

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

細胞は分子反応の確率性に起因するゆらぎを内包したシステムである。確率的にはたらく分子を要素として情報処理機能・運動機能などを有するシステムが自律的に組織化され、変動する環境に対して巧みに適応できる。本研究では、細胞内情報処理システムの決定論的ダイナミクス(平均的・規則的挙動)と確率論的ダイナミクス(平均からのズレ・ゆらぎ)を実験的に捉え、理論・数理モデルの構築を通して、ゆらぐ分子から構成された情報処理システムの構築原理・演算原理の解明を目指している。これまで開発してきた細胞内1分子イメージング解析法、及び、細胞運動の統計力学解析に加え、本年度は、分子ネットワークの時空間ダイナミクスを捉えるためのマルチカラーイメージング法とそこから得られる不規則時系列データの解析法を開発した。これにより、1分子・分子ネットワーク・細胞の多階層にわたって機能発現現象のダイナミクスを追跡・解析することが可能となった。こうした解析法を走化性情報処理システムに適用することにより、各階層において以下の知見が得られた。1分子レベルでは、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G蛋白質の共役反応過程の1分子解析から、受容体が単に酵素的に働いてG蛋白質を活性化することによりシグナルを伝達するのではなく、受容体とG蛋白質の拡散、結合解離反応およびG蛋白質の細胞膜・細胞質間シャトリングといったダイナミックな反応過程を通して、走化性のシグナルが動的に形成されることが明らかになった。分子ネットワークのレベルでは、G蛋白質の下流にある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を実験的に捉え、数理モデルを構築した。この自己組織化により細胞が自発的に運動するためのシグナルがゆらぎを伴って形成されることが分かった。さらに、細胞レベルでは、これまで自発運動にのみ適用可能であった一般化ランジュバンモデルを拡張し、走性運動の数理モデル化に成功した。この数理モデルの解析から、細胞自身がつくる自発運動のゆらぎの大きさは、一定の刺激に対する細胞の応答効率を比較的高く維持しつつ、かつ、変動する刺激に対しても追従性が高くなるように最適化されていることが明らかとなった。環境変動が前提となるような実世界では、細胞がほどよくゆらぐ方が、環

境適応性が高くなることを意味する。細胞は分子反応の確率性に起因するゆらぎを内包しながら、自己組織化メカニズムを通して機能発現へと結びつけることによって変動する環境に対して柔軟に応答するシステムを作り上げているようだ。

§ 2. 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、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

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(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の時空間ダイナミクスを明らかにするためのイメージング解析法を開発している。昨年度に引き続き、1分子顕微鏡および1分子輝点自動追跡ソフトの開発を行なった。さらに、分子ネットワークの時空間ダイナミクスを明らかにするために、マルチカラー顕微鏡の導入および不規則時系列解析法を開発した。これらを用いて走化性情報処理システム最上流にあたる受容体・G 蛋白質共役反応過程およびその下流にあるイノシトールリン脂質代謝系の細胞内ダイナミクスの解析を進めた。

(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。全反射エバネッセント励起照明系に電子制御光減衰器とそのフィードバック制御系を導入することで、安定な励起光の供給を実現した。また、1分子輝点自動追跡ソフトの開発では、昨年度までに改良したコードを実使用環境に導入し、所要時間を従来比約1/5に短縮、また安定性の向上を図った。これにより、受容体の拡散を自動解析することが可能になった。今後は、より複雑で早い拡散運動性を示す G 蛋白質、PTEN 分子等の自動解析を可能にする高品質な画像の取得と、1分子輝点自動追跡ソフトとの連携をさらに進めることによる顕微鏡セットアップの省力化・効率化を目指す。

生きた細胞における1分子イメージングでは、抽出した輝点の軌跡からその分子が膜上で携わる反応のキネティクスを知ることができる。しかし、特にシグナル伝達分子の場合、反応に伴い膜上で拡散運動性の異なる多数の状態間を遷移することが予想されるが、これを解析するには軌跡の時間情報と空間情報を同時に扱う方法論が必要である。昨年度までに、受容体などの膜結合性の分子を想定した場合の方法論を確立したので²⁾、今年度は、これを細胞膜と細胞質とを行き来する分子の場合に拡張した。ミニマムモデルとして 2 状態遷移に各状態からの解離反応を加えたモデルを考え、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に加え、2 乗変位の自己相関関数を利用することにより、状態ごとの拡散係数と遷移および解離レートを推定することができた。さらに、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。これにより、シグナル伝達分子全般に適用しうる1分子拡散・キネティクス解析法の基盤を開発することができた。

こうした1分子レベルでのイメージング解析法の開発に加えて、分子ネットワークの細胞内動態を計測するためにマルチカラー顕微鏡法を導入し、多色画像の解析ソフト、及び、そこで得られる不規則時系列データの解析法を開発した。この解析システムをイノシトールリン脂質代謝系に適用することにより、この代謝系の時空間ダイナミクスを抽出することに成功した(1-3 参照)。

(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、G 蛋白質共役型受容体(cAR1)および三量体 G 蛋白質($G\alpha_2$, $G\beta\gamma$)の共役反応過程の1分子解析を進めており、従来モデル(ternary complex model)では説明できない現象として 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てきた。本年度は、従来モデルを拡張した数理モデルを構築した。この拡張により、1 分子解析から見つかった新たな現象だけでなく、1980 年代に活発に行なわれた反応速度論解析の結果についても説明できた。今後は、数理モデルに基づき、G 蛋白質レベルでの「ノイズ生成・処理・伝搬」について理論解析を進める。

