

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K19401

研究課題名（和文）振動子としての細胞周期制御系の特徴とその生理学的性質のリンク

研究課題名（英文）Characteristics of the cell cycle as an oscillator and its relationship with physiological properties

研究代表者

村山 依子（井上依子）（Murayama, Yoriko）

早稲田大学・理工学術院・日本学術振興会特別研究員

研究者番号：70750925

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、分岐理論の知識を使ってアフリカツメガエルの初期胚の細胞周期が低温環境で止まる原因を明らかにしながら細胞周期の振動子としての特徴をあぶり出すことを目的とした。低温ほど卵割の周期が長くなったことから、周期が無限大になってリズムが停止するSaddle-node on an invariant circle（SNIC）分岐であることが示唆された。SNIC分岐ならば温度を下げていくと緩和振動子から興奮性のシステムに変化すると考えられるため、これを検討した。低温での振る舞いを細胞周期の反応ネットワークに基づいて理解するための準備を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

極限の状態に置かれた時に人間の本性がわかるように、低温という条件に置かれて止まりかけている生物リズムを観察すると平時（自律振動をしている時）にはわからない特徴が見えてくる。低温環境下での生物リズム消失を分岐理論の知識に基づき解析する手法は簡便に分岐点近傍の振動子の特徴をつかめる点、全ての生物リズムを理論上たった2種類に分類できる点で有望である。本研究を通し、周期・生物種・構成因子を超えた分野横断的な生物リズム研究の発展に貢献したい。

研究成果の概要（英文）：Based on the bifurcation theory, we have been studying the cause of cell cycle arrest in early embryos of *Xenopus laevis* when the environmental temperature is lowered and the characteristics of the cell cycle as an oscillator. The observation that the cell cycle in *Xenopus* eggs became longer with decreasing temperature suggests a Saddle-node on an invariant circle (SNIC) bifurcation rather than other types of bifurcation. If the SNIC bifurcation is adopted, the cell cycle oscillator transforms into an excitable system below a critical temperature. Therefore, we examined whether appropriate stimuli could trigger excitability. Now, we are preparing an experiment to understand the behavior of the cell cycle at low temperatures according to its reaction network.

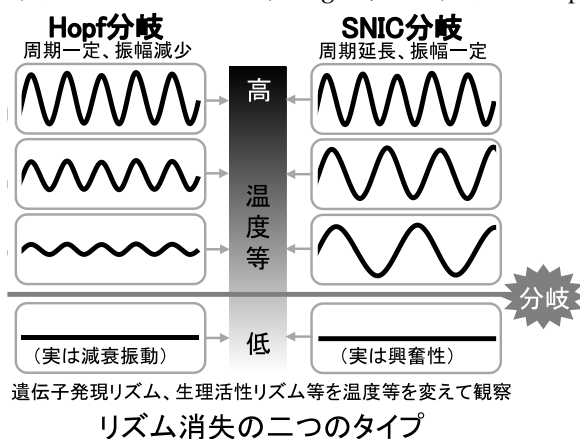
研究分野：概日リズム

キーワード：細胞周期

1. 研究開始当初の背景

概日リズム、細胞周期、分節時計、心拍のリズム、植物の回旋運動、ホタルの点滅など、生物は様々なリズムを示す。それらの生物リズムに共通して影響を与えられる刺激は温度であろう。特に環境温度を下げていけばやがて生物リズムがなくなることは直感的に予想できる。温度を下げるだけで「リズムがある」状態から「リズムがない」状態へと劇的な変化が起こるにも関わらず、「なぜ低温でリズムがなくなるのか？」という単純な問いは、多くの生物リズムでそれほど注目されていない。

長年携わってきた概日リズム研究でも、極めて低い温度で変温動物や植物の概日リズムが観察できなくなることは古くから報告されてきたが、生理的範囲よりも低い温度では研究する価値がないと思われたのかほとんど解析されてこなかった。温度を下げるという量的な変化に起因して「リズムがある」状態から「リズムがない」状態へ定性的な変化が起きている。これは非線形動力学の分野で「分岐」と呼ばれる現象である。生物リズムが消失する際のは主に Hopf 分岐と Saddle-node on an invariant circle (SNIC) 分岐の2つである (Strogatz, 1994)。私は Hopf 分岐の理論に導かれ、シアノバクテリア概日リズムは 18°C 以下の低温では「リズムがない」のではなく、刺激があれば特定の周期で揺れる減衰振動であること、適切な周期の 16°C/18°C 温度サイクルを与えると共鳴が起こり振幅の大きな振動が発生することを明らかにした。これまで概日時計が「ない」とされてきた生理的溫度以下の環境でも、わずかな昼夜の温度変化があれば減衰振動子の共鳴現象を利用した時計を使える可能性がある (Murayama et al, 2017)。これはシアノバクテリアが低温に適応進化してきた結果と考えられるが、他の生物の様々なリズムでも同様に自律振動が維持できない低温環境に置かれても切り抜けられる仕組みが作られているのではないかと。そして振動をうみだす分子・メカニズムはそれぞれの生物リズムで異なるにも関わらず、その仕組みが理論上たった二種類に集約される可能性があると考えた。



