

Title	真核生物の細胞分裂周期制御機構のモデル
Author(s)	伊達, 英俊
Citation	
Issue Date	2000-09
Type	Thesis or Dissertation
Text version	author
URL	http://hdl.handle.net/10119/700
Rights	
Description	Supervisor:小長谷明彦, 知識科学研究科, 修士

修 士 論 文

真核生物の細胞分裂周期制御機構のモデル化

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

850204 伊達 英俊

審査委員： 小長谷 明彦 教授（主査）
佐藤 賢二 助教授
吉田 武稔 助教授

2000 年 8 月

目 次

1	はじめに	1
1. 1	目的	1
1. 2	背景	3
1. 3	モデル化とシミュレーション	8
1. 4	結論	9
1. 5	本論文の構成	9
2	細胞周期の基本特性	10
2. 1	細胞周期は四つの位相に分けられる	10
2. 2	細胞は分裂期に染色体を分配する	11
2. 3	細胞の種類によって細胞周期の長さは様々であり、細胞分裂の詳細も異なる	13
2. 4	初期胚の細胞周期は自然に同調している	14
2. 5	細胞周期へのアプローチ	15
2. 5. 1	細胞の DNA 含量により細胞周期の位置を知る	16
2. 5. 2	細胞融合実験によって細胞周期を支配する論理が判明	17
2. 6	細胞周期のエンジン	19
2. 6. 1	分子レベルからのアプローチ	19
2. 6. 2	G ₂ /M期制御機構	20
2. 6. 3	ブレーキの役目を果たす CKI	22
2. 6. 4	タンパク質の選択的分解：ユビキチン-プロテアソーム系	23

2. 7 酵素	2 4
2. 7. 1 酵素の特徴	2 5
2. 7. 2 酵素反応の特徴	2 5
2. 7. 3 酵素反応速度論	2 7
2. 7. 4 酵素活性	2 8
2. 7. 4. 1 酵素量の調節	2 8
2. 7. 4. 2 酵素活性の調節	2 9
3 細胞周期モデル	3 1
3. 1 細胞分裂のメカニズム	3 1
3. 1. 1 Cdk、Cyclin、Protease モデル	3 3
3. 1. 2 Cdk、Cyclin、Protease、Rum1 モデル	3 6
3. 1. 3 Cdk、Cyclin、ユビキチン-プロテアソームモデル	4 0
4 考察	4 4
4. 1 モデル化をするにあたっての注意点	4 5
4. 1. 1 どのようなシミュレーション結果を安定もしくは答えとするのか？：対象を細胞周期にした有効性	4 5
4. 1. 2 モデル化をするにあたって使用するミカエリス・メンテン式の有効性の検討	4 5
4. 1. 3 モデル化におけるパラメータ評価	4 6
4. 1. 4 酵素活性の分散表現	4 9
4. 1. 5 細胞周期におけるポリユビキチン化の意味	5 2
4. 2 実験データを用いるにあたっての注意点	5 4
4. 2. 1 RNA 発現プロファイルデータとの比較	5 4
4. 2. 1. 1 RNA 発現ピークとタンパク質発現ピークのずれ	5 5
4. 2. 1. 2 細胞周期関連遺伝子数	5 5
4. 2. 1. 3 DNA チップ・マイクロアレイのデータの再現性	5 6

4. 2. 2	発現遺伝子量解析.	5 6
4. 3	結論	5 7
4. 4	今後の課題	5 7
4. 5	今後の展開	5 8
4. 5. 1	細胞周期とガン	5 8
4. 5. 2	ユビキチン-プロテアソーム系と神経変性疾患.	5 8
5	参考文献.	6 0

目次

2.1 細胞周期のステージ.....	10
2.2 細胞分裂のステージ.....	11
2.3 分裂酵母と出芽酵母の細胞周期の比較.....	13
2.4 細胞周期を通じて DNA 量の変化.....	16
2.5 細胞周期の分子制御機構.....	19
2.6 ハマグリの初期胚でみられるサイクリンと MPF の濃度変化.....	20
2.7 ユビキチン付加反応カスケード.....	23
3.1 有糸分裂を制御するもっともシンプルな細胞周期モデル.....	33
3.2 3.1 のモデルのシミュレーション結果.....	35
3.3 3.2 のグラフのフェーズプロット.....	35
3.4 サイクリン阻害剤を導入した有糸分裂機構のモデル.....	36
3.5 3.4 のモデルのシミュレーション結果.....	39
3.6 3.5 のグラフのフェーズプロット.....	39
3.7 ユビキチン-プロテアソームによって制御する細胞周期モデル.....	40
3.8 3.7 のモデルのシミュレーション結果.....	43
3.9 3.8 のグラフのフェーズプロット.....	43
4.1 $V_m=0.25, 0.6, 0.95$ 時の細胞周期の状態.....	46
4.2 $K_m=0.2, 0.6$ 時の細胞周期の状態.....	47
4.3 $V_m=0.06, 0.14, 0.2$ 時の細胞周期の状態.....	48
4.4 $K_m=0.3, 0.5$ 時の細胞周期の状態.....	48
4.5 細胞中の酵素活性の含有割合 (3 パターン).....	49

4.6 $V_m=0.6, 0.8, 0.9$ 時の細胞周期の状態.....	50
4.7 ①の酵素割合からなる細胞周期.....	50
4.8 ②の酵素割合からなる細胞周期.....	51
4.9 ③の酵素割合からなる細胞周期.....	51
4.10 ユビキチンを 1～10 個まで付加させた時の細胞周期変化.....	53
4.11 DNA チップにより 2 周期にわたってサイクリンの発現量をみたデータ.....	56

表目次

4.1 V_m 値を 1~0.1 まで変化させた時の周期の変化.....	46
4.2 K_m 値を 0~0.7 まで変化させた時の周期の変化.....	47
4.3 V_m 値を 0.21~0 まで変化させた時の周期の変化.....	47
4.4 K_m 値を 0~0.7 まで変化させた時の周期の変化.....	48
4.5 細胞中の酵素活性の含有割合①.....	49
4.6 細胞中の酵素活性の含有割合②.....	51
4.7 細胞中の酵素活性の含有割合③.....	51
4.8 タンパク質と RNA の発現時期の違い.....	55
4.9 二つのグループが報告する細胞周期関連遺伝子数の違い.....	55
4.10 DNA チップにより 2 周期にわたってサイクリンの発現量を見たデータ.....	56
4.11 遺伝子産物量の変化と表現形.....	57

第 1 章

はじめに

1.1 目的

細胞活動は、数千から数万の遺伝子、タンパク質の相互作用から成り立っている。その一つ一つの遺伝子、タンパク質の働きは比較的単純であるが、その数千から数万の遺伝子、タンパク質のネットワークが、生命活動という複雑なシステムを作り出している。われわれは、分裂して増殖を制御する細胞分裂周期タンパク質群に注目した。この細胞周期は連続的なタンパク質合成と間欠的なタンパク質分解により制御されている。本研究ではそれらのタンパク質間の生化学反応をミカエリス・メンテン式をベースとした連立微分方程式で細胞周期の分子動態をモデル化するとともに、今後より詳細なモデル細胞を構築するための注意点を考察する。

1.2 背景

細胞分裂は細胞の生命活動のなかでよく知られている現象である。細胞はその成分を 2 つに分裂して増殖する。この細胞分裂は、あらゆる生物は増える基本で、単細胞生物は新しい個体をつくり、多細胞生物は消耗や損傷などを通じて失われる細胞を補うのに必要不可欠な手段である。これらは、分子レベルで見ると、いくつかのタンパク質の相互作用により成り立っている。近年の遺伝子工学の発展により、真核生物の DNA 合成の調節機構や細胞分裂の分子レベルの制御が解明されてきた。その結果、この細胞周期機構は種を超えた共通の制御機構をもつことが判明した。

細胞のガン化とユビキチンシステムによるタンパク質分解という 2 つのキー

ワードで、現在細胞周期研究が盛んに行われている。

細胞周期を制御している中心的な役割を果たす遺伝子の中に p53、p16、RB(Retinoblastoma)といったガン抑制遺伝子と呼ばれるものが多く存在する。これらの遺伝子は、細胞周期中に放射線や薬剤等のストレスによって DNA に損傷が生じた場合、DNA が自己修復するまで細胞周期を停止させる機能を持っている。これらガン抑制遺伝子に異常があると、DNA に異常を抱えたまま増殖をおこない、そのまま異常増殖をおこなったり、細胞自身が自殺し結果的には個体を構成している細胞社会の秩序が乱す。

タンパク質の量的コントロールは細胞の恒常性の維持にきわめて重要である。ユビキチンシステムは、基質タンパク質を選択的にユビキチン化することで、タンパク質分解を制御している。このタンパク質分解系は、細胞周期・代謝・ストレス応答などの重要な生命現象に普遍的にかかわっている。そのため、ユビキチン-プロテアソームまたは、基質タンパク質の異常によって適切な分解が破綻すると、タンパク質の過剰または、過少が生じて多様な細胞障害・個体異常を生じる。現代の代表的な神経変性疾患であるパーキンソン病は、病的には黒質ドーパミン作動性ニューロンや脳幹神経細胞が変性脱落するとともに、残存ニューロンの細胞体内にレビー小体が出現することが特徴である。最近、患者の神経細胞のレビー小体に α -シヌクレインタンパク質とユビキチンが蓄積していることが判明し、その異常な細胞内蓄積の原因となることが示唆されている。また、家族性パーキンソン病の家系で脱ユビキチン酵素である UCHL-1 の異常が見出されている。2000 年には、日本人に比較的多い若年発症するパーキンソン病の原因遺伝子 *perkin* がユビキチンリガーゼであることが分かった。

1.3 モデル化とシミュレーション

実験科学を基に、酵素反応の反応速度の測定、および反応速度を左右する要因である pH、温度、補因子や金属イオンの存在を検討するものに酵素反応速度論がある。ここでは、この酵素反応速度論に基づくミカエリス・メンテン式をベースに細胞内のタンパク質の相互作用を表現した。これらの結果をもとに、本論文では、今後詳細なモデル化を構築していくための問題点と、生物試料を使って得られる実験デー

タを用いるにあたっての問題点を述べる。

1.4 結論

本研究では、細胞活動の一つである細胞周期の分子制御機構のモデル化を行った。本モデルは文献知識のみで構築しており、特別な生物実験は一切行わなかった。今後も生物実験サイドから提供される文献知識のみで、より詳細なモデル化が可能となるであろう。しかし、文献から提供される実験データもさまざまな形で加工されたデータであり、その実験データが生産される手法や背景を把握しておかなければ、大きく読み違える可能性を含んでいる。今後、大量のゲノムデータが生産されるが、これら膨大なデータを扱う為には、生物学の知識が必要であると言える。

文献知識を再構築した細胞モデルを評価する上で、微分方程式を用いたシミュレーション技術は必要不可欠なものである。この技術を用いた本研究でも、ユビキチン-プロテアソーム系のタンパク質分解機構において、ユビキチンの特性に関する新たな知見を得ることができた。

1.5 本論文の構成

まず、第2章で本研究の生物学的背景について説明する。次に第3章で細胞周期をモデル化するための方法論とそのシミュレーション結果を報告する。そして最後に考察として、今後より詳細なモデルを構築するための問題点、生物実験データを用いるにあたっての問題点および今後の課題を述べる。

第 2 章

細胞周期の基本特性^{[1],[2],[3]}

2.1 細胞周期は四つの位相に分けられる

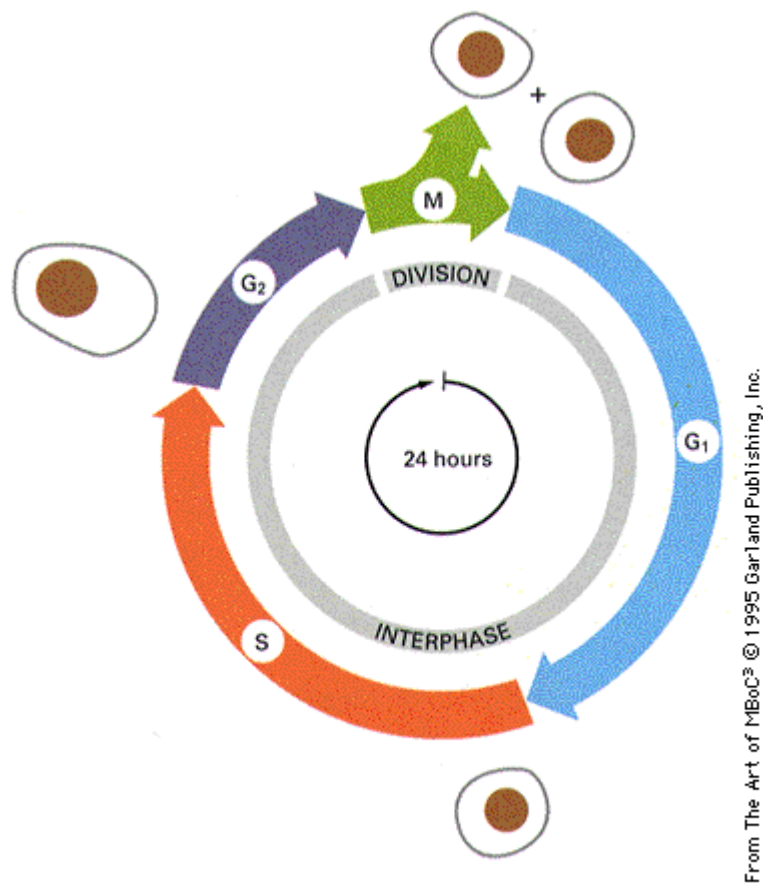


図 2.1 細胞周期のステージ

分裂期（M 期）は全細胞周期の約 5% を占める。DNA 合成期（S 期）と分裂期の間を占める G₁ 期のほかに、分裂期と DNA 合成期の間を占める G₂ 期がある。

頻繁に分裂を繰り返しているヒト細胞の細胞周期はおよそ 24 時間である。細胞周期は基本的な二つの部分に分けることができる。一つは細胞周期の大部分を占める間期 interphase であり、もう一つは細胞分裂とともに終わる 30 分ほどの分裂期 mitosis である。間期の間に DNA は核内に分散し、個々の染色体は識別できない。このとき 2 組の重要な過程が進行しているにもかかわらず、顕微鏡下ではほとんど何の徴候も認められない。一つは間期を通じて連続的に進行する過程で、ひとまとめでして成長といわれる。この過程には、リボソーム、膜、ミトコンドリア、小胞体および多くのタンパク質の新規合成が含まれる。他の一つは、一回の細胞周期を通じて一回だけ起こる段階的に進行する過程である。例として、染色体複製が間期の中の S 期 (S は DNA Synthesis の S に由来) という特定の時期に限定されていることが挙げられる。S 期は間期の真中に位置し、その前には G1 と呼ばれる間隔が続く。個々の染色体が複製されたのち、二つの娘染色体は互いに長軸方向に沿った複数の点でくっついた状態を保ち、姉妹染色分体 sister chromatic と呼ばれる。典型的な動物細胞における G1 期、S 期、G2 期、M 期はそれぞれ 12 時間、6 時間、6 時間、30 分である。

2.2. 細胞は分裂期に染色体を分配する

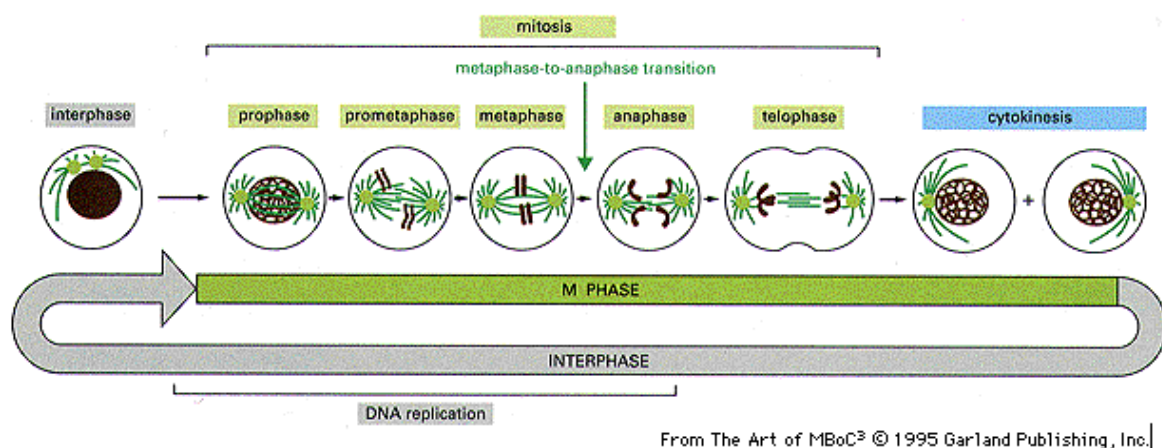


図 2.2 細胞分裂のステージ

前期の間に中心体は核の反対側へ移動し、染色体は凝縮する。核は崩壊し、細胞が分裂中期へと進むにつれて染色体は紡錘体の中央に配列する。後期になると染色分体間の結合は切れ、娘染色体は反対側の紡錘体極へとそれぞれ分離する。最終的に細胞質分裂が起こり、二つの娘細胞が誕生する。

