

「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

本研究では、細胞内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している。昨年度に引き続き、(1) シグナルのゆらぎを計測するための細胞内 1 分子顕微鏡解析法、(2) 分子ネットワーク解析法、(3) 細胞内情報処理システムを外部から変調するためのノイズ印加実験系、の 3 点について技術開発を行った。また、これらの解析手法を用いて、走化性情報処理システムの最上流にあたる GPCR 型受容体と三量体 G 蛋白質の共役反応過程、及び、システムの出力にあたる細胞運動について解析を行なった。G 蛋白質の 1 分子イメージング計測から、従来の反応スキームでは説明できない現象が見つかった。また、細胞運動計測およびその統計力学的解析から、細胞の運動特性を一般化ランジュバンモデルにより定量的に記述することに成功した。今後は、受容体と G 蛋白質の共役反応過程について数理モデルの構築および実験的検証を行なうことにより、G 蛋白質レベルでの「ノイズ生成・処理・伝搬」について明らかにする。さらに、G 蛋白質の下流で細胞運動の制御に働くイノシトールリン脂質代謝系の自己組織化ダイナミクスに着目し、ランジュバン型細胞運動モデルの分子的基盤について理解を進めるとともに、G 蛋白質からイノシトールリン脂質代謝系を経て運動装置へと伝搬するシグナルとノイズの計測、及びそれらが細胞運動へ及ぼす影響について定量的な解析を行なう。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

(1) 細胞内 1 分子顕微鏡解析法の開発とゆらぎ計測

本研究項目では、細胞内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ために、シグナル伝達に伴うノイズ量の定量化法を開発している。細胞内 1 分子顕微鏡解析法はシグナル分子の個数を指折り数えるように計測できることから、シグナル分子数の時間的ゆらぎを計測するのに適した手法である。昨年度に引き続き、細

胞内 1 分子顕微鏡の開発および 1 分子輝点自動追跡ソフトの開発を行なった。また、走化性情報処理システム最上流にあたる GPCR 型受容体と三量体 G 蛋白質の共役反応過程について 1 分子解析を進めた。

(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. 細胞内 1 分子解析の自動化に向け、ピエゾミラーを用いた輪帯型全反射エバネッセント励起照明系を構築した。また、昨年度に引き続き、1 分子輝点自動抽出に必要な画像処理法について検討した。特に、細胞自身の自家蛍光などにより生じる背景光のムラが主原因となって輝点抽出が困難になる場合について検討し、従来法と比較して輝点認識エラーを低減することができた。さらに、輝点自動追跡ソフトの演算処理速度を約 1.1 倍向上させることができ、1 分子顕微鏡で取得された画像をほぼリアルタイムで解析することが可能になった。今後は、1 分子輝点自動追跡ソフトで得られた輝点蛍光強度などの計測値を顕微鏡装置に自動的にフィードバックさせることにより、励起照明系の自動調節化を実現し、1 分子計測システム全体としての効率化を図る。

細胞における 1 分子画像から抽出された輝点の軌跡は、1 分子の膜上の位置の時系列変化に関する情報を与える。従来、その位置情報から分子の 2 次元拡散の運動性が、時間情報から分子の反応キネティクスが、それぞれ独立に解析されてきた。しかし、シグナル伝達分子のたずさわる反応を考慮すれば、軌跡の時空間情報を分かつずに解析する方法が必要不可欠である。そこで、1 分子の軌跡から、分子が膜上で拡散運動性の異なる多状態を遷移する反応キネティクスを解析する方法を開発した。ミニマムモデルとして 2 状態遷移モデルを考え、このモデルを記述する拡散方程式から導き出された確率密度関数を解析した。結果、最尤推定法によって状態ごとの拡散係数と遷移レートを推定することができ、さらには、この方法の有効性を数値シミュレーションによって生成された軌跡を用いて確認した。今回開発した解析法は、受容体などの膜結合性の分子に適用できる。今後は、この解析法をさらに拡張し、細胞膜と細胞質との行き来を含めた反応スキームの解析法を開発するとともに、1 分子輝点自動追跡ソフトと組み合わせる事によって、輝点抽出から拡散解析までの自動化を実現する。

(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的最上流にあたる G 蛋白質共役型受容体 (cAR1) および三量体 G 蛋白質 ($G\alpha 2$, $G\beta\gamma$) の共役反応過程における「ノイズの生成・処理・伝搬」の仕組みを明らかにするために、この反応過程の 1 分子解析を進めている。すでに蛍光プローブの調整に成功している分子 (cAR1, $G\alpha 2$, $G\beta\gamma$ など) について、拡散係数、膜滞在時間、反応速度などの各種確率的特性パラメーターについて計測した。その結果、G 蛋白質の細胞質-細胞膜シャトリング、G 蛋白質の活性化に伴う低親和性受容体-G 蛋白質複合体の形成、リガンド濃度依存的な G 蛋白質活性化時間の調節などの新たな現象が見つかった。これらの現象は、GPCR と G 蛋白質の共役反応を説明する従来モデル (ternary complex model) では説明できない。今後は、従来モデルを拡張した数理モデルを構築し、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と共に、モデルの実験的検証を行なう。

(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. 本研究項目では、細胞内情報処理システムにおける「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。

