

## 酵母，この上なく優れたモデル生物

大嶋 泰治

人々が酵母の存在に初めて気付いたのは、19世紀中葉の酒類の醸造においてであった。その興味はしばらくは分類学に限られていたが、その他の微生物におけると同様に、その分類学は碩学達の蘊蓄を傾けた論考であった。1937年には、酵母などの菌類が、動・植物と本質的に同じ細胞構造もつ真核生物とされ、原核生物の細菌との違いが初めて示唆されたが、一般に承認されるにはさらに十余年を要した。続いて米国University of IllinoisのCarl R. Woeseが、16S rRNAの塩基配列を分子時計とした、系統分類法を細菌に取り入れ始めたのは1980年前後であり、その最初の大きな成果としてアーキア(Archaea)の発見があった。これに触発されて酵母を含む菌類においても、これまでの形態と生活環、エネルギーと栄養摂取の様式などの分類指標に、核酸とタンパク質を分子時計とした系統進化の考えを加えて、分類学の見直しが始められ、現在もその作業が進行中である<sup>1)</sup>。

それらの研究を通して、菌類・原生動物・微細藻類など、多くの真核微生物における有性生活環の解明が進み、1930年頃には遺伝学者の目がアカパンカビ(*Neurospora crassa*)に注がれて遺伝学の近代化が始まった。一方、細菌では形質転換(1928)が肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)で、続いて接合現象(1946)が大腸菌(*Escherichia coli*)で報告された。さらにバクテリオファージの介在する一般形質導入(1951)がネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)で、λファージによる特殊形質導入(1956)が大腸菌で報告され、細菌遺伝学の黄金時代を迎えた。同じ頃、糸状菌での知見も集積し、ヘテロカリオンと疑似有性生活環によるゲノム再編成の過程が明らかになった。これら微生物遺伝学の研究は、一般に栄養要求性と糖の資化性などの形質を対象とし、生化学と直結して進んだことから遺伝生化学を生み、分子遺伝学から分子生物学に展開し、今日の細胞生物学に発展した。さらにこれら微生物での知見が、真核と原核の相違を認めながらも、広く動・植物にも及ぶものであると分かってきた<sup>2)</sup>。

これら微生物遺伝学の発展を経て、今日では酵母(*Saccharomyces cerevisiae*、一部*Schizosaccharomyces pombe*)は、トウモロコシ(*Zea mays*)、ショウジョウバ

エ(*Drosophila melanogaster*)、アカパンカビと大腸菌に続いて、遺伝学研究における重要なモデル生物の一つとされ、1960年頃より国際的な研究交流が始まった<sup>2)</sup>。その背景には、*S. cerevisiae*には他の追従を許さない遺伝学的な解析技法があり、それを基にゲノムと細胞の操作にもさまざまな技術が発展している<sup>3,4)</sup>。これら諸技法の中で、ここでは遺伝学的な解析法とその意義について、歴史的な話題を交えて紹介しよう。

### 酵母遺伝学の始まり

酵母遺伝学の始まりは、1930年代中頃から60年代にかけての、デンマークのCarlsberg LaboratoryにおけるØjvind Wingeと、米国・セントルイスのWashington University(その後、Southern Illinois University)でのCarl C. Lindegrenの活躍である。いずれも酵母遺伝学の創始者とされ、両者の論争を通して、酵母の有性生活環と特異な四分子分析法が確立されてきた<sup>2)</sup>。まずはその過程から眺めてみよう。

**WingeとLindegrenの活躍** Wingeは、1930年代の中頃、Carlsberg Laboratoryに保存されていたE. C. Hansen以来の*Saccharomyces*属酵母株について、その新鮮培養細胞を石膏塊や人参片に塗布して子嚢を形成させ、(自身の製作になる)ミクロマニピュレーターを駆使して子嚢胞子を単離培養し、その発芽と出芽増殖の様相を調べていた。こうして彼は、*Saccharomyces*属酵母の栄養細胞は二倍体であり(菌類では稀である)、各子嚢内の4個の子嚢胞子は、減数分裂(meiosis)産物の四分子(tetrad)核のそれぞれ1個をもつ単数体(一倍体)細胞と知った。しかし、各子嚢胞子は、単離培養すれば発芽増殖を始め、間もなく、隣接する同一胞子に由来する細胞間で接合子(zygote)を形成し、そこから大型(二倍体)の細胞を出芽することを報告した。すなわち、彼が観察したのはホモタリズム(homothallism)酵母の有性生活環であった。当時は、この簡単な報告に対しても、子嚢形成に先立って、2細胞間の接合による二倍体化(菌類では一般的な現象)が起こるとする見解や、子嚢形成は単数体細胞の単為生殖(parthenogenesis)によるものだとする疑義が呈された。

