

真性粘菌変形体の誘引、忌避刺激に対する
情報処理過程と Ca^{2+} 濃度の時空間パターン

夏目 季代久

真性粘菌変形体の誘引、忌避刺激に
対する情報処理過程と
Ca²⁺濃度の時空間パターン

夏目 季代久

序論		1
第1章	はじめに	2
第2章	真性粘菌変形体	3
第3章	真性粘菌変形体の走性	7
第4章	真性粘菌変形体の振動現象と情報処理	9
第5章	真性粘菌変形体中の化学物質の細胞内濃度パターン と情報処理	13
第6章	本研究の方針	14
本論		16
第1章	真性粘菌変形体の誘引刺激に対する情報処理過程と Ca^{2+} 濃度の 時空間パターン	17
第1節	序	17
第2節	材料と方法	17
1.	粘菌変形体	17
2.	Ca^{2+} 濃度測定装置	18
3.	細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定	21
4.	行動速度の評価	22
第3節	結果	22
1.	誘引刺激時の細胞内時空間 Ca^{2+} 濃度パターンの変化	22
1)	誘引刺激前後における変形体内の時空間的な Ca^{2+} 濃度 パターン	23
2)	Ca^{2+} 濃度パターンと変形体の行動方向との関係	27

第4節	考察	27
1.	誘引刺激に対する情報処理過程におけるCa ²⁺ 濃度時空間パターン変化生成のメカニズム	31
第2章	真性粘菌変形体の忌避刺激に対する情報処理過程とCa ²⁺ 濃度の時空間パターン	35
第1節	序	35
第2節	材料と方法	36
1.	粘菌変形体	36
2.	細胞内Ca ²⁺ 濃度パターンの測定	36
第3節	結果	38
1.	変形体への局所的な忌避刺激による細胞内Ca ²⁺ 濃度の時空間的なパターンと行動速度の変化	38
第4節	考察	42
1.	忌避刺激に対する情報処理過程におけるCa ²⁺ 濃度時空間パターン変化生成のメカニズム	46
2.	自己組織されたCa ²⁺ 濃度時空間パターンと情報処理過程	46
第3章	嫌氣的条件下での局所的誘引刺激時の変形体内Ca ²⁺ 濃度時空間パターン変化	50
第1節	序	50
第2節	材料と方法	50
1.	粘菌変形体	50
2.	細胞内Ca ²⁺ 濃度パターンの測定	51
第3節	結果	53
1.	嫌氣的条件が化学刺激前の変形体Ca ²⁺ 濃度パターン及び	

行動速度に与える影響	5 3
2. 嫌氣的条件下において誘引刺激をした時の変形体内 Ca^{2+} 濃度パターン及び行動速度	5 3
3. 変形体に誘引刺激後、嫌氣的条件下にした時の変形体内 Ca^{2+} 濃度パターン変化及び行動速度変化	5 7
第4節 考察	5 7
結論	6 3
第1章 本論のまとめ	6 3
第1節 本論第1章のまとめ	6 3
第2節 本論第2章のまとめ	6 3
第3節 本論第3章のまとめ	6 4
第2章 変形体の Ca^{2+} 濃度時空間パターンと情報処理過程	6 6
文献	6 8
謝辞	7 3

序論

序論

第1章 はじめに

最近、様々な生物において細胞内 Ca^{2+} 濃度パターン、つまり Ca^{2+} 濃度振動と Ca^{2+} 濃度勾配、がみつかっている。例えば肝細胞、下垂体のgonadotropesやsomatotropes、血管内皮細胞、繊維芽細胞はホルモン及び神経伝達物質の投与により細胞内 Ca^{2+} 濃度振動が引き起こされる(Woods et al. 1986; Woods et al. 1987; Shangold et al. 1988; Holl et al. 1988; Jacob et al. 1988; Harootunian et al. 1989)。メダカ卵の授精時に Ca^{2+} 波が伝搬する事(Yoshimoto et al. 1986)やハムスターの卵に Ca^{2+} 振動(Culbertson et al. 1985; Miyazaki 1986)が生じる事は有名な話である。また白血球の一種である好酸球には、移動相と静止相があり、その移動相においては細胞内進行方向から後部への Ca^{2+} 濃度勾配が存在し、その濃度勾配は走化性と関連がある(Brundage et al. 1991)。現在、これら細胞内パターンの機能に対する重要性が示唆されているが、実際の機能は不明のままである。現在までの研究では、そのパターンの生成メカニズムに主眼がおかれ、その機能に着目する研究は少なかった(Berridge 1990)。最近、Goldbeterら(1990)により Ca^{2+} 濃度振動の振動数変化が Ca^{2+} 依存性磷酸化酵素の活性化を制御しているという提案がなされたのみである。大部分の細胞では Ca^{2+} 濃度パターンは Ca^{2+} 濃度勾配か Ca^{2+} 濃度振動のどちらか一方しか持ち合わせていない。しかし真性粘菌変形体は、その両方のパターンを持ち合わせ、さらに種々の走性があるので細胞内情報処理過程と細胞内 Ca^{2+} 濃度パターンとの関係を調べようとする時、非常に都合の良い材料である。

第2章 真性粘菌変形体

真性粘菌 (*Physarum polycephalum*) はモジホコリカビの和名を持つ細胞であり、変形菌植物門の粘菌類に分類される生物である。この細胞の生活環を図1に示す (Wick and Sauer 1982)。通常、実験に使用するのは変形体の状態である。この変形体は移動能力を持つ多核の $2n$ 体である。移動時、細胞は図2に示すように進行方向前部は扇状に、後部に行くに従って管状の構造を形成している。この変形体をある一定時間、飢餓状態にして、光刺激を与えると子実体を形成する。子実体中の胞子は単核 n 体であるが発芽すると外部環境に応じて鞭毛細胞もしくはアメーバになる。これらのアメーバが細胞融合及び核融合を繰り返して前述の変形体に戻る。変形体を乾燥状態に置くと細胞壁が形成されスクレロチウムになる。スクレロチウムに水分をかけると再び移動体である変形体に戻る。従って実験前、スクレロチウムの状態で保存して置き実験前に水分を掛け変形体の状態にし実験に使用する非常に便利な生物である。

変形体は面積として $\text{cm}^2 \sim 1 \text{ m}^2$ に及ぶものまでであるが、その細部の構造は比較的単純で、図3に示すように外質ゲルと内質ゾルの2種類の構造に分化している。外質ゲルは内質ゾルを取り囲むチューブ状をして能動的な収縮弛緩振動をしている (Ueda and Gotz Von Olenhusen 1978)。その運動能力は、外質中にあるアクチンフィラメントにより発生している。一方、内質ゾルは外質の中を満たしており、外質中に見られるようにアクチン分子がフィラメント状には存在せず細かいアクチン分子の断片として粘性も低い。この内質は外質が発生する収縮弛緩振動による内圧差に従い受動的に往復原形質流動を示す (Kamiya 1950, Kamiya and Kuroda 1958)。

また変形体の原形質膜は神経細胞のような興奮性を持たず、活動電位を発生する事はない (吉本 1979)。

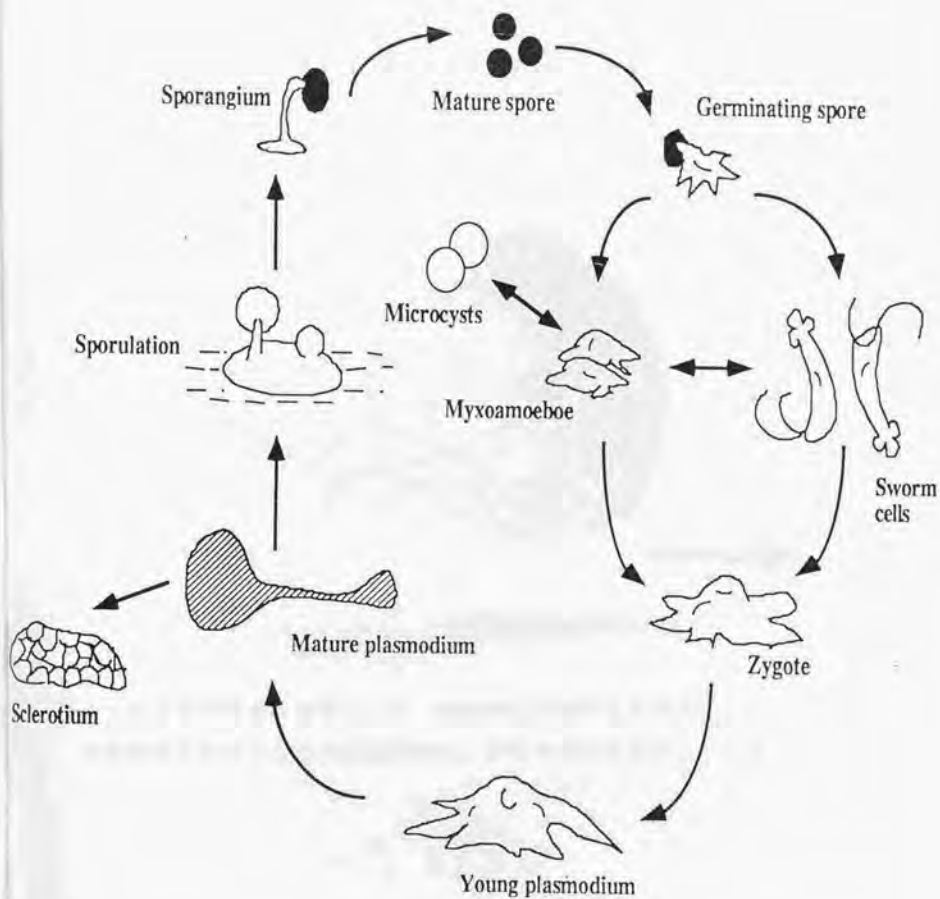
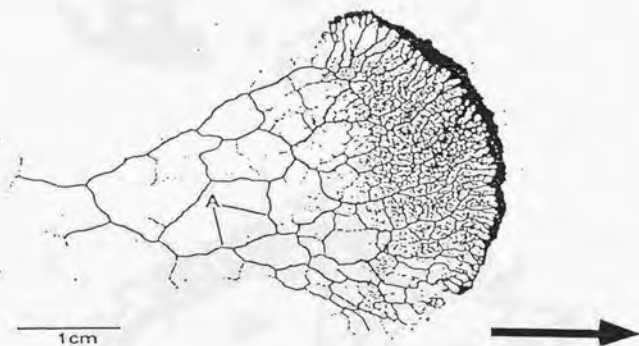


図 1. 真性粘菌変形体の生活環 (Alexopoulos & Mins(1979)の改変による)

実験に使用したのは図中、変形体 (plasmodium) の相である。



Stiemerling (1970)

図2. 真性粘菌変形体の写真 (Stiemerling (1970)より引用)

無栄養寒天培地上をはい回る変形体。矢印の方向に進行している。

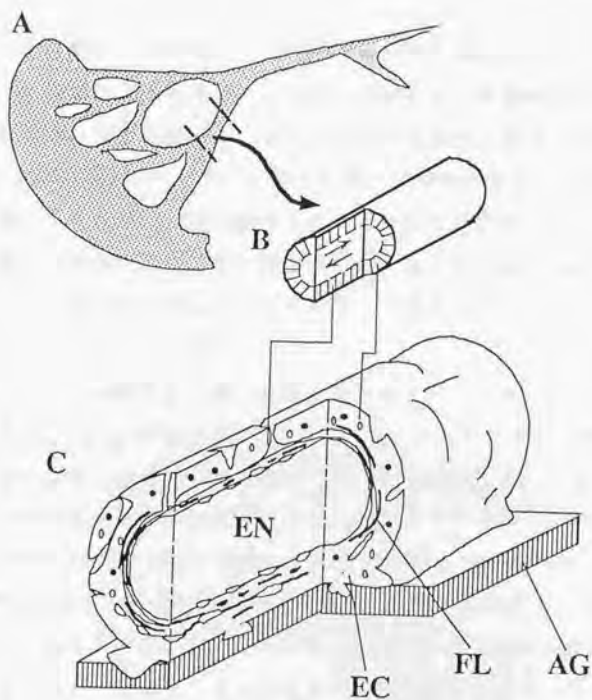


図3. 真性粘菌変形体の構造 (Fleischer M & Wohlfarth-Botterman KE(1975)の
 改変による)

Aは、移動中の変形体の模式図である。図中、点線部分の拡大断面図が、Bである。矢印は、往復原形質流動を表す。また、さらに、この部分を拡大したものが、図Cである。図中、ENは原形質ゾル、ECは原形質ゲル、FLはアクチオン繊維、AGは寒天板を表す。変形体は、原形質ゾルと、それを取り囲む原形質ゲルからなる。往復原形質流動に関係するアクチオン繊維は、外側の原形質ゲル中に存在する。

第3章 真性粘菌変形体の走性

変形体には走熱性、走化性、走光性、走電性等、種々の走性が存在する。Tsora (1975) 及び Durham ら (1976) は変形体に局所的な熱を加えたとき高温側へ移動することを発見した。また走光性では青色光に対して負の走性を示す (Bialczyk and Rakoczy 1975)。さらに様々な波長の光を与えた時の変形体の行動速度を測定した報告によると波長 500 nm 以下または、700 nm 以上の光は忌避刺激、600~700 nm は誘引刺激であった (Hato et al. 1976)。走電性については変形体の両側に電極を配置し電場をかけると、マイナス極方向に進行する (Ueda et al. 1990)。

走化性については特によく調べられているがグルコース、ガラクトース、マルトース、 KH_2PO_4 、 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 、オートミールなどが誘引刺激で変形体の接近反応を誘起し、sucrose、 KCl 、 NaCl 、 CaCl_2 などが忌避刺激であり逃避反応を変形体に起こすことが知られている (Coman 1940, Carlile 1970, Ueda et al. 1975, Knowles and Carlile 1978, Ueda and Kobatake 1982)。例えば変形体の進行方向後部に局所的に誘引物質であるオートミールを与えたときの反応を図4に示す。これによると刺激場所の変形体が扇状に形態化しているのみならず、刺激をしていない部位の刺激前、扇状だった部分も管状構造に変化した。これは局所的な刺激に関する情報が刺激をしていない部位に伝搬し細胞全体として協調的な応答をしていると考えられる。また変形体の数カ所に誘引刺激を与えたとき変形体は分裂すること無く一つの刺激を選択する。この事は変形体は走性の発現において各部分の外部環境から入力される情報に対してただ単に受動的に応答するのではなく、入力情報を統合し、個体全体としての進行方向を判断し応答する情報処理を行っていることを強く示唆している (三宅 1990)。

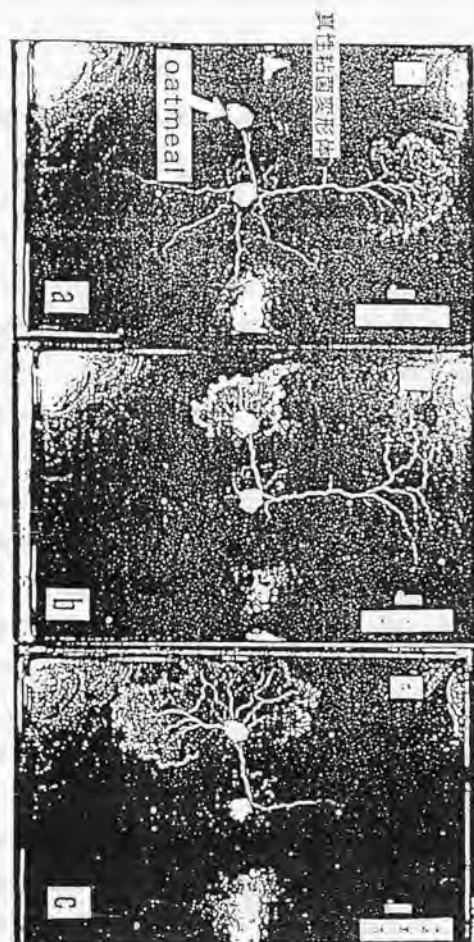


図4. 真性粘菌変形体の誘引刺激に対する応答 (三宅 (1988)より引用)

写真中矢印の先(進行方向後部)に変形体に対する誘引物質であるオートミールを与えた。数時間後には変形体は、そちらの方にファンを出し進み始めた。同時に今まで進行方向前部のファンだった場所が、管状の組織に分化し始めた。

変形体には、様々な振動現象が報告されている。変形体のひも状原形質部分では、その中を1~2分で流動方向を反転する、周期2~4分で流れる内質ゾルの往復原形質流動が観察される(Kamiya 1950)。これは、外質ゲルの収縮弛緩振動による受動的流動である(Kamiya and Kuroda 1958)。故に、切り出してきた変形体糸のひも状部分は、その長軸方向または、直径方向に、ほぼ同周期で振動している事も確認された(Kamiya 1970; Wohlfarth-Bottermann 1975; Samans et al. 1976)。さらに、外質ゲル中のF-アクチン繊維束の周期的形態変化(Nagai et al. 1978)が、張力振動と一定の位相関係がある事が報告され、その繊維束の張力発生への関与が示唆されている。そこで、張力発生を制御している物質との関連が調べられ、細胞内 Ca^{2+} 濃度(Yoshimoto et al. 1981)は、張力振動と逆位相で変化し、細胞内ATP濃度(Yoshimoto et al. 1981)、細胞表面及び細胞内 H^+ 濃度(Nakamura et al. 1982; Nakamura and Kamiya 1985; Fabczak and Fabczak 1985)は張力と同位相で変化した。また細胞内c-AMP濃度、c-GMP濃度(Akitaya et al. 1984; Ueda et al. 1986)、変形体糸の表面温度振動(Allen et al. 1963; Tanaka et al. 1987)なども張力振動と同調して振動している事が明らかにされた。また2点間での表面電位差(Kishimoto 1958)、表面電位(小松 1988)、細胞内電位(Rhea 1966; Meyer and Stochem 1979)等も張力振動と同程度の周期で振動していた。

