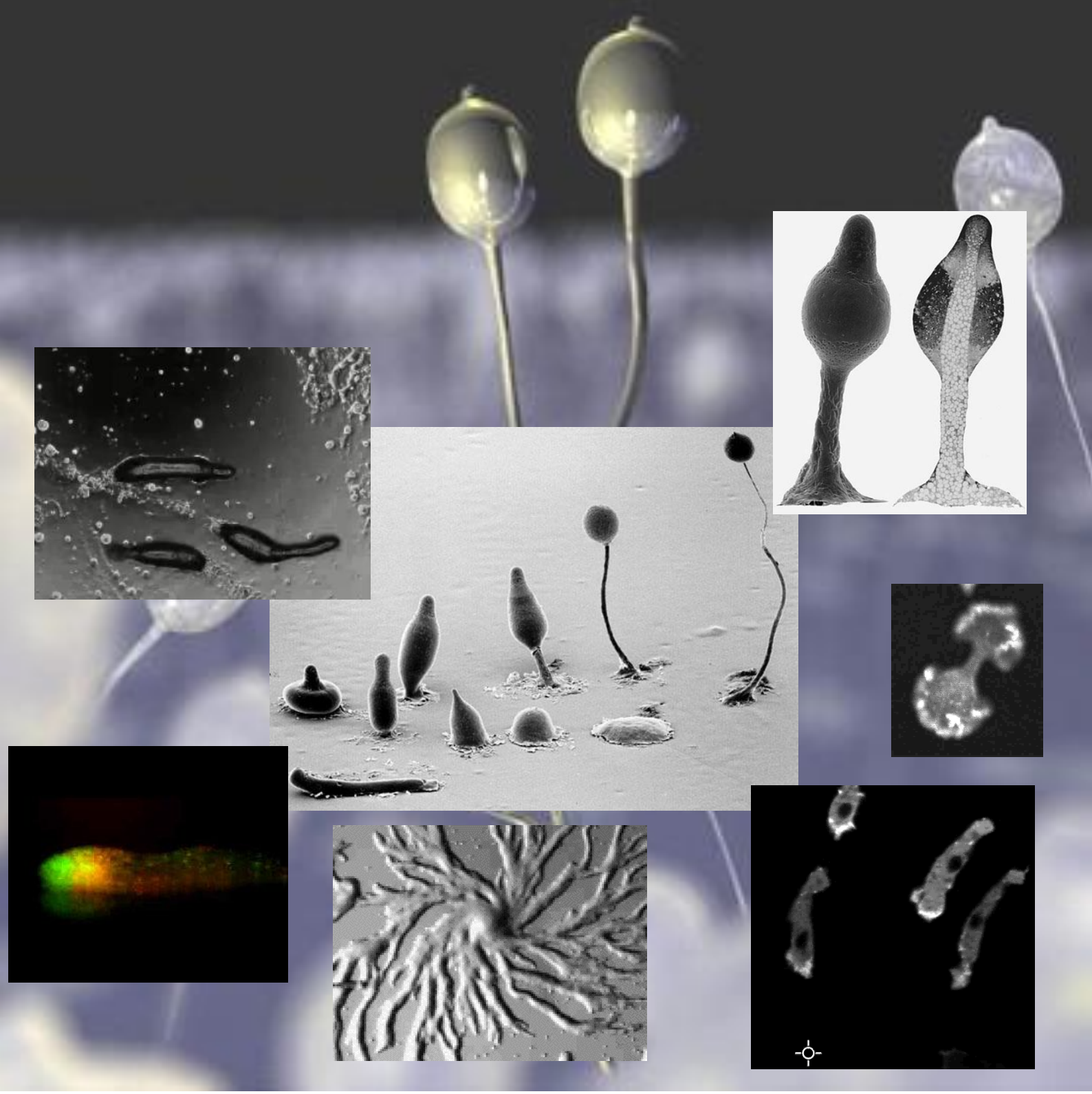
モデル生物　細胞性粘菌

ＮＢＲＰトレーニングコース用実験手引書



目次

Ⅰ．はじめに

Ⅱ．細胞性粘菌の培養と保存法

Ⅲ．細胞性粘菌の観察

Ⅳ．細胞性粘菌の形質転換法

Ⅴ．PCR 法遺伝子増幅

Ⅵ．ゲノムＤＮＡの調製

Ⅶ．土壌からの細胞性粘菌の分離法

Ⅷ．ＮＢＲＰからの細胞性粘菌株の提供方法

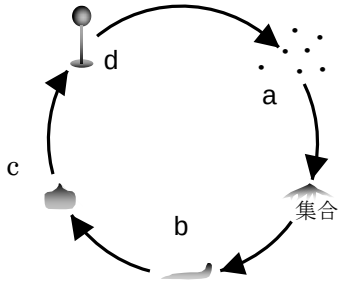
Ⅸ．細胞性粘菌に関する参考サイト

Ⅹ．参考書、参考文献

ⅩⅠ．培地等組成表

Ⅰ．はじめに

細胞性粘菌は土壌中のアメーバ様真核微生物で、通常はバクテリアを捕食しながら分裂増殖している。飢餓状態に陥ると単純な発生過程を経て 24 時間以内にわずか 2 種類の細胞分化パターンを持つ多細胞体（子実体）を完成させる（右図）。



