

動物のからだの左右を決める 回転繊毛間の流体相互作用

高松敦子¹, 石川拓司², 篠原恭介³, 濱田博司³

¹ 早稲田大学 理工学術院, ² 東北大学大学院 工学研究科,

³ 大阪大学大学院 生命機能研究科,

A. Takamatsu¹, T. Ishikawa², K. Shinohara³, H. Hamada³

¹Waseda University, ²Tohoku University, ³Osaka University

マウスでは初期胚のノードと呼ばれるくぼみを満たす体液の流れが最初のトリガーとなり、左右差が決定することが知られている。ノードは百余りの細胞で構成され、それらの細胞には1本ずつ繊毛が生えている。各繊毛はからだの尾側に傾いた回転軸周りに時計回りに回転する。これによって左向きの一方向流が生成される。最近ミュータントマウスを用いて、たった2本繊毛の回転でも、左右差が確立できることが実験的に示された。本稿では、たった2本の繊毛で何ができるか、繊毛の回転運動の同期現象に着目して解析をおこなった。さらに、繊毛間に流体相互作用を仮定して、それだけでも繊毛が同期しうることを、境界要素法による計算と位相縮約法を組み合わせた理論により示す。これに基づき、繊毛の同期によって効果的な流れが形成される可能性について議論する。

1 はじめに

動物のからだには左右差がある。マウスでは初期胚に形成されるノードと呼ばれるくぼみが重要な役割を果たすことがわかっている [1, 2]。ノードは百余りの細胞で構成され、その一つ一つに1本ずつ1次繊毛が生えている (図 1A)。ノード細胞の繊毛はノード上面から見ると時計回りに回転運動する。ノードは体液で満たされており繊毛の運動によって体液の流れが生じる。繊毛運動の回転軸が尾側に傾いているため (図 1B)、細胞表面から離れたところを繊毛が運動する場合には比較的自由に運動できるが、近いところを運動する場合には流体の抗力を大きく受ける (細胞表面における non-slip 境界条件)。前者を有効打 (effective stroke)、後者を回復打 (recovery stroke) という。有効打は左向きの運動であるため、ノード全体では左向きの流れが生成される。この流れが、ノード両端にあるクラウン細胞という細胞群に「左シグナル」を伝達すると考えられている*¹。

左シグナルを生成するには数十から百本余りの繊毛の回転運動が必要であるとこれまで考えられていたが、最近たった2本の繊毛でも左右差が形成できることが実験的に明らかにされた [3]。本稿では、たった2本の繊毛で何ができるか、繊毛の回転運動の同期現象に着目して解析を行った。

*¹ 流れが、クラウン細胞にある運動しない1次繊毛に機械的な刺激を与える説と、化学物質を内包したベシクルを運搬する説があるが、現時点では詳細は明らかではない。

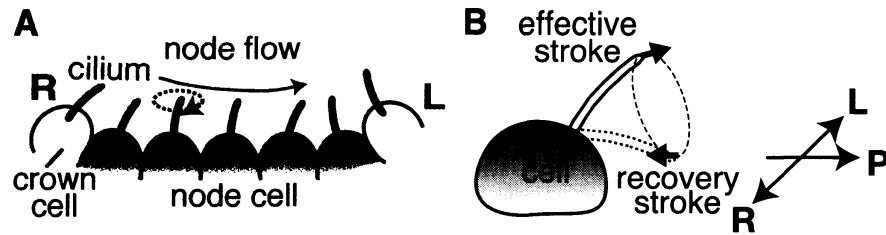


図1 A ノード断面図. B ノード繊毛. R, L, P はそれぞれノードの右側 (right), 左側 (left), 尾側 (posterior) を表す.

