

細胞の形状変化と分子シグナルとの多次元相互作用に関する研究

●石井 信¹⁾ ◆中村 岳史²⁾ ◆作村 諭一³⁾

1) 京都大学大学院 情報学研究所 2) 京都大学大学院 医学研究科 3) 奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科

<研究の目的と進め方>

重要な細胞機能である運動やそれに伴う形態変化は、それ自体が動的であるとともに、タンパク質集団が存在する空間的な「場」を時間的に変化させる。一方で、動的な「場」はタンパク質間相互作用に影響を与える。このような「タンパク質」と「場」の相互作用が働く生命現象は数多く存在する。例えば、細胞増殖、間葉—上皮変換、好中球移動のように細胞骨格の制御を伴う生命現象である。これらの生命現象は、ゲノムから翻訳されたタンパク質同士の反応のみならず、そこから派生する物理的な作用を含んでおり、そのシステムの全貌の理解は重要なテーマである。

本研究課題では、生化学反応系を超えて、細胞走性や細胞形状変化といった動的空間との相互作用に着目し、生命システムを時空間的に理解することを目指す。特に低分子量 G タンパク質の相互作用に関する生化学反応と、細胞骨格系タンパク質が生み出す細胞運動との関係に注目する。このような次元の異なる現象を結び付けることによって、分子群が作り出すシステムとしての生命を理解する。

以上の研究目的のために、FRETによる細胞内分子(G タンパク質)活性と形態変化の同時イメージング、および、イメージングデータの解析による、G タンパク質活性と形態変化の相関関係の解明を行う。以上により、細胞形態変化における「受容体 ⇄ Rho ファミリー-低分子量 G タンパク質 ⇄ 形態変化」といったシステムを全貌の解明を目指す。

<2007 年度の研究の当初計画>

本研究課題は、シミュレーション・実験・解析により、上流シグナルから細胞形態変化までのシステムを理解することが目的である。2006年度において明るみになった最大の問題は、細胞のエッジが刻一刻と変化するため、細胞内の分子活性を時系列で追えないということである。このため、細胞内分子活性の履歴を用いることができず、時空間データがあるにも関わらず、スナップショットのデータしか用いることができなかった。したがって、細胞内分子活性と形状変化との関係を解析することが困難であった。また、これまでの解析結果から、分子活性が原因でありその結果として形状変化が起きるという前提から考え直すことも視野に入れて解析を行う必要性も考慮すべきであると判断した。そこで、本年度においては、以下の3点について研究を推進した。

(1) 細胞形態の追跡アルゴリズム開発

顕微鏡画像に写されたフレーム毎の細胞形態は絶対座標系で定量化することが可能である。しかし、細胞内分子活性との依存関係を、時系列を含めて理解するためには、各時刻の形態をフレーム間でリンクし、形態発展の時系列を定量化しなくてはならない。そのため、複雑な細胞形態変化にも対応できるアルゴリズムを開発し、本研究課題に適用する。また、形態が極めて複雑化する PC12 細胞以外の細胞についても解析を検討する。

(2) 仮説の見直しと予備的解析

一般的に、細胞内分子活性が細胞骨格を制御すると考えられている。本研究課題においても、研究開始時点から同様の仮説のもと実験データを解析し、いくつかの特性を見ることができた。し

かし、例えば分子活性のレベルと細胞の運動方向(伸張方向を正)が一見負の相関を持つという結果は、これまでの報告とは異なるものであり、理解し難いものである。したがって、細胞内分子活性から細胞形状の変化に至るまでの仮説を考察し直し、その新しい仮説のもとで解析を行う。

(3) 細胞内分子の確率的反応特性に関する理論構築

細胞内分子の活性変化、およびそれに付随する細胞形状変化は極めて確率的なものである。規則性よりも確率的な要素が、本研究課題における実験データの解析を困難にしている。したがって、実験データの解析に応用するために、細胞形状の制御に関わる細胞内分子の確率的反応特性に関する理論を構築する。

