

主論文

学位申請論文

細胞性粘菌（社会性アメーバ）の
多細胞体形成過程における種識別機構の解析

京都大学大学院理学研究科 生物科学専攻

植物学系 形態統御学分科

早川（芝野） 郁美

目次

目次	1
要旨	2
論文目録	5
序章	6
第 1 章 細胞性粘菌 <i>D. discoideum</i> と <i>D. purpureum</i> における 種識別因子の同定	
導入	3 2
結果と考察	3 4
材料と方法	4 7
第 2 章 細胞性粘菌 18 種 (株) のゲノム配列を用いた <i>tiger</i> 遺伝子の解析	
導入	5 3
結果と考察	5 4
材料と方法	6 1
結論と展望	6 3
引用文献	6 7
謝辞	8 6
表・図	8 9

要旨

本研究は、細胞性粘菌の種間相互作用に着目し、*Dictyostelium discoideum* と *D. purpureum* を代表種に用いて、特に種識別機構を主題として進められた。第1章では、これら2種の細胞選別のパターンを手がかりに、*D. purpureum* における種識別因子を特定することを目指した。その結果、*tiger (tgr) family* 遺伝子 (TIG ドメインをもつ細胞性粘菌に特有の遺伝子) のひとつ、*Dp-tgr2752C* を同定した。*Dp-tgr2752C* は *Dp-tgr2752B* という別の因子と染色体上で隣り合い、協調して機能すると考えられる。続いて、合計18種(株)の細胞性粘菌のゲノム配列を用い、各種における *tgr* 遺伝子の配列解析をおこなった。結果、細胞性粘菌において *tgr* 遺伝子対を分子基盤とした厳密な識別システムが獲得されたのは Group 4 と呼ばれるクレードの共通祖先であることが示唆された。ここに至る過程、および進化的背景に関する考察を、第2章として報告する。

細胞性粘菌は社会性アメーバとも呼ばれる土壌性の小型アメーバで、二分裂によって増殖するが、餌のバクテリアが枯渇すると互いに走化性物質を出し合って集合し、多細胞体を形成する(このような細胞性粘菌が多細胞体を形成する過程は「発生」と呼ばれる)。最終形態である子実体のうち、孢子細胞だけが次世代となり、柄は死細胞となる。細胞性粘菌は、野外で密に多種共存していることがこれまでに知られている。餌を巡る競争状態などを経て、適応度の高い種が他を排除し、資源を独占することが予想されるが、実際には種の多様性が保たれている。また、もし異種混在の子実体が形成され、優先的に柄細胞となる種が生じた場合、その種は適応的に不利となる。多くの種が維持されている現状から、異種混合の子実体形成を避ける機構の存在が示唆され、実際、他種が混ざらないことも確認されている。しかし、異種と混合する種も例外的に存在し、細胞性粘菌における種認識・選別機構の解釈を複雑なものにしている。

細胞性粘菌はこれまで、モデル生物として分子生物学的手法が確立されたキイロタマホコリカビ *D. discoideum* を中心に、発生生物学や細胞生物学の視点で研究が進められてきた。その傾向は今なお衰えず、次世代シーケンサーの普及等によって複数種のゲノム情報・予測遺伝子情報が入手可能な近年において

も、種間の相互作用をテーマとした研究は希である。本研究は、細胞性粘菌が異種混在の環境下で、どのような種間相互作用のもと、各自が種を維持しているのかに興味を持ち、種間相互作用の実態と、そのメカニズムを解明することを目的として進められた。本学位論文では、細胞性粘菌の様々な種間相互作用の中でも特に、「同種を選別し、近縁細胞だけで子実体形成を形成する機構」である、種識別機構を主題として扱った。これまでの細胞性粘菌の識別機構に関する研究は、他の研究分野と同様、*D. discoideum* の一種を用いた種内の株（クローン）識別機構の研究に限定されており、種間については、最初に種識別機構の存在を示した 1941 年の Raiper の報告以来、ほとんど進展しておらず、*D. discoideum* の株識別機構との関連についても明らかになっていなかった。

第 1 章では、*D. discoideum* と *D. purpureum* のアメーバが混合状態から細胞選別をおこなう過程を観察し、特徴的な細胞分布パターンを手がかりにいくつかの因子を種認識因子の候補に挙げた。*D. purpureum* のゲノム配列中からこれら候補に相当する配列をクローニングし *D. discoideum* に発現した上で、改めて野生型の *D. purpureum* と混合したところ、*Dp-tgr2752C* と名付けた *tgr* family 遺伝子のひとつを発現する形質転換体だけが、*D. purpureum* の細胞と混ざり合ったまま子実体までを形成することができた。*Dp-tgr2752C* 遺伝子は *D. purpureum* の他の *tgr* family 遺伝子 (*Dp-tgr2752B*) と染色体上でペア（隣り合い、中心からそれぞれが外向きにコードされている）になっており、同じ有性生殖グループに属する株の間で高度に多型となっていた。*Dp-tgr2752C* と *Dp-tgr2752B* は、*D. discoideum* において種内の株識別を担うことで知られている *tgrB1/C1* とそれぞれが構造的に類似しており、同一起源であると推測される。これらのことから、少なくとも *D. discoideum* と *D. purpureum* の 2 種においては、種識別機構と株識別機構は *tgr* 遺伝子ペアを分子基盤とした共通のシステムであることが強く示唆された。

第 2 章では、*tgr* 遺伝子ペアによる識別システムが、現在 150 種以上が知られている細胞性粘菌の系統樹において、どの範囲で共通して保持されているのかを調べるために進められた。計 18 種（株）の細胞性粘菌のゲノム配列情報を用

いた *tgr* 遺伝子の解析によって、*D. discoideum* と *D. purpureum* で見られるような *tgr* 遺伝子ペアは、これら 2 種を含む Group 4 と呼ばれるクレードにのみ存在することが明らかになった。また、*tgrB1* と *tgrC1* は分子系統的に明瞭に分けられ、*tgrB1* に似た配列はすべての種が持っている一方、*tgrC1* に似た配列はペアの有無と同様、Group 4 の種でのみ保持されていた。これにより、*D. discoideum* の *tgrB1/C1* および *D. purpureum* の *Dp-tgr2752B/C* のような *tgr* 遺伝子ペアは、*tgrC1* タイプの配列が Group 4 の共通祖先で新規に獲得されたことによりはじめて成立したと推測される。

細胞性粘菌ではこの Group 4 の種のみが「予定柄細胞」と呼ばれる柄細胞前駆体を発生の初期から確保し、頑丈で大型の子実体を作ることにより乾燥地帯・寒冷地帯への分布拡大に成功している。本研究は細胞性粘菌の進化の過程において、厳密な認識システムと、社会性動物における「ワーカー」とも言うべき新規の細胞型（予定柄細胞）が同時に獲得されたことを示唆する。

論文目録

本論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

第1章, 第2章 第1節

Species recognition in social amoebae

Ikumi Shibano Hayakawa, Kei Inouye

2018年12月発行

Journal of Biosciences 誌 第43巻, 第5号, 1025-1036 ページに掲載

他の部分の発表の方法・時期は未定

序章

バクテリアから真核単細胞生物、真核多細胞生物に至るまで、地球上の生物全般にとって「異種混在下における安定した種の維持」は常に直面する問題として共通のものである。中でも細胞性粘菌（社会性アメーバ）は一世代の中に単細胞期と多細胞期が存在し、「単独でも生きられるが、危機に陥ると協力する」、独自の生存戦略を持った生物である。自身のクローンで占められるシャーレ中とは異なり、野外環境下では異種の細胞性粘菌、およびその他多くの生物種が共存する。著者は、細胞性粘菌が異種混在の環境下において、どのような種間相互作用のもと、各自が種を維持しているのかに興味を持って研究を進めた。特に本学位論文では、細胞性粘菌の様々な種間相互作用の中でも、種識別機構を中心に扱う。

細胞性粘菌の生活環

細胞性粘菌は土壤中に生息する小型（10-20 μm ）の単細胞アメーバであり、主にバクテリアを捕食し、二分裂によって増殖する。ここまでは他の小型アメーバと同様であるが、細胞性粘菌は飢餓状態に陥ると多細胞体形成過程を開始し、最終的には孢子と柄からなる子実体を作る。細胞性粘菌のユニークな生活環を、以下にキイロタマホコリカビ（*Dictyostelium discoideum*）を例として説明する（図 In-1）。飢餓に陥った細胞は、CMF（conditioned medium factor）と呼ばれる 80 kDa の糖タンパク質を放出し、その濃度によって周囲に自分と同様な飢餓細胞がどれだけいるのかを推定する（Jain et al. 1992）。CMF の濃度が閾値に達し、十分な密度で飢餓細胞が存在することが認められると、次に走化性物質である cyclic AMP（cAMP）を出し合って集合を開始する。集合の中心は、リーダー的な細胞によって決まるわけではなく、ランダムな cAMP 濃度上昇のノイズが蓄積し、確率的に決定される（Gregor et al. 2010）。集合中心へ向かう細胞は、ストリームと呼ばれる細胞列を作り、流れるように進んでい

く。この時、各細胞は進行方向に対して縦に伸びた、極性を持った形をしている。集合を終えると、一つあたり数十から数十万もの細胞を含む半球状の細胞塊（マウンド）となる。

また、この頃から将来の子実体において柄になる細胞（予定柄細胞）と、孢子になる細胞（予定孢子細胞）の分化が始まる。細胞塊は次に移動体と呼ばれるナメクジ型の構造体（slug）となって這いまわる。この移動体の中では、元の単細胞アメーバたちがそれぞれ独立した運動をしており、他の一般的な多細胞生物のように、各細胞の位置関係が明確に固定されるわけではない。例えば前方の細胞を追い越したり、隣り合う細胞と逆方向に運動したりといったことができる。つまり、全体では多細胞体として統率されているが、構成員である各細胞は比較的自由に柔軟な運動を保っているのである。マウンドの頃に分化した予定柄細胞と予定孢子細胞は、概ね移動体の前側 2 割、後側 8 割にそれぞれ位置する。移動体には正の光走性と負のアンモニア走性があるため（Bonner et al. 1988）、明るくて開けた場所、つまり地上へ向かって移動すると考えられている。

そのようにして、彼らにとって「適当な場所」まで移動した移動体は、続いて子実体形成に入る。ここで、これまで先頭をきって進んできた予定柄細胞は、子実体形成過程で孢子の支えとなって死んでゆく。言い換えれば、細胞性粘菌の子実体の中で次世代に生き残るのは、孢子細胞だけである。他の多細胞生物に例えれば、細胞性粘菌において柄細胞は体細胞的であり、孢子細胞は生殖細胞的であるとも言える。水平方向への移動をやめ、垂直方向に伸び始めた移動体の先端では、予定柄細胞が順次組織内部へと落ち込んでいき（Raper and Fennell 1952）、大きな液胞と、細胞壁を持った柄細胞（死細胞）へと分化する。同時にその周りを覆う stalk tube と呼ばれる構造が作られ、細長い柄が形成される。移動体の後半 8 割である予定孢子細胞の集団は、陥入・伸長する予定柄細胞および柄細胞に引き上げられるようにして柄の上方へ運ばれ、途中、固い孢子外皮などの耐性構造を持った孢子へと一斉に分化する。孢子塊が柄の先端まで到達し、子実体形成は完了となる。孢子は水流（O'Dell 1979）や脊椎動物

(Stephenson et al. 1992)、昆虫 (Stephenson et al. 2007)、鳥 (Suthers 1985) などを介して拡散され、水分や栄養条件が整えば次世代のアメーバが発芽する。そして再び二分裂による増殖を開始するのである。以上は常に核相 n での無性生殖過程であり、飢餓から子実体形成までは約 24 時間で完了する。発生における各ステップは細胞性粘菌の種によって異なることがあり、たとえば、集合に用いる走化性物質は、cAMP の他にも、glorin (Shimomura et al. 1982) など、少なくとも 8 数種類以上存在する (Bonner 1982)。

細胞性粘菌の有性生殖環

無性生殖過程である子実体形成とは別に、細胞性粘菌には有性生殖の過程も存在する。マクロシスト形成である (図 In-2)。マクロシスト形成の過程では減数分裂がおこなわれ、遺伝子が組み換わることが示されている (Macinnes and Francis 1974、Wallace and Raper 1979)。

マクロシスト形成過程ではまず、互いに適合する交配型 (性別) を持つ一倍体細胞同士が融合し、二倍体の接合体が形成される。ここから少し驚異的だが、巨細胞と呼ばれる接合体は周囲に残る一倍体細胞を、子実体の形成時と同様、cAMP によって引き付け、それらを栄養源として貪食、つまり共食いは始める。中心の巨細胞と、引き寄せられた一倍体細胞たちによる細胞塊は、粘液性の膜で覆われる。細胞塊は成熟するにしたがって、セルロースを含むより強固な膜に包まれ、きわめて耐性の強い構造体となる (Nickerson and Raper 1973)。この構造体がマクロシストである。マクロシストの内部では減数分裂が起こり、適した環境下において発芽し、複数の次世代アメーバが放出される (Li and Purugganan et al. 2011、Nickerson and Raper 1973)。

子実体形成およびマクロシスト形成のどちらの過程へ入るかは培養条件によって制御することが可能であり (Saga and Yanagisawa 1982、Saga et al. 1983)、マクロシストは冠水状態の暗条件下で形成される。また、それぞれの過

程開始を誘導する物質として、cAMP と植物ホルモンであるエチレン(ethylene) が同定されており、cAMP は子実体形成を、エチレンはマクロシスト形成を誘導する (Amagai 1984, Amagai and Filosa 1984)

D. discoideum においては、3つの有性生殖型が存在し (Bloomfield et al. 2010)、それぞれが自分と異なる型の細胞と接合できる。接合型は *mat* 遺伝子をどのような組み合わせで持つかで決まっており、交配型 I では *matA* のみ、交配型 II では *matA* と相同性のある *matB* に加えて *matC* と *matD*、交配型 III では *matC*、*matD* とそれぞれ相同性のある *matS* と *matT* を持つ (図 In-3)。しかしながら、これら *mat* 遺伝子の産物は細胞膜上には存在しないと推測されるため、交配型認識の具体的な機構は明らかになっていない。

モデル生物としての細胞性粘菌：

キイロタマホコリカビ (*D. discoideum*)

細胞性粘菌を含む粘菌類は、生物の系統分類において所属が二転三転した歴史がある。かつて Haeckel の三界説では原生生物界に分類され (Haeckel 1866)、その後の五界説ではキノコやカビの仲間とされ (Whittaker 1969)、Margulis の修正五界説では再び原生生物界へと戻ってきた (Margulis 1971)。しかし近年のスーパーグループによる生物分類により、粘菌類は Amoebozoa に属するということによってようやく落ち着きを見せている (Adl et al. 2012、図 In-4)。この分類群 Amoebozoa には「アメーバ動物」という和訳が付けられることもあり (洲崎敏伸 他 2014 年)、粘菌類の他には *Entamoeba* (赤痢アメーバ) や *Acanthamoeba* (アカントアメーバ)、*Amoeba proteus* など、多くの単細胞アメーバが含まれる。京都大学大学院理学研究科においては、細胞性粘菌グループは植物学教室に位置していたが、この系統樹により、細胞性粘菌は植物 (Archaeplastida) よりも動物および真菌 (Opisthokonta) に近いと言える。

細胞性粘菌の中でも *D. discoideum* はこれまでに見たように、アメーバ状の

細胞から柄と孢子のたった 2 種類の細胞型へ分化すること、飢餓から子実体形成完了までが約 24 時間しかかからないこと、単数体（染色体数は 6）であるために突然変異体の分離が容易であること、多細胞組織が無色であり、免疫染色および蛍光マーカータンパク質の発現および可視化が可能であること、等の理由から、主に発生生物学や細胞生物学におけるモデル生物として長く研究されてきた。研究対象となる個別の事象としては、食作用、運動性、プログラム細胞死（アポトーシス）、走化性移動、シグナル伝達、細胞選別、パターン形成、細胞分化など多岐にわたる (Annesley and Fisher 2009)。

D. discoideum は他の生物でも広く使用される分子遺伝学的ツールが利用可能であり、エレクトロポレーションによる遺伝子導入 (Howard et al. 1988)、相同組み換えによる遺伝子破壊 (De Lozanne and Spudich 1987)、REMI (restriction enzyme-mediated integration) 法 (Kuspa and Loomis 1992)、RNAi (Morita et al. 2004, Boeckeler et al. 2006) などによってこれまで多くの研究成果が得られてきた。最近では CRISPR/Cas9 の技術も導入されている (Sekine et al. 2018)。

2005 年に 34 Mbp の全ゲノム解析結果が報告され (Eichinger et al. 2005)、*D. discoideum* は約 12500 遺伝子をコードするとされる。細胞性粘菌ゲノムの最も大きな特徴は、高い AT 含量 (77%) であり、コドンの使用頻度にも影響している (3 文字目にアデニンまたはチミンが使われる頻度が高い)。ゲノム配列や、個々の遺伝子情報は、dictyBase (<http://www.dictybase.org>) で公開されている。

細胞性粘菌は、多細胞生物に固有と考えられていた様々な因子を数多く備えており、例えば機能不明の GPCR (G-protein coupled receptor) は 50 近く存在する。したがって、細胞性粘菌の多細胞体構築様式は独特であるが、そのために用いる機構の多くは、後生動物をはじめ他の多細胞生物と共通である可能性が大いにある。実際に、後生動物の上皮組織における細胞の極性決定に中心的な役割を果たす α -catenin の相同タンパク質が、細胞性粘菌の子実体組織中における細胞の極性の決定においても同様の働きをしていることが示された

(Dickinson et al. 2011)。また、後生動物の細胞接着に関わる Talin のホモログも細胞性粘菌には 2 種類あり、それぞれが異なった機能を持つ (Kreitmeier et al. 1995、Tsujioka et al. 1999, 2008)。

細胞性粘菌は 150 種類以上が知られており、分子系統解析の結果、大きく 4 つのグループに分けられた (図 In-5、Romeralo et al. 2013)。このうち現在、17 種 (株) のゲノム配列が NCBI に公開されており、*D. discoideum* (Group 4) に加えて *D. purpureum* (Group 4)、*D. lacteum* (Group 3)、*Polysphondylium pallidum* (Group 2)、*D. fasciculatum* (Group 1) については遺伝子のコード領域予測がなされている。このような状況下で、徐々に各種間での遺伝子比較や、発現比較がおこなわれるようになってきた (Parikh et al. 2010、Heidel et al. 2011)。しかし、これまでの研究が *D. discoideum* を中心に進められており、特に分子生物学の分野では他の種が扱われることは稀であったため、細胞性粘菌の種間における相互作用について、メカニズムの詳細や、野外での実態についてはほとんど明らかになっていない。

野外で想定される細胞間 (種間) 相互作用

細胞性粘菌は野外で密に異種共存しており、ごく少量採取した土壌や大型動物の糞から複数種の細胞性粘菌が単離される (Eisenberg 1976、Sathe et al. 2010)。また、学部 1 回生向けの少人数制ゼミナール (ポケットゼミ) の中で行われた、京都大学植物園におけるサンプリングでも、同じ地点から高い頻度で複数種の細胞性粘菌が得られた。もちろん、共存しているのは細胞性粘菌のみではなく、他の微生物も同様であるが、特に細胞間 (種間) 相互作用という観点から細胞性粘菌を見た時、限られた領域での共存において、他の単細胞生物とも多細胞生物とも異なる独自の問題が現れる。以下に順を追って説明したい。

世の中には数多くの多細胞生物がいるが、発生過程での多細胞化の様式としては主に、“分裂した細胞同士が離れない” という形をとる。例えばヒトを始め

脊椎動物の場合では、一つの受精卵が分裂を繰り返し、やがて何十兆個もの細胞からなる一個体を形成する。ところが細胞性粘菌の多細胞体形成は先に述べたように、バラバラに存在していた単細胞アメーバの“集合”によって達成される。これが、細胞性粘菌が他の生物には見られない特徴的な細胞間（種間）相互作用を生じる要因となる。例えば、増殖期から飢餓を契機として集合するまで、すなわち単細胞期では、当然周囲に他種細胞（細胞性粘菌以外も含む）が多くいることが予想される。そして集合によって多細胞体が形成されるために、他の多細胞生物では基本的に起こらない他種細胞とのキメラ体形成が、細胞性粘菌では容易に起こり得るのである。つまり、細胞性粘菌が密に共存している事実を前にしてまず浮かんでくるのは、「他種の存在は発生に影響するのだろうか？」そして、「他種が混ざり合わないのだろうか？」という疑問である。

単細胞期の相互作用

まず単細胞期、すなわち増殖期から集合までの相互作用について考える。細胞性粘菌の餌として実験室で用いられているのは大腸菌（*Escherichia coli* B/r 株など）や、*Klebsiella aerogenes* (Ka) などであり、野外ではより多様な細菌が存在している。細胞性粘菌はある程度、餌の選り好みをすることが知られているが（Raper 1937）、例えば B/r、Ka がほとんどの細胞性粘菌の餌となることから、恐らく種が異なっても概ね似たバリエーションの細菌を好んで食べていると予想される。従って多くの種の共存下では、餌を奪い合うという状況が避けられないだろう。単純に考えれば、増殖力の強い種や他種を排除、究極的には殺してしまうような種が現れ、その領域を占拠してしまってもおかしくはない。実際 *P. pallidum* の中には他の種を殺すキラー株が存在することが確認されている（Mizutani et al. 1990）。本研究室でも *P. tenuissimum* の中にキラー株を発見した（早川郁美 修士論文、2012 年）。Mizutani et al. (1990) によると、*P. pallidum* のキラー株は周囲に **killer factor** と呼ばれる因子を放出し、自身と有性生殖の相手となる株以外は全て殺してしまう。しかし、現実にはキラー株がその他全ての細胞性粘菌を絶滅させるような事態は

起らず、京都大学植物園で見られるような種の多様性が維持されている。また、野外で束にしたストローを地面に突き刺し、各ストローに詰まったごく少量の土から細胞性粘菌を分離した実験では、細胞性粘菌が 1 種でも見つかったストローからは別の種も見つかることが多い、という結果が得られ、細胞性粘菌は土壌中で均一に分布しているのではなく、異種が共局在する傾向があることが示唆された (Eisenberg 1976)。このストローを用いたサンプリング実験はポケットゼミでも試みられ、同様の結果が得られた (2015 年)。これらのことから、細胞性粘菌の種間には、餌を取り合う、殺し合う、というような殺伐とした関係だけでなく、互いの生存を有利にするような何らかの相互作用が存在するのではないかと予想される。現在その一例と思われる事例が知られており、*P. violaceum* (“violaceum complex”) の集合開始に必要な D factor と呼ばれる因子を *D. discoideum* や他の種も分泌していることが分かった (Hanna and Cox 1978)。*D. discoideum* の発生における D factor は孢子形成促進作用を持つ、ベンゾキノンをベースとした有機化合物であり (2-hydroxy- 5-methyl-6-pentylbenzoquinone、Dictyoquinone) (Takaya et al. 2014)、集合不全を示す *P. violaceum* の D factor 欠損株でも、*D. discoideum* の存在下では正常に発生できるので、まるで *D. discoideum* が *P. violaceum* を助けているように見える。細胞性粘菌ではよく、柄細胞の死が「利他行動」と言われるが、D factor 以外にも未だ知られていない「種を超えた利他行動」が存在する可能性は十分にある。ただし、ここで「利他行動」と言っているのはもちろん、結果的にそう見えるという意味合いであって、進化の過程で実際に適応的であったために保存された形質なのか、それとも共通の祖先から受け継いだ因子がたまたま機能を保っていたのか、については現時点では議論できない。

以上のような着眼点から、著者はこれまでに細胞性粘菌の初期発生（飢餓から集合まで）における種間相互作用を調べ、少なくとも細胞性粘菌の Group 4 に属する種の間において、実際に他種の存在が発生の進行に有利に働く事象を見出している。この Group の種間では特定の初期発生因子に互換性があることが示唆され、他種細胞が分泌した因子を *D. discoideum* 細胞に作用させた実験

結果（本来は集合不能な低い細胞密度でも集合可能になるなど）から、CMF が有力候補として挙げられる（早川郁美 修士論文 2012 年）。

多細胞期の相互作用

続いて、多細胞体形成における種間相互作用、すなわち「他種が混ざりあわないのか？」という問題について考える。仮に、細胞性粘菌の異種が混ざって子実体を形成したとする。すでに何度か述べたが、子実体において柄は死細胞であり、孢子だけが次世代となれるので、異種が混合した際に、もし柄細胞となりやすい種がいた場合、世代を経るごとに割合を減らし、やがては姿を消してしまう。従って、異種混合の子実体を形成することは種によっては適応的に不利となるため、多くの種が共存しながら維持されている現状を考えれば、混合を避けて単一種での子実体を形成するための機構が存在するのではないかと考えられる。異種混合の多細胞体形成を避ける方法としては、第一に走化性物質の使い分けが挙げられる。生活環のくだりでも述べたが、細胞性粘菌ではよく知られた cAMP の他に数種類の走化性物質が存在し、実際異なる走化性物質を使うことで混合を避けた集合体を作ることが出来る (Bonner 1982)。しかし、近縁の種では同じ走化性物質を使っていることが珍しくなく、図 In-5 の系統樹で言えば、*D. discoideum* を含む group 4 の種は全て共通の cAMP を用いる。つまり先の疑問は、言い足すならば「共通の走化性物質を集合に用いても、他種が混ざりあわないのか？」という疑問なのである。そして、ここで予め結論を述べてしまうと、ほとんどの場合、他種は混ざらない。実は、古くから異種の細胞性粘菌のアメーバを混合しても最終的には同種を選抜して各種が独立した子実体を形成することは知られていた (Raper and Thom 1941、Bonner and Adams 1958)。特に本研究において代表的に用いた *D. discoideum* と *D. purpureum* に関しても、お互いに混ざり合わないことが確認されている（移動体を単細胞へ分離した上で 2 種を混合するなどの処置をした場合は、低頻度で混ざることもある）。しかし「ほとんどの場合」と言ったからには、これとは逆に、どんな相手とも混ざる種もまた存在する。*D. caveatum* は、ほんの少数の

細胞でも他種の多細胞体に混ざりこむと、相手を食べ尽し、最後には *D. caveatum* の子実体だけが形成される (Waddell 1982)。しかも調べた限りではどんな相手にも混ざることが出来るという。他の種にとっては悪夢のような相手だが、*D. caveatum* の存在は細胞性粘菌の種間認識・選別機構の考察に、興味深い示唆を与えてくれる。先に述べた「異種が互いに混ざらない」という現象だけなら、その解釈として 1) 積極的に同種を選んでいる 2) 異種を排除している の2通りが考えられる。*D. discoideum* は同じ種内でも株が違えば混ざらないことがあり、2011年にこの株間識別には TgrC1、TgrB1 という一組の膜タンパク質 (接着因子) が関与していることが示された (Hirose et al. 2011)。これは相手が自分と同じ TgrC1、B1 を持ってさえいれば、共通の多細胞体を形成できるとするもので、別株の TgrC1、B1 との二重発現をさせても排除されることはなかった。株間の問題は厳密には種間と同様に扱えないかもしれないが、ひとまずこの論文における結果は先に挙げたうちの 1) を支持する。しかし、*D. caveatum* が、出会う全ての種の同種識別因子、*D. discoideum* でいうところの TgrC1、B1 を備えているとは到底考えられない。したがって *D. caveatum* は、どんな種にも積極的に選ばれる、のではなく、どんな種にも排除されない、と考えるほうが妥当だろう。ここまでの、細胞性粘菌の種間認識・選別機構について総合すると、細胞性粘菌にはまず、積極的に同種を選抜するような機構があり、*D. discoideum* の株間認識・選別においては接着因子が関与している。しかしそれとは別に、異種を排除するような機構も存在し、*D. caveatum* はその排除機構をかいくぐるような対抗措置を備えていると考えられる。本研究では主に *D. discoideum* と *D. purpureum* を用いて、2種が分離する過程のより詳細な観察から関与する因子の候補を挙げ、異種間形質転換によって種認識・選別機構の解明に取り組んだ。

協力の進化

以上のように、細胞性粘菌は様々な種（細胞）間の相互作用をしながら単細胞のアメーバが集団となり、最終的には孢子と柄からなる子実体を形成する。初期は均一な細胞の集合の中に、孢子（生細胞）と柄（死細胞）という二つの細胞型が生じることは、細胞集団（社会）における階級制度的な役割分担であると捉えられるため、細胞性粘菌は、しばしば社会性アメーバ (social amoeba) とも呼ばれる。

この章では、生物集団において協力行動が進化する条件、および、その条件を達成するにあたって生物が取り得る戦略について概要を述べる。

利他行動

自らはコストを支払って、他個体の利益を向上させるような行動は、「利他行動 (altruism)」と呼ばれる。例えば、自分が獲得した食料を他の個体に分け与える、親鳥がおとりとなって天敵を雛から遠ざける、などの自分が損をしてでも他個体を助けるような行動が利他行動にあたる。ある集団の中に秩序立った行動や協力が見られるときには、何らかの形で利他行動がともなっていることが多い。

細胞性粘菌の柄細胞は死細胞となって孢子細胞を高く持ち上げ、孢子の拡散成功率を向上させる。このような、細胞性粘菌における柄細胞の自己犠牲的なふるまいを「利他行動」であるとし、社会性の研究対象としようとするとき、細胞性粘菌は実験室での扱いやすさや遺伝子改変技術など、理想的な側面を多く揃えている。実際、細胞性粘菌の社会性に関する研究を数多く報告している Joan Strassmann と David Queller は、もともとはハチなどの社会性昆虫を研究対象としている。

適応度

生涯を通じて平均的にどれだけの子を残すか、という量は「適応度 (fitness)」

として定義される。特定の環境により良く適応した個体が多くの子を残すと考えられるので、次世代ではその環境に適応する遺伝子型が頻度を増していく。多くの昆虫のように、一度繁殖して死ぬという簡単な場合では、適応度は繁殖に成功するまでの生存率と、繁殖した際に残す子供の数とを掛けたものである。生物の同種内や異種間での相互作用を考慮している際は、適応度は本人だけでなく、集団内の他の個体や他種の個体のふるまい・状態によっても変わってくる。例えば集団内にメスが多いときはオスの個体の方が適応度が高く、集団内にオスが多いときはその逆となる。

様々な環境下で生きる様々な生物において、他個体と協力することは、その個体の適応度を上昇させることが多い。このため、程度やスケールの違いこそあれ、協力という現象が多くの生物種で見られるのである。

協力が進化する条件（近縁選択）

「社会性」と名のつく生物では、アリやハチなどの社会性昆虫が特に有名である。ほ乳類では、ハダカデバネズミなどの齧歯目の動物に社会性を持つ物がある。これら生物の共通点は、集団の中で生殖に参加する個体（女王アリなど）と、参加しない個体（ワーカー）が明確に区別されることである。たんに役割分担があるだけでなく、このような生殖に参加しない階級を持つ集団をとくに「真社会性」ということもある。実は細胞性粘菌のうち、「予定柄細胞」という次世代に生き残らず、犠牲となることが決まった細胞を発生の早期から確保するのは系統的に **Group 4** クレードに属する種のみであり、その他の **Group** に属する種では、柄細胞は予定胞子細胞が発生の最終段階で脱分化することにより形成される (Schilde et al. 2014)。つまり、どの細胞にも最後まで胞子になるチャンスが与えられているのである。

先の節で説明した適応度は、残す子の数で定義されるため、協力することで自分の生殖成功率を上げたり、子供の生存率を上げたりできる状況なら「協力する」という形質は次世代に残り、進化可能な形質として認められる。

しかし、これら真社会性生物のワーカーは自分の子を残さないため、適応度

がゼロである。細胞性粘菌においても、柄細胞は死細胞となるので適応度はゼロとなる。このようなワーカーによる自己犠牲的な利他行動が進化する説明として、現在最も広く受け入れられている理論は、ハミルトンの近縁選択理論 (Hamilton 1964) である。

例えばハチやアリなどの社会性昆虫のワーカーは、女王と血縁の近い個体であり、多くの場合女王の娘である。つまりワーカーにとって、女王が産んだ卵や幼虫は、まったくの他人ではなく、自分の妹であることが多い。自分と妹は遺伝子を共有しているのだから、妹を育てることは自分の子供を育てるのと同様、遺伝子の広がりを助けることになる。

ハミルトンの血縁選択理論によれば、協力のための遺伝子は、 $rB > C$ が成り立つ場合に進化可能となる。 r は利益を提供する側と受ける側との平均的な近縁度、 B は協力的行為によって得られる利益、 C は協力的行為にかかるコストを表す。つまり、協力の効果の血縁度倍がコストよりも大きいときは協力が進化し、そうでない場合は進化しない。

たとえば同じ個体内の生殖細胞と体細胞はもともと一つの受精卵が分裂を繰り返してきたものなので、基本的に同じ遺伝子セットを持っており、血縁度は 1 である。そのため、免疫細胞として侵入者と戦うといった、自己犠牲的な行動が進化しやすいのだと言える。逆に、協力する相手が赤の他人であり、血縁度がゼロであるならば、いくら協力の効果が高くても利他行動は進化しないことになる。

社会性昆虫の場合、仮に二倍体の生物を想定し、ある 2 個体において母親が同じで父親が異なるとすれば、片方の個体にある遺伝子をランダムに選ぶと、他の個体に同じコピーがある可能性は $1/4$ である (それが母親由来の遺伝子である確率 $1/2$ $\times$ 2 本の染色体のうち同じ側を相手が持つ確率 $1/2$)。よって、上の式の r は $1/4$ となる。もし母親だけでなく父親も共通だとすれば、 r は $1/2$ である。

このように、血縁度の考え方を導入することで、個体レベルでの適応度が極端に低くなるような協力関係の進化も説明可能となる。細胞性粘菌の柄細胞が

死細胞となり、孢子細胞を助けることが自己犠牲的な行動と考えると、柄になる細胞と孢子になる細胞との間での遺伝的な近さが重要な意味を持ってくる。つまり、柄細胞の立場にたてば、孢子細胞が自分と同じ遺伝子を持っているなら安心して犠牲になるが、他人のためには死にたくない。この要求を叶えるため、本研究で主題とする種（株）識別のシステムが必要になる。

協力する集団に不正行為者 (cheater) が出現した時

原核生物である緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は、細胞へ鉄を取り込むために鉄キレート剤であるシデロホアという物質を分泌する (West and Buckling 2003)。分泌されたシデロホアは周囲へ拡散していくため、大きな集団を形成した方が、互いに分泌したシデロホアを利用でき、効率的である。これも一種の協力と見ることができる。

一方で、シデロホアを生産するのには当然コストがかかる。しかも自分で分泌しなくとも、周囲の細胞が分泌したシデロホアを使えるため、「シデロホアを分泌しない」という個体が現れた場合、その個体は適応的に有利となる。このような、いわば不正を働く形質 (cheater) が遺伝子の変異によるものであれば、その遺伝型は集団内に広まり、集団の協力関係を根本から危うくする (“The tragedy of the commons” Hardin 1968)。

しかしながら、cheater が出現してしまった状況においても、協力関係を保つ自身のクローン (またはごく近縁者) だけで集団をつくるシステムさえあれば、このような不正行為による搾取からは身を守ることができる。

つまり、自己犠牲的な利他行動の進化や、cheater による搾取を避けたい、といった要求は、共に「血縁度の高い個体のみで集団を作る」というシステムによって達成されるのである。

血縁度の高い集団を作るには

例えば遺伝的に均一な細胞集団をつくらうとすると、おそらく最も簡単な方法は、細胞間の接着を保ったまま分裂を繰り返すことである。先の節でも触

れたが、ヒトをはじめ、多くの多細胞動物はこの方式を採用しており、受精卵が卵割を繰り返し、最終的に数十兆もの細胞集団となる間、各細胞は細胞間接着によって離れないまま形態形成をおこなっていく。ここに遺伝的に異なる細胞が入り込む余地はない。

また、細胞間接着によらない場合でも、分裂後の細胞にほとんど移動能力がなく、各自がその場に留まっていれば、結果的に遺伝的に均一な集団づくりは達成される。寒天プレート上に形成される大腸菌のコロニーなどがこれにあたる。このように、分裂後の細胞が互いに離れないでいることは、同じ遺伝子を持つ個体だけで集団を作る代表的な手段である。

一方で、各個体が運動性をもち、近縁でない個体と出会う可能性が高い場合は、より積極的な近縁者選択の方法が発達すると考えられる。もし出会った相手が自分と近縁であるかを外見で見分けることが可能なら、そのような外見や認識能力を持つ個体は、適応度が高くなると予想されるからである。近縁度の指標となる何らかの手がかりによって、協力する相手を選別する行為は、**Dawkins (1976)** が外から見える特徴として緑ひげを例に説明したため「緑ひげ効果」と呼ばれるようになった。この効果がはたらくためには、(1) その遺伝子をもつことが外から見て分かる (2) 両者の個体が互いに認識できる、そして (3) それをもつ個体に対してだけ利他行動をおこなう、の3つが必要とされる。例えば、個体間で少しずつ構造の異なる分子が細胞表面に提示され、個々はその分子を認識するレセプターを有し、自分と同じ分子を持った個体だけに利他行動をする、といった状況である。

細胞性粘菌は、柄細胞が利他行動と取れるふるまいをするため、血縁度の観点から遺伝的に均一な集団を作る必要性が高い一方、単細胞アメーバの集合によって多細胞体を形成するので、遺伝的に異なる細胞が混合する機会が「分裂後に離れない」タイプの生物よりも圧倒的に多い。したがって細胞性粘菌が子実体をつくる際に遺伝的に近い細胞を選び、異なる細胞を排除する機構は、単に細胞性粘菌という一生物の一システムという以上に、ある生物集団において

進化上、協力行動や「ワーカー」階級の個体（細胞）が獲得される過程を知る上で有用な研究対象なのである。

細胞性粘菌における cheater 研究

次に、細胞性粘菌において具体的に cheater 株がどのように見出され、研究されているかを順に見て行く。総合すると、*D. discoideum* においては異なる株が混ざった場合に cheater となる株、搾取される株が実際に区別され、防衛手段としての近縁選択も起こっている。先に理論的に紹介してきた「協力の進化」のための攻防は、細胞性粘菌の世界で実際に繰り広げられ、具体的な研究分野となっている。

誤解のないよう念のため注釈を加えるが、ここで cheater のことを擬人的に裏切り者扱いしているのは「協力」の観点から見たストーリーの簡便化のためであって、もちろん実際の細胞に道德観・倫理感のようなものがあるわけではない。たとえばある分化誘導因子の生産量や感受性に差があったり、多細胞中の進行速度に差があったり、といった形質の違いが、結果的にその細胞を柄とするか孢子とするかを左右するのである。

Strassmann et al. (2000) は細胞性粘菌の cheater について最初に報告した重要論文である。この実験では、様々な地域から集めた *D. discoideum* の株同士を混合させたところ、柄細胞と孢子細胞への寄与が半々ではなく、柄になりやすい株、孢子になりやすい株が存在することを発見した。

