

「生命システムの動作原理と基盤技術」

平成 18 年度採択研究代表者

黒田 真也

東京大学大学院 理学系研究科・教授

シグナル伝達機構の情報コーディング

1. 研究実施の概要

生命現象は細胞内分子ネットワークであるシグナル伝達機構により制御されているが、その種類は入力刺激や細胞の応答に比べると少なく限られている。シグナル伝達機構の本質は、多彩な入出力を限られた種類の細胞内分子にコードすることにある。このコーディングには、入力の違いを活性化する分子の組み合わせにコードする以外にも分子活性の時間波形に情報をコードする時間情報コーディングがある。本研究では、情報コーディングの観点から、同じ刺激であっても時間波形に依存して異なる応答を示す生命現象である細胞運命決定とインスリン作用にフォーカスして、実験と微分方程式モデルを組み合わせ、時間情報コーディングのメカニズムを解明する。また、細胞種に依存して各分子の発現量が異なるため、これらの刺激に対する応答は細胞種によっても異なる。その仕組みを各細胞種での発現量や応答の観測と統計的モデルを用いて明らかにする。これらのモデルを縮約してシグナル伝達の情報コーディングの基本原理を抽出する。

2. 研究実施内容

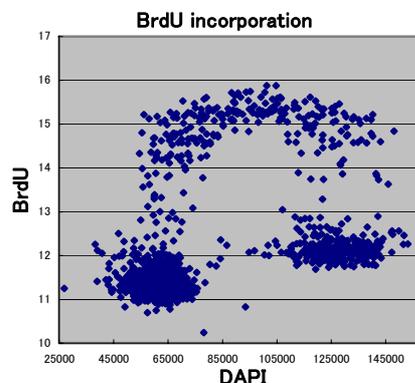
(文中にある参照番号は 4. (1)に対応する)

本研究計画では、主に時間情報コーディングの観点からシグナル伝達経路の動的特性を明らかにする目的で、同じ刺激であっても入力パターンが異なれば異なる応答を示す生命現象である ERK 経路による細胞運命決定機構や、一過性と持続性の時間波形を示すインスリンの標的細胞への作用機構を解析する。

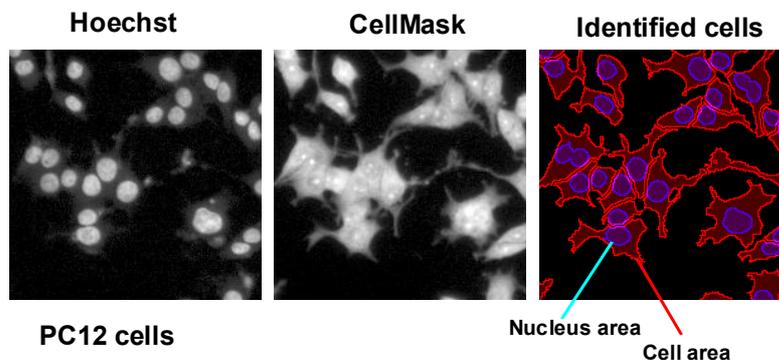
I. ERK 経路による細胞運命決定機構

①ERKのデコード：

1細胞レベルで細胞内情報伝達分子のリン酸化などを高速かつ大量に取得する手法の開発を行った。昨年度の段階で定量的な免疫染色を自動的に行う手法を確立できたので、本年度は計測対象分子を増やし、古典的MAPキナーゼファミリーとその直下で発現するimmediate early geneの染色条件を決定した。また本年度は自動化免疫染色法を用いてPC12細胞の細胞周期の変化をBrdU取り込み量を指標に評価する手法を確立した(右図)。現在、この手法を用いてEGFによる増殖効果の評価を進めている。本手法



の特徴は1細胞ごとの対象分子のリン酸化量や発現量、局在を計測できることであるが、これまでの画像解析法は核の領域を同定した後、この周囲数マイクロメートルを細胞質と見なして細胞ごとの蛍光強度を算出していた。しかし今後はNeuriteの長さを自動的に計測するためにも、細胞の形態を正確に認識する必要がある。本年度は免疫蛍光染色画像から1つの細胞の領域を正確に同定するアルゴリズムの開発を行い、満足な結果を得た(下図)。現在引き続きこの領域内における各チャンネルの蛍光シグナルを算出する画像解析プログラムの開発と評価を行っている。

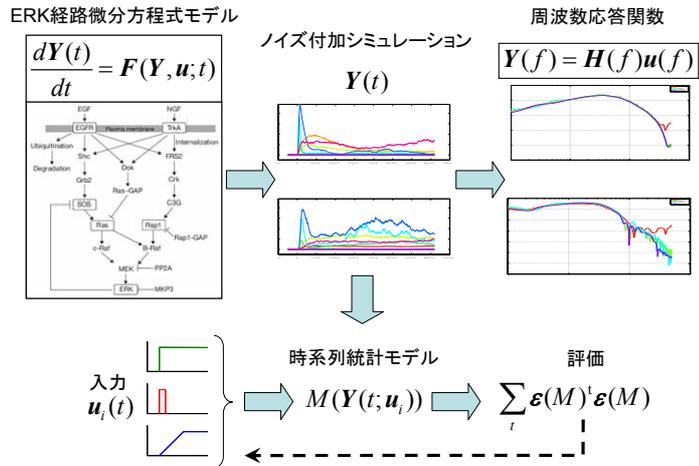


②ERK経路のモデル：

ERK 経路を通して伝達されるシグナルの周波数特性の解析を開始した。ERK のエンコード微分方程式モデルを用いノイズを付加したシミュレーションデータを作成した。ERK 経路の周波数特性の解析のため、作成したデータを用い周波数応答関数を算出するいくつかの手法を比較・検討した。

