

# マウス網膜細胞光シグナル伝達過程の 生体分子混み合いを考慮した数理モデル

高本 怜<sup>1</sup>, 西森 拓<sup>1,2</sup>, 栗津 暁紀<sup>1,2</sup>

広島大学大学院 理学研究科 数理分子生命理学専攻<sup>1</sup>, 広島大学 ReMcD<sup>2</sup>

## 概要

マウス網膜細胞の光シグナル伝達は、桿体細胞の外節内円板膜周辺における分子間の生化学反応の連鎖によって実現される。近年円盤膜上でのシグナル分子の拡散が、ロドプシンによる膜上の生体分子混み合いに阻害されている可能性が、実験から示唆されている。今回我々は数理モデルによって、実験で観測された I) 野生型マウス網膜細胞の光活性化及び緩和が、円板膜上のロドプシン数が野生型の半分の変異型の網膜細胞より遅くなること、II) 強い光刺激を受けた細胞の光活性が、弱い刺激を受けた細胞より大幅に長い時間活性を維持すること、を再現し考察した。

## Rate equation models of phototransduction processes influenced by molecular crowding into membranous disks of mouse rod cell

Rei Takamoto<sup>1</sup>, Hiraku Nishimori<sup>1,2</sup>, Akinori Awazu<sup>1,2</sup>

Department of Mathematical and Life Sciences, Hiroshima University<sup>1</sup>

Research Center for the Mathematics on Chromatin Live Dynamics, Hiroshima University<sup>2</sup>

## Abstract

Mouse rod phototransduction process was investigated through the rate equation models of biochemical reactions of several molecules that contribute to the signaling process into the membranous disks in outer segments of rod cell. By considering the molecular crowding effects of rhodopsin as expected by experiments that may hinder the diffusion and reactions of molecules on disk membrane, our models can reproduce the following phenomena observed in experiments; I) The activations and relaxation of this signaling pathway of WT mouse rod cell are slower than those of mutant cell involving a half of rhodopsin on membrane. II) Relaxation of the photo-activation of the cell exhibits drastic slowing down for strong light-stimuli.

## 1 研究の背景

細胞の活動は様々な生体高分子に支えられている。近年これらの高分子は、細胞内の非常に混雑した状況で機能していると考えられている。例えばある実験では、典型的な *in vitro* 実験における分子の濃度が 1-10mg/mL であるのに対し、細胞内での高分子の濃度は 50-400mg/mL 程度と見積もられている [1]。この状況は、細胞内の分子の拡散が自身の排除

体積により強く抑制される可能性を示唆する。またこの細胞内の混雑が、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼのリン酸化 [2] や、タンパク質のフォールディング [3] を促進する可能性も報告され、更に混み合った細胞膜上のシグナルタンパク質が、シグナル伝達を通じてその伝達に効率的なタンパク質分布を自発的に形成する可能性も示唆されている [4]。

近年、マウス網膜上にある桿体細胞の光応答に関するシグナル伝達について、以下の事実が報告され

ている [5]。桿体細胞では、円盤膜上に約  $10^9$  個のロドプシンが配置されており、その円盤膜に対する面占有率は約 27% に達する。これほど密な配置は光子の補足を確実にする一方、シグナル伝達を担う他の分子の膜上拡散を制限し、逆にシグナル伝達を阻害してしまう可能性も考えられる。そこで、2つあるロドプシン遺伝子の一方を破壊し、円盤膜上のロドプシン数を野生型の約半分 (面占有率は約 13.5%) に下げた変異型マウス桿体細胞を作成し、光に対する応答と回復を計測すると、野生型と比べ約 1.7 倍速い変化が見出された [5]。この事は、光受容タンパクであるロドプシンの円盤膜上での混み合いが、桿体細胞内シグナル伝達の障害になっている可能性がある。

