

細胞形状変化と分子活性の因果関係の解明

●作村 諭¹⁾ ◆中村 岳史²⁾ ◇石井 信³⁾

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 生命科学研究科 3) 京都大学大学院 情報学研究科

<研究の目的と進め方>

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。

従来から、Rhoファミリー低分子量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(Machacek et al., Nature, 2009)。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)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。これにより、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。

<研究開始時の研究計画>

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。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い。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る。また、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がある。そこで、以下に関する研究を推

進した。

(1) エッジ伸長における物理・生化学過程の定量化：

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) 仮定する物理過程の見直し：

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。しかし、例えば分子活性が細胞エッジの運動に遅れて変化する結果は、これまでの上流・下流のシステムの考え方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物理過程を考察し直し、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。

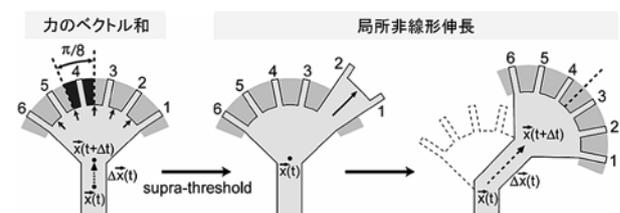
(4) Gタンパク質に関わるシステムの同定：

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。実験的に、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ため、上記解析から、Gタンパク質の相互作用を推定する。

<研究期間の成果>

[2005年度]

神経細胞の軸索誘導機構について、Gタンパク質相互作用の特性から説明するモデル研究を行った。現象の本質を見るために、RhoファミリーGタンパク質の相互作用を主要反応系として簡略化し、その活性系列の特性を調べ、成長円錐の形態変化を包含した軸索誘導機能を発現するためのモデルを提案した(Sakumura, et al., Biophys. J., 2005)。下図は、モデルの概略であり、Gタンパク質相互作用に主眼を置き、上流の受容体及びPI3キナーゼシグナル、下流のアクチン細胞骨格形成に至る部分は、簡略化を行っている。



また実験では、PC12細胞と軸索成長円錐におけるFRETイメージングを行い、制御タンパク質の時空間活性度を計測した(Aoki, et al., Mol. Brain Res. 2005)。

[2006-07年度]

【細胞形態の追跡アルゴリズム開発】

以下に Edge Evolution Tracking (EET) アルゴリズムの概略を記す(Tsukada et al., PLoS Comput.Biol. 2008)。

(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。

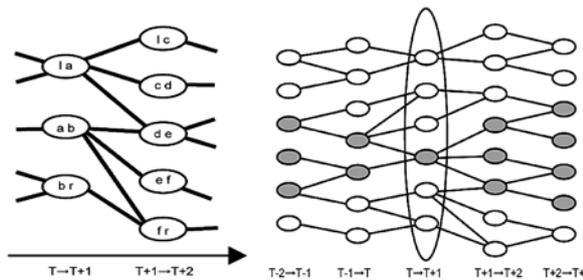
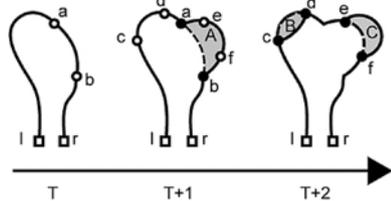
lとrは初期の端点である。

(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。

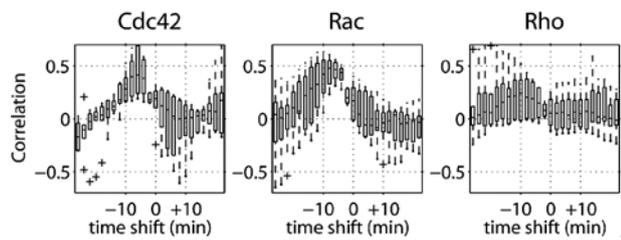
例えば、T+2時刻のセグメントdeは、前時刻のセグメントlaとabのそれぞれ一部から発展したものである。

(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/Rac1/RhoA)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6分負の側、つまり形状変化が起きた後に分子活性が変化していることを示している。

