

特集：次世代シグナル伝達研究—先駆的基礎解析と臨床・創薬への展開—

転写因子 NF- κ B の振動パターンに 大きな影響を与える 3次元細胞内空間構造

大島大輔, 市川一寿

転写因子 NF- κ B (nuclear factor-kappaB) は刺激依存的に活性化して核内移行する。この NF- κ B の核移行は一過性ではなく、核内 NF- κ B 量は振動する。その機構は数理モデルの対象となっており、抑制因子 I κ B α を介したフィードバックループが報告されている。一方で、振動パターンにより多数の標的遺伝子の発現が制御されるが、その制御因子の解析は充分でなく、また空間的要因が振動に与える影響も不明であった。従来の数理モデルも空間的要素を省略してきた。そこで我々は、核と細胞質の区別があり、実際の細胞と同じ核-細胞質体積比率を持つ3次元球形細胞モデルを構築して、3次元空間パラメータが振動に与える影響を検討した。その結果、3次元空間パラメータが NF- κ B 振動の制御因子であることを示した。本稿では、点モデルと3次元モデルのシミュレーション結果の違いと3次元空間パラメータが持つ役割について論じたい。

1. はじめに

転写因子 NF- κ B は様々なサイトカインや紫外線照射によるストレスなどにより活性化され、免疫応答や細胞増殖・生存、そしてアポトーシスなど多くの生命現象に関連する遺伝子の発現を担う重要なタンパク質である。一方で、多くのがん細胞において悪性化と共に恒常的な活性化が見られることから、NF- κ B はがんの悪性化因子としても知られている。このように NF- κ B の活性化制御は細胞の運命を決定するだけでなく、がんや過剰な免疫細胞の活性化による自己免疫疾患など様々な疾患との関連においても重要であると考えられている。このため、これまで NF- κ B の活性化経路の研究が盛んに行われてきた。サイトカ

イン受容体からの刺激は複雑なシグナル伝達経路を經由して NF- κ B を活性化し、核に移行して DNA のエンハンサー領域にある κ B 配列と結合し、遺伝子発現を誘導する。これまで網羅的な解析から、NF- κ B の標的遺伝子は500種類以上にのぼると考えられており、その中には生理活性に関わる遺伝子だけでなく、NF- κ B の活性を抑制的に制御する遺伝子が含まれている。面白いことに NF- κ B はサイトカインの刺激により核を出入りし、核内の量が振動することがわかっている。この振動現象はしばしば数理モデルを用いたコンピュータシミュレーションの対象となり、Hoffmann らが *Science* 誌に論文を発表して以来¹⁾、これまでに30編以上の論文が発表されている²⁾。

生命における振動現象はいくつか知られており、概日リズムや細胞内 Ca²⁺ 振動をはじめとして、以前から数理モデルの恰好の対象であった。核内 NF- κ B の振動現象は比較的新しく見いだされた現象であり、現在はその生物学的意義と振動制御のメカニズムがまさに明らかになろうとしている段階である。なおかつ、実験と数理モデルの協同が研究の進展に決定的に重要である点において、今後の生命科学にとって大変に興味深い対象である。本稿では核内 NF- κ B の振動現象とその数理モデルについて概説する。

東京大学医科学研究所腫瘍数理分野 (〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1)

The change in 3-dimensional intracellular parameters alters oscillation pattern of nuclear NF- κ B

Daisuke Ohshima and Kazuhisa Ichikawa (Division of Mathematical Oncology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo-to 108-8639, Japan)

そして従来の点モデルから3次元モデルへの拡張によって初めて明らかになる振動メカニズムの一端について我々の研究成果を報告する。

2. 転写因子 NF- κ B のシグナル伝達経路

NF- κ B の活性化経路は古典的経路と非古典的経路の二つが知られている。本稿では、古典的経路に注目し、RelA-p50 を中心とした研究に関して論じる (図 1A)。定常状態で、NF- κ B は抑制因子 I κ B と結合し核移行シグナル (NLS) が遮蔽されて細胞質に留まっている。TNF (腫瘍壊死因子) 受容体 (TNFR) スーパーファミリーやインターロイキン-1 受容体 (IL-1R) からのシグナルにより I κ B が分解され、NF- κ B が核内へ移行して遺伝子発現を誘導する (詳細は柴田らの稿を参照)。核内に入った NF- κ B はその後、I κ B と再度結合し、核外へと追い出される。このように NF- κ B の核への局在は一過性である。しかし活性化した IKK が残存していると NF- κ B と結合する I κ B が再び細胞質で分解され、NF- κ B は核移行する。こうした NF- κ B の局在の変化が繰り返されることで核内 NF- κ B 量が振動するという興味深い現象が生じることになる。図 1B は NF- κ B の核内移行と核外移行に注目した図である。I κ B には α , β , ε の 3 種類のアリソフォームが知られており、振動に対してそれぞれ異なる役割があると言われている¹⁾。また、核内 NF- κ B は p300 や CBP (CREB 結合タンパク質)

