

酵母菌の増殖に及ぼすパロモマイシンの

影響についての遺伝学的研究 I

体細胞分離と減数分裂分離

須田 紘太・西嶋 健司*

(奈良教育大学生物学教室)

内 田 昭

(神戸大学教養部生物学教室)

(昭和61年4月30日受理)

Genetic Studies of Effect of Paromomycin on Growth in *Saccharomyces cerevisiae* I

Somatic and meiotic segregation of the resistance factors

Kohta SUDA, Kenji NISHIJIMA*

(Biological Laboratory, Nara University of Education, Nara 630, Japan)

and

Akira UCHIDA

(Biology Division, College of General Education, Kobe University, Kobe 657, Japan)

(Received April 30, 1986)

Abstract

A strain of *S. cerevisiae*, KL14-4A, was not affected evidently for the growth on a complete glucose medium containing high concentration (10 mg/ml) of paromomycin. KL14-4A was crossed with a strain, C814-36B, that could not grow on the medium containing the same concentration of the drug. Examination of the zygote progeny indicated that somatic segregation had occurred for the characters of resistance and sensitivity to the drug. Assay of ascospores from the diploid clones of the two strains indicated that the genetic character as well as the mitochondrial paromomycin resistance, was irregularly segregated during meiosis.

From the results it was assumed that KL14-4A might harbor non-mitochondrial cytoplasmic paromomycin-resistance gene(s), together with the mitochondrial paromomycin-resistance gene, and both characters of paromomycin resistances might be controlled by chromosomal gene(s).

* 現在, 天理市立天理北中学校 (Present address: Tenri-Kita Junior High School, Tenri, Nara 632, Japan)

緒 言

パロモマイシンは, *Streptomyces* の一種から分離されたアミノグリコシド抗生物質で, 細菌のリボソームの 30S サブユニットに作用し, 蛋白合成を阻害する. 酵母菌に対しても高濃度で増殖を阻害し¹⁾, *in vitro* でミトコンドリアリボソームの 15SrRNA に作用し, ミトコンドリアの蛋白合成を阻害する²⁾ ことが知られている. また酵母菌においてはミトコンドリアゲノム上の *par 1* 遺伝子座における同抗生物質に対する耐性突然変異が発見され, ミトコンドリアの遺伝学的研究のマーカーの一つとして使用されており³⁾, 現在ではこの突然変異はミトコンドリアDNAの 15SrRNA 遺伝子附近にあることも確認されている⁴⁾.

酵母菌の研究室株には, 発酵性(ブドウ糖)培地上での増殖に関して, 高濃度の同抗生物質に対して耐性を示すものと感受性を示すものがある. この論文では, 耐性株と感受性株との交雑による接合子孫及びその子嚢胞子についての解析結果が示され, 非ミトコンドリア性細胞質性パロモマイシン耐性遺伝子の存在と非ミトコンドリア性及びミトコンドリア性耐性遺伝子の保持または形質発現に影響を及ぼす核染色体遺伝子の存在についての仮説が提出される.

材 料 と 方 法

株

交雑に用いた株は Slonimski 由来の KL14-4A (*a*, *his1*, *trp2*, [*cap*⁺, *oli*⁺, *par*⁺]) 及び高橋由来の C814-36B (*a*, *adel1*) である. KL14-4A は, ミトコンドリア性パロモマイシン耐性遺伝子を持ち, 1mg/ml のパロモマイシンを含む非発酵性培地及び 10 mg/ml の同抗生物質を含む発酵性培地の双方に増殖可能である. C814-36B はミトコンドリア性パロモマイシン感受性遺伝子を持ち, 両パロモマイシン含有培地に増殖不能である.

培 地

発酵性完全培地として YPD (1%酵母エキス, 1%ペプトン, 1%ブドウ糖), 非発酵性完全培地として YPG (1%酵母エキス, 1%ペプトン, 2%グリセリン) を用いた. YPD-*par* 及び YPG-*par* は YPD 及び YPG にそれぞれ 10 mg/ml 及び 1 mg/ml のパロモマイシン (Paromomycin sulfate; Warner-Lambert Co.) を添加した培地である. 原栄養体選択には SD を用いた. SD は Wickerham の最少培地⁵⁾を若干改変した培地である. 胞子形成のためには SFM (1%酢酸カリウム, 0.3%ラフィノース) を用いた. 固形培地(プレート)を作製するためには, ブドウ糖培地には2%, グリセリン培地には1%の寒天を加えた.

