JAIST Repository
https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	Epidermal Growth Factor 経路モデルの再考
Author(s)	根元，圭二郎
Citation	
Issue Date	2002-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	author
URL	http://hdl.handle.net/10119/357
Rights	
Description	Supervisor:小長谷　明彦，知識科学研究科，修士

JAIST
JAPAN
ADVANCED INSTITUTE OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY

Japan Advanced Institute of Science and Technology

修　士　論　文

Epidermal Growth Factor　経路モデルの再考

指導教官　　小長谷　明彦　教授

北陸先端科学技術大学院大学
知識科学研究科知識システム基礎学専攻

050065 根元　圭二郎

審査委員：　小長谷　明彦　教授
佐藤　賢二　　助教授
中森　義輝　　教授
本多　卓也　　教授

2002 年 2 月

Copyright © 2002 by Keijiro Nemoto

目　次

1　はじめに……1
1.1　目的……1
1.2　背景……1
1.3　ターゲットとなるシステム……2
1.4　モデルの再構築と評価……3
1.5　結論 ……3

2　シグナル伝達系と EGF（Epidermal Growth Factor 上皮増殖因子）の経路
……4
2.1　シグナル伝達系とは……4
2.2　EGF（Epidermal Growth Factor 上皮増殖因子）経路……5
2.2.1　EGFR（EGF レセプター）……7
2.2.2　Ras……7
2.2.3　EGFR から G タンパクまでの経路……8
2.2.3.1　SH ドメイン（シグナル伝達分子に特徴的な分子構造）……8
2.2.3.2　Ras までの経路に関わるタンパク……9
2.2.3.3　Ras までの経路に関わる他の物質……11
2.2.3.4　経路の全体像……12

3　シグナル伝達に関わるモデルとその分析……13
3.1　生物モデルにおける表現……13
3.1.1　モデル選択上の注意点……14
3.1.2　生化学における微分方程式……15
3.1.3　生化学における古典的な酵素反応式……16

3.1.3.1 酵素の特徴……..16
3.1.3.2 酵素の化学反応式……..17
3.1.4 S-system と GMA……..19
3.1.4.1 S-system（synergism and saturation – system）……...19
3.1.4.2 GMA(Generalized Mass Action) system……21
3.1.4.3 S-system と GMA 導入の利点……...21
3.1.5 化学反応シミュレータ……..22
3.2 Sensitivity Analysis による分析……23

4 EGF 経路モデルに対する考察と Kholodenko モデルの改良……26
4.1 モデルの構成……26
4.1.1 経路の構成を考えるにあたって……26
4.1.2 モデルの再構成……26
4.2 Kholodenko モデル……27
4.2.1 Kholodenko モデルの数値的表現……..28
4.1.3 Kholodenko モデルに関する考察……...28
4.1.4 PLCγ周辺の生化学における研究……..29
4.2 Kholodenko モデルの拡張……31
4.3.1 Kholodenko モデルの経路に関する拡張……...31
4.3.2 経路に付随する式とその係数について……..32

5 考察……34
5.1 拡張モデルと Kholodenko モデルの比較……...34
5.1.1 それぞれのモデルと生化学実験のデータ……34
5.1.2 考察……38
5.1.2.1 PLCγ周辺について……..38
5.1.2.2 PI3 キナーゼ周辺の経路について……...41
5.1.2.3 SOS、Grb2 複合体経路について……42

5.1.2.4 EGF レセプター周辺について……..46
5.1.2.5 モデル全体としての評価……47
5.2 生体内化学反応経路シミュレータの展望……48
5.2.1 ケーススタディと経路の改良……..48
5.2.2 モデル化手法について……..49
5.2.3 情報学と生化学との連携……..50

図　目　次

Fig 2.1　EGF の反応経過……5
Fig 2.2　EGF 経路全体像……12

Fig 4.1　Kholodenko モデルの経路図……27
Fig 4.2　リン酸化 PLCγ……28
Fig 4.3　拡張する経路……31
Fig 4.4　Kholodenko モデルを改良した拡張モデル……32

Fig 5.1　リン酸化 Shc の濃度……34
Fig 5.2　Grb2 と結合する EGFR の濃度の時間変化……35
Fig 5.3　Shc と会合する Grb2 の濃度の時間変化……35
Fig 5.4　EGFR と会合するリン酸化 Shc の濃度の時間変化……35
Fig 5.5　SOS と結合する EGFR の濃度の時間変化……36
Fig 5.6　リン酸化 PLCγの濃度の濃度の時間変化……36
Fig 5.7　全リン酸化 EGFR の濃度の時間変化……36
Fig 5.8　生化学データ１……37
Fig 5.9　生化学データ２……37
Fig 5.10　シグナルを作る経路例……39
Fig 5.11　仮想的な経路の物質濃度変化……39
Fig 5.12　シグナルを作る経路例（時間経過後）……40
Fig 5.13　Kholodenko モデルの PLCγ関連物質濃度の時間変化……40
Fig 5.14　Shc、Grb2、SOS による経路を簡略化した経路……43
Fig 5.15　簡略化経路の時間経過後の流れ……44
Fig 5.16　Shc、SOS、Grb2 簡略化経路における H の濃度変化（R-Sh-G-S に相当）..44
Fig 5.17　反応 i に対する物質濃度の Sensitivity（Kholodenko モデル）……45
Fig 5.18　反応 i に対する物質濃度の Sensitivity（拡張モデル）……45
Fig 5.19　Kholodenko モデルのレセプター周辺データ……46
Fig 5.20　拡張モデルのレセプター周辺データ……47

表　目　次

Table 4.1　Kholodenko モデルの反応式とパラメータ……30
Table 4.2　拡張モデルの反応式とパラメータ……33

Table 5.1　データの表現式……37
Table 5.2　シグナルを作る経路例のパラメータ……39
Table 5.3　Fig 5.12 による経路の係数……43

第　1　章
は じ め に

1.1　目的

本研究は、生物が情報をやり取りするために自ら構築する生体内シグナル伝達系のモデル化を目的とする。生物はよく知られるタンパク質、DNA 等のほかに数多くの物質で構成され、非常に複雑な機構を持っている。このシステムを解明するためには、生物を構成する部分的なシステムを捉えるだけでは不十分であり、そのダイナミクスを知る必要性がある。そこでわれわれは、生物を構成するタンパク質や化学物質を生成し、それらが生物を構成していく過程を捉えるために用いられる化学反応経路を扱い、中でも情報のやり取りに関連するシグナル伝達系に着目した。過去のモデルを参照として、生化学的に研究されている分野との比較を行い、今後の方針について提案する。

1.2　背景

２０世紀は科学が著しく発展した世紀であった。しかしながら科学が急速な発展をみせる一方、捉えるのが非常に難しい対象が存在していた。中でも、実体としてつかみづらい分野は生物学であったのではないだろうか。分子生物学が急速に発展した一方で、特に、「生命」の明確な定義付けがなされていないことは象徴的である。生物

を構成するコンセプトの中核となるアイディアとなったセントラルドグマこそ発見されたが、セントラルドグマを構成する機構の詳細についてはいまだ理解されていないところが大半である。その理由は、生物が予想を越える非常に複雑な制御形態をとっていたからであった。しかしながら、近年、２０世紀に発展著しかった計算機技術によって、膨大な処理をコンピュータに任せることが出来るようになり、複雑なシステムをそのままモデルとして構築したり、解析したりすることができるようになってきた。この生物のモデル化技術の領域がバイオインフォマティクスである。

バイオインフォマティクスは遺伝子の解析や遺伝子から得られた情報や立体構造からのタンパクの解析など、多くの異なる技術から成っている。その中でも最近注目を集めているのが細胞内の代謝や情報のやり取りをシミュレーションする化学反応経路モデルの構築である。

1.3　ターゲットとなるシステム

多細胞生物は細胞が集まることで構成されている。高等な多細胞生物も一つの卵細胞から分裂、増殖し、機能に応じて分化ていくことで最終的な成体を構成していく。また、生体を構成する細胞は生きていく過程で新陳代謝などの現象で変化していき、個体が成長していく過程で必要に応じて入れ替わっている。このために細胞の増殖と分化が必要になってくる。これらの現象は、タンパク質などの反応によって引き起こされているものである。化学物質は濃度という観点から数値的に表現することが可能であり、モデル化することが出来る。そこで、本研究では生物の化学反応経路に着目し、モデル化することでコンピューター上でその特性を解明していこうとするものである。特に、生体内の化学反応経路のなかで細胞内の器官の間で交わされる情報をコントロールする「細胞内のシグナル伝達」をターゲットとした。素材として細胞の増殖をコントロールする化学物質として知られる EGF（Epidermal Growth Factor 細胞上皮増殖因子）のシグナル伝達を扱うものとする。

1.4　モデルの構成と評価

数値化されたモデルを構築するにあたって重要なのは、データである。データからそれに適合するような数式を構築していく。大規模なモデルを一から構築するためには非常に大量のデータが必要である。これらを収集するには生化学的な研究を多数こなしつつ、そこから得られた経験を元にして手法を選択していかなければならない。この作業は非常に難しく、生化学的な勘と知識、数学的な素養が要求され、すでに、一人の人間が行うのではなくプロジェクトとして行われるほどになっている。そこでモデルは、以前に構築された先人のモデルを元にして、それを再構成していくことにする。低分子量 G タンパクまでのシグナル伝達を扱った EGF のモデルとして、Boris N.Kholodenko が構築したモデル[13]を元にしてそれを拡張していこうと考えた。Kholodenko のモデルの発表後に明らかになった PI3K と PLCγの経路を導入し、その様子を解析した。

1.5　結論

Kholodenko モデルとは別の経路モデルを用いて、生化学的実験値と同等のデータを得ることが出来た。また、経路の特徴を示すような結果が得られた。しかしながら、モデルを構成するにあたって、見逃された点も多く存在する。そこで、現在の経路シミュレーションにとっての必要事項をまとめることにした。

第　2　章
シグナル伝達系と
Epidermal Growth Factor（上皮増殖因子）の経路

2.1　シグナル伝達系とは

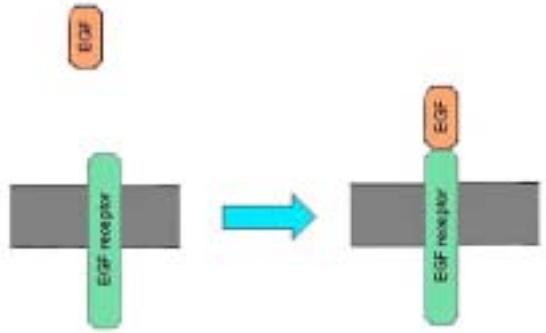
多細胞生物は細胞の集合体であるため、生物として構成されるためにはそれぞれの細胞がそれぞれの役割を果たしていかなくてはならない。そのためには、細胞の間で密接な情報連絡網が出来ている必要がある。これが大きいスケールでのシグナル伝達である。シグナルが細胞に伝わると、細胞は通達された情報を元にそれぞれの作業を行う。細胞は役割が分担されているが、それぞれの行う作業も非常に複雑であり、これらをうまくコントロールするためには細胞の中にコンピュータの回路のようなシステムが必要になってくる。そのために生物は DNA を中心とした化学反応を用いた回路を作っている。これが細胞内の小さなスケールにおけるシグナル伝達である。DNA はいわば生物の構成物であるタンパク質の設計図であり、生成済みタンパクがこの設計図を必要に応じて読み取り、新たなるタンパクを作り出している。これをコントロールしているのがタンパクと化学物質によるシグナル伝達系なのである。今回、われわれが扱うのは小さいスケールでのシグナル伝達系である。

2.2　Epidermal Growth Factor　（上皮増殖因子）経路

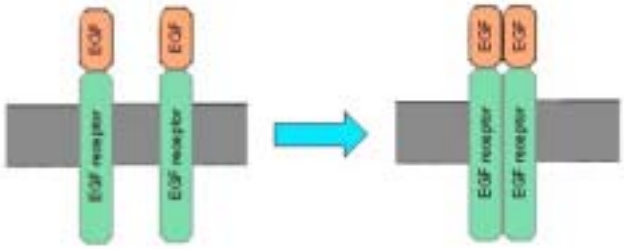
EGF とは、字のごとく細胞の増殖に関わる物質として S.Cohen らによって発見された。この発見は増殖因子研究の始まりでもあった。EGF はマウスの顎下腺抽出液をマウスの新生児に投与したところ、無処理のマウスに比べて眼瞼の開裂や歯の発育がかなり早期に起こるという事実から発見された。その後、他に多くの増殖因子が発見されてゆくとともに、増殖が発病の要因でもある癌とのかかわりが研究され、現在では EGF の遺伝子と癌化遺伝子（oncogene）の相同性は広く知られるところとなっている。

EGF の作用は大きく見ると次のようなプロセスを経る。

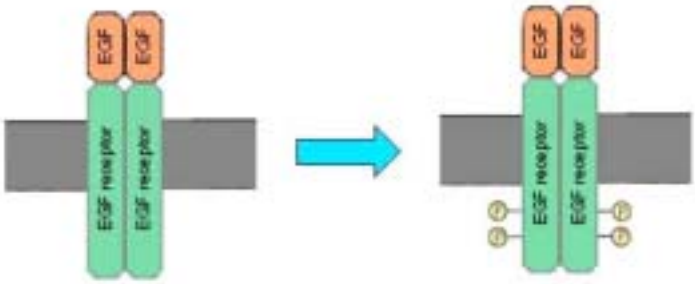
Fig 2.1 EGF の反応経過



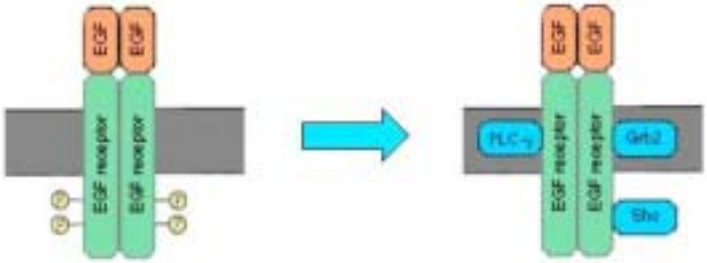
１・EGF が細胞膜上に存在する EGF レセプターの上部に結合する。



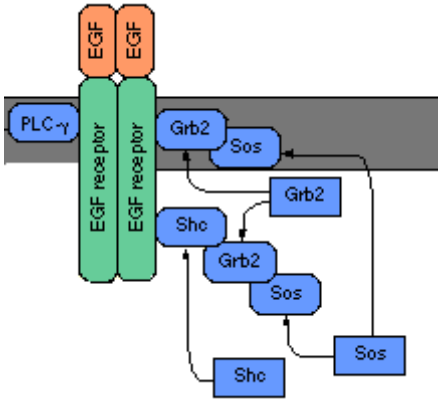
２・EGFR が EGF の結合により活性化され、二量体を作る。



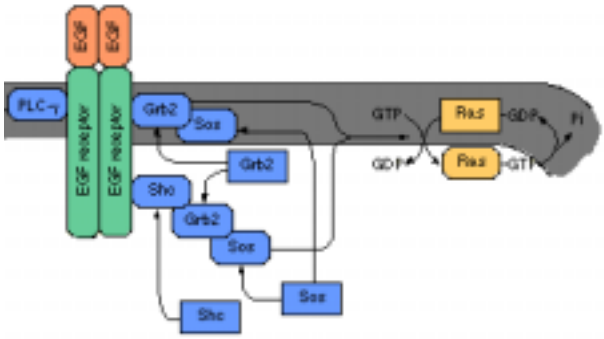
３・細胞膜内にある EGFR の下部のチロシン残基がリン酸化される



４・リン酸化部に SH（Src Homology）ドメインを持つタンパクが結合



５・SH 基を持つタンパクが細胞膜内で他のタンパクと相互作用してシグナルを伝達する。



６・シグナルが低分子量 G タンパク（GTP 結合タンパク）の Ras に集約

その後、

７・MAPK（Mitogen Activated Protein Kinase）の系へシグナルが渡される
８・シグナルが核内に到達し、遺伝子発現が起こる。

という経路を取るが、本研究では１～６までの経路モデルを主に扱う。

2.2.1　EGFR（EGF レセプター）

EGFR は細胞膜を貫通して細胞の膜外、内に存在するタンパクである。膜外の EGF を EGFR が捕らえることで活性化される。EGFR は一分子で作用するのではなく、２つの EGFR 分子が EGF を挟み込むようにして結合することで、活性化されると一般的に考えられてきている。（実際には２つだけで作用するのではないという研究結果が多数報告されているが、まだはっきりとした結果は得られていない。ex.[12]）EGFR が 2 つの分子によりダイマー（２量体）を構成することで膜内に存在するリン酸化基が相手となる EGFR のリン酸化領域を相互にリン酸化しあうことになる。リン酸化はシグナル伝達にとって非常に重要な要素であり、それは後に述べる SH（SrcHomology）ドメインの作用から理解できる。

