

氏名 (本籍)	澤井 哲 (東京都)
学位の種類	博士 (情報科学)
学位記番号	情博 第 185 号
学位授与年月日	平成 13 年 3 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科、専攻	東北大学大学院情報科学研究科 (博士課程) システム情報科学専攻
学位論文題目	2次元細胞性粘菌集合体の細胞分化と運動
論文審査委員	(主査)
	東北大学教授 沢田 康次                      東北大学教授 山本 光璋
	東北大学教授 前田 靖男                      東北大学教授 矢野 雅文
	(理学研究科)    (工学研究科)

## 論文内容要旨

### 1 緒論

細胞性粘菌の分化と形態形成運動を2次元的な制限のもとで行った研究は、特にこの数年間で活発化している。このような機運の背景には、生物学的な複雑現象の数理的理解への機運と、近年の計算機の高速度化をうけて、解析が現実的であるような問題を設定できるという期待がある。空間の次元が低いほど、現象の数理的なモデル化とその解析が容易である。数値的な解析が可能な問題設定ができるようになれば、その現象のマイクロマクロ関係性について言及でき、したがって現象の本質的な理解につながる。

本論文では、高速パターン形成の問題を軸に、2次元的に拘束した細胞性粘菌の細胞塊の発生についての特性をさらに詳細に探り、その中で注目されたいくつかの点について特に集中的に実験研究を行った。粘菌細胞塊を特定の幾何学的な状態に束縛することで、本研究が目的としたことは、

(1) ガラスマウンド間の2次元的な培養において出現するマウンドや移動体の運動性や、ガラスーガラス間のいわゆる2次元培養系の拘束条件が、細胞の運動と分化におよぼす影響について調べること。(2) 高速パターン形成のメカニズムを明らかにすること。また、それと分化への影響を明らかにすること。2次元培養系内の酸素勾配、分化パターンそして高速パターン形成はどう関連しているかを解明することである。

### 2 高速パターン形成

粘菌の位置依存的な分化との関連において、2次元培養系という新しいアプローチに注目したい。そこで観察される高速パターン形成(図1)は、本研究の展開の中心軸となる現象である。Bonnerらは1994年、細胞性粘菌の細胞塊を1次元キャピラリー内に閉じ込め、片方をオイルで封じ、もう片方を大気に触れさせるような環境に置くと、数分間で大気側に明瞭な明暗パターンが出現することを発見した。大気側の暗層の細胞と内層の細胞では、その形

状や運動形態が著しく異なり、生体染色パターンは明暗パターンが細胞分化と関係していることを示唆した。ここでは、スパーサーで隔てられた2枚のスライドガラス間の空間内に細胞塊を閉じ込めて、これを2次的に行う。

### 3 主な実験結果

**系のサイズへの依存性。**Ax-2細胞の2次元培養系においてもNC-4と同様の高速パターンが出現し、外層幅は系の大きさに依存しないことが分かった(図省略)。さらに興味深いことに、NC-4(サンプル数39, 平均 $110.1\mu\text{m}$ , 標準偏差7.7)に比べAx-2の外層幅は大きい(サンプル数42, 平均 $145.4\mu\text{m}$ , 標準偏差13.5)。NC-4に比べAx-2の場合、境界が安定しないためか、外層幅により大きな分散が認められる。なお、測定系に由来する読み取り誤差はおよそ $12.5\mu\text{m}$ である。

**系内の酸素濃度への依存性。**Ax-2で作成した系の酸素濃度を調べた。大気酸素(20%)以下ではほとんど外層幅に変化は見られないが、高酸素条件ではその幅は濃度の平方根にほぼ比例するかたちで増大する。また、こうした酸素濃度に対する幅の変化は可逆な反応であり、酸素100%条件から大気条件へ開放すると数分以内にパターンの変化が追従する。高酸素条件下で観測される外層幅には、通常大気条件でみられる系の幅の揺らぎをはるかに上回るばらつきも認められる。

多孔質ガラス下における高速パターンは、最初の30分ほどは通常ガラス下の場合とほぼ同様の振舞を示す。外層の幅も通常ガラスの場合と同じだが、30-60分の間に内層内の細胞も不均一に暗くなりはじめ、同時に外層が明るく見えるようになる。細胞が暗くなるのが、内層で遅れるのは、多孔質ガラス中の酸素の輸送が限られているからと考えられる。さらに6-10時間ほどすると、内層の明暗の不均一さが秩序立ってくるのが観察される(図1)。暗い細胞の塊をタイムラプスで記録し、それらが動いていることを確認した。自己相関解析を行った結果、平均スポット間距離 $\lambda$ は、NC-4, Ax-2についてそれぞれ、 $\lambda=100\pm 10\mu\text{m}$ ,  $\lambda=143\pm 4\mu\text{m}$ であることが示された。興味深いことに、外層幅において確認されたものと同様のパターンサイズの細胞依存性が、スポットパターンにおいても見られる。