などのタンパク質と結合することで DNA のエンハンサー領域に結合するが、それには NF- κ B がリン酸化されていることが必要である。しかし NF- κ B は核内で WIP (野生型 p53 誘導性ホスファターゼ) によって脱リン酸化されることで活性が抑制される。さらに NF- κ B はアセチル化、メチル化、ユビキチン化などの多様な翻訳後修飾を受けることから、その活性制御は非常に複雑であると考えられているが²⁾、本稿では NF- κ B の振動現象に焦点を絞って論じたい。

NF- κ B の核内振動は、これまでに多くの実験報告がある。Hoffmann らは EMSA (electrophoretic mobility shift-assay) 法を用いて持続的な TNF α 刺激による核内 NF- κ B を測定し、2 時間程度の周期で振動していることを見出した³⁾。Nelson らも RelA-DsRed (RelA と赤色蛍光タンパク質との融合タンパク質) を用いた 1 細胞イメージングによって、持続的な TNF α 刺激による核内 NF- κ B の振動を報告している⁴⁾。当初、彼らの測定によれば周期は 6 時間程度で Hoffmann らの報告に比べてかなり長いですが、その後 Nelson らも Hoffmann らと同様の周期を報告している⁵⁾。Nelson らの報告はタンパク質の蛍光標識を用いたイメージング技術によって単一細胞を観測しており、従来のような細胞集団に対する解析では得られない結果が得られた。すなわち 1 細胞イメージングの結果では細胞によって振動の有無や周期が異なるなど大きなばらつきが見られること

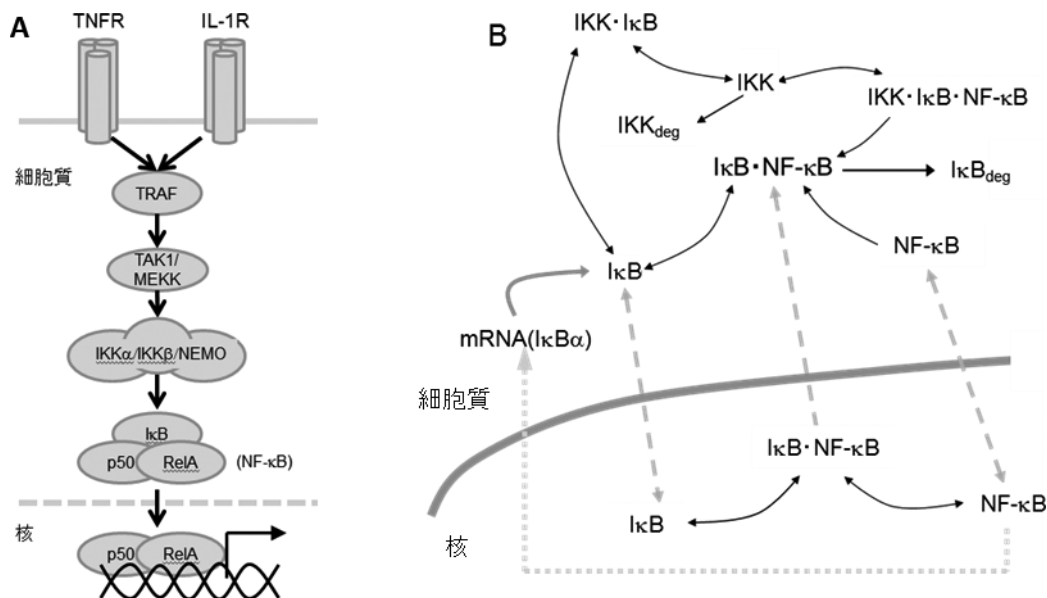


図 1 NF- κ B 活性化経路

- (A) 古典的経路の概要。古典的経路では、TNF 受容体スーパーファミリーや IL-1 受容体などから種々のアダプター分子を介してシグナルが伝達される。RelA-p50 複合体である NF- κ B は通常、I κ B と結合して細胞質にある。I κ B が刺激依存的にリン酸化とプロテアソーム分解を受けると、フリーになった NF- κ B が核内移行により遺伝子発現を誘導する。
- (B) 古典的経路における NF- κ B の核移行に着目した模式図。核内で I κ B と結合した NF- κ B が核外へ移行する。細胞質で IKK と再び出会うと核内へ移行する。分解により失われる I κ B は NF- κ B による転写で供給される。IKK_{deg}、及び I κ B_{deg} はそれぞれのタンパク質分解産物を表す。