2.2.2　Ras

Ras は 21kD の低分子量 G タンパク（GTP 結合タンパク）として知られている。G タンパクは、GTP と GDP を特異的に結合するタンパクである。Ras は癌遺伝子として同定され、GTP との結合時に細胞を活性化する。これは、Ras 以下につながる経路である MAP キナーゼカスケードを活性化させることによるものである。また、Ras は細胞膜上に存在することも確認されている。

2.2.3　EGFR から Ras までの経路

シグナル伝達経路はレセプターから G タンパク（GTP 結合タンパク）までで一区切りとなっている。本研究のターゲットとなる経路はレセプターである EGFR から G タンパクである Ras までの EGFR 特有の経路である。ここではそれらについて説明する。

2.2.3.1　SH ドメイン～シグナル伝達分子特有の分子構造～

SH ドメインは SrcHomology ドメインつまり Src に似た構造を持つの意である。これは 1986 年に T.Pawson らによって癌遺伝子の産物である細胞質チロシンキナーゼ Src の中に約 100 個のアミノ酸からなる構造を見出し、他の癌遺伝子の Fps や Abl にも同様の構造が見られたことから SH2 と名づけられたものである。（SH1 ドメインは元々チロシンキナーゼ部位そのものを指していた）この構造はリン酸化したチロシン残基に結合する性質を持つことから見出された。これはチロシンキナーゼによるリン酸化を行うレセプターに結合してシグナル伝達を担う重要な要素である。

また、SH3 ドメインは別の癌遺伝子産物 Crk を Src や PKC（ホスホリパーゼ C）と比較した結果発見された約５０アミノ酸のモチーフであり、プロリン残基を多く含む構造（多プロリン領域　proline-rich domain）と特異性を持って結合することがわかった

これらの SH 領域はレセプターからのシグナルを伝える分子によく見られる構造であり、この構造を持つことはシグナル伝達を担う分子であることを示す指標的な役割を果たしている。

また、最近では SH ドメインだけでなく、PH（Pleckstrin Homology）ドメインについても研究が進んでいる。このドメインは配列だけから見ると相同性が低いが立体構造を比較すると相似性が非常に高くなるドメインである。配列相同性が少ないだけに発見が困難であるが、このドメインは膜上にある脂質分子であるイノシトールリン酸に高い親和性を持っていることが確認され、シグナル分子内にドメインが存在することから膜上の分子とシグナル分子の相互作用について研究が進められている。

2.2.3.2　Ras までの経路に関わるタンパク

Ras に至るまでのタンパクは全てが知られているわけではない。しかしながら、この経路に大きな影響を及ぼすようなタンパクについて数多くの研究がなされている。たいていのタンパクはチロシンキナーゼによる反応やタンパクと複合体を作るために SH ドメインを持っている事が知られている。

a ）　Shc（src homology and collagen）

シグナル伝達分子が、Src ファミリーチロシンキナーゼと相同性のある領域を持つことがわかったことで、SH ドメインの重要性が認識され、さかんに研究されるようになった。その中で９２年、Pelicci らは、ヒト c-fes の SH2 ドメインをプローブとして用いて、Burkitt lymphoma 由来の cDNA ライブラリーを low stringent な条件でスクリーニングし、SH2 ドメインを持つ新しい遺伝子を単離、shc（src homology and collagen）と名づけた。Shc の SH2 ドメインは PTB ドメインを介して、リン酸化されたレセプターに結合する。レセプターに結合した Shc はチロシンキナーゼの基質としてチロシンリン酸化される。続いて、後に説明する Grb2 の SH2 ドメインと結合し、Grb2 は SH3 はこれも後に説明する SOS と結合する。この Shc-Grb2-SOS の複合体形成が他のさまざまなリガンドの Ras を活性化させるシグナルとなっている。

ここで着目すべきは Shc は生化学反応で特有の酵素活性を持たないことである。EGFR と Grb2 の仲介をするようなタンパクとなっており、このようなタンパクをアダプタータンパクと呼ぶ。アダプタータンパクは SH ドメインを持つようなタンパクによく存在する。

b)　Grb2（Growth factor receptor bound protein 2）

Grb2 は新規の SH2 タンパクとして、松岡らと Lowenstein らにより日米ほぼ同時期に cDNA がクローニングされた。分子量は約 25kD と小さなタンパクである。中心

に SH2 ドメインを持ちその両脇に 2 つの SH3 ドメインを持つ。SH2 ドメインはリン酸化チロシンを認識、結合し上流の EGFR や Shc 等と結合する。SH3 に結合しているエフェクタータンパクを介して低分子量型 GTPase の 1 つ Ras を活性化し、それより下流の MAP キナーゼシグナル伝達系を作動させることが知られる。しかし、機能としてはこれ以外にも存在することが報告されている。チロシンリン酸化に関与するタンパクは Cbl、Dynamin、WASP、N-WASP 等が挙げられ、Grb2 がエンドサイトーシスやアクチン細胞骨格の再構成に関わっていることを示すデータも報告されている。

ｃ) SOS（son of sevenless）

SOS は、その名が示すようにショウジョウバエの sevenless（EGF ホモログであるレセプター型チロシンキナーゼ）遺伝子の下流で Ras を活性化する因子として発見された。Sevenless の語源は遺伝子変異の表現系がハエの複眼形成異常（7 番目の視細胞 R7 が欠損すること）に由来する。SOS は Ras に対して活性を持っており、基質である Ras の近傍に局在することで Ras を活性化すると考えられている。

ｄ） PLCγ

ホスホリパーゼ C（PLC）は、PI(4,5)P_2（phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate）を分解してイノシトール（1,4,5）三リン酸（IP_3）やジアシルグリセロール（DAG）等のセカンドメッセンジャーをを産生する酵素である。活性ドメインである X、Y ドメインの他、SH2 ドメイン、SH3 ドメインをもち、血小板由来増殖因子（PDGF）、EGF 等のレセプターチロシンキナーゼ、Src、Fyn 等の癌遺伝子チロシンキナーゼからの情報を SH2 ドメインを介して受け取る因子として注目されてきた。また、PH ドメイン等のの機能ドメインも存在する。

PLCγの活性化機構については、チロシンキナーゼによる PLCγのチロシンリン酸化だけでは活性化されないとする考えが最近では主流となってきている。この場合、PI3 キナーゼ依存的に PLCγの活性化が生じること、PI3 キナーゼの産物である PI(3,4,5)P_3が、PLCγの PH ドメインや SH2 ドメインに結合する必要があることが報告されている。PLC と PI3 キナーゼは、PI(4,5)P_2をどちらも基質とすることから、

細胞内での両者の活性バランスは種々の機能発現に重要であると思われる。

また、最近では C 末端側の SH2 ドメインが PIP_3 と結合することが判明した。その他にも PH ドメインも PIP_3 と結合することが解っている。

e) PI3（phosphatisyl inositol 3）キナーゼ

PI3 キナーゼはイノシトールリン脂質のイノシトール環の３位をリン酸化する酵素である。PI3 キナーゼは 85kD と 110kD の 2 つの触媒サブユニットで構成されている。PI（phosphatidyl inositol）の他に、PI(4)P（phosphatidyl inositol 4-phospphate）、PI(4,5)（phosphatidyl inositol 4,5-bisphospphate）を基質として、それぞれ PI(3)P、$PI(3,4)P_2$、$PI(3,4,5)P_3$ を産生する。細胞レベルでの PI3 キナーゼの役割はかなり広汎で主なものとして PDGF、EGF 等による細胞増殖、細胞骨格の調節、インスリンによる糖代謝、神経突起の伸長、免疫細胞等への関与がある。分子レベルでは低分子量 G タンパク質の機能調節を行い、膜ラッフリング、活性酸素の産生に関与する。PI3K には多様な種類が存在するが、EGF シグナル伝達の場合、レセプター自身または、レセプターに結合したチロシンキナーゼによって活性化されるタイプが関わることになる。

2.2.3.3　Ras までの経路における他の物質

Ras に至る経路は EGFR を開始点として、最終点の Ras まで細胞膜近くで起こるとされている。細胞膜は、リン脂質で出来ているが、最近の研究でこのリン脂質がシグナル伝達に関わる要素として注目されている。先に紹介した PI3 キナーゼはリン脂質である PIP2（ホスファチジルイノシトール２リン酸）を PIP3（ホスファチジルイノシトール３リン酸）にする酵素である。PIP3 は細胞膜受容体刺激に伴い産生され、さまざまなタンパク質の PH ドメインに結合して細胞内局在、酵素活性を調節する。最近知られたこととして PLCγ と EGFR の複合体が PIP3 に結合することが判明した。

最近では、生化学的な研究から、ここに紹介した物質以外にも多数の物質がシグナル伝達に関わっていることを示唆する論文が提出されている。しかし、それらの物質

がどのように化学反応経路に寄与しているか、まして、存在がはっきりと確認されていないものもあるので、ここでは的を絞って、今回モデル化する経路に大きな影響を与えると考えられる物質に焦点を当ててモデルの構築を考えて行く。５章では作成したモデルの時系列データと Sensitivity Analysis を用いて経路と物質の間の相互作用を考察した。

2.2.3.4　経路の全体像

2.2.2.2 で挙げた物質が、どのような経路を作っているかを図にすると以下のようになる。

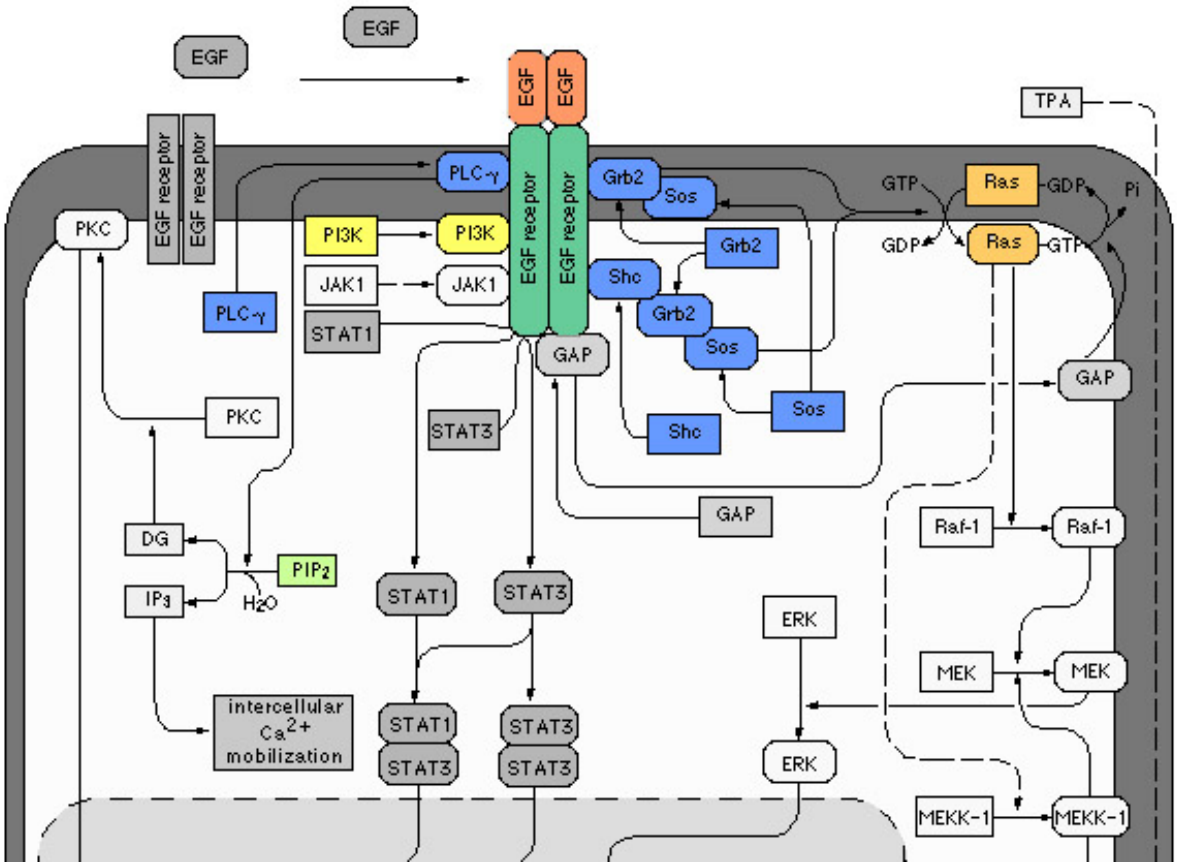


Fig2.2　EGF 経路全体像

EGF シグナル伝達系において、実際には上図に示された物質のように上述した物質以外にも経路に関わっている。

第三章
シグナル伝達に関わるモデルとその分析

3.1　生物モデルにおける表現

生物は一つの化学反応モデルを化学物質の連鎖によって結び付け、シグナルの伝達をおこなう。現在、数学的には化学反応の表現手法は大きく分けて３つの系統に分けられると考えられる。

１）　化学反応を微分方程式で表現し、それを解いた解によって出力を得る。
２）　化学反応を一種の記号変換と考え、出力された記号による離散的な量をもって出力を得る。[23]
３）　空間上において制約条件下で確率を用いて動いた分子一つ一つの衝突を考え、衝突にルールを与えて化学物質を変化させ、出力を得る。[25]

一般的に用いられるのが１）の手法であり、われわれが用いる手法もこれである。２）は生物学との定量的な比較を行うためのものではなく、大まかな特徴を示すような、つまり定性的な特徴を得るための手法である。３）はモンテカルロ法などに代表されるモデルであり、分子一つ一つの位置情報を用いる手法である。近年、生物の正確なモデル化にあたり、空間的な情報が重要な役割を果たすことが議論されるようになり、現在多くの研究者が実際の生化学との比較が出来るモデルを研究している。新

