

## 細胞内情報伝達系の反応パラメーターの定量と コンピューターシミュレーション

青木 一洋

(京都大学大学院生命科学研究科生体制御学分野, JST さきがけ)

### はじめに

「生命科学研究がこれから目指すべきゴールは何か？」このように問われたら、読者諸兄は何と答えるだろうか。私は、「生命システムのコンピューター上での再構成と予測、及び制御」と答える。こう考える理由は二つある。一つ目は、分子生物学やハイスループット解析などの技術革新に伴って膨大な量の情報が蓄積されてきたが、それらはまだ有機的に結びついておらず、多階層システムとして生命の理解が進んでいないと私自身が強く感じるからである。これは基礎指向の動機からくるものである。二つ目は、生命システムでインシリコで再構成し、薬剤に対する影響を包括的に評価することで、抗癌剤などの開発に貢献したい、という応用指向の動機からくるものである。

ではどうしたら、「生命システムをコンピューター上で再構成し制御する」という大層なことができるのだろうか。私はここ数年来この問題について思いを巡らせているのだが、その解決のための重要なキーワードは「定量性」であると現在考えている。例えば、研究が進んでいる細胞内情報伝達系では、その中の主要な情報伝達分子や経路はほぼ同定されている。極論すると、細胞内情報伝達系は生化学的な反応と拡散の連鎖で構成される。これらは微分方程式ですべて記述することができる。適切なパラメーターを代入することで、系の振る舞いを数値計算により解析することができるわけである。しかし、実際はそう甘くはない。心臓や神経などの電気生理学とは異なり、細胞内情報伝達系の多くの研究は、分子間相互作用がある or 無い、またはリン酸化される or されないという「1 or 0」の情報で完結していることがほとんどである（このような状況は「バンド生物学」と呼ばれる<sup>1)</sup>）。解離定数 ( $K_d$ ) やミカエリス

定数 ( $K_m$ ) や代謝回転数 ( $k_{cat}$ ) といったパラメーターを実測している論文は最近ではほぼ皆無に近い。したがって、数値計算に必要なパラメーターがほとんど定量されていないため、任意の値を使ってシミュレーションせざるを得ない。パラメーターフィッティングという方法により実験データからパラメーター値を推定することはできるが、細胞内情報伝達系のような自由度の高い系では事実上フィッティングによりなんでも再現できてしまう（オーバーフィッティング問題）。このような状況を鑑みたくて私が出した結論は、細胞内情報伝達系の反応パラメーターを自分自身の実験で定量し、それを使ってシミュレーションする、という泥臭い研究戦略を採用することであった。本稿では、我々が最近報告した論文<sup>2)</sup>を例にとりこの技術的な手法を紹介する。

### 1. EGF-Ras-ERK MAP キナーゼ情報伝達系

私は上皮細胞増殖因子 (EGF)-Ras-ERK MAP キナーゼ情報伝達系を研究対象としている。その理由は、この情報伝達系が細胞の増殖や分化といった生理的な細胞機能において重要であるだけでなく、細胞のがん化に密接に関連するからである<sup>3)</sup> (図 1A)。本研究では、この情報伝達カスケードの出力部位に相当する MEK-ERK 反応系に着目して研究を行った。これは MEK, ERK という二つの分子で構成される反応系であるが、この系には反応パラメーターが5種類含まれる。①タンパク質濃度、②結合・解離定数、拡散速度 (③核内・核外移行速度)、そして酵素学的反応速度 (④リン酸化速度、⑤脱リン酸化速度) である (図 1B)。ちなみに、他の細胞内情報伝達系も含めて、それらを構成する素反応の大部分はこれらのパラメーターで説明できる。まずこれらのパラメーターを全て実験により定量し、その後、シミュレーションを行うことで細胞内の反応が定量的に再現できるか検討を行った。

### 2. タンパク質の細胞内濃度の定量

細胞内のタンパク質濃度の定量は比較的容易である。内

Computational simulation based on experimentally-determined kinetic parameters in signal transduction

Kazuhiro Aoki (Graduate School of Biostudies, Kyoto University, JST, PREST, Yoshida-Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8315, Japan)

