

細胞が非対称性を獲得する原理の分子レベルおよび数理・数式レベルでのモデル構築

●稲垣 直之 ◆島田 忠之 ◆島山 道則

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科

<研究の目的と進め方>

組織や細胞は発生・分化に伴って非対称性（極性）を獲得して固有の形態を形づくる。生体がゲノム情報を用いてどの様にして非対称性を獲得するかという問題は、生物学および数理科学分野における重要な研究テーマである。

神経細胞は、培養条件下で自発的に対称性を破って1本の軸索と複数の樹状突起を形成し細胞極性を獲得する (spontaneous symmetry breaking)。また、いったん極性を獲得した神経細胞の軸索を切断して極性を失わせると、再び複数の突起のうち1本のみが急激に伸びて軸索となり、神経極性の再獲得がおこる。従って、神経極性形成の過程は強固 (robust) なシステムであると考えられる。このように、対称な神経細胞にいかにして非対称性が生じるかという点は謎である。

我々は、これまでの大規模なプロテオーム解析により、軸索に存在するタンパク質群を網羅的にスクリーニングし、神経極性形成タンパク質 Shootin1 を見出した。本研究では、Shootin1 の実験計測データを条件とした自立的に極性を獲得することができるモデルニューロンの構築を行う。そして、数理解析の結果を実験科学にフィードバックして研究を推進するアプローチを通して、細胞が非対称性を獲得するしくみの原理を分子レベルおよび数理・数式レベルで解き明かすことを目指す。

ここで目指す「分子レベルおよび数理数式レベル」のモデルは、生物学的に適切な数式で記述し、またパラメータも実際に Shootin1 の実験定量データをフィッティングして得られたもののみを用いて構築するモデルである。

<2008年度の研究の当初計画>

我々は、昨年度までの研究で、ラット培養海馬神経細胞の極性形成に伴う Shootin1 の細胞内挙動を計測し、以下のデータを得ている。

- i) 神経極性形成に伴う Shootin1 の発現上昇
- ii) 神経突起先端における Shootin1 の濃縮に伴う神経突起伸長
- iii) Shootin1 の細胞体から神経突起先端への能動輸送
- iv) Shootin1 の神経細胞内での拡散

そこで、本年度は、

- 1) 上述 (i-iv) の、詳細な定量的データを基にした完成型のモデルニューロンを構築する
- 2) 完成型のモデルニューロンの様々なパラメータに変動を与えて実験計測データと比較することにより、モデルニューロンの徹底的な検証および修正を行う

を目標に研究を進める。以上の研究により、神経細胞が非対称性を獲得するしくみの原理が分子レベルおよび数理・数式レベルで明かとなることが期待される。

<2008年度の成果>

- 1) 神経極性形成に伴う Shootin1 の細胞内挙動の定量的計測

本研究のモデリングで必要となる、

- i) 神経極性形成に伴う Shootin1 の発現上昇
 - ii) 神経突起先端における Shootin1 の濃縮に伴う神経突起伸長
 - iii) Shootin1 の細胞体から神経突起先端への能動輸送
 - iv) Shootin1 の神経細胞内での拡散
- に関して定量的な計測データを得た。

2) 完成型のモデルニューロンの構築

(1) で得られた Shootin1 の詳細な定量的データ

- i) 神経極性形成に伴う Shootin1 の発現上昇
- ii) 神経突起先端における Shootin1 の濃縮に伴う神経突起伸長
- iii) Shootin1 の細胞体から神経突起先端への能動輸送
- iv) Shootin1 の神経細胞内での拡散

に関して、生物学的に適切な数式を導入し、データのパラメーターフィッティングを行った。その結果、得られた複数の微分方程式は、すべて (1) で得られた Shootin1 の細胞内動態を定量的によく再現した。さらにこれらの微分方程式をモデルニューロンにおいて統合することによって、自発的に極性を獲得する完成型モデルニューロンを構築に成功した。このモデルニューロンのパラメータは、実質的に実験定量データのみから得られており、また、モデルニューロンは培養海馬神経細胞と極めてよく似た挙動を示した。

