

「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

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。これらの現象では分子ネットワークが必ずしも明確に分かっておらず、かつ上流と下流の分子の対応が多対多の関係である場合が多い。これらの場合、従来の微分方程式では十分に対応できない。しかし、上流と下流の分子の時間波形を詳細に計測して、それをもとにデータドリブンモデルを構築すれば、これらの問題が一気に解決できて、シグナル伝達ネットワークのダイナミクスを明らかにできる。そこで、本年度はこれらの解析に必要なシグナル分子の自動免疫染色手法の開発と、データドリブンモデルとしての統計モデル構築手法を開発する。来年度これらの手法を統合してシグナル伝達ネットワークのダイナミクスを明らかにする予定である。

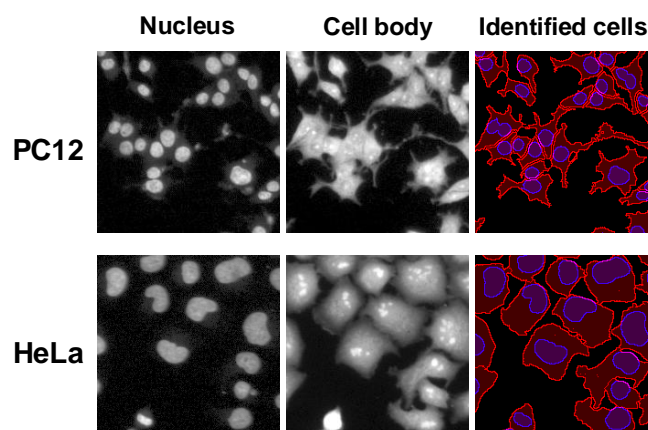


図1 画像解析による個々の細胞の認識結果

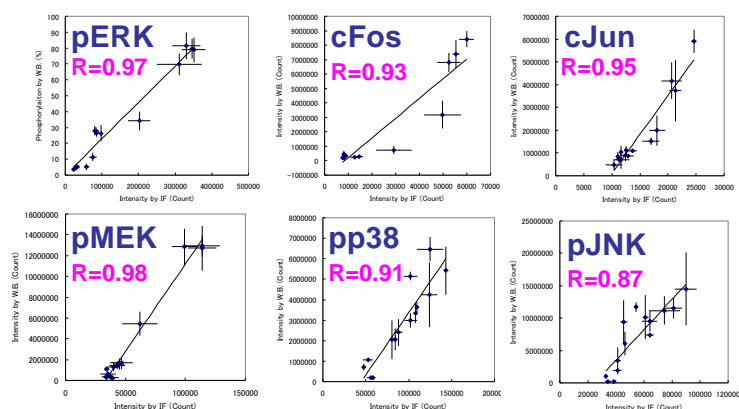


図2 自動化免疫染色法と Western blot による計測の相関

## I. ERK 経路による細胞運命決定機構

### ①ERK のデコード (自動免疫染色手法開発) :

本年度は昨年度に引き続き、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。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、認識精度の評価を行った。この結果、認識アルゴリズムはロバストであり、染色条件が一定であれば細胞種によらずに正確に個々の細胞を正確に認識できた(図1)。これにより細胞種間の発現量の違いによるシグナル伝達ネットワークの振る舞いの違いを計測する目処が立った。現在、一連の画像解析の自動化に向けたユーザーインターフェイスの実装と、光学収差に由来する誤認識の軽減アルゴリズムを開発している。また、昨年度の段階で定量的な免疫染色を自動的に行う手法および古典的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。本年度は自動化免疫染色法による計測法の評価を行った(図2)。この結果、本手法による計測はWestern blotによる計測と非常に高い相関を示し、また再現性もWestern blotと同等であることが示された。

## 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。モデル化手法として自己回帰モデルを適用することを念頭に、数分間隔で ERK のリン酸化および IEG の発現量変化を計測するためのロボット制御プログラムを作成した。この結果、シグナル伝達分子の時系列データを大量に計測する目処がついたので、モデル化に向けた時系列データの取得を行った。予備的に計測データを用いて微分方程式モデルのパラメータ推定を行ったところ、計測精度は Western blot と比較しても悪くはないものの、特異的な観測ノイズが推定に悪影響を与えることが示唆された。観測ノイズの影響は次年度の検討課題である。

## ③統計モデル構築:

時系列データからの統計モデルの構築方法の検討・アルゴリズムの開発に加え、統計モデルからの情報抽出法の開発を行った。前年度に開発した統計モデル構築手法のプロトタイプをベースにしてモデル構築方法の開発を継続し、さらに、統計モデルから抽出され得る周波数特性の検討と周波数応答関数の推定手法の開発とを行った(図3)。この手法を用いることで、シグナル伝達経路の入出力時間波形データから経路の伝達特性を推定することが可能になる。開発した手法の評価として、複数のトイモデルに対して伝達特性の推定を行ったところ、元のトイモデルから予測される伝達特性をよく再現した。今後、本研究プロジェクトにて取得予定のデータの実際の特徴をより意識した課題の検討と対策の実施を行う予定である。