細胞分裂とは細胞構造の劇的かつ協調的な変化であるといえる。S 期に複製された染色体は有糸分裂によって相同な 2 組に分離され、細胞質分裂が始まる。細胞が分裂期に入ろうとしていることを示す最初の兆候は、前期 **prophase** とよばれる時期に現れる。前期の間に染色体は凝縮する。すなわち、染色体はまず非常に微細な糸状のものとして視覚的に相互識別が可能になり、さらに太く、短くなる。そして、個々の染色体は一对の染色体として見分けられるまでになる。

核膜が崩壊して前期は終わり、核と細胞質の境界はなくなる。微小管 **microtubule** の構造にも著しい変化が生じる。微小管は微小管形成中心 **microtubule organizing center** から細胞内に放射状に伸びた長い繊維状の構造である。微小管形成中心は動物細胞では中心体 **centrosome**、酵母や菌類ではスピンドルポールボディ **spindle pole body** とよばれている。細胞は誕生したとき、単一の微小管形成中心しかもっていないが、間期の間に微小管形成中心は複製される。分裂期が進むにつれ、微小管のネットワークは大きな変化をとげ、紡錘体 **mitotic spindle** を形成するに至る。紡錘体とはアメリカンフットボールのような形をした微小管の束を指し、その両端に中心体が位置する。動原体 **kinetochore** と呼ばれる染色体の特殊領域で、染色体は微小管に結合している。一对の染色分体はそれぞれ紡錘体の反対の紡錘体極から伸びている微小管に結合しており、両極の中間に移動していく。すべての染色体がこのように並んだ時が、分裂中期 **metaphase** である。

細胞は短い時間分裂中期にとどまったのち、染色分体の結合を解く。これは分裂後期 **anaphase** の始まりを示す決定的な出来事である。染色分体はもはや互いに拘束されていないので、互いから分離し、微小管に沿って紡錘体の反対側の紡錘体極へと移動していく。染色体が極に近づくと、細胞分裂の物理的な過程である細胞質分裂 **cytokinesis** が始まる。収縮管が細胞を二つにくびりきる結果、一組の完全な染色体と一つの中心体をもつ娘染色体が 2 個できあがる。細胞質分裂が進むにつれ、染色体は脱凝縮し、核膜を形成し、間期の核を再構成する。また、微小管束も間期のパターンに戻る。細胞質分裂と染色体脱凝縮との相対的なタイミングは細胞によってまちまちである。したがって、分裂期の終わりと間期の始まりの正確な境界を定義することは難しい。一般に下記の 2 つの理由から分裂後期の開始を分裂期の終わりと考えられている。理

由の第一は分裂後期の開始が容易に観察でき、明瞭に定義できる出来事であることであり、第二は分裂後期の開始が細胞周期制御機構の重要な変化に対応しているということである。さらに、分裂後期の開始を、細胞周期の終わりと次ぎの細胞周期の開始を定義する点としても位置付けられている。

2.3 細胞の種類によって細胞周期の長さは様々であり、細胞分裂の詳細も異なる

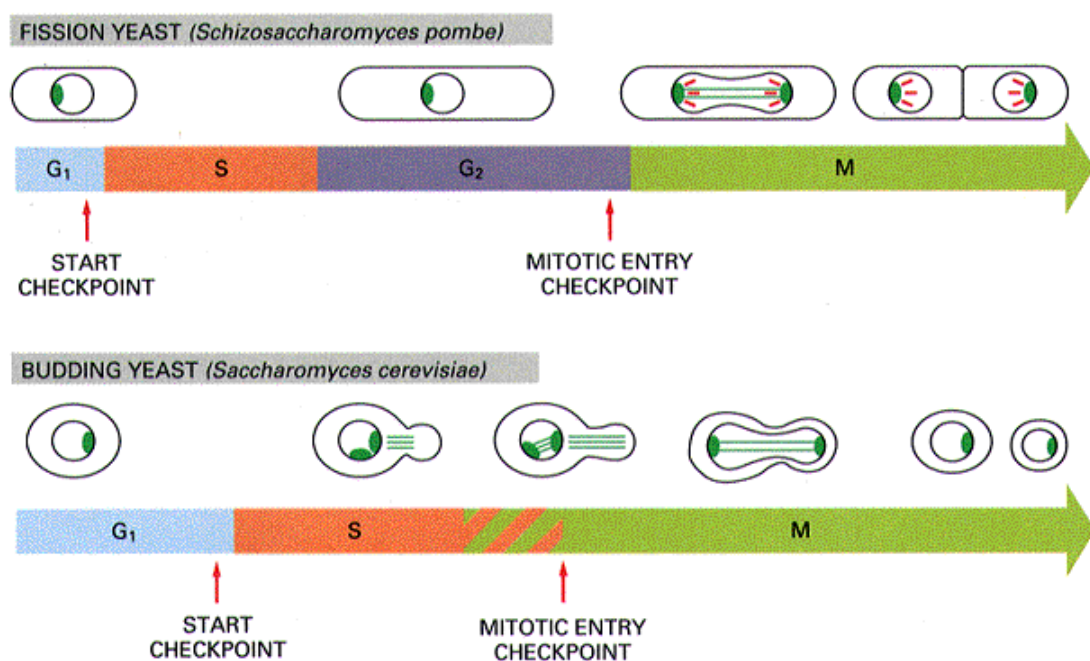


図 2.3 分裂酵母と出芽酵母の細胞周期の比較

分裂酵母の細胞周期は、出芽酵母の細胞周期と二つの点で異なっている。分裂酵母では DNA 複製の終了と紡錘体形成の開始との間に明瞭な G₂ 期があるが、出芽酵母にはない。スタートの通過を出芽によって示す出芽酵母と異なっており、分裂酵母にはスタートを示す形態学的マーカーは存在しない。

同じ生物体を構成する細胞でも種類が違えば、細胞周期には大きな違いが生

じうる。多くの多細胞生物は核膜の崩壊と再構成を行なう開放分裂 open mitosis をする。対照的に、単細胞生物のなかには、分裂期の間も核構造が保たれる閉鎖分裂 closed mitosis をするものが多い。閉鎖分裂においては、紡錘体は核の内側に形成され、染色体の分配が完了したのちに核は二つにくびり、そして切られる。細胞分裂の詳細もまた細胞の種類によって様々である。動物細胞は半分に切り離されるが、強固な細胞壁をもつ植物細胞などは細胞の中央に細胞壁を構築する。にも関わらず、これらの細胞はすべて、典型的な真核細胞の体細胞周期 somatic cell cycle にみられる、成長、DNA 合成、有糸分裂、細胞質分裂という四つの特性を有している。

適切な条件下では多くの体細胞はたえず成長し続ける。細胞周期の長さは、多少の変動はあるものの細胞のタイプごとにほぼ一定であるが、細胞のタイプによる違いは大きく、頻繁に分裂している哺乳類細胞の 24 時間から酵母の 90 分と様々である。また、一つの細胞集団をとってみても個々の細胞の細胞周期の長さにはバラツキがあり、ある細胞は周囲の細胞より非常にはやく、あるいは非常にゆっくりと分裂するというこゝともしばしば見られる。何日も何ヶ月も場合によっては何年もの間、成長も分裂もしないが、肝障害が起こるとすぐに分裂するようになる。一方、神経細胞のような細胞は、不可逆的に細胞周期から逸脱し二度と再び分裂できない。

2.4 初期胚の細胞周期は自然に同調している

細胞周期を生化学的に研究するためには、細胞周期を同調して回っている細胞集団が必要である。体細胞周期を回っている細胞集団は通常同調していない。したがって、細胞周期の特定の時期にある細胞集団を得るための技術を開発する必要がある。細胞を同調させるには、つぎのような方法がある。誘導同調法 induction synchronization は、細胞周期の特定の段階を阻害する薬剤で処理するなど、細胞を特別な条件下におくことによってすべての細胞を細胞周期のある点で停止させようとする。阻害を解除することによって停止していた細胞の細胞周期を比較同調して進行させることができる。選択的同調法 selection synchronization は、細胞周期を進むにつれて細胞の特性が変化することを利用して細胞周期の特定の時期にある細胞集団を分離するというものである。よく用いられる方法の一つは、細胞を大きさによって分

離できる特殊な遠心機を使うもので、細胞の大きさが細胞周期の間に変化することを利用して。しかし、どんな同調法にもどうにもならない限界がある。すなわち、体細胞周期の長さはさまざまであり、細胞周期を進むにつれ、細胞集団の同調性は急速に失われてしまう。

このような欠点は、自然の同調系、すなわち受精卵を出発点とする初期胚の細胞周期 *early embryonic cell cycle* を利用することによって克服することができる。カエルや海産無脊椎動物を使えば、大量の未受精卵を集め、さらにそれらを受精させることにより、数回の細胞周期を急速かつ同調的に進行する細胞集団を集めることが容易にできる。これらの細胞は分裂の間に成長することではなく、細胞周期ごとに受精卵は単により小さい細胞へと分割されていく。現在の細胞周期調節に関する知見の多くは、このような非常に単純な細胞周期を研究することによって得られた。

2.5 細胞周期へのアプローチ

細胞周期を研究するためには、個々の細胞が細胞周期のどの時期にいるのかを知る必要がある。分裂期の動物細胞は、核と細胞質との境界がなくなり、凝縮した染色体が紡錘体のなかに並んでいることから、顕微鏡下で容易に同定することができる。しかし、間期の細胞が G1、S、G2 期のいずれにあるのかについては、顕微鏡では知ることができない。

2.5.1 細胞の DNA 含量により細胞周期の位置を知る。

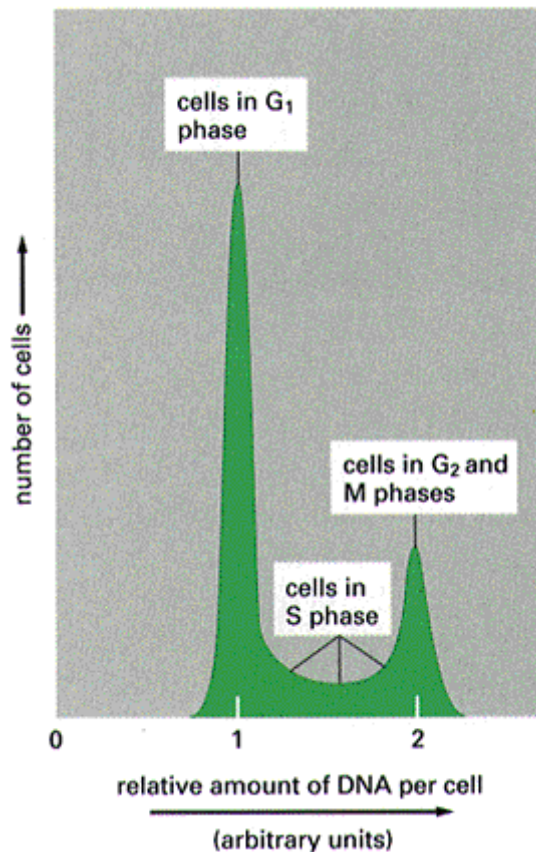


図 2.4 細胞周期を通じて DNA 量は変化する

G₂ 期の細胞の DNA 含量は G₁ 期の細胞の 2 倍であり、S 期の細胞の DNA 量は G₁ 期と G₂ 期の間の値を示す。

量の 2 倍の値を示す。S 期の細胞の DNA 量は DNA 複製の進行に応じて増加し、G₁ 期と G₂ 期における DNA 量の中間の値を示す。非同調的に分裂している哺乳類細胞集団における DNA 含量分析の典型的なパターンは図のようになる。G₁ 期と G₂ 期の細胞数は明瞭なピークを描く。しかし、S 期の細胞あたりの DNA 量は、G₁ 期と G₂ 期にみられるピークの間にあたる範囲に分散しているので、二つのピークに比べて谷の部分はかなり低くなっている。

S 期の細胞は標識された DNA 前駆体の取り込みによって同定できる。取り込まれた前駆体は細胞を固定（タンパク質凝固剤などで細胞を殺し、その構造を維持しておく処理）してから検出されることになる。この方法は改良され、細胞が細胞周期の各時期にどのような比率で存在するのかを決定するために用いられたが、実験に時間がかかるうえに、得られる結果は間接的なものでしかなかった。現在多くの研究者が用いているのはフローサイトメトリー flow cytometry と呼ばれるもので、集団を構成する個々の細胞の DNA 量を測定する。細胞集団を DNA 結合性蛍光色素で標識し、この細胞集団を一度にまとめて超高感度分析装置にかける。この装置は個々の細胞に結合した蛍光色素量を測定し、それを DNA 量に換算することができる。G₂ 期の細胞あたりの DNA 量は、正確に G₁ 期の DNA

2.5.2 細胞融合実験によって細胞周期を支配する論理が判明

二つの生きた遺伝的に同一の娘細胞を作り出すためには、解決しなければならない数多くの問題が存在する。しかも、この二つの作業は相互に協調的に進められねばならない。よい例として、染色体の凝縮は DNA 複製を抑制するので、細胞は DNA 複製が完了するまで分裂を開始することができないという現象を挙げることができる。これは完了に関する問題の一例である。完了に関する問題とは、細胞周期のある過程を開始するためには、他の特定の過程を完了しなければならないというものである。細胞が解決しなければならないもう一つの問題は、交互性に関する問題である。DNA 複製が完了するたびに一回の染色体分離が引き続いて起こり、もう一度 DNA 複製が続いて起こることはない。

1970 年代に行なわれた一連の実験によって、細胞周期の研究が急速に飛躍した。最初に行なわれた一連の実験では、間期の細胞と分裂期で停止している細胞が融合された。G1 期、S 期、G2 期の細胞を分裂期の細胞と融合して得られた融合細胞、ヘテロカリオン heterokaryon では、間期の核が崩壊し、すべての染色体が凝縮を起こす。この結果は、分裂期は細胞周期の他の時期に対して優性であること、また、分裂期の細胞には、間期の細胞に導入すると分裂を引き起こす因子が含まれることを示唆していた。次ぎの実験では、S 期の細胞が G1 期の細胞と融合された。すると、G1 期の核はすぐに DNA 複製を開始した。この結果は、S 期の細胞の細胞質には G1 期の核に DNA 複製を誘起する因子が含まれていることを示唆した。G1 期の細胞を S 期の細胞と融合して得られたヘテロカリオンは、G1 期の核が DNA 合成を終えるまで分裂期には入らなかった。この遅延からフィードバック制御の存在が明らかになった。すなわち、細胞周期のある過程が終了するまで細胞を細胞周期のチェックポイントで休止させておく機構である。

G2 期の細胞と S 期の細胞との融合は、それまでの結果とは違った結果だった。S 期の核は DNA 複製を続けたが、G2 期の核はあらたな DNA 複製を開始せず、ヘテロカリオンは S 期の核が DNA 複製を終了するまで分裂期にはいることはなかった。