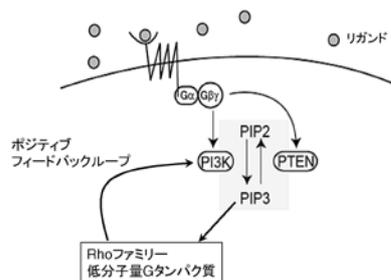


【細胞内分子の確率的応答特性に関する理論構築】

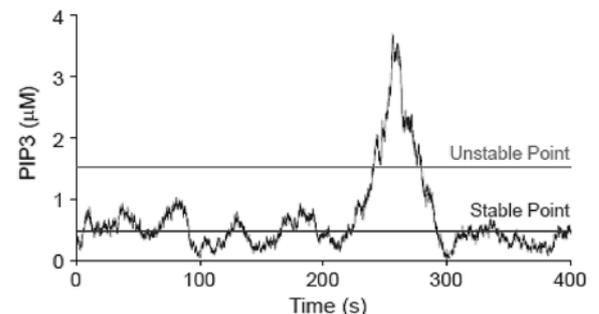
Gタンパク質の

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であると仮定し、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上図のようなポジティブフィードバックを導入している。



このモデルにおいて、PIP2とPIP3間の状態遷移でゼロ次超過感性を示すパラメータを導入すると、PIP3の濃度が下図のように確率的な変動を示す。そしてこの変動は単なるノイズの変動(ガウス過程)ではなく、超過感性が働いて時々大きな状態を作り出す。FRETによる観測から、Gタンパク質の活性が非常に確率的であることが分かっているが、そのような観測の裏にはこのようなメカニズムが存在している可能性がある。

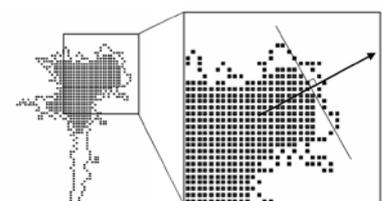


[2008-09年度]

【局所時空間サンプリング】

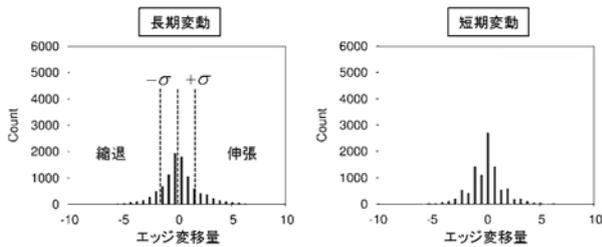
上記のEETアルゴリズムは、細胞全体のスケールで長時間の形状追跡をする目的に向いている。一方で、PC12の突起先端のような微小部位の分子活性を観察すると、分子活性の変化、および注目する細胞部位の形状変化は非常に早く、空間的にも狭い。そこで、局所時間・局所空間の定量化を行った。

右図は、PC12細胞の突起先端を表している。最も外側の複雑な輪郭部分が実際の細胞形状であり、この輪郭を平滑化したものが内部にある



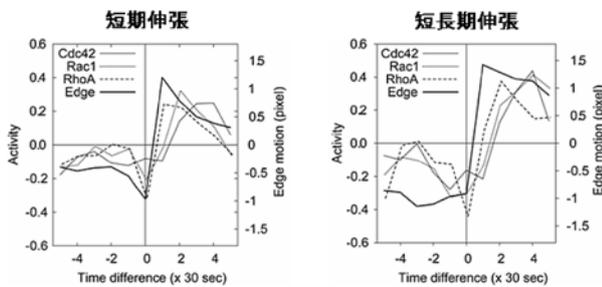
ドットの集合部分である。平滑化形状のエッジ上で法線方向に観測軸をとり(拡大図)、平滑化エッジと法線の交点をx、観測軸を設定したフレーム番号をtとして観測軸をO(x,t)とする。観測軸O(x,t)に対し、t±5の合計11フレームの細胞の実際のエッジの変動とエッジ直下の分子活性を定量化すると、(x,t)につき2つ(エッジと分子活性)の時系列ができる。可能なxとt全てについて上

記操作を行うと、局所時空間時系列を数多く得ることができる。これら時系列についてエッジ変移の分布をとると下図のようになる。長期変動は前後5フレーム平均の差であり、短期変動は1フレームにおける変化である。

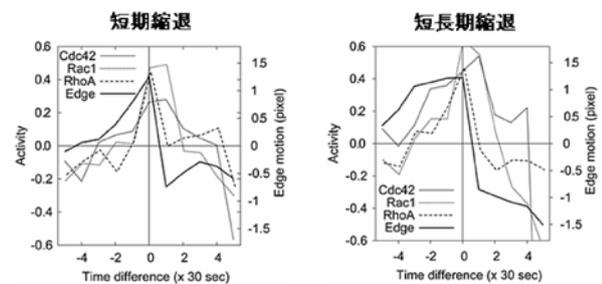


【分子活性と細胞運動の逆相関解析】

上記分布から、形状エッジの運動について特徴ごとにクラス分けし、各クラス(伸張、縮退、待機)における分子活性の時系列の平均を算出した。つまり、特徴エッジ変動イベントに基づくサンプリング(逆相関解析)である。その結果、それぞれのGタンパク質について、特徴的な時系列が得られた。