しいモデルが多く存在する中で、われわれは長い間用いられてきた微分方程式をベースとしてモデルを考えていくことにした。

3.1.1　モデル選択上の注意点

過去に生体内の化学反応を扱う場合、限定された条件下であることが多い。例えば、後に説明する Michaelis-Menten 式の成立には、迅速平衡法（rapid equilibrium method）、あるいは定常状態法（method of steady state）による仮定が必要となる。今までのモデルが限定条件下であるということは、今までの研究においては、既知でない反応を織り込んだ、全体の反応に対し適用する有効なモデルが開発されることが無かったということである。このことは詳細にモデルを記述しようとするほどに条件が付け加えられていくということにも起因する。

モデルを構成するために重要なのは、分子レベルの挙動を追う必要があるのかあるいは化学反応速度論を用いれば表現できるのかなどのスケールを見極めることである。今までには細胞内の化学反応のダイナミクスを記述するような手法を用いた研究が行われてこなかったことから有効なモデルが存在しなかったのである。最近、化学反応のダイナミクスの重要性が議論されるようになり新たなモデルが提案されるようになってきた。ダイナミクスを記述する上で重要なのは以下のようなことである。

１）　現実の状態におけるシステムのエッセンスをモデルに取り込む
２）　実験結果と、定性的、定量的に矛盾がない
３）　大きなシステムでも解析できるようなモデルにする
４）　全ての反応に適用可能なモデルにする
５）　測定量によって特徴付けをすることが出来る
６）　生化学的な視点で捉えることが出来る
７）　数学的な分析が可能である

これらの特徴を全て満たすことは困難であり、たいてい、特定の生化学的な現象を記述すると非常に複雑な式の形をとり、実際の生化学的なデータとの対応を取るのが難

しい。そこで、ダイナミクスを表現するための手法として必要十分であるようなモデルが研究されてきた。微分方程式を用いる場合、最近の主流となっているモデルは S-system と GMA である。新しい化学反応モデルを導入する前に過去より微分方程式でよく用いられた手法についてまず説明したい。

3.1.2　生化学における微分方程式

微分方程式とは、正式には独立変数、その関数およびその導関数の間の関係式のことを言う。化学反応においては通常、基質等の濃度による変化量を表現して、ある時間における基質（あるいは他の酵素等の）濃度を求めることを目的として式を立てる。

全反応における、それぞれの基質濃度を X_i と表現する。微分方程式においては、まず、$\dot{X}_i(t) =$ ある時間での X_i の変化量 $= \dfrac{dX_i}{dt}$ として、時間の関数で表現する。

ここで S_n を基質濃度、E_n を酵素濃度、P_n を生成物濃度とすると

$\dot{X}_i =$ 基質、酵素、他の関連因子、生成物の濃度による関数
$= f(S_1, S_2 \mathrm{K}, E_1, E_2, \mathrm{K}, F_1, F_2 \mathrm{K}, P_1, P_2 \mathrm{K})$
（S_i、E_i、F_i、P_i は順に基質、酵素、関連因子、生成物の濃度）

と記述できる。つまり、関数部位の特徴こそがその式の特徴となる。
さらに一般的には、性質による物質の区分を無くし、全ての物質がエフェクターであり基質であると考えれば、

$$\dot{X}_i = V(X_1, X_2, X_3, \mathrm{K}, X_n)$$

とも考えられる。区分による考え方の相違は今まで考えられてきた複雑なモデルと後に説明する S-system と GMA の考え方の違いを反映している。

3.1.3　生化学における古典的な酵素反応式

生化学の世界において、非常に重要な役割を果たすのは酵素による化学反応である。酵素（enzyme）は、高い分子認識力を持った生体反応に関与する触媒で、反応の特異性（specificity）がきわめて強く、かつ選択性（selectivity）が高い。通常、１つの反応系に１つの酵素が対応しており、熱化学的に可能な反応のうち限られた１つの反応のみに関与する。したがって、該当反応以外の反応による副産物は生成しない。酵素の作用を受ける物質を基質（substrate）、酵素が触媒するような反応を酵素反応という。

3.1.3.1　酵素の特徴

酵素は、通常の化学触媒と同様に

１）　活性エネルギーを下げて反応を促進する
２）　反応過程では変化するが最終的には元の状態に戻る
３）　反応系の平衡定数には変化はない

といった特徴を持つと同時に以下の特徴も持っている。

１）　反応速度が大きい。
酵素反応は酵素なしの時の10^6～10^{12}倍速いのが普通で、化学触媒反応に比べても数桁速い。

２）　酵素反応は穏やかな条件で進む
酵素反応が起こる条件は 100℃以下、大気圧、ほぼ中性の pH である。（もちろん、アルカリ耐性菌、高熱菌等の持つ酵素など、例外は存在している。）これに対して化学触媒の場合は高温、高圧、極端な pH が普通である。

３）　特異性を持つ。

酵素反応では基質、生成物の両者に対し化学触媒よりも特異性が高く、副反応がほとんどない。ポリペプチド合成で比較すると、通常の化学反応では、副反応や不完全反応がつきもので、まずまずの収率で合成できるのが１００残基程度であるが、酵素では１０００残基を超えるポリペプチドが間違いなく合成される。

４）　調節能を持つ。

酵素活性は基質以外の物質により支配される。その機構はアロステリック作用、酵素の共有結合による修飾、酵素合成量の調節などいろいろである。

3.1.3.2　酵素の化学反応式

酵素反応を表現する式として生化学者によって用いられてきたのが、Michaelis-Menten 式である。Michaelis-Menten 式は 1902 年の Adrian Brown の β-フルクトフラノシダーゼによるスクロースの分解に関する研究に起源をもつ。

スクロース＋H_2O→グルコース＋フルクトース

Brown はスクロース濃度が酵素濃度よりはるかに大きい場合、反応速度は基質となるスクロースによらないことを発見した。この事実から、酵素反応は以下のように基質と生成物の間に酵素と基質の複合体が存在すると考えた。

$$\mathrm{E}+\mathrm{S} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \mathrm{ES} \xrightarrow{k_2} \mathrm{P}+\mathrm{E} \qquad \text{(eq 3.1)}$$

このように考えれば基質濃度が大きくとも第二段階の反応が律速段階となり、全体の反応速度は基質濃度が大きくなっても変わらないことになる。

この場合求める物質 P の生成速度は

$$v=\frac{d[\mathrm{P}]}{dt}=k_2[\mathrm{ES}] \quad \text{(eq 3.2)}$$

そして、基質、酵素それぞれの濃度を参照にした場合[ES]の変化量は

$$\frac{d[\mathrm{ES}]}{dt} = k_1[\mathrm{E}][\mathrm{S}] - k_{-1}[\mathrm{ES}] - k_2[\mathrm{ES}] \quad \text{(eq 3.3)}$$

となるが、この式は仮定を置かなければ積分が出来ない。そこで次のような仮定を置く。

１． 平衡の仮定

1913 年 Leonor Michaelis と Maude Menten は Victor Henri の考えを基礎として $k_{-1} \gg k_2$ とし、第一段階反応は平衡にあると仮定した。

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[\mathrm{E}][\mathrm{S}]}{[\mathrm{ES}]} \quad \text{(eq 3.4)}$$

K_s は第一段階反応の解離定数である。この仮定により積分可能となる。

２．定常状態の仮定

生理条件下基質濃度は酵素濃度よりはるかに大きいと考えられる。反応のごく初期のミリ秒単位の時間を除けば、[ES]は基質が反応の最後までほぼ一定と考えられる。この場合、ES は生成と分解が同量で行われていると考えられるので、

$$\frac{d[\mathrm{ES}]}{dt} = 0 \quad \text{(eq 3.5)}$$

であり、濃度が一定であると仮定できる。これを定常状態という。
初期に投入する酵素量を$[\mathrm{E}]_\mathrm{T}$とすれば、$[\mathrm{E}]_\mathrm{T} = [\mathrm{E}] + [\mathrm{ES}]$である。この式と(eq 3.5)とを(eq 3.3)に代入すると

$$k_1([\mathrm{E}]_\mathrm{T} - [\mathrm{ES}])[\mathrm{S}] = (k_{-1} + k_2)[\mathrm{ES}] \quad \text{(eq 3.6)}$$

この式を変形して[ES]について解くと

$$[\mathrm{ES}]=\frac{[\mathrm{E}]_{\mathrm{T}}[\mathrm{S}]}{K_M+[\mathrm{S}]} \qquad (K_M=\frac{k_{-1}+k_2}{k_1}) \qquad \text{(eq 3.7)}$$

よって、(eq 3.2)から

$$v=\frac{k_2[\mathrm{E}]_{\mathrm{T}}[\mathrm{S}]}{K_M+[\mathrm{S}]}=\frac{V_{\max}[\mathrm{S}]}{K_M+[\mathrm{S}]} \qquad \text{(eq 3.8)}$$

となり、これが Michaelis-Menten 式である。$V_{\max}=k_2[\mathrm{E}]_{\mathrm{T}}$ であり、これは基質が酵素で飽和しているときの速度であり、最大の反応速度を示している。

3.1.4　S-system と GMA

通常、化学反応系の構築において、定性的、定量的データの全てがそろっていることが少ないことは前述した。そこで、化学反応をシミュレーションする場合、細かい生化学的な特徴を示さなくとも、ダイナミクスを表現できるような式が必要となる。これを目指して考案されたのが S-system と GMA である。

3.1.4.1　S-system（synergism and saturation – system）

数学的に厳密さを求めなくとも、次のような式は化学反応系において正しいことは理解できる。

$$\dot{X}_i=V_i^+-V_i^-$$

ここで

$$V_i^+ = V_i^+(X_1, X_2, \mathrm{K}\ X_n, X_{n+1}, \mathrm{K}\ , X_{n+m})$$

$$V_i^- = V_i^-(X_1, X_2, \mathrm{K}\ X_n, X_{n+1}, \mathrm{K}\ , X_{n+m})$$

であり、$X_1, X_2, X_3, \mathrm{K}\ , X_n$は非独立変数を、$X_{n+1}, X_{n+2}, \mathrm{K}\ , X_{n+m}$は独立変数を明示的に示している。ここでは、示さないが累乗関数を用いると関数の近似がうまくいくことが知られており、また、通常の化学反応速度方程式を累乗関数で拡張すると

$$V_i^+ = \alpha_i X_1^{g_{i1}} X_2^{g_{i2}} \Lambda\ X_n^{g_{in}} X_{n+1}^{g_{i,n+1}} \Lambda\ X_{n+m}^{g_{i,n+m}}$$

$$V_i^- = \beta_i X_1^{h_{i1}} X_2^{h_{i2}} \Lambda\ X_n^{h_{in}} X_{n+1}^{h_{i,n+1}} \Lambda\ X_{n+m}^{h_{i,n+m}}$$

と表現できる。一見すると単純すぎて、生化学における複雑なプロセスを表現できなさそうに見える。しかし、シンプルでありながら、非常に良い近似を与えてくれる。実際、複雑な濃度の振動も表現でき、カオスも表現できることが示されている。

ここで、解りやすく今までの式をまとめると

$$\dot{X}_i = \alpha_i \prod_{j=1}^{n+m} X_j^{g_{ij}} - \beta_i \prod_{j=1}^{n+m} X_j^{h_{ij}} \qquad \text{for} \qquad i = 1,2,\mathrm{K}\ ,n \qquad \text{（eq 3.9）}$$

という式になる。この表現手法は S-system（synergism and saturation – system）と呼ばれている。この表現手法は式として簡潔であるため、経路の解析もやりやすいという利点がある。

3.1.4.2　GMA(Generalized Mass Action) system

S-system とは別に、累乗関数で表現するモデルが存在する。それが GMA(Generalized Mass Action) system である。S-system では

$$\dot{X}_i = V_i^+ - V_i^-$$

と表現されたモデルを GMA では反応に速度式の対象となる物質とそれに寄与する物質の反応ごとに分割する。つまり、

$$\dot{X}_i = \sum_{j=1} V_{ij}^+ - \sum_{j=1} V_{ji}^-$$

と表現し、最終的に

$$\dot{X}_i = \gamma_{i1} \prod_{j=1}^{n+m} X_j^{f_{ij1}} + \gamma_{i2} \prod_{j=1}^{n+m} X_j^{f_{ij2}} + \Lambda + \gamma_{ik} \prod_{j=1}^{n+m} X_j^{f_{ijk}} \qquad i = 1,2,\mathrm{K},n \qquad \text{(eq 3.10)}$$

と表現する。

3.1.4.3　S-system、GMA を導入する利点

今まで化学反応ネットワークのダイナミクスを表現するような一般的なモデルが無かったことが上述のモデル導入における第一のモチベーションであるが、詳しくは以下のような点が利点となっているからである。

- 近似理論における数学的手法において一般的な手法で得られている。
- 正確に処理できる数値範囲が広い。累乗関数は濃度の変化が大きくとも正確に値を算出できる。これは濃度変化が１０、１００倍になるようなことがよく起きる生体内の反応では必要不可欠である。
- S-system で用いた近似によって化学物質の濃度の相対値は化学反応経路によって合成された物質や速度係数と線形的に関わっている。これは後に述べる解析手法である Sensitivity Analysis に非常に重要な役割を果たしている。

3.1.5　化学反応シミュレータ

化学反応のシミュレーションをするにあたって、いくつかの有名なツールを紹介する。いくつかのツールが存在しているが、そのほとんどが微分方程式エンジンである。現在、よく知られる微分方程式系の細胞シミュレータを紹介する。

a) Gepasi

University of Wales の Pedro Mendes のチームが作成した Windows 上で動作する微分方程式による化学反応経路シミュレータ[7]。GUI が使いやすく、解析機能も付属している。現在、さらに洗練したシミュレーションシステムである COPASI を開発している。本研究のシミュレーションも Gepasi で行った。

b) Virtual Cell

NCRR（National Center for Research Resources）、NIH（National Institute of Health）より支援をうける NRCAM（National Resource for Cell Analysis and Modeling）が開発した Java によるリモート細胞シミュレータ[8][9][10]。NRCAM のホームページ[30]上からシミュレーションできる。細胞の空間的な情報を組み入れたシミュレーターである。最近、リン脂質に関係した神経細胞のカルシュウム濃度のシミュレーションが実装され注目を集めた。

d) E-CELL

慶応大学の富田勝教授のチームが開発しているシミュレータ[11]。富田教授は、早くから細胞シミュレータについて研究を行っており、細胞シミュレータの草分け的な存在である。現在、E-CELL2 と E-CELL3 の開発が進められている。E-CELL2 は Java で記述されプラットフォームを選ばない E-CELL 1 であり、E-CELL3 は次世代のシミュレータとなる予定である。

3.2　Sensitivity Analysis による分析

細胞の状態は、まず、時系列のデータと生化学的なデータや性質を比べることで行われる。しかしながら、それだけでは細胞内に存在する大量の化学物質がどのように関係を持っているかを捉えることは出来ない。そこで、ダイナミクスの観点から物質間の関係を示すような分析手法を導入する必要性がある。これを行う手法として、われわれは Sensitivity Analysis[6]を用いることにした。

Sensitivity Analysis は、生物学における手法ではなく、一般的にある系において特定のパラメータの微小変化に対して系全体がどのような変化をするかを得る数学的手法である。われわれが用いるのは、Sensitivity Analysis の中でも生物を対象とした解析手法である MCA（Metabolic Control Analysis）である。

MCA は Kacser、Burns[15]や Heinrich、Rapoport[16]によって開発され、生物における感応解析の中でも、もっともよく知られている手法である。基本的なコンセプトとしては、特定の物質における反応速度の微小変化に対する他のパラメータへの影響を見るものである。