## テクニカルノート

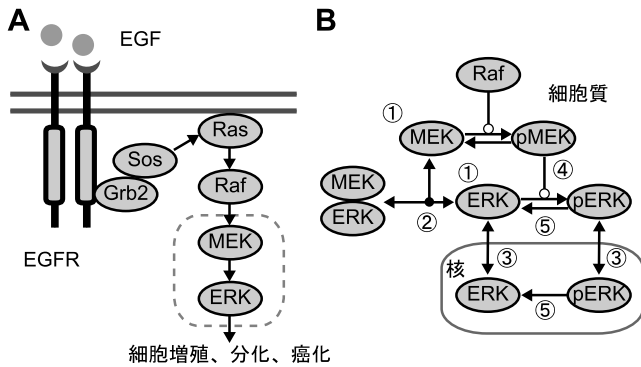


図1 EGFR-Ras-ERK 情報伝達系

A: EGF (上皮細胞増殖因子) とその下流の情報伝達系。点線で囲んだ部分が MEK-ERK 反応モジュール。B: MEK-ERK 反応モジュールの反応モデルとそれらを構成する反応パラメーター。パラメーターはそれぞれ、①タンパク質濃度、②解離定数、③核内・核外移行速度、④リン酸化、⑤脱リン酸化速度を示している。

在性の分子（この場合は MEK, ERK）を認識することができる抗体があることが必要条件となる。まず、濃度が分かっているリコンビナント MEK, ERK タンパク質を用意する。次に、細胞数を計測して調製した細胞溶解液を用意する ( $10^3 \sim 10^4$  cells/ $\mu\text{l}$  くらい)。あとは、MEK 抗体、ERK 抗体を用いたウエスタンブロットにより、一細胞あたりの MEK, ERK 分子数が求められる (図 2A)。次に、濃度に換算するため、細胞の体積を測定する。トリプシンで HeLa 細胞をはがして直径を顕微鏡により測定し、球と仮定して体積を換算することで、MEK が  $1.2 \mu\text{M}$ , ERK が  $0.74 \mu\text{M}$  という値が得られた。

