アガロースゲル電気泳動による YAC-DNA の増幅産物の解析 1:YAC117H7, 2:YAC353G6, 3:YAC70D11, 4:YAC2A11, 5:YAC177B7, 6:YACYGA5, 7:YACYGA10, 8:Yeast Chromosome IX, 9:Negative area, 10:Total Human DNA(1ng), 11:NO Template DNA

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 医学、特に遺伝性疾患の分子遺伝学的解析。
- 2) ゲノムプロジェクト

特許出願

なし

報告書他

- 1) Hadano, S., Watanabe, M., Yokoi, H., Kogi, M., Kondo, I., Tsuchiya, H., Kanazawa, I., Wakasa, K. and Ikeda, J.-E. (1991) Laser microdissection and single unique primer PCR allow generation of regional chromosome DNA clones from a single human chromosome. Genomics 11, 364-373.
- 2) Hadano, S., Ishida, Y., Bates, G. P., Nagayama, T., Kanazawa, I., Lehrach, H. and Ikeda, J.-E. (1993) Generation of high-density DNA markers from yeast artificial chromosome DNA by single unique primer polymerase chain reaction. Genet. Anal. Techn. Appl.10, 105-108.
- 3) Hadano. S., Ishida, Y., Tomiyasu. H., Muramatsu, W., Wakasa, K., Bates, G. P., and Ikeda. J.-E. (1994) Generation of a high density transcription map of the 1 Mbp region in human chromosome 4pl6.3 containing Huntington's disease gene. Abstracts of paper presented at the 1994 meeting on GENOME MAPPING & SEQUENCING, P84, Cold Spring Harbor / New York.

〔研究者名〕秦野伸二、石田由和

4. 細胞内分裂期染色体3次元構造の観察

哺乳類培養細胞内の分裂期染色体の立体配置を明らかにするために、光学顕微鏡の画像から細胞内の3次元画像を再構成して調べた。

研究成果の概要

哺乳動物の細胞内の染色体の立体配置を明らかにするために次のような手順で研究を行った。

- 1) 染色体の数が適当(n=14)なフクロネズミ(Sminthopsis crassicaudata)の培養細胞を研究 対象として用いた。
- 2) 培養細胞を固定する際、その立体構造を破壊せず、なおかつ観察に不必要な細胞膜や大部分の細胞質を除去できるような分離固定液を使用した。
- 3) 光学顕微鏡の画像から細胞内の3次元画像を再構成するために、光学系の、点像分布関数を実験により求めた。ワークステーションで3次元のディジタル画像処理を行うためのソフトウェアを開発した。
- 4) コンフォーカル顕微鏡によって撮影した 2 次元画像をワークステーション上で再構成した。
- 5) 上記 3、4 の方法で再構成した像から、染色体セントロメアの 3 次元位置座標を求め、染色体分布の偏りについて調べた。
- 6) 分裂中期においては最小の X 染色体だけが中 心部にあり、他の染色体はそれを取り囲むよう に存在することがわかった。(図)

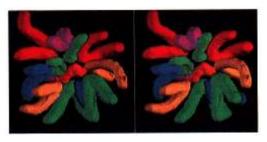


図 3次元再構成された染色体のステレオ画像

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 染色体以外の細胞内小器官の3次元配置の研究等、細胞生物学・分子生物学一般への応用
- 2) 染色体異常の診断
- 3) 染色体分配の機構の解明

特許出願

なし

報告書他

- 1) 中野義太郎、児嶋浩一、池田穣衛(1994) 顕微鏡 CT による染色体の 3D イメージングと 空間配置の解析. 第 17 回日本分子生物学会年会講演要旨集.pp179
- 2) akano.Y.,Kojima,K.,Wakasa,K.and lkeda,J.-E. A three-dimensional view of metaphase chromosomes within mammalian cultured cells.投稿準備中

〔研究者名〕中野義太郎、児嶋浩一

5. 迅速な Whole Cells FISH 法の開発

細胞内の構成物の立体配置をなるべく壊さないように調整した試料で、染色体上の特定領域の DNA 配列の相補鎖をプローブとした FISH を、迅速に行う方法を開発した。