<2007 年度の成果>

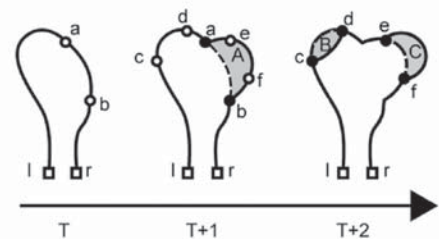
【細胞形態の追跡アルゴリズム開発】

以下にアルゴリズムの概略を記す。

(1) ノイズ除去処理後の各顕微鏡画像から、形態と分子活性データを定量化する。

(2) 時間的に連続

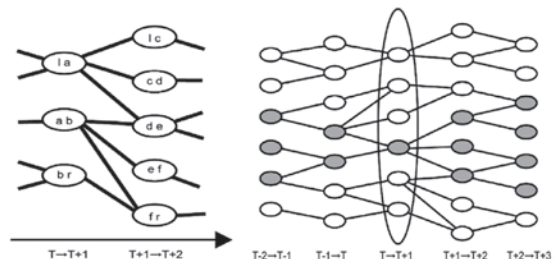
する画像の差分を評価し、右図のように、アンカーポイントを付ける。右図の例では、T+1時刻で領域Aが伸張したため、



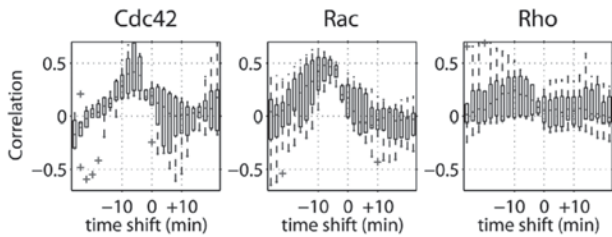
アンカーポイントaおよびbを付加し、T+2時刻では領域Bが縮退、領域Cが伸張したため、アンカーポイントc-fを付加している。lとrは初期の端点である。

(3) 細胞エッジ上に各時刻に付加されたアンカーポイントのうち、全ての隣接ポイントで区切られるセグメントの対応関係を下図左の発展系統樹で記述する。例えば、T+2時刻のセグメントdeは、前時刻のセグメントlaとabのそれぞれ一部から発展したものである。

(4) 全てのセグメントに対して作成された系統樹は、下図右のようになる。例えば、時刻T→T+1の灰色のセグメントに注目したとき、このセグメントを形成するために必要であった過去のセグメント群を注目時刻の左側に、その形成に関わる未来のセグメント群を右側に同じ灰色で表現される。これにより、過去の未来の依存関係が定義され、この定義空間における細胞エッジの動きと分子活性のプロファイルを評価することができる。



以上のアルゴリズムによって得られる細胞エッジ (HT1080 細胞; タイムラプス 1 分) の動きとその近辺の分子活性のプロファイルから、時間差を含めて相関係数を求めると、G タンパク質 (Cdc42/Rac/Rho) ごとに下図のような結果を得ることができた。



この結果は、特に Cdc42 と Rac について、相関係数のピークが相対時刻 0 より左側 -6 分にあることを示している。ただし、細胞形状の変化が発生してから分子活性の変化が起きるためではなく、分子活性の変化後の状態が形状変化よりも長く続くためであり、その効果を評価できている。

上記アルゴリズムについては、現在論文投稿中である。

【細胞運動制御の仮説の再構築】

G タンパク質を中心とする分子群の、細胞骨格制御のメカニズムは未だほとんど不明であり、例えば Rho が細胞突起形成と正の相関があるという報告がなされるなど (Danuser et al., 2006)、従来の考え方とは異なる主張がなされることもある。これは、従来の仮説に基づいた実験データの定量化方法では、経験則を説明することが極めて困難であることに起因する。

そこで、上流 (G タンパク質)・下流 (形状変化) という観点に基づいた因果関係そのものを、生化学的・生物物理学的観点から見直し、次の仮説を立てた。

(1) 関係分子の相対的活性度がシグナルである

生化学的平衡状態からの時空間差分、つまりシグナルの時間変化や、細胞部位による活性度の違いがシグナルを生むとする。

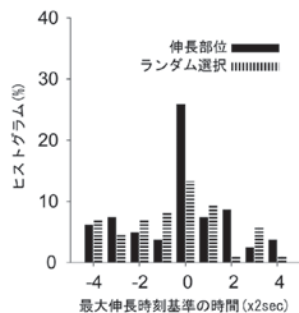
(2) 細胞エッジは収縮の抑制によって伸張する

形状の揺らぎで生じた空間で G タンパク質活性が高まり、アクチンフィラメントを形成・安定化することでエッジの収縮方向の変移を抑制し、結果的にエッジの伸張を促すとする。

