

サッカロミセス酵母における性及び種の分化

久富 泰資

Sex and Species differentiation in *Saccharomyces* yeasts

Taisuke HISATOMI

ABSTRACT

We isolated heterothallic haploid strains from a homothallic diploid strain of a yeast *Saccharomyces exiguus* by mutagenization with UV or ethylmethanesulfonate (EMS). A gene, not linked to the mating-type locus, was found to control homothallism in the yeast, as in *Saccharomyces cerevisiae*. In heterothallic strains of *S. exiguus*, sexual agglutination followed by zygote formation was observed when a-type and α -type haploid strains were mixed. This mating process was regulated by mating pheromones secreted by both type cells.

Neither sexual agglutination nor zygote formation occurred between *S. exiguus* and *S. cerevisiae* or *Saccharomyces kluyveri*. A Pheromone of *S. exiguus* acted only on α type cells of *S. exiguus*. On the contrary, α pheromone of *S. exiguus* induced sexual agglutination of an inducible a-type cells of *S. cerevisiae*.

We purified α pheromone of *S. exiguus* and determined its amino acid sequence. α Pheromone of *S. exiguus* is a linear tridecapeptide whose sequence slightly differed from those of *S. cerevisiae* and *S. kluyveri*. These α pheromones from *S. cerevisiae*, *S. kluyveri* and *S. exiguus* displayed interspecific actions on the a-type cells of all three yeast species. The intraspecific α pheromone — a-type cell reaction was not necessarily more effective than the interspecific one.

Finally, the DNA of *S. exiguus* was analyzed by Southern hybridization using the cloned *MATa*, *MAT α* and *HO* genes of *S. cerevisiae* as probes. It was shown that *S. exiguus* has a DNA sequence homologous with the *HO* gene of *S. cerevisiae*. Pulsed field gel electrophoresis revealed that this DNA sequence located on a chromosome of about 940Kb of DNA in *S. exiguus*. However, no DNA sequence homologous with the *MAT* genes of *S. cerevisiae* was detected in *S. exiguus*.

Key Words: *Saccharomyces* yeasts, *S. exiguus*, Homothallism gene, Mating reaction, Mating pheromone

はじめに

子囊酵母の一種 *Saccharomyces cerevisiae* (パン酵母) における遺伝学的研究は、ドイツの Winge によって始められた。1935年に Winge は *S. cerevisiae* において一倍体の単離胞子を増殖させた結果、二倍体のクローンとなる株を発見した¹⁾。更に、それが優性の単一遺伝子(当時 *D* 遺伝子と呼ばれていたもので、現在の *HO* 遺伝子に相当する)の働きによるものであることを明らかにした²⁾。このような生活環を有する菌株をホモタリズムと呼ぶ。これに対して、1943年に Lindegren と Lindegren は安定した一倍体のクローンとして増殖する株を別の系統の *S. cerevisiae* の子囊胞子より分離することに成功した³⁾。また、このようにして得られた一倍体のクローンには、性表現に関して2つの接合型があり、それらを a 型と α 型と名づけた。この a 型と α 型の一倍体細胞を混合培養すると、接合子が形成されて、二倍体の細胞を得ることができる。これをマス・メイティング法という。このようにして得られた二倍体細胞を胞子形成させ、子囊中の胞子を分離して発芽増殖させると、 a 型の一倍体クローンと α 型の一倍体クローンとが各々2個ずつ得られる。このような生活環を有するものをヘテロタリズムと呼ぶ。一方、前述のホモタリズム株では、 a または α の接合型を有する一倍体の単離胞子は細胞の分裂毎に接合型の転換を行う。そのため、胞子の発芽増殖中に相補的な a 型及び α 型の両接合型一倍体細胞が発生し、それらの間で接合子が形成されて二倍体のクローンとなる。

このようなヘテロタリックな株が自然界より分離され、マス・メイティング法が開発されたことによって、*S. cerevisiae* における接合過程の実質的な研究がはじめて可能となり、目ざましい進歩をみた。しかし、自然界から分離される野生の *Saccharomyces* 属酵母においては、上記 *S. cerevisiae* 及び *Saccharomyces kluyveri* をのぞいては、ほとんどすべての種がホモタリックな生活環を有していた。そのため、これらの *Saccharomyces* 属酵母においては、ヘテロタリックな一倍体細胞が得られず、性に関する研究や遺伝学的解析はほとんど不可能であった。このような理由から、*S. cerevisiae* 以外の *Saccharomyces* 属酵母の性転換及び性決定における遺伝子制御や接合過程における生理生化学的機構については、まったく未知のままであった。

そこで、これらの *Saccharomyces* 属酵母においても、ヘテロタリックな一倍体株が人為的に分離できるようになれば性の遺伝的・生理生化学的研究が可能となる。また、このようなヘテロタリックな一倍体株を用いれば、これら野生の *Saccharomyces* 属酵母の性転換及び性決定における遺伝子制御や接合過程における生理的現象の解析が可能になると同時に、*S. cerevisiae* との間での種間

における性的な相互作用や性表現の類似性の比較検討を行うことができるようになる。第一に、生理的な面では、接合過程における種間での相互作用を調べることにより、種のアイデンティティを特定することが可能となる。第二に、性表現に関する遺伝子群の種間での類似性を調べることにより、それら遺伝子群の機能的・構造的な可変性を推測することができる。これらのことを研究することによって、進化的見地から *Saccharomyces* 属酵母の種・性の隔離・分化の機構を遺伝学・生理学の両面より解析する道を開くことが期待できる。

以上のような理由から、野生の典型的なホモタリックな *Saccharomyces* 属酵母の一種 *Saccharomyces exiguus* の単離胞子に突然変異誘発処理を施して、ヘテロタリックな一倍体株を誘導・分離することを試み、上述のような考えのもとに下記の一連の研究を行った。

1では、*S. exiguus* のホモタリズム遺伝子及び接合型遺伝子の解析と、分離したヘテロタリックな *S. exiguus* の一倍体株を用いた *Saccharomyces* 属酵母の種間での生理的性的相互作用の解析を中心に述べる。

2では、*S. exiguus* の α フェロモンの分離・精製及び構造解析と、*Saccharomyces* 属酵母三種の合成 α フェロモンの種間での交叉活性について述べる。

3では、*S. exiguus* のゲノムにおける *S. cerevisiae* 性転換及び接合型遺伝子類似DNAの検索結果を電気泳動核型の比較とともに述べる。

最後に、*Saccharomyces* 属酵母における種及び性の隔離・分化について、上述の性表現遺伝子の種間類似性・種間での生理的性的相互作用を通して、進化的見地から、種のアイデンティティの生理的表現及び性表現遺伝子群の可変性と保守性のはたす役割について議論する。

1. 野生出芽酵母 *Saccharomyces exiguus* におけるホモタリック株よりヘテロタリック株の誘導・分離とその形質の解析

1.1. 概 説

S. cerevisiae のホモタリズムは接合型の転換に起因していることがわかっており、その細胞系譜(親子関係)も生理的に調べられている^{4,5)}。また、ホモタリズム調節遺伝子として知られている第4番染色体上の *HO* 遺伝子が、第3番染色体右端の *HMR* 座または同左端の *HML* 座にある抑制された a 型または α 型の遺伝情報を発現場所である同中央付近の *MAT* 座に組み換えによって転送することで、接合型の転換をひきおこすことが解明されている^{7,8)}。そこで、*S. cerevisiae* 以外のほかの *Saccharomyces* 属酵母においても、同様な機構が働いていると考えるならば、接合型転換を制御している遺伝子に突然変異を引き起こすことによって、ホモタリックな株からヘテロタ

リックな株を分離できることが期待される。*S. cerevisiae* では、そのような菌株が大島と高野⁹⁾により既存のヘテロタリックな株を標準株に用いることによって得られている。

この章では1970年に日本の屋久島で分離された野生出芽酵母 *Saccharomyces exiguus* のホモタリック株からのヘテロタリック株の誘導・分離とその遺伝学的な形質についての研究結果をまず述べる。さらに、得られたヘテロタリック株を用いて、この酵母の性表現の様式を他の *Saccharomyces* 属酵母との相互作用の解析を通して議論する。

1.2. *S. exiguus* における性の分化

S. exiguus Yp74L-3株(図1)は孢子形成培地上で孢子を形成し、すべての分離孢子のクローンが孢子形成能を有する二倍体であることがわかった。このことにより、*S. exiguus* Yp74L-3株はホモタリックであることが確認できた。Yp74L-3におけるホモタリズムの機構が *S. cerevisiae* のものと同様なものであるならば、Yp74L-3の孢子は二つの相対する接合型に分化するはずである。そこで、まず最初に、孢子培養における性の分化と相互作用について調べてみた。

その結果を図2に示す。性的凝集は調製した孢子の培養開始後7時間目より始まり、10時間目に最高になる。性的凝集とは、a型一倍体細胞と α 型一倍体細胞とが1対1の割合で凝集塊を形成する性的細胞認識であり、次いで1対1対合、細胞融合、核融合に至る接合過程の重要な初期反応である。接合子の形成は、8時間目にわ

