

# 予測技術を用いた生命システムの同定手法の開発

京都大学大学院情報学研究科 教授

石井 信

## Development of prediction-based identification methods for biological systems

Shin Ishii

Kyoto University

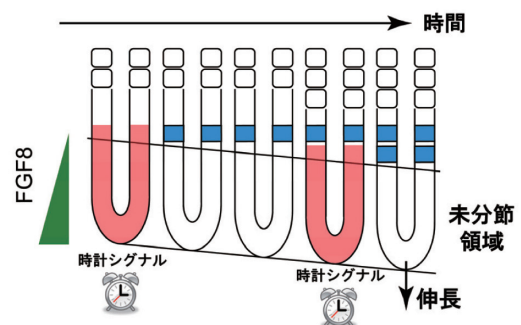
Biological data have been accumulated to deep investigate molecular interactions which emerge biological functions. However, they often include incomplete data or lack important knowledge, so that realistic model simulation is still difficult. The role of each molecule cannot be specified in models because it is hard to distinguish how each molecule functions in the target biological systems. Then the system identification which leads to quantitative evaluation of molecular contributions and hypothesis is required in the field of bioinformatics and systems biology. The long term goal of this project is to develop a top-down technique that contributes to system identification of biological systems and enables predictions for biological systems.

### 1. はじめに

近年、膨大に蓄積された生物学情報を統合すべく、生体分子の相互作用システムのダイナミズムを理解しようとする研究、いわゆるシステム生物学が注目されているが、個別の生物機能を発現するシステム構成が完全な形で解明されているわけではなく、リアルなシミュレーションを行うには多くの情報が欠落している状況にある。不足部分については仮説の導入が必要となるが、その仮説の正当性を情報科学的に評価する手法は乏しい。一方、生物現象は多様であり、関わる生体分子情報を忠実に盛り込んだモデル化を行えば、各機能に関する分子の責任度合は不明瞭となる。生物学の現場で望まれているのは、情報科学的手法に基づく、生物システムに存在する普遍的な原理の解明、個別分子の役割の情報科学的手法による定量化と、それらに基づく新しい仮説の提供にある。本研究では、生命システムの構成に関する不足情報を補足し、プロセス同定・ミニマムモデルの構築を行う情報科学的手法の開発を目的とした。

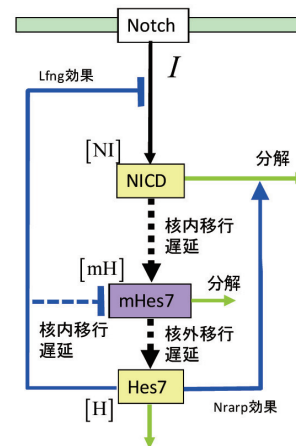
### 2. 研究開発の成果

(1) 脊椎動物の発生過程では、頭尾軸に沿って体節が形成され、その後発生する神経・血管などの基盤となる。体節は、尾側の未分節領域の頭側の細胞群が上皮化し、分節することで形成され、頭から尾方向にかけて順々に周期的に形成される。この体節形成の時間的周期性は、体節時計遺伝子（ニワトリ

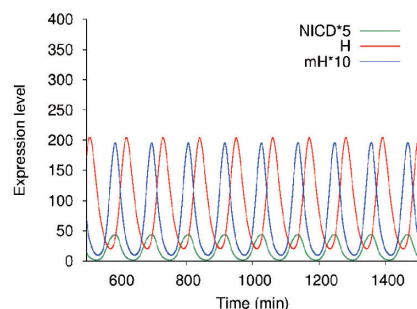


ではHairy1/2, ゼブラフィッシュではHer1/7, マウスではHes1/7) の発現が時間的に振動していることに起因する。また、体節が形成される位置は、未分節領域に存在するFGF8の濃度勾配により決定される。本研究課題では、(1-1) 周期的に発現する体節時計遺伝子のシステムの同定、および(1-2) 体節時計遺伝子による周期シグナルとFGF8濃度勾配を統合したシステムの同定を目的として、そのための数理的手法の開発を行った。