## 3. 解離定数の定量

ERK 分子は定常状態では MEK 分子と細胞質で結合し

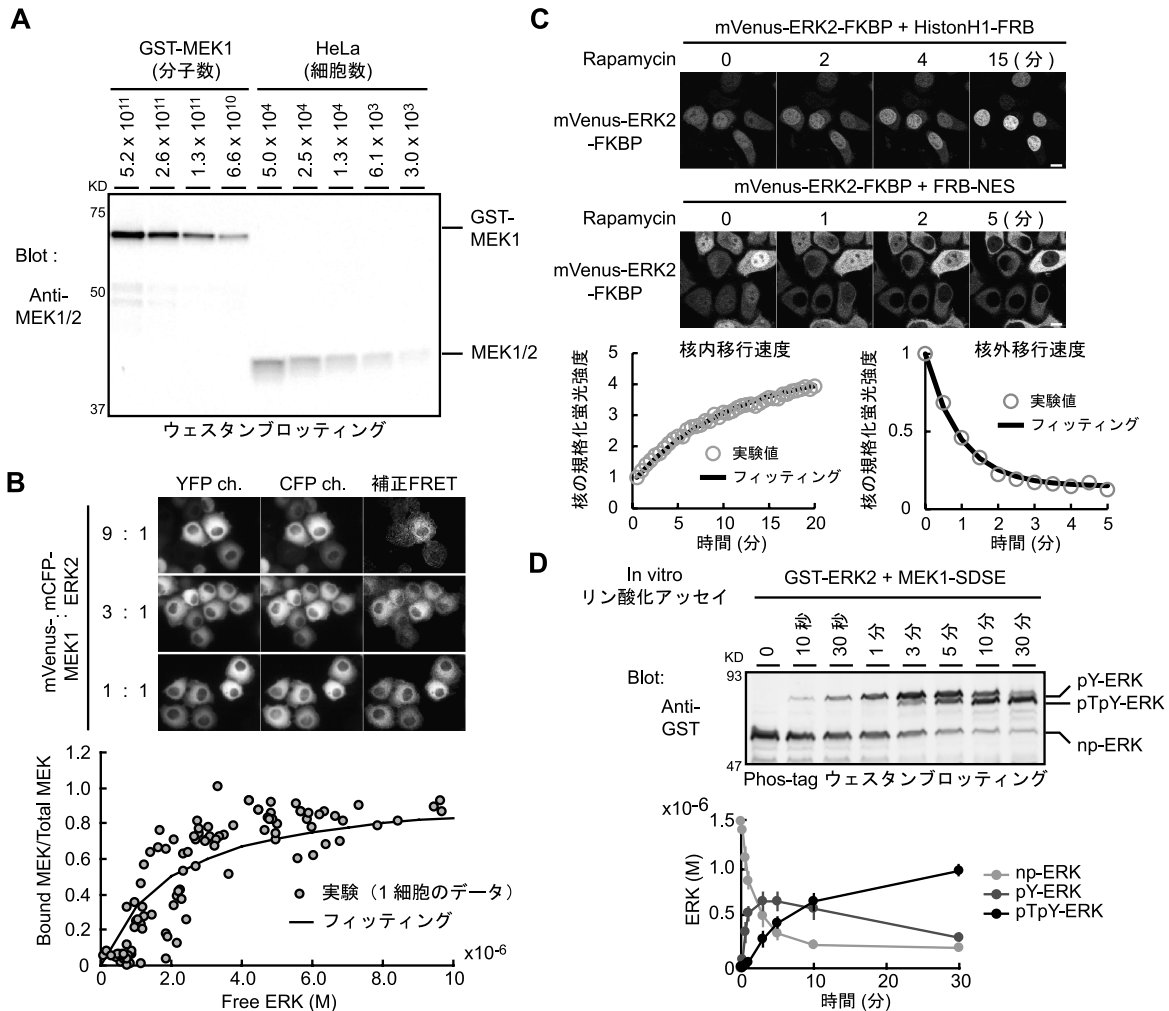


図2 反応パラメーターの定量

A: タンパク質濃度の定量化。MEK の定量結果を示している。B: 解離定数の定量化。C: 核内・核外移行速度の定量化。D: リン酸化速度の定量化。Phos-tag によりリン酸化 ERK 分子の電気泳動度が大きく変化する。これにより正確にリン酸化アイソフォームを定量できる。

ラップされていることが知られている。そこでMEK分子とERK分子の結合の解離定数( $K_d$ )を蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)イメージングにより定量した(図2B上)。YFP-MEK, CFP-ERKをHeLa細胞に発現させ、どれくらい結合しているかをFRETにより測定する。この実験系のような分子間のFRET測定から定量する場合には、いくつかの補正を必要とする。①CFP蛍光がYFP蛍光チャンネルにどれくらい漏れこむか(bleed-through), ②YFP分子がCFP分子に対する励起光によってどれくらい励起されるか(cross-excitation), ③CFP分子, YFP分子の細胞内の発現量, ④最大FRET効率, ⑤YFPの量子収率, などである。①, ②に関しては, 顕微鏡やフィルターのセットによって値が異なるので, 注意が必要である。③はCFP, もしくはYFPを安定的に発現するHeLa細胞の安定発現株を作製し, 先述のタンパク質濃度の定量によって, 一細胞あたり何個のCFPもしくはYFPが発現しているのかを定量する。その細胞をリファレンスとして蛍光観察することにより, 蛍光分子の絶対量を顕微鏡で見積もっている。④は蛍光褪色法により測定した。これらのデータから一細胞ごとにデータを取得し, ERK分子と結合しているMEK分子の割合に対して結合していないフリーのERK分子の濃度でプロットする(図2B下)。このプロットに対し, 解離定数( $K_d$ )の定義式を変換して得られる以下の式でフィッティングをすることで $K_d$ を得ることができる。

$$\frac{[MEK\_ERK]}{[Total\_MEK]} = \frac{[Free\_ERK]}{K_d + [Free\_ERK]}$$

我々の結果では, MEK-ERK分子間結合の解離定数は, 約1.5  $\mu$ Mと見積もられた。ちなみに, MEK分子とERK分子のリコンビナントタンパク質を用いたin vitroのpull downアッセイ, BIACOREにより測定でもほぼ同様の結果を得ている。

