

## 大腸菌化学走性モデルの比較解析

松崎由理, 富田勝

慶應義塾大学先端生命科学研究所

大腸菌の化学走性系は、環境の変化に対して応答するシンプルなシグナル伝達経路である。この系の特徴として、信号を大きく増幅することと、刺激への順応がかなり正確に行われていること（完全順応）があげられる。私達は、信号増幅を説明する仮説のうち最も広く受けられている、異なる種類の物質を感知する受容体間の相互作用の影響を調べるため、既存のモデルを組み合わせた動的モデルを構築してシミュレーションを行った。この結果、受容体活性の協調調節機構と信号のクロストークの両方が幅広い規模の信号の増幅に寄与している一方、それぞれの仕組みが不安定な定常状態を生む可能性があることや、致命的ではないものの順応エラーを増大させることがわかった。

## Comparative study of bacterial chemotaxis models

Yuri Matsuzaki, Masaru Tomita

Institute for Advanced Biosciences, Keio University

Chemotaxis system of *E. coli* consists of simple signal transduction network that can amplify small change of attractants and subsequently adapt precisely recovering prestimulus condition. It is known that the structure of the chemotaxis signaling pathway itself confirms cells to adapt perfectly, though what causes the signal gain is yet unknown. One possible mechanism for high gain is receptor crosstalk, which include coupling effects of receptor activity and crosstalk of signaling molecules among different chemoreceptors. In this study, we combined a model that can adapt perfectly with a preproposed model of receptor crosstalk to see how receptor coupling and signal crosstalk affect overall behavior of the system. We show that models that include receptor interactions can achieve high gain but may cause instability of steady-state or increase adaptation error.

### 1 はじめに

大腸菌の化学走性は、菌体が特定の化学物質を感知して運動を制御し、より好ましい環境に移動する現象である。菌体の運動を司るべん毛モーターは、特定の化学物質を感知する受容体と相互作用する Che タンパク質群で構成されるシグナル伝達経路により制御されている（図 1）。刺激物質を感知する受容体は Methyl-accepting chemotaxis protein (MCP) とよばれ、大腸菌には、Tar, Tsr, Tap, Trg, Aer の 5 種類存在する。これらは遺伝子情報から、同じ Che タンパク質群と相互作用するとみられている [6]。

Tar により感知される誘引物質アスパラギン酸による刺激については、定常状態における菌体の方向転換頻度が、刺激物質にさらされていない菌体と刺激に順応した菌体との間の比が野生種で  $0.98 \pm 0.05$  (SD) であるといわれている [3]。刺激未投入時と刺激順応時では受容体の修飾状態が異なるにもかかわらず、システムの出力としての運動制御は正確に刺激未投入時のレベルと同じ状態に復するのである。この現象は完全順応と呼ばれており、大腸菌化学走性の重要な特徴の一つである。また、このような順応の正確さが幅広い刺激幅にわたって維持される現象は「robust」な完全順応と呼ばれている。

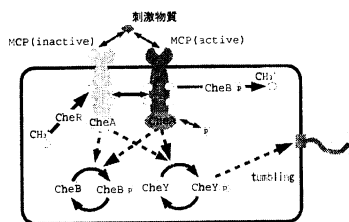


図 1: 大腸菌の化学走性におけるシグナル伝達経路。CheA のリン酸化により、鞭毛モーターと相互作用して菌体の方向転換をうながす CheY, 受容体 (MCP) を脱メチル化する CheB にリン酸基が受け渡される。MCP の修飾状態が CheA のリン酸化速度をコントロールする。受容体に環境中の誘引物質が結合すると、CheA のリン酸化が抑制される。また、CheB はリン酸化した状態で高い脱メチル化活性をもつため、CheA のリン酸化活性が低下すると同時に CheB の脱メチル化活性が下がり、MCP のメチル化が進む。メチル化された MCP は誘引物質存在下でも CheA のリン酸化を進めるように作用する。