細胞性粘菌の生活史

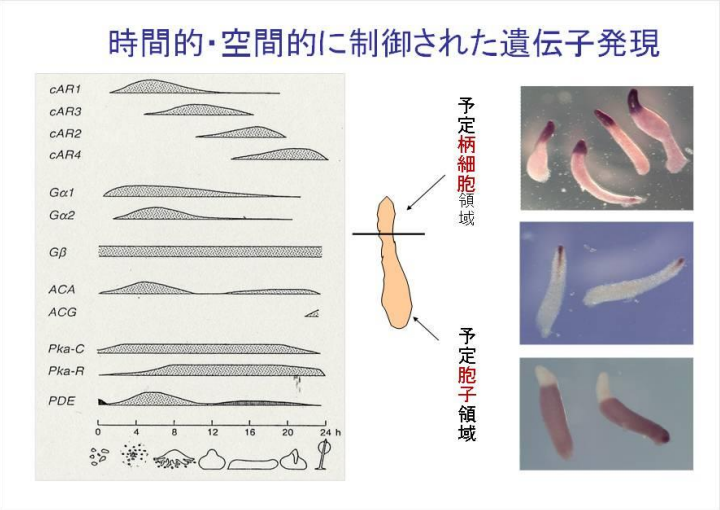
a: 増殖期（単細胞期）

b-d: 形態形成期（多細胞期）

細胞性粘菌の多細胞化は集合中心の細胞が分泌する cAMP に対する走化性運動による。その後、ナメクジ形の移動体を形成する。この段階においてすでに将来胞子になる細胞と、それを支える柄になる細胞が決定されている（右下図）。

以下細胞性粘菌の実験上の特徴を列記すると、

－培養液中での単純な細胞分裂
－バクテリアの捕食、消化
－走化性等の指向的なアメーバ運動
－形態形成の容易な誘導
－半数体
－容易な形質転換
－様々な発現ベクター
－ゲノム解読の終了
－遺伝子、株、論文データベースの充実
－高い相同性組換え効率
－保存が容易
－細胞株の整備
等々



本手引書は初めて細胞性粘菌を扱う研究者が実験標準株である *Dictyostelium discoideum* を研究に活用するにあたり、その扱い方を解説することを目的としています。内容は細胞性粘菌培養法から分子生物学的手法を利用した形質転換体の分離までを中心とし、土壌からの細胞性粘菌の分離法についての解説も加えています。

本書によりモデル生物細胞性粘菌が多くの研究の場において活用され、有用な生物学上の発見につながることを願っています。

2018 年 11 月

筑波大学生命環境系　　桑山　秀一

Ⅱ．細胞性粘菌の培養と保存法

細胞性粘菌野生株はバクテリアを餌として、寒天培地上あるいは液体培地中で培養することが基本である。ただし、無菌培養株を利用すればバクテリアのない培地中で粘菌細胞だけを純粋培養することが可能である。

細胞性粘菌の培養法

１）バクテリアとの二員培養法（発生過程の観察）

（準備）*Dictyostelium discoideum* 標準株（AX2 株）

バクテリア（餌）: *Escherichia coli* B/r あるいは *Klebsiella aerogenes*

５LP 寒天培地（lactose 5.0 g, Bacto Peptone (BD REF No.; 211677) 5.0 g, Bacto Agar 15.0 g / 1L Distilled $H_2$0; オートクレーブ滅菌）※直径 9 cm シャーレに対して 20 mL

恒温器（21℃）

１．5LP 液体培地中（５LP 寒天培地から Agar を抜いたもの）で 37℃一晩培養したバクテリア（餌）（*Escherichia coli* B/r あるいは *Klebsiella aerogenes*）を 0.5 mL 5LP 寒天培地上に滴下し均一に広げたのちクリーンベンチ中で水分がひくまで風乾する。

２．中心に *Dictyostelium discoideum* 標準株（AX2 株）を植える。

３．4~5 日間 21 ℃に維持された恒温器で保温する。

４．バクテリアを捕食し、中心にプラークが形成される。中心近傍では飢餓状態が進行しており、子実体が観察される。外周へ近づくにつれナメクジ体、集合体、増殖アメーバーが観察される。

＜メモ＞

２）寒天培地上でのバクテリアとの二員培養法による細胞調整（Under Water Culture 法）

（準備）*Dictyostelium discoideum* 標準株（AX2 株）

バクテリア（餌）: *Escherichia coli* B/r あるいは *Klebsiella aerogenes*

Ｎ寒天培地（glucose 10.0 g, Bacto Peptone (BD REF No.; 211677) 10.0 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_20$ 0.96 g, KH_2PO_4 1.44 g, Bacto Agar 15g / 1 L Distilled H_20; オートクレーブ滅菌）

滅菌リン酸緩衝液（$Na_2HPO_4 \cdot 12H_20$ 1.07 g, KH_2PO_4 0.96 g / 1 L; オートクレーブ滅菌）

滅菌蒸留水、滅菌試験管、遠沈管

恒温器（21℃）

１．N 寒天培地上で培養したバクテリア（餌）（*Escherichia coli* B/r あるいは *Klebsiella aerogenes*）を適量かきとり、滅菌試験管に入れた滅菌水 3 mL に懸濁する。

２．*Dictyostelium discoideum* 標準株（AX2 株）アメーバもしくは胞子を適量かきとり、バクテリアを懸濁した滅菌水に懸濁する。

３．N 寒天培地上に懸濁液を移す。

４．4~5 日間 21 ℃維持された恒温器で保温する。

５．アルコール滅菌したガラス棒（スプレッダー）で表面を軽くこすり、細胞懸濁液を遠沈管に移す。

６．300-350 g (1,500 - 2,000 rpm) で 2 min、遠心を行う。

７．上清を捨て、冷滅菌リン酸緩衝液を入れ懸濁する。

８．６．７．の操作をあと 2 回繰り返す（合計 3 回の細胞洗浄）。

９. 細胞性粘菌細胞を適当な緩衝液に懸濁し、実験に使用する（氷上で保存）。

＜メモ＞

３）バクテリアとの二員培養法による細胞調整（液体振盪培養法）

（準備）*Dictyostelium discoideum* 標準株（AX2 株）

バクテリア（餌）: *Escherichia coli* B/r あるいは *Klebsiella aerogenes*

５LP 液体培地（lactose 5.0 g, Bacto Peptone (BD REF No.; 211677)　5.0 g / 1L Distilled H_20; オートクレーブ滅菌）

