

## 生体分子間相互作用と局在に関する空間シミュレーションモデル

我妻 竜三<sup>†</sup> 小林 弘<sup>††</sup> 山本 知幸<sup>†††</sup>  
北川 哲次<sup>††††</sup> 小長谷 明彦<sup>†,††††</sup>

分子イメージング技術の進歩によって細胞内における時空間の分子運動を視覚化することができるようになった。しかしながら、観察された分子レベルの運動がどのようなメカニズムの帰結として生じているのかについての説明はこれまでのところ推測の域を出ていないようである。我々は細胞における分子運動、相互作用、局在、などの理論解析を目的とした用途のための、三次元空間内における粒子の反応拡散シミュレーションアルゴリズムを提案する。細胞表面における分子間相互作用のシミュレーションを行うことにより、クラスタリングドメイン (約 0.2 $\mu$ m) の生成を見出した。このドメインを構成する分子の軌跡は「ホップ拡散」を再現する。これらの結果は、局在を理論的に解析するために、我々のアプローチが有望であることを示している。

### Simulation model for interactions and localization of biological molecules

Ryuzo Azuma,<sup>†</sup> Hiroshi Kobayashi,<sup>††</sup> Tomoyuki Yamamoto<sup>†††</sup>  
Tetsuji Kitagawa,<sup>††††</sup> and Akihiko Konagaya<sup>†</sup>

Spatio-temporal dynamics within cells can now be visualized at appropriate resolution, due to the advances in molecular imaging technologies. However, little is known concerning how molecular-level dynamics affect properties at the cellular level. We propose an algorithm designed for three-dimensional simulation of the reaction-diffusion dynamics of molecules, based on a particle model. Snapshot images taken from simulated molecular interactions on the cell-surface revealed clustering domains (size  $\sim$ 0.2 $\mu$ m) associated with rafts. Sample trajectories of raft constructs exhibited "hop diffusion". These domains corralled the diffusive motion of membrane proteins. These findings demonstrate that our approach is promising for modelling the localization properties of biological phenomena.

#### 1 はじめに

生体分子運動と相互作用についてのシミュレーションを行うための粒子モデルに基づく一般的な方法を提案する。現在、細胞以下レベルの局在の解析は、興味ある細胞の性質がどのように制御されるかを知るために重要となっている。実験技術の進歩とともに、これらの性質の解析が進められている。例えば、単一粒子トラッキング(SPT)と単一フルオロフォアビデオイメージ(SFVI)の技術は個々の分子が時間空間で実際にどのような動きを行い相互作用するかに関する観測を可能にした。SPTとSFVIは、形質膜における受容体

の運動<sup>1),2)</sup>と核内の mRNA の運動<sup>3),4),5)</sup>の解析に利用されている。また、これらの技術は、微小ドメイン構造のサイズの測定を可能にした<sup>6),7)</sup>。SPT/SFVI 研究に関するこれらの実験研究のように定量的なデータを与える例も出てきたが、まだ多くの実験は目的とした物質が得られたか否か判断するために定性的データを用いている。もうひとつ注意すべき点は、これらの実験における長さやタイムスケールは典型的なマイクロならびにマクロなシミュレーション(すなわち、分子動力学と速度論方程式シミュレーション)で解析可能なスケールのほぼ中間にあることである。したがって、我々の目的はこのスケールでの実験データを統合して、理論解析を行うことを可能とするシミュレーションツールを提供することである。

我々のシミュレーション方法においては 3 次元空間内の分子のブラウン運動を考慮する。この空間内での分子間相互作用により複合体が生み出される。複合体の結合、解離ならびに基質から生成物への変化はエネ

<sup>\*</sup> 理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター  
RIKEN Genomic Sciences Center  
<sup>††</sup> 千葉大学 薬学研究院  
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University  
<sup>†††</sup> 北陸先端科技学院大 知識科学  
School of Knowledge Science, JAIST  
<sup>††††</sup> 東京工業大学 情報理工学研究所  
Dept. of Mathematics and Computing Sciences, Tokyo Institute of Technology

ルギー状態の変化を考慮し、モンテカルロアルゴリズムに基づいたある確率で受け入れられる。これらの基本ダイナミクスは分子レベルのモデルであるが、これらの反応確率と速度論定数の関係を明らかにしており、シンプルな系（酵素反応モデル）のシミュレーションにおいては、アンサンブル平均の時間変化が速度論方程式理論により導かれる予測を正しく再現することを確認した。

この方法を使用することによって、我々は「ラフト」<sup>9)</sup>と呼ばれるコレステロールリッチな界面活性剤耐性膜(DRM)と関連した細胞膜上のクラスタリングドメインの生成を示すことに成功した。さらに、(1)ドメインを構成する分子の軌跡は「ホップ拡散」<sup>9)</sup>と関連した特有の拡散を示す、(2)ラフト親和性の蛋白質がクラスタリングドメインに入るによりタンパク質複合体生成が促進される、(3)クラスタリングドメインからのタンパク質複合体の跳避速度は複合体状態にない分子のものより少ないように見える、(4)このことにより、膜蛋白は、ほぼこれらのドメイン内に囲われた状態にあり、逆にクラスタリングドメインを安定させるように見る。これらの結果のうち(1)は実験観測事実を再現しており、我々のシミュレーションアプローチの有用性を示している。

本稿の構成は以下のとおりである。2章でシミュレーションモデルとアルゴリズムについて説明を行い、時間と長さスケールの変換則、確率論定数と速度論定数の関係性について考察を行う。3章ではまずシミュレーションアルゴリズムの妥当性チェックとして酵素反応モデルについて行ったシミュレーション結果と微分方程式の数値解との比較を行う。次に細胞膜表面におけるクラスター形成のシミュレーション結果を示す。最後に4章で結論を述べる。

