



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	生命のリズムを取り出す
Author(s)	黒田, 茂; 國田, 樹
Relation	研究者が教える動物実験3 (行動), 日本比較生理生化学会編集, pp.18-22
Issue Date	2015-07-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59571
Type	book part
File Information	20130907_kuroda, Kunita.pdf



生命のリズムを取り出す

粘菌糸の収縮リズムの観察と解析

(高校生向き)

真正粘菌のモジホコリ（以下、粘菌と呼ぶ）は、脳や神経を持たない単細胞生物であるが、何億年も前から複雑な環境に適応して生き抜いてきた。粘菌は、好ましい環境では「変形体」と呼ばれる形態で活動し、好ましくない環境では孢子やスクレロチウム(皮体)になって休眠する。

粘菌変形体の身体は原形質からできており、それはゲル状(固体)とゾル状(液体)の2つの状態をとる。粘菌変形体の形は、先端の這って移動している部位はシート状、後方は管のネットワーク構造である。その管はゲル状の原形質でつくられており、管の中にはゾル状の原形質が流れている(原形質流動)。この流れによって、粘菌の身体に栄養や情報が運ばれている。原形質の流れは管の収縮-弛緩運動によって生じており、流れの向きは周期的に変わる。本実験では、これらの性質を利用して、生物のリズム現象を観察する。

実験のねらい

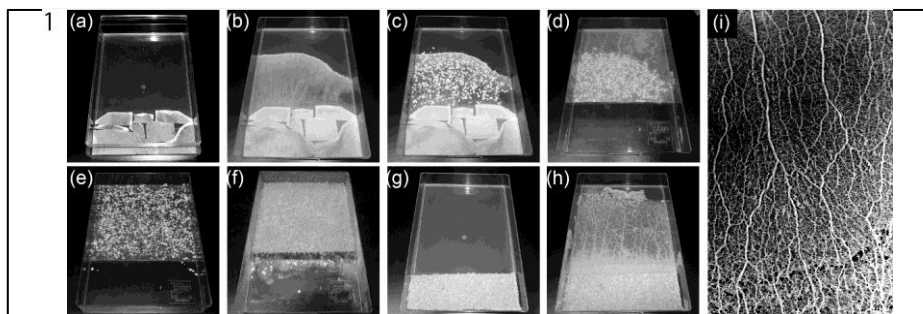
粘菌変形体の原形質流動をつくる収縮-弛緩運動の周期を決定する。1) 実験に必要な大きな粘菌変形体を培養する。2) 寒天上に広がった粘菌変形体から十分に発達した管を切り出し（以下では粘菌糸と呼ぶ）、床につかないように天板から垂れ下げる。粘菌糸の収縮弛緩運動を撮影し、画像解析によって収縮弛緩運動の周期を決定する。

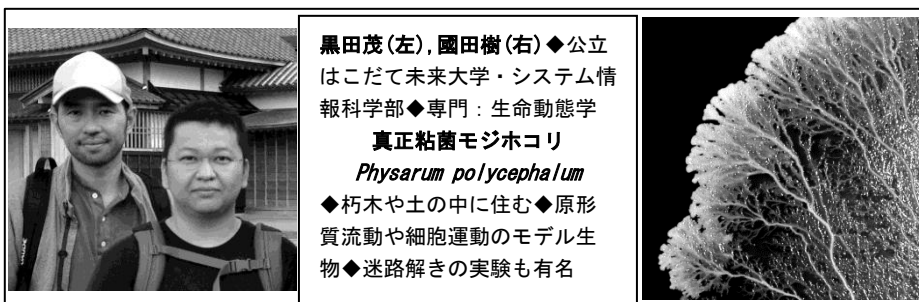
実験の準備

動物：寒天上に伸展した十分に発達した管をもつ粘菌変形体。

試薬：寒天(お菓子用で良い)、蒸留水(水道水でも可)、オートミール(餌)。

器具：スポイト、スパチュラ(細長いさじ、ナイフでも可)、ビニールテープ、ピーカー等の観察用透明容器、ピーカーにのせる天板、撮影背景用の黒紙、暗幕で囲った撮影ブース、撮影用機材(デジタルビデオカメラあるいはデジタルカメラ(タイムラプス撮影可なら尚良))、飼育用のプラスチック容器(A4程度のサイズ、タッパーでも良い)、スプレー(水を入れて使用)。





