

酵母遺伝学の発展と共に

大嶋 泰治

お い た ち

私は昭和7年の生まれである。ものごころ付いた頃は軍国主義と戦争のさなかにあったが、中国地方の盆地の村で小さな造り酒屋を営む生家では、戦火は遠いニュースであった。蒸米の湯気と新酒の香りで新春を迎え、芽吹きのは春には野山に遊び、夏は盆地を貫く清流で泳ぎ、秋には田畑の収穫を手伝った。小学校のころから模型飛行機に熱中し、宇宙を考え、ラジオと写真にも手を染め、ひとかどの科学者気取りの少年時代であった。反面、一夜漬けの試験勉強のほかには、学校教科に力を入れた憶えはない。高校を卒業したのは戦後の色濃い昭和26年であり、なんとなく憧れていた航空技術者への道は敗戦で閉ざされていた。仕方なく父の言に従って、酒造技術の習得に大阪大学の醸酵工学科を受験した。それも一度限りの受験で、失敗したら高卒のままで酒造業を継ぐつもりでいた。物資に不足していたその頃は、酒造家は地域の殿様であった。

大学への進学は酵母の勉強のためであった。父の一途の言に素直に従ったまでである。その頃の清酒業界は、古来の生酏(山麩酏)から速醸酏への移行のさなかにあった。ほどよい水と米に恵まれていた父にとって、唯一の心配事は、その筋から配布される酵母にあった。その素性はもとより雑菌汚染の判断もつかないのである。

運良く入学試験に合格した私は、阪急塚口に歯科医院を構えていた叔父の家へ、当然の如く居候し、迷惑をかけながら石橋の教養部へ通いはじめた。卒業したら家に帰るつもりであったから、入学当初は教科の履修も気ままであった。しかしこの考えは日が経つにつれて変わり始めた。帰郷の折に車窓から見る灘の酒蔵に、井の中の蛙であることをまず痛感した。枚方の火薬庫跡で初めて専門の講義を聴き、つづいて東野田キャンパスでの実験科目に、模型飛行機とは違った面白さを覚えた。卒業研究に及んでは、研究者への道を考えるようになり、帰郷の念はさらに薄れた。それでも父への遠慮があり、さしずめもう少々勉強をと大学院へ進学した。

酵母の勉強が目的であったから、卒業研究は小田雅夫先生の菌学研究室へ入れて頂いた。そこでは清酒酵母の研究が行われていたからである。特に衰退の方向にあっ

た生酏醪から分離された *Saccharomyces* 属の株が多数保存されていた。それら酵母株の保存中の形質変化を調べることが私に与えられた課題であった。保存条件の如何に関わらず、植え継ぎを重ねるとさまざまな形質に変化を生じ、呼吸能を欠く細胞が頻発した。一方で、研究生として在籍していた先輩の若林謙太郎氏が、生酏醪より分離された酵母株から、子囊の熱処理による一倍体株の分離を行い、交配を試みていた。その手伝いをさせて頂いたのが私の遺伝学への入り口であった。その初歩的な実験を通して、後年の研究の基となる遺伝学的思考と感覚を学んだ。当時の発酵工学界では、遺伝学はフロンティアの一つであり、積極的に優良株を創り出すことに魅力があった。

この小田研究室は間もなく先生のご退官で消滅し、大学院では発酵生理学の照井堯造先生の研究室へ入れて頂いた。生酏醪よりの酵母株と共にである。しかも都合よく、私の参加を待っていたかのように、照井研に de Fonbrune 型のマイクロマニピュレーターが導入されていた。念願の四分分子分析による本格的な酵母の遺伝学が可能となったのである。またその頃、講師に就任されたばかりの岡田弘輔先生が、マルトースに対する酵母の適応現象について、細胞レベルの解析をされていた。私も重複したマルトース遺伝子の遺伝子型分析でお手伝いをする機会に恵まれた。これが博士課程での「酵母の糖醗酵性遺伝に関する研究」となり、その後の主要テーマの一つである遺伝子発現制御系への下地となった。

