

細胞内シグナル伝達系の反応機構が双安定性に及ぼす 影響の網羅的解析

末吉智奈佐^{†1,a)} 仲隆^{†2,b)}

概要: 細胞内シグナル伝達系は、細胞内の生化学反応を制御しており、その異常が細胞のがん化の原因と考えられているため、近年盛んに研究されている。しかし、生化学反応は非線形であるため、理論的解析手法の構築が難しい。系毎にパラメータを固定したシミュレーション解析が行われているのが現状である。本研究では、シグナル伝達系を、伝達経路の酵素の活性化不活性化サイクル反応をノードとし、それらの制御関係をアークとする制御ネットワークとして定式化することにより、系の双安定性に関する網羅的解析を行った。ネットワークを構成する各ノードは、活性化と不活性化の最大反応速度の比というパラメータを持つ。ネットワークの形状と制御関係に加え、反応機構が双安定性の出現率に及ぼす影響に関して網羅的に解析した。

キーワード: シグナル伝達系、双安定性、サイクル反応、制御ネットワーク、反応機構

Exhaustive analysis for the effect of reaction mechanisms on bistability in cellular signaling systems

CHINASA SUEYOSHI^{†1,a)} TAKASHI NAKA^{†2,b)}

Abstract: Cellular signal transduction systems have been studied intensively from the recent viewpoint that their disorder is thought to be one of the causes for cancer formation since the systems are known to regulate biochemical reactions in cells. Actually, many studies have employed simulation analysis with the given values for the parameters in the systems because of the difficulty developing the analytical method for the systems due to their non-linearity. In this study, a method of the exhaustive analysis for the bi-stability of the systems is proposed. The system is formulated as regulatory network in which every node represents an activation-deactivation cyclic reaction for a constituent enzyme in the system and the regulatory interactions between the reactions are depicted by the arcs between nodes. Assigning each node with one parameter which is the ratio of the maximum deactivation velocity to the maximum activation velocity of the enzyme, the exhaustive analysis is performed to examine the effects of reaction mechanisms on the occurrence of bi-stable states in the parameter space for the variety of regulatory network configurations.

Keywords: signal transduction system, bi-stability, cyclic reaction, regulatory network, reaction mechanism

1. はじめに

細胞内シグナル伝達系は、細胞の増殖、自殺、分化、恒常性を制御する機構として機能している。その異常が細胞のがん化の原因と考えられているため、近年盛んに研究されている重要な生化学反応系である。しかし、生化学反応系は非線形で、理論的解析手法の構築が困難であるため、系毎にパラメータを固定したシミュレーション解析が行われているのが現状である。

本研究では、シグナル伝達系を、伝達経路の酵素のサイクル反応系をノード、その制御関係をアークとする制御ネットワークとして定式化することにより、細胞内シグナル伝達系の双安定性を網羅的に解析する。基本的な生化学反応系や転写制御を含む系の特性に関する網羅的解析は既に

ある[1,2]。また、本研究と同様の制御ネットワークを用いた解析もなされている[3,4]。本研究では、制御ネットワークの隣接行列を用いた制御行列表現を導入することにより、これらの解析手法より見通しのよい網羅的解析の手法を提案し、それを用いて解析を行う。解析には、数値計算・数式処理システムである *Mathematica* を用いた[5]。*Mathematica* は、数理モデルの構築やシミュレーション解析に適している。また、プログラミング言語を利用することで高度な処理を容易にすることが可能となる。本研究では、*Mathematica* 10.2 を用いた。

2. 制御ネットワーク

制御ネットワークでは、酵素は活性型と不活性型の2つ

^{†1} 九州産業大学大学院情報科学研究科
Graduate School of Information Science, Kyushu Sangyo University, Japan

