

微好気性鞭毛虫(*Dysnectes brevis*)と単一のバクテリアとの二者培養系の確立

井上貴史 (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、目的

真核生物の分類群のひとつであるフォルニカータ生物群は、嫌気性・微好気性の単細胞生物から構成されており、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 (MRO) を共通した細胞小器官として保持している。このフォルニカータ生物群に属している生物には、人の腸管に寄生する *Giardia intestinalis* などが知られている。*G. intestinalis* は非常に縮退した MRO の一種であるマイトソームと呼ばれるオルガネラを保持しており、寄生性・嫌気性環境に適応していく中で、TCA 回路や酸化リン酸化による ATP 合成に代表される代謝機能や独自のゲノムなどを失ってきたと考えられている。しかしミトコンドリア縮退進化の過程はいまだ解明されておらず、その解明にはミトコンドリアとマイトソームの中間段階にある MRO の解析が必要である。そこで当研究室では、フォルニカータに属している *Dysnectes brevis* という微好気性の従属栄養性鞭毛虫に注目し、研究を行っている。*D. brevis* は、フォルニカータの系統樹上で *G. intestinalis* よりも早期に分岐しており、形態的にもマイトソームとミトコンドリアの中間程度の大きさである MRO を保持している。以上のことから、*D. brevis* が保持する MRO がミトコンドリアからマイトソームへの縮退的進化の中間段階にあることが予想される。当研究室ではその MRO についてのデータを、既存の *G. intestinalis* のもつマイトソームについてのデータと比較し、ミトコンドリアの縮退的進化解明の足掛かりとすることを目的としている。

しかし、現在 *D. brevis* は複数種の餌バクテリアが混在する培地で培養されている。そのため、それらのバクテリアの存在が、ゲノムやプロテオームを始めとするオミックス解析の妨げとなっている。そこで餌バクテリアの解析に及ぼす影響を最小限に抑えるために、本研究ではバクテリア一種と *D. brevis* との二者培養系を確立させることを目的として実験を行った。

材料と方法

D. brevis を 75 ml フラスコにて 16–17°C で培養し、細胞を 800 g、20°C、15 分の遠心分離により回収した。回収した細胞を密度勾配形成用試薬の Optiprep (Axis-shield 社) を用いて懸濁した。Optiprep の濃度は 0%、10%、20% となるように調整し、50 ml ファルコンチューブ内に重層することによって濃度勾配を形成した。遠心分離によって回収した細胞は、Optiprep の終濃度が 40% になるように調整し、ファルコンチューブの最下層に注入した。800 g、20°C、20 分で遠心分離し、Optiprep の濃度が 10% と 20% の境界面で *D. brevis* の細胞を回収した。回収できた細胞を、同様の方法で再度密度勾配遠心にかけて、同じように細胞を回収し、培地中に存在するバクテリアの一種 *Pseudoalteromonas* sp. (γ -proteobacteria) のみをあらかじめ

培養しておいた培養液に継代した。以上、*D. brevis* の濃縮・継代の操作を数回繰り返した後、75 ml のフラスコ 3 本にて大量培養し同様の遠心条件にて *D. brevis* の精製を試みた。

結果

遠心前には、*D. brevis* が 2.5×10^8 cells/ml、バクテリアが 1.8×10^{11} cells/ml 存在していた。一回目の密度勾配遠心を行った後では、*D. brevis* が 1.6×10^7 cells/ml、バクテリアが 4.0×10^7 cells/ml となり、二回目の密度勾配遠心後は *D. brevis* が 4.0×10^6 cells/ml、バクテリアが 4.8×10^5 cells/ml となった。最終的に *D. brevis* は最初の 4%、バクテリアは最初の 0.0004% となり、バクテリアの細胞数を *D. brevis* の細胞数以下にまで減らすことに成功した (図 1)。

現在、濃縮・継代の操作 9 回目を終えたところである。今後は二者培養系が確立されているのかどうか、培養液から DNA を抽出し、バクテリアの 16S rRNA の部分配列を PCR にて増幅し、増幅産物を大腸菌にクローニングして、約 300 サンプルをシーケンスする。そこで得られた配列を、BLAST 検索することによって、培地中のバクテリアの種類とその比率を調べ、二者培養系が確立できたかどうかを確認する予定である。

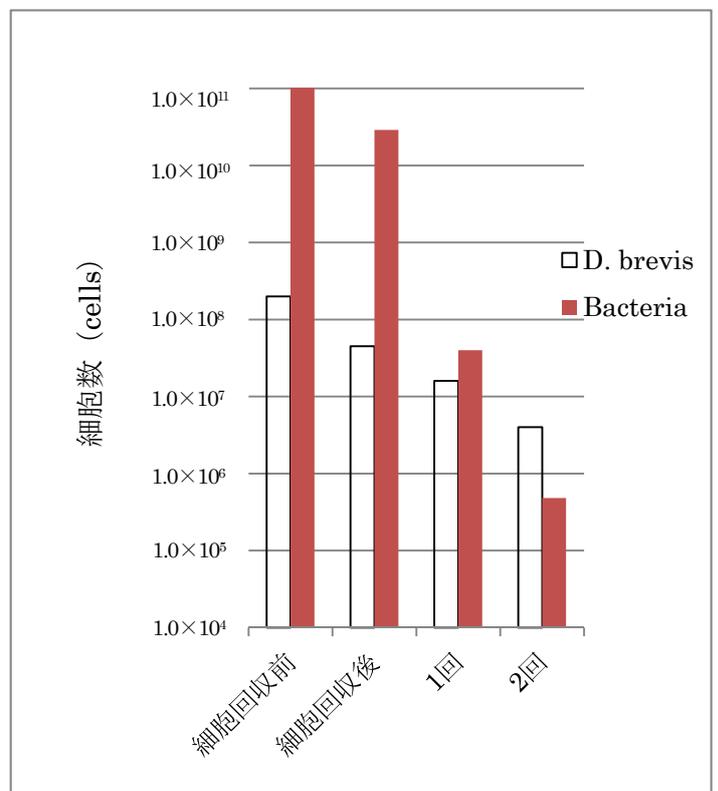


図 1 遠心による細胞数の変化