The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	実験的共生 ： 大腸菌と細胞性粘菌を用いた実験系
Author(s)	等々力, 政彦
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2761
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

実験的共生
—大腸菌と細胞性粘菌を用いた実験系—

Induced symbiosis: Distinctive *Escherichia coli-Dictyostelium discoideum* transferable co-cultures on agar

等々力　政彦

TODORIKI, Masahiko

Department of Biotechnology

Graduate School of Engineering

Osaka University

目　次

第 1 章：緒論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・5

1.1 共生について　5

1.2 共生の重要性　8

1.3 過去における共生への実験的アプローチとその問題点　10

1.4 筆者らの共生実験　14

第 2 章：新しい共生実験系の構築・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・16

2.1 緒言　16

2.2 材料と方法　18

2.2.1 使用菌株　18

2.2.2 共培養　18

2.2.3 細胞外分泌物の分離　20

2.2.4 多糖および核酸, タンパク質の分析　20

2.3 結果と考察　21

2.4 要約　27

第 3 章：長期共生実験における形質変化・・・・・・・・・・・・・・・・・・29

3.1 緒言　29

3.2 材料と方法　30

3.2.1 実験系のデザイン　30

3.2.1.1 大腸菌と細胞性粘菌の共培養　30

3.2.1.2 大腸菌と細胞性粘菌の形質変化の追跡　31

3.2.2 培養条件　32

3.2.3 観察　34

3.3 結果　35

3.3.1 共培養における大腸菌の形質変化　35

3.3.2 共培養における細胞性粘菌の形質変化　38

3.4 考察　39

3.5 要約　40

第 4 章：総合考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・42

4.1 それぞれの実験の意味　42

4.2 菌株の検討　44

4.3 バイオフィルム　45

4.4 遺伝子発現について　47

4.5 形質変化について　48

4.6 今後の展望　51

文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・53

あとがき・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・66

第 1 章

緒論

1.1 共生について

共生という言葉は，Frank（1877）によって，地衣類の共生関係に対し，*symbiotismus* としてはじめて提示された．その後，De Bary による 1879 年の著書『共生現象』（*Die Erscheinung der Symbiose*）において，さらに概念を拡張された．De Bary は，共生を，「異種の生物が一緒になって生活すること」として定義した(Margulis, 1993; Paracer and Ahmadjian, 2000)．彼はまた共生を，敵対的（共生生物間に争いがある）と相利的（共生生物相互に利益がある）の二つに分類した．現在の理解においては，共生はおおむね，相利共生（共生によって，双方が生活上の利益を得ている状態）と片利共生（共生によって，片方が生活上の利益を得ている状態）および寄生（共生によって，一方が利益を受け，他方は害を受けている状態）の三つに分類されている（例えば Barnes, 1972; 山田ほか, 1983; 石川, 1988; Mader, 2001）．

過去の一時期において，また研究者によって，共生の用語が相利共生に限定して用いられる状況（山田ほか, 1983; Paracer and Ahmadjian, 2000）があった．しかし先述したような共生の分類は，基本的に観察者の判断にまかされており，境

界があいまいなことも多い（Barnes, 1972; 石川, 1988）．そのため，共生の用語が相利共生に限定されることは不適切であると考えられるようになってきた（石川, 1988; Margulis, 1990）．現在共生の定義は，はじめの De Bary の定義に戻って，相利共生と片利共生および寄生を含む広い意味に捉えられることが多い（例えば Barnes, 1972; 山田ほか, 1983; 石川, 1988; Mader, 2001）．本研究でも，この広義の共生の意味を採り，狭義の分類は，適宜その旨を述べることとする．

共生関係にある生物同士は，たがいに行動的あるいは生理的に緊密な結びつきを定常的に保っていることがふつうである．したがって，同じ生息場所に住んでいるだけでは，この概念には入らない（山田ほか 1983）．例外としては，例えば一過性の感染症などのように，短期的な関係も共生に含まれることがある（Margulis, 1976）．しかしその際には，病気の諸症状という形で，特異的な形質変化が認められるのである．

具体的な共生の例としては，以下のような生物関係があげられる．クマノミ亜科 *Amphiprioninae* に属する魚は，捕食者から身を守るためにイソギンチャクに寄り添って生きるという性質を持っており，片利共生として捉えられることが多いが，相利共生であるという異論もある（石川, 1988; Mader, 2001）．この共生の例では，両生物の外部形態は保たれており，したがって比較的ゆるやかな共生関係である．地衣類は，藻類と菌類の共生体そのものが生物学的分類群を形

成している，興味深い例である（Hale, 1967）．この例では，藻類と菌類とを単独で培養されているときと共生体とでは外部形態が異なっており，また共生体独特の物質生産をおこなっており，共生関係はより深い関係である（Ahmadjian, 1962; 石川, 1988; Margulis, 1993）．加えて，クロレラを細胞内共生させているゾウリムシ *Paramecium bursaria*（Karakashian, 1975; Margulis, 1993）なども深い共生関係の例としてあげられよう．よりいっそう緊密な共生の例としては，葉緑体やミトコンドリアのように真核細胞の細胞内小器官として組み込まれてしまったもので（Margulis, 1970; 石川, 1988; Margulis, 1993; Alberts et al., 2002），このような共生体は，もはやそれぞれ単独の生物として分離することは不可能になってしまっている．このように，共生生物の関係の強さはさまざまである（図 1）．

重要なことは，ほとんどすべての生物において，なんらかの共生関係が認められる（Margulis, 1993），ということである．

ひとたび共生関係になると，形質や代謝，あるいは行動などに少なからぬ変化が生じ，個々の生物に大きな影響をおよぼすことが多い．例えば地衣類では，それぞれの菌類と藻類が単独で生きているときには生産されない，共生体独自の物質を生産する（Hale, 1967）．また根粒菌は，植物の根に根粒の形成を促し，自

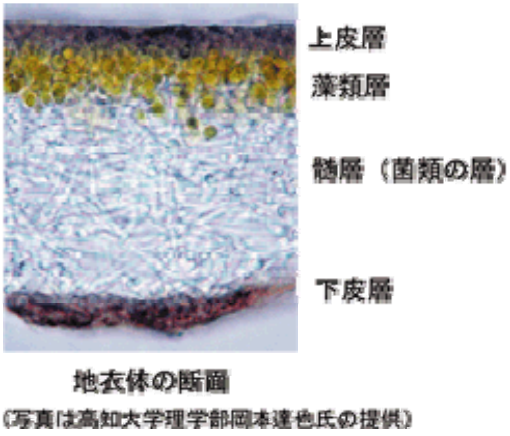
身はバクテロイドと呼ばれる状態に変化して，窒素固定を開始する（Fred et al., 1932; 石川, 1988）．さらに葉緑体とミトコンドリアは，真核細胞の生存に欠かせない ATP の合成にかかわっている（Alberts et al., 2002）．

1.2 共生の重要性

このような共生現象への人類の興味は，まずその応用からはじまった（Paracer and Ahmadjian, 2000）．例えば医学では，主要な課題として疾病の研究および治療があるが，多くの疾病は，外来の生物やウイルスがヒトと共生している状態のことを意味する（Margulis, 1976）．医療行為の歴史が古いことは容易に想像できるが，人類最古の文字記録である，楔形文字で書かれたメソポタミアのシュメール[1] 語文献にも，すでに医学に関する記述がある（Magner 2005）．このことから，医学の歴史は少なくとも紀元前 2000 年以前までは，確実にさかのぼることができる（Magner, 2005）．農学的な面では，農作物や家畜の様々な病気の研究（Margulis, 1976; Paracer and Ahmadjian, 2000）が，19 世紀以前にさかのぼることができる．その他の応用研究としては，マメ科やハンノキ属の植物に共生する根粒菌（Fred et al., 1932），あるいは菌根形成をする真菌（Smith and Read, 1997）など，農業や園芸にとって重要な問題があげられる．加えて近年は，ヒトの健康

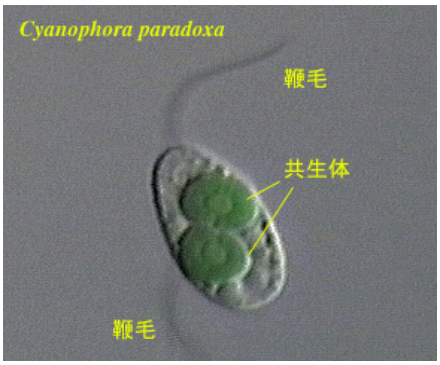
[1]「シュメール」とはアッカド人による他称で，自称は Ki-en-gi(-r)もしくは Ke-en-gi(-r)）（吉川, 1988-2001）

a イガイとカザガイ

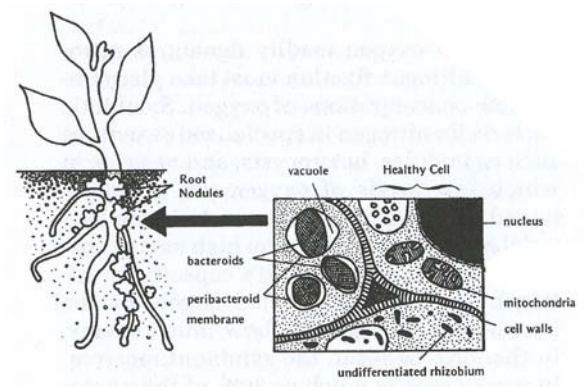


d 地衣類（ウメノキゴケ）

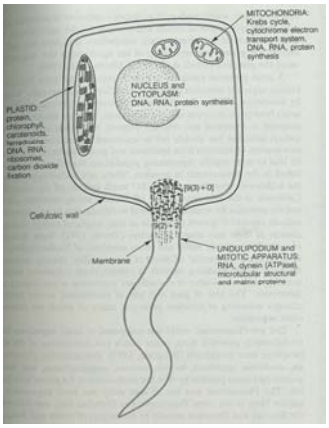
b ヤドリギ



e 灰色藻類 *Cyanophora paradoxa*



c マメ科植物と根粒菌



f 共生説による真核細胞と細胞内小器官

図 1 さまざまな共生

a 片利共生（『SF SU』http://userwww.sfsu.edu/~biol240/labs/lab_03symbiosis）

b 寄生（『電脳・土佐の植物図鑑』http://www.attaka.or.jp/hana/aki/flower35.html）

c 相利共生（Paracer and Ahmadjian, 2000）

d 相利共生（『国立科学博物館・地衣類の探求』http://research.kahaku.go.jp/botany/chii/02/index.html）

e 相利共生（『Phycological Images』http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~inouye/ino/gl/gl_pic.html）

f 相利共生（Margulis, 1993）

のために，共生生物としての腸内細菌（例えば Sears, 2005）を研究する，プロバイオティクスが興隆してきている（例えば Sonnenburg et al., 2006）．このように，共生の応用研究には枚挙のいとまが無い．

これに対し，自然科学における共生研究の意義としては，生物進化において共生現象が果たす役割の大きさがあげられるであろう（石川, 1988; Margulis, 1990）．上述したように，共生関係は，それぞれが単独で生きているときの生物の生活様式を根本的に変革してしまう可能性があることから，またすべてほとんどすべての生物において認められることから，進化における共生の意味は，重要であると考えられる．しかし残念ながら，欧米を中心とする進化研究においては，共生の果たす役割は，被食・捕食関係や競争関係と比して，いまだに過小評価される傾向にある（Margulis, 1990）．これに比してロシアでは, 1900 年代の初頭より，Фаминцын をはじめとする研究者によって，共生が進化に及ぼす影響が強調されてきている（Margulis, 1990; Khakhina, 1992）．共生関係の進化における重要性は，よりいっそう強調されるべき問題であると考えられる（Margulis, 1990）．

1.3 過去における共生への実験的アプローチとその問題点

このような状況にもかかわらず，後述するように，共生関係が構築される過程において，生物の形質変化が具体的に記録された例はほとんどない．その記録

されている数少ない形質変化の例も，後述するように不完全なものにとどまっている．共生を応用生物学的に利用したり，進化における共生関係の重要性を示すためには，まず，共生関係になかった生物同士からどのように共生関係が生じてゆくのか，という具体的な観察例は必須であると考えられる．そのためには，実際に，単独で生きられる生物同士を用いて、実験室で共生関係を実験的に構築すること（共生実験）をおこない，その間の生物のさまざまな変化を記録する方法がとられるべきであろう．

そこで筆者は，共生が進化に及ぼす具体的な影響を調べるために，実験によって共生を作り出す試みをおこなう分野として，「実験共生学（experimental symbiology）」（Lewis, 1981）を推進するべきであると考える．

共生関係を実験的に構築する試みは，1755 年の Tillet と 1807 年の Prevost による小麦の黒穂病（小麦と *Tilletia* 属のカビ）の研究や，1796 年の Jenner による種痘法（ヒトと牛痘ウイルス）など，共生という言葉が提唱された 19 世紀後半までにすでにはじまっていた（Paracer and Ahmadjian, 2000）．これら初期の実験は，科学的興味というよりも，先述したように，植物の病気の仕組みを解明するという，応用的な意味を持っていた．そして当然ながら，自然界ですでに共生しているものをあつかっていた．方法としては，共生している生物を分けたものを，もしくは共生していると考えられる生物を，再構成するという方法であった．

同様の例としてはカイコの硬化病（カイコと糸状菌 *Beauveria bassiana*），根粒（マメ科植物と根粒菌），地衣類（藻類と菌類）などがあげられる（Paracer and Ahmadjian, 2000; Fred et al., 1932; Ahmadjian, 1962）．つまりこれらの実験は，共生関係が構築される過程を観察するのではなく，共生している生物同士の関係を再構築，確認するための実験であった．

さらに後になると，自然界には存在しない共生関係を構築しようという試みがなされるようになった．例えば，もともと共生藻を持っているヒドラやゾウリムシを宿主として用い，そこに共生したことのない生物を組み込むことに成功した例や（Bomford, 1965; Karakashian, 1975; Muscatine et al., 1975; Rahat and Reich, 1985），クロレラとストレプトマイセスをジャガイモの表面で共培養して自然界には存在しなかった新しい地衣類類似体を構成させたという例が報告された（Lazo, 1966）．特筆すべきは, Jeon らによっておこなわれた一連の研究である（Jeon and Lorch, 1967; Jeon, 1995a）．彼らは実験に使用していたアメーバ *Amoeba proteus* を不注意から未知の複数の細菌（X-細菌）に感染させてしまい，その毒性によってアメーバが死んでいくことを観察した．その後，生き残ったアメーバで感染前の増殖能力を回復したものが現れたが，興味深いことに，それらのアメーバの中では, X-細菌も一定数を維持しつつ，アメーバとともに増殖していたのである．さらに驚くべきは，このようにして共生関係が成立したアメ

ーバは，もとは単独で生活できていたにもかかわらず，共生細菌を失うと自らも死んでしまうように変化していたことである．これは，共生による生物の形質変化が，実験室で具体的に観察されたはじめての例となった．

このような，数少ない実験室における新しい共生体形成も，不十分なものであった．ヒドラやゾウリムシの例では，自由生活をしている生物を取り込むことは観察したのであるが，宿主はもともと共生藻を持っていた生物であるため，非共生状態から共生にいたるまでの変化を追ったわけではない．それに比べると，地衣類類似体やアメーバと共生細菌の実験は，実験室でまったく新しい共生関係が構築され，その共生体の変化も認めることができた点で評価される．しかし，両実験とも無菌の状態で無機的培地を用いた培養（純粋培養）をすることができないため，培養液に混在している生物の影響を取り除くことはできなかった．またアメーバと共生細菌の実験においては，もとの細菌が未知のものであった．したがって，検証可能な繰り返しの実験ができなかったのである．

共生関係が構築される過程を観察するためには，共生関係にない実験生物で，かつ純粋培養できるものを用いるべきである．これまでの研究においては，そのことが十分に認識されていなかったように思われる．その一因として，上述したような共生実験が，できるかできないかよく判らない博打のような要素を持っていることがあげられよう．Margulis（1990; 1993）は，研究に対する資金が

少ない点も問題として指摘している．しかし彼女は，共生関係の形成はまれにしか起こらない事象ではないと考えている．

1.4 筆者らの共生実験

そこで筆者は，新しい共生関係を実験的に構築するに際して，これまでの共生実験で不十分であった点を是正するため，共生関係にない，純粋培養可能な生物材料を選んだ．その際，形態変化に伴うと考えられる遺伝子変化の解析も可能にするため，遺伝的によく調べられている生物材料であることにも配慮した．

その条件を満たすものとして，実験室で一般的に用いられている細菌である大腸菌 *Escherichia coli* と，真核生物の細胞性粘菌キイロタマホコリカビ *Dictyostelium discoideum* との組み合わせを選んだ．細胞性粘菌は自然状態では細菌を捕食しているが，実験室の株では純粋培養できるものが確立されている．したがって，実験室の細胞性粘菌株は，無機的な液体培地と細菌を餌にした場合の両方の条件で生育が可能である（Loomis, 1975; Sussman, 1987）．

具体的な実験としては，以下のことに取り組んだ．

第 2 章に紹介した一連の実験において，筆者は，最小寒天培地上で，大腸菌と細胞性粘菌が共存する特異なコロニーを形成することを発見した．このコロニーを用いて，大腸菌と細胞性粘菌が長期にわたって共存できるような条件を検

討した．共存して相互作用が密になる時間が長引くことによって，それぞれの生物の形質が，相手に依存するように変化するのではないかと考えたためである．その際，培地の栄養を少なくすることで，共存している生物が培地からの栄養摂取以外に，相手の生物が生合成しているものも摂取して生存してゆくようにしむけ，相手に依存する可能性を高めるように工夫した．ここではまた，共存を可能にする特徴的なコロニーについての化学的な分析もおこなった（Todoriki et al., 2002）．

次に第 3 章では，第 2 章で検討した条件を使って，植継ぎを繰り返しながら寒天培地上で共培養をおこない，一定の時間ごとに生物の形質の変化を観察した（Todoriki and Urabe, 2006）．

以上の実験の結果，純粋培養可能な生物を用いて，最小培地上で長期の共培養をおこなうことによって，独立して生育していた生物が，それぞれ相手の生物に生存を依存する共生体に変化していくことを，観察することに成功した．

この結果は，実験共生学の研究史の中で，再現可能な実験系として初めて示されたものであった．これによって，共生関係は現在でも十分成立可能な現象で，まれな現象ではないことが示唆できたと考える．

第 2 章

新しい共生実験系の構築

2.1 緒言

生物の共生関係は，早くから研究の対象となってきた．それらは，連続培養（Proper and Gaever, 1966; Hamilton and Preslan, 1970; Dent et al., 1976）や，また物理的（Jeon and Ahn, 1978）あるいは生化学的（Tsuchiya et al., 1972）方法で進められてきた．また，共生に必要な要因や遺伝子が，細菌（Jeon, 1995a; Choi et al., 1997），根粒菌（Radeva et al., 2001），真菌（Heckman et al., 2001），藍藻（Uheda and Silvester, 2001）などからあきらかにされつつある．しかし，共生関係を安定させる条件に関しては，いまだ不明な点が多い（石川, 1988; Mader, 2001）．

さらに共生関係の発達過程を調べるため，既存の共生生物を用いた共生関係の再構築もおこなわれてきた．共生生物を分け，独立に培養してから，再び共培養する実験によって，共生体を再構成することに成功している例がある（Bomford, 1965; Hale, 1967; Muscatine et al., 1975）．しかし，もともと共生関係にある生物は，独立で生存していた頃とはすでに形質が異なってしまっている．したがって共生初期に何が起こっているのかは，これらの実験から知ることはできないのである．

Jeon et al.（1967）は，アメーバ *Amoeba proteus* に感染した未知の細菌（X-細菌）について報告している．それによると，感染したアメーバは細菌による有害な影響を数年かけて克服しただけでなく，細菌に生存を依存するように変化したのである（Jeon et al., 1967; Jeon, 1995a）．彼らは研究をさらに進めて，細胞生物学的手法や分子生物学的手法で，アメーバと X-細菌の共生関係について多くのことをあきらかにした（Jeon, 1995b; Jeon, 1996）．しかし，アメーバがなぜ細菌に依存的になっていったのか，またどのように二つの生物が共生関係を構築していったのかは未解決のままである（Jeon, 1995b）．したがってこれらの一連の実験からも，共生初期に何が起こっているのかはわからないのである．

今回の研究は，遺伝子解析が充分に進んでいる 2 種の生物，大腸菌 *Escherichia coli* と細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* を用いておこなわれた．細胞性粘菌は自然状態では細菌を捕食しており，それが何らかの共存状態へと導かれるとしたら，新しい視点を提供するものと考えられる．この 2 種を最小寒天培地上で共培養したところ，特異な粘液コロニーを形成することを発見した．さらに 2 種の生物は，このコロニーの中で安定に共存していた．このコロニーの分析をおこなった．

2.2 材料と方法

2.2.1 使用菌株

使用した大腸菌 *Escherichia coli* は，グルタミン合成能欠損株である YMC21 (Δ(*glnA-glnG*)2000 Δ*lacU169 endA1 hsdR17 thi-1 supE44*) (Chen et al., 1982) で，Magasanik 博士（Massachusetts Institute of Technology）より提供していただいた．細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は HS175（*erkB*$^-$）集合能欠損株（Segall et al., 1995）で， 前田ミネ子博士（大阪大学）よりいただいた．大腸菌のプラスミドは Cormack 博士（Stanford University）より提供を受けた pKEN1 に高い蛍光量を有する突然変異の *gfp* を組み込んだ pKEN1-GFPmut2（Cormack et al., 1996）で，大腸菌を検出するのに用いた．プラスミドの形質転換は Maniatis et al.（1982）によった．形質転換した大腸菌は Olympus IX70 (Olympus optical Co. Ltd.) を用いて WIB フィルター（Olympus optical Co. Ltd.）で確認した. GFP mut2 の最大励起波長は 481 nm 最大蛍光波長は 507 nm（Cormack et al., 1996）であった.

2.2.2 共培養

pKEN1-GFPmut2 を組み込んだ大腸菌 YMC21 株は，融解した–80 ^{o}C 保存株 5 μl を, 50 μg/ml のアンピシリンを含む 2 x YT 液体培地（Maniatis et al., 1982）5 ml に植菌し, 37 ^{o}C で一晩振とう培養して増殖した．細胞性粘菌 HS175 は，融解した

100 µl の –80 ºC 保存株を, HL5（Sussman, 1987）を改変した液体培地（Glucose : 15.4 g/l, Bacto peptone : 14.3 g/l, Yeast extract : 7.2 g/l, KH_2PO_4 : 0.485 g/l, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$: 1.28 g/l, Ampicillin : 50 µg/ml, Kanamaicin : 50 µg/ml）10 ml に植菌後, 22 ºC で静置培養した.

共培養は以下のようにおこなった. 上記のとおり前培養した大腸菌と細胞性粘菌は, それぞれ 0.1 M グルタミンを含んだ C 液体培地（L-Glutamate : 100 mM, Glucose : 4 g/l, K_2HPO_4 : 10.5 g/l, KH_2PO_4 : 4.5 g/l, Thiamine·HCl : 5 mg/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 50 mg/l, Ampicillin : 50 µg/ml） (Kashiwagi et al., 2001) で洗浄した. その細胞を, 大腸菌は OD_{600} = 1.0（4 x 10^8 cells/ml）, 細胞性粘菌は血球計算板で計測して 10^6 cells/ml の濃度になるよう, それぞれの細胞を 0.1 M グルタミンを含んだ C 液体培地にけん濁した. まず C 寒天培地（最小寒天培地 ; C 液体培地に 1.5 %寒天を加えたもの）の上に 0.1 M グルタミンを含んだ C 液体培地 1 ml を滴下し, そこにそれぞれの細胞けん濁液 100 µl づつをのせ, 寒天表面上に細胞を満遍なく分散した. その寒天表面が完全に乾いたのち, 22 ˚C で培養をおこなった. 対照実験として, 大腸菌 YMC21 (pKEN1-GFPmut2) と細胞性粘菌 HS175 もそれぞれ単独で同じ条件で培養した. 細胞性粘菌は 1 ヵ月後にいたっても成育が認められなかった. 共培養した大腸菌と細胞性粘菌のコロニーは, 肉眼と位相差顕微鏡 DIAPHOT-TMD（Nikon Inc.）で観察した.

2.2.3 細胞外分泌物の分離

共培養で発達してきた粘液コロニーは，水を加えて，ピペットで水流を起こすことで寒天培地から引き剥がしたのち集め，9,000 x *g* で 4 ºC の条件で 3 時間遠心処理をした．その遠心上澄をさらに 0.22 μm セルロース膜のついた 150 ml ボトルトップ・フィルター（Becton Dickinson Labware）でろ過して，細胞を完全に取り除いた．ろ過した溶液（細胞ろ過液）は Freeze Dryer VD-800F（TAITEC Corp.）で 2 日間凍結乾燥した．凍結乾燥してできた粉末 50 mg を，滅菌した 20 ml の超純水で溶解し，4 ºC で 7 時間 Spectra/Por membrane7 MWCO 3500（Spectrum Laboratories, Inc.）を用いて，透析水を 2 度交換して透析した．透析した溶液は再び 2 日間凍結乾燥をおこない，得られた粉末量を測定し，それを細胞外成分の総乾燥重量とした．純粋培養した大腸菌 YMC21（pKEN1-GFPmut2）も同様の処理をして，対照実験とした．

2.2.4 多糖および核酸，タンパク質の分析

上記のように準備した 3500 ダルトン以下の分子を含まない透析物を用いて，核酸とタンパク質，多糖の比率を測定した．核酸の含有量は 260 nm の吸光度で測定した．タンパク質含有量は BCA Protein Assay Reagent Kit*（Peirce Chem. Co.）

を用いた BCA 法（Smith et al., 1985）で，ウシ血清アルブミンを標準にして測定した．多糖含有量はフェノール硫酸法（Dubois et al., 1956）で，グルコースを標準にして測定した．単糖は，透析物をトリメチルシリレートによってメタノリシスしたのち（York et al., 1986）, DB-1 カラム（0.25m x 15m）を装着したキャピラリー・ガス・クロマトグラフィー（Shimadzu GC-14A）を用いて分析した（Sweeley et al., 1963）．温度条件として 8 ºC/min で 260 ºC まで上昇させたのち，恒温期（140 ºC, 2 分）を設定した．

透析前後の細胞ろ過液の粘性は 30 ºC の条件で, 1.3 – 6.5 cSt オストワルド粘度計（Top®-Lab-Ware）で測定した. 3 つの試料は測定前に等量になるよう調整した.

2.3 結果と考察

大腸菌 YMC21（pKEN1-GFPmut2）株は，集合能欠損株の細胞性粘菌 HS175（*erkB*⁻）とともに 22 ℃の条件で共培養した．最小寒天培地上で，かつ比較的低温（22 ℃）の培養では大腸菌の増殖は遅くなるため，大腸菌を捕食する細胞性粘菌の増殖も制限された．

まず大腸菌の層は，一晩の培養で，肉眼で観察できるまでに，寒天培地の表面を白く薄く覆った．このときの大腸菌の増殖量は，栄養培地上におけるよりも，明らかに低かった．続いて，その白い層のあちこちから，細胞性粘菌が大腸菌を

捕食はじめたことによる，透明な斑点が現れた（図 2a および 2b）．細胞性粘菌が増えるにつれ，透明な斑点は拡がってゆき，ほぼ 5 日目になると，わずかな大腸菌層が残されるだけで，ほとんどが透明になった（図 2c および 2d）．そして培養後ほぼ 2 週間以降に，その透明な部分から，水滴を思わせる粘液コロニーが生じてきた（図 2e および 2f）．コロニーの直径は 0.5 mm から 1 cm のオーダーで，コロニーの数はプレートあたりほぼ数 10 のオーダーであった．ここで注意しておきたいのは，集合能欠損株の細胞性粘菌 HS175 を用いたのは，観察を煩雑にする子実体形成をさせないためである．実際のところ，同様の結果は野生株の細胞性粘菌でも得られている（データ非表示）．

共培養後 5 日目，細胞性粘菌がほとんど大腸菌を捕食してしまったときに，寒天培地を位相差顕微鏡下で観察した．すると図 3a のような粘液コロニーとして，大腸菌は増殖を再開したことがわかった．そして，大腸菌が増えだすようになると，細胞性粘菌もふたたび大腸菌を捕食しはじめるのが，確認できた（図 3b および 3c）．その後，粘液コロニーは成長し，細胞性粘菌もその中で増殖していった（図 3d）．

このような観察事実は，別の株を用いておこなわれた，液体培地による大腸菌と細胞性粘菌の連続培養の個体群動態（Dent et al., 1976; Tsuchiya et al., 1972）とよく一致している．それによると，両生物の個体数は安定期になるまで交互に

増減を繰り返したのである．しかし，粘液コロニーにおいて認めれらた細胞外分泌物は，液体培地の連続培養からは報告されなかった．

上記した観察結果は，最終的に共生関係にいたるであろうと考えられる共存状態の，初期のものであると考えた．

次に，大腸菌と細胞性粘菌が共存する粘液コロニーが安定であるか調べるため，粘液コロニーを植継いだ．植継ぎは，火炎滅菌したスパチュラを用いて，粘液コロニーをすくい取り，新しい最小寒天培地に移しておこなわれた．植継いだ粘液コロニーは，5-10 日ほどの培養で増大が確認できた．注目すべきは，ひとたび粘液コロニーとして共存状態が確立されると，植継いだときに，はじめから粘液コロニーが出現することである．大腸菌のコロニーを，細胞性粘菌が大規模に捕食する（図 2a-2d）ことは認められなかった．このような共存状態は，3 ヶ月間安定であることも確認した．

続いて，粘液コロニーの粘液の性質を特定するため，我々は粘液コロニーの細胞外成分と大腸菌を純粋培養したコロニーの細胞外成分とを分析した．細胞性粘菌は，共培養と同様の条件で純粋培養することができないため，細胞外成分の分析をおこなわなかった．

まず，粘液コロニーの粘性の測定をおこなった．同重量・同条件で測定した透析前の細胞ろ過液の粘性は，粘液コロニー由来の試料の方が，大腸菌の純粋培

養のものよりも高いことを確認した（データ非表示）．透析によって 3500 ダルトン以下の分子を除いた，粘液コロニーの細胞ろ過液（表 1 の「透析後」）の粘度は，透析前に比べて下がらなかった．したがって，粘液コロニーの粘性を高めているのは, 3500 ダルトン以上の細胞外物質であることがわかった（表 1）．

次に，細胞外高分子の成分分析をおこなった（図 4）．粘液コロニーの高分子細胞外成分は，細胞ろ過液乾燥重量のうち 12.9 %をしめ（図 4 b），大腸菌の純粋培養のもの（図 4 a; 3.9 %）より高い比率を示した．前者の高分子成分は，多糖類を主要成分としていた．

細胞外多糖成分の単糖分析は，ガス・クロマトグラフィーを用いておこなった．それによると，多糖を構成する単糖組成は，粘液コロニーと大腸菌の純粋培養のコロニーとでは大きく異なっていることが判った（図 5）．培地にも含まれているグルコースは，粘液コロニーからも大腸菌の純粋培養コロニーの透析済み細胞ろ過液からも見つかった．加えて粘液コロニーからは，培地に含まれていないキシロースとガラクトースが検出された（図 5a および 5b）．このことは，糖を作る代謝系に変化が生じたことを示唆している．

以上の結果は，増大した多糖成分が，大腸菌と細胞性粘菌が共存しているコロニーの，粘液の主成分をなしていることを示唆している．

さらに，粘液コロニーの粘液が，大腸菌による細胞外分泌物であるかを確認し

た．細胞性粘菌に対して毒性を示すサイクロヘキサマイド（300 μg/ml）を含んだ新しい最小寒天培地に，細胞性粘菌細胞の濃度が 10^6 cells/ml になるように C 液体培地で希釈した粘液コロニーを，共培養と同様に一面に植菌した．サイクロヘキサマイドを含んだ培地は細胞性粘菌を全滅させたが，大腸菌の増殖には影響を示さなかったことを，顕微鏡観察で確認した．そのようにして生じた大腸菌だけのコロニーも，粘液コロニーとしての外観と特徴（図 4c および図 5c）を維持していた．粘液コロニーは，同じ状態で生育させた大腸菌の純粋培養のコロニーとは形質がまったく異なっていた．前者は透明なドーム状の形態のコロニーであるのに対し，後者は黄色の光沢のない平板なコロニーであった．

細胞性粘菌は，細菌を捕食する性質があることは知られている．今回の研究が行われたような環境下で 2 つの生物を混合した場合，通常は細菌を食べつくしてしまうであろうと考えられる．しかしいくつかの被食・捕食関係についてのモデルが示しているように（Rosenzweig, 1971; Yodzis and Innis, 1992; Takahara, 2000），我々は，最小寒天培地上において，被食・捕食関係にある大腸菌と細胞性粘菌が共存することを示した．それは，粘液コロニーに包まれた中でのみ観察されたことから，粘液が 2 つの生物種が共存する環境を提供しているであろうことを示している．

一連の詳細なアメーバと X-細菌の共生の研究において X-細菌の起源が未知で

表 1 粘液コロニーの細胞外成分の粘性（30 ºC で試験）.

試料	時間（sec）*	粘度 (mPa·sec)
透析前	372.44 ± 1.01	1.85
透析後	574.96 ± 2.83	2.84
透析水	168.32 ± 0.04	0.96
蒸留水（基準）	162.01 ± 0.55	0.80
標準試料**	414.96 ± 0.04	1.61

*時間：時間は重力にしたがって粘度計を通る時間を測定した. 粘度は 3 回の測定の平均.
**標準試料：標準試料は工業技術院研究所において試験され, 30 ºC で 1.61 mPa·sec の粘度であることが保証されている（沖真弥原図）.

あったのに対し，我々は，研究のよく進んでいる2つの種を用いた再現可能なモデルを提供した．簡便さや再現性，そして異なる種が共存にいたるまでが短期間であることが，我々の系の特徴である．この系は安定に再現可能であることから，共生進化（symbiogenesis; Margulis, 1993）の初期にどのように共生関係が深まってゆくかを知るための，新しいモデル実験系となるであろう．加えて，大腸菌も細胞性粘菌も，ともにゲノム配列がすでに知られている（Blattner et al., 1997; Kay and Williams, 1999）．したがってこの実験系は，共生へと遷移するときのゲノム・ネットワークを解析するときに，そしてその際のゲノム構造の変化を追うときに，効力を発揮するであろう．

2.4 要約

研究が充分におこなわれている2種の生物，大腸菌 *Escherichia coli* と細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* を最小寒天培地で22℃の条件で共培養すると，2週間ほどで共存状態になった．共存しているコロニーは粘液質で，どちらの純粋培養したコロニーとも異なっていた．純粋培養した大腸菌のコロニーと粘液コロニーを比較したところ，後者では高分子の量が著しく高まっており，そのうち多くが多糖類であった．多糖を構成する単糖の分析からは，純粋培養の大腸菌コロニーでは認められなかったキシロースとガラクトースが検出された．この

ような簡単で繰り返し可能な実験は，とくに初期の共生を調べるための新しいモデル実験として有効である.

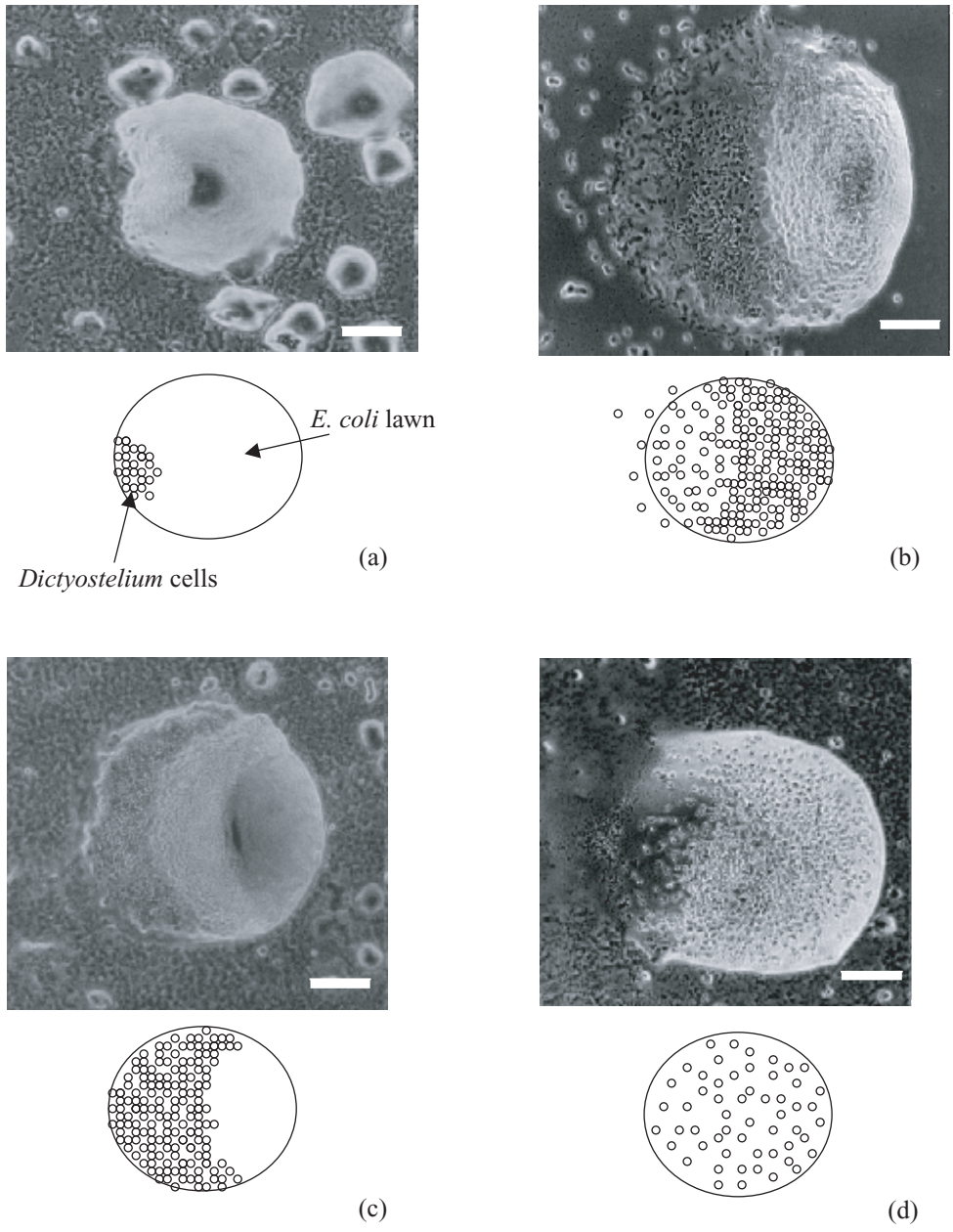


図 3　位相差顕微鏡（x 100）による粘液コロニーの形成へといたる過程の観察。詳細は本文参照。スケールは100 μm。

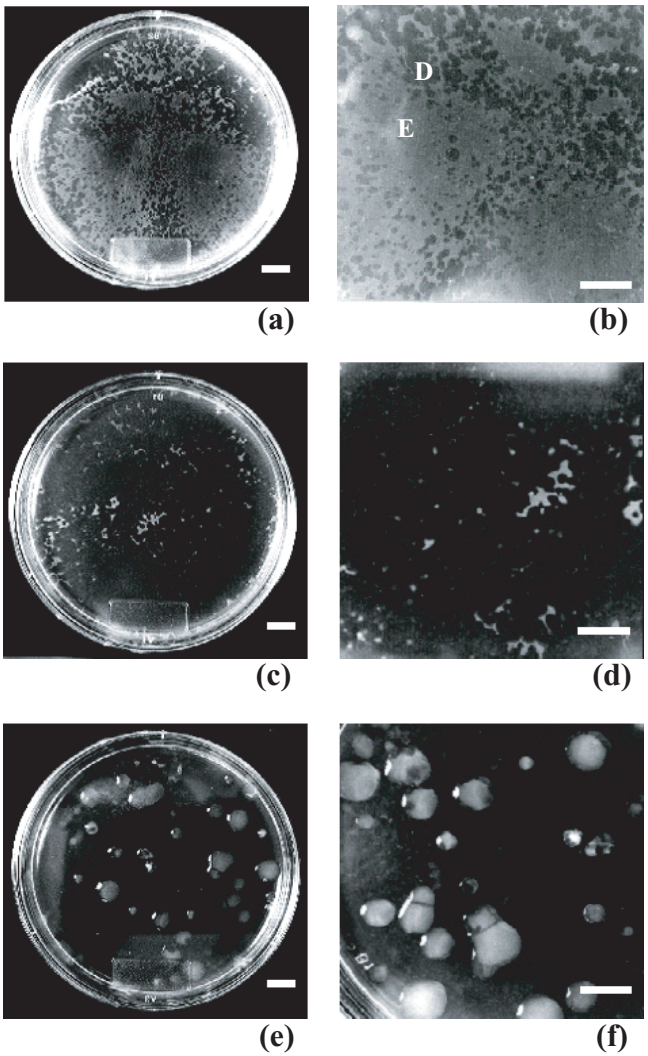


図 2　大腸菌YMC21（pKEN1-GFPmut2）と細胞性粘菌HS175の共培養。共培養は最小寒天培地上で22 oCの条件でおこなった。寒天培地は裸眼で2週間以上観察した。(a) 共培養1日後；(c) 5日後；(e) ほぼ2週間後。詳細は本文参照。(b)と(d)、(f)は(a)と(c)、(e)それぞれの拡大。Dは細胞性粘菌*D. discoideum* HS175、Eは大腸菌*E. coli* YMC21 (pKEN1-GFPmut2)を示す。
スケールは1 cm。

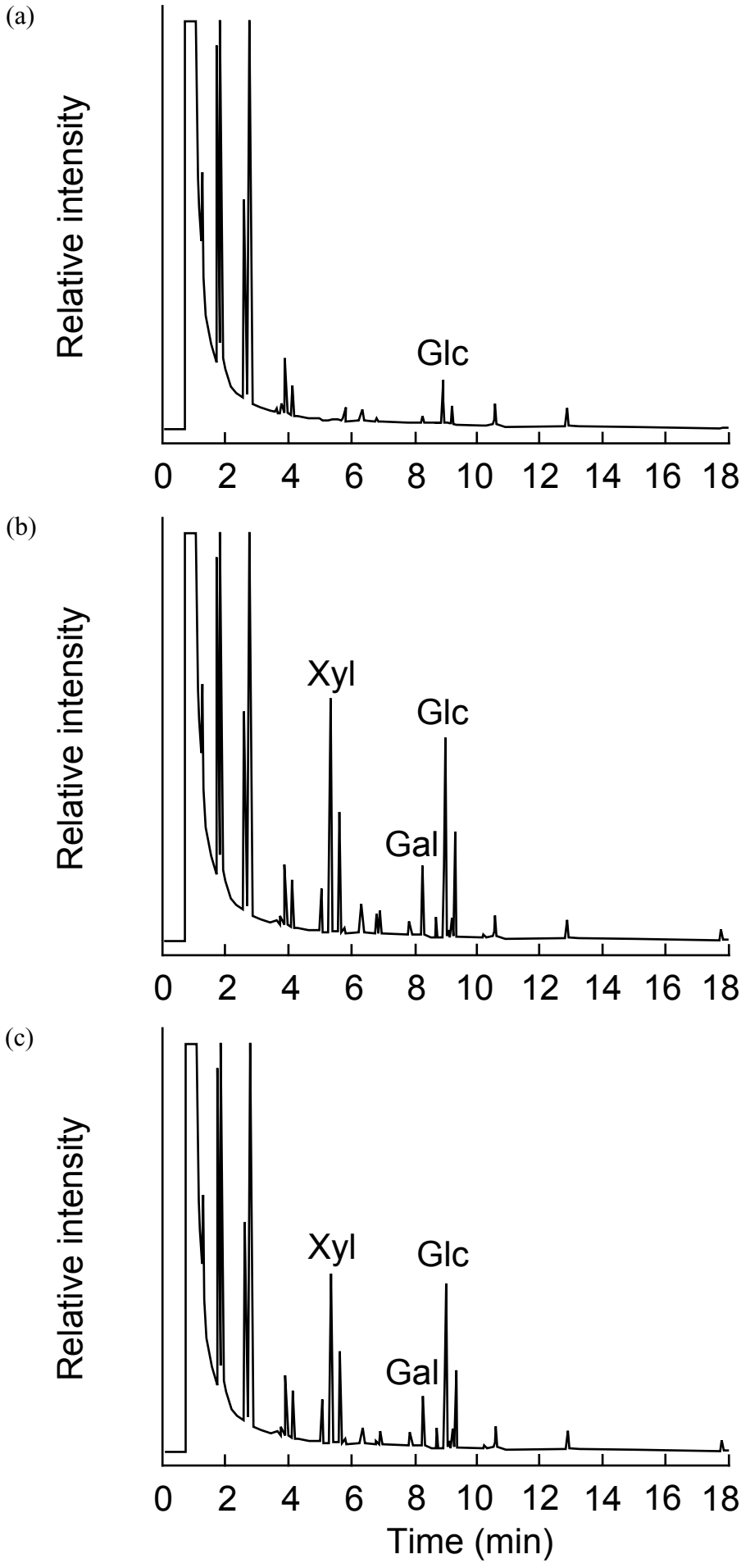


図 5 透析済み細胞ろ過液の細胞外成分の量的解析試料（「試料と方法」参照）。(a) YMC 21 (pKEN1-GFPmut2) の純粋培養の透析済み細胞ろ過液；(b) YMC21 (pKEN1-GFPmut2)と細胞性粘菌HS175株の共細胞からの透析済み細胞ろ過液；(c) 共培養した大腸菌のみの純粋培養からの透析済み細胞ろ過液（沖真弥原図）。

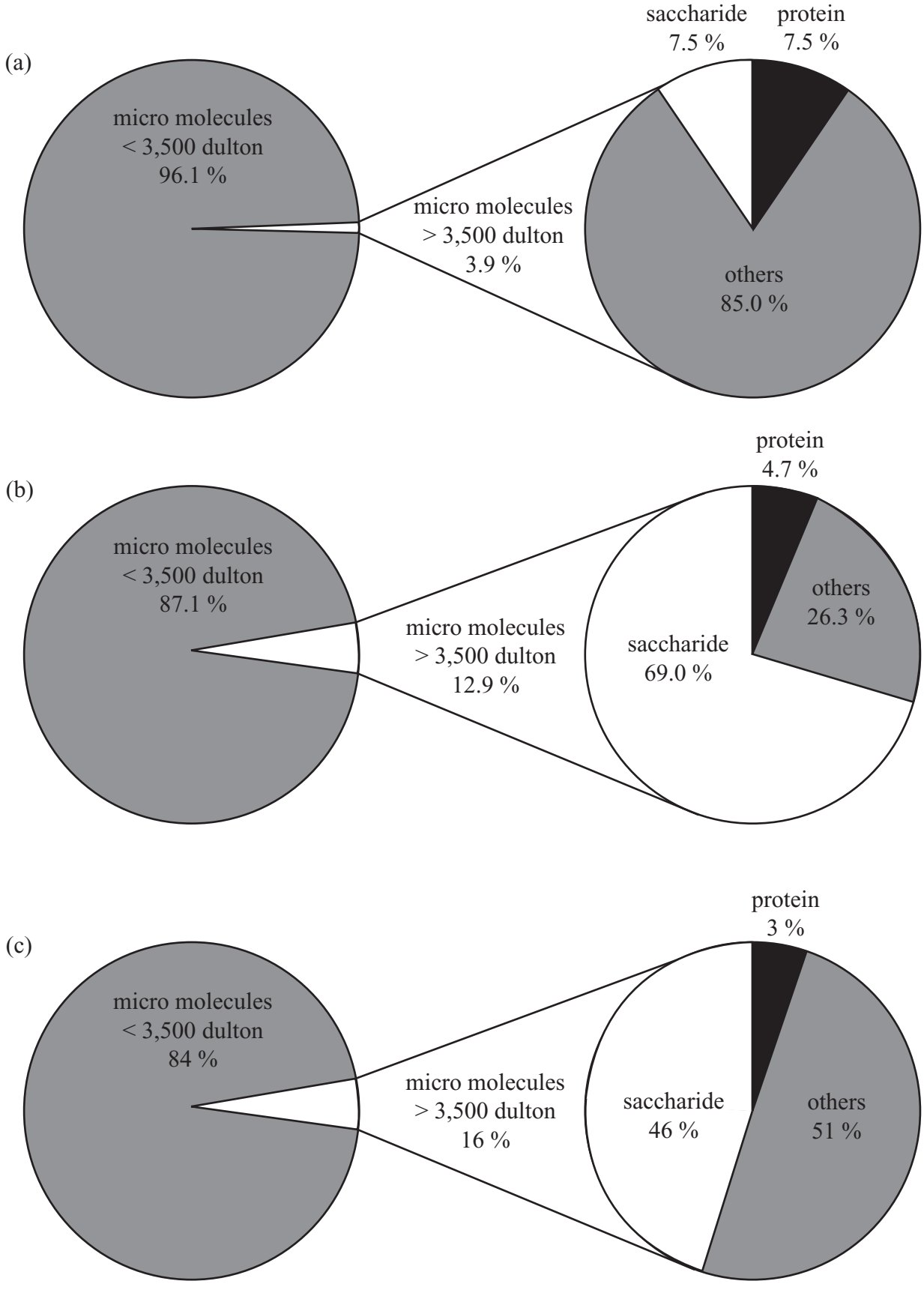


図 4 透析済み細胞ろ過液の細胞外成分のガス・クロマトグラフィーによる質的解析試料（「試料と方法」参照）。(a) YMC21 (pKEN1- GFPmut2) の純粋培養の透析済み細胞ろ過液；(b) YMC21 (pKEN1-GFPmut2)と細胞性粘菌HS175株の共細胞からの透析済み細胞ろ過液；(c) 共培養した大腸菌のみの純粋培養からの透析済み細胞ろ過液（沖真弥原図）。

第 3 章

長期共生実験における形質変化

3.1 緒言

歴史的に, 19 世紀のはじめまでには, 自然界にある共生関係を再構築する実験ははじまっていた（Fred et al., 1932; Ahmadjian, 1962; Paracer and Ahmadjian, 2000）. それらの実験はふつう, 共生しているパートナー（シンバイオント）を別々に分けておこなわれた. その後シンバイオントは別々に培養され, それから再構成された. それ以降, 宿主のシンバイオントに自由生活している生物を取り込ませる実験がおこなわれたり（Bomford, 1965; Rahat and Reich, 1985）, いくつかの実験ではまったく新しい共生が観察されたりした（Lazo, 1966; Jeon, 1995）. しかし, 新しく生じた共生関係も, シンバイオントの一方もしくは両方が純粋培養できないことから, 観察は限定されたものになっていた. つまり, 混入している未知の生物からの影響を取り除くことができないため, 共生が成立する過程を実験的に再現することが難しいのである. 加えて, 共生関係に至る変化は, 部分的にしか報告されていない. これらの観点から, 共生までの一連の過程は, 十分には実証されていないのである.

我々は, 遺伝的に十分研究が進んでいる 2 つの生物として, 一般的な細菌であ

る大腸菌 *Escherichia coli* と細菌を捕食する細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum*（Blattner et al., 1997; Eichinger et al., 2005）を実験試料として選んだ．そして，両生物を最小寒天培地上で 22 °C の条件で共培養すると，安定に共存することを発見した（Todoriki et al., 2002）．両生物が共存している透明でドーム型のコロニーは，大腸菌によって生産される粘液が関与していた．このコロニーは共培養していない大腸菌では認められず，後者の場合は黄色い平板な光沢のないコロニーになった．

すでに報告されているように（Margulis, 1993; Jeon, 1995a），長期間の共培養は形質変化を増大することが期待されている．そこで，1998 年 9 月より 2002 年 11 月まで長期間にわたる粘液コロニーの植継ぎ実験をおこない，その期間中の両生物の形質変化を観察した．

3.2 材料と方法

3.2.1 実験のデザイン

3.2.1.1 大腸菌と細胞性粘菌の共培養

大腸菌と細胞性粘菌の長期共培養：粘液コロニーを 1 カ月おきに植継ぎながら，同時に–80 °C での保存株の作成も継続的におこなった．対照実験として，同じ条件下で大腸菌単独の植継ぎをおこなった．もう一つの対照実験として，同じ条

件下での細胞性粘菌の単独培養はできなかった. かわりに栄養液体培地での植継ぎをおこなった.

3.2.1.2 大腸菌と細胞性粘菌の形質変化の追跡

長期共培養した大腸菌と細胞性粘菌は, それぞれ前培養の条件に戻すことによって, 共培養前の状態との比較をおこなった. 対照実験である大腸菌を単独で培養した試料も, 同様の比較をおこなった. 具体的には以下の通り.

大腸菌の形質変化：比較の内容は, 3 種類. 1 つ目は, 抗生物質を含む栄養液体培地で 37 ˚C で振とう培養し, 増殖を観察した（サンプル数 2）. 2 つ目は, 抗生物質を含む栄養寒天培地で 37 ˚C 培養し, コロニーの直径を測定した（サンプル数 12）. 3 つ目は, 抗生物質を含む栄養寒天培地で 37 ˚C 培養し, コロニーの GFP 発現率を測定した（サンプル数 1）.

細胞性粘菌の形質変化:比較の内容は, 栄養液体培地で 22 ˚C で静置培養し, 増殖を観察した（サンプル数 1）.

3.2.2 培養条件

実験に用いた生物材料は, 第 2 章と同様, GFP とアンピシリン耐性遺伝子を含むプラスミドを転移した単一クローン大腸菌と, 集合能欠損株の単一クローン細胞性粘菌（Todoriki et al., 2002）を用いた. それぞれの生物は, 別々に前培養した後, C 培地（Kashiwagi et al., 2001）に 0.5 mM グルタミンを加えた液体培地（CG 培地）を用いて, それぞれ細胞濃度を 4 x 10^7/ml と 10^5/ml に調整した.

1 ml の細胞けん濁液を CG 寒天培地（表 2）の上に植菌し, 表面を乾燥したのち, 22 ˚C で培養したものを, 第 1 世代とした. 1 ヶ月後に生じた粘液コロニーのうち, ~100 µl（~10^6 の細胞性粘菌と不確定な数の大腸菌を含む）を火炎滅菌したスパチュラで集め, 1 ml の CG 液体培地にけん濁した. 細胞けん濁液の細胞性粘菌の細胞数は, 位相差顕微鏡 DIAPHOT-TMD（Nikon Inc.）を用いて血球計算板（Nitirin）上で計測し, 10^6/ml に調整した. その後, 10 µl の細胞けん濁液を 2 枚の CG 寒天培地シャーレ（90 x 15 mm）上にそれぞれ 25 点づつ滴下し, 22 ˚C で培養し, 第 2 世代とした.

並行して, 0.1 M グルタミンと 10 %ジメチル・スルホキシドを含む C 培地をフィルター滅菌した液に細胞をけん濁して, Laine et al.（1975）の方法を改変した方法で, 試料の凍結保存もおこなった. 2 つの 600 µl 試料はそれぞれ 2 ml プラスチック瓶に入れ, –80 ˚C で保存した.

表 2 培地組成

大腸菌の純粋培養用培地	成分
LBG-a 培地	Bacto triptone：10 g/l, Yeast extract：5 g/l, NaCl：10 g/l, Glutamine：2 mM, Ampicillin：50 µg/ml
LBG 寒天培地	Bacto triptone：10 g/l, Yeast extract：5 g/l, NaCl：10 g/l, Glutamine：2 mM, agar：1.5 %
LBG-a 寒天培地	Bacto triptone：10 g/l, Yeast extract：5 g/l, NaCl：10 g/l, Glutamine：2 mM, Ampicillin：50 µg/ml, agar：1.5 %

細胞性粘菌の純粋培養用培地	成分
HL5-ak 液体培地 （前田ミネ子先生（大阪大学）より）	Glucose：15.4 g/l, Bacto peptone：14.3 g/l, Yeast extract：7.2 g/l, KH_2PO_4：0.485 g/l, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$：1.28 g/l, Ampicillin：50 µg/ml, Kanamaicin：50 µg/ml

共培養培地	成分
CG 寒天培地	Glutamine：0.5 mM, L-Glutamate：100 mM, Glucose：4 g/l, K_2HPO_4：10.5 g/l, KH_2PO_4：4.5 g/l, Thiamine·HCl：5 mg/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$：50 mg/l, Ampicillin：50 µg/ml, agar：1.5 %

–80 ˚C から凍結保存細胞を再生するときは，速やかに解凍し，いくつかの実験に用いた．第２世代の滴下点のうち，コロニーが一番よく発達した１点を，次世代の植継ぎの候補とした．その後コロニーは毎月，第2世代と同じ方法で植継ぎをおこなった．位相差顕微鏡下の観察で細胞分裂の遅延が認められた場合，植継ぎまでの期間は通常の細胞増殖が認められるまで，最長で 2 ヶ月まで延期された．コロニー内の細胞性粘菌細胞の数が，次の植継ぎに十分でないときには，コロニーをそのまま新しい CG 寒天培地に移し，十分な量が得られるまで培養した．

対照実験として，大腸菌を 4 x 10^7 細胞含む 1 ml の CG 液体培地を CG 寒天培地の上に植菌，乾燥し, 22 ˚C で 1 ヶ月間純粋培養した．生じてきた大腸菌は火炎滅菌したスパチュラでほぼ 10 µl（10^9–10^7 細胞）集め，そのまま新しい CG 寒天培地の上に塗り広げる操作を毎月おこなった．さらに，残ったコロニーからほぼ 10 µl の大腸菌細胞を，共培養と同様の方法で凍結保存した．

並行して，増殖後期の 100 µl (10^7–10^5 細胞)の純粋培養した細胞性粘菌は，HL5-ak 液体培地（表 2）10 ml で, 2 週間ごとに植継ぎをした．

3.2.3 観察

凍結保存した共培養試料は速やかに解凍し，三つに分けた．そのうち二つは大

腸菌細胞の性質を観察するのに用いた．純粋培養した大腸菌試料は二つに分けた．

最初の共培養および純粋培養した大腸菌の試料は, LBG-a 培地（表 2）に植菌し, 37 ˚C で振とう培養をおこなった．大腸菌細胞の増殖曲線は, BioSpec-mini（Shimadzu）を用いて 600 nm の光学密度 (OD_{600})で測定し, その最大増殖時の平均数を調べた.

共培養および純粋培養した大腸菌の第二の試料は希釈して, LBG 寒天培地と LBG-a 寒天培地（表 2）に植菌し, 37 ˚C で培養した．アンピシリン耐性は, LBG 寒天培地でのコロニー形成単位 (CFU) に対する, LBG-a 寒天培地の CFU の値を, パーセントで示した．また, 寒天培地でのコロニー増殖能を表すものとして, コロニーの直径の変化を経時的に測定し、その最大時の値を調べた．さらに蛍光顕微鏡をもちいて（Todoriki et al., 2002）, LBG-a 寒天培地上での GFP 発現率, すなわち蛍光を発するコロニー数（CFU）を全コロニー数（CFU）で割った値も計算した.

第三の試料（共培養したもののみ）は, CG 寒天培地上に植菌し, 実験に十分な量の細胞性粘菌細胞が得られるまで, 22˚C で培養した．その後粘液コロニーを 10 ml の HL5-ak 培地にけん濁し, 10^4/ml の細胞性粘菌細胞になるように調整したのち, 22 ˚C で静置培養した．細胞性粘菌の細胞数は位相差顕微鏡下で測定した.

3.3 結果

3.3.1 共培養における大腸菌の形質変化

まず，長期共培養した大腸菌と，長期純粋培養をおこなった大腸菌の形質の比較をおこなった.

共培養した大腸菌の形質は，アンピシリン入りの液体培地に移し，共培養前の条件である 37 °C で培養して調べた．細胞性粘菌細胞はその条件では生育することはできない．大腸菌の液体培地に移してからの最大増殖時の細胞数を調べたところ，実験が開始してまもなくその数は減少したことが確認され，実験 75 日目には増殖が認められなくなった（図 6a）．このような結果にもかかわらず，共培養条件においては，大腸菌細胞は粘液性を持ったまま安定に植継ぎが可能であった.

さらに，大腸菌の寒天培地上での性質を調べるため，大腸菌を寒天培地上に移し，37 °C で培養した．アンピシリン耐性体の比率は，アンピシリンを含む培地と含まない培地におけるコロニー形成単位（CFU）を比較して求めた．アンピシリンを含まない寒天培地の CFU は 10^5–10^9/mL であったが，それを総大腸菌細胞数とみなした．共培養を経ない大腸菌のアンピシリン耐性体の比率は 99.4 %であったが，培養が始まるとまもなく低下し，共培養開始後 14 日（共培養開始後初めての測定）以降は 0.3 %（± 0.5 s.d.; n = 12）で維持された．同時に，アンピシ

リン存在下での大腸菌細胞のコロニーの直径と GFP の発現も調べられた．共培養のコロニーでは共培養後 75 日目に，コロニーの直径がほぼ半分になった（図 6b）．このコロニー直径の減少は，共培養後 75 日に認められた細胞濃度の減少と呼応している．GFP 発現率は，総アンピシリン耐性細胞のうち，GFP を発現している細胞数で求めた．すると，共培養後 75 日目に 96.0 %であった GFP 発現率が, 101 日目では 0 % へと劇的に減少したことがわかった（図 6c）．

それらの共培養の結果と並行して，同様の変化が純粋培養でも生じたのかを調べた．純粋培養の結果は共培養のものとは異なっていた．実験後 75 日目の測定においてアンピシリン耐性を失った共培養とは異なり，純粋培養した大腸菌のアンピシリン耐性は，実験後 382 日目の測定時までは確認されたが，552 日目の測定時には失われていた．さらに寒天培地上のコロニーの直径は，552 日目の測定時には，それ以前の直径の半分になった（図 6b）．同様の減少は共培養では 75 日目に観察された．寒天培地上での GFP 発現（図 6c）も 552 日目に失われたが，共培養では 75 日目に失われた．しかし，アンピシリン耐性の比率は，純粋培養開始後初めての測定である 101 日目以降では, 3.2 % （±3.9 s.d.; $n = 9$）と低い値に維持された．これらのことから，共培養と純粋培養では大腸菌の変化が異なっていることがあきらかであった．

3.3.2 共培養における細胞性粘菌の形質変化

細胞性粘菌の形質は, 液体培地（大腸菌は増殖できない）に移したときの増殖能（図 7）と細胞の形態（図 8）で調べた. 共培養した細胞は, 共培養の期間中ずっと, 粘性コロニーの中では活発な増殖を示した（図 8a, 8b）. 実験が開始されてから 259 日目までは, 細胞を液体培地に移したときに, 細胞は通常の増殖を示し（図 7）, 細胞も生き生きとしていた（図 8c）. その状態は, 液体培地で純粋培養しているときに認められるものと同様であった. 297 日目から 552 日目の間では, 細胞の形態は図 8c のように活発なままであるのに, 最大増殖したときの細胞数が 259 日目の 1/10 以下の値に落ちてきてしまった（図 7）. さらに 645 日目以降は増殖が認められなくなり（図 7）, 細胞も縮んで丸くなり, 液体培地に移してから 10 日ほどで死んでしまった（図 8d）. 図 7 に示した細胞の増殖曲線の詳細は図 9 に示した. 以上から, 細胞性粘菌の形質の変化は二つの時期に分けられた. 一つは 259 日目の測定時より以前の段階で, 細胞性粘菌は自由生活しているものと同様の状態であり, その後徐々に増殖能力が落た. そして二つ目は, 645 日目以降の測定時において観察された, 大腸菌に対しての依存性が生じた時期である.

これに対し, 液体培地で純粋培養した細胞性粘菌は, 4 年の植継ぎの間, 細胞の増殖能をずっと維持していた（図 10）.

3.4 考察

液体培地に移植して測定した，大腸菌の GFP 発現の消失とアンピシリン耐性の消失は，プラスミドを失ったことによる形質変化である可能性を示唆している．しかし，プラスミドの喪失は，寒天培地上で一定のレベルのアンピシリン耐性が維持されていることを説明してはいない．そのため，これは今後の課題となるであろう．

Matsuyama et al.（2004）のように，すでに我々の研究グループは大腸菌の遺伝子発現の比較を開始している．この研究は，植継ぎにおける遺伝形質の変化をあきらかにするであろうと期待される．

共培養した大腸菌に認められた変化が，純粋培養したものの変化よりも 1 年以上も早く起こったことは，図 6 よりあきらかである．したがって，この変化は細胞性粘菌によって引き起こされたのである．

液体培地で純粋培養した細胞性粘菌は，4 年の植継ぎの間，細胞の増殖能を維持し（図 10），かつ生き生きとした状態（図 8c）を保っていた．この条件は共培養した条件（その条件では細胞性粘菌を単独で培養できない）とは異なっているのだが，共培養による細胞性粘菌の変化が，単純に細胞の老化では説明することができないことを示している．

純粋培養できる実験室用の細胞性粘菌株は，3 つの遺伝子，*axe*A と *axe*B そして

*axe*C が突然変異している（Williams et al., 1974; North　and Williams, 1978）．このことから，細胞性粘菌の変化は，これらの復帰突然変異が生じた結果であることも考えられる．しかしながら，3 つの遺伝子が復帰する可能性は，低いように思われる．

共培養した生物は，それぞれ純粋培養において増殖する能力を失ってしまった. 4 年間の培養期間（29 世代）中，その変化は大腸菌では実験開始後 32-101 日目（第 2-4 世代），細胞性粘菌では 259-645 日目（第 8-13 世代）でおこった.

今回の実験結果は，自由生活から相互依存的な関係になってゆくという，予想されていた共生の進化の過程（Margulis, 1993）によく一致している．したがって，この繰り返し可能な実験は，共生関係へといたる進化の過程を追う，有効なモデルとなりうるであろうと考えている.

3.5 要約

共生はほとんど普遍的な現象であるにもかかわらず，共生関係が新しく構築されてくる過程はほんの少ししか報告されていない．アメーバと細菌の共生の成立が Jeon と彼の同僚らによって観察されたが，共生している生物が純粋培養できないことから，それを実験的にたどりなおすことは難しい．共生の起源についての詳細，とくに実験室でつくられる共生については，あらゆる意味で未

知なのである．ここに，大腸菌 *Escherichia coli* と細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* の 4 年間にわたる植継ぎ実験を紹介した．両生物は，それぞれ対照実験として継代しながら純粋培養をおこなったが，その条件では純粋培養する能力を維持し続けた．しかしながら，共培養した両生物では，純粋培養可能な性質を失っていった．共培養後 32-101 日目の間に大腸菌が，259-645 日目の間に細胞性粘菌がそれぞれ純粋培養能力を失ってしまった．しかし両生物は，4 年間にわたって，共培養は常に可能であった．我々はこの実験系で，それぞれの生物の表現型の変化を追跡した．大腸菌も細胞性粘菌も，純粋培養可能であって，遺伝的にもよく調べられている．この実験は，比較的単純なものであり，実験室で研究するのに都合のよいモデル実験である．

