総 説

Differential Display による *Candida albicans* 遺伝子探索

中 島 茂¹ Fariba Mirbod² 北 島 康 雄²

野 澤 義 則¹

¹岐阜大学医学部生化学教室

²岐阜大学医学部皮膚科学教室

要 旨

細胞や組織の特異性を明らかにする方法として、発現している mRNA の差異を解析することは、きわめて有用なアプローチである。しかし、従来のサブトラクション法に代表される解析法は、試料調製や手技的にさまざまな問題点があった。PCR 法を応用して mRNA 発現量の違いを解析する方法 (Differential Display, DD や mRNA fingerprinting using arbitrarily primed PCR; RAP) は、その有用性のみならず、比較的簡便に行えることから、さまざまな領域で応用されている。本稿では、DD 法の原理といくつかの問題点について解説するとともに、*C. albicans* の感染性因子の解析を目的として、感染力の異なる *C. albicans* 株間で行った我々の実験例を紹介する。

Key words: *Candida albicans*, ディファレンシャルディスプレイ (differential display, DD), 遺伝子探索 (mRNA fingerprinting), 翻訳開始因子 (translation initiation factor, TIF)

はじめに

感染には生体の抵抗性のみでなく、菌側の因子も関与していることが知られており、感染性の弱い菌株、比較的高い感染性を示す菌株が分離されている。*Candida albicans* の virulence factor として二形成を含めさまざまな因子が推測されているが、その特定は必ずしも容易でない。従来、菌側の因子の精製、同定には大量の試料を必要とすることが常であった。ところで、最近開発された Differential Display (DD) 法¹⁾は、同一細胞での経時変化 (例えば二形成変化など)、異なる細胞間、あるいは正常部位と病変部位との遺伝子発現の変化を探索するのに有用な方法であり、少量の試料で解析が可能である。われわれの研究室では DD 法を、神経細胞の分化に関与する遺伝子の同定²⁾、腫瘍細胞に特異的に発現する遺伝子の検索、原生動物テトラヒメナ細胞の環境適応に必要な遺伝子の解明など、さまざまな分野へ応用している。そこで、この DD 法を用いて *C. albicans* の病原性に関与すると思われる遺伝子の検索を試みた。

Differential Display (DD) 法の原理

mRNA の発現量の差により、特定の生命現象に関与する遺伝子を同定する方法は、極めて有効な分子生物学的手法として近年注目されている。従来は differential hybridization や subtractive hybridization に基づく、いわゆるサブトラクション法が用いられてきた。しかし、

これらの方法では大量の試料を必要とし、少なくとも cDNA ライブラリーを構築できる以上の分子生物学的方法論を習得した研究者のみが行えるアプローチであった。しかし、最近 arbitrary primer (以下、任意プライマー) による PCR (polymerase chain reaction) を利用したアプローチが開発された。DD 法¹⁾と RAP (mRNA fingerprinting using arbitrarily primed PCR) 法^{3,4)}がそれである。ここでは DD 法を中心にその原理をまず紹介する。

Fig. 1 に示すように、まず 3' 末端に余分のヌクレオチドを付加したオリゴ dT プライマー (3'-anchored oligo-dT primer, 以下アンカープライマーと略) で逆転写反応を行い、cDNA を合成する。試料は全 RNA でも mRNA でもどちらでもよい。例えば、CT を付加したプライマー (TnCT) を用いると、poly (A) + mRNA のうち polyA のすぐ 5' 側が AG という配列になったものだけが選択的に cDNA に変換される。プライマーの 3' 末端から 2 番目の塩基 (上の例だと C) が実際には識別にほとんど影響していないことが明らかになり、最近では T 以外の 3 塩基のミックスをこの位置にあてることが多い⁵⁾。市販されているアンカープライマーは TnMA, TnMC, TnMG, TnMT というように 3' 末端から 2 番目の塩基は T 以外の 3 塩基のミックスとなっている。これらのアンカープライマーを組み合わせれば、理論的にはすべての poly (A) + mRNA をカバーすることができる。次に任意の配列からなる 10mer の任意プライマーを加えて PCR を行くと、その第 1 サイクル目で上記の逆転写反応で合成された一本鎖 cDNA のうち、その 10mer とよく似た配列を持ったものだけが選択的に二本鎖 cDNA に変換される。こうして両端をアンカープライマーと 10mer の

別刷請求先: 中島 茂

〒500 岐阜市司町 40

岐阜大学医学部生化学教室

Fig. 1. Protocol of differential display.

