



産業酵母のベストゲノムを求めて

原島 俊

はじめに

本特集の趣旨は、私どもシニアが、研究の中身よりむしろ研究を進めてきたその時々で考えたことを若い方々にお伝えし、エールを送ることがあることは理解しているつもりです。しかし、恥ずかしながら、研究生活を振り返ってみると、それぞれの場面で確固とした哲学があったわけでもなく、言わば流れるままに研究生活を過ごしてきたことを思い知らされました。とても哲学が散りばめられたような原稿は書けませんので、生い立ちから現在に至るまで、時間経過に従って、研究の中身と多少の個人的な回想を含めた原稿になってしまいましたこと、お許し願いたいと思います。

1) 生い立ち

私は、1949（昭和24）年5月21日、愛媛県今治市という小さな地方都市で、父、原島修、母、鈺子の長男として生まれました。父は愛媛県立今治工業高等学校機械科の教諭で、官立の旧制広島高等工業学校（現・広島大学工学部機械工学科）を卒業し、川崎重工業株式会社に勤めていましたが、終戦と同時に今治市に帰郷し、工業高校の教諭になったと聞かされました。後に、私が大阪大学で大変御世話になりました恩師のひとり、芝崎勲先生も当時、応用化学科で、父より2年上の学年におられたことを知りました。母は今治高等女学校を卒業して、現在の武蔵野音楽大学ピアノ科に進みましたが、戦争で中退せざるを得ない状況になり、東京から今治に帰郷しました。母の影響で、私は幼稚園に入学した頃からピアノを習い始めました。

2) 小学時代～高校時代

1955（昭和30）年4月に今治市立日吉小学校に入学しました。幼稚園の頃は、まだいやいやながらピアノを習っていたような気がしますが、小学校に入学してから、将来は音楽大学（作曲科）に行きたいと思うように

なつたと記憶しています。この夢は結局、「音楽で飯を食っていくほどの才能はない、もっと堅実なことを考えなさい」という父のアドバイスによって断念しましたが、小学校の高学年の頃からジャズを聴いていた結構ませた小学生でした。音楽家になる道は断念しましたが、今に至るまで、音楽、特にジャズは、私にとっては生涯の趣味であり、小さい時に音楽に導いてくれた母、そして「音楽を仕事にする程の才能はない」とアドバイスしてくれた父には大変感謝しています。ここで音楽の道に進んでいれば、バイオへのキャリアはなかったことになります。

1961（昭和36）年4月、今治市立美須賀中学校に入学しました。中学校は実家のすぐそば、藤堂高虎が築城した今治城のすぐ横にあり、「海城」と言われる珍しい城で、城のまわりのお堀には海水が入って来る構造になっていました。校舎は、道を隔てたお堀のすぐそばだったので、昼休みに釣り糸を垂れることもでき、海の魚が釣れるのどかな中学校でした。

1964（昭和39）年4月に愛媛県立今治西高等学校に入学しました。私達の年代は、いわゆる「団塊の世代」ですので、教室が同級生であふれかえっていたことを思い出します。今治西高は公立高校ですが、県内では、1、2を争う進学校でしたので、高校の教科は2年生までで終え、2年の終わりに修学旅行がありました。当時、修学旅行の行き先はクラスごとに決めてもよい珍しい高校でしたが、私たちのクラスは南九州に行くことになりました。先日、修学旅行の写真を見ておりましたら、熊本城で写した集合写真が出てきました。大阪大学（阪大）を定年した後、熊本の崇城大学に勤めるようになりましたが、50年後、まさか熊本に住むようになるとは夢にも思いませんでした。

3) 大学進学

高校生なら誰もが考えるように、何学部に進もうかと色々考えました。父は機械工学科を出ていたことから数

学や物理をよく教えてくれたのですが、模擬試験の点数は上がりませんでした。逆に、英語や国語が良くできたことから、一時は文科系への進学も考えました。担任の先生は京大農学部を受験することを勧めてくれましたが、当時は農学部より工学部の方が女の子にもてそうと、そんな浅はかな考えを持っていたこと、また当時の工学部はつぶしが効くと言われていたこと、阪大の工学部であれば、大きなミスをしないうり必ず合格すると進路指導の先生が保証してくれたことから、阪大工学部を受験しました。

なぜ醗酵工学科かと言えば、数物系学科ではとてもやっていけるとは思わなかったこと、それに比べ、生物系であれば、実験をやっている間に運がよければ新しい現象を発見することもできるのでは、という非常にナイーブな考えを持ったことが理由です。もう一つの理由としては、当時、工学部に生物系の学科がある大学は、阪大の醗酵工学科と広島大の醗酵工学科、山梨大の発酵生産学科の3校しかなく、珍しい学科であるということもありました。現在では、多くの大学の工学系学部には生物系学科がありますので、最近の学生さんは不思議なことと思われるかもしれません。大学受験に際し、初めて将来のことを自分自身で考えたように思います。

さて、入学してみると同級生は39名でした。その中には、三重県立医大に合格していたものの医学部に行かず醗酵工学科に来たという同級生もいました。当時は、電子工学科など工学部の2、3の学科の入試合格者最低点は、医学部の最低点より高い時代でしたので、さもありなんという気もしましたが、現在の受験事情が大きく変わっていることは皆様良くご存知のごとくです。

