

1, シグナル伝達と符号・暗号 黒田真也

1, 生物におけるシグナル伝達とは？

シグナル伝達とは外部環境に対して細胞内に情報を伝達する経路や手段である（通信路、または符号化・複合化）。実際には、ホルモン・増殖因子等を介した外部環境の情報（入力）を、受容体・2次メッセンジャー等のシグナル伝達を介して下流の分子が構造変化・化学変化（主にリン酸化）をおこし（符号化・通信路・複合化）、分裂・細胞死・分化等の細胞応答（出力）を行う過程の経路や手段である。通信路の特性は（生化学反応モデルで記述した場合）微分方程式モデルで理解することができる。しかし、生物において何が情報か？と問われても、明確に答えるのは非常に難しい。現時点ではそもそも<何が情報かわからない>ので、符号化・複合化といわれても難しい問題となってしまう。

シグナル伝達における入力信号としてはホルモン（インスリン・アドレナリン）、神経伝達物質（グルタミン酸・アセチルコリン）、サイトカイン（インターロイキン）等が挙げられる。今回は入力信号としてサイトカインの一種である上皮成長因子（EGF）と神経性成長因子（NGF）の2つを用いた。

黒田研究室が行った研究を紹介する前に、シグナル伝達経路をモデル化し、数理的に解析する上で問題点を挙げる。

①、どの分子を観測すればよいか（すぐには）わからない。

→現在の分子生物学の主流は、ある生命現象にどの分子が関与しているか調べることである

②、入出力を含め全ての分子を観測できるわけではない

→一部の分子のみ測定可能。しかも分子種ごとに測定手法が異なる場合も

さらに観測手法が限定的（多くの測定手法は集団平均）

③、すべての分子を同時に計測できるわけではない

→ライブイメージングとエンドポイント

④、（多くの観測手法で）観測精度が低く、測定ノイズが大きい

このように現在の分子生物学においてシグナル伝達の数理解析を行うには多くの問題点が存在する。

次にシグナル伝達経路を、EGFの下流を例にして説明する。外部刺激であるEGFの情報はタンパク質のリン酸化反応により伝達される（0, 1の信号に近い）。EGFを入力としたときの細胞の出力は（PC12細胞では一般的に）増殖であるが、今回はシグナル伝達経路の中間に存在するpERK（リン酸化されたERK:核に移行し転写を促進する）を出力とした。ここで注意しなければならないことは、EGFがあれば常にERKがリン酸化されるわけではなく、EGFがあればERKがリン酸化される場合がある、ということである。つまり、常に「風が吹けば桶屋が儲かる」のではなくて「風が吹けば桶屋が儲かる場合がある」ということである。分子生物学の教科書で問題なのは、現象を最も特徴付けやすいもので表現してしまうことである（この場合EGF刺激=ERKのリン酸化）。そのためシステム生物学では、これらの関係を数式で定量的に記述することを一つの目的としている。

シグナル伝達経路の本質はなんだろうか？この答えの一つは、限られたシグナル伝達経路で多様な応答をすることである。細胞はこの問題を解決するために以下の2つの戦略を用いていると考えている。①組織ごとに発現する分子の種類を変えて、分子の組み合わせで多様性をふやす。②分子の活性化などの時間パターンに情報をコードする。今回の我々の研究の紹介では、生物も、電磁波が異なる波形に情報をのせられるように、ある分子の時間波形に情報をのせているという話を紹介する（一種の周波数応答と考えている）。実際に生物は分子を用いて色々な微分回路（みたいなもの）や積分回路を作ることができる（広く見たら周波数応答といえるかも）。また、場合によっては空間パターンを作

ることができるし、バイステイブルのようなスイッチ応答も作ることができる。化学反応のネットワークには大雑把に分ければフィードフォワード制御フィードバック制御があり、今回はフィードフォワード制御を用いた微分回路と積分回路について紹介する。

2, シグナル伝達機構の情報コーディング

PC12 細胞は、EGF 刺激で一過的な pERK の活性化を伴い増殖し、NGF 刺激で持続的な pERK の活性化を伴い分化する（*PC12 細胞は一過的な pERK の波形を作成することで増殖、持続的な波形を作成することで分化すると報告されている）（Fig.1）。一見不思議ではないが、これらの結果は現象（増殖・分化）を分子（pERK）に帰着させることが出来ない事実を示している（pERK の活性化＝細胞の増殖・分化ではない）。つまり同じ pERK の活性化でも、入力刺激が一旦＜pERK の時間波形＞に変換されていることを示している。

