

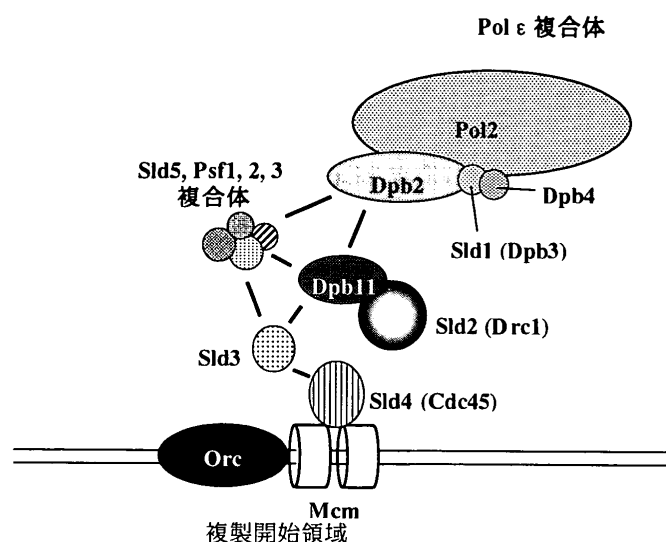


図1. 出芽酵母の複製開始に働く因子。線は遺伝的相互作用やツーハイブリッド法による結合があることを示す。Orc 複合体は細胞周期を通して、Mcm 複合体はG1期に、複製開始領域に結合する。

を含む複製タンパク質群が結合し、複製が開始する。我々は、染色体 DNA の複製に関与する DNA ポリメラーゼ ϵ の変異を抑圧する遺伝子として取得した *DPB11* が、この複製タンパク質群の複製開始領域への結合過程に関与していることを示した。¹⁾ この *Dpb11* の詳細な機能を知る目的で、*dpb11* 温度感受性変異と許容温度で合成致死になる (同時に変異を持つと死んでしまう) *sld* (synthetic

lethality with *dpb11-1*) 変異を分離した。²⁾ さらにこの中の *sld5* 変異を利用して、*SLD5* 遺伝子と相互作用する遺伝子 *PSF1* ~ 3 を多コピー抑圧という方法を用いて分離した。これらの遺伝子間の相互作用を図1に示すが、それぞれの因子がお互いに相互作用し、複製開始に関与する一連の遺伝子群が分離できたことが、解析を進めていくとともに分かってきた。しかも、驚くことに我々が分離した多くの遺伝子は、機能未知の遺伝子として、解析が進んでいなかったのである。そして、この中の *Sld2* は細胞周期のメインレギュレーターである CDK (Cyclin dependent kinase) の基質であり、*Sld2* のリン酸化によりはじめて *Sld2*-*Dpb11* 複合体が形成され、複製が開始することが分かった。³⁾ これは、これまで分かっていたなかった S 期開始に正に働く CDK の基質を明らかにした最初の例である。

このように遺伝学的手法のパワーはやはり大したものである。少しは、大嶋先生に近づけたかな? 「わしの域に入るには十年早いわ」という言葉が聞こえてきそうだ。

文 献

- 1) Masumoto, H. *et al.*: *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 2809 (2000).
- 2) Kamimura, Y. *et al.*: *EMBO J.*, **20**, 2097 (2001).
- 3) Masumoto, H. *et al.*: *Nature*, **415**, 651 (2002).

酵母遺伝学から酵母分子系統学, 比較ゲノム学へ

金子 嘉信

酵母の分類はその時代の最新知識や技術を取り入れて変遷してきている。遺伝学の基礎となる有性生殖環の発見や染色体に関する理解が進むにつれ、酵母における種概念は微生物でありながら高等動植物の概念を取り入れて考えるようになっていく。筆者は大阪大学大嶋研究室で酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の分子遺伝学を学び、1983 年から財団法人発酵研究所で酵母分類学の世界に触れた時、ゲノム情報に基づく分類が生物分類の理想であろうと考えた。酵母の染色体を電気泳動でバンドとして検出できることが報告された頃である。すでに酵母分類学の先導的な研究者は細菌の化学分類学で確立されていた DNA 塩基組成やゲノム DNA のハイブリダイゼーションによる相同性試験などの手法をどんどん取り入れ始めていた。その後、遺伝子クローニングが盛んに行われ始め、その遺伝子の塩基配列を決定することも一般化し、さらに PCR による遺伝子増幅も可能になってく

