

黒田 真也

東京大学大学院理学系研究科・教授

時間情報コードによる細胞制御システムの解明

§1. 研究実施体制

(1)「黒田」グループ

- ① 研究代表者: 黒田 真也 (東京大学大学院理学系研究科、教授)
- ② 研究項目: 時間情報コードのシステム解析
 - ・既知の代謝経路の時間情報コードの実験とモデリング
 - ・新規代謝経路の時間情報コードの経路同定と解析手法の開発

(2)「石井」グループ

- ① 主たる共同研究者: 石井 信 (京都大学大学院情報学研究科、教授)
- ② 研究項目: データドリブンモデルを用いた時間情報コードの解析
 - ・時間情報コードに関するシステム同定と制御アルゴリズムの開発

(3)「小澤」グループ

- ① 主たる共同研究者: 小澤 岳昌 (東京大学大学院理学研究科、教授)
- ② 研究項目: 光制御とイメージングを用いた時間情報コードの解析
 - ・AKT 光制御プローブの開発
 - ・AKT 光制御プローブの適用

(4)「藤井」グループ

- ① 主たる共同研究者: 藤井 輝夫 (東京大学生産技術研究所、教授)
- ② 研究項目: 時間情報コード解析のためのマイクロ流体デバイスの開発
 - ・刺激波形制御のためのマイクロ流体制御系の構築
 - ・蛍光物質を用いた実証実験と評価

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

1. 既知の代謝経路の時間情報コード

・実験:計測系の確立(黒田 G)

シグナル伝達のリン酸化に加えて、グリコーゲン、解糖系、糖新生、糖放出抑制などの高感度代謝測定系を用いてモデル作成のための時系列データを取得した。

・生化学反応モデル作成(黒田 G)

インスリンシグナリングである AKT 経路とその下流のグリコーゲン合成、解糖系、糖新生、糖放出抑制を含む既知の代謝経路の生化学反応モデルを構築して、培養肝がん細胞におけるインスリン作用の時間情報コードを解明した。その結果、グリコーゲンは **incoherent feedforward loop** によりインスリンの時間変化に、解糖系は基質消費 **feedforward** によりインスリンの時間変化に、糖新生抑制は **PEPCK** の遅い積分経路によりインスリンの濃度に応答することが明らかとなった。

2. 新規代謝経路の時間情報コード

・新規代謝経路の同定法の開発(黒田 G)

プロテオーム、メタボロームなど複数階層のオミクスデータ(トランスオミクスデータ)からインスリンシグナリングによる代謝調節経路を同定する手法を開発した(国内特許:特願 2012-256440)。これにより多階層にわたる大規模ネットワークをアンバイアスに同定することに成功した。また、**citrate** を中心に計測対象分子を絞り込み、動的なシグナルフローの解析を開始した。

・データドリブンモデルの開発(黒田 G、石井 G)

黒田らはブラックボックスモデリングとして **Hill 式** と線形時間フィルタを組み合わせた非線形時間フィルタの開発を行い、PC12細胞における **ERK signaling** とその下流の **immediate early genes** の発現に対して適用して成果を報告した(文献1)。

石井らは、ブラックボックスモデリングに基づくシステム同定のために、一般化線形モデルのベイズ的階層モデルを設計し、このモデルに対する推定アルゴリズムを実装した。ここで要因間関係の有無がブラックボックスである場合に、帰無仮説設定をデータ・ドリブンで行うことで、多重検定の下で高い検出力が得られる工夫を実装した。また、このモデルに対する実数値入力信号を積の形で入れる拡張を実装し、二値的入出力関係に実数値入力を含むハイブリッドシステムのモデリングを可能とした。**MAP Kinase** と **CREB**リン酸化系の時間情報コードへの応用を来年度以降に行う予定である。石井らは一方で、上記のシステム同定手法で得られる時間情報コードに基づいて、システム制御を行うための方法開発を進めた。生化学分野のモデルでは、しばしば、システムの非線形性に加え、システム内部次元に対して入力次元が小さいという問題が存在する。経路積分に基づく最適制御法理論を応用することで、このような場合でも一般に制御しうるフレームワークを検討した。次年度以降に、システム同定と合わせてこうした制御手法をシミュレーションレベルで実装する予定である。

