

微生物の走光性にもなう局在対流パターンの光応答性

末松 J. 信彦 (明治大学大学院先端数理科学研究科)

Nobuhiko J. Suematsu (Graduate School of Advanced Mathematical Sciences, Meiji University)

1. 生物対流パターン

繊毛虫や鞭毛虫の様に培養液中を遊泳する微生物の中には、様々な外部環境に応答する走性を示すものがある。例えば、化学物質の濃度に応答する走化性、重力に応答する走地性、光に応答する走光性などが挙げられる。この走性により微生物が上向きに遊泳するような外部環境が与えられると、条件に応じて mm オーダーの巨視的な空間パターンが形成されることが知られている。この巨視的な空間パターンの形成は微生物が走性によって培養液の液面に集まることで密度不安定な状態が形成することに起因する、流体力学的な現象である。つまり、培養液よりも比重の大きい微生物が走性により上向きに遊泳する効果と自重で沈降する効果が拮抗して、空間均一な状態が不安定化し、巨視的な対流パターンが形成される。この現象は生物対流と呼ばれ、熱対流で知られる Rayleigh-Bénard 対流の類推で流体力学的な解析が進められてきている[1]。

一般的には生物対流パターンも熱対流パターンと同様に、容器全体に細胞密度の差が生みだす巨視的な流体パターンが形成される。しかし、ミドリムシという光合成微生物の場合、容器の中央付近に局所的に細胞密度の高い領域を形成し、対流パターンを生成する[2]。この特徴的なパターン形成はミドリムシの走光性に起因していると考えられ、筆者らはこれまでに自己遮蔽効果を考慮した局在化機構を提案してきた[2]。ミドリムシは強い光を照射すると負の走光性を示すため、下から均一な光を照射すると上向きの走性が誘起される。そのため、上部の境界付近の細胞密度が高くなり、密度不安定が起こるために流体パターンが形成されるものと考えられる。観察結果より、細胞密度の高くなっている斑点部分は沈降点に対応しており、高密度のミドリムシが自重で沈降していることが分かっている。この時、沈降点付近は高密度のミドリムシにより下から照射されている光が遮蔽され、周辺と比べて相対的に暗い領域になる。筆者らはこの傾向に着目し、上境界付近のミドリムシは負の走光性により、より暗い領域、すなわち細胞密度の高い領域に向かって遊泳する傾向があるものと仮定して数理モデルを構築した。その結果、実験で観察されたものと同様の現象が再現されている[2]。現在、これらの仮定や数理モデルの妥当性の検証が求められている。

本稿では、3つの環境変数に対するミドリムシの空間パターンの変化を観察し、局在化しない一般的な生物対流に対して立てられた流体力学的な理論式からの予測と実験結果を比較することで、局在パターンの特徴を調べた。

2. 実験

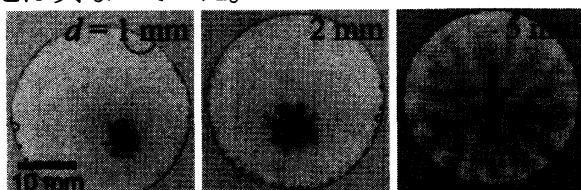
ミドリムシはケーレン・ハートナー培地で1週間培養した後、遠心分離し、培地を HYPONeX 溶液 (1 g/L) に変えてから更に1週間培養したものを用いた。HYPONeX 培地では、明期 14 時間・暗期 10 時間で光依存的に培養することで、概日リズムを同期させた。実験の直前に培養液中の細胞密度を測定し、HYPONeX 溶液を用いて希釈することで目的の細胞密度の培養液 ($4.8 - 1.44 \times 10^6$ cells/mL) を調製した。また、培養液の比重を変えて、密度不安定が起こる条件を調べた。培養液の比重は、培養液に Percoll (Sigma Aldrich) を加えることで 1.01 – 1.06 g/mL の間で制御した。

