

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13617

研究課題名(和文)単細胞・多細胞生物進化の熱力学的解明

研究課題名(英文)Thermodynamics for Single/Multicellular Transition

研究代表者

中林 誠一郎 (NAKABAYASHI, Seiichiro)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：70180346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞性粘菌の飢餓集合をモデルにして、単細胞生物から多細胞生物への生物学的変化の熱力学的原因を解明した。二匹の粘菌細胞が接近するに伴ってNADH量が減少し、接触したときに最小値を示し、その後細胞の分離とともに上昇する事が判った。細胞性粘菌集団の総NADH量を、飢餓による集合体形成前後で測定しても、集合体形成により総NADH量は減少した。これら2つの実験結果は、互いに調和的であり、多細胞化の初期過程は、多細胞化によるエネルギー代謝効率改善に支えられたと考える事ができる。

研究成果の概要(英文)：A plausible reason of an evolution of a multicellular organism from single cellular one was studied experimentally by using starvation induced aggregation of Dictyostelium. While the total number of Dictyostelium cells were constant, WST measurement showed decrease in total NADH by the aggregation. The amount of NADH in a single cell was detected by fluorescence microscopy. A collision of two free moving cells decreased the fluorescence intensity. After separation, the intensity was recovered. These two types of measurements were harmonized well to indicate that the multicellular organism requested less energy dissipation than that of single cellular system, which means the biological transition of single to multicellular organism was achieved by the thermodynamically.

研究分野：物理化学

キーワード：単細胞多細胞転移 細胞性粘菌 NADH蛍光

1. 研究開始当初の背景

単細胞生物が多細胞生物へと進化したことで、外界との界面積の減少や、組織ごとに役割を分担することが可能となり、その結果、多細胞生物は数々の高度な機能を獲得した。単細胞生物と比較して 10^{14} 以上もの細胞で構成されているヒトは、細胞・組織ごとに役割を分担し、高度な機能を維持している。だが、 10^{14} 匹を越す細胞の集団も、原始生命の初期の過程では、数匹の単細胞生物の接合で始まったはずである。その多細胞化の初期過程で起こった数匹の単細胞生物の接合では、上で述べたような多細胞化による高度な機能の獲得を得られたのかどうかは疑問である。我々は多細胞化の初期過程は、多細胞化によるエネルギー代謝効率改善に支えられたと推定して、細胞性粘菌の集合をモデルとして仮説の妥当性を検証した。本研究は進化の初期過程における多細胞化の初期駆動力の解明を目的とした研究である。

2. 研究の目的



図1 細胞性粘菌の単細胞 多細胞転移

細胞性粘菌は、飢餓状態におかれると、それまで孤立してバラバラに動いていた細胞が、突然、特定方向に移動を始め、多細胞化し凝集体を作る (図1)。飢餓が誘起する多細胞化は、細胞性粘菌に特徴的な振る舞いであり、以前からよく知られている。飢餓状態の細胞性粘菌は、c-AMP を放出し、自らの存在を、他の孤立細胞に知らせる。孤立細胞は、誘因分子である c-AMP の濃度勾配を遡る運動をおこない、凝集体が完成する。申請者は、この細胞凝集が、単一細胞当たりのエネルギー代謝を減少させ、生存を担保する合目的性を持っていると推定した。さらに、孤立単細胞が、多細胞状態に転移する現象は、生命進化の初期過程の重要な状態変化「真核多細胞生物の出現」に関わりがある。つまり、細胞性粘菌の単細胞・多細胞転移に伴う生体エネルギー変化を明らかにできれば、細胞性粘菌に固有な知見を得ると同時に、広く、生命進化の初期過程の駆動力を解明するヒントが掴めると期待して研究を進めた。細胞性粘菌は、劇的な単細胞多細胞転移をおこし、光学的に透明な実験生物であり、顕微レーザー分光が有効に機能する研究対象である。

3. 研究の方法

①細胞性粘菌の単細胞・多細胞転移に伴う単位細胞当たりの代謝量変化を顕微蛍光法から測定した。②細胞内生理回路の一部を壊して、部分的な破壊が、単細胞・多細胞転移のどこ

を傷害するかを調べた。全体を通して、細胞どうしの接着や接触、あるいは、細胞外に送った信号分子が、細胞のエネルギー代謝に与える影響を調べ、細胞集団の熱力学的取り扱いのヒントを得ることを目指した。

