

課題名 (タイトル) :

## 高性能生化学ネットワークシミュレーションの研究

利用者氏名 : ○高橋 恒一, 小泉 守義, 海津 一成, サティア・アルジュナン  
渡部 匡己, 岩本 一成, 西田 孝三, 宮内 敦所属 : 神戸研究所 生命科学研究センター  
生命モデリングコア生化学シミュレーション研究チーム高度情報科学技術研究機構

## 1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

分子生物学、生化学の飛躍的な進歩と共に、計算生物学の分野でも細胞シミュレーションが大きく発展してきた。

さらに近年、FRET や FCS といった単分子解像度での計測技術の確立に伴い、細胞シミュレーションの分野でも 1 分子粒度での生化学反応ネットワークシミュレーション技術の確立が重要になりつつある。

1 分子粒度シミュレーションが対象とする生命システムは細胞の環境応答や発生・分化など多岐にわたる。とりわけ、分子の少数性や局在、細胞環境の影響を強く受けると考えられる信号伝達系や遺伝子発現系では、*in vitro* 実験のような関わる分子の数が十分に多く、希薄な溶媒における均一な攪拌系とは大きく異なった特性を示すことが容易に想像できる。また近年、理論・実験共にそのような例が実際に示されつつある。1 分子粒度シミュレーションを単分子解像度の *in vivo* 計測系と組み合わせる事でこうした細胞特異的な反応系の特性を明かにすることが可能であろう。

しかしながら、細胞内反応拡散系の 1 分子粒度シミュレーションは、1) 1 千万粒子以上の超多体、2) 数 mM の超高分子濃度での分子混雑、3) 超多タンパク質間相互作用など、従来の技術の延長では解決困難な多くの課題を含んでいる。

## 2. 具体的な利用内容、計算方法

## 2.1 基盤となる計算方法

本研究では対象とする系の特徴に応じて、enhanced

Green's Function Reaction Dynamics (以下、eGFRD) 法と微視格子 (Spatioocyte) 法と呼ばれる 2 種類の計算技法を用いている。

## 2.1.2. eGFRD 法

eGFRD 法とは、各分子の周囲の状況に応じて、ブラウン動力学法、Gillespie 法、GFRD 法を局所的に選択・適用し、離散イベントシミュレーションとして逐次的に計算する新規の高性能アルゴリズムである。これにより、従来の手法と比べて、非常に高精度な計算を高速に計算することができる。

eGFRD 法は計算に反応拡散系の厳密解であるグリーン関数を用いているため、分子直径程度の距離相関や数ナノ秒程度の時間スケールに対しても正確な結果を得ることができる。また、様々な大きさの粒子が混在することも可能であるため、細かい時空間解像度が要求されるゆらぎの計算や分子混雑の厳密計算に非常に適している。

## 2.1.3. 微視格子法

微視格子法は、空間を 1 分子粒度の微細な格子に分割し、分子の拡散をその格子上の動きとして表現したものである。これにより、短い時間スケールでは eGFRD 法と比べて不正確だが、分子混雑など高濃度のシミュレーションや大規模なモデルを長時間走らせる場合でも性能を発揮できる。

また、細胞内の複雑な構造も粒子 (脂質分子などの構造タンパク質を表現する) の集まりとして表現することが可能であるため、実際の細胞に近い複雑で入り組んだ細胞内環境を再現し、その細胞内動態を明かにす

る必要のある 1 細胞シミュレーションにおいて特に重要な技法である。

## 2.2 利用内容

本研究では (1) 1 分子粒度シミュレーション技法の開発と (2) それを用いた信号伝達系のシミュレーションを行う。

### 2.2.1. eGFRD 法、及び、微視格子法の改良・拡張による 1 分子粒度シミュレーション技法の開発

本プロジェクトではこれら 2 つの計算技法を基盤としているが、世界的に見ても 1 分子粒度反応拡散シミュレーション技法はまだ開発途上の分野であり、研究を進める中で継続的にその改良・拡張を行ってきた。これにより、1 分子粒度シミュレーション研究を行う上での標準的なソフトウェアとして普及する事も目的としている。