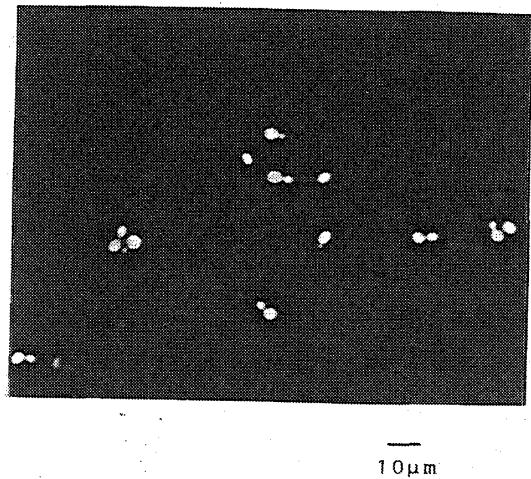


Fig.1. *Saccharomyces exiguus* Yp74L-3 strain

ずかに観察され、12時間目に最高に達する。このように、接合子の形成に先立って、性的凝集が起こることが認められた。これらの結果は *S. exiguus* のホモタリック株 Yp74L-3においても、*S. cerevisiae* のホモタリック株と同様に、その孢子に性の分化があることを示している。上述の結果はホモタリズムの調節機構が、*S. exiguus* と *S. cerevisiae* との間で基本的に同様なものである可能性を示唆している。したがって、ホモタリズム調節遺伝子に突然変異を誘起することによってホモタリックな *S. exiguus* からヘテロタリックな株を分離することができるものと思われた。

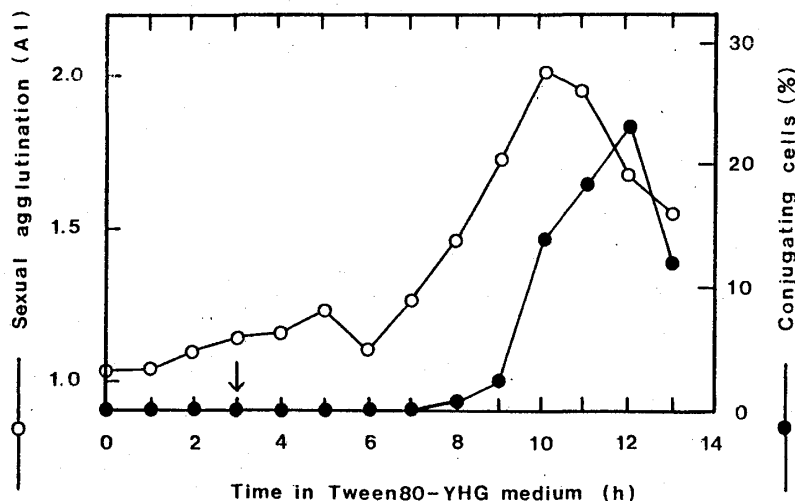


Fig.2. Changes in sexual agglutination and percentage occurrence of conjugating cells (zygotes) in a spore culture of the homothallic strain Yp74L-3 in YHG medium. Spores of Yp74L-3 were shaken in YHG medium, containing 0.5% Tween80 at a density of 10^7 spores/ml. Samples were taken at every one hour. ○, sexual agglutination expressed by the agglutination index (AI); ●, percentage occurrence of conjugating cells (zygotes). The arrow indicates the time when budding cells were first observed. YHG is a complete medium. AI is a ratio of absorbance of a non-agglutinating cell suspension against an agglutinating cell suspension.

1.3. ホモタリック株からのヘテロタリック株の誘導・分離

ホモタリック株Yp74L-3の単離調製胞子を液体完全培地で5時間培養した後、突然変異誘発剤エチルメタンサルフォネート(EMS)で処理を行った。この処理は2%グルコースを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.8)中において、細胞濃度が 2×10^6 /mlで、2%のEMS濃度を用いて、28℃の温度で、90分間行った。処理細胞は10mMリン酸緩衝液(pH 5.5)(PBS)で洗った後、完全培地のプレートに広げた。このときの処理細胞の生存率は約20%であった。また、紫外線による突然変異誘発処理は、完全培地のプレート上に広げた単離調製胞子を直接紫外線で照射することにより行った。このときの処理細胞の生存率は約30%に設定した。

これらのプレートを2日間保温し、現れたコロニーを胞子形成培地のプレートにレプリカして1週間培養した。これらのコロニーの胞子形成は顕微鏡下で検定し、呼吸能のあるコロニーのみを選択した。ヘテロタリックな一倍体株の候補株として、胞子形成能欠損で呼吸能のあるコロニーを選択した。紫外線及びEMSで処理したそれぞれ2000個のコロニーについて検定した。その結果、それぞれ16株と20株とをヘテロタリック株の候補株として一次選別できた。

ヘテロタリックで相対的な接合型細胞を分離するために、これら36の候補株において、すべての組み合わせについて2株ずつ液体完全培地中で混合培養し、その性的凝集を検定した。その結果、2組だけが性的凝集を示した。また、その中の1組は接合子を形成した。この接合子を形成した相対的な2株をSEH-0及びSEH-1と名づけた。SEH-0とSEH-1はそれぞれ紫外線及びEMS処理細胞から分離されたものである。次に、この2株の接合型を決定するために、それらと*S. cerevisiae*との間での性フェロモンの交叉活性を検定した。SEH-0を液体完全培地で1夜培養した時、その培養上澄には、性的凝集に関して誘導性の*S. cerevisiae*のa型株(T55s-41)¹⁰⁾の性的凝集を誘導する活性があった。しかし、SEH-1の培養上澄には、そのような誘導活性は認められなかった。これらのことから、SEH-0はα型株、SEH-1はa型株と決定した。SEH-1は安定したヘテロタリックなa型株であったが、SEH-0は毎代5%のホモタリックな細胞が混じていた。そこで、SEH-0とSEH-1を交雑させ、その子囊の分離胞子から、安定したα型株を再分離した。この株をSEH-2と名づけた。

SEH-1(a)とSEH-2(α)とは混合培養すると、強い性的凝集を示し、続いて接合子の形成が起こった。雑種二倍体は高頻度に胞子を形成し、子囊胞子はa型とα型の接合型が2対2に分離した。これはa型とα型の接合

型が、*S. cerevisiae*の場合と同じように、共優性な遺伝子座によって支配されていることを示唆している^{7,8)}。これらの結果に基づいて、SEH-1とSEH-2とを、それぞれ、ヘテロタリックなa型標準株及びα型標準株として以降の実験に用いることにした。

1.4. ホモタリズム調節遺伝子の遺伝解析

SEH-1の突然変異遺伝子を解析するために、次の方法によりSEH-1をホモタリックな二倍体の親株Yp74L-3と戻し交雑させた。まず、Yp74L-3の単離胞子を紫外線照射して培養し得られた960個のコロニーより、ホモタリックなアスパラギン要求性の突然変異体を分離した。この株をL-31と名づけた。また、SEH-1を1μg/mlのエチジウムブロマイドを含む液体完全培地で1夜培養して、呼吸欠損の突然変異体を分離した。この株をSEH-101と名づけた。L-31の単離胞子を液体完全培地で4時間振盪培養したのち、液体完全培地中でSEH-101と混合培養した。1夜振盪培養して接合させたのち、培養細胞をグリセロール最少培地のプレートに広げた。このプレートに生育する呼吸能のある原栄養性の雑種を選別し、そのうちの1株をDL-EH1と名づけた。このDL-EH1株を胞子形成させ、子囊中の四つの胞子を分離して、四分子分析を行った結果を表1に示した。接合型とホモタリズムの四分子分離はPD(両親二型):NPD(非両親二型):TT(テトラ型)=1:1:4を示した。この結果は接合型遺伝子座に連鎖していない単一遺伝子に起こった突然変異がヘテロタリズムの原因となったことを示している。この遺伝子は、*S. cerevisiae*にみられるHO遺伝子またはCSM, SWI遺伝子のようなホモタリズムを調節している遺伝子の一種であろうと思われる^{7,8,9,11,12)}。以上の事実から、*S. exiguus*は*S. cerevisiae*と同様なホモタリズ

Table 1. Tetrad segregation from the cross SEH-101 × L-31 (1).

Homo, homothallic segregants; a, a-type segregants; α, α-type segregants. PD, parental ditype; NPD, non-parental ditype; TT, tetratype.

Vegetative cells of SEH-101 (ρ^- haploid a-type strain derived from SEH-1) were crossed to spores of L-31 (asparagine-requiring homothallic ρ^+ diploid strain derived from Yp74L-3).

Tetrad types		
Homo : a : α		
2 : 2 : 0	2 : 0 : 2	2 : 1 : 1
(PD)	(NPD)	(TT)
5	5	20

Table 2. Tetrad segregation from the cross SEH-101 × L-31 (2).

Asn⁻, asparagine-requiring segregants; Asn⁺, prototrophic segregants. ρ^- , respiratory-deficient segregants; ρ^+ , respiratory-competent segregants.

Tetrad types				
Asn ⁺ :Asn ⁻				
4:0	3:1	2:2	1:3	0:4
0	0	30	0	0

Tetrad types				
$\rho^+:\rho^-$				
4:0	3:1	2:2	1:3	0:4
30	0	0	0	0

ムの調節機構をもっていると考えられたので、この遺伝子を *MTI1* (Mating Type Interconversion) と命名した。また、Asn⁺:Asn⁻=2:2の分離比を示したことにより、アスパラギン要求性(Asn⁻)は、単一遺伝子により調節されていることがわかった。このアスパラギン要求性を引き起こした遺伝子を *asn1* と名づけた。さらに、 ρ^+ (呼吸能有り): ρ^- (呼吸能無し)=4:0の分離比を示したことにより、 ρ^- は細胞質性の要因によって調節されていることも確認された(表2)。DL-EH1から得られたヘテロタリックな分離株の中より、あらためて安定した原栄養性のa型株及び α 型株を分離しなおした。得られたa型株及び α 型株を、それぞれ、THE1-16C及びTHE1-16Bと名づけた。これら2株の炭素源及び窒素源の資化性・醗酵性を調べて、親株 *S. exiguus* (Yp74L-3)の分類学的特徴を全て所有していることを確認した¹⁹⁾。

1.5. *S. cerevisiae*, *S. kluyveri* 及び *S. exiguus* の性的相互作用

ヘテロタリック株THE1-16C及びTHE1-16Bの接合

Table 3. Tetrad segregation from the cross THE1-16C × THE1-16B.

a, a-type segregants; α , α -type segregants.

