

Carpedemonas-like organisms と培地中バクテリア *Shewanella* sp. との二者培養系の確立

高林 舜 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 橋本 哲男 (筑波大学 生命環境系)

背景と目的

フォルニカータ (Fornicata) は真核生物の分類群のひとつである。この分類群は哺乳類の腸管寄生虫である *Giardia* 属 (ジアルジア) を含む diplomonads や retortamonads、そして *Carpedemonas*-like organisms (CLOs) から構成される単系統群である。フォルニカータに属する生物はクエン酸回路や電子伝達系に関わる典型的なミトコンドリアを失っており、その代わりにミトコンドリアが縮退したと考えられるミトコンドリア関連オルガネラ (mitochondrion-related organelle, MRO) をもつ。MRO はフォルニカータだけに見られるものではなく真核生物の幅広い系統で発見されており、フォルニカータと姉妹群を形成しているパラバサリア (Parabasalina) でも寄生虫である trichomonads (トリコモナス) に存在する。ジアルジアの MRO はマイトソーム、トリコモナスの MRO はハイドロジェノソームと呼ばれる。近年これらの分子細胞生物学的研究は大きく進展しており、マイトソームはハイドロジェノソームよりも機能的、形態的に縮退の度合いが強いということが明らかになっている。

フォルニカータに属する CLOs の多くにも MRO と考えられるオルガネラが確認されておりそれらの大きさはマイトソームより大きいことがわかっている。さらに CLOs が系統的にトリコモナスの分岐とジアルジアの分岐の中間に位置づけられるということが大規模分子系統解析により支持されている。これらのことから CLOs の持つ MRO はマイトソームとハイドロジェノソームの中間的な縮退段階にあると予想され、CLOs はオルガネラの縮退進化の過程を研究する上で重要な生物であると考えられる。

今回研究対象としている CLOs の一種である *Kipferlia bialata* の培養液中には複数種のバクテリアが存在するため各種解析で得られるデータにはバクテリアのものが多量に含まれてしまい問題となる。しかし *K. bialata* はバクテリアを捕食しているため単独での培養は不可能である。そこで本研究では、これらの解析の精度と効率を向上させるために、一種類のバクテリアとの二者培養系を確立させることを目的とした。

材料と方法

K. bialata NY0173 株を 20°C で培養し、800 g、20°C、15 min の遠心分離により細胞を回収した。回収した細胞を密度勾配作成用試薬である Optiprep™ (Axis-Shield 社) を用いて懸濁し 0%、10%、20% からなる段階的な密度勾配をファルコンチューブ内に作成し、20% フラクシオンの底部に 40% に濃度調整したサンプルを注入した。これを 800 g、20°C、20 min 遠心し、各濃度内部および境界面の計 7 フラクシオンからサンプリングし、光学顕微鏡を用いて観察した。*K. bialata* が含まれるフラクシオンを回収後 75% Optiprep で濃度調整し、再び同一の密度勾配を用いて同条件で遠心した。計 3 回の密度勾配遠心を行い最終的に

得られた *K. bialata* のフラクシオンを培地中に存在するバクテリアの一種である *Shewanella* sp. の培養液に混入した。

以上の操作を数回繰り返した。

結果

細胞回収前の培養液 1 L 中に *K. bialata* は 3.1×10^8 cells 存在したのに対しバクテリアは 1.3×10^{11} cells であった。このサンプルを細胞回収のための遠心分離にかけたところ *K. bialata* を 2.2×10^8 cells、バクテリアを 2.2×10^{10} cells 回収することができた。

Optiprep を用いた密度勾配遠心ではそれぞれの濃度の境界面にバンドが見られた。0% と 10% の境界面には *K. bialata* の死骸と少数のバクテリア、10% と 20% の境界面では活発に運動する *K. bialata* が多く見られ、20% と 40% の境界面にはバクテリアが主に見られた。生きている状態の *K. bialata* を回収する必要があるため 10% と 20% の境界面のバンドを回収し次の遠心に用いた。

密度勾配遠心の 1 回目では *K. bialata* を 1.9×10^8 cells 回収することができ、バクテリアは 7.2×10^8 cells であった。2 回目では *K. bialata* を 7.8×10^7 cells 回収したのに対しバクテリアは 3.6×10^7 cells であった。2 回目を終えた時点で *K. bialata* の細胞数がバクテリアの数を上回るという結果になった。3 回目の遠心分離後は *K. bialata* が 5.9×10^7 cells でありバクテリアは 2.2×10^7 cells であった。

最終的に回収できた *K. bialata* の細胞数は開始時の約 19% であった。一方でバクテリアの数を開始時の約 0.017% にまで減らすことに成功し *K. bialata* とバクテリアの比率をおよそ 1 : 1 にまでにすることができた。

今後、実際に培養液中に含まれるバクテリアが *Shewanella* sp. だけになっているかどうかを 16S rRNA 遺伝子のシーケンス解析によって確認する予定である。