

|                  |                                                                                                                                                                                                          |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | E-CELL Systemを用いた出芽酵母の細胞周期シミュレーション                                                                                                                                                                       |
| Sub Title        |                                                                                                                                                                                                          |
| Author           | 藤田, 由起(Fujita, Yuki)<br>富田, 勝(Tomita, Masaru)                                                                                                                                                            |
| Publisher        | 慶應義塾大学湘南藤沢学会                                                                                                                                                                                             |
| Publication year | 2001-03                                                                                                                                                                                                  |
| Jtitle           | 研究会優秀論文                                                                                                                                                                                                  |
| JaLC DOI         |                                                                                                                                                                                                          |
| Abstract         | 本書は、真核細胞の中で細胞周期に関してよく調べられている出芽酵母をモデルとして取り上げ、細胞周期のシミュレーションを行い、Tysonらの出芽酵母細胞周期モデルをE-Cell Systemにおいて再現する事を試みたものである。その結果、反応式の一部を工夫する事によってTysonらのモデルとほぼ同じ結果を得る事が出来た。またこれらの結果と、マイクロアレイ等を用いて得られる発現データの比較も行っている。 |
| Notes            | 富田勝研究会2000年秋学期                                                                                                                                                                                           |
| Genre            | Technical Report                                                                                                                                                                                         |
| URL              | <a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=0302-0000-0393">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=0302-0000-0393</a>            |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究会優秀論文

**E**

Keio University Shonan Fujisawa Academic Society

# **-CELL System を用いた出芽酵母の 細胞周期シミュレーション**

**2000年 秋学期**  
AUTUMN

---

**藤田 由起** 環境情報学部 3年

**富田 勝** 研究会

---

慶應義塾大学湘南藤沢学会



# E-CELL System を用いた出芽酵母の 細胞周期シミュレーション

環境情報学部 藤田由起 (t98826yf@sfc.keio.ac.jp)

## Abstract

細胞周期は大腸菌などの原核生物からヒトに至る真核生物まで全ての生物に必要な機構であり、その詳しい制御を知ることが生物を理解する上で欠かせない。今回、真核細胞の中で細胞周期に関してよく調べられている出芽酵母をモデルとして取り上げ、細胞周期のシミュレーションを行った。本研究では、まず先行研究である Tyson らの出芽酵母細胞周期モデルを、E-CELL System において再現することを試みた。その結果、一部、反応式 (Reactor) を工夫することによって Tyson らのモデルとほぼ同じ結果を得ることができた。次にマイクロアレイ等を用いて得られる発現データ 2 種類を E-CELL System におけるシミュレーション結果と比較した。今後の課題として、マイクロアレイなどから得られる発現データに基づいてパラメータ予測を行い、より実際の細胞に近いシミュレーションを目指す。

## 1 はじめに

細胞周期は細胞が DNA 複製を行い、細胞分裂を行う周期のことである。細胞周期はあらゆる生物が持っている基本的な機構であり、細胞分裂によって単細胞生物は新しい個体を作り、多細胞生物は消耗した細胞を補ったり成長したりする。細胞周期の制御がうまくいかないと、細胞が増殖しなかったり、異常に増殖したりする。癌とはまさに細胞周期制御に異常が生じて起こる現象である。

細胞分裂が正常に行われるためには、DNA が完全に複製し終わるまで細胞分裂が行われないようにしたり、細胞分裂が起こる際には体積が元の 2 倍になっていることを確認したりする仕組みが必要である。

真核細胞は S 期 (複製期)、G2 期、M 期 (分裂期)、G1 期からなる細胞周期を繰り返すことで増殖する。次のステップに進むか進まないかを決定する制御機構を知ることが、細胞周期を理解する上で非常に重要である。

## 2 研究目的

近年の細胞周期に関する研究が進み、その分子生物学的知見の集約をうけ、細胞周期の振る舞いをシミュレーションによって解析しようとする試みが Tyson らによって行われている。これらのモデルは、細胞周期における重要なサイクリンを決定的に捉えて反応速度式によって数理モデル化している。

