

細胞の自己組織化過程を光子でとらえる

——細胞性粘菌の生物フォトン光子統計特性分析——

小林 正 樹

自己複製（細胞分裂，増殖），形態形成（分化），自己修復は，生命現象を特徴づけるキーワードであり，無生物（物質）世界と「生き物」の世界を大きく隔てている。形態形成は，生体を構成するミクロな要素である細胞が，相互に協同してマクロな構造や機能分化パターンを形成することであり，要素間相互作用による自発的な時空間秩序形成という意味で「自己組織化」現象として特徴づけることができる¹⁾。一般に自己組織化とは，要素間における非線形作用を起源とし，系（システム）の構成要素・要素群での競合・協調による巨視的秩序形成を意味するが，これは熱平衡状態から遠く離れた非平衡開放系において，系外からのエネルギーや物質（情報）の流れの中で発生し時間発展する，動的秩序状態であり，プリゴジンはこれを散逸構造²⁾と名付け体系化した。現実の世界が熱平衡状態の「死んだ」世界ではなく，地球というレベルでの開放系上に存立する非平衡なダイナミックな世界であるように，自己組織化は生命現象に限らず非生物系においても広くみられる現象である。

さて，生物における自己組織化を考えたとき，それは構成要素である部品間の相互作用のみによって成立するのか，あるいはそれらを総合する「場」がはじめに用意されていて，その内部要素が組織化されるのか，DNAの遺伝情報が自己組織化とどのように関わりコードされているのか，また生体を構成する要素は階層構造を有するが，階層システムにおいて自己組織化がどのように発展するのか，など自己組織化現象のシステム論的，物理的メカニズムは大変興味深い。その解明には，分子生物学に代表される要素還元手法による分析は必須であるが，これと協奏的，相補的

にシステム論的視点での生命理解の研究が必要であると考えられる。

本稿ではこのような問題意識を立脚点とし，生物の自己組織化過程のダイナミズムの極微弱発光による計測・分析について解説する。単純な分化型と特異な生活史を有する細胞性粘菌 (*Dictyostelium discoideum*) をモデルに，独立した単細胞集団が多細胞体制を構築する発生過程を対象として，分化シグナルに関連したエネルギー代謝変化を反映する生物フォトン発光の光子統計分析について述べ，細胞集団レベルでの自己組織化現象の新しい解析・情報抽出法の研究について紹介する。

1. 細胞性粘菌の生活環と極微弱発光による生体情報計測

細胞分化は，多細胞生物の発生過程において，特定の細胞パターンの形成を担う，細胞の機能的，構造的 specialization であるが，一般に分化と細胞の増殖は連関して進行する。ところが細胞性粘菌の場合，増殖期と分化期が時間的に完全に区別されており，周囲に栄養源があるときは直径 10 μm ほどのアメーバ状の単細胞で存在し，二分裂法で増殖を繰り返すが（増殖期），飢餓状態になると分化期へ移行し，それまで単細胞として独立していた細胞が集合し多細胞体制を確立する。図1はその生活環を模式的に表したものであるが，飢餓ストレスにより増殖期から分化期へスイッチングされた細胞は，集合して半球体の集合塊 (mound) を形成する。その後移動体 (slug) を経て，一連の形態形成運動の後，胞子とそれを支える柄の2種類の細胞型からなる子実体を形成する。このように，細胞分化が増殖期と明確に区別されて進行すること，きわめて単純な分化系を有していること，また実験室での培養やそれらの制御も容易なことから，細胞分化や形態形成，細胞間コミュニケーション，

山形県テクノポリス財団 山形県地域結集型共同研究事業（〒990-2473 山形市松栄 2-2-1 山形県高度技術研究開発センター内）
E-mail: kob@ckk.ymgt-techno.or.jp

