酵母two-hybridの方法論

若　者

押　海　裕　之*

A Methodology For Yeast Two-Hybrid Screening

Key Words：Yeast，two-hybrid，screeninng，proteome

蛋白質間相互作用を調べる為に質量分析を使った手法が主流に成りつつある今，酵母のtwo-hybridによるスクリーニングは，もはや時代遅れのローテクと化した感がある．書店に並ぶ本では，大抵，当たり障りの無いことしか書いて無く，「こんな方法でtwo-hybridでスクリーニングして上手く捕れるのかな？」と思いつつ裏表紙の値段を見ると予想外に高い．十人十色で100人の研究者がいれば100通りのプロトコルが存在する中，個人的なノウハウを含んだ方法論も展開すれば，中国のローテクのミサイルがアメリカのハイテク衛星を打ち落とす如く，或いは，過ぎ去りし技術もまた温故知新．

１：*ADE２*レポーターは諸刃の剣

学生の頃はL40株などというマニアックな酵母を使って青くなった成らなかったと一喜一憂していたが，最近良く用いる酵母株はクロンテック社のAH109株．その特徴はレポーターの*ADE２*のコンストラクト．従来からある*HIS３*レポーターや***lacZ***レポーターはバックグラウンドが高すぎるために非常に多くの擬陽性を生むが，*ADE２*レポーターがこれらのバックグラウンドを抑えてくれる．しかし，実はAH109の親株から派生したpJ69-４A株では*ADE２*レポーターはタイトすぎて本来結合するクローンをも逃してしまう危険性があることが判明している．現在はベクターの改良によってこの問題がクリアされているがスクリーニングには項目の３以降に書いた工夫等々が必要.

２：ライブラリー：ガラス玉の中にダイヤモンドがあること

鬼気迫る思いで実験をしても，そもそも，ライブラリーの中に目的のクローンが無ければ全ては徒労に終わる．ライブラリーの準備はスクリーニングの中でもっとも重要で，ここで全てが決まる．10万円程度を払ってでも買って，それを添付のプロトコル通りに一度だけ増やして使うのが簡単で，人づてに貰うと大抵は質が低下していて上手く行かない．ライブラリーをプレートで増やすのは大変で，二人で行っても一日仕事である．培養細胞を使う研究室では酵母は嫌われるので大抵どこか遠くの小部屋の片隅で実験をさせられる羽目になるが，ポスドク時代にテクニシャンの人と二人で朝の10時から夜の８時過ぎまでぶっ通しでプレートに増やしたライブラリーを回収したら，翌日研究室の先生から「君は昨日一日中どこで遊んでいた！」と怒られたことがあった．どうも二人で遊びに行ったと思われたらしく，ライブラリーを増やすときはあらかじめラボの先生にアピールしておくことも肝要.

３：ベイトの作成段階でスクリーニング後の擬陽性の数を予測する

two-hybridのスクリーニングをすると擬陽性だけで終わってしまうという話をよく聞く．実はベイトの作成段階で擬陽性がどの程度現れるのかを予見できる．インサートを何も含まない空のベイト（例えばクロンテック社のpGBKT７）と，結合をみたい遺伝子断片を挿入したベイト（pGBKT７/geneX）をプレイのプラスミド（クロンテック社のpGADT

*Hiroyuki OSHIUMI
1972年11月生
大阪大学大学院理学研究科生命科学専攻博士後期課程修了（2001年）
現在，北海道大学大学院，医学研究科免疫学分野，准教，PhD，分子生物学
TEL：011-706-5056
FAX：011-706-7866
E-mail：oshiumi@med.hokudai.ac.jp

７）と同時に形質転換し，現れたコロニーを，HIS３レポーターを調べる選択培地（ヒスチジンとトリプトファンとロイシンを除いた合成培地SD-WLH）にストリークする．本来ならHIS３のレポーターはいずれの形質転換体でも発現しないのでコロニーは生育しないのであるが，バックグランドで生じる転写の為に一週間ほどするとゆっくりと生えてくる．この時に遺伝子断片を持ったベイトを含むクローンが，空のベイトクローンに比べて早く生育するとスクリーニングをしても，大量の擬陽性クローンが現れてスクリーニングに失敗するのである．目的の遺伝子断片を持った方が空のベイトを入れた酵母よりも生育が遅いか同じ場合のみ，遺伝子断片をもったベイトはスクリーニングに使用することができる．この段階で，もし空のベイトの場合よりも早く生育した場合は，目的の遺伝子断片を分割することでバックグラウンドを押さえることができる．僕がよく使う手は断片をドメインごとに切断することである．約200アミノ酸ほどにしてもスクリーニングで結合する分子を単離できる．これまでの経験からするとヒトの蛋白質は酵母の蛋白質とは異なり結合する蛋白質が多い．約200アミノ酸ほどの領域に対するスクリーニングで通常１つか２つ程度の生物学的に意味のある結合する分子を単離できる．

