

## *Saccharomyces* 属酵母における近縁種間の生殖隔離

杉原 千紗\*、中野 圭介、大野 雄之、大和 宏一郎、石橋 修一、久富 泰資

系統的に近縁性を示す *Saccharomyces cerevisiae* と *Saccharomyces paradoxus* のヘテロタリック株を用いて、生殖隔離の実態を解析した。集団交雑法では種間交雑の接合率は *S. cerevisiae* の種内交雑のそれに比べて約半分まで減少したが、*S. paradoxus* の種内交雑の場合より約5倍上昇し、両種間で有意に雑種を形成できることが明らかとなった。DAPIで核を観察したところ、種間雑種細胞においても核が融合して1核になっていることが確認された。次に、種間雑種の孢子形成能を調べたところ、種間雑種は種内雑種に比べて約半分の孢子形成率を示し、DAPIによる核観察においても、子囊中の4個の孢子に核が一つずつ分配されていることが確認された。そこで、種間雑種由来の孢子を顕微解剖器で分離したところ、それらの孢子はほとんど発芽しない（孢子発芽率は4%未満）ことが明らかとなり、*S. cerevisiae* と *S. paradoxus* の間には接合後隔離が生じていることが判明した。この接合後隔離の生起機構を明らかにするために、種間雑種の染色体編成を電気泳動核型解析法で調べたところ、種間雑種は必ずしも親株由来の全ての染色体を保持しているわけではなく、染色体に欠失や組換えが数多く生じていることがわかった。このように、配偶子不稔は、種間での染色体の不和合性に起因することが示唆された。また、*S. cerevisiae* の第10番染色体及び *S. paradoxus* の第11番染色体に異常が生じると孢子発芽能の欠損につながることを推定された。

キーワード：*Saccharomyces* 属酵母、*S. paradoxus*、*S. cerevisiae*、生殖隔離、種間雑種、配偶子不稔、接合後隔離、染色体不和合性、染色体進化

酵母の分類は、当初 Yarrow (1984) による糖類の資化性・発酵性、薬剤耐性度、37°Cでの増殖の有無、コロニーの色・形状といった主に生理学的特徴に基づいて分類されていた<sup>1)</sup>が、DNA再会合性試験<sup>2)</sup>、GC含量<sup>3)</sup>、電気泳動核型<sup>4)</sup>による分類が報告され、90年代に入ると rDNA<sup>5)</sup>や ITS領域<sup>6) 7)</sup>の塩基配列の比較など、分子レベルでの基準による分類が提起されるようになった<sup>8-13)</sup>。酵母はおおよそ98属678種に分けられるとされている<sup>14)</sup>が、その中でも *Saccharomyces* 属酵母は高い発酵性を有し、工業的によく用いられている。

---

〒729-0292 福山市学園町1番地三蔵 福山大学生命工学部生物工学科

\*Tel: +81-84-936-2111, Fax: +81-84-936-2023, E-mail: csugihar@bt.fubt.fukuyama-u.ac.jp

しかしながら、*Saccharomyces* 属酵母の生殖的な隔離を基準とした純生物学的な分類に関しては未知の点が多い。その主な原因として、野生から分離される *Saccharomyces* 属酵母の大多数が自己 2 倍体化するホモタリズムの生活環を有することが挙げられる。*Saccharomyces paradoxus* は、自然界に生息する酵母として分離され<sup>15)</sup>、18S rDNA の塩基配列に基づく分子系統学的解析からパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に近縁であり、Vaughan-Martini ら (1998) による DNA 再会合性試験では *S. cerevisiae* と 55% のゲノム DNA の相同性がある<sup>16)</sup>。また、*Saccharomyces* 属酵母の中でも比較的高い孢子形成率を示し、ゲノムサイズは約 11Mbp であり、*S. cerevisiae* のそれよりも僅かに小さいが、*S. cerevisiae* と同様 16 本の染色体から構成されている<sup>17)</sup>。

Kodama ら (2003) は、*S. paradoxus* のホモタリック基準株のホモタリズム遺伝子を破壊することにより、*S. paradoxus* のヘテロタリック株を分離することに成功した<sup>18)</sup>。著者らは、この株を用いて *S. paradoxus* と *S. cerevisiae* の種間における接合能・孢子形成能・孢子発芽能について詳細な解析を行った。その結果、種間においても接合に引き続き孢子形成までは進行するが、形成された孢子には発芽能がほとんどないことがわかった。つまり、種間交雑を通して配偶子不検が引き起こされ、接合後隔離が生じていることが明らかとなった。さらに、この現象が種間雑種 (F1) における染色体編成異常に起因することを示唆した。

