

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のダイナミックな振る舞いをイメージング技術により定量的に計測し、計測結果に基づいた理論・数理モデルの構築を通して、情報処理システムの構築原理と演算原理の解明を目指している。特に、分子運動や分子反応の確率性に起因するゆらぎが細胞の情報処理機能・運動機能の発現に積極的に利用される可能性について追求し、それを可能にするシステムの構造と機能発現ダイナミクスの解明を目的とする。

これまで1分子・分子ネットワーク・細胞の各階層において、定量的なイメージング計測法(1分子イメージング法・マルチカラーイメージング法・細胞運動計測法)とそこで得られる不規則時系列データの統計解析法を開発し、実験結果に基づいた理論・数理モデルの構築を行った。こうした統合的方法論を走化性情報処理システムに適用することにより、多階層にわたって情報処理機能・運動機能の機能発現ダイナミクスを時間的・空間的に追跡・解析することを可能にし、以下の知見が得られた。

- (1) 1分子レベルの解析では、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 蛋白質の共役反応の解析から、この反応におけるシグナル伝達に伴う「ノイズの生成・処理・伝搬」と G 蛋白質の反応キネティクスの関係が定量的に明らかになった。G 蛋白質の時間平均作用により走化性シグナルの S/N 比が向上することが分かり、その分子メカニズムとして、受容体・G 蛋白質間の化学量論的相互作用(複合体形成)の重要性が明らかになった。
- (2) 分子ネットワークレベルの解析では、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により細胞の運動機能が自発生成されることが明らかになった。この自己組織化では、構成分子のゆらぎがネットワークレベルのゆらぎを生成しており、細胞の自発運動を確率的にしていた。確率的分子情報処理システムの構築原理として「構造化された確率性 (organized randomness)」というコンセプトが得られた。
- (3) 細胞レベルの解析では、自発運動・走性運動の一般化ランジュバンモデルの構築に成功した。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、環境変動に対する細胞の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。

細胞は分子運動・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分子のゆらぎを情報処理機能・運動機能の発現へと結びつけ、細胞の振る舞いを確率的にすることによって変動する環境に対して柔軟に適応するシステムを作り上げている可能性が明らかになってきた。

§ 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-神戸」グループ

① 研究分担グループ長: 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
ットリーダー)

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

(2)「奈良県立医科大学」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・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)

(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.

細胞内1分子イメージング解析法については、顕微鏡励起光学系の自動化、及び、1分子輝点自動解析ソフトのアルゴリズムとコードの徹底的な見直しにより、処理速度と安定性の向上を実現し、解析に要する時間をこれまでの 1/10~1/30 に短縮できた。その結果、受容体など比較的単純な振る舞いをする分子については自動解析が可能になり、従来は数週間程度かかっていたデータ解析が1日で出来るようになった。これにより、100 細胞、数万分子、数百万データポイントの解析を1日以内に終わらせることができ、理論・数理モデル構築に必要な1分子のパラメタを迅速かつより正確に計測できるようになった。

1 分子拡散・キネティクス統計解析法については、昨年度までに開発した方法を改良し、パラメタ推定の精度を向上させることに成功した。反応が複雑なモデルを想定した場合、同時に推定するキネティックパラメタの数が増加する。その推定精度は 1 分子軌跡データ量に依存しており、例えば 2 状態で遷移と解離があるモデルの場合、信頼できるパラメタ推定には数万分子のデータが必要である。PTEN 分子のように複雑な挙動を示す分子に関しては、まだ完全な自動追跡が可能となっておらず、膨大なデータ量を必要とする解析法をそのまま適用することは現実的でなかった。そこで、各状態の成分比の時系列変化に基づいたパラメタ推定法を新たに導入した。これは、反応キネティクスの全体的な傾向に基づいて推定するため、データ量に対してロバストな方法となっていることが明らかになった。実際に PTEN 分子の解析に使用した結果、全キネティックパラメタの推定に成功した。

(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、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分子解析を進めている。昨年度は、本研究で得られた細胞内1分子計測の実験結果を元に従来モデルの拡張を行い、1分子解析で見つかった新しい現象だけでなく、1980 年代に反応速度論的解析によって明らかにされた現象も説明できるモデルを構築した。本年度はこの拡張モデルを用い、受容体-G 蛋白質における「ノイズ処理」について解析を行った。拡張モデルの特徴として、活性化された G 蛋白質が低親和性受容体と安定した複合体を形成する事が挙げられるが、ノイズ解析の結果、低親和性受容体-G 蛋白質複合体形成による時間平均効果によりノイズを低減させて下流にシグナルを伝達する事が分かった。こうした両蛋白質間の安定した複合体形成は GPCR 研究としても新規性が高い。今後は低親和性受容体-G 蛋白質複合体形成の分子メカニズムを明らかにする必要がある。

走化性シグナル伝達システムの下流部には、イノシトールリン脂質代謝反応の自己組織化による細胞極性シグナルの自発生成システムがあることが明らかになり、その数理モデルの構築に成功

した⁽¹⁾. このシステムは外部環境に非依存的に細胞極性の形成に働く. 具体的には, イノシトールリン脂質代謝系の $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ と PTEN の進行波が自己組織化のメカニズムによって細胞膜上に自発的に生成され, 細胞の前後極性を形成することにより, 細胞の自発運動のシグナルとして機能する. さらに, そのシグナルがイノシトールリン脂質代謝反応に伴うゆらぎに対してロバストに生成されることがわかった. また, 分子反応ゆらぎがこのシステムのもつ振動ダイナミクスに影響した結果, 自発シグナルの時空間パターンが多様化されることが明らかになった. この時空間パターンの多様性が細胞のランダムな自発運動を生み出すと考えられる. 細胞の自発運動におけるゆらぎの存在は, 環境変動に対する細胞の応答性において有利に働くことがわかってきており, 柔軟なシステム構築にゆらぎの階層化が貢献する一例となっている (organized randomness).