一方のLindegrenは、1945年頃に、イリノイ州ベオリアにあるNorthern Regional Research LaboratoryのL. J. Wickerhamから糖発酵性の異なる数株の*Saccharomyces*属株を、またUniversity of CaliforniaのE. Mrakyよりも数株を得て、その間の交雑と子嚢胞子分離により、糖の発酵性およびアミノ酸とビタミン、また核酸塩基などの合成に関わる遺伝子の同定を始めていた。その当面の目標は、それらを対象とした染色体地図の制作であった。それら酵母株の一部(MrakyのEM93株)にヘテロタリズム(heterothallism)株があり、それに由来する子嚢胞子より、対立する接合能を示しながら栄養増殖を続ける単数体株が得られた。そこで、対立する接合型(交配型, mating type; いずれの接合型細胞も形態的には区別がつかない)に対して、**a**と $\alpha$ の命名がなされた。こうしてLindegrenの研究室では、ヘテロタリズム株を用いることにより、本来の二倍体栄養細胞に加えて単数体の栄養細胞をも実験に供することが可能となり、遺伝子分析の基本的操作である交配と四分子分析に新局面を開いた。このヘテロタリズム株は、直ちに多くの研究者の注目を受けて酵母遺伝学の研究に広く採用され、以後の接合型決定でもLindegren株が基準とされている。

こうして酵母では、接合型の異なる単数体細胞の新鮮培養を、1~2 mlの栄養培地に混合培養すれば、一夜にして多数の接合子を生じさせることができる。その培養液をそのまま白金耳で胞子形成培地(酢酸ソーダ寒天または酢酸カリ寒天)に移して適温(30°C)におけば、2・3日後には解剖操作に十分な子嚢が得られる。一方のホモタリズム株では、交配株を得るには顕微鏡下で子嚢胞子と子嚢胞子を接触して置き、その間での接合子形成を確認して雑種二倍体とする。しかもヘテロタリズム株では、交配に用いた個々の両親株を支障なく他の実験にも供することができるが、胞子・胞子接合法によるホモタリズム株では、交配に使用された胞子のクローンは失われている。少々事情は異なるが、動・植物での交配でもこの不便さがある。これもモデル生物としてのヘテロタリズム酵母株の長所の一つである。1948年には、Winge自身も米国・シカゴのNorthwestern Yeast Co.より得た株(yeast foam)でヘテロタリズムを観察し、ホモタリズムとヘテロタリズムの違いが対立する*D/d*遺伝子(現在では*HO/ho*)により支配されていることを知り、この違いについての両者のわだかまりは消えた。

その後、Lindegrenが発見した遺伝子変換の現象をめぐって始まった両者の論争は、多くの研究者にも波及し、酵母遺伝学における永年の関心の的となった。すなわち遺伝学では常に対立する形質を研究対象とし、Lindegren

はその研究初期より、糖発酵性(発酵性を+, 非発酵性を-と記す)あるいはアミノ酸合成能(非要求性が野生型で+, 要求性の変異型を-)などにおける対立する表現型の単数体を交配し、その雑種二倍体由来の4胞子嚢を顕微鏡下で解剖して4個の胞子クローンを揃えて回収し、それらについて各種の形質分離を調べることを始めた。これはアカパンカビなど子嚢菌類に共通する解析法であり、四分子分析(tetrad analysis)といわれ、それまで広く行われてきたトウモロコシやショウジョウバエなど、動・植物を対象とする遺伝学では実施不可能な技法である。

この四分子分析を、図1に示すように、表現型Aとaの単数体間の雑種二倍体で行い、対象とする形質が常に2A:2a分離(図ではAAaa分離)を示すならば、その二倍体の遺伝子型はヘテロの*A/a*型と判定され、この実験を通して遺伝子Aが同定される。すなわち、一对の+/-型対立遺伝子をもつ二倍体細胞に由来する子嚢はすべて2+:2-分離を示し、メンデル分離(Mendelian segregation)と呼ばれている。こうして多くの形質について対応する遺伝子の同定が行われ、それら遺伝子間で連鎖を検出してその遺伝子座を決め、染色体地図に描く努力が酵母を含むすべてのモデル生物で常に行われている。