黒田茂(左), 國田樹(右) ◆公立
はこだて未来大学・システム情
報科学部 ◆専門: 生命動態学
真正粘菌モジホコリ
Physarum polycephalum
◆朽木や土の中に住む ◆原形
質流動や細胞運動のモデル生
物 ◆迷路解きの実験も有名

方法 1) 粘菌変形体の培養方法

1. 粘菌変形体のスクレロチウムの入手

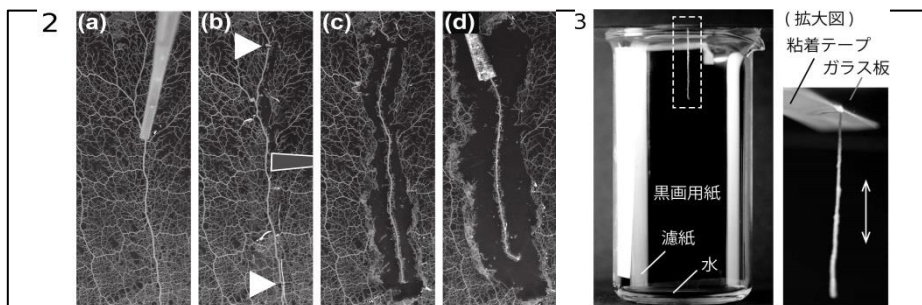
大量培養に適した粘菌変形体を野外で採集することは難しいので、粘菌変形体の休眠体であるスクレロチウム(皮体)を入手する。スクレロチウムは、専門の業者から購入するか、所有している人から株分けしてもらう。

2. 粘菌変形体の培養環境の準備

培養環境として、温度が 25℃前後で湿度が高めの暗所を用意する。専用の部屋や培養器が望ましいが、それらが用意できない場合には段ボール箱や本棚に暗幕を付けたもので良い。

3. 粘菌変形体の大量培養

- 3-1. 寒天培地を用意する。A4 サイズのプラスチック容器やタッパーに 1%寒天溶液(寒天 1g あたり水 100ml を加えて溶かしたもの)を厚さ 1cm になるように入れて、冷やし固める。
- 3-2. 寒天培地の短辺の一端にスクレロチウムを置き【1a】、それをスプレーなどを使って水で湿らせる。容器のふたを少しずらして置き、その容器を 2 で準備した培養環境に置く。
- 3-3. 半日から 1 日程度経つと、スクレロチウムから黄色の粘菌変形体が出てきて、寒天培地に広がって動き回るようになる【1b】。
- 3-4. 広がった粘菌変形体の上に餌のオートミールを置き、そのオートミールをスプレーを使って水で湿らせる【1c】。容器のふたをずらして置いて、培養環境に半日程度置くと、粘菌変形体が増殖してオートミールの上に移動してくる【1d】。
- 3-5. スクレロチウムがついていた紙は、雑菌の繁殖が激しいので寒天ごと切り取り捨てる【1e】。
- 3-6. 3-4 の手順で、半日ごとに粘菌変形体に餌を与える。2~3 日間ほど培養を続けると、【1f】のように増える。
- 3-7. 新しい寒天培地を用意して、増殖した粘菌変形体の 3 分の 1 程度を寒天ごと移す【1g】。残った変形体は、生ごみ処理機に入れたり、洗剤水をかけて死滅させた後で廃棄する。
- 3-8. 粘菌変形体は寒天培地上に這い出し、1 時間におよそ 1~2cm の速度で他端を目がけてシート状に伸展する。培養環境に置いて半日から 1 日程度経つと、粘菌変形体が寒天培地上に広がって管構造を作る【1h, 1i】。
- 3-9. 3-4~3-7 までの手順を繰り返して、粘菌を飼育する。