るとリボソーム RNA 遺伝子の塩基配列による系統樹解析が盛んになり、分子系統樹による系統推定が行われるようになってきた。そんな中、1996年に真核生物で初めて *S. cerevisiae* ゲノムのすべての塩基配列が決定されたことは新たな研究手法と研究分野を拓いたと言える。ご存じのように *S. cerevisiae* の研究はトランスクリプトーム解析やプロテオーム解析などのポストゲノムシーケンスのゲノムサイエンス研究として重要な位置を占めているが、比較ゲノム学の材料としても注目され、酵母の系統、進化に関する研究成果が生まれつつある。*S. cerevisiae* ゲノム中に多くの重複領域の痕跡が発見され、*S. cerevisiae* では祖先種のゲノムが倍加したあと、染色体の再編成・縮重が起こり現在のゲノムになったというゲノム倍加仮説が提案されている。このように一挙に多数の遺伝子あるいはゲノムまるごと比較による系統推定、種分化プロセスの推定なども可能となりつつある。

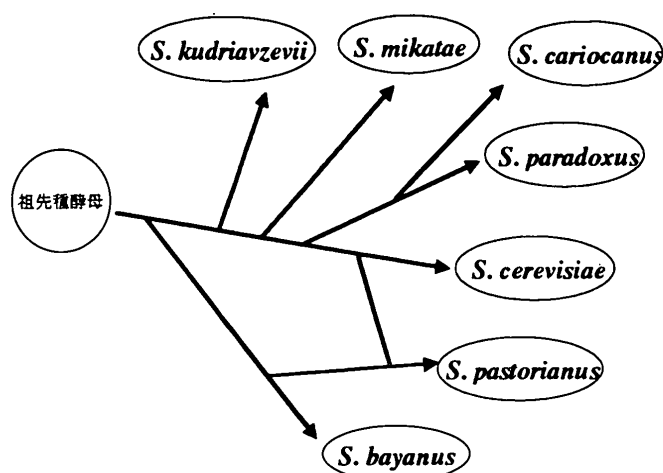


図1. *Saccharomyces sensu stricto*を構成する種と系統的な関係

ここでは *S. cerevisiae* が代表種となっている同胞種グループ *Saccharomyces sensu stricto* の知見について紹介してみたい。

Saccharomyces sensu stricto の分類学

酵母の分類学書として有名な著書の1つである“The Yeasts, a taxonomic study”第4版²⁾による分類では4つの種, *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus* が *Saccharomyces sensu stricto* として記載されている。この4種のうち, *S. pastorianus* は *S. bayanus* と *S. cerevisiae* が交雑した allotetraploid が起源で誕生したと考えられている種である。*Saccharomyces sensu stricto* に含められる酵母は非常に近縁な種であり, 同胞種 (sibling species) の関係にある。2000年には新たに3種の同胞種が報告され,³⁾ 現在では図1に示すような7種が *Saccharomyces sensu stricto* と提案されている。18S rRNA 遺伝子塩基配列による系統樹解析では, *Saccharomyces* 酵母は系統樹の枝が他の属の酵母と混じっている不均一な属であるが, 同胞種の関係にある *Saccharomyces sensu stricto* は1つの系統枝クラスターを形成している。⁴⁾

Saccharomyces sensu stricto の分子系統学

rRNA 遺伝子 (rDNA) は高度に反復してゲノム中に存在し, どの生物にも共通に存在する遺伝子で保存性も高いことから分子系統解析に使われる。しかし, 近縁種間の分子系統解析には18Sや26SのrDNAでは保存性が高く相違が少ないため, 代わりにスペーサー部分の配列が使用されている。PCR増幅したrDNAの5.8S rRNA 遺伝子を含む internal transcribed spacer (ITS) 断片 (約780 bp) と5S rRNA 遺伝子を含む non-transcribed spacer (NTS) 断片 (3.2 kb) を制限酵素処理して生じる切断

