

分裂酵母の挿入突然変異体の確立と有性生殖に関与する新規遺伝子の解析 —非対称現象に関与する分子の探索—

非対称変異体グループ
研究員 饗庭一博

1. はじめに

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* はロッド状の単細胞生物であり、分裂によって増殖するが、分裂直後の細胞伸長は、非対称的に起こる。それは NETO (new end take off) と呼ばれ、分裂によって新しく生じた細胞端の伸長が遅れる現象である。また、分裂酵母は窒素源飢餓により有性生殖を開始する。この過程にも非対称な現象が見られる。接合型特異的な遺伝子発現や有性生殖特異的な遺伝子発現（非対称な遺伝子発現）、細胞端に局在する接合関与分子や減数分裂中に局在を変化させる分子（非対称な分子の局在）などである。しかし、有性生殖過程に関与する遺伝子の非対称な発現や分子の非対称な局在の分子機構などは、未だ充分には明らかにされていない。

分裂酵母は通常半数体生物であるため、突然変異体を得ることが容易である。これまでに突然変異誘発剤などによって非常に多くの突然変異体が得られているが、原因遺伝子の同定までには多大な時間を要する。一方、外来 DNA の挿入によって遺伝子を破壊する挿入突然変異法では挿入位置の塩基配列を容易に決定できる。このことは、分裂酵母ゲノムの全塩基配列データから迅速な遺伝子同定が可能になることを示している。ところが *S. pombe* では挿入突然変異法がいまだ確立されていない。そこで、今研究において分裂酵母の挿入突然変異法の確立を行い、有性生殖に変異のある挿入突然変異体の単離、及び同定遺伝子の解析を行った。

2. プラスミドのゲノムへのランダムな挿入

挿入突然変異法に用いるプラスミド pRIM1 を pUC18 と *S. pombe ura4* 遺伝子を用いて構築し、EcoRI 処理後、*ura4* を完全に欠失している酵母細胞に導入した。pRIM1 のゲノムへの挿入数と挿入位置のランダム性を調べるために、任意に選んだ挿入突然変異体を *ura4* 遺伝子をプローブとしてサザン解析を行った。その結果、約半数が pRIM1 一分子による挿入、他は二分子以上のタンデム挿入であったが、*ura4* 遺伝子を含むゲノム断片の移動度は様々であった。このことは、pRIM1 のゲノムへの挿入はランダムな位置に起こり、特異的に挿入しやすい部位が無いことを示している。

3. 有性生殖に欠損のある突然変異体の単離

挿入突然変異体に有性生殖を誘導し、孢子形成の有無をヨウ素染色で検定した結果、ヨウ素で染まらない、または染色が親株に比べて薄い突然変異体を得られた。これらが有性生殖過程のどの段階に欠損があるのか、その表現型を観察してみたところ、接合不全から孢子形成不全までの様々な表現型の有性生殖欠損株が得られていた。さらに、細胞分裂後の細胞分離に異常のある株も得られた。このことは、このプラスミドによる挿入突然変異法でも多様な突然変異体が単離できることを示している。

4. 挿入突然変異体の原因遺伝子の同定

挿入突然変異体 18 株の pRIM1 挿入位置の DNA 塩基配列を inverse PCR 法を用いて決定し、データベースで検索した結果、11 株が有性生殖での関与が知られている既知遺伝子への挿入であり、7 株が機能未知の遺伝子への挿入であった。さらに、*ura4* 遺伝子のみを用いた挿入突然変異法によって 2 遺伝子を同定した。このように既知遺伝子以外に新たに 9 遺伝子を同定した。これらの遺伝子を *gdi* (Genes Disrupted by DNA Insertion) と名付けた (*gdi1~gdi9*)。

