

## 研究終了報告書

### 「データ同化による1細胞内自己組織化過程の全可視化」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：松岡 里実

#### 1. 研究のねらい

白血球などに代表されるアメーバ様細胞は、一様な環境に存在していて細胞外からの刺激入力がない状況でも、ランダムな方向に移動運動をすることができる。このとき、どちらの方向に動くかは細胞膜上での分子の分布によって決まる。細胞膜を構成するリン脂質の一種であるフォスファチジルイノシトール 3,4,5-3リン酸(PI(3,4,5)P3)が局所的に高密度で存在する領域が発生すると、そこが細胞の前側となる(図1)。我々は PI(3,4,5)P3 高密度領域が細胞膜上を進行波となって伝搬することを発見した。これは PI(3,4,5)P3 の合成・分解反応と細胞膜平面上での拡散過程に基づいて生まれる散逸構造であり、細胞膜上での分子数のゆらぎをきっかけとして生成すると考えられる。実際に、適当な変数を用いて反応拡散方程式でモデル化し、シミュレーションによってこの進行波の特徴を再現することができている。しかしながら、どの分子のどのようなゆらぎが鍵で、どのように制御されているかを解明しなければ、細胞内自己組織化原理の理解には到達できない。

生細胞内で分子数のゆらぎを実際に計測することは困難であり、シミュレーションはこうした観測できない過程を可視化して解析するための有効な手段となりうる。特に、分子数のゆらぎの統計解析の目的においては、シミュレーションにも個々の分子の位置を取り扱う精度が求められる。近年開発された1分子粒度シミュレーションでは、細胞内の注目する現象に關与する全種全分子の拡散運動と反応の計算によって1細胞スケールでのダイナミクスを再現できる。各種の分子の拡散係数と反応速度定数を細胞内で実測できれば、原理的には生細胞内と同じ自己組織化過程を計算機内で再現できる可能性がある。

そこで、こうした分子の反応・拡散を規定するパラメータの生きた細胞内での値を1分子イメージングによって計測あるいは統計的に推定する技術を開発してきた。しかし、酵素反応速度に關連するパラメータは生細胞内での値を定量化できていない。測定不能なパラメータの存在は1分子粒度シミュレーションの妨げとなっている。この問題を解決するために、本研究課題ではデータ同化を用いることを構想した。生細胞内で実測不可能なパラメータの値を推定することで、細胞膜上を伝搬する PI(3,4,5)P3 の進行波を1分子粒度シミュレーションによって計算機内で再現する。これにより、分子数ゆらぎの統計解析を実現し、細胞内自己組織化の原理を解明する。

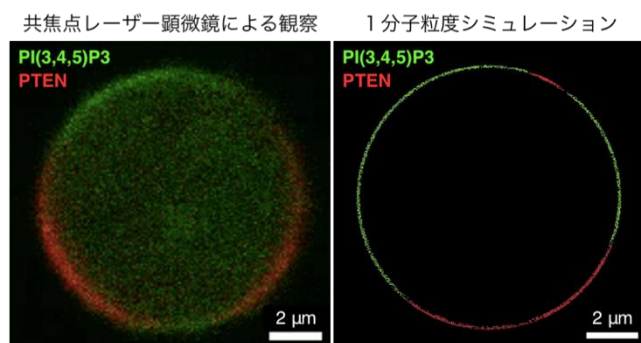


図1. 1分子粒度シミュレーションによる再現。

## 2. 研究成果

### (1) 概要

自発的に運動する細胞の前後極性は細胞内で自己組織化的に形成される。本研究は、この自己組織化にはたらく分子反応ネットワークを明らかにし、ネットワークを構成する個々の分子の反応と拡散を1分子ごとに計算することによってネットワーク全体のダイナミクスを再現する1分子粒度シミュレーション法の開発を行い、自己組織化原理を分子レベルで明らかにすることを目的として行った。