が明らかになった。なお、Sungらの論文ではPLoS ONEのサイトから核内NF- κ B振動の動画を見ることができ⁶⁾。

3. NF- κ B シグナル伝達経路の数値モデル

HoffmannらはNF- κ Bの挙動について初めて数値モデルを構築し、実験的な観測を説明した¹⁾。彼らのモデルでは受容体からIKKへのシグナルが省略され、活性化IKKが生成されるところが開始点となる。モデルは比較的単純で、登場するタンパク質はIKK, (IkB α , β , ϵ)_c, (IkB α , β , ϵ)_n, (NF- κ B)_c, (NF- κ B)_nだけである(ここで添字のnとcはそれぞれ核と細胞質の局在を表す)。これらタンパク質の結合/解離反応に加えてIkB α , β , ϵ の核内外移行とプロテアソームによる分解、またNF- κ B依存的なIkB α の遺伝子発現が含まれている。ただしこの数値モデルでは細胞質と核の局在を区別した議論がなされているものの、実際には空間的な区別はなく、すべての物理化学的プロセスが1点で進行する「点モデル」である。それでもシミュレーションと実験の結果はよく一致しており、IkB α , β , ϵ の各遺伝子欠損マウス細胞を用いた実験との比較では、IkB α の欠損により周期2時間の振動が消失する一方、IkB β , ϵ の二重欠損マウス細胞では振動パターンに大きな変化がないことが示され、数値モデルとシミュレーション結果の妥当性が主張されている。

この数値モデルが契機となり、これまで多くの亜種モデルが報告されてきた。これらにはA20によるIKK不活性化の影響を検討し、実験と比較したもの⁷⁾、IKKの活性化プロファイル(濃度変化の時間経過)を様々に設定してその違いによる核内NF- κ B振動パターンの変化を検討したもの^{6,8-10)}、新たに見いだされたIkB δ アイソフォームの役割を論じたもの¹¹⁾がある。これらはいずれも反応式を常微分方程式で表現したモデルで、決定論的かつ空間的な広がりがない点モデルの検討である。一方前述の通り、1細胞イメージングの結果では細胞間で振動パターンのばらつきが大きいことから、Gillespie法を用いた確率的シミュレーションによってばらつきの原因が検討されている¹²⁾。確率的振る舞いが重要な意味を持つのは反応に関わる分子数がごく小さい場合であり、それはNF- κ BのDNAエンハンサー領域への結合と解離であるという前提の下、従来の決定論的な常微分方程式のこの反応部分を確率的なモデル表現に置き換えたシミュレーションが報告されている^{13,14)}。一方、サイトカイン刺激のパターン(一定濃度を持続的に与えるかそれともパルスのか、またパルスの刺激の間隔)の違いによる遺伝子発現の実験と、それに基づく数値モデルも報告されている¹⁵⁾。これらのシミュレーション結果は、いずれも実験結果と良く合致することが報告された。

さらに、NF- κ Bの核内振動の本質的なメカニズムを抽出する目的で数値モデルの単純化が試みられた¹⁶⁾。それによると、振動の本質はたった三つの変数(分子)で表現可能で、その変数とはNF- κ B, IkB, IkBのmRNAである。この検討では、細胞質からの持続的なNF- κ Bの核移行、IkBのmRNAによる細胞質でのIkBの産生と分解、またIkBによる核内NF- κ Bの抑制、そしてIkB産生の時間遅れによって振動が生まれることが示された。このように、シグナル伝達機構を単純化してそのメカニズムの本質を抽出する作業は数値モデルならではの作業であり、その真価が発揮される局面である。興味深いことに、このように単純化された数値モデルは、ヘリックス・ループ・ヘリックス型転写因子であるHes1の振動やDNA損傷により活性化されるp53-Mdm2経路の振動とメカニズムは同一である。すなわち持続的な転写因子(RelAやp53)の活性化と核移行、転写と時間遅れを持つ転写抑制タンパク質の産生、そして転写抑制タンパク質による転写因子の一時的抑制である。Krishnaらが示した本質的な三つの変数はどれを欠いても振動は生じず、最も単純化された生命における振動のメカニズムであると考えられる。異なるシステムにおいて共通の基本的機構が存在するという事は、細胞内の他のシグナル伝達経路においても振動現象が普遍的に生じている可能性を示唆するものとして興味深い。

ここまで核内NF- κ Bの振動の実験データと数値モデルについて概観してきた。この振動の生物学的な意義については依然として明らかになっていない。そのヒントになる振動パターンと遺伝子発現プロファイルとの関係について考えていきたい。HoffmannらはIkB α 欠損マウスでTNF α 刺激の時間を変えることで核内NF- κ Bの振動の継続時間を変化させ、それに伴う各種標的遺伝子の発現量の違いを調べた¹⁾。それによるとサイトカインIP-10の遺伝子は一過性の核内NF- κ Bの上昇で発現するが、同じくサイトカインRANTESの遺伝子は持続的な核内NF- κ Bの上昇がなければ発現しないことが示された。ただしこの結果はそもそも振動が生じないIkB α 欠損細胞を用いた実験であり、核内NF- κ Bの振動と遺伝子発現の関係が明らかになったわけではない。これに対してAshallらは5分間の短いTNF α 刺激を様々な間隔で与え、その刺激パターンと発現する遺伝子との関係を調べた¹⁵⁾。5分間のTNF α 刺激では1回だけ核内NF- κ Bの上昇が起こり、この刺激を100分間隔で与えることが周期100分間の核内NF- κ B振動に相当すると想定した実験である。それによると、RANTES遺伝子は200分間以上の長い周期の刺激では発現せず、100分間以下の短い周期の刺激で、しかも刺激開始から430分後に大きな遅れをもって発現上昇が見られた。これに対してケモカインMCP-1の遺伝子は1回の刺激で、しかも刺激から130分後には発現が見られた。さらにIkB α

