

2014年度 生物工学賞 受賞



酵母を用いた真核生物遺伝子機能の
解明とバイオテクノロジーへの応用

原島 俊



Study on eukaryotic gene regulation
and application to yeast biotechnology

Satoshi Harashima (Department of Biotechnology, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871) 93: 2-22, 2015.

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*; 以下酵母) は、バイオサイエンスにおけるモデル生物として重要であるだけでなく、バイオテクノロジーにおいてももっとも重要な生物の一つである。筆者は、大学院に進学して以来、43年間、「酵母を用いた真核生物遺伝子機能の解明とバイオテクノロジーへの応用」を目標として研究に携わってきた。本稿のタイトルの前半部、「酵母を用いた真核生物遺伝子機能の解明」は「育種理論の確立」であり、後半の「バイオテクノロジーへの応用」は、「育種技術の開発と産業酵母の改良」を意味している。特に、後者の研究においては、発酵や醸造などの伝統的発酵生産、そして助手になった頃から始まった遺伝子工学的発酵生産のことを常に意識して研究を行ってきたつもりである。本稿は、そうした酵母育種理論の確立と酵母育種技術の開発についての個人的な研究回想となるがお許しいただきたい。

1) 酵母との出会い

「工学とは何か」がよく理解できていなかったこともあったが、当時の感覚で工学とはほど遠いと感じた「遺伝学」になんとなく魅力を感じ、卒業研究時(1972年)に、恩師の大嶋泰治先生(現大阪大学名誉教授)が主宰しておられた「工業微生物遺伝学研究室」に入れて頂いた。我国の工学部で初めて創設された遺伝学の講座であったと思う。当時、正統的な遺伝学ができる工業微生物と言え、枯草菌と酵母くらいで、大腸菌も工業微生物

とは考えられていなかった時代である。研究室には、関 達治助手(現大阪大学名誉教授)がリーダーの枯草菌グループと東江昭夫助手(現東京大学名誉教授)が率いる酵母のグループの二つがあった。配属後まもなく、教授室に呼ばれて行くと、「君は酵母の接合型変換の研究をやりなさい」と言われた。これが21才の時、酵母との出会いである。

2) 学位論文、一遺伝子が動く一

修士、博士課程へと進学し、1977年、「*Saccharomyces* 酵母の接合型変換に関する遺伝学的研究」というタイトルの学位論文で工学博士の学位を頂いた。この仕事は、i) 出芽酵母の接合型変換が、サイレントな接合型遺伝子座、*HML*と*HMR*にある接合型遺伝子の、発現遺伝子座である*MAT*座への転移によって起こること、ii) *HML*、*HMR*座が、第III番染色体の、それぞれ左端と右端にあることを明らかにした研究である(図1)。Genetics誌に3報の論文として発表することができたが¹⁻³⁾、i)の結論を導くために、少なくとも4000個の胞子を顕微解剖した。また、遺伝子のマッピングは、通常、既知マーカーとの2因子間の連鎖解析によって行われるが、*HML*と*HMR*遺伝子座の場合には、接合型変換現象が、*MAT*と*HML*または*HMR*にある接合型情報(aまたは α)の組合せによって決められるので、ii)の結論を導くためには、2因子交雑ではなく、*MAT-HML*(または*HMR*) - マーカー間の3因子交雑をせざるを得なかった。そのため、

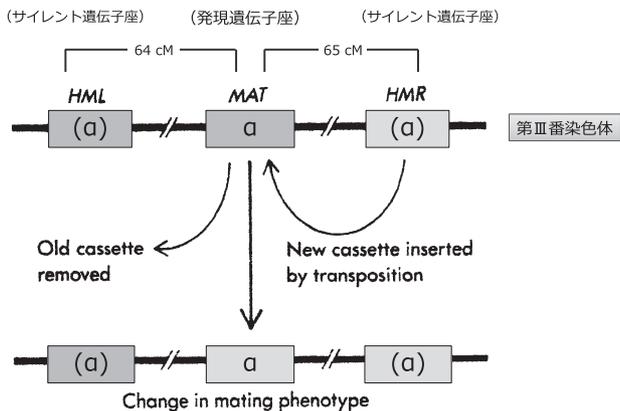


図1. 出芽酵母の接合型変換とHML, HMR遺伝子のマッピング

3因子交雑 (XYZ/xyz) の2倍体から分離する12通りの四分子型の分離頻度を計算する理論式を誘導し、計算機シミュレーションによって、HMLとHMRの位置を色々に変化させ、理論値と実際の観察値について、最少の χ^2 乗値を与える位置としてHMLとHMR座をマッピングした。こうした複雑な方法によってHMLとHMR座の位置を決めたので、果たしてこの結果が正しいのかどうか、論文を発表した後も不安で仕方がなかった。当時は酵母の形質転換もまだ報告されておらず、HML, HMR遺伝子の実体もわかっていなかった頃のことだったので、その不安は想像していただけたと思う。しかし、この論文を発表した2年後の1978年には酵母の形質転換が報告され、酵母を宿主とした遺伝子クローニングが可能となった。そして、ついに、1979年になって米国のHicksらにより、HMLとHMR遺伝子がクローニングされ、分子生物学的な解析によって、HML, HMRが筆者らの予測した位置にあることが明らかにされた。報告したことが間違っていなかったと、やっと不安から解放されたことを昨日のように思い出す。

この学位論文の研究は、現在でも、欧米の大学で使われている、Molecular Biology of the Gene, Molecular Biology of the Cell, Recombinant DNA, GENESなど、いくつかの教科書に、「遺伝子が動く」という生物学の新しい概念として掲載されている。望外の喜びである。しかし、この仕事は、もともと、実用酵母の多くがホモタリックで、高次倍数体であることの意義を明らかにしようとした産業的応用を動機として始まった研究であり、基礎的な生物学の問題を解こうとはじまった研究ではない。しかし筆者は、この研究を通じて、産業上重要な問題の研究から、基礎生命科学においても新しい原理を発見できるという認識を強く持つことができたようになった。研究の方向性として、よく言われる「基礎科学から産業応用へ」ということではなく、「産業応用

から基礎科学へ」という研究スタイルを取ろうと思うようになったきっかけを与えてくれた研究であったと思っている。

3) 古典遺伝学から分子遺伝学へ

学位は取得できたものの職はなかった。しかし、幸い、学術振興会の奨励研究員として採用され、初めてサラリーらしきものをもらうことができるようになった。また、留学をしたいとも思っていたが、できる事と言えば四分子分析だけであり、受け入れてくれる留学先があるだろうかと不安であった。しかし、前述のように、まもなく(1978年)、米国Massachusetts Institute of Technology (MIT) のGerald Fink教授の研究室から酵母で初めてプロトプラストを用いた形質転換法が報告され、酵母の分野でも、徐々に遺伝子を扱った研究が展開されてくる。折しもその時、米国National Institutes of Health (NIH) のReed Wickner博士の研究室に留学をしておられた東江先生が、酵母ベクターとプロトプラスト形質転換法の詳しいプロトコールを送って下さった。こうしたこともあり、我国で初めて、酵母(大腸菌ではなく)を宿主として、酵母遺伝子(HIS5など)をクローニングするなど⁴⁾、古典遺伝学から分子遺伝学へと徐々に研究手法を広げていくことができる幸運に恵まれた。1978年から1981年頃にかけてのことであるが、この間、1979年には、幸いにも助手のポストに空席ができ、大嶋研の助手にいただいた。

4) 形質転換付随細胞融合現象と同質遺伝背景の高次倍数体育種への応用

4-1) プロトプラスト形質転換体は細胞融合体である
 プロトプラスト形質転換実験を行っているとき、形質転換体の細胞が、もともとの細胞より大きいことに気がついた(図2A)。ひょっとして形質転換体は同時に細胞融合体であり、DNAは細胞融合を介して細胞に入るのはないかと想像した。一つの理由は、プロトプラスト形質転換法では、途中のプロセスで、細胞融合にも使われるポリエチレングリコールを使うということである。この仮説を証明する為、形質転換時に起こる細胞融合や細胞質融合の頻度を、プラスミド、あるいは細胞質性(ミトコンドリア性)呼吸欠損変異で細胞質をマークしたり、倍数性が1倍体のときには胞子形成をしないが、2倍体以上になると胞子形成能を示すようになるsir変異を持つ株を宿主とするなど種々の方法論で推定した。その結果、形質転換体が、ほぼ100%細胞融合体、あるいは細胞質融合体であることを証明することができた⁵⁾。

4-2) 形質転換付随細胞融合法による同質遺伝背景を

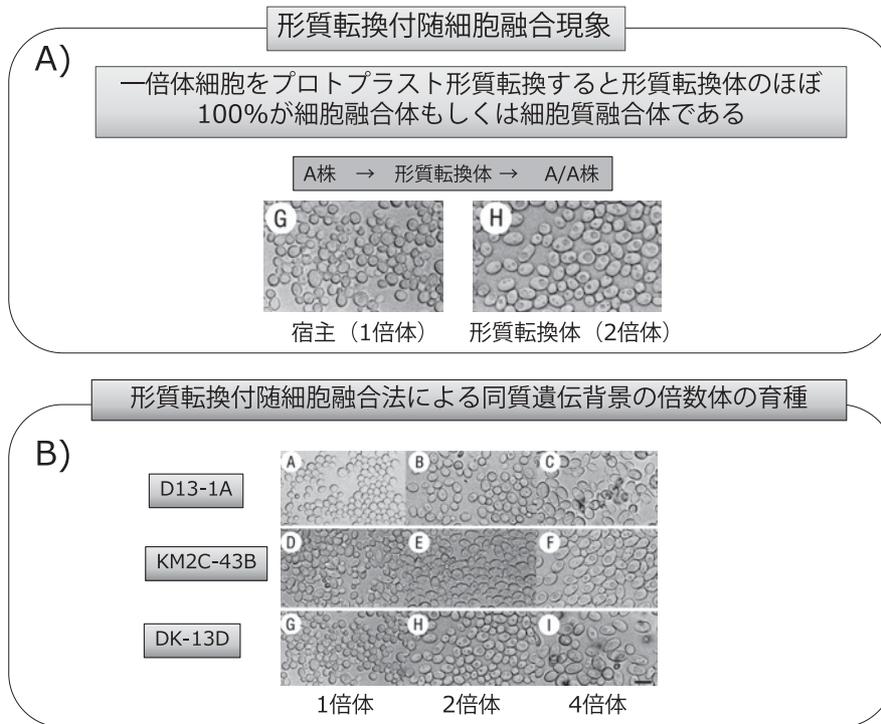


図2. 形質転換細胞融合法と同質遺伝背景の倍数体育種への応用. D13-1A, KM2C-43B, DK-13Dは菌株名.

持つ高次倍数体の育種 長い年月にわたって選抜されてきた実用酵母に、なぜ倍数体が多いのか、倍数性の生理的な意義は何かなどの疑問に正確に答えるためには、まったく同じ遺伝背景を持つが、倍数性のみ違う細胞を作製し、その表現型を比較することが必要である。そこで、形質転換付随細胞融合法を利用して、いくつかの1倍体から、世界で初めて同質遺伝背景を持つ1, 2, 3, 4倍数体シリーズを作製した(図2B)⁶⁾(3倍体は示していない)。特に、本法によって作成された4倍体酵母は、**a/a/a/a**あるいは $\alpha/\alpha/\alpha/\alpha$ の接合型構成を持つものであり、自然界では報告のなかったものである。これらの株を用いて、非増殖速度、発酵力、細胞の大きさ、培養容積あたりの細胞数、ベクターの安定性やコピー数、プロモーターの発現の強さなどを調べたところ、倍数性が大きくなるにつれて細胞サイズは2, 3, 4倍と大きくなるが、培養容積あたりの細胞数は、逆に1/2, 1/3, 1/4に低下した。期待に反し、それ以外の表現型は、倍数性によらず変化しなかった⁷⁾。しかし、違った遺伝背景を持つ株(A株, B株とする)から作製した2, 4倍体株(AA, AB, BB, AAAA, AABB, BBBB)の表現型を比較したところ、同じ倍数性であるにもかかわらず、雑種の方が有意に高い発酵力を示すことがわかった⁷⁾。これらの結果は、実用酵母、特にウイスキーやビール醸造で使われている高次倍数体は、単に倍数性が高いために選抜されてきたわけではなく、いわゆる雑種強勢により有意

な形質が付与されたものが選抜されてきたことを示している。この仕事によって、長年にわたる課題であった実用酵母の倍数性と有用形質との関係について、初めて実験的に正確な答えを出すことができた。

接合型が違う**a/a/a/a**あるいは $\alpha/\alpha/\alpha/\alpha$ 4倍体を作製することができたので、この二つの4倍体株を通常の接合法によって交雑し、世界で初めて酵母の8倍体を造成することを試みた。不思議な事に、交雑体を培養して観察すると、細胞の大きさは4倍体のものと同じか、あるいはそれより小さいサイズの細胞ばかりであった。この結果から、8倍体は、一過的には形成されているものの非常に不安定で、体細胞分裂の間に、ゲノム構成が容易に4倍体、あるいはそれ以下になってしまうことが想像された。大学院に入学後、留学(次項)までの約10年間(1972~1983年頃)、実用酵母の魅力と、それを扱うことの難しさを経験できたことは、その後長くバイオテクノロジーにかかわる研究生活を送ることになったことを考えると、大変有り難かったと思っている。

5) NIHへの留学

—遺伝子の翻訳レベルでの発現制御の研究—

酵母のヒスチジン合成系遺伝子*HIS5*のクローニングがきっかけで⁴⁾、1984年10月から2年間、当時、「酵母におけるアミノ酸合成の翻訳制御」の研究でその才能が認められつつあったNIHの若手研究者、Alan G.