特に微視格子法については、京コンピュータでの運用を目的として、大規模並列計算機における並列計算手法の開発と性能解析を行っている。次項で述べるように高等真核細胞について、細胞スケールで 1 分子粒度シミュレーションを行うためには非常に多くの計算量が必要である。1 分子から細胞の動態へというスケールの壁を越えるためには、こうした大規模計算機を用いた並列計算が必要不可欠である。

### 2.2.2. 上皮細胞成長因子受容体 (以下、EGFR) 経路対象とする、細胞環境を考慮した 1 分子粒度シミュレーション

EGFR 経路は、ヒトをはじめとした高等真核細胞の信号伝達系の中でも最も良く調べられてきた経路のひとつである。EGFR 経路は細胞の成長・分化に関わっており、細胞のガン化、幹細胞の分化をはじめとして応用面においても非常に重要なものである。計算生物学 (システムバイオロジー) の分野でも、生化学的な実験結果や分子生物学的な知見に基づいた詳細なモデリングが行われてきた。

しかし一方で、近年の技術の進歩に伴う細胞内の詳細な計測により、これまでのモデリングではしばしば見落とされてきた、様々な分子の細胞内局在、足場タンパク質の存在、少数分子の重要性、分子の構造多型、細胞内環境の影響などが次第に問われるようになってきた。

今回は 1 分子粒度での EGFR 経路の「細胞まるごとモデリング」へ向けた試みと、信号伝達経路における分子局在、分子混雑下での反応特性に着目し、考察する。

## 3. 結果

### 3.1. クラスタリングの信号伝達特性への影響

膜上分子のクラスタリングは原核生物から高等真核細胞に至るまで様々な信号伝達経路においてみられる現象である。我々は今回、eGFRD 法を用いて、クラスタリングが信号伝達経路に与える影響、さらにはクラスタリングによって生じる新しい特性について明かにした。

今回は分子の二重リン酸化サイクル系を用いてその酵素が膜上でクラスタを形成していた場合にその入出力応答がどのように変化するかを調べた。二重リン酸化サイクル系は基質とリン酸化酵素と脱リン酸化酵素からなる単純なモデルであるが、双安定性などの信号伝達特性を再現できるだけでなく、実際の信号伝達経路でも一般にみられるモチーフのひとつである (図 1)。

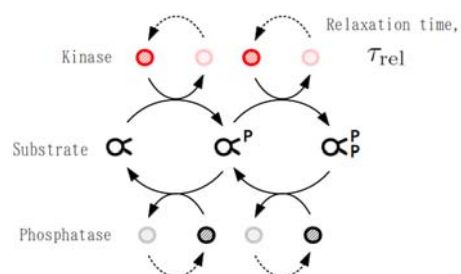


図 1. 二重リン酸化サイクル系の模式図

まず前段階として単一リン酸化サイクル系においてクラスタリングの影響を調べた。リン酸化酵素が膜上に均一に分布している場合と、8 分子ずつが分子直径のおよそ 5 倍の直径を持つクラスタに属するように配置し

た場合とでその入出力応答の違いをシミュレーションした。基質分子への結合反応が拡散律速である場合、酵素の飽和条件下でその応答はクラスタ形成によってほとんど影響を受けなかったが、不飽和条件下ではシグナル伝達が著しく阻害されることがわかった。この効果は常に阻害として働き、増強作用は見られない。