さらに、繊毛間に流体相互作用を仮定すれば同期しうることを、境界要素法による計算と位相縮約法を組み合わせた理論により示す。

2 孤立した2繊毛の位相同期

繊毛成長に変異を持つ *Dpcd* というミュータント・マウスを用いてノード内で少数の繊毛だけが回転運動する系を作成す [3], 孤立した2本の繊毛が回転している系についてハイスピードカメラを用いて観察した. その画像を基に繊毛の先端をトラッキングし, 細胞配列平面へ射影された軌道を計測した (図2A). 3次元空間では繊毛は図3Aに示したような円錐表面に沿ってに回転し, その先端が真円軌道上を運動すると仮定すれば, 観察平面には楕円軌道として射影される. そのデータと繊毛の根の位置座標から, 元の3次元運動を再構成できる [4]. 再構成データから, 繊毛のセッティングに関するパラメータ, すなわち, 繊毛回転軸の傾き角 α , 円錐の開き角 β , 傾き方向 η , そして, 位相 θ を見積もれる. 左右軸上 (LR 軸上) に並んだ繊毛 1, 2 の位相差の解析結果の一例を図2Bに示す. この例では, 繊毛2が1に対して $\pi/2$ だけ遅れた状態で位相固定されていることがわかる. 同様な計測から, この系では位相固定する場合があること^{*2}, 位相固定する場合には位相差は $\theta_2 - \theta_1 \sim -\pi/2$ となることがわかった [5]. 繊毛間の相互作用として, 細胞間のシグナル伝達, 繊毛間に存在する流体による相互作用, 細胞骨格を介した機械的相互作用が考えられる. 一般的に細胞間コミュニケーション手段としてギャップ・ジャンクションや Notch-Delta シグナル伝達経路があると言われている, ノード系について免疫染色などによりこれらの探索を試みたがこれまでのところノード細胞間にそのような結合を見つけることができなかった. 本稿では問題を簡単化するために, まずは流体相互作用だけで繊毛間の位相同期現象がどこまで説明できるか探ることとした.

^{*2} 全観測回数のうち $n = 9/29$ に位相同期が見られた. 繊毛のセッティングはほぼ同一の状態得ているので, 同期/非同期の差は固有回転速度 ω_i の差によるものと考えられる. 実験データから固有回転速度を正しく見積もることはできないが, 二つの繊毛の回転速度が5% ($\sim \delta\omega/\bar{\omega}$, ここで, $\delta\omega = |\omega_2 - \omega_1|$, $\bar{\omega} = (\omega_1 + \omega_2)/2$) 以上離れると位相同期できないことが実験データから読み取れた [5].

