

植物病原菌のcDNA Lottery

- 平成12年度化学教室への講座配属3年生の研究報告 -

(植物病原菌 / cDNA / 塩基配列)

吉田 浩*・飯塚真理*

石ヶ坪 潤**・小田耕平**・小川祥子**・福島理恵**

cDNA Lottery of a Phytopathogenic Fungus

- A Report of Studies of the Third Year Graders Allotted to the Department of Chemistry in the Year 2000 -

(Phytopathogenic fungus / cDNA / Base sequence)

Hiroshi YOSHIDA*, Mari IIZUKA*,

Jun ISHIGATSUBO**, Kohei ODA**, Shoko OGAWA**, Rie FUKUSHIMA**

The third year graders in the year 2000 allotted to the Department of Chemistry in a curriculum course carried out the following studies. Each student was given arbitrarily a clone from the cDNA library of a phytopathogenic fungus *Fusarium moniliforme* and sequenced the insert of the clone. Two clones contained full length cDNAs encoding stomatin-like protein and putative glutathione S-transferase and one harbored a non-full length cDNA encoding putative 5-aminolevulinate synthase. The last one contained a cDNA not for a protein but for the 5'-half molecule of 18 S ribosomal RNA. The curriculum course was evaluated as successful and problems about the course were discussed.

はじめに

島根医科大学には3年次学生に対する講座配属制度というカリキュラム・コースがある。学生たちは、後期が始まる10月上旬から12月下旬までの約3ヶ月間を希望講座に配属されて過ごす。その主旨は、学生便覧の教育課程の説明によると、「学生が小グループに分かれ、自らが希望する講座での研究に参加したり、症例の解説を体験します。」となっている。講座等を「一般教育および基礎医学」と「臨床医学」の2グループに分け、各学生は前後半6週ずつ別のグループから配属講座を選ぶ。配属期間中何をするかは講座等の裁量に任されている。

さて、一般教育化学教室のわれわれのグループでは、植物病原菌(カビの1種) *Fusarium moniliforme*の加水分解酵素の構造と機能について、主として遺伝子工学的手法により研究を行っている。医学と関連の深い生化学分野の研究ではあるが、研究材料がカビなので医学生に興味を引くまい、したがって希望学生もいない

だろうと高をくくっていた。ところが嬉しい誤算というべきか、化学教室を希望する学生がいたのである。しかしじっさいに学生が来るとなると、何をやらうか考え込んでしまった。というのも、私達のグループは教授1、教務職員1の小グループで、いくつかの研究テーマが同時進行しているわけではなく、1つのテーマに1人の学生を割り当てて研究の手伝いをさせるわけにはいかない。また、単に手伝いというのでは学生もおもしろくないであろう。研究では努力しても何の成果も挙がらない時期もありうるが、研究のそんな側面を知るのも勉強といって澄ましているわけにもいかない。どうしてもある程度確実な成果が挙がるテーマを与え、学生に満足感を味わってほしい。そう考え、平成10年度最初に配属学生を迎えたときは、遺伝子工学のやや高度な学生実習ともいえる一種のモデル実験を考えた。こちらは結果を予測できるが、学生にとっては新しいことなのだし、遺伝子工学の実験手法を勉強するだけでもよかろうと思ったのであるが、いざやってみると指導する側としてはどうもおもしろくないのである。研究の醍醐味は、たとえ小さな事柄であろうとも自らの手で新しい事実を見いだすところ

*化学教室 Department of Chemistry

**平成12年度3年生 Third Year Graders in the Year 2000

にある。この醍醐味を味わうことなくして、研究をしたとはいえないであろう。

そんな経験を経て、平成12年度には次のようなテーマを考えた。われわれの研究室では、植物病原菌のcDNAライブラリが確立されている。この中からめいめい任意の1クローンを選び、まずそのインサートの塩基配列を決定する。これをアミノ酸配列に翻訳し、ホモロジー検索を行えばおそらく何か既知タンパクがかかってくるはずである。そこでそのタンパクの構造や機能について文献調査をする。ただし、うまく機能タンパクのcDNAに当たるか、またどんなタンパクに当たるかは予測できない。そこでこれをcDNA lottery (cDNAくじ) と名付けた。平成12年度は前後半ともこちらが指定した定員いっぱい、2名ずつ計4名の学生がきてくれた。彼らにcDNA lotteryを引いてもらった結果はどうだったか、以下はその報告である。