次にモデル化を行ったが、たかだか約 20 種類の分子種でも組み合わせもあるのでその量は膨大になり、常微分方程式を作成するにしても、速度定数・濃度などを実験では全て決められない。しかも、式を常微分方程式で作成するには論文を参照するが、非常に恣意的になってしまう。この様な理由から、我々は測定する分子を絞り、パラメータは実験でフィットした。式は分子の挙動が再現できたことで良しとした。このモデルは一見複雑だがエッセンスは単純で、pERK の活性化波形が一過的か持続的かどうかだけである。このように出力が単純にもかかわらず中身が複雑なのは、間違いなく出力を行うことを保証するためのものと思われる（生命の特徴の一つ）。

1) EGF による刺激

EGF による pERK の一過的な波形はいつから現れるのか？実験結果から pERK の一過性の波形は Ras から現れることがわかった（Fig.2）。そして Ras の一過的な波形は速い Ras の活性化（増やす項：SOS）と遅い不活性化（減らす項：RasGAP）の和からなっていることが実験から明らかになった（Fig.2）。次にこの実験結果を数学的に理解

するために、*in silico* model からエッセンスを抽出した *in silico* model を良く再現する simple model を作成した（Fig.3）。その後、式の無次元化を行い、式の性質を良く表すと思われる $1/q$ （見かけの速度定数）を求めた（Fig.4）。 $q < 1$ なら GAP（上記の RasGAP）より GEF（上記の SOS）が速いことを示しており、

ERKの時間波形が異なるだけで異なる現象を制御

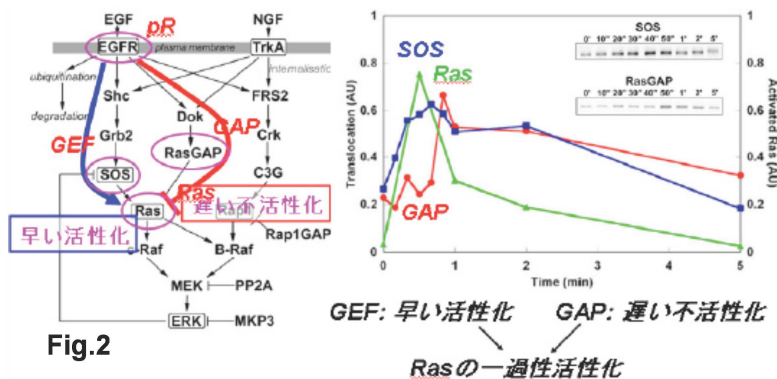
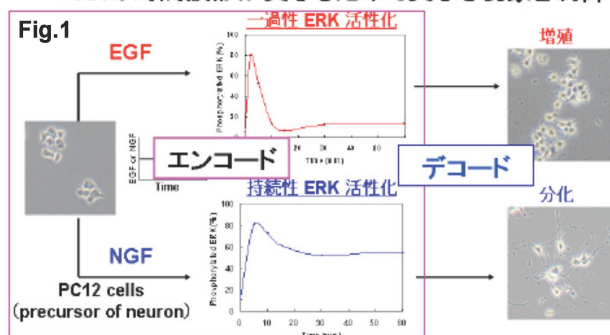


Fig.2

$$\begin{aligned}
 & \text{GEF}_i \xrightarrow{pR} \text{GEF} \\
 & \text{pR} \xrightarrow{\text{GAP}_i} \text{Ras} \\
 & \text{GAP}_i \xrightarrow{\text{Ras}} \text{GAP} \\
 & \text{Ras} \xrightarrow{\text{RasGAP}} \text{Ras} \\
 & \text{Ras} \xrightarrow{\text{SOS}} \text{Ras}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \frac{d[\text{GEF}]}{dt} &= k_1[pR][\text{GEF}_{\text{total}}] - [k_2[\text{GEF}]] \\
 \frac{d[\text{GAP}]}{dt} &= k_3[pR][\text{GAP}_{\text{total}}] - [k_4[\text{GAP}]] \\
 \frac{d[\text{Ras}]}{dt} &= k_5[\text{GEF}][\text{Ras}_{\text{total}}] - [k_6[\text{GAP}][\text{Ras}]]
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \frac{d[\text{GEF}]}{dt} &= pR - (1 + pR) \text{GEF} \\
 \frac{d[\text{GAP}]}{dt} &= q \{ p \cdot pR - (1 + p \cdot pR) \text{GAP} \} \\
 \frac{d[\text{Ras}]}{dt} &= s \left\{ \frac{\text{GEF}}{K_e} - \left(\frac{\text{GEF}}{K_e} + \text{GAP} \right) \text{Ras} \right\}
 \end{aligned}$$

