

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月13日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21240025

研究課題名（和文） 細胞成長を制御する Akt 経路のシステム生物学

研究課題名（英文） Systems biology of AKT signaling

研究代表者

黒田 真也（KURODA SHINYA）

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：50273850

研究成果の概要（和文）：

本研究では、Akt 経路による細胞成長の制御メカニズムを周波数応答解析により明らかにする。我々は PC12 細胞において Akt 経路が逐次一次反応で表現することができるローパスフィルタという信号処理特性を示すことを発見した。また、逐次一時反応経路において、刺激や阻害剤に対する感受性解析を行った結果、刺激に対しては上流より下流のほうが感受性が高く、逆に阻害剤に対しては上流より下流のほうが感受性が低くなることを理論的に見出した。この原理の発見は、薬剤応答の予測や創薬デザインなどに役立つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：

In cellular signal transduction, information in an external stimulus is coded as temporal patterns of signaling activities; however, the temporal coding mechanism has been poorly investigated. In this study, we modeled the epidermal growth factor (EGF)-dependent Akt pathway in PC12 cells based on experimental results, and found how the Akt pathway, which is involved in cell growth, specifically transfers temporal information of upstream signals to downstream. In addition, we theoretically analyzed a simple biochemical reaction and found that signal transfer efficiency of transient peak amplitude attenuates depending on the strength of negative regulation, and found that cells can control downstream sensitivity through attenuation of signal transfer efficiency by changing the expression level of negative regulators.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2011年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
年度			
年度			
総計	24,900,000	7,470,000	32,370,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学、生体生命情報学

キーワード：Akt、シグナル伝達、システム生物学、周波数応答、ローパスフィルタ

1. 研究開始当初の背景

Akt 経路は細胞成長を制御することにより、細胞の増殖や分化などさまざまな現象を制御している。本研究では、Akt 経路による細胞成長の制御メカニズムを周波数応答解析と 1 細胞レベルの分布解析を行うことにより明らかにする。以前申請者らは刺激の速さや強度がシグナル伝達分子の活性へ変換されていることを見出した[1]。その後、これらは刺激やシグナル分子の時間パターンに情報をコードしていると思なせること、つまり一種の周波数応答として理解できることを独自に見出した。

2. 研究の目的

本研究では、まず Akt 経路の周波数応答を細胞集団レベルで解析して情報処理機構を明らかにする。細胞成長においては個々の細胞のサイズを計測するのが一般的であるため、シグナル分子活性についても従来用いられてきた細胞集団平均データだけでなく 1 細胞レベルの分布データを計測する必要がある。申請者らが最近開発したロボットを用いた蛍光免疫染色法により、1 細胞レベルの分布データを精度よく大量に計測して、Akt 経路のシグナル分子活性と細胞サイズの相関を解析する。細胞成長制御の特性を明らかにするために取得した分布データからの確率微分方程式を用いたモデル化手法を開発して解析する。

3. 研究の方法

Akt の周波数応答特性：Akt 経路は低周波フィルタとして機能していると考えられるため、受容体の活性の低周波成分が Akt 経路を介して選択的に下流に伝達され、その結果 S6 の活性の異なるパターンを生み出していると考えられる。受容体の活性の低周波成分のみが下流に伝達されるかどうかを検討するため、さまざまな周波数成分を含む受容体の活性パターンを微分方程式モデルに与えることにより、低周波成分のみが選択的に下流に伝達されているかどうかを検討する。さらに、実験を用いて検証する。また、これが AKT 経路以外でも認められる一般的な特性であることも同様に解析する。

4. 研究成果

PC12 細胞における Akt 経路の周波数応答解析の結果、EGFR-Akt と Akt-S6 の経路はいずれも低周波をよく通すローパスフィルタ

として作用していることが分かった。シグナル分子の時間パターンが持続的であるほどローパスフィルタによる伝達効率が高いため、EGFR の弱い持続的な信号がより効率的に下流へ伝わり、S6 の強い応答を誘導するという、逆転現象のメカニズムが明らかになった (図 1)。

