

出芽酵母の超簡単形質転換法によるポストゲノム解析

山口大学工学部応用化学工学科 星田 尚司、北川 孝雄、赤田 倫治

タンパク質間の結合解析に酵母のツーハイブリッド法を用いたり、目的タンパク質の発現に酵母を宿主に用いる酵母家以外の研究者が増えている。真核生物で最も扱いやすいモデル生物である酵母は、実験材料としての幅を広げ、分子生物学時代のファージや大腸菌の役目を、ゲノム時代には酵母が担う勢いである。酵母の価値はその遺伝子操作法にある。今回、超簡単な遺伝子導入法を開発したので紹介する。単に混ぜるだけという方法はコンペitentセル（形質転換能力を与えた細胞）の概念をなくし、ポストゲノム解析のキーツールとなる。

真核生物で最初にゲノム解析が完了した酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、ポストゲノムにおいてもその先頭を走っている。その代表的な例の1つは、EUROFANプロジェクトによって行われた全遺伝子破壊株コレクションの作成である。ここではゲノム解析により明らかにされた約6,000のORFを薬剤耐性マーカーで置換し、ノックアウトしている。これにより6,000の遺伝子のうち1,105遺伝子が破壊すると生存できなくなる必須遺伝子であることも明らかになった。このコレクションは1,144株の必須遺伝子破壊ヘテロ2倍体セット（遺伝子2つのうち一方を破壊してある）、約4,800株の非必須遺伝子破壊1倍体セット（a及びα接合型）、約4,800株の非必須遺伝子破壊株ホモ2倍体セット、及び約6,000株のヘテロ2倍体セットなどや、それらのプールからなる。日本ではインビトロジェンやフナコシから入手可能である。遺伝子破壊された部位にはそれぞれ異なるタグ配列が挿入しており、タグ配列を利用した株の同定も可能で、ハイスループットゲノムワイド解析が盛んに行われ、ゲノムレベルでの生物像が明らかになってきている^{1,2)}。しかし、これだけでは酵母の遺伝子しか解析できない。そこで求められるのがこれら数千のコレクションへの遺伝子導入法である。

酵母では様々な形質転換法が報告されており、最も一般的に使われているのはItoら³⁾によって報告された酢酸リチウム法であろう。しかしこの方法は遠心操作による細胞の濃縮や細胞増殖期の制限があり、不可能ではないが数千の株には不向きである。私たちがこれまでに用いてきたOne-step法はChenら⁴⁾によって報告された方法を改良したものであるが、その名の通り「ワンステップ」で形質転換できることから数千株へのハイスループットワークにも適用可能であると考えられた。実際この方法を適用したセミハイスループット形質転換法も開発したが、これでも4,800株の形質転換に2か月程度の時間がかかり、その操作も、今思えば、煩雑であった。

「*S. cerevisiae*ダイレクトトランスフォーメーションキット コー」は酵母培養液に

形質転換液を混ぜるだけの操作で酵母への遺伝子導入を可能にする画期的な試薬である。日常的な酵母へのプラスミド導入には簡単な上に十分な効率を持ち、さらに、その能力を最大限に発揮できるのがハイスループット形質転換である。酵母遺伝子破壊株コレクションに遺伝子を導入した報告はいくつかあるが、いずれも破壊株プールにランダムに導入したものからスクリーニングするか⁵⁾、マイクロプレートでの遠心濃縮を含む通常の形質転換法であった^{6,7)}。今回の方法がいかに簡単で、さらにその簡単さがいかにパワフルであるか紹介する。

一株ずつの形質転換では、試験管などの培養容器に1mlのYPD培地（酵母の最も一般的な富栄養培地）を入れ酵母を植菌し、28℃で24時間培養する。あらかじめ目的のプラスミドと