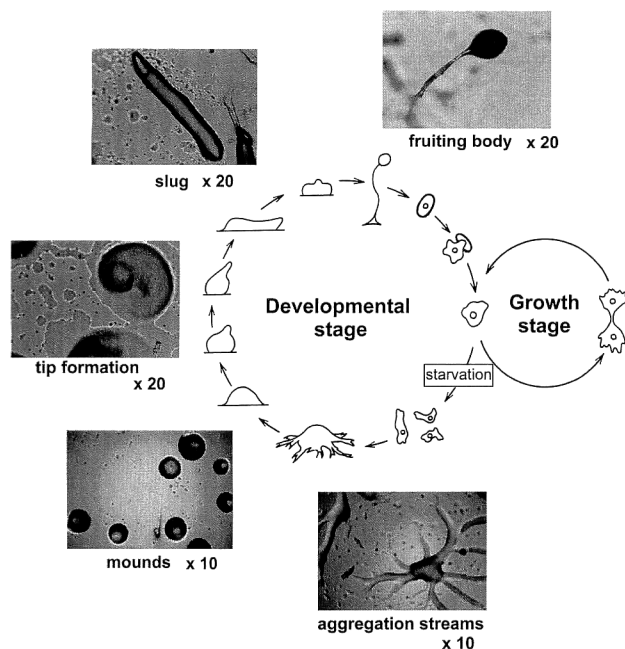


図1 細胞性粘菌の生活環³⁾の模式図, およびそれぞれのステージの顕微鏡写真. 図中の数字は倍率.

シグナル伝達に関するすぐれた実験材料として利用されている^{3,4)}.

分化期の最初に細胞は流れ (aggregation streams) を形成しながら集合するが, これは 3', 5'-サイクリック AMP (cAMP) を走化性物質とした走化性によるものであり, 1つの集合中心は直径 10 mm ほどの領域に影響を及ぼし, 約 10^5 個ほどの細胞からなる集合塊を形成する. 移動体には前後軸極性が存在し, 前部約 1/4 が将来子実体の柄になる予定柄細胞, 後部が孢子となる予定孢子細胞に分化している. 移動体はやがて子実体となり, その後環境条件が至適になると孢子は発芽し, 単細胞アメーバとして再び増殖を繰り返すことになる.

さて, 生物はその生命活動に伴って「生物フォトン⁵⁻⁹⁾」と称される自発的発光を示す. これは細胞内におけるエネルギー代謝などの酸化的代謝反応過程で生じる励起分子種に由来する化学発光 (冷光) であり, 発光強度約 10^{-16} W/cm² 以下のヒトの目では検知できないレベルの極微弱発光である. 細胞性粘菌においても生物フォトン発光を観測することができ, 細胞分化の各ステージで特徴的な変化を示すことがわかってきた¹⁰⁻¹²⁾. 生物フォトン, 一般に生物発光と称されるホタルなどのルシフェリン-ルシフェラーゼ反応や発光タンパク質などによる特定の発光代謝反応メカニズムをもつ発光とは異なり, 主にミトコンドリアにおけるエネルギー代謝過程で微量に産生する活性酸素種^{13,14)}や, 環境などの外因性または内因性ストレスに対する代謝

応答として生じる酸化的ストレス状態^{9,15-17)}が関与した発光である. また活性酸素種の生体シグナルとしての役割からも注目されており, 生物フォトン計測は生理的狀態における非侵襲情報計測という意味で, 他の手法にはないすぐれた特長を有する. しかし単一細胞レベルでの発光検出は困難であり, 実際には $10^5 \sim 10^6$ 個程度以上の細胞集団を観測対象とせざるをえない. また, 生体構成物質由来の発光であるため, 発光メカニズムは多岐にわたり複雑である. このような極微弱発光現象において発光の協同性を抽出・表現する手法として, われわれは生物フォトン発光の光子統計・光子相関分析の研究を行ってきた.