任意プライマーとで置換された cDNA が生じる。2 サイクル目以降の PCR では、このような分子のみが指数関数的に増幅されてくることになる。一方、RAP 法では一種類の 20mer 前後の任意プライマーで逆転写と PCR の両方の反応を行う。逆転写反応と PCR の第 1 サイクルのアニーリングをとともに 40℃ 前後で行うことにより、20 mer 前後のプライマーでも多数の部位からプライミングを起こさせるようにする。2 サイクル目以降はアニーリング温度を上昇させて、任意プライマーで両端を置換された断片のみを特異的に増幅する。すなわち、いずれの方法もプライマー依存的に一部の RNA のみを分別し cDNA に変換後、増幅することになる。それらの産物を変性アクリルアミドゲルで電気泳動すると多数のバンドよりなるフィンガープリントが得られ、比較したいサンプルを並べて電気泳動すると差のあるバンド、すなわち発現パターンが変化した分子種が明瞭に区別できる。Fig. 1 では試料 Y のみに発現している cDNA バンドがみられる。次に、興味あるバンドをゲルから切り出し、もう 1 度同じプライマーの組み合わせで PCR により増幅すれば、これを充分量回収することができ、以後のさまざまな解析に使用できる。これらの方法は、2 つ以上のサンプルを一度に比較でき、またさまざまな発現パターンを示すものを同時に観察できる、出発材料は少量でよい、希少転写物も検出できる、などの利点を有し、比較的簡便に行えることから、多方面に応用可能な一般性のある実験法である。DD 法ではアンカープライマーを組み合わせることにより、細胞に発現しているすべての poly (A) +mRNA をカバーすることが可能である。理論的には

100~200 回の解析で細胞に発現している約 10,000~20,000 種類の mRNA すべてを比較検討できることになる。しかし、基本的には poly (A) を出発点とした 3' 非翻訳領域が増幅されるために、コードしているタンパク質の情報を得るためには、上流部をさらにクローニングしなければならないことが多い。一方、RAP 法では得られるバンドの数は DD 法より少なく、すべての mRNA を解析することは理論上困難である。しかし、得られる cDNA 断片は一般的に DD 法より長く、しばしばタンパク質をコードしている部分が増幅され、哺乳動物細胞など長い 3' 非翻訳領域を有する場合には、DD 法よりも後の解析が容易となる場合が多い。

DD 法の注意点

上記のように簡便で極めて有効な方法ではあるが、いくつかの問題点(注意点)も指摘されている。ここではそれらの中でも実際に DD 法を施行する上で問題となる、混入 DNA の除去、アンカープライマーの特異性、再現性の 3 点について述べる。

慎重に全 RNA を調製しても試料中への DNA の混入は避けられない。オリゴ dT カラムなどにより mRNA を精製した場合も同様である。PCR により増幅されるので微量の DNA の混入でも大きな問題となってくる。実際に DNA が混入したまま DD 法を行うと、ミトコンドリア由来の DNA 断片が高頻度に増幅される。試料へ混入した DNA の多少が、バンドの濃度差へと反映され、偽陽性のバンドを増す原因となる。従って、必ず RNase フリー DNase (Message clean キット, GenHunter

など)を用いて、DNAを除去したRNA試料で反応を行う必要がある。

Liang & Pardeeの原法¹⁾ではTが12個のT12MNアンカープライマーを用いている。しかし、伊藤ら⁶⁾(東大・医科研)によるとT12では逆転写反応のプライマーとしての使用には耐えるが、PCR反応時のプライマーとしては適切ではない。筆者らも当初は原法通り市販のT12MNアンカープライマー(GenHunter)を用いてDD法を行ったが、ゲルから切り出したバンドのシーケンスを行うと、半数以上が両端に任意プライマーを持つものであった。そこで、伊藤らの推奨するGT15MNアンカープライマーに変更したところ、大半のバンドがアンカープライマーと任意プライマーで増幅されたものになった。