Fortunato et al. (2003a) では、野外環境において、*D. discoideum* の別の株がごく近い場所で共存していることが報告されており、上記のような孢子細胞の座を巡る株間の競合が実際にも起こっているだろうと推測している。また、同年の同じく Fortunato et al. (2003b) では、孢子になりやすい株というのは、どの相手に対してもそうであり、すなわち *D. discoideum* の株間では例えばじ

ゃんけんのように相手による得手・不得手があるというよりは、胞子になる序列（ヒエラルキー）があるようだ。

Queller et al. (2003) は、この後もたびたび触れることになるが、「細胞接着因子のひとつである CsA が「緑ひげ因子」であると報告した論文である。それまで、「緑ひげ効果」は概念としては受け入れられていたが、実際に微生物でそのような分子が同定されることは稀だったため、細胞性粘菌の研究領域にとどまらない大きなインパクトを持っていた。しかしながら、CsA には緑ひげ因子に必要な株間の多型が認められず、後述するように現在では TgrB1/C1 ペアが *D. discoideum* における緑ひげ因子であるという見解が広まっている。

Foster et al. (2004) では、遺伝子が多面的な機能を持つことが、cheater に関する抑止力となる事例を報告している。*dimA* という遺伝子を欠損すると、細胞は DIF-1（予定柄細胞誘導因子）に不感受性となって柄細胞になれなくなる。では胞子になりやすい、つまり cheater となるのか、といえばそうではない。*dimA* はまた、胞子細胞領域に混ざるために必要な因子であるようで、*dimA* を欠損した細胞は予定胞子細胞領域から排除され、しかも野生型の細胞が予定柄細胞から予定胞子細胞へと分化転換してくるため、*dimA* 欠損株は結局胞子細胞になることができない。このように、cheater となりそうな変異株は無条件に搾取側に立てるわけではなく、場合によっては遺伝子機能の多面性が cheater 出現の抑止力となることがある。

Mehdiabadi et al. (2006) では、本研究でも代表的に用いた *D. purpureum* において近縁選択が存在することを示している。

Gilbert et al. (2007) では、それまで理論上言われていた、近縁選択が cheater の搾取から逃れる手段となり、協力の進化を安定させることを実験的に確かめている。

Ostrowski et al. (2008) は本研究の結果とも関連する論文である。ここまでの論文では主に、異なる株同士が混ざるかどうか、混ざった場合、柄と胞子の比率はどうか、ということの問題にしてきたが、細胞塊の中で異株は均一に混合するわけではなく、部分的に分離していることに初めて着目した。つまり、

同じ多細胞体内で混合しながらも、異なる株細胞の間には依然として何らかの差異があること、および互いに識別するシステムが存在すること、が示唆された。

Santorelli et al. (2008) は、様々な変異を持つ株を混ぜ合わせ、胞子を何世代も植え継ぐことによって、胞子になりやすいクローンを選別し、それらの変異の原因遺伝子を調べている。「cheater 遺伝子」が発見できそうな試みであるが、変異株を cheater にさせる原因遺伝子は、機能的に多岐にわたり、一定の法則は見出せなかった。つまり、ある特定の遺伝子に変異が入った時だけではなく、cheater が現れるチャンスはいくらでもあるようだ。おそらく、*dimA* のような多面発現が抑止力となるケースはごく一部で、「裏切り者が出ないこと」に労力を注ぐよりも、近縁選択等の防衛策に力を入れる方が現実的なのであろう。

Flowers et al. (2010) では、*D. discoideum* の異なる株は、同じ箇所でサンプリングした異株ほど近縁識別の力が強いと報告している。つまり、日頃接している相手は「自分と違う」ことを強く認識するが、初めて出会うような相手ははっきり認識できないことがある。この結果は、例えば単一種（株）だけが隔離されたような環境では認識力が弱くなっていくのか、究極的には認識力を失うことがあるのか、ということ进行を考察する上でも重要な事象である。

これらの研究は細胞性粘菌において近縁選択が実際に起こっていることを示す物であるが、逆に遺伝的に離れた株（種）でも混合した子実体を形成するという報告もある (Sathe et al. 2014)。また、D factor の例のような、種を超えた協力関係ととれる事象も存在するため、細胞性粘菌をはじめとする微生物に対して近縁選択や協力に関する理論が完全に当てはまるかどうかは、議論の余地が残る領域である (Nanjundiah and Sathe 2011、Zahavi et al. 2018)。

細胞性粘菌の細胞接着因子

細胞接着因子は細胞を基質、または隣の細胞としっかりと固定し、細胞内で発生させた力学的なエネルギーを効率よく変形や前進に利用するために欠かせないものである。これによって細胞は望む方向へ進行したり、多細胞体となった際、集団として協調しながら個々の細胞の位置関係を調整したりといったことが可能となる。結果、集合体の大きな変形をともなう形態形成を達成することができる。とくに細胞性粘菌は、植物や、一般的な動物の組織とは異なり、単細胞期から多細胞期の中程までを通して細胞が常に活発に運動をし続ける。たとえば、移動体の中の細胞であっても、個々の細胞の相対的な位置は固定されておらず、前の細胞を追い抜いたり、隣の細胞とすれ違うように逆方向へ移動したりといったことが頻繁に見られる。

つまり、細胞性粘菌の細胞接着因子は、一度基質や細胞と接着すれば終わり、というものではなく、絶えず接着と解離を繰り返す、動的なものであると想像される。実際に細胞性粘菌において基質との接着で観察される接着班のような構造は、短時間の内に解体され、別の箇所にもた構築される (Tsujioka et al. 2004)。

また、先の節でも述べたように、ある細胞集団について近縁者を認識する手段を考えると、細胞接着因子は分裂後の細胞を同じ箇所にとどめたり、出会った相手との近縁度を測ったりといった重要な要素として捉えられる。

ここでは、細胞性粘菌の多細胞期における接着因子を特に取り上げる。細胞性粘菌は飢餓を契機に開始される形態形成のなかで、発現時期、発現場所の異なるいくつかの細胞接着因子を使い分けていることが知られており (Coates and Harwood 2001、Siu et al. 2004、Siu et al. 2011、図 In-6A, B)、代表的でよく研究がなされている Dd-CAD1、CsA、および TgrC1 の3因子について以下に紹介したい。

Dd-CAD-1 (gp24, contact site B)

Dd-CAD-1 は、飢餓状態に入った直後から発現される糖タンパク質であり (Yang et al. 1997) (図 In-6A)、ほ乳類が持つカドヘリンの細胞外領域と一定の領域で高い相同性を示す (Wong et al. 1996)。活性は Ca^{2+} 依存性であり、ホモフィリックな結合によって細胞間接着を仲介するという点でもカドヘリンに似ている (Brar and Siu 1993)。一方で Dd-CAD-1 は一般的な細胞接着因子には見られない特徴も備えており、例えば細胞膜に移行するためのシグナル・ペプチドが存在せず、細胞膜にアンカーされる領域もない。ではどうやって細胞内で翻訳された後、細胞表面へ移動するのかといえ、収縮胞にまず移行し、収縮胞が細胞膜と融合する際に細胞表面へとたどり着くのである (Sriskanthadevan et al. 2009, Sesaki et al. 1997)。しかしながら、細胞膜との結合方法は未だ不明であり、一部は細胞膜にアンカーされず細胞外へ放出される。Dd-CAD-1 は発生初期において糸状仮足の先端に強く局在し、集合のストリームでは外縁に位置する細胞で強く発現することから (Sesaki and Siu 1996) (図 In-6B)、ストリームの外にいる細胞をストリームへと引き込むような役割をしているのではないかと予想される。Dd-CAD-1 をコードする遺伝子 *cadA* の欠損株は、形態形成に遅れが見られるが、子実体形成までを完了することが出来る。しかし、柄細胞と孢子細胞の分化比率が正常ではなく、柄が長くて孢子が少ない子実体を形成する (Wong et al. 2002)。Dd-CAD-1 はマウンド期以降も発現が維持され、予定柄細胞の細胞膜において局在が観察されること (Sriskanthadevan et al. 2011) も考え合わせると、Dd-CAD-1 は分化比率の調整にも関与しているのかもしれない。

CsA (gp80, contact site A)

CsA も Dd-CAD-1 と同様、ホモフィリックな細胞接着因子であり (Wong and Siu 1986, Noegel et al. 1986, Kamboj et al. 1988)、1978 年に同定された (Muller and Gerish 1978)。発現は Dd-CAD-1 よりもやや遅れて飢餓から数時間後に発現量が上昇する (図 In-6A)。Dd-CAD-1 が初期の細胞間接着を担

った後、引き継ぐような形で Dd-CAD-1 の接着領域は CsA と入れ替わる。CsA は細胞膜中のラフト上で脂質グリカンにアンカーされて集積しており、このラフト構造へ細胞内側から F-アクチンが相互作用することによって安定した細胞間接着を形成すると考えられている (Yoshida et al. 2006、Harris et al. 2001a、Harris et al. 2001b)。集合中のストリームでは Dd-CAD-1 が外縁の細胞で強く発現するのに対し、CsA はストリーム内部の細胞の側面膜に特に強く局在する (図 In-6B)。CsA をコードする遺伝子 *csaA* を欠損させても、表現型に大きな変化は見られず、正常な子実体が形成される。このひとつの理由は TgrC1 という別の因子が前倒しになって発現して機能を補うからである (Wang et al. 2000)、*csaA* 欠損株は実は完全に正常というわけではなく、平らな寒天上と違って自然に近い、でこぼこした土壌の上で発生させると、ほとんど子実体を形成しない (Harloff et al. 1989、Ponte et al. 1998)。このように、一見表現型に変化がないように思えても環境によって顕著な違いが生じることがある。他にも *csaA* 欠損株を野生株と混合して寒天上で発生させると、野生株が優先的に柄となり、*csaA* 欠損株は *cheater* のようにふるまうが、土壌の上だと逆に *csaA* 欠損株が優先的に柄となる (Queller et al. 2003)。Dd-CAD-1 の欠損株においても同様に、野生株と混合した場合、寒天表面と土壌の上とでは結果が逆になる (Sriskanthadevan et al. 2011)。また、*csaA* の欠損株で *tgrC1* が機能を補うのと同様、*cadA* の欠損株では *csaA* が早く多く発現する (Wong et al. 2002)。このように、これらの細胞接着因子は相互に補完するように発現が制御されている。

ここで、Dd-CAD-1 と CsA の存在が示された経緯と、これらの局在箇所の諸説についても少し触れたい。そもそも細胞性粘菌は細胞接着 (cell-to-cell contacts) システムの存在が示唆された最初の生物であり、1960 年代に多くの重要な研究が G. Gerisch らの研究室によってなされた (Muller-Taubenberger and Bozzaro 2006)。初期の研究では、細胞を栄養のないバッファー中で振盪した際に見られる細胞塊の形成が、EDTA によって最初の 4 時間だけ阻害される

ことが見出された。それよりも時間が経過すると、EDTA の有無に関わらず細胞塊が形成される (Gerisch 1960, Gerisch 1961a, b, c)。ここから細胞性粘菌には発生時期に応じて、少なくとも EDTA 感受性・非感受性の 2 つの異なる細胞接着システムが存在することが示唆されることとなった。

続く Beug らによる古典的な単価抗体 Fab を用いた研究では、contact site B (Dd-CAD-1) を阻害した場合、細胞は進行方向に対して横の接着が外れて縦方向だけで接着し、contact site A を阻害した場合は逆に、横方向の接着だけが残る (Beug et al. 1973)。したがって、contact site B はストリームにおいて横方向の接着を担い、contact site A は縦方向の接着を担うとされていたが、これまでに述べてきたように、細胞内の局在を直接調べた結果はこの限りではない。つまり、局在を直接的に見る実験と、接着を阻害する実験では、Dd-CAD-1 と CsA が重要な役割を担うと考えられる箇所が違ってくるのだが、それらは多面的な役割を持つ因子の機能を、ある一面から切り取って見た結果かもしれない。ちなみに、この Fab を用いて接着因子を同定する手法は細胞性粘菌で最初に用いられ、後に他の生物でも広く応用された画期的なものであった (Edelman 1987, Yoshida and Takeichi 1982, Yoshida-Noro et al. 1984)。

TgrC1 (LagC, gp150)

TgrC1 は遺伝子タギング法的一种である REMI 法によって同定され、それまで gp150 と呼ばれていた糖タンパク質をコードしていることが確認された (Wang et al. 2000, Dynes et al. 1994)。TgrC1 は、Dd-CAD-1 や CsA よりさらに遅い時期、マウンド期の頃から発現する (図 In-6A)。集合が完了した直後のマウンドは、loose mound と呼ばれ、やがて細胞が分泌するセルロースや糖タンパク質からなる粘液性の物質 (slime sheath) で包まれて tight mound となる。TgrC1 をコードする *tgrC1* の欠損株は loose mound の段階で発生が停止する (Dynes et al. 1994)。ここから、同定された当時は Loose AGgregate の文字をとって Lag C と呼ばれていた。TgrC1 は Dd-CAD-1 や CsA とは異なり、TgrB1 という別の因子とヘテロフィリックに結合する接着因子である (Chen et

al. 2013)。TgrC1 分子の一部は細胞膜の近傍で切断されて slime sheath の一部となるが、具体的な機能は不明である (Wang et al. 2000)。マウンド期の初期には周縁部付近の細胞で発現が強いが、やがてマウンド頂部へと選別される (図 In-6B)。この領域は予定柄細胞の領域と一致しており、実際に *tgrC1* の mRNA レベルは予定胞子細胞に比べて予定柄細胞の方が 3 倍ほど高く、TgrC1 に対する単価抗体によって接着を阻害する効果も予定柄細胞では耐性が高いことから、TgrC1 の発現レベルは総じて予定柄細胞で高いと考えられる (Dynes et al. 1994, Lam and Siu 1981)。TgrC1 は細胞間において単なる接着力を発揮するだけでなく、シグナル伝達にも関わっており、例えば loose mound で発生がとまる *tgrC1* の欠損株において GBF (G-box-binding factor) という転写因子を過剰発現させると、表現型が回復して正常に発生できるようになる (Schnitzler et al. 1994, Sukumaran et al. 1998)。TgrC1 や TgrB1 のホモログは細胞性粘菌以外の生物では知られていないが、ドメインのレベルで言えば、抗体の認識部位と共通の TIG (Transcription factor immunoglobulin) ドメインをそれぞれ複数有しており、TgrC1 と TgrB1 はこの TIG ドメインを介して相互作用している (Chen et al. 2013)。Tgr (Tiger) という名は Transmembrane, IPT, IG, E-set, Repeat protein の略である。TgrC1 に関する研究は接着因子としての側面が調べ上げられた後はやや下火となっていたが、2011 年に Hirose らによって *D. discoideum* における種内のクローン識別に関わることが報告されてからは、再び注目されることとなった (Hirose et al. 2011)。TgrB1/C1 の識別に関する知見は次の節で詳細を述べる。

D. discoideum における株識別機構の研究

D. discoideum の遺伝的に異なる株同士を混合させたとき、各株の細胞が凝集することを見出した Ostrowski ら (2008) の報告から、別株の細胞の間には識別可能な差異が存在することが示唆された。その流れをくんで、2009 年には

株間で多型になっている遺伝子として *tgrB1/C1* が同定された (Benabentos et al. 2009)。株間での *tgrB1/C1* の配列の距離は、その株間での選別の度合いと正の相関がある。**TgrC1** は接着因子 **LagC** として研究されてきた因子と同じものであり、この論文までは **LagB/C** という名前が使用されている。続く Hirose らの 2011 年の研究によって、*D. discoideum* AX4 株に別株の *tgrB1/C1* ペアを発現させれば、その株と混合可能になることが実験的に示され、**TgrB1/C1** ペアこそが *D. discoideum* の「緑ひげ因子」であることが決定的となった (Hirose et al. 2011)。このとき、別の株のものと二重に発現させた **TgrB1/C1** ペアは、自身の親株との混合の妨げにはならず、両方の株と混合可能になった。つまり、**TgrB1/C1** は、積極的に自己を選別する仕組みの一部であって、別の株から拒絶される際の目印としては機能していない。また、Hirose らはこの後つづいて、2015 年に、周囲の細胞と適合する **TgrB1/C1** を持つことが細胞の極性化、協調した運動、分化に必要であること (Hirose et al. 2015)、および 2017 年にはこのペア因子のうち **TgrB1** 側がレセプター、**TgrC1** 側がリガンドとして機能することを示している (Hirose et al. 2017)。本研究は、これら *D. discoideum* の株識別に関するヒューストンの研究室とは独立した研究として 2010 年に開始された。途中、研究内容が競合する可能性があったが、Hirose らの所属する研究室は対象を細胞性粘菌の他種へ広げるのではなく、あくまでも *D. discoideum* におけるこれら因子の機能解析をターゲットとしていたため、学会等での情報交換を重ねながら互いの研究を進めてきた。

一方で、最初に接着因子として **LagC** を同定したカナダの研究室からは、2013 年に、**TgrC1** と **TgrB1** が TIG ドメインを介してヘテロフィリックに接着することが示された (Chen et al. 2013)。それまでは、*tgrB1/C1* が発現パターンを共有していることから互いに接着相手であることが示唆されているのみであった。続く 2014 年には同研究室から、**TgrC1** は一つの細胞上で自立的に二量体となるが、**TgrB1** は接着相手の **TgrC1** 二量体に依存的に二量体化することが報告された (Chen et al. 2014)。

このように、ここ十年ほどのあいだに **TgrB1/C1** ペアが、「緑ひげ因子」の条

件、すなわち (1) その遺伝子をもつことが外から見て分かる (細胞膜上に提示されている) (2) 両者の個体が互いに認識できる (株間の多型があるリガンド・レセプター系である)、そして (3) それをもつ個体に対してだけ利他行動をおこなう (適合する *TgrB1/C1* をもつ細胞とだけ多細胞体を作る)、をすべて満たすことが示され、ひとつの研究分野としての活性化を見せている。

本学位論文の目的と構成

これまでに記述したように、細胞間認識に関わる分野も、細胞性粘菌の他の研究課題と同様、ほとんどが *D. discoideum* の 1 種のみ集中して取り組まれてきた経緯がある。

本学位論文では、細胞性粘菌の種間の相互作用に着目し、第 1 章では、*D. discoideum* と *D. purpureum* を代表種に用いて種識別機構に関与する因子を特定すること、ならびに *D. discoideum* で知られている株識別機構と種識別機構との関連を明らかにすることを目指した。また第 2 章では、細胞性粘菌において種 (株) 識別機構が獲得された過程および進化的背景を明らかにするため、系統的に異なる種のゲノム配列から *tgr* 遺伝子と予想される配列を抽出し、解析をおこなった。

これまで「種」という言葉を多用してきたが、そもそも細胞性粘菌をはじめとする微生物における種の定義は多細胞生物に比べて曖昧であり、主に形態的特徴と、分子系統解析の結果によって判断されている。本来なら有性生殖の有無を評価に加えるべきだが、未だすべての種について確認されたわけではない。有性生殖を抜きにして考えるならば、*D. discoideum* における「互いに混ざらない株」は、もはや「別種」と見ることも出来る。また、進化的には、「互いに混ざらない株がそれぞれ世代交代を繰り返し、株間に遺伝子変異が蓄積する」という過程によって「別種」が生じた可能性もあるため、株は種の前段階とも考えられる。

どちらにしても、細胞性粘菌は土壌環境中で細胞間相互作用を行い、集団内での多様性を生み出すと同時に、その多様性を維持するための機構もまた進化させてきたと言える。本研究は、株間以上に遺伝的隔たりを持った細胞性粘菌の種間において、何が共通であり、何が種を分けているのかをそれぞれ明らかにし、将来的には種分化、並びに種の維持という、生物進化に普遍的な事象の理解に貢献することを目指した。

第 1 章

細胞性粘菌 *D. discoideum* と *D. purpureum* における 種識別因子の同定

導入

序章と重複する箇所も含め、第 1 章の導入として改めて研究の背景をまとめる。

同じ性質の細胞を見分け、選別することは、捕食、生殖、免疫など生命現象の根幹に関わる重要なシステムである。単細胞生物であれば、有性生殖時や捕食の際、相手が自分の仲間であるか否かを見分ける必要が生じるし (Sakaguchi et al. 2001、Seike et al. 2015)、多細胞生物であってもまた、有性生殖時や、他の生物の侵略から個体を守る免疫機能において、自己/非自己認識システムが欠かせない。種によっては個体を形成する細胞を、生殖系列と非生殖系列 (体細胞系列) とに分け、自身の遺伝子が確実に次世代へ引き継がれるように工夫をこらしている (Litman et al. 2005、Buchmann 2014)。細胞性粘菌は単細胞期と多細胞期を繰り返す、ユニークな生活環を持っており、多細胞期は単細胞アメーバが走化性によって集合することで開始される。細胞性粘菌は無性生殖および有性生殖のどちらもおこない、無性的な発生過程の最終的な構造物は子実体と呼ばれ、次世代へ生き残る孢子細胞と、その場で死ぬ柄細胞から構成される。このような、集合によって多細胞化する生物は、遺伝的に異なる細胞がひとつの多細胞体へ混ざり込む可能性がより高いと考えられる。しかし、もし孢子となれる細胞に種 (クローン) の偏りが存在すれば、それぞれの種 (クローン) の適応度にダイレクトに影響するため、1 つの子実体へ異種 (クローン) が混合することは、種の安定性を潜在的に危うくする (Atzmony et al. 1997、Strassmann et al. 2000、Nanjundiah and Sathe 2011、Strassmann and Queller 2011)。野外では多種の細胞性粘菌が共存しており (Eisenberg 1976、

Sathe et al. 2010)、異種混合の子実体形成を避けるため、自己/非自己認識システムの重要性はとりわけ高いと予想される。

異種の混合を避けるひとつの方法は、種間で異なる走化性物質を用いることであり、実際に系統的に比較的遠い種間においては、cAMP や glerin など集合時に別の走化性物質が使われる (Konijn et al. 1968、Shimomura et al. 1982、van Haastert et al. 1982、de Wit and Konijn 1983、Asghar et al. 2012)。しかし、系統的に近い種においては同じ走化性物質が用いられる。例えば *D. discoideum* と *D. purpureum* はどちらも走化性物質として cAMP を使うため、混合したまま集合する。しかし、多細胞体形成の過程で細胞選別がおこり、最終的には別々の子実体を作ることができる (Raper and Thom 1941、Bonner and Adams 1958、Jack et al. 2008、Sathe et al. 2014)。

種間のみならず、細胞性粘菌の自己/非自己認識は同種内でも起こることが知られている (Mehdiabadi et al. 2006、Ostrowski et al. 2008)。分子生物学的な手法が確立されたモデル生物である *D. discoideum* は、自己/非自己認識のメカニズム研究に用いられており、株間で多型となっている一対の因子 Tiger B1 (TgrB1) と Tiger C1 (TgrC1) が *D. discoideum* 株間の選別に関わることが明らかになった (Benabentos et al. 2009、Hirose et al. 2011)。しかしながら、これらの知見は *D. discoideum* の一種内のみに留まっているため、種間の識別については未解明のままであり、種内識別と種間識別のシステムがどのように関連するのかも明らかになっていない (Nydham and De Tomaso 2011)。本章の目的は、*D. discoideum* と *D. purpureum* の2種の細胞性粘菌を代表に用いて種識別に関わる因子を同定すること、および種内識別と種間識別の関連についての示唆を得ることである。

結果と考察

集合中のストリームにおける細胞選別

それぞれ標識をした *D. discoideum* と *D. purpureum* の細胞を 1 : 1 の割合で混合して発生させると、2 種の細胞は混合したまま集合し、細胞塊を形成するが、先行研究と同様、しだいにどちらか一方の種で構成された 2 ~ 3 のチップが現れる (Raper and Thom 1941、Jack et al. 2008)。図 1-1a のように、*D. discoideum* と *D. purpureum* の独立した子実体が共通の根元からのびるのは、典型的な結果である。著者は、発生時の温度を下げ、ゆっくりと発生が進む状態にすると、2 種のストリーム形成のタイミングがそろい、各種の細胞はストリーム中、同種で構成された縦列を作る傾向を持つことを見出した (図 1-1b)。このことは、細胞間の接着に種差が存在することを示唆する。

D. discoideum において、種認識に関わる因子を考察する

集合期の細胞は進行方向に対して縦方向に伸びた形をしており、前方と後方には区別がある (Shaffer 1962)。一価 Fab 抗体を用いた *D. discoideum* の細胞接着に関する初期の研究では、細胞性粘菌はストリームの中で進行方向に対して縦方向と横方向で異なる細胞接着因子を使い分けていることが明らかとなり、そのうち、contact site A (gp80) は縦方向の接着因子として同定された (Beug et al. 1973)。この因子は免疫グロブリン様の折り畳み構造を持ち (TIG domain)、ホモフィリックな細胞間接着を担う (Siu et al. 1987)。しかし、*D. discoideum* では contact site A (csaA) を欠損した変異体は、表現型に変化がない。その一因は、csaA を欠損した細胞では、別の TIG ドメインを含む因子である TgrC1 が本来の発現時期よりも前倒しに発現し、csaA の機能を補うためである (Gao et al. 1992、Wang et al. 2000)。TgrC1 は、もうひとつの TIG ドメインを含む因子、TgrB1 とヘテロフィリックな細胞接着をおこなう (Chen et al. 2013)。この 2 つの因子は互いに似ているものの、イントロンの配置など、異なった配列上の特徴を持つ (図 1-2a~c)。これら、*D. discoideum* の *tgrB1*, *tgrC1* の特

徴を備えた因子を、以降 *tgrB*-type、*tgrC*-type と呼ぶ。*D. discoideum* のゲノム上では *tgrB1* と *tgrC1* 遺伝子は隣り合い、中心から外向きにコードされた遺伝子ペアを構成し、多細胞期の開始にともない、同時に発現される (Benabentos et al. 2009)。*TgrB1/C1* ペアはまた、株間で高度に多型になっており、*D. discoideum* の株間の認識において中心的な役割を果たしている (Benabentos et al. 2009、Hirose et al. 2011、Gruenheit et al. 2017)。*D. discoideum* のゲノム上には、他にも二つの構造的に *tgrB1/C1* ペアに似た遺伝子ペアが存在するが、株間で配列はほとんど変わらず (Benabentos et al. 2009、Gruenheit et al. 2017)、*tgrB1/C1* の欠損株でこれらの機能を補完することはできない。*D. discoideum* と *D. purpureum* の細胞選別に関与する因子を同定するため、著者は上記の *D. discoideum* における候補遺伝子 (*csaA*, *tgrB1/C1*) に相当する配列を *D. purpureum* からクローニングし、遺伝子改変技術が確立されている *D. discoideum* に導入することで、細胞選別への影響を調べた。

D. purpureum のゲノム配列から候補因子を検索する

D. purpureum の野外株である、P1Ba 株のゲノム配列を次世代シーケンサーによって取得し、その中から *D. discoideum* の contact site A および *tgr* family 遺伝子に相当する配列を探した。その結果、分子系統樹上で *D. discoideum* の contact site A (*csaA*) とクラスターを形成する遺伝子をひとつ見つけた。その遺伝子の推定アミノ酸配列は contact site A と類似しており (図 1-3)、免疫グロブリン様折り畳み構造を含む球状ドメイン、および予測 GPI-修飾サイトが存在し、ホモフィリックな細胞間接着に必要とされる 8 アミノ酸 (Siu et al. 1987、Kamboj et al. 1989) もまた持っている (*D. discoideum* のものに近いが、数アミノ酸異なる)。この遺伝子が *D. purpureum* において contact site A 相当の因子をコードしていると考え、以降 *Dp-csaA* と呼ぶ。続いて、P1Ba のゲノム上で、3 つの *tgr* family 遺伝子のペアを見出した。これらは *tgrB*-type 遺伝子と *tgrC*-type 遺伝子で構成されており、*D. discoideum* の *tgr* ペアと同様に、内側からそれぞれが外向きに隣り合ってコードされる、

TIG ドメインを含んだ因子である（図 1-2a, b）。全体的な類似性は、*D. purpureum* と *D. discoideum* のそれぞれ種内でのペア間の方が、種間でどのペアを比べるよりも高く、系統樹においてもそれら 3 つずつのペアは、種間でパラログ（種分化の後、それぞれの配列が派生した）であることを示す（図 1-2c）。それぞれの遺伝子を、tgrB-type であるか tgrC-type であるかに従って、これ以降、*Dp-tgr2752B*、*Dp-2752C*、*Dp-tgr11238B*、*Dp-tgr11238C*、*Dp-tgr11392B* および *Dp-tgr11392C* と呼ぶ（番号はコンティグ番号を表す）。これらの推定アミノ酸配列は、互いに、または *D. discoideum* の Tgr 因子と中程度の類似性を示す（相同性 30-55%）。

D. purpureum における種識別因子の同定

以上の 7 つの遺伝子をクローニングし、ひとつずつ GFP-fusion タンパク質として発現ベクターに組み込み、act15 恒常プロモーター下で *D. discoideum* に発現させた。それぞれの形質転換体は細胞内の膜構造に加えて、細胞膜での GFP 蛍光が明確に確認できる（図 1-4）。これら形質転換体は、以降 Dd（Dp-遺伝子名）と表記する。導入した遺伝子の選別過程への影響を見るため、各形質転換体と *D. purpureum* 細胞をそれぞれ同じ割合で混合し、発生させた。図 1-5 は、移動体中での各形質転換体と *D. purpureum* の分布を示す。Dd（*Dp-tgr2752C*）と *D. purpureum* の組み合わせにおいてのみ、キメラとなった移動体が得られた（図 1-6）。キメラ体での 2 種の細胞の分布には 2 パターンあり、一方はより細かく混合したパターン、もう一方は、それぞれの種がひとつの移動体の中でクラスターとなったパターンである（図 1-7）。集合中は 2 種の細胞は比較的良好に混合しているが（図 1-8）、移動体形成が進むにつれ同種がクラスター化する傾向があり、後者の分布パターンが優先的になる。このことは、異種の細胞間には導入した一つの因子だけでつながっているのに対し、同種の細胞間には本来の接着因子セットがあるため、根本的に接着力が強いためであると考えられる。もしくは同種の領域から異種を排除しようとする未知のシステムがあるのかもしれないが、現時点でははっきり分らない。*Dp-csaA* を含め、

他の組み合わせでは、ほとんどすべての移動体はどちらか1種の細胞のみから構成されていた（図 1-5、6）。発生の後期では、キメラの移動体は孢子塊に両種の正常な孢子を含む子実体を形成した（図 1-9）。また、串団子のように、ひとつの柄に孢子塊を2つ持つ子実体もしばしば見られ、その場合、先端の孢子塊と柄はほぼ *D. purpureum* 細胞で構成されており、下方の孢子塊は *D. discoideum* 細胞で構成されていた（図 1-10）。*D. purpureum* の遺伝子を導入した *D. discoideum* と、親株の *D. discoideum* 細胞を混合するとすべて混合した移動体を形成し（図 1-11）、導入した *D. purpureum* 由来の因子が、*D. discoideum* からの排除のシグナルとして機能してはいないことを確かめた。

発生過程における *Dp-tgr2752B* と *Dp-tgr2752C* の発現パターンはほぼ一致しており、マウンド期にピークを持つ。一方で他の *tgr* 遺伝子の mRNA レベルは非常に低い（図 1-12）。*Dp-csaA* の発現パターンは *Dp-tgr2752B* および *Dp-tgr2752C* と似ているが、mRNA レベルは低い。これらの結果から、*Dp-tgr2752B* と *Dp-tgr2752C* の産物は、種間の細胞選別が起きるタイミングであるマウンド期に、協調的に機能すると考えられる。しかし、移動体から子実体へと至る多細胞期を通して *D. purpureum* 細胞と混合したのは Dd (*Dp-tgr2752C*) のみであり、Dd (*Dp-tgr2752B*) は混合しなかったことから、これら2つの遺伝子は異なる機能を持つことが示唆される。*D. discoideum* においては、2つの Tgr 因子は細胞認識において、TgrC1 はリガンド、TgrB1 はレセプターとしての機能をもつことが明らかになっている（Hirose et al. 2017）。2種の Tgr ペアの類似性を考えれば、この知見は *D. purpureum* にも適応できる可能性が高い。Dd (*Dp-tgr2752B*) 細胞が *D. purpureum* 細胞と混合できなかったのは、TgrB1 と、*Dp-tgr2752B* の細胞内領域が異なるため（図 1-13）、*Dp-tgr2752B* 分子が *D. discoideum* 細胞の中でうまく機能しなかったためとも考えられる。しかしながら、*D. discoideum* においても、*tgrC1* を持ち *tgrB1* を持たない *tgrB1*-null 細胞は親株の *D. discoideum* 細胞と混合できる一方、*tgrC1*-null 細胞は混合できず（Benabentos et al. 2009）、後に明

らかになったように (Wang and Shaulsky 2015)、TgrC1 が接着の際のリガンドとしての機能の他に、多面的な機能を持つことを示唆していた。*D. purpureum* においても、発生の後期では *Dp-tgr2752C* は単なるリガンドというだけでなく、より重要な機能を持つのかかもしれない。

D. purpureum の DNA 配列多型

Dp-tgr2752C が *D. purpureum* 種内の自己/非自己認識にも関与するかを確かめるため、本研究で使用した P1Ba 株と SSU rDNA が完全に一致する複数の *D. purpureum* 野外株 (図 1-14A, B) について遺伝子配列を調べた。様々な地域で採取したが (採取場所間の距離は 6.2~561 km, 表 1-1)、これら *D. purpureum* 株は同じ有性生殖グループに属することを、2 株ずつの組み合わせにおいてマクロシスト形成 (細胞性粘菌の有性生殖環で最終的に作られる構造物) を見ることによって確かめた (表 1-2)。*Dp-tgr2752B* と *Dp-tgr2752C* 遺伝子はどちらも高度に多型となっており、*Dp-tgr11238B/C*、*Dp-tgr11392B/C* よりも明らかに多型の度合いが高かった (図 1-15A, B)。2 株ずつのアメーバを混ぜ合わせ、無性生殖的な発生をしやすい、つまり子実体形成をしやすい環境に置くと、異なる株の細胞は一緒に集合するが互いに選別して別々の子実体を形成した (図 1-16)。特に、Dd (*Dp-tgr2752C*) は配列をクローニングした P1Ba 株としか混合せず (図 1-16)、*D. purpureum* でも、*Dp-tgr2752C* が種間の認識だけでなく、種内のクローンレベルの認識と選別において重要な役割を果たしていることが示された。この結果は、有性生殖における適合性と、無性生殖の適合性 (子実体形成過程で混合するかどうか) は無関係であることもまた示している。このように有性生殖と無性生殖の適合性が独立であることは、*D. purpureum* と *D. giganteum* の野外株でも報告されている (Sathe et al. 2014)。*D. discoideum* においては、これら有性生殖の識別 (*mat* 遺伝子) と無性生殖の識別 (*tgrB1/tgrC1*) を担う遺伝子は別の染色体上に位置する (Bloomfield et al. 2010)。

D. discoideum と *D. purpureum* における株識別機構と種識別機構の関連

以上の結果は総じて、*Dp-tgr2752C* が *D. discoideum* における自己/非自己認識システム (Hirose et al. 2011) と共通の分子基盤を持つ、種識別システムの構成因子であることを示唆する。*D. discoideum* と *D. purpureum* は進化的に分岐してから数億年経過していることを考えれば (Fiz-Palacios et al. 2013、Schilde et al. 2016)、一方から他方へのたった一遺伝子の導入が、これらの組織を適合させ、協調した形態形成やキメラ体の中での正常な細胞分化を可能にしたのは特筆すべきことである。このことは、これら 2 種において発生中の細胞相互作用に関与する分子は高度に保存されているとする、トランスクリプトームの比較研究 (Parikh et al. 2010、Glockner et al. 2016) を実験的に裏付け、種識別のメカニズムもまた、2 種の間で保存されていることを示唆する。Hirose らによって報告された、*D. discoideum* における株識別システム (Hirose et al. 2011) は、種間の識別システムが、種内の株識別に使用するに十分な精度であることを示す結果と見ることもできる。

一方で、遺伝的に異なる細胞がキメラ体を形成することもまた報告されている (Filosa 1962、Buss 1982、Strassmann et al. 2000、Fortunato et al. 2003、Kaushik and Nanjundiah 2003、Sathe et al. 2014)。考える妥当な説明としては、これらの研究で使用された細胞は、適合的な *tgr* 遺伝子を有性生殖による遺伝子組換えの結果得たのではないかと、ということである。これらの細胞はほとんどの場合、同じ場所か、非常に近い場所から採取されており、*D. discoideum* の野外集団で見られたように (Flowers et al. 2010)、有性生殖をおこなう機会が高かったと考えられる。しかし、種間のキメラもまた報告されていることから (Sathe et al. 2014)、本研究で扱った範囲を超える未知の要素も存在するのかもしれない。

Dp-tgr2752B の機能解析について

本研究においては、*Dp-tgr2752C* をはじめ、作成した形質転換体が導入した遺伝子を正常に発現していることは、細胞膜への蛍光局在によって確認してい

るが、それらが互いに（例えば Dp-tgr2752B と Dp-tgr2752C が）接着能を有するかどうかを直接確かめることはできていない。もし、これらの TIG ドメインを持つ分子が、*D. discoideum* の TgrB1/C1 と同様にヘテロフィリックに接着するのであれば、免疫沈降法等の手法で直接的に確認することが可能であり、またこれら分子の機能機序を知る上で重要である。

接着能とは別角度からのアプローチではあるが、今回作成した Dd (*Dp-tgr2752C*)、Dd (*Dp-tgr2752B*) については、*D. purpureum* のストリーム中での進行が可能であることがいくつかの実験において確認されている（図 1-17）。とくに、移動体の時点ではキメラ体を生じなかった Dd (*Dp-tgr2752B*) が、*D. purpureum* 細胞に周囲を囲まれた状況で前進可能であることは、*D. discoideum* において TgrB1 がレセプターとしての機能を持ちながら、移動体となる段階では単独の分子では混合に不十分である (Hirose et al. 2017, Benabentos et al. 2009) ことと一致しており、Dp-tgr2752B は単に膜上に局在しているだけでなく、機能をもった因子として発現できていることが示唆される。

これら、ストリーム中の動態に関する結果は非常に重要ではあるが、現時点ではあくまで示唆にとどめたいと考える。その理由として、2種の混合比率を大きく違えた場合、それぞれの発生の進行が揃いにくくなること、また観察対象のストリームが一層の細胞からなるか、多層であるかで結果が異なること、などによって、この実験系が未だ不完全であることが挙げられる。とりわけ、次の節で詳細を述べる *csaA* については2種の細胞の間に発現時期や担う役割の程度が大きく異なっていると予想されるため、ストリーム中の挙動について、2種の間で完全に条件を揃えて実験することが難しい。やはり、個々の因子についての詳細な機能解析は、これまでの知見や実験技術の蓄積が豊富な *D. discoideum* 細胞のみを用いておこなうことが近道であるように思われる。