Hinnebusch博士の研究室に留学する機会を得た。NIHがあるメリーランド州ベセスダは公園のようにきれいな街で、助手としての雑用から離れて、朝から晩まで研究のためだけに自分の時間を使う事ができるという、今では考えられないような有り難い時間を過ごすことができた。留学中の仕事は、一言で言えば、遺伝子発現の翻訳制御であったが^{8,9)}、研究のこともさることながら、留学によって、多くの知己（NIH留学中の日本人も含め）ができたことや、Hinnebusch博士の研究室運営、また、大学とは違う政府の研究所における研究スタイルなどについて多くのことを学ぶことができた。

1986年の9月30日、2年間の留学を終えて帰国した。帰国後はNIHで携わった研究はしないことに決めていた。それは、やはり自身のモチベーションから始めた研究ではないからである。NIHでは基礎生物学の研究を行ったが、帰国してからは、工学部の研究室に所属するということもあり、「バイオテクノロジーのための酵母研究」が、私に課せられた使命と強く考えるようになった。

そうした頃、東江先生が助教授として広島大学に転任されることになった。ある日、大嶋先生に呼ばれて教授室に行くと、東江先生がリーダーとして進めていたリン酸シグナル伝達系（PHO）系の仕事を引き継いで欲しいとのことであった。PHO系は、無機リン酸（Pi）というシグナルによって、一群の遺伝子の発現が制御されるシステムであり、大嶋先生、東江先生の努力によって、真核生物における遺伝子発現制御のモデルとして、長きにわたりその分野をリードしてきたシグナル伝達系である。これから先は、自分自身のしっかりした考えをもって、実用酵母の「育種理論の確立」と「育種技術の開発・応用」についての研究を進展させていかなければと思っていた矢先ではあったが、考えてみれば、PHO系の研究は、まさに育種理論の確立に資する研究であり、良い機会と思ってPHO系の研究に参画させていただくことにした。ただ、それとともに、実用酵母の育種の問題や伝統的な発酵生産における酵母のストレス耐性の問題、また、当時、酵母宿主による遺伝子工学的物質生産が行われるようになってきたことも考え、酵母の宿主・ベクター系の問題にも挑戦したいという思いも持った（後述）。これ以降の本稿では「育種理論の確立」のために行った基盤的な研究のいくつかと、そうした研究から得られた知見を応用して行った「育種技術の開発」についての研究を、研究系列ごとに紹介したい。

6) リン酸シグナルによる酵素生産制御機構（PHO系）と酵母バイオテクノロジーへの応用

出芽酵母のPHO系は、外界のPi濃度が高いと酸性ホスファターゼ（APase）をコードする*PHO5*やリン酸トランスポーターをコードする*PHO84*など、いくつかの遺伝子群の転写が抑制されるシグナル伝達系である¹⁰⁾。PHO系が実験系として優れていることの一つは、*PHO5*遺伝子から産生されるAPaseが、非常に簡単なコロニーの染色法によって視覚的に検出できることである。現在わかっているPHO系の概略を図3に示すが、当時、大嶋研では、こうしたPHO系の全貌を明らかにするため、PHO系を構成するすべての遺伝子をクローン化し、その機能を明らかにする研究が進められていた。その中で、難航を極めていた*PHO84*遺伝子のクローニングに挑戦することとした。

6-1) *PHO84*遺伝子のクローニングと機能、 $-Pi$ トランスポーターか、センサーか *pho84*変異株は、外界のPi濃度が高くても、*PHO5*の構成的な発現を示す変異株として分離された。しかし、かなりの高頻度で抑圧変異が出現するという、表現型が不安定な変異株であり、クローン化できたと思われる候補の形質転換体を分離しても、それは単なる抑圧変異株であるという事情のためクローニングに困難を極めていた。しかし、いくつかの工夫をした事もあり、2年がかりでやっとクローニングに成功した。そのときの嬉しさは忘れられない。クローン化によって、Pho84タンパクが12回膜貫通型の典型的なトランスポーター様構造を持つタンパクであり、実際に高親和性のPiトランスポーターであることを実験的に明らかにすることができた¹¹⁾。

*PHO84*遺伝子のクローン化によって、Pho84タンパクがPiを取り込む能力があることはわかったものの、Pho84がセンサーとして同時にPiの濃度も感知しているかどうかについては依然として不明であった。当時、Pho84トランスポーターの機能として二つの考え方があった。一つは取り込み能を持つだけで、センサーは別にあるとする考え方であり、もう一つは、Piを一分子取り込むごとに、Pho84タンパクがなんらかのメカニズムでその数をカウントし、それが濃度のシグナルとなるとする考え方である。この問題にどのようにして答えるべきか悩んだが、当時方法論が確立しつつあったNMRを利用した細胞内リン酸濃度の測定を行うことにした。紙面の都合上、詳細は記載できないが、結論としては、細胞内のオルトリン酸、ポリリン酸の濃度がともに低下すれば構成的な転写が起こること、*pho84*破壊株でも、何らかの方法で細胞内オルトリン酸の濃度を上昇させ

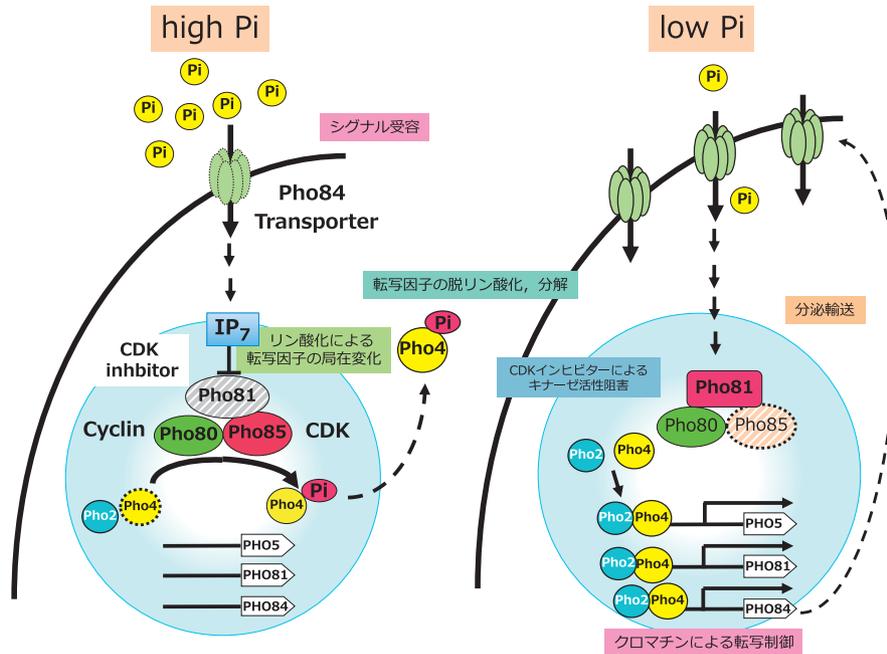


図3. 出芽酵母のリン酸シグナル伝達系. high Pi, low Pi は、培地中の無機リン酸の濃度を示す.

ば、*PHO5*の構成性が抑圧されることを明らかにすることができた¹²⁾. この結果は、Pho84タンパクにはPiシグナルを感知する機能はなく、トランスポーターとしてのみPHO系のシグナル伝達に関与していることを示している.

6-2) PHO系の真のシグナル分子は何か 上記のようなことが明らかになっても、PHO系の真のシグナルについては何もわからないままであった. ただ、Pi濃度が高い時には、未同定のシグナルによって、タンパク質リン酸化酵素 (PKase) 阻害因子 (CDKインヒビター) Pho81が阻害され、その結果、サイクリン依存性PKase複合体 (Pho80-Pho85) が活性化されること、そして、最終的に、下流の転写因子Pho4がリン酸化されて核外に排除されることにより、PHO系遺伝子群の転写が抑制されることが徐々に明らかになりつつあった (図3). しかし、酵母細胞が、どのようにしてリン酸の濃度を、Pho81分子に伝達しているのかについては皆目わかっていなかった. そこで、そうした因子を同定するため、約5000株からなる出芽酵母破壊株のコレクションを利用し、リン酸濃度が高いにもかかわらず、そのことを感知できない (*PHO5*が構成的な発現を示す) 破壊株のスクリーニングを行った. その結果、それまでの突然変異株の分離では見つかっていなかった *PLC1*, *ARG82*, *KCS1*, *ADK1*の破壊株で *PHO5*が構成的に発現していることを見いだした. 興味深い事に、これらの遺伝子のうち *PLC1*, *ARG82*, *KCS1*がイノシトールポリリン酸合成系の遺伝子であること、しかし、同経路上の

シグナル分子はイノシトールリン酸生成系の代謝物である

[PP]₂-IP₃ (=IP₇) がシグナルであることを提案

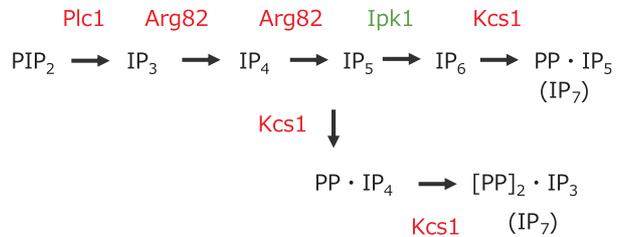


図4. 出芽酵母のイノシトールリン酸生成系とその酵素. 赤字の酵素をコードする遺伝子の破壊株は構成性を示す. 緑地の酵素をコードする遺伝子の破壊株では構成性とならない.

IPK1 遺伝子の破壊株では *PHO5*が構成性にならないことから、*IP₇*が真のシグナル分子である可能性を初めて提示することができた (図4)¹³⁾. この結果は後に、ハーバード大学のO'Sheaらによる *in vitro*の実験などにより証明される. こうした研究の結果、Piの濃度が、*IP₇*に変換され、そのシグナルをPho81がセンサーとして検知することが明らかになった.

6-3) PHO系構成因子の温度制御可能な宿主・ベクター系構築への応用 遺伝子工学的物質生産では、使いやすい宿主・ベクター系の開発がキーポイントである. その一つが、温度によって制御可能な宿主・ベクター系である. しかし、当時、(そして今でも) 出芽酵母においては、意外にそうした宿主・ベクター系は開発されていなかった. PHO系の研究から色々なリソースが蓄積し

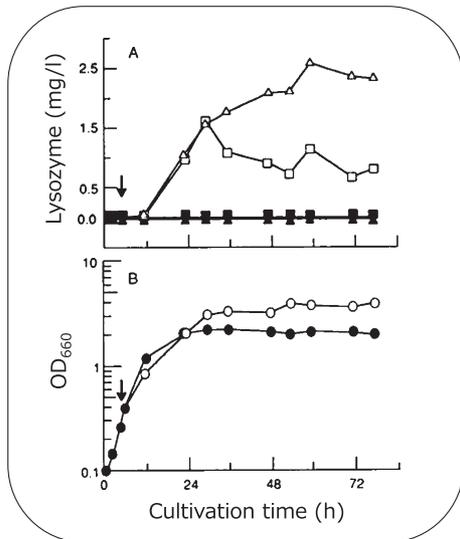


図5. *pho81^{ts}*温度感受性宿主と*PHO84*遺伝子プロモーターを利用したヒトリゾチームの生産. ○, ●はそれぞれ25°C, 37°Cでの増殖を示す. □, ■は、それぞれ、25°C, 37°Cでのヒトリゾチームの細胞内生産量. △, ▲は細胞外への分泌量.

たこともあり、それを利用して温度制御可能な酵母の宿主・ベクター系を構築し、日本新薬（株）との共同研究により、酵母によるヒトリゾチーム（h-lysozyme）の生産を行った（図5）¹⁴。発現プロモーターとしては、低濃度のPi条件下において高効率で脱抑制される、*PHO84*遺伝子のプロモーターを使用した。h-lysozymeをコードするcDNAを*PHO84*のプロモーター下流につなぎ、低いPi濃度条件下、多コピーベクターで発現させると、4.5 mg/Lのh-lysozymeが分泌生産された。この発現系を、温度制御可能なものにするため、*PHO84*プロモーターの作用に必要な*PHO81*遺伝子の高温感受性変異株（*pho81^{ts}*）を宿主に使った。その結果、h-lysozymeは37°Cでは生産されないが、25°Cでは生産することができる。低温で作動する宿主・ベクター系を構築することができた¹⁴。

*PHO84*プロモーターの抑制に必要な*PHO80*遺伝子の温度感受性変異株（*pho80^{ts}*）を宿主とする宿主・ベクター系も構築し、それを利用してイネα-アミラーゼ生産の最適化も試みた¹⁵。*pho81^{ts}*株を宿主とした場合には、低温で生産が可能であるが、*pho80^{ts}*を宿主とした場合には、逆に、高温でアミラーゼを産生させることができる。こうした温度制御可能な宿主・ベクター系は、言うまでもなく、宿主に負荷を与える生産物や、細胞増殖の最適温度と生産物の安定な最適温度が違っている場合などの遺伝子工学的物質生産に適している。

6-4) 融合遺伝子テクノロジーへの*PHO5*の応用
PHO系の研究から、*PHO5*がレポーターとして非常に

有用であることを認識し¹⁶、いくつかの応用研究を行った（図6）。プロモーター検出ベクターとして¹⁷、DNA結合能の検出、解析用レポーターとして（図6A）¹⁸、環境中のPi濃度のセンサーとして（図6B）¹⁹、変異株分離のレポーターとして（図6C）、実用酵母から接合能を持つクローンの簡便なスクリーニング用レポーターとしての利用（図6D）²⁰などである。それらのうち、*PHO5*を実用酵母の接合能検出ツールとして応用した例をとりあげ、以下に述べる。