滅菌リン酸緩衝液（$Na_2HPO_4 \cdot 12H_20$ 1.07 g, KH_2PO_4 0.96 g / 1 L; オートクレーブ滅菌）

滅菌蒸留水、滅菌三角フラスコ、遠沈管

恒温器（21℃）、振盪器

１．N 寒天培地上で培養したバクテリア（餌）（*Escherichia coli* B/r あるいは *Klebsiella aerogenes*）を適量かきとり、三角フラスコに移した 5LP 液体培地に懸濁する（5LP 液体培地の容量はフラスコの容量の２０～３０％程度）。

２．*Dictyostelium discoideum* 標準株（AX2 株）アメーバもしくは胞子を適量かきとり 5LP 培地中に懸濁する。

３．4~5 日間 21 ℃に維持された恒温器中で振盪する（125 rpm）。

４．対数増殖期前期（細胞密度 1.0 ～3.0 ×10^6 cells / mL）の細胞を遠沈管に回収する。

５．300-350 g (1,500 - 2,000 rpm) で 2 min、遠心を行う。

６．上清を捨て、冷滅菌リン酸緩衝液を入れ懸濁する。

７．５．６．の操作をあと 2 回繰り返す（合計 3 回の細胞洗浄）。

８. 細胞性粘菌細胞を適当な緩衝液に懸濁し、実験に使用する（氷上で保存）。

＜メモ＞

４）無菌培養法よる細胞調製（バクテリアを利用しない方法）

（準備）*Dictyostelium discoideum* 標準株（AX2 株）

※細胞性粘菌野生株は必ずしも無菌的に培養できるわけではないので、使用する株が無菌培養可能かどうかを事前に確認すること。

（AX と記載がある株由来のものは基本的に無菌培養が可能である。）

HL5 培地（Glucose 14.3 g, Bacto Proteose Peptone (BD REF No.; 211684) 14.3g, Bacto Yeast Extract (BD REF No.; 212750)　7.15g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_20$ 1.28 g, KH_2PO_4 0.485 g / 1 L; オートクレーブ滅菌）

抗生物質溶液（1000x; Streptomycin sulfate 100mg, Benzylpenicillin potassium 70 mg / mL）フィルター滅菌を行い、オートクレーブ滅菌した HL5 培地に添加すること。市販されている溶液でも可。

葉酸 (folic acid)、ビタミン B12 (cyanocobalamin) 溶液（10,000 x; 葉酸 2.0 mg, ビタミン B12　6 mg / mL）NaOH 溶液で中和後溶液が溶解したのを確認しメスアップ後、フィルター滅菌を行い、オートクレーブ滅菌した HL5 培地に添加すること。

滅菌リン酸緩衝液（$Na_2HPO_4 \cdot 12H_20$ 1.07 g, KH_2PO_4 0.96 g / 1 L; オートクレーブ滅菌）

滅菌シャーレ(例：直径 9cm)　もしくは　滅菌三角フラスコ、遠沈管

恒温器（21℃）、振盪器

１．滅菌シャーレに 20mL の HL5 培地（＋抗生物質、＋葉酸、ビタミン溶液；以下 HL5 と記載がある場合は添加済みのものとする）を満たす。

２．寒天培地上（あるいは他の液体培地中）の細胞性粘菌胞子（あるいはアメーバ細胞）を白金耳等でかきとり懸濁する。

３．4~5 日間 21 ℃維持された恒温器中で保温する。

４．液体振盪培養を行う場合は、細胞をパスツールピペット等でかきとり、滅菌した三角フラスコに移し、21 ℃、125 rpm で振盪培養する。この場合、液体培地の容量はフラスコの容量の２０％を目安とする。

５．前期増殖期（1.0 ～3.0 ×10^6 cells / mL の細胞密度）の細胞を遠沈管に回収する。

６．300-350 g (1,500 - 2,000 rpm) で 2 min、遠心を行う。

７．上清を捨て、冷滅菌リン酸緩衝液を入れ懸濁する。

８．６．７．の操作をあと 2 回繰り返す（合計 3 回の細胞洗浄）。

９．細胞性粘菌細胞を適当な緩衝液に懸濁し、実験に使用する（氷上で保存）。

＜メモ＞

細胞性粘菌の保存法

１）シリカゲルを用いた胞子保存法

（準備）子実体を形成した細胞性粘菌

シリカゲル（白色小粒子のもの；180℃2 時間程、乾熱滅菌を行っておく）

感熱滅菌したガラス製バイアル瓶（蓋はオートクレーブ後に乾燥）

あるいは、滅菌したマイクロチューブでも可（滅菌、密閉できるものであること）

0.5％ ドライミルク溶液（オートクレーブ後、冷蔵保存）

１．新しく作製した細胞性粘菌のストックプレート（子実体を形成させたプレート）を冷蔵庫で冷やす。

２．滅菌した白金耳で子実体の胞子塊を集め、少量（0.5 ㎖ 程度）のドライミルク溶液にとる。この操作を繰り返し行い、できるだけたくさんの胞子を集める。 （ドライミルク溶液を使用せず、胞子を直接シリカゲルに懸濁しても保存は可能である。）

３．胞子を含んだドライミルク溶液を氷で冷やし、あらかじめ冷やしておいたシリカゲル容器に滴下する（約 0.2 ㎖ / 1g シリカゲル）。

４．容器を密閉（蓋を）し良く振って中身を均一にした後、この容器を乾燥剤を入れた別の容器に入れて冷蔵保存する。

（戻し方）

（準備）シリカゲルに保存した胞子

バクテリア（餌）：*Escherichia coli* B/r あるいは *Klebsiella aerogenes*

５LP 寒天培地（lactose 5.0 g, Bacto Peptone (BD REF No.; 211677) 5.0 g, Bacto Agar 15.0 g / 1L Distilled $H_2$0）※直径 9 cm シャーレに対して 20 mL

恒温器（21℃）

１．5LP 液体培地中（５LP 寒天培地から Agar を抜いたもの）で 37℃一晩培養したバクテリア（餌）（*Escherichia coli* B/r あるいは *Klebsiella aerogenes*）を 0.5 mL 5LP 寒天培地上に滴下し均一に広げたのちクリーンベンチ中で水分がひくまで風乾する。