## 実験方法

**使用菌株** 本研究で使用した菌株を表 1 に示した。

表 1. 使用菌株とその遺伝子型

菌株名	遺伝子型
<i>S. paradoxus</i>	SP41 <i>MATa</i> <i>leu2</i>
	SP42 <i>MATα</i> <i>ile1</i>
	SP12 <i>MATa</i> <i>lys1</i>
	SP7 <i>MATα</i> <i>his1</i>
	FSP2-3C <i>MATa</i> <i>ura3(ScURA3)</i>
	FSP2-2D <i>MATα</i> <i>ura3(ScURA3)</i>
	<i>S. cerevisiae</i>
A31 <i>MATα</i> <i>ade6 ura2</i>	
E11 <i>MATα</i> <i>arg1</i>	
G06 <i>MATα</i> <i>ade7 ura1</i>	
G19 <i>MATα</i> <i>arg4 asp5</i>	
A06 <i>MATa</i> <i>hys7 lys2 tyr1</i>	
A07 <i>MATa</i> <i>arg4 lys1 met3 thr3 pea2</i>	
A12 <i>MATa</i> <i>arg5 his7 ura4</i>	
A15 <i>MATα</i> <i>arg4 trp3 ura1</i>	
A26 <i>MATa</i> <i>ade6 his4 leu2 thr4</i>	
A35 <i>MATa</i> <i>leu1</i>	
A53 <i>MATα</i> <i>lys2 tyr1 his7</i>	
C03 <i>MATα</i> <i>ura3 arg9</i>	
E08 <i>MATa</i> <i>lys5 trp5 leu1 ade6</i>	
G07 <i>MATa</i> <i>ade7 ura1 gal2</i>	
G09 <i>MATα</i> <i>lys2 tyr1 his7 ura1</i>	
G14 <i>MATa</i> <i>trp1 met14</i>	
G15 <i>MATα</i> <i>his7 ura1 trp1</i>	
2-5-B <i>MATa</i> <i>hys7 lys2 tyr1</i>	
1-1-D <i>MATa</i> <i>tyr1</i>	
T55 <i>MATa</i>	
T56 <i>MATα</i>	

集団交雑法による接合率の測定 (接合子観察法) 10 ml の YPD 液体培地 (Bacto Yeast Extract 1%,

Bacto Peptone 2 %, Glucose 2 %) に試験菌株をそれぞれ別個に植菌した。26°Cで一晩振とう培養し、対数増殖期 (OD<sub>600</sub>3-4) で集菌して、両菌株の吸光度が OD<sub>600</sub>1.0 になるように YPD 液体培地で調製した。これを YPD 液体培地 2 ml に 0.5 ml ずつ植菌し、26°Cで振とうしながら最大 10 時間まで培養し、1 時間毎に培養液を分取した。最終濃度が 1.85%になるようにホルマリン溶液を加え、酵母細胞を固定した後、顕微鏡下で 200-300 個の細胞を観察した。接合率は以下の式により算出した (接合子数を X 個、単独細胞数を Y 個とする)。

$$\frac{2X}{2X+Y} \times 100 \quad (\%)$$

**胞子形成率の測定** 雑種細胞を YPD 寒天培地上に接種して増殖させた後、SPO 培地 (Potassium Acetate 1 %, Bacto Yeast Extract 0.1 %, Glucose 0.05 %, Agar 2 %) 上に接種して 26°Cで 7 日間培養した。顕微鏡下で 200 細胞以上を観察し、胞子形成率を以下の式により求めた (2 胞子または 4 胞子から成る子嚢数を A 個、栄養細胞数を B 個とした)。

$$\frac{A}{A+B} \times 100 \quad (\%)$$

**胞子の発芽率の測定** 栄養細胞を SPO 培地上に接種して 26°Cで 2 日間培養して得られた子嚢胞子を、Zymolyase-20T (1mg/ml) 溶液中で 37°Cで 15 分間処理し、子嚢壁を分解した後、顕微解剖器で各交雑につき 25 子嚢分を YPD 培地 (スラブ) 上に胞子分離した。これを、26°Cで 2 日間培養した。その後、YPD 培地上に生育してきたクローンを観察し、胞子の発芽率を以下の式により算出した (YPD 培地上での発芽増殖クローン数を C 個、分離した全胞子数を D 個とした)。

$$\frac{C}{D} \times 100 \quad (\%)$$

**DAPI による酵母の核染色** 1.5 ml 容マイクロチューブに試験菌培養液を 1 ml 入れ、集菌 (3000 rpm, 室温, 10 分) した。これをオートクレーブ済み MilliQ 1 ml に懸濁し、集菌 (同上) して上清を捨てた。次に 95% エタノール溶液を 1 ml 加えて固定した (室温, 5 分)。これに DAPI 溶液を最終濃度 1 μg/ml になるように加えて、染色 (室温, 20 分) した後、オートクレーブ済み MilliQ 1 ml で 3 回洗浄後、オートクレーブ済み MilliQ 50 μl に懸濁して蛍光顕微鏡で核の形態を観察した。