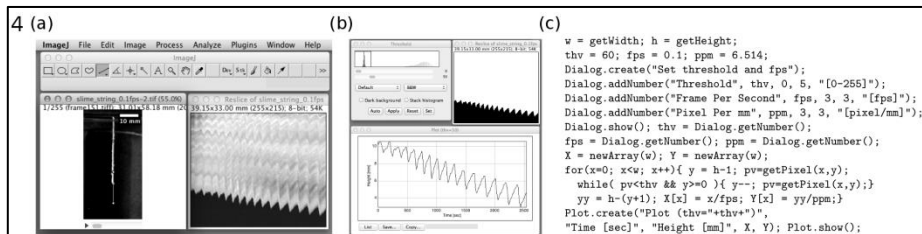


応用・発展課題のヒント

妹：収縮リズムと原形質の流れはどのように関係しているのかな。

母：粘菌糸を使って原形質流動を生み出す圧力を測る実験(複室法)もできるよ。

兄：粘菌の体の厚みの時間空間変化も画像解析で調べてみたいな。



方法 2) 粘菌糸の収縮リズム

1. 大きな粘菌変形体の準備

方法 1 で大量培養した粘菌変形体を用いる。方法 1) の 3-7 と同様にして新しい寒天培地に粘菌変形体を寒天ごとに移し【1g】。一晩自由伸展させる【1h, 1i】。

2. 粘菌糸の切り出し

2-1. 十分に発達した管を一つ選び、スポイト等を使って優しく水をかける【2a】。

2-2. 管の両端を切断する。切断面がゲル状に変化し固まるまで少し待つ(30 秒程度)【2b】。

2-3. 管の周りの枝をスパティラを使って取り除く【2c】。

2-4. 管全体をスパティラを使ってそっとずらして寒天からはがす【2d】。

3. 粘菌糸の垂れ下げ

3-1. ビーカ等の透明容器を用意し、撮影の背景用に黒紙を内半面に貼る。ビーカの底に乾燥防止用に水を少し入れておく【3】。

- 3-2. 粘菌系の一端をスパティラですくい、持ち上げる【2d】.
- 3-2. 持ち上げた粘菌系の端にテープを張り、それを天板に固定する（写真ではガラス板を使用）.
粘菌系がまっすぐ垂れるように天板をピーカーにのせる【3】.

4. 粘菌系のタイムラプス撮影

- 4-1. 粘菌系の垂れたピーカーを暗幕で遮光した空間に設置する。ライトで照明を行う。
- 4-2. 粘菌系の下端が画面の上辺から 3 分の 2 程度の位置になるように視野を調整する。タイムラプス撮影を行う場合、1~15 秒間隔にセットする。デジタルカメラを使用して、手動で一定時間毎にシャッターを押して撮影しても良い。最低 15 分間は撮影したい。
- 4-3. 撮影終了後、再生して早回しで見てみる。粘菌系が伸びたり縮んだりしている様子を観察できれば、実験は成功。