Tetrad types				
a : α				
4:0	3:1	2:2	1:3	0:4
0	0	20	0	0

過程を図3に示す。性的凝集はa型細胞と α 型細胞の混合培養開始直後より起こり始め、約3時間後に最高に達し、接合子形成も認められた。接合子の形成率が最高になったのは約5時間後であった。このように、*S. exiguus*の接合過程は、基本的には、*S. cerevisiae*と同様である^{14, 15, 16)}。この交雑株(THE1-216)の子嚢胞子のa型と α 型の分離比は、すべて、2対2を示した(表3)。

ところで、*S. cerevisiae*の接合過程は、a型及び α 型が細胞外に分泌する、それぞれ、aフェロモン及び α フェ

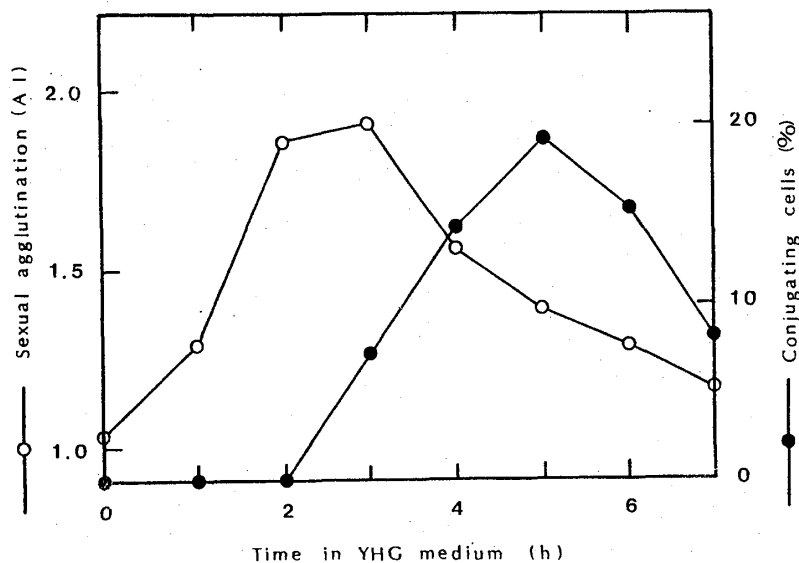


Fig. 3. Changes in sexual agglutination and percentage occurrence of conjugating cells (zygotes) in a mixed culture of THE1-16C(a) and THE1-16B(α) in YHG medium. THE1-16C(a) cells and THE1-16B(α) cells, grown to midlogarithmic phase in YHG, were mixed in YHG medium and shaken, the initial cell density being $A_{530}=0.3$ for each strain. Samples were taken at every one hour to measure degree of sexual agglutination (AI), ○ and occurrence of conjugating cells (zygotes) (%), ●.

ロモンと呼ばれる性フェロモンによって調節されている。これらの性フェロモンは、相手型細胞に対して、性的凝集や細胞周期のG1期停止などの性特異的機能の活性化や誘導を引き起こす^{14,15,16}。そこで、*S. exiguus*にも同様な菌体外に分泌される性フェロモンが存在するかどうかを調べるために、THE1-16CとTHE1-16Bを使って、相手型細胞に対する培養上澄のフェロモン活性を検定した。検定する細胞を液体完全培地で1夜培養した培養上澄に新しい液体完全培地を1対1の割合で混合した後、フェロモン検定するため相対する接合型細胞をその中で培養した。その結果、両株ともに、未出芽細胞が蓄積することが見いだされた。これは、細胞が細胞周期のG1期に分裂を停止していることを示している。しかし、両株とも本来高い構成的な性的凝集能をもっているのに、性的凝集のフェロモンによる誘導性を検出することは不可能であった。しかしながら、培養上澄液にG1期停止活性があることから、*S. exiguus*も*S. cerevisiae*と類似した性フェロモンによる調節機構を有していることがわかった。

次に、*S. exiguus*、*S. cerevisiae*及び*S. kluyveri*との間における種間での接合反応を調べてみた。表4に示すように、どの種間の組み合わせにおいても性的凝集はまったく認められなかった。もちろん、そのような非凝集の混合培養中には、接合子形成は認められなかった。つま

り、これら3種の*Saccharomyces*属酵母においては、性的凝集や接合子形成などの、種間での性的相互作用はまったく起こらなかった。したがって、ヘテロタリックな標準株と検定すべきヘテロタリックな株が得られれば、性的凝集を試験することによって検定菌の種を同定することができる。このようにホモタリズムからヘテロタリズムへの人為的転換法と性的凝集法を併用すれば、野生*Saccharomyces*属酵母の同定に関しても、新しい方法を導入することができる。

最後に、*S. cerevisiae*と*S. exiguus*の間における、フェロモンの相互作用について調べた。表5に示すように、THE1-16Bから分泌される*S. exiguus*の α フェロモンは、*S. cerevisiae*の性的凝集誘導性のa型株(T55s-41)の性的凝集を誘導することがわかった。しかし、THE1-16Cから分泌される*S. exiguus*のaフェロモンは、*S. cerevisiae*の性的凝集誘導性の α 型株(T562s-161)の性的凝集を誘導しなかった。つまり、*S. exiguus*の α フェロモンは、種の障壁を越えて*S. cerevisiae*のa型細胞に対して交叉活性をもつが、aフェロモンの生理活性は厳密に種内に限定されているということが出来る。McCulloughとHerskowitzは、*S. kluyveri*と*S. cerevisiae*の間において、同様に、 α フェロモンには交叉活性があり、aフェロモンには交叉活性がないことを確認している¹⁷。

Table 4. Interspecific sexual agglutination between *S. exiguus* and *S. cerevisiae* or *S. kluyveri*. Each strain in the left column was mixed with each strain in the top lane in YHG, the initial cell density of each strain being 10^7 /ml. After shaking for 2 hours, the degree of sexual agglutination was measured and expressed by the agglutination index. The agglutination indices higher than the background values are underlined.

		<i>S. exiguus</i>			<i>S. cerevisiae</i>	
		THE1-16C	THE1-16B	Yp74L-3	T55	T56
		(a)	(α)	(a/ α)	(a)	(α)
<i>S. exiguus</i>	THE1-16C	1.25	<u>2.00</u>	1.27	1.21	1.22
	THE1-16B		<u>1.28</u>	1.27	1.20	1.21
	Yp74L-3			1.24	1.20	1.21
<i>S. cerevisiae</i>	T55				1.21	<u>1.77</u>
	T56					1.21
		<i>S. exiguus</i>			<i>S. kluyveri</i>	
		THE1-16C	THE1-16B	Yp74L-3	SK3	SK2
		(a)	(α)	(a/ α)	(a)	(α)
<i>S. exiguus</i>	THE1-16C	1.29	<u>2.19</u>	1.25	1.27	1.24
	THE1-16B		<u>1.27</u>	1.26	1.28	1.25
	Yp74L-3			1.26	1.29	1.23
<i>S. kluyveri</i>	SK3				1.21	<u>1.88</u>
	SK2					1.21

Table 5. Effects of sex pheromones of *S. exiguus* on *S. cerevisiae*. Cell-free fluids from stationary cultures in YHG medium were inoculated with *S. cerevisiae* inducible strains, T55s-41(a) and T562s-161(α) after addition of 2% glucose and 0.2% peptone, the initial cell densities being $A_{530}=0.5$. "None" indicates treatment in PBS containing 2% glucose and 0.2% peptone.

The cultures were shaken at 28°C for 2 hours. The degree of sexual agglutination ability of the treated strains was expressed by the agglutination index (AI), after mixing with the opposite mating-type tester strain of *S. cerevisiae* having high sexual agglutination ability, T55(a) or T56(α). The cells were boiled before the AI measurement. The induced sexual agglutination ability showing pheromone activity is underlined.

		Culture fluids					None
		<i>S. exiguus</i>			<i>S. cerevisiae</i>		
		THE1-16C	THE1-16B	Yp74L-3	T55	T56	
		(a)	(α)	(a/ α)	(a)	(α)	
Treated cells	T55s-41 (a)	1.14	<u>1.99</u>	1.15	1.16	<u>2.56</u>	1.13
	T562s-161 (α)	1.07	1.09	1.09	<u>1.50</u>	1.06	1.08

2. *Saccharomyces exiguus* の α フェロモンの分離・精製及び一次構造解析と *Saccharomyces* 属酵母 3 種間での α フェロモンの交叉活性

2.1. 概説

S. exiguus のヘテロタリックな a 型株及び α 型株は、それぞれ a フェロモン及び α フェロモンと呼ばれる性フェロモンをその培養液中に分泌する。1 で述べたように、この *S. exiguus* の α フェロモンは、*S. cerevisiae* の性的凝集誘導性の a 型株の性的凝集を誘導するような種間での交叉活性を有していた。そこで、このような生理活性を指標として *S. exiguus* の α フェロモンの精製を行った。この章では、その精製の方法・結果と一次構造の解析について述べる。

ところで、*Saccharomyces* 属酵母においては、既に、2つの種において α フェロモンが分離され、構造決定が行われている。1つは、*Saccharomyces cerevisiae* の α フェロモン^{18,19)}であり、もう1つは、*Saccharomyces kluyveri* の α フェロモン^{20,21)}である。この章では、これら3種の *Saccharomyces* 属酵母の合成 α フェロモンを用いて、それらが3種すべての a 型細胞に生理活性をもち得るのかどうかを調べた。そして、それら種間での交叉活性において、相対的な効果を比較した。また、フェロモン制御の種間交叉活性の範囲について、*Saccharomyces* 属酵母の種の系統発生の見地から論じた。

