

研 究 報 告 書

「細胞膜-細胞質結合反応系による細胞情報処理の動作原理の解明」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：柴田達夫

1. 研究のねらい

細胞の走化性は、細胞が外部の化学物質の濃度勾配を感知し、それに対して方向性のある運動を示す性質で、単細胞生物の環境探索や多細胞生物の形態形成に重要な細胞機能のひとつである。濃度勾配を認識するためには、細胞はその前後でシグナルの濃度を検出し、その情報を散逸することなく比較し、濃度の高い方向を計算する必要がある。しかし、レセプターと結合している走化性リガンドの前後の個数の差は百数十から十程度と極めて小さい。さらに、レセプターとリガンドの結合・解離は確率的プロセスであるため、結合しているリガンドの個数は時間的に確率的な変動をする。このような、ノイズのともなう微弱なシグナルから、シグナル伝達系はどのようにして適切に走化性の応答を作り出すことができるのだろうか (Ueda & Shibata, 2007, Biophys. J.; Shibata & Ueda, 2008, Biosystems)。一方、走化性運動をする細胞は誘因シグナルのない状態においても、自発的に細胞極性を作り出しランダムな方向に向かって運動を繰り返す。そのためには、細胞は外部のシグナルに依存することなく、どちらの方向に運動装置を伸長させるべきなのかを時々刻々と決定する必要があるとあって、そのためのシグナルが細胞内で生成されていると考えられる。つまり、細胞は外部のシグナルに依存することなく自発的に空間対称性の破れたシグナルを細胞内に形成することができると考えられる。このように細胞の情報処理を担っているシグナル伝達系は、外部のシグナルを処理し、応答する作用と、外部にシグナルの無い状態においても自発的にシグナルを形成する作用の両方が備わっている。本研究では、細胞が示す自発的に空間対称性を破る自己組織化能に注目して、シグナル伝達系が濃度勾配を認識し走化性運動を引き起こす機構の解明をめざした。特に、走化性情報処理の鍵となる反応であるイノシトールリン脂質反応の自己組織化現象に、イメージングデータの統計的な解析と数理モデルの構築を組み合わせ取り組んだ。さらに、その結果が最終的にあらわれる細胞運動に注目し、細胞運動のデータの取得から運動の統計的な解析を進めた。また、細胞内の反応系と形態変化が結合した結果表れる細胞運動の計算モデルの開発をめざした。

2. 研究成果

2-1. イノシトールリン脂質反応の自発的な極性形成と走化性刺激に対する応答

真核細胞における走化性は細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* において、詳しく調べられてきた。細胞性粘菌と白血球細胞では走化性の分子メカニズムが良く保存されており、比較すると実験の容易な細胞性粘菌の研究を通じて、そのメカニズムの理解が進んでいる。細胞性粘菌において、走化性のシグナル伝達系は、7回膜貫通型受容体、受容体と結合する3量体G蛋白質をシグナル受容の入り口として、その下流に複数の並列的な経路が知られている。そのなかで、イノシトールリン脂質代謝系の経路は最もよく調べられており、また、主要な役割を果たしている。細胞性粘菌の誘引物質であるcAMPの勾配下において、イノシトールリン脂質代謝系の主要酵素のひとつであるPI3キナーゼ(PI3K)が、濃度の高い側でホスファチジルイノシトール(3,4,5)三リン酸(以下PIP3)を産生する。PIP3の局所的な増加がアクチンの重合を促し、細胞膜を伸長させ仮足形成を促すことで走化性が実現されると考えられている。一方、細胞の後方ではPIP3は脱リン酸化酵素PTENによって分解されている。

わたしたちは、勾配認識の鍵となるこれらの分子PIP3とPTENの動態を多色のイメージング法によって1細胞スケールで計測し、それらが自己組織化的現象を示すことを発見し

た(図 1A, B)。つまり、PIP3 が局在ドメインを膜上に形成する。さらに、局在ドメインは時間的に膜上を運動していた。この自己組織化現象の発見が本研究の出発点のひとつである。このような自己組織化を引き起こすメカニズムは何であろうか。また、その生物学的な役割は何であろうか。それにたいして数理モデルを通じて解明することに取り組んだ。

