

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経路により制御されているが、その経路の数は入力刺激や細胞の応答に比べると限られている。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、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、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、PC12 細胞における Akt 経路が低周波フィルタとして機能することを明らかにしたほか、リン酸化シグナルの自動計測技術の開発を行った。現在、自動計測技術を用いてデータドリブンモデルの作成を行っている。

§ 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 (東京大学大学院理学系研究科、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(研究機関別)

① 研究分担グループ長:小川 渉 (神戸大学大学院医学系研究科、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

本研究計画では、シグナル伝達経路の動的特性により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時間情報コーディングの観点から解析する。

1. ERK のデコード

自動化計測技術開発については、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の実用化した⁴⁾。現在、本手法を用いて以下に述べるERKの下流の遺伝子発現のデータドリブンモデルを作成している。

我々は、これまでに持続的なERKの活性に特異的に応答し、神経分化の初期過程である、突起伸張準備にかかわる3つの遺伝子(*Metlnl*, *Dcl1/Ania4*, *Serpinb1a*)を同定した。それぞれの発現の時間パターンは、刺激後直ぐに鋭い発現の上昇を示すもの、素早い上昇の後に持続性を持つもの、刺激後徐々に発現が上昇するものの3つのパターンに分けられた。阻害剤を用いた実験から、これらの遺伝子の発現には、ERKの活性を必要とすることが確かめられた(論文準備中)。今後、これら遺伝子の特徴的な時間パターンを持った発現の制御が、どのようなERKのデコーディング機構により引き起こされるのかを、これら遺伝子の発現を出力としたモデルを作成して明らかにする。

2. ERK経路のモデル

自動化計測技術を用いて ERK 経路の下流である immediate early gene(IEGs)の発現誘導を計測して、時系列データからデータドリブンモデルの作成を行い、ERK 下流の時間情報コードのメカニズムを明らかにした。まず、NGF, EGF, PACAP, Forskolin, bFGF Anisomycin など各刺激時における、MAP キナーゼファミリー(ERK,JNK,p38)の活性(リン酸化)、CREB の転写因子の活性(リン酸化)と、その下流の IEGs (c-FOS, c-JUN, EGR1, JunB, FosB)の蛋白質発現の時系列データを取得した。その結果、各刺激に対するIEGsの応答は種類により異なり、c-FOSはNGFおよびPACAP刺激に、EGR1はNGF刺激に、c-JUNはNGF, Anisomycin刺激にそれぞれ応答し、JunB, FosBはPACAP刺激に応答することが明らかになった。続いてこれらのデータを再現するため、データドリブンモデルのひとつとしてHill式による非線形変換および多入力多出力システムの自己回帰モデルを組み合わせたモデル化手法を開発し解析を行った。そ

の結果、ERK は 1 次反応として、CREB は高次反応として記述できることが分かり、c-FOS の発現誘導に関しては ERK および CREB の寄与が大きく、EGFR、c-JUN の発現誘導には ERK の寄与が大きく、JunB の発現誘導には CREB、c-FOS の寄与が大きいことが示唆された(論文準備中)。さらに PC12 細胞において、シグナル伝達系の活性や IEG タンパク質の発現パターンが神経分化に対してどのように関わっているかを定量的に調べるために、計量工学の分野にて発達してきた PLS(Partial Least Square)回帰法と呼ばれるデータドリブンモデルを用いて解析を行う。

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(後述)。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 1)。これらの時系列データを再現できる生

化学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。また、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³⁾。また我々は、ローパスフィルタによるシグナル伝達について、モデルを用いて詳細に解析し、シグナルの時間パターンと信号の伝達効率との関係を明らかにしつつある。さらに、ローパスフィルタがその下流のシグナル分子の刺激に対する感受性を増大させたり、阻害剤感受性を低下させたりする可能性を見出した。これは、標的分子を効果的に抑制できる阻害剤であっても下流の分子を同様に抑制できるとは限らないというリスクを示しており、現在研究を進めている(論文準備中)。

3. モデル化手法開発

シグナル伝達経路はシャノンの情報理論における通信路の一種とみなすことができる。自動化計測技術を用いれば、個々の細胞のリン酸化レベルの分布情報を得ることができるため、シグナル伝達の通信路としての特性を初めて解析できる。現在、1 細胞レベルの分子活性のデータから、刺激と応答分子間の相互情報量を算出し、ERK 経路において刺激の情報が下流の初期応答遺伝子にどのように伝達されるのかを調べている。相互情報量は、刺激と分子応答間で伝達可能な情報の量を表す指標である。相互情報量をデータから算出する方法はいくつかあり、特に算出にあたって 1 細胞レベルの分子活性のデータから分子活性の密度分布関数を推定する部分がひとつの要所である。相互情報量は刺激の与え方に依存して変わる量であり、刺激の与え方を最適にしたときの相互情報量の上限は通信路容量と呼ばれている。通信路容量は通信工学において通