そこで細胞周期を表現する方法として、Tyson ([1]) らによって行われた出芽酵母における細胞周期のシミュレーションを E-CELL System で再現することを行った。出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の細胞周期を研究テーマとしたのは、マイクロアレイを用いた実験で得られた発現データが WEB で公開されており、シミュレーション結果と、実験による発現データと比較が可能であることによる。これにより、細胞周期制御機構の細かい働きを知り、シミュレーション結果と実験による発現データを比較し、実際の細胞周期に行われる細胞内物質の反応を表現することが可能となる。

### 3 出芽酵母の細胞周期とその調節機構

#### 3.1 細胞周期

細胞周期の長さは細胞によって大きく異なる。酵母では1.5時間～3時間に1回分裂するが、例えば人の肝細胞は1年に1回程度しか分裂しない。真核細胞の細胞周期は4つの段階に分けられており、それぞれM期(有糸分裂と細胞分裂)、G1期、S期(DNA合成期)、G2期である。一見単純そうな機構であるが、M期に入るためには体積も全ての成分も2倍になっていなくてはならないし、DNA合成は一細胞周期に2回以上起こってはならない。そうでなければ分裂する毎に細胞が小さくなってしまったり正常な細胞が出来なくなってしまう(ただし、動物の胚では細胞成長が起こらないがこれは例外といえる)。酵母細胞については分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)と出芽酵母が存在するが、分裂酵母の方は他の大多数の細胞と同じように、細胞分裂の後には同じ大きさの細胞が2つできる。一方の出芽酵母は非対称に分裂するので大きい方の母細胞と小さい方の娘細胞は区別しなくてはならない。また出芽酵母はG1期が長くG2期が短いが、分裂酵母は逆である。

#### 3.2 細胞周期調節系

出芽酵母の細胞周期調節は、大きく分けて2種類に分類されているサイクリンがCDK(cyclin-dependent kinase)であるCdc28に結合したり、結合しているサイクリンが分解したりすることによって行われている。2種類とはCln群とClb群である。主なサイクリンとそれらがCdc28に結合したものの働きを表1に示す。またサイクリンの発現を調節する転写因子も幾つか存在する(表2)。他にCDKとサイクリン複合体に結合して活性を阻害する物質も知られており、これらの作用により細胞周期調節が行われる。

| サイクリン     | 働き                                 |
|-----------|------------------------------------|
| Cln1,Cln2 | 出芽と紡錘極体の形成などG1期の開始に必須              |
| Cln3      | 新たに分裂して生じた細胞がどの大きさとStartすればよいかに関わる |
| Clb1,Clb2 | 有糸分裂を正しく完成させる                      |
| Clb3,Clb4 | DNA複製に補助的に関わる                      |
| Clb5,Clb6 | DNA複製開始のタイミングに関わる                  |

表1：主なサイクリンとその働き

| 複合体   | 構成要素        | 部位の名称 |
|-------|-------------|-------|
| SBF   | Swi6p+Swi4p | SCB   |
| MBF   | Swi6p+Mbp1p | MCB   |
| Mcm1p | Mcm1p       | MCM1  |
| SFF   | SFF         | SFF   |
| Ace2p | Ace2p       | SWI5  |
| Swi5p | Swi5p       | SWI5  |

表2：細胞周期調節に関わる転写因子

## 4 出芽酵母の細胞周期モデルと再現シミュレーション

### 4.1 モデルの概要

今回のシミュレーションで使用したモデルは Tyson、Novak らのモデルである ([1])。モデル図を図 1 に示した。前述の通り、出芽酵母の細胞周期調節に重要な役割を果たしているのは Cdc28 という CDK である。このモデルにおいて Cdc28 は十分な量があるとしており、モデル図の中に登場するそれぞれのサイクリンは Cdc28 に結合していることを意味する。そのために Cdc28 はモデル図には描かれていない。

