

「生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出」  
平成24年度採択研究代表者

H28 年度 実績報告書
-----------------

黒田 真也

東京大学大学院理学系研究科  
教授

時間情報コードによる細胞制御システムの解明

## § 1. 研究実施体制

### (1)「黒田」グループ

- ① 研究代表者:黒田 真也 (東京大学大学院 理学系、教授)
- ② 研究項目:時間情報コードのシステム解析
  - ・既知の代謝経路の時間情報コードの実験とモデリング
  - ・新規代謝経路の時間情報コードの経路同定と解析手法の開発

### (2)「石井」グループ

- ① 主たる共同研究者:石井 信 (京都大学大学院 情報学研究科、教授)
- ② 研究項目:データドリブンモデルを用いた時間情報コードの解析
  - ・時間情報コードに関するシステム同定と制御アルゴリズムの開発

### (3)「小澤」グループ

- ① 主たる共同研究者:小澤 岳昌 (東京大学大学院 理学研究科、教授)
- ② 研究項目:光制御とイメージングを用いた時間情報コードの解析

### (4)「藤井」グループ

- ① 主たる共同研究者:藤井 輝夫 (東京大学 生産技術研究所、教授)
- ② 研究項目:時間情報コード解析のためのマイクロ流体デバイスの開発
  - ・培養細胞を用いた細胞応答計測
  - ・グループ内共同利用に向けたマイクロ流体制御系の改良

## § 2. 研究実施の概要

### 1. 既知の代謝経路の時間情報コード

#### ・実験:計測系の確立と生化学反応モデル作成(黒田 G)

インスリン刺激と同様に、分化させた C2C12 細胞に対する電気刺激の筋収縮によるシグナル分子リン酸化の測定、代謝物の濃度の計測をおこなった。その結果、筋収縮後に解糖系、ペントースリン酸経路の代謝物濃度が増加することが明らかとなった。

#### ・ヒトの血中インスリンと血糖値の時間情報コード(黒田 G)

健常者、境界型、2 型糖尿病患者に対するグルコースクランプ、インスリンクランプ試験における血糖値、血中インスリン波形のデータから、ヒトにおけるインスリンによる血糖値制御の時間情報を解析した。インスリンとともに等モル分泌される C ペプチドの血中濃度も利用することで、インスリン分泌直後及び末梢血での 2 種類のインスリンクリアランスが、それぞれ耐糖能異常の進行とともに増加・減少という逆の変化を示すとともに、血中インスリン濃度の時間情報パターンの形成に深く関与することを見出した。この研究は神戸大学医学部糖尿病内科、小川渉博士との共同研究である。

### 2. 新規代謝経路の時間情報コード

#### ・新規代謝経路の同定法の開発(黒田 G)

肝がん由来の FAO 細胞を用いて、インスリンの様々な時間パターンおよび濃度に対する転写応答を解析した。実験および数理モデルを用いた解析の結果、インスリン刺激により発現が促進される遺伝子は、インスリンのステップ刺激・パルス刺激に対して速やかに応答するが、抑制される遺伝子は低い濃度のインスリンで応答することが明らかになった (佐野ら, *Sci. Signal.* 2016)。また、健常マウスと 2 型糖尿病モデルマウスである *ob/ob* マウスを用いてグルコース負荷における、肝臓・筋肉・脂肪組織におけるトランスクリプトーム、メタボローム、プロテオームデータを取得した。肝臓のプロテオーム、メタボローム、トランスクリプトームデータを元に各階層の解析および階層間のつながりを解析した。

#### ・神経細胞 spine における確率的な反応と情報コード(黒田 G)

神経細胞樹状突起上 spine における情報伝達の特徴である、robustness, sensitivity, efficiency を生み出すメカニズムを解析し、これらの特性が全て spine の小ささに起因していることを見出した (藤井ら, *Biophys. J.* 2017)。

#### ・データドリブンモデルの開発(黒田 G、石井 G)

黒田らは、工学院大学の小西らとの共同研究を開始して、不等間隔データからの Hill 式と線形時間フィルタから統計モデルを適用できる手法を開発した。この手法を用いて、時間スケールの早いシグナル伝達のリン酸化反応と時間スケールの遅い遺伝子発現間のネットワーク構築を行った。

また石井らは、ブラックボックスモデリングに基づくシステム同定法の開発を継続し、ヒト糖代謝系のシステム同定とそれに基づく個体差の解析を行った。また、開発した入力時間パターン最適化法を、インスリンシグナル伝達系および EGF シグナル伝達系の微分方程式モデルに適用し、手法の有効性を確認した (村上ら, *Biophysics and Physicobiology* 2017)。さらに、ブドウ糖摂取時

間パターンの最適化を行い、ヒト経口ブドウ糖負荷試験における血糖値の制御を行った。

### 3. プローブ開発

#### ・AKT 光制御プローブの適用(小澤 G、黒田 G)

これまで小澤 G と共同で AKT の光活性型プローブ PA-AKT の開発に成功している(桂ら, Sci. Rep 2015)。昨年度から C2C12 細胞を用いてインスリン刺激と光刺激(AKT 活性)でのシグナル活性、遺伝子発現、代謝変動における選択的制御メカニズムの研究を開始した。インスリン刺激と光刺激(AKT 活性)での RNAseq、メタボローム計測を行った(小澤 G、黒田 G)。また AKT 光活性型プローブのコンセプトを応用し、ERK を赤色光で活性化する光活性型プローブ PA-Raf の開発を行っている(小澤 G)。PA-AKT と PA-Raf を同時発現した PC12 細胞を用いて、同一細胞での AKT と ERK のクロストークを明らかにする。

### 4. マイクロ流体デバイス

#### ・マイクロ流体デバイスの適用(藤井 G、黒田 G)

開発したプロトタイプデバイスを用いて構築した細胞培養用マイクロ流体システムにおいて、培養細胞に対して時間的に変化する様々な刺激パターンを与える実験を継続して行い、細胞の時間的応答の計測・評価を行った。構築したシステムを用いて、細胞外の ATP 濃度の時間的パターンを様々に変化させた時の、細胞内カルシウムイオン濃度変化を蛍光プローブにより測定した(藤井 G)。さらに、この観測データを用いて、黒田 G において定量的画像解析法の開発、数理モデル化の検討を行った(黒田 G)。また新たに発現プローブを用いたカルシウム、リン酸化 AKT 及び S6K、ATP(ミトコンドリア、細胞質)の蛍光イメージング計測系の構築も行った(黒田 G)。加えてマイクロ流体デバイス上での細胞動態オンライン計測に向けたセンサの開発として、酸素濃度センサに関する検討も実施し、デバイス内の酸素濃度分布の可視化へのめどがついた(藤井)。引き続き、開発したプロトタイプマイクロ流体デバイスおよび細胞培養用マイクロ流体システムのグループ内共同利用も行った。