サントリー研究所では

大学院博士課程在学中のある日、サントリー社(当時は株式会社寿屋)への入社が決まった。ウイスキーとワインで日本を代表する当社は、酵母の研究は粗略にはしないだろうと考えたからである。また結婚を控えて収入も必要であった。何よりも当時の佐治敬三専務のご理解と、研究部長をされていた楠本四郎氏と技術担当常務であった本多久吉氏のご厚意があった。こうして昭和34年4月からサントリー社員となったが、大阪大学で研究を続け、大阪市の堂島にあった研究所に移ったのは昭和36年の4月であった。

その頃のサントリー研究所はまことに自由闊達な雰

気に包まれ、いくらかの責任を果たせば、比較的自由的な発想で研究ができた。そこで大学時代からの延長で、酵母のマルトース適応の研究を続けた。環境変化に対応して微生物がいかに遺伝子機能を変化するかを理解が、発酵工業に大変重要と考えたからである。特に、デンプン質を原料とする醸造には、酵母のマルトースへの適応機構の理解は欠かせないと思った。その過程でマルターゼ活性の簡便な検定基質とされていた α -methylglucoside が、実はマルターゼではなく、いわゆるイソマルターゼによって加水分解されることを知った。また重複するマルトース遺伝子が互いに機能的に補い合うことを発見し、個々のマルトース遺伝子が2つ以上の機能単位になると考察した。このことは後に判明した遺伝子構造から当然期待されることであった。しかしこのマルターゼ系は、このような系自体の複雑さと、表現型決定の煩雑さから、適応現象の解明には不相当と考えはじめた。基本的原理のまったく不明な当時としては、実用から一時離れても、解析の容易な現象を研究対象とすべきであると思った。

カーボンデルでの留学生活

そうこうするうちに、照井先生のご紹介で、昭和38年の9月から40年の6月まで、米国イリノイ州カーボンデルの南イリノイ大学、生物学研究所の Carl C. Lindegren 先生の下への留学が実現した。そこで欧州回りの経路をとり、パリ近郊の Gif-sur-Yvette で行われた第2回国際酵母遺伝学集談会と、オランダのハーグで開催された第11回国際遺伝学会議に参加した。適応現象に対する欧米の学者達の考えを学びたかったのである。しかし当時の酵母遺伝学はまだ揺籃期にあり、また初めての外国経験とあり、戸惑いと消化不良で、これというアイデアには到達しなかった。

カーボンデルでの生活は、日本から直行してきた妻と長女を迎えて、今思うと人生で一番屈託のない楽しい時代であった。Lindegren 先生は音に聞こえた頑固者であったが、研究室はミセスが取り仕切り、酵母をモデル生物に引き上げるために、遺伝子連鎖地図の作成に打ち込んでいた。ポストクの Ernest Shult 博士（その後 Kansas State University 数学科教授）が四分子分析資料よりの連鎖値計算式を考え、私は ethylmethane sulfonate による突然変異株の分離と連鎖分析を行った。以前行った α -methylglucoside 資化性遺伝子の分析の如く、四分子分析を遺伝子間の連鎖分析のみでなく、この時も機能分析に応用して抑圧変異を検出した。この方法が後年ホモ

タリズム遺伝子の解析に威力を発揮した。

ホモタリズムとの出会い

昭和40年の夏、南イリノイ大学から堂島のサントリー研究所へ帰った。サントリー社が旧称の寿屋からの社名変更と、念願のビールを市場に出したのは昭和38年であったが、帰国当時の研究所ははまだビール事業進出時の余熱を保っていた。その雰囲気の中で、同僚達に留学中の見聞を語り、その間の研究所の様子を聞いた。その会話のなかで、高野勇氏から異常なホモタリズム現象を示す株の存在を知った。当時知られ始めていた工業酵母株、特に下面発酵ビール酵母の高次倍数性とホモタリズムの関連を考えた私は、ただちに高野氏とその異常なホモタリズム株の研究にとりかかった。