**パルスフィールドゲル電気泳動 (CHEF 型)** 菌体を 10 ml YPD 液体培地に植菌して 26°Cで一晩培養し、これを 50 ml 遠沈管で集菌 (3000 rpm, 室温, 10 分) した。上清を捨て滅菌水 10 ml に懸濁後、洗浄 (3000 rpm, 室温, 10 分) し、これを 2 回行った。上清を捨て、細胞容量 : 0.05 M EDTA 溶液 = 2 : 3 の容積比になる様に、0.05 M EDTA 溶液 (pH 8.0) を加え懸濁した。細胞懸濁液 150 μl、Zymolyase 20T (25 mg/ml) 溶液 50 μl を 1.5 ml 容マイクロチューブに入れ、十分にピペティングし、ローテーターで緩やかに回転させながらインキュベート (37°C, 20 分) した。低融点アガロースゲル (1 % LMTA, 0.125 M EDTA pH 7.5) 600 μl を加えてピペティングして素早くモールドチャンバーに流し込み、冷却固化 (4°C, 20 分) した。上記のようにして作製したプラグを、火炎滅菌済みマイクロスパーテルでエチレンオキシドガス滅菌済みの 35 mm

径プラスチックシャーレに移して LET buffer (0.5 M EDTA pH 8.0, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.075 % mercaptoethanol) 3 ml 中でインキュベート (37°C, 一晚) した。NDS buffer (0.5 M EDTA pH 8.0, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mg/ml sodium N-dodecanoyl sarcosinate, 3 mg/ml proteinase K ) 3 ml に入れ換えてインキュベート (50°C, 一晚) した。そして、0.05 M EDTA 溶液 (pH 8.0) 3 ml に入れ換えて室温で静置 (15 分) し、新しい 0.05 M EDTA 溶液 (pH 8.0) 3 ml に入れ換えて室温で一晩静置した。これを泳動用プラグとした。一方、500ml 三角フラスコに Ultra Pure Agarose (Invitrogen 社) 1.08 g を入れ、0.5×TBE buffer 120 ml で溶解し、gel casting stand (濡らした黒い下敷きをひいて密着させ、コームをセットしたもの) に流し入れた。表面が固まり始めたら冷蔵庫で完全固化 (4°C, 20 分) させた。火炎滅菌したマイクロスパーテルでウェルの深さの 50 % にプラグを切り、ウェルに泳動用プラグを入れ、穴埋め用ゲル (0.8 % Agarose LGT, 0.5×TBE buffer pH 8.0) で隙間を埋め、冷蔵固化 (4°C, 20 分) した。予め 14°C に冷却しておいた 0.5×TBE buffer pH 8.0 約 3 L を泳動槽に入れ、作製したゲルをセットした。そして CHEF DR- II (Bio-RAD 社) を用いて、[Initial A time:60 秒, Final A time:60 秒, Run time:15 秒, Mode:10, Volts:200] , [Initial A time:90 秒, Final A time:90 秒, Run time:8 秒, Mode:11, Volts:200] , buffer の温度 : 14°C の条件下で一晩泳動した。このゲルを染色液 (0.5 μg/ml ethidium bromide, 0.5×TBE buffer pH 8.0) 中にて緩やかに振とう染色 (30 回/分, 1 時間) した後、蒸留水ですすいで紫外線照射下で写真撮影した。

## 結果および考察

### 種間交雑

*Saccharomyces* 属酵母において、系統的に近縁な種間の酵母ではどのような生殖隔離が生じているのかを調べるために、*S. cerevisiae* と *S. paradoxus* のヘテロタリック株を用いて種内と種間における性的相互作用について解析を行った。まず最初に接合の可否を調べた。接合率は、集団中における接合子の出現頻度を顕微鏡下で観察して算出した。その結果、*S. cerevisiae* 種内の接合率が最も高く、次に *S. cerevisiae* と *S. paradoxus* の種間交雑、そして *S. paradoxus* 種内の順であった。また、種内交雑では 7 時間、種間交雑では 8 時間で接合率がピークに達した。このことから、*S. cerevisiae* と *S. paradoxus* の種間では相対する接合型の細胞間で有意に接合が起こることがわかった。また *S. paradoxus* の 1 倍体株は *S. cerevisiae* の 1 倍体株との方が効率よく接合することがわかった (図 1)。

