

上田 昌宏

大阪大学大学院生命機能研究科・特任教授

細胞における確率的分子情報処理のゆらぎ解析

§1. 研究実施体制

(1)「大阪大学」グループ

① 研究代表者: 上田 昌宏 (大阪大学大学院生命機能研究科, 特任教授)

② 研究項目

(1) 細胞内1分子顕微鏡法の開発とゆらぎ計測

(1-1) 細胞内1分子顕微鏡の構築

(1-2) 1分子輝点自動追跡ソフトの開発

(1-3) 走化性情報処理システムのゆらぎ計測

(2) ネットワーク解析法の開発と再構成ゆらぎ計測実験系による検証

(2-2) 再構成ゆらぎ計測実験系による検証

(3) ノイズ印加実験系の開発および数理モデル構築

(2)「広島大学-理化学研究所」グループ

① 主たる共同研究者: 柴田 達夫 (理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター, ユニ
トリーダー)

② 研究項目

(1) 細胞内1分子顕微鏡法の開発とゆらぎ計測

(1-2) 1分子輝点自動追跡ソフトの開発

(2) ネットワーク解析法の開発と再構成ゆらぎ計測実験系による検証

(2-1) ネットワーク解析法の開発と数理モデル構築

(3)「奈良県立医科大学」グループ

① 主たる共同研究者: 高木 拓明 (奈良県立医科大学・物理学教室, 講師)

② 研究項目

(3) ノイズ印加実験系の開発および数理モデル構築

(3-2) 細胞運動解析法の開発と数理モデル構築

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

本研究では、細胞の情報処理機能や運動機能の機能発現ダイナミクスを1分子・分子ネットワーク・細胞の各階層において定量的に計測し、計測結果に基づいた理論・数理モデルの構築を通して、分子運動・分子反応の確率性に起因して生じるゆらぎが機能発現に果たす役割を明らかにすることを目的としている。これまでの研究から、各階層においてイメージング技術の開発と理論・数理モデルの構築を行い、走化性情報処理システムに適用する事により、両者を連携させた研究を実現した。その結果として、GPCR 型受容体-G 蛋白質共役過程での「時間平均作用によるノイズ低減」、細胞内自己組織化と細胞運動解析における「構造化された確率性 (organized randomness)」などの作業仮説が得られた。そこで本年度は、これらの作業仮説の実験的検証と理論による理解をさらに進めた。

(1) 細胞内1分子顕微鏡解析法の開発とゆらぎ計測

(1-1 および 1-2) 細胞内1分子顕微鏡の構築と1分子輝点自動追跡ソフトの開発。

これまでに開発してきた細胞内1分子イメージング顕微鏡の機能を拡張し、個々の分子の挙動(1分子計測)と自己組織化パターン形成(多分子計測)を同時に観察できる顕微鏡を構築した。これにより1分子レベルでの個々の分子の確率的な振る舞いとネットワークレベルでのダイナミクスを直接計測することが可能となった。また、多分子計測には Structured illumination microscopy (SIM)による超解像イメージングを導入した。1分子輝点自動追跡ソフトについては、すでに実際の実験研究での利用を開始しているが、適用範囲を広げる観点から、免疫系の細胞を含む様々な細胞種における1分子イメージング解析に応用した。この過程で各種統計解析法や分子拡散状態イメージング法、解析結果の可視化のための機能拡張モジュールの開発・統合化を進めた。これにより、顕微鏡による画像データの取得から統計解析結果の表示までのワークフロー全体を効率的に進めることが可能になった。

(1-3) 走化性情報処理システムのゆらぎ計測。

走化性情報処理システムにおける「ノイズの生成・処理・伝搬」の仕組みを明らかにすることを目的として、走化性シグナル伝達系の最上流部で働く走化性受容体(cAR1)および三量体 G 蛋白質($G\alpha 2$, $G\beta\gamma$)の共役反応過程の1分子解析を進めてきた。これまでの研究から、受容体と G 蛋白質の共役反応過程には従来の GPCR 研究では知られていない二つの相互作用様式(酵素的相互作用と化学量論的相互作用)が関与していることが明らかになった。数理モデルを用いた解析から、両蛋白質間の化学量論的相互作用は「時間平均作用によるノイズ低減」(ローパス)機能を持つことが示唆された。そこで本年度は、生きた細胞上での個々の G 蛋白質分子の拡散動態を隠れマルコフ法により解析し、G 蛋白質が受容体と相互作用する位置とタイミングを決定する方法を開発した。これにより、走化性を示している細胞上で受容体から G 蛋白質へと化学量論的にシグナルが伝達される瞬間を捉えることが可能になった。