実 験

方法

ミニプレップなどルーチンの実験は、基本的に遺伝子工学の標準実験マニュアルであるManiatisの実験書(1)によった。また多くの場合、市販のキットを用い、添付マニュアルにしたがって実験操作を行ったので、キットの名称と販売業者のみ記す。

塩基配列の決定は、ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)を用いて反応を行い、ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)により測定した。この方法では任意のプライマーを用いることができるが、配列情報に基づき適切に設計した20merをPharmacia社のOligo Express PCRに依頼して合成しプライマーとした。得られた配列データの解析はまずマニュアル、最終的にはGenetyx-Mac Ver 10.1 (Software Development)によった。

ホモロジー検索はGenomeNet Database Service (<http://www.genome.ad.jp>)に依頼しFASTAで行った。

指導側の準備

いくらcDNA lotteryとはいえ、いきなりcDNAライブラリから1クローンを選んでもらうわけにはいかない。クローンにインサートが入っていない可能性があるからで、指導側である程度の準備はしておく必要がある。以下、cDNAライブラリの作成も含め簡単に準備内容を述べる。

1) cDNAライブラリの作成

- a. *F. moniliforme*を培養し対数増殖期後期にある菌体を集める
- b. 菌体を破碎し全RNAを単離する
 - a, bの過程については既報(2)のとおり
- c. BioMag mRNA Purification Kit (PerSeptive Diagnostics)を用い、Poly(A) tailをもつmRNAを分離する
- d. Oligo(dT)プライマーを用いFirst strandを合成する
- e. リボヌクレアーゼH処理後Second strandを合成する
 - d, eの過程ではcDNA Synthesis Kit (Takara)を用いた
- f. cDNAに、一方にEcoRI切断末端、他方に平滑末端をもつ次のアダプター (Pharmacia) を接続する

$$5\text{'-AATTCGCGGCCGCT-3'}$$

$$3\text{'GCGCCGCGAp-5'}$$
- g. アダプターを接続したcDNAをLambda ZAP Predigested EcoRI/CIAP-Treated Vector (Stratagene) に挿入する
- h. 上で得たDNAを ファージ (Gigapack Gold Packaging Extract, Stratagene) にPackagingする

2) インサートをもつクローンの選択とPhagemidとしてのExcision

- a. Blue-white selectionでインサートが入ったファージを選ぶ
- b. ヘルパーファージを用いて、pBluescript SK(+/-) phagemidに入った形でインサートをExcisionする
- c. 得られたクローンを制限酵素 EcoRIで消化し、アガロースゲル電気泳動によりインサートの長さを調べる
- d. インサート入りクローンをもつ大腸菌をグリセロールストックにする

以上の準備を経て、インサートとして1-2 kb程度の長さをもつクローンを材料として与え研究に入る。

実験と学習項目

表 に実験の内容とその実験を通じて学習すべき内容を示す。

結果と考察

Lottery 1 (石ヶ坪 潤担当)

電気泳動から推定したインサートの長さは1630 b、塩基配列の決定では1646 bであった。配列決定には3回の反応を要した。配列は日本DNAデータバンク

表 実験と学習内容

実験	学習内容
グリセロールストックを起こす	アンピシリン耐性と Blue-white selection に基づく、インサート入りクローンのスクリーニング原理
単一コロニーを拾って培養しプラスミドのミニプレップを行う	プラスミドの性質と調製法
プラスミドを <i>EcoRI</i> 制限酵素で消化し、生成断片をアガロースゲル電気泳動にかけ、長さを推定する	制限酵素の性質 アガロースゲル電気泳動法による DNA の分離法
プラスミドをポリエチレングリコール沈澱により精製し、濃度を紫外線吸収で決定する	DNA の紫外線吸収スペクトル
インサートの塩基配列決定。ベクターの共通プライマーから始め、得られた配列情報に基づいて新しいプライマーを設計・合成し配列決定を続ける。両鎖を完全に配列決定する	DNA の塩基配列決定法
cDNA の塩基配列からタンパク質の読み枠を見つける	遺伝コードと mRNA の構造
タンパク質のアミノ酸配列のホモロジー検索を行う	アミノ酸配列のホモロジーと進化
ホモロジーのあったタンパク質について構造や生理機能を文献で調べる	文献調査法 バイオインフォマティクス

