

〔生物工学会誌 第71巻 第5号 341-350. 1993〕

 総合論文

酵母の分子育種に関する研究

(平成4年度 日本生物工学会生物工学賞受賞)

大 嶋 泰 治

大阪大学工学部応用生物工学科
〒565 吹田市山田丘2-1

Molecular breeding of the yeast *Saccharomyces*. —Monograph— YASUJI OSHIMA (*Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565*) *Seibutsu-kogaku* 71: 341-350, 1993.

In 1951, shortly after the end of World War II, I entered Osaka University to study yeast biology in brewing technology. This was due to my father's wish, in part, as well as to my own interest, though I had to give up the possibility of pursuing my long-cherished desire to be an aeronautical engineer. Because my family owns a small sake factory locally, I was already somewhat familiar with yeast, and had some interest in this simple organism. When I became a senior student in the Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, I joined the laboratory of industrial microbiology. Professor Masao Oda, head of the laboratory, introduced me to Mr. Kentaro Wakabayashi, an alumnus of the Department working as a research student in the laboratory at that time. Professor Oda asked me to do some hybridization experiments with *Saccharomyces* yeast under Mr. Wakabayashi's supervision. This was my first contact with yeast genetics. Since then, I have been involved with and conducted experiments in several areas of yeast genetics and molecular biology for almost 40 years. This article summarizes my major topics in yeast genetics and molecular biology: homothallism and the controlling element model for mating type switching, mechanisms of gene regulation, the structure and function of a yeast plasmid, pSR1, and its application to chromosome engineering.

はじめに

わが国において、発酵工学に育種を目標とした遺伝学が必要であると真剣に考えられ始めたのは、昭和20年代の後半である。そのメリットは、当時盛んであった抗生物質と工業酵素の生産における突然変異体の有効性で如実に示されていた。ちょうどその頃、大阪大学工学部醸酵工学科の学生であった私は、幸いに卒業研究にこれに関連する課題を与えられた。対象生物種が酵母であったのは、大学への進学そもそもが酵母の研究が目標であったからである。勿論その時のテーマは、酵母の簡単な交雑法についての追試であった。しかし、突然変異による生産性の向上を望むだけでなく、

オーソドックスな遺伝学による発酵生産の原理を探るといった研究を許す環境が、すでに当時の教室に芽生えていた。以来、サントリー社にお世話になった11年間を含め、一貫して酵母を対象とした遺伝学の研究に従事してきた。したがって、研究の始めから遺伝学の実用的応用を心掛けたつもりである。しかし、研究を進めれば進めるほど生命の基本に直面する問題が現れ、安直に有用株を育種することは思いもよらず、どちらかと云えば基礎分野の研究が多くなった。この間の研究を以下の3分野に分けてまとめてみたい。

1. 酵母の交雑と倍数性変化に関する研究

ビール醸造、パンの製造、あるいはアルコール発酵

に使用される *Saccharomyces* 属の実用株には高次倍数体が多い。経験的に選抜されてきたこれらの実用酵母に、なぜ高次倍数性が多いのか、その育種はどのように行うべきか、などの興味を抱き、ホモタリズムが直接これに関連するのではないかとの考えのもとに、1965年頃より本課題の研究を開始した。その直接のきっかけは、サントリー社における高野 勇氏の観察であった。

昭和40年の夏、私は2年間にわたり留学していた米国南イリノイ大学の Lindegren 研究室から、当時大阪市の堂島にあったサントリー社の研究所に帰ってきた。サントリー社が念願のビールを市場に出したのは私の留学中のことであったが、研究室はビール進出で熱気をはらんでいた。その雰囲気の中で留学中の経験を語り、また研究室での仕事を聴いた。その内容はどんなものであったかは忘れたが、実用酵母株における高次倍数性¹⁾と異常なホモタリズム現象を示す交雑株²⁾についての高野の話には強く感ずるものがあった。酵母のホモタリズム現象は Winge と Lindegren による酵母遺伝学の発祥期からよく知られていたが、ビール事業と高次倍数性酵母と新奇なホモタリズム現象の取り合わせは、私達をその日から研究に駆り立てた。

Saccharomyces 酵母の子嚢胞子を単離して栄養培地に置けば、発芽増殖の過程で a あるいは α の接合型を示す一倍体栄養細胞が得られるヘテロタリズム株と、同一胞子に由来する細胞間で、接合子を形成して二倍体細胞を生ずるホモタリズム株の区別がある。Winge と Lindegren の時代より、この違いは一对の対立遺伝子（現在の *HO/ho* 遺伝子）の支配下にあり、ホモタリズム二倍体株よりの子嚢胞子は、すべてホモタリズム株であることが知られていた。これに対し、各子嚢中の4胞子が2個のホモタリズム二倍体株と2個の a 接合型のヘテロタリズム一倍体株に分離する株が、偶然サントリー研究所で高野により発見されていたのである。

この現象についての最初の論文³⁾をアメリカ遺伝学会の機関誌である *Genetics* 誌に送り、続けてこの現象が従来のホモタリズム支配遺伝子系の異常によるものであり、⁴⁾ホモタリズムの現象自体が接合型支配遺伝子座 *MAT* が特異的に相補的な接合型に変換する現象であるとの報告⁵⁾を送った。ちょうどその頃、高野の発見した株と類似の四分子分離を示す株がスペイン国立農学研究所で発見された。⁶⁾しかし、スペイン株では2個のヘテロタリズム株の接合型が α 型であり、a 型を示したサントリー株と対照的であった。この2

株に加えて、デキストリン資化性の *S. diastaticus* の1株にホモタリズム系による変換に抵抗する *MATa* 接合型遺伝子があることが分かり、⁶⁾これら異常分離を示す株について、高野（サントリー）と原島俊（現阪大）らをはじめとする当時の同僚と学生達の遺伝学的解析により以下の結論を得た。

