

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, 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

所属 : 神戸研究所 生命システム研究センター 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

## 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

分子生物学および生化学の飛躍的な進歩と共に、細胞シミュレーションも発展してきた。従来の細胞シミュレーションは、細胞内のタンパク質ネットワークに基づくものであったが、近年、共焦点レーザー顕微鏡や全反射照明蛍光顕微鏡の発展に伴い、細胞内のタンパク質を一分子レベルで観測可能となり、タンパク質を一分子レベルで記述した細胞シミュレーション（一分子粒度シミュレーション）が重要になりつつある。一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り、とりわけ、分子の少数性や局在、混雑状況等の細胞環境の影響を検証することが可能となる。一分子粒度シミュレーションの先行研究では、タンパク質の二重リン酸化モチーフの持つ双安定性や超感受性に、分子混雑がおよぼす影響を検証・予測しており (Takahashi et al., 2010)、この予測は、後に wet 実験により確認された (Aoki et al., 2011)。つまり、一分子粒度シミュレーションと wet 実験を組み合わせることで、細胞特異的な反応系の特性を明らかにすることが可能となる。本研究では、一分子粒度シミュレーションの技術開発および上皮成長因子 (EGF) シグナル伝達経路への応用を目指している。

EGF シグナル伝達経路は、細胞の増殖や分化等を制御するため、細胞のがん化や幹細胞の分化のような現象に深く関与している。以下に、EGF シグナル伝達経路の一連の流れを示す。EGF と細胞膜上の受容体 (EGFR) が結合し、それらの EGFR

は二量体化した後、相互のリン酸化を経て、Shc、Grb2、Sos 等のアダプタータンパク質と結合し、活性化する。活性化 EGFR は、細胞膜上の Ras-GDP を Ras-GTP へと変化させ、Ras-GTP は細胞質中の Raf を活性化させる。続いて、活性化した Raf は、下流の MEK を二重リン酸化により活性化させ、MEK も Raf と同様に、ERK を二重リン酸化し活性化させる。リン酸化された ERK は、最終的に、細胞質から核内へと移行し、細胞の増殖および成長に関与する転写因子の発現を促す。この EGF シグナル伝達経路では、同程度の刺激を受けた場合においても、細胞ごとの応答が変化する現象が知られており (応答不均一性)、このような現象は、細胞のがん化や発生、薬剤感受性などに影響をおよぼすと考えられている。したがって、この応答不均一性の発生機序を解明することで、それらの現象の更なる理解や新規薬剤の開発等に有益な情報が得られると期待されている。当チームでは、一分子粒度シミュレーションにより、EGF シグナル伝達経路の応答不均一性の機序の解明を目指しており、前年度までに、上に示した EGF シグナル伝達経路の一連の流れを数理モデル化し、プロトタイプモデルを構築している。

一分子粒度シミュレーションでは、分子一つ一つの動きをシミュレートするため、計算量が膨大になり、シミュレーションに長い時間を要するという欠点がある。細胞全体をシミュレートする場合、現行の一分子粒度シミュレーションソフトウェアでは、年単位の時間を要してしまい、現実的ではない。この問題を解決するため、現行の一分子粒度シミュレーションの計算手法を元に、RICC を始めとするスーパーコンピュータ向けに並列化したソフトウェアを開発している。未だ開発中であるが、本年度の経過を合わせて報告する。

2. 具体的な利用内容、計算方法

本研究で使用する一分子粒度シミュレーションソフトウェア、**Spatioocyte** は微視格子法と呼ばれる計算方法に基づいて実装されている。また、このアルゴリズムに基づいて、スーパーコンピュータ向けの並列化も実装中である (**pSpatioocyte**)。

2-1 微視格子法 (**Spatioocyte**)

微視格子法は、格子ベースのモンテカルロ法であり、具体的には、空間を一分子粒度の微細な格子に分割し、その場で、タンパク質の反応拡散をシミュレートする。分子の拡散は、格子上的の動きとして表現されており、分子同士の反応は、**Collins-Kimball** 法および **Gillespie** 法に基づいて実装されている。格子の利用により、ごく短時間での分子の動き等のシミュレーションはやや不正確になるものの、長時間のシミュレーションや分子混雑など高濃度 (多分子) の状況のシミュレーションを行う場合には有用な計算方法である。本計算方法は、**Spatioocyte (E-Cell3)** に実装されており (Arjunan and Tomita, 2010)、今回はこのソフトウェアを利用した。