G1 期の細胞を S 期の細胞と融合させた結果、S 期の細胞質には DNA 複製を活性化する因子が含まれることが示されたので、G2 期の細胞が 2 度目の DNA 複製に入れないことを説明するのは困難であった。これを単純に説明するには、再複製の抑制という概念を持ち込むことが有効である。この解釈は同じに、細胞がいかにして交互性に関する問題を解決するかということも示唆している。この仮説では、DNA はいったん複製されると再び複製されないように修飾されることを仮定している。分裂の間にこの抑制が解除されるとすれば、G1 期の核の DNA 複製能はかなりよく説明できる。また、DNA 複製と DNA 複製の間に一回の分裂が必要であることも同様に説明できる。細胞融合実験は細胞周期を理解するうえで重要な概念上の進展をもたらした。これらの実験は分裂促進因子 mitotic-promoting factor などの分子の存在を示唆したが、残念ながらこの実験系をそれらのアッセイ系として用いることは困難であった。細胞融合実験では、細胞周期の間に起こっている協調的現象のうち、重要な他の二つのタイプについては明らかにされなかった。一つは細胞周期という段階的に進行する出来事と細胞成長という連続的に進行する出来事との相関である。DNA 複製と分裂の誘起は細胞が一定の大きさに達することによって一義的に規定されており、細胞が細胞周期における決定的な段階を通過できるか否かは、この細胞の成長が達成されたうえでの話である。もう一つの協調的現象とは、細胞外環境に起因するシグナルによる細胞周期の制御である。このシグナルには栄養素の存在（栄養素の有無自体がシグナルとなる）や他の細胞からのシグナルなどが含まれる。

2.6 細胞周期のエンジン^{[4],[5],[6],[7],[8]}

2.6.1 分子レベルからのアプローチ

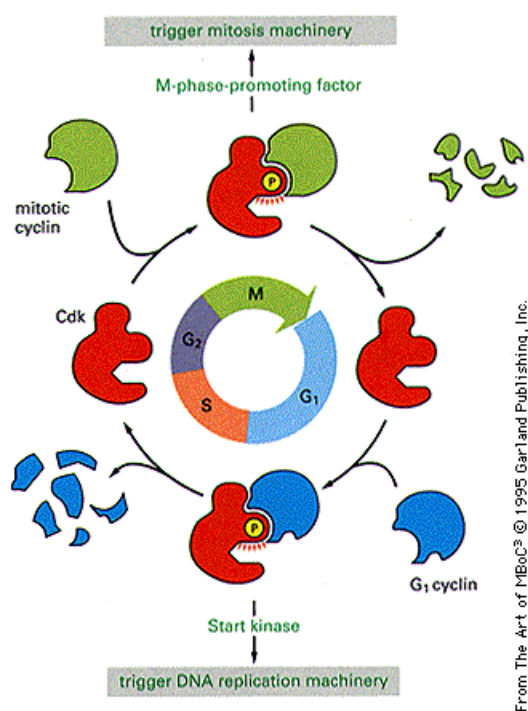


図 2.5 細胞周期制御機構

異なるサイクリンの結合により **Cdk** は活性化し、それぞれ違ったシグナル伝達を開始する。**Cdk** の活性化は結合するサイクリンの分解により終了する。

細胞周期研究のきっかけとなったのは、細胞周期を進行させるためのエンジンとも言える **Cdc2** (**Cdk**) と呼ばれるタンパク質の発見である。このエンジンには回転を円滑に進めるためにサイクリン (**Cyclin**) というタンパク質が結合して細胞周期の進行に合わせてタイミングよく機能している。細胞周期においてエンジンの動力をつたえる役割を果たすのが、タンパク質を構成するアミノ酸のうちセリン(**Ser**)あるいはスレオニン(**Thr**)のリン酸化である。すなわち、**Cdc2** は標的タンパク質の特定のセリンとスレオニンをリン酸化することのできる酵素活性をもつプロテインキナーゼである。その際リン酸基の付加、脱離が標的タンパク質の立体構造を変化させる。そしてそれが活性化や不活性化の制御をしている。

サイクリンはその名前から連想されるように、細胞内で周期的 (**Cyclic**) に増えたり減ったりしている。一方、**Cdc2** は細胞周期の間中ずっと一定で量的な変化はない。ところが、**Cdc2** キナーゼ活性はサイクリンが結合してはじめて発揮されるため、キナーゼ活性はある特定の時期にだけ働くように制御されて周期的に変動する。サイクリンと結合した **Cdc2** は、キナーゼとしての仕事が終われば邪魔になるので、速やかに分解され、もとの不活性な **Cdc2** のみが残るという仕組みになっている。ここで、**Cdc2** 自身もまた特定のスレオニン

あるいはチロシン (Tyr) という 2 種類のアミノ酸をリン酸化されることで不活性化された待機状態におかれている。Cdc2 が活性化されるのは、これらのリン酸化されたアミノ酸が特別な酵素 (Cdc25)によって脱リン酸化されることではじめて達成されるのである。

最初の研究が進んだ酵母では一種類の Cdc2 エンジンで細胞周期を回していることが明らかにされてきたが、ヒトでは Cdc2 のみではなく、CDK2~CDK9 と順次名づけられた 9 種類の類似な機能・構造をもつタンパク質と、それをコードする遺伝子が発見されている。一方、サイクリンのほうは、酵母でさえ数種類のサイクリンとその遺伝子が見つかっており、それぞれのサイクリンが細胞周期の特定の時期でキナーゼ活性を制御していることがわかってきた。ヒトでは現在までにサイクリン A,B,C,D,E,F,G,H,I,T の 10 種類のサイクリンが知られており、その制御する標的や時期はかなり多様であると考えられている。

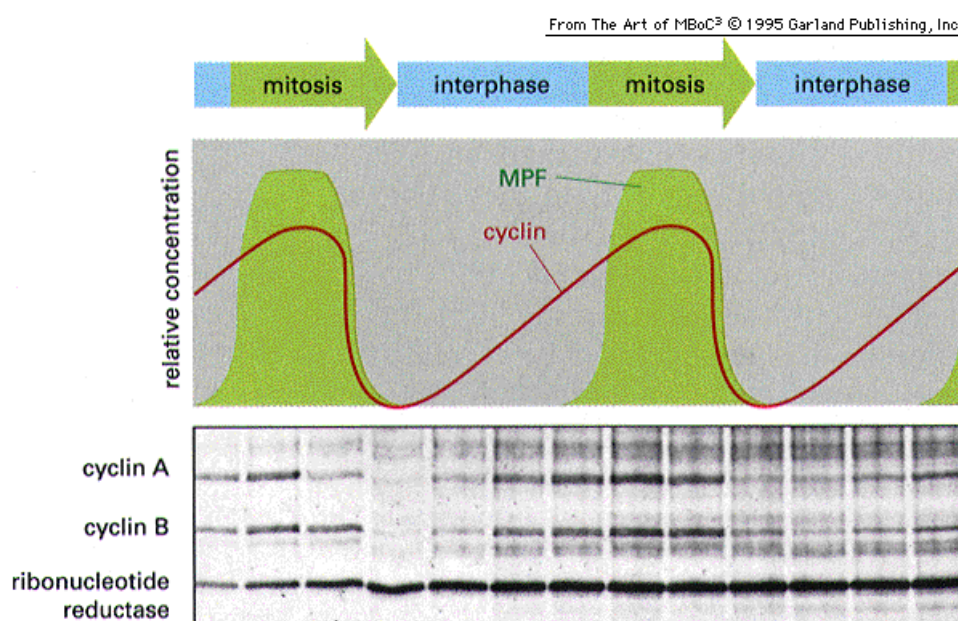


図 2.6 ハマグリ初期胚でみられるサイクリンと MPF の濃度変化

下図の写真は、一定間隔で採取したサイクリン A、B の濃度と比較対照としてのハウスキーピング酵素。上図は下図の写真をもととしたイラスト。

2.6.2 G2/M 期制御機構

Cdc2/サイクリン複合体の細胞周期制御における役割が最初に明らかになったのは G2/M 期の遷移点においてである。図で簡略に述べたような仕組みに従って制御されているが、詳しく調べてみるともう一段複雑で巧妙な仕掛けがこらされていることがわかってきた。

まず、G2/M 期において存在量がピークとなるよう周期的に発現制御されているサイクリンの一種であるサイクリン B が、Cdc2 キナーゼと複合体を形成する。この複合体はカエルの受精卵の成熟過程の研究で最初に存在が予言されたところから、卵成熟促進因子 (MPF、maturation promoting factor) とよばれることもある。しかし、Cdc2 はこのままではキナーゼ活性を発揮できない。自身の N 末端から数えて 14 番目 (ヒト) と 161 番目 (ヒト) の二つのスレオニンと 15 番目 (ヒト) のチロシンがリン酸化され、立体構造の変化が起きて待機状態になることではじめて活性化の準備状態がセットされる。

このリン酸化にも二つのステップが必要となる。最初のステップは、Mik1 あるいは Wee1 と呼ばれる双子のプロテインキナーゼのうちどちらかが働いて、特異的に Thr14 (ヒト)、Tyr15 (ヒト) の 2 ヶ所をリン酸化することである。Wee1 キナーゼそのものも、さらに上流からのシグナル伝達制御を受けた Nim1 と呼ばれるプロテインキナーゼによって特定の場所がリン酸化されることで負に制御されている。このようにリン酸化が多段の滝のように次々と起こっていくことで制御されている仕組みは細胞の中のいくつかの現象において近年発見されてきたもので、リン酸化カスケードによるシグナル伝達と呼ばれる。次のステップは Cdc2 の Thr161 (ヒト) のリン酸化であり、これが終了してはじめて待機状態となる。

これまでに述べた仕組みと類似のものは酵母やヒトのみでなく、カエル、マウス、ラットなどでも成り立っていることが証明されてきたが、ヒトにおいてはさらにリン酸化反応が CAK (Cdc2 activating kinase) というキナーゼによって触媒されることも分かっている。ここで、CAK それ自身も CDK7/サイクリン H から構成される CDK キナーゼである。さらに CAK も CAK 活性化酵素 (CAK activating kinase) によって自身の Thr170 (ヒト) がリン酸化されることでキナーゼ活性が制御されているというふうに、ここでもリン酸化によるカスケードが制御の鍵となっている。

細胞周期が順調に進んでいて M 期に進入してもよいという信号が入ると、

Cdc25 と呼ばれる特異性の高い脱リン酸化酵素によって Tyr15 が脱リン酸化され、MPF (Cdc2 キナーゼ/サイクリン複合体) は活性型に変化する。活性型 MPF が標的タンパク質をリン酸化することで M 期が誘導され、その後は M 期特有のスケジュールに従って有糸分裂が進行してゆく。

MPF の標的タンパク質として M 期進行に重要なタンパク質の一つにラミン(lamin)が知られている。ラミンは重合して網目状のラミナ(lamina)を形成して核膜の内側の層を裏打ちし、この補強によって細胞核は袋状構造を保って染色体を収納している。G2 期においてはラミンは 2 量体となったうえで頭部同士がくっついて四量体を構成し、これが単位となって網目状構造を形成しているが、MPF によりリン酸化されることでラミンは重合をほどいて単量体となり、核膜は崩壊する。これが信号となって染色体凝縮や紡錘糸の伸長などの染色体分配に必要な M 期特異的な現象が次々と開始して M 期が進行してゆくと考えられている。細胞が M 期を終えて新たな G1 期に進入するには、サイクリン B の分解が必須な出来事である。こうして Cdc2 キナーゼは次ぎの G2 期に至るまで不活性な状態にとどまっているのである。

2.6.3 ブレーキの役目を果たす CKI

研究が進むにつれてある種の CDK においては、サイクリン以外にも、CKI(CDK inhibitor)と呼ばれる阻害タンパク質が結合してブレーキの役目を果たしているケースがあることが分かってきた。CKI は結合により CDK のキナーゼ活性を阻害しており、機が熟すと分解されて、本来の CDK のもつキナーゼ活性が発揮される。哺乳類ではこれまで 8 種類の CKI をコードする遺伝子が単離されているが、これらは構造上次ぎの二つのグループに分類される。

一つのグループを構成するものは、p15,p16,p18,p19 と呼ばれる四つの CKI で、いずれも CDK4、CDK6 と強固に結合することでサイクリンが結合するのを競合的に阻害してキナーゼ活性が発揮できないようにし、細胞周期を G1 期で停止させる。これら CKI は分子のほとんどがアンキリンリピート(ankyrin repeat)と呼ばれるタンパク質分子間の結合に作用すると考えられている反復アミノ酸配列から出来ているため、結合による阻害よりほかの機能を持っていないと考えられている。

もう一つのグループを構成するのは p21,p27,p57 と呼ばれる三つの CKI でこれ

らはいずれも CDK/サイクリン複合体に結合することでキナーゼ活性を阻害する。N 末端側に CDK 結合阻害ドメインを持つが、C 末端側にはおのおのに特徴的なドメインをもっており、他の多彩な機能を発揮できると推測できる。

2.6.4 タンパク質の選択的分解：ユビキチン-プロテアソーム系

[13],[14]

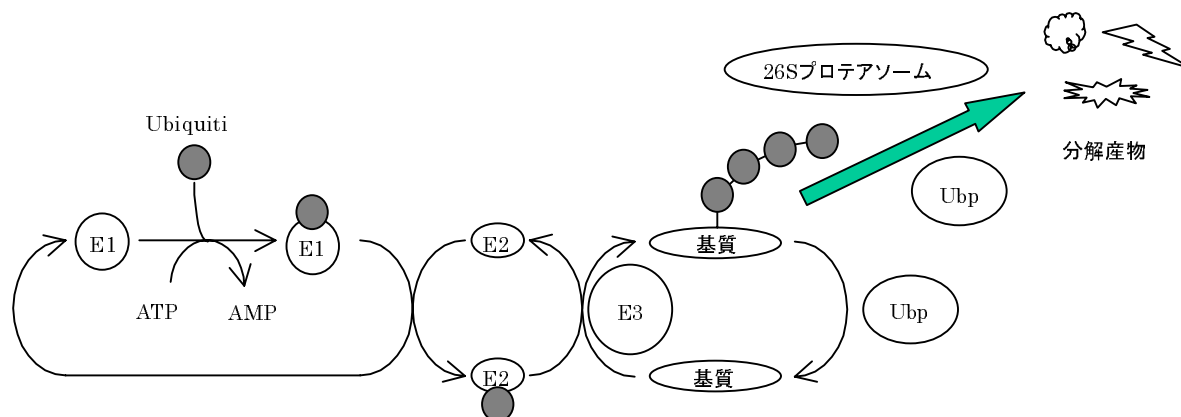


図 2.7 ユビキチン付加反応カスケード

E1: ubiquitin-activating enzyme. E2: ubiquitin-conjugating enzyme. E3: ubiquitin ligase. Ubp: 脱ユビキチン酵素

タンパク質のユビキチン付加によって引き起こされる選択的分解は、その迅速性と不可逆性を特徴として、多様な細胞機能の調節に直接関わっている。

ユビキチンは分子量 8600 のタンパク質で、すべての真核生物に共通して存在し、構造上の保存性が極めて高いことが特徴である。タンパク質のユビキチン化の作用の主なものは、それが分解シグナルとして働き、ユビキチン化されたタンパク質が巨大なプロテアーゼ複合体であるプロテアソームの標的となり、急速に分解されることにある。

細胞内でユビキチン化されたタンパク質がエネルギー依存的に分解されることの意味は、第一には不要タンパク質の細胞内から除去である。ストレスや環境変化、また合成途上での間違いやアミノ酸類似物質の取り込みなどに由来する変成したタンパク質は速やかに除去される必要がある。第二に、機能調節を行っているタンパク質を特定の時期に積極的に壊す“選択的分解”機構として作用することで、数々の機能制御に直接的に関わることである。これはとくに時間的、段階的な制御のステップを不可逆的にコントロールするのに適している。重要な点は、このようなユビキチンを経た選択的タンパク質分解を通して制御されている細胞の機能が、転写、DNA 複製と修復、細胞周期の制御、ストレス応答、多くの原ガン遺伝子産物の分解による増

殖制御、タンパク質のトランスロケーション、免疫始動など、きわめて多岐にわたっていることにある。

選択的なタンパク質分解での最大の問題は、いかに特定のタンパク質を特定の時期に認識して分解するかの特異性とタイミングの問題である。タンパク質分解にはほかにカルパイン系やリソソーム系などもあるが、ユビキチン-プロテアソーム系は他と比べて特異的分解機構としての実態を備えていることにある。