^{†2} 九州産業大学情報科学部
Faculty of Information Science, Kyushu Sangyo University, Japan

a) k15dj01@st.kyusan-u.ac.jp
b) naka@is.kyusan-u.ac.jp

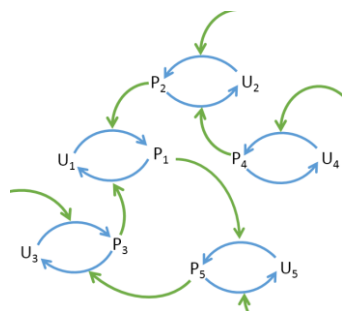
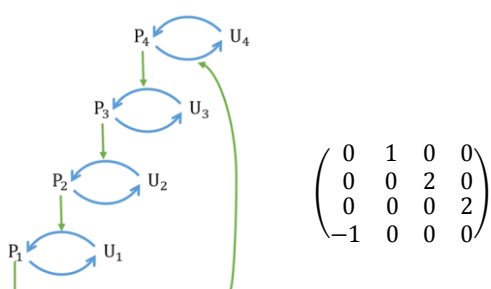


図 1 制御ネットワーク

の状態を循環するサイクル反応系がノードとなる。活性化型酵素 P_i 、不活性化型酵素 U_i で表した制御ネットワークの例を図 1 に示す。酵素の活性化と不活性化は、それぞれ、他のノードにある活性化型酵素により触媒される反応である。ノード A の活性化型酵素がノード B の酵素の活性化を触媒する場合は、ノード A がノード B を正に制御し、不活性化を触媒する場合は、負に制御していることになる。図 1 の制御ネットワークでは、 P_2 が P_1 を正に制御し、 P_3 が P_1 を負に制御している。酵素の活性化および不活性化の反応機構は、単純な質量作用の法則に従うと仮定する。反応速度が基質濃度と酵素濃度の n 乗の積に比例する場合を n 次制御と呼ぶ。各ノード、すなわちサイクル反応系は、活性化・不活性化の反応速度定数や酵素の総濃度などのパラメータを持つ、しかし、定常状態のみを問題にする場合、総濃度で正規化することにより、それらのパラメータは活性化と不活性化の最大反応速度の比という 1 つのパラメータに集約される。

制御ネットワークは、正の n 次制御では n 、負の n 次制御では、 $-n$ を要素とする隣接行列で表現できる。これを制御行列と呼ぶ。ノード j がノード i を n_{ij} 次制御しているとすると制御行列は $N = \{n_{ij}\}$ となる。図 2 は、代表的なシグナル伝達系である MAPK カスケードの反応スキームとその制御行列である。MAPK カスケードの 3 段目と 4 段目の 2 重リン酸化の過程は、制御機構を二次とすることで表現することが可能となる。

図 3 は、制御ネットワークのノードとなるサイクル反応系の反応スキームである。P は、当該ノードの不活性化型の酵



(a) 制御ネットワーク (b) 制御行列表現

図 2 MAPK カスケード

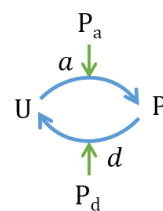


図 3 サイクル反応

素、U は、活性化型の酵素である。 P_a は、U を活性化する酵素であり、 a はその反応速度定数である。 P_d は、P を不活性化する酵素であり、 d はその反応速度定数である。活性化と不活性化の両方を同じ n 次制御とするとサイクル反応の動態は、式 1 の微分方程式系で表される。

$$\begin{aligned} \frac{dU}{dt} &= -(aP_a)^n U + (dP_d)^n P \\ \frac{dP}{dt} &= (aP_a)^n U - (dP_d)^n P \end{aligned} \quad \cdots \text{式 1}$$

P, P_a , P_d は、酵素 P, P_a , P_d の濃度である。酵素 P, P_a , P_d の総濃度を、それぞれを T , T_a , T_d で表し、それぞれの相対濃度を、それぞれを R , R_a , R_d とすると、相対濃度に関する微分方程式系である式 2 が得られる。

$$\frac{1}{aT_a} \cdot \frac{dR}{dt} = R_a(1 - R) - KR_dR \quad \cdots \text{式 2}$$