DD法の再現性は、原法^{1,5)}や市販キット(GenHunter)のパンフレットでは80%前後と報告されている。かなり高い再現性とも見られるが、100%でないことに常に留意しなければならない。さらに、逆に偽陽性率が70%という報告⁷⁾もあり、再現性を確認することが、非常に大切なステップとなる。筆者らは、同条件の試料を2ケ以上用意して反応を行う。しかも、必ず2回以上独立してRNA採取からスタートする実験を行い、再現性のあるバンドを採取することにしていく。また、これらをPCR増幅後ベクターにサブクローニングしたものをプローブとして用いてノザンプロットを行うと、DD法で得られたRNA発現量の差が再現できるものは、半数以下になることが多い。

C. albicans の病原性因子検索への応用

我々の研究室では、*C. albicans* のシグナル伝達分子の解析とともに、病原性に関与する因子の解析を進めている。特に、ヒト臨床分離株より得られた*C. albicans* の感染性の弱い株(18084)と強い株(16240)(UCLA Ghannoum 研より供与)⁸⁾を用いて、病原性に関与する因子について物質・遺伝子レベルで検索を行っている。その候補の一つとして、16240株の菌体外に多量に放出される脂質分解酵素、リゾホスホリパーゼ-トランスアシラーゼ(lysophospholipase-transacylase)を単一にまで精製⁹⁾、その遺伝子解析を行っている。さらに、病原性因子の解析を目的として、これらの菌株で発現の異なるmRNAの検索を行った。哺乳動物細胞に比べて、一般に*C. albicans* の3'非翻訳領域はかなり短いことから、DD法でも有用な情報が得られることを期待して、DD法を応用した。両菌株からmRNAをAGPC(acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform)法に準じて抽出¹⁰⁾、polyA部分に結合するpolyTアンカープライマー(伊藤らが改良したGT15MNアンカープライマー)⁶⁾を用いて逆転写反応を行った。逆転写酵素としては、RNase活性のないSuper Script II(Gibco-BRL)を用いた。その後、Liang & PardeeのDD法の原法¹⁾に準じて任意プライマー(AP-1からAP-5)とT15アンカープライマーを用いて、PCRによりcDNAを増幅して検索を

AGCCAGCGAA

```
AGCCAGCCAACAAGGAAACTACATTCATAGAATTGGTAGAGGTG
P N A K E N Y I H R I G R G G
GTCGTTTCGGTAGAAAGGGGTTGCCATCACTTTGTCTACTGACA
R F G R K G V A I N F V T D R
GAGATGTTGGTATGATGAGAGAATTGAAAAATCTACTCTACTC
D V G M M R E L K K F Y S T Q
AAATCGAAGAAATGCCAGCTGATATTGGTGCCTTTATTGCTTAGA
I E E M P A D I G A L F A -
GAAGTTATGTAACCTTCTCTTTTAAATTGTATTCTTCATCTT
TTGACTGTGTCGTGGTCTTTTTTTCGTATAAATGTATAGTAGTT
TCTTCATTTTGATTTTCACTATTTATGTGAATAATTGTTTTTAAT
GACTTCTATAGGTTTTCAAAAAAAAAAAAAAAC348
```

Fig. 2. Nucleic acid and deduced amino acid sequences of cDNA fragment obtained by DD analysis.

Underline and double underline indicate arbitrary primer (10 mer) and sequence complementary to GT15 anchored primer, respectively.

```
Candida      PNAKENYIHRIGRGRFRKGVAINFVTD
*****
Saccharomyces PANKENYIHRIGRGRFRKGVAINFVNE

Candida      DVGMMRELKKFYSTQIEEMPADIGALFA-
***  ***  *****  *  *  *
Saccharomyces DVGAMRELEKFFYSTQIEELPSDIATLLN-
```

Fig. 3. Comparison of amino acid sequences of C-terminal region of *Saccharomyces cerevisiae* TIF and of region encoded by cDNA fragment obtained by *Candida albicans* DD analysis.

