

# 分裂酵母の減数分裂システム解明に向けたゲノム生物学的研究

●野島 博 ◆藪田紀一 ◆奥崎大介 ◆東岸任弘

大阪大学・微生物病研究所

## ＜研究の目的と進め方＞

ポストゲノム時代のゲノム生物学的研究のモデルとして、微生物のひとつである分裂酵母の減数分裂システムは有用である。微生物のひとつである分裂酵母の減数分裂システムは細胞の持つゲノムの半数体化（減数分裂）、2回連続して起こる細胞分裂（MII, MII）、進化に重要な多様化を生む遺伝的組み換え現象（ゲノム間の交差）、半数体独自の遺伝子発現による発生プロセスなど基礎生物学的にも重要な問題を含む。

我々は独自に開発してきた段階的の差分化法（文献6）を応用して分裂酵母の減数分裂の過程において特異的に転写誘導される遺伝子群を網羅的に単離してきた（文献11）。また、それに関連する分裂酵母の減数分裂特異的にター油される遺伝子群の単離を行ってきた。本研究の目的はこれら分裂酵母の減数分裂を制御する新規な遺伝子群およびそれに強く関連する遺伝子群のゲノム生物学的な網羅的解析を行い、減数分裂を進めるプログラムの分子レベルでの解析をシステム生物学的視点から展開することにある。

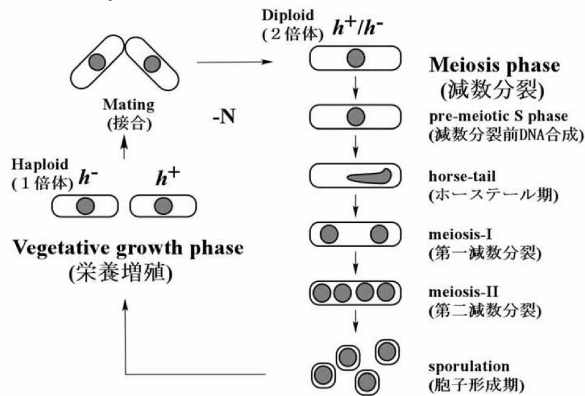


図1：分裂酵母の生活環

## ＜研究開始時の研究計画＞

以下に列挙する新規な *meu* 遺伝子について順に遺伝子破壊株を作製して表現型を詳細に調べるとともに各遺伝子とオワンクラゲの蛍光蛋白質（GFP）との融合遺伝子を各遺伝子を *ura4* で破壊した位置に組み込み、融合蛋白質を発現させて局在を観察する。

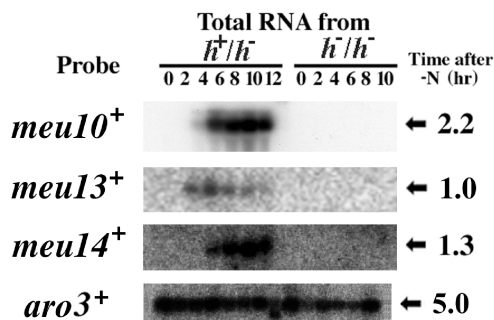


図2：*meu10+*, *meu13+*, *meu14+* のノーザンブロット解析。

*Meu3/Meu19*: これら2つは塩基配列が酷似した双子の遺伝子で減数分裂特異的（M1/MII でピーク）に転写誘導される。ORF(open reading frame) が無く機能性 RNA をコードすると考えられる。*Meu10*: *meu10* は孢子形成に関わる出芽酵母 SPS2 と類似な新規遺伝子である。*Meu14*: *meu14* 破壊株は減数第1分裂から減数第2分裂からの移行が異常となり、ヨードで染色されるような正常な孢子は形成されない。*Meu13*: *Meu13* はシナプトネマ(SC) 構造の形成をともに保障する機能を持つ出芽酵母の Hop2 蛋白質に類似する。

## ＜研究期間の成果＞

我々は分裂酵母の減数分裂の過程において特異的に転写誘導される遺伝子群を、独自に開発してきた段階的サブトラクション法を応用して網羅的にクローニングし、*meu* (meiotic expression up-regulated) と包括的に命名した。このうち蛋白質をコードする *meu10+*, *meu13+*, *meu14+*, *meu7+*, *mcp5+*, *mcp6+*, *mcp7+*, *mek1+*, *rfc3+*, *dmcl1+* 遺伝子などについて詳細な機能解析を行ってきた。とくに *dmcl1+*, *meu13+*, *checkpoint rad+* 遺伝子を用いて減数分裂チェックポイント制御機構の解析を行ったのみならず、孢子形成を制御する *meu10+*, *meu14+*, *omt1+*, *omt2+*, *omt3+* 遺伝子などについても詳細な機能解析を行ってきた。またシステム生物学の手段としてこれらの相互作用のみでなく、減数分裂チェックポイント制御を担う Mek1 キナーゼを始点としたリン酸化カスケードを決定した。