蛍光データの時間・空間相関関数の解析から、この自己組織化現象が 2-3 分程度の周期を持つ周期的現象であることや、PTEN と PIP3 の振動に位相差のあることがわかった。さらに、ノイズな PIP3 と PTEN の時系列から平均的な動力学を抽出するために、主成分分析を用いた方法を開発した。その方法も用いて図 1C に示した特徴的なダイナミクスを抽出することに成功した。位相空間のダイナミクスは relaxation oscillator の特徴を示し、PIP3 のレベルが高い状態と低い状態を速い遷移がつないでいた。この解析にもとづいて、細胞膜上におけるイノシトールリン脂質代謝系の反応拡散モデルを構築した。このモデルにおいて、これまで知られていない新たな調節を仮定すると、実験結果を上手く再現できることがわかった。(Arai, Shibata, et al. 2010 PNAS)。

さらに数理モデルを解析したところ、いくつかの重要なパラメータの値に依存して、モデルは PIP3 のウェーブパタンのみならず、PIP3 の局在が一過的に形成される興奮系の特徴を示すことも分かった。実験的にも条件を調整することで、PIP3 の一過的な局在形成が観測された。つまり、実験データに基づいて構成した数理モデルはパラメータを調節することでイノシトールリン脂質代謝系の示す様々な現象を説明できることが明らかになったのである。(Shibata, 出版準備中)

このような、自己組織化現象は、細胞性粘菌のイノシトールリン脂質代謝反応の本来の機能である勾配認識においてどのような役割を果たすのであろうか。数理モデルの解析から、自己組織化現象で PIP3 が自発的にドメインを形成することで、走化性誘引物質のゆるやかな勾配に対して極めて敏感に走化性応答をすることがわかった。その敏感さは、自己組織化現象がなく、自発的に PIP3 の局在が形成されない場合に比べると極めて顕著であった。これらのことから、真核細胞の走化性シグナル伝達系は、外部のシグナルに依存することなく、自発的に対称性を破ってなんらかの秩序形成をする作用を持っていて、外部のシグナルは局在形成をバイアスすることで、走化性応答が実現されていると考えることができる。つまり、外部シグナルは、局在形成を駆動するのではなく、シグナル伝達系の内在的な性質として形成される PIP3 の局在をバイアスしているのである。これによって、ゆるやかな勾配に極めて敏感に応答することが可能になると考えることができる。(Shibata, 出版準備中)