の遺伝子発現は刺激から15分後と特に早い応答が見られた。この結果は個々の遺伝子が応答し得る振動パターンに違いがあることを示唆するもので、核内NF- κ Bの振動が生命現象に対して意義を持つことを示唆している。したがって核内NF- κ Bの振動パターンを解析することが生理学的に意義付けられ、その解析をする上で、実験ではほぼ不可能な環境を再現したり、あるいは複雑に混みあった現象を単純化したりできる数理モデルが担う役割は大きいであろう。シミュレーションでは、パラメータを自由に設定することによって、未知の現象の予見をすることが可能である。それだけでなく今まで考えてこられなかったパラメータを加えた新しいモデルを構築することにより、未知の可能性について検討することが可能となる。そこで次にこのようなシミュレーションの結果について紹介したい。

4. 3次元空間球形細胞モデル

既報の核内NF- κ B振動のモデルはいずれも空間的要素を含まない2次元モデルのため限定的な議論にとどまってきた¹⁷⁾。点モデルでは、細胞質におけるIKKによるNF- κ Bの活性化も、核内におけるI κ BのmRNA転写、I κ Bタンパク質の産生も同一の場所で行われており、かつNF- κ Bの核内外移行は単にシミュレーション上の変数名を置き換えるだけであった。これは空間的広がりを持つ実際の細胞の単純化であり、この単純化ゆえに省略されてしまうパラメータがいくつか存在する。それはNF- κ Bをはじめとする可溶性タンパク質の拡散定数、核-細胞質体積比(N/C比)、タンパク質産生の場所(核からの距離)、核膜間のタンパク質のフラックス(核膜孔を介したタンパク質の移動量)、サイトカイン刺激の空間的配置(細胞膜局所か全体か)などである。これらは2次元モデルで検討できるパラメータも含まれるが、議論としては限定的である。そこで我々は細胞の3次元空間における反応拡散をモデリング・シミュレーションできるA-Cellソフトウェア^{18,19)}を用いてこの問題にアプローチした²⁰⁾。我々の数理モデルは単純で、約17,000のコンパートメントからなる直径50 μ mの球形の細胞をコンピュータ上に構築し、その約8%の体積で球形の核を内部中央に作り、その境界を核膜、外側の領域を細胞質とした。そしてHoffmannらのモデルを基本にした化学反応式(図2A)を細胞質、核、核膜にそれぞれ適切に割り付けたものである(図2B)。細胞質、核膜、核は小さな立方体のコンパートメントに分割しており、コンパートメント間の物質移動はフィックの式で記述して拡散を扱った。

5. 3次元シミュレーションの結果と空間パラメータの役割

前節で作製した3次元モデルのシミュレーション結果を

図3Aに示す。Sungらの実験データ⁶⁾(図3A)に合うようなパラメータの調整を行った。まず点モデルの反応パラメータを3次元モデルにそのまま用いた結果では、実験で観測される振動と周波数が大きく異なり、再現できないことが明らかになった。これは、モデルを3次元化することによって新たに導入が必要になる拡散定数やN/C比を、実際の細胞でとり得る値の範囲で調節しても実験データと同じ周波数の振動を得ることができなかった(図3B)。すなわち、これまで30編以上の論文で検討されてきた点モデルの反応パラメータは、3次元モデルではそのまま使えないといえる。そこで、新たに実験データを再現できる反応パラメータセットを導入した上で、拡散定数、I κ Bの合成場所、N/C比、核膜を通るフラックスなどの空間パラメータについて検討を行った。その結果、いずれの空間パラメータもNF- κ B振動パターンに影響を与える結果を得た(図4)。ただし、サイトカイン刺激の空間的配置はいずれの場合でも振動パターンに影響はなかった²⁰⁾。以下でそれぞれの空間パラメータについて詳細を述べたい。

1) 核の大きさ(N/C比)

N/C比を3.7~17%の範囲で変えて振動パターンを調べた(図4A)。その結果、核の大きさの違いによる振動の周波数への影響は見られなかった。一方で、第1ピークの高さは核の大きさにしたがって小さくなること、さらに減衰率も小さくなることが示された。これは核の大きさが大きいほど振動が持続的になることを示す。

2) タンパク質の拡散定数

拡散定数を 10^{-10} ~ 10^{-13} (m^2/s)の範囲で検討した(図4B)。その結果、 10^{-11} ~ 10^{-12} (m^2/s)の範囲ではほとんど振動に影響を与えなかった。しかし、それ以外の領域では、周波数と減衰率に影響があることがわかった。特に拡散定数が小さくなると、振動そのものがなくなる傾向にあった。また興味深いことに拡散定数が高いほど周波数が低いという現象が見られた。この点については今後、詳細な解析が必要である。