以下に, 極微弱発光の超高感度計測による光子統計分析技術について解説した上で, 10^6 個程度の独立した粘菌細胞が, 飢餓ストレスシグナルを受けて集合を始める初期段階において, 相互独立なランダム状態から局所的協同性を形成する過程を, 光子統計特性の動的変化としてとらえようと試みた結果について述べる¹²⁾.

2. 極微弱発光の光子統計分析

半古典論を用いると, 光電子増倍管 (PMT) 光電面においてある時間 t にて微小時間間隔 ΔT の間に 1 個の光電子が出力される確率は, 量子効率を η , 時間 t における光強度を $I(t)$ として $\eta \langle I(t) \rangle \Delta T$ で与えられる. これは光電子パルスの平均計数値が光強度に比例するという光電子計数法 (通常は略して光子計数法と呼ぶ) の原理を表す ($\langle \dots \rangle$ は集合平均). 時間間隔 T 観測時間の間に光電子数 n 個を計数する確率は

$$P(n) = \int_0^\infty P(W) \left[\frac{W^n e^{-W}}{n!} \right] dW \quad (1)$$

で与えられ, 光子統計分布 (正確には光電子計数分布, 光電子統計分布) 関数を表す. ここで W は $W = \eta \int_t I(t) dt$ で定義される積分強度であるが, 式 (1) はその確率密度 $P(W)$ のポアソン変換の形になっているという特徴をもつ. また, 強度相関関数を規格化して, 光の 2 次のコヒーレンス度を

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (2)$$

と定義するが, これが光子相関 (正確には光電子相関) 関数を与える式である. ある時刻 t_1 で光電子パルスを検出しさらに t_2 で検出する条件付き確率を $\tau = t_2 - t_1$ を用いて $P_c(\tau)$ とすると,

$$P_c(\tau) = \eta \langle I(t) \rangle g^{(2)}(\tau) \quad (3)$$

の関係にあることから, 連続したパルス時間間隔データから光子相関関数を求めることができる. また光子相関 (電

場の2次の相関)は、計数値の2次のファクトリアルモーメントに対する2階微分の関係で光子統計分布特性と結びられている。光子統計分布特性に対する指標として、ポアソン分布からの偏差を光電子計数値の平均値と分散値の比であるファノファクター (Fano factor)

$$F_n(T) = \langle \Delta n^2 \rangle / \langle n \rangle \quad (4)$$

を用いて定量することができる¹⁸⁾。

光の状態が古典的なコヒーレント状態にあるとき、式(1), (2), (4)はそれぞれ

$$P(n) = \frac{\langle n \rangle^n e^{-\langle n \rangle}}{n!}, \quad g^{(2)}(\tau) = 1, \quad F_n(T) = 1$$

となり、すなわち光電子事象時系列は、古典的ショット雑音に対応して無相関、ランダムな状態として観測される。一方、インコヒーレントなカオス光(熱放射)の場合は、そのコヒーレンス時間に対応した光子バンチング効果が現れ、 $g^{(2)}(\tau) > 1$ のように正の相関および光子統計分布でのスーパーポアソン特性 ($F_n(T) > 1$)を示すことになるが、通常PMTによる計測ではコヒーレンス時間 τ_c が観測時間 T に対し $\tau_c \ll T$ となるため、熱的光源に対してはそのバンチング効果をとらえられず、結果としてポアソン分布として観測される。しかし、発光源が中心極限定理が成立するような圧倒的多数でない場合や、励起過程がここで対象とするような化学反応系のように、系内あるいは系外からのフィードバックや反応系のマルコフ性が存在する場合、観測される光子放出時間列は光子相関特性を伴って観測されることになる。