4. 研究成果

単一細胞の個別観察を行う前段階として、細胞増殖検査試薬である WST-1 を用いて、細胞集団全体で、単細胞→多細胞転移に伴う代謝量変化を測定した。テトラゾリウム塩 WST-1 (4-[3-(4-ヨードフェニル)-2-(4-ニトロフェニル)-2H-5 テトラゾリノ]-1,3-ベンゼンジスルフォネート) は、ミトコンドリア内の NADH 分子と、電子メディエーターを介して、酸化還元してフォルマザン色素を生成する (図2)。

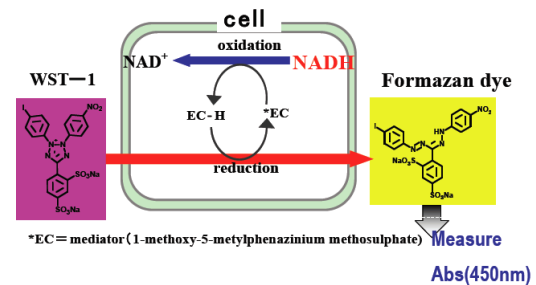


図2 フォルマザン色素による NADH の定量

飢餓状態においた細胞性粘菌集団中の総 NADH 量は、細胞増殖が止まっていることを確かめた上で、WST-1 を用いて、フォルマザン色素の呈色から求めた。元来、生理的なエネルギーキャリアは ATP であることから、単位細胞当たりの ATP 量を代謝の指標に用いるべきである。しかしながら、生細胞の ATP 量を、非侵襲に測定する手法は皆無である。そこで、NADH が ATP 合成の前駆分子である事を考え合わせて、測定した NADH 量を、細胞の代謝エネルギーの間接的な指標として用いた。得られた結果は、概ね予想と一致し (図3)、単一細胞の凝集が始まるとともに、1細胞当たりの NADH 量が減少することが判った。つまり、飢餓状態の細胞は、凝集し多細胞集団となることで生存に必要な最低維持エネルギー量を減らし、生存の確率を高めるように見える。

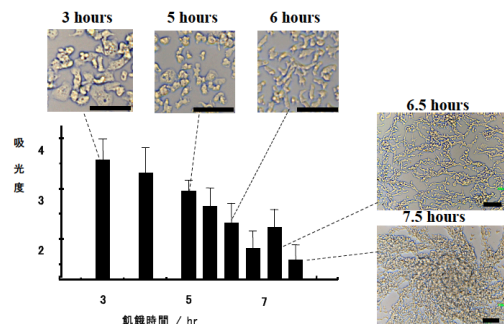


図3 細胞集合と NADH の減少

上述の準備実験には、結論を確定する際に検証すべき仮定がある。WST 測定には、培養する全ての細胞が関与する。従って、結論を維持するためには、単細胞→多細胞転移が完結するまでのあいだ、細胞数が不変であること、また、より根本には、NADH 量が、正しく細胞代謝の指標になることを確かめる必要がある。本研究では、顕微鏡下の単一細胞の形態計測と、単一細胞中の NADH からの発光を測定し、仮定から自由な状況で結論を検証するとともに、細胞 1 つ 1 つに注目した細胞代謝の詳細を明らかにした。

水銀ランプからの紫外光 (330-380nm) の光を、孤立細胞性粘菌に照射すると、452nm に発光極大波長を持つ蛍光が観測される。この発光は、生細胞中の NADH 分子に由来する蛍光である。このことは、観測される発光の、励起スペクトルと発光スペクトルの両方が、NADH のそれと良く一致すること。さらに、顕微鏡像と、染色色素ロッド 2 でミトコンドリアを選択染色した画像との一致から、蛍光分子はミトコンドリア中の NADH であると確認できた。NADH 蛍光強度は、WST を用いた予備測定の結果から、単一生細胞の代謝の指標となる。しかし、紫外光の照射は、細胞機能を損傷する可能性もある。

