

研究報告書

「細胞内シグナル伝達の定量的数理モデリング」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 青木 一洋

1. 研究のねらい

我々のからだを構成する細胞は、成長因子やホルモンといった様々な入力刺激を受容体で感知し、細胞内へと入力する。その入力刺激は「細胞内シグナル伝達系」と呼ばれる分子反応のネットワークにより処理され、最終的には表現型として出力される。生化学や分子生物学の発展に伴って、細胞内シグナル伝達の研究は急速に進展した。しかしながら、これまでの膨大な研究結果の大半は新規の情報伝達分子・系の同定であり、システムとしての細胞内シグナル伝達の統合的な理解にはほど遠いと言わざるを得ない。一方、細胞内シグナル伝達は、極論すると、生体物質の物理化学的な法則に従った拡散や化学反応の連鎖である。従って、要素間の反応や拡散等のパラメーターを指定することで、細胞内シグナル伝達をコンピュータ上でシミュレートすることができる。本研究では、細胞内シグナル伝達をイメージングにより可視化、定量化し、細胞内シグナル伝達が持つネットワークの時間的、空間的なシステム特性とその機能的、生物学的な意義を数理モデル構築を通して明らかにすることを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究課題では、細胞癌化に深く関与するシグナル伝達ネットワークの反応素過程をバイオイメージングにより可視化し、定量的な時空間パラメーター測定、数値解析を行うことで、入力と出力の時間的・空間的システム構造の関係を、数理モデルとして記述することを目指す。具体的な研究項目として、以下の3つの階層立てたテーマを中心に研究を進めていく。

(2) 詳細

研究テーマ A「細胞内反応素過程の数理モデル」

EGFシグナル伝達ネットワークの主要な出力であるERK MAPキナーゼは細胞増殖に関与する。先行研究から、MAPキナーゼは分配的(Distributive)リン酸化モデルに従ってリン酸化されることでスイッチ様(switch-like)応答を示すということが報告されてきた。しかしながら、予備研究から、哺乳類細胞のEGF-ERK MAPキナーゼシグナル伝達カスケードは、入力刺激に対し段階的(graded)応答を示すことが分かったが、その分子機構が不明である。本研究テーマでは、ERKリン酸化に関連する定量的なシグナル伝達モデルを構築し、この分子機構の解明を目的とした。

まず、ERK リン酸化反応に関連する 30 以上の反応パラメーターを全て実験により取得した。さらにこれらの反応パラメーターを用いてシグナル伝達モデルを作成し、数値シミュレーションしてみたところ、ERK 分子はこれまで言われてきた分配的 (Distributive) リン酸化モデルではなく、一連 (Processive) リン酸化モデルに従ってリン酸化されることが明らかになった。さらに、細胞内の微小環境である分子混み合い (molecular crowding) がこの一連リン酸化モデルにとって十分であることを見出した (図1) (Aoki et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011 に掲載)。

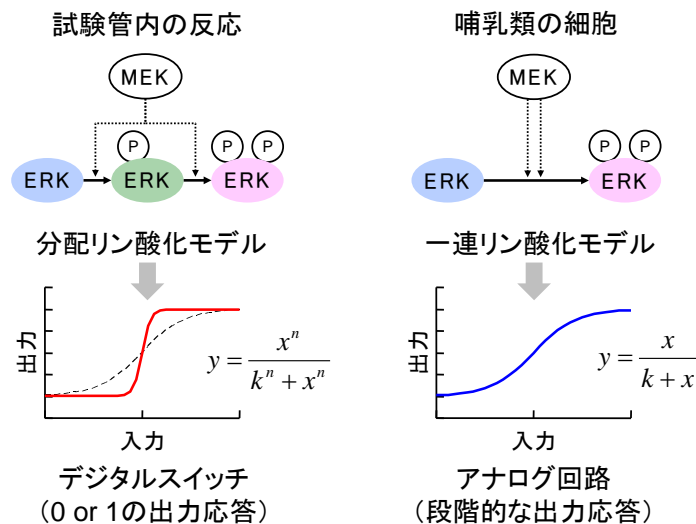


図1 ERK リン酸化モデルと入出力応答の関係性

そこで、分子混み合いを考慮することで創発される準一連 (quasi-processive) 反応に焦点を当てて研究を進めた。まず、in vitro の ERK リン酸化反応に異なる濃度のポリエチレングリコール (PEG-6000) を加えて、分子混み合い環境を段階的に変化させ、ERK の二重リン酸化反応の反応速度と Processivity に与える影響を定量化した。その結果、反応速度に関しては、PEG の濃度が 6% までは上昇するのに対し、PEG が 6% 以上になると反応速度が遅くなる、二相性の応答を示した。また Processivity に関しては、PEG の濃度が 8% 近くまではほとんど上昇しないが、それを超えると急激に上昇することが分かった。