2.2. *S. exiguus* の α フェロモンの部分精製と薄層クロマトグラフィーによる純度検定

S. exiguus の α フェロモンの部分精製は、図4に示すような手順で行った。セファデックス LH-20 によるゲルろ過で分画したサンプルの紫外吸収と活性のパターン

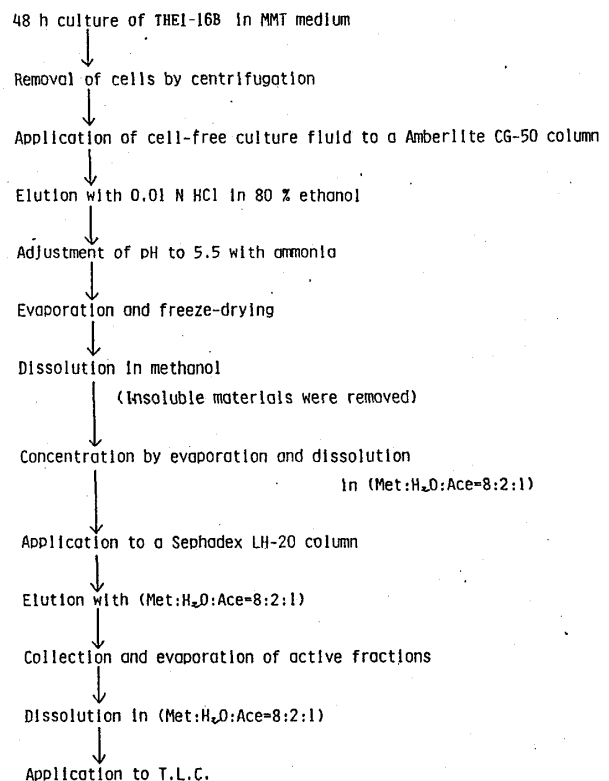


Fig.4. Procedure for partial isolation of *S. exiguus* α pheromone.

を図5に示した。ここで、 α フェロモンの生理活性の検定は、*S. cerevisiae* の性的凝集誘導性の a 型株(T55s-41)の性的凝集誘導活性を指標にして行った。図5に示す LH-20ゲルろ過で活性のある25番から28番までの画分を回収し、濃縮した後、メタノール:水:酢酸=8:2:1の溶媒に溶解した。次に、標品の精製度の検査も兼ねて、この *S. exiguus* の α フェロモン標品を *S. cerevisiae* の合成

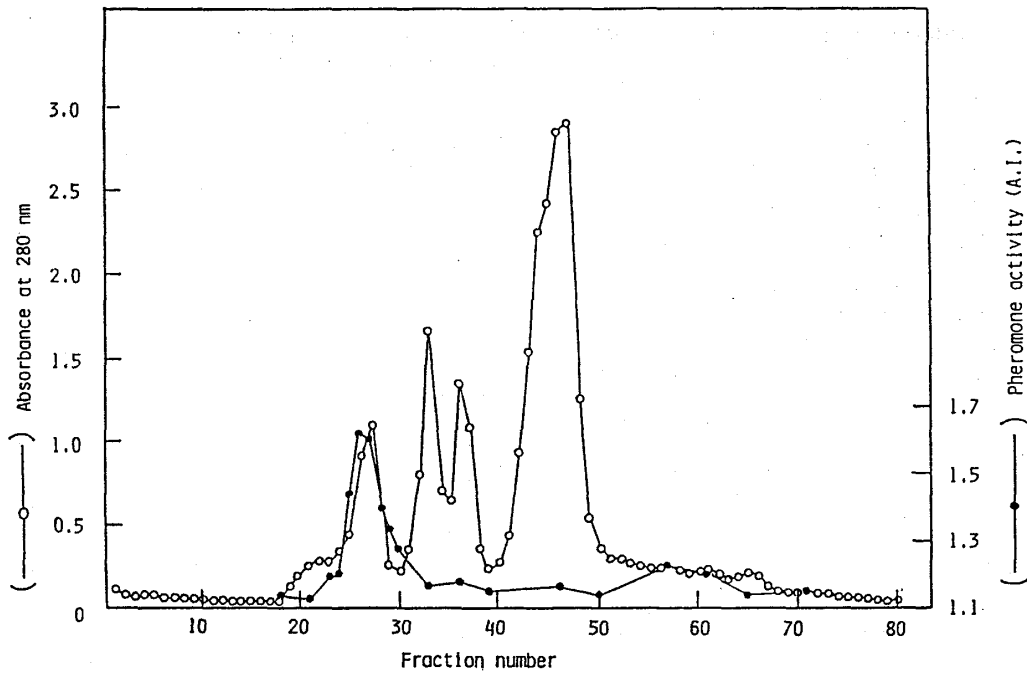
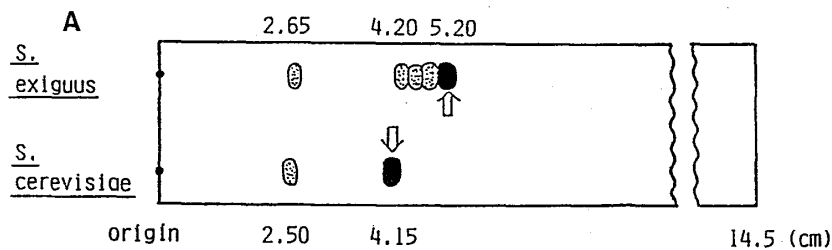


Fig.5. Chromatography of α pheromone on Sephadex LH-20. The biological activity of α pheromone was determined by the induction of sexual agglutination ability of *S. cerevisiae* inducible a-type strain (T55s-41).



B

Rf of α pheromone	
<i>S. exiguus</i> (purified)	<i>S. cerevisiae</i> (synthesized)
0.35	0.28

Fig.6. Thin-layer chromatography of α pheromones of *S. exiguus* and *S. cerevisiae*. A, Samples were applied to a plate of silica gel and developed in butanol—acetic acid—water (4:1:5, v/v/v) upper phase, at chamber saturation for 5.5 hours. \odot , UV-absorbed spots; \bullet , biologically active spots. B, Rf values of biologically active spots.

α フェロモンと比較のため一緒に薄層クロマトグラフィー上で展開した。その結果を図6に示した。*S. exiguus*の α フェロモンは10000単位、*S. cerevisiae*の合成 α フェロモンは0.1mgを、それぞれ、薄層クロマトグラフィーにのせた。ここで、1単位は 4×10^7 細胞/mlの細胞濃度のT55s-41の凝集を誘導する最少濃度とした。図6に示すように、紫外線吸収性スポットがいくつか認められ、まだ不純物の混入が認められた。0.5cm間隔で展開した薄層をスパーテルでかきとり回収して0.01Nの塩酸(80%エタノール中)に懸濁し、試料を溶出した。これらを濃縮してPBS(リン酸緩衝液)に溶解した後、活性を検定した。その結果、図6に示すように、矢印の位置にフェロモン活性があることがわかった。これから*S. exiguus*及び*S. cerevisiae*の α フェロモンのRf値を計算してみると、それぞれ、0.35と0.28であり、明らかに違っていた。この結果は*S. exiguus*の α フェロモンと*S. cerevisiae*の α フェロモンとは同じ活性を持つにもかかわらず、構造上は異なった物質であることを示唆していた。

2.3. *S. exiguus*の α フェロモンの精製と一次構造決定

*S. exiguus*の α フェロモンと*S. cerevisiae*の α フェロモンとはその構造において明らかに違いがあると考えられたので、*S. exiguus*の α フェロモンを徹底的に精製して、その一次構造の解析を行った。その精製の手順を図7に示した。生理活性の検定は*S. cerevisiae* T55s-41株に対する性的凝集誘導活性を指標とした。このようにして精製した*S. exiguus*の α フェロモンの一次構造を解析したところ、13個のアミノ酸よりなるオリゴペプチドであることがわかった。更に、そのアミノ酸配列を調べたところ、図8に示すようにその配列を決定することができた。また、一次構造の正しいことを確認するため、このアミノ酸配列を有するペプチドを人工合成して、生理活性のあることを確かめた²²⁾。図8では比較のため*S. exiguus*の α フェロモンのアミノ酸配列を、*S. cerevisiae*及び*S. kluyveri*の α フェロモンのアミノ酸配列とともに

に示した。3種の α フェロモンの構造比較をすると、ともに、13個のアミノ酸よりなるオリゴペプチドであるが、そのアミノ酸配列は3種とも少しずつ異なっていた。特徴としてはN末端及びC末端には相同なアミノ酸が多くみられるが、中心付近は異なっていることがわかった。以降、*S. exiguus*の α フェロモンを α^{se} フェロモン、*S. cerevisiae*の α フェロモンを α^{sc} フェロモン、*S. kluyveri*の α フェロモンを α^{sk} フェロモンと区別して呼ぶことにした。

2.4. *Saccharomyces*属酵母3種における α フェロモンの交叉活性

*S. kluyveri*及び*S. exiguus*のヘテロタリック株は構成的に高い性的凝集能を有している上、*S. cerevisiae*のT55s-

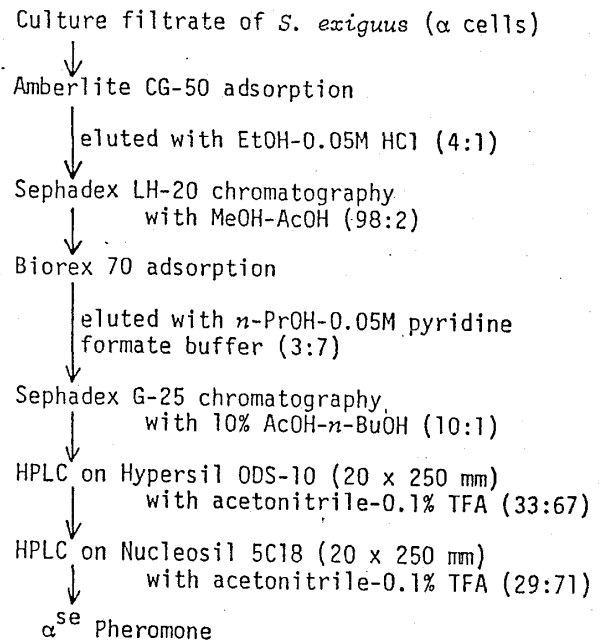


Fig.7. Isolation procedure of *S. exiguus* α pheromone.