G 蛋白質の下流の反応として、イノシトールリン脂質代謝系による細胞極性形成が知られているが、昨年度までの予備的な実験により、この極性形成過程に自己組織化反応が関わっていることが分かってきた。そこで本年度は、イノシトールリン脂質代謝系を構成する PTEN, PI3K, PHD 等の細胞内時空間ダイナミクスを計測し、時系列データの解析、数理モデルの構築を通して自己組織化反応の分子メカニズムの推定を行なった。その結果、イノシトールリン脂質代謝系に見られる振動は **relaxation oscillator** の特徴を持つこと、またこの振動が細胞の自発運動を引き起こす内在的なシグナルとなっていることが明らかとなった。この自己組織化反応はイノシトールリン脂質代謝系の反応に基づいて反応拡散方程式により数理モデル化することができ、実験的に明らかになった **relaxation oscillator** を再現できることが分かった。自己組織化反応は分子の確率性を織り込んで形成されるために、ノイズに対してロバストな情報処理システムを構築するのに重要と考えられる。今後は、数理モデルの実験的検証、及び、分子ゆらぎ(ノイズ)の影響等を理論的に解析する。これにより、熱ゆらぎの中で確率的に作動する生体分子からどのようにして自律的に情報処理機能が構築されるのかという問題を分子レベルで明らかにする。

(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、応答・適応を示す反応回路におけるノイズの生成・伝搬。刺激入力の変化に対してシグナル伝達系の活性が一時的に増加し元のレベルに戻る反応は応答・適応反応と呼ばれ、さまざまなシグナル伝達系に広く見つかっている。昨年度までに、完全適応が実現されている応答・適応反応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を明らかにしてきた。刺激濃度が低いときには、応答・適応反応のゆらぎが大きくなり、高濃度になればゆらぎが小さくなる。そこで本年度は、このゆらぎがシグナル伝達系の下流へと伝搬して細胞の行動に影響する可能性について、バクテリアの走化性シグナル伝達系をモデルとして理論的に解析した。その結果、モデル細胞は環境に低濃度の誘引物質が存在するときには、活性の時間ゆらぎがあることでわずかな勾配を速く上ることができ、そして勾配を上って誘引物質濃度が高くなれば、ゆらぎが小さくなってそこに留まることができることが分かった。このように、応答・適応反応で生じる活性ゆらぎは下流のシグナル伝達に影響を与える。

(b) 細胞内情報伝達のスペクトル解析法。これまで、カスケード構造を持つシグナル伝達系においては、**Gain fluctuation relation** 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。さらに、ノイズの伝搬がバクテリアや細胞性粘菌のシグナル伝達系において果たす役割を理論的

に議論してきた。そこで今年度は、これらの理論の実験的な検証を実現するために、1 分子計測からノイズの伝搬を検証する方法を理論的に検討した。1 分子計測では細胞質にあるシグナル分子が細胞膜上の基質分子に結合して細胞膜に滞在する時間を計測でき、それを解析することで反応のキネティクスを決めることが出来る。そこで、この反応の上流となる基質分子の濃度が時間的にゆらぐ場合を想定し、それが下流のシグナル分子の細胞膜滞在時間分布にどのような影響が現われるかを調べた。その結果、シグナル分子の細胞膜滞在時間分布は、基質分子のゆらぎを考慮しなければ指数分布に従うが、基質分子が時間的に変動すると指数分布からずれることが分かった。さらに、シグナル分子の濃度の時間変動のパワースペクトルを調べると、基質分子濃度がゆらぐときには低周波数側にシフトしており、ゆらぎがない場合に比べてシグナル分子の時間変動が遅くなることがわかった。細胞膜滞在時間分布の時定数とパワースペクトルの時定数には比例関係があることから、1 分子の滞在時間分布を詳しく調べることで上流からのノイズ伝搬を調べることが出来る可能性が示唆された。

(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 本年度は、電位感受性を有する PTEN 様酵素 (VSP) を用いて、任意のタイミングで生細胞内において走化性情報処理分子の活性調節を試みた。PTEN 欠損細胞は、丸みを帯びた極性のない特徴的な細胞形態を示し、仮足を全方位からランダムに突出させるために運動性が著しく低い。つまり、走化性シグナル伝達に並行的に働くとされる複数のシグナル経路のうち、PTEN 依存的なシグナル伝達経路はこうした細胞形態と運動性に関与する。この PTEN 欠損細胞に VSP を発現させ、脱分極を誘導するために高電場短パルスを印加した。その結果、細胞が明確な前後極性を回復し、運動性も向上する様子が観察された。

(3-2) 細胞運動解析法の開発と数理モデル構築 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)は、一般化ランジュバン方程式によって定量的に記述されること、及び外部電場に対する細胞運動の変調(走電性応答)¹⁾は、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、定量的に再現できることを明らかにしてきた。その上で、変動する環境に対する細胞応答の有効な定量評価法を検討し、一定入力存在下での細胞の応答効率と、入力反転に対する細胞の追従能の双方を取り入れた指標を新たに導入した。結果として、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計算機シミュレーションから明らかになった。今後は、モデルから予想される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行なう。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

- (1) 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*. 106: 6667-6672. (doi:10.1073/pnas.0809974106).
- (2) Matsuoka, S., Shibata, T. and Ueda, M. (2009). Statistical analysis of lateral diffusion and multi-state kinetics in single-molecule imaging. *Biophys. J.* 97: 1115-1124. ([doi:10.1016/j.bpj.2009.06.007](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.06.007)).