K は式 3 で示す各ノードの持つパラメータであり、活性化と不活性化の最大反応速の比である。

$$K = \frac{dT_d}{aT_a} \quad \cdots \text{式 3}$$

式 2 において定常状態を仮定し、値を 0 として R について解き、その逆数を Q とし、 R_a と R_d の逆数を、それぞれを Q_a , Q_d とするとノード間の定常状態値の関係を記述する式 4 を得る。

$$Q = 1 + K^n \cdot \left(\frac{Q_a}{Q_d}\right)^n \quad \cdots \text{式 4}$$

制御行列を N 、それぞれのノードの活性化酵素の相対濃度の逆数 Q_i を要素とする縦ベクトルを Q とすると、制御ネットワークの定常状態値は、行列の積の定義を式 4 として、式 5 を解くことにより得ることができる。

$$Q = NQ \quad \cdots \text{式 5}$$

全てのノードの制御機構を一次とした場合と二次とした場合に関して網羅的な解析を行った結果については、別発表

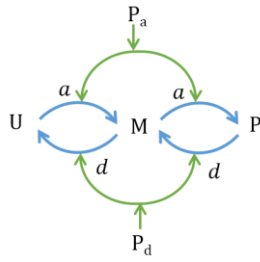


図 4 二段階のサイクル回路反応

で報告する予定である[6]. 本研究では、特に全ての制御を二次とした場合と次に示す2段階サイクル反応系との比較を行った. 図4は、二段階サイクル反応系の反応スキームである. UとPは、それぞれ、不活性型酵素と活性型酵素を表し、Mは中間型であり不活性と仮定している. それぞれの反応は一次の質量作用の法則に従うとし、活性化と不活性化の反応速度定数は全て、 a と d としている. この反応系の動態は式6の微分方程式系で記述される.

$$\begin{aligned}\frac{dU}{dt} &= -aP_a U + dP_d M \\ \frac{dM}{dt} &= aP_a U - aP_a M + dP_d P - dP_d M \\ \frac{dP}{dt} &= aP_a M - dP_d P\end{aligned} \quad \dots \text{式 6}$$

上述の n 次制御サイクル反応の定式化と同様に、活性型酵素の相対濃度の逆数を Q 、活性化酵素と不活性化酵素の相対濃度の逆数を、それぞれを Q_a , Q_d とすると、ノード間の定常状態値の関係を記述する式7を得る.

$$Q = 1 + K \cdot \frac{Q_a}{Q_d} + K^2 \cdot \left(\frac{Q_a}{Q_d}\right)^2 \quad \dots \text{式 7}$$