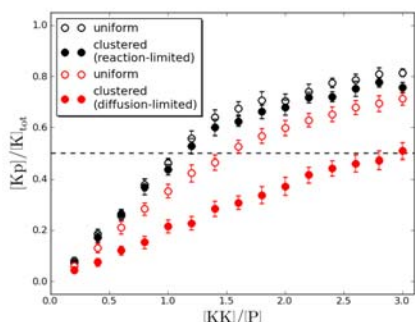


図 2. 不飽和条件下での単一リン酸化モデルにおけるクラスタリングの影響

次に二重リン酸化系についても同様のシミュレーションを行った。その結果、不飽和条件下では単一リン酸化の場合と同様にシグナル強度を弱めるのに加えて、その超感受性をも下げることが示した (図 3 上)。さらに興味深いことに、二重リン酸化系は飽和条件下において双安定性を示すことが知られているが、クラスタ形成はこの双安定条件下でシグナル強度を増強することがわかった (図 3 下)。さらに解析によってこの効果が、分子の再結合によることが示されている。

以上の結果は二重リン酸化による双安定性を利用することで、膜上での数分子のクラスタ形成、すなわち位置的な相関関係を感じ、応答することができることを示している。また、入力ノイズが空間的に均一であり、一方で特定の入力クラスタを通じて行われる場合、ノイズだけを効率的に除去することができる。本研究は、膜上ラフトやフェンスモデルなどによる微小ドメインによるクラスタ形成の新たな機能について示したと言える。

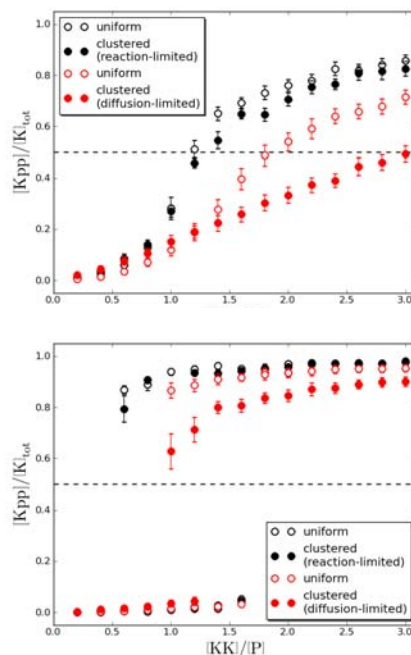


図 3. 二重リン酸化モデルにおけるクラスタリングの影響。不飽和条件下 (上図) と飽和条件下 (下図)

### 3.2. 分子混雑の信号伝達特性への影響

システムバイオロジーの発展は同時に酵素反応論に基づく信号伝達経路のモデリングを推し進めてきた。しかしながら、一般に *in vitro* な系で用いられる溶媒と違い、細胞内は様々な細胞骨格や細胞内小器官が存在するだけでなく、数 mM にも及ぶ分子がひしめきあう分子混雑の状況にある。それら分子の充填率は 30% を越えると考えられている。こうした特異な環境下において生化学反応特性がどのような影響を受けるのかはまだ十分に知られているとは言えない。

そこで我々はこうした分子混雑、特にその排除体積効果が二重リン酸化サイクル系の特性に与える影響をブラウン動力学法 (メトロポリス法) を用いて示した。本研究では分子混雑下での分子の再結合とスモールコフスキー型反応式との関係性に着目し、RICC 上でのサンプリングを行った。まず、先年度までのプロジェクトで得られていたように分子混雑中の拡散速度は非混雑下と比べ、およそ半分程度まで遅くなる (終端拡散速度) が、その動態はおおよそ数マイクロ秒程度で変化していくことを確認した。再結合の起こる時間スケールもおおよそ数マイクロ秒であり、既存の研究で言われていたような終端拡散速度のみを考慮した方法は適切で

ない。実際、今回の計算により、こうした微小時間スケールにおける拡散動態が再結合反応において非常に重要であることが示されている。

また、こうした再結合への効果は通常の 2 次反応においても現れており、結合定数の時間依存性を確認したところ、微小時間スケールにおいて通常のスモルコフスキー型とは異なる動態が確認された。このことは二重リン酸化サイクルのような単純な系においても分子混雑が特性を大きく変化させうることを意味している。今回の結果を元に分子混雑下での酵素反応速度論を構築していくことで、理論・計算の両面において様々な信号伝達経路への応用を目指している。