産業酵母は実験室酵母と違って接合能を示さない。実用酵母から、接合能を持つクローンを分離することができれば、実用酵母間の交雑が可能となり、育種が格段に進展する。**a**型細胞で特異的に発現する遺伝子群（*asg*；たとえば*STE6*）、 α 型細胞で特異的に発現する遺伝子群（*asg*；たとえば*MF α 1*）が知られていたので（後述）、それらの遺伝子のプロモーター下流に*PHO5*遺伝子を融合して、**a**型で特異的に発現する*STE6p-PHO5*、あるいは α 型で特異的に発現する*MF α 1-PHO5*融合遺伝子を構築した¹⁹。その発現は、コロニーの活性染色により簡便に検出できるので、**a**または α の接合能を持つクローンが出現すれば、簡単に見分けることができる（図6D）。こうしたレポーターを開発して、次項で述べるような、実用酵母に接合能を付与する技術を開発するための基盤的な研究を行った。

7) 出芽酵母接合型制御機構の研究 —実用酵母の育種と新規な宿主・ ベクター系開発への応用

7-1) 出芽酵母の接合型制御機構 既述のように、産業酵母は実験室酵母と違って、i) 接合能を示さないが、それ以外にも、ii) 形質転換や細胞融合のための選択符号を持たない、iii) 高次倍数体である、またそのため、iv) 突然変異の誘起が困難である、v) 胞子形成能を持たない、など育種にとって障害となるさまざまな特性を持つ。こうした特性を持つ産業酵母を育種するための一つのアプローチとして、接合型の制御機構を明らかにする必要があったと考えた。しかし、筆者らが研究を始めた1980年代の後半には、このような実用酵母の非接合性を明確に意識した研究は、内外ともにまったくなかったと言っても過言ではない。しかし、当時、いくつかの研究室の努力で以下のような基盤的な知見は得られつつあった（図7）。

酵母の**a**、 α の接合型は*MATa*と*MAT α* の接合型遺伝子によって規定されており、それぞれの遺伝子は、**a1**、**a2**、 $\alpha1$ 、 $\alpha2$ の4つのタンパクを産生する。 $\alpha1$ タンパクは、 α 型を示すのに必要な遺伝子群（*asg*）の転写を活性化

PHO5レポーターの多様な応用

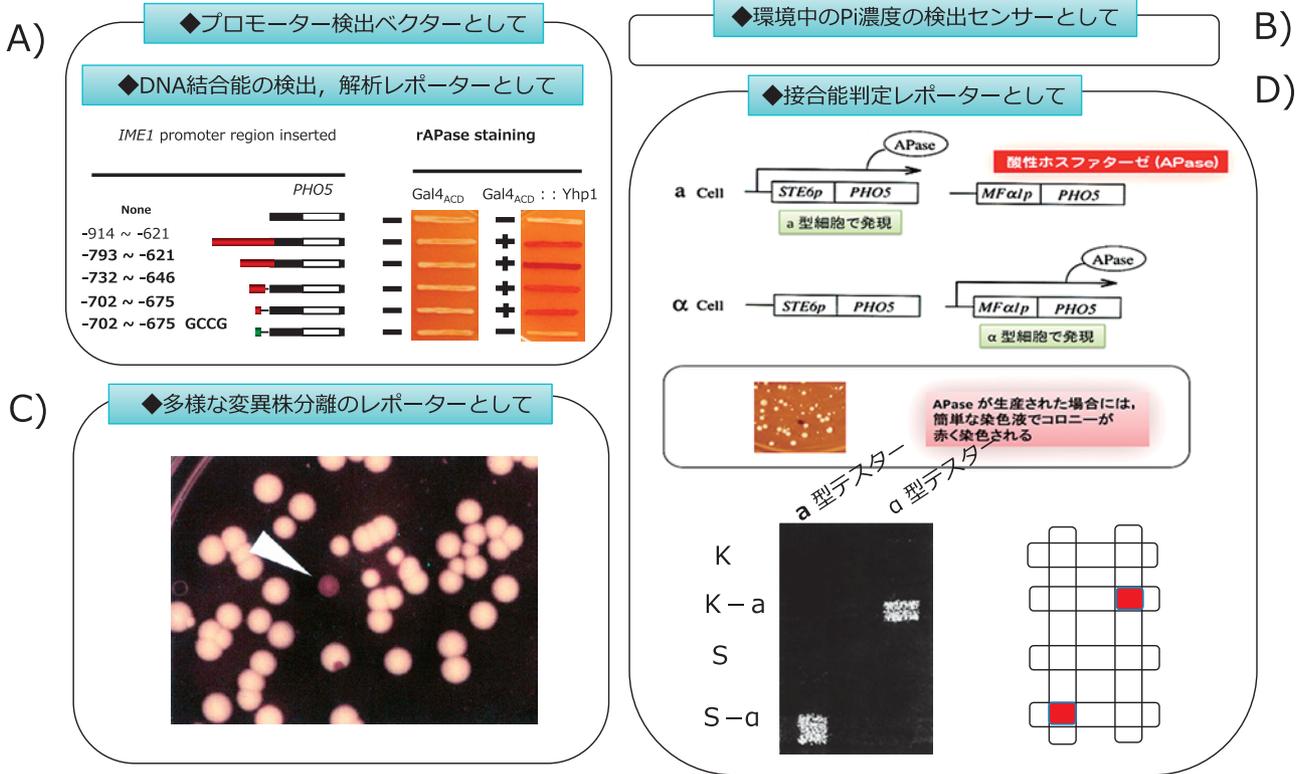


図6. レポーターとしてのPHO5遺伝子の種々の応用

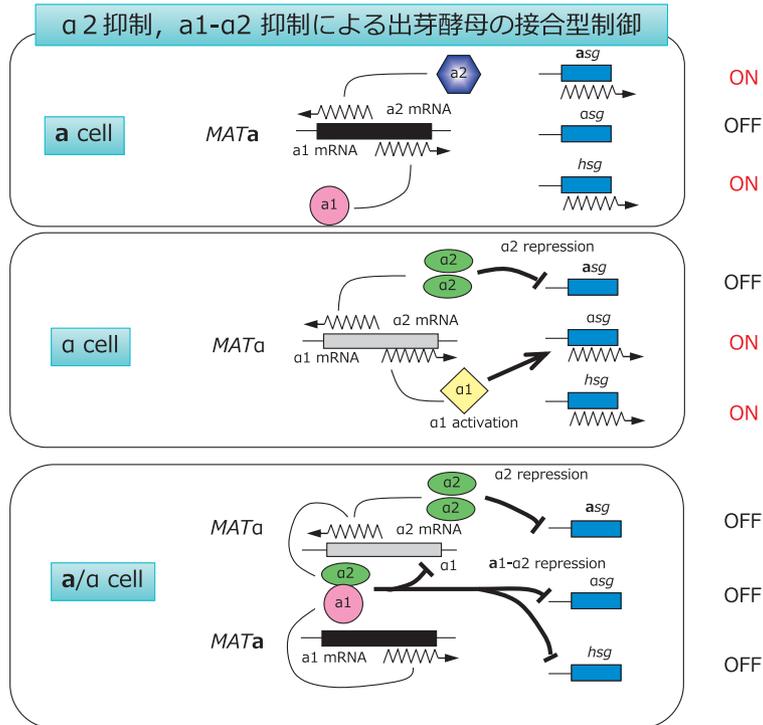


図7. 出芽酵母における接合型制御機構. asg : a型特異的の遺伝子, asg : α型特異的の遺伝子, hsg : 一倍体特異的の遺伝子, α2抑制 : α2タンパクによる発現抑制, α1-α2抑制 : α1-α2複合体による発現抑制.

する。α2タンパクは、単独でa型特異的遺伝子群 (asg) の転写を抑制する(α2抑制)。一方、α2タンパクは、a1タンパクと複合体を形成し、1倍体特異的遺伝子群 (hsq) (あるいはa/α特異的遺伝子群とも言う) の転写を抑制する(a1-α2抑制)。a型細胞とα型細胞が接合してa/α 2倍体になると、α2抑制、a1-α2抑制によってasgもαsgも発現できず非接合となる。

実用酵母の非接合性の原因は色々と考えられるが、清酒酵母協会7号などでは、正常なa、α接合型情報の共存によって非接合性となっていることがわかった。そうであれば、以下のような方法で接合能を回復させることが可能であろう。たとえば、非接合性からα型にするためには、α2抑制は正常であるが、a1-α2抑制のみ欠損とするような変異遺伝子を創り出せばよい。その変異遺伝子を実用酵母に導入すれば、α接合能を回復させることができる。しかし、実用酵母は多くの場合高次倍数体であるので優性の変異を取得する必要がある。

7-2) a1-α2抑制のみが欠損となる3種の変異株の分離

優性の変異が分離できるかどうかはやってみないとわからないが、まずは、優性、劣性にかかわらず、上記で想定したような変異株が分離できるか否か研究を行った。MATa HMLα HMRa sir3 遺伝子型一倍体株 (sir3 変異のため、MATa HMLα HMRa のすべての遺伝子座で接合型情報が発現し、α2抑制、a1-α2抑制が発揮される) を親株として分離を試みたところ、幸いにも、3種の遺伝子座に起こった変異株が分離できた²¹⁻²³⁾。一つは、HMLα 遺伝子座のα2タンパクにミスセンス変異が起こったもの (hmlα2-102) であり²¹⁾、あとの二つはMAT、HML、HMR以外の遺伝子座に起こった変異であった。これらの変異を、aar1 (a1-α2 repression)、aar2 変異と命名した。クローニングの結果、AAR1 遺伝子はTUPIとして知られていたグローバルリプレッサーであったが²²⁾、AAR2 遺伝子は、355アミノ酸からなる機能未知のタンパクをコードする遺伝子であった²³⁾。後の研究によって、AAR1 (= TUPI) は、α2抑制においてα2ホモ二量体と、また、a1-α2抑制においては、a1-α2ヘテロ二量体と複合体を形成していることが明らかにされる。TUPIはDNA結合能をもっておらず、当時、DNA結合能を持っていないグローバルリプレッサーとして、さまざまなDNA結合タンパクと複合体を形成し多様な遺伝子の転写を抑制するとのモデルを提示したのが目に止まったのか、文科省科学研究費「転写特定」に入れていただいた。

AAR2はどのような遺伝子なのか。出芽酵母には、イントロンを持つ遺伝子はほとんどないが、珍しい例の一つが、a1 pre-mRNAである。a1 pre-mRNAは短いイン

トロンを二つ持っているが、aar2変異株ではa1転写産物が長くなっていることに気がついた。しかし、不思議なことにイントロンを持つことが知られていたACT1 pre mRNAでは、イントロンは正常にスプライシングされていた。aar2変異株は増殖阻害を示すが、aar2変異株に、イントロンを持たないMATa1 遺伝子を作製して導入すると、α接合型は相補され非接合型となったが、興味深いことに、増殖遅延の表現型は抑圧されなかった。この結果より、AAR2は、MATa1 pre-mRNA、およびイントロンを持つその他の増殖に重要な遺伝子のpre-mRNAスプライシングに関わっていると結論した²³⁾。AAR2 遺伝子については、その後、スプライシングの専門家による研究が行われており、最近、リン酸化を受けるU5 snRNPアセンブリー因子をコードすることが報告された。筆者らが命名したAAR2という遺伝子名が25年以上にわたって使われているのは感無量である。これらの結果より、a/α型のため非接合性となっている実用酵母、あるいは醸造酵母にα型を付与するには、i) α2タンパクあるいはAar1タンパクの中で、a1タンパクと相互作用する機能ドメインの優性変異か、あるいは、ii) Aar2タンパクの優性変異を創り出せばよいことがわかった。

7-3) a1-α2抑制欠損変異の高次倍数体育種への応用

興味深いことに、上記の研究で分離したα2-102変異は、簡単に高次倍数体を育種するために応用できることがわかった。a型細胞に、mata2-102変異を導入すると、α2抑制は正常で、a1-α2抑制のみ欠損となるので、細胞はα型を示す。したがって、この株は、再び、もとのa型細胞と交雑できる。造成した2倍体交雑体 (MATa/mata2-102) は、上記の理由によってα型を示す。したがって、この2倍体交雑体は、再びa型細胞と交雑可能であり、3倍体交雑体 (MATa/MATa/mata2-102) を育種できる。こうして、理論的には無限に交雑を繰り返すことが可能で、同質遺伝背景の高次倍数体を簡単に育種できる。もちろん、この方法では、a型細胞であればどのような遺伝背景の株でも交雑できるので、色々な雑種も育種できる(未発表)。酵母は、精密な遺伝解析が可能であるとの有利性によってモデル生物の一つとして位置づけられているが、一方では、動物細胞と比べて細胞のサイズが小さいため、細胞生物学的解析には不向きであると言われている。しかしこうした研究で作製した高次倍数体は、細胞が大きいことから、細胞生物学的解析のための有用な材料として、また、バイオテクノロジーの観点からは、物質生産における有用な菌株として応用可能であると思っている。

7-4) Dual modeで温度制御可能な宿主・ベクター系

の開発 遺伝子工学的物質生産では、使いやすい宿主・ベクター系が一つのキーポイントであり、その一つが、温度によって制御可能な宿主・ベクター系であることはPHO系の研究のところで述べた。そこで、接合型制御研究から構築したリソースである *MATa hmlα2-102 HMRa sir3-8^{ts}* 遺伝子型株を宿主として、dual modeで温度制御可能な宿主・ベクター系を構築した(図8)²⁴⁾。プロモーターとしては、分泌生産を想定し、細胞外に分泌されることが知られているα-ファクターをコードする *MFα1* のプロモーターと、pre-, pro-配列を用いた、*MATa hmlα2-102 HMRa sir3-8^{ts}* 遺伝子型を持つ宿主は、制限温度(37°C)で培養すると、*sir3-8^{ts}* 変異によって Sir3 タンパクが不活化され、*MAT*座だけでなく、*HML*、

