

「植物的生活史をもつ社会性アメーバの生態遺伝学的解析：柄細胞分化と利他行動」

上智大学院 理工学研究科 理工学専攻 生物科学領域
環境分子生物学研究室 M2 佐藤 有紀江

細胞性粘菌 *D. discoideum* は土壌微生物であり、通常は単細胞でバクテリアを捕食し分裂を繰り返すが、飢餓をきっかけに 10 万個もの細胞が集合し多細胞体を形成する無性生殖サイクルを持つ。この集合した細胞のうち 20%の細胞は空胞化し柄細胞として胞子を支えるために犠牲となる。そのため、集合体における柄分化は利他行動とみなすことができる。この利他行動である柄分化は始原的な種から保存されている機構であると考えられている。*D. discoideum* はゲノム情報の整備が進み分化やパターン形成のモデル生物として知られているが、予定柄細胞のうち、主要な柄を形成する *prestalkA*(*pstA*)細胞の分化誘導経路は未解明のままであった。そこで本研究では *pstA* 細胞の分化誘導因子の探索を第一の目的とした。さらに、柄細胞分化を利他行動のモデルとみなし、細胞性粘菌を研究対象とすることで、それまで社会性昆虫などでは不可能であった利他行動の分子生物学的な機構の解析を行うことが可能となる。本研究では柄細胞分化機構と利他行動との関連を視野に入れ、*pstA* 細胞分化誘導機構の解析を目指した。

I) 予定柄細胞分化誘導機構の解析

細胞性粘菌の予定柄細胞分化は細胞性粘菌に広く保存された機構であると考えられ、分化誘導因子はポリケタイドであることから、細胞性粘菌の種をこえて保存されているポリケタイド合成酵素(PKS)遺伝子、*stlA*, *stlB*, *pks2* の 3 つの遺伝子を、*pstA* 細胞分化誘導因子合成酵素の候補として選定した。3 つのうち細胞性粘菌に普遍的に存在していると示唆されている *Steely* は細胞性粘菌で初めて発見された I 型 PKS と III 型 PKS が融合した新規ハイブリッド型 PKS である。候補とした *pks* 遺伝子の単一遺伝子破壊株を基に、*in vitro* で柄細胞分化誘導能を持つ DIF-1 の影響をなくすために *stlB* と他の 2 つの遺伝子の二重遺伝子破壊株の作製を行った。作製した遺伝子破壊株(*stlA*⁻株, *stlB*⁻株, *pks2*⁻株, *stlA*⁻/*stlB*⁻株, *stlB*⁻/*pks2*⁻株)の表現型の解析については、*prespore* と *prestalk* のマーカー遺伝子群の時間的および空間的な発現パターン解析を主に検証した。欠損の見られた *pstA* 細胞のマーカー遺伝子の空間的発現に対し、野生株から分泌された抽出物による回復実験などを行った。観察した 5 種類の遺伝子破壊株のうち *pks2*⁻株と *stlA*⁻/*stlB*⁻株の 2 株において *pstA* 細胞のマーカー遺伝子の空間的発現パターンに欠損が観察された (Fig.1)。まず *pks2*⁻株において、*pks2* の発現時期である発生初期から詳細を観察したところ、パターン形成に伴い tip 付近へ選別されるはずの *pstA* 細胞の位置に異常があることが分かった。この *pstA* 細胞のパターニング異常(*prespore* 領域に見られる染色)は、野生株とのキメラを作らせても回復されなかったが、本来の *pstA* 領域は薄かった発現が強まった (Fig.2)。このことから *pstA* 細胞の分化誘導の欠損は野生株からの分泌物によって回復されるが、パターニングに関する欠損は野生株の影響を受けず、細胞自律的であるといえる。*stlA*⁻/*stlB*⁻株では、*pstA* 細胞のマーカー遺伝子の発現量が減少し、僅かに tip 部分に薄い染色が見られた (Fig.1)。この欠損は単一の遺伝子破壊株においては観察できず、二重遺伝子破壊株において初めて現れた。また、*stlA* と *stlB* それぞれの既知の産物である MPBD と DIF-1 を片方ずつ、または両方添加した条件でもこの欠損が回復しなかったことから、*pstA* 細胞の分化誘導には *stlA* と *stlB* が協調的に働きを担っており、既知産物以外の化合物によるものと考えられる (Fig.3)。このことは *Steely* 酵素の産物多様性を示唆する結果となった。未知の化合物も含む野生株の分泌物を添加したところ、*pstA* 領域のうち tip に近い部分の発現が回復したことから、*pstA* 領域の中でも細胞非自律的に分化誘導される先端部分と、細胞自律的な分化をする後端部分との少なくとも 2 種以上のサブセルタイプに分けることができると推定される (Fig.4)。複数のポリケタイドや、細胞自律性・細胞非自律性などの複数の経路によって予定柄細胞分化誘導機構を複雑化させることで、細胞性粘菌の利他行動の仕組みを維持し、協調性を高めていると考えられる。

II) PKS2 の機能解析および利他行動との関係

pks2 は過去に利他行動に関係する可能性のある遺伝子として候補に挙げたことがあるため、柄細胞分化二関与すると考えて、予定柄、予定胞子のマーカー遺伝子の時間的・空間的発現パターンの解析をおこなった。マーカー遺伝子群の時間的発現パターンに野生株との変化は見られなかった。空間的発現パターンにおいて、*prespore* マーカー遺伝子の発現に若干の変化はみられた