極微弱光領域で光子統計分析を行うためには、PMTの暗電流やアフターパルスに起因する相関特性を十分把握した上で、それを考慮した入射信号光子の計測、分析を行う必要がある。また発光が微弱であるために計測時間の長時間化が避けられないことから、計測系の高安定化が要求されることはもちろんのこと、対象とする観測時間内の生物フォトン発光強度の経時変化に対する補正が必要となる^{8,12,19)}。図2に検出系の安定性を追求してPMTをパルス管冷凍機をもつクライオチャンバー内に装着して用いた、生物フォトン光子統計分析システムのブロック図を示すが、PMTから出力される光電子パルスの各隣接パルス時間間隔を時間分解能12.5 nsで連続記録して、測定後に演算処理により光子統計・光子相関分布を求めるといった解析手法^{19,20)}、装置構成をとっている。PMT暗電流には、宇宙線や環境放射線が入射する際の管面でのチェレンコフ光やシンチレーション光の発生²¹⁾、あるいはPMT本体でのダイノード間の微小放電に由来すると考えられる相関性暗電流成分があるため^{22,23)}、あらかじめ計測した暗電流パルス

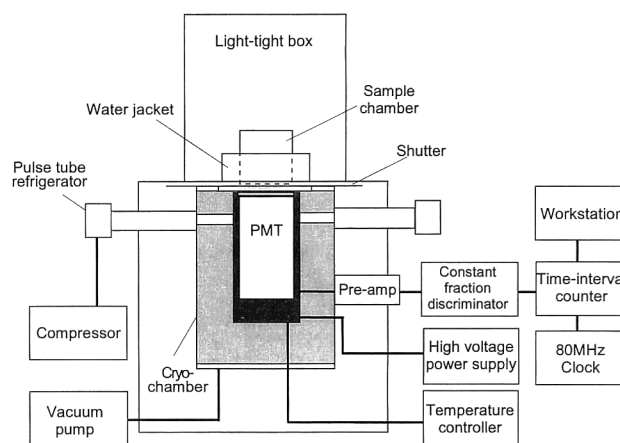


図2 生物フォトン光子統計分析システムのブロック図。

相関分布を統計的に差し引き処理し、光源の光子統計分布特性および光子相関分布特性を導出する^{12,19)}。また非定常過程でのファノファクターの導出は、発光強度時間関数を推定し、暗電流の分散値を逐次実測データの分散値から差し引くことによって行う^{12,19)}。

この手法を生物発光系に適用し、発光細菌増殖期での生物発光の光子統計分析を行った実験では、増殖初期においてスーパーポアソン分布特性を示す結果が得られており、発光細菌の増殖に伴うルシフェラーゼの誘導的発現によるフィードバック作用に起因した、発光過程のクラスターリング特性を反映しているものと推察している¹⁹⁾。

3. 細胞性粘菌の発生過程における生物フォトン光子統計特性

あらかじめ大腸菌との二員培養によって増殖した粘菌細胞を、遠心操作によりバクテリアと分離、洗浄することによって飢餓処理を行った後、約 $10^6 \sim 10^7$ 個の細胞を集め無栄養寒天培地上にまき、その直後から生物フォトン発光計測を行った。

図3は発光強度経時変化の典型的な一例であるが、測定開始後15~30分ごろにおいて、生物フォトン発光の一過的增加がみられる。その後発光強度は、約5時間にわたって低い水準で推移するが、約10時間目ごろを最大とするような発光ピークが観測された。約5時間目ごろ発光強度が上昇に転じるころから、aggregation streamsが顕在化し、10時間ごろ発光強度がピークに達するころに mounds が形成されている¹²⁾。飢餓処理後に測定用培地内にラジカル消去剤を添加すると、飢餓処理直後の発光ピークが濃度依存的に抑制されることや、発生異常がみられるなどの実験データが得られており、飢餓処理直後の発光の増強は、飢餓ストレスによって誘導されたミトコンドリア呼吸鎖にお