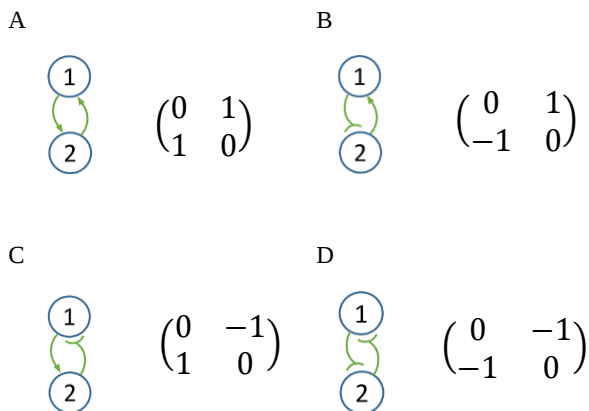


図 5 2ノードフィードバック有制御ネットワーク

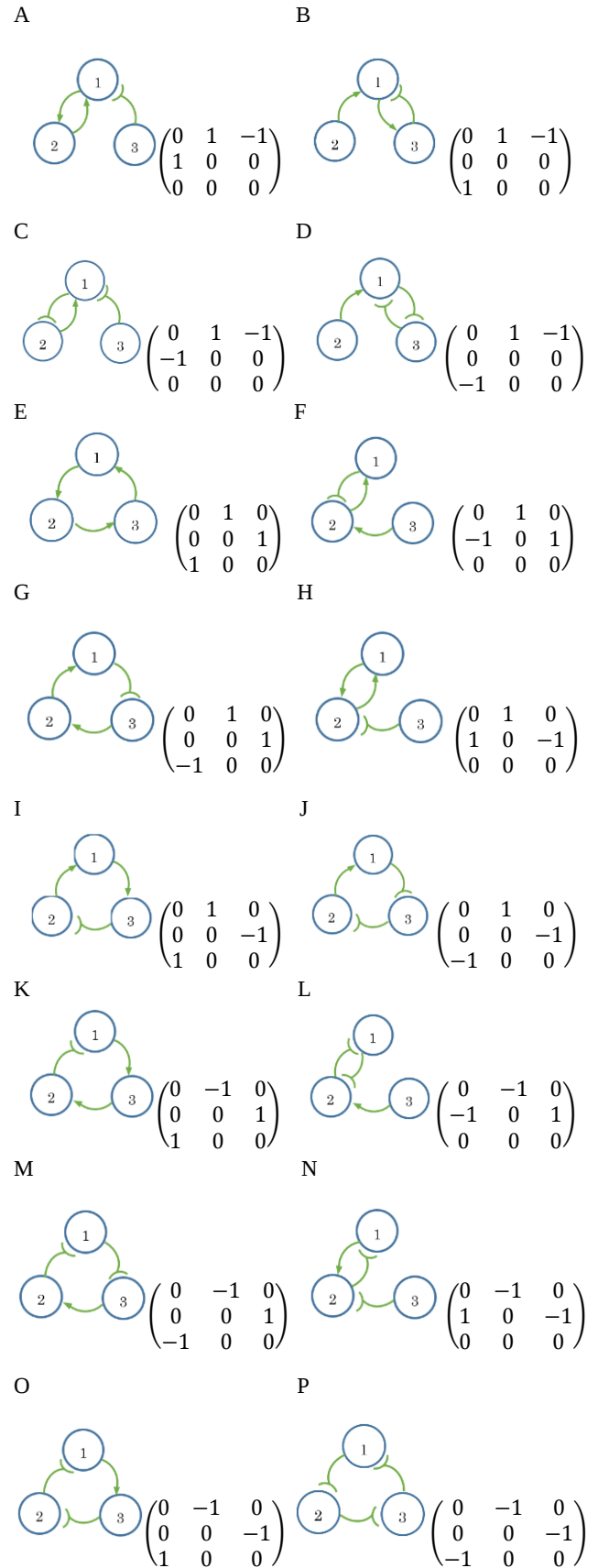


図 6 3ノードフィードバック有制御ネットワーク

表 1 2 ノードの二次制御反応機構と 2 段階反応機構

	二次制御反応機構	2 段階反応機構
A	124(124)	95(95)
B	0(0)	0(0)
C	0(0)	0(0)
D	28(0)	19(3)

3. 双安定性の網羅的解析

本研究では、2 ノードおよび 3 ノードの制御ネットワークを解析対象とした。ただし、下記の 4 つの制約条件を仮定した。

1. ノード 1 を出力ノードとする。
2. 各ノードは他の一つのノードを制御する。
3. 各ノードは他のノードから高々 1 つの負の制御と 1 つの正の制御を受ける。
4. フィードバック制御は高々ノード 1 からの一つのみとする。

2 ノードの制御ネットワークの総数は 6 個、そのうちフィードバック制御のあるものは図 5 に示す 4 個である。→ は正の制御、← は負の制御を表す。ネットワーク A は、互いに正のフィードバック制御をもち、ネットワーク D は、互いに負のフィードバック制御を備えている。ネットワーク B は、ノード 1 がノード 2 から正のフィードバック制御を、ノード 2 がノード 1 から負のフィードバック制御を受けている。ネットワーク C は、ノード 1 がノード 2 から負にフィードバック制御を受け、ノード 2 がノード 1 から正にフィードバック制御を受けている。それぞれの制御ネットワークの制御行列を、各制御ネットワークの模式図の右側に示す。