現在、タンパク質のユビキチン化反応として図 2.7 に示すカスケードが確立されている。このシステムは全体として酵母からヒト細胞に至るまで高度に保存されている。ユビキチンはユビキチン活性化酵素(ubiquitin-activating enzyme: E1)と ATP により C 末端の Gly がアデニル化され、活性化酵素の特定の Cys 残基に高エネルギー結合する。次にこれはユビキチン結合酵素(ubiquitin-conjugating enzyme: E2)の特定の Cys 残基に転移する。E2 から直接に、あるいはその際もう 1 種類の酵素、ユビキチンリガーゼ(ubiquitin ligase: E3)が介在して最終標的タンパク質の Lys 残基にユビキチンの C 末端 Gly がイソペプチド結合する。標的タンパク質が分解系の基質になるためには通常のユビキチン鎖が必要で、このため標的タンパク質に結合したユビキチン分子内の 48 番目の Lys 残基が次々とユビキチン化されていく。また、タンパク質に結合したユビキチンを遊離させる脱ユビキチン化酵素としてイソペプチターゼ(ubiquitin carboxylterminal hydrolase)が存在し、タンパク質のユビキチンによる修飾がユビキチン化と脱ユビキチン化の間で動的に制御されている。

2.7 酵素^[9]

酵素 enzyme とは、生物において化学反応の触媒となるタンパク質である。酵素の作用を受ける物質を基質 substrate、酵素が触媒する反応を酵素反応という。生体内の大部分の化学反応は酵素の触媒作用で起こるので、酵素なしには生命の維持は不可能である。

2.7.1 酵素の特徴

酵素を含め触媒は反応の活性化エネルギーを低下させることによって反応速度を大きくする。化学反応が起こるためには、その分子は活性化されなくてはならない。活性化にはエネルギーが必要で、それを活性化エネルギーという。つまり、ある壁を飛び越さなければ反応は起こらず。飛び越すためのエネルギーが活性化エネルギーである。触媒はこの壁、すなわち活性化エネルギーを低下させて反応を起こりやすくする。

酵素は一般に触媒とは違ったいくつかの特徴をもっている。

1. 酵素はタンパク質である。したがってタンパク質が変性する条件では作用を失う。酵素が作用を失うことを失活という。
2. 高性能触媒である。一般の化学反応では高温や強酸性、強アルカリ性で進行する反応が、酵素反応では37℃前後の温度で、しかも中性で速やかにおこる。
3. 作用特異性、基質特異性がある。酵素反応では目的とする反応以外は起こらない。一つの酵素は一種類の反応しか触媒しないことを作用特異性という。基質特異性とは一つの酵素は特定の基質にしか作用しないことをいう。
4. 酵素反応は大変種類が多い。普通の化学触媒による反応は種類が限られているが、酵素は酸化、還元、加水分解、脱水その他多くの反応を触媒する。
5. 酵素の働きは細胞内では状況に応じて調節される。

2.7.2 酵素反応の特徴

酵素反応の速度（酵素活性 activity）はいろいろな条件で変化する。反応速度に影響を与える因子は以下のものがある。

a)時間

反応速度と時間の関係は図のようになり、時間がたつと反応速度は低下する。これは
1)基質が使われて濃度が低下する。2)反応生成物が反応を抑える（反応物阻害 product inhibition）、3)反応によって pH が変化する。4)酵素が失活する、などの原因による。

b)酵素量

酵素を増やせば反応速度は酵素量に比例して増加するが、ある量をこえると増加は少なくなる。

c)基質濃度

反応速度と基質濃度の関係は図のように双曲線状となり、ある量以上では一定の値に近づく。この値を最大速度といい V_{max} で表す。

d)pH

反応速度は pH によって変化し、その関係は図のようになる。その酵素が最大の活性を示す pH を最適 pH（至適 pH optimal pH）という。（中性付近が多い）

e)温度

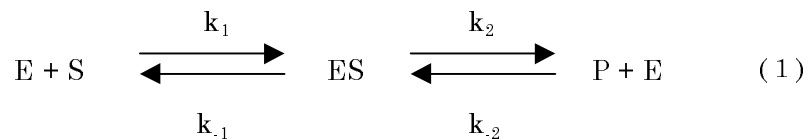
酵素反応も一般の化学反応と同様温度を上げれば反応速度が増す。しかし酵素はタンパク質であるから、高温では変性し失活するので反応速度は低下する。酵素には反応速度が最大となる最適温度がある。

f)金属イオン

酵素の中には特定の金属イオン(K,Na,Ca,Mg,Mn,Fe,Co,Ni,Cu,Zn,Se,Mo)がないと作用しないものがあり、金属酵素 metalloenzyme と呼ばれる。

2.7.3 酵素活性速度論

酵素反応では酵素（E）は基質（S）と結合し、酵素 - 基質複合体（ES）を形成する。ES は E と S に戻るか、反応生成物（P）を生成する。ES は E と P から生成可能である。それぞれの反応の速度定数を k_1 、 k_{-1} 、 k_2 、 k_{-2} とすれば、以上の



ことは次ぎの式のようになる。

酵素、基質、酵素 - 基質複合体、反応生成物の濃度をそれぞれ $[E]$ 、 $[S]$ 、 $[ES]$ 、 $[P]$ とする。酵素反応の反応速度は ES から P を生成する反応の反応速度に等しい。

$$v = k_2[ES] - k_{-2}[E][P] \quad (2)$$

ES の生成と分解の反応速度はそれぞれ次ぎの式となる。

$$ES \text{ の生成速度} = k_1[E][S] + k_{-2}[P][E] = (k_1[S] + k_{-2}[P])[E] \quad (3)$$

$$ES \text{ の分解速度} = k_{-1}[ES] - k_2[ES] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (4)$$

酵素反応では定常状態 **steady-state** における反応速度について解析する。定常状態とは、反応の中間の存在する ES の濃度は一定であるが、基質と反応生成物は変化している状態である。これは、ES の生成速度と分解速度が等しい時におこる。

$$(k_1[S] + k_{-2}[P])[E] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (5)$$

いま反応系の全酵素濃度を $[E_t]$ とすれば、それは基質が結合していない酵素の濃度と酵素 - 基質複合体に含まれる酵素の濃度との和となる。

$$[E_t] = [E] + [ES] \quad (6)$$

式(6)を式(5)に代入して $[ES]$ と $[E]$ を求めると式(7)と(8)が得られる

$$[ES] = \frac{(k_1[S] + k_{-2}[P])[E_t]}{k_1[S] + k_{-2}[P] + k_{-1} + k_2} \quad (7)$$

$$[E] = \frac{(k_{-1} + k_2)[E_t]}{k_1[S] + k_{-2}[P] + k_{-1} + k_2} \quad (8)$$

となる。

反応生成物の生成速度はこれらを式(2)に代入すれば式(9)となる。

$$v = \frac{k_1 k_2 [S] - k_{-1} k_{-2} [P] [E_t]}{k_1 [S] + k_{-2} [P] + k_{-1} + k_2} \quad (9)$$

酵素反応では反応の初速度を問題とするので、反応開始時 $P=0$ であるから反応速度は式(10)となる。

$$v = \frac{k_1 k_2 [S][Et]}{k_1 [S] + k_{-1} + k_2} = \frac{k_2 [Et][S]}{[S] + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \quad (10)$$

$k_2[Et]$ は反応系に存在するすべての酵素が ES となった時の反応速度であり、この反応の最大速度 V_m と表す。 $\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_M$ とおけば式(10)は式(11)となり、

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (11)$$

これを一般的にミカエリス・メンテンの式と呼ぶ。酵素反応速度と基質濃度との関係はこの式で表される。 K_m はミカエリス定数と呼ばれ、最大速度 $V_{\max}$ の半分の反応速度に与える基質濃度に等しい。 K_m 値は同一条件であれば各酵素につき一定の値となる。 K_m 値が小さいほど基質が低濃度でも反応が起こることになるので、 K_m 値はその酵素反応が起こりやすいかどうかの目安となる。

2.7.4 酵素活性

酵素の活性は生体が置かれた条件によって変動し、生命維持に都合がよい状態をつくり出せるように調節されている。活性の調節には酵素の量を増減させる方法と、酵素の活性を直接増減させる場合とがある。

2.7.4.1 酵素量の調節

成長期の動物ではタンパク質の合成が盛んであり、タンパク質合成に関係する諸酵素の活性は高い。このような長期的な変動に対しては、酵素量の増減で活性の調節が行なわれる。酵素量がある条件で増加する（酵素の合成が促進される）ことを誘導 *induction* という。酵素誘導の各種ホルモン、基質などによって起こるが、薬物投与で起こる場合もある。この逆に酵素合成の低下が起こる場合を抑制 *repression* という。

2.7.4.2 酵素活性の調節

細胞内のある物質の量が増えたので、それを急いで代謝分解しなければなら

ないときとか、ある物質が十分合成されたので一時合成を止めたいとか、短時間でその状況に対応して酵素の活性を変えなければならない場合は、酵素分子の活性そのものを変化させる機構が働く。

細胞内の物質代謝是一群の酵素が順序よく作用して進められる（たとえば解糖系）。反応系全体の速度は最も反応速度の遅い反応の速度で決まるので、もっとも反応速度が遅い触媒する酵素を律速酵素 *rate-limiting enzyme* と呼ぶ。律速酵素はその反応系の最初または比較的前の方に位置し、細胞内の各種情報を受けて活性が調節される。活性が調節される酵素を調節酵素 *regulatory enzyme* という。調節酵素にはアロステリック *allosteric* 酵素と、可逆的に共有結合で修飾されて活性が変化する酵素がある。

a) アロステリック酵素

アロステリックとは”別な場所”の意味である。アロステリック酵素にはアロステリック部位または調節部位 *regulatory site* と呼ばれる場所があって、ここに調節因子 *effector, modulator* が可逆的に非共有結合で結合すると酵素活性が上昇したり低下したりする。反応を促進する物質を生の調節因子、阻害する物質を負の調節因子と呼ぶ。調節因子は酵素により異なる。その代謝系の最終産物によって活性が阻害される場合を特にフィードバック阻害という。アロステリック酵素は他の酵素より構造は複雑であって、大部分は2個以上のサブユニットからなり、活性中心をもつ触媒サブユニット *catalytic subunit* と調節部位をもつ調節サブユニット *regulatory subunit* が別になっているものもある。ミカエリス・メンテン式には従わず、基質濃度と反応速度の関係はシグモイド形となる。

b) 可逆的に酵素タンパク質が修飾されて活性が調節される酵素

酵素タンパク質に特定の化合物が共有結合により可逆的に結合すると酵素の活性が変化する場合があります、代表的なものは酵素タンパク質のセリン残基の-OH がリン酸化、脱リン酸化を受ける場合である。リン酸化是一群のプロテインキナーゼ *protein kinase* とよばれる酵素によって、脱リン酸化はプロテインフォスファターゼ *protein phosphatase* によって触媒される。

第 3 章

細胞周期モデル^{[1],[2],[10],[11]}

本研究は細胞内のタンパク質の相互作用によって細胞活動がどのように制御されているかを理解する目的で、次のような方法で細胞内のタンパク質相互作用を表現した。

細胞内で起こっている酵素反応の反応速度は、化学反応素過程に参与する反応物の濃度に比例し、その反応速度は微分方程式で表現できる。まず、対象となるタンパク質同士の相互作用を図示化し、それぞれのタンパク質同士の関係をミカエリス・メンテン式をベースとした数式を使って表現した。これにより、何に対して、どういう順序で、どこで、何が起こっているのかが分かる。本研究では、細胞周期に関するタンパク質相互作用をモデル化した。

3.1 細胞分裂のメカニズム

細胞周期エンジンの生化学的モデルは、数多くの生物での研究結果に基づいている。まず、Cdk のスレオニン 161 がリン酸化されている間は、MPF 活性が保たれるが、サイクリンが消失すると、この部位のリン酸はフォスファターゼによって速やかに除去され、MPF は不活化する。MPF が不活化すると、サイクリン分解系の活性が減少し、これによって新しく合成されたサイクリン A と B が蓄積する。サイクリンは、蓄積するに従って Cdk と結合し、Cdk は Wee1 によるチロシン 15 のリン酸化及び Cdk 活性化キナーゼによるスレオニン 161 を脱リン酸化するホスファターゼ、または、チロシン 15 の再リン酸化する Wee1 によって、不活化される。

preMPF のプールが小さい時には、大量の MPF の生産を引き起こす反応を開

始させるには、定常状態の MPF レベルは低すぎる。しかし、サイクリンが蓄積するに従って preMPF のプールは増加し、やがて MPF を不活化するホスファターゼや Wee1 の能力を超えて、MPF レベルが増加する。この時点で、MPF は Cdc25 のリン酸化と活性化および Wee1 の抑制を開始し、その結果、MPF 活性化の速度が著しく増加し、細胞内のすべての preMPF の急速で不可逆的な活性化が起こる。MPF が完全に活性化してしまうと、今度はサイクリン分解系の活性化を引き起こし、分裂期から脱出させる。このモデルは細かい点ではおそらく不正確ではあるが、MPF 活性化の過程で起こる実際の出来事と少なくとも近似的には一致していると考えられる。

3.1.1 : Cdk、Cyclin そして Protease (タンパク質分解酵素) のみのもっともシンプルなモデル

3.1.2 : 3.1.1 のモデルにサイクリン阻害剤 (CKI) を導入したモデル

3.1.3 : 1 のモデルの Protease をユビキチンと 26S プロテアソームによってより詳細に有糸分裂機構を表現したモデル

3.1.1 Cdk、Cyclin、Protease モデル

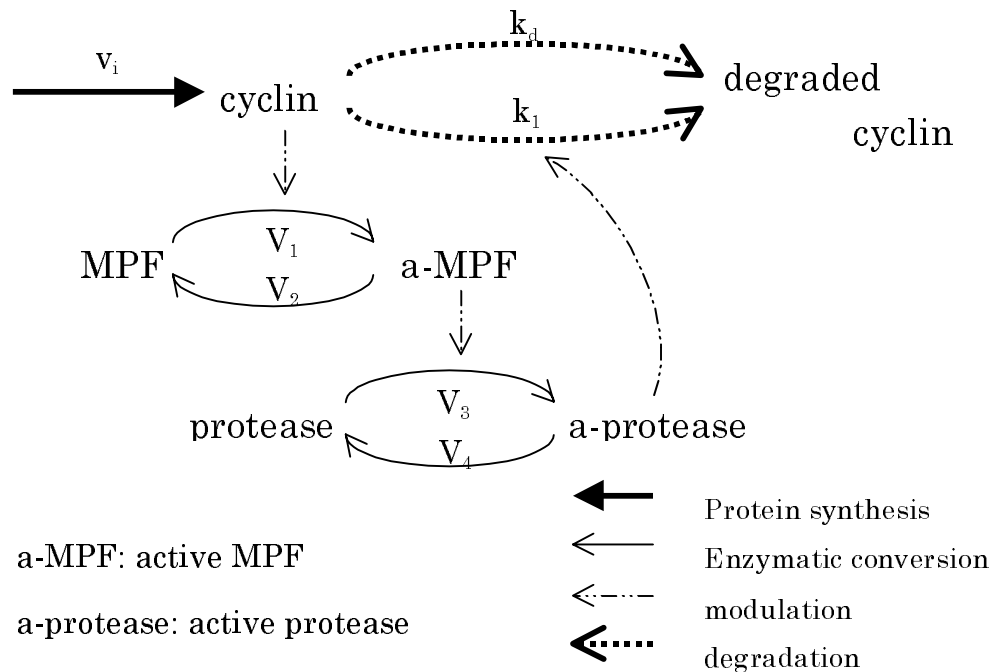


図 3.1 有糸分裂（M 期）を制御するもっとも簡略なモデル。

細胞は a-MPF の濃度上昇により、細胞分裂を開始する。

- 1) まず、一定の合成速度 v_i で Cyclin が合成される（→実線の矢印）
- 2) そして、速度 k_d で自然分解される（破線の矢印）
- 3) 生成される Cyclin が Cdk と複合体（MPF）を形成し、 V_1 の速さで活性化 MPF となる。（有糸分裂開始）
- 4) 活性化した MPF の濃度上昇に伴い、タンパク質分解酵素(Protease)のが活性化する。活性化する速度は V_3 。
- 5) 活性化した Protease は Cdk と結合しているサイクリンの特異的に分解する。
- 6) V_1 に影響を与えるサイクリンの濃度も減少により、 $V_2 > V_1$ となり細胞内の活性化 MPF が減少する。（有糸分裂終了）
- 7) 活性化 MPF の減少に伴い、サイクリンを分解する Protease も減少する。（ V_4

> V3)

