

# 細胞膜上の分子混み合いを考慮した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

細胞膜上のシグナル伝達系において、分子の混み合いがその機能に及ぼす影響について、格子ガスモデルを用いて考察した。特に、レセプターからシグナルタンパクを介して標的タンパクへと伝達されるシグナル流量の、分子の体積密度依存性を調べた結果、標的タンパクの膜への親和性が非常に高く、分子の細胞膜上での移動が制限される程混み合う状況において、シグナル流量は最も大きくなることを見出した。またこのとき、レセプター周りでの分子の動径分布関数から、各分子が反応経路に沿ってカスケード的に空間分布することが見出され、これによって、分子が混み合う状況で、よりシグナル伝達が効率的に行われるメカニズムが明らかとなった。

## Model of Signaling Pathway on Cell Membrane including Effect of Molecular Crowding

Masashi Fujii, Akinori Awazu, and Hiraku Nishimori

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

### Abstract

The influence of the molecular crowding on the signal transduction on the cell membrane is considered. We propose a lattice gas model to focus on the molecular volume fraction dependency of the signal flow, in which the signals are transduced from the receptor to the target protein via the signaling protein. Consequently, we find that the signal flow becomes maximum a high affinity of the target protein for the membrane, where the proteins are so crowded that the movements of proteins are limited. Additionally, the radial distribution function of proteins around receptors shows that the proteins distribute in order, receptor  $\rightarrow$  signaling protein  $\rightarrow$  target protein, as the signaling pathway. This fact gives the mechanism of the more effective signal transduction in the crowded condition.

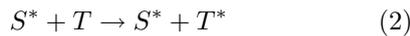
## I. Introduction

細胞は、細胞外の環境やその変化を認識し、その環境に応じて振る舞いを変える。例えば、細胞性粘菌は、誘因物質である cAMP の濃度勾配を感知し、濃度が高い方へ進む、いわゆる走化性を示す。また、心筋細胞は、周りの細胞の振動と同調することによって、大きな拍動を引き起こす。このような細胞外の環境の認識や、細胞間での情報を内部に伝達する方法の1つとして、シグナル伝達がある。シグナル伝達では、細胞外の誘因物質などの刺激を、細胞膜上のレセプターで感知し、シグナルタンパクを活性化し、さらに下流のシグナルタンパクの活性化を繰り返すことで、最終的に自身の細胞核などに伝達される。このような細胞内のシグナル伝達は、細胞の運命を決定づける上で重要な役割を果たしており、そ

の性質から、正確で、かつ、迅速な反応が要求される [1]。一方で、細胞内には多種多様なタンパク質などの分子が存在するため、分子の混雑・渋滞が起こり、反応速度が低下してしまう、Molecular Crowding という現象が示唆されており [2-4]、例えば、分子の混み合いによるパーキンソン病の誘発可能性など、Molecular Crowding が生体与えられる影響の研究も進められている [5,6]。そこで我々は、二次元格子ガスモデルを用いて、細胞内のシグナル伝達系の中でも、シグナル伝達の最上流である細胞膜上の反応に着目し、細胞内の混み合いがシグナル伝達に与える影響を考察する。

## II. Model and Setting

本研究では、細胞内(細胞質側)の細胞膜上における代表的なシグナル伝達系であるGPCR(G-protein coupled receptor)伝達系を基にしつつ、反応を簡略化した系について考える。細胞膜を二次元六角格子状の平面で表現し、レセプター( $R$ )・不活性化型シグナルタンパク( $S$ )・活性化型シグナルタンパク( $S^*$ )・標的タンパク( $T$ )の4種類のタンパク質が、この格子上をランダムに移動するとする。ただし、各サイトに入ることが出来るタンパク質は1つのみとする。タンパク質は、隣接するサイトのタンパク質と、以下の反応を行う。



ただし、反応(2)で活性化された $T^*$ は、細胞膜上から解離し、細胞質中の次のシグナル伝達に向かう。今回は、細胞膜上の反応のみに注目し、細胞質中には標的タンパクが十分多く存在すると仮定する。また、シグナルタンパクと標的タンパクは確率的に不活性化する(反応(3),(4))。



ここで、 $P_s \cdot P_{in}$ は、それぞれシグナルタンパクの不活性化確率・標的タンパクの膜への結合確率(細胞質中の $T^*$ が不活性化し、膜へ結合する確率)である。これらを踏まえた上で、シミュレーションの時間発展規則を以下のように定義する。

