

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770221

研究課題名(和文) 一分子精密定量計測と数理モデル化による細胞極性スケーリング機構の解明

研究課題名(英文) Scaling mechanism revealed by single-molecule detection technologies 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：動物の発生を考える上での古典的な問題の一つである「スケーリング」の物理的基盤を解明するために極性タンパク質PARに着目した。スケーリングの分子・物理的基盤を明らかにするために、1分子イメージングにより細胞内タンパク質動態を包括的に計測した。得られた物理パラメーターを数理モデルに導入し、非対称局在を再現することに成功した。計測結果とモデルの解析から、これまでの報告とは異なり、極性タンパク質PAR-2の非対称局在は細胞表層を拡散によって移動できないほど早い細胞膜と細胞質間の交換反応によって維持されることがわかった。今後、早い交換反応のスケーリング現象における機能を明らかにしていく。

研究成果の概要(英文)：Spatial distribution of morphogens and polarity proteins is scaled to cell and embryonic size. To reveal molecular and physical basis of the scaling, we measured intracellular protein dynamics using single-molecule detection technologies. By incorporating the parameters to describe the protein dynamics in vivo into a mathematical model, we succeeded in reproducing asymmetric localization of polarity protein PAR-2. Based on the in vivo measurements and theoretical analyses, we demonstrated that the asymmetric PAR-2 localization is maintained by a rapid-local exchange of PAR-2 between the cortex and cytoplasm. We will investigate how the rapid-local exchange contributes to the scaling.

研究分野：発生生物物理学

キーワード：細胞極性 PAR/aPKC 1分子イメージング 定量計測 数理モデル

1. 研究開始当初の背景

1) 発生や進化の過程では、個体サイズや細胞サイズが大きく変化するにもかかわらず“morphogen”や“細胞極性因子”の空間分布は同様のプロポーションで局在する。このスケリング現象は発生生物学において古典的な問題として知られている。このスケリング現象を保証する分子的、物理的基盤はわかっていない。

2) PAR/aPKC システムは、進化的に保存された極性システムである。このシステムの構成因子は、細胞の極性軸上の細胞膜に相補的に非対称に局在する少なくとも2つのグループに分類される。2つのグループの間では、お互いに膜上の局在を負に制御するリン酸化反応によって成り立っている。この相互抑制機構は、もともと局在していた場所から膜上を拡散によって反対の領域に移動し、そこで(おそらくリン酸化を受けることにより)解離するという長距離移動により成立するというモデルが提唱されていた(Goehring et al. 2011)。一方で、このような長い距離を拡散する分子は、細胞サイズが小さくなると非対称局在が一様化すると考えられる。しかし実際には、PAR-2 タンパク質の非対称局在は、受精卵の 1/6 から 1/10 しかない小さな生殖系列の P 細胞でも非対称局在を維持することができる(Arata et al. 2010)。PAR/aPKC システムは、細胞サイズが小さくても非対称局在を維持するスケリング能を持っていると考えられるが、その分子的・物理的機構はわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では、1 分子観察技術および数理モデルを用い PAR-2 タンパク質の動態を定量的に計測し、計測データに基づいて数理モデルを構築する。計測とモデル解析により、スケリング能を実現する分子的・物理的基盤を明らかにする。

3. 研究の方法

極性タンパク質の非対称局在を理解するために重要な細胞内タンパク質動態は、1) 細胞膜上の拡散、2) 膜から細胞質への解離、3) 細胞質内の拡散、4) 細胞質から細胞膜への結合の4種類に分類できる。これまでに、Fluorescence recovery after photobleach (FRAP)により、極性タンパク質 PAR-2 の動態が計測されてきたが、本研究では1分子観察技術を用いより高時間分解・高空間分解で PAR-2 タンパク質の動態を定量計測する。また、1分子イメージングと蛍光相関分光法(FCS)を相補的に用いることにより、上記の細胞内動態を表す物理パラメーターを包括的に取得する。それぞれのパラメーターを数理モデルに導入し、非対称局在を再現する十分条件を検討する。さらに、実際の細胞内分子の動態と数理モデル上の解析により、スケリング

の分子機構および数理的原理を明らかにする。

4. 研究成果

全反射蛍光顕微鏡を用いることにより、生きた線虫胚で、極性タンパク質 PAR-2 の 1 分子イメージングに成功した(図1)

