

## テトラヒメナと大腸菌からなる実験的共生系の構築

森 光太郎<sup>1</sup>・四方 哲也<sup>1,2,3</sup>(<sup>1</sup>阪大院生命機能, <sup>2</sup>阪大院情報科学, <sup>3</sup>ERATO複雑系生命プロジェクト)Synthetic Symbiosis between *Tetrahymena thermophila* and *Escherichia coli*Kotaro MORI<sup>1</sup> and Tetsuya YOMO<sup>1,2,3</sup>(<sup>1</sup>Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, <sup>2</sup>Department of Bioinformatics Engineering, Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University, <sup>3</sup>Complex Systems Biology Project, ERATO, JST)

## SUMMARY

To help understand how an intracellular symbiosis evolves from independently living organisms, we have tried to construct a symbiosis between a ciliate, *Tetrahymena thermophila*, and a bacterium, *Escherichia coli*, under laboratory conditions. These two species do not form a symbiosis in nature because of the difference in their habitats. We hoped to construct a symbiosis (obligate mutualism) between them via reciprocal nutrient (amino acids) exchange. We utilized the phagocytosis behavior of *T. thermophila* to take up *E. coli* into *Tetrahymena* cells, and we used amino acid auxotrophic strains of *E. coli*. First, we searched for candidate amino acids by co-culturing in a minimal medium lacking single amino acids essential for *Tetrahymena*. Second, we conducted selection cycles for 10 months in which co-culturing and sorting for *Tetrahymena* cells having more *E. coli* were repeated weekly. As a result, we obtained *Tetrahymena* populations that contained live *E. coli* cells. Moreover, both species proliferated well indicating that they mutually co-existed. However, there were many free-living *E. coli* cells in the co-culture, so we could not confirm the establishment of an intracellular symbiosis. In future studies, we will try to further select for *Tetrahymena* with established intracellular symbionts.

【目的】 私たちは、自然界に多く見られる細胞内共生をモデル生物であるテトラヒメナ（捕食者）と大腸菌（被食者）を使って構築し、理解しようとしている。自然界に細胞内共生の例が多く存在することは、進化系統樹上何度も細胞内共生が生じたことを示唆しており、また細胞内共生は新奇形質の獲得機

構の重要なひとつと考えられている<sup>1</sup>。独立に生きていた細胞同士が食作用や寄生を通じ融合して細胞内共生が成立する際に、どのように生理学、形態学、生態学的な困難を乗り越えていくのか、またそれはどのくらい難しいことなのかは謎である。この疑問に答えるひとつの方法として、実験条件下でその初

期段階を作り出し観察することを考えた。

本研究ではテトラヒメナの食作用によって大腸菌を取り込ませ、消化を回避した大腸菌が維持される状態を目指す。本発表ではその途中段階として、まず、両者が相手から供給される栄養に依存して増殖する系（絶対相利共生系）を構築した。その後、共培養系においてより多くの大腸菌を取り込んだテトラヒメナをセルソータ（FACS）により選択的に分取して培養する選択系を構築し、10ヶ月に渡ってこの選択系を繰り返した。その結果、テトラヒメナの大腸菌取り込み量が増加し、始めはほとんど増殖しなかったテトラヒメナと大腸菌が、サイクルの過程で共に増殖できる共生的状態へ変化したことを観察した。

#### [材料と方法]

1) 生物：30℃、静置条件で継代培養しているテトラヒメナSB210株と大腸菌DH1株由来の各種アミノ酸合成関連遺伝子欠損株（アミノ酸要求株）<sup>2</sup>を使用した。これら的大腸菌はマーカーとして赤色蛍光タンパク質遺伝子をゲノム上に導入してある。

2) やり取りする栄養の探索：テトラヒメナの最少培地CDMを改変した培地（mini15と呼ぶ、Kashiwagi未発表）にはテトラヒメナが必須とするアミノ酸が11種類含まれている。このアミノ酸を1種類ずつを抜いた培地でテトラヒメナとアミノ酸要求性大腸菌株を共培養し、1週間後に両種が増殖しているかどうかを調べた。同じ条件で単独培養した時と比べて増殖している場合は相手からアミノ酸の供給があったと判断した。

3) 大腸菌を保持するテトラヒメナのFACSによる選択：2) で両種がともに増殖したSer抜きmini15にグルタミン要求性大腸菌株を組み合わせた共培養系を10ヶ月間、1週間おきに培養と選択を繰り返した。培養は6穴プレート、30℃、静置条件でおこない、増殖曲線を描いた。選択はFACSを用い、テトラヒメナ集団中で、より赤色蛍光強度の高い領域を大腸菌植菌済みの培養液へソートした。

#### [結果と考察]

1) やり取りする栄養の探索

mini15から除いたアミノ酸11種類×栄養要求性株6株の合計66個の組み合わせのうち、30個の組み合わせにおいて両者の増殖が観察された（相利的）。また片方のみ増殖する組み合わせ（捕食-被食的、寄生的）が27個、両方ともに増殖しない組み合わせ（競争的）が9個あった。アミノ酸の種類

によって両者の示す増殖パターンは異なることがわかった。これらのどの組み合わせを培養していけば細胞内共生が構築できるかはわからないが、本発表では相利的と判断された組み合わせであるSer抜きmini15にグルタミン要求性大腸菌株を組み合わせた共培養系を以降の実験で用いた。

2) 大腸菌を保持するテトラヒメナのFACSによる選択

本実験系において、テトラヒメナの示す赤色蛍光強度は取り込んでいる大腸菌数に比例すると考えられる。選択サイクルの最初は単独培養と比較してテトラヒメナの赤色蛍光強度には違いがないが、サイクルが進むにつれて集団全体が赤色蛍光強度の高い方へ徐々に約10倍移動した。顕微鏡観察からもこの傾向は確かめることができ、サイクルが進むにつれて赤色の食胞を持つテトラヒメナが増加していった。テトラヒメナに取りこまれた大腸菌の数を顕微鏡観察によって数えてみると、平均1.38個であった。この大腸菌が生きているかどうかを確かめるため、赤色蛍光強度の高いテトラヒメナをLB寒天培地へプレートアウトしてみるとテトラヒメナ数とほぼ同数のコロニーが生えてきた。つまりテトラヒメナの食胞中で大腸菌は少なくとも一定期間生存していると考えられた。また、共培養サイクルの始めはテトラヒメナの増殖率は非常に低い（ $\mu=0.005(\text{h}^{-1})$ ）、サイクルが進むにつれて段階的に増加し、4サイクル目には $0.07(\text{h}^{-1})$ になり、23サイクル目以降は $0.1(\text{h}^{-1})$ 近辺で変動するようになった。増殖率の上昇は両者のアミノ酸交換量が増加するか、アミノ酸の利用効率が高まったことを示唆する。つまり本系の相互作用強度が培養サイクルにともなって強化されたと考えられた。

もともと捕食-被食関係にあるテトラヒメナと大腸菌が本研究の培養条件において絶対相利共生系となった。しかしながら、本培養系は細胞外にも多くの大腸菌が観察されるため、細胞内共生であると結論づけることはできない。今後はテトラヒメナ外部の大腸菌を効果的に取り除く培養系を確立してさらに選択をかけ、実験的に細胞内共生を構築することを目指していきたい。

#### [文献]

1. Margulis, L., and Fester, R., ed. (1991) Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation, MIT press, Cambridge.
2. Kashiwagi, A., Sakurai, T., Tsuru, S., Ying, B-W., Mori, K. and Yomo, T., (in press) Metabolic Eng