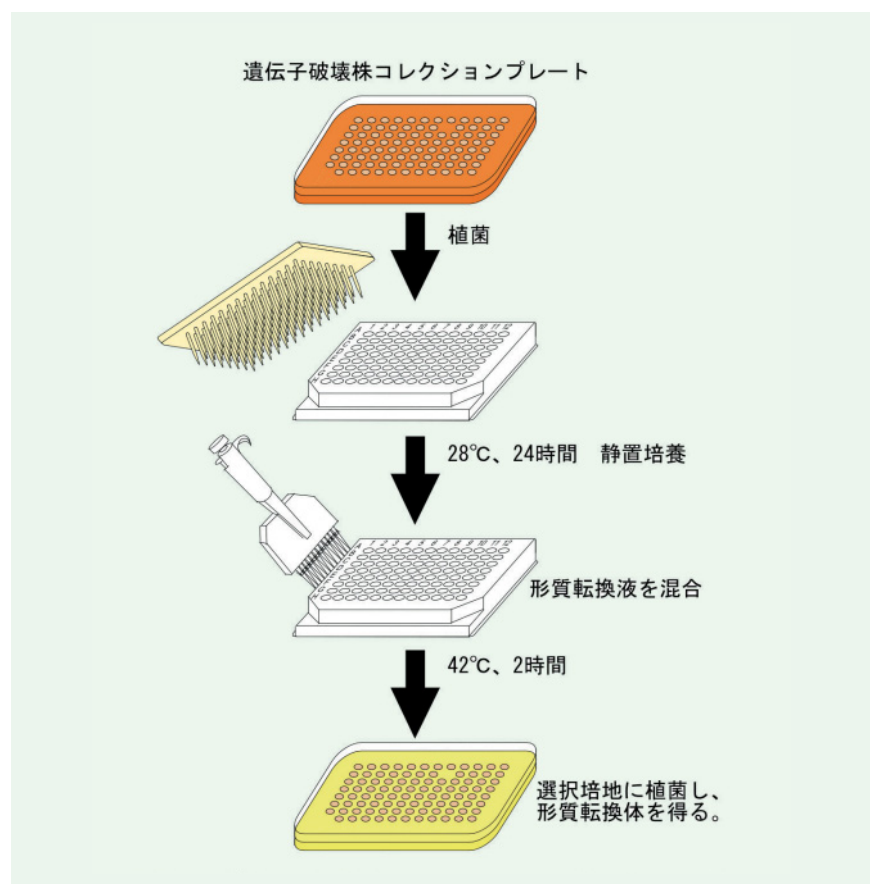


図1. ダイレクトトランスフォーメーションキットによるハイスループット形質転換法

混合した試薬混合液25 μ lを入れた1.5mlチューブに、この培養液25 μ lを分注し混合する。42℃で2時間ヒートショックを与え、適切な選択培地に混合液を広げた後、28℃で培養すれば形質転換体を得ることができる。この方法で5,000cfu/ μ gDNA以上の形質転換効率を得られた。酢酸リチウム法などとくらべると形質転換効率は低く、遺伝子ライブラリースクリーニングには不向きである。また、染色体上への遺伝子の組み込みができないという欠点はある。しかし、単に形質転換体を得るための実験であれば必要以上のコロニーを得ることができるし、一桁程度であれば、細胞を濃縮することで容易に形質転換効率を上げることも可能であった。

この方法を酵母遺伝子破壊株コレクションに適用したハイスループット形質転換の例を示す。ハイスループット形質転換法では、酵母遺伝子破壊

株コレクションが保存されている96ウェルフォーマットのままで操作を行った(図1)。この例では、LEU2を形質転換マーカーとするpRS315⁸⁾に、ガラクトースプロモーター下に食中毒原因菌 *Campylobacter jejuni* のエフェクター遺伝子 *CdtB* を挿入したプラスミドを導入した。この時のプラスミドは大腸菌からアルカリ-SDS法で調整したものをを用いており、大腸菌由来のRNAが大量に含まれているので、キャリアーRNA/DNAは加えていない。角型シャーレに作成したYPD寒天培地上に保存しておいた破壊株を、96個のピンがついたレプリケーターで取り、25 μ lのYPD液体培地を分注した96ウェルプレートに植菌した。プラスチック製のふたをして28℃で24時間静置培養した。形質転換用酵母の培養は25 μ lという少量の培地で行うため、プレート周辺のウェルが乾燥しやすい。乾燥したウェルに滅菌水を入れて形質転換を試み

