

一般市民参加型テトラヒメナの全国分布調査

○西本 裕希^{a,b)}、中山 潤一^{b)}、片岡 研介^{b)}

基礎生物学研究所 技術課^{a)}、基礎生物学研究所クロマチン制御研究部門^{b)}

1. 目的

繊毛虫類の一種のテトラヒメナは、世界中の池や湖などに生息している単細胞真核生物である。約100年前に無菌的な培養法が開発されて以来、テトラヒメナ (*T. thermophila*) はモデル生物として広く研究者に利用され、リボザイムやテロメアの発見などのノーベル賞に輝いた研究にも貢献してきた。これまでに、米国を中心として、世界各地に生息する約80種のテトラヒメナが報告されており、地球上には、さらに多くの未同定種が存在することが予想されている^[1]。一方、日本国内のテトラヒメナについては、種を同定したという前例がない。そこで、本研究では日本のテトラヒメナを同定し、それらの国内分布を明らかにすることを目的として、一般市民と協力してテトラヒメナを日本中から採集するプロジェクト「テトラハント」を新たに始動させた。

2. 方法

(1) テトラヒメナの野外採集用トラップ

テトラヒメナは、動物由来の栄養物に集まる習性がある。この性質を利用して、クライオチューブにテトラヒメナの培地を入れ、コーヒーフィルターで蓋をした「トラップ」を作成し、野外からテトラヒメナを採集した(図1)。また、トラップのチューブの蓋に直径2mmのガラス玉を埋め込み、顕微鏡としての機能を持たせ、トラップをスマートフォンのカメラの上に置くことで、採集したテトラヒメナを容易に観察できる様にした。

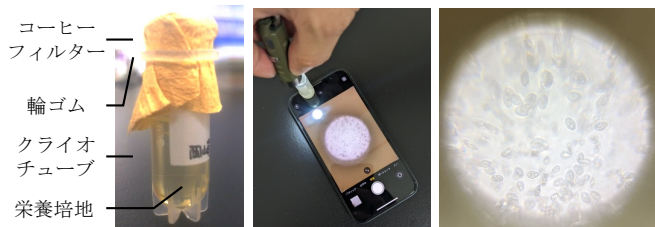


図1. 採集キットとスマートフォンを使った観察

(2) テトラヒメナの野外採集

日本全国の協力者に、本トラップの作製キット(図1)を配布し、協力者の居住地付近の池に一晩

トラップを沈めてもらった。回収したトラップは着払いで返送してもらった。

(3) テトラヒメナの単離培養と保存

協力者から返送されたサンプルから、実体顕微鏡下でガラスキャピラリーを用いて1細胞ずつテトラヒメナを単離した。単離したテトラヒメナは、ペニシリン・ストレプトマイシンなどの抗生物質を添加した培地で培養した。単離培養した細胞は、従来からテトラヒメナを常温で保存する際に用いられている、大豆の煮汁を用いて保存した(図2)。

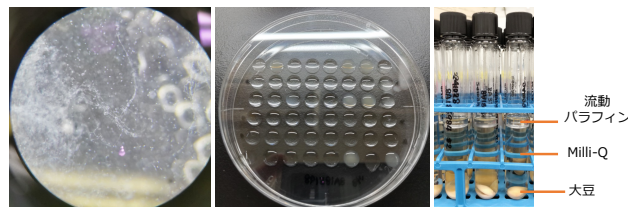


図2. 返送されてきたサンプルと単離培養と保存

(4) テトラヒメナの種の同定

テトラヒメナの種同定は、ミトコンドリアのシトクロム酸化酵素 *COXI* 遺伝子の塩基配列を指標に行った。細胞が含まれる培養液を鋳型にして、*COXI* 遺伝子領域をダイレクトPCR法で増幅した。得られたPCR産物のDNA配列をサンガー法で解析し、その配列と、既知のデータベースから取得した全テトラヒメナの記載種の *COXI* 配列とを用いて系統樹を作成した。採集したテトラヒメナの種の同定に際しては、過去に報告された種の同定基準に従って、*COXI* の塩基配列の差異 (pairwise differences) が4%以下であれば同種、4%以上であれば異種と定義し、既に報告されている種との差異が見られるものを新種の候補とした^[2]。

3. 結果および考察

2024年6月から2025年2月までの8ヶ月間テトラハントを実施した結果、のべ93名の協力を得て、全国102ヶ所の池や湖で調査を実施した。

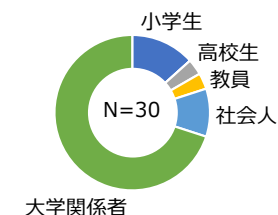


図3. 協力者の職業

協力者の内訳は、大学関係者が最も多く、小学生や高校生、小中高校の教員、社会人など多層にわたっていた(図3)。協力者の多くを大学関係者が占めるのは、学会での募集活動を中心に行ったためである。今後一般市民の参加者を促進するために、小・中学校、高等学校への依頼、XなどのSNSを通じた広報活動を積極的に行なっていく必要がある。