ここからは、数学的に詳しく説明していく。ある反応 i の反応速度を 、平衡状態における反応 k におけるフラックス（流束）を J_k、平衡状態における物質 X_j の濃度を x_j とする。
このとき

$$C_i^{J_k} = \frac{\partial \ln|J_k| / \partial p_i}{\partial \ln|v_i| / \partial p_i} = \frac{\partial \ln|J_k|}{\partial \ln|v_i|} \qquad C_i^{J_k} = \frac{\partial \ln|x_j| / \partial p_i}{\partial \ln|v_i| / \partial p_i} = \frac{\partial \ln|x_j|}{\partial \ln|v_i|} \qquad i, j, k = 1,2,3,\mathrm{K}$$

(eq3.11)

をぞれぞれ、flux control coefficient、concentration control coefficient と呼ぶ。
（ p_i は反応 i に直接的に影響を与えるパラメータ一般を指す）

これらの係数は化学物質間を流れる経路や化学物質濃度の、反応速度による影響を示す係数であり、化学反応経路について考察するのに役立つ。上に挙げた係数は対数の微分の形で表現されるのには理由がある。それぞれの係数の式を書き換えると

$$C_i^{J_k} = \frac{\partial \ln|J_k|}{\partial \ln|v_i|} = \frac{|v_i|}{|J_k|} \cdot \frac{\partial |J_k|}{\partial |v_i|} = \frac{\partial |J_k| / |J_k|}{\partial |v_i| / |v_i|} \qquad C_i^{x_j} = \frac{\partial \ln|x_j|}{\partial \ln|v_i|} = \frac{|v_i|}{|x_j|} \cdot \frac{\partial |x_j|}{\partial |v_i|} = \frac{\partial |x_j| / |x_j|}{\partial |v_i| / |v_i|}$$

となる。この式は flux control coefficient や concentration control coefficient が化学反応 i の反応速度の比に対して、フラックス、化学物質濃度の比にどの程度の影響を与えるかを示す指標になることをあらわしている。つまり、それぞれ、ある反応速度が 1 パーセント変化したとき、特定のフラックスや化学物質濃度が何パーセント変化するかを示す指標なのである。

2 つの係数は、それぞれ面白い特性を持っている。それは以下のような式を満たすということである。

$$\sum_{i=1}^{n} C_i^{J_k} = 1 \qquad \sum_{i=1}^{n} C_i^{x_j} = 0 \qquad \text{(eq 3.12)}$$

このように、あるフラックスの変化とフラックスの比に対する全化学反応の速度の変化と濃度との比の和は 1 になり、ある化学物質の変化量と元の濃度との比に対する全ての化学反応速度の比は 0 になるというのである。この式はその性質から summation relationships と呼ばれている。

MCA を用いるに際して、常に注意しておかなければならないのは、定常状態（steady state）を仮定しているということである。定常状態ということは、時間進行によって反応が収まり、その後、変化を起こさなくなる状態のことを示すことになる。MCA における係数を求める場合、速度式において全ての物質の速度を 0 と置く仮定により解を得る。すなわち、MCA の結果は全ての時間における影響を示すものではないのである。定常状態は代謝系では非常に重要である。なぜなら、生物は定常

状態における物質の収量が生育のための資源になるからである。シグナル伝達に関しては、単純に物質の収支だけではなく、シグナルの変動が大きな意味を持っている。つまり、定常状態だけでは解析不十分といえる。以前に MCA をシグナル伝達に適用した例も無いが、あるパラメータに対して、システムが以上に反応する、定常状態時のシグナル物質の挙動を探る、つまり、シグナルが「オフ」になっている状態を解析する意味合いでは適用する価値があると思われる。

第四章
EGF モデルに関する考察と Kholodenko モデルの改良

4.1　モデルの構成

4.1.1　経路の構成を考えるにあたって

EGF シグナル伝達経路を含め、生物学においてはタンパク質による化学反応の経路をはっきりと断定することは出来ない。もちろん、多くの研究を通して「ほぼ確か」と考えられる事実は数多く存在するが、発見されていない要素等を考慮に入れると経路の量的なパラメータが変化してしまう。また、知られているタンパク全てを導入することも出来ない。定性的、定量的データが得られていなければ不確かな部分が多数あらわれ、モデルの検証が不可能になってしまうからである。現在の研究では、経路全体がユニットとして考えられるような系を選んで、経路に導入するタンパク質や化学物質を選択していく。

4.1.2　モデルの再構成

経路を作るための物質の選択において重要なのは実験的な見地で物質を選ぶ必要があることである。実験データが関わりを持つと思われる物質を選んでいかなければならない。このことは、実験の経験が多くなければ物質の導入を考えるのが難しく、

まして、一からモデルを作ることは非常に困難であることを示している。これを解決するためには、新しいモデルを作成するのではなく、過去のモデルを解析し、改良することで再構成するのが適切であると考えた。われわれは Boris N.Kholodenko の EGF 経路モデル[13]に着目し、これを改良する手法をとることにした。

4.2　Kholodenko モデル

このモデルは Boris N.Kholodenko が EGF の化学反応経路についてモデル化したものであり、生化学的実験のデータとモデルのデータを比較をしている点で化学反応経路モデルに大きな貢献をした。この論文が発表された１９９９年当時は、生化学データとモデルを比較するような研究においても、代謝系の生化学データを用いたモデル化が始まったばかりであり、あまり生化学的に数値データが得られていなかったシグナル伝達系を扱うものはほとんど無かった。Kholodenko モデルは左図に示すような経路で構成される。

（モデルの図は２章とあわせて見ていただきたい。）

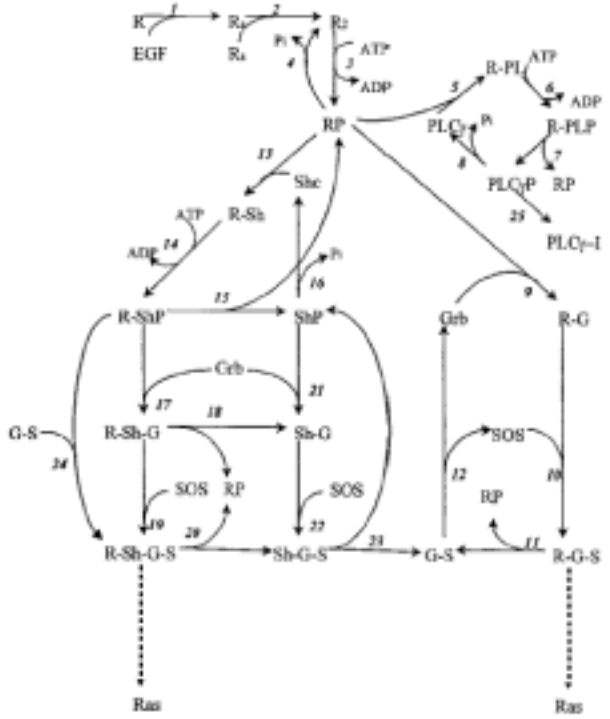


Fig4.1　Kholodenko モデルの経路図

現在でもシグナル伝達系においては、生化学的な研究で数値的データを取る研究は広く行われておらず、定性的な事実、通常、新たな経路を探すような研究が主流である。研究手法についても確立されておらず、正確さを欠くのが現状である。

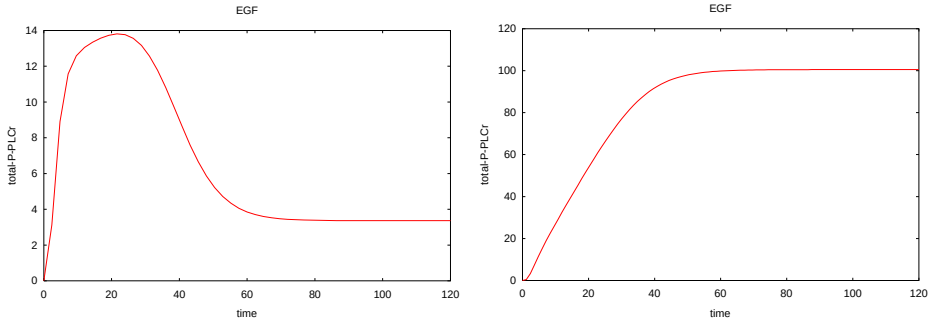
4.2.1　Kholodenko モデルの数値的表現

Kholodenko モデルは３章で説明したモデルの中でも GMA の階乗項が全て１、つまり、係数×濃度の積を全ての経路について持つ微分方程式で表現されている。この表現手法は Mass-Action と呼ばれている。詳しくは Table 4.1 に示す。

4.2.2　Kholodenko モデルに関する考察

Kholodenko モデルは、EGF のシグナル伝達において中核となる SOS、Grb2 の複合体形成のダイナミクスと複合体による Ras へのシグナル伝達を非常によく表現していると考えられる。少ない物質の複合体形成ながら、複合体の形成が一つの経路で行われるだけでなく、組み合わせによってコントロールされる様子をうまく表現していると思われる。

しかしながら PLCγによる複合体周辺の系に関しては疑問が残る。SOS-Grb2 複合体とは、ほぼ分離した経路を取り、ダイナミクスを表現したとは考えにくいのである。また、PLCγに関連する複合体が形成する経路のサイクル上では、唐突に PLCγに抑制因子が着くことを持ち出している。Kholodenko の論文[13]中には PLCγの生化学的データとの比較があり、抑制因子を入れることで実際のデータと合致させることが出来ることが記されている。実際に、抑制因子を削除して得られたリン酸化 PLCγと Kholodenko モデルのリン酸化の PLCγデータを示す。



(a) Kholodenko モデル　　(b)　PLCγ経路削除した場合

Fig4.2　リン酸化 PLCγ

確かに、PLCγ抑制因子が無いモデルと比較するとリン酸化 PLCγは生化学的データに近づいている。しかしながら、モデルの形状を見てみると PLCγ周辺の経路はサイクルを取っている以外に何の経路も持っていない。これはモデルとして不適切であると考えられる。PLCγのデータと EGF 経路を結びつけるために、生化学的な値に合致するように経路に対して応急処置をしたと考えられるのである。

4.2.3　PLCγ周辺の生化学における研究

先にも述べたように１９９９年当時は生化学的データが少なく、定性的なデータ、特に経路に関しても未判明な部分が多かった。現在でも、シグナル伝達系を構成する全要素から見れば、理解されている部分はごく一部である。しかしながら、１９９９年に比べると、非常に多くのことが理解されるようになってきた。

Kholodenko の論文中からもうかがえることであるが、PLCγ周辺は未知の部分が多く存在していた。しかし、最近２年間に PLCγ周辺の研究が進み徐々に経路が判明してきた。PLCγ以外にも、以前に比べて研究が進み、性質がよく理解されるようになってきた物質がある。PI3（phosphatisyl inositol 3）キナーゼもまた、そのような物質の一つである。われわれがこの２つの物質について調べてみたところ、作用する経路に同じ物質が関与していることがわかった。それはリン酸化脂質である。リン酸化脂質は生物の細胞膜を形成する物質としてよく知られているが、単に膜を形成するだけでなく、多くの物質と作用して経路を作ることも知られている。EGF から Ras までの経路が膜の近傍で起こることは偶然ではなく、このリン酸化脂質の必要性を示すものと思われる。

Table 4.1　Kholodenko モデルの反応式とパラメータ

反応経路番号	反応式	反応式係数パラメータ
1	$k_1 \cdot [R] \cdot [EGF] - k \cdot [R_a]$	$k_1 = 0.003$　$k_{-1} = 0.06$
2	$k \cdot [R_a] \cdot [R_a] - k \cdot [R_2]$	$k_2 = 0.01$　$k_{-2} = 0.1$
3	$k_3 \cdot [R_2] - k_{-3} \cdot [RP]$	$k_1 = 1$　$k_{-1} = 0.01$
4	$\dfrac{V_4 \cdot [RP]}{K_4 + [RP]}$	$V_4 = 450$　$K_4 = 50$
5	$k_5 \cdot [RP] \cdot [PLC\gamma] - k_{-5} \cdot [R\text{-}PL]$	$k_5 = 0.06$　$k_{-5} = 0.2$
6	$k_6 \cdot [R\text{-}PL] - k_{-6} \cdot [R\text{-}PLP]$	$k_6 = 1$　$k_{-6} = 0.2$
7	$k_7 \cdot [R\text{-}PLP] - k_{-7} \cdot [RP][PLC\gamma P]$	$k_7 = 0.3$　$k_{-7} = 0.006$
8	$\dfrac{V_8 \cdot [PLC\gamma P]}{K_8 + [PLC\gamma P]}$	$V_8 = 1$　$K_{-8} = 100$
9	$k_9 \cdot [RP] \cdot [Grb] - k_{-9} \cdot [R\text{-}G]$	$k_9 = 0.003$　$k_{-9} = 0.05$
10	$k_{10} \cdot [R\text{-}G] \cdot [SOS] - k_{-10} \cdot [R\text{-}G\text{-}S]$	$k_{10} = 0.01$　$k_{-10} = 0.06$
11	$k_{11} \cdot [R\text{-}G\text{-}S] - k_{-11} \cdot [RP][G\text{-}S]$	$k_{11} = 0.03$　$k_{-11} = 4.5 \times 10^{-3}$
12	$k_{12} \cdot [G\text{-}S] - k_{-12} \cdot [Grb][SOS]$	$k_{12} = 1.5 \times 10^{-3}$　$k_{-12} = 0.6$
13	$k_{13} \cdot [RP] \cdot [Shc] - k_{-13} \cdot [R\text{-}Sh]$	$k_{13} = 0.09$　$k_{-13} = 0.6$
14	$k_{14} \cdot [R\text{-}Sh] - k_{-14} \cdot [R\text{-}ShP]$	$k_{14} = 6$　$k_{-14} = 0.06$
15	$k_{15} \cdot [R\text{-}ShP] - k_{-15} \cdot [ShP][RP]$	$k_{15} = 0.3$　$k_{-15} = 9 \times 10^{-4}$
16	$\dfrac{V_{16} \cdot [ShP]}{K_{16} + [ShP]}$	$V_{16} = 1.7$　$K_{16} = 340$
17	$k_{17} \cdot [R\text{-}ShP] \cdot [Grb] - k_{-17} \cdot [R\text{-}Sh\text{-}G]$	$k_{17} = 0.003$　$k_{-17} = 0.1$
18	$k_{18} \cdot [R\text{-}Sh\text{-}G] - k_{-18} \cdot [RP][Sh\text{-}G]$	$k_{18} = 0.3$　$k_{-18} = 9 \times 10^{-4}$
19	$k_{19} \cdot [R\text{-}Sh\text{-}G] \cdot [SOS] - k_{-19} \cdot [R\text{-}Sh\text{-}G\text{-}S]$	$k_{19} = 0.01$　$k_{-19} = 2.14 \times 10^{-2}$
20	$k_{20} \cdot [R\text{-}Sh\text{-}G\text{-}S] - k_{-20} \cdot [Sh\text{-}G\text{-}S][RP]$	$k_{20} = 0.12$　$k_{-20} = 2.4 \times 10^{-4}$
21	$k_{21} \cdot [ShP] \cdot [Grb] - k_{-21} \cdot [Sh\text{-}G]$	$k_{21} = 0.003$　$k_{-21} = 0.1$
22	$k_{22} \cdot [Sh\text{-}G] \cdot [SOS] - k_{-22} \cdot [Sh\text{-}G\text{-}S]$	$k_{22} = 0.03$　$k_{-22} = 0.064$
23	$k_{23} \cdot [Sh\text{-}G\text{-}S] - k_{-23} \cdot [ShP][G\text{-}S]$	$k_{23} = 0.1$　$k_{-23} = 0.021$
24	$k_{24} \cdot [R\text{-}ShP] \cdot [G\text{-}S] - k_{-24} \cdot [R\text{-}Sh\text{-}G\text{-}S]$	$k_{24} = 0.009$　$k_{-24} = 4.29 \times 10^{-2}$
25	$k_{25} \cdot [PLC\gamma P] - k_{-25} \cdot [PLC\gamma P\text{-}I]$	$k_{25} = 1$　$k_{-25} = 0.03$

