

2003年 CBI 学会大会 公開シンポジウム
「生体现象研究におけるシミュレーションと実験のクロストーク」

世話人/座長：菊地進一（慶應義塾大学・先端生命科学研究所）

近年、構成論的手法によって、生体现象のシミュレーションモデルを構築し、それを解析するといった新しい研究アプローチが盛んになってきている。しかし、それが実際に、実験科学者に役立つ知見を提供できているかと言えば、未踏の感があるだろう。その理由の1つに、相互理解の不足があると考えられる。

本シンポジウムでは、その中でもシミュレーションと実験科学が密接にコラボレーションをしている3つのグループに演者として御参加頂くことになった。1つの生体现象に対するシミュレーション研究と実験科学研究の2つの成果が、1つのセッションとして連続発表されるという極めてユニークな企画が実現した。これによって、「シミュレーションが実験科学に提唱できること」、「実験科学がシミュレーションに求めること」が明確になることを期待している。

また、もう1つの目的として、本シンポジウムから異分野の聴衆の交流が深まることを期待している。この公開シンポジウムから、シミュレーションと実験科学の新しい研究交流が形成されれば幸いである。是非、演者を始め、色々な方との交流を大いに深めて頂きたい。

本シンポジウムの演目概要と発表順は、次の通りである。

「赤血球の代謝」

中山洋一（慶大・先端生命研：シミュレーション）

末松誠（慶大・医：実験科学）

「MAPK系シグナル伝達」

畠山真理子（理研・GSC：実験科学）

木村周平（理研・GSC：シミュレーション）

「神経細胞のシグナル伝達」

菊地進一（慶大・先端生命研：シミュレーション）

竹居光太郎（横市大・医：実験科学）

詳しくは、アブストラクトの方を参照されたい。

「ヒト赤血球細胞の全代謝モデル構築に向けて」

中山洋一（慶應義塾大学・先端生命科学研究所）

ヒト赤血球は核を含まず、遺伝子の発現が起こらないことが知られており、その単純さからシミュレーションの対象として最適であると考えられる。また、ヒト赤血球は古くから代謝学的解析が行われており、これまでに膨大な実験データの蓄積が存在している。我々は特にデータが蓄積している主要な代謝経路である解糖系、ペントースリン酸経路、核酸代謝経路、簡単な膜輸送系の実験データを用いて E-CELL システム上に赤血球シミュレーションモデルを構築し、最も患者数の多い G6PD 欠損症の再現を試みた。その結果、当初モデル化された範囲では表現されていなかったグルタチオン生合成経路など標準状態の赤血球ではほとんど機能していない経路が、欠損症などの異常な条件下では重要な役割を果たすことが示唆された。この結果から、創薬などに応用できるヒト赤血球細胞のシミュレーションには、全代謝経路をモデル化することが不可欠であることが判明した。

このような酵素反応速度論をベースにしたモデルは 1960 年代から開発が続けられているが、細胞の全代謝モデルは未だ存在していない。そのようなモデルを構築する上で最も障害となっているのが、反応メカニズムに依存した反応速度式とそのパラメータ、また、細胞内の物質濃度などの動的モデルのための情報の不足である。最も生化学的な情報が収集されていると言って過言ではないヒト赤血球ですら、上記モデルで再現した主経路以外の部分の動的モデル情報はほとんど存在しないと言ってよい。この問題を解決するために、代謝工学の分野で用いられてきた代謝流速モデルと従来の酵素反応速度論をベースとしたモデルを組み合わせた動的/静的ハイブリッドシミュレーションアルゴリズムを開発した。このアルゴリズムを応用したハイブリッドモデルはボトルネックとなっている酵素の動的情報、および、その他の反応に関する化学量論係数のみで構成することができ、対象の細胞によっては 70% を超える動的情報の削減が可能となった。これにより、反応速度論的な実験解析、及び、物質濃度の定量実験を大幅に削減することが可能となり、また、その計算精度はすべてを詳細な反応速度式で構成された動的モデルと同等であることが示された。現在、CE-MS による細胞内代謝物質の一斉定量法を利用してヒト赤血球の細胞内代謝物質濃度の時系列データを収集し、ボトルネックとなる酵素の特定、および、一般化質量作用則とハイブリッド・アルゴリズムを組み合わせたモデル化手法で全代謝モデルの構築を行っている。

「Nitric oxide の微小循環系における代謝と赤血球の役割」

末松誠（慶應義塾大学・医学部・医化学教室）

NO は血管内皮細胞や神経細胞から生成され、soluble guanylate cyclase の prosthetic heme に結合し cGMP を上昇させたり、superoxide を消去することにより多彩な生物活性を発揮することが知られているが、生体局所での生成量や分布、代謝については不明な点が多い。我々は NO の一部が代謝されて生じる NO⁺と安定な複合体を形成する diaminofluorescein を in vivo の微小循環に負荷し局所の NO の分布と生成系酵素の分布の相関を解析し、いくつかの興味深い結果を得た。ラット腸間膜微小循環における解析の結果、血管壁の NO のリソースとしては細動脈では神経由来(NOS1)が優位であるのに対し、細静脈では血管内皮細胞由来(NOS3)が優位であること、局所の酵素活性を高濃度の阻害剤で阻害しても蛍光強度の約半分は抑制できないこと、さらに Vitamin C に依存して非酵素学的に生成されると思われる NO の fraction が存在し、赤血球はすくなくともそのリソースとして関与することが明らかになった。これらの知見から導かれる NO 代謝の最新の知見について概説する。