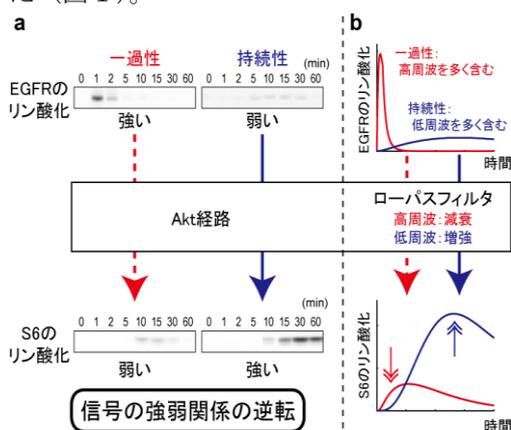


図 1 Akt 経路のローパスフィルタ特性

このローパスフィルタ特性は逐次一次反応という非常に単純な生化学反応に内在する特性であることがわかった。また異なる種類の刺激として NGF の step 刺激を与えた際にも同様のローパスフィルタ特性が見られることを確認した。さらに、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がモデルから予測された。実際に、抗癌剤としても用いられる EGFR 阻害剤 lapatinib は EGFR の活性を強い一過性から弱い持続性へと変化させ、結果として S6 の活性を亢進させた。つまり抗癌剤が下流の応答を逆に亢進させる場合があることを実際に確認した。

刺激により引き起こされた信号がシグナル伝達経路を伝わる時、信号のピーク強度の伝達効率が経路の負の制御の強さによって異なることを明らかにした。さらに上流分子の時間パターンの時定数と経路の時定数との比から伝達効率が求められることをモデルから予測し、実際に実験を行って実証した。この実験は同時に、多くのシグナル伝達経路の入出力関係が逐次一次反応で近似できることを示唆しており、逐次一次反応に伴うローパスフィルタ特性が細胞や刺激、経路によらない普遍的な特性であることを明らかにした (図 2)。

さらに、ピーク強度の伝達効率の低下によって、刺激の強度に対するピーク強度の感受性

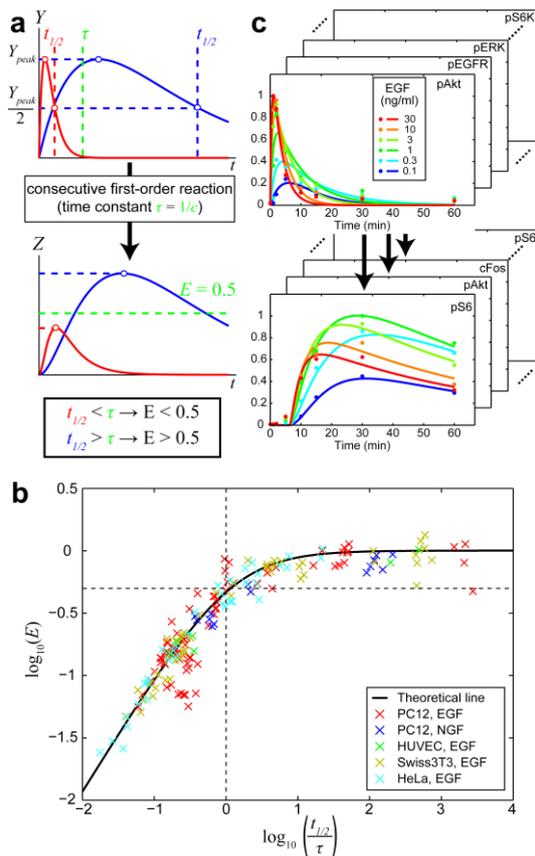


図2 ローパスフィルタ特性の普遍性

(EC50)が経路の下流で増強されることや、経路の負の制御が弱いほど増強が強くなることを見出した。また同様のメカニズムにより、ピーク強度の阻害剤感受性(IC50)は経路の下流で減弱することや、経路の負の制御が弱いほど減弱が強くなること、不可逆性の強い阻害剤を用いるとこの減弱が抑圧されることなどを見出した。さらに、抗癌剤として用いられるEGFR阻害剤lapatinibに対する感受性(IC50)が、Akt経路下流のS6でAktよりも減弱していることを実際に実験を行って確認し、阻害剤感受性が減弱する現象を実証した。

