

平成23年 5 月 25日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20770187

研究課題名(和文)

画像解析プログラムおよび数理モデルを用いた、「細胞極性の方向」の制御機構の解明

研究課題名(英文) Directional control of cell polarization revealed by quantitative measurement and mathematical modeling

研究代表者

荒田 幸信 (ARATA YUKINOBU)

独立行政法人理化学研究所・佐甲細胞情報研究室・研究員

研究者番号： 40360482

研究成果の概要(和文)：

我々の体を構成する細胞は極性を持っている。この細胞極性は、細胞内の極性タンパク質の動的平衡状態で維持されている。本研究では、共焦点画像の定量計測プログラムの作成、全反射顕微鏡および蛍光相関分光法(FCS)を行い、極性タンパク質分子の動きを定量的に計測することに成功した。これにより、動物の発生過程において細胞内でおこるタンパク質の非対称局在を物理、化学の枠組みで解析を行うための土台を作ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：

Cells polarize along with the axes of the animal body. Cell polarity is maintained by dynamic equilibrium of protein movements. In this study, I succeeded to apply and develop the new systems to reveal protein dynamics quantitatively to developmental biology (Edge-detection image processing program, Fluorescence correlation spectroscopy (FCS), Total internal reflection fluorescence microscope (TIRFM)). Based on the achievements of this study, I will carry out mathematical modeling to understand cell polarization as a dynamical system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生物学

キーワード：

画像解析プログラム、数理モデル、細胞極性、方向制御

1. 研究開始当初の背景

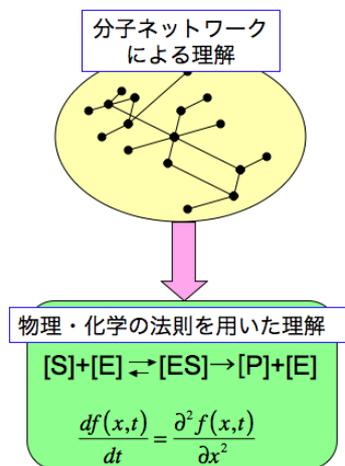
動物の発生において、遺伝子発現パターンは時間的に変化し、機能分子の局在パターンは細胞内または胚内において空間的に変化する。つまり、動物の発生は動的な過程である。

これまでに分子生物学は、発生現象を担う機能分子を多数同定し、機能分子間の関係は、複雑に絡み合うネットワークを形成していることを明らかにした。一方、実際の生体内では、機能分子は、物質科学の法則に従い細胞内を移動し、制御下にある分子に対し一定の速度で物理・生化学的反応を起こす。したがって、ネットワーク上で「矢印」でつながれた分子間の関係は、物理・化学の法則によって表現することが出来るはずである。

しかし、非常に多くの機能分子の生化学・物理的な反応が、時間的、空間的に協調して進行する「生化学反応ネットワークの構築原理」とはどのようなものであろうか？

動的な現象を支配する「生化学反応ネットワークの構築原理」を解明するためには、機能分子間の関係を物理・化学の法則を基礎として数理モデル、つまり「定量モデル」により表現する必要がある。「定量モデル」構築のためには、複数の分子の物理化学的パラメーターを生きた細胞内で計測する技術と、得られた定量データを解析する数理的アプローチが必要である。

計測技術に関しては、これまでは、細胞内の時間情報、空間情報を犠牲にし、解析を試験管内に移さなければならなかった。しかし、近年、生物物理分野において、生きた細胞内で、1つ1つのタンパク質分子の動きを直接観察する技術が開発されている。この技術を用いると、細胞内で起こる生化学反応の様々なパラメーター（分子数、反応速度定数、ミカエリス定数、拡散定数、輸送速度）を計測できる。これまでに、増殖因子の細胞膜結合定数の測定やシグナル伝達分子の構造変化の計測など、反応パラメーターの取得に成功している。この技術により、生命現象