8) Protease の減少により、細胞内にサイクリンが再び蓄積を始める。

9) 3) の手順へ

以下に 3 つのタンパク質（サイクリン、Cdk、Protease）の濃度変化式を示す。

- サイクリンの濃度変化式の説明 [] は濃度を示す。

$$\frac{d}{dt}[\text{Cyclin}] = v_i - k_1 \frac{[\text{Protease}][\text{Cyclin}]}{[\text{Cyclin}] + K_5} - k_d[\text{Cyclin}]$$

第 1 項：サイクリンが合成速度 v_i で合成されサイクリン濃度が増加する。

第 2 項：Protease の濃度に連動しサイクリンが分解が促進し、サイクリン濃度が減少。

第 3 項：分解速度 k_d でサイクリンの自然分解による濃度減少。

- MPF の活性化速度（活性化 Cdk の濃度変化式）

$$\frac{d}{dt}[\text{Cdc2}] = \frac{V_1(1-[\text{Cdc2}])}{(1-[\text{Cdc2}]) + K_1} - \frac{V_2[\text{Cdc2}]}{[\text{Cdc2}] + K_2}, \quad V_1 = \frac{[\text{Cyclin}]}{[\text{Cyclin}] + K_6} V_1'$$

第 1 項：不活性 MPF から活性化 MPF への変化式。V1 はサイクリン濃度に依存

第 2 項：活性化 MPF から不活性 MPF への変化式。

- Protease（タンパク質分解酵素）の活性化速度（活性化 Protease の濃度変化）

$$\frac{d}{dt}[\text{Protease}] = \frac{V_3(1-[\text{Protease}])}{(1-[\text{Protease}]) + K_3} - \frac{V_4[\text{Protease}]}{[\text{Protease}] + K_4}, \quad V_3 = [\text{Cdc2}]V_3'$$

第 1 項：不活性 Protease から活性 Protease への濃度変化式。V3 は MPF 濃度に依存

第 2 項：活性 Protease から不活性 Protease への濃度変化式。

パラメーター群

$$v_i=0.1, \quad k_1=0.5, \quad k_d=0.02, \quad K_1=K_2=0.06, \quad K_3=K_4=0.1, \quad K_5=0.02, \quad K_6=0.3, \quad V_1'=0.75, \\ V_2=0.25, V_3'=0.3, V_4=0.1$$

シミュレーション結果

本研究では、タンパク質の相互関係を連立微分方程式で表現し、それらの数式を汎用数式処理システムである Mathematica[12]を用いてタンパク質の挙動をグラフで表わした。

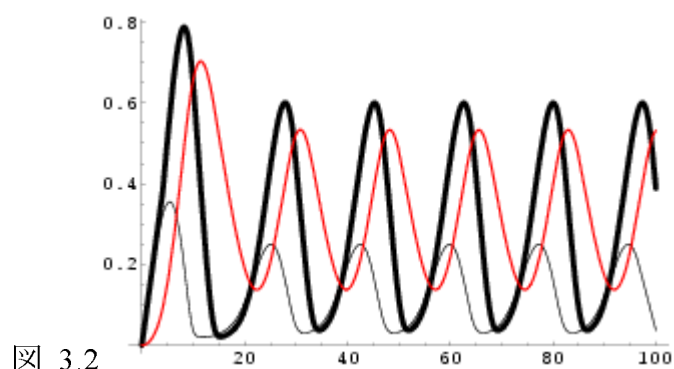


図 3.2

縦軸を濃度（分子数）、横軸を時間とし、細線はサイクリン、太線は活性型 MPF、赤線はプロテアソームを表わす。

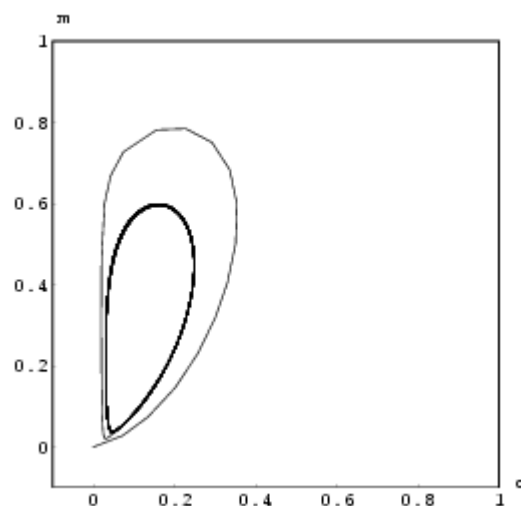


図 3.3

縦軸を活性型 MPF 濃度、横軸をサイクリン濃度を表わし、時間 $t=600$ までの濃度変化を見た。一周目を除き $t=600$ までは安定した周期であることが分かる。

3.1.2 Cdk,Cyclin,Protease,Rum1 モデル

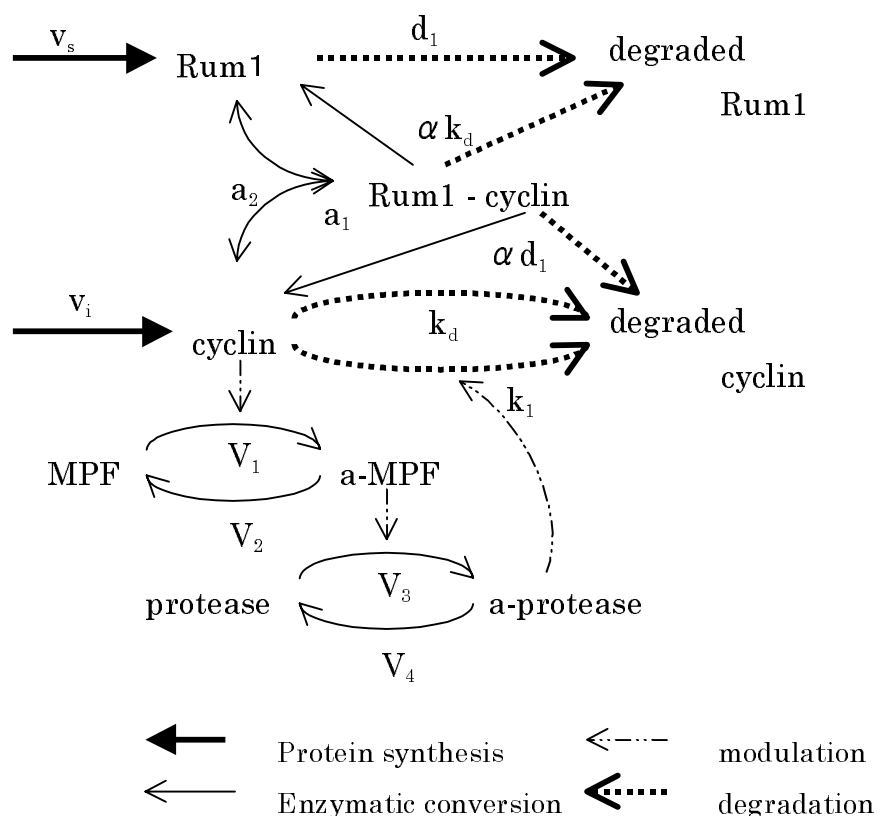


図 3.4 サイクリン阻害剤を導入した有糸分裂機構のモデル

Cdc2 キナーゼ活性はサイクリン以外にも CDK inhibitor (ここでは Rum1 タンパク質)とよばれる阻害タンパク質が結合してブレーキの役目を果たしている。Rum1 は、結合により CDK のキナーゼ活性を阻害しており、機が熟すと分解されて、本来の CDK のもつキナーゼ活性が発揮される。これらは二つのグループに分けられる。一つはサイクリンと競合的に阻害してキナーゼ活性が発揮できないようにするもの。もう一つは、CDK/サイクリン複合体に結合することでキナーゼ活性を阻害する。ヒトでは、これまで 8 種類が報告されており、そのなかには、ガン抑制遺伝子として機能している事が明らかになっている。

実際の CDK-Inhibitor (Rum1) の役割

Cdc13 は、有糸分裂時にすべてが分解されている訳ではなく、G1 初期にも存

在が確認されている。この状況だと、サイクリンは Cdc2 と複合体を作り蓄積し、その結果、細胞が十分な大きさになる前に、DNA 合成を始めたり、有糸分裂を開始してしまう。Rum1 は分裂・後期にから蓄積を始め、cdc2/cyclin に結合して細胞が十分な大きさになるまで S 期（DNA 合成期）の開始や、cdc2/cyclin による有糸分裂の開始を妨げている。

前回の細胞周期モデルに Rum1（阻害剤・Inhibitor）を導入したシンプルなモデル。

- サイクリンの濃度変化式の説明。 [] は濃度を示す。

$$\frac{d}{dt}[\text{Cyclin}] = v_i - k_1 \frac{[\text{Protease}][\text{Cyclin}]}{[\text{Cyclin}] + K_5} - kd[\text{Cyclin}] - a_1[\text{Cyclin}][\text{Rum1}] + (a_1 + \alpha d_1)[\text{Rum1/cyclin}]$$

第 1 項：サイクリンが合成速度 v_i で合成されサイクリン濃度が増加する。

第 2 項：Protease の濃度に連動しサイクリンが分解が促進し、サイクリン濃度が減少。

第 3 項：分解速度 k_d でサイクリンの自然分解による濃度減少。

第 4 項：Cyclin が Rum1 と結合し、Cyclin 濃度が減少する様子。

第 5 項：Cyclin と Rum1 が単純に分離し Cyclin 濃度が増加する様子と複合体の Rum1 の部分のみが分解し、Cyclin 濃度が増加する様子。

- MPF の活性化速度（活性化 Cdk の濃度変化式）

$$\frac{d}{dt}[a\text{MPF}] = \frac{V_1(1-[a\text{MPF}])}{(1-[a\text{MPF}]) + K_1} - \frac{V_2[a\text{MPF}]}{[a\text{MPF}] + K_2} \quad V_1 = \frac{[\text{Cyclin}]}{[\text{Cyclin}] + K_6} V_1'$$

第 1 項：リン酸化された Cdc25 により、Cdk が活性化される。

第 2 項：Wee1 によって活性化 Cdk（Cdk/Cyclin、MPF）が不活性化。

- Protease（タンパク質分解酵素）の活性化速度（活性化 Protease の濃度変化）

$$\frac{d}{dt}[\text{Protease}] = \frac{V_3(1-[\text{Protease}])}{(1-[\text{Protease}]) + K_3} - \frac{V_4[\text{Protease}]}{[\text{Protease}] + K_4}, \quad V_3 = [a\text{MPF}]V_3'$$

第 1 項：不活性 Protease から活性 Protease への濃度変化式。V3 は MPF 濃度に依存

第 2 項：活性 Protease から不活性 Protease への濃度変化式。

- Cdc25 の活性化速度（リン酸基の付いた Cdc25 の濃度変化）

$$\frac{d}{dt}[RumI] = v_s - d_1[RumI] - a_1[Cyclin][RumI] + (a_2 + \alpha k_d)[RumI/cyclin]$$

第 1 項：Rum1 が合成速度 v_s で合成され、Rum1 濃度が増加する状態。

第 2 項：Rum1 が d_1 の分解速度で自然に分解し、Rum1 濃度が減少する状態。

第 3 項：Rum1 と Cyclin が結合して Rum1 濃度が減少する状態。

第 4 項：Cyclin-Rum1 複合体が無傷で Cyclin と Rum1 に分離する事で Rum1 濃度が増加する状態と、複合体の Cyclin が分解することで Rum1 濃度が増加する状態。

- Rum1/Cyclin 複合体の濃度変化

$$\frac{d}{dt}[RumI/Cyclin] = a_1[Cyclin][RumI] - (a_2 + \alpha k_d + \alpha d_1)[RumI/Cyclin]$$

第 1 項：Cyclin と Rum1 が結合して Cyclin-Rum1 濃度が増加。

第 2 項：Cyclin-Rum1 が分離し複合体の濃度が減少。複合体の Rum1 部が分解し複合体濃度が減少。複合体の Rum1 部が分解して複合体濃度が減少。

パラメータ

$v_i=0.1$, $v_d=0.1$, $k_1=0.5$, $k_d=0.02$, $K_1=K_2=0.06$, $K_3=K_4=0.1$, $K_5=0.02$, $K_6=0.3$, $V_1'=0.75$, $V_2=0.25$, $V_3'=0.3$, $V_4=0.1$, $\alpha=0.1$, $d_1=0.05$, $a_1=0.03$, $a_2=0.03$

シミュレーション結果

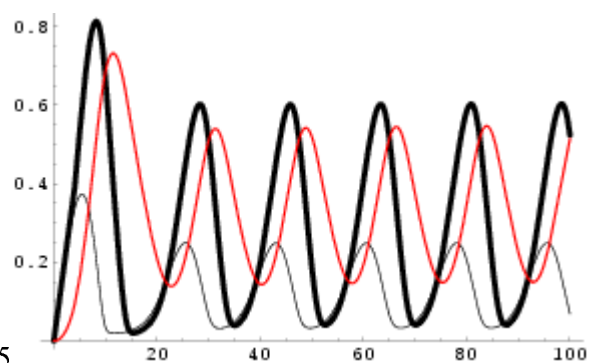


図 3.5

縦軸を濃度（分子数）、横軸を時間とし、細線はサイクリン、太線は活性型 MPF、赤線はプロテアソームを表わす。

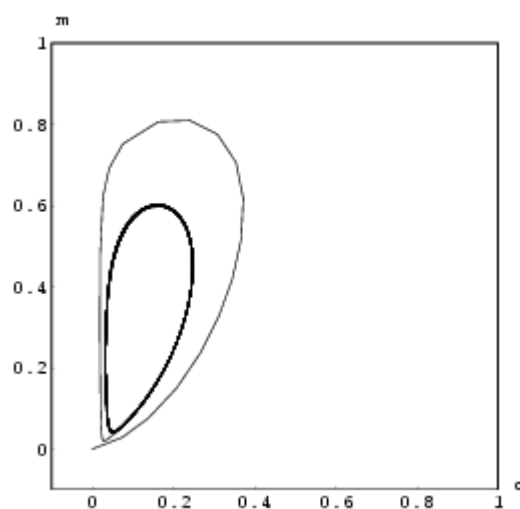


図 3.6

縦軸を活性型 MPF 濃度、横軸をサイクリン濃度を表わし、時間 $t=600$ までの濃度変化を見た。一周目を除き $t=600$ までは安定した周期であることが分かる。

3.1.3 : Cdk、Cyclin、

ユビキチン - プロテアソームモデル

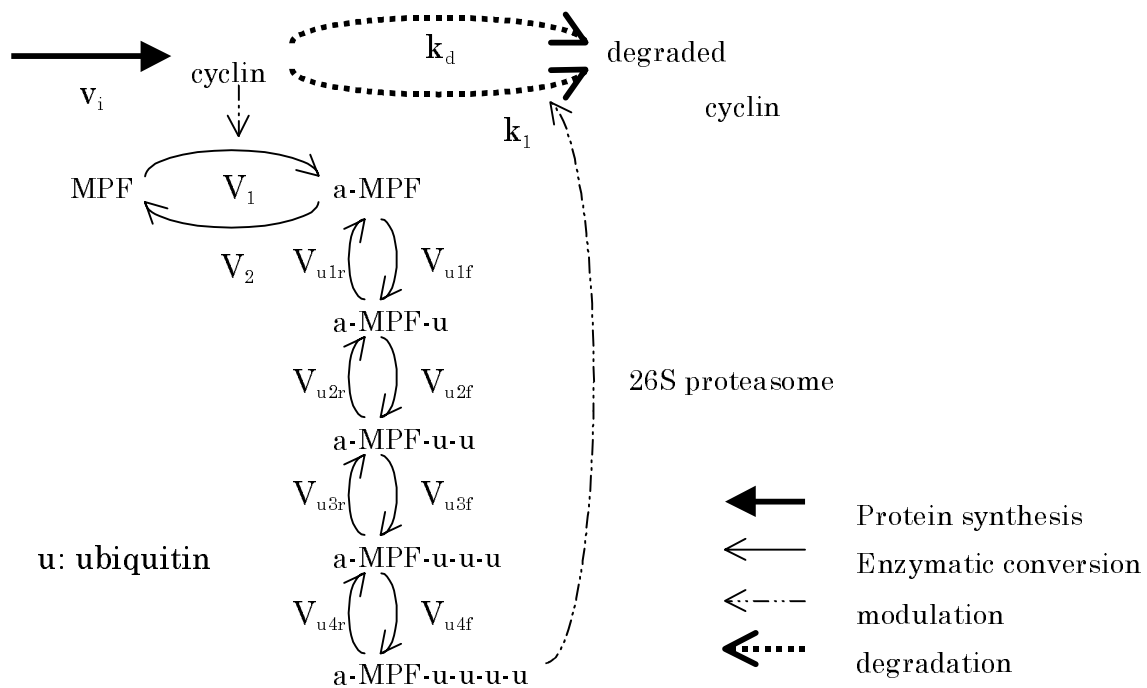


図 3.7

ユビキチン-プロテアソームによって制御する細胞周期モデル

このモデルは1のモデルで表現しているプロテアソームをより詳細に表し、ユビキチン - プロテアソーム系の特質を検討する目的で構築した。

サイクリンは細胞周期進行の制御に必須は因子の制御サブユニットであり、その量の変動により細胞周期の各段階への移行を制御している。サイクリンの量は主として細胞周期に応じた分解活性の変動により制御されており、その分解を担うのはユビキチンシステムであることが示されてきた。