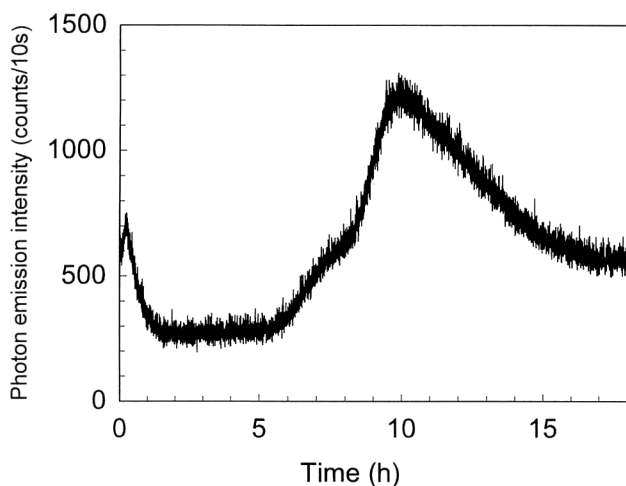


図3 細胞性粘菌 (*Dictyostelium discoideum* NC-4) の形態形成過程における生物光子発光強度経時変化の計測例。

けるエネルギー代謝の擾乱が活性酸素種の産生をもたらした結果であると考えられる。またこれは発生を開始するための遺伝子発現を制御するストレスシグナルであるとも推察され¹⁰⁾、極微弱発光強度の経時変化は、分化過程の各ステージでの遺伝子発現、機能発現に伴うエネルギー代謝活性の変化を反映するものと判断される。

さて、飢餓処理直後から最初の発光ピークが現れ、その後発光強度が再び増加するまでの約5時間の間、発光強度は比較的安定し大きな経時変化を伴わないが(図4(a))、ここでの光子統計特性をファノファクターの観測時間特性の経時変化として3次元表示してみると(図4(b))、最初の発光ピークに相当する時間領域では光子統計分布はポアソン特性を示し、その後スーパーポアソン分布特性に変化することがわかった。図4(c)は解析方法の妥当性を検討するために、(a)と同一の発光強度経時変化を示すよう制御した発光ダイオードのファノファクター特性を同様の手法で求めた結果であるが、全計測時間にわたってポアソン分布特性が得られている。飢餓処理直後の発光増強が前述のように飢餓ストレス応答として現れる細胞呼吸代謝系の変化によるものであるとすると、光子放出事象は個別細胞間で独立でありランダムであるといえる。その後光子統計特性が非ポアソン特性を示すことは、aggregation streamsの形成に先行した、局所的な細胞間の協同的振る舞いを示唆するものである。具体的な発光反応過程および経路は明らかでないが、光子放出のクラスタリング特性を反映するものと推察している¹²⁾。今後、それ以降のステージでの光子統計特性と形態形成の関係、分化シグナルと発光メカニズムの関係など詳細な検討が必要であるが、光子統計特性が、発光強度変化だけでは得ることのできない生理的情報を提供

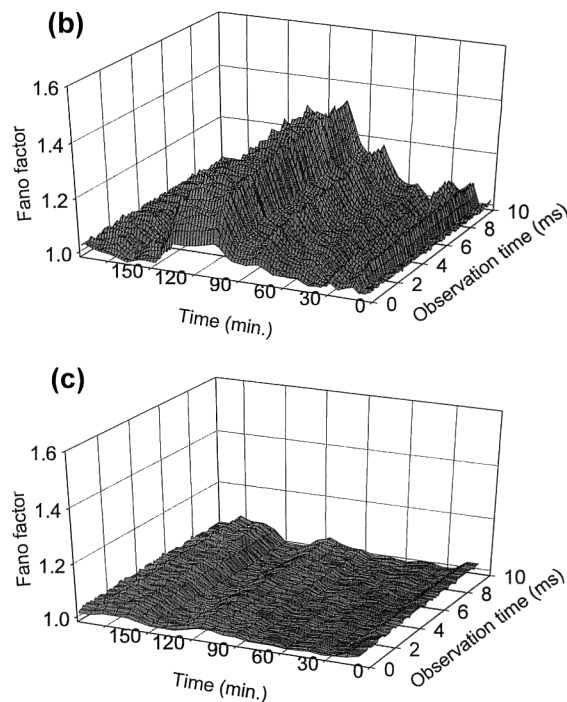
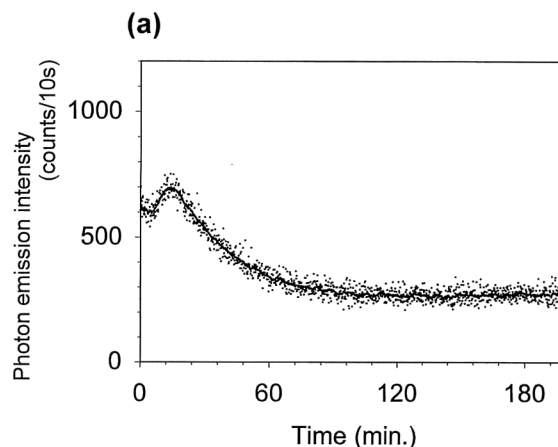