4) 研究室配属と卒業研究、大学院への進学

4年生になると研究室配属がありました。「遺伝学」に魅力を感じ、恩師の大嶋泰治先生（阪大名誉教授）が主宰しておられた「工業微生物遺伝学研究室」を志望しました（図1）。当時、遺伝学ができる工業微生物と言えば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す。研究室には、関達治助手（阪大名誉教授）がリーダーの枯草菌グループと東江昭夫助手（東大名誉教授）が率いる酵母のグループがありました。配属後まもなく、教授室に呼ばれて行くと、大嶋先生より「君は酵母の研究をやりなさい」と言われました。これが22才の時、酵母との出会いでした。「バイオ系のキャリアデザイン」という連載とのことですが、自身でキャリアをデザインするなどの意識も能力もな

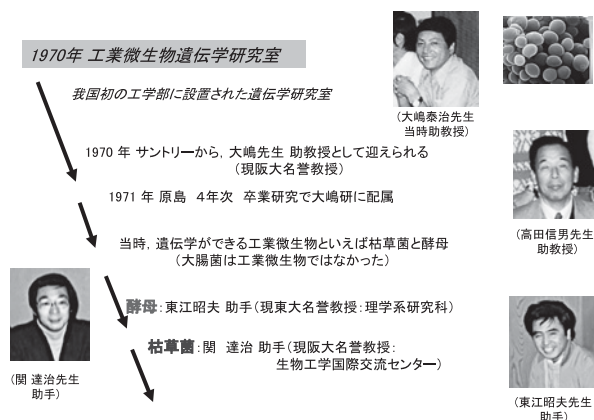


図1. 1971年4月、卒業研究で大嶋研究室に配属

く、気がついてみると酵母の研究をすることになってしまっていたというのが正直なところです。しかしこの時、大学院に行って学者になろうということだけは決めていました。

与えられた卒論のテーマは、「酵母におけるタリズム支配の遺伝学的研究」で、具体的にはタリズムが一体何個の遺伝子により支配されているかを明らかにするものでした。当時は、酵母における生命現象の遺伝学的解析法と言えば四分子分析しかなかった時代でしたので、それに必須のマイクロマニピュレーターの使い方を必死で練習し、来る日も来る日も、ひたすら四分子分析をしたことを覚えています。

学部を卒業し、予定通り、大学院に進学しました。修士課程が終ろうとする頃になって、やっと卒論から始めた研究に一つの目処がつき、大嶋先生が論文を書いてみないかと薦めてくれました。随分長い間かけて、やっと初稿を書き終え、大嶋先生のところに持って行ったところ、跡形もなく直されました。原稿が大嶋先生との間を何十回も行き来する状態でしたが、こうしたご指導のお陰で、修士課程の2年の時に、米国遺伝学会が出版している遺伝学の専門誌『Genetics』誌に論文が受理されました。内容は、ホモタリズムが、*MATa/MATα* 遺伝子と3つの遺伝子 (*HO/ho HMLα/hmlα HMRa/hmra*) によって支配されていることを明らかにし、その遺伝子型と表現型の対応をつけたことですが、改めて振り返ってみると、この結論を導くために、10,000個近く胞子を顕微解剖したことになります。我ながら、よくも飽きずにできたものだなと思います。

さらに博士課程に進学をしました。古典遺伝学は遺伝子の概念的な同定には有効ですが、その実体を明らかに

することはできません。そこで、博士課程では、*HMLα/hmlα*、*HMRa/hmra* 遺伝子が本当に実在することを証明しようと思いました。当時、遺伝子の実在性を示すには染色体上にマッピングするしか方法がありませんでしたので、これを目指しました。しかし、タリズム遺伝子のマッピングは特殊で、コンピュータシミュレーションなども用い、博士課程の2年の時に、やっと第3番染色体の左端に*HMLα/hmlα* 遺伝子を、そして右端に*HMRa/hmra* をマップすることができました。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ありませんでした。しかし、2年後の1978年には酵母の形質転換法が開発され、その翌年、アメリカのグループにより*HMLα/hmlα* と *HMRa/hmra* 遺伝子がクローン化されます。その結果、我々が予測した位置に実際に存在することが明らかにされました。やっと不安から解放されたことを昨日のように思い出します。これらの一連の研究をまとめて、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きました(図2)。

手前味噌になりますが、この研究の結果は驚くべきことを意味しているものでした。それは、出芽酵母の接合型は、*MAT* 遺伝子座にある接合型遺伝子 *a* または *α* によって支配されている以外に、サイレントな接合型遺伝子が *HML* と *HMR* 座にあり、ホモタリズム株における自己2倍体現象は、それらがサイレントな遺伝子座から、発現遺伝子座である *MAT* 座に転移することによって起こるというものでした。

この仕事は、もともと大嶋先生がサントリーにおられ



図2. 1977 (昭和52) 3月博士課程修了。なんとか工学博士に。阪大松下講堂にて。ほとんど全員がスーツなのに……。

た時に、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味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して始まった研究ではありません。しかし、私はこの時から、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の認識を強く持つようになりました。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り、その後の研究スタイルにも大きな影響を与えた研究であったと思っています。