さらに変形体における張力振動を生成しているリズムジェネレーターの同定も行われてきた。変形体ホモジェネートの希釈上清において、 Ca^{2+} 濃度振動が、観察された事(Yoshimoto and Kamiya 1982)は、 Ca^{2+} 振動生成には原形質膜は必要ない事を示した。さらに、嫌氣的条件下において張力振動の周期が増加する事(Wohlfarth-Bottermann 1979)、また種々の代謝阻害剤を用いた実験、例えば、解糖系阻害剤は張力振動の周期を変化させない事、呼吸系脱共役剤は周期を増加させる事、 Ca^{2+} 取り込み阻害剤は振動を停止させる事等(Satoh et al. 1982)

から、ミトコンドリアの細胞内Ca²⁺調節機構が、張力振動を制御している実態として注目されている。

また変形体内には、振動現象の空間的同調が多く報告されている。変形体系であれば張力振動に於いて、数cm～数10cm離れた2点間でも同調する事 (Yoshimoto and Kamiya 1978; 上野 1982; Samans et al. 1984; Hejnowicz et al. 1984) が報告されている。その振動は、変形体を小さく切断すると各部分が、元の周期とは異なる固有の周期で振動する事 (Takeuchi and Yoneda 1977) が、知られているので、変形体内に見られる空間的な同調現象は、複数のリズムジェネレーター間の相互作用により構成されている事を強く示唆している。

変形体には、第3章で述べたように、様々な走性が存在し、その情報処理過程に、振動現象が関与する事が報告されている。走化性に関する処理過程において、誘引刺激に対して体積振動の周期が短くなり、忌避刺激に対しては、周期が長くなる事が報告されている (Durham and Ridgway 1976)。また負の走光性を示す青色光照射により、やはり、体積振動の周期は長くなる (Block and Wohlfarth-Bottermann 1981)。特にグルコース、青色光に対する周期変化は、KCN処理で抑制されること (Baranowski et al. 1983) から、呼吸系の関与も示唆されている。さらに、化学物質または温度を局所刺激すると変形体に秩序ある空間的位相関係が生成する事が、体積振動 (Hejnowicz and Wohlfarth-Bottermann 1980; Ueda et al. 1986; Matsumoto et al. 1986a)、表面温度振動 (Tanaka et al. 1987) において報告されている。誘引刺激を受けた部分は、その周りよりも振動の位相は進んでおり (図5)、一方、忌避刺激では、位相遅れである事がわかる。またこの空間的な位相勾配は、変形体の行動方向と対応がある事 (Matsumoto et al. 1986b) も報告されている。

従って変形体に於いては、これら振動現象、特に、周期の増減、空間的な位相関係の進み、遅れ等の秩序を利用して情報処理がなされていると考えられる。特に変形体の内質部分は、振動周期の伝搬に関して非対称性があり、短い周期ほど伝搬し易い。この事は変形体の行動方向の選択過程に重要な役割をしていると考えられている (Miyake et al. 1991)。

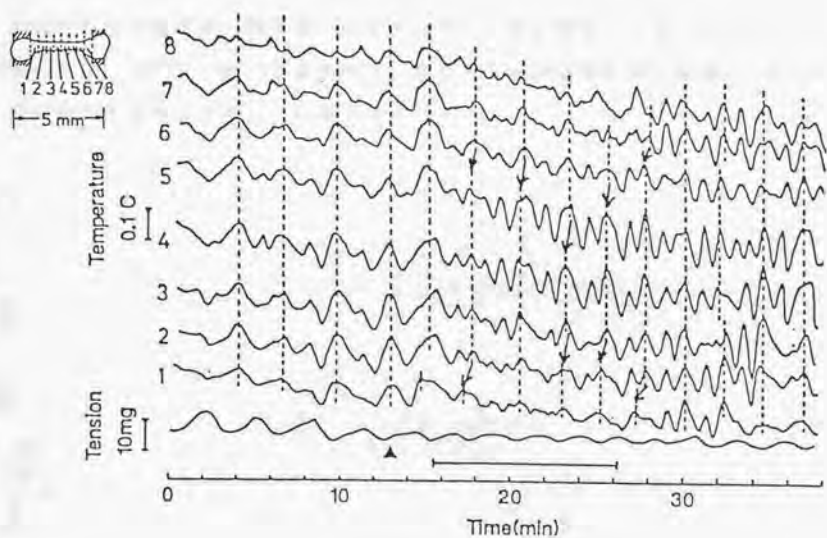


図5. 局所的誘引刺激を与えた時の変形体表面温度振動の時空間パターン変化 (Tanaka et al. (1987)より、引用)

図中番号は、挿入図に示した変形体系の長軸に沿った測定部位を表す。縦点線は、各振動の対応するピークを表す。矢頭の場所で部位1に誘引刺激である10 mMガラクトースを与えた。刺激直後から、刺激15分後まで、空間的な位相勾配が生成している(図中、矢印の方向に位相進みになっている)。その後、位相勾配は消失した。

しかしもし、空間的な位相勾配が変形体の情報処理過程に関与しているならば、変形体の刺激時、位相勾配は変形体が行動方向を細胞全体として変化させる以前に形成されているはずである。ところが変形体の位相勾配と行動方向変化の関係は最近までわかっていなかった。三宅ら(1991)によって、最近、位相勾配形成が、行動方向の変化に先んじている事が、示された。従って位相勾配は変形体の協調的行動に対する情報処理に関与していると考えられる。しかし、それにも関わらず空間的な位相勾配の行動発現機構については、わかっていない。さらに温度振動の位相勾配は、刺激後、細胞が協調的行動を開始した後、消失する(Tanaka et al. 1987)。従って位相勾配以外のパターンも変形体の協調的行動に対する情報処理過程に関与していると考えられる。

振動現象と共に、変形体の行動方向と一致してATP、ADP、cAMP、cGMP等の化学物質の濃度勾配が細胞内に存在する(Ueda et al. 1986)。その勾配は、進行方向前部の濃度が高く、後部にしたがって、低くなる。この濃度勾配は、局所的な化学物質の刺激によって変化する(Ueda et al. 1987, 1988c)。その変化は細胞の行動に関与する細胞骨格系と相関がある(Ueda et al. 1990)。また変形体のガルバノタキシスにおいて、変形体が行動方向を変化させる時、プラス極からマイナス極の方向にATPの濃度進行波が伝搬する事が、報告されている(Ueda et al. 1990)。さらに、この化学物質の濃度勾配には、サイズ不変性が観察されており、2cmの変形体内にも、40cmの変形体内にも存在する(Ueda et al. 1987)。この事は、数10cmに及ぶ変形体内の濃度勾配は、変形体の小さな部分が、相互作用のもと、集合して形成されている事を強く示唆する。

以上、概観した様に、変形体は、巨大な単細胞生物であり、たとえ細胞の局所に化学刺激を与えられても、適切に情報処理し細胞全体として一つの行動方向を選択していく。しかし脳、神経等の分化した情報処理系は持っていない。そこで我々は、変形体の情報処理には行動方向に一致するcoherentな、細胞内に自己組織される時空間パターンが必要であると考えた。

このことは序論 第4章で述べたようにリズム現象において見られる。しかし、そこで述べたように、振動現象以外の、細胞内に自己組織されるパターンも変形体の協調的行動に対する情報処理過程に関与していると考えられる。

序論 第5章で述べたように、変形体の行動方向と一致した化学物質の濃度勾配が細胞内に存在し、その勾配は、局所的な化学物質の刺激によって変化する。従って化学物質濃度の自己組織されたパターンは細胞内情報処理に関与する2番目の候補であると考えられる。このことを明らかにするためには刺激後の変形体のパターン変化のみならず、変形体の行動変化をも測定する必要がある。しかし、その事は、現在まで明らかにされていない。

当研究において我々は、変形体内における Ca^{2+} 濃度の時空間パターン— Ca^{2+} 濃度振動と Ca^{2+} 濃度勾配—と行動方向の変化の両方を測定した。 Ca^{2+} に着目したのは、それが、細胞の行動に関与する変形体の細胞骨格系を制御することが知られ (Hasegawa et al. 1980, Furuhashi and Hatano 1989)、さらに変形体内の Ca^{2+} 濃度は、振動している (Yoshimoto et al. 1981) からである。

以下、本論第1章で、協調的行動時、及び誘引刺激時の変形体内 Ca^{2+} 濃度時空間パターン変化を調べ、パターンの変形体の誘引刺激に対する情報処理過程への関与、役割を考察した。次に本論第2章に於いて、忌避刺激に対する Ca^{2+} 濃度時空間パターン変化を調べ、誘引刺激の、それと比較検討した。次に本論第3章に於いて、嫌氣的条件下における変形体内 Ca^{2+} 濃度時空間パターン変化を調べ、さらに変形体の情報処理過程の様々な時期を、嫌氣的条件にさらす事により、

変形体情報処理過程の嫌氣的条件に対する感受性を調べ、 Ca^{2+} パターン生成の細胞内反応を検討した。

本論

第1章 真性粘菌変形体の誘引刺激に対する情報処理過程と Ca^{2+} 濃度の時空間パターン

第1節 序

序論第6章で述べたように、変形体は、巨大な単細胞生物であり、たとえ細胞の局所に化学刺激を与えられても変形体は適切に情報処理し細胞全体として一つの行動方向を選択していく。しかし脳、神経等の分化した情報処理系は持っていない。そこで、変形体の情報処理には行動方向に一致するcoherentな、細胞内に自己組織される Ca^{2+} 濃度の時空間パターンが必要と考えられる。

本章においては、定常的な Ca^{2+} 濃度の時空間パターンが、細胞の協調的行動時に常に存在する事を明らかにした。また誘引刺激により、他の定常的でcoherentなパターンが細胞内に形成され、細胞は協調的に行動し始めた。その時、刺激直後に、刺激部位における Ca^{2+} 振動周期変化は、細胞全体に伝搬した。

第2節 材料と方法

1. 粘菌変形体

真性粘菌 (*Physarum polycephalum*) 変形体は Camp の方法 (1936) によって培養した。使用前には 1.5% 寒天を敷いた容器の中を餌を与えず、一夜放置した。変形体糸は長さ 10 mm、直径 0.6 - 0.8 mm のものを使用した。

2. Ca^{2+} 濃度測定装置

Ca^{2+} 濃度測定システムの概略図を図 6 A に示す。それは蛍光顕微鏡 (Olympus, BH-2-RFK)、光電子増倍管 (浜松フォトニクス, R-268)、記録装置よりなる。この装置のうち、光電子増倍管は吉岡昇修士製作のもの、光電子増倍管用の 1000 倍アンプは錦織氏の製作による物を使用した。蛍光顕微鏡のステージ上にマイクログラフエーションを行った変形体 (下記 3. 参照) を載せる。超高圧水銀ランプ (Osram, HB0100W/2) からの紫外線 (UV) はダイクロイック・ミラーと UV 透過性の対物レンズ (Olympus, UVFL*20) を通ってステージに当たる。UV 光は 340, 360 nm の励起フィルターであるバンドパス・フィルター (日本真空工学, BPF, HardBPF) を通る。細胞上の照射面積は直径 150 - 200 μ m の範囲である。この面積のうち通常 30% が外質の面積、70% が内質の面積である。測定側は 498 nm の干渉フィルター (日本真空工学) を透過する蛍光を測定する。その強度は光電子増倍管で増幅した後、ペン・レコーダーで記録する。蛍光顕微鏡の詳細は図 7 に示した様に、タイマー (オムロン)、ソレノイドを用いて、自動で UV 光のシャッター開閉、及び 340 または 360 nm のフィルター切り替えができる。以上が最初に使用した測定系である。後に、記録系の一部を改良し、ペン・レコーダーの代わりにパーソナル・コンピュータ (NEC 9801X A) に AD 変換ボード (カノプス ADX-98E) を使い、信号を取り込むようにした。その時、取り込んだデータの解析には統計解析ソフトである Lotus123 (ロータス社) を使用した。

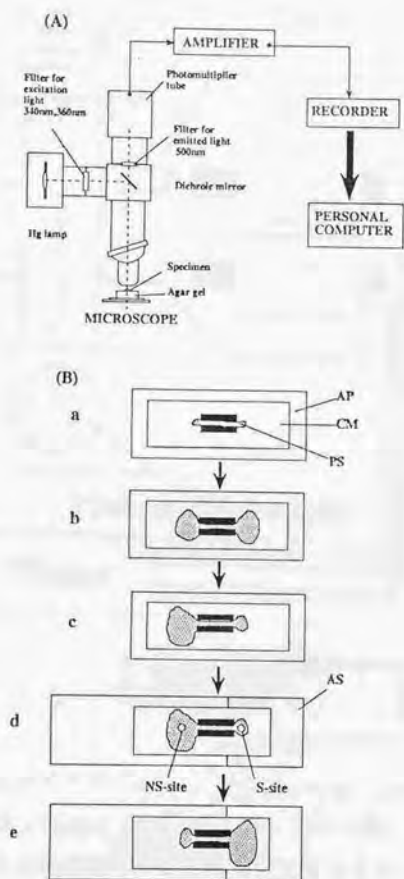


図6. A. Ca^{2+} 染色試薬である fura-2 を用いて粘菌変形体の細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定するための装置の概略図。B. 変形体への誘引化学物質刺激の投与方法と走化性の反応。図d中の変形体内の小さな円は直径150-200 μm の測定部位を示す。APは寒天板、CMは透析膜、PSは変形体系、VSはビニールシート、ASは誘引物質を含んだ寒天板、SSは刺激部位(S-site)、NSは非刺激部位(NS-site)をそれぞれ表す。

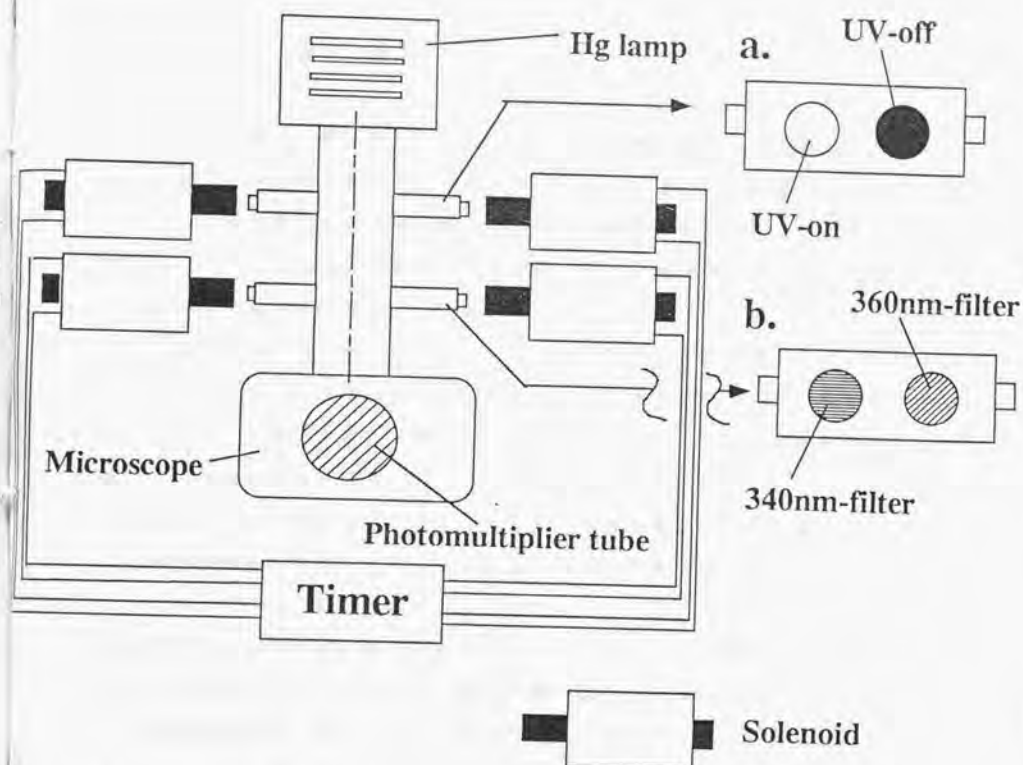


図7. 自動蛍光強度測定システム

図6Aの蛍光顕微鏡(Olympus BH-2)を改良して340, 360nmの励起フィルターで励起したときの蛍光強度を自動で測定できるようにした。図中、UV光の光路を点線で示した。aはUV光のシャッター切り替え板で白丸の部分が光路に入ると、UV光がステージに置いた試料に当たり、黒丸ではUVが当たらない。bはフィルター切り替え板であり、2つの励起フィルターが、交互に光路に入っている。シャッター及びフィルターは、横に取り付けたブッシュ式のソレノイドにより切り替わる。さらに、4台ソレノイドは、タイマーによってタイミングが制御される。この装置により、 Ca^{2+} 濃度測定のためのUV光の自動照射を実現した。