1. ランダムにサイトを選択する。
2. 選択したサイトに

(a) タンパク質が存在する場合

- タンパク質がシグナルタンパクで、かつ、反応(1)・(2)または(3)の反応が行うことが出来れば、反応を行う。ただし、反応(2)と反応(3)は、同時に起こる、すなわち、見かけ上 $S^* + T \rightarrow S + T^*$ の反応も起こるとする。
- タンパク質がシグナルタンパクではない、または、シグナルタンパクではあるが反応(1)-(3)を行うことが出来ない場合、最近傍の6サイトからランダムに1サイトを選択し、そのサイトが空いていれば移動する。この際、レセプターは確率0.1で、標的タンパクは確率1で移動する<sup>1</sup>。

<sup>1</sup>これは、膜貫通型のレセプターは、細胞膜を構成している脂質との排除体積効果により、他のタンパク質に比べて拡散係数の比率がおよそ0.1-0.3程度になる[7,8]という結果による。

(b) タンパク質が存在しない場合、確率 $P_{in}$ で標的タンパクをおく(反応(4))。

3. 上記の1・2を全サイト数回繰り返し、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。また、シグナルタンパクの不活性化確率を $P_s = 0.1$ とする<sup>2</sup>。初期状態として、レセプターとシグナルタンパクをランダムに配置する。以上のモデルを用いて、シグナルタンパクの密度 $[S_{tot}]$ ・レセプターの密度 $[R]$ ・標的タンパクの膜への結合確率 $P_{in}$ とレセプターからシグナルタンパクを介して標的タンパクに到達したシグナル流量 $J$ の関係を考察する。

## III. Results

### 1. 空間構造を無視した平均場モデルによる推測

実際にシミュレーションした結果を紹介する前に、平均場を仮定し、シグナル流量の密度依存性を推測する。全タンパクが一様に分布していると仮定すると、系の時間発展は、次のように、活性化型シグナルタンパクと細胞膜上の標的タンパクの密度の時間発展によって記述される。

$$\dot{[S^*]} = (1 - \rho)[R][S] - P_s[S^*] \quad (5)$$

$$\dot{[T]} = (1 - \rho)P_{in} - (1 - \rho)[T][S^*] \quad (6)$$

$$\rho = [R] + [S] + [T] \quad (7)$$

ここで、 $[\ ]$ は密度を表す。また、シグナルタンパクの活性化(式(5)右辺第一項)と標的タンパクの活性化(式(6)の右辺第二項)は、2つのタンパク質の接触による反応に対応する。系内のタンパク質密度が増加すると分子の拡散がしづらくなり、反応が起こりにくいため、系内の全タンパク質の密度に応じて接触頻度が変化するよう、 $(1 - \rho)$ を付加している。II章で述べた初期条件のもとでこの式の定常解を求めた結果、シグナルタンパクの密度 $[S_{tot}]$ ・標的タンパクの膜への結合確率 $P_{in}$ とシグナル流量 $J$ 及び全タンパク質の総密度の関係は図1のようになる。ここで、レセプターの密度は0.2であり、このとき、最も大きなシグナル流量を実現する。ただし、レセプターの密度を変化させても、 $[S_{tot}] \cdot P_{in} \cdot J$ 間の関係は定性的には変化しない。図から、 $J$ は $[S_{tot}] = 0.2 \cdot P_{in} = 0.02$ 付近で最大となり、そのときの全タンパク質の総密度は0.6付近であることが分かる。また、このとき以上に $[S_{tot}]$ や $P_{in}$ が増加すると、全タンパク質の総密度は増大し、シグナル流量は減少する。

<sup>2</sup>この値は、一格子(タンパク質)のサイズ( $\sim nm$ )と、希薄な場合のタンパク質の拡散係数が $\sim nm^2/\mu s$ であるため、系の単位時間ステップは $\sim \mu s$ となる。一方で、一般的な酵素反応の時間スケールは、(考えるタンパク質に依存するが) $\sim \mu s$ から $\sim s$ である。そのため、 $P_s = 0.1$ は $\sim 10\mu s$ の反応という点で、妥当であると思われる。

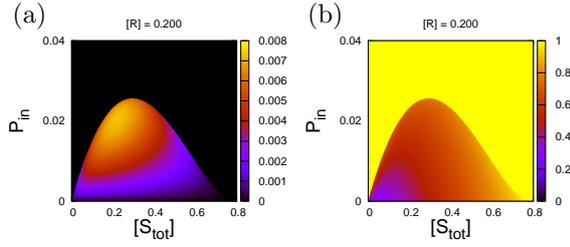


図1: 全タンパク質が空間に一様に分布していると仮定した場合、シグナルタンパクの密度  $[S_{tot}]$  (横軸)・標的タンパクの膜への結合確率  $P_{in}$  (縦軸) と (a)シグナル流量  $J$  (濃淡) と (b) 全タンパク質の総密度 (濃淡) の関係、レセプターの密度  $[R] = 0.2$ 。明るい色ほど、値が高い。

