

フローサイトメーターを用いたテトラヒメナの捕食大腸菌数の定量

富田 憲司¹, 森 光太郎², 細田 一史¹, 四方 哲也^{1,2,3}(¹阪大院情報科学, ²阪大院生命機能, ³ERATO複雑系生命プロジェクト)Flow cytometric quantification of the number of *Escherichia coli* ingested by *Tetrahymena thermophila*.Kenji TOMITA¹, Kotaro MORI², Kazufumi HOSODA¹ and Tetsuya YOMO^{1,2,3} (¹Department of Bioinformatics Engineering, Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University, ²Graduate School of Frontier Biosciences, ³Complex Systems Biology Project, ERATO, JST)

SUMMARY

In order to investigate the origin of endosymbiosis, we have synthesized a mutualism composed of *Tetrahymena thermophila* and *Escherichia coli*. Previously, we found that *E. coli* cells entered *T. thermophila* cells by predation and that the number of intracellular *E. coli* cells increased during serial subculture of the mutualism, although it is still unclear whether the intracellular *E. coli* duplicate. Here, we quantified the number of intracellular *E. coli* cells by flow cytometry, and investigated their change in number during serial subculture. We found that the average number of intracellular *E. coli* cells per *T. thermophila* cell increased from 2 to 40 and that the standard deviation of the number among *T. thermophila* cells increased tenfold during serial subculture. These results suggest that *T. thermophila* increases its predation rate or decreases its digestion rate and that the extent of the change varies widely between individual cells. Moreover, we found that both the average cell volume of *T. thermophila* and the average number of intracellular *E. coli* cells per unit cell volume of *T. thermophila* increased during subculture. However, the cell volume was not correlated with the number of intracellular cells per unit volume among *T. thermophila* cells in a batch of the serial subculture.

[目的] 細胞内共生説によると、葉緑体やミトコンドリアの起源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いる。細胞内共生は自然界で普遍的に見られる^{1,2}ものの、独立関係にある生物が細胞内共生に至る実験例は報告されていない。一度細胞内共生細菌を宿主細胞から分離し再度共生させる研究の報告はある^{3,4}が、この細菌は共生状態にあったという履歴持つため独立関係にある細菌が細胞内共生に至る実例とはいえない。独立関係にある生物が細胞内共生に至る実例を挙げ、それまでの過程を解明することを目的として、私たちはこれまでに、テトラヒメナ（捕食者）と大腸菌（被食者）を用いた再構成細胞内共生を試みてきた。これら2種生物は自然界では共存しておらず、テトラヒメナが大腸菌を細胞内に取り込むことができるという利点を持つ上に、2種共にモデル生物でありゲノム配列が分かっている⁵点でも扱いやすい。これまで得られた結果では、グルタミン合成能を欠如した大腸菌を用いると、2種が互いに栄養を相補することで初めて共に増殖することが出来る共生状態が観察されている。またこの共生状態において、大腸菌を赤色蛍光タンパク質RFPにより標識し、これをより多く細胞内に保持するテトラヒメナをセルソータによって分取して植え継ぐと、テトラヒメナ細胞内の大腸菌数が増加していくことが

判った。この大腸菌がテトラヒメナ細胞内で増殖することは確認できていないが、細胞内共生に至る過程を調べる上で、テトラヒメナの細胞内大腸菌数の増加は重要な変化であると考えられる。本研究ではこれまでフローサイトメーターによって得られた実験結果から、テトラヒメナ細胞内に存在する大腸菌数を定量的に推定して、その変化を解析および考察す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、グルタミン合成能を欠如し、かつ赤色蛍光タンパク質RFPにより蛍光標識された大腸菌 (*Escherichia coli*) OSU11AglA株を用いた。共培養は、テトラヒメナの最少培地CDM⁶を改変した培地 (Kashiwagi 未発表) からセリンを抜いた培地を用いて30°Cで行った。初期培養はテトラヒメナを1 × 10⁴ cells/ml、大腸菌を1 × 10⁷ cells/mlで植菌して行った。この共培養において、テトラヒメナの濃度が5 × 10⁴ ~ 3 × 10⁵ cells/mlに達したときに、フローサイトメーター (セルソータ) FACSAria (BD) を用いてテトラヒメナの蛍光強度を測定した。この際、大腸菌をより多く細胞内に取り込んでいると考えられる赤色蛍光が強いテトラヒメナを、セルソータを用いて分取して、新たに大腸菌1 × 10⁷ cells/mlを加えておいた培地にテトラヒメナ濃度が1 × 10³ cells/mlとなる

ように植え継いだ。以降、テトラヒメナの濃度が $5 \times 10^4 \sim 3 \times 10^5$ cells/mlに達したときに同様にして植え継ぎ、これを13回継続した。得られた実験結果から、テトラヒメナはその細胞体積に比例した自家蛍光（赤色および緑色）をもち、観察されるテトラヒメナの赤色蛍光強度は自家蛍光および細胞内大腸菌による蛍光の和であるという仮定の下、テトラヒメナ細胞内の大腸菌細胞数を推定した。

【結果と考察】 1) テトラヒメナ1細胞あたりの平均細胞内大腸菌数を、13回の植え継ぎ培養の各時点において求めたところ、植え継ぐにつれて増加し、培養初期には平均約2細胞であったが、10回植え継ぎ以降には平均約40細胞になっていた。テトラヒメナ細胞内大腸菌数は、テトラヒメナの大腸菌捕食による増加と、消化による減少の釣り合いであると考えられる。また、消化能力が下がったということが考えられる。また、テトラヒメナの取り込み大腸菌数の頻度分布を取ると、植え継ぐにつれて幅が約10倍程度に広がっていたことから、全てのテトラヒメナにお

いて細胞内大腸菌数が一様に増加したのではなく、大きく増加したものからあまり増加しないものまで、植え継ぎによる変化は個体間でばらつきがあることが判った。2) テトラヒメナの単位体積当たりの取り込み大腸菌数をテトラヒメナ細胞の細胞体積を用いて求めた。植え継ぐにつれて、細胞体積および単位体積当たり的大腸菌数が共に上昇していた。しかし、各時点での細胞体積と細胞内大腸菌数は相関していなかった。これは、テトラヒメナが大腸菌を取り込むことで細胞体積を上昇させたが、それ以上にテトラヒメナが本来持つ細胞体積のばらつきの方が大きいためと考えられる。

【文献】

1. Nakabachi, A. et al. (2006) *Science*, 314: 267.
2. Shigenobu, S. et al. (2000) *Nature*, 407: 81-86.
3. Bomford, R. (1965) *J. Protozool.*, 12(1): 221-224.
4. Karakashian, S.J. et al. (1965) *Evolution*, 19: 368-377.
5. Jonathan, A, Eisen. et al. (2006) *PLoS Biol*, 4(9): e286.
6. Zablewski, L. et al. (1991) *J. Protozool.*, 38(1): 62-65.