

細胞性粘菌を用いた実験

Physics Lab. 2020 生物物理班

2020/09/20, 21

目次

1	概要-2 種類の細胞性粘菌-	1
2	結果-2 種とその混合の集合の様子-	1
3	データ解析	4
4	簡単なモデル	5
5	追実験-Dr を除いた対照実験-	6
6	結論-cAMP 波の変化の原理-	7
7	まとめ	8

1 概要-2 種類の細胞性粘菌-

細胞性粘菌の細胞たちは、エサが不足し飢餓状態になると cAMP という物質の波を伝えることで集合します。¹

今回、私たちはキイロタマホコリカビとツユタマホコリカビという 2 種の細胞性粘菌の集合する様子を観察しました (図 1(a,b))。それぞれ、*Dictyostelium discoideum*、*Dictyostelium rosarium*² という学名がついているため、以下では略して Dd、Dr と呼びます。この Dd、Dr の 2 種は cAMP の波の周期 (一度 cAMP が増加してから再度増加するまでの時間) が異なることが知られています。

まず、この 2 種の細胞やこれらを混ぜたものが集合する様子を観察し、それぞれの特徴を調べました。またその中で私たちは集合の際形成される cAMP の波の伝わる速さがだんだん変化することを発見し、その原理を簡単なモデルを用いて説明することを試みました。

2 結果-2 種とその混合の集合の様子-

まずは、Dd、Dr、そしてそれらを同じ割合で混ぜた Mix について、集合する様子を観察しました。それぞれ、総細胞密度は同じにしてあります。だから Mix については Dd と Dr が半量ずつ入っています。

今回観察に用いた蛍光顕微鏡では、蛍光色素や蛍光タンパク質と呼ばれる蛍光を発する限られた物質だけを見ることができます。

¹実際は細胞性粘菌の仲間でも種によって cAMP 以外の物質を用いる。研究の場で主に用いられている種であるキイロタマホコリカビは cAMP を用いており、また今回観察した 2 種はどちらも cAMP で集合する。集合に使う物質を総称して acrasin と呼ぶようだが今回は簡単に cAMP とする。

²rosarium はロザリオ・数珠という意味で、子実体が胞子塊が連なる様子から。

Dd は細胞内の cAMP 濃度に応じて蛍光の強さが変わる蛍光タンパク質を持った変異体があるので、これを用いることで cAMP の波を簡単に見ることができます。Dr については、このようなことができないため、細胞の動きから波の形状を予測しています。cAMP の波が来ると細胞が大きく移動することを利用して、映像の中から特に細胞が移動したところを解析すると波の形状が予測できます。³

細胞はエサが不足した飢餓状態になると集合を始めるため、エサが豊富な培地からまず細胞を取り出して、よく洗ってから栄養のない寒天培地へ薄く広げて観察します。

簡単に見ただけでわかる集合の特徴として、種類にかかわらず次のようなことがありました。

まず細胞が薄く広がった状態から波ができ始めます。何度か波が通過する頃にある程度近くの細胞たちは近付き始めます。cAMP の波はだんだん細かく (波長が短く) なり、細胞たちはどんどん集合してストリームと呼ばれる形状を作って中心へ向かいます (図 1(c,d,e,f,g))。

その後は、今回すべてでは観察していませんが、集合した細胞は移動体を経て子実体を形成します (図 1(h))。これは Mix(200319mix) の集合の映像です。この時ストリームや大きい波はほとんどできませんでした。ちなみにデータの名称は観察した日付と種類の組み合わせです。

各種について、Dr は Dd よりも波ができる周期が長くなっており、だいぶ間をおいたあと一斉に中心に向かって動く様子が見られました。Dr のつくるストリームは Dd よりも細くなっていました (図 1(c,d))。波をみると、Dd は周期が短くらせん波も見られましたが、Dr の作る波は周期が長くターゲットパターンになっていました (図 1(g))。

Mix は驚くべきことに、Dd と Dr が一緒に集合して子実体まで形成しました (図 1(h))。子実体に Dd と Dr が混ざっているかははっきりとわかりません。波は薄く、実験日によってはほとんど見られないこともありましたが、周期はおおよそ Dd とよく似たように見えます。ストリームは波が綺麗にできるほどよく出来ました。ほとんど見られない回もありました。