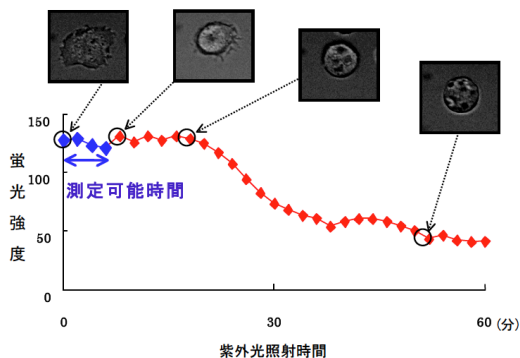


図4 紫外線照射と NADH 自家蛍光

そこで、生細胞の紫外光照射に対する耐性閾値を測定した。測定は、2 波長の光パルス (可視光・紫外光パルス) を交互に照射する序列に従った。先行する可視光照射で、細胞の形態を観測し、後続する紫外光照射で蛍光像を得、イメージプロセッサ上で、細胞上で積分した蛍光強度を、単一細胞蛍光値とした。長時間の紫外光照射では、アメーバ状の細胞形態が球形に変化し、細胞の内部機能に損傷が誘起されることが判った (図 4)。有意な代謝評価は、細胞形態がアメーバ状に保持される領域でだけ可能である。紫外光の強度を変えて、耐性閾値を求めると、興味深いことに、紫外光の照射総光量に明確な閾値が存在した (図 5)。つまり、この閾値以下ならば、細胞機能を阻害することなく、NADH 濃度を蛍光測定できる。但し、この閾値は、現在のところ、相対値であるから、生細胞 1 個あたり幾つの紫外光光子を捕獲すると、機能損傷が起こるのかは明らかではない。

蛍光測定を行うためには、無蛍光性の培養液の探索が必須であった。一般的な細胞性粘菌培養液は、無視できない蛍光を発するため、試行錯誤の末、ロフロと呼ばれる特殊な無蛍光性培養液を使用した。ロフロ環境下でも、細胞は、飢餓状態に晒すと集合体を形成し、

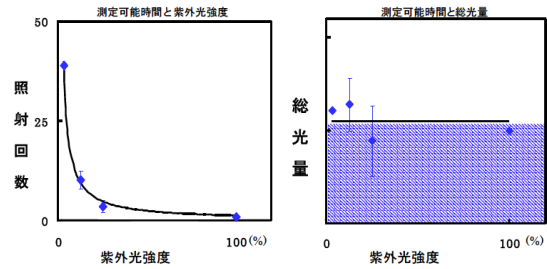


図5 細胞性粘菌の紫外線損傷と閾値

細胞の活性を保持している。

細胞内代謝回路を制御する目的で、培養液中に NaCl と Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) を添加した。それぞれ、ミトコンドリア中で NADH の分解と生成を阻害することが知られている。NaCl 添加で、孤立生細胞中に NADH の濃度上昇が起こり、蛍光強度が増すこと。さらに、FCCP の添加で、蛍光強度が減少することを確認できた [図 6]。このように、測定の原理的な信頼性は、確保されていると言える。NaCl や FCCP による、NADH 合成回路の部分損傷の絶対効率を明らかにすれば、化学的に生理的な実態に迫ることができるだろう。

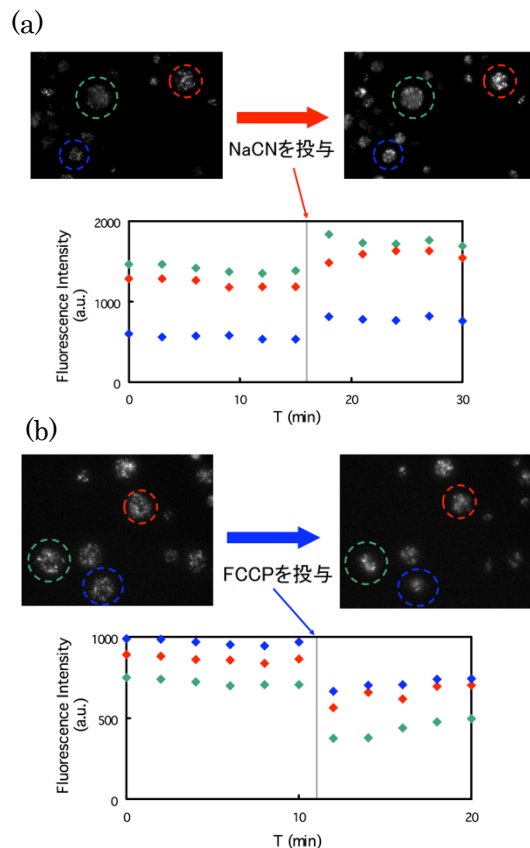


図6 NaCl FCCP 投与による NADH 蛍光強度変化

細胞間の相互作用（接着、接触、分子コミュニケーション）による代謝状態の変化を測定した。細胞性粘菌の NADH 蛍光を、細胞ごとに観測すると、それぞれの動作状態で蛍光変化が大きく変わることが判った。図 7 は、運動している細胞と、静止している細胞の蛍光強度の時間変化を測定したグラフである。運動にはエネルギーを要するので、不規則に運動している細胞は、不規則に蛍光強度を変化させた。一方、静止している細胞は、NADH 蛍光強度も、ほぼ一定であった。これらの測定をもとにして、2つの細胞が衝突、接触、停止する前後での蛍光強度の変化を NADH 蛍光から明らかにした。