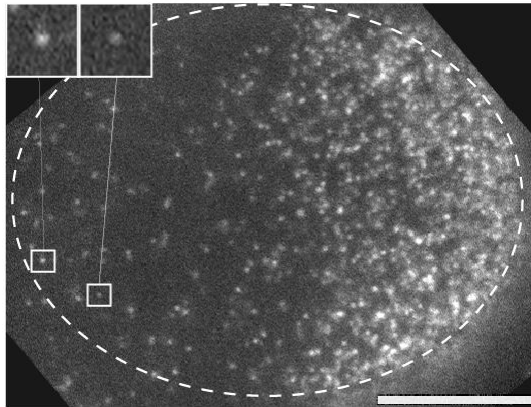


図1: 全反射顕微鏡を用いた GFP 融合 PAR-2 分子の 1 分子イメージング。白い輝点が GFP::PAR-2 分子。図の左右(胚の極性軸)に沿って膜上の輝点が非対称に分布していた。点線は線虫胚の細胞外周。輝点ごとに明るさ(GFP::PAR-2 分子の重合度)が異なることに注意(左上)。

蛍光輝点の動きを解析することにより、膜上での移動を解析した。膜上の輝点は、胚の極性軸を通じて方向性を持たず、速度も一様な単純拡散であった。このことから、非対称局在は膜上で PAR-2 の動きを制御することによって成立するのではないことが明らかになった。

次に、膜からの解離速度を解析した。PAR-2 にはサブ秒から分のオーダーの時定数で膜から解離する複数の成分が存在していた。疑似リン酸化点変異を持つ PAR-2 と PAR-2 をリン酸化する *pkc-3RNAi* 胚における PAR-2 の動態を比較することにより、この時定数の違いは、PAR-2 のリン酸化度合いと重合度の違いによって作り出さ

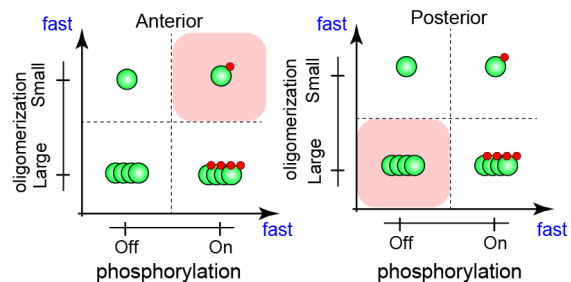


図2: PAR-2 の膜上の滞在時間はリン酸化と重合度によって制御されていた。胚の極性軸の両端において PAR-2 の分子状態は異なっている。将来の頭側では低重合度・高リン酸化 PAR-2、尾側では、高重合度・低リン酸化状態の PAR-2 が分布している。リン酸化と重合度の制御により、細胞内での動態が制御されていた。

れることを明らかにした(図2)。胚の極性軸に従って解離速度の変化を調べると、胚の中央付近で急峻に解離速度が遅くなるような非線形な変化があることが分かった。

リン酸化と重合度の違いには、PAR-2 の解離時定数を極性軸に沿って非線形に変化させるために機能していると考えられる。1 分子計測により、PAR-2 の解離速度はこれまでの FRAP の計測で報告されていたよりも、100-1000 倍早い新しい成分により制御されていることが明らかになった。

さらに、1 分子イメージングによる計測結果と FCS による濃度の計測結果から、細胞質から細胞膜への結合速度を計測した。これまでは、細胞質での PAR-2 分布が一様であることなどから、細胞膜への結合速度は空間一様と考えられていた。しかし、予想外にも細胞質から細胞膜上に結合する速度定数も極性軸に沿って非対称であった。膜への結合速度を非対称にするメカニズムはわかっていないが、膜と細胞質の間で正のフィードバック機構があると考えられる。さらに、細胞質の拡散速度は FCS によって見積もった。

これらの細胞内動態の計測から得られた物理パラメーターを数理モデル上に導入して非対称局在が再現できるかを解析した。その結果、この細胞膜への結合と膜からの解離過程における PAR-2 動態の線形および非線形な制御は、非対称局在を維持するために十分であることが明らかになった。この十分条件の証明から、PAR-2 の局所的で早い細胞膜-細胞質間の交換反応が非対称局在の維持に中心的な働きをしていることを示している (図 3)。