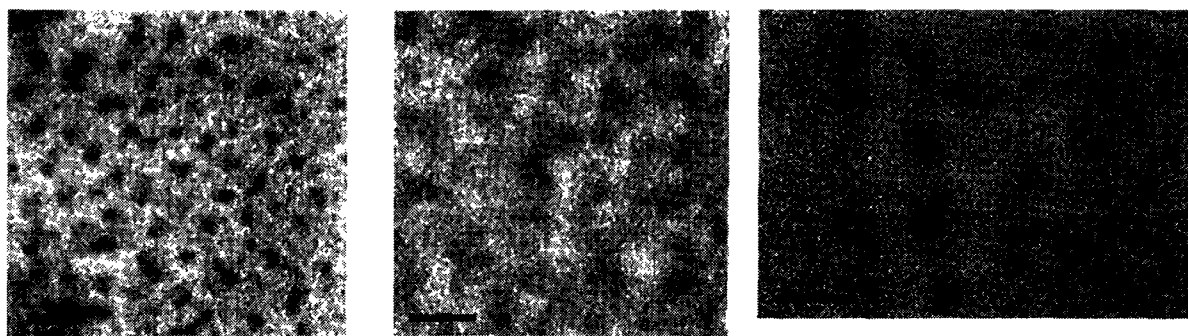


図1 多孔質ガラス下におけるパターン形成。スケールバーは(a) $200\mu\text{m}$ , (b) $100\mu\text{m}$ , (c) $150\mu\text{m}$ 。

**系の温度への依存性。**外層の幅は温度に対して顕著な変化を示すことが明らかになった。 $2^{\circ}\text{C}$ から $40^{\circ}\text{C}$ の温度領域においてパターンは出現し、温度が低下するにしたがって、幅は増大した。低温では外層と内層のコントラストの違いがはっきりするため30分から1時間を要するが、系作成から2分ほどで明るい境界の出現は確認される。高温では系作成後2分ですみやかに明暗パターンのコントラストがはっきりする。図2は温度と外層幅と

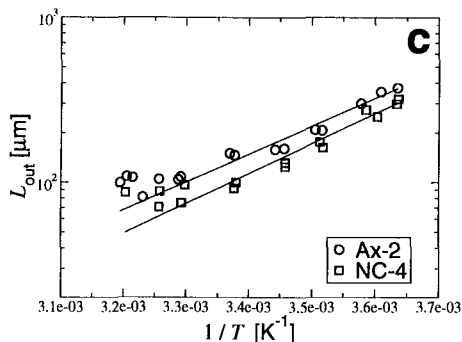


図 2 外層幅の温度依存性。Ax-2 と NC-4 細胞の両方で同様の傾きが得られ、これから反応の見かけ上の活性化エネルギーが求まる。

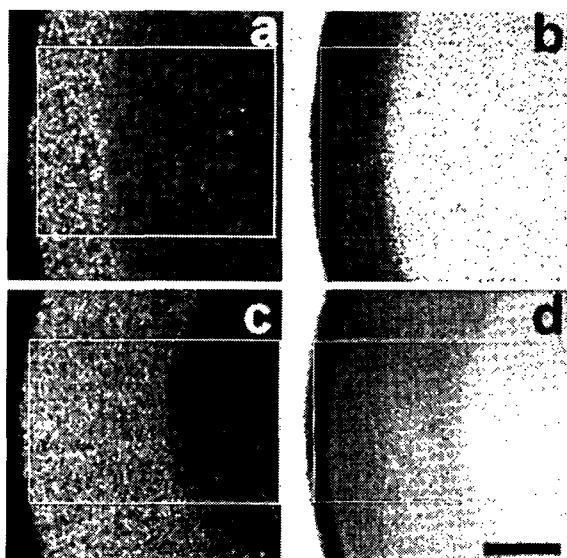


図 3 細胞質 pH と高速パターン形成。(a, b) 大気酸素濃度と (c, d) 100% 酸素下の実験。スケールバーは 200  $\mu\text{m}$  を示す。(a, c) 蛍光強度像と (b, d) 透過光像。