また、発現パターン等から、*Dp-tgr2752B/C* はプロモーターを共有し、ペアで機能していると考えられるが、*D. purpureum* 由来のプロモーターが *D. discoideum* で機能する確信がなかったため、まずは1配列ずつ導入する手法を

選択した。

柄細胞の蛍光検出について

高頻度にキメラ体を生じた *D. purpureum* と Dd (*Dp-tgr2752C*) の混ぜ合わせ実験について、混合した孢子細胞はそれぞれ別の色素による細胞ラベルによって確認できたが、柄細胞の混合については明確な蛍光を検出できなかった（図 1-18）。例えば図 1-18 では、柄細胞の中に *D. purpureum* 細胞の染色に使用した Rhodamine の蛍光が見られない細胞（△で示す）があるが、それらの細胞は GFP 蛍光も見られず、*D. discoideum* 細胞であるとも断言できない。その原因として、柄細胞は形態形成の過程でオートファジーによって自身の細胞質のほとんどを、主に移動体を前進させるエネルギー源として消化するため（Uchikawa et al. 2011）、細胞内で小胞などの膜系に局在していた *Dp-tgr2752C* の GFP 融合タンパク質が、ほとんど残っていないことが予想される。

利他行動と同種認識の関連性を述べるにあたって、混合した 2 種の細胞がどのような比率で孢子細胞と柄細胞へと分化しているかを定量的に明らかにすることは非常に重要である。Rhodamine で染色した *D. purpureum* では比較的蛍光が検出される（図 1-18）ことから、Dd (*Dp-tgr2752C*) 細胞が持つ自前の蛍光に頼らず、Fluorescein 等の色素で改めて染色することで、各種の分化比率の定量において実験系が改善されることが期待できる。

柄細胞への分化比率を直接定量可能にすることはもちろん重要な課題であるが、本研究でおこなった *D. purpureum* と Dd (*Dp-tgr2752C*) の混合実験では、移動体の時点で *D. purpureum* が前方（予定柄細胞領域）に位置する頻度が高く（図 1-19）、1 つの柄の上に二つの細胞塊をもつ子実体においては、柄のほとんどが *D. purpureum* で構成されていたこと（図 1-10）からも、今回の実験条件下においては Dd (*Dp-tgr2752C*) が cheater 的にふるまい、*D. purpureum* がいわば柄に追いやられて搾取される側となっていると推測される。

このことは、キメラとなった移動体中で *D. purpureum* 細胞の方がなんらかの理由で進行速度が速いためかもしれないし、分化誘導因子の生産量やその感受性が2種の間で異なるためかもしれないが、現時点では明確な原因はわからない。そもそも、**cheater** を生じる原因遺伝子は数多く存在し、それらの間に機能的な脈絡はないため (Santorelli et al. 2008)、異なる株、種が混合した際の分化比率はさまざまな要因によって総合的に決定されているのであろう。たとえば、同じ *D. discoideum* を2群にわけ、一方を glucose を含む培地、他方を含まない培地で培養した後に混合した、というだけの実験においても、glucose を含む培地で育った方が胞子になりやすいという差異が生じる (Leach et al. 1973)。

補足的考察、および課題と展望

選別がおこるメカニズムについて

この節では *D. discoideum* において TgrB1 は TgrC1 に対するレセプターであるとされながら、なぜ移動体に混合する際は TgrC1 が主体となる (TgrB1 だけでは混合できない) のか、という点について、もう一步進んで考察をおこないたい。

Hirose ら (2017) の報告によると、周囲の細胞と適合する TgrB1 を持っている細胞は協調した前進運動をおこなうことができ、発生に関連した遺伝子発現もおこるが、時間経過とともに選別され、Benabentos らの報告 (2009) と同様、やはり最終的には移動体へ混合することができない。これらの知見から、ストリームをはじめ比較的初期の多細胞体と、移動体以降の多細胞体では、細胞が組織中へ混合するための条件が一変するのだと推測される。

発生段階が違うのであるから、様々な状況が異なるのは当然であるが、細胞内の細胞骨格系 (主にアクチン・ミオシンの複合体) が産生するエネルギーを効率よく利用し、前進せねばならないという細胞運動の観点からすれば、おそ

らく細胞にとって、ストリームと移動体の最も大きな違いは「足場が基質であるか、隣接する細胞であるか」という点だと考えられる。

移動体が前進する力を測定した実験では、移動体が出す力は移動体の表面積ではなく体積に比例しており、ここから細胞性粘菌の移動体では基質に接している細胞のみでなく、内部の細胞も前進するための力へ寄与していることが示唆される (Inouye and Takeuchi 1980)。

基質に触れていない内部の細胞が力を発揮するメカニズムは、現在でも明らかになっていないが、たとえば、各細胞において、細胞膜直下に存在するカゴ状のアクトミオシンの裏打ち構造が、隣り合う細胞と細胞接着因子を介して連結し、移動体全体で一つのネットワークを形成していると考えたと説明可能である (Umeda and Inouye 1999, Inouye 2003)。この細胞骨格系ネットワークは、移動体の最下層 (表層) の細胞を介して、基質に接している。

つまり、全体の細胞骨格系ネットワークに連結できる細胞は、実質的に基質を足場にする場合と同様、前進が可能であるのに対し、ネットワークに連結できない細胞は前進できず、次第に取り残されることになる。

具体的な確証に乏しい状況であるが、著者は現在、上記の移動体内部の細胞骨格ネットワークのモデルを考慮に加え、「周囲の細胞と適合する **TgrC1** を持っていれば全体の細胞骨格ネットワークに連結できるが、**TgrB1** だけでは連結できないのではないか」と考察している。

今の所は、**TgrB1/C1** のどちらか (もしくは両方) が、細胞内で細胞骨格と相互作用しているという知見は得られていないが、たとえば **Chen** の博士論文では、**TgrC1** は細胞内で myosin heavy chain kinase C (MHCK-C) と相互作用していることが示されており (Chen 2014)、MHCK-C はミオシンの脱重合に関与する因子であるため、何らかの形で、**TgrC1** は細胞骨格系とリンクしている可能性がある。

いずれにせよ、*D. discoideum* における **TgrB1**、**TgrC1** の協調した、しかし異なる機能についての詳細は、さらなる研究成果が待たれる領域である。

csaA (CsA) について

csaA (CsA) は、序論にもまとめたが *D. discoideum* の集合中のストリーム内において、進行方向に対して縦方向の接着 (end-to-end 接着) を担う分子として報告された (Beug et al. 1973)。 *D. discoideum* の *csaA* は飢餓を契機として、*tgrB1/C1* よりも早く集合期に発現し、ピーク時の発現量も *tgrB1/C1* に比べ高いが、*D. purpureum* QsAX1 における *csaA* (DPU_G0066076) の発現量は、*tgrB*-type (DPU_G0058048) , *tgrC*-type (DPU_G0058046) 遺伝子に比べ低い (図 1-20、dictyExpress)。これは本研究で使用した *D. purpureum* P1Ba 株についても同様の傾向である (図 1-12)。発現量に関する情報のみから断定することはできないが、たとえば *D. discoideum* のストリームでは CsA が接着に関してより大きな役割を担った後、マウンド期から *TgrB1/C1* にバトンタッチするのに対し、*D. purpureum* のストリームでは CsA (*Dp-csaA*) の重要性が全発生時期を通じて相対的に低い可能性がある。

また、Queller らによって CsA は *D. discoideum* 株識別に関わる「緑ひげ因子」であるとされたが (Queller et al. 2003)、CsA には、「緑ひげ因子」として機能する上で必要な株間多型がなく (Benabentos et al. 2009)、現在では *D. discoideum* の株識別の「緑ひげ因子」は *TgrB1/C1* であるという結論に落ち着いている。

Queller ら (2003) は、*csaA* をノックアウトした細胞は野生型と混合した際、多細胞体内で選別され、孢子細胞になりやすいことが示されていたが、*csaA* をノックアウトすると *tgrC1* が本来よりも早い発生段階で発現し、*csaA* の機能を補うため (Wang et al. 2000)、この実験では、結局は *tgrB1/C1* の効果を見ていたのかもしれない。加えて、近年 Gruenheit ら (2017) により、*D. discoideum* の株間で多型になっている分子が網羅的に調べられたが、多型となっているのは *tgrB1/C1* のみであり、*csaA* は多型でないことが再確認された。以上のことから、本研究で種識別因子の候補の一つに挙げた *csaA* は、混合実験の結果も合わせ、識別に直接は関わっていないと結論される。

有性生殖時の認識システムと独立であることについて

本研究で扱った、*tgr* 遺伝子ペアを分子基盤とした認識システムは、有性生殖時の認識システムとは、完全に独立した機構であり、すでにある *D. purpureum* や *D. giganteum* についての報告 (Sathe et al. 2014) と同様、本研究で使った *D. purpureum* 株においても子実体形成時の混合に対して適合・不適合となる株の組み合わせと、有性生殖において適合・不適合となる組み合わせには相関がない。例えば、*D. purpureum* P1Ba 株は *D. purpureum* P4Aa 株と有性生殖をするが、子実体形成では分離する。これは一見不自然なようにも見えるが、ヒトなど身近な動物においても、例えば自分が日本人女性であるなら「いとこの男性」は、近縁であるが異性。「スウェーデン人（特に何人でも構わないが、異なるルーツを持つ人種）の女性」は遠縁で同性。遺伝的な距離と、性別はまったく別に決定される要素であり、細胞性粘菌だけが特別というわけではない。（臓器移植ができるかどうかは MHC (major histocompatibility complex) の型、性別は XY 染色体の組み合わせで決まり、これらは独立して遺伝する。）

D. discoideum では性別（有性生殖型）を決定する遺伝子（*mat* 遺伝子）(Bloomfield et al. 2010) は 5 番染色体、*tgrB1/C1* は 3 番染色体にコードされているので、遺伝学的にも独立であることが分かる。*D. purpureum* において有性生殖型を決める遺伝子は今のところ明らかになっていないが、*D. discoideum* との種間で保存されている可能性が大いにあり、研究の進展次第では異種間での有性生殖が実現されるかもしれない。

混ざらない別株は、別種となりうるのか

D. discoideum での知見 (Ostrowski et al. 2008, Flowers et al. 2010) や、本研究における *D. purpureum* の株識別のように、同種（互いに有性生殖をおこなう株集団）の中にも、子実体形成時に混合せず、別々の子実体を形成する組み合わせが多くあった。著者はこの事象を知った当初、このような「混ざらない株」が、世代を重ねるうちに徐々に別種へと進化するのだと考えていた。その理由と、一転して懐疑的になった現在の見解を順に述べる。

例えば *D. discoideum* のある株に *TgrB1/C1* の変異がおこり、今まで混合できていた株と混合しなくなったとする。この株はその時点から、自身のクロー

ンとのみ子実体を作り（もともとそういう目的で TgrB1/C1 の変異が入ると考察しているわけだが）、他の株とは多細胞体形成過程での相互作用をしなくなる。自身のクローンのみによる子実体形成を、何十、何百世代と重ねれば、発生に関する他の因子へも次第に変異が入り、いずれ他の株と発生の様式（たとえば子実体の枝分かれの有無や、胞子塊の色、シグナル分子の互換性など）が大きく異なってくると考えられる。最終的には元の株とは「別種」と言えるほどの差異が蓄積するだろう。

しかし、改めて考察し直すと、ある株とある株が「別種」と見なせるかどうかは、一般的には有性生殖が出来るかどうか、すなわち遺伝子プールを共有しているかどうかで判断される。つまり、他の遺伝子がどれだけ変異したとしても、有性生殖に関するシステムが依然として共通で接合可能であれば、変異した遺伝子群は他の株とも共有され、それらは「同種」のままと見なせる。

つまり、まざらない別株が別種となるためには、「互いに有性生殖ができなくなる変異」が入るまでの期間（それがどれほどの時間的スケールかは不明であるが）、地理的に隔離されているなどの状況をもって、遺伝子が交流しないことが条件となる。

子実体形成で混合しなくなった株はそれぞれ独自の子実体を作るため、例えばいずれかの子実体だけが昆虫などに付着して拡散されるならば、別株が地理的に隔離されるような状況は比較的起こりやすいのかもしれない。

しかしながら、細胞性粘菌における有性生殖時の識別機構の全貌が明らかになり、どれだけの世代を経れば互いに接合しないほどの変異が蓄積するのか、という情報が得られない限りは、無性生殖環である子実体形成において異株が混ざらないことと、種分化の関連性に結論を出すことは控えた方がよさそうである。

材料と方法

細胞系列

本研究には *D. purpureum* の P1Ba 株と、*D. discoideum* の AX2 株をおもに使用した。*D. purpureum* の株の中には系統的に分かれるいくつかのグループが存在し、DNA 配列 (Mehdiabadi et al. 2009) だけでなく有性生殖の適合性と形態的な特徴で区別することができる (Hagiwara et al. 2004)。P1Ba は有性生殖の実験結果から、荻原ら (2004) の温帯型に属し、rDNA 配列から Mehdiabadi ら (2009) の group B に属する。すでにゲノムが読まれている *D. purpureum* QSAX1 (Sugang et al. 2011) と比較して、P1Ba は *tgr* family 遺伝子の重複のレベルが低く、よりシンプルな構成をしていた (詳しくは第 2 章)。加えて、P1Ba と同じ有性生殖グループに属する 11 の野外株も実験に用いた (表 1-1、2)。これらのうち、TNS-C-7 (=Hagiwara et al. 2004 の 'Hagiwara 5') を含む 4 つは、National Bio Resource Project Nenkin (<http://nenkin.nbrp.jp/>) から入手し、他の株 (由来不明の一株を除く) は日本の様々な場所から採取された野外株である (表 1-1)。Group 4 以外については、*Polysphondylium filamentosum*、*D. lacteum*、*D. rhizopodium* および *D. laterosorum* は、Dicty Stock Center (<http://dictybase.org/StockCenter/StockCenter.html>) から入手した。*Acytostelium subglobosum* 2CBg、*A. amazonicum* 2B1Ba、*P. pallidum* 2F2Ca、*D. polycephalum* 2A2j と 1JNd1、*D. menora* 1Za32a、*P. violaceum* P4Ba と 1MN8b、および *D. giganteum* E1SS12 は日本の様々な場所で採取した。

培養

D. purpureum の野外株は *Klebsiella aerogenes* もしくは *E. coli* B/r をエサとして与えて培養し、実験の際には遠心を繰り返すことでバクテリアを取り除いた。*D. discoideum* AX2 と、AX2 を親株とする形質転換体はシャーレまたは 175 rpm のシェーカーで、無菌培地 (Proteose Peptone 2 (Difco) 14.3 g,

Yeast extract (Difco) 7.15 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 1.28 g, KH₂PO₄ 0.49 g, H₂O 1000 ml (Watts and Ashworth 1970)) によって培養した。形質転換体の場合は、無菌培地に G418 (20 µg/ml) を添加した。特に記述しない限り、培養と発生は 22°C でおこなった。

ゲノム配列の取得とアセンブリ

Klebsiella aerogenes をエサに SM プレート上で培養した増殖期の P1Ba のクローン 2a 細胞を何度も洗ってバクテリアを取り除き、約 3 時間飢餓状態にしておくことで残ったバクテリアも消化させた。ゲノム DNA は GenElute™ Genome DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を使用して抽出し、続いて RNase 処理もおこなった。抽出したゲノム DNA が断片化していないことは、アガロースゲル電気泳動によって確認した。ゲノム配列の取得は、100-bp のペアエンド法による Illumina HiSeq platform でおこなった (Hokkaido System Science, Sapporo, Japan)。アダプター配列を Skewer v.0.1.123 によって取り除いた後、*Klebsiella aerogenes* のゲノム (Shin et al. 2012) を bwa-0.7.12 によって取り除き、残った配列を様々な k-mer 値で Velvet-1.2.10 (Zerbino and Birney 2008, Zerbino et al. 2009) によってアセンブルした。この研究で使用しているコンティグは k-mer 67 のものである。

形質転換

候補の *tgr* 遺伝子の配列は PCR で増幅し、In-Fusion (TAKARA BIO INC., Kusatsu, Japan) または SLiCE (Okegawa and Motohashi 2015) を用いて、pDXA-GFP2 (Levi et al. 2000) の KpnI サイトに挿入した。*Dp-csaA* についてはアミノ酸 1 から 487 番目にあたる塩基配列を *D. discoideum gppA* (Barth et al. 1994) の膜貫通領域 (アミノ酸 470 から 544 番目) と繋げて pDXA-GFP2 の KpnI サイトに挿入した。これら GFP 融合コンストラクトは AX2 細胞へエレクトロポレーションで導入し、G418 耐性によって選別した。Gabriel et al. (1999) の報告とは異なり、*Dp-csaA* の融合タンパク質は細胞膜への明瞭な蛍

光局在を示した（結果参照）。

細胞標識と混合実験

増殖期の *D. purpureum* 細胞を 20 mM のリン酸カリウムバッファー pH 6.0 (PB) 中、遠心によって繰り返し洗ってバクテリアをとり除いた後、エレクトロポレーションバッファー (EP, 20 mM Na/K₂ phosphate pH 7.4, 50 mM sucrose, 2 mM MgSO₄ and 0.2 mM CaCl₂) へ再懸濁し、エレクトロポレーション (0.4 mg/mL in EP, 10⁷ cells/ml, 400 µl, 4 mm gap cuvette, 4 µF, 1000 volts, 10 秒おきに 4 回のパルス, 22°C) によって tetramethylrhodamine-dextran (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) で染色した。細胞懸濁液は PB で希釈し、丁寧に 3 回洗った。Rhodamin で標識した *D. purpureum* の細胞は培地を取り除いた増殖期の *D. discoideum* 細胞と 1 : 1 の割合で混合し、細胞懸濁液 (10⁷ cells/ml) は無栄養の寒天プレート (1.25%) へスポット状に滴下した。10°C で 24 時間発生させた後、集合中の細胞を共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮影した。その他の混合実験では細胞はエレクトロポレーションによって tetramethylrhodamine-dextran または fluorescein-dextran (Sigma) で標識した。Group 4 以外の種を用いたいくつかの実験では、chloromethylfluorescein diacetate (Invitrogen) も細胞標識として用いた。

観察

発生中の細胞の観察には Zeiss LSM510 共焦点レーザー顕微鏡を用いた (Plan-Apochromat 10x/0.45 または Plan-Apochromat 20x/0.75)。個別の細胞の観察には Olympus FV3000 共焦点レーザー顕微鏡を用いた (PLAPON60XO, NA1.42, UPLSAPO40X2, NA0.95)。GFP に対しては、アルゴンレーザーの 488 nm 波長および 500-530 nm emission filter、tetramethylrhodamine に対しては HeNe 543 nm レーザーおよび 560 nm long-pass emission filter を用いた。

発生時間ごとの mRNA レベル

増殖期の *D. purpureum* 細胞からバクテリアを除いて回収し、熱湯で洗った cellulose acetate membranes (Millipore) を水を切って寒天プレート上に置いたところへ、細胞懸濁液を滴下した。メンブレンは 0 時間目から 12 時間目まで 3 時間おきにエッペンドルフチューブへ回収し、液体窒素で凍らせたのち、使用時まで -80℃ で保存した。全 RNA を RNeasy mini kit (Qiagen) によって抽出し、cDNA を SuperScriptII Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) によって合成した。候補遺伝子の転写レベルは、リアルタイム qPCR によって定量し、反応試薬は SYBR Premix Ex Taq TM II (Tli RNaseH Plus, Takara)、サーマルサイクラーは StepOnePlus cyclor (ABI) を用いた。*D. purpureum* の Ig7 を細胞内の reference とした。

DDBJ/ENA/GenBank に登録済の配列情報

本研究に使用した *D. purpureum* 各株の rDNA-ITS 配列は DDBJ/ENA/GenBank の MK002463 ~ MK002469、*D. purpureum* P1Ba 株の *Dp-csaA* および各 *tgr* 遺伝子配列は MK002470 ~ MK002481、*D. purpureum* P1Ba 株のゲノム配列 (コンティグ) は RBCH000000000 に登録されている。*D. caveatum* のゲノム配列 (コンティグ) は RCTL000000000 に登録されている。

プライマーセット

クローニングに用いたプライマーセット

Dp-csaA

F ATGAAGTTATTATTAATTGGTTTAATTTTAACTTTAATAAACTATGCTAATGGTCAAGC
R TTAATTTAATAAAAAATGGTAATAAAAAATAATAAAATAAATATATTAATTGGTAATAATTG

Dd-Dajumin

F GCAGTAGATTCTTCAAAATCTAATAATAATAGTGGTGG

R TGTGGTGATTTTCATCCAACATTTGGAATGGTAC

Dp-tgr2752B

F ATGTTATTAAAAAAATTCTTTATTTTTATTTTATTTTATTTTAAAAATGTAATGGTCAATGC
R TTAAAAGGTTTTTTCAAGAATCTTATTAATTGTTTTTAATCTTATATATCTATTGTATTTG

Dp-tgr2752C

F ATGATAAAAAATTTATTTTTGTATATTATTTATTTTTTTTTATTTTC
R TTATACATTTGATTACCATTTTTTAGTTTATC

Dp-tgr11238B

F ATGAAAATTAATTTTTATTTTTATTTTTCTTTTTAACCAATATTATGTATTAATTAATAG
R TTAAAAAACCTTATTATCTAAAATCTTTTGAATTTCTTTTAATCTTCTATTAC

Dp-tgr11238C

F ATGAAAAAGTTAATAAGTATATTATTTTTATTAACCATTCAAATTTCTATATTCTCATGTTTAG
R TTATTTTTTTTTCTTCATCATTATTAAAATTATTGCTGTCACCTGCTTTCGATATTTTTCTTC

Dp-tgr11392B

F ATGAAACCTTTATTGTTTATATTTCTTTTTCTATACCTTATAAAAAACAATTTTCATCATTTTG
R TTATAAAAAAACTTTTTTGTTTAAAAGCTCTTGAATTTTTTTTAATCTTCTCATTC

Dp-tgr11392C

F ATGATTATAAAAAATAAAAAAAAAGTTCTCTTTTTACTATTGATCCAAATAGTTTTTTCC
R TTAGTTTTTTTTCTTTTTTTGTGTTTTCTATTTTGTTTTGATGGTATTTCCAAACACC

リアルタイム qPCR に用いたプライマーセット

Dp-tgr2752B

F TGCCCAAATCTATGGTGGTG
R CCTCCTTTCCACATCCTTCT

Dp-tgr2752C

F GTAACCTACATGTTCCCAATTAACCTATG

R CACTAATATCATTAGAGCCCTCTAC

Dp-tgr11238B

F AGGTATTGCGGCAAATGGAC

R ACATTACCGCCATCCTTTGC

Dp-tgr11238C

F ATGAAAGCATGTGCCCAGAG

R TTGTTGAAGGACGGTTGAGG

Dp-tgr11392B

F TTTGACTCGGTTTCTACAGATCCTC

R TAGCAACATTCCACACACCACA

Dp-tgr11392C

F GGAGGATGGTTACTGCTGGTG

R TGATGGAGATTGATACGGGACTT

Dp-csaA

F GCTTTCTTAAACGACTGCTATTTCC

R TGGGCAAAC TACAACATCACCT

Dp-ig7

F cgaaggagaccaagagaaaa

R cgctcaccactactttccgtatc

第 2 章

細胞性粘菌 18 種（株）のゲノム配列を用いた *tiger* 遺伝子の解析

導入

第 1 章では、少なくとも *D. discoideum* と *D. purpureum* の 2 種において、共に *tiger* 遺伝子ペアを分子基盤とした種識別システムが存在することが明らかとなった。このシステムはそれぞれの種内で、ごく近縁な別株を識別できるほどの精度を持つ。本章では、現在約 150 種が知られる細胞性粘菌の全体へと視野をひろげ、*D. discoideum* と *D. purpureum* が保持する種識別機構が、細胞性粘菌の進化の過程において獲得された時点、および進化的背景を明らかにすることを目標とする。細胞性粘菌は系統的に Group 1~4 のメインクレードと、いくつかのサブクレードに分けられる (Romeralo et al. 2013, 図 In-5)。それらのうち、2018 年 12 月現在、NCBI にゲノム情報が公開されているものは 17 種（株）であり、遺伝子予測がなされているものは 5 種（株）である。以下の節ではモデル生物である *D. discoideum* AX4 と著者が独自に配列を取得した *D. purpureum* P1Ba のゲノム配列に加え dictyBase (<http://dictybase.org/>)、NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/)、SACGB (<http://sacgb.fli-leibniz.de/cgi/index.pl>) 等サイトから入手したもの、および他研究室からご提供いただいたゲノム配列、あわせて 18 種（株）を用いて *tgr* 遺伝子の解析をおこなった。その経緯と結果、進化的な考察について報告する。

結果と考察

各種細胞性粘菌のゲノム上における *tgr* 遺伝子ペアの有無

まず、18 種（株）の各染色体（contig）上において、*D. discoideum* の *tgrB1/tgrC1* に相当するような *tgr* 遺伝子ペアの有無を調べるため、次の手順で解析をおこなった。

D. discoideum TgrB1/TgrC1 のアミノ酸配列を query として tblastn 検索をおこない、e-value の閾値を $1e-10$ として各染色体（contig）上にヒット箇所、コード方向をそれぞれプロットした。つぎに、それらプロットされた配列のうち、外向き逆方向に 1.5 kbp 以内の間隔でコードされた遺伝子ペアを抽出した。その結果、*D. discoideum* の *tgrB1/tgrC1* ペアに相当するような染色体上の *tgr* 遺伝子ペアは、Group 4 と呼ばれるクレードにのみ存在することが明らかになった（表 2-1, 表 2-2A）。続いて、*D. discoideum* のすべての *tgr* 配列（37 本）を query として、e-value の閾値：10、2 配列の間隔：5 kbp 以内、という非常に緩めた基準下でも同様の解析をおこなった。結果、そのような閾値では他の Group の種でもペアが見つかったが、それらの中には一方が tgrB-type、他方が tgrC-type となっているペアは存在しなかった（表 2-2B）。図 2-1 に、*D. purpureum* P1Ba の *Dp-tgr2752B/C* ペア、*D. discoideum* の *tgrB1/C1* ペアに加え、Group 1～3 の種のうち、遺伝子予測がなされている *D. lacteum*（Group 3）、*P. pallidum* PN500（Group 2）、*D. fasciculatum*（Group 1）の遺伝子ペアを各染色体（または contig）上に図示する。これら Group 1～3 に属する種の遺伝子ペアは、tgrB-type と tgrC-type の組み合わせでないことに加え、おおよその長さや、イントロンの位置、数が *tgrC1/B1* ペアおよび *Dp-tgr2752B/C* ペアとは大きく異なる。

シングルの予測 *tgr* 遺伝子の選抜

先の節で、各種細胞性粘菌のゲノム配列上において、tgrB-type と tgrC-type の組み合わせで構成される遺伝子ペアは Group 4 に属する種のみが存在するこ

とが明らかとなった。ここまではペアとなっている *tgr* 遺伝子に着目してきたが、*D. discoideum*、*D. purpureum* も含め、細胞性粘菌の各種は、染色体上に単独でコードされた *tgr* 遺伝子を多く持っている。たとえば、*D. discoideum* の場合、“*tgr*” とアノテーションされた遺伝子は 37 あるが、そのうちペアとなっているのは *tgrB1/C1*, *tgrD1/E1*, *tgrJ1/K1* の 6 遺伝子 (3 ペア) のみである。ここから、*tgr* 遺伝子自体は細胞性粘菌の共通祖先から保持しており、Group 4 の共通祖先において染色体上で隣り合って機能するペアの *tgr* 遺伝子が出現したと推測される。そこで *tgr* 遺伝子がペアとなった経緯を明らかにすることを目的に、遺伝子予測がなされた種からシングルの予測 *tgr* 遺伝子配列を集め、分子系統解析をおこなった。

遺伝子予測のなされた *D. lacteum* (Group 3)、*P. pallidum* PN500 (Group 2)、*D. fasciculatum* (Group 1) から、

1、*D. discoideum* の TgrB1 または TgrC1 を query としたとき、e-value が 1e0 以下

2、TIG ドメインをもつ (MOTIF Search: <https://www.genome.jp/tools/motif/> で) の e-value が 1e0 以下)

3、アミノ酸配列が 1500 aa 以下

4、アミノ酸配列が 501 aa 以上

という 4 段階の基準を設け、すべてクリアした配列をシングルの予測 *tgr* 遺伝子とした (これまでペアとして扱ってきた配列についても、一配列ずつ個別に基準を適応する)。それぞれの種について、各ステップ後の予測 *tgr* 遺伝子の数を図 2-2 に示す。本研究で独自に配列を取得した *D. purpureum* P1Ba のゲノムに対しては、e-value 1e-10 で候補を絞り、1 配列ずつ読み枠予測をおこなった。最終的に予測 *tgr* 遺伝子の数は *D. discoideum* 29 本、*D. purpureum* QsAX1 33 本、*D. purpureum* P1Ba 9 本、*D. lacteum* 30 本、*P. pallidum* PN500 13 本、*D. fasciculatum* 11 本の合計 125 本であった。図 2-3A~F にそれぞれの種の予測 Tgr 配列について TIG ドメインと hydropathy を図示

する。

これら最終的に選抜された配列の中には、シグナルペプチド、および膜貫通領域（どちらも 10 個前後の疎水性アミノ酸が連続する領域）を有する配列と、それらを含まない配列が存在する。よって、上記の 4 つの条件に加え、シグナルペプチドと膜貫通領域の有無によってさらに候補を絞ることも可能であるが、例えば *D. discoideum* の Tgr 配列において、どの配列が実際に細胞膜に移行でき、どの配列ができないか、という網羅的な情報がないため、膜移行に必要なシグナルペプチドと膜貫通領域（疎水性の強さおよびアミノ酸数）を定義することができない。よって、今回の予測 Tgr 配列の選抜は上記の 4 段階までとした。

予測 Tgr 配列の分子系統解析

前節で収集した 6 種（株）の予測 Tgr 配列 125 本に対して系統解析をおこなった。UPGMA 法による系統樹を図 2-4 に示す。色を付けて示した *D. discoideum* の TgrC1 を含む "TgrC-type clade" は、Group 4 の種である *D. discoideum* と *D. purpureum* の配列のみで構成される一方、TgrB1 を含むクレードには、Group 1~4 すべての種に由来する予測 Tgr 配列が含まれていた。しかし、UPGMA 法は、各配列において進化速度が一定であることを仮定しており、TgrB1/C1 ペアおよび Dp-tgr2752B/C ペアが多型となっている（変異速度が他の配列よりも速い）という現状にそぐわない。そこで続いて NJ 法、ML 法によっても系統樹推定をおこなった。結果を図 2-5, 6 に示す。NJ 法、ML 法では、UPGMA 法に用いた配列セット（125 配列）から系統樹の主要な枝を残し、かつ全配列で保存された領域（330 aa）が十分大きくなるように 62 配列を抜粋し使用した。系統樹は、*D. discoideum* の TgrB1 を含むクレードと、TgrC1 を含むクレードに大きく分けられ、TgrB1 を含むクレードには、やはりすべての種に由来する予測 Tgr 配列が含まれる一方、TgrC1 のクレードには、*D. discoideum* と *D. purpureum* の予測 Tgr 配列のみで構成されていた。NJ 法による系統樹、ML 法による系統樹では TgrC-type clade と TgrB-type clade

はそれぞれ Bootstrap 値 98, 95 の信頼度で分けられた。

TgrB-type 配列は Group 1~4 すべての種が保持し、TgrC-type 配列は Group 4 の種だけに存在するというこれらの結果から、本研究で主題として扱った *tgr* 遺伝子ペアを分子基盤とした種認識システムとは、細胞性粘菌全体でもともと保持していたと予想される祖先型の *tgrB*-type 配列と、新規に獲得された *tgrC*-type 配列が染色体上に隣り合い、協調して機能することで、Group 4 の共通祖先においてはじめて構築されたシステムであることが示唆される。

Group 4 に属する種が厳密な認識システムを獲得した背景および意義

Group 4 は、*D. discoideum* や *D. purpureum* のように、cAMP を集合に用いる種で構成される。これら Group 4 の種は、概して頑丈な柄をもち、大きくて丈夫な子実体を作る。このような形質は寒冷地帯や乾燥地帯へ適応すると考えられる (Cavender 2013)。細胞性粘菌の分布に関する研究によれば、Group 4 の種は実際にそのような地域に多く存在し、優占種となっている (Cavender 1973、Benson and Mahoney 1977、Cavender 1978、Swanson et al. 1999)。このクレードに属する種だけが、柄細胞の前駆体である予定柄細胞を作る一方で、Group 4 以外の種では、形成中の子実体の先端において、予定胞子細胞が脱分化することで柄細胞となる (Schilde et al. 2014)。*D. discoideum* と、おそらく他の Group 4 の種では、予定柄細胞のうち、かなりの大きさの領域が発生の初期において、DIF-1 によって誘導され (Thompson and Kay 2000、Kay et al. 1992、van Es et al. 1995)、移動体の先端付近の領域を占める (prestalk-O cell)。DIF-1 は予定胞子細胞によって分泌され、予定柄細胞によって分解される (Kay and Thompson 2001)、拡散性の分子である。つまり、多少の擬人化を交えて表現すると、Group 4 の種では、先に予定胞子細胞に分化した細胞が周囲の細胞に対し「柄になれ」とばかりに DIF-1 を分泌し、予定柄細胞へ誘導する。予定柄細胞が増えてくれば、DIF-1 の分解が進み、新たに予定胞子細胞となれるものが現れるのである。

予定柄細胞は自身の資源を消費して予定胞子細胞がより遠くへ移動する手助

けをした後、死細胞となって大きくて丈夫な子実体の支えとなる。このようなシステムは、例えば、より多量の DIF-1 を産生しながら自身は DIF-1 への感受性を下げることで、他の株と混合した際、より多く孢子細胞となろうとする株（不正を働く者：cheater と呼ばれる）が出現する土壌となるため、種の維持が不安定化する影響をとりわけ受けやすい（Uchinomiya and Iwasa 2013）。

以上のように、他の社会性動物において「ワーカー」にあたるような、自身は生殖に参加しない細胞型の獲得は、実質的に cheater による搾取の危険性を増すため、種を安定的に維持するにあたっては、非自己細胞の混合を防ぐ、より厳密なメカニズムが必要になる。Group 4 以外の種における種識別機構については今の所わかっていないが、本研究室でおこなった種間混合実験の結果では、Group 4 以外の種は遺伝的に離れた細胞の混合に対して比較的寛容である（図 2-7）。現在の著者の仮説は、多型の Tgr 分子による細胞識別機構は Group 4 の共通祖先で確立され、予定柄細胞という新しい細胞型が作られる前提となった、とするものである。変異が速く、遺伝的にごく近い株間においても多型となる細胞接着因子を基盤とする厳密な識別機構と、新たな自己犠牲的な細胞型が Group 4 の共通祖先で同時的に進化したことは、この Group の種が他の Group に比べて頑丈な子実体を形成することを可能にし、生存可能な分布の拡大に貢献したと考えられる。

補足的考察と展望

tgrM1 について

図 2-5 の NJ 法による系統樹と、図 2-6 の ML 法による系統樹は、TgrB-type と TgrC-type の配列に高い Bootstrap 値で分かれるという点では一致しているが、*D. discoideum* の TgrM1 を含む枝が NJ 法では TgrB-type clade に含まれ、ML 法では TgrC-type clade に含まれるという点で異なる。*D. discoideum* における tgrM1 の機能は不明であるが、発生の後半で転写レベルが上昇し、最終

的には *tgrB1/C1* ペアを凌ぐほどの転写産物の蓄積量を示す。*D. purpureum* QsAX1 株の *tgrM1* にあたる DPU1256273 (G0062162) でも同様の発現パターンである (図 2-8)。加えて、*tgrM1* のホモログもまた Group 4 の種にしか存在しないことから (図 2-5,6)、この配列も Group 4 の種共通祖先で獲得され、発生過程において *tgrB*-type、*tgrC*-type とは異なる何らかの機能を持っていると推測される。

tgrC-type 遺伝子の重複と多型を生み出すメカニズムについて

例えば図 2-6 の系統樹を見ると、Group 4 の *D. discoideum*、*D. purpureum* ともに、比較的短期間に *TgrC*-type clade において激しい重複が起こっている。*TgrB*-type clade で見られる重複はすべて *TgrC*-type とペアとなっている配列 (*TgrB1*、*TgrE1*、*TgrJ1*、*Dp-tgr2752B*、*Dp-tgr11238B*、*Dp-tgr11392B*) であるため、*tgr* 遺伝子の重複を起こすメカニズムが元々 *tgrC*-type 遺伝子に対して働いており、*tgrB*-type 遺伝子の重複はペアとなった後に *tgrC*-type 配列に巻き込まれる形で起こったのではないかと推測される。

tgr 遺伝子の重複がおこるメカニズムは不明であるが、*D. purpureum* の QsAX1 株と *D. discoideum* の AX4 株はどちらも液体培地でアメーバ細胞のまま分裂増殖し続けることが可能な株である。そのため、野外においておそらく子実体やマクロシストとなって長期間を過ごし、実験室下でも孢子の状態で保存される一般的な野外株と比べ、分裂増殖をし続ける分、DNA 複製の機会が多く、何らかの過程で遺伝子が重複する機会もまた多いのかもしれない。本研究において、*D. purpureum* の代表として遺伝子予測がなされている QsAX1 株ではなく、野外株 P1Ba を用いたのは、重複が少なく *tgr* 遺伝子の構成がシンプルであったことが理由のひとつである。

株の間で多型となっている配列において、重複もまた頻繁に起こっているという *tgr* 遺伝子の状況から、特定の遺伝子へ積極的に変異を起こすメカニズムと遺伝子自体を重複させるメカニズムには関連があるのかもしれない。

また、*D. discoideum* と *D. purpureum* のゲノム上では *tgr* 遺伝子ペアが 3 つ

ずつ存在したが、多型になっているペアはそれぞれ *tgrB1/C1*、*Dp-tgr2752B/C* のみであった。このことから、遺伝子ペアの重複が起こっても、多型を生み出す仕組み自体は1つのペアに対してのみ働いていることが示唆される。したがって、*D. discoideum* と *D. purpureum*、もしくは他の Group 4 の種を含め、株間で多型になっている *tgr* ペアに共通の特徴や、周辺領域の共通配列などが絞られれば、多型を生み出すメカニズム解明の糸口となるかもしれない。遺伝子上に高頻度に変異を起こす現象は、ヒトの免疫系において抗体産生を担う B 細胞で有名であるが (Muramatsu et al. 2000)、その仕組みも未だ全貌は明らかになっていない。高等動物の細胞に比べ、細胞性粘菌は培養が容易な上、一倍体であるため変異の検出にも適しており、このような「積極的に多型を生み出すメカニズム」の研究において今後有用な材料として貢献できる可能性は高い。

Group 4 以外の種の識別機構について

Group 4 以外の Group の細胞性粘菌が、他種との混合に比較的寛容であるといっても、それぞれの種は大まかには同種同士で細胞塊を作る傾向があり (図 2-7)、識別機構自体は存在すると推測される。Group 4 以外の種は TgrB-type の配列のみを持っていることから、TgrB-type 配列だけを用いた識別が可能なのかもしれないが、もちろんまったく別のシステムを備えている可能性もあり、これらの種の識別機構については不明な点が多い現状である。

材料と方法

データ解析

アセンブリした配列は `blast` データベースに変換し、*D. discoideum* の遺伝子のうち *tgr* 遺伝子とされている 37 遺伝子 (*tgrA1*~*tgrS1*)、および *csaA* について `tblastn` 検索 (アミノ酸配列を `query` とし、塩基配列を対象とした検索) をおこなった。配列検索は `ncbi-blast-2.2.26+` を使用した。検索結果はコンティグ上に、`perl` スクリプトと `gnuplot` を使用して図示し、2 配列とも $1e-10$ 以下の *e-values* であり、隣り合って外向きにコードされた遺伝子ペアについて、*tgr* 遺伝子ペアの候補とみなせるかをさらに調べた。比較解析のために、以下にリストしたゲノム配列について潜在的な *tgr* 遺伝子を検索した。配列のアライメントは MAFFT (Kato et al. 2005、Kato and Standley 2013) の E-INS-i を用いておこない、系統樹は RAxML (Stamatakis 2014) を用いて構築し、FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) によって図示した。候補 *tgr* 遺伝子の配列多型は、P1Ba と同じ有性生殖グループに属する野外株を用いておこなった。それぞれの *tgr* 領域は PCR によって増幅し、ABI3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて配列を取得した。同義置換、非同義置換の数は Nei and Gojobori (1986) に従い、SNAP.pl (Korber 2000) を用いて計算した。Pfam ドメイン検索は、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database (<http://www.genome.jp/tools/motif/>) を用いておこなった。各組み合わせの種間または株間の系統的距離は、Dr. Akifumi S. Tanabe (<http://www.fifthdimension.jp/products/distontree/>) によって書かれた ‘`distontree.pl`’ `perl` スクリプトをもちいて、報告されている SSU rDNA に基づいた細胞性粘菌の系統樹 (Romeralo et al. 2011) の枝の長さを計算することで見積もった。元々の系統樹に含まれていない株については、枝の長さを規格化した上でメインの系統樹へ局所的な系統樹を埋め込んだ。Hydropathy index は古典的な Kyte-Doolittle scale (Kyte and Doolittle, 1982) に基づき、各アミノ酸について前後 3 ずつのアミノ酸の値を合わせ、計 7 アミノ酸の平均

をそのサイトの値とした。いくつかの細胞性粘菌の種の公開されたゲノム配列は dictyBase(<http://dictybase.org/>)、NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、および SACGB(<http://sacgb.fli-leibniz.de/cgi/index.pl>) から得た。*D. polycarpum* Ohio、*D. deminutivum* M19A、*D. polycephalum* MY1-1 および *Acytostelium ellipticum* AE2 のゲノム配列は Pauline Schaap 博士からご提供いただいた。*D. rosarium* WS689 (元々は David Waddell 博士によって提供された株)、*D. caveatum* B4-3 (Dicty Stock Center より取り寄せた株) のゲノム配列は著者が取得・構築した(*D. rosarium* WS689 については未発表)。*D. caveatum* B4-3 のゲノム配列は DDBJ/ENA/GenBank に accession No. RCTL000000000 で登録されている。*D. polycephalum* 1JNd1 株 (井上敬博士が野外から採取) のゲノム配列は桑山秀一博士よりご提供いただいた (未発表)。

結論と展望

本研究の結論

本研究は、野外で密に共存する細胞性粘菌の種間において、どのような相互作用のもと、各自が種を維持しているのかという興味をもって進められた。

主題とした種識別機構について、第1章では細胞性粘菌、少なくとも *D. discoideum* と *D. purpureum* の2種では、*tgr* 遺伝子ペアを分子基盤とした共通のシステムによって種識別・株識別の両方がなされていることを明らかにした。つまり、おそらくこのシステムは接触した相手の細胞が「おなじ *tgr* ペアを持つ、自身のクローンかどうか?」という点だけを識別しており、相手が数億年前に分岐したとされる *D. discoideum*（または *D. purpureum*）であっても、SSU レベルでは完全に一致する、同種内の別株であっても同様に識別し、クローン細胞のみによる子実体づくりを可能にしていると考えられる。

序論の中で述べたように、多種混合の環境下では「種を超えた利他行動」が見られることを考え合わせると、細胞性粘菌は「発生の初期には他種との共存が有利であるが、最終的には同種（株）のみで子実体を作りたい」という矛盾した要求を抱えた存在である。そしてその要求を、少なくともある一面では、*tgr* 遺伝子ペアを分子基盤とした種（株）識別システムによって解決し、「効率的な発生」と「種の維持」を共に実現する、合理的な種間相互作用を行っていると言える。

第2章では、各種の *tgr* 遺伝子配列を解析することによって *tgrB*-type/*tgrC*-type 遺伝子ペアは Group 4 の種だけが持つこと、またそもそも *tgrC*-type 遺伝子の存在自体が、Group 4 の種に限られることを見出した。これらの結果から、*tgrB*-type/*tgrC*-type 遺伝子ペアによる厳密な識別システムは、Group 4 の共通祖先で *tgrC*-type 配列を新たに獲得したことによって初めて構築されたことが示唆された。これにより厳密な種識別機構と、「予定柄細胞」という社会性動物のワーカー的な細胞型は、Group 4 の共通祖先で同時に獲得され、この Group における子実体の大型化、および分布拡大を実現したという進化仮説を新規に提唱した。

ワーカーと認識機構の獲得は、どちらが先に起こったか？

上記のように、本研究の結果と、これまでの知見により、将来の柄細胞を予め確保することで丈夫な子実体を作るようになったことと、*tgr* ペアによる厳密な識別機構の獲得は、どちらも Group4 の共通祖先で起こったと考えられるが、ここでは具体的にはどちらが先に起こったのかについて改めて考察する。

例えば、予定柄細胞をあらかじめ決めるシステムを先に獲得すると、序章でも論じたように、柄細胞への貢献を減らして孢子細胞になろうとする株、*cheater* による搾取の危機に常にさらされる。つまりシステム獲得の瞬間に危機的状况が生じるわけであるが、逆に厳密な識別機構の獲得が先に起こったとすれば、その株が不利になる瞬間は訪れないと考えられる。生物の進化において、重複した遺伝子群が異なる機能を持つことはよく見られることであり、*tgrB*-type 配列から派生したと考えられる *tgrC*-type 配列が *tgrB*-type 配列と隣り合い、機能を分担したヘテロフィリックな接着因子ペアとして確立されることは、比較的自然的な流れであると推測される。基本的に協力の進化という観点から見て、自身のクローンを選別できるという形質はそのクローンの適応度をあげるため、*tgrB*-type/*C*-type ペアを持った株は存在頻度を増していった可能性が高い。つまり、識別機構の獲得それ自身に目立ったデメリットはないが、識別機構がない状態で予定柄細胞というワーカー的細胞型を獲得することは *cheater* に付け入られるという大きなデメリットをはらんでいる。よって、著者は現在、Group4 の共通祖先においてほぼ同時に獲得されたといっても、どちらかと言えば *tgr* による識別機構が先にでき、予定柄細胞がつくられる前提になったと考えている。このことは例えば、DIF-1 を合成する各酵素が、それぞれ細胞性粘菌のどの種から存在しているのかなどを詳しく解析することで分かるかもしれない。加えて、仮に Group 4 の種やこの Group に近い *P. violaceum* の株の中で、厳密な識別機構を持つが、DIF-1 による予定柄細胞分化をおこなわない、という種（株）が見つければ、識別機構が先に生じたという説が支持される。

D. caveatum の捕食は認識に基づくか？

序章で触れた *D. caveatum* について、著者は存在を知った当初は他の種から「別種だと認識され、排除される目印」のような形質を失った種ではないかと考えていた。しかしながら、本研究室でなされた学生実習の中で、*D. caveatum* は低い頻度で共食いもおこなっていることが明らかになった（成山 日本細胞性粘菌学会 第6回例会 2016年）。つまり *D. caveatum* はどうやら、自分を完全に見分けているわけではなく、「誰でも食べようとしている」ことが示唆された。ここから、捕食する能力は認識に関するものではなく、細胞自体の「固さ」や「齧る力」に依存している可能性があり、単に *D. caveatum* 自身の細胞は *D. caveatum* にとって例えば「固くて食べにくい物」なのかもしれない。

著者は将来的に *D. caveatum* の混合能を解析することを視野に入れ、*D. caveatum* のゲノム配列を取得したが、予測される *tgr* 配列については、今のところ同じ Group 3 の *D. lacteum* と比べ、取り立てて変わった点は見出せていない。もちろん *D. caveatum* の配列は完全にエキソン領域を決定できているわけではなく、さらには配列を眺めるだけで検出できるような特徴によって「混合能」が得られているわけでは無いのかもしれない。

D. caveatum の捕食能力が「認識機構」、「摂食能」いずれによるものにせよ、本研究において *D. discoideum* と *D. purpureum* の異種間キメラを作成できたように、*D. caveatum* のゲノム配列から候補遺伝子を探索し、*D. discoideum* に導入することで例えば「*D. caveatum* に食べられない *D. discoideum*」、または「他種を食べる *D. discoideum*」を作出できる可能性がある。

総括

本研究で扱った *tgr* 遺伝子ペアのように、高度に多型となった、互いに適合する分子（鍵と鍵穴）が染色体上で隣接することは、ホヤ（Harada et al. 2008）や植物（Takuno et al. 2007）といった他の生物の認識システムにおいても見られることである。これら生物の遺伝子の複雑な構造に比べると、*tgr* 遺伝子ペア

はシンプルな遺伝子構造をしており、細胞性粘菌は自己/非自己識別因子の進化を研究する上で理想的な真核生物のモデルであるといえる。

次世代シーケンサーの普及による大規模な配列情報の取得や、野外において細胞ごとの遺伝子発現量を測る、などといった手法上の発展が進むにつれ、これまでの分子生物学・細胞生物学・発生生物学によるミクロな知見と、進化学・生態学・動物行動学におけるマクロな視点をつなぐことが可能になってきた。このような、別々の視点から発展してきた学問を統合し、生物学・生命科学における基本的な問いに答えを出せる存在としても、細胞性粘菌はその有用性を益々高めると予想される。

本研究は、細胞単位で機能する分子機構の解明と、進化学・生態学的な解釈を結ぶ研究が、細胞性粘菌を用いて実際に可能であることを示す研究例として、多様な研究分野へ貢献すると期待される。

引用文献

- Adl, S. M., Simpson, A. G., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S. et al, (2012). The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **59**, 429-514.
- Amagai, A. (1984). Induction by ethylene of macrocyst formation in the cellular slime mould *Dictyostelium mucoroides*. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 2961-2965.
- Amagai, A. and Filosa, M. F. (1984). The possible involvement of cyclic AMP and volatile substance(s) in the development of a macrocyst forming strain of *Dictyostelium mucoroides*. *Devel. Growth Differ.* **26**, 583-589.
- Annesley, S. J. and Fisher, P. R. (2009). *Dictyostelium discoideum*--a model for many reasons. *Mol Cell Biochem.* **329**, 73-91.
- Asghar, A., Groth, M., Siol, O., Gaube, F., Enzensperger, C., Glöckner, G. and Winckler, T. (2012). "Developmental gene regulation by an ancient intercellular communication system in social amoebae. *Protist* **163**, 25-37.
- Atzmony, D., Zahavi, A. and Nanjundiah, V. (1997). Altruistic behaviour in *Dictyostelium discoideum* explained on the basis of individual selection. *Curr. Sci.* **72**, 142-145.
- Barth, A., Muller-Taubenberger, A., Taranto, P. and Gerisch, G. (1994). Replacement of the phospholipid-anchor in the contact site A glycoprotein of *D. discoideum* by a transmembrane region does not impede cell adhesion but reduces residence time on the cell surface. *J. Cell Biol.* **124**, 205-215.
- Benabentos, R., Hirose, S., Sucgang, R., Curk, T., Katoh, M., Ostrowski, E. A., Strassmann, J. E., Queller, D. C., Zupan, B., Shaulsky, G. and Kuspa, A. (2009). Polymorphic members of the lag gene family mediate kin discrimination in *Dictyostelium*. *Curr Biol.* **19**, 567-572.

- Benson, M. R. and Mahoney, D. P. (1977). The distribution of dictyostelid slime molds in southern California with taxonomic notes on selected species. *Am. J. Bot.* **64**, 496-503.
- Beug, H., Katz, F. E. and Gerisch, G. (1973). Dynamics in antigenic membrane sites relating to cell aggregation in *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.* **56**, 647-658.
- Bloomfield, G., Skelton, J., Ivens, A., Tanaka, Y. and Kay, R. R. (2010). Sex determination in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Science*. **330**, 1533-1536.
- Boeckeler, K., Tischendorf, G., Mutzel, R. and Weissenmayer, B. (2006). Aberrant stalk development and breakdown of tip dominance in *Dictyostelium* cell lines with RNAi-silenced expression of calcineurin B. *BMC Dev. Biol.* **6:12**, P 11 pages
- Bonner, J. T. (1982). Evolutionary strategies and developmental constraints in the cellular slime molds. *Am. Naturalist* **119**, 530-552.
- Bonner, J. T. and Adams, M. S. (1958). Cell mixtures of different species and strains of cellular slime moulds. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **6**, 346-356.
- Bonner, J. T., Chiang, A., Lee, J. and Suthers, H. B. (1988). The possible role of ammonia in phototaxis of migrating slugs of *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3885-3887.
- Brar, S. K. and Siu, C. H. (1993). Characterization of the cell adhesion molecule gp24 in *Dictyostelium discoideum* - mediation of cell-cell adhesion via a Ca²⁺-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **268**, 24902-24909.
- Buchmann, K. (2014). Evolution of innate immunity: clues from invertebrates via fish to mammals. *Frontiers in immunology*, **5**, 459.
- Buss, L. W. (1982). Somatic cell parasitism and the evolution of somatic tissue compatibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5337-5341.

- Cavender, J. C. (1973). Geographical distribution of Acrasidae. *Mycologia* **65**, 1044-1054.
- Cavender, J. C. (1978). Cellular slime molds in tundra forest soils of Alaska including a new species, *Dictyostelium septentrionalis*. *Can. J. Bot.* **57**, 1326-1332.
- Cavender, J. C. (2013). A global overview of Dictyostelid ecology with special emphasis in North American forest. In *Dictyostelids*(pp. 149-166). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Chen, G. (2014). *Heterophilic Cell Adhesion Molecule TgrC1 and its Binding Partners during Dictyostelium discoideum Development* (Doctoral dissertation).
- Chen, G., Wang, J., Xu, X., Wu, X., Piao, R. and Siu, C. H. (2013). "*TgrC1* mediates cell-cell adhesion by interacting with *TgrB1* via mutual IPT/TIG domains during development of *Dictyostelium discoideum*. *Biochem J* **452**, 259-69.
- Chen, G., Xu, X., Wu, X., Thomson, A. and Siu, C. H. (2014). "Assembly of the *TgrB1-TgrC1* cell adhesion complex during *Dictyostelium discoideum* development. *Biochem J* **459**, 241-9.
- Coates, J. C. and Harwood, A. J. (2001). Cell-cell adhesion and signal transduction during *Dictyostelium* development. *J. Cell Sci.* **114**, 4349-4358.
- Dawkins, R. (1975). "Selfish Gene". Oxford University Press, Oxford. (邦訳, R. ドーキンス 著「利己的な遺伝子」, 日高ほか訳, 紀伊国屋書店)
- De Lozanne, A. and Spudich, J. A. (1987). Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. *Science* **236**, 1086-1091.
- de Wit, R. J. W. and Konijn, T. M. (1983). Identification of the acrasin of *Dictyostelium minutum* as a derivative of folic acid. *Cell Differ.* **12**, 205-210.
- Dickinson, D. J., Nelson, W. J. and Weis, W. I. (2011). A polarized epithelium organized by beta- and alpha-catenin predates cadherin and metazoan origins. *Science*.**331**, 1336-1339.

Dicty Stock Center <http://www.dictybase.org/StockCenter/StockCenter.html>

dictyBase <http://dictybase.org/>

Dynes, J. L., Clark, A. M., Shaulsky, G., Kuspa, A., Loomis, W. F. and Firtel, R. A. (1994). *LagC* is required for cell-cell interactions that are essential for cell-type differentiation in *Dictyostelium*. *Genes Devel.* **8**, 948-958.

Edelman, G. M. (1987). CAMs and Igs: cell adhesion and the evolutionary origins of immunity. *Immunological reviews*, *100*(1), 11-45.

Eichinger, L., Pachebat, J. A., Glockner, G., Rajandream, M. A., Sugang, 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., vanDriessche, N., Cronin, A., Goodhead, I., Muzny, D., Mourier, T., Pain, A., Lu, M., Harper, D., Lindsay, R. et al, (2005). The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **435**, 43-57.

Eisenberg, R. M. (1976). Two-dimensional microdistribution of cellular slime molds in forest soil. *Ecology* **57**, 380-384.

FigTree <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

Filosa, M. F. (1962). Heterocytosis in cellular slime molds. *Am. Naturalist* **XCVI (no. 887)**, 79-92.

Fiz-Palacios, O., Romeralo, M., Ahmadzadeh, A., Weststrand, S., Ahlberg, P. E. and Baldauf, S. (2013). "Did terrestrial diversification of amoebas (amoebozoa) occur in synchrony with land plants?. *PLoS One* **8**, e74374.

Flowers, J. M., Li, S. I., Stathos, A., Saxer, G., Ostrowski, E. A., Queller, D. C., Strassmann, J. E. and Purugganan, M. D. (2010). Variation, sex, and social cooperation: molecular population genetics of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *PLoS Genet.* **6**, e1001013.

Fortunato, A., Strassmann, J. E., Santorelli, L. and Queller, D. C. (2003a). Co-occurrence in nature of different clones of the social amoeba, *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Ecol.* **12**, 1031-1038.

Fortunato, A., Queller, D. C. and Strassmann, J. E. (2003b). A linear dominance hierarchy among clones in chimeras of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *J. Evol. Biol.* **16**, 438-445.

Foster, K. R., Shaulsky, G., Strassmann, J. E., Queller, D. C. and Thompson, C. R. L. (2004). Pleiotropy as a mechanism to stabilize cooperation. *Nature* **431**, 693-696.

Gabriel, D., Hacker, U., Kohler, J., Muller-Taubenberger, A., Schwartz, J. M., Westphal, M. and Gerisch, G. (1999). The contractile vacuole network of *Dictyostelium* as a distinct organelle: its dynamics visualized by a GFP marker protein. Correction: 112:U3(1999). *J. Cell Sci.* **112**, 3995-4005.

Gao, E. N., Shier, P. and Siu, C. H. (1992). Purification and partial characterization of a cell adhesion molecule (gp150) involved in postaggregation stage cell-cell binding in *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **267**, 9409-9415.

Gerisch, G. (1960). Zellfunktionen und Zellfunktionwechsel in der Entwicklung von *Dictyostelium discoideum*. I. Zellagglutination und Induktion der Fruchtkorperpolaritat. *W.R. Arch. Entw. Mech.* **152**, 632-654.

Gerisch, G. (1961a). Zellfunktionen und Zellfunktionwechsel in der Entwicklung von *Dictyostelium discoideum*. III. Getrennte Beeinflussung von Zelldifferenzierung und Morphogenese. *W.R. Arch. Entw. Mech.* **153**, 158-167.

Gerisch, G. (1961b). Zellfunktionen und Zellfunktionswechsel in der Entwicklung von *Dictyostelium discoideum*. V. Stadienspezifische Zellkontaktbildung und ihre quantitative Erfassung. *Exp. Cell Res.* **25**, 535-554.

Gerisch, G. (1961c). Zellkontaktbildung vegetativer und aggregationsreifer Zellen von *Dictyostelium discoideum*. *Naturwissensch.* **48**, 436-437.

Gilbert, O. M., Foster, K. R., Mehdiabadi, N. J., Strassmann, J. E. and Queller, D. C. (2007). High relatedness maintains multicellular cooperation in a social amoeba by controlling cheater mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 8913-8917.

Glöckner, G., Lawal, H. M., Felder, M., Singh, R., Singer, G., Weijer, C. J., & Schaap, P. (2016). The multicellularity genes of dictyostelid social amoebas. *Nature communications*, **7**, 12085.

Gregor, T., Fujimoto, K., Masaki, N. and Sawai, S. (2010). The onset of collective behavior in social amoebae. *Science*. **328**, 1021-1025.

Gruenheit, N., Parkinson, K., Stewart, B., Howie, J. A., Wolf, J. B., & Thompson, C. R. (2017). A polychromatic ‘greenbeard’ locus determines patterns of cooperation in a social amoeba. *Nature communications*, **8**, 14171.

Haeckel, E. 1866. *General Morphologie der Organismen*. Georg Reimer, Berlin.

Hagiwara, H., Kawakami, S. and Hwang, J. Y. (2004). Mating system and morphology of the temperate form of *Dictyostelium purpureum* Olive. *Bull. Natl. Sci. Mus. Tokyo, Ser. B* **30**, 71-78.

Hamilton, W. D. (1964). The genetical evolution of social behaviour I and II. *Journal of theoretical biology*, **7**(1), 1-16, 17-52.

Hanna, M. H. and Cox, E. C. (1978). The regulation of cellular slime mold development: A factor causing development of *Polysphondylium violaceum* aggregation-defective mutants. *Dev. Biol.* **62**, 206-214.

Harada, Y., Takagaki, Y., Sunagawa, M., Saito, T., Yamada, L., Taniguchi, H., ... & Sawada, H. (2008). Mechanism of self-sterility in a hermaphroditic chordate. *Science*, *320*(5875), 548-550.

Hardin, G. (1968). The tragedy of the commons. *science*, *162*(3859), 1243-1248.

Harloff, C., Gerisch, G. and Noegel, A. A. (1989). Selective elimination of the contact site A protein of *Dictyostelium discoideum* by gene disruption. *Genes Devel.* **3**, 2011-2019.

Harris, T. J. C., Awrey, D. E., Cox, B. J., Ravandi, A., Tsang, A. and Siu, C. H. (2001). Involvement of a Triton-insoluble floating fraction in *Dictyostelium* cell-cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **276**, 18640-18648.

Harris, T. J. C., Ravandi, A. and Siu, C. H. (2001). Assembly of glycoprotein-80 adhesion complexes in *Dictyostelium* - Receptor compartmentalization and oligomerization in membrane rafts. *J. Biol. Chem.* **276**, 48764-48774.

Heidel, A. J., Lawal, H. M., Felder, M., Schilde, C., Helps, N. R., Tunggal, B., Rivero, F., John, U., Schleicher, M., Eichinger, L., Platzer, M., Noegel, A. A., Schaap, P. and Glöckner, G. (2011). Phylogeny-wide analysis of social amoeba genomes highlights ancient origins for complex intercellular communication. *Genome Res.* **21**, 1882-1891.

Hirose, S., Benabentos, R., Ho, H. I., Kuspa, A. and Shaulsky, G. (2011). Self-recognition in social amoebae is mediated by allelic pairs of tiger genes. *Science*. **333**, 467-470.

Hirose, S., Chen, G., Kuspa, A. and Shaulsky, G. (2017). "The polymorphic proteins *TgrB1* and *TgrC1* function as a ligand-receptor pair in *Dictyostelium* allorecognition. *J Cell Sci* **130**, 4002-4012.

Hirose, S., Santhanam, B., Katoh-Kurosawa, M., Shaulsky, G. and Kuspa, A. (2015). "Allorecognition, via *TgrB1* and *TgrC1*, mediates the transition from unicellularity to multicellularity in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Development* **142**, 3561-70.

Howard, P. K., Ahern, K. G. and Firtel, R. A. (1988). Establishment of a transient expression system for *Dictyostelium discoideum*. *Nucl. Acids Res.* **16**, 2613-2623.

Inouye, K. (2003). Pattern formation by cell movement in closely-packed tissues. *In* Morphogenesis and pattern formation in biological systems..(ed. Sekimura, T., Noji, S., Ueno, N. and Maini, P. K.) pp. 191-202. Tokyo: Springer Verlag.

Inouye, K. and Takeuchi, I. (1980). Motive force of the migrating pseudoplasmodium of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Sci.* **41**, 53-64.

Jack, C. N., Ridgeway, J. G., Mehdiabadi, N. J., Jones, E. I., Edwards, T. A., Queller, D. C. and Strassmann, J. E. (2008). Segregate or cooperate- a study of the interaction between two species of *Dictyostelium*. *BMC Evol Biol.* **8**, 293.

Jain, R., Yuen, I. S., Taphouse, C. R. and Gomer, R. H. (1992). A density-sensing factor controls development in *Dictyostelium*. *Genes Devel.* **6**, 390-400.

Kamboj, R. K., Gariepy, J. and Siu, C. H. (1989). Identification of an octapeptide involved in homophilic interaction of the cell adhesion molecule gp80 of *Dictyostelium discoideum*. *Cell* **59**, 615-625.

Kamboj, R. K., Wong, L. M., Lamb, T. Y. and Siu, C. - H. (1988). Mapping of a cell-binding domain in the cell adhesion molecule gp80 of *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.* **107**, 1835-1843.

Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, *30*(4), 772-780.

Katoh, K., Kuma, K. I., Toh, H., & Miyata, T. (2005). MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic acids research*, *33*(2), 511-518.

- Kaushik, S. and Nanjundiah, V. (2003). Evolutionary questions raised by cellular slime mold development. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.* **B69**, 825-852.
- Kay, R. R. and Thompson, C. R. L. (2001). Cross-induction of cell types in *Dictyostelium*: evidence that DIF-1 is made by prespore cells. *Development* **128**, 4959-4966.
- Kay, R. R., Taylor, G. W., Jermyn, K. A. and Traynor, D. (1992). Chlorine-containing compounds produced during *Dictyostelium* development - Detection by labelling with ³⁶Cl. *Biochem. J.* **281**, 155-161.
- Konijn, T. M., Barkley, D. S., Chang, Y. Y. and Bonner, J. T. (1968). Cyclic AMP: a naturally occurring acrasin in the cellular slime molds. *Am. Naturalist* **102**, 225-233.
- Korber, B. (2000). HIV signature and sequence variation analysis. *Computational analysis of HIV molecular sequences*, 4, 55-72.
- Kreitmeier, M., Gerisch, G., Heizer, C. and Muller-Taubenberger, A. (1995). A talin homologue of *Dictyostelium* rapidly assembles at the leading edge of cells in response to chemoattractant. *J. Cell Biol.* **129**, 179-188.
- Kuspa, A. and Loomis, W. F. (1992). Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8803-8807.
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology*, 157(1), 105-132.
- Lam, T. Y. and Siu, C. - H. (1981). Synthesis of stage-specific glycoproteins in *Dictyostelium discoideum* during development. *Dev. Biol.* **83**, 127-137.
- Leach, C. K., Ashworth, J. M. and Garrod, D. R. (1973). Cell sorting out during the differentiation of mixtures of metabolically distinct populations of *Dictyostelium discoideum*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **29**, 647-661.

Levi, S., Polyakov, M. and Egelhoff, T. T. (2000). Green fluorescent protein and epitope tag fusion vectors for *Dictyostelium discoideum*. *Plasmid* **44**, 231-238.

Li, S. I. and Purugganan, M. D. (2011). The cooperative amoeba: *Dictyostelium* as a model for social evolution. *Trends Genet.* **27**, 48-54.

Litman, G. W., Cannon, J. P., & Dishaw, L. J. (2005). Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nature Reviews Immunology*, *5*(11), 866.

MacInnes and Francis, D. (1974). Meiosis in *Dictyostelium mucoroides*. *Nature* **251**, 321-324.

Margulis, L. (1971). Whittaker's five kingdoms of organisms: minor revisions suggested by considerations of the origin of mitosis. *Evolution*, *25*(1), 242-245.

Mehdiabadi, N. J., Jack, C. N., Farnham, T. T., Platt, T. G., Kalla, S. E., Shaulsky, G., Queller, D. C. and Strassmann, J. E. (2006). Kin preference in a social microbe. *Nature* **442**, 881-882.

Mehdiabadi, N. J., Kronforst, M. R., Queller, D. C. and Strassmann, J. E. (2009). Phylogeny, reproductive isolation and kin recognition in the social amoeba *Dictyostelium purpureum*. *Evolution*. **63**, 542-548.

Mizutani, A., Hagiwara, H. and Yanagisawa, K. (1990). A killer factor produced by the cellular slime mold *Polysphondylium pallidum*. *Arch. Microbiol.* **153**, 413-416.

Morita, T., Amagai, A. and Maeda, Y. (2004). Translocation of the *Dictyostelium* TRAP1 homologue to mitochondria induces a novel prestarvation response. *J. Cell Sci.* **117**, 5759-5770.

MOTIF Search <https://www.genome.jp/tools/motif/>

Muller-Taubenberger, A. and Bozzaro, S. (2006). Editorial: From cell-cell adhesion and cellular oscillations to spectacular views inside the cell - 50 years of research with *Dictyostelium*. *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 851-858.

Muller, K. and Gerisch, G. (1978). A specific glycoprotein as the target site of adhesion blocking Fab in aggregating *Dictyostelium* cells. *Nature* **274**, 445-449.

Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., & Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, *102*(5), 553-563.

Nanjundiah, V., & Sathe, S. (2011). Social selection and the evolution of cooperative groups: the example of the cellular slime moulds. *Integrative biology*, *3*(4), 329-342.

National Bio Resource Project Nenkin <https://nenkin.nbrp.jp/>

NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>

Nei, M., & Gojobori, T. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular biology and evolution*, *3*(5), 418-426.

Nickerson, A. W. and Raper, K. B. (1973). Macrocysts in the life cycle of the Dictyosteliaceae. I. Formation of the macrocysts. *Am. J. Bot.* **60**, 190-197.

Nickerson, A. W. and Raper, K. B. (1973). Macrocysts in the life cycle of the Dictyosteliaceae. II. Germination of the macrocysts. *Am. J. Bot.* **60**, 247-254.

Noegel, A., Gerisch, G., Stadler, J. and Westphal, M. (1986). Complete sequence and transcript regulation of a cell adhesion protein from aggregating *Dictyostelium* cells. *EMBO J.* **5**, 1473-1476.

- Nydam, M. L., & De Tomaso, T. (2011). Creation and maintenance of variation in allorecognition loci. *Frontiers in immunology*, 2, 79.
- O'Dell, W. D. (1979). Isolation, enumeration and identification of amebae from a Nebraska lake. *J. Protozool.* **26**, 265-269.
- Okegawa, Y., & Motohashi, K. (2015). A simple and ultra-low cost homemade seamless ligation cloning extract (SLiCE) as an alternative to a commercially available seamless DNA cloning kit. *Biochemistry and biophysics reports*, 4, 148-151.
- Ostrowski, E. A., Katoh, M., Shaulsky, G., Queller, D. C. and Strassmann, J. E. (2008). Kin discrimination increases with genetic distance in a social amoeba. *PLoS Biol.* **6**, e287.
- Parikh, A., Miranda, E. R., Katoh-Kurasawa, M., Fuller, D., Rot, G., Zagar, L., Curk, T., Sugang, R., Chen, R., Zupan, B., Loomis, W. F., Kuspa, A. and Shaulsky, G. (2010). Conserved developmental transcriptomes in evolutionarily divergent species. *Genome Biol.* **11**, R35.
- Ponte, E., Bracco, E., Faix, J. and Bozzaro, S. (1998). Detection of subtle phenotypes: The case of the cell adhesion molecule csA in *Dictyostelium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9360-9365.
- Queller, D. C., Ponte, E., Bozzaro, S. and Strassmann, J. E. (2003). Single-gene greenbeard effects in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Science* **299**, 105-106.
- Raper, K. B. (1937). Growth and development of *Dictyostelium discoideum* with different bacterial associates. *J. Agr. Res.* **55**, 289-316.
- Raper, K. B. and Fennell, D. I. (1952). Stalk formation in *Dictyostelium*. *Bull. Torrey Bot. Club* **79**, 25-51.
- Raper, K. B. and Thom, C. (1941). Interspecific mixtures in the Dictyosteliaceae. *Am. J. Bot.* **28**, 69-78.

Romeralo, M., Cavender, J. C., Landolt, J. C., Stephenson, S. L. and Baldauf, S. L. (2011). An expanded phylogeny of social amoebas (Dictyostelia) shows increasing diversity and new morphological patterns. *BMC Evol Biol.* **11**, 84.

Romeralo, M., Skiba, A., Gonzalez-Voyer, A., Schilde, C., Lawal, H., Kedziora, S., Cavender, J. C., Glöckner, G., Urushihara, H. and Schaap, P. (2013). "Analysis of phenotypic evolution in Dictyostelia highlights developmental plasticity as a likely consequence of colonial multicellularity. *Proc Biol Sci* **280**, 20130976.

SACGB <http://sacgb.leibniz-fli.de/cgi/index.pl>

Saga, Y. and Yanagisawa, K. (1982). Macrocyst development in *Dictyostelium discoideum*. I. Induction of synchronous development by giant cells and biochemical analysis. *J. Cell Sci.* **55**, 341-352.

Saga, Y., Okada, H. and Yanagisawa, K. (1983). Macrocyst development in *Dictyostelium discoideum*. II. Mating type-specific cell fusion and acquisition of fusion-competence. *J. Cell Sci.* **60**, 157-168.

Sakaguchi, M., Murakami, H., & Suzaki, T. (2001). Involvement of a 40-kDa glycoprotein in food recognition, prey capture, and induction of phagocytosis in the protozoon *Actinophrys sol*. *Protist*, **152**(1), 33-41.

Santorelli, L. A., Thompson, C. R., Villegas, E., Svetz, J., Dinh, C., Parikh, A., Sucgang, R., Kuspa, A., Strassmann, J. E., Queller, D. C. and Shaulsky, G. (2008). Facultative cheater mutants reveal the genetic complexity of cooperation in social amoebae. *Nature*. **451**, 1107-1110.

Sathe, S., Kaushik, S., Lalremruata, A., Aggarwal, R. K., Cavender, J. C. and Nanjundiah, V. (2010). Genetic heterogeneity in wild isolates of cellular slime mold social groups. *Microb Ecol.* **60**, 137-148.

Sathe, S., Khetan, N. and Nanjundiah, V. (2014). "Interspecies and intraspecies interactions in social amoebae. *J Evol Biol* **27**, 349-62.

Schilde, C., Lawal, H. M., Noegel, A. A., Eichinger, L., Schaap, P. and Glöckner, G. (2016). "A set of genes conserved in sequence and expression traces back the establishment of multicellularity in social amoebae. *BMC Genomics* **17**, 871.

Schilde, C., Skiba, A., & Schaap, P. (2014). Evolutionary reconstruction of pattern formation in 98 Dictyostelium species reveals that cell-type specialization by lateral inhibition is a derived trait. *EvoDevo*, **5**(1), 34.

Schnitzler, G. R., Fischer, W. H. and Firtel, R. A. (1994). Cloning and characterization of the G-box binding factor, an essential component of the developmental switch between early and late development in *Dictyostelium*. *Genes Devel.* **8**, 502-514.

Seike, T., Nakamura, T., & Shimoda, C. (2015). Molecular coevolution of a sex pheromone and its receptor triggers reproductive isolation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201501661.

Sekine, R., Kawata, T., & Muramoto, T. (2018). CRISPR/Cas9 mediated targeting of multiple genes in Dictyostelium. *Scientific reports*, **8**(1), 8471.

Sesaki, H. and Siu, C. H. (1996). Novel redistribution of the Ca²⁺-dependent cell adhesion molecule DdCAD-1 during development of *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.* **177**, 504-516.

Sesaki, H., Wong, E. F. S. and Siu, C. H. (1997). The cell adhesion molecule DdCAD-1 in *Dictyostelium* is targeted to the cell surface by a nonclassical transport pathway involving contractile vacuoles. *J. Cell Biol.* **138**, 939-951.

Shaffer, B. M. (1962). The Acrasina. *Adv. Morphogenesis* **2**, 109-182.

Shimomura, O., Suthers, H. L. B. and Bonner, J. T. (1982). Chemical identity of the acrasin of the cellular slime mold *Polysphondylium violaceum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 7376-7379.

Shin, S. H., Kim, S., Kim, J. Y., Lee, S., Um, Y., Oh, M. K., ... & Yang, K. S. (2012). Complete genome sequence of *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190. *Journal of bacteriology*, *194*(9), 2373-2374.

Siu, C. - H., Cho, A. and Choi, H. C. (1987). The contact site a glycoprotein mediates cell-cell adhesion by homophilic binding in *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.* **105**, 2523-2533.

Siu, C. H., Harris, T. J. C., Wang, J. and Wong, E. (2004). Regulation of cell-cell adhesion during *Dictyostelium* development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 633-641.

Siu, C. H., Sriskanthadevan, S., Wang, J., Hou, L., Chen, G., Xu, X., Thomson, A. and Yang, C. (2011). Regulation of spatiotemporal expression of cell-cell adhesion molecules during development of *Dictyostelium discoideum*. *Dev Growth Differ.* **53**, 518-527.

Sriskanthadevan, S., Lee, T., Lin, Z., Yang, D. and Siu, C. H. (2009). Cell adhesion molecule DdCAD-1 is imported into contractile vacuoles by membrane invagination in a Ca²⁺- and conformation-dependent manner. *J Biol Chem.* **284**, 36377-36386.

Sriskanthadevan, S., Zhu, Y., Manoharan, K., Yang, C. and Siu, C. H. (2011). The cell adhesion molecule DdCAD-1 regulates morphogenesis through differential spatiotemporal expression in *Dictyostelium discoideum*. *Development.* **138**, 2487-2497.

Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, *30*(9), 1312-1313.

Stephenson, S. L. and Landolt, J. C. (1992). Vertebrates as vectors of cellular slime molds in temperate forests. *Mycol. Res.* **96**, 670-672.

Stephenson, S. L., Slay, M. E., Slay, C. A., and Tuggle, A. E. (2007). Cave crickets (orthoptera: rhaphidophoridae) as vectors of dictyostelids (protista: dictyosteliida). *Entomological News*. 118(3), 292-295.

Strassmann, J. E. and Queller, D. C. (2011). Evolution of cooperation and control of cheating in a social microbe. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **108**, 10855-10862.

Strassmann, J. E., Zhu, Y. and Queller, D. C. (2000). Altruism and social cheating in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **408**, 965-967.

Sucgang, R., Kuo, A., Tian, X., Salerno, W., Parikh, A., Feasley, C. L., Dalin, E., Tu, H., Huang, E., Barry, K., Lindquist, E., Shapiro, H., Bruce, D., Schmutz, J., Salamov, A., Fey, P., Gaudet, P., Anjard, C., Babu, M. M., Basu, S., Bushmanova, Y., van der Wel, H. and et al (2011). Comparative genomics of the social amoebae *Dictyostelium discoideum* and *Dictyostelium purpureum*. *Genome Biol*. **12**, R20.

