

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の形質転換分子基盤情報に基づく 「超高効率」形質転換法の確立

河井 重幸

(京都大学大学院農学研究科 食品生物科学専攻)

研究の目的

真核生物のモデル生物である酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の研究には、高効率で簡便な形質転換法が必要である。しかしながら、酵母の形質転換効率が低く（大腸菌の約 1000分の1以下）その改善が望まれる。酵母の形質転換機構の理解により、酵母のみならず他の真核生物の形質転換効率の増大も期待される。本機構を理解するため、酵母の非必須遺伝子欠損株（約 5,000 株）の形質転換能が、「自然形質転換法」(1)により網羅的に調べられ、3種の変異株 (*pde2*, *spf1*, and *pmr1*) が高い形質転換能を示すことが見いだされた (2)。*pde2*は、高親和性 cAMP フォスフォジエステラーゼを欠損している。*pde2* においては、cAMP レベルが上昇しているため、cAMP レベルの上昇が高い形質転換能をもたらしていると推測される。cAMP の主なターゲットはプロテインキナーゼ A (PKA) であり、Tpk1p、Tpk2p、および Tpk3p は PKA の触媒サブユニットである。なお、PKA は、ホモまたはヘテロダイマーの触媒サブユニットとホモダイマーの制御サブユニットから構成される。従って、cAMP が、PKA の Tpk1p、Tpk2p、又は Tpk3p を介して形質転換能を増大させていると予想される。

本研究の目的は、上記の知見に基づいて、「超高効率」な形質転換能を有する酵母株を育種すること、および「超高効率」な形質転換能を与える形質転換条件を見いだすことである。

方法

酵母の形質転換は、自然形質転換法 (1) および酢酸リチウム/一本鎖キャリアーDNA / ポリエチレングリコール (LiAc/SS-DNA/PEG) 法 (3) によって行った。対数期初期の酵母細胞 ($A_{600}=0.3 \sim 0.6$; 10 ml YPD液体培地) を集洗菌後、自然形質転換法では、160 μ l の DNA/PEG溶液 [0.5 μ g プラスミドDNA (YEp13), 35% PEG4,000] に細胞をけん濁し、30°Cで1時間保温後、42°Cで5分間処理した。LiAc/SS-DNA/PEG法では、細胞を360 μ l の LiAc/SS-DNA/PEG 溶液 [0.5 μ g プラスミドDNA (YEp13), 0.1 M LiAc, 0.1 mg SS-DNA, 33 % w/v PEG3,350] にけん濁し、42°Cで40分間保温した。両方法ともに、集菌した細胞を1 ml TEで洗浄し、選択培地に塗布した (従来法)。場合によっては、洗浄操作を省いた (直接塗布法)。なお、選択培地への塗布直前の細胞懸濁液の希釈液をYPD培地に塗布し、生じたコロニー数を計測することにより生菌数を求めた。形質転換能は、「形質転換体数」および「形質転換頻度 (形質転換体数 / 生菌数)」で評価し、三回以上の独立した実験で得られた値の平均値として表示した。なお、遺伝子破壊はPCRターゲティング法で行った (4)。本研究で用いた酵母株を表1にまとめた。

結果

「超高効率」な形質転換能を有する酵母株を育種するため、まず PKA の形質転換に関わる触媒サブユニットの同定を試みた。触媒サブユニット (*TPK1*, *TPK2*, *TPK3*) のうち、もし一個若しくは二個の触媒サブユニットが形質転換に阻害的に関与するのであれば、それらサブユニットの破壊により、形質転換能の増大が期待される。もし一個若しくは二個の触媒サブユニットが形質転換能を活性化する方向で関与するのであれば、それらサブユニットの大量発現により、形質転換能の増大が期待される。そこで、以下の株の形質転換能を自然形質転換法と LiAc/SS-DNA/PEG 法で検討した：(i) *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* の各々を大量発現した株 (MK793, 794, 795), (ii) *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* の各々および *BCY1* を大量発現した株 (MK973, 974, 975), (iii) *BCY1*, *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* の各々を欠損した変異株 (XPY1, MK450, 451, 452), (iv) *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* のうち二つを欠損した二重変異株 (MB13, 23, 12) (表 1)。しかしながら、上記の株と対照株 (野生株) との間に形質転換能の大きな違いは認められなかった。すなわち、*TPK1*, *TPK2*, *TPK3* の大量発現 (*BCY1* との共発現も含む) や欠損の形質転換能に対する影響は検出されなかった。そこで、上記の株に *PDE2* 変異を導入することにより、*TPK1*, *TPK2*, *TPK3* の大量発現や欠損の形質転換能に対する影響を検出できるかもしれないと考え、以下の株の形質転換能を検討した。(v) *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* の各々を大量発現した *pde2* (MK979, 980, 981), (vi) *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* の各々および *BCY1* を大量発現した *pde2* (MK940, 941, 942), (vii) *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* の各々を欠損した *pde2* (MK871, 872, 873), (viii) *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* のうち二つを欠損した *pde2* (MK944, 945, 946)。しかしながら、いずれの場合も *PDE2* 変異導入による形質転換能の増大は観察されたが、*TPK1*, *TPK2*, *TPK3* の大量発現 (*BCY1* との共発現も含む) や *TPK1*, *TPK2*, *TPK3* 欠損の形質転換能に対する影響は検出されなかった。

