

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570093

研究課題名(和文)単細胞生物におけるアロメトリー法則の検証

研究課題名(英文)Verification of the allometry theory for unicellular organisms

研究代表者

最上 善広(MOGAMI, YOSHIHIRO)

お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・教授

研究者番号：30166318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：運動活性と酸素消費の同時測定を応用し、単細胞生物繊毛虫での「基礎代謝」を特定し、単細胞生物での、アロメトリー理論の生物界全般への普遍性の検証を行った。ゾウリムシに対して、コンピューター・トモグラフィーによる細胞重量の推定方法を適用することによって、細胞咽頭による餌の取り込みに依存するアイソメトリー関係と、細胞表面からの酸素の流入に依存するアロメトリー関係のふたつの基礎理論が導入された。測定精度を向上し、より精密な理論予測の検証を行うことで、アロメトリー理論の普遍性が検証される方向性が確立された。

研究成果の概要(英文)：Scaling analysis was carried out on the unicellular organism, Paramecium. Confocal microscopy and computer assisted tomography revealed that the linearity between tomographic and prolate volume suggests the isometric scaling of the cytopharynx volume to the cell volume. Prolate assumption of the cell body, which has the short axis allometrically scaled to the long suggests the allometric relation of surface area to the cell volume. Allometric scaling of energy expenditure was tested based on the result of geometrical scaling using the SMR measured by the extrapolation method established by the previous study. The result presented by this research may pave the way to understand the general rule of allometry throughout the animal kingdom.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 動物生理・行動

キーワード：単細胞生物 遊泳 基礎代謝 アロメトリー 3/4乗則 酸素消費 トモグラフィー

1. 研究開始当初の背景

サイズの大きな生物種と小さな生物種を比較すると、その個体サイズと生理現象の関係はアロメトリックな関数で表現される。もっとも基本的な指標として基礎代謝速度があり、哺乳類だけにとどまらず多くの生物種をまたいで「基礎代謝速度は体重の $3/4$ 乗に比例する」ことが知られている (Schmidt-Nielsen, 1990, *Animal Physiology*, Cambridge University Press.)。しかし、 **$3/4$ 乗法則**と呼ばれるこの「経験則」の理論的背景に関する研究はなかなか進展しなかった。

West *et al.* (1997, *Science*, **276**, 122-6) は、 $3/4$ 乗法則に対し、フラクタル理論を応用することによって説明が可能であるとしている。それをもとに、 $3/4$ 乗法則は全生物普遍の共通原理であり、エネルギー代謝だけではなく遺伝子の突然変異や進化にまで適用できるという考え方が提唱されている。今や、 $3/4$ 乗法則は生物のボディープランに関わるだけでなく、生命そのもののデザインやその起源と進化にまで及ぶ統一的な法則であると見なされるようになってきている。

アロメトリーの概念は当初、恒温動物における多くの測定に基づいて提唱され、他の生物での測定が進むにつれ、その適用範囲が拡大されてきた。現在では、アロメトリーの法則は多細胞生物の仕切りを超え、単細胞生物にも当てはまるというのが通説となっている。

理論の先鋭化に比べ実験事実の集積は遥かに遅れており、アロメトリー理論が根拠とするデータは数十年間改訂されていない。特に、単細胞を扱ったものは少なく、集約的な例として良く引用されるデータ (Hemmingsen, 1960, *Rep. Steno Meml Hosp.* **9**, 1-110) は半世紀近くもの間改訂されていない。しかもこの論文に記載されている測定には多細胞動物の卵細胞での測定が含まれており、厳密な意味での単細胞生物のデータとは言えない。また、原動物での測定であっても、それらがどのような活動 (運動) 状態であったかは不明であり、「基礎」代謝の測定条件を満たしているとは言えない。

Hemmingsen (1960) も含めて多くの場合、単細胞生物における代謝の定義が曖昧なままとなっている。本来、アロメトリー理論は、動物の基礎代謝量に対して当てはめられるものであるが、単細胞生物においてはそのことに十分な注意が払われてこなかった。粘性効果が支配的となる単細胞生物の運動では、運動 (移動) によって消費されるエネルギー