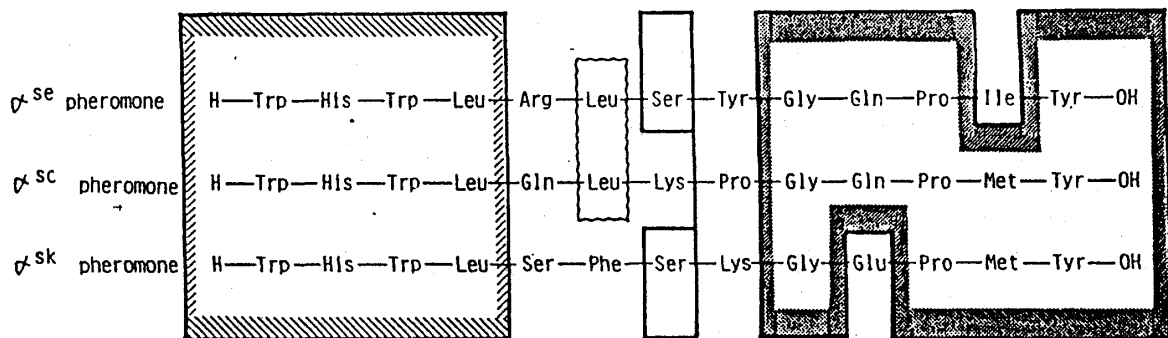


Fig.8. Similarities in primary structures of α pheromones of three *Saccharomyces* yeasts. α^{se} pheromone of *S. exiguus*, α^{sc} pheromone of *S. cerevisiae*, α^{sk} pheromone of *S. kluyveri*.

41のような性的凝集誘導性の株¹⁰⁾も分離されていないので、 α フェロモンの活性の検定は、a型細胞に対するG1期停止誘導活性を指標にして行った。G1期停止細胞の蓄積は、未出芽細胞の出現率の増加で表すことができる。図9に示すように、*S. cerevisiae*のa型細胞においては、 α フェロモンの処理濃度の増加とともに未出芽細胞の割合も増加した。3種の*Saccharomyces*属酵母の α フェロモン(α^{sc} , α^{sk} , α^{se} フェロモン)は、どれも、同じように*S. cerevisiae*のa型細胞にたいしてG1期停止を引き起こした。これらの結果は、 α^{sk} , α^{se} フェロモンは、ともに、*S. cerevisiae*のa型細胞に対して種間での交叉活性をもつことを示している。しかしながら、1で述べたように*S. kluyveri*及び*S. exiguus*の α 型細胞は、*S. cerevisiae*のa型細胞とは接合しないことがわかっている。ここで、注目すべきことには、 α^{sc} フェロモンは、*S. cerevisiae*のa型細胞に対するG1期停止誘導活性において、かならずしも、他2種の α フェロモン(α^{sk} , α^{se} フェロモン)よりも高い誘導活性をもつとはかぎらないということがわかった。換言すると、同種のフェロモンの方が高い生理活性を示すというわけではない。

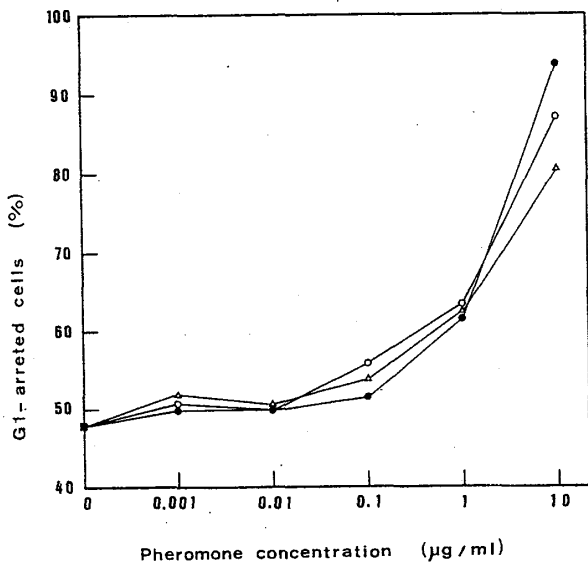


Fig.9. Accumulation of G1-arrested cells in *S. cerevisiae* a-type cells relative to the different α pheromone concentrations. *S. cerevisiae* a-type cells (T55), grown to midlogarithmic phase in YHG, were treated with various concentrations of the three α pheromones in YHG medium for 3 hours, the initial cell density being 2×10^7 cells/ml. The samples were then fixed with formaldehyde (1.85 %) and briefly sonicated and microscopically observed to measure unbudded cells (%). ○, α^{sc} pheromone; △, α^{sk} pheromone; ●, α^{se} pheromone; ■, no pheromone (control).

図10及び図11に示すように、それぞれ*S. kluyveri*及び*S. exiguus*のa型細胞をフェロモン処理細胞として用いた場合にも、同様な効果が認められた。また、G1期停止細胞の割合は、処理した細胞の種によって、それぞれ、ある一定の値で飽和する傾向が認められた。

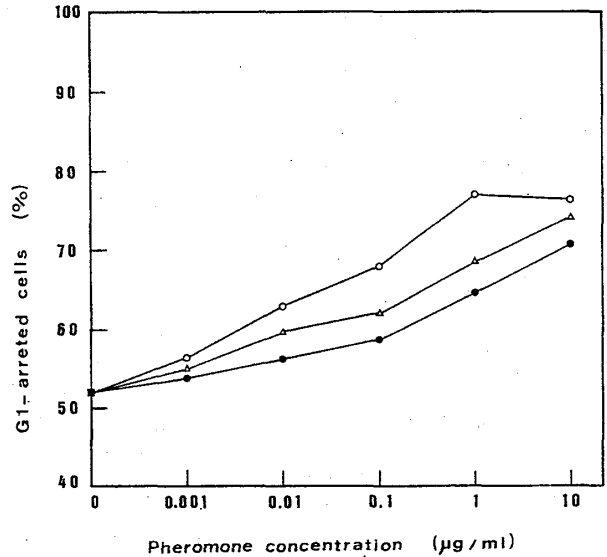


Fig.10. Accumulation of G1-arrested cells in *S. kluyveri* a-type cells relative to the different α pheromone concentrations. The treated strain was *S. kluyveri* a-type strain (SK3). See Fig.9 for symbols.

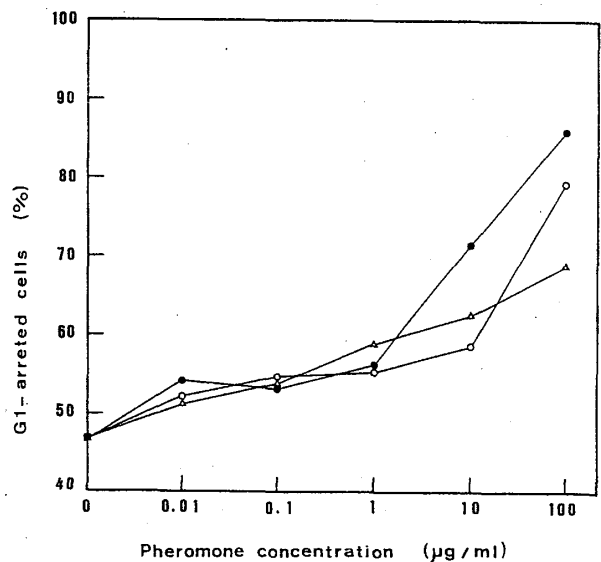


Fig.11. Accumulation of G1-arrested cells in *S. exiguus* a-type cells relative to the different α pheromone concentrations. The legends are similar to those in Fig.9, with exception that the treated strain was *S. exiguus* a-type strain (THE1-16C) and the treatment time was 5 hours.

最後に、*S. exiguus* の合成 α フェロモンが *Saccharomyces* 属酵母 3 種の a 型細胞にたいしてシュムー形成を誘導する最低のフェロモン濃度を調べた。シュムーとは、フェロモンによって特異的に DNA 合成を阻害された G1 期停止細胞のタンパク質、RNA や細胞壁合成などが持続することによって、細胞が洋なし形に膨潤することを言う^{14, 15, 16}。その結果が表 6 である。また、それらのシュムーの形態を図 12 に示した。

このように、3 種の *Saccharomyces* 属酵母の α フェロモン (α^{sc} , α^{sk} , α^{se} フェロモン) は、これら 3 種の *Saccharomyces* 属酵母のすべての a 型細胞に対して、種間で相互に交叉活性をもつことが明らかになった。また、同種のフェロモンの方がその効果が高いとは言えないという結果を得た。

Table 6. Shomoo-inducing activity of *S. exiguus* α pheromone on three *Saccharomyces* yeasts. Minimum concentrations to induce shomoo formation in the a-type cells of three *Saccharomyces* yeasts are indicated.