*: indicates identical amino acid. -: indicates C-terminal end.

行った。前述の如く、DNase未処理の試料あるいはT12アンカープライマーを用いてDD法を行うと、得られたバンドの再現性は信頼性に欠けるものであった。DNase処理試料でT15アンカープライマーを用いてDD法を行い、計40種類以上の遺伝子断片を検出しその塩基配列を決定した。そのひとつのバンド(348塩基対)(Fig. 2)は出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の翻訳開始因子(translation initiation factor, TIF)¹¹⁾のC末端部分と同一性が認められ、C末端の58個のアミノ酸中48個が同一(83%)であった(Fig. 3)。この遺伝子断片をプローブとして、genomic library(ニュージーランド・オタゴ大Cannon 研より供与)¹²⁾をスクリーニングして、397個のアミノ酸をコードする*C. albicans* TIF遺伝子をクローニングした(Fig. 4)。*S. cerevisiae*のTIF遺伝子産物は哺乳動物の翻訳開始因子eIF4A(eukaryotic translation initiation factor 4A)に相当し、mRNAの情報からタンパク質合成を行う際に不可欠の因子である¹¹⁾。*C. albicans* TIFはアミノ酸レベルで*S. cerevisiae*のTIFと90%の相当性が認められた。*S. cerevisiae*では全く同じアミノ酸をコードする2種類の遺伝子TIF1とTIF2が知られている。どちらか1つのTIF遺伝子を破壊しても*S. cerevisiae*の生存・増殖には何ら影響はないが、両遺伝子を破壊すると致死的となる¹³⁾。ノザンプロット上、TIFの発現は