3. 細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定

図6Bに実際の実験手順を図示した。変形体系を巨大変形体の真ん中付近より切り出し2mmの厚さの寒天上に敷いた透析膜上に置く。変形体系の両側にはビニールシートを置き変形体系の真ん中にファン構造を作らないようにした(図6Ba)。1-2時間後に変形体系の両端にファン構造が現れた(図b)。次にfura-2溶液(1.2mM fura-2, 2.5mM KCl, 1mM NaCl, 10mM HEPES pH 7.4)を変形体内に最終濃度10-15 μ Mになるようにマイクロインジェクション法により注入した。使用した薬物のうちfura-2は同人化学から購入し、その他の薬物は全て和光純薬製のものを使用した。注入量が多くfura-2が比較的高い細胞内濃度になる時、fura-2はリソゾーム内に取り込まれる。しかし今回実験に使用した濃度では、そのような事は見られなかった。30分以内に溶液は細胞内に均一に広がった。それから変形体に2枚の酸素透過性のプラスチックシート(HOYA Hard58)をかぶせ細胞の厚さ変化の影響を減少させた。これらの条件の元で変形体の行動及び化学走性は普通と変わらなかった。1時間の後、細胞は2つのファンのうち1つのファンの方向に移動し始め、そのファンが大きく成長し(図c)始める。1.5-2cmの長さの変形体を2.の Ca^{2+} 測定装置に移動し Ca^{2+} 濃度を測定する。

化学刺激は誘引刺激時には変形体の進行方向後部のファンの下の寒天を10mMグルコース、10mMガラクトース、10mM KH_2PO_4 を含んだ寒天と取り替えた(図d)。また忌避刺激時には進行方向前部のファン下の寒天片を50mM KCl入りの寒天片と取り替えた。

変形体中の絶対 Ca^{2+} 濃度はfura-2を負荷した細胞の340nmと360nmの蛍光強度の比より定量的に求まる(Grynkiewicz et al. 1985, Tsien et al. 1985)。実際にはKudo & Ogura(1986)の方法により行った。そのとき変形体は340, 360nmの励起波長でNADH, NADPH等による自己蛍光を持っているので、生の測定データより、それぞれの波長での自己蛍光の数値を

差し引いた値を使用した。Ca²⁺濃度は特別に言及しない限り変形体糸の両側に形成されているファン中の地点で行った。以後簡単に刺激した部位を“S-site”、非刺激部位を“NS-site”と呼ぶ。S-siteは刺激前、進行方向後部、NS-siteは進行方向前部となる。NS-siteはS-siteより約1cm離れた場所である。それぞれの場所で刺激前、15分間Ca²⁺濃度を測定した。刺激時、化学物質を含んだ寒天で交換するのに約2分かかったため、その後35分間Ca²⁺濃度を測定した。UV光は340、360nmそれぞれの波長について1秒ずつ照射し、そのサイクルを10秒毎に行った。上田ら(1988a、b)によるとUV光は変形体の体積振動等の振動周期を増加させ、回避応答を起こす。従って、できるだけ照射時間を短くした。今回の照射時間、強度のUV光では変形体のリズム現象及び化学走性の行動に対して、影響はなかった。

全ての実験は消灯下、室温(24℃)で行った。

4. 行動速度の評価

変形体の細胞質は、“往復原形質流動”と呼ばれる2-3分周期でゆきつ戻りつ流れている。細胞が一方向に移動している時、原形質は進行方向後部から前部に向かって運ばれている。従って流動により運搬された原形質量は変形体の移動量を表す良い指標となる。今回の条件下では、その量をS-siteからNS-siteへ流動が起こっている時間、及びその逆の方向に流動している時間を測定する事により求めた。5分毎の平均流動量を計算し、それを“移動速度”と呼んだ。

第3節 結果

1. 誘引刺激時の細胞内時空間Ca²⁺濃度パターンの変化

1) 誘引刺激前後における変形体内の時空間的なCa²⁺濃度パターン

変形体は一方向に進行している時、細胞内には、既にCa²⁺濃度勾配が存在した。一例を図8に示す。各点は細胞内の各地点での5分間の平均Ca²⁺濃度を示す。進行方向前部の濃度は後部より約140 nM高かった。細胞の進行方向後部を1.0 mMグルコースで刺激すると図8bに示すようにCa²⁺濃度勾配は逆転した。その時、行動方向も逆転した。従ってこのCa²⁺濃度勾配は行動方向と一定の関係がある。同様な濃度勾配が他の3つの細胞でも見つかった。進行方向後部に誘引刺激をした時の行動方向逆転の過程における典型的な時間パターンの変化を図9に示す。観察点は変形体の刺激後の前部(S-site, 図9a)及び後部(NS-site, 図9b)である。両部位共にCa²⁺濃度は刺激前、一定のレベルで振動していたが、その振動レベルは両者で異なっていた。刺激前15分間の平均で比べると進行方向前部(NS-site)の平均レベルは244 nMで後部(S-site)のそれは189 nMであった。この絶対的な変形体糸におけるCa²⁺濃度は黒田等によって測定されたmicroplasmodiaの値と大体同じであった(Kuroda et al. 1988)。

刺激により両部位におけるCa²⁺濃度は変化した。S-siteでは濃度は刺激後急激に増加し、その後刺激10分後まで徐々に増加し定常状態に達した。定常濃度は、刺激後10分から35分の平均をとると246 nMであった(図9a)。NS-siteではCa²⁺濃度は徐々に減少し、S-site同様、10分後に定常状態に達し刺激部位と同様な時間保持された。刺激10分後から35分後の平均値は175 nMであった(図9b)。

これらの時間経過を統計的に平均化すると(S-siteで7例、NS-siteで11例)、上記と同様な傾向が見られた(図10)。刺激前、S-siteの平均Ca²⁺濃度は 170 ± 12 nM(平均濃度 \pm S. D.)であり、NS-siteの 224 ± 16 nMより高かった。これらの値は-15から0分までの平均値を表す。一方、誘引刺激後には、進行方向前後でのCa²⁺濃度勾配は刺激5分後に逆転し15分後に定常状態に達した。定常Ca²⁺濃度はS-siteで

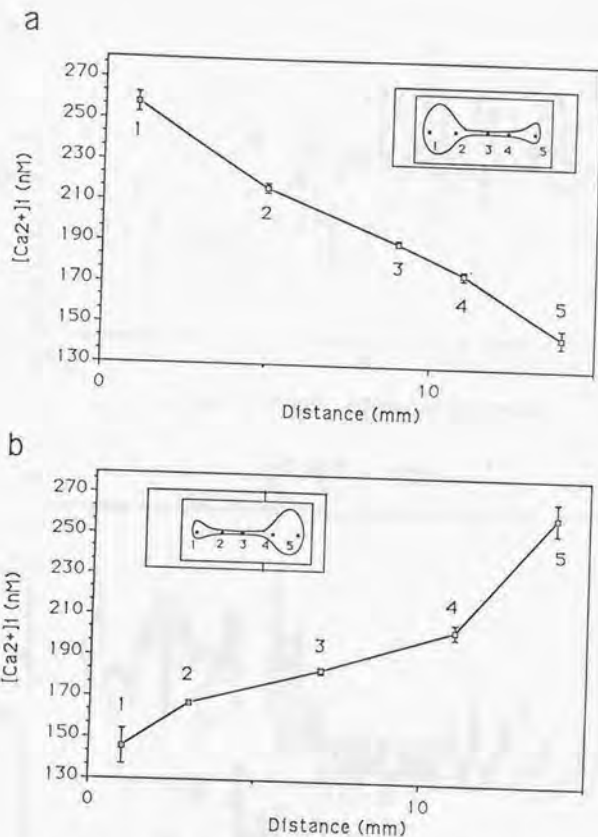


図 8. 一方向に進行している変形体に沿った Ca^{2+} 濃度パターンの 10 mM グルコース刺激前 (a) と刺激 35 分後 (b) の典型例。

変形体の長軸方向に沿った 5 点に於ける Ca^{2+} 濃度は 5 分間での平均 Ca^{2+} 濃度を示す。a, b の図中の数字は挿入図中にある変形体内の数字に対応する。変形体内 5 分間での Ca^{2+} 濃度変化は小さかったので、S. D. の値は小さかった。刺激方法等詳細は本文参照。Bars = S. D. (標準偏差)

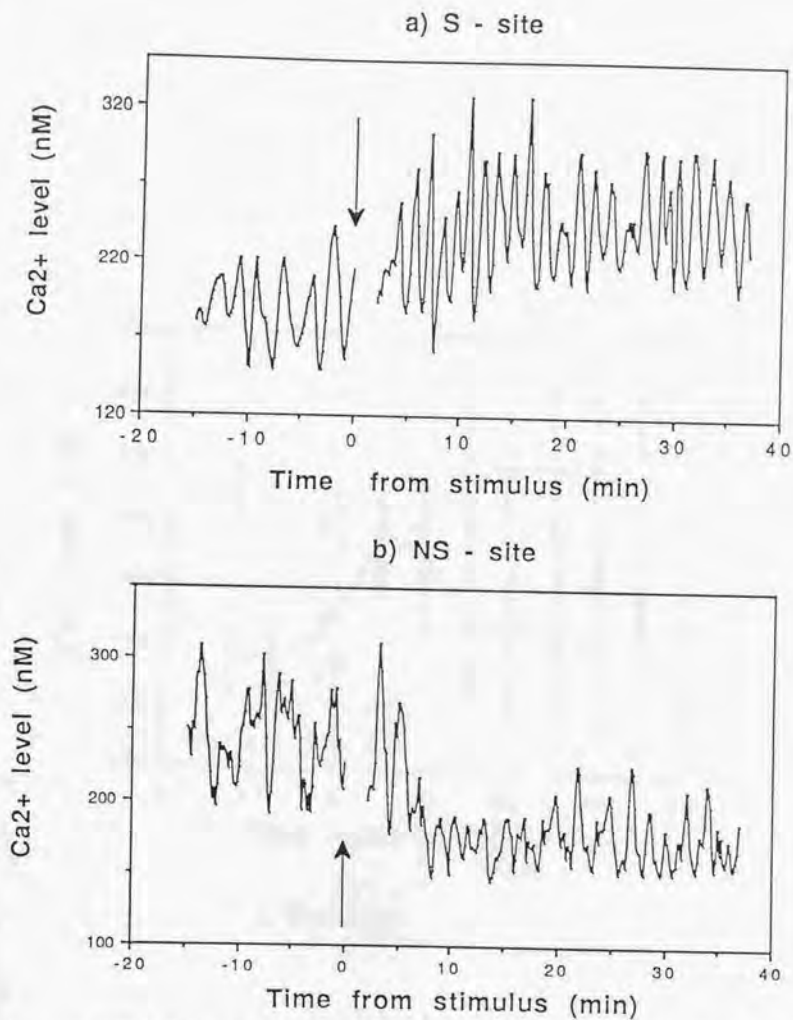


図9. 一方向に進行している変形体の進行方向後部に10 mMグルコースを与えた時のS-site及びNS-siteにおけるCa²⁺濃度パターン。a. S-site (刺激部位) b. NS-site (非刺激部位) 以後、図11まで図中の矢印はグルコース刺激を表す。

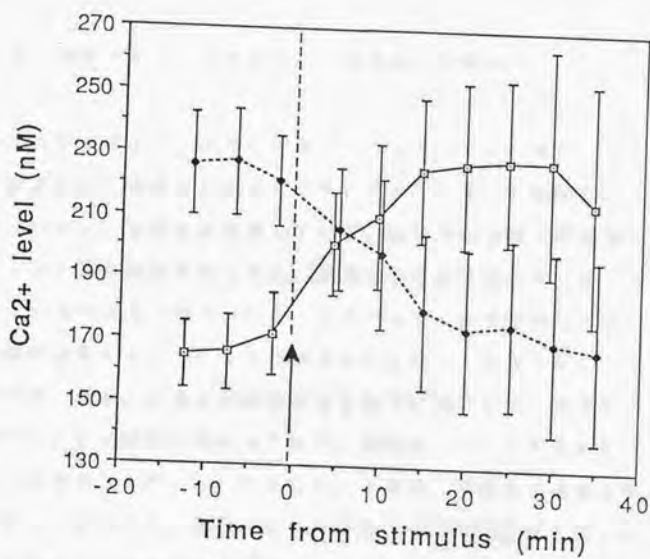


図10. S-siteとNS-siteにおける平均Ca²⁺濃度の時間変化。

実線と波線は、それぞれS-site、NS-siteのCa²⁺濃度を示す。平均値は、各々の部位における5分間の平均Ca²⁺濃度によって求めた。(S-site: n=7、NS-site: n=11)。Bars=S. D.

$223 \pm 31 \text{ nM}$ (平均 \pm S. D.)、NS-siteで $173 \pm 28 \text{ nM}$ であった。これらは刺激後15分から35分の平均値である。

局所的誘引刺激は、また兩部位の Ca^{2+} 濃度振動を変化させた。それらは刺激により、平均で約70-80%短くなった(図11a)。図に示すように兩部位での変化は刺激後、即座に現れた。そして刺激後20分して回復し始めた。

同様の反応が他の誘引物質である10mMガラクトース、 KH_2PO_4 で観察された。

2) Ca^{2+} 濃度パターンと変形体の行動方向との関係

図11bに示すように刺激前の変形体のS-site及びNS-siteにおける行動速度は、兩部位ではほぼ1に等しかった。従って細胞は、全体として非刺激部位に向かい、協調的に移動していた。進行方向後部(刺激部位)に10mMグルコースの誘引刺激を与えると、兩部位の速度は異なり、S-siteでは刺激後すぐに負の値まで減少したが、NS-siteでは約0の値になった。この事から細胞はS-siteのみ行動方向を逆転し、NS-siteは停止した。約10分後、NS-siteの速度も0以下に減少した。兩部位の速度は、刺激前に比べて小さく顕著に異なっていた。細胞は、このとき全体としてバラバラに行動し、協調的な行動は行っていない。その後、兩部位の速度は刺激前とは逆の方向に徐々に増加した。刺激約20分後に、それらは定常状態に達し細胞全体として、刺激前とは逆の方向に速度1になった。この時、変形体は誘引物質であるグルコースの方向に協調的な行動を開始した。

第4節 考察

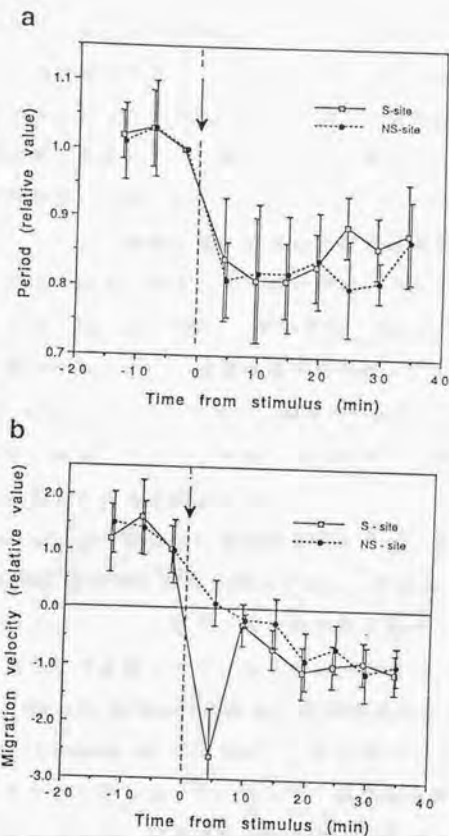


図11. a. グルコース刺激によるS-site、NS-siteにおける Ca^{2+} 濃度振動周期の時間的推移。

Ca^{2+} 濃度振動5分間毎の平均周期を表示する。刺激により両部位での周期は即座に変化し、刺激20分後には回復し始めた。(S-site: $n=6$, NS-site: $n=10$)。b. 誘引刺激による変形体の行動速度の時間的推移。S-site、NS-siteにおける5分間毎の平均行動速度を表示する。全データはNS-siteの-2.5分のデータで規格化した。(S-site: $n=9$, NS-site: $n=7$)。Bars = S. D.