この2+:2-分離を*A/a*と*B/b* 2対の対立遺伝子について調べると、それら相互の分離パターンから図2に示す6通りの子嚢型(ascus type)が見られ、それらの出現頻度から簡単にAとB両遺伝子間の連鎖が計算される<sup>3,4)</sup>。多くの子嚢菌類の遺伝学でも、この四分子分析法が遺伝子の同定と連鎖の検出など、遺伝学的分析法の基本となっている。因みに、この連鎖分析で描いた*S. cerevisiae*の染色体地図は16本の連鎖群にまとめられ、1996年に

交 雑	<u>A/a 二倍体の表現型</u>
A × a	
↓	A 優性: A 型形質
A/a (二倍体) →	半優性: A と a の中間形質
↓	共優性: A でも a でもない形質
子嚢解剖	
四 分 子	
AAaa	染色体 対立遺伝子による形質分離
AAAA	細胞質遺伝による形質分離

図1. 一遺伝子雑種二倍体の表現型と対立遺伝子の優性・劣性関係

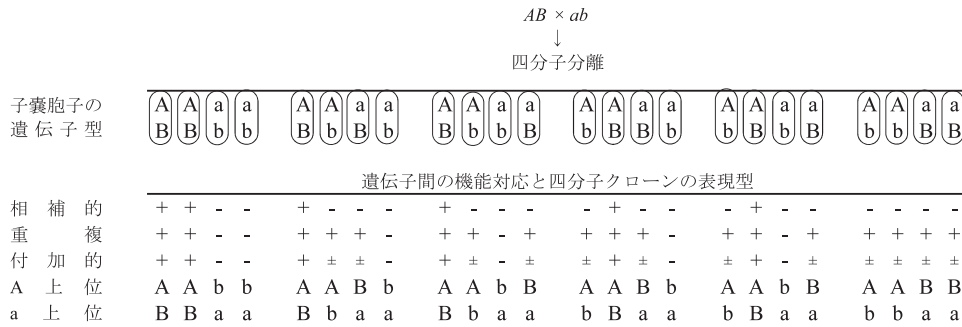


図2. 二遺伝子雑種よりの四分子における遺伝子型と形質の分離

決定されたゲノムDNAの全配列<sup>5)</sup>から帰納されるDNA分子数, またその上に分布するタンパク質コード域(open reading frame; ORF)の配列順序とも調和する。

こうしてLindegrenは, 多くの対立遺伝子について四分子分離を調べていたが, 2+ : 2-分離の他に, かなりの頻度(2~5%)で3+ : 1-または1+ : 3-分離を観察して遺伝子変換(gene conversion)と呼び, その原因について種々考察していた。これに対しWingeは, マルトースやスクロースの発酵性で, 2+ : 2-分離に加えて多くの子嚢で3+ : 1-と4+ : 0-分離(図2で示す重複遺伝子支配)を観察し, 酵母の染色体上には同じ機能のMAL遺伝子やSUC遺伝子が多数散在していることを知っていた。そのため彼はLindegrenの観察もこの重複遺伝子の考えで説明できると反論した。しかし, このMALとSUC両遺伝子が酵母のゲノム上に重複しているとWingeの説は正しいが, 遺伝子変換現象に対する説明としては正しくない。Lindegrenの発見した現象が互いに独立する重複遺伝子とか相補遺伝子(後述)に由来するとすれば, 3+ : 1- (遺伝子が重複している場合)または1+ : 3- (相補性遺伝子で構成されていれば)の分離を示す四分子の出現頻度は, Lindegrenの観察値より格段に高く, 加えて4+ : 0- (遺伝子重複支配の場合)と0+ : 4- (相補性遺伝子支配では)分離も高い頻度で見られるはずである。

遺伝子変換現象は, 四分子分析で初めて検出された現象で, 多くの研究者の注目するところとなり, その他の子嚢菌類[アカパンカビ, スイライカビ(*Ascobolus immersus*), *Sordaria fimicola*など]でも観察され, 盛んな論議を醸した<sup>2)</sup>。それらの論議を含めて, 1964年にRobin Hollidayにより, 減数分裂における染色体交差についての機構モデル(Holliday model)が示され, 1983年には, 後述する酵母の接合型変換機構など, その後の知見を交えて, Jack W. Szostakら<sup>6)</sup>により改訂されて,

