

出会ったことが無い原生動物と細菌が出会ったらどうなるのか？

細田 一史¹, 末吉 真人¹, 熊野 いつか², 松本 佑介¹, 富田 憲司¹,
森 光太郎³, 柏木 明子⁴, 四方 哲也^{1,5}

(¹大阪大・情報, ²大阪大・工, ³大阪大・生命, ⁴弘前大・農生, ⁵JST・ERATO)

What happens when a protozoan encounters a previously non-interacting bacterium?

Kazufumi HOSODA¹, Makoto SUEYOSHI¹, Itsuka KUMANO², Yusuke MATSUMOTO¹,
Kenji TOMITA¹, Kotaro MORI³, Akiko KASHIWAGI⁴ and Tetsuya YOMO^{1,5}

(¹Grad. Sch. Inform. Sci. Tech., Osaka Univ., ²Grad. Sch. Engn., Osaka Univ., ³Grad. Sch. Frontier, Biosci., Osaka Univ., ⁴Fac. Agr. Life Sci., Hirosaki Univ., ⁵ERATO, JST)

SUMMARY

To understand how a protozoan and a smaller organism such as a bacterium that have not previously been in contact can establish symbiosis and coevolve, it is necessary to observe these processes from their first encounter. Instead of tracing back the history of known natural symbiosis, we experimentally simulated a first encounter between a protozoan and a bacterium using *Tetrahymena thermophila* and a genetically engineered auxotrophic strain of *Escherichia coli*. By varying the culture condition, we laid out the following four sets of circumstances: (i) both the protozoan and bacterium can grow autonomously, (ii) only the bacterium can grow autonomously (ordinary predator-prey system), (iii) only the protozoan can grow autonomously, (iv) neither the protozoan nor the bacterium can grow autonomously. Herein, we demonstrate that symbiosis was established in circumstances of (iii) (commensalism) and (iv) (mutualism). More precisely, the protozoan as a predator became extinct because of a defensive adaptation of the bacterium in (i) and (ii), the bacterium grew because of a leakage of nutrients from the protozoan in (iii), and both the protozoan and bacterium grew because of the predation of the bacterium and the leakage of nutrients from the protozoan, respectively, in (iv). These experimental symbioses in (iii) and (iv) might enable us to observe the trajectory of their co-evolution to endosymbiosis.

【目的】原生動物は、捕食被食・細胞内共生など、様々な形でより小さな生物と共生している。これらは互いに出会った後、共生が成立し、共進化してきた結果である。その共進化の過程は、遺伝子系統解析により推測することが可能である^{1,2)}。一方で、共

生成立や共進化の過程における個体群、局所環境、表現型などを調べるには、その直接観測が望ましい。また、“どのようなときにどのようにして共生が成立し、また失敗するか？”の情報を得るには、両者が出会った直後からの観測が必須である。しか

し天然の共生系に関して、その出会いまでさかのぼって直接観測することはできない。

原生動物が、より小さな生物と出会った直後から観測する簡単な方法として、試験管内で人工的に出会わせる実験的手法がある。これまでの研究では主に、より小さな生物は原生動物に依存せずに増殖することができ、原生動物はそれを捕食することで増殖するという、片利の捕食被食系に関するものが多く、より小さな生物の防御的適応と培養環境の不均一性が、共生を安定に維持すること等が示されている^{3,4)}。

本研究では、原生動物 *Tetrahymena thermophila* (以降、テトラヒメナ) と細菌 *Escherichia coli* (以降、大腸菌。遺伝子組換えにより栄養要求性を持たせた) を用いて、以下の 4 種の増殖依存関係で共培養し、どのようなときにどのようにして共生が成立し、また失敗するか? について答える: ①ともに単一で増殖可, ②細菌のみ単一で増殖可 (一般的な捕食被食), ③原生動物のみ単一で増殖可, ④双方が単一では増殖不可。

[方法]

用いた株

本研究では、*Tetrahymena thermophila* SB210 株あるいは *Escherichia coli* DH1 株のグルタミン合成に関わる遺伝子を赤色蛍光タンパク質に置換した株を用いた。