### 種間雑種の孢子形成

次に、*S. cerevisiae* と *S. paradoxus* の種間雑種における孢子形成能について調べた。種間雑種株の 4 孢子形成率

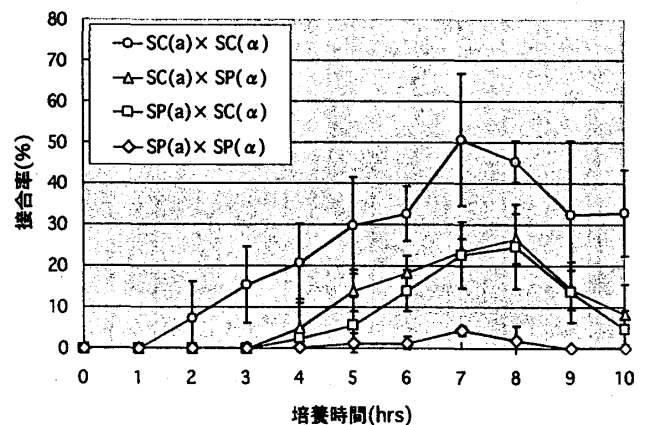


図 1. 集団交雑での種内及び種間での接合率  
SC(a):*S.cerevisiae* T55(a)株, SC(α): *S.cerevisiae* T56(α)株, SP(a):*S.paradoxus* FSP2-3C(a)株, SP(α): *S.paradoxus* FSP2-2D(α)株を集団交雑させ、顕微鏡下で接合子形成率を測定した。

は、*S. cerevisiae* 種内雑種で見られる4孢子形成率の約2/5、*S. paradoxus* 種内雑種で見られる4孢子形成率の約1/2程度の値を示し、種間雑種株の2孢子形成率では、*S. cerevisiae* 種内雑種で見られる2孢子形成率の約7/10、*S. paradoxus* 種内雑種で見られる2孢子形成率の約7/10程度の値を示した(図2)。このことから、*S. cerevisiae* と *S. paradoxus* の種間雑種における孢子形成率は、種内雑種に比べてある程度低下しているものの、2孢子または4孢子を有意に形成することができることがわかった。では、種間雑種から形成された孢子は発芽することができるのだろうか?

**種間雑種由来の孢子発芽**

*S. cerevisiae* と *S. paradoxus* の種間雑種由来の子嚢からの孢子発芽率を図3に示す。*S. cerevisiae* の種内雑種由来では98%、*S. paradoxus* の種内雑種由来では85%、*S. cerevisiae* と *S. paradoxus* の種間雑種由来では4%未満(*SC(a)×SP(α)*の場合)及び1%未満(*SP(a)×SC(α)*の場合)の孢子発芽率を示した。このように、種間雑種由来の孢子では発芽しないか、もしくは著しく低い発芽率であった。このことより、*S. cerevisiae* と *S. paradoxus* の種間ではF1由来の配偶子が不稔性を示す接合後隔離が生じていることが明らかとなった。

**種間雑種及び子嚢孢子における核の形態**

*S. cerevisiae* と *S. paradoxus* の種間雑種やそれから生じた孢子の核の様子をDAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)による核染色で観察した。DAPIはDNAのアデニンとチミンの塩基対に特異的に結合する蛍光色素で、UV 300 nm-400 nmを照射すると青い蛍光を発する。結果、図4の上に見られるように、種間雑種においても、核が正常に融合していることが観察された。また、図4の下に見られるように、減数分裂、孢子形成により得られた4個の子嚢孢子のそれぞれに1個ずつの核が分配されていることが確認できた。以上のことから、種間交雑では、接合→雑種栄養細胞形成→孢子形成時の核分配は正

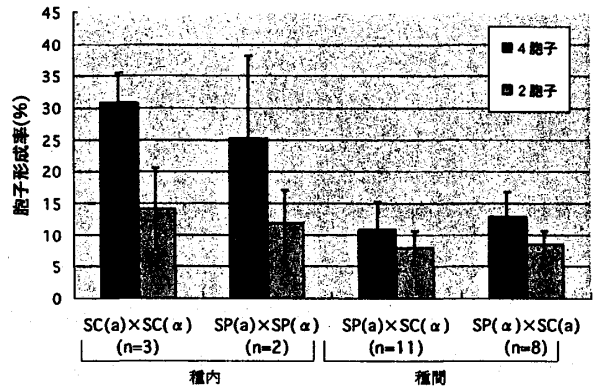


図2. 種内及び種間における孢子形成率

SC(a)×SC(α)では1-1-D×G15、2-5-B×G15、A31×J1からのデータ。SP(a)×SP(α)ではSp12×Sp7、SP41×SP42からのデータ。SC(a)×SP(α)では1-1-D×Sp7、2-5-D×Sp7、A06×SP42、A07×SP42、A12×SP42、A26×SP42、A35×SP42、E08×SP42、G07×SP42、G14×SP42、J1×SP42からのデータ。SP(a)×SC(α)ではSp12×G15、SP41×A31、SP41×A53、SP41×C03、SP41×E11、SP41×G06、SP41×G15、SP41×G19からのデータ。

