

# 排除体積効果を考慮した細胞膜上シグナル伝達系モデル

藤井 雅史, 栗津 暁紀, 西森 拓

広島大学大学院 理学研究科 数理分子生命理学専攻

## 概要

細胞膜上の三量体 GTP 結合タンパク質 (G タンパク)・G タンパク連結型受容体 (レセプター)・標的タンパク質からなるシグナル伝達系について、分子の混み合いがその機能性に及ぼす影響を、格子ガスモデルを用いて考察した。特に、レセプターに活性化された G タンパクが、標的タンパクを活性化する頻度のレセプター・G タンパク・標的タンパクの密度依存性を調べた結果、(レセプター密度) < (G タンパク密度) < (標的タンパク密度) という関係を満たす場合に、活性化頻度が高くなることを見出した。また、標的タンパクの不活性化確率が低い場合、G タンパクの移動しやすさが活性化頻度を上昇させるのに対し、標的タンパクの不活性化確率が高い場合は、混雑し、分子間の接触頻度が高い場合に活性化頻度が上昇することが見出された。

## Model of Signaling pathway on cell membrane including excluded volume effect

Masashi Fujii, Akinori Awazu, and Hiraku Nishimori

Department of Mathematics and Life Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

## Abstract

The influence of molecular crowding on their functionality of the signaling process by receptor  $\rightarrow$  G-protein  $\rightarrow$  target protein on cell membrane is considered. We propose a lattice gas model to describe and focus on the molecular density and inactivation rate of target protein dependency of the activation frequency of target protein. We found the activation frequency tends to be high when densities of proteins obey the relation of that [density of receptor] < [density of G-protein] < [density of target protein] independent of inactivation rate of target. we also found that, when the inactivation rate of target protein is low, the mobility of G-protein contribute to high signaling activation frequency. On the other hand, in the case of high inactivation rate of target, the activation frequency become high when the density of molecular is so high that these molecules cannot move but can contact to react frequency with each other, when the inactivation rate of target protein is high, molecular are congested contact frequency between molecules contribute to high activation frequency.

## 1. 研究背景

生体内には多種多様なタンパク質が存在し、これらはその種類に応じて生体内の構造形成、運動、代謝やシグナル伝達などの元となる様々な酵素反応に関与することで、生命活動を支えている。また、細胞内にはタンパク質以外にも数多くの分子が存在する。そして近年、それらの排除体積効果によって分子の移動が困難になる、‘Molecular Crowding’という、いわば細胞内における分子の渋滞というべき現象が示唆されており [1-3]、この効果によるパーキンソン病の誘発可能性など、生体に与える影響も研

究が進められている [4, 5]。

このような分子の混雑は、例えば細胞膜上など 2 次元に制限された空間で、より顕著な影響が生じると考えられる。そこで今回我々は、細胞膜上で行われている代表的な化学反応である、G タンパク連結型受容体  $\rightarrow$  三量体 GTP 結合タンパク質 (G タンパク)  $\rightarrow$  標的タンパク質シグナル伝達過程について、細胞膜上のタンパク質の密度の増加によって引き起こされる混雑がシグナル伝達に与える影響を考察する。このシグナル伝達系で重要となる G タンパクは、全ての真核細胞に存在しており [7]、その構造は、図 1 のように、 $\alpha$  サブユニットと  $\beta\gamma$  複合体が結合して三

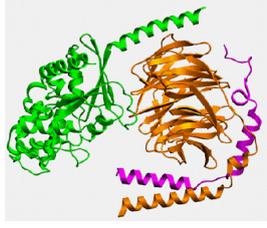


図1: 三量体 GTP 結合タンパク質の構造 [6]。緑色の部分が  $\alpha$  サブユニット、黄色の部分が  $\beta$  サブユニット、紫色の部分が  $\gamma$  サブユニットを表している。 $\beta$  サブユニットと  $\gamma$  サブユニットは基本的に結合しており、 $\beta\gamma$  複合体を形成している。

量体を形成している。この G タンパクは、細胞外部から G タンパク連結型受容体を介してシグナル (ホルモンや神経伝達物質等) を受け取り、活性化 (GTP が結合する) して  $\alpha$  サブユニットと  $\beta\gamma$  複合体に解離する。そして、各サブユニット・複合体が細胞内部の標的タンパク質を活性化することでシグナルの伝達を行う。本研究では、このようなシグナル伝達過程を、タンパク質 1 分子を 1 粒子と見なした簡単な格子ガスマデルを用いて考察する。