5) 学術振興会奨励研究員から助手へ

学位は取得できたものの職はありませんでした。しかし、幸いにも日本学術振興会の奨励研究員として採用され、初めてサラリーをもらうことができるようになりました。やっと学者の端くれになったような気持ちになったことを覚えています。既述のように、1978年には、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るようになりました。折しも、米国に留学をしておられた東江先生が、酵母ベクターと形質転換法の詳しいプロトコルを送ってくださいました。こうしたこともあり、我が国で初めて、酵母（大腸菌ではなく）を宿主として、酵母遺伝子 (*HIS5* など) をクローン化するなど、古典遺伝学から分子遺伝学へと徐々に研究領域を広げていくことができる幸運に恵まれました。またこの間、幸いにも助手のポストに空きができ、1979年には大嶋研の助手にさせていただきました。

奨励研究員時代には、早く分子遺伝学の分野に習熟しなければという意識が強く働き、DNAを用いた実験に力を入れていたことを思い出します。ある日、プロトプラスト形質転換体の細胞が、もともとの宿主細胞より大きいということに気がつきました。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ではないかと想像し、この仮説を色々な方法で検討した結果、予想通り、形質転換体はほぼ100%細胞融合体あるいは細胞質融合体であるとの意外な事実を証明することができました。

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ち、倍数性のみ違う細胞を作製することが必要です。そこで、上記の形質転換に付随した細

胞融合法を利用して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、色々と表現型を比較しました。その結論は、醸造産業で使われている高次倍数体は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用な形質を併せ持ったものが選抜されてきたということでした。これら一連の仕事は、1年前に国立循環器病センターの室長で定年をされた高木敦子さんの博士論文となりました。その他にも、多田宏子さん(現・岡山大学教授)をはじめとする多くの学生さん、また、当時の大嶋研に、サントリーから研究生として来ておられた須田幹夫さん、ユネスコ国際微生物学大学院コースの研修生として大嶋研に滞在し、その後、30年にわたる共同研究者となるマヒドン大学のChuenchit Boonchirdさん(現・マヒドン大学准教授)などの協力のもとで行われた研究です。大学院に入学後、留学(次項)までの約10年間(1972~1983年頃)、実用酵母の魅力を体験できたことは、その後の研究生活に大きな影響を与えることになりました。

6) 米国NIHへの留学

酵母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、1984年10月から2年間、当時、「酵母におけるアミノ酸生合成の翻訳制御」の研究でその才能が認められつつあった米国NIHの若手研究者、Alan Hinnebusch博士の研究室に留学する機会を得ました。幸いにも家族で留学することができましたが、上の娘は4才、下の息子は1才になったばかりでした。当時は、伊丹から成田へ、成田からロサンゼルスへ、そしてワシントンへという旅程でした(図3)。西海岸は比較的近いような気がしましたが、東海岸にあるワシントンに着いたときには、なんて遠いところに来ってしまったのだろうという非常に不安な気持ちになりました。Hinnebusch



図3. 米国NIHへ留学。大嶋先生ご夫妻、高田先生、関先生、学生さん達が見送ってくれる。1984年10月1日、伊丹空港にて。

博士は、まだNIHのテニユアを取得しておらず、研究室員は、彼と私とスイスから来たポスドクのたったの3人でした。Hinnebusch博士は、日本ではあまり知られていないかもしれませんが、これまでの30年間に250報ほどの論文を、Cell, Natureなどをはじめとするいわゆる一流誌に発表し、今では、NIHでもっとも大きな研究室を主宰するまでになりました。先日、アメリカのNational Academy of Scienceの会員にも選ばれました。人柄も温厚で、非常に頭の良い人でした。そのようなHinnebusch博士の研究室で、2年間、翻訳制御の研究を行うことができたことは貴重な経験になりました(図4)。

1986年の9月30日、2年間の留学を終え帰国しました。帰国後はNIHで携わった研究はしないことに決めました。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す。そして、これからはバイオテクノロジーのための酵母研究をしなければ、と強く思ったことを記憶しています。NIHへの留学経験は、自分で決めた一つのキャリアと言えるかもしれません。最近の若い人は、色々な事情で留学する機会が少なくなったので大変気の毒に思っています。

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ました。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した。留学後は、実用酵母の「育種理論の確立」と「育種技術の開発・応用」についての研究を発展させなければならないと思っていた矢先でしたので、少々面食らいましたが、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、参画をさせていた

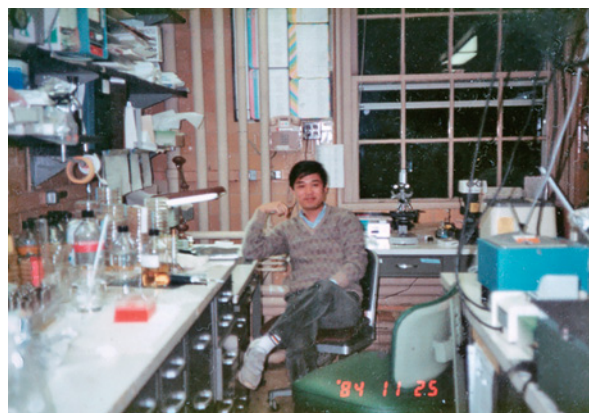


図4. NIHに来て2か月、ようやく慣れた頃

だくことにしました。ただ、それとともに、実用酵母の育種の問題や当時酵母宿主・ベクター系による遺伝子工学的物質生産がさかんになってきたこともあり、そうした研究にも挑戦したいという思いも持ちました。