共培養条件

テトラヒメナ用の合成培地を元に、アミノ酸を足す及び (もしくは) 抜いた培地を用い、30°C で振盪培養した。テトラヒメナが増殖し、テトラヒメナと大腸菌の両菌体濃度が数日間一定になった場合、テトラヒメナの初期濃度が 10^4 cells/ml になるように希釈による植継を行った。

細胞濃度測定

テトラヒメナ、大腸菌ともに、フローサイトメーターを用いた。

細胞状態の評価

顕微鏡観察およびフローサイトメーターによる測定により行った。

[結果] テトラヒメナ用の合成培地を元に、アミノ酸を足す及び (もしくは) 抜くことにより、上述した①-④の 4 条件の共培養を行った。なお、単純化のために、培養環境は振盪により均一可しているため、先行研究^{3,4)}にあるような培養環境の不均一性は除かれている。結果、①②のときは大腸菌単一となって共生に失敗し、③④のときは共生が成立 (両者が継続的に増殖) した。

それぞれの個体群に関して、①②のときは、初めは両者が増殖するが、一度植え継ぐと、テトラヒメナは減少していった。③のときは、テトラヒメナは

ほとんど一定の増殖率で増殖し、大腸菌は増加・減少・増加という動態になった。これは 20 回植えついても安定に継続された。④のときは、大腸菌は初めに増えた後に一定濃度になり、テトラヒメナは 1 週間-1 ヶ月に 10 倍程度の増殖率で増殖した。これはおよそ 9 割の確率で植え継ぐことができる。

それぞれの微生物の状態について、大腸菌は①-④を通して、単一培養時と比較して 10 倍以上長くなっているものが現れた。テトラヒメナは、外部大腸菌濃度が高いほど、大腸菌を細胞内に取り込んでいるものが多く見られた。ただし、長い大腸菌の比率が高い場合は、取り込み大腸菌が少なくなっていた。

[考察] 私達の実験系では、細菌が単一で増殖できないとき (③④) のみ、共生が成立した。①-④を通して長い大腸菌の比率が高くなってきたことから、テトラヒメナによる捕食を避けるような大腸菌の防御的適応により、捕食による大腸菌の増殖阻害が減少すると同時に、テトラヒメナの増殖も減少し、①②は大腸菌単一になったと考えられる。③ではテトラヒメナは大腸菌を捕食しなくても増殖できる。さらに大腸菌はテトラヒメナからの栄養漏洩により増殖することができるため、共生が成立したと考えられる (片利共生)。④では両者が単一では増殖できないが、大腸菌はテトラヒメナからの栄養漏洩により増殖し、テトラヒメナは大腸菌を捕食して増殖することで、共生が成立したと考えられる (必須相利共生)。

本研究により、環境が均一な場合、細菌が単一で増殖可能のときにはその防御的適応により原生動物が死滅しうること、細菌は原生動物が漏洩する栄養により共生できること、捕食被食でありながら必須相利共生が成立すること等が示された。今後、③④がどのように進化していくのかを調べる。関係性が強まって細胞内共生になれば、その起源と進化について重要な知見を与えることができる。また相利共生に関しては、協力関係がもつ進化的脆弱性⁵⁾について知見を与えることができる。本研究は一例であり、全ての原生動物で同じことが起こると主張するわけではない。生物や状況の違いにより様々な場合があるだろうが、それも本研究のように実験的に調べることで、次第に明らかになって行き、一般的な理解へとつながっていくだろう。

[文献]

- 1) Struder-Kypke et al. (2000) Mol. Phylogenet. Evol., 14, 122-130.
- 2) Hoshina et al. (2004) Plant Biol., 6, 447-453.
- 3) Todoriki et al. (2002) Biosystems, 65, 105-112.
- 4) Nakajima et al. (2009) Biosystems, 96, 127-135.
- 5) Sachs et al. (2006) Trends Ecol. Evol., 21, 585-592.