の関係を示したものである。便宜上、横軸には絶対温度 (K) の逆数を取り、外層幅を対数軸上にとってあるが、摂氏に換算するとおよそ 2°C から 40°C の間で行われた実験結果のプロットである。NC-4、Ax-2 細胞で幅の大きさは異なるが、直線の傾きはほぼ同じである。

**pH の変化と高速パターン。** 図 3 に見るように、フルオセインの蛍光強度は最外層の細胞で最も大きく、内層にむけて徐々に蛍光強度が下がり、内層と外層の境界付近で急激に低下し、内層においても徐々に低下した。これは内層細胞の細胞質が外層細胞に比べ低いことを意味している。また、0.02% のプロモクレゾールパープル (pH 5.2 黄、pH 6.8 紫) を含んだ BSS を用いて、2 次元培養を行うと、外層が紫色となり、内層が黄色となることが確認された。さらに、0.04% のプロモクレゾールパープルを含んだ BSS 10  $\mu\text{l}$  を、細胞塊から 1mm ほど離して、pH 変化の有無を観察したところ、系作成から約 2.5 時間ではっきりとした黄色から紫への変化が確認された。これらから、外層細胞が塩基性ガスを活発に放出していることが明らかになった。細胞質 pH を変化させることが知られている処理を加えることによって、パターンそのものに変化が見られるかについても検討した。5-20mM のプロピオン酸はパターンの出現を遅らせ、明暗のコントラストを著しく弱める効果を示した。パターンがはっきりするまでの時間はプロピオン酸濃度が高いほど長くなる。同濃度を pH 8.0 の PB に加えた場合では、これらの影響は一切見られなかった。また別の弱酸として DMO を用いた場合でも同様の効果があった。逆に弱塩基として、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  を 5-20mM 加えた実験では、パターンの出現は高速化され、およそ 0.5-1.5 分以内にコントラストの強いパターンが確認された。pH を 6.0 に下げた PB で同様の実験を行った

場合には効果が認められなかった。また、同程度の濃度のメチルアミンでも同様の効果が認められた。

**プロトンポンプの阻害。** 細胞膜上の起電性プロトンポンプの阻害剤である DES およびミコナゾールのパターンへの影響を調べた。DES はインキュベーション時間が 1 分以内の場合、10  $\mu\text{M}$  では通常パターンが出現し、15  $\mu\text{M}$  だと幅の広い (150-170  $\mu\text{m}$ ) のパターンが出現する。20 および 30  $\mu\text{M}$  では過渡的なパターン (幅約 200  $\mu\text{m}$ ) が 1 時間ほど出現した後に消失し、50  $\mu\text{M}$  で完全にパターンの出現が抑えられた (データ省略)。5 分から 10 分のインキュベーション時間によって効果はより顕著なものとなり、10-20  $\mu\text{M}$  でパターンの出現がほぼ抑えられた (ただし低倍率観察で

は幅  $250\mu\text{M}$  の外層が認められた)。コントロール実験として、0.5%エタノールだけで同様の実験を行っても、高速パターンに変化は全く認められなかった。

#### 4 考察

**パターン機構のモデルシミュレーション。**高速パターン形成が、反応-拡散機構によって説明されることをより具体的に示すため、substrate-depleted 型の最も標準的なモデル方程式であるブラッセレータの数値解析結果をもとに解説する。具体的なスキームとしては、 $X$  を弱酸もしくはその前駆体となるアミノ酸、 $Y$  をアンモニア、 $A$  を分解されるタンパク質、 $B$  をアミノ酸をさらに分解してアンモニアが生成される際に必要とされる基質としている。ここでは  $B$  が酸素濃度に依存して、細胞の代謝を制御するパラメータであると仮定する。したがって  $B$  は系内の酸素勾配を反映して空間的に変化する関数として与える。

図 4 (左) に示すように、 $B$  の傾きが十分に大きい場合、系の最も外側に 1 周期分のパターンが出現し、内部では一様に落ちるようなことが生じる。ちなみに図内の矢印は全て、境界から線形安定性解析から求まる固有長の半分の地点を示している。このように  $X$  と  $Y$  は、波長のピークが半波長ずれるため、強い非線形性を考慮に入れずとも、境界付近で pH が急激に落ちることが説明しやすい。また、通常の 2 次元培養系で周期パターンが内層の奥側で出現しない原因などについても理論的な予想がつく。また、 $B$  の値をさらに上げ、かつ内部の  $B$  の値も上げた場合は、図 4 (右) にみるように内層内で  $Y$  がスポット状の周期構造をとる。