### 3.3. EGFR 経路の 1 分子粒度シミュレーションモデルの構築

前述の通り、EGFR 経路は高等真核細胞の信号伝達経路の中でも詳細に調べられてきたものの一つであり、その応用も多岐に渡る。我々は既存の生化学的測定、分子生物学的な知見、そして 1 分子粒度測定技術による計測結果を基に EGFR 経路モデルの構築を行い、その「1 分子粒度での細胞まるごとモデリング/シミュレーション」を目標に研究を進めている。

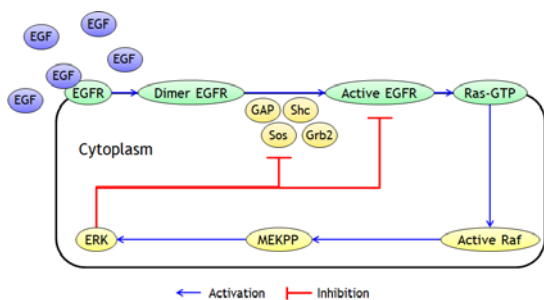


図 4. EGFR 経路モデルの概要

今年度ではまず既存のモデルを改変し、微視格子法を用いて、細胞膜と細胞質を含む領域での 1 分子粒度シミュレーションを行った (図 4)。

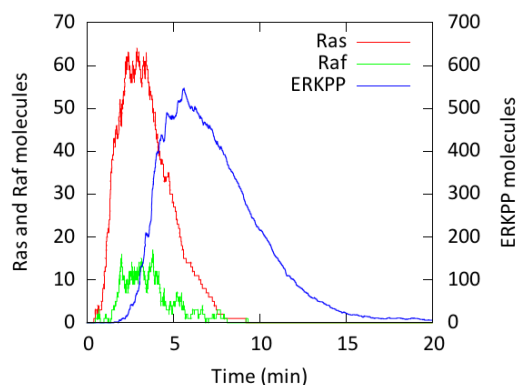


図 5. EGFR 経路モデルのシミュレーション結果の一例

EGFR 経路では EGF 受容体など多くの分子が膜状に局在するため、既存の数値モデルから生化学実験による測定結果を再現するようパラメータの改変を行った (図 5)。このように空間局在がある場合には均一系とは大きく異なったパラメータとなるため、1 分子観察技術などにより得られたパラメータを用いるには陽な空間表現によるモデリング、すなわち 1 分子粒度シミュレーションが必要不可欠である。

今年度では、このモデルを用いて予備的なシミュレーションを進めており、次年度以降 RICC 上での本格的な計算を行う予定である。

### 3.4. 微視格子法の並列化手法の開発

微視格子法は空間を微小な格子に分割することによって分子混雑下のような高濃度条件下においても、高効率な 1 分子粒度シミュレーションを実現することができる。しかし、格子の大きさを分子の粒度 (数ナノメートル) 単位まで小さくした場合、高等真核細胞などの細胞をまるごとシミュレーションするためには並列計算は欠かすことができない。

我々は空間を大きく分割し、その各々を各 CPU に割り振ることによって微視格子法の並列化を可能にした。先年度までにそのプロトタイプとして拡散のみを含むモデルを対象に並列化の性能評価を行ってきた。

今年度では、拡散に加えて反応を含むモデルの並列化に取り組み、実現した。この実装では分子の 1 次反応

## 平成 23 年度 RICC 利用報告書

だけでなく、2 次反応形式の分子間反応も可能であるため、EGFR 経路をはじめとした実用的なモデルへの応用が可能となった。また、その並列化効率も拡散のみの場合とほぼ同様であり、分子混雑下で数千コアまでの実行性能が得られることを確認している。