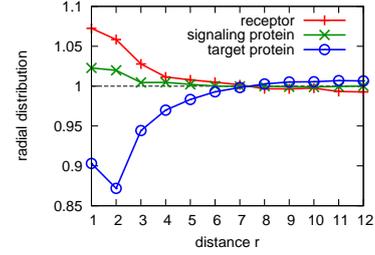


図3:  $[R] = 0.2, [S_{tot}] = 0.4, P_{in} = 1$  における、レセプター周りでの各タンパク質の動径分布. 赤+・緑×・青○はそれぞれ、レセプター・シグナルタンパク・標的タンパクのレセプター周りでの動径分布関数を表している。

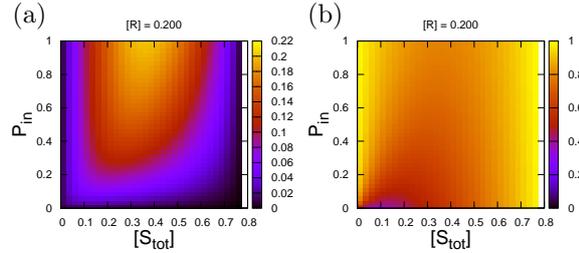


図2: 格子ガスモデルをシミュレーションした結果得られた、シグナルタンパクの密度  $[S_{tot}]$  (横軸)・標的タンパクの膜への結合確率  $P_{in}$  (縦軸) と (a)シグナル流量  $J$  (濃淡) と (b) 系内の全タンパク質の総密度 (濃淡) の関係、レセプターの密度  $[R] = 0.2$ 。明るい色ほど、値が高い。

すなわち、本研究でのモデルを平均場として捉えようと、ある密度のときに反応が最も起こりやすくなり、それ以上の密度では、これまでの先行研究で示唆されていたような Molecular Crowding による反応速度 (シグナル流量) の減少が起こる。

## 2. シミュレーション結果

次に、II章で導入した空間構造を取り入れたモデルについて、シグナル流量の密度依存性を議論する。図2は図1と同様に、シグナルタンパクの密度  $[S_{tot}]$ ・標的タンパクの膜への結合確率  $P_{in}$  とシグナル流量  $J$  の関係である。図から明らかに、図1で得られた推測とは異なり、標的タンパクの膜への結合確率  $P_{in} = 1$  で<sup>3</sup>シグナル流量は最大となり、そのときの全タンパク質の総密度もほぼ0.8となっている。また、シグナルタンパクの密度を固定し、標的タンパクの膜への結合確率を増加、すなわち、標的タンパクの密

<sup>3</sup>空いているサイトに標的タンパクが必ず結合するという意味であり、全タンパク質の総密度が1になるという意味ではない。そこで、各時間ステップの最後に、全ての空いているサイトに標的タンパク置き、全タンパク質の総密度を一時的に1とした場合でも、定性的には同じ結果が得られた。

度を増加させると、シグナル流量は単調に増加することが分かる。

これらの結果が、平均場近似による推測と異なることから、タンパク質は自発的に何らかの構造を形成していると推測出来る。そこで今回は、レセプターの周りにおける構造の解析を行うため、次に示す動径分布関数  $d_R(r), d_S(r), d_T(r)$  を用いた。

$$d_R(r) = \frac{\langle N_R(r) \rangle}{6r} \Big/ [R] \quad (8)$$

$$d_S(r) = \frac{\langle N_S(r) + N_{S^*}(r) \rangle}{6r} \Big/ [S_{tot}] \quad (9)$$

$$d_T(r) = \frac{\langle N_T(r) \rangle}{6r} \Big/ [T] \quad (10)$$

ここで、 $N_i(r)$  は、あるレセプターから距離  $r$  に存在するタンパク質  $i$  の個数であり、 $\langle \rangle$  は、全レセプターでの平均を意味する。シグナル流量が最も最大となるとき ( $[R] = 0.2, [S_{tot}] = 0.4, P_{in} = 1$ ) でのレセプター周りでの動径分布は図3となった。この図から、ある距離  $r_c \sim 7.3$  の前後で、レセプター周りでの構造が異なっていることが分かる。 $r < r_c$  では、レセプターの周りには、他のレセプターやシグナルタンパクが多く存在するものの、 $r > r_c$  では、標的タンパクが他のタンパクに比べて多く存在する。この結果を、極端ではあるが、模式的に表した図が、図4である。まず、この構造は、レセプター → シグナルタンパク → 標的タンパクの順にシグナルを伝達する上で効率的な構造であると考えられる。また、標的タンパクがレセプターやシグナルタンパクを囲っており、これらの必要以上の拡散を防ぐ、いわばケージ効果が働いていると推測される。