ホモタリズムの現象は、細胞増殖中に染色体上の対立する接合型支配遺伝子 *MATa* と *MAT α* 相互の間で規則正しく変換が起こることにより、同一胞子に由来する細胞集団中に a 接合型細胞と α 接合型細胞の混在を招き、その間で接合子の形成が行われ二倍体細胞を生ずる現象である。^{4,6-12)}その変換には接合型情報を持つ2個の予備遺伝子（現在 *HMR* と *HML* と呼ばれ、一般に *HMR* 遺伝子座は a 型を、*HML* 座は α 型の情報を担う）があり、それらが接合型支配遺伝子座 (*MAT*) の存在する第III染色体のセントロメアより左右それぞれ約65センチモルガンの位置にあることを新たに考案した三遺伝子雑種の連鎖分析法¹³⁾で決定した。*HO* 遺伝子はこれらとは独立の遺伝子であるが、予備遺伝子よりの情報を *MAT* 座に移動させる機能をもつと考えた。現在では、この *HO* 遺伝子は、*MAT* 座内の所定の位置で塩基配列を切断し、接合型変換の開始を司るエンドニュークラーゼをコードすることが知られている。

この考えを B. McClintock¹⁴⁾ がトウモロコシで発見した現象との類似性にちなみ、Controlling element モデルとして1973-1974年頃発表した。^{6,9)}この報告を読んで当時 Oregon 大学にいた Ira Herskowitz らが研究に参入し、テープレコーダーとカセットテープの概念で説明し、Cassette モデルとして世に流布した。¹¹⁾以来、米国 (Oregon 大学, Cold Spring Harbor 研究所, Brandeis 大学) あるいは英国 (Medical Research Council) その他の国々でも深い関心を集め、酵母分子生物学における大きな研究分野に発展した。

その後、組換え DNA 技術が導入されると間もなく、Nasmyth と Tatchell,¹⁵⁾ Strathern ら¹⁶⁾ および Astell ら¹⁷⁾ により *MAT* 遺伝子座と本質的に同じ構造を持つ予備遺伝子座 *HMR* と *HML* の存在が、われわれが遺伝子分析で予言していた位置に検出され、提案モデルが基本的に正しいことが確認された。この接合型変換についての中心的な機構の概略をその後の知見を含めて Fig. 1 に示す。以来、この現象についての解明が進み、現在では教科書（たとえば Watson らにより *Molecular Biology of the Gene*; 1987年版）にも採録さ

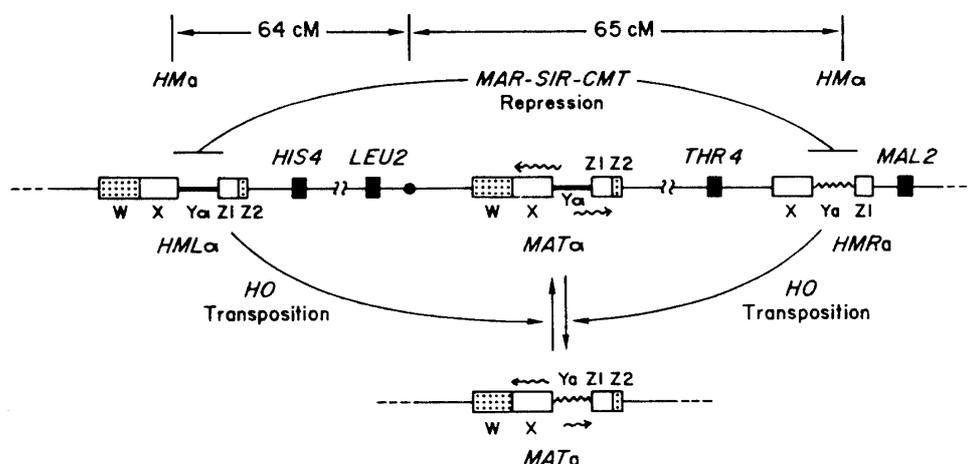


Fig. 1. Diagram of the mating type genes on chromosome III. The diagram is not to scale. W, X, Y, Z1 and Z2 represent regions defined by homologies between *MAT* and *HML* or *HMR*. The W region is 723 bp in length and is homologous between *HML* and *MAT*. The X region (704 bp) is found at *HML*, *MAT* and *HMR*. *HML* and *HMR* can have either in α -specific sequence *Ya* (642 bp) or the α -specific sequence *Ya* (747 bp). Z1 (239 bp) is found at *HML*, *MAT* and *HMR*, whereas Z2 (89 bp) is found only at *HML* and *MAT*. The *MAR*, *SIR*, and *CMT* genes were detected independently, but these genes were assigned later to four *SIR* genes which produce proteins to turn off the expression of the *HML* and *HMR* genes. Transposition of the *Ya* or *Ya* α information to the *MAT* locus is initiated by cutting DNA at a specific site in *MAT* by the *HO* product, an endonuclease.

れている。これらの研究経過は1982年に出版された Cold Spring Harbor Yeast Monograph¹¹⁾に初期の理論を、また研究開始の動機と進展の歴史については文献18に記述した。和文では文献19その他で簡単にまとめた。最近の進展の詳細は、Herskowitzらにより新しい1992年版の Cold Spring Harbor Yeast Monograph²⁰⁾にまとめられている。

本研究の成果はホモタリズム現象の解明のみでなく、染色体上の遺伝子は安定な存在であるとのこれまでの概念を改め、遺伝子によっては規則正しく変化し移動することを遺伝学的解析データにより予言し、分子生物学的立証の端緒を開いたことである。今日では、免疫遺伝子の再配列などで特定の遺伝子が変化することは広く受け入れられている。この酵母の性変換の知見その他により B. McClintock がトウモロコシで提案した動く遺伝子の概念が認められ、²¹⁾彼女のノーベル賞(1983年)に結びついた。

当初の課題であった高次倍数体の由来については、より詳しく論議できる知見を与え、それに基づき高次倍数体の育種^{22,23)}も可能になった。しかし、細胞融合法の開発^{24,25)}により、高次倍数体育種はより簡便に行われるようになった。また、この研究は、接合能発現のメカニズムについて多くの研究者の興味を呼び起こし、大いにこの分野の進展に寄与した。その知見が深

まるにつれ、胞子形成能を失った株に対して遺伝子工学的的方法によりその回復を図り、また野生株に接合能を付与することを目標とした研究²⁶⁻²⁹⁾が可能となった。

2. 信号伝達と遺伝子発現制御機構に関する研究

本研究課題は、大阪大学大学院工学研究科での修士学生の頃より、工業微生物の育種では遺伝子発現機構の操作がもっとも重要であるとの考えを抱き、今日まで中心命題として研究を続けている。初めは工学的に直接役立つことを考え、ガラクトース代謝酵素遺伝子とオリゴ糖の加水分解酵素遺伝子の発現制御を対象とした解析を行い、工学博士の学位(昭和35年)を得た。しかし、詳細な解析を進めることの技術的困難さから、新しい研究系を模索していた。昭和45年、サントリー社より大阪大学に移った時、新進の東江昭夫博士(現東京大学理学部教授)が助手として研究室に加わった。この時、培地中の無機リン酸(P_i)濃度により力価が変動するホスファターゼを研究対象とすることを教えられ、これに一時ガラクトース代謝酵素系を加えて今日の研究に至っている。