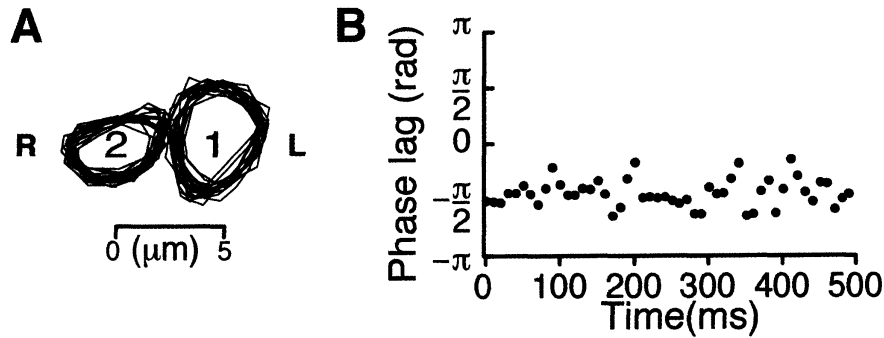


図2 A 孤立した2本の繊毛の軌道。各軌道の数字は繊毛の番号を表す。B 二つの繊毛間の位相差 $\theta_2 - \theta_1$ 。

3 モデル

原生動物の細胞表面や気道上皮細胞における繊毛のメタクロナル波や複数の鞭毛の協調的運動には流体相互作用が重要な役割を果たすことは古くから議論されてきた [6]。これらの系では、1細胞に多数本形成され繊毛間の距離が接する程に近いこと、運動が平面的なビートパターンである点において、ノード繊毛の特徴と異なる^{*3}。ノード繊毛は少なくとも1細胞以上の間隔で離れている。これまでまばらな間隔にある繊毛の運動では繊毛間に働く流体相互作用については重要視されてこなかった。数少ない例として、実験系には、2繊毛が協調運動して遊泳するクラミドモナスや [7]、コロイド粒子などの人工系 [8] がある。ビート運動の協調的な挙動に関する議論は多くなされているが、回転運動に適用できるものは数少ない上に、繊毛の運動をストークスレットと名付けた球形の小さいビーズの運動で近似している [9–11]。繊毛が十分に離れている場合には良い近似を与えるが、ノード繊毛のような1細胞程度の距離では棒状の繊毛の形状が影響する可能性が残される。そこで本稿では、繊毛の形状も考慮に入れ、繊毛間の流体相互作用を境界要素法を用いてより厳密に計算してみることにした。

ここでは、繊毛を長さ l_0 、直径 $0.1l_0$ の円筒形の剛体棒と仮定し、2本の繊毛を $d = (2l_0)$ の距離に配置した (図3)。細胞は平面で近似し、ここで non-slip 境界条件を考える。また流体には (繊毛が生成するもの以外は) 流れは考えないものとする。繊毛 i ($i = 1, 2$) の位相 θ_i は、図3Aにおいて y 軸 (尾側) に向いたときを基準に時計回りに定義し、2繊毛の位相を位相ベクトル $\Theta = (\theta_1, \theta_2)^T$ で表す。繊毛は非常に小さく (長さ数 μm)、ノード体液の粘性は非常に大きい (水の1.5倍程度) ため、この系のレイノルズ数は $Re \ll 1$ となる。従って慣性力は無視できるストークス流が仮定できる。つまり、回転運動をする際に繊毛が流体から受ける抗力は、接線方向成分において駆動力

^{*3} 繊毛自体の構造的差異もある。ノード繊毛は1次繊毛であり、9組のダブレット微小管が回転対称を保持するように並ぶ。一方、1細胞多繊毛系の繊毛は円周上に並んだ9組のダブレット微小管の他に、中心に2本の微小管がある。前者は9+0構造と呼ばれ、後者は9+2構造と呼ばれる。動物細胞の多くの1次繊毛は運動せず、主にセンサー繊毛の役割を果たし、回転運動をするノード繊毛はむしろマイナーな存在である。

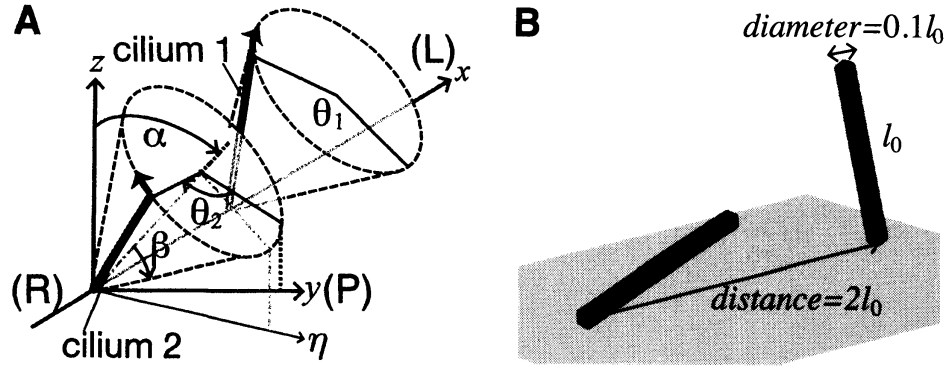


図3 境界要素法計算における繊毛のセットアップ。A 2本の繊毛は傾き角 α 、開き角 β の軸の周りを回転する。 η は回転軸の傾き方向である。B 境界要素法では円筒状の繊毛表面に 594 個 (1 繊毛当り) の三角格子を設定し、細胞表面は平面であると仮定した。

$\mathbf{F} = [F_1(\theta_1), F_2(\theta_2)]^T$ と釣り合うものとする^{*4}。

$$\mathbf{F} = \mathbf{K}\dot{\boldsymbol{\Theta}}. \quad (1)$$

ここで、 $\mathbf{K}$ は抗力行列

$$\mathbf{K} = \begin{pmatrix} K_{11} & K_{12} \\ K_{21} & K_{22} \end{pmatrix},$$