(1-1) 体節時計の周期性を実現する分子システムに関しては、未だ不明な点が多い。マウスではHes7が体節時計として重要な役割を担っていることは分かっているが、周辺分子(LfngやNrarp)との関係や細胞外からの刺激入力(Notchシグナル)に対する応答特性は不明である。そこで、Hes7の発現周期の変化を予測対象として、周辺分子と刺激入力を包含したシステムを簡略化を行いつつ同定した。LfngとNrarpの発現はHes7によって抑制されるため、これらのタンパク質が発現可能な時間的位相はHes7と等しい。したがって、これらの分子をHes7そのものに置き換えると、入力であるNICD([NI])、Hes7のmRNA([mH])、出力であるHes7のタンパク質([pHes])の3変数からなるモデルで記述できる。LfngによるNICD抑制、およびNrarpによるNICD分解は、Hill型の容量応答曲線で近似した。LfngとNrarpの変数をHes7のそれへの置き換えによる省略された分子の相対的な効果は、Hill式のKd値に反映させることができ、最終的に4つのKd値(NICD→Hes7 mRNA生成、Hes7→Hes7 mRNA抑制、Hes7→Notch抑制、Hes7→NICD分解)がこの分子システムの挙動を決定する。



以上のミニマムモデルは、多くのパラメータ空間(生成速度係数、分解速度係数、遅延時間、Kd値)で、周期的なHes7発現を示す(右図)。遅延付きフィードバック抑制制御であったHes7のタンパクとmRNAが振動する機能を持っていることは先行研究(Lewis, 2003)で明らかになっていたが、ここでの問題は、それ以外の周辺のフィードバック(LfngとNrarp)が何を行っているかという点である。このうちLfngによるものは、確率的ゆらぎが大きいと

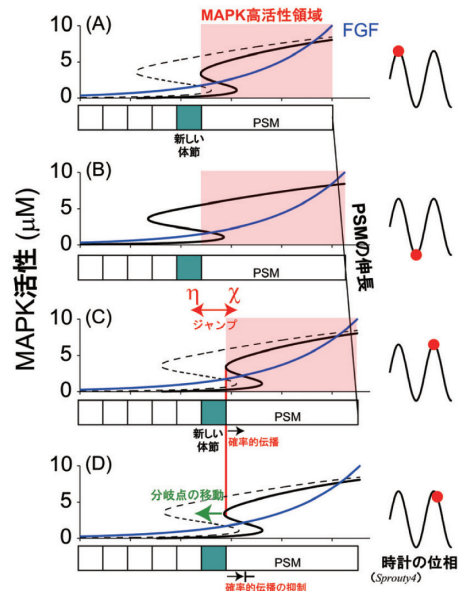
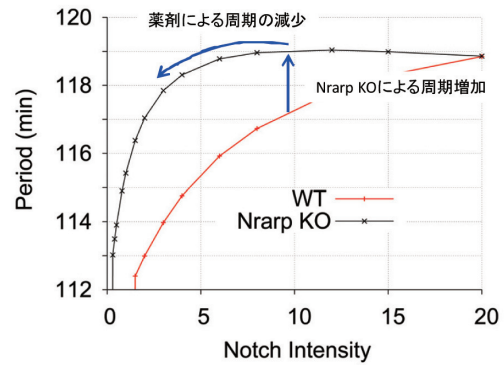


考えられるNotchシグナルを整流化し、NICDにHes7の周期情報を埋め込んでいることが分かる。NrarpもNICD分解という形で同様の効果が考えられるが、LfngがNICD生成において制御するのに対し、NrarpはNICDの分解であり、システム全体の周期性に影響を与える。そこで、このモデルを用い、野生型とNrarp KOの比較を行った結果、野生型は発現周期のNotchシグナル強度依存性を示すバンドが広く、Nrarp KOは発現周期の変動効果が小さいことが予測された。つまり、Nrarpは、Notchシグナルという生化学的情報をシステム全体の周期特性という時間情報に変換する役割を持つと可能性がある。この予見的知見を確認するために、Nrarp KOと薬剤投与による実験を行った結果、体節の数が有意に変化し、周期が変化していることを示すデータが得られた。この結果は、Hes7を中心とする周期振動システムが、その周期特性を変容させ得る「しなやかさ」を持ちながら体節形成を行っていることを示唆している。

(1-2) 未分節領域には、FGF8の濃度勾配が存在し、体節に近づくにつれて薄くなる。このFGF8の分布を人為的に上昇(減少)すると、体節が短く(長く)なる。また、体節の周期的形成

は、体節時計遺伝子の振動に起因する。したがって、未分節領域の細胞群は「体節時計遺伝子による周期シグナル」と「FGF8濃度勾配による位置情報」を統合することで、体節へと分化する。そこで、この非線形システム理論に基づきシステムの動作を予測できるミニマムモデルを構築した。