5. パソコンへの取り込み、時間変化のグラフ化

無料動画画像処理ソフト ImageJ を使って、粘菌系の先端の動きをグラフ化する方法を紹介する。
以下で[]内は ImageJ のコマンドを表す。

- 5-1. パソコンに撮影データを取り込む。必要であれば、ImageJ で読み込める形式にデータを変換する (Image Sequence (撮影時刻順に番号づけられ一つのフォルダ内に収められた画像ファイル(tif や jpg など)群) や QuickTime(mov)形式の動画など)。
- 5-2. ImageJ の Reslice 機能を使って粘菌系の Space-time 画像(粘菌系の一次元像を下→上が空間軸に、左→右が時間軸に一致するように並べて一つの画像にしたもの)を次の手順で作る: (1) 撮影データを ImageJ で開く。画像タイプをモノクロ 8bit にする [Image>Type>8bit]。 (2) 全ての時刻で粘菌系の先端が入るように、粘菌系に沿って線状の ROI を設定する【4a 左】。 (3) この ROI を空間軸とする Space-time 画像を作る [Image>Stacks>Reslice (Start at:left;Rotate 90)] 【4a 右】。
- 5-3. 粘菌系と背景の閾値を決める [Image>Adgust>Threshold] 【4b 上段】。 5-4 で各時刻での粘菌系の先端の位置を決めるために使う。
- 5-4. 5-2 (3) で得た Space-time 画像から先端位置の時系列データを求めるプログラムを ImageJ のマクロ言語を用いて作成する (参考プログラム【4c】)。作成したプログラムをテキストファイルに保存して、ImageJ で実行する [Plugins>Macros>Run] 【4b 下段】。
- 5-5. 得られた振動時系列をファイルに保存する。後は好みの方法で振動の周期や振幅を調べる。

注意すること・役立ち情報・耳よりな話

- ◆ 粘菌が身体に付着したときは、石鹸で洗い流す。
- ◆ 私たちの筋肉と粘菌の収縮機構には、動物の筋肉の収縮機構と同じモータ蛋白質分子（アクチン系）が関わっている。
- ◆ 粘菌変形体を寒天ごと切り取って移動させる際 (1 の 3-5, 3-7, 2 の 1) には、お好み焼き用のコテが便利である。

図・写真もしくは
内容のイラスト説明

～リンク～

本書第 0 巻 000-000
動物飼育法 第 0 巻 000-000
比較生理生化学 00 巻 00 号
比較生理生化学会 HP

※以下は巻末に掲載します。

動物名：モジホコリ	実験内容：粘菌系を用いた収縮リズムの観察
1. 参考文献 ・ 粘菌：その驚くべき知性，中垣俊之著，PHP 研究所 (2010)。 ・ 月刊たくさんのふしぎ 2012 年 11 月号 かしい単細胞 粘菌，中垣俊之著，福音館 (2012)。 ・ 細胞の不思議，神谷宣郎著，ブレーンセンター (1989)。 ・ 日本変形菌図鑑，荻原博光ほか著，平凡社 (1995)。 ・ 粘菌の生物学，前田みね子，前田靖男著，東京大学出版社 (1978)。 ・ 自己組織化とは何か，都甲潔ほか著，講談社 (2009)。 ・ ImageJ のマクロ言語の説明 (http://rsbweb.nih.gov/ij/developer/macro/macros.html)。 ・ 画像解析テキスト 改訂第 3 版，小島清嗣，岡本洋一編，羊土社 (2006)。 2. 動物や器具・試薬の入手先 モジホコリの入手先 ・ (株)京都科学，(http://www.kyotokagaku.jp/appli2/contents.php?action_record&code=22395-000) ・ 国立科学博物館 植物研究部 (代表 TEL: 029-851-5159)。 3. 動物，器具，試薬の補足説明 ・ ImageJ の入手先 = ImageJ のホームページ (http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html) ・ 変形菌の飼い方，国立科学博物館，植物研究部ホームページ (http://research.kahaku.go.jp/botany/henkeikin/3400a.html) 4. 高校生向けの簡便法の紹介 ・ パソコンを使った処理が難しい場合，3-3 まで行った後，動画を再生しながら目で見て収縮リズム周期を測っても良い。 ・ 培養が難しい場合には，【1b】のようにスクレロチウムから出てきた粘菌変形体をそのまま使用しても良い。この場合，培養した粘菌変形体よりも活動度が低い場合がある。	