3) 核膜を通るフラックス

核膜を通るフラックスを0.125~8倍の範囲で検討した(図4C)。その結果、核膜を通るフラックス周波数に強く関わることを示された。フラックスが大きいほど周波数が高くなり、また振動の減衰率もフラックスが大きいほど高かった。

4) I κ B α の合成位置

I κ B α の合成位置を核膜領域、核を覆う立方体の領域、それと同じコンパートメント数で核から最も離れた領域の三つに分けて検討した(図4D)。その結果、I κ B α の合成位置は振動パターンに対して、非常に大きな影響を与えた。周波数だけでなく、合成位置が遠くなると減衰振動にならないことが示された。本結果は、どのmRNAがどこ

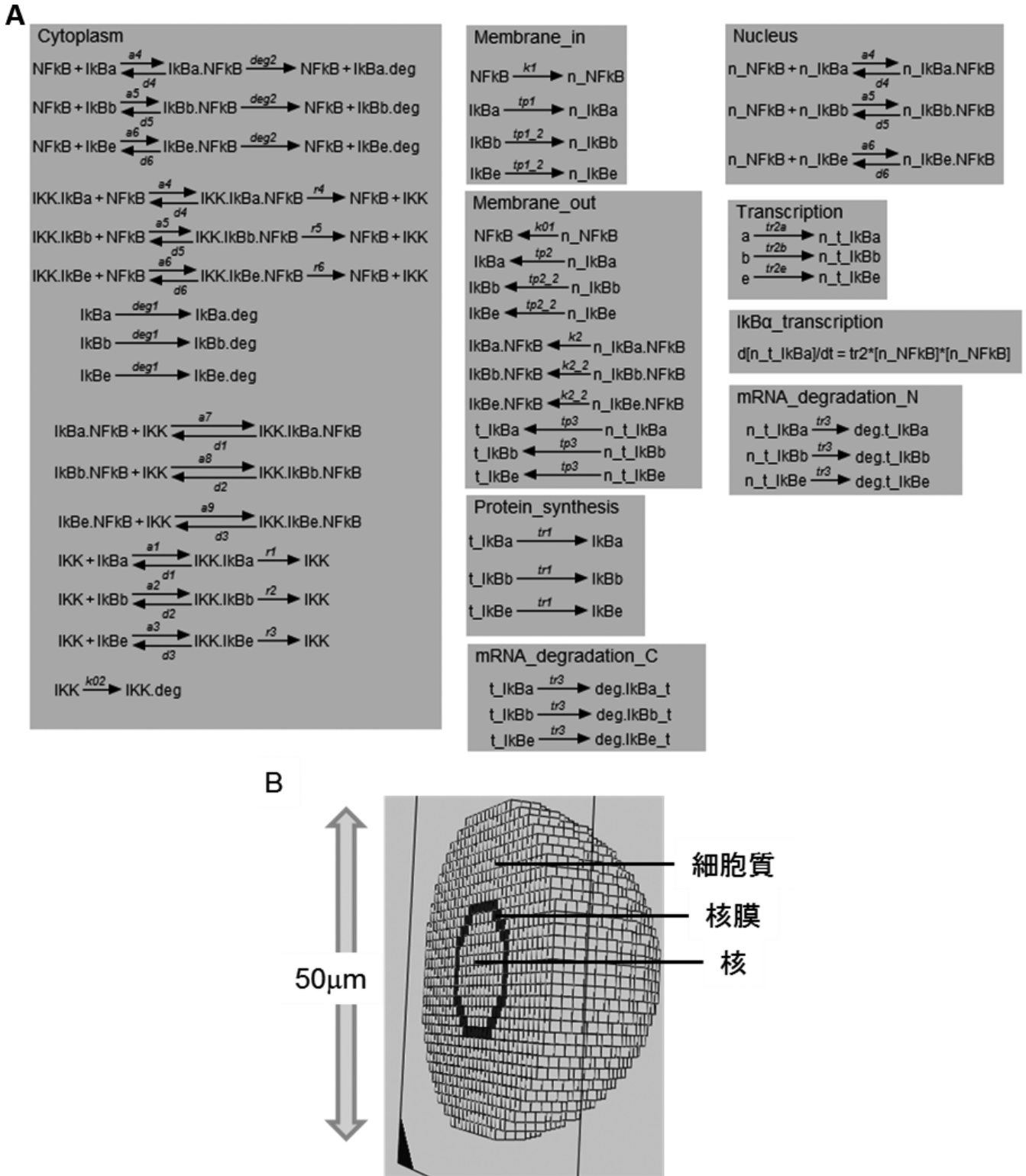


図2 化学反応式と3次元球形細胞モデル

(A) シミュレーションソフトウェア A-Cell 上で再現した NF- κ B 振動の化学反応式。

(B) 直径 50 μm の球形モデル上に細胞質と核、その境界である核膜の三つの領域を作製した。(A)で示した反応式を適切な領域にそれぞれ割り付ける(例えば、I κ B α の転写反応は核領域に割り付ける)。各コンパートメント間はフィックの式にしたがって、タンパク質の拡散を計算する。A-Cell はこれらの計算を実行する C 言語プログラムを書き出すので、コンピュータ上でシミュレーションが容易に可能である。なお A-Cell と本稿で用いた数理モデルは、筆者らの研究室の HP (<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/mathcancer/>) からダウンロードできる。

