

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

修了した1970年頃、分子遺伝学の分野では大腸菌とそのファージを材料とした研究が、その圧倒的な解析力と人材の豊富さで、群を抜いていました。カビの遺伝学研究の意義はカビが真核生物であるということでした。真核生物には原核生物にはない、何か新奇の制御系があるのではないかと期待していたわけです。遺伝学の観点からは酵母でも同様であったように思います。それでは、アカパンカビと酵母ではどちらが優れた実験材料だったのでしょうか。研究目的にもよりますが、この時点では甲乙付けがたいというのが本当のところでした。私が酵母へ移ったのも、積極的に酵母を選んだわけではなく、所属研究室での研究材料であったからということでした。今から考えてみると大変な幸運といわざるを得ません。しかし、実験材料を変えるということは結構大変なことで、当時大阪市内の堂島にあったサントリーの研究所に大嶋先生をお尋ねしたおり、高野さんが四分子分離した寒天スラブを見せて下さって、「これからこれが主な実験手法になりますよ」といわれ、「顕微解剖のような器用なことをできるようになれるだろうか」と目の前が真っ暗になったことを思い出します。アカパンカビの子嚢胞子は実体顕微鏡のもと、手で解剖針を操作して分離できますので、顕微操作の必要はなかったわけです。

実際に酵母を扱ってみて酵母の方がアカパンカビより使いやすい点もいくつか分かりました。特に印象的だったのが成長曲線の作成法の違いでした。アカパンカビでは一点一点を乾燥重量で表わすのですが、酵母ではODで示せるので酵母の成長曲線を書くのが楽しかったことを思い出します。酵母ではほとんどのバクテリアのプレートワークが使えるのもうれしいことでした。ベルベットを使ったレプリカ法はアカパンカビには適用できませんでした。

こうして酵母の取扱いに慣れながら、さあ何を研究課題にしようかと考えたのですが、酵母遺伝の分野でどのような研究が行われているのかよく分かりませんでしたし、あまりいいアイデアもなかったもので、アカパンカビで成功したホスファターゼ染色法を使って酵母のホスファターゼをやってみようと考え、試しにいろいろな培地上でホスファターゼの活性染色をしてみました。酵母ではアカパンカビとは違って、酸性ホスファターゼが脱抑制されること、この酸性ホスファターゼは分泌酵素であることが分かりました。酵母のコロニーの上に染色液をかけるとホスファターゼの活性は検出できるのですが、細胞が散ってしまっただけでアカパンカビの時とは様子が違ったのでこれはどうしたものかと大嶋先生にうかがっ

たところ、染色液に寒天を入れて重層する方法があるということを知り、すぐに試してみるとこれが大変うまくいきました。染色後のコロニーから生きた細胞を回収することもできることが分かりましたので、これを使ったホスファターゼ変異体の分離が可能であることがわかったわけです。また、幸いなことに、当時酵母ホスファターゼの遺伝学的な研究もないということだったのでこのテーマでやってみることに決めただけでした。

清酒酵母 H42 を親株としてホスファターゼ突然変異体の分離を始めました。H42 を使ったことも幸運でした。染色の結果から、この株は二種類の酸性ホスファターゼ、構成性酸性ホスファターゼと抑制性酸性ホスファターゼ、を持つことが予想されたからです。実際、これらの二種のホスファターゼの存在は突然変異体の分離によって確かめられました。またそれぞれ酵素の構造遺伝子が近接してあることも分かりました。研究室保存株の中には、構成性酸性ホスファターゼを欠損した株がたくさんあります。もし、このような株を親株として使って、ホスファターゼの変異体の分離を始めていたら、思いもよらない寄り道をする事になっていたかもしれません。構成性酸性ホスファターゼの復帰変異体が分離された場合、隣接している抑制性酸性ホスファターゼの調節領域の変異と区別するのが難しいからです。ホスファターゼ変異体の分離と遺伝解析は順調に進み、紆余曲折はありましたが、新しい遺伝子発現調節モデルの提案にまで行きつめたことは、私自身のその後にとっても大変重要な意味を持っていたと、今振り返ってあらためて思う次第です。この間、大嶋研究室に集まった、個性豊かな学生諸君の大きな助けがあったことを付け加えておきます。

1970年代の後半はカビ・酵母の実験系を使っていた私達にとって、大変苦しい時代でした。遺伝学的な研究結果を説明するモデルはできたけれど、その分子機構を調べる方法がなかったのです。大腸菌とファージのいくつかの系ではリプレッサータンパク質が単離精製されましたし、ラムダファージの形質転換ファージとして *in vivo* の遺伝子クローニングができていて、分子レベルの研究がどんどん進んでいました。私達の研究にも遺伝子の単離や制御タンパク質の単離精製が必要であることは分かっていたのですが、その方法がないという閉塞感から大変悲観的になっていました。このような時期に米国 NIH 研究所の Wickner 博士の研究室に二年間留学する機会が与えられたことは私にとって天恵でした。この頃大腸菌を宿主に酵母遺伝子のクローニングが成功してい