酵母遺伝子の発現制御の研究では、ホスファターゼ系には以下の長所がある。i) 抑制性酸性およびアルカリ性ホスファターゼはそれぞれの力価を寒天平板上

の個々のコロニーについて、分別して活性染色法により簡単に検定できる. ii) 抑制性酸性ホスファターゼの抑制/脱抑制時の活性比が大きく、変異による変化の判定が容易である. iii) 培地中の P_i 濃度の信号は、これらのホスファターゼおよび P_i 取込み酵素の各構造遺伝子に対し同一信号伝達系によって伝達されているから、これらの酵素活性のいずれについても情報伝達系の変調を認識できる. iv) また各構造遺伝子上の情報認識塩基配列などの特異的構造について複数の遺伝子について比較検討が可能であり、正確な情報を得ることができる.

一方、酵母における遺伝子の発現制御機構については、1960年代の初めより米国 Seattle の Washington 大学においてガラクトース代謝酵素の生産調節系を対象に Douglas と Hawthorne らにより先駆的な研究が開始され、酵母では最初の遺伝子発現制御モデルが1966年に提案された.³⁰⁾しかし、このモデルは、1960年代初頭に形成された大腸菌におけるラクトースオペロンの考え方に影響されるところが大きく、正・負2種の遺伝子発現制御タンパク質による遺伝子転写制御機構が2段に重なり、酵素構造遺伝子にガラクトースの有無についての信号を伝達し、そのON-OFFコントロールを行うとするものであった.

ホスファターゼ系による研究を開始して間もなく、この考え方では説明できない現象を多数観察し、³¹⁻³⁷⁾改訂モデルとして以下の考え方を提案した.³⁶⁻³⁸⁾すなわち遺伝子発現に必須なDNA結合正因子タンパク質と、正因子の活性を阻害的に支配する負因子タンパク質、この負因子の正因子阻害活性を環境因子の情報を受けて負に制御する機能を持つ仲介因子の、3種のタンパク質因子が構成的に生産され、これらタンパク質が互いに干渉しあって培地中の P_i 濃度についての信号を酵素構造遺伝子に伝達するとの考え方である. さらに、ホスファターゼ系には、高発現の遺伝子には、正因子に並列して働く第二の正因子の働きがその発現に必要である.

この考えは研究系の違いもあり、当初学界には容易に受け入れられず、直接ガラクトース系での解析を余儀なくされた. この困難に対して、ガラクトース系における遺伝子発現正因子タンパク質である Gal4 に温度感受性変異を導入して行った松本邦弘(当時修士学生、現名古屋大学理学部教授)らの実験^{39,40)}により、ようやくモデルの改訂が受け入れられた. 遺伝子工学技術の導入に伴い、モデル³⁸⁾の分子生物学的検証が、

われわれ⁴¹⁻⁵³⁾は勿論、欧米の多くの研究室で行われている(わが国ではガラクトース系について慶応大学の深沢俊夫教授). その結果、制御系により異なるが、仲介因子遺伝子あるいは負因子遺伝子が正因子の発現制御を受け、いずれの制御系も全体としては閉鎖環状サーキットを形成することが判った^{45,47,48)}が、それ以外に本質的な間違いを指摘する報告はない. 1991年は、Douglas と Hawthorne による最初のモデル提案以来四半世紀を経ることになり、これを記念して米国遺伝学会の依頼により、当研究室を中心としたこの間の研究の進展と考え方について寄稿した(文献54). Fig. 2は、その時まとめたホスファターゼ系遺伝子の発現制御系の概念図である.

最近の成果によれば、塩基配列の操作による研究から、正因子タンパク質はヘリックスループヘリックス

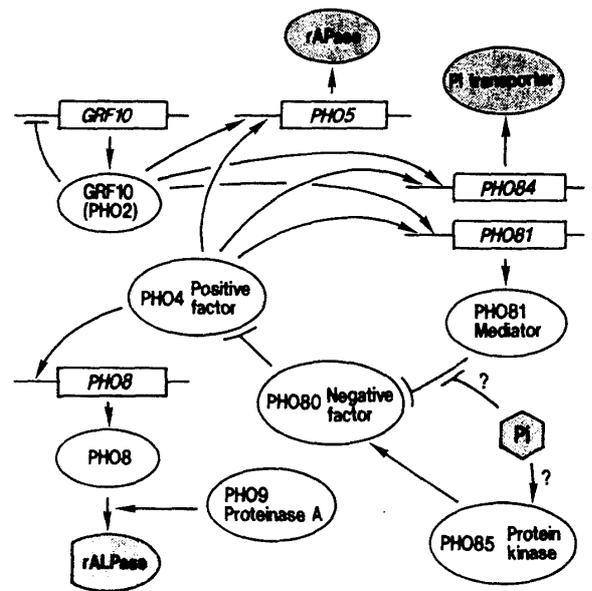


Fig. 2. The regulatory circuit for the phosphatase genes. The protein factors, enzymes, and enzyme precursors in the regulatory circuit are shown in open ovals, and the genes under regulation by these proteins are shown in boxes. The factors in the shaded hexagon and ovals, P_i , rAPase (repressible acid phosphatase) and rALPase (repressible alkaline phosphatase) are the input signals and outputs of the regulatory circuit, respectively. The regulatory factor, for which the corresponding gene is not shown, is produced constitutively, or its regulation is unknown. The arrows in the regulatory circuit indicate positive or stimulating function of the factors, and the bars indicate repressive or inhibitory functions. The Pho9 (Pep4) protein, proteinase A, is needed for processing the Pho8 polypeptide.