TCCTTTATTTTAAATAAAGTACCTTTTGTATTACTAATACATTATAAACCGGTATTAGAAATGTAATAATGCCACTGTCTAGGAATAAAGATAAATGATCATT	CGAAAGAAGAAAGTTTAAAGATCA	24
CATATTTGCAGCAATGTTTCTGTAGGCGGAGAACTTCAACTAAGGAGATCATTGGTTTTTTCGTTTTTGGTGATCTCCCTTCGTCGTTGCTAAATCAACCATC		129
AACTCGTGCCTGCTCCTCAAAATACCACTAAATGAAAAATTTCTTGGCAGTAATGATATTTTTTCCCTTACAATGTCTCATCTACTCATATTTTCACT		234
AACTACACTTTTATAAAGTAAAGGAAAAAATAATTTTCTCCTTTCATTCTTCCCTTTTTCATTTTGTCTTATATTAACAACAAACACCTAATC		339
ATGGCATCCGAAGGTATTACTGAAATCGACTCTGGTTAATTGAAACCAATTACGATAACGTCGCTACAAAGTTCGACGATTAACTTGAACCAACATTTGTT		444
M A S E G I T E I D S G L I E T N Y D N V V Y K F D D L N L K P N I V		549
AGAGGTATTTTGGTTACGGGTATGAAACTCCGCTATTCAACAAAGAGCCATCTTGCCAACTCAAGGTAGAGATGTTTTGGCTCAAGCTCAATCCGGT		35
R G I F G Y G Y E T P S A I Q Q R A I L P I T E G R D V L A Q A Q S G		654
ACTGGTAAAAACCGCTACCTTTTACCATTCTGCATTACAAAGAATCAATGAAAATGAAAAAGCCACTCAAGCTTTAATCTTGGCTCAACAGAGAGATGGCTTTG		70
T G K T A T F T I S A L Q R I N E N E K A T Q A L I L A P T R E L A L		759
CAAAATCAAGAATGTTATCACTGCTATTGGTTGTACTTGAAGGTACTGTCCATGCTTCTATTGGTGGTACCTCAATGAGTGACGATATGAAGCTTTTCAATCT		105
Q I K N V I T A I G L Y L K V T V H A S I G G T S M S D D I E A F R S		864
GGTGTTCAAATTTGCTGGTACTCCAGGTAGAGTCTTAGACATGATTGAAAGAAGATATTTCAAACCGATAAAGTCAAGATGTTTATTTGGATGAAGCTGAT		140
G V Q I V V G T P G R V L D M I E R R Y F K T D K V K M F I L D E A D		969
GAAATGTTATCAAGTGGATTTAAAGAACAAATTTACAACATTTTCAAGATTATTACCAGAAACCAACCAATTTGCTTATTATCTGCCACCCTGCCACAAGACGTT		175
E M L S S G F K E Q I Y N I F R L L P E T T Q I V L L S A T M P Q D V		1074
TTGGAAGTCAACCAAAATTCATGAACAACCCAGTCAGAACTCTTAGTCAAAAAAGATGAATTGACTTTGGAAGGTATCAACAATCTATATTAATGTTGAATTA		210
L E V T T K F M N N P V R I L V K K D E L T L E G I K Q F Y I N V E L		1179
GAAGATTACAAATTCGATTGTTTGTGTGATTGTGACGATTCTATTCTGTCCACCAAGCCGCTCATTTTCTGTAACACTAGATCCAAAGGTGAAATTTTAAACCAAC		245
E D Y K F D C L C D L Y D S I S V T Q A V I F C N T R S K V E F L T N		1284
AAATTGAGAGAACAACACTTTTACTGTCTCTGCCATCCACGCTGACTTGCCACAAGCCGAAAGAGACACCATTAAGAAATTCAGATCTGGTCTTCAAGAATC		280
K L R E Q H F T V S A I H A D L P Q A E R D T I M K E F R S G S S R I		1389
TTGATCTCTACCGATTGTTAGCTAGAGGTATTGATGTCCAAACAGTTTCTTTAGTTATCAACTACGATTGTCAGCCCAAGGAAAACACTACATTCATAGAATT		315
L I S T D L L A R G K G I D V Q Q V S L V I N Y D L P A N K E N Y I H R I		1494
GGTAGAGGTGGTGGTGGTGAAGGGGGTGGCCATCACTTTGTCTGCTGACGAGAGATGTTGGTATGATGAGAGAAATGAAAAATTTCTACTCTACTCAAATC		350
G R G G R F G R K G V A I N F V T D R D V G M M R E I E K F Y S T Q I		1599
GAAGAAATGCCAGCTGATATTGGTCTTTATTTGCTTAGAGAAGTTATGTAACCTTTCTCTTTTTTAATTTGATTCTTCTATCTTTTGAAGTGTGCTGTTCT		385
E E M P A D I G A L F A *		1704
TTTTTGCATATGATATGATGTTTCTTCTATTTTGAATTTTCACTATTATGTAATAATTTGTTTTTAATGACTTCTATAGGTTTTCAAGGGAAGAAAGTATT		397
AAATTTAATAAACATAAGGAAAAATAAAAAACAGATAAATGTGAGAACGATTAGTGATAGAAAGTTGATTATCTGTAAGTTTTTTTTT		1809
		1901

Fig. 4. Nucleic acid and deduced amino acid sequences of *Candida albicans* TIF.

16240株では18084株に比べて有意に上昇しており、DD法により両菌株間で発現量の異なる遺伝子が単離できた¹⁰⁾。TIFと病原性との関連は現在明らかではないが、*C. albicans*の発現量の異なる遺伝子探索法としてDD法は有用であると思われる。

おわりに

DD法やRAP法によりmRNA発現量の違いにより、特定の生命現象に関与する分子を同定する方法は、さまざまな分野で応用されており、これらの方法を利用した論文数は指数関数的に増加しているといっても過言ではない。医真菌学の分野でも今後さまざまな応用が期待される。最後に、この方法を利用しようとされる方は、最近の実験書^{14, 15)}を参考にいただきたい。