#### 4. 核内・核外移行速度の定量

ERKはMEKによりリン酸化され活性化される。リン酸化したERKは細胞質から核内に移行し, ターゲット遺伝子の発現を制御する。ERK分子の核内・核外移行速度は以下のイメージング手法により測定した。原理としてはRapamycin処理によってFK506 binding protein 12 (FKBP)分子とmammalian target of rapamycin (mTOR)分子のFKBP 12-Rapamycin Binding (FRB)ドメインが強固にヘテロ二量体を形成する反応を利用している。ERK分子にVenus蛍光分子とFKBP分子を融合させたキメラタンパク質Venus-ERK-FKBPをHeLa細胞に発現させ, 同時にHiston-H1分子にFRBドメインを融合させたHiston-H1-FRB分子, もしくはFRBドメインに核外移行シグナルNESを付

加したFRB-NES分子を発現させる。前者は核内にERKをトラップし, 後者は細胞質にERKをトラップする。トラップ分子をERK分子より大過剰に発現させ, Rapamycin処理により二量体形成を誘導することで, 核内移行速度, 核外移行速度を測定することができる。Rapamycin刺激によるERK分子の核内移行, 核外移行の時間変化を測定し, 指数関数でフィッティングすることで時定数を定量した(図2C)。ERKの核内, 核外移行速度はそれぞれ $1.7 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ ,  $1.2 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ と見積もられた。

#### 5. リン酸化反応の定量

ERK分子は, activation loop上のThrとTyrの二か所のアミノ酸がMEK分子によってリン酸化されることで活性化される。したがって, ERK分子のリン酸化アイソフォームは脱リン酸化型(np-ERK), Thrリン酸化型(pT-ERK), Tyrリン酸化型(pY-ERK), 及びThr-Tyrリン酸化型(pTpY-ERK)の四種類存在する。以前の報告から, ERK分子のリン酸化は, Tyrリン酸化とThrリン酸化の反応が別々に起こる「distributive model (図3B左)」と呼ばれる反応機構であること, またこの分子機構によってERK分子が「スイッチ様応答」を引き起こすことが知られている<sup>4,5)</sup>。したがって, このリン酸化反応パラメーターを測定することはモデルの構築にとって重要である。そこで我々は, リン酸化アミノ酸キレーターPhos-tagを用いて, ERK分子のリン酸化アイソフォームを定量的に分離, 測定した<sup>6)</sup>。リン酸化反応は, 試験管内でnp-ERK, 活性化型MEK, ATP, Mg, バッファーを混合して行った。この反応液をPhos-tagを混合して作製したポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを行い, 後は定法に従ってウエスタンブロットを行った。先述の四つのリン酸化アイソフォームはリン酸化特異的抗体により特定している(図2D)。図のように, 電気泳動度の低い順に, pY-ERK, pTpY-ERK, pT-ERK, np-ERKと分離されることが分かった。このバンドを定量し, 二段階反応モデルからnp-ERK  $\rightarrow$  pY-ERK, pY-ERK  $\rightarrow$  pTpY-ERKのリン酸化速度定数がそれぞれ $3.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ ,  $2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ と求められた。この系では,  $K_m$ が基質分子の濃度よりも十分大きい場合, リン酸化反応は一次の式になっている。

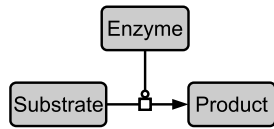
#### 6. 脱リン酸化反応の定量

ERK分子を脱リン酸化する脱リン酸化酵素は複数種あること, またそれらは細胞質と核に局在することが報告されている。そこで, 細胞質と核におけるERK分子の脱リン酸化速度を以下の方法で測定した。まずNES, もしくはNLS(核内移行配列)を付加したERK分子を安定的に

## テクニカルノート

## A CellDesigner の使用例

- ① Species を作る
- ② 反応の種類と向きを示す矢印を描く



- ③ 微分方程式とパラメーターを代入する
- ④ Simulation > Control Panel で実行, 後処理

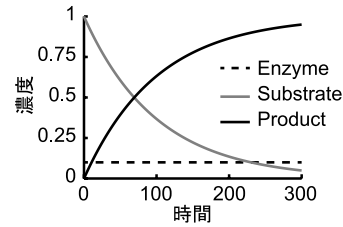
$$k_f * [\text{Enzyme}] * [\text{Substrate}]$$

