

光による粘菌変形体の反応の周期性
Periodic reaction of Plasmodium by light
岡田 莉里花 近藤 実怜 大谷 駿輔
OKADA Ririka KONDO Misato OTANI Shunsuke

要旨

私たち独自の解析方法を用いて、変形体の移動速度を求め、光刺激によって真正粘菌の変形体の移動速度が変化することを確認した。

赤外線撮影下で、白色光を与えない場合、変形体はほぼ一定の速度で移動したが、白色光を照射した場合には変形体は動きを止め（移動抑制）、60分あたり5分周期の白色光照射で、それに合わせるように周期的な移動抑制の反応が観察された。さらに、光照射を止めた後も引き続き、少なくとも2回の周期的な移動抑制の反応を繰り返した。

研究の動機と目的

真正粘菌の変形体は活発に移動しながら捕食する一方で、環境変化に応じて形態を変える。温度、湿度などの外部環境の変化や飢餓状態に置かれたりすると、移動を止めたり、休眠状態の菌核になったり、さらには子実体という次のライフステージに変わったりする。また、変形体は負の光走性を示すことも知られている。様々な外部刺激が変形体にどのような影響を与えるのか興味を持った。また、変形体は乾燥や低温に対しては一時的な移動の減速が観察され、さらに周期的にこれらの刺激を与えると周期的な移動の減速反応を示すことが知られている。刺激がなくなった後も周期的な反応は残ることから、変形体レベルで反応の周期性の記憶の能力があるともいわれている。

今回、私たちは特に光刺激の影響、その周期的な刺激に対する反応の様子を調べた。

生物材料と実験方法

<粘菌変形体の入手と培養方法>

実験に使用したモジホコリ (*Physarum polycephalum*) は菌核の状態(株) 京都科学より購入した。変形体の培養は、2%の寒天培地上で培養し、市販のオートミールを培地上に置いて餌として与えた。数日ごとに寒天培地と一緒に変形体の一部を切り出し、新たな寒天培地上に置いて植え継いだ。

実験時には、培地の寒天ごとに変形体を切り出し、撮影用の寒天培地の上に置いてしばらくすると撮影用培地上に変形体が降りて移動を始める。変形体の移動の様子はビデオカメラで赤外線撮影を行うと同時にテレビモニターで観察しながら操作を行っている。



<形態変化の観察>

粘菌の変形体、子実体、菌核の形態変化を以下の操作によって観察した。

①変形体→菌核

培養した変形体を培地とともに切り出し、水で湿らせたろ紙上に置く。暗所 25℃で一昼夜置き、ろ紙上に変形体が移動した後、余分な水を除き、ろ紙ごと密閉容器に乾燥剤のシリカゲルとともに入れ、乾燥剤の交換をしながら暗所で数日間放置する。

②菌核→変形体

菌核をろ紙ごと切り取り、湿気のある寒天培地上に置き、暗所で数時間放置する。

③変形体→子実体

培地上で広がった変形体を、暗所に数日間放置する。

<撮影環境と撮影方法>

実験室はエアコンでほぼ一定の室温 (21℃前後) に保ち実験室内に撮影のための棚を設置し、棚全体を暗幕で覆って遮光した。(右の写真はその棚の中の様子である。) 照度計で測定し、十分に暗いことを確認した。

変形体の動画撮影はビデオカメラ (SONY HANDYCAM HDR-CX700) を用いた。暗所での撮影は、ビデオカメラのナイトショット機能 (カメラ本体から 900nm 前後の赤外線を照射して撮影する赤外線撮影の機能) を用いて、変形体の移動を撮影した。