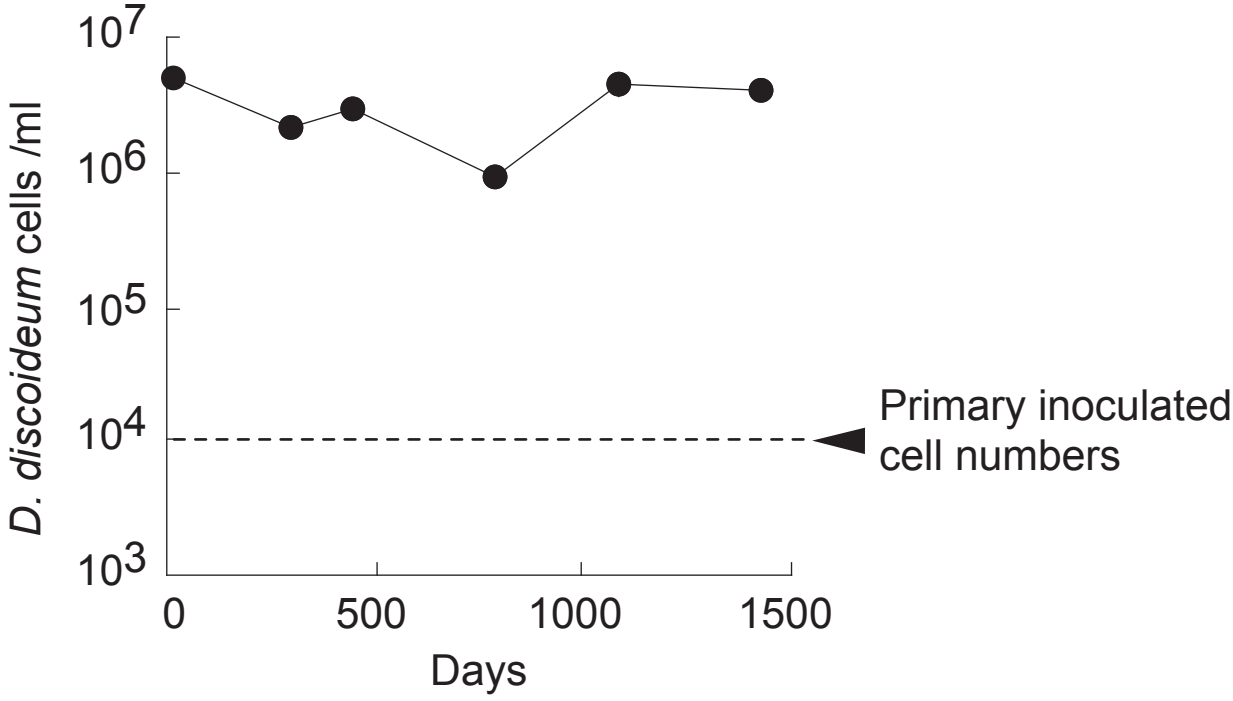


図 10　液体培地へ移してから15日後の、長期純粋培養中の細胞性粘菌の細胞数。

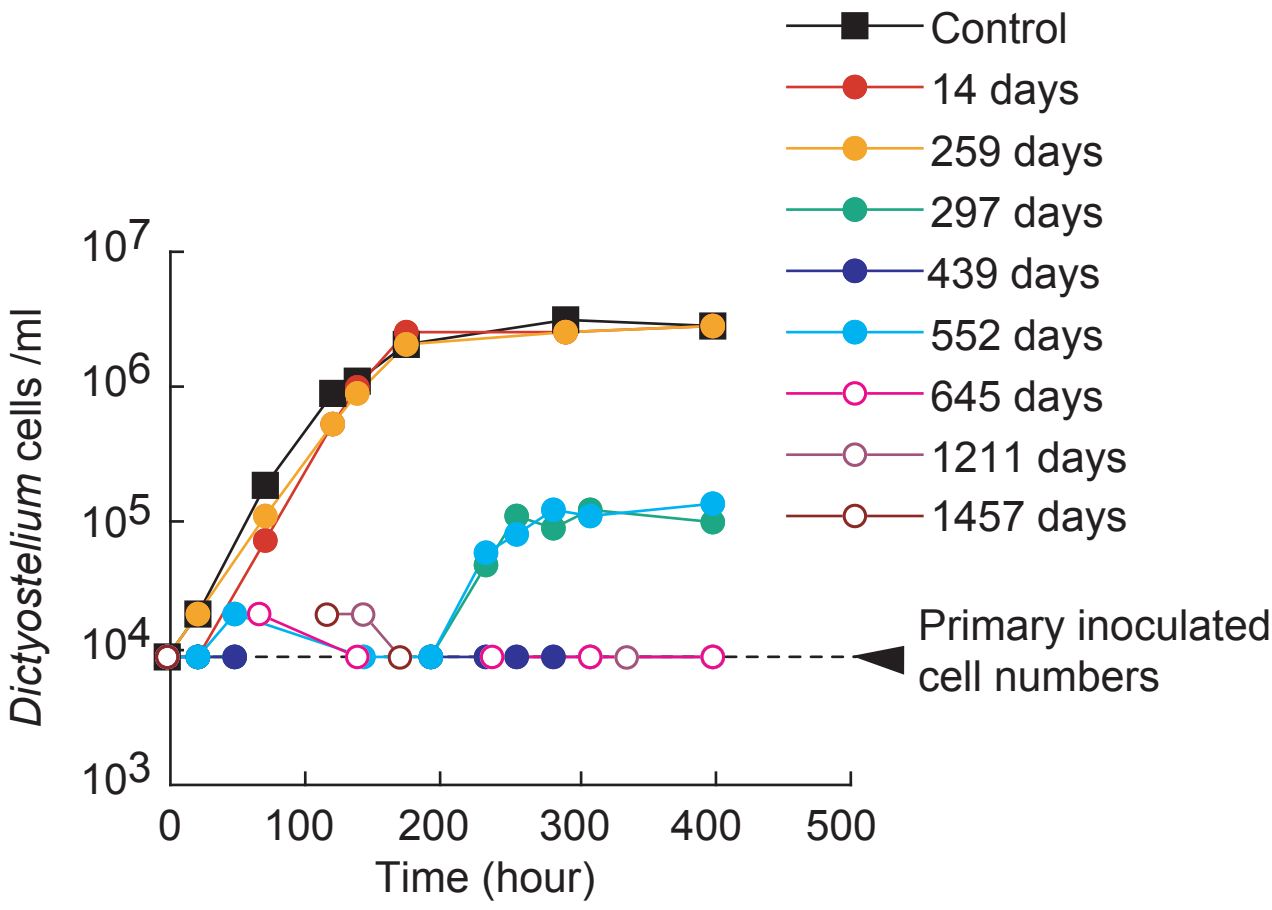


図 9　細胞性粘菌の個々の増殖曲線。

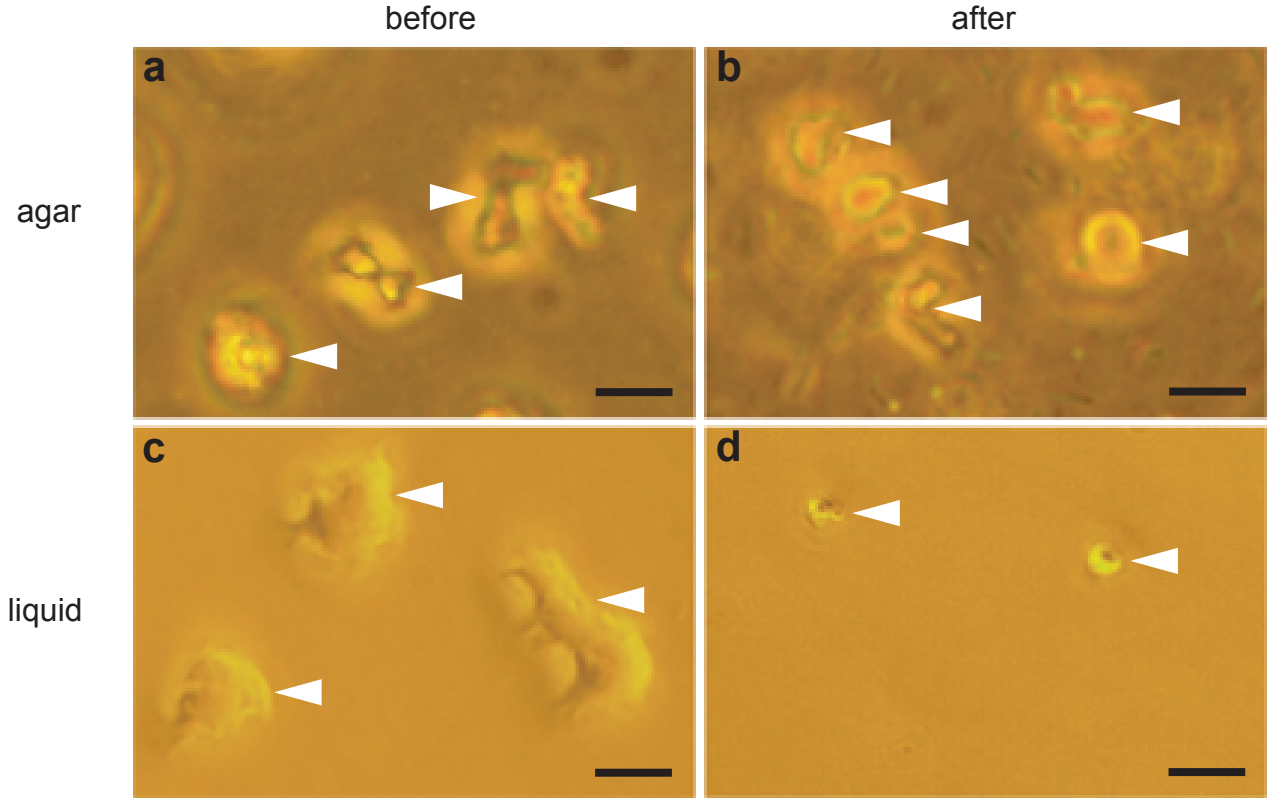


図 8　長期共培養中の細胞性粘菌における液体培養能を失う前（259日目；aとc）と後（645日目；bとd）の細胞形態。ここの細胞は矢印で示した。共培養した細胞はCG最小寒天培地で観察された（aとb）。その後細胞はCG寒天からHL-5ak液体培地へと移され（「試料と方法」参照）、15日後に観察された（cとd）。スケールは10 μm。

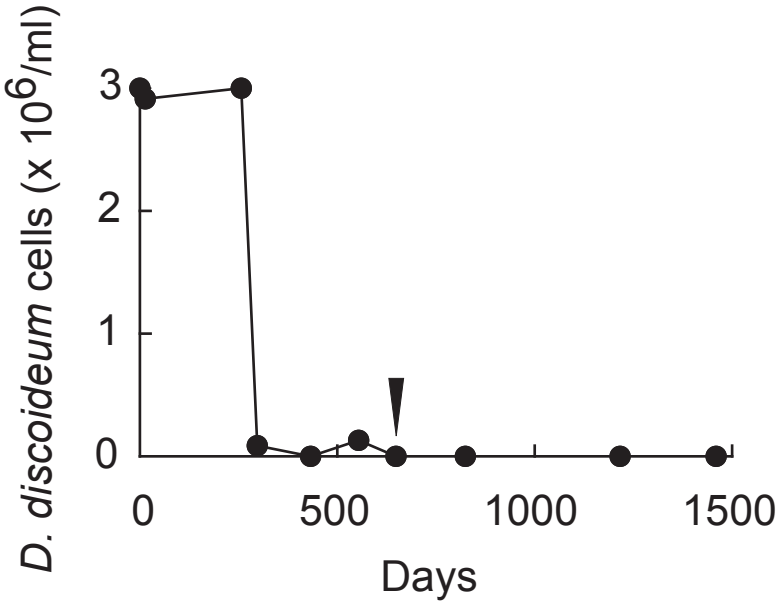


図 7　液体培地へ移してから15日後の、長期共培養中の細胞性粘菌の細胞数。0日目の値は対照実験より得た。矢印は通常の形態（図 3c）から縮小した形態（図 3d）へと形態が変化した時点を示す。

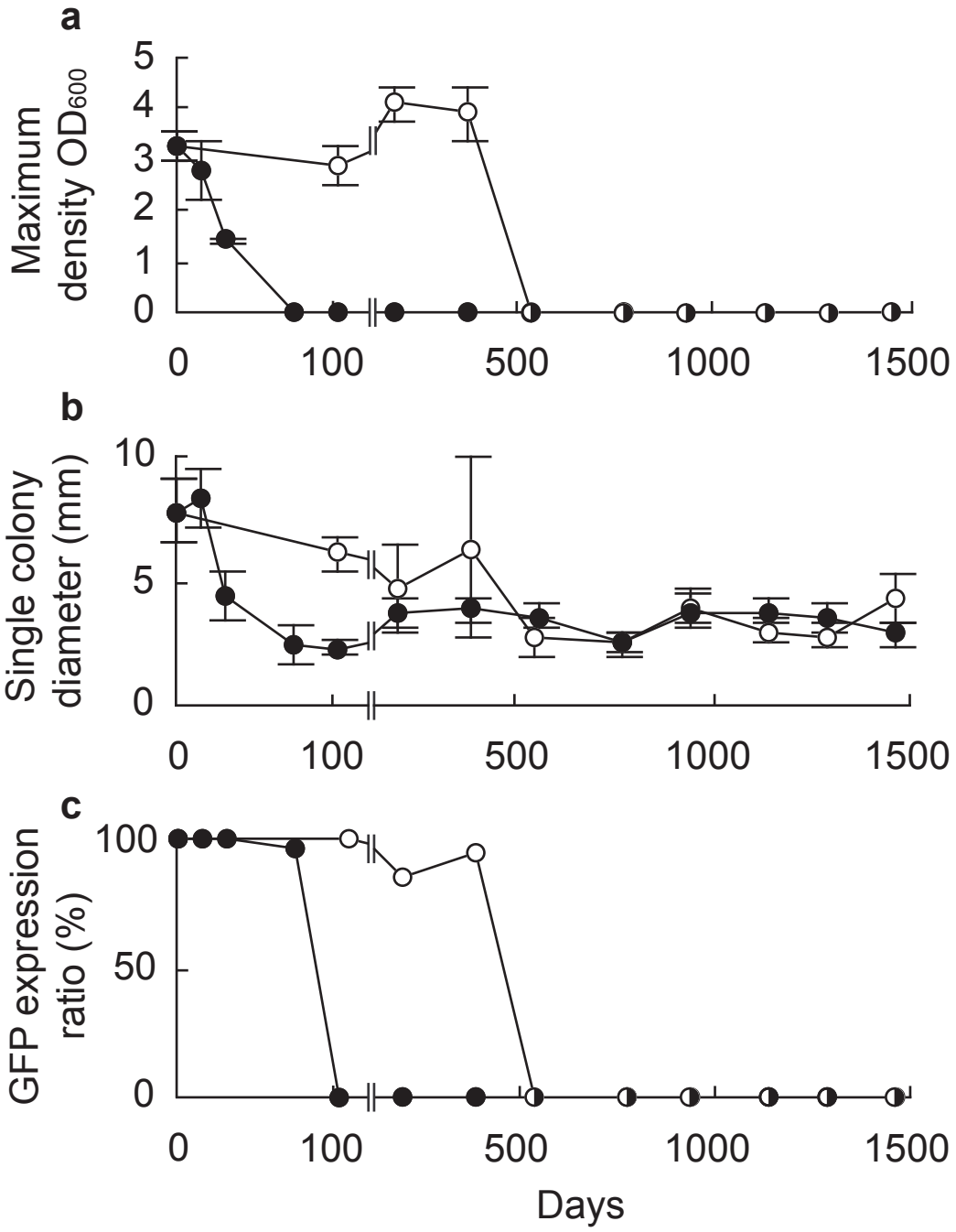


図 6　長期培養した大腸菌細胞。他の培地に移した際の、共培養した細胞（黒丸）と純粋培養した細胞（白丸）の値。対照実験した細胞を0日目の値とした。(a) 600 nmの光学密度（OD600）で測定した、アンピシリン耐性細胞の最大増殖値（「試料と方法」参照）。値は平均値で表した（± s.d. n = 2）。b, c, アンピシリンを含んだ寒天培地に移したときの細胞の性質（「試料と方法」参照）。純粋培養したときのコロニーの最大直径（b）。b の値は平均値 ± s.d.で表した（n = 5）。コロニー形成単位（CFU）で表した、全アンピシリン耐性細胞における緑色蛍光タンパク質（GFP）発現細胞の比率（c）。

第 4 章

総合考察

4.1 それぞれの実験の意味

今回の一連の実験により筆者は, 1）大腸菌と細胞性粘菌を用いて, 寒天培地上で長期にわたる共培養が可能であること（Todoriki et al., 2002）, 2）長期共培養した大腸菌と細胞性粘菌は, 自由生活状態から相互依存的な関係へと変化したこと（Todoriki and Urabe, 2006）, を見出した. これは共生関係の進化が実際に連続観察された数少ない例の一つであり, 純粋培養可能であって遺伝的にもよく調べられた生物を用いた実験としては, 初めてものである.

液体培地による共培養において, 両種が安定な共存状態になることまではすでに知られていた（Tsuchiya et al., 1972; Dent et al., 1976）. この場合, 被食・捕食関係にある両種の細胞数は, はじめに Lotka–Volterra 式にそった振動をおこした. その後振動は減衰し, 一定の数に収束していった. ただし液体培地を最小培地にした場合, グルコース量が少ない場合と多い場合では, 最終的な細胞性粘菌の量は低く抑えられてしまった（Tsuchiya et al., 1972）. それに比べ, グルコース量が適切な場合には, 細胞性粘菌の量は 10 倍ほど高まった. そして, いちど振動が収束した細胞は, 新しい液体培地に移しても細胞数の振動を起こさなく

なった（Tsuchiya et al., 1972）.

液体培地の結果は, 第 2 章で述べた寒天培地上での実験と整合性がある. つまり最小寒天培地上で共培養を開始した直後は, 大腸菌と細胞性粘菌の数が時間差で増減するが, ひとたび特徴的な粘液コロニーを形成すると状態は安定した. そして安定したコロニーは, 植継いでも細胞数の大規模な増減はもうおこらず, 粘液コロニーを維持したまま増殖したのである.

また両種の共存は, 栄養が限られた培地上で実現されるという点でも, よく似ている（Todoriki et al., 2002）. 培地の栄養条件については, 地衣類の培養においても, 片側もしくは両方のシンバイオントにとって有利な培地条件になると共生関係は解消されることが報告されているおり（Ahmadjian, 1962; Margulis, 1993）, シュミレーション実験からも同様のことが報告されている（Rosenzweig, 1971）. これらのことから, 共生関係を構築するには, 栄養状態を低く保つということが重要であるように考えられる. そのような栄養条件下では, 生存に必要な物質の供給源を, 培地だけに頼りきることができない. その代わりに, 共培養している他の生物に求めることになる. すると, 一方の生物における物質循環の変化によって, もう一方の生物の物質循環も敏感に反応せざるをえない関係になるのである. このような条件が, 共培養している生物同士のカップリングをより密にしてゆく方向へと進化を進めていくように考えられる. そして,

密接で不可分な共生関係へと移行するのであろう.

4.2 菌株の検討

今回実験に用いた大腸菌以外にも, 細胞性粘菌と共存するような粘液コロニーを形成する大腸菌があるのかを検討した. 実験をおこなったのは B/R, HB101, JM109, OP51 の 4 株で, 条件は今回の実験と同じ条件でおこなった. 結果は, HB101 でも良好な結果が得られた. JM109, B/R でも低い確率で粘液コロニーが認められたが, OP51 では認められなかった.

大腸菌は, 菌株によって粘性コロニーのでき方に大きな違いが認められるようである.

細胞性粘菌は野生株 KAx3（大阪大学・前田ミネ子先生よりの提供）で確認したが, その他の培養条件を一定にした場合, 一連の実験に用いた HS175 株と同等の比率で共存する粘液コロニーを形成した. ただし野生株ではコロニー内で胞子のう形成をおこしてしまうことがあり, 細胞が休眠状態にはいってしまうため, 解析を複雑にしてしまうと考えられた. 胞子のう形成は, 細胞性粘菌が飢餓状態になったときに生ずる（Loomis 1975; 前田 2000）. このことは, 周囲を大腸菌に囲まれているにもかかわらず, 細胞性粘菌細胞がある種の飢餓状態にあることも考えられ, 興味深い.

4.3 バイオフィルム

粘液コロニーは，大腸菌によって産生される細胞外多糖を主成分とする細胞外分泌物を基質とした，微生物の集合体であった（Todoriki et al., 2002）．この特徴は，広く自然界や人工物に認められるバイオフィルム（細菌によって産生される，多糖を主成分とする細胞外分泌物を基質とした，微生物の集合体）とよく一致する（ZoBell and Anderson, 1936; ZoBell and Anderson, 1936; Costerton et al., 1987; Costerton et al., 1995; Sonnenburg et al., 2005）．バイオフィルムは細菌を栄養の多い培地で純粋培養したときには形成されない（Costerton et al., 1987）ということも考えあわすと，今回の実験における粘液コロニーはバイオフィルムであるとしてよいであろう（Matsuyama et al., 2004）．

バイオフィルム中の細胞は，遊離状態のものに比較して，かなりの抗生物質耐性があることが知られている（Costerton et al., 1995）．近年，バイオフィルムの耐性は persister（ここでは「耐性体」とする）とよばれる休眠している細菌，つまり死んではいないが成長を止めている状態の細菌がもたらすと考えられるようになってきている（Balaban et al., 2004; Keren et al., 2004; Lewis, 2005; Shah et al., 2006）．耐性体は突然変異体ではなく，エピジェネティック変異体（Hall, 1999）であって，その出現の割合はバイオフィルム中の菌体数の約 1%であることが大

腸菌を用いた実験で確認されている．この値は，第 3 章で紹介した実験において，プラスミドを失った可能性が考えられる大腸菌のアンピシリン耐性体の割合，すなわち共培養では 0.3 % ± 0.5 s.d，純粋培養では 3.2 % ± 3.9 s.d.に，よく一致している．以上のことから，プラスミドを失った可能性が考えられる大腸菌が薬剤耐性を維持しているのは（Todoriki and Urabe, 2006），耐性体になっていることが考えられる．ただし，純粋培養の場合，バイオフィルムの状態ではなかったので，果たして共培養の場合と同じ変化が生じていたのかは，今後の課題である．

成長を止めている耐性体が，抗生物質の入っている培地でなぜコロニー形成をするのかも，今後の課題である．静置培養中の抗生物質が，培養時間の経過にしたがって劣化することにより，有効濃度が低下することが，あるいは考えられるかもしれない．

プラスミドの消失に関しては，フローサイトメーターを用いた高感度の検出法があり（Bahl et al., 2004），これを用いて今後確認することも可能であろう．

耐性体の研究ではジーンチップを用いて遺伝子発現を比較しており（Lewis, 2005; Shah et al., 2006），今後詳細な内容が発表されると，我々の結果（Matsuyama et al., 2004）とも比較することが可能になる．

バイオフィルムには多くの微生物を包含することができるので，今後このよ

うな共生実験を構築するのに効果的に用いることができると考える．つまり，今回の一連の実験と同様な方法で，バイオフィルムを形成するような条件に細菌をおいて，そこに他の生物を共存させる方法がとれるのである．

4.4 遺伝子発現について

共培養の初期において，大腸菌コロニーの形質は，黄色の光沢のない平板な形態から，粘液質で透明なドーム状の形態へと変化した（図 2）．我々は，このときの大腸菌の遺伝子発現の変化を，ジーンチップ法（Lipshutz et al., 1999）を用いて比較した（Matsuyama et al., 2004）．その結果，コロニーの形質変化は，遺伝子の発現変化としても顕著に表れることが判った．具体的な変化としては，以下のことが認められた．

純粋培養した大腸菌に比較して，共培養した大腸菌で発現量の落ちた遺伝子群は，エネルギー代謝と遺伝子転写に関係するもの，そしてストレス誘導性の遺伝子発現であった．前者の結果は，共培養している大腸菌では，細胞増殖速度がゆるやかになっていることを示唆している．増殖速度の低下は，今回の実験からは直接観察することはできなかった．後者は，共培養している大腸菌が捕食者に囲まれているにもかかわらず，ストレスから開放されていることを示しており，興味深い．細胞性粘菌が粘液コロニー内で飢餓状態にある可能性につ

いては，4.2.章において触れたが，このことを考え合わすと，粘液コロニーが細胞性粘菌による大腸菌の捕食を妨げている可能性を示唆している．そのことと，大腸菌がストレスから開放されていることは，あるいは関連があるかもしれない．

逆に，共培養した大腸菌で発現量の上がったものとしては，大腸菌の分泌する細胞外多糖として広く認められる，コラン酸の合成に関わる遺伝子群であった．コラン酸の生産はバイオフィルムの発達に関係しており（Prigent-Combaret et al., 1999; Danese et al., 2000），4.3 章で述べたこととも整合的である．また図 4 や図 5 で示したような，細胞外多糖の分泌変化とも整合的であった．加えて，ガラクトース代謝遺伝子の発現量の増大も確認された．このことは，図 5 で示したように，共培養した大腸菌の多糖の単糖成分として，ガラクトースが観察されたことと整合的である．

以上述べたように，大腸菌の遺伝子発現の変化は，形質変化と整合的であることが確認できた．今後は，細胞性粘菌における遺伝子発現についても，比較されることが期待される．

4.5 形質変化について

ラマルク主義の教条である「獲得形質の遺伝」を排斥するあまり，ダーウィン

主義者は環境が積極的に生物進化にかかわっているということを忘れられがちであった．これに対し Waddington と彼の同僚は, 1940 年代から 60 年代にかけてのショウジョウバエを使った一連の実験から，環境刺激によって生じた表現型が遺伝するように見える現象を報告し，遺伝的同化と名付けた（Waddington, 1952; Waddington, 1956; Waddington, 1957; Hall, 1999）．この研究によって，環境による形質の変化とその遺伝に対して実際に遺伝学的手法を用いることが可能であることが判ったのである．こういった流れの中から，近年，環境が進化におよぼす影響をとりあつかった進化発生学／Evo-Devo（Hall, 1999）や，より生態学的な部分をあつかった生態発生学／Eco-Devo（Gilbert, 2001）が，発展してきた．

第 2 章の実験において，共培養条件に移った大腸菌は, 2 週間ほどで粘液を分泌する形質へと変化し，細胞性粘菌との共存を可能にした．大腸菌がひとたびこの形質になると，分泌した粘液中での細胞性粘菌との共存は安定に維持された．興味深いことに，共培養を開始して 1 ヶ月ほどでは，粘液を分泌する状態になった大腸菌を，再び 50 μg/ml のアンピシリンを含む LBG-a 培地で, 37 ^{o}C で一晩振とう培養することによって，大腸菌を変化前の状態に戻すことができた．つまり，その大腸菌を用いて細胞性粘菌と共培養すると，粘液コロニーを形成する代わりに，図 2, 図 3 で見られたような変化をおこしたのである．加えて大腸菌

は単一クローンであるため，粘液を分泌する形質が突然変異である可能性は限りなく低いと考えられる．したがってこの変化は，共培養環境によって生じた後生的な変異であると考えられる．先述した耐性体が，エピジェネティック変異体であることとも整合的である．

このように，後生的に生じた変異が遺伝する現象は，進化発生学や生態発生学において数多く報告されている（Gilbert, 2001; Molinier et al., 2006）．しかし具体的にエピジェネティック変異がどのようになされ，そしていかに遺伝するようになるのかは，まだあまり判っていない．そこでこの実験系は，エピジェネティック変異がどのように固定されてゆくのかを調べる系としても用いることができる可能性を秘めている．

一方，細胞性粘菌は，野生状態ではおもに森林土壌に生息しており（Raper, 1984; 前田, 2000），細菌だけを捕食して生きている（Clarke and Kayman, 1987）．したがって，現在も実験室で用いられている細胞性粘菌（NC-4 株）が，はじめて 1933 年にアメリカ合衆国ノースカロライナ州で採集されて以降，株は種々の細菌との共培養によって維持されてきていた（Raper, 1984）．純粋培養は，ようやく 1960 年代に成功し，その後，効果的に純粋培養できる株である Ax-1，Ax-2，Ax-3 が選抜され，実験株として汎用されるようになった（Raper, 1984; Sussman, 1987）．

このように，細菌に生存を依存するような形質は，もともと細胞性粘菌が有していた形質なのである．したがって，純粋培養可能な状態から細菌に依存する状態への形質の変化は，逆突然変異体（いわゆる先祖返り）を選択したことによって生じた可能性も考えられる．しかしながら，純粋培養できる実験室用の細胞性粘菌株は*axe*A, *axe*B, *axe*C の 3 つの遺伝子の変異によるものであり（Williams et al., 1974; North and Williams, 1978），同じ遺伝子に変異がおこって元に戻る可能性は，低いように思われる．そのため，形質において先祖返りにみえても，別の遺伝子変化によって類似の形質を示す，偽逆突然変異体である可能性も考えられる．加えて野生状態の細胞性粘菌は，今回のような大腸菌のみを摂取する条件にある訳ではなく，また特異な粘液コロニーのなかで生育している訳でもない．したがって，仮にこの変異が逆突然変異に起因するとしても，野生状態と同じ選択圧がかかっていた訳ではない．

以上のことから，共培養した細胞性粘菌において起こった変化は，単純に逆突然変異体の選択として片付けることはできない．これも今後，ゲノム解析をおこなうことによって，変異の内容が明らかになるであろう．

4.6 今後の展望

今回用いたような，遺伝的によく調べられている生物種は，具体的に DNA の

塩基配列の変化を追跡することが可能である．まずは時系列にしたがって，どのように塩基配列が変化したのか，あるいはしていないのかを調べることによって，上述したような問題に貢献ができると考えている．

もう一つ, DNA 塩基配列の解読で明らかにできると考えているものに，共生による大規模な遺伝子の授受がある．例えば，アズキゾウムシ *Callosobruchus chinensis* においては，ゲノムの中に，共生微生物からの大きなゲノム断片が水平伝播（Syvanen and Clarence, 2002）している例が見つかっている（Kondo et al., 2002）．また，細菌のゲノムには 10%を超える外来遺伝子があることが判っていて（Nakamura et al., 2004），細菌には大規模に外来の遺伝子を取り込む能力があることが判っている．このようなことから，共生によって遺伝子の授受があったとすると，遺伝子解析から明らかになる可能性がある．

今回の一連の実験の結果，栄養の比較的少ない培地上で長期の共培養をおこなうことによって，独立して生育していた生物が，それぞれ相手の生物に生存を依存する共生体に変化していくことを，初めて観察することに成功した．このような，繰り返し実験が可能な条件下での共培養による形質変化の例は，進化における共生の重要性に対し，具体的なデータを提供するであろう．

さらに，このような新しい共生を構築することで，未知の応用分野も広がってゆくのではないかと期待される．

文献

Ahmadjian, V. (1962) Investigations of lichen synthesis. *Am. J. Bot.* **49**: 277–283.

Alberts, B., Johnson. A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002) *Molecular biology of the cell*. 4th ed., Garland Science, New York

Bahl, M.I., Sørensen, S.J., and Hansen, L.H. (2004) Quantification of plasmid loss in *Escherichia coli* cells by use of flow cytometry. *FEMS Microbiol. Lett.* **232**: 45-49.

Balaban, N. Q., Merrin, J. Chait, R., Kowalik, L., and Leibler, S. (2004) Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* **305**: 1622-1625.

Barnes, N.S. (1972) *Invitation to biology*. 4th ed., Worth Publishers, Inc, New York.

Blattner, F.R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., and Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453–1474.

Bomford, R. (1965) Infection of alga-free *Paramecium bursaria* with strains of *Chlorella*, *Scenedesmus*, and a Yeast. *J. Protozool.* **12**: 221–224.

Chang, D.E., Smalley, D.J., and Conway, T. (2002) Gene expression profiling of *Escherichia coli* growth transitions: an expanded stringent response model. *Mol.*

Microbiol. **45**: 289-306.

Chen, Y.-M., Bachman, K., and Magasanik, B. (1982) Characterization of a gene, *glnL*, the product of which is involved in the regulation of nitrogen utilization in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. **150**: 214–220.

Choi, J.Y., Lee, T.W., Jeon, K.W., and Ahn, T.I. (1997) Evidence for symbiont-induced alteration of a host's gene expression: irreversible loss of SAM synthetase from *Amoeba proteus*. *J. Eukaryot. Microbiol*. **44**: 412-419.

Clarke, M., and Kayman, S.C. (1987) The auxenic mutations and endocytosis in *Dictyostelium*. *Methods Cell Biol*. **28**: 157-176.

Cormack, B.P., Valdivia, R.H., and Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33–38.

Costerton, J.W., Cheng, K.-J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel J.C., Dasgupta M., and Marrie T.J. (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 435-464.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., and Lappin-Scott, H.M. (1995) Microbial biofilms. *Ann. Rev. Microbiol.* **49**: 711-745.

Danese, P.N., Pratt, L.A., and Kolter, R. (2000) Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.*

182: 3593-3596.

電脳・土佐の植物図鑑 (http://www.attaka.or.jp/hana/aki/flower35.html) 2006/08/03.

Dent, V.E., Bazin, M.J., and Saunders, P.T. (1976) Behaviour of *Dictyostelium discoideum* amoebae and *Escherichia coli* grown together in chemostat culture. *Arch. Microbiol*. **109**: 187-94.

Dubois, M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., and Smith F. (1956) Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substrates. *Anal. Chem*. **28**: 350.

Eichinger, L., Pachebat, J.A., Glöckner, G., Rajandream, M.A., Sucgang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q., Tunggal, B., Kummerfeld, S., Madera, M., Konfortov, B.A., Rivero, F., Bankier, A.T., Lehmann, R., Hamlin, N., Davies, R., Gaudet, P., Fey, P., Pilcher, K., Chen, G., Saunders, D., Sodergren, E., Davis, P., Kerhornou, A., Nie, X., Hall, N., Anjard, C., Hemphill, L., Bason, N., Farbrother, P., Desany, B., Just, E., Morio, T., Rost, R., Churcher, C., Cooper, J., Haydock, S., van Driessche, N., Cronin, A., Goodhead, I., Muzny, D., Mourier, T., Pain, A., Lu, M., Harper, D., Lindsay, R., Hauser, H., James, K., Quiles, M., Madan Babu, M., Saito, T., Buchrieser, C., Wardroper, A., Felder, M., Thangavelu, M., Johnson, D., Knights, A., Loulseged, H., Mungall, K., Oliver, K., Price, C., Quail, M.A., Urushihara, H.,

Hernandez, J., Rabbinowitsch, E., Steffen, D., Sanders, M., Ma, J., Kohara, Y., Sharp, S., Simmonds, M., Spiegler, S., Tivey, A., Sugano, S., White, B., Walker, D., Woodward, J., Winckler, T., Tanaka, Y., Shaulsky, G., Schleicher, M., Weinstock, G., Rosenthal, A., Cox, E.C., Chisholm, R.L., Gibbs, R., Loomis, W.F., Platzer, M., Kay, R.R., Williams, J., Dear, P.H., Noegel, A.A., Barrell, B., and Kuspa, A. (2005) The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **435**: 43–57.

Frank, A.B. (1877) Über die biologischen verhältnisse des Thallus einiger Krustenflechten. *Beitr. Biol. Pflanzen* **2**: 123-200.

Fred, E.B., Baldwin, I.L., and McCoy, E. (1932) *Root nodule bacteria and leguminous plants.* University of Wisconsin, Madison.