(DNA Data Bank of Japan, DDBJ) に登録番号 (Accession number) AB071859として登録した。

このインサートには15 bのPoly(A) tailと、開始ATG コドンから終止TAAコドン (112-1182) に至る356アミノ酸残基のタンパク読み枠 (Open Reading Frame, ORF) がある。したがって、何らかのタンパクの完全長cDNAであると予想された。じっさい、翻訳タンパクをホモロジー検索にかけたところ、ストマチンというタンパクがかかってきた。これは、ヒト赤血球膜のバンド 7.2Bタンパクとして知られる31 kDの膜タンパクで、遺伝的欠失によりストマトサイトーシスという珍しい溶血性貧血を起こすことから、最近医学的に注目され、Stewartによる総説 (3) がある。ただし機能については、イオンチャネルの調節をするのではないかとされているが、はっきりとは分かっていない。

このタンパクは動物界に広く分布しており、下等動物のセンチュウ (*Caenorhabditis elegans*) では機械的刺激の知覚に関連するタンパクであるといわれている (4)。興味深いことに、類似のタンパクは古細菌 *Archae* にも広くみられるが、これまでのところカビや植物での報告はなく、本研究が初めてである。そうしてみるとストマチンは、進化的に保存され生物界に広く存在するタンパクということになり、機能の解明がまたれる。

F. moniliforme のストマチン類似タンパクと最もホモロジースコアが高かったのは、ゼブラフィッシュ (*Danio reio*) のそれであった。両者の配列比較を図1に示す。全体のホモロジーは28%とあまり高くなく、

とくにC末端部約50残基にはまったく類似性がない。

図1にはホモロジーのある部分のみ示されている。ストマチンは疎水性のN末端部を膜に埋め込み、細胞質中にある親水性のC末端部で他成分と相互作用し機能を発揮すると考えられている。C末端部の違いは機能の違いの反映かもしれない。

```

1' MSSTEGMINGGSSSANPTKAPVMEGNGGFMQAQHKMAVEPPKKEDLQRSY
1"                                     MEDGRETAAMREERERRR
51' ATVVENDANPKGWYGSMMNALGTIIGTMGAVPCCIICPNPFKEVNVQNGV
19" QIALENTDSDIGLGGWILVIFSIILLTLPLSLIWMCL---IKIVKEYERA
101' LVTKFGKFKYK--AVDPGLVNIPLSERLIQIDVKIQTTTEVPEQICMTKDN
66" IIFRLGRILRGAGKGPLFFILPCTDSFINVDMRTITFDIPPQEVLTKDS
149' VTLRLTSVIYHYHVSHPKAAFGINNVKQALMERTQTTLRHVVGARVLQDV
116" VTVSVDGVVYRVQNTLAVANITNADAATRLLAQTTLRNVLGTKNLAEI
199' IERREEIAQSIGEIIEDVAAGWVQVESMLIKDIVFSQELQESLSMAAQS
166" LSDREEIAHSMQSTLDDATDWDGKVERVEIKDKVLPQLQRAMAAEAEA
249' KRIGESKIIAAKAEVESAKLMRQAADILSSAP-AMQIRYLEAMQAMAKSA
216" SREARAKVIAAEGEMNASRALKEASLVIAESPSALQRYLQTLNNTIAAEK
298' NSKVIFLPAANQTMGNALNAAMANQTGESSARALDNENDFGQDPGFQQA
266" NSTIIF-PLPIDMMQSFLLKH