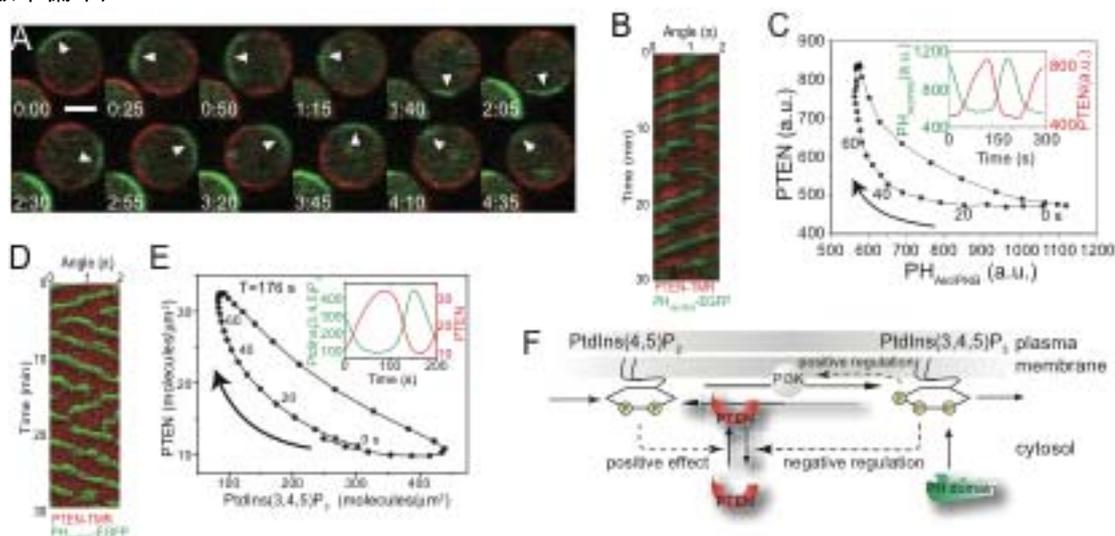


図 1 イノシトールリン脂質代謝系における自己組織化反応 A. 細胞膜上における PIP3 (緑) と PTEN (赤) の強度の時間経過。 B. 細胞膜上における PIP3 (緑) と PTEN (赤) の強度変化の時間空間ダイアグラム (キモグラフ)。 C. 抽出された相空間中にお

ける PIP3 と PTEN の平均的な時間変化。D. 確率的な数値計算によって得られたイノシトールリン脂質反応のキモグラフ。E. 再現された、相空間中における PIP3 と PTEN の平均的な時間変化。F. イノシトールリン脂質反応の模式図

2-2. 細胞形態を考慮した細胞運動の数理モデル

細胞運動は、シグナル伝達系やその他の細胞内の活性が、アクチンなどの運動装置を誘導して実現される。走化性の場合、そのような運動の結果、細胞が濃度勾配に沿って伸長すれば、細胞の形の変形ばかりではなく、勾配認識のためのシグナル処理はより進むかもしれない。そこで、そのようなシグナル反応と細胞の形態の相互作用を議論するための計算モデルの構築を行った。このモデルにおいては、(1)細胞の形態が変化できること、(2)細胞膜上でのシグナル反応が実現できること、(3)細胞質中でのシグナル反応が実現できること、さらに(4)細胞膜と細胞質の反応がカップルしていること、の4要件の実現をめざした。細胞運動はアクチン重合などを含む分子スケールの記述よりは、より粗視化されたスケールによる記述をめざした。

細胞の形態の変形によって反応場の境界の形状が時々刻々と変化する。濃度場の境界が時々刻々と変化する事は、境界付近の濃度の扱いに関する計算法において大きな問題が生じる。これを回避するために粒子法を用いた。ここでは、粒子法的一种である Smoothed particle hydrodynamics (SPH)法を用いた。さらに、SPHを構成する粒子を細胞の境界の範囲にとどめておくために、フェーズフィールド法を用いた。つまり、SPHによって細胞質を、フェーズフィールドによって細胞膜をそれぞれ表わしたと考えることができる。フェーズフィールドの収縮力を細胞膜上のシグナル因子の濃度に依存するようにすることで、反応と形態の変化がカップルするようになった。これは、ちょうど、シグナル因子によってアクチンなどの骨格の重合が誘導されることに対応している。

さらに、細胞質と細胞膜のそれぞれにおけるシグナル反応拡散系を、SPHを構成する粒子上に実装した。細胞膜と細胞質を行き来する分子によって、それら2つの反応系はカップルしている。シグナル反応のプロトタイプとして、細胞が円形で形状の変化を起こさないときには定常的な局在パターン(モード1のチューリングパターン)を形成する反応を用いた。

当初、細胞は、シグナル反応の局在パターンに駆動されて直進運動することを予想していた。ところが細胞は、回転運動やジグザグ運動など多様な運動を示すことが分かった。つまり、形の変形によって新たな不安定性が容易に生じることを示唆している。反応から形態変化への反映の時定数を小さい値から大きくしていくと、直進運動がジグザグ運動に変化し、さらに回転運動に変化していくこともわかった (Shibata 出版準備中)。

これらの結果は現在出版準備中である。反応を細胞性粘菌の走化性シグナル伝達系反応にするなどして、より実際の状況において、形と反応、さらに勾配認識が形態にどのように影響されるのかを調べていくための基盤ができた。

