

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25890025

研究課題名(和文) 実験とシミュレーションによるNFκBシグナル伝達システムの解明

研究課題名(英文) Revealing NF-κB signal transduction system by experiment and simulation

研究代表者

井上 健太郎 (Inoue, Kentaro)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・特別研究員

研究者番号：80708529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子NF-κBは細胞運命決定や疾患に関与しており、NF-κBシグナル伝達システムの数理モデルによる解析はNF-κB活性化の制御メカニズムの理解に役立つ。これまでNF-κB活性化システムのモデリングはNF-κB活性の振動を再現できる一部のモデルの構築に留まっていたが、本研究では、振動に加えてスイッチライク応答も再現でき、これまでで最も多くの実験を説明できるNF-κBシステムのモデルを構築した。

研究成果の概要(英文)：Transcription factor nuclear factor kappa B (NF-κB) is related to cell fate decision and various diseases. Mathematical model for NF-κB signal transduction system is useful to understand a regulatory mechanism of NF-κB activation. Previous models for NF-κB system can reproduce an oscillatory behavior for NF-κB activity. In this study, we constructed a model which reproduces not only the oscillatory behavior but also a switch-like response for NF-κB activity. This model is the largest model explaining a lot of experiments in NF-κB system.

研究分野：システム生物学

キーワード：NF-κB シグナル伝達システム シミュレーション モデリング

## 1. 研究開始当初の背景

近年、1分子ではなく細胞単位でデータ計測ができるアレイやシーケンサの登場により、細胞まるごと解析を行うオミクス解析が発展し、システム全体から個々のモジュールを捉えることができるようになった。一方で、生体分子ネットワークの合理的知見に基づいて、分子や遺伝子レベルでのダイナミクスを解析し、薬剤投与などの入力に対する発現制御のメカニズムをシステムレベルで、そのロバスト性を明らかにする合成生物学が発展している。各モジュールへの影響を漏れなくシステムレベルで捉えるためには、オミクス解析と合成生物学的解析を両側面から検討していくことは重要である。

転写因子 NF- $\kappa$ B の活性化に関わる分子の欠損は免疫不全になり、逆に過活性化は自己免疫疾患やがんを誘導することが報告されている。NF- $\kappa$ B を誘導するシグナル制御の理解は重要な課題となっている。研究代表者が所属する研究グループは分子メカニズムに基づいた NF- $\kappa$ B 活性化経路における PKC、TAK1、CARMA1、IKK のシグナル増幅機構を明らかにし、抗原受容体シグナルでは MEKK3 が必須な分子であることを明らかにした(Shinohara et al., Int. Immunol., 2009)。

しかし、現状では NF- $\kappa$ B 経路の部分的な経路のモデリングに留まり、そのシステム全体のダイナミックモデルの構築、ロバスト性解析までには至っていない。受容体から NF- $\kappa$ B 活性化までの詳細なモデルを構築し、シグナル経路全体の制御メカニズムを明らかにする必要がある。

オミクス解析と合成生物学的解析の知見に基づいた NF- $\kappa$ B 活性化特異的な経路を決定する理論的方法論の開発が求められている。

## 2. 研究の目的

本研究では、

(1)オミクスデータから細胞特異的な分子ネットワークを構築し、研究代表者が開発したネットワーククラスタリング法 ADMSC (Inoue et al., PLOS ONE, 2010)を適用して、そのネットワークの NF- $\kappa$ B 関連分子の特徴づけの検討を行う。オリジナルの ADMSC はネットワークトポロジーのみで解析されるが、トランスクリプトームデータ等を組み合わせた手法を検討し、NF- $\kappa$ B 関連分子の探索精度向上を図る。

(2)既存の NF- $\kappa$ B に関連したモデルの統合を行う。そして、ネットワーク解析によって推定された分子を含めて、モデル拡張を図る。統合モデルで生じる未知の動力学パラメタ

を最適化し、NF- $\kappa$ B の現象を再現できるパラメタ探索を行う。knockout や knockdown による摂動解析を行い、シミュレーションと生物実験を繰り返すことによって信頼性の高いモデルを目指す。異なる細胞でもパラメタ最適化を行い、細胞間の NF- $\kappa$ B 応答に対するシグナル経路のロバスト性を評価して、NF- $\kappa$ B システムの特性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

モデリングは大規模なモデルから始めると、反応速度パラメタの最適化がうまくいかない場合、原因をつきとめるのが困難なため、まずは既存の NF- $\kappa$ B 関連のモデルの統合を行い、ベースモデルを作成した。

ベースモデルは研究代表者のグループで開発された NF- $\kappa$ B 上流の CARMA1、TAK1、IKK のモデル(Shinohara et al, Science, 2014)と、Werner らの IKK、NF- $\kappa$ B、I $\kappa$ B のモデル(Werner et al, Science, 2005)を統合した。また、CARMA1 に結合する BCL10、MALT1 と NF- $\kappa$ B に発現誘導される A20 を加えた。モデルは質量作用の法則やミカエリスメンテン式などの微分方程式で記述し、モデルにある未知の反応速度パラメタを探索するために遺伝的アルゴリズムを使って、実験を説明できるパラメタ探索を行った。

NF- $\kappa$ B 活性化を誘導する AntiIgM(M4)と CD40 で刺激した細胞の時系列トランスクリプトームデータと、データベースの STRING(<http://string-db.org/>)からダウンロードしたプロテオームデータを用いて、刺激後発現が変化する遺伝子の中で、Gene Ontology に基づく NF- $\kappa$ B 関連分子との相関がある分子の探索を行った。

## 4. 研究成果

微分方程式 47、反応パラメタ 189 のベースモデルを開発した(図 1)。シミュレーションは NF- $\kappa$ B の活性ダイナミクスだけでなく、シグナル分子である CARMA1、TAK1、IKK の短い時間の応答から、長い時間の応答までの実験を再現できた。また、野生型の実験だけでなく、モデル内にある反応を阻害した実験や遺伝子をノックアウトした実験も再現できるパラメタが得られた。

開発したベースモデルは NF- $\kappa$ B 活性ダイナミクスの特徴である、(1)刺激後活性の増減を繰り返す振動の振る舞いと、(2)刺激量に応じて徐々に活性が上がるのではなく、急激に活性が上昇するスイッチライク応答、を再現できる世界初のモデルである(図 2)。今後はこのモデルの特性を解析し、シミュレーションによって予測されたシステム特性を実験によって検証を進める予定である。

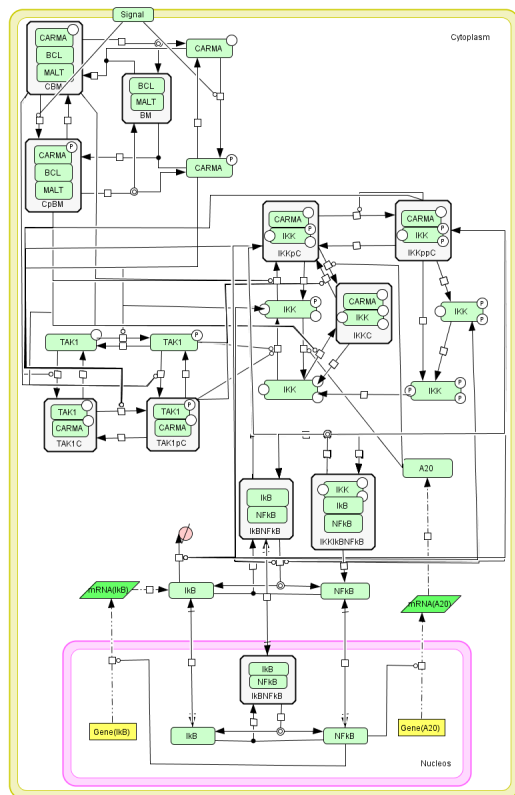


図1: NF- B 活性化システムのベースモデル

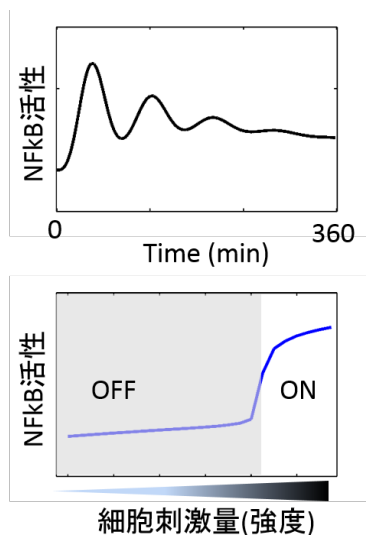


図2: NF- B 活性の振動(上)とスイッチライク応答(下)

トランスクリプトーム解析で使用した細胞はトリ DT40 細胞を用いたので、STRING から Gallus のプロテオーム (PPI) データ (Protein:14,261, Interaction: 1,283,185) を用いた。トランスクリプトームデータの発現変動遺伝子 (DEG) は 578 遺伝子あり、この遺伝子に対応する PPI を取り出した (Protein:494, Interaction:3031)。この遺伝子中で、Gene

Ontology の NF- B パスウェイに関連した分子は 23 遺伝子であった。この 23 遺伝子に隣り合う遺伝子を PPI (Protein:206, Interaction:1520) から取り出し、それらの PPI からネットワークダイナミクスと発現相関を調べた。上記のネットワーク内の分子で、M4 で刺激した発現データと CD40 で刺激した発現データをクラスタリングした結果、刺激後初期に発現が上昇する遺伝子群と後期に発現が上昇する遺伝子群に分かれた。

各種の刺激した細胞で相関係数を求めて、各エッジにおける相関係数の絶対値を調べたところ、CD40 は M4 に比べて NF- B 関連分子との相関が低かった。

オミクス解析で得られた結果をベースモデルに加えようとしたが、それらの分子とベースモデルの分子を関連づける文献情報が少なかったため、モデル拡張までには至らなかった。

今回得られた結果から、ボトムアップ解析に応用するのは現状、適当ではないと判断したことから、本研究はベースモデルの解析を主に進めた。

本研究で、文献情報に基づいてボトムアップに構築したベースモデルは私が知る限り、既知の実験データを最も多く説明できるモデルである。NF- B 活性化システムを研究する多くの研究者がモデルと実験によって、生物学的な現象の検証・説明に使っていることから、今回、構築したモデルは様々な NF- B 研究において活用されることが期待される。

今後はこのモデルを使って、NF- B 活性ダイナミクスに対するシステムのロバスト性解析を進めて、論文としてまとめる。

< 引用文献 >

Inoue, K., Li, W., and Kurata, H. (2010). Diffusion model based spectral clustering for protein-protein interaction networks. PLoS One 5, e12623.

Shinohara, H., and Kurosaki, T. (2009). Comprehending the complex connection between PKCbeta, TAK1, and IKK in BCR signaling. Immunological reviews 232, 300-318.

Shinohara, H., Behar, M., Inoue, K., Hiroshima, M., Yasuda, T., Nagashima, T., Kimura, S., Sanjo, H., Maeda, S., Yumoto, N., et al. (2014). Positive feedback within a kinase signaling complex functions as a switch mechanism for NF-kappaB activation. Science 344, 760-764.

Snel B, Lehmann G, Bork P, Huynen MA, (2000). STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. Nucleic Acid Res. 28(18), 3442-4.

Werner, S.L., Barken, D., and Hoffmann, A. (2005). Stimulus specificity of gene expression programs determined by temporal control of IKK activity. Science 309, 1857-1861.

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計10件)

井上健太郎, 篠原久明, 岡田眞里子, BCRシグナリングによるNFkBの振動とスイッチライク応答のシステム解析, 生命動態合同シンポジウム, 京都大学(京都), 3月16-17日, 2015

Kentaro Inoue, Hisaaki Shinohara, Mariko Okada-Hatakeyama, System analysis for oscillation and switch-like response of NF-kappaB in B cell, The Third BMIRC International Symposium, Nogami president hotel (Fukuoka), March 6, 2015

井上健太郎, NF-kBシグナル伝達経路のモデリング, 第7回定量生物学の会, 九州大学(福岡), 1月11-12日, 2015

井上健太郎, 篠原久明, 岡田眞里子, 動力学モデルによる転写因子NFkB活性の振動およびデジタル応答の制御メカニズム解明, 第3回生命医薬情報学連合大会, 仙台国際センター(仙台), 10月2-3日, 2014

Kentaro Inoue, Hisaaki Shinohara, Marcelo Behar, Alexander Hoffmann, Mariko Okada-Hatakeyama, Kinetic modeling of NF-kappaB signaling pathway, 22nd Annual International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB2014), Boston (USA), July 13-14, 2014

井上健太郎, NFkBシグナル伝達系の速度論モデル, 理研シンポジウム「細胞システムの動態と論理」, 理化学研究所(埼玉), 4月3日, 2014

Kentaro Inoue, Hisaaki Shinohara, Mariko Okada-Hatakeyama, Dynamic modeling of NF-kB signaling system in B cell, The Second BMIRC International Symposium, Center of Iizuka research and development (Fukuoka), January 30, 2014

Kentaro Inoue, Hisaaki Shinohara, Mariko Okada-Hatakeyama, Dynamic modeling of NF-kB signaling system in B cell, Genome

Informatics Workshop (GIW2013), Biopolis (Singapore), December 16-17, 2013

Kentaro Inoue, Hisaaki Shinohara, Marcelo Behar, Alexander Hoffmann, Mariko Okada-Hatakeyama, Dynamic modeling for NF-kB signal transduction system, 第36回分子生物学会年会, 神戸国際会議場(神戸), 12月3日, 2013

Kentaro Inoue, Hisaaki Shinohara, Mariko Okada-Hatakeyama, System analysis for NF-kB signal transduction pathway, The 2nd Joint Conference on Informatics in Biology, Medicine and Pharmacology, Tower Hall Funabori (Tokyo), October 29-31, 2013

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://csb.rcai.riken.jp/?lang=ja>

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

井上 健太郎 (INOUE, Kentaro)  
理化学研究所・統合生命医科学研究センター・特別研究員  
研究者番号：80708529