```

図1. *F. moniliforme* とゼブラフィッシュ (*Danio reio*) のストマチン類似タンパクの配列比較。後者の配列は、GenPept (GP) (GenBankをタンパクに翻訳したデータベース) より得た (Locus, BRY13473; Author, Schlegel W., Schmierer B., Zon L. and Prohaska R.; Direct submission (1997))。配列比較はGenetyx-Mac Ver. 10.1のHomology Searchにより行い、結果をそのまま表示した。*は同一、. は同種のアミノ酸残基を示す。上段、配列番号に'を付してあるのが *F. moniliforme*、下段、配列番号に"を付してあるのが *D. reio*。後者は409残基からなるが、ホモロジーのないC末端側約130残基は表示されていない。

Lottery 2 (小田耕平担当)

電気泳動から推定したインサートの長さは960 b, 塩基配列の決定では907 bとなった。配列決定には2回の反応を要した。配列はDDBJに登録番号AB071860として登録した。

このインサートにはPoly(A) tailがなく, どの読み枠をとってもすぐに終止コドンが現れ, 長いORFをとることができない。そこでDNA配列をそのままホモロジー検索にかけたところ, 18SリボソームRNA (rRNA)の部分配列, ほぼ5'末端側の半分子に相当することが分かった。cDNAライブラリを作るとき, 全RNAからPoly(A) tailをもつmRNAを精製したのではあるが, 全RNA中に圧倒的に多量に含まれるrRNAが混入し, Oligo (dT)プライマーによるcDNA合成の際, Aに富む領域にプライマーが結合し合成が始まったのであろう。cDNAライブラリにはこのようなクローンも混入していることを認識させられる結果となった。

rRNAは生物界に広く分布し, その塩基配列は生物分類の良い指標になるとされている。事実ホモロジー検索では, わずか3 bしか違わない同属の*Gibberella pulcaris*をはじめとして, さまざまな生物の18S rRNAがかかってきた。図2に中程度のホモロジー (88%)をもつ酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) との配列比較を示す。

Lottery 3 (小川祥子担当)

電気泳動から推定したインサートの長さは1590 b, 塩基配列の決定では1756 bで, 両者はやや食い違っていた。配列決定には3回の反応を要した。配列はDDBJに登録番号AB071862として登録した。