## 2 モデルと方法

### 2.1 ランダムウォーク

この過程において、各粒子は立方格子に沿って移動する。このとき、最隣接格子点6つのうちの1つに等しい確率で到達するようなランダムステップをとる。このステップは長さ  $l$  である。したがって、それぞれのその後の粒子位置は値  $(n_x, l, n_y, l, n_z, l)$  ( $n_x, n_y, n_z$  は整数である)のみを取り得る。この過程で粒子は単位時間( $\tau$ )あたり確率  $d$  でステップする。つまり、この粒子は各サイトで可変の待ち時間を与えられている。マスター方程式理論により、 $t \rightarrow 0$  の極限でこのタイプのランダムウォークは、以下の拡散係数をもつ時間に依存したガウス分布をもつ Wiener 過程であることを示すことができる<sup>10)</sup>;

$$D = \lim_{l \rightarrow 0} (3l^2 d) \quad (1)$$

ここで最大の拡散速度を与えるのは  $d=1/6[\tau^{-1}]$  の場合であり、これは粒子がかならずステップすることを意味する。

### 2.2 結合プロセス

化学種  $S$  の粒子が上で説明した移動に関する試行によって  $T$  種の別の粒子の相互作用範囲にちょうど入り、なおかつこれらの粒子が互いに結合することが可能であると仮定しよう。この過程で粒子が  $ST$  複合体を形成することができるかどうか決定される。まず、事前に定義されたテーブル内の複合体候補リストから現在対象となっている組合せ(ここでは  $ST$  のペア)を探す。図1は二元複合体のケースの典型的な例を示す。簡単のために、特定の平面に投影した運動のみを考える。ここで、 $S, T, U$  は粒子の化学種を示す。一点破線の円によって囲まれた領域は粒子  $S$  の相互作用範囲(半径  $\sqrt{3}$  の球と定義する)を示す。この場合、結合プロセスは以下に述べる一連のステップから成る。

- (1) 粒子  $S$  はポインタによって示されるように上方に動く。これによって、別の粒子  $T$  が相互作用範囲に入る。ここで、これらの粒子に付けられたシンボル( $\phi$ )は、空の変数を示し、拘束された粒子がないこと示す。この変数は以下、結合変数と呼ぶことにする(図1A)。
- (2)  $S$  粒子について事前に定義されたテーブルを参照することによって、 $S$  粒子が  $T$  粒子と結合可能であることのチェックを行う。より正確には、(b)で  $S-T$  として表されているように、このテーブルに単一の  $S$  粒子と単一の  $T$  粒子の組み合わせがあれば、 $S$ -粒子は  $T$ -粒子と結合することができる(図1B)。
- (3) 一樣乱数  $\xi$  ( $0 \leq \xi < 1$ ) を生成し確率  $R(ST|S+T) = p_1 \exp(-\Delta E_{1b}/RT) \approx p_1$  と比較を行う(図1C)。ここで、 $\Delta E_{1b}/RT$  は無次元の活性化エネルギー( $R, T$  はそれぞれ、気体定数、絶対温度)。 $p_1$  は  $\Delta E_{1b} = 0$  での  $p_1$  を与え、各試行間の時間間隔をコントロールする因子であるが、実効活性化エネルギー  $\Delta E_{1b} = \Delta E_{1b} - RT \ln p_1$  を導入することによって  $p_1 = \exp(-\Delta E_{1b}/RT)$  と表すことができる。 $\xi < p_1$  であれば、粒子  $S$  の矢印の方向の運動をアクセプトする。逆に  $\xi \geq p_1$  であるときには、リジェクトする。ここでは、 $ST$  複合体の生成速度が条件付き確率  $p_1$  であることを仮定している。
- (4) 移動をアクセプトする場合、 $T$  を粒子  $S$  の結合変数に割り当てる。逆の場合もまた同様である(図1D)。

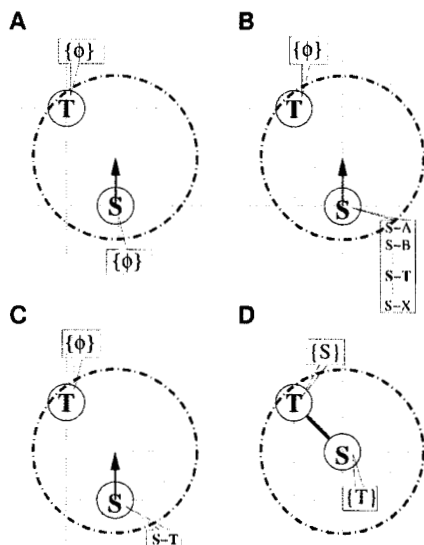


図1 結合プロセス。(A) ランダムウォークによりSは矢印の向きに進もうとする。ここで、SとTの結合変数は空になっている(シンボル{φ})。(B)移動の前に、複合体の候補リストのテーブルを探索し、SとTの結合が定義されているかのチェックを行う。(C)このテーブルが単一のSおよび単一のTのコンビネーション(ST)を持っている場合、一様乱数 $\xi(0 \leq \xi < 1)$ と遷移確率 $p_2$ の比較を行う。(D) $\xi \leq p_2$ であれば、この移動はアクセプトされる。

### 2.3 化学量論の保存のためのチェック機構

相互作用範囲の中のすべての組のSとT粒子が必ずしも互いに結合することできるというわけではない。図2は結合プロセスに伴う例外的な場合を示している。分子Tは、既にU分子に結合し、したがって、分子Sと結合することができない。このような場合、これらの粒子は以下に述べる一連のステップの手続きによって処理される。

- (1) 移動トライアルにより粒子Sが上方方向に移動しようとする。その結果、粒子Tが相互作用範囲に入る。(図2A)
- (2) 事前に定義されたテーブルを参照することによって、分子Sが分子Tと結合可能であることがわかる(図2B)。
- (3) 分子Tの中の結合変数をチェックするとUがあることがわかる。したがってSをTの結合変数に割り当てることができない。同様に粒子Sの結合変数にTの割り当ても妨げられる(図2C)。