観察用の密閉容器は、円形(直径 40 mm)に穴をあけたシリコンゴムシート(厚さ 0.5 – 5.0 mm)を2枚のスライドガラス(70 × 50 mm)ではさんで圧着して作成した。ミドリムシの培養液を密封した試料を、平面光源(光量 200 – 45k lx)の上にのせ、上からデジタルカメラでタイムラプス撮影した。光源と試料の間にはガラス板をはさみ、そのガラス板の温度を水冷することで試料の温度を 25°C に保った。撮影したデータは画像解析ソフトウェア「ImageJ」で解析を行った。

3. ミドリムシの生物対流パターンの環境条件依存性

局在パターンの特性波長の環境依存性を調べるために、容器の深さ d 、細胞密度 ρ 、照射光の強度 ϕ を変数として観察を行った。ここで、特性波長 λ は隣接する斑点の中心間距離を画像解析で測定し、その平均値で評価した。

細胞密度を 1.0×10^6 cells/mL、光源の光量を 3000 lx に固定して、容器の深さを変数として観察を行ったところ、容器の深さが 0.5 – 2.0 mm の領域で生物対流パターンは斑点模様を形成し、その特性波長は深さとともに大きくなった (Fig. 1)。一方で、3.0 mm 以上の深さでは特性波長は一定値を取り、変化しなかった。この深さ領域での対流パターンは近接した斑点間を線で結ぶ模様が形成され、浅い容器で観察された模様とは異なっていた。



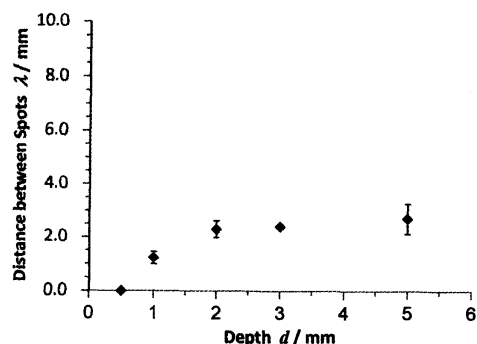


Fig. 1 生物対流パターンの深さ依存性。挿入図は照射後 60 min の対流パターンを示している。

深さを 2.0 mm に固定して細胞密度を変数として観察を行ったところ、対流パターンの特性波長は約 2 mm で深さに対応するほぼ一定の値を示し、細胞密度には依存しなかった (Fig. 2)。一方で、斑点の数は細胞密度とともに増加した。特性波長が細胞密度に依存しない点は、一般的な生物対流[3]とは異なる、局在パターンにみられる特徴的な現象である。つまり、局在化することで局所的な細胞密度が決定されるため、対流パターンの特性波長が平均密度に依らないものと考えられる。

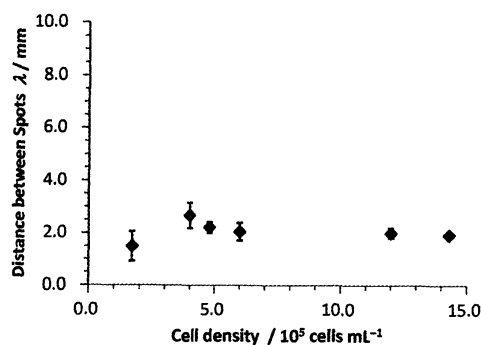
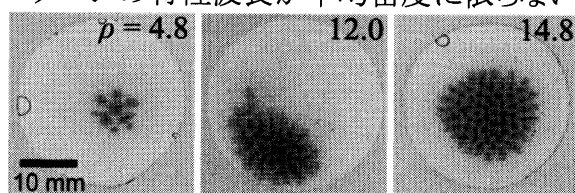


Fig. 2 生物対流パターンの平均細胞密度依存性。挿入図は照射後 60 min の対流パターンを示している。

光強度が強くなるとミドリムシが走光性により上向きに遊泳する割合は大きくなる。その結果、光強度が強くなるほど、対流パターンの特性波長は小さくなり光強度が 10k lx を超えると特性波長は下限に達して一定になった (Fig. 3)。光強度が高い領域では、斑点パターンの周縁に形成される線状パターンの領域が大きくなった。