さらに、 $[R] = 0.2, [S_{tot}] = 0.4$  における、レセプターの最近傍サイトでの各タンパク質の動径分布関数の  $P_{in}$  依存性 (すなわち各  $P_{in}$  に対する  $d_R(1), d_S(1), d_T(1)$ ) を図5に示す。図から、 $P_{in}$  の増加、すなわち、標的タンパクの密度の増加に対して、レセプター周りの最近傍サイトでは、レセプター

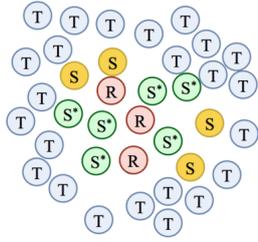


図 4:  $[R] = 0.2$ ,  $[S_{tot}] = 0.4$ ,  $P_{in} = 1$  における、レセプター周りでの各タンパク質の動径分布から推測される構造の模式図。

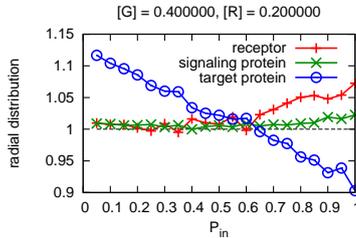


図 5:  $[R] = 0.2$ ,  $[S_{tot}] = 0.4$  における、レセプターの最近傍サイトの各タンパク質の動径分布関数の  $P_{in}$  依存性。赤+・緑×・青○はそれぞれ、レセプター最近傍サイトでのレセプター・シグナルタンパク・標的タンパクの動径分布関数の値を表している。

とシグナルタンパクの割合が多くなり、標的タンパクは逆に少なくなる傾向があることが分かる。このようなタンパク質の空間構造の形成過程は、次のように考えることが出来る。レセプターの近くでは、シグナルタンパクは活性化していることが多く、標的タンパクは、膜に結合してもすぐに反応して膜から解離する。一方、レセプターから離れたところでは、シグナルタンパクは活性を失い、標的タンパクを活性化することが困難となる。すると、タンパク質の分布の疎密が発生し、排除体積効果により、各タンパクはレセプターの近くに行きやすくなる。このことから、細胞膜上の分子の混雑が、シグナルの伝達に効率的な構造の形成に重要な役割を果たしていると考えられる。

#### IV. Conclusion and Discussion

細胞膜上のシグナル伝達系において、分子の混雑がシグナルの伝達に及ぼす影響について、レセプターからシグナルタンパクを介して標的タンパクへ伝達する、簡単なシグナル伝達系を格子ガスモデルを用いて考察した。本研究では、特に、シグナルタンパクの密度・レセプターの密度・標的タンパクの細胞膜への結合確率を変化させ、これらとシグナル流量の関係を調べた。その結果、標的タンパクが

必ず膜へ結合するような状況において、シグナル流量は最も大きくなることを見出した。また、レセプターの周りでのタンパク質の構造を動径分布関数を用いて調べたところ、タンパク質は混み合いを利用して自発的にシグナル伝達に効率的な構造を形成していることが見出された。

今回の結果は、これまでに議論されてきた Molecular Crowding, すなわち、密度の増加に対して反応速度は減少するという現象とは全く逆の結果となったが、本研究で明らかとなったタンパク質の自発的な空間構造の形成が、細胞内の非常に混み合った状況においてもシグナルの増幅を行っている可能性がある。実際に、生体膜上でレセプターなどの特定のタンパク質が集まり、クラスターや多量体を形成していることが観測されており [9], これらとの関連についても考察していきたい。

#### 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] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, "Molecular Biology of the Cell 5th edition.", Garland Science, New York (2010)
- [2] D.S. Goodsell, Trends in Biochemical Sciences **16**, 203-206 (1991).
- [3] A. P. Minton, Methods in Enzymology **295**, 127-149, (1998)
- [4] R. J. Elis, Current Opinion in Structural Biology **11**, 114-119 (2001)
- [5] M. D. Shtilerman, T. T. Ding, and P. T. Lansbury, Jr., Biochem. **41**, 3855-3860 (2002)
- [6] D. Kilburn, J. H. Roh, L. Guo, R. M. Briber, and S. A. Woodson, J. Am. Chem. Soc. **132**, 8690-8696 (2010)
- [7] G. Kwon, D. Axelrod, and R. R. Neubig, Cellular Signalling **6**, 663-679 (1994)
- [8] K. Suzuki, K. Ritchie, E. Kajikawa, T. Fujiwara, and A. Kusumi, Biophys. J. **88**, 3659-3680 (2005)
- [9] J. J. Sieber, K. I. Willig, C. Kutzner, C. Gerding-Reimers, B. Harke, G. Donnert, B. Rammner, C. Eggeling, S. W. Hell, H. Grubmüller, and T. Lang, Science **317**, 1072-1076 (2007).