

Synchronization/ 細胞同調

Rumi Miyamoto 020728 (+ Masuda)

細胞周期の研究には同調した細胞を集めることが重要となる。当研究室で用いられている下記の同調法について簡単に説明する。

- A) 窒素源を抜くことで生じる G1 arrest を利用した同調
- B) hydroxyurea (HU) 処理によって生じる G1/S arrest を利用した同調
- C) 細胞の大きさの違いを利用して G2 細胞を選択的に集める方法
 - C-1) ラクトース濃度勾配を利用した分離
 - C-2) エルトリエーションを利用した分離
- D) 温度感受性株(cdc25.22)を利用した同調

細胞同調率の検討のために、フラクションごとの septation index (septum の入っている細胞の割合) と細胞数を求める。エタノール固定した sample を明視野顕微鏡下で観察することによっておおよその septation index を得ることができるが、この方法では septum がやや見づらいので、厳密に septation index を求めるには、カルコフラワー染色して蛍光顕微鏡下で septum の有無を観察する。

細胞の濃度は重要である。mid-exponential phase (2×10^6 - 1×10^7 cells/ml) の細胞を用いる。株と温度ごとに微妙に異なる doubling time をあらかじめ計算した上で培養を行うのが望ましい。

sample の固定方法は目的により異なる。フローサイトメーターを用いて DNA 含量を解析するためには 70% エタノールで固定する (固定方法その他はフローサイトメーターの章を参照)。

A) 培地中の窒素源を抜いて生じる G1 arrest を利用した同調

培地中の窒素源を枯渇させることで細胞を G1 に arrest させる。同調率の評価はフローサイトメリーで行う。Arrest した細胞を再び rich medium に移すことによって、growth を誘導する。栄養要求性を持った株、特に leucine 要求性の株は、G1 arrest がかかりにくいので、注意する。

Preculture

Transfer a single colony from a streak plate to 3 ml YEA.
Incubate overnight at 30°C with shaking.

Culture

Determine cell number by counting.
Inoculate 60 ml YEA.¹⁾
Grow at 30°C with shaking for ~16 hr.

G1 arrest in EMM2-N culture

Determine cell number by counting.²⁾
Wash twice with EMM2-N.
Adjust cell concentration to 2.0×10^6 cells/ml by diluting with EMM2-N.
Incubate overnight (about 4 generation time) at 25°C with shaking.³⁾

Release

Resuspend cells in YEA at 2.0×10^6 cells/ml, and incubate at 33°C.

Fixation

0 min から 1hr おきに sample を採取する。2 hr 後から 20 min ごとに sample を採取する。

< 注意点 >

- 1) 必要な細胞量を計算し、だいたい 30°C で 2×10^6 cells/ml となるように doubling time を考慮して inoculate する。
- 2) early- exponential phase くらいの濃度の細胞 ($2 \sim 4 \times 10^6$ cells/ml) で実験を行う。
- 3) だいたい 4hr ぐらいから peak の移行が観察される。しかし、N 源飢餓でも 24 時間で 2 回ほど分裂する。

B) HU を使って生じる G1/S phase arrest を利用した同調

HU は RNR を阻害するため、DNA 合成が阻害される。フローサイトメーターを用いた解析では DNA 含量が 1C のピークが観察される。15 mM HU を用いて G1/S phase arrest させた後、HU を除いて細胞周期を進行させることによって、同調培養する。

Preculture

Transfer a single colony from a streak plate to 3 ml YEA.

Incubate overnight at 30°C with shaking.

Culture

Determine cell number by counting.

Innoculate 60 ml YEA.¹⁾

Grow at 30°C with shaking for ~16 hr.

Synchronization by HU treatment

Determine cell number by counting.²⁾

Adjust cell concentration to 2.0×10^6 cells/ml by diluting with YEA.

Incubate with 15 mM HU³⁾ in YEA for 3 hr.