## 2. モデル及び設定

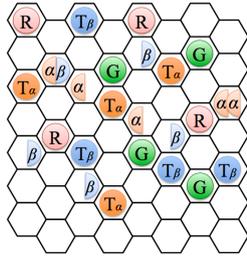
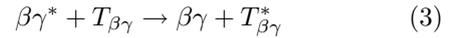
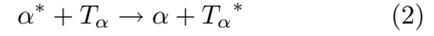


図2: シミュレーションの設定の模式図。G タンパク (G)・ $\alpha$  サブユニット ( $\alpha$ ) と  $\beta\gamma$  複合体 ( $\beta$ )・レセプター (R) や、標的  $\alpha$  ( $T_\alpha$ )・標的  $\beta\gamma$  ( $T_\beta$ ) が六角格子で仕切られた平面上をブラウン運動する。

G タンパク連結型受容体 (レセプター)  $\rightarrow$  三量体 GTP 結合タンパク質 (G タンパク)  $\rightarrow$  標的タンパク質からなるシグナル伝達系における、分子間の排除体積効果の影響を考察するため、以下のようなモデルを導入する。まず、G タンパクを介したシグナル伝達系では、細胞膜上で次のような活性化・不活性化反応が行われている [7]。ここで、「R」はレセプター、「G」は G タンパク、「 $\alpha$ 」「 $\alpha^*$ 」は  $\alpha$  サブユニット、「 $\beta\gamma$ 」「 $\beta\gamma^*$ 」は  $\beta\gamma$  複合体、「 $T_\alpha$ 」「 $T_\alpha^*$ 」は  $\alpha$  の標的タンパク、「 $T_\beta$ 」「 $T_\beta^*$ 」は  $\beta\gamma$  の標的タンパクのそれぞれ不活性化型・活性化型を表すとする。



これらのシグナル伝達過程は、細胞膜表面という 2 次元空間上で行われるので、各タンパク質 1 分子を 1 粒子とした粒子が六角格子状の平面を、ブラウン運動しながら反応を行うと仮定する。ここで、レセプター・G・T、と  $\alpha$ ・ $\beta\gamma$  は体積が異なる。よって排除体積効果として、各格子には、R・G・T のうちいずれか 1 個まで、あるいは、 $\alpha$  と  $\beta\gamma$  が合計で 2 個までしか入れないとする。また、実際の実験結果から、レセプターは細胞膜に深く埋まっており、他のタンパク質より拡散が遅いことが報告されている [8,9]。そのため、今回はレセプターの移動は考慮しないことにする。

本モデルでは、式 (1)-(6) の各タンパク質の活性化・不活性化が、以下のルールに従って進行するとする。

(i) G は隣接する格子に R がある場合、活性化して  $\alpha^*$  と  $\beta\gamma^*$  に解離する (式 (1))。

(ii) 解離した  $\alpha^*$  と  $\beta\gamma^*$  は、それぞれ  $T_\alpha$  と  $T_\beta$  に隣接した際に、 $T_\alpha \rightarrow T_\alpha^* \cdot T_\beta \rightarrow T_\beta^*$  と活性化し、自身は不活性化する (式 (2), (3))。

(iii) 不活性化型  $\alpha$  と不活性化型  $\beta\gamma$  が同じ格子にいるとき、結合して G を形成する (式 (4))。

(iv) 活性化した  $T_\alpha^*$  と標的  $T_\beta$  は、確率  $p$  で自発的に不活性化する (式 (5), (6))。

シミュレーションでは以下の手順に従って行うとする。

1. ランダムに粒子を選択する。
2. 選んだ粒子がレセプター以外の場合
  - (a) 選んだ粒子が式 (1)-(6) のいずれかの左辺第一項のタンパク質の場合、活性化・不活性化を行うことが出来れば活性化・不活性化を行う。
  - (b) (a) の活性化・不活性化を行うことが出来なければ、最近傍の 6 格子からランダムに 1 格子を選び、選んだ格子に移動する。
3. 以上の 1・2 を粒子数回繰り返して、単位時間ステップとする。

以下のシミュレーションでは、系のサイズを  $40 \times 40$  とし、境界には周期境界条件を課す。初期状態として、G、R、 $T_\alpha$ 、 $T_\beta$  をランダムに配置する。ただし、 $T_\alpha$  と  $T_\beta$  の個数は等しいとする。また、T の不活性化確率  $p$  を 0.01、0.1、1 の場合を考察する。