DNA二本鎖切断修復モデル(double-strand-break repair model)が唱えられ, ようやく遺伝子変換の機構も解明された。

**Ephrussi・Slonimskiとミトコンドリア遺伝学** このWingeとLindegrenの活躍に続いて1950年頃, フランスのBoris Ephrussi (University of Paris, 後にCNRS at Gif-sur-Yvette)により, 酵母遺伝学におけるもう一つの特徴が示された<sup>2)</sup>。Ephrussiは, 栄養寒天平板上に形成した*S. cerevisiae*のコロニー観察で, 正常なサイズのコロニーに混じって, 微小コロニーが低頻度(1~2%)で常に混在することを見出し, 酵母がミトコンドリア機能を失っても生存できる特異な生物であり, ミトコンドリアと呼吸系の研究に大変すぐれた対象であることに気付いた。その研究は後にPiotr Slonimskiに引き継がれ, 呼吸能を失った微小コロニー変異体(*petite mutant*)の細胞には, 細胞透過光の分光分析でシトクロームaとbのバンドが見られないこと, その原因はミトコンドリアの環状DNA上の遺伝子にあり, 野生型(+)との交配株の四分子分析では, 一般に細胞質遺伝と呼ばれる特異な4+ : 0-分離(図1)を示すことなどを報告した。これが端緒となって, 呼吸能に加えて薬剤耐性など, ミトコンドリアDNAに基づく細胞質遺伝学が発展した。さらにUniversity of RochesterのFred Shermanは, ミトコンドリア遺伝子の機能に関連する核染色体上のCYC遺伝子などを見出し, 核と細胞質相互の干渉についての研究を展開した。

### 酵母における細胞機能の遺伝学的解析法

上記は酵母遺伝学で基本となる事項とその発見の歴史の一端である。これらの基本的な知見を受けて, *S. cerevisiae*では多岐にわたる研究が始まり現在に及んでいる。そこでは生化学では及びもつかない広域な生命機構の解明をもたらしている。その全体像を今ここで述べる



ことは不可能であり、数冊の総説<sup>2,7-12)</sup>を挙げるに留め、以下にその研究を支えた特異な遺伝学的解析法<sup>3,4)</sup>について要約する。

**ヘテロ二倍体の表現型と優劣検定** 遺伝学では、研究対象を常に+/-の対立する形質においている。たとえば前述の糖発酵/非発酵、栄養要求性/非要求性などであり、その多くは、対立する突然変異型とその野生型の形質である。この一对の対立遺伝子をA/aとしたとき、二倍体がA型形質を示すとA遺伝子是对立するaに対して優性で、aは劣性である(図1)。A/a二倍体が、色調や酵素力価など、量的にAとaの中間形質を示せばAは半優性である。これに対し、例えば単数体のaとαの接合型形質では、両者の接合によるa/α二倍体細胞はaとαいずれの接合能も示すことなく、替わりに胞子形成能を得ていることから、これらa/α対立遺伝子は共優性の関係にある。このように、優劣検定(dominance/recessiveness test)では、交雑二倍体の表現型から、その遺伝子とコードするタンパク質の機能についての重要な示唆が得られる。細菌はもとより、二倍体の栄養世代が存在しないアカパンカビなどでは、この実験は簡単ではない。これに対し、ヘテロタリズム酵母では、単数体と二倍体いずれの栄養細胞も存在することから、この優劣検定の操作はまことに容易である。

**相補性検定** 野生型株から突然変異体の分離を行えば、一般に多数の同一表現型の劣性変異体を得られる。相補性検定(complementation test)はそれら変異体の分別法である。たとえば、酵母の野生型株は20種のアミノ酸のすべてを合成することができる。そこで、野生型の単数体より、ヒスチジン合成能を失った多数のヒスチジン要求性変異株を分離したとすれば、それらは以下の操作で容易に数種の異なる変異遺伝子型に分別される。

上記変異体のヒスチジン要求性は、一般に劣性形質であり、対立する接合型の野生型株と交配すれば、その雑種二倍体は一般に野生型の表現型を示す。その二倍体の子嚢を約20個解剖し、(稀に起こる遺伝子変換型の四分子を除いて)そのほとんどがヒスチジンの非要求性(+)と要求性(-)について2+ : 2-分離を示すことを観察して、元の変異株がヒスチジン合成系における劣性の一遺伝子変異体であると判断される。この操作を分離したヒスチジン要求性変異体すべてについて行い、得られた多数の四分子分離体の中から、元変異体それぞれについてaおよびα接合型のヒスチジン要求性の単数体を選び、それらを用いてすべての元変異体間の組み合わせで雑種二倍体を作り、そのヒスチジン要求性についての表現型を調べる。こうして雑種二倍体が非要求性(野生型)の

表現型を示す(相補の関係にある)なら、交配された2株の変異体は互いに異なる変異遺伝子を持ち、それら2遺伝子は互いに補足遺伝子(complementary gene)である。もし雑種二倍体がヒスチジン要求性なら、両者の変異は同一遺伝子に生じた変異と判断される。