## 【*Meu*プロジェクト】

### ① *meu10+* :

*meu10+* 遺伝子は窒素源枯渇4時間以降に発現が誘導され、その mRNA はおよそ 2.2kb、416 アミノ酸をコードする（文献9）。ホモロジーサーチから分裂酵母で1つ、出芽酵母に4つのホモログが存在することが明らかとなった。これまでにその中の1つである出芽酵母 SPS2 が孢子形成に関与することが報告されている。*meu10+* 遺伝子を破壊し、その表現型を観察した。ヨウ素感受性試験により *meu10* 破壊株は野生型株と同様、もしくはそれ以上に染色されたが、顕微鏡観察により正常な孢子は観察されなかった。これらの結果は孢子壁の構成成分であるアミロース様物質は生産されているが、孢子は形成できないことを示している。

蛍光顕微鏡により細胞の形態および核の挙動を観察したところ、*meu10* 破壊株は第二減数分裂の完了する8時間までは野生型株とほぼ同様の挙動を示すが、その後孢子形成期において孢子壁の形成が見られず、核の形態も崩れるなど、野生型株と顕著な差が見られた。正常な形態の核を持つ細胞と異常な形態の核を持つ細胞の割合を測定した結果、10時間以降、異常な形態をした核を持つ細胞の割合が増加していることがわかった。

電子顕微鏡観察により、窒素源枯渇12時間後の *meu10* 破壊株を観察したところ、孢子壁がぶ厚くなり、孢子内

の細胞質が流れ出すような形態が観察された。窒素源枯渇22時間後では胞子の形態を留めていなかった。Meu10-GFPインテグランド株を作成し、Meu10-GFPの細胞内の挙動を観察したところ、第二減数分裂期の頃からシグナルが現れ、その後、胞子膜、もしくは胞子壁付近に局在し、その後ははっきりとした4つのリングが観察された。胞子のはじけた後、細胞質内に顆粒状に局在することが観察された。

抗GFP抗体によりウエスタンブロッティングを行ったところ、ノザンの結果と同調するように8、10時間で発現がピークとなり、18、24時間でGFPのみのサイズのバンドが検出された。このことから細胞質内の顆粒はMeu10が分解され、GFPのみの蛍光であることが予想された。

金コロイド法により、1,3-β-グルカンの局在を観察したところ、野生型株では胞子壁の内側に局在しているが *meu10* 破壊株では胞子壁全体に散在していた。このことは1,3-β-グルカンの局在にMeu10が必要であることを示す。一方で1,3-β-グルカンの合成酵素である *bgs2* 破壊株、キチンの合成酵素である *chs1* 破壊株においてMeu10-GFPの局在を調べたところ、Meu10-GFPは胞子壁に局在していることが明らかとなった。これらの結果からMeu10-GFPの胞子壁への局在は1,3-β-グルカン、キチンは必要でないことが明らかとなった。

Meu10のN末端は哺乳類のインシュリンレセプターの相同領域が、C末端は膜貫通モチーフが保存されていた。これらの領域を破壊した変異株はいずれも正常な胞子形成は見られなかった。このことはこれらの領域が胞子形成に必須であることを示している。