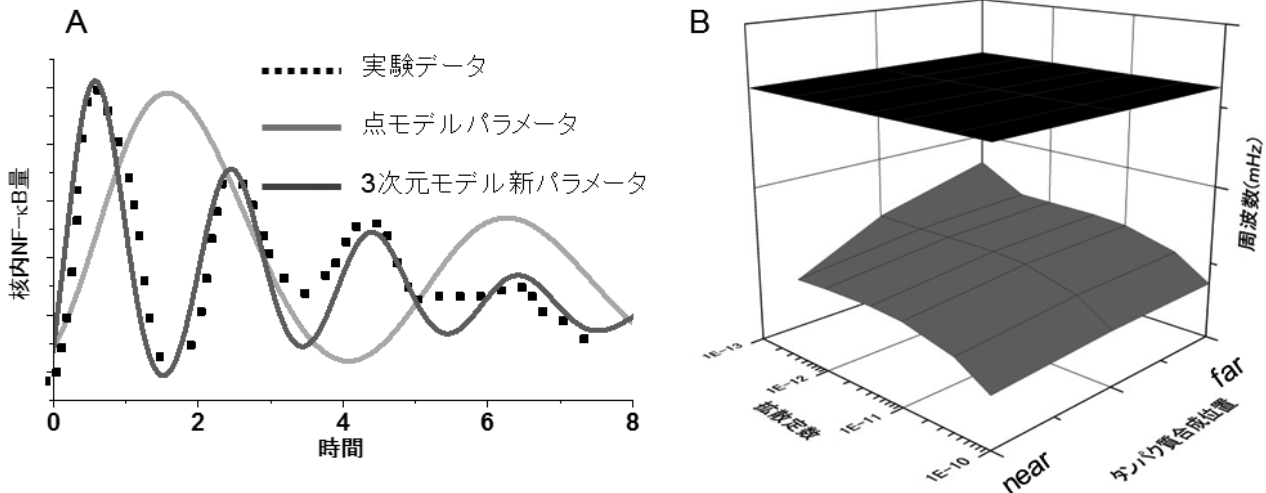


図3 点モデルと3次元モデルの比較

- (A) Sungらによる実験データ⁶⁾を基に核内NF-κB量をプロットした結果を点線で描いた。図2に示した3次元球形細胞モデルにおいて、点モデルのパラメータでシミュレーションした結果、周波数の点で大きく実験結果と異なる波形が得られた。実験データと合うような3次元モデルの新しいパラメータを調整し、これ以降のシミュレーションを行った。
- (B) (A)の波形に対して、拡散定数やタンパク質合成の位置を変更した時の周波数の値を灰色面で示す。黒面で示した実験結果の周波数の領域とは検討したパラメータの範囲内では交わらず、3次元球形細胞モデルにおいて点モデルのパラメータでは実験データの再現ができない。

でタンパク質として合成されるか、その空間的な配置を知ることが、シグナル伝達の制御を考える上で重要であることを示唆する。

6. おわりに

核内NF-κBの振動の生物にとっての意義はこれまでもLahavらによっても考察されてきており、それによると持続的な振動の意義とは、1回の核内NF-κBの上昇によってすぐに遺伝子発現が起こらず、複数回の振動により持続的な遺伝子発現誘導刺激の存在を担保して確実に遺伝子発現に導く役割があるのだと主張している²¹⁾。この可能性は否定できないが、いまだ証明はされておらず、しかも振動パターンの違いによる遺伝子発現プロファイルの違いまでは説明できていない。生物の接する様々な局面において細胞のおかれる環境と核内NF-κBの振動の関係、そして振動の結果生じる生命現象を明らかにしなければ、最終的な振動の意義を明らかにすることはできないであろう。さらに生物学的に重要なことは、様々な疾患との関連が示唆されることである。たとえばがん細胞では悪性化するほどN/C比が大きくなっていることが知られており²²⁾、またN/C比が大きいほど生存率が低くなるという報告もある²³⁾。そしてがん細胞ではNF-κBの恒常的な活性化が見られるという報告が数多くある²⁴⁾。この点については本シミュレーション結果から、N/C比が大きくなるほどNF-κBは持続的な振動をしやすいうことが示唆され、がん細胞で核の大きさに異常が見られることと遺伝子発現の破綻との間につながりがあるという可能性が考えられる。一方、

ハッチンソン・ギルフォード早老症では球形の核の形態が崩れてクルミ状になることが知られている。同様の現象は加齢やがん細胞においても見られる。このように核の形態異常は疾患や加齢との関連が考えられ、しかもNF-κBの恒常的な活性化が見られる²⁵⁾ことから、核の形態と転写因子の活性の変化との関連について検討することが今後必要になるであろう。さらに実際の細胞を顕微鏡で見ると、どれも均一であることはなくばらつきがある。そして例えば、細胞質では、さまざまな細胞小器官が多数ひしめき合って存在しているため、タンパク質の拡散が単純に進行するとは考えにくく、シグナル伝達に対して影響が大きいことが容易に想像される。