このインサートは23 bのPoly(A) tailをもち, 5'末端の直後に始まりTGA終止コドンで終わる, 516アミノ酸残基のタンパクをコードするORF (2-1552)をもつ。開始ATGコドンで始まっていないため, 不完全長cDNAではないかと推測された。タンパクのホモロジー検索では, 5-アミノレブリン酸シンターゼ (EC 2. 3. 1. 37)がかかってきた。この酵素はスクシニル-CoAとグリシンからヘム生合成の最初の間体, 5-アミノレブリン酸を合成する酵素である。ヘムは呼吸鎖シクロムの補欠分子族であるから, 当然すべての生物に必須で, 分布は広い。最もホモロジーが高かったのは, 同じ子囊菌*Ascomycota*の1種であるコウジカビ (*Aspergillus oryzae*) で, 72%のホモロジーがあった。配列比較を図3に示す。図から, われわれの得たcDNAはN末端側約100アミノ酸残基に相当する部分が欠けていると推測される。

```

1'          GTCTCAAAGATTAAGCC
*****
1"  TATCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCC
18'  ATGCATGTCTAAGTATAAGCAA--TTATACAGCGAAACTGCGAATGCGTCA
*****
51"  ATGCATGTCTAAGTATAAGCAATTATACAGTAACTGCGAATGCGTCA
67'  TTATATAAGTTATCGTTTATTTGATAGTAC--TTACTACTTGG--ATAACC
***  *
*****
101"  TTAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTTCCTTACTACATGGTATAACC
115'  GTGGTAATTCAGAGCTAATACATGCTAAAATCCGA--CTTCGAAGG
*****
151"  GTGGTAATTCAGAGCTAATACATGCTTAAAATCCGACCTTTGGAAGA
163'  GATGTATTTATAGATTAATAAACAATGCCCTCGGGGCTCACGTGTGAT
*****
201"  GATGTATTTATAGATAAAAAATCAATG--TCTTC--GGACTCTTTGATGAT
213'  TCATGATAACTCCTCGAATCGCATGGCCTTGTGCCGGCGATGGTTCATTTC
****  *****
249"  TCATAATAACTTTTCGAATCGCATGGCCTTGTGTGGCGATGGTTCATTTC
263'  AAATTTCTCCCTATCAACTTTCGATGTTTGGTATTTGGCCAAACATGGT
*****
299"  AAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGTTAGATAGTGGCTTACCATGGT
313'  TGCAACGGGTAACGGGAGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGGAGGCGCTGAG
*  *
349"  TTCAACGGGTAACGGGGAATAAGGTTTCGATTCGGAGAGGAGCGCTGAG
363'  AACGGCTACTACATCAAGGAAGGAGCAGGCGCGCAAAATACCCAATC
*****
399"  AACGGCTACCACATCAAGGAAGGAGCAGGCGCGCAAAATACCCAATC
413'  CCGACAGGGGAGGTAGTGACAATAAATCTGATACAGGCTCTTTTGGG
*  *
449"  CTAATTCAGGGAGGTAGTGACAATAAATACGATACAGGCCCATTCGGG
463'  TCTTGTAAATGGAATGAGTACAATTTAAATCCCTTAACGAGGAACAATTG
*****
499"  TCTTGTAAATGGAATGAGTACAATGTAATACCTTAAACGAGGAACAATTG
513'  GAGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGT
*****
549"  GAGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGT
563'  ATATTAAGTTGTTGTGGTTAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGGGCGCTGG
*****
599"  ATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGGGCGCGG
613'  CTGGCCGTCGCCCTCACCGGCTGACTGG--TCCGGCCGGGCTTTCC
*****
649"  TTGGCCGTCGG--ATTTTTCGTGACTGGATTTCCAACGGGCGCTTTCC
660'  CTGCTGGAACCCATGCCCTTCACTGGGTGTGGCGGGAACAGGACTT
****  *
698"  TTCTGGCTAACCTTGAGTCTT--GTGGCTCT--TGGCGAACGAGGACTT
710'  TTACTGTGAAAAAATAGAGTGTCCAGCGAGGCTA--TGCTCGAATACA
****  *
744"  TTACTTTGAAAAAATAGAGTGTCAAAGCAGGCGTATTGCTCGAATATA
759'  TTAGCATGGAATAATAGAAATAGGACGTGTGGTCTATTTTGTGGTTTCT
*****
794"  TTAGCATGGAATAATAGAAATAGGACGTGTGGTCTATTTTGTGGTTTCT
809'  AGGACCGCGTAATGATTAATAGGACAGTGGGGGATCAGTATTCAAT
*****
844"  AGGACCATCGTAATGATTAATAGGACAGTGGGGGATCAGTATTCAAT
859'  TGTACAGGTTGAAATTCCTGGATTATTTAGAGACTAACTACTCGGAAAG
***  *
894"  TGTC--GAGGTGAAATTCCTGGATTATTTAGAGACTAACTACTCGGAAAG

```

図2. *F. moniliforme* と酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の18S rRNAの配列比較。後者の配列はGenBankより得た (Locus, YSCRGEA; Author, Mankin A. S., Skryabin K. G. and Rubtsov P. M.; Reference, Gene 44, 143-145(1986))。配列比較はGenetyx-Mac Ver. 10.1のHomology Searchにより行い, 結果をそのまま表示した。*は同一塩基を示す。上段, 配列番号に'を付してあるのが*F. moniliforme*, 下段, 配列番号に"を付してあるのが*S. cerevisiae*。後者は1798 bから成る。

Lottery 4 (福島理恵担当)

電気泳動から推定したインサートの長さは910 b, 塩基配列の決定では874 bとなった。配列決定には2回の反応を要した。配列はDDBJに登録番号AB071861として登録した。

