

## マイクロチャンバー培養を用いたテトラヒメナの1細胞観察

松本 佑介<sup>1</sup>, 一ノ瀬 純也<sup>2</sup>, 森 光太郎<sup>3</sup>, 鈴木 宏明<sup>1</sup>, 四方 哲也<sup>1,2,3</sup>( <sup>1</sup>大阪大学大学院・情報科学研究科, <sup>2</sup>科学技術振興機構・ERATO・金子複雑系生命プロジェクト, <sup>3</sup>大阪大学大学院・生命機能研究科)Observation of single cells of *Tetrahymena thermophila* cultured in a microchamberYusuke MATSUMOTO<sup>1</sup>, Junya ICHINOSE<sup>2</sup>, Kotaro MORI<sup>3</sup>, Hiroaki SUZUKI<sup>1</sup> and Tetsuya YOMO<sup>1,2,3</sup> ( <sup>1</sup>Department of Bioinformatics Engineering, Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University, <sup>2</sup>Exploratory Research for Advanced Technology (ERATO), Japan Science and Technology Agency (JST), <sup>3</sup>Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University)

## SUMMARY

We have developed a new method that enables us to use a microscope to conduct continuous observation of living motile ciliate cells at single-cell level. Direct information on timescales or individual differences, which are obscured by the ensemble-averaging inherent in conventional observation, can be obtained, and synchronization of the cell cycle in a population is not required. Indirect observations of the intracellular organelle dynamics have been made on chemically fixed cells of motile ciliates in conventional studies. Continuous observations of individual cells have been impossible, and only snapshot information or the ensemble-average of the population could be obtained. So to observe living motile ciliates at single-cell level, we constructed a new system using a microchamber made of polydimethylsiloxane (PDMS). The device can confine a single ciliate cell in each microwell, restricting the area it can swim around to within the microscopic field. In this study, we used *Tetrahymena thermophila* and we confirmed that *T. thermophila* showed stable exponential growth independent of the size of the microwell in a range from 200 $\mu$ m to 4mm diameter. Moreover, the generation time of *T. thermophila* could be measured. There was very little variance in generation time in *T. thermophila* growing in the microchamber.

**[目的]** 本研究は、運動性原生生物である繊毛虫の新たな観察培養技術の開発を目的とした。この技術は1細胞レベルで生きたまま顕微鏡下での連続観察を可能にする。この計測の利点には、タイムスケールの情報が得られる、集団平均化によって個体差の情報がぼやけることが無い、集団の細胞周期を同期させる必要が無い、などが挙げられる<sup>1</sup>。従来、繊毛虫の分裂や細胞内小器官の動態観察は、主に細胞を固定して行われてきた。この手法では同一細胞の連続観察が不可能であり、スナップショットや集団平均の情報しか得ることができない。その困難の原因は細胞の運動性の高さである。そこで我々は、Polydimethylsiloxane (PDMS)で形成したマイクロチャンバー中に細胞を維持し観察するシステムを実現した。今回我々が開発したシステムの使用により、細胞分裂や接合の経時変化の観察、ゾウリムシがクロレラを取り込み共生関係に至る様子の観察、細胞間での表現型のばらつきの観察などが可能になり、今後の原生生物の研究に大きな貢献ができると考えられる。本研究では合成培地かつ最少培地が確立されており培養が容易なモデル生物である *Tetrahymena thermophila* を使用し、上記の目的の前段階としてどの程度増殖できるのか、そして世代時間

の1細胞計測を行った。

**[方法]** *T. thermophila* は、PPYG-Fe培地<sup>2,3</sup> (0.4% Protease Peptone, 0.2% Yeast extract, 1.0% Glucose, 33  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>6H<sub>2</sub>O) と市販の培養フラスコを用い、30°Cで日常的に維持培養した。実験では初期濃度  $1 \times 10^4$  cells/ml で1日培養し、指数増殖期にあるものを使用した。遠心して回収後、フレッシュなPPYG-Fe培地で再希釈して使用した。PDMSマイクロチャンバーは、直径数100  $\mu$ m から数mm、深さ50  $\mu$ m のウェルを持つPDMSウェル部とそれを蓋する形態で細胞を閉じ込めるためのカバーガラス、そしてそれらを保持するための治具から成る。ほぼ1ウェル当たり1細胞が入るようにセットし、倒立型顕微鏡下で培養観察を行った。顕微鏡下では環境の温度は30°Cに保たれた。ソフトウェアで制御されたCCDカメラにより画像を自動取得し、任意の時間間隔で長時間にわたる経時観察を行った。

**[結果と考察]** ウェルサイズが200  $\mu$ m から4 mmのマイクロチャンバーを使用した培養において、安定して指数増殖することが確認された。フラスコで培養した場合、定常期の細胞濃度は約  $5 \times 10^5$  cells/ml であ

るが、このマイクロチャンパーにおいてもウェル内の細胞濃度が約 $5 \times 10^5$  cells/mlに達するまで増殖することが確認できた。特に、200  $\mu$ m及び400  $\mu$ mのウェルでは1 cell/ウェルであってもその濃度は $1 \times 10^5$  cells/mlを超え、フラスコ内では定常期に差し掛かる濃度に相当する。しかしながら、その状態からさらに3, 4度の分裂が観察され、濃度的には $10^6$  cells/mlにまで増殖した。これは、細胞をチャンパーに閉じ込めた直後の培地はまだ栄養分が消費されておらず、そのため $5 \times 10^5$  cells/mlを超える濃度まで増殖できたからではないかと考えている。したがって、常にフレッシュな培地を供給して連続培養を行うことができればより高い細胞濃度まで増殖期を維持することができるのではないかと予測している。

また、より短い時間間隔で経時観察を行うことにより、*T. thermophila*の世代時間を計測することができた。閉じ込めた後、1度分裂した細胞が2度目の分裂をするまでの時間を観察することにより、*T. thermophila*の世代時間を1細胞レベルで調べることが出来

た。直径800  $\mu$ mのウェルを使用して本研究での実験条件下で観察を行うと、1度目の分裂から2度目の分裂までの時間は $150 \pm 12$ 分 (n=4)、2度目から3度目の分裂までの時間は $225 \pm 25$ 分 (n=8)であることが分かった。つまり世代時間は10%程度しかゆらがない。これはバクテリアなどに比べて非常に強く細胞周期を制御する機構が働いていることを示唆する。1度目の分裂から2度目の分裂より、2度目の分裂から3度目の分裂の方が長い世代時間になっている。これは定常期の濃度近くまで細胞が増えたこと、もしくは消費により栄養が減少したことによると考えられる。よってこのことは、マイクロチャンパーの構造を培地交換ができるように変更することによって調べることが出来ると考えている。

#### [文献]

- 1) Nam S. et al. (2007) Lab on Chip, 7: 638-640.
- 2) Conner R.L. (1964) J. Protozool, 11: 486-491.
- 3) Austin L. et al. (1969) J. Nutrition, 99: 379-386.