遺伝子発現リズム、生理活性リズム等を温度等を変えて観察

リズム消失の二つのタイプ

SNIC 分岐に分類されるリズム現象を研究してモデルケースを示せば、周期・構成因子・生物種を超えた生物リズムの普遍的な研究手法として提案できるかもしれない。SNIC 分岐となりそうな生物リズムとして着目したのが細胞周期である。中でもアフリカツメガエルの卵を使った細胞周期研究には歴史があり、無細胞系などの実験手法が確立されている。これまでほとんど接することがなかった生物・研究分野であるがチャレンジしやすいのではないかと考え、アフリカツメガエル卵の細胞周期の低温でのリズム停止の研究を開始した。

2. 研究の目的

極限の状態に置かれた時に人間の本性がわかるように、低温という条件に置かれて止まりかけている生物リズムを観察すると平時 (自律振動をしている時) にはわからない特徴が見えてくる。Hopf 分岐では、リズム消失の原因は振幅の減少である。臨界温度近傍では調和振動子様の振る舞いをして、リズム消失直前まで周期はあまり変わらず、臨界温度以下では減衰振動子となる。一方 SNIC 分岐では、温度を下げていくと進行が遅くなるボトルネックとなる反応ができて、周期が無限大に伸びた結果、運行停止することがリズム消失の原因である。温度を下げて振幅は比較的維持されるが、緩和振動子から興奮性のシステムに変わる。どちらの分岐に当てはまるかは、分岐点近傍のリズムの周期と振幅を調べるだけで判断できる。細胞周期進行リズムは SNIC 分岐を介して停止する可能性が高いが、まずどちらの分岐に分類されるかきちんと確認し、リズムがなくなる原因を明らかにすることを最初の目的とした。表に示すように分岐理論はさらに様々なことを教えてくれる。その知識を利用し、細胞周期制御系が低温で興奮性を示すことや、振動子自体が温度ゆらぎに対する抵抗性を持つこと等、細胞周期の振動子としての特徴とそれに起因する生理学的性質を明らかにすることを目指した。

	Hopf分岐	SNIC分岐
リズム消失の原因	振幅がゼロ	周期が無限大
リズム消失直前まで維持されるのは	周期	振幅
振動子の種類	調和振動子 (振り子)	緩和振動子 (しおどし)
・臨界温度近傍		
・臨界温度以下	減衰振動子	興奮性のシステム
温度変化刺激に対して	位相が変わりやすい	位相は変わりにくい

表: 分岐理論が教えてくれること

3. 研究の方法

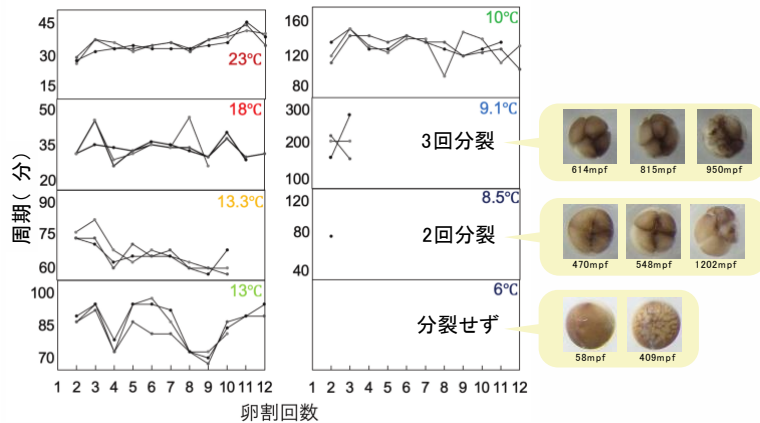
アフリカツメガエル卵の最初の 10 数回の分裂はだいたい同調して 23°C で約 30 分周期で起こ

る (Kirschner et al, 1985)。受精直後の卵を様々な温度でインキュベーションし、タイムラプス撮影して周期を求めた。アフリカツメガエルの卵を穏やかに遠心分離して得られる可溶性画分：卵抽出液は無細胞系と呼ばれ、細胞周期の過程で起こる様々な事象を試験管内で再現するツールとして活用されてきた。その一つであるサイクリング抽出液は擬似的に受精時の応答を誘起した未受精卵を遠心分離することにより得られ、S 期と M 期の移行を自律的に 2-3 回繰り返さず (Murray & Kirschner, 1989)。サイクリング抽出液を様々な温度でインキュベーションし、リズムの周期と振幅を測定することにした。サイクリング抽出液のリズムの検出は放射性同位体を用いた H1 kinase 活性、あるいは細胞周期関連因子の量やリン酸化状態の変化として測定されてきたが、先行研究を参考にレポーター系を用いてリズム観察の簡便化を試みた。

