

焼酎酵母遺伝子の網羅的解析

吉田直人（農学部）

片山哲郎（遺伝子実験施設）



要旨

各生物が保持する全遺伝子の構造がここ数年間のゲノムシーケンシングプロジェクトの進展により、次々と明らかにされつつある。この成果をどのように生かして、生命現象の謎を解き、産業に結び付けるかが次の大きな課題であるといえる。その一つとして、細胞内におけるすべての遺伝子の発現量を一度にモニターするシステムの構築が考えられ、DNA マイクロアレイあるいは DNA チップを用いた解析法が注目されている。本研究では焼酎酵母の遺伝子発現プロファイルを仕込み時から段階的に DNA マイクロアレイを用いて調べ、アルコール発酵時の代謝の推移を明らかにすることが目標である。本報告において、九州大学大学院生物資源環境科学研究科教授、久原哲先生による技術指導、および調査、予備研究等について説明する。また平成13年12月20日に遺伝子実験施設において久原先生の講演会を開催した。

1. はじめに

1990年代から急速に加速してきたゲノムシーケンシングプロジェクトの成果として、この数年間に真核生物から原核生物に至る各種生物のゲノム構造が明らかにされ、各生物に存在する遺伝子が明らかにされてきている。このゲノム配列の次にくるプロジェクトとしては、数千から数十万と考えられる遺伝子の発現制御の理解が挙げられる。各遺伝子の性質によって分類し、系統だてることにより、各生物全体の制御を理解する方法が考えられる。しかしながら対象となる遺伝子の数も膨大になるだけでなく、各遺伝子の性質は単純ではなく、観測しなければならない項目も多次元となり複雑なものとなる。例えば単純な見方をしても、DNA の配列レベルではコーディング領域の制御領域、種特異的あるいは亜種におけるポリモルフィックな変異、発生における部位および時間での遺伝子の発現の違い、疾病あるいは生理学的な条件の違いによる遺伝子発現の違い、遺伝子産物としてのタンパク質の局在性、タンパク質間の相互作用、生体反応による反応生成物間の相互作用などが挙げられる。このような状況において、従来の単独の遺伝子を解析していく手法を用いては、上記の多次元情報を収集、解析することは不可能に近い。

このような多次元の解析を可能にする第一歩が、多種類の DNA あるいは RNA の変化量を同時に測定できる DNA マイクロアレイあるいは DNA チップ法の出現である、この手法は今後広く用いられる可能性があり、得られる情報は従来の方法に比較して桁違いの量

である。このため新規の解析手法も必要となってくる。日本でも最近になってようやくこれらの多次元解析に対する関心が高くなってきている。世界的にはすでに Nature Genetics が 1999 年の 1 月に遺伝子チップの特集を組んでいる。

マクロアレイの基本技術

マクロアレイの基本原理はサザンブロット法と同じである。この方法がアレイと最も大きく異なっているところはライブラリーとハイブリダイズするシグナルとの関係が 1 遺伝子を対象としているところである。これに続いてグリッド化フィルター法が開発されマイクロタイタープレートからロボットを用いてフィルターを作製することが可能となり、cDNA ライブラリーのグリッド化フィルターが作製されるようになった。このフィルターを利用して遺伝子の発現解析が可能となった。

アレイ技術の飛躍的な進歩の原因となった技術的進歩は、米国スタンフォード大学の P.O.Brown らが開発した機器（アレイヤーあるいはスポッターおよびスキャナー）である。これにより 1 万種以上の cDNA ライブラリーを一枚のスライドガラスに結合したマイクロアレイが可能となった。次に 2 種の蛍光物質でラベルしたサンプルとリファレンスの mRNA を元に作製した cDNA を同時に一枚のスライドガラスにハイブリダイズすることにより遺伝子の発現状況が測定可能となった。この方法とは異なるフォトリソグラフィの手法を用いて、高密度にオリゴヌクレオチドを直接ガラス表面に合成する、より工業化を目指した GeneChip(<http://www.affimetrix.com>)も作製されている。この他にもインクジェット機構を用いた方法等も開発されつつあり、より高速で高密度なアレイを作製できる可能性が期待されている。