7) リン酸シグナル伝達系 (PHO系) の研究と 酵母バイオテクノロジーへの応用

7-1) *PHO84* 遺伝子クローニングと機能—Pi トランスポーターかセンサーか— 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* など、いくつかの PHO 遺伝子群の転写が抑制されるシグナル伝達系です。その頃までに、PHO 系の概略は明らかになりつつありましたが、いくつかの基本的な問題が明らかになっていませんでした。その中で、難航を極めていた *PHO84* 遺伝子のクローニングに、当時博士課程学生であった文谷正憲君 (現・徳島文理大准教授) とともに挑戦することにしました。色々と苦労がありましたが、2 年がかりでやっとクローン化に成功し、Pho84 タンパク質が高親和性の Pi トランスポーターであることを明らかにすることができました。

しかし、Pho84 が Pi の濃度も感知しているセンサーかどうかについては依然として不明でした。この問題に NMR を利用した細胞内リン酸濃度の測定からアプローチすることにしました。細胞内リン酸濃度の測定は、当時、横浜市大におられた白川昌弘さん (現・京大教授) の協力を得ました。色々な変異株を用いた測定から、Pho84 タンパク質には 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という重要な結果を得ることができました。

しかし依然として、PHO 系の真のシグナルについては何もわからないままでした。そこで、そうした因子を同定するため、約 5,000 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、*PHO5* が発現する破壊株のスクリーニングを行いました。この結果から非常に興味深いことが明らかになりました。それは、発見した遺伝子の多くがイノシトールポリリン酸生合成系の遺伝子であり、 $[PP]_2IP_3$ ($=IP_7$) という物質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からです。これらの成果は、タイからの留学生、Choowong 君の学位論文になりました。

7-2) PHO 系の応用 基礎生物学的なことをやっても、やはりいつも産業応用を考えていました。PHO 系では色々な変異株が蓄積していましたので、そうした

リソースを利用して、i) 低温あるいは高温でのみ作動する宿主・ベクター系や、ii) *PHO5* をレポーターとしたプロモーター検出ベクターの構築、iii) *PHO5* レポーターの変異株分離への応用、iv) DNA 結合能の検出レポーターとしての応用、v) 環境中の Pi 濃度センサーとしての利用、vi) 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応用などの研究を行いました。これらの研究の一部は、久能樹君 (現・筑波大学特任准教授) の学位論文となりました。

8) 産業酵母の非接合性を回復させる 育種技術の開発を目指して

産業酵母は、i) 接合能を示さない、ii) 胞子形成能がない、iii) 高次倍数体のため突然変異の誘起が困難である、など育種にとって障害となるさまざまな性質を持ちます。こうした産業酵母を育種する一つのアプローチとして、非接合性の **a**/α 細胞から、α 型あるいは **a** 型の変異株を分離することにしました。もし、そうした変異を分離することができれば、それを利用して、α 接合能や **a** 型接合能を回復させる技術を開発できる可能性があると考えたからです。その結果、幸いにも、α 型を示す 3 種の変異株を分離することができました。一つは、α2 タンパク質にミスセンス変異が起こったもの (*hmlα2-102*)、残りの二つの変異は接合型遺伝子以外の遺伝子に起こったもので、*aar1* (**a1-α2 repression**) 変異、*aar2* 変異と命名しました。クローニングの結果、*AAR1* 遺伝子は *TUP1* として知られていたグローバルリプレッサーであり、*AAR2* 遺伝子は機能未知の遺伝子でした。*AAR1* は DNA 結合能を持たないタンパク質にもかかわらず、種々の DNA 結合タンパク質と複合体を形成し、多様な遺伝子の転写を抑制するとのモデルを提示することができました。またこのモデルが目止まったのか、科研費の特定研究「転写制御」に入れていただきました。この研究は向由起夫君 (現・長浜バイオ大教授) の学位論文になりました。

出芽酵母にはイントロンを持つ遺伝子はほとんどありませんが、珍しい例の一つが、*MATa1* 遺伝子から産生される **a1** pre-mRNA です。色々な実験から、*AAR2* は、*MATa1* pre-mRNA のスプライシングに関わっているタンパク質であることがわかりました。*AAR2* の研究は、当時、小西酒造から研究生として来ておられた中澤伸重さん (現・秋田県立大教授) の学位論文となりました。こうして助教授時代は過ぎて行きました。

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をされた後、研究室を主宰する幸運に恵まれました。楽々と研究室を運営しておられる教授の先生方も多いと思いますが、私自身は、研究テーマにしても、研究費にしても、学位指導にしても大変な重荷であると感じました。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電話をいただきました。その内容は、「文科省がゲノムの特定研究を計画しており、いくつかのモデル生物を対象にすることを考えているらしい、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、もし良ければ推薦したい」、とのことでした。誰も思いつかないトリックによって変異株を分離することを生業とする遺伝学者の端くれとして、網羅的な遺伝子破壊は、そのアイデンティティを投げ打ったようなアプローチであり、そうした“なりふりかまわないアプローチ”をすることにためらいはありました。しかし、教授として研究室を主宰するようになったときでもあり、正直なところ研究費にも大いに不安がありました。色々考えた末、結局推薦をしていただくことに致しました。