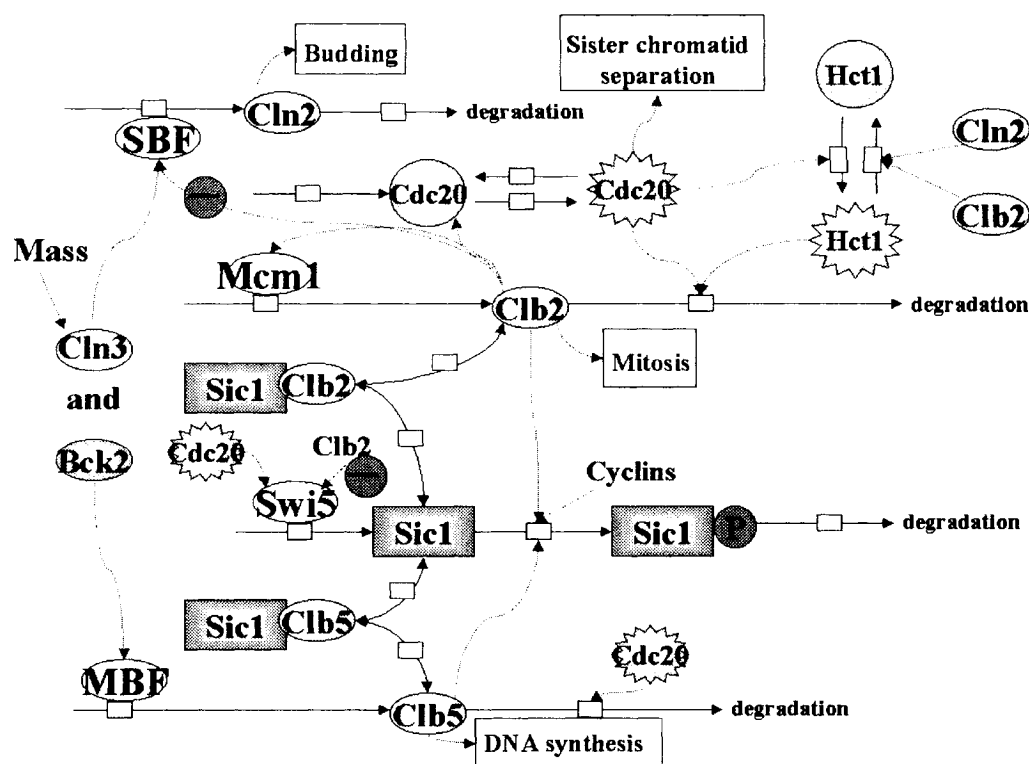


図 1：出芽酵母の細胞周期モデル図

表 1 で主なサイクリンをまとめたが、多くのサイクリンの役割は重複しており、そのことはいくつかのノックアウト実験により確かめられている ([9][10][11][12])。同じ役割を持つサイクリンは合成と分解のタイミングは似ていると考えられる。そのため、このモデルでは Cln1 と Cln2 は Cln2 として、Clb1 と Clb2 は Clb2 として、Clb5 と Clb6 は Clb5 としてモデル化されている。また Clb3 と Clb4 に関しては補助的な役割しか果たしていないので省いている。転写因子の SBF と MBF も両者の周期が似ていることから同じ式を利用してモデル化している。

Cln2、Clb5、Clb2 の各サイクリンはそれぞれ SBF、MBF、Mcm1 という転写因子の影響で合成が促進され、また Clb2 と Clb5 は阻害剤である Sic1 の結合によって阻害される。Clb2 は Sic1 の合成を負に

制御しており、Cdc20 は正に制御している (モデル図の+ (プラス) は負の制御を表す)。また Mcm1 に働きかけて自らの合成も促進している。Cln2 と Cdc28 の複合体は出芽を、Clb2 と Cdc28 の複合体は有糸分裂、Clb5 と Cdc28 の複合体は DNA 複製を促進する。サイクリンはユビキチンが結合すると蛋白質分解酵素により分解されるが、このモデルでは簡単に分解速度定数である  $k_d$  をかけて分解速度を求めている。

CDK の活性が DNA 合成や出芽、有糸分裂を起こすことを表現するために 3 つの指標となる物質を用いている。それぞれ ORI、BUD、SPN であり、それぞれの値が 1 を超すと各反応が起こったことを意味する。これらの現象が起こることによってサイクリンの分解が促進され、Sic1 の合成を促進する Cdc20 の活性が調節される。

## 4.2 シミュレーション結果

E-CELL System を用いたシミュレーション結果と元論文 ([1]) を比較した。図 2 が E-CELL System を用いたシミュレーション結果で図 3 は元論文のシミュレーション結果である。(x 軸に時間 (分)、y 軸に濃度)

ほぼ同じようなサイクルを描く結果が得られた。つまり、サイクリンである Cln2 と Clb5 の合成を促進する SBF(MBF) が増加すると、Cln2 と Clb5 が増える。そして Cln2 の増加によって Hct1 が不活性化され、Clb2 の分解が抑えられる。さらに Clb2 は転写因子である SBF に働きかけ、Cln2 の合成を抑える。このモデルでは MBF は SBF と同じ式で表現されているため、Clb の合成も抑制している。Swi5 は Clb2 が減少すると、反対に増加している。

続いて Reactor について述べる。図 1 のモデルに対応する数式 (論文に記載されている) を Structured Substance-Reactor Model に基づいて Reactor にすると、43 個の Reactor で表現することができた (うち 12 個は代数式 Reactor)。一部は Michaelis-Menten 式と同型であった。転写因子は活性型とそうでないものがあり、活性型を F とおいた場合、以下の Michaelis-Menten 式で表すことができる。

$$\frac{dF}{dt} = \frac{V_a(1-F)}{J_a + 1-F} - \frac{V_i F}{J_i + F}$$

さらに、 $V_{max}$  である  $V_a$  と  $V_i$  が十分大きいとすると、転写因子は次のような代数式で表せる。

$$F = G(V_a, V_i, J_a, J_i) = \frac{2\gamma}{\beta + \sqrt{\beta^2 - 4\alpha\gamma}}$$

ただし、 $\alpha = V_i - V_a$ ,  $\beta = V_i - V_a + V_a J_i + V_i J_a$ ,  $\gamma = V_a J_i$  である。

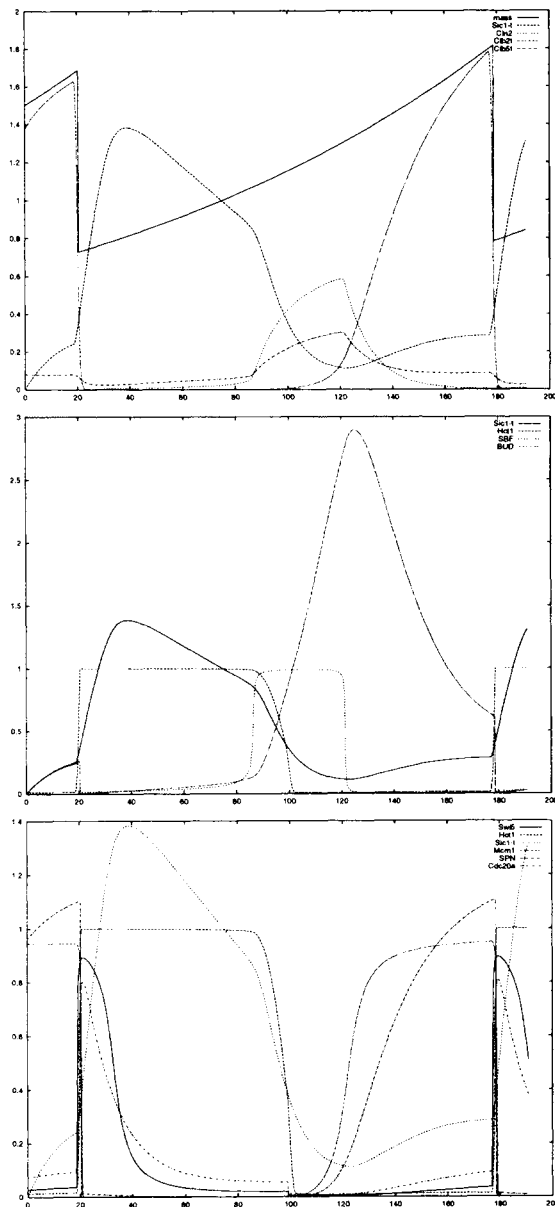


図2：シミュレーション結果

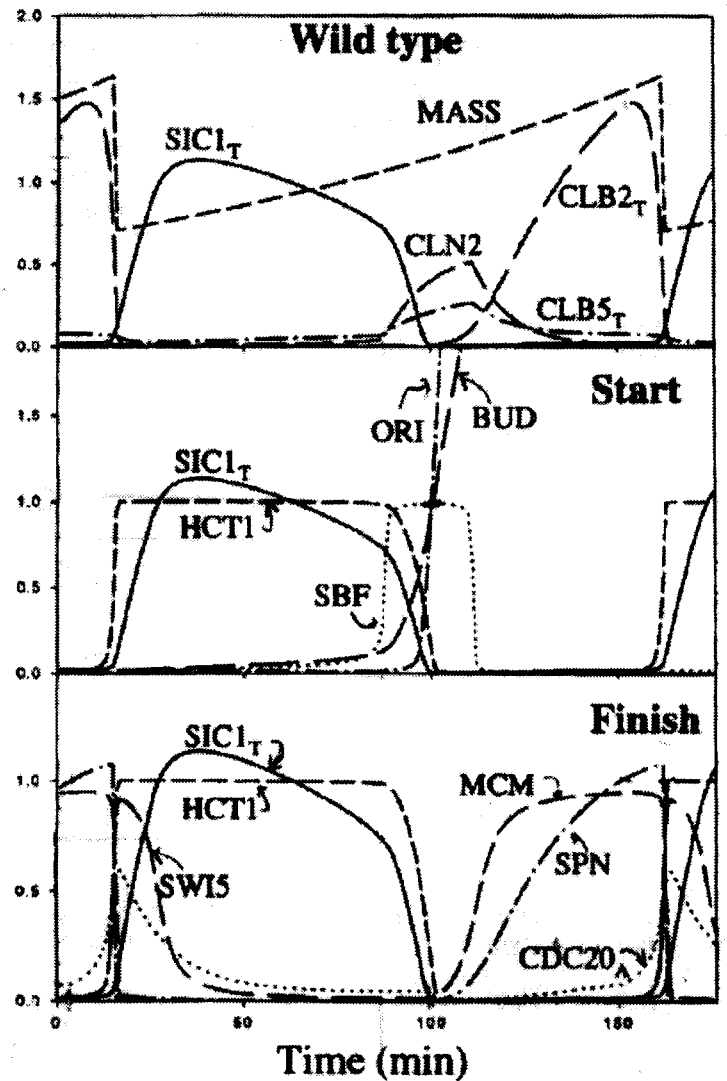


図3：論文のシミュレーション結果

また、先に述べたように出芽酵母は対称に分裂しないため、分裂後の細胞を大きい方(母細胞)と小さい方(娘細胞)を区別しなくてはならない。今回のシミュレーションでは娘細胞のシミュレーションを行った。両者の違いは分裂後の細胞の大きさ(このモデルでは mass)であり、細胞分裂の際の mass の計算は以下の式を用いて計算している。

$$[\text{娘細胞の mass}] = f * [\text{分裂時の mass}]$$

ただし、

$$f = e^{-\mu D}, D = (1.026/\mu) - 32 (\mu = \text{成長率})$$

### 4.3 シミュレーションに関する考察

#### ORIRector の問題

パラメータは論文に載っているものを用いてシミュレーションを行った。しかし、ORI の Reactor を入れると ORI の値が異常に増加し、周期が得られずうまく動かないという問題が発生した。先にも述べたように ORI は DNA が複製していることを便宜的に表すための Substance であり、他の反応の速度式に直接、影響を及ぼしてはいない。Cdc20 の不活性化に関わるパラメータが ORI が 1 を超した瞬間に変わるようにモデル化されている。この問題を解決するため、ORI の Reactor は使用せずに、ORI が 1 になる瞬間をグラフから読みとり、Reactor の中で時間を計るようにし、その時間がきたら ORI の値が 1 になるような Reactor を作成した。