上記の例から理解されるように、相補性検定は同じ表現型を示す多くの劣性変異を類別する方法である。こうして分別された遺伝子群は、上記の例では、ヒスチジン合成系のさまざまなステップを司る酵素をコードする遺伝子と考えられ、その具体的な支配段階については、生化学的な検討が必要である。こうして、さまざまな生体系における一連の反応段階に対応する多くの遺伝子(とタンパク質)が検出され、それらは上記の如く、一連の反応系上に配列される場合と、ある特定の反応段階に働く複数の構成要素の場合がある。

**重複遺伝子とアレリズム検定** ある生化学反応において、複数の遺伝子に由来する酵素が、それぞれ独立に対応することがある。このような遺伝子は互いに重複関係にあり、重複遺伝子(duplicated genes, polymeric genes)と呼ばれている。酵母におけるその最も一般的な例が、前述のマルトースあるいはスクロースの発酵性に関わる多くのMAL遺伝子とSUC遺伝子である。S. cerevisiaeの野生型株の多くに、これらの遺伝子3~5個が、染色体上に分散あるいは互いに接近して、しかもその多くが染色体のテロメア近傍に遺伝子座を占めており、酵母の進化とこれら遺伝子の由来について何かを示唆して興味深い。その雑種二倍体の四分子分析では、図2に重複関係にあるAとBの2遺伝子について模式的に示すように、2+ : 2-分離に加えて、多くの子嚢で3+ : 1-と4+ : 0-型の四分子分離が見られる。ここで4+ : 0-型子嚢を選んで、その+表現型の4胞子クローンすべてに-型の単数体を交配し、それら雑種二倍体について四分子分析を行い、また必要あれば繰り返して-型株に戻し交配を行って四分子分析を続けることにより、遂に2+ : 2-型分離のみを示す雑種二倍体に至れば、その二倍体は多くの重複遺伝子のうち、ある遺伝子座のみが+/-の遺伝子型である(他の重複遺伝子座は-/-)。こうして、多くのMAL遺伝子が重複した酵母株から、特定のMAL遺伝子のみが活性な株を育種することができる。

この優性な対立遺伝子間の同・異判定に用いられるのがアレリズム検定(allelism test)である<sup>注1)</sup>。すなわち表現型で+ × +の交配による雑種二倍体よりの四分子が、

注1) アレリズムの検討には前記の相補性検定も含まれるが、筆者は検討対象とする対立遺伝子の優性と劣性の違いにより、「アレリズム検定」と「相補性検定」の用語を当てている。

すべて4+ : 0-分離を示すなら、その交配に供した単数体は、共に同一の優性対立遺伝子を持つことになる。4+ : 0-分離に加えて3+ : 1-と2+ : 2-の四分子分離が観察されるなら、交配単数体は互いに異なる遺伝子型と判定される。こうして酵素を調製して検討するまでもなく、それら酵素の由来についての同・異を容易に判定することができる。

さらに、+と-の表現型株の間で造成された雑種二倍体の四分子分析で、すべての子囊で4+ : 0-分離が見られるなら、その+形質は優性の細胞質因子に支配されているとほぼ断定できる。多くの呼吸欠損株の交配実験でこの型の分離が見られるが、逆に-形質が優性の場合もあり、一部の*petite*変異で報告されている。

**上位・下位検定** ある形質について突然変異体を分離すれば、分離された突然変異体により表現型が異なることがある。例えば野生型株から、あるアミノ酸を要求する変異体を多数分離したとき、変異体により、その排出する中間代謝物に、またそのアミノ酸要求性を代替する物質に違いが見られることがある。多くの物質代謝系の研究において、この現象に注目して、それら遺伝子（と酵素）の代謝経路上における配列順序と役割が生化学的に決められてきた。しかし、この方法は物質としての中間代謝物が存在しない情報伝達系などの解析では困難である。そのような場合でも、変異体の表現型が異なるなら、以下に述べる上位・下位検定 (epistasis/hypostasis test) がその解析に威力を発揮する。その簡単な例として、著者らの行ったホスファターゼ系遺伝子の発現制御に関わる信号伝達系<sup>8,13)</sup>注2を例に説明しよう。

酵母は必須要素の無機リン酸 (P<sub>i</sub>) を細胞内外の物質から調達するために、その細胞表層には抑制性酸性ホスファターゼ (脱リン酸化酵素, repressible acid phosphatase; rAPaseと略す) を備え、基質から切り取ったP<sub>i</sub>の細胞内への取り込みに、輸送体のPho84p膜タンパク