そこで本研究では、桿体細胞内の光シグナル伝達に関わる物質の反応過程を、反応速度式によってモデル化し、ロドプシン占有率とシグナル伝達速度の関係を考察する。

## 2 光シグナル伝達のモデル化

### 2.1 シグナル伝達過程の概要

図 1(a) は桿体細胞内の光シグナル伝達に関わる分子の反応ネットワークである。マウスは外界からの光に反応するために、網膜上に多数の桿体細胞を保持している。桿体細胞は図 1(b) のように外節、内節、核、シナプスから構成されており、光受容体のロドプシンは外節内の円盤膜上に多数存在している。このロドプシンは膜貫通型の光受容体であり、G タンパク共役型受容体 (GPCR) の一種である。マウスのような哺乳類の光シグナル伝達は、以下のように進行する。まずロドプシン ( $R$ ) が、細胞外からの光子により活性化される。この活性化型  $R$  ( $R^*$ ) に円盤膜上の GTP 結合型 G タンパク質トランスデュシン ( $G$ ) が結合すると、 $G$  の  $\alpha$  サブユニットに結合している GDP を GTP と交換することで活性化型  $G$  ( $G^*$ ) となる。次いで  $G^*$  は膜上を拡散し、円盤膜上に存在する cyclic GMP ホスホジエステラーゼ ( $PDE$ ) と複合体  $2G^* \cdot PDE$  を形成する。また、G タンパク質調節因子である  $RGS9$  は、 $2G^* \cdot PDE$  に結合し複合体  $2G^* \cdot PDE \cdot RGS9$  を形成する。そして  $G$  の  $\alpha$  サブユニットに結合している GTP の加水分解を促進し、一定確率で  $G^*$  を不活性化し  $2G^* \cdot PDE \cdot RGS9$  を分解する。

また細胞質中では、グアニル酸シクラーゼを触

媒としセカンドメッセンジャーである cyclic GMP ( $cGMP$ ) が合成される。さらに、 $cGMP$  は閉じている  $Ca^{2+}$  Channel ( $Ch_c$ ) に作用することで、Channel を開く ( $Ch_o$ )。また  $cGMP$  は  $2G^* \cdot PDE$  に触媒され加水分解する。 $Ca^{2+}$  は  $Ch_o$  を通じて外節内に流入し、イオンポンプを通じて細胞外に流出する。外節中の  $Ca^{2+}$  の濃度が下がると、桿体細胞は過分極状態になり、下流の神経細胞を活性化する。また、 $Ca^{2+}$  は細胞質中のリカバリン ( $Rec_c$ ) と複合体  $2Ca^{2+} \cdot Rec_c$  を形成する。また、 $2Ca^{2+} \cdot Rec_c$  は円盤膜上に結合 ( $2Ca^{2+} \cdot Rec_m$ ) する。ロドプシンキナーゼ ( $RK$ ) は  $R^*$  とリン酸化反応することで  $R^*$  の不活性化を促進し、光シグナル伝達を緩和する。また  $2Ca^{2+} \cdot Rec_m$  は  $RK$  と複合体  $2Ca^{2+} \cdot Rec_m \cdot RK$  を形成することで、 $RK$  による光シグナル伝達の緩和を阻害する。最終的に、 $2Ca^{2+} \cdot Rec_m \cdot RK$  が分解されることで  $Ca^{2+}$  と  $Rec_m$  は細胞質中に解離し、 $RK$  は再び  $R^*$  を不活性化する。