であり、 $K_{ij} = K_{ij}(\theta_i, \theta_j)$ のように繊毛の位相に依存する。 $\mathbf{K}$ の各要素は境界要素法を用いて数値計算により決定した [4, 12]。詳細は引用論文 [5] に譲るが、概要は以下の通りである。この問題は線形化して考えることができるため、 $\mathbf{K}$ の 1 行目の要素は 2 行目の要素とは独立に求められる。例えば、繊毛 2 は固定しておいて ($\dot{\theta}_2 = 0$)、繊毛 1 をある単位速度 ($\dot{\theta}_1 = 1$) で回転運動させた場合に、繊毛 2 が受けるトラクション力を K_{21} と求める。

次に、式 (1) から位相方程式を求める。 $|\mathbf{K}| \neq 0$ ならば (実際に上述の数値計算結果はこの条件を満たす)、式 (1) は次のように書き換えられる：

$$\dot{\boldsymbol{\Theta}} = \mathbf{K}^{-1}\mathbf{F}. \quad (2)$$

ここで、 $\mathbf{K}$ の対角要素は自分以外の繊毛がない場合の抗力係数 $J_i(\theta_i)$ とそれ以外の成分 $K'_{ii}(\theta_i, \theta_j)$ に分けておく：

$$K_{ii} = J_i(\theta_i) + \epsilon K'_{ii}(\theta_i, \theta_j).$$

ここで、 ϵ は繊毛間距離に依存した係数であり、 $0 \leq \epsilon \leq \epsilon_{max}$ である。 ϵ_{max} は繊毛同士が接触する直前の距離の場合の係数である。本稿の数値計算では、 $\epsilon = 1 (d = 2l_0 \text{ のとき})$ としている^{*5}。ま

^{*4} 繊毛の駆動力は繊毛内部の微小管とダイニンモータータンパク質の滑り運動によって生成される。これらの駆動力源は繊毛の長軸方向全体に分布しており、繊毛の根元一点で駆動力が発生するわけではない。その理由でここでは力のバランス方程式を採用した。トルクバランス方程式 $\mathbf{T} = \mathbf{K}_t \dot{\boldsymbol{\Theta}}$ を考えることもできるが、本稿の結論は変わらない。ここで、 $\mathbf{T} = [T_1(\theta_1), T_2(\theta_2)]^T$ は駆動トルク、 $\mathbf{K}_t$ はトルクに基づき計算した抗力行列である。

^{*5} 厳密には $\mathbf{K}$ の値は繊毛間距離に依存して単調に変化しないが、本稿で想定している範囲内ではほぼそれで近似できることを確かめている。

た, K_{ij} も次のように再定義しておく.

$$K_{ij} = \epsilon K'_{ij}(\theta_i, \theta_j)$$

以上より次の位相方程式が求められる.

$$\begin{aligned}\dot{\theta}_1 &= \frac{F_1 J(\theta_2) + \epsilon(K'_{22} F_1 - K'_{12} F_2)}{|\mathbf{K}|}, \\ \dot{\theta}_2 &= \frac{F_2 J(\theta_1) + \epsilon(K'_{11} F_2 - K'_{21} F_1)}{|\mathbf{K}|}.\end{aligned}\quad (3)$$

さらに, 繊毛の回転駆動力^{*6}は一定ではなく位相に依存することが実験データ解析から確かめられている [4] ので,

$$F_i(\theta_i) = F_0^{(i)} \{1 - F_r^{(i)} \cos(\theta_i - F_s^{(i)})\}, \quad (4)$$

とする. ここで, $F_0^{(i)} > 0$, $0 \leq F_r^{(i)} < 1$, $0 < F_s^{(i)} < \pi$ である.