情報処理の見地からすると変形体は細胞全体として協調的な行動を行うためにはコヒーレントで定常的な細胞内 Ca^{2+} の時空間パターンが必要である。実際、変形体内には、行動方向と対応した細胞内 Ca^{2+} 濃度勾配が存在した。また進行方向後部への誘引刺激時、細胞内 Ca^{2+} 濃度勾配が逆転した後、変形体は刺激前とは逆方向への協調的行動を開始した。

では、どのようにして Ca^{2+} 濃度勾配が協調的な行動を発現させるのであろうか？変形体の細胞内では、移動は両端での収縮力の違いから生じる偏った往復原形質流動によって生じる (Kamiya 1950)。その収縮力は Ca^{2+} 濃度 100 nM 以上では Ca^{2+} 濃度が増加するに従い、減少する事がわかっている (Yoshimoto & Kamiya 1984, 図 12 a)。これらの知見から細胞内にわたる Ca^{2+} 濃度勾配は変形体の進行方向後部から前部にかけての収縮力の差を生み、その結果、変形体は協調的な行動を行うと考えられる (図 12 b)。

誘引刺激により S-site で生じた Ca^{2+} 振動の周期変化は、即座に細胞全体に伝搬し、NS-site でも周期変化が起こった (図 11 a)。その後、定常的な Ca^{2+} 濃度勾配が生成した (図 10)。この期間、序論第 4 章で述べたように、細胞全体にわたる空間的な位相勾配が観察されている (Matsumoto et al. 1986; Tanaka et al. 1987; Miyake et al. 1990)。しかし、その位相勾配は、細胞が行動し始めると消失してしまう (Tanaka et al. 1987)。にも関わらず、 Ca^{2+} 濃度勾配は、協調的な行動が発現した後も残った。従って、協調的行動発現のための情報処理過程において、振動現象は、変形体の行動方向選択する過程に関与し (Miyake et al. 1991)、その後、選択された方向に空間的な Ca^{2+} 濃度勾配が生成し、変形体の協調的な行動が発現され、また、その行動が維持される、と考えられる。

以上の考察中、 Ca^{2+} 濃度勾配が、変形体の協調的な行動に関与している、事については、協調的な行動の結果、 Ca^{2+} 濃度勾配が生成したのではないか、との反論がつきまとう。これに関しては、濃度勾配生成の後に協調的な行動が開始する事実 (図 10, 11 b)、今回観察された濃度勾配より、変形体の行動が説明可能な事から、前者が正しいと考えられる。しかし、より直接的な証明は、変

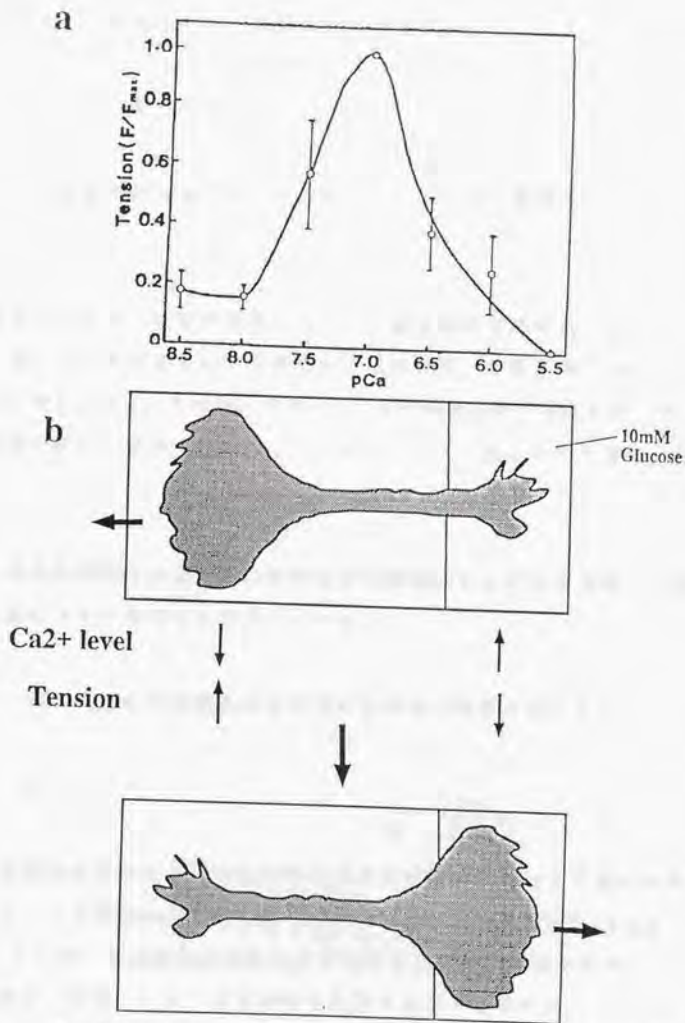


図 12. (a) 変形体の張力と Ca^{2+} 濃度との関係 (Yoshimoto and Kamiya (1984) より引用)。図中の矢印は、今回測定された変形体内の Ca^{2+} 濃度の範囲を表す。(b) 変形体の進行方向後部に誘引刺激を与えた時に生成する Ca^{2+} 濃度勾配と、張力勾配及び、それに伴った行動方向の変化

形体外部から、細胞内 Ca^{2+} 濃度勾配を制御する事である。これは、Nitr5 等の caged- Ca^{2+} 、または A23187 等の Ca^{2+} イオノフォアの使用により可能であると考えられる。

1. 誘引刺激に対する情報処理過程における Ca^{2+} 濃度時空間パターン変化生成のメカニズム

誘引刺激により、まず刺激部位の Ca^{2+} 濃度振動の振動数が変化した (図 11 a)。同時に、その変化は非刺激部位にも伝わり、非刺激部位の Ca^{2+} 濃度振動の周期も短くなった。その後、定常的な Ca^{2+} 濃度勾配が生成した (図 10)。この濃度勾配の生成機構はどのようなであろうか？ 次に2つの可能性を上げ議論する。

1) 情報処理過程の同時期に観察される細胞内 Ca^{2+} 濃度振動の空間的位相勾配が、濃度勾配生成機構に関与している。

2) 上記とは異なる機構により定常的な Ca^{2+} 濃度勾配が生成する。

[1] について]

誘引刺激直後に変形体の体積振動及び透過率振動において空間的な位相勾配が生成している (Matsumoto et al. 1986, Tanaka et al. 1987, Miyake et al. 1990)。その時、誘引刺激の刺激部位が位相進みの位相勾配が生成している。この位相勾配が、直接、 Ca^{2+} 濃度勾配を生成するのではないが、一つの可能性のあるモデルを紹介する。これは、木村らの KYS 振動子 (木村 1989) を用いたモデル (Kimura & Yano 1992) を参考にしたものである。現在まで、変形体内 Ca^{2+} 振動機構の解析は、ほとんど行われていないので、ここでは、 Ca^{2+} 振動子として変形体以外で提案されているモデル (Yamaguchi et al. 1985; Goldbeter e

t al. 1990) を採用する。これらの振動子は、KYS振動子同様、relaxation振動子であり、KYS振動子を用いたモデルの結果は、 Ca^{2+} 振動子系を用いたモデルにおいても出現すると考えられる。以下モデルの概要、及び結果を示す。

本論第3章で述べるように、 Ca^{2+} 振動は、嫌氣的条件の影響を受け易いが、 Ca^{2+} 濃度勾配は、その影響を受けにくい。従って最も単純に、 Ca^{2+} 振動と勾配は、別々の機構で形成されているとし、 Ca^{2+} 振動子層と勾配生成層を仮定する。 Ca^{2+} 振動層では、変形体各部で振動する Ca^{2+} 振動子は、拡散的相互作用をしながら、一次元結合をしているとする。濃度勾配の生成のモデルは、各種あるが、ここでは、Gierer-Meinhardtの拡散方程式（以下G-Mモデル）（Gierer & Meinhardt 1972）⁽¹⁾を導入する。今回提案するモデルでは、G-Mモデル中のactivatorには、 Ca^{2+} を、inhibitorには、物質は、不明であるが、細胞内のfreeの Ca^{2+} を減少させる反応なり、物質なりを仮定する。前述の Ca^{2+} 振動子系層とG-M層とは、 Ca^{2+} を介して結合している。最初、 Ca^{2+} 振動子は、全て同周期で振動させておく。その時、誘引刺激に対応して、端の Ca^{2+} 振動子の周期を短くすると、 Ca^{2+} 振動子同士は引き込み、刺激端からもう一つの端にかけて位相勾配が形成される。その時、G-M層内には、刺激部位の Ca^{2+} 濃度が高く、非刺激部位に従って低くなる濃度勾配が形成される。以上の現象は、誘引刺激時の変形体内 Ca^{2+} 振動変化、 Ca^{2+} 濃度勾配変化を再現していると考えられる。ここでは、位相勾配は、 Ca^{2+} 振動子の相互作用の結果として生成している。しかし最近、三宅（1992）によると、変形体の体積振動を人工的に制御し、細胞内に空間的な位相勾配を形成させると、変形体の行動が変化する事になった。上記モデルでは、 Ca^{2+} 振動子系層に位相勾配を形成しても、 Ca^{2+} 濃度勾配は生成しない。従って、モデル中、 Ca^{2+} 振動子層とG-M層との相互作用を再考する必要があると考えられる。

(1) このモデルは、ヒドラの発生、分化の現象を説明したものである。モデルは、拡散定数の小さなactivatorと、それが大きいinhibitorを仮定する。activatorの生成には、自己触媒反応を採用、またinhibitorはactivatorから生成するとする。

細胞のある箇所、activatorが増加すると、そこからinhibitorが生成し、activatorより早く拡散し、activatorが最初に増加した箇所以外の場所でのactivatorの増加を抑える。その結果、activatorの濃度勾配が形成する。

[2) について]

例えば、刺激部位における Ca^{2+} 濃度上昇が起こり、他の部位では、濃度変化起こらず、刺激部位からの Ca^{2+} の拡散により、細胞全体に Ca^{2+} 濃度勾配が生成すると考える。刺激後、振動現象の変化が観察されるが、これは Ca^{2+} 濃度勾配の逆転とは関係がないと考えられる。これは、今回の現象を説明するには、十分な機構かも知れないが、変形体への2箇所誘引刺激の結果は、説明できない。2箇所刺激の場合、 Ca^{2+} の拡散のみで濃度勾配の生成を考えると、 Ca^{2+} 濃度勾配は一義的に決まらず、変形体の両端が高い濃度パターンをとると考えられ、変形体は両端に向かって行動し、最終的には分裂すると予想される。しかし実際には、変形体は、どちらか一方に、細胞全体として行動し始める。従って、 Ca^{2+} の拡散のみの機構はありそうにない。

1) の Ca^{2+} 振動子系に、三宅等の実験によって見いだされたように、周期の空間的な伝搬に関する非対象性 (Miyake et al. 1990) が観察されれば、2箇所刺激であろうが、3箇所刺激であろうが、刺激により変化した Ca^{2+} 振動周期同士で競合が起こる。その結果、変形体の Ca^{2+} 振動周期を最も短く変化させた刺激が勝ち残り、その場所から他の場所にかけて位相勾配が生成し、同時に Ca^{2+} 濃度勾配も形成されると考えられる。不備はあるにしても、1)の方が、ありそうなモデルと考えられる。

以上、濃度勾配生成機構について考察したが、誘引物質により、変形体刺激部位の膜電位は脱分極する (Ueda et al. 1975)。従って、刺激部位の変形体原形質膜上の電位感受性の Ca^{2+} の開口による細胞外からの Ca^{2+} 流入も無視できな

いと考えられる。この事は、細胞外 Ca^{2+} 濃度を free にすれば、簡単に調べられる。実際、 Ca^{2+} キレーターである EGTA を含んだ寒天を作成し、試みたが、寒天がうまく固まらず失敗した。現在、イオノフォアを用いた他の実験を計画予定中である。

今回の変形体の協調的行動に対する情報処理過程に関する研究において、我々は変形体を誘引物質で刺激した。変形体内の ATP 等の細胞内パターンは、また忌避物質によっても変化が起きる (Ueda et al. 1987, 1988)。従って次の第 2 章では、忌避刺激に対する細胞内 Ca^{2+} 濃度の時空間パターンを測定し、変形体の情報処理過程をさらに明らかにしていきたい。

第2章 真性粘菌変形体の忌避刺激に対する情報処理過程と
Ca²⁺濃度の時空間パターン

第1節 序

第1章で述べたように変形体の細胞内には変形体の進行方向前部から後部にかけてCa²⁺濃度勾配（以下Ca²⁺勾配と略す）が他の化学物質と同様に存在する（Ueda et al. 1986, 1987; Natsume et al. 1992a）。また変形体内のCa²⁺濃度は振動していた。この変形体のCa²⁺濃度の時空間パターン（以下Ca²⁺パターンと略す）は、誘引刺激時の情報処理過程に重要な役割を演じていた。

変形体の局所的な誘引刺激時、変形体内のCa²⁺パターンは変化し新たなパターンが、その情報処理過程において生成した。変形体の進行方向後部を誘引物質で刺激すると刺激部位においてはCa²⁺濃度の増加が起きた。そのとき、またCa²⁺濃度振動の振動周期も減少した。この周期減少は即座に非刺激部位に伝搬した。その後、変形体は細胞全体として行動方向を逆転した。

忌避物質を変形体に局所的に与えると透過率振動の周期は刺激部位において増加した。しかし、この変化は誘引刺激と異なり、非刺激部位には伝搬しなかった（Miyake et al. 1991）。変形体の忌避刺激に対する情報処理においては、誘引刺激時とは異なるCa²⁺濃度パターンが生じていると考えられる。従って、本研究では変形体の進行方向前部に忌避物質を局所的に与えたときのCa²⁺パターン変化を調べた。さらに刺激によるCa²⁺パターン変化について、誘引刺激におけ

るパターンと比較検討した。

第2節 材料と方法

1. 粘菌変形体

真性粘菌変形体はCampの方法(1936)により培養した。使用前に1.5%の無栄養の寒天培地で一晚移動させた。長さ約1cm、直径0.6-0.8mmの変形体糸を使用した。

2. 細胞内Ca²⁺濃度パターンの測定

図13の様に、巨大な変形体から変形体糸を切り出し寒天板上に敷いた透析膜上に載せた。2-3時間後、変形体にfura-2溶液(1.2mM fura-2、25mMKCl、1mM NaCl、10mM HEPESを含みpH7.4の溶液)を細胞内におけるfura-2の最終濃度が10-15μMになるようにマイクロインジェクション法により注入した。細胞内Ca²⁺濃度は光電子増倍管を装着した蛍光顕微鏡を用いて測定した。測定時、変形体の長さは約2cmであった。Ca²⁺濃度は10秒毎に測定した。変形体内のCa²⁺濃度は工藤及び小倉の方法(1986)により評価した。より詳細は第1章を参照のこと。

化学刺激は変形体の進行方向前部下の寒天板を50mM KClを含む寒天板と交換することにより行った。変形体の長さ方向に沿った点の経時変化を図13dに示したように5mm毎に離れた各点で測定した。以下で使用する部位番号は

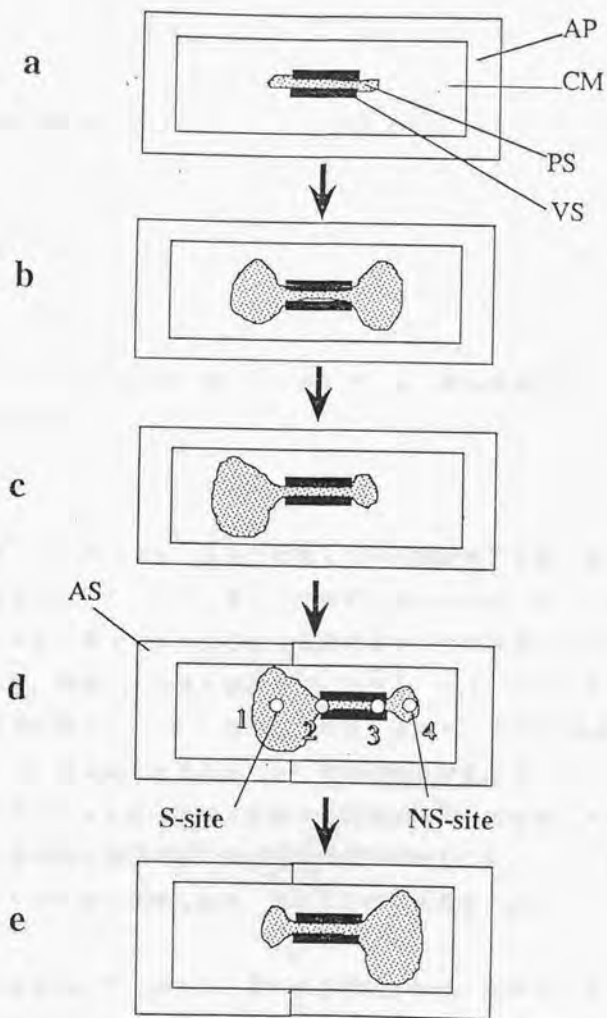


図13. 変形体の進行方向後部に50mMKClを与えたときの実験手順。

dにおいて進行方向前部に刺激を加える事以外は誘引刺激の場合(図1)と同一である。この場合、S-siteとは刺激前、進行方向前部、NS-siteは進行方向後部になる。

図13dの変形体の測定部位に対応する。この時、部位1をS-site、部位4をNS-siteと呼ぶ。

全ての実験は消灯後、室温下(24°C)で行った。

第3節 結果

1. 変形体への局所的な忌避刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の時空間的なパターンと行動速度の変化

本論第1章で述べたように一方向に行動している変形体内には行動方向に対応した Ca^{2+} 濃度勾配が存在した。進行方向前部への50mM KCl刺激により変形体の長さ方向に沿った4点における典型的な Ca^{2+} 濃度変化を図14(1)-(4)に示す。部位1、つまり刺激部位、では50mM KClの刺激後、即座に Ca^{2+} 濃度は減少し約15分後に定常状態に達した。部位2(刺激部位の隣接部位)においては、刺激後10分から Ca^{2+} 濃度の減少が始まり、やはり定常状態に達した。部位3においては刺激5分後から濃度は増加し始めた。その後15分後に減少し定常状態に達したが、その濃度は元の濃度より高かった。部位4においては濃度は10分後に増加し始め、約20分後には定常状態に達し、そのまま維持された。