マイクロアレイ用 DNA の調製

発現解析に用いるマクロアレイ作製のためのスポット用 DNA としては、クローン、PCR による増幅断片、合成オリゴヌクレオチドなどが使用できる。すでに出芽酵母で決定された全塩基配列から推定されている約 6000 の ORF の M13 ファージベクターへのクローン化は終了した。そこで、これらのクローンを鋳型として、ベクター内の共通配列プライマーを用いて PCR 増幅した断片を、スポット用 DNA として使用した。クローン化した DNA が入手できない生物種の場合には、解析したい遺伝子に特異的なプライマーセットを準備し、ゲノム DNA もしくは、mRNA から合成した cDNA を鋳型として、同様の反応を行えばアレイ用サンプルとして使用できる。

方法

- 1) 96 穴 PCR 反应用プレートを用いて、100 μ l 反応系で 20-30 サイクルの PCR を行う。
- 2) サンプルの一部 (1-5 μ l) をアガロースゲル電気泳動を行い、増幅の状態を確認する。
- 3) イソプロパノール 130 μ l を加えて混合し、20-30 分間室温放置する。
- 4) 3000rpm、20 分間遠心し、溶液を除去後、沈殿を乾燥させる。
- 5) 適当な濃度 (0.5-1 μ g/ μ l) になるように 2XSSC、もしくは、TE に溶解させる。

RNA 試料からのターゲット調製

酵母からの RNA 抽出法としては、酵素による細胞壁の破壊やガラスビーズによる破壊などがあるが、細胞内の RNA 存在量を忠実に測定できる方法としてホットフェノール法を採用している。

方法

- 1) 酵母から、ホットフェノール法によって RNA を抽出し、さらに、poly(A)RNA を調製する。
- 2) 標識は、逆転写酵素 (SSII, SuperScriptII Reverse Transcriptase, GibcoBRL) を用いて行う。反応系は、20 μ l (10mg poly(A)RNA, 1X 反応バッファー (SSII 付属)、25ng/ml オリゴ(dT)プライマー、0.5mM dATP, dGTP, dCTP, 0.2mM dTTP, 0.1mM FluoroLink dUTP (Amersham-Farmacia)、10mM DTT, 100URNasin)とし、2種類の細胞からの RNA をそれぞれ、FluoroLink Cy3-dUTP, FluoroLink Cy5-dUTP でラベルする。
- 3) 65℃、2分加熱後、42℃に移し、200U SSII を加えて、42℃、30-40分インキュベートする。
- 4) 200U SSII を加えて、さらに、42℃、30-40分インキュベートする。
- 5) 20 μ l D₂O、5 μ l 0.5M EDTA、10 μ l 1M NaOH を加えて、65℃、60分インキュベートする。
- 6) 25 μ l 1M Tris-HCl(pH7.5)を加えて、中和する。
- 7) 溶液を、microcon30 を用いて、10-20ml に濃縮する。
- 8) 200-400 μ l TE を加えた後、microcon30 を用いて、10-20 μ l に濃縮する。この操作を2-3回繰り返して、未標識の dNTP を除去する。
- 9) 標識したサンプルのうち、1 μ l をアガロースゲル電気泳動後、蛍光検出可能なゲルスキャナーを用いて標識を確認する。

マイクロアレイの作製およびハイブリダイゼーション

DNA をガラス上にスポットし、ガラス表面に固定する操作は、アレイヤーのピンの形状やガラス表面の物理化学的性質が大きく影響する。スライドガラス表面のコーティング法としては、poly-L-Lysine コートや表面にアルデヒド基を配したシランコートがある。PCR 産物のスポットにおいては、どちらも同程度の固定効率である。また、単純なピンタイプのアレイヤーを使用する場合でも、DNA 溶液にポリマーを添加し、粘性を与えることでスポット状態は安定する。