3) 完成型モデルニューロンを用いたモデルの検証

以上の研究成果に加えて、完成型モデルニューロンおよび培養ニューロンを用いて以下に示すような実験パラメータに変動を与えて、極性形成過程への影響を調べた：

- i) 神経極性形成過程で発現が上昇する Shootin1 の量を、通常量以下に低下させる。
- ii) 極性形成過程で発現が上昇する Shootin1 の量を、通常量以上に増加させる。
- iii) Shootin1 の突起先端への能動的な輸送を停止させる。

まず、神経極性形成過程で発現が上昇する Shootin1 の量を、通常量以下に低下させた場合、培養ニューロンもモデルニューロンもともに極性形成に遅れが生じた。

次に、極性形成過程で発現が上昇する Shootin1 の量を、通常量以上に増加させた場合は、培養ニューロンもモデルニューロンもともに過剰な軸索を形成して極性形成に乱れが生じた。

Shootin1 の突起先端への能動的な輸送を停止させた場合は、Shootin1 のポジティブフィードバックループの形成に支障が生じると考えられる。予想通り、培養ニューロンもモデルニューロンもともに Shootin1 を1本の突起に濃縮させることができず、神経極性形成が阻害された。

以上、すべての条件下 (i-iii) で培養ニューロンとモデルニューロンが一致した挙動を示したため、モデルニューロンが概ね正しく神経極性形成を再現することが示唆された。

4) 完成型のモデルニューロンと培養海馬ニューロンの挙動の比較検討

さらに完成型モデルニューロンと培養海馬ニューロンの挙動を詳細に比較検討してモデルの validity を解析した。その結果：

- i v) モデルニューロンでは培養ニューロンと同様に極性形成前に複数の未成熟な突起の先端で Shootin1 が揺らぐように濃縮と消失を繰り返した。
- v) モデルニューロンでは培養ニューロンと同様に極性形成前に複数の未成熟な突起が揺らぐように伸長と退縮を繰り返した。
- vi) モデルニューロンでは培養ニューロンと同様に極性形成前に軸索となる突起に持続的に Shootin1 が濃縮した。
- vii) モデルニューロンは培養ニューロンに見られるように突起の数を3-6本の間で変化させても安定して極性を形成した。
- viii) モデルニューロンは培養ニューロンと同様な非典型的な極性形成（一過的に2本の軸索様突起を伸長させ、最終的には軸索を1本形成する）を再現した。
- ix) モデルニューロンは培養ニューロンと同様な非典型的な極性形成（一過的に1本の軸索様突起を伸長させ、最終的には異なる突起から軸索を形成する）を再現した。
- x) モデルニューロンは培養ニューロンと同様な非典型的な極性形成（数%のニューロンによる過剰軸索の形成）を再現した。
- xi) モデルニューロンは培養ニューロンと同様に培養4-8時間のあたりで極性形成を起こした。
- xii) モデルニューロンでは培養ニューロンと同様に極性形成前の1本の突起をひっぱるとその突起が軸索になった。
- xiii) モデルニューロンではすべての神経突起を合わせた長さの伸びに培養ニューロンと同様の制限が見られた。
- xiv) モデルニューロンでは培養ニューロンと同様に、いったん極性を獲得した神経細胞の軸索を切断して極性を失わせると、再び複数の突起のうち1本のみが急激に伸びて軸索となり、神経極性の再獲得がおこった。
- xv) モデルニューロンでは培養ニューロンと同様に、上述の軸索切断後、最も長い突起が軸索になった。