<変形体の移動の解析方法>

- ①撮影した変形体の様子を大型テレビモニターで再生し(図1)、5分ごとに一時停止し、モニター画面に貼り付けた透明フィルムに変形体の5分ごとの輪郭を重ねてトレースする(図2)。
- ②トレースした変形体の5分ごと輪郭を重ねた全体図から、同じ5分間で移動して変わった変形体の輪郭部分をさらにトレーシングペーパーに写し取る(図3)。図の1枠の図形が、同じ5分間で変化した変形体の輪郭である。
- ③このトレース像を画像としてPCに取り込み、画像ソフト(PhotoShopCS6)で5分間の変形体の変化分の面積(相対値)を測定する。
- ④この変形体の変化分の面積(面積拡大量)は変形体の5分間の移動量を示していると考えられる。これは5分間あたりの移動速度とも見なせる。



図1 ビデオ再生時のモニター画面

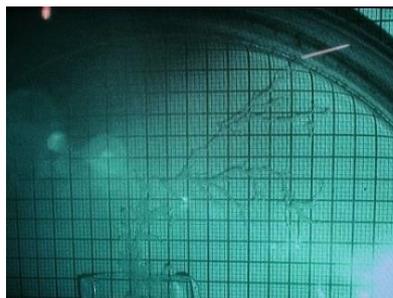


図2 培地上を移動しながら広がる変形体

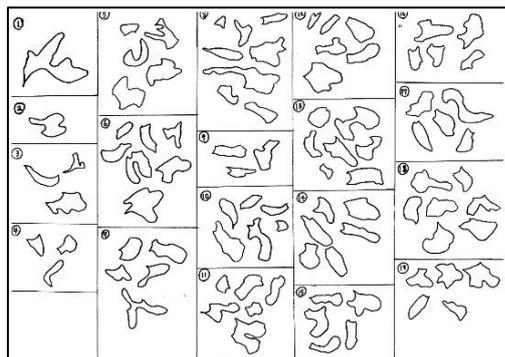


図3 5分間で拡大した変形体の輪郭

左の図で、1つの枠に描かれた図形は、同じ5分間の間に変形体が移動拡大して変化した変形体の輪郭を表す。すなわち、1枠内の図形の面積和は5分間で拡大した変形体の面積を表し、これを変形体の5分間の移動量(5分当たりの移動速度)とする。

<光照射実験>

対照として光照射を行わず、変形体の移動の様子を撮影した。

光照射実験として、白色光(LEDランプ)で光照射を行った。5分間の光照射と55分間の暗所放置の60分1サイクルとし、このサイクルを3回繰り返す。その後は光照射を行わず、そのまま暗所で撮影を続けた。

実験結果

<形態変化の観察>

粘菌は、実験方法で述べた操作によって、以下のようになった。

①変形体→菌核

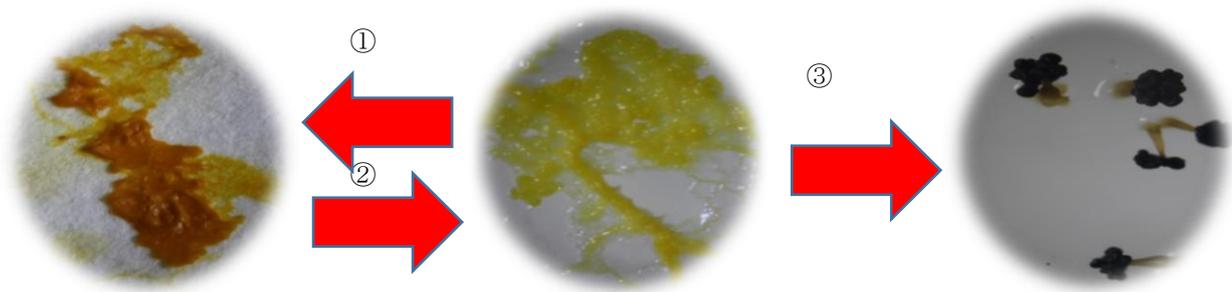
変形体を乾燥させることで菌核に変化した。黄色の瑞々しい状態の変形体から、色は茶褐色がかり、乾燥したフィルム状に変化した。