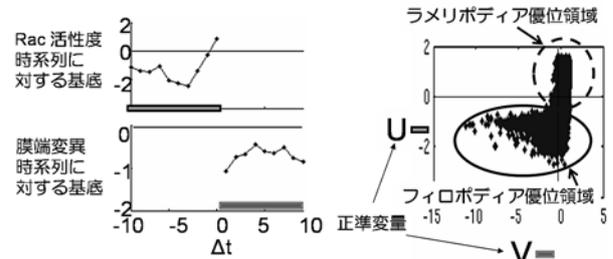


上図は、エッジ伸張(太線)の後に各分子の活性変化が大きく変化していることを示す。上図左は、短期的にエッジが伸張するも、すぐに縮退が起きる場合で、上図右は短期的な伸張の後、持続的に伸張状態を維持している場合である。これら2つの図を比較すると、(1)伸張とRhoAの活性上昇はほぼ同時である、(2)伸張状態を維持するためには、RhoA活性の後にRac1またはCdc42の活性が必要である、ということが言える。また、これらの時系列の特徴は、時間平均からの差をとって初めて見えるものであるが(平均が0)、このことは、分子活性の絶対的な値より時間的な相対量にエッジ変動のための情報が乗っていることを意味する。ちなみに、空間平均からの差ではこのような明確な特徴を捉えることができなかった。



一方、縮退について同様の時系列を抽出したものが上図である。これらの図のうち、縮退がすぐ戻る部分(左図の右側)と縮退が継続する部分(右図の右側)を比較すると、長期的に縮退する場合は、(1)RhoA活性とRac1活性も落ちている、(2)逆にCdc42活性が上がっている、ことが分かる。これらの結果は、先行研究(Machacek et al., Nature, 2009)よりも時系列と伸張・縮退の関係についてより詳細に解析したものである。

また、生物学的な知見を一切考慮せず、単なる時系列の関係性から情報抽出が可能かどうか情報科学的な解析も行った。ここでは、正準相関解析(Canonical Correlation Analysis; CCA)を用いた。細胞運動の活発な領域のみにおいて、膜速度の過去の情報と膜速度の未来の情報に対してCCAを適用すると、大きな相関(再構成性能)がみられた。そのカーネル(線形基底)より、膜が伸びているときは伸び続け、縮んでいるときは縮み続けるという性質があることがわかった。これは、細胞運動の時定数が現在見て



いるスケールよりも大きい可能性を示唆している。

<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、Level Set Method や SNAKE など、エッジの発展をモデル化して観測フレーム間を埋めるものや、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、そして、エッジ上に適度な個数のサンプリング点を決め、その点の物理モデル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。本研究課題で開発したEET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。しかし、これまでの評価方法とは異なるものであり、特に形状が複雑なものに適用できる点は他の手法に対して優れている。また、局所時空間について観測を繰り返す方法は特に新しいものではないが、観測軸の取り方を敢えて生物学的に意味のない平滑化空間に基づき、そこから生物学的な情報を抽出しようとする点では他に類を見ない。

細胞運動の制御仮説について、形状変化を制御すると考えられてきた分子活性が、形状変化よりも時間的に遅れているという点は、他の研究報告と一致する(Machacek et al., Nature, 2009)。これは、細胞形状の制御過程における生物学的な因果関係を再考すべきであることを示すだけでなく、全ての機能が分子ネットワークで説明できるという根本的な考え方も再考を迫るものである。本研究課題の当初の目的が、生化学反応系を超えて、物理空間や物理的な過程を含め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であった。現状として、本研究課題においてこれらのメカニズムが完全に解明された訳ではないが、先行研究(Machacek et al., Nature, 2009)よりも詳細な知見が得られており、早期の成果発表が望まれる。また、メカニズムの可能性のひとつとしては、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考えられるが、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には至ったが、分子シグナルと形状変化の相互関係を明確にするまで至っていない。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が長い可能性(最小で10秒)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。また、鍵となるGタンパク質が複数存在し、同時観測で

きないため、Gタンパク質間の相互作用を推定することも困難であった。過去の報告から、様々なGタンパク質間の相互作用が主張されてきたが、未だ決定されていない。細胞部位が伸びるか縮むかという単純な機能でありながら、Gタンパク質が個別に制御している可能性が高く、しかも最新の結果から分かるように、Gタンパク質活性が細胞の動きより時間的に遅れることは、更に問題を複雑にしている。

