

大腸菌と細胞性粘菌の液体培養共生系の構築

久保 勲生¹, 木原 久美子², 森 光太郎², 四方 哲也^{1,2,3}(¹大阪大学大学院情報科学研究科, ²大阪大学大学院生命機能研究科, ³科学技術振興機構 ERATO 複雑系生命プロジェクト)Construction of symbiotic liquid culture system for *E. coli* and *D. discoideum*Isao KUBO¹, Kumiko KIHARA², Kotaro MORI² and Tetsuya YOMO^{1,2,3} (¹Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University, ²Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, ³Complex Systems Biology Project, ERATO, JST.)

SUMMARY

When *Escherichia coli* and *Dictyostelium discoideum* are mixed and allowed to grow on minimal agar plates, mucoid colonies that did not exist before emerged. However, these mucoid colonies were hard to analyze because they were not uniform and each colony was in a different growth phase. We therefore constructed a symbiotic liquid uniform culture system of *E. coli* and *D. discoideum* to analyze the symbiosis in more detail using special medium. In this medium these two species could not grow independently, but they could grow as a co-culture. We picked one-by-one each medium component out of SIH medium to prepare a base medium and tested this medium to see if we could grow these two species independently. Using this method we were able to identify some essential components for their growth. This result will be helpful to complete the next step of making a new medium in which the two species can live together and exchange nutrients that are not present in the medium.

【目的】 共生は生物間で普遍的に見られる現象である。共生関係にない生物を用いて実験室内で新たな共生系を構築することで、生物間でどのように相互作用しながら互いの関係性を変化させるのかを明らかにしたい。

現在、細胞性粘菌（捕食者）と大腸菌（被捕食者）を大腸菌用固体最少培地で共培養すると、くずあん状の共生コロニーを作ることがわかっている¹。しかし、固体培地上の共生コロニーを使って共生過程における 2 生物間の物質の授受や遺伝子発現を解析することは困難であった。なぜなら、コロニーの共生段階、細胞数などの間でばらつきがあるため、複数のコロニーを混合してしまうと正しく解析ができないからである。そのため、均一なサンプルを調製できる液体培養共生系の構築は重要と考えられる。

必須な栄養素がない培地で、共生者の栄養素の漏れ出し、捕食によって相互に栄養を補完しあい、互いに増殖できる共生系を作るためには、大腸菌、粘菌の必須・非必須の栄養素を知ることが必要である。そのために既存の粘菌用液体最少培地である SIH 培地²から培地成分を一つずつノックアウトした培地で培養することにより、両生物にとって必要な成分を明らかにした。また共生時の相互作用を強めるためには培地の成分は必要最低限なものが望ましいので、明らかになった非必須成分の結果を利用して新しい最少培地の調製も行った。

【方法】

①粘菌と大腸菌の必須栄養素の確認

細胞性粘菌 (*Dictyostelium discoideum*) として HS-175 株³を使用した。大腸菌については DH1ΔglnA::kan-gfpuv5 株、OSU11-ΔglnA 株の 2 種（どちらもグルタミン要求株）を使用した。培養条件は粘菌、大腸菌ともに 9 cm シャーレ、培地量 10 ml、22°C、静地培養である。SIH 培地成分 (Glucose, Amino acids, Buffer, Salts, Vitamins, Trace Metals) のうち、Amino acids, Salts, Vitamins に含まれる成分を一つずつ抜いた培地で培養した。前培養は、粘菌は粘菌用富養培地である HL-5 培地で 5～7 日培養したもの、大腸菌は LB 培地にグルタミンを 2 mM 添加した培地で、37°C、振盪培養で 24 時間培養したもの（いずれも停滞期）を使用した。前培養したものを遠心して培地を取り除いた後、使用する培地に懸濁して植菌した。大腸菌はグルタミン要求株だが SIH 培地にはグルタミンが含まれていないので、大腸菌を培養する際にはグルタミン終濃度が 2 mM になるように添加した。粘菌は 6 日目に血球計算盤でセルカウントを行い、増殖が認められたものに関しては、前培養の栄養素の持ち込みによる増殖の可能性を否定するために同条件で植え継いで、もう一度増殖を測定した。初期植菌量は粘菌が 2×10^5 (cell/ml)、大腸菌は $OD_{600}=0.05$ である。大腸菌は 1 日後と 3 日後に OD_{600} を測定した。