クス構造を持つ DNA 結合タンパク質であること⁵⁰⁾、それが認識する構造遺伝子プロモーター上の塩基配列は CACGTG/T であること^{51,55)} がわかった。現在は、正因子タンパクと DNA 結合体の立体構造についての解析⁵⁶⁾ と、この制御系の支配下にある 4 個の遺伝子について、それぞれの発現量に及ぼすプロモーター部の構造の違いと第二正因子の機能メカニズムについて研究を重ねている。

さらに、ガラクトース代謝酵素生産遺伝子は、一方で培地中のグルコースによる発現抑制を受ける。この抑制に働く遺伝子の解析⁵⁷⁻⁶¹⁾ から、酵母における cAMP カスケードとガン遺伝子の *ras* に類似した遺伝子の発見につながり、GTP 結合タンパク質の研究に結びついた。

遺伝子発現機構についての酵母の分子遺伝学によるこれらの成果と最近のは乳動物細胞における分子生物学的研究成果は互いに相補し合うものであり、遺伝子発現における転写因子複合体の概念が明確になりつつある。また、ガンなどの病因解明のモデルにもなることが、多くの基礎医学者の注目を引き、酵母分子遺伝学への参入を促した。工学的には、この研究を通して得られたプロモーター活性を持つ DNA 断片と機能の解明された制御系とさまざまな変異株は遺伝子工学育種において、発現調節可能な宿主・ベクター系⁶²⁻⁶⁴⁾ を提供するものであり、生産現場で、また実験技術として広く利用されている。

本課題の成果は前記の東江、松本および原島に加え、禾 泰寿 (現埼玉医大)、吉田和哉 (現阪大)、小川暢男 (現阪大)、林 直之 (現九大)、文谷政憲 (現広大) など、多くの学生諸君 (当時) の努力によるものである。

3. 酵母プラスミドとその部位特異的組換え系の染色体工学技術への応用

1980年頃、大腸菌のみでなく、幅広い生物種について宿主・ベクター系を構築することを目標に科学技術庁のプロジェクトが発足した。その時、*S. cerevisiae* 以外のその他酵母における宿主・ベクター系の開発を目標に酵母プラスミドの検索^{65,66)} を行ったのが本研究の始まりである。

このプロジェクト終了後は、そこで得られた醤油酵母のプラスミド pSR1 を対象に、*S. cerevisiae* の 2 μ m DNA を含めて保持安定性の高い酵母ベクターの必要条件を探る目的で、酵母プラスミドの一般的な構造と

機能についての研究を進めてきた。⁶⁷⁻⁷⁷⁾ その結果、プラスミドの分配と複製に関する宿主タンパク質の存在と、プラスミド遺伝子のコードするタンパク質およびそれらのタンパク質が働きかけるプラスミド上の部位が明らかとなり、それら機能的部位に障害を与えないように外来遺伝子 DNA を結合することがベクターを宿主内で安定に保つことに重要であることが分かった。

2 μ m DNA についての初期の研究から、酵母プラスミドには 2 種の異性体があり、宿主細胞中にはこれらが等しい割合で存在することが知られていた。pSR1 プラスミドの構造と機能部位についての知見が蓄積されるにつれ、pSR1 プラスミドにも 2 種の異性体があり、特異的組換え系によりこの異性化が効率よく行われることが分かった。異性体が共存することの効果は不明であるが、この部位特異的組換え系が *in vivo* の DNA 組換えに簡単に効率の良い道具となることが分かり、*S. cerevisiae* の染色体を操作することへの応用⁷⁸⁻⁸⁰⁾ を考えついた。

pSR1 プラスミドは Fig. 3 に示すように 6,251 bp からなる環状 DNA 分子である。⁶⁷⁾ その分子内には完全に同じ 959 bp の塩基配列からなる一対の逆向き反復配列がある。この逆向き反復配列のそれぞれは、完全に同一の塩基配列からなっている。それは、もしこの間の塩基配列に変化が生ずると、いずれか一方の配列と同じものに修復される機構があるからである。⁷⁰⁾ それぞれのプラスミド分子では、Fig. 3 で二本の逆向き反復配列間を結ぶ交叉線で示す位置で高頻度で組換えが起こり、この点を境としてプラスミド分子の左右の配列が互いに逆となった異性体が生ずる。⁷⁰⁾ この組換え位置には一組の短い 12 bp の逆向き配列が 7 bp のスペース配列を挟んで存在し、この 12 bp に pSR1 分子上の R 遺伝子にコードされる組換え酵素が結合して切断し、7 bp 部が 1 本鎖となった末端を作る。⁸¹⁾ この切断末端は次の瞬間には再結合されるが、そのとき 2 本の 959 bp の逆向き反復配列間で取り違えて再結合することにより組換え型のプラスミド分子が作られる。⁸¹⁾ こうして酵母細胞中には 2 種の異性体プラスミド分子がほぼ等分子存在する。

この特異的組換え部位と R タンパクさえあれば、宿主細胞の生物種に関わることなく組換えを起こすことができる。*S. cerevisiae* の染色体工学には、この pSR1 プラスミドの部位特異的組換え系が適している。それは、ほとんどの *S. cerevisiae* 細胞には 2 μ m

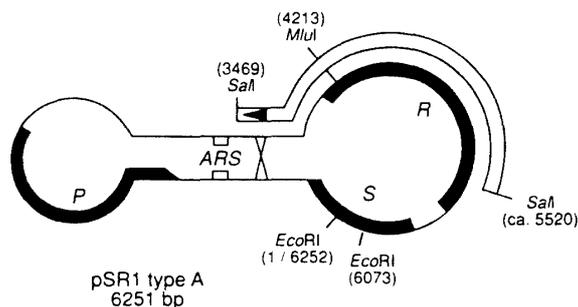


Fig. 3. Structure of pSR1 plasmid and the specific recombination fragment. pSR1 plasmid is a 6251 bp double-stranded circular DNA molecule with a pair of inverted repeats, each composed of a 959 bp sequence, that divide the plasmid molecule into two unique regions of 2654 bp and 1679 bp. The figure represents type A configuration of the pSR1 molecule. The linear portions of the drawing correspond to the inverted repeats. The location and orientation of protein coding regions are indicated by heavy lines and the taper indicates the 3' end of the coding region. Open boxes labeled ARS represent autonomously replicating sequences. The cross connection between the inverted repeats shows the approximate position of the specific recombination site. Numbers for restriction sites represent their positions with respect to G of the EcoRI site as position 1. The 2.1-kb SaI fragment extending from nucleotide position 3469 to ca. 5520 (exact position is not known as this SaI sites was created by linker insertion.) was used as the specific recombination fragment, the arrowhead in the fragment indicating approximate position of the specific recombination site.