当初の研究計画でも述べたように、走化性情報処理システムの全貌を1分子レベルで明らかに

するためには、20種類程度の分子種について1分子解析を進める必要がある。これを実現するためには、計測対象となる各蛋白質分子の機能を失わないように1分子計測用の蛍光色素で標識することが必要不可欠となる。そこで本年度は、走化性情報処理システムを構成する複数のパラレル経路のうち、PI3K-PTEN経路、及び、TorC2経路にある蛋白質分子群の蛍光プローブを調整した。各蛋白質分子の遺伝子破壊株作製と蛍光標識蛋白質による表現型の確認作業を行なった。このうち、イノシトールリン脂質代謝系の自己組織化反応に関することが明らかとなっているPTEN分子については、項目(1-1 および 1-2)で開発した1分子イメージング解析法を適用し、多状態間遷移モデルにより確率的な振る舞いを記述できることが明らかになった。

(2)ネットワーク解析法の開発

(2-1) ネットワーク解析法の開発と数理モデル構築.

(a) 小規模ネットワークモチーフ、応答・適応を示す反応回路におけるノイズの生成・伝搬.

細胞内情報処理に伴うノイズの生成伝搬と応答性の関係に注目して理論的な解析を行ってきた。本年度はまず、細胞がスパイク的な応答を示す場合に、分子スケールの確率性が自発的なスパイク生成を引き起こすことを、提案されている理論モデルの解析によって示し、報告した¹⁾。この結果は、走化性シグナル伝達系におけるイノシトールリン脂質反応の自発的な局在形成が(項目(b)参照)、反応の確率性によって誘起されていることを強く示唆している。また、本年度は化学勾配認識の統計的な情報処理についての理論的な解析を進め、その確率性を明らかにした。受容体とリガンドの結合から統計的に最も確からしい勾配方向を推定したときに、その推定方向の分布は、細胞の形態に依存して特徴的な分布を示すことが分かった。また、方向のみを推定するか、あるいは、方向と勾配の大きさの2つを推定するかで、推定方向の細胞形態に対する依存性が大きく異なっていることを見だし、理論的に説明した。これらの結果は、走化性シグナル伝達系の複数の生化学反応がどのような情報処理を行っているのか(勾配方向のみの推定や方向と勾配両方の推定など)を示唆しており、反応との対応関係を検討していく手がかりとなることが期待される。

(b) 細胞内情報伝達のスペクトル解析法.

予備的な実験から、細胞運動の制御因子であるイノシトールリン脂質代謝系のPI(3,4,5)P3は、刺激がない場合にも細胞膜上で自発的に局在ドメインを形成することが明らかとなり、興奮性を示すことが示唆された。興奮性は神経の発火をはじめとする細胞応答の基本様式のひとつであり、自発的な局在形成を説明しうるため、本年度は興奮性の検証に焦点を絞って研究を進めた。興奮性の応答は悉無律的で、閾値を越えると反応自身によって決まる特定の変動を示す。すなわち、応答の様子は入力に依存しない。さらに進めて言えば、いったん閾値を越えれば、その後の応答に刺激は必要ない。そこで、一様な持続性刺激やパルス状の瞬間的な刺激など、様々な入力パターンで細胞を刺激し、入力に対するPI(3,4,5)P3の応答変化を詳細に調べた。その結果、刺激の大きさによらずPI(3,4,5)P3の応答の大きさは一定で、興奮系を持つ特徴を示した。また、周期的な繰り返し刺激に対して、PI(3,4,5)P3の応答性は低下し、興奮系の特徴である不応期が観察された。これらの結果により、PI(3,4,5)P3を含む反応系は興奮系であることが明らかとなった。さらに、

自発的に形成される局在ドメインは発火強度、発火時間ともに、刺激入力により得られた結果と一致していた。これは、自発的な PI(3,4,5)P₃ の発火は興奮性を起源とすることを示唆している。

(2-2) 再構成ゆらぎ計測実験系による検証.