次に、野生株並びに *pde2*, *spf1*, *pmr1* 株を用いて、「超高効率」な形質転換能を与える形質転換の条件を検討した。LiAc/SS-DNA/PEG 法は、自然形質転換法よりも高い形質転換能を示した (図 1)。酵母の形質転換法 (LiAc/SS-DNA/PEG 法、自然形質転換法) において、酵母細胞を選択培地に塗布する前に、細胞を緩衝液 [例 TE] などで洗浄するのが一般的である。しかし、形質転換過程において、(i) プラスミド DNA は酵母細胞の細胞表層近辺の領域に結合すること、及び(ii)この結合したプラスミド DNA は、細胞の洗浄により細胞から遊離し、その結果として形質転換能が低減する (Tuan et al., 未発表データ)。そこで、従来法で得られた形質転換能を細胞の洗浄操作をしない形質転換法 (直接塗布法と称する) で得られた形質転換能を比較した (図 2)。自然形質転換法でも LiAc/SS-DNA/PEG 法でも、直接塗布法の方が従来法よりも高い形質転換能を与えた。そして、直接塗布法においても、LiAc/SS-DNA/PEG 法の方が、自然形質転換法よりも高い形質転換能を与え、*pde2*, *spf1*, *pmr1* 株は、野生株よりも高い形質転換能を与えた。直接塗布法の方が従来法よりも高い形質転換能を与えるという結果と一致して、細胞を選択培地に塗布する前に細胞を希釈する場合、細胞を PEG4,000 で希釈した場合の方が、緩衝液で希釈した場合よりも、形質転換能が高かった。

PDE2, *SPF1*, *PMR1* の二重、三重変異株は、各々の変異株よりも高い形質転換能を示すと

推測される。そこで、これら二重、三重変異株を作製し（MK870, MK1341, 1342, 1343;表 1）その形質転換能を調べたが、形質転換能は増大しなかった。

結論

「超高効率」な形質転換能を得るために、目的とする酵母株への *PDE2*, *SPF1*, 又は *PMR1* 各々の変異の導入（二重、三重変異は効果がない）LiAc/SS-DNA/PEG 法と直接塗布法の組み合わせ（選択培地への塗布の前に細胞を希釈する場合、35 % PEG で希釈する）が有効であることを明らかにした。

文献

1. Hayama, Y., Y. Fukuda, S. Kawai, W. Hashimoto, and K. Murata. 2002. Extremely simple, rapid, and highly efficient transformation method for the yeast *Saccharomyces cerevisiae* using glutathione and early log phase cells. *J. Biosci. Bioeng.* **94**:166-171.
2. Kawai, S., T. A. Pham, H. T. Nguyen, H. Nankai, T. Utsumi, Y. Fukuda, and K. Murata. 2004. Molecular insights on DNA delivery into *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**:100-107.
3. Gietz, R. D., and R. A. Woods. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* **350**:87-96.
4. Shi, F., S. Kawai, S. Mori, E. Kono, and K. Murata. 2005. Identification of ATP-NADH kinase isozymes and their contribution to supply of NADP(H) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J.* **272**:3337-3349.