また、教授になったことをきっかけに研究室名を「ゲノム機能工学研究室」と改名しました(図5)。そして、

教授にいただいたのだから、これまでとは違う、なにか独自の研究を始めなければと思う、「ゲノム工学技術の開発と応用」を研究室の主要なテーマの一つにすることにしました(後述)。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も新しい展開をもたらすのではと思ったからです。私のバイオキャリアの中では、珍しく、テーマを自分自身で決めたと言えるかもしれません。次項では、ゲノム機能工学研究室として行った研究のいくつかについて記します。

9-1) プロテインホスファターゼのゲノムサイエンス

前述のような経緯で、文科省の「ゲノム特定」研究班に入れていただきました。その後、10余年にわたり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ました。また、「ゲノム特定」で学んだ大規模、網羅的という研究スタイルは、後年、いくつかのテーマを進めるうえで大いに活用することになりました。

1996年5月、出芽酵母ゲノムの全塩基配列が明らかにされた時、それまでに同定されていた遺伝子が、全遺伝子の半数にも満たないことが明らかになりました。この事実は私にはかなりの驚きでした。理由はいくつか考えられるかと思いますが、そのひとつとして「遺伝子の機能重複の問題」が考えられると思います。私達は、いくつかの理由でプロテインホスファターゼ (PPase) の機能

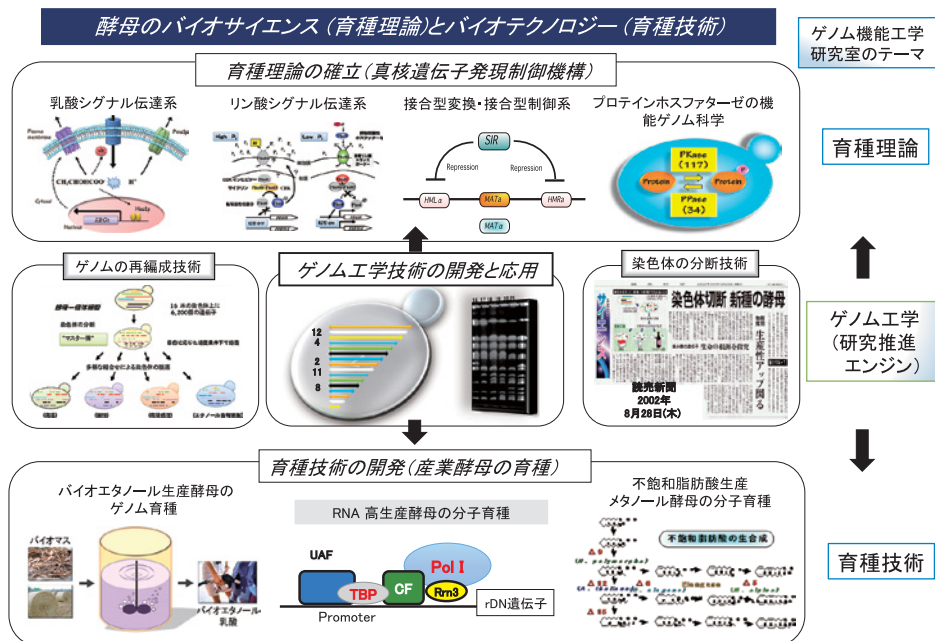


図5. ゲノム機能工学研究室の研究テーマ

重複の問題を取り上げることになりました。32種のPPase遺伝子について、単独破壊株だけでなくすべての組合せの二重破壊株やプロテインキナーゼ遺伝子との二重破壊株など、合計1,000株に及ぶPPase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ました。これらPPase関連の研究は、作本直子さん(現・国立遺伝学研究所)、平崎正孝君(現・埼玉医大助教)、Hermansyah君(インドネシアからの留学生、現・Sriwijaya大学講師)、Walter君(フィリピンからの留学生)、沼本穂さん(現・京都府大博士研究員)、Sharminさん(バングラデシュからの留学生)の博士論文になりました。

9-2) 不飽和脂肪酸、低温、酸素シグナルの伝達機構
清酒醸造において低温での増殖、発酵性、香り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ます。出芽酵母の場合、主要なUFAであるオレイン酸を生成する $\Delta 9$ -脂肪酸不飽和化酵素は、*OLE1*にコードされており、低温で誘導されます。逆に、*OLE1*はUFAによって抑制されます。吟醸酒の醸造では米を70%以上削りますが、その理由は、米粒の外側にはUFAが多く含まれており、それによって吟醸香の生成に関与する遺伝子群の発現が抑制されるからと考えられています。さらに、*OLE1*による脂肪酸の不飽和化には酸素が必要です。低温、酸素、UFAによる3種のシグナルへの応答機構の基礎生物学的興味と、UFAが存在しても吟醸香の生成に必要な遺伝子群が発現すれば、吟醸酒ができるのではという単純な応用的興味から、*OLE1*の発現制御の研究を行いました。その結果、転写因子Mga2が、真核生物における低温および酸素のセンサーであることを初めて明らかにすることができました。この研究は、某油関連企業との共同研究をきっかけに始めたものですが、中川洋史君(現・山梨大准教授)の博士論文となりました。