次に、データをより詳しく解析して周期と波の速さを計測しました。⁴

細胞が集合するにはちょうどいい cAMP の波の速さがあると考えられています [1]。波の速さを測定することは今回 Dd と Dr がともに集合できたことに重要なヒントを与えてくれるかもしれません。(結果としてこのことについてはあまりわかりませんでしたが、波の速さの決まり方をはじめ、多くの考察のきっかけを与えてくれました。)

³一部の細胞のみを蛍光色素で染色して追跡する方法と、映像の各フレームで前のフレームとの差分をとることで変化を抜き出す方法がある。

⁴波の速さとは位相速度のことを指す。これまで同様波が伝わっていく速さのことだが誤解のないように明記しておく。

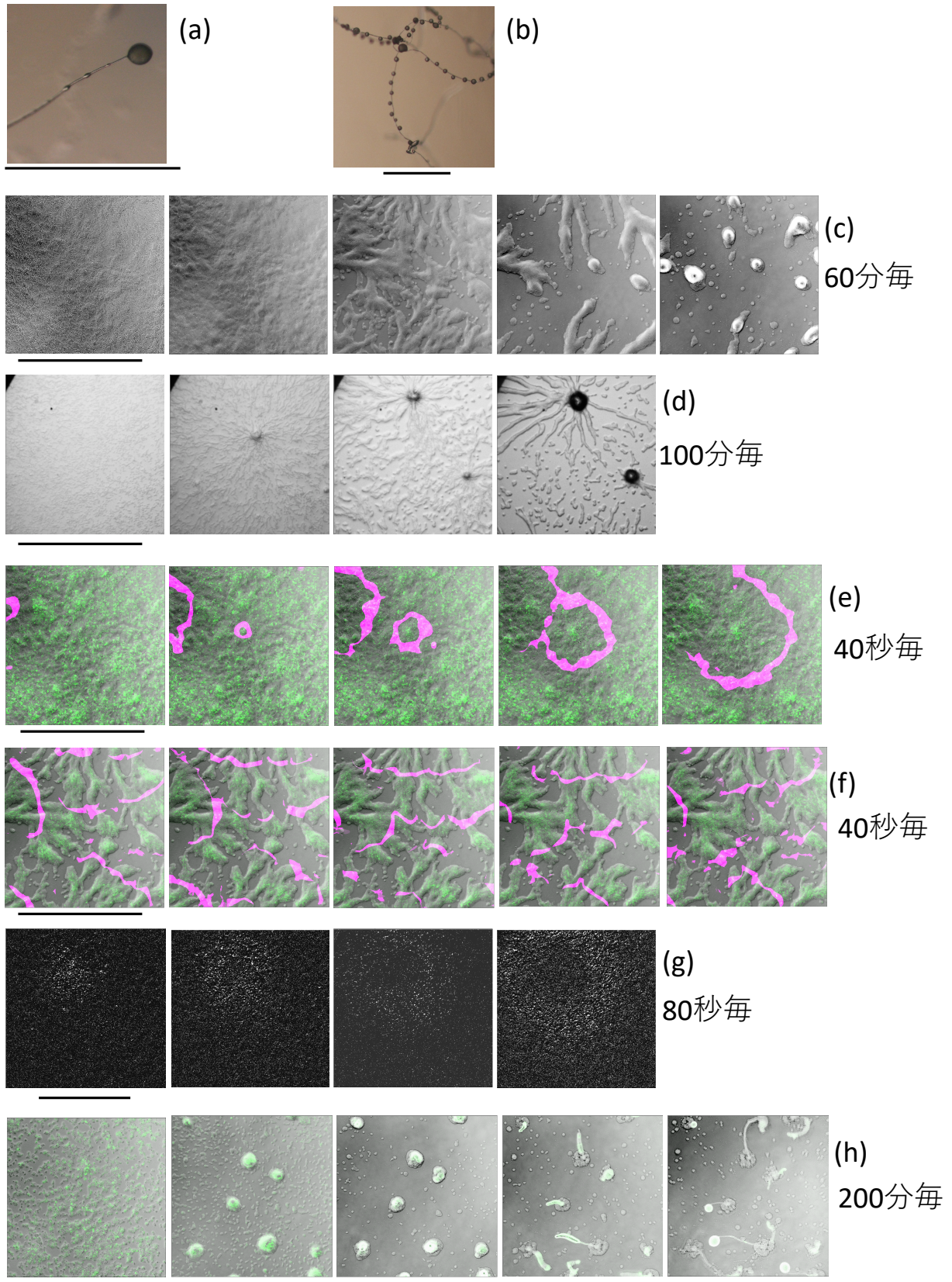


図 1: 黒いバーは 1mm(a) キイロタマホコリカビ (Dd) の子実体.(b) ツユタマホコリカビ (Dr) の子実体.(c)Dd(200312Dd) の集合の様子.(d)Dr(200319Dr) の集合の様子.(e,f)Dd(200312Dd) の集合でできた cAMP の波を着色したもの.(f) は (e) の約 30 分後.(g)Dr(200319Dr) の集合でできた波.cAMP の濃度ではないことに注意.(h)Mix(200319mix) での集合の様子.

3 データ解析

周期と波の速さを計測し、グラフにすると図 2,3 のようになりました。横軸は時間で、それぞれ徐々に変化していることがわかります。

どのデータも、周期はおおよそ徐々に短くなっていることがわかります (図 2)。

