

酵母タンパク質発現系と MALDI TOF/MS を組み合わせた新規トランスポーター単離法の確立

秋廣高志

目 的

筆者はこれまでに約1350種類のイネのトランスポーター遺伝子を発現する酵母タンパク質発現ライブラリーの構築を行ってきた。また、このライブラリーを用いて重金属のトランスポーターを単離することに成功している (Oda *et al.* 2001)。重金属トランスポーターが酵母に導入されると、導入された酵母は重金属を含む培地で生育が遅延するため、重金属トランスポーター遺伝子を発現する酵母を選抜することは容易である。しかしこのシステムでは、酵母にとって無毒な物質のトランスポーター遺伝子が導入された酵母を選抜することは難しい。1350種類の酵母の中から、無毒な物質のトランスポーターが導入された酵母を選抜するためには、無毒な物質を含む培地で酵母を培養した後、酵母から代謝物を抽出し、吸収された無毒な物質の細胞内量を定量する必要がある。しかし、これには膨大な時間と労力が必要となる。

Jamesらはイオントラップ型のMALDI-TOF/MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight) を用いて酵母中の代謝物を抽出作業なしで網羅的に測定する方法を報告している (James, LE *et al.* 2005, Aman-tonico, A *et al.* 2008)。この方法は、酵母をMALDIプレート上に楊枝などで塗布し、その上にマトリックス溶液を添加し乾燥させる。これにレーザーを照射し、生成されるイオンをTOF/MSにおいて検出するものである。この方法は抽出作業が不要であるため、1350種類の酵母の中から、無毒な物質のトランスポーター遺伝子を発現する酵母をハイスループットに選抜する際に利用できると考えられる。しかしながら、Jamesらが確立した手法はイオントラップ型のMALDI-TOF/MSを利用する方法であり、本学部に設置されたqTOF型のMALDI-TOF/MSにおいても同様の解析が行えるかは不明である。そこで本研究では、qTOF型のMALDI-TOF/MSを用いて、抽出工程なしに酵母中の代謝物を検出する方法の確立を行った。

方 法

本研究では、植物ホルモンサイトカイニンの合成ホルモンであるKinetinの出芽酵母細胞内への取り込みをMALDI TOF/MSを使って抽出工程なしに検出する方法の確立を行った。出芽酵母はKinetinを合成できないが、アデニントランスポーターを介してKinetinを細胞内に輸送できることが報告されている (Bernd, G *et al.* 2000)。材

料には出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* W303-1A Δ ycf1 Δ acr3 株) を用いた。酵母の培養には、SD培地 (Kinetinを終濃度0~1mM添加) を用いた。酵母をSD培地にて30°C, 200rpmで一晩回転培養を行った。2000rpmで5分間室温にて遠心し集菌しs上清を捨てた。沈殿を1mlの蒸留水に懸濁し、再度遠心し上清を捨てた。この操作を3回繰り返した。1mlの70%エタノールを加え良く懸濁し、遠心した後、上清を完全に取り除いた。沈殿をイエローチップで掻き取り、MALDI-プレートに塗布し風乾した。これに、3種類のマトリックス (9-Aminoacridine Hydrochloride Monohydrate; 9-AA/HM, 2, 5-ジヒドロキシ安息香酸; DHB, α -シナピン酸; α -CHCA) を1 μ l加えて風乾させた。マトリックスの濃度は10mg/mlとした。Jamesらは(2005)、酵母中の代謝物をイオン化する際に9-AA, α -CHCAおよびDHBをマトリックスとして用いる方法を報告している (9-AAが最も多くの代謝物をイオン化することを報告している)。本実験でも9-AAを使用する予定であったが、9-AAは現在製造が中止されており国内で入手することはできなかった。9-AA Hydrochloride Monohydrateについては入手が可能であったため、これを実験に用いた。測定にはSYNAPT G2 HDMS (Waters社) を使用した。測定条件はsample plate 0, Extraction 10, Hexapole 10, Aperture 5, Qyadropole Option Auto Profile, Mass range 2-1000, レーザー強度280とした。

