

## 細胞形状変化と分子活性の因果関係の解明

●作村 諭<sup>1)</sup> ◆中村 岳史<sup>2)</sup> ◇石井 信<sup>3)</sup>

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

### <研究の目的と進め方>

細胞運動は、個体が死に至るまでほとんどの生物機能において重要な役割を担う。ゆえに、そのメカニズムの解明は重要な問題である。主要な生体分子に関する知見は増えているが、生化学反応と形態変化を含んだ細胞運動全体のシステムについてはほとんど不明である。従来から、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質 (Cdc42/Rac1/RhoA; 以下 G タンパク質) を中心とする分子群が、細胞骨格制御の中心的なシステムであると考えられ、多くの研究がなされてきた。しかし、メカニズムは未だ不明であり、例えば RhoA が細胞突起形成と正の相関があるという従来とは異なる報告がなされることもある (Danuser et al., 2006)。これは、従来の仮説に基づいた実験データの定量化と解析方法では、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、これまでのプレリミナリな結果も踏まえ、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、細胞運動の分子システムを解明することが本研究課題の目的である。

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。

### <2008 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。そのためには細胞の「動き」をできるだけ正確に定量化する必要がある。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た方法論を適用する必要がある。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。

#### ◆ エッジ伸長における物理・生化学過程の定量化：

研究対象は、PC12 細胞の突起先端部位である。突起先端は大きな形状変化をしながら突起の伸張方向を決めている。したがって、実質的な「伸長部位」を定義する必要がある。これまでは、人為的な画像解析による定量化であったが、客観的な評価基準で再定義を行う。また、細胞内分子活性の時間方向の相対量のみならず、細胞内空間における相対量の定量化方法を開発する。

#### ◆ 一過性の分子活性制御による実験データの取得：

解析のために、時間的に高解像度の分子活性データが必要である。FRET プローブによるイメージングを行う。これにより分子活性と細胞形状の詳細な動きを解析する。場合によっては、実験が比較的容易な細胞に変えて、データの取得を行う。

#### ◆ 解析結果の統計的検定法の開発：

定量化したデータの解析結果を評価するための検定を行う。本研究課題で得られるデータと解析結果は、時空間に渡る複雑なものであるため、検定評価も複雑なものとなる。そのため、特殊な検定方法を考案する必要がある。

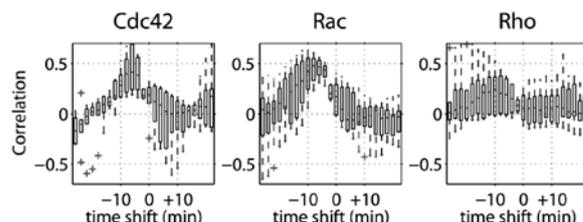
### <2008 年度の成果>

#### 【細胞形態の追跡アルゴリズム開発】

細胞形状の変化を追跡するための、Edge Evolution Tracking (EET) アルゴリズムを開発し、論文誌に発表した (Tsukada et al., PLoS Comput. Biol., 2008)。アルゴリズムの概略は以下の通りである。

- (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、形状が変化した部位に関してラベルを付加する。
- (3) 細胞エッジ上に各時刻で付加されたラベルのうち、連続する時刻間でのラベルの関係を発展系統樹で記述する。
- (4) これにより、過去と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。

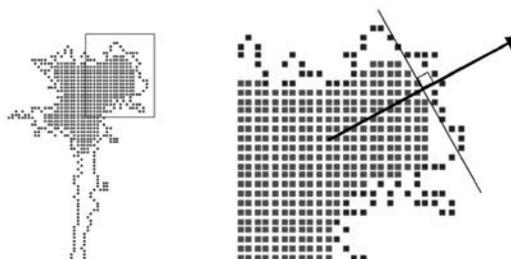
以上のアルゴリズムによって得られる細胞エッジ (HT1080 細胞；タイムラプス 1 分) の動きとその近辺の分子活性のプロファイルから、時間差を含めて相関係数を求めると、G タンパク質 (Cdc42/Rac/Rho) ごとに下図のような結果を得ることができた。



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。

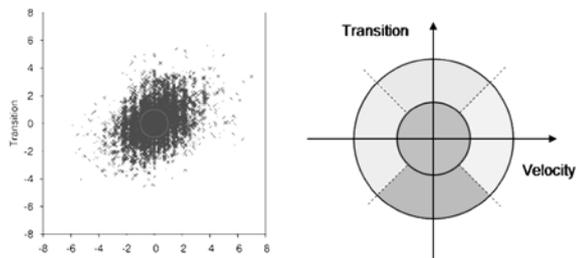
#### 【分子活性と細胞運動の逆相関解析】

上記の EET アルゴリズムは、細胞全体のスケールで長時間の形状追跡をする目的に向いている。一方で、PC12 の突起先端のような微小部位の分子活性を観察すると、分子活性の変化は非常に早く、注目する細胞部位の形状変化は限られた部位であることが分かる。そこで、まず局所時間・局所空間の定量化を行った。

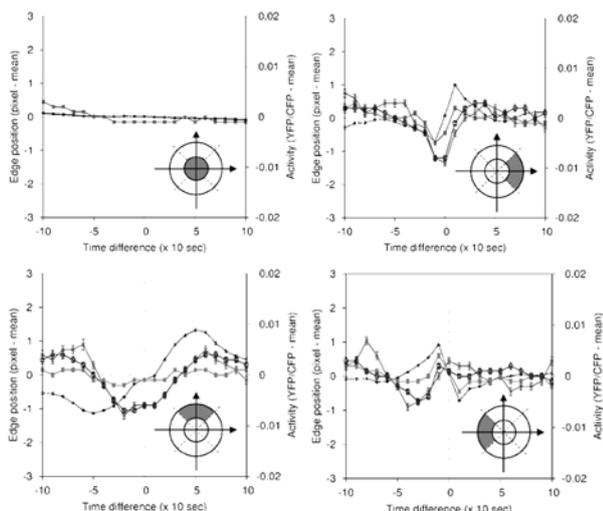


各フレーム画像 (10 秒間隔) において、上図のように、局所部位の細胞の動きとエッジ付近における分子活性度を計測するための空間軸を定義する。上図左は PC12 細胞の突起先端部位の実際