以上、これまでのところモデルニューロンは15のケース(i-xv)において培養海馬神経細胞と極めてよく似た挙動を示した。

<国内外での成果の位置づけ>

細胞の非対称性獲得の原理として、局所シグナルのフィードバック増殖と側方抑制の数理モデル (Meinhardt and Gierer, *BioEssays* 22, 753, 2000) が提唱されてきた。すなわち、細胞がシグナルの小さな空間的勾配や確率論的 (stochastic) な揺らぎを増殖するシステムを持つことによって細胞極性を形成するという考えである。最近の出芽酵母 (Wedlich-Soldner et al., *Science* 299, 1231, 2003; Irazoqui, et al., *Nat Cell Biol* 5, 1062, 2003) や白血球 (Xu et al., *Cell* 114, 201, 2003) を用いた研究は、このようなモデルで極性形成の説明を試みている。また、実験データと数理モデルを組み合わせようとする試みもなされている (Wedlich-Soldner et al., *Science* 299, 1231, 2003)。しかし、これらの研究でフィードバック増殖を起こすシステムは明確に同定されておらず、側方抑制のメカニズムも不明である。また、数理モデルも定性的なものにとどまっている。ごく最近、実験データと数理モデルを組み合わせる神経細胞の非対称性破壊の説明を試みる論文が発表されたが (*Curr Biol.* 18, 44-50, 2008)。しかし、このモデルは定性的なモデルであり、実験的に検証されていない重要な仮定を含んでいる。すなわち、「突起先端でのシグナルが

上昇すると、そのシグナル分子の突起先端への輸送が高まる」という仮定が入っているが、このフィードバック増殖において決定的要素に関する実験的な検証が欠けている。

今回我々が構築したモデルニューロンは、ポジティブフィードバックが実験的に証明されているという点と、すべて定量的なデータに基づいて構築されているという点で、これまでの研究に比べて抜きん出ている。さらに、モデルニューロンは、総数15のケースにおいて培養海馬神経細胞と極めてよく似た挙動を示した。この数は、優れた数理モデルとして知られる Hodgkin and Huxley の活動電位モデル (*J. Physiol.* 177, 500-544, 1952) で報告されているモデルデータと実験データの一致数 (8ケース) よりも多い。従って、我々のモデルは細胞が非対称性を獲得するしくみの原理を分子レベルおよび数理・数式レベルで示す画期的なモデルとなることが予想される。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

Shootin1の実験計測データを用いて完成型のモデルニューロンを構築するのに予想以上の時間を要してきた。特に、数式を導入するにあたって、生物学的「現象」や「分子メカニズム」を適切に記述できる数式を選ぶこととパラメータを定量的な計測データのみから決定することに時間がかかった。

しかし、上記のようにほぼ満足のゆく完成型のモデルニューロンを構築することができた。

<今後の課題>

1) 今回構築した完成型のモデルのさらなる検証・修正のため、モデルによる培養神経細胞の挙動の予測を行い、これを実験データで検証する。

2) 我々は、昨年度、神経細胞の過剰な軸索形成を抑制して神経極性に強固性 (robustness) を与える新規分子 Singar1 を同定している (Mori et al., *J. Biol. Chem.* 282, 19884-19893, 2007)。今後は、本研究で作成された Shootin1 のみからなる完成型のモデルニューロンに Singar1 の分子挙動も組み入れ、さらに発展型のモデルニューロンを構築する。

3) 今回構築したモデルニューロンは、細胞外からの位置情報のない条件で自発的に対称性を破って極性を形成する。しかし、脳内では細胞外環境によって神経極性の方向が厳密に制御されている。今後は、方向性を伴った細胞外環境に応じて極性の方向が決まる発展型のモデルニューロンの構築を目指す。

<成果公表リスト>

1) 論文

1. 0806121712

Shimada, T., Toriyama, M., Uemura, K., Kamiguchi, H., Sugiura, T., Watanabe, N. and Inagaki, N., Shootin1 interacts with actin retrograde flow and L1-CAM to promote axon outgrowth, *J. Cell Biol.* 181: 817-829 (2008).

2) 共同研究

コンピュータを用いたモデル構築と数理解析は、奈良先端科学技術大学院大学・情報科学研究科 作村論一准教授 (生命システム情報) との共同研究で進めている。