

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32621

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510306

研究課題名(和文)「利他行動」を制御する新規化合物の探索とその作用機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanism and identification of the novel compound that regulates Altruism

研究代表者

齊藤 玉緒 (SAITO, TAMAO)

上智大学・理工学部・教授

研究者番号：30281843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：社会性昆虫などで見られる「利他行動」を、社会性アメーバである細胞性粘菌をモデルとして、その分子機構を理解することをめざした。2008年の大規模変異体解析に基づき2つのポリケタイド合成酵素(PKS2, PKS26)に着目し、その遺伝子破壊株の欠損がもたらす表現型としての利他行動を観察した。その結果PKS2は遺伝子を失うと「裏切り者」となり、PKS26は「敗者」になった。本研究でPKS2の産物は細胞とその環境とのコミュニケーション分子の上流を制御するシグナル分子であることが示唆され、PKS26についてはこれまでに報告のない敗者であることが実験的に証明された。

研究成果の概要(英文)：In order to understand the molecular mechanism of Altruistic behavior that can be seen in the social insects, we used the cellular slime mould, also known as social amoebae. In 2008, the report of a large-scale analysis of restriction enzyme mediated insertion mutants has been published, and two PKS genes were reported to be involved in Altruistic behavior. By the used of gene knockout mutants, we found out that pks2 null mutant was a Cheater mutant that differentiated more spore than its fair share, when mixed with wild type cells. Our result also suggested that the product of PKS2 was involved in the regulation of the communication between the slime mould and its environment. Pks26 null mutant was found to be a Loser mutant. As far as we know, there was no report of the Loser mutant in the cellular slime mould.

研究分野：生物分子科学

キーワード：ポリケタイド 生合成 利他行動

1. 研究開始当初の背景

(1) **ポリケタイド研究の現状**：貴重な医薬品資源としての重要性と新たな資源開発という課題

ポリケタイドはその多様な構造から幅広い生理活性を有する。特に微生物由来のポリケタイドは医薬品資源としての重要度が群を抜いた存在であり、国内外を問わず長年研究が進められてきた。現在では新たな物質資源開発が解決を迫られる重要な課題となっている。

(2) **原生生物のポリケタイド合成酵素研究の現状と本研究の位置づけ**：展開が期待される研究分野の開拓

細胞性粘菌をはじめとする原生生物のポリケタイドとその生合成に関する研究は歴史が浅く、申請者の研究はこの分野の先駆けとして位置づけられる。ゲノム解析終了により、細胞性粘菌はほかのどの微生物よりも多くの pks 遺伝子を持ち、独特の進化を遂げてきたことが推察され、PKS 研究の優れたモデル生物になる可能性が示された。(Eichinger et al., 2005 *Nature*, Austin, Saito et al., 2006 *Nat. Chem. Biol.*)。

(3) **「利他行動」についての研究状況**：生物現象を制御する化学物質

「利他行動」は自分を犠牲にして仲間を助ける行動で、社会性昆虫でよく研究されてきた。この「利他行動」は、ダーウィンの自然淘汰説では単純に説明することができなかったが、ハミルトンの「包括適応度」と「血縁淘汰」の概念の導入により数学的に解析・検証がなされてきた。一方で、「利他行動」を制御する化学物質やその生合成遺伝子については、適切なモデル生物がなかったことから、全く研究が進んでいない。社会性アメーバである細胞性粘菌は飢餓にさらされると、10万個の細胞が協調して子実体を形成する。その際、20%の細胞が自らは死亡して孢子細胞を支える柄細胞となる「利他行動」をとる。社会性アメーバは「利他行動」を示す生物の中で唯一ゲノム情報が完備され、実験室レベルでの研究が可能なモデル生物である。従って、この現象を解き明かす鍵となる化学物質やその生合成遺伝子を検索することが可能である。社会性アメーバの「利他行動」に関する研究は近年、世界的にも注目を集めている(Pennisi et al., 2009 *Science*, Queller et al., 2008 *Nature*)

2. 研究の目的

本研究は自然界に見られる「利他行動」という生物現象に着目し、この現象を制御する化学物質とその生合成経路を明らかにすることを目的とする。これまで、「利他行動」につ

いては理論的、数学的な検証とフィールドワークによる検証がなされてきた。しかし、生物現象の理解は、その現象を制御する化学物質の理解なくしては成り立たない。本研究はこの理解を目指している。生物現象を解き明かす鍵となる化学物質を解明することにより、「利他行動」という生物現象の化学的な側面を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

全体の実験計画の概要は以下の3点にまとめられる。

- (1) 遺伝子破壊株を用いた「利他行動」制御機構の解明
遺伝子破壊株の利己的行動を観察し、そこから「利他行動」制御機構の仮説を提唱、検証する。
- (2) 生合成経路の推定と生物活性の評価
新規化合物の化学合成と生合成経路の推定を中心に、新規化合物の広汎な生物活性の評価を行う。
- (3) 新規物質の同定
「利他行動」を制御するPKSの産物を同定し、構造解析を行う。