DNA プラスミドが存在し、そこでも同じ機構で分子内組換えが行われる。しかし、pSR1 の特異的組換え部位と R タンパク質の特異性は、2 μ m DNA プラスミドを含めた *S. cerevisiae* 細胞のいずれの組換え系とも異なり、それらの影響を受けることなく pSR1 に特異的な組換えを高頻度で起こすことができるからである。

pSR1 の特異的組換え部位を含む DNA 断片を、*S. cerevisiae* 染色体上のこれから挿入しようと思う位置にある遺伝子 DNA と共に大腸菌ベクターに結合し、酵母細胞に導入する。このプラスミド DNA は酵母細胞内では複製できないが、結合されている酵母遺伝子 DNA との相同的組換えにより、低頻度ながら所定の染色体遺伝子座に組み込まれる。このときは、組込まれた遺伝子、あるいはあらかじめマークして置いた選択符号遺伝子の活性を指標に、染色体に外来 DNA が挿入された株を選択できる。また所定の位置に挿入さ

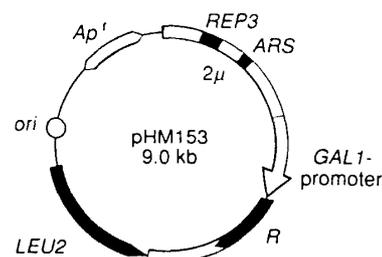


Fig. 4. Structure of pHM153 used for generation of R protein. The thin line with Ap^r and *ori* is a DNA fragment of pBR322. Double lines with closed boxed marked *LEU2* and *GAL1*-promoter are from *S. cerevisiae*, *R* is from pSR1, and *REP3* and *ARS* are from 2- μ m DNA.

れていることは、サザーン法で確認することも容易である。酵母では多くの遺伝子がクローニングされているから、この方法で染色体上の様々な位置に、pSR1 に特異的な組換え部位 DNA を挿入することが可能である。

次に、pSR1 プラスミド上の *R* 遺伝子をクローニングし、適当な酵母遺伝子のプロモーター部下流に結合する。さらにその構築体を酵母のベクターに結合し、組換え部位を染色体上にあらかじめ挿入しておいた酵母細胞に入れる。このとき、たとえば Fig. 4 のごとくガラクトース代謝酵素生産遺伝子のプロモーターを使用すれば、この酵母細胞をガラクトース培地で培養することにより組換え酵素の R タンパクを作るが、グルコース培地では *R* 遺伝子の発現は抑制される。こうして、操作目的により適当な 2 ヶ所の遺伝子座に組換え部位を挿入した染色体を持つ細胞を作り、*R* 遺伝子プラスミドの発現条件で培養することにより、Fig. 5 に示す方法で、i) 欠失、ii) 逆位、あるいは iii) 非相同染色体間で組換えを起こすことができる。しかし、Fig. 5 で「挿入」と示した欠失反応の逆反応で、任意の DNA 断片を組換え部位を 1 ヶ持つプラスミドに乗せ、染色体上の所定位置に組み込むことを試みたが、反応は欠失の方向に偏り成功はおぼつかない。挿入には後述のごとくまた別のアイデアが必要であった。

これらの操作で、分子量の変化した被操作染色体は容易に電気泳動法で検出できる。逆位を生じた染色体には分子量の変化はないが、適当な制限酵素を用いて染色体 DNA を切断し、この付近の DNA をプローブとしたサザーン解析で確認できる。

組換え操作は、*R* 遺伝子の非発現条件下では停止する。さらに *R* プラスミドを細胞より除去することに

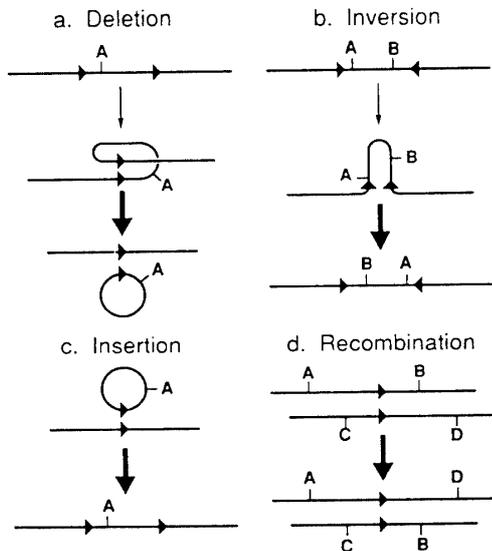


Fig. 5. Four principal strategies to create (a) deletion, (b) inversion, (c) insertion, and (d) recombination between two non-homologous chromosomes. The arrowheads represent the specific recombination sites inserted in the chromosome with the relative orientations as indicated. The thick arrow represents the R-catalyzed recombination.

より、以後の変化を完全に止めることができる。酵母では、ベクタープラスミドは一般に高頻度で脱落するから、R生産プラスミドの除去は容易である。

以上の方法で、主に Fig. 3 に示す pSR1 プラスミド

の特異的組換え部位を含む 2.1 kb の *SaI* 断片と、Fig. 4 に示す pHM153 プラスミドを使用し、現在までに Fig. 5 に示す 4 種の基本的操作のうち挿入実験を除く 3 種類の操作を効率よく行うことに成功した。⁷⁸⁾ 欠失反応をセントロメアを挟んだ 2 点の間で行うと、切り出された領域はセントロメアを含み、環状染色体として保存される。⁸²⁾ その宿主内保持安定性は、分子量にもよるが、プラスミドベクターよりは高い。また、1 本の染色体上で隣接する 2 個の遺伝子座について、いずれがセントロメア側にあるかなどの位置関係を正確に決定することにも利用できる。⁵³⁾ さらに染色体の保持にはセントロメアとテロメアが必要であることから、二倍体細胞で、この組換え法を用いて 1 本の染色体からセントロメアを欠失させることにより、その染色体を消去することが可能となった。⁸³⁾ しかし、これらの $2n-1$ 異数体培養は、栄養培地上での増殖は原株より劣るが、約 30 世代培養を続けると多数の増殖性を回復した正常二倍体と考えられる細胞が出現する。この方法で、一組の相同染色体をホモに持つ株を容易に構築することが可能と考えられる。

一方、大分子量の外来 DNA を染色体に挿入することについては、Fig. 5 に示すプラスミド挿入法ではほとんど不可能であることが分かった。この方法は欠失を生ずる反応の逆反応であるが、実際の反応が欠失の