体節形成は、PSMの細胞が体節に分化するという、離散的なイベントである。したがって、細胞は「PSM状態」と「体節状態」の二つの状態を持つシステムである。この非線形性は、FGF8の下流分子であるMAPKが担うと考えられる。MAPKシグナル伝達の簡略化されたモデルから、PSMにおけるMAPKの活性状態を調べると、下図のようになる。高い活性状態が「PSM状態」に、低い活性状態が「体節状態」に対応する。MAPKの抑制因子であるSprouty4の発現量は体節時計に依存して振動している<sup>[1]</sup>。これをモデルに組み込むと、MAPKの活性状態（黒実線）は時計の位相に依存して振動する。この結果に基づき、体節形成を予測することができる。時計の振動のピーク時に、できたばかりの体節があるとする。半周期進んでも、MAPKの高活性領域は変化しない。さらに半周期進んで、時計が元の位相に戻ると、その間にPSMが伸長するので、高活性領域がジャンプし、 $\eta$ と $\chi$ の間の細胞はPSM状態から体節へと分化する。このモデルから予測されたMAPK高活性領域のジャンプは、実験的に確認された。さらにモデルから、時計遺伝子のKO変異体における不規則な体節形成の論理が予測される。細胞は集団として体節へ分化するので、「隣の細胞と同じ状態になろうとする細胞間相互作用」を導入し、遺伝子発現の「揺らぎ」を考えると、不規則な体節が自発的に形成される。また、体節時計はこの不規則性を抑制する効果があることが予測された。

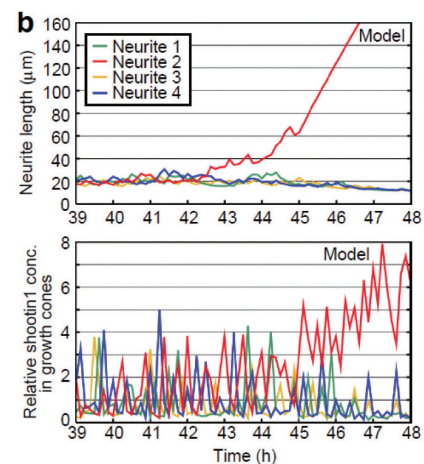
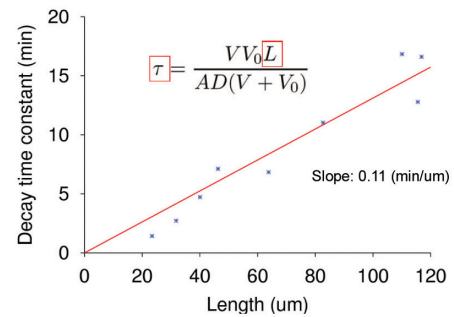


(2) 神経細胞は、発生過程において複数の突起を生成し、その中の一つが長くなることで軸索となり、残りは樹状突起となる（極性形成）。神経細胞実験グループによって発見されたタンパク質であるshootin1は、神経細胞の極性形成時に急激に発現量が増え、神経突起先端へとwaveにより、能動的に輸送される<sup>[6]</sup>。将来軸索となる神経突起の先端にshootin1が濃縮することで、突起が伸長され軸索になり、極性が形成される。一つの神経突起が十分に長くなると、極性は安定に維持される。たまに複数の神経突起が伸長することがあるが、最終的には一つの神経突起のみが長くなり、正確な極性形成が誘導される。つまり、神経細胞には、(1) 安定に極性形成を誘導するメカニズム、および(2) 複数の神経突起が伸びた場合、最終的には一本が選ばれる誤り補正のメカニズムが内在する。しかしながら、これらの動作原理は、未解明なままであった。本研究課題は、極性形成に関わるシステムについて統計的手法に基づき定量ミニマムモデルを構築することで、神経細胞の極性形成が予測できる程度にシミュレーションし、それにより上記の生物学機構を明らかにする

ことを目的とした。

神経突起先端に存在するshootin1の濃度とその突起の長さの時間変化に関するモデル化を行った。まず、濃度が増加する要因は時間離散的に発生するwaveによる。注目すべき点は、waveの発生時間間隔がPoisson過程ではなく、長い時間間隔について裾をもつガンマ分布状になっていることであり、これは極性形成において重要な意味を持つ可能性がある。次に、waveによって増加した濃度が減少する理由は、自由拡散である。