また、波の速さは始めが遅く、そこからすぐ速くなりますが、また徐々に遅くなっていくことがわかります。このとき、どれも同じ程度の速さになることがわかります (図 3)。

各種で比較してみましょう。周期は Dr だけが大きく離れて長いことがわかります。しかし集合後期には Dr と Dd が同じ程度になっているようにも見えます。Mix は集合初期中期は Dd と同程度ですが、集合後期では Dd と Dr の間くらいをばらついているようです。

波の速さは Dr がもっとも遅く、Mix についてはばらつきが多くあまり正確にはわかりませんが、Dd よりも少し速いように見えます。混ぜると場が混乱して波が遅くなる気がしていましたが、逆に混ぜたほうが速くなっています。どうしてでしょうか。

さて、このような波の変化の原因を探るため、特に波の速さとその変化を説明すべく次のような簡単なモデルを作って考えました。

計測方法の説明

周期は、まず映像の各ピクセルとそのある程度周囲に含まれる部分の光の強さの時間変化を測定します。このとき光の強さは振動します。各ピクセルの振動のデータについて、各時間でその前後の光の強さの下側のピーク位置を取ると、その間隔が周期になります。このような各ピクセルが持つ周期について、各時間で全ピクセルの最頻値をとることでその時間における周期を求めました。

波の速さは、まず波をはっきり見えるように映像を処理するところから行いました。先ほどとった各ピクセルの振動の様子から下側のピーク位置にあるピクセルに色を付けると、映像全体としては、波の暗い部分に色がつくことになります。

見やすくした波について、あとは単純に進んだ距離とそれにかかった時間を計測し速さを求めています。

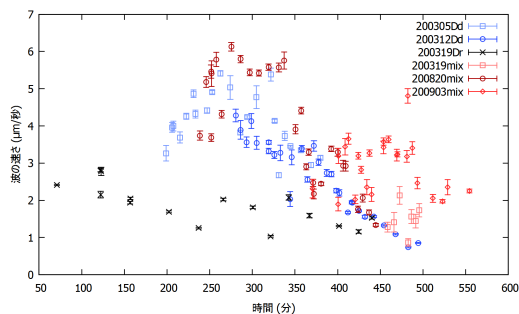


図 2: 各種の周期.