上記結果を統計的に見るために、4つの部位における5分間の平均 Ca^{2+} 濃度を計算した(図15)。上記と同様の結果が得られたが、忌避物質を与えた後、15分後に細胞内の Ca^{2+} 濃度勾配は逆転し、20分後に定常になった。

刺激による細胞内の空間的な Ca^{2+} パターンの発展を図16に示す。刺激前 Ca^{2+} 濃度は部位1の方が高く部位4に行くほど低かった。局所的な刺激を部位1に加えると、部位1の濃度は減少し、一方、部位2の濃度は増加した。他の部分

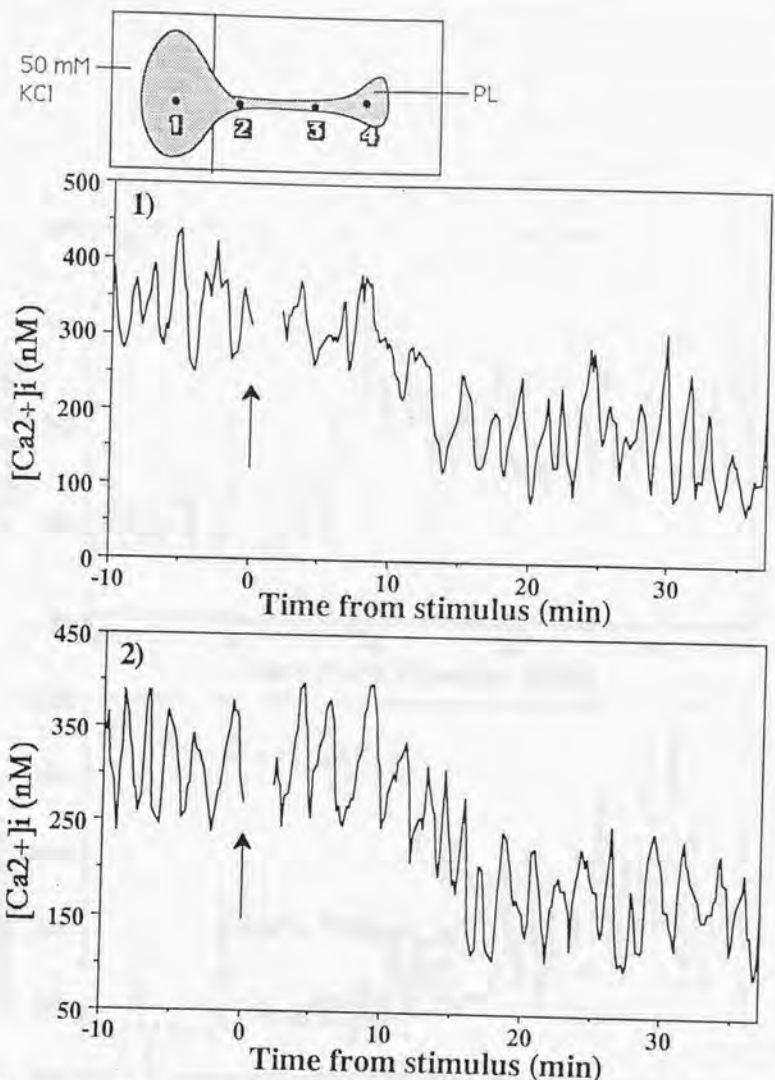
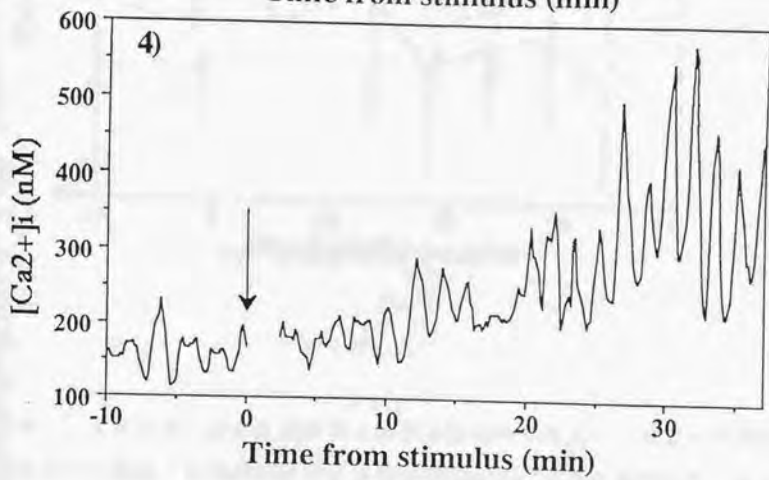
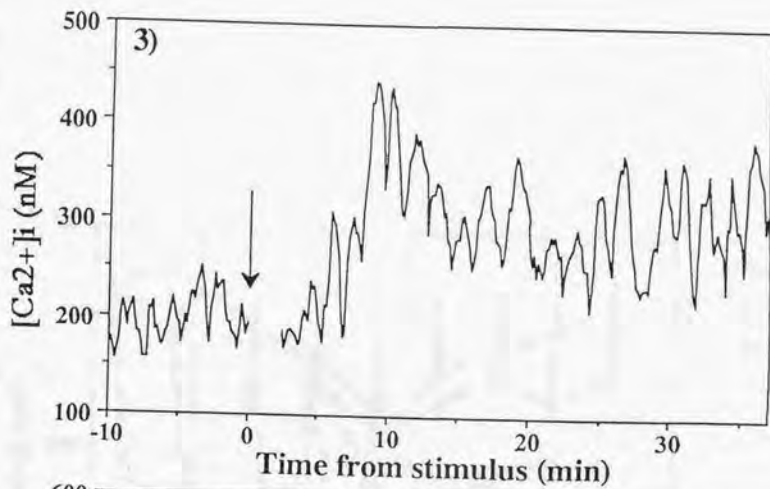


図14. 変形体の進行方向前部に50 mM KClを与えた時の細胞内 Ca^{2+} 濃度の時空間パターンの典型例。

図中(1) - (4)の数字は挿入図中の変形体の Ca^{2+} 濃度の測定部位の数字に対応する。忌避刺激方法は挿入図に示してある。以降の図17まで、図中矢印はKCl刺激を表す。PLは変形体を表す。



(図 1 4 の続き)

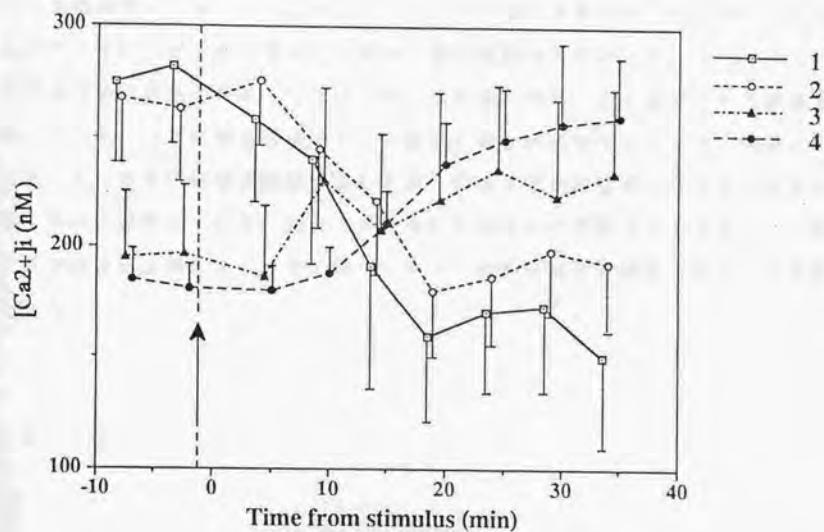


図15. 50 mM KCl刺激による変形体内の平均Ca²⁺濃度の時間変化。

挿入図中の部位1から4までの5分間の平均Ca²⁺濃度を計算した(部位1: n = 6, 部位2: n = 6, 部位3: n = 7, 部位4: n = 5)。部位1は刺激部位で部位2は刺激部位の隣、部位4は、もっとも刺激部位から離れた部位である。

Bar = S. D.

の濃度変化はなかった。この時、変形体内には部位2を頂点とする山の形をした Ca^{2+} 濃度のパターンが生成した。その後、部位2の濃度は減少し始めた。部位3では Ca^{2+} 濃度は刺激9.5分後に増加し始め、14.5分後に減少し始めた。部位4では刺激後14.5分後に増加し始め、その後高く保たれた。忌避物質の刺激後、再生した定常的な Ca^{2+} 濃度勾配は刺激19.5分後に生成した。

変形体内の Ca^{2+} 濃度は、また1-2分周期で振動していた(図14)。部位1から部位4までの刺激による周期変化を図17aに示す。部位1の周期は刺激により刺激前の1.4-1.7倍になった。その変化は刺激後20分後には回復し始めた。部位1以外の各部位では顕著な変化は見られなかった。

移動速度の経時変化を図17bに示す。刺激前、部位1と4は同一の行動速度で動いていた。つまり変形体全体として部位1の方向に進行していた。刺激により部位1は、即座に行動方向が逆転したが、部位4では刺激後10分まで刺激前と同じ方向に移動していた。刺激15分後には部位4の行動方向も逆転した。両部位の行動速度は刺激25分後に同一になり、変形体は再び細胞全体として移動し始めた。

第4節 考察

変形体の進行方向前部に局所的な忌避刺激を与えると細胞内の Ca^{2+} 濃度勾配の逆転と細胞の進行方向の逆転が起こった。新しい Ca^{2+} 濃度勾配は変形体が協調的な行動をおこす以前に生成した(図15と図17b)。従って、細胞内の Ca^{2+} 濃度勾配は誘引刺激時と同様、変形体の協調的な行動発現に関与している。

誘引刺激を変形体に局所的に与えると刺激部位において Ca^{2+} 濃度振動の周期は減少した。その周期変化は細胞全体に伝わり、その後、新しい Ca^{2+} 濃度勾配が生成した。従って、変形体の誘引刺激時の情報処理過程においては、刺激部位における周期変化の非刺激部位への伝搬、変形体全体にわたる位相勾配の生成が

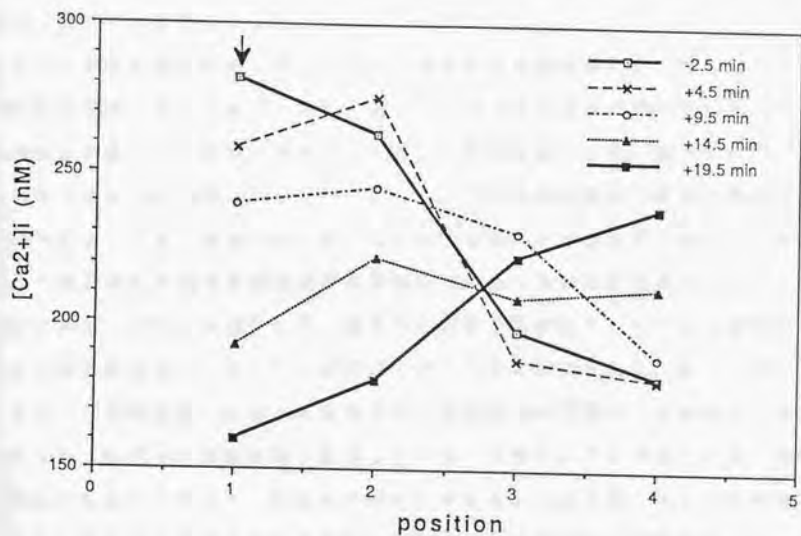


図16. 50 mM KCl刺激による変形体内空間的 Ca^{2+} 濃度パターン変化の時間的推移。

図15の部位毎の平均値から、空間パターンを求めた。刺激前、図の左側が Ca^{2+} 濃度が高い濃度勾配が変形体内に生成していた（白い四角）。部位1を局所的にKClで刺激することにより、刺激後20分後には濃度勾配は逆転した（黒い四角）。その途中の過程では刺激により部位2で Ca^{2+} 濃度は一時的に増加したが、その後9.5分後には減少した。このゆっくりした変化が他のNS-site、部位3と4、に伝わった。部位4では Ca^{2+} 濃度は減少せず高いままであった。

新しい Ca^{2+} 濃度勾配の生成にとって必要であると考えられる (Natsune et al. 1992、及び第1章)。本章の結果において、局所的な忌避物質の変形体への刺激により刺激部位の Ca^{2+} 濃度振動は即座に増加した。しかし、その変化は局所的なものであり (図17a)、誘引刺激と異なり、細胞全体にわたる位相勾配は、生成していないと考えられる。にもかかわらず Ca^{2+} 濃度勾配は逆転し、それに伴い行動方向も逆転した (図15、17b)。

それでは変形体内において、どうして局所的な忌避刺激により新しい Ca^{2+} 濃度勾配が生成するのであろうか? 図16にみられるように部位2における Ca^{2+} 濃度は刺激により即座に増加し、その後、濃度は減少した。濃度が上昇してから下降するまでの時間は約10分であった。これは変形体内で観察される Ca^{2+} 濃度振動よりも長い周期であった。図16により、その部位2における、ゆっくりした濃度変化が他の非刺激部位に伝搬した。9.5分後には部位3の Ca^{2+} 濃度が上昇し、それから減少した。部位3の濃度上昇が起こってから5分後に、部位4の濃度は増加し、そこでの濃度は上昇したまま維持された。従って部位2における、持続時間約5分の一時的な Ca^{2+} 濃度変化の伝搬が、局所的な忌避物質による新しい Ca^{2+} 濃度勾配の生成にとって、必要であると考えられる。情報処理過程の見地からすると、変形体に局所的な刺激を与えた後、変形体が細胞全体として行動方向を変化させるためには刺激についての情報が非刺激部位に伝搬する必要がある。局所誘引刺激を行うと、非刺激部位は即座に行動方向をストップさせた。その時、非刺激部位では、刺激部位同様、 Ca^{2+} 濃度振動周期変化が起こった。従って、この場合、局所的な情報は、 Ca^{2+} 濃度の振動周期により非刺激部位に伝搬していると考えられる。一方、局所忌避物質刺激時には、非刺激部位は一時的な Ca^{2+} 濃度変化が非刺激部位に到達するまで、刺激前と同様の方向に進行していた (図16と図17b)。忌避物質に対する情報処理過程においては、 Ca^{2+} 濃度変化の伝搬により、局所的な情報が細胞全体に伝わるのかもしれない。

誘引刺激と忌避刺激の間に、これまで述べたような違いが存在する。しかしまた、それらの間に共通点も存在する。それは、どちらの刺激によっても情報処理

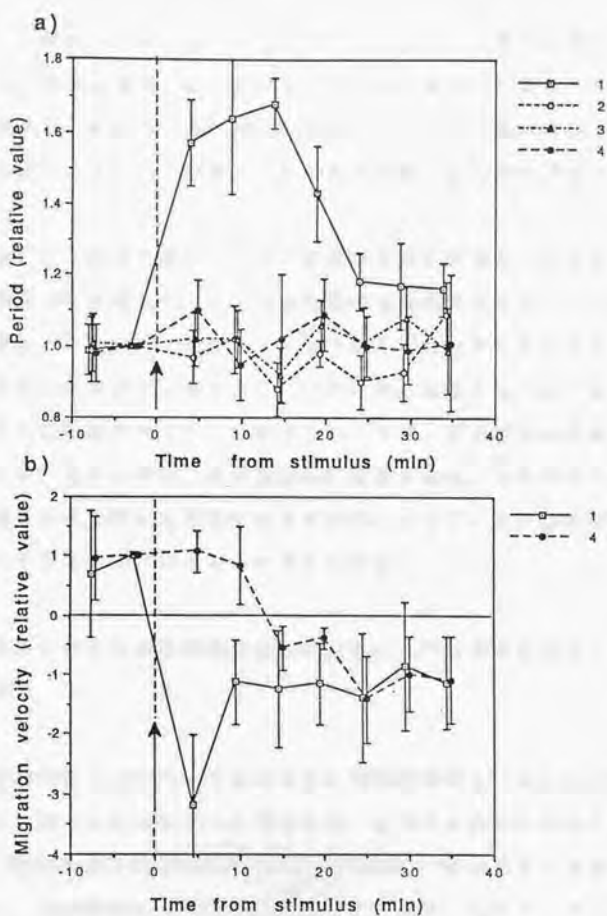


図17. 50 mM KCl刺激による変形体内の Ca^{2+} 濃度振動周期 (a)と変形体の行動速度 (b)の時間的推移。

(a)、(b) 図中の値は-2.5分の値で規格化した。(a) 部位1から4までの周期変化を示した。(b) 部位1から部位4までの行動速度を示した。細胞が部位1に進行している時、行動速度の符号を正とした。Bars = S. D.