結 果

前述した方法で調製した酵母をプレートに塗布し、各種マトリックスを添加し測定を行った。その結果、9-AA/HMを用いた場合、代謝物のイオン化は起こらなかった。 α -CHCAとDHBをマトリックスに用いた場合は、どちらもさまざまな代謝物のイオン化を確認することができた。続いて、各種濃度のKinetinを含む培地で培養した酵母を用いて抽出工程なしにKinetinを検出する実験を行った。その結果、DHBをマトリックスとして用いた場合、Kinetinの培地中濃度が10 μ Mよりも高い場合にKinetinのピークを検出することができた (図1A)。1 μ M以下ではピークを検出することはできなかった (図1B)。ポジティブモードではピークを検出できたが、ネガティブモードでは検出ができなかった。 α -CHCAをマトリックスに用いた場合、ポジティブ、ネガティブどちらのモードでもピークを確認することはできなかった。

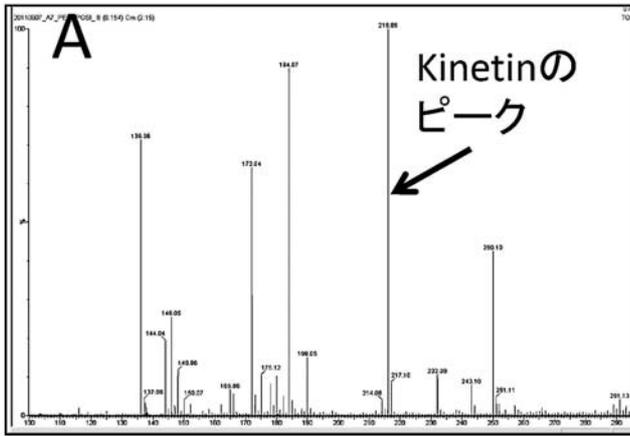


図 1A

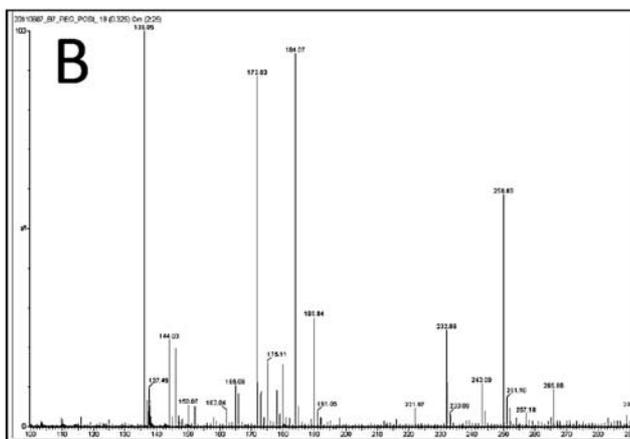


図 1B

図 1 縦軸はシグナル強度，横軸は m/z を示す。
Kinetin を $10\mu\text{M}$ (A) または $1\mu\text{M}$ (B) 含む SD 培地にて培養した酵母中の代謝物のマススペクトログラム。

考 察

本研究では、 $q\text{TOF}$ 型の MALDI-TOF/MS を用いて出芽酵母中の代謝物および Kinetin をマトリックス DHB を用いることで抽出工程無しに検出することに成功した。MALDI-TOF/MS のプレート一枚には 96 種類の酵母を塗

布し分析することができる。1 サンプル当たりの測定時間は約 30 秒であるため、96 サンプルの測定は 1 時間以内に行える。筆者の研究室で一日に培養できる酵母は最大約 400 種類であるため、約 4 日間で 1350 種類の酵母全ての測定を完了できる計算となる。イネには約 1500 種類のトランスポーターが存在するとアノテーションされているが、その多くが未だ輸送基質が特定されていない。今回確立した方法はイネのトランスポーターの輸送基質を特定する際の強力な研究ツールになるものと考えられた。

謝 辞

MALDI-TOF/MS の使用法は島根大学医学部皮膚科 高橋仁博士、岡山大学資源植物科学研究所 谷明生博士にご指導頂きました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Amantonico, A., Oh, JY., Sobek, J., Heinemann, M., Zenobi, R., (2008) Mass spectrometric method for analyzing metabolites in yeast with single cell sensitivity. *Angew Chem Int Ed Engl.* **47** : 382-385.
- Bernd, G., Lukas, B., Bruno, A., Christina, K., Doris, R., Birgit, B., Wolf, F., (2000) A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **12** : 291-300.
- James, LE and Robert, TK., (2005) Metabolomic analysis of eukaryotic tissue and prokaryotes using negative mode MALDI time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **77** : 2201-2209.
- Oda, K., Otani, M., Uraguchi, S., Akihiro, T., Fujiwara, T., (2011) Rice *ABCG43* is Cd inducible and confers Cd tolerance to yeast. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* **75** : 1211-1213.