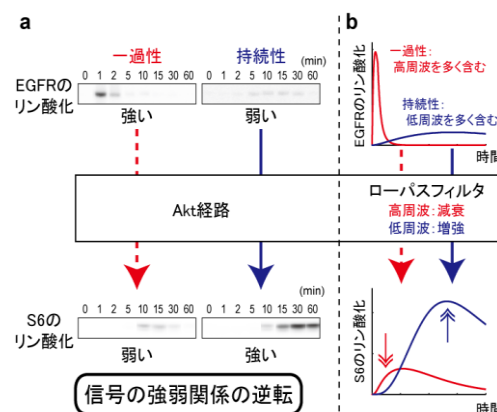


図1: Akt経路の周波数応答解析

信システムの性能を評価する上での重要な指標のひとつであり、同様な観点から細胞内シグナル伝達における経路の特性のひとつとして通信路容量を調べている。また、時系列の入出力データに自己回帰モデルの一種 (ARXモデル) を適用して伝達関数を数値的に求め、求めた伝達関数から生化学反応システムとして有益な情報を取り出す手法を開発した (論文投稿中)。

4. インスリン作用の時系列データ取得とモデル化

前年度に我々は、同じ pAkt の下流にもかかわらず、pGSK3 β , pFox01, G6Pase, PEPCK は pAkt の活性量に依存して持続的な応答を示し、pS6K, FAS, cJun は一過的な応答を示すことを見出した。今年度は、上記の中でも特に上流の制御機構が比較的明らかな分子 (pGSK3 β , G6Pase, pS6K) と pAkt について、時系列データを基に生化学反応モデルを作成した。その結果、血中のインスリンの追加分泌に対応するような波形は pAkt の一過的な波形に情報がコードされ下流の pS6K に優位に伝わり、血中のインスリンの基礎分泌に応答するような波形は pAkt の持続的な波形に情報がコードされ下流の G6Pase に優位に伝わり、これらの両方の情報が pGSK3 β に伝わるのがモデルの解析から明らかになった。上記のシミュレーションによる予測はインスリンのステップワイズ増加刺激や、一定時間だけ刺激を与えるパルス刺激、濃度を徐々に増加させるランプ刺激といった実験により確認した。以上の結果から我々は、同じ上流の波形から違った特徴を取り出す機構の存在をシミュレーションと実験の両方を用いて明らかにした。これらの結果から我々はインスリンの追加分泌と基礎分泌に速度と濃度の情報がコードされるというだけでなく、pAkt という分子の活性化波形に「同時に」情報をコードすることができるという「マルチコーディング」の機構が存在することを明らかにした (論文準備中)。

当初期待していた短い (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下流に位置する分子は見出せなかった。そこで九州大学の中山研究室との共同研究でインスリン刺激のリン酸化プロテオミクスを開始した。現在 8000 ペプチドの同定に成功しており、インスリン刺激により一過的にリン酸化が 2 倍以上変動する分子が 6 分子同定できた (論文準備中)。今後さらに時間波形について解析を進める。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Honda, M., Urakubo, H., Tanaka, K. and Kuroda, S., “Analysis of development of direction selectivity in retinotectum by a neural circuit model with Spike Timing Dependent Plasticity.”, The Journal of Neuroscience, in press
2. Otsuji, M., Terashima, Y., Ishihara, S., Kuroda, S. and Matsushima, K., “A Conceptual Molecular Network for Chemotactic Behaviors Characterized by Feedback

of Molecules Cycling Between the Membrane and the Cytosol.”, *Science Signaling*,3(152),ra89,2010(DOI:10.1126)

3. Fujita, K., Toyoshima, Y., Uda, S., Ozaki, Y., Kubota, H. and Kuroda, S., “Decoupling of Receptor and Downstream Signals in the Akt Pathway by Its Low-Pass Filter Characteristics.”, *Science Signaling*,3(132),ra56,2010(DOI: 10.1126)

4. Ozaki, Y., Uda, S., Saito, T., Chung, J., Kubota, H. and Kuroda, S., “A quantitative image cytometry technique for time series or population analyses of signaling networks.”, *PLoS ONE*, 5(4), e9955,2010(DOI:10.1371)

5. Chung, J., Kubota, H., Ozaki, Y., Uda, S. and Kuroda, S., “Timing-Dependent Actions of NGF Required for Cell Differentiation.”, *PLoS ONE*, 5(2), e9011, 2010(DOI:10.1371)

(4-4) 知財出願

① 平成22年度特許出願件数(国内 0 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)