研究成果の概要

従来、FISH (fluorescence in situ hybridization)法は染色体が形成される分裂中期の細胞を用いて、染色体をスライドグラス上に展開した後、ハイブリダイゼーションを行っていた。このために以下のことが必要であり、およそ1週間の時間が必要であった。

- 1. 細胞の培養
- 2. 染色体をスライドグラス上に展開するための処理
- 3. 染色体試料の固定
- 4. ハイブリダイゼーションのための煩雑な処理
- 5. 顕微鏡による観察

我々の開発した方法は、以下の手順で、およそ1日の時間で完了し、実際の作業は約1時間を要するだけである。

- 1. 細胞を固定
- 2. プローブ DNA とハイブリダイゼーション試薬を固定した細胞とともにインキュベーション
- 3. 顕微鏡による観察(図)

成果展開可能なシーズ、用途等

1) 培養を必要としない羊水細胞の染色体検査、染色体の立体配置の観察など。

特許出願

なし

報告書他

なし

〔研究者名〕児嶋浩一、中野義太郎



図 第 18 番染色体のセントロメアに特異的な DNA をプローブとした FISH

6. 脊髄性筋萎縮症(SMA)原因候補遺伝子の単離

遺伝性神経・筋疾患の一つである脊髄性筋萎縮症原因候補遺伝子の単離に成功した。

研究成果の概要

脊髄性筋萎縮症(SMA)は劣性遺伝形式をとる神経筋疾患(タイプ I,II,III)で、その遺伝子座は染色体 5q13.1 にマップされている。 SMA 領域由来のゲノム断片をプローブにして胎児脳 cDNA ライブラリーから SMA 領域にマップされる新規遺伝子を単離し、 NAIP(Neuronal Apoptosis Inhibitory Protcin)と名付けた(図)。遺伝子構造解析の結果、この遺伝子は細胞の余命あるいは計画死 (アポプトーシス)の中枢機構に係わっている新規遺伝子であることが示唆された。また、脊髄性筋萎縮症 I 型の患者では、この遺伝子に部分欠失が認められた。

成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 脊髄性筋萎縮症発症の機構解明
- 2) 脊髄性筋萎縮症の遺伝子治療
- 3) 神経細胞の分化や細胞の余命、アポプトーシスの解明

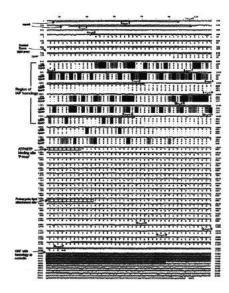


図 脊髄性筋萎縮症原因候補遺伝子 NAIP の全 cDNA 塩基配列と予想されるアミノ酸配列

特許出願

《外国出願申請中》

発明の名称:脊髄性筋萎縮症原因遺伝子の単離とそれを用いた遺伝子診断技術の開発

出願人 :新技術事業団、オタワ大学

報告書他

- 1) M. McLean, N. Roy, K. Tamai, G. Shutler, Z. Yaraghi, M. Salih, C. Lefebvre, A. Besner, H. Aubry, L. Surh, P. de Jong, R. Korneluk, J.-E. Ikeda and A. MacKenzie: Isolation of cDNA clones from within the Spinal Muscular Atrophy (SMA) disease gene region. The American Journal of Human Genetics, Vol. 55, No. 3, Suppl. A373 (1994)
- 2) M. D. McLean, N. Roy, A. E. MacKenzie, M. Salih, A. H. M. Burghes, L. Simard, R. G. Korneluk, J.-E. Ikeda and L. Surh: Two 5ql3 simple tandem repeat loci are in linkage disequilibrium with Type I Spinal Muscular Atrophy. Hum. Mol. Gen., Vol.3, No. 11, p.1951-1956 (1994)
- 3) N. Roy, M. S. Mahadevan, M. McLean, G. Shutler, Z. Yaraghi, R. Farahani, S. Baird, A. B.-Johnston, C. Lefebrve, X. Kang. M. Salih, H. Aubry, K. Tamai, X. Guan, P. Ioannou, T. O. Crawford, P. J. de Jong, L. Surh, J.-E. Ikeda, R. G. Korneluk, A. MacKenzie: The Gene for

Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein Is Partially Deleted in Individuals with Spinal Muscular Atrophy. Gell, Vol. 80, p.167-178(1995)

4) M. S. Mahadevan, R. G. Korneluk, N. Roy, A. MacKenzie and J.-E. Ikeda: SMA genes: deleted and duplicated. Nature Genetics Vol. 9, No.2, correspondence (19955) In press

〔研究者名〕M.D.McLean、玉井克之、A.E.MacKenzie

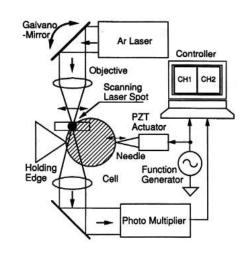
7. 細胞の硬さを測る-計測装置の開発と細胞活動の評価-

細胞のカ学的特性の評価により細胞の生体活動を探る。

研究成果の概要

生体細胞の活動や機能を調べることを目的として、細胞の振動応答から細胞のカ学的特性(硬さ)を評価する細胞振動計測装置を開発した(図 1)。

細胞の活動のなかでもっとも顕著な構造変化を示す卵細胞の初期発生過程をメダカ卵細胞に対して測定し、膜構造の変化に伴う力学的特性を定量的に評価した。1日間未受精のまま放置した異常受精卵の力学的特性は正常なものとは異なる変化をしていることを定量的に評価可能であった(図 2)。



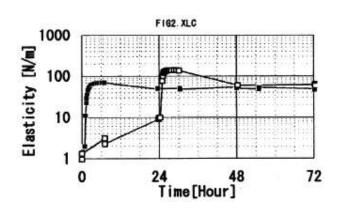


図1 レーザー顕微鏡を応用した細胞振動計測装置

図 2 異常受精卵のカ学的特性の変化 ■正常受精卵 □1 日放置後受精させた異常受精卵

成果展開可能なシーズ、用途等

1) 医学・生物学上重要なマウスや大型哺乳動物の受精卵の生理活性の定量化。

特許出願

1) レーザー走査型高速変位測定方法および装置

特 願:平4-291698(平4.10.29) 特開平6-137813(平6.5.20)

出 願 人:新技術事業団、占部修司

請求の概要:弾性測定対象を機械的に励振した状態で走査レーザスポットを照射し、測定対象の所定部分における走査レーザー光の透過光あるいは反射光の強度変化を検出することから測定対象の変位を検出し、検出した変位を測定対象の励振信号を時間基準として再構成して測定対象の対時間変位を求めることを特徴とするレーザー走査型高速変位測定方法。

報告書他

1) 占部修司、池田穣衛:レーザー顕微鏡を用いた細胞の振動応答の測定一細胞の硬さ測定への応用一、第30回日本生物物理学会年会講演概要集、p.S51、(1992)

〔研究者名〕占部修司

8. ゲノム情報の意味づけ

膨大な DNA 情報の配列問の比較を簡便に行えるアルゴリズムと図形表示のためのソフトを開発した。

研究成果の概要

生物種を越えて保存されている遺伝情報および遺伝子機構を簡便迅速に推定あるいは検出することを目的としてゲノム情報解析のための新しいアルゴリズムを開発した。年々、増加の一途をたどる塩基配列データを効率よく処理するために、データファイルを既存のプログラムで直接演算する前に、いったん辞書索引様式化(end set position tree)することによってデータ検索に要する時間が大幅に短縮された(図)。

D G H

成果展開可能なシーズ、用途等

1) 生物種を越えて保存されているゲノム 情報の推定、検出

図 酵母第 III 染色体における類似塩基配列の検出 A:315357 全塩基配列を 12 分間で解析したドットプロット図。 B-H:A の特定領域をさらに解析したドットプロット図。 ドットは類似塩基配列の存在を示す。

特許出願

なし

報告書他

- 1) C.Lefevre and J.-E,Ikeda: The poition end-set tree: A small automation for word recognition in biological sequences. CABIOS,VOl.9,No.3,p.343-348 (1993)
- 2) C.Lefvre and J.-E.Ikeda: Patteen recognition in DNA sequences and its application to consensus foot-printing. CABIOS, VOI.9, No.3, p.349-354 (1993)
- 3) C.Lefevre and J.-E.Ikeda: A small automation for word recognition in DNA sequences and its application to consensus analysis of regulatory elements in DNA regions controlling gene expression. Proceedings First Intenational Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology,p.243-250(1993)
- 4) C.Lefevre and J.-E.Ikeda: A fast word search algorithm for the representation of sequence similarity in genomic DNA. Nucleic Acids Research, Vol. 22, No. 3, p. 404-411 (1994)