この研究は、昭和45年の私の大阪大学への移籍を挟んで昭和55年頃まで続けられ、染色体上を規則正しく移動し変化する遺伝子の存在を、原島俊君（現大阪大学教授）と禾泰壽君（現埼玉医科大学教授）など、多くの学生諸君の協力により明らかにすることができた。すなわち、酵母の第III染色体上の接合型支配対立遺伝子 $MATa$ と $MAT\alpha$ は、細胞増殖中に相互の間で規則正しく変換し、1個の単相体孢子に由来する細胞集団中に、 a と α の両接合型細胞の混在をもたらす。その間で接合子が形成されて二倍体細胞を生ずる。その MAT 座の遺伝子型変換は、 HML と HMR と命名された2個の接合型情報を担う遺伝子から、もう1つのホモタリズム主要遺伝子 HO の働きで、細胞分裂の定められた時期に規則正しく接合型情報が MAT 座に送られ、それまでの情報と入れ替わるためである。この結論を、その後マドリードの研究者から得た1株と、もう1株の研究所保存株を加えた合計3株の特異な株間の交配雑種の四分子分析から導いたのである。これらの成果を1967から80年に亘って数編の論文にまとめ、主として米国遺伝学会の *Genetics* 誌に報告し、その機構を Barbara McClintock がトウモロコシで発見した動く遺伝子にちなんで、Controlling element モデルと呼んだ。また Ira Herskowitz との連名の総合論文を、1981年の Cold Spring Harbor Yeast Monograph にまとめた。¹⁾ さらに求められて文献²⁾に研究経緯を記述した。以来、Herskowitz を始めとする欧米の研究者の強い関心を集め、改めて Cassette モデルとして世に流布し、接合型支配系全体の解明に重要な影響を及ぼし、さらに醸造酵母の交配育種に新しい道を拓いた。現在では多細胞生物の細胞分化のメカニズムにまで示唆が及んでいる。

ホモタリズム研究の当初の目的であったビール酵母などの高次倍数性については、ホモタリズム機構に含まれる接合型変換により四倍体育種が可能となった。しかし、より容易に細胞融合法により造成可能である。最近、高次倍数性の下面発酵ビール酵母（現在では *S. pastorianus* に分類されている）の由来については、（恐らく細胞融合による）*S. cerevisiae* と *S. bayanus* の種間雑種説が有力となってきた。³⁾

ホスファターゼ系

しかし、1980年代に至って、ホモタリズムの研究をこれ以上研究室のテーマとすべきではないと判断した。その理由は、*HMR*、*HML* および *MAT* 遺伝子のクローニングなどで欧米勢に大きく後れをとったこと。また分子レベルの解析に、ポストドクを大量に投入できる欧米の戦力に対抗できないと覚悟したからである。当時の日本では、制度的にそのいずれにも対応できなかった。そこですでに始動していた第2のテーマに力を集中した。アイデアに優るホスファターゼ系を対象とした遺伝子発現制御系の研究である。

すでに述べたように、私は修士学生の頃より、工業微生物の育種では、遺伝子発現制御機構の操作が最も重要との考えを抱き、解析の容易な研究系を模索していた。昭和45年6月、サントリー社より大阪大学に移籍した際、アカパンカビの遺伝生化学で博士号を取得したばかりの東江昭夫君（現東京大学教授）が助手として研究室に加盟した。この東江君より、培地中の無機リン酸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示唆され、直感的にこれこそ求めていた研究系と思った。さらに一時ガラクトース代謝酵素系を対象に加えて、その後の主な研究対象とした。ホスファターゼ系の長所は、抑制性酸性ホスファターゼが細胞表層にあり、その力価検定を寒天平板上のコロニーで行うことができる。またその脱抑制/抑制時の活性比が大きく、変異の判定も容易なことにあった。さらに、突然変異体の増殖が、野生型に比較して大きな差がないことも優れていた。