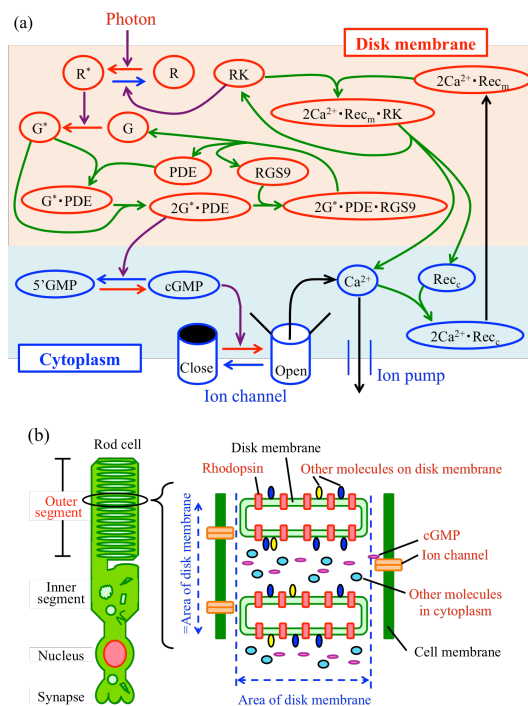


図 1: (a):本研究における光シグナル伝達過程のネットワーク、(b):桿体細胞のイラスト

### 2.2 モデル方程式

上記の反応ネットワークを反応速度式を用いて定式化すると、以下ようになる。ここで各物質  $i$  に対して物質量を  $X_i$  とする。

$$\begin{aligned}
\dot{X}_{R^*} &= -k_{mem}X_{R^*}X_{RK} \\
\dot{X}_{G^*} &= k_{mem}X_{R^*}X_G - k_{mem}X_{G^*}X_{PDE} \\
&\quad - k_{mem}X_{G^*}X_{G^* \cdot PDE} + k_dX_{G^* \cdot PDE} \\
\dot{X}_{G^* \cdot PDE} &= k_{mem}X_{G^*}X_{PDE} \\
&\quad - k_{mem}X_{G^*}X_{G^* \cdot PDE} - k_dX_{G^* \cdot PDE} \\
\dot{X}_{2G^* \cdot PDE} &= k_{mem}X_{G^*}X_{G^* \cdot PDE} \\
&\quad - k_{mem}X_{2G^* \cdot PDE}X_{RGS9} \\
\dot{X}_{2G^* \cdot PDE \cdot RGS9} &= k_{mem}X_{2G^* \cdot PDE}X_{RGS9} \\
&\quad - k_dX_{2G^* \cdot PDE \cdot RGS9} \\
\dot{X}_G &= 2k_dX_{2G^* \cdot PDE \cdot RGS9} - k_{mem}X_{R^*}X_G \\
\dot{X}_{PDE} &= k_dX_{2G^* \cdot PDE \cdot RGS9} \\
&\quad - k_{mem}X_{G^*}X_{PDE} + k_dX_{G^* \cdot PDE} \\
\dot{X}_{RGS9} &= k_dX_{2G^* \cdot PDE \cdot RGS9} \\
&\quad - k_{mem}X_{2G^* \cdot PDE}X_{RGS9} \\
\dot{X}_{cGMP} &= k_{cG} - k_{cG}X_{cGMP} \\
&\quad - k_{cyt}X_{cGMP}X_{2G^* \cdot PDE} \\
\dot{X}_{Ch_o} &= k_{cyt}X_{cGMP}^2X_{Ch_c} - k_cX_{Ch_o} \\
\dot{X}_{Ca^{2+}} &= k_{ion}X_{Ch_o} - k_{ion}X_{Ca^{2+}} \\
&\quad - k_{cyt}X_{Ca^{2+}}X_{Rec_c} - k_{cyt}X_{Ca^{2+}}X_{Ca^{2+} \cdot Rec_c} \\
&\quad + 2k_dX_{2Ca^{2+} \cdot Rec_m} \cdot RK \\
\dot{X}_{Ca^{2+} \cdot Rec_c} &= k_{cyt}X_{Ca^{2+}}X_{Rec_c} \\
&\quad - k_{cyt}X_{Ca^{2+}}X_{Ca^{2+} \cdot Rec_c} \\
\dot{X}_{2Ca^{2+} \cdot Rec_c} &= k_{cyt}X_{Ca^{2+}}X_{Ca^{2+} \cdot Rec_c} \\
&\quad - k_{mem}X_{2Ca^{2+} \cdot Rec_c} \\
\dot{X}_{2Ca^{2+} \cdot Rec_m} &= k_{mem}X_{2Ca^{2+} \cdot Rec_c} \\
&\quad - k_{mem}X_{2Ca^{2+} \cdot Rec_m}X_{RK} \\
\dot{X}_{Rec_c} &= k_dX_{2Ca^{2+} \cdot Rec_m} \cdot RK - k_{cyt}X_{Ca^{2+}}X_{Rec_c} \\
\dot{X}_{RK} &= k_dX_{2Ca^{2+} \cdot Rec_m} \cdot RK \\
&\quad - k_{mem}X_{2Ca^{2+} \cdot Rec_m}X_{RK} \\
\dot{X}_{2Ca^{2+} \cdot Rec_m} \cdot RK &= k_{mem}X_{2Ca^{2+} \cdot Rec_m}X_{RK} \\
&\quad - k_dX_{2Ca^{2+} \cdot Rec_m} \cdot RK
\end{aligned}$$

ここで円盤膜上に存在する  $R$ ,  $R^*$ ,  $G$ ,  $G^*$ ,  $PDE$ ,  $RGS9$ ,  $RK$ ,  $Rec_m$  を合わせた総物質量を  $\rho$  とすると、円盤膜の面積は有限であるため、 $\rho$  には何らかの制約が必要になる。今回は  $\rho \leq 1$  であるとした。

