

多細胞間での時空間的相互作用の理解を目指した定量的解析基盤の創出
2021 年度採択研究代表者

2022 年度
年次報告書

黒田 真也

東京大学 大学院理学系研究科
教授

時空間トランスオミクスを用いた多細胞・臓器関連代謝制御の解明

主たる共同研究者:

稲葉 有香 (金沢大学 新学術創成研究機構 准教授)

曾我 朋義 (慶應義塾大学 先端生命科学研究所 教授)

研究成果の概要

哺乳類の全身の代謝恒常性は、分子レベルでは DNA・RNA・タンパク質・代謝物の各オミクス階層にまたがるトランスオミクスネットワークにより、細胞レベルでは代謝細胞の臓器内で最適な空間的配置(ゾネーション)により、臓器レベルでは内分泌系と自律神経系のクロストークにより制御されている。本研究では、分子レベル・細胞レベル・臓器レベルを時空間トランスオミクスにより統合して、代謝恒常性のメカニズムの解明を目指す。

本年度は、黒田グループは、野生型 (WT) およびレプチン欠損肥満 (*ob/ob*) マウスの骨格筋のマルチオミクス解析を行い、グルコース経口投与後の代謝制御に関するトランスオームネットワークを構築した (Kokaji *et al*, *Sci. Rep.*, 2022)。その結果、WT マウスでは、グルコース応答性代謝産物による代謝制御が大きな影響を及ぼし、特に糖質代謝経路が重要であることがネットワークから判明した。一方、*ob/ob* マウスでは、グルコース応答性代謝物による代謝調節の多くが失われ、グルコース応答性遺伝子による代謝調節が大きく増加し、特に炭水化物や脂質の代謝経路で顕著であった。この結果は、骨格筋が血糖値の変化にどのように反応し、肥満ではどのように反応しないのかについての洞察を与えるものである。

化学専攻の小澤博士との共同研究で、C2C12 細胞において Akt2 のオプトジェネティクスとトランスオミクスを組み合わせることにより、インスリンシグナル経路における Akt2 による選択的代謝制御機構を明らかにした (Kawamura *et al*, *Sci. Signal.*, 2023)。Akt2 によりアロステリック制御を介して代謝変化が生じる一方で、一部の代謝反応では Akt2 と他酵素との協調的な働きが必要であることが明らかとなった。

現在進行中のプロジェクトとしては、稲葉グループと共同で、今年の自律神経(迷走神経)OFF マウスにつづいて ON マウスを作製して、曾我グループと共同で肝臓における代謝物濃度測定及び転写産物量測定、シグナル分子の計測を開始した。次年度以降に、迷走神経 OFF マウスと ON マウスのトランスオミクス解析を行う予定である。また神戸大学の小川博士、坂口博士との共同研究でヒトの血糖制御における新しいインスリンの効果 (Insulin effectiveness) を定義して、糖尿病における病態進行の新しいメカニズムを見出し、現在論文を投稿中である。

稲葉グループは、自律神経によるトランスオミクス解析の基盤となる迷走神経操作マウスのマルチオミクスデータを取得する為、迷走神経 OFF・ON マウスの実験・測定を進めている。迷走神経操作マウスは、人工リガンド CNO に特異的に応答する人工デザイナー受容体 (DREADD; 本研究では hM4Di または hM3Dq を使用) を延髄迷走神経核に発現するマウスである。本年度は、迷走神経 ON マウスの実験・測定を中心に行った。昨年度までに、hM3Dq を発現するマウスでは、CNO 投与により迷走神経が活性化 (ON) されることを、確認済みである。当該迷走神経 ON マウスでは、血糖値、グルカゴン値は、CNO 投与後 60 分を最大値として上昇し、インスリン値は、CNO 投与後 15 分を最大値として一過性に上昇した。グルカゴン欠損マウスと迷走神経 ON マウスのダブル遺伝子改変モデルを作成し、迷走神経による血糖値変動におけるグルカゴンの役割を検討し

た。グルカゴン欠損により迷走神経 ON マウスの血糖値増加は正常化した。これらの結果は、迷走神経 ON による血糖値の上昇がグルカゴン値の上昇に起因することを示唆している。また、メタボローム解析用のサンプルとして、血漿パラメーターの結果に基づき、迷走神経操作前、及び迷走神経 ON 後 15 分、30 分、60 分、120 分、180 分での肝臓、筋肉、血漿を、順次採取中である。

曾我グループは、CE-MS メタボローム解析技術の更なる高感度化、ハイスループット化に取り組んだ。これまでに陽イオン性代謝物質についてはシーストレス CE-MS 法を開発し平均で 30 倍の高感度化が実現した。しかし、シーストレス CE-MS 法を陰イオン性代謝物質に応用すると放電が起きて測定できなくなった。そこで、今年度はメタノール蒸気と窒素ガスをシーストレス CE-MS デバイスに加える方法を考案することで放電を抑制することに成功した。この方法により 10 倍以上の高感度化が達成された。ハイスループット化については、キャピラリーに 40 検体の試料を注入してから一度に電気泳動する方法を陽イオン性のみならず陰イオン性代謝物質についても開発し、40 検体を 40 分で測定することが可能になった。

【代表的な原著論文情報】

黒田グループ

- 1) Kokaji, T., Eto, M., Hatano, A., Yugi, K., Morita, K., Ohno, S., Fujii, M., Hironaka, K., Ito, Y., Egami, R., Uematsu, S., Terakawa, A., Pan, Y., Maehara, H., Li, D., Bai, Y., Tsuchiya, T., Ozaki, H., Inoue, H., Kubota, H., Suzuki, Y., Hirayama, A., Soga, T., **Kuroda, S.** (2022) In vivo transomic analyses of glucose-responsive metabolism in skeletal muscle reveal core differences between the healthy and obese states. *Scientific Reports* (2022) 12:13719. DOI:org/10.1038/s41598-022-17964-9
- 2) Uematsu, S., Ohno, S., Tanaka, K. Y., Hatano, A., Kokaji, T., Ito, Y., Kubota, H., Hironaka, K., Suzuki, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Hirayama, A., Soga, T., and **Kuroda, S.** Multi-omics-based label-free metabolic flux inference reveals obesity-associated dysregulatory mechanisms in liver glucose metabolism. *iScience*, 25(2), 103787. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103787>
- 3) Terakawa, A., Hu, Y., Kokaji, T., Yugi, K., Morita, K., Ohno, S., Pan, Y., Bai, Y., Parkhitko, A.A., Ni, X., Asara, J.M., Bulyk, M.L., Perrimon, N., and **Kuroda, S.** (2022) Trans-omic analysis of insulin action reveals a cell growth sub-network which coregulates anabolic processes. *iScience*, 25(5), 104231. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104231>.

稲葉グループ

- 1) **Inaba Y.**, Hashiuchi E, Watanabe H, Kimura K, Oshima Y, Tsuchiya K, Murai S, Takahashi C, Matsumoto M, Kitajima S, Yamamoto Y, Honda M, Asahara S, Ravnskjaer K, Horike S, Kaneko S, Kasuga M, Nakano H, Harada K, Inoue H. The transcription factor ATF3 switches cell death from apoptosis to necroptosis in hepatic steatosis in male mice. *Nat Commun.* 2023 Jan 23;14(1):167. DOI: 10.1038/s41467-023-35804-w

曾我グループ

- 1) Kudo, R., Igarashi, K., Soga, T., Ishikawa, T., Saito, Y., "Comprehensive metabolome analysis of intracellular metabolites in cultured cells" STAR Protoc. 3, 101531, 2022.