Fig.3

$$\begin{aligned}
 & \text{pR} \quad \alpha \text{ (const.)} \\
 & \text{GEF} \quad \frac{d[\text{GEF}]}{dt} = pR - (1 + pR) \text{GEF} \\
 & \text{GAP} \quad \frac{d[\text{GAP}]}{dt} = q \{ p \cdot pR - (1 + p \cdot pR) \text{GAP} \} \\
 & \text{Ras} \quad \frac{d[\text{Ras}]}{dt} = s \left\{ \frac{\text{GEF}}{K_e} - \left(\frac{\text{GEF}}{K_e} + \text{GAP} \right) \text{Ras} \right\}
 \end{aligned}$$

$\alpha = 0.28, \quad p = 3.5, \quad q = 0.027, \quad K_e = 3.2, \quad s = 2$
 at EGF 1ng/ml *in silico*

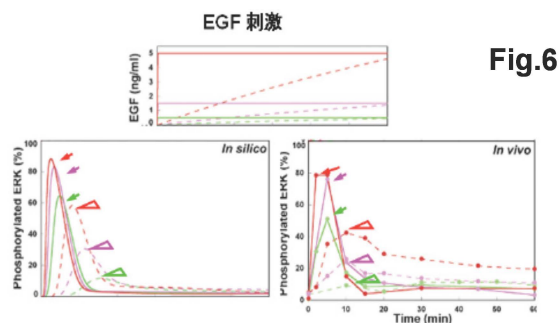
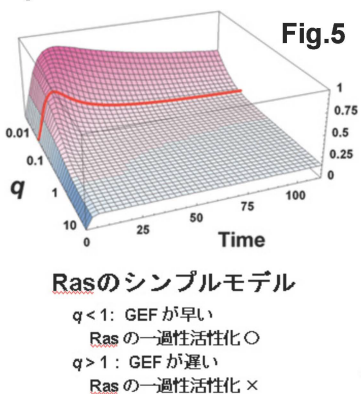
The relative time constant of GAP to GEF; $1/q$

$q < 1$, GEF is faster; $q > 1$, GAP is faster

Fig.4

Ras は一過性となる (Fig.5)。

また逆に $q > 1$ なら、Ras は一過性にならないことを示している。では何故このようになるか？それはステップ入力を与えているために (GAP と GEF の時定数より速い入力を与えているため) GAP と

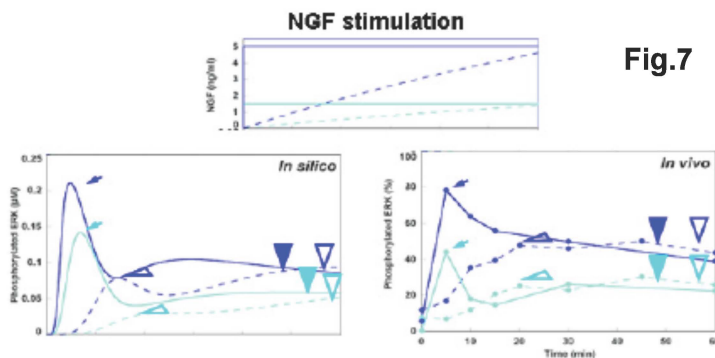


Rasのシステムは刺激の速度(強度ではない)を捉えていた。

GEF の時定数の差が際だつからである。そこで入力を遅くして GAP と GEF の時定数の差をなくしてみると (最終濃度は同じ)、Ras の一過的な波形はなくなっていく (Fig.6)。つまり、Ras の活性化のシステムは入力 (刺激) のスピードを捉えていることが示された。またスピードを変えるということは、GAP と GEF の相対的なスピードを変えることなので、前述の q を変えるということと同じである。このシミュレーションの結果は上記の実験の結果通りの挙動を示すことがわかった (Fig.6)。