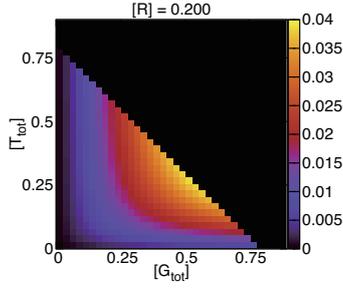


図 3:  $k = 2$ ,  $p = 1$  における、レセプターの密度  $[R] = 0.2$  での、G タンパクの初期密度  $[G_{init}]$  (横軸) と標的タンパクの密度  $[T_{init}]$  (縦軸) に対する活性化頻度  $J$  (濃淡) の関係。

### 3. 空間を無視した平均場モデル

ここではまず、反応速度式 (1)-(6) で示される反応過程について、分子の移動の詳細を無視した平均場モデルについて考察する。ここで、このシグナル伝達系の動作の指標として、単位時間あたりに各サブユニットが  $T$  を活性化する頻度を、活性化頻度  $J$  と定義する。 $G$ 、 $\alpha$ 、 $\alpha^*$  サブユニット、 $\beta\gamma$ 、 $\beta\gamma^*$ 、 $T_\alpha$ 、 $T_\alpha^*$ 、 $T_{\beta\gamma}$ 、 $T_{\beta\gamma}^*$ 、 $R$  の密度を、それぞれ  $[G]$ 、 $[\alpha]$ 、 $[\alpha^*]$ 、 $[\beta\gamma]$ 、 $[\beta\gamma^*]$ 、 $[T_\alpha]$ 、 $[T_\alpha^*]$ 、 $[T_{\beta\gamma}]$ 、 $[T_{\beta\gamma}^*]$ 、 $[R]$  とすれば、系内のタンパク質の時間発展は

$$\dot{[\alpha]} = 2[T][\alpha^*] - 4[\alpha][\beta\gamma] \quad (7)$$

$$\dot{[\alpha^*]} = [R][G] - 2[T][\alpha^*] \quad (8)$$

$$\dot{[\beta\gamma]} = 2[T][\beta\gamma^*] - 4[\alpha][\beta\gamma] \quad (9)$$

$$\dot{[\beta\gamma^*]} = [R][G] - 2[T][\beta\gamma^*] \quad (10)$$

$$\dot{[T_\alpha]} = p([T_\alpha^*] - 2[T_\alpha][\alpha^*]) \quad (11)$$

$$\dot{[T_{\beta\gamma}]} = p([T_{\beta\gamma}^*] - 2[T_{\beta\gamma}][\beta\gamma^*]) \quad (12)$$

$$[G] = [G_{tot}] - \frac{[\alpha] + [\alpha^*] + [\beta\gamma] + [\beta\gamma^*]}{2} \quad (13)$$

$$[T_\alpha^*] = \frac{[T_{tot}]}{2} - [T_\alpha] \quad (14)$$

$$[T_{\beta\gamma}^*] = \frac{[T_{tot}]}{2} - [T_{\beta\gamma}] \quad (15)$$

と表される。ここで、 $\alpha$ 、 $\alpha^*$ 、 $\beta\gamma$ 、 $\beta\gamma^*$  は他のタンパク質の半分の大さきなので、他のタンパク質より拡散が早いため、反応する相手との遭遇率が高くなる。そこで、ここでは「 $\alpha$ 」「 $\beta\gamma$ 」「 $\alpha^*$ 」「 $\beta\gamma^*$ 」が関わる反応は大まかに 2 倍、「 $\alpha$ 」「 $\beta$ 」間の反応は大まかに 4 倍程度早く進むとした<sup>1</sup>。この式 (7)-(15) を  $[R] \cdot [G_{tot}] \cdot [T_{tot}]$  を変化させつつ数値的に解き、定常状態における  $J = [T_\alpha][\alpha^*] + [T_{\beta\gamma}][\beta\gamma^*]$  に着目する。図 3 は、最も  $J$  が高くなるときの  $[R]$  に対する、 $[G_{tot}] \cdot [T_{tot}]$  と  $J$  の関係をに示したものである。こ