	Treated a-type strain		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. kluyveri</i>	<i>S. exiguus</i>
α^{se} pheromone	5 μ g/ml	1 μ g/ml	50 μ g/ml

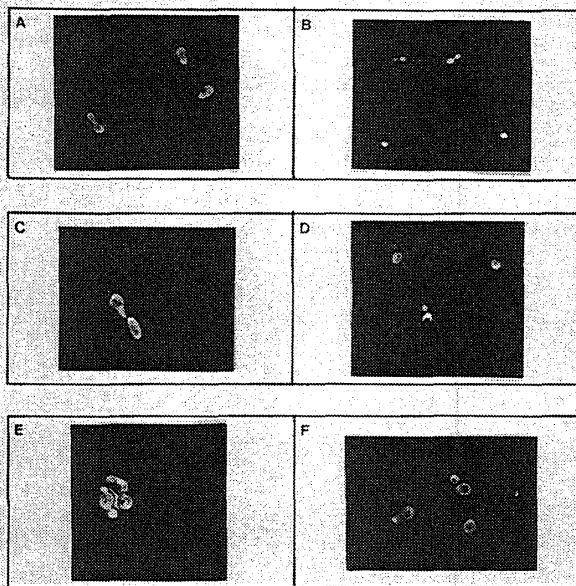


Fig. 12. Shomoo induction of three *Saccharomyces* yeasts by synthetic α pheromone of *S. exiguus*. A, B, *S. exiguus* a-type strain (THE1-16C); C, D, *S. cerevisiae* a-type strain (T55); E, F, *S. kluyveri* a-type strain (SK3). A, C and E were treated with synthetic α pheromone of *S. exiguus*. Others were controls with no pheromone.

2.5. *Saccharomyces* 属酵母における性フェロモンの種間交叉活性についての一考察

S. cerevisiae と *S. kluyveri* 間で α フェロモンの交叉活性があることは、最初に、McCullough と Herskowitz によって報告された¹⁷。この章では、3 種の *Saccharomyces* 属酵母の合成 α フェロモンが、これら 3 種の *Saccharomyces* 属酵母のすべての a 型細胞に対して、種間で相互に交叉活性をもつことを示した。これらの結果は、*Saccharomyces* 属酵母においては、 α 型細胞の分泌する α フェロモンは種特異性を持たない可能性を示唆している。一方、1 では、*S. exiguus* 及び *S. kluyveri* の α フェロモンは *S. cerevisiae* に対して活性を示さず、 α フェロモンは種特異的であることを示した。

これらのことは、*Saccharomyces* 属酵母においては、 α 型細胞から分泌される α フェロモンが a 型細胞に対して生理活性を示す範囲をもって属を規定し、a 型細胞から分泌される α フェロモンが a 型細胞に対して生理活性を示す範囲によって種を規定することができることを示唆しているのかも知れない。このような方法により、*Saccharomyces* 属酵母の種の分類をおこなえる可能性もある。

3. *Saccharomyces exiguus* ゲノムにおける、*Saccharomyces cerevisiae* のホモタリズム遺伝子及び接合型遺伝子と類似性のある DNA 塩基配列の検索

3.1. 概説

1 では、EMS による突然変異誘発処理を行うことによって、*S. exiguus* のホモタリク株からヘテロタリク株を誘導・分離できることを述べた。また、*S. exiguus* においても、接合型は単一の遺伝子座によって決定されており、この接合型遺伝子座とは連鎖していない単一の遺伝子がホモタリズムを調節していることを示した。ところで、1 及び 2 では、*S. exiguus* のヘテロタリクな一倍体株は *S. cerevisiae* とは接合しないが、*S. exiguus* の α 型細胞から分泌される α フェロモンは *S. cerevisiae* の a 型細胞に対して生理活性をもつことを示した。これらの結果は、*S. exiguus* が、*S. cerevisiae* の接合型の決定及び転換の機構と類似した機構を有している可能性を強く示唆している。

そこで、これら 2 種の間における接合型の決定及び転換の機構の異同について、DNA レベルで調べることにした。*S. cerevisiae* で既に、クローン化されている *MAT* 遺伝子^{23, 24}及び *HO* 遺伝子^{25, 26}をプローブに用いて、*S. exiguus* のゲノム DNA に対してサザンハイブリダイゼーション実験を行った。また、パルス・フィールド・ゲル電気泳動を用いての *S. cerevisiae* 及び *S. exiguus* の核型解析を行うとともに、*HO* 遺伝子と類似性のある DNA

の染色体同定を行った。

3.2. *S. exiguus* における、*S. cerevisiae* の *MAT* 遺伝子及び *HO* 遺伝子類似DNAの検索

S. exiguus が *S. cerevisiae* の接合型決定遺伝子及びホモタリズム調節遺伝子と類似性のあるDNA塩基配列をもっているかどうかを調べるために、クローン化された *S. cerevisiae* の *MAT a* (a型発現遺伝子)、*MAT α* (α型発現遺伝子) 及び *HO* 遺伝子 (ホモタリズム遺伝子) をプローブとして用い *S. exiguus* のDNAに対してサザンハイブリダイゼーションを行った。

S. exiguus のホモタリック株 (Yp74L-3) 及び *S. cerevisiae* のホモタリック株 (MT13) から調製したゲノムDNAを *Hind*III で消化した後、アガロース・ゲル電気泳動で分離した。*S. cerevisiae* の *MAT a* 及び *MAT α* の遺伝子を、それぞれ、完全に含むpBR322の誘導プラスミドpDX及び p2.5をプローブに用いて、これらのDNAに対して

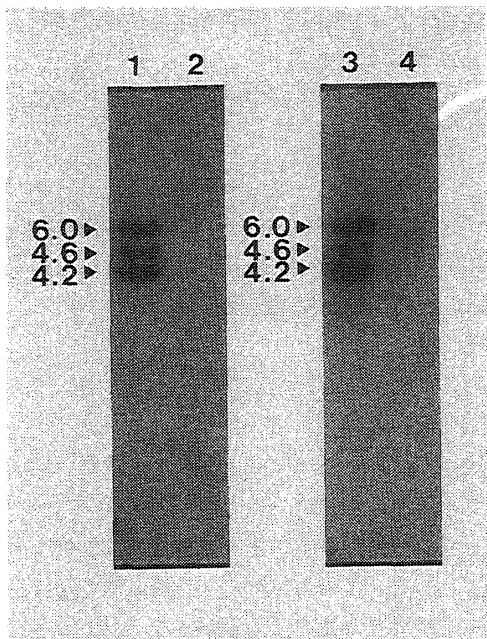


Fig.13. Southern hybridization of *Hind*III-digested DNAs from *S. exiguus* and *S. cerevisiae* probed with the *MAT a* and *MAT α* genes of *S. cerevisiae*. DNAs (2 μg/lane) from *S. cerevisiae* homothallic strain (MT13) (lanes 1 and 3) and *S. exiguus* homothallic strain (Yp74L-3) (lanes 2 and 4) was digested with *Hind*III. The DNA fragments were then separated by electrophoresis in 0.8 % agarose gels, and Southern blots were probed with the radioactive plasmids pDX (*MAT a*) (lanes 1 and 2) and p2.5 (*MAT α*) (lanes 3 and 4). The sizes of the hybridization bands are given in kolobase pairs (Kbp).

サザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、*S. cerevisiae* のDNAに対しては、どちらのプローブを用いた場合にも、3本のハイブリダイゼーション・バンドが認められた (図13, 列1と3)。これらは、*MAT* 遺伝子及び2つのサイレントな接合型遺伝子 (*HMR a* 及び *HML α* 遺伝子) にハイブリダイズしたバンドであって、6.0Kb, 4.6Kb及び4.2Kbのバンドは、それぞれ、*HML α*, *HMR a* 及び *MAT* の遺伝子座に由来している²⁹⁾。*S. exiguus* のDNAに対して、同様なサザンハイブリダイゼーションを行った場合には、どちらのプローブを用いてもハイブリダイズするようなバンドは認められなかった (図13, 列2と4)。以上の結果は、*S. exiguus* のゲノムには、*S. cerevisiae* の *MAT* 遺伝子と類似性のあるDNA塩基配列は存在しないことを示している。

次に、*S. cerevisiae* の *HO* 遺伝子と類似性のあるDNA塩基配列が、*S. exiguus* のゲノムに存在するかどうかを調べた。プローブとしては、*S. cerevisiae* の *HO* 遺伝子を完全に含むプラスミドYEp13-*HO* と、その対照としてのプラスミドYEp13を用いた。プラスミドYEp13は *S. cerevisiae* と *E. coli* とのシャトル・ベクターで、*S. cerevisiae* の *LEU2* 遺伝子, 2μプラスミドの複製起点及びpBR322から構成されるプラスミドである。その結果は図14

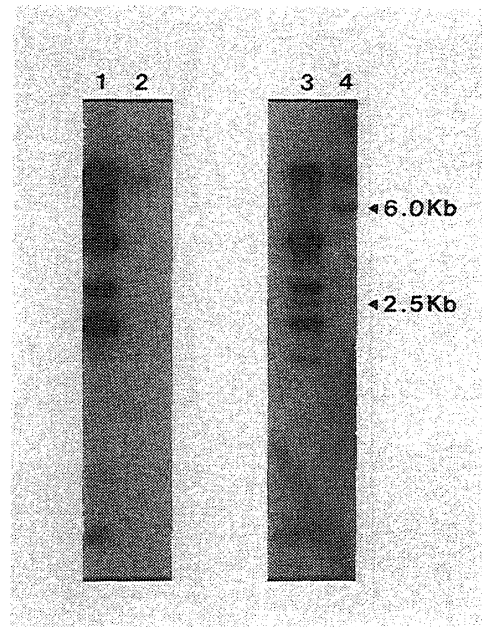


Fig.14. Southern hybridization of *Hind*III-digested DNAs from *S. exiguus* and *S. cerevisiae* probed with the YEp13-*HO* and YEp13 plasmids. DNAs from *S. cerevisiae* MT13 (lanes 1 and 3) and *S. exiguus* Yp74L-3 (lanes 2 and 4) were probed with YEp13 (lanes 1 and 2) and YEp13-*HO* (lanes 3 and 4).