2) NGF による刺激

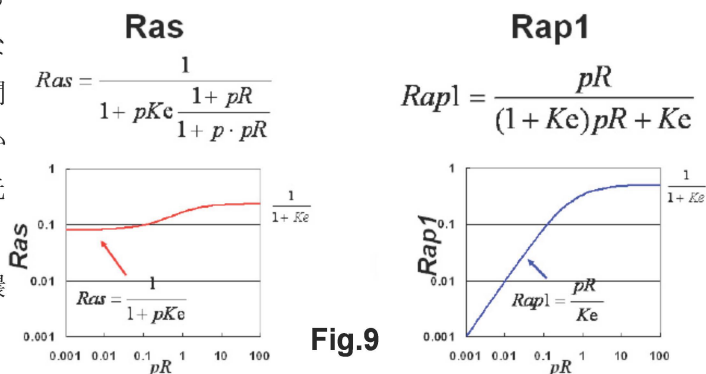
それでは NGF による持続性の波形はどのように出来るのか？EGF の時と同様に PC12 細胞に NGF のランプ刺激を与え、シミュレーションと実験でその挙動を比較した。その結果、Ras 依存の一過性の波形は消えるが、最終的に到達する活性化の値は同じになった (Fig.7)。つまり、NGF による pERK の活性化は NGF の濃度を捉えていると考えられた。それでは、どの様に濃度を捉えているのであろうか？ここでポイントとなるのが EGF とは違う NGF による ERK の活性化メカニズムである。NGF は Ras を活性化すると同時に Rap1 も活性化出来る。Ras と Rap1 は



持続性ERKの活性化 → NGFの最終濃度(強度)

似ているタンパク質であるが、不活性化の仕方が違うことが知られている。そこで、Rap1 に注目してモデルを作成した (Fig.8, 3)。次に EGF, NGF の方程式をそれぞれ解き、その定常状態について比較を行った (Fig. 9)。その結果、定常状態で Ras は刺激濃度によらず一定値をとることが式の上でも明らかになった (一過的な刺激になる)。この結果は、間違っ

て (神経に分化しようとしているにもかかわらず) EGF の入力が大量に入っても、元に戻る (関係ない) ということを示している。定常状態における Rap1 の活性は、生理的な濃度では (< 1)、濃度依存的に増加しており、



実験結果と合致している。つまり、**Rap1** のシステムは刺激の濃度を捉えていると考えられる。以上の **Ras** と **Rap1** の結果を別の観点からみると、**Ras** のシステムはバンドパスフィルタであり、**Rap1** のシステムは低周波フィルタであるとも考えることができ、それぞれのシステムは刺激の中の周波数を情報として取り出していると考えられる。つまり、上記の 2 つのシステムは刺激の速さ、強さを捕らえていると考えられるが、周波数応答と扱った方が適切かもしれない。

3, 今後

EGF, NGF による刺激の難点は、生体内での波形がわからないことである。そこで、生体内における時間情報の重要性を明らかにするために、現在インスリンに注目している。インスリン波形の重要性は古くから認識されており、実際に糖尿病の患者ではインスリンの速い成分が減弱する。また、糖尿病の患者では糖の吸収が鈍くなるが、脂肪合成は出来るとの報告がある（インスリンの速い成分が糖の吸収に関与し、遅い成分が脂肪合成に関与していると考えられる）。そこで我々はインスリンの時間波形がこれらの現象に関与している可能性に注目している。

4, 質問

Q1 : pERK のパターンは一過性、持続性の 2 つだけか？

A1 : 刺激がステップ入力ならこれだけ。通常、生物学の実験ではステップ入力しか使わない。他の入力刺激なら他の形をとる。

Q2 : 入出力のパターンで増殖と分化以外の第三の情報を伝えるか？

A2 : 可能性はあるが（誰も）調べていない。

Q3 : 何で GAP は SOS に比べて遅いのか？

A3 : GAP には酵素反応が入っており、これに時間が（より）かかるのではないか？

Q4 : 刺激のスピードを遅くしたとき（ランプ刺激）細胞は増殖するのか？

A4 : きれいには観察できていない。

Q5 : *in vivo*（生体内）での EGF のパターンは？

A5 : （おそらく）ステップとランプ入力の間。

Q6 : PC12 細胞を使った理由は？

A6 : pERK のパターンで増殖と分化が観察できるから。さらに、有名で手に入りやすかった。

Q7 : PC12 細胞の特性はどこに含まれている？

A7 : タンパク質量だろう。タンパク質は物質なので、速度定数は細胞種が変わっても変わらないはず。

Q8 : シンプルモデル中の GEF とは何か？

A8 : SOS のこと。