②菌核→変形体

菌核を湿気のある寒天培地に移すと数時間で変形体に戻り、培地上を移動し始めた。

③変形体→子実体

寒天培地状でオートミールを与えず放置しておく、数日後にはシャーレの中で一面に広がり子実体に変化した。



<光照射しない場合の変形体の動き>

変形体を撮影用培地に移し新しい培地上に降りて安定して移動を始めてからの記録である。横軸の数字は5分を1単位時間として表し、(単位時間×5)分を表す。縦軸は5分毎の面積拡大量の累積加算した値である。すなわち、変形体の移動量を表すと見なせる。

光刺激を与えなかった場合は、変形体はほぼ一定の速度で移動していることになる。最後はほぼ培地シャーレの縁にまで達している。

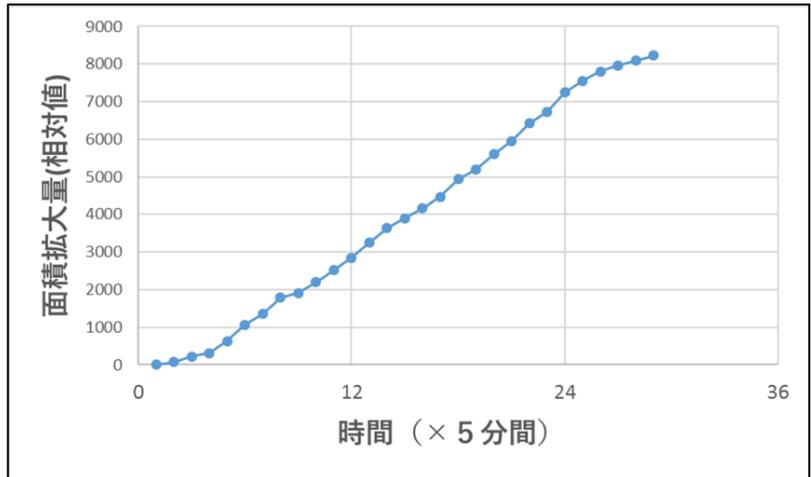


図4 光照射しない場合の変形体の動き

<周期的な光照射した場合の変形体の動き>

変形体に以下の手順で周期的に光照射を行いその反応を調べた。

光の照射条件：

- ①白色光 (LED ランプ) による光照射 (紫外光は含まれていない) を行う。
- ②暗所で変形体が新しい寒天培地の上に降りたら開始する。
- ③5分間の光照射と55分間の暗所放置を行う。(60分1サイクル)
- ④同じ光照射のサイクルを3回繰り返し、その後光照射は行わず暗所で放置する。