2-2 並列化

ソフトウェアの並列化に関しては以下のとおりである。**Spatioocyte** において格子状にされた空間を、利用するプロセス数に応じて、プロセス毎の

領域に分ける。現行版においては、全体の空間形状および各プロセスが担当する領域の形状は、直方体のみである。各プロセス領域において、分子の拡散処理を同時に実行するため、2つの分子が1つの格子に移動し衝突する状況が発生し得る。本実装では、各プロセスが担当する領域をさらに8つのサブボリュームに分割することで、この問題を回避した。

2-3 利用内容

プロトタイプ of **EGF** シグナル伝達経路の数理モデル (**EGF** モデル) は、前年度までに構築済みである。今年度は、1) プロトタイプ **EGF** モデルの

アップデート、2) **ERK** の細胞質から細胞核への移動のバラツキの再現およびそのメカニズム検証、3) 分子混雑が **EGF** シグナル伝達経路の応答特性におよぼす影響の検討、を主に実施した。

3. 結果

プロトタイプ of **EGF** モデルには、細胞膜および細胞核の構造が含まれていないため、まずは、これらを **EGF** モデルに追加した (図 1)。細胞膜には、**EGF** と **EGFR** の結合から **Raf** タンパク質の活性化までの一連の反応が含まれ、一方、細胞核には、**MEK-ERK** の二重リン酸化反応系が含まれる。このモデルの一分子粒度シミュレーションを、**Spatioocyte** により実行し、その結果を図 2 に示した。図 2 の上図は、核内の **ERK** の動的挙動を示しており、全て同条件でシミュレーションを実行し

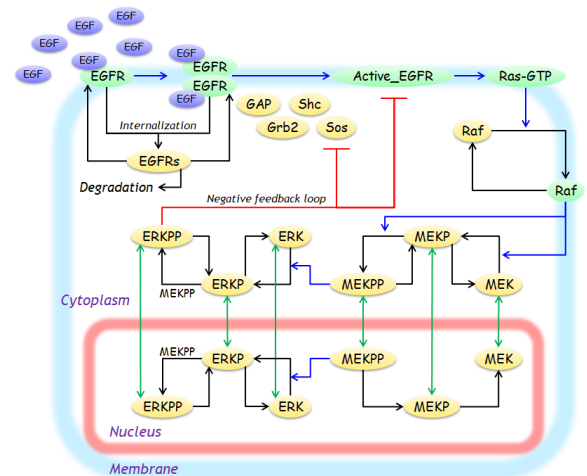


図 1 細胞膜および細胞核を含む **EGF** モデル

たにもかかわらず、シミュレーション毎に核内の **ERK** のダイナミクスは大きく変化し、核内の **ERK** のバラツキが生じた。また、この時の核内の **ERK** のピーク値の分布は、二峰性の形状を示した (図 2 下)。図 2 に示すような核内の **ERK** のバラツキは、**wet** 実験で観察される **ERK** の応答不均一性と非常に類似していた。また、**EGF** シグナル伝達経路における **ERK** の核移行は、**EGF** リガンドが低濃度の場合、図 2 のように二峰性の分布を示すことも報告されている。使用した一分子粒度シミュレーションソフトウェア **Spatioocyte** では、分子の拡散および反応がモンテカルロ的にシミュレートされており、このランダム性 (ゆらぎ) が、図 2 に示

す核内の ERK のバラツキを生み出したと考えられる。分子の拡散や反応のゆらぎは、実際の細胞でも観察されており、一般的に、内因性ノイズと呼ばれる。今回のシミュレーション結果は、EGF シグナル伝達経路において、細胞の内因性ノイズのみでも、ERK の核移行のバラツキが発生する可