文 献

- Liang P, Pardee AB: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**: 967-971, 1992.
- Sakai H, Nakashima S, Yoshimura S, Nishimura Y, Sakai N, Nozawa Y: Identification of differentially expressed mRNAs during rat C6 glial cell differentiation by mRNA fingerprinting using arbitrarily primed PCR (RAP). *Neurosci Lett* **229**: 93-96, 1997.
- Welsh J, Chada K, Dalal SS, Cheng R, Ralph D, McClelland M: Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res* **20**: 4965-4970, 1992.
- Ralph D, McClelland M, Welsh J: RNA finger printing using arbitrarily primed PCR identifies differentially regulated RNAs in mink lung (MylLu) cell growth arrested by transforming growth factor b1. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 10710-10714, 1993.
- Liang P, Averboukh L, Pardee AB: Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display; refinement and optimization. *Nucleic Acids Res* **14**: 3269-3275, 1993.
- Ito T, Kito K, Adachi N, Mitsui Y, Hagiwara H, Sakaki Y: Fluorescent differential display: arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer. *FEBS Lett* **351**: 231-236, 1994.
- Sun Y, Hegamyer G, Colburn NH: Molecular cloning of five messenger RNAs differentially expressed in preneoplastic or neoplastic JB6 mouse epidermal cells: one is homologous to human tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Cancer Res* **54**: 1139-1144, 1994.
- Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, Edwards JE Jr, Nozawa Y, Ghannoum MA: Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* **63**: 1993-1998, 1995.
- Mirbod F, Banno Y, Ghannoum MA, Ibrahim AS, Nakashima S, Kitajima Y, Cole GT, Nozawa Y: Purification and characterization of lysophospholipase-transacylase (h-LPTA) from a highly virulent strain of *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* **1257**: 181-188, 1995.
- Mirbod F, Nakashima S, Kitajima Y, Ghannoum MA, Cannon RD, Nozawa Y: Molecular cloning of a gene

- encoding translation initiation factor (TIF) from *Candida albicans*. J Med Veter Mycol **34**: 393-400, 1996.
- 11) Niimi M, Niimi K, Cannon RD: Temperature-related expression of the vacuolar aspartic proteinase (APR1) gene and beta-N-acetylglucosaminidase (HEX1) gene during *Candida albicans* morphogenesis. FEMS Microbiol Lett **15**: **148** (2): 247-254, 1997.
 - 12) Linder P, Slonimski SS: An essential yeast protein, encoded by duplicate genes TIF1 and TIF2 homologous to the mammalian translation initiation factor eIF-4A, can suppress a mitochondrial missense mutation. Proc Natl Acad Sci USA **86**: 2286-2290, 1989.
 - 13) Schmid SR, Linder P: Translation initiation factor 4A from *Saccharomyces cerevisiae*: Analysis of residues conserved in the D-E-A-D family of RNA helicases. Mol Cell Biol **11**: 3463-3471, 1991.
 - 14) 伊藤隆司: mRNA の分別増幅 (Differential Display 法). PCR 法の最新技術 (林 健志編), p114-123, 羊土社, 1995.
 - 15) 中釜 斉, 野崎中成, 益谷美都子, 川寄弘詔, 児玉龍彦: PCR による広領域の解析. 3. DDA 法. 蛋白質核酸酵素増刊. PCR 法最前線 **41**: 580-584, 1996.

Molecular Cloning of *Candida albicans* Genes by Differential Display

Shigeru Nakashima¹, Fariba Mirbod², Yasuo Kitajima²,
Yoshinori Nozawa¹

¹Department of Biochemistry and ²Department of Dermatology, Gifu University School of Medicine,
Tsukasamachi-40, Gifu 500, Japan

mRNA fingerprinting based on RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) such as differential display (DD) and RAP (mRNA fingerprinting using arbitrarily primed PCR) are useful methods to identify differentially expressed genes. We adopted DD to identify the gene(s) involved in *Candida albicans* pathogenicity using highly (16240) and weakly (18084) virulent strains. More than 40 cDNA fragments were isolated. The deduced amino acid sequence of one fragment was highly homologous to *Saccharomyces cerevisiae* translation initiation factor (TIF). The TIF gene was isolated from the *C. albicans* genomic library. Its expression was nearly 2-fold higher in the 16240 strain as assessed by Northern blot analysis. At present, the link between TIF gene and virulence is not clearly understood. However, DD is a useful technique to isolate differentially expressed genes in *C. albicans*.

この論文は、第40回日本医真菌学会総会の“シンポジウムIII: 病原真菌の遺伝子を探る”
において発表されたものです。