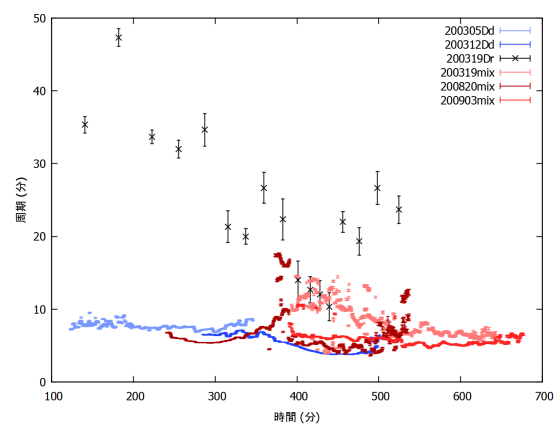


図 3: 各種の波の速さ.

4 簡単なモデル

細胞性粘菌は cAMP を受け取ると、自身も cAMP を作り出して放出することで周囲の細胞へ cAMP を伝えます。これを繰り返すことで cAMP の波が伝わっていきます。その様子から、cAMP リレーと呼ばれます。

これを単純化すると、cAMP の波が伝わる時間は”細胞間を cAMP が運ばれる時間”と”細胞が cAMP を作り出して放出するまでの時間”に分けることができます。ポスターでは簡単に説明してありますが、ここでは単純な数式を用いてもう少し詳しくみてみます。しかし、ここで拡散現象を取り入れて数式を用いて行う議論はこの後の考察であまり必要ないので読み飛ばしても構いません。重要なのは細胞の密度が増すほど波の速さが遅くなるということです。

まず状況設定をします。全体の長さを L 、細胞間の距離を l とし、細胞が N 個あるとします。これらは一列に並んでおり、 $L = l \times N$ が成り立ちます。

細胞間を cAMP が伝わるのにかかる時間を t 、細胞が cAMP を受け取ってから自身で cAMP を作り出して放出するまでにかかる時間を τ とします。cAMP は隣の細胞までしか伝わらないことにします。また、全体 L を cAMP が伝わるのに必要な合計時間を T とします。 $T = (t + \tau) \times N$ です。

さらに物理的な過程を考えます。細胞間を cAMP が運ばれるのは拡散と呼ばれる現象です。これは塩や砂糖を水に入れると混ぜなくても徐々に溶けて広がっていくのと同じです。

拡散では、物質の広がる距離はふつうの速さ $\times$ 時間ではなくて、 $l = \sqrt{2Dt}$ と表されます。 D は拡散係数と呼ばれる定数です⁵。よって、 $t = \frac{l^2}{2D}$ となります。

以上より、 T を l, L, τ, D もしくは、密度 $r = 1/l$ で表すと、

$$T = L\left(\frac{l}{2D} + \frac{\tau}{l}\right) = L\left(\frac{1}{2Dr} + \tau r\right)$$

になります。また、波の速さ V は、

$$V = \frac{L}{T} = \frac{1}{\left(\frac{l}{2D} + \frac{\tau}{l}\right)} = \frac{1}{\frac{1}{2Dr} + \tau r}$$

と書けることがわかります。

グラフにすると次のようになります (図 5)。 $r = 1/\sqrt{2D\tau}$ で波の速さが増加から減少に変わっていることがわかります。

特に、 r が大きくなるほど、すなわち細胞の密度が増すほどに波の速さが遅くなることがわかります。(この後の考察にも用いるこの性質は拡散を考えなくても現れます。拡散の効果が現れるのは $r < 1/\sqrt{2D\tau}$ の領域で、今回の実験ではあまり現れません。ただ、波を速く伝えるのに最適な密度があるということはあるでしょう。)

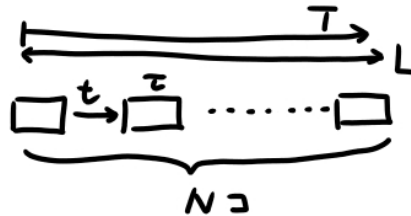


図 4: リレーモデルの図.