本モデルでは多くの化学反応を含んでいるが、これら全てについて反応係数が知られているわけではない。そこで今回はモデルの単純化のため、分子の自発分解反応、細胞質中での2体反応、円盤膜上で

の2体反応の係数を、それぞれ分子種に依らない一定値、 $k_d$ ,  $k_{cyt}$ ,  $k_{mem}$  とした。また  $k_{cG}$ ,  $k_c$ ,  $k_{ion}$  はそれぞれ  $cGMP$  生成率、 $Ca^{2+}$  Channel の自発閉鎖頻度、及び  $Ca^{2+}$  の流速を表すとした。

### 2.3 反応係数に対する仮定

先に述べた反応係数については、細胞内で自然に考えられる以下の仮定をおいた。A1) 一般的に脂質膜に結合した分子の拡散は、細胞質の分子よりも遅い。したがって、膜上における反応係数  $k_{mem}$  は、細胞質中の反応係数  $k_{cyt}$  に比べて十分に小さいと仮定する。ここで、 $cGMP$  と  $2G^* \cdot PDE$  や  $Ch_c$  との反応は、細胞質中での反応とみなす。A2) 円盤膜上では、膜上の総物質量  $\rho$  ( $0 \leq \rho \leq 1$ ) の増加に伴い、反応する分子同士の衝突がその反応に関わらない他の分子の排除体積により阻害されるため、膜上での2体反応の実効的な反応係数は  $\rho$  に従い減少すると考えられる。そこで今回、膜上での2体反応係数は  $k_{mem} = k'_{mem}(1 - \rho)$  となると仮定する。A3)  $Ca^{2+}$  の細胞質中における拡散は、非常に速いと考ええる。よって  $k_{ion}$  は大きい値をとり、また  $Ca^{2+}$  の  $Ch_o$  からの流入とイオンポンプからの流出速度は等しいとする。A4)  $cGMP$  の  $Ch_o$  への作用がない場合は、 $Ch_o$  は直ちに  $Ch_c$  になるとし、 $k_c$  は大きい値をとる。A5) 分子や複合体の自発的な分解反応は、触媒反応よりも遅いと考えられるので、 $k_d$  は小さい値をとる。A6)  $cGMP$  の新規合成も遅いと考え、 $k_{cG}$  は小さい値をとる。次節のシミュレーションでは  $k_{cyt} = k_{ion} = k_c = 1.6 \times 10^5$ ,  $k'_{mem} = 8.0 \times 10^4$ ,  $k_d = k_{cG} = 4.0 \times 10^2$  とした。

### 2.4 野生型と変異型のモデル

本研究では野生型及び変異型のマウス桿体細胞内における光シグナル伝達過程を考察する。本モデルでは野生型、及び変異型の違いを、円盤膜上のロドプシン  $R$  と  $R^*$  の総物質量  $X_R^t$  の違いで表現する。具体的には実験 [5] に基づき、野生型及び変異型における円盤膜上に存在する  $R$  の物質量をそれぞれ、 $X_R^t = 0.27$  (野生型),  $X_R^t = 0.135$  (変異型) と与えた。また、ロドプシン以外の分子の遺伝子発現量は、野生型と変異型でほとんど変化がないことがわかっている。また一般的に細胞内の体積分率は  $0.2 \sim 0.4$  と報告されている。そこで、今回我々は野生型及び変異型どちらにおいても、円盤膜上の  $G$  及び  $G^*$  の総量  $X_G^t = 0.01$ ,  $PDE$  の総量  $X_{PDE}^t = 0.1$ ,  $RGS9$  の総量  $X_{RGS9}^t = 0.0005$ ,  $RK$  の総量  $X_{RK}^t = 0.0005$

であると仮定した。また、細胞質中のリカバリンの総量を  $X_{Rec}^t = 0.05$ 、細胞膜上の  $Ca^{2+}$  Channel の総量を  $X_{Ch}^t = 0.05$  と仮定した。

## 2.5 実験状況のシミュレーションと計測量

実験 [5] ではロドプシンが完全に不活性な状態からの光シグナル伝達を計測するために、マウス桿体細胞に光を照射する前に、24 時間以上暗室にマウスを隔離する。そこで本研究でもこの状況を再現するため、まず任意の初期条件から  $X_{R^*} = 0$  となるまで緩和させ、その時間を  $t = 0$  とする。そして、 $t = 0$  のとき  $X_{R^*} : 0 \rightarrow X_{R^*}(0)$  とすることで光を照射後の実験状況を再現したシミュレーションを行う。ここで光強度  $L$  と初期活性量  $X_{R^*}(0)$  に正の相関があると考えて、 $L = X_{R^*}(0)/X_R^t$  とする。