研究の結果、この細胞内自己組織化を担う分子反応ネットワークは興奮系と双安定系から構成されることを明らかにした。また、興奮系は低分子量 G タンパク質である Ras、双安定系はイノシトールリン脂質 PI(3,4,5)P3、PI(4,5)P2 とその代謝酵素 PI3K、PTEN を中心的分子として構成されることが分かった。より詳細な分子的知見を得られている双安定系に焦点を絞り、1分子粒度シミュレーション法の研究開発を行った。双安定系は、細胞膜上で PI(3,4,5)P3 の高密度領域とその脱リン酸化酵素である PTEN の高密度領域が空間的に分離するために働く。この空間分離の過程を、分子の反応と拡散を1分子ごとに計算する1分子粒度シミュレーションによって計算機内で再現することに成功した。このダイナミクスには PI3K の活性が重要なパラメータとなっていることが本研究の結果から示唆されたが、実際の細胞内では計測できないため、データ同化によって推定する方法の開発を進めている。

研究の過程において、興奮系は計測対象となる分子の種類が比較的多いことが予想された。そこで、当初の計画にはなかったが、1分子イメージング計測のハイスループット化のために細胞内1分子自動観察システムを構築した。実際に、複数のシグナル伝達分子の細胞内1分子イメージング計測を行い、パラメータの統計的推定を従来よりも高速に進めることができた。また、1つの細胞の細胞膜上に存在する酵素分子の個数を計測するために、超解像顕微鏡法の一つである光活性化局在性顕微鏡法(Photo-Activated Localization Microscopy; PALM)を導入した。その結果、PI3K 系のシグナル伝達分子が細胞膜上で集積してクラスター様に分布することを明らかにした。今後、こうしたメソスコピックな構造を利用した自己組織化の可能性を追求するために、細胞膜の不均一性を1分子粒度シミュレーションに取り入れた上で、データ同化を進めている。

### (2) 詳細

#### (研究テーマ A) 自己組織化系の分子反応ネットワークモデルの構築

まず、この細胞内自己組織化系をどのような分子反応ネットワークとして数理的に記述することができるかを明らかにするために実験的解析を行った。その結果、研究対象の分子反応ネットワークは、興奮系と双安定系から構成されることを明らかにした(図2)。

細胞膜上の分子の空間分布を自発的に非対称化するためには興奮系の分子反応ネットワークが機能する。興

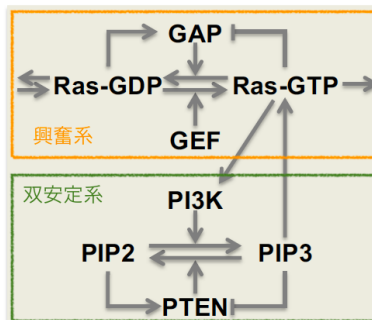


図2. 分子反応ネットワークのモデル.

興奮系は、全か無かの法則に則って閾値を超える入力に対して定型的な応答を出力する系である。この性質のために、特徴的な空間サイズと寿命を持つ活性化型 Ras の高密度領域が細胞膜上のランダムな場所で確率的に発生する。本研究対象の細胞内自己組織化系では、興奮系が低分子量 GTP 結合タンパク質である Ras を中心として、Ras の活性化因子 RasGEF、Ras 不活性化因子 RasGAP によって構成されることを明らかにした [論文 1]。興奮が起こるメカニズムとして、Ras の活性化が素早く起こる(活性化型 Ras (Ras-GTP) を増やすための fast positive feedback loop が存在する)一方で、不活性化が時間遅れを伴って起こる(不活性化型 Ras (Ras-GDP) に戻すための delayed negative feedback loop が存在する)ことで一過的に活性化型 Ras が局所的に蓄積するようになると考えられた。