が代謝量の大きな割合を占めるが、これまでの測定では、運動依存的な代謝を分離することができなかった。

2. 研究の目的

本研究の端緒として、単細胞生物繊毛虫において厳密な定義の基に基礎代謝速度の測定を行うとともに、精密な細胞サイズの計測を行う。それらに基づき、繊毛虫におけるアロメトリー法則、特に $3/4$ 乗法則の妥当性を検討する。さらに、同様の測定を他の原生生物にも応用し、単細胞生物でのアロメトリー理論の普遍性の検証を行う。これまでの研究を通して開発してきた測定システムを応用することで、単細胞生物の運動活性とそれに伴う酸素消費速度とを同時に測定する。

従来の研究では、運動状態を全く無視して測定した結果をもって、単細胞生物の代謝活性を評価してきた。しかし粘性が支配する単細胞生物の運動では、そのような測定に基づいたデータでは、単細胞生物でのアロメトリーを論ずるには不十分である。本研究に先行して、単細胞生物の運動速度と酸素消費速度とを同時に測定することにより、運動に依存する代謝を分離し、「基礎代謝」を明確に同定することを可能としている (Katsu-Kimura *et al.*, 2009, *J. Exp. Biol.*, **212**, 1819-1824)。そうして得られたデータこそが、本来のアロメトリー理論の検証に適用しうるものである。本研究で導入する実験システムを用いることで、単細胞生物のアロメトリー研究が、本質的にスタートすることになる。

3. 研究の方法

(1) 遊泳行動と酸素消費の同時測定のための測定装置の作成

酸素センサーの先端に生物試料を封入した小容量のチャンバーを装着し、その内部での溶存酸素濃度を測定すると同時に、チャンバー内部を側面から扁平レーザー光で照射し、試料の暗視野照明像をビデオ記録 (オプティカル・スライス法, Kato *et al.*, 2003, *Zool. Sci.*, **20**, 1373-1380) し、それをもとに遊泳速度を計測する。このような実験要求に適合した実験容器を作成する。

(2) 細胞サイズの精密測定のための画像処理計測方法の導入

単細胞生物のサイズを測定する際、これまでは細胞の外部形態を幾何学モデル (回転楕円体等) に近似し、その体積をもって、サイズの代表値としてきた。本研究では供焦点レーザー顕微鏡によって得られる光学切片を

もとに、細胞体の3次元再構築を行うことで、より具体的な体積の計測を行うための方法を導入する。

(3) 実測値に基づいたアロメトリー理論の検証

アロメトリー計測に使用できるサイズの異なる単細胞生物試料を収集し、酸素消費に基づく代謝活性とサイズの測定を行い、アロメトリー理論の検証を行う。

4. 研究成果

(1) 遊泳行動と酸素消費の同時測定のための測定装置の作成

小容量のチャンバーを用い、生物試料による酸素消費速度を測定すると同時に、チャンバー内部での遊泳行動を記録するために、酸素センサーを装備したオプティカル・スライス法記録のできる装置の検討を、既存の装置をもとに行った。

遊泳行動を妨げるような、攪拌をせずに酸素濃度を測定するためには、試料チャンバーの体積をなるべく小さくする必要がある。そのために、測定自体によって内部の酸素濃度が変化してしまう電気化学式センサーに代えて、前年度購入の蛍光式酸素センサーを搭載した小型測定容器の検討を行った。従来の装置では、700 μl 程度のチャンバー容量を実現していたが、装置の操作性が悪く、作業が複雑になりがちであった。まずは、既存のセンサー装置の仕様を改めてチェックし、次の装置開発へ反映させる作業を行った。その結果、測定の精度を高めるためにはチャンバー容量を1/4以下にする必要があり、そのためにはセンサーチップを工夫する必要があることがわかった。PreSens社製のFibox3-MOを用いたシステムでは、蛍光センサーチップを容器内に封入したままで非破壊的に酸素濃度の計測が可能となる。このセンサーシステムを中核として、オプティカル・スライス法が可能なチャンバーを設計した(図1上)。

工作技術を有する専門業者の協力を得て、蛍光センサーチップを容器内に封入したオプティカル・スライス法が可能なチャンバーを作成した。その際に、容器容量を減少するとともに、試料の交換が容易となるように定容量バルブを装着することとした。チャンバーを試作しながら、適合素材を模索し、工作性の優れた、ポリスルフォンを使用することで、光学性能を向上させ、センサーによる酸素消費速度と暗視野ビデオ記録による遊泳速度の同時測定を可能とするシステムを導入した(図1下。右側から扁平レーザー光を