テトラヒメナは、30-100 ミクロンほどの比較的大きな単細胞生物で、実体顕微鏡下で、ラグビーボール状の動く姿が観察される。我々は、協力者から送られた全てのサンプルについて、テトラヒメナ様の細胞の有無を顕微鏡下で確認し、全102個のサンプルのうち、35個のサンプルに、テトラヒメナ様の細胞を確認した。一方、全体の2/3にあたる67個のサンプルからは、テトラヒメナを採集できなかった。これらの多くは、7・8月に採集された物であった(図4)。これは、気温が35度を超える夏期には、輸送中のサンプルが、高温にさらされたため、サンプル内のテトラヒメナが死滅したことが原因であると考えられる。今後は、夏期中のサンプル輸送に際しては、緩衝材を使う等、サンプルの温度が上がらない様に工夫する必要がある。

テトラヒメナ様の細胞が確認された35サンプルについては、

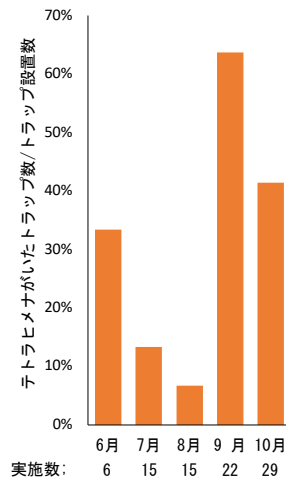


図4. テトラハントの成功率

キャピラリーを用いて、単一細胞を分取し、クローン株として培養を試みた。単離の際には、細胞を含む液体中のバクテリア等を取り除くために、単離した細胞を培地で作ったドロップの中で泳がせた後、新たな培地に移すという限界希釈の手法をとった。通常、各サンプルから、48個の細胞を単離し、24個以上の単離細胞が得られた。単離した細胞が増殖し、かつバクテリアの混入がみられない場合は、大豆の煮汁中での常温保存を試みた。その結果、単離株が得られた全ての場合で、大豆の煮汁中で少なくとも数ヶ月にわたって、生きた細胞を保存することが確認できた。

テトラヒメナ様の細胞のクローン株が得られたら、光学顕微鏡で撮影し、細胞の大きさ、大核小核

の有無等の形態的な特徴を記録した。続いて、単離株が得られた全てのテトラヒメナのCOXI遺伝子の配列を解析した。その結果、COXI遺伝子配列に差異を有する84個のテトラヒメナ種を確認した。これらの中で、56種については、既に記載されているテトラヒメナ種であった。一方で、28種については、COXI遺伝子の配列が、既知のテトラヒメナ種と4%以上の違いが見られたため、新種であると判断した。既知の種の中で最も多く採集されたのは、北アメリカで採集実績のある*T. gruchyi*であり、我々の調査では、東京都をはじめとする7都府県から計24個の株が単離されている。マレーシアで採集実績のある*T. malaccensis*については、我々の調査で、静岡県など6県から合計10株採集された。*T. pyriformis*などの8つの既知のテトラヒメナ種は、日本各地にも生息していることが明らかになった。特に、琵琶湖で実施した我々の調査では、新種の候補を含めて計10個のテトラヒメナ種を単離した。今回単離した新種の候補については、テトラヒメナ種の近縁のグループ間で異なる配列を有する、リボソームRNA遺伝子やヒストンH3遺伝子とヒストンH4遺伝子間のゲノム領域の配列を比較解析する予定である。

4. おわりに

本研究は、一般市民との連携によって進めるクラウドサイエンスであり、テトラヒメナの野外採集をはじめとする一連の活動は、教育機関、研究機関、地域社会などと様々な組織間連携を促進できる可能性を有している。今後は、テトラヒメナの調査を通じて市民の自然科学への社会全体の関心を高める第一歩にしていきたい。

参考文献

- [1] Doerder FP, Brunk C. Natural populations and inbred strains of Tetrahymena. *Methods Cell Biol.* 109, 277-300, 2012.
- [2] Doerder FP. Barcodes Reveal 48 New Species of Tetrahymena, Dexiostoma, and Glaucoma: Phylogeny, Ecology, and Biogeography of New and Established Species. *J Eukaryot Microbiol.* 66, 182-208, 2019.

謝辞

本研究を行うにあたり、テトラハントにご協力いただきました皆様に感謝申し上げます。なお本研究は、JSPS 科研費24H02514の助成を受けて実施した。