

学生実験における酵母の胞子形成条件の検討

木澤 祥恵

筑波大学生命環境科学等技術室（応用生物化学系）

〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

微生物実験で使用する 4 種類の酵母を用い、より扱いやすく、確実に胞子形成を観察できる培地の検討を行った。

現在学生実験で使用している Kleyn 培地では、7 日以上培養しても受講生 20 名前後のうち胞子を確認できるプレパラートを作成できた例が 1~2 人であったが、今回の実験では 3 日ないし 4 日で胞子が確認でき、それぞれの胞子の特性を確認することができた。培地組成も Kleyn 培地より単純で、新たな試薬を購入する必要もなく、今後の実験でも導入しやすいと考えられる。

キーワード：酵母、胞子形成、学生実験

1. はじめに

微生物実験で酵母の供試菌（*Saccharomyces cerevisiae*、*Hansenula anomala*、*Candida utilis*、*Schizosaccharomyces pombe*）の同定を行う際、生菌を光学顕微鏡で観察して出芽、分裂などの様子を観察するほかに、胞子形成培地に生育させた酵母の胞子を顕微鏡で観察している。胞子の形成にはスポア形成培地で栄養増殖を抑えながら、なおかつ菌が生育できる条件を作り出す必要があり、現在、応用生物学実験Ⅱ（生物学類 2 年生対象）では、Kleyn 培

地を用いている。しかし、植菌量を多めにして生菌量を調節するなど、初めて微生物を扱う場合には取り扱いが難しく、塩類溶液の調製などにも手間がかかり、実際に観察できるプレパラートを作成することが大変難しい。そのため、より扱いやすく、確実に胞子形成を観察できる培地条件を調べる必要があると考えた。

2. 方法

2.1 供試菌

応用生物学実験Ⅱ（生物学類 2 年生対象）で供試菌として用いている酵母（*Saccharomyces cerevisiae*、*Hansenula anomala*、*Candida utilis*、*Schizosaccharomyces pombe*）を使用した。マルト培地のスラントで保存した株を 3 種類の胞子形成培地（SPO 培地、ME 培地、KAc 培地：組成を Table 1 に示す。）のプレートに植菌し、30℃で 5 日間培養した。

本来、SPO 培地は *Saccharomyces cerevisiae* の胞子形成培地として、ME 培地は *Schizosaccharomyces pombe* の胞子形成培地として用いられているものであるが、今回は対比実験として、どの菌も 3 種類の培地に植菌し、生育状態と形態を観察した。

Table 1 培地組成

培地名	組成（/蒸留水 1000 ml）	pH	Agar
Malt 培地（マルト培地）	麦芽エキス 20.0 g ペプトン 1.0 g ブドウ糖 20.0 g	6	2 %
Kleyn 培地	酢酸ナトリウム・3H ₂ O 5 g K ₂ HPO ₄ 0.2 g KH ₂ PO ₄ 0.12 g ブドウ糖 0.62 g NaCl 0.62 g 塩類溶液 ^{a)} 10 ml ビオチン 20 µg	7	2 %
胞子形成培地 SPO 培地	酢酸カリウム 10 g 酵母エキス 1 g ブドウ糖 0.5g		2 %
胞子形成培地 ME 培地	麦芽エキス 20.0 g	5.5	2 %
胞子形成培地 KAc 培地	酢酸カリウム 10 g		2 %

^{a)} 塩類溶液：MgSO₄・7H₂O 0.4g, FeSO₄ 0.2 g, CuSO₄・5H₂O 0.02 g, NaCl 0.4 g, MnSO₄・4H₂O 0.2 g, 蒸留水 100 ml

2.2 プレパラートの作製及び観察

生育状態を確認しながら3日、4日、5日目の生菌をスライドガラス上で火炎固定し、5%マラカイトグリーン(商品名 ブリリアントグリーン 和光1級)水溶液をピペットでのせてバーナーの上でゆるく沸騰させ、空冷して水洗し、胞子部分を緑色に染色した。栄養細胞を赤く対比染色するために、0.5%サフランイン液に5~10秒浸漬して再度水洗し、風乾した。光学顕微鏡は Olympus CX41、撮影用のデジタルカメラは E-330 を用いた。

3. 結果

3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

胞子形成培地のうち、SPO 培地、ME 培地の2種類では生育も良く、却って栄養細胞での増殖の方が多く見られるのではと危惧していたが、5日目には SPO 培地、ME 培地ともに細胞内の子嚢胞子がごくわずかに観察できた。KAc 培地では生菌そのものの生育が悪く、観察を断念せざるを得なかった。

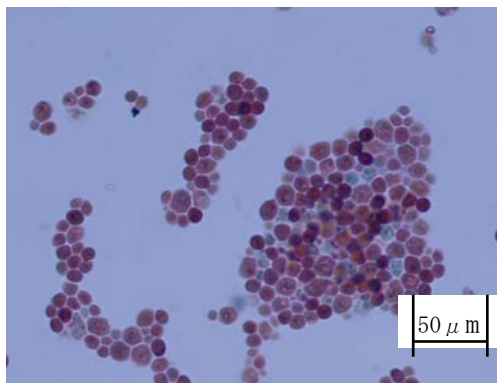


Figure 1. *Saccharomyces cerevisiae* SPO 培地

3.2 *Hansenula anomala*

胞子らしいものも観察できたが、今回の実験では確認できたとは言いがたく、更なる条件検討が必要と考えられる。逆に ME 培地などでは培地成分によるものと思われる菌体の形状の相違が激しく、対比実験の供試菌としては不向きであると考えられる。やはり KAc 培地では生菌そのものの生育が悪く、観察を断念せざるを得なかった。