が、大きな変化は上述の *pstA* マーカー遺伝子のみであった。この欠損を発生初期から追ったところ、ランダムに *prespore* と *prestalk* 細胞に分化するマウンド期において異常は見られず、その後からパターン形成に異常が見られるようになることが分かった。このパターンニング異常は野生株との混合条件下でも回復することはなく、本来 *slug* 前方に位置するはずの *pstA* 細胞が野生株に対して後方へ分布する挙動が見られた。利他行動に関する検証として、*pks2* 株について野生株との共存条件下で発生させた時の細胞の運命を GFP ラベルを用いて検証した。その結果、*pks2*⁻ 株は野生株とキメラを作ったとき、より柄細胞に分化しにくい、つまり利他行動をとりにくいという挙動を示した。この理由として、*slug* 期に移動方向前方に局在しているはずの *pstA* 細胞が後方にも分布してしまうという *pks2*⁻ 株のパターンニング異常が、野生株に対して柄に分布することを避ける挙動をとることになったと考えられる。*pks2*⁻ 株が野生株に対して柄に分布することを避けるというこの結果から、*pks2* は *pks2* の産物を持つ細胞に対して優先的に利他行動を行う緑髭遺伝子である可能性が示唆された。緑髭効果は血縁選択と同様に種の包括的適応度を高める仕組みの一つであるが、その報告事例は少ない。今後の展望として、どのような機能が緑髭効果につながったのか検証するために、発生初期における *PKS2* の具体的な機能解析を行いたいと考えている。

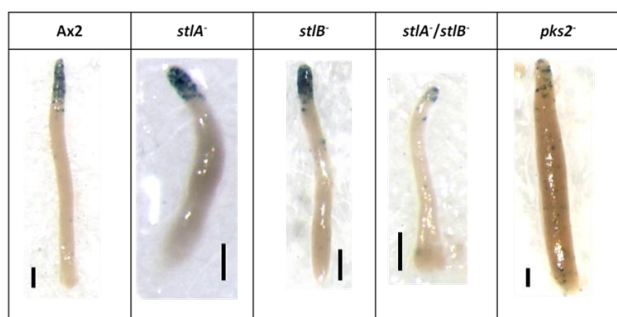


Fig. 1 *pstA* 細胞のマーカー遺伝子の空間的発現パターン
Scale bars indicate 100 μ m.

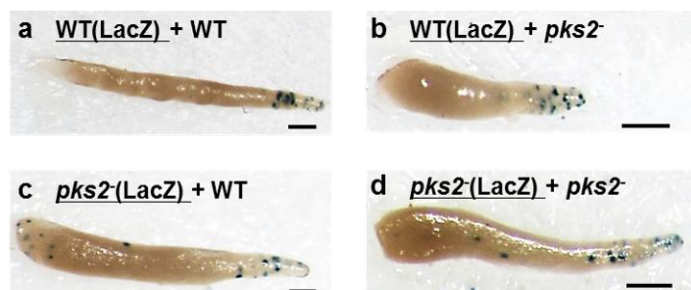


Fig. 2 *pstA* 細胞のマーカー遺伝子の空間的発現パターン
(野生株との混合実験)

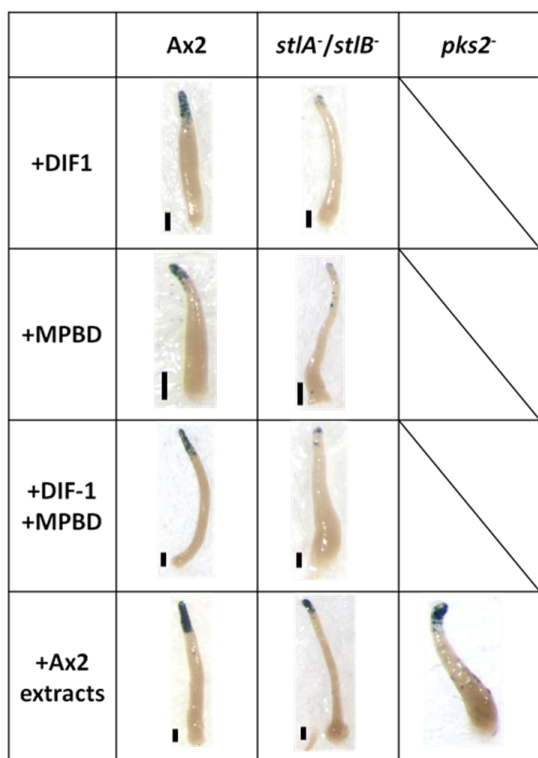


Fig.3 *pstA* 細胞のマーカー遺伝子の空間的発現パターン
(回復実験)

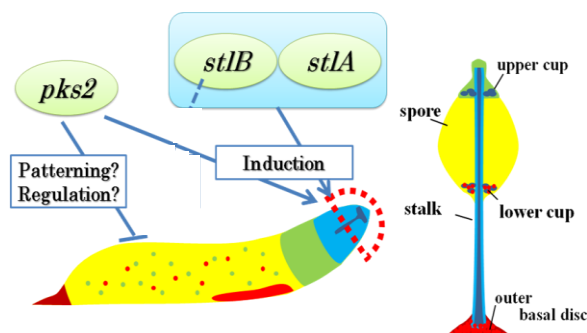


Fig.4 *pstA* 細胞の分化誘導機構の考察