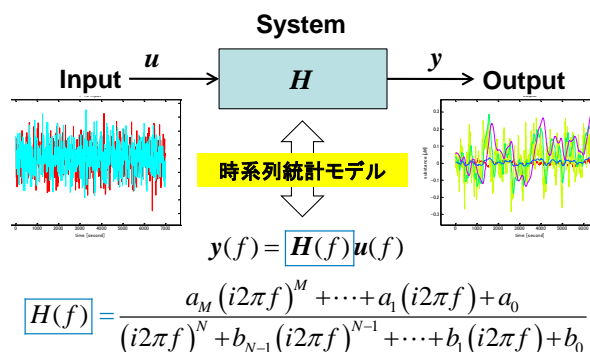


図4 インスリンの時間情報コード

## 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

昨年度測定を開始したシグナル伝達経路や遺伝子発現の測定分子のモデル化を行うために、ハイスループットな大量時系列データの取得手法開発を行った。まず初めに、再現性の高い大量時系列データの取得方法の検討を行った。その結果、リキッドハンドリングロボットを用いて刺激からサンプル回収までを自動化し、再現性の高いデータを得ることが出来るようになった。また、インパルス刺激(上図)

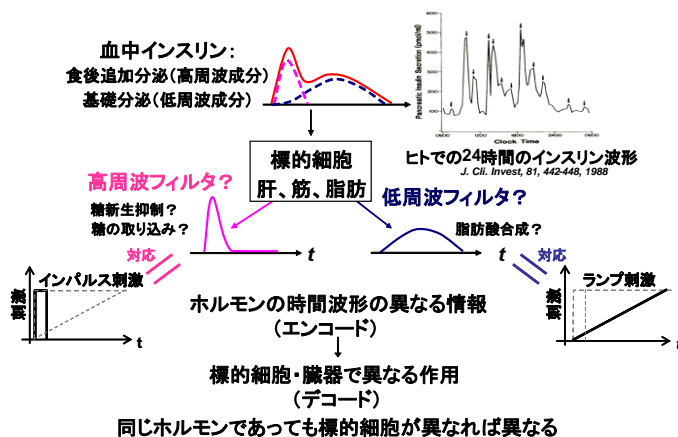


図3 統計モデルによる周波数応答解析

やランプ刺激（図4）の刺激方法の検討も行った。本研究では、同じ刺激であっても時間波形に依存して異なる挙動を示す応答が存在するかどうか注目しており、インパルス刺激やランプ刺激の時系列データが必要となる。そこで、これらの刺激をリキッドハンドリングロボットと非接触分抽装置を用いてシステムティックに行う手法を開発した。その結果、これらの特殊な刺激方法も、一連のロボットを用いた手法で刺激からサンプル取得が出来るようになった。今後、これらの手法を用いてシグナル伝達経路や遺伝子発現のモデル化に必要なデータの取得を開始する予定である。

#### ⑤インスリン作用の個体レベル解析：

インスリンによって PDK1 の下流で発現が抑制される転写因子 KLF15 の機能解析を進めた。KLF15 が糖新生系酵素遺伝子に加えて、アミノ酸異化系酵素遺伝子の発現を制御することにより糖新生の調節に重要な機能を果たすことを見出した。また抗糖尿病薬であるメトホルミンによって KLF15 のユビキチン依存性の蛋白分解が促進されること、メトホルミンの抗糖尿病作用の発現に KLF15 が重要な機能を果たすことを見出した。さらに、インスリンによって発現が増強する転写因子 Stra13 の機能解析を進め、肝臓において転写因子 SREBP1c の発現を誘導することにより、脂肪酸合成系遺伝子の発現制御に重要な機能を果たすことを見出した。*In vivo* でのインスリンによるリン酸化プロテオミクスに向けて、グルコースランプやインスリンランプの手法を確立した。

### 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. Nakamura K, Sakaue H, Nishizawa A, Matsuki Y, Gomi H, Watanabe E, Hiramatsua R, Tamamori-Adachi M, Kitajima S, Noda T, Ogawa W, Kasuga M. PDK1 regulates cell proliferation and cell cycle progression through control of cyclin D1 and p27Kip1 expression. *J Biol Chem.* 283:17702-17711, 2008
2. Nagare T, Sakaue H, Takashima M, Takahashi K, Gomi H, Matsuki Y,

- Watanabe E, Hiramatsu R, Ogawa W, Kasuga M. The Kruppel-like factor KLF15 inhibits transcription of the adrenomedullin gene in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Dec 16. [Epub ahead of print]
3. Nakamichi S, Senga Y, Inoue H, Emi A, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, Ogawa W, Kasuga M. Role of the E3 ubiquitin ligase GRAIL in glucose and lipid metabolism in the liver. *J Mol Endocrinol*. 2008 Dec 5. [Epub ahead of print]

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)