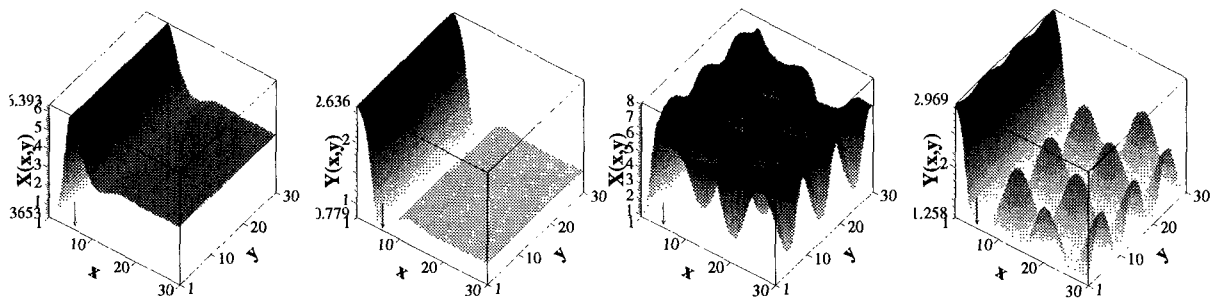


図 4 (左) 酸素勾配の存在によりパターンが系の外側にのみ限られて存在する。矢印は方程式の線形安定性解析からもとまる固有長の半分の長さの位置を示す。(右)系内部に酸素があると、内部に周期パターンが出現する。

#### 5 結論

チューリング不安定性によるパターン形成であるとこれまで考えられる生物系の例では、既存の細胞の異質性や、境界条件を設定することの難しさから、その機構を特定することは以前困難な状況にある。それと比較し、高速パターン形成では、系の初期条件が一様であることや、酸素や温度などの境界条件が設定でき、かつパターン機構は細胞の代謝物という基本的な要素が、高濃度で生成され、これが拡散し、さらに細胞がこれに生理学的な応答するという基本的なものと考えられる。粘菌の高速パターン形成のメカニズムが反応-拡散である可能性は非常に高く、その意義は大きい。

## 論文審査の結果の要旨

生物のパターン形成は発生生物学の基本問題として、近年その重要性が増してきた。しかし、パターン形成の基本的機構の一つと考えられているチューリングパターンは約50年前に提案されて以来、制御可能な生物的システムでは実現されていなかった。著者は、典型的なモデル生物である細胞性粘菌の細胞集合体を2次元空間に閉じこめることによりチューリングパターンを初めて実現し、その発生機構を解明するための研究を行った。本論文はこれらの成果を取りまとめたもので全編5章からなる。

第1章は序論であり、本研究の研究分野の背景と目的について述べている。

第2章では、本研究の研究手段となる細胞性粘菌*Dictyostelium discoideum*の培養方法と、研究に用いた制御系と観察・測定方法について述べている。

第3章では、2次元培養実験系に関する測定結果について述べている。まず、2枚のガラス板の数10 $\mu$ mの間隙に細胞を閉じこめると数分内に生じる外周に沿った約100 $\mu$ m幅のリング状パターンについて述べ、この幅が環境酸素濃度やシステムサイズによらず一定値を取ることから非線形力学的自己組織構造であることを見いだしている。また、リングの幅温度依存性からその非線形力学が化学反応に起因していることを結論している。さらに多孔質ガラスを用いることにより、リング状パターンの内側にはほぼ等間隔のスポット状パターンが現れることを発見し、チューリングパターンと断定できることを述べている。このことは、制御可能な生物系における初めてのチューリングパターンの発見として重要な成果であり高く評価できる。つづいて、蛍光プローブおよび前処理による影響を測定し、このパターン形成が細胞質pHの変化と深く関連した現象であることを明らかにしている。このことは、このパターンの発生機構を細胞内の生理学的状態変化として捉えたもので評価できる。

第4章では、実験結果の考察を行い、実験から示唆される様々な状況的な証拠からこのパターン形成のメカニズムとしての反応-拡散機構を提案している。また、その基礎的なモデル方程式の数値シミュレーションを実行することにより、このモデルメカニズムが実験結果をうまく説明することを示している。このことは、生物に現れるパターン形成について新しい知見を加えたもので評価出来る。

第5章は結論である。

以上要するに本論文は、細胞性粘菌の2次元細胞集合体において制御可能な生物系における初めてのチューリングパターンを発見し、そのメカニズムの理解を進め、多細胞の生物システムに出現するジェネリックな構造形成機構を明らかにしたもので、生物物理学およびシステム情報科学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士(情報科学)の学位論文として合格と認める。