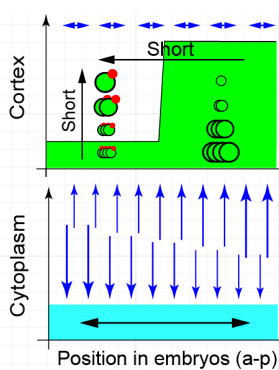


図 3 : PAR-2 の膜上拡散距離は、これまでの報告とは異なり、局所的な細胞質との交換反応により維持されていた (横向き青矢印)。膜からの解離と結合は、空間非対称であった (青縦向き矢印)。黒横向き矢印は細胞質拡散を表す。緑丸、赤丸はそれぞれ PAR-2 とリン酸基。分子状態の異なる PAR-2 が空間非対称に分布していた

これまでの PAR-2 の膜上距離が非常に長いとするこれまでの報告 (Gohering et al. 2010) では、膜上拡散距離は、PAR-2 が膜上に一様に分布する *pkc-3RNAi* において計測されていたこと、および、この論文の supplemental data に報告されていた野生型での拡散距離は我々の 1 分子計測の結果とほぼ一致することなどから、野生型における PAR-2 が膜上を移動する距離は、早い細胞膜と細胞質間の交換反応によって、局在する領域サイズに比べ非常に短く、局所的で早い交換反応によって成立していることなどから我々の計測の artifact によるものではないと考えられる。

さらに、数理モデル上で物理パラメーターを仮想的に変化させ、早い細胞膜-細胞

質間の交換反応の役割を解析したところ、早い交換反応は非対称局在を一様化する膜上の拡散の効果を抑制し、非対称局在を安定に維持するとともに、非対称な局在分布が定常からずれた場合に、迅速に元の定常状態に戻すという二つの効果を両立させていることが明らかになった。

誘因物質の濃度勾配に依存して移動する細胞の極性タンパク質 PTEN でも、同様の早い時定数で交換反応が起こる成分が報告されている。外環境の変化に合わせて迅速な細胞応答を引き起こす細胞移動のためのメカニズムと、細胞サイズなどの外環境の変化に応答して柔軟で早い細胞応答をするメカニズムとの共通点が明らかになってきた。早い交換反応はスケーリングのメカニズムの一部として貢献している可能性がある。

<引用文献>

Gohering et al. 2011 *JCB*.

Arata et al. 2010 *Development*

#### 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)

1. Power law relationship between cell cycle duration and cell volume in the early embryonic development of *Caenorhabditis elegans* *Frontiers in Physiology* (2015) 査読有り Yukinobu Arata\*, Hiroaki Takagi, Yasushi Sako and Hitoshi Sawa この発表論文において、申請者\* は corresponding author

[学会発表](計 5 件)

- 1) (招待講演) 荒田幸信 動物初期胚における極性タンパク質の局在分布の “Steepness” 定量生物学の会 第七回年会 2015/1/11-12 九州大学筑紫キャンパス (福岡県、春日市)
- 2) (ポスター) 荒田幸信、他 5 名 PAR polarity protein dynamics in the presence of ATP production inhibitor Azide in *C. elegans* embryos 「理論と実験」研究会 2014/10/9-10 広島大学東広島キャンパス (広島、東広島)
- 3) (ポスター) Yukinobu Arata et. al. (6 authors in total) Stable maintenance of the cortical PAR-2 asymmetry by the cytoplasmic diffusion in the one-cell

*C. elegans* embryo 第 52 回日本生物物理学会年会 2014/9/25-27、札幌コンベンションセンター（北海道、札幌）

- 4) (ポスター) Yukinobu Arata et. al. (6 authors in total) Measurement-based mathematical modeling of PAR-2 protein localization in *C. elegans* embryo. The 6th Asia-Pacific *C. elegans* meeting 2014/7/15-19、奈良県新公会堂(奈良県、奈良市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.biophys.jp/highschool/C-09.html>  
<http://www.riken.jp/cell-info/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

荒田 幸信 (ARATA, Yukinobu)  
理化学研究所・佐甲細胞情報研究室・研究員  
研究者番号：40360482

##### (2) 研究分担者

該当なし ( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

該当なし ( )

研究者番号：