### 2.4 解離プロセス

この過程では、粒子TとSの結合変数にそれぞれ割り当てられたSとTは、解離のアクセプトと同時にクリアされる。

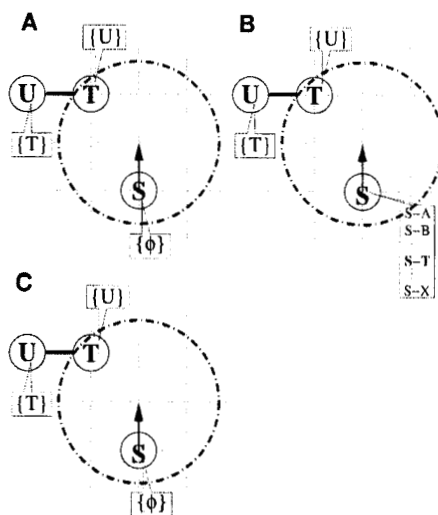


図2 結合を伴わない相互作用例。(A)Uは、既に、TとUの結合によりTの結合変数を占有している。(B)候補リストの中のTSを探索するプロセス。(C)粒子Tの結合変数を参照すると{U}がある。したがってST複合体の生成は排除される。

- (1) 一様乱数 $\xi(0 \leq \xi < 1)$ を生成し、確率 $R_{S+T|ST} = p^0 \exp(-\Delta E_{2b}/RT) = \exp(-\Delta E_{2b}/RT) \equiv p_2$ との比較を行う。ここで、 $p^0$ は $\Delta E_{2b}=0$ での解離確率、 $\Delta E_{2b}/RT$ は無次元の活性化エネルギー、また、 $\Delta E_{2b} = \Delta E_{2b} - RT \ln p^0$ 。 $\xi < p_2$ であるときに、粒子Sの移動をアクセプトし、逆に $\xi \geq p_2$ であるときリジェクトする(図3A)。つまり、 $S+T \rightarrow ST$ の反応速度は $\Delta E_{2b}/RT$ の指数関数として書くことができると仮定する<sup>11)</sup>。
- (2) 移動をアクセプトする場合、粒子Sの結合変数におけるTをクリアする、逆もまた同様となる(図3B)。

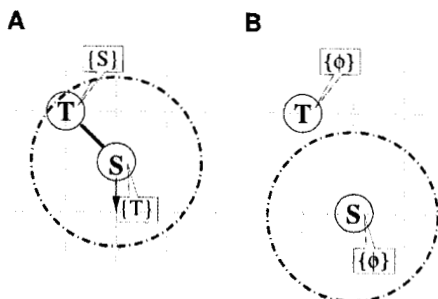


図3 解離プロセス。粒子Sは、ランダムウォーク試行によって矢印の方向へ進もうとする。TS複合体(A)はSとT粒子に分裂する(B)。

## 2.5 反応プロセス

この過程で、各粒子は化学種が異なったものに入れ換えられる試行を受ける。手順のステップは以下の通りである。

- (1) 一様乱数  $\xi$  ( $0 \leq \xi < 1$ ) を生成し確率  $P(VT|ST) = p_3^{\xi} \exp(-\Delta E_{3b}/RT) = \exp(-\Delta E_3/RT) = p_3$  と比較を行う。ここで、 $p_3$  は  $\Delta E_{3b} = 0$  での反応確率、 $\Delta E_{3b}/RT$  は無次元の活性化エネルギー、また、 $\Delta E_3 = \Delta E_{3b} - RT \ln p_3$ 。  $\xi < p_3$  であるときに、粒子 S の V への変更をアクセプトし  $\xi \geq p_3$  であるときにリジェクトを行う。(図 4A)
- (2) この変更がアクセプトされれば ST から VT へ変換を行う。(図 4B)

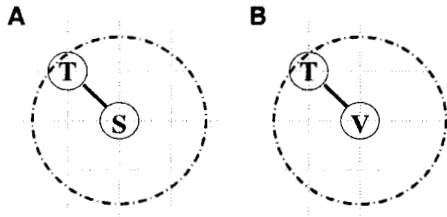


図4 化学反応プロセス。TS複合体(A)はTVに変換される(B)。

## 2.6 時間と長さスケール

シミュレーションの単位時間( $\tau$ )は、あらゆる粒子が一度だけ移動の試行を受けた1サイクルと定義する。同様に、反応プロセスの試行も全ての粒子について単位時間あたり一度だけ実行される。次に、これら単位時間と単位長さを実時間(sec)、長さ単位( $\mu\text{m}$ )の間の関係づけを行う。具体的には、スケール変換を以下のように行う。(a) 比較的小さな体積の中での比較的速いダイナミクスに興味を持っているとき、 $1\text{sec} = 5 \times 10^5 \tau$  ならびに、 $1\mu\text{m} = 181.9l$  とする。(b) 逆に、比較的大きい容積中での比較的長時間にわたる反応の振舞いを調べるときには、 $1\text{sec} = 5 \times 10^3 \tau$  ならびに、 $1\mu\text{m} = 18.19l$  とする(表 1)。

これらの2つの組み合わせのスケール変換は、 $d = 1/6[\tau^2]$  つまり、最も速い拡散であるときに、双方が実単位系で  $D = 7.6[\mu\text{m}^2/\text{sec}]$  を与えるように選択されている。これは以下の計算で容易にチェックすることができる。拡散係数を式(1)の近似として  $D = 3P[d\tau^2]$  によって評価するので、(a)と(b)双方のパラメータの組合せ ( $l, d = (5.498 \times 10^{-3}[\mu\text{m}], 5 \times 10^5/6[\text{sec}^2])$ ) ならびに ( $5.498 \times 10^{-2}[\mu\text{m}], 5 \times 10^3/6[\text{sec}^2]$ ) は等しく  $D = 7.6[\mu\text{m}^2/\text{sec}]$  を与える。この値は、細胞質中の球状蛋白に対する実験値に近い<sup>12)</sup>。

表1 確率論定数と速度論定数の関係。

	(a)	(b)
1 sec	$5 \times 10^5 \tau$	$5 \times 10^3 \tau$
1 $\mu\text{m}$	181.9l	18.19l
$D$ [ $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ ]	45d	45d
$k_1$ [ $\text{nM}^{-1}\text{sec}^{-1}$ ]	$3.77p_1d$	$37.7p_1d$
$k_1$ [ $\text{sec}^{-1}$ ]	$5 \times 10^5 \times 1/3 \times p_2d$	$5 \times 10^3 \times 1/3 \times p_2d$
$k_2$ [ $\text{sec}^{-1}$ ]	$5 \times 10^5 p_3$	$5 \times 10^3 p_3$