$$[\text{Substrate}]_0 = 1.0$$

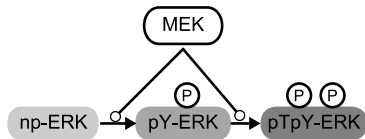
$$[\text{Enzyme}]_0 = 0.1$$

$$[\text{Product}]_0 = 0$$

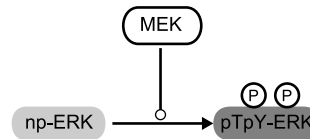
$$k_f = 0.1$$



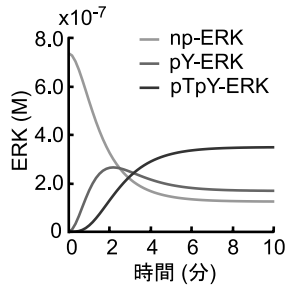
## B Distributive model



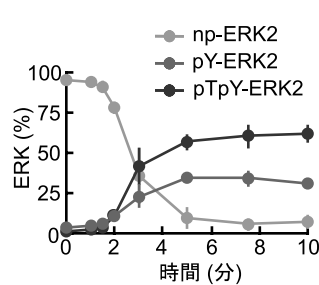
## Processive model



## C Distributive model



## D 実験結果



## E Processive model

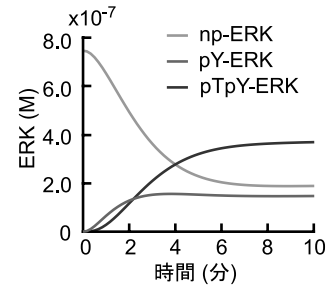


図3 モデル化とシミュレーション

A: CellDesigner の使用例. B: ERK 分子のリン酸化モデル. C: Distributive model を採用したときのシミュレーション結果. D: 実験結果. HeLa 細胞を EGF 刺激し, ERK のリン酸化の時間変化を Phos-tag ウェスタンブロットングにより定量した. E: Processive model を採用したときのシミュレーション結果.

発現する HeLa 細胞を樹立する. それらの細胞を EGF 処理し ERK 分子のリン酸化を誘導する. その後, MEK 阻害薬を処理し ERK 分子のリン酸化アイソフォームの脱リン酸化の時間変化を Phos-tag を用いたウェスタンブロットにより定量した. 実際には, 脱リン酸化酵素の阻害薬を用いて, 四つの脱リン酸化酵素の基質と産生物となるリン酸化アイソフォームを同定している.

## 7. 反応のモデル化と数値シミュレーション

これで全てのパラメーターを取得したことになる. 詳細な説明は省略したが, 全部で約 30 個のパラメーターを定量した. 次のステップは, これらのパラメーターを使って, コンピューターで情報伝達系をシミュレートすることである. 大まかな流れとしては, まず MEK-ERK 反応モジュールに含まれる反応を微分方程式で書き下し (モデル化), 次に, パラメーターを代入し微分方程式を数値的に解く (シミュレーション), という流れになる. 微分方程

式の数値計算ができればどのような方法でも構わないが, 我々は CellDesigner (フリーソフト, <http://www.celldesigner.org/>) を愛用している<sup>7)</sup>. 理由は, 反応モデルを視覚的にデザインできること, 数値解析ができること, MATLAB ファイルに出力できること, などが挙げられる. 使い方は至ってシンプルで, CellDesigner 上で, 分子を作製し, 反応を線でつなげる. その線に微分方程式を書き下し, パラメーターを入れるだけで数値計算ができる (図 3A). CellDesigner の詳細な使い方はユーザーマニュアルに譲る. 実際には, CellDesigner で反応モデルを作製し, それらを MATLAB ファイルに出力して, MATLAB ソフトウェア上でより詳細な数値計算を行っている.

## 8. 定量パラメーターによるシミュレーションの意義

さて, 定量的なパラメーターに基づくシミュレーション結果が完全に細胞内の反応を再現したのだろうか? 答えは No であった. 私は, そもそも, この手法で細胞内の反

