

セルソーターを用いたテトラヒメナのクローニング

森 光太郎¹, 柏木 明子², 四方 哲也^{1,3,4}(¹阪大院生命機能, ²弘大農学生命, ³阪大院情報科学, ⁴ERATO 複雑系生命プロジェクト)Cloning of *Tetrahymena* cells using cell sorterKotaro MORI¹, Akiko KASHIWAGI² and Tetsuya YOMO^{1,3,4} (¹Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University ² Faculty of Agriculture and Life Sciences, Hirosaki University, ³Department of Bioinformatics Engineering, Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University, ⁴Complex Systems Biology Project, ERATO, JST)

SUMMARY

We developed a cloning method for *Tetrahymena* cells using fluorescence activated cell sorting (FACS). This new cloning method can isolate mutants due to the phenotype (using size, fluoresce intensity, etc.) quantitatively and achieve a high through-put. We previously developed a chemically defined medium (CDM mini15) that was modified from the CDM of Szablewski et al (1991). In this study, we found that *Tetrahymena* cells could proliferate from 10 cells/ml (= 1 cell/100 μ l) in CDM mini15 containing BSA. By supplementing CDM mini15 with BSA, we can isolate single mutant cells based on their nutritional requirements. We tried to sort single cells into a broth medium of PPYG and CDM mini15 with BSA, and divide it over 96-well plates. The percentage of wells in which surviving cells were found were 93% and 44%, respectively.

[目的] テトラヒメナ細胞をクローニングする際は、顕微鏡下でピペットによる単離あるいは希釈してマルチウェルプレートへ分注するという方法が行われている^{1,2}。本研究ではテトラヒメナのクローニングにセルソーターを用いることを検討した。セルソーターを用いることによってテトラヒメナ細胞のクローニングはハイスループット化することができ、また、目的とする表現型（サイズや蛍光強度）を持った細胞をクローン化することが可能になると期待される。つまり、セルソーターを使えば、表現型を量的に評価した細胞を選ぶことができる。クローニングを完全合成培地で行うことができれば、栄養要求性などの情報を得ることができて有用である。しかしながら、完全合成培地でテトラヒメナを低密度から増殖させることは一般に困難である。そこで、本研究では1細胞（密度としては10細胞/ml）から増殖することのできる完全合成培地を開発し、これを使ってクローニングすることを検討した。

[方法] テトラヒメナ (*Tetrahymena thermophila*) SB210 系統を使用した。1細胞（密度としては10細胞/ml）から増殖することのできる完全合成培地の開発には、完全合成培地³を改変した培地（以下 mini15）（Kashiwagi 未発表）に Christensen と Rasmussen⁴が示唆した BSA の添加を検討した。セルソーターを使用した解析には mini15 で 30°C、静置で1日培養し、対数増殖期の培養液を遠心して培地を除去し、Tris バッファ (pH7.4) で置換した細胞溶液を供試した。テトラヒメナはセルソーター FACS Aria (BD) で通常使用される細胞よりも非常に大きいため、FACS は独自にカスタマイズしたフローモードで使用した。ドロップディレイ調整も細胞サイズが大きいため、通常の Accudrop ピーズによる調整では

うまくいかず、微調整を要した。クローニング効率の測定には 96 穴プレート (Nunc nunclon Δ surface) に PPYG (proteose peptone 0.4%, yeast extract 0.2%, glucose 1.0%) または mini15 を 100 μ l あらかじめ入れておき (mini15 の場合は BSA を添加)、そこへ1細胞ずつソーティングした。ソーティングしたウェルをソーティング直後とその後毎日顕微鏡観察し、細胞が増殖しているウェルを数え、生細胞が存在するウェルをクローニング成功とした。

[結果と考察] BSA を mini15 へ添加することによって、10細胞/ml の密度からでも増殖させることができた。つまり、96穴プレートのウェルに 100 μ l の培地を入れた場合に1細胞から増殖できる計算になる。しかしながら、BSA はアミノ酸から成るため、添加した BSA がアミノ酸源として機能する場合、アミノ酸要求性をもとにテトラヒメナのクローニングができないことになる。これについて調べたところ、BSA の添加によってアミノ酸成分が相補されることはなかった。以上からテトラヒメナのアミノ酸要求性を調べることでできる培地組成が明らかになった。次にこの培地を使い、FACS によってクローニングができるかどうか調べた。今回は FSC-SSC 平面に表示された全テトラヒメナ集団をターゲットとして1細胞/ウェルとなるようにソーティングした。ソーティング直後にウェルを観察すると、2細胞以上存在するウェルはなかった。7日目には PPYG を入れたウェルでは 96 個のウェルのうち 93% のウェルで細胞の増殖が観察された。一方、完全合成培地 mini15 を入れたウェルでは 96 個のウェルのうち増殖の観察されたウェルは皆無であったが、BSA を添加した mini15 を入れたウェルでは 96 個のウェルのうち 44% のウェルで細胞の増殖が観察された。以上の

ように、テトラヒメナ細胞をセルソーターによって PPYG および完全合成培地を利用してクローニングできることが示唆された。

[文献]

1. Schousboe, P., Christensen, M., Ghiladi, M. and Rasmussen, L., (1992) *J. Protozool.* 39(2), 343-345.
2. Hellung-Larsen P., (2005) *J. Biotechnol.* 115, 167-177.
3. Szablewski, L., Andreasen, P.H., Tiedtke, A., Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M. and Rasmussen, L., (1991) *J. Protozool.* 38(1), 62-65.
4. Christensen, S.T. and Rasmussen, L., (1992) *Acta Protozool.* 31, 215-219.