興奮系が働いて活性化型 Ras の高密度領域が発生すると、さらに双安定系によって明確化される。双安定系とは、系の状態として2つの準安定状態を実現する系である。この性質のために、前側領域とそれ以外の領域が空間的に明確に分離される。本研究対象の細胞内自己組織化系では、細胞膜を構成するリン脂質である PI(3,4,5)P3、PI(4,5)P2、PI(3,4,5)P3 の脱リン酸化酵素 PTEN、PI(4,5)P2 のリン酸化酵素 PI3K によって構成される [論文 2,5]。PI(3,4,5)P3 と PTEN の細胞膜上の局所的な密度は双安定性を示す [論文 5]。双安定性が生まれるメカニズムとして、PTEN と PIP3 の間に相互抑制が働き、PTEN を増やすように働く positive feedback loop と PI(3,4,5)P3 を増やすように働く positive feedback loop が綱引きの状態にあることを明らかにした。2つの feedback loop の強さを制御する上で、PI(3,4,5)P3 を増やす酵素である PI3K の活性が重要な制御パラメータとなっている。活性化型 Ras が PI3K を結合して活性化することで、興奮系が双安定性を制御していることが分かった。

これらの結果から、本研究対象の細胞内自己組織化系の主要な構成分子の間にもどの様な反応や制御関係が存在するかを概ね明らかにすることができ、当初の目標を達成できた。そこで、以下に記述する通り、これらの2つの系それぞれに対して、(1)計測対象分子の絞り込み、(2)1分子イメージングによる反応・拡散パラメータの計測・推定、(3)1分子粒度シミュレーションとデータ同化の順で研究を進めた。

### (研究テーマ B) 双安定系

#### (1) 計測対象分子の絞り込み

系の構成分子は PI(3,4,5)P3、PI(4,5)P2、PTEN、PI3K の4種類である。PI(3,4,5)P3 および PI(4,5)P2 は細胞膜を構成する脂質である。PI3K および PTEN は酵素であり、PI3K は PI(4,5)P2 をリン酸化して PI(3,4,5)P3 を産生する反応を触媒し、PTEN は

PI(3,4,5)P3 を脱リン酸化して PI(4,5)P2 を産生する反応を触媒する。

#### (2) 1分子イメージングによる反応・拡散パラメータの計測・推定

PTEN および PI3K について、これらの酵素分子の1分子イメージングを生きた細胞内で行い、拡散係数および細胞膜解離速度定数、状態間遷移速度定数を統計解析により推定し

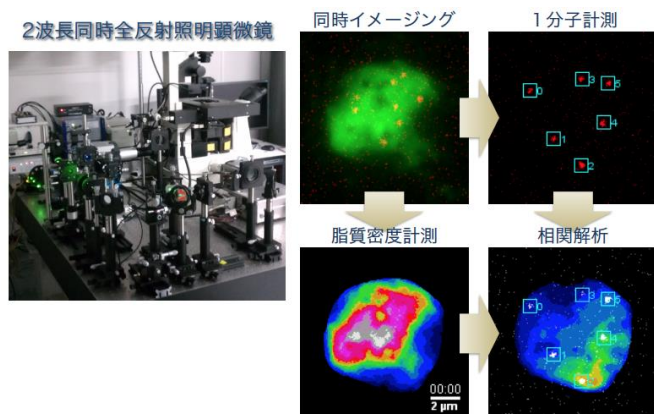


図3. 進行波と酵素1分子の同時イメージング。

た。実験に際して、イメージングのために蛍光色素を付加した後もこれらの酵素が活性を保持していることを確認した。また、進行波と1分子の同時観察が可能な顕微鏡システム(図3)を構築し、PI(3,4,5)P3 や PI(4,5)P2 の局所的な密度に依存して PTEN および PI3K の反応・拡散がどのように変化するかを解析できるようにした。結果、PTEN は細胞膜の PI(3,4,5)P3 密度が高いと結合速度が遅く解離速度が速いこと、PI(4,5)P2 密度が高いと結合速度が速く解離速度が遅いことを明らかにした [論文 2,5]。これらは、双安定系に見られる2つの準安定状態間のスイッチ様の遷移を実現するポジティブフィードバック機構の分子レベルでの実体(分子メカニズム)となっていると考えられる。