初期濃度は EGF=680nM、R=100nM、PLCγ=105nM、Grb2＝85nM、SOS=34nM、Shc=150nM であり、他の物質は 0nM でシミュレーションを開始している。

4.3　Kholodenko モデルの拡張

文献調査によって 4.1 節で説明したようなモデル上の不備があることが判明した。そこで、この節ではわれわれの行った研究の根幹となる Kholodenko モデルの拡張について説明する。

4.3.1　Kholodenko モデルの経路に関する拡張

Kholodenko モデルは、PLCγ周辺の経路が不備であり、それと同時に１９９９年よりも経路の知識が増えたことを先に述べた。そこで、われわれは PLCγ周辺の拡張を行うことが出来るのではないかと考えた。PI3K は EGF レセプターに結合し、PIP2（phosphatisyl inositol bisphospphate）が PIP3（phosphatisyl inositol triphospphate）になる反応を触媒する。PLCγは EGF レセプターに結合するだけでなく、PIP3 に細胞膜上で結合することで活性が生じる形になる。

この一連の反応を図示すると以下のようになる。

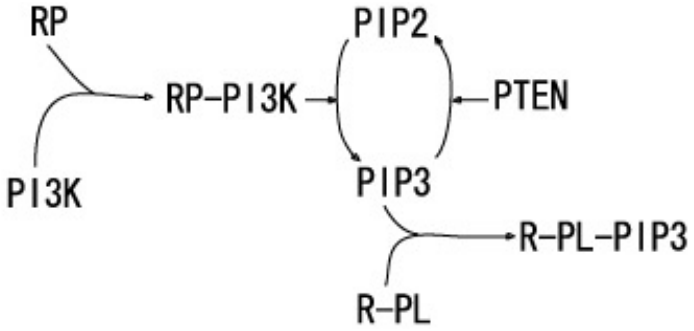


Fig 4.3　拡張する経路

この経路を Kholodenko モデルに拡張し、その様子を見てみることに PLCγに抑制因子が付着することで EGF レセプターへの結合を抑制するという報告も一部でなされているが、詳しい知識が文献から見出せなかったことから単純に削除する方針をとることにする。

以上のことを踏まえ構成したモデルの全体像を次に示す

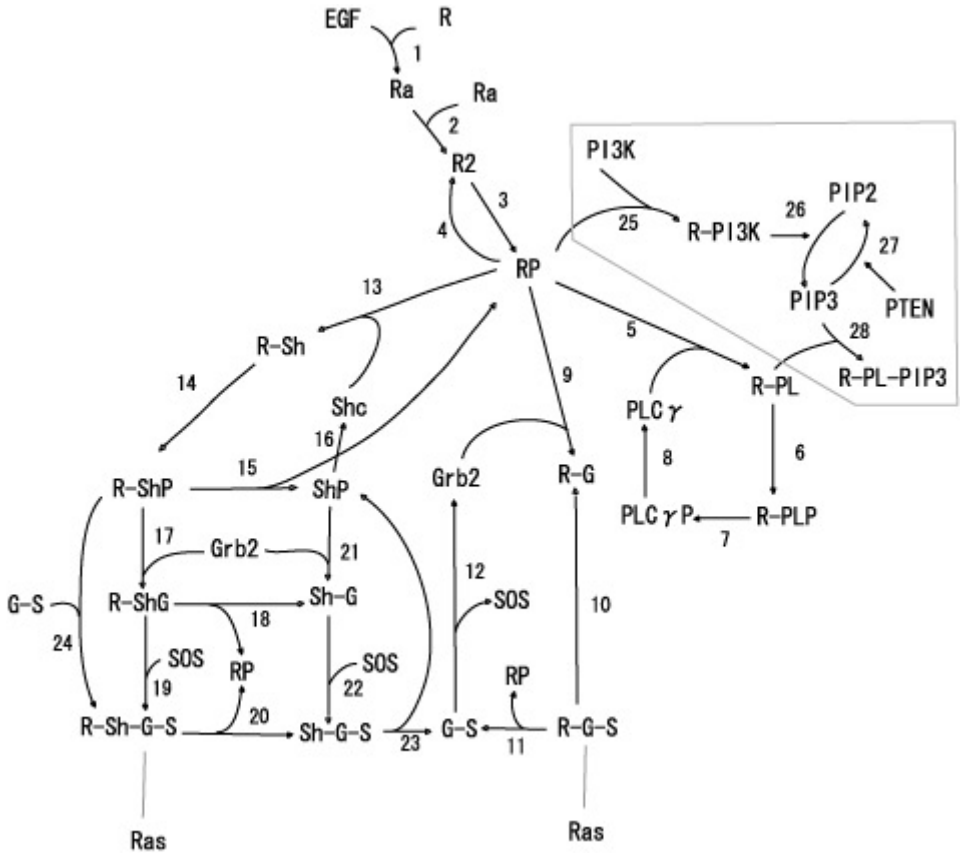


Fig 4.4　Kholodenko モデルを改良した拡張モデル

4.3.2　経路に付随する式とその係数について

経路を数値的にモデル化するためには、拡張した経路に関して係数を得る必要がある。数値化にあたって生化学文献を多数当たってみた。しかしながら、そこから得られた知識は定性的なデータがほとんどであり、かろうじて PI3 キナーゼに関する Michelis-Menten 式が得られる程度[19]であった。また、文献のデータそのものにもモデル化にあたって、問題点がある。文献によると、PI3 キナーゼの反応は異常に遅い。文献で行われた実験は in vivo（生体内）で行われたものではなく、in vitro（試験管内）で行われた実験なのである。実際に活性を計測する際には、細胞をつぶし、得られた PI3 キナーゼをビーズ上に固定して行われている。このため、タンパクが失活する可能性は否めない。ゆえにこの活性は比較対象がある場合、つまり、同じ実験

環境下で活性の比較を見ることは出来るが、in vivo 活性を示すものではない。

以上のことを考えた結果、われわれは経路の特性を見つつ、Kholodenko の報告したデータと比較しながら係数データを調整し、適切な値を決めていくことにした。式は、結合に関しては Mass-Action で表現し、酵素反応には$V_{\max}$を酵素濃度×係数k_{cat}と表現した式を用いることにした。

以下に拡張した式を示す。

Table 4.2　拡張モデルの反応式とパラメータ

反応経路番号	反応式	反応式係数パラメータ
25	$k_{25}[\mathrm{RP}][\mathrm{PI3K}] - k_{-25}[\mathrm{RP\text{-}PI3K}]$	$k_{25} = 0.01 \ k_{-25} = 0.001$
26	$\dfrac{k_{26_{cat}}[\mathrm{RP\text{-}PI3K}][\mathrm{PIP2}]}{\mathrm{K}_{26} + [\mathrm{PIP2}]}$	$k_{26_{cat}} = 1 \ \ K_{26} = 500$
27	$\dfrac{k_{27_{cat}}[\mathrm{PTEN}][\mathrm{PIP3}]}{\mathrm{K}_{27} + [\mathrm{PIP3}]}$	$k_{27_{cat}} = 1 \ \ K_{27} = 500$
28	$k_{28}[\mathrm{R\text{-}PL}][\mathrm{PIP3}] - k_{-28}[\mathrm{R\text{-}PL\text{-}PIP3}]$	$k_{25} = 0.1 \ k_{-25} = 0.001$

初期値は Kholodenko モデルのデータに PI3K=100nM、PIP2=100nM、PTEN=100nM で他の物質を０nM で拡張した。

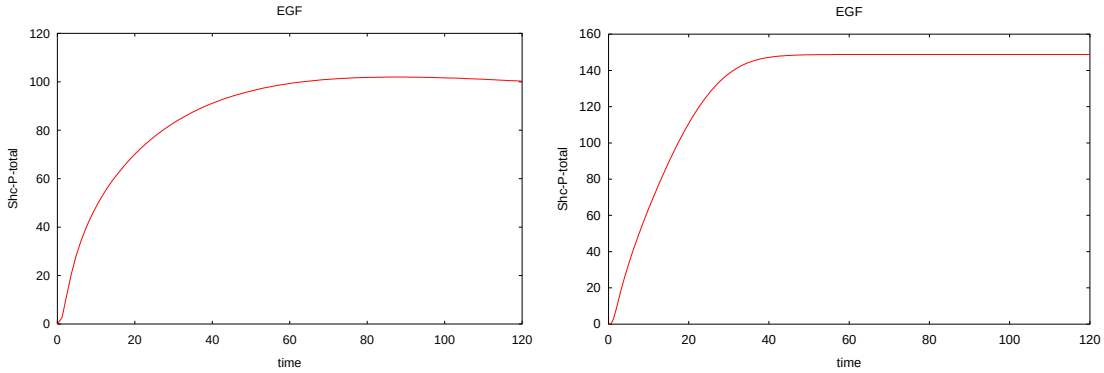
第五章
結果と経路シミュレーションの展望

この章では、Kholodenko モデルの結果とその拡張によって得られた結果との比較、考察を行い、実験から得られた知見から今後の生物内化学反応経路シミュレーションの展望について述べていく。

5.1　拡張モデルと Kholodenko モデルの比較

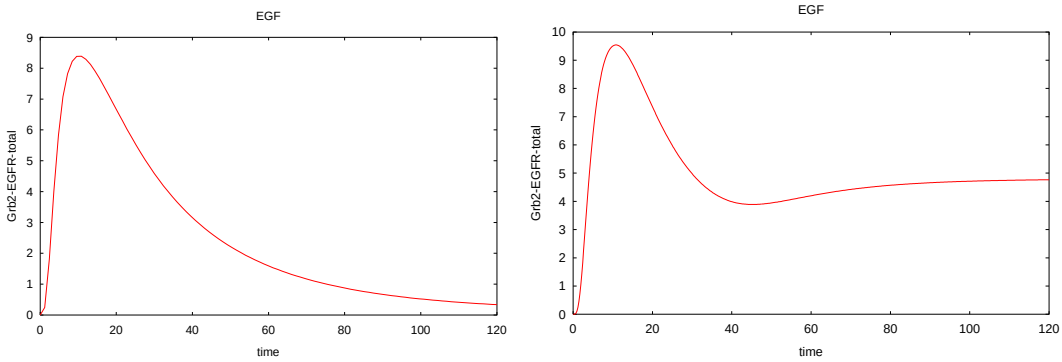
5.1.1　それぞれのモデルと生化学実験のデータ

拡張モデルによって得られたデータと Kholodenko モデルのデータを示す。また、Kholodenko モデルの成否を判断するために用いられた生化学データも示す。ここでは、Kholodenko の論文中で議論されていたデータについてのみ掲載する。他のデータは適宜、議論の際に提示する。
以下のシミュレーションにおける物質濃度の単位は全て nM、時間は秒（s）である。



(a)　拡張モデル　　(b)　Kholodenko モデル

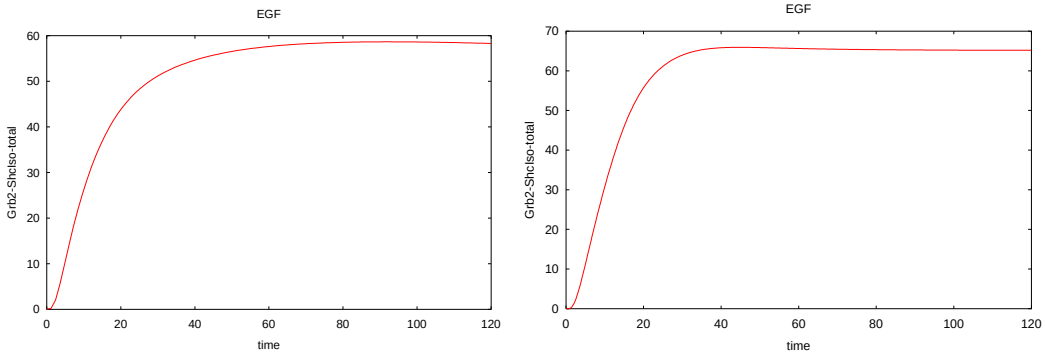
Fig 5.1　リン酸化 Shc の濃度の時間変化
生化学データ Fig 5.8B と対比される