を解析するための精密計測が可能になった。しかし、この技術を細胞レベル以上の高次の現象（たとえば動物の発生）に適用する試みはこれまでに例を見ない新しい挑戦である。

2. 研究の目的

本研究では、生物物理分野で発展してきた技術および数理的アプローチを、分子生物学的な解析が十分に進んだモデル生物「線虫」の「受精卵の細胞極性形成」に用いることにより、定量性・予測性を兼ね備えた新しい「定量発生生物学」を構築するための土台作りを行うことである。

3. 研究の方法

前側 PAR と後側 PAR の相互抑制反応を表す「濃度と移動速度」を表す関数を計測により決定し、反応拡散方程式を完成させる。そのために、タンパク質濃度は FCS(蛍光相関分光法)により、移動速度は一分子の直接観察により計測した。

a) FCS (蛍光相関分光法) を用いた、タンパク質濃度の測定

生細胞内の PAR タンパク質の正確な濃度測定は、FCS を用いて行った。FCS では励起光焦点の体積と励起光焦点内にある粒子数から細胞内に存在する濃度を決定することができる。濃度の計測は、胚を前後軸にそって5領域に分割し、それぞれの領域の細胞膜上、細胞質中での絶対濃度を計測した。細胞膜上、細胞質中の場所を再現性よく指定するために、FCS 計測の前に共焦点顕微鏡を用いて Z 軸方向に 0.5um 間隔で画像撮影を用いて正確な位置を計測した。

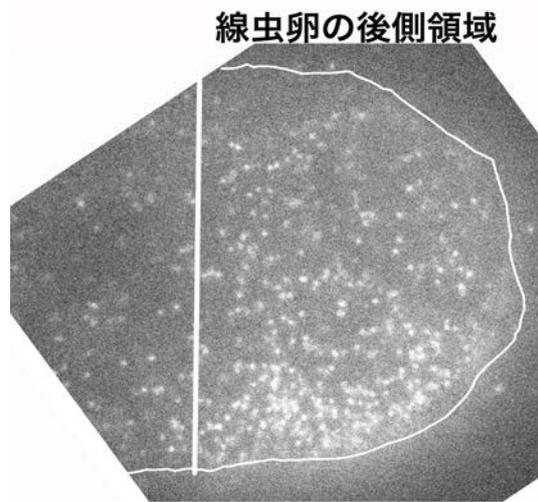
また、励起光焦点は Z 軸方向に長い楕球形をしていることが知られている。そのため細胞膜上を測定する際には、細胞質タンパク質成分も同時に計測してしまう。細胞質成分の粒子を除くために、粒子の拡散係数の違いを利用した。これまでに、細胞質の拡散係数は細胞膜成分に比べ2桁以上早いことが分かっているのでこの違いを利用し、正確な細胞内の各部位での濃度を決定した。

b) 一分子計測による、移動速度の測定、相互作用を表す関数の決定から「野生型モデル」の構築

一分子の動きを撮影したムービー上で、胚を FCS の計測と同様に5箇所に分けて、膜上への結合、乖離速度、膜上の移動速度を決定した。PAR タンパク質粒子の軌跡を Image J のマクロ (Particle tracker) を用いて追跡し、膜からの離脱および膜へ結合過程の反応速度を決定した。膜上では、タンパク質は、自由拡散による移動か、能動輸送による方向性をもった移動の二種類が考えられるので、輝点の軌跡が単位時間当たりどの程度の距離を移動したかを算出する（平均二乗変位を算出することにより、自由拡散であることを明らかにした。