Sukumaran, S., Brown, J. M., Firtel, R. A. and McNally, J. G. (1998). lagC-null and gbf-null cells define key steps in the morphogenesis of *Dictyostelium* mounds. *Dev. Biol*. **200**, 16-26.

Suthers, H. B. (1985). Ground-feeding migratory songbirds as cellular slime mold distribution vectors. *Oecologia* **65**, 526-530.

Swanson, A. R., Vadell, EM and Cavender, J. C. (1999). Global distribution of forest soil dictyostelids. *J. Biogeography* **26**, 133-148.

Takaya, Y., Hotta, R., Fujiwara, K., Otani, R., Uchiyama, Y., Sakakibara, M., Fukuda, E., Niwa, M., Inouye, K. and Oohata, A. A. (2014). "Alkylbenzoquinone involved in development of cellular slime molds. *Org Lett* **16**, 3660-3.

Takuno, S., Fujimoto, R., Sugimura, T., Sato, K., Okamoto, S., Zhang, S. L., & Nishio, T. (2007). Effects of recombination on the hitchhiking diversity in Brassica self-incompatibility locus complex. *Genetics*.

- Thompson, C. R. L. and Kay, R. R. (2000). The role of DIF-1 signaling in *Dictyostelium* development. *Mol. Cell* **6**, 1509-1514.
- Tsujioka, M., Machesky, L. M., Cole, S. L., Yahata, K. and Inouye, K. (1999). A unique talin homologue with a villin headpiece-like domain is required for multicellular morphogenesis in *Dictyostelium*. *Curr. Biol.* **9**, 389-392.
- Tsujioka, M., Yoshida, K. and Inouye, K. (2004). Talin B is required for force transmission in morphogenesis of *Dictyostelium*. *Embo J.* **23**, 2216-2225.
- Tsujioka, M., Yoshida, K., Nagasaki, A., Yonemura, S., Müller-Taubenberger, A. and Uyeda, T. Q. (2008). Overlapping functions of the two talin homologues in *Dictyostelium*. *Eukaryot Cell* **7**, 906-916.
- Uchikawa, T., Yamamoto, A. and Inouye, K. (2011). Origin and function of the stalk-cell vacuole in *Dictyostelium*. *Dev Biol.* **352**, 48-57.
- Uchinomiya, K. and Iwasa, Y. (2013). "Evolution of stalk/spore ratio in a social amoeba: cell-to-cell interaction via a signaling chemical shaped by cheating risk. *J Theor Biol* **336**, 110-8.
- Umeda, T. and Inouye, K. (1999). Theoretical model for morphogenesis and cell sorting in *Dictyostelium discoideum*. *Physica D* **126**, 189-200.
- van Es, S., Hodgkinson, S., Schaap, P., & Kay, R. R. (1995). Metabolic pathways for differentiation-inducing factor-1 and their regulation are conserved between closely related *Dictyostelium* species, but not between distant members of the family. *Differentiation*, **58**(2), 95-100.
- van Haastert, P. J. M., de Wit, R. J. W., Grijpma, Y. and Konijn, T. M. (1982). Identification of a pterin as the acrasin of the cellular slime mold *Dictyostelium lacteum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6270-6274.

- Waddell, D. R. (1982). A predatory slime mould. *Nature* **298**, 464-466.
- Wallace, M. A., & Raper, K. B. (1979). Genetic exchanges in the macrocysts of *Dictyostelium discoideum*. *Microbiology*, *113*(2), 327-337.
- Wang, J., Hou, L. S., Awrey, D., Loomis, W. F., Firtel, R. A. and Siu, C. H. (2000). The membrane glycoprotein gp150 is encoded by the *lagC* gene and mediates cell-cell adhesion by heterophilic binding during *Dictyostelium* development. *Dev. Biol.* **227**, 734-745.
- Wang, Y., & Shaulsky, G. (2015). *TgrC1* has distinct functions in *Dictyostelium* development and allorecognition. *PLoS One*, *10*(4), e0124270.
- Watts, D. J. and Ashworth, J. M. (1970). Growth of myxamoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. J.* **119**, 171-174.
- West, S. A., & Buckling, A. (2003). Cooperation, virulence and siderophore production in bacterial parasites. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *270*(1510), 37-44.
- Whittaker, R. H. (1969). New concepts of kingdoms of organisms. *Science*, *163*(3863), 150-160.
- Wong, E. F. S., Brar, S. K., Sesaki, H., Yang, C. Z. and Siu, C. H. (1996). Molecular cloning and characterization of DdCAD-1, a Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion molecule, in *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **271**, 16399-16408.
- Wong, E., Yang, C. Z., Wang, J., Fuller, D., Loomis, W. F. and Siu, C. H. (2002). Disruption of the gene encoding the cell adhesion molecule DdCAD-1 leads to aberrant cell sorting and cell-type proportioning during *Dictyostelium* development. *Development* **129**, 3839-3850.
- Wong, L. M. and Siu, C. - H. (1986). Cloning of cDNA for the contact site A glycoprotein of *Dictostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4248-4252.

Yang, C. Z., Brar, S. K., Desbarats, L. and Siu, C. H. (1997). Synthesis of the Ca^{2+} -dependent cell adhesion molecule DdCAD-1 is regulated by multiple factors during *Dictyostelium* development. *Differentiation* **61**, 275-284.

Yoshida-Noro, C., Suzuki, N., & Takeichi, M. (1984). Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. *Developmental biology*, *101*(1), 19-27.

Yoshida, C., & Takeichi, M. (1982). Teratocarcinoma cell adhesion: identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. *Cell*, *28*(2), 217-224.

Yoshida, M., Sakuragi, N., Kondo, K. and Tanesaka, E. (2006). Cleavage with phospholipase of the lipid anchor in the cell adhesion molecule, csA, from *Dictyostelium discoideum*. *Compar Biochem. Physiol. B* **143**, 138-144.

Zahavi, A, Harris, K. D. and Nanjundiah, V. (2018). An individual-level selection model for the apparent altruism exhibited by cellular slime moulds. *J Biosci.* *43*, 49-58.

Zerbino, D. R., McEwen, G. K., Margulies, E. H., & Birney, E. (2009). Pebble and rock band: heuristic resolution of repeats and scaffolding in the velvet short-read de novo assembler. *PloS one*, *4*(12), e8407.

Zerbino, D., & Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome research*, gr-074492.

洲崎敏伸 編 (2014) 原生生物フロンティア, DOJIN BIOSCIENCE SERIES 化学同人

早川 (芝野) 郁美 (2012) 修士論文

謝辞

本研究は学術振興会 DC1 の支援を受け、実施されました。本研究で示したデータのうち、*D. purpureum* の有性生殖型に関する実験、株間の *tgr* 遺伝子配列比較、Group 1-3 の混合実験の一部には井上敬博士の実験結果が含まれています。また、*D. discoideum* のアメーバ、移動体、子実体の写真もご提供いただきました。山口優輔さまには Group 3 種の混合実験に関する情報をご提供いただきました。桑山秀一 筑波大学准教授には *D. polycephalum* 1JNd1 株のゲノム配列を、Dundee 大学 Pauline Schaap 教授には *D. polycarpum* Ohio、*D. deminutivum* M19A、*D. polycephalum* MY1 - 1 および *Acytostelium ellipticum* AE2 のゲノム配列をそれぞれご提供いただきました。早川卓志 霊長類研究所助教には、次世代シーケンサーの配列解析に関するアドバイスを多くいただきました。みなさま心より感謝申し上げます。

本研究は、ほんとうにたくさんの方々を支えられ、進めることができました。この場をおかりし、改めまして心よりお礼申し上げます。

なにをおきましても井上敬博士には、院試のオープンキャンパスではじめて細胞性粘菌を見せていただいた時より、長きにわたって粘菌の魅力や研究に関することはもちろん、生活上有用な様々な知識までを数多く伝授していただきました。いつお会いしても話題がつきず、精神的にも非常に助けていただいていた。ありがとうございます。同時期に研究室におられた大畠明子博士、吉田邦人博士、内川徹博士、橋村秀典さま、荻田豪士さま、山口優輔さま、ならびに学会・同窓会等でお会いする細胞性粘菌グループ出身の方々には、具体的な実験のアドバイスに加え、折に触れ進捗を気にかけていただき、大いに励みとなりました。ありがとうございます。

小山時隆准教授ならびに伊藤照悟助教をはじめ、ご卒業・ご移動された方々を含めて形態統御学研究室のみなさまには、プライマー設計やクローニングのコツなど分子生物学の初歩的な実験を教えていただいただけでなく、研究内容

に関しても常に的確で有用なアドバイスを下さいまして心より感謝しております。院生時代をこのような恵まれた環境で過ごさせていただいたことを非常にありがたく感じております。

共通機器を使わせていただく際などには、植物学教室のみなさまに大変お世話になりました。いつも温かくお声をおかけくださいましてありがとうございます。嶋田知生講師にはリアルタイム PCR に関して、望月伸悦助教にはシーケンサーに関して助言をいただき、大変感謝しております。

市川正敏講師をはじめ時空間秩序・生命物理研究室のみなさまには、特に行き先を模索していた際に快く受け入れてくださり、この上なくありがたい環境で研究をさせていただきました。心より感謝申し上げます。西上幸範 現北海道大学助教には機器の使い方や実験手法を教えていただいただけでなく、なにとともに体力が重要、という人生の真理かと思われる姿勢を常に体現されており、現在でもありがたくお手本にさせていただいています（精進します）。研究室でなされている、物理の視点から生物を見るという研究内容も非常に面白く、大変有意義な時間を過ごさせていただきました。各々が自由に研究されていながらもまとまりが感じられる皆様を見ているうち、なるほどこれがアクティブマターか、と誠に勝手な印象を持っていました。ほんとうにありがとうございます。

また、研究に関すること以外にも、京都市立養正保育所の保育士のみなさま、ならびにママ友のみなさまに大変助けていただきました。ただ「子供の年が同じ」という幸運でこのような素晴らしい人々に出会うことができ、こころより感謝しております。子育てに関しても、お仕事に関しても尊敬するたくさんの方々との交流に支えられ、毎日を過ごすことができました。

親族のみなさま、家族のみなさまにも実務的、精神的、両側面からの支援をいただき、心より感謝しております。早川昌志さまには常日頃から様々なサイエンスに関するディスカッションをいただき、各分野への造詣の深さに感嘆するとともに有意義な刺激となっております。実験や執筆で帰りが遅い際には家庭のことを様々サポートしていただきまして、本当にありがとうございます。

早川朝陽さまには幼少のころより「ねんきん」や「アメーバ」を覚えていただき、また見過ごしてしまうような小さな季節変化や感情の機微を的確な日本語を駆使して知らせていただき、日々感謝しております。母親になったことで初めてわかった（ような気になった）ことがたくさんありました。いつもありがとうございます。

最後になりましたが、様々な実験に付き合っていただいた細胞性粘菌のみなさまにも感謝の意を表したいと思います。「この辺が潮時か」と思われるたびになぜかクリアな結果を垣間見せてくださるみなさまは、確かに病原性はなくとも中毒性のある、油断ならない方々であります。

研究ができること、学問ができること、さらには寝る場所があり、食べ物があることまで、毎日を支えてくれるすべてのことに感謝していますが、ひとつひとつを挙げるとそれだけで紙面が埋まってしまいますので、これをもって学位論文の括りとさせていただきます。ほんとうに、ありがとうございました。

2018 年 12 月

早川（芝野）郁美

表1-1 実験に使用した *D. purpureum* 野外株の一覧

	strain	m-type ^(a)	site ^(b)	coordinates	distance ^(c)	date	by ^(d)	source ^(e)
1	P1Ba	A	Shiga	35°11'18" N 135°51'59" E	-	4 Nov, 2006	KI	*
2	P4Aa	B	Shiga	35°14'02" N 135°54'18" E	6.2	4 Nov, 2006	KI	*
3	O1Ba	C	Kyoto	35°03'40" N 135°49'02" E	14.8	22 Oct, 2006	KI	*
4	1L5Aa	A	Wakayama	~34°14'00" N 135°40'30" E	107.4	30 Apr, 2012	TU	*
5	G4A5	C	Nara	34°31'11" N 136°09'48" E	73.8	22 Oct, 2005	KI	*
6	E1M2	B	Kyoto	35°01'08" N 135°49'20" E	19.2	23 Sep, 2005	KI	*
7	2D2Ba	D	Yamagata	38°04'20" N 139°43'55" E	471.0	12 Oct, 2014	KI	*
8	K1BC	B		unknown				lab stock
9	TNS-C-7	A	Tokyo	~35°37'40" N 139°15'00" E	311.1	Aug, 1970	HH	NBRP
10	NYA2	E	Nagano	36°52'05" N 137°58'21" E	266.0	2004	HH	NBRP
11	DP5	F	Miyagi	38°14'30" N 140°52'01" E	560.6	unknown	TS	NBRP
12	AKG-F1	C	Gunma	~36°33'00" N 139°10'00" E	334.1	unknown	YK	NBRP

(a) 有性生殖型。2株ずつを組み合わせた有性生殖実験に基づく（表1-2）。

(b) 採取した場所（県）。すべて日本の本州の森林土壌から採取した（DP5だけは都会の公園から採取した）。

(c) P1Baを採取した場所からの距離（km）。

(d) K. Inouye, T. Urai, H. Hagiwara, T. Suzuki *et al.*, Y. Kubohara.

(e) *：本研究、NBRP：National BioResource Project Nenkin, Japan.

表1-2 有性生殖実験の結果

1	2	3	4	5	6	7	8		strain
-	+	+	-	+	++	+	+	1	P1Ba
		-	+	++	+	-	+	2	P4Aa
			-	++	-	+	++	3	O1Ba
				-	++	++	+	4	1L5Aa
					-	+	+	5	G4A5
						-	+	6	E1M2
							-	7	2D2Ba
								8	K1BC

1	2	3	5	7	9	10	11	12		strain
-	++	++	++	+++	-	++	+	+	1	P1Ba
		-	++	+++	+++	+	+++	+++	2	P4Aa
			-	-	+++	+	++	++	3	O1Ba
				-	+++	+	+	-	5	G4A5
					-	+	+++	+	7	2D2Ba
						-	+++	+	9	TNS-C-7
							-	++	10	NYA2
								-	11	DP5
									12	AKG-F1

プレシスト（マクロシストの前駆体）の形成を2種のアメーバの混合から7日後と1ヶ月後に計測した。

- : シストなし

+ ~ +++: プレシスト形成の程度を+の数で表す

結果は12株が同じ有性生殖グループに属し、6つの有性生殖型があることを示す。A(P1Ba, 1L5Aa, TNS-C-7), B(P1Aa, E1M2, K1BC), C(O1Ba, G4A5, AKG-F1), D(2D2Ba), E(NYA2), F(DP5)

表2-1 各種の細胞性粘菌におけるtgrB-type/tgrC-typeペアの数

clade	species	strain	Number of potential tgrB/C pairs
Group 4	<i>D. purpureum</i>	P1Ba	3
	<i>D. purpureum</i>	QSAX1	4
	<i>D. rosarium</i>	WS689	3
	<i>D. citrinum</i>	OH494	1
	<i>D. discoideum</i>	AX4	5
	<i>D. intermedium</i>	PJ-11	2
	<i>D. firmibasis</i>	TNS-C-0014	5
violaceum	<i>P. violaceum</i>	QSVi11	0
Group 3	<i>D. lacteum</i>		0
	<i>D. caveatum</i>	B4-3	0
polycephalum	<i>D. polycephalum</i>	MY1-1	0
	<i>D. polycephalum</i>	1JNd1	0
Group 2B	<i>P. pallidum</i>	PN500	0
	<i>A. ellipticum</i>	AE2	0
Group2A	<i>A. subglobosum</i>	LB-1	0
polycarpum	<i>D. polycarpum</i>	Ohio	0
Group 1	<i>D. fasciculatum</i>	SH3	0
	<i>D. deminutivum</i>	M19A	0

各種の細胞性粘菌の染色体 (contig) において、*D. discoideum* の TgrB1 および TgrC1 と evalue 1e-10 の閾値でホモロジーを示す遺伝子を tgrB-type 遺伝子、tgrC-type 遺伝子と呼ぶこととし、tgrB-type 遺伝子と tgrC-type 遺伝子のそれぞれが内側から外側にコードされ、1.5 kb 以内の間隔で並ぶものをカウントした。数値は偽遺伝子を含む。Group 4 以外の種については、より基準を緩めた tblastn 検索であっても (e-value 閾値: 10、遺伝子間の間隔: 5 kb 以内)、tgrB-type/tgrC-type pair と呼べるものはなかった (表2-2B)。

表2-2 細胞性粘菌 各種の *tgr* 遺伝子ペア

A. evalue 1e-10 以下、2 配列の間隔 1.5 kbp 以内

species	query	score	evalue	coord	dir	dist	dir	coord	query	score	evalue	contig	gene pair
Dpur_P	tgrC1	90.8	3e-19	18760	L	1604	R	20365	tgrB1	116	1e-27	4P1Ba_11238	Dp-tgr11238B/C
	tgrB1	112	2e-26	20987	L	788	R	21776	tgrC1	102	4e-23	4P1Ba_11392	Dp-tgr11392B/C
	tgrB1	85.7	1e-17	05792	L	924	R	06717	tgrC1	110	1e-25	4P1Ba_2752	Dp-tgr2752B/C
Dpur_Q	tgrC1	92.2	9e-20	083476	L	1164	R	084641	tgrB1	118	4e-28	DPU0000046	DPU_G0069294/69296
	tgrC1	103	2e-23	050591	L	1087	R	051679	tgrB1	105	7e-24	DPU0000244	DPU_G0058046/58048
	tgrB1	115	4e-27	010752	L	1522	R	012275	tgrC1	86.3	6e-18	DPU0000421	DPU_G0065764/65762
	tgrC1	98.8	7e-22	010416	L	1173	R	011590	tgrB1	109	4e-25	DPU0000535	DPU_G0069194/69196
Dros	tgrC1	224	1e-64	080808	L	1594	R	082403	tgrB1	225	5e-65	Dr_08114	
	tgrC1	199	4e-56	086529	L	883	R	087413	tgrB1	188	1e-57	Dr_08114	
	tgrB1	151	3e-39	191949	L	1311	R	193261	tgrC1	71.7	4e-13	Dr_10967	
Dcit	tgrB1	841	0.0	07970	L	*	R	09956	tgrC1	187	5e-52	Dcit_00189	
Ddis	tgrB1	707	0.0	0647143	L	785	R	0647929	tgrC1	607	0.0	DDB0232429	tgrJ1/K1
	tgrB1	54.5	9e-71	0659362	L	262	R	0659625	tgrC1	367	6e-115	DDB0232429	ps
	tgrB1	80.9	1e-34	3610631	L	566	R	3611198	tgrB1	166	1e-66	DDB0232430	ps
	tgrC1	1192	0.0	3633266	L	723	R	3633990	tgrB1	449	0.0	DDB0232430	tgrC1/B1
	tgrB1	782	0.0	4985040	L	826	R	4985867	tgrC1	643	0.0	DDB0232431	tgrE1/D1
Dint	tgrB1	127	1e-171	03645	L	664	R	04310	tgrC1	387	5e-151	Dint_5408	
	tgrB1	24.8	8e-14	02138	L	506	R	02645	tgrC1	411	2e-143	Dint_6476	
Dfir	tgrC1	68.2	5e-12	002126	L	454	R	002581	tgrC1	81.5	2e-16	Dfir_3129	
	tgrC1	149	1e-38	039847	L	20	R	039868	tgrC1	127	3e-31	Dfir_3133	
	tgrC1	77.7	4e-15	041772	L	656	R	042429	tgrB1	405	1e-128	Dfir_3133	
	tgrC1	596	0.0	057882	L	638	R	058521	tgrB1	601	0.0	Dfir_3161	
	tgrB1	90.5	3e-19	273304	L	1201	R	274506	tgrC1	100	1e-22	Dfir_3277	
Pvio													
Dlac													
Dcav													
Dpol-1													
Dpol-M													
Ppal													
Aell													
Asub													
Dpcp													
Dfas													
Ddem													

B. evalue 10 以下、2 配列の間隔 5 kbp 以内

species	query	score	evalue	coord	dir	dist	dir	coord	query	score	evalue	contig
Dpur-P		3										
Dpur-Q		6										
Dros		7										
Dcit		3	(number of matches)									
Ddis		17										
Dint		5										
Dfir		15										
Pvio	tgrA4	63.7	2e-10	020332	L	1005	R	021338	tgrA2	43.8	3e-04	Pvio_0102
	tgrD1	32.2	1.1	008017	L	4323	R	012341	tgrM2	31.9	1.4	Pvio_0476
	tgrB1	31.0	2.5	008827	L	2891	R	011719	tgrM1	43.2	3e-04	Pvio_0593
Dlac	tgrE1	44.7	1e-04	0645208	L	1983	R	0647192	tgrG1	29.5	8.8	GAOABQK02H81I9
	tgr04	35.5	0.12	0677324	L	4437	R	0681762	tgrM1	34.3	0.22	GAOABQK02J0CCH
Dcav	tgrF1	40.8	0.003	015343	L	3401	R	018745	tgrF1	58.1	1e-08	Dc_01851
Dpol-1												
Dpol-M	tgrN1	32.8	1.6	023076	L	719	R	023796	tgrM1	32.2	1.9	Dpol2_281
Ppal	tgrQ1	29.5	6.6	1024108	L	3175	R	1027284	tgrQ1	28.9	9.8	PpalA1359422
	tgrQ1	28.9	9.7	1056253	L	3321	R	1059575	tgrM2	30.4	5.2	PpalA1359422
Aell	tgrC4	31.6	4.6	022678	L	3236	R	025915	tgrD1	32.2	3.1	Aell_84
Asub	tgrC4	30.7	4.5	1586224	L	4484	R	1590709	tgrK1	31.6	2.3	DF837575
Dpcp	tgrC5	34.9	0.44	012783	L	1454	R	014238	tgrM1	45.3	2e-04	Dpcp_782
Dfas	tgrR2	36.4	0.062	1497866	L	3812	R	1501679	tgrD1	30.4	5.1	DFA1435654
Ddem	tgrG1	32.8	1.5	019904	L	4894	R	024799	tgrM1	35.2	0.22	Ddem_408

表2-2 細胞性粘菌 各種の *tgr* 遺伝子ペアの数

D. discoideum *tgr* 遺伝子を query として、各種の細胞性粘菌のゲノム配列に対して tblastn をおこない、潜在的な *tgr* 遺伝子ペアを検索した。Blast+を使用し、gapopen は 9 に設定した。

headerの “coord” はコンティグに対するアライメントの開始位置 (sstart)、“dir” はコーディング配列の方向 “distance” はアラインされた2つの遺伝子の 5′末端の間隔である (sstart2-sstart1-1)。アスタリスクは、コンティグ上に配列のギャップがあり、2 遺伝子間の距離が正確に決定できないことを示す。

A. TgrB1, TgrC1 を query として、E-value を $1e-10$ 以下とした結果。遺伝子名、もしくは遺伝子番号が割り振られている配列は、それらを記載する (psは偽遺伝子)。2 遺伝子間の距離は “distance” から query配列の上流領域 (アラインされなかった部分) を引くことで見積もられ ($sstart2 - sstart1 - 1 - 3(qstart2 + qstart1 - 2)$)、ほとんどが 1 kbp 以下である。*D. purpureum* QSAX1 のゲノム内で *Dp-tgr2752B* と *Dp-tgr2752C* のオーソログである可能性が最も高いのはそれぞれ DPU_G0058048 と DPU_G0058046 である。

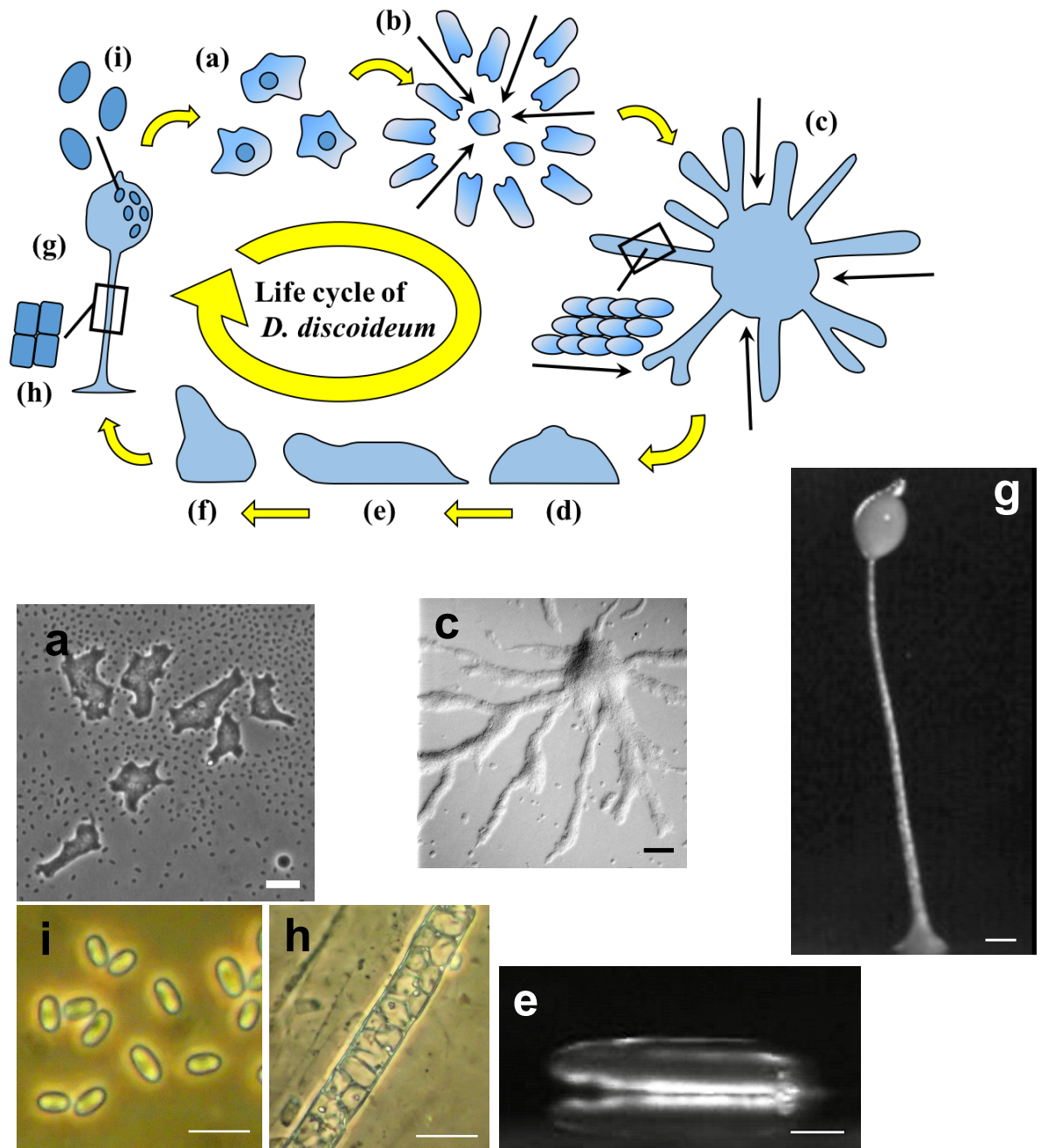
B. *D. discoideum* の全 Tgr 配列を query として、E-value を10以下とした結果。Group 4については、*tgr*遺伝子ペアの数だけを示す (Aの結果を含んでいる)。他のクレードの種については、個別に結果を記載するが、*tgrB*-typeと*tgrC*-typeの組み合わせで構成されたペアはなかった。

本来ペアである遺伝子が、別のコンティグ上に乗っている可能性を考慮して、コンティグの端に内向きの配列があるかどうかを確認したが、*tgrB*-type, *tgrC*-type とともに、どのゲノムにもそのような配列はなかった。
(次頁へ続く)

表2-2 細胞性粘菌 各種の *tgr* 遺伝子ペアの数 (つづき)

各種名はそれぞれ4文字の略語で示す。Dpur-P = *Dictyostelium purpureum* P1Ba, Dpur-Q = *D. purpureum* QSAX1, Dros = *D. rosarium* WS689, Dcit = *D. citrinum* OH494, Ddis = *D. discoideum* AX4, Dint = *D. intermediu* PJ-11, Dfir = *D. firmibasis* TNS-C-0014, Pvio = *P. violaceum* QSvill, Dlac = *D. lacteum*, Dcav = *D. caveatum* B4-3, Dpol-1 = *D. polycephalum* 1JNd1, Dpol-M = *D. polycephalum* MY1-1, Ppal = *P. pallidum* PN500, Aell = *A. ellipticum* AE2, Asub = *A. subglobosum* LB-1, Dpcp = *D. polycarpum* Ohio, Dfas = *D. fasciculatum* SH3, Ddem = *D. deminutivum* M19A. *P. pallidum* PN500 は *P. album* の同物異名.

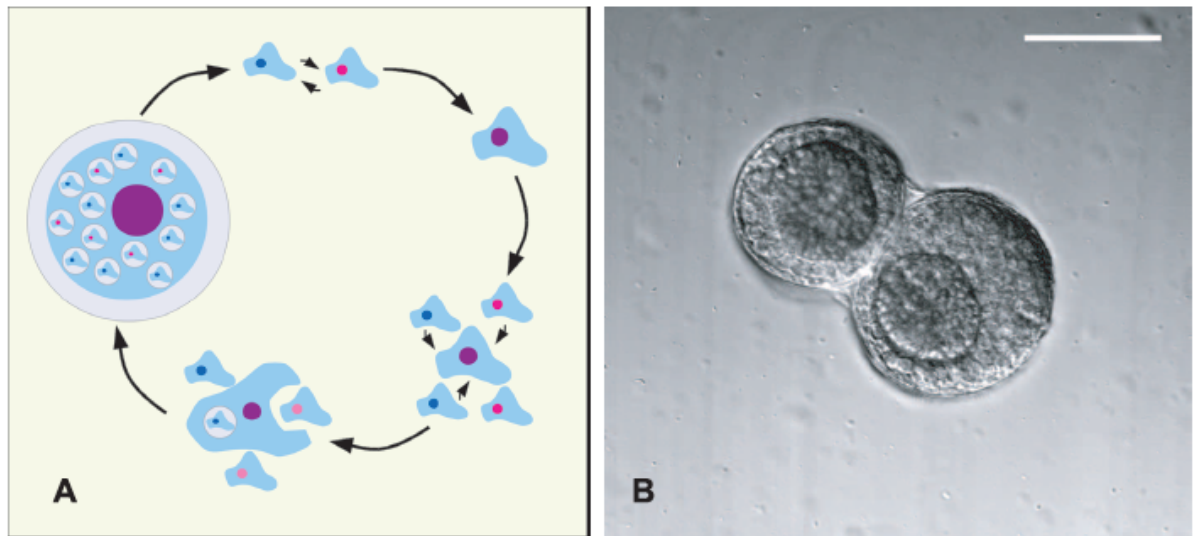
配列情報; Dpur-P, Dros, Dcav は本研究および、著者の未発表データ。Ddis, Dpur-Q は dictyBase (<http://dictybase.org/>) より, Dcit, Dint, Dfir, Pvio, Asub は NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/) より, Dlac, Ppal, Dfas は SACGB (<http://sacgb.fli-leibniz.de/cgi/index.pl>) より。Dpol-M, Aell, Dpcp, Ddem は P. Schaap (University of Dundee), Dpol-1 は桑山秀一准教授 (筑波大学) から、それぞれご提供いただいた。



図In-1

細胞性粘菌 *D. discoideum* (キイロタマホリカビ) の生活環（無性生殖環）。飢餓状態になってから約24時間で子実体になる。(a) 増殖期のアメーバ。周囲の粒々は餌となるバクテリア。bar: 10 μm (b) 集合期のアメーバ。(c) 集合中の細胞塊。bar: 0.1 mm (d) マウンド。(e) 移動体。bar: 0.2 mm (f) 子実体形成期。(g) 子実体。先端の胞子塊と、それを支える柄からなる。bar: 0.1 mm (h) 柄細胞。bar: 20 μm (i) 胞子。bar: 10 μm

(a, g, e の画像は井上博士より提供)



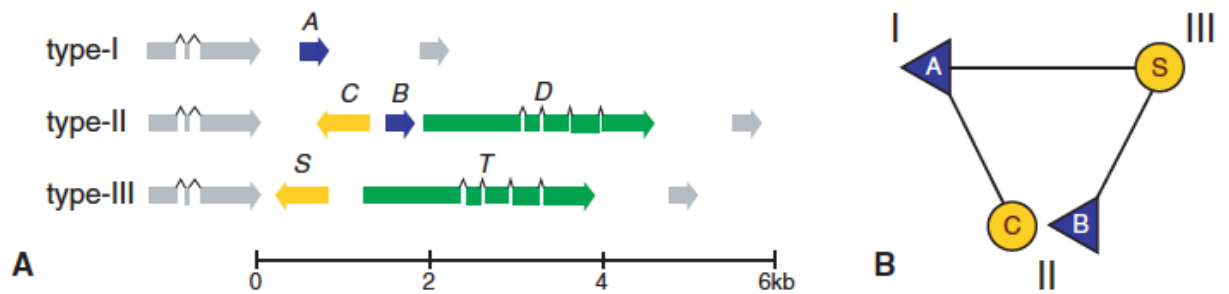
(Bloomfield et al. 2010)

図In-2

*D. discoideum*の有性生殖。

A 異なる有性生殖型（性別）をもつアメーバ細胞が融合し、核融合を経て二倍体接合体（巨細胞、右上）が生じる。接合体はcAMPを分泌して周囲に残る一倍体細胞（右下）を引きつけ、貪食し（下）、最終的にマクロシストが形成される（左）。適切な環境下でマクロシストは発芽し、数十から数百の次世代細胞を放出する。

B *D. discoideum* AC4株の初期のマクロシスト（プレシスト）。この画像では、成熟途中の2つのマクロシストがひとつの外壁に包まれている。各マクロシストにおいて、巨細胞は中心の暗く大きい細胞であり、この後周囲の一倍体アメーバをゆっくりと消化していく。Scale bar: 50 μm 。



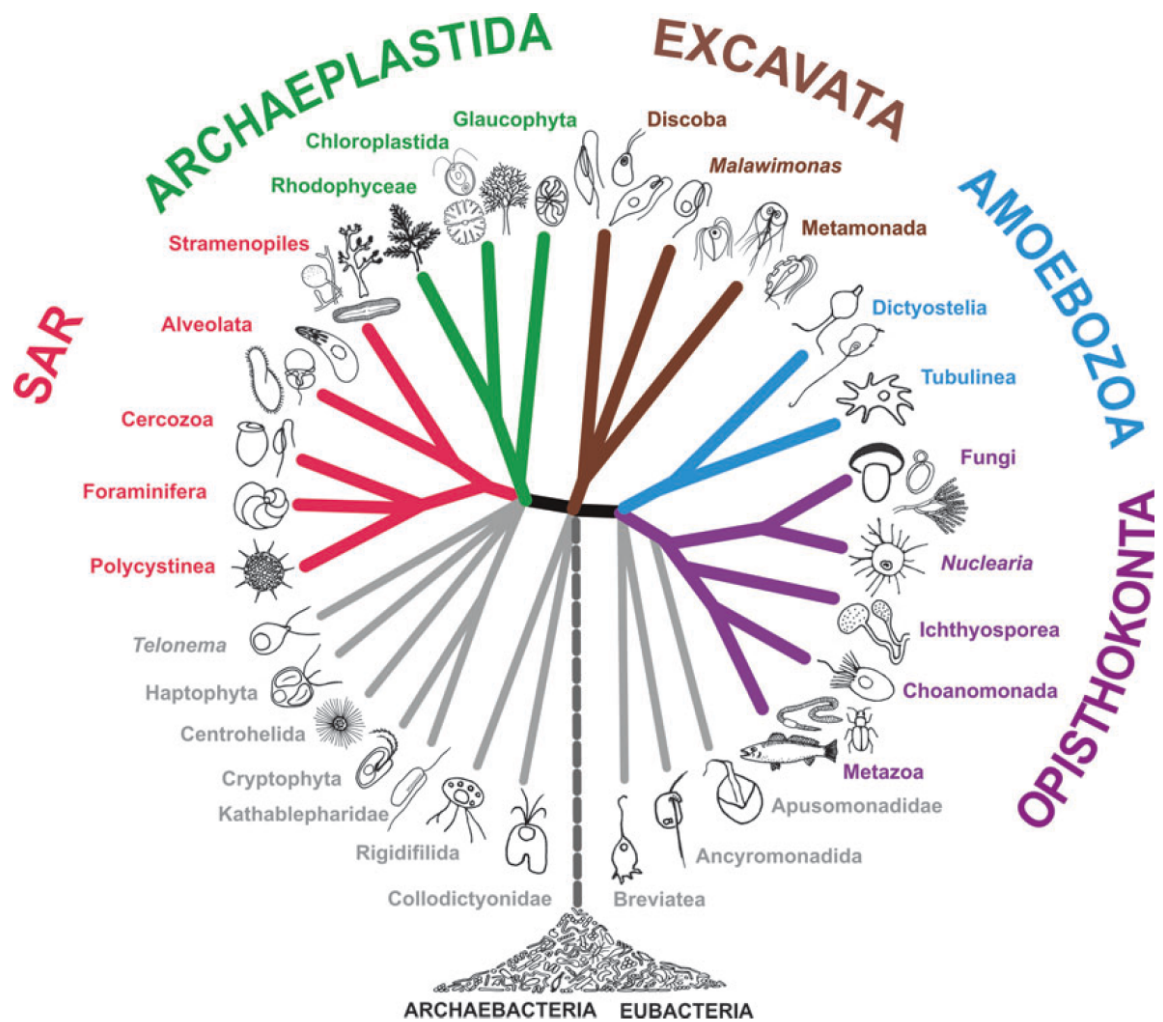
(Bloomfield et al. 2010)

図In-3

D. discoideum の *mat* 遺伝子座の構造

A 交配型Iは、*matA*（青色矢印A、DDB_G0289165）を持つ。交配型IIは *matA* に相同な *matB*（青色、B）を持ち、加えて *matC*（黄色、C）および *matD*（緑色、D）を持つ。交配型IIIは、*matS* および *matT*（相同性に 従って黄色および緑色の矢印で示す）を持つ。これらの遺伝子座は、交 配型によらず第5染色体上の遺伝子 DDB_G0289171 と DDB_G0289163 （どちらも灰色矢印で示す）との間に位置する。

B 交配ができるかどうかは、2つの配偶子によって *matA* タイプの遺伝 子（青い三角）と *matS* タイプの遺伝子（黄色の円）が揃うかどうかで 決められる。交配型IIの細胞は、各クラスの遺伝子を含み、交配型Iお よびIIIの両方と交配できる。しかし、*matB* と *matC* を持つ交配型IIが、 なぜ自家不和合なのかは不明である。

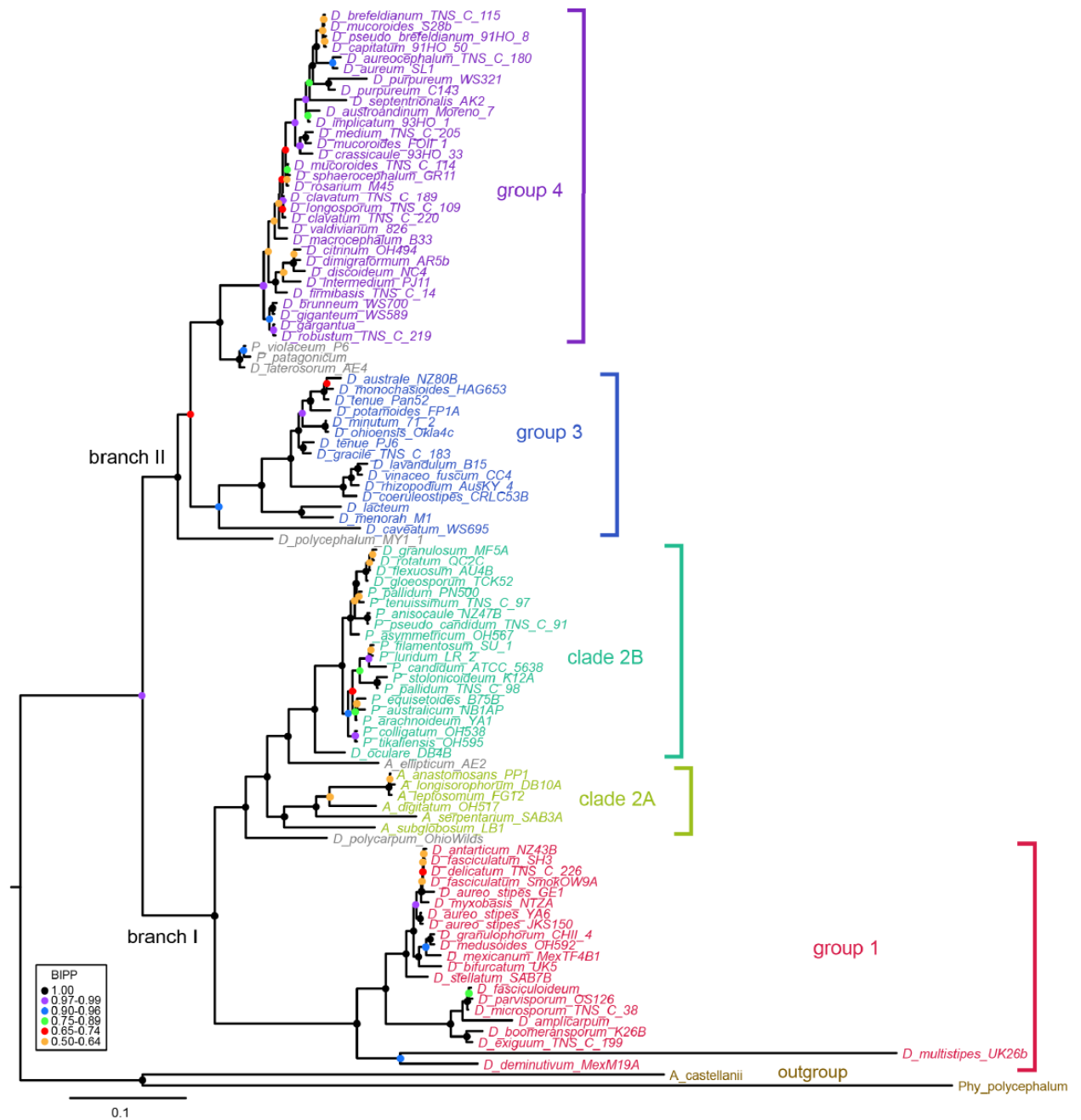


(Adl et al. 2012)

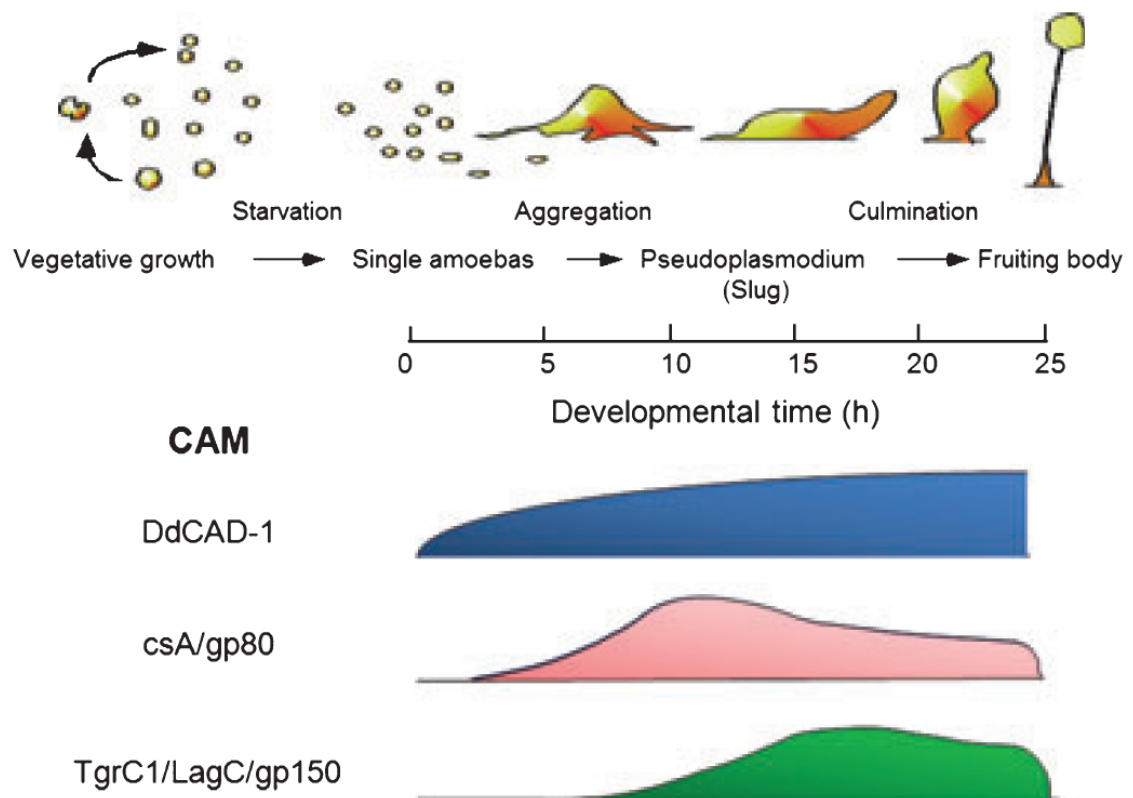
図In-4

真核生物の系統分類。

細胞性粘菌は Amoebozoa の Dictyostelia に位置する。



図In-5
細胞性粘菌の系統樹 (Romeralo et al. 2013)

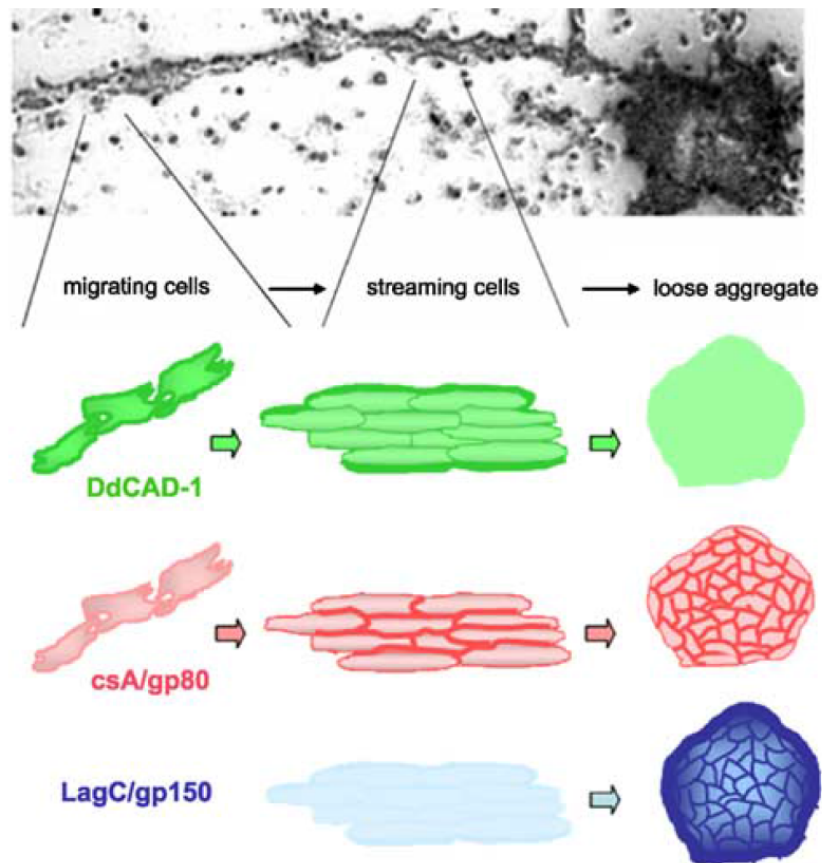


(Siu et al. 2011)

図In-6 A

細胞性粘菌の接着因子

細胞性粘菌は飢餓状態になってからの経過時間によって異なる細胞接着因子を発現する。DdCAD-1は飢餓状態になった直後から、CsAは飢餓後4～5時間後から、TgrC1はマウンド期あたりからそれぞれ発現する。



(Siu et al. 2004)

図In-6 B

細胞性粘菌における接着因子の空間的発現パターン。

DdCAD-1はストリームの外縁、CsAはストリームやマウンドの内部、TgrC1はマウンドの外縁でそれぞれ発現が強い。

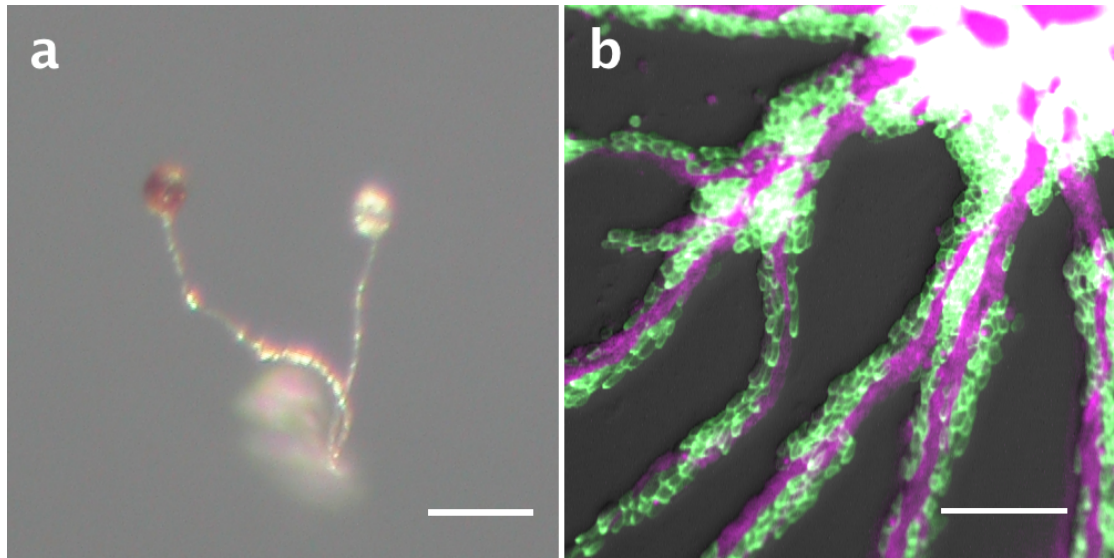


図1-1

a, 根元を共有する *D. discoideum* (薄い黄色の胞子塊) と *D. purpureum* (紫の胞子塊) の子実体。

b, GFPを発現する *D. discoideum* 細胞 (green) と、rodamine で標識した *D. purpureum* 細胞 (magenta) の集合中のストリーム。各細胞は 1: 1 の割合で混合し、10°Cで24時間発生させた。低い温度でゆっくり発生させることによって、2種の発生が同調的になる。この画像では、細胞は右上の集合中心に向かって細胞が進行している。Scale bar: 100 μm

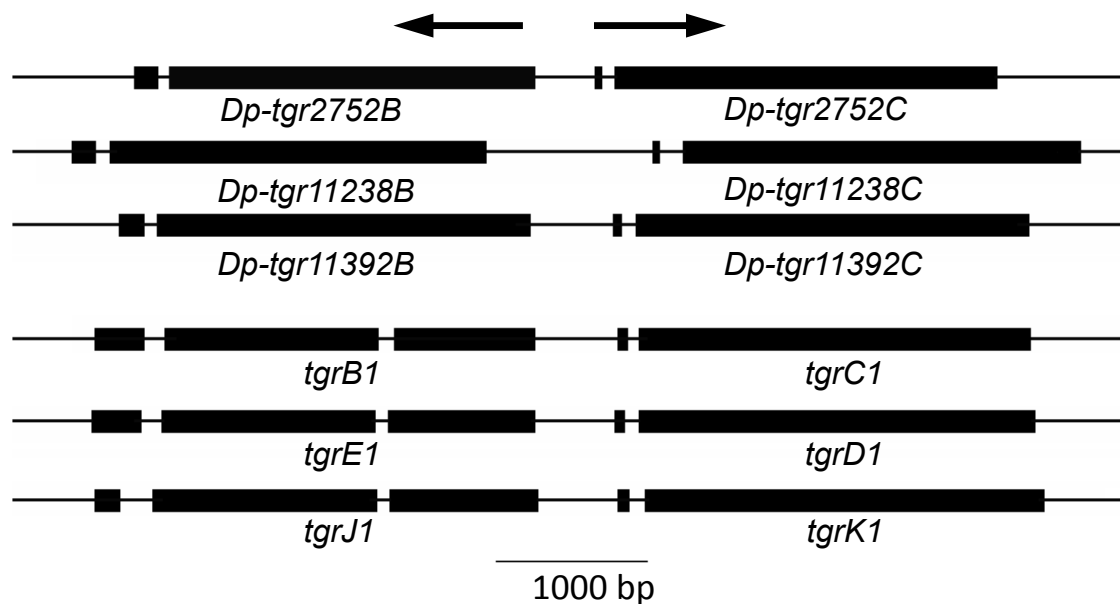


図1-2a

D. purpureum (上側3つ) と *D. discoideum* (下側3つ) ゲノムにおける双方方向性 *tgr* 遺伝子ペア。

各太線はペアとなっているDNA配列 (エキソン) を示す。tgrB-type 遺伝子(左)と tgrC-type 遺伝子(右)はそれぞれ反対側のDNA鎖にコードされており、上方の矢印はコード方向を示す。tgrC-type 遺伝子にはコード領域の5' 端付近に1つのイントロンがあり、tgrB-type 遺伝子にはコード領域末端付近に1つのイントロンがある。これらに加えて、*D. discoideum* の B-type 遺伝子は、開始コドンから約1 kb あたりにも1つイントロンを持つ。2つの遺伝子の間隔は約0.5 kb である

(*Dp-tgr11238*ペアだけはこれよりも広い)。 *D. discoideum* の遺伝子予測は dictyBase のデータベースに基づくが、tgrJ1の2番目のイントロン予測はESTデータと一致しないため修正を加えている。

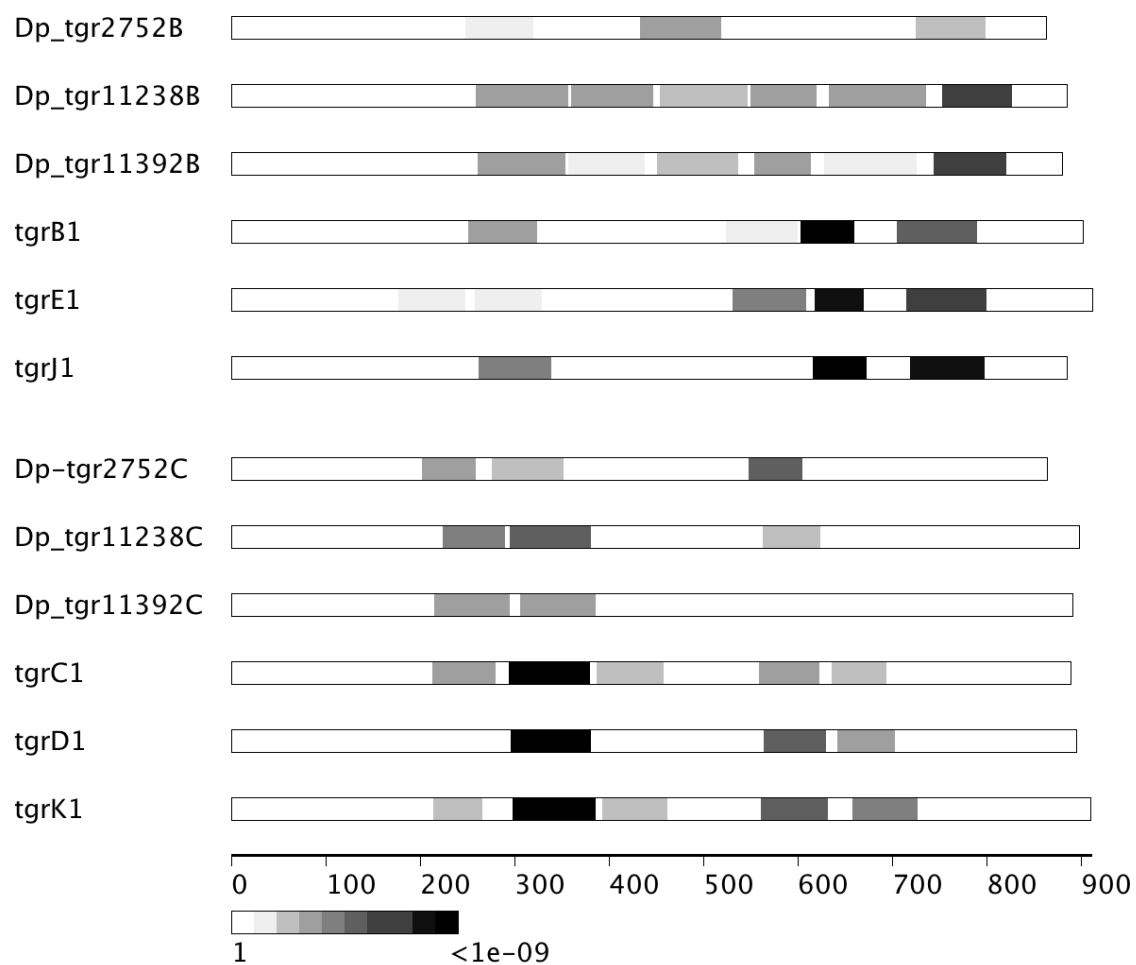


図1-2b
 MOTIF Search (<http://www.genome.jp/tools/motif/>) による tgrB-type, tgrC-type 遺伝子のドメイン予測。
 E-values をグレースケールで表したTIGドメインだけを示す。

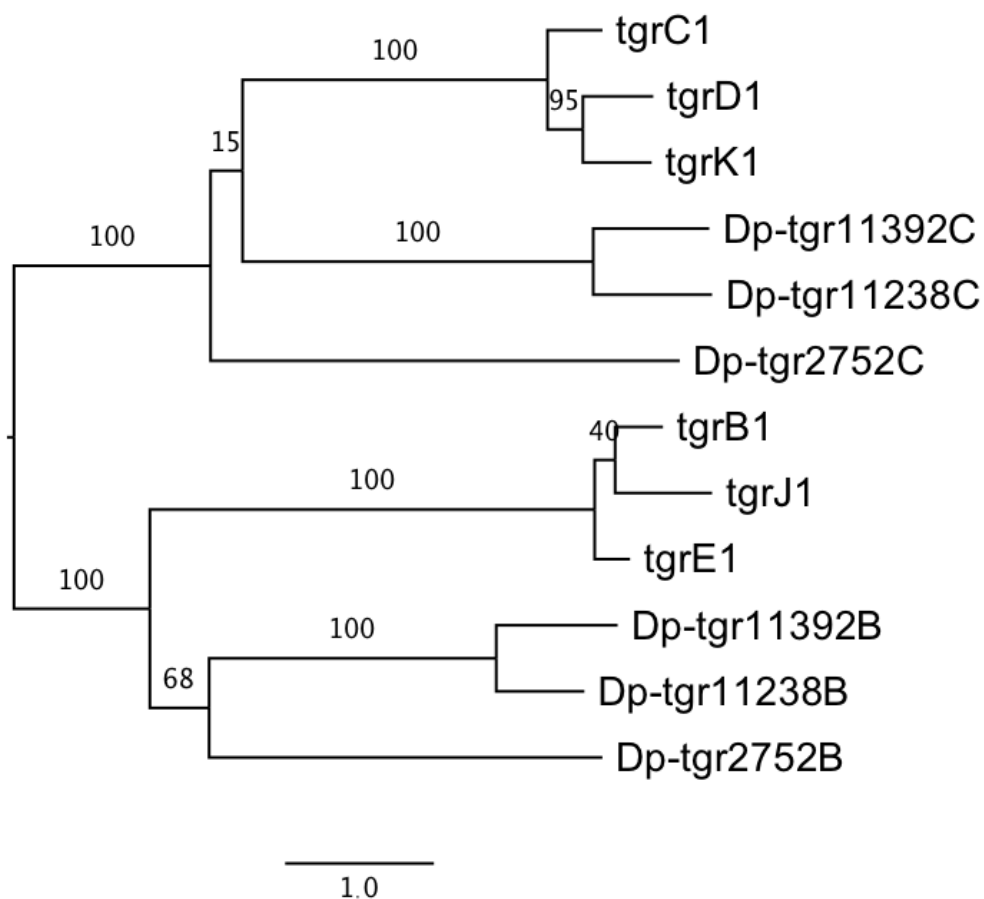


図1-2c

D. discoideum と *D. purpureum* の合計12の Tgr 配列(アミノ酸配列)をから構築した最尤法による系統樹。

数値は Bootstrap 値を表す。tgrB-type と tgrC-type の配列群は100%の Bootstrap 値で支持される。それぞれのクラスターの中で *D. discoideum* の3つの遺伝子は100%のBootstrap 値でまとまる一方で、*D. purpureum* の3つの遺伝子にはやや配列間の広がりがある。

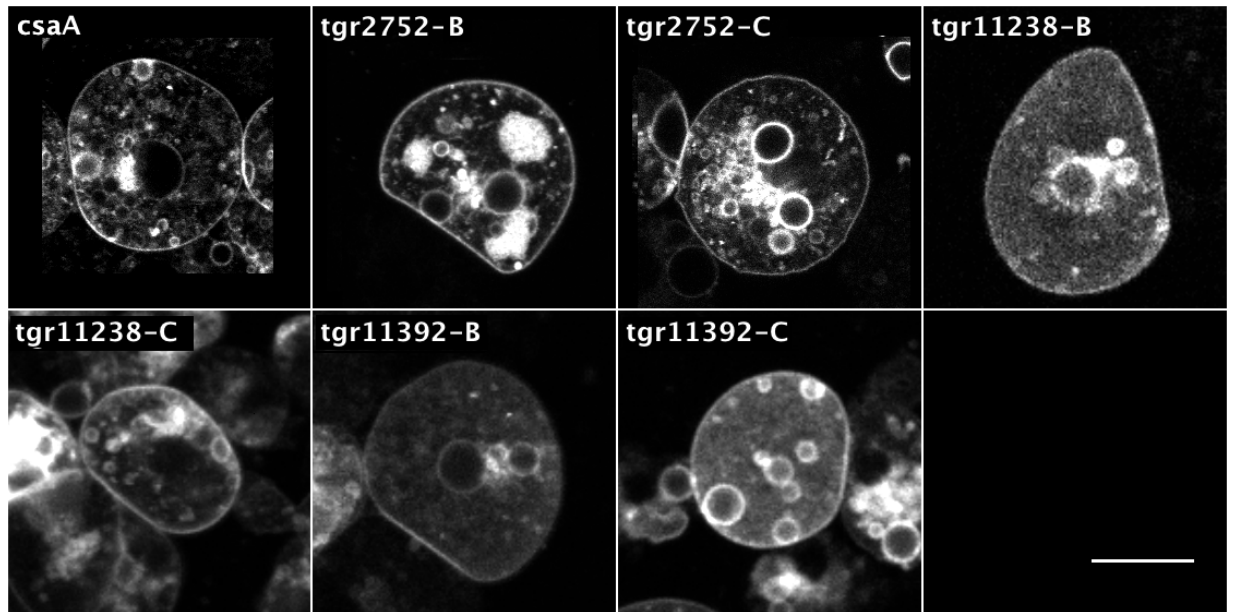


図1-4

Dp-csaA および各 *Dp-tgr* 遺伝子のGFP融合タンパク質を発現させた *D. discoideum* 細胞における蛍光局在。

撮影には Olympus FV3000 を使用した。

Scale bar: 10 μ m

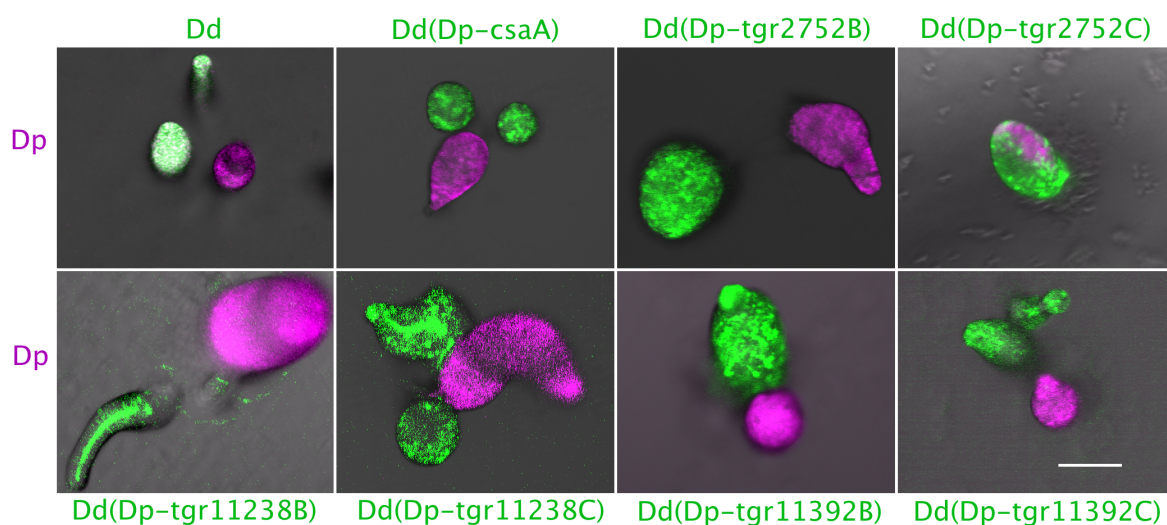


図1-5

形質転換した *D. discoideum* 細胞 (green) と *D. purpureum* 細胞 (magenta) の移動体における分離状況。

それぞれの *D. discoideum* 細胞に導入した *D. purpureum* の遺伝子名を写真上または下に緑の文字で示す。形質転換体の *D. discoideum* 細胞と、Rhodamineで標識した *D. purpureum* 細胞は1 : 1 の割合で混合し、17°Cで24時間発生させた。

Scale bar: 100 μ m

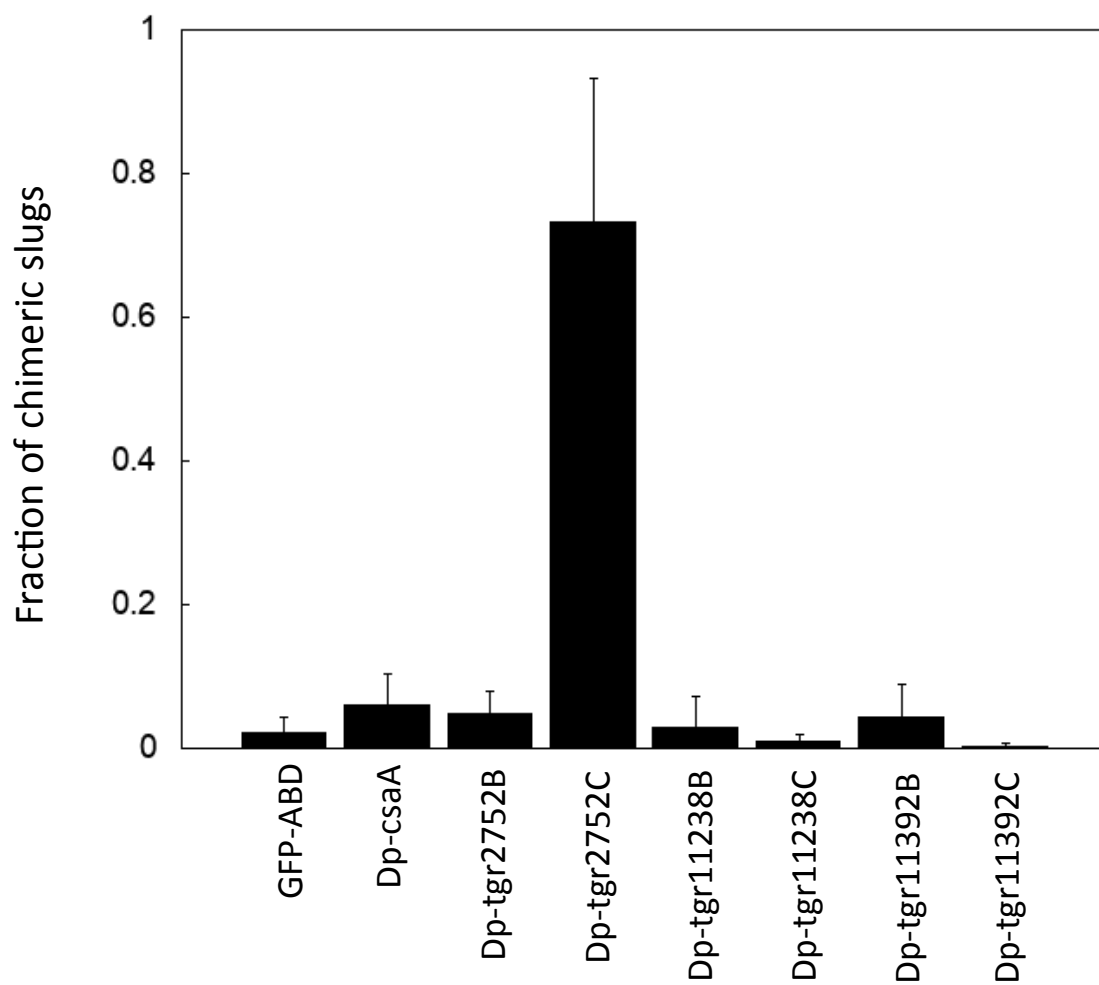


図1-6

D. purpureum と *D. discoideum* の各形質転換体における、2種が混合した移動体の割合。

6回 (*Dp-tgr2752C*) から2回 (*Dp-tgr11238C*) の独立した実験の平均値と S. D. を示す。カウントした移動体の合計は780体。

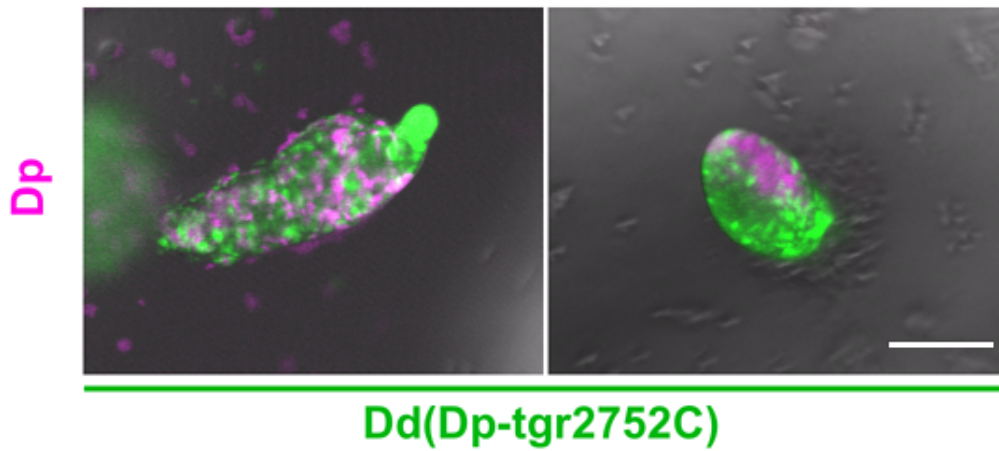


図1-7

Dd(*Dp-tgr2752C*) 細胞 (green) と *D. purpureum* 細胞 (magenta) の組み合わせにおいて形成された移動体の例。

各種が比較的均一に分布している場合（左）と、それぞれの種がクラスター化している場合（右）がある。

Scale bar: 100 μm

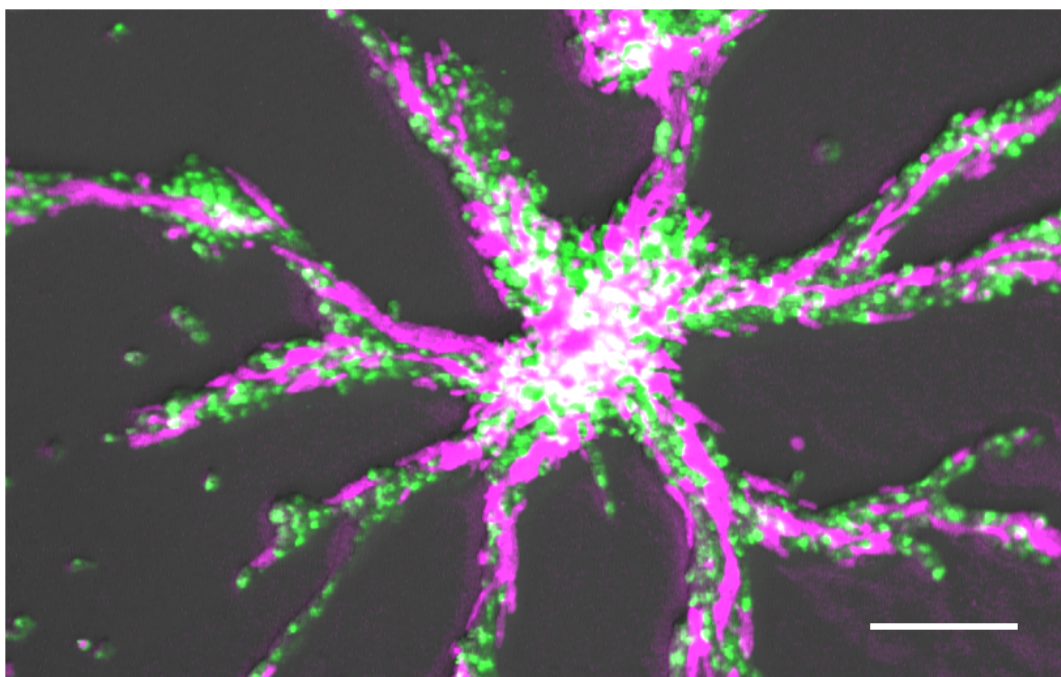


図1-8

Dd(*Dp-tgr2752C*) 細胞 (green) と *D. purpureum* 細胞 (magenta) の集合中のストリーム。

各細胞は 1 : 1 の割合で混合し、10℃で24時間発生させた。

Scale bar: 100 μ m

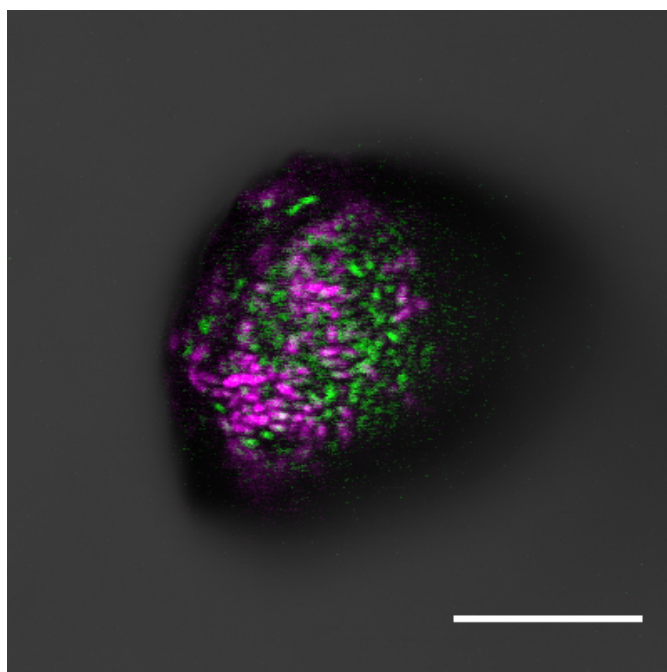


図1-9

Dd(*Dp-tgr2752C*) 細胞 (green) と *D. purpureum* 細胞 (magenta) の子実体。

各胞子からはそれぞれの種のアメーバが正常に発芽する。

Scale bar: 50 μ m

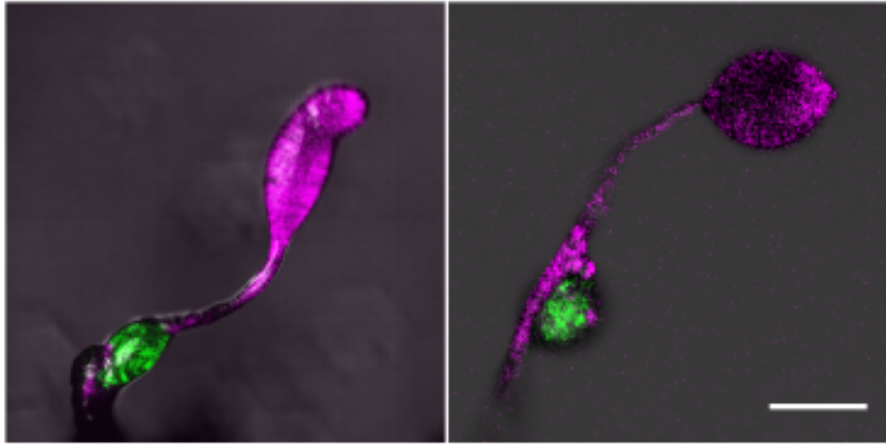


図1-10

D. discoideum と *D. purpureum* のキメラ移動体および子実体。形態形成の最後で胞子塊が2つに分離したもの。

Scale bar: 100 μm

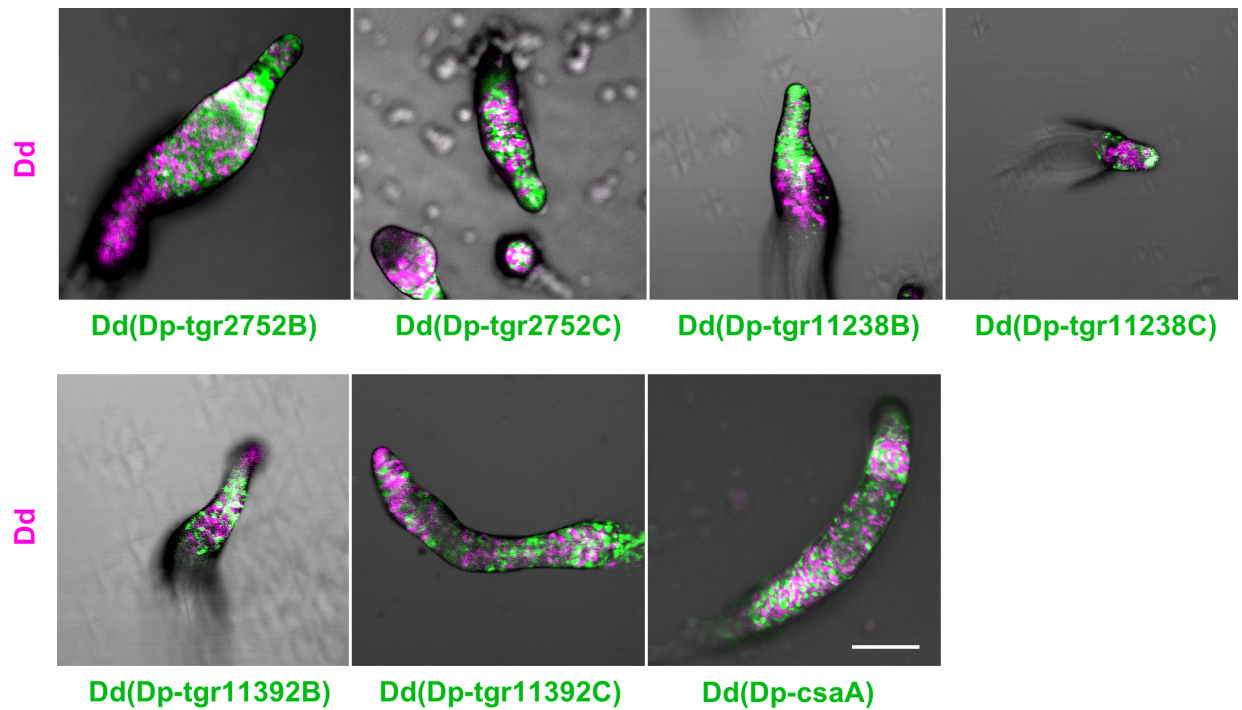


図1-11

D. purpureum の遺伝子を導入した *D. discoideum* 細胞 (green) と親株の *D. discoideum* 細胞 (magenta)。

それぞれの *D. discoideum* 細胞に導入した *D. purpureum* の遺伝子名を写真下に緑の文字で示す。形質転換体の *D. discoideum* 細胞と、rhodamineで標識した *D. discoideum* 細胞は1 : 1 の割合で混合し、17°Cで24時間発生させた。Scale bar: 100 μ m。すべての移動体は両方の細胞を含んでいた。(観察した移動体の合計は297)