②新しい最少培地の作成

①の実験で Control である完全な SIH 培地と同程度まで増殖し、非必須であると思われる成分を全て抜いた培地、Amino acids 成分として非必須と思われるものだけを抜いた培地、Salts 成分として非必須と思われるものだけを抜いた培地、Vitamins 成分として非

必須と思われるものだけを抜いた培地の 4 種を調製し、①と同条件で培養、測定した。

【結果】

①粘菌と大腸菌の必須栄養素の確認

<粘菌について> 植え継いで培養を行ったところ、6 日間培養後の菌体濃度が 2 つのパターンに分かれた。一方は Control と同じく、初期植菌量 2×10^5 (cell/ml) に対して培養後は $4 \sim 6 \times 10^6$ (cell/ml) 程度まで増殖した。もう一方は $2 \sim 6 \times 10^5$ (cell/ml) 程度までしか増えなかった。前者のレベルまで増殖が確認できた培地成分から非必須成分を特定し、後者のレベルまでしか増殖しない培地成分から必須成分を特定した。SIH 培地に含まれる Amino acids 成分 (全 16 成分) 中、11 成分が必須成分であり、5 成分が非必須成分であった。Salts 成分 (全 5 成分) 中、2 成分が必須成分で、3 成分が非必須成分であった。Vitamins 成分 (全 6 成分) 中、2 成分が必須成分であり、4 成分が非必須成分であった。

<大腸菌について> DH1ΔglnA::kan-gfpuv5 株、OSU11-ΔglnA 株間で培地成分による増殖の差は見られなかった。3 日間培養した結果、両菌株もほとんどの培地で Control と同程度の $OD_{600}=0.8$ 程度まで増殖した。しかし、ある Amino acids 成分を抜いた培地でのみ両菌株で $OD_{600}=0.08$ 程度までしか増殖しなかった。 グルタミンを含まない SIH 培地では両菌株共に増殖しないので、用いた大腸菌の SIH 培地における必須成分はグルタミンであり、ある Amino acids 成分を培地から抜いた場合に大腸菌の増殖が極端に落ちるということがわかった。

②新しい最少培地の作成

<粘菌について> ①の結果から粘菌にとって非必須成分を抜いた SIH 培地で植え継ぎ培養を行った。①の結果と同じく培養後の濃度が Control と同程度の $4 \sim 6 \times 10^6$ (cell/ml) と、初期植菌量とほぼ変わらない $2 \sim 6 \times 10^5$ (cell/ml) にわかれた。非必須成分を全

て抜いた培地、Salts 成分の中から非必須成分を抜いた培地、Vitamins 成分の中から非必須成分を抜いた培地の 3 種では $2 \sim 6 \times 10^5$ (cell/ml) 程度までしか増殖しなかった。しかし、Amino acids 成分の中から非必須成分を抜いた培地では Control と同程度まで増殖した。

<大腸菌について> 両菌株共いずれの培地でも Control と同程度まで増殖した。

【考察】 ①の実験により、粘菌、大腸菌に必須の成分を明らかにすることが出来た。しかし、②の実験では非必須アミノ酸を抜いた最少培地以上に栄養素が最低限の培地を調製することができなかった。Salts 成分、Vitamins 成分では、単独では抜いても増殖に影響がない成分でも、複数同時に抜くと増殖しないことがわかった。今後は①の実験で粘菌にとって必須な成分が明らかになったのを利用して、目標としている共生者の栄養素の漏れ出し、捕食によって相互に栄養を補完しあい、互いに増殖できる共生系の構築を行う予定である。

【文献】

1. Todoriki M, Oki S, Matsuyama S, Ko-Mitamura EP, Urabe I, Yomo T., An observation of the initial stage towards a symbiotic relationship. Biosystems. 2002 Mar-May; 65(2-3):105-12
2. Sang-In Han, Karl Friehs and Erwin Flaschel. Improvement of a synthetic medium for *Dictyostelium discoideum*. Process Biochemistry. 2004 April; 39 (8):925-930
3. Segall JE, Kuspa A, Shaulsky G, Ecke M, Maeda M, Gaskins C, Firtel RA, Loomis WF. A MAP kinase necessary for receptor-mediated activation of adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. Cell Biol. 1995 Feb; 128 (3):405-13.