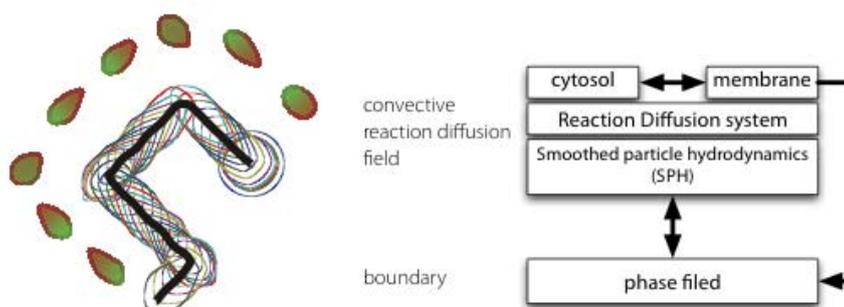


図2 粒子法とフェーズフィールド法を組み合わせた細胞運動モデル

2-3 細胞性粘菌の運動の統計的解析

細胞のシグナル受容やシグナル処理の結果あらわれる細胞の形態変化や細胞運動は、細胞内部の活動の最終的な出力であると考えられることができる。特に、細胞の外部に誘引物質のない場合や一様にある環境において現れる細胞運動は、活性の自発的な対称性の破れを含む、細胞内部の活動を推測する手がかりをあたえるだろう。また、走化性が細胞のランダムな運動をバイアスすることで現れていることを考えると、細胞のランダムな運動の性質を解明することは、走化性運動の解明にとって不可欠である。そこで、学生と協力して、細胞性粘菌を恒常的に培養できる環境を整備することから開始した。また、細胞運動の位相差顕微画像を取得するための環境を整備した。そして、細胞性粘菌の走化性誘引物質である cAMP を 0、100pM、1nM、10nM、100nM、1 μ M の濃度で空間的に一様な条件のときの細胞運動の位相差顕微画像を取得することに成功している。

実験系の確立と平行して、細胞形態、特に仮足の形成に注目して解析を進めるための解析法の開発に取り組んだ。まずは、位相差顕微画像から細胞の縁取りをするアルゴリズムを開発した。細胞の縁取りのアルゴリズムとしては画像解析にもとづく方法と統計モデルにもとづく2つの方法が使用可能な状態にある。さらに細胞の運動を解析するためにそのために、仮足を検出するアルゴリズムを開発した。その結果、仮足形成のタイミングや伸張時間に関する統計則と細胞重心の運動の統計則を調べることに成功している。さらに、走化性誘引物質の空間的一様刺激に対するそれらの統計則の変化を調べた。それらは重心および仮足形成に関する簡単な確率モデルで説明できる可能性がわかった。(Shibata, 出版準備中)

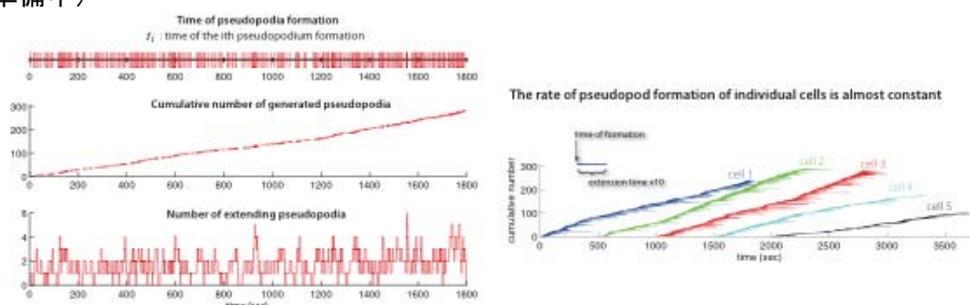


図3 仮足の動態：左：仮足の形成された時系列。右：仮足形成の細胞間の違い

3. 今後の展開

3年半の研究を通じて、学生や共同研究者と協力して多くの成果が得られた。これらを順次、論文として出版していく作業を進めている。

近年の細胞のイメージング技術の発達で、様々な細胞で自己組織化現象が定量的に計測できるようになってきた。そのなかでも、細胞の極性形成は、単細胞の運動のみならず、多細胞における組織形成などにおいても本質的に重要な役割を果たしている。本研究で示されたことは、細胞が内在的に持つ極性形成の能力の重要性である。これまでは、しばしば、細胞の外部環境によって細胞の性質が誘導されるという面が強調されてきたように思われる。本研究の成果が、そうした見方に対して細胞自身の自発的性質の重要性に視線を向けるきっかけになることを大いに期待する。