3 ノードの制御ネットワークの総数は 21 個、そのうちフ

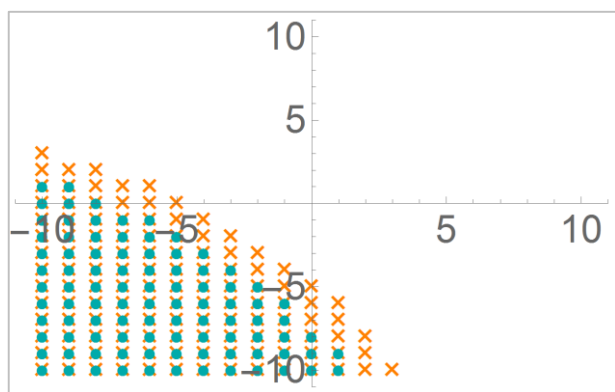


図 7 2 ノードのネットワーク A において
二次制御反応機構と 2 段階反応機構の
出現しているパラメータ値の比較

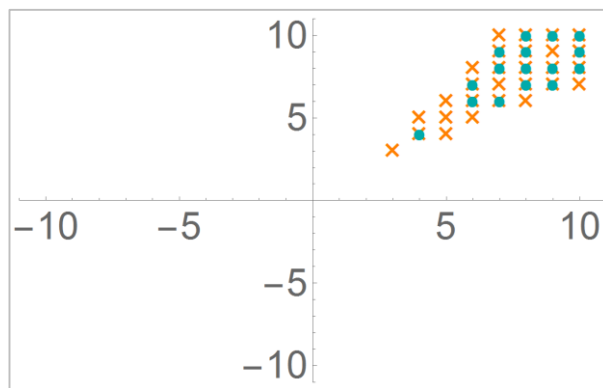


図 8 2 ノードのネットワーク D において
二次制御反応機構と 2 段階反応機構の
出現しているパラメータ値の比較

ィードバック制御のあるものは図 6 に示す 16 個である。

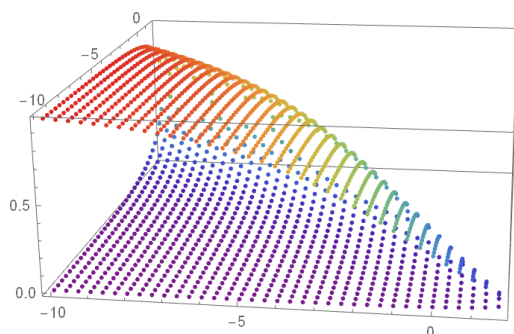
フィードバック制御のない制御ネットワークでは、それぞれのノードの定常状態値は末端から順次出力ノードまで、式 4 あるいは式 7 に従って決定されていくため一意であり、明らかに双安定性は出現しないので解析対象から外した。また、全てのパラメータ値を 1 とした予備解析では、全てのノードが一次制御および二次制御の場合は、2 ノードおよび 3 ノードでは、双安定性は出現しないということが分かっている[4,6]。そこで、本研究では、各ノードのパラメータ値 K_i^2 を下記のように変化させてパラメータ値に関して網羅的に解析を行った。

$$\left(\frac{1}{2^p}\right)^{-np}, \left(\frac{1}{2^p}\right)^{-np+1}, \left(\frac{1}{2^p}\right)^{-np-1}, \dots, \left(\frac{1}{2^p}\right)^{np}$$

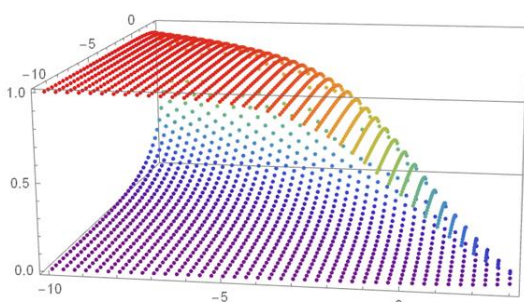
上記は、パラメータの変化幅の下限が $-n$ 、上限が n であることを示している。 p は、パラメータの密度に対応する。対象とした反応機構は、式 4 で $n = 2$ とした二次制御反応機構と式 7 の 2 段階反応機構である。パラメータの変化幅 n を 10、密度 p を 1 とした場合の 2 ノード制御ネットワークにおける双安定性の出現数を表 1 に示す。式 5 の解が 2 つまたは 3 つ得られた場合に双安定性が出現したとみなしている。括弧内の数字は解が 2 つの場合の個数である。設定するパラメータの種類は $n = 10$ であり、全 441 通りとなる。二次制御反応機構の出現率は、ネットワーク A、ネットワーク D において 28.1%、6.3% となるが、2 段階反応機構の出現率は、ネットワーク A、ネットワーク D において 21.5%、4.3% となる。ネットワーク B およびネットワーク C は、双安定性は出現しなかった。