質が細胞膜に存在し、また液胞に存在するアルカリ性ホスファターゼ (repressible alkaline phosphatase; rAL-Pase) が、細胞内P<sub>i</sub>のリサイクルに働いている。これら3種の酵素それぞれの構造遺伝子*PHO5*, *PHO84*および*PHO8*は、環境のP<sub>i</sub>濃度に対応して応分の転写調節を受けている。なかでも*PHO5*のコードするrAPaseの生産は、P<sub>i</sub>を十分に加えた高P<sub>i</sub>培地 (標準の合成培地: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を1,500 mg/l含有) に生育した細胞ではほぼ完全に抑制され、低P<sub>i</sub>培地 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30 mg + KCl 1,500 mg/l) では高い力価を示す。しかも、rAPaseは細胞表層に在ることから、寒天平板上に生育したコロニーに、試薬を溶かした軟寒天 [0.05 M酢酸緩衝液 (pH 4.0) にα-naphthylphosphate 0.5 mg/mlとFast blue salt B 5 mg/mlを含む1%寒天] を重層することで、その活性を容易に検出できる<sup>3,14)</sup>。

このホスファターゼ系には、環境P<sub>i</sub>の濃度情報を核遺伝子まで伝達する機構が働いているはずである。その情報伝達系の解明を目標に、rAPase活性を指標として多くの突然変異体が分離された。その結果、rAPase活性を失う*pho2*, *pho4*, *pho5*と*pho81*変異が、また環境のP<sub>i</sub>濃度の高低に関わらず、構成的にrAPaseを生産する*pho80*, *pho84*, *pho85*の3変異が得られた。その中で、*pho5*変異体の一部に温度感受性のrAPaseを生産するなど、酵素自体に異常をもたらす変異が起きていた。このことから*PHO5*遺伝子はrAPaseの構造遺伝子と判断され、同様に*pho84*変異体ではP<sub>i</sub>の細胞内取込みが著しく低下することから、*PHO84*はP<sub>i</sub>輸送体をコードすることが分かった。これら以外の変異は、環境のP<sub>i</sub>濃度の検知と、その情報を*PHO5*遺伝子などへの伝達に関わるタンパク質をコードする制御遺伝子に起きたものと考えられた。それでは、これら制御遺伝子（とそのタンパク質）は機能的にどのように配置されるであろうか。その決定は上位・下位検定法で行われた。

前述のように、*pho2*, *pho4*および*pho81*の3変異体ではrAPaseの生産が停止し、*pho80*と*pho85*の2変異体では構成的に生産する。これら活性欠失型と構成性の、互いに異なる表現型を示す変異遺伝子を組み合わせた二重突然変異体を作り、それらのrAPase生産性について調べた<sup>注3</sup>。その結果、図3に示すように、活性を失った*pho4*変異と構成性の*pho80* (および*pho85*) 変異からなる二重変異体は、*pho4*単独変異体と同じくrAPase活性を示さず、*pho4*変異は機能的に*pho80*変異の上位にあると判定された。逆に活性欠失型の*pho81*変異と構成性*pho80*変異との二重変異体は構成性のrAPase活性を示し、*pho81*変異は*pho80*変異の下位にあると分かった。

注2 微生物における酵素の生産制御系を自由に操作することができれば、酵素の生産からアミノ酸などの代謝制御発酵だけでなく、混合糖質原料からのアルコール発酵の効率化にも有用と考え、筆者は大阪大学大学院在学中より、また2年間のLindgren研究室への留学期間を含めて、11年間に亘るサントリー社の研究所在職時代 (1959~1970年) に、*MAL*遺伝子のマルトース適応現象を対象に苦闘していた。その過程で、酵素力価の測定に細胞破砕が必要な*MAL*遺伝子系は、多数の分離株を対象とする遺伝学的研究には不利と考え、応用的見地から一時離れても、より簡便で明確な知見の得られる研究対象をと模索し続けた。1970年6月に母校の大阪大学への復帰に際して、助手として研究室に加わった当時の東江昭夫君 (現、東京大学名誉教授) から、酵母のコロニーに対するホスファターゼ活性の検定法を紹介され、ホスファターゼ系こそが求めていた研究系と知った。



