

## フローサイトメーターによるテトラヒメナの集団の分布解析

富田 憲司<sup>1</sup>, 森 光太郎<sup>2</sup>, 柏木 明子<sup>3</sup>, 四方 哲也<sup>1,2,4</sup> (<sup>1</sup>阪大院情報科学, <sup>2</sup>阪大院生命機能, <sup>3</sup>弘大農学生命, <sup>4</sup>ERATO 複雑系生命プロジェクト)

Flow cytometrical analysis of a *Tetrahymena thermophila* population

Kenji TOMITA<sup>1</sup>, Kotaro MORI<sup>2</sup>, Akiko KASHIWAGI<sup>3</sup> and Tetsuya YOMO<sup>1,2,4</sup> (<sup>1</sup>Department of Bioinformatics Engineering, Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University<sup>2</sup>Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University<sup>3</sup> Faculty of Agriculture and Life Sciences, Hirosaki University, <sup>4</sup>Complex Systems Biology Project, ERATO, JST)

## SUMMARY

In a co-culture of *Tetrahymena thermophila* and *Escherichia coli* that expresses RFP, we can observe not only fluctuations of population but also phenotypic variations of each organism. In order to observe the phenotypic variation in the co-culture system, we analyzed the co-culture using a flow cytometer, which allowed us to measure parameters of forward scatter, side scatter and fluorescence of single cells. As a result, we found that the distribution of the *Tetrahymena* population, especially based on data from red fluorescence, varied more in co-culture than in single-culture. We guess this variation results from the fact that *Tetrahymena* preyed on *E.coli*. Cell sorting and microscopic observation may allow us to confirm this. We suggest that flow cytometrical analysis can be a powerful tool to elucidate the multi-variate dynamics of a co-culture system.

【目的】細胞内共生説によると葉緑体やミトコンドリアは宿主細胞が取り込んだ細菌類が細胞内共生を経てオルガネラ化したものであると言われているが、既に細胞内共生関係にある生物の例は報告されている<sup>1,2</sup>ものの、独立した生物がどのような過程を経て細胞内共生に至るかを実験的に解明した例はない。これを明らかにするひとつの方法として、自然界で共生関係に無く、一方が他方を取り込むことができる2種の生物を共培養し、どのようにそれぞれの生物が変化していくかを観察することが有効であると考えた。生物の共培養系を個体数の変化の側面だけから調べた例は過去に報告されているが<sup>3</sup>、実際は同種の生物でも体の大きさなど形質は個体によって様々である。このばらつきが共培養においてどのように変化していくのかを理解するため、集団平均ではなく1細胞ごとに形質を観察できるフローサイトメーターを使用することにした。本研究では、捕食性の原生動物であるテトラヒメナとその被食者として大腸菌(赤色蛍光タンパクを発現している)の2種の生物を共培養し、生物細胞一つ一つの大きさ、内部構造の複雑さ、GFP 蛍光強度、RFP 蛍光強度(機器上それぞれ FS,FL1,FL2,FL3 の値として取得される)

を高速で測定できるフローサイトメーターを用いて、テトラヒメナと大腸菌の共培養の集団がどのように測定できるかの基礎知見を得ることを目的とした。

【材料と方法】テトラヒメナ (*Tetrahymena thermophila*) SB210 株とテトラヒメナの捕食対象として、IPTG により RFP 合成が誘導される大腸菌 (*Escherichia coli*) OSU11AglA 株、これら2種をテトラヒメナの最少培地 CDM<sup>4</sup> を改変した培地 (Kashiwagi 未発表) に IPTG (100 μM) とグルタミン (10 μM) を加え、30°C と 37°C で共培養し、フローサイトメーター FC500 (Beckman Coulter) で培養後毎日 5 日間測定した。測定条件を(HV,Gain); FS=(0,1)、FL1=(500,1)、FL2=(500,1)、FL3=(500,1) としてディスクリミネーション; FL1=1 と設定した。488 nm のレーザーで励起し、FL1 は 488 nm、FL2 は 525 nm、FL3 は 620 nm のバンドパスフィルタを通して取得した。気泡によるノイズをデータから省くため、サンプル測定開始後 30 秒で再開始し、その後 120 秒で測定終了とした。試料調製は 5ml Polystyrene Round-Bottom Tube(FALCON)に全量が 400 μl になる

ように適宜希釈し調製した。比較実験として同様の条件でテトラヒメナと大腸菌それぞれの単独培養したものについても測定した。

**【結果と考察】** テトラヒメナ単独培養と大腸菌単独培養の測定結果から、テトラヒメナは大腸菌と比較して FS,SS,FL2,FL3 の全てのパラメータにおいて高い値が取得できることが分かった。また、テトラヒメナ単独培養ではテトラヒメナ細胞集団以外に大腸菌と FS,FL1,FL2,FL3 の値が近い非常に大量の集団（以下ノイズと呼ぶ）が測定された。共培養の測定からも同様のノイズ分布が確認され、大腸菌の集団分布と区別がつかなかった。このことから、共培養における大腸菌の分布解析が困難であることが分かった。大腸菌の分布解析のためには、大腸菌をより強く蛍光標識し GFP 蛍光強度 (FL2) または RFP 蛍光強度 (FL3) をノイズ以上の値に上昇させなければならない。次にテトラヒメナの集団分布に注目すると、単独培養と比較して共培養において FS, FL1, FL2, FL3 の全てのパラメータで集団分布のばらつきが大きくなった。特に RFP 蛍光強度 (FL3) では分布の一部が大きく上昇することが確認された。大腸菌を IPTG により RFP 合成を誘導させているので、

この結果における FL3 の値が大きな分布は大腸菌を細胞内に取り込んでいるテトラヒメナ集団であると推定される。以上の結果から、テトラヒメナと大腸菌の共培養における集団をフローサイトメーターでどのように測定できるかの基礎的知見を得ることができた。今後、テトラヒメナの集団分布をいくつかの領域に区切ってソーティングし蛍光顕微鏡観察を行なうことで、区切った各領域のテトラヒメナがどのような大きさ、蛍光強度などの形態として観察できるかを明らかにしたい。

#### 【文献】

1. A. Nakabachi, A. Yamashita, H. Toh, H. Ishikawa, H. E. Dunbar, N. A. Moran, M. Hattori (2006) *Science* 314,267
2. S. Shigenobu, H. Watanabe, M. Hattori, Y. Sasaki, H. Ishikawa (2000) *Nature* 407,81-86
3. J. L. Jost, J. F. Drake, A. G. Fredrickson, H. M. Tuchiya (1973) *Journal of Bacteriology* 113,834-840
4. zablewski, L., Andreasen, P.H., Tiedtke, A., Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M. and Rasmussen, L., (1991) *J. Protozool.* 38(1), 62-65.