Determine cell number by counting.⁴⁾

Collect cells and wash twice with YEA.

Resuspend in 60 ml of YEA at 2.0×10^6 cells/ml.

Incubate at 30°C with shaking.

Fixation

0 min から 20 min おきに sample を採取する。

<注意点>

- 1) 必要な細胞量を計算し、だいたい 30°C で 2×10^6 cells/ml となるように doubling time を考慮して inoculate する。
- 2) early log phase くらいの濃度の細胞 ($2 \sim 4 \times 10^6$ cells/ml) で実験を行う。
- 3) 粉の HU (分子量 76.06) を DW で 1M に dilution (freshly made)。15 mM だと 60 ml の培地では 15/1000 (900 μ l) を添加。
- 4) 細胞濃度と細胞のサイズ (大きくなっているか) で HU の効果を確認。

<問題点>

arrest された細胞は通常の細胞周期とは異なる非生理的な状態にあり、arrest からの回復も均一には起こりにくい。release 後の細胞も正常な生理的な状態にはない可能性がある。

C) Selection Synchrony/ 細胞の大きさの違いを利用して選択的に集める方法

当研究室では 2 通りの方法が用いられている。

①ラクトース濃度勾配を利用した分離

②エルトリエーションを利用した分離

S.pombe では細胞増殖期において一番小さい細胞は early G2 の細胞である。これを利用し lactose gradient や elutriation などを用いて、early G2 の細胞を選択的に分離することができる。HU を用いる同調とは異なり、Selection Synchrony では exponential phase にある細胞を用いるため、得られた細胞が通常の細胞増殖における生理的な状態を保っている可能性が高い。

C-1) ラクトース濃度勾配を利用した分離

一般に、ショ糖あるいはラクトースの濃度勾配が用いられている。当研究室ではラクトースを用いた。

Preculture

Transfer a single colony from a streak plate to 3 ml YEA.

Incubate overnight at 30 °C with shaking.

Culture

Innoculate 250 ml YEA \times 2 flasks.¹⁾

Grow at 30°C with shaking for ~16 hr.

Selection Synchrony

(Make 10-40% lactose gradient in 40 ml YEA.)²⁾

Determine cell number by counting.

(use cells at mid-exponential phase: $< 1 \times 10^7$ cells/ml)

Centrifuge at 3,500 rpm for 5 min.

Resuspend in YEA.³⁾ (total cell suspension: ≤ 3 ml)

Sonicate. → 以下の作業は無菌的には行えない

Apply cells³⁾ on lactose gradient medium.

Centrifuge at 2,000 rpm for 2 min with a swing rotor.³⁾

Collect cells.⁴⁾

10 フラクション(0.2 ml/fraction) くらいに分けて顕微鏡で観察。septum の入った細胞を含まない、できるだけ細胞の大きさのばらつきの少ない⁵⁾フラクションを用いて、release。

Resuspend cells in YEA at 2×10^6 cells/ml, and incubate at 33°C.
(early/mid-log phase の細胞濃度でリリース)

Fixation

20 min おきに固定

<注意点>

- 1) 実験に必要な必要量の細胞数を計算しておく。だいたい 30°C で 2×10^6 cells/ml となるように doubling time を考慮して inoculate する。Stationary phase の細胞を inoculate しないように朝に細胞数をチェックし、夕方に log phase の細胞をつかえるようにするとよい。同時に doubling time のチェックもできる。
- 2) あらかじめ 10% および 40% lactose in YEA を準備し、ベリスタポンプ、gradient mixer をつかってつくっておく。作り置きは避け、実験の直前にできるようにする。
- 3) 細胞によって異なるが再現性をよくする目的で、apply する細胞の量、suspend する培地の量、遠心する速度および時間は必ず意識して行うこと。ここら辺の微妙な違いで結果がかなり変わってくる恐れがある。
- 4) 上部をパスツールピペットなどで液面を乱さずに、界面際の小さい細胞 (early G2) を集菌する。
- 5) ばらつきが大きいと septation index がきめんに低くなる傾向がある。より均一な細胞を得るには、一度回収した細胞をもう一度 gradient にかける。

<問題点>

ショ糖およびラクトースをつかった濃度勾配法では、実験ごとに同調率にばらつきがやすいこと、ショ糖やラクトース中という非生理的な条件に細胞をおくことの影響を無視できないことが問題点としてあげられる。

C-2) Elutriation / エルトリエーションを利用して分離

エルトリエーションを用いると、濃度勾配法と比較して、より均一な細胞群、細胞数も多く得られ、短時間で分離でき(準備に時間がかかるが)再現性もよい。

Preculture

Inoculate 10 ml YEA with a single colony from a YEA plate.

Incubate overnight at 30°C with shaking.

Culture

Determine cell number by counting.¹⁾

Inoculate 700 ml of YEA.²⁾

Incubate overnight at 30°C with shaking.

Elutriation

当研究室では日立エルトリエーター細胞分離システム R5E および日立高速冷却遠心機 CR21E を用いている。機械によって調整などは大いに異なるので留意していただきたい。簡単に説明する。

配管接続とシステムのセット(→説明書にしたがってチャンバー、シールアッセンブリ、バッファボトル、サンプルボトルをチューブでつなげ、ベリスタポンプ、ローターにセット)。

ラインに DW を流してリークチェックする。(流速 40 ml/min → 10min)

ラインにエタノールを流して滅菌する(ライン充填させてから還流。流速 20 ml/min → 60min)。

ラインに滅菌 DW をながしてエタノールを洗い流す(流速 40 ml/min → 30min)。

ラインに medium を流す。³⁾

キャリブレーション。

サンプル調製

Determine cell number by counting.⁴⁾

Collect cells by centrifuging at 4,000 rpm for 5 min.

Resuspend pellet in ~60 ml of YEA at 3.0×10^8 cells/ml.

Load 30 ml cell suspension ($3.0 \times 10^8 \times 30$ cells) into a 40 ml sample chamber.

サンプル注入⁴⁾

分離フラクション回収⁵⁾

リリース⁶⁾

Incubate at 33°C (or 30°C)

Fixation

20min おきにそれぞれの point の sample を固定する。

後かたづけ

medium 排出

ラインに DW を流して洗浄

ラインにエタノールを流して滅菌

ラインに DW を流して洗浄

システム配管取り外し

分解 清掃 乾燥

<注意点>

- 1) 実験に必要な必要量の細胞数を計算しておく。だいたい 30°C で 2×10^6 cells/ml となるように doubling time を考慮して inoculate する。Stationary phase の細胞を inoculate しないように朝に細胞数をチェックし、夕方に exponential phase の細胞をつかえるようにするとよい。同時に doubling time のチェックもできる。
- 2) この量はフラスコの大きさに依存する。3L のフラスコを使う場合はエアレーションを考えてほしいくらいこのスケールで培養する。翌日実験に必要な細胞量を計算した上で培養し、更に、無駄を覚悟で数本に濃度をふって、最適なものを使うと良い。
- 3) 必要量はキャリブレーションや測定にかかる時間による。途中でとぎれるとエアが入るので注意。10L あれば、だいたい事足りる。10L の培地を一つの容器に入れて滅菌すると、通常の条件では滅菌が不完全になる。何本かのフラスコに分けて滅菌する方がよい。
- 4) 40ml のチャンバーで 10^{10} cells をアプライする。細胞によって異なるが再現性をよくする目的で、apply する細胞の量、suspend する培地の量、遠心する速度および時間は必ず意識して行うこと。ここら辺の微妙な違いで結果がかなり変わってくる恐れがあるようだ。データをとる前に事前に練習して最適な条件を見つけた方がよい。
- 5) 回転速度と流速は、細胞の大きさや量などのによって微妙に調整した方がよい。データをとる前に何度か練習した方がよい。3,000rpm くらいの回転数を用いる。2,750rpm、流速 80ml/min より start し、この条件から、データをとるのに十分な細胞数が得られるまで 5ml/min ずつ上げていく。細胞と培養液の界面はのぞき窓で確認する。回転数を下げると、一時的に設定回転数より低くなり界面が乱れるため、長い細胞が混じるのではないかと思われる。回転数を変えない方が界面を安定させるのでよい。fraction はいずれも約 250 ml ずつ採取した。
- 6) チャンバーに細胞を集めてからデータ採取の開始までは 1 hr 以内に行うのを推奨する。集菌からリリースまで、できるだけ素早く行う。

<問題点>

- 1) 細胞の同調率 (septation index) が 30-50% くらいであるため、細胞周期のある特定の時期における変化を観察する実験の精度としては不相当である場合がある。
- 2) 一度に得られるサンプルがチャンバーの大きさに依存するため回収率が低い。一番大きい 40ml のチャンバーで最大細胞収容数は 10^{10} cells で、実際に回収される細胞数はその 10~20% といわれている。そのため、使用する細胞が $1 \sim 2 \times 10^9$ cells 以内で可能な実験に限定される。

D) Synchronization by temperature block

分裂酵母では多数の cell division cycle(cdc)温度感受性株が得られているが、大部分の株は制限温度下で不可逆的な増殖異常が誘導される。しかし、ごく一部の cdc 変異株では、制御温度下で細胞増殖を停止させた後、非制限温度に戻すことによって、可逆的に増殖を開始させることができる。この方法ではエルトリエーター使用に比べ arrest point 直後の特定の時期に高い同調性が得られ、培養液量を増やすことにより回収される同調細胞を増やすことが容易である。制限温度下で G2/M 期で arrest し、非制限温度下で M 期へ移行できる cdc 変異株として、cdc25.22 や cdc2.33 が知られている。

cdc25-22 を用いた実験例を説明する。cdc25-22 温度感受性変異株は 36°C で 70~80% の細胞が G2/M 期で arrest した後、非制限温度の 25°C に戻すと大部分が mitosis に進行する。

Cell : HR348-1 *h⁻ leu1 cdc25-22*

Preculture

Transfer a single colony from a streak plate to 3 ml YEA.

Incubate overnight at 25°C with shaking.

Culture

Determine cell number .

Innoculate 100 ml YEA.¹⁾

Grow at 26°C with shaking for ~16 hr.

Synchronization by temperature block

Determine cell number.

Adjust cell concentration to 3.0×10^6 cells/ml by diluting with YEA.

Incubate at 36°C for 4 hr.²⁾

Cool to 25°C by incubating the flask on ice with shaking.³⁾

Check the temperature.

Incubate at 25°C.

Fixation

10 min から 15 min おきに sample を固定する。

<注意点>

1) 実験に必要な必要量の細胞数を計算しておく。だいたい 26°C で 2×10^6 cells/ml となるように doubling time を考慮して inoculate する。Stationary phase の細胞を inoculate しないように朝に細胞数をチェックし、夕方に exponential phase の細胞をつかえるようにするとよい。同時に doubling time のチェックもできる。

2) 36°C, 4hr で temperature block をかける。

3) 迅速に温度を下げることができるかどうか、この実験の大きな point である。

<問題点>

arrest された細胞は、通常の細胞周期とは異なる非生理的な状態にあるため、生理的な状態を反映していない可能性がある。

参考

<http://www.bio.uva.nl/pombe/handbook/section3/section3-3.html>

G. M. Walker. Synchronization of yeast cell populations (Methods in Cell Science 21: 87-93(1999))

取り扱い説明書 日立エルトリエーター細胞分離システム

石原(小原)朋子 第2章 細胞周期の同調法 ②酵母(エルトリエーション、温度感受性株、cdc 変異株を利用)in 「
」、