パロモマイシン含有培地上での増殖の有無の検定

各資料を YPD 液体培地中で 30℃ で1日間培養し, 培養の約 5 μ l (約10⁵ 細胞を含む) を YPD-*par* または YPG-*par* プレート上にスポットし, 30℃ で4日間培養した後, 増殖の有無を調べた.

接合, 原栄養体選択及び胞子形成

詳細は以前に発表された論文⁶⁾に記載されている.

子嚢解剖

子嚢解剖は, 子嚢懸濁液を2%のカタツムリ消化酵素 (β -Glucuronidase from *Helix poma-*

tia; Sigma) で 30°C, 20分間の処理を行った後, YPD 寒天スラブ上でマイクロマニプレイターを使用して行った.

結 果 と 考 察

1. 体細胞分離

予備的な実験から, KL14-4A は 1mg/ml のパロモマイシンを含む YPG プレート (YPG-par) 上及び 10 mg/ml の同抗生物質を含む YPD プレート (YPD-par) 上で十分に増殖できるが, 一方, C814-36B は両プレート上で全く増殖できないことが判った. KL14-4A はミトコンドリアゲノム上の *par* 1 領域における耐性突然変異遺伝子を持ち, C814-36B は同領域における感受性遺伝子を持つ. 我々は KL14-4A の YPD-par 上での増殖能力がミトコンドリアゲノム上の耐性変異と関連したものであるか否かを検討するために, 両株の交雑後10世代以上増殖した多数の接合子子孫 (2倍体クローン) について, YPD-par, YPG-par 上での増殖の有無を調べた. 接合子子孫における耐性と感受性との分離 (体細胞分離) は, その遺伝的基盤が核染色体上の遺伝子によらず, 細胞質遺伝子によっている可能性を示唆する.

交雑により生じた接合子子孫の内, 312クローンを選び, 実験に供した. その結果を Table 1 に示す. 解析された全クローン中, 230クローンが YPD-par 上で増殖し, 82クローンは増殖できなかった. 一方, YPG-par 上では, 109クローンが増殖し, 203クローンが増殖できなかった. 抗生物質を含む YPG プレート上での接合子子孫における耐性と感受性との分離 (体細胞分離) は, ミトコンドリア性耐性遺伝子についての一般的特徴である. 一方, YPD-par 上での耐性と感受性との体細胞分離はミトコンドリア遺伝子以外の細胞質遺伝子の関与の可能性を推測させるものである.

この仮定上の細胞質性パロモマイシン耐性遺伝子はミトコンドリア性パロモマイシン耐性遺伝子とは直接の関連はないものと考えられる. 何故ならば, YPD-par 上で増殖する230クローン中, 約半数の103クローンが YPG-par 上で増殖し, 残りの約半数の127クローンは増殖できなかったからである. データとして示していないが, KL14-4A の持つ他のミトコンドリア性抗生物質耐性遺伝子, *cap^r* 及び *oli^r* の分離についても同様に調べた結果, YPD-par 上での増殖は, 両ミトコンドリア遺伝子の存否とも相関がないことが判った. YPD-par 上で増殖できなかった82クローンの内, YPG-par 上で増殖できたものは, わずかに6クローンであり76クローンは増殖できなかった. このことはミトコンドリア性パロモマイシン耐性遺伝子の存否とは無関係に, YPD-par 上での増殖不能は YPG-par 上での増殖不能と何らかの関連を有することを推測させる.

Table 1. Ability of zygote progeny from KL14-4A XC814-36B to grow on YPD and YPG plates containing paromomycin

Ability of growth		Number of clones
YPD-par	YPG-par	
+	+	103
+	—	127
—	+	6
—	—	76
Total		312

2. 減数分裂分離

細胞質遺伝のもう一つの特徴は、孢子形成前にその遺伝子の体細胞分離が完了している場合には、減数分裂によって生じる4個の子嚢孢子（4分子）クローンがその形質について4：0（0：4）に分離することである。一方、核染色体上のマーカーは通常2：2に分離する。