方法

- 1) スライドガラスを 2N NaOH-70%EtOH 溶液に1時間以上浸した後、MilliQ 水で3, 4回すすぐ。
- 2) 10% poly-L-lysine 溶液に1時間以上浸した後、遠心によって水分を除去し、室温で、乾燥させる。
- 3) で調製したDNA溶液を日立ソフト、SPBIO-Eを用いて、poly-L-lysine でコ

ートしたスライドガラス上にスポットする。

4) 70-80℃、1時間処理をする。

5) UVを120KJ照射する。

6) スライドガラスをコハク酸溶液(70 mM 無水コハク酸、0.1 M ホウ酸ナトリウム(pH 8.0)、1-methyl-2-pyrrolidinone)に、ときどき振とうしながら、10-20分間浸す。

7) 沸騰した MilliQ 水中に、2分間浸し、エタノールで脱水した後、室温で乾燥させる。

8) 一枚のマイクロアレイあたり、40 μ lのターゲット溶液を準備する。蛍光標識したターゲット溶液に20XSSC, MilliQ 水を加えて、終濃度5XSSCに調製する。95℃、3分間加熱変性後、室温まで冷やし、SDSを終濃度0.5%に加えて、ターゲット溶液とする。

9) マイクロアレイ上にターゲット溶液40 μ lを静かに加える。カバーガラス(もしくは、耐熱性のシート)を端の方から静かに乗せ、モイスチャーチャンバー内にて、65℃、10-20時間インキュベートする。