のエッジ (青) とガウスフィルタによる平滑化形状 (赤) である。上図右は、左図の四角で囲まれた部位の拡大図である。図のように平滑化部位の各エッジで法線軸 (矢印線) が定義できる。空間軸が定義された相対時刻を 0 とする。このような相対的な時間と空間を、平滑化細胞エッジの全てとフレーム画像全てについて作成する。この操作により細胞のエッジの動き (細胞外の向きを正) と分子活性に関する時系列が作られる。



各定義軸において、 $x(t)$  を膜のエッジの相対位置とし、上図左のように相対時刻 0 前後でのエッジの移動量 (Velocity;  $x(1)-x(-1)$ ) と、長時間平均の差 (Transition;  $\langle x(1:6)-x(-6:-1) \rangle$ ) の分布 (平均 0、sd 1 に規格化) を作成する。円は sd = 1 を意味する。右図は、左図の分布を 5 つのカテゴリに分ける領域を意味し、各領域でデータをサンプルし、分子活性時系列の特徴を抽出した。その結果、下図のような特徴的な結果を得た。



上図は、類別したサンプルに関する分子の活性時系列である (Rac1)。各図の挿入図は、データをサンプルした領域の場所を意味する。黒線はエッジの動き、それ以外の線は Rac1 の活性度時系列を表す。解析は、Rac1 と RhoA について行ったが、Rac1 について結果をまとめると、(1) 実質的に動きが見られない部位では、分子の活性度の変化も特に見られない (左上)。 (2) 短時間のうちに大きな変移が起きる場合は、Rac1 の活性は一度減少し、その後増加するがエッジの動きに比べてタイミングが遅れる (右上)。 (3) 緩やかなエッジ上昇の場合でも、分子の活性は最初の減少し、その後エッジの動きに遅れて増加する (左下)。 (4) エッジの急な縮退があるときは、直前に急な伸張があり、その場合でも Rac1 の活性増加は遅れている (右下)。これまで Rac1 の活性増加がエッジ伸張の原因となっていると考えられてきたが、本研究の結果では、必ずしもそうではないことを意味する。

<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。また細胞の動きが少なければ、固定軸を常に設けてキモグラフを作成することもできる。これらの方法を用いた海外の研究グループの最近の報告においても、異なる細胞において、分子活性がエッジの動きに遅れることを示唆しており、本研究における結果は PC12 細胞においても言えることを意味する。細胞の膜の動きについては、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あり、本研究課題においては、ラチェットモデルとの関係について議論する予定である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

細胞エッジの動きを定量化するために、客観的な方法論を導入し、エッジの動きを分類すること、そして各分類における分子活性の時系列の特徴を抽出することに成功した。当初の計画では、得られた分子活性の時系列からエッジの動きに関する生物物理学的なメカニズムまで推定する予定であった。しかし、分子活性の変化の信頼性がまだ得られていないこと、他の分子との関係性がまだ見えないことなどから、メカニズムの推定までには至っていない。

<今後の課題>

本年度の結果を踏まえ、以下の問題に取り組む予定である。

◆細胞形状のスプラインフィット法開発:

PC12 細胞の突起先端には、フィロポディアと呼ばれる更に細かい構造が存在するだけでなく、突起先端全体が非常にダイナミックに動く。このような曲率が激しく変化するものを対象にするために、スプラインフィット法を導入し、形状の定量化精度を向上させる。

◆Turning アッセイにおける細胞内分子 FRET 計測:

細胞突起は細胞外誘導因子の勾配に従って誘導される。これまでの実験では勾配のない培地における実験であったが、伸長誘導因子の勾配による突起伸長の方向転換を含めた分子計測を行う。これにより、細胞外に情報 (分子の勾配) がある場合の運動特性を解析する。

◆G タンパク質同士のシステム同定:

細胞運動は、3 種の主要 G タンパク質 (Cdc42/Rac1/RhoA) の相互作用によって制御されていると考えられる。現在のところ、各分子の機能的役割さえも明解な知見はなく、これらの相互作用に至っては様々な仮説が存在する。実験的にも、2 つ以上の分子を同時計測することは現在のところ不可能である。ゆえに、この条件で G タンパク質同士の相互作用を推定する技術を開発する。

<成果公表リスト>

論文/プロシーディング

- 0901141145  
Tsukada, Y., Aoki, K., Nakamura, T., Sakumura, Y., Matsuda, M., Ishii, S., Quantification of local morphodynamics and local GTPase activity by edge evolution tracking. PLoS Comput. Biol., 4(11): e1000223. 1000223, 2008.
- 0901141129  
Honda, N., Sakumura, Y., Ishii, S., Stochastic Control of Spontaneous Signal Generation for Gradient Sensing in Chemotaxis. J. Theor. Biol., 255, 259-266, 2008.
- 0806211102  
Kitano, M., Nakaya, M., Nakamura, T., Nagata, S., and Matsuda, M. Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation, Nature, 453, 241-245, 2008.

<班員間の共同研究>

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、それぞれの課題について共同研究を行っている。