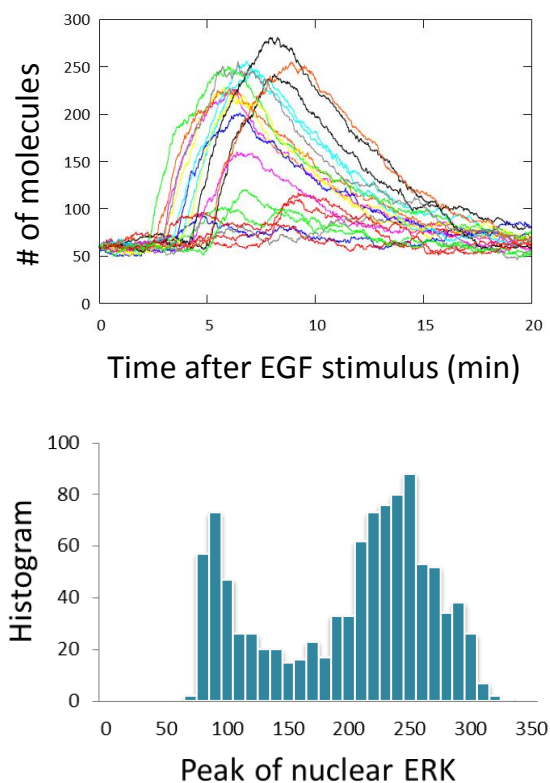


図 2 EGF モデルの一分子粒度シミュレーション結果 (1,000 サンプル)。核内 ERK のダイナミクス (上図)。核内の ERK のピーク値の分布 (下図)

能性を示した。次に、核内の ERK のピーク値の分布が、二峰性を示したメカニズムの解明を試みた。ERK の 2 つ上流に存在する Raf のピーク値と核内の ERK のピーク値の関係は調査したところ、それらはシグモイドの関係を示した (図 3 上図)。その際の Raf のピーク値の分布は対数正規分布を示しており (図 3 下図)、この分布は、核内の ERK と Raf のピーク値が描くシグモイド曲線に重なった。この結果より、Raf のピーク値のゆらぎが、Raf と ERK 間のシグモイド関係により増幅され、核内の ERK のピーク値の on/off 的な応答を招き、その結果、二峰性の分布が形成されたと考えられた。

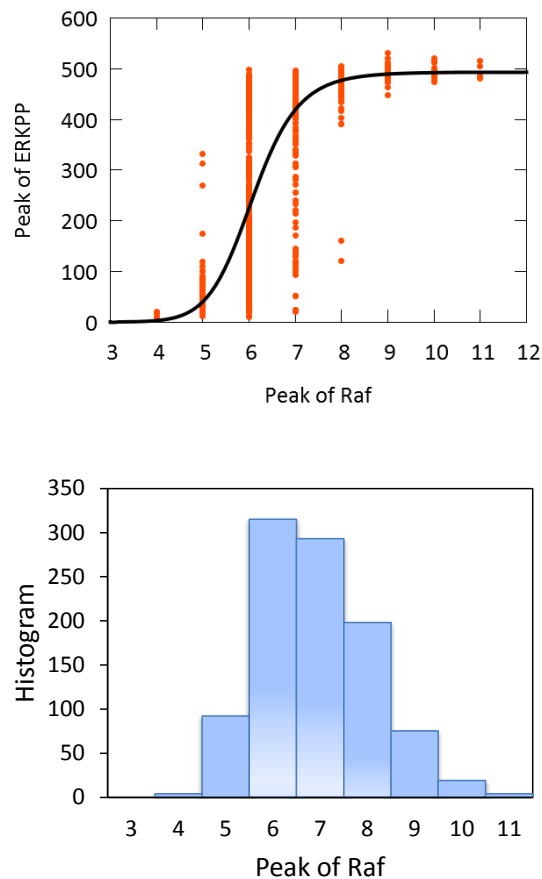


図 3 核内 ERK のピーク値と Raf のピーク値の関係 (上図)。赤丸は、それぞれのシミュレーション結果を示し、黒実線は、Hill 式でのフィッティング曲線を表す。Raf のピーク値の分布 (下図)。

