

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26330326

研究課題名(和文)生物はなぜ振動・同期するのか - 酵母細胞における解糖系振動現象の生命機能の解明 -

研究課題名(英文) Why do organisms oscillate? Investigation of biological function of glycolytic oscillations in yeast cells -

研究代表者

雨宮 隆 (Amemiya, Takashi)

横浜国立大学・大学院環境情報研究院・教授

研究者番号：60344149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では生物の振動・同期の生命機能を解明することを目的とした。従来、酵母細胞はある一定以上の細胞密度を越えなければ解糖系振動を行さないと考えられていたが、酵母細胞は孤立していても1細胞レベルで解糖系振動反応を起こすことを実験的に確認した。解糖系の数理モデル解析により、振動的解糖反応は定常的解糖反応よりもエネルギーの獲得効率が7～8%程度高いことが示された。また、酵母細胞をアルギン酸マイクロカプセルに封入し細胞密度を高めると細胞集団は解糖系振動反応を完全に同期させることを実験的に明らかにした。酵母と代謝類似性をもつがん(HeLa)細胞の解糖系振動反応を1細胞レベルで初めて観察した。

研究成果の概要(英文)：This study has aimed to clarify biological function of oscillations and synchronization of organisms. We experimentally observed glycolytic oscillations in yeast cells at a single cell level, though yeasts were considered not to exhibit the oscillations above a critical cell density. Analyses of a mathematical model of glycolytic oscillations revealed that the efficiency of energy acquisition is about 7 to 8% higher in the oscillatory glycolysis than in the stationary-state glycolysis. We also revealed that yeast cells encapsulated in alginate microparticles at a high cell-density exhibited complete synchronization in the glycolytic oscillations. Glycolytic oscillations in cervical cancer HeLa cells that have metabolic similarities with yeast cells were also observed at a single cell level for the first time.

研究分野：非線形科学

キーワード：細胞 解糖系 振動反応 同期現象

## 1. 研究開始当初の背景

心臓の鼓動をはじめ、ホルモン分泌、細胞の再生、脳波など、生命活動には明確なリズムが存在する。このような自律的な振動・同期現象は生物で普遍的に見られるが、そのメカニズムや機能には不明な部分が多い。本研究で対象とする解糖反応はバクテリアからヒトまで全ての生物で行われている最も基本的なエネルギー獲得プロセスである。また、良く知られているように、解糖系は、悪性の腫瘍細胞においては好气的環境でも ATP (アデノシン三リン酸) の主要な獲得プロセスとなっている。

さて、真核生物のモデルである酵母細胞を用いた研究においては、主に細胞を懸濁させた溶液系の実験から、細胞密度が高い場合は解糖系振動反応を同期させ、細胞密度が低い場合は解糖系振動が観察されないことが報告されていた。また、細胞を 2 次元平面に分散させた実験系によって、酵母細胞は細胞密度が低くても、単独で振動することが報告された。

酵母細胞は、解糖系反応をなぜ細胞単体として振動的に行うのか、また、なぜ高密度の細胞集団は位相と周期を揃えて同期的に行うのか、などについては不明であった。すなわち、解糖系振動反応・同期現象の生物学的機能はほとんど分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、生命活動において振動や同期現象が広く見られるのはなぜかを明らかにすることを目的とした。そこで、酵母細胞を対象に、(i) 酵母細胞が解糖反応を振動させる生命機能、(ii) 酵母細胞集団が解糖系振動反応を同期させる生命機能、を明らかにすることを目的とした。前者については解糖系反応の数理モデルを用いた検討、後者については細胞密度をさらに高めた場合の実験を行うこととした。

さらに、酵母細胞と代謝的類似性をもつがん細胞に着目して、ヒト子宮頸がん (HeLa) 細胞を用いて、解糖系振動反応および同期現象の観察と解析を行った。

## 3. 研究の方法

### 3.1 単一細胞の解糖系振動反応の数理モデル

解糖系振動反応の数理モデルに Wolf and Heinrich の 7 変数モデルを用いた (Wolf and Heinrich, *Biochem. J.*, 2000)。振動反応のエネルギー効率を計算するために、まず、振動状態と定常状態が共存する双安定状態が見られるかどうかを分岐図を作成することで検討した。分岐パラメータとして、実験で得られている pH 依存性に対応するように (雨宮, 信学技報, 2012), 細胞内の pH 調整を行う ATPase (アデノシン三リン酸分解酵素) に関する酵素反応の速度定数を分岐パラメータとした。