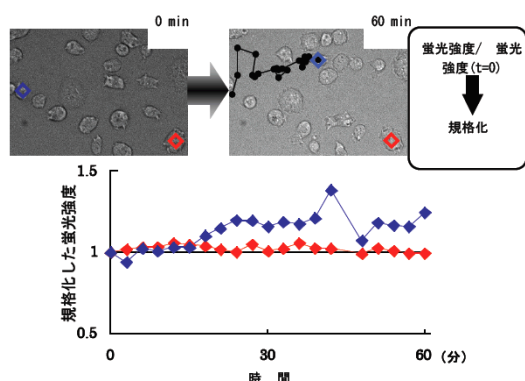


図 7 細胞運動による NADH 蛍光の変化

細胞衝突を制御するためには、例えば、レーザーピンセット法や、電場輸送法が既存の技術としてある。レーザーピンセットは、光学的な屈折率差を利用して集光スポットに細胞を捕獲する手法である。電場輸送法は、細胞が帯電していることを利用して、静電的に細胞を捕獲し輸送する方法である。特にレーザーピンセット法は、実績のある手法ではあるが、プローブ用のビーズではなく、生細胞そのものを捕獲した際に細胞機能をどの程度阻害するかが明らかではない。そこで、これらアクティブな手法に先立って、原始的ではあるけれども、侵襲性の皆無な「たまたま衝突」を数回観測して、ここから得られるデータを標準変化として記録した。但し、偶然に基づく衝突は、おそらく 2 体衝突以上の多体衝突を期待することには無理があるだろう。つまり、できる限り自然な状態で、細胞の運動軌跡を制御する手法の開発が必須である。現在、アガロースゲル上に細胞を播き、ひっくり返してシャーレ底から、倒立顕微鏡で細胞運動観察を行っている。アガロースに、赤外レーザーで筋を付けたり、塩分を調節して細胞の運動軌跡の制御を試行錯誤しているが、いまだ、満足いく結果に至っていない。

図 8 は、細胞性粘菌の集合体の NADH 顕微蛍光像である。集合体内部に比べ、周囲や頂点に位置する細胞の蛍光が強い。この像は、集合体やその前駆体で、細胞間の結合強さと、配位数に応じて、代謝が変化する事を強く支持しており、提案する実験の妥当性を示して

いる。

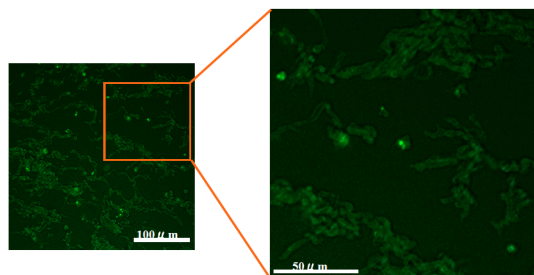


図 8 細胞位置〔配位数〕による NADH 蛍光変化

熱力学では、物質のエントロピー(乱雑さ)が増すと自由エネルギーが低下すると言われている。しかしこれまでに行った研究の結果より得られた細胞性粘菌の集合とエネルギー代謝量の相関を見ると、エントロピーの低下(集合)に伴い細胞のエネルギーが低下していることが示された。

エネルギー源となる餌が存在しない飢餓条件下でなく、十分な餌がありかつ、細胞集合を誘起で着る塩ストレスか下で細胞の集合がエネルギー代謝に及ぼす影響調べた。細胞性粘菌はもともと集合する性質を持っている生物である。そこで集合する性質を持っていない細胞でも細胞の密度上昇に伴って粘菌細胞と同様のエネルギー代謝量減少プロセスが働く事が判った。

全体を通して、エネルギー代謝効率の改善が多細胞進化の初期駆動力となったのではないかと我々の仮説〔図 9〕をより強く支持する結果を得た。

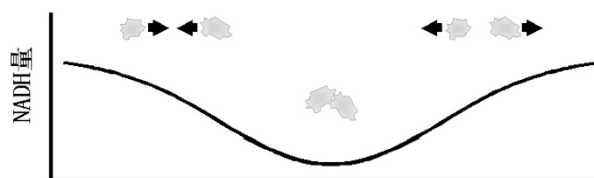


図 9 二匹の粘菌細胞が接近するに伴って NADH 量が減少し、接触したときに最小値を示し、その後細胞の分離とともに上昇する

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 10 件)

- (1) S.Tajima, H.Singh, S. Nakabayashi, T. Singla, P. Parmananda "The emergence of synchrony behavior in weakly coupled electrochemical oscillators via a 'metallic plate'" J.Electroanal.Chem., 769. 16-20 (2016).
DOI: 10.1016/j.jelechem.2016.03.004
- (2) A. Loukanov, V. Zhelyazkov, Y. Hihara, Yukako, S. Nakabayashi, "Intracellular Imaging of Qdots-Labeled DNA in

- Cyanobacteria "MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE. 79. 447-452 (2016).
DOI: 10.1002/jemt.22651
- (3) H.Singh, S.Nakabayashi. "A temporal semi-stochastic model for pitting corrosion" J.Electroanal.Chem., 766. 60-70 (2016).
DOI: 10.1002/jemt.22651
- (4) T.Matsuzaki, I. Kosaku, K. Masuda, E. Kakinuma, R. Sakamoto, K. Iketaki, H.Yamamoto, M. Sukanuma, N. Kobayashi, S. Nakabayashi, T. Tani, HY.Yoshikawa. "Quantitative Evaluation of Cancer Cell Adhesion to Self-Assembled Monolayer-Patterned Substrates by Reflection Interference Contrast Microscopy" J.Phys.Chem.B. 120. 1221-1227 (2016).
DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b11870
- (5) T. Singla, F.Montoya, M.Rivera, S.Tajima, S.Nakabayashi, P.Parmananda. "Synchronization using environmental coupling in mercury beating heart oscillators" Chaos 26. 063103 (2016).
DOI: 10.1063/1.4953014
- (6) N.Kobayashi, R.Kawamura, H.Yoshikawa, S.Nakabayashi. "Investigation on Nanoscale Processes on the BaF₂(111) Surface in Various Solutions by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy".J.Appl.Phys. 119. 214308 (2016).
DOI: 10.1063/1.4953233
- (7) A.Loukanov, R.Sekiya, M.Yoshikawa, N.Kobayashi, Y.Moriyasu, S. Nakabayashi "Photosensitizer-Conjugated Ultrasmall Carbon Nanodots as Multifunctional Fluorescent Probes for Bioimaging" J.Phys.Chem.C 120, 15867-15874 (2016).
DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b11721
- (8) Kawamura, Ryuzo; Uehara, Daiki; Kobayashi, Naritaka; Nakabayashi, Seiichiro; Yoshikawa, Hiroshi "Kinesin-driven active substrate giving stochastic mechanical stimuli to cells for characterization" ACS Biomaterials Science & Engineering.2, 2333-2338 (2016).
DOI: 10.1021/acsbiomaterials.6b00538
- (9) R.Sakamoto, E. Kakinuma, K.Masuda, Y.Takeuchi, K.Ito, K.Iketani, T.Matsuzaki, S.Nakabayashi, H.Yoshikawa, H.Yamamoto, Y.Sato, T.Tani "Quantitative comparison of cancer and normal cell adhesion using organosilane monolayer templates: an experimental study on the anti-adhesion effect of green-tea catechins" IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY-ANIMAL, 52, 799-805 (2016)
DOI: 10.1007/s11626-016-0049-6
- (10) Tomoya Naganuma, Harpartap Singh and Seiichiro Nakabayashi "Feedback effect on pitting corrosion dynamics" Journal of Solid State Electrochemistry 19, 3219-3228 (2015).
DOI: 10.1007/s10008-015-2991-8
- [学会発表] (計 1 件)
- ① Advanced Architectures in Photonics 2016 Mykonos Island, GREECE "Photosensitizer-conjugated Ultrasmall Carbon Nanodots as Multifunctional Fluorescent Probes for Bioimaging" 2016年9月25日～2016年9月29日 (招待講演)
- [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]
ホームページ等
<http://park.saitama-u.ac.jp/~nakabayashi-lab/>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
中林 誠一郎 (NAKABAYASHI, Seiichiro)
埼玉大学・理工学研究科・教授
研究者番号：70180346