酵母における遺伝子発現制御機構については、1960年代の初めよりガラクトース代謝酵素を対象に H.C. Douglas と D.C. Hawthorne らによる先駆的な研究があり、1966年にモデルが提案されていた。このモデルでは、酵素構造遺伝子の転写制御に正負2種の因子が存在していたが、それら制御因子の作用機構について、1960年代初頭に成立した大腸菌のラクトースオペロンに影響を受けていた。すなわち負因子遺伝子は、正因子遺伝子の発現

を抑制するリプレッサーをコードすると考えていた。ガラクトースの存在下では、この負因子は不活性化されて正因子遺伝子が発現し、その関与のもとでガラクトース代謝酵素遺伝子が一斉に発現するとされていた。ホスファターゼ系で突然変異体の収集とその遺伝解析を始め、間もなく、ガラクトース系と同じく、遺伝子発現に必須の正因子をコードする遺伝子、正因子の活性を阻害的に支配する負因子遺伝子が検出され、さらにこの負因子活性を負に調節する第3番目の遺伝子があり、これら3種の遺伝子は環境の無機リン酸濃度に関係なく構成的に発現し、そのコードする制御タンパク質が互いに干渉し合って無機リン酸信号を酵素構造遺伝子に伝達し、その on-off 制御を行うと考えた。

Douglas-Hawthorne モデルでは、負因子は正因子遺伝子 DNA に働きかけるのに対して、改訂モデルではタンパク質とタンパク質間の干渉と考えた。研究系の違いもあって、この考えは素直には学界に認められず、直接ガラクトース系での証拠を示す必要に迫られた。これに対し、ガラクトース系の正因子タンパク質に温度感受性変異を導入して行った松本邦弘君（現名古屋大学教授）らの実験により、ようやく改訂モデルが酵母での一般機構を示すものとして受け入れられた。^{4,5)} 以来、私達はもとより、欧米の多くの研究室で検証実験が続けられ、制御因子の実体の解明が行われている。⁶⁾ 関連する知見は哺乳類での制御系にも示唆を及ぼし、現在もなお真核生物遺伝子の転写制御モデルとして広く研究の対象とされている。

部位特異的組換え系と染色体工学

アメリカ遺伝学会で、私の研究が T.H. Morgan メダル受賞の対象となったのは、主として上記2分野の研究である。しかし、これらと並んでもう一つ特筆したい研究がある。酵母プラスミドの部位特異的組換え系の染色体工学への応用である。1979年に組換え DNA 実験の指針が初めて文部省より提示され、わが国でも遺伝子操作実験が始まった。その中広い応用を目的として、さまざまな生物種についてベクター素材を検索する科学技術庁のプロジェクトが発足した。その時、*S. cerevisiae* 種以外の酵母種に分布するプラスミドの検索を担当し、東江昭夫君を中心に実験を行った。その頃、郡家徳郎氏により *Kluyveromyces lactis* のキラ現象に対応する2種の線状 DNA プラスミドが報告されていたが、この研究で *S. cerevisiae* に広く分布する2 μ m DNA 類似の環状 DNA プラスミドが、一部の *Zygosaccharomyces* 属と *Kluyveromyces*