表 1. 本研究で用いた *S. cerevisiae* 株

株	遺伝型	入手先
BY4742	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1</i>	EUROSCARF
MK351	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 spf1 ::kanMX4</i>	EUROSCARF
MK355	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 pde2 ::kanMX4</i>	EUROSCARF
MK480	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 pmr1 ::kanMX4</i>	EUROSCARF
MK793	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 [TPK1 in YEplac195]</i>	本研究で作成
MK794	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 [TPK2 in YEplac195]</i>	本研究で作成
MK795	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 [TPK3 in YEplac195]</i>	本研究で作成
MK973	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 [TPK1 in YEplac195] [BCY1 in V056]</i>	本研究で作成
MK974	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 [TPK2 in YEplac195] [BCY1 in V056]</i>	本研究で作成
MK975	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 [TPK3 in YEplac195] [BCY1 in V056]</i>	本研究で作成
MK979	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 pde2 ::kanMX4 [TPK1 in YEplac195]</i>	本研究で作成
MK980	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 pde2 ::kanMX4 [TPK2 in YEplac195]</i>	本研究で作成
MK981	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 pde2 ::kanMX4 [TPK3 in YEplac195]</i>	本研究で作成
MK940	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 pde2 ::kanMX4 [TPK1 in YEplac195] [BCY1 in V056]</i>	本研究で作成
MK941	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 pde2 ::kanMX4 [TPK2 in YEplac195] [BCY1 in V056]</i>	本研究で作成
MK942	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 pde2 ::kanMX4 [TPK3 in YEplac195] [BCY1 in V056]</i>	本研究で作成
MK342	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 [YEplac195]</i>	本研究で作成
MK959	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 [YEplac195] [V056]</i>	本研究で作成
MK325	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 pde2 ::kanMX4 [YEplac195]</i>	本研究で作成
MK960	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 pde2 ::kanMX4 [YEplac195] [V056]</i>	本研究で作成
MK450	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 tpk1 ::kanMX4</i>	EUROSCARF
MK451	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 tpk2 ::kanMX4</i>	EUROSCARF
MK452	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 tpk3 ::kanMX4</i>	EUROSCARF
MK871	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 tpk1 ::kanMX4 pde2::URA3</i>	本研究で作成
MK872	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 tpk2 ::kanMX4 pde2::URA3</i>	本研究で作成
MK873	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 tpk3 ::kanMX4 pde2::URA3</i>	本研究で作成
MK870	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 pde2::URA3 spf1 ::kanMX4</i>	本研究で作成
MK1341	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 pde2::URA3 pmr1 ::kanMX4</i>	本研究で作成
MK1342	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 pmr1 ::kanMX4 spf1 ::HIS3MX6</i>	本研究で作成

MK1343	<i>MAT leu2 0 lys2 0 ura3 0 his3 1 pde2::URA3 pmr1 kanMX4</i>	本研究で作成
	<i>spf1 ::HIS3MX6</i>	
W303-1A	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 lue2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>	Dr. Mazon
MB13	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 lue2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 tpk1::LUE2</i>	Dr. Mazon
	<i>tpk3::URA3</i>	
MB23	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 lue2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 tpk2::HIS3</i>	Dr. Mazon
	<i>tpk3::URA3</i>	
MB12	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 lue2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 tpk1::LUE2</i>	Dr. Mazon
	<i>tpk2::HIS3</i>	
MK943	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 lue2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 pde2</i>	Dr. Mazon
	<i>::kanMX6</i>	
MK944	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 lue2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 pde2</i>	本研究で作成
	<i>::kanMX6 tpk1::LUE2 tpk3::URA3</i>	
MK945	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 lue2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 pde2</i>	本研究で作成
	<i>::kanMX6 tpk2::HIS3 tpk3::URA3</i>	
MK946	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 lue2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 pde2</i>	本研究で作成
	<i>::kanMX6 tpk1::LUE2 tpk2::HIS3</i>	
MYL40	<i>MAT ura3-52</i>	Dr. Heitman
XPY1	<i>MAT ura3-52 bcy1::kanMX2</i>	Dr. Heitman