「Ras-ERK および PI3K-Akt クロストークを含む細胞内情報伝達モデル」

畠山真里子（理化学研究所・ゲノム科学総合研究センター・ゲノム情報科学グループ）

近年の細胞学的研究によって PI3K の種々の細胞内での役割がわかるにつれ、IGF などいくつかの成長ホルモンが PI3K およびその下流の Akt を活性化し、それが Raf-MEK-ERK を阻害するクロストークが細胞特異的に存在することが見出された。我々は ErbB4 リセプターを発現した CHO 細胞における細胞内情報伝達経路を調べる過程で、これと類似の機構が見られることを実験的に見出した。そして、その制御機構を理解するために Ras-ERK と PI3K-Akt とのクロストークを含む細胞内情報伝達機構についての数学モデルを作製した。モデルは、主にタンパク質相互作用に対しては質量作用則、酵素反応にはミカエリス-メンテン型の常微分方程式による記述を行い、既知の反応パラメータや酵素濃度は文献から求めた。未知のパラメータや酵素濃度に関しては、遺伝的アルゴリズム(GA)による推定を行った。これらの計算および分子の経時的変化のシミュレーション結果を示すグラフ表示機能を持つシミュレータ(YAGNS)は本研究室で開発した。シミュレーションの結果、ERK 経路と Akt 経路の制御機構は複雑であり、Akt による阻害だけでなく、各経路における特定のタンパク質間の親和性も系のダイナミクスに影響することが示された。

「MAPK 信号伝達系のモデル化における未知パラメータ推定」

木村周平（理化学研究所・ゲノム科学総合研究センター・ゲノム情報科学グループ）

シグナル伝達系のような生体内の化学反応系を理解するためには数理モデルを利用したコンピュータシミュレーションによる接近が有効である。このようなシミュレーションには反応の速度定数や化学種の初期濃度といったパラメータ値が不可欠である。しかし全てのパラメータ値を生化学実験によって予め得ることは困難な場合が多い。また *in vitro* で測定したパラメータ値が *in vivo* のモデルに適用できるという保証もない。そのため生化学実験によって容易に測定可能なデータから測定困難なパラメータ値を推定する技術が重要となる。本発表ではコンピュータシミュレーションのための生化学反応系のモデル化の方法について、Ras-ERK および PI3K-Akt クロストークを含む細胞内信号伝達系のモデル化を通して、特にパラメータ推定の観点から説明する。

「神経成長円錐におけるシグナル伝達のシミュレーション」

菊地進一（慶應義塾大学・先端生命科学研究所）

我々は、“E-Neuron project”と題して、神経細胞における様々な現象のシグナル伝達のシミュレーションを行っている。本発表では、神経成長円錐がシナプス結合を果たす相手を見つける、軸索ガイダンスと呼ばれるシグナル伝達のシミュレーションについて発表する。入力を L1 とし、出力を微小管の伸縮としている。カスケードとしては、Ca²⁺を中心としたシグナル伝達である PP1、PP2A、CaN、MAPK、CaMKII、PKA、PKC、PKG などのプロテインフォスファターゼ/キナーゼなどの複雑なクロストークから構成されている。非常にロバストなモデルであり、定常状態を保つ濃度範囲が広い。その状態から、入力刺激を与えることで、伸縮していく様子が観察される。さらに、我々は、未知のキネティックパラメータを予測する研究も同時に進めている。ここでは、遺伝的アルゴリズム、遺伝的プログラミング、動径基底関数ネットワークなどの手法の成果を紹介する。もう1つのモデル精緻化のアプローチとして、神経成長円錐シミュレーションでは、CALI 法という時間的に特性の分子を不活性化する実験にヒントを得て、E-CALI システムという概念を構築した。実験では行えない数の E-CALI シミュレーションをすることで、重要物質や重要経路の知見を提供することを目的としている。本シンポジウムでは、これらの構築とその成果を発表する。

「時空間的分子不活性化実験技術とシミュレーションモデルの精緻化:神経突起伸長モデルにおける CALI 法の適用」

竹居光太郎（横浜市立大学・医学部・薬理学講座，慶應義塾大学・先端生命科学研究所，科学技術振興事業団 CREST）

発生または再生時における伸長中の神経突起先端には運動性に富んだ神経成長円錐と呼ばれる特殊な構造体が存在する。神経成長円錐は外界刺激に応じて迅速に形態や運動性を変化させながら神経回路網の形成に寄与する。神経成長円錐の形態や運動性の変化は、遺伝子発現制御系と関連しない細胞局所の完結したシグナル伝達系によって制御されていると考えられている。このような単純なシグナル伝達系はシミュレーション実験系の構築に適する。我々は、神経突起伸長の制御機構を明らかにするため、神経成長円錐内のカルシウム依存性シグナル伝達経路を検討する一連の実験研究を行ってきた。その中、特定分子の時空間的な不活性化を実現するレーザー分子不活性化法（CALI 法）を用いて神経成長円錐内に局在する分子の機能を明らかにしてきた。この実験技術は時間軸上の或る時点から特定分子を瞬時に機能阻害することができるため、シミュレーションモデルにおける特定分子の不活性化の影響（CALI 効果）を実験科学的に生体内で検証することが可能となる。我々は複雑緻密なシグナル伝達系の制御システムの理解を求め、E-CELL システム上に神経突起伸長を司る神経成長円錐内のシグナル制御系のシミュレーションモデルを構築した。シミュレーションモデルにおける *in silico* CALI (E-CALI) 効果と生細胞における *in vivo* CALI 効果を比較検討することでシミュレーションモデルの精緻化を図る一方、生体における未知の機能分子の検索などにも功を奏する *in silico/ in vivo* 相互解析法を確立した。本シンポジウムでは、生体における CALI 実験の例を紹介し、E-CALI システムとの相互関係の意義を議論する。