1986 年の実験で、刺激を受けた菌体の挙動は刺激量の変化を増幅していることがわかっている [10]。信号増幅は、刺激物質濃度の変化率に対する信号応答の変化の割合として定義される。この増幅は CheYp とべん毛モーターの相互作用によりおこっている可能性も考えられていたが、2000 年には、CheYp の量そのものが刺激の変化を増幅した値になることと、メチル化や脱メチル化の仕組みを欠いた菌体では信号増幅がおこらないことが示されている [12]。このことにより、この系の信号増幅はべん毛モーター付近ではなく受容体部分で起こっているという考え方が現在では広く受け入れられている。

大腸菌の化学走性系については、アスパラギン酸受容体である Tar によるシグナル伝達を中心に古くから研究され実験データが蓄積されている [5]。一方、この系は多重の相互作用やフィードバックを含む構造になっているため、個々の分子どうしの相互作用が理解されても、それによって信号の増幅や順応の正確さといったシステムの機能を端的に説明することは難しい。こうした背景から、化学走性の示す性質を説明する目的で、モデル構築とシミュレーションが利用されている。

その成果のひとつに、Barkai らのモデル [2] により、このシグナル伝達系がとっているフィードバック制御の構造こそが大腸菌の化学走性が示す完全順応という特徴を実現するために必要な機構であることが示されたことがある。Barkai と Leibler [2]、および Morton-Firth ら [9] は、Che タンパク質の量的変化にかかわらず完全順応が達成されるメカニズム (「robust」な完全順応のための機構) として、受容体が活性状態と不活性状態の間を遷移する two-state モデル [1] を前提とした上で、受容体がメチル化・脱メチル化される反応の速度が、受容体と複合体を形成する CheA のリン酸化活性に依存しているという仮定を提示した。

大腸菌の化学走性のもう 1 つの特徴である信号増幅を説明するための仮説には、5 種類の MCP が相互作用し、活性の調節が協調して行われる機構が必要だとするものがある。いくつかのモデルで、この仮説を組み込むことで信号増幅が再現されるということが示された [4][11][8]。また、Shimizu らは、異なる受容体との活性調節の協調を組み込むことにより刺激に対するインパルス応答が実験データと一致することを報告している [11]。

一方、受容体間の相互作用を仮説としてモデルに組み込むと、完全順応についての先の議論の前提条件がくずれる。完全順応の定式化では、受容体の活性状態が受容体のメチル化状態と刺激物質の結合状態にのみ依存することが想定されているからである。私達は、受容体活性の協調調節がインパルス応答だけではなく、ある程度の持続した時間刺激にさらされた場合 (ステップ刺激) における順応の仕方にも影響を与える可能性があると考え、その影響を調べることを研究の目的とした。

## 2 対象と方法

まず、ベースとなるモデルを、「robust」な完全順応のための仮定を含む Morton-Firth らのモデルをもとに以下のような構成で実装した。シミュレーションには汎用の細胞シミュレーション環境 E-Cell System [13] を用いた。MCP (受容体) のうち Tar と Tsr の 2 種類をモデルに含めた。CheA と CheW は MCP と複合体の形で存在するものとした。受容体のメチル化部位の数は 4 つで、メチル化状態はメチル化された部位の数によって 0 から 4 までの 5 種類とした。各受容体や Che タンパク質のリン酸化、メチル化といった修飾状態はそれぞれを別のシミュレーション対象オブジェクトとして区別した。時系列の量的変化を計算する

対象となるオブジェクトのうち実際に存在する分子の状態に対応するものの数は 164 である。この他には、各受容体の修飾状態ごとの活性やリガンドによる占有率を表す値を計算対象とし、30 種類定義した。さらに、受容体の修飾状態を把握するためにメチル化された部位の数やリガンドの結合状態などにより各修飾状態にある受容体の数を集計する値を 23 種類定義した。

各タンパク質の行う反応は各修飾状態ごとに微分式として定義した。総計は 630 である。タイムスケールの短い反応である受容体の活性変化とリガンドの結合状態の変化は迅速平衡を仮定し、活性状態にある受容体の割合とリガンドによる受容体の占有率を代数的に計算する過程を 16 記述した。また、メチル化状態ごとの総計や受容体の平均の活性など、指標となる値について各積分ステップごとに集計する過程を 31 記述した。