((a) 部位1: $n = 6$, 部位2: $n = 6$, 部位3: $n = 7$, 部位4: $n = 5$ (b) 部位1: $n = 8$, 部位4: $n = 5$)

過程の初期の段階ではリズム現象、誘引刺激時には Ca^{2+} 濃度振動の振動数、また忌避物質の情報処理過程には一時的な Ca^{2+} 濃度変化、が局所的な刺激に関する情報を細胞全体に伝える。その後、空間的なパターンである細胞全体にわたる Ca^{2+} 濃度勾配が生成され、細胞全体にわたる協調的な行動が発現すると考えられる。

現研究においては細胞の進行方向前部に忌避物質を刺激したが変形体は細胞全体間して行動方向を逆転した。ところが同様の実験条件の下で三宅らは変形体は行動方向を変化させない、と報告している。彼らが使っていた変形体は我々が使っている変形体とは長さが4倍もある。変形体内に生成する Ca^{2+} 濃度パターンが変形体の長さに影響されるのかも知れない。実際、刺激部位の隣接部位であるで生成した Ca^{2+} 濃度変化が、非刺激部位に伝搬する時、その変化の仕方は、刺激部位から遠ざかるに従って小さくなっている。よって、この濃度変化の伝搬範囲は、長さ的にある限界が存在すると考えられる。

1. 忌避刺激に対する情報処理過程における Ca^{2+} 濃度時空間パターン変化生成のメカニズム

本論第1章の考察で述べたような結合 Ca^{2+} 振動子層と一次元Gierer-Meinhardtモデル層との結合したシステムを考えたが、このシステムにおいて、今回測定された Ca^{2+} 振動とは、異なる周期の一過的な Ca^{2+} 濃度変化の伝搬は見られない。なぜなら、刺激直後に出現する山型のパターンは、このシステムでは、安定であり、それ以上、パターン変化は起こらないと予測される。従って本論第1章考察の最後で述べたように、層間の相互作用を変化させるか、若しくは、別のモデル、例えば、周期1~2分の Ca^{2+} 振動子系と、それより長い周期で振動する Ca^{2+} 振動子系の結合した系、等を考える必要があるかも知れない。

2. 自己組織された細胞内 Ca^{2+} 濃度時空間パターンと情報処理過程

変形体は、局所的な化学刺激に対する情報処理過程に於いて、上述したような自発的な Ca^{2+} 濃度時空間パターン変化を利用して来た。このような自己組織現象は、非線形非平衡系において観察される。この現象は、初めは主に、B-Z 反応、レーザーなど物理化学系において、研究が進められてきた（コリス & プリコグニツ 1980; ホーケン 1980）。自己組織現象の生物系における役割について、骨格筋の収縮機構を再構成した流動セルにおいて、最初に研究が行われた（Yano et al. 1978; Yano & Shimizu 1978; Shimizu & Yano 1978; Yano et al. 1982）。これら生物系における研究によれば、系を構成する要素が、相互作用を介して、マクロな秩序状態を形成し、さらにそのマクロな状態が、個々の要素の状態を、スレーブするように、逆に影響を及ぼすという、要素と系全体間での循環的相互作用（フィードバックループ）を通じて、秩序状態が自己組織される。しかし、情報処理の観点に立った場合、上記の研究では、情報的に外界との相互作用が無く、また自己組織されたパターンと情報処理や機能との対応付けは、そのままでは、困難である。

一方、自己組織現象を利用したパターン認識モデルとしてホロビジョン（清水 & 山口 1986; Shimizu & Yamaguchi 1987）が提案されている。これは、外界からの入力系を設け、要素に非線形振動子を用いて、その位相に線の方向をコードし、外界からの情報と内的意味空間との間の関係的秩序生成として自己組織現象を扱っており、情報処理と自己組織現象との問題における新しい方向性を示した。最近、実際に神経の振動的発火による自己組織パターン（Gray et al. 1989; Engel et al. 1991）が、脳内情報処理に関与している事が明らかにされ、上記モデルとの対応が注目される。

変形体の場合も、細胞内に自己組織される振動、化学物質の濃淡パターンが情報処理過程に関与している。三宅ら（1991）は、変形体の透過率振動を測定し、その情報処理機構を明らかにした。彼らは、変形体の情報処理過程には、内質、外質の2階層の非線形振動子結合系が関与する事を明らかにした。変形体にとっ

ての局所的な環境の状態は、外質振動子周期にコードされ、その周期変化は内質振動子系を引き込み、より短い周期が伝搬し易い内質振動子系により、情報の統合が起こり、空間的な位相勾配が生成し、協調的な行動が発現する。しかし実際の行動発現の機構は明らかにされなかった。

今回測定された Ca^{2+} 濃度勾配は、今まで明らかにされていなかった変形体の協調的な発現を制御するものとして、意義があるパターンであると考えられる。また Ca^{2+} 振動も、局所的な細胞全体への伝搬と共に、上記透過率振動子同様、入力刺激を統合して、行動するための一番良い方向の選択過程に関与していると考えられる。

一般に、生物が、刺激を受けてから反応するまでの情報処理過程には、細胞から個体まで、どのレベルに於いても次の3つの段階があると考えられる。

1) まず、細胞から個体まで、自己、つまり自分自身の状態との関係で、外界からの刺激を受容する段階。

2) 1) で受容した様々な刺激を自己の中で統合して、刺激に対する反応を可能にする段階。

3) 2) で統合した結果を元に、刺激に対する反応を生じさせる段階。

今回研究した、変形体の化学物質に対する情報処理過程において、細胞内に自己組織された Ca^{2+} 濃度時空間パターンは、上記過程に密接に関与していた。 Ca^{2+} 振動は、(1)と(2)に、 Ca^{2+} 濃度勾配は、(3)の過程と関わっている。

ここまで Ca^{2+} の時空間パターンについて、述べてきたが、これは変形体の情報処理過程には、形態変化を伴い、形態変化には、 Ca^{2+} が重要であるからである。変形体以外の細胞には、 Ca^{2+} 以外のイオン若しくは、低分子の振動、または濃淡パターンが、生成しているかも知れない。重要なのは、その化学物質種ではなく、その自己組織されたパターンにある。変形体のような移動能のある細胞以外にもイオン濃度の振動、勾配は観察される。細胞に、成長因子、分化誘導物質を作用した時、それらの物質が作用するのは、原形質膜である。しかし、その

作用により、新しい遺伝子の発現等が起こる場合、原形質膜と核間の細胞質を何らかの信号が伝搬しなければならないと考えられる。cAMP、IP₃等は、セカンドメッセンジャーと呼ばれ、原形質膜に何らかの物質を作用した事を細胞内に伝えるが、これ以外に細胞内を伝搬する何らかの信号が必要であると考ええる。それが、化学物質の振動及び濃淡パターンであると考ええる。

また、単細胞のみならず、複数の細胞群においても、化学物質の時空間パターンは、観察されている。例えば、脳内海馬細胞では、培養神経細胞中、Ca²⁺振動が観察され (Ogura et al. 1987)、培養海馬グリア細胞群、培養海馬スライス中に於いても、神経伝達物質の投与及び神経刺激により、単細胞中のCa²⁺振動、細胞間のCa²⁺波の伝搬等の現象が見つかっている (Cornell-Bell et al. 1990; Dani et al. 1992)。従って、化学物質の振動・濃淡パターンは、一細胞の情報処理のみならず、異種細胞を多数含んだ系における情報処理にも関与しているかも知れない。

本論

第3章 嫌氣的条件下での局所的誘引刺激時の変形体内 Ca^{2+} 濃度時空間パターン変化

第1節 序

本論第1, 2章で見てきたように、変形体内に存在する Ca^{2+} 振動及び Ca^{2+} 濃度勾配からなる Ca^{2+} 濃度時空間パターンは、変形体の化学物質に対する情報処理過程に非常に重要な役割を担っていると考えられる。しかし、その Ca^{2+} 濃度の時空間パターンが、細胞内の、どのような反応により、生成しているのかは、現在の所、わかっていない。

そこで、パターン生成に関与する細胞内反応を調べる目的で、変形体を嫌氣的条件下に置き、その時の変形体内の Ca^{2+} 濃度時空間パターン変化を測定しました。

また、変形体の誘引刺激時の情報処理過程において、嫌氣的条件の影響を受ける過程と受けない2つの過程が存在する事が明らかになったので、以下報告する。

第2節 材料と方法

1. 粘菌変形体

真性粘菌変形体はCampの方法(1936)により培養した。使用前に1.5%の無栄養の寒天培地で一晚移動させた。長さ約1cm、直径0.6-0.8mmの変形体系を使用した。

2. 細胞内Ca²⁺濃度パターンの測定

巨大な変形体から1cmの変形体系を切り出し寒天板上に敷いた透析膜上に載せた。2-3時間後、変形体にfura-2溶液(1.2mM fura-2、2.5mMKCl、1mM NaCl、10mM HEPESを含みpH7.4の溶液)を細胞内におけるfura-2の最終濃度が10-15μMになるようにマイクロインジェクション法により注入した。

嫌氣的条件下における化学刺激を可能にするために、図18の様なチャンパーを作り、その中で、化学刺激を行った。チャンパー横の管から、チャンパー内に飽和水蒸気を含んだ窒素ガスを送入し嫌氣的環境を作成した。嫌氣的条件下の、変形体の誘引刺激に対する情報処理過程に及ぼす影響の、時期による違いを測定するために、窒素ガスを送入する時期は化学刺激をする前と後において行った。Ca²⁺濃度測定は、チャンパー全体を蛍光顕微鏡(Olympus BH-2)のステージに載せて行った。濃度測定は、光電子増倍管を装着した蛍光顕微鏡を用いて行った。測定時、変形体は両端にファンを形成し、どちらか一方に動き始めていた。その時、変形体の長さは、約2cmであった。Ca²⁺濃度は10秒毎に測定した。変形体内のCa²⁺濃度は工藤及び小倉の方法(1986)により評価した。より詳細は第1、2章を参照のこと。

化学刺激は変形体の進行方向後部下の寒天板を10mM グルコースを含む寒天と交換することにより行った。

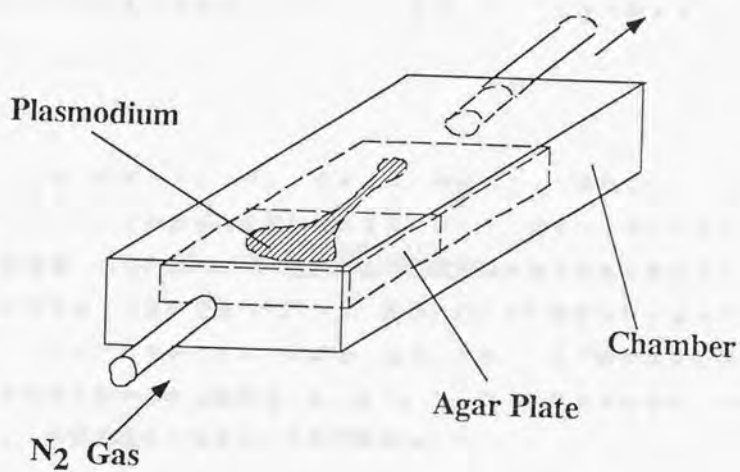


図18. 嫌気的条件下において変形体に10mMグルコースを与えた時の実験チャンバーの模式図。飽和水蒸気を含む窒素流入下において変形体に図6と同様な方法によりグルコース刺激を行った。

全ての実験は光の無い室温下(24°C)で行った。

第3節 結果

1. 嫌氣的条件が化学刺激前の変形体 Ca^{2+} 濃度パターン及び行動速度に与える影響

第1、2章でも見てきたように、変形体中、細胞内 Ca^{2+} 濃度は1-2分周期で振動している。この変形体を嫌氣的な条件に置くと、図20に見られるように進行方向前部、後部共に、 Ca^{2+} 濃度振動の振動周期が約2倍近く増加した。この周期の増加は、可逆的であった。一方、細胞内の Ca^{2+} 濃度勾配は窒素の流入によって、進行方向前部の Ca^{2+} 濃度は、増加したが、 Ca^{2+} 濃度勾配の極性には変化が見られなかった(図20、21a)。この時、行動速度は進行方向前部、後部共に、好氣的条件下の20-40%に減少した。

2. 嫌氣的条件下において誘引刺激をした時の変形体内 Ca^{2+} 濃度パターン及び行動速度

嫌氣的条件下に於ける誘引刺激時の Ca^{2+} 濃度パターンの変化の典型例を図に示した。刺激部位、非刺激部位共に本論第1章図10に示したような Ca^{2+} 濃度パターン変化はしなかった。進行方向後部へのグルコース刺激により、刺激部位のみならず、非刺激部位においても Ca^{2+} 濃度の上昇が起こった。この傾向は統計的に平均をとっても起こっていた(図19と図21)。変形体内の Ca^{2+} 濃度勾配も逆転していなかった。好氣的条件下における刺激時に起こる Ca^{2+} 濃度振

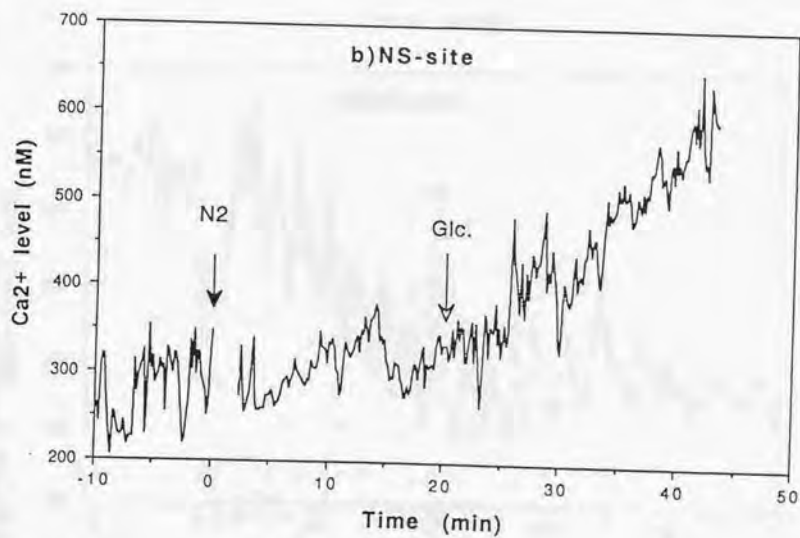
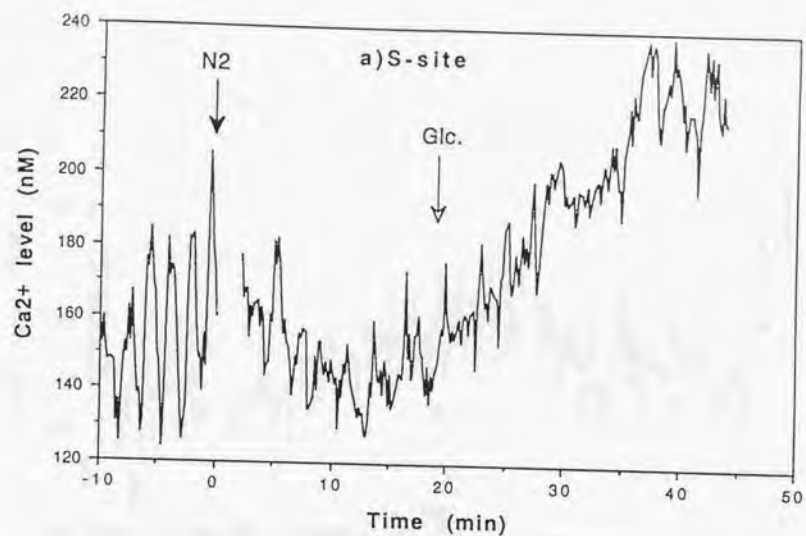


図19. グルコース刺激以前に窒素を送入し、その15分後に変形体の進行方向後部に刺激を行った時の変形体内 Ca^{2+} 濃度の時空間パターン変化の典型例。横軸は、刺激してからの時間を表す。

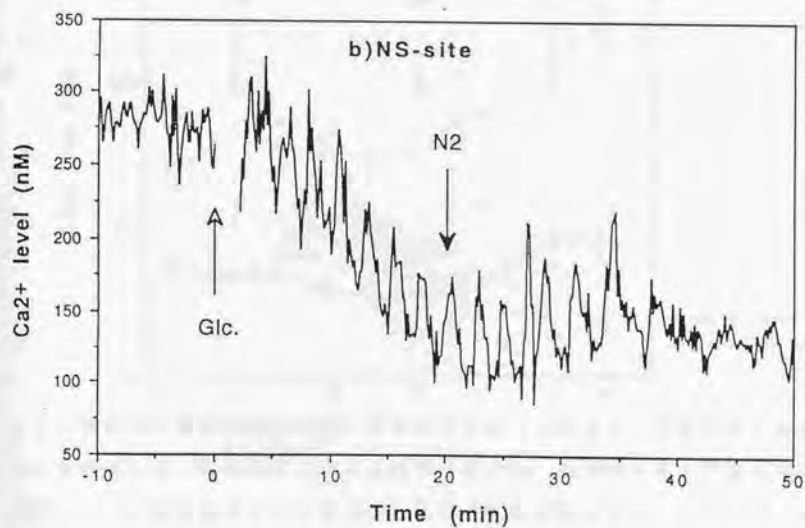
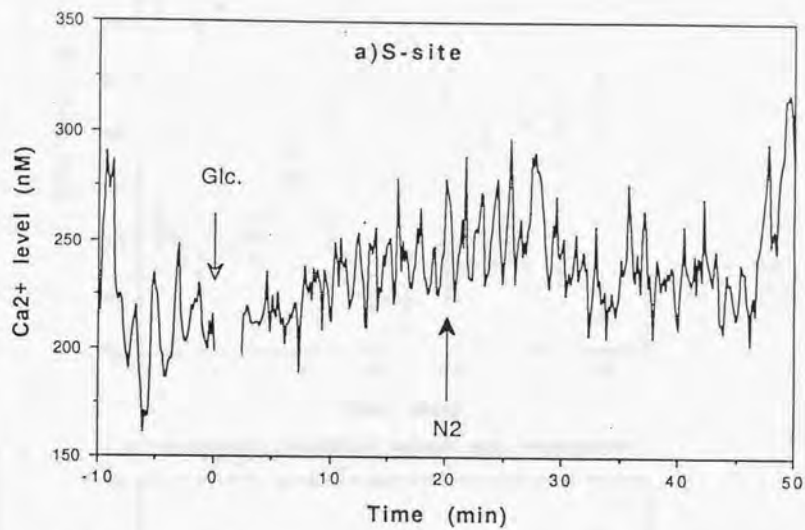