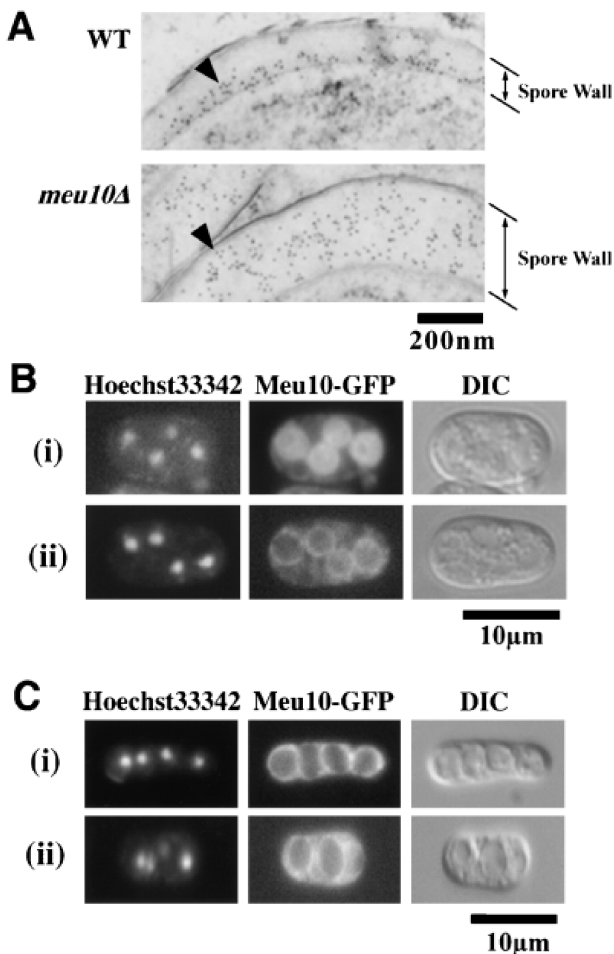


図2 : *meu10<sup>Δ</sup>* 破壊株は胞子形成に異常を示す。

### ② *meu13+* :

減数分裂の過程で起こる遺伝子組み換えには相同染色体の対合が必須である。我々が単離した *meu13+* 遺伝子から発現されるMeu13は核内の染色体に局在して、この相同染色体の対合と遺伝子組み換えにおいて重要な働きをすることを見出した(文献10)。減数分裂遺伝子組み換えの開始に必須なRec12がMeu13の働きに貢献することも始めて見出した。ただし、その作用は遺伝子組み換えには依存しないため、*rec12* 遺伝子破壊株でもMeu13が欠損すると遺伝子組み換えの効率が大幅に落ちる。我々はさらに相同染色体の対合をライブで観察しMeu13の相同染色体の対合における重要性を証明した。Meu13はテロメア集合にも染色体の報告書ステムループ構造運動にも必要でないことも見出した。

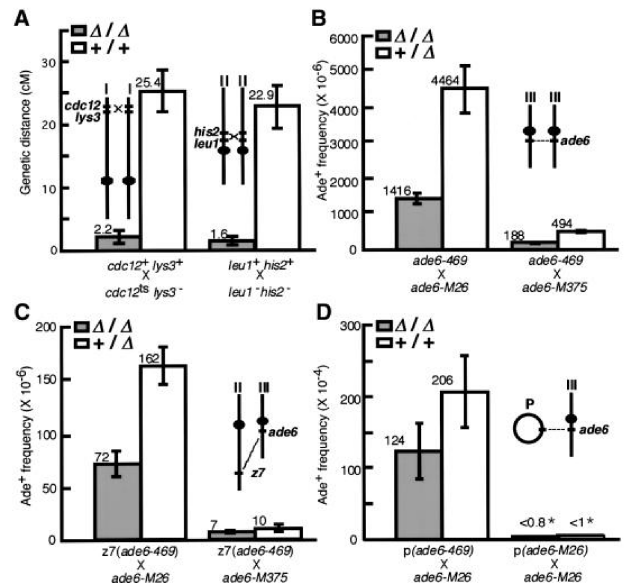


図3 : *meu13<sup>Δ</sup>* 破壊株は減数分裂遺伝子組み換えに異常を示す。

### ③ *meu14+* :

*meu14+* は減数分裂期特異的な転写因子であるMei4に依存して発現する(文献5)。*meu14+* を欠失した二倍体(*meu14<sup>Δ</sup>*)を減数分裂期に誘導すると、DNA合成期には異常が見られず、後に続く2回の核分裂のタイミングも野生株と比べて顕著な変化がない。しかし、*meu14<sup>Δ</sup>* 株は正常な胞子を形成することができず胞子の生存率も低い。類似な機能を持つ出芽酵母Don1はMeu14と同じ局在をするが胞子形成には必須でない。Meu14は細胞質あるいは細胞膜から前胞子膜に供給される既知の前胞子膜成分とは異なりMeu14は核内に蓄積すること、前胞子膜形成の終期には速やかに消失するなど前胞子膜形成に関わるタンパク質としては興味深い性質を持ち、電子顕微鏡でしか可視化できなかった分裂酵母前胞子膜の成長端をモニターすることができる点でMeu14は有用である。

Meu14にはタンパク質間相互作用に必要なCoiled-Coilドメイン、2つの膜貫通領域そして核移行シグナル配列が存在し、Two-Hybrid解析からMeu14同士の結合が示唆されたことからMeu14は核あるいは核膜に存在する構造タンパク質複合体であることが考えられる。Meu14-GFP融合タンパク質を発現する *meu14+*-*gfp* 株を作製し、間接蛍光抗体法による観察と生細胞の計時変化の観察を行った結果、Meu14-GFPは減数第2分裂(MII)期でのみ発現することがわかった。Meu14-GFPはMII前期に核内に蓄積し、それぞれの核を挟み込むような形で点状に出現する。MII中期に入ると2つの平行なリングを形成し、核を取り

囲むように大きくなる。MII後期に入ると2つのリングは分裂した核の間に留まるように見られ、核の分裂距離が長くなるにつれてリングの直径も小さくなり前胞子膜形成以前の段階で点状となって、やがて消失する。また、*meu14*Δ株では前胞子膜形成の開始に必要なSPB(spindle pole body)の分離、核の形状と位置にも野生株を比べて異常が見られる。これらの結果から、*Meu14*は減数第2分裂期の核分裂と前胞子膜の形成に密接に関わると考えられる。

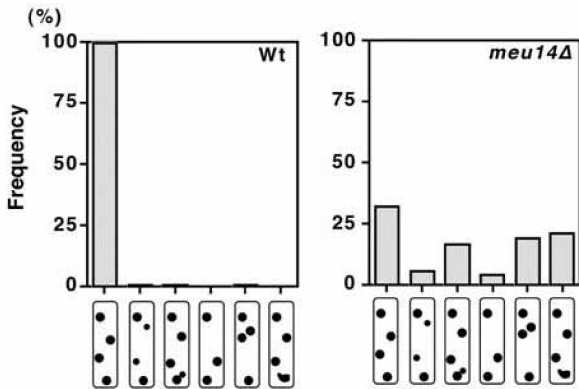


図4：*meu14*破壊株は胞子形成に異常を示す。

#### 【減数分裂組み換えチェックポイント制御機構】

まず減数分裂相同組み換え率が低下する*meu13*変異株(文献10)を用いて、以下の結果を明らかにした(文献8)。

- ① *meu13*変異株は減数第一分裂への進行が遅延した。
- ② *meu13*変異株の減数第一分裂の遅延は、組み換えの開始とcheckpoint *rad+*遺伝子、*cds1+*、減数分裂特異的な*cds1+*ホモログの*mek1+*に依存していた。
- ③ PFGEによる減数分裂特異的なDSBを検出したところ、*meu13*変異株ではDSBの修復が遅れていた。
- ④ checkpoint *rad*と*meu13*の二重変異株の胞子の生存率と組み換え率はさらに低下した。
- ⑤ 相同組み換え期の細胞にガンマ線照射を行い、多量にDSBを導入したところ、*rad17+*に依存して減数第一分裂の開始が遅延した。
- ⑥ *meu13*変異株では減数第一分裂への進行が遅延するのと同じく、*Cdc2*Tyr15の脱リン酸化も遅延していた。以上のことから、分裂酵母では減数分裂組み換え過程で生じるDSBの修復が遅れたときに、減数第一分裂の開始が遅延する制御機構が存在することが分かった。このDSBの修復の遅延は、checkpoint *rad+*により感知され、*cds1+*、*mek1+*にシグナルが伝わり、*Cdc2*Tyr15の脱リン酸化を維持することで減数第一分裂の開始が遅延すると示唆される。またこの制御機構は、胞子の生存率と組み換え率を高く維持するという生物学的な意義を持つと考えられる。

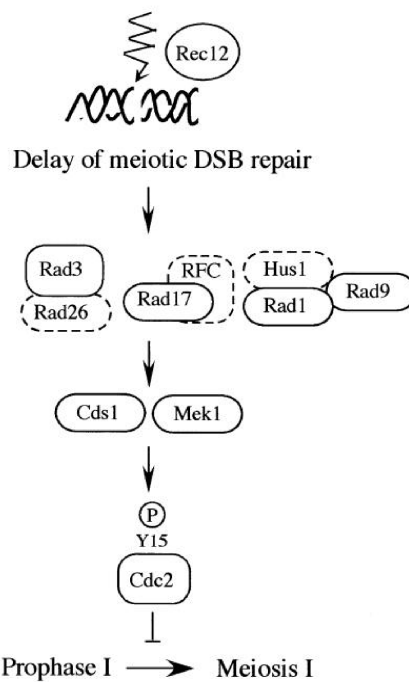


図5：減数分裂遺伝子組み換えチェックポイント制御の概念図。

#### 【mRNA-like non-coding RNAプロジェクト】

我々は以下の4つに分類できる機能未知な「翻訳フレームを持たない新規なポリAテールを有するRNA群」を多数見いだした。これらは新しいタイプの遺伝子転写産物であり、これらのゲノムレベルでの機能解析を行ってきた。

① Antisense RNA：*meu11+*、*meu16+*、*meu20+*および*tos1+*、*tos2+*、*tos3+*は減数分裂組み換え遺伝子である*rec7+*の翻訳枠のアンチセンス側で転写されており、アンチセンスRNAの機能を持っていると予測される(Molner et al., Genetics, 157, 519-532, 2001)。

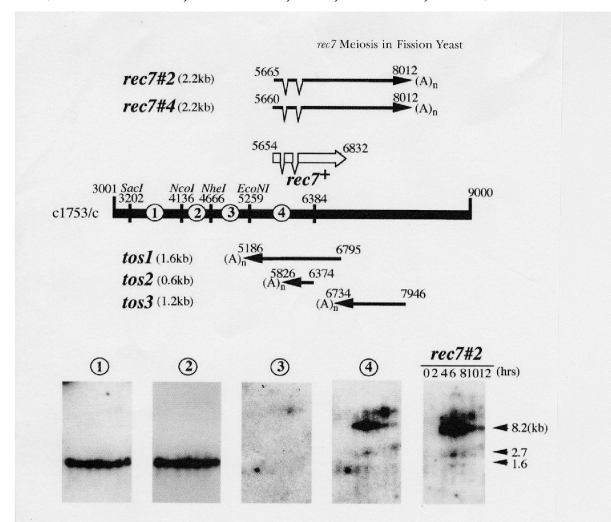


図6：*rec7*領域で減数分裂特異的に転写されるアンチセンスRNA。

② MultiplexRNA：*eta2+* 周辺領域からは、種々の長さのmRNAが両鎖から重複して多重転写(multiplex transcription)されていた。*eta2+*は減数分裂チェックポイントの制御する遺伝子群転写を制御すると予想される新規な転写制御因子(Myb2)をコードしている。

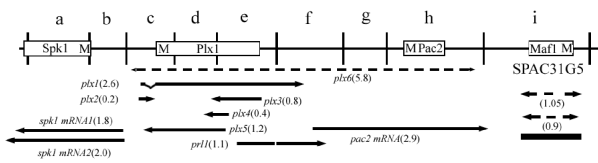


図 7 : *eta2* 領域で減数分裂特異的に転写される多重 RNA。

③ Overlapping RNA：減数分裂特異的にサイズと発現時期が異なった 3 種類の転写産物が発現している約 5 kb のゲノム領域をノーザン解析と cDNA クローニングから見出した。我々はこれらの遺伝子を *omt1+*、*omt2+*、*omt3+* (overlapping meiotic transcripts) と命名し機能解析した (後述)。

④ Non-coding RNA：分裂酵母において上記以外に 5 2 種類の翻訳枠 (ORF) を持たないポリ A プラス RNA を見出し、これらを総括して *prl* (poly A-bearing RNA without long open reading frame) と名づけた (文献 7)。これらは 50 アミノ酸以下の小さな ORF しか持たないため、mRNA-like non-coding RNA (mncRNA) であると考えられている。その後の検索により、さらに数多くの mncRNA を我々は単離したが、それらのいくつかは減数分裂特異的に転写誘導されていた (Tougan & Nojima, 投稿準備中)。

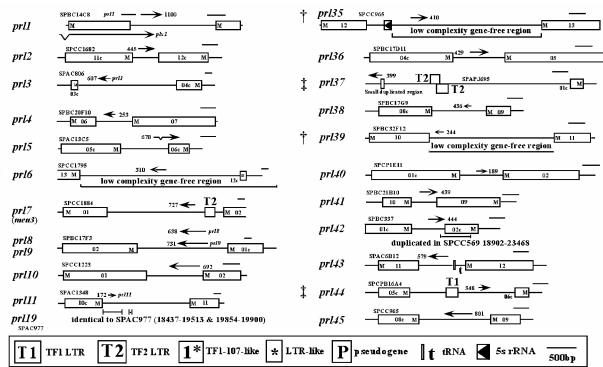


図 8 : これまでに単離した mncRNA の分裂酵母ゲノム上での配座。

これらのうち Overlapping RNA について詳しく解析した。下図にあるように *omt1+*、*omt2+*、*omt3+* はいずれも減数分裂特異的に重複して転写され、*omt1+* と *omt2+* はゲノム上でセンスとアンチセンスの関係に位置しており、互いの 3' UTR 領域が重複していた (文献 4)。Omt1 (107aa) は APC/C サイクロソームの構成因子であることが示唆され、Omt2 (96aa) はヒトにも類似の蛋白質 (DcoH) が存在する。omt3+ は蛋白質をコードしない。omt2+ 転写産物は omt1+ 転写産物の蓄積とほぼ同時に消失することから、これらの転写産物が相互作用することで、転写後制御が起こっている可能性が示唆された。

*omt1+*、*omt2+*、*omt3+* の遺伝子破壊株を作成し、表現型の観察を行ったところ、全ての破壊株において減数分裂は正常に進行したが、*omt1+* 破壊株と *omt2+* 破壊株ではその後の胞子形成過程に異常が観察された。特に胞子壁の構成成分であるキチンや 1,3-β-グルカンの局在に異常が見られ、また、胞子壁形成に関与する *Meu10p* の局在も異常であった。これらのことから、*omt1+* と *omt2+* 遺伝子は胞子壁形成に必要であることが明らかとなった。

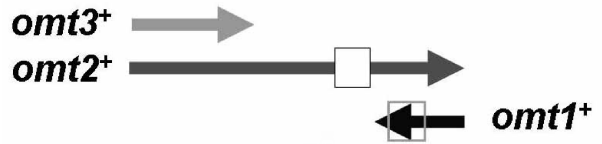


図 9 : *omt1+*、*omt2+*、*omt3+* 転写産物の位置関係。

### 【Mcp プロジェクト】

我々はサンガーセンターのデータベースを基にした Northern 解析により、重コイルモチーフを有し、かつ減数分裂特異的に発現する遺伝子を 7 個同定し、*mcp+* (meiotic coiled-coil protein) 遺伝子群と名付けた。そのなかで第一減数分裂前期で発現のピークを示した *mcp7+*、*mcp6+*、*mcp5+* について機能解析を行った。

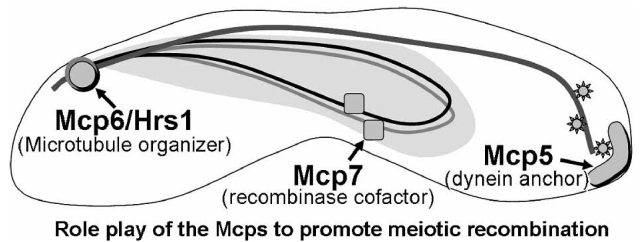


図 10 : Mcp6, Mcp6, Mcp7 の染色体運動に果たす役割の模式図。

Mcp7 は出芽酵母 *Mnd1* とホモロジーがありその局在はホーステイル期の核にありクロマチンに結合していた (文献 3)。解析当初、出芽酵母 *Mnd1* は相同染色体の対合と組換えに必要なタンパクである *Hop2* と相互作用することが報告された。出芽酵母 *Hop2* は分裂酵母 *Meu13* にホモロジーがある。そこで免疫沈降により、Mcp7 が *Meu13* と *in vivo* で相互作用する事を確かめた。*mcp7* 破壊株では組換え頻度の低下、染色体分配異常、胞子の生存率の低下、組換えチェックポイント依存的な MI の染色体分配開始の遅れといった *meu13* 破壊株に類似の表現型を示した。しかしながら、Mcp7 と *Meu13* は互いに要求性が異なっていた。すなわち Mcp7 は *meu13* 破壊株ではより安定に存在する一方で、*Meu13* は *mcp7* 破壊株において不安定であった。

組換え機構との係わりを調べるため、組換え酵素 *Dmcl* との遺伝学的解析を試みた結果、Mcp7 が相同組換えとその後の胞子形成の両方で *Dmcl* の下流で機能することを支持するデータを得た。これらの結果から、我々は Mcp7 が *Meu13* と共同し、減数分裂期組換えに重要な役割を果たすと結論した。

	+	-	+	-	Mcp7-3HA	
	+	+	-	-	IP	IB
					HA	HA
Mcp7-3HA	[band]	[band]	[band]	[band]		
Meu13-GFP	[band]	[band]	[band]	[band]	GFP	GFP
Mcp7-3HA	[band]	[band]	[band]	[band]	GFP	HA

図 11 : Mcp7 は *Meu13* と *in vivo* で相互作用する。

分裂酵母において、第一減数分裂前期の核の往復運動 (ホーステイル運動) は相同染色体の対合、組換えを効率良く起こすために必要である。*mcp6* 破壊株ではホーステ