上記のモデルをベースに、受容体活性の協調調節機構を組み込んだモデルと組み込まないモデルを作成してシミュレーションを行い、その挙動を比較した。また、今回対象とするアスパラギン酸受容体以外に、他の物質を感知する受容体も Che タンパク質と相互作用する信号のクロストーク機構についても、単一の刺激を与えたときの役割があるのかを調べるために、モデルの要素として取り入れたものと取り入れていないものを比較した。作成したモデルは以下の 4 種類である。

1. 受容体活性の協調調節機構と信号のクロストークを両方組み込んだモデル (c1t1 モデル)
2. 受容体活性の協調調節機構はあるが信号のクロストークは起きないモデル (c1t0 モデル)
3. 受容体活性の協調調節は起きないが信号のクロストークが起きるモデル (c0t1 モデル)
4. 受容体活性の協調調節も信号のクロストークも起こさないモデル (c0c0 モデル)

受容体活性の協調調節機構は、mean-field theory に基づいて Mello らにより提案された式 [8] (Eq.1,Eq.2) を用いて実装した。c1t0 モデル、c1t1 モデルは受容体活性の協調調節を含むモデルとするために Mello らの式を用いて受容体の活性を動的に計算した。c0t0 モデル、c1t1 モデルは受容体の協調を含まないモデルとするため、Mello らの式のうち他の受容体の状態を反映する項を取り除いた式を用いて受容体の活性状態を計算した。この場合、活性状態の受容体の割合はメチル基とリガンドによる受容体の修飾状態ごとに一定になる。

また、c0t1 モデルと c1t1 モデルは信号のクロストークを起こすモデルとして、Tsr はアスパラギン酸は感知しないものの Tar と同様に自己リン酸化、CheR や CheBp によるメチル化と脱メチル化を受けつけ、CheY へのリン酸基の授受を行うものとした。c0t0 モデルと c1t0 モデルはクロストークを起こさないモデルとし、Tsr 複合体についてのみ CheB、CheR、CheY との相互作用を取り除き、実際の細胞内で最も多い状態といわれる 2 箇所メチル化された状態に固定した。

これら 4 種のモデルについてシミュレーションを行い、ステップ刺激への応答とインパルス応答、また、モデルの各パラメータ（タンパク質の量と反応速度定数）の変動による影響を調べた。

### 3 結果と議論

ステップ刺激への応答では、刺激投入前の定常状態における CheYp レベルがモデルによって大きく 2 パターンにわかれ、信号のクロストークを含むモデル (c1t1, c0t1) は含まないモデル (c1t0, c0t0) における値の 1.7 倍の値を示した。刺激に応答して減少した CheYp の量は c1t1 モデルが最も多く、c1t0 モデルが最も少なかった。クロストークを含む 2 つのモデルでは、受容体活性の協調調節も含む c1t1 モデルの方が c0t1 モデルよりも応答幅が大きかった。一方、クロストークを含まないモデルの場合は c1t0 モデルよりも受容体活性の協調調節を含まない c0t0 モデルの方がむしろ大きな応答幅を示した。また、受容体活性の協調調節を含むモデルは含まないモデルに比べて順応にかかる時間が短くなっていた。

一方、野生種の大腸菌では2%程度といわれる順応エラーについては、信号のクロストークのあるモデルとないモデルの間で顕著な差が見られた。c0t1とc1t1では、刺激投入前の誘引物質量を0Mとして10 $\mu$ M以上の刺激を与えると順応エラーが2%を大きく上回った。

インパルス応答については、信号のクロストークを導入しないモデルではパルス刺激に対する応答そのものがほとんどみられなかった。また、受容体の活性についての協調機構の有無にかかわらず、信号のクロストークを組み込んだモデルではovershootが観察された。このことから、インパルス応答は信号のクロストークによる影響でおきている現象であると考えられる。