〔研究者名〕Christophe Lefevre

9. ヒト4番染色体短腕に特異的な新規反復配列の分離と解析

4.7Kb を基本ユニットとする新しいカテゴリーの反復配列の研究。

研究成果の概要

ヒトのゲノミック DNA のコスミドライブラリーから 4.7Kb をユニットとした反復配列を含むコスミドクローン(CRS447)を分離した。この反復配列は 4 番染色体短腕端部 4p15 に特異的に存在し、50-70 コピーあることが明らかになった(図 1)。この基本ユニット 4.7Kb のすべての塩基配列を決定したところ、4752bp と算定された。この中には 2 つの既知の STS マーカーが含まれていたものの、ユニット全体(4752bp)は新規な配列であることが判明した。



図1 CRS447をプローブに用いた in situ hybridization。シグナ ルは 4p15 に局在している。

成果展開可能なシーズ、用途等

1) ヒト4番染色体及び、4番短腕の物理的地図作成のためのマーカー

特許出願

なし

報告書他

1) 小木美恵子、秦野伸二、池田穣衛。(1994) ヒト4番染色体特異的 repetitive sequence について。第11回ワークショップ「染色体、核、細胞情報の階層性とそのネットワークについて」要旨集 pp17。

〔研究者名〕小木美恵子、秦野伸二、福重真一

10. 微小核染色体の由来

高齢出産の母親に見られる、微小核染色体 DNA 診断と由来同定のための DNA プローブ作製に成功した。

研究成果の概要

羊水細胞分裂中期染色体核型分析による出生前診断において微小核染色体がしばしば観測される。 レーザー染色体切断/SUP(Single Unique Primer) – PCR 法を用いて、被験者の羊水細胞(一個)由来の微小核染色体 DNA を単離・増幅した後、蛍光標識し、羊水細胞分裂中期染色体に対して *in situ hybridization* を行い、微小核染色体が由来した染色体を特定する筆が可能になった(図)。

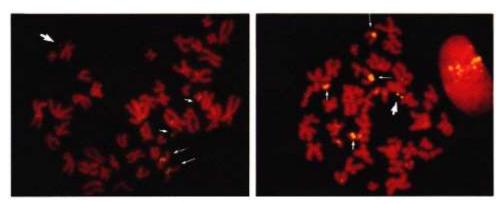


図 高齢出産の母親に見られる、微小核染色体の由来

左図は、ビオチン標識した微小核染色体 DNA を、また右図は、第13染色体と第21染色体に特異的な alpha – サテライト DNA をプローブとして FISH を行った結果を示す。太い矢印は微小核染色体、細い矢印は第13、21染色体を示す。

成果展開可能なシーズ、用途等

1) 微小核染色体の出生前診断。

特許出願

1) 染色体診断法

特 願:平6-250916(平6.10.17)

出 願 人:新技術事業団

請求の概要: 染色体異常領域をレーザー染色体切断法により微細断片化し、これらの断片化 した DNA を SUP-PCR により増幅し、この増幅された DNA 断片の集合をプローブとして FISH 法によりその異常部位を検出する。

報告書他

1) E.R.-Separovic, H.-S.Wang, L.Janes, R.G.Korneluk, K.Wakasa and J.-E.Ikeda: Identification of the origin of chromosomal aberrations by laser microdissection: double minutes

observed in two cases derive from different chromosome. Hum.Mol.Gen.In press

2) E.R.-Separovic,H.-S.Wang,L.Janes,R.G.Korneluk and J.-E.Ikeda: Identification of the origin of chromosomal aberrations by laser microdissection: double minutes observed in two cases derive from different chromosome. The American Journal of Human Genetics,Vol.55,No.3,Suppl.A115 (1994)

〔研究者名〕 Evica Rajcan-Separovic