⁵ 拡散だと遠くでは濃度が薄くなってしまい十分な cAMP が供給されないかもしれないが、ここでは簡単に平均二乗変位のルートで物質の広がる距離を考える

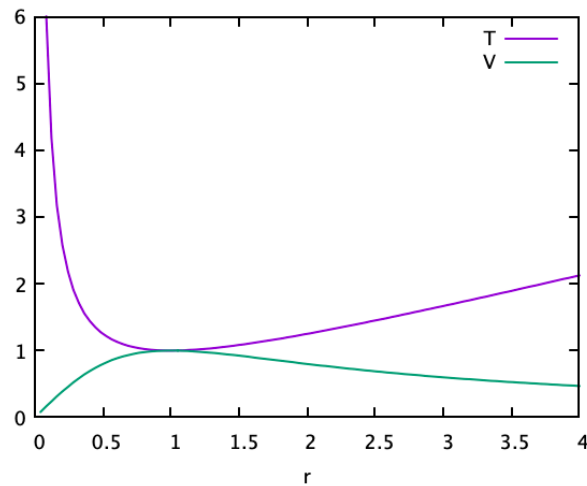


図 5: 一次元リレーモデルからわかる密度 r と伝わる時間、速さ.

5 追実験-Drを除いた対照実験-

Mix の波の速さが Dd より少し速いようであるのは、上のモデルから次のように考えることができます。

まず、Mix で集合初・中期にできる波は Dd によく似ていることから、Mix の中の Dr は cAMP リレーにほとんど参加していないと考えられます。もし Dr を無視して Dd だけで波を作っていたら、実質半分の密度でリレーをしていることになるので確かに波は速くなりそうです。

そこで、もとの Dd の半分の密度で集合を見てみることにしました。これを Dd_half と呼びます。Dd_half は Mix から Dr を取り除いたものに相当します。

Dr が本当に何もしていなければ Dd_half の作る波は Mix と同じになるはずです。

結果、Dd_half の波の速さは集合初・中期でとても速いものでした (図 7)。また、集合後期には Dd と同じになり、Mix と同程度か遅くなりました。

よって、確かに密度が低いと波が速くなることがわかりました。

一方で集合初・中期では Mix の中の Dr は波の速さを遅くする働きを持つようです。原因は二つ考えられます。

一つ目は、単純に Dr が cAMP の拡散の壁になっているということです。リレーのためには cAMP が細胞間を伝わる必要がありますが、その途中に Dr がいることで妨害されているというわけです。また細胞性粘菌は cAMP を分解する物質も持っています。Dr の持つ分解能力で Dd の発した cAMP が分解されていることも考えられます。

二つ目は、Mix の中の Dr の一部がリレーに参加しているということです。Dr は Dd に比べ周期が遅いので、Dd が波を数回伝えるうちに Dr は 1 回波を伝えると長い休止期に入ってしまうことになります。しかしそれでも Dr は数回に一回 Dd のリレーに参加できることになります。

それぞれの効果の強さは普通の Dd と、cAMP を作ることのできない Dd の変異体のようなものを使うことで調べることができるでしょう。

集合後期で Mix の波の速さが他よりも速くなっているのは、Mix のうち Dd だけの密度が他の半分なので自然なことですが、同程度にもなる (200820mix) ののは不思議です。これも原因が二つ考えられます。

一つ目は、Dd と Dr が混ざってリレーに参加していることです。今回はデータが取れていませんが集合後期には Dr と Dd の周期が近づく上に、Mix では確かに Dd と Dr の間に周期があるように見えます。これによって細胞密度が他と同等になっていると考えられます。

二つ目は、集合後期に細胞が立体的に積み重なることによる効果です。もし Dr がリレーに参加しないとしても、半分以上を占める Dd はそれぞれが近づくことで Dr を横にどかして隣接すれば、Dd 単一の時

と同等のリレーができるかもしれません。立体的に細胞が近づくと、平面的に近づいていた時より隣接する細胞の数が増えるのでこのようなことが可能になります。

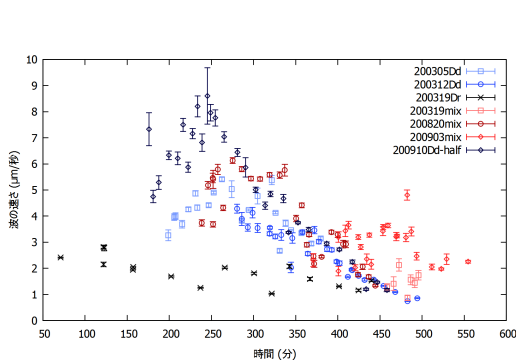


図 6: Dd_half を含めた各種の周期.