タンパク質を選択的に分解・不活化を制御するユビキチンは、細胞間相互作用、細胞周期、核における遺伝子発現、情報伝達などにおいて重要な役割を担う短寿命タンパク質を分解する。このように短寿命タンパク質を分解する普遍的な機構とさ

れる一方で、個々のタンパク質には、それぞれ固有のユビキチンシステムが存在するのでは？とも言われいまだ理解が混沌としている状態である。このような背景から現在、ユビキチンに依存したタンパク質分解は、細胞周期制御を含む生命理解のキーワードになりつつある[13]。

ここで説明するモデルでは、活性化型 MPF にユビキチンが 4 分子結合したところを、26S プロテアソームによってサイクリンのみが分解されるモデルとなっている。

- サイクリンの濃度変化式の説明 [] は濃度を示す。

$$\frac{d}{dt}[\text{Cyclin}] = v_i - k_1 \frac{[uuuu\text{MPF}][\text{Cyclin}]}{[\text{Cyclin}] + K_5} - k_d[\text{Cyclin}]$$

第 1 項：サイクリンが合成速度 v_i で合成されサイクリン濃度が増加する。

第 2 項：ユビキチン 4 分子が結合した MPF の濃度に連動しサイクリンが分解が促進し、サイクリン濃度が減少。

第 3 項：分解速度 k_d でサイクリンの自然分解による濃度減少。

- MPF の活性化速度（活性化 Cdk の濃度変化式）

$$\frac{d}{dt}[\text{Cdc2}] = \frac{V_1(1 - [\text{Cdc2}])}{(1 - [\text{Cdc2}]) + K_1} - \frac{V_2[\text{Cdc2}]}{[\text{Cdc2}] + K_2}, \quad V_1 = \frac{[\text{Cyclin}]}{[\text{Cyclin}] + K_6} V_1'$$

第 1 項：不活性 MPF から活性化 MPF への変化式。V1 はサイクリン濃度に依存

第 2 項：活性化 MPF から不活性 MPF への変化式。

- MPF にユビキチン 1 分子が付加する状態式

$$\frac{d}{dt}[u\text{MPF}] = \frac{V_{u1f}[\text{MPF}](1 - [u\text{MPF}])}{(1 - [u\text{MPF}]) + K_{u1f}} - \frac{V_{u1r}[u\text{MPF}]}{[u\text{MPF}] + K_{u1r}}$$

第 1 項：MPF にユビキチンが付加する状態式

第 2 項：付加していたユビキチンが外れる脱ユビキチン反応の状態式

- uMPF にユビキチン 1 分子が付加する状態式

$$\frac{d}{dt}[uuMPF] = \frac{V_{u2f}[uMPF](1-[uuMPF])}{(1-[uuMPF]) + K_{u2f}} - \frac{V_{u2r}[uuMPF]}{[uuMPF] + K_{u2r}}$$

第1項：uMPF にユビキチンが付加する状態式

第2項：付加していたユビキチンが外れる脱ユビキチン反応の状態式

- uuMPF にユビキチン1分子が付加する状態式

$$\frac{d}{dt}[uuuMPF] = \frac{V_{u3f}[uuMPF](1-[uuuMPF])}{(1-[uuuMPF]) + K_{u3f}} - \frac{V_{u3r}[uuuMPF]}{[uuuMPF] + K_{u3r}}$$

第1項：uuMPF にユビキチンが付加する状態式

第2項：付加していたユビキチンが外れる脱ユビキチン反応の状態式

- uuuMPF にユビキチン1分子が付加する状態式

$$\frac{d}{dt}[uuuuMPF] = \frac{V_{u4f}[uuuMPF](1-[uuuuMPF])}{(1-[uuuuMPF]) + K_{u4f}} - \frac{V_{u4r}[uuuuMPF]}{[uuuuMPF] + K_{u4r}}$$

第1項：uuuMPF にユビキチンが付加する状態式

第2項：付加していたユビキチンが外れる脱ユビキチン反応の状態式

パラメータ

$$\begin{aligned} v_1=0.1, k_1=0.5, k_d=0.02, K_1=K_2=0.06, V_{u1f}=V_{u2f}=V_{u3f}=V_{u4f}=0.3, K_{u1f}=K_{u2f}=K_{u3f}=K_{u4f}=0.1, \\ V_{u1r}=V_{u2r}=V_{u3r}=V_{u4r}=0.1, K_{u1r}=K_{u2r}=K_{u3r}=K_{u4r}=0.1, K_5=0.05, K_6=0.3, V_1'=0.75, V_3'=0.3, \\ V_4=0.1 \end{aligned}$$

シミュレーション結果

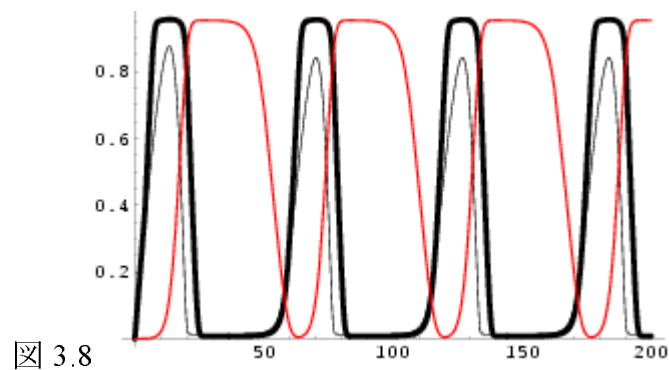


図 3.8

縦軸を濃度（分子数）、横軸を時間とし、細線はサイクリン、太線は活性型 MPF、赤線はプロテアソームを表わす

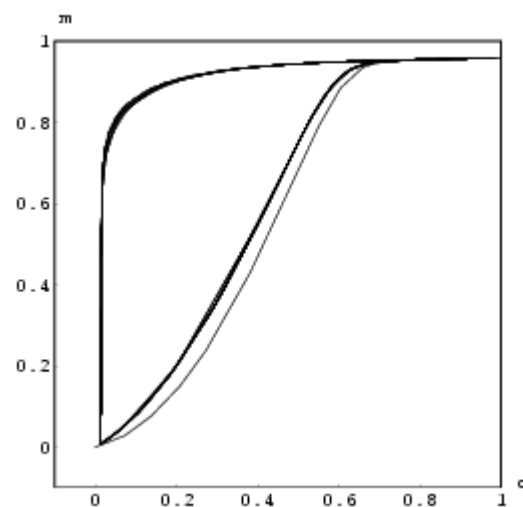


図 3.9

縦軸を活性型 MPF 濃度、横軸をサイクリン濃度を表わし、時間 $t=600$ までの濃度変化を見た。 $t=600$ までは安定した周期であることが分かる。

第 4 章

考察

本研究は細胞内のタンパク質の相互作用によって細胞活動がどのように制御されているかを理解する目的で、細胞内でのタンパク質間の関係を数式で表現することを試みた。コンピュータ上に細胞内で起こっているタンパク質同士の相互作用を構築することにより、細胞生物学者が本物の細胞を使って実験するうえで、様々な重要なアイデアを提供する実験支援になると考える。しかしながら、細胞シミュレーションに関しては、未だモデル化のための方法論が確立しておらず、またモデル化に必要なデータも不足している。

本章では、連立方程式による細胞周期の構築ならびにシミュレーションの知見に基づき、細胞周期の分子動態をモデル化する上での注意点を大きく 2 つに分けて以下に考察する。

4.1 モデル化をするにあたっての注意点の項では、モデル化を行うにあたって問題点、および、モデル構築するためにはどのような実験データが必要かを以下の 5 つの項目で述べる。

4.1.1 モデル化の対象としての細胞周期の評価

4.1.2 ミカエリス・メンテン式の有効性の検討

4.1.3 パラメータの評価

4.1.4 酵素活性の分散表現

4.1.5 細胞周期におけるポリユビキチン化の意味

4.2 実験データを用いるにあたっての注意点の項では、実際の生物試料を使って得られて実験データを用いるにあたっての注意すべき点を述べる。

4.2.1 RNA 発現プロファイルデータとの比較

4.2.1.1 RNA 発現ピークとタンパク質発現ピークのズレ

4.2.1.2 細胞周期関連遺伝子数

4.2.1.3 DNA チップ・マイクロアレイのデータの再現性

4.2.2 遺伝子量発現

4.1 モデル化をするにあたっての注意点

4.1.1 どのようなシミュレーション結果を安定もしくは答えとするのか？：対象を細胞周期にした有効性

パラメータを調節するにあたってどのパラメータを良しとするのか？ 何に向かってパラメータ調節を行えばよいのであろうか？ どのような結果・状態を安定とするのかという問題がある。シミュレーションをする対象として細胞周期を選んだ利点にその周期性にあると考える。つまり、サイクリンの濃度（分子数）が常に周期的であることを安定としたモデルとして、パラメータ調節をする。

一方、他の多くのタンパク質相互作用は一方通行である。例えば、細胞膜の外側にある分泌物を受け止める受容体は、それに特異的な分子が結合した場合、細胞内側の受容体部分から cAMP、MAP キナーゼといった分子群のシグナルが、核に向けていっせいに流れる[1]。このような一方通行のシグナル伝達は、どのような結果を良しとするのかといった点でモデルを評価するのが困難である。

4.1.2 モデル化をするにあたって使用するミカエリス・メンテン式の有効性の検討

モデル式を構築するにあたって、ミカエリス・メンテン式をベースに用いた。この理由は、酵素速度反応論で広く用いられているからである[9]。このミカエリス・メンテン式は酵素反応が定常状態であると仮定した場合に成り立つ式である。しかし、実際の細胞は成長し、分裂を起こし細胞の内部環境は絶えず変化している。こういったことからミカエリス・メンテン式のみで表現することが妥当であるかを今後も検討しつつ、微分方程式での表現に限定せず、確率的な表現方法も組み合わせた、ハイブリッドな数式表現が今後の課題と考えている。

（定常状態：反応の中間に存在する基質と酵素の複合体の濃度は一定であるが、基質と反応生成物の濃度は変化している状態である）

4.1.3 モデル化におけるパラメータ評価

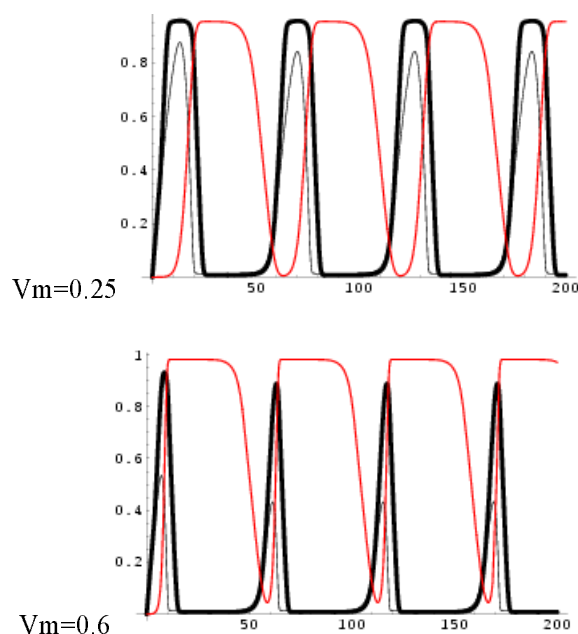
上記で述べたように、この細胞モデルは各タンパク質の濃度（分子数）が周期的な挙動をとるようパラメータを調節したが、周期的な挙動を示すパラメータ幅は意外と広く存在していた。ここでは、MPF に特異的に結合するユビキチンの結合速度式のパラメータと MPF についたユビキチンを外す脱ユビキチン化の反応式に注目し、これらの反応式のパラメータを変化させ、その周期の変化をみる。パラメータを変化することで細胞周期の動態の変化を観察し、その結果より、モデル化を行うにあたっての問題点、及びより詳細なモデルを構築するための実験データは何か必要かを述べる。

（以下のグラフでは、細線：サイクリンの濃度、太線：活性化型 MPF、赤線：MPF にユビキチンが 4 分子付加したものを表わす）

①ユビキチンを MPF に結合させる結合式のパラメータ V_m を 1~0.1 まで変化させる。この変化は生化学的には、ユビキチンの結合活性が低くなることを意味している。

ユビキチン結合活性 (V_m :1~0.1) 高い → 低い
 周期 長くなる
 MPF結合時間 長くなる

表 4.1 V_m 値を 1~0.1 まで変化させた時の周期の変化



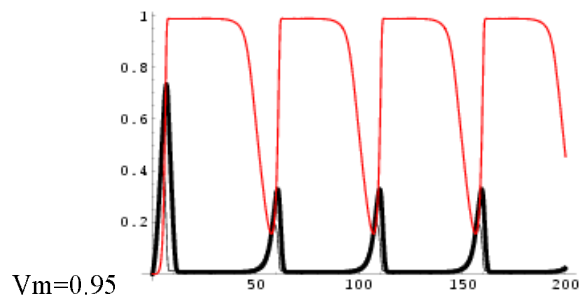


図 4.1 $V_m=0.25, 0.6, 0.95$ 時の細胞周期の状態

②ユビキチンを MPF に結合させる結合式のパラメータ K_m を $0 \sim 0.7$ まで変化させる。
生化学的には、ユビキチンの結合活性が低くなることを意味している。

ユビキチン結合活性 ($K_m:0 \sim 0.7$) 高い $\rightarrow$ 低い	
周期	長くなる
MPF 結合時間	長くなる

表 4.2 K_m 値を $0 \sim 0.7$ まで変化させた時の周期の変化

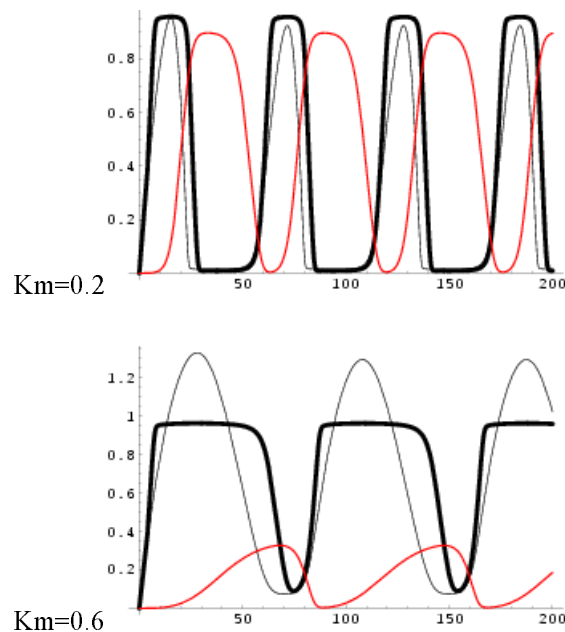


図 4.2 $K_m=0.2, 0.6, 0.6$ 時の細胞周期の状態

③MPF についてのユビキチンを外す脱ユビキチン化反応のパラメータ V_m を $0.21 \sim 0$ まで変化させる。この変化は生化学的には、脱ユビキチン化活性が低くなることを意味している。

