

大腸菌と細胞性粘菌の共生系における大腸菌の遺伝子発現 ダイナミクス解析：共生環境の大腸菌はストレスが緩和されている

木原 久美子¹, 森 光太郎¹, 鈴木 真吾², 小野 直亮², 柏木 明子⁴, 古澤 力^{2,3}, 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, ⁴弘前大学農学部生命科学部)

The dynamics of gene expression of *E. coli* in a symbiotic system with *Dictyostelium discoideum*: *E. coli* experiences reduced stress under symbiotic status

Kumiko KIHARA¹, Kotaro MORI¹, Shingo SUZUKI², Naoaki ONO², Akiko KASHIWAGI⁴, Chikara FURUSAWA^{2,3} 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, ⁴Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University)

SUMMARY

Symbiotic relationships are normal phenomena in nature, but it is difficult to understand how the relationship is created by only investigating existing symbioses. Todoriki et al. (2002) established an experimental symbiotic system composed of *Escherichia coli* and *Dictyostelium discoideum* that is suitable to monitor the symbiotic process. We report here global expression of *E. coli* genes within one month of the co-culture. Statistical analysis of expression dynamics showed many functional gene categories that characteristically changed expression level in the transition phase. We found that the transcriptional profile of symbiotic *E. coli* stress genes significantly decreased within 6 days of co-culture, for example in desiccation and starvation categories. Additionally, anaerobic respiration, iron acquisition, polysaccharide biosynthesis and amino acid biosynthesis gene expression increased in the symbiotic culture relative to the control culture. The proportion of genes significantly differently expressed was only a few percent of all *E. coli* genes, although phenotypic changes in the symbiosis were dramatic.

【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する [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。

先行研究では、共生コロニー発生から3ヶ月後の遺伝子発現が調べられている [2] が、大腸菌の表現型は一ヶ月以内に变化する事も知られており [3,4]、共生関係が構築されるに重要なのは培養開始から一ヶ月以内の時期であることが示唆されていた。そこで、本研究ではそのような大腸菌の表現型の変化をもたらす大腸菌の内部状態を明らかにすることを目的とした。具体的には、表現型の変化を引き起こす直接の原因となる遺伝子発現を網羅的に捉え、共生過程でどのような変化が見られるのかに着目した。

【方法】大腸菌と細胞性粘菌の混合液を最少寒天培地にスポット植菌し、22度で培養した。コントロール

として、大腸菌単独培養を用意した。決めたサンプリング日ごとに培地上の細胞を掻き取って集め、細胞から全RNAを抽出しAffymetrixのプロトコルに従ってGeneChipにかけた。このGeneChipは大腸菌の全ゲノムをカバーするようにデザイン設計して製造したカスタムアレイである。このアレイを使うと、クロスハイブリダイゼーションがシグナル強度に与える影響を考慮したアルゴリズム(FH model [5])を使用できる。本研究ではこのアルゴリズムを使用して求めた遺伝子ごとのシグナル値を次のようにして比較考察した。

大腸菌単独培養と共培養の2系列のデータを2つの視点から比較し、遺伝子発現変動の様子を捉えた。比較1として、大腸菌単独培養と共培養、共に、時系列パターンはどのようになっているか、に着目した。0日目の遺伝子発現量に対して各サンプリング日の発現量を比較し、時間経過と共に見られる相対的な遺伝子発現変動を捉えた。比較2として、同日のサンプリング日の遺伝子発現を比較する事で、大腸菌単独培養と共培養の遺伝子発現を直接比較し差異を抽出する事とした。これらの比較を行ない、誤差範囲以上に遺伝子発現が有意に変動したとみなせるものをピックアップし、どのようなカテゴリーが有意に出現しているかを片側二項検定によって調べた。このとき、機能カテゴリーとしてGene Ontology の

biological process (GO)カテゴリーを使用した。さらに、比較2で抽出した遺伝子のうち、上述した検定において、属する機能カテゴリーが有意であると判定されなかった遺伝子をピックアップした。このうち、主に遺伝子機能がよくわかっている遺伝子について、変動の大きさ（絶対値）が大きい遺伝子に注目し、それらの関連遺伝子も含めて発現挙動の特徴を調べた。

【結果と考察】 共培養環境下の大腸菌は、最少培地に捕食者である粘菌が存在し、大腸菌の最適生育温度よりも温度の低い22℃で長期培養による寒天培地の乾燥が予想される環境に生育していることから、そのような大腸菌には栄養、捕食、低温、乾燥ストレスがかかっているのではないかと予想された。ところが、共培養では単独培養よりも乾燥ストレスカテゴリーの発現が低く、飢餓応答関連カテゴリーが培養3日目に有意に発現が減少していた。さらに、共培養の大腸菌ではポリサッカライドに関する遺伝子発現の上昇がみられ、共生コロニーの表現型を裏付ける結果が得られた。

加えて、共培養下の大腸菌は嫌気状態に至り、運動性に関する遺伝子の発現が単独培養よりも上昇していたり、アミノ酸の生合成、鉄の取り込み輸送に関する遺伝子や細胞壁の分解、ポリサッカライドの合成、エネルギー生産系などに関する遺伝子発現が単独培養よりも共培養で上がっている事が明らかとなった。共培養環境下の大腸菌は、単独培養下の大腸菌よりもストレスが緩和されている部分がある事が捉えられた。これらの結果から、大腸菌は細胞性粘菌との共存環境下において、早い段階で様々な遺伝子発現を変化させ、共生関係へと向かっている様子が明らかになった。

【文献】

- 1) Todoriki, et. al. *Biosystems*. 2002 65(2-3): 105-12.
- 2) Matsuyama, et. al. *Biosystems*. 2004; 73(3): 163-171.
- 3) Yamada., et. al. *Biosystems*. 2008; 92(1): 1-9.
- 4) Kiahra., et. al. *Japanese Journal of Protozoology*. 2008; 41(1): 76-77.
- 5) Ono., et. al. *Bioinformatics*, 24 (10): 1278-1285.