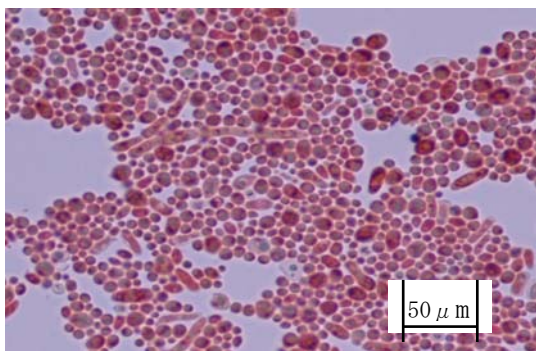


Figure 2. *Hansenula anomala* SPO培地

3.3 *Candida utilis*

無胞子の酵母の代表として用いているが、わずかな核の部分や死細胞と思われる部分が胞子と同じ緑色に染色されてしまうために、外の菌と見比べないと勘違いしてしまう可能性もあり、実験の際に注意を促す必要がある。やはり KAc 培地では生菌そのものの生育が悪く、観察を断念せざるを得なかった。

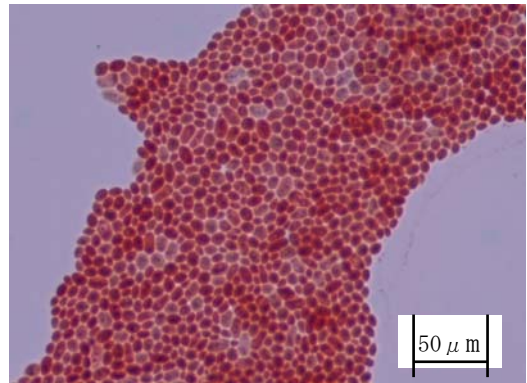


Figure 3. *Candida utilis* SPO 培地

3.4 *Schizosaccharomyces pombe*

4日目の SPO 培地、ME 培地から作成したプレパラートで、きれいな接合胞子の形が観察できた。KAc 培地では生菌そのものの生育が悪く、観察を断念せざるを得なかった。

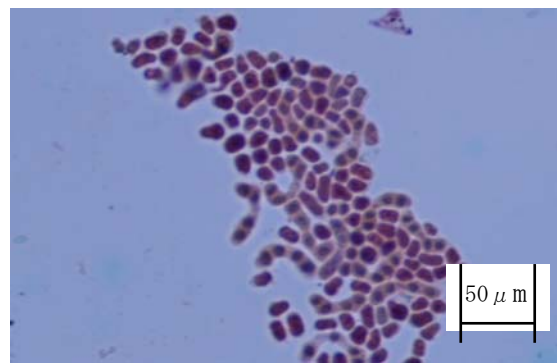


Figure 4. *Schizosaccharomyces pombe* SPO 培地

4. 考察

今回の実験で、SPO 培地、ME 培地はそれぞれ子嚢胞子をつくる *Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe* の2種類の酵母の胞子を観察するのに適しており、従来使用している Kleyn 培地に比べて調製も簡単であることがわかった。KAc 培地は栄養細胞の成育が極めて悪く、今回の実験には不向きであると考えている。今後は染色方法に

も改善を加え、さらに観察のしやすい方法を検討していきたいと考えている。

微生物の形態の観察は応用実験を行っていく過程でももちろん重要であるが、分類学上では生活環や生育状況で変化する形態よりも遺伝子の解析が主になりつつある傾向があり、特に分類学上不安定な位置にある酵母では、胞子の観察をする機会は余程専門的な研究に必要がない限り学生実験以外で取り扱う機会はごく少ないと考えられる。今回取り上げたテーマ以外でも同じように廃れていきがちな基礎実験、基礎的な手法というものが学生実験ではまだ多く残されており、残された少ない機会であるからこそ、今後もより観察のしやすい手法を取り入れられ

るよう努力していくことが重要ではないかと考えている。

謝辞

本検討の一部は、日本学術振興会 科学研究費補助金（奨励研究）20934009 によるものである。

参考文献

- [1] 近藤正臣・渡部一仁 編著, スポア実験マニュアル, 技報堂出版, 1995 年
- [2] 応用生物化学実験Ⅱ実験書, 筑波大学生物学類 2008 年
- [3] 東京大学農学部 農芸化学教室 編, 実験農芸化学 (下) 第3版, 朝倉書店, 1983 年
- [4] 大隈良典・下田親 編, 酵母のすべて 系統, 細胞から分子まで, シュプリンガー・ジャパン, 2007 年
- [5] 菊池韶彦 著, 酵母のライフサイクル, サイエンス社, 2006 年

Investigation of sporulation conditions of yeast in student's training experiment

Yoshie Kizawa

Institute of Applied Biochemistry, Technical Service Office for Life and Environmental Sciences,
University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8572 Japan

This study examined culture media which are easier to handle and enable definite observation of sporulation. The study was conducted using the 4 types of yeasts employed in microbiology experiments.

Kleyn's medium is currently used in student's training experiments. But even if culturing is done for 7 days or more with Kleyn's medium, only 1 or 2 of about 20 students can make a slide enabling confirmation of spores. In this experiment, sporulation could be confirmed in 3 or 4 days. It was also possible to confirm the characteristics of the various spores. The medium composition is simpler than Kleyn's medium, and there is no need to purchase any other extra reagents. This medium may also be useful in other laboratory training in the future.

Keywords: yeasts; sporulation; student's training experiments