*in vitro*の実験で、同一のサイトカイン刺激をした細胞が同調することなくNF-κBの活性化を見せることから、個々の細胞の状態を知ることはシグナル伝達を理解する上で重要になると考えられる。詳細な細胞内空間を考慮した3次元モデルを構築する手法とそれに伴う計算の大規模化への対応については今後の課題である。

本稿では核内NF-κBの振動とその数理モデルについて述べてきた。核内NF-κBの振動は、前述の振動の意義や、細胞間のばらつきの意義と原因、組織レベルでの振動の様子など、明らかにすべき多くの点が未解決のままである。今後実験と数理モデルのさらなる協同によってこれらの点を明らかにし、治療や創薬に結び付けていくことが望まれる。

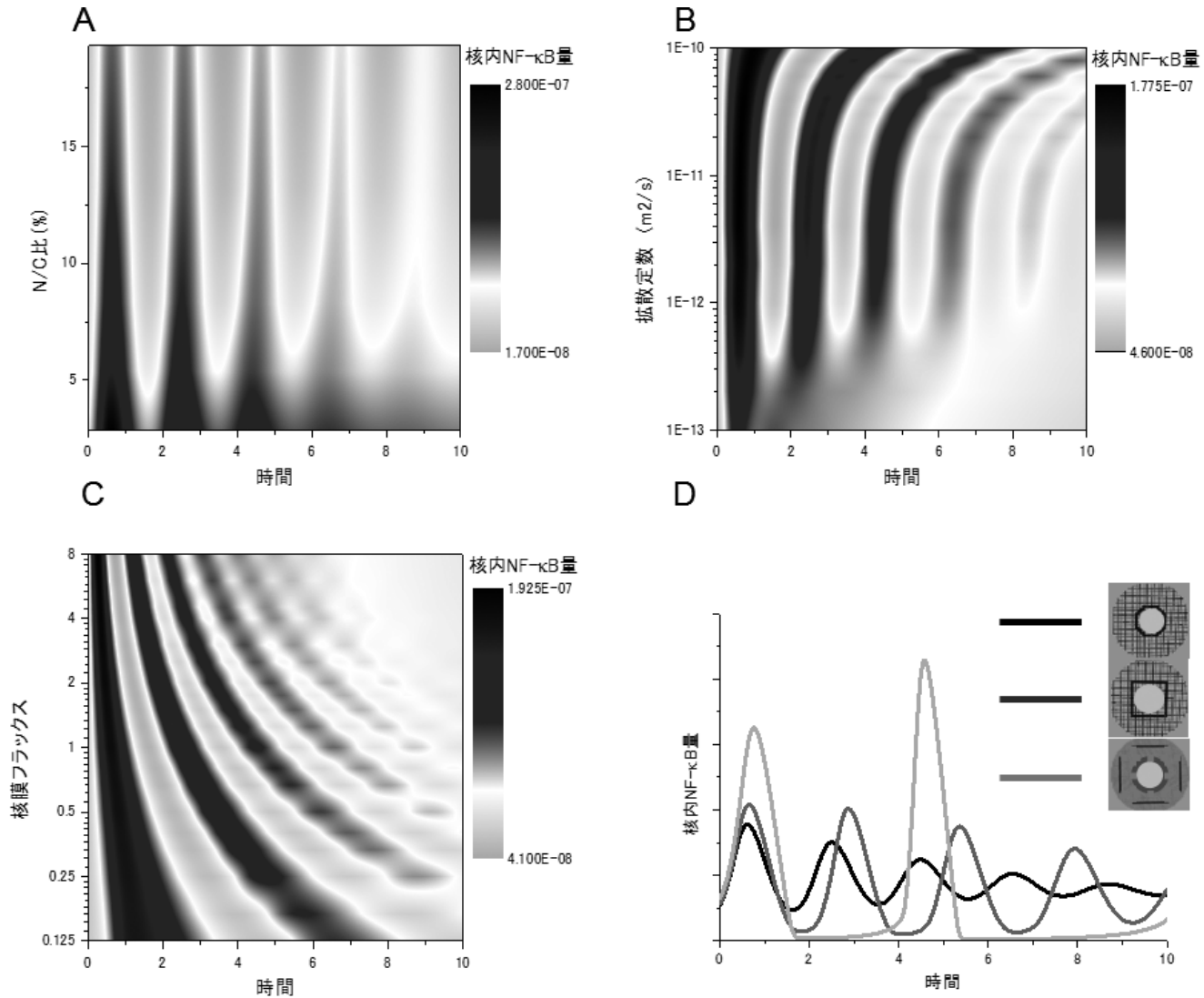


図4 空間パラメータと振動パターンの関係

- (A) 核-細胞質体積比 (N/C 比) を変化させた時の振動の変化の様子。N/C 比が変化しても周波数に影響が見られないが、核が大きいほど減衰率が小さくなる。
- (B) 拡散定数を変化させた時の振動の変化の様子。ある範囲 ($1 \times 10^{-11} \sim 1 \times 10^{-12} \text{m}^2/\text{s}$) では振動に変化はほとんど見られない。それより大きくパラメータを変えると周波数が変化する。
- (C) 核膜フラックスを変化させた時の振動の変化の様子。核膜フラックスが低いと周波数が小さく、フラックスが上がるにつれて周波数が大きくなる。
- (D) $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 合成位置を変化させた時の振動の変化の様子。核膜領域の時 (黒線)、核を覆う立方体領域の時 (濃い灰色)、核から最も離れた領域 (薄い灰色) で比較した。合成位置が核から離れるにつれて周波数が小さくなり、減衰率も小さくなる。

文 献

- Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M.L., & Baltimore, D. (2002) *Science*, 298, 1241-1245.
- Cheong, R., Hoffmann, A., & Levchenko, A. (2008) *Mol. Syst. Biol.*, 4, 192.
- Huang, B., Yang, X.-D., Lamb, A., & Chen, L.-F. (2010) *Cell. Signal.*, 22, 1282-1290.
- Nelson, G., Paraoan, L., Spiller, D.G., Wilde, G.J.C., Browne, M.A., Djali, P.K., Unitt, J.F., Sullivan, E., Floetmann, E., & White, M.R.H. (2002) *J. Cell Sci.*, 115, 1137-1148.
- Nelson, D.E., Ihekweaba, a E.C., Elliott, M., Johnson, J.R., Gibney, C.a, Foreman, B.E., Nelson, G., See, V., Horton, C.a, Spiller, D.G., Edwards, S.W., McDowell, H.P., Unitt, J.F., Sullivan, E., Grimley, R., Benson, N., Broomhead, D., Kell, D.B., & White, M.R.H. (2004) *Science*, 306, 704-708.
- Sung, M.-H., Salvatore, L., De Lorenzi, R., Indrawan, A., Pasparakis, M., Hager, G.L., Bianchi, M.E., & Agresti, A. (2009) *PLoS one*, 4, e7163.
- Lipniacki, T., Paszek, P., Brasier, A., Luxon, B., & Kimmel,