*HMR*座の接合型情報も発現する。しかし、*a1-α2*抑制が欠損しているのでα型を示す。一方、許容温度(25°C)では、Sir3 タンパクは、*HML*、*HMR* 遺伝子の発現を抑制するので、宿主はa型を示す。α型細胞でのみ発現する遺伝子、あるいはa型細胞でのみ発現する遺伝子のプロモーターに生産物をコードする遺伝子を連結すれば、同一生産物であっても、あるいは違う生産物であっても、高温、低温での自在な生産が可能となる(図9)。

8) 実用酵母非孢子形成性の遺伝学的解析と実用酵母育種システムの構築

8-1) 清酒酵母協会7号はなぜ胞子を形成しないか

7-1) 項で述べたように、実用酵母は一般に胞子形成能を示さず育種を妨げる要因の一つとなっている。たとえば、清酒酵母協会7号と9号はほとんど胞子形成能がない。実用酵母を自由に胞子形成させることができれば、子孫を用いた交雑によって多様な性質を持つ酵母を育種することができる。当時、胞子形成制御についての基礎的な研究はいくつかなされていたものの、非胞子形成性の回復という観点からの研究はなかったように思う。こうした状況下、1988年に、イスラエルのSimchenによって、胞子形成の開始に重要な *IME1* 遺伝子のクローン化が、Cell誌に報告された。*IME1* mRNAは、グルコースや窒素源の非存在下、a/α細胞で誘導されるがa/aあるいはα/α細胞では誘導されない。その結果、a/α細胞でのみ胞子形成が起こる。そのメカニズムは、*IME1*の抑制に作用する *RME1* が、a/α細胞で働く a1-α2抑制シ

α2-102 変異はα2抑制は正常であるが、a1-α2抑制のみ欠損を示す変異

宿主: *MATa hmlα2-102 HMRa sir3-8^{ts}*

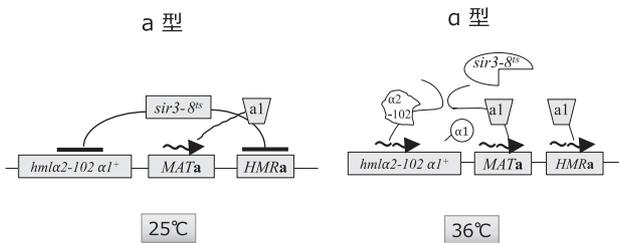


図8. α2-102変異を利用したdual modeで温度制御可能な宿主・ベクター系。sir3-8^{ts}温度感受性変異から生産されるSir3タンパクは、25°Cでは正常な機能を持つが、37°Cでは欠損となる。

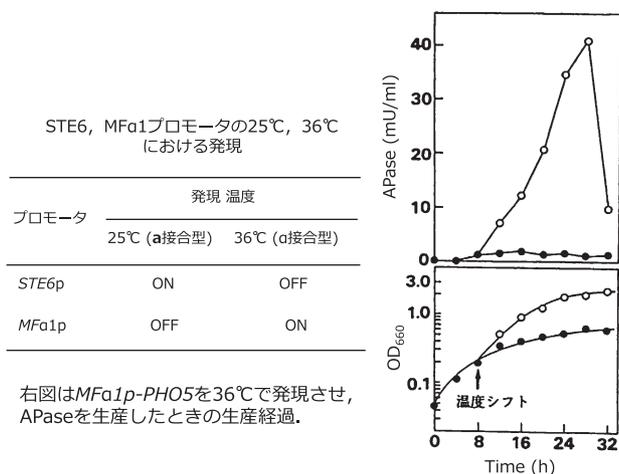


図9. Dual modeで制御可能な宿主・ベクター系による酵母の生産。モデルとして酸性ホスファターゼ (APase) を生産した。25°CではSTE6遺伝子のプロモーターが、36°CではMFα1遺伝子のプロモーターが作動する。ここでは、MFα1遺伝子のプロモーターの下流に酸性ホスファターゼ遺伝子の構造遺伝子部を連結した。●印、○印は、それぞれ25°C、37°Cでの増殖と生産量。

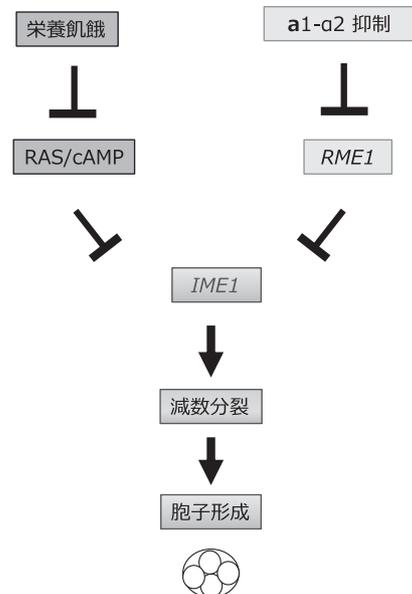


図10. 出芽酵母の胞子形成制御機構。IME1遺伝子の発現は、栄養飢餓とa1-α2抑制の2つの条件が満足されたとき誘導される。

テムにより抑制されるからである(図10).

清酒酵母について、非胞子形成性の原因を明らかにするため、*IME1*、*RME1* 遺伝子の転写を解析した。その結果、協会7号の*IME1*の発現レベルは低く、胞子形成培地でも誘導が起こらなかった²⁵⁾。しかし、*RME1*の転写がないことから、**a1- α 2**抑制は働いていると推察された。これらの結果より、協会7号は、*IME1* 遺伝子自身の機能欠損か、その発現制御に欠陥を持っており、そのために胞子形成しないことが示唆された。この結果より、協会7号酵母に多コピーで*IME1*を導入すると胞子形成能が回復するのではないかと考え、実験行ったところ、予想通り胞子形成能が回復した²⁶⁾。そこで、協会7号酵母から、さまざまな性質を持つ子孫が取得できるのではとの期待のもとに多くの胞子を分離したが、まったく発芽しなかった。

8-2) 清酒酵母協会7号の4倍体化による胞子発芽の改良 大変がっかりしたが、協会7号(2倍体)を4倍体にして胞子形成をさせれば発芽が起こるかもしれないと考えた。そこで、6-4)項で述べた**a**型細胞、 **α** 型細胞でそれぞれ特異的に発現する*STE6p-PHO5*、*MF α -PHO5* 融合遺伝子を、栄養要求性を持たない実用酵母用に、新しく開発したセルレニン耐性選択マーカー*PDR4*²⁷⁾を利用して協会7号に導入し、接合能を持つクローンをスクリーニングした。接合能を持つクローンを得たあと、それらのクローンを交雑して4倍体を造成し、それに*IME1* 遺伝子を導入した。予想通り胞子を形成したので、胞子を分離して発芽を行わせたところ、2倍体協会7号の場合と違って、4倍体協会7号酵母の胞子(2倍体)は効率よく発芽した。

そこで、九州の酒造会社で実際に使われている2種の

異なる吟醸酵母(K, Sとする)から、それぞれ**a**、 **α** の接合能を示すクローン(K-**a**、S- **α**)を分離後(図11)交雑し、*IME1* 導入によって胞子を形成させた後、四分子分析を行ったところ、予想通り発芽し、かなりの数の減数分裂分離株を得た。K株は低温に強いが、醗過程で高泡を形成する欠点を持ち、S株は、吟醸香が高く高泡を生じないが低温では発酵が遅延する欠点を持っている。減数分裂分離株のうち発酵試験で、吟醸香の主成分であるカブロン酸エチルの量が親株の1.5倍であった1株を使用して、総米1kgの小仕込試験を行った結果、端麗で吟醸香の高い清酒が得られた。また、仕込中の醗経過から、この酵母は高泡を形成しないことがわかった。このように、i) 優性のセルレニン耐性遺伝子による形質転換系²⁷⁾、ii) 接合能検出カセットの利用¹⁹⁾、iii) *IME1*の過剰発現²⁶⁾、iv) 倍数性の増加による発芽の回復などの技術を組み合わせた一連の育種システムが、実際に吟醸酵母の育種に有効であることを実証することができた(図12)。今後、本研究で開発した分子育種システムが、清酒酵母だけでなく、パン酵母、ウイスキー酵母、ビール酵母、アルコール製造酵母などに応用され、多彩な有用形質を持つ産業酵母が育種されることを願っている。

9) ゲノム機能工学研究室を主宰して

1996年に大嶋先生が退官された後、研究室を主宰する幸運に恵まれた。教授として、楽々と研究室を運営しておられる方も多いが、私自身は、研究テーマにしても、研究費の問題にしても、学生指導にしても、正直大変な重荷であると感じた。その頃、広島大学から母校の東京大学に教授として戻られた東江先生から、「文科省がゲ

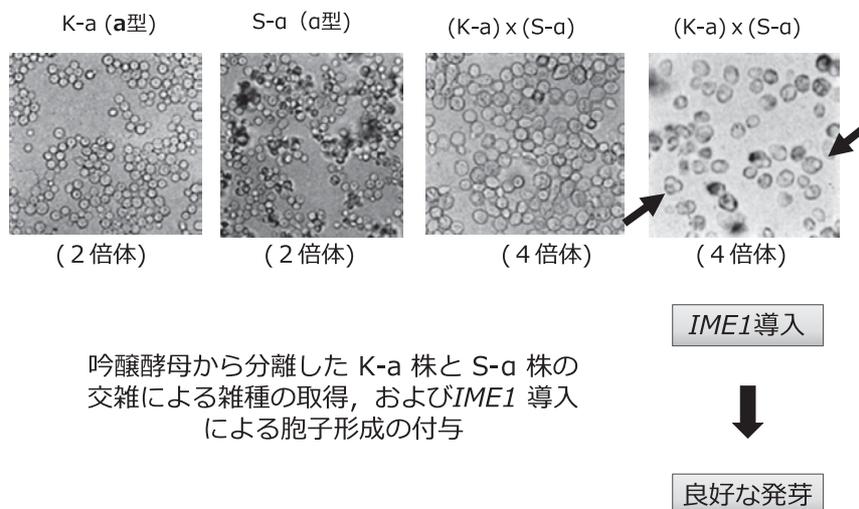


図11. 吟醸酵母間の雑種形成と *IME1* 遺伝子の導入による胞子形成。倍数性をあげると良好な発芽をしめた。

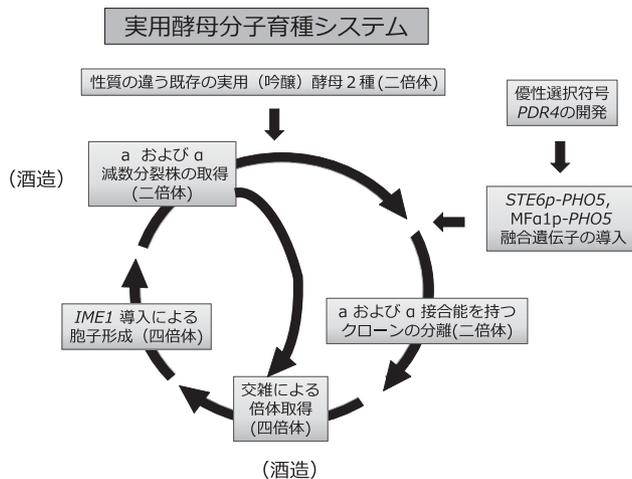


図12. 多様な性質を持つ実用酵母を交雑によって育種するシステムの構築。接合能、胞子形成能を示さない2株の実用酵母から出発し、最終的にはそれらの実用酵母間の雑種、およびそれから種々の性質を示す減数分裂分離株を取得するシステム。

ノムの特定期研究を計画しており、いくつかのモデル生物を、ゲノム研究の対象にすることを考えているらしい、特に、当初の目的としては網羅的な遺伝子破壊による機能解析を進めたいとのことだが、東大の私の研究室は学生が少なく、とても大規模な解析はできないと思う、もし、よければ推薦したい」という電話をいただいた。エレガントな？トリックによって突然変異株を分離することを生業とする遺伝学者として、網羅的な遺伝子破壊は、そのアイデンティティーを投げ捨てたようなアプローチであり、こうした“言わばなりふりかまわないアプローチ”をすることに正直ためらいはあった。しかし、大嶋先生が退官をされ、教授として研究室を主宰するようになった時でもあったので、正直なところ研究費にも大いに不安があった。色々なことを考えた結果、推薦をしていただくことにした。これが、新しいテーマとして（後述）、出芽酵母「プロテインホスファターゼのゲノムサイエンス」を始めた経緯である。その後、10余年にわたり科研費「ゲノム特定」に御世話になることになり、研究費の面では大いに助けられた。また、この時学んだ大規模、網羅的というゲノムサイエンスの研究スタイルは、後年、いくつかのテーマを進める上で大いに活用することになる。

研究室を主宰するにあたって、研究室名を改称したいと思い、大嶋先生にご相談を申し上げた。その当時の研究室名は、「生物情報工学」であったので（当初の「微生物遺伝学研究室」から、学科改組の時に、大嶋先生は「生物情報工学」と研究室名を変えられた）、名称を変えることについてお叱りを受けるかもしれないと思ったが、長く続いた研究室名を踏襲するのは良い考えではない、

君自身の色彩を反映する名前とすべきであるというお言葉をいただいた。それに意を得て、研究室名を「ゲノム機能工学研究室」と改称した。しかし、白状すれば、研究室名を変えても、研究テーマは、相変わらず、「育種理論の確立」と「育種技術の開発」であり、名前が変わっただけと言われても、返す言葉はない。しかし、その時、「育種理論」と「育種技術」の両分野にまたがって研究を推進するエンジンとして、「ゲノム工学技術の開発と応用」を研究室のテーマの一つの柱にしたいと思った。その理由は、ゲノム工学技術が、ゲノム機能を明らかにするための基礎生命科学への応用だけでなく、酵母のバイオテクノロジー、特に育種への応用に新しい展開をもたらすのではと思ったからである。もちろん、それまで続けてきたシグナル伝達系の研究も進める一方、産業酵母の育種に重要な、多様なストレスへの応答メカニズムの解明、そして実際に使えるストレス耐性酵母の育種など、より応用的なテーマも行うことにした（図13）。次項からは、ゲノム機能工学研究室を主宰することによって新たに開始した研究の一端を紹介したい。