④成果の位置づけ

シグナル伝達研究において信号のピーク強度は応答の強さの指標として頻用されるにもかかわらず、その伝達効率や刺激感受性がどのようにして決まるかは不明のままであった。我々は生化学反応の基本的な要素である逐次一次反応に注目し、信号のピーク強度の伝達効率や刺激感受性が逐次一次反応の負の制御の強さによって決まることを明らかにした。この成果は信号の伝達効率や刺激感受性の決定について、全く新たなメカニズムを提示するものである。また阻害剤の効果が下流分子ほど減弱するという発見は、薬剤開発の分子標的の選定などに役立つと考えられる。

また、負の制御の強さは脱リン酸化酵素やタ

ンパク分解酵素といった負の調節因子の活性・発現量を反映すると考えられるので、細胞はこのような分子の活性調節を介して、刺激や阻害剤に対する自身の感受性を制御していることが示唆された。さらに、遺伝子発現から翻訳までの過程は逐次一次反応で近似できる場合が多く、またシグナル伝達経路と比して負の制御が弱い(時定数が大きい)と考えられるので、細胞は遺伝子発現の過程を介することで刺激に対する感受性を増強していることが示唆された。このように、個々の分子・経路ではなくシステムのレベルの特性を明らかにした点は、システム生物学の点から高く評価できる。

また一般にシグナル伝達経路は多数の分子からなる複雑で非線形なネットワークを形成していると考えられているが、本研究によって、多くのシグナル伝達経路の入出力関係が逐次一次反応で近似できることがわかった。この結果は、シグナル伝達のダイナミクスを解析する上では、詳細な分子ネットワークの構築は重要ではなく、詳細を省いた粗視化(単純化)が有効であることを実証するものである。この結果は同時に、逐次一次反応に伴うローパスフィルタ特性が細胞や刺激、経路によらない普遍的な特性であり、多くの経路に存在することを意味している。これによって、Akt経路の解析において我々が開発した、周波数特性に注目してシグナル伝達経路を解析する手法の有効範囲が広がり、妥当性や意義が強まったといえる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Kubota, H., Noguchi, R., Toyoshima, Y., Ozaki, Y., Uda, S., Watanabe, K., Ogawa, W. and Kuroda, S.
Temporal Coding of Insulin Action through Multiplexing of the AKT Pathway,
Molecular Cell、査読あり、46 (6), 820-832,(2012)
DOI:10.1016/j.molcel.2012.04.018
- ② Watanabe, K., Akimoto, Y., Yugi, K., Uda, S., Chung, J., Nakamuta, S., Kaibuchi, K. and Kuroda, S.
Latent process genes for cell differentiation are common decoders of neurite extension length,
Journal of Cell Science、査読あり、125, 2198-2211(2012)
DOI: 10.1242/jcs.097709

- ③ Toyoshima, Y., Kakuda, H., Fujita, K., Uda, S. and **Kuroda, S.**, Sensitivity control through attenuation of signal transfer efficiency by negative regulation of cellular signaling, Nature Communications, 査読あり、3(473),(2012)、DOI:10.1038/ncomms1745
- ④ 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, 査読あり、3(132),ra56,(2010) DOI:10.1126/scisignal.2000810

[学会発表] (計 5 件)

- ① 久保田浩行、野口怜、豊島有、尾崎裕一、宇田新介、渡邊可奈子、小川渉、**黒田真也**、第 35 回日本分子生物学会年会、AKT 経路の情報多重化によるインスリン作用の時間情報コード、20121212、福岡（福岡国際会議場）
- ② **黒田真也**、第 50 回日本生物物理学会年会 ERK 経路の情報コード、20120921、名古屋（名古屋大学）
- ③ 久保田浩行、野口怜、豊島有、尾崎裕一、宇田新介、渡邊可奈子、小川渉、**黒田真也**、Joint meeting of JSDB 45th & JSCB 64th、Temporal Coding of Insulin Action through Multiplexing of the AKT Pathway、20120529、神戸（神戸国際会議場）
- ④ **黒田真也**、第 85 回日本生化学会大会、インスリン作用の AKT 経路による多重情報コード、20110921、京都（国立京都国際会館）
- ⑤ **黒田真也**、Temporal coding of ERK and AKT signaling networks、2010 年日本バイオインフォマティクス学会年会、20101214、福岡（九州大学医学部百年講堂）

[その他]

ホームページ等

<http://kurodalab.bi.s.u-tokyo.ac.jp/ja/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 真也 (KURODA SHINYA)
東京大学・大学院理学系研究科・教授
研究者番号：50273850

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし