

## 1) はじめに

分裂酵母は培地中の栄養源（特に窒素源）が枯渇すると増殖を G1 期で停止し、異なる接合型細胞間で接合する。接合によってできた二倍体細胞（接合子、zygote）では、核が融合（karyogamy）し、その後、DNA 合成・減数第一分裂・第二分裂が起こる。第二分裂の進行と同時に胞子形成が始まり、最終的に 4 つの胞子をもった子嚢（ascus）となる。周りに異なる接合型細胞がない場合や、接合し損ねた細胞は、細胞周期停止後 G0 期（静止期）に入る。二倍体細胞として増殖中の細胞の場合は、窒素源枯渇によって接合することなく減数分裂・胞子形成をおこなう。接合・減数分裂・胞子形成は、培地を胞子形成培地に交換することで誘導することができる。

\*接合から胞子形成に至る過程を広義の有性生殖過程ととらえることがある。

## 2) 胞子形成培地の種類

### 2-1) 固体培地

ME

\*当研究室では adenine, uracil, leucine, lysine, histidine を規定量加えた培地を作ってストックしている。

EMM2-N（EMM 2 から窒素源を除いたもの）

### 2-2) 液体培地

EMM2-N

## 3) プレートでの接合・減数分裂・胞子形成の誘導

### 3-1) 非同調培養

フレッシュな菌体を胞子形成培地に塗りつける。その後は 30℃以下で培養するのが望ましい。接合能、胞子形成能をチェックする程度であれば 1~2 日間の培養して観察すれば判定できる。

\*栄養要求性のある菌株を用いる場合には必要なサプリメントを添加する。

\*EMM2-N には窒素源が含まれないので、2 回ぐらいの細胞分裂を経たのちに接合・減数分裂・胞子形成をおこなう。プレートで培養する際は、EMM2-N には菌体を多めに接種しないと、翌日の菌体操作が難しいことがある。

\*ME には多少の栄養源は含まれているので、菌体は ME 培地で多少は増殖して栄養源を使い果たしたのちに接合・減数分裂・胞子形成をおこなう。

### 3-2) ある程度と同調培養

- ①液体 YES 培地で細胞を培養（ $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$  cells/ml 程度まで）。
- ②集菌、細胞を洗う（EMM2-N 培地で 2 回）。
- ③EMM2-N に懸濁。
- ④ME プレートに滴下。20～26℃で一晩培養すると、接合したての細胞を観察できる。

\*大きな一滴を一面に広げるのではなく、何滴かにわけて滴下するとよい。

### 4) 液体培地での接合・減数分裂・孢子形成の誘導

\*同調性の高い培養が必要な場合は、液体培養で接合・減数分裂・孢子形成を誘導するのが一般的である。

- ①液体 YES 培地で細胞を培養（ $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$  cells/ml 程度まで）。
- ②集菌、細胞を洗う（EMM2-N 培地で 2 回）。
- ③ $5 \times 10^6 \sim 10^7$  cells/ml 程度になるように EMM2-N に懸濁。
- ④26～30℃で振とう培養。

\*上記はあくまで一般的なやり方である。実際には条件をよく検討する必要がある。

\* 一般的には、二倍体細胞を用いる場合は、細胞濃度を低く、一倍体細胞を用いる場合は細胞濃度を高めにする。

\* YES での前培養時に培養が定常期に入らないように気をつける。

\* 一倍体細胞を用いる場合、EMM2 のグルコース濃度を通常の半分（1g/liter）にすると接合率がよい。

\* 一倍体細胞を用いた場合、4～6 時間後に細胞の凝集が見られる。10～12 時間後には減数分裂を終えた細胞が多く見られるようになる。

\* 一倍体を用いた場合、最終的に接合率が 70～80%以上になるのが理想的。

## 接合による二倍体細胞の取得

接合して二倍体になった細胞は、減数分裂に入る前に栄養培地に移すと、二倍体として増殖を再開する。この性質を利用して、二倍体細胞を得ることができる。

- ①YE plate medium で前培養。
- ②ME plate 上で mix。
- ③半日～一晩培養。
- ④選択培地に広げる。

\*ME での培養温度は 26～30℃が適当。33℃では減数分裂・孢子形成まで進行してしまうおそれがある。37℃では接合しない。20℃

では進行が遅いので培養時間を長くする。

\* 胞子形成まで進ませてしまうと、二倍体だけではなく、選択条件で生えることのできるような一倍体が得られる。

\* *ade6-210* と *ade6-216* 対立遺伝子は、互いのアデニン要求性を補うことができる。*ade6-210* を持った株と *ade6-216* を持った株を親株にすれば、二倍体になったときだけアデニン非要求性となるので、容易に二倍体を取得できる。

\* 接合不能 (*sterile*) な株から二倍体を得るときには、一度接合能を相補できるプラスミドで形質転換してから接合させるという方法もある。二倍体取得後、プラスミドを落とさせればよい。