(a)　拡張モデル　　(b)　Kholodenko モデル

Fig5.2　Grb2 と結合する EGFR の濃度の時間変化

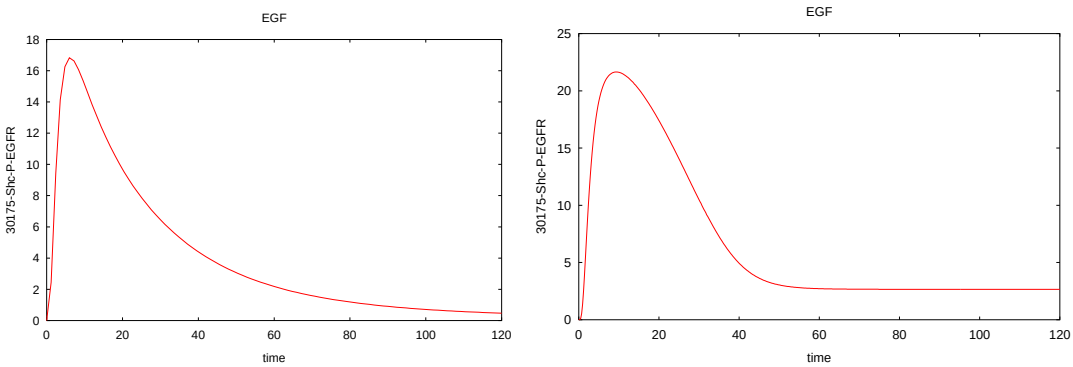
生化学データ Fig 5.8C の▲と対比される



(a)　拡張モデル　　(b)　Kholodenko モデル

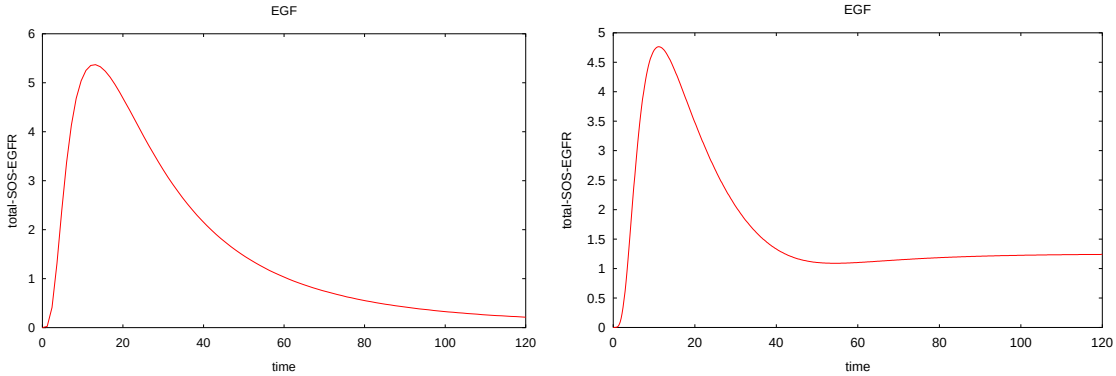
Fig5.3　Shc と会合する Grb2 の濃度の時間変化

Fig 5.8C の●と対比される



(a)　拡張モデル　　(b)　Kholodenko モデル

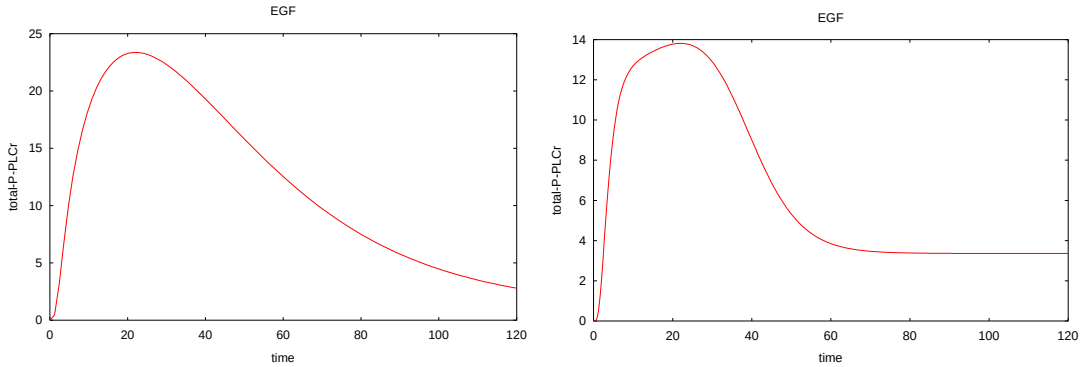
Fig5.4　EGFR と会合するリン酸化 Shc の濃度の時間変化



(a)　拡張モデル　　(b)　Kholodenko モデル

Fig 5.5　SOS と結合する EGFR の濃度の時間変化

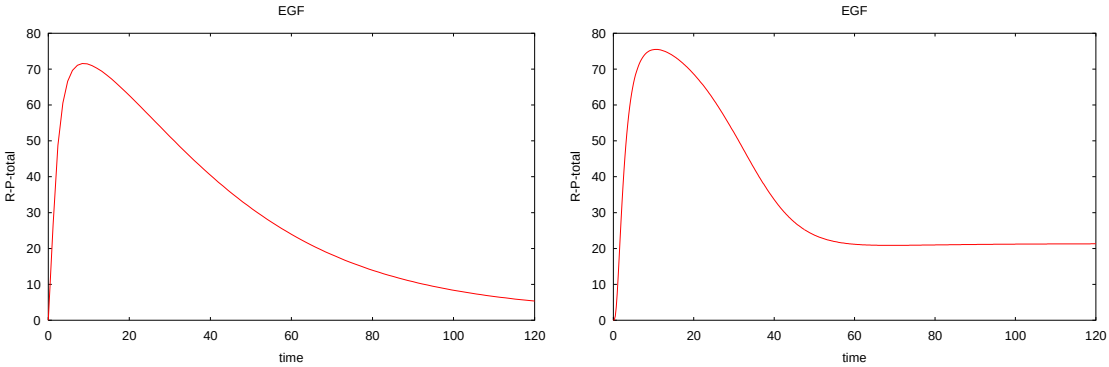
Ras へシグナルを伝える物質の濃度を示す。



(a)　拡張モデル　　(b)　Kholodenko モデル

Fig5.6　リン酸化 PLCγ の濃度の時間変化

生化学データでは Fig5.7A と対比される値である



(a)　拡張モデル　　(b)　Kholodenko モデル

Fig5.7　全リン酸化 EGFR の濃度の時間変化

生化学データでは Fig5.9 と対比される値である

Table 5.1　データの表現式

データの名称	式
リン酸化 Shc の濃度	[R-ShP]+[R-Sh-G]+[R-Sh-G-S]
Grb2 と結合する EGFR の濃度の時間変化	[R-G]+[R-G-S]+[R-Sh-G]+[R-Sh-G-S]
Shc と会合する Grb2 の時間変化	[R-Sh-G]+[Sh-G]+[R-Sh-G-S]+[Sh-G-S]
EGFR と会合するリン酸化 Shc	[R-ShP]+[R-Sh-G]+[R-Sh-G-S]
SOS と結合する EGFR	[R-G-S]+[R-Sh-G-S]
リン酸化 PLCγの濃度	[R-PLP]+[PLCγP]

以下に示すのは、Kholodenko による生化学実験のデータである。このデータを基準にモデルを作成した。Fig 5.1～5.7 と比較していただきたい。縦軸は物質濃度でないことに注意されたい。

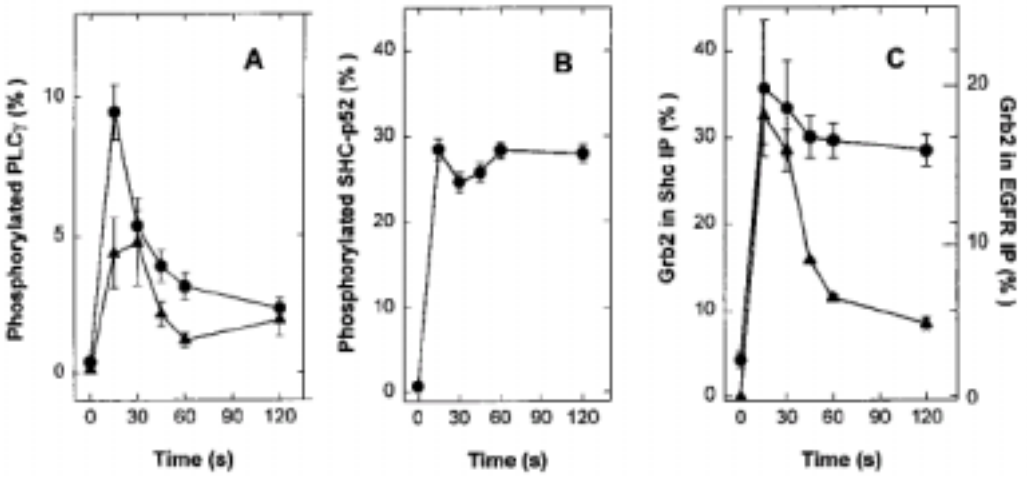


Fig 5.8　生化学データ１

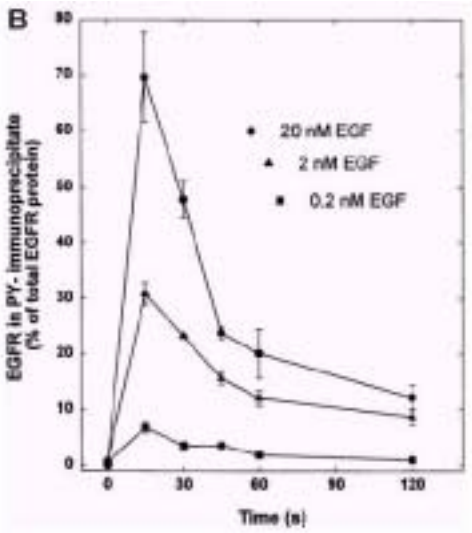


Fig5.9　生化学データ２

5.1.2　考察

5.1.2.1　PLCγ周辺について

まず、Kholodenko モデルで問題になっていた PLCγ周辺のデータについて考察する。シグナル伝達系に必要とされるピークがあらわれるとともに、EGF 下流の物質濃度に関する生化学的実験データとも矛盾していない。しかしながら、われわれのモデルでは、最終的に行き着く平衡状態が Kholodenko モデルとは異なる。われわれが作成した経路では、平衡時に MAPK に影響があると思われるシグナル伝達物質が非常に少なくなる。MAPK へのシグナルに関わる物質、つまり R-Sh-G-S と R-G-S は初期状態では 0 とされているので、平衡状態が初期状態に戻っていることを示している。これは非常に良い結果であると考えられる。Kholodenko モデルではシグナル伝達に関わる物質の濃度が 0 に近づくものの、化学物質としての効果があるとはっきり認識できる量の濃度が残って平衡状態になる。シグナル伝達の後に初期状態にもどることから、拡張モデルの方がより生物学的知見に近いと思われる。

Kholodenko モデルも生化学的に得られたデータには適用できる範囲にある。しかしながら、生化学データから結論を導くにあたって忘れてはならないのは、論文で示されている生化学的なデータは in vivo（生体内）のデータではなく in vitro（試験管内）のデータであることである。細胞を破砕し、免疫沈降を行っているため、実際に生体内で起こっている現象を示す一つの指標でしかない。これ以上の真偽を問うためには、さらに精密に in vivo を反映した結果を得る必要がある。この課題は今後の生化学的実験の発展によって得られるデータによって解決される課題であろう。

また、PLCγの系の調査から経路の特徴を示す結果が得られた。まず、直線的な経路を持つ系で、初期濃度が経路の最初の物質のみ存在する場合に経路の途中に一つの物質を入れてみる。このときのデータをみると、物質の増加が時間的に遅れることがわかる。これを示すために次のような経路を作ってみた。

Fig 5.10 シグナルを作る経路例

Table 5.2 シグナルを作る経路例のパラメータ

反応経路	係数
A→B	$k_{AB+}=1$ $k_{AB-}=5$
B→C	$k_{BC+}=5$ $k_{BC-}=1$
C→D	$k_{CD+}=1$ $k_{CD-}=0.01$
D→E	$k_{DE+}=1$ $k_{DE-}=0.01$
E→F	$k_{EF+}=1$ $k_{EF-}=0.01$

反応式は全て Mass-Action で作成した。A→B については順方向の係数を小さく、逆方向を大きく設定した。B→C はその逆の設定を行い、B を観察すると B の増加に伴って急激に B が減少するのでピークを作ることが出来る。その後の C→D、D→E については順方向の係数を大きく、逆方向を小さく設定する。これはシグナルを順方向に伝えるための設定である。この経路から得られたデータを示す。

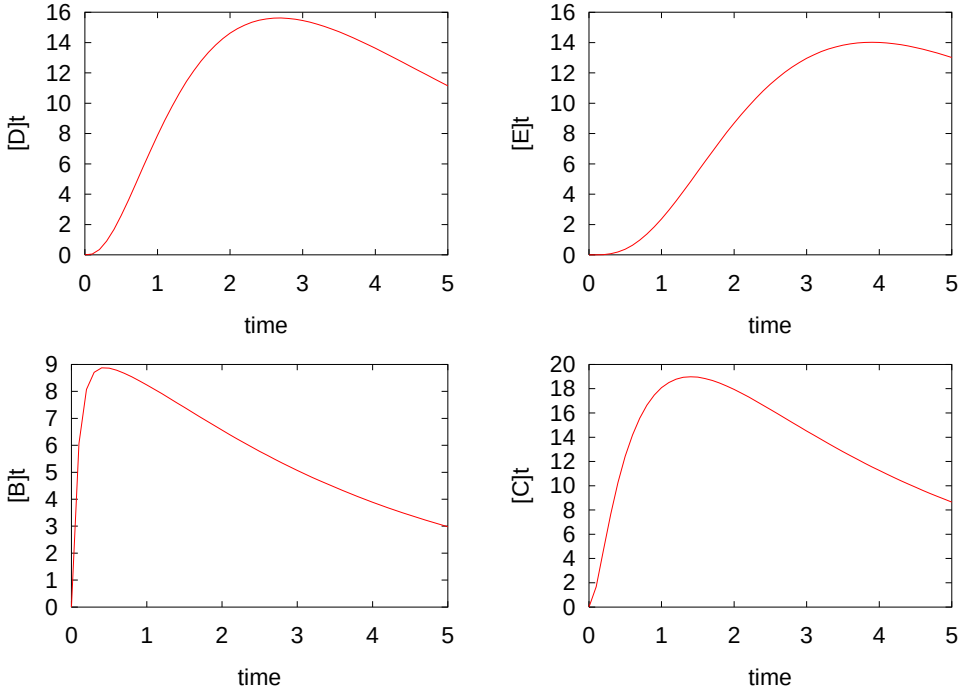


Fig 5.11 仮想的な経路の物質濃度変化

A、F は単調に減少、増加するだけなので示さなかった。このグラフからもわかるように、波形は一つの物質を通過するごとに衰えていく。これは初期は濃度の影響で順方向に進んでいるシグナルを濃度変化後、係数による支配に移すことで得られるのである。つまり、平衡に近づくにつれて Fig 5.12 のような経路になる。

Fig 5.12 シグナルを作る経路例（時間経過後）

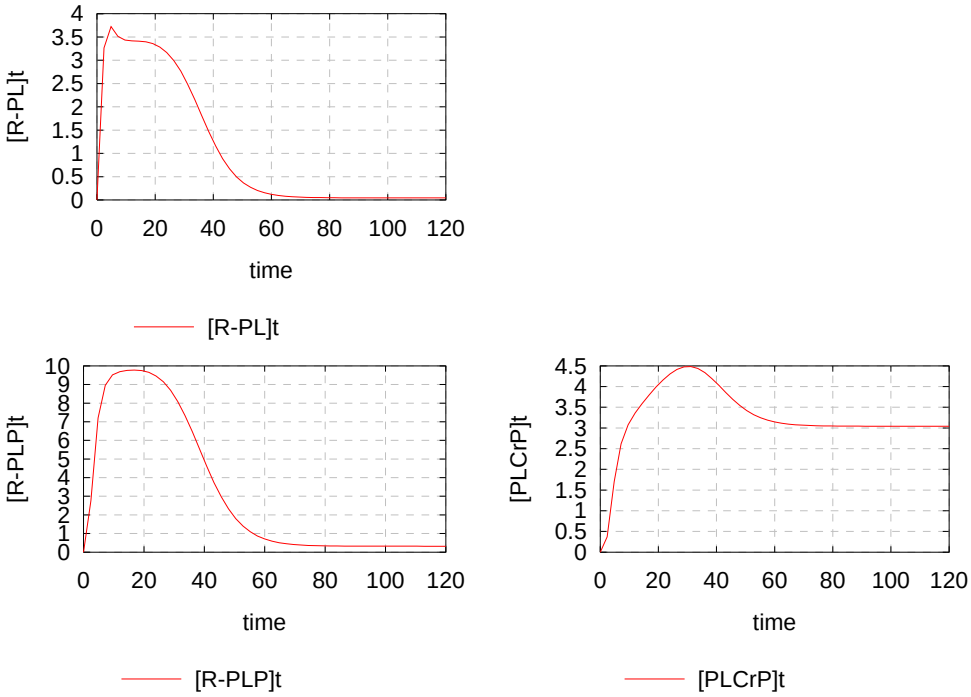


Fig5.13　Kholodenko モデルの PLCγ関連物質濃度の時間変化

PLCγ関連の複合体の波形にも、同じようなシグナルの遅れが観察できる。Kholodenko モデルの PLCγ周辺の経路は円形の経路を作り上流にフィードバックをしつつ、円形の経路にある一つの物質からシグナルを作るのに障害となる物質を排出していると考えられる。実際、経路５，６の係数は例として示した経路のように経路５の順方向の係数 k_{-5} が k_5 よりも大きく、経路６では k_6 が k_{-6} よりも大きいことがシグナルの発生を示し、経路７，８は順方向に進んでいる。われわれの拡張モデルもこの性質を持っている。Kholodenko モデルでは PLCγP が排出の対象であったが、われわれの拡張モデルでは、PIP3 と結合することになる RP-PLCγ（EGFR と PLCγの