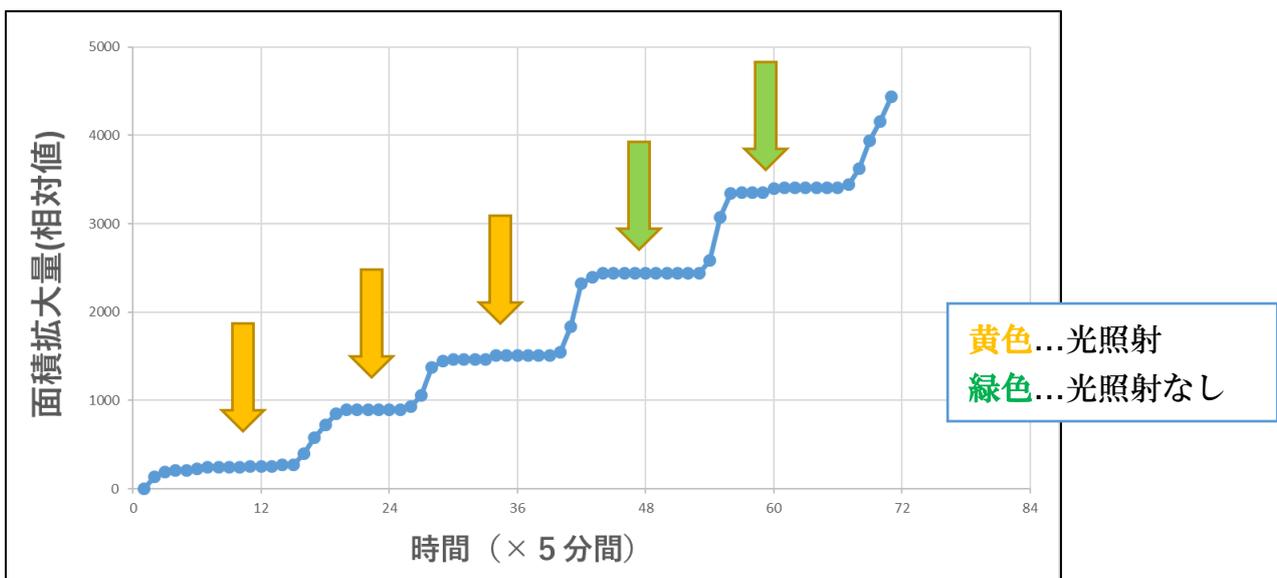


図5 周期的な光照射した場合の変形体の動き

横軸・縦軸の値は、光照射しない場合の図4と同じである。黄色の矢印は、光照射をした時点を示し、緑色の矢印は、光照射はしないが最後の光照射から60分後と120分後の時点を示している。

3回の光照射によって、ある程度の期間、移動が抑制されている。周期的に移動と移動の抑制が繰り返された。さらに、3回の光照射後も暗所中ではほぼ同じリズムでの周期的な移動抑制が2回まで確認できた。

この後については変形体が培地シャーレの縁にまで達したためこれ以上の観察はできなかった。

考察

私たちの行った解析方法は、粘菌変形体の移動の様子を、変形体の面積変化でとらえることで、移動の大きさを数値で表すことができた。これによって、光に対する変形体の微妙な動きの変化をとらえられたことから、この解析方法は有用であったと考えている。

変形体は光照射が無ければ、一定の速度で移動するが、光照射によって移動が抑制されると考えられる。下の図6は図5のグラフを5分間の単位時間当たりの面積変化量、すなわち5分の単位時間当たりの移動速度の変化を表したものである。