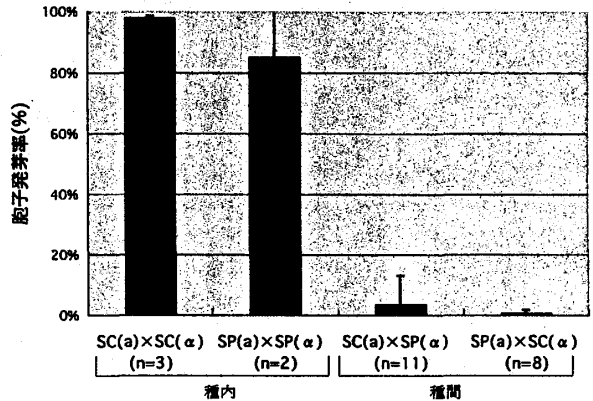


図3. 種内及び種間での孢子発芽率

SC(a)×SC(α)では1-1-D×G15、2-5-B×G15、J1×A31からのデータ。SP(a)×SP(α)ではSp12×Sp7、SP41×SP42からのデータ。SC(a)×SP(α)では1-1-D×Sp7、2-5-D×Sp7、A06×SP42、A07×SP42、A12×SP42、A26×SP42、A35×SP42、E08×SP42、G07×SP42、G14×SP42、J1×SP42からのデータ。SP(a)×SC(α)ではSp12×G15、SP41×A31、SP41×A53、SP41×C03、SP41×E11、SP41×G06、SP41×G15、SP41×G19からのデータ。

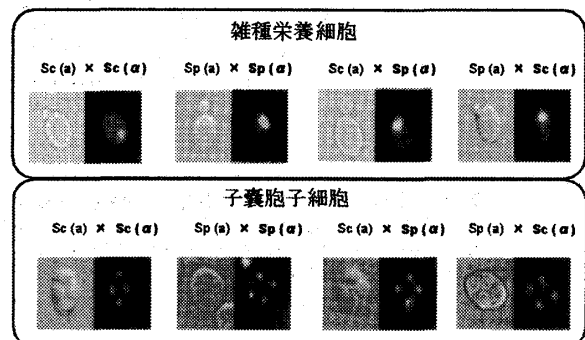


図4. 種内と種間での雑種栄養細胞と子嚢孢子のDAPI染色

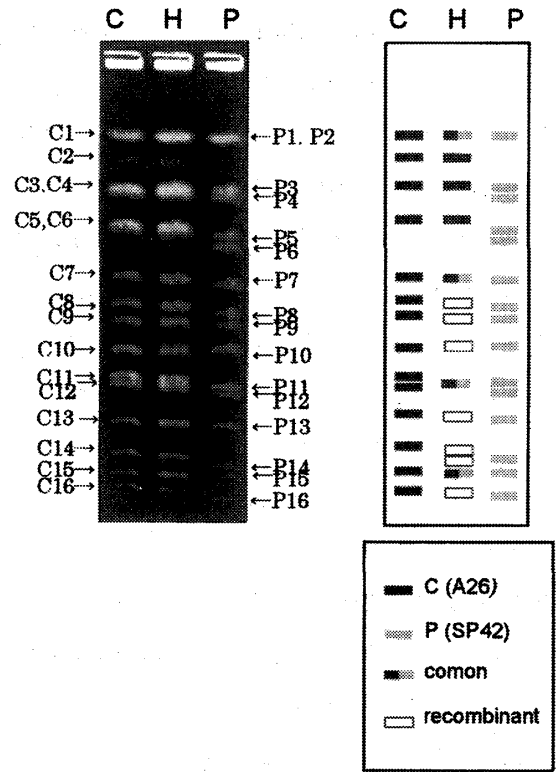
常に行われていると考えられた。それでは *S. cerevisiae* と *S. paradoxus* の種間における F1 雑種由来胞子の発芽能の欠損は、どのようにして起きるのだろうか？