チロシンリン酸基による結合体）が結果的に排出の対象になっている。Kholodenko モデルの波形が複雑な形状を取っているのは酵素反応物質となる PLCγP が排出のための経路になっていることが考えられるが、証拠は得られなかった。経路中にある物質濃度のシグナルピークは、このような手法で生成されていると思われる。

一方、Mass-Action は前駆体の物質濃度に依存して変化するので、途中で増幅を受けない限り、途中の物質濃度において新たなピークを発生させることは出来ない。ほとんどの場合、物質の反応係数が小さい値をとっていることを考慮すると、シグナルが深部に伝わるにしたがって小さくなっていくことが想像される。これは、まだ確認されてはいないものの、「経路の深いところにある物質は感受性が高い」ということを予期させる。

5.1.2.2　PI3 キナーゼ周辺の経路について

PI3 キナーゼについては、生化学的実験結果として EGF のシグナル伝達そのものには必要ないという報告がされている。同時に EGF シグナル伝達においてサポート的な役割を果たしているのではないかという報告もされている。EGF の濃度が高い場合 Grb2、SOS の複合体によるシグナル伝達を担い、EGF の濃度が低い場合 Grb2、SOS 複合体とともに PI3K の系がシグナル伝達を担うのではないかとする説[20]があるが、実際には、他の物質が PI3K の影響を受けて SOS、Grb2 複合体形成に関わるのではないか等、諸説が入り乱れており、詳細はわかっていない。もし、前者の説を支持するならば PI3K、PLCγ周辺が RP からのシグナルを緩衝しながら、サポートする経路にシグナル伝達をしているということになる。

われわれが作った経路においては、RP-PLCγ-PIP3 が、PI3 キナーゼ、PLCγによる経路の最終点になっている。RP-PLCγ-PIP3 は通常、PIP2 から DAG（ジアシルグリセロール）と IP3（イノシトール３リン酸）を生成する酵素としての役割を果たすものである。拡張モデルでは濃度が他の物質に比較すると高い。酵素として分解される率が低ければ、EGF が少ない場合でも Ras へのシグナルを出す要素となるかもしれない。今後、この先の経路が理解されるようになった場合、モデル化することで EGF 濃度が低い場合の仮説を立証する一つの証拠となるのではないだろうか。

5.1.2.3　SOS、Grb2 複合体経路について

この経路に関しては、われわれの拡張モデルでは全く変更していない。したがって、この経路に影響を及ぼすとすれば、それは RP（リン酸化 EGF レセプター）が PLCγ、PI3 キナーゼ方向へ流れたことによる濃度の変化である。濃度変化が大きくなれば、PLCγの経路の係数が変わることで SOS、Grb2 の経路に与える影響が大きくなる。影響を見るには Sensitivity Analysis が役に立つ。Fig 5.17、Fig 5.18 に拡張モデルと Kholodenko モデルの Sensitivity Analysis と物質濃度の変化を示す。

Fig 5.16、Fig 5.17 の結果を見ると、はっきりとわかる事実がある。経路における flux 変化による物質濃度の影響が Kholodenko モデルと拡張モデルでは全く異なっている。Kholodenko モデルは経路３，４によってかなりの物質が影響を受けることがわかる。それに対して、拡張モデルは全体に影響が分散している。一見すると、Kholodenko モデルはレセプターによるコントロールがスイッチになり、他の物質は経路の flux 量の変化にロバストであるように思える。つまり、かなりはっきりとシグナル伝達の役割を果たしているかのように見える。しかしながら、平衡状態の時の flux を見てみればわかるが、経路３，４は他の経路と比べて非常に大量の flux が残っていることがわかる。経路３，４は EGF レセプターのリン酸化と脱リン酸化を行う経路であり、レセプターは EGF のシグナルが送られてこなくとも常にリン酸化と脱リン酸化を行っている必要がある。これは EGF によって EGF レセプターが２量体を作り、２量体を構成するレセプターそれぞれが相互にリン酸化し合うという生化学的な事実とは異なっている。われわれの作成した拡張モデルの場合、sensitivity は全体的に分散している。また、経路３，４が特別、強いわけではない。では、選択的に sensitivity が強くするにはどのようにしたら良いのか？この疑問にはっきりと答えられる解答は残念ながら今回の研究では得られなかった。

しかし、生化学的には観察結果をモデルに変換するという手法の他には手段は無い、つまり、経路が決まっている場合、数学的な式が問題となることは明白である。Flux に変化を与えるには２通りの手法がある。Mass-Action の場合、１．係数を変える、

２．濃度の初期値を変える、である。Kholodenko モデルを構成している係数の値を確かめると非常に小さい値であることがわかる。この場合、経路の深部に行くにしたがって、シグナルは衰えていく。直線的な経路の場合、上流の経路を変えることで下流は大きな影響を受ける。しかしながら、Kholodenko モデルで実際に大きな影響を及ぼしているのは濃度の方である。ある平衡経路中に大量の flux を残していれば、係数による影響を打ち消すほどの影響を与える。

よって、上流の係数を大きい値にするか、係数が正確であるとした場合、経路によって、経路が正しいとした場合、係数によって flux を溜め込むような経路を考えれば影響は大きくなる。生化学的にこれらの特徴を確かめてみる価値はあると思われる。しかしながら、これはあくまでも平衡状態での解析であることを忘れてはならない。シグナル伝達は一過性のものであり、上記の経路改良は、シグナルを受けるのを待つ平衡時の状態を考慮した上で行われるものである。

Ras に関与する物質のピークの出現理由についても調べてみた。SOS、Grb2 について、簡略モデルを作った。以下に示すようなモデルである。拡張モデルの１３～２２までの経路と合わせてみていただきたい。

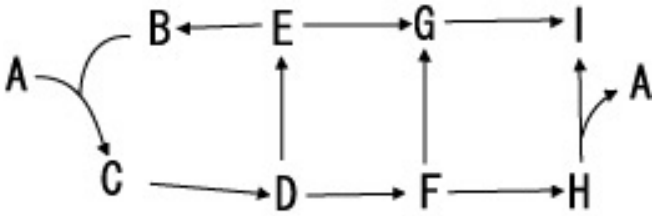


Fig 5.14　Shc、Grb2、SOS による経路を簡略化した経路

Table 5.3　Fig 5.12 による経路の係数

反応経路	係数	反応経路	係数
A + B→C	$k_{AB,C+}=0.1$　$k_{AB,C-}=1$	F→G	$k_{FG+}=1$　$k_{FG-}=0.1$
C→D	$k_{CD+}=1$　$k_{CD-}=0.1$	E→G	$k_{EG+}=0.1$　$k_{EG-}=1$
D→E	$k_{DE+}=1$　$k_{DE-}=0.0001$	F→H	$k_{FH+}=0.01$　$k_{FH-}=0.02$
E→B	$k_{BE+}=1$　$k_{BE-}=0$	H→I + A	$k_{HI+}=0.01$　$k_{HI-}=0.02$
D→F	$k_{DF+}=0.1$　$k_{DF-}=1$	G→I	$k_{GI+}=0.01$　$k_{GI-}=0.02$

このモデルは一見すると、Ras に関与する R-Sh-G-S と同等の位置にある H にピークが立つとは思えない。しかしながら、R-Sh-G-S はピークが立つ変化をする。実は、グラフ上の経路図は時間によって変化している。実際に、ほぼ平衡になった場合、経路は以下に示すようなグラフになっていると思われる。

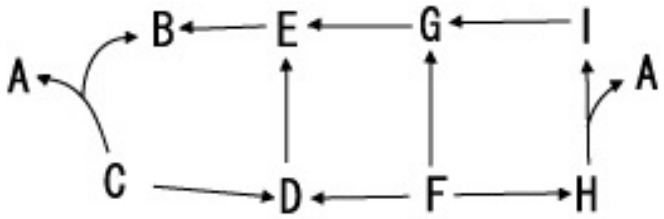


Fig 5.15　簡略化経路の時間経過後の流れ

理由は係数にある。上流以外は初期値が 0 であることで順方向の係数のみが有効になるので、最初のグラフが成り立つ。全物質の濃度が全て同じであると仮定すると、実際に係数は Fig 5.13 のような経路を作る。この経路は直線的な経路ではないが PLCγのピークを作るのと同じ原理である。濃度 0 の物質が一過的に上昇するが、外に排出する係数が高いことから、低い平衡状態に落ちてゆき、シグナルを発生する。この経路で R-Sh-G-S に相当する H の濃度をプロットすると以下のようになる。

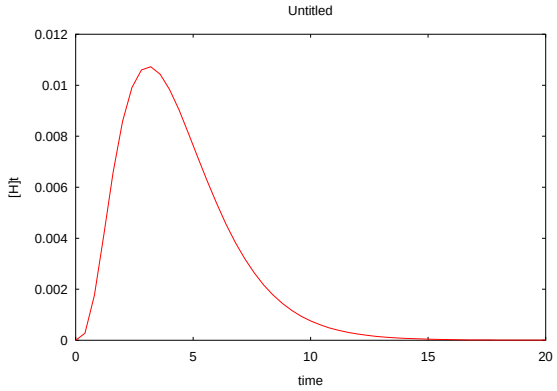


Fig 5.16　Shc、SOS、Grb2 簡略化経路における H の濃度変化（R-Sh-G-S に相当）

また、Kholodenko モデル、拡張モデル共に Michaelis-Menten 式と Mass-Action を用いているため、正式な意味では S-system、GMA を扱ってはいない。S-system、GMA 共に Mass-Action と同じ特徴を持つことは容易に想像できる。特に mass-action では、すべて 1 で扱っている濃度の階乗（p20 の eq3.9、g^{ij}、h^{ij}）による影響がどの程度出るかを今後、調査する必要があるだろう。

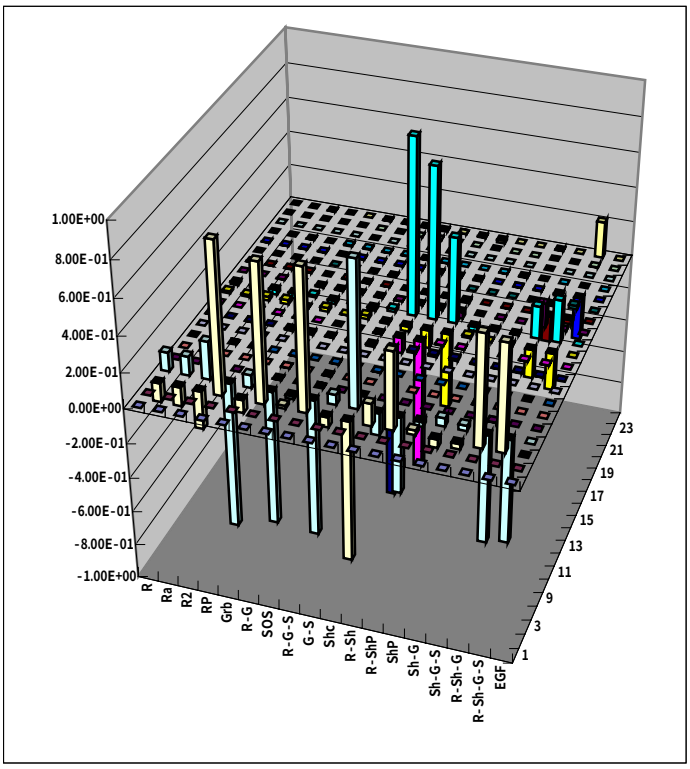


Fig 5.17　反応 i に対する物質濃度の Sensitivity（Kholodenko モデル）

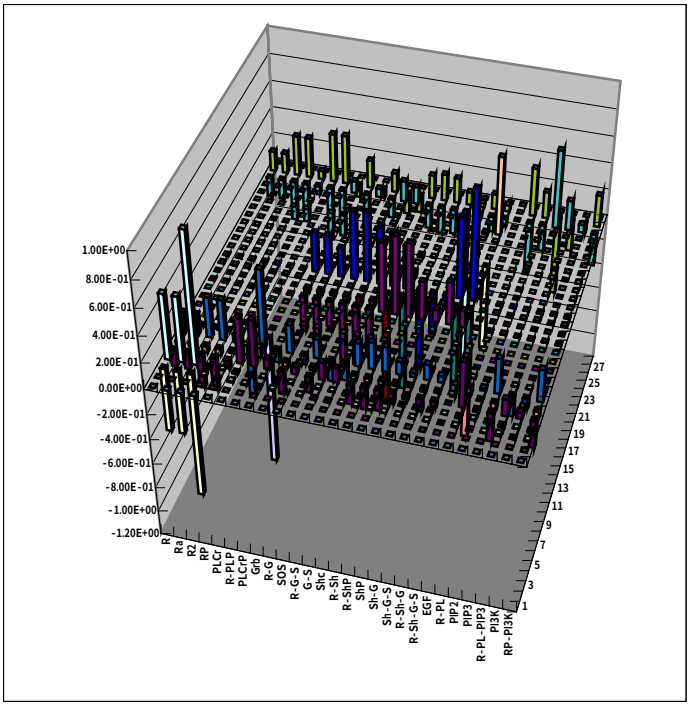


Fig 5.18　反応 i に対する物質濃度の Sensitivity（拡張モデル）

5.1.2.4　EGF レセプター周辺について

Fig 5.19 を見ていただければわかるが 5.1.2.3 で述べたようにレセプターのリン酸化脱リン酸化が起こりつづけていることが見て取れる。これはつまり、ほとんどのレセプターがシグナル伝達をせずに終わることを示している。Ra の値が１５nM 付近で平衡状態になり、このことはレセプターの１５％が二量体を作らずに終わっていることを示している。これに対して、拡張モデルでは、レセプターは複合体となるための構成要素として消費されている。この性質の違いはレセプターの定性的な性質が関わってくる。つまり、使い捨てなのか、再利用可能なのかである。EGF レセプターはエンドサイトーシスで分解されることが知られているが、再利用可能でないことを示す例にはならないと同時にどの程度のタイムスケールで起こるかも不明である。どちらが的確な表現なのかを評価するためには、生化学的な実証が必要であろう。