パターンの類似性を算出した系統解析とITSすべての塩基配列 (747 bp) を使用した系統解析はほぼ同じ結果を示し, *Saccharomyces sensu stricto* は大きく2つのクラスターに分かれ, 古い異名種 (synonym) も含めた23種のうち16種が *cerevisiae* クラスターを, 残り7種が *bayanus* クラスターを形成した。⁵⁾ ただし, *Saccharomyces sensu stricto* を構成する2つの種 *S. pastorianus* と *S. paradoxus* はそれぞれ *bayanus* と *cerevisiae* クラスターから明白に分離していなかったが, *S. paradoxus* は *cerevisiae* クラスターから最初に分岐していた。興味深いことに *S. bayanus* と *S. cerevisiae* の雑種タイプである *S. pastorianus* のITSとNTSは *S. bayanus* に類似しており, rDNAの系統解析からは雑種タイプという情報を得ることができない。Naumov ら³⁾ は *Saccharomyces sensu stricto* に属する新しい3種の検討に18S rDNA およびITSの分子系統樹解析を行っているが, 18S rDNA とITSでの系統樹形は互いに一致せず, やはり18S rDNAの方がおおまかな区別しかできていない。ITSの場合でもITS1とITS2での塩基の相違具合に違いがあり, ITS1の方がより細かな区別が可能となっている。*Saccharomyces sensu stricto* 酵母種間でのrDNAの相違は他の *Saccharomyces* 酵母種との相違に比べて少ないので, *Saccharomyces sensu stricto* 内の種分化は他の *Saccharomyces* 酵母種との種分化後であり, そして *S. bayanus* と *S. cerevisiae* の系統がまず分岐したと考えられる。

Saccharomyces sensu stricto のゲノム構成解析

酵母の染色体をそのままのサイズで分離できるパルスフィールドゲル電気泳動により *Saccharomyces sensu stricto* における染色体の対応を調べることが可能になった。1996年にはRyu ら⁶⁾ が *S. bayanus* のゲノムについて *S. cerevisiae* の遺伝子プローブによる検討を行い, *S. cerevisiae* ゲノムを基準として *S. bayanus* では4本の染色体で, 2組の染色体相互転座が生じていることを見つけた。このうち, *S. bayanus* の染色体12と染色体14の組は *S. cerevisiae* の第IIと第IV染色体がそれぞれの右腕セントロメア近傍にある *RPL2A* と *RPL2B* の遺伝子座 (現在では遺伝子名が *RPL4A* と *RPL4B* に変更されている) で相互転座したものに対応するということが判明した。⁷⁾ *RPL2A* と *RPL2B* は重複遺伝子であり, その相同性を利用した組換えにより非同相染色体間の相互転座が生じたと考えられた。もう1組の染色体8と染色体9の相互転座は第VIIIと第XV染色体で非同相的な組換えにより生じたことが判明した。これを契機に, *Saccharomyces sensu*

stricto のゲノム構成が調べられるようになり、例えば、*S. bayanus* と *S. cerevisiae* との雑種タイプの種であるとされている下面発酵ビール酵母では、実際に *S. cerevisiae* タイプの染色体と Ryu らが検出した相互転座を起こした *S. bayanaus* タイプの染色体の共存が確認された。^{8,9)} さらに、Fischer ら¹⁰⁾ がこの手法を *Saccharomyces sensu stricto* のすべての種に広げたところ、染色体転座が確認されたのは *S. mikatae* で2組と *S. cariocanus* で4組であり、*S. kudriavzevii* や *S. paradoxus* では染色体転座は見られず、*S. cerevisiae* と同じゲノム構成であった。また、rDNA の ITS1 配列やミトコンドリア遺伝子 *COX2* 配列による分子系統樹の解析も行っており、それらの情報も考慮に入れることにより、*S. cerevisiae* との種分化が最も遅いと考えられる *S. paradoxus* で染色体の転座がないのに対し、その *S. paradoxus* と最も近縁と考えられる *S. cariocanus* では4組の染色体転座が見られ、最も種分化が古いと考えられる *S. bayanus* と同じ染色体転座数であったことから、種分化の過程で染色体転座が一定の頻度で起こるのではなく、突発的に生じることが示された。染色体転座はゲノム倍加の痕跡領域に存在する重複遺伝子やゲノム中に散在する Ty 配列や tRNA 遺伝子などの相同配列を介して生じる場合と非相同領域で生じる場合が観察されている。

S. cerevisiae 種内でも遺伝子のセットは微妙に異なるようである。清酒醸造過程の高泡形成にかかわる遺伝子 *AWA1* は *S. cerevisiae* ゲノムデータベースには存在しない遺伝子で、*YOL155c* と *YJR151c* が融合してできた遺伝子と考えられている。¹¹⁾ 冷凍耐性パン酵母の研究で解析されているプロリンアナログ耐性遺伝子 *MPR1* と *MPR2* も特定の *S. cerevisiae* 系統株 (Σ1278b) に存在しているが、ゲノム塩基配列決定に使用された S288C 系統株や清酒酵母協会9号系統株には存在していない。¹²⁾