**種間雑種株の染色体編成**

種間雑種 (F1) において形成された胞子が発芽しなかった雑種栄養細胞の染色体編成を詳細に解析した。図 5 は、CHEF 型パルスフィールドゲル電気泳動法による親株と種間雑種の核型解析の例を示している。*S. cerevisiae* と *S. paradoxus* の染色体 DNA に高分子側から順に 1 番から 16 番までの染色体 DNA 番号 (*S.*

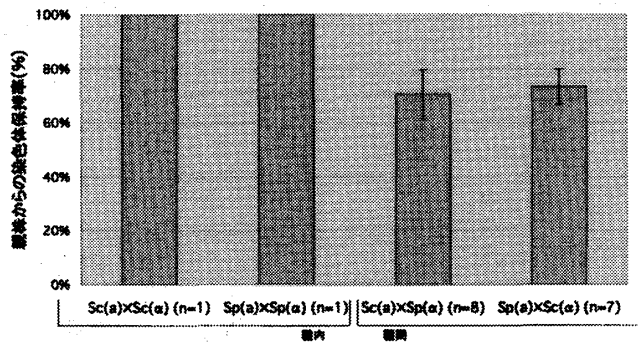
*cerevisiae* で一般的に使用されている染色体番号とは異なる点に注意) を付け、種間雑種での染色体編成を解析した。その結果、種間雑種株では親株由来の染色体 DNA を必ずしも全て保持しているわけではなく、持ち込まれた染色体 DNA に欠失や体細胞組換えが数多く生じていることがわかった。親株に由来する染色体の欠失や組換えの状況を図 6 にまとめた。

種内雑種では図 6 に示すように、両方の親株の染色体を全て保持している。一方、種間雑種では親株からの約 30% の染色体を保持できていない。図 7 に示す



**図 5. CHEF 型パルスフィールドゲル電気泳動法による核型解析の一例**

C は *S. cerevisiae* を、P は *S. paradoxus* を、H は種間雑種を示す。染色体の分子量の大きいものから順に C1-C16 及び P1-P16 と染色体番号を決め、Diversity Database Quantity One ソフト (pdi 社) を用いて移動度と相対発色度により各染色体が欠失もしくは組換えしているかを解析した。



**図 6. 種内と種間の F1 における親株由来染色体の保持率**

Sc (a) × Sc (α) では J1 × A31 からのデータ。Sp (a) × Sp (α) では SP41 × SP42 からのデータ。Sc (a) × Sp (α) では A06 × SP42, A12 × SP42, A26 × SP42, A35 × SP42, E08 × SP42, G07 × SP42, G14 × SP42, J1 × SP42 からのデータ。Sp (a) × Sc (α) では SP41 × A31, SP41 × A53, SP41 × C03, SP41 × E11, SP41 × G06, SP41 × G15, SP41 × G19 からのデータ。

Saccharomyces 属酵母における近縁種間の生殖隔離

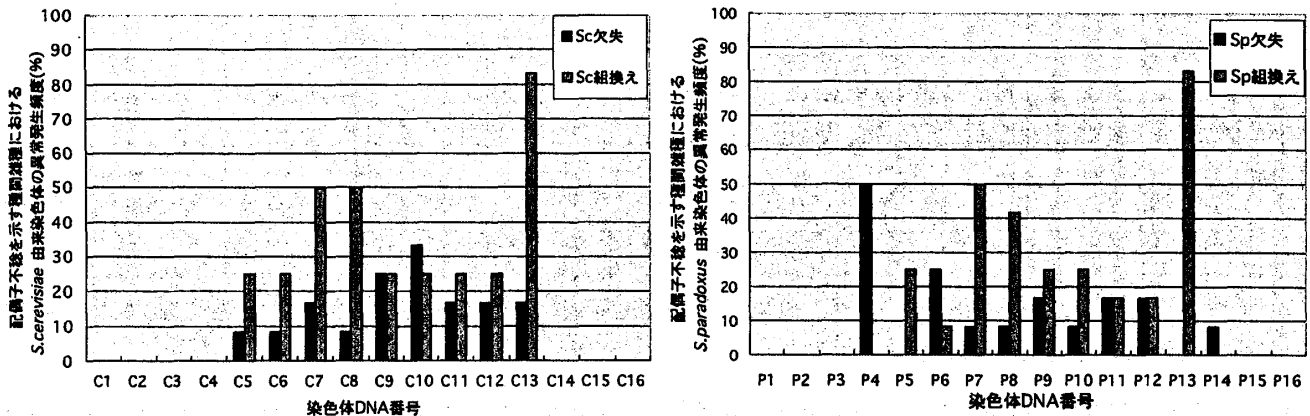


図 7. 種間雑種 (F1) からの胞子が発芽しなかった雑種栄養細胞の染色体組成  
 Sc (α) × Sp (α) では A06 × SP42, A12 × SP42, A35 × SP42, E08 × SP42, G07 × SP42, J1 × SP42 からのデータ。  
 Sp (α) × Sc (α) では SP41 × A31, SP41 × A53, SP41 × E11, SP41 × G06, SP41 × G15 からのデータ。