また実験 [5] では、桿体細胞の光活性化を  $Ca^{2+}$  流入量  $\phi$  を用いて  $r = 1 - \phi/\phi^{dark}$  とし、 $r$  の時間変化を計測している。ここで  $\phi^{dark}$  は暗室状態での  $Ca^{2+}$  の流入量である。今回のモデルでは  $\phi$  は  $X_{Ch_o}(t)$  に比例するので、活性度を  $r(t) = 1 - X_{Ch_o}(t)/X_{Ch_o}(0)$  として、 $r(t)$  の時間変化に着目する。

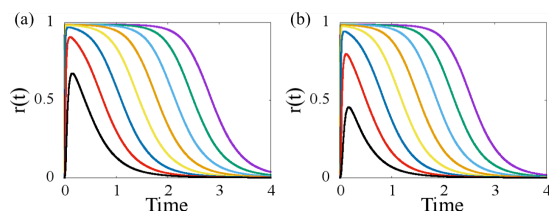


図 2: シミュレーション結果。(a):野生型、(b):変異型モデルにおける、 $r(t)$  の時間変化。各曲線の色は光強度  $L$  の違いを表し、紫、緑、水色の順で、光が強いている。(  $L = 0.75^{31 \sim 1}$  )

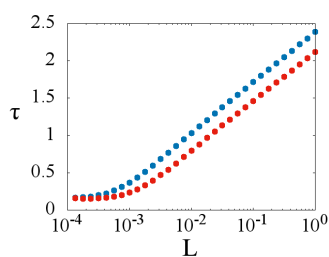


図 3: 緩和時間 ( $\tau$ ) の  $L$  依存性。 $\tau$  は  $r(t)$  が最大値をとってから 20% 減少するまでの時間を表す。青が野生型、赤が変異型の結果である。

## 3 シミュレーション結果

図 2 は (a) 野生型、(b) 変異型モデルのシミュレーションで得られた、 $r(t)$  の時間変化である。

まず図 2 から、光強度  $L$  の増加に伴い  $r(t)$  に長いプラトーが現れ、その結果  $r(t)$  の緩和が遅くなる事が分かる。また同じ  $L$  に対し、変異型の方が野生型より  $r(t)$  の緩和が速くなる事も分かる (図 3)。また紙面の都合上詳しくは触れないが、変異型の方が野生型より  $r(t)$  の増加も速くなる結果も得られている。これらの結果は実験 [5] で得られた結果 (図 4) の特徴を定性的に再現している。

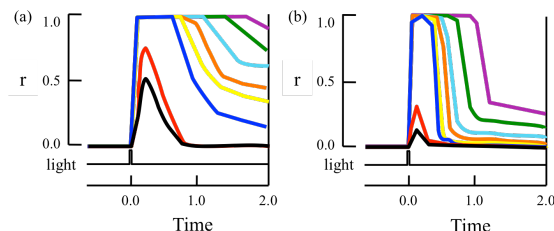


図 4: 桿体細胞における光応答の速さの実験 ([5] を参照) から得られた、 $r$  の時間変化。

## 4 まとめ

本研究では、マウス桿体細胞内の光シグナル伝達過程に対して反応速度式によるモデルを構築し、円盤膜上におけるロドプシンの混雑がシグナル伝達に及ぼす影響を考察した。そして、ロドプシンの膜占有率の高い野生型マウスの方が、膜占有率の低い変異型マウスと比べ、シグナル伝達速度が遅くなるという、実験結果を定性的に再現した。

## 謝辞

本研究は文部科学省生命動態システム科学推進事業「核内クロマチン・ライブダイナミクスの数理研究拠点」の助成を受けたものです。

## 参考文献

- [1] A.B.Fulton, Cell **30** (1982) 345-347
- [2] K.Aoki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **108(31)** (2011) 12675-12680
- [3] A.Kinjo et al., Phys. Rev. E **66** (2002) 051902
- [4] M.Fuji, H.Nishimori, and A.Awazu, PLOS ONE **8** (2013) e62218
- [5] P.D.Calvert, et al., Nature **411** (2001) 90-94