図4 (a) 細胞性粘菌 (*Dictyostelium discoideum* NC-4) 飢餓処理後の生物光子発光経時変化、および (b) ファノファクター-観測時間特性の経時変化、(c) (a)と同様の発光強度経時変化を示すよう制御した発光ダイオード(波長670 nm)によるファノファクター-観測時間特性の経時変化。

する可能性を示しているものといえる。

形態形成の各段階においては、分化を誘発するシグナルが細胞内あるいは細胞間でどのように発せられ、伝達・処理されているのかを細胞集団レベルで知ることは、多細胞体制を形成する自己組織化過程を明らかにする上で、重要である。細胞内におけるセカンドメッセンジャーとしての細胞内カルシウムイオン ($[Ca^{2+}]_i$) が重要な役割を担っていることはよく知られているが、エクオリン(オワンクラゲ由来発光タンパク) 遺伝子を導入した細胞株 (*Dictyostelium discoideum* Ax-3由来 RHI76) を用い、極微弱発

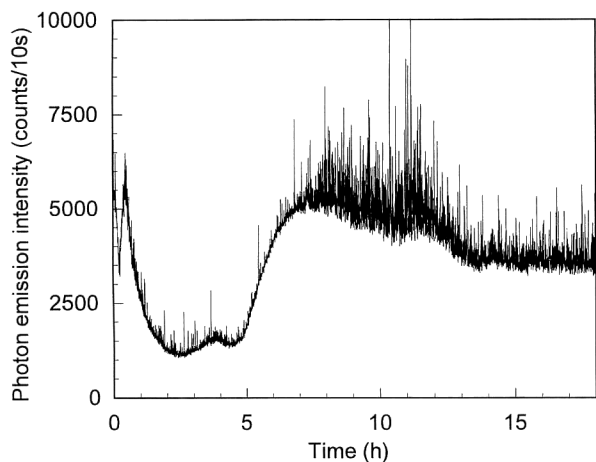


図5 アポエクオリン発現株 (*Dictyostelium discoideum* RHI-75) による, 形態形成過程における $[Ca^{2+}]_i$ 依存性極微弱発光の経時変化。

光画像²⁴⁾としてこれを実時間計測し, 分化シグナルの時空間パターン解析を行った研究が報告されており^{25,26)}, 分化に際し細胞質の形態的・生理的变化を誘導するシグナルとしての重要な役割が明らかにされている。生物フォトン発光との比較のために計測した, アポエクオリン発現株の飢餓処理後から形態形成過程における $[Ca^{2+}]_i$ 依存性発光の経時変化測定例を図5に示す。形態形成過程全般にわたる発光強度変化パターンは両者(図3と図5)間で比較的類似しており, 生物フォトン発光が分化シグナルと共役した細胞代謝活性の変化を表しているものと考察される。また図5では集合前や集合塊形成後にカルシウムスパイクの頻出が認められるが, これは局所的な細胞間の協同性(カルシウムウェーブ²⁵⁾)によるものとみられており, 生物フォトンで観測されたスーパーポアソン分布特性との関係がうかがわれる。