4. 研究成果

23°Cから 6°Cまで温度条件をかえてアフリカツメガエルの受精卵の卵割を観察した。受精卵の卵割周期は 23°Cで約 33 分、18°Cで約 34 分、13.3°Cで約 68 分、13°Cで約 85 分、10°Cで約 125 分と低温ほど長くなった。画像の解像度の問題で分裂周期が出せないことはあったが、受精した卵はほぼ 12 回以上分裂した。しかし、10°Cを下回る温度では受精卵の発生が途中で止まるようになった。9.1°Cで受精卵の多くは 3 回分裂したが、最終的には卵が白濁して発生が止まった。受精卵や細胞ごとにタイミングが異なる傾向があったが、平均すると周期は約 215 分だった。8.5°Cでは 67% の受精卵が一度も卵割しなかった。1 個だけ 2 回卵割したのがあり、その時の周期は 78 分だった。6°Cでは 400 分観察したが一度も卵割は観察されず、卵がまだら模様になった。卵割回数によって臨界温度が違う可能性があるが、最初の卵割が発生しなくなる臨界温度は 8.5 から 6°Cの間と考えられる。

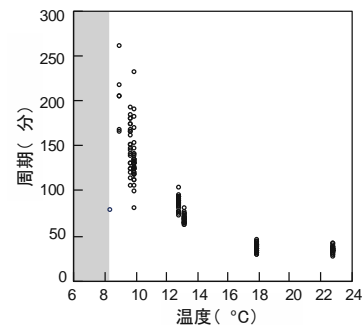
低温条件下のアフリカツメガエル受精卵の卵割の周期



臨界温度に近づくほど卵割の周期が長くなることから、周期が無限大になってリズムが停止する SNIC 分岐のシナリオで細胞周期のリズムが消失していることが示唆された。また周期のばらつきは 13°C以上では比較的小さいが、10°C以下では大きくなるのがわかった。Hopf 分岐のシナリオでは分岐点付近でも周期はそれほど変わらないが、SNIC 分岐では分岐点に近づくほど僅かな温度差で周期が劇的に変わる。周期のばらつきが大きくなる現象と SNIC 分岐は関連があるかもしれない。

SNIC 分岐のシナリオならば理論上、細胞周期は分岐点近傍で緩和振動子様の振る舞いをする、周期が劇的に長くなる一方で振幅は比較的に変わらないこと、臨界温度以下では安定平衡点でリズムが停止するが、適切な刺激が与えられるとリズムが一回転だけ起こり再び安定平衡点で留まる興奮性を示すことが言える。これらの中で興奮性に着目し、刺激の強さがある閾値以下では反応が起こらないが、閾値以上なら強さに関係なく一定の応答をするか検討するため、6°Cで卵割を停止させた受精卵を刺激する実験を行った。適度な強度の高温パルス後に 6°Cで卵割する現象は観察できたものの、6°Cの期間が長すぎると卵に深刻なダメージが入る点、高温パルスに必要な時間が想定していたよりも長期間になった点、温度変化を繰り返すと発生を止めてしまう受精卵が増える点の問題となった。高温パルス後に 6°Cで一度だけ卵割した結果は SNIC 分岐と関連づけて解釈できるが、Hopf 分岐でも説明できる余地がある。高温パルスの与え方を工夫して両者を見分ける方法を考えたが、先に示した問題からうまくいかなかった。高温という作用が曖昧な刺激ではなく、細胞周期への効果がわかっている刺激を用いると結果がクリアになるかもしれない。

低温での振る舞いを細胞周期の反応ネットワークに基づいて理解することを目指してサイクリング抽出液の観察を試みた。ところが、サイクリング抽出液中のサイクリン B の量的変動や Apc3 のリン酸化リズムが再現よく観察できなかった。原因の特定に至っていないが、リズムを簡便に検出する方法は必須であると考えレポーターの準備を進めた。まず CDK によるリン酸化で発光強度が上昇するプローブ (Mochida et al, 2016) を試した。発光基質は高温では不安定で 10°C以下では比較的安定となる一方、23°Cから 10°C以下まで温度を下げると発光強度が 3 割弱まで減少することがわかった。S 期から M 期への発光強度の変化は 23°Cで 1.2 倍程度であるから、現在までにプレートリーダーで低温下でのリズムを検出できていないため、より SN 比の高そうな蛍光レポーターの使用も検討している。またサイクリング抽出液を細いチューブ内に



充填 (Chang & Ferrell, 2013) あるいは油中水マイクロエマルジョン化 (Guan et al, 2018) して長期間リズムを測定した報告があり、こちらの観察系の導入も進めている。

本事業は採択が決まってすぐ 2017 年 11 月から研究中断し 2020 年 1 月から再開したが、その直後からコロナ禍となり研究を進める上で様々な困難があった。今後はサイクリング抽出液の低温でのリズム消失のシナリオを確かめ、SNIC 分岐であればボトルネック、臨界温度以下の安定平衡点と不安定平衡点を細胞周期の反応ネットワークに踏み込んで理解していきたい。また SNIC 分岐であれば温度揺らぎに対するロバストネスが実現できるのではないかというアイデアを実験と数理の両面から明らかにするなど今後もライフワークとして取り組み、成果を論文としてまとめたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村山依子、伊藤浩史、砂坂太郎、岩崎秀雄
2. 発表標題 低温環境条件下での生物リズム停止現象の分岐理論を用いた解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------