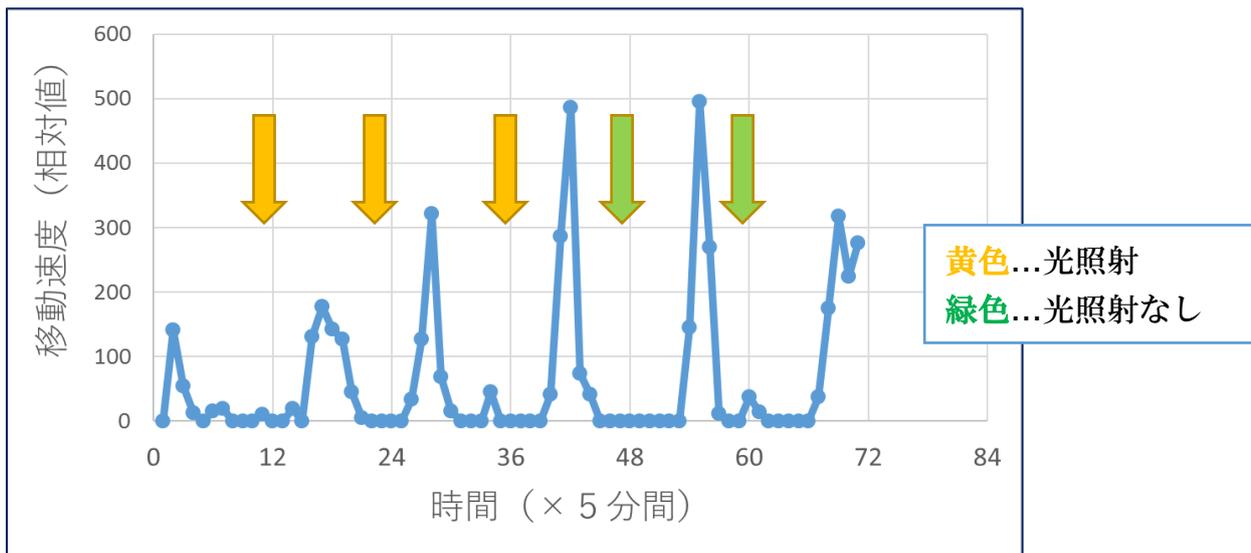


図6 周期的な光照射した場合の変形体の速度変化

光照射によって即座に減速してはいない。光の効果が薄れ、移動速度が増加すると前に当たった光の効果によって速度が抑えられているとも読み取れる。明るいとこで撮影用培地に植え替え、その後暗所で実験を行っている。最初の減速は植え替え時に当たった光の影響があるのかもしれない。いずれにせよ、光と減速にはかなりの時間的ずれがある。一方、中垣氏らの研究では、乾燥した冷気を与えた時、変形体は即座に減速している。

変形体の動きは、細胞骨格とモータータンパク質であるアクチン-ミオシン系によるものと予想される。湿度や温度刺激は直接アクチン-ミオシン系に作用し即座に減速するのに対し、光刺激の場合は光受容体を介してアクチン-ミオシンに作用し変形体の動きを制御することで、刺激と反応にずれが生じるのかもしれない。今後、光受容体の関与や光受容体とアクチン-ミオシンの関係などを詳しく調べる必要がある。

光照射を2回、3回と繰り返すごとに、移動と減速の反応の周期性が明確になり、光を与えなくなった後も反応の周期性だけは残ることから、光による減速効果は確からしいと考えている。別の回の同様の実験では、最初の減速が明瞭ではないが光照射を繰り返すと、図5のような階段状の減速反応が徐々に明瞭に現れてくることがあった。実験前の準備での変形体の植え替え時にあたる光の影響が十分なくなってから光照射実験を始めないといけないのかもしれない。

光照射を終えても、周期的な減速反応が見られることから、暗所の中でも反応の周期性のリズムは刻まれ、リズムを刻むしくみが変形体の中に存在すると考えられる。また、光の受容から移動速度の低下まで、変形体の中でどのようなメカニズムが働いてこの反応がおこるのかは不明である。

結論

私たちが行った変形体の移動の解析方法は、変形体の面積変化をその移動量と見なし、移動の様子を数値で表し移動速度を求められた。詳細な移動速度の変化をとらえられることで、光刺激の移動速度に対する影響を明確にとらえることができた。よって、この解析方法は有用である。

暗所では、変形体の移動はほぼ一定の移動速度を示すが、周期的な光刺激を与えると周期的な移動速度の低下が観察され、その周期的な速度低下の反応は光刺激がなくてなってもしばらくは続く。周期的な刺激と反応のリズムは変形体に刻まれ、光刺激がなくなっても少なくとも2時間程度はそのリズムは残る。

中垣氏らによって湿度や温度刺激に対する変形体の反応は詳しく調べられ、また、刺激に対する反応の記憶という観点からも研究されている。私たちの行った光刺激に対する反応も光受容体も含めて、興味ある研究課題と考えている。

謝辞

この課題研究の実施にあたり、担当教員の三好先生には実験等を見守っていただき、また、前年度の課題研究で粘菌の研究を行っていた先輩方には粘菌の飼育等の基本操作を教えていただき、本当にありがとうございました。

参考文献

- ・中垣俊之. 粘菌 その驚くべき知性. PHP 研究所. 2010. 198p.
- ・ジャスパー・シャープ/ティム・グラバム著 (監修 川上新一). 粘菌 知性のはじまりとそのサイエンス. 誠文堂新光社. 2017.