たが、形質転換体はほとんど得られなかったことから、乾燥を防ぐ必要がある。培養時にプレートを完全にシールした嫌気的な培養を行っても好気条件下と同等に形質転換体を得ることができたことから、プレートを密閉して培養するのも一つの方法である。24時間培養した培養液はプレートミキサーで穏やかに攪拌し、細胞を十分に懸濁した後、形質転換液を分注し再び穏やかに攪拌した。今回は12チャンネルピペットを用いて形質転換液の分注を行ったが、一度に大量のプレートに対して形質転換を行うときには96ウェル対応の分注装置を使うと細かな神経を使う必要がなくなる。42℃に2時間おいた後、10 μ lずつを選択培地にスポットし、数日後のすべてのプレートの様子を図2に示した。この実験ではまず、53枚(0349と0381を1枚のプレートにまとめた)のプレートを29枚と24枚の2回に分けて形質転換操作を行い、

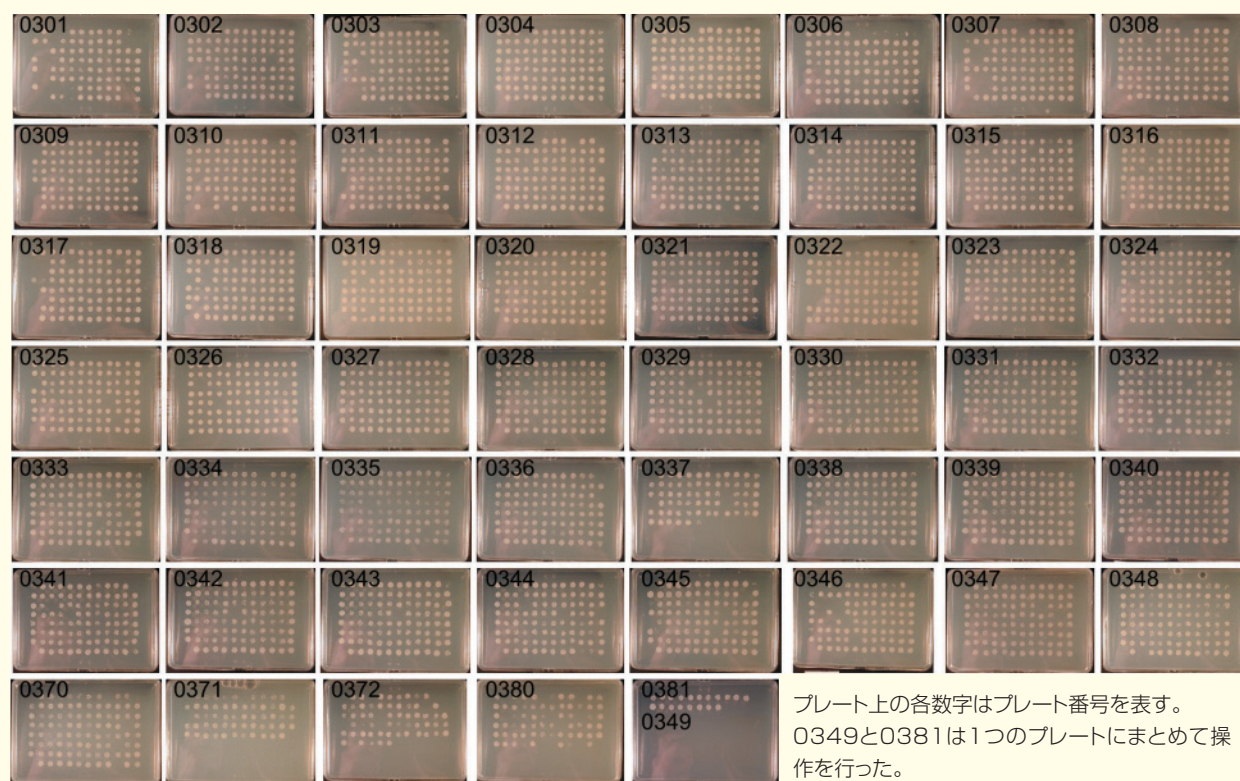


図2. *Campylobacter jejuni* *CdtB*遺伝子を導入した遺伝子破壊株コレクション

4,708株の破壊株から4,602株の形質転換体を得た。残りの106株を96ウェルプレートに集めもう一度形質転換し、98株の形質転換体を得た。残り8株のうち6株はチューブ法で形質転換体を得た。最後まで残った2株はロイシン要求性株であるために、形質転換体を得ることができなかったことがわかった。この結果は*S. cerevisiae*ダイレクトトランスフォーメーションキットWakoで簡単に4,700株に遺伝子を導入できることを示しているとともに、新しい結果「遺伝子導入できない非必須遺伝子破壊株はない。」ということを示している。DNAの取り込みは生物にとって必須の現象であると考え始めている。