既往研究では、ネットワークモチーフレベルにおける分子混雑の影響が検証されている。一方、

本研究では、細胞のシグナル伝達経路全体が、分子混雑により、どのような影響を受けるか検証した。図 4 に、分子混雑下および非混雑下における、核内の ERK と Raf のピーク値の関係を示す。非混雑下においては、図 3 と同様に、シグモイダルな関係を示した。一方、混雑下では、非混雑下よりも線形的な応答を示しており、Hill 係数は、非混雑下の 12 から、混雑下では 7 へと低下した。二重リン酸化モチーフにおいて、分子混雑は、系の応答特性をより線形的に変化させることが報告されている。今回利用した EGF シグナル伝達経路モデルにも、いくつかの二重リン酸化モチーフが含まれており、本シミュレーション結果は、分子混雑

がモチーフレベルへおよぼす影響が、細胞のシグナル伝達経路全体に波及することを示唆した。

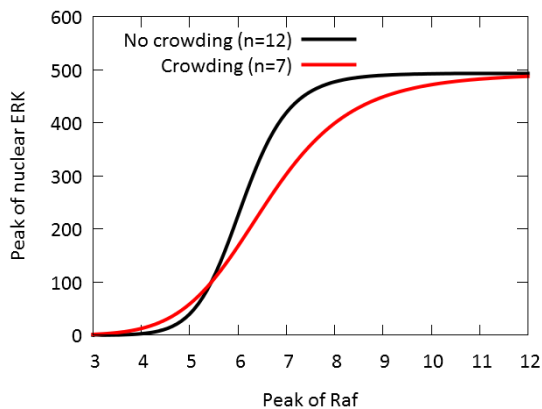


図 4 分子混雑の影響。シミュレーション結果を Hill 式でフィッティングした結果。n は、Hill 係数を表す。

pSpatioocyte の開発に関しては、2-2 に示したとおりの実装を行った。しかしながら、京コンピュータでの動作を優先させたため、RICC への移植が未だ完了おらず、現在も、pSpatioocyte の移植のための環境整備を継続している。

#### 4. まとめ

本年度は、EGF シグナル伝達経路のシグナル伝達経路の一分子粒度シミュレーションを実行した。

そして、EGF シグナル伝達経路で観察される核内の ERK タンパク質の応答不均一性を再現した。更なる解析により、分子のゆらぎとシグモイド的応答の組み合わせが、応答不均一性を生み出す可能性を示した。また、分子混雑下での EGF シグナル伝達経路のシミュレーションを実行し、その応答特性が変化することを示した。

pSpatioocyte に関しては、その実装は終了したが、RICC への移植作業が完了しておらず、現在も継続中である。

#### 5. 今後の計画・展望

pSpatioocyte の RICC への移植作業を、最優先に行う予定である。pSpatioocyte が利用できるようなれば、格子のサイズをより縮小でき、解像度の高い正確なシミュレーションが可能となる。また、実際の細胞に含まれるタンパク質量は、細胞毎に異なることが知られており、これが EGF シグナル伝達経路の応答特性にどのような影響をおよぼすか検証する予定としている。

#### 6. 利用がなかった場合の理由

pSpatioocyte の RICC への移植が困難であり、本年度予定していた計算資源は、完全に利用することが出来なかった。

平成 24 年度 RICC 利用研究成果リスト

**【国際会議、学会などでの口頭発表】**

岩本一成, 上皮成長因子シグナル伝達経路の一分子粒度細胞まるごとモデルの構築, 細胞システムの動態と論理 IV, 2012 年 4 月 12 日-13 日, 和光

岩本一成, 京コンピュータを利用した上皮成長因子シグナル伝達経路の一分子粒度シミュレーション, 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 2012 年 7 月 26 日-27 日, 東京 (招待講演)

**【その他】**

Kazunari Iwamoto, Kazunari Kaizu and Koichi Takahashi, Toward Simulation of Epidermal Growth Factor (EGF) pathway at the molecular resolution on K computer, The 50th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2PT215, 22-24 Sep. 2012, Nagoya, (Poster).

Kazunari Iwamoto, Kazunari Kaizu and Koichi Takahashi, Elucidation of heterogeneity in epidermal growth factor (EGF) signaling pathway by using simulation at the molecular resolution, The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 11-14 Dec. 2012, Fukuoka, (Poster).