Saccharomyces sensu stricto の比較ゲノム学

ヨーロッパで分離された *Saccharomyces* sp. CID1 株 (CBS 8614) について、PCR 増幅したミトコンドリア遺伝子 (*ATP8*, *ATP9*, *SSU*) と核性遺伝子 *MET2* の塩基配列による系統解析を行ったところ、核ゲノムが *S. cerevisiae* と *S. bayanus* 由来と思われる、ミトコンドリアゲノムは日本で落ち葉から分離された *S. kudriavzevii* 由来と考えられる3種の雑種タイプであることがわかった。¹³⁾ このような株の存在は *Saccharomyces sensu stricto* 酵母種間での接合が起こり、雑種起源の新しい種が生まれることが稀ではないことを示唆している。また、rDNA の NTS2

解析や電気泳動核型分析と交配試験など結果から *S. bayanus* に含まれていた *S. uvarum* を *S. bayanus* から種として復活させようという提案がなされている。^{14,15)} さらに、*S. bayanus* の基準株 (CBS 380) 自身が *S. cerevisiae* と *S. uvarum* との雑種タイプであるという報告もされている。¹⁶⁾ 下面発酵ビール酵母での情報をあわせて Casregola ら¹⁷⁾ は *S. bayanus* の1つの系統が *S. cerevisiae* と雑種となり、下面発酵ビール酵母と現在の *S. bayanus* 基準株の系統に分化し、*S. bayanus* の別系統が現在の *S. uvarum* に分化してきたと考えている。しかし、現在の *S. bayanus* 基準株ゲノム中に *S. cerevisiae* 由来のゲノム部分があるという証拠は明確でなく、さらなる研究が必要である。

Saccharomyces sensu lato を含めたゲノム解析が報告されており、種分化を考えるうえで興味深い。Langkjaer ら¹⁸⁾ は *S. bayanus*, *S. servazzii* および *S. kluyveri* のゲノムから調製した 1 kb 以上のランダムな断片の塩基配列を数十個決定し、その配列類似性および遺伝子配置の同一性を *S. cerevisiae* ゲノムを対照として比較解析した。*S. cerevisiae* の ORF と相同性のあった配列は *S. bayanus* で96, *S. servazzii* で56, *S. kluyveri* で96であり、アミノ酸配列での平均同一性はそれぞれ76%, 60%, 61%であった。1つの種で隣接して存在する遺伝子のペアが別の種でも同じ染色体に同じ配置で隣接している場合、その遺伝子ペアはシンテニー (synteny) であるという。*S. bayanus* の解析した遺伝子ペアは *S. cerevisiae* と比較してすべてシンテニーであった。このことは調べた遺伝子は両種の祖先種で同じように存在していたと考えられる。*S. servazzii* での遺伝子ペアは88%がシンテニーであり、*S. kluyveri* では72%がシンテニーであった。

フランスを中心としたヨーロッパの研究グループが Génolevures プロジェクト¹⁹⁾ と呼ばれる13種の半子囊菌酵母のゲノム解析プロジェクトを行っている。ランダムゲノムライブラリーを作製してその塩基配列を解読し、それぞれの酵母種からゲノムの約半分の塩基配列を Random Sequence Tag (RST) 情報として得ている。この RST 情報からゲノム中のレトロトランスポソンを検出して、さらに構造、類似解析を行った結果が報告されている。²⁰⁾ *Kluyveromyces thermotolerans* と *Pichia farinosa* 以外の11種の酵母では2~45コピーのレトロトランスポソンがあり、酵母の種分化とレトロトランスポソンの進化との考察がされている。米国の2つのグループも複数の *Saccharomyces* 酵母ゲノムの解析を行っており、つい最近インターネット上でその成果を公開している。^{21,22)} こ