２．胞子が懸濁されたシリカゲルストックを適当にばら捲く。（あるいは、バクテリア溶液にシリカゲルを数粒入れ、良く撹拌後５ＬＰ寒天培地に拡げる。

３．3～7 日間、21℃で保温する。

４．子実体を観察したら、新しい５ＬＰバクテリア培地あるいは無菌培地（ＨＬ５等）に移す。

（メモ）

２）ＤＭＳＯを用いたアメーバ細胞の保存法

胞子を作らない変異株はシリカゲルを用いた方法で保存できない。そのような株はアメーバ細胞として超低温（−80 ℃ 以下） フリーザあるいは液体窒素中で凍結保存する。

（準備）細胞性粘菌アメーバ（ＨＬ５培地に懸濁された、あるいはリン酸）

培養グレードの DMSO（例：Hybrimax;sigma 社, HPLC グレードのものも使用可）

滅菌蒸留水

滅菌済みのクライオチューブ

滅菌リン酸緩衝液 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_20$ 1.07 g, KH_2PO_4 0.96 g / 1 L; オートクレーブ滅菌）

-80 ℃ フリーザー、（液体窒素）

１．滅菌水を用いて 20％ ＤＭＳＯ溶液を作製し、冷蔵保存（もしくは冷凍保存）する（フィルター滅菌不可）。直前まで氷上で冷却しておく。

２．細胞懸濁液を用意する。細胞懸濁液は、HL5 で無菌培養細胞、あるいは二員培養し遠心処理によりバクテリアを除き滅菌リン酸緩衝液に懸濁した細胞のどちらでもよい。また、細胞密度は 1.0×10^8 cells / mL にしておく。

３．氷上で冷却してある 20 ％ ＤＭＳＯ溶液から 0.5 mL をクライオチューブに移す。

４．懸濁した細胞を 0.5 mL 入れ、氷上で穏やかにピペティングする。

５．これを細胞凍結用の容器（BICELL など）に入れ、−80 C の冷凍庫に数時間以上置く。（ ※ゆっくりと冷やし、過冷却の状態まで作り出すのが目的である。）容器が無い場合は綿を折りいれた箱に、チューブを挟みこむように挿入し、そのまま−80 ℃のフリーザーに入れ、数時間冷やす。

６．チューブをクライオボックス等に移し、−80 ℃あるいは液体窒素で保存する。

（メモ）

（フリーズストック細胞の戻し方）

（準備）クライオチューブで保存してある冷凍細胞ストック

ＨＬ５培地あるいは５ＬＰ液体培地

バクテリア（餌）（*Escherichia coli* B/r あるいは *Klebsiella aerogenes*）

５LP 寒天培地（lactose 5.0 g, Bacto Peptone (BD REF No.; 211677) 5.0 g, Bacto Agar 15.0 g / 1L Distilled H_20; オートクレーブ滅菌）※直径 9 cm シャーレに対して 20 mL

恒温器（21℃）

１．フリーザーからチューブを出し、室温に置く。

２．ゆっくり振りながら全体が溶けた時点で、ＨＬ５培地あるいは５ＬＰ培地を適量ゆっくり加え、15 mL 遠沈管に移す。

３．ＨＬ５培地あるいは５ＬＰ培地を 15 mL になるまで足し、300-350 g (1,500 - 2,00 rpm) で 2 min、遠心を行う。

４．上清みを捨て、適量のＨＬ５を加え、滅菌シャーレに移し、適量の HL5 培地を足す。５ＬＰ培地を加え 2 員培養するときは、沈殿した細胞に５ＬＰで増やしたバクテリア懸濁液を 1～2 mL 加え、0.5 mL を５ＬＰ寒天培地に播く。

５．3～7 日間、21℃で保温する。

※　ＨＬ５液体培地に戻す場合、溶かした細胞液を直接 15 ㎖ の液体培地に移してもＤＭＳＯは細胞の増殖を阻害しない程度まで希釈されるので大丈夫である。

また、凍ったストックが絶対溶けないような保冷容器にチューブを入れてクリーンベンチ中で滅菌した細いスパチュラなどで凍ったストックの表面を少し掻き取ってシャーレ中の新鮮な栄養培地に入れ、チューブが溶けないうちにフリーザなどに戻すことで１本のチューブから何度でも細胞を戻すことができる。

（メモ）

Ⅲ．細胞性粘菌の観察

細胞性粘菌はアメーバ細胞として増殖し、栄養を取り除き寒天プレート上などの適当な水分条件下で多細胞体形成を行い、胞子と柄からなる子実体を形成する。

細胞性粘菌の発生過程の観察

１）バクテリアとの二員培養による発生過程の観察

（準備）*Dictyostelium discoideum* 標準株（AX2 株）

バクテリア（餌）: *Escherichia coli* B/r あるいは *Klebsiella aerogenes*

５LP 寒天培地（lactose 5.0 g, Bacto Peptone (BD REF No.; 211677) 5.0 g, Bacto Agar 15.0 g / 1L Distilled $H_2$0）※直径 9 cm シャーレに対して 20 mL

恒温器（21℃）

１．5LP 液体培地中（５LP 寒天培地から Agar を抜いたもの）で 37℃一晩培養したバクテリア（餌）（*Escherichia coli* B/r あるいは *Klebsiella aerogenes*）を 0.5 mL 5LP 寒天培地上に滴下し均一に広げたのちクリーンベンチ中で水分がひくまで風乾する。

２．中心に *Dictyostelium discoideum* 標準株（AX2 株）を植える。

３．4~5 日間 21 ℃に維持された恒温器で保温する。

４．バクテリアを捕食し、中心にプラークが形成される。中心近傍では飢餓状態が進行しており、子実体が観察される。外周へ近づくにつれナメクジ体、集合体、増殖アメーバーが観察される。