4. プローブ開発

•AKT 光制御プローブの開発(小澤 G)

Akt の時空間的な活性を選択的に一細胞レベルで制御する手法はこれまでになく、Akt の活性化と生体機能発現の詳細なメカニズムは未だ不明である。そこで、生体内における Akt 活性を時空間的に光により制御するプローブの開発を目的とした。生体内において Akt は成長因子などの細胞外刺激に応じて細胞質から細胞膜へ局在変化し、上流のリン酸化酵素によって活性化される。そこで光感受によってヘテロ二量体を形成する光受容タンパク質 CRY2 と CIBN を利用し、光によって Akt が細胞膜へ移行するシステムを作製した。CRY2 と CIBN のヘテロ二量体形成は可逆的反応であること、また作製した光活性型 Akt が光依存的に活性化されるかを顕微鏡観察および生化学的手法によって検証した。結果、Akt の局在を可逆的に 1 μ m 以下の高い空間分解能で制御できること、光照射により数秒以内に細胞膜に移行すること、光照射を止めると数分で細胞質に戻ることに、この空間的ダイナミクスは光の on/off で可逆的に制御できることを実証した。さらに光照射依存的な Akt の活性化と Akt の基質タンパク質のリン酸化修飾を確認した。

•AKT 光制御プローブの適用(小澤 G、黒田 G)

AKT 光制御に適した細胞種として、C2C12 細胞を選択した。この細胞腫に対して、シグナル伝達経路のダイナミクスの計測を準備的に開始した。

5. マイクロ流体デバイス

•マイクロ流体デバイスの開発(藤井 G、黒田 G)

インスリンの刺激波形を制御するためのマイクロ流体デバイスの開発に取り組んだ。圧力損失や拡散距離を考慮しながらマイクロ流路の幅、高さ、流量を設計することで、単純な流路構造を使って速やかにターゲット物質を目的の濃度に混合できるマイクロ流路構造を設計、製作した。マイクロポンプや電磁バルブ等の流体素子と、自作の制御装置を組み合わせ、様々な送液モードを実現できるマイクロ流体送液システムを構築し、それを使ってマイクロ流体デバイス内で濃度波形を制御する実証実験を開始した。インスリン代替モデル物質として、分子量が比較的近い蛍光物質(蛍光デキストラン等)を用いることによって、ターゲット物質の濃度変化を光学顕微鏡とビデオカメラで視覚的に可視化し、定量的に測定・評価できる実験系を構築することができた。細胞動態計測に向けて、デバイス集積型のマイクログルコースセンサの開発にも着手した。センサ感度の向上を目指して微小電極の形状、サイズ、電極間距離等のパラメータの最適化検討を実施した。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Minoru Honda, Hidetoshi Urakubo, Takuya Koumura, and Shinya Kuroda, “A Common Framework of Signal Processing in the Induction of Cerebellar LTD and Cortical STDP”, *Neural Networks*, pp. 114-124 22-MAR-2013

(DOI: 0.1016/j.neunet.2013.01.018)

2. Takeshi H. Saito, Shinsuke Uda, Takaho Tsuchiya, Yu-ichi Ozaki and Shinya Kuroda, “Temporal Decoding of MAP Kinase and CREB Phosphorylation by Selective”, *Journal of PLoS ONE*, volume. 8, Issue 3, e57037, March 2013

(DOI: 10.1371/journal.pone.0057037)

3. Rei Noguchi, Hiroyuki Kubota, Katsuyuki Yugi, K., Yu Toyoshima, Yasunori Komori, Tomoyoshi Soga and Shinya Kuroda, “The Selective Control of Glycolysis, Gluconeogenesis and Glycogenesis by Temporal Insulin Patterns” *Molecular Systems Biology*, 28-MAR-2013 Manuscript number: MSB-12-4146RR (in press)

(3-2) 知財出願

① 平成 24 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)