スケール変換(a)と(b)、ならびに、速度論係数と確率論定数の関係。

## 2.7 速度論係数

表 1 に、(a)および(b)について理論的に導いた確率論定数および速度論係数の関係性をまとめた。ここで、 $k_1, k_1$  および  $k_2$  は、反応  $S+T \rightarrow ST, ST \rightarrow S+T$  および  $ST \rightarrow VT$  についての速度論係数をそれぞれ示す。これらの関係性の意味を簡単に考察してみる。まず、 $k_1$  については(b)に比べて(a)のほうが小さくなっている。これは(b)に比べて(a)のほうが空間刻みが小さくなり反応半径が小さくなった ( $R-l$  を仮定すれば、前者は  $R-55\text{nm}$ 、後者は  $R-5.5\text{nm}$ ) ため相互作用の頻度が低下したことに起因する。次に、 $k_1$  と  $k_2$  は(b)に比べて(a)が時間刻み数に比例して増大していることがわかる。これは1 sec あたりに行う  $k_1$  と  $k_2$  の反応プロセス(解離と反応)の1 sec あたりの試行回数が増えただけ増大したためである。したがって、時間刻み、すなわち  $\tau$  は最も早い反応でなおかつ反応確率が1のときの反応の時間間隔を表していると解釈することができる。

係数  $k_1$  は以下のように導かれる。不可逆反応  $S+T \rightarrow ST$  において、相互作用半径内に入った S と T は必ず ST になるとした場合、この過程の反応速度は溶液中における拡散律速反応速度理論から予言され、

$$v_1^b = 4\pi R D' \left\{ 1 + R(\pi D' \tau)^{-1/2} \right\} [S][T] \quad (2)$$

と書かれる<sup>13),14)</sup>。ここで  $D = D_S + D_T$  ( $D_S, D_T$  はそれぞれ S, T の拡散定数)。 $R$  は反応半径である。これに対して結合の活性化エネルギー、すなわち、結合確率を考慮したモデルでは、(2)式に  $p_1$  を掛けた速度

$$v_1 = v_1^b p_1 = 4\pi p_1 R D' \left\{ 1 + R(\pi D' \tau)^{-1/2} \right\} [S][T] \quad (3)$$

より反応がすすむ。通常的时间範囲では  $R/\sqrt{\pi D' \tau} \ll 1$  である。したがって、

$$v_1 = v_1 \Big|_{R \rightarrow \infty} = 4\pi p_1 R D' [S][T] \quad (4)$$

を用いる。さらに、 $D_S = D_T = D$  を仮定すると、(4)式は(1)より

$$v_1 = 24\pi p_1 R l^2 d [S][T] \quad (5)$$



したがって、速度論係数

$$k_1 = 24\pi p_1 R^2 d \quad (6)$$

が導かれる。実際には  $R \sim 1$  の近似による式  $k_1 = 24\pi p_1 \beta d \tau^{-1}$  を用いた。これに表中の 1, 2 行目にあるスケール変換則を適用すると 4 行目の  $k_1$  の形が得られる。

$k_1$  についての関係式内のファクター  $1/3$  は、T を固定して考えたときに、S のあらゆる結合配位のうち解離を伴う移動の総数が、S のあらゆる結合配位について解離するか否かに関係なく数えた移動の総数の  $3$  分の  $1$  であることを示している。つまり、

$$\alpha = \frac{\sum_{\mathbf{x}_s} \theta(R + \varepsilon - \|\mathbf{x}_s - \mathbf{x}_T\|) \sum_{\Delta \mathbf{x}_s} \theta(\|\mathbf{x}_s + \Delta \mathbf{x}_s - \mathbf{x}_T\| - R)}{\sum_{\mathbf{x}_s} \sum_{\Delta \mathbf{x}_s} \theta(R + \varepsilon - \|\mathbf{x}_s - \mathbf{x}_T\|)} \quad (7)$$

のファクターの寄与分を考慮している。ここで  $\theta(x)$  は  $x > 0$  で  $1$ 、 $x \leq 0$  で  $0$  の値をとる関数であり、 $\varepsilon$  は  $0$  より大きい小さな数、 $\mathbf{x}_s$  と  $\mathbf{x}_T$  はそれぞれ  $s$  と  $T$  の位置、 $\Delta \mathbf{x}_s$  は  $1$  ステップの  $s$  の移動分を表す。 $\mathbf{x}_T$  固定しているので  $\mathbf{x}_T = 0$  としてよい。また、 $R = \sqrt{3}$  であるので、 $\mathbf{x}_s$  は  $\mathbf{x}_T = 0$  を中心として  $1$  辺あたり  $3$  つの格子点を持つ立方体中の点のうちのいずれかにある。したがって、これらの点における移動の総数を計算すると  $3^3 \times 6 = 162$  とおりである。一方、これらのうち、解離、つまり、 $\mathbf{x}_T = 0$  から  $R = \sqrt{3}$  以上離れるものについて考えると、まず、立方体の  $8$  つの頂点については  $3$  つの移動方向が存在する。次に  $12$  の辺の中点については  $2$  つの方向がある。最後に  $6$  つの面の中点に関しては  $1$  つの向きがある。したがって、解離をともなう移動の総数は  $8 \times 3 + 12 \times 2 + 6 = 54$  になる。したがって、 $\alpha = 54/162 = 1/3$  が導かれる。

以上のことを一般的な形で再びまとめ直すと下の表 2 のようになることが示される。ここで  $\varphi$  は  $1$  sec あたりの時間刻みの数、 $\lambda$  は  $1 \mu\text{m}$  あたりの空間刻みの数であり、4 行目の  $k_1$  の式中のファクター  $0.602$  は濃度単位  $\text{nM}$  に変換を行う際に現れる係数である。表 1 中では  $k_1$  および  $k_2$  が時間刻み数  $\varphi$  に依存しているように表示されていたが、表 2 で示されているように、実際には時間  $\tau$  あたりの速度  $p_2^0$  ならびに  $p_3^0$  が掛け算される。

表 2 確率論定数と速度論定数の間の関係：一般的な関係式

1 sec	$\varphi \tau$
$1 \mu\text{m}$	$\lambda l$
$D [\mu\text{m}^2/\text{sec}]$	$\varphi d \lambda^2$
$k_1 [\text{nM}^{-1}\text{sec}^{-1}]$	$0.602 \times 24\pi d \varphi p_1 \exp(-\Delta E1_V/RT) \lambda^3$ $= 0.602 \times 24\pi d \varphi \exp(-\Delta E1/RT) \lambda^3$
$k_{-1} [\text{sec}^{-1}]$	$\alpha d \varphi p_2^0 \exp(-\Delta E2_V/RT)$ $= \alpha d \varphi \exp(-\Delta E2/RT)$
$k_2 [\text{sec}^{-1}]$	$\varphi p_3^0 \exp(-\Delta E3_V/RT)$ $= \varphi \exp(-\Delta E3/RT)$

### 3 結果

#### 3.1 結合した 2 分子の運動

上記のアルゴリズムとその実装が設計されたように正しく働くか否かのチェックを行うため、単純な 2 分子反応  $S+E \rightarrow SE$  のシミュレーションを行い、粒子の軌跡の表示を行った。図 5 のように  $p_2=0$  (すなわち、恒久的な結合) であるので、分子 S と E は空間内で絶えず動き回る一方で常に互いに拘束しあっている。

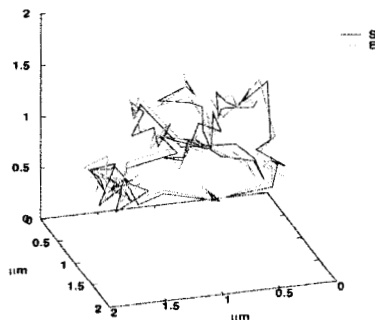
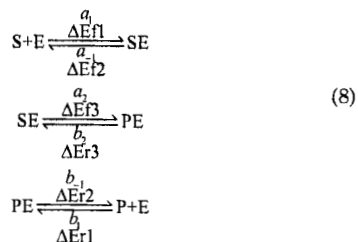


図 5  $S+E \rightarrow SE$  のシミュレーション。粒子 S および E は  $p_2=0$  で互いに結合している。これらの軌跡を  $t=0$  から  $1.6 \times 10^4 \tau$  まで  $1.6 \times 10^2 \tau$  おきにプロット。長さ単位は  $1 \mu\text{m}$ 、表 1(b) のスケール変換に基づく。

#### 3.2 可逆酵素反応

上記の結合、解離、および化学反応の各プロセスについて、多数の粒子系において理論上の要件を満たすかどうかの定量的な検討を行うために、以下の可逆酵素反応について一連のシミュレーション解析を行った：



ここで、各反応における変数(例えば、 $S+E \rightarrow SE$  反応における  $a_1$  と  $\Delta E f_1$ )は速度論係数と無次元の活性化エネルギーの組み合わせを示す。

我々のモンテカルロシミュレーションにおいては、各サイトごとに  $[S]_0$  の割合で粒子をランダムに配置した初期分布から開始して、 $16$  サンプルに関する平均値の時間発展の評価を行った。図 6 に、表 2(a) および 2(b) に示した 2 セットの活性化エネルギーについて、 $[P]$  の平均値の時間発展を様々な初期濃度  $[S]_0$  にたいしてプロットした結果を示す。図 6A および B 中のシ

ンボルがそれぞれ表 3 (a)および(b)のパラメタを用いて計算された結果である。この結果、比率[P]/[S]の定常値は  $\exp(-\Delta G/RT)$  と一致することが確認できる(ここで  $\Delta G = \Delta E f1 - \Delta E r1 - \Delta E f2 + \Delta E r2 + \Delta E f3 - \Delta E r3 = 0.7 RT$ )。例えば、図 6 A と B 中のシンボル  $\nabla$  ([S]<sub>0</sub> = 10 μM) の定常状態の値は双方ともに [P] = 8.20 μM を、シンボル  $\diamond$  ([S]<sub>0</sub> = 4 μM) のそれはともに [P] = 3.27 μM を与える。

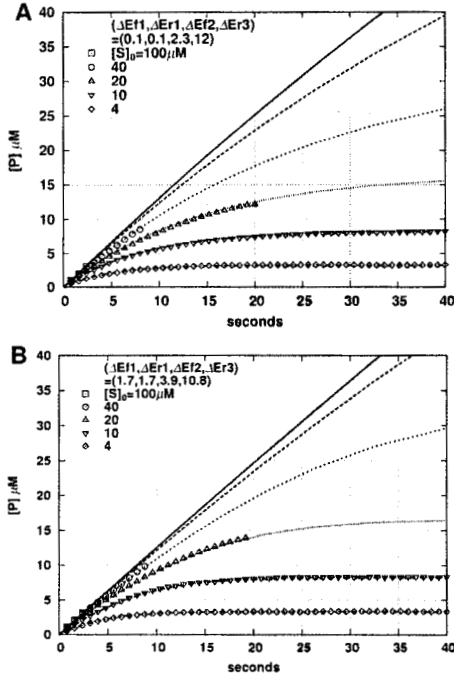


図 6 モンテカルロシミュレーションと連立常微分方程式の結果の比較。モンテカルロ(粒子)シミュレーション(白抜きシンボルの結果を[P]の平均値、およびこれに対応した速度論方程式(点線および実線)の数値解を時間(秒)に対してプロットした。活性化エネルギーおよびこれらに対応した速度論パラメーターを表 3 に示す。(A)表 3 (a)および(c)のパラメタセットについての結果。(B)表 3 (b)および(d)のパラメタセットについての結果。E 総濃度は[E]<sub>0</sub> = 0.1 μM。モンテカルロのデータは 16 サンプルの平均値。初期条件において、3 次元空間内のすべてのサイトに等しい確率で粒子を配置。

(8)式と同じ反応について、速度論式(連立常微分方程式)を解くことによって得られた結果と比較を行った。この比較を行うため、表 3 (a)および 2(b)中の活性化エネルギーに表 1(a)中のスケール変換規則を適用し、これによって、表 3 (c)および 2(d)中の対応する速度論パラメーターをそれぞれ得た。速度論方程式の具体的な形を以下に示す。

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = a_1 uv - a_{-1} x + b_2 y - a_2 x \\ \frac{dy}{dt} = a_2 x - b_2 y - b_{-1} y + b_1 z v \\ \frac{dz}{dt} = b_{-1} y - b_1 z v \end{cases} \quad (9)$$

ここで x, y, z はそれぞれ [SE], [PE], [P] を表し、以下の束縛条件を持つ。

$$\begin{aligned} u &= [S]_0 - x - y - z \\ v &= [E]_0 - x - y \end{aligned} \quad (10)$$

表 3 可逆酵素反応モデル(式 8)のパラメーター値。

活性化エネルギー [kJ]	(a) (図 6A)	(b) (図 6B)	速度論係数	(c) (図 6A)	(d) (図 6B)
ΔE <sub>f1</sub>	0.1	1.7	a <sub>1</sub> [nM <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> ]	5.60 × 10 <sup>1</sup>	1.12 × 10 <sup>1</sup>
ΔE <sub>r1</sub>	0.1	1.7	b <sub>1</sub> [nM <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup> ]	5.60 × 10 <sup>1</sup>	1.12 × 10 <sup>1</sup>
ΔE <sub>f2</sub>	2.3	3.9	a <sub>2</sub> [sec <sup>-1</sup> ]	2.79 × 10 <sup>2</sup>	5.62 × 10 <sup>2</sup>
ΔE <sub>r2</sub>	4.6	4.6	b <sub>2</sub> [sec <sup>-1</sup> ]	2.79 × 10 <sup>2</sup>	2.79 × 10 <sup>2</sup>
ΔE <sub>f3</sub>	10.8	10.8	a <sub>3</sub> [sec <sup>-1</sup> ]	1.02 × 10 <sup>3</sup>	1.02 × 10 <sup>3</sup>
ΔE <sub>r3</sub>	12.4	10.8	b <sub>3</sub> [sec <sup>-1</sup> ]	2.06	1.02 × 10 <sup>3</sup>
ΔG	0.7	0.7	K <sub>eq</sub>	0.50	0.50

活性化エネルギーの速度論係数への変換は表 1(a)に基づいて行なった。K<sub>eq</sub> = a<sub>1</sub>a<sub>2</sub>b<sub>3</sub> / (a<sub>-1</sub>b<sub>2</sub>b<sub>3</sub>)

### 3.3 2次反応以上の高次のオーダーの反応への拡張

以上に述べたシミュレーションは、高々 2 つの異なる種類から成る複合体をもつ化学反応のみを含んでいる。しかしながら、シミュレーション方法の一般的な適用については、2 つを越える種類の多体の相互作用を含む、より高次のオーダーの化学反応モデルに対応可能なアルゴリズムを実装しなくてはならない。これを可能とするため、各粒子の結合パートナーのインデックスおよび化学種を常にモニターし、この情報を「結合配列」としてとっておくようにしたアルゴリズムの開発を行った。煩雑になるためアルゴリズムのその他の詳細については割愛するが、この拡張版アルゴリズムは 2.2-2.5 章で述べたものと基本的には同じ考え方で作られたものである。

### 3.4 細胞膜上におけるクラスター形成

細胞膜上におけるクラスター形成についてのシミュレーションは拡張アルゴリズムの有用性を最も良く示す応用例の 1 つである。このシミュレーションにおいて、細胞膜上のクラスターである「ラフト」の形成とこれともなう T 細胞受容体 TCR と LAT (膜貫通型アダプター・タンパク質) の相互作用に対する影響の検討を行った。T 細胞受容体および LAT は細胞表面上のコレステロールリッチなマイクロドメイン (ラフト) にたいする親和性がある。

コレステロールは主としてスフィンゴミエリンから成る形質膜の性質を変えることができるため、クラス

タリングに対して非常に重要な効果がある。コレステロールを加えることによって固体(SO)相をとる形質膜が液体(LO)相へ移行することが示されている。このコレステロール付加の中間のレベルで、SO相およびLO相は共存することができる。この共存相においては形質膜側方の異方性が生じており、コレステロールリッチドメインへコレステロールが分離した状態にある<sup>8)</sup>。形質膜外葉のクラスタリングに関して他の要因の影響もあるといわれている。たとえば、アルキル鎖の長さおよび飽和がクラスタリングに寄与しているとの提案がなされている。つまり、長い飽和アルキル鎖をもつ、スフィンゴ糖脂質、スフィンゴミエリンおよびリン脂質は、コレステロールリッチドメインに入ってラフトを形成しうる<sup>15),16),17),18)</sup>。

これらの要因を考慮に入れ、クラスタ形成に関係する重要なコンポーネントおよびそれらの相互作用パラメーターの組込みを行った。コレステロール(C)、スフィンゴ糖脂質(G)、TCR(T)およびLAT(L)分子間の相互作用を考慮した。比較的低い大きさのカップリングをCG、GTおよびGL複合体について仮定し、これらより高い親和性をTL複合体について仮定する(詳細は<sup>19)</sup>)。このような相互作用条件ならびに十分な量のCG複合体があるときに、安定したクラスタリングパターンが得られる(図7; 動画ファイル<sup>20)</sup>)。図7に示すように、CおよびGコンポーネントはDRM/ラフト状構造を示し、クラスタリング領域(サイズ約0.2 $\mu\text{m}$ )を形成する。我々のシミュレーション結果が先行研究の結果<sup>17)</sup>から進歩した点は、オリゴマー化に引き起こされたクラスタリングを示した点にある。このクラスタリングにおいては、比較的高いカップリングで結合した少数の膜タンパク質複合体の存在が、CとGに富んだ安定したラフト(受容体クラスタラフト)の生成を促す<sup>21)</sup>。実際、クラスタ内のTL複合体の遅い運動はクラスタの分解を妨げているように見える一方、TL複合体の生成は、クラスタ領域のTおよびLの囲い込みによって促進される。

SFVIならびにSPT実験結果との比較を行うため、このシミュレーションから得られた典型的なサンプルの軌跡の表示を行った(図8および動画ファイル<sup>22)</sup>)。クラスタリングが存在する状態において2つのタイプの特徴的な拡散運動が観察された。すなわち、主としてTおよびL成分(図8AおよびB)について観察される遅い移動、およびCおよびG(図8CおよびD)が示す比較的自由的な運動だがクラスタリングのない状態で示すものより遅い運動、の2つが観察された。興味深いことに、CとG成分はクラスタを横切る「ホップ拡散」を示す。すなわち、分子の軌跡にほぼ同じサイズ(約

0.2 $\mu\text{m}$ )をもつ塊状のものが現れる(図8D)。このサイズは、ほぼ図7の中のクラスタリング領域の直径と等しい。

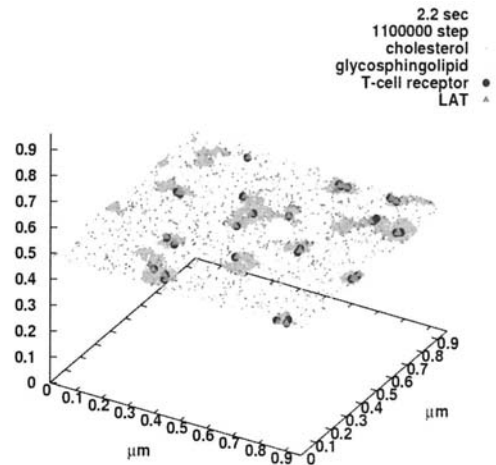


図7 細胞膜表面におけるクラスタ形成のシミュレーション。t=2.2秒において得られたスナップショット。各軸の長さ目盛りは $\mu\text{m}$ 。分子の種類:(+)コレステロール、(x)スフィンゴ糖脂質、(\u25b2)T細胞受容体、および(\u25cf)LATアダプター・タンパク質。

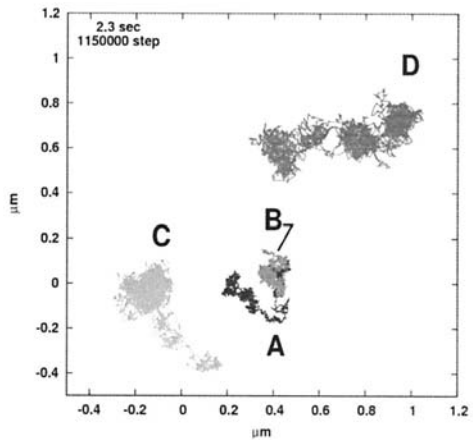


図8 細胞膜表面におけるクラスタ形成のシミュレーション: t=0.4-2.3秒間の粒子の軌跡。(A)TCR、(B)LAT、(C)コレステロール、(D)スフィンゴ糖脂質。

TとLについては、ほとんどのTおよびLがクラスタ中でTL複合体を急速に形成するのでクラスタから脱出するのに必要なエネルギー・コストが増加する。このため、このホップ拡散はめったに生じない。図8AおよびBでは、Tは、かろうじてクラスタを脱出し、別のクラスタ(Lが捕らえられている)へ再び入



り込む。

同様の性質は実験的にも観察データが示されている。すなわち、NRK の繊維芽細胞の細胞膜上において単一あるいは小集団の DOPE(リン脂質)分子の軌跡のイメージを 25 ミリ秒カンドの時間分解能で追跡し記録した結果、約 0.2 マイクロメートルの典型的なスケールを持ったホップ拡散を示すことが見出された<sup>9)</sup>。膜タンパク質の運動においては、Lck(TCR クラスタリングにリクルートされた Src ファミリー蛋白質キナーゼ)の拡散速度は、TCR クラスタの刺激箇所からの距離が減少するにつれて減少した<sup>23)</sup>。これらの観察は我々のシミュレーション結果と一致する。

#### 4 結論

我々のシミュレーション方法は粒子モデルを用いることにより分子の運動および相互作用の数理的解析を可能とする。分子の運動は 3 次元空間内のランダムウォークとして表現し、相互作用は粒子間の結合プロセスおよび解離プロセスとしてそれぞれ表現する。我々のアプローチの特徴のひとつは、互いに拘束した粒子として複合体を表現可能な点にある。これらの複合体の結合プロセスおよび解離プロセスは、エネルギー変化を考慮したモデルに基づいている。つまり、活性化エネルギーに基づく遷移確率によって結合と解離のプロセスが進行する。このように、1 つ 1 つの粒子を区別してすべてのプロセスを実行する。従来の副空間をもちいる手法、すなわち、Gillespie のアルゴリズム<sup>26),27)</sup>に基づいた以前の反応拡散方法<sup>24),25)</sup>においては、必ずしも粒子と分子の対応関係が明確ではなかった。

さらに、我々の粒子シミュレーション・モデルは基本的に確率論であるので、確率的な変動の大きさおよび影響を調べることは重要である。3. 2 節で述べた可逆酵素反応モデルの定量的解析を行うことによって、濃度の平均値が速度論方程式理論から導いた理論曲線を再現することを実証した。しかしながら、生の時間変化をみると個々のサンプルは平均値のまわりに常に変動していることに気づく。この種の変動は固有ノイズに相当する。他方、外部入力による変動は外因性ノイズと呼ばれる<sup>28),29)</sup>。現在、固有ノイズの定量的な解析、特に、 $K_m$  と  $V_{max}$  のような速度定数にたいしての依存性の検討を行っている。

このシミュレーション方法を使用して、細胞膜におけるラフトと「流動モザイク」モデル<sup>30),31)</sup>に関係したクラスタリング・パターンが存在を実証することに成功した。免疫細胞シグナル伝達では、ラフトは T 細胞の LAT のようなラフト親和性のアダプター・タンパク質の「プラットフォーム」であり、他のタンパク質

からの異なるシグナルを絶縁しているとの仮説が示されている<sup>32),33)</sup>。シミュレーションを用いてこれを確認するためには、(1) クラスタリングドメインを自動的に識別すること、ならびに(2)これらのドメイン間で輸送された物質の統計解析を行うことの 2 点が必要となる。これらの解析を近く行う予定である。

#### 謝辞

本論文のシミュレーション計算は東京工業大学学術国際情報センター Tsubame グリッドクラスタ、RIKEN スーパーコンバインドクラスタ(RSCC)を使用して行なわれた。