照射し、容器下側からマクロ撮影を行う)。

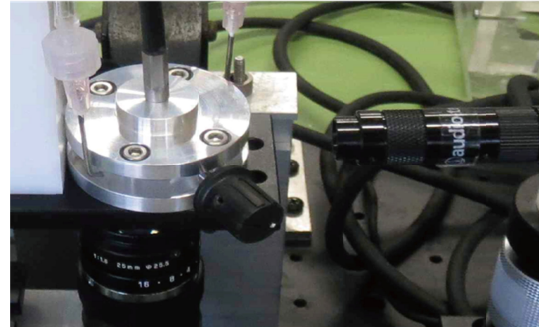
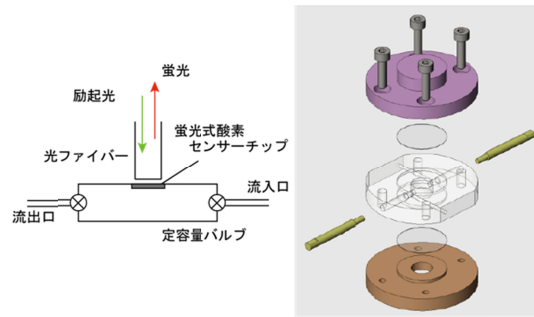


図1 測定装置の概略

(2) 細胞サイズの精密測定のための画像処理計測方法の導入

単細胞生物でのアロメトリー理論の再検討を行うために、細胞重量を決定する基礎となる細胞体積の測定方法の改良を行った。従来からの、回転楕円体近似に加えて、共焦点レーザー顕微鏡を用いた、コンピューター・トモグラフィーによる体積の算出法を取り入れ、両者の対比を行った。

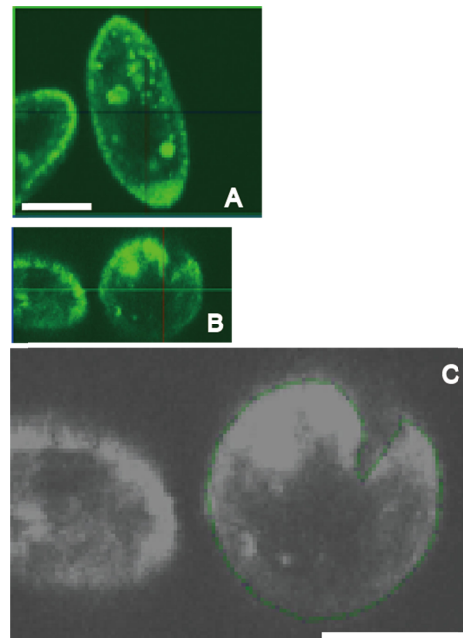


図2 ゾウリムシの共焦点顕微鏡画像による体積測定。バーは50 μm 。

図2に、ゾウリムシへの応用例を示す。自家蛍光をもとに、焦点位置を変えながら撮影した共焦点画像(図2A)を使って、細胞の長軸に垂直な断面の画像スタックを作成する(図2B)。それぞれの画像について、マニュアル操作で外周を閉曲線で囲い、内部の面積を求める。各画像間の距離との積を取り、その断面を含むスライス部分の体積とする(図2C)。全てのスライスの体積を合計し、全体積とした。これによって、従来の回転楕円体近似では難しかった、細胞咽頭部を排除した実体積の測定が可能となった。

(3) 実測値に基づいたアロメトリー理論の検証

回転楕円体近似と、コンピューター・トモグラフィーによる体積、それぞれの測定方法を精査する目的で、サイズの異なる数種のゾウリムシ(*P. caudatum* syngen 1, 3, 4, 及び *P. aurelia* syngen 8)を用いて実際の測定を行った。図3に、回転楕円体体積(V_p)と、トモグラフィー体積(V_t)の関係を示す。図3の挿入図に示すように、両データ対数の対数プロットは直線となり、その傾きは1となった。このことは、両者の間に比例関係が存在することを示している。ふたつの測定値の差分は、細胞咽頭の体積であることから、細胞体の体積と、細胞咽頭の体積はアロメトリーの関係(アロメトリー式における指数が1)にあることが示唆された。さらに、この結果は、回転楕円体近似による体積測定の有用性を示唆している。