#### 初期値問題

シミュレーション結果と元論文の結果を比べると、ほぼ同じような周期が見られたが、一部、相違点も見られた。例えば、Sic1t は論文のグラフを見ると一度 0 まで下がってから上昇するという周期を描くことが分かるが、E-CELL System を用いたシミュレーション結果では値が 0 まで下がっていない。この原因として、元論文に初期値に関する記載がなかったことが考えられる。今回のシミュレーションで用いた初期値は、グラフに出ている物質はグラフから読み取った値を用い、それ以外の物質に関しては自ら予想した適当な値をいれて補った。より正確な再現シミュレーションを行うためには、初期値推定を行う必要がある。

## 5 実験値との比較

出芽酵母の細胞周期に関する研究はこれまで数多く行われており、サイクリン等が細胞周期を通じて周期的に発現しているのは確かめられている。また近年マイクロアレイを用いて細胞周期に同調して周期的な発現が見られる遺伝子の研究も行われるようになり ([2][3])、その数は 800 とも言われている。またその発現データはスタンフォード大学が WEB 上で公開している。

([http://171.65.26.52/yeast\\_cell\\_cycle/full\\_data.html](http://171.65.26.52/yeast_cell_cycle/full_data.html), <http://cellcycle-www.stanford.edu>)

このようなデータはシミュレーション結果との比較によって、モデルの信憑性を確かめることができるので、ここでは両者を比較し、どの程度一致しているのかを調べた。

### 5.1 サイクリン Cln2、Clb2、Clb5 の mRNA 転写量との比較

Cln2、Clb2、Clb5 の 3 つのサイクリンの振る舞いを E-CELL System を用いたシミュレーション結果と、実験で求められたデータとを比較した。図 5 は転写量の変動を時間軸に沿ってみたグラフである ([2])。E-CELL System を用いたシミュレーション結果も図 5 のグラフと同様に転写量全体の平均値で割った値を縦軸にとった (図 4)。

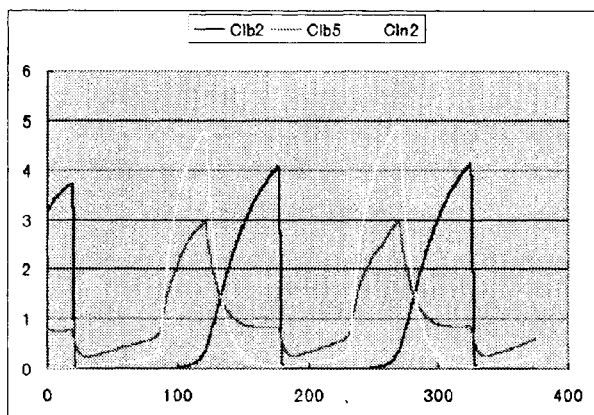


図4：シミュレーション結果2周期分(サイクリン)

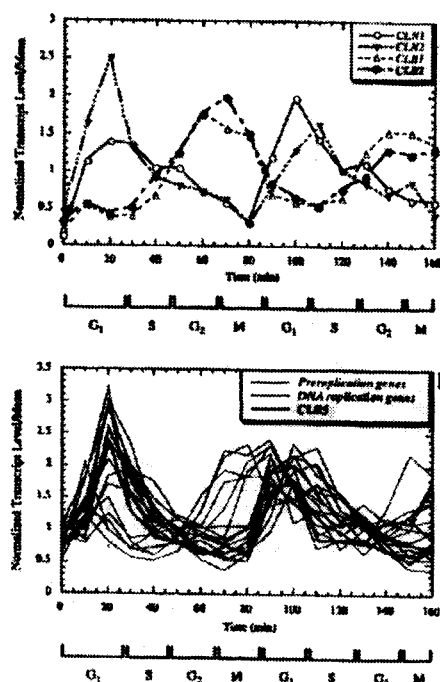


図5：論文の転写量 ([2])