ました。Differential plaque hybridization 法を用いて、*GAL1,10,7* 遺伝子がクローニングされました。さらに、Hinnen, Hicks, Fink による酵母の形質転換系の開発、これを用いた酵母ベクターの開発が行われ、酵母宿主を用いた酵母遺伝子のクローニングが可能になりました。これ以後、ホスファターゼ系を含めて、酵母研究全般で遺伝子レベルでの解析が可能となり爆発的な発展が始まりました。

帰国後新しい研究テーマも始めましたが、ホスファターゼの研究も続け、今ではもう30年の付き合いになるとは感慨深いものがあります。私が研究者としての出発をした頃、遺伝子発現制御の研究材料として、アカパンカビと酵母の間にはそれほど大きな差はなかったのですが、酵母を使ってよかったと、自分の幸運をあらためて感じています。私を酵母研究に導いて下さった大嶋先生に感謝申し上げる次第です。

酵母遺伝学から医学生化学へ — 膵臓β細胞の再生 —

禾 泰壽

1997年の厚生省（現厚生労働省）の調査では生活習慣病の1つである糖尿病の日本における患者数は約690万人で、さらに潜在的患者数も含めると糖尿病患者は日本人口の1割に上ると報告されている。この現状は他の先進諸国においても同様である。糖尿病はさらに糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害などの重篤な合併症をひき起すことから重大な社会問題にもなりつつある。血液中の糖分は膵臓の膵島にあるβ細胞から分泌されるインスリンにより調節されている。生活習慣と遺伝的背景によりこのインスリンによる調節機構の破綻がおき、糖尿病になる。現在行われているインスリン補充療法などの対症療法に対して膵島移植や膵β細胞移植が有力な治療方法ではあるが、ヒトの治療のため十分量の膵島を得ることは困難であり、またドナー不足の問題や免疫拒絶反応の問題などもあり、もっと一般的かつ抜本的治療法の開発が望ましいと考えられている。そこで最近ではバイオ人工膵島の開発や、未分化なES細胞または膵β幹細胞をインスリンを分泌できるβ細胞まで分化させ、大量に膵β細胞を産生し、糖尿病の治療を行う膵島機能再生医療にたいする期待が高まっている。

筆者の研究室においては、糖尿病再生医療の基礎研究として、まずマウスを用いて、膵島β幹細胞を試験管内または成体内でインスリンを分泌できるβ細胞に分化誘導して、大量に増殖せしめ、糖尿病再生治療に用いるための膵島β幹細胞単離を試みている。膵臓を部分的に削除するとβ細胞の重量は増加すること、膵β細胞はアポトーシスによりターンオーバーしていること、また導管を*in vitro*で培養することによりインスリン分泌細胞に分化させ得るといことなどから、β細胞幹細胞が膵臓にあることは間違いない。しかし過去そのような個体発

生期もしくは特殊な状況でのみ増殖する膵β幹細胞の数は少ないので、その単離や性質の研究は困難であった。しかしながら最近内胚葉の細胞から膵臓の内分泌細胞、外分泌細胞へ分化する過程で、発生時期特異的に機能する転写因子が徐々に明らかになってきた。¹⁾発生学的には消化管上皮から膵芽が形成され、膵導管、内分泌細胞、外分泌細胞に分化する。膵島には4種類の内分泌細胞があり、最初にα細胞、そしてβ細胞、δ細胞、PP細胞が分化してくる。図1では現在明らかになりつつある膵島内分泌細胞、外分泌細胞分化で働く転写因子を示す。Pdx1 (pancreatic and duodenal homeobox gene 1) は異なる時期に働く転写因子で、膵の前駆細胞発生に必須であり、このノックアウトマウスは膵原基形成後、膵発生のすべてがとまる。しかし発生が進んだ段階でも Pdx1

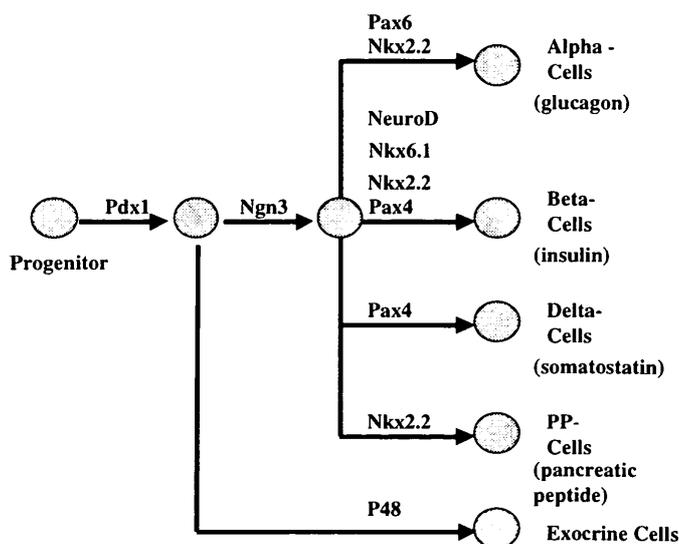


図1. 膵臓細胞の分化に関する転写因子カスケード
(文献1より改変)