この方法を用いることで、酵母で発現させたときに何らかの表現型を示す遺伝子であればどんな遺伝子でも解析可能である。例えば、ほ乳類アポトーシス誘導遺伝子*Bax*を酵母で過剰発

現させると致死性を示すことから、ハイスループット形質転換法により酵母内で*Bax*と遺伝学的に相互作用のある遺伝子の探索が可能になる。タンパク質の発現、局在の解析や、さらには疾患の原因となる遺伝子を用いることができれば、創薬のターゲットとなる遺伝子の探索も可能になる。既に私たちはこの方法を用いて酵母遺伝子、ヒト遺伝子、病原菌エフェクター遺伝子、有用酵素遺伝子など12以上の遺伝子の導入を完了し、ゲノムレベルの解析を行っている。それぞれ大変興味深い結果が得られており、この方法の簡便さはもちろんであるが、そこからもたらされる結果にも驚かされている。

〔参考資料〕

- 1) Giaever, G. *et al.*: "Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome.", *Nature*, 418, 387-391 (2002).
- 2) Scherens, B. and Goffeau, A.: "The use of genome-wide yeast mutant collections.", *Genome Biol.*, 5, 229.1-229.8 (2004).
- 3) Ito, H. *et al.*: "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations.", *J. Bacteriol.*, 153, 163-168 (1983).
- 4) Chen, D. *et al.*: "One-step transformation of yeast in stationary phase.", *Curr. Genet.*, 21, 83-84 (1992).
- 5) Willingham, S. *et al.*: "Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment or α -synuclein.", *Science*, 302, 1769-1772 (2003).
- 6) Kushner, D. B. *et al.*: "Systematic, genome-wide identification of host genes affecting replication of a positive-strand RNA virus.", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 15764-15769 (2003).
- 7) Murthi, A. and Hopper, A. K.: "Genome-wide screen for inner nuclear membrane protein targeting in *Saccharomyces cerevisiae*: Roles for N-acetylation and an integral membrane protein.", *Genetics*, 170, 1553-1560 (2005).
- 8) Sikorski, R. S. and Hieter, P.: "A system of shuttle vectors and yeast host strains designated for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*.", *Genetics*, 122, 19-27 (1989).

Products

ゲノムワイドなスクリーニングに対応!!

S. cerevisiae ダイレクトトランスフォーメーションキット Wako

本キットは、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を簡単に形質転換させることができる試薬キットです。わずらわしい菌体の遠心・洗浄操作をすることなく、酵母培養液に直接プラスミドDNAと専用試薬を加えるだけのワンステップトランスフォーメーション試薬です。特に96ウェルマイクロプレートを用いた多検体への導入に威力を発揮します。

特 長

- 菌体の遠心・洗浄が不要
- 目的プラスミドDNAと専用試薬を加えるだけのワンステップタイプ
- 96ウェルマイクロプレートで導入できるため、多検体処理が可能
- チューブ法でも導入が可能
- 低粘性試薬の実現で、ハイスループット化が可能

形質転換効率

BY4743株にpRS316を導入した場合の形質転換効率

- 96ウェルマイクロプレート法…………… 500cfu/ μ g以上
- チューブ法…………… 5,000cfu/ μ g以上

キット内容

	(20回用)	(100回用)	(500回用)
● <i>Sc</i> Transformation Reagent	500 μ l	2.5ml	12.5ml
● Carrier DNA (5 μ g/ μ l)	50 μ l	250 μ l	1.25ml



コードNo.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格(円)
296-62701 292-62703 290-62704	<i>S. cerevisiae</i> Direct Transformation Kit Wako	遺伝子研究用	20回用 100回用 500回用	4,800 10,000 40,000

