

## 2 種類の実験室内共生系のゲノム解析

●四方哲也<sup>1)2)</sup>

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

### 〈研究の目的と進め方〉

自然界には数多くの共生系が存在している。それらの生物がいつ共生関係を形成したかについては、遺伝的解析と分子系統樹より幾つかの知見が溜まりつつあるが、どのような環境でどのような変化を伴って共生関係が成立したかは明らかではない。本研究では、実験進化の特徴である再現性を生かして、安全な共生系を作り出し、共生系安定化の複数プロセスをmRNAレベル、DNAレベルで解析することによって、共生系発達の基本的条件を明らかにする。

具体的には、我々の実験室で見つかった2つの人工共生系を解析する。1つは細胞性粘菌と大腸菌が共存するコロニーである。大腸菌と細胞性粘菌はそれぞれ別の環境に適応してきた生物であるが、実験室内で2年以上にわたって安定な共存状態を維持している。ここでは、粘性コロニー中で共存する大腸菌と細胞性粘菌について、全mRNAの発現パターンの変化、DNAゲノム変化を解析し、安定な共生系発達過程を詳細に記述する。

もうひとつの共生系は、光合成細菌が鞭毛虫であるテトラヒメナへの細胞内共生する系である。

### 〈研究開始時の研究計画〉

1) 細胞性粘菌と大腸菌との共生系の中の細胞性粘菌、大腸菌の形態、個体数などをセルソーターを用いて観察し、個体群動態を得る。この手法は我々の研究室で常時使われている方法なので、容易に定量的データが得られる。セルソーターを用いて、それぞれの細胞に分けた後、大腸菌、細胞性粘菌から全mRNAを取り出し、解析する。

ゲノム変化については、現在までに我々の研究室で2年間以上継代している粘性コロニーの経時的なストックを用いる。この網羅的解析をする前に、統計的データとして取り扱えるレベルまで、人為的誤差を少なくしなければならない。現在までにmRNAについて発現変化をみる実験方法は立ち上げてあるが、DNAについては方法論の最適化が必要である。

2) テトラヒメナと光合成細菌の液体培養系には、さまざまな数の光合成細菌を維持したテトラヒメナが存在する。これらの分布、およびその分布の経時変化を、セルソーターを使って測定する。この系で共存系の安定性を確認する。

### 〈研究期間の成果〉

細胞性粘菌と大腸菌を貧栄養固体培地上で共培養すると、コロニーの形態が順次変化し、粘性コロニーへと移行してゆく。その過程における細胞性粘菌と大腸菌の形態や個体数を、セルソーターなどを用いて観察した。その結果、両者を単独で培養した場合は異なる、特徴的な個体群動態が見られた。

アフィメトリックス社のジーンチップで網羅的解析をする際、低発現量遺伝子のデータはノイズが大きく有意なデータが得られない。そこで、独自にアルゴリズムを開発した。大腸菌のmRNAを独立に2度調整して、従来

法と我々の方法で解析した結果、独自のアルゴリズムでは、低発現のmRNAまで、高い相関が得られた。その結果、2桁以上低い発現量のmRNAが定量的に扱えるようになった。

粘性コロニーを形成している大腸菌と、単独培養の大腸菌とで菌体内の生理状態に差があるかどうか調べるために、両者から全mRNAを取り出し、ジーンチップにより解析した。その結果、解糖系やクエン酸回路などの主要代謝経路の酵素遺伝子に明確な差が認められるものがあったほか、ストレスタンパク質群の中にも顕著な差を示すものがあった。以上の結果は、細胞性粘菌との共生系の発達の初期段階の大腸菌の変化を明らかにしたものである。