4. 研究成果

本研究は社会性昆虫などで見られる自分を犠牲にして仲間を助ける「利他行動」を、社会性アメーバである細胞性粘菌をモデルとして、この行動を制御する分子機構を理解するものである。2008年に報告された挿入変異体(REMI mutants)の大規模解析によると100あまりの遺伝子が利他行動にかかわることが示唆された。その中にあって、2つのPKS遺伝子がこの利他行動にかかわっているということが報告された。社会性アメーバ・細胞性粘菌ではそのゲノムの中に数多くのPKS遺伝子を持つが、種を超えて保存されているものは少なくそれぞれで独自のグループを形成している。その中で種を超えて保存されているpks2遺伝子の挿入変異体は協調性を失い、周辺の野生型株を柄細胞にして、自らは孢子細胞として生き残る「裏切り者(Cheater)」になることが示された。つまり、pks2は利他行動に関わると考えられる。もう一つのPKSであるPKS26遺伝子では挿入を受けた変異体がCheaterの反対の「敗者(Loser)」つまり、自らが犠牲になってまわりの細胞を助ける変異体になることが示唆された。そこでそれぞれの遺伝子についての解析を行うために遺伝子破壊株を作成し、それぞれの変異体について解析を進めた。当初はpks2にのみ注目して研究を進めたが、pks26は*D. discoideum*にのみ見られるPKSであること、これまでに報告のないLoser

の表現型を示す可能性があることから、両者を並行して解析することにした。

(1) PKS2に関する解析結果

Pks2遺伝子破壊株作成
pks2 遺伝子のアシルキャリアプロテイン (ACP) ドメインを欠損させる遺伝子破壊コンストラクトを作成し、相同組換えによって遺伝子破壊株を作成した。



なお、I型PKSの構造を上図に示す。遺伝子破壊株は5つの独立クローンを得、それぞれについてゲノムPCRによって遺伝子組換えを確認した。

遺伝子破壊株の表現型の特徴

まず、単細胞期の増殖にかかる倍加時間を野生型株と遺伝子破壊株と比較したところ、両者に違いはなかった。次に発生過程を比較した。遺伝子破壊株は通常の実験室での発生条件では野生型株と同様の発生過程を示し、子実体を形成した。胞子は野生型と同じように発芽能を有していた。しかし、発生過程の詳細な観察をしたところ移動体は寒天表面上を移動する際に細胞塊を落として移動することが観察されたが、これは発生条件のふれによってみられる異常の可能性もある。

遺伝子破壊株の利他行動

遺伝子破壊株が利他行動に異常をきたすかどうかのテストは野生型株とキメラ体を作らせて得られた子実体の胞子に由来する細胞の中に占める遺伝子破壊株の割合で判定した。Cheater変異の場合にはFair Share(公平な分け前)以上に胞子(生き残り細胞)になり、Loser変異の場合にはFair Share以下の割合で胞子を形成することが予想される。胞子形成の割合はキメラ体を継代培養して得られた各世代の細胞の中に占める遺伝子破壊株の割合をQ-PCRで定量することによって算出した。その結果、第一世代で遺伝子破壊株が全体の50%を占めていた状態を基準の1とした場合、5世代後には遺伝子破壊株の占める割合が1.4倍になっていることが分かった。このことはpks2遺伝子破壊株がCheater変異であることを示していると考えられる。一般にCheater変異を生じる遺伝子は、発生過程において重要な機能を果たすものが多く、そのためCheater変異をきたすことは生存に不利になるTrade-Offの関係を持つことが知られている。このpks2遺伝子破壊株については、遺伝子破壊株は単独でも子実体を形成することはできたが、単独で子実体を形成した場合に胞子形成能が野生型株よりも劣っていることが示唆されTrade-Offが成り立ってCheaterが細

胞性粘菌の集団内に発生するのを抑制していると考えられた。

PKS2産物の解析

PKS2産物の生理活性について検証するためまず、変異体から抽出した細胞抽出液について野生株細胞抽出液との様々な生理活性の比較を行った。その結果、予想に反して遺伝子破壊株由来の細胞抽出液は抗菌活性が野生株よりも強くなることが示された。このことはPKS2酵素の産物がなくなることにより抗菌活性を強く示すようになったということであり、PKS2酵素産物は他の二次代謝産物(抗菌活性物質)のレギュレーターである可能性が考えられる。同様に遺伝子破壊株由来の細胞抽出物を使って土壌微生物に対する影響を評価したところ、土壌線虫に対する細胞抽出物の効果が変化していることも明らかになった。現在、産物の精製について検討しているが、上記の結果がPKS2の産物の欠損による直接的な影響でない可能性が高いこと、また産物が微量であることから、精製には更なる時間が必要であると考えている。

(2) PKS26に関する解析結果

pks26遺伝子破壊株の作成

pks26遺伝子のアシルトランスフェラーゼ(AT)ドメインを欠損させるようにコンストラクトを作成し、相同組み換えによって遺伝子破壊株を作成した。遺伝子破壊についてはゲノムDNAを用いたPCRによって確認し、8つの独立したクローンを得た。