次に、これらの実験結果を再現する反応速度論モデルを構築することを試みた。反応速度の二相性の応答は、これまでに分子混み合い分子の排除体積効果に起因する活量の上昇と粘性の上昇で説明されていたが、定式化はされていなかった。そこでこれらの二因子を含む形で数理モデルを構築した。さらに、Processivity に関しては、一つリン酸化された ERK 分子がもう一つリン酸化されるまでに到達する確率分布を積分することで計算し、分子混み合いによる拡散速度の減少によって Processivity が急激に上昇することが分かった。これら二つの数理モデルは実験結果を非常に合理的に説明することが分かった。これらの数理モデルは、これまでほとんど省みられてこなかった細胞内の分子混み合い環境によって、シグナル伝達の応答性が変化することを示していた。

研究テーマ B「細胞増殖の数理モデル構築」

ERK MAP キナーゼ系が制御する細胞の機能としては細胞増殖（細胞分裂、細胞周期の進行）が知られており、阻害薬や優勢劣性変異体の解析から、ERK が細胞増殖に必要であることが分かっている。しかしながら、ERK 分子が細胞周期のどの時期に、どれくらい活性化して、細胞増殖を促進しているかという定量的な関係を数理モデルとして表現することを目的として研究した。

まず、ERK 活性を生きた細胞で長期間観察するために、高感度 ERK FRET バイオセンサーとその FRET バイオセンサーを安定的に発現させるための手法を開発した（Komatsu et al., Molecular Biology of the Cell, 2011 に掲載）。次に、この手法を用いて、上皮細胞の細胞増殖条件下での ERK 活性を長期間にわたり可視化したところ、予期せず ERK 活性が細胞ごとに確率的に振動していることが観察された（図2）。また、この ERK 活性の確率的な振動は細胞増殖速度と相関していることを見出した。

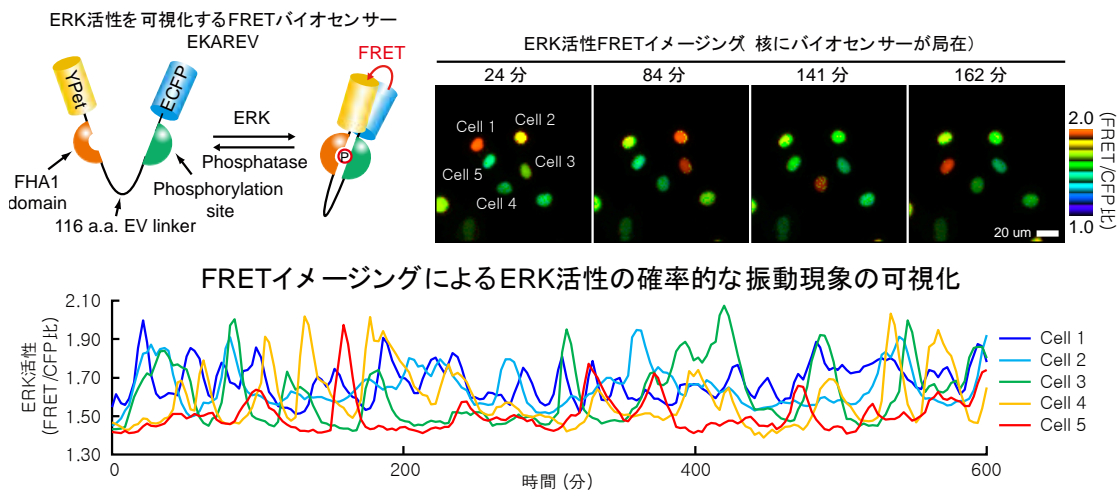


図2 ERK 活性の可視化と定量化

次に、これらの現象を説明する数理モデルの構築に取り組んだ。まず、ERK 活性の確率的な振動を再現するために、Raf、ERK の二分子の興奮系の数理モデルを作った。反応パラメータは実験から直接、もしくは実験結果から推定して求めた。さらに、細胞間の影響を考慮した結合振動子モデルを採用し、実験結果を再現するような数理モデルを探索した。その結果、確率的なパルスの発生頻度、すなわちノイズの強さが細胞密度に応じて増加していることが推測された。この予測は、イメージング結果を画像処理し、ノイズ依存性のパルスとそうでないものを分離し定量することで検証することができた。

これらの結果は、これまで生化学的手法では見つけることができなかった ERK 活性の多細胞動態がその表現型に少なからず影響を及ぼしていることを示しており、イメージングと数理モデルの強みを存分に活かした結果である。