4. 研究成果

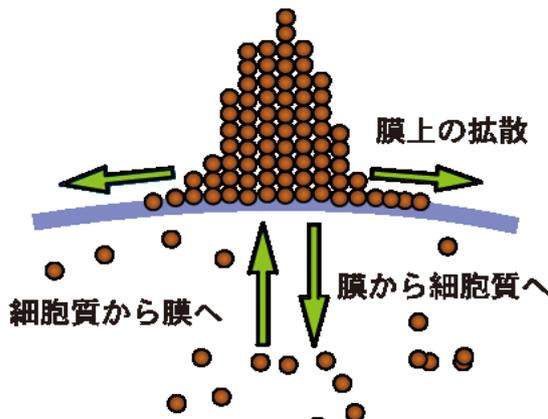
本研究により、生きた線虫胚の一分子計測に世界で初めて成功した(下図)。この結



GFP融合PAR-2粒子が後側領域に多く局在する様子

果から、膜上のPARタンパク質は、下図の3つの経路で移動することが明らかになった

3つの重要な動態



さらに、PAR-2タンパク質は、将来の前側と後側で細胞膜上への結合速度および乖離速度が異なっていることを明らかにした。また、細胞質に存在するPAR-2分子は共焦点顕微鏡を用いた観察では細胞内で対称に局在しているように見えるが、蛍光相関分光法(FCS)を用いた観察の結果、細胞質PAR-2タンパク質は将来の前側では2量体として、後ろ側では単量体として存在すること、および単量体で存在する後ろ側細胞質のPAR-2は拡散が前側より2倍程度遅いことを見つけた。これらのことは、PAR-2タンパク質は細胞質においても非対称に局在していることを示している。本研究課題により、これまでの遺伝学的な研究の枠組みを越え、新たに発生過程における細胞単離実験および細胞内のタンパク質動態

の計測にまで踏み込んだ研究を進めることに成功した。これにより、細胞内でおこるタンパク質の非対称局在を物理、化学の枠組みで解析を行うための土台を作ること成功した。

これにより、頭側PARと後側PARの非対称な局在パターンは、以下に示した反応拡散方程式(「野生型の定量モデル」)で表せることになる(「式」:この方程式は、頭側PARおよび後側PARを表す二因子と、移動経路を表す三変数(膜への移行、膜からの乖離、膜上での移動)で構成された単純なものである)。今後、この野生型モデルを、

二つの PAR タンパク質の濃度変化を表す

反応拡散方程式

$$\frac{\partial f(t,x)}{\partial t} = F_m(g(t,x))F_{cyto} - F_c(g(t,x))f(t,x) + D_f \frac{\partial^2 f(t,x)}{\partial x^2}$$

$$\frac{\partial g(t,x)}{\partial t} = G_m(f(t,x))G_{cyto} - G_c(f(t,x))g(t,x) + D_g \frac{\partial^2 g(t,x)}{\partial x^2}$$

「局在パターンの質的な変化」および「局在領域の定量的な変化」が報告されているさまざまな変異体においても「変異体の定量モデル」を計測によって決定することにより、両モデルを比較し、野生型と変異体の非対称局在パターンを統一的に説明できる「統合モデル」を構築する。この統合モデルを決定することは、同時に、これまで「ネットワーク上の矢印」でしか説明されていなかったPARシステムの構成因子の関係を、生化学反応として記述することと同義である。これまで明らでなかつた遺伝子の機能を含め、機能分子間の関係を化学反応速度論を基本とする反応拡散方程式上で説明する新しい手法が確立する点でもユニークな試みである。将来的には、PARネットワークのその他の構成因子において「変異体の定量モデル」を構築し、それらの「最終統合モデル」を構築する。「最終統合モデル」の数理的な解析により、「生化学反応ネットワークの構築原理」の全容が明らかになると期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Arata Yukinobu, Lee Jen-Yi, Goldstein Bob, Sawa Hitoshi

Extracellular control of PAR protein localization during asymmetric cell division in the *C. elegans* embryo

Development 2010

〔学会発表〕(計4件)

1. 第48回日本生物物理学会年会(宮城・2010年9月20~22日)

2. 第82回日本生化学会大会(兵庫・2009年10月21~24日)

3. 17th International C. elegans Meeting
(June 24-28, 2009)

4. 日本発生生物学会第 42 回大会 (新潟・
2009 年 5 月 28~31 日)

[その他]

<http://www.riken.jp/cell-info/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒田 幸信 (ARATA YUKINOBU)

独立行政法人理化学研究所・佐甲細胞情報研
究室・研究員

40360482

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者