また、受容体活性の協調調節機構を含むモデルでのみ、タンパク質の量を変化させた時に振動現象が観察された。このような振動現象は実験的には報告されていないが、Melloらは受容体活性の協調調節を含むモデルを解析的に調べると、受容体活性の協調調節の度合いを高くした場合に系の振動がおり得るとしている[7]。受容体の量を増やした場合には、受容体活性の協調調節の度合いを高めるのと同じ効果がある。今回の実験では、TarとCheタンパク質群を同時に増加させた場合とTarのみを増加させた場合に振動が観察され、Tsrのみを減少させた時にも不安定な定常状態が確認された。また、TarとTsrの2種類を共に増加させた場合や受容体と全てのCheタンパク質群を同様に増加させた場合には、特に不安定な定常状態は見られていない。このため、今回用いたモデルについては、TarとTsrの数のバランスが崩れた場合に定常状態が不安定になっている可能性があると考えられる。

今回のシミュレーション実験で、受容体活性の協調調節機構と信号のクロストークの両方が信号増幅に寄与している一方、この2つの仕組みが不安定な定常状態を生む可能性があることや順応エラーを増大させることがわかった。受容体間の相互作用についての仮説が正しいとすれば、偶然に化学走性系のパラメータが狭い範囲に調節されているのか、振動現象や順応エラーの増大を避ける仕組みが存在するのかという疑問が生まれる。この問題についての考察が今後の課題である。

## 参考文献

- [1] Asakura, S. and Honda, H.: Two-state model for bacterial chemoreceptor proteins. The role of multiple methylation, *J Mol Biol*, Vol. 176, No. 3, pp. 349-367 (1984).
- [2] Barkai, N. and Leibler, S.: Robustness in simple biochemical networks, *Nature*, Vol. 387, No. 6636, pp. 913-917 (1997).
- [3] Berg, H. C. and Tedesco, P. M.: Transient response to chemotactic stimuli in *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 72, No. 8, pp. 3235-3239 (1975).
- [4] Bray, D., Levin, M. D. and Morton-Firth, C. J.: Receptor clustering as a cellular mechanism to control sensitivity, *Nature*, Vol. 393, No. 6680, pp. 85-88 (1998).
- [5] Falke, J. J., Bass, R. B., Butler, S. L., Chervitz, S. A. and Danielson, M. A.: The two-component signaling pathway of bacterial chemotaxis: a molecular view of signal transduction by receptors, kinases, and adaptation enzymes, *Annu Rev Cell Dev Biol*, Vol. 13, pp. 457-512 (1997).
- [6] Liu, J. D. and Parkinson, J. S.: Genetic evidence for interaction between the CheW and Tsr proteins during chemoreceptor signaling by *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, Vol. 173, No. 16, pp. 4941-4951 (1991).
- [7] Mello, B. A., Shaw, L. and Tu, Y.: Effects of receptor interaction in bacterial chemotaxis, *Biophys J*, Vol. 87, No. 3, pp. 1578-1595 (2004).
- [8] Mello, B. A. and Tu, Y.: Quantitative modeling of sensitivity in bacterial chemotaxis: the role of coupling among different chemoreceptor species, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 100, No. 14, pp. 8223-8228 (2003).
- [9] Morton-Firth, C. J. and Bray, D.: Predicting temporal fluctuations in an intracellular signalling pathway, *J Theor Biol*, Vol. 192, No. 1, pp. 117-128 (1998).
- [10] Segall, J. E., Block, S. M. and Berg, H. C.: Temporal comparisons in bacterial chemotaxis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 83, No. 23, pp. 8987-8991 (1986).
- [11] Shimizu, T. S., Aksenov, S. V. and Bray, D.: A spatially extended stochastic model of the bacterial chemotaxis signalling pathway, *J Mol Biol*, Vol. 329, No. 2, pp. 291-309 (2003).
- [12] Sourjik, V. and Berg, H. C.: Receptor sensitivity in bacterial chemotaxis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 99, No. 1, pp. 123-127 (2002).
- [13] Takahashi, K., Kaizu, K., Hu, B. and Tomita, M.: A multi-algorithm, multi-timescale method for cell simulation, *Bioinformatics*, Vol. 20, No. 4, pp. 538-546 (2004). Evaluation Studies.