<sup>1</sup>以下の結果は、この重みの詳細には大きく依らない

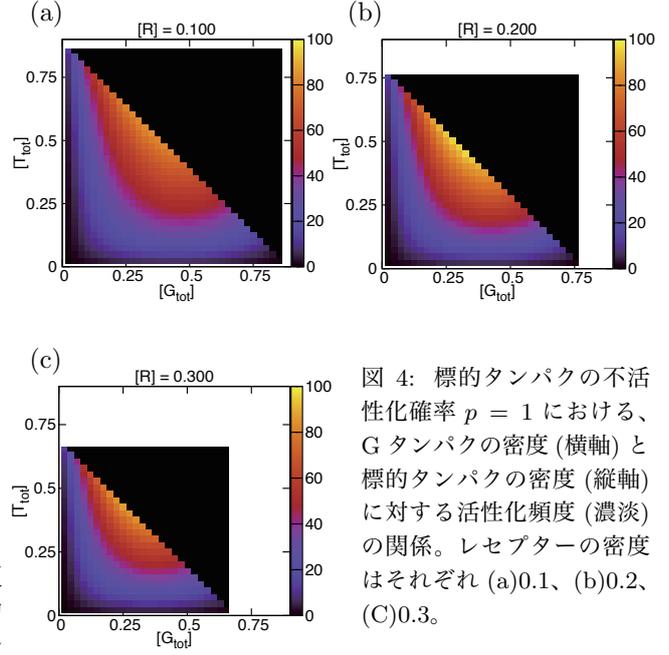


図 4: 標的タンパクの不活性化確率  $p = 1$  における、G タンパクの密度 (横軸) と標的タンパクの密度 (縦軸) に対する活性化頻度 (濃淡) の関係。レセプターの密度はそれぞれ (a)0.1、(b)0.2、(C)0.3。

の結果から、平均場モデルでは、活性化頻度の最大値を実現するときの各タンパク質の密度比が、およそ、 $[R] : [G_{tot}] : [T_{tot}] = 0.2 : 0.55 : 0.25 \approx 1 : 2 : 1$  となることが分かる<sup>2</sup>。

### 4. シミュレーション結果

ここで、2章で導入した、排除体積効果を考慮したシグナル伝達系モデルにおける、活性化頻度 (単位時間あたりに活性化された標的タンパクの個数) の各タンパク質の密度 (タンパク質の個数/格子数) 依存性を議論する。

まず、標的タンパクの不活性化確率  $p$  が 1 の場合を考える。図 (a)-(c) は、レセプター密度  $[R]$  が 0.1、0.2、0.3 の場合における、G タンパク密度  $[G_{tot}]$ ・標的タンパク密度  $[T_{tot}]$  と活性化頻度の関係である。どの場合も、全体の密度が 1 のときに活性化頻度が高くなるのがわかる。さらに、活性化効率が最大となるのは、 $[R] : [G_{tot}] : [T_{tot}] \approx 2 : 3 : 5$  となる場合であることがわかる。一方、3章で考察した平均場モデルでは、活性化効率が最大となる密度はレセプターの密度 : G タンパクの密度 : 標的タンパクの密度  $\approx 1 : 2 : 1$  であった。従って、今回考えているような膜上のシグナル伝達系では、分子の排除体積効果が重要な寄与を及ぼし、その結果、(レセプター密度) < (G タンパク密度) < (標的タンパク密度) という関係を満たす場合に、活性化頻度が大きくなる可能性が見出された。

次に、標的タンパクの不活性化確率  $p$  が低い場合についても同様の考察を行う。図 4(a)・(b) は  $p = 0.1$ ・

<sup>2</sup>密度の効果として、反応速度が密度に対し減少するとした場合でも、 $J$  が最大となる総密度は 1 より小さくなるものの、 $R$ 、 $G$ 、 $T$  の比については同様の結果が得られる。

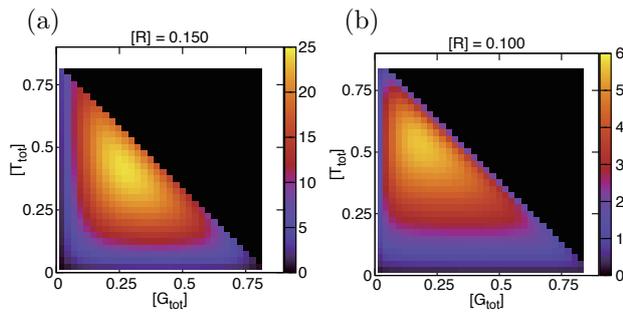


図4: (a) 標的タンパクの不活性化確率  $p = 0.1 \cdot$  レセプターの密度 0.15、(b) 標的タンパクの不活性化確率  $p = 0.01 \cdot$  レセプターの密度 0.1 での、G タンパクの密度 (横軸) と標的タンパクの密度 (縦軸) に対する活性化頻度 (濃淡) の関係。