(a) **小規模ネットワークモチーフにおけるノイズの生成・伝搬.** これまでに、カスケード回路については、Gain fluctuation relation (GFR)によってノイズの生成・伝搬を記述できることを示してきた。そこで、カスケード反応で構成されているバクテリアと細胞性粘菌の走化性情報伝達システムに GFR を適用し、ノイズ伝搬と細胞応答の関係について解析した。その結果、バクテリアと粘菌細胞のいずれにおいても、システムの出力となる細胞運動にカスケード反応で生じるノイズが影響することが示唆された¹⁾。特に粘菌細胞においては、GFR による理論解析と実験との比較から、走化性シグナル伝達系最上流部の受容体と三量体 G 蛋白質におけるシグナル・ノイズ比に比例して、細胞応答の正確さの程度が決まることが明らかになってきた。1 分子計測の結果に基づいて、G 蛋白質レベルでの「ノイズ生成・処理・伝搬」を理論的に解析する必要がある。

(b) **刺激に対する応答・適応を示す反応回路のノイズの生成・伝搬.** 走化性シグナル伝達系の性質として細胞外からの刺激に対する適応が知られている。特に、刺激の変化に対してシグナル伝達系の活性のレベルが完全に元に戻る応答は “完全適応 (perfect adaptation)” と呼ばれ、バクテリアにおいては走化性応答のダイナミックレンジを広げるのに役立っている。完全適応反応におけるノイズの伝搬を明らかにするために、今年度はバクテリアの走化性シグナル伝達系の確率モデルを構築し、解析を行った。その結果、完全適応が実現されている適応反応回路においても、シグナル平均値のまわりのゆらぎ (ノイズ) は適応せず、刺激濃度依存的に変化することが分かった。今後、このゆらぎがシグナル伝達系の下流へ伝搬し、細胞の走性行動に影響する可能性について検討し、分子数ゆらぎと細胞行動の関係について理論的に解析する。

(c) **細胞内情報伝達のスペクトル解析法.** 本研究項目では、細胞内情報処理システムの確率的な反応を考慮した細胞応答のスペクトル解析法の開発をする。情報伝達分子の確率的特性 (反応速度係数など) と細胞応答のスペクトル特性との間の関係を GFR により理論的に整理し、シグナル伝達に伴うノイズが細胞応答の多様性の起源となることを明らかにした¹⁾。また、実験による検証可能性を検討したところ、走化性情報処理システムの出力である細胞運動を解析対象とし、細胞運動のスペクトル解析法を開発することにし、運動装置である仮足の生成消滅過程を定量化するためのソフトウェア開発を始めた。

(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、走化性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行う。また、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。

(3-1)

電場を用いたノイズ印加実験系の開発 外部電場の印加によって影響を受ける細胞内情報伝達経路を同定した。阻害剤と変異体株を用いた実験から、走化性情報処理システムを担うグアニル酸シクラーゼと PI3 キナーゼ依存性経路が、電場による入力を運動装置へと出力するシグナル伝達においてもその実体であることが明らかになった⁷⁾。この知見は、電場により走化性情報処理システムを変調できることを示している。

(3-2)

細胞運動解析法の開発と数理モデル構築 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、一般化ランジュバン方程式による記述に成功し、細胞運動が速度の減衰項、記憶(メモリー)項、ノイズ項によって特徴づけられることが明らかになった³⁾。また、外部電場の影響による細胞運動の変調をモデル化することを試みたところ、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、電場存在下での細胞運動の実験結果を定量的に再現することに成功した。さらに、細胞が環境変動に応答する場合、運動速度の記憶項が適応度を決めており、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できるような記憶強度に最適化されていることが分かった。こうした解析に加え、細胞の自発運動の数理モデルを構築し、細胞に見られる多様な運動モードを再現することに成功した⁹⁾。今後は、一般化ランジュバンモデルの妥当性を定量的に検討し、電場を用いた揺らぎ入力に対する細胞の動的な振る舞いを記述する方法を探ることにより、情報処理メカニズムにおける揺らぎの機能的意義をさぐる。

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、特認教授）

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、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

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表（原著論文）

1. Shibata, T. and Ueda, M. (2008). Noise generation, amplification and propagation in chemotactic signaling systems of living cells. *BioSystems*, 93, 126-132.
2. Ishihara, S. and Shibata, T. (2008). Mutual interaction in network motifs robustly sharpens gene expression in developmental processes, *Journal of Theoretical Biology*, 252, 131-144.
3. Takagi, H., Sato, M. J., Yanagida, T. and Ueda, M. (2008). Functional analysis of spontaneous cell movement under different physiological conditions. *PLoS ONE*, 3, e2648.
4. Yumura, S., Ueda, M., Sako, Y., Kitanishi-Yumura, T. and Yanagida, T. (2008). Multiple mechanisms for accumulation of myosin II filaments at the equator during cytokinesis. *Traffic*, 9, 2089-2099.
5. Nishikawa, M., Takagi, H., Shibata, T. Iwane, A. H. and Yanagida, T. (2008). Fluctuation analysis of mechanochemical coupling depending on the type of biomolecular motors. *Physical Review Letter*, 101, 128103.
6. Nishimura, S. I., Ueda, M. and Sasai, M. (2009). Cortical factor feedback model for cellular locomotion and cytofission. *PLoS Computational Biology*, 5, e1000310.
7. Sato, M. J., Kuwayama, H., van Egmond, W. N., Takayama, A. L. K., Takagi, H., van Haastert, P. J. M., Yanagida, T., and Ueda, M. (2009). Switching direction in electric-signal induced cell migration by cGMP and phosphatidylinositol signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* in press.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数：0 件（CREST 研究期間累積件数：0 件）