③統計モデル構築：

H18 年度に引き続き、時系列データからの統計モデルの構築方法の検討とアルゴリズムの開発を行った(右図)。ERK のエンコード微分方程式から生成される時系列データを用いて、統計モデルを構築する手法のプロトタイプを開発した。構築手法・構築モデルの検証として、予測誤差二乗和を用いてモデルの汎化性能を評価した。この構築モデルを用

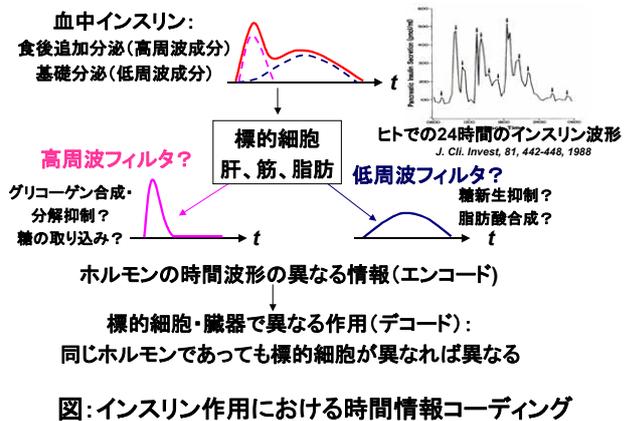


いて、モデルの特性を踏まえた入力刺激パターンを検討中である。また、時間情報コードは神経細胞のシナプス可塑性にも重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。そこで、スパイクタイミング依存性のシナプス可塑性(Spike-timing dependent synaptic plasticity)の計算論モデルを構築して、NMDA 受容体の新規アロステリック特性を予測した(原著論文1)。

II. インスリン作用機構

④インスリン作用の時系列データ

取得： 肝臓におけるインスリン応答をモデル化するには、シグナル伝達経路や遺伝子発現だけでなく、糖の放出やグリコーゲン合成等の代謝産物の計測が重要である。そこで本年度は初代培養肝細胞の系を立ち上げ、シグナル伝達経路や遺伝子発現、そして代謝産物の時系列データや発現量データの取得を開始した。その結果 Fao 細胞では測定出来なかった



GK 等の遺伝子発現、そしてグリコーゲン合成や脂質合成が測定できるようになった。現在これらの詳細な時系列データを同一条件下で取得し、同じインスリン刺激でもステップ刺激やインパルス刺激といった異なる時間波形の刺激を与えた時にこれらの分子がどのような時間波形を示すか検討中である。

また、インスリンのターゲットは肝臓のみならず脂肪、筋肉も主要なターゲットである。そこで細胞種によるインスリン応答の違いを比較するために、脂肪組織の良いモデル細胞

である 3T3-L1 細胞を用いてシグナル伝達経路や遺伝子発現、そして脂質などの代謝産物の計測を開始した。

⑤**インスリン作用の個体レベル解析**：肝臓特異的 PDK1 欠損マウスは様々なインスリンシグナルの障害により 2 型糖尿病様の代謝異常を示す。肝臓特異的 PDK1 欠損マウスの肝臓に解糖系酵素遺伝子であるグルコキナーゼを再発現させると、耐糖能異常がほぼ完全に改善することを見出した。この結果から肝臓における種々のインスリン作用のうちでグルコキナーゼの発現維持作用が耐糖能の維持に最も重要であることが示唆された。また、インスリンによって発現が抑制される転写因子 KLF15 の機能を解析し、KLF15 が糖新生系酵素遺伝子の発現制御因子であるとともに、その肝臓における発現亢進が、肥満インスリン抵抗性モデルマウスの耐糖能障害の原因の一つであることも見出した（原著論文 2）。

3. 研究実施体制

(1)「黒田」グループ

①研究分担グループ長：黒田 真也（東京大学大学院、教授）

②研究項目

- ・ ERK 経路の時間情報コーディング
- ・ インスリン作用の時間情報コーディング

(2)「小川」グループ

①研究分担グループ長：小川 渉（神戸大学大学院、准教授）

②研究項目

- ・ インスリンの標的細胞・臓器におけるシグナル伝達・代謝経路の解析

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

1. Hidetoshi Urakubo, Minoru Honda, Robert C. Froemke, and Shinya Kuroda
Requirement of an allosteric kinetics of NMDA receptors for spike-timing-dependent plasticity, *Journal of Neuroscience*, in press.
2. Okamoto Y, Ogawa W, Nishizawa A, Inoue H, Teshigawara K, Kinoshita S, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, Sakaue H, Noda T, Kasuga M. Restoration of glucokinase expression in the liver normalizes postprandial glucose disposal in mice

with hepatic deficiency of PDK1. *Diabetes*. 2007 56:1000-1009.