また、運動のモデルは「形態と反応」という新しいフィールドの発展を予感させる。数理的にも豊かな内容を含むはずである。細胞スケールのみならず、組織スケールも射程におく問題である。時々刻々と境界が変化しながら反応が進む、数理モデルの展開につながることを期待したい。さらには、細胞や組織の現象は、数理モデル自身が時々刻々と変化していくような、よりダイナミックな記述を通じて理解される必要があるかもしれない。こうした問題は、細胞や組織の定量的な計測に裏打ちされている必要がある。本研究課題で発展させた、細胞運動の定量化技術が、生命現象の理解、記述のみならず、新しい数理科学の発展に資することを期待する。

4. 自己評価

走化性シグナル伝達系から細胞運動までを統合的に理解するというテーマは、3年半の研究テーマとして、欲張りすぎたか内容だったかもしれない。しかし、その端緒はつかめたのではないかと自負している。細胞運動の形態変形を含むモデルや、細胞運動の計測・解析技術は今後、様々な形で展開・発展が期待できる。

本研究は、実験グループとの共同研究の一環として進められ、実験グループの協力は何より不可欠であった。その過程で、走化性シグナル伝達系の性質に関する理論からの貢献は大いにあったものと自負している。細胞や組織スケールの生命科学において、理論が影響力を持つと思えば、実験結果の本質を看破し、数理的方法を通じて現象の本質を明らかにする必要があるだろう。しかし、理論家がデータを通じて生命科学の既存のスタイルに適應するばかりではなく、理論自身が持つ力を示していく必要もあるのかもしれない。細胞、組織スケールにおける生命科学において、理論生物学の役割、また、理論家の地位、については未だに議論の余地がある。国際的にも手探りの感じを受け取る。もしも、本研究によって生命科学における理論的な研究の可能性や重要性が少しでも認識されたならば、幸いである。

5. 研究総括の見解

走化性運動をする細胞は、外部の誘因シグナルを処理し応答する能力と外部刺激の無い状態においても自発的に細胞極性を作り出しランダム運動を行う能力を合わせ持つことに着眼し、細胞のシグナル伝達系が走化性運動を引き起こす機構の解明を目指した難度の高い挑戦的な研究課題である。まず、細胞性粘菌において本研究者らが発見したイノシトールリン脂質反応の自己組織化現象を取り上げ、イメージングデータの統計解析と数理モデルを駆使して、自発的極性形成や誘因物質濃度勾配認識のメカニズムを見事に解き明かした。さらに外部シグナルによって引き起こされる細胞形態と細胞運動を統合的に記述する数理モデルの構築にも成功したことは高く評価できる。これらは、理論と実験が双方向的に密接にタイアップした実証的研究の卓越した成果であるといえる。

6. 主要な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

	1. Yoshiyuki Arai*, Tatsuo Shibata*, Satomi Matsuoka, Masayuki Sato, Toshio Yanagida and Masahiro Ueda, (2010), "Self-organization of the phosphatidylinositol lipids signaling system for random cell migration", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107 12399-12404 (*equal contribution) (Science Signaling, EDITORS' CHOICE; Nature Chemical Biology, Research Highlights; Faculty of 1000 Biology に選出された.)
	2. Shibata, T. and Ueda, M. (2008). Noise generation, amplification and propagation in chemotactic signaling systems of living cells. <i>BioSystems</i> , 93, 126-132.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

受賞

柴田達夫, 「細胞の確率的な情報処理システムに関する研究」, 平成 22 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞

その他の論文

(1) Nishikawa M, Shibata T (2010) "Nonadaptive Fluctuation in an Adaptive Sensory System: Bacterial Chemoreceptor". PLoS ONE 5(6): e11224

(2) Yasuaki Kobayashi, Tatsuo Shibata, Yoshiki Kuramoto, and Alexander S. Mikhailov, (2010) "Evolutionary design of oscillatory genetic networks", European Physical Journal B, 76,

167-178

- (3) Hibino K, Shibata T, Yanagida T, Sako Y. 2009. "A RasGTP-induced conformational change in C-RAF is essential for accurate molecular recognition". *Biophys Journal* 97(5):1277-1287
- (4) Matsuoka, S., T. Shibata, and M. Ueda, "Statistical analysis of lateral diffusion and multistate kinetics in single-molecule imaging". *Biophys Journal*, 2009. 97(4): p. 1115-24
- (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) M. Ueda and T. Shibata (2007), "Stochastic signal processing and transduction in chemotactic response of eukaryotic cells" *Biophysical Journal* 93:11-20 (2007)

主な著作物

- (1) Masahiro Ueda, Tatsuo Shibata, and Yasushi Sako (2008). "Signal transduction across the plasma membrane". *In Single Molecule Dynamics in Life Science*. (eds. T. Yanagida and Y. Ishii) WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 99-116.
- (2) Tatsuo Shibata (2010). "Noisy signal transduction in cellular systems," *In Cell Signaling Reactions: Single-Molecule Kinetic Analysis*. (eds. Y. Sako and M. Ueda). p 297-324
- (3) 柴田達夫、上田昌宏、(2011)「細胞における情報処理の確率性と自発的対称性の破れ」、*「生命科学の新しい潮流 理論生物学」*(望月敦史編集) 共立出版 p.97-p.115

主な招待講演

- (1) Tatsuo Shibata (2009) "Deterministic and probabilistic aspects of signal processing and transduction in chemotactic response of eukaryotic cells", 第32回日本分子生物学会年会, シンポジウム"Systems biology of cellular signaling", 2009年12月9日~12日, パシフィコ横浜, 横浜
- (2) Shibata, T. (2008), "Self-organization in chemotactic signaling for spontaneous cell migration of Eukaryotic cells" Integrating Physics, Chemistry, Mathematics and Biology to understand living systems (IPCMB 2008), 4-6, Dec, 2008 Bose Institute, Kolkata, India.
- (3) 柴田達夫 (2008) "細胞スケールの自己組織化現象 イメージ・データ解析と数理モデル", 細胞・発生生物学研究への数理科学的アプローチ, 2008年9月2~3日, 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター, 神戸
- (4) 柴田達夫 (2008) "走化性情報処理のゆらぎと協同性", 第60回日本細胞生物学会大会, 2008年6月29日~7月1日, パシフィコ横浜, 横浜

新聞報道

- (1) 原著論文(Arai, Shibata et al. 2010 PNAS)について JST, 大阪大学, 広島大学の共同でプレス発表を行なった. 平成22年6月15日
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20100615/index.html>
- (2) 日経産業新聞, 『酵素が細胞の動き決定』, 平成22年6月16日.
- (3) 科学新聞, 『細胞の自発運動時に機能, 分子挙動を解明』, 平成22年6月25日.

その他

- (1) Science Signaling, EDITORS' CHOICE にて原著論文(Arai, Shibata et al. 2010 PNAS)が紹介された. "Organized Randomness", Vol. 3, Issue 130, p. ec210 (13 July, 2010).
- (2) Nature Chemical Biology, Research Highlights にて原著論文(Arai, Shibata et al. 2010 PNAS)が紹介された. "Migration in cue-less cells", Vol. 6, p564 (August, 2010).
- (3) Faculty of 1000 Biology にて原著論文(Arai, Shibata et al. 2010 PNAS)が選ばれた.
<http://www.f1000biology.com/article/id/4195956>

- (4) 物理系研究者に生物関連論文を紹介する: Virtual Journal of Biological Physics Research に原著論文(Arai, Shibata et al. 2010 PNAS)が選ばれた.