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
転写制御を研究しなければと思うようになったのは、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研究が世界的に非常な勢いで進んでいることを痛感したからです。そうした状況下考えたことは、転写活性化因子の不在下でも強い転写が起こる変異株を分離し、その後、元の転写活性化因子を導入すれば、強いプロモーター活性を発揮させることができるのではというアイデアでした。多くの変異株を分離して解析を行った結果、そのいくつかが高次のクロマチン構造に影響する変異であることがわかりました。そこで、そうした変異を利用して転

写の変化を調べたところ、期待通り、野生型株における発現よりも5~10倍の転写上昇が得られることがわかりました。この研究によって、転写の活性化が、クロマチンレベル、ヌクレオソームレベル、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で加算的となり、プロモーターを最大限に働かせることができることがわかりました。こうした知見は、後に(次項)旨味調味料として有用なRNAを高生産する酵母の育種戦略に応用しました。これらの研究の一部は、久能樹君(現・筑波大学特任准教授)、水野貴之君(現・徳島文理大准教授)の学位論文となりました。

9-4) RNA高生産酵母の分子育種
2013年に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”が世界的に注目されるようになりました。核酸系うま味調味料は、主として酵母RNAの酵素分解により生産されるため、RNA高含有酵母の育種は産業上有効です。RNA含量を増やすためにはリボソームRNA(rRNA)の含量を増やすことが有効ですが、それまでRNA高含有酵母の育種は行われていませんでした。そこで、RNA高生産酵母を育種するため、まずrRNAの転写活性化因子の破壊株を作製し、それから抑圧変異株を分離することによって、feedback制御を解除後、野生型の転写活性化因子の遺伝子を導入すると戦略を取ることにしました。その結果、野生型株の約2倍のRNAを生産する酵母を育種することができました。この研究は、タイからの留学生、Varesa Chuwattanakulさんとバングラデシュからの留学生、Fahmida Khatunさんの学位論文になりました。白状すれば、この研究も某アミノ酸企業からの依頼によって始めたものです。

9-5) バイオエタノール生産酵母の育種
バイオエタノールの生産微生物には、コスト削減のためにさまざまな性質が要求されます。コスト面から有利な並行復発酵を考える場合には特に高温耐性が重要です。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最適温度が50°C付近であるのに対し、一般的な生産株である*S. cerevisiae*の生育最適温度は30°Cであり、できるだけ高い温度での旺盛な増殖と良好な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す。

*S. cerevisiae*の生育限界温度は41°Cであり、これ以上の温度で、“旺盛”に増殖する*S. cerevisiae*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ありません。こうした背景のもと、高温耐性を持つバイオエタノール生産酵母の育種を目的として研究を開始しました。この研究は、学術振興会のAsian Coreというプロジェクト

(代表者阪大仁平卓也先生)のもとで、長年交流のあるマヒドン大学(タイ、バンコク) Boonchird博士との共同研究によって行ったものです。その結果、タイのフルーツから41°Cでも旺盛に増殖する*S. cerevisiae*株を分離することができました。遺伝学的な解析によって、41°Cでの旺盛な増殖には6つの優性遺伝子アレル(*HTG1*~*HTG6*)が必要なこと、そのうちの*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ました。ピルビン酸キナーゼはATP生成反応を触媒します。E3ユビキチンリガーゼは、タンパク質分解に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知られています。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、複数の遺伝子によって支配されている形質の改良には、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重要なヒントを与えてくれた研究であったと思っています。この研究は、タイからの留学生Benjaphokee Suthee君とイランからの留学生Hosein Shahsavarani君の学位論文となりました。

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すが、酸性条件下では基質を殺菌せずとも細菌の汚染を防止できることから、バイオエタノール生産を含む種々の発酵生産のコスト削減のためにも重要です。酸耐性酵母の育種を目的として、5,000株の破壊株シリーズから乳酸感受性あるいは乳酸耐性を引き起こす遺伝子群をスクリーニングし、いくつかの新しい遺伝子を同定しました。また、それらの乳酸耐性破壊変異を重ねることによって、乳酸の生産性も向上することを明らかにすることができました。この研究は、鈴木俊宏君(現・アピ株式会社)の学位論文になりました。

9-6) メタノール酵母 *Hansenula polymorpha* の脂質分子生物学 UFAを自在な比率で生産するバイオテクノロジーは、現在でも確立されているとはいえないと思います。それは、いつにUFA、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と言っても良いかと思います。*S. cerevisiae*は、UFAとしてオレイン酸(18:1)しか生産しません。そこで、我々はリノール酸(18:2)やリノレン酸(18:3)も生産し、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UFA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ました。その結果、*H. polymorpha*の脂肪酸およびUFA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ました。これらの研究は、タイからの留学生、Sarintip Anamnartさん(現・Chulalongkorn大学講師)、Phatthanon Prasitchoke君(現・PTT Chemical 研究員)、Juthaporn Sangwallekさん(現・Max Planck 研究所博士研究員)の学位論文になりました。

9-7) 酵母における多様なゲノム工学技術の開発と応用 20世紀後半、組換えDNA技術の発明によって生命科学が大きく発展しました。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の技術に負っています。しかし、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(欠失)、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ありません。教授として、ゲノム機能工学研究室を主宰するにあたり、「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”はどのようなものかと考えた時、それは、「ゲノム工学技術」であると思うに至りました。筆者自身、方法論を開発することが好きなせいもあって、それ以来、「ゲノム機能の解明と育種への応用」を目的に、多様なゲノム工学技術の開発に注力してきました(図6)。