うした分子系統学や比較ゲノム学の知見は微生物を利用する生物工学の分野でも新しい微生物の発見や育種技術開発などのヒントを与えてくれるのではと期待している。

文 献

- 1) Wolfe, K.H. and Shields, D.C.: *Nature*, **387**, 708 (1997).
- 2) Vaughan-Martini, A. and Martini, A.: *The yeasts, a Taxonomic Study*, 4th edn., (Kurtzman, C. P. and Fell, J. W.), Elsevier (1998).
- 3) Naumov, G. I. et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 1931 (2000).
- 4) James, S. A. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 453 (1997).
- 5) Montrocher, R. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**, 295 (1998).
- 6) Ryu, S.-L. et al.: *Yeast*, **12**, 757 (1996).
- 7) Ryu, S.-L. et al.: *Curr. Genet.*, **33**, 345 (1998).
- 8) Tamai, Y. et al.: *Yeast*, **14**, 923 (1998).
- 9) Yamagishi, H. and Ogata, T.: *System. Appl. Microbiol.*, **22**, 341 (1999).
- 10) Fischer, G. et al.: *Nature*, **405**, 451 (2000).
- 11) Shimoi, H. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2018 (2002).
- 12) Takagi, H. et al.: *J. Bacteriol.*, **182**, 4249 (2000).
- 13) Groth, C. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 1933 (1999).
- 14) Nguyen, H.-V. and Gaillardin, C.: *System. Appl. Microbiol.*, **20**, 286 (1997).
- 15) Naumov, G. I.: *Microbiology (Russia)*, **69**, 338 (2000).
- 16) Nguyen, H.-V. et al.: *System. Appl. Microbiol.*, **23**, 71 (2000).
- 17) Casaregola, S. et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 1607 (2001).
- 18) Langkjær, R.B. et al.: *J. Mol. Biol.*, **304**, 271 (2000).
- 19) <http://cbi.labri.u-bordeaux.fr/Genolevures/Genolevures.php3>
- 20) Neuvéglise, C. et al.: *Genome Res.*, **12**, 930 (2002).
- 21) <http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/FUNGI/FungiMap>
- 22) <http://www.genome.wustl.edu/projects/yeast/>

酵母と医科学

田中 一馬

酵母の解析系は今日の分子細胞生物学の発展に多大な貢献をしてきた。したがって、酵母の遺伝学の発展の礎を築き、その可能性の高さを示した大嶋先生が、この度米国遺伝学会モルガンメダルを受賞されたことは、「当然」のことであるかもしれない。酵母の解析系で得られた知見は、医学領域にも大きな影響を与えているが、これは酵母がモデル生物として確固たる地位を築いたからであろう。医学系の基礎研究の大きな目的は、人間の生命活動を分子レベルで解き明かし、その成果を病気の克服に応用することである。特に、多くの疾患が遺伝子の異常で説明できることが明らかにされつつある現在、個々の遺伝子（タンパク質）の役割を解明することが重要課題となっている。病気とは、ある特定の種類の臓器なり細胞なりが異常な状態となって引き起こされる。細胞のどの機能に異常が生じているかを知るためには、まず正常な細胞の機能を知る必要がある。ところが、ヒトの細胞では解析できる手法に限界が多く、満足な結果を得られない。特に、遺伝子の機能を明らかにするためにはその遺伝子を変異させた時に何が起こるか（表現型）を知ることが必要となるが、現在のところ、これはヒトの細胞では不可能に近い。そこで、より単純な生物で個々の遺伝子の機能を明らかにし、その情報を参考にしてヒト遺伝子の役割を解析しようとするアプローチも取られ

るようになった。このような過程で生まれてきたのがモデル生物である。細胞周期や DNA 合成、タンパク質の輸送、シグナル伝達、転写制御のメカニズムといった細胞の基本的な営みは酵母を用いて、細胞の分化やアポトーシス、神経細胞の基本的な活動は線虫、また、より高次な神経活動や発生のメカニズム、手や足が形成されるメカニズムはショウジョウバエを用いて、というように明らかにしたい生命現象に応じて使い分けられている。また、高等植物の世界においてもシロイヌナズナがモデル生物として用いられている。モデル生物とは、人間とは何であるか？を知るためのいわば水先案内人のようなものであろう。一方、ゲノムプロジェクトの進展によって、機能未知の多数の遺伝子が酵母からヒトにまで保存されていることが明らかにされつつあり、モデル生物の重要性は確立されたと言ってよいであろう。現在のところ、簡単に遺伝子変異を作ることができるモデル生物のうち、ヒトに最も近いのはマウスであるが、マウスは、ある特定の表現型を指標に変異体をスクリーニング (forward genetics) できない、という点で酵母、線虫、ショウジョウバエとは異なる。酵母、線虫、ショウジョウバエがマウスの水先案内人であって、マウスがさらにヒト研究をリードして、というところであらうか。

欧米の医学系研究機関で、酵母や線虫、ハエを研究す