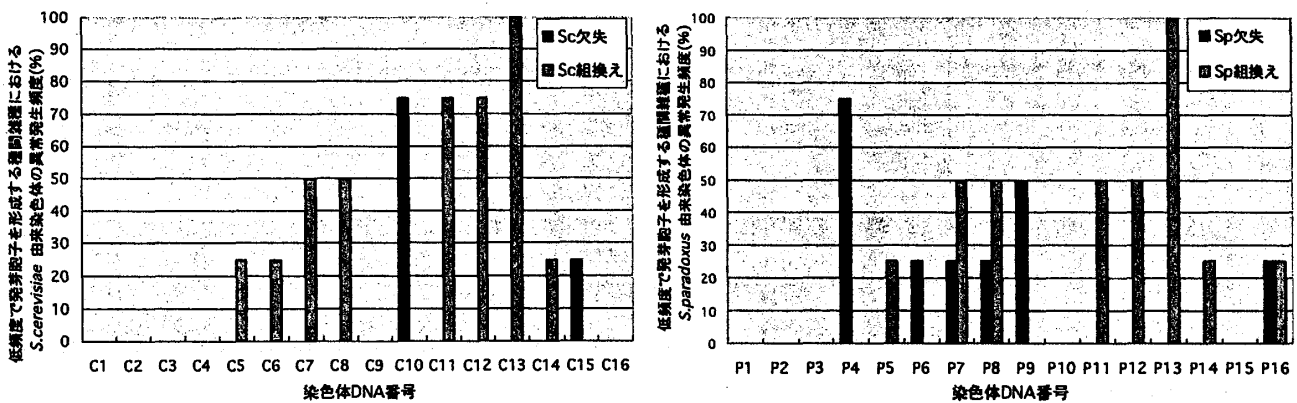


図 8. 種間雑種 (F1) から低頻度で胞子が発芽した雑種栄養細胞の染色体組成  
 Sc (α) × Sp (α) では A26 × SP42, G14 × SP42 からのデータ。Sp (α) × Sc (α) では SP41 × C03, SP41 × G19 からのデータ。

ように種間交雑で胞子が発芽しなかった株では、*S. cerevisiae* と *S. paradoxus* の染色体番号 C13, P13 (共に第 9 番染色体に相当) において高頻度な組換えが生じていた。しかしながら、種間交雑で低頻度ながらも胞子が発芽した雑種栄養細胞においても染色体 DNA 番号 13 に組換えが生じていた。また、種間雑種で胞子が発芽した株では、*S. cerevisiae* の染色体番号 C9 (第 10 番染色体に相当) と *S. paradoxus* の染色体番号 P10 (第 11 番染色体に相当) が比較的良好に保持されていた (図 8)。このことから、*S. cerevisiae* と *S. paradoxus* の種間雑種 (F1) において、*S. cerevisiae* の第 10 番染色体及び *S. paradoxus* の第 11 番染色体が保持されるような細胞では、低頻度ながらも胞子発芽が可能になるのではないかと考えられた。また、胞子が発芽した種間雑種株では、*S. cerevisiae* からの染色体 DNA の欠失や組換えが少なかったことから、発芽した株では比較的 *S. cerevisiae* の性質を多く引き継いでいると考えられた。以上述べてきた染色体の不和合性を生じさせるような染色体の多様化は、どのようにして進化してきたのかに興味を持たれるところである。