実際にフィックの法則に従うとしてモデルを構築し、神経細胞実験グループが取得したデータを数理解析したところ、モデルの予測結果と一致し、かつモデルパラメータも推定できた。すなわち、濃度変化に関するモデルが同定された。神経突起の長さに関しては、詳細なモデル構築は困難であるため、必要最低限の物理的な拘束条件を導入したミニマムモデルを作成した。Shootin1が細胞外基質と細胞内骨格とを連結するクラッチタンパク質であることが、神経細胞実験グループによって解明された<sup>[2]</sup>ので、(1) 突起先端のshootin1濃度依存の伸長力、(2) 細胞が本質的に持っている突起の縮退力（丸くならうとする力）、(3) 突起を維持する細胞骨格濃度、の3点を突起長のモデルに導入した。このモデルには未知パラメータがあるので、実験データに基づき同定した。上記の濃度と長さに関する定量モデルを独立に同定した後、これらを統合してシミュレーションを行った結果、ロバストな極性形成（1本のみが伸長する）過程を再現することができた（右図）。これは、1つの突起が伸び始めると他の突起の伸びが抑えられるという側抑制によることが分かった。さらに、複数の神経突起が伸びても、最終的には一本が選ばれる誤り補正のメカニズムを数理モデルの解析から予測することができた。このモデルにより、shootin1などの輸送される分子群の発現量を変化した場合の極性形成の変化を、統一的に理解することが可能になった。



### 3. まとめ

本課題では、生命システムを少数のパラメータで表現された定量的、数理的ミニマムモデルで記述することで、その動作原理を予測し、また、予測された結果を実験的に検証するというスタイルでの研究を実施した。これにより、脊椎動物の体節形成では、Notchシグナル強度から体節時計遺伝子の周期的発現の時間情報への変換メカニズムを提唱することができた。また「体節時計遺伝子による周期シグナル」と「FGF8濃度勾配による位置情報」を統合して、正確に体節が形成されるメカニズムを提案し、それから予測されたMAPK高活性領域のジャンプを実験的に確認した。神経細胞の極性形成では、実験結果の定量的解析を元に構築した数理モデルにより、軸索決定分子shootin1に基づく極性形成がシミュレーション可能になった。また、複数の神経突起が伸長しても最終的には一本の突起が選ばれる誤り補正の機構を示した。本研究開発終了後も、分子活性から体節位置、軸索となる突起を十分に予測できる数理的手法とモデルの開発について、さらに研究を進

める。

#### 4. 研究開発実施体制

代表研究者 石井 信 (京都大学 大学院情報学研究科)

研究開発題目

- (1) パラメータ推定技術・機能予想技術の開発

グループリーダー 石井 信 (京都大学 大学院情報学研究科)

- (2) 機能の予測技術の開発、および実験データへの適用

グループリーダー 作村 諭一 (奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科)

- (3) 生物個体の体節形成に関する実験、および予測技術の適用

グループリーダー 別所 康全 (奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科)

- (4) 細胞の極性形成に関する実験、および予測技術の適用

グループリーダー 稲垣 直之 (奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科)

#### 5. 参考文献

- [1] Hayashi S, Shimoda T, Nakajima M, Tsukada Y, Sakumura Y, Dale JK, Maroto M, Kohno K, Matsui T, Bessho Y. Sprouty4, an FGF inhibitor, displays cyclic gene expression under the control of the notch segmentation clock in the mouse PSM. *PLoS One*, 4(5):e5603, 2009.
- [2] 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. *Journal of Cell Biology*, 181, 817-829, 2008.
- [3] Maroto, M., Iimura, Y., Dale, J. K., and Bessho, Y. bHLH protein and their role in somitogenesis. *Somitogenesis; Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 638 (ed. Maroto, M. and Whittock, N. V.), 124-139, 2008.
- [4] Naoki, H., Sakumura, Y., Ishii, S. Stochastic control of spontaneous signal generation for gradient sensing in chemotaxis. *Journal of Theoretical Biology*, 255, 259-266, 2008.
- [5] 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 Computational Biology*, 4(11), e1000223, 2008.
- [6] Mori T., Wada, T., Suzuki, T., Kubota, Y., Inagaki, N. Singar1, a novel RUN domain-containing protein, suppresses formation of surplus axons for neuronal polarity, *Journal of Biological Chemistry*, 282, 19884-19893, 2007.