

「生命システムの動作原理と基盤技術」

平成 19 年度採択研究代表者

上田 昌宏

大阪大学大学院生命機能研究科・特任教授

細胞における確率的分子情報処理のゆらぎ解析

1. 研究実施の概要

細胞を構成する生体分子は、熱ゆらぎによる無秩序な攪乱に晒される中で機能を果たすが、細胞内の情報処理はそのことで不可避免的に確率的性質を持つ。従来の工学では、ノイズを徹底的に排除することによって正確なシグナル処理・伝達を行ってきたが、生物の情報処理システムでは、ノイズの生成・伝搬がむしろ特徴となっている。ここには従来の工学とは違う新しい情報処理原理があるのだろうか？本研究では、細胞内の分子情報処理システムを流れるシグナルとノイズを1分子レベルの精密計測により実験的に捉え、「ノイズの生成・処理・伝搬」に着目した理論・数理モデルの構築を通して、分子情報処理システムの確率的演算原理の解明を目指す。本年度は、(1) 細胞内1分子顕微鏡解析法の自動化、(2) 比較的小規模の分子ネットワークモチーフにおける理論・数理モデル、(3) 細胞内情報処理システムを外部から積極的に変調するためのノイズ印加実験系、の3点について研究開発を開始した。また、具体的な解析対象として走化性情報処理システム最上流の受容体と三量体 G 蛋白質について解析したところ、「ノイズ処理」のメカニズムとして時間平均によるノイズ除去を示唆する結果が得られた。

2. 研究実施内容

(1) 細胞内 1 分子顕微鏡法の開発とゆらぎ計測

本研究項目では、細胞内情報システムを流れるシグナルとノイズを1分子レベルで計測するための顕微鏡法を開発する。本年度は、全反射型1分子蛍光顕微鏡をベースとして、照明系の自動制御化および1分子輝点自動追跡ソフトの開発を開始した。走化性情報処理の解析においては、システム最上流にあたる受容体と三量体 G 蛋白質の共役反応過程について1分子解析を行なった。

(1-1) 細胞内 1 分子顕微鏡の構築 全反射エバネッセント照明においては、試料面へ照射する励起用レーザー光の角度・強度によってサンプルの照明条件が変わり、それにより蛍光1分子の褪

色時間や蛍光強度、輝度分布が変化し、計測精度に大きく影響を与える。今年度は励起用レーザーの光路調整を自動化した。今後は、構築したプロトタイプのパフォーマンスを最大化するために、1分子輝点強度の情報を自動調整系にフィードバックすることにより、照明条件の安定化を図る。

(1-2) 1分子輝点自動追跡ソフトの開発 1分子イメージングによって得られた画像から分子の位置を決定するためには、画像に現れる輝点を抽出する必要があり、この輝点抽出過程の自動化は1分子輝点自動解析の実現に不可欠である。本年度は、これまで作成してきた解析ソフトの改良とともに、新しい蛍光プローブと1分子顕微鏡を利用して得られた画像へ適用した。GFP等の蛍光タンパク質にかわり、ローダミン等の有機色素を用いることにより1分子の蛍光強度が増強され、画像のシグナルノイズ比が大幅に改善された。これに加えて、輝点抽出における画像フィッティング法を改良することにより、これまでの解析法では困難であった分子密度が高い画像においても輝点抽出と多点の輝点分離が可能になった。

細胞における1分子計測から得られるデータは大きく分けて2つある。ひとつは膜上の分子の拡散運動と膜への結合時間の分布である。後者は膜上における反応のキネティクスを反映している。これまで、これらの2つのデータは別々に解析されてきた。しかし、注目している分子が他の分子との結合が変化するなどして膜上で多状態を持ち、それぞれの状態で膜上における運動性が異なる場合、分子の拡散運動と反応のキネティクスに関する情報は独立ではなく、相互に関係を持つ。そこで、出来るだけ簡単な方法で拡散情報と反応情報から同時に情報を取り出す方法を開発した。今後はシミュレーションなどによってその解析方法の有効性を検証する。