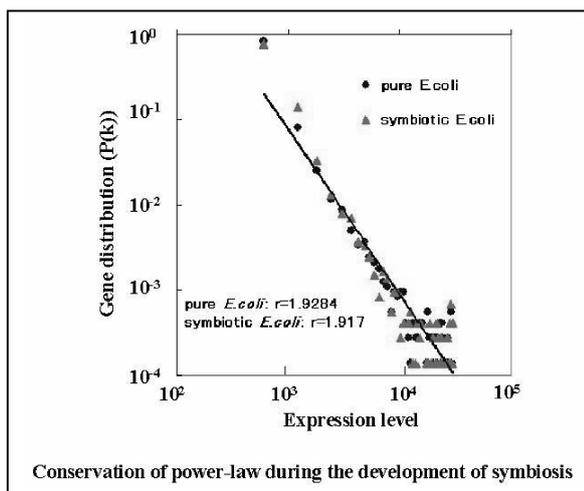
次に、大腸菌と細胞性粘菌が共生状態を獲得する過程で大腸菌の細胞状態の分布がどのように変化するのか、またどのような細胞状態の大腸菌が細胞性粘菌との共生に移行できるのかを明らかにした。大腸菌の細胞状態の変化を検出するために、大腸菌のゲノム上に大腸菌の遺伝子発現制御を受けないプロモーターとその下流にGFP(緑色蛍光タンパク質)の遺伝子を組み込み、GFPの蛍光強度を大腸菌の細胞状態の指標として用いた。また、測定方法としてはセルソーターを用いて、共生状態への移行過程での大腸菌のGFP蛍光強度の分布を経時的に測定した。その結果、大腸菌単独の培養では培養開始8日目から15日目にかけて大腸菌のGFP蛍光強度の分布はほとんど変化しなかったのに対して、大腸菌と細胞性粘菌の両者を共培養した条件では8日目で大腸菌のGFP蛍光強度の分布が蛍光強度のより強い領域にも広がっていた。さらに、共生コロニーが生じた15日目では大腸菌のGFP蛍光強度の分布は大腸菌単独の条件と比べて蛍光強度の強い領域にのみ現れた。また、共生条件の培養8日目での蛍光強度の強い大腸菌をセルソーターにより分取し、粘菌との共生のしやすさを比較したところ、蛍光強度の強い大腸菌の方が短期間に非常に高い確率で細胞性粘菌と共生することが明らかになった。これらの結果、共生状態への移行途中において大腸菌は細胞性粘菌との相互作用により多様な生理状態をとるようになり、その結果細胞性粘菌との共生状態に移行できたのではないかと考えている。

共生系形成過程で、ゲノム全体にわたって、どのような変化が起こっているかを解析した。その結果、遺伝子の元の発現量とその変化量は正に相関することがわかった。発現量の変化はそれぞれの遺伝子で異なっていたが、平均的な変化量では、元の発現量に一次に比例するのである。この比例性は、大腸菌から人間までの遺伝子発現量変化で普遍であることが上田らと共同研究で明らかになった。

生物はその環境条件が許す範囲で最大限増殖する。そして、えさの欠乏などからその増殖が抑えられる。言い換えると、自ら力学によって、まさに系が崩れる手前で安定性を保っている。これは、多くの要素が連結した系

の臨界点近傍での状況と似ている。そこで、そのような臨界点近傍で見られるべき乗則について解析した。共生系形成過程の前後の大腸菌の発現状態を網羅的に解析した。図は大腸菌ネットワークの各遺伝子の発現量（mRNA量）とそのような発現量を示す遺伝子頻度の両対数グラフである。負の傾きは発現量の大きい遺伝子はあまり多くないことを示している。傾きはほぼ $-2$ で、これは多くの臨界点現象で見られるものと共通であった。ここで特筆すべきは、共生系形成過程前後で30%以上の遺伝子の発現量に変化しているにもかかわらず、同じ傾き $-2$ をもったべき乗則が観測された点である。つまり、共生系形成過程で保存されるルールのひとつとしてべき乗則が見つかったことになる。

Yomo, T., Global change in *Escherichia coli* gene expression in initial stage of symbiosis with *Dictyostelium* cells, *Biosystems*, 73 (3), 163-171 (2004).



#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

新しい共生系が成立する過程を記載した例は世界的にもなく、内外で初めてである。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

テトラヒメナと光合成細菌の共生系に関しては、培養条件の確率に予想外の時間がかかった。

#### 〈今後の課題〉

細胞性粘菌と大腸菌との人工共生系に関する解析をさらに進める。光合成細菌とテトラヒメナの安定な細胞内人工共生系を創出し、解析することによりオルガネラの発達過程の知見が得られるのではと考えている。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 0403101448

Ueda, HR., Hayashi, S., Matsuyama, S-I., Yomo, T., Hashimoto, S., Kay, SA., Hogenesch, JB., and Iino, M., Universality and flexibility in gene expression from bacteria to human, *PNAS*, 101 (11), 3765-3769 (2004).

2) 0312241655

Sato, K., Ito, Y., Yomo, T., and Kaneko, K., On the relation between fluctuation and response in biological systems, *PNAS*, 100 (24), 14086-14090 (2004).

3) 403101429

Matsuyama, S-I., Furusawa, C., Todoriki, M., Urabe, I., and