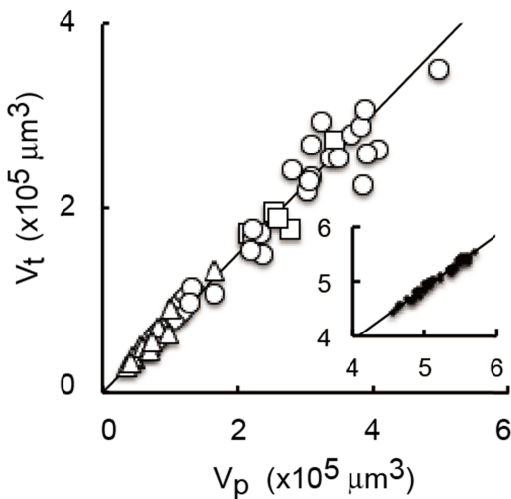


図3 回転楕円体体積(V_p)と、トモグラフィー体積(V_t)

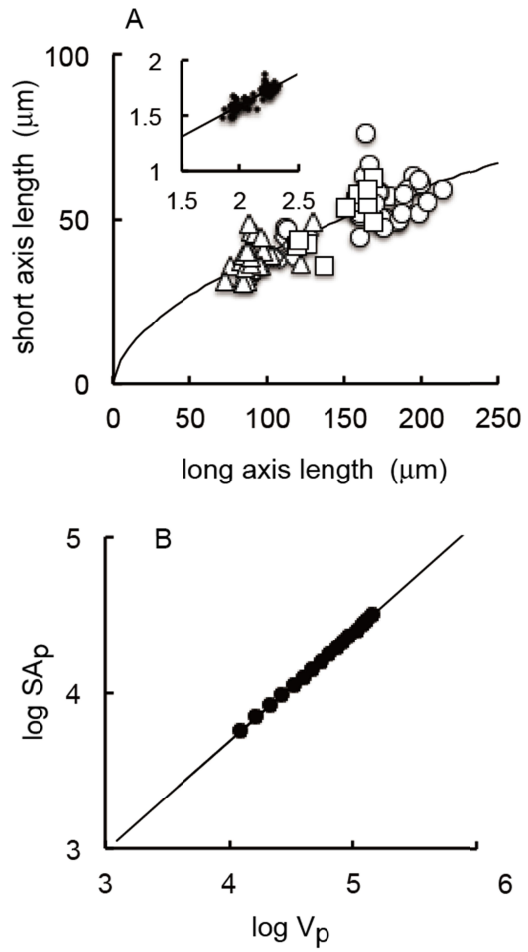


図4 A: 細胞体の長軸長と短軸長とのアロメトリー。B: 回転楕円体体積(V_p)と表面積(SA_p)との関係。

さらに、細胞体の長軸長と短軸長との間にアロメトリックな関係があることがわかった。図4Aの挿入図に示した両データ対数の対数プロットは直線となり、その傾きは0.56となり、短軸長は長軸長の0.56乗に比例することを示している。ここで、回転楕円体近似をした場合の体積(V_p)と、幾何学的に求めた表面積(SA_p)との関係を調べたところ、両者の対数プロットは直線となり、その方向きは0.71となった(図4B)。このことは、細胞表面積と体積との間にアロメトリーな関係(指数は0.71)があることが示唆された。これらの結果から、単細胞生物(ゾウリムシ)の代謝活性と細胞体積(=重量)との間に、いくつかの関連性(法則性)が指摘された。代謝速度が、細胞咽頭からの餌の取り込みに支配されるとしたら、代謝速度は細胞重量に比例することが予想される。一方で、代謝速度が細胞表面からの酸素の流入によって規定されているとしたら、代謝速度は表面積に比例

し、従って、細胞体積 (= 重量) の 0.71 乗に比例することが想定される。後者の想定は、単細胞生物における「surface rule」であり、従来から提唱されてきた 3/4 乗則の根拠となり得る可能性がある。

これらの理論的予測に対し、既存のシステムを用いた、酸素消費のデータと新たな体積測定法のデータを用いて検証を試みた。オプティカル・スライス法により得られたビデオ映像よりゾウリムシの運動速度を測定するとともに、酸素消費速度を測定し、データの外挿により非遊泳状態での代謝速度を求めた。この基礎代謝速度と、新たに開発した体積測定法による細胞重量との関係 (両対数プロット) を図 5 に示す。図 5 の a は、代謝速度が、細胞咽頭からの餌の取り込みに支配されると仮定した場合のアイソメトリー関係 (アロメトリー指数 = 1) を示し、b は、本研究によって新たに想定された、単細胞生物における「surface rule」によるアロメトリー関係 (アロメトリー指数 = 0.71) を示す。データにばらつきが大きかったために、上記のふたつの予測はいずれも否定されることはなかった。両理論を弁別できなかったのは、測定装置の改良が不十分であったことが主な原因であり、さらなる装置の改良によって、理論予測の検証の精度を上げることが可能である。