### (3) 1分子粒度シミュレーションとデータ同化

構築した数理モデルおよび計測したパラメータを用いて、Spatioocyte を利用して1分子粒度シミュレーションを行った。結果として、細胞膜上で PTEN 高密度領域と PI(3,4,5)P3 高密度領域に空間分離する過程を計算機内で再現することができた。細胞を用いた実験と同様に、シミュレーションにおいても PI3K の酵素活性パラメータを操作することでこれらの領域の占有率を制御できた(図4)。したがって、細胞の持つ双安定系の特徴を本質的には再現できたと言える。PTEN の酵素活性パラメータは人力でパラメータサーチを行って、その値のおおよその範囲を見積もったが、現在これをデータ同化を利用して推定する方法を開発中である。細胞膜全体に存在する PI3K の分子数は数千個のオーダーであることが推測されたことから、PI3K の活性が双安定系のダイナミクスを大きく左右すると考えられる。こうした特徴をデータ同化で捉えられるかどうか検討すべき課題である。

## (研究テーマ C) 自動化1分子イメージング顕微鏡システムの導入

興奮系の構成分子では、同一種のタンパク質についても複数の遺伝子が冗長的に働くことから、1分子イメージング計測の対象となる分子の種類が多いことが予想された。また、PI3K の場合に実際に経験したように、酵素の活性を維持した状態で蛍光色素を付加するために、何度かトライアルアンドエラーを繰り返す必要がある。そこで、当初の研究計画にはなかったが、計測(画像取得・統計解析)のハイスループット化のために、細胞内1分子自動観察システムを構築した。結果、画像取得のハード面に関しては、高精度電動ピエゾステージを用いて96 ウェル培養プレートの各ウェルを移動して自動で画像を取得できるようになった。一方、ソフト面に関しては、哺乳類培養細胞を対象とした深層学習による細胞の自動認識が、そのままでは本研究で用いる細胞性粘菌細胞を対象としてうまく機能しないことがわかった。現在も引き続き開発を進めている。また、統計解析に関しては、現在入手可能な複数の1分子自動追跡ソフトの比較・検討を行った結果、ImageJ のプラグインの一つである TrackMate を用いて自動追跡したデータからの拡散係数の統計的推定が可能になった。

## (研究テーマ D) 興奮系

### (1) 計測対象分子の絞り込み

計測対象分子は、Ras、Ras の活性化因子(RasGEF)、不活性化分子(RasGAP)の3種類である [論文 1]。Ras については RasG と呼ばれる遺伝子が重要であることがわかっているが、RasGEF および RasGAP についてはコードする遺伝子がそれぞれ 25 種類および 14 種類ずつ存在し、どの遺伝子がこの興奮系に必須であるかわかっていなかった。そこで、遺伝子に一

つつつ変調を与えたときに進行波の時空間的特徴に現れる変化に着目し、イメージング・統計解析・階層的クラスタリングによって顕著に影響する遺伝子を見つけるヴィジュアルスクリーニング法を開発した。RasGEF についてスクリーニングを行なった結果、数種類の遺伝子を興奮系関連遺伝子として同定することに成功した [Iwamoto et al., in preparation]。

#### (2) 1分子イメージングによる反応・拡散パラメータの計測・推定

細胞内1分子自動観察システムは細胞の自動認識がまだうまく行えなかったものの、光学系の工夫により十分に S/N 比の高い1分子画像を取得できるようになったため、1分子自動追跡ソフトを用いて半自動的な統計解析が可能となった。本システムを用いて現在進行中である。