<今後の課題、展望>

課題としては、ノイズの多いデータの扱い、得られた解析結果の解釈の方法である。そのため、正確な細胞形状を取得するために、顕微鏡画像における輝度の分布の2階微分を用いたエッジ抽出方法等を検討する。特に、PC12細胞の突起先端は複雑な形状をしており、細い突起には有効である。また、形状変化に基づく分子活性の時系列について特徴量が得られたので、逆の解析、つまりこの特徴量に基づいて、形状変化の推定とGタンパク相互作用のシステム同定を行う。その際、生物物理的な知見を導入したモデルを導入する。CCAを用いた解析は、実験へのフィードバックは今後の課題である。実際、過去の情報として膜速度およびRac活性の両方を用いてCCAを適用しても、再構成性能に変化はなかった。これより、現在計測に用いている時間スケールにおいて、Racは細胞運動の激しい領域において高い活性を示すという結果にとどまった。今後、Rac活性と細胞運動が高い相関を示す様な実験条件を検討して、ここで開発したCCAにより細胞形態変化を分子活性情報から予測する予定である。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文

1. 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).
2. 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).
3. 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).
4. 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, (2007).
5. 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).
6. 0602230043
Sakumura, Y., Tsukada, Y., Yamamoto, N., and Ishii, S. A Molecular Model for Axon Guidance Based on Crosstalk between Rho GTPases, *Biophysical Journal*, 89, 812-822,

(2005).

7. 0602230130

Nakamura, T., Aoki, K., and Matsuda, M. FRET imaging in nerve growth cones reveals a high level of RhoA activity within the peripheral domain. *Mol. Brain Res.* 139. 277-287. (2005).

2) 学会発表

1. Dauwels, J., Tsukada, Y., Sakumura, Y., Ishii, S., Aoki, K., Nakamura, T., Matsuda, M., Vialatte, F., Cichocki, A. On the synchrony of morphological and molecular signaling events in cell migration. *International Conference on Neural Information Processing (ICONIP 2008)*, (2008).
 2. Tsukada, Y., Aoki, K., Sakumura, Y., Nakamura, T., Matsuda, M., and Ishii, S., Quantitative Morphodynamic Analysis of FRET time-lapse imaging. *International Conference on Systems Biology (ICSB 2008)*, DS2-1-54 pp.104, (2008).
 3. Tsukada, Y., Sakumura, Y., Ishii, S. Quantitative Morphodynamic Analysis of Time-Lapse Imaging by Edge Evolution Tracking. *International Conference on Neural Information Processing (ICONIP 2007)*, (2007).
 4. Naoki, H., Sakumura, Y., and Ishii, S. Spontaneous signal generation induced by reaction noise for gradient sensing in chemotaxis. *International Conference of Systems Biology (ICSB 2007)*, pp.46, (2007).
 5. Sakumura, Y., Tsukada, Y., Yamamoto, N., and Ishii, S. Axon guidance based on cross talk between Rho GTPases requires switching mechanism, *Society for Neuroscience, 35th Annual Meeting* 146.8, (2005).
 6. Sakumura, Y., Tsukada, Y., Yamamoto, N., and Ishii, S. Axon guidance regulated by interactions of Rho family small GTPases. *the Sixth International Conference on Systems Biology (ICSB 2005)*, pp.279, (2005).
 7. Tsukada, Y., Aoki, K., Sakumura, Y., Nakamura, T., Matsuda, M., and Ishii, S. Quantitative Analysis of Morphological Dynamics and the Activity of Rho-family GTPases during Neurite Outgrowth. *the Sixth International Conference on Systems Biology (ICSB 2005)*, pp.316, (2005).
- ##### 3) 図書
1. 作村論一、塚田祐基：細胞形状を制御する細胞内分子の解析、(inpress)
 2. 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，198-204, (2007).
 3. 0801291414
中村岳史、松田道行：細胞内シグナル伝達のFRETプローブによる可視化、*Medical Bio* 4 (7): 50-54. (2007).
 4. 0801291417
中村岳史、松田道行：分子間相互作用解析ハンドブック、羊土社 (2007).
 5. 0801291419
中村岳史、青木一洋、松田道行：FRETの基礎と応用、*組織細胞化学* 129-139. (2007).
 6. 0801291421

中村岳史、青木一洋、松田道行：FRET イメージングとシミュレーションによる神経突起伸展シグナルの解析、実験医学 25: 1676-1683. (2007).

4) データベース/ソフトウェア

1. (ソフトウェア)Edge Evolution Tracking、激しく形態を変化させる細胞の形態変化の定量化。