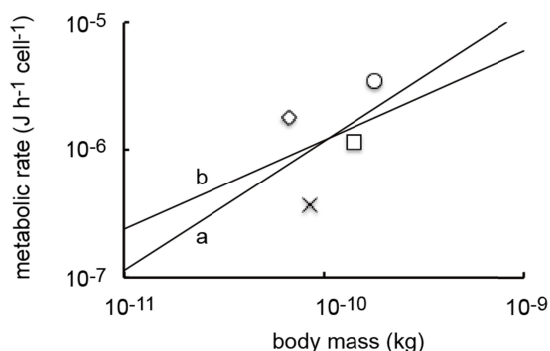


図 5 基礎代謝速度と、細胞重量との関係 (両対数プロット)。

従来から、多細胞生物のボディープランを決める統一的法則と考えられているアロメトリー理論が単細胞生物でも成立すると考えられてきた。しかし、先行する理論研究に比べて、その実証につながる測定データに対しては、厳密な批判は行われてこなかった。特に、アロメトリー理論の基礎となる、サイズと代謝の関係にしても、多細胞生物には「基礎代謝」が適用されるのに対し、単細胞

生物ではその定義が曖昧なままであった。本研究で開発された計測手法により、単細胞生物での、代謝速度とサイズとの関係を明らかにし、アロメトリー理論の生物界全般への普遍性の検証への方向性が確立された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

Azusa Kage, Chiharu Hosoya, Shoji A. Baba, Yoshihiro Mogami Drastic reorganization of the bioconvection pattern of *Chlamydomonas*: quantitative analysis of the pattern transition response. *The Journal of Experimental Biology*, 216, 査読有, 2013, 4557-4566. DOI: 10.1242/jeb.092791

赤池環, 鹿毛あずさ, 最上善広, 河村哲也 生物対流パターン形成の数値シミュレーション *ながれ*, 32, 査読有, 2013, 113-116.

Kage A., Asato E., Chiba Y., Wada Y., Katsu-Kimura Y., Kubota A., Sawai S., Niihori M., Baba S.A. and Mogami Y. Gravity-Dependent Changes in Bioconvection of *Tetrahymena* and *Chlamydomonas* during Parabolic Flight: Increases in Wave Number Induced by Pre- and Post-Parabola Hypergravity. *Zool. Sci.*, 査読有, 28, 2011, 206-214. DOI:10.2108/zsj.28.206

[学会発表] (計 7 件)

Azusa Kage, Yoshihiro Mogami Spontaneous pattern transition in bioconvection of *Chlamydomonas reinhardtii*. International workshop on Spatiotemporal pattern formation in biological and active matters. March 2, 2014, Tokyo, Japan. 鹿毛あずさ, 最上善広 クラミドモナスの運動変異体における生物対流パターンの挙動 第 10 回クラミドモナス研究会 2013 年 11 月 30 日 岡崎

Azusa Kage, Yoshihiro Mogami Bioconvection in waveform mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* 日本生物物理学会 第 51 回年会 2013 年 10 月 30 日 京都

大瀧美珠枝, 和田祐子, 鹿毛あずさ, 細谷千春, 辻沙奈絵, 近藤るみ, 馬場昭次, 最上善広 *Drosophila melanogaster* の飛翔

行動における重力応答の解析に向けて
日本宇宙生物科学会第25回大会 2011年
9月30日 横浜

鹿毛あずさ, 最上善広 クラミドモナス
の鞭毛波形変異体を用いた生物対流の挙
動 日本動物学会 第84回大会 2013年9
月28日 岡山

大瀧美珠枝, 酒井真美, 櫻田文, 郷原優花,
細谷千春, 鹿毛あずさ, 近藤るみ, 馬場昭
次, 最上善広 *Drosophila melanogaster* の
飛翔行動における重力応答の解析 第28
回 宇宙利用シンポジウム 2012年1月
24日 東京

鹿毛あずさ, 細谷千春, 馬場昭次, 最上善
広 クラミドモナスの生物対流における
空間パターンサイズの激変 日本動物学
会 第82回大会 2011年9月21日 旭川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

最上 善広 (MOGAMI, Yoshihiro)

お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科
学研究科・教授

研究者番号：30166318

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし