



Title	TalinBによるPI3Kシグナル伝達経路を介した集団運動の制御
Author(s)	山崎, 真一
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76638
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

TalinB による PI3K シグナル伝達経路を介した集団運動の制御
TalinB regulates collective cell migration via PI3K signaling

山崎 真一

大阪大学大学院生命機能研究科 生命機能専攻
1 分子生物学研究室

2020 年 3 月 博士学位論文

Abstract

Collective cell migration is a coordinated migration of multiple cells, which has important roles in various physiological phenomenon including embryonic morphogenesis, wound healing, and cancer invasion in multicellular organisms. Multiple processes including the cell adhesion, cytoskeletal activity, and guidance by chemical and mechanical cues are required for the coordinated behaviors between multiple cells. Here I have focused on talin which is a key adhesion molecule in collective cell migration.

To explore the roles of TalinB on collective cell migration, the cells lacking the talinB gene were observed at the mound stage. Wild-type cells exhibited collective rotational migration continuously in one direction, while the talinB-null cells lost the normal directional movement and randomly migrated each other, showing severe defects in the collective migration. Next I characterized cellular cAMP production in a mound by analyzing the fluorescence intensities of Flamindo2 which is a live reporter of cAMP and decreases its fluorescence along increases in cAMP concentrations. Wild-type cells exhibited that periodic cAMP waves rotationally traveled in a mound, which was closely correlated with changes in cell velocity. On the other hand, talinB-null cells exhibited severe defects in such cAMP dynamics. PI(3,4,5)P₃, a key molecule of directional migration as well as cAMP production, was recruited to the leading edge of individual cells in an oscillatory manner in a mound of wild-type cells. On the other hand, talinB-null cells exhibited continuous recruitments of PI(3,4,5)P₃ on the plasma membrane of individual cells in a mound without obvious cAMP waves. These results indicated that talinB-null cells produced excess amounts of PI(3,4,5)P₃ on the membrane, which was followed by abnormal cAMP dynamics. To examine this hypothesis, PI3K activity was reduced by either its gene disruption or a specific inhibitor. Both cases were partially able to recover the defects of talinB-null cells in collective cell migration.

Taken together, this study shows that TalinB regulates the collective cell migration via PI3K activity, which provides a new insight into collective cell migration by coordinating the phosphatidyl inositol signaling transduction pathway and cell adhesion.

1. 序論

- 1-1 細胞の集団運動と研究意義
- 1-2 モデル生物としての細胞性粘菌
- 1-3 細胞性粘菌が集団運動を行う仕組み
- 1-4 イノシトールリン脂質代謝系によるアクチン骨格系の制御
- 1-5 細胞接着における talin の役割
- 1-6 研究の目的

2. 実験方法

- 2-1 細胞培養法
 - 2-1-1 細胞培養法
 - 2-1-2 クローン化法
 - 2-1-3 細胞性粘菌への遺伝子導入
- 2-2 細胞株
- 2-3 試薬とプラスミド
 - 2-3-1 試薬
 - 2-3-2 プラスミド
 - 2-3-3 顕微鏡システム
- 2-4 細胞の発生処理
 - 2-4-1 細胞の飢餓処理
 - 2-4-2 細胞の集団運動の観察に用いる細胞試料の準備
 - 2-4-3 細胞の集団運動の観察用チャンバーの構築
 - 2-4-4 タイリング機能を使用した画像取得方法と顕微鏡観察時の注意点

2-5 細胞追跡解析

2-6 ドロップアッセイ

2-7 Particle Image Velocimetry 解析

2-7-1 Particle Image Velocimetry 解析の原理と使用パラメータ

2-7-2 相関距離の計算

2-7-2 Matlab プログラム

3. 結果

3-1 細胞の集団運動の定量解析

3-2 マウンド中での cAMP wave の観察と周期の定量解析

3-3 マウンド中での PIP3 局在の観察

3-4 PI3K シグナル伝達経路の変調による集団運動の回復

4. 考察

4-1 研究結果のまとめ

4-2 Rap1 経路を介した TalinB の PI3K シグナル伝達経路の制御の可能性

5. 参考文献

6. 付録

7. 謝辞

8. 業績

1. 序論

1.1 細胞の集団運動と研究意義

細胞の集団運動は複数の細胞が一緒に動く運動であり、多細胞生物の様々な場面で見られる重要な現象である(Friedl and Gilmour 2009)。例えば、胚発生や創傷治癒、癌細胞の転移などの生物学上の重要なイベントに関与する(Haeger et al. 2015)。細胞の集団運動は周囲の細胞や周りの環境との相互作用から生み出される。このとき、細胞の集団がある一定の方向に運動する様子が観察される。複数の細胞が互いに接着し、シート状やクラスター等様々な細胞集団を形成し、外部刺激に対する方向性を持った走性運動を行う(Friedl 2004)。例えば、化学勾配に沿って運動する走化性、電場方向に沿って運動する走電性、基質の固さに沿って運動する走蝕性などがある。

近年、様々な生物で様々な実験系が開発され、それぞれの系で精力的に研究が進められている。有名なモデル実験系としては、傷に浸潤する細胞を模した創傷治癒アッセイやショウジョウバエのボーダー細胞の集団運動、ゼブラフィッシュのラテラルライン実験系などがある(Theveneau and Mayor 2013)。これらの細胞の集団運動の実験系では運動様式の分類が進み、細胞の集団運動に関与する因子や遺伝子の同定が進んでいる。

細胞の集団運動のメカニズムには共通したいくつかの機能が存在する。運動方向を決める外部ガイダンス、細胞内のシグナル伝達経路、アクチン骨格系などの運動装置、細胞接着や細胞間相互作用である(Haeger et al. 2015)。これらの機能が協調して働くことで細胞の集団運動は実現されている。

これらの実験系で細胞の集団運動のメカニズムを調べることは、胚発生や創傷治癒、癌細胞の転移などの重要な現象の理解につながる。またこれらの研究から得られた知見は、種々の疾患に対する治療法開発にも役立つ(Friedl and Gilmour 2009)。創傷治癒に有効な薬剤の開発や、胚発生の問題や機能不全を防ぐことに応用できる可能性がある。また、癌の転移のメカニズムを明らかにする事は、患部から癌細胞が転移し、新しい癌の形成を予防することが出来るかもしれない(Aceto et al. 2014; Friedl and Alexander 2011; Plodinec et al. 2012)。

1.2 モデル生物としての細胞性粘菌

細胞の集団運動の研究をする時、モデル生物として細胞性粘菌がしばしば用いられる(Weijer 2009)。これは細胞性粘菌がその生活環の中で特徴的な集団運動を示す事が知られており、その他にもいくつかモデル生物としての利点が存在するためである。以下に細胞性粘菌の特徴を紹介しつつ、細胞の集団運動の研究において利用される理由を説明する。

細胞性粘菌の生活環はキイロタマホコリカビ *Dictyostelium discoideum* で詳しく調べられており、植物や動物、菌類とも異なる独特な生活環を有する(Rapet 1984)。大きき 10 μ m 程度の粘菌細胞は主として腐植土壤中で細菌を捕食しながら 2 分裂法で増殖する。増殖した粘菌細胞は、周囲に餌が無くなると、集合中心になる粘菌アメーバが cAMP と呼ばれる物質を分泌し、周囲の粘菌アメーバはその物質に誘引されて集合する。この集合過程の細胞の流れは「ストリーム」と呼ばれる。その後、およそ 10 万匹からなる細胞の集合体は丸い半球状の「マウンド」と呼ばれる構造を形成する。この時、粘菌細胞は、ぐるぐると回転するような細胞の集団運動を示す。さらに、集合の中心に集まってできた粘菌細胞は移動体と呼ばれるナメクジ状の構造を作り、移動を開始する。適当な位置に落ち着くと集合体の上端で順次粘菌アメーバが柄細胞に分化し始める。塊の中心に柄を貫通させながら、空中に残りの粘菌アメーバ塊を持ち上げていく。最終的には多細胞性の柄の先に孢子塊を持つ子実体となる。このストリームとマウンド期はcAMPの振動的な wave に制御され集団運動が行われる。この cAMP wave と呼ばれる時空間的なパターンは特徴的な集団運動であり、研究のモデルとして良く利用されている。

次に、細胞性粘菌は遺伝子操作等の分子生物学的方法論が容易に利用できる点が挙げられる。2005 年 5 月に国際共同研究によって *Dictyostelium discoideum* の全ゲノム配列が解読されている(Eichinger et al. 2005)。そのため、細胞の集団運動やシグナル伝達、細胞接着に関与する遺伝子のホモログ検索をたやすく行うことができる。細胞性粘菌の染色体は一倍体であるため遺伝子破壊は 1 回行えばよく、その際の相同性遺伝子組み換えも高い頻度で起こるため、遺伝子の変異体を作成することが容易である。染色体外で保持されるプラスミドを利用して外来遺伝子を強制発現させることが可能である。このため、GFP を始めとする各種レポーター遺伝子による細胞内分子挙動の解析手法も整備されている。加えて、哺乳類細胞と比べて培養が容易であり、細胞の増殖時間も 12 時間程度と速いために実験上便利である。

細胞状態の調整が容易である点も、細胞性粘菌をモデル生物として利用する際の利点を与えている。細胞性粘菌は周囲の栄養が枯渇し飢餓状態に陥ると。細胞は増殖を停止し、飢餓状態におかれ 3 ~ 5 時間すると、各々細胞が細胞外

に cAMP を分泌する。それに対して互いに走化性を示すことで細胞は極性をもった細長い形態となり、顕著なアメーバ運動を示す。集合期の細胞は運動性が高く、また cAMP に対する応答性も高い。この発生過程の進行は細胞の同調性が極めて高く、細胞集団の 99 %以上が cAMP に対して同程度の応答を示す。これらの利点を活かして、細胞運動や走化性のシグナル伝達系のモデル生物として細胞性粘菌は多くの研究に用いられてきた。

1.3 細胞性粘菌が集団運動を行う仕組み

飢餓状態の細胞性粘菌は cAMP リレーという仕組みを使って多くの細胞が集まる事が出来る(Mahadeo and Parent 2006; Gregor et al. 2010)。cAMP リレーとは、誘引物質である cAMP の信号が細胞から細胞へ次々に伝搬、すなわち「リレー」され、集合効率が高められる現象である。この現象は発生初期のストリームやマウンド期で見られる螺旋波状や同心円状のパターンで容易に観察することが出来る(Gross, Peacey, and Trevan 1976; Siegert and Weijer 1989)。これらのパターンは走化性運動中の細胞の形態の違いに起因し(Alcantara and Monk 1974)、この光学密度パターンと cAMP のパターンが一致することが示されている(Tomchik and Devreotes 1981)。その後、これらの螺旋状のパターンはマウンド中で観察され(Rietdorf, Siegert, and Weijer 1996)、移動体中で観察されるパターンは 3 次元運動を制御していると考えられている(Bretschneider, Siegert, and Weijer 1995)(D Dormann, Vasiev, and Weijer 1998)。

cAMP リレーの分子メカニズムは大きく 2 つに分けて考えることが出来る。一つは細胞間を伝搬する cAMP の合成と、2 つ目は細胞外の cAMP 勾配に対する走化性シグナル伝達である。まず cAMP の合成について説明する。細胞外の cAMP が細胞内のシグナル伝達経路を活性化するためには、細胞膜上の cAMP レセプターに結合する必要がある。細胞性粘菌では 4 種類の cAMP レセプターが存在することが知られており(J. Y. Kim, Van Haastert, and Devreotes 1996)、いずれのレセプターも 7 回膜貫通型で、嗅覚レセプターやロドプシンなどの視物質と類似の構造をしている(Klein et al. 1988)。この中で発生初期に重要な役割を果たすのが cAR1 であり(Firtel 1995)、cAR1 遺伝子の破壊は、走化性能に欠損が生じるため細胞が集合できなくなる(Julia Sun and Devreotes 1991)。cAR1 は G タンパク質共役型受容体で(Karnik et al. 2003; Milligan and Kostenis 2006)、cAMP が結合すると G タンパク質が活性化され、下流の分子へとシグナルを伝える(Bagorda,

Mihaylov, and Parent 2006; Prabhu and Eichinger 2006)。G タンパク質から伝えられたシグナルは、Ras を介して PI3K を活性化する(Sasaki et al. 2004)。これは細胞膜上への PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5 phosphate)の蓄積を引き起こす(Swaney, Huang, and Devreotes 2010)。その後 CRAC(cytosolic regulator of adenylyl cyclase)は PIP3 の蓄積に伴って膜移行し、アデニル酸シクラーゼの活性化に直接関与する (Insall et al. 1994; Parent et al. 1998)。アデニル酸シクラーゼは ATP を基質として、cAMP とピロリン酸に変換する反応を触媒する酵素である。細胞性粘菌の細胞膜上に存在し、集合期に発現するアデニル酸シクラーゼは ACA(adenylate cyclase A) で、この遺伝子を破壊すると細胞は集合できない(Pitt et al. 1992)。以上で説明した様な cAMP を受け取り、cAMP を合成・放出するプロセスは細胞性粘菌の集合中心から順次隣の細胞へと伝えられる。これが基本的な cAMP リレーの分子メカニズムである。

1.4 イノシトールリン脂質代謝系によるアクチン骨格系の制御

細胞性粘菌の示す運動は誘引性（或いは忌避性）の刺激の有無によって走性運動と自発運動の 2 種類の運動に分けられる。走性運動には、化学物質の濃度勾配が存在するときに細胞が示す走化性運動がある。粘菌細胞の場合、細胞外の cAMP の濃度勾配に対して正の走化性を示す。粘菌細胞が効率よく走化性運動を行っている時、細胞は濃度勾配の高い方に向かって比較的直線的に移動する。一方、細胞は外部に化学物質の勾配が無い場合でも運動する。こうした自発的な運動は走性運動のように方向性を持った運動ではなくランダムな方向へと運動する。自発運動は細胞が走性運動を行うときの基礎となる。すなわち、環境に刺激がないときに細胞が自発的に示すランダムな運動が基となり、環境からの勾配刺激によって細胞の運動方向がバイアスされることにより方向性のある運動が実現される(Van Haastert and Postmay 2007)。細胞が自発的に運動する仕組みの理解は、走性運動の仕組みを理解する基盤となっている。

上述したように、走性運動と自発運動はアクチン骨格系のダイナミクスによって実現されている。細胞性粘菌と白血球においては、アクチン骨格系の制御にかかわるシグナル伝達系としてホスファチジルイノシトールリン脂質代謝系がよく知られている(Parent and Devreotes 1999)。イノシトールリン脂質代謝系の制御によって走化性運動が実現される過程を、細胞性粘菌での知見を例に説明する(Kimmel and Parent 2003)。

細胞性粘菌は細胞外の cAMP の濃度勾配を感知して走化性を行う。cAMP 濃度勾配は三量体 G タンパク質共役型受容体を介して認識される。cAMP が結合した受容体は三量体 G タンパク質を活性化し、PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) や PTEN (phosphatase and tensin homolog) といった下流のイノシトールリン脂質代謝系構成分子にシグナルを伝達する (Funamoto et al. 2002; Iijima and Devreotes 2002)。PI3K と PTEN はそれぞれ細胞膜を構成成分のイノシトールリン脂質である PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate) を合成・分解するリン酸化酵素・脱リン酸化酵素である。細胞前端では PI3K によって細胞膜上の PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) がリン酸化されることにより PIP3 が合成され、PIP3 に結合する PKB を介してアクチン重合が促進されることにより仮足形成が誘導される (Meili et al. 1999)。細胞後部では PIP3 を脱リン酸化する PTEN が局在し、PIP3 が分解されることにより、仮足形成が抑制される。このように PIP3 と PTEN が細胞の前後に局在することで細胞の極性が形成され、仮足の形成箇所が制御されることで細胞の進む方向が決まる。アクチン重合阻害剤によって細胞の仮足形成を阻害して移動運動を抑制した状態でも、cAMP 濃度勾配で刺激されると cAMP 濃度の高い方の細胞膜に PIP3 が局在する (Parent and Devreotes 1999)。このため、PIP3 の細胞内分布の制御に働くイノシトールリン脂質代謝系はコンパスのような働きをしていると考えられている。

こうした PIP3 の局在は細胞の自発運動時にも観察され、細胞の仮足領域に局在している。PIP3 を産生する PI3K を阻害剤によって抑制すると自発運動も抑制されることから、イノシトールリン脂質代謝系は自発運動の制御にも重要であることが分かっている (Sasaki et al. 2007)。さらに、アクチン重合阻害剤を用いて細胞の仮足形成や運動を阻害した状態でも、PIP3 と PTEN は細胞膜に相互排他的に局在し、細胞全体として極性を形成していることが明らかになってきた (Arai et al. 2010)。この PIP3 と PTEN の局在は一定の場所に止まっているわけではなく、細胞膜上を伝搬し進行波を形成する。こうした PIP3 と PTEN の相互排他的な局在は、イノシトールリン脂質代謝系の自己組織化反応によって形成されることが分かっており、PIP3 のパターン形成がアクチン骨格系の制御を通して仮足の形成場所や形成のタイミングを決める。すなわち、イノシトールリン脂質代謝系の自己組織化反応により、細胞前後でのアクチン骨格系の協調的な制御が行われることを通して、自発運動が制御されていると考えられる。イノシトールリン脂質代謝系の自己組織化反応による極性形成は、細胞全体で働くグローバルな制御と言える。

1.5 細胞接着における talin の役割

細胞が運動を行うためにはアクチン骨格系による仮足の伸長と退縮の調節に加えて、細胞の接着に関する調節が必要である。細胞接着にかかわる接着分子として細胞膜貫通タンパク質のインテグリンが良く知られている(Calderwood 2004; Harburger and Calderwood 2009)。細胞外基質と結合したインテグリンは接着斑を形成し、様々な接着斑構成分子を介してアクチンフィラメントと結合していることが知られている。このとき接着分子とアクチン骨格系をつなぐ分子として重要な働きをするのが Talin である。

哺乳類細胞の Talin は比較的大型のタンパク質(～270kDa)で(Critchley 2000)、接着斑の形成・解体に関わるだけでなく、接着斑において細胞内外でのシグナル伝達を行うと考えられている(Critchley and Gingras 2008; Hytönen and Wehrle-Haller 2016)。Talin は約 50kD の球状のヘッド領域と約 220kD の棒状のロッド領域からなる(Rees et al. 1990)。Talin のヘッド領域と呼ばれる部分には FERM ドメインという膜結合ドメインがあり、このドメインを介して細胞膜と結合する(Tepass 2009)。またインテグリンのβ鎖と結合し、インテグリン複合体の細胞外領域の構造変化を引き起こすことでインテグリンを活性化する(Calderwood 2004; M. Kim, Carman, and Springer 2003)。さらに talin は複数のアクチン結合サイトと vincullin 結合サイトを持っている。

細胞性粘菌には、哺乳類細胞と同様に、二つの talin 遺伝子 (*talA* と *talB*) がある(Niewöhner et al. 1997; M. Tsujioka et al. 1999)。*talA* 遺伝子を破壊すると、顕著に細胞の接着性が弱くなる(Niewöhner et al. 1997)。両方の遺伝子を破壊すると細胞は基質に全く接着することが出来ない(Masatsune Tsujioka et al. 2008)。このため、Talin は細胞性粘菌の細胞-基質間接着に必須の蛋白質であると考えられている。さらに *talB* 遺伝子を欠損した細胞は、発生過程の途中であるマウンド期で発生が止まり、それ以降の形態形成が出来ない(M. Tsujioka et al. 1999)。*talB* 遺伝子破壊株では圧力がかかった場合の運動速度が極端に低下し、力発生に欠損があると言われている(Masatsune Tsujioka, Yoshida, and Inouye 2004)。以上の実験結果から、*talB* 遺伝子は力発生に重要な役割を果たし、このため多細胞体形成が出来ないと考えられている。

1.6 研究の目的

細胞の集団運動はいくつかの機能から実現される。運動方向を決める外部ガイダンス、細胞内のシグナル伝達経路、アクチン骨格系などの運動装置、細胞接着や細胞間相互作用等である。それぞれの機能については単細胞での知見を参考に集団運動における役割が明らかになってきている。しかしながらタイミングや空間的に制御された集団運動の実現にはこれらの機能が協調して働く必要がある。本研究ではこれらの機能が協調するメカニズムについて、蛍光イメージングによる細胞の集団運動の詳細な観察と定量的な画像・数値解析を用いてアプローチした。

私は運動を制御している外部ガイダンスと細胞内シグナル伝達系に注目した。そして細胞が複数になった場合に重要な細胞接着との関係について明らかにしたいと考えた。細胞接着では接着斑構成分子の中で最も重要な **Talin** に注目した。細胞性粘菌では2つの **Talin** 遺伝子が存在するが、このうち多細胞隊形成に重要な役割を果たす *talB* 遺伝子を中心に解析を行った。

まず、細胞性粘菌のマウンドにおける細胞の集団運動を蛍光イメージングにより観察した。その後、野生型細胞と *talB*-null 細胞で運動の特徴を比較するために、定量的な解析を行った。さらに、細胞の集団運動の方向を制御する **PIP3** シグナル伝達系の局在解析を行い、集団運動における役割とその制御メカニズムについて検証する実験を行った。

2. 実験方法

2.1 細胞培養法

2.1.1 細胞培養法

本研究では細胞性粘菌の野生株として Ax2 を用いた(Sussman and Sussman 1967)。90 mm のプラスチックシャーレ (Petridish, $\phi=90$ mm, height=20 mm, INA-OPTIKA)に細胞と HL-5 液体培地を 10 ml 入れ, 21°Cの恒温培養器内で静置培養した(Watts and Ashworth 1970; Cocucci and Sussman 1970)。細胞が増えすぎないように適当な間隔で継代を行い, 対数増殖期を維持した(Fey et al. 2007)。雑菌の繁殖を防ぐため, HL-5 培地は調整後オートクレーブ滅菌 (120°C 15 分) し、Streptomycin を終濃度 10 μ g/ml で添加した。

表 3.1 HL-5 液体培地

Glucose	15.4 g/L
Yeast Extract (DIFCO)	7.15 g/L
Proteose Peptone (DIFCO)	14.3 g/L
KH ₂ PO ₄	0.485 g/L
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.28 g/L
Folic acid	200 mg/L
Cyanocobalamin (VB12)	0.06mg/L
Penicillin-Streptomycin Solution	1ml/L

2.1.2 クローン化法

遺伝子破壊株作製後に単一ゲノムの細胞株を得るためと蛍光プローブ導入後に適切な発現量の細胞株を得るために細胞のクローン化を行った。以下の材料を準備し、寒天培地上に細胞性粘菌のプラークを作らせる。

- ・粘菌細胞株 (HL5 培地で対数増殖しているものを使用)
- ・*Escherichia coli* B/r (LB 培地で振とう培養後のものを使用)
- ・5LP プレート
- ・HL5 Buffer

表 3.2 5LP プレート

Lactose Monohydrate (Wako)	0.5 %
Proteose Peptone (DIFCO)	0.5 %
Agar (Wako)	1.5 %

*滅菌済み 90 mm プレート (INA-OPTIKA) に 10ml 入れ。クリーンベンチ内で乾燥させた。

表 3.3 HL-5 Buffer

KH ₂ PO ₄	0.485 g/L
Na ₂ PO ₄ · 12H ₂ O	1.28 g/L

適切な細胞密度に調整した細胞と液体培地で振とう培養しておいた *Escherichia coli* B/r を混ぜ、5LP プレート上に広げる。数日後、プレート上に出来た粘菌のプラークの端から細胞を削り取り、HL5 培地中で培養する。この時単一細胞から出来たプラークから細胞を取得するよう注意する。

2.1.3 細胞性粘菌への遺伝子導入

細胞性粘菌への遺伝子の導入は、エレクトロポレーション法に基づいて行った。すなわち高電圧の印加により細胞膜に穿孔し、そこからプラスミドを細胞内に入れることで行った。指数関数的に増殖している細胞を集菌し、HL-5 buffer (表 3.2) に懸濁した。細胞を細胞密度 1×10^8 cells/ml になるように Electroporation Buffer (EB, 表 3.3) に懸濁した。この懸濁液 400 μ l を、エレクトロポレーション用のキュベット (Electroporation cuvettes plus BTX 社、2 mm Gap Cuvette) にプラスミド 2~10 μ g とともに入れた。遺伝子導入装置 (Electro Square Porator™ ECM 830, BTX) にキュベットをセットし、実効電圧 500V、パルス幅 100 μ sec の電気パルスを 1 秒間隔で 15 回加えた。90mm のプラスチックシャーレに 4 μ l の Healing Buffer (表 3.4) を置いておき、そこに Electroporation 後の細胞懸濁液を移し、HL-5 buffer で 2 倍に希釈した HL-5 培地を入れ培養した。24 時間後、各セレクションマーカーを上記の濃度で添加した。これにより数日後には遺伝子導入に成功した細胞のみが生き残り、これを形質転換体として利用した。

表 3.4 HL-5 Buffer	
KH ₂ PO ₄	0.485 g/L
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	1.28 g/L

表 3.5 Electroporation Buffer (EB)	
KH ₂ PO ₄	10 mM (pH6.1)
Sucrose	50 mM

表 3.6 Healing Buffer	
CaCl ₂	100 mM
MgCl ₂	100 mM

2.2 細胞株

野生株や変異体株は以下のものを使用し、各種プラスミドを導入し蛍光イメージングを行った。

・ Ax2

細胞性粘菌の野生株として広く利用されている Ax2(Watts and Ashworth 1970) を、ラボストックより取得し使用した。

・ *talB*-

talB- 株は辻岡らによって作製され(M. Tsujioka et al. 1999)、50 mg/ml hygromycin の存在下で培養した。PHD-GFP を発現させる場合は、形質転換後、20 mg/ml G418 存在下で培養した。本研究で使用した *talB*- 株は辻岡博士より提供された (Masatsune Tsujioka, Yoshida, and Inouye 2004; Masatsune Tsujioka et al. 2008)。

・ *talB*⁻ *pi3k2*⁻

talB⁻ *pi3k2*⁻ 細胞は *talB*- 細胞から *pi3k2* 遺伝子をノックアウトすることで作製した。Blasticidin S 耐性遺伝子の入った *pi3k2* ノックアウトカセット断片を PCR によって増幅し、エレクトロポレーションによって細胞に導入した[7]。この時 PCR 断片の濃度は 1 μg ul⁻¹ で 15 μg をエレクトロポレーション時に使用した。細

胞は $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ blasticidin S の入った HL5 培地中でセレクションを行った。 *pi3k2* 遺伝子の破壊はクローン化後の細胞のゲノム DNA を抽出し、PCR 法によって確認した。

使用したプライマー F R

シーケンス名 : P2-1

配列 : TGAGTGAAGGAATTATATCACC

シーケンス名 : P2-4

配列 : TGACGAATATAGTCATAGTCC

Name	Direction	Sequence(5' to 3')
P2-1	F	TGAGTGAAGGAATTATATCACC
P2-4	R	TGACGAATATAGTCATAGTCC

これらの細胞株は各種蛍光プローブを遺伝子導入し、観察を行った。この時蛍光プローブを発現した細胞を維持するため、必要に応じて以下の薬剤を HL-5 培養液に添加した。

20 $\mu\text{g/ml}$ G-418

10 $\mu\text{g/ml}$ Blasticidin S

50 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B

使用した全ての細胞リストは下の表に示した。

Supplementary Table 2. Strain list.

Strain name	Genotype	Background	Source or reference
AX2		AX2	Lab stock
<i>talAΔ</i>	<i>talAΔ</i> (blar)	AX2	Tsujioka et al., 2004
<i>talBΔ</i>	<i>talBΔ</i> (hygr)	AX2	Tsujioka et al., 2004
<i>talAΔtalBΔ</i>	<i>talAΔ, talBΔ</i> (blar, hygr)	AX2	Tsujioka et al., 2008
<i>talBΔpi3k2Δ</i>	<i>talBΔ, pikBΔ</i> (blar, hygr)	AX2	This study
Flamindo2/AX2	(neor)	AX2	This study
Flamindo2, HistoneH2B-RFP/AX2	(neor, blar)	AX2	This study
Flamindo2/ <i>talBΔ</i>	<i>talBΔ</i> (hygr, neor)	AX2	This study
Flamindo2, HistoneH2B-RFP/ <i>talBΔ</i>	<i>talBΔ</i> (hygr, neor, blar)	AX2	This study This study
Flamindo2/ <i>talBΔpi3k2Δ</i>	<i>talBΔ, pikBΔ</i> (blar, hygr, neor)	AX2	This study
PH _{PKB} -eGFP /AX2	(neor)	AX2	This study
PH _{PKB} -eGFP / <i>talAΔ</i>	<i>talAΔ</i> (blar, neor)	AX2	this study
PH _{PKB} -eGFP / <i>talBΔ</i>	<i>talBΔ</i> (hygr, neor)	AX2	this study
PH _{PKB} -eGFP / <i>talAΔtalBΔ</i>	<i>talAΔ, talBΔ</i> (blar, hygr, neor)	AX2	this study

2.3 試薬とプラスミド

2.3.1 試薬

- LY294002

マウンド中の細胞の PI3K の活性を下げるために PI3K の阻害剤を使用した。PI3K の阻害剤として良く用いられている LY294002(Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, United States)を使用した(Vlahos et al. 1994)。試薬は DMSO(Wako)に溶解して-20°Cで保存したものを溶解して利用した。細胞に適用する時は、DMSO 濃度が高くなるないように Buffer で十分希釈された溶液を使用した。

2.3.2 プラスミド

- Flamindo2

細胞内の cAMP 濃度の変化を可視化するために、Flamindo2 蛍光プローブを使用した(Odaka et al. 2014)。細胞性粘菌用のプラスミド pHK12neo_Flamindo2 は森本博士(九州工業大学)によって構築された。細胞性粘菌における pHK12neo_Flamindo2 の使用例は既に報告されている(Hashimura et al. 2019)。Flamindo2 は Epac1 の cAMP 結合ドメインを黄色蛍光タンパク質シトリンに挿入しており、細胞内 cAMP 濃度が上昇すると蛍光強度が下がる。細胞性粘菌の多細胞体内での Flamindo2 の使用はすでに前例がある(Ohta et al. 2018)。Flamindo2 は遺伝子合成サービス(GenScript)で作製し、コドンユーセージを粘菌で効率よく発現するように変更している。ベクターは HK12neo で、actin 15 promoter 下で発現した。

- H2B-RFP

細胞の核を可視化し、細胞の動きを計測するために H2B-RFP を使った。pHistone2B-RFP は村本哲哉博士(東邦大学)より提供された。pHistone2B-RFP については既に報告されている((Fischer et al. 2004; Muramoto and Chubb 2008)。

• PHD-GFP

細胞膜に存在する PIP3 を可視化するために PH ドメインと緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein, GFP) との融合タンパク質を細胞に発現させた。PHD-GFP(pBIG_PHAkt/PKB-GFP) については既に報告されている (Asano, Nagasaki, and Uyeda 2008)。

PH ドメインは PIP3 を特異的に認識する (Lemmon 2007)。GFP と融合させることで、細胞内の PIP3 を検出するプローブとして働く (Parent and Devreotes 1999)。本研究では Akt/PKB 由来の PH ドメインを使用した (Tanaka et al. 1999)。

Supplementary Table 1. Plasmid list.

Plasmid name	Protein expressed	Tag	Backbone	Source or reference
Flamindo2	Flamindo2		pHK12(neo)	Hashimura et al., 2019
Histone2B-RFP	Histone2B	RFP	(bla)	Muramoto et al., 2008
PH _{PKB} -eGFP	PkbA(1-113)	eGFP	pBIG(neo)	Meili et al., 1999
Plasmid name	Disrupted gene	Cassette	Backbone	Source or reference
<i>pi3k2</i> ΔBSR	pi3k2	blasticidin S resistant	pCR4(ampr, kanr)	this study

2.3.3 顕微鏡システム

蛍光観察には共焦点レーザー顕微鏡システムを用いた。単細胞期の PIP3 局在観察には NikonA1R を、細胞の集団運動観察やその他の実験は Olympus FV1000 を使用した。顕微鏡本体やレーザー、ステージ等は付属のソフトウェアを用いて制御し、画像を取得した。画像は各ピクセル 12bit である。使用した共焦点顕微鏡システムと対物レンズを以下に示す。

Nikon A1R confocal laser scanning microscope system

制御ソフトウェア：NIS-ElementsC

- 100x Apo TIRF oil-immersion objective lens (NA = 1.49, Nikon, Tokyo, Japan)
- 60x Apo TIRF oil-immersion objective lens (NA = 1.49, Nikon, Tokyo, Japan)
- 40x Plan Fluor oil-immersion objective lens (NA = 1.30, Nikon, Tokyo, Japan)

Laser Diode

- 405、440、488、561、640

Olympus Fluoview FV1000 confocal laser scanning biological microscope

制御ソフトウェア：FV10-ASW4.2

- 60x PlanApoN oil-immersion objective lens (NA = 1.42, Olympus, Tokyo, Japan)
- 40x UPlanSApo objective lens (NA = 0.95, Olympus, Tokyo, Japan)
- 20x UPlanSApo objective lens (NA = 0.75, Olympus, Tokyo, Japan)
- 10x UPlanSApo objective lens (NA = 0.40, Olympus, Tokyo, Japan)

Laser Diode

- 405、473、559、635

2.4 細胞の発生処理

2.4.1 細胞の飢餓処理

実験を行う際はHL-5液体培地中で培養していた粘菌細胞をリン酸緩衝液中に移し飢餓状態にすることで発生段階への移行を誘導し、cAMPに対する走化性能を有した細胞を使った。対数増殖期の細胞を、シャーレの底にはりついたままの状態に培養液HL-5を全て吸い出し、リン酸緩衝液 Developmental Buffer (DB, 表 3.5) を入れ全体に行き渡らせた。静かにDBを吸い出し新たなDBを入れることで残余の培養液を洗い、マイクロピペットでピペッティングすることにより細胞をはがしてDB中に懸濁し、遠沈管に集めた。遠心機(2min 4°C 1500rpm)にかけて細胞を集めた後、細胞密度が 2×10^6 cells/mlになるように細胞をDBに懸濁した。この細胞懸濁液1mlを35mmのプラスチックシャーレ(35mm/Tissue Culture Dish, IWAKI)に入れ21°C恒温器で5時間静置した。5時間後、マイクロピペットで静かにピペッティングし、細胞を遠沈管に集めた。遠心機(2min 4°C 1500rpm)にかけて細胞を集めた後、細胞を1~2mlのDBに懸濁し、適当な細胞密度に調整した。細胞懸濁液は氷上で冷やしたエッペンドルフチューブに入れ、観察時まで保存した。caffeine等の薬剤を添加はこの時に行った。

表 3.5 Developmental Buffer (DB) pH6.5

Na ₂ HPO ₄	5mM
KH ₂ PO ₄	5mM
MgSO ₄	2mM
CaCl ₂	0.2mM

2.4.2 細胞の集団運動の観察に用いる細胞試料の準備

細胞の集団運動を観察するために、粘菌細胞を飢餓状態に誘導し、発生をマウンド期まで進めた。高い細胞密度の細胞懸濁液を無栄養寒天上に置いてから9-11 時間待ち、細胞が十分に密着した円状の形態のマウンドになってから顕微鏡観察を行った。

細胞を発生段階に誘導するために、「細胞の飢餓処理」と同様の方法で細胞を洗浄し、細胞密度が 5×10^7 cells/ml になるように細胞を DB に懸濁した。DB に1%の粉末寒天(松栄)を入れ、溶解したものを 35mm のプラスチックシャーレ (IWAKI)に 2ml 入れた。室温で 1-2 時間放置して寒天を固め、無栄養寒天プレートを作成した。細胞を LY294002 で処理する場合は、アガー中に薬剤を所定の濃度で添加した。

細胞密度を調節した細胞懸濁液を寒天上に 5ul ずつ置き、寒天プレート表面の水分が無くなるまでクリーンベンチ内で乾燥させた。無栄養寒天プレートのふたを閉じ、乾燥しないように湿室に入れ、21°Cで静置した。9-11 時間後にストリームが無くなった半球状のマウンドが出来たら、湿室から取り出し、観察を行った。

2.4.3 細胞の集団運動の観察用チャンバーの構築

細胞の集団運動を安定して観察するために、スペーサーを用いた観察用チャンバーの構築を行った(図 2-1)。観察用チャンバーの構築には、細胞性粘菌の移動体の観察に用いられる実験系(Dormann et al. 2002; Dormann et al. 2002)を参考にした。この実験系はカバーガラスの上にスペーサーを置き、その上に発生させたマウンドをアガーをひっくり返して置いた構造になっている。観察には、試料のドリフトを防ぐためにメタルチャンバー(Molecular Probes®)を使用した。また、Φ25mm 丸形カバーガラス(松浪)は 70%エタノールに入れ、超音波洗浄機であらかじめ洗浄しておく。まず、スペーサーとしてガラスの中心にビニールパッチシール(KOKUYO 内径 6mm)を貼った。ビニールパッチシールの厚さは 50um である。シールをガラスにしっかりと接着させた後、シールの穴に DB を 5ul 入れた。細胞を LY294002 で処理する場合は、この DB にも薬剤を所定の濃度で添加した。

細胞を発生させた寒天プレートを取り出し、細胞をドロップした部分のアガーを 8-10mm 四方に切り出した。切り出したアガーをひっくり返し、細胞を乗せ

た面とガラスが向かい合う様にシールの上に置いた。この時カバーガラスとアガーの間に空気が入って気泡が出来ないように注意した。その後、アガーの載ったガラスをメタルチャンバーに入れ、しっかりと固定する。さらにもう一枚のカバーガラスを使い、メタルチャンバーの上からふたをしてアガー部分が乾燥しないように密封した。

2.4.4 タイリング機能を使用した画像取得方法と顕微鏡観察時の注意点

多くの細胞を観察するために、広範囲にわたり高空間分解能の画像を得る必要がある。このため顕微鏡のステージをずらしながら複数の画像を取得し、最後に画像を連結する画像タイリング機能を使用した。1枚の画像は40倍または60倍の対物レンズで撮影するため、細胞内のPHD-GFP分子の局在が確認できる分解能を持つ。タイムラプス撮影は行わないため、各細胞にレーザーが照射されるのは1回だけとなる。このためレーザー照射による生細胞への光毒性の影響はほとんど考慮する必要がなく、レーザー強度を比較的強く設定することにより、鮮明なPHD-GFPの分布画像を得た。

粘菌細胞はガラス表面に沿って扁平な形をしているわけではなく、ガラス面から垂直な方向に厚みを持っている。そのため共焦点顕微鏡で画像を取得するとき焦点をどこにするか問題になる。この実験では細胞が接着しているガラス面と細胞上面の中間位置で、細胞の面積が一番広がっている所に焦点を合わせた。

得られた画像データからPIP3が細胞膜に集積している細胞の割合を求めるために、ある観察領域内でPIP3が細胞膜に集積している細胞としていない細胞の数をカウントした。画像データは画像解析ソフトウェアImageJで解析した。統計的に正確な値を得るために各caffeine濃度に対して500細胞についてPIP3の膜集積の有無を判定した。PHD-GFPの発現量が低くほとんど蛍光像が見えない細胞については解析から除外した。またサイズが小さすぎるものや形がいびつなものなど細胞と考えられないものも解析から除外した。

2.5 細胞追跡解析

マウンド中で運動している個々の細胞の運動を詳細に調べるために、細胞追跡解析を行った。細胞の追跡手法や運動の定量化については既に確立された方法を利用した(Litschko et al. 2018; Sato et al. 2007)。細胞の位置を特定するために Histone2B-RFP を発現させ、細胞核を可視化した。マウンド観察実験系を用い、5 秒間隔で 30 分間タイムラプス画像を取得した。その後、ImageJ を使いコントラスト調整と AVI 動画への変換を行った。細胞の追跡はラボで開発したソフトウェアを使用した。取得した位置情報の時系列データは Matlab 書いたプログラムを用いて解析した。細胞運動の特徴を表す指標として正味の速度 V と運動の効率 PL を、それぞれの軌跡で計算した。

速度 V は以下の式で計算した。

$$V = \frac{\sum_{i=1}^N \sqrt{(x_i - x_{i-1})^2 + (y_i - y_{i-1})^2}}{\Delta t}$$

ここで各時間での細胞の位置は (x_i, y_i) で表され、 N はそれぞれの軌跡のデータ点数を表す。

また、運動の効率は細胞が実際に移動した距離を始点と終点の距離で割った値として定義され、以下の式で計算した。

$$PL = \frac{\sum_{i=1}^N \sqrt{(x_i - x_{i-1})^2 + (y_i - y_{i-1})^2}}{\sqrt{(x_n - x_0)^2 + (y_n - y_0)^2}}$$

ここで、速度 V と同様に各時間での細胞の位置は (x_i, y_i) で表され、 N はそれぞれの軌跡のデータ点数を表す。

2.6 ドロップアッセイ

粘菌細胞の走化性能を調べるために、ドロップアッセイを行った(Cai et al. 2011; Iijima and Devreotes 2002; Konijn and Van Haastert 1987)。ドロップアッセイは細胞性粘菌の走化性研究で古くから用いられている手法で(Konijn 1970)、細胞が応答できる走化性濃度レンジを調べる事が出来る。疎水性アガー上に細胞と誘引物質のドロップレットを作製し、形成された濃度勾配に従って走化性を示すか否かを確認した。

まず、アガー(Wako)をミリ Q に溶かし、ろ過フィルター(IWAKI メンブレンフィルターシステム PES 0.22 μm)を用い余分な水分を取り除く。これを 10 回繰り返し、残ったものを疎水性アガーとして使用した。

実験の前に疎水性アガーを 0.7 %の濃度で DB に入れ、電子レンジで溶解した。さらに Caffeine を終濃度 4 mM になる様に加え、プラスチックディッシュに入れてアガープレートを作製した。

また、細胞は・・・の方法で 5 時間発生を進めておいたものを使用する。細胞をディッシュから集め、細胞密度 1×10^7 cells/ml に調節する。アガープレートの上に細胞懸濁液 1 μl と cAMP 溶液を対になる様にドロップレットを作製する。この時、cAMP と細胞のドロップレット間の距離は 2.5 mm とした。cAMP 濃度は 10 mM、1 mM、100 μM 、10 μM 、1 μM 、100 nM、10 nM、1 nM、の希釈系列を使用した。

ドロップレットを作製してから 30 分経過後に実体顕微鏡で細胞の応答を観察し、それぞれのドロップレットで走化性を示したか否かを調べた。この時の基準は、ドロップレット中の半分以上の細胞が cAMP 側の端に移動していた場合に走化性応答を示したと判定した。

2.7 Particle Image Velocimetry 解析

2.7.1 Particle Image Velocimetry 解析の原理と使用パラメータ

多細胞体中での細胞の集団運動を定量化するために、PIV(Particle Image Velocimetry)解析という手法を用いた(Adrian 2005)。

PIV 解析は、タイムラプス画像から物体の運動を計測する解析手法である。気体や液体などを扱う流体力学の分野で良く用いられ、変形を伴う複雑な対象物に対して利用される。原理としては、画像を Window に分割し画像のマッチングから次の時間にどこに移動したか計算し、各領域で速度ベクトルを得る。画像のマッチングに関しては以下の式で計算される。

$$x(s, t) = \frac{\sum_{j=0}^{N-1} \sum_{i=0}^{M-1} I_1(i, j) \cdot I_2(i - s, j - t)}{\sqrt{\sum_{j=0}^{N-1} \sum_{i=0}^{M-1} I_1(i, j)^2 + \sum_{j=0}^{N-1} \sum_{i=0}^{M-1} I_2(i - s, j - t)^2}}$$

ここで、 i, j は $M \times N$ の Window の各画素を表し、 s, t は Window 間のずれを表す。各変数の関係は Fig2-1 に示した。

実際の解析には Matlab (MathWorks Inc.)上で動作する MatPIV (Sveen 2004) software package version 1.6 を利用した。MatPIV は GNU General Public License で、様々な研究で広く利用されている(Poujade et al. 2007; Sepúlveda et al. 2013)。

また、PIV 解析に用いるパラメーターとしては、Window Size を 50um とし、Window 間のオーバーラップは通常良く用いられる 50% と設定した。比較する画像間の時間間隔は 15 秒とした。これをタイムラプス画像 30 分に渡り、自動的に順次 PIV 解析を行えるようにバッチ処理プログラムを作成した。

2.7.2 相関距離の計算

周りの細胞との運動の揃い具合を調べるために、PIV 解析で得られた速度ベクトル場から空間相関を計算した(Petitjean et al. 2010)。ベクトル場の x 要素を使い、縦横にデータ系列を取得する。データ系列それぞれで自己相関関数を計算し、全データから平均値と標準偏差 SD を得た。自己相関関数は以下の式で計算した。

$$ACF(x) = \frac{\sum_k^n (F(k) - \mu)(F(k+x) - \mu)}{n^2 \sigma^2}$$

ここで μ は平均値、 σ^2 は分散を表す。

得られた自己相関関数は $\exp(-r/\xi)$ にフィットされる。 r は距離を表し、 ξ は空間相関関数の特徴距離を表し、細胞運動の揃い具合の指標となる。以後、 ξ を相関距離(Correlation length)と呼ぶ。

2.7.3 Matlab プログラム

PIV 解析と相関距離の計算を自動的に多数の画像ファイルに対して計算するために Matlab を使い、計算プログラムを組んだ。解析で使った Matlab プログラムを付録 1 に示す。

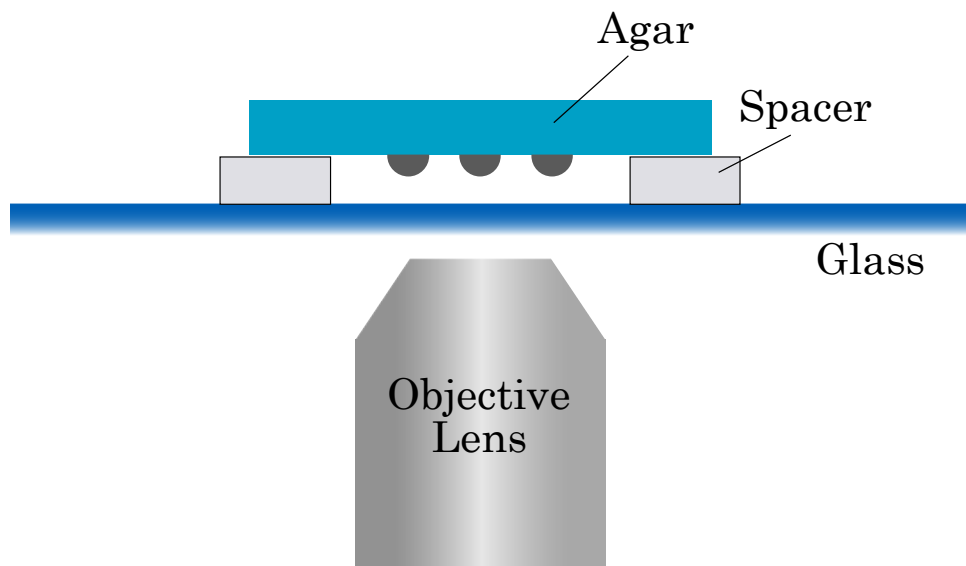


図1 マウンド観察実験系

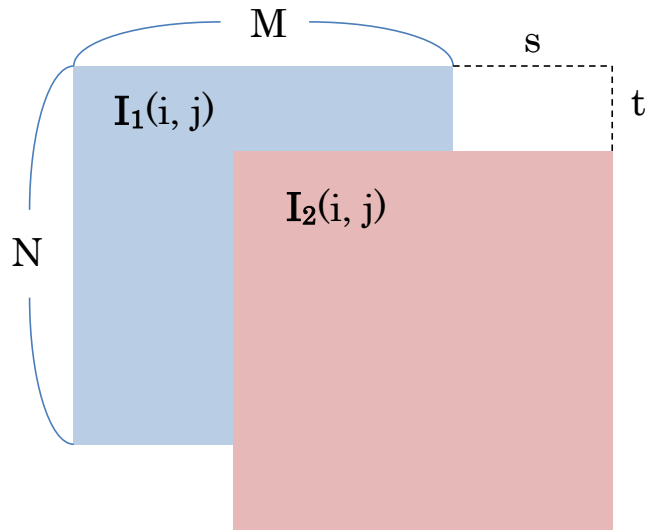


図 2 PIV 解析の原理の説明

ここで、 i, j は $M \times N$ の Window の各画素を表し、 s, t は Window 間のずれを表す。

3. 結果

3.1 細胞の集団運動の定量解析

細胞の集団運動における TalinB の役割を調べるために、*talB*-null 細胞のマウンドの観察を行った(図 3A)。細胞は核標識のためのヒストン H2B-RFP と cAMP インジケーターの Flamindo2 を発現した。そしてそれぞれの位置の cAMP 濃度と細胞の運動を解析した。マウンド期では野生型細胞は回転するように連続的に一方向に回るような運動を行う事が分かった(図 3 B)。しかし、*talB*-null 細胞はそれぞれがランダムな運動を示し、方向性を持った集団運動ができないことが分かった。次に、私は PIV 解析を適応して、集団運動中の細胞集団の流れについて可視化した。そしてそれぞれの細胞で、速度のベクトル場を得た(図 3 B)。矢印の向きはその領域の細胞の運動方向を示し、ヒートマップの色は運動の速度を表す。野生型細胞のマウンドでは一方向に回るようなベクトルの向きを示し、*talB*-null 細胞ではベクトルの向きがバラバラな方向を示している事が分かる。

定量的に運動の揃い具合を評価するために、速度ベクトルの空間相関係数を計算した(図 4A)。空間相関係数はベクトル場の縦横列 x 要素のデータ列を取得し、それぞれのデータ列で自己相関関数を計算した。距離を横軸に取ったグラフは、相関係数が 1 から距離が離れるに従って下がっていく。野生型細胞では長い距離でも高い相関係数を持つのにに対し、*talB*-null 細胞では短い距離で相関係数が下がってしまうことが分かる。このグラフより相関距離を求めると、野生型細胞は *talB*-null 細胞より長い相関距離を持つことが分かった(図 4A)。相関距離は速度ベクトルの空間相関係数を $\exp(-r/\xi)$ にフィットすることで計算し、 ξ は運動の揃い具合の指標として空間相関係数の特徴的な長さを表している。相関距離は速度ベクトルの空間相関係数の値が $1/e$ まで落ちた時の距離に相当する。図 4B は相関距離 ξ の時系列を示し、野生型細胞は 30 分間にわたり長い相関距離が保たれている。一方で *talB*-null 細胞は 30 分間にわたり相関距離が低い値を示し、方向の揃った集団運動が出来ていないことが分かる。30 マウンド以上のマウンドで計測を行った結果、相関距離の平均値は野生型細胞と *talB*-null 細胞でそれぞれ $44.9 \mu\text{m}$ と $7.70 \mu\text{m}$ であった(図 4C)。野生型細胞では大きなマウンドは大きな相関距離を示し、これは野生型細胞のマウンドでは全ての細胞が協調的に運動している事を表している(図 4C)。一方 *talB*-null 細胞のマウンドではマウンドサイズに関わらず、低い相関距離を示すのが分かる。

次に、取得した蛍光画像から核の追跡を行い、マウンド中のそれぞれの細胞の運動速度を計測した(図 5A)。細胞の運動速度は野生型細胞と *talB*-null 細胞でそれぞれ 6.60 ± 2.88 and 4.82 ± 1.33 $\mu\text{m}/\text{min}$ であった。これは *talB*-null 細胞のそれぞれの細胞の運動に大きな欠損が無いことを示している(図 5B)。しかしながら、細胞の運動の効率を調べると、*talB*-null 細胞は野生型細胞より効率が低いことが分かった(0.77 ± 0.22 vs 0.32 ± 0.19 $\mu\text{m}/\text{min}$)。これは、野生型細胞は直線的に効率よく運動することを示しており、*talB*-null 細胞は色々な方向に移動しランダムな運動を行うことが示している。これより TalinB は細胞性粘菌のマウンドで回るような集団運動に必要である事が分かった。

3.2 マウンド中での cAMP wave の観察と周期の定量解析

次に Flamindo2 の蛍光強度の変化を調べる事で cAMP の合成能を調べた。Flamindo2 プローブは *in vitro* の計測で、 EC_{50} は 3.2 μM 、ヒル係数は 0.95 で、 0.1 μM から 100 μM まで計測することができる。野生型の細胞は周期的な回転するような cAMP wave を示し、これは細胞の運動速度の変化と相関している(図 6A)。しかしながら、*talB*-null 細胞ではこのような cAMP wave は観察されず、cAMP の合成は多くても 30 分に一度程度しかない(図 6B)。

明確な cAMP 合成と速度の相関は *talB*-null 細胞では見られなかった。自己相関解析では野生型細胞は 4-7 分の周期性を持ち、*talB*-null 細胞では周期性を示さなかった(図 7AB)。これよりマウンド中での cAMP の周期的な伝搬には TalinB 分子が働くことが必要であることが分かった。

さらに我々は *talB*-null 細胞の個々の細胞での cAMP 合成能を調べるために、野生型の細胞に少しだけ *talB*-null 細胞を混合した(図 8A-C)。図 8A に示されている様に *talB*-null 細胞は野生型細胞のバックグラウンドのマウンドの中では周期的な cAMP wave を示すことが分かった。周期はおよそ 4-7 分程度であった(図 8D)。さらに分離した個々の *talB*-null 細胞は、野生型細胞と同様に cAMP 刺激に対して cAMP 応答を示すことが分かった(図 9A)。これより、TalinB はマウンド中で cAMP リレーの自己組織化に必要で、それぞれの細胞の化学物質の合成能は複数の細胞の振動ダイナミクスの生成を強調する。

3.3 マウンド中での PIP3 局在の観察

talB-null 細胞の cAMP リレーへのディフェクトは、PIP3 局在に異常があるかどうかという疑問を提起する。PIP3 は CRAC の制御を通じて cAMP リレーに欠かせない役割をする。細胞内の PIP3 の時空間的な振る舞いは EGFP を付けた pleckstrin homology domain の Akt/PKB の蛍光プローブで分かる。我々は以前の研究で PIP3 は外部刺激に関係なく、自己組織化ドメインを作る事を示した。

単細胞では、PH_{Akt/PKB}-EGFP は cAMP の一様な刺激に対して細胞質から細胞膜へ移行し、cAMP 勾配下では細胞前端の仮足に局在する。野生型のマウンドでは PH_{Akt/PKB}-EGFP は回転的な Wave を形成し、PH_{Akt/PKB}-EGFP はそれぞれの細胞の前端にリクルートされ、振動的になる。これは個々の細胞が cAMP wave にマウンド中で応答できることを示している(図 10A, B)。一方で *talB*-null 細胞ではマウンド中の個々の細胞膜への PH_{Akt/PKB}-EGFP の連続的なリクルートは見られず、cAMP リレーも見られない。これは PIP3 産生の過剰が *talB*-null 細胞で起こっている事を示している(図 10A, B)。

野生型の細胞はカフェイン濃度依存的にドメインを作るが、*talB*-null 細胞はカフェイン濃度に依存しない(図 11 A, B)。細胞性粘菌は TalinB の他に TalinA というホモログを持っている。*talB*-null 細胞と同様に両方をノックアウトした細胞は PIP3 が増大し、*talA*-null だけではカフェイン濃度依存性は変わらなかった。これらの結果から PIP3 産生は特に TalinB の活性によって抑制されている事が分かった。

3.4 PI3K シグナル伝達経路の変調による集団運動の回復

talB-null 細胞での PIP3 のコントロールの異常が cAMP リレー形成に影響を与えているかどうか確かめるために、我々は PI3K の活性を、PI3K2 遺伝子をノックアウトする事と PI3K 阻害剤 LY294002 を使う事で変調を掛けた。

TalinB と PI3K2 のダブルノックアウト細胞は、部分的に集団運動を回復した(図 12A, B)。PIV 解析と相関距離解析は複数の細胞が協調的に運動し、一時的に cAMP リレーが見られることを明らかにした(図 12A, B, C, D)。さらに 30 μ M LY294002 処理した時に *talB*-null 細胞は部分的に集団運動を cAMP リレーと同時に回復することを示した(図 13A, B, C)。これらの結果は *talB*-null 細胞での PIP3 レベルの減少が部分的にマウンドでの集団運動の回復に寄与したことを示している。

次に *talB*-null 細胞の走化性能についてドロップアッセイを用いて計測を行った。*talB*-null 細胞は高い cAMP 濃度レンジでの走化性にわずかに欠損があり、これは PI3K 活性を抑制すると完全に回復する(図 12F)。

これらの結果は TalinB は PI3K の活性をマウンド中で抑制していて、これが集団運動の自己組織化に少なくとも cAMP リレーと走化性を通じて寄与している事を示唆している。TalinB はルーズマウンドの時期から重要な役割を果たすため、これらの結果はマウンド中での細胞のパッキングでの力発生における TalinB のリクルートが必須であることを示唆している。

これにより、TalinB は細胞間接着の力発生、cAMP リレーによる化学的ガイダンス、集団運動における cAMP に対する走化性の 3 つを協調させる重要な分子であることが示唆された。これらのメカニズムは高等生物で解明されることが期待される。

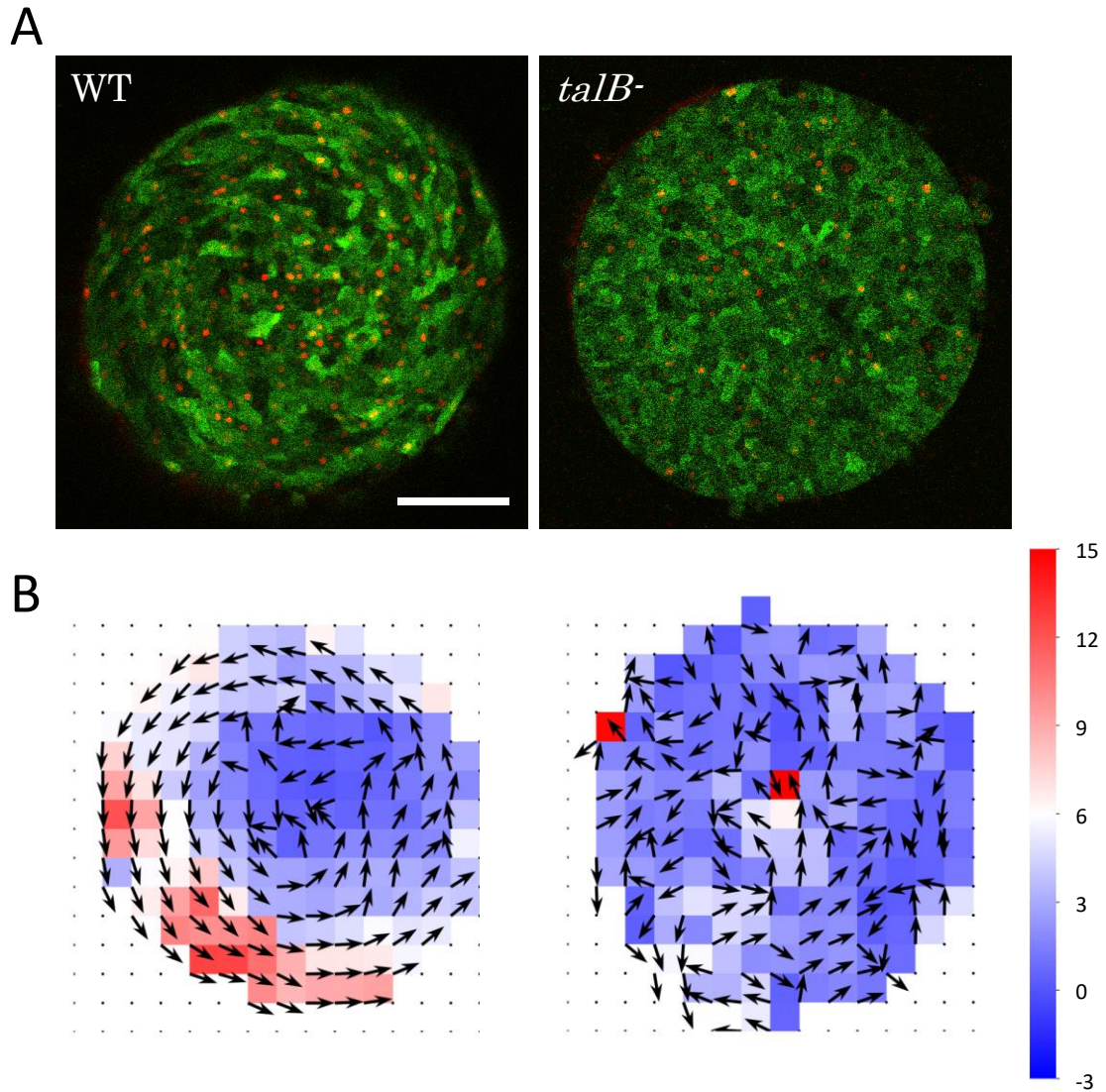


図3 マウンドでの集団運動の様子

(A). マウンド中で運動している細胞。左が野生型細胞(WT)のマウンド、右が *talB*-null 細胞 (*talB*) のマウンド。緑 : Flamindo2 の蛍光、赤 : H2B-RFP の蛍光。スケールバーは 50 μm 。

(B). (A) の画像の PIV 解析結果。矢印の向きは運動方向を表し、ヒートマップの色は運動の速度を表す。

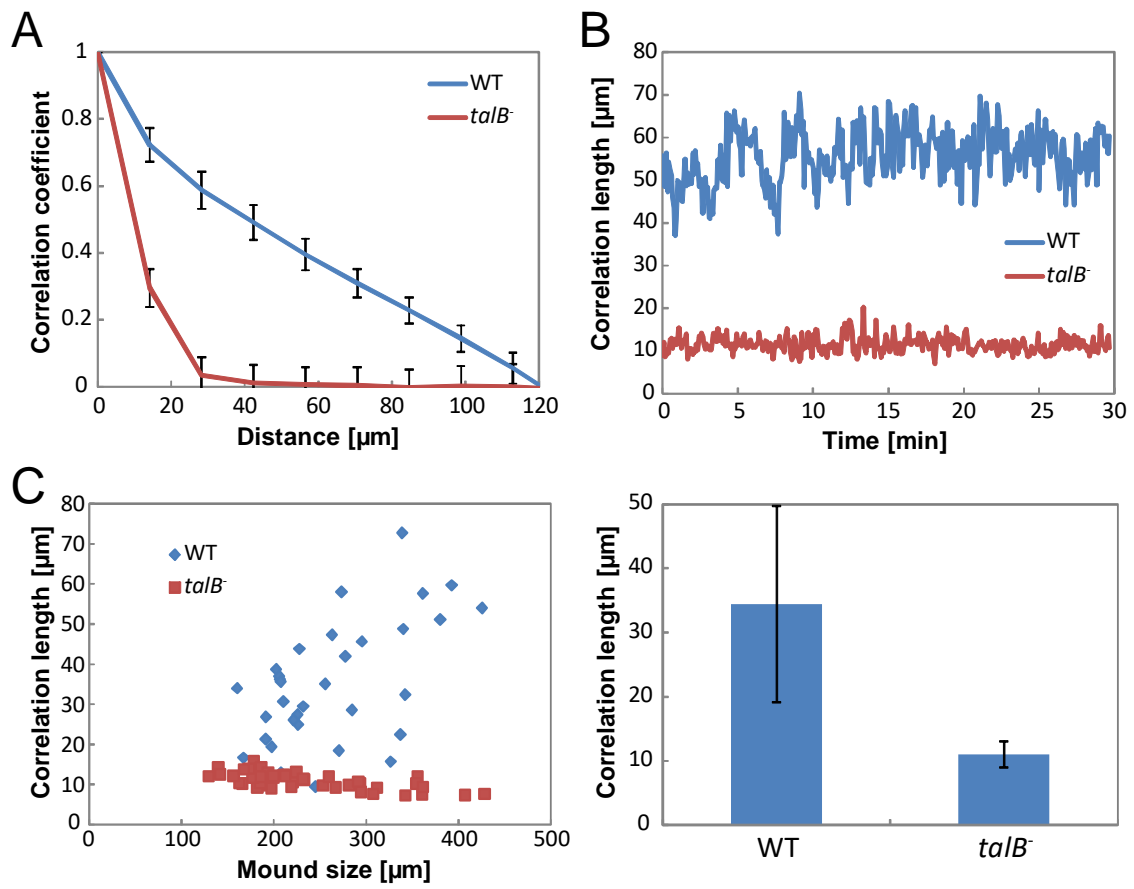


図4 相関距離解析の結果

(A). 速度ベクトルの空間相関関数、青が WT、赤が *talB*⁻ の30分間の平均値(mean \pm SD) (B). 相関距離の時系列 (C). マウンドサイズ-相関距離プロット

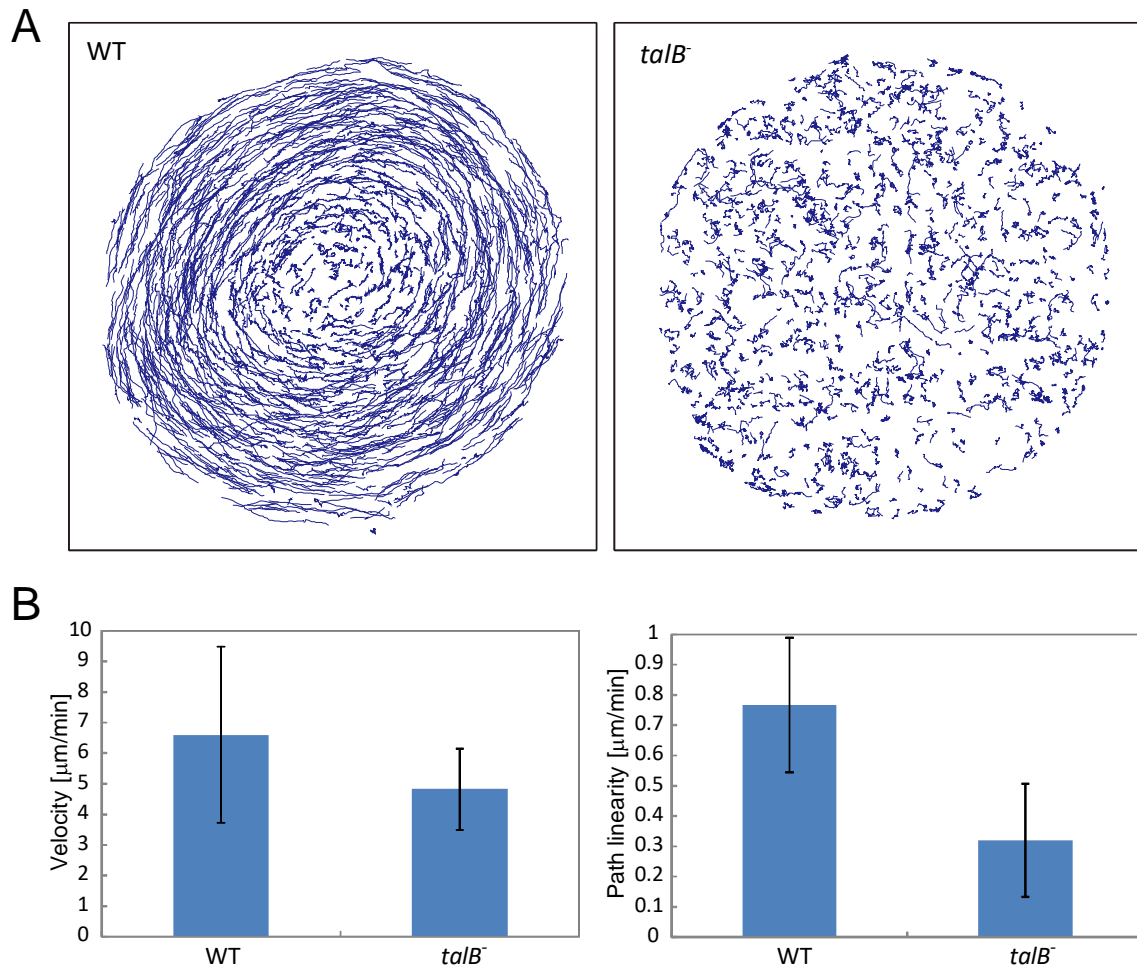


図 5 細胞追跡解析の結果

(**A**). マウンド中での 30 分間の細胞の軌跡をプロットした。左が野生型細胞のマウンド、右が *talB*-null 細胞のマウンド。(**B**). 追跡結果から速度と運動の効率を計算した。(mean \pm SD, WT : n = 1451 cells, *talB*⁻ : n = 1066 cells)

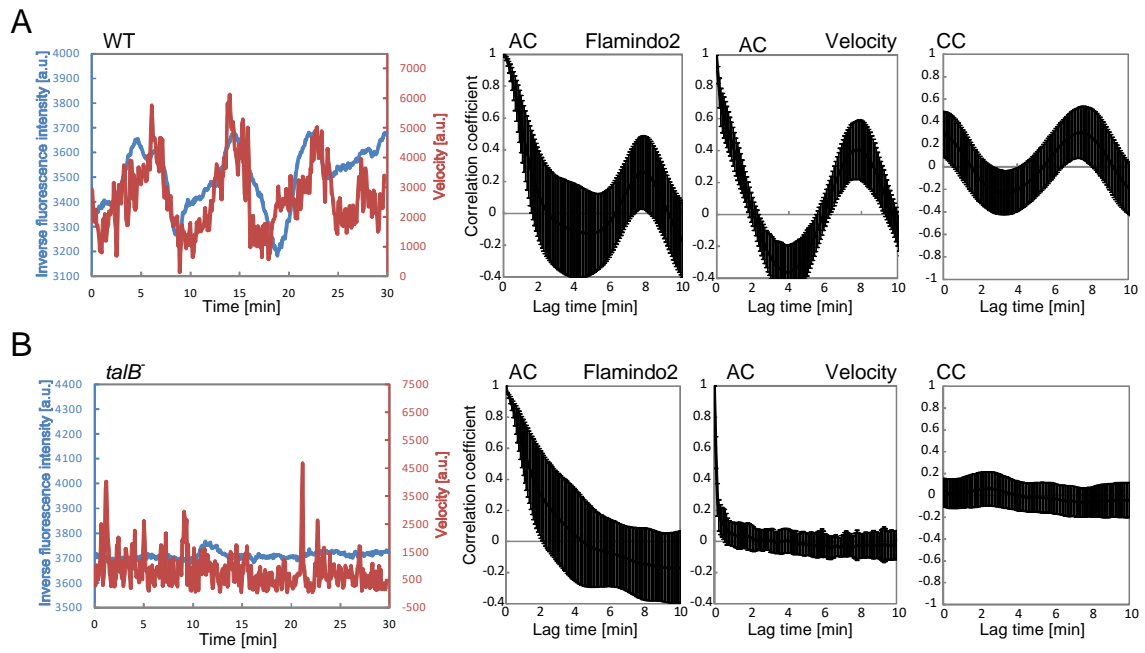


図6 cAMPwaveの周期解析

(A)(B). マウンドの一部での反転した Flamindo2 の蛍光強度と速度のプロット、自己相関関数(AC)と相互相関関数(CC)は全ての区画で算出した値をマウンド全体に渡り平均した (mean \pm SD)。

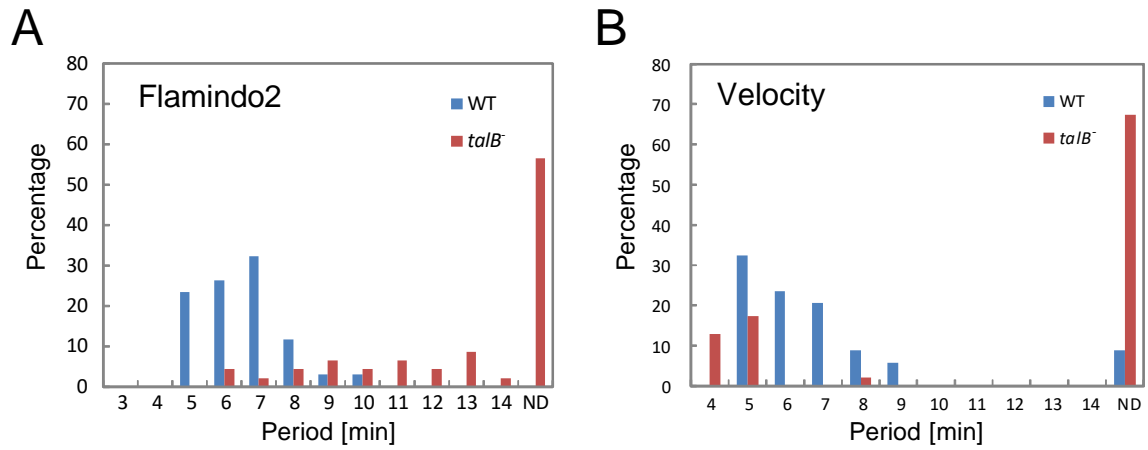


図7 cAMPwave の周期解析のヒストグラム

(A). 自己相関関数から算出された Flamindo2 の蛍光強度の周期、青が WT、赤が *talB*⁻、頻度分布は%表示(WT: n = 33, *talB*⁻: n = 34)(B). 自己相関関数から算出された速度の周期、青が WT、赤が *talB*⁻、頻度分布は%表示(WT: n = 33, *talB*⁻: n = 34)

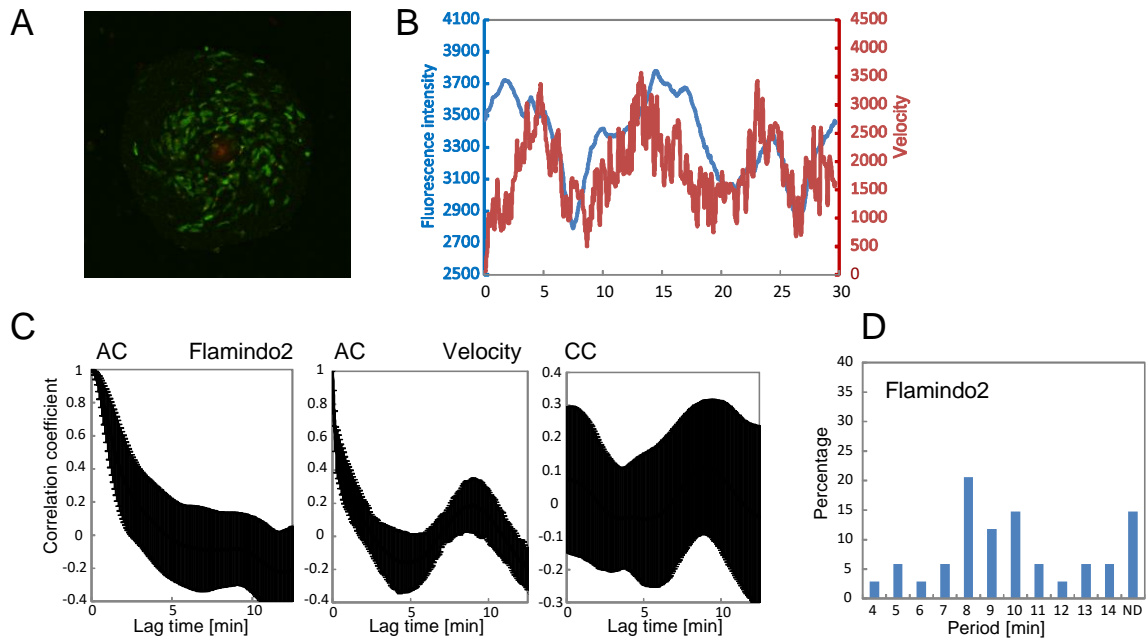


図8 *talB*-null 細胞と野生型細胞の混合マウスの解析

(A). *talB*-null 細胞と野生型細胞の混合マウスの画像(10% of *talB*⁻ cells with Flamindo2 and Histone2B-RFP in 90% of WT cells) (B). マウスの一部での反転した Flamindo2 の蛍光強度と速度のプロット (C). 自己相関関数(AC)と相互相関関数(CC)は全ての区画で算出した値をマウス全体に渡り平均した(mean ± SD)。 (D). 自己相関関数から算出された Flamindo2 の蛍光強度の周期、青が WT、赤が *talB*⁻、頻度分布は%表示(n = 30)

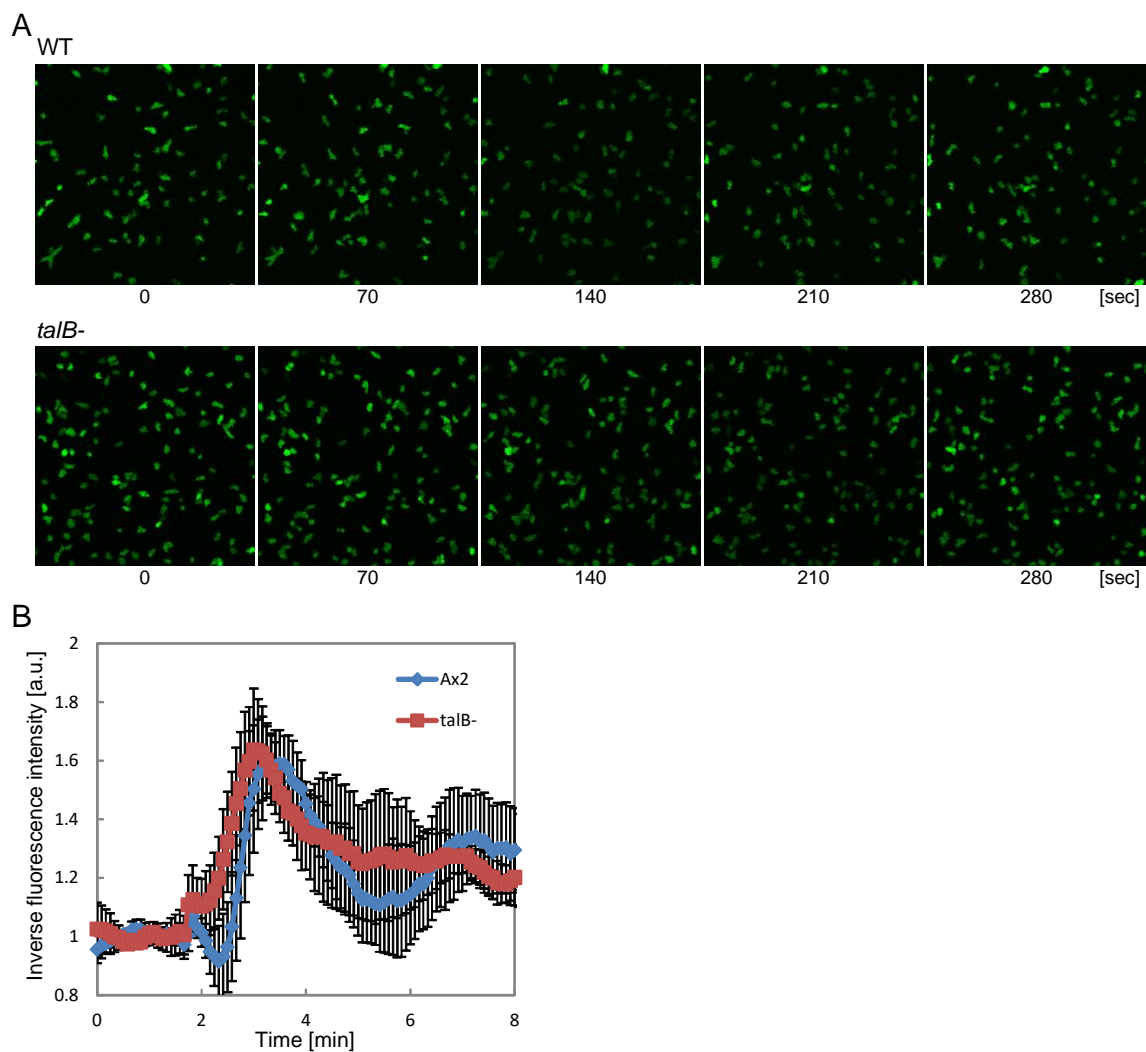


図9 単細胞期の cAMP 応答

(A). 野生型細胞と $talB$ -null 細胞の cAMP 刺激時の Flamindo2 蛍光強度変化。(B). 細胞領域での反転した Flamindo2 蛍光強度変化(mean \pm SD)。青が WT、赤が $talB^-$ 。(n = 3)

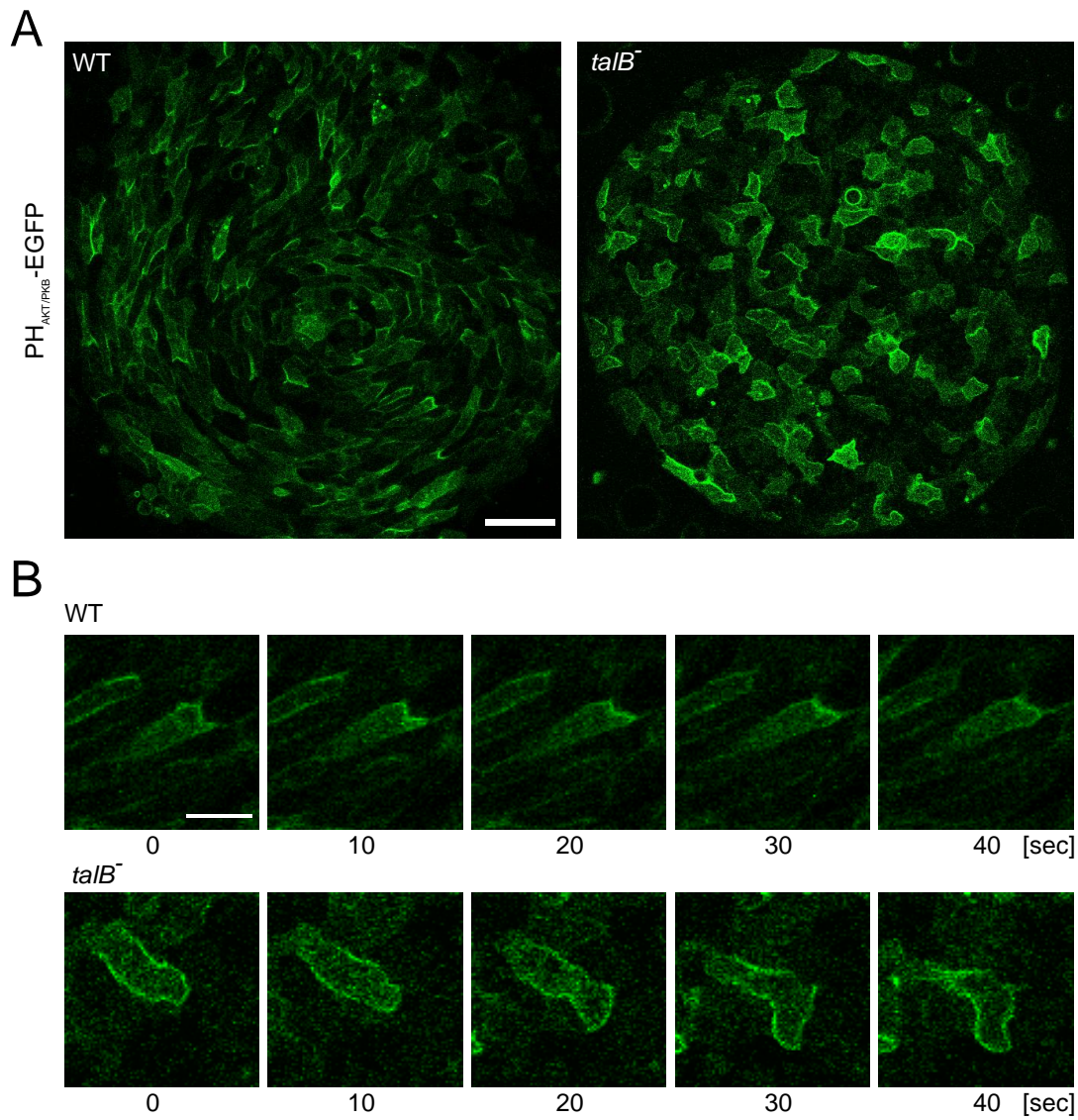


図 10 *talB*-null 細胞と野生型細胞のマウンド中での PIP3 局在

(A). マウンド中で運動している細胞の PIP3 局在、左が野生型細胞のマウンド、右が *talB*-null 細胞のマウンド、細胞は PH_{Akt/PKB}-EGFP を発現している。スケールバーは 30 μm. (B). 代表的な PH_{Akt/PKB}-EGFP 細胞内局在と時間変化、スケールバーは 10 μm.

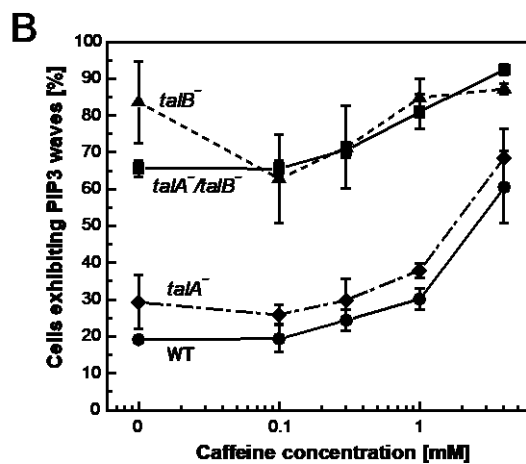
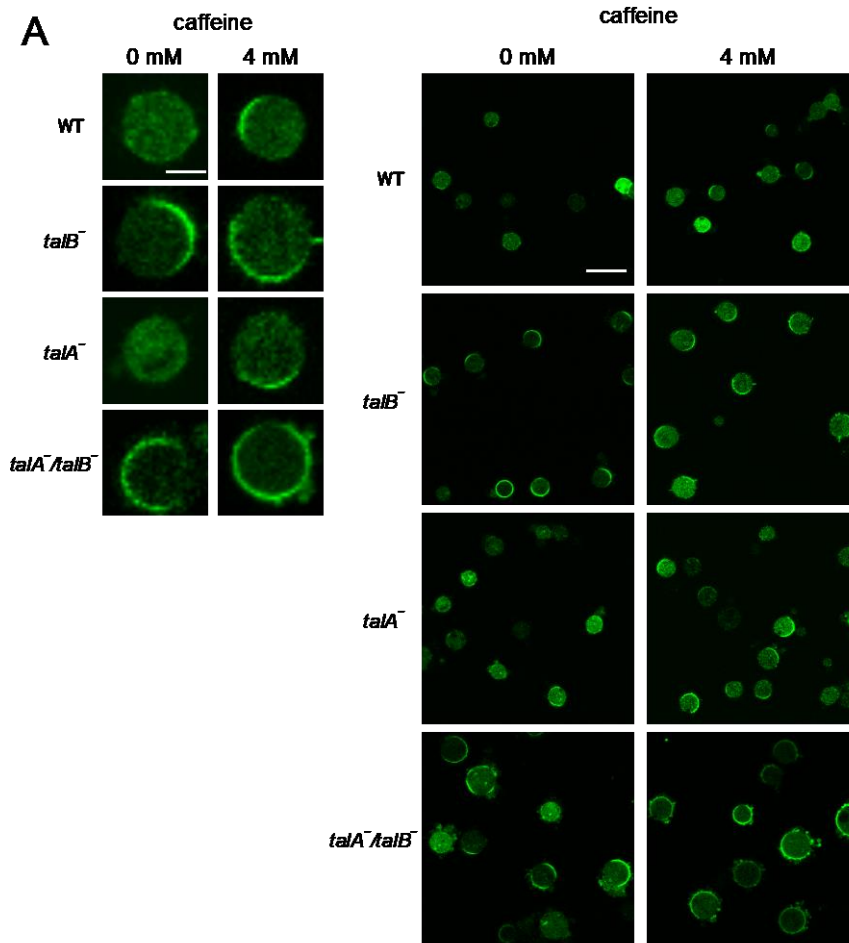


図 11 単細胞期の *talB*-null 細胞と野生型細胞の PIP3 局在

(A). LatrunculinA 処理した細胞の PIP3 局在の代表例、上から WT、*talB*⁻、*talA*⁻、*talA*⁻/*talB*⁻、細胞は PH_{Akt/PKB}-EGFP を発現している。スケールバーは 5 μm と 20 μm (B). PIP3 局在のカフェイン濃度依存性(WT、*talB*⁻、*talA*⁻、*talA*⁻/*talB*⁻)

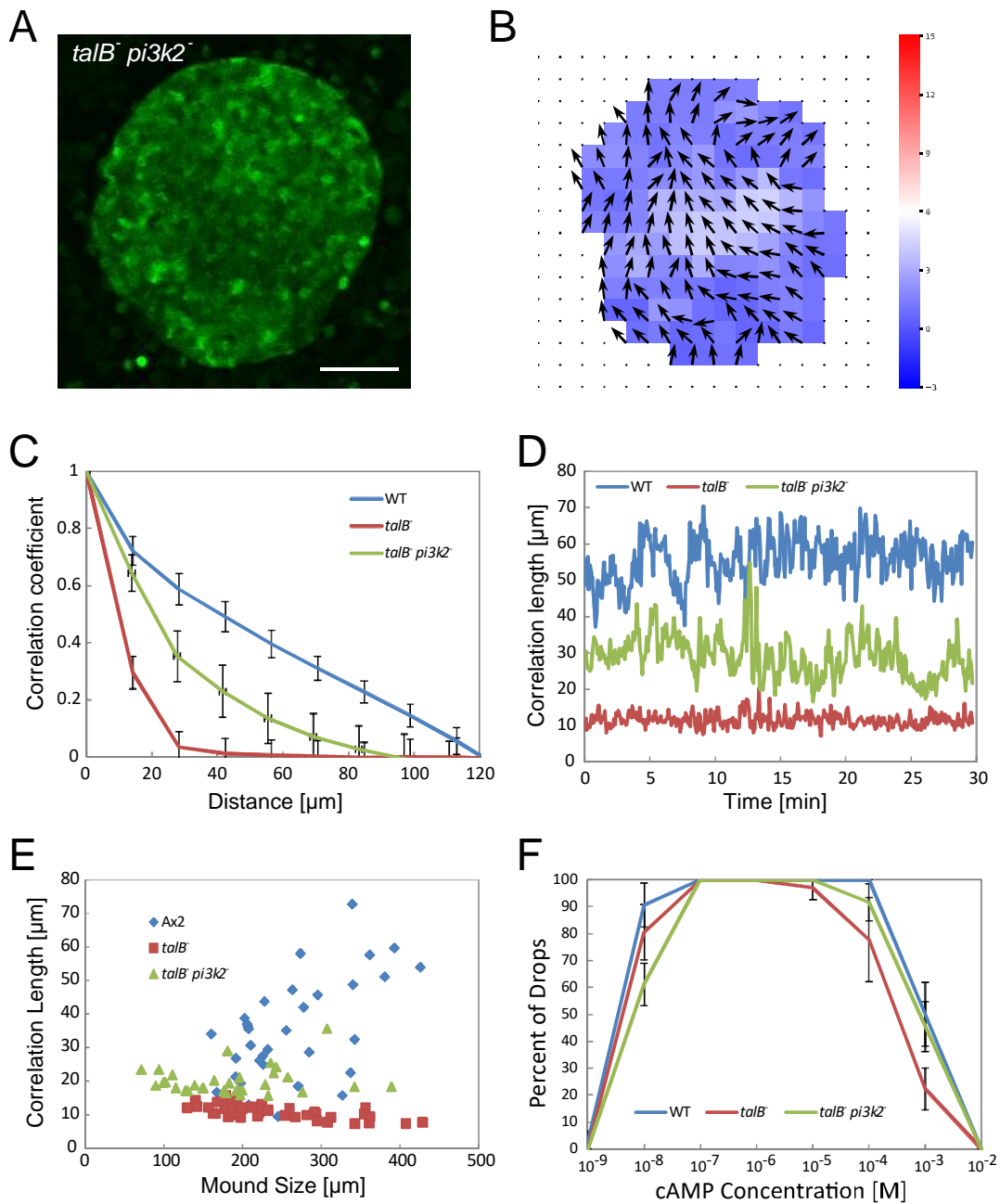


図 12 *talB*, PI3K2-null 細胞のマウンドの解析

(A). *talB*, PI3K2-null 細胞(*talB*⁻ *pi3k2*⁻)のマウンド。緑は Flamindo2 の蛍光、赤が H2B-RFP の蛍光を表す。スケールバーは 50 μm 。(B). *talB*⁻ *pi3k2*⁻ の PIV 解析結果。矢印は運動の方向を表し、ヒートマップの色は運動の速度を表す。(C). 速度ベクトルの空間相関関数、青が WT、赤が *talB*⁻、緑が *talB*⁻ *pi3k2*⁻ の 30 分間の平均値(mean \pm SD) (D). 相関距離の時系列 (E). ドロップアッセイの結果、%は全体から応答したドロップの割合を表す、cAMP 濃度は 1 nM から 10 mM。(mean \pm SD, n = 3)

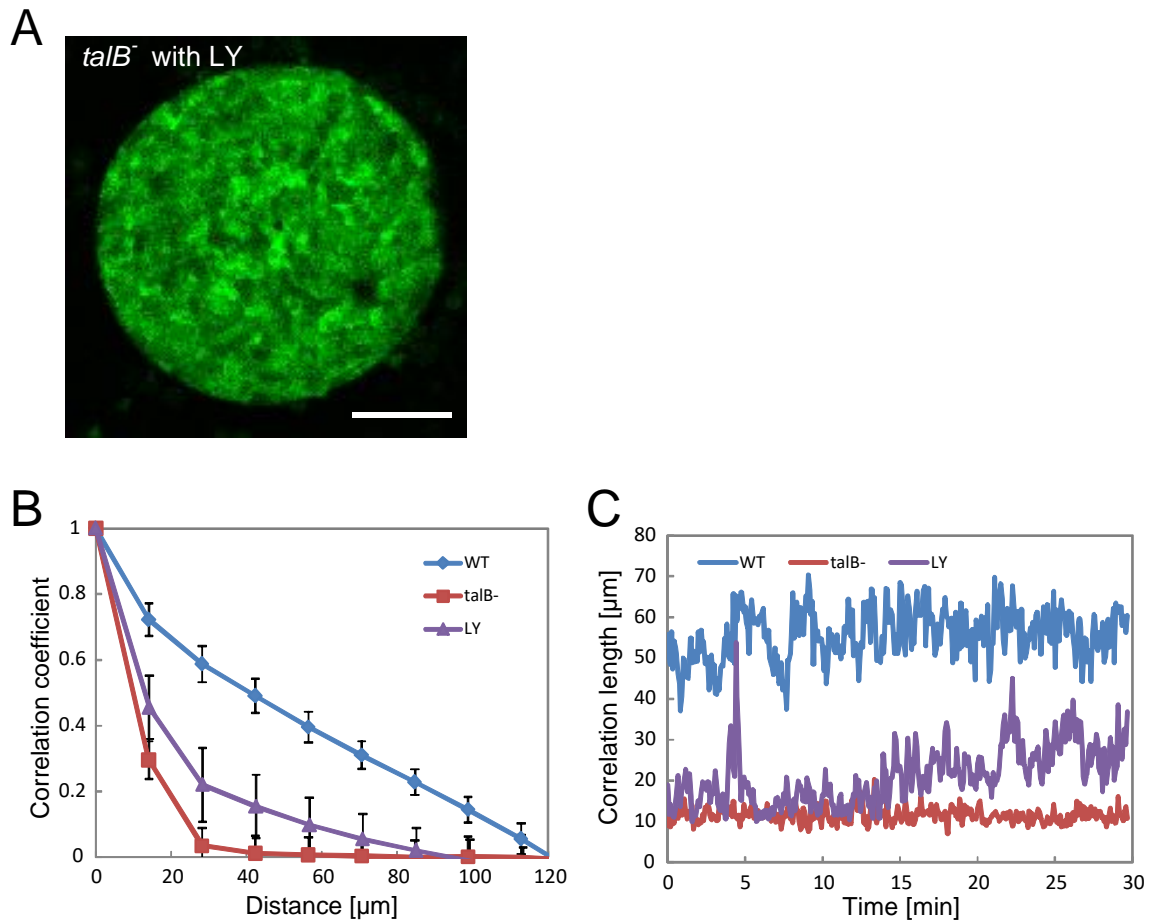


図 13 単細胞期の *talB*-null 細胞と野生型細胞の PIP3 局在

(A). LY294002 処理した *talB*-null 細胞(LY)のマウンド。緑は Flamingo2 の蛍光、赤が H2B-RFP の蛍光を表す。スケールバーは 50 μm 。(B). 速度ベクトルの空間相関関数、青が WT、赤が *talB⁻*、緑が LY294002 処理した *talB*-null 細胞の 30 分間の平均値(mean \pm SD) (D). 相関距離の時系列

4. 考察

4.1 研究結果のまとめ

本研究では細胞接着に重要な役割を果たす **TalinB** に着目し、その遺伝子破壊株で多細胞体マウンド中での細胞の集団運動を観察した。蛍光イメージングと新規に開発した定量解析法によって、この *talB* 破壊株では、周囲の細胞との協調性が失われ正常な集団運動が行えない事が示された。細胞性粘菌では細胞の集団運動に周期的な cAMP 波による時空間制御が必要であるが、*talB*-null 細胞はこの機能に欠損があった。さらに解析を進めると、*talB* 破壊株では細胞の運動制御に重要なイノシトールリン脂質代謝シグナルである PIP3 が膜上で過剰に蓄積している事が分かった。次に、PIP3 の過剰な蓄積を減らすため、*talB*-null 細胞に PIP3 産生酵素である PI3K の遺伝子破壊あるいは PI3K 阻害剤処理を行った。その結果、これらの処理によって *talB*-null 細胞は部分的に細胞の集団運動を回復することが分かった。これらの実験結果から、**TalinB** は膜上の PIP3 量を介して細胞間の cAMP シグナルリレーを調節し、適切な集団運動に寄与することが示唆された。

4.2 Rap1 経路を介した TalinB の PI3K シグナル伝達経路の制御の可能性

これまでの研究結果から、**TalinB** は PI3K シグナル伝達経路を介して細胞の集団運動を制御することが示唆された。しかし、その詳細な分子メカニズムは不明である。本研究では **TalinB** による PIP3 の抑制メカニズムが示唆されたが、その間に機能する分子が分かっていない。そこでこの分子メカニズムに関与する可能性のある候補分子を挙げ、議論していきたい。

以前の研究から、**TalinB** と **Rap1** という低分子量 G タンパク質の直接的な相互作用が報告されている(Direct Interaction between TalinB)。この報告では *in vitro* の実験系で **TalinB** と GTP 型の **Rap1** が直接結合する事が生化学的な実験から示されている。**Rap** は **Ras** ファミリーの低分子量 G タンパク質の一つで、接着やエキサイトーシス、分化、増殖に関わる事が知られている。細胞性粘菌でも **Rap1** が細胞運動や細胞接着のシグナルの制御に様々な重要な役割を果たす事が近年の研究成果で明らかになっている。

また Rap1 と PI3K の関係も先行研究により報告がある(Plak et al. 2016)。この報告によると GTP 型の Rap1 は PI3K シグナル伝達系を活性化し、膜状での PIP3 の量を上げる事が示唆されている。以上の事から TalinB から Rap1 そして PI3K という経路を想定することが出来る。

5. 引用文献

- Aceto, Nicola, Aditya Bardia, David T. Miyamoto, Maria C. Donaldson, Ben S. Wittner, Joel A. Spencer, Min Yu, et al. 2014. "Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis." *Cell* 158 (5): 1110–22.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.013>.
- Adrian, R. J. 2005. "Twenty Years of Particle Image Velocimetry." *Experiments in Fluids* 39 (2): 159–69. <https://doi.org/10.1007/s00348-005-0991-7>.
- Alcantara, F., and M. Monk. 1974. "Signal Propagation during Aggregation in the Slime Mould Dictyostelium Discoideum." *Journal of General Microbiology* 85 (2): 321–34.
<https://doi.org/10.1099/00221287-85-2-321>.
- Arai, Yoshiyuki, Tatsuo Shibata, Satomi Matsuoka, Masayuki J. Sato, Toshio Yanagida, and Masahiro Ueda. 2010. "Self-Organization of the Phosphatidylinositol Lipids Signaling System for Random Cell Migration." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (27): 12399–404.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0908278107>.
- Asano, Yukako, Akira Nagasaki, and Taro Q.P. Uyeda. 2008. "Correlated Waves of Actin Filaments and PIP 3 in Dictyostelium Cells." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 65 (12): 923–34. <https://doi.org/10.1002/cm.20314>.
- Bagorda, Anna, Vassil A. Mihaylov, and Carole A. Parent. 2006. "Chemotaxis: Moving Forward and Holding on to the Past." *Thrombosis and Haemostasis* 95 (1): 12–21.
<https://doi.org/10.1160/TH05-07-0483>.
- Bretschneider, Till, Florian Siegert, and Cornelis J. Weijer. 1995. "Three-Dimensional Scroll Waves of cAMP Could Direct Cell Movement and Gene Expression in Dictyostelium Slugs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (10): 4387–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4387>.
- Cai, Huaqing, Chuan Hsiang Huang, Peter N. Devreotes, and Miho Iijima. 2011. "Analysis of Chemotaxis in Dictyostelium." *Methods in Molecular Biology* 757: 451–68.

https://doi.org/10.1007/978-1-61779-166-6_26.

Calderwood, David A. 2004. "Integrin Activation." *Journal of Cell Science*. The Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/jcs.01014>.

Cocucci, S. M., and M. Sussman. 1970. "RNA in Cytoplasmic and Nuclear Fractions of Cellular Slime Mold Amebas." *Journal of Cell Biology* 45 (2): 399–407. <https://doi.org/10.1083/jcb.45.2.399>.

Critchley, David R. 2000. "Focal Adhesions - The Cytoskeletal Connection." *Current Opinion in Cell Biology*. Current Biology Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(99\)00067-8](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)00067-8).

Critchley, David R., and Alexandre R. Gingras. 2008. "Talin at a Glance." *Journal of Cell Science* 121 (9): 1345–47. <https://doi.org/10.1242/jcs.018085>.

Dormann, D, B Vasiev, and C J Weijer. 1998. "Propagating Waves Control Dictyostelium Discoideum Morphogenesis." *Biophysical Chemistry* 72 (1–2): 21–35. [https://doi.org/10.1016/s0301-4622\(98\)00120-3](https://doi.org/10.1016/s0301-4622(98)00120-3).

Dormann, Dirk, Gerti Weijer, Carole A Parent, Peter N Devreotes, and Cornelis J Weijer. 2002. "Visualizing PI3 Kinase-Mediated Cell-Cell Signaling during Dictyostelium Development." *Current Biology: CB* 12 (14): 1178–88. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00950-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00950-8).

Eichinger, I., J. A. Pachebat, G. Glöckner, M. A. Rajandream, R. Sugang, M. Berriman, J. Song, et al. 2005. "The Genome of the Social Amoeba Dictyostelium Discoideum." *Nature* 435 (7038): 43–57. <https://doi.org/10.1038/nature03481>.

Fey, Petra, Anthony S. Kowal, Pascale Gaudet, Karen E. Pilcher, and Rex L. Chisholm. 2007. "Protocols for Growth and Development of Dictyostelium Discoideum." *Nature Protocols* 2 (6): 1307–16. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.178>.

Firtel, R. A. 1995. "Integration of Signaling Information in Controlling Cell-Fate Decisions in Dictyostelium." *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/gad.9.12.1427>.

- Friedl, Peter. 2004. "Prespecification and Plasticity: Shifting Mechanisms of Cell Migration." *Current Opinion in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.11.001>.
- Friedl, Peter, and Stephanie Alexander. 2011. "Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity." *Cell*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.016>.
- Friedl, Peter, and Darren Gilmour. 2009. "Collective Cell Migration in Morphogenesis, Regeneration and Cancer." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm2720>.
- Funamoto, Satoru, Ruedi Meili, Susan Lee, Lisa Parry, and Richard A. Firtel. 2002. "Spatial and Temporal Regulation of 3-Phosphoinositides by PI 3-Kinase and PTEN Mediates Chemotaxis." *Cell* 109 (5): 611–23. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00755-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00755-9).
- Gregor, Thomas, Koichi Fujimoto, Noritaka Masaki, and Satoshi Sawai. 2010. "The Onset of Collective Behavior in Social Amoebae." *Science* 328 (5981): 1021–25. <https://doi.org/10.1126/science.1183415>.
- Gross, J.D., M.J. Peacey, and D.J. Trevan. 1976. "Signal Emission and Signal Propagation during Early Aggregation in Dictyostelium Discoideum." *Journal of Cell Science* 22 (3).
- Haastert, Peter J.M. Van, and Marten Postmay. 2007. "Biased Random Walk by Stochastic Fluctuations of Chemoattractant-Receptor Interactions at the Lower Limit of Detection." *Biophysical Journal* 93 (5): 1787–96. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.104356>.
- Haeger, Anna, Katarina Wolf, Mirjam M. Zegers, and Peter Friedl. 2015. "Collective Cell Migration: Guidance Principles and Hierarchies." *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.06.003>.
- Harburger, David S, and David A Calderwood. 2009. "Integrin Signalling at a Glance." *Journal of Cell Science* 122 (Pt 2): 159–63. <https://doi.org/10.1242/jcs.018093>.
- Hashimura, Hidenori, Yusuke V. Morimoto, Masato Yasui, and Masahiro Ueda. 2019. "Collective Cell Migration of Dictyostelium without CAMP Oscillations at Multicellular Stages." *Communications Biology* 2 (1). <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0273-6>.

- Hytönen, Vesa P., and Bernhard Wehrle-Haller. 2016. "Mechanosensing in Cell-Matrix Adhesions - Converting Tension into Chemical Signals." *Experimental Cell Research*. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.027>.
- Iijima, Miho, and Peter Devreotes. 2002. "Tumor Suppressor PTEN Mediates Sensing of Chemoattractant Gradients." *Cell* 109 (5): 599–610. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00745-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00745-6).
- Insall, Robert, Adam Kuspa, Pamela J. Lilly, Gad Shaulsky, Lonny R. Levin, William F. Loomis, and Peter Devreotes. 1994. "CRAC, a Cytosolic Protein Containing a Pleckstrin Homology Domain, Is Required for Receptor and G Protein-Mediated Activation of Adenylyl Cyclase in Dictyostelium." *Journal of Cell Biology* 126 (6): 1537–45. <https://doi.org/10.1083/jcb.126.6.1537>.
- Julia Sun, T., and P. N. Devreotes. 1991. "Gene Targeting of the Aggregation Stage CAMP Receptor CAR1 in Dictyostelium." *Genes and Development* 5 (4): 572–82. <https://doi.org/10.1101/gad.5.4.572>.
- Karnik, Sadashiva S., Camelia Gogonea, Supriya Patil, Yasser Saad, and Takanobu Takezako. 2003. "Activation of G-Protein-Coupled Receptors: A Common Molecular Mechanism." *Trends in Endocrinology and Metabolism*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2003.09.007>.
- Kim, Ji Yun, Peter Van Haastert, and Peter N. Devreotes. 1996. "Social Senses: G-Protein-Coupled Receptor Signaling Pathways in Dictyostelium Discoideum." *Chemistry and Biology*. Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(96\)90103-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(96)90103-9).
- Kim, Minsoo, Christopher V. Carman, and Timothy A. Springer. 2003. "Bidirectional Transmembrane Signaling by Cytoplasmic Domain Separation in Integrins." *Science* 301 (5640): 1720–25. <https://doi.org/10.1126/science.1084174>.
- Kimmel, Alan R., and Carole A. Parent. 2003. "The Signal to Move: D. Discoideum Go Orienteering." *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1085439>.
- Klein, Peter S., Tzeli J. Sun, Charles L. Saxe, Alan R. Kimmel, Ronald L. Johnson, and Peter N. Devreotes. 1988. "A Chemoattractant Receptor Controls Development in

- Dictyostelium Discoideum." *Science* 241 (4872): 1467–72.
<https://doi.org/10.1126/science.3047871>.
- Konijn, T M. 1970. "Microbiological Assay of Cyclic 3',5'-AMP." *Experientia* 26 (4): 367–69.
<https://doi.org/10.1007/bf01896891>.
- Konijn, T M, and P J Van Haastert. 1987. "Measurement of Chemotaxis in Dictyostelium." *Methods in Cell Biology* 28: 283–98. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)61652-0](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)61652-0).
- Lemmon, Mark A. 2007. "Pleckstrin Homology (PH) Domains and Phosphoinositides." *Biochemical Society Symposium*, no. 74: 81–93. <https://doi.org/10.1042/BSS0740081>.
- Litschko, Christof, Julia Damiano-Guercio, Stefan Brühmann, and Jan Faix. 2018. "Analysis of Random Migration of Dictyostelium Amoeba in Confined and Unconfined Environments." In *Methods in Molecular Biology*, 1749:341–50. Humana Press Inc.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7701-7_24.
- Mahadeo, Dana C., and Carole A. Parent. 2006. "Signal Relay During the Life Cycle of Dictyostelium." *Current Topics in Developmental Biology*.
[https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(05\)73004-0](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(05)73004-0).
- Meili, R, C Ellsworth, S Lee, T B Reddy, H Ma, and R A Firtel. 1999. "Chemoattractant-Mediated Transient Activation and Membrane Localization of Akt/PKB Is Required for Efficient Chemotaxis to CAMP in Dictyostelium." *The EMBO Journal* 18 (8): 2092–2105. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.8.2092>.
- Milligan, Graeme, and Evi Kostenis. 2006. "Heterotrimeric G-Proteins: A Short History." *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706405>.
- Muramoto, Tetsuya, and Jonathan R Chubb. 2008. "Live Imaging of the Dictyostelium Cell Cycle Reveals Widespread S Phase during Development, a G2 Bias in Spore Differentiation and a Premitotic Checkpoint." *Development* 135 (9): 1647–57.
<https://doi.org/10.1242/dev.020115>.
- Niewöhner, Jens, Igor Weber, Markus Maniak, Annette Müller-Taubenberger, and Günther Gerisch. 1997. "Talin-Null Cells of Dictyostelium Are Strongly Defective in Adhesion to

Particle and Substrate Surfaces and Slightly Impaired in Cytokinesis.” *Journal of Cell Biology* 138 (2): 349–61. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.2.349>.

Odaka, Haruki, Satoshi Arai, Takafumi Inoue, and Tetsuya Kitaguchi. 2014. “Genetically-Encoded Yellow Fluorescent CAMP Indicator with an Expanded Dynamic Range for Dual-Color Imaging.” Edited by Tsuyoshi Koide. *PLoS ONE* 9 (6): e100252. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100252>.

Ohta, Yusaku, Toshiaki Furuta, Takeharu Nagai, and Kazuki Horikawa. 2018. “Red Fluorescent CAMP Indicator with Increased Affinity and Expanded Dynamic Range.” *Scientific Reports*, no. January: 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20251-1>.

Parent, Carole A., Brenda J. Blacklock, Wendy M. Froehlich, Douglas B. Murphy, and Peter N. Devreotes. 1998. “G Protein Signaling Events Are Activated at the Leading Edge of Chemotactic Cells.” *Cell* 95 (1): 81–91. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81784-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81784-5).

Parent, Carole A, and Peter N Devreotes. 1999. “A Cell’s Sense of Direction.” *Science (New York, N. Y.)* 284 (5415): 765–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10221901>.

Petitjean, L., M. Reffay, E. Grasland-Mongrain, M. Poujade, B. Ladoux, A. Buguin, and P. Silberzan. 2010. “Velocity Fields in a Collectively Migrating Epithelium.” *Biophysical Journal* 98 (9): 1790–1800. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.01.030>.

Pitt, Geoffrey S., Nina Milona, Jane Borleis, Kenneth C. Lin, Randall R. Reed, and Peter N. Devreotes. 1992. “Structurally Distinct and Stage-Specific Adenylyl Cyclase Genes Play Different Roles in Dictyostelium Development.” *Cell* 69 (2): 305–15. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90411-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90411-5).

Plak, Katarzyna, Henderikus Pots, Peter J.M. Van Haastert, and Arjan Kortholt. 2016. “Direct Interaction between TalinB and Rap1 Is Necessary for Adhesion of Dictyostelium Cells.” *BMC Cell Biology* 17 (1). <https://doi.org/10.1186/s12860-015-0078-0>.

Plodinec, Marija, Marko Loparic, Christophe A. Monnier, Ellen C. Obermann, Rosanna Zanetti-Dallenbach, Philipp Oertle, Janne T. Hyotyla, et al. 2012. “The Nanomechanical Signature of Breast Cancer.” *Nature Nanotechnology* 7 (11): 757–65.

<https://doi.org/10.1038/nnano.2012.167>.

Poujade, M., E. Grasland-Mongrain, A. Hertzog, J. Jouanneau, P. Chavrier, B. Ladoux, A. Buguin, and P. Silberzan. 2007. "Collective Migration of an Epithelial Monolayer in Response to a Model Wound." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (41): 15988–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705062104>.

Prabhu, Yogikala, and Ludwig Eichinger. 2006. "The Dictyostelium Repertoire of Seven Transmembrane Domain Receptors." *European Journal of Cell Biology*. Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2006.04.003>.

Rees, D. J.G., Sarah E. Ades, S. J. Singer, and Richard O. Hynes. 1990. "Sequence and Domain Structure of Talin." *Nature* 347 (6294): 685–89. <https://doi.org/10.1038/347685a0>.

Rietdorf, Jens, Florian Siegert, and Cornelis J. Weijer. 1996. "Analysis of Optical Density Wave Propagation and Cell Movement during Mound Formation in Dictyostelium Discoideum." *Developmental Biology* 177 (2): 427–38. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0175>.

Sasaki, Atsuo T., Cheryl Chun, Kosuke Takeda, and Richard A. Firtel. 2004. "Localized Ras Signaling at the Leading Edge Regulates PI3K, Cell Polarity, and Directional Cell Movement." *Journal of Cell Biology* 167 (3): 505–18. <https://doi.org/10.1083/jcb.200406177>.

Sasaki, Atsuo T., Chris Janetopoulos, Susan Lee, Pascale G. Charest, Kosuke Takeda, Lauren W. Sundheimer, Ruedi Meili, Peter N. Devreotes, and Richard A. Firtel. 2007. "G Protein-Independent Ras/PI3K/F-Actin Circuit Regulates Basic Cell Motility." *Journal of Cell Biology* 178 (2): 185–91. <https://doi.org/10.1083/jcb.200611138>.

Sato, Masayuki J., Michihito Ueda, Hiroaki Takagi, Tomonobu M. Watanabe, Toshio Yanagida, and Masahiro Ueda. 2007. "Input-Output Relationship in Galvanotactic Response of Dictyostelium Cells." *BioSystems* 88 (3): 261–72. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2006.06.008>.

Sepúlveda, Néstor, Laurence Petitjean, Olivier Cochet, Erwan Grasland-Mongrain, Pascal Silberzan, and Vincent Hakim. 2013. "Collective Cell Motion in an Epithelial Sheet

Can Be Quantitatively Described by a Stochastic Interacting Particle Model.” *PLoS Computational Biology* 9 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002944>.

SIEGERT, FLORIAN, and CORNELIS WEIJER. 1989. “Digital Image Processing of Optical Density Wave Propagation in Dictyostelium Discoideum and Analysis of the Effects of Caffeine and Ammonia.” *Journal of Cell Science* 93 (2).

Sussman, R, and M Sussman. 1967. “Cultivation of Dictyostelium Discoideum in Axenic Medium.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 29 (1): 53–55. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(67\)90539-6](https://doi.org/10.1016/0006-291x(67)90539-6).

Sveen, J Kristian. 2004. “An Introduction to MatPIV v . 1 . 6 . 1.” <https://doi.org/10.1.1.1028.6368>.

Swaney, Kristen F., Chuan-Hsiang Huang, and Peter N. Devreotes. 2010. “Eukaryotic Chemotaxis: A Network of Signaling Pathways Controls Motility, Directional Sensing, and Polarity.” *Annual Review of Biophysics* 39 (1): 265–89. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.093008.131228>.

Tanaka, Kenichi, Hiroyuki Adachi, Hiroaki Konishi, Akihiro Iwamatsu, Katsuya Ohkawa, Toshiyuki Shirai, Satoshi Nagata, Ushio Kikkawa, and Yasuhisa Fukui. 1999. “Identification of Protein Kinase b (Pkb) as a Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Binding Protein in Dictyostelium.” *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 63 (2): 368–72. <https://doi.org/10.1271/bbb.63.368>.

Tepass, Ulrich. 2009. “FERM Proteins in Animal Morphogenesis.” *Current Opinion in Genetics and Development*. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.05.006>.

Theveneau, Eric, and Roberto Mayor. 2013. “Collective Cell Migration of Epithelial and Mesenchymal Cells.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 70 (19): 3481–92. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1251-7>.

Tomchik, K., and P. Devreotes. 1981. “Adenosine 3',5'-Monophosphate Waves in Dictyostelium Discoideum: A Demonstration by Isotope Dilution--Fluorography.” *Science* 212 (4493): 443–46. <https://doi.org/10.1126/science.6259734>.

Tsujioka, M., L. M. Machesky, S. L. Cole, K. Yahata, and K. Inouye. 1999. "A Unique Talin Homologue with a Villin Headpiece-like Domain Is Required for Multicellular Morphogenesis in Dictyostelium." *Current Biology* 9 (7): 389–94.

[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80169-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80169-9).

Tsujioka, Masatsune, Kunito Yoshida, and Kei Inouye. 2004. "Talin B Is Required for Force Transmission in Morphogenesis of Dictyostelium." *EMBO Journal* 23 (11): 2216–25.

<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600238>.

Tsujioka, Masatsune, Kunito Yoshida, Akira Nagasaki, Shigenobu Yonemura, Annette Müller-Taubenberger, and Taro Q.P. Uyeda. 2008. "Overlapping Functions of the Two Talin Homologues in Dictyostelium." *Eukaryotic Cell* 7 (5): 906–16.

<https://doi.org/10.1128/EC.00464-07>.

Vlahos, C. J., W. F. Matter, K. Y. Hui, and R. F. Brown. 1994. "A Specific Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase, 2-(4-Morpholinyl)- 8-Phenyl-4H-1-Benzopyran-4-One (LY294002)." *Journal of Biological Chemistry* 269 (7): 5241–48.

Watts, By D J, and J M Ashworth. 1970. "Growth of Myxamoebae of the Cellular Slime Mould Dictyostelium Discoideum in Axenic Culture." *Biochem J* 119 (2): 171–74.

<https://doi.org/10.1042/BJ1190171>.

Weijer, Cornelis J. 2009. "Collective Cell Migration in Development." *Journal of Cell Science*.

<https://doi.org/10.1242/jcs.036517>.

6. 付録

解析に利用したプログラムを示す。

```
%-----メイン関数ファイル名と同じ名前にする。
-----
function aMixPIVACCCFfun_170608()
% 自動で.mat ファイルのあるフォルダを検索(mat というセル配列に情報を入れる)。
folderName =
fullfile('C:¥Users¥yama-mouse¥Documents¥MATLAB¥180406Mix_WinSize¥0902Mix
_Results1012¥0902Mix_ImgSeq'); % 現在のフォルダの下に imgData というフォルダ作っ
ておく。そこを調べる。

ldirs = genpath(folderName); % folderName 以下のサブフォルダを取得
ldirs = [';' ldirs]; % 取得した文字列の一番初めに;を付け足す。区切り用
sepidx = strfind(ldirs, ';'); % ;のあった文字番号を取得。文字列をを区切る。
for i = 1:size(sepidx, 2) -1
    gpath{i} = ldirs(sepidx(i)+1:sepidx(i+1)-1); % gpath というセル配列にサブフォ
ルダのパスを入れる
end
j = 1; % ファイルの数カウントアップ用
for i = 1:size(gpath, 2) % サブフォルダの数だけ回す
    fpathcur = dir([gpath{i} '¥aImgRaw*.mat']); % 各サブフォルダでファイルを探す。
    あったら fpathcur に入れる。
    if size(fpathcur, 1)>0
        for f = 1:size(fpathcur, 2)
            mmMat.folder{j} = gpath{i}; % mMat.folder にファイルの入っているフォル
            ダ名を入れる
            mmMat.full{j} = [gpath{i} '¥' fpathcur(f).name]; % ファイル名も含めた fullpath
            を取得
            mmMat.file{j} = fpathcur(f).name; % ファイル名だけ
            j = j+1;
        end
    end
end
end
```

```

clear folderName ldirs sepidx gpath fpathcur i j f

for i=1:size(mmMat.folder, 2)
    % この関数で.mat ファイルを読み込んで処理して。元の場所に結果をコピーする。
    [fpName] = ProcAndCopy(mmMat.full{i}, mmMat.folder{i}); % フォルダーPath
    と読み込む.mat ファイルの名前を与える。

    % 結果.mat ファイルのコピー。ここでコピーすればコピー先フォルダーとかを.mat に入れなくて
    すむ。
    copyfile('aPeriod_ACFCCF_result.mat', mmMat.folder{i}); %

end
end

%-----実際の処理部分。PIV 解析、Fla2 の ACF 解析、PIV の ACF 解析、CCF の解析----別
にした方がフォルダ情報とか保存しなくてすむ。
% 読み込むと同じ変数が合った場合上書きされるので注意。特にパス。
function [fpName] = ProcAndCopy(currObjFull, currObjFolder)
    %-----.mat ファイルの読み込みと画像のコピー-----
    load(currObjFull); % .mat ファイルを読み込む
    copyfile([currObjFolder '¥C2-*'], pwd); % サブフォルダ内の C2-...というファイル全
    部を現在のフォルダー(pwd)にコピー

    % 初期値設定
    intTime = 5; % インターバルタイムの設定。[sec]
    %-----実際の処理部分。PIV 解析、Fla2 の ACF 解析、PIV の ACF 解析、CCF の解析----
    % PIV 処理を実行。10min 程度かかる
    [VecField_u, VecField_v, mat_x, mat_y] = piv(WindowSize); % PIV 処理を実行。
    10min 程度かかる

    % WindowSize の長さを計算。グラフ描いたり後で使う。PIV 処理が終われば計算できる。
    PixelinWindow = imgSize / size(VecField_u, 1); % ベクトル場 1 つ当たり何 pixel
    か。PixelinWindow
    LengthWindow = PixelinWindow * PixelSize; % 1 つの区画が何 um か。
    LengthWindow

```

```

meshNum = size(VecField_u, 1); % メッシュの数。19 個。

% PIV 解析の ACF とその平均値の計算
[ACF_PIV_dis, MeanACF_PIV_dis, StdACF_PIV_dis, meanAC] =
pivDisACF(VecField_u);
pivDisACFGraph(imgSize, PixelSize, VecField_u, MeanACF_PIV_dis,
StdACF_PIV_dis); % グラフ化

% 各時間で exp 関数にフィット
[Fitted_Le, Fitted_L2, CorrLength_1_e, CorrLength_1_2] =
pivDisACFFit(meanAC, LengthWindow, intTime);
% 相関距離をマウンドサイズで割り算する。
[Fitted_Le_dMS, Fitted_L2_dMS, CorrLength_1_e_dMS, CorrLength_1_2_dMS]
= pivDisACF_dMS(Fitted_Le, Fitted_L2, intTime, MoundSize);

% PIV 処理のレポートを作成
pivReport(H2BiFileList, MoundSize, PixelSize, imgSize, WindowSize, meshSize,
CorrLength_1_e, CorrLength_1_2, VecField_u, ...
LengthWindow, MeanACF_PIV_dis, StdACF_PIV_dis, intTime, Fitted_Le,
Fitted_L2, Fitted_Le_dMS, Fitted_L2_dMS, CorrLength_1_e_dMS,
CorrLength_1_2_dMS);

% cAMP の時系列を作る。結構時間かかる
[MeshImg_fla2, Fla2forAC, measuredMeshNum] = imgFla2Time(imgSize,
imgNum, ImgStack_fla2, meshNum, Projection, Mesh);
% cAMP 時系列の自己相関関数 AC の計算
[ACFcAMP, MeanFla2ACF, StdFla2ACF] = fla2ACF(Fla2forAC);
% cAMP 時系列の自己相関関数 AC のグラフ描画
cAMPacfGraph(MeanFla2ACF, StdFla2ACF, intTime);
% cAMP 時系列の自己相関関数 AC のピーク検出
[Period_Fla2, peaks_fla2] = peakFla2ACF(MeanFla2ACF, intTime);

% PIV の時系列を作る。
[VF_magnitude, VFMag_time] = imgPIVTime(VecField_u, VecField_v, mat_x,
mat_y, Projection, meshNum);
% PIV 時系列の自己相関関数 AC の計算

```

```

[ACF_PIV_time, MeanPIVACF, StdPIVACF] = pivACF(VFMag_time);
% PIV 時系列の自己相関関数 AC のグラフ描画
pIVacfGraph(MeanPIVACF, StdPIVACF, intTime);
% PIV 時系列の自己相関関数 AC のピーク検出
[Period_PIV, peaks_piv] = peakPIVACF(MeanPIVACF, intTime);

% 相互相関の計算
[CCFcAMPVelo, MeanCCF, StdCCF] = ccfAMPVelo(Fla2forAC, VFMag_time);
% 相互相関 CCF のグラフ描画
ccfGraph(MeanCCF, StdCCF, intTime);
% 相互相関 CCF のピーク検出
[firstPeak_CCF, secondPeak_CCF, peaks_ccf] = peakCCF(MeanCCF, intTime);
% ACF と CCF 解析のレポートを作成
acfccfReport(H2BiFileList, Period_Fla2, intTime, meshNum, measuredMeshNum,
Period_PIV, firstPeak_CCF, secondPeak_CCF);
close all

%-----結果のファイルを元のサブフォルダにコピー-----
% PIV 解析結果のコピー
copyfile('ACF_PIV_dis.*', currObjFolder); %
copyfile('aCorrLength1_*.*, currObjFolder); % これで MS で割った時系列も2種類コ
ピーされる。計4種類のグラフ
copyfile('aCorrLength_result*', currObjFolder); % レポートの画像ファイル 2 つと結
果の text ファイルのコピー

% cAMP 解析グラフのコピー
copyfile('acAMP_ACF_bar*', currObjFolder); %
copyfile('acAMP_ACF_peak*', currObjFolder); %

% PIV 時系列解析グラフのコピー
copyfile('ACF_PIV_time*', currObjFolder); %
copyfile('ACF_PIV_time_peak*', currObjFolder); %

% 相互相関グラフのコピー
copyfile('acAMPVelo_CCF*', currObjFolder); %
copyfile('acAMPVelo_CCF_peak*', currObjFolder); %

```

```

copyfile('aPeriod_ACFCCF_result*', currObjFolder); %

% レポートのファイル名の作成。コピー用
FileList = dir(['*.tif']); % 現在のフォルダ内の拡張子が tif のファイルをリストアップ
fName = char(FileList(1).name); % char 型に変換
fName = strrep(fName, '.tif', ''); % ファイル名の ".tif" を "" に置き換える。削る。

apiv = 'aREPORT_PIV_';
fpName = [apiv fName '.jpg']; % 文字列の結合
accf = 'aREPORT_CCF_';
fcName = [accf fName '.jpg']; % 文字列の結合

% レポートのコピー
copyfile(fpName, currObjFolder); % PIV レポートの画像ファイルのコピー
copyfile(fcName, currObjFolder); % CCF レポートの画像ファイルのコピー
clear fName fName accf
delete('C2-*'); % 現在のフォルダの C2-... というファイルを全部削除

%-----相互相関(Flamindo2, PIV 運動速度)の結果を.mat ファイルに保存-----
clear currObjPath currObjFolder currObjFolder1 mMat % 保存前にフォルダー関連
のパス余計なの消しておく。
save('aPeriod_ACFCCF_result.mat')
end

%-----以下計算用の基本関数。
-----
-----

%-----PIV 処理をする関数。結果の配列を'aPIVResult.mat'に保存
-----
-----

function [VecField_u, VecField_v, mat_x, mat_y] = piv(WindowSize)
% 現在のフォルダ内の tif ファイルをリスト化する。
FileList = dir(['*.tif']); % 現在のフォルダ内の拡張子が tif のファイルをリストアップ

```

```

imgNum = size(FileList, 1); % 見つけた tif ファイルの数を取得
for i = 1 : imgNum-3
    % ファイル名の取得。
    FileName_now = char(FileList(i).name); % char 型に変換
    FileName_next = char(FileList(i+3).name); % char 型に変換

    % 実際に MatPIV 関数にファイル名を渡して処理する部分。
    [x,y,u,v,snr,pkh]=matpiv(FileName_next,FileName_now,
WindowSize,0.0012,0.5,'multi');

    % 結果の保存。(VecField_uにベクトル場のx座標を格納。iはフレーム番号。3次元の行列)。
    先にメモリ確保しても速度変わらない。
    VecField_u(:, :, i) = u;   VecField_v(:, :, i) = v;
end;
mat_x=x; mat_y=y; % 座標の保存。まあ一応
clear FileName_now FileName_next testImg u v i snr pkh x y
%save('aPIVResult.mat') % save .mat(ワークスペースの行列を保存)PIV 処理終わった段
階で保存した方がよい
end

%-----PIV 解析結果の距離の自己相関解析。平均と SD も計算。
-----
function [ACF_PIV_dis, MeanACF_PIV_dis, StdACF_PIV_dis, meanAC] =
pivDisACF(VecField_u)
% 事前の設定
F = size(VecField_u, 2); %データ長
t = 1; %タイムインターバル。[steps]。あんまり気にしなくてよい。便宜的に
lagT_max=F-1; % maximum of lag time [steps] in calculating autocorrelation

rr = 2 * size(VecField_u(:, :, 1), 1);
AC_temp_mean = zeros(rr,lagT_max+1); %配列確保
norAC = zeros(rr,lagT_max+1); %配列確保
ACF_PIV_dis = zeros(rr,lagT_max+1, size(VecField_u, 3)); %配列確保

% 外の for 文で全部のフレームについて処理を回す。

```

```

for kk = 1 : size(VecField_u, 3)
    % k 番目のフレームのベクトル場の x 座標を CurrVF に読み込む。
    CurrVF = VecField_u(:, :, kk);
    % 転置した行列も下に付け足して列方向も相関を計算する。
    VFforAC = [CurrVF; CurrVF'];
    % 全ての行で相関係数を計算。
    for i = 1 : rr
        VFforAC_temp = VFforAC(i, :); %それぞれの行を取得
        tVFforAC_temp = transpose(VFforAC_temp); %転置して縦並びのデータに。
        AC_temp=zeros(F, F);
        % ずらして掛け算。各 lag time で。
        for lagT=0:lagT_max % lag time [steps] ranging from 0 to lagT_max
            for k=1:F-lagT
                AC_temp(k, lagT+1)=tVFforAC_temp(k, 1) * tVFforAC_temp(k+lagT,
1);
            end
        end
        % 各 lag time での平均値を計算。F-t がデータの個数。確認する。
        for l=1:F
            AC_temp_mean(i, l)=sum(AC_temp(:, l))/(F-l+1);
        end
        C0 = AC_temp_mean(i, 1); %規格化定数の取得
        norAC(i, :) = AC_temp_mean(i, :)./C0; %結果全体を C0 で割る。
    end
    % 各フレームのデータ(AC)をまとめて ACF に保存。3 次元行列。3 番目はフレーム番号。
    ACF_PIV_dis(:, :, kk) = norAC;
end
clear F t lagT_max lagT CurrVF VFforAC VFforAC_temp tVFforAC_temp AC_temp
AC_temp_mean
clear rr norAC i k l kk C0

%-----PIV 解析ベクトル場の自己相関関数の mean, std の計算。-----
% meanAC の初期化
meanAC = zeros(size(ACF_PIV_dis, 3), size(ACF_PIV_dis, 2)); stdAC =
zeros(size(ACF_PIV_dis, 3), size(ACF_PIV_dis, 2));

```

```

% 各フレームごとに自己相関の平均値を計算。(meanAC の各行がそれぞれのフレームの AC の平均)
for i = 1 : size(ACF_PIV_dis, 3)
    meanAC(i, :) = mean(ACF_PIV_dis(:, :, i));
    stdAC(i, :) = std(ACF_PIV_dis(:, :, i));
end
MeanACF_PIV_dis = mean(meanAC); % データ全体の平均の計算。
StdACF_PIV_dis = std(meanAC); % データ全体の SD の計算。
clear stdAC i
end

%-----PIV 解析ベクトル場の自己相関関数の mean, std のグラフ化
-----
function pivDisACFGraph(imgSize, PixelSize, VecField_u, MeanACF_PIV_dis,
StdACF_PIV_dis)

PixelinWindow = imgSize / size(VecField_u, 1); % ベクトル場 1 つ当たり何 pixel か。
PixelinWindow
LengthWindow = PixelinWindow * PixelSize; % 1 つの区画が何 um か。LengthWindow

njiku = 0 : size(VecField_u, 1)-1; % x 軸の作成(データ番号で)
xjiku = njiku * LengthWindow; % x 軸の作成(実際の距離[um]で)
errorbar(xjiku, MeanACF_PIV_dis, StdACF_PIV_dis) % plot。バー付きグラフ描画。横軸
は実距離[um]
xlim([0 Inf])
clear njiku n xjiku

%-----PIV 解析ベクトル場の自己相関関数の mean, std のグラフ保存-----
saveas(gcf,'ACF_PIV_dis.bmp')
saveas(gcf,'ACF_PIV_dis.fig')
close(gcf)
end

