

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。本年度は、主に時間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ることで時間情報コーディングのメカニズムを解明する。また、ERK 経路の下流など経路の情報が不明な部分については、計測データをもとにモデル化するデータドリブンモデルを用いて解析を行う。本年度は、データドリブンモデルに必要な精度よく大量にシグナル分子の活性を計測できる技術開発を行った。

§ 2. 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 のデコード

ERK 経路のモデル

モデル化手法開発

インスリン作用の時系列データ取得

インスリン作用のモデル

(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

インスリン作用の個体レベル解析

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(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。また、中間評価のコメントに従いインスリンの個体レベルの解析は本年度で終了する。

1. ERK のデコード

自動化計測技術開発については、平成20年度において開発を行った免疫染色法に基づくシグナル伝達ネットワークの自動計測技術を実用化するために、画像解析プログラムの改良および実験プロトコルの最適化を行った。この結果、従来のウェスタンブロット法と同等の定量性と再現性を備え、かつサンプル調製からデータ解析までの操作をほぼ全自動で行う自動実験システムの構築に成功した(特許申請中、論文投稿中)。また、このシステムにより得られた計測データを解析した結果、サンプル調製の段階が比較的大きな観測ノイズを発生していることが明らかとなった。このノイズは汎用のリキッドハンドリングロボットを採用したことによる限界であり、計測精度の向上にはサンプル調製を専用に行う装置の開発が必要である。そこで前記のノイズを低減させる自動サンプル調製装置の開発を開始した。

また、上述の自動化計測技術を用い、PC12細胞におけるNGFの刺激パターンによる分化応答の計測を行い、PC12細胞の神経突起伸張過程は、およそ12時間の突起伸張準備期間とその後の突起伸張期間にわけられることを昨年度見出している(プライミング現象)。本年度は、プライミング現象にかかわるシグナル伝達経路の同定およびプライミング期間中に誘導される遺伝子の同定を行った。突起伸張準備機構は、**ERK**の活性と転写活性を必要とし、突起伸張機構は、**ERK**と**PI3K**の活性を必要とすることを見出した。PC12細胞の神経細胞への分化は、時間的に分離された、非連続的なプロセスにより誘導されることを初めて明らかにした(論文1)。以上から、突起伸張準備機構は、持続的**ERK**活性化のデコーディング機構に該当すると考えられ、関連遺伝子の同定を試みた。その結果、マイクロアレイ実験により、約50の遺伝子が同定された。その内約30の遺伝子を、siRNA実験により調べた結果、7つの遺伝子(**Serpinb1a**, **Neu2**, **Tph1**, **Ania4**, **Trib1**, **PVR**, **RGD1305778**)が突起伸張に重要と思われた。これら遺伝子は持続的**ERK**活性化に特異的に応答し、神経分化の初期過程である、突起伸張準備にかかわると期待される。今後は

これらの遺伝子群を応答としたモデル化を行う。

2. ERK経路のモデル

自己回帰モデルを用いた IEG(immediate early genes)のモデル化については、自動化免疫染色システムを用い、PC12 細胞を用いた NGF, PACAP 刺激実験を行い、MAP キナーゼファミリー、CREB などの転写因子の活性と、その下流の IEGs(c-Fos,c-Jun,EGR1 など)の蛋白質発現の時系列データを取得した。その結果、NGF 刺激時においては、ERK の活性は一過性および持続性の応答を示したが、PACAP 刺激時では一過性の応答を示した。また、その下流に関して、EGR1 の発現は、NGF,PACAP 刺激時の順にピークの値が高くなった。一方、c-Fos に関しては、この関係が逆転し、PACAP,NGF 刺激時の順にピークの値が高くなる結果となった。このデータを再現する自己回帰モデルの作成を試みた。pERK, pCREB を入力と見なし、多入力システムの自己回帰モデルを作成することで、実験データの再現に成功した。この結果は、IEGs の発現誘導の理解には、ERK のみならず他のプロモーター領域からの入力もモデル化する必要があること、多入力システムを定量的に解析する必要があることを示唆している。

また、PC12 細胞を用いて、EGF 刺激時の Akt 経路について、周波数特性の解析を行った。Akt 経路は経路を構成する分子の研究が進んでおり、ERK 経路と同様に生化学反応ベースのモデル化が行える。またインスリン応答の主要なシグナル伝達経路でもある。Akt 経路の時系列データを取得したところ、経路の上流分子(EGFR)と下流分子(S6)のリン酸化の強さが逆転する場合があった(図)。これらの時系列データを再現できる生化学

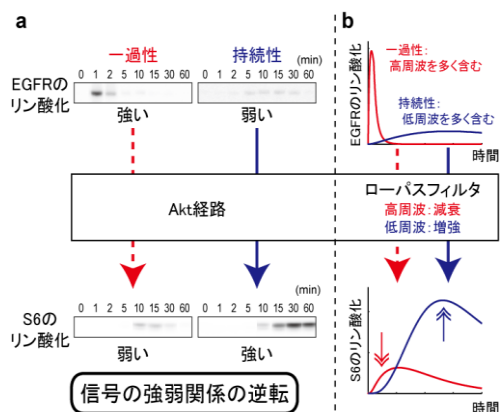


図: Akt経路の周波数応答解析

反応モデルを作成し、周波数応答解析を適用したところ、Akt 経路は高周波よりも低周波を効率よく伝達するローパスフィルタとして機能していることを見出した。一過性の時間波形は主に高周波から、持続性の時間波形は主に低周波から構成されているので、持続性の時間波形の方が効率よく下流へ伝達されて、信号の強弱関係が逆転することがわかった。このようなローパスフィルタ特性は生化学反応に内在する普遍的な性質であるので、他の経路においても同様の逆転現象が生じる可能性が示唆された。我々はさらに、抗癌剤として用いられるある種の EGFR 阻害剤が S6 のリン酸化を逆に亢進させる場合があることをモデルから予測し、実際に実験を行って確認した。これらの研究から、時系列データ取得の重要性や周波数応答解析の有用性が示された(論文投稿中)。

3. モデル化手法開発

自己回帰モデルからの情報抽出については、前年度に開発した統計モデルからの情報抽出法について、実データにより近い特性を持つモデルを用いて大規模な評価を実施した。さらに、この評価に基づき実装上の問題を把握し、対策として、モデル構築・周波数応答関数推定アルゴ

リズムの修正・変更を行った。

情報量による解析については、自動化免疫染色法で得られた既存のデータを用い、分子種間の相互情報量を数値計算で試験的に評価した。しかし、単純に幅固定のヒストグラムを用いて密度分布関数を推定する方法では、密度分布関数が正しく推定できず、相互情報量が正しく計算できないことが分かった。従って、現在、**adaptive partitioning** 法を用いて、密度分布関数を推定する方法を検討している。さらに、データはステップ刺激に対する応答であるため過渡応答を含んだ非定常時系列であり、解析は簡単ではない。現在、非定常時系列データにおいて刺激に対する情報量を評価する方法を検討している。

4. インスリン作用の時系列データ取得とモデル化

時系列データの取得については、リキッドハンドリングロボットでの刺激手法を用いて、培養肝細胞である **Fao** 細胞を用いたインスリン刺激を行い、**pAkt** とその下流のシグナル分子 (**pGSK3 β** , **pFox01**, **pS6K**) ならびに遺伝子発現 (**G6Pase**, **PEPCK**, **FAS**, **cJun**) の用量反応の時系列データを取得した。その結果、同じ **pAkt** の下流にもかかわらず、**pGSK3 β** , **pFox01**, **G6Pase**, **PEPCK** は **pAkt** の活性量に依存した持続的な応答を示したが、**pS6K**, **FAS**, **cJun** は一過的な応答を示した。

上記で得られた用量反応の時系列結果を基に、生化学反応モデルの作成を行った。その結果、上記の実験結果を良く再現するモデルの作成に成功した。また現在、外挿刺激として、インスリンのパルス刺激やステップワイズ増加刺激を行い、モデルの妥当性の検討を行っている。また、短い (10 分程度) パルス刺激特異的に応答するようなシグナル伝達経路の探索も開始した。

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** の下流で発現が制御される転写因子 **Stra13** の機能解析を進めた。**Stra13** が **SREBP1c** の発現制御を介してインスリンによる脂質合成制御に重要な機能を果たすことを明らかとした。また、肥満モデル動物の肝臓における **Stra13** の発現増強が肥満に伴う血清脂質の異常の原因となることも見出した。また、**SREBP1c** 遺伝子上の **Stra13** の結合部位を同定し、本部位がインスリン反応性に重要な機能を持つことを明らかとした。また、肝臓において転写因子 **HIF1 α** がインスリンによって発現が誘導され、脂肪酸合成系遺伝子の発現制御と耐糖能の制御に重要な機能を果たすことを肝臓特異的 **HIF1 α** 欠損マウスの解析を通じて明らかとした。さらに、**PDK1** の心機能や T リンパ球活性化機構に関する新規な知見も明らかとした。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. Ozaki Y, Uda S, Saito TH, Chung J, Kubota H, and Kuroda S. A quantitative image cytometry technique for time series or population analyses of signaling

networks. PLoS ONE, e9955, 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0009955

2. Chung J, Kubota H, Ozaki Y, Uda S, and Kuroda S. Timing-dependent actions of NGF required for cell differentiation. PLoS ONE, e9011, 2010, doi:10.1371/journal.pone.0009011

3. Takashima M, Ogawa W, Hayashi K, Inoue H, Kinoshita S, Okamoto Y, Sakaue H, Wataoka Y, Emi A, Senga Y, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, Kasuga M. Role of KLF15 in regulation of hepatic gluconeogenesis and metformin action. Diabetes in press.

4. Ito K, Akazawa H, Tamagawa M, Furukawa K, Ogawa W, Yasuda N, Kudo Y, Liao CH, Yamamoto R, Sato T, Molkentin JD, Kasuga M, Noda T, Nakaya H, Komuro I. PDK1 coordinates survival pathways and beta-adrenergic response in the heart. Proc Natl Acad Sci U S A. 106(21):8689-8694, 2009, doi:10.1073/pnas.0900064106

5. Park SG, Schulze-Luehrman J, Hayden MS, Hashimoto N, Ogawa W, Kasuga M, Ghosh S. The kinase PDK1 integrates T cell antigen receptor and CD28 coreceptor signaling to induce NF-kappaB and activate T cells. Nat Immunol. 10(2):158-66, 2009, doi:10.1038/ni.1687

6. Yoshioka T, Inagaki K, Noguchi T, Sakai M, Ogawa W, Hosooka T, Iguchi H, Watanabe E, Matsuki Y, Hiramatsu R, Kasuga M. Identification and characterization of an alternative promoter of the human PGC-1alpha gene. Biochem Biophys Res Commun. 381(4):537-543, 2009, doi:10.1016/j.bbrc.2009.02.077

7. 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. 379(1):98-103, 2009, doi:10.1016/j.bbrc.2008.12.020

8. 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. 42(2):161-169, 2009, doi:10.1677/JM

E-08-0145

(4-2) 知財出願

- ① 平成21年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)