シミュレーション結果と実験結果では成長率が異なるので、1周期にかかる時間は異なっている。しかし、両者のピークの出現タイミングを見るとほぼ一致しているといえる。つまり Cln2 と Clb5 が似たような周期出現パターンをとっており、Clb2 はそれらに遅れてピークが現れている。ここで比較した論文 [2] における実験値はサイクリンのものしか載っていなかったため、その他関連物質は次に述べる。

## 5.2 マイクロアレイを用いた発現量との比較

続いて、シミュレーション結果をマイクロアレイを用いた実験 ([3]) で得られたデータと比較した。実験は3種類の方法で行っているが、それぞれ異なる方法で細胞同調をさせている。今回モデルが野生型のものであったので、比較するデータも変異体ではなく、野生型を用いたものを使用した。実験結果は細胞同調が崩れるまで培養させて得たものである。データはWEBにあったものをダウンロードして使用し、グラフは図6のようになった。

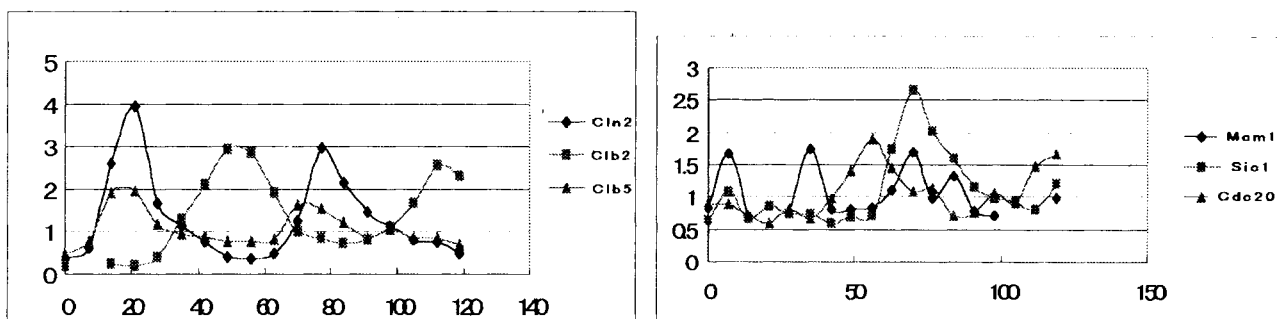


図6：マイクロアレイを用いた発現データ

これらと図2に示したシミュレーション結果を比較していえることは、3つのサイクリン Cln2、Clb2、Clb5 に関しては、ほぼ同様の波形をとっている。しかし、図6の右のグラフに示した転写因子を構成するタンパク質等はあまり一致していないといえる。

### 5.3 シミュレーション結果と実験値の比較に関する考察

今回は発現データと、シミュレーション結果とを比較することを行った。次に今後の展望を述べるが、今後シミュレーションデータを発現データにチューニングするということを考えている。今の時点で発現データの信用性が薄いとしても、将来的にはマイクロアレイの精度も向上し、詳細な発現データが蓄積されると予想されており([8])、シミュレーション結果を実験値に合わせるということは今後シミュレーションをしていく上で重要なテーマとなると考えられる。そのため、実験値に合うようにチューニングをすることには意義があり、その手法の蓄積は E-CELL System の発展にも必要不可欠である。

## 6 今後の展望

今回は Tyson らのモデルを用いてほぼシミュレーションを再現することができた。今後の展望としては、モデルは今回のものを使用してマイクロアレイのデータに合うようにチューニングを行うことを考えている。その簡単な方針を以下に示す。