研究テーマ C「細胞遊走の数理モデル構築」

細胞の運動は、胚発生や創傷治癒、癌細胞の浸潤などに見られる重要な細胞機能の一つである。細胞運動は、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質によってアクチン細胞骨格が時間的

に、かつ空間的に適切に制御されて引き起こされると考えられている。しかし、Rho ファミリーG タンパク質が細胞内でいつ、どこで、どのようにして活性化されるのかについては未だ議論の余地が残っている。そこで本研究では、Rho ファミリーG タンパク質を細胞の形の変化を定量的に関連付ける数理モデルを提案することを目的として研究を行った。

Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の一種である Rac1 分子の細胞内活性を蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の原理に基づくバイオセンサーにより可視化し、さらに画像処理、統計処理を施し、Rac1 分子活性と細胞形態の時間的・空間的な自己相互相関、及び相互相関関係を定量化した。その結果、外部刺激がない状態にもかかわらず、細胞は自発的に秩序だった形態変化をしていることを見出した(図3)。さらにさまざまな阻害薬を添加したときの Rho ファミリーG タンパク質の活性の摂動結果を得ることができた。この解析から、(a)アクチン細胞骨格から Rac1 へのポジティブフィードバック経路が存在すること、(b)PI3K 活性を阻害すると、Rac1 活性が一過的に減少し、basalレベルに落ち着く adaptation 現象が起こること、(c)実験結果を再現する反応モデルとして負のフィードバックの存在が示唆されたこと、さらに(d)ミオシン軽鎖キナーゼが adaptation 現象の負のフィードバックの node であることを見出した(Kunida et al., Journal of Cell Science, 2012 に掲載)。

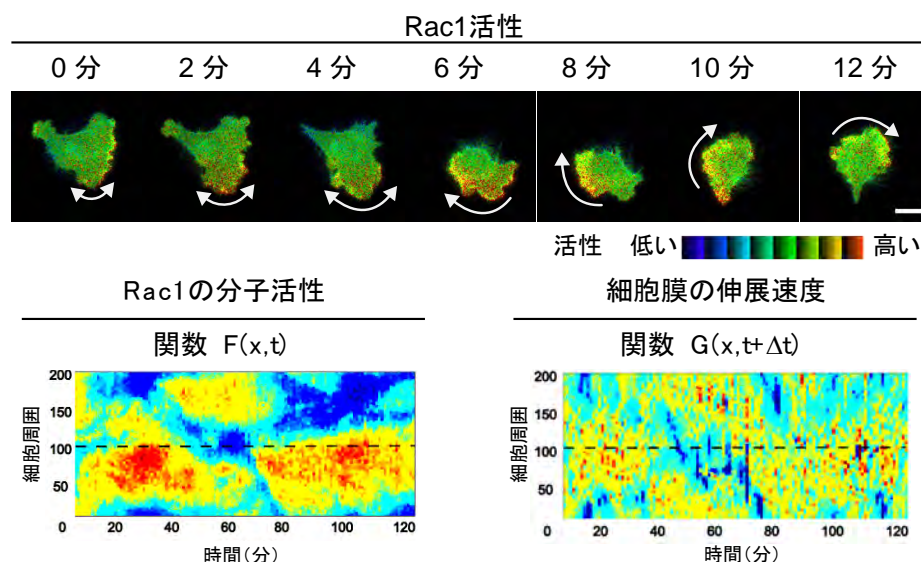


図3 Rac1 活性と細胞膜進展速度の可視化と定量化

3. 今後の展開

このさきがけ研究で、実験データから定量的なデータを取得し、それらを使って数理モデルを構築していく、という手法を確立、実践することができたと考えている。今後は、この手法を使って、より詳細でより予測可能ながん細胞モデルを作りたい。そして将来的には、がんの征圧に向けて少しでも貢献できるような定量的な数理モデルを構築したいと考えている。

具体的には、①(テーマ A に関連して)Ras-ERK シグナル伝達経路以外にも、PI3K-Akt 経路などがんに関連するシグナル伝達経路の定量的なシミュレーションモデルを構築すること、②(テーマ B に関連して)シグナル伝達経路と表現型(細胞増殖だけでなく、アポトーシスや癌化など)の数理モデル化をより進めること、③(テーマ C に関連して)より生体に近い三次元培養下やマウスを用いた生体イメージングにより、シグナル伝達と三次元環境下での細胞運動の相関解