図20. 変形体の進行方向後部に10 mMグルコースを与え、その15分後に嫌氣的条件にした時の細胞内Ca²⁺濃度パターン変化の典型例。

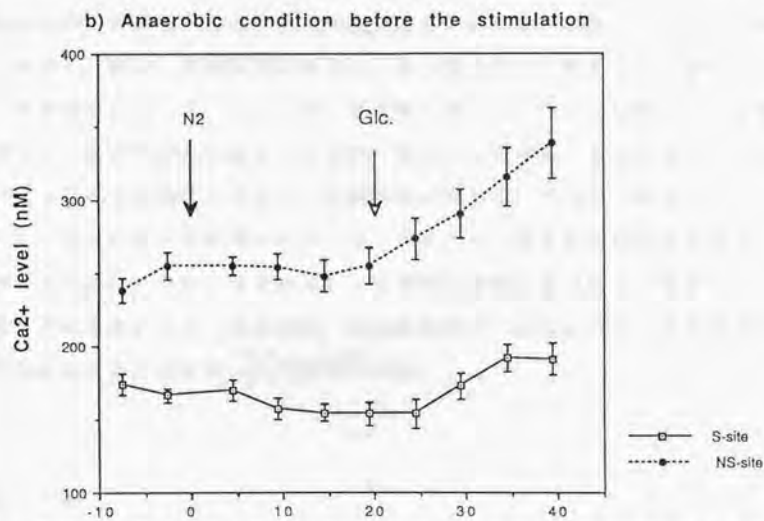
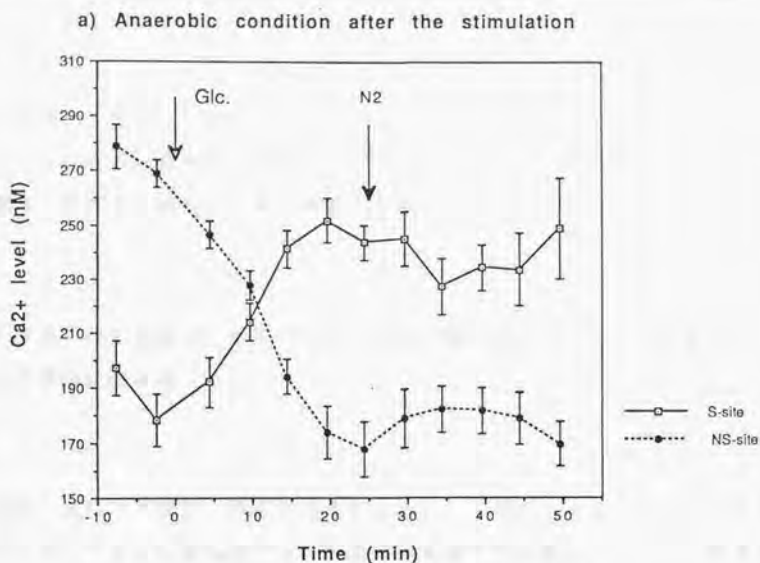


図 2 1. 変形体の進行方向後部に 10 mM グルコースを与え、刺激前後に嫌気的
 条件した時の Ca^{2+} 濃度変化に与える影響のまとめ。嫌気的条件を刺激以前に与
 えた時 (a) と刺激後に与えた時 (b) のパターン変化の平均 ((a) S-site: $n=4$ 、NS-site: $n=5$;
 (b) S-site: $n=4$ 、NS-site: $n=3$)。

動の周期減少も起こらなかった。

また、その時の行動速度は図23(b)に示す。嫌氣的条件により減少した行動速度は、進行方向後部への誘引刺激にも関わらず、変化しなかった。

3. 変形体に誘引刺激後、嫌氣的条件下にした時の変形体内 Ca^{2+} 濃度パターン変化及び行動速度変化

変形体の進行方向後部に誘引刺激である10mMグルコースを与えると本論第1章にも示したように細胞内 Ca^{2+} 濃度は刺激部位では増加したが、非刺激部位では減少した。その後、 Ca^{2+} 濃度勾配が定常状態になる刺激20分後に窒素を送入し始めた。刺激、非刺激両部位共に、送入後も変化は無かった(図20)。但し、刺激部位において、2, 3例で窒素流入後、10~15分後に Ca^{2+} 濃度が増加した。統計的に平均を取った物が、図21aである。変形体の進行方向後部へのグルコース刺激により Ca^{2+} 濃度勾配は逆転し、その後、嫌氣的条件にしても Ca^{2+} 濃度勾配への影響は無かった。また Ca^{2+} 濃度振動の周期はグルコース刺激により減少したが、窒素流入により周期は増加した(図20及び図22a)。行動速度は刺激により、刺激部位、非刺激部位共に逆転したが、窒素流入により、両者はほとんど0になった(図23a)。

第4節 考察

変形体に、窒素を流入すると、変形体内の呼吸鎖は、阻害され、嫌氣的な反応、つまり、解糖系のみ働いている、と考えられる。

このような嫌氣的条件下において、 Ca^{2+} 濃度振動は、消失はしなかったが、

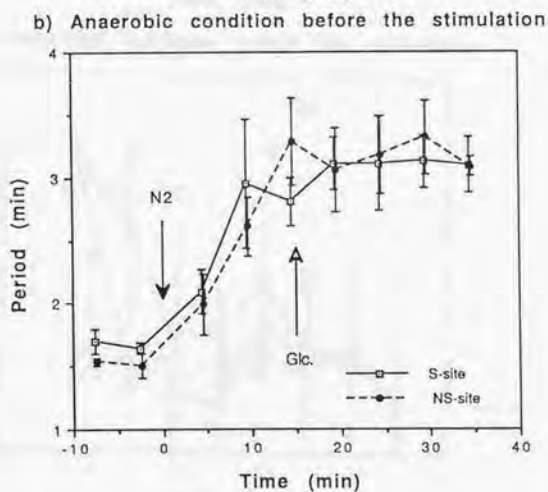
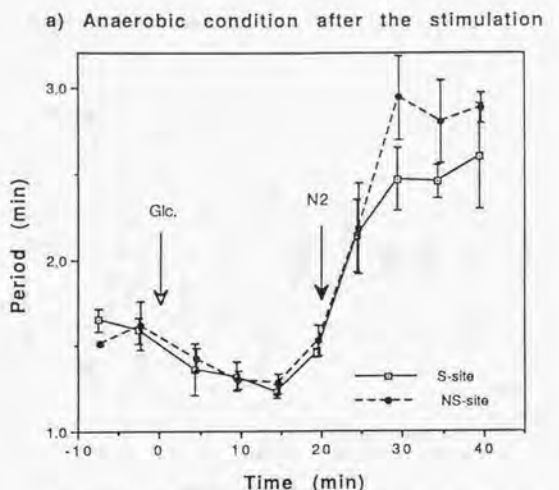


図22. 変形体の進行方向後部に10 mMグルコースを与え、刺激前後に嫌気的
 条件した時の Ca^{2+} 濃度振動の振動周期に与える影響。嫌気的条件を刺激以前に
 与えた時(a)と刺激後に与えた時(b)の振動周期の平均((a) S-site: n=5、NS-site: n=5;
 (b) S-site: n=4、NS-site: n=3)。

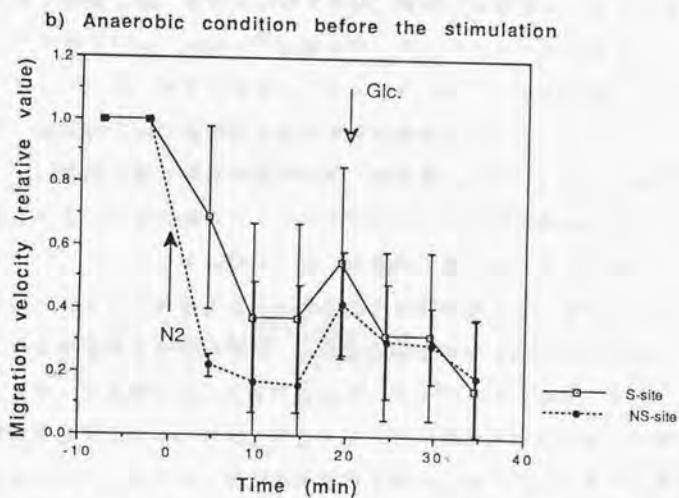
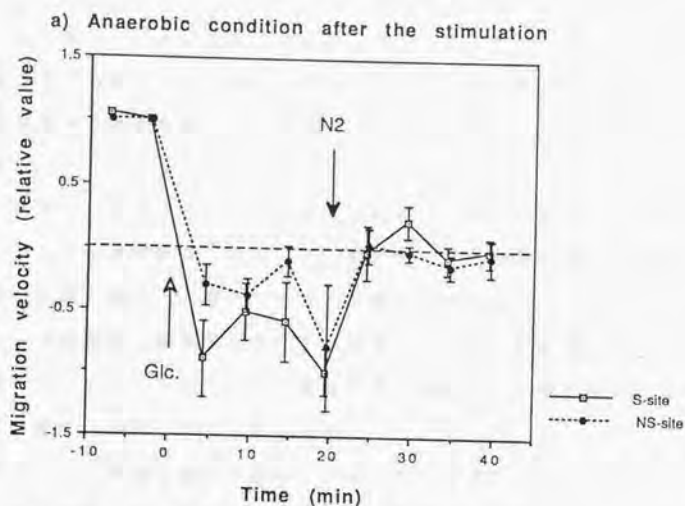


図 2 3. 変形体の進行方向後部に 10 mM グルコースを与え、刺激前後に嫌気的
 条件した時の変形体の行動速度に与える影響。嫌気的条件を刺激以前に与えた時
 (a) と刺激後に与えた時 (b) の行動速度の平均 ((a) S-site: $n = 4$ 、NS-site: $n = 5$;
 (b) S-site: $n = 5$ 、NS-site: $n = 4$)。図中速度値は、 -2.5 分の数値で規格化した。

その周期は、図22(a)に見られる様に増加した。従って、この Ca^{2+} 振動の周期を決定する反応に、呼吸鎖が、関与している可能性がある。嫌氣的条件下における張力振動の周期増加(W. Korohoda et al., 1983、三宅 1988)は、現結果と一致する。

しかし、嫌氣的条件下では、 Ca^{2+} 濃度勾配は、その勾配値は、変化したが、細胞内における極性は変化しなかった。従って、この勾配の極性を維持する反応には、細胞の呼吸鎖は、含まれていないと考えられる。

グルコース刺激時、嫌氣的な条件下にあると、図22bの様に Ca^{2+} 振動周期は、減少しなかった。つまり Ca^{2+} 振動周期の減少として現れるグルコースの受容には呼吸鎖が、必要であると考えられる。

呼吸鎖は、主に細胞内器官であるミトコンドリアで行われているので、上記細胞内の Ca^{2+} 振動には、ミトコンドリアが、関与すると考えられる。実際、ミトコンドリアの膜上には、カルシウム輸送系、ナトリウム・カルシウム交換体等が存在し、細胞内 Ca^{2+} 濃度を調節している事がわかっている。従って、ミトコンドリアが、細胞内 Ca^{2+} 振動子である可能性が高い。

一方 Ca^{2+} 濃度勾配の極性の維持には、呼吸鎖は関係ない。どの細胞内器官が、 Ca^{2+} 濃度勾配の生成に関わっているのであろうか？細胞内の Ca^{2+} 貯蔵部位として知られているのは、原形質膜、核、小胞体、ミトコンドリア等がある。このうち、核は、 Ca^{2+} を吸着するのみの機能しか持たない事、変形体内に、均一に分散している事を考え合わせると、濃度勾配を形成する事はできない。それに対して原形質膜、小胞体には、 Ca^{2+} ポンプ、 Ca^{2+} チャネルが、存在し、細胞内 Ca^{2+} 濃度を調節し得る。またミトコンドリアも細胞質中の解糖系で産生されるATPを用いて、上記 Ca^{2+} 輸送系を使用できる。従って、これらの細胞内小器官のどれか、または、その協調的な相互作用により、濃度勾配が形成されている、と考えられる。

変形体の誘引刺激に対する情報処理過程との関連では、その情報処理過程において、図19の様に、嫌氣的条件下に対して、感受性が高い相と、図20の様に、その条件に対して感受性が低い相の2種類が存在すると考えられる。本論第1章

の結果と考え合わせると、誘引刺激による情報処理過程における、初期相は、 Ca^{2+} 振動の周期変化が起こり、局所刺激に対する情報を細胞全体に伝播する相であり、この相は嫌氣的条件に対して感受性が高く、またそれに続く第2相は、 Ca^{2+} 濃度勾配により、協調的な行動を発現、及び維持する相であり、嫌氣的条件に対して感受性は低い、と考えられる。

結論

結論

第1章 本論のまとめ

第1節 本論第1章のまとめ

真性粘菌 (*Physarum polycephalum*) の化学走性中の Ca^{2+} 濃度の時空間パターン変化を Ca^{2+} 蛍光試薬である fura-2 を用いて測定した。細胞全体として一方向に進行している時、時空間パターンは進行方向に沿って形成されていた。 Ca^{2+} 濃度は細胞内で 2~3 分周期で振動して、その平均 Ca^{2+} 濃度は進行方向前部が高く後部に従って減少していた。細胞の進行方向後部に局所的に誘引刺激を与えると刺激部位では即座に Ca^{2+} 濃度の増加と振動周期の減少が起こった。その後、その変化は非刺激部位に伝わり非刺激部位の Ca^{2+} 濃度は減少した。結果として Ca^{2+} 濃度勾配は逆転し、変形体はその Ca^{2+} 濃度勾配に沿って細胞全体として行動し始めた。この研究により変形体内の Ca^{2+} 濃度時空間パターンは化学走性に対する情報処理と深く関わっていることがわかる。情報処理中の時空間パターンの Ca^{2+} 振動は、局所刺激に対する情報の細胞全体へ伝搬に、及び Ca^{2+} 濃度勾配は、変形体の協調的な行動の発現、維持に関与している。

第2節 本論第2章のまとめ

真性粘菌 (*Physarum polycephalum*) 変形体の忌避応答時における時空間的な Ca^{2+} 濃度パターンを Ca^{2+} 染色試薬である fura-2 を用いて測定した。結論第一節で述べたように変形体内には進行方向前部から後部にかけて Ca^{2+} 濃度勾配が存在する。変形体の進行方向前部に局所的に忌避物質である 50 mM KCl を与

えると Ca^{2+} 勾配のうち、刺激した部位の Ca^{2+} 濃度が刺激直後に減少した。それに対し刺激部位の隣接部位の Ca^{2+} 濃度は一旦、上昇しその後減少した。その濃度変化は非刺激部位末端まで伝搬し、その非刺激部位末端では Ca^{2+} 濃度は上昇したまま維持された。その結果、刺激後 25 分後に細胞全体にわたる新たな Ca^{2+} 勾配が生成した。その後、変形体全体にわたる協調的な行動が発現した。しかし、その時、刺激部位における Ca^{2+} 振動周期の増大は、非刺激部位に伝搬しなかった。忌避刺激においては、局所刺激の、細胞全体への伝搬には、誘引刺激と異なり、刺激部位隣接部で生じた一過的な Ca^{2+} 濃度変化の非刺激部位に伝達、関与していた。一方、協調的な行動の発現には、誘引刺激同様、 Ca^{2+} 濃度勾配が、関与していた。

第3節 本論第3章のまとめ

嫌氣的条件下における真性粘菌 (*Physarum polycephalum*) 変形体の時空間的な Ca^{2+} 濃度パターンを Ca^{2+} 染色試薬である fura-2 を用いて測定した。また変形体への誘引刺激前後に、嫌氣的条件下にし、その時の Ca^{2+} 濃度時空間パターンへの影響を調べた。

一方向に進行している変形体を嫌氣的条件にすると Ca^{2+} 振動周期は、変形体全体で増加したが、 Ca^{2+} 濃度勾配の極性は、変化せずに残った。また嫌氣的条件下において、変形体の進行方向後部に誘引刺激を行っても、第1章のように、 Ca^{2+} 振動の周期変化は、起こらず、また Ca^{2+} 濃度勾配も逆転しなかった。また刺激後、20分経過後、嫌氣的条件にすると、 Ca^{2+} 濃度勾配の極性には、変化が無かった。