応を完全に再現できるとは考えてはいない。なぜなら、これまでに報告されている MEK 分子や ERK 分子を制御する他の分子やフィードバック反応の大部分を無視しているからである。むしろ、定量的なパラメーターに基づくモデルであるからこそ、シミュレーション結果と細胞内で起こっている反応とを比較し、反応モデルには含まれていない隠れた反応やフィードバックなどの制御機構を精度よく抽出するのがこの手法の狙いである。事例を挙げると、これまで説明してきた MEK-ERK 反応系のシミュレーション結果と HeLa 細胞を EGF で刺激したときの ERK のリン酸化のタイムコースとの間に大きな相違があった。シミュレーション結果では、リン酸化反応の過程で pY-ERK が pTpY-ERK より先行して産生されたが (図 3C), 細胞内の結果では pTpY-ERK の産生とほぼ同じ動態で産生される, という結果であった (図 3D)。パラメーター値を最適化することでこの違いを説明することも可能ではあったが, 実験的に求めたパラメーターをわざわざ変化させて実験結果と合わせることに意味がないことは明白であった。そこで, この違いをもっとも合理的に説明できるリン酸化反応モデルを検討した。その結果, ERK 分子のチロシンとスレオニンが一つの反応でほぼ同時にリン酸化される「processive model (図 3B 右)」と呼ばれる反応機構を反応モデルに組み込むと, 実験結果をもの見事に説明できることが分かった (図 3E)。もちろん, このモデルは実験的に検証しており, 全ての結果は我々が提唱した processive model を支持していた。詳細な結果は論文を参照していただきたい。

## 9. 将来展望

最後に, このような定量データに基づくシミュレーション手法ならではの利点と今後の課題を挙げる。もっとも大きな利点は, 前述のように, シミュレーション結果と実験結果の差異を比較することで隠れた反応機構を精度よく予測ができる点である。また, これは私個人の感想だが, この手法によって「理解できた」, 「分かった」と肌で感じることができる, というのも利点である。ただし, 課題も山積している。まず不均一性の問題である。細胞の中はオルガネラを含む不均一な環境であり, また細胞ごとに不均一性 (個体差) があるのも事実である。また, 細胞内の分子の濃度が小さくなると, 濃度を連続変数ではなく離散的な変数で記述する必要性がでてくる。こういった不均一性

や離散的な変数を取り扱うためには大規模な計算機を使う必要がある, 私のような実験系の研究者には困難な課題となってくる。さらに大きな課題となるのが, パラメーターの効率的な取得である。これまで読み進めると, いかにもパラメーターを定量するのが大変か分かっていたかと思う。パラメーターの効率的な取得に関しては, その種類によって難易度が変わる。例えば, 細胞内のタンパク質濃度は質量分析による絶対定量法により比較的容易に網羅計測をすることができるようになってきた。分子の拡散速度は, 共焦点レーザー顕微鏡を用いることで簡単に取得できる。一方, 結合解離反応や酵素反応に関連するパラメーターの網羅的な計測はまだ難しい。これらのパラメーターは, 試験管内よりも細胞内環境でのパラメーター値を測定することが肝要であるが<sup>88,9)</sup>, そうすると難易度がさらに上がる。ただし, これまでの経験から, パラメーターの精度に関しては, 有効数字が一桁でも分かれば十分であると考えている。やってみるとわかるが, パラメーターの桁が分かるだけでもシミュレーションをする際にはかなり有益な情報である。我々は現在, 細胞内でリン酸化速度定数や解離定数を効率よく測定する手法を開発中である。これらを通じて, 定量データをさらに蓄積し, 最終的には抗がん剤のインシリコスクリーニングに耐えるパーチャル細胞を構築したいと考えている。本稿で紹介した方法や考え方が参考になれば幸いである。

最後に, これまでご指導いただいている松田道行教授 (京都大学大学院生命科学研究科) と研究室の皆さんに深く感謝いたします。

- 1) 西村善文 (2011) 生化学, 83, 809.
- 2) Aoki, K., Yamada, M., Kunida, K., Yasuda, S., & Matsuda, M. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 12675–12680.
- 3) Roberts, P.J. & Der, C.J. (2007) *Oncogene*, 26, 3291–3310.
- 4) Ferrell, J.E. Jr. & Machleder, E.M. (1998) *Science*, 280, 895–898.
- 5) Xiong, W. & Ferrell, J.E. Jr. (2003) *Nature*, 426, 460–465.
- 6) 木下英司, 木下恵美子, 小池 透 (2010) 生化学, 82, 857–862.
- 7) Funahashi, A., Tanimura, N., Morohashi, M., & Kitano, H. (2003) *BIOSILICO*, 1, 159–162.
- 8) Minton, A.P. (2006) *J. Cell Sci.*, 119, 2863–2869.
- 9) Schnell, S. & Turner, T.E. (2004) *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 85, 235–260.