### 4. まとめ

### 5. 今後の計画・展望

今後も eGFRD 法、微視格子法の両 1 分子粒度シミュレーション技法の開発を継続して行う。重要な改良点として細胞の構造表現の実装が挙げられる。計算技法だけでなく、細胞まるごとモデリング/シミュレーションを目標とする EGFR 経路についても、細胞の形状や核、細胞内小器官、細胞骨格などを取り入れるとともに、分子の局在制御についても導入していく。

また、並列計算手法の開発は最も重要な問題の一つである。今期の成果でも示したとおり、微視格子法の並列計算化は拡散に加えて反応の実装が実現された。今後複雑なネットワークへの対応を経て、細胞環境、特に分子混雑下での EGFR 経路モデルのシミュレーションを行い、並列計算の効率や実用性についてまとめていく。さらに今後は eGFRD 法の並列化手法 (pGFRD 法) の実現についても検討中であり、次年度以降、微視格子法と共に実装していく計画である。

続いて生物学的な成果として、今期は分子クラスタリングと分子混雑といった細胞内環境が反応系 (信号伝達経路、遺伝子発現系) の特性に与える影響について調べた。今回示した細胞内環境の影響を理論の基盤として、今後は複雑な細胞環境下での実際の生命現象に即したモデルについて検討していく予定である。

さらに前述の通り、今年度 EGFR 経路のモデリングを行い、生化学実験結果と一致するプロトタイプモデルを構築した。現在通常の計算機を用いた計算により、分子の少数性などに起因する細胞応答の不均一性について明らかになりつつある。応答不均一性のシミュレーションには単一のモデルに対して非常に多くの試行が

必要であり、今後並列計算の必要性はますます高まるだろう。細胞応答の不均一性は、生物学的にも非常に重要なテーマの一つであり、より詳細なモデルを作成し、解析を行っていくことで来年度以降の主要な問題として取り組んでいく予定である。

6. RICC の継続利用を希望の場合は、これまで利用した状況 (どの程度研究が進んだか、研究においてどこまで計算出来て、何が出来ていないか) や、継続して利用する際に行う具体的な内容

微視格子法の並列計算手法については今年度までに反応と拡散を含んだプロトタイプが完成しつつある。次年度以降ではプロトタイプの性能評価を行い、詳細なチューニングを行うと共に、実際に研究で用いている EGFR 経路などのモデルを用いた 1 細胞スケールのシミュレーションに本格的に取り組んでいきたいと考えている。eGFRD 法の並列計算化はこれまで困難であると考えられていたが、今年度、新たな並列計算手法をまとめつつある。次年度以降ではこの eGFRD 法の並列計算技法を実装していく。

細胞環境を考慮したシミュレーションでは、分子クラスタリング、分子混雑が二重リン酸化サイクル系の特性に与える影響を示した。多重修飾系は MAPK をはじめとした信号伝達経路などの基礎となる反応系であるが、実際の信号伝達経路にはカスケードや足場タンパク質、分子局在制御なども含まれる。今後はこうした影響についても検討していく。また一方で EGFR 経路を対象としたモデリングを進め、上で述べた細胞環境を取り入れていく事でボトムアップ・トップダウンの双方から細胞まるごとモデリングを目指していく。

内容の詳細については前述 3 から 5 章を参照の事。

平成 23 年度 RICC 利用研究成果リスト

**【論文、学会報告・雑誌などの論文発表】**

**【国際会議などの予稿集、proceeding】**

**【国際会議、学会などでの口頭発表】**

Kazunari Kaizu and Koichi Takahashi, Noise, clustering and crowding in biochemical reactions, 第 49 回日本生物物理学会年会、2011 年 9 月 22-24 日、兵庫県立大学姫路書写キャンパス

海津一成、細胞環境を考慮した生化学反応の一分子粒度シミュレーション、第 4 回 JSBi 応用システムバイオロジー研究会、2011 年 11 月 7 日、理化学研究所計算科学研究機構

**【その他】**