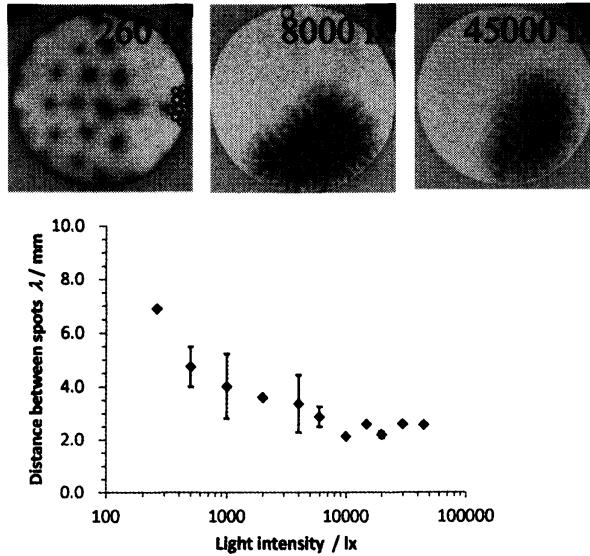


Fig. 3 生物対流パターンの照射光強度依存性。挿入図は照射後 60 min の対流パターンを示している。

生物対流は微生物の比重が培養液のそれより大きいことに起因して起こる現象である。そこで、培養液の比重を制御することで、密度不安定が起こらない条件を調べた。培養液の比重を増加させたところ、1.04 g/mL でパターン形成にかかる時間が長くなり、1.05 g/mL 以上で対流パターンが観測されなくなった(Fig. 4)。このことから、ミドリムシの比重はおよそ 1.04 - 1.05 g/mL にあるものと考えられる。

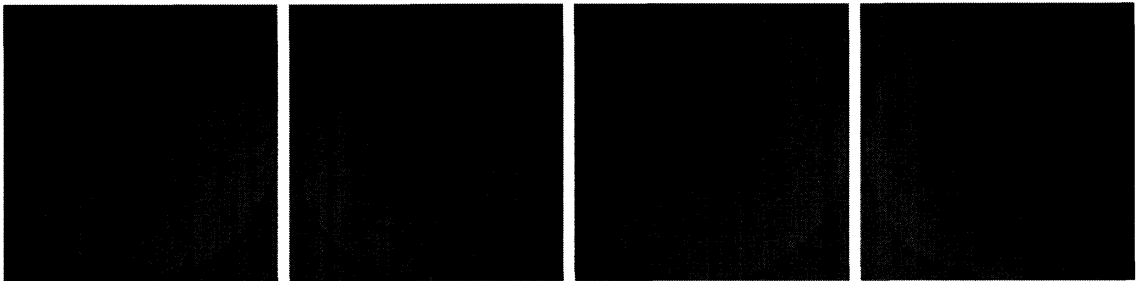


Fig. 4 生物対流パターンの比重依存性(照射後 60 min の対流パターン)。

4. 理論解析との比較

熱対流からの類推で生物対流に対応する数理モデルが提案されている[4]。連続場近似と Boussinesq 近似を仮定して Navier-Stokes 方程式を記述すると、生物対流現象は以下のように書き表すことができる。

$$\nabla \cdot \mathbf{u} = 0, \quad (1)$$

$$\rho_0 \left(\frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \nabla \mathbf{u} \right) = -\nabla p + nV \Delta \rho g \mathbf{k} + \mu \nabla^2 \mathbf{u}. \quad (2)$$

ここで、 $\mathbf{u}$ は流速、 ρ_0 は培地の比重、 p は静水圧、 n は局所的な細胞密度、 $\Delta \rho$ は細胞

の比重の超過分、 g は重力加速度、 $\mathbf{k}$ は z 方向の単位ベクトル、 μ は懸濁液の動粘性係数をそれぞれ示している。また、細胞運動は保存則に則って次の様に書かれる。

$$\frac{\partial \mathbf{n}}{\partial t} = -\nabla \cdot \mathbf{j}, \quad (3)$$

$$\mathbf{j} = n\mathbf{u} + m_c \bar{\mathbf{p}} - \mathbf{D} \cdot \nabla \mathbf{n}. \quad (4)$$