以上の結果から、変形体の Ca^{2+} 濃度時空間パターンの内、 Ca^{2+} 振動には、細胞内の呼吸鎖が行われているミトコンドリアが関与していると考えられる。また Ca^{2+} 濃度勾配の極性の維持には、嫌氣的でも起こる反応が関与していると考えられる。

また誘引刺激に対する情報処理過程には、嫌氣的条件に対して感受性が高い相と低い相の2種類があり、前者には、 Ca^{2+} 振動により、局所情報が細胞全体に伝搬する過程が、後者には Ca^{2+} 濃度勾配生成により、協調的な行動が発現する過程が、それぞれ対応すると考えられる。

第2章 変形体の Ca^{2+} 濃度時空間パターンと情報処理過程

一方向に進行している変形体内には、行動方向に対応した Ca^{2+} 濃度勾配が存在した。また進行方向後部への誘引刺激、及び進行方向前部への忌避刺激共に、変形体全体の Ca^{2+} 濃度勾配を逆転させた。と同時に、変形体の行動方向は逆転し、協調的な行動が発現した。細胞内の Ca^{2+} 濃度勾配は、変形体の協調的な行動発現に関与していると考えられる。

また誘引刺激時、刺激部位における Ca^{2+} 振動周期は、即座に細胞全体に伝搬した。一方、忌避刺激では、刺激後、刺激部位の周期変化は、非刺激部位に伝搬しなかった。その代わりに、刺激部位の隣接部位で生じた持続時間約5分の、一過的な Ca^{2+} 濃度上昇変化が、非刺激部位に伝搬した。これら Ca^{2+} 振動変化、及び一過的な Ca^{2+} 濃度変化の伝搬によって、刺激部位の局所的な情報が、非刺激部位に伝搬し、細胞全体にわたる Ca^{2+} 濃度勾配が逆転した、と示唆される。

以上より、変形体の局所に化学刺激を与えた時の情報処理過程では、図24に示したように刺激後、 Ca^{2+} 振動の周期変化、及び一過的な Ca^{2+} 濃度変化の伝搬により、刺激部位の局所情報が、細胞全体に伝搬され、その後、 Ca^{2+} 濃度勾配が、細胞全体に形成され、変形体の協調的な行動が発現される、と考えられる。行動発現後、刺激による Ca^{2+} 振動周期変化等は消失するが、濃度勾配は、その後も維持される。従って、濃度勾配は、変形体の協調的行動の維持にも関与していると考えられる。

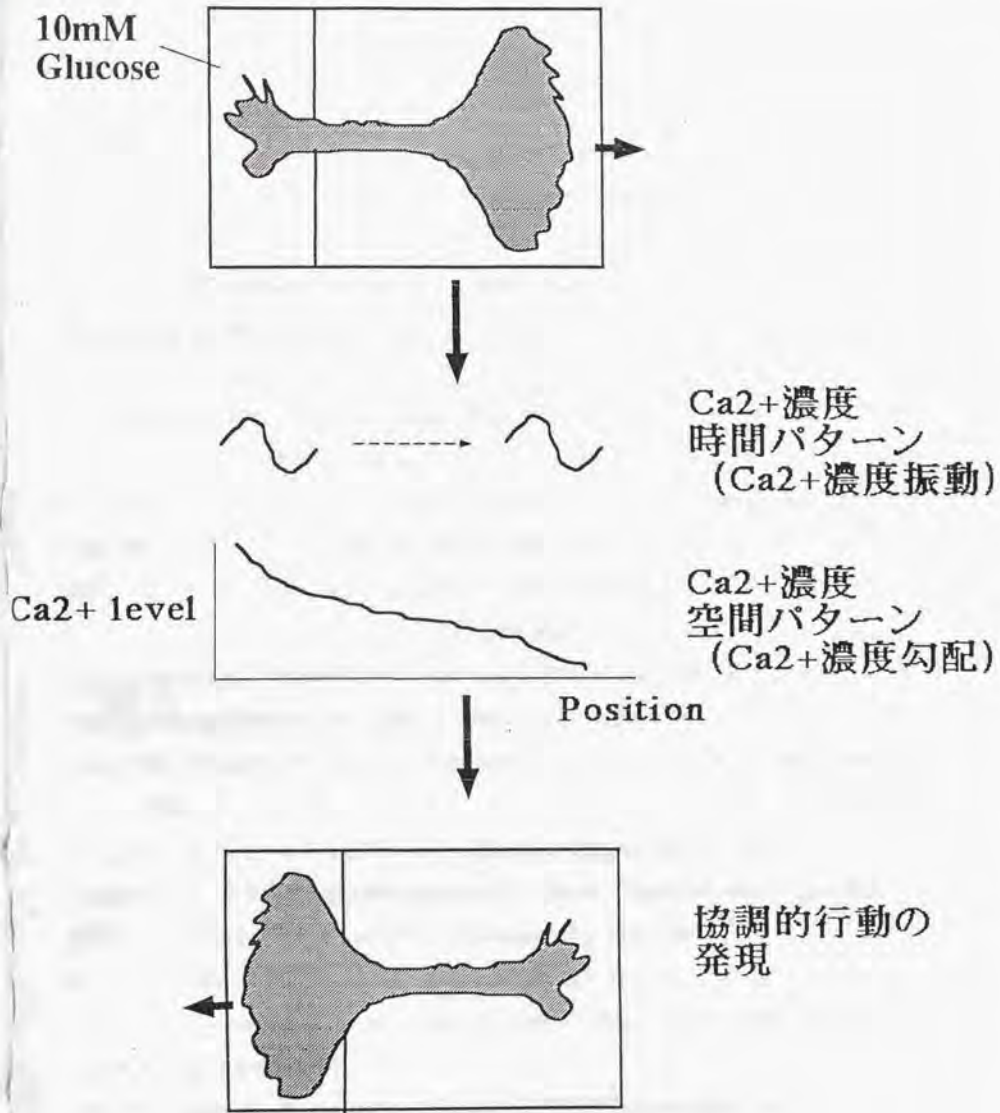


図24. 局所的な化学刺激に対する変形体の情報処理過程における、細胞内Ca²⁺濃度時空間パターン変化。ここでは、誘引刺激の例を上げたが、忌避刺激の場合でも、同様である。

文献

- Akitaya T, Hirose T, Ueda T & Kobatake Y (1984) *J. Gen. Microbiol.* 130: 549
- Alexopoulos CJ, & Mims CW, In *Introductory Mycology* 3rd ed., pp69,
John Wiley & Sons
- Allen RD, Pitts WR Jr. & Speir D (1963) *Science* 142: 1485
- Baranowski Z, Shraideh Z, Korohoda W & Wohlfarth-Bottermann KE (1983)
Eur. J. Cell Biol. 31: 187
- Berridge MJ (1990) *J. Biol. Chem.* 265(17): 9583-9586
- Block I & Wohlfarth-Bottermann KE (1981) *Cell Biol. Int. Rep.* 5: 73
- Brundage RA, Forgarty KE, Tuft RA, & Fay FS (1991) *Science*, 254: 703-706
- Camp WG (1936) *Bull. Torrey. Bot. Club*, 63: 205-210
- Carlile MJ (1970) *J. Gen. Microbiol.*, 63: 221-226
- Coman DR (1940) *Arch. pathol.*, 29: 220-228
- Cuthbertson KSR, Cobbold PH (1985) *Nature(London)* 316: 541-542
- Durham ACH & Ridgway EB (1976) *J. Cell Biol.* 69: 218
- Engel AK, Kreiter AK, Konig P & Singer W (1991) *Proc. Natl. Sci. USA* 88:
6048-6052
- Fabczak S & Fabczak H (1985) *Acta Protozoologica* 24(2): 125
- Fleischer M. & Wohlfarth-Bottermann KE (1975) *Cytobiologie*, 10: 339
- Furuhashi K & Hatano S (1989) *J Biochem* 106: 311-318
- Gierer A & Meinhardt H (1972) *Kybernetik* 12: 30-39
- Goldbeter A, Dupont G, & Berridge MJ (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.*
U.S.A., 87: 1461-1465
- Gray CM, Konig P, Engel AK & Singer W (1989) *Nature* 338: 334-337
- Grynkiewicz G, Poenie M & Tsien RY (1985) *J Biol Chem* 260: 3440-3450
- ルケン H (1980) "協同現象の数理" 牧島、小森訳、東海大学出版会
- Hasegawa T, Takahashi S, Hayashi H & Hatano S (1980) *Biochemistry* 19:

2677-2683

- Harootunian AT, Kao JPY & Tsien RY (1989) In: Molecular Biology of Signal Transduction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 53: 935-943
- Hato M, Ueda T, Kurihara K & Kobatake Y (1976) Cell Struct. & Funct. 1 : 269-278
- Hejnowicz Z & Wohlfarth-Bottermann KE (1980) Planta 150: 144
- Hejnowicz Z, Hinz I & Wohlfarth-Bottermann KE (1984) J. Interdiscipl. Cycle Res. 15: 251
- Holl RW, Thorner MO, Mandell GL, Sullivan JA, Sinha YN & Leong DA (1988) J. Biol. Chem. 263: 9682-9685
- Jacob R, Merritt JE, Hallam TJ & Rink TJ (1988) Nature(London) 335: 40-45
- Kamiya N (1950) Cytologia 15: 183-193
- Kamiya N & Kuroda K (1958) Protoplasma 49: 1
- Kamiya N (1970) Proc. Japan Acad. 46: 1026
- 木村真一 (1990) 東京大学薬学部修士論文
- Kimura S & Yano M (1992) Personal communication
- Kishimoto U (1958a) J. Gen Physiol. 41: 1205
- Kishimoto U (1958b) J. Gen Physiol. 41: 1223
- Knowles DJC & Carlile MJ (1978) J. Gen. Microbiol., 108: 17-25
- 小松靖彦 (1988) 東京大学薬学部学位論文
- Korohoda W, Shraideh Z, Baranowski Z & Wohlfarth-Bottermann KE (1983) Cell Tissue Res., 231: 675-691
- Kudo Y & Ogura A (1986) Br. J. Pharmacol., 89: 191-198
- Kuroda R, Hatano S, Hiramoto Y & Kuroda H (1988) Protoplasma [Suppl] 1 :72-80
- Matsumoto K, Ueda T & Kobatake Y (1986a) J Theor Biol. 122: 339-345
- Matsumoto K, Ueda T & Kobatake Y (1986b) At the 24th Meeting of Biophys.

Soc. Japan

- Matsumoto K, Ueda T & Kobatake Y (1988) *J Theor. Biol.* 131: 175-182
- Meyer R & Stochem W (1979) *Cell Biol. Int. Repts.* 3: 321
- Meyer T & Stryer L (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 5051-5055
- 三宅美博 (1989) 東京大学薬学部学位論文
- 三宅美博 (1992) 私信
- Miyake Y, Yano M & Shimizu H (1991) *Protoplasma*, 162: 175-181
- Miyazaki S-I (1988) *J. Cell Biol.* 106: 345-353
- Nagai R, Yoshimoto Y & Kamiya N (1978) *J. Cell Sci.* 33: 121
- Nakamura S, Yoshimoto Y & Kamiya N (1982) *Proc. Japan Acad.* 58 Ser B:270
- Nakamura S & Kamiya N (1985a) *Cell Struct. & Funct.* 10: 133
- Nakamura S & Kamiya N (1985b) *Cell Struct. & Funct.* 10: 143
- Natsume K, Miyake Y, Yano M & Shimizu H (1992a) *Protoplasma*, 166: 55-60
- Natsume K, Miyake Y, Yano M & Shimizu H (1992b) *Cell Struct. & Funct.*
(in press)
- Natsume K, Miyake Y, Yano M & Shimizu H (1992c) *Cell Struct & Funct*
(in preparation)
- ニコラス G & フリコック'-ス I (1980) " 散逸構造 " 小島、相沢訳、岩波書店
- Ogura A, Iijima T, Amano T, Kudo Y (1987) *Neurosci. Let.* 78: 69-74
- Rhea RP, (1966) In *Dynamics of Fluids and Plasmas*, pp35, Academic Press
- Samans KE & Olenhusen KG (1978) *Cell Biol. Int. Repts.* 2: 271
- Samans KE, Hinz I, Hejnowicz Z & Wohlfarth-Buttermann KE (1984)
J. Interdiscipl. Cycle Res. 15: 241
- Satoh H, Ueda T & Kobatake Y (1982) *Cell Struct. & Funct.* 7: 275
- Shangold GA, Murphy SN & Miller RJ (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
85: 6566-6570
- Shimizu H & Yano M (1978) *J. Biochem.* 84: 1093
- 清水 博 & 山口陽子 生体の科学 37: 26

- Shimizu H & Yamaguchi Y (1987) *Physica Scripta* 36: 970
- Stiemerling R (1970) *Cytobiologie* 1: 273
- Takeuchi Y & Yoneda M (1977) *J. Cell Sci.* 26: 151
- Tanaka H, Yoshimura H, Miyake Y, Imaizumi J, Nagayama K, Shimizu H (1987)
) *Protoplasma* 138: 98-104
- Tsien RY Rink TJ Poenie M (1985) *Cell Calcium* 6: 145-157
- Ueda T, Terayama K, Kurihara K & Kobatake Y (1975) *J. Gen. Physiol.*,
65: 223-234
- Ueda T & Kobatake Y (1982) In *Cell Biology of Physarum and Didymium*,
vol.1. (HC Aldrich & JW Daniel, eds.) Academic Press, New York,
pp 111-143
- Ueda T, Matsumoto K, Akitaya T & Kobatake Y (1986) *Exp. Cell Res.*,
162: 486-494
- Ueda T, Mori Y & Kobatake Y (1987) *Exp. Cell Res.*, 169: 191-201
- Ueda T, Mori Y, Nakagaki T & Kobatake Y (1988a) *Photochem Photobiol* 48:
705-709
- Ueda T, Mori Y, Nakagaki T & Kobatake Y (1988b) *Photochem Photobiol* 47:
271-275
- Ueda T, Nakagaki T & Kobatake Y (1988c) *Protoplasma*[Suppl] 1: 51-56
- Ueda T, Nakagaki T & Yamada T (1990) *J Cell Biol* 110: 1097-1102
- 上野正孝 (1983) 東京大学薬学部修士論文
- Wick RJ & Sauer HW, (1982) In *Cell Biology of Physarum and Didymium* vol.
II, pp3, Academic Press, New York
- Wohlfarth-Bottermann KE (1975) *Z. Pflanzenphysiol.* 76: 14
- Wohlfarth-Bottermann KE (1979) *J. Exp. Biol.* 81: 15
- Woods NM, Cuthbertson KSR & Cobbold PH (1986) *Nature (London)*, 319:
600-602
- Woods NM, Cuthbertson KSR & Cobbold PH (1987) *Cell Calcium*, 8: 79-100

- Yamaguchi Y, Komatsu Y & Shimizu H(1985)Jikeikai Med. Journal 32:189-209
- Yano M, Yamada T & Shimizu H (1978) J. Biochem. 84: 277
- Yano M & Shimizu H (1978) J. Biochem. 84: 1087
- Yano M, Yamamoto Y & Shimizu H (1982) Nature 299: 557
- 吉本康明 (1979) 数理科学 195: 24
- Yoshimoto Y, Iwamatsu T, Hirano K & Hiramoto Y (1986) 28(6): 583-596
- Yoshimoto Y & Kamiya N (1978) Protoplasma 95: 89
- Yoshimoto Y & Kamiya N (1982) Protoplasma 110: 63 (1982)
- Yoshimoto Y & Kamiya N (1984) Cell Struct. & Funct. 9: 134-141
- Yoshimoto Y, Matsumura F & Kamiya N (1981a) Cell Motility, 1: 433-443
- Yoshimoto Y, Sakai T & Kamiya N (1981b) Protoplasma 109: 159

謝辞

本論文は筆者が東京大学大学院在学中及び九州工業大学助手在任中に同大学薬学部薬品製造工学教室 清水 博教授の指導の下、まとめた物であります。本研究を行うにあたり、終始ご指導、ご助言を頂きました清水 博 教授に心より感謝申し上げます。

実験を進めるにあたり、ご教示、ご討論をいただくと共に常に励ましを与えてくださいました、現東北大学電気通信研究所 矢野雅文 教授に深く感謝いたします。また常に厳しいお言葉で激励してくださいました現金沢工業大学 情報工学科 三宅講師、さらに東京大学薬学部薬品製造工学 山口陽子助手には理論的側面についてご教示いただき、また川原茂敬助手、岩淵輝助手には様々なご助言を頂きありがとうございました。心より感謝いたします。

東京大学薬学部薬品製造工学教室の皆様には有形無形多大なるご援助を頂き誠にありがとうございました。

九州工業大学情報工学部に就職後にもかかわらず快く東京大学での数回にわたる実験を許可していただきました九州工業大情報工学部生物化学システム工学科生物情報処理講座 米谷快男児教授 に心から感謝いたします。

また真性粘菌変形体の研究を進めてこられた東京大学薬学部薬品製造工学教室の先輩諸兄に深く感謝いたします。

最後に私のわがママを受け入れ陰で暖かく見守ってくれた最愛なる妻 夏目陽子嬢にも深く感謝いたします。