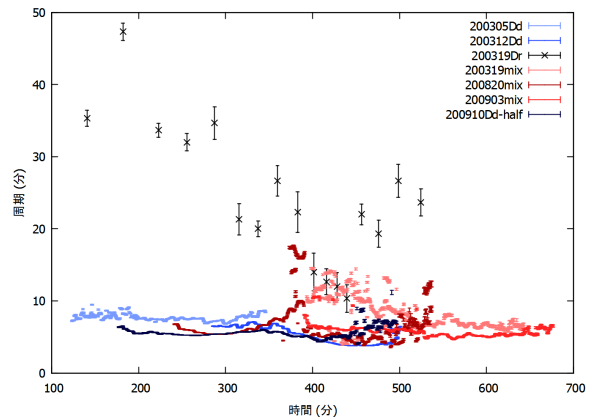


図 7: Dd_half を含めた各種の波の速さ.

6 結論-cAMP 波の変化の原理-

わからないこともまだまだ多いですが、今回わかったことを用いて cAMP の波の時間変化を説明してみます。

周期長い、波の速さ遅い

Dd は周囲の cAMP 濃度がある程度高くないと反応して cAMP を出さないこと、また周囲の cAMP 濃度が低いと cAMP を作る頻度が低いことがわかっています [2]。最初のうちは飢餓状態にある細胞が少なく⁶、cAMP の放出も少ないと考えられます。なので cAMP の濃度があまり高くなく、周期は長くなり、また、リレーに参加できない細胞が多いと考えられるのでそれらがリレーの邪魔をすることで波の速さが遅くなると考えられます。

リレーの邪魔を実効的に拡散係数 D を小さくするものとして考えてやると、 $r < 1/\sqrt{2D\tau}$ をみたすようになり実効的な細胞間隔が大きすぎて波の速さが遅くなったとも考えられるかもしれません。単純に、細胞間を cAMP が移動する速さが遅くなったとも言えます。

もしかしたら集合初期の密度はそもそも $r < 1/\sqrt{2D\tau}$ なのかもしれません。

周期長い、波の速さ速くなる

徐々に cAMP 濃度が上がってきてリレーに参加できる細胞が増えてくると、邪魔をする細胞が減り効率的に波を伝えることができるようになります。およそ同じ頃に周期が短くなるようです。cAMP が十分増えてくるからだと考えられます。

周期短くなる、波の速さ遅くなる

十分周囲に cAMP が増えてきて周期が短くなります。また、細胞がだんだんと集合してくることで細胞密度が大きくなってきて波の速さが遅くなっていきます。

ちなみにそうなる波は波長が短く、すなわち細かくなります。実際にそのようになっているのが確認できます (図 1(e,f))。

⁶ 飢餓状態になると、細胞はランダムに cAMP を作って周囲へ出すようになる

7 まとめ

今回は細胞性粘菌が集合する様子を観察し、そのなかでcAMP波が変化していく様子について簡単なモデルを使って考えました。物理学において実験は理論・モデルを、ある時は作る役割があり、ある時は検証する役割があります。今回も、細胞性粘菌の細胞の振る舞いや拡散からリレーのモデルをつくり、そのモデルから予測される波の速さを実験で検証しました。このように実験(現象)とモデル(理論)をお互いに照らし合わせることによって現象に潜む法則を探っていくのです。この実験を通して物理学の世界の見方を感じ取っていただけたなら幸いです。

謝辞

この実験の実施および展示の作成に当たりまして、総合文化研究科(駒場)澤井研究室、橋村秀典博士にご協力いただきました。深く感謝申し上げます。澤井研究室 HP: <https://sawailab.c.u-tokyo.ac.jp/>

参考文献

- [1] A. Nakajima, S. Ishihara, D. Imoto, S. Sawai, *Nat. Commun.* 5, 5367 (2014).
- [2] T. Gregor, K. Fujimoto, N. Masaki, S. Sawai, *Science* 328, 1021 (2010).