このインサートは22 bのPoly(A) tailをもつ。また, 開始ATGコドンから始まり終止TAAコドンで終わる, 241アミノ酸残基のタンパクをコードするORF (33-

をアミノ酸配列に翻訳するという手作業をやってもらった。はじめは、なんでそんなことをやるの、という雰囲気だったのが、配列データに意外に間違いが多いことを発見したり、読み枠が違ふと終止コドンがひんぱんに出てくることを悟ったり、ずっと続くORFを見つけて喜んだり、けっこう楽しんでいるようであった。もちろん最後には、コンピュータ解析の方法を教え、手作業とつぎ合わせてみたのはいうまでもない。

こちらでは考えていなかったような教育効果もあった。医学を学ぶ者は、共通の性癖として、ヒトとそれに近い高等動物にしか興味がなく、きわめていびつともいえる生物観をもっているものであるが、配列比較を通じて広い生物世界を感じ取らせることができたように思う。もっとも、なぜカビの研究なぞするのか、という正直な感想も聞かれたが。結論として、この講座配属はおおむね成功といってよいと評価している。しかし問題がないわけではない。化学教室の側の人手不足という問題はさておき、カリキュラム・コースとしての一般的問題点を考察してみる。まず、この講座配属のカリキュラムにおける位置付けである。学生は一般教育を含む基礎医学等と臨床医学の2回に分けて講座配属研究を行う。前者では基礎医学研究に参加、また後者では臨床医学の場で症例解説などを体験、というのが建て前になっている。ではなぜ、基礎医学の勉強を始めて間もない3年生のこの時期に行うのか。彼らはまだ基礎医学全体のスコープをもっていないのはもちろん、臨床医学の勉強に至っては始めてさえいない。自らの興味にしたがって配属講座を選べといわれても、よく分からないというのが正直なところである。

また、研究を体験するという意味では、6週間、実質20日ちょっと、それも午後だけというのはいかにも短い。また学生の方は、この期間にも講義があり、いろいろな試験も入ってくるので、研究に集中するのは難しい。こんな状態で研究の現場に放り込めば、悪くすれば足手まとい、よくても学生自身は何をやっているのか分からないうちに終わる、ということになってしまいかねない。研究である程度成果を挙げ満足感を得るには、どうしても予めよく練った実験計画をスプーン・フィーディングで与える必要があるように思う。ただ、それでは学生実習と同じようなことになってしまう危険性があり、兼ね合いが難しいところではある。

臨床講座への配属は、学問的な意味は分からなくても、学生はほとんど臨床医を目指しているので、将来の自分達の姿を現在の医局員に重ねて想像することができるのは彼らにとって興味深いことだと思われるが、学問的内容の理解ということになると困難であろう。

以上いろいろ建て前を述べてきたが、じつはこの講座配属制度は、3年生のカリキュラム編成の都合でできた、というのが本音のところなのである。つまり、学士入学の3年生が2年生といっしょに解剖実習をやっているこの時期、一般入学の学生は何か他のことをしていなければならない、という理由で生まれたのがこの制度である。とすれば、「理想論をいっても始まらない、とにかく学生が講座に行つて雰囲気を感じたい、教官と親しく接する契機になればよいのだ」という議論もあながち的外れとはいえない。しかしそうやってしまったのでは、学生は講座配属の基準をどこが楽かにおくようになり、制度の空洞化が進むだけであろう。いろいろな悪条件を乗り越えてこの制度を定着させるには、それぞれの立場で最善を尽くすほかはない。とくに受け入れ側の熱意は最も重要なファクターと思われる。

謝 辞

文献検索法では、講座配属学生のために図書館で講習会をわざわざ設けていただいた。ここに深く感謝する。

参考文献

- 1) Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- 2) Yoshida H., Iizuka M., Norioka N., Norioka S. and Sakiyama F. (1998) *Biochem. Mol. Biol. Int.* 45, 555-560
- 3) Stewart G. W. (1997) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 271-274
- 4) Huang M., Gu G., Ferguson E. and Chalfie M. (1995) *Nature* 378, 292-295

(受付 2001年10月26日)