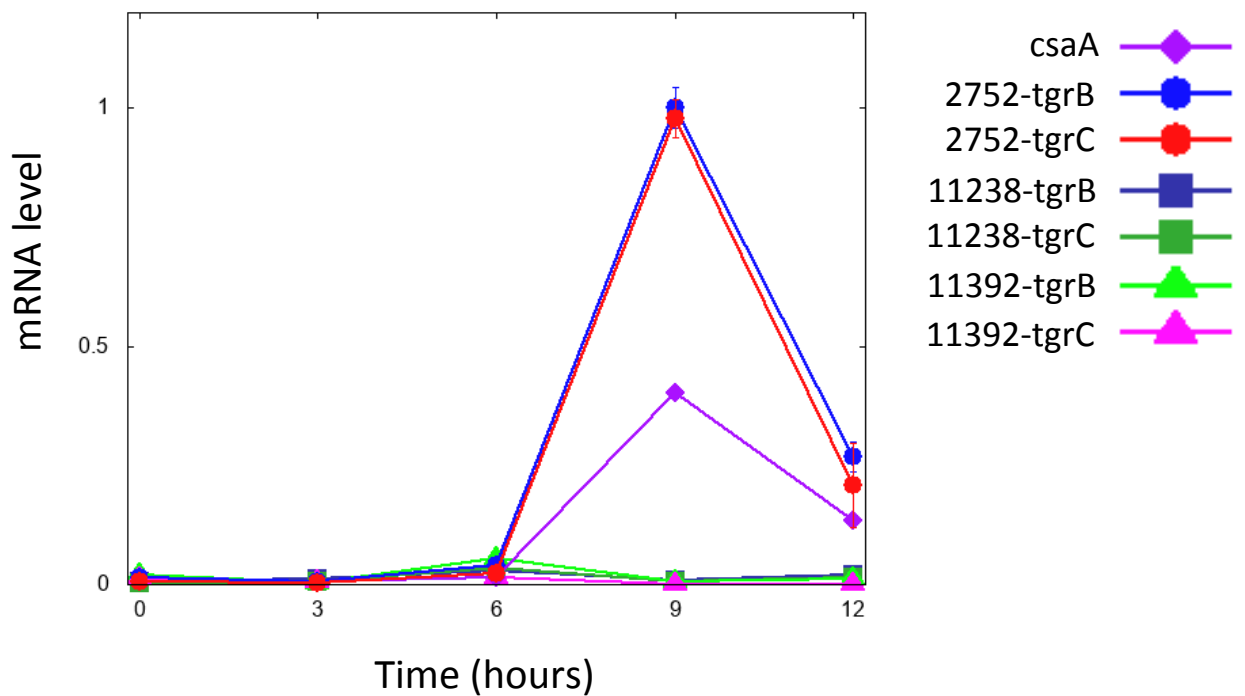


図1-12

発生の進行にともなう *Dp-csaA* 遺伝子と 6 つの *Dp-tgr* 遺伝子の mRNA レベル変化。

飢餓状態を開始してから移動体初期までの細胞を 3 時間おきにサンプリングし、qPCRによってmRNAレベルを定量した。グラフ上の各値は *Dp-tgr2752B* の最高値を 1 とした相対値。横軸は飢餓状態となつてからの経過時間。

TgrB1

805 PNEMYLG FVVFVIFIALISFAAKNQIEKYFEERKSRKAFRSLDNLRLKLRQKHATEIAKH YTFGEQSAPKPKSTFYDIR 884
----- * * ** ** * * * * * * * *
885 KKLSRLPLIRRCFKEHTD 902
** * ** *

Tgr2752B

819 SAVGIIVGVVISGVIAAATIIFISVYKYNRYIRLKTINKILEKTF 863
----- * * * * *

図1-13

D. discoideum の TgrB と、*D. purpureum* の Dp-Tgr2752B のC末配列の比較。アスタリスクは塩基性アミノ酸。破線は予想される膜貫通領域。

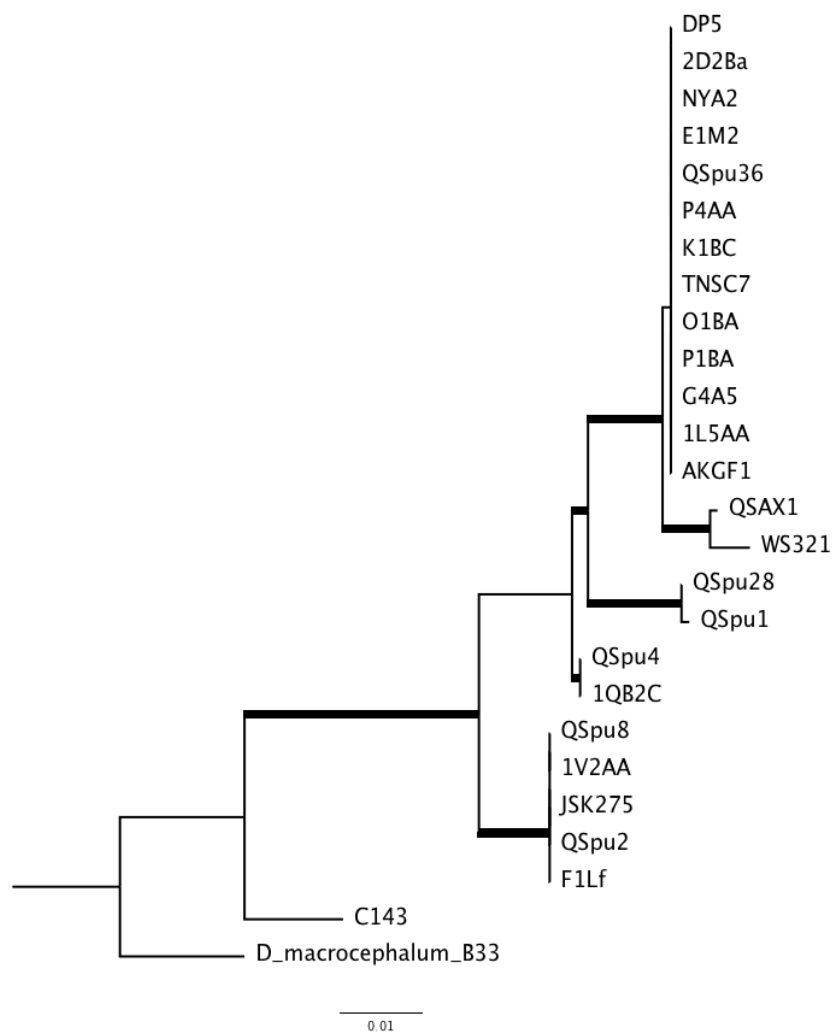


図1-14A

本研究に使用した*D. purpureum* の各株（最上部の枝からQSpu36をのぞいた12株）の系統的な位置。

系統樹はSSU rDNAの配列に基づき、RAxMLを使った最尤法によって構築した。Bootstrap値が90以上の枝を太線で表す。

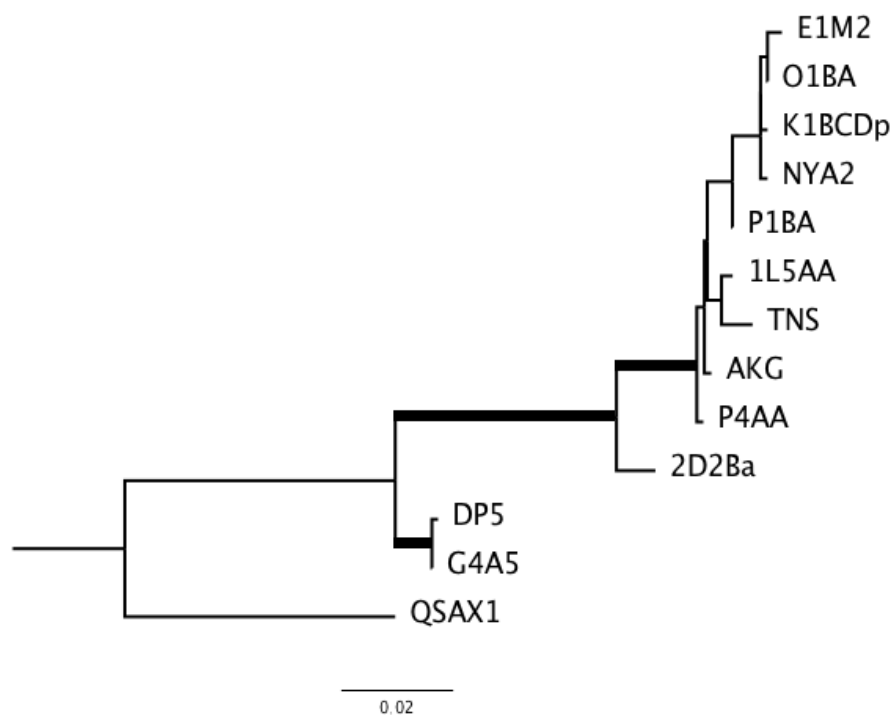


図1-14B

D. purpureum 各株の ITS1 - 5.8S - ITS2 領域の塩基配列を使用した、最尤法による系統樹。

3 株 (G4A5, 2D2Ba, DP5) の配列は残りの 9 株からは系統的に離れる。Bootstrap値が90以上の枝を太線で表す。

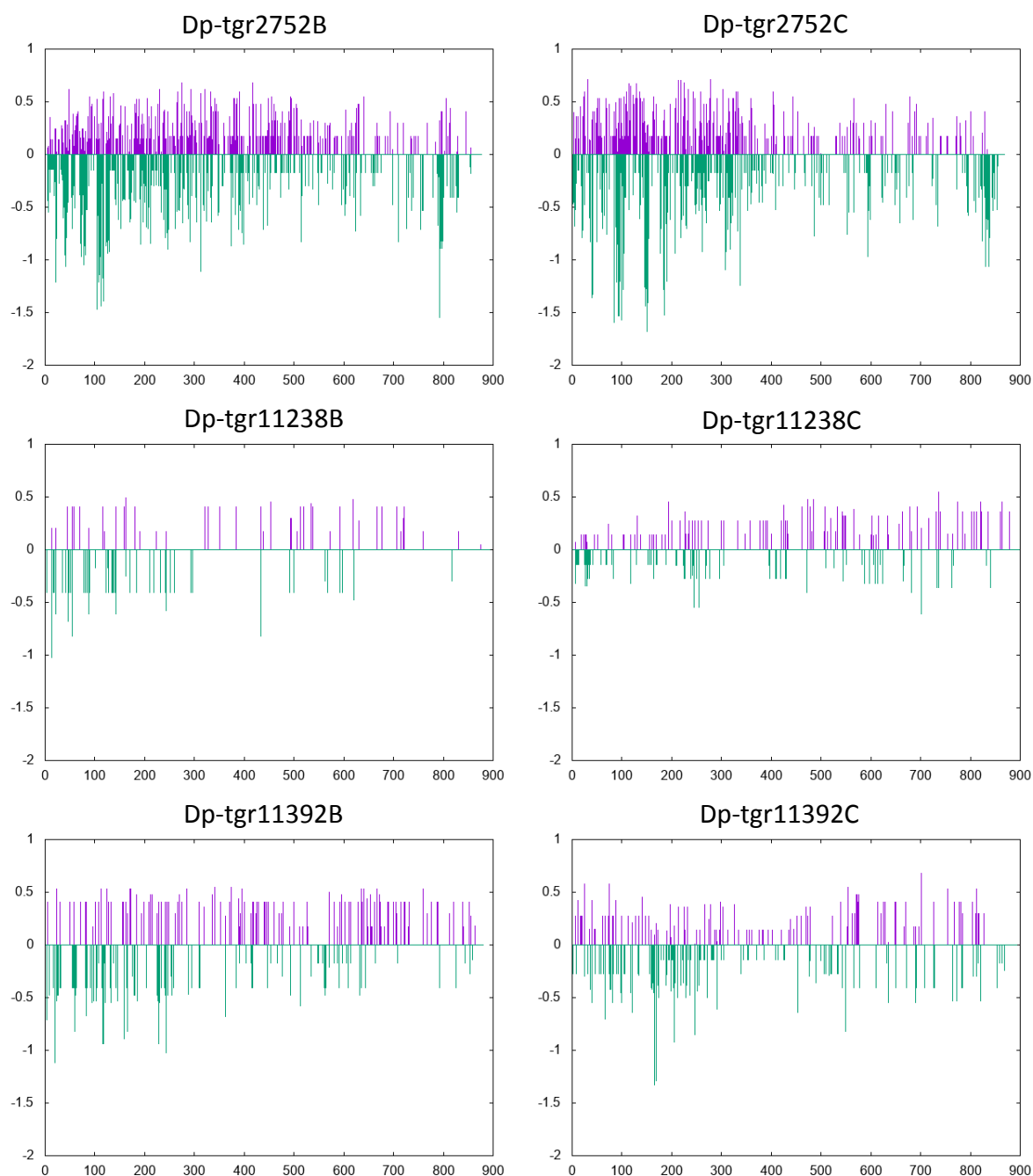


図1-15A

コドンごとの同義置換・非同義置換量

1 2 の *D. purpureum* 株を用いて各 *tgr* 遺伝子を 2 配列ずつ比較し、コドン単位でアミノ酸の同義置換、非同義置換の数を算出した（算出法は Nei and Gojobori, 1986 に従う）。各グラフにおいて横軸はコドン番号。0 ラインの上側は同義置換、下側は非同義置換であり、各コドンについて算出した値を、2 配列の組み合わせの数(66)で割ったものをプロットした。

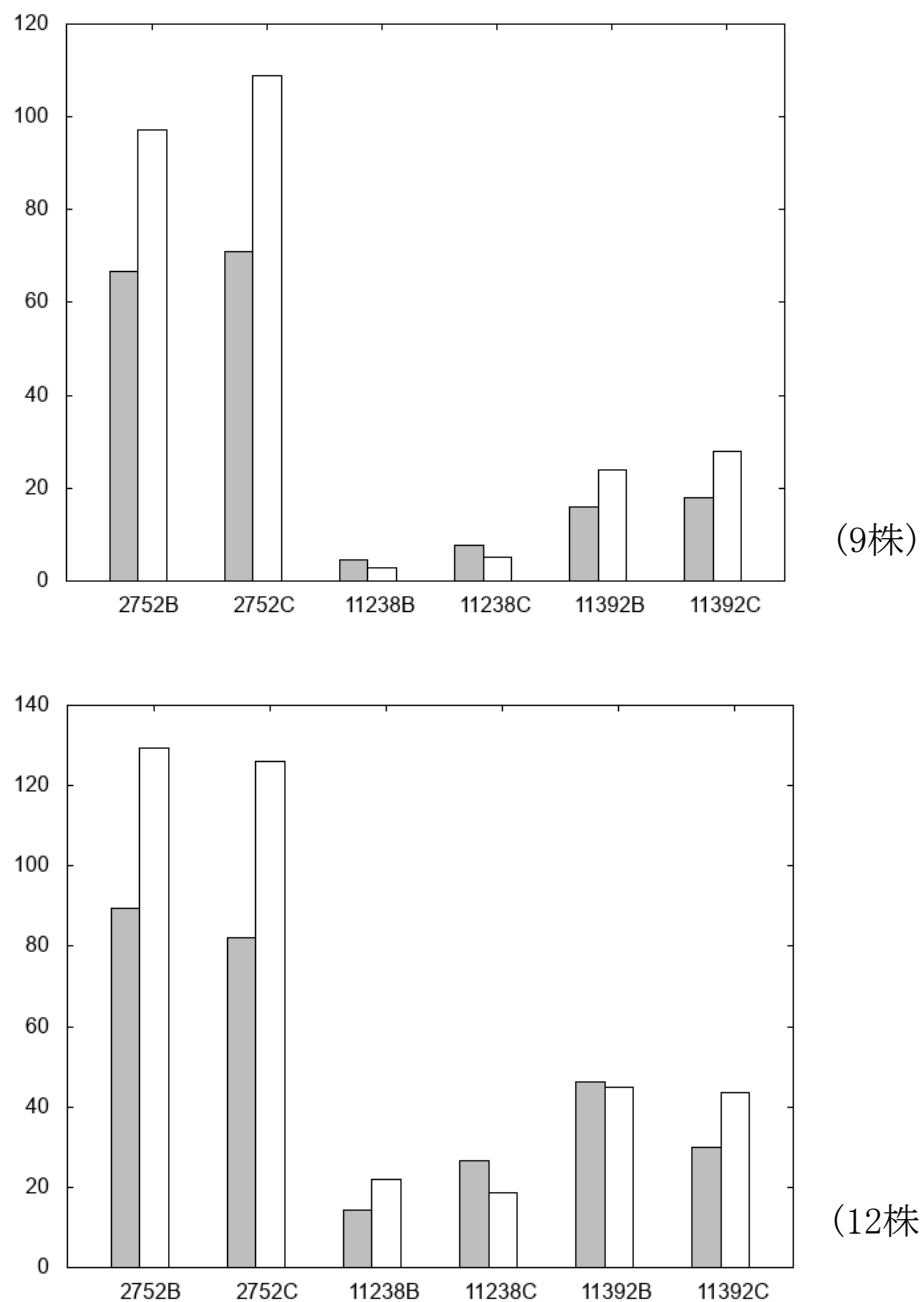


図1-15B

6つの *Dp-tgr* 遺伝子配列における同義(グレー)および非同義(白)置換の平均の数。

使用したDp株のうち、2D2Ba, DP5, G4A5 の3株は系統的に他の9株から離れているため(図13-B)、これら3株を含める場合(12株)は、含めない場合(9株)に比べて各配列の置換数が多く算出される。

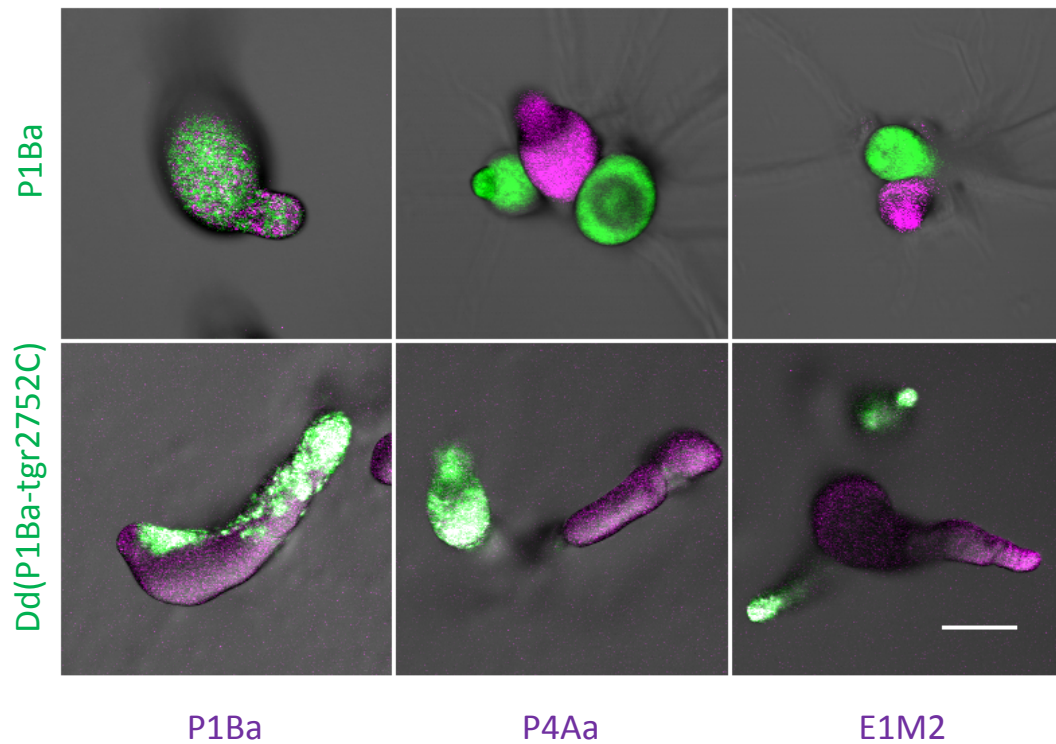


図1-16

D. purpureum のうち、*Dp-tgr2752C*の配列をクローニングしたP1Ba株（上段, green）および Dd(*Dp-tgr2752C*)（下段, green）と、他の *D. purpureum* 株 (magenta) との混合実験。

Scale bar: 100 μ m

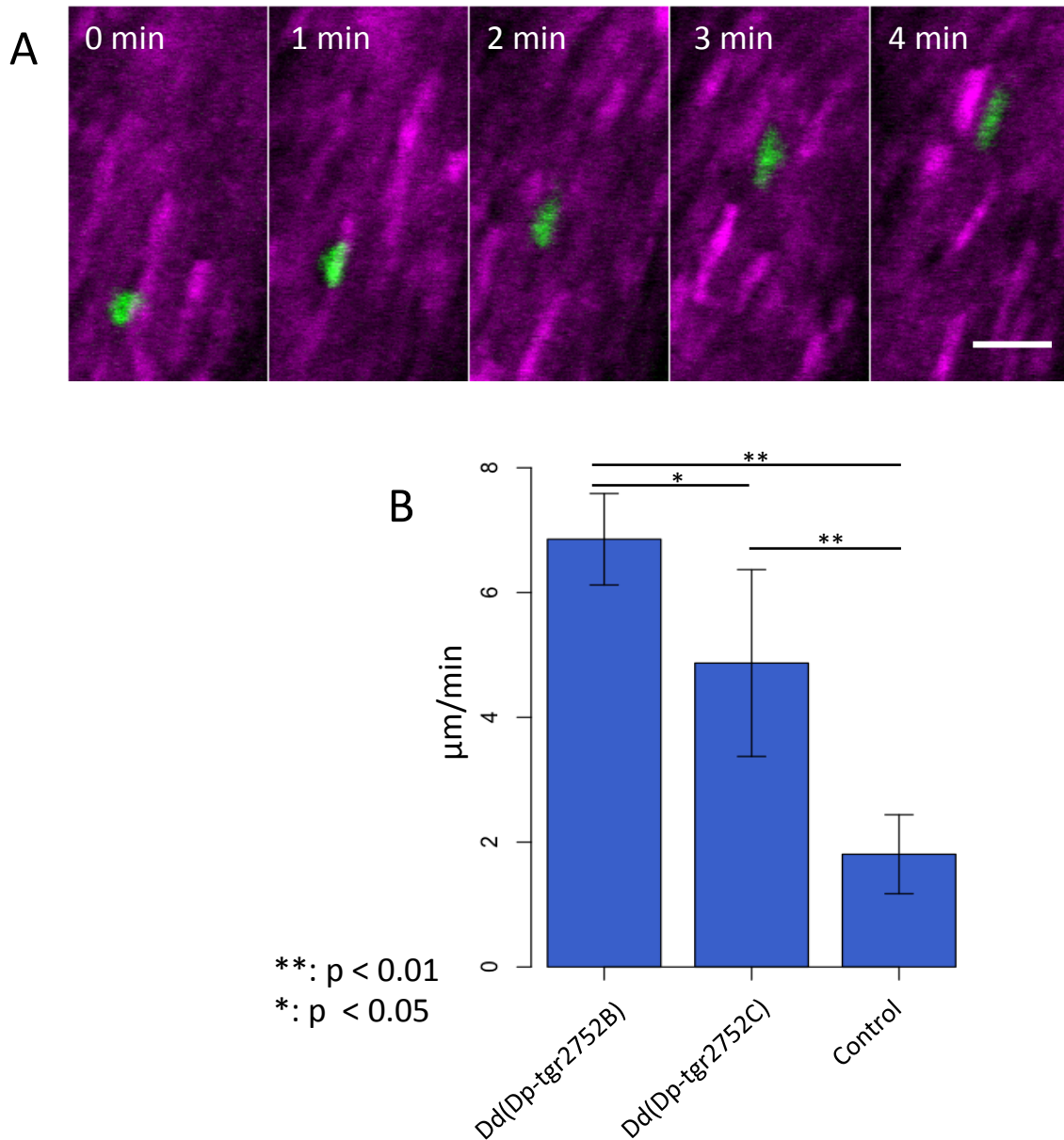


図1-17

Dd(*Dp-tgr2752B*) の *D. purpureum* ストリーム中での運動。

A *D. purpureum* ストリーム中を前進する Dd(*Dp-tgr2752B*) 細胞のタイムラプス画像。Dd(*Dp-tgr2752B*) : green、

D. purpureum : magenta。

scale bar: 20 μm

B Dd(*Dp-tgr2752B*)、Dd(*Dp-tgr2752C*)、*D. discoideum* AX2 (Control) における *D. purpureum* ストリーム中での進行速度。平均とS. D. を示す。

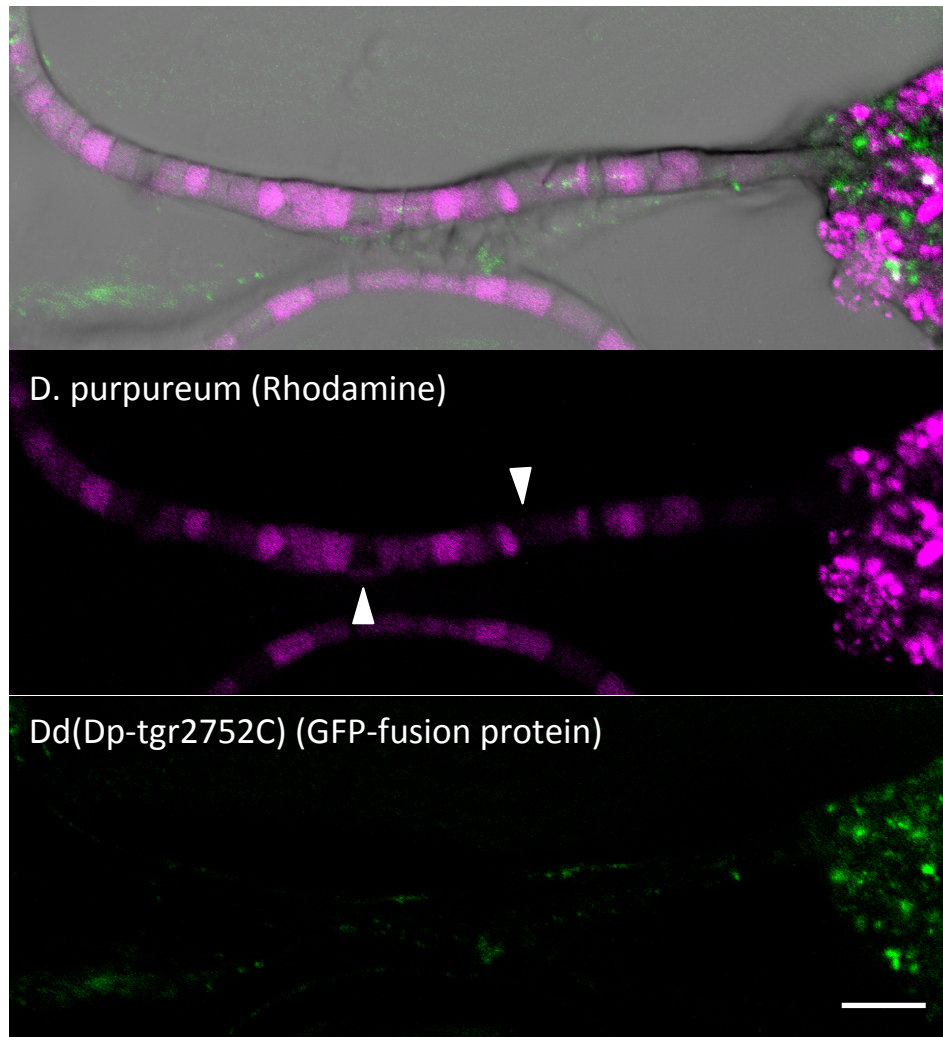


図1-18

Dd(*Dp-tgr2752C*)と*D. purpureum*が混合した子実体。

D. purpureum 側は孢子細胞、柄細胞ともに蛍光が検出されるが、Dd(*Dp-tgr2752C*) 側は孢子細胞しか検出できない。△は蛍光が見られず、どちらの種由来であるかが不明な柄細胞。

Scale bar: 20 μ m

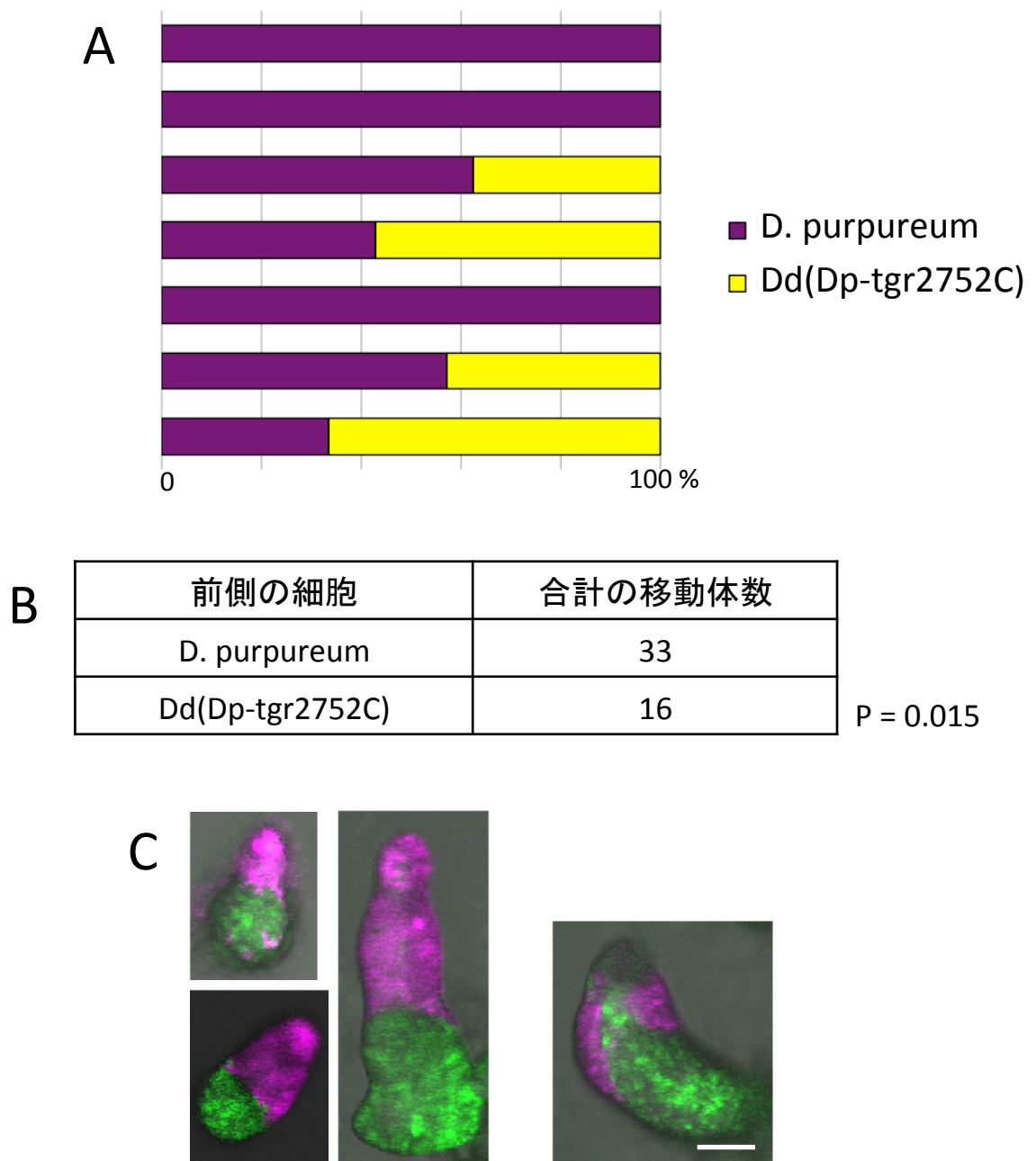


図1-19

D. purpureum 細胞の方がキメラ移動体の前側に分布する。

A *D. purpureum*と*Dd(Dp-tgr2752C)*で形成されたキメラ移動体のうち、形状から前後が分かる物に関して、*D. discoideum*が前側の移動体、および*Dd(Dp-tgr2752C)*が前側の移動体をそれぞれカウントし、割合を示した。各棒グラフは独立の実験を表す。

B *D. purpureum*が前側、*Dd(Dp-tgr2752C)*が前側となっている移動体の各合計数。期待される各移動体数が総数の50%ずつだとした場合のカイ二乗検定のp値は0.015。

C 前側（上方）が*D. purpureum*（左3つ）、前側が*Dd(Dp-tgr2752C)*（右1つ）の移動体の例。Scale bar: 50 μm （共通）、*Dd(Dp-tgr2752C)*: green、*D. purpureum*: magenta。

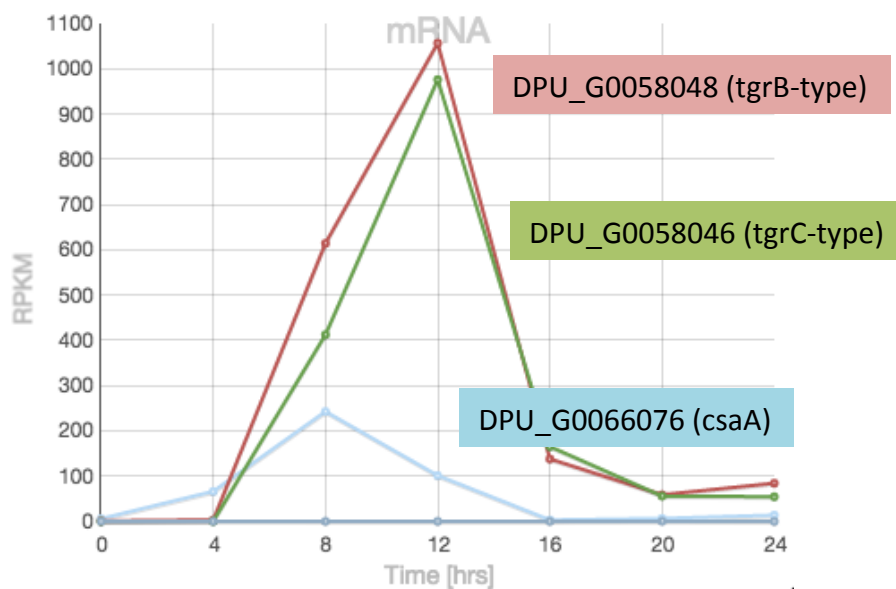
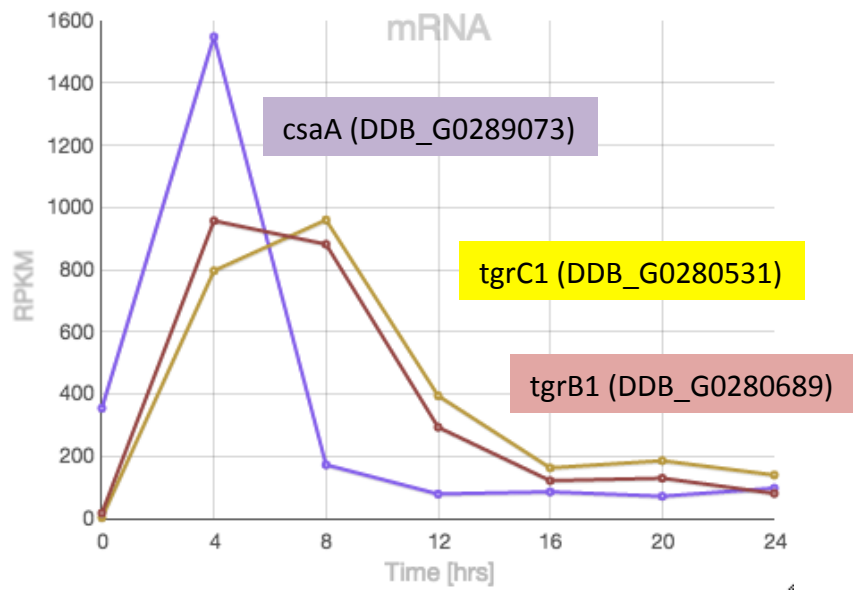