周期 : $0.21 \sim 0.15$ までは周期の長さは短くなるが、 0.15 以降は周期が長くなる。

ユビキチン結合活性 ($V_m: 0.21 \sim 0$)	
	高い → 低い
周期	長くなる
MPF結合時間	短くなる

表 4.3 V_m 値を 0.21~0 まで変化させた時の周期の変化

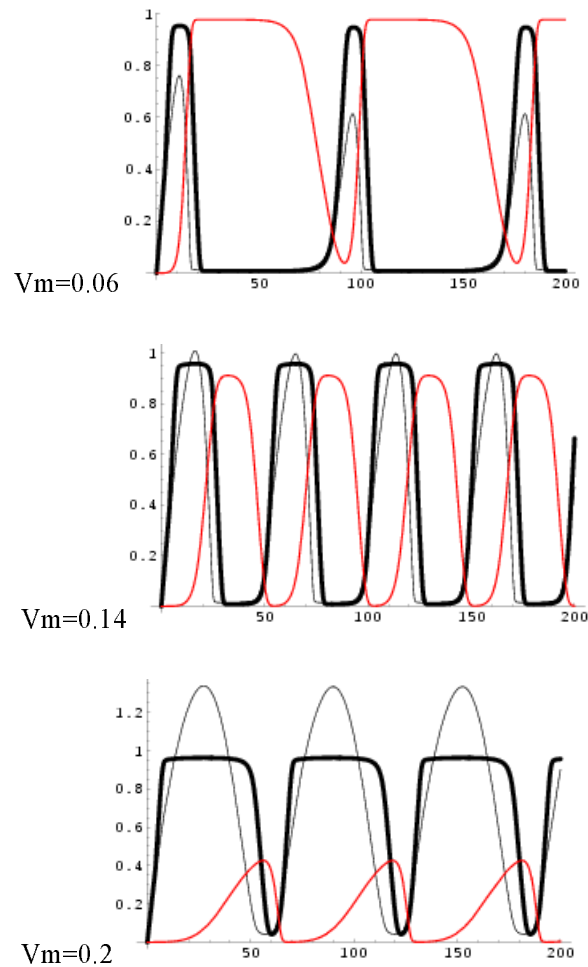


図 4.3 $V_m = 0.06, 0.14, 0.2$ 時の細胞周期の状態

④MPF に付いたユビキチンを外す脱ユビキチン化反応のパラメータ K_m を 0~0.7 まで変化させる。生化学的には脱ユビキチン化活性が低くなることを意味している。

脱ユビキチン活性 ($K_m: 0 \sim 0.7$)	
	高い → 低い
周期	短くなる
MPF結合時間	やや短くなる

表 4.4 K_m 値を 0~0.7 まで変化させた時の周期の変化

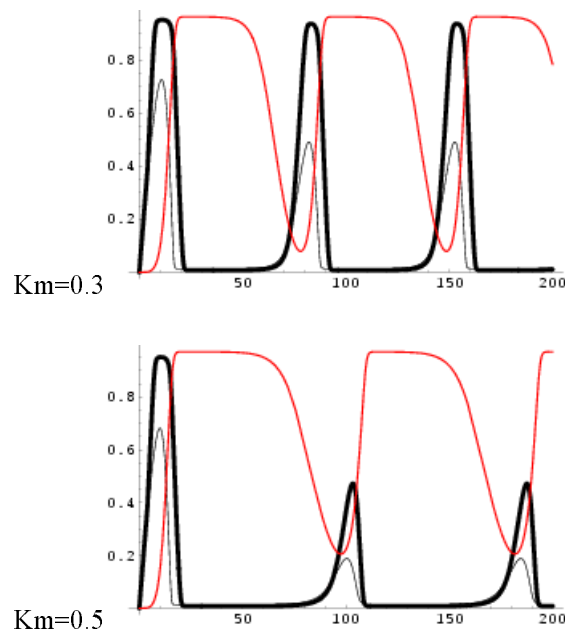


図 4.4 $V_m=0.3, 0.5$ の時の細胞周期の状態

問題点

以上のように周期的な挙動となるパラメータの幅は広い。そしてこれらのパラメータすべてが実際の細胞現象を表現しているとは言い難い。これ以上のパラメータの絞り込みには実際の生物実験データが必要となる。

必要な実験データ

現時点で必要と思われる細胞情報は、MPF の活性時間とサイクリン／MPF の発現量である。有糸分裂の時間は、全細胞周期の約 5% である[2]。これより、MPF 活性時間を全周期の 5% になるようにパラメータを絞り込むことができる。一方、サイクリンと MPF の発現量については現在参考となる公表データがない。

4.1.4 酵素活性の分散表現

前述の項では、細胞周期を制御している酵素が単一であることを仮定したモデルである。しかし、酵素はタンパク質でありナマモノである。そのため、酵素活性にも寿命がある。つまり、実際の細胞では、同一の酵素と言えども酵素活性が高い状態のものから、わずかにしか酵素活性をもっていない状態のものと様々である。この項では、細胞周期を制御する酵素活性の寿命を考慮した反応式を考えみた。ここでは、

MPF にユビキチン分子を付加させる式で説明する。

まず、MPF にユビキチン分子を付加する反応に関与する酵素を 3 段階に分ける。最も活性が高い状態のユビキチン付加酵素、活性がやや落ちた活性状態、活性があまり無い状態の 3 状態に分け、それらの酵素比率を次のように分散し、細胞周期モデルの挙動を観察した。

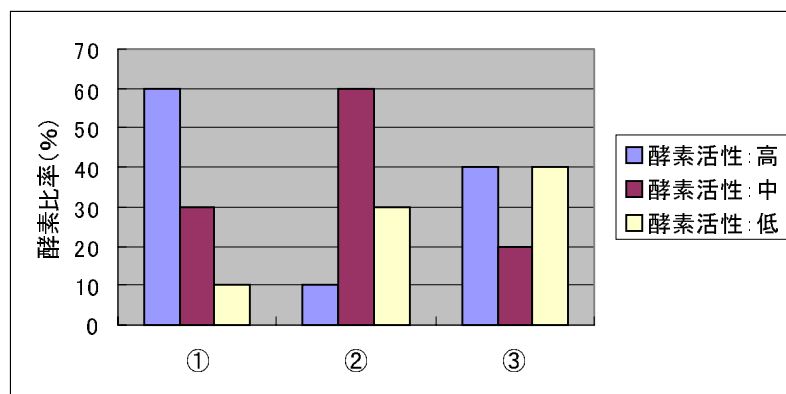


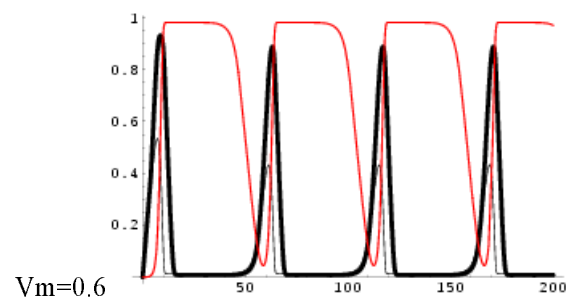
図 4.5 細胞中の酵素活性の含有割合 (3 パターン)

①：最も活性が高い状態のユビキチン付加酵素、次に、活性がやや落ちた状態、そして、活性があまりない状態。これら 3 つ活性状態の酵素の分子比率をそれぞれ 60%、30%、10% と分ける。

酵素活性	酵素比率
活性の高い状態 ($V_m = 0.6$)	60%
活性がやや落ちた状態 ($V_m = 0.8$)	30%
活性のあまり無い状態 ($V_m = 0.9$)	10%

表 4.5 細胞中の酵素活性の含有割合①

単一の酵素反応での細胞周期の挙動は以下のようなになる。



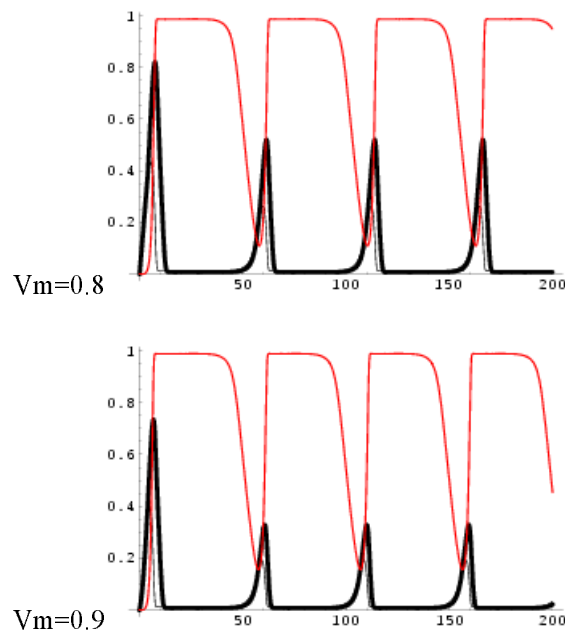


図 4.6 $V_m=0.6, 0.8, 0.9$ 時の細胞周期の状態

以上より、この細胞の酵素活性 V_m 値は $0.69 (= 0.6 \cdot 0.6 + 0.8 \cdot 0.3 + 0.9 \cdot 0.1)$ となり以下のようなグラフとなる。

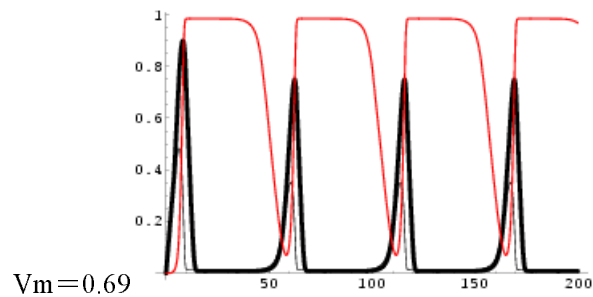


図 4.7 ①の酵素割合からなる細胞周期

②：最も活性が高い状態のユビキチン付加酵素の活性がもっとも高い状態（10%）、活性がやや落ちた状態（60%）、そして、活性があまりない状態（30%）とした場合。

活性の高い状態 ($V_m = 0.6$)	10%
活性がやや落ちた状態 ($V_m = 0.8$)	60%
活性のあまり無い状態 ($V_m = 0.9$)	30%

表 4.6 細胞中の酵素活性の含有割合②

この状態での細胞の酵素活性は Total V_m 値 $0.81 (= 0.6 \cdot 0.1 + 0.8 \cdot 0.6 + 0.9 \cdot 0.3)$ となり以下のようなグラフとなる。

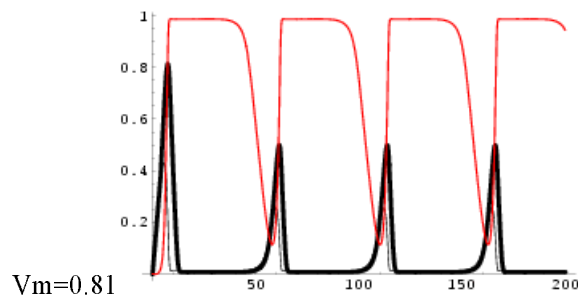


図 4.8 ②の酵素割合からなる細胞周期

③：最も活性が高い状態のユビキチン付加酵素の活性がもっとも高い状態（40%）、活性がやや落ちた状態（20%）、そして、活性があまりない状態（40%）とした場合。

活性の高い状態 ($V_m = 0.6$)	40%
活性がやや落ちた状態 ($V_m = 0.8$)	20%
活性のあまり無い状態 ($V_m = 0.9$)	40%

表 4.7 細胞中の酵素活性の含有割合③

この状態での細胞の酵素活性は Total V_m 値 0.76 ($= 0.6 \times 0.4 + 0.8 \times 0.2 + 0.9 \times 0.4$) となり以下のようなグラフとなる。

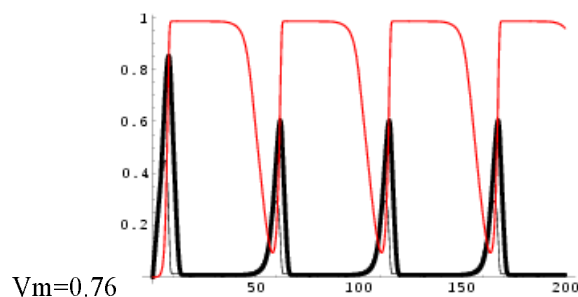


図 4.9 ③の酵素割合からなる細胞周期

この表現方法の利点

先に述べたように、周期的な挙動をとるパラメータ幅は広く、パラメータを一つに限定することが困難であるが、このように適当なパラメータをいくつか選択することで、パラメータ設定の現実的な理由付けが可能となる。また、有効な実験データが無い場合、パラメータをいくつか分散することで、パラメータ設定に対して、あまりナーバスにならなくて済む。

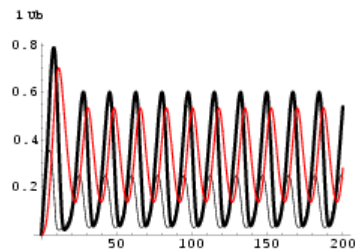
この表現方法の注意点

細胞内でのタンパク質の寿命はすべてこの分解機構によって制御されている分けではないため、この表現方法がすべての酵素反応表記に有効となるわけ

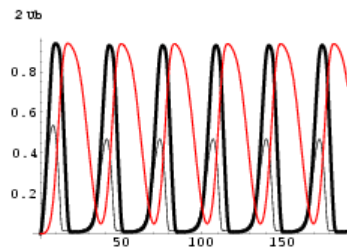
ではない。

4.1.5 細胞周期におけるポリユビキチン化の意味

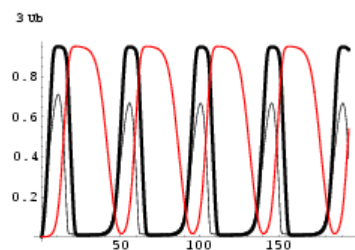
上記のモデルは MPF にユビキチンを 4 つ付けたモデルである。これは、タンパク質分解酵素である 26S プロテアソームに認識されるポリユビキチンの最小単位が 4 つであるという理由からである[13]。実際は、数十のユビキチン鎖が分解される基質に結合していることが報告されているが、そのポリユビキチンの長さは均一ではなく、その不均一なポリユビキチンの細胞周期への影響は不明である。ここでは、実際にユビキチンを 10 個つけて、モデルの挙動を観察し、ポリユビキチンの長さによる細胞周期の変化とポリユビキチン化に伴うエネルギー効率について述べる。



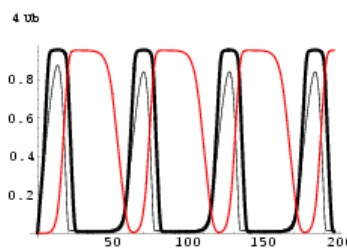
ユビキチン 1 個



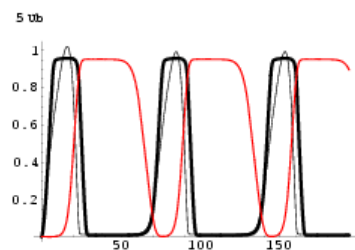
ユビキチン 2 個



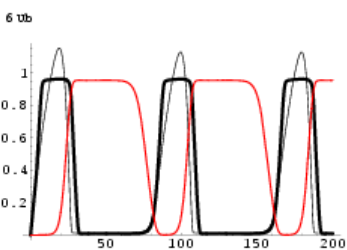
ユビキチン 3 個



ユビキチン 4 個



ユビキチン 5 個



ユビキチン 6 個

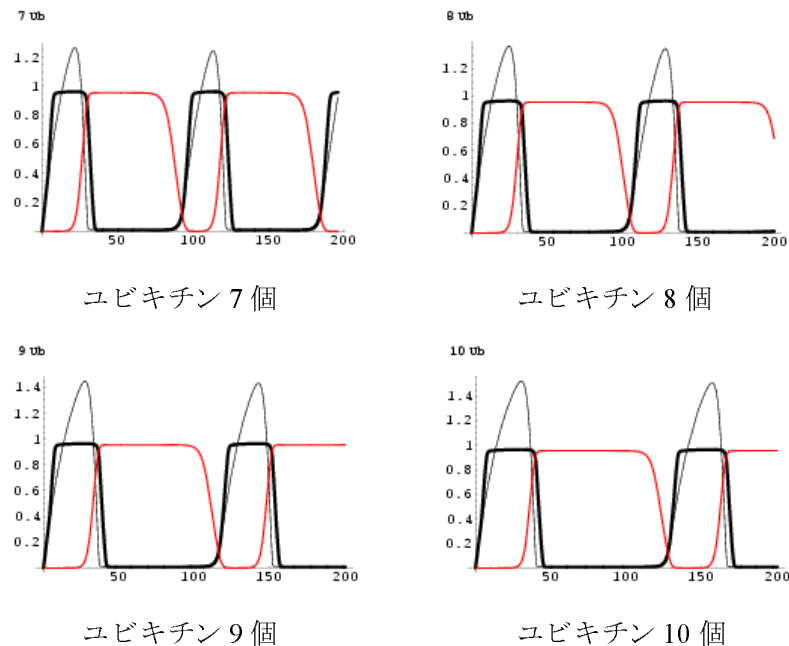


図 4.10 ユビキチンを 1~10 個まで付加させた時の細胞周期変化

本モデルのユビキチンの役割

上記のグラフのように、本モデルはユビキチンの長さに比例して、周期が長くなるようになっている。つまり、ユビキチンが細胞周期の長さを決定している。

実際のユビキチンの特性

ユビキチンの役割は、分解する基質にユビキチンが結合して、26S プロテアソーム（タンパク質分解酵素）にその分解基質を呈示する。実際のユビキチンは数十個つながり、その長さにバラツキがある事が報告されている[13]。以上のことより、本モデルと実際の細胞活動を比較して、次の 2 点についてより詳細な解析が今後必要といえる。