(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. 走化性シグナル伝達における重要な反応として応答・適応反応が知られている. 一般に, シグナル伝達系で応答・適応回路を作るにはフィードバックループ (FBL) かフィードフォワードループ (FFL) が必要である. FBL は応答を入力に戻して差をとることで適応を実現するのに対し, FFL は逆の応答を示す因子からの入力により適応する. 両者は異なるネットワーク構造を持ちながら, 同じ機能を持つ. しかし, 応答性や反応で生じるゆらぎは異なることが予想される. そこで今年度は 2 成分の生化学反応を考え, FFL 或いは FBL により適応を示す回路モデルを構築し, 応答性とゆらぎを評価した. 応答性とゆらぎの関係を詳細に議論するために, 今後は揺動応答関係について解析する.

(b) 細胞内情報伝達のスペクトル解析法. 細胞内情報伝達系はフィードバックやフィードフォワードを含む複数の生化学反応により構成されており, システム論的アプローチのひとつであるスペクトル解析はこのような系の構造的特徴を抽出する優れた手法の一つである. 細胞性粘菌においては, cAMP 濃度のステップ状刺激に対して, イノシトールリン脂質代謝系の $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ の濃度が細胞膜上で一過的に上昇し, 元に戻る応答・適応を示すことが知られている. そこでこの反応をスペクトル解析によって詳細に解析するための実験系を構築した. 微小流路デバイスを用いることで, スペクトル解析に必要な cAMP 濃度のステップ巾や周期的変化を, 各細胞に対して高時間分解能で空間的に均一に与えることが可能になった. これまでの実験から, 細胞膜上で PIP_3 の応答は不均一で, 応答する領域は局在していることが明らかになった. また, 刺激を繰り返したとすると, 応答する領域は変化した. これより, 細胞の応答性は空間的に不均一で時間的に変動すること, そしてこの不均一性は, 反応ネットワークの性質によることが示唆された. これらの実験と平行して, 昨年度までに構築したイノシトールリン脂質代謝系の反応拡散モデルを解析したところ, 反応拡散モデルは興奮性を示し, 実験で観察された結果を良く再現できることが分かっ

た。今後は、応答の不均一性の起源を実験と数理モデルの両面から解明していく。

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⁽²⁾。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てきた。今年度は、実際の状況に近い複雑な反応系について解析を広げ、基質分子の濃度ゆらぎの影響が、滞在時間分布のどのような性質に現れるのかを明らかにした。今後はこの結果を G タンパク質などの実験結果に適用していくことを検討する。

(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 これまでに、電場印加実験系および電位感受性を有する PTEN 様酵素 (VSP) を用いて、生細胞内における走化性シグナル伝達分子の活性を任意のタイミングで操作する手法の開発を進めて来た。PTEN 依存的なシグナル伝達経路は細胞形態と運動性に関与するため、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運動性が著しく低い。この PTEN 欠損細胞に VSP を安定に発現する細胞株を作成した上で、今年度は細胞に脱分極を誘導するための高電場短パルス印加と比べて、VSP/PTEN-細胞では顕著に前後極性が回復し、運動性も向上する様子が観察された。これは、電気パルスの印加により VSP が活性化され、細胞の極性形成に関与する下流分子の活性化が引き起こされたためと考えられる。これにより、走化性に関与する細胞内シグナル伝達分子の活性を操作する手法の開発に成功したと言える。

(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、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。また、モデルから予想される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行なった。具体的には、野生型細胞とは走電性応答の特性が異なる変異体細胞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、モデルの予想を指示する実験結果が得られた。さらに、上記変異体での細胞運動の記憶強度を同定するために、各変異体細胞の自発運動を計測した上で、統計物理学的解析を通じて、変異体ごとの一般化ランジュバンモデルの同定を行なっている。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Arai, Y., Shibata, T., Matsuoka, S., Sato, M. J., Yanagida, T., and Ueda, M., “Self-organization of the phosphatidylinositol lipids signaling for random cell migration,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 107, 12399-12404 (2010). (DOI: 10.1073/pnas.0908278107).
2. Nishikawa, M., and Shibata, T., “Nonadaptive fluctuation in an adaptive sensory system: Bacterial chemoreceptor,” *PLoS ONE*, 5, e11224 (2010). (DOI: 10.1371/journal.pone.0011224).
3. Ochiai, H., Fujita, K., Suzuki, K., Nishikawa, M., Shibata, T., Sakamoto, N., and Yamamoto, T., “Targeted mutagenesis in the sea urchin embryo using zinc-finger nucleases,” *Genes Cell*, 15, 875–885 (2010). (DOI: 10.1111/j.1365-2443.2010.01425.x).