＜メモ＞

２）細胞性粘菌発生過程の経時的観察（寒天上）

（準備）*Dictyostelium discoideum* 標準株（AX2 株）

バクテリア（餌）: *Escherichia coli* B/r あるいは *Klebsiella aerogenes*

５LP 液体培地（lactose 5.0 g, Bacto Peptone (BD REF No.; 211677) 5.0 g, Bacto / 1L Distilled H_20）

滅菌リン酸緩衝液（$Na_2HPO_4 \cdot 12H_20$ 1.07 g, KH_2PO_4 0.96 g / 1 L; オートクレーブ滅菌）

滅菌 BSS（NaCl 0.6 g, KCl 0.75 g, $CaCl_2 \cdot 2H_20$ 0.4 g / 1 L; オートクレーブ滅菌）

恒温器（21℃）

無栄養寒天（Bacto Agar 15.0 g / 1L Distilled H_20）

１．対数増殖期前期（1.0 ～ 3.0 × 10^6 cells / mL）のＨＬ５で純粋培養あるいは５ＬＰ液体培地中で二員培養した細胞性粘菌を遠沈管に回収する。

２．300 - 350 g (1,500 - 2,000 rpm) で 2 min、遠心を行う。

３．上清を捨て、冷滅菌リン酸緩衝液を入れ懸濁する。

４．２．３．の操作をあと 2 回繰り返す（合計 3 回の細胞洗浄）。

５．1.0 x 10^7 cells / mL（目安）になるように、細胞を冷滅菌リン酸緩衝液もしくは冷 BSS に懸濁する。

６．5 μL をピペットで吸い取り、無栄養寒天に滴下する。この時、寒天を突き刺してしまわないように注意する。

７．水気がひくまで風乾後、21 ℃に維持された恒温器で保温する。

８．実体顕微鏡等で経時的に観察する。

＜メモ＞

３）細胞性粘菌発生過程の経時的観察（リン酸緩衝液中）

細胞性粘菌は水中では子実体を形成しないが、集合までは行うことができる。細胞集合の細胞レベルの観察は、カバーガラス上、水没下の条件で行うことが可能である。

（準備）*Dictyostelium discoideum* 標準株（AX2 株）

バクテリア（餌）: *Escherichia coli* B/r あるいは *Klebsiella aerogenes*

５LP 寒天培地（lactose 5.0 g, Bacto Peptone (BD REF No.; 211677) 5.0 g, Bacto Agar 15.0 g / 1L Distilled H_20）※直径 9 cm シャーレに対して 20 mL

滅菌リン酸緩衝液

恒温器（21℃）

無栄養寒天（Bacto Agar 15.0 g / 1L Distilled H_20）

１．対数増殖期前期（1.0 ～ 3.0 × 10^6 cells / mL）のＨＬ５で純粋培養あるいは５ＬＰ液体培地中（５LP 寒天培地から Agar を抜いたもの）で二員培養した細胞性粘菌を遠沈管に回収する。

２．300 - 350 g (1,500 - 2,000 rpm) で 2 min、遠心を行う。

３．上清を捨て、冷滅菌リン酸緩衝液を入れ懸濁する。

４．２．３．の操作をあと 2 回繰り返す（合計 3 回の細胞洗浄）。

５．1.0 x 10^7 cells / mL（目安）になるように、細胞を冷滅菌リン酸緩衝液に懸濁する。

６．1.0 x 10^6 cells / cm^2（目安）になるように、ガラスボトムディッシュ等に移す。

７．21 ℃に維持された恒温器で保温する。

８．倒立顕微鏡にて細胞の様子を観察する。

＜メモ＞

Ⅳ．細胞性粘菌の形質転換法

研究標準株である *Dictyostelium discoideum*（AX 株）は、形質転換法が確立されている。また、形質転換に必要な様々なベクター類も整備されている。

細胞性粘菌 AX 株の形質転換（エレクトロポレーション法）

（準備）*Dictyostelium discoideum* 標準株（AX2 株）

HL5 培地（Glucose 14.3 g, Bacto Proteose Peptone (BD REF No.; 211684) 14.3g, Bacto Yeast Extract (BD REF No.; 212750)　7.15g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_20$ 1.28 g, KH_2PO_4 0.485 g / 1 L）

抗生物質溶液（1000x; Streptomycin sulfate 100mg, Benzylpenicillin potassium 70 mg / mL）フィルター滅菌を行い、オートクレーブ滅菌した HL5 培地に添加すること。

葉酸 (folic acid)、ビタミン B12 (cyanocobalamin) 溶液（10,000 x; 葉酸 2.0 mg, ビタミン B12　6 mg / mL）NaOH 溶液で中和後溶液が溶解したのを確認しメスアップ後、フィルター滅菌を行い、オートクレーブ滅菌した HL5 培地に添加すること。

エレクトロポレーション緩衝液（$Na_2HPO_4 \cdot 12H_20$ 0.32 g, NaH_2PO_4 1.40 g, Sucrose 17.12 g / 1 L;フィルター滅菌）

形質転換用ＤＮＡ

幅 2 mm サイズのエレクトロポレーション専用キュベット

滅菌ヒーリング溶液（100 mM $CaCl_2$, 100 mM $MgCl_2$; オートクレーブ滅菌）

滅菌シャーレ(例：直径 9cm)

遠沈管

恒温器（21℃）

１．エレクトロポレーション緩衝液を準備する。エレクトロポレーション緩衝液はフィルター滅菌により滅菌する。

２．対数増殖期前期（1.0 ～ 3.0 × 10^6 cells / mL）のＨＬ５で純粋培養した細胞性粘菌を遠沈管に回収する。

３．300 - 350 g (1,500 - 2,000 rpm) で 2 min、遠心を行う。

４．上清を捨て、冷エレクトロポレーション溶液を 5.0 × 10^7 cells / mL になるように加え穏やかに懸濁し、氷上に静置する。

５．400 μL をキュベットに移し、10～20 μg のＤＮＡを加えて、穏やかに懸濁する。

６．30 分間氷上で静置する。

７．電気刺激を与える。（例 ; BTX 社 ECM830, 500 V, 100μsec, ×10:Biorad 社 Gene Pulser, 0.85 kV, 25μF, ×2：電気刺激による致死率は 25%以下になることは避ける。通常 50 %程度である。）