10) ハイブリダイゼーション後、スライドガラスを2XSSC-0.1%SDS溶液に浸し、カバーガラスを静かに外す。

11) 2XSSC-0.1%SDS溶液で5分間、2回洗浄する。

12) 0.2XSSC-0.1%SDS溶液で5分間、2回洗浄する。

13) 0.2XSSC溶液で2回リンスし、600rpm、20秒間遠心後、室温で乾燥させる。

14) 蛍光のマイクロアレイ用スキャナーを用いて、マイクロアレイ上の蛍光量を測定する。

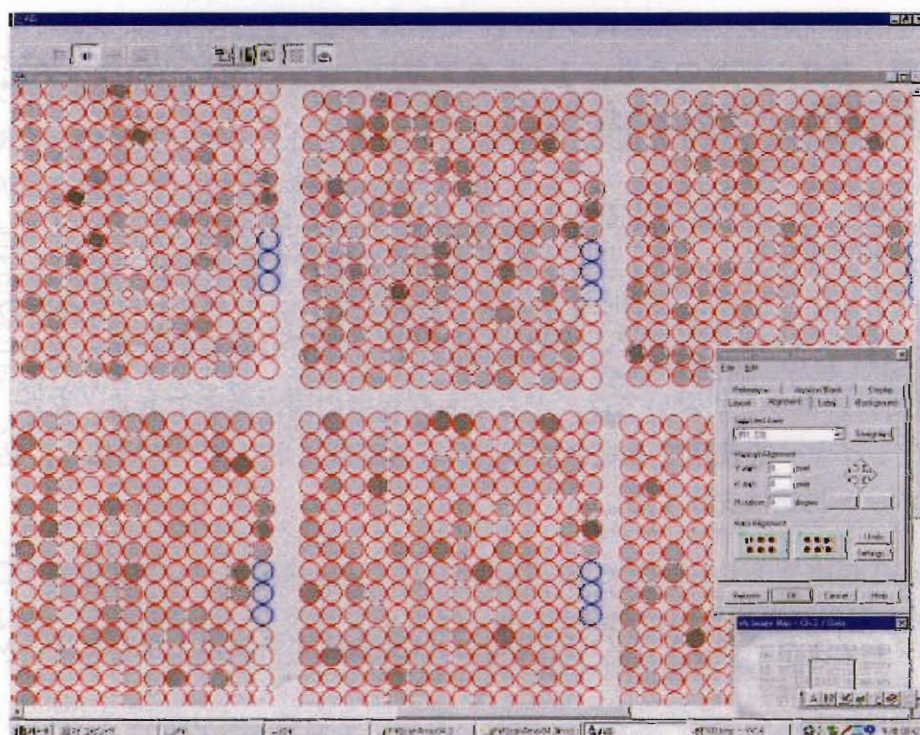


図1 定量化ソフトウェアの画面の一部

測定されたマイクロアレイの画像データから各スポットの定量を行わなければならない。一般的にはスキャナーに定量化のソフトウェアが付随している。そのソフトウェアの使いがってはさまぎまである。しかし、ソフトウェアによっては、この過程が最もボトルネックになる可能性がある。定量化の手順の一例を次に示す。

- 1) スポット測定のためのゲージを作成する。ゲージは保存できることが必須で、スポットターによるが、アレイのロット毎についてゲージを作成しなければならない。できればカット、ペースト、コピーの機能が必要である。
- 2) 自動囲い込みを行う。この過程が最も重要で、この過程が不十分であれば6000個のゲージを手作業で修正しなければならなくなる。そうなると一枚のアレイの定量に数時間が必要となる。
- 3) バックグラウンドの測定法を指定し、定量化を行う。

これまで行われた研究例

酒総研の家藤らは YPD 培地で静置培養した清酒酵母（協会 9 号）と実験室用酵母（X-2180）から mRNA を調整し、DNA マイクロアレイ法により遺伝子発現量を比較したところ、清酒酵母ではエルゴステロール合成に関与する様々な遺伝子、PAU1 ファミリー、脂肪酸代謝系、メチオニン、チアミンなどの合成系および取込み系、エタノール代謝系、細胞壁タンパク遺伝子が高発現し、酸性ホスファターゼ遺伝子群、CUP 遺伝子などの発現は著しく抑制されたと報告している（日本生物工学大会講演要旨集 p.87、2001 年）。

また同研究所の下飯は清酒もろみ中の清酒酵母の遺伝子発現プロファイル DNA マイクロアレイ法にて調べ、もろみ初期にはリポゾームタンパク質など細胞増殖に関与する遺伝子が高発現しており、後期にはヒートショックタンパク質や細胞壁タンパク質遺伝子などストレス耐性に関与する遺伝子が高発現していると報告している（日本生物工学大会講演要旨集 p.80、2001 年）。

今後の展望

近年酒類業界では、酒質の向上が望まれており、焼酎については、吟醸酒の特徴であるきめ細かいなめらかな味と、フルーティで軽快な芳香を持つ焼酎の開発が望まれる。主な香気成分である酢酸イソアミル、カプロン酸エチル、 β -フェネチルアルコールに焦点をあて、これら香気成分の生成に深く関与する、アルコールアセチルトランスフェラーゼ、アルコールシアルトランスフェラーゼ、 β -フェネチルアルコール生成酵素の各遺伝子、その他合成に関与する周辺の遺伝子発現をもろみ中で追跡し、網羅的遺伝子発現プロファイルを作成する。このような香気成分の代謝を網羅的に分子レベルで解明することは、香気成分高生産酵母の育種に有益な情報をもたらすと考えられる。

講演会報告

日時： 平成13年12月20日 午後二時より

場所： 遺伝子実験施設一階セミナー室

講演者：九州大学大学院農学研究院・教授・久原哲 先生

「DNAチップによる遺伝子の網羅的解析」

参加者：教官、大学院生、学部学生併せて約40名

DNAチップによる遺伝子の網羅的解析に関して、専門外の学部学生にも十分に理解できる内容であった。酵母の約5千個の遺伝子を全て研究室で用意したときの苦勞話から最先端の分析技術、これらの研究から明らかとなってきた遺伝子同士のネットワーク的な繋がりから未知の機能を予測できるすばらしさを教えていただいた。さらにこれらの技術を応用した恋占いの可能性まで非常に興味深い講演であった。