遺伝子破壊株の表現型の特徴

遺伝子破壊株について細胞増殖の倍加速度を野生株と比較したところ、変化がないことを確認した。次に発生過程を比較したところ、発生初期の集合体形成が野生株よりも~3時間ほど早くなっていること、子実体の柄の部分が野生株よりも長くなり逆に胞子塊が小さくなっていることが観察された。特に柄の表現型については柄の太さが変化している訳ではなく、子実体形成における柄と胞子の割合が変化し、柄細胞の分化の割合が多くなり胞子細胞の分化の割合が減少していることが示唆された。

遺伝子破壊株の利他行動

先行実験であるPKS2の解析と同様に、pks26遺伝子破壊株が利他行動に異常をきたすかどうかのテストは、野生型株とキメラ体を作らせて得られた胞子の中に占める遺伝子破壊株の割合で判定した。キメラ先行実験と同様にキメラ体を継代培養して得られた各世代の細胞の中に占める遺伝子破壊株の割合をQ-PCRで定量することによって算出したところ、第4世代で遺伝子破壊株が占める割合は全体のほぼ半分にまで減少していることが分かった。

このことからpks26遺伝子変異体はLoser（敗者）の表現型を示していると考えられる。

Loser変異の位置づけ

これまでの細胞性粘菌を用いた利他行動の解析ではCheaterについての報告はいくつか見られるものの、Loserについての具体的な研究例についてはこれまで報告がなく、本研究がその先駆けになると考えられる。また得られた変異株は孢子細胞分化が弱くなることから予定柄：予定孢子の分化の割合を制御するか孢子細胞への分化を誘導する分子である可能性があると考えている。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Narita TB., Chen Zh., Schaap P., & Saito T. (2014) The Hybrid Type Polyketide Synthase SteelyA Is Required for cAMP Signalling in Early *Dictyostelium* Development. *PLoS One* DOI: 10.1371/journal.pone. 0106634 (査読有)

Narita, TB., Kikukawa, TW., Sato, YG., Miyazaki, SH., Morita N., & Saito, T.* (2014) Role of fatty acid synthase on the development of *Dictyostelium discoideum* *J Oleo Sci.* 63(3):281-9 (査読有)

齊藤玉緒 (2013) 「原生生物細胞性粘菌のポリケタイド生合成機構」(ミニレビュー) 『生化学』85(11):1024-8 (査読有)

Sato, YG., Kagami, HN., Narita, TB., Fukuzawa, M. & Saito, T.* (2013) Steely enzymes are involved in prestalk and prespore pattern formation *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77:2008-2012 (査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

菅愛実子、深澤汐香、北圭人、齊藤玉緒 細胞性粘菌*Dictyostelium discoideum*におけるO-methyltransferase2の機能解析 2015年度日本農芸化学会大会 2015年03月27日～03月29日 岡山大学 (岡山県岡山市)

松本郁加 齊藤玉緒：細胞性粘菌*Dictyostelium discoideum*のpks26の機能解析 2015年度日本農芸化学会大会 2015年03月27日～03月29日 岡山大学 (岡山県岡山市)

松本郁加 齊藤玉緒：細胞性粘菌のpks26の機能解析 日本細胞性粘菌学会 2014年10月11日～10月12日 東北大学 (宮城県仙台市)

齊藤玉緒：細胞性粘菌にみるポリケタイド合成酵素の機能と生合成機構 日本細胞性粘菌学会 NBRPワークショップ 2014年10月11日～10月12日 東北大学 (宮城県仙台市)

Sato, YG & Saito T.: The prestalk inducing factor hunting in *Dictyostelium discoideum* Dictyostelium Christmas Meeting in UK 2013年12月19日～12月20日 Cambridge UK

Narita TB, Saito T.: The function of SteelyA in early development Dictyostelium Christmas Meeting in UK 2013年12月19日～12月20日 Cambridge UK

佐藤有紀江、加賀美太平、齊藤玉緒：細胞性粘菌の予定柄細胞分化誘導に関するポリケタイド合成酵素の働き 日本農芸化学会2013年度大会 2013年03月24日～2013年03月28日 東北大学 (宮城県仙台市)

齊藤玉緒：原生生物細胞性粘菌のポリケタイド生合成機構と産物の機能解析 第25回植物脂質シンポジウム 2012年11月30日～2012年12月01日 甲南大学 (兵庫県神戸市)

佐藤有紀江、齊藤玉緒：細胞性粘菌の予定柄細胞分化誘導に関するポリケタイド合成酵素の働き 第25回植物脂質シンポジウム 2012年11月30日～2012年12月01日 甲南大学 (兵庫県神戸市)

Sato, YG & Saito T.: The prestalk inducing factor hunting in *Dictyostelium discoideum* Annual International Dictyostelium Meeting (2012年07月29日～2012年08月02日) Madrid Spain

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕 出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://rscdb.cc.sophia.ac.jp/Profiles/69/0006815/profile.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

齊藤 玉緒 (SAITO TAMAO)

上智大学 理工学部 教授

研究者番号：30281843

(2)研究分担者

森田 直樹 (MORITA NAOKI)

国立研究開発法人 産業技術総合研究所
生物プロセス研究部門 分子生物工学研究グループ グループ長

研究者番号：60371085