Gilbert, S.F. (2001) Ecological developmental biology: developmental biology meets the real world. *Dev. Biol.* **233**:1-12.

Hale, M.E. (1967) *The biology of lichens*. Edward Arnold Ltd., London.

Hall, B.K. (1999) *Evolution Developmental Biology*. 2nd ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht : Boston : London.

Hamilton, R.D., and Preslan, J.E. (1970) Observation on the continuous culture of a planktonic phagotrophic protozoan. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*. **5**: 94-104.

Heckman, D.S., Geiser, D.M., Eidell, B.R., Stauffer, R.L., Kardos, N.L., and Hedges,

S.B. (2001) Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* **293**: 1129-1133.

石川統 (1988) 『共生と進化—生態学的進化論—』 培風館, 東京.

Jeon, K.W., and Lorch, I. (1967) Unusual intra-cellular bacterial infection in large, free-living amoebae. *Exp. Cell Res.* **48**: 236-240.

Jeon, K.W., and Ahn, T.I. (1978) Temperature sensitivity: A cell character determined by obligate endosymbionts in amoebas. *Science* **202**: 635-637.

Jeon, K.W. (1995a) The large, free-living amoebae: Wonderful cells for biological studies. *J. Euk. Microbiol.* **42**: 1–7.

Jeon, K.W. (1995b) Bacterial endosymbiosis in amoeba. *Trends Cell Biol*. **5**: 137-140.

Jeon, K.W. (1996) Free-living amoeba as microcosms. *Jap. J. Protozool.* **29**: 11-19.

Kay, R.R., and Williams, J.G. (1999) The *Dictyostelium* genome project: an invitation to species hopping. *Trends Genet*. **15**: 294-7.

Karakashian, M. W. (1975) Symbiosis in *Paramecium bursaria*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **29**: 145-173.

Kashiwagi, A., Noumachi, W., Katsuno, M., Alam, M.T., Urabe, I., and Yomo, T. (2001) Plasticity of fitness and diversification process during an experimental molecular evolution. *J. Mol. Evol*. **52**: 502–509.

Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y., and Lewis, K. (2004) Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol. Lett.* **230**: 13-18.

Khakhina, L.N. (1992) *Concepts of symbiogenesis—A historical and critical study of the research of Russian botanists*. Yale University, New Haven : London.

国立科学博物館・地衣類の探求

(http://research.kahaku.go.jp/botany/chii/02/index.html) 2006/08/03.

Kondo, N., Nikoh, N., Ijichi, N., Shimada, M., and Fukatsu T (2002) Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. *PNAS* **99**: 14280-14285.

Laine, J., Roxby, N., and Coukell, M. B. (1975) A simple method for storing cellular slime mold amoebae. *Can. J. Microbiol*. **21**: 959–962.

Lazo, W. R. (1966) An experimental association between *Chlorella xanthella* and a *Streptomyces*, *Amer. J. Bot.* **53**: 105–107.

Lewis, D.H. (1981) Reviews. *New Phytol.* **88**: 399-402.

Lewis, K. (2005) Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc.)* **70**: 267-274.

Lipshuts, R.J., Fodor, S.P., Gingeras, T.R., and Lockhart, D.J. (1999) High-density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat. Genet.* **21**: 20-24.

Loomis, W. F. (1975) *Dictyostelium discoideum: A Developmental System*. Academic Press, New York : San Francisco : London.

Mader, S.S. (2001) *Biology*. 7th ed., international ed., McGraw-Hill, Boston.

前田靖男 (2000)『モデル生物：細胞性粘菌』アイピーシー, 東京.

Magner, L.N. (2005) *A history of medicine*. 2nd. ed., Taylor & Francis, Boca Raton : London : New York : Singapore.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

Margulis, L. (1970) *Origin of Eukaryotic Cells*. Yale University Press, New Haven.

Margulis, L. (1975) Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles: criteria for proof. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **29**: 21-38.

Margulis, L. (1976) A review: genetic and evolutionary consequences of symbiosis. *Exp. Parasitol.* **39**: 277-349.

Margulis, L. (1990) Words as Battle Cries: Symbiogenesis and the New Field of Endocytobiology. *BioScience*, **40**: 673-677.

Margulis, L. (1993) *Symbiosis in Cell Evolution: Life and its Environment on the Early Earth*. 2nd ed., Freeman, New York.

Matsuyama, S., Furusawa, C., Todoriki, M., Urabe, I., and Yomo, T. (2004) Global

change in *Escherichia coli* gene expression in initial stage of symbiosis with *Dictyostelium* cells. *BioSystems* **73**: 163–171.

Molinier, J., Ries, G., Zipfel, C., and Hohn, B. (2006) Transgeneration memory of stress in plants. *Nature* **442**: 1046-1049.

Muscatine, L., Cook, C.B., Pardy, R.L., and Pool, R.R. (1975) Uptake, recognition and maintenance of symbiotic *Chlorella* by *Hydra viridis*. *Symp. Soc. Exp. Biol*. **29**: 175-203.

Nakamura, Y., Itoh, T., Matsuda, H., and Gojobori, T. (2004). Biased biological functions of horizontally transferred genes on 324,653 open reading frames of 116 prokaryotic complete genomes. *Nat. Genet.* **36**: 760-766.

North, M. J., and Williams, K. L. (1978) Relationship between the axenic phenotype and sensitivity to ω-aminocarboxylic acids in *Dictyostelium discoideum*. *J. Gen. Microbiol.* **107**: 223-230.

Paracer, S., and Ahmadjian, V. (2000) *Symbiosis: An Introduction to Biological Associations.* 2nd ed., Oxford University Press, New York.

Phycological Images (http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~inouye/ino/gl/gl_pic.html) 2006/08/03.

Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C., and Lejeune, P. (1999) Abiotic surface

sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**: 5993-6002.

Proper, G., and Garver, J.C. (1966) Mass culture of the protozoa *Colpoda steinii*. *Biotechnol. Bioeng*. **8**: 287-296.

Radeva, G., Jurgens, G., Niemi, M., Nick, G., Suominen, L., and Lindstrom, K. (2001) Description of two biovars in the Rhizobium galegae species: biovar orientalis and biovar officinalis. *Syst. Appl. Microbiol*. **24**: 192-205.

Rahat, M., and Reich, V. (1985) Correlations between characteristics of some free-living *Chlorella* sp. and their ability to form stable symbioses with *Hydra viridis*. *J. Cell Sci.* **74**: 257–266.

Raper. K.B. (1984) *The dictyostelids*. Princeton University Press, Princeton.

Rosenzweig, M.L. (1971) The paradox of enrichment: destabilization of exploitation ecosystems in ecological time. *Science* **171**: 385-387.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Sears, C.L. (2005) A dynamic partnership: Celebrating our gut flora. *Anaerobe* **11**: 247-251.

Segall, J.E., Kuspa, A., Shaulsky, G., Ecke, M., Maeda, M., Gaskins, C., Firtel, R.A.,

and Loomis, W.F. (1995) A MAP-kinase necessary for receptor-mediated activation of adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *J. Cell Biol*. **128**: 405-413.

SF SU (The San Francisco State University) (http://userwww.sfsu.edu/~biol240/labs/lab_03symbiosis/) 2007/03/04.

Shah, D.V., Zhang, Z., Kurg, K., Kaldalu, N., Khodursky, A., and Lewis, K. (2006) Persisters: A distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol.* **6**: 53.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem*. **150**: 76-85.

Smith, S.E., and Read, D.J. (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*. 2nd ed., Academic Press, San Diego : Tokyo.

Sonnenburg, J.L., Xu, J., Leip, D.D., Chen, C.-H., Westover, B.P., Weatherford, J., Buhler, J.D., and Gordon, J.I. (2005) Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science* **307**: 1955-1959.

Sonnenburg, J.L., Chen, C.T.L., and Gordon, J.I. (2006) Genomic and Metabolic Studies of the Impact of Probiotics on a Model Gut Symbiont and Host. *PLoS Biol.* **4**: 2213-2226.

Sussman, M. (1987) Cultivation and synchronous morphogenesis of *Dictyostelium*

under controlled experimental conditions. *Methods Cell Biol*. **28**: 9-29.

Sweeley, C.C., Bentley, R., Makita, M., and Wells, W.W. (1963) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *J. Am. Chem. Soc*. **85**: 2497.

Syvanen M., and Clarence I. K. (2002) *Horizontal gene transfer*, 2nd ed., Academic Press, San Diego.

Takahara, Y. (2000) Individual base model of predator-prey system shows predator dominant dynamics. *BioSystems* **57**: 173-185.

Todoriki, M., Oki S., Matsuyama, S., Ko-Mitamura, E. P., Urabe, I., and Yomo, T. (2002) An observation of the initial stage towards a symbiotic relationship. *BioSystems* **65**: 105–112.

Todoriki, M., and Urabe, I. (2006) Induced symbiosis: Distinctive *Escherichia coli-Dictyostelium discoideum* transferable co-cultures on agar. *Symbiosis* **42**: 135-139.

Tsuchiya, H.M., Drake, J.F., Jost, J.L., and Fredrickson, A.G. (1972) Predator-prey interactions of *Dictyostelium discoideum* and *Escherichia coli* in continuous culture. *J. Bacteriol*. **110**: 1147-53.

Uheda, E., and Silvester, W.B. (2001) The role of papillae during the infection process in the gunnera-nostoc symbiosis. *Plant Cell Physiol*. **42**: 780-783.

Veron, J.E.N. (1995) *Corals in space and time : biogeography and evolution of the* Scleractinia. Comstock : Cornell, Ithaca.

Waddington, C.H. (1952) Selection of the genetic basis for an acquired character. *Nature* **169**: 278.

Waddington, C.H. (1956) Genetic assimilation of the *bithorax* phenotype. *Evolution* **10**: 1-13.

Waddington, C.H. (1957) The genetic basis of the assimilated *bithorax* stock. *J. Genet.* **55**: 240-245.

Williams, K.L., Kessin, R.H., and Newell, P.C. (1974) Genetics of growth in axenic medium of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **247**: 142–143.

山田常雄・前川文夫・江上不二夫・八杉竜一・小関治男・古谷雅樹・日高敏隆 (1983)『岩波生物学辞典』第 3 版, 岩波書店, 東京.

Yodzis, P., and Innis, S. (1992) Body size and consumer-resource. *Am. Naturalist* **139**: 1151-1175.

York, W.S., Darvill, A.G., McNeil, M., Stevenson, T.T., and Albersheim, P. (1986) Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. *Methods Enzymol*. **118**: 3-40.

吉川守 (1988-2001)『シュメール語』言語学大辞典 **2**: 227-232, 三省堂, 東京.

ZoBell, C.E., and Anderson, D.Q. (1936) Observations on the multiplication of bacteria in different volumes of stored sea water and the influence of oxygen tension and solid surfaces. *Biol. Bull*. **71**: 324-342.

あとがき

大腸菌と細胞性粘菌の共培養をしていた筆者は，その寒天培地を 22 ℃で 1 ヶ月ほど放置していた．すると 1996 年 9 月 9 日，放置していた培地表面に，両生物が共存している粘性に富んだ水滴状のコロニーを発見した．それぞれの純粋培養では現れない形状のコロニーであった．このコロニーをヒントに，筆者は，1998 年 9 月 4 日より，6 年間にわたって植継ぎを繰り返す，共生実験を開始したのである．

筆者は小学校から高校まで，いじめられっ子であった．また学校のテスト勉強が苦手で，高校卒業後も中途採用の就職先を点々とする，いわゆる落ちこぼれであった．そんな筆者にとって，人と異なっている者がいかに生きてゆくことができるのか，ということは，核となる大きな問題なのである．1992 年より 14 年間（2006 年現在）関ってきている南シベリアのトゥバ民族への視点も，「大民族」の中の「少数民族」がいかに生きてゆけるのか，という問題を中心としている．そして，今回の生物の共生という問題意識もやはり同じ根っこから生えた木の，枝の一本なのである．

この視点は，今までとは異なる環境と相互作用することによって，筆者自身も，その周りの人たちも変化してゆくのではないか，という思いが込められている．

その様子をできるだけ具体的に思い描いてみたかったのである．自らを振り返ったとき，高校卒業後の 23 年間において，確かに筆者は，新しい相互作用の中で劇的に変化した．これもある種の実験であったようにも考えられる．じつに幸福で，実りの多い年月であったと考えている．

まずはじめに，恵まれた研究場所を提供していただいた，大阪大学大学院・工学研究科の卜部格先生に御礼申し上げます．また研究室内の先生方および職員，学生の方々にも御礼を申し述べたいと思います．特に，四方哲也先生には有益な助言を戴きました．御礼申し上げます．山本恵三博士，中石智之博士には，特に博士課程後期入学の初期の実験でお世話になりました．感謝申し上げます．さらに論文作成に協力いただいた Elizabeth KO-MITAMURA 氏，また共同研究をおこなった松山晋一（博士），鈴木真吾（博士），東陽一郎，沖真弥，川瀬芳恵，木原久美子，合地信雄，早川志帆，山田成人の諸氏にはお世話になりました．御礼申し上げます．

今回の実験においては，大阪大学工学研究科の福崎英一郎先生と梶山慎一郎先生に粘液コロニーの細胞外成分の解析に際し，技術的な援助を受けました．また細胞性粘菌株の供与および培養方法の指導を大阪大学理学研究科の前田ミネ子先生より受け，大腸菌株は Massachusetts Institute of Technology の Boris

MAGASANIK 博士に，そして大腸菌のプラスミドは Stanford University の Brendan CORMACK 博士より供与を受けました．記して御礼申し上げます．

東京大学の本條晴一郎氏，大阪外国語大学／東京大学の深尾葉子先生，有限会社 DGC 総合研究所の藤森博之氏，東京医科歯科大学の安田研の皆様，東京大学の安冨歩先生，北海道農業研究センターの横山和成博士，米田会計事務所の米田浩之氏には，博士論文に関して，さまざまに支えていただいきました．御礼申し上げます．

加えて，実験のディスカッションを戴いた University of Tennessee, Knoxville の Kwang W. JEON 先生, City of Hope の故・大野乾先生，また現在投稿中の論文を雑誌へ推薦していただき，さらに懇切丁寧な校正と様々な相談応じていただいた University of Massachusetts, Amherst の Lynn MARGULIS 先生に御礼申し上げます．

筆者の記憶力の悪さから，はからずもここに漏れてしまっている方々，また名前も伺わず，知らないうちに筆者に対していろいろなサポートをして下さっている皆様などに，この場をお借りしてお許しを請い，御礼申し上げたいと思います．

この研究は文部科学省の科学研究費（11CE2006）を受けておこなわれました．記して感謝申し上げます．

最後に, 筆者をこの世界へと投じてくれ, 遅かった博士号を心待ちにしているであろう両親, 等々力貞治・憲子夫妻に感謝いたします.