析などを進めていきたい。

4. 自己評価

研究面に関しては、3つの研究テーマともに満足のいく結果を得ることができた。研究テーマ A に関しては、システム生物学の教科書にも載っている「分配(distributive)リン酸化モデル」が哺乳類の細胞には適用できず、「一連(processive)リン酸化モデル」が妥当であることを見出したことが大きな成果であった。さらに分子混み合いというこれまで省みられてこなかった細胞内の環境を加味した新しい数理モデルを構築し、実験データから検証することができたことは大きい。また、研究テーマ B に関しても、興味深い実験結果を幸運にも得ることができ、また数理モデルに関しても、領域内の多くの方から貴重なアドバイスをいただいた。このアドバイスがなければ、数理モデルはここまで進まなかったと思われる。研究テーマ C に関しても、これまでの自身の研究で取り組んでこなかった画像解析や統計処理を組み込み、細胞遊走の数理モデルを提案できた。これも領域内に専門家があり、いつも相談させていただいた。反省点は、これらの結果の一部をさきがけ期間内に論文発表することができなかったことである。研究テーマ A に関しては理論部の論文を、研究テーマ B に関しては実験と理論を合わせた論文が残っており、これらを論文という形できちんと発表したい。

おそらく、私がこの研究領域で最も実験(ウェット)よりであり、理論(ドライ)とは遠い研究者であると思う。にもかかわらずこの研究課題に応募したのは、自分自身を成長させるためという意味も含んでいた。期待通り、これまであまり馴染みのなかった数理モデルやシミュレーションにどっぷりつかることができ、かえがたい経験を得ることができた。今後は、このさきがけ期間に得られた経験を基に、研究をさらに進めていきたい。

5. 研究総括の見解

細胞内シグナル伝達系の研究は近年急速に進展したものの、これまでの研究の大半は、精密パラメータ値の欠如によって実際の観察と乖離していることに問題意識をもち、イメージング計測によって実験的に求めた定量的なパラメータ値をもとに、システムとしての細胞内シグナル伝達の統合的理解を目指すというスケールの大きい研究課題であった。提案で掲げた3つの研究テーマはいずれも極めて難度の高いものであったが、本人が保有する卓越したイメージングの実験技術をベースに、専門外であった数理生物学分野にも情熱を持って取り組み、見事に目標を達成したことは高く評価できる。特に ERK リン酸化の反応機構において、分子混み合いを考慮して新規な反応速度論モデルを構築し、従来のシステム生物学の教科書に記載されている定説が哺乳類の細胞には適用できないことを明らかにしたことは特筆に価する。本人が記述しているように、本領域の研究者との積極的な交流が本人の資質とあいまって良い成果を生んだと感じている。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Aoki K, Yamada M, Kunida K, Yasuda S, Matsuda M. Processive phosphorylation of ERK MAP kinase in mammalian cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the



United States of America. 2011, 108, 12675–126800.
2. Komatsu N, Aoki K, Yamada M, Yukinaga H, Fujita Y, Kamioka Y, Matsuda M. Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. <i>Molecular Biology of the Cell</i> , 2011, 22 4647–46561
3. Kunida K, Matsuda M, Aoki K. FRET imaging and statistical signal processing reveal positive and negative feedback loops regulating the morphology of randomly migrating HT-1080 cells. <i>Journal of Cell Science</i> , 2012, 125, 2381–2392
4. Matsunaga-Udagawa R, Fujita Y, Yoshiki S, Terai K, Kamioka Y, Kiyokawa E, Yugi K, Aoki K, Matsuda M. The scaffold protein Shoc2/SUR-8 accelerates the interaction of Ras and Raf. <i>The Journal of Biological Chemistry</i> , 2010, 285, 7818–7826
5. Aoki K, Komatsu N, Hirata E, Kamioka Y, Matsuda M. Stable expression of FRET biosensors: a new light in cancer research. <i>Cancer science</i> , 2012, 103 614–619

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(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)

<主な学会発表・招待講演>

1. Aoki K. Stochastic oscillation of ERK MAPK activity induced cell proliferation. 2nd Japanese–French Cancer Workshop, 2012年11月28日
2. Aoki K. FRET imaging revealed a functional link between frequency of ERK oscillation and cell growth control. Joint symposium by JST/BBSRC (UK) Molecular Imaging and Systems Biology, 2012年1月30日
3. 青木 一洋、分子混み合いの影響を加味した反応速度論モデルの導出と検証、第1回「細胞環境の測定とモデリング」ワークショップ 2011年11月7日 第四回 JSBi 応用システムバイオロジー研究会
4. 青木一洋、松田道行, FRET イメージング による ERK 活性の細胞増殖制御機構の定量解析, 第84回日本生化学会大会 2011年9月21日 日本生化学会
5. 青木 一洋, がんの制御に向けたシステム的なアプローチ, 公開シンポジウム「日本のライフ研究開発を元気にする“夢”と“攻め” ～バイオ研究と計算・情報科学の次世代型融合を探る～」, 2011年1月22日

<プレスリリース>

文献1. 京都新聞(7月20日 23面)および日刊工業新聞(7月20日 29面)に掲載。