細胞集団レベルにおける, 細胞間相互作用による自己組織化現象とそのプロセスの極微弱光による情報抽出技術について紹介した。分化モデルとしての細胞性粘菌の発生過程は, 工学的視点からも非常に興味深い現象である。最近システム工学の分野では創発システム²⁷⁾, 自律分散制御という言葉を目にするが, これは生物の自己組織化にみられるように, サブシステムが結合し相互作用することによりシステム機序を形成し, そこで発現した機能が, 環境および内部でのフィードバックにより動的に秩序を維持する新しいシステムの実現を意図するものである。古くはWienerのサイバネティクス理論を起源とするような, 工学的視点からの生命・生物システムの把握とそのシステム理論としての体系化を指向するものである。このようなシ

ステムを解析してそのメカニズムを探るとき, 協同性(創発性)を失うことなく, マクロな「生きた」秩序状態を維持しながら, 非破壊的に要素間相互作用を観測することが必要であり, ここで述べたような極微弱発光による計測は, その意味においてミクロとマクロをつなぎ, 動的システムとして系全体をとらえることのできる, すぐれた計測・解析系であるといえる。

最近ルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として, 特定の細胞機能発現を制御するプロモーター遺伝子にこれを結合することにより, 微弱発光画像としてその機能発現の時空間動態を計測する試みが動・植物個体から細胞に至るさまざまな系で報告され, 注目されている。分化に限らずさまざまな機能発現に伴って生じる協同性を単一細胞あるいは細胞集団レベルでとらえることは, その分子生物学的メカニズムの解明への寄与にとどまらず, 自己組織化現象のモデル化に対して大きく貢献するであろうし, そのためにも極微弱発光検出・分析技術の進展に負うところはますます大きいといえよう。

最後に, 細胞性粘菌を提供してくださった, 東北大学前田靖男教授, Marine Biological Lab. L. Jaffe 教授, 共同実験ならびに有益な助言をいただいた Baylor College of Medicine 松山晋一博士, および研究全般にわたりご指導いただいた東北工業大学稲場文男教授に感謝いたします。なお, この研究は(株)生体光情報研究所で行われたものです。

文 献

- 1) 吉川研一: 非線形科学(学会出版センター, 1992), 都甲 潔, 松本 元編著: 自己組織化(朝倉書店, 1996), 北森俊行, 北村新三編: 自己組織化の科学(オーム社, 1996)など。
- 2) G.ニコリス, I.プリゴジヌ(小島陽之助, 相沢洋二訳): 散逸構造(岩波書店, 1983)。
- 3) 荒木 剛, 雨貝愛子, 前田靖男: “粘菌の形態形成”, 生物の形態形成 生物の科学遺伝別冊6号(裳華房, 1994) pp. 8-17。
- 4) 前田みね子, 前田靖男: 粘菌の生物学(東京大学出版会, 1978)。
- 5) 稲場文男編: 創造科学技術推進事業 稲場生物フォトンプロジェクト研究概要集(新技術事業団, 1992)。
- 6) 稲場文男: 生物フォトンの計測とその応用(レーザー技術総合研究所, 1995)。
- 7) H. Inaba: “New bio-information from ultraweak photon emission in life and biological activities: Biophoton,” *Modern Radio Science 1990*, ed. J. B. Andersen (Oxford University Press, Oxford, 1990) pp. 163-184。
- 8) 小林正樹, 稲場文男: “極微弱生物フォトン発光現象の量子統計解析, 時空間特性分析と生体情報計測への応用”, *レーザー研究*, 25 (1997) 197-203。
- 9) 小林正樹, 稲場文男: “バイオフィトンによる生体計測”, *医科学*, 68 (1998) 347-356。
- 10) P. R. Fisher, P. Karampetsos, Z. Wilczynska and L. T. Rosenberg: “Oxidative metabolism and heat shock-

