



# 微生物，特に出芽酵母の 形質転換法についてのよもやま話

守屋 央朗

## はじめに

本稿は、微生物，その中でも大腸菌 (*Escherichia coli*) と出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の「形質転換」という技術を中心に考えてみたい。これらの微生物への形質転換法はほぼ確立していて、そのプロトコルについて筆者がわざわざ駄文で解説する必要はない。本稿では、筆者のこれまでの形質転換の経験（あるいは体験）を通じて、確立しているとされる形質転換についてエッセイに近いよもやま話を展開してみたい。これらの「形質転換あるある」を通じて、微生物の形質転換の実際を読者に疑似体験してもらうのが本稿の目的である。当然ながら筆者が形質転換のすべてを知り尽くし経験しているわけではない。ひとりの中年（熟年？）研究者の視点からみた形質転換にすぎず、経験豊富な読者は自身の実体験と照らし合わせ、うなずいたり首をかしげたりしながら読んでいただければ幸いである。

## 遺伝子工学と形質転換

手元にある、1982年に発行され1993年に改訂された『応用微生物学』という教科書<sup>1)</sup>の「組換えによる微生物菌株の改良」の章には、当時の微生物に遺伝子を導入するための技術がいくつか紹介されている。その中に、「最近、塩化カルシウムと温度処理（4℃→42℃）により、大腸菌の形質転換が可能になった」という一文がある。その他、ファージを用いた形質導入や接合によるDNAの伝達など、微生物の本来の能力を利用した遺伝子導入の技術が紹介されている（そして、これらの技術は、形質転換が難しい微生物では現代でも使われている）。この教科書では、「分子育種の問題点」（あるいは、組換えDNA実験技術の発展のための今後の課題）として、6つの課題があげられている。そのうちの①は適当な宿主—ベクター系の開発であり、②は宿主細胞にDNA小片を取り込ませる方法の工夫、③はDNAを受け入れた細胞の選択である。これらすべては、教科書が発表されて30年で急速に発展し、「遺伝子工学」と呼ばれる分野を築き、これらの技術の全容を知るには、一冊の（ある

いは数冊の？）書籍が必要な時代となった。この古い教科書には、PCR法が使えなかったときに人類がどのように遺伝子組換えを行っていたのか、あるいはプラスミドに外来DNAを組み込む操作をなぜ「クローニング」とよぶのかなど、当時の教科書だから説明されていることもあったりして、「遺伝子工学の古典」として眺めるのは、なかなか楽しい。

## 「形質転換」という言葉の誤用？

微生物の形質転換は、悩ましい技術である。そもそも「形質転換」とは、一部の微生物に見られる外来DNAの取り込み能力によって微生物の性質（表現型）が変化する現象のことを意味していた。表現型を決める遺伝物質の実態がDNAであることを示した肺炎双球菌の形質転換が、有名な、そして形質転換について言及された初期の例と言える。その後、外来DNA取り込み能をもっていない生物に対しても、化学的操作や物理的操作により外来DNAを取り込ませることができるようになり、形質転換は現象というよりは技術だと考えられることが多くなった。しかしながら、形質転換とはあくまでも現象であり、形質転換されるのはDNAを取り込んだ宿主の細胞である。したがって、「プラスミドDNAを、（宿主細胞に）形質転換する」という言い方は本来の意味から考えると間違っていて、「『プラスミドDNAによって、宿主細胞を形質転換する』といわなければならない」と老教授にたしなめられたことがある。形質転換では、大抵いつも同じ宿主細胞（たとえば大腸菌や酵母）を使っていて、導入するプラスミドが違うケースがほとんどだろう。その場合にも、必ず「大腸菌に」や「酵母に」という目的語を入れなければならないのである。知人の研究室では、形質転換技術のことを「トラホメ」といっている。トラホメは、おそらくTransformation（形質転換）の略だろう。これは造語であり、すでに現象なのか技術なのかも分からず、そうなれば誤用もへったくれもない。「このプラスミドをトラホメします」と言ってしまったとしても、もう老教授にたしなめられることはない。ただ、逆に「トラホメとは何だ？」といわれる可能性は大いにある。

### 形質転換は悩ましい技術である

先ほど、「悩ましい」と書いたのは、言葉の使い方から怒られるからではない。微生物の形質転換は、日常的に頻繁に行われていながら、実際には原理はいまだによく分かっておらず、したがって、コツがどこにあるのかもよく分からず、実験室や実験者によってローカルなノウハウが生まれやすい。筆者の研究室でも日常的に行われプロトコルも完成されているので、「ノウハウなんか存在しない」と筆者が思っていた酵母の形質転換でも、学生によってはまったく形質転換体が得られないかと思えば、細胞が全部形質転換されたのではないか、あるいはコンタミか、と驚くような数の形質転換体のコロニーを生やしてくる学生もいる。おそらく、細かな手先の動作なのだと思うのだが、原因は分からない。こういうときに、「酵母への愛の違いだ」などと言うこともあるが、そうなってくると私も老教授の仲間入りと言うことになる。実に悩ましい。