ここで、 $\mathbf{j}$ は流速、 v_c は微小領域における細胞の平均遊泳速度、 $\bar{\mathbf{p}}$ は平均遊泳の方向ベクトル ($0 \leq \bar{\mathbf{p}} \leq 1$)、 $\mathbf{D}$ は拡散係数のテンソルをそれぞれ示している。これらの式から、一般的な(例えば Rayleigh-Benard 対流のように)対流の安定性の問題と同様にして、無次元量である Rayleigh 数を次の様に定義できる。

$$R = \frac{N_s V g \Delta \rho d^3}{\mu D_v}. \quad (5)$$

ここで、 N_s は表面付近に集まった細胞密度に比例する値、 D_v は垂直方向の拡散係数である。熱対流からの類推より、特性波長は Rayleigh 数 R にともなって増加するものと考えられる。

ここで、式(5)を用いてミドリムシの実験結果を定性的に評価する。ただし、式(5)は局在化しない一般的な生物対流に対して導かれた Rayleigh 数であるため、ミドリムシの系と対応しない点があることに注意して比較を行う。実験観察では、容器が浅い領域では深さ d に伴って特性波長も増加した。これは d に伴って R が増加したためと考えられる。一方で、深い領域では容器の深さに依存せず特性波長は一定になったことから、系の振る舞いが増変したものと考えられる。次に平均細胞密度の増加は N_s を増加させることを意味し、Rayleigh 数の観点からは特性波長の増加が予想されるが、実際は一定値を取った。これは上述したとおり、局在パターンの特徴であると考えられる。すなわち、局所的な細胞密度が平均細胞密度に依存しないことに起因していると考えられる。ただし、平均細胞密度が局在化により実現される局所細胞密度を上回ると、特性波長も平均細胞密度に依存するものと予想される。最後に光強度の効果を考察する。光強度は主に平均遊泳の方向 $\bar{\mathbf{p}}$ を増加させる働きがあると考えられる。 $\bar{\mathbf{p}}$ は Rayleigh 数 R に陽には入っていないが、 D_v が $\bar{\mathbf{p}}$ に依存するために光強度が高い時、 R は低くなると考えられる。光強度の増加にともない特性波長が低下したのはこのためと考えられる。また、光強度が 10000 lx を超えたところで特性波長がそれ以上減少しなくなったのは $\bar{\mathbf{p}}$ が最大値である 1 に達したからと考えられる。すなわち、ほとんどすべての細胞が上向きの遊泳をしている状態になったものと考えられる。

5. まとめ

光応答性微生物であるミドリムシを用いた生物対流パターンの環境依存性を実験的に調べ、理論式との比較を行った。ミドリムシの対流パターンは局在化するという特徴がある。この特徴は、対流パターンの特性波長が平均細胞密度に依存しないという

形で現れた。一方で、容器の深さや光強度依存性は一般的な生物対流と同様の傾向が認められた。細胞の局在化効果を考慮した数理モデルの構築は未解決問題であるが、現状の数理モデルでも、細胞密度依存性を除いて定性的に現象を説明できていることから、基本的な対流形成機構は一般的なものと同様であると考えられる。

謝辞

本研究で用いているミドリムシの培養および取り扱いについては広島大学の泉 俊輔 教授にご指導いただきました。また、ミドリムシの株も泉教授から分けて頂いたものを使用しています。また、本研究の元となっている対流パターンの機構に関する考察は広島大学の栗津 暁紀 准教授との議論に基づいています。培養液の比重コントロールの実験は、研究集会「生物流体力学における流れ構造の解析と役割」において京都大学の井上 敬 教授から試薬をご紹介いただいたことで実現できました。その他、本研究を支えてくださった多くの方々に、この場をお借りして御礼申し上げます。

参考文献

- [1] N. A. Hill and T. J. Pedley, *Fluid Dynamics Research* 37, 1-20 (2005).
- [2] N. J. Suematsu et al., *J. Phys. Soc. Jpn.* 80, 064003 (2011).
- [3] M. A. Bees and N. A. Hill, *J. Exp. Biol.* 200, 1515-1526 (1997).
- [4] R. V. Vincent and N. A. Hill, *J. Fluid Mech.* 327, 343-371 (1996).