9-1) プロテインホスファターゼのゲノムサイエンス
出芽酵母は真核生物で初めてゲノムの全塩基配列が決定された生物である。1996年の5月のことであるが、1990年代の初めに配列決定プロジェクトが計画され、我が国においても主要な酵母研究グループに参加を要請する動きもあった。しかし、ほとんどの研究室は積極的ではなかったように思う。それは、配列決定がいわば“作業”と考えられていた時代であり、多くの教授の先生方は、研究室員にそうした“作業”をさせることを躊躇されたためと思う。しかし、配列決定以降、時代はあつと言ふ間に進み、「ゲノムサイエンス」と呼ばれる学問が台頭した。ゲノムサイエンスがどのような学問であるかを正確に定義することは簡単ではないが、語弊を恐れずに言えば、個々の生命現象の理解の積み重ねから生命を理解するという従来の考え方ではなく、生命の全体像を丸ごと理解しようとする考え方である。また、その研究スタイルの特徴は、「大規模」で「網羅的」ということであり、あるステージではマンパワーが必要な研究であるとも言える。

さて、ゲノムの全塩基配列が明らかにされた時、それまで遺伝学や生化学によって同定されていた遺伝子が、全遺伝子の半数にも満たなかった事実は、筆者にはかなりの驚きであった。酵母遺伝学の始まりを Lindegren 夫妻によってヘテロタリック株が発見された1943年とすれば、それ以来、半世紀もの間にわたって、酵母遺伝学者は永々と多くの突然変異株を分離してきた。その結果、ゲノムの配列が決定される頃には、色々なトリックを弄

ゲノム機能工学研究室
(現在のテーマ)

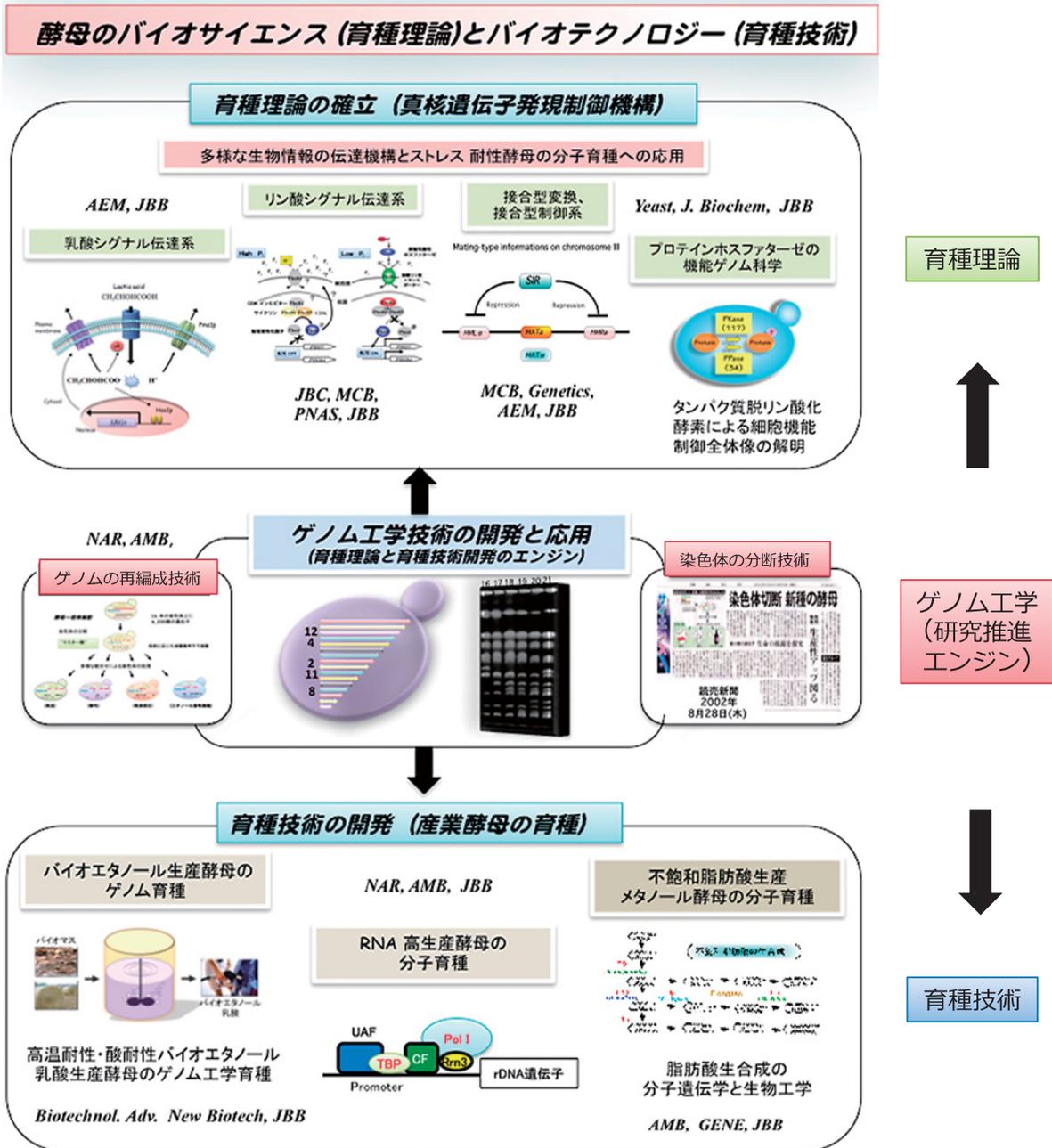


図 13. ゲノム機能工学研究室の現在の研究テーマ

しても、なかなか新しい変異株が分離できないと実感していた酵母遺伝学者も少なくなかったように思う。なぜだろうか？理由はいくつか考えられるが、その一つとして、同様な機能を持つ遺伝子が複数あり、その一つが変異しても表現型として現れない、いわゆる「機能重複の問題」が考えられる。機能重複を示す遺伝子は、突然変異株の分離によって、その存在を認識するという従来の

アプローチでは発見が困難である。

細胞生理は、色々なメカニズムによって調節されている。その代表的なものはタンパク質のリン酸化、脱リン酸化であろう。出芽酵母ゲノムの配列決定がなされた時、さまざまな細胞生理に関係すると考えられる機能重複遺伝子はいくつも予想されたが、タンパク質のリン酸化にかかわるタンパク質リン酸化酵素 (PKase) が117種、

またタンパク質の脱リン酸化にかかわるプロテインホスファターゼ(PPase)が32種存在するとされた(現在では、PKaseは129種、PPaseは40種同定されている)。筆者らは、当時、PKaseに比べて圧倒的に知見が乏しかったPPaseを取り上げることとした。そして、すべてのPPaseの細胞生理における役割を明らかにするため、当初から、32種のPPaseの単独破壊株だけでなく、すべての組合せ(破壊が致死となる二つのPPaseを除く30種について435通り)の二重破壊株を作成することを目的とし、実際に世界に先駆けて作製した^{28,29)}。さらに、その後、破壊しても致死とならない110のPKaseといくつかのPPaseとの二重破壊株や³⁰⁾、PP2CクラスのPPase(*PTC1*~*PTC7*)については、すべての組合せである127種の多重破壊株³¹⁾など、合計1000株に及ぶ破壊株を網羅的に作製し、種々の表現型や機能重複を見いだした³²⁻³⁴⁾。今後は、これらの破壊株リソースを活用し、さらに多くの表現型解析や、トランスクリプトーム、プロテオーム解析などの多面的なアプローチによって、出芽酵母、ひいては真核生物におけるタンパク質の脱リン酸化による細胞機能制御の全体像を明らかにしたいと考えている。

9-2) 不飽和脂肪酸, 低温, 酸素シグナルの伝達機構

清酒やビールの醸造において酵母の低温での増殖能、発酵能、吟醸香生成能は重要な形質であり、こうした形質には不飽和脂肪酸(UFA)の生合成が関係している。UFAは、飽和脂肪酸から脂肪酸不飽和化酵素によって生成するが、出芽酵母の場合、その遺伝子*OLE1*は $\Delta 9$ -脂肪酸不飽和化酵素をコードしており、低温誘導性である。吟醸酒の醸造では原材料の米を70%以上削るが、その理由は、米粒の外側に多く含まれているUFAによって、吟醸香の生成に関与する遺伝子群の発現抑制が起こるからであると考えられている。さらに、*OLE1*による脂肪酸の不飽和化には酸素が必要である。したがって、*OLE1*の発現制御には、低温、不飽和脂肪酸、そして酸素の3つのシグナルが関係する。一般に複数のシグナルの支配下にある高等真核生物遺伝子のモデルとして、低温、酸素、不飽和脂肪酸による3種のシグナルへの応答機構への基礎生物学的興味とともに、不飽和脂肪酸が存在しても、それらの遺伝子群が発現すれば、吟醸香が生成するのではという非常に単純な考えの応用的興味もあって、*OLE1*の発現制御の研究を始めることにした。当時、*OLE1*遺伝子の発現は、小胞体膜結合性の二つの転写因子Spt23とMga2が報告されてはいたが詳細は不明であった。しかし、不飽和脂肪酸、酸素、低温シグナルによる*OLE1*の発現制御の研究から、Mga2が、真核生物における初めての低温および酸素のセンサーであることを明らかにすることができた³⁵⁻³⁷⁾。

9-3) グローバル転写制御因子の研究と発現ベクター増強への応用

遺伝子工学的物質生産で生産収率に関係する重要な要素の一つは発現ベクターである。発現ベクターには当然ながら強いプロモーターが使われる。1980年代の後半、遺伝子工学的物質生産がさかんに行われるようになったとき、色々な企業の研究者の方々から、酵母で遺伝子工学によって有用物質を生産することを考えているが、どのような宿主、どのような発現ベクターがベストなのか教えて欲しいという相談を頻繁にうけた。当時もそして今も、構成的に発現する強いプロモーターであれば、解糖系遺伝子(*TDH3*, *ENO1*)のプロモーター、誘導可能な発現プロモーターとしては、ガラクトースで誘導できる*GALI*プロモーター、あるいはリン酸の飢餓により誘導される*PHO84*のプロモーターくらいが使われており、それほど新規なものが開発されているとは思わない。こうした既存の強いプロモーターに変異をかけ、さらに強いものを取ろうとする試みもあったようには思うが、いくら変異をかけても、天然のものより強いプロモーターを分離することはできないということが結論であったように記憶している。私たちも、*PHO5*レポーターを利用したプロモーター検索ベクターを使って、酵母で既存のプロモーターよりさらに強い、最強のプロモーター活性を示すDNA断片をクローニングしようとしたときもあった。しかし、そうしたDNA断片をクローン化することはできなかった。

真核生物遺伝子の転写制御のことを研究しなければと思うようになったのは、上記のように生産収率の向上に発現ベクターが重要であると思ったこともあったが、それより少し前に、グローバル転写因子*TUP1*の課題で、科研費の「転写特定」に入れていただいたとき、ヌクレオソームやクロマチンレベルでの転写制御研究が世界的には相当な勢いで進んでいる事を痛感し、基礎的な観点からもきちんと勉強をしなければ、バイオテクノロジーへの応用もできないのではと思う気持ちが強かったからのように思う。そうした状況のもとで考えたことは、プロモーターの発現を増強するような宿主の変異であり、アプローチとしては、転写活性化因子(あるいは転写活性化因子が働くのに必要な因子)の不在下でも強い転写が起こる変異株を取得し、その後、もともとの転写活性化因子を導入すれば、天然のものを凌駕した強いプロモーター活性を発揮できる宿主を構築できないだろうかということであった。こうした考えのもと、*PHO5*レポーターを利用して、多くの変異株(*rbt1*~*rbt6*, *bel2*~*bel7*)を分離した³⁸⁻⁴¹⁾。それらの変異には、既存の変異株*sin4*(=*bel2*), *rgr1*, *tup1*, *ssn6*も含まれていたが、新しい変異株もあった。これらの変異のいくつかは染色

遺伝子型	PHO5の発現			
	APase 活性(mU/OD ₆₆₀)		APase 活性染色	
	+PI	-PI	+PI	-PI
<i>BEL2 PHO4</i>	2	37		
<i>BEL2 Δpho4</i>	1	1		
<i>bel2 PHO4</i>	34	54		
<i>bel2 Δpho4</i>	29	19		

図14. グローバル転写抑制因子の変異を利用した発現プロモーター増強法。クロマチン構造の欠損を引き起こすグローバル転写抑制因子 *BEL2* の変異株を宿主として、RNAポリメラーゼをリクルートする遺伝子特異的転写活性化因子 *PHO4* を働かせると、野生型株を宿主とした場合より転写活性化レベルが上昇する。

体における位置依存効果を示すこと、ヌクレオソーム構造に影響する変異とは異なる表現型を示すことなどから、高次のクロマチン構造に影響する変異であろうと考えた。そこで、そうした変異株を利用して、実際に上記の考えが正しいことを、*PHO5* プロモーターを例として調べたところ、期待通り、野生型株における発現よりも高い発現が得られることがわかった(図14)³⁹⁾。また、アミノ酸が十分あるときには *GCN4* による転写活性化が起こらない *HIS5* プロモーターにおいても、*bel3* 変異と *GCN4* の共存下では野生型株の10倍の転写が得られることを示すことができた³⁹⁾。

転写活性化因子は、一般にRNAポリメラーゼII(RPase II)をリクルートすることによって転写を活性化すると考えられている。しかし、その前に、RNAポリメラーゼ自身が転写開始点近傍にアクセスする必要がある。その効率は、ヌクレオソームや高次のクロマチン構造によって支配されていると考えられている。筆者らの研究によって、ヌクレオソームと高次のクロマチン構造に影響する変異は、その効果が加算的であり、そうした2種の変異を宿主に持たせることによって、転写の活性化が、高次のクロマチン構造のレベル、ヌクレオソームのレベル、そして転写活性化因子がRPase IIをリクルートするレベルの三層のレベルで加算的となり、発現プロモーターを最大限に働かせることができることが明らかになったと考えている³⁸⁻⁴²⁾。残念ながら、こうした知見を取り入れて、モデル生産物ではなく、実際に有用な生産物の遺伝子工学的物質生産を行うまでには至っていない。しかし、こうした研究からの知見は、後に、うま味調味料として有用なRNA高生産酵母の育種をするときの育種戦略にも応用した⁴³⁾。

9-4) バイオエタノール生産酵母の育種 再生可能なエネルギー源としてバイオエタノールの生産には、多くの場合 *S. cerevisiae* が使われるが、その生産菌株には、生産コスト削減のためにさまざまな性質が要求される。生産コストの面から有利な糖化と発酵を同時に進める並行復発酵 (Simultaneous Saccharification and Fermentation: SSF) を想定する場合には、特に、高温耐性が重要である。その理由は、セルロース系基質の糖化に必要なセルラーゼの至適温度が50°C付近であるのに対し、一般的な *S. cerevisiae* 酵母の生育至適温度は30°Cであるので、できるだけ高い温度での旺盛な増殖とエタノール発酵能を示す高温耐性株が必要であるからである。また発酵熱のために温度が上昇する発酵タンクの冷却コストを低減するためにも、高温耐性は重要である。

S. cerevisiae の遺伝学研究が始まって以来半世紀を超えるが、それにもかかわらず、生育限界温度のチャンピオンデーターは41°Cであり、これ以上の温度で、“旺盛”に増殖する *S. cerevisiae* 菌株が自然界から分離されたり、育種されたりしたとの報告はない(図15A)。高温耐性株の論文を読む場合、当該の高温でかろうじて生存しているだけなのか、それとも、その温度で“旺盛”とまでは言えなくとも、かなりの程度の良い増殖を示すのかということとを、きちんと区別して議論する必要があることを指摘しておきたい。さて、それぞれの生物には、高温側にも低温側にも生育の限界温度があるが、それが、どのようなメカニズムで規定されているかについては、いまだによくわかっていない。筆者らも、実用酵母育種研究の一環として、基礎生物学の観点からは、高温耐性メカニズムについて、また、バイオテクノロジーの観点からは、高温耐性を持つバイオエタノール生産酵母の育種を目指して、研究を開始した。マヒドン大学(タイ、バンコク) Boonchird博士との共同研究によって、41°Cでも旺盛に増殖する *S. cerevisiae* 株 (Htg⁺株) を分離した(図15B)。この株と高温感受性株 (Htg⁻) との交雑をはじめとする種々の遺伝学的な解析によって、41°Cでの旺盛な増殖には6つの優性に働く遺伝子アレル (*HTG1*~*HTG6*と命名) が関与していることを明らかにした⁴⁴⁻⁴⁷⁾。また、そのうちの *HTG2* と *HTG6* をクローン化し、*HTG2* がピルビン酸キナーゼをコードする *CDC19* であり、*HTG6* が E3 ユビキチンリガーゼをコードする *RSP5* であることを明らかにした^{44,46)}。高温耐性株からクローンした *RSP5* 遺伝子アレル (*RSP5-C*) は、転写上昇を引き起こす塩基置換をプロモーター部に持っていたが、*RSP5-C* アレルを高温耐性株で過剰発現すると旺盛な増殖の上限温度が42°Cに上昇することも見いだした(図16)。ピルビン酸キナーゼはATPを生成する

***S. cerevisiae* 高温耐性株 (C3723, C3751) の分離と増殖表現型**

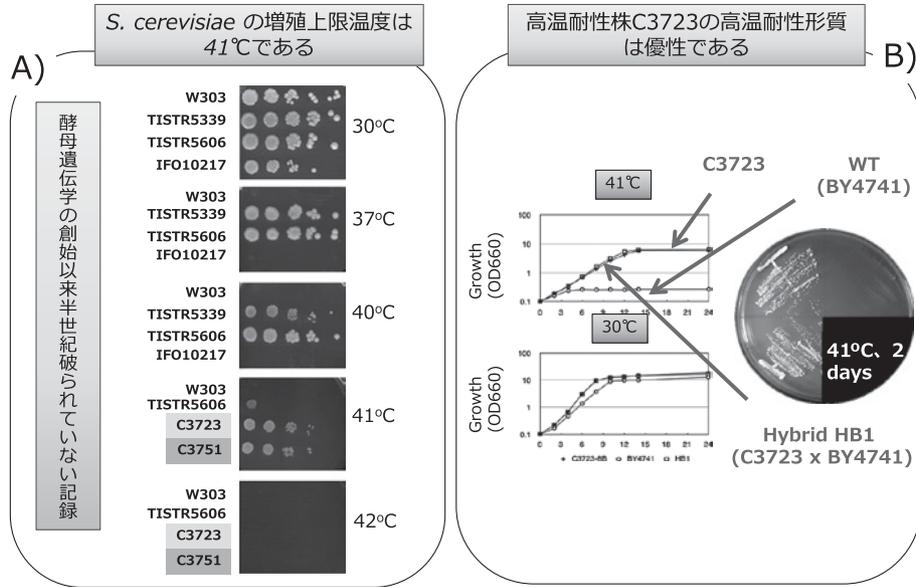


図15. *S. cerevisiae* 高温耐性バイオエタノール生産株の分子育種. C3723, C3751はバンコクで分離した高温耐性株. W301, TISTR5606は高温感受性株.

RSP5-C アレルの過剰発現は上限温度を上昇させる

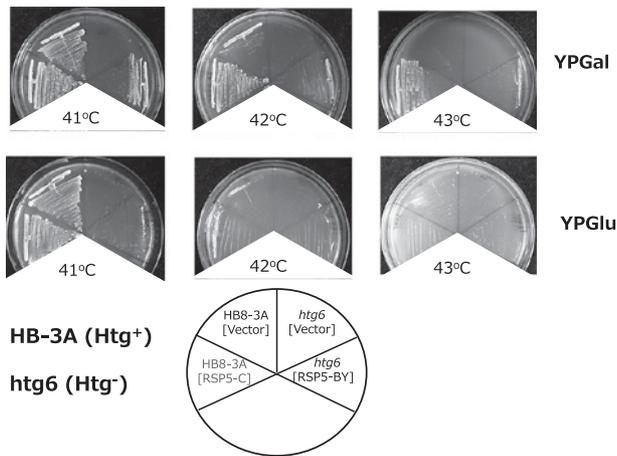


図16. RSP5-Cアレルの過剰発現による増殖上限温度の上昇. バンコクで分離した高温耐性株は41°Cで旺盛な増殖を示す. 高温耐性株から単離したRSP5-Cアレルを過剰発現させると, 増殖の上限温度が41°Cから43°Cに上昇する.

反応を触媒する. 一方, E3ユビキチンリガーゼは, タンパク分解に広く関与する酵素であり, どちらも細胞生理に広く関与していることが想定される. たった1°Cの上限温度の上昇と思われるかもしれないが, 高温耐性のような性質は多くの遺伝子によって支配されていることを考えると, この研究は, 高温感受性株に高温耐性を付与するには, 広範な細胞生理に影響を与える遺伝子进行操作することが有効であるとの一つの重要なヒントを与え

てくれた研究であったと思っている.

9-5) 乳酸ストレスシグナル応答機構と酸耐性酵母の分子育種

酸耐性は, 乳酸などの酸性物質の生産において重要な性質であるだけでなく, 基質を殺菌せずとも, 酸性に弱い細菌の汚染を防止できることから, 種々の発酵生産のコスト削減のためにも重要である. 酵母による乳酸生産に有用な菌株の育種を目的として, 5000株からなる破壊株シリーズから, その破壊が乳酸感受性, あるいは乳酸耐性を引き起こす遺伝子群を同定した. また, 乳酸耐性破壊変異を重ねることによって乳酸耐性だけでなく, 乳酸の生産性も向上することを明らかにした⁴⁸⁾. さらに, 過剰発現が乳酸耐性を付与する遺伝子をスクリーニングし, 転写因子HAA1を同定した. HAA1については, 分子メカニズムを解析し, 脱リン酸化により核移行が重要な働きをしていることを明らかにすることができた⁴⁹⁾.

9-6) RNA 高生産酵母の分子育種

うま味調味料はさまざまな食品に使用されており, 今日の世界において欠かすことはできない. また, 2013年には和食がユネスコの無形文化遺産に登録され, 和食の繊細な味わいを醸し出す“うま味”について世界が注目しているところである. 核酸系うま味調味料であるグアニル酸やイノシン酸は微生物由来, 特に酵母由来のRNAを原料として酵素分解法により生産されるため, RNA高含有酵母の育種は産業上有用である. RNAの約80%はリボソームRNA (rRNA) であるので, RNA含量を増やすため

にはrRNA量を増やすことが有効である。RNA高含量酵母としては、以前より自然界から分離した酵母が使われているが、積極的な育種は行われていない。その理由は、約150コピーあるrRNA遺伝子のコピー数を増加させる方法論や、rRNA遺伝子転写の恒常性維持機構(feedback inhibition)の複雑さにより転写を上昇させる方法論がないことによる。こうした問題を解決することによって、RNA含量を2倍にでも増加させることができれば産業的な意義には大きなものがある。そこで核酸系うま味調味料の供給源であるRNAを高生産する酵母を育種するため、i) リボソームRNA (rRNA) 転写の上昇と、ii) rDNAのコピー数増加の戦略を取ることにした。i)では、rRNAの転写活性化に必須の遺伝子(*RRN5* および*RRN10*)の破壊株から抑圧変異株を分離し、feedback制御を解除後、野生型*RRN5*あるいは*RRN10*遺伝子を導入した。ii)では、ゲノム工学を利用して、約150コピーあるrDNA遺伝子を一挙に約300コピーとした。その結果、*rrn5*あるいは*rrn10*破壊株のいずれを出発株とした場合にも、野生型株の約2倍のRNAを生産する酵母を育種することでできた⁵⁰⁻⁵²⁾。

9-7) メタノール酵母 *Hansenula polymorpha* の脂質分子生物学 飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸は生体膜の主要な構成成分であり、生物が生きていくために必須の生体物質である。しかし、ヒトをはじめとする高等動物は限られた不飽和脂肪酸しか合成できず、植物などから摂取しなければならない。一方、微生物は多彩な不飽和脂肪酸を生産するが、遺伝子学的な取扱いが容易な酵母では、そうした不飽和脂肪酸を、自在な比率で、効率良く生産するバイオテクノロジーは、まだまだ確立されているとは言い難い。それは、いつに、不飽和脂肪酸、特に多価不飽和脂肪酸の生合成系とその遺伝的制御メカニズムについての知見が充分でないことによる。

真核生物のモデルとして基礎生命科学の材料となっている *S. cerevisiae* は、不飽和脂肪酸としてオレイン酸(18:1)しか生産せず、多価不飽和脂肪酸の生合成系を持っていない。筆者らは、リノール酸(18:2)やリノレン酸(18:3)も生産し、*S. cerevisiae*と同様、精密な遺伝解析が可能で、宿主・ベクター系も利用できるメタノール資化酵母、*Hansenula polymorpha*、をモデルに、「真核生物における不飽和脂肪酸の生合成系とその制御機構」の全貌を明らかにしたいと考えた。これまでに、*H. polymorpha*の脂肪酸、あるいは不飽和脂肪酸の生合成にかかわる、ほぼすべての遺伝子をクローン化し、脂肪酸の鎖長制御のメカニズムなどについての知見を得ることができた⁵³⁻⁵⁷⁾。この研究は、筆者らの研究テーマの中では、「真核生物遺伝子の発現制御機構」を明らかにす

る基礎生物学的研究の色彩が強いが、その他の研究テーマと同様、最終的には、そうした基礎生物学の研究成果を基盤にして、安全で培養工学的にも扱いやすい酵母により、付加価値の高い多様な不飽和脂肪酸を自在に創り出すバイオテクノロジーにも貢献したいという意識も持って進めてきた研究である。

10) 酵母におけるゲノム工学技術の開発とゲノム機能の解明、育種への応用

10-1) 多様なゲノム工学技術の開発 組換えDNA技術の発展によって、遺伝子を自在に改変し、これを細胞に導入して野生型遺伝子と差し換えることが多くの生物で可能になった。20世紀の後半は、こうした革新的な生命工学基盤技術の発展によって、遺伝子の改変を通して細胞や生物個体の改造が可能になり、生命科学が大きく発展・変貌した時代と言える。多様な生物種でのバイオテクノロジーの発展も、多分にこうした技術に負っている。しかし、こうした技術によって、確かに遺伝子の改変は自在にできるようにはなったが、遺伝子が存在する場である染色体を自在に改変する技術、たとえば、染色体の任意の領域を取り除いたり(削減)、入れ替えたり(置換)、倍加したり(重複)、あるいは特定の染色体領域を取り出して(単離)、他細胞に移したり(移植)、さらには二つの染色体を一つにしたり(融合)する「染色体レベルでのゲノム操作技術」はいまだ、どのような生物においても確立されていないと言っても過言ではない。ゲノム機能工学研究室を主宰するにあたって、「育種理論」と「育種技術」の両分野にまたがって研究を推進する“研究推進エンジン”はどのようなものであろうかと考えた時、それは、「ゲノム工学技術」であると思うに至った。筆者自身、方法論を開発することが好きなきせいもあって、それ以来、「ゲノム機能の解明と育種へ