８．５ 分間氷上で静置する。

９．この間に 4μL のヒーリング溶液を滅菌シャーレの上に滴下しておく。

１０．電気刺激を与えた細胞懸濁液を滅菌シャーレに移し、ヒーリング溶液と軽く懸濁する。

１１．10 ～ 15 分間 21℃で保温する。

１２．15 mL ＨＬ５培地をゆっくりと加え、21 ℃ 保温する。コロニーで分離したい場合は、この時点で 96 穴滅菌プレートに分注しておく。その場合、ＨＬ５培地を 40 mL 加え、100μL / well ずつ分注する。

１３. 12 ～24 時間後、1,000 倍濃度の選択薬剤（G418; 20 mg / mL, Blasticidin S 10 mg / mL：フィルター滅菌したもの）を 15 μL 加える。96 well に分注している場合は、Final 濃度（G418; 20 μg / mL, Blasticidin S 10 μg / mL）の 2 倍濃度の G418 あるいは Blasticidin S を加えたＨＬ５培地を 100 μL ずつ加える。

１４．４－5 日で選択薬剤入り培地を交換する。

１５．形質転換がうまくいっている場合、G418 の場合 10～14 日後、Blasticidin S の場合 7~10 日後にコロニーが観察される。

＜メモ＞

細胞性粘菌 AX 株の形質転換（リン酸カルシウム法）

（準備）*Dictyostelium discoideum* 標準株（AX2 株）

HL5 培地（Glucose 14.3 g, Bacto Proteose Peptone (BD REF No.; 211684) 14.3g, Bacto Yeast Extract (BD REF No.; 212750)　7.15g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_20$ 1.28 g, KH_2PO_4 0.485 g / 1 L）

抗生物質溶液（1000x; Streptomycin sulfate 100mg, Benzylpenicillin potassium 70 mg / mL）フィルター滅菌を行い、オートクレーブ滅菌した HL5 培地に添加すること。

葉酸 (folic acid)、ビタミン B12 (cyanocobalamin) 溶液（10,000 x; 葉酸 2.0 mg, ビタミン B12　6 mg / mL）NaOH 溶液で中和後溶液が溶解したのを確認しメスアップ後、フィルター滅菌を行い、オートクレーブ滅菌した HL5 培地に添加すること。

Bis-Tris HL5 培地（2.1g Bis-Tris in HL5, pH 7.1 with HCl, フィルター滅菌）

1.25M $CaCl_2$ 溶液（フィルター滅菌）

18 % グリセロール溶液 in 1x HBS

2 x HBS 溶液（4.0 g NaCl, 0.18 g KCl, 0.05 g Na_2HPO_4, 2.5 g HEPES, 0.5 g グルコース / 1 L 蒸留水, pH to 7.1 with NaOH:フィルター滅菌.）

形質転換用ＤＮＡ

滅菌シャーレ(例：直径 9cm)

遠沈管

恒温器（21℃）

１．対数増殖期前期（1.0 ～ 2.0 × 10^6 cells / mL）のＨＬ５で純粋培養した細胞性粘菌　10 mL を滅菌シャーレに播く。

２．30 分間　21℃で静置・保温する。

３．HL5 を細胞を残して丁寧に取り除き、12.5 mL の Bis-Tris HL5 を静かに加え、30 分間 21℃で静置・保温する。

４．10～20 μg DNA を含んだ 1x HBS 溶液 540 μL を準備する。

５．60 μL の 1.25M $CaCl_2$ を加え、600 μL とする。

６．静置してあるシャーレから Bis-Tris HL5 を静かに取り除き、５．のＤＮＡ溶液を中心からゆっくり滴下する。

７．蓋をして 30 分間 21℃で静置・保温する。

８．12.5 mL の Bis-Tris HL5 を静かに加え、4 時間 21℃で静置・保温する。

９. 静置してあるシャーレから Bis-Tris HL5 を静かに取り除き、4 mL の 18 % グリセロール溶液 in 1x HBS をゆっくりと加える。

１０．正確に 5 分間 21℃で静置・保温する。

１１. グリセロール溶液 in 1x HBS を吸い取り、15 mL ＨＬ5 培地を加える。

１２. 12 ～24 時間後、1,000 倍濃度の選択薬剤（G418; 20 mg / mL, Blasticidin S 10 mg / mL：フィルター滅菌したもの）を 15 μL 加える。96 well に分注している場合は、Final 濃度（G418; 20 μg / mL, Blasticidin S 10 μg / mL）の 2 倍濃度の G418 あるいは Blasticidin S を加えたＨＬ５培地を 100 μL ずつ加える。

１３．４－5 日で選択薬剤入り培地を交換する。

１４．形質転換がうまくいっている場合、G418 の場合 10～14 日後、Blasticidin S の場合 7~10 日後にコロニーが観察される。

＜メモ＞

Ⅴ．ＰＣＲ法による遺伝子増幅

一般的なゲノムを鋳型としたPCR法で細胞性粘菌の遺伝子を増幅することが可能であるが、細胞性粘菌ゲノムはATリッチであるため反応条件の若干の変更が必要となる。

（準備）*Dictyostelium discoideum* 標準株（AX株）ゲノムＤＮＡ
オリゴＤＮＡ２本
耐熱性ポリメラーゼ（例 TOYOBO, KOD plus）
1.5 mL マイクロチューブ、PCR 専用マイクロチューブ

１．ＰＣＲのテンプレートとなるＤＮＡを調製する。（ゲノムＤＮＡ、プラスミドＤＮＡetc）

２．High-Fidelity タイプの耐熱性酵素を使用することが望ましい。（例：TOYOBO 社 KOD シリーズ、Takara 社プライムスター、Finnzyme 社 Phusion 等）