表 1 より、二次制御の場合も 2 段階反応の場合も、ネットワーク A および D で双安定性が出現することが分かる。図 7 は、2 ノードのネットワーク A において双安定性の出現したパラメータの位置を図示したものである。縦軸は、ノード 1 のパラメータの値、横軸は、ノード 2 のパラメー

A



B

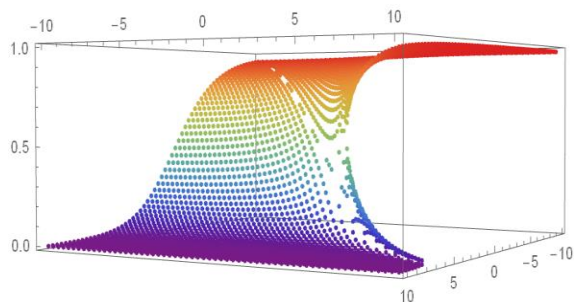


(A) 2 段階反応機構 (B) 二次制御反応機構

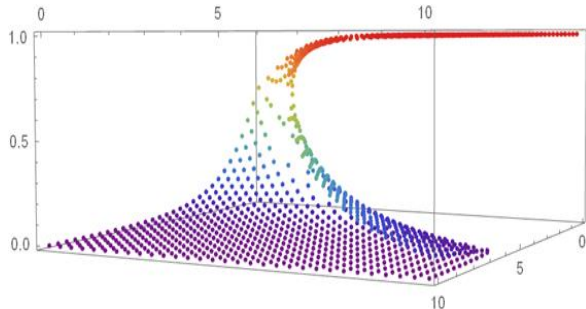
図 9 制御ネットワーク A の双安定性

タ値である。パラメータの値は全て底 2 の対数目盛として
いる。二次制御で双安定性が出現したパラメータ位置を○
で、2 段階反応の場合を×で示す。ネットワーク D に関し
て同様の図を図 8 に示す。どちらの場合でも双安定性が出

A



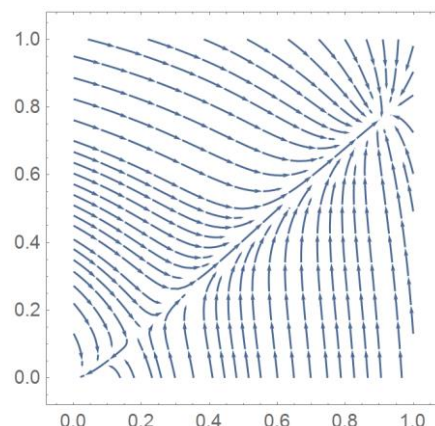
B



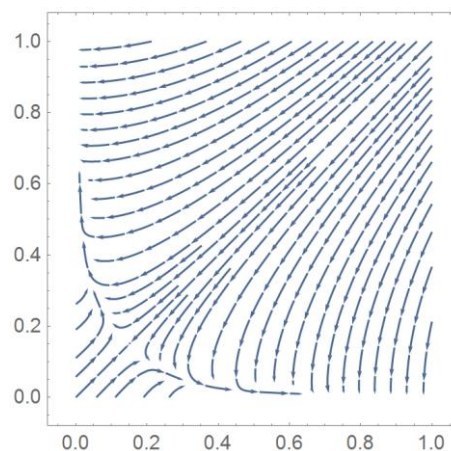
(A) 2 段階反応機構 (B) 二次制御反応機構

図 10 制御ネットワーク D の双安定性

A



B



(A) ネットワーク A (B) ネットワーク D

図 11 流線プロット

現しているパラメータ位置は、○の部分と×の部分为重なり合っている。二次制御において双安定性が出現するパラメータ値は、2 段階反応で双安定性が出現するパラメータ値を包含していることが分かる。ネットワーク A において、二次制御では、は、双安定性が出現するパラメータは、124 箇所存在するのに対して、2 段階反応では、95 箇所となり、19 箇所において出現しなくなっている。ネットワーク D では、二次制御では、双安定性が出現するパラメータは、28 箇所存在するのに対して、2 段階反応で双安定性が出現するのは、19 箇所となり、9 箇所において出現しなくなっている。また、パラメータ空間では、ネットワーク A では、双安定性が出現するパラメータ値は、2 個とも負の値、ネットワーク D では、2 個とも正の値を取る部分に集中していることがわかる。以上の結果から、2 つの反応機構の双安定性出現に関する性質はよく似ているが、二次制御の方がそのパラメータ範囲がわずかに広いことが示された。