```

```

%-----計算した自己相関を各時間で exp 関数にフィット。相関距離の算出。
-----
function [Fitted_Le, Fitted_L2, CorrLength_1_e, CorrLength_1_2] =
pivDisACFFit(meanAC, LengthWindow, intTime)
pMeanAC = meanAC; %右半分を取得。データの
loop = size(pMeanAC, 1); % ループ回数の取得
Fitted_Le = zeros(loop, 1); % 配列確保
Fitted_L2 = zeros(loop, 1); % 配列確保
% フィット
for i= 1:loop
    Data = pMeanAC(i, :);
    % ある値(0.02)まで落ちる配列を見つけて番号を取得
    th = find(Data<0.02, 1) -1;
    %th = min(find(Data<0.02)) -1;
    % th までの自己相関関数の値を取ってくる
    ydata = Data(1:th);
    % x 軸を実際の距離(um)で作成。160628_LengthWindow に直した。
    xdata = LengthWindow*(0 : size(ydata, 2) -1);

    % 指数減衰率の値tを使用して、その減衰率とデータをもつモデルとの差のベクトルを返す、無
    名関数を作成。これを最小にする
    fun = @(t)exp(-xdata*t)-ydata;
    % 時定数の初期値を設定して。誤差関数 fun を最小にする tau を求める。
    x0 = 0;
    tau = lsqnonlin(fun,x0)
    % 相関距離(correlation length)の計算。1/e まで落ちる距離[um]近似曲線から求める。
    Fitted_Le(i, :) = 1/tau;
    Fitted_L2(i, :) = 1/tau *log(2);
end
% Fitte_Le と L2 はそれぞれの時間でフィットして 1/e or1/2 に対応する距離。
clear pMeanAC A loop i th Data fun xdata ydata x0 tau

%-----相関距離(1/e)の時系列グラフ描画。-----
%intTime = 5; % インターバル時間の設定。今回は 5sec
frameNum = [1 : size(Fitted_Le, 1)]; % 計算したデータ数の取得
sec = frameNum * intTime; min = sec / 60; % 横軸の時間の計算。min で。

```

```

plot(min, Fitted_Le') % plot。転置してプロット。
ylim([0 100])
%-----相関距離(1/e)の時系列グラフ保存。-----
saveas(gcf,'aCorrLength1_e_time.bmp')
saveas(gcf,'aCorrLength1_e_time.fig')
close(gcf)
%-----相関距離(1/2)の時系列グラフ描画。-----
%intTime = 5; % インターバル時間の設定。今回は 5sec
frameNum = [1 : size(Fitted_Le, 1)]; % 計算したデータ数の取得
sec = frameNum * intTime; min = sec / 60; % 横軸の時間の計算。min で。
% plot。転置してプロット。
plot(min, Fitted_L2');
ylim([0 100])
%-----相関距離(1/2)の時系列グラフ保存。-----
saveas(gcf,'aCorrLength1_2_time.bmp')
saveas(gcf,'aCorrLength1_2_time.fig')
close(gcf)
%-----平均の相関距離の計算。-----
% まずコピーする。元の Inf を含んだデータも残す。グラフ描画用。
Fitted_Le_fix = Fitted_Le;
Fitted_L2_fix = Fitted_L2;
% Inf と NaN を 0 に置き換える。
Fitted_Le_fix(~isfinite(Fitted_Le_fix))=0;
Fitted_L2_fix(~isfinite(Fitted_L2_fix))=0;
% 平均の相関距離の計算。
CorrLength_1_e = sum(Fitted_Le_fix) / sum(Fitted_Le_fix>0); % 平均の計算。非ゼロ要素は抜いてる。
CorrLength_1_2 = sum(Fitted_L2_fix) / sum(Fitted_L2_fix>0); % std も計算したら棒グラフ描けるけど。
end

%-----マウンドサイズで相関距離を割り算する。マウンドの半径で割る。
-----
function [Fitted_Le_dMS, Fitted_L2_dMS, CorrLength_1_e_dMS,
CorrLength_1_2_dMS] = pivDisACF_dMS(Fitted_Le, Fitted_L2, intTime, MoundSize)
% まずコピーする。元の Inf を含んだデータも残す。グラフ描画用。

```

```

Fitted_Le_dMS = Fitted_Le;
Fitted_L2_dMS = Fitted_L2;
% マウンドサイズの半径で割り算する。
Fitted_Le_dMS = Fitted_Le_dMS ./ (MoundSize/2);
Fitted_L2_dMS = Fitted_L2_dMS ./ (MoundSize/2);

% 平均値の計算
Fitted_Le_dMSf = Fitted_Le_dMS; % とりあえずコピー
Fitted_L2_dMSf = Fitted_L2_dMS; % とりあえずコピー
Fitted_Le_dMSf(~isfinite(Fitted_Le_dMSf))=0; % Inf と NaN を 0 に置き換える。
Fitted_L2_dMSf(~isfinite(Fitted_L2_dMSf))=0; % Inf と NaN を 0 に置き換える。

CorrLength_1_e_dMS = sum(Fitted_Le_dMSf) / sum(Fitted_Le_dMSf>0); % 平均
の計算。非ゼロ要素は抜いてる。
CorrLength_1_2_dMS = sum(Fitted_L2_dMSf) / sum(Fitted_L2_dMSf>0); % std も
計算したら棒グラフ描けるけど。

%-----相関距離(1/e)の時系列グラフ描画。-----
%intTime = 5; % インターバル時間の設定。今回は 5sec
frameNum = [1 : size(Fitted_Le_dMS, 1)]; % 計算したデータ数の取得
sec = frameNum * intTime; min = sec / 60; % 横軸の時間の計算。min で。
plot(min, Fitted_Le_dMS') % plot。転置してプロット。
ylim([0 1])
%-----相関距離(1/e)の時系列グラフ保存。-----
saveas(gcf,'aCorrLength1_e_time_dMS.bmp')
saveas(gcf,'aCorrLength1_e_time_dMS.fig')
close(gcf)
%-----相関距離(1/2)の時系列グラフ描画。-----
%intTime = 5; % インターバル時間の設定。今回は 5sec
frameNum = [1 : size(Fitted_L2_dMS, 1)]; % 計算したデータ数の取得
sec = frameNum * intTime; min = sec / 60; % 横軸の時間の計算。min で。
% plot。転置してプロット。
plot(min, Fitted_L2_dMS');
ylim([0 1])
%-----相関距離(1/2)の時系列グラフ保存。-----
saveas(gcf,'aCorrLength1_2_time_dMS.bmp')

```

```

saveas(gcf,'aCorrLength1_2_time_dMS.fig')
close(gcf)
end

%-----PIVレポートの作成。
-----
function pivReport(H2BiFileList, MoundSize, PixelSize, imgSize, WindowSize,
meshSize, CorrLength_1_e, CorrLength_1_2, VecField_u, ...
    LengthWindow, MeanACF_PIV_dis, StdACF_PIV_dis, intTime, Fitted_Le,
Fitted_L2, Fitted_Le_dMS, Fitted_L2_dMS, CorrLength_1_e_dMS,
CorrLength_1_2_dMS)
fig = figure; % 新しい Fig を作成
% 結果の文字列を作成
strFileName = ['FileName : ' H2BiFileList(1).name];
strMoundSize = ['MoundSize : ' num2str(MoundSize) '[um]'];
strPixelSize = ['PixelSize : ' num2str(PixelSize) '[um/pixel]'];
strimgSize = ['imgSize : ' num2str(imgSize) '[pixel]'];
strWindowSize = ['WindowSize : ' num2str(WindowSize)];
strWindowMeshSize = ['MeshSize : ' num2str(meshSize*PixelSize)];
strCorrLength_1_e = ['CorrLength(1/e) : ' num2str(CorrLength_1_e) '[um]'];
strCorrLength_1_2 = ['CorrLength(1/2) : ' num2str(CorrLength_1_2) '[um]'];
strCorrLength_1_e_dMS = ['CorrLength(1/e) /r : ' num2str(CorrLength_1_e_dMS)
'[-]'];
strCorrLength_1_2_dMS = ['CorrLength(1/2) /r : ' num2str(CorrLength_1_2_dMS)
'[-]'];
% 結果文字列の連結
str = {strFileName, strMoundSize, strPixelSize, strimgSize, strWindowSize,
strCorrLength_1_e, strCorrLength_1_2, strCorrLength_1_e_dMS,
strCorrLength_1_2_dMS};

set(gcf,'Position', [.25 .25 827 1165]); % fig の大きさを pixel で指定。A6 200dpi と同じ
にしてる。
set(gcf, 'paperpositionmode', 'auto'); % PaperPositionMode?プロパティが?'auto'?!にな
っていると画面上のサイズと同じサイズに保存される
%set(gcf,'PaperPosition', [.25 .25 21 29.7], 'paperpositionmode', 'auto');

```

```

% 結果テキストの描画
subplot(3, 2, 1)
text(-0.1, 0.6, str, 'FontSize', 12, 'FontWeight', 'bold', 'interpreter', 'none'); % テキストを-0.1, 0.6 の位置に描画
axis off % 軸を非表示にする

% PIV 距離の自己相関の描画
subplot(3, 2, 3)
njiku = 0 : size(VecField_u, 1)-1; % x 軸の作成(データ番号で)
xjiku = njiku * LengthWindow; % x 軸の作成(実際の距離[um]で)
errorbar(xjiku, MeanACF_PIV_dis, StdACF_PIV_dis) % plot。バー付きグラフ描画。横軸は実距離[um]
xlim([0 Inf]); title('MeanACF_PIV_dis', 'interpreter', 'none');
ylabel('ACF'); xlabel('distance [um]')

% PIV 距離の自己相関の描画
subplot(3, 2, 5)
frameNum = [1 : size(Fitted_Le, 1)]; % 計算したデータ数の取得
sec = frameNum * intTime; min = sec / 60; % 横軸の時間の計算。min で。
plot(min, Fitted_Le) % plot。転置してプロット。
ylim([0 100]); title('TimeSeries of Correlation Length(1/e)', 'interpreter', 'none');
ylabel('Correlation Length(1/e)'); xlabel('Time [min]')

% PIV 距離の自己相関(MoundSize の半分で割ったもの)の描画
subplot(3, 2, 6)
plot(min, Fitted_Le_dMS) % plot。転置してプロット。
ylim([0 1]); title('TimeSeries of Correlation Length(1/e) /r', 'interpreter', 'none');
ylabel('Correlation Length(1/e) /r'); xlabel('Time [min]')

% ファイル名の作成
FileList = dir(['*.tif']); % 現在のフォルダ内の拡張子が tif のファイルをリストアップ
fName = char(FileList(1).name); % char 型に変換
fName = strrep(fName, '.tif', ''); % ファイル名の ".tif" を "" に置き換える。削る。
sen = 'aREPORT_PIV_';
ffName = [sen fName '.jpg']; % 文字列の結合

```

```

% ファイル名違う内容同じ jpeg ファイル2つに保存。
print(gcf,'-djpeg','-r400',ffName)
print(gcf,'-djpeg','-r400','aCorrLength_result.jpg')
%print(gcf,'-dtiff','-r400','aoutput1.tif') %
saveas(fig,'aCorrLength_result.fig')
close(gcf)
clear fig str strFileName strPixelSize strimgSize strWindowSize strCorrLength_1_e
strCorrLength_1_2

```

```

%-----結果を text ファイルに保存。

```

```

-----
fid=fopen('aCorrLength_result.txt', 'w');
fprintf(fid, 'FileName %s ¥r¥n', H2BiFileList(1).name);
fprintf(fid, 'MoundSize %f [um]¥r¥n', MoundSize);
fprintf(fid, 'PixelSize %f [um/pixel]¥r¥n', PixelSize);
fprintf(fid, 'imgSize %d [pixel]¥r¥n', imgSize);
fprintf(fid, 'WindowSize %d ¥r¥n', WindowSize);
fprintf(fid, 'CorrLength(1/e) %f [um]¥r¥n', CorrLength_1_e);
fprintf(fid, 'CorrLength(1/2) %f [um]¥r¥n', CorrLength_1_2);
fprintf(fid, 'CorrLength(1/e) /r %f [-]¥r¥n', CorrLength_1_e_dMS);
fprintf(fid, 'CorrLength(1/2) /r %f [-]¥r¥n', CorrLength_1_2_dMS);
fclose(fid);
end

```

```

% ここから Fla2 の自己相関を計算して cAMP 振動周期を求める。

```

```

function [MeshImg_fla2, Fla2forAC, measuredMeshNum] = imgFla2Time(imgSize,
imgNum, ImgStack_fla2, meshNum, Projection, Mesh)

```

```

%-----画像反転。-----

```

```

X = ones(imgSize, imgSize, imgNum) * 4095; % 12bit なので max4095。これから引き
算する。

```

```

X = int16(X); % int に変換。データ型が同じでないと減算出来ない。

```

```

InvImgStack_fla2 = X - ImgStack_fla2; % 引き算して

```

```

clear X

```

```

%-----各メッシュでの Fla2 蛍光値の取得。細胞がいる所のみ。-----

```

```

MeshImg_fla2 = zeros(meshNum, meshNum, imgNum); % メモリ確保
for f = 1:imgNum
    Img_temp = InvImgStack_fla2(:, :, f);
    for i = 1:meshNum
        for j = 1:meshNum
            if Projection(i, j)==1
                testMesh = Img_temp(Mesh(i):Mesh(i+1), Mesh(j):Mesh(j+1));
                meanValue = mean(mean(testMesh),2);
                MeshImg_fla2(i, j, f) = meanValue;
            else
                MeshImg_fla2(i, j, f) = 0;
            end
        end
    end
end
end
clear f i j Img_temp testMesh meanValue

%-----AC 用に Fla2 時系列を並べる。-----
aa = sum(sum(Projection>0)); % データのあるメッシュの数を求める
measuredMeshNum = aa;
Fla2forAC = zeros(aa, imgNum); % 配列確保
t_row = 1; %格納配列の行のカウンタアップ用
for i = 1:meshNum
    for j = 1:meshNum
        if Projection(i, j)==1
            tFla2_time = MeshImg_fla2(i, j, :);
            tFla2_time = squeeze(tFla2_time); % 不要な次元の削除
            Fla2forAC(t_row, :) = tFla2_time'; % 転置したデータを格納
            t_row = t_row + 1; % 格納配列の行をカウンタアップ
        end
    end
end
end
clear aa t_row tFla2_time i j
end

```

%-----cAMP 時系列の自己相関関数 AC の計算。

function [ACFcAMP, MeanFla2ACF, StdFla2ACF] = fla2ACF(Fla2forAC)

cAMPtime = Fla2forAC; % データを渡す。横に時系列が並んでる。

F = size(cAMPtime, 2); %データ数

t = 1; %タイムインターバル。[steps]

X = size(cAMPtime, 1); %本当は処理するデータの数。今はテストなので 1 個だけ。松岡さんは X の分だけ For 文で回してる。

lagT_max = F-1; % maximum of lag time [steps] in calculating autocorrelation

ACFcAMP = zeros(X,lagT_max+1); %配列確保

for i = 1:size(cAMPtime, 1)

TimeSeries = cAMPtime(i, :); %データの読み込み。行を上から順に読み込んで処理。

tTimeSeries = transpose(TimeSeries); %転置。横のデータを縦並びに。皆そうしてるので

mtTimeSeries = tTimeSeries - mean(tTimeSeries); %平均値を引いて、トレンド除去

AC_dx2_mol_temp=zeros(F,F);

% ずらして掛け算。各 lag time で。

for lagT=0:lagT_max % lag time [steps] ranging from 0 to lagT_max

for k=1:F-lagT

AC_dx2_mol_temp(k, lagT+1) = mtTimeSeries(k, 1) *

mtTimeSeries(k+lagT, 1);

end

end

% 各 lag time での平均値を計算。F-t がデータの個数。確認する。

for l=1:F

ACFcAMP(i, l)=sum(AC_dx2_mol_temp(:, l))/(F-l+1);

end

C0 = ACFcAMP(i, 1); %規格化定数の取得

ACFcAMP(i, :) = ACFcAMP(i, :)./C0; %結果全体を C0 で割る。

end

% トレンド除去でまず配列作れば良かった。元データ→トレンド除去データ。それを読み込んで転置して処理。

clear F t X TimeSeries i mtTimeSeries tTimeSeries cAMPtime lagT_max lagT k l

AC_dx2_mol_temp C0;

%-----cAMP 時系列の自己相関関数 AC の平均の計算。-----

```

MeanFla2ACF = mean(ACFcAMP); % AC の平均値の計算
StdFla2ACF = std(ACFcAMP);
end

```

```

%-----cAMP 時系列の自己相関関数 AC の平均の mean, std のグラフ化
-----

```

```

function cAMPacfGraph(MeanFla2ACF, StdFla2ACF, intTime)
frameNum = 0 : size(MeanFla2ACF, 2)-1; % 計算したデータ数の取得
sec = frameNum * intTime; min = sec / 60; % 横軸の時間の計算。min で。
errorbar(min, MeanFla2ACF, StdFla2ACF) % plot。バー付きグラフ描画。横軸は
LagTime[min]
xlim([0 Inf])

```

```

%-----cAMP 時系列の自己相関関数 AC の平均の mean, std のグラフ保存-----

```

```

saveas(gcf,'acAMP_ACF_bar.bmp')
saveas(gcf,'acAMP_ACF_bar.fig')
close(gcf)
end

```

```

%-----cAMP 時系列の自己相関関数 AC からピーク検出。1 個前と後が現在の値より小さい所。
-----

```

```

function [Period_Fla2, peaks_fla2] = peakFla2ACF(MeanFla2ACF, intTime)
data = MeanFla2ACF; % ACF データ読み込み
%intervalTime = 5; % タイムラプスのインターバル時間の設定[sec]
length = size(data, 2); % データの長さ
p = -0.2; % 閾値(mv. 任意. これより小さい値のピークがあっても無視する)
peaks_fla2 = zeros(1,length); % ピーク位置記憶用
xx = [1:length] * intTime / 60; % データのプロット用
idata = zeros(1, length); % 移動平均後のデータ

```

```

% とりあえず 5 点移動平均で

```

```

idata(1)=data(1); idata(2)=data(2); idata(end)=data(end);

```

```

idata(end-1)=data(end-1);

```

```

for n = 3:length-2 % 1 番目のデータは n-1 に値が無いので 2 から始めてる。

```

```

        idata(n) = (data(n-2)+data(n-1)+data(n)+data(n+1)+data(n+2))/5;
    end

    for n = 2:length-1 % 1 番目のデータは n-1 に値が無いので 2 から始めてる。
        if idata(n) > p && idata(n-1) < idata(n) && idata(n) > idata(n+1)
            %if idata(n-2) < idata(n) && idata(n) > idata(n+2)
                peaks_fla2(n) = data(n); % 移動平均したデータでピーク検出してピーク値は元のデータ
                からとって来る。
            %end
        end
    end
    if isempty(find(peaks_fla2, 1))
        Period_Fla2 = NaN;
    else
        peaksNzero = find(peaks_fla2); % 0 以外の値が入っている列番号を取得
        fPeak = peaksNzero(1); % 1 番初めのピークの列番号を取得
        ff = [data(fPeak-1), data(fPeak), data(fPeak+1)]; % 移動平均したデータでピーク位置
        探した。その両隣のデータの中で最大値を取る
        [fMax, nf] = max(ff); % 両隣のデータの中で max を取る。nf は番号(1-3)
        fPeak = fPeak + (nf-2); % 両隣のデータとピーク番号を置き換える。
        Period_Fla2 = (fPeak - 1) * intTime /60; % 周期[min]
    end

    peaks_fla2(peaks_fla2==0) = NaN; % 0 だったら NaN に置き換える。グラフ表示の時にジ
    ヤマ
    plot(xx, data,'g-', xx, peaks_fla2, 'ro'); % 波形(緑線)と検出ピーク位置(赤丸)の表示。確認
    %ylim([0.001, Inf])
    clear length p data xx minPeak n
    %-----cAMP 時系列の自己相関関数 AC の平均の mean, std のグラフ保存-----ピーク検出
    後--
    saveas(gcf,'acAMP_ACF_peak.bmp')
    saveas(gcf,'acAMP_ACF_peak.fig')
    close(gcf)
end

```

```

% ここから PIV 速度の自己相関の計算
%-----PIV 結果の速度(Magnitude)を全時間全領域で計算。
-----
function [VF_magnitude, VFMag_time] = imgPIVTime(VecField_u, VecField_v, mat_x,
mat_y, Projection, meshNum)
loop = size(VecField_u, 3); % ループ回数の取得
% 配列確保。VecField_uと同じサイズの配列作れば良い。
VF_magnitude = zeros(size(VecField_u, 1), size(VecField_u, 2), size(VecField_u, 3));
for i= 1:loop
    u = VecField_u(:, :, i);    v = VecField_v(:, :, i);
    x = mat_x;    y = mat_y;
    norm=sqrt(u.^2 + v.^2);    %Norm ベクトルの計算(ベクトルの大きさ)
    VF_magnitude(:, :, i)=magnitude(x,y,u,v);    % 速度の大きさの計算
end
clear i u v x y norm eu ev w loop

%-----細胞がいる所のみ PIV 結果の速度(Magnitude)の時系列を作成。-----
aa = sum(sum(Projection>0)); % データのあるメッシュの数を求める
VFMag_time = zeros(aa, size(VF_magnitude, 3)); % 配列確保。こっちは時系列の長さ
が3フレームおき
t_row = 1; %格納配列の行のカウントアップ用。
for i = 1:meshNum
    for j = 1:meshNum
        if Projection(i, j)==1
            tVFMag_time = VF_magnitude(i, j, :);
            tVFMag_time = squeeze(tVFMag_time); % 不要な次元の削除
            VFMag_time(t_row, :) = tVFMag_time'; % 転置したデータを格納
            t_row = t_row + 1; % 格納配列の行をカウントアップ
        end
    end
end
clear aa t_row tVFMag_time i j

%-----速度時系列のショットノイズ除去(ある大きさ以上の値を除去)-----
for i = 1:size(VFMag_time, 1)
    data = VFMag_time(i, :); % データ読み込み

```

```

length = size(data, 2); % データの長さ
mdata = zeros(1,length); % 結果のメモリ確保

for n = 2:length-1 % 1 番目のデータは n-1 に値が無いので 2 から始めてる。
    if data(n) > 12000
        mdata(n) = (data(n-1) + data(n+1)) / 2; % 前と後の値の平均に置き換える。
    else
        mdata(n) = data(n);
    end
end
mdata(1) = data(1); % 初めのデータと最後のデータは for 文で対応できないのでそのまま入れる。
mdata(end) = data(end);
VFMag_time(i, :) = mdata; % 置き換える。
end
clear length data mdata n i
end