大腸菌の形質転換では、「42℃の熱ショックが必要」と言われている。上記の教科書にも、この温度処理により大腸菌の形質転換が可能となったと書いてある。しかし、実はこの温度処理は「必須」ではない。一般的な大腸菌の形質転換のプロトコルでは、コンピテントセルとプラスミドDNAを混ぜて氷上に置き(30分間)、その後42℃(90秒間程度)の熱ショックを行って、抗生物質の入っていない培地で復活培養(1時間)をしてから選択培地にまく。だいたい1.5時間のプロトコルである。実は、これらの操作のほとんどは必須ではない。アンピシリン耐性を選択として行う場合には(pUC系のほとんどのプラスミドが当てはまる)、コンピテントセルとプラスミドDNAを混ぜ、いきなり選択培地にまいても十分な数の形質転換体が得られる(ただし、カナマイシンやクロラムフェニコールによる選択には復活培養が必要なので注意。詳しくは筆者のブログ<sup>2)</sup>参照)。こんなのも、知っているか知らないかで一日の実験スケジュールが大きく変わる、ちょっとした(だけど大きな)ノウハウだと言える。

#### 微生物の形質転換でのプラスミド導入率は著しく低い

上記の教科書の分子育種の問題③にあるように、微生物の形質転換では遺伝子が導入された細胞の選択が非常に重要である。現代ならば、ベクターのプラスミドがもつ栄養要求性や薬剤耐性などのマーカー遺伝子を用いて選択を行うのが一般的だろう。微生物の形質転換の「効率」は、ほとんどの場合、形質転換に用いるプラスミド

1 μgあたりでどれくらいの数の形質転換体のコロニーが出るかで算出される。これは、与えられたプラスミドDNA分子のどれだけだけがコロニー数として反映されるか、という指標である。一方、形質転換に用いた細胞のうち何パーセントにプラスミドが導入されるか、すなわち「導入率」は、ほとんどの場合考慮しない。これは、微生物の形質転換では導入率が著しく低く、何の選択もしなかった場合、プラスミドの入った細胞を探し出すことはほとんど不可能だからである。筆者は以前、「蛍光タンパク質を発現するプラスミドで酵母を形質転換したが、光る細胞が見つからないので原因を考えて欲しい」と外部の学生達から相談を受けたことがある。その学生達は、形質転換操作のあと選択のない培地にそのまま酵母をまいていた。筆者らの経験でおおよその見積もりをすると、形質転換に用いる酵母のうち、細胞内にプラスミドが導入されコロニーを形成するものは1万から10万分の1程度である。形質転換後の寒天培地を顕微鏡で必死に探索すれば、1万以上のコロニーに埋もれた光るコロニーを1つ見つけることができるかもしれない。それを取り出すのは、まさに針に糸を通すような操作が必要だろう。だが、この非常識とも思われる「選択のない形質転換」は、実は、微生物ならではなのかもしれない。実際、ヒトの細胞をはじめとする培養細胞での外来DNA導入操作(トランスフェクション)では、90%以上の導入率となることもある。操作後の培地を覗くと、視野のほとんどの細胞にDNAが導入されている像を見ることができる。つまり、実験に用いたほとんどの細胞にプラスミドを導入することができるわけで、「選択」という概念は必要なくなる。筆者は寡聞にして、微生物でこのような高導入率の形質転換法を知らない。もしこれが可能になると、微生物での形質転換実験の考え方は大きく変わるものと思う。もし、特に酵母でこのような高効率導入法をご存じの方がいらしたら筆者にご教示いただきたい。

#### 酵母の形質転換法あれこれ

さて、ここからは酵母の形質転換について少し真面目にプロトコルの紹介などもしてみたいと思う。出芽酵母(*S. cerevisiae*)にはいくつか形質転換法が存在する。1) 酢酸リチウム(LiAc)法、2) エレクトロポレーション法、3) スフェロプラスト法が代表的な方法である。筆者が知る限り、1はもっとも頻繁に用いられている方法であり、分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)でも同様の方法で形質転換ができる。*S. cerevisiae*では1が主流なので2はあまり使われない印象で、1が難しい*Komagataella pastoris*では2の方が主流のようである。3は、1や2ができる前の「古