#### 参考文献

- 1) Dumas F, Destainville N, Millot C, Lopez, A, Dean, D., and Salome L: Confined diffusion without fences of a g-protein-coupled receptor as revealed by single particle tracking. *Biophys J*. 2003, 84 (1): 356-66.
- 2) Ritchie K and Kusumi A: Single-particle tracking image microscopy. *Methods Enzymol*. 2003; 360: 618-34.
- 3) Shav-Tal Y, Darzacq X, Shenoy SM, Fusco D, Janicki SM, Spector DL, and Singer RH: Dynamics of single mRNPs in nuclei of living cells. *Science* 2004-a, 304 (5678): 1797-800.
- 4) Shav-Tal Y, Singer RH, and Darzacq X: Imaging gene expression in single living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004-b, Oct.5 (10): 855-61.
- 5) Fusco D, Accornero N, Lavoie B, Shenoy SM, Blanchard JM, Singer RH, and Bertrand E: Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells. *Curr Biol*. 2003, 13 (2): 161-7.
- 6) Murase K, Fujiwara T, Umemura Y, Suzuki K, Iino R, Yamashita H, Saito M, Murakoshi, H., Ritchie, K., and Kusumi, A: Ultrafine membrane compartments for molecular diffusion as revealed by single molecule techniques, *Biophys J*, 2004, 86: 4075-4093.
- 7) Kusumi A, Ike H, Nakada C, Murase K, and Fujiwara T: Single-molecule tracking of membrane molecules: plasma membrane compartmentalization and dynamic assembly of raft-philic signaling molecules. *Sem in Immunol* 2005, 17: 3-21.
- 8) Barenholz Y: Sphingomyelin and cholesterol: from membrane biophysics and rafts to potential medical applications. *Subcell Biochem*, 2004, 37: 167-215.
- 9) Fujiwara T, Ritchie K, Murakoshi H, Jacobson K, and Kusumi A: Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane, *J Cell Biol* 2002, 157, 1071-1081.



- 10) Gardiner CW: *Handbook of stochastic methods*, Springer, Berlin, 2004
11. Kramers HA: Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. *Physica.*, 1940, 7: 284-304.
- 12) Arrio-Dupont M, Foucault G, Vacher M, Devaux PF, Cribier S: Translational diffusion of globular proteins in the cytoplasm of cultured muscle cells. *Biophys J* 2000, 78: 901-907.
- 13) Smoluchowski MV: Versuch einer mathematischen theorie der koagulationskinetik kolloider losungen. *Z Physic Chem*, 1917, 92: 129-168.
- 14) Collins FC and Kimbal GE: Diffusion-controlled reactions in liquid solutions. *Industrial and Engineering Chemistry*, 1949, 41: 2551-2553.
- 15) Subczynski WK, Antholine WE, Hyde JS, Kusumi A: Microimmiscibility and three-dimensional dynamic structures of phosphatidylcholine-cholesterol membranes: translational diffusion of a copper complex in the membrane. *Biochemistry*, 1990, 29: 7936-7945.
- 16) Pasenkiewicz-Gierula M, Subczynski WK, and Kusumi A: Influence of phospholipid unsaturation on the cholesterol distribution in membranes. *Biochemistry*, 1991, 73: 1311-1316.
- 17) Gil T, Ipsen JH, Mouritsen OQ, Sabra MC, Sperotto MM, and Zuckermann MJ: Theoretical analysis of protein organization in lipid membranes. *Biochem Biophys Acta*, 1998, 1376: 245-266.
- 18) Bretscher MS and Munro S: Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science*, 1993, 261: 1280-1281.
- 19)  
[http://big.gsc.riken.jp/index\\_html/Members/azuma/folder.2006-06-13.0548915430/AdditionalFile2.pdf](http://big.gsc.riken.jp/index_html/Members/azuma/folder.2006-06-13.0548915430/AdditionalFile2.pdf)
- 20)  
[http://big.gsc.riken.jp/index\\_html/Members/azuma/folder.2006-06-13.0548915430/112.mp4](http://big.gsc.riken.jp/index_html/Members/azuma/folder.2006-06-13.0548915430/112.mp4)
- 21) Kusumi A, Koyama-Honda I, and Suzuki K: Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable rafts. *Traffic*, 2004, 5:213-230.
- 22)  
[http://big.gsc.riken.jp/index\\_html/Members/azuma/folder.2006-06-13.0548915430/112trj.mp4](http://big.gsc.riken.jp/index_html/Members/azuma/folder.2006-06-13.0548915430/112trj.mp4)
- 23) Ike H, Kosugi A, Kato A, Iino R, Hirano H, Fujiwara T, Ritchie K, Kusumi A: Mechanism of Lck recruitment to the T-cell receptor cluster as studied by single-molecule-fluorescence video imaging, *Chemphyschem* 2003, 4(6):620-6.
- 24) Stundzia AB and Lumsden CJ: Stochastic simulation of coupled reaction-diffusion processes. *J Compt Phys.*, 1996, 127: 196-207.
- 25) Elf J, Donic A and Ehrenberg M: Mesoscopic reaction-diffusion in intracellular signaling, In: *Fluctuations and noise in biological, biophysical and biomedical systems*. Edited by Bezrukov S et al. 2003, SPIE, Bellingham, WA. pp.114-124.
- 26) Gillespie DT: A general method for numerically simulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions. *J Compt Phys*, 1976, 22: 403-434.
- 27) Gillespie DT: Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. *J Phys Chem*, 1977, 81 (25): 2340-2361.
- 28) Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, and Swain PS: Stochastic gene expression in a single cell. *Science* 2002, 297, 1183–1186.
- 29) Swain PS, Elowitz MB, and Siggia ED: Intrinsic and extrinsic contributions to stochasticity in gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 (20), 12795–12800.
- 30) Singer SJ and Nicolson GL: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, 1972, 175,720-730.
- 31) Barenholz Y and Cevc G: Structure and properties of membranes. In: *Physical Chemistry of Biological Surfaces*. Edited by Baszkin A, and Norde W, Marcel Dekker, New York 2000, pp.171-241.
- 32) Veillette A: Specialized adaptors in immune cells. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16: 146-155.
- 33) Leo A, and Schraven B: Networks in signal transduction: the role of adaptor proteins in platelet activation. *Platelets* 2000, 11, 429-445.