(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の最上流にあたるG蛋白質共役型受容体(cAR1)および三量体G蛋白質($G\alpha 1$, $G\alpha 2$, $G\alpha 9$, $G\beta \gamma$)に研究対象を絞り、両者の共役過程について解析を進める。本年度は、その準備として、これらの分子群のノックアウト変異体および蛍光プローブを作成した。すでに蛍光プローブの調整に成功している分子(cAR1, $G\alpha 2$, $G\beta \gamma$)については、拡散係数、膜滞在時間、反応速度などの確率的特性パラメーターについて1分子解析を行った。結果、受容体の活性化時間に比べてG蛋白質の活性化時間が約10倍長いことがわかった。この知見は、受容体におけるノイズな入力シグナルがG蛋白質の活性化に伴って時間的に平均化され、ノイズが除去されること(noise reduction)を示唆している。今後は、他のG蛋白質の1分子解析を進めるとともに、その知見を取り入れた数理モデルを構築することにより、G蛋白質レベルでのノイズ生成・処理・伝搬について理論的解析を進める。

(2) ネットワーク解析法の開発

細胞内情報処理システムには、繰り返し現われるネットワークモチーフ(例えば、カスケード回路、フィードフォワード回路、フィードバック回路など)が存在する。研究の初期段階では、こうした小規模ネットワークモチーフに注目し、ノイズの生成・処理・伝搬を記述するための理論を構築する。

(2-1) ネットワーク解析法の開発と数理モデル構築 比較的単純な反応においては、反応の応答性と定常状態における揺らぎには比例関係があり、数理的には Gain-fluctuation relation (GFR)によって記述される。これを長いカスケード型の反応に拡張したところ、この場合にも応答性

と揺らぎの間には比例関係があることを確かめた。カスケード長が長くなると、揺らぎの時定数が大きくなっていくことが分かった。さらに、揺らぎの大きさが大きくなっていくとシグナル伝達系全体が活性化状態と非活性化状態を自発的に遷移することが分かった。こうした結果は、カスケード反応で構成されている走化性情報伝達系に適用できる可能性がある。また、走化性応答に不可欠な反応として刺激に対する適応が知られているが、適応反応回路における応答性と揺らぎの関係についてはよく分かっていない(GFR では記述できない)。そこで典型的な適応反応回路について確率的なシミュレーションと化学反応を記述する確率微分方程式の解析を開始した。

(3) ノイズ印加実験系の開発および数理モデル構築

本研究項目においては、細胞内情報処理システムを流れるシグナルの時間的変化を外部から変調できるようなノイズ入力実験系の開発を目指す。また、本実験系の出力として得られる細胞運動の不規則時系列データの特徴づけを行い、細胞内情報処理システムの構造と機能に関する情報やノイズ印加の効果を定量化するための理論解析法を開発する。

(3-1) 電場を用いたノイズ印加実験系の開発 これまでに細胞に任意の電場ノイズを印加できる実験系の構築に成功している。本年度は、この電場入力実験系の顕微鏡装置にシグナル観察用の新たな観察装置を導入することにより、ノイズ入力印可中の細胞内情報分子の蛍光観察が可能となった。さらに予備的実験として、細胞性粘菌の細胞運動に対する電場ノイズの影響を計測し、ノイズ周波数に対する応答特性を明らかにした。結果、特定周波数の入力に対して、細胞の運動速度と効率が有意に上昇することを見出した。ノイズ入力によるシグナル増強を示唆している。

(3-2) 細胞運動解析法の開発と数理モデル構築 大阪大学の実験グループと連携し、これまでに細胞の自発運動(入力刺激やノイズなしでの運動)については、一般化ランジュバン方程式による記述に成功している。本年度は、本プロジェクトの初年度にあたる為、細胞運動の理論解析に関連した研究の文献調査・分析を行ない、その結果を踏まえた上で、上記のランジュバン方程式をベースとして、ノイズ印加の影響を定量的に解析するための解析方法の開発を開始した。実際に、電場ノイズ印可実験から得られた細胞運動データの解析を行うことによって、自発運動との差異の定量化を行った。その結果、上記のノイズ入力による速度と効率の上昇と整合する変化が運動速度の分布、減衰項、相関関数などに生じていることが明らかとなった。

3. 研究実施体制

(1)「大阪大学」グループ

①研究分担グループ長: 上田 昌宏(大阪大学大学院、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
- (3) ノイズ印加実験系の開発および数理モデル構築
 - (3-1) 電場を用いたノイズ印加実験系の開発

(2)「広島大学」グループ

- ①研究分担グループ長:柴田 達夫:(広島大学大学院、准教授)
- 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
 - (1-2) 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)「奈良医科大学」グループ

- ①研究分担グループ長:高木 拓明(奈良県立医科大学、助教)
- 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