10 × KOD plus ver2 buffer	3.0 μL
dNTP mix (2.0 mM)	3.0 μL
$MgSO_4$ (25 mM)	3.0 μL
プライマー　（10μM）	
5'側	1.5 μL
3'側	1.5 μL
テンプレート（プラスミド or ゲノムＤＮＡ）	0.1 ng(プラスミド) 10 ng(ゲノムＤＮＡ)
KOD plus	0.3 μL
up to	30.0 μL with dH_20

サーマルサイクラーの条件；94℃、（94℃-2min、50-60℃-20sec、65℃-全長 kbp x 1 min）×25、65℃-全長 kbp x 1min、Hold

３．５μL の反応溶液を電気泳動し、目的の長さの断片が増幅されているかを確認する。場合により、ゲノム断片の精製・抽出を行う。

注意　増幅がうまくいかなかった場合には、まずコントロール実験を行い試薬等が劣化していないことを確かめる。さらに、ゲノム DNA を鋳型にした増幅の場合には、５％DMSO（最終濃度）を反応溶液に加えると反応が安定して増幅することがある。

Ⅵ．ゲノムＤＮＡの調製

（準備）*Dictyostelium discoideum* 標準株（AX 株）

遠沈管

遠心機、卓上冷却遠心機

恒温器（60℃と 37℃）

滅菌リン酸緩衝液（$Na_2HPO_4 \cdot 12H_20$ 1.07 g, KH_2PO_4 0.96 g / 1 L）

STE 緩衝液（10mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 400mM NaCl, pH 8.0）

Proteinase K（10 mg / mL)

10% SDS 溶液

滅菌蒸留水

1.5 mL マイクロチューブ

TE 飽和フェノール

クロロホルム

99.5 % エタノール

70.0 % エタノール

リボヌクレアーゼＡ溶液（10 mg / mL）

１．2.0 ～5.0 × 10^7 cells の細胞性粘菌細胞を遠沈管に回収する。

２．300 - 350 g (1,500 - 2,000 rpm) で 2 min、遠心を行う。

３．上清を捨て、450 μL の STE 緩衝液を加え、細胞を 1.5 mL マイクロチューブ中に懸濁する。

４．50 μL の 10 % SDS 溶液を加え、蓋をして上下に５－６回転倒させる。

５．10μL の Proteinase K 溶液を加え、同様に転倒させる。

６．60 ℃、1～2 時間、つづいて 37 ℃、2 時間～１晩保温する。

７．TE 飽和フェノール / クロロホルム (1:1) 液を 500 μL 加え、蓋をして上下に５－６回転倒させ、15 krpm, 10 分間遠心する。

８．白く濁った中間層を取らないように上清みだけを、400 μL 丁寧に新しいマイクロチューブに移す。

９．（必要に応じて）７．８．の操作を合計３回まで繰り返す。

１０．冷 99.5%エタノールを 1.0 mL 加え、-20 ℃で 30 分間冷却する。

１１．15 krpm, 10 分間遠心する。

１２．沈殿に 70 % エタノールを 1.0 mL 加え、沈殿をリンスする。

１３．軽く遠心処理し、上清みを捨てる。

１４．１２．１３．の操作をもう一度行う。

１５．10～15 分間風乾し、100 μＬ滅菌蒸留水を加えタッピングにより懸濁する。

１６．リボヌクレアーゼＡ溶液を１ μＬ加え、３７℃、1～2 時間保温する。

１７．ゲノムＤＮＡは凍結・融解処理により断片化するので、冷蔵保存しておく。

＜メモ＞

Ⅶ. 土壌からの細胞性粘菌の分離法

木陰の湿った場所や落ち葉の下の土壌中から、細胞性粘菌の分離を行う。

（準備）分離用寒天培地（Glucose 1.0 g, Bacto Peptone (BD REF No.; 211677) 1.0 g, K_2HPO_4, 1.0 g, KH_2PO_4, 1.5 g, $MgSO_4$ 1.0 g, Agar 15.0 g / 1.0 L Distilled H_2O）※直径 9 cm シャーレに対して 20 mL（以下同様）

N 寒天培地（glucose 10.0 g, Bacto Peptone (BD REF No.; 211677) 10.0 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_20$ 0.96 g, KH_2PO_4 1.44 g, Bacto Agar 15g / 1 L Distilled H_20）

５LP 寒天培地（lactose 5.0 g, Bacto Peptone (BD REF No.; 211677) 5.0 g, Bacto Agar / 1L Distilled H_20）

バクテリア（餌）（*Escherichia coli* B/r あるいは *Klebsiella aerogenes*）

滅菌蒸留水

滅菌ガーゼ

１．土壌の表層部分を採取する。

２．10 g の土に対して 90 mL の滅菌蒸留水を加え、良く撹拌する。

３．２枚に重ねた滅菌ガーゼでこし、ろ液 5mL に対して滅菌蒸留水 7.5 mL を加える。

４．0.5 mL の３.の薄めたろ液に対して、0.4 mL バクテリアを懸濁した滅菌蒸留水（白金耳等でバクテリアを寒天プレートから掻きとって懸濁させる。）を加え、分離培地に均一に塗り拡げる。

５．21 ℃で保温する。

６．3～7 日後、培地上に出現する子実体をバクテリア懸濁液を塗り拡げた 5LP 寒天上に接種し、21℃で保温する。

＜メモ＞

Ⅷ. ＮＢＲＰからの細胞性粘菌株の提供方法

細胞性粘菌株はＮＢＲＰ（ナショナルバイオリソースプロジェクト）細胞性粘菌において収集・保存されており、有料で提供を受けることができる（ただし、中等教育等での教育目的に対しては無償で提供を受けることができる）。