- M. (2004) *J. Theor. Biol.*, **228**, 195–215.
- 8) Werner, S.L., Barken, D., & Hoffmann, A. (2005) *Science*, **309**, 1857–1861.
- 9) Park, S.G., Lee, T., Kang, H.Y., Park, K., Cho, K.-H., & Jung, G. (2006) *FEBS Lett.*, **580**, 822–830.
- 10) Kim, D., Kolch, W., & Cho, K.-H. (2009) *FASEB J.*, **23**, 2796–2802.
- 11) Shih, V.F.-S., Kearns, J.D., Basak, S., Savinova, O.V., Ghosh, G., & Hoffmann, A. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 9619–9624.
- 12) Hayot, F. & Jayaprakash, C. (2006) *J. Theor. Biol.*, **240**, 583–591.
- 13) Tay, S., Hughey, J.J., Lee, T.K., Lipniacki, T., Quake, S.R., & Covert, M.W. (2010) *Nature*, **466**, 267–271.
- 14) Lipniacki, T., Paszek, P., Brasier, A.R., Luxon, B.A., & Kimmel, M. (2006) *Biophys. J.*, **90**, 725–742.
- 15) Ashall, L., Horton, C.A., Nelson, D.E., Paszek, P., Harper, C. V., Sillitoe, K., Ryan, S., Spiller, D.G., Unitt, J.F., Broomhead, D.S., Kell, D.B., Rand, D.A., Sée, V., & White, M.R.H. (2009) *Science*, **324**, 242–246.
- 16) Krishna, S., Jensen, M.H., & Sneppen, K. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 10840–10845.
- 17) Terry, A.J. & Chaplain, M.A.J. (2011) *J. Theor. Biol.*, **290C**, 7–26.
- 18) Ichikawa, K. (2001) *Bioinformatics*, **17**, 483–484.
- 19) Ichikawa, K. (2005) *Neuroinformatics*, **3**, 49–64.
- 20) Ohshima, D., Inoue, J., & Ichikawa, K. (2012) *PloS one*, **7**, e46911.
- 21) Lahav, G., Rosenfeld, N., Sigal, A., Geva-Zatorsky, N., Levine, A.J., Elowitz, M.B., & Alon, U. (2004) *Nat. Genet.*, **36**, 147–150.
- 22) Millot, C. & Dufer, J. (2000) *Histol. Histopathol.*, **15**, 1185–1200.
- 23) Pienta, K.J. & Coffey, D.S. (1991) *Cancer*, **68**, 2012–2016.
- 24) Karin, M. (2006) *Nature*, **441**, 431–436.
- 25) Adler, A.S., Sinha, S., Kawahara, T.L.a, Zhang, J.Y., Segal, E., & Chang, H.Y. (2007) *Genes Dev.*, **21**, 3244–3257.
-