次に、双安定状態において、ATP の単位時間 (1 周期) 当たりの生成量を計算し、エネルギー獲得の時間効率を比較した。

### 3.2 細胞集団の同期現象の数理モデル

初めに、単一細胞の数理モデルと同様に Wolf と Heinrich のモデルを用いて細胞同士を結合させて、周期の異なる細胞が同期するかどうかを調べたところ、周期の異なる細胞同士は同期を示さなかった。このモデルでは、酵母細胞における解糖系振動反応の情報伝達物質と言われているアセトアルデヒドを同期物質として扱っている。しかし、このモデルでは細胞間の同期が見られなかったので、ATP や他の中間産生物を細胞間同期物質としたモデルを構成して検討を行った。

### 3.3 細胞間同期現象の実験

今までに当研究室で行った、細胞を 2 次元平面に分散させた実験系では、酵母細胞を最も重点させた場合でも完全同期にはいたらなかった (未発表データ)。そこで、細胞密度をより高めるために、細胞を 3 次元的に集積することを行った。アルギン酸マイクロカプセルを用いて、その中に酵母細胞を封入した。細胞が 3 次元的に情報伝達物質を交換することで、同期の程度が高まるものと考えた。

細胞間の同期の程度を定量的に評価するために、蔵本の秩序パラメータを用いた (Shinomoto and Kuramoto, *Prog. Theor. Phys.*, 1986)。

### 3.4 ヒト子宮頸がん (HeLa) 細胞を用いた実験

酵母細胞の実験系を応用して、HeLa 細胞の解糖系振動反応を観察する実験手法を整え、HeLa 細胞の解糖系振動反応を 1 細胞レベルで観察した。

## 4. 研究成果

### 4.1 単一細胞のエネルギー獲得効率

Wolf と Heinrich の数理モデルの分岐解析を行うと、ATPase の反応の速度定数を分岐パラメータとすると、ある領域で振動状態と定常状態が共存する双安定領域が得られた。そこで、この双安定状態において、振動状態と定常状態のエネルギーチャージ量 (ATP/ADP) の 1 周期あたりの生成量を計算した。一例として、 $k_5=1.15$  の時、定常状態における値は 0.437、振動状態では 0.469 であった。従って、振動状態は定常状態に比べてエネルギーチャージ量が 1 周期あたり 7.3% 程度高いことになる。すなわち、振動的解糖反応は定常的解糖反応よりも、時間効率的にエネルギーを得ることができる解釈できる。

### 4.2 細胞間同期

上記の Wolf と Heinrich の数理モデルを用いて多数の細胞を情報伝達物質であるアセトアルデヒドで結合させたところ、振動周期の異なる細胞同士は同期しなかった。そこで、動物細胞において情報伝達を担っているとされている ATP や他の産生物質を介して結

合するモデルを構成した (Serizawa et al., Nat. Sci., 2014)。2次元平面に配置した  $11 \times 11 = 120$  個の細胞について、最近接細胞が情報伝達物質を介するモデルとした。121 個の細胞について、初期のグルコース濃度と速度定数等 9 つのパラメータ値をランダムに変化させた。すると、ATP を介して結合した細胞同士が最も高い同期性を示した。本数理モデル解析では、細胞集団が同期するモデルを構築するにとどまり、同期した細胞集団のエネルギー獲得効率を計算するには至らなかった。

#### 4.3 細胞間同期現象の実験

解糖系振動反応における細胞間同期現象 (コミュニケーション) の細胞密度依存性を調べるために、酵母細胞をアルギン酸マイクロカプセルに封入した研究を行った (Amemiya, et al., Chaos, 2015)。この実験により、マイクロカプセル内に 3 次元的に高密度に封入された酵母細胞集団が、2 次元での最密充填では示さなかった完全同期現象を示すことを定量的に明らかにした (図 1)。さらに、マイクロカプセル内を 2 つの半球に分割し、一方に密度の低い細胞集団を、もう一方に密度の高い細胞集団を封入したシステムを構成して実験を行ったところ、密度の低い細胞集団の振動が密度の高い細胞集団の振動に引き込まれることも示した。