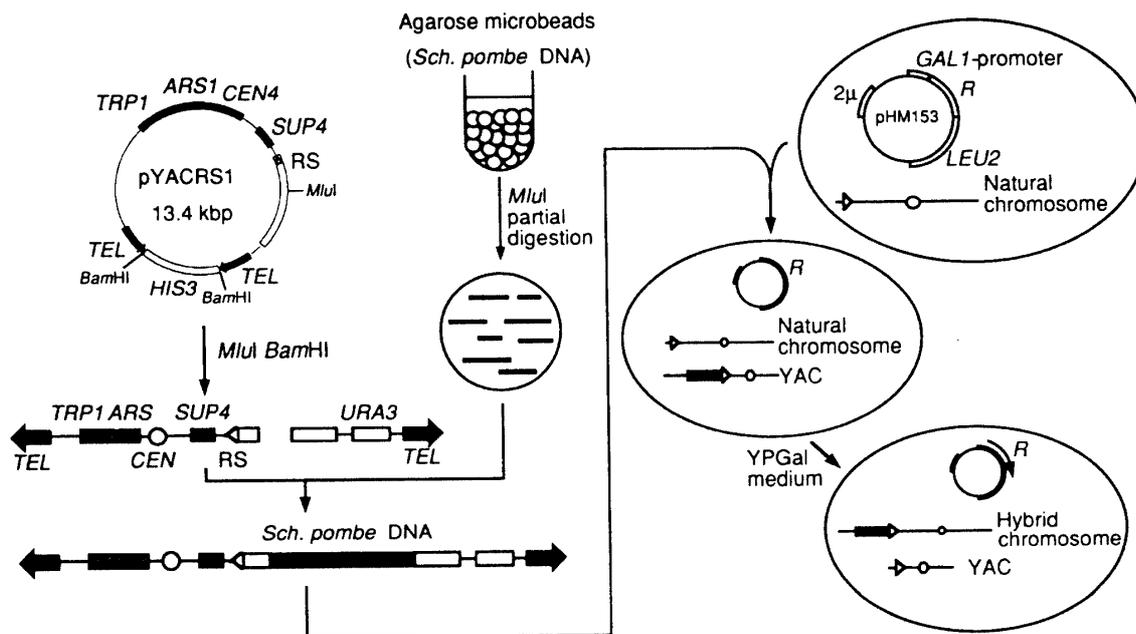


Fig. 6. Construction of an *S. cerevisiae* chromosome connected with a chromosomal segment of *Schizosaccharomyces pombe* by use of YAC vector. The open triangle and circle shown in the oval shaped cells in the right panel represent the specific recombination site and centromere, respectively.

方向に強く偏っているからである。そこで、まず導入すべき外来 DNA を酵母で開発されている人工染色体である YAC ベクター⁸⁴⁾に乗せ、これを酵母細胞内に導入し、YAC ベクターと任意の染色体間の相互組換えにより、外来 DNA 断片を酵母染色体に結合することを考えた。すなわち Fig. 6 に示すように、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の染色体の約 100 kb の断片を *S. cerevisiae* の染色体へ結合することを試みた。⁸⁵⁾ この改変染色体には YAC ベクターに由来する pBR322 プラスミド DNA と相同性を持つ DNA 断片が組み込まれていることを確認した。しかし、酵母染色体に結合された YAC ベクター DNA の大きな部分は分裂酵母の染色体 DNA と考えられるが、未だこれを確認する方法がないのが残念である。この方法を反復して DNA を導入するか、導入株間の交雑により、1000 kb 程度の異種 DNA を導入することは可能と考えられる。

本研究により、これまでのプラスミドベクターを用いる遺伝子工学育種法で、制限されていた導入遺伝子数が大幅に緩和され、百を超える外来遺伝子を導入し、新規代謝系を付与することも可能となるであろう。また、外来遺伝子は直接染色体に組み込まれるからプラスミドのごとく細胞から脱落することが少なく、育種形質が安定化することが期待される。さらに外来遺伝子に頼ることなく、単に染色体に欠失をもたらし、ある機能を完全に除去し、あるいは染色体異常を導入することにより成熟分裂に障害をもたらし、種なし、雄性・雌性不稔の形質を与え、ハイブリッドの育種などへの寄与も期待できる。このような応用を考え、この部位特異的組換え系の植物細胞内での有効性を確かめ、⁸⁶⁾ また、酵母染色体への外来遺伝子の多数導入を可能とするベクターの構築を試みている。⁸⁷⁾

本研究におけるプラスミドの分離については東江、その構造と機能解析では荒木弘之（現阪大微研）、Amonnrat Jearnipatkul（現タイ国ソクラ王子大）、松崎浩明（現福山大）と入江賢児（現名大）の、さらに染色体操作技術の開発では、荒木と松崎をはじめとする多くの教職員、学生、研究生諸君の労を多とした。

おわりに

本研究は、主として大阪大学工学部応用生物工学科とサントリー研究所で行ったものであり、関係各位のご理解とご協力に深く感謝する。特に、恩師である大阪大学名誉教授故照井堯造先生および故小田雅夫先生には永年にわたりご指導とご支援を戴いた。その間、

私に初めて酵母遺伝学を紹介下さった若林謙太郎氏、初期の研究を共同研究者としてご指導いただいた大阪大学名誉教授岡田弘輔先生、酵母遺伝学への本格的修行の機会をいただいた Carl C. Lindegren 先生をはじめとする当時の米国南イリノイ大学 Biological Research Laboratory の方々、さらに我々の学説を米国学界に紹介された Reed B. Wickner 博士と Ira Herskowitz 博士をはじめ、国内外の多くの方々のご指導とご援助によるものである。

本稿では、*S. cerevisiae* の分子育種に関連する研究に限ってまとめたが、その他にも山梨大学の山崎豊彦氏との共同研究になる *Saccharomyces ludwigii* の生活環に関する研究、インドよりのユネスコ微生物学大学院研修講座への留学生であった Pramod K. Sribastava 氏が行った培養条件の改変による酵母成熟分裂中断実験、同じくユネスコ研修講座への留学生であった Elizabeth N. Chua, Chuenchit Boonchird お二人のプラスミドコピー数についての研究などは印象深く記憶している。また、高田信男元助教授、関達治助教授をはじめ多くの学生および研究生諸君が従事した *Bacillus* 属および *Pseudomonas* 属細菌についての分子生物学的分類と遺伝学についての研究があるが、ここで紹介することができなかったことをお詫びする。