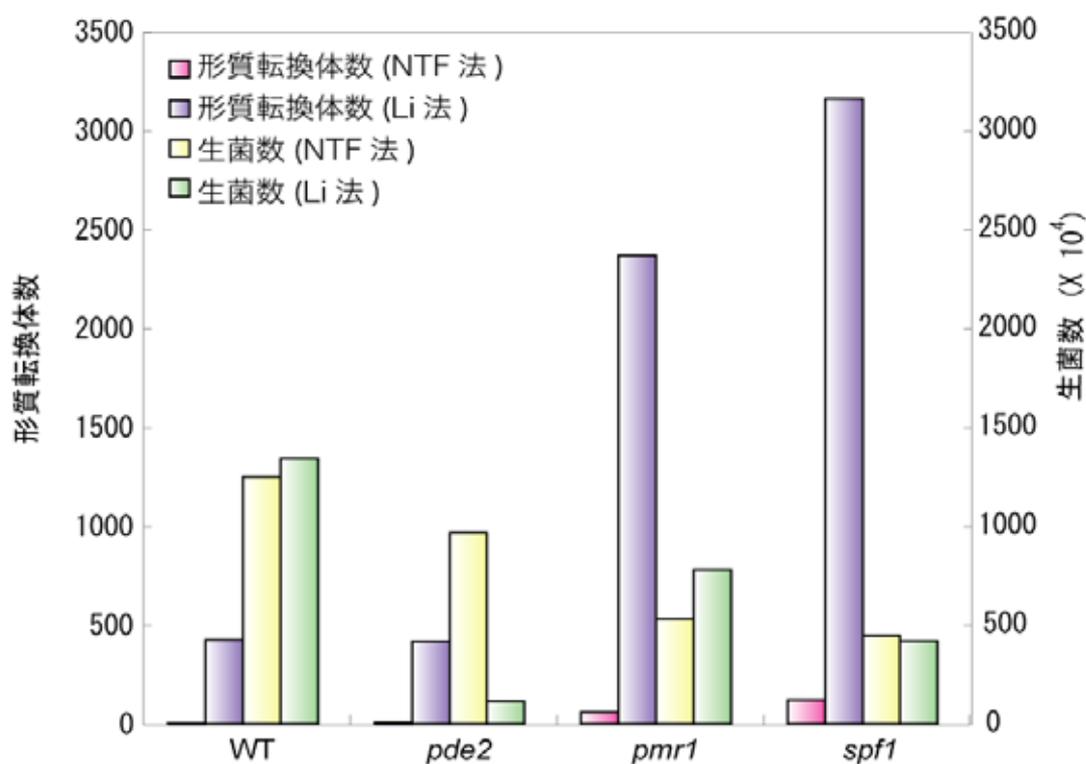


図1 各株の形質転換体数と生菌数

LiAc/SS-DNA/PEG法 (Li法)、自然形質転換法 (NTF法) で形質転換を行った。プラスミドDNAとして YEp13 (0.5 μ g) を使用し、選択培地への塗布の前に、細胞を1mlのTEで1回洗浄した。5回 (Li法)、及び3回 (NTF法) の形質転換で得られた結果の平均値を示した。

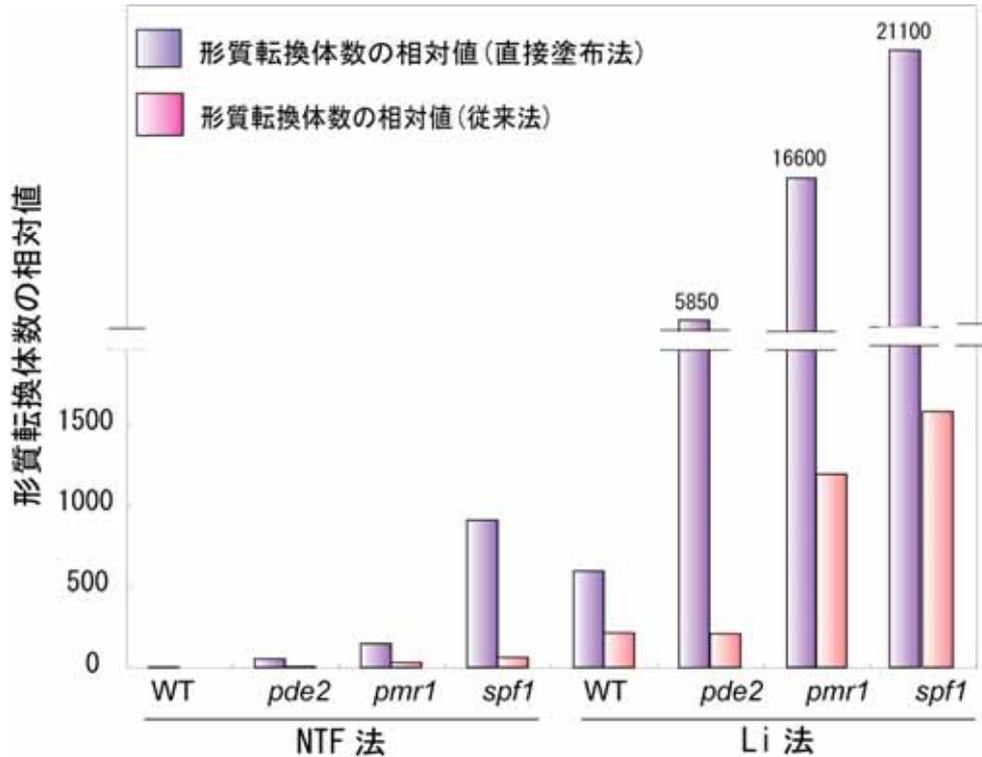


図2 従来法と直接塗布法で得られた各株の形質転換体数と生菌数

LiAc/SS-DNA/PEG法 (Li法)、自然形質転換法 (NTF法) で形質転換を行った。

各々、プラスミドDNAとして YEp13 (0.5 μ g) を使用し、選択培地への塗布の前に、細胞を1mlのTEで1回洗浄する従来法、及び洗浄しない直接塗布法で形質転換を行った。

5回 (Li法)、及び3回 (NTF法) の形質転換で得られた結果の平均値を示した。

野生株 (WT) をNTF法と従来法で形質転換して得られた形質転換体数を1とした。

pde2, *pmr1*, *spf1* 各株をLi法と直接塗布法で形質転換して得られた値はグラフの上に示した。