細胞性粘菌株の提供申し込み方法

http://nenkin.lab.nig.ac.jp/にアクセスする。

株提供のインストラクション画面（この画面を参考に提供依頼してください）

申し込みに必要な情報

・メールアドレス

・クレジットカード（支払い用）

・受け取り方法（配送方法；冷蔵、普通、手渡し）

＜メモ＞

Ⅸ．細胞性粘菌に関する参考サイト

１．http://dictybase.org/

細胞性粘菌の国際サイト。細胞性粘菌の研究標準株 *Dictyostelium discoideum* を中心としたコミュニティサイト。ゲノムや遺伝子情報の検索、細胞性粘菌研究室、国際細胞性粘菌学会の案内等の情報もこちらから取得することができる。

２．http://dicty.jp/

日本細胞性粘菌学会のホームページ。２０１１年に立ち上がった日本の細胞性粘菌学会に関する情報や年会の情報が取得できる。随時会員の受付をしている。日本の細胞性粘菌研究者ホームページへのリンクもある。

３．http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~hideko/index.html

筑波大学の細胞性粘菌研究室のホームページ。研究内容の紹介や大学院生の募集を行っている。

Ｘ．参考書、参考文献

１．細胞性粘菌：研究の新展開
～モデル生物・創薬資源・バイオ～
編著者　阿部知顕・前田靖雄、アイピーシー（２０１２）
2000 年発行のモデル生物：細胞性粘菌の改訂版。細胞性粘菌の実験上の扱いに関する章もある。

２．細胞性粘菌のサバイバル—環境ストレスへの巧みな応答 (新・生命科学ライブラリ—生物再発見)、漆原秀子著、サイエンス社
細胞性粘菌に関する生態と研究を初心者にわかりやすく解説してある細胞性粘菌の入門書。

３．パワフル粘菌、前田靖男著、東北大学出版会
細胞性粘菌の発生に関してご自身の研究を元に分かりやすく解説した書。

４．Dictyostelium.
Richard H. Kessin.
Cambridge University Press, 2001
英語で書かれた細胞性粘菌研究の総説書。

５．Differentiation in social amoebae..
John T Bonner.
Sci. Am. 201, 152-162, 1959
古いが英語で書かれた一般向けの細胞性粘菌総説。

６．Transformation of *Dictyostelium discoideum* with plasmid DNA.
Gaudet P, Pilcher KE, Fey P, Chisholm RL.
Nat Protocols. 2(6):1317-1324, 2007.
細胞性粘菌の形質転換法の解説。

７．A new set of small, extrachromosomal expression vectors for *Dictyostelium discoideum*.
Veltman DM, Akar G, Bosgraaf L, Van Haastert PJ.
Plasmid. 61(2):110-118, 2009.
細胞性粘菌の種々の遺伝子発現ベクターに関する論文。ベクターはＮＢＲＰ細胞性粘菌で入手が可能。

８．A versatile set of tagged expression vectors to monitor protein localization and function in *Dictyostelium*.
Dubin M, Nellen W.
Gene. 465(1-2):1-8, 2010.

細胞性粘菌の種々の遺伝子発現ベクター、特に蛍光タンパク質融合発現ベクターに関する論文。ベクターはＮＢＲＰ細胞性粘菌で入手が可能。

９．　A user's guide to restriction enzyme-mediated integration in *Dictyostelium*.
Guerin NA, Larochelle DA.
J. Muscle Res. Cell Motil. 2002;23(7-8):597-604.
遺伝子挿入による突然変異株の作製、分離と遺伝子解析方法に関する総説。必要なベクターはＮＢＲＰ細胞性粘菌で入手が可能。

１０．PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors.
Hidekazu Kuwayama, Shinji Obara, Takahiro Morio, Mariko Katoh, Hideko Urushihara and Yoshimasa Tanaka.
Nucleic Acids Research. 30 (2):e2, 2002
PCR 法による遺伝子破壊ベクター作製に関する論文。

ＸＩ．培地等組成表

HL5 培地 （オートクレーブ滅菌）	Proteose Peptone (BD REF No.; 211684) Yeast Extract BD REF No.; 212750 Glucose KH_2PO_4 Na_2HPO_4・$12H_20$	14.3 g 7.15 g 14.3 g 0.485g 1.28g
	蒸留水	to 1 liter

5LP 培地 （オートクレーブ滅菌） (5LP 寒天培地の場合は + 15.0 g Bacto agar)	Lactose Bacto Peptone (BD REF No.; 211677)	5.0 g 5.0 g
	蒸留水	to 1 liter

N 培地 （オートクレーブ滅菌） (N 寒天培地の場合は + 15.0 g Bacto agar)	Glucose Bacto Peptone (BD REFNo.; 211677) KH_2PO_4 Na_2HPO_4・$12H_20$	10.0 g 10.0 g 1.44 g 0.96 g
	蒸留水	to 1 liter

分離培地 （オートクレーブ滅菌）	Glucose Bacto Peptone (BD REFNo.; 211677) KH_2PO_4 Na_2HPO_4 MgSO4 Bacto agar	1.0 g 1.0 g 1.0 g 1.5 g 1.0 g 15.0 g
	蒸留水	to 1 liter

リン酸緩衝液 （オートクレーブ滅菌）	$Na_2HPO_4 \cdot 12H_20$ KH_2PO_4	1.07 g 0.96 g
	蒸留水	to 1 liter

BSS (オートクレーブ滅菌) (BSS-寒天の場合は + 15.0 g Bacto agar)	NaCl KCl $CaCl_2$・$2H_2O$	0.60 g 0.75 g 0.40 g
	蒸留水	to 1 liter

エレクトロポレーション緩衝液 (フィルター滅菌)	$NaH_2PO_4 \cdot 12H_20$	0.32 g
	NaH_2PO_4	1.40 g
	Sucrose	17.12 g
	蒸留水	to 1 liter

ヒーリング溶液 (オートクレーブ滅菌)	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.51 g
	$MgCl_2$	0.952 g
	蒸留水	to100 mL

= 注意 =

組換え実験室内ですので飲食・喫煙はご遠慮ください。

＜メモ＞

氏名

© 2018 H. Kuwayama