文 献

- 1) 高野 勇, 吉栖 肇, 寺島 豊: 醸酵工学, 44, 150-157 (1966).
- 2) Takano, I., Oshima, Y.: *Genetics*, 57, 875-885 (1967).
- 3) Takano, I., Oshima, Y.: *Genetics*, 64, 229-238 (1970).
- 4) Takano, I., Oshima, Y.: *Genetics*, 65, 421-427 (1970).
- 5) Santa Maria, J., Vidal, D.: *I. N. Investigaciones Agronomicas (Madrid)*, 30, 1-21 (1970).
- 6) Takano, I., Kusumi, T., Oshima, Y.: *Mol. Gen. Genet.*, 126, 19-28 (1973).
- 7) Oshima, Y., Takano, I.: *Genetics*, 67, 327-335 (1971).
- 8) Oshima, Y., Takano, I.: *Fermentation Technology Today, Proc. IVth IFS*, (Terui, G.), p. 847-852, Soc. Fermentation Technology, Osaka (1972).
- 9) Harashima, S., Nogi, Y., Oshima, Y.: *Genetics*, 77, 639-650 (1974).
- 10) Harashima, S., Oshima, Y.: *Genetics*, 95, 819-831 (1980).
- 11) Herskowitz, I., Oshima, Y.: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*, (Strathern, J. N., Jones, E. W., Broach, J. R.),

- p. 181-209, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1981).
- 12) Tanaka, K., Oshima, T., Araki, H., Harashima, S., Oshima, Y.: *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 203-211 (1984).
 - 13) Harashima, S., Oshima, Y.: *Genetics*, **84**, 437-451 (1976).
 - 14) McClintock, B.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **21**, 197-216 (1956).
 - 15) Nasmyth, K. A., Tatchell, K.: *Cell*, **19**, 753-764 (1980).
 - 16) Strathern, J. N., Spatola, E., McGill, C., Hicks, J. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2839-2843 (1980).
 - 17) Astell, C. R., Ahlstrom-Jonasson, L., Smith, M., Tatchell, K., Nasmyth, K. A., Hall, B. D.: *Cell*, **27**, 15-23 (1981).
 - 18) Oshima, Y.: *The Early Days of Yeast Genetics*, (Hall, M., Linnder, P.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1993). (印刷中)
 - 19) 大嶋泰治: 生物科学の新しい展開—分子から細胞へ—, p. 156-162, 岩波, 東京 (1987).
 - 20) Herskowitz, I., Rine, J., Strathern, J. N.: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Gene Expression*, (Jones, E. W., Pringle, J. R., Broach, J. R.), p. 583-656, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1992).
 - 21) Fedoroff, N., Botstein, D. (ed.): *The Dynamic Genome*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1992).
 - 22) Takano, I., Oshima, T., Harashima, S., Oshima, Y.: *J. Ferment. Technol.*, **55**, 1-12 (1977).
 - 23) Takagi, A., Harashima, S., Oshima, Y.: *Appl. Env. Microbiol.*, **45**, 1034-1040 (1983).
 - 24) Harashima, S., Takagi, A., Oshima, Y.: *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 771-778 (1984).
 - 25) Takagi, A., Harashima, S., Oshima, Y.: *Appl. Env. Microbiol.*, **49**, 244-246 (1985).
 - 26) Harashima, S., Miller, A. M., Tanaka, K., Kusumoto, K., Tanaka, K., Mukai, Y., Nasmyth, K., Oshima, Y.: *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 4523-4530 (1989).
 - 27) Mukai, Y., Harashima, S., Oshima, Y.: *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 3773-3779 (1991).
 - 28) Nakazawa, N., Harashima, S., Oshima, Y.: *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 5693-5700 (1991).
 - 29) Nakazawa, N., Ashikari, T., Goto, N., Amachi, T., Nakajima, K., Harashima, S., Oshima, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 265-270 (1992).
 - 30) Douglas, H. C., Hawthorne, D. C.: *Genetics*, **54**, 911-916 (1966).
 - 31) Toh-e, A., Ueda, Y., Kakimoto, S., Oshima, Y.: *J. Bacteriol.*, **113**, 727-738 (1973).
 - 32) Toh-e, A., Oshima, Y.: *J. Bacteriol.*, **120**, 608-617 (1974).
 - 33) Ueda, Y., Toh-e, A., Oshima, Y.: *J. Bacteriol.*, **122**, 911-922 (1975).
 - 34) Toh-e, A., Kakimoto, S., Oshima, Y.: *Mol. Gen. Genet.*, **143**, 65-70 (1975).
 - 35) Toh-e, A., Nakamura, H., Oshima, Y.: *Biochim. Biophys. Acta*, **428**, 182-192 (1976).
 - 36) Toh-e, A., Kobayashi, S., Oshima, Y.: *Mol. Gen. Genet.*, **162**, 139-149 (1978).
 - 37) Toh-e, A., Inouye, S., Oshima, Y.: *J. Bacteriol.*, **145**, 221-232 (1981).
 - 38) Oshima, Y.: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*, (Strathern, J. N., Jones, E. W., Broach, J. R.), p. 159-180, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982).
 - 39) Matsumoto, K., Toh-e, A., Oshima, Y.: *J. Bacteriol.*, **134**, 446-457 (1978).
 - 40) Matsumoto, K., Adachi, Y., Toh-e, A., Oshima, Y.: *J. Bacteriol.*, **141**, 508-527 (1980).
 - 41) Kaneko, Y., Toh-e, A., Oshima, Y.: *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 127-137 (1982).
 - 42) Toh-e, A., Kaneko, Y., Akimaru, J., Oshima, Y.: *Mol. Gen. Genet.*, **191**, 339-346 (1983).
 - 43) Kaneko, Y., Tamai, Y., Toh-e, A., Oshima, Y.: *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 248-252 (1985).
 - 44) Tamai, Y., Toh-e, A., Oshima, Y.: *J. Bacteriol.*, **164**, 964-968 (1985).
 - 45) Yoshida, K., Kuromitsu, Z., Ogawa, N., Ogawa, K., Oshima, Y.: *Phosphate Metabolism and Cellular Regulation in Microorganisms*, (Torriani-Gorini, A., Rothman, F. G., Silver, S., Wright, A., Yagil, E.), p. 49-55, American Society for Microbiology, Washington, DC (1987).
 - 46) Kaneko, Y., Hayashi, N., Toh-e, A., Banno, I., Oshima, Y.: *Gene*, **58**, 137-148 (1987).
 - 47) Yoshida, K., Kuromitsu, Z., Ogawa, N., Oshima, Y.: *Mol. Gen. Genet.*, **217**, 31-39 (1989).
 - 48) Yoshida, K., Ogawa, N., Oshima, Y.: *Mol. Gen. Genet.*, **217**, 40-46 (1989).
 - 49) Kaneko, Y., Toh-e, A., Banno, I., Oshima, Y.: *Mol. Gen. Genet.*, **220**, 133-139 (1989).
 - 50) Ogawa, N., Oshima, Y.: *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 2224-2236 (1990).
 - 51) Hayashi, N., Oshima, Y.: *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 785-794 (1991).
 - 52) Bun-ya, M., Nishimura, N., Harashima, S., Oshima, Y.: *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 3229-3238 (1991).
 - 53) Bun-ya, M., Harashima, S., Oshima, Y.: *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 2958-2966 (1992).
 - 54) Oshima, Y.: *Genetics*, **128**, 195-201 (1991).
 - 55) Ogawa, N., Noguchi, K., Yamashita, Y., Yasuhara, T., Hayashi, N., Yoshida, K., Oshima, Y.: *Mol. Gen. Genet.*, **238**, 444-454 (1993).
 - 56) Hakoshima, T., Teranishi, Y., Ohira, T., Suzuki, K., Shimizu, M., Shirakawa, M., Kyogoku, Y.,