イノシトールリン脂質代謝系の自己組織化反応ネットワークは、各分子の確率的な動作に基づいて分子集団としてシグナルを自発生成するため、この再構成実験系の構築は「構造化された確率性」の仮説を検証するために重要である。昨年度までに確立した数理モデルにおいて、自己組織化過程の基本的な構成要素は、細胞膜の PI(3,4,5)P₃ および PI(4,5)P₂ と、これらの代謝酵素である PI3-kinase および PTEN である。要素間の反応として、モデルでは代謝反応の他に細胞膜上の PTEN 濃度に対する PI(3,4,5)P₃ による負の制御 (negative regulation: PI(3,4,5)P₃ の多い細胞膜領域から PTEN が排除される) が仮定されており、今年度はこの制御が実際に細胞内で働いているかどうかを検証した。その結果、PTEN の基質結合部位に PI(3,4,5)P₃ が結合することにより PTEN は細胞膜から解離しやすくなることが明らかになった。このように、他のタンパク質の介在なしに PTEN の膜結合性が制御されることから、今後は、PTEN の負の制御の分子メカニズムを 1 分子軌跡統計解析法により解明する。また、各構成要素の分離精製を進め、自己組織化パターンを形成するミニマムな再構成実験系の構築を目指す。

(3) ノイズ印加実験系の開発および数理モデル構築

(3-1 と 3-2) 電場を用いた入出力応答計測と細胞運動の数理モデル構築.

本研究項目においては、細胞運動の不規則時系列データから細胞内情報処理システムの構造と機能に関する情報を引き出す解析法を開発する。これまでに、一般化ランジュバン方程式における運動速度の記憶項に外部電場依存性を持たせることにより、走性応答における細胞運動を定量的に再現できることを明らかにしてきた。この現象論モデルを解析した結果、細胞の運動速度の記憶項が細胞の応答を規定する主要因であり、野生型細胞では環境変動に対してもっとも効率よく適応可能な記憶強度に最適化されていることが明らかになった。よって次に、モデルから予想された細胞運動の記憶強度と環境適応性の関係について実験による検証を進めた。具体的には、自発運動のゆらぎが増加し、走電性応答の効率が低下する、cGMP 合成酵素依存性経路の変異細胞 (以下 cGMP 経路変異細胞)、及び細胞の極性と運動の直進性が高まる、cAMP 一様刺激を加えた野生型細胞、そして cAMP 刺激なしでの野生型細胞のそれぞれに対して入力電場反転実験を行い、反転電場に対する追従性から細胞の環境適応性を調べた。その結果、cGMP 経路変異細胞は一定電場中での効率は低いが、電場反転に対しては追従速度が高く、cAMP 一様刺激細胞は一定電場中での効率は高いが、電場反転に対しては追従速度が低く、通常の野生型細胞では双方ともに中間をとることが明らかとなり、モデルの予想を支持する実験結果が得られた。また、細胞の走性運動のモデルを用いたシミュレーションにより、複雑な環境変動に対する細胞の適応的な応答を再現することに成功した³⁾。今後は、野生型細胞及び変異体細胞を包括的に扱う数理モデルを構築し、変化する環境へも柔軟に応答できる野生型細胞の情報処理能をより定量的に検証していく。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Ooyama S. and Shibata T., “Hierarchical organization of noise generates spontaneous signal in Paramecium cell, *J. Theor. Biol.* 283, 1–9, 2011 (DOI: 10.1016/j.jtbi.2011.05.016)
2. Kobayashi Y., Shibata T., Kuramoto Y., and Mikhailov, A.S., “Robust network clocks: Design of genetic oscillators as a complex combinatorial optimization problem”. *Phys Rev E* 83:060901, 2011 (DOI: 10.1103/PhysRevE.83.060901)
3. Nishimura, S. I., Ueda, M. and Sasai, M. (2012). Non-Brownian dynamics and strategy of amoeboid cell locomotion. *Phys Rev E*, in press.