```

%-----PIV 速度時系列の自己相関関数 AC の計算。

```

-----
function [ACF_PIV_time, MeanPIVACF, StdPIVACF] = pivACF(VFMag_time)
cAMPtime = VFMag_time; % データを渡す。横に時系列が並んでる。

F = size(cAMPtime, 2); %データ数
t = 1; %タイムインターバル。[steps]
X = size(cAMPtime, 1); %本当は処理するデータの数。今はテストなので 1 個だけ。松岡さんは X の分だけ For 文で回してる。
lagT_max = F-1; % maximum of lag time [steps] in calculating autocorrelation
ACF_PIV_time = zeros(X,lagT_max+1); %配列確保

for i = 1:size(cAMPtime, 1)
    TimeSeries = cAMPtime(i, :); %データの読み込み。行を上から順に読み込んで処理。
    tTimeSeries = transpose(TimeSeries); %転置。横のデータを縦並びに。
    mtTimeSeries = tTimeSeries - mean(tTimeSeries); %平均値を引いて、トレンド除去
    AC_dx2_mol_temp=zeros(F,F);

```

```

% ずらして掛け算。各 lag time で。
for lagT=0:lagT_max % lag time [steps] ranging from 0 to lagT_max
    for k=1:F-lagT
        AC_dx2_mol_temp(k, lagT+1)=mtTimeSeries(k, 1) *
mtTimeSeries(k+lagT, 1);
    end
end
% 各 lag time での平均値を計算。F-t がデータの個数。確認する。
for l=1:F
    ACF_PIV_time(i, l)=sum(AC_dx2_mol_temp(:, l))/(F-l+1);
end
C0 = ACF_PIV_time(i, 1); %規格化定数の取得
ACF_PIV_time(i, :) = ACF_PIV_time(i, :)./C0; %結果全体を C0 で割る。
end
% トレンド除去でまず配列作れば良かった。元データ→トレンド除去データ。それを読み込んで転置し
て処理。
clear F t X TimeSeries i mtTimeSeries tTimeSeries cAMPtime lagT_max lagT k l
AC_dx2_mol_temp C0;
%-----PIV 速度時系列の自己相関関数 AC の平均の計算。-----
MeanPIVACF = mean(ACF_PIV_time); % AC の平均値の計算
StdPIVACF = std(ACF_PIV_time);
end

%-----PIV 速度時系列の自己相関関数 AC の平均の mean, std のグラフ化
-----
function pIVacfGraph(MeanPIVACF, StdPIVACF, intTime)
frameNum = 0 : size(MeanPIVACF, 2)-1; % 計算したデータ数の取得
sec = frameNum * intTime; min = sec / 60; % 横軸の時間の計算。min で。
errorbar(min, MeanPIVACF, StdPIVACF) % plot。バー付きグラフ描画。横軸は
LagTime[min]
xlim([0 Inf])

%-----PIV 速度時系列の自己相関関数 AC の平均の mean, std のグラフ保存-----
saveas(gcf,'ACF_PIV_time.bmp')
saveas(gcf,'ACF_PIV_time.fig')

```

```
close(gcf)
end
```

```
%-----PIV 速度時系列の自己相関関数 AC からピーク検出。1 個前と後が現在の値より小さい  
所。-----
```

```
function [Period_PIV, peaks_piv] = peakPIVACF(MeanPIVACF, intTime)
```

```
data = MeanPIVACF; % ACF データ読み込み
```

```
intTime = 5; % タイムラプスのインターバル時間の設定[sec]
```

```
length = size(data, 2); % データの長さ
```

```
p = -0.2; % 閾値(mv. 任意. これより小さい値のピークがあっても無視する)
```

```
peaks_piv = zeros(1,length); % ピーク位置記憶用
```

```
xx = [1:length] * intTime / 60; % データのプロット用
```

```
idata = zeros(1, length); % 移動平均後のデータ
```

```
% とりあえず 5 点移動平均で
```

```
idata(1)=data(1); idata(2)=data(2); idata(end)=data(end);
```

```
idata(end-1)=data(end-1);
```

```
for n = 3:length-2 % 1 番目のデータは n-1 に値が無いので 2 から始めている。
```

```
    idata(n) = (data(n-2)+data(n-1)+data(n)+data(n+1)+data(n+2))/5;
```

```
end
```

```
for n = 2:length-1 % 1 番目のデータは n-1 に値が無いので 2 から始めている。
```

```
if idata(n) > p && idata(n-1) < idata(n) && idata(n) > idata(n+1)
```

```
    %if idata(n-2) < idata(n) && idata(n) > idata(n+2)
```

```
    peaks_piv(n) = data(n); % 移動平均したデータでピーク検出してピーク値は元のデータ
```

```
    からのとって来る。
```

```
    %end
```

```
end
```

```
end
```

```
if isempty(find(peaks_piv, 1))
```

```
    Period_PIV = NaN;
```

```
else
```

```
peaksNzero = find(peaks_piv); % 0 以外の値が入っている列番号を取得
```

```
fPeak = peaksNzero(1); % 1 番初めのピークの列番号を取得
```

```

ff = [data(fPeak-1), data(fPeak), data(fPeak+1)]; % 移動平均したデータでピーク位置
探した。その両隣のデータの中で最大値を取る
[fMax, nf] = max(ff); % 両隣のデータの中で max を取る。nf は番号(1-3)
fPeak = fPeak + (nf-2); % 両隣のデータとピーク番号を置き換える。
Period_PIV = (fPeak - 1) * intTime /60; % 周期[min]
end

```

```

peaks_piv(peaks_piv==0) = NaN; % 0 だったら NaN に置き換える。グラフ表示の時にジャ
マ
plot(xx, data,'g-', xx, peaks_piv, 'ro'); % 波形(緑線)と検出ピーク位置(赤丸)の表示。確認
%clear length p data xx minPeak peaks n
%-----PIV 速度時系列の自己相関関数 AC の平均の mean, std のグラフ保存-----ピーク検
出後---
saveas(gcf,'ACF_PIV_time_peak.bmp')
saveas(gcf,'ACF_PIV_time_peak.fig')
close(gcf)
end

```

```

%-----相互相関の計算(Flamindo2, PIV 運動速
度)-----
% calculate the cross-correlation for Flamindo2 intensity and PIV velocity
function [CCFcAMPVelo, MeanCCF, StdCCF] = ccfcAMPVelo(Fla2forAC, VFMag_time)
tFla2forAC = Fla2forAC(:, 1:size(VFMag_time, 2)); % Fla2 の時系列の長さを PIV 速度
の時系列の長さにそろえる。

```

```

F = size(VFMag_time, 2); %データ数
t = 1; %タイムインターバル。[steps]
X = size(VFMag_time, 1); %処理するデータの数。for 文で使う。

```

```

lagT_max = F-1; % maximum of lag time [steps] in calculating autocorrelation
CCFcAMPVelo = zeros(X,lagT_max+1); %配列確保

```

```

for i = 1:size(VFMag_time, 1)
    Fla2_time = tFla2forAC(i, :); % Fla2 データの読み込み。行を上から順に読み込んで処
理。

```

```

tFla2_time = transpose(Fla2_time); % 転置。横のデータを縦並びに。皆そうして
るの
で
tFla2_time = tFla2_time - mean(tFla2_time); % 平均値を引いて、トレンド除去

tVFMag_time = VFMag_time(i, :); % PIV 速度データの読み込み。
tVFMag_time = transpose(tVFMag_time); % 転置。
tVFMag_time = tVFMag_time - mean(tVFMag_time); % 平均値を引いて、トレンド
除去

CCFcAMPVelo_temp=zeros(F,F);
% ずらして掛け算。各 lag time で。
for lagT=0:lagT_max % lag time [steps] ranging from 0 to lagT_max
    for k=1:F-lagT
        CCFcAMPVelo_temp(k, lagT+1)=tFla2_time(k, 1) * tVFMag_time(k+lagT,
1);
    end
end
for l=1:F % 各 lag time での平均値を計算。F がデータの個数。確認する。
    CCFcAMPVelo(i, l)=sum(CCFcAMPVelo_temp(:, l))/(F-l+1);
end
C0 = sqrt(sum(tFla2_time.^2)/F) * sqrt(sum(tVFMag_time.^2)/F); %規格化定
数の取得
CCFcAMPVelo(i, :) = CCFcAMPVelo(i, :)./C0; %結果全体を C0 で割る。
end
clear F t X tFla2forAC Fla2_time i tFla2_time tVFMag_time ;
clear CCFcAMPVelo_temp lagT_max lagT k l AC_dx2_mol_temp C0;

%-----相互相関(Flamindo2, PIV 運動速度)の平均の計算。-----
MeanCCF = mean(CCFcAMPVelo); % CCF の平均値の計算
StdCCF = std(CCFcAMPVelo);
end

%-----相互相関(Flamindo2, PIV 運動速度)の平均の mean, std のグラフ化
-----
function ccfGraph(MeanCCF, StdCCF, intTime)

```

```

frameNum = 0 : size(MeanCCF, 2)-1; % 計算したデータ数の取得
sec = frameNum * intTime; min = sec / 60; % 横軸の時間の計算。min で。
errorbar(min, MeanCCF, StdCCF) % plot。バー付きグラフ描画。横軸は LagTime[min]
xlim([0 Inf])

```

```

%-----相互相関(Flamindo2, PIV 運動速度)の平均の mean, std のグラフ保存-----
saveas(gcf,'acAMPVelo_CCF.bmp')
saveas(gcf,'acAMPVelo_CCF.fig')
close(gcf)
end

```

```

%-----相互相関(Flamindo2, PIV 運動速度)からピーク検出。1 個前と後が現在の値より小さい所。-----

```

```

function [firstPeak_CCF, secondPeak_CCF, peaks_ccf] = peakCCF(MeanCCF, intTime)
data = MeanCCF; % ACF データ読み込み
%intTime = 5; % タイムラプスのインターバル時間の設定[sec]
length = size(data, 2); % データの長さ
p = -0.2; % 閾値(mv. 任意. これより小さい値のピークがあっても無視する)
peaks_ccf = zeros(1,length); % ピーク位置記憶用
xx = [1:length] * intTime / 60; % データのプロット用
idata = zeros(1, length); % 移動平均後のデータ

```

```

% 5 点移動平均で

```

```

idata(1)=data(1); idata(2)=data(2); idata(end)=data(end);
idata(end-1)=data(end-1);
for n = 3:length-2 % 1 番目のデータは n-1 に値が無いので 2 から始めてる。
    idata(n) = (data(n-2)+data(n-1)+data(n)+data(n+1)+data(n+2))/5;
end

```

```

for n = 2:length-1 % 1 番目のデータは n-1 に値が無いので 2 から始めてる。

```

```

if idata(n) > p && idata(n-1) < idata(n) && idata(n) > idata(n+1)
    %if idata(n-2) < idata(n) && idata(n) > idata(n+2)
    peaks_ccf(n) = data(n); % 移動平均したデータでピーク検出してピーク値は元のデータ
    からとって来る。
    %end

```

```

end
end
if isempty(find(peaks_ccf, 1))
    firstPeak_CCF = NaN;    secondPeak_CCF = NaN;
else
    peaksNzero = find(peaks_ccf);    % 0 以外の値が入っている列番号を取得
    fPeak = peaksNzero(1);    % 1 番初めのピークの列番号を取得
    sPeak = peaksNzero(2);    % 2 番目のピークの列番号を取得
    ff = [data(fPeak-1), data(fPeak), data(fPeak+1)];    % 移動平均したデータでピーク位置
    探した。その両隣のデータの中で最大値を取る
    ss = [data(sPeak-1), data(sPeak), data(sPeak+1)];
    [fMax, nf] = max(ff);    % 両隣のデータの中で max を取る。nf は番号(1-3)
    [sMax, ns] = max(ss);
    fPeak = fPeak + (nf-2);    % 両隣のデータとピーク番号を置き換える。
    sPeak = sPeak + (ns-2);    % 両隣のデータとピーク番号を置き換える。
    firstPeak_CCF = (fPeak - 1) * intTime / 60;    % 周期[min]
    secondPeak_CCF = (sPeak - 1) * intTime / 60;    % 周期[min]
end
Ppeaks_ccf = peaks_ccf;
Ppeaks_ccf(Ppeaks_ccf==0) = NaN;    % 0 だったら NaN に置き換える。グラフ表示の時にジ
ヤマ
plot(xx, data,'g-', xx, Ppeaks_ccf, 'ro'); % 波形(緑線)と検出ピーク位置(赤丸)の表示。確認
clear length p data xx Peak12 fPeak sPeak peaks n Ppeaks_ccf

%-----相互相関(Flamindo2, PIV 運動速度)の平均の mean, std のグラフ保存-----ピーク
検出後---
saveas(gcf,'acAMPVelo_CCF_peak.bmp')
saveas(gcf,'acAMPVelo_CCF_peak.fig')
close(gcf)
end

%-----レポートの作成。
-----
function acfccfReport(H2BiFileList, Period_Fla2, intTime, meshNum,
measuredMeshNum, Period_PIV, firstPeak_CCF, secondPeak_CCF)

```

```

% 結果の文字列を作成
strFileName = ['FileName : ' H2BiFileList(1).name];
strPeriodFla2 = ['Period_cAMP : ' num2str(Period_Fla2) '[min]'];
strIntervalTime = ['intervalTime : ' num2str(intTime) '[sec]'];
strMeshNum = ['meshNum : ' num2str(meshNum)];
strMeasuredMeshNum = ['measuredMeshNum : ' num2str(measuredMeshNum)];
strPeriod_PIVACF = ['Period_PIVACF : ' num2str(Period_PIV) '[min]'];
strfirstPeak_CCF = ['firstPeak_CCF : ' num2str(firstPeak_CCF) '[min]'];
strsecondPeak_CCF = ['secondPeak_CCF : ' num2str(secondPeak_CCF) '[min]'];

str = {strFileName, strPeriodFla2, strIntervalTime, strMeshNum,
strMeasuredMeshNum, strPeriod_PIVACF, strfirstPeak_CCF, strsecondPeak_CCF};

% 保存しておいた Fig を開いてハンドルを取得
h1 = openfig('acAMP_ACF_bar.fig','reuse'); ax1 = gca;
h2 = openfig('acAMP_ACF_peak.fig','reuse'); ax2 = gca;
h3 = openfig('ACF_PIV_time.fig','reuse'); ax3 = gca;
h4 = openfig('ACF_PIV_time_peak.fig','reuse'); ax4 = gca;
h5 = openfig('acAMPVelo_CCF.fig','reuse'); ax5 = gca;
h6 = openfig('acAMPVelo_CCF_peak.fig','reuse'); ax6 = gca;
h7 = figure; %create new figure
% subplot
s1 = subplot(4, 2, 3);
xlim([0 Inf]); ylim([-1 1]); title('Autocorrelation of cAMP(fla2) timeseries with
bar','interpreter','none');
ylabel('Correlation coefficient'); xlabel('Time [min]');
s2 = subplot(4, 2, 4);
xlim([0 Inf]); ylim([-Inf 1]); title('Autocorrelation of cAMP(fla2) timeseries with
peaks','interpreter','none');
ylabel('Correlation coefficient'); xlabel('Time [min]');
s3 = subplot(4, 2, 5);
xlim([0 Inf]); ylim([-1 1]); title('Autocorrelation of velocity(PIV) timeseries with
bar','interpreter','none');
ylabel('Correlation coefficient'); xlabel('Time [min]');
s4 = subplot(4, 2, 6);

```

```

xlim([0 Inf]);   ylim([-Inf 1]);   title('Autocorrelation of velocity(PIV) timeseries
with peaks','interpreter','none');
ylabel('Correlation coefficient');   xlabel('Time [min]');
s5 = subplot(4, 2, 7);
xlim([0 Inf]);   title('Cross-correlation of timeseries with bar','interpreter','none');
ylabel('Correlation coefficient');   xlabel('Time [min]');
s6 = subplot(4, 2, 8);
xlim([0 Inf]);   title('Cross-correlation of timeseries with peaks','interpreter','none');
ylabel('Correlation coefficient');   xlabel('Time [min]');
%get handle to all the children in the figure
fig1 = get(ax1,'children');
fig2 = get(ax2,'children');
fig3 = get(ax3,'children');
fig4 = get(ax4,'children');
fig5 = get(ax5,'children');
fig6 = get(ax6,'children');
%copy children to new parent axes i.e. the subplot axes
copyobj(fig1,s1);
copyobj(fig2,s2);
copyobj(fig3,s3);
copyobj(fig4,s4);
copyobj(fig5,s5);
copyobj(fig6,s6);
% 表示形式の設定
set(gcf,'Position', [.25 .25 827 1165]);   % fig の大きさを pixel で指定。A6 200dpi と同じ
にしてる。
set(gcf, 'paperpositionmode', 'auto');   % PaperPositionMode?プロパティが?'auto'?!にな
っていると画面上のサイズと同じサイズに保存される
% 結果テキストの描画
subplot(4, 2, 1)
text(-0.1, 0.6, str, 'FontSize', 12,'FontWeight','bold','interpreter','none');   % テキス
トを-0.1, 0.6 の位置に描画
axis off   % 軸を非表示にする

% ファイル名の作成
FileList = dir(['*.tif']);   % 現在のフォルダ内の拡張子が tif のファイルをリストアップ

```

```

fName = char(FileList(1).name); % char 型に変換
fName = strrep(fName, '.tif', ''); % ファイル名の".tif"を""に置き換える。削る。
sen = 'aREPORT_CCF_';
ffName = [sen fName '.jpg']; % 文字列の結合

% ファイル名違う内容同じ jpeg ファイル2つに保存。
print(gcf, '-djpeg', '-r400', ffName)
print(gcf, '-djpeg', '-r400', 'aPeriod_ACFCCF_result.jpg')
%saveas(fig, 'aTest.bmp')
close(gcf); close(h1, h2, h3, h4, h5, h6)
close all
clear fig str h1 h2 h3 h4 h5 h6 h7 ax1 ax2 ax3 ax4 ax5 ax6 s1 s2 s3 s4 s5 s6 fig1 fig2
fig3 fig4 fig5 fig6
clear strFileName strPeriodFla2 strIntervalTime strMeshNum strMeasuredMeshNum
strPeriod_PIVACF strPeriod_CCF

%-----相互相関(Flamindo2, PIV 運動速度)の結果を text ファイルに保存-----
fid=fopen('aPeriod_ACFCCF_result.txt', 'w');
    fprintf(fid, 'Period_cAMP %f [min]¥r¥n', Period_Fla2);
    fprintf(fid, 'intervalTime %d [sec]¥r¥n', intTime);
    fprintf(fid, 'meshNum %d ¥r¥n', meshNum);
    fprintf(fid, 'measuredMeshNum %d ¥r¥n', measuredMeshNum);
    fprintf(fid, 'Period_PIVACF %f [min]¥r¥n', Period_PIV);
    fprintf(fid, 'firstPeak_CCF %f [min]¥r¥n', firstPeak_CCF);
    fprintf(fid, 'secondPeak_CCF %f [min]¥r¥n', secondPeak_CCF);
    fprintf(fid, 'intervalTime %d [sec]¥r¥n', intTime);
fclose(fid);
clear fid
end

```

7. 謝辞

本研究を遂行し、本論文を執筆するにあたりまして、たくさんの方にお世話になりました。この場を借りて感謝いたします。

指導教官の上田昌宏先生には、日ごろのセミナーや研究ミーティングの中で、研究に対する心得、方針の立て方までありとあらゆる面でご指導いただきました。この博士論文をまとめることができたのも上田先生のご尽力の賜物です。心より厚くお礼申し上げます。

大変お忙しい中、予備審査委員会の主査を快く引き受けてくださいました深川竜郎教授、副査を引き受けてくださいました平岡泰教授、難波啓一教授に感謝申し上げます。

また、本研究について指導・議論してくださいました大阪大学生命機能研究科 1 分子生物学研究室、理化学研究所生命機能科学研究センター細胞シグナル動態研究チームの皆様にも感謝いたします。

本研究の推進、論文の投稿等で大変お世話になりました上村陽一郎博士に感謝申し上げます。また、理研 BDR テクニカルスタッフの田邊香様、田口静香様には日々の研究生活で大変お世話になりました。

2020 年 3 月 山崎 真一

8. 業績

(1) 学術雑誌等（紀要・論文集等も含む）に発表した論文、著書
無し

(2) 学術雑誌等又は商業誌における解説、総説
無し

(3) 国際会議における発表

○Yamazaki S., Sato MJ., Matsuoka S., Takagi H., Ueda M.,

[ポスター・査読有り]

「Relationship between Spontaneous Cell Migration and Self-organization of Phosphatidylinositol Lipids Signaling System」

『Biophysical Society's 55th Annual Meeting』 Baltimore, USA, (March 2011)

○Yamazaki S., Matsuoka S., Tsujioka M., Ueda M.,

[ポスター・査読有り]

「Regulation of self-organization in chemotactic signaling system by an adhesion-related molecule, talin」

『Biophysical Society's 56th Annual Meeting』 San Diego, USA, (February 2012)

○Yamazaki S., Matsuoka S., Tsujioka M., Ueda M.,

[ポスター・査読有り]

「Regulation for phosphatidylinositol lipids signaling system by Talin」

『Biophysical Society's 58th Annual Meeting』 San Francisco, USA, (February 2014)

(4) 国内学会・シンポジウム等における発表

○山崎 真一、佐藤 雅之、松岡 里実、高木 拓明、上田 昌宏

[ポスター・査読無し]

「細胞性粘菌の自発運動解析」

『定量生物の会第3回年会』、東京大学生産技術研究所、2010年11月

○山崎 真一、佐藤 雅之、松岡 里実、高木 拓明、上田 昌宏

[ポスター・査読無し]

「細胞内自己組織化現象と自発運動の関係」
『理研シンポジウム「細胞システムの動態と論理 III」』、理化学研究所和光キ
ャンパス、2011年5月

○山崎 真一、松岡 里実、辻岡 政経、高木 拓明、上田 昌宏
[口頭発表・査読有り]
「Regulation by Adhesion Molecule in Self-organization of Phosphatidylinositol Lipid
Signaling System」
『第49回 日本生物物理学会年』、兵庫県立大学、姫路書写キャンパス、2011
年9月

○山崎 真一、松岡 里実、辻岡 政経、上田 昌宏
[口頭発表・査読無し]
「接着分子によるイノシトールリン脂質代謝系自己組織化パターンの制御」
『「理論と実験」研究会』、広島大学理学部、2011年10月

○山崎 真一、松岡 里実、辻岡 政経、上田 昌宏
[口頭発表・査読無し]
「接着分子によるイノシトールリン脂質代謝系自己組織化パターンの制御」
『第1回日本細胞性粘菌学会』、大阪大学バイオ関連多目的施設(OLABB)、2011
年11月

○山崎 真一、松岡 里実、辻岡 政経、上田 昌宏
[ポスター・査読無し]
「接着分子によるイノシトールリン脂質代謝系自己組織化パターンの制御」
『定量生物の会第4回年会』、名古屋大学野依学術記念館、2012年1月