

# 物質生産性向上を目的とした生体内反応系ネットワーク制御機構の 解析システムの開発

研究代表者 : 濱田 浩幸 hamada@brs.kyushu-u.ac.jp

共同研究者 : 田島慶彦・木坂裕・花井泰三・岡本正宏

九州大学大学院農学研究院

生物機能科学部門生物機能制御学講座生物機能制御学分野

## 【緒言】

国内外で精力的に進められている種々のゲノム・プロジェクトは、ヒトを含む多種多様な生物の DNA 塩基配列の決定と、遺伝子ネットワークの相互作用を解明することを目的としている。ゲノム研究の次なる目標は、遺伝子ネットワークの産物ともいえるべき、代謝系、シグナル伝達系などの生体内反応系ネットワークを genotype から phenotype まで包括的に明らかにすることである。ポストゲノム研究で着目されているシステム生物学では、これを実現するため、*in silico* 実験により生体内反応系ネットワークの制御機構をシステム解析し、新規経路の創出や代謝経路における支配因子の探索を行い、*in vivo* または *in vitro* 実験を鋭意に進行させる情報駆動型研究戦略が有効であると考えられている。しかしながら、genotype から phenotype までの多段階の反応機構を包括的に扱うシステム解析法は構築されていない。そこで、本研究では、生体内反応系ネットワークが有する制御機構の解明を通して、*in silico* 実験による genotype から phenotype に至る包括的なシステム解析法の確立をめざし、その有用性を検討することにした。目的を達成するために、まず、遺伝子ネットワークと代謝ネットワークが相互作用する数理モデルを構築し、そして、キネティックパラメータおよび化学種濃度の変化が数理モデルに与える影響を評価する感度解析システムを開発する。感度の高い経路を操作することにより、新規能力を有する phenotype の創造が期待され、将来的には、物質生産能の向上、高付加価値物質の創出を試みる。本報告では、生体内反応系の根幹である細胞周期の数理モデルを構築し、遺伝子およびタンパク質の発現に関与するキネティックパラメータが化学種濃度の定常状態におよぼす影響を解析する方法を検討した。

## 【方法】

代表的な生体内反応系ネットワークの1つである細胞周期の制御機構の解明は、物質生産性の向上、高付加価値物質の創出、疾病の解明および治療などにおいて重要な課題となっている。しかしながら、多種多様の化学種を含む細胞周期をシステムとして捉えた場合、生化学実験による解析は困難を伴う。本研究では、哺乳類の細胞周期制御機構の遺伝子および代謝ネットワークを数理モデル化し、システム解析により細胞周期制御機構の支配因子の同定を試みた。そして、支配因子がネットワークに与える影響を精査し、*in vivo* または *in vitro* 実験で得られた生物学的知見との整合性を確認することで、解析法の妥当性を検討した。

### 細胞周期制御機構

哺乳類の細胞周期は、Gap1(G1)、Synthetic(S)、Gap2(G2)、Mitotic(M)および Gap0(G0)期から構成される不可逆過程の生体内反応系ネットワークである。これらの期の移行期、G1-to-S、G2-to-M および G0-to-G1 期には、複数の Cyclin が関与する細胞周期異常の監視機構(チェックポイント)が存在し、細胞増殖の恒常性を維持する上で重要な役割を果たしている。本報告では、G1-to-S および G2-to-M 期の数理モデルを構築し、数理モデルのシステム解析を行い、支配因子の同定を行った。

### G1-to-S 期の反応機構

G1-to-S 期の反応機構に関する生物学的知見は、Sherrら、Nurseら、Lundbergらをはじめ、多くの生物学者により報告されている。これらの報告を踏まえて、G1-to-S 期の反応スキームを構築した(図1)。G1-to-S 期の主要な化学種は、CyclinD (CycD)、CyclinE (CycE)、CyclinA (CycA)、Cyclin Dependent Kinase 2(CDK2)、CDK4、p16、p27、E2 promoter binding factor(E2F) および Retinoblastoma protein(RB)である。G1 期に活性を持つ CycD と CDK4 の複合体(CycD/CDK4)が、RB と E2F の複合体(RB/E2F)をリン酸化し、CycE および CycA の転写因子である活性型 E2F のレベルを上昇させる。E2F によって合成された CycE および CycA は、CDK2 と複合体を形成し、RB/E2F のリン酸化に正のフィードバック作用をおよぼす。一方、p16 および p27 は RB/E2F のリン酸化を抑制し、さらに、E2F は CycA のレベルの上昇に伴い転写能の抑制が促進される。活性型 CycE/CDK2 (aCycE/CDK2) のレベルのピーク時刻とともに G1 期は終了し、S 期へ移行する。図1の反応スキームを基に、G1-to-S 期の数理モデルを構築した。

## G2-to-M 期の反応機構

G2-to-M 期の反応機構に関する生物学的知見も、G1-to-S 期に比して少ないが、Ruthらなどにより反応経路が徐々に明らかになっている。これらの報告を踏まえて、G2-to-M 期の反応スキームを構築した(図2)。G2-to-M 期の主要な化学種は、p53、p21、Cdc25、Wee1、Cyclin B と Cdc2 の複合体である M phase Promoting Factor (MPF) および 14-3-3 である。有糸分裂開始前に DNA の損傷部位を修復する G2-to-M 期のチェックポイントは、G2 期までに発生した DNA の損傷の有無で異なるダイナミクスを呈する。DNA の損傷が無い場合は、Cdc25 が preMPF をリン酸化し、MPF のレベルを上昇させ、遅滞なく M 期を開始する。一方、DNA の損傷を伴う場合は、DNA 損傷シグナルによる p53 のレベルの上昇に伴い p21 および 14-3-3 のレベルが上昇する。p21 は MPF を拘束し、14-3-3 は Cdc25 と複合体を形成するため、MPF のレベルは上昇しない。したがって、DNA 損傷シグナルが低下するまで、MPF のレベルは上昇できず、M 期の開始は遅延する。図2の反応スキームを基に G2-to-M 期の数理モデルを構築した。

## システム解析

数理モデルの物質収支式において、キネティックパラメータは独立変数、化学種濃度は従属変数と考えることができる。数理モデルに初期設定した独立変数を用いて定常状態値を算出し、数理モデルの安定性を確認した。さらに、独立変数の変化が従属変数の定常状態値に与える影響と、摂動に対するモデルの頑健性を網羅的に検討した。安定性は、定常状態値を用いて算出した支配方程式のヤコビ行列の固有値を、リアプノフの安定性理論にしたがい評価した。固有値は摂動などに対するモデルの応答挙動を定性的に表現し、固有値の実部が負値ならば摂動による過渡状態を経た後、ダイナミクスは安定状態(定常状態値)に快復する。また、固有値の実部の絶対値が大きいほど、過渡応答時間は短くなる。

## 【結果】

細胞周期の G1-to-S および G2-to-M 期の数理モデルを構築し、数値シミュレーションにより定常状態値を算出した。定常状態値を用いて、支配方程式のヤコビ行列の固有値を算出し、システム解析を行い、数理モデルの安定性および頑健性を評価した。

## G1-to-S 期の数理モデルの構築

図1の G1-to-S 期の反応スキームを基に、G1-to-S 期の数理モデルを構築した。G1-to-S 期の数理

モデルのキネティックパラメータ、化学種および物質収支式を表1～3に示す。物質収支式は、19個の化学種および48個の速度定数から構築された。また、表1および2に示したパラメータセットを G1-to-S 期の標準パラメータセットとした。

### G2-to-M 期の数理モデルの構築

図2のG2-to-M期の反応スキームを基に、G2-to-M期の数理モデルを構築した。G2-to-M期の数理モデルのキネティックパラメータ、化学種および物質収支式を表4～6に示す。物質収支式は、18個の化学種および41個の速度定数から構築された。また、表4および5に示したパラメータセットを G2-to-M期の標準パラメータセットとした。

### G1-to-S 期の数理モデルのシステム解析

表1～3のキネティックパラメータ、化学種初期濃度および物質収支式を用いて、G1-to-S期の化学種濃度のダイナミクスを算出し、生物学的知見と比較した(図3)。図3の定常状態値を用いて、支配方程式のヤコビ行列の固有値を算出し、定常状態のモデルの安定性を確認した(表7)。また、標準パラメータセットを10%ごと増減させ、網羅的に化学種濃度の定常状態値を算出し、それぞれの定常状態の安定性を確認した(表8)。

### G2-to-M 期の数理モデルのシステム解析

表4～6のキネティックパラメータ、化学種初期濃度および物質収支式を用いて、G2-to-M期の化学種濃度のダイナミクスを算出し、生物学的知見と比較した(図4)。図4の定常状態値を用いて、支配方程式のヤコビ行列の固有値を算出し、定常状態のモデルの安定性を確認した(表9)。また、標準パラメータセットを10%ごと増減させ、網羅的に化学種濃度の定常状態値を算出し、それぞれの定常状態の安定性を確認した(表10)。

## 【考察】

細胞周期は G1、S、G2、M、そして G0 期と進行し、未分化の細胞を除く多くの細胞は G0 期で休止している。細胞周期の主要なダイナミクスは G1 期から M 期にて生起するため、G1 期から M 期に至る一連の反応機構の解明および制御は、物質生産、高付加価値物質の創出、疾病の解明および治療などあらゆる分野において有用性が高い。G1 期から M 期までの細胞周期の数値シミュレーションを実施するに

は、G1-to-S 期または G2-to-M 期など複数の期間でシグナル伝達の役割を果たす CycD、CycE、CycA および MPF のダイナミクスを忠実に再現する数理モデルを構築する必要がある。これまで、個別の Cyclin のダイナミクスに着目した数理モデルは提案されてきたが、本研究では、細胞周期全体の数値シミュレーションを実現するため、複数の Cyclin が同時に関与する G1-to-S 期および G2-to-M 期の数理モデルを構築した。数理モデルを用いて算出した G1-to-S 期および G2-to-M 期の化学種濃度のダイナミクスは、生物学的知見と定性的にはほぼ一致し、数理モデルの妥当性が高いことが示唆された(図3および4)。これまで、哺乳類の細胞周期の複数の期を対象にした数理モデルは提案されておらず、本研究で構築した数理モデルは、細胞周期全体の数値シミュレーションを実現するうえで、非常に有用性が高い。

構築した数理モデルを用いて G1-to-S 期および G2-to-M 期の各化学種濃度の定常状態の安定性および頑健性を評価した。標準パラメータセットを用いて算出した G1-to-S 期および G2-to-M 期の定常状態は安定であった(表7および9)。標準パラメータセットを用いた数値シミュレーションは正常な細胞周期の化学種濃度のダイナミクスを良好に再現したことから(図3および4)、正常な G1-to-S 期および G2-to-M 期の反応系は、種々の摂動に対して過渡応答時間を経た後、定常状態に快復する能力が高いことが示唆された。また、この見解はダイナミクスの揺らぎを創出する一因である可能性もある。

細胞周期機構の破綻の主な原因として、各種タンパク質の劣化、変性および失活が考えられる。標準パラメータセットと異なるキネティックパラメータ値を数理モデルに用いれば、化学種または酵素の劣化、変性および失活を想定した数値シミュレーションを実施できる。G1-to-S 期および G2-to-M 期の数理モデルのキネティックパラメータを10%ごと増減させ、網羅的に定常状態の数理モデルの安定性を評価した。G1-to-S 期の数理モデルでは、961条件のうち522条件(54.3%)の定常状態が安定であり、様々なダイナミクスを含む500通り以上の定常状態を示した(表8)。定常状態が安定な522条件において、正常な定常状態と最も異なる定常状態を創出するキネティックパラメータを探索した。このようなキネティックパラメータは、数理モデルのダイナミクスに与える影響が最も大きく、数理モデルの支配因子と考えることができる。G1-to-S 期の数理モデルでは、p27と aCycE/CDK2 の結合および解離の速度定数  $k_9$  および  $k_{10}$  が支配因子であった。 $k_9$  および  $k_{10}$  は可逆反応の速度定数であることから、これらの比率( $k_9 / k_{10}$ ) が支配因子である可能性がある。そこで、 $k_9$  を130%、 $k_{10}$  を40%に設定し算出した CycE および CycA

のダイナミクスと標準パラメータセットのダイナミクスを比較した(図5)。 $k_9$  および  $k_{10}$  を変更して算出した CycE および CycA のダイナミクスは CycA が CycE より早期に最大値時刻を呈しており、G1-to-S 期の制御機構が大きく崩壊していることが示された。ガン化した細胞では、p27 の発現レベルが低い特徴を呈することが知られており、 $k_9$  および  $k_{10}$  の反応経路の慢性的な機能低下または不全がガン化に関与している可能性が示唆された。したがって、G1-to-S 期の破綻を回避するには、 $k_9$  および  $k_{10}$  の反応経路を標的にしたシステム制御または構築(ガンにおいては治療)が好ましいことが示された。一方、G2-to-M 期の数理モデルでは、628条件のうち293条件(46.6%)の定常状態が安定であり、様々なダイナミクスを含む290通り以上の定常状態を示した(表10)。定常状態が安定な293条件において、正常な定常状態と最も異なる定常状態を創出するキネティックパラメータを探索した。G2-to-M 期の数理モデルでは、Wee1p の脱リン酸化反応の速度定数  $k_{-17}$  が支配因子であった。そこで、 $k_{-17}$  を10%から100%の範囲で設定し算出した MPF のダイナミクスと DNA 損傷がない場合のダイナミクスを比較した(図6)。DNA 損傷があるにもかかわらず、MPF のダイナミクスは  $k_{-17}$  の低下とともにピーク時刻が早まった。これは、DNA 損傷を修復することなく M 期に進行することを意味しており、G2-to-M 期の制御機構が大きく崩壊していることが示された。ガン化した細胞では、p27 と同様に、Wee1 の発現レベルが低い特徴を呈することも知られており、 $k_{-17}$  反応経路の慢性的な機能低下または不全もガン化に関与している可能性が示唆された。したがって、G2-to-M 期の破綻を回避するには、 $k_{-17}$  反応経路を標的にしたシステム制御または構築(ガンにおいては治療)が好ましいことが示された。

G1-to-S 期および G2-to-M 期のシステム解析において、それぞれ、キネティックパラメータが異なる条件下で、500通りおよび290通り以上の定常状態を呈した。生体内反応系がこのような複数の定常状態を有することは、生命の多重保証システムの構成に不可欠である。細胞周期の恒常性を維持する能力は、これら複数の定常状態に保障されている可能性がある。一方、これらの定常状態には、正常な化学種濃度のダイナミクスと大きく異なる場合も含まれており、ガン化した細胞が、無限増殖能を獲得する1つの要因になっている可能性もある。今後は、ガン化に好都合な定常状態を排除する機構、すなわち、アポトーシスの制御機構などを考慮したより詳細な数理モデルを構築し、システム解析を行い、細胞周期の制御機構の解明を目指す。

## 【まとめ】

遺伝子ネットワークと代謝ネットワークが相互作用する生体内反応系として、細胞周期を取り上げ、G1-to-S 期および G2-to-M 期の数理モデルを構築した。構築した数理モデルを用いて、化学種濃度の定常状態の解析およびキネティックパラメータが化学種濃度のダイナミクスに与える影響を検討した。G1-to-S 期および G2-to-M 期の数値シミュレーションは、生物学的知見と定性的に良好な一致を示した。また、キネティックパラメータの感度解析により G1-to-S 期および G2-to-M 期の支配因子を特定し、それらが生物学的に着目されているガン化の支配因子と一致した。本研究で提案した、支配方程式のヤコビ行列の固有値、定常状態値の安定性および化学種濃度のダイナミクスを評価する解析法は、生体内反応系の頑強性、恒常性、安定性を解析するために有用性が高いことが示唆された。今後は、より大規模なシステムにおける本解析法の有用性を検討し、genotype から phenotype に至る包括的な生体内反応系の解析に取り組む予定である。

## 【謝辞】

本研究は、九州大学大学院農学研究院平成16年度若手助手支援プロジェクトの研究資金により実施した。

表1 G1-to-S 期の数理モデルのキネティックパラメータ

|                    |                      |                    |                |
|--------------------|----------------------|--------------------|----------------|
| $k_1 = 8.0$        | $k_9 = 4.0^*$        | $k_{28} = 0.01^*$  | $k_{41} = 2.0$ |
| $k'_1 = 0.5^*$     | $k_{10} = 0.035^*$   | $k_{29} = 0.001^*$ | $k_{42} = 0.3$ |
| $k''_1 = 0.5^*$    | $k_{17} = 0.1$       | $k_{31} = 0.5$     | $k_x = 0.016$  |
| $k'''_1 = 1.0$     | $k_{18} = 0.00001^*$ | $k_{32} = 4.0$     |                |
| $k_{-1} = 0.01^*$  | $k_{19} = 0.1$       | $k_{-32} = 0.05$   |                |
| $k_2 = 5.0$        | $k_{20} = 0.01^*$    | $k_{33} = 15.0$    |                |
| $k_{-2} = 0.3$     | $k_{21} = 0.4^*$     | $k_{34} = 0.1$     |                |
| $k_3 = 7.0^*$      | $k_{22} = 0.001^*$   | $k_{35} = 10.0$    |                |
| $k_4 = 0.000001^*$ | $k_{23} = 0.2^*$     | $k_{-35} = 0.04$   |                |
| $k_{-4} = 0.016^*$ | $k_{24} = 0.1^*$     | $k_{36} = 0.1$     |                |
| $k_5 = 0.05^*$     | $k_{25} = 0.01^*$    | $k_{37} = 3.8$     |                |
| $k_6 = 0.018^*$    | $k'_{25} = 0.02^*$   | $k_{-37} = 0.1$    |                |
| $k_{-6} = 0.8$     | $k_{26} = 0.01^*$    | $k_{38} = 0.01$    |                |
| $k_7 = 0.00001^*$  | $k'_{26} = 0.1^*$    | $k_{39} = 0.5$     |                |
| $k_8 = 2.0^*$      | $k_{27} = 0.01^*$    | $k_{40} = 0.035$   |                |

表2 G1-to-S 期の数理モデルの化学種

|                          |
|--------------------------|
| $aCycE/CDK2 = 0.001$     |
| $iCycE/CDK2 = 0.001$     |
| $RB/E2F = 1.95$          |
| $E2F = 0.0$              |
| $RB = 0.05$              |
| $CycD/CDK4 = 2.0$        |
| $p27 = 15.0$             |
| $p27/CycE/CDK2 = 1.0$    |
| $p27/CycD/CDK4 = 0.001$  |
| $p16 = 5.0$              |
| $RB\_PP = 0.01$          |
| $RB\_P/E2F = 0.001$      |
| $CycA = 0.00004$         |
| $CycE = 0.001$           |
| $aCycA/CDK2 = 0.0001$    |
| $iCycA/CDK2 = 0.0004$    |
| $p27/CycA/CDK2 = 0.0001$ |
| $CDK2 = 13.5$            |
| $X = 0.0001$             |



表3 G1-to-S 期の数理モデルの物質収支式

$$\begin{aligned} \frac{dY_1}{dt} &= k_2 Y_1 Y_2 + k_{10} Y_8 - (k_{-2} Y_1 + k_9 Y_1 Y_7 + k_{21} Y_1^2) \\ \frac{dY_2}{dt} &= k_{32} Y_{14} Y_{18} + k_{-2} Y_1 - (k_5 Y_2 + k_{-32} Y_2 + k_2 Y_1 Y_2) \\ \frac{dY_3}{dt} &= k_{-1} Y_4 Y_5 - (k'_1 Y_3 Y_6 + k''_1 Y_3 Y_9) \\ \frac{dY_4}{dt} &= k_1 Y_1 Y_{12} + k'_1 Y_{12} Y_{16} + k_4 + k_{18} Y_4 - (k_{-1} Y_4 Y_5 + k_{-4} Y_4 + k_{41} Y_4 Y_{15}) \\ \frac{dY_5}{dt} &= \frac{k_{26}}{1 + k_{26} Y_{10}} + k_{27} + k_{29} Y_{11} - (k_{-1} Y_4 Y_5 + k_{28} Y_5) \\ \frac{dY_6}{dt} &= k_6 + k_{20} Y_9 - (k_{-6} Y_6 + k_{17} Y_6 Y_{10} + k_{19} Y_6 Y_7) \\ \frac{dY_7}{dt} &= k_7 + k_{10} Y_8 + k_{20} Y_9 + k_{40} Y_{18} \\ &\quad - (k_8 Y_1 Y_7 + k_9 Y_1 Y_7 + k_{19} Y_6 Y_7 + k_{22} Y_7 + k_{39} Y_7 Y_{15} + k_{42} Y_7 Y_{15}) \\ \frac{dY_8}{dt} &= k_9 Y_1 Y_7 - k_{10} Y_8 \\ \frac{dY_9}{dt} &= k_{19} Y_6 Y_7 - k_{20} Y_9 \\ \frac{dY_{10}}{dt} &= k_{23} + \frac{k_{25}}{1 + k'_{25} Y_5} - (k_{17} Y_6 Y_{10} + k_{24} Y_{10}) \\ \frac{dY_{11}}{dt} &= k Y_1 Y_{12} + k' Y_{12} Y_{15} - k_{29} Y_{11} \\ \frac{dY_{12}}{dt} &= k' Y_3 Y_6 + k' Y_3 Y_9 - (k Y_1 Y_{12} + k' Y_{15} Y_{12}) \\ \frac{dY_{13}}{dt} &= k_x X + k_{-35} Y_{16} - (k_{34} Y_{13} + k_{35} Y_{13} Y_{18}) \\ \frac{dY_{14}}{dt} &= k_{33} Y_4 + k_{-32} Y_2 - (k_{31} Y_{14} + k_{32} Y_{14} Y_{18}) \\ \frac{dY_{15}}{dt} &= k_{37} Y_{15} Y_{16} + k_{40} Y_{17} - (k_{-37} Y_{15} + k_{39} Y_{15} Y_{15} + k_{38} Y_{15}) \\ \frac{dY_{16}}{dt} &= k_{35} Y_{13} Y_{18} + k_{-37} Y_{15} - (k_{36} Y_{16} + k_{-35} Y_{16} + k_{37} Y_{16} Y_{16}) \\ \frac{dY_{17}}{dt} &= k_{39} Y_{15} Y_{15} - k_{40} Y_{17} \\ \frac{dY_{18}}{dt} &= k_{21} Y_1^2 + k_5 Y_2 + k_{-32} Y_2 + k_{-35} Y_{16} + k_{36} Y_{16} + k_{38} Y_{15} \\ &\quad - (k_{32} Y_{14} Y_{18} + k_{35} Y_{13} Y_{18}) \\ \frac{dX}{dt} &= k_{33} Y_4 - k_x X \end{aligned}$$

[CDK2]=[Total CDK2]-[complexes including CDK2]

|                         |                   |                      |                      |
|-------------------------|-------------------|----------------------|----------------------|
| $Y_1$ :aCycE/CDK2       | $Y_2$ :iCycE/CDK2 | $Y_3$ :RB/E2F        | $Y_4$ :E2F           |
| $Y_5$ :RB               | $Y_6$ :CycD/CDK4  | $Y_7$ :p27           | $Y_8$ :CycE/CDK2/p27 |
| $Y_9$ :CycD/CDK4/p27    | $Y_{10}$ :p16     | $Y_{11}$ :RB-P*      | $Y_{12}$ :RB-P/E2F   |
| $Y_{13}$ :CycA          | $Y_{14}$ :CycE    | $Y_{15}$ :aCycA/CDK2 | $Y_{16}$ :iCycA/CDK2 |
| $Y_{17}$ :CycA/CDK2/p27 | $Y_{18}$ :CDK2    | $X$ :Intermediate X  |                      |

表4 G2-to-M 期の数理モデルのキネティックパラメータ

|                 |                    |                   |                   |
|-----------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| $k_1 = 0.2$     | $k_{11} = 0.1$     | $k_{24} = 10.0$   | $v_{in} = 1.0E-5$ |
| $k_2 = 1.0$     | $k_{-11} = 1.0$    | $k_{25} = 0.005$  | $K_m = 9.5$       |
| $k_3 = 1.0$     | $k_{12} = 0.01$    | $k_{26} = 0.004$  | $n = 9.0$         |
| $k_{-3} = 1.0$  | $k_{13} = 0.1$     | $k_{27} = 6.0$    | $k_{damp} = 0.02$ |
| $k_4 = 0.01$    | $k_{14} = 0.01$    | $k_{28} = 0.009$  | $k_{deg} = 0.772$ |
| $k_{-4} = 0.01$ | $k_{15} = 0.1$     | $k_{29} = 0.0556$ |                   |
| $k_5 = 1.0$     | $k_{16} = 2.0E-4$  | $k_{30} = 0.001$  |                   |
| $k_{-5} = 0.01$ | $k_{17} = 0.1$     | $k_{31} = 1.0$    |                   |
| $k_6 = 1.0$     | $k_{-17} = 1.0$    | $k_{32} = 0.0001$ |                   |
| $k_{-6} = 0.01$ | $k_{18} = 1.0$     | $k_{33} = 1.0E-8$ |                   |
| $k_7 = 0.01$    | $k_{19} = 1.0$     | $k_{ex} = 1.0$    |                   |
| $k_8 = 100.0$   | $k_{20} = 1.0$     |                   |                   |
| $k_9 = 0.0005$  | $k_{21} = 0.01$    |                   |                   |
| $k_{10} = 1.0$  | $k_{22} = 0.00094$ |                   |                   |
| $k_{-10} = 1.0$ | $k_{23} = 0.02$    |                   |                   |

表5 G2-to-M 期の数理モデルの化学種

|                             |
|-----------------------------|
| $Chk1 = 1.0$                |
| $Chk1p = 1.0E-6$            |
| $ATR = 0.2$                 |
| $p53 = 0.0265$              |
| $preMPF = 1.0E-6$           |
| $MPF = 1.0E-8$              |
| $p21 = 0.0$                 |
| $p21/MPF = 0.0$             |
| $iCdc25 = 1.0E-6$           |
| $iCdc25Ps216 = 2.0E-5$      |
| $iCdc25Ps216/14-3-3 = 0.03$ |
| $aCdc25 = 1.0E-6$           |
| $aCdc25Ps216 = 0.0$         |
| $14-3-3\sigma = 2.0$        |
| $Wee1 = 0.001$              |
| $Wee1p = 0.0$               |
| $Mdm2 = 2.35E-4$            |
| $I = 0.0$                   |
| $signal(0) = 5.0E-3$        |

表6 G2-to-M 期の数理モデルの物質収支式

$$\begin{aligned} \frac{dx_{1pre}}{dt} &= k_{-3} * x_1 - k_3 * x_{1pre} * x_2 \\ \frac{dx_1}{dt} &= k_3 * x_{1pre} * x_2 - k_{-3} * x_1 \\ \frac{dx_2}{dt} &= k_1 * [signal] - k_2 * x_2 \\ \frac{dx_3}{dt} &= k_{28} - k_{30} * x_3 - k_{29} * x_3 * x_{16} \\ \frac{dx_4}{dt} &= \frac{k_9}{(1 + k_{31} * x_3)} + k_{-10} * x_5 * x_{14} - k_{10} * (x_{11} + x_{12}) * x_4 \\ \frac{dx_5}{dt} &= k_{10} * (x_{11} + x_{12}) * x_4 + k_{-11} * x_7 - (k_{-10} * x_5 * x_{14} + k_{11} * x_5 * x_6 + k_{11} * x_5^2) \\ \frac{dx_6}{dt} &= k_{15} * x_3 + k_{14} + k_{-11} * x_7 - (k_{13} * x_6 + k_{11} * x_5 * x_6) \\ \frac{dx_7}{dt} &= k_{11} * x_5 * x_6 - k_{-11} * x_7 \\ \frac{dx_8}{dt} &= k_{-5} * x_{11} + v_{in} - k_5 * x_5 * x_8 \\ \frac{dx_9}{dt} &= k_{-6} * x_{12} - (k_6 * x_5 * x_9 + k_8 * x_9 * x_{13}) \\ \\ \frac{dx_{10}}{dt} &= k_8 * x_9 * x_{13} - k_{ex} * x_{10} \\ \frac{dx_{11}}{dt} &= k_5 * x_5 * x_8 + k_{-4} * x_{12} - (k_{-5} * x_{11} + k_4 * x_1 * x_{11}) \\ \frac{dx_{12}}{dt} &= k_4 * x_1 * x_{11} + k_6 * x_5 * x_8 - (k_{-4} * x_{12} + k_{-6} * x_{12}) \\ \frac{dx_{13}}{dt} &= k_{21} * x_3 + k_{20} - (k_8 * x_9 * x_{13} + k_{19} * x_{13}) \\ \frac{dx_{14}}{dt} &= k_{16} + k_{-17} * x_{15} - k_{17} * x_5 * x_{14} \\ \\ \frac{dx_{15}}{dt} &= k_{17} * x_5 * x_{14} - (k_{-17} * x_{15} + k_{18} * x_{15}) \\ \\ \frac{dx_{16}}{dt} &= k_{22} - k_{23} * x_{16} + k_{24} * x_{17} \\ \frac{dx_{17}}{dt} &= \frac{k_{27} * x_3 * [signal]}{1 + k_{26} * x_3 * x_{16}} - k_{25} * x_{17} \\ \\ [signal]_{T=t} &= [signal]_{T=0} * \exp(-k_{33} * Time\_h) \end{aligned}$$

|                     |                                       |                  |                       |
|---------------------|---------------------------------------|------------------|-----------------------|
| $X_1$ :Chk1p        | $X_2$ :ATR                            | $X_3$ :p53       | $X_4$ :preMPF         |
| $X_5$ :MPF          | $X_6$ :p21                            | $X_7$ :p21/MPF   | $X_8$ :iCdc25         |
| $X_9$ :iCdc25Ps216  | $X_{10}$ :iCdc25PS216/14-3-3 $\sigma$ | $X_{11}$ :aCdc25 | $X_{12}$ :aCdc25Ps216 |
| $X_{13}$ :14-3-3    | $X_{14}$ :Wee1                        | $X_{15}$ :Wee1p  | $X_{16}$ :Mdm2        |
| $I$ :Intermediate I | $X_{1pre}$ :Chk1                      |                  |                       |

表7 標準パラメータセットを用いた G1-to-S 期の数理モデルの安定性(固有値19個)

|        |       |          |          |           |       |       |
|--------|-------|----------|----------|-----------|-------|-------|
| -65.2  | -28.3 | -15.0    | -11.6    | -9.14     | -2.69 | -1.01 |
| -0.49  | -0.42 | -0.10    | -0.10    | -0.03     | -0.02 | -0.51 |
| -0.012 | -0.01 | -9.93E-3 | -1.00E-3 | -1.00E-15 |       |       |

表8 網羅的な条件における G1-to-S 期の数理モデルの安定性

| 正の固有値実部の個数<br>(モデルの安定性) |        | 正の固有値実部を持った<br>パラメータセット数 |
|-------------------------|--------|--------------------------|
| 0(安定)                   |        | 522                      |
| 1(不安定)                  | ↑<br>↓ | 436                      |
| 2(不安定)                  |        | 2                        |
| 3(不安定)                  |        | 1                        |
| 4以上(不安定)                |        | 0                        |

表9 標準パラメータセットを用いた G2-to-M 期の数理モデルの安定性(固有値18個)

|        |       |        |        |          |           |
|--------|-------|--------|--------|----------|-----------|
| -101.2 | -10.0 | -2.01  | -1.10  | -1.00    | -1.00     |
| -1.00  | -0.19 | -0.12  | -0.10  | -0.04    | -0.02     |
| -0.02  | -0.01 | -0.002 | -0.002 | -9.51E-5 | -6.22E-17 |

表10 網羅的な条件における G2-to-M 期の数理モデルの安定性

| 正の固有値実部の個数<br>(モデルの安定性) | 正の固有値実部を持った<br>パラメータセット数<br>(Damage有り) | 正の固有値実部を持った<br>パラメータセット数<br>(Damage無し) |
|-------------------------|--|--|
| 0(安定)                   | 293                                    | 590                                    |
| 1(不安定)                  | 334                                    | 0                                      |
| 2(不安定)                  | 1                                      | 0                                      |
| 3(不安定)                  | 0                                      | 0                                      |
| 4以上(不安定)                | 0                                      | 0                                      |

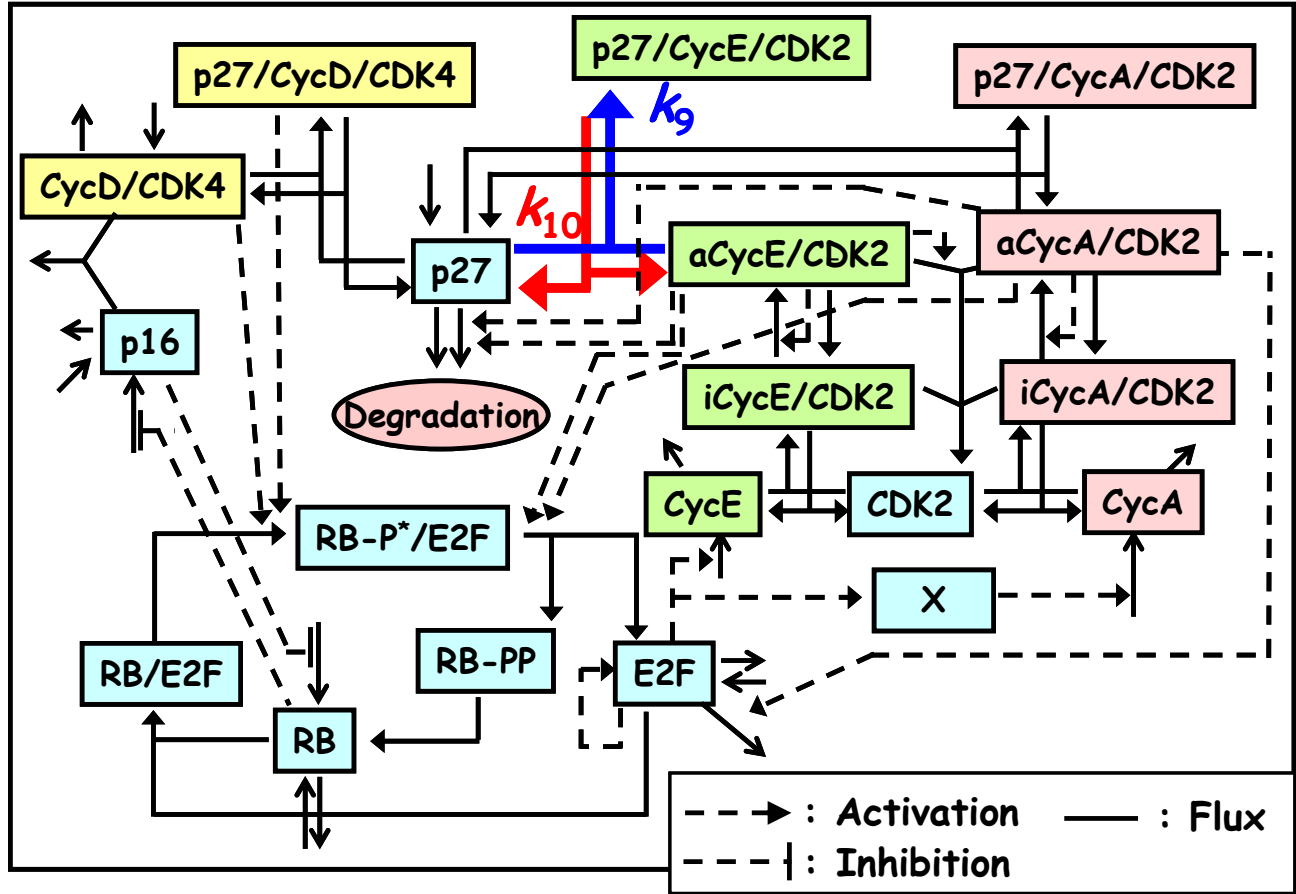


図1 G1-to-S 期の反応スキーム

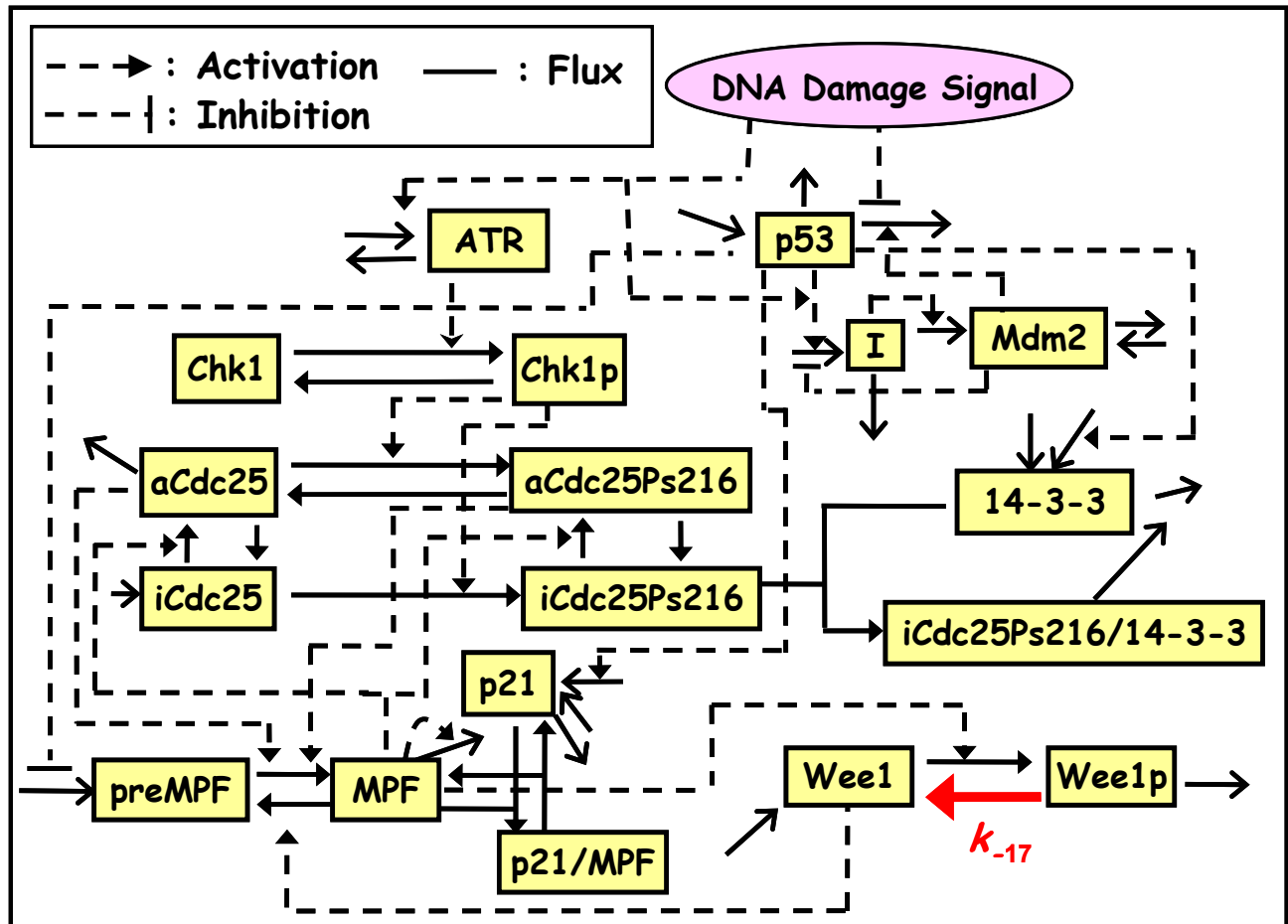
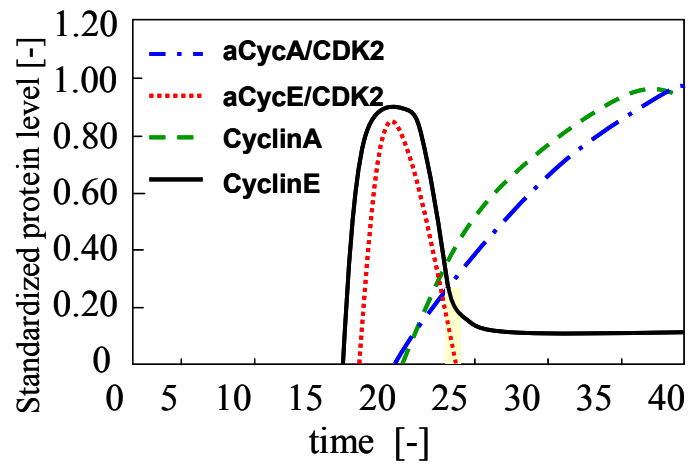


図2 G2-to-M 期の反応スキーム

a)



b)

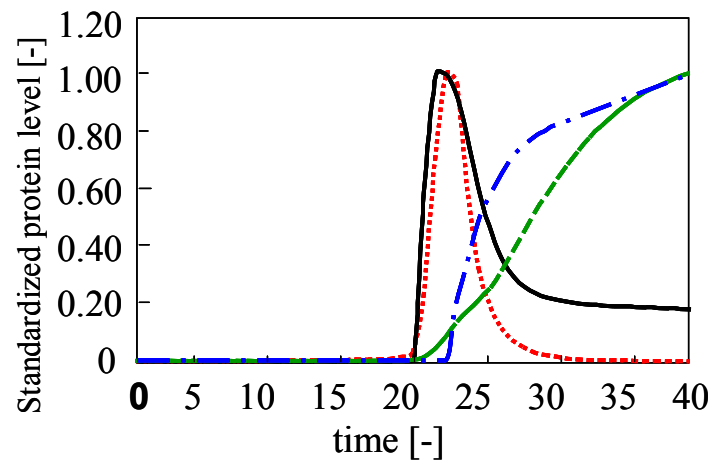


図3 G1-to-S 期の化学種濃度のダイナミクス

CycE、CycA、aCycE/CDK2 および aCycA/CDK2 の経時変化を示す。数値シミュレーション結果は生物学的知見と定性的に良好な一致を示した。

a) 生物学的知見による定性的なダイナミクス (Aguda)

b) 標準パラメータセットを用いた数値シミュレーション

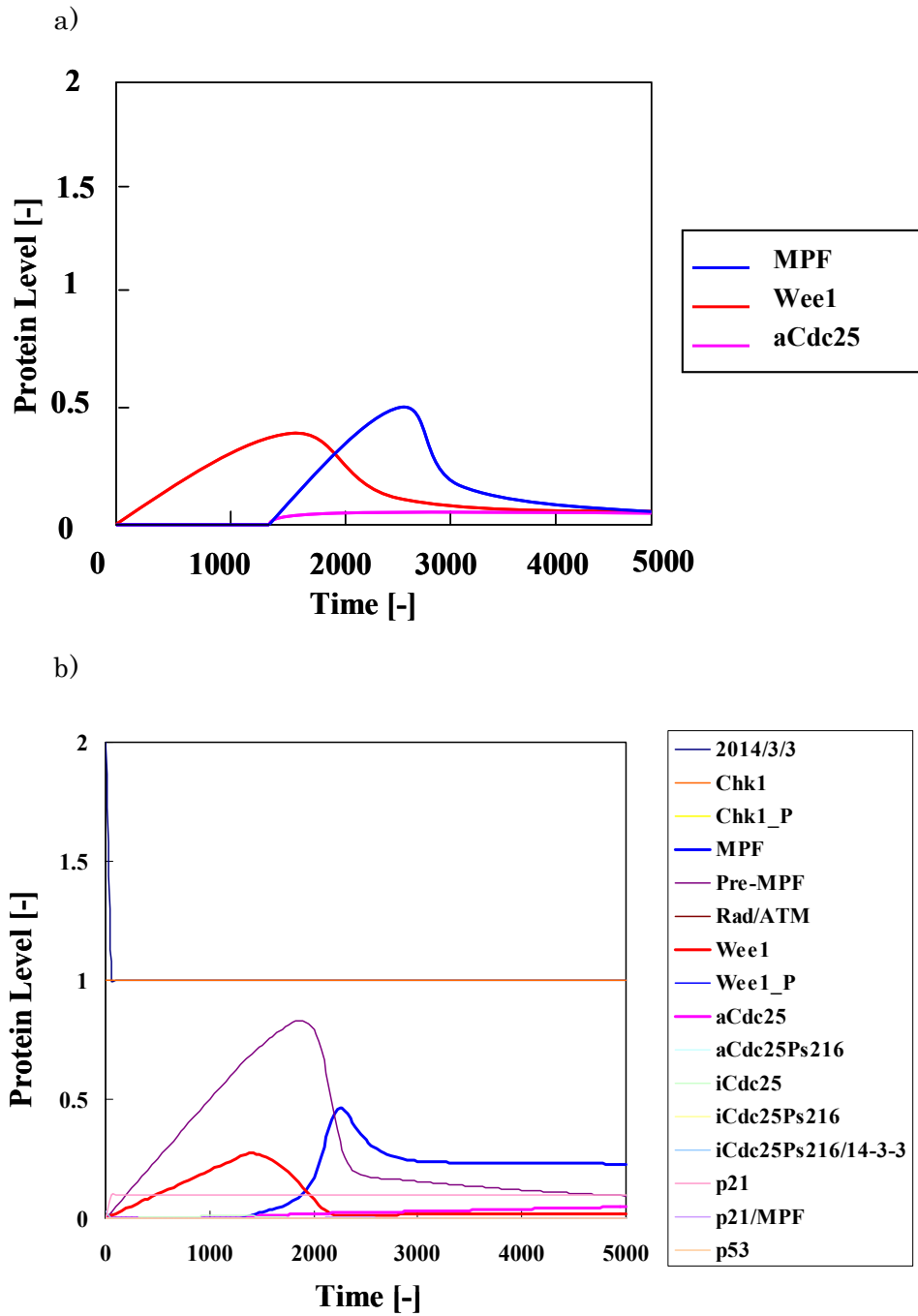


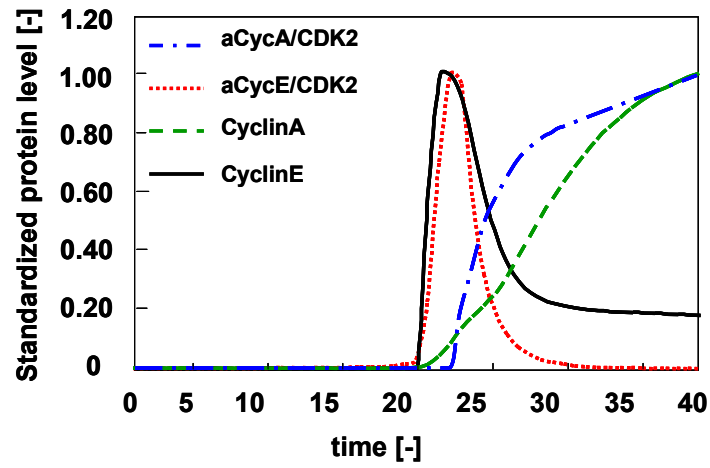
図4 G2-to-M 期の化学種濃度のダイナミクス

MPF、Wee1 および aCdc25 の経時変化を示す。数値シミュレーション結果は生物学的知見と定性的に良好な一致を示した。

- a) 生物学的知見による定性的なダイナミクス(Aguda)
- b) 標準パラメータセットを用いた数値シミュレーション



a)



b)