上位・下位検定

*pho* 遺伝子突然変異体の表現型

- pho4* 変異体 → 酵素非生産
- pho80* 変異体 → 酵素の構成性生産
- pho81* 変異体 → 酵素非生産
- pho85* 変異体 → 酵素の構成性生産
- pho4 pho80* 二重変異体 → 酵素非生産
- pho4 pho85* 二重変異体 → 酵素非生産
- pho80 pho81* 二重変異体 → 酵素の構成性生産
- pho81 pho85* 二重変異体 → 酵素の構成性生産

対応するタンパク質の機能配列

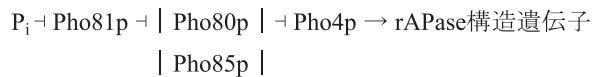


図3. 上位・下位検定とその結果から想定されるタンパク質の機能配列

すなわち、*pho4*変異体では、*PHO80*（と*PHO85*）遺伝子が野生型であっても、また変異型であっても関係なく酵素の生産を停止する。同様に、*pho80*（と*pho85*）変異体は*PHO81* 遺伝子の如何に関わらず構成性の形質を示す。

これらの結果を総合して図3の下部に示す機構が考えられる。すなわち、信号伝達の流れをこれら制御遺伝子に由来するタンパク質で示せば、Pho81pタンパク質は最上流に位置して細胞内P<sub>i</sub>による活性阻害を受け、Pho80p/Pho85p複合体はPho81pによる活性阻害を受ける。そのPho80p/Pho85p複合体は、*PHO5* 遺伝子その他構造遺伝子の転写活性化因子であるPho4pの活性を阻害すると考察した。この結論は、高P<sub>i</sub>環境下でrAPase生産性をもたらす*pho84*変異が、細胞外よりのP<sub>i</sub>取込み能の低下によるとの実験結果とも調和する。

このモデルが報告されると、ホスファターゼ系は多くの研究者の関心と呼び、広くその検証に供された。その結果、これらの調節因子タンパク質自身は、Pho81pを除いて構成的に生産され、P<sub>i</sub>信号はタンパク質とタンパク質の干渉を通してPho4pまで伝達されることが分かった。

注3 *PHO2* (= *BAS2/GRF10*) 遺伝子は、*PHO5*と*PHO84*のみでなく、一群のアミノ酸や核酸塩基の合成系遺伝子の転写に関わる因子をコードするが、直接P<sub>i</sub>信号の伝達には関係しないことから、この論議から除外した。なお、*PHO2*は*PHO8*の転写には関与しない。

た。すなわち、Pho81pは細胞内P<sub>i</sub>の欠乏下でPho80p/Pho85p複合体の阻害因子として働き、Pho80pはサイクリン (cyclin) の一種であり、Pho85pはそのサイクリン依存性タンパク質リン酸化酵素 (cyclin-dependent protein kinase) で、Pho80pの介添えのもと、Pho4pをリン酸化してその核内進入を阻害する。こうして最終走者としてP<sub>i</sub>信号を受けたPho4pは、酵素構造遺伝子の転写正因子として機能することが確認された<sup>13)</sup>。さらに、Pho81pをコードする*PHO81* 遺伝子の転写発現もPho4pの支配下であり、このホスファターゼ制御系は閉環状回路を構成する。この構造は、酵母で研究の進んだガラクトース代謝系遺伝子<sup>15)</sup>や、またアミノ酸合成の一般制御系にも共通して見られる特徴である。

この上位・下位検定の操作もまことに簡単であるが、問題は二重突然変異体の構築にある。酵母では、対象とする単数体突然変異体の中で交配を行い、それよりの四分子クローンすべての表現型分離 (図2) の観察により、その中に求める二重突然変異体を確定することができる。この方法は四分子分析が可能な菌類に限られ、大腸菌はもちろん、動・植物のモデル生物でも大変困難である。これも酵母がすぐれたモデル生物とされる理由の一つである。

この上位・下位検定法を広く採用して成功した研究の一つに、1960年代末から70年代にかけての、L. H. Hartwell (2001年度ノーベル生理学・医学賞受賞) の細胞周期に関わる研究がある<sup>2,7)</sup>。彼はその頃、出芽増殖中の*S. cerevisiae*細胞を、標準とする培養温度から高い、あるいは低い温度に移すことにより、さまざまな段階で出芽細胞の成長が停止する温度感受性変異体を集め、その生育状態を写真に撮影して解析を行っていた。筆者は、1973年に米国・シアトルのUniversity of Washingtonに彼を訪ね、多数の35 mmフィルムを天井から吊るした薄暗い実験室で、出芽細胞の成長を指標とした二重温度感受性変異体に対する温度シフト実験と、それから帰納された遺伝子の機能配列、またexecution pointとterminal phenotypeなどについて説明を受けたことを記憶している。

さらに、上位・下位検定を含む多重遺伝子支配系の解析例として、筆者らの行ったホモリズムに関わる接合型遺伝子の変換現象についての解析がある。それについては文献2)と7)に筆者執筆の総説が載せられている。また、その後の進展についてはI. Herskowitzらの総説<sup>10)</sup>その他がある。また、多くの文献<sup>1,3,4,12,16,17)</sup>にも教科書的な記述がある。そこから、他の追従を許さない酵母ならではの遺伝学的解析技法を読み取って頂けるであろう。

おわりに

当初、遺伝学の研究材料として取り上げられた酵母は、今日では細胞生物学における優れたモデル生物とされている。その酵母における遺伝学的な解析技法を要約して述べた。筆者にとって、そのいずれの技法も他から教えられたものではない。その技法の名称は遺伝学辞典から学んだが、実技のすべては、筆者の大阪大学在学中より、研究室所属の教職員、大学院生と研究生などの諸君と考へ出した方法である。その大きな特長は、研究対象にもよるが、短い時日で経費も安く、目標とする現象の機構について、生化学では及びもつかない広い範囲にわたる機構モデルが描けることにある。勿論その結論は最終的な結論ではない。遺伝学では生きた生体を観察し、生化学では細胞外に分離した生体成分が対象であり、研究の完成には両者の組合せが必須である。酵母には豊富な実績をもつ生化学に加えて、ここで述べた遺伝学的解析法と優れた遺伝子操作技術<sup>3,4)</sup>がある。これが酵母をして優れたモデル生物に仕立てている。しかも複雑な生体機構の解明には、遺伝学によるモデルの構築を先行させることが有利であることを多くの例が示している。Hartwellの細胞周期とSzostakによる染色体交差機構の解明がその好例であり、著者らの接合型変換系とホスファターゼ制御系もまたそれに含まれる。

その傍らで、巷の研究の多くに、*S. cerevisiae*を対象とした研究でさえも、生化学的な解析に終始しているのを見る。またDNAを対象とした生化学を遺伝学と誤信する向きも多く、慨嘆するばかりである。筆者はかつて、科学技術振興事業団から「さきがけ研究」の一領域を委嘱され、参加者個々の研究課題は何であれ、研究領域の命題を「素過程と連携」とした。これもその経験によるものである。そこでは装備に最新型の機器を求める声が多く、さらに近年は、その原理を考えることなく、キットに頼る実験が盛んと聞く。そこで思い出すのは巖流島の武蔵である。彼は小次郎の物干し竿より三寸長い櫂の木剣で試合に臨んだ。広い識見に加えて臨機応変の対応が肝要と思う。

文 献

- 1) 大嶋泰治ら(編著): IFO微生物学概論, 培風館(2010).
- 2) Hall, M. N. & P. Linder (eds.): *The Early Days of Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1993).
- 3) 大嶋泰治(編著): 酵母分子遺伝学実験法, 学会出版センター(1996).
- 4) Adams, A. et al.: *Methods in Yeast Genetics - A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual 1997 ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998).
- 5) Goffeau, A. et al.: *Science*, **274**, 546 (1996).
- 6) Szostak, J. W. et al.: *Cell*, **33**, 25 (1983).
- 7) Strathern, J. N. et al. (eds.): *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces - Life Cycle and Inheritance*, Cold Spring Harbor Laboratory (1981).
- 8) Strathern, J. N. et al. (eds.): *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces - Metabolism and Gene Expression*, Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
- 9) Broach, J. R. et al. (eds.): *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces - Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1991).
- 10) Jones, E. W. et al. (eds.): *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces - Gene Expression*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1992).
- 11) Pringle, J. R. et al. (eds.): *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces - Cell Cycle and Cell Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1997).
- 12) 東江昭夫ら(編): 酵母に見る最新の真核生物像 - 酵母実験系への誘い, 蛋白質 核酸 酵素, **39**, 303 (1994).
- 13) Oshima, Y.: *Genes Genet. Syst.*, **72**, 323 (1997).
- 14) Toh-e, A. and Y. Oshima.: *J. Bacteriol.*, **120**, 608 (1972).
- 15) Oshima, Y.: *Genetics*, **128**, 195 (1991).
- 16) 大嶋泰治ら(編著): バイオテクノロジーのための基礎分子生物学, 化学同人(2004).
- 17) Watson, J. D. et al. (eds.): *Molecular Biology of the Gene*, 5th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, © Pearson Education, Inc., Benjamin Cummings, San Francisco, CA (2004).