イル運動が鈍くなり、相同染色対の対合効率と組換え頻度が減少した(文献2)。興味深いことにmcp6破壊株では異所性の組換え頻度がWTに比べて上昇していた。ホーステイル運動に異常をきたす株では相同染色体間の正確な部位での対合がうまくいかないために相同組換えが減少し、異所性の組換えが上昇したものと考えられる。

さらにMcp6がホーステイル期を通して発現しSPBに局在することを見出した。また、mcp6破壊株ではSPBコンポーネントの局在やテロメアクラスタリングには異常が見られなかったが、微小管の局在に異常が見られた。Mcp6はホーステイル期特異的なSPB結合蛋白であり、正確な星状微小管形成を促進する事で核のホーステイル運動を成し遂げるのに貢献していると考えられる。

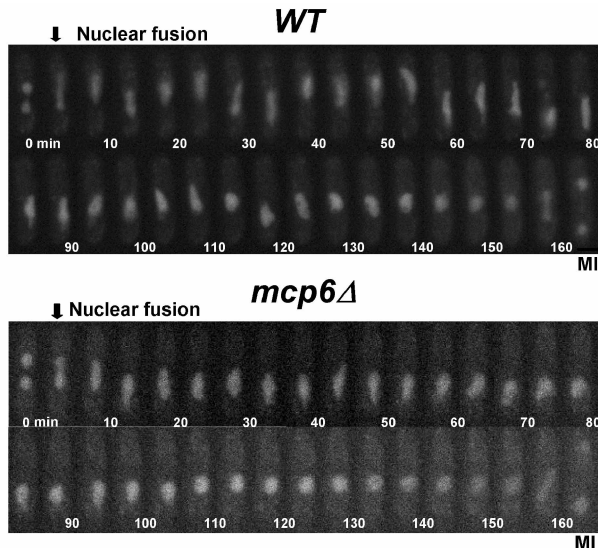


図1.2 : mcp6 破壊株ではホーステイル運動が鈍くなる。

Mcp5はコイルドコイルモチーフの他にPHドメインをもつ(文献1)。その局在はPHドメイン依存的にホーステイル期のCell cortexに複数のドットとして観察された。mcp5破壊株でもmcp6破壊株同様に核運動が阻害された。正確なホーステイル運動のためにはSPBから派生した微小管が対極のcell cortexまで伸長し、微小管上のダイニン複合体がcell cortexに蓄積する事で微小管をスライドさせてSPBを引っ張る事が重要とされている。

mcp5破壊株ではダイニンのcell cortexでの蓄積も微小管のcell cortexでのスライドもわずかしら観察されなかった。またmcp5+のコイルドコイルモチーフのみを削った変異株でも核運動の異常、組換え頻度の低下が見られた事から、コイルドコイルを介して核運動に必要な因子との相互作用が強く示唆された。これらの結果から、Mcp5はcell cortexにおけるダイニンアンカーとしてホーステイル運動を促進している事が考えられる。

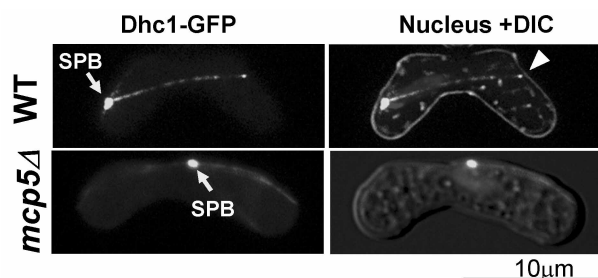


図1.3 : mcp5 破壊株ではダイニンの cell cortex での蓄積が減少していた。

### 〈国内外での成果の位置づけ〉

ここで解析した遺伝子は我々が独自に発見し、世界に先駆けて機能解析したものであるため国内外で独自な位置づけができる。減数分裂組み換えチェックポイント制御機構の存在を世界ではじめて発見した。この成果は独創的であることが評価されてEMBO Jへ論文が受理された(文献8)。さらに多数のmRNA-like non-coding RNA(mncRNA)の発見は、理研から出されたマウスcDNAプロジェクトにおける報告よりもずっと早い(文献10、文献6)。とくに文献6は出されるとすぐに英国サンガーセンターのホームページにおいて注目すべき論文のひとつとして取り上げられた。

### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

これまで多数のmeu遺伝子群やmncRNAを包括的に単離し、それらの遺伝子破壊株も作ってきたが、表現型が出ないものが多数あった。これらはその時点で研究がストップして機能解析までは達成できなかった。

meu遺伝子群の網羅的単離の過程でポリAテールを持っていないながら蛋白質をコードしない新しいタイプのmRNA(non-coding RNA)や100種類近くのアンチセンスRNA群、および単一のゲノム領域から複数の転写産物が発現されているという珍しい多重転写領域を見つけた。しかし、その詳細な機能解析はまだ達成できていない。また数多く単離してきたmeu遺伝子の解析も手付かずの者が数多く残されたままである。理由は担当していた学生が卒業したことなどによる人手不足である。

我々の所属する大学の付置研究所は学部と連続していないため大学院生の採用が困難である。とくにこのような基礎研究は理学部出身者でないと興味を持たないが、感染症の研究を主体とする大阪大学微生物病研究所でこのような分裂酵母を使った減数分裂の基礎研究が行われていることが知られていないため志望する学生も多くない。

### 〈今後の課題〉

今後は分子遺伝学的手法のみでなくTOF/MASSを使った生化学的手法により、これまでに解析した蛋白質と相互作用をする蛋白質を単離するシステムをセットアップし、それらを実行して新たな遺伝子を単離したのちに機能解析することが今後の課題である。他方、人手不足の解消が急務であるが解決法は少ない。

### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

- (1) 0602211231  
Saito, T.T., Okuzaki, D. and Nojima, H.: Mcp5, a meiotic cell cortex protein, is required for nuclear movement mediated by dynein and microtubules in fission yeast. J. Cell. Biol. in press, 2006.
- (2) 0602211215  
Saito TT, Tougan T, Okuzaki D, Kasama T, Nojima H.: Mcp6, a meiosis-specific coiled-coil protein of Schizosaccharomyces pombe, localizes at the spindle pole body and is required for horsetail movement and recombination. J. Cell. Sci., 118(2):447-459, 2005.
- (3) 0602211210  
Saito TT, Tougan T, Kasama T, Okuzaki D, Nojima H.: Mcp7, a meiosis-specific coiled-coil protein of fission yeast, associates with Meu13 and is required for meiotic recombination. Nuc. Acids Res., 32: 3325-39.2004.

- (4) 0403291738  
Kakahara, Y., Nabeshima, K., Hirata, A. and Nojima, H.:  
Overlapping omt1+and omt2+ genes are required for  
spore wall maturation in Schizosaccharomyces pombe.  
Genes Cells, 8: 547-558, 2003.
- (5) 0403291744  
Okuzaki, D., Satake, W., Hirata, A. and Nojima, H.:  
Fission Yeast meu14+ is required for proper nuclear  
division and accurate formation of forespore membrane  
during meiosis II. J. Cell. Sci., 116: 2721-2731, 2003.
- (6) 208151236  
Fujii, T., Tamura, K., Masai, K., Tanaka, H., Nishimune, Y.  
and Nojima, H.: Use of stepwise subtraction to  
comprehensively isolate mouse genes whose  
transcription is upregulated during spermiogenesis.  
EMBO Rep. 3:367-372, 2002.
- (7) 0305121724  
Watanabe, T., Miyashita, K., Saito, T.T., Nabeshima, K.  
and Nojima, H.: Abundant poly (A)-bearing RNAs that  
lack open reading frames in Schizosaccharomyces  
pombe. DNA Res., 9: 1-7, 2002.
- (8) 208151233  
Shimada, M., Nabeshima, K., Tougan, T. and Nojima, H.:  
Checkpoint rad+genes regulate meiotic progression in  
recombination-deficient mutants of fission yeast. EMBO  
J., 21: 2807-2818, 2002.
- (9) 208151230  
Tougan, T., Chiba, Y., Kakihara, Y., Hirata, A. and  
Nojima, H.: Meu10 is required for spore wall maturation  
in Schizosaccharomyces pombe. Genes Cells, 7: 217-  
231, 2002.
- (10) 110301013  
Nabeshima, K., Kakihara, Y., Hiraoka, Y. and Nojima,  
H.: Homologous pairing during fission yeast meiosis is  
promoted by the novel meiosis-specific protein Meu13p  
and maintained by Rec12/Spo11p. EMBO J., 20: 3871-  
3881, 2001.
- (11) 202200901  
Watanabe, T., Miyashita, K., Saito, T.T., Yoneki, T.,  
Kakahara, Y., Nabeshima, K., Kishi, Y.A., Shimoda, C.  
and Nojima, H.: Comprehensive isolation of meiosis  
specific genes identifies many unusual non-coding  
transcripts in Schizosaccharomyces pombe. Nuc. Acids  
Res., 29: 2327-2337, 2001.