双安定性を示すパラメータ領域における定常状態値の様相を図 9 と図 10 に示す。図 9 は制御ネットワーク A で図 10 は制御ネットワーク D に関するものである。x 軸は、

表 2 3 ノードの二次制御反応機構と 2 段階反応機構

	二次制御反応機構	2 段階反応機構
A	4304(4304)	3863(3863)
D	681(0)	451(0)
E	1856(1856)	1327(1327)
H	4304(4304)	3863(3863)
J	386(0)	242(0)
L	681(0)	451(0)
M	386(0)	242(0)
O	386(0)	242(0)

ノード 1 のパラメータ値, y 軸は, ノード 2 のパラメータ値, z 軸は, ノード 1 の活性化酵素の相対濃度である. 双安定性の様相は, 制御ネットワーク A は反応機構にあまり影響を受けないが, 制御ネットワーク D は影響を受けていることが分かる.

図 11 は 2 ノードのネットワーク A およびネットワーク D の各パラメータ値におけるベクトル場の局所的方向を示す流線プロットである. 図 11 のネットワーク A のパラメータ値は, 2^{-2} と 2^{-1} であり, ネットワーク D のパラメータ値は, 2^4 と 2^4 としている. 2 つのノードの活性化酵素の値が 2 つの安定点に引き寄せられる状態を見ることができる.

3 ノードの制御ネットワークでの, 双安定性の出現数を表 2 に示す. 2 段階反応においてネットワーク A, D, E, H, J, L, M および O で双安定性が出現した. ネットワーク A および H において, 二次制御反応機構では, 双安定性が出現するパラメータは, 4304 箇所存在するのに対して, 2 段階反応機構では, 3863 箇所となり, 441 箇所において出現しなくなっている. ネットワーク E において, 二次制御反応機構は, 双安定性が出現するパラメータは, 1856 箇所存在するのに対して, 2 段階反応機構では, 1327 箇所となり, 529 箇所において出現しなくなっている. ネットワ

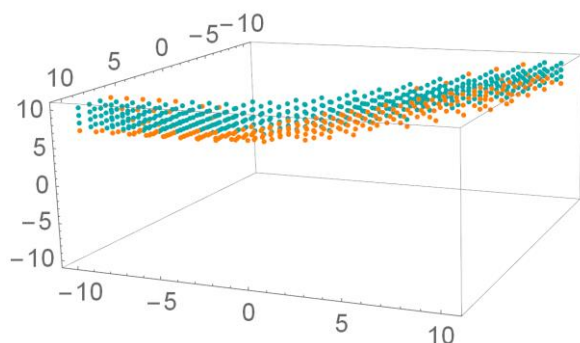


図 12 2 ノードのネットワーク H において
二次制御反応機構と 2 段階反応機構の
出現しているパラメータ値の比較

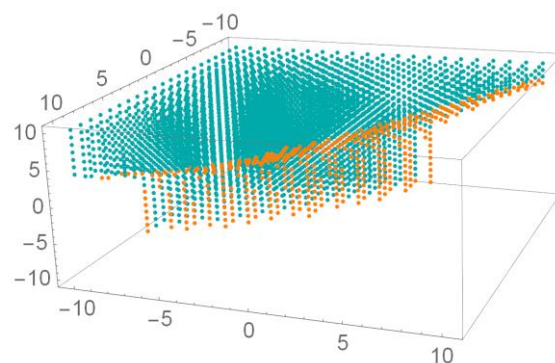


図 13 2 ノードのネットワーク A において
二次制御反応機構と 2 段階反応機構の
出現しているパラメータ値の比較

ーク J, M および O において, 二次制御反応機構では, 双安定性が出現するパラメータは, 386 箇所存在するのに対して, 2 段階反応機構では, 242 箇所となり, 144 箇所において出現しなくなっている. ネットワーク D および L において, 二次制御反応機構では, 双安定性が出現するパラメータは, 681 箇所存在するのに対して, 2 段階反応機構では, 451 箇所となり, 230 箇所において出現しなくなっている.

3 ノードの二次制御反応機構で双安定性を示したパラメータは, 2 段階反応機構でも双安定性を示した. 設定するパラメータの種類は $n = 10$ であり, 全 9261 通りとなる. 二次制御反応機構における双安定性の出現率は, ネットワーク A, ネットワーク H において 46.5% となる. ネットワーク D, ネットワーク L において 7.4% となる. ネットワーク E は, 20.0% となる. ネットワーク J, ネットワーク M およびネットワーク O において 4.2% となる. その他の 8 個のネットワークは, 双安定性は出現しなかった. しかし, 2 段階反応機構における双安定性の出現率は, ネットワーク A, ネットワーク H において 41.7% となる. ネットワーク D, ネットワーク L において 4.9% となる. ネットワーク E は, 14.3% となる. ネットワーク J, ネットワーク M およびネットワーク O において 2.6% となる. その他の 8 個のネットワークは, 双安定性は出現しなかった. また, 3 ノードでは, 2 ノードのネットワーク A および D の構造を含む制御ネットワークにおいて双安定性が示されることがわかった.

図 12 は, 3 ノードのネットワーク H において双安定性の出現したパラメータの位置を図示したものである. 縦軸は, ノード 1 のパラメータの値, 横軸は, ノード 2 のパラメータ値である. パラメータの値は全て底 2 の対数目盛としている. 二次制御で双安定性が出現したパラメータ位置を緑色の○で, 2 段階反応の場合を橙色の○で示す. ネットワーク H に関して同様の図を図 13 に示す. どちらの場合でも双安定性が出現しているパラメータ位置は, 緑色の

○の部分と橙色の○の部分为重なり合っている。二次制御において双安定性が出現するパラメータ値は、2 段階反応で双安定性が出現するパラメータ値を包含していることが分かる。以上の結果から、3 ノードでも 2 つの反応機構の双安定性出現に関する性質は、よく似ているが、二次制御の方がそのパラメータ範囲がわずかに広いことが示された。

4. まとめ

細胞内シグナル伝達系のサイクル反応をノード、制御関係をアークとする制御ネットワークとしてモデル化し、制御行列表現を用いた解析手法を提案しネットワークの制御関係及び各ノードのパラメータについて、反応機構が双安定性の出現に及ぼす影響を網羅的に解析した。

2 ノードでは、2 段階反応機構は、二次制御反応機構より双安定性を示すパラメータの範囲が減少していることがわかった。それらのパラメータの値に関して、二次制御反応機構で双安定性が出現している部分は、2 段階反応機構で双安定性が出現している部分を包含していることもわかった。3 ノードでは、双安定性が出現した制御ネットワークは、双安定性を示した 2 ノードネットワークを部分ネットワークとして含むことが示された。それらの制御ネットワークも、2 ノード同様にパラメータの値に関して、二次制御反応機構で双安定性が出現している部分は、2 段階反応機構で双安定性が出現している部分を包含していることが示された。

謝辞

本研究を進めるにあたり、多くのご支援を賜りました。仲研究室の皆様をはじめ、ご協力をいただいた多くの方々に感謝の意を表して謝辞と致します。

参考文献

- 1) Ramakrishnan N, Bhalla US.: Memory Switches in Chemical Reaction Space, PLoS Comput Biol, Vol.4, No.7, e1000122 (2008).
- 2) Shah, N. A., & Sarkar, C. A.: Robust network topologies for generating switch-like cellular responses, PLOS Computational Biology, Vol.7, No.6, e1002085 (2011).
- 3) Kuwahara, H. and X. Gao.: Stochastic effects as a force to increase the complexity of signaling networks, Scientific Reports, Vol.3, 2297(2013).
- 4) Takashi N.: Systematic model construction and simulation analysis for regulatory networks in cellular signal transduction systems. The 25nd international conference on genome informatics (GIW2014)
- 5) Wolfram Mathematica
<https://www.wolfram.com/mathematica/index.ja.html?footer=lang>
- 6) 末吉智奈佐, 仲隆: 細胞内シグナル伝達系の双安定性に関する網羅的解析, 情報処理学会第 78 回全国大会論文誌, 発表予定 (2016).