- enhanced chemiluminescence in *Dictyostelium discoideum*," J. Cell Sci., **99** (1991) 741-750.
- 11) P. R. Fisher and L. T. Rosenberg: "Chemiluminescence in *Dictyostelium discoideum*," FEMS Microbiol. Lett., **50** (1988) 157-161.
 - 12) M. Kobayashi and H. Inaba: "Photon statistics and correlation analysis of ultraweak light originating from living organisms for extraction of biological information," Appl. Opt. (in press).
 - 13) E. Cadenas, A. Boveris and B. Chance, "Low-level chemiluminescence of biological systems," *Free Radicals in Biology Vol. VI*, ed. W. A. Pryor (Academic Press, Orlando, 1984) pp. 211-242.
 - 14) M. Kobayashi, M. Takeda, T. Sato, Y. Yamazaki, K. Kaneko, K.-I. Ito, H. Kato and H. Inaba: "In vivo imaging of spontaneous ultraweak photon emission from a rat's brain correlated with cerebral energy metabolism and oxidative stress," Neurosci. Res., **34** (1999) 103-113.
 - 15) M. Kobayashi, B. Devaraj, M. Usa, Y. Tanno, M. Takeda and H. Inaba: "Development and applications of new technology for two-dimensional space-time characterization and correlation analysis of ultraweak biophoton information," Frontiers Med. Biol. Eng., **7** (1996) 299-309.
 - 16) M. Kobayashi, B. Devaraj, M. Usa, Y. Tanno, M. Takeda and H. Inaba: "Two-dimensional imaging of ultraweak photon emission from germinating soybean seedlings with a highly sensitive CCD camera," Photochem. Photobiol., **65** (1997) 535-537.
 - 17) 大矢智幸, 倉重秀明, 甲斐昌一: "環境ストレスと植物の生態成長—光学的手法によるイオンストレスの早期検出—", 九大工学集報, **71** (1998) 575-581.
 - 18) M. C. Teich and B. E. A. Saleh: "Photon bunching and antibunching," *Progress in Optics Vol. XXVI*, ed. E. Wolf (Elsevier Science, Amsterdam, 1998) pp. 1-104.
 - 19) M. Kobayashi, B. Devaraj and H. Inaba: "Observation of super-Poisson statistics of bacterial (*Photobacterium phosphoreum*) bioluminescence during the early stage of cell proliferation," Phys. Rev. E, **57** (1998) 2129-2133.
 - 20) G. Matsumoto, H. Shimizu and J. Shimada: "Computer-based photoelectron counting system," Rev. Sci. Instrum., **47** (1976) 861-865.
 - 21) 大須賀慎二: "光電子増倍管の発光現象", 光学, **22** (1993) 410-411.
 - 22) P. B. Coates: "Noise sources in the C31000D photomultiplier," J. Phys. E: Sci. Instrum., **4** (1971) 201-207.
 - 23) R. W. Engstrom: *Photomultiplier Handbook* (RCA Co., Lancaster, 1980).
 - 24) A. L. Miller, E. Karplus and L. F. Jaffe: "Imaging $[Ca^{2+}]_i$ with aequorin using a photon imaging detector," Meth. Cell Biol., **40** (1994) 305-338.
 - 25) A. B. Cubitt, R. A. Firtel, G. Fischer, L. F. Jaffe and A. L. Miller: "Patterns of free calcium in multicellular stages of *Dictyostelium* expressing jellyfish apoaequorin," Development, **121** (1995) 2291-2301.
 - 26) Y. Tanaka, R. Itakura, A. Amagai and Y. Maeda: "The signals for starvation response are transduced through elevated $[Ca^{2+}]_i$ in *Dictyostelium* cells," Exp. Cell Res., **240** (1998) 340-348.
 - 27) 北村新三編: "特集 創発システム—人工システムの新たなパラダイムをめざして—", 計測と制御, **35** (1996) 489-563.

(1999年6月21日受理)