

303 酵母 *Saccharomyces ludwigii* の life cycle に関する遺伝学的研究

(山梨大・エ・醸酵) 山崎豊彦, (阪大・エ・醸酵) 大嶋泰治

1. 目的 供試酵母の栄養細胞は、大形(二倍体, 約 $200\mu\text{m}^2$)のレモン型で減数分裂により2個ずつ対立した4胞子を形成する。この対胞子は発芽と同時に接合するが、我々はこの対胞子を顕微解剖器で二分し、その単胞子培養株の示すいろいろな特性を観察して来た。今回は、これらの観察結果を遺伝学的立場から検討し、Wingeらの報告したlife cycleを再確認すると共に、新しく単胞子のたどるlife cycleを推定した。

2. 方法 ブドウ酒醗から分離したStr.0-81の単胞子培養株(ATCC 26617, a 型株; ATCC 26618, α 型株)の栄養細胞を紫外線(生存率約0.1%)又はアクリフラゼン($10\mu\text{g}/\text{ml}$)処理して、接合型(a/α)のほかにも栄養要求性(*ade1*, *arg1*, *Cys1*, *gual*, *his2*, *met1*など)21種, 薬剤耐性(*can1*, *CYH1*), 呼吸能欠損(*rho1*)に関する24種のマーカーを準備した。同一染色体上の2種のマーカーをシス型に配置した菌株を育成し、これらを供試して染色体の挙動を追跡し、各遺伝現象を確認した。なお、核染色法(Robinow法)による結果も参考にした。また、半数体から四倍体までの各倍数性を示す菌株を育成し、それらの胞子形成率(*asci/2000 cells*)、細胞の体積(Coulter channelyzer), 乾燥重量(約 10^8 cells, 105°C), DNA含量(約 10^9 cells, Schneider法抽出, Burton法染色, 600nm 比色定量)を測定し、更に四分子解析(Zymolyase利用)の結果を総合して倍数性判定基準を設定した。各種遺伝現象の発生頻度の測定に際し、桃色アデニン要求株(*ade1*)や色素平板法(フロキシシン $10\text{mg}/\text{l}$, トリパンブルー $15\text{mg}/\text{l}$ 混合)を用いて、できるだけ母集団が大きくなるようにした。

3. 結果 (1) 減数分裂における特性

24個のマーカーにつき、1016個の子のうを四分子解析した結果、すべての対胞子は対立する接合型(a 型と α 型)を示す半数体クローンに分離された。また、60対のマーカーの組合せにつき、解析した子のうの四分子型(両親型, 非両親型, テトラ型)をしらべたが、テトラ型四分子は、わずかに5個だけであった。したがって、Wingeらのlife cycle や、原らの相互凝集性が遺伝的に証明された。また、テトラ型四分子の得られない原因は染色体交叉が起こらないためと考えられ、この現象は三倍体, 四倍体でも確認された。これらの実験で、右に図示した染色体の存在が遺伝的に確認された。

LINKAGE GROUPS (CHROMOSOMES)

I. a/α - *gual* - *his2* - *can1*II. *arg1* - *met1* - *ilv1* - *CYH1*III. *ade1* - *cys1* - *trp1* - *lys2*

(2) 単胞子培養株における特性

①自己二倍体化と高次倍数体化機構 単胞子培養株(a *arg1 met1*)を色素平板に撒くと、ホモ二倍体(a/a *arg1 met1/arg1 met1*)集落が約 5×10^3 の頻度で母集団(半数体集落)より濃く染め分けられた。また a *arg1 met1* / α *gual* 又は α *arg1 met1* / α *his2*におけるプロトトロフは約 1×10^{-8} の頻度で回収された。したがって、これらは同一現象とは考えられない。一方、半数体クローン中に、垂鈴型に伸長した細胞から大型細胞(ホモ二倍体)が出芽している状態をしばしば観察した。すなわち、細胞融合によらない、いわゆるDirect diploidization

シンポジウム (菌類のライフサイクルとその生化学)

による二倍体化 ($a \rightarrow a/a$ 又は $\alpha \rightarrow \alpha/\alpha$) が起こると考えられた。このホモ二倍体を用いて三倍体 ($a/a \times \alpha$ 又は $a \times \alpha/\alpha$)、四倍体 ($a/a \times \alpha/\alpha$) の形成が確認された。

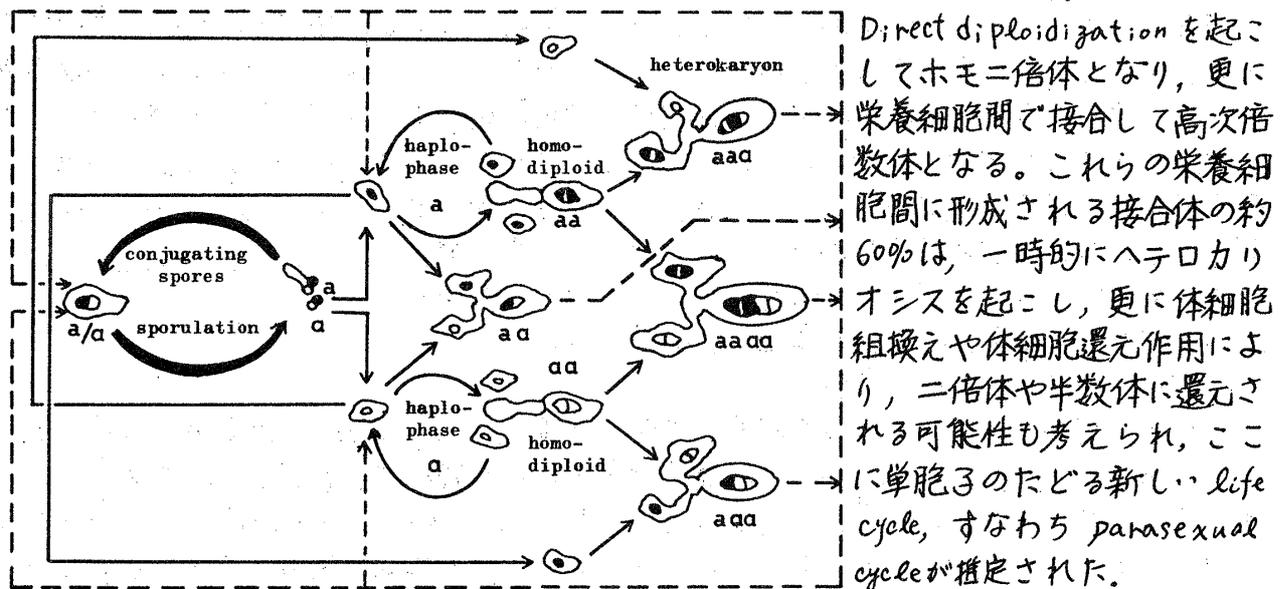
② 一時的ヘテロカリオシス 栄養細胞間交雑 ($a \text{ wild} \times \alpha \text{ ade1 arg1 [trh]}$) により形成される接合体を単離培養すると、約60%のものが異質細胞集団 ($a \text{ wild} + \alpha \text{ ade1 arg1 [trh]} + a/\alpha \text{ wild}$) となる。また、これら接合体には複数の核染色像が観察された。しかし、この酵母では *Rhodospotidium* の如き長い二核相 (dicaryophase) の存在は考えられなかった。

③ 体細胞組換え ヘテロ二倍体交雑株 ($a/\alpha \text{ ade1 cys1 / ADE1 CYS1}$) における紫外線処理 (生存率約5%) は、その同型接合型クローン ($a/\alpha \text{ ade1 cys1 / ade1 cys1}$) の出現頻度を 2×10^{-6} から 5×10^{-2} に急上昇させた。この紫外線による高頻度の体細胞組換え誘発の原因は不明だが、この体細胞組換え頻度に基づく染色体地図作製の可能性および、ヘテロカリオシスに続く体細胞還元作用の誘発が示唆された。

(3) *Sd. ludwigii* の倍数性

ブドウ酒醗から分離した株 (10株) および保存株 (ODT, IFOの7株) には、二倍体と判定されるもの (9株) が最も多いが、単胞子に由来したと考えられる半数体、ホモ二倍体、三倍体などの存在も確認された。なお、ブドウ酒醗から分離した株の大部分 (9株) には接合型因子が認められたが、保存株では α 型の1株 (IFO 1194) があっただけであった。

以上の結果に基づき life cycle を模式的に下図に示した。自然界における *Sd. ludwigii* (複相) の大部分の対胞子 (単相) は、発芽と同時に接合 (複相化) する基本的 life cycle に従って生活していると考えられた。しかし、不幸にして子のう内で接合できなかった単胞子は、そのまま発芽して相互凝集性を持つ a 又は α 型の単相クローンとなり、その大部分の栄養細胞はこの相互凝集性に助けられて a と α 型間で接合する。ところが、約 10^3 の細胞は



Life cycle of *Saccharomyces ludwigii* Hansen
(Assumed cycle is denoted by dashed lines)