図1-20

D. discoideum AX4 (上), *D. purpureum* QsAX1 (下) における *csaA*, *tgrB1*, *tgrC1* の発現量 (dictyExpress より)。

横軸は飢餓状態となつてからの経過時間。

dictyExpress

(<https://dictyexpress.research.bcm.edu/landing/>)

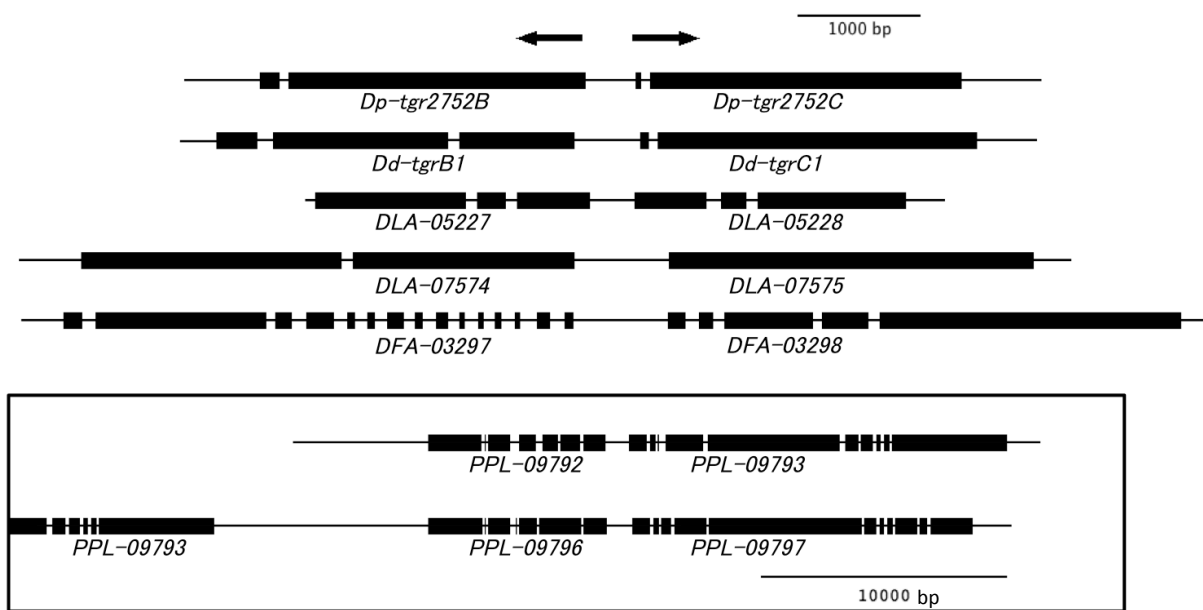


図2-1

D. purpureum P1Ba (Group 4)、*D. discoideum* (Group 4)、*D. lacteum* (Group 3)、*D. fasciculatum* (Group 1) および *P. pallidum* PN500 (Group 2) のゲノムにおける双方方向性 *tgr* 遺伝子ペア。

各太線はペアとなっているDNA配列(エキソン)を示す。*tgrB*-type 遺伝子(左)と *tgrC*-type 遺伝子(右)はそれぞれ反対側のDNA鎖にコードされており、上方の矢印はコード方向。

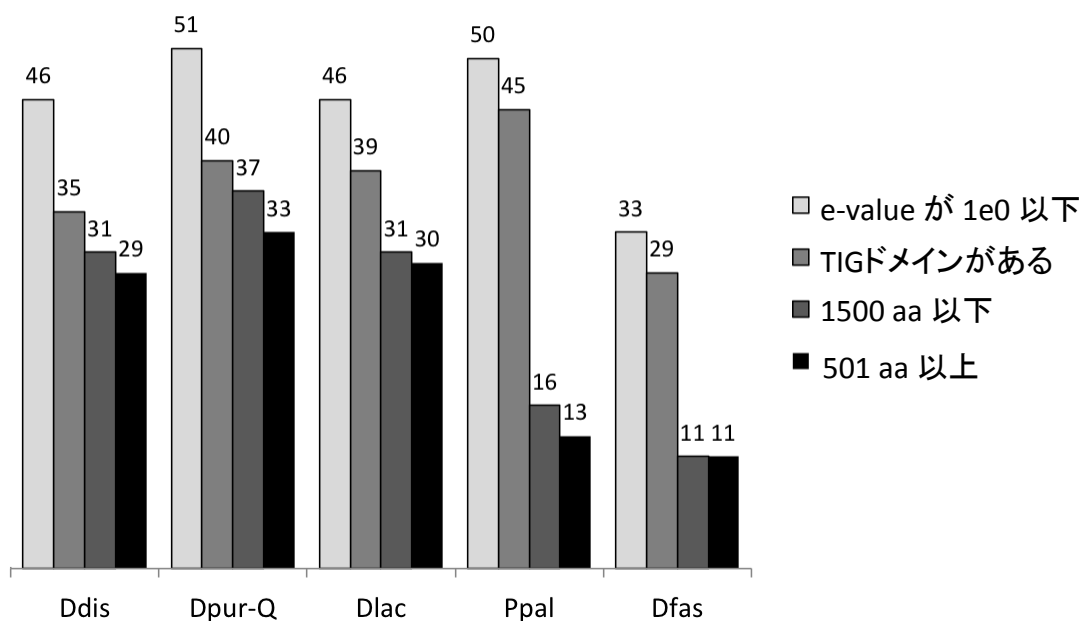


図2-2

遺伝子予測のなされた種における、予測 *tgr* 遺伝子の選抜。

D. discoideum、*D. purpureum*、*D. lacteum*、*P. pallidum* PN500、*D. fasciculatum* の予測遺伝子から、以下の4段階の基準をすべてクリアしたものを予測 *tgr* 遺伝子とした。

- 1、*D. discoideum* の TgrB1, TgrC1 に対する e-value が 1e0 以下
- 2、TIGドメインがある (MOTIF Search での e-value が 1e0 以下)
- 3、アミノ酸配列が 1500 aa 以下
- 4、アミノ酸配列が 501 aa 以上

P. pallidum PN500、*D. fasciculatum* では 1500 aa 以上の長い配列が多く、3のステップで配列数が大きく減少する。各種において右端の黒い棒グラフの数値が、最終的に選抜された予測 *tgr* 遺伝子の数。

MOTIF Search

[\(https://www.genome.jp/tools/motif/\)](https://www.genome.jp/tools/motif/)



図2-3A

*D. discoideum*の予測Tgr配列。

e-value をグレースケールで表したTIGドメインとhydropathyを図示する。



図2-3B

D. purpureum QsAX1の予測Tgr配列。

e-value をグレースケールで表したTIGドメインとhydropathyを図示する。



図2-3C

D. lacteum の予測Tgr配列。

e-value をグレースケールで表したTIGドメインとhydrophathyを図示する。

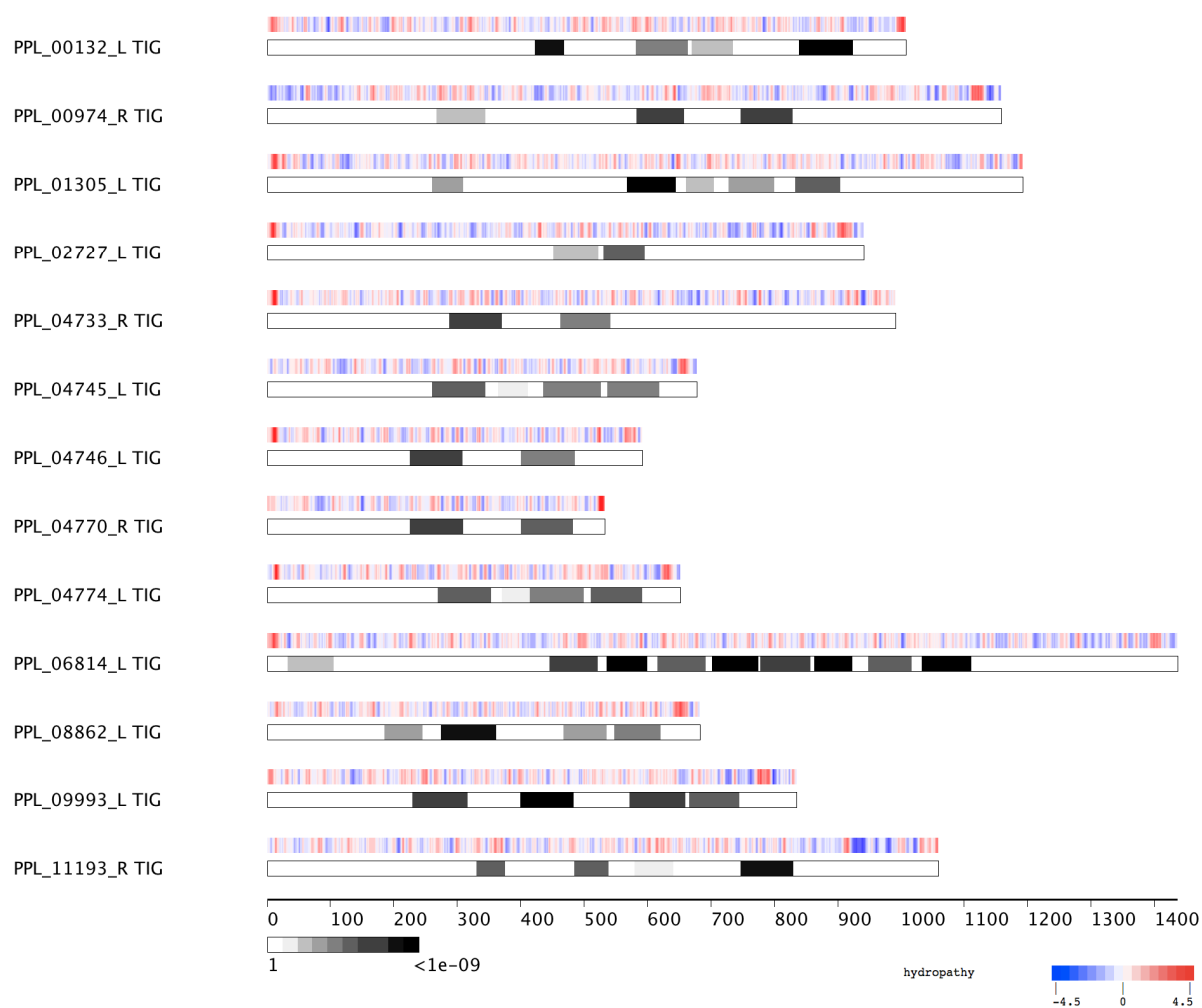


図2-3D

P. pallidum PN500 の予測Tgr配列。

e-value をグレースケールで表したTIGドメインとhydropathyを図示する。

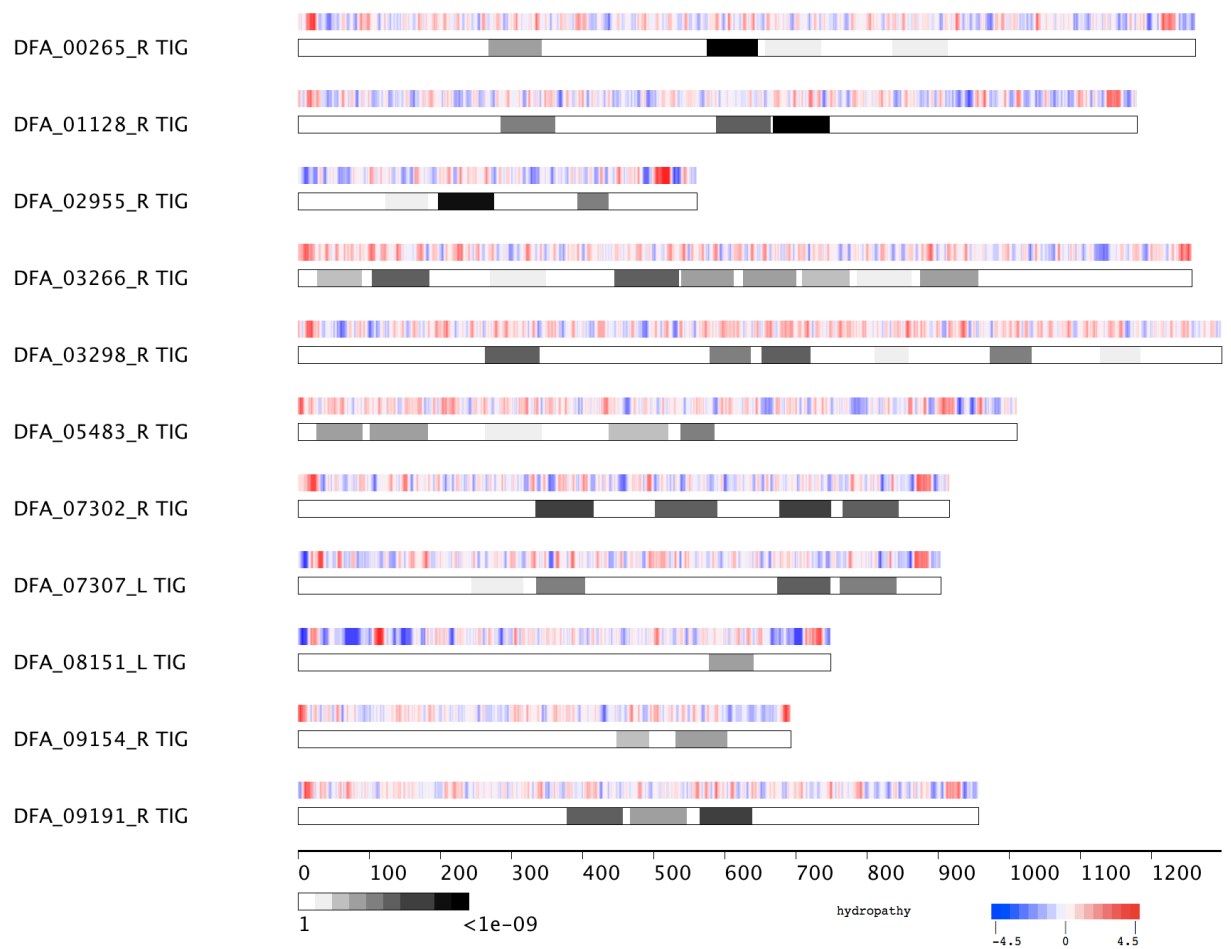


図2-3E

D. fasciculatum の予測Tgr配列。

e-value をグレースケールで表したTIGドメインとhydropathyを図示する。

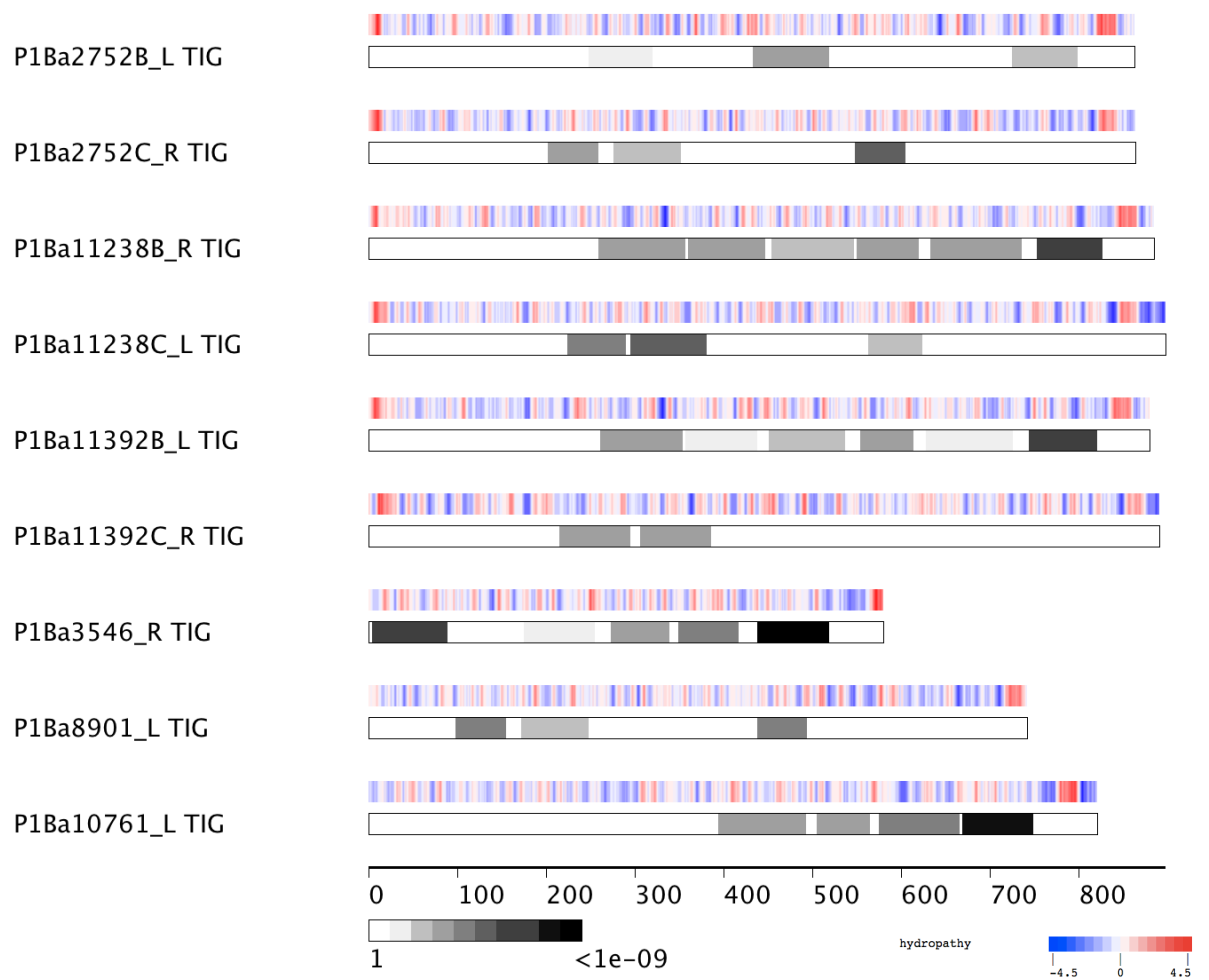


図2-3F

D. purpureum P1Ba の予測Tgr配列。

e-value をグレースケールで表したTIGドメインとhydropathyを図示する。

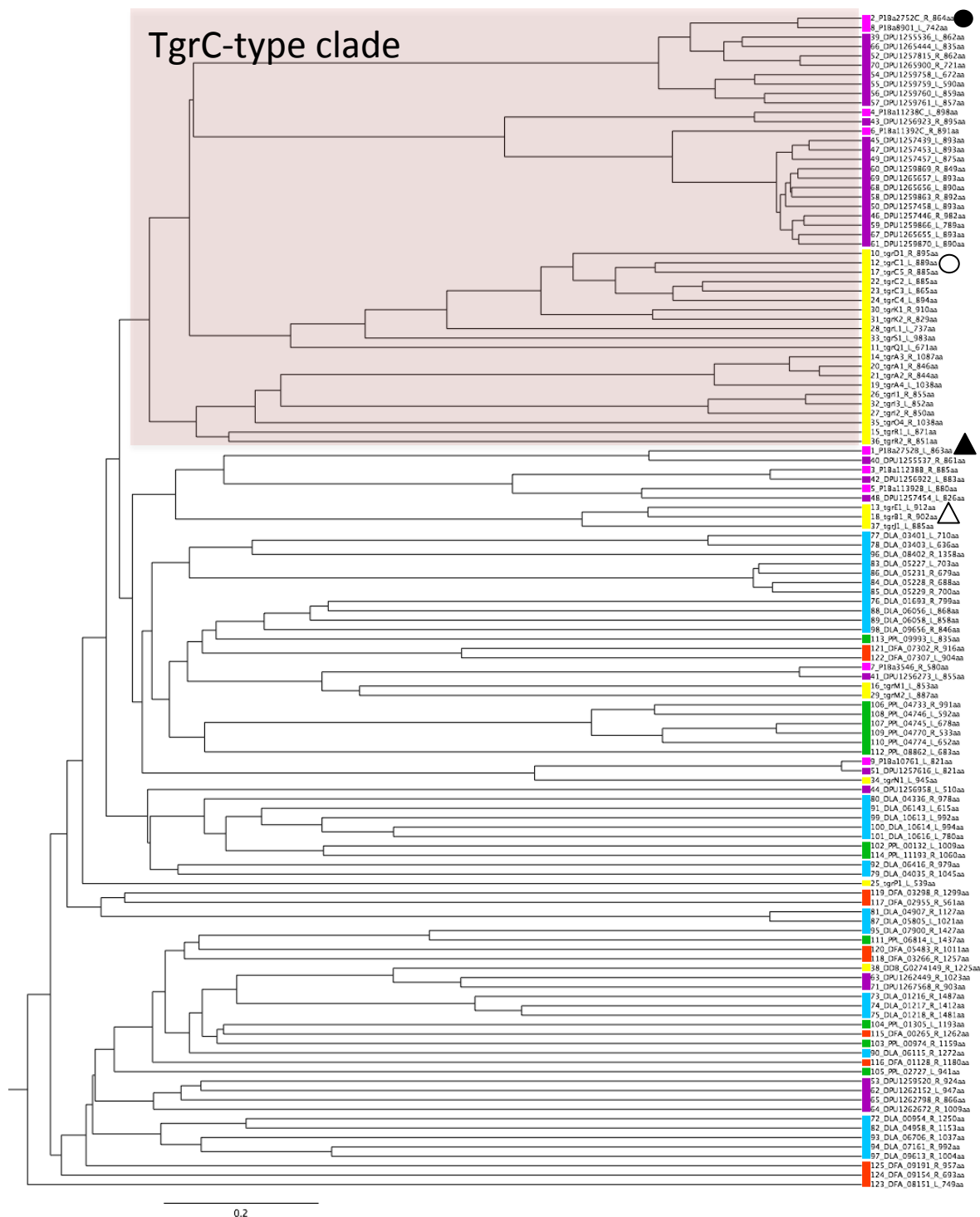


図2-4
UPGMA法による予測Tgr配列の分子系統樹。

Group 4 の *D. discoideum* と *D. purpureum* 由来の配列は黄色と紫色でそれぞれ表す。その他の種について *D. discoideum* (Group 1): 赤、*P. pallidum* PN500 (Group 2): 緑、*D. lacteum* (Group 3): 青でそれぞれ表す。また、白丸: TgrC1、白三角: TgrB1、黒丸: Dp-tgr2752C、黒三角: Dp-tgr2752B をそれぞれ示す。うすい赤色の背景をつけた部分は TgrC-type clade。

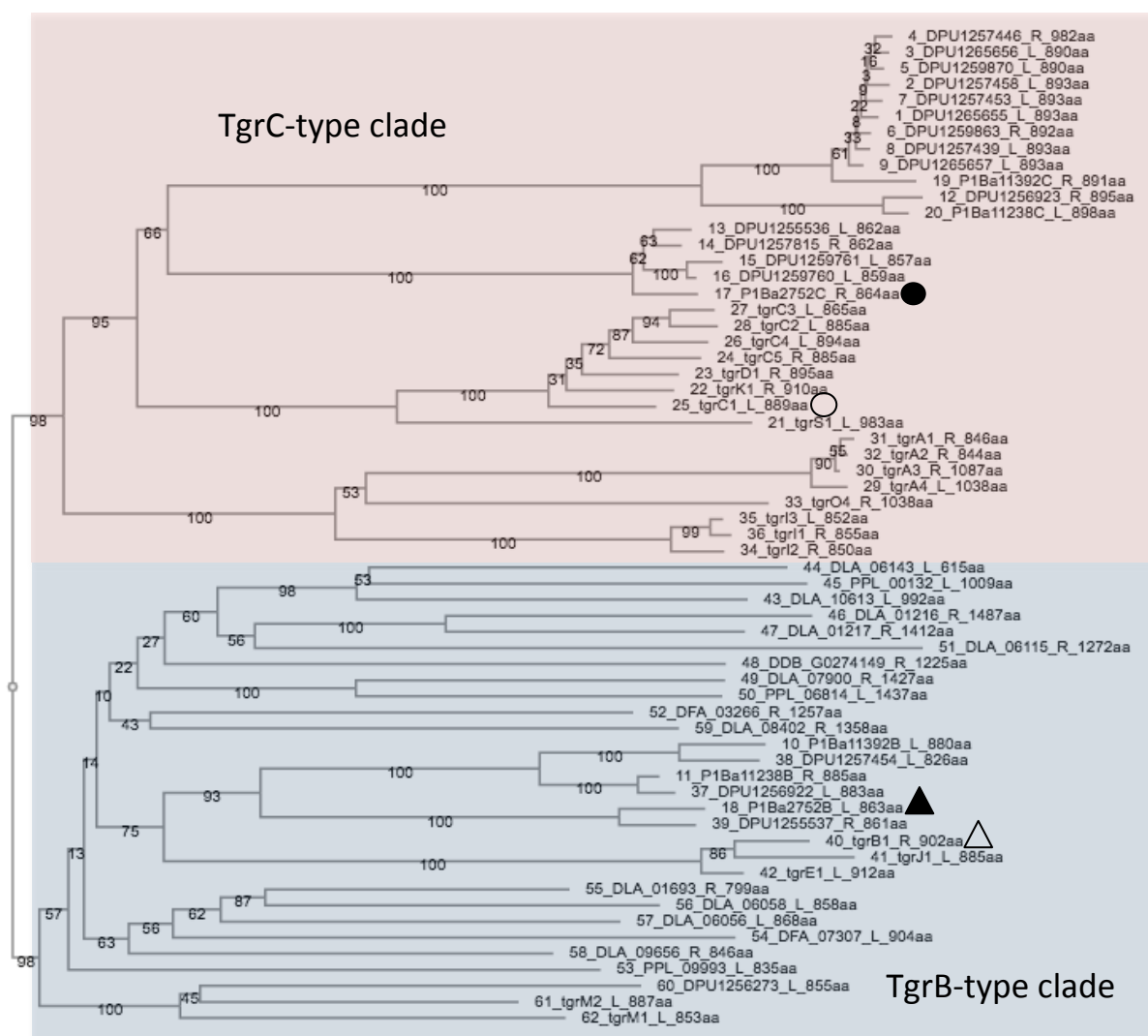


図2-5

NJ法による予測Tgr配列の分子系統樹。

UPGMA法に用いた配列セット（125配列）から系統樹の主要な枝を残し、かつ全配列で保存された領域（330 aa）が十分大きくなるように62配列を抜粋し使用した。数値は Bootstrap 値。白丸：TgrC1、白三角：TgrB1、黒丸：Dp-tgr2752C、黒三角：Dp-tgr2752B をそれぞれ示す。

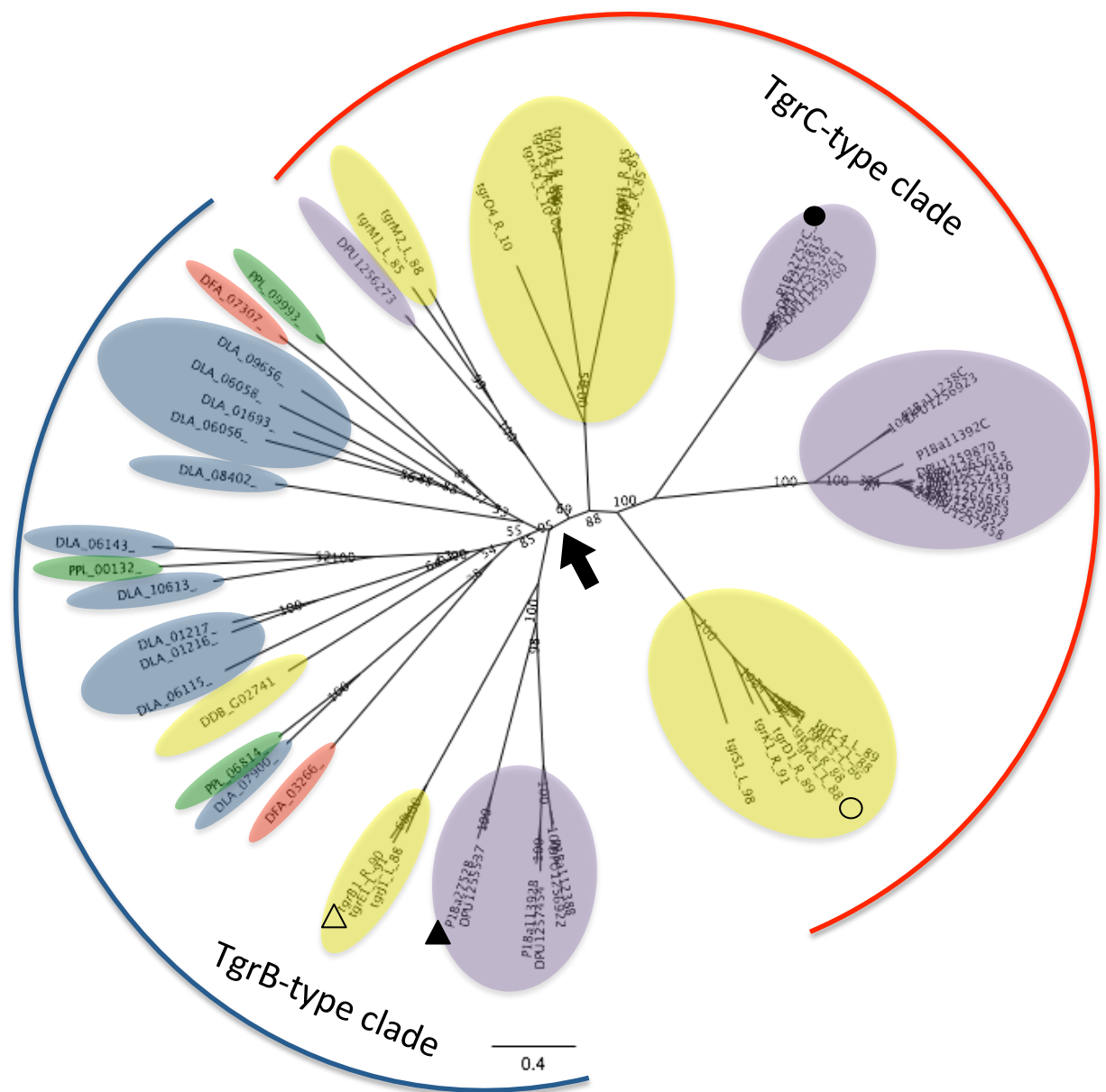


図2-6

ML法による予測Tgr配列の分子系統樹。

使用した配列セットは図2-5のNJ法と同じ。数値は Bootstrap 値。白丸：TgrC1、白三角：TgrB1、黒丸：Dp-tgr2752C、黒三角：Dp-tgr2752B をそれぞれ示す。黒の矢印 (Boodstrap 値 95) において tgrC-type clade と tgrB-type cladeが分岐する。

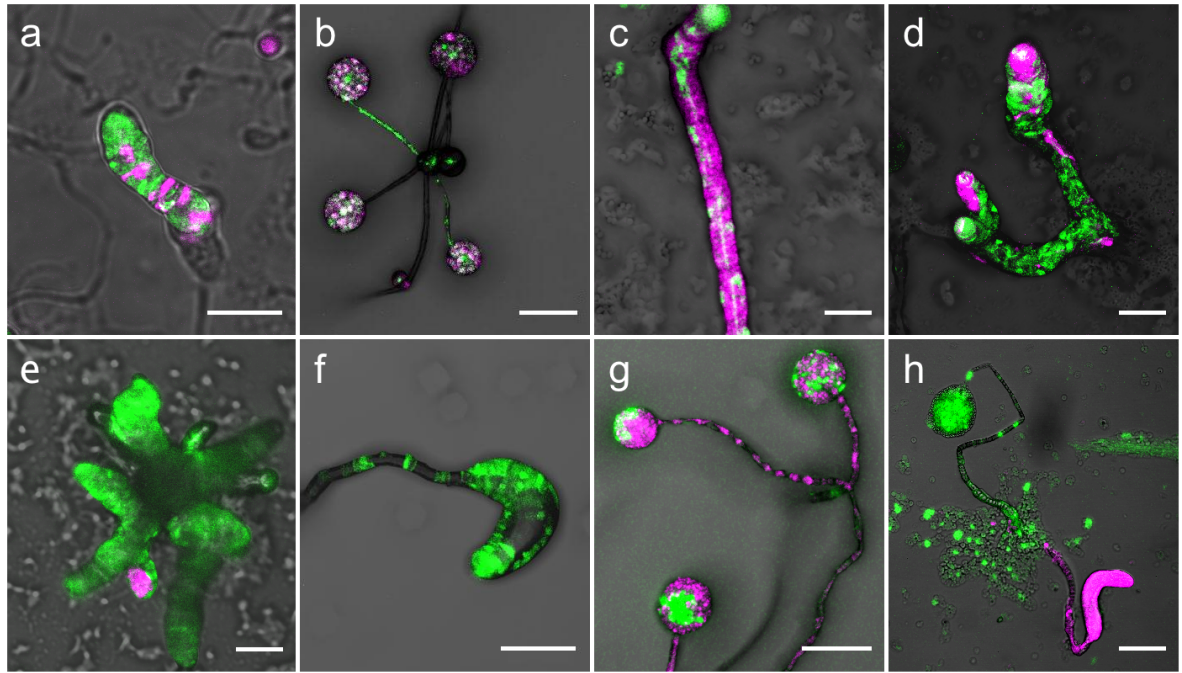


図2-7 種間の混合実験の例。Group 4 以外の1対1の混合では、遺伝的に区別される種や株が、高頻度に混合したまま多細胞体が形成される。**a**, Group 2A, *Acytostelium subglobosum* (green) と *A. amazonicum* (magenta) (genetic distance: 0.1321)。**b**, Group 2B, *P. filamentosum* (green) と *P. pallidum* (magenta) (0.0604)。**c**, clade polycephalum, *D. polycephalum* 2A2j (green) と *D. polycephalum* 1JNd1 (magenta) (0.0225)。**d**, Group 3, *D. lacteum* (green) と *D. menorah* (magenta) (0.0760)。**e**, Group 3, *D. lacteum* (green) と *D. rhizopodium* (magenta) (0.1529)。**f**, clade violaceum, *P. violaceum* no. 6 (green) と *D. laterosorum* (unlabelled) (0.0171)。**g**, clade violaceum, *P. violaceum* P4Ba (green) と *P. violaceum* 1MN8b (magenta) (0.0197)。**h**, Group 4, *D. giganteum* (green) と *D. purpureum* (magenta) (0.0968)。写真は子実体 (の一部) : **b**, **g**, **h** の左上、集合塊からのびた移動体: **d**, **e**、移動体: **a**, **c**, **f**。2配列の遺伝的距離(siteあたりの塩基置換数)はSSU rDNA 配列に基づいて計算し、各系統間の距離の指標として括弧内に示した。**h**でのみ二つの種は完全に分離し、他の組み合わせでは、少なくとも部分的には混合した箇所が見られた。Scale bars: **a** 25 μ m, **h** 100 μ m, その他 50 μ m。

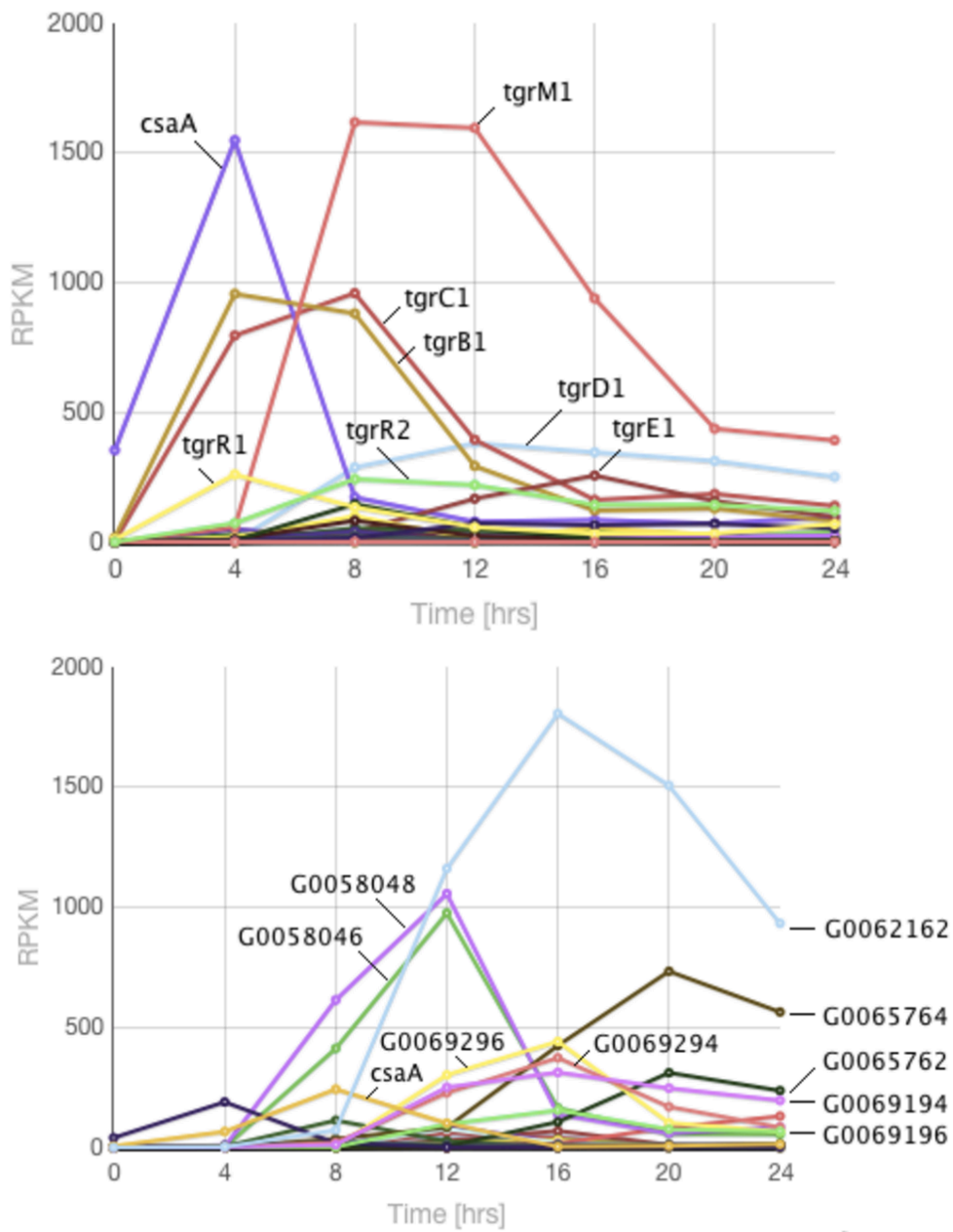


図2-8
D. discoideum (上) と *D. purpureum* (下) 各 *tgr* 遺伝子の mRNA レベル (dictyExpress より)。

dictyExpress (<https://dictyexpress.research.bcm.edu/landing/>)