文献

- 1) Yarrow, D. *Saccharomyces* Meyen ex Reess. In *The Yeasts: A taxonomic study* (Kreger-van Rij, N, J.W. ed.) , 379-395, Elsevier Nederland BV, Amsterdam (1984)
- 2) Vaughan-Martini, A. and Kurtzman, C.P. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces sensu stricto*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **35**, 508-511 (1985)
- 3) Kurtzman, C.P. Molecular taxonomy of fungi. In *Gene manipulation in fungi* (Barnet, J.W. and Lasure, L.L. eds.), 35-56, Academic Press, New York. (1985)
- 4) Vaughan-Martini, A., Martini, A, Cardinali, G. Electrophoretic karyotyping as a taxonomic tool in the genus *Saccharomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **63**, 145-156 (1993)
- 5) Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J. Phylogenetic relationships among species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces* and *Schwanniomyces* determined from partial ribosomal RNA sequences. *Yeast*, **7**, 61-72 (1992)
- 6) James, S.A., Collins, M.D., and Roberts, I.N. Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspota*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**, 189-194 (1996)
- 7) Oda, Y., Yabuki, M., Tonomura, K., and Fukunaga, M. A phylogenetic analysis of the *Saccharomyces* species by the sequence of 18S-28S rRNA spacer regions. *Yeast*, **13**, 1243-1250 (1997)
- 8) Lodder, J. and Kreger van Rij, N.J.W. *The Yeasts, a taxonomic study*. North Holland Publishing Company, Amsterdam (1952)
- 9) Lodder, J. *The Yeasts, A taxonomic study*, 2nd ed. North Holland Publishing Company, Amsterdam (1970)
- 10) Barnett, J.A., Payne, R.W., and Yarrow, D. *Yeasts, Characteristics and identification*. Cambridge University Press, Cambridge (1983)
- 11) Kreger van Reij, N.J.W. *The Yeasts, A taxonomic study*, 3rd ed. Elsevier Science Publishing Company, Amsterdam (1984)
- 12) Barnett, J.A., Payne, R.W., and Yarrow, D.: *Yeasts, Characteristics and identification*, 2nd ed. Cambridge University press, Cambridge (1990)
- 13) Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. *The Yeasts, A taxonomic study*, 4th ed. Elsevier Science, Amsterdam (1998)
- 14) Barnett, J.A., Payne, R.W. and Yarrow D. *Yeasts, Characteristics and identification*, 3rd ed. Cambridge University press, Cambridge (2000)
- 15) Naumov, G.I. Genetic analysis for classification and identification of the ascomycetous yeasts. *Stud. Microbiol.*, **30**, 469-475 (1987)



- 16) Vaughan-Martini, A. and Martini, A. *Saccharomyces* Meyen ex Reess, In *The Yeasts, A taxonomic study*. 358-371 (1998)
- 17) Kellis, M., Patterson N., Esdrizzi M., Birren B., Lander E.S. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature*, **423**, 241-254 (2003)
- 18) Kodama, T., Hisatomi, T., Uchida, K., Yamaki, T., and Tsuboi, M. Isolation and characterization of the *HO* gene from the yeast *Saccharomyces paradoxus*. *FEMS Yeast Research* **4**, 51-57 (2003)

\*\*\*\*\*

Annu. Rep. Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ. (7), 1-10 (2008)

**Reproductive isolation system between phylogenetically neighboring yeasts  
in the genus *Saccharomyces***

Chisa Sugihara, Keisuke Nakano, Katsuyuki Oono, Kouichirou Yamato, Syu-ichi Ishibashi, and Taisuke Hisatomi

Department of Biotechnology, Faculty of Life Science and Biotechnology, Fukuyama University,  
Fukuyama, Hiroshima 729-0292, Japan

The yeast *Saccharomyces paradoxus* is phylogenetically close to *Saccharomyces cerevisiae*, laboratory strains of which have been well characterized and systematically investigated. In this study, sexual interactions between these two yeasts were analyzed to clarify the reproductive isolation system laid on phylogenetically neighboring species. It was revealed that mating processes between these two yeast species effectively proceeded on the results of mass-mating tests using their heterothallic strains, with interspecific crosses showing intermediate scores of mating efficiency between those of intraspecific ones. The interspecific hybrid between *S. paradoxus* and *S. cerevisiae* was shown to have one fused nucleus and to promote sporulation on sporulation media, resulting in four nuclei an ascus. However, the spores derived from the interspecific hybrid hardly germinated, indicating that two yeast species were postzygotically isolated each other. Then, the chromosome DNA organization of the vegetative cells from the interspecific hybrid was examined with pulsed-field gel electrophoresis methods to elucidate the incidence of infertile gametes from the interspecific F1 hybrid. It was revealed that chromosome losses and/or abnormal mitotic recombinations among chromosomes derived from the two parent species occurred in the interspecific F1 hybrid, suggesting that these irregular organization of chromosomes led to infertile gametes having incomplete entities of genome. The tendency of abnormality in chromosomes was discussed from the viewpoint of incompatibility of chromosomes in the F1 hybrid and chromosome evolution in the genus *Saccharomyces*.

杉原千紗、中野圭介、大野雄之、大和宏一郎、石橋修一、久富泰資

**Key words : *Saccharomyces* yeasts, *S. paradoxus*, *S. cerevisiae*, reproductive isolation, interspecific hybrids, infertile gametes, postzygotic isolation, incompatibility of chromosomes, chromosome evolution**