位相差 $\phi = \theta_2 - \theta_1$ に関する時間発展方程式を $\dot{\phi} = \dot{\theta}_2 - \dot{\theta}_1 \equiv S(\theta_1, \theta_2)$ としたとき, $S(\theta_1, \theta_2) = 0$ を常に満たす ϕ が存在すれば 2 繊毛は同期できると言えるが, そのような ϕ は繊毛パラメータをどうとつても見つけられなかった. そこで, もう少し条件をゆるくし広義の位相同期について考えてみる. つまり, 常に位相が固定されるのではなく, ある一定位相差の周りに小さな周期的変動を許すというものである. ここで位相縮約理論 [13] の考え方を導入する

その前に, 準備として 2 繊毛間に相互作用がない場合について整理しておく. 式 (3) で $\epsilon = 0$ とおく. このとき, $|\mathbf{K}| = J_1(\theta_1)J_2(\theta_2)$ となるので, これを式 (3) に代入すると,

$$\dot{\theta}_i = \frac{F_i(\theta_i)}{J_i(\theta_i)}$$

となる. ここで, $J_i(\theta_i)$ や $F_i(\theta_i)$ は位相に依存するので θ_i は単調増加しない. 位相縮約の準備のため, これを $\dot{\psi}_i = \omega_i$ のように単調増加する新しい位相変数 ψ_i に, 次式を用いて変換しておく.

$$\psi_i = \omega_i \int_0^{\theta_i} \frac{1}{\dot{\theta}'_i} d\theta'_i = \omega_i \int_0^{\theta_i} \frac{J(\theta'_i)}{F_i(\theta'_i)} d\theta'_i,$$

ここで, ω_i は固有位相速度である.

次に相互作用がある場合を考える. $J \gg K'_{ii}, K'_{ij}$ のとき^{*7}, $|\mathbf{K}| \approx J_1(\theta_1)J_2(\theta_2)$ とおけるので^{*8},

$$\dot{\psi}_i = \omega_i \frac{J_i(\theta_i)}{F_i(\theta_i)} \cdot \dot{\theta}_i,$$

の関係式とともに, 式 (3) に代入すると,

$$\begin{aligned}\dot{\psi}_1 &= \omega_1 + \epsilon \omega_1 \gamma_1(\psi_1, \psi_2), \\ \dot{\psi}_2 &= \omega_2 + \epsilon \omega_2 \gamma_2(\psi_1, \psi_2)\end{aligned}\quad (5)$$

^{*6} またはトルク

^{*7} 実際にそうなっている.

^{*8} 後の数値計算ではこの近似式は用いず, 元の行列式で厳密に計算している. ここでは式の性質を理解するために簡略化して説明している.

が得られる。ここで、

$$\begin{aligned}\gamma_1(\psi_1, \psi_2) &= \frac{\hat{K}'_{22}\hat{F}_1 - \hat{K}'_{12}\hat{F}_2}{\hat{J}_2(\psi_2)\hat{F}_1}, \\ \gamma_2(\psi_1, \psi_2) &= \frac{\hat{K}'_{11}\hat{F}_2 - \hat{K}'_{21}\hat{F}_1}{\hat{J}_1(\psi_1)\hat{F}_2}\end{aligned}\quad (6)$$

である。 $\hat{K}'_{ij}(\psi_i, \psi_j)$ や $\hat{J}_i(\psi_i)$ は θ_i から ψ_i への変換に伴い、元の抗力係数を変換したものである。

位相差 $\Phi \equiv \psi_2 - \psi_1$ の時間発展方程式は、

$$\begin{aligned}\dot{\Phi} &= \dot{\psi}_2 - \dot{\psi}_1 \\ &= \delta\omega + \epsilon\{\omega_2\gamma_2(\psi_1, \psi_2) - \omega_1\gamma_1(\psi_1, \psi_2)\},\end{aligned}\quad (7)$$

となる。ここで、 $\delta\omega \equiv \omega_2 - \omega_1$ としている。いま、位相差の変化のトレンドは繊毛回転による位相の変化と比較してずっとゆっくりであると仮定すると、

$$\Gamma_i(\Phi) \equiv \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} \gamma_i(\psi_i, \psi_j) d\psi_1.$$

