

大腸菌と細胞性粘菌の共生系における大腸菌の表現型変化について

木原 久美子¹, 鈴木 真吾², 森 光太郎¹, 四方 哲也^{1,2,3}

(¹大阪大学大学院生命機能研究科, ²大阪大学大学院情報科学研究科, ³科学技術振興機構 ERATO 複雑系生命プロジェクト)

Escherichia coli changes phenotype when cultured in symbiosis with *Dictyostelium discoideum*

Kumiko KIHARA¹, Shingo SUZUKI², Kotaro MORI¹ and Tetsuya YOMO^{1,2,3} (¹Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, ²Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University, ³Complex Systems Biology Project, ERATO, JST.)

SUMMARY

We established an experimental symbiotic system composed of *Escherichia coli* and *Dictyostelium discoideum* to examine how symbiosis occurs. Even though the relationship of *E. coli* and *D. discoideum* is a prey-predator relationship, these two species achieved a state of stable coexistence within mucoidal colonies after several weeks of co-cultivation (we named this the “symbiotic colony”). We then investigated the population dynamics of *E. coli* after cells were isolated from the symbiotic colony. To do these experiments we observed the morphological changes of the *E. coli* cells and the shape of the *E. coli* colonies and also tested if *E. coli* could be cultured again with *D. discoideum*. To do these experiments, we used a glutamine-auxotrophic mutant *E. coli*. The amino acid was then supplied with the medium (for the *E. coli* colonies), or available through the products of *D. discoideum* (in the co-cultivation experiments). We observed the *E. coli* response to the glutamine through its growth curve. We found that there were two types of *E. coli* present in this system. One type formed normal colonies by itself and mucoidal colonies with *D. discoideum*, while the other type formed mucoidal colonies in both cases. The mucoidal colony developed faster than the original symbiotic mucoidal colony, even though its growth curve differed according to the glutamine quantity provided in the liquid medium. This phenotypic change of *E. coli*, induced through an interaction with *D. discoideum* cells, seems important. We aim to gain a better understanding of how *E. coli* changes its relationship by looking at intracellular aspects such as gene expression in the future.

【目的】自然界では生物同士の関係性として共生関係は普遍的に見られるが、既に関係性が確立している既存の共生系では、共生関係成立過程を捉えることは出来ない。そこで、自然界では共生関係にない大腸菌-細胞性粘菌（被捕食者-捕食者の関係）が共生関係を築くという実験室で構築した共生系を用いて共生樹立過程を捉える事とした。両者を共培養すると、通常、細胞性粘菌は大腸菌を食べ尽くし飢餓状態となるが、最少寒天培地上で共培養すると、内部に両者が安定して共存した粘液質コロニーの出現が知られている [1]。これを共生コロニーと名づけた。共生コロニーが発生成長維持される機構は明らかではない。

そこで、この現象を解明する為に、細胞状態を観測し、物理状態、内部状態、生理状態の実態を知ることが必要と考えた。また、共生関係の経験の有無は新たな共培養状態で細胞応答に影響を与えるのかどうか、再共生実験を行うことで確認し、共生過程で構築される相互作用の強さの変化を捉えようとした。さらに、自然界の共生系では物質の授受を介在とする関係性が多く見られる事を考慮すると、共生過程において細胞の必須物質に対する感受性に変化が見られる可能性がある。今回はこれらの観点から主に大腸菌の性質の変化を詳しく調べた。

【方法】細胞の形態的特長や位置分布を識別するため、蛍光タンパク質を発現する大腸菌・細胞性粘菌を用いて共生過程の顕微鏡観察を行った。共培養系から細胞を経時的に採取し、細胞数、大きさ、蛍光強度の変化を血球計算盤、粒度分布計、FACS を用いて測定した。大腸菌は CFU 測定とともにコロニー形状を確認し、細胞性粘菌は PFU 測定により生菌数と捕食能を観察した。採取した共生過程の細胞から大腸菌を単離後、再び新たな細胞性粘菌と最少固体培地上で共培養する再共生実験を行った。一度共生過程を経験した大腸菌細胞が再び細胞性粘菌と出会った際に示す応答を観察した。

また、大腸菌のコロニー形態別に、液体培地内での増殖能を測定した。本共生系はアミノ酸要求性の大腸菌株を用いており、大腸菌の生育には外部からのアミノ酸供給が必須で、培地中に直接添加される場合と、細胞性粘菌が生産した物質が培地中に漏れ出る場合の 2 種類によって供給される。そのため、培地に添加された必須アミノ酸が枯渇した場合には、捕食者である細胞性粘菌の存在が大腸菌にとって必須であるという系になっている。大腸菌にとって生存の鍵となるアミノ酸に対する応答を捉えるため、LB 培地に含まれる必須アミノ酸量に対して見られる増殖度合いを増殖曲線を描いて測定した。

【結果】共培養開始後、初めに増殖速度の速い大腸菌

が増殖した後、細胞性粘菌が増え、約 1 週間ではほとんどの大腸菌が食べ尽くされるが、その後、突然共生コロニーが発生した。このとき同時に、大腸菌単独からなる高密度コロニーも発生することがあり、このコロニーの縁は伸びた大腸菌で覆われていた。共生コロニー内部の両細胞集団の分布を見ると、中央から放射状に大腸菌の筋が見られるが細胞性粘菌は共生コロニー全体に均一に分散しているタイプと、どちらの細胞も共生コロニー内部に均一に分散しているタイプの 2 つが見られた。どちらのタイプでも日を経るに従い共生コロニー体積は増加し成長した。

大腸菌にシングルコロニーを形成させると、共培養開始から約一週間で通常型のコロニーを形成するものと粘々型のコロニーを形成するものの 2 タイプが出現した。前者を由来とする大腸菌の再共生実験では、これまでと同様の共生過程を経るが、後者を由来とする大腸菌の再共生実験では、培養開始直後から内部に細胞性粘菌を含んだ共生コロニーが発生し始め、急激にそのコロニーが成長する様子が観察された。さらにこの 2 タイプの大腸菌は、必須アミノ酸を十分添加した LB 培地での増殖曲線に違いは見られないが、必須アミノ酸を添加していない LB 培地では粘々型コロニー由来大腸菌で増殖速度が遅いという結果が得られた。どちらのタイプの大腸菌でも LB 培地で培養する限り培養液に粘性は見られなかったが、粘々型コロニー由来大腸菌を必須アミノ酸添加最小培地で培養すると培養液の粘性が明らかに増加することがわかった。これら 2 タイプの大腸菌の性質は長時間の培養を挟んでも失われる事がなく、大腸菌の共生コロニー形成能は世代を超えて保存されている事がわかった。

【考察】以上の観察から大腸菌は細胞性粘菌との共培養において、食べられて死ぬ道、細胞性粘菌の捕食をうけにくいような形状を発達させる道、細胞性粘菌と一緒に生きる共生コロニーを形成する道、の 3 つの選択肢を持っていると言えよう。また、大腸菌細胞の表現型変化から、共生コロニーの粘性物質は大腸菌由来であることが示唆された。本共生系の構築には、被捕食者である大腸菌の表現型変化という初期応答と、その維持が重要であるといえよう。この形質は、大腸菌の世代を超えて維持されているが、表現型として維持されているのか、遺伝型として固定して維持されているのかは今後明らかにすべき課題と考えている。

【文献】

- [1] Todoriki M, Oki S, Matsuyama S, Ko-Mitamura EP, Urabe I, Yomo T. , (2002) Biosystems. 65(2-3):105-12.