４：「陽性」クローンの数から「擬陽性」クローンの数を予測する

スクリーニングは10分の１スケール（10万クローン程度）で一度行い，現れる陽性クローンの数を確認する．このスケールで10個以上の陽性クローンが表れた場合はベイトに挿入した遺伝子断片をさらに縮小する．スクリーニングはクロンテック社のマニュアルの中程度の基準で行わないと弱い結合をする分子は単離できない．これは*ADE２*レポーターがタイトすぎる為である．

遺伝子の断片化は，それがコードする蛋白質の形成するドメインごとに行うことが多い．ドメインの予測はSMART（http://smart.embl-heidelberg.de/）やELM（http://elm.eu.org/）等のweb上のサイトでサーチすれば何かしらのドメインが出てくるが，やはりドメインが現れない蛋白質も存在する．そういうときは大抵適当に切ってスクリーニングをしても大丈夫な場合が多い．two-hybridはどこか理屈では無いところがあって，蛋白質を適当に切っても意外と結合は保持されていたり，逆に全長をいれてやっても，使用するベクターや酵母の種類を変えると結合しなかったりする．

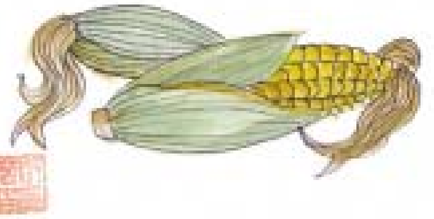
５：ヒトの場合

当然two-hybridで結合したとしてもアーティファクトの可能性がある．スクリーニングで得られたクローンが再テストをクリアーすれば，すぐさま培養細胞の発現ベクターにクローニングし直して，免疫沈降法で結合の確認をするべきである．昔，自然免疫で働く細胞膜受容体の細胞質内領域でスクリーニングを行った時，単離したクローンのフレームがGAL４蛋白質とフレームがずれていた．ただ，ドメイン構造からすると結合していてもおかしく無いドメインを持っていたので，このクローンを捨てようかどうか迷っていたときに，「どうせ，あきらめ切られへんねんから，とっととヒトの細胞に発現させてみればいいねん」と別のラボの先生からアドバイス頂いたことがあった．結果は，見事にヒト培養細胞内でも結合し，その後，シグナル伝達に必須であることが証明された．マニュアルにも書かれているが，どうも酵母内での数%の割合で常にフレームのシフトが起きるので相互作用が検出された様である．

最近，two-hybridのスクリーニングもほとんど流れ作業でヒトの培養細胞を使いながら片手間にスクリーニングを次から次へと行っている．分野によって差はあるが，バイオロジーから発展した分野では分子生物学の血が薄いようでポロポロと新しい分子が捕れてくる．でも，そういう分野では逆に分子生物学的な研究スタイルの評価が低いので捕れても「ふーん」と特に何の感慨も無く流されてしまう．概念の新しさが重要なのは理解していても物足りないもの．

６：精神論

今流行りの捏造の話ではないが，「彼が実験すると上手くいくが，君が実験すると上手くいかない」と言うようなことは日常茶飯事．同じレシピで料理をしても一流のシェフと素人とでは，その味に大きな開きがあるのと同じである．スクリーニングでも同一の方法と材料を使っても，目的とする分子を発

見できる人もいれば出来ない人がいるのも然りである．学生にスクリーニングをさせる前に言うのは「ダイヤの指輪とガラスの指輪も一つずつだと，どちらがダイヤでどちらがガラスかを見分けるのは簡単だけど，100個の偽物の中から一つの本物を見分けるのは非常に難しい. 一万個の偽物の中からでも，たった一つの本物を見つける覚悟で臨んでください」.

修士一年の頃の雨降るある春の夜．時計の針が11時を過ぎた頃，研究室のお茶部屋でコーヒーを飲んでいると，当時の指導教官の小川英行先生が飲み干したマグカップを洗う為に部屋に入ってこられた．ふと実験の話になり，昔スクリーニングで***recA***遺伝子を最初に発見された当時の苦労話をされ，毎日穴が開くほどプレートを見続けて，もうダメかもしれないとあきらめかけた最後の最後にようやく一つのクローンを見つけられた話をされた．思い出には早い，少し懐かしい昔話.