5. 挿入突然変異体の表現型

gdi 挿入突然変異体 6-121 (*gdi1*⁻) と 194-61(*gdi7*)は、接合子を正常に形成するが、6-121 (*gdi1*⁻) は減数第二分裂の段階で、194-61U(*gdi7*)は、主に減数第一分裂で、一部が減数第二分裂で止まっていた。215-49(*gdi5*)は全く接合せず、また、窒素源飢餓後に生じる細胞の矮小化も見られなかった。他の *gdi* 挿入突然変異体は、ほとんどが矮小化した単細胞の状態であった。しかし、211-27(*gdi4*)では、核が異常な形態や位置になり、形成された子嚢や胞子も明らかに異常が見られた。83-40(*gdi2*)及び 172-38U(*gdi6*)の形態は、分裂後の細胞分離異常であった。

6. 変異表現型のレスキューと遺伝子破壊

挿入突然変異体の表現型が二次的な突然変異でないことを確かめた。*gdi* 遺伝子を相当する挿入突然変異体に導入したところ、挿入突然変異体に胞子形成能を回復させることができた。また、*gdi* 遺伝子破壊株に有性生殖を誘導した際、遺伝子破壊株は挿入突然変異体の最終形態と同じ形態を示していた。これら表現型レスキューや遺伝子破壊の結果は、同定された *gdi* 遺伝子が明らかに有性生殖に関与していることを示している。

7. *gdi* 遺伝子の発現制御

ノザン解析により *gdi* 遺伝子の発現を調べた。*gdi1* と *gdi7* は、栄養増殖中にはその発現は検出されないが、減数分裂途中から発現が誘導され、その後発現量が減少する遺伝子であった。*gdi3* と *gdi4* は栄養増殖中にも発現が見られたが、*gdi3* が一定の発現量を保っていたのに対し *gdi4* は窒素源飢餓後、発現量を上昇させた。

8. *gdi* 遺伝子産物の局在

GFP を用いて *gdi* 遺伝子産物の細胞内局在を調べた。Gdi1p-GFP の蛍光は、減数第二分裂後の核を囲むように検出された。*gdi1* 株では減数第二分裂後で分化が止まり、決して成熟胞子は形成されないため、Gdi1p は胞子の成熟に必須な胞子壁の構成分子であることが示唆された。GFP-Gdi4p の局在は核膜と細胞膜であった。Gdi4p にはアミノ酸配列からリパーゼの活性部位の存在が推定されるが、リパーゼ活性の有無や、その活性が核形態や位置の維持に関与しているのかは今後の課題である。Gdi7p-GFP の蛍光は、減数分裂前期から細胞質全体に又はドット状に観察されたが、減数第二分裂には、その局在位置を変化させ、核の周辺にドット状に検出された。Gdi7p はその C 末端側に RNA 結合蛋白質との類似性があり、RNA 結合能の有無やその結合相手がどのような分子であるかは、局在を変化させた機構と共に今後の更なる解析が必要である。

9. おわりに

挿入突然変異法では温度感受性突然変異体の単離などはできないが、突然変異剤を用いた方法にはない利点がある。特に、ゲノム全塩基配列のデータベースから、迅速な遺伝子の同定が可能になった点が顕著である。実際、分裂酵母の有性生殖に関与する遺伝子を同定したが、約半数が機能未知の遺伝子であった。このようにゲノム配列データと挿入突然変異法の利用により、ゲノムワイドな遺伝子の機能解明が可能になった。

gdi 遺伝子を非対称の観点から見てみると、*gdi1* と *gdi7* は栄養増殖中は発現せず、減数分裂特異的に発現する、すなわち時間軸上の非対称な遺伝子発現をした。また、Gdi7p は有性生殖過程で、局在を変化させ非対称な分子の局在を示した。一方、*gdi4* 株では窒素源飢餓により、核の細胞内の中央に位置するという対称性を失うため、*gdi4* は核の対称性の維持に関与する遺伝子であった。

それぞれの *gdi* 遺伝子がどのように機能し、どのような分子と相互作用しているかなど、興味深い研究課題は多く残されており、分裂酵母の有性生殖の分子機構の解明には更なる研究が必要である。