

テトラヒメナのトランスクリプトーム解析

鈴木 健太¹, 木原 久美子², 鈴木 真吾³, 小野 直亮³, 古澤 力^{3,4}, 森 光太郎², 四方 哲也^{2,3,4}
(¹阪大工, ²阪大院生命機能, ³阪大院情報科学, ⁴ERATO複雑系生命プロジェクト)

Transcriptome analysis of *Tetrahymena thermophila*

Kenta SUZUKI¹, Kumiko KIHARA², Shingo SUZUKI³, Naoaki ONO³, Chikara FURUSAWA^{3,4}, Kotaro MORI² and Tetsuya YOMO^{2,3,4} (¹Faculty of Engineering, Osaka University, ²Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, ³Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University, ⁴Complex Systems Biology Project, ERATO, JST)

SUMMARY

Symbioses are widely found in nature. However, it is difficult to analyze how symbioses have been established, because symbioses in nature have already optimized their functions to maintain the sophisticated symbiotic relationship. To understand how symbiosis occurs, we are constructing an artificial symbiotic system between a ciliate, *Tetrahymena thermophila*, and a bacterium, *Escherichia coli*, in the laboratory. In the present study, we aimed to establish a transcriptome analysis method for *T. thermophila*, in order to understand the global changes in gene expression during development of the artificial symbiosis. We designed a custom high-density oligonucleotide microarray (Affymetrix GeneChip)

for *T. thermophila*. Total RNA was isolated and purified from independently cultured *T. thermophila* cells. For GeneChip transcriptome analysis, standard methods for target sample preparation, hybridization, and scanned image analysis were carried out in accordance with the Affymetrix eukaryotic target preparation protocols. We confirmed specific hybridization between the target sample and *T. thermophila* probes. This result indicated that the present method would enable us to analyze changes in gene expression of *T. thermophila* during the development of the artificial symbiosis.

【目的】 自然界にはさまざまな共生現象が見られる。昆虫類であるアブラムシと細菌類であるブフネラの共生、アブラムシとアリの共生、イソギンチャクとカクレマノミの共生などが例に挙げられる。しかし自然界における共生系では、共生系を形成する各々の生物がすでにその機能を変化させ共生という状態への適応を完了しているため、既存の共生系の解析では2種の生物がどのような環境でどのような変化を伴って共生関係に移行したかを解明できない。また、既存の共生系は飼育が困難であることも多々あり、2種の生物の相互関係を定量的に扱うことが困難である。

このような背景のもと、我々は、複数の生物群が互いに協調関係を生み出し、共生関係を構築するかを解明するために、自然界では出会うことのないテトラヒメナと大腸菌からなる人工共生系を構築している。様々な共生系のなかでも最もその関連性が密接である共生系のひとつである細胞内共生は、宿主となる生物が異種生物を取り込むことが必要であると考えられる。我々は、異種生物を取り込む上での機構として食作用に着目し、食作用が活発であるテトラヒメナを宿主として選択した。また、取り込まれる生物として、遺伝子操作が容易で、ゲノム情報にはじまり様々な知見が蓄積されている大腸菌を使用した。

この人工共生系を用いて、2種の生物がどのような遺伝子発現変化を伴い共生系へと移行するのか網羅的に解析するため、トランスクリプトーム解析手法の確立を目指した。共生系を形成するためには、それまで独立に進化してきた生物群が各々の機能を変化させることが必要であると考えられるが、細胞内の遺伝子発現を網羅的に解析することでその細胞の状態を定量的に扱うことができ状態を把握することができる。さらに、共生関係を形成する上で必要とする遺伝子を個別に解析するのではなく、生物を生体分子の統合的な遺伝子ネットワークとしてとらえ、個別に進化してきた生物の遺伝子ネットワークが互いに融合して、共生系としての新たな遺伝子ネットワークを形成するのかを解明することも可能と考えられる。人工共生系の生物のひとつの大腸菌については、トランスクリプトーム解析手法がすでに確立されているが¹⁾、テトラヒメナに関してはまだ未報告であるためテトラヒメナのトランスクリプトーム解析の手法の確立を目的とした。

【方法】

1) トータルRNAの抽出

テトラヒメナ(*Tetrahymena thermophila*)SB210株の細胞をNeff培地にて対数増殖期の後期まで培養した。遠心分離をして細胞を回収し、RNasey Mini Kitを使用しトータルRNAを得た。得られたトータルRNAを変性ゲル泳動に付し精度を確認した。

2) トータルRNAからの2本鎖cDNAの合成

以下2)~6)の操作は、Affymetrixの真核生物のアレイ用試料調製法のプロトコールに沿った。トータルRNAにT7オリゴ(dT)プライマーを加え、polyA配列のついたmRNAを特異的に逆転写し、T7プロモーターのついた2本鎖cDNAの合成を行った。

3) cRNAの合成

合成した2本鎖cDNAを鋳型としてT7 RNAポリメラーゼにより転写を行いcRNAを合成した。この際、ビオチン化されたUTPを一定量混合することでcRNAにビオチンを取り込ませた。

4) cRNAの断片化

合成したcRNAの断片化を行い、断片化されたcRNAキャピラリー電気泳動にて分析した。断片化されたcRNAの長さが35~200 baseに分布しており、アレイに供する条件に適していることを確認した。

5) ハイブリダイゼーション

断片化されたcRNAを、我々がデザインしたテトラヒメナ用オリゴDNAアレイに供し、ハイブリダイゼーションを行った。

6) 洗浄・染色・スキャン

専用機器を用いてビオチンと蛍光物質であるフィコエリスリンが結合したストレプトアビジンを特異的に結合させた。洗浄、染色を終えたアレイをスキャナーにかけ各プローブの蛍光強度を測定した。

【結果】 スキャンした画像をもとに各プローブの蛍光強度を測定し、テトラヒメナ用プローブとその他のプローブの蛍光強度について比較した。横軸蛍光強度、縦軸頻度(相対頻度)のヒストグラムを作成したところ、多数のテトラヒメナ用プローブがその他のプローブに比してより強い蛍光強度を示していることが確認された。

【考察】 デザインしたテトラヒメナ用アレイと方法に記したアレイ用の試料調製法により、テトラヒメナのトランスクリプトーム解析が可能となった。しかし、現状ではテトラヒメナ用のプローブの蛍光が弱く、測定可能な遺伝子発現量のダイナミックレンジが狭いことが示唆された。今後は、他種生物の遺伝子配列をもとに作製したmRNAをテトラヒメナのトータルRNAに様々な濃度で混合し、上記方法に記

した一連の試料調製法を用いてトランスクリプトーム解析を行う（スパイクコントロール実験）。このスパイクコントロール実験により、テトラヒメナ用試料調製法の各ステップの最適化を行い、手法確立後にテトラヒメナおよび大腸菌からなる人工共生系

のトランスクリプトーム解析を行う。

【文献】

- 1) Pomposiello, P.J., Bennik, M.H. and Demple, B. (2001) J. Bacteriol., 183(13): 3890-3902.