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)技術と命名しました。クローニングが不要な簡単な技

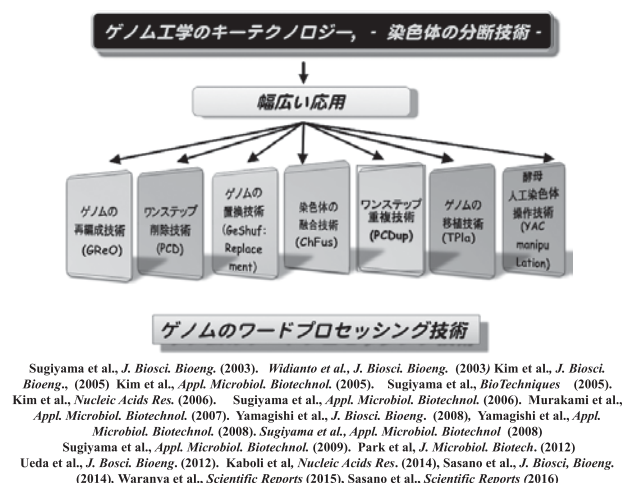


図6. 開発してきた多様なゲノム工学技術

術です。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) 法と命名しました。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、これまでいずれの生物においても開発されていなかった技術です。我々は、こうした技術を利用して、バイオテクノロジーに有用な形質を含む、多様な表現型を明らかにしてきました。これらの技術は、Kim Yoen-Heeさん(現・韓国東儀大学助教授)、山岸和雄君(現・味の素株式会社バイオファイン研究所研究員)、タイからの留学生 Waranya Natesuntornさん(現・タイ国立研究所博士研究員)の学位論文になりました。これらの技術の応用例を、以下に、二つだけ紹介したいと思います。

9-7-1) 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 私は、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ます。そしてベストゲノムに到達する技術の一つとして、「ゲノムの再編成工学」(GReO: Genome ReOrganization Technology) と命名した技術を提案してきました。出芽酵母の1倍体は約6,000の遺伝子を16本の染色体上に持っています。もっとも短い染色体は約200 kbですが、長さが約50 kb以下の染色体を生成させると、体細胞分裂時に $10^{-3} \sim 10^{-5}$ の頻度で染色体の不均衡分離が起こり、母あるいは娘細胞に均等に伝達されなくなります。この現象を利用すれば、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と考えました。たとえば、20個のミニ染色体でも約100万通り、30個のミニ染色体を想定すれば約10億通りの多様性を創出することが可能です。

こうした方法論が有効かどうかを、脱落可能な12個のミニ染色体を持つ親株からエタノール耐性株が分離できるかどうかで検証した結果、著しく増殖能が良いエタノール耐性株を分離することができました。それらの株におけるミニ染色体の組成を調べたところ、二つのミニ染色体が脱落していることがわかりました。責任遺伝子の解析はこれからですが、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望であることを示してくれたものと考えています。

9-7-2) ゲノムの新しい風景を求めて一新規合成致死遺伝子の発見— 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ました。この事実は、その

領域には同時に欠失させると細胞が致死となる合成致死遺伝子ペアがあることを意味しています。酵母ゲノムに合成致死遺伝子がはたしてどれくらいあるのかについては、トロント大学のCharlee Boone博士らによってSynthetic Genetic Arrayと呼ばれる方法論が提案され、系統的に調べられてきました。しかしこの方法は、減数分裂での組換えを利用して二重破壊株を作製し、その合成致死を検定する方法であるため、近接した遺伝子については十分な情報が得られていない問題を内包していました。我々は、この問題を解決すべく、ゲノム工学を利用した解析を行ったところ、非必須遺伝子しか存在しないにもかかわらず、調べた110個の領域の約半数が削除できないことがわかりました。この結果は、出芽酵母のゲノムには、合成致死を引き起こす遺伝子ペアが数多く見いだされずに存在していることを示しています。この研究は、イランからの留学生、Saeed Kaboli君の学位論文となりました。

10) 崇城大学に移って

2015年の3月に大阪大学を定年退職し、大阪大学応用生物工学科と縁の深い、熊本の崇城大学に移ってきました。定年に際し、卒業生が記念祝賀パーティーを開いてくれました。本当に有難く、嬉しく、一生の思い出になりました(図7)。崇城大学に移ることを決めた理由はいくつかありますが、当時、阪大を定年後、崇城大学に移られ、その後、崇城大学の研究担当副学長をしておられた塩谷捨明先生(阪大名誉教授、崇城大学名誉教授)が、「崇城大学は本当にいい大学ですよ」とアドバイスしてくださったことが大きかったと思います。崇城大学に行って、どのような研究をすべきか考えました。色々考えた結果、以下の三つのテーマに絞って研究を行うことにしました。

10-1) 染色体分断とゲノム編集の融合による酵母ゲノム工学の新展開 前述のゲノムの再編成技術などによってベストゲノムを短期間で創成するには、分断技術(PCS)の加速化が必要です。しかし、従来の技術では、どうしても一度の形質転換で1か所の分断しかできませんでした。そうこうしているうちに、近年、CRISPR/Casと命名された新しいゲノム編集技術が発展してきました。CRISPR/Casがどのような技術かは本稿では詳しく説明しませんが、このゲノム編集技術を我々のゲノム工学技術(PCS)に融合させることによって(CRISPR-PCSと命名)、染色体分断の迅速化が可能になるのではと考えました。そして、実際にこの考えを試してみた結