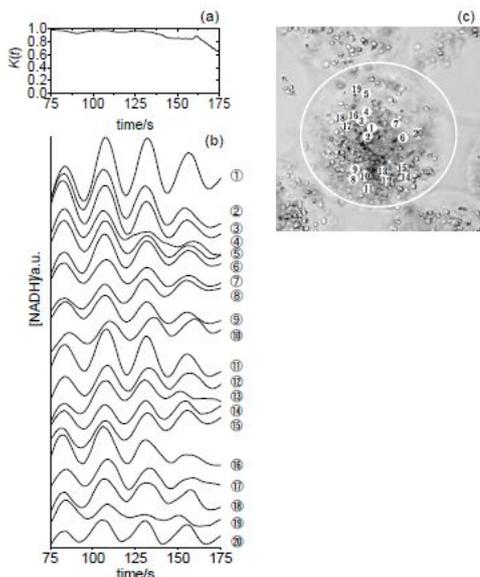


図 1. マイクロカプセルに高密度で封入された酵母細胞の解糖系振動反応の完全同期。(a)同期パラメータ (1 は完全同期)。(b)マイクロカプセル内の酵母細胞。(c)個々の細胞の解糖系振動 (20 細胞分)

#### 4.4 HeLa 細胞の解糖系振動反応

HeLa 細胞の 1 細胞ごとの解糖系振動反応の時系列データを図 2 に示す。解糖系振動反応は、グルコースを欠損させた前培養条件またはグルコースと血清を共に欠損させた前培

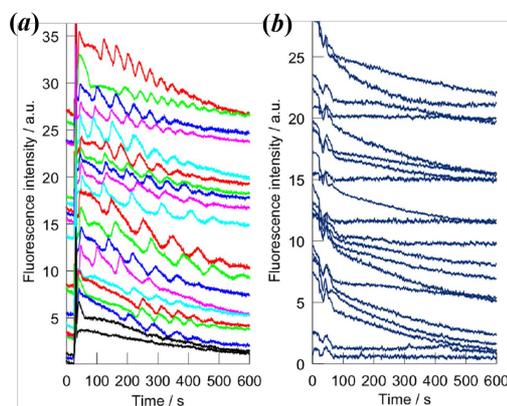


図 2. がん (HeLa) 細胞の解糖系振動反応。NADH (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) の自家蛍光強度変化で観察。(a)1 細胞の振動波形 (20 細胞分) (b)コントロール

養条件において観察された。すなわち、グルコースを欠損させた前培養を行わなければ、解糖系振動反応は観察されなかった。これは、酵母細胞の場合と同様であった。個々の HeLa 細胞は、前培養条件に応じて異なる解糖系振動反応を示した。グルコースのみを欠損させた条件では、比較的小さな振幅と短い周期 (20 秒 ~ 50 秒程度) の振動反応を示した。

一方、グルコースと血清の両方を欠損させた前培養条件では、大きな振幅と長い周期 (30 秒 ~ 90 秒程度) の振動反応を示した。この違いは、血清飢餓により、解糖系の酵素反応の活性が落ちることによって、振動周期が長くなったと考えられる。また、グルコース飢餓を受けなかった細胞は、解糖系振動を示さなかったが、これは、グルコース飢餓を受けた細胞はグルコースが添加された時に、グルコースの取り込み速度が高くなることと関連していると考えられる。すなわち、解糖系振動反応はグルコースの取り込み速度が高い細胞のみが示すことが示唆される。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- 1) 雨宮隆, 柴田賢一, 伊藤良洋, 渡邊昌俊, 伊藤公紀, 山口智彦。がん (HeLa) 細胞の解糖系振動反応の 1 細胞観察。信学技報, 116(437), 5-8, 2017。(査読無)
- 2) T. Amemiya, K. Obase, N. Hiramatsu, K. Itoh, K. Shibata, M. Takinoue, T. Yamamoto, T. Yamaguchi. Collective and individual glycolytic oscillations in yeast cells encapsulated in alginate microparticles. Chaos, 25, 0646061-0646067, 2015。(査読有)
- 3) 雨宮隆, 小長谷耕平, 平松直樹, 柴田賢一, 伊藤公紀。マイクロカプセル内の酵母細胞における解糖系振動現象および同期現象。信学技報, 115, 15-16, 2015。(査読無)