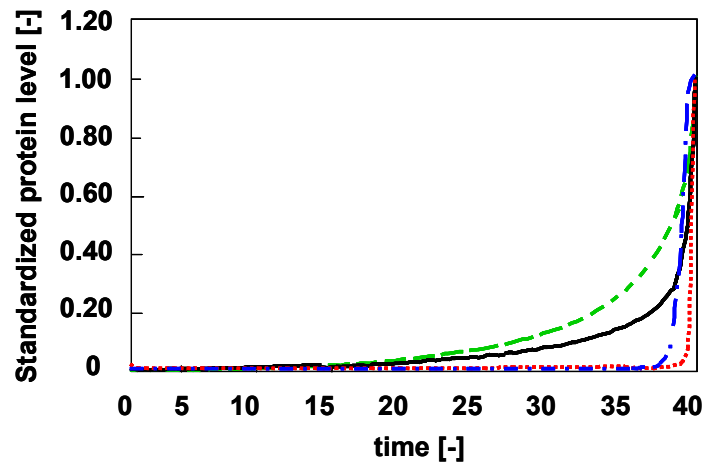


図5  $k_9$  および  $k_{10}$  が G1-to-S 期の CycE および CycA のダイナミクスに与える影響

CycE、CycA、aCycE/CDK2 および aCycA/CDK2 の経時変化のピーク時刻に大きな相違を生じた。

a) 標準パラメータセットを適用した場合のダイナミクス

b)  $k_9=130\%$ 、 $k_{10}=40\%$ に設定した場合のダイナミクス

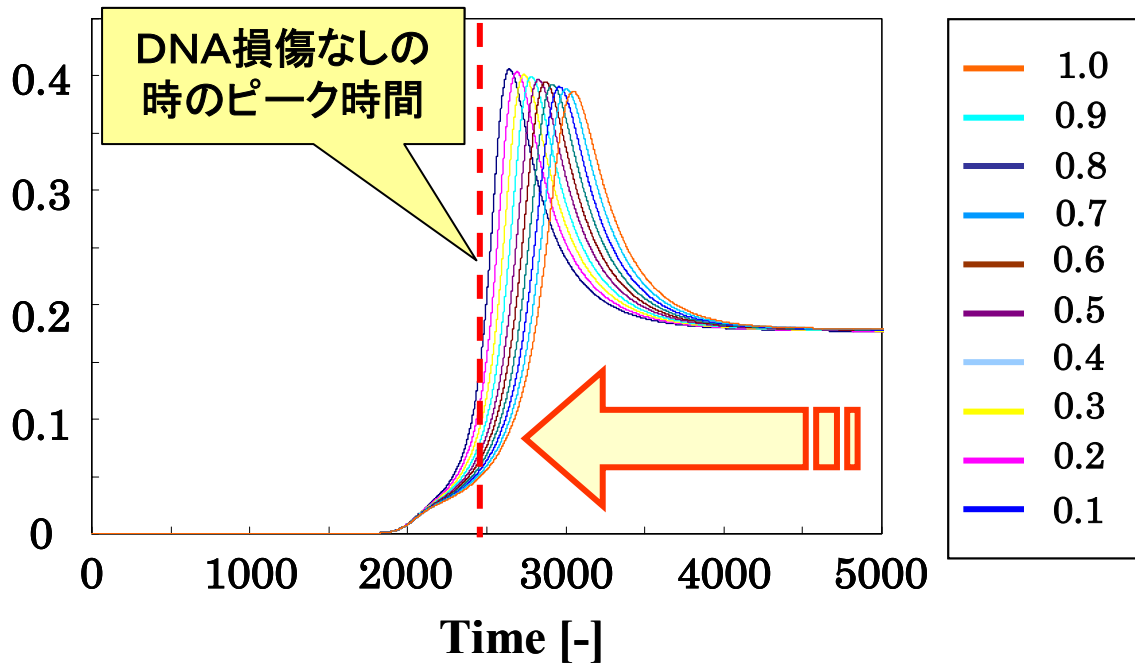


図6  $k_{17}$ がG2-to-M期のMPFのダイナミクスに与える影響(DNA損傷あり)

$k_{17}$ が低下すると、DNA損傷があるにも関わらずMPFのピーク時刻が早まった。

$k_{17}$  (標準パラメータ値=1.0)を100%から10%まで低下させた。

## 【参考文献】

- Akama, Y., Yasui, W., Yokozaki, H., Kuniyasu, H., Kitahara, K., Ishikawa, T., Tahara, E., Frequent amplification of the cyclin E gene in human gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res.* 86(7):617-621, 1995
- Bloom, J., Pagano, M., Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin Cancer Biol.* 13(1):41-47, 2003
- Bracken, A. P., Ciro, M., Cocito, A., Helin, K., E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem Sci.* 29(8):409-417, 2004
- Demetrick, D. J., Matsumoto, S., Hannon, G. J., Okamoto, K., Xiong, Y., Zhang, H., Beach, DH., Chromosomal mapping of the genes for the human cell cycle proteins cyclin C (CCNC), cyclin E (CCNE), p21 (CDKN1) and KAP (CDKN3). *Cytogenet Cell Genet.* 69(3-4):190-192, 1995
- Dulic, V., Lees, E., Reed, S. I., Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science.* 25;257(5078):1958-1961, 1992
- Dyson, N., The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 1;12(15):2245-2262, 1998
- Cobrinik, D., Pocket proteins and cell cycle. *Oncogene* 24:2796-2809, 2005
- Coqueret, O., Linking cyclins to transcriptional control. *Gene.* 16;299(1-2):35-55, 2002
- Harbour, J. W., Luo, R. X., Dei, Santi, A., Postigo, A. A., Dean, D. C., Cdk Phosphorylation Triggers Sequential Intramolecular that Progressively Block Rb Functions as Cells Move Through G1. *Cell* 98:859-869, 1998
- Hwang, H. C., Clurman, B. E., Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene.* 18;24(17):2776-2786, 2005
- Horowitz, J. M., Park, S.-H., Bogenmann, E., Cheng, J.-C., Yandell, D. W., Kaye, F. J., et al., Frequent inactivation of the retinoblastoma antioncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2775-2779, 1990
- Hulleman, E., and Boonstra, J., Regulation of G1 phase progression by growth factors and the extracellular matrix. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:80-93, 2001

Kamb A., Gruis N. A., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Harshman, K., Tavtigian, S.V., et al., A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264: 436-, 1994

Kastan M. B. and Bartek Jiri: Cell-Cycle checkpoints and cancer. *Nature* 18;432(7015): 316-323, 2004

Kohn, K. W., Molecular Interaction Map of the Mammalian Cell Cycle Control and DNA Repair Systems. *Mol. Biol. Cell* 10:2703-2734, 1999

Lee, M.H., and Yang, H.Y., Regulators of G1 cyclin-dependent kinases and cancers. *Cancer Metastasis Rev* 22: 435-449, 2003

Lundberg, A.S., Weinberg, R.A., Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol.* 18(2):753-761. 1998

Malumbres, M., Barbacid, M., To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer.* 1(3):222-231, 2001

Massagué, J., G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432;18:298-306, 2004

Nakayama, KI., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Regulation of the cell cycle at the G1-S transition by proteolysis of cyclin E and p27Kip1. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 282:853-860, 2001.

Nobori, T., Miura, K., Wu, D. J., Lois, A., Takabayashi, K., and Carson, D. A., Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368: 753-755, 1994

Quelle, D. E., Ashmun, R. A., Shurtleff, S. A., Kato, J. Y., Bar-Sagi, D., Roussel, M. F., Sherr, C. J., Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev.* 7(8):1559-1571. 1993

Ruth, L.B. *et al.*, Generation of oscillations by the p53-Mdm2 feedback loop: A theoretical and experimental study. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.*, 11250-11255, 2000

Schlisio, S., Halperin, T, Vidal, M., Nevins, J. R., Interaction of YY1 with E2Fs, mediated by RYBP, provides a mechanism for specificity of E2F function. *EMBO J.* 2002;21(21):5775-5786, 2002

Sherr, C. J., Cancer cell cycles. *Science* 6;274(5293):1672-1677, 1996

- Sherr, C. J., Roberts, J. M., CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 15;13(12):1501-1512, 1999
- Stevens, C., and La Thangue, N. B., E2F and cell cycle control: a double-edged sword. *Arch Biochem Biophys.* 15;412(2):157-169, 2003
- Swat, M., Kel, A., Herzog, H., Bifurcation analysis of the regulatory modules of the mammalian G1/S transition. *Bioinformatics.* 10;20(10):1506-1511, 2004
- Tsihlias, J., Kapusta, L., Slingerland, J., The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu Rev Med.* 50:401-23, 1999
- Tyson, J. J., Csikasz-Nagy, A., Novak, B., The dynamics of cell cycle regulation. *Bioessays.* 24(12):1095-1109, 2002
- Yam, C. H., Fung, T. K., and Poon, R. Y. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* 59:1317-1326, 2002
- Yamasaki, L., and Pagano, M., Cell cycle, proteolysis and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16:623-628, 2004
- Yew, P. R., Ubiquitin-mediated proteolysis of vertebrate G1- and S-phase regulators. *J Cell Physiol.* 187(1):1-10, 2001
- Yoshihiko Tashima, Taizo Hanai, Hiroyuki Hamada, Masahiro Okamoto. System analysis for mathematical model of G1-to-S cell cycle phase transition. The 10th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering (APCChE) P436:01-06, 2004