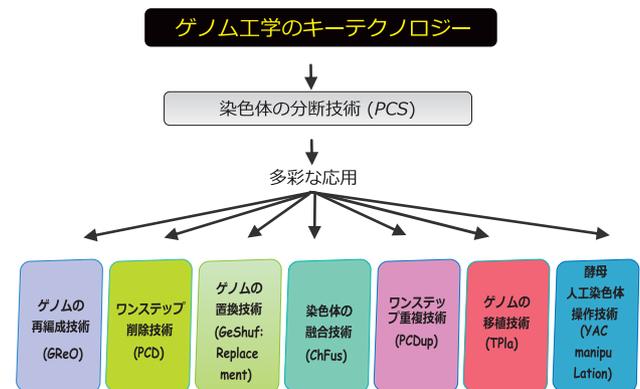


図17. ゲノム工学技術のキーテクノロジーとしての染色体分断技術とその多様な応用

の応用」を目的に、ゲノム工学技術の開発に注力してきた(図17)⁵⁸⁾。本稿の最後に、それらについて紹介したい。

ゲノム工学技術のキーテクノロジーとして、最初に開発した技術は、染色体を任意の部位で分断する技術であり、PCR-mediated chromosome splitting (PCS) 技術と命名した⁵⁹⁾。以下に述べるゲノム工学技術は、すべてPCS技術が基盤となっている。たとえば、染色体任意領域の欠失技術は、ワンステップで染色体の任意領域を削除できる技術であり、PCR-mediated chromosome deletion (PCD) 法と命名したが⁶⁰⁾、目的の削除領域を挟むように染色体を分断する。PCD法も、当該の染色体領域の機能解析と育種に非常に有用な技術である(後述)。ゲノムシャフリング技術は、二つの異なる菌株の染色体の任意領域を置換する技術である⁶¹⁾。この技術では、まず、置換したい領域を、染色体分断技術によって、それぞれ異なるマーカーを持つミニ染色体とした2株を交雑し、2倍体を造成する。その後、マーカーの脱落を指標にして、どちらかの親株由来のミニ染色体の脱落と、その後の他方の親株の相当する領域からなるミニ染色体の複製により、染色体の任意領域をいずれか一方の株由来のものになるよう置換する。さらにPCR-mediated chromosome segmental duplication (PCDup) と命名した技術は、ワンステップで、染色体の任意領域を重複する技術である(論文準備中)。PCSをキーテクノロ

ジーとして開発したこれらの技術に加え、醤油酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* で見つかったプラスミド pSR 由来の部位特異的な組換えを利用して任意の染色体を融合する技術 (ChrFus) も開発した⁶²⁾。これらの技術は、染色体数や⁶³⁾、染色体構造の細胞生理における意義⁶⁴⁾、酵母人工染色体 (YAC) にクローンされた高等動・植物染色体の操作など、ゲノム機能の解析や育種に応用できる^{65,66)}、以下に、最近の研究例を紹介する。

10-2) ゲノムの再編成技術とエタノール耐性酵母育種への応用 従来の育種技術の問題点は、i) 多大な時間と労力がかかる、ii) 単一または少数の遺伝子の操作しかできないということにまとめられよう。近年、この問題を解決するため、短時間で、一挙に多数の遺伝子、あるいは遺伝子発現を操作して、目的の細胞を創成する新しい育種技術が求められるようになった。こうした考え方に呼応して、筆者らは、特定の物質生産にもっとも適したゲノムを「ベストゲノム」と呼ぶことを提唱している。そして、ベストゲノムに到達する技術の一つが、「ゲノムの再編成工学」(GreO: Genome ReOrganization Technology) であり⁶⁷⁾、そのコンセプトは以下のようなものである。出芽酵母の1倍体は約6000の遺伝子を16本の染色体上に持つ(図18)。PCS技術によって、染色体を約50 kb以下の染色体に分断すると、そうした短い染色体では、体細胞分裂時に $10^{-3} \sim 10^{-5}$ の頻度で不



図18. ゲノムの再編成工学の概念と方法論。i) 染色体を分断後、非選択条件下で培養する。ii) 分断染色体は多様な組合せで脱落し、莫大な種類のゲノム組成を持つ細胞集団 (ライブラリー) が生成する。iii) この細胞集団を特定の条件下で培養すると、その培養条件下で不要な分断染色体はさらに脱落し、必要な分断染色体は保持される。こうして、特定の培養条件下での生存 (特定の物質生産) にベストなゲノム組成を持つ細胞がスクリーニングされる。

分離が起こり、娘細胞に正常に伝達されない(脱落する)ことが知られている。このことを利用すれば、染色体の分断と脱落によって天文学的な数のゲノムの多様性を創り出すことができる。たとえば、20個のミニ染色体を想定しただけでも約100万通り、30個のミニ染色体を想定すると約10億通りの多様性(組合せ)が作出可能である(図19)。

実際にこうした方法論が有効であるかどうかを、エタノール耐性酵母が分離できるかどうかで検証した⁶⁸⁾。PCS法を用いて1倍体酵母のゲノム(染色体)を分断し、必須遺伝子を含まず脱落可能と予想される12個のミニ染色体を持つ親株を作成後、8%のエタノールを含む培地で培養し、ゲノムの再編成を誘導した。その結果、親株よりも著しく増殖能が良いエタノール耐性株(ETY1~ETY8)を分離することができた(図20)。それら8株におけるミニ染色体の組成を調べたところ、いずれの株も、8番染色体の左端25 kbの領域、および14番染色体の右端35 kbの領域からなるミニ染色体が脱落していることがわかった。二つの領域には、それぞれ15個、10個の遺伝子があり、それらの遺伝子のなんらかの組合せの脱落が、顕著なエタノール耐性をもたらしていると想像された。これらの結果は、ゲノムの再編成工学が、新しい育種技術として有用であることを示した結果であると考えている。

10-3) ゲノムの新しい風景を求めて ゲノムの再編成工学技術の開発途上、非必須遺伝子のみからなる領域であるのに脱落しない領域があることを見いだした。このことから、その領域には、同時に欠失させると細胞が

致死となる、いわゆる合成致死遺伝子のペアがあるのではないかと想像した。酵母ゲノムに、そうした合成致死遺伝子がはたしてどれくらいあるかについては、1250万通り(=5000×5000÷2)の組合せについてSynthetic Genetic Arrayと呼ばれる方法論によって、系統的に調べられている。しかしこの方法では、減数分裂における組換えを利用して二重破壊株を作製するため、近接した遺伝子については、十分な研究が行われていない。ゲノムの再編成工学の問題とも関連すること、また、ゲノムの新しい風景が見えるのではと期待して以下の研究を行った。

まず、酵母ゲノムに、12 kb以上の長さで、非必須遺伝子が9個以上含まれている領域を110か所マップした

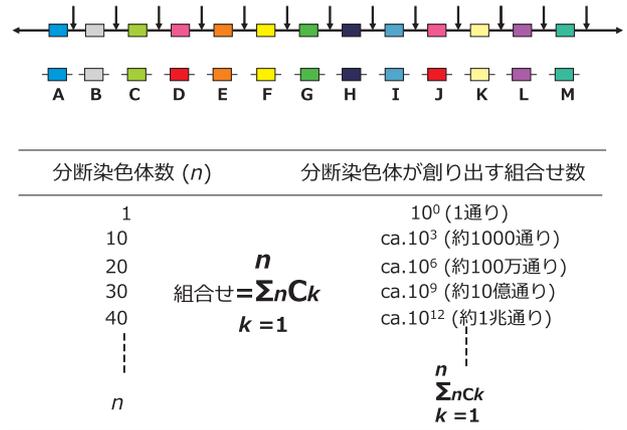
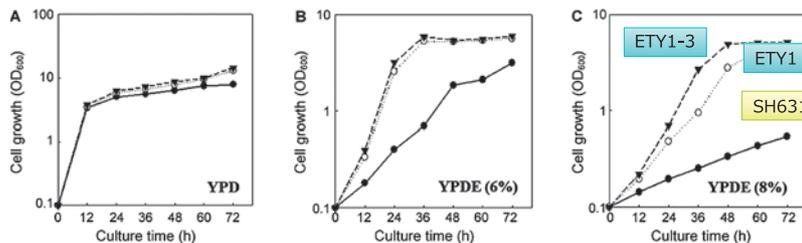
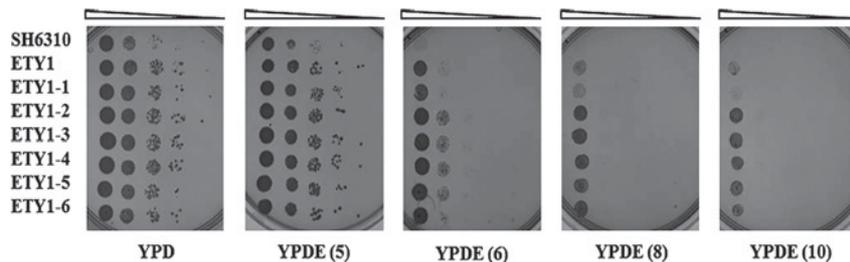


図19. n個の分断染色体とその脱落が生み出す膨大な種類のゲノムの多様性



Symbols: (●) SH6310, (○) ETY1, (▼) ETY1-3 strains.

図20. ゲノムの再編成工学によるエタノール耐性株の分離。YPDE (5)などの括弧の中の数字はエタノールの濃度(%)。

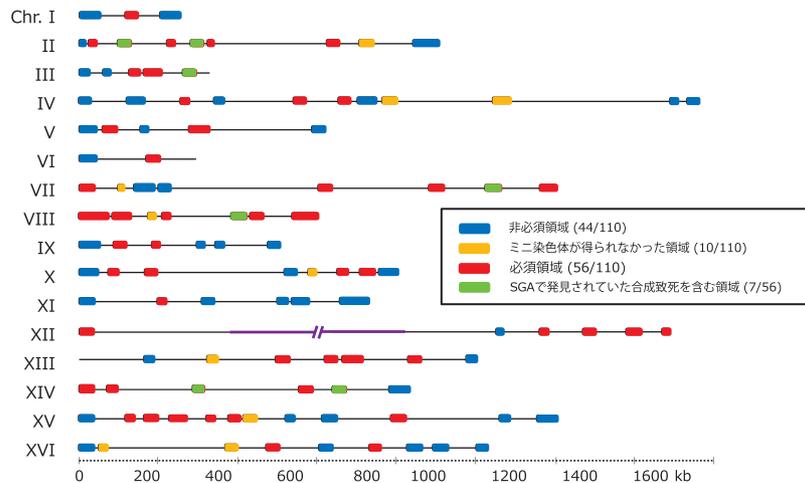


図21. 出芽酵母染色体の必須領域, 非必須領域のゲノムワイドマッピング

(図21)⁶⁹⁾. これらの領域が削除可能かどうかを、筆者らが開発したゲノム工学技術を利用して解析したところ、驚くべきことに、約半数の、少なくとも56領域が削除できないことがわかった(図21). これらのうち49領域は、これまでの研究で合成致死の遺伝子ペアが知られていない領域であった. この結果は、出芽酵母のゲノムには、合成致死を引き起こしたり、相互作用をする遺伝子ペアが数多く見いだされないうまま存在していることを示している. 我々はまだまだ見た事のないゲノムの風景(ランドスケープ)を見る事ができることを期待させるものである.

また、一方で、削除可能であった44領域のそれぞれの欠失株について表現型解析を行うと、高温、エタノールや硫酸などのストレスに対して耐性を示す株も見いだされた⁶⁹⁾. こうした結果は、ゲノムの大きな領域の欠失が、細胞にとって不利な表現型をもたらすだけでなく、バイオテクノロジーにとって有用な表現型を引き起こす事を示している. 今後、「ゲノムの再編成工学」を応用するにあたって必須の知見であるだけでなく、ゲノム機能の解明と育種への応用の観点からも有用な知見であると思っている.

11) 日暮れて道遠し

今回の受賞のお陰で、研究生生活を振り返る機会をいただいた. 研究テーマは、あるいは種々雑多に見えるかもしれないが、筆者自身の中では、「酵母を用いた真核生物遺伝子機能の解明とバイオテクノロジーへの応用」という課題を、「育種理論の確立」と「育種技術の開発」という二つの軸のもとで行ってきたつもりである. 大学院に進学してから43年、産業酵母の高次倍数体育種から始まった研究生生活は、酵母バイオテクノロジーの発展

とともに、結局は、「ベストゲノム」を持つ産業酵母の育種という目的に向かって進んできたようにも思える. 43年という年月は、若い人には気の遠くなるような年月かもしれないし、43年も経つのに何もできていないことを白日の下に晒すようで忸怩たる思いであるが、この間、酵母バイオテクノロジーの発展とともに過ごしてこられた幸運には感謝したい.