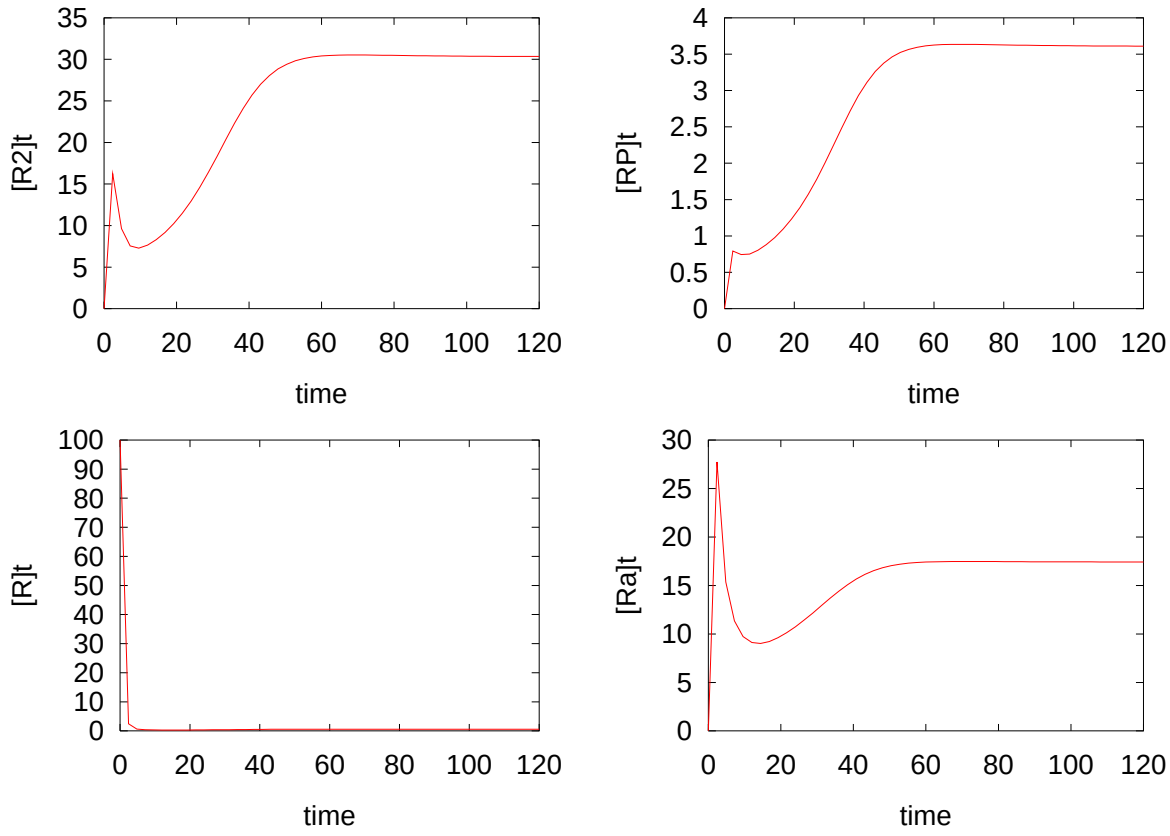


Fig 5.19　Kholodenko モデルのレセプター周辺データ

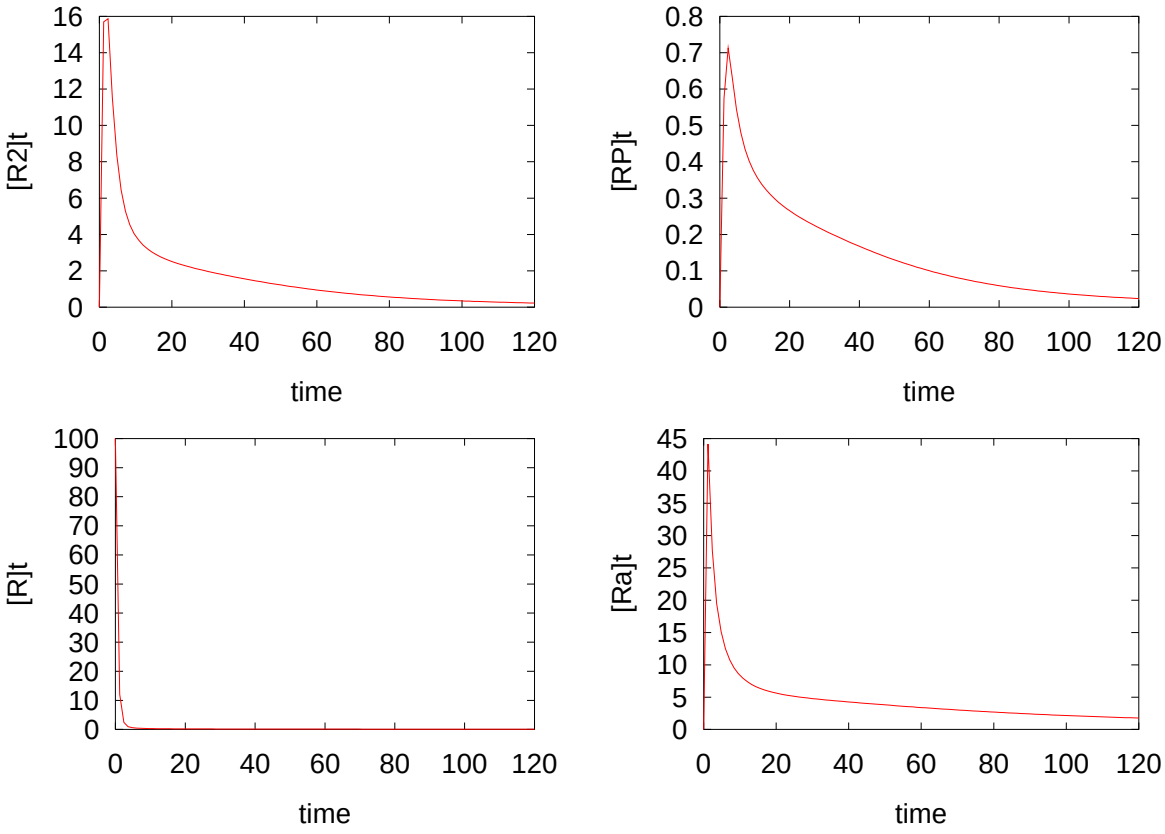


Fig 5.20　拡張モデルのレセプター周辺データ

5.1.2.5　モデル全体としての評価

モデル評価の最後に非常に重要な事実を記したい。単純に「このモデルは全体として正しいのか？」という問いかけには答えられえないのである。モデル作成にあたって痛感したのは、生化学的な実験との連携が非常にほしいということである。実際にモデルが正しいとするには、経路についての実験が必要だからである。モデリングによる「仮定」を「実証」しながら新たにモデルを構築していくことが理想的なのである。しかしながら、今回のモデル作成を通して、実験との連携の必要性を改めて示すことが出来たと考えている。

5.2　生体内化学反応経路シミュレータの展望

結果的に得られたデータは実際の化学反応データをもとにKholodenkoモデルを拡張したものであった。実際の値に近い表現を行うことが出来たが、生物本来の姿を十分に表現することが出来たかと問われたならば、否定的な解答を出さざるおえないだろう。この節では、生体内化学反応シミュレーションの今後について大きく捉えていきたい。

5.2.1　ケーススタディと経路の改良

今回の研究で行ったのは、過去に作られたモデルにおける経路の改良であった。経路の改良によって実際のダイナミクスに近づけることは出来た。しかし、その判定基準は非常に見えにくく、データと生化学における定性的な知識を持つ人の目を用いた判断にたよる部分が多分に存在している。Kholodenko モデルの他に作成されたモデルにおいても判断基準は知識とデータの比較に終わるのがほとんどである。このままでは、モデルの良し悪しの判定が付きにくく、他の研究者から得られた知識を積み重ねて研究するのは非常に困難である。また、経路作成に必要な生化学的な知識は分散しており、調査するのは非常に困難である。特に数値的なデータを得るのは非常に難しい。われわれが行った経路の拡張が仮想値で行われていることはこの問題に起因するものである。すべての問題を解決するのは困難であるが、上記の問題からまず行われるべき課題として思い当たるものは２つある。

１．経路を表現する式や複合的な経路の関係を評価する数学的な基準の作成
２．経路を作成するためのデータを一括で引き出せるデータベースの作成

１の問題についてはS-system、GMAだけで生化学のモデル化が出来るかどうかという問題も含まれている。モデルの表現能力は数学的に評価されているが、生化学にこれが適応するかどうかは判定できない。モデルから得られたデータを評価する一つ

の手法として MCA を挙げたが、MCA の M が Metabolic を指しているように、生化学の中でも代謝反応を主に判定する手法である。平衡状態でデータを取ることで、常にどれだけの物質が生成されているかを評価することができ、経路の異常による特定物質の収量の評価が出来るのである。シグナル伝達は一過性のシグナルを扱うもので、平衡状態はシグナルの待ち状態を評価する基準にしかならない。以上のことから、モデルの評価、さらにモデルから得られたデータの評価をする基準を作ることは、今後の経路シミュレータを発展させるための重要要素となると思われる。

5.2.2　モデル化手法について

この研究では、化学反応の微分方程式による経路のみを用いて研究を行った。経路の表現は多様であるが、3.1 節で少し触れたように、実際には化学反応の微分方程式以外にも多様な選択肢がある。経路表現のための選択肢としてだけでなく、最近では、位置情報の導入と濃度を用いたモデルの見直しが話題に上っている。つまり、従来のような化学反応式を用いた細胞に対する濃度によるモデル化は、生体内の化学反応を表現できていないとする傾向がある。

濃度を用いて、一つの経路について計算するようなモデルの場合、生物の機能を大幅に抽象化している。実際にはレセプターが一つずつ反応し、多くの経路が絡み合いながらシグナルを伝えていくのである。このような経路をモデル化する場合、タンパクや脂質などの細胞内における化学物質の位置を考えて、相互作用を計算しなければならない。また、化学反応は細胞の特定の位置で起こっていることが多いため、細胞全体に対する濃度として表現することはおかしいという報告もされており、微分方程式を用いて位置情報を入れながら計算する研究や、生物の化学反応ではあまり用いられてこなかった分子一つずつを表現する手法で定性的な特徴を捉えようとする研究などが行われている。（ex.[22]）

5.2.3　情報学と生化学との連携

5.2.1、5.2.2 節で示したようなケーススタディとモデル化手法の開発を続けることで、今後シミュレータの信頼性が上がっていくであろう。しかし、このようなプロセスを採るためには、大きな問題が残されている。それは情報学と生物学の交流である。順調に見えるバイオインフォマティクス分野ではあるが、情報学と生物学がお互いのリソースを生かしきっていないのが現状である。

参考文献に挙げたデータベースのデータは十分でない、生化学者の実験を楽にするようなシステムの開発が行われない等、情報学、生物学がそれぞれやりたくても出来ない課題が多く残されている。お互いの役割を見極めつつ、それぞれが望むこと、望まれることを実行できる環境が成立しなければ、今後の研究が難しい。お互い協力し合える土壌が育つことを祈りつつ、論文を締めくくりたい。

謝辞

情報学と生物学という分野を跨いだバイオインフォマティクスという分野では、さまざまな方々のご助力無しでは研究は成り立ちません。論文という形でひとつにまとめ上げることが出来たのも多くの方々の後ろ盾あってのことです。この場をお借りしまして、私がバイオインフォマティクスという分野の様相を理解するのにご助力いただいた小長谷明彦教授はじめとする多くの方々に御礼申し上げたいと存じます。また、アドバイスをいただいた佐藤賢二助教授、Xavier Defago 助手、山本知幸助手や、研究の面だけでなく、多くのことを与えてくれた遺伝子知識システム論講座のメンバー、私と懇意に付き合っていただいた方々にも御礼申し上げます。

参 考 文 献

[1] 宮澤恵二　横手幸太郎　宮園浩平・著　　新・細胞増殖因子のバイオロジー　羊土社

[2] 山本雅・編　　新・用語ライブラリー　細胞内シグナル伝達　羊土社

[3] 山本雅、秋山徹・編　　細胞内シグナル伝達がわかる　羊土社

[4] 海野肇、中西一弘、白神直弘・著　　生物化学工学　講談社

[5] Donald Voet,Judith G.Voet・著　　ヴォート・生化学　東京化学同人

[6] Eberhar O.Voit　　Computational Analysis of Biochemical Systems. CAMBRIGE UNIVERCITY PRESS

[7] P.Mendes.　Biochemistry by numbers: simulation of biochemical pathways with Gepasi 3. *Trends Biochem. Sci.* Vol 22,361-363,1997

[8] C.C.Fink, B.Slepchenko, I.I.Moraru, J.Schaff, J.Watras and L.M.Loew, Morphological Control Of Inositol-1,4,5-Trisphosphate-dependent Signals. *J.Cell.Biol*,Vol 147,5,November 29 924-935 1999

[9] C.C.Fink, B.Slepchenko, I.I.Moraru, J.Schaff, J.Watras and L.M.Loew, An Image-Based Model of Calcium Waves in Differentiated Neurobl astoma Cells. *Biophysical J*, Vol 79,July,163-183,2000

[10] L.M.Loew and J.C.Schaff.　The Virtual Cell:a software environment fo r computational cell biology.　*TRENDS in Biotechnology* Vol 19,No 10, October,401-406,2001

[11] M.Tomita, K.Hashimoto, K.Takahashi, T.S.Shimizu, Y.Matuzaki, F.Miyoshi, K.Saito, S.Tanida, K.Yugi, J.C.Venter and C.A.HutchisonⅢ. E-CELL:software environment for whole-cell simulation.　*Bioinfomat ics* Vol 15,No 1,72-84,1998

[12] S.Joseph.　Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases.　*Cell*,Vol.103,21 1-225, October 13,2000

[13] B.N.Kholodenko, O.V.Demin, G.Moehren and J.B.Hoek.　　Quantificati

on ofShort Term Signaling by the Epidermal Growth Factor. *J.Biol.Chem*. Vol 274,No 42,October 15,pp 30169-30181,1999

[14] 佐々木雄彦、鈴木聡、佐々木純子、Josef M.Penninger. PI3 キナーゼと PI ホスファターゼの免疫応答、糖代謝、腫瘍形成における役割 蛋白質 核酸 酵素 Vol 46,No12,1820-1829,2001

[15] H.Kacer and J.A.Burns The control of flux. *Symp.Soc.Exp.Biol*.Vol 27, 65-104,1973

[16] R.Heinrich and T.A.Rapoport A linear steady-state treatment of enzy matic chains.General properties,control and effextor strength. *Eur.J.Bi ochem*.Vol 42,89-95,1974

[17] S.Schuster, B.N.Kholodenko and H.V.Westerhoff. Cellular information t ransfer regarded from a stoichiometry and control analysis perspective. *BioSystems*,Vol 55,73-81,2000

[18] M.Mauch, S.Arnold and M.Reuss. Dynamic sensitivity analysis for met abolic systems. *Chem.Eng.Sci.*,Vol 52,No 15,pp2589-2598,1997

[19] J.Yu, Y.Zhang, J.McIlroy, T.Rordorf-nikolic, G.A.Orr, and J.M.Backer. R egulation of the p85/p110 Phosphatidylinositol 3'-Kinase:Stabilization an d Inhibition of the p110α Catalytic Subunit by the p85 Regulatory Sub unit. *Mol.Cell.Biol*. Vol 18, No 3, pp1379-1387 ,1998

[20] S.Wennstrom. and J.Downward. Role of Phosphoinositide 3-kinase in Activation of Ras and Mitogen-Activated Protein Kinase by Epidermal Growth Factor. *Mol.Cel.Biol.*Vol 19,No 6,4279-4288,1999

[21] M.Flasca,S.K.Logan,V.P.Lehto,G.Baccante,M.A.Lemmon and J.Schlessinger Activation of phospholipase Cγ by PI3-kinase-induced PH domain-m ediated membrane targeting. *EMBO J.*Vol 17,No.2,414-422,1998

[22] N.Atul, K.K.Subramanian, and D.A.Lauffenburger. A Mathmatical Model for Chemoattractant Gradient Sensing Based on Receptor-Regulated Me mbrane Phopholipid Signaling Dynamics. *Annals Biomed Eng.* Vol 29. 677-791,2001

[23] Y.Suzuki,and H.Tanaka. Order parameter for a symbolic chemical system. *Artificial Life VI*, MITPRESS, 1998

[24] U.S.Bhalla and R.Iyenger. Emergent properties of Networks of Biological Signaling Pathways. *Science*,Vol 283,381387,1999

[25] 神山新一、佐藤明・著　モンテカルロ・シミュレーション　朝倉書店

以下参考 URL

[25] PubMed
http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/

[26] Science-stke(signal transduction Knowledge Environment)-
http://stke.sciencemag.org/

[27] BIND (Biomolecular Interaction Network Database)
http://www.bind.ca/

[28] TransPath
http://transpath.gbf.de/

[29] GeneCards
http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards/

[30] NRCAM
http://www.nrcam.uchc.edu/