- 再現シミュレーションをした際に、ORIRector を用いないで時間を計る Reactor で代用してしまった部分を、ORI 発現箇所のパラメータをチューニングして使えるようにする。
- モデルに関して、今回のモデルでは Clb2 が Swi5 の発現を負に調節しているが、正に調節すると記述されている論文([2])もあった。そのため関連文献を調べて、モデルの改善が必要であれば変える。この点に限らず、良いモデルがあれば適宜改善していく。
- サイクリンに関してはほぼ同じような周期をとっていたが、転写因子を構成するタンパク質やサイクリンを阻害するタンパク質の発現量が一致しなかった。そのため、マイクロアレイを用いた実験による発現データに合うようにチューニングする。
- 常にシミュレーションを行っているもの、細胞周期に必須な物質の発現データを調べている論文を調査し、吟味してモデルに採用する。

## 謝辞

最後にこのプロジェクトを行うにあたり、様々な面でサポートして頂いた環境情報学部教授の富田勝氏にこの場を借りて感謝の意を表したい。

## 参考文献

- [1] Katherine C. Chen, Attila Csikasz-Nagy, Bela Györfy, John Val, Bela Novak, and John J. Tyson; Kinetic Analysis of a Molecular Model of the Budding Yeast Cell Cycle, *Molecular Biology of the Cell*, Vol.11,369-391:2000
- [2] Cho, R.J., et al. A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol. Cell*, Vol.2,65-73:1998
- [3] Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D., Futcher, B.; Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. Cell*, Vol.9,3273-3297:1998
- [4] Michael D. Mendenhall, Amy E. Hodge; Regulation of Cdc28 Cyclin-Dependent Protein Kinase Activity during the Cell Cycle of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Reviews*, Vol.62, No.4, 1191-1243:1998
- [5] Gian Luigi Russo, Christian Van Den Bos, Ann Sutton, Paola Coccetti, Maurizio D. Baroni, Lilia Alberghina and Daniel R. Marshak; Phosphorylation of Cdc28 and regulation of cell size by the protein kinase CKII in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. J.* 351,143-150:2000
- [6] Kim Nasmyth, Gunther Adolf, David Lydall, and Angela Seddon; The Identification of a Second Cell Cycle Control on the HO Promoter in Yeast: Cell Cycle Regulation of SWI5 Nuclear Entry; *Cell*, Vol.62, 631-647:1990
- [7] Curt Wittenburg, Katsunori Sugimoto, and Steven I. Reed; G1-Specific Cyclins of *S. cerevisiae*: Cell Cycle Periodicity, Regulation by Mating Pheromone, and Association with the p34<sup>CCDC28</sup> Protein Kinase; *Cell*, Vol.62, 225-237:1990
- [8] DeRisi J.L., Iyer V.R., Brown P.O.; Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale; *Science*, Vol.278, 680:1997
- [9] Drick, L., Böhm, T., and Nasmyth, K.; Roles and regulation of Cln/Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*, *EMBO J.*, Vol.4, 4803-4813:1995
- [10] Richardson, H., Lew, D.J., Henze, M., Sugimoto, K., and Reed, S.I.; Cyclin-B homologs in *Saccharomyces cerevisiae* function in S phase and in G2. *Genes Dev.*, Vol.6:2021-2034
- [11] Richardson, H.E., Wittenberg, C., Cross, F., and Reed, S.I. An essential G1 function for cyclin-like proteins in yeast, *Cell* 59, 1127-1133:1989
- [12] Schob, E. and Nasmyth, K. CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* Vol.7, 1160-1175:1993



E-CELL System を用いた出芽酵母の細胞周期シミュレーション

---

---

2001年3月30日 初版発行

著者 藤田由起

監修 富田勝

---

発行 湘南藤沢学会

〒252-0816 神奈川県藤沢市遠藤5322

TEL:0466-49-3437

---

Printed in Japan 印刷・製本 ワキブプリントピア

---

**SFC-SWP 2000-A-006**

■ 本論文は研究会において優秀と認められ、出版されたものです。