我々は YPD-par, YPG-par の両プレート上で増殖する+・+タイプ, 2クローン (No. 27, No. 42), YPD-par 上で増殖するが, YPG-par 上では増殖できない+・-タイプ, 2クローン (No. 20, No. 33) を孢子形成させ, 4分子解析を行った。結果は **Table 2** 及び **Table 3** にまとめられている。**Table 2** には各子嚢中の4分子の分離比とその子嚢数が示してある。各クローンの各子嚢については, YPD-par 上で増殖可能(+)な孢子と増殖不能(-)な孢子が0：4, 1：3, 2：2に分離した。もし, YPD-par 上での増殖を支配する遺伝子が核染色体上の単一の遺伝子であるとすれば, この分離比は全てのクローンの全ての子嚢について2：2となるはずである。一方, この遺伝子が細胞質性であり, 細胞質遺伝子の体細胞分離が, 孢子形成前の2倍体クローン中で完了しているとすれば, 通常4：0の分離比をとるはずである。実験結果は不規則分離を示した。YPG-par 上における増殖についても, No. 27 と No. 42 の両2倍体クローンから生じた4分子は不規則分離を示した。両クローンはミトコンドリア性パロモマイシン耐性遺伝子を持つものと考えられ, 同条件下では, データには示していないが, 他のミトコンドリア遺伝子, *cap^r*, *oli^r* については全て4：0または0：4の分離比を示し, ミトコンドリアゲノム全体の体細胞分離の完了を示唆している。ミトコンドリア性パロモマイシン感受性遺伝子を持つと考えられる No. 20 及び No. 33 クローンの4分子については全て, YPG-par 上での増殖に関して0：4の分離比を示した。

YPD-par 上における増殖に関する減数分裂時の不規則分離は, 1. 耐性は複数の核染色体上の耐性遺伝子により支配されている, 2. 耐性は細胞質遺伝子により支配されており, その遺伝子の体細胞分離が不完全である, 3. 耐性は細胞質遺伝子により支配されており, 耐性の発現または耐性遺伝子の保持のためには核染色体上の複数の遺伝子が影響を及ぼしている, という三つの仮説のいずれかにより説明される。仮説1は前項で述べた様に体細胞分離の存在から否定される。仮説2は後の研究⁷⁾ が示すように可能性は薄いように

Table 2. Meiotic segregation of four zygote clones derived from the cross, KL14-4A×C814-36B

Clones	Segregation ratio	Number of asci	
	+ : -	YPD-par	YPG-par
No. 27	0 : 4	2	0
+・+type	1 : 3	13	16
20 asci	2 : 2	5	4
No. 42	0 : 4	6	3
+・+type	1 : 3	15	14
25 asci	2 : 2	4	8
No. 20	0 : 4	3	23
+・-type	1 : 3	16	0
23 asci	2 : 2	4	0
No. 33	0 : 4	3	22
+・-type	1 : 3	9	0
22 asci	2 : 2	10	0

Table 3. Ability of the spores of the four zygotes to grow on YPD and YPG plates containing paromomycin

Ability of growth		Number of spores			
YPD-par	YPG-par	No. 27	No. 42	No. 20	No. 33
+	+	19	18	0	0
+	-	4	5	24	29
-	+	5	12	0	0
-	-	52	65	68	59
Total		80	100	92	88

思われる。仮説3がこの複雑な遺伝様式を説明するのに最も妥当であろう。

Table 3 は、胞子クローンの YPD-par 上と YPG-par 上での増殖の関連について示している。前項でも述べた様に、YPD-par 上での増殖を支配する仮定上の細胞質遺伝子と YPG-par 上での増殖を支配するミトコンドリア遺伝子との間に直接の相関はない。しかし、再び、YPD-par 上での増殖不能は YPG-par 上での増殖不能と関連する傾向を示した。

以上の結果は呼吸能（ミトコンドリア）とは直接関連のない発酵性（ブドウ糖）培地上での増殖に関して、パロモイシン耐性を与える非ミトコンドリア性細胞質遺伝子が存在すること、この遺伝子の発現または保持には複数の核染色体遺伝子が影響を及ぼすこと、核染色体遺伝子はまたミトコンドリア性パロモイシン耐性遺伝子の発現に影響を及ぼすことを示唆する。後の研究⁷⁾はこのことを更に強力に裏付けた。

引用文献

- 1) M. Richards & E. R. Elliott: *Nature* **209**, 536 (1966)
- 2) P. J. Davy, J. M. Haslam & A. W. Linnane: *Arch. Biochem. Biophys.*, **136**, 54 (1970)
- 3) K. Wolf, B. Dujon & P. P. Slonimski: *Molec. Gen. Genet.*, **125**, 53 (1973)
- 4) G. Fay, C. Kujawa, B. Dujon, M. Bolotin-Fukuhara, K. Wolf, H. Fukuhara & P. P. Slonimski: *J. Molec. Biol.*, **88**, 185 (1975)
- 5) L. J. Wicherham: *J. Bacteriol.*, **52**, 239 (1946)
- 6) K. Suda & A. Uchida: *Molec. Gen. Genet.*, **128**, 331 (1974)
- 7) 須田紘太・光橋照子・山崎充子・安田千秋・内田 昭: 奈良教育大学紀要, **35**(2), 77 (1986)