- Ogawa, N., Oshima, Y.: *J. Mol. Biol.*, **229**, 566-569 (1993).
- 57) Matsumoto, K., Toh-e, A., Oshima, Y.: *Mol. Cell. Biol.*, **1**, 83-93 (1981).
- 58) Matsumoto, K., Uno, I., Toh-e, A., Ishikawa, T., Oshima, Y.: *J. Bacteriol.*, **150**, 277-285 (1982).
- 59) Matsumoto, K., Uno, I., Oshima, Y., Ishikawa, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2355-2359 (1982).
- 60) Matsumoto, K., Yoshimatsu, T., Oshima, Y.: *J. Bacteriol.*, **153**, 1405-1414 (1983).
- 61) Matsumoto, K., Uno, I., Ishikawa, T., Oshima, Y.: *J. Bacteriol.*, **156**, 898-900 (1983).
- 62) Hwang, Y.-I., Harashima, S., Oshima, Y.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 155-159 (1988).
- 63) Hwang, Y.-I., Harashima, S., Oshima, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 1-7 (1989).
- 64) Kobayashi, H., Nakazawa, N., Harashima, S., Oshima, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **69**, 322-327 (1990).
- 65) Toh-e, A., Tada, S., Oshima, Y.: *J. Bacteriol.*, **151**, 1380-1390 (1982).
- 66) Toh-e, A., Araki, H., Utatsu, I., Oshima, Y.: *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 2527-2534 (1984).
- 67) Araki, H., Jearnpipatkul, A., Tatsumi, H., Sakurai, T., Ushio, K., Muta, T., Oshima, Y.: *J. Mol. Biol.*, **182**, 191-203 (1985).
- 68) Jearnpipatkul, A., Araki, H., Oshima, Y.: *Mol. Gen. Genet.*, **206**, 88-94 (1987).
- 69) Jearnpipatkul, A., Hutacharoen, R., Araki, H., Oshima, Y.: *Mol. Gen. Genet.*, **207**, 355-360 (1987).
- 70) Matsuzaki, H., Araki, H., Oshima, Y.: *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 955-962 (1988).
- 71) Ushio, K., Tatsumi, H., Araki, H., Toh-e, A., Oshima, Y.: *J. Ferment. Technol.*, **66**, 481-488 (1988).
- 72) Araki, H., Oshima, Y.: *J. Mol. Biol.*, **207**, 757-769 (1989).
- 73) Irie, K., Araki, H., Oshima, Y.: *Mol. Gen. Genet.*, **225**, 257-265 (1991).
- 74) Irie, K., Araki, H., Oshima, Y.: *Gene*, **108**, 139-144 (1991).
- 75) Irie, K., Takase, M., Araki, H., Oshima, Y.: *Mol. Gen. Genet.*, **236**, 283-288 (1993).
- 76) Irie, K., Takase, M., Lee, Y. S., Levin, D. E., Araki, H., Matsumoto, K., Oshima, Y.: *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 3076-3083 (1993).
- 77) Araki, H., Awane, K., Irie, K., Kaisho, Y., Naito, A., Oshima, Y.: *Mol. Gen. Genet.*, **238**, 120-128 (1993).
- 78) Matsuzaki, H., Nakajima, R., Nishiyama, J., Araki, H., Oshima, Y.: *J. Bacteriol.*, **172**, 610-618 (1990).
- 79) 大嶋泰治：酵母研究技法の新展開（倉石 衍編），p. 45-48, 学会出版センター，東京（1991）。
- 80) 松崎浩明，中島亮一，川崎秀紀，荒木弘之，大嶋泰治：酵母研究技法の新展開（倉石 衍編），p. 49-62, 学会出版センター，東京（1991）。
- 81) Araki, H., Nakanishi, N., Evans, B. R., Matsuzaki, H., Jayaram, M., Oshima, Y.: *J. Mol. Biol.*, **225**, 25-37 (1992).
- 82) Kawasaki, H., Matsuzaki, H., Nakajima, R., Oshima, Y.: *Yeast*, **7**, 859-865 (1991).
- 83) 松本雄大，松崎浩明，荒木弘之，大嶋泰治：日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集，p. 155 (1991)。
- 84) Burke, D. T., Carle, G. F., Olson, M. V.: *Science*, **236**, 806-812 (1987).
- 85) 松本雄大：大学院工学研究科 醸酵工学専攻 修士論文，大阪大学（1992）。
- 86) Onouchi, H., Yokoi, K., Machida, C., Matsuzaki, H., Oshima, Y., Matsuoka, K., Nakamura, K., Machida, Y.: *Nucleic Acids Res.*, **19**, 6373-6378 (1991).
- 87) Roca, J., Gartenberg, M. R., Oshima, Y., Wang, J. C.: *Nucleic Acids Res.*, **20**, 4671-46732 (1992).