典的な方法」という認識で、それなりに手間がかかる。それこそ30年ほど前、筆者が学部生だった当時、先輩がスフェロプラスト法で酵母を形質転換しており、「酵母の形質転換は、(大腸菌と比べて)ずいぶんと面倒くさいのだな」と思いながら見ていた記憶がある。現在でも形質転換が難しい酵母種には使われているようであるが、*S. cerevisiae*においても利用が終わったわけではない。染色体レベルの長鎖のDNAを形質転換する際、すなわち、「酵母細胞内でのバクテリアゲノムの再構成」という歴史的な研究において再び使われ、新たな脚光を浴びた<sup>3)</sup>。おそらく、大きなDNAを損傷させずに形質転換するためにはスフェロプラスト法が有効なのだろう。古典的な実験手法についても知識として知っておくことの重要性を示す良い事例であろう。なお、これらの形質転換法には、後でも紹介するマニトバ大学のDaniel Gietzらが書いた総説<sup>4)</sup>に詳しく説明されているので、より詳しく(偏りのない)知識を得たい読者は参照していただきたい。

### 現在もっともよく使われている酢酸リチウム法

現在もっともスタンダードな酢酸リチウム法は、1983年の京都大学食料科学研究所の伊藤らの研究に端を発している<sup>5)</sup>。大腸菌の形質転換が細胞のカルシウム処理により可能になることに着想を得て、さまざまな金属イオン水溶液で酵母細胞を処理し、結果として酢酸リチウムの処理がもっとも形質転換効率が高いことを発見した。これに加えて、スフェロプラスト法で利用されていたポリエチレングリコール(PEG)の重要性も本研究で調査された。その後、対数増殖期の酵母細胞を用いること、熱変成させた一本鎖DNA(サケ精巣DNA)を加えること、42°Cで20分間程度の熱処理を行うことなどにより、この方法の高効率化が進んだ。この改良を牽引し、酢酸リチウム法の普及をその研究キャリアを通じて行っているのが上述のGietzである。*S. cerevisiae*で(高効率の)形質転換を行いたければ、Gietzが管理している「Yeast transformation homepage」を見れば良かった。残念ながら現在は、このウェブページは閉鎖されている。ここに掲載されていた内容は2007年のNature Protocols誌に、1) High-efficiency yeast transformation<sup>6)</sup>、2) Quick and easy yeast transformation<sup>7)</sup>、3) Large-scale high-efficiency yeast transformation<sup>8)</sup>、4) Microtiter plate transformation<sup>9)</sup>、5) Frozen competent yeast<sup>10)</sup>の5部作としてまとめられている。実験操作だけでなく、試薬の型番や、トラブルシューティングについても記載されているので、酢酸リチウム法で酵母の形質転換を行いたい場合には参照すると良い。なお、Gietzらは酢酸リチウム法とは呼ばず、「the LiAc/SS carrier DNA/PEG method」と呼んでいる

ようである。酢酸リチウムが酵母の形質転換に有効であるのを見つけたのがGietz自身ではないという思慮(あるいはプライド?)からかもしれない。

なお、この方法の派生形として、(試薬の詳細は公開されていないが)いくつかの企業から酵母の形質転換キットが販売されている。試薬をそろえる必要がなく、プロトコルも詳細が書かれているので、初めて形質転換を行いたい際にはこのようなキットに頼ることも良いだろう。ちなみに、筆者は市販のキットの1つ(Takara GZ-1)を購入して形質転換を試してみたが、研究室で従来行っている酢酸リチウム法の形質転換の方が効率良かった。

以下に、筆者の研究室のもっとも一般的なプロトコルを紹介する。なお、形質転換操作は無菌操作で行うことが原則である。

1. 酵母細胞培養液 ( $10^7 \sim 10^8$  cells/mL)<sup>\*1</sup>を、1 mLずつ1.5 mLチューブに分注する。
2. 卓上遠心機による遠心分離 (10,000 rpm, 1 min) で集菌する。上清を取り除く。
3. 滅菌水 1 mLに細胞を懸濁し、遠心分離 (10,000 rpm, 1 min) したのち、上清を取り除く。
4. 下記のを細胞に加える。1に細胞を完全に懸濁した後に、2~4を任意の順序で加え、ボルテックスミキサーでよく懸濁する。

1	1 M LiAc	36 $\mu$ L
2	50 % PEG4000	240 $\mu$ L
3	2 mg/mL sssDNA <sup>*2</sup>	25 $\mu$ L
4	導入するDNA溶液 <sup>*3</sup>	50 $\mu$ L

5. 室温で30分間放置した後、42°C、20分間熱処理する。
6. 卓上遠心機で数秒遠心し、上清を取り除く。
7. 滅菌水を50  $\mu$ L加え、選択用の寒天培地にやさしく播く。

<sup>\*1</sup> 前日から富栄養培地 (YPD) でプレカルチャーしておいた培養をYPDで適当に薄め数時間培養する。高い形質転換効率を求めるときには、対数増殖期にあるOD<sub>600</sub> = 1程度の培養液を用いる。

<sup>\*2</sup> Salmon testes DNAを2 mg/mLになるよう滅菌水に溶かし、100°C、5分間熱処理した後、氷上で急冷したもの。

<sup>\*3</sup> DNA溶液は水で調製して50  $\mu$ Lにする。筆者らは通常1  $\mu$ g程度のプラスミドDNAを用いる(濃度は気にしていない)。

試薬のメーカー・型番

- ・PEG4000: 富士フイルム和光純薬・162-09115
- ・酢酸リチウム (LiAc): 富士フイルム和光純薬・127-01545
- ・Salmon testes DNA: Sigma-Aldrich・D1626



筆者らの経験として、酢酸リチウム法には注意すべき点がいくつかある。まず、酢酸リチウム法で用いるPEGは室温で劣化しやすい。長時間室温で保存したPEGは変質して異常なpHを示し、形質転換の効率を著しく低下させる。効率が下がったと感じたときには、PEGを再調製すると改善する場合が多い。また、PEG溶液に細胞がうまく懸濁されないので、先にLiAc溶液に細胞を懸濁しておいてPEGを添加する。さらに、形質転換効率を高めるためには対数増殖期の酵母細胞を準備する、一本鎖DNAの熱変性と急冷はその都度行う、酵母細胞を寒天培地に播くときにコンラージ棒で激しくこすらないなどが、研究室のノウハウとしてある。これらを含めたノウハウも、前述のGietzらの論文<sup>6-10)</sup>にはまとめられている。

### おわりに：形質転換は悩ましい、再び

最後に、「形質転換は悩ましい」の話題に戻る。酢酸リチウム法による形質転換のメカニズムは驚くほど分かっていない。この方法に生物学的な合理性、つまり、「リチウムと一本鎖DNAとPEGの作用でDNAを取り込むように酵母が進化している」という合理性はない。すなわち、なぜこれらの試薬が必要なのか、どうやって細胞外DNAは取り込まれるのか、そしてどうやって核へとDNAが移行できるのかはまったく分かっていない(まことしやかな説明がされることはあるが、あまり根拠がない)。酢酸リチウム法はトライアル&エラーの累積により作られたものであり、現在のプロトコルはたまたま発見されたことを最適化していった結果として存在しているにすぎない。したがって、「まったく違う解」もあ

りえる。すなわち、これまで誰もやらなかった処理を施してみたら、びっくりするほど酵母がDNAを取り込んだということが、いつ発見されてもおかしくないのである。酢酸リチウム法を使った酵母の形質転換には、日常的にプラスミドを酵母に導入するのに十分な形質転換効率がある。時として、プラスミドライブラリーの形質転換など、大量の形質転換体が必要なときには、より高い効率を目指してGietzらのプロトコルを参考にしたりするが、それでも特に不満はない。一方で、上述したように、「すべての酵母細胞にDNAが入り選択が必要ない」というようなレベルの導入率にはほど遠い。逆に言えば、そんなことが可能になると、まったく次元の違う実験が可能になるだろう。この原稿を書いてみて改めて、「びっくりするほど酵母がDNAを取り込む形質転換法」を誰かが作ってくれないかなあと期待するのである。

### 文 献

- 1) 村尾沢夫, 荒井基夫 (共編): 応用微生物学, 培風館 (1993).
- 2) 筆者のブログ「酵母とシステムバイオロジー」: [https://tenure5.vbl.okayama-u.ac.jp/HM\\_blog/?p=3572](https://tenure5.vbl.okayama-u.ac.jp/HM_blog/?p=3572) (2022/6/28).
- 3) Gibson, D. G. *et al.*: *Science*, **319**, 1215 (2008).
- 4) Gietz, R. D. and Woods, R. A.: *Biotechniques*, **30**, 816 (2001).
- 5) Ito, H. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **153**, 163 (1983).
- 6) Gietz, R. D. and Schiestl, R. H.: *Nat. Protoc.*, **2**, 31 (2007).
- 7) Gietz, R. D. and Schiestl, R. H.: *Nat. Protoc.*, **2**, 35 (2007).
- 8) Gietz, R. D. and Schiestl, R. H.: *Nat. Protoc.*, **2**, 38 (2007).
- 9) Gietz, R. D. and Schiestl, R. H.: *Nat. Protoc.*, **2**, 5 (2007).
- 10) Gietz, R. D. and Schiestl, R. H.: *Nat. Protoc.*, **2**, 1 (2007).