図7. 大阪大学退職記念講演会

果、一度の形質転換操作で、同時に少なくとも4か所の分断が可能になりました。このことによって、1か所ずつ分断を重ねることが必要なために35日程度かかっていた作業が1日でできるようになりました。現在、崇城大学では、このアイデアを、染色体複数領域の同時削除 (CRISPR-PCD)、同時重複 (CRISPR-PCDup) に広げべく挑戦をしています。この研究は、幸いにも「染色体分断技術とゲノム編集技術の融合によるゲノム工学の新展開」と題する研究として、科研費「基盤研究B」の支援を受けて進めています。

10-2) “超” 高次倍数体酵母の育種 以前の研究で分離した接合型遺伝子の特異な変異, *mata2-102* 変異が (8 項), これまで育種されたことのない“超” 高次倍数体を簡単に育種するために応用できるのではないかと思います。a 型細胞に, *mata2-102* 変異遺伝子を導入すると野生型 *MATa* 遺伝子と違って細胞は α 型を示します。したがって、この株は再び、もとの a 型細胞と交雑できることとなります。できた2倍体 (*MATa[mata2-102]*) は α 型を示します。したがって、この2倍体は再び a 型細胞と交雑可能であり、3倍体交雑体 (*MATa/MATa[mata2-102]*) を育種できるはずですが、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“超” 高次倍数体を簡単に育種できるのではと考えました。実際、この方法によってこれまで育種されたことのない16倍体を育種することができています。*mata2-102* 変異を利用した、この研究は、「酵母における“超” 高次倍数体の育種技術の開発と応用」と題する研究として、科研費「挑戦的萌芽」の支援を受けて進めています。

10-3) 酵母の異数体育種工学技術の開発と応用 バイオマスの糖化工程で生じる阻害物は、酵母をはじめとする微生物の増殖や発酵を著しく阻害します。1倍体を親株としたこれまでの方法論では、阻害物耐性のような多くの遺伝子によって支配されている形質の変異株は分離できません。そこで、こうした多遺伝子支配形質の変異株を育種する新規の技術として、「異数体育種工学」と命名した育種技術の開発を始めました。高次倍数体を親株とし、染色体の不分離を引き起こす微小管重合阻害剤を用いて異数体を誘導し、そこで起こる大規模な発現変動を利用して、これまで分離できなかった複合ストレス変異株を分離しようとする技術です。この異数体工学育種技術によって、これまでの方法論では分離できなかった変異株が分離できるとの予備的な結果を得ています。ゲノム工学の研究は、阪大からの続きですが、“超” 高次倍数体育種工学と異数体育種工学の研究は、崇城大学で始めた研究です。これら三つの研究を崇城大学の学生さん達と、忙しくも楽しく進めています。

11) 研究に終わりなく 一産業酵母のベストゲノムを求めて一

お気づきのように、研究テーマのほとんどは、私自身で考えたものではなく、恩師大嶋先生から与えていただいた学位論文のテーマをはじめ、NIHでは留学先のテーマ、また科研費特定研究に推薦をしていただいたり、お声をかけていただいたりしたことで始めたもの、色々な企業との議論の中で始めたものであり、主体性を持って始めたのは、唯一、「ゲノム工学」くらいで、誠にお恥ずかしい限りです。しかし、今振り返ってみると、産業

酵母の高次倍数体育種から始まった研究生活は、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ます。この間、常に、工学的応用ということも意識してやってきたつもりです。また、応用の問題の中に基礎的にも重要な問題がたくさんあることも実感しました。この特集では、「若い方へのメッセージを」ということですが、とてもそのようなものはありません。ただ、いつも、どのようなテーマであっても、与えられた環境で一生懸命やってきたと言うことはできます。

残された研究課題については、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ます。また、筆者自身もあと少しの間、熊本の地で取り組んでいきたいと思っています。

最後に、研究生活に託つけて家庭のことは、ほとんど何もしてこなかったことを白状しなければなりません。妻、俊子、長女、彩、長男、純の理解がなければ、とてもこれまでやってくることはできなかったと思います。

＜略歴＞ 1977年 大阪大学大学院工学研究科・醗酵工学専攻博士課程修了（工学博士）、1978年 日本学術振興会奨励研究員、1979年 大阪大学・工学部・助手、1984～1986年 米国国立保健研究所（NIH）分子遺伝学研究室留学、1988年 大阪大学助教授工学部（醗酵工学科）、1997年 大阪大学教授大学院工学研究科（応用生物工学専攻、現生命先端工学専攻）、2003～2005年 酵母遺伝学フォーラム会長、2005～2009年 酵母研究会会長、2007～2011年 大阪大学生物工学国際交流センター長、2011～2015年 日本微生物学連盟常任理事、2011～2013年 日本生物工学会会長、2015年 大阪大学定年退職（大阪大学名誉教授）、2015年～崇城大学生物生命学部教授、2017年～崇城大学図書館長

＜趣味＞ ジャズ音楽を聞くこと、演奏すること