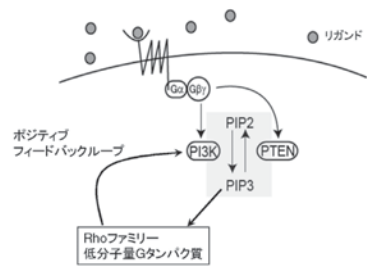
以上の仮説に基づき、PC12 細胞の実験データの解析を行った。右図は、「細胞エッジの伸長が最大になる時刻」(時間幅 ± 10sec 内)を基準に、その前後の時刻で「周辺の分子 (Rac) 活性度がピークになるタイミング」をヒストグラムにしたものである。実線は、平均的に伸長していると考えられるエッジデータをサンプルした場合、点線はランダムにエッジデータをサンプルした場合である。このヒストグラムは、エッジが伸長する際、エッジの伸長ピークと分子活性ピークがほぼ同期することを示している。分子活性の時間的ピーク (相対値) しか計量していないこと、エッジの伸長そのものは少し前の時刻から開始していることを考慮すると、先に挙げた 2 つの仮説の可能性が成立している可能性が高い。現在、この解析を詳細に進めている。

【細胞内分子の確率的応答特性に関する理論構築】

G タンパク質の上流に位置する PIP3、PIP2 をリン酸化して PIP3 を生成する PI3K、脱リン酸化する PTEN などの分子は、局所領域では分子数が比較的少数なため、濃度変化を連続変数による微分方程式で近似表現できない。その場合、分子活性のレベ



ルは離散変数で評価され、反応は確率的になる。実験データにおける分子活性の確率的挙動が、G タンパク質の上流分子の確率的応答特性にあると仮定し、特に PIP3 のパルス状の活性変化を説明する理論モデルを構築した。モデルは、実験的にも分かっている右図のようなポジティブフィードバックループを導入している。本研究内容については論文投稿中であり、今後の実験データ解析への応用も考察している。



<国内外での成果の位置づけ>

細胞形状を追跡する方法としては、比較的丸い細胞に対してその重心を原点とする極座標系を設定する方法や、エッジ上に適度な個数のサンプリング点を決めその点のダイナミクスを考慮することでサンプリング点を追跡する方法などが存在する。本研究課題のアルゴリズムは、全てのエッジ点をサンプル対象とする代わりにフレーム間で変化のある部分だけに焦点を置く手法と捉えることができる。また、細胞運動の制御仮説については、これまで生物物理の分野で提唱されてきたラチェットモデルがほぼ等価の概念である。ただし、ラチェットモデルは未だ証明されていない。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

解析アルゴリズムの開発は行えたが、分子シグナルと形状変化の関係性を明確にするまで至っていない。方針は立っているが、細胞形状の変化の大きさに比べ、実験のサンプリング間隔 (最小で 10 秒) が長い可能性があるが、実験限界に近いため解析において工夫を行う必要がある。

<今後の課題>

形状変化には、複数の分子シグナルが関わっていると考えられ、それらのシステムを考慮すべきである。現状として個々の分子の寄与の実態が見えてきたが、複数の分子の関係性までを議論するものではない。今後の課題としては、この点に関して方法論を考案する必要がある。

<成果公表リスト>

- 0801291407
Nakamura, T. and *M. Matsuda. In vivo imaging of signal transduction cascades with probes based on Förster resonance energy transfer. In Current Protocol in Cell Biology (J. S. Bonifacino, M. Dasso, J. B. Harford, J. Lippincott-Schwartz, K. M. Yamada eds.) John Wiley & Sons, Hoboken, in press.
- 0706131021
Aoki, K., Nakamura, T., Inoue, T., Meyer, T., Matsuda, M. An essential role for the SHIP2-dependent negative feedback loop in neurogenesis of nerve growth factor-stimulated PC12 cells, J. Cell Biol. 177(5), 817-827, 2007.
- 0705041524
石井 信, 作村 論一: 神経の可塑性と発達の生体反応モデリング. ゲノム情報と生命現象の統合的理解 2007, 実験医学増刊 (2007年2月), 198-204, 2007.
- 0801291414
中村 岳史, 松田 道行: 細胞内シグナル伝達の FRET プロブによる可視化, Medical Bio, 4 (7): 50-54, 2007.

別所康全班員 (生命システム情報)、稲垣直之班員 (生命システム情報) と、それぞれ別の課題について共同研究を行っている。