4) H. Serizawa, T. Amemiya, K. Itoh. Glycolytic synchronization in yeast cells via ATP and other metabolites: Mathematical analyses by two-dimensional reaction-diffusion models. Nat. Sci., 6, 719-732, 2014. (査読有)

5) 雨宮隆。癌細胞における解糖系振動反応。信学技報, 114, 21-23, 2014. (査読無)

[学会発表](計 26 件)

1) K. Shibata, T. Amemiya, M. Watanabe, K. Itoh, T. Yamaguchi. Intra- and inter-cellular analysis of glycolytic oscillations in cervical cancer HeLa cells. International Workshop, Symposium on Nonlinear Sciences - The history for 30 years and vision for the future -, 2016/09/26, AIST waterfront, Tokyo.

2) Y. Kawakita, K. Shibata, T. Amemiya, K. Itoh, T. Yamaguchi. Distance dependency of synchronized glycolytic oscillations in yeast cells encapsulated in alginate microparticles. International Workshop, Symposium on Nonlinear Sciences - The history for 30 years and vision for the future -, 2016/09/26, AIST waterfront, Tokyo.

3) T. Yamaguchi. Matter and life, and beyond. International Workshop, Symposium on Nonlinear Sciences - The history for 30 years and vision for the future -, 2016/09/26, AIST waterfront, Tokyo. (招待講演)

4) D. Yichen, 柴田賢一, 真原仁, 雨宮隆。大域結合された細胞集団の膜電位バースト。第 26 回非線形反応と協同現象研究会。2016/12/10, 明治大学(東京)。

5) 柴田賢一, 雨宮隆, 伊藤良洋, 渡邊昌俊, 伊藤公紀, 山口智彦。Intra- and inter-cellular analysis of glycolytic oscillations in cervical cancer HeLa cells. 第 26 回非線形反応と協同現象研究会。2016/12/10, 明治大学(東京)。

6) 川北侑羽, 柴田賢一, 雨宮隆。酵母細胞集団間の解糖系同期現象の距離依存性解析。第 26 回非線形反応と協同現象研究会。2016/12/10, 明治大学(東京)。

7) 麻野拓摩, 柴田賢一, 雨宮隆。HeLa 細胞の解糖系振動反応の pH 依存性。第 26 回非線形反応と協同現象研究会。2016/12/10, 明治大学(東京)。

8) T. Amemiya, K. Shibata, Y. Itoh. Glycolytic oscillations in cancer cells. 26th Annual Meeting of MRS-J, 2016/12/19-2016/12/22, 横浜市開港記念会館(神奈川)。(招待講演)

9) 山口智彦。自己組織化とバイオミメティクス。第 67 回コロイドおよび界面化学討論会, 2016/9/23, 旭川教育大学(北海道)。(招待講演)

10) 山口智彦。ジャボチンスキーのおくりもの。第 26 回非線形反応と協同現象研究会。2016/12/10, 明治大学(東京)。(招待講演)

11) T. Yamaguchi. Electrochemical and Nanoscale Instabilities. Gordon Research Conference on Oscillations and Dynamic Instabilities in Chemical Systems. 2016/7/17-2016/7/22, Stowe, (VT, USA).

12) T. Yamaguchi. Life and Matter, and Beyond. 先端科学技術シンポジウム 自己組織と新しいナノ物質科学。2016/10/14, 秋葉原プラザ(東京)。(招待講演)

13) 雨宮隆。細胞における解糖系振動反応の医療情報への応用。電子情報通信学会, 2015 ソサイエティ大会, 2015/9/9-2015/9/11, 東北大学(宮城)。(招待講演)

14) T. Amemiya. Function and application of glycolytic oscillations in cells. 25th Annual Meeting of MRS-Japan 2015, 2015/12/8-2015/12/10, 横浜市開港記念会館(神奈川)。(招待講演)