#### (3) 1分子粒度シミュレーションとデータ同化

1分子粒度シミュレーションに用いる数理モデルを精緻化する目的で、あるシグナル伝達分子の PALM イメージングを行った結果、細胞膜上でクラスター様の分布を示すことが明らかになった [Shin et al., submitted]。クラスターの半径は約 200 nm であり、脂質マイクロドメイン(いわゆる脂質ラフト)に集積している可能性が示唆された。このことから、本研究の研究対象とする自己組織化系は本質的に細胞膜のミクロな不均一構造を利用して自己組織化している可能性が考えられる。実際に、脂質ラフト形成に関与する脂質分子の代謝を阻害すると、興奮性が抑制されることを明らかにした。興奮によって発火する頻度が低下するだけでなく、一旦発火したとしても進行波として伝搬しにくくなっていた。こうした結果を踏まえて、1分子粒度シミュレーションとデータ同化にもクラスター構造を陽に取り入れたものとする必要があると考え、その作業を進めている。

### 3. 今後の展開

さきがけの研究期間内では、本研究対象の細胞内自己組織化系において、タンパク質や脂質の1分子のスケールより大きく、自己組織化構造のスケールより小さい、メソスコピックなスケールの中間構造としてシグナル伝達分子のクラスターを見いだすことができた。さきがけの研究期間終了後数年のスパンでは、こうした構造が自己組織化の過程で積極的に利用されるのかどうかを明らかにする。脂質ラフトも含めた形で1分子粒度シミュレーションを行うことで、細胞膜環境の不均一性を利用した分子数ゆらぎの制御の有無について問うことができるだろう。これは、細胞に特有の自己組織化原理の理解へ繋がると予想される。BZ 反応のような化学反応系では、溶液中の塵がトリガーとなって興奮が起こることが知られている。細胞内での興奮の制御機構との相違点を明らかにし、生物が進化の過程で獲得してきた独自の自己組織化原理の理解・生物らしさの理解につなげたい。こうした展開は、さきがけ研究期間終了後 10 年程度を目処に進めたい。

本研究課題とは直接関連しないが、マイクロ流路デバイス(MEMS)を用いて水溶液中に化学物質の空間的な濃度勾配を安定的に作成する技術を利用して、細胞の走化性による運動を定量計測する実験系を構築した [論文 4]。この実験から、細胞を誘引する働きのある化学物質 6 分子が細胞膜上の受容体に結合すれば、細胞がその化学物質の濃度の高い側を認識してそちらへ向かって運動できることを明らかにした。こうした従来知られていなかったような高感度な細胞応答において、上述の自己組織化原理も有利に働く可能性がある。つまり、たった 6 分子であっても発火を起こすのに十分であれば、細胞は応答すると考

えられる。将来的には、ウイルスや何らかの化学物質などを高感度で検出するシステムにこうした細胞特有の原理が利用できる可能性があるだろう。

#### 4. 自己評価

研究目的である「1分子粒度シミュレーション法の開発」「自己組織化原理の理解の深化」においては、想定通りかそれ以上の成果が得られた。実際に、1分子イメージングによって計測したパラメータ値を用いて、1分子粒度シミュレーションを行い、双安定系の動態を再現することに成功した。また、脂質代謝阻害剤を用いた超解像顕微鏡イメージング研究から、活性化型 Ras のクラスターと興奮性との関連を明らかにすることに成功した。活性化型 Ras 高密度領域のような細胞内自己組織化構造を構築する過程で、活性化型 Ras クラスターのようなメソスコピックな構造がトリガーとして積極的な寄与をしている可能性もある。こうした細胞内自己組織化における中間構造の存在を明らかにした研究はほとんど前例がないものであり、関連する研究分野への波及効果としては十分に大きいと予想している。こうしたことから、目的をある程度達成できたと評価した。

一方で、もう一つの重要な研究目的である「1分子粒度シミュレーションへのデータ同化の採用」については、想定より研究が遅れてしまった。これには、自身の研究・教育の進め方に問題があった。コロナ禍に伴い、それまで一緒に研究を進めていた学生さん2名が体調不良となった。彼女らの研究生活において、私がもう少し精神面でのサポートを常々からしておくべきであったのに、十分にできていない状況であったことが一因だと考えられる。結果、学生さんの研究をかなりの部分で手伝う必要が生じ、データ同化を進める時間を作れなかった。細胞の各種顕微鏡イメージングとシミュレーションをつなぐ過程でデータ同化を取り入れることができれば、生物学研究一般に新しい研究分野を拓く可能性がある。こうした波及効果の大きい分野において先駆的に研究を進めるために、研究・教育の時間のマネジメントについて改善して、今後も本研究課題を継続したい。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 5件

1. Fukushima, S., Matsuoka, S., and Ueda, M. Excitable dynamics of Ras triggers spontaneous symmetry breaking of PIP3 signaling in motile cells. *Journal of Cell Science*, 132(5): jcs224121. (2019).