1. ATP 消費効率

ユビキチンを分解する基質に 1 つ結合させるためには、細胞内でのエネルギー通貨と言える ATP の 1 分子消費が必要である。つまり、ポリユビキチンを長くすればするほど ATP を消費しなければならない。細胞のエネルギー効率は非常に高い。このことから実際の細胞内には、ポリユビキチンが無限につながらないような機構の存在がこのモデルを使うこと

で確認できた。このモデルを使って今後は、エネルギー効率の観点から、ポリユビキチンの長さを検討する。

2. 未知の酵素の予測

現在報告されているポリユビキチン化に関与している酵素は 4 種類である。しかし、この 4 種の酵素の役割だけでは、ポリユビキチンの長さの意味やそれによって調節される細胞周期の長さが説明できないことがこのモデルによって確認できた。これらをより具体的に説明するためには、4 種の酵素の機能についての更なる解析、そしてこのモデルを使ってどのような機能を持った酵素が細胞にとって必要かを検討する。

4.2 実験データを用いるにあたっての注意点

モデル化しようとする対象は生き物である。そのため、モデル化をするにあたっての注意点の項で述べたように、対象の生き物を使った実験のデータは、モデルを構築する上で必要不可欠である。今後、生物実験のデータを元にして詳細なモデルを組み上げていく過程で、その実験データが生まれた背景を十分に熟知し、モデル化に用いるにあたり有効かどうか検討する必要がある。

以下に最近注目を集めている DNA チップ・マイクロアレイにより生産されるデータ。そして、遺伝子量解析から得られるデータを扱う上での注意点を述べる。

4.2.1 RNA 発現プロファイルデータとの比較

現在、ポストゲノムの研究による解析が進むなか、DNA チップ・マイクロアレイ等による新技術により、大量の情報が手に入るようになった[15][16]。しかし、DNA チップ等の新技術は現時点では発展途上であり、それらによって生み出されたデータが正確に細胞内の状況を反映しているかどうかについては注意が必要である。

4.2.1.1 RNA 発現ピークとタンパク質発現ピークのズレ

Spellman らのグループが公表するデータでは、タンパク質レベルで G1/S 期にピークで向かえる出芽酵母のサイクリン Cln 3 は、DNA チップ・マイクロアレイで得られる RNA の発現ピークだと G2/M 期が発現ピークとなっている[17]。

	<u>Cln3</u>	<u>Cib1</u>
タンパク質の発現量の最大時期	G1/S	G2/M
DNAチップによるRNA発現量の最大時期	G2/M	G2/M

表 4.8 タンパク質と RNA の発現時期の違い

この RNA の発現ピーク時期とタンパク質の発現ピーク時期の時間差は DNA チップ・マイクロアレイの原理的な問題なのか？ それとも RNA からタンパク質の生成能力の差なのかがわからない。一方、出芽酵母のサイクリン Cib 1 はタンパク質の発現量ピークと DNA チップ・マイクロアレイから得られる RNA 発現量ピークは同期である。分裂酵母の場合、サイクリン Cig1 は、G1 期にタンパク質発現量が最大になるが、古典的な手法であるノーザンブロッティングによる測定では RNA の発現レベルは細胞周期中一定であり[18]、RNA の発現とタンパク質の発現の関係が曖昧である。DNA チップ・マイクロアレイの時系列によるデータの取り扱いには注意が必要といえる。

4.2.1.2 細胞周期関連遺伝子数

出芽酵母を対象とした発現プロファイルから読み取った細胞周期関連遺伝子と報告する遺伝子の数が、Spellman らのグループでは 800 個。そして Cho らのグループでは 416 個と大きく異なっている[17][19]。

	<u>細胞周期関連遺伝子数</u>
Spellman PT	800個
Cho RJ	412個

表 4.9 二つのグループが報告する細胞周期関連遺伝子数の違い

すでに出芽酵母の全塩基配列の解読は終了している。公開されている遺伝子数は予測を含めたものであり、機能不明な遺伝子は機能既知遺伝子との相同性により推測しているものが大半である。そのため、これほどの遺伝子数の違いが出てくる。

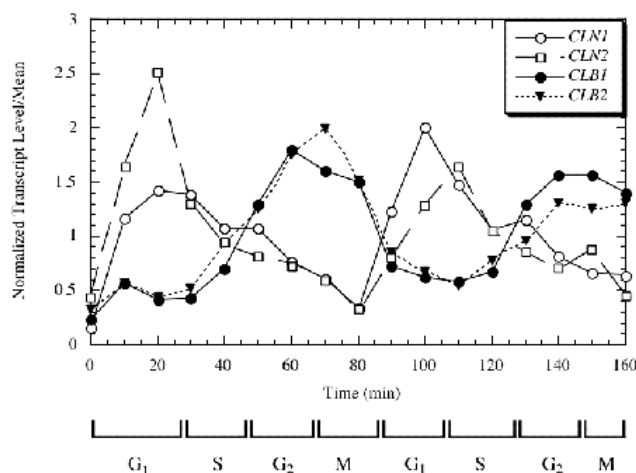


図 4.11 DNA チップにより 2 周期にわたって
サイクリンの発現量をみたデータ

等の結果を合わせてはじめて議論ができると言われている。また、発現量においても DNA チップ・マイクロアレイでは発現量が 2 倍の違いを通常陽性とするが、この判断基準にはあまり根拠が無いといわれている。現時点では、DNA チップ・マイクロアレイでの定量には難があるとされている。加えて、いくつかのタンパク質同士が複合体を形成してはじめて機能を持つものもあり、そのような複合体のサブユニットが発現し、複合体を形成し機能を持つまでの過程は当然モニターできない。

4.2.2 発現遺伝子量解析[20]

また、正確に発現量が定量出来たとしても、それらが有効なモデル化につながるとは限らない。遺伝子量(gene dosage)解析においても、不確定な要素を含んでいる。例えば、ヒトの突然変異における機能喪失が、遺伝子産物(gene product)の 50%の産生低下で明確になる場合もあれば、正常の 10%ないし 5%まで遺伝子産物が低下しないと効果が現れない場合がある。逆に、ヒトのダウン症候群に見られる余分な第 21 番染色体は、第 21 番染色体の遺伝子量が 50%以上増加することによって生じるが、余分な第 21 番染色体自体は健常な親から受け継いだ全く正常なものである。

4.2.1.3 DNA チップ・マイクロアレイのデータの再現性

Cho らのグループが RNA のサイクリン発現レベルを 2 周期にわたり 10 分間隔でデータを採取しているが、1 周期目の発現量と 2 周期目の発現量に最大 20% 近くの違いが生じている 図 4.11[19]。また、DNA チップ・マイクロアレイのみの結果ではデータとはならず、RT-PCR、ノーザンブロッティング

遺伝子産物	表現形の例
正常値の50%低下	高コレステロール血症 (LDL受容体)
正常値の90%までの低下	大部分の劣性遺伝形質の代謝性疾患
正常値の50%増加	ダウン症候群、X染色体の異常は軽度

表 4.10 遺伝子産物量の変化と表現形

各遺伝子産物は細胞内において別の物質との相互作用の比率が定まっているので、遺伝子量の変化が機能異常を引き起こすといえる。問題となるのは、遺伝子産物の適性な絶対量ではなく、相互作用する遺伝子産物の適性な比率であろう。代謝に関連する可溶性酵素などのように、まったく単独で作用する遺伝子には、量効果はほとんど認められていない。

4.3 結論

本研究では、細胞活動の一つである細胞周期の分子制御機構のモデル化を行った。本モデルは文献知識のみで構築しており、特別な生物実験は一切行わなかった。今後も生物実験サイドから提供される文献知識のみで、より詳細なモデル化が可能となるであろう。しかし、文献から提供される実験データもさまざまな形で加工されたデータであり、その実験データが生産される手法や背景を把握しておかなければ、大きく読み違える可能性を含んでいる。今後、大量のゲノムデータが生産されるが、これら膨大なデータを扱う為には、生物学の知識が必要であると言える。

文献知識を再構築した細胞モデルを評価する上で、微分方程式を用いたシミュレーション技術は必要不可欠なものである。この技術を用いた本研究でも、ユビキチン-プロテアソーム系のタンパク質分解機構において、ユビキチンの特性に関する新たな知見を得ることができた。

4.4 今後の課題

- ・ ミカエリス・メンテン式以外での有効な表現方法の検討
- ・ サイクリン発現量のデータ入手
- ・ パラメータ最適値を GA によって決定するシステム作り

4.5 今後の展開

4.5.1 細胞周期とガン

本研究では細胞周期エンジンのブレーキである Rum1 タンパク質を扱った。この Rum1 と同様な機能を持つものが、哺乳類で現在 8 種類単離されている。p16 といった幾つかのタンパク質は、ガン抑制遺伝子として機能することが明らかにされている[21]。また、このように細胞周期の関連遺伝子の解析が進む一方で、化学物質を用いて、Cdc2 を直接阻害する事を試みているグループもある[22]。このような研究の流れは、細胞内のシグナル伝達経路を詳細に把握し、次ぎにシグナル伝達経路を特異的に抑制することを考えることが重要になることを示唆している。細胞活動のシミュレーションは、これらの研究を推進する上で重要なものとなるだろう。そして将来的にはこれらの研究は、ガン細胞のみにアポトーシス（細胞死）を起こさせるといった遺伝子治療に大きく貢献すると考えられる。

4.5.2 ユビキチン-プロテアソーム系と神経変性疾患

現在遺伝性パーキンソン病の 3 つ原因遺伝子が判明している。UCHL-1 [23]、perkin [24]、 α -synuclein [25]である。UCHL-1 は脱ユビキチン化酵素[26]、perkin はユビキチンリガーゼ[27]である。 α -synuclein は 26S プロテアソームにより分解されるため、ユビキチン化される基質であるとされている[28]。遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子は分かっているが、それがなぜアポトーシス（細胞死）を引き起こすのかは現在のところ分かっていない。ハンチントン舞踏病[29]や幾つかの脊髄小脳変性症の原因遺伝子もユビキチン化されることが確認されている[30]。しかし、これらの疾患も原因遺伝子が分かっているが、その遺伝子異常がどうして発病するのかは不明である。おりこれらの現象とユビキチン-プロテアソーム系は深く関与していると思われる。今後の詳細なモデルにより、神経変性疾患の発病の機序や治療についてなんらかの解釈が可能となるかもしれない。

謝辞

この研究にご協力していただいた多くの方々に感謝の意を表します。遺伝子知識システム論講座のみなさまには、たくさんの貴重な助言をいただきました。遺伝子知識システム論講座の佐藤賢二助教授には、貴重な時間をさいて私のためにアドバイスしていただきましたことに深く感謝いたします。最後に、私の研究が小長谷明彦教授の恩恵を多くこうむっていることを明記し、教授の好意と寛容に謝意をあらわしたいと思います。

参考文献

- [1]. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the Cell*. Third Edition, Garland Publishing, Inc, New York (1994)
- [2]. Murray A, Hunt T. 岸本健雄 監訳 細胞周期の分子生物学 メディカル・サイエンス・インターナショナル (1995)
- [3]. Stein GS, Baserga R, Giordano A, Denhardt DT. *The Molecular Basis of Cell Cycle and Growth Control*. John Willy & Sons, Inc, New York (1999)
- [4]. Stern B, Nurse P. A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet* 1996 Sep;12(9):345-50
- [5]. Hayles J, Fisher D, Woollard A, Nurse P. Temporal order of S phase and mitosis in fission yeast is determined by the state of the p34cdc2-mitotic B cyclin complex. *Cell* 1994 Sep 9;78(5):813-22
- [6]. 田矢陽一、野島博 細胞周期と癌 実験医学 Vol.17 No. 5 (増刊) 1999.
- [7]. Benito J, Martin-Castellanos C, Moreno S. Regulation of the G1 phase of the cell cycle by periodic stabilization and degradation of the p25rum1 CDK inhibitor. *EMBO J* 1998 Jan 15;17(2):482-97
- [8]. Stern B, Nurse P. Cyclin B proteolysis and the cyclin-dependent kinase inhibitor rum1p are required for pheromone-induced G1 arrest in fission yeast. *Mol Biol Cell* 1998 Jun;9(6):1309-21
- [9]. 林典夫、廣野治子 シンプル生化学 南江堂 (2000)
- [10]. Goldbeter A. A minimal cascade model for the mitotic oscillator involving cyclin and cdc2 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Oct 15;88(20):9107-11
- [11]. Gardner TS, Dolnik M, Collins JJ. A theory for controlling cell cycle dynamics using a reversibly binding inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Nov 24;95(24):14190-5

- [12]. Schwalbe D & Wagon S. 金田和久訳 VisualDsolve 海文堂 (1999)
- [13]. 鈴木紘一、小南英紀、田中啓二編 プロテオリシス タンパク質分解の分子機構とバイオロジー 共立出版 (1999)
- [14]. Kirschner M. Intracellular proteolysis. *Trends Cell Biol* 1999 Dec;9(12):M42-5
- [15]. DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 1997 Oct 24;278(5338):680-6
- [16]. White KP, Rifkin SA, Hurban P, Hogness DS. Microarray analysis of Drosophila development during metamorphosis. *Science* 1999 Dec 10;286(5447):2179-84
- [17]. Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, Iyer VR, Anders K, Eisen MB, Brown PO, Botstein D, Futcher B. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell* 1998 Dec;9(12):3273-97
- [18]. Fisher D, Nurse P Cyclins of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Semin Cell Biol* 1995 Apr;6(2):73-8
- [19]. Cho RJ, Campbell MJ, Winzeler EA, Steinmetz L, Conway A, Wodicka L, Wolfsberg TG, Gabrielian AE, Landsman D, Lockhart DJ, Davis RW A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol Cell* 1998 Jul;2(1):65-73
- [20]. Strachan T & Read AP. *Human Molecular Genetics*, BIOS Scientific Publishers Ltd. (1996)
- [21]. Sherr CJ Cancer cell cycles. *Science* 1996 Dec 6;274(5293):1672-7
- [22]. Gray NS, Wodicka L, Thunnissen AM, Norman TC, Kwon S, Espinoza FH, Morgan DO, Barnes G, LeClerc S, Meijer L, Kim SH, Lockhart DJ, Schultz PG. Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science* 1998 Jul 24;281(5376):533-8
- [23]. Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998 Oct 1;395(6701):451-2
- [24]. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive

- juvenile parkinsonism. *Nature* 1998 Apr 9;392(6676):605-8
- [25]. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997 Jun 27;276(5321):2045-7
- [26]. Wilkinson KD, Lee KM, Deshpande S, Duerksen-Hughes P, Boss JM, Pohl J. The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science* 1989 Nov 3;246(4930):670-3
- [27]. Shimura H, Hattori N, Kubo Si, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T. Familial parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000 Jul;25(3):302-5
- [28]. Bennett MC, Bishop JF, Leng Y, Chock PB, Chase TN, Mouradian MM. Degradation of alpha-synuclein by proteasome. *J Biol Chem* 1999 Nov 26;274(48):33855-8
- [29]. Gusella JF, MacDonald ME, Ambrose CM, Duyao MP. Molecular genetics of Huntington's disease. *Arch Neurol* 1993 Nov;50(11):1157-63
- [30]. Kalchman MA, Graham RK, Xia G, Koide HB, Hodgson JG, Graham KC, Goldberg YP, Gietz RD, Pickart CM, Hayden MR. Huntingtin is ubiquitinated and interacts with a specific ubiquitin-conjugating enzyme. *J Biol Chem* 1996 Aug 9;271(32):19385-94