15) T. Amemiya, K. Obase, N. Hiramatsu, K. Itoh, K. Shibata, M. Takinoue, T. Yamamoto, T. Yamaguchi. Metabolic network and glycolytic oscillations in yeast and cancer cells. Pacificchem 2015, 2015/12/15-2015/12/20, ホノルル, ハワイ(米国)。

16) 雨宮隆, 小長谷耕平, 平松直樹, 柴田賢一, 伊藤公紀。マイクロカプセル内の酵母細胞における解糖系振動現象および同期現象。電子情報通信学会, 有機エレクトロニクス研究会, 2015/4/29-2015/4/30, 大瀧信泉記念館(沖縄)。

17) 伊藤良洋, 柴田賢一, 伊藤公紀, 雨宮隆。代謝振動反応を指標とした休眠細胞検出法の確立に向けた基礎研究。第 25 回非線形反応と協同現象研究会, 2015/10/3-2015/10/3, 旭川医科大学(北海道)。

18) 小長谷耕平, 平松直樹, 柴田賢一, 伊藤公紀, 雨宮隆。細胞の階層性ダイナミクスを用いた毒性評価概念の創出。第 25 回非線形反応と協同現象研究会, 2015/10/3-2015/10/3, 旭川医科大学(北海道)。

19) T. Amemiya, T. Miyata, N. Hiramatsu, K. Shibata, K. Itoh. Metabolic network and glycolytic oscillations in yeast and other cells. Gordon Research Conference, Oscillations & Dynamic Instabilities in Chemical Systems, 2014/7/13-2014/7/18, Girona (Spain).

20) T. Amemiya. Glycolytic oscillations in yeast and cancer cell. 24th Annual Meeting of MRS-Japan 2014, 2014/12/10-2014/12/12, 横浜市開港記念会館(神奈川)。(招待講演)

21) T. Amemiya. Cell-to-cell communication in yeasts via ATP. IUMRS-ICA2014, 2014/8/24-2014/8/30, 福岡大学(福岡)。(招待講演)

22) 雨宮隆。癌細胞における解糖系振動反応。電子情報通信学会，有機エレクトロニクス研究会，2014/11/28-2014/11-29，奄美大島商工会議所（鹿児島）。

23) 平松直樹，柴田賢一，伊藤公紀，山本哲也，山口智彦，雨宮隆。酵母解糖系における振動反応の時空間制御。第24回非線形反応と協同現象研究会，2014/12/6，東京電機大学（東京）。

24) 小長谷耕平，柴田賢一，伊藤公紀，瀧ノ上正浩，雨宮隆。酵母マイクロカプセル化における解糖系振動反応の酵母間相互作用の解析。第24回非線形反応と協同現象研究会，2014/12/6，東京電機大学（東京）。

25) 伊藤良洋，柴田賢一，伊藤公紀，雨宮隆。酵母におけるG0細胞周期と解糖系振動反応の関連性の解析。第24回非線形反応と協同現象研究会，2014/12/6，東京電機大学（東京）。

26) 飯塚一步，柴田賢一，伊藤公紀，雨宮隆。酵母解糖系振動反応を利用したバイオアッセイの検討。第24回非線形反応と協同現象研究会，2014/12/6，東京電機大学（東京）。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

〔国際研究集会開催〕(計1件)

1) International Workshop, Symposium on Nonlinear Sciences - The history for 30 years and vision for the future -, 2016/09/26, AIST waterfront, Tokyo.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

雨宮 隆 (AMEMIYA TAKASHI)

横浜国立大学・環境情報研究院・教授

研究者番号：60344149

### (2) 研究分担者

伊藤 公紀 (ITO KIMINORI)

横浜国立大学・環境情報研究院・教授

研究者番号：40114376

### (3) 研究分担者

山口 智彦 (YAMAGUCHI TOMOHIKO)

産業技術総合研究所・機能化学研究部門・

首席研究員

研究者番号：70358232

### (4) 研究協力者

山本 哲也 (YAMAMOTO TETSUYA)

東京都立産業技術高等専門学校・ものづくり

工学科・教授

研究者番号：00259839

### (5) 研究協力者

佐々木 聡 (SASAKI SATOSHI)

東京工科大学・応用生物学部・教授