のように速い ϕ_i の周期的変化の1周期に渡って平均化して、位相差変化のトレンドにだけ着目することができる。すると

$$\dot{\Phi} \simeq \delta\omega + \epsilon\Gamma(\Phi; \omega_1, \omega_2), \quad (8)$$

を得る。ここで、

$$\Gamma(\Phi; \omega_1, \omega_2) \equiv \omega_2\Gamma_2(\Phi) - \omega_1\Gamma_1(\Phi), \quad (9)$$

としている。式(8)は固有回転速度差の項 $\delta\omega$ と、相互作用項 $\epsilon\Gamma$ に整理されているが、式(9)に見るように、相互作用項もまた固有回転速度 ω_i に依存することに注意を要する^{*9}。この点が、通常の単純拡散による相互作用から導出される位相方程式 [13] と大きく異なる点である。

本方程式を元に位相同期条件について考えてみる。

$$\min\{\Gamma(\Phi; \omega_1, \omega_2)\} < -\delta\omega/\epsilon < \max\{\Gamma(\Phi; \omega_1, \omega_2)\} \quad (10)$$

を満たす Φ が存在するとき、2つの繊毛は広義の位相同期が可能である。図4にその例を示す。2本の繊毛のパラメータが同一の場合2繊毛間の $\omega_i\Gamma_i$ の値 (図4A) の差はほとんどなく、図4Bの見るように位相同期可能な範囲 (プロットの極大から極小までの差) は非常に狭い。これでは現実的には位相同期は難しいことになってしまう。一方、繊毛のパラメータが2本の間で異なる場合、同期範囲が格段に拡大し、実験データ程度の固有回転数差があっても位相同期可能であることがわかった。例として図4C, Dに、繊毛2の長さが繊毛1の1.5倍とした場合について示している。このほかに、実験と同様の繊毛パラメータ条件では $-\pi < \Phi < 0$ で位相同期することを確認した [5]。

^{*9} Γ_i 自体にも陰に固有回転速度は含まれている。式(6)の定義より被積分関数 γ_i には駆動力 $\hat{F}_i$ が含まれているからだ。固有回転速度は駆動力に依存する。