$p = 0.01$  において、活性化頻度を最大とする  $[R]$  における、 $[G_{tot}]$ 、 $[T_{tot}]$  と活性化頻度の関係である。これらの結果からまず、どちらの場合も  $p = 1$  の場合 (図 (b)) と同様に (レセプター密度)  $<$  (G タンパク密度)  $<$  (標的タンパク密度) という関係を満たす場合に、活性化頻度が大きくなる。しかし、 $p = 1$  の場合とは異なり、タンパク質の総密度が 1 小さい場合に活性化頻度が最大となることが分かる。

この結果から以下のことが示唆される。まず、全体の密度が 1 のとき、全てのタンパク質は動くことが出来ないが、逆に局所的に G タンパクがレセプターと標的タンパクと隣接している箇所では常に活性化反応を行うことが出来る。ここで、標的タンパクの不活性化確率が高い場合、このような 3 種の分子が隣接する場所では、移動という「ロス」をなしに高い頻度でシグナルの伝達が可能になるため、このような場所が多くなるような密度が高い (=1) 状況で活性化頻度が高くなる。一方、標的タンパクの不活性化確率が下がると、密度がほぼ 1 の時はタンパク質は動くことが出来ないため、隣接している標的タンパクが不活性化するのを待つ必要がある。しかし密度がある程度低い場合、タンパク質は移動することで少し離れた標的タンパクを活性化させることが出来る。よって、活性化頻度が最大となる全体の密度は 1 より小さくなる。

## 5. まとめと議論

細胞膜上での三量体 GTP 結合タンパク質 (G タンパク)・G タンパク連結型受容体 (レセプター)・標的タンパク質からなるシグナル伝達系に対する、排除体積効果を考慮した格子ガスモデルを構成し、分子の混雑と、レセプターに活性化された G タンパクが標的タンパクを活性化する頻度の関係を考察した。活性化頻度が最大となる条件は、それぞれのタンパク質の密度が、(レセプターの密度)  $<$  (G タン

パクの密度)  $<$  (標的タンパクの密度) という関係を満たす場合であることが分かった。この結果は、空間効果・排除体積効果を無視した平均場モデルの結果と有意なずれがあることが分かった。このことから、膜上のシグナル伝達系のように、粒子の排除体積効果が重要な寄与を及ぼす系では、下流のタンパク質が占める比率を程よく大きくなることでシグナル伝達効率を高くしていることが示唆される。また、特に標的タンパクの不活性化が早い場合、混雑し、下流のタンパク質との接触頻度を増加させることで、活性化の効率を向上させている可能性が示唆された。

Goodsell らによれば、細胞内でタンパク質が占める体積比はおよそ 20-30%程度であることが示唆されている [1]。タンパク質の形状は、単純ではなく、複雑な形状をしているため、慣性半径等で考えた実効的な密度は多少は高くなると考えられるが、それでも、十分に混雑した状況かどうかは、今後議論する必要がある。また、実際の細胞内では、今回考慮したタンパク質以外にも (今回のシグナル伝達系への関与の有無を問わず) 様々なタンパク質が存在し、それらによる影響というものも考える必要がある。また、G タンパク・標的タンパクは膜と細胞質の間を行き来していることが実験により知られている。今後は、これらの実験で観測された結果との今回得られた結果とを照らし合わせ、生体内の混雑が与える影響についてあらゆる角度から考えていきたいと思う。

## 謝辞

本研究は日本学術振興会特別研究員制度による科学技術研究費補助金によって行われた。

## 参考文献

- [1] D. S. Goodsell, Trends Biochem. Sci. **16**, 203-206 (1991)
- [2] A. P. Minton, Methods in Enzymology **295**, 127-149, (1998)
- [3] R. J. Ellis, Current Opinion in Structural Biology **11**, 114-119 (2001)
- [4] M. D. Shtilerman, T. T. Ding, and P. T. Lansbury, Jr., Biochem. **41**, 3855-3860 (2002)
- [5] D. Kilburn, J. H. Roh, L. Guo, R. M. Briber, and S. A. Woodson, J. Am. Chem. Soc. **132**, 8690-8696 (2010)
- [6] Image Library of Biological Macromolecules.
- [7] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, "Molecular Biology of the Cell 4th.", Garland Science, New York (2002)
- [8] G. Kwon, D. Axelrod, and R. R. Neubig, Cellular Signalling **6**, 663-679 (1994)
- [9] K. Suzuki, K. Ritchie, E. Kajikawa, T. Fujiwara, and A. Kusumi, BioPys. J. **88**, 3659-3680 (2005)