細胞の前後を作るためには、外来の入力によらず細胞内で内因的に分子の分布に偏りを発生させる必要がある。本論文では、この過程で中心的な役割を担う分子とその反応を明らかにした。具体的には、低分子 GTP 結合タンパク質の一種である Ras が不可欠であり、これを活性化するタンパク質と不活性化するタンパク質が興奮系と呼ばれる分子反応ネットワークを構成することを解明した。興奮系のダイナミクスを理解するためにはこれらのタンパク質の挙動を解析すればよいことが分かり、以降の研究の方針を決定づけた。本研究分野の最先

端の研究者らがすでに本論文を引用して論文発表をしており、世界的にも影響の大きい論文の一つと言える。

2. Yoshioka, D., Fukushima, S., Koteishi, H., Okuno, D., Ide, T., Matsuoka, S., and Ueda, M. Single-molecule imaging of PI(4,5)P2 and PTEN in vitro reveals a positive feedback mechanism for PTEN membrane binding. *Communications Biology*, 3: 92. (2020).

細胞内で前後に分かれて存在する分子は、前(後ろ)に存在する分子は前(後ろ)に存在しやすい性質を持つ。本論文では、後ろで働く分子がポジティブフィードバック制御を介して後ろに存在しやすくなる機構を分子レベルで解明した。具体的には、後ろの細胞膜に結合する脱リン酸化酵素 PTEN は、自身が触媒する酵素反応の生成物 PI(4,5)P2 と結合する結果、膜への結合が安定化することが分かった。生細胞だけでなく人工脂質膜を用いて1分子計測を行うことにより、細胞膜を用いた場合には困難な PI(4,5)P2 密度の厳密な制御を実現し、メカニズムを定量的に明らかにすることに成功した。1分子計測を通して in vivo と in vitro を繋ぐ理解を得る研究であり、世界的にも先駆的である。

3. Yamazaki, S., Hashimura, H., Morimoto, Y. V., Miyanaga, Y., Matsuoka, S., Kamimura, Y., and Ueda, M. Talin B regulates collective cell migration via PI3K signaling in the mound of *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 525(2): 372–377. (2020).

4. Ohtsuka, D., Ota, N., Amaya, S., Matsuoka, S., Tanaka, Y., and Ueda, M. A sub-population of *Dictyostelium discoideum* cells shows extremely high sensitivity to cAMP for directional migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 554: 131–137. (2021).

5. Matsuoka, S., and Ueda, M. Mutual inhibition between PTEN and PIP3 generates bistability for polarity in motile cells. *Nature Communications*, 9: 4481. (2018).

## (2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件 (特許公開前のもも含む)

## (3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. (招待講演) 「細胞内自己組織化現象の1分子計測に基づく1分子粒度シミュレーション」  
日本化学会第 100 春季年会 (2020 年 3 月 23 日)

2. (招待講演) 「自己組織化による細胞極性形成の1分子粒度シミュレーション」, 中国-日本交流シンポジウム 『膜分子ダイナミクスの最前線』, 第 58 回日本生物物理学会年会 (2020 年 9 月 17 日)

3. (受賞) 理化学研究所 梅峰賞 (2019 年 5 月 24 日)

4. (総説) 松岡里実, 上田昌宏 「運動する細胞の前後極性形成のための自発シグナル生成メカニズム」, 特集 『生物物理学の進歩 - 生命現象の定量的理解に向けて』, 生体の科学 72 巻 3 号, pp. 229–233. (2021).