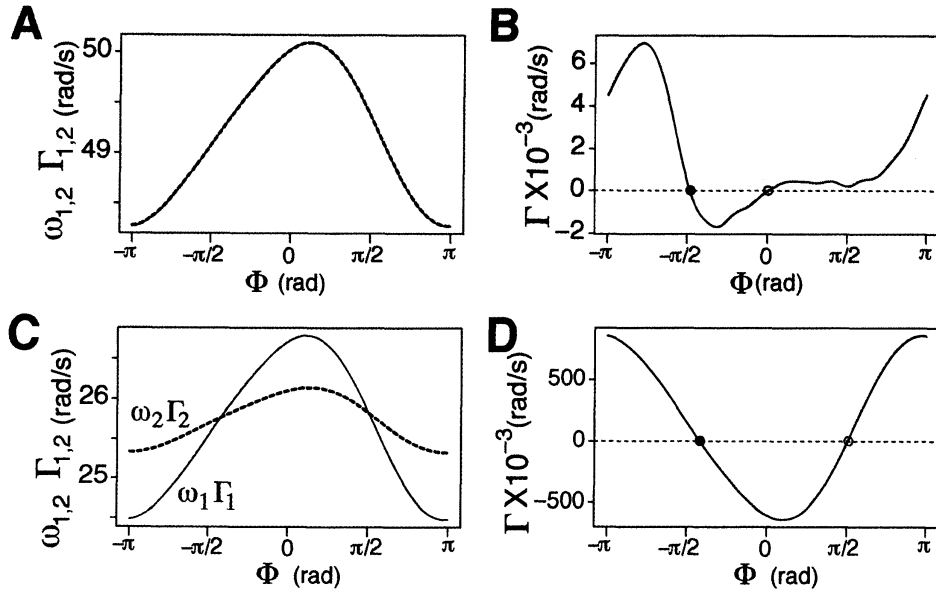


図4 2 繊毛の位相同期条件. 2 本の繊毛のパラメータが同一の場合 (A, B) と差異がある場合 (C, D). A, C $\omega_i \Gamma_i$ ($i=1,2$). B, D $\Gamma = \omega_2 \Gamma_2 - \omega_1 \Gamma_1$. 繊毛のパラメータは A, B では $\alpha_{1,2} = \pi/6$, $\beta_{1,2} = \pi/4$, $\eta_{1,2} = -\pi/2$, $l_{1,2} = l_0$, $F_0^{(1,2)} = 0.1$, $F_r^{(1,2)} = 0$ としている. C, D では $l_2 = 1.5l_0$ and $F_0^{(2)} = 0.05229$ (同期できるように調整) とした以外は A, B の場合と同じ. 図 B, D において相平面解析をした結果, 黒丸を安定固定点として, 白丸を不安定固定点として得る.

4 まとめと今後の課題

本稿ではマウスノードにおける孤立した2本の繊毛の回転運動を分析し, 境界要素法による数値計算と位相縮約理論を用いて細胞サイズ程度離れていても流体による相互作用だけで位相同期可能であることを示した. さらに, 全く同一のパラメータにある繊毛同士よりも異なる繊毛同士の方が位相同期しやすいことがわかった. また, 本稿では取り上げなかったが位相同期する場合, 単独の場合よりも有効打のフェーズにおいて回転数が速くなる場合もあることを見いだしている. 回転数が増加すれば, その周りの流体をより速く動かせることになる. 現実系においては繊毛が不揃いである方が自然であり, そのことが, ノードにおいてより効率的に流れを形成できる点は興味深い, まだいくつかの問題が残されている. まず, 野生型マウスのノードでは複数繊毛が同時に回転するので, その場合の流体相互作用はさらに複雑である. 従ってここでの結論が複数繊毛においても成立するのか検討が必要である. さらに第2節でも述べたが, ノード細胞間において生化学的な相互作用は排除できるが, 本稿では考慮に入れなかった細胞骨格や細胞膜自体を介した機械的相互作用の存在は否定しきれない. 機械的相互作用が流体相互作用と比較して無視できるほど小さいか, 無視できないとすればどのような効果を与えるか検討を要する. また, 本稿のモデルでは繊毛自体は変形しない円筒形の剛体と仮定したが, 実際の繊毛は弾性体である. このことも同期条件に

どれほどの影響があるのか見積もる必要があり、これらの問題は今後の課題となる。

5 謝辞

本研究の一部は科研費，科学技術振興機構 CREST の補助によるものである。

参考文献

- [1] W. F. Marshall and S. Nonaka, *Current Biology* **16**, R604 (2006).
- [2] H. Shiratori and H. Hamada, *Development* **133**, 2095 (2006).
- [3] K. Shinohara *et al.*, *Nat. Commun.* **3**, 622 (2012).
- [4] A. Takamatsu, T. Ishikawa, K. Shinohara, and H. Hamada, *Phys. Rev. E* **87**, 050701(R) (2013).
- [5] A. Takamatsu, K. Shinohara, T. Ishikawa, and H. Hamada, *Phys. Rev. Lett.* **110**, 248107 (2013).
- [6] D. Bray, *Cell Movements: From Molecules to Motility*, 2 ed. (Garland Science, 2000).
- [7] M. Polin, I. Tuval, K. Drescher, J. P. Gollub, and R. E. Goldstein, *Science* **325**, 487 (2009).
- [8] J. Kotar, M. Leoni, B. Bassetti, M. C. Lagomarsino, and P. Cicuta, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 7669 (2010).
- [9] A. Vilfan and F. Jülicher, *Phys. Rev. Lett.* **96**, 058102 (2006).
- [10] P. Lenz and A. Ryskin, *Phys. Biol.* **3**, 285 (2006).
- [11] N. Uchida and R. Golestanian, *Phys. Rev. Lett.* **106**, 058104 (2011).
- [12] T. Ishikawa, M. P. Simmonds, and T. J. Pedley, *J. Fluid Mech.* **568**, 119 (2006).
- [13] Y. Kuramoto, *Progress of Theoretical Physics Supplement* **79**, 223 (1984).