近年、微生物育種技術の進展が著しい. 目的とする有用物質の生産に素質のある微生物を自然界からスクリーニングし、突然変異を重ねていくこれまでの方法論が、いくつかのエポックメイキングな技術によって取って代わろうとされている. そうした技術の代表的なものは、「グローバル転写装置工学」, 「ゲノムシャフリング技術」, 「人工転写因子工学」, 「リボソーム結合部位改変工学」, そして筆者らが提唱している「ゲノム再編成工学」などである. さらに、それらに加え、最近では、「CRISPR/Cas」と呼ばれる画期的なゲノム編集技術も登場した. 筆者は、こうした一連の技術を「多様性創出ゲノム工学」という概念でまとめることができていると思っている. 「多様性創出ゲノム工学」とは、素材微生物(ゲノム)から出発し、ゲノムレベル、転写レベル、翻訳レベルの違いはあるにせよ、多数の遺伝子によって支配される有用形質を改変することを目的として、ゲノムを大規模に改変したり、転写や翻訳装置を操作して、一挙に多数の遺伝子の発現を変化させる工学のことである. そして、その結果、創り出された何億通りという多様なゲノム、多様な転写や翻訳プロファイルを持つ細胞集団の中から、目的の物質について、最高の生産収率を示す細胞、すなわち、「ベストゲノム」をスクリーニングするとのアイデアである. 一端、ベストゲノム(目的によって多数ある)を持つ細胞が取得できれば、そのゲノム組成や発現プロ

ファイル, プロテオーム, メタボロームなどを解析することによって, なぜベストゲノムなのかを明らかにするための基盤的な知見を得ることができよう。DNA合成のコストが下がれば, 将来, ベストゲノムを合理的にデザインし, 化学合成によって創成することが育種戦略として一般的になるかもしれない。残された課題は多いが, ゲノム機能の解析と微生物育種分野に, 「ゲノム工学」の有用性, 重要性を多少は示すことができたのではないかと思っている。残された課題については, これまで研究を支えてくださった共同研究者の方々や, これから研究生活に入ろうとする若い方々が解決し, さらに新しい展開を図ってくださるものと期待している。また, 筆者自身もあと少しの間, 取り組んでいきたいと思っている。

謝 辞

振り返ると, ほんとうに恵まれた研究生活を送ることができたことと感謝以外のなものもない。特に, 4年生の卒論配属以来, もう何十年にもわたって, ご指導をいただいている恩師, 大嶋泰治先生との出会いがなければ, 筆者の研究者としての人生はなかったように思う。東江昭夫先生(現東大名誉教授)と関 達治先生(現阪大名誉教授)にも多大な御指導をいただいた。研究面での交わりはなかったが, たまたま部屋が隣であったこともあり, 故・高田信男先生(当時研究室の助教授)には, 日常の色々なことについてアドバイスをいただいた。かつての同僚であった荒木弘之さん(現国立遺伝学研究所教授), 金子嘉信さん(現大阪大学酵母リソース工学寄附講座教授), 小川暢男さん(現米国ローレンスバークレー国立研究所), 向由起夫さん(現長浜バイオ大学准教授), そして現在のスタッフである杉山峰崇准教授, 笹野 佑助教との議論は大いなる刺激の源であった。さらに, 紙面の都合で, 一人ひとりのお名前をあげさせていただくことはできなかったが, 共同研究をしていただいた多くの先生方, そして, なによりも, 多くの才能ある学生諸君がいなければ, 筆者の研究生活は成り立たなかったことは言うまでもない。ここに改めて厚く御礼を申し上げる次第である。

文 献

- 1) Harashima, S., Nogi, Y., and Oshima, Y.: *Genetics*, **77**, 639–650 (1974).
- 2) Harashima, S. and Oshima, Y.: *Genetics*, **84**, 437–451 (1976).
- 3) Harashima, S. and Oshima, Y.: *Genetics*, **86**, 535–552 (1977).
- 4) Harashima, S., Sidhu, R., Toh-e, A., and Oshima, Y.: *Gene*, **16**, 335–341 (1981).
- 5) Harashima, S., Takagi, A., and Oshima, Y.: *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 771–778 (1984).
- 6) Takagi, A., Harashima, S., and Oshima, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 244–246 (1985).
- 7) Takagi, A., Chua, E., Boonchird, C., Harashima, S., and Oshima, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 123–129 (1985).
- 8) Harashima, S. and Hinnebusch, A. G.: *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 3990–3998 (1986).
- 9) Harashima, S., Hannig, E., and Hinnebusch, A. G.: *Genetics*, **117**, 409–419 (1987).
- 10) Oshima Y., Ogawa, N., and Harashima, S.: *Gene*, **179**, 171–177 (1996).
- 11) Bun-ya, M., Nishimura, M., Harashima, S., Oshima, Y.: *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 785–794 (1991).
- 12) Auesukaree, C., Homma, T., Tochio, H., Shirakawa, M., Kaneko, Y., and Harashima, S.: *J. Biol. Chem.*, **279**, 17289–17294 (2004).
- 13) Auesukaree, C., Tochio, H., Shirakawa, M., Kaneko, Y., and Harashima, S.: *J. Biol. Chem.*, **280**, 25127–25133 (2005).
- 14) Hiraoka, E., Murai, M., Yano, J., Bun-ya, M., Harashima, S., and Oshima, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 376–381 (1994).
- 15) Uchiyama, K., Ohtani, T., Morimoto, M., Shioya, S., Suga, K., Harashima, S. and Oshima, Y.: *Biotechnol. Prog.*, **11**, 510–517 (1995).
- 16) Harashima, S. and Kaneko, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 325–338 (2001).
- 17) Hwang, Y-I., Harashima, S., and Oshima, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 155–159 (1988).
- 18) Kunoh, I., Kaneko, Y., and Harashima, S.: *Yeast*, **16**, 439–449 (2000).
- 19) Shibasaki, S., Ninomiya, Y., Ueda, M., Iwahashi, M., Katsuragi, T., Tani, Y., Harashima, S., and Tanaka, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 702–707 (2001).
- 20) Nakazawa, N., Tsuchihara, K., Hattori, T., Akita, K., Harashima, S., and Oshima, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 1–6 (1994).
- 21) Harashima, S., Miller, A. M., Tanaka, K., Kusumoto, K., Tanaka, K., Nasmyth, K., and Oshima, Y.: *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 4523–4530 (1989).
- 22) Mukai, Y., Harashima, S., and Oshima Y.: *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 3773–3779 (1991).
- 23) Nakazawa, N., Harashima, S., and Oshima Y.: *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 5693–5700 (1991).
- 24) Kobayashi, H., Nakazawa, N., Harashima, S., and Oshima, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **69**, 322–327 (1990).
- 25) Nakazawa, N., Harashima, S., and Oshima, Y.: *J. Brew. Sci.*, **88**, 354–357 (1993).
- 26) Nakazawa, N., Ashikari, T., Goto, N., Amachi, T., Nakajima, R., Harashima, S., and Oshima Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 265–270 (1992).
- 27) Nakazawa, N., Harashima, S., and Oshima, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **76**, 60–63 (1993).
- 28) Sakumoto, N., Mukai, Y., Uchida, K., Kouchi, T., Kuwajima, J., Nakagawa, Y., Sugioka, S., Yamamoto, E., Furuyama, T., Mizubuchi, H., Ohsugi, N., Sakuno, T., Kikuchi, K., Matsuoka, I., Ogawa, N., Kaneko, Y., and Harashima, S.: *Yeast*, **15**, 1669–1679 (1999).
- 29) Sakumoto, N., Matsuoka, I., Mukai, Y., Ogawa, N., Kaneko, Y., and Harashima, S.: *Yeast*, **19**, 587–599 (2002).
- 30) Hirasaki, M., Kaneko, Y., and Harashima, S.: *Gene*, **409**, 34–43 (2008).

- 31) Sharmin, D., Sasano, Y., Sugiyama M., and Harashima, S.: *Yeast*, (2014). (in press).
- 32) Hermansyah, Laviña, W. A., Sugiyama, M., Kaneko, Y., and Harashima, S.: *Arch. Microbiol.*, **192**, 157–165 (2010).
- 33) Laviña, W. A., Hermansyah, Sugiyama, M., Kaneko, Y., and Harashima, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 138–146 (2013).
- 34) Laviña, W. A., Shahsavarani, H., Saidi, A., Sugiyama, M., Kaneko, Y., and Harashima, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **117**, 135–141 (2014).
- 35) Nakagawa, Y., Sakumoto, N. Kaneko, Y., and Harashima, S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **291**, 707–713 (2002).
- 36) Nakagawa, Y., Ueda, A., Kaneko, Y., and Harashima, S.: *Mol. Genet. Genomics.*, **269**, 370–380 (2003).
- 37) Nakagawa, Y., Sugioka S., Kaneko, Y., and Harashima, S.: *J. Bacteriol.*, **183**, 745–751 (2001).
- 38) Kunoh, I., Sakuno, T., Furukawa T., Kaneko, Y., and Harashima, S.: *J. Biochem.*, **128**, 575–584 (2000).
- 39) Harashima, S., Mizuno, T., Mabuchi, H., Tanaka, A., Yoshimitsu, S., and Oshima, Y.: *Mol. Gen. Genet.*, **247**, 716–725 (1995).
- 40) Mizuno, T., Nakazawa, N., Remgsamrarn, P., Kunoh, I., Oshima, Y., and Harashima, S.: *Curr. Genet.*, **33**, 239–247 (1998).
- 41) Mizuno, T. and Harashima, S.: *Mol. Gen. Genet.*, **263**, 48–59 (2000).
- 42) Mizuno, T. and Harashima, S.: *Mol. Genet. Genomics.*, **269**, 68–77 (2003).
- 43) Chuwattanakul, V., Kim, Y. H., Sugiyama, M., Nishiuchi, H., Miwa, H., Kaneko, Y., and Harashima, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 1–7 (2011).
- 44) Benjaphokee, S., Koedrih, P., Auesukaree, C., Asvarak, T., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Boonchird, C., and Harashima, S.: *New Biotechnol.*, **29**, 166–176 (2011).
- 45) Benjaphokee, S., Hasegawa, D., Yokota, D., Asvarak, T., Auesukaree, C., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Boonchird, C., and Harasima, S.: *New Biotechnol.*, **29**, 379–386 (2012).
- 46) Shahsavarani, H., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Chuenchit, B., and Harashima, S.: *Biotechnol. Adv.*, **30**, 1289–1300 (2012).
- 47) Shahsavarani, H., Hasegawa, D., Yokota, D., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Boonchird, C., and Harashima, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 20–23 (2013).
- 48) Suzuki, T., Sakamoto, T., Sugiyama, M., Ishida, N., Kambe, H., Obata, S., Kaneko, Y., Takahashi, H., and Harashima, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **115**, 467–474 (2013).
- 49) Sugiyama, M., Akase, S. P., Nakanishi, R., Horie, H., Kaneko, Y., and Harashima, S.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 3488–3495 (2014).
- 50) Chuwattanakul, V., Sugiyama, M., Khatun, F., Kurata, K., Tomita, I., Kaneko, Y., and Harashima, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 17–22 (2012).
- 51) Khatun, F., Sasano, Y., Sugiyama, M., Kaneko, Y., and Harashima, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 9011–9019 (2013).
- 52) Khatun, F., Kurata, K., Chuwattanakul, V., Sugiyama, M., Kaneko, Y., and Harashima, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 423–432 (2013).
- 53) Prasitchoke, P., Kaneko, Y., Bamba, T., Fukusaki, E., Kobayashi, A., and Harashima, S.: *Gene*, **391**, 16–25 (2007).
- 54) Prasitchoke, P., Kaneko, Y., Sugiyama, M., Bamba, T., Fukusaki, E., Kobayashi, A., and Harashima, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76**, 417–427 (2007).
- 55) Prasitchoke, P., Kaneko, Y., Bamba, T., Fukusaki, E., Kobayashi, A., and Harashima, S.: *Arch. Microbiol.*, **189**, 297–304 (2008).
- 56) Sangwallek, J., Kaneko, Y., Sugiyama, M., Ono, H., Bamba, T., Fukusaki, E., and Harashima, S.: *Arch. Microbiol.*, **195**, 843–852 (2013).
- 57) Sangwallek, J., Kaneko, Y., Tsukamoto, T., Marui, M., Sugiyama, M., Ono, H., Bamba, T., Fukusaki, E., and Harashima, S.: *Gene*, **533**, 110–118 (2014).
- 58) Sugiyama, M., Yamagishi, K., Kim, Y. H., Kaneko, Y., Nishizawa, M., and Harashima, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **84**, 1045–1052 (2009).
- 59) Sugiyama, M., Ikushima, S., Nakazawa, T., Kaneko, Y., and Harashima, S.: *Biotechniques*, **38**, 909–914 (2005).
- 60) Sugiyama, M., Nakazawa, T., Murakami, K., Sumiya, T., Nakamura, A., Kaneko, Y., Nishizawa, M., and Harashima, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **80**, 545–553 (2008).
- 61) Sugiyama, M., Yamamoto, E., Mukai, Y., Kaneko, Y., Nishizawa, M., and Harashima, S.: *Appl. Microbiol. Biotech.*, **72**, 947–952 (2006).
- 62) Widiyanto, D., Yamamoto, E., Mukai, Y., Oshima Y., and Harashima S.: *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 125–131 (1997).
- 63) Widiyanto, D., Yamamoto, E., Sugiyama, M., Mukai, Y., Kaneko, Y., Oshima, Y., Nishizawa, M., and Harashima, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 89–94 (2003).
- 64) Kim, Y. H., Ishikawa, D., Ha, H. P., Sugiyama, M., Kaneko, Y., and Harashima, S.: *Nucleic Acids Res.*, **34**, 2914–2924 (2006).
- 65) Kim, Y. H., Kaneko, Y., Fukui, K., Kobayashi, A., and Harashima, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **1**, 55–60 (2005).
- 66) Kim, Y. H., Sugiyama, M., Yamagishi, K., Kaneko, Y., Fukui, K., Kobayashi, A., and Harashima, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **69**, 65–70 (2005).
- 67) Ueda, Y., Ikushima, S., Sugiyama, M., Matoba, R., Kaneko, Y., Matsubara, K., and Harashima, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 675–682 (2012).
- 68) Park, A. H., Sugiyama, M., Harashima, S., and Kim, Y. H.: *J. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 184–189 (2012).
- 69) Saeed, K., Yamakawa, T., Sunada, K., Takagaki, T., Sasano, Y., Sugiyama, M., Kaneko, Y., and Harashima, S.: *Nucleic Acids Res.*, (2014).(in press)