

## 遺伝子破壊の落とし穴

古川健太郎

従来の遺伝学的手法は、特定の表現型を示す変異体を取得し、その原因遺伝子を同定するというものであった。現在では、相同組換えにより遺伝子破壊株を作製し、細胞または個体レベルで生じる表現型を解析する逆遺伝学的手法が一般的となっている。遺伝子破壊株の表現型が明確であれば、その遺伝子の機能や役割を推定することができるが、目立った表現型がない場合は誤った解釈につながることや本来の機能を見逃してしまう可能性がある。本稿では、酵母及び糸状菌のシグナル伝達経路における興味深い特徴を持つ遺伝子破壊株または変異体について紹介する。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の  $\Sigma 1278b$  株は、窒素源やグルコースの飢餓条件下において酵母型から菌糸型への形態変化（偽菌糸形成）や寒天培地中へ潜り込む生育（侵入性増殖）を示す。これらの形態形成は、酵母の性接合を担うシグナル伝達経路と共通する構成因子によって制御されている。構成因子である Fus3 及び Kss1 マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（MAPK）遺伝子を破壊しても見かけ上は野生株と差がないことから、形態形成特異的な MAPK が存在すると推測されていた<sup>1)</sup>。その後、Kss1 は活性状態依存的に正反対の機能を持つという仮説のもと、キナーゼ活性を失った変異体のスクリーニングが行われた結果、不活性型（非リン酸化型）Kss1 は形態形成の抑制因子として機能することが明らかとなった<sup>2)</sup>。即ち、Kss1 遺伝子破壊株に目立った表現型がないのは、形態形成を抑制できないことが主な原因であった。一般的な不活性型は破壊株に近い結果が期待されるのに対し、Kss1 の不活性型の場合は破壊株が正反対の表現型をもたらすという点が特徴的である（図 1A）。

果実や野菜に感染する糸状菌を標的とした殺菌剤であるフルジオキソニル（FLU）は、高浸透圧応答経路の攪乱によって殺菌効果を発揮するが、耐性菌の出現が問題となっている。耐性変異株の多くは、高浸透圧応答経路の構成因子であるグループ III ヒスチジンキナーゼ（GIII-HK）もしくは Hog1 MAPK 遺伝子にストップコドンやアミノ酸置換の変異が生じていることが知られていた<sup>3)</sup>。これら二つの遺伝子破壊株は表現型が類似しており（高浸透圧感受性かつ FLU 耐性）、GIII-HK 遺伝子破壊株では Hog1 の活性化が起こりにくいことから、GIII-HK は Hog1 経路の正の制御因子であると考えられていた<sup>4)</sup>。ところが、GIII-HK の特定の反復領域を欠く恒常的活性型変異体は、野生型 GIII-HK と共存下にお

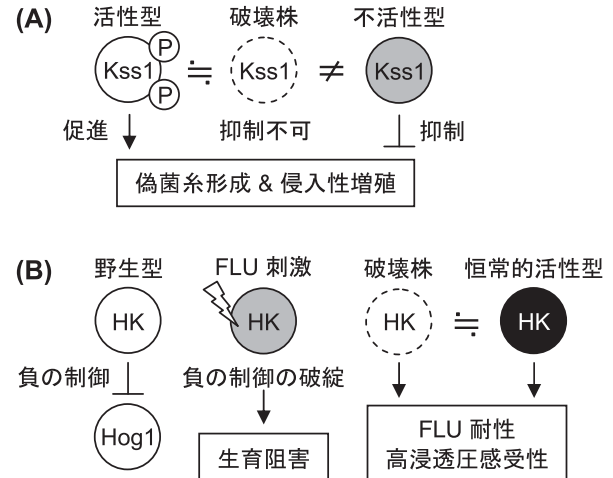


図 1. (A) 遺伝子破壊 ≠ 不活性型変異 (B) 遺伝子破壊 = 恒常的活性型変異

いても FLU 耐性及び高浸透圧感受性を示し、さらには以前同定された GIII-HK の FLU 耐性アミノ酸置換変異体のいくつかも機能欠失変異ではなく恒常的活性型であることが確認された<sup>5)</sup>。つまり、本来 GIII-HK は Hog1 経路を負に制御しており、FLU 刺激によるこの制御の破綻が生育阻害を引き起こすが、GIII-HK 破壊株は FLU の標的が存在せず、活性型変異体では恒常的な負の制御という異なる要因によって FLU 耐性を引き起こしていると考えられる。一般的な恒常的活性型変異は破壊株と異なる結果が期待されるのに対し、GIII-HK の恒常的活性型の場合は破壊株と類似した表現型を示すという点が特徴的である（図 1B）。

以上、遺伝子破壊と不活性型変異の表現型が異なる例および遺伝子破壊と恒常的活性型変異の表現型が同じ例を紹介した。このような例は稀であるが、遺伝子破壊法を用いた場合の落とし穴として注意すべき研究例であり、過去の研究結果についてもさまざまな変異体を用いて改めて解釈し直す必要があるかもしれない。

- 1) Liu, H. *et al.*: *Science*, **262**, 1741 (1993).
- 2) Madhani, H. D. *et al.*: *Cell*, **91**, 673 (1997).
- 3) Ochiai, N. *et al.*: *Pest. Manag. Sci.*, **57**, 437 (2001).
- 4) Yoshimi, A. *et al.*: *Eukaryot. Cell*, **4**, 1820 (2005).
- 5) Furukawa, K. *et al.*: *FEBS Lett.*, **586**, 2417 (2012).