に示すように、*S. exiguus* のゲノムには *S. cerevisiae* の *HO* 遺伝子と特異的な類似性を示す 6.0Kb の *Hind*III 断片が存在することがわかった。そこで、*S. cerevisiae* の *HO* 遺伝子の転写領域を完全に含む 2.5Kb の *Hind*III 断片をプラスミド pUC18 にサブクローニングした pUC18-*HO* をサザンハイブリダイゼーションのプロープとして用いた(図15)。*S. cerevisiae* の MT13 株から調製した DNA を *Hind*III で消化して電気泳動した後、pUC18-*HO* プロープによるサザンハイブリダイゼーションを行った。予想どおり、2.5Kb のハイブリダイゼーション・バンドが認められた(図16, 列1)。同様に、*S. exiguus* の Yp74L-3 株の DNA に対してサザンハイブリダイゼーションを行った場合には、このプロープは 6.0Kb の *Hind*III 断片にハイブリダイズすることが確認された(図16, 列2)。pUC18 プラスミドは、*S. exiguus* や *S. cerevisiae* の DNA にはハイブリダイズしないことは、予め、確認している。

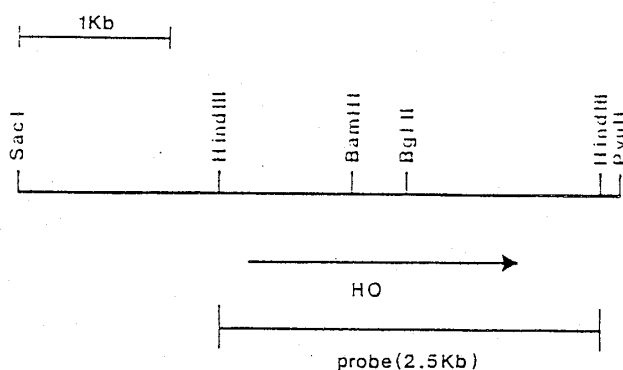


Fig. 15. Physical map of *S. cerevisiae* *HO* gene and 2.5 Kb *Hind*III-fragment subcloned into pUC18. Large arrow indicates *HO* transcript.

3.3. *HO* 遺伝子類似DNAの染色体同定

さらに、染色体サイズのDNAでの実験を行うにあたって、まず始めに、*S. exiguus* と *S. cerevisiae* の染色体サイズのDNAを調製し、パルス・フィールド・ゲル電気泳動(PFGE)で分離して、その電気泳動核型を比較した。パルス・フィールド・ゲル電気泳動とは、電場を泳動方向に対して、ある角度で交互に変換することにより、巨大なDNA(10⁸塩基対以上)を分離できる装置を言う。その結果を図17に示した。*S. cerevisiae* は15本のバンドに分離した。一方、*S. exiguus* は11本のバンドに分離し、それらのバンドのパターンもこの酵母特有のものであることがわかった。しかしながら、DNAサイズはほぼ同じような範囲に分離している。これらの結果は、1及び2で述べてきたように、*S. exiguus* と *S. cerevisiae* とは、

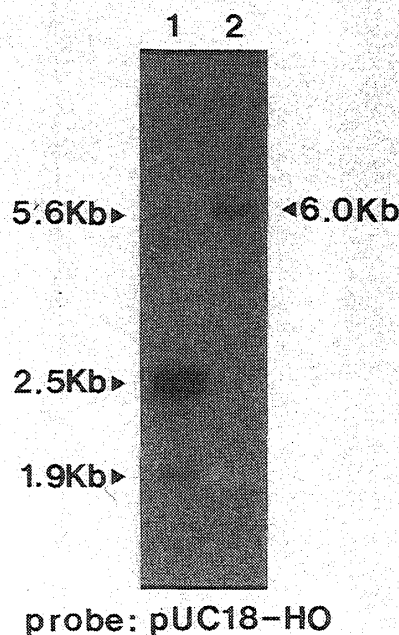


Fig. 16. Southern hybridization of *Hind*III-digested DNAs from *S. exiguus* and *S. cerevisiae* probed with the *HO* gene of *S. cerevisiae*. DNAs from *S. cerevisiae* MT13 (lane 1) and *S. exiguus* Yp74L-3 (lane 2) were probed with pUC18-*HO* plasmid.

同じ *Saccharomyces* 属酵母に属しながらも別種であることを明確に支持しているものと考えられる。

このようにして分離した *S. exiguus* 及び *S. cerevisiae* の染色体サイズのDNAに対して、pUC18-*HO* プラスミドをプロープに用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、*S. cerevisiae* においては、pUC18-*HO* は、予想どおり、*HO* 遺伝子の存在することがわかっている約1500Kbの第4番染色体DNAにハイブリダイズした(図18, 列1, 2, 6)^{27, 28, 29)}。一方、*S. exiguus* においては、図18に示すように、pUC18-*HO* は約940Kbの染色体DNAにハイブリダイズした(列3, 4, 5)²⁷⁾。このことから、*S. cerevisiae* の *HO* 遺伝子と類似性のあるDNA塩基配列は、*S. exiguus* においては、約940Kbの染色体DNA上に存在することがわかった。

ところで、図16の列1に示したように、*S. cerevisiae* のDNAに対しては、プラスミドpUC18-*HO* は2.5kbの *Hind*III断片以外に1.9Kb及び5.6Kbの *Hind*III断片にも弱くハイブリダイズすることがわかった。同様に、*S. cerevisiae* の染色体DNAに対してプラスミドpUC18-*HO* は第4番染色体以外に第2番染色体(860Kb)にも弱くハイブリダイズした(図18, 列1, 2, 6)^{27, 28, 29)}。このことから、上記の弱くハイブリダイズする2本のバンドは第2番染

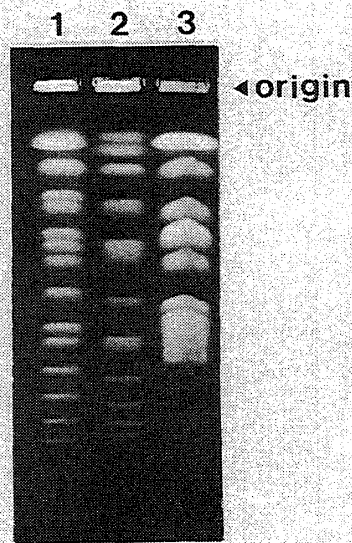


Fig. 17. Pulsed field gel electrophoresis of DNAs from *S. exiguus* and *S. cerevisiae*. 1, *S. cerevisiae* YNN295 strain; 2, *S. cerevisiae* MT13 strain; 3, *S. exiguus* Yp74L-3 strain.

色体に由来している可能性が高いと思われる。

以上述べてきた結果は、*S. exiguus* には、*S. cerevisiae* の *MAT* 遺伝子と類似性のある DNA 塩基配列は存在しないが、*HO* 遺伝子と類似性のある DNA 塩基配列が明らかに存在することを示している。このことは、接合型決定機構に関しては、*S. exiguus* と *S. cerevisiae* との間ではかなりの違いがあるが、接合型転換の機構に関しては、それら 2 種の間で類似性が高いのかもしれない。これらを立証するには、この *S. exiguus* の *HO* 類似 DNA が、真に *S. exiguus* において、接合型転換に関与する物質をコードしているのかどうかを検定する必要がある。これは、今後に残された課題である。

おわりに

1 において述べたように、*Saccharomyces* 属酵母における性の遺伝的・生理的研究は、*Saccharomyces cerevisiae* 以外の種においては、それらの酵母のホモタリクな生活環のために事実上不可能であった。その壁を突破するためには、ヘテロタリクな一倍体の株を分離することが必要不可欠であった。本研究では、野生のホモタリクな *Saccharomyces* 属酵母に対して、突然変異誘発処理を行うことにより、人為的にヘテロタリクなハプロイド株を分離することができることを、はじめて、示すことができた。さらに、この変換のもとになった突然変異を解析することによって、*S. cerevisiae* にみられるよう

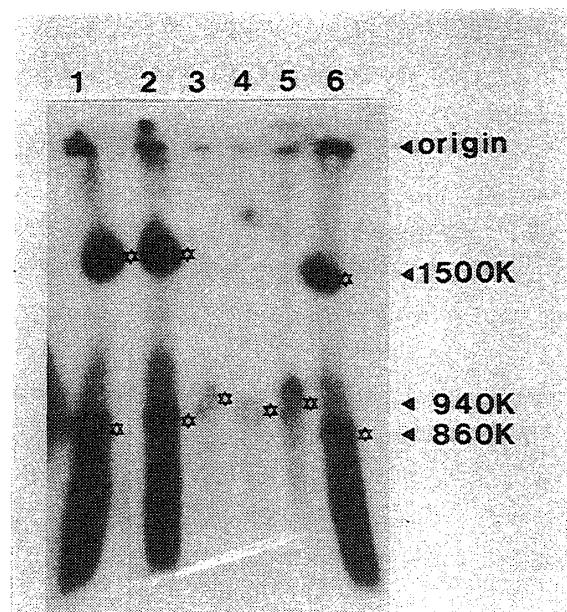


Fig. 18. Southern hybridization of chromosome-sized DNAs from *S. exiguus* and *S. cerevisiae* probed with the *HO* gene of *S. cerevisiae*. The chromosome-sized DNAs were separated by pulsed field gel electrophoresis, and a Southern blot was probed with the radioactive plasmid pUC18-HO. Stars indicate hybridized chromosomes. Lane 1, *S. cerevisiae* homothallic diploid strain, D10; Lane 2, *S. cerevisiae* a-type haploid strain, T55; Lane 3, *S. exiguus* a-type haploid strain, THE1-16C; Lane 4, *S. exiguus* a-type haploid strain, THE1-16B; Lane 5, *S. exiguus* homothallic diploid strain, Yp74L-3; Lane 6, *S. cerevisiae* a-type haploid strain, T56. The sizes of the hybridization bands are given in Kbp.