属の株に検出された。

プロジェクト終了後、*Z. rouxii* 由来の pSR1 プラスミドと *S. cerevisiae* の 2 μ m DNA を対象に、酵母プラスミドの構造と機能についての研究を、当時助手であった荒木弘之君（現国立遺伝学研究所教授）を中心に始めた。その成果の多くはここでは割愛するが、2 μ m DNA と同じく pSR1 分子も宿主細胞中では 2 種の異性体として存在する。その異性化に働く部位特異的組換え系の、プラスミド種による特異性に興味を抱いた。酵母の環状 DNA プラスミド分子には一対の大きな逆向き反復配列があり、その反復配列中に、たとえば pSR1 では 7 bp のコア配列を挟んで左右に 12 bp の短い逆向き反復配列がある。一対の大反復配列上にある短い反復配列部位 2 箇所の間で組換えが起こり、この位置を挟んでプラスミド分子の左右の領域が逆配列となった異性体ができる。その組換えはプラスミド分子上にコードされる特異的な組換え酵素により触媒されている。興味を引いたのは、pSR1 の組換え酵素と組換え部位の特異性が 2 μ m DNA のそれと異なり、互いに噛合わないことである。そこで pSR1 の組換え系を用いて、*in vivo* での *S. cerevisiae* 染色体の操作を考えた。大学院生の松崎浩明君（現福山大学助教授）がこの課題に挑戦し、内在する 2 μ m DNA に影響を受けることなく、染色体に欠失と逆位の導入また非相同染色体間の組換え体の構築など^{7,8)} 染色体の大幅な改造や異数体の構築が可能となった。さらに組換え部位と組換え酵素の適切な組合せで、染色体に限ることなく、さまざまな DNA の *in vivo* 操作が可能となり、動・植物に及ぶ多様な生物種でその幅広い応用が検討され、一部は実用化されている。⁹⁾

上記以外にもさまざまな研究に関与してきたが、私達の酵母の分子遺伝学分野での研究は、ほとんど上記 3 課題に含まれている。紙面の制限からそれらに直接触れることができないのが残念である。思えば第 1 回の国際酵母遺伝学集談会は 1961 年にカーボンデールで開催されている。まさに私達の研究は、国際的な酵母の遺伝学と分子生物学の進歩と共に歩み、いずれの研究も新規な課題であった。T.H. Morgan メダルの対象となったのも、これら研究テーマの先駆性にあつたと考えている。わが国ではポストドク制度の立ち遅れがあつたが、多くの優れた協力者と学生諸君に恵まれた幸運もあり、楽しく実の濃い研究生活であつた。また国内外の多くの研究者と研究機関から有益なご教示とご支援を頂いた。

文 献

- 1) Herskowitz, I. and Oshima, Y.: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*, (Strathern, J. N. et al.), p.181, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1981).
- 2) Oshima, Y.: *The Early Days of Yeast Genetics*, (Hall, M.N. and Linder, P.), p.291, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1993).
- 3) Tamai, Y. et al.: *Yeast*, **16**, 1335 (2000).
- 4) Oshima, Y.: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*, (Strathern, J.N. et al.), p.159, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1982).
- 5) Oshima, Y.: *Genetics*, **128**, 195 (1991).
- 6) Oshima, Y.: *Genes Genet. Syst.*, **72**, 323 (1997).
- 7) Matsuzaki, H. et al.: *J. Bacteriol.*, **172**, 610 (1990).
- 8) Oshima, Y. et al.: *Methods in Molecular Biology*, (Evans, I.H.), Vol. **53**: *Yeast Protocols, Methods in Cell and Molecular Biology*, p.217, Humana Press Inc., Totowa, N.J. (1996).
- 9) Kilby, N.J. et al.: *Trends Genetics*, **9**, 413 (1993).

糸状菌の遺伝学から酵母遺伝学へ

東江 昭夫

私は東京大学大学院ではアカパンカビを研究材料に学位論文を書いて、その後大阪大学工学部醗酵工学科の助手に採用して頂き、大嶋研で酵母の遺伝学を始めた者です。この機会に当時のことを振り返ってみました。

アカパンカビでの研究テーマは石川辰夫先生（東京大学名誉教授、当時東京大学植物学教室助手）のご指導のもとに、1965年から始めたもので、核酸をリン酸源として利用する反応の遺伝生化学的な研究でした。「発生、分

化など、高次の生命現象には生体高分子の合成ばかりではなく、分解も重要な役割を果たしているであろう」という考えで、核酸分解系の研究を進めていました。この間に、電気泳動担体上でのアルカリ性ホスファターゼの活性染色法をヒントに、プレート上でのホスファターゼ活性染色法を考案し遺伝解析に応用しました。この方法は、後に、酵母のホスファターゼ活性染色に適用して、大きな成果をあげることができました。私が博士課程を