なホモタリズム遺伝子及び接合型遺伝子が *Saccharomyces exiguus* にも明らかに存在することを示した。

このようにして人為的に分離した *S. exiguus* のヘテロタリクな一倍体株を用いて、性に関する生理的な研究を行った結果、*S. exiguus* にも *S. cerevisiae* にみられるような性的凝集や性フェロモンが存在することがわかった。さらに、*Saccharomyces* 属酵母の種間での性的な相互作用を調べた結果、*S. exiguus* は、*S. cerevisiae* 及び *S. kluyveri* とは性的凝集も接合子形成も行わないことがわかった。したがって、*S. exiguus* は、生物学的にも *S. cerevisiae* 及び *S. kluyveri* とは隔離・分化した別種であることが明確に示された。このように、野生のホモタリクな *Saccharomyces* 属酵母でも、人為的にヘテロタリクな株を分離することができれば、それらの

酵母の分類を生物学的に行うことができる。これまでは、それらの野生酵母の分類は主として糖の資化性・醗酵性に頼っていた¹⁹⁾。それに対して、人為的なヘテロタリック株の分離と性的凝集の検定法を用いる種の分類を行うことは生物学的に大変重要である。

2では、3種の *Saccharomyces* 属酵母において、それらの α フェロモンは、それぞれ違った構造を持ちながらも、すべての3種の *Saccharomyces* 属酵母の a 型細胞に対して相互に生理活性を持つことを示した。しかしながら、 α フェロモンの生理活性は同種内の α 型細胞に対してのみ限定されていた。これらのことは、*Saccharomyces* 属酵母の分類に関しては、 α フェロモンが a 型細胞に対して生理活性を持ち得る最大範囲を属と規定し、 α フェロモンが α 型細胞に対して生理活性を持ち得る範囲を種と規定することができる可能性を示唆しているものと考えられる。

これまで述べてきた実験結果は、*S. exiguus* は *S. cerevisiae* とは同じ *Saccharomyces* 属酵母でありながらも、明らかに別の種であることを示している。そこで、このことを遺伝子DNAのレベルで確認することを試みた。*S. exiguus* にも、*S. cerevisiae* にみられるような性転換及び性決定を調節している遺伝子が存在することは1に述べた。3では、*S. exiguus* のゲノムに、*S. cerevisiae* の *MAT* 遺伝子及び *HO* 遺伝子と類似性のあるDNA塩基配列が存在するかどうかを調べた。その結果、*S. exiguus* には *MAT* 遺伝子と類似性を示すDNA塩基配列は存在しないが、*HO* 遺伝子と類似性を示すDNA塩基配列が存在することがわかった。

これらの結果から、*Saccharomyces* 属酵母においては、種及び性の進化過程において、性に関連する遺伝子には、そのDNAレベルでの可変性に段階性があり、*HO* 遺伝子は保守性が高く、*MAT* 遺伝子はより変わり易かったのではないかと考えられる。*Saccharomyces* 属酵母においては、この *MAT* 遺伝子の可変性が種の分化(接合しない別種)をもたらし、*HO* 遺伝子の支配するホモタリズムは、属を通して普遍的に存在しているのかもしれない。また、当然、*MAT* 遺伝子に支配されている性的凝集物質などの遺伝子は、それらの産物が種間で機能的な相補性を示さないことから、かなり大きく変化していると考えられる。これらのことから考えると、*S. cerevisiae* で知られている遺伝子調節の流れ *HO* \rightarrow *MAT* \rightarrow 性表現遺伝子(性的凝集物質遺伝子、性フェロモン遺伝子など)²⁰⁻²¹⁾ は、そのまま、進化過程における遺伝子の可変性を反映しているかにみえる。つまり、性に関連する遺伝子の調節経路において、上流に行くほど、それらの遺伝子の保守性が高くなるように思われる。このようにして、属の枠組があり、種の分化が行われてきたのではないだ

ろうか。

追記

本論文は、著者の学位論文(名古屋大学,1989年)を編集し直したものである。福山大学工学部紀要への投稿をお勧め頂いた福山大学工学部教授 山本武彦先生 並びに同工学部助教授 壺井基夫先生に感謝致します。

参考文献

- 1) Winge, Ö. : On haplophase and diplophase in some *Saccharomyces*. C. R. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Physiol. 21 77-112 (1935)
- 2) Winge, Ö. & Roberts, C. : A gene for diploidization in yeast. C. R. Trav. Lab. Carlsberg Ser. Physiol. 24 341-346 (1949)
- 3) Lindegren, C.C. & Lindegren, G. : A new method for hybridizing yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. 29 306-308 (1943)
- 4) Hicks, J.B. & Herskowitz, I. : Interconversion of yeast mating types. I. Direct observations of the action of the homothallism (*HO*) gene. Genetics 83 245-258 (1976)
- 5) Strathern, J.N. & Herskowitz, I. : Asymmetry and directionality in production of new cell types during clonal growth: the switching pattern of homothallic yeast. Cell 17 371-381 (1979)
- 6) Nasmyth, K. : Molecular analysis of a cell lineage. Nature 302 670-676 (1983)
- 7) Herskowitz, I. & Oshima, Y. : Control of cell type in *Saccharomyces cerevisiae*: Mating type and mating type interconversion. In: Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, Life Cycle and Inheritance (Strathern, J.N., Jones, E.W. & Broach, J.R., Editors). Cold Spring Harbor Lab., New York, pp.181-209 (1981)
- 8) Sprague, G.F.Jr., Blair, L.C. & Thorner, J. : Cell interactions and regulation of cell type in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Ann. Rev. Microbiol. 37 623-660 (1983)
- 9) Oshima, T. & Takano, I. : Mutants showing heterothallism from a homothallic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 94 841-857 (1980)
- 10) Yanagishima, N. & Nakagawa, Y. : Mutants inducible for sexual agglutinability in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. 178 241-251 (1980)
- 11) Harber, J.E. & Garvik, B. : A new gene affecting the efficiency of mating type interconversions in

- homothallic strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 87 33–50 (1977)
- 12) Stern, M., Jensen, R. & Herskowitz, I. : Five *SWI* genes are required for expression of the *HO* gene in yeast. J. Mol. Biol. 178 853–868 (1984)
 - 13) Lodder, J. (Editor) : The Yeasts, A Taxonomic Study. North-Holland Publ., Amsterdam (1970)
 - 14) Yanagishima, N. & Yoshida, K. : Sexual interactions in *Saccharomyces cerevisiae* with special reference to the regulation of sexual agglutination. In: Sexual Interactions in Eukaryotic Microbes (O' Day, D.H. & Horgen, P.A., Editors). Academic Press, New York, pp.261–295 (1981)
 - 15) Thorner, J. : Pheromonal regulation of development in *Saccharomyces cerevisiae*. In: The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, Life Cycle and Inheritance (Strathern, J.N., Jones, E.W. & Broach J.R., Editors). Cold Spring Harbor Lab., New York, pp.143–180 (1981)
 - 16) Yanagishima, N. : Sexual differentiation and interactions in yeasts. Microbiol. Sci. 2 45–49 (1986)
 - 17) McCullough, J. & Herskowitz, I. : Mating pheromones of *Saccharomyces kluyveri*: Pheromone interactions between *Saccharomyces kluyveri* and *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 138 146–154 (1979)
 - 18) Stötzler, D., Kiltz, H-H & Duntze, W. : Primary structure of α factor peptides from *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 69 397–400 (1976)
 - 19) Sakurai, A., Tamura, S., Yanagishima, N. & Shimoda C. : Structure of a peptidyl factor, α substance-IA inducing sexual agglutinability in *Saccharomyces cerevisiae*. Agric. Biol. Chem. 41 395–398 (1977)
 - 20) Sakurai, A., Sakamoto, M., Tanaka, H., Esumi, Y., Takahashi, N., Fujimura, H., Yanagishima, N. & Banno, I. : Isolation and amino acid sequence of a mating pheromone produced by mating type α cells of *Saccharomyces kluyveri*. FEBS Lett. 166 339–342 (1984)
 - 21) Sakamoto, M., Sakurai, A., Ichikawa, Y., Esumi, Y., Tanaka, H., Kitada, C., Fujino, M., Yanagishima, N. & Takahashi, N. : Chemical structure of mating pheromone peptides, α^{sk^1} and α^{sk^2} pheromones, produced by mating type α cells of *Saccharomyces kluyveri*. Agric. Biol. Chem. 50 1279–1285 (1986)
 - 22) Sakurai, A., Tanaka, H., Esumi, Y., Takahashi, N., Hisatomi, T., Yanagishima, N. & Ban-no, I. : Isolation and amino acid sequence of a mating pheromone produced by mating type α cells of *Saccharomyces exiguus*. FEBS Lett. 203 285–288 (1986)
 - 23) Hicks, J.B., Strathern, J.N. & Klar, A.J.S. : Transposable mating type genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Nature 282 478–483 (1979)
 - 24) Nasmyth, K. & Tatchell, K. : The structure of transposable yeast mating type loci. Cell 19 753–764 (1980)
 - 25) Nasmyth, K. : At least 1400 base pairs of 5' -flanking DNA is required for the correct expression of the *HO* gene in yeast. Cell 42 213–223 (1985)
 - 26) Breeden, L. & Nasmyth, K. : Regulation of the yeast *HO* gene. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50 643–650 (1985)
 - 27) Yoshida, K., Hisatomi, T. & Yanagishima, N. : Sexual behavior and its pheromonal regulation in ascosporeogenous yeasts. J. Basic. Microbiol. 29 99–128 (1989)
 - 28) Carle, G.F. & Olson, M.V. : An electrophoretic karyotype for yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 3756–3760 (1985)
 - 29) Mortimer, R.K. & Shild, D. : Genetic map of *Saccharomyces cerevisiae* (Edition 9). Microbiol. Rev. 49 181–212 (1985)
 - 30) Kurjan, J. & Herskowitz, I. : Structure of a yeast pheromone (MF α): a putative α -factor precursor contains four tandem copies of mature α -factor. Cell 30 933–943 (1982)
 - 31) Siliciano, P.G. & Tatchell, K. : Identification of the DNA sequences controlling the expression of the *MAT α* locus of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 2320–2324 (1986)