

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21624

研究課題名(和文) NF- κ B活性の振動とスイッチライク応答における制御メカニズムの解明研究課題名(英文) Research on regulatory mechanism for oscillation and switch-like response of NF- κ B

研究代表者

井上 健太郎 (Inoue, Kentaro)

宮崎大学・工学部・助教

研究者番号：80708529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：NF- κ Bは転写因子のひとつで、細胞運命決定に重要であることが知られている。NF- κ B活性化の分子レベルの制御メカニズムの全容ははまだ解明されていない。私たちはNF- κ B活性化に関わる分子ネットワークを数理モデルで表現し、NF- κ B活性が示す振動とスイッチライク応答に焦点をあてて解析を行い、その結果を生物実験で検証した。振動とスイッチライク応答という2つの性質は、制御メカニズムがすべて同じというわけではないが、活性化に関わる分子の量や反応速度のバランスによって、補間可能であることが数値解析と理論解析で示された。また、それを生物実験でも証明した。

研究成果の概要(英文)：Nuclear factor kappa B (NF- κ B) is a transcription factor and is important for cell fate decision. The regulatory mechanism of NF- κ B activation at molecular level is still unclear. We developed a mathematical model for NF- κ B signal transduction system and focus on oscillatory behavior and switch-like response of NF- κ B activity. Furthermore, we validated the results by biological experiments. The numerical and theoretical analysis showed that the mechanism of oscillatory behavior and switch-like response of NF- κ B activity is not same but their behaviors can be interpolated by balance among amounts of molecules and reaction rates with respect to the activation. Our experiments supported the results.

研究分野：システム生物学

キーワード：シグナル伝達 数理モデリング シミュレーション NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

転写因子 NF-κB は細胞増殖や分化、細胞死といった細胞運命決定だけでなく、免疫応答や炎症反応においても中心的な役割を担っている。NF-κB 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-κB 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 (Hayden, Genes Dev, 2012)。

申請者らは、これまで未知とされてきた NF-κB 活性の ON/OFF を決めるスイッチライク応答(図 1)が起きるメカニズムを免疫 B 細胞において、生物実験と数理モデルにより明らかにした(Shinohara, Science, 2014)。この研究では、NF-κB の上流にある IKK の活性がアダプタータンパク質である CARMA1 を介した正のフィードバックにより増幅されることに着目し(Shinohara, Int Immunol, 2009)、CARMA1-TAK1-IKK モジュールにおける正のフィードバックによって、TAK1 活性の持続化、IKK 活性の増幅、そして、NF-κB の活性化のスイッチライク応答を制御していることを明らかにした。

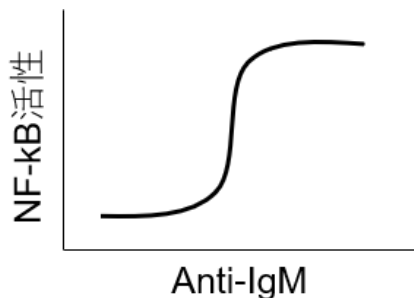


図 1 : NF-κB 活性のスイッチライク応答

NF-κB 活性のダイナミクスには、スイッチライク応答のほかに、細胞の刺激に対して減衰振動を示すことが知られている(Hoffmann, Science, 2002)。振動のダイナミクスを生み出すネットワーク構造は、IKK -IκB-NF-κB における負のフィードバックによって引き起こされることが知られている。

NF-κB 活性の振動やスイッチライク応答がどのようなネットワークで起きるかはわかってきたが、それぞれのネットワークが異なるダイナミクスに与える影響についてはわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では、NF-κB の振動とスイッチライク応答のダイナミクスを引きおこすシステム間について、数理モデルと生物実験により解析を行った。

本研究の目的は、NF-κB 活性の減衰振動とスイッチライク応答に係るネットワークに着目して数理モデルを構築し、NF-κB 活性の振動とスイッチライク応答をシミュレーションにより再現する。

次に、反応速度パラメタ等のすべてのモデルパラメタを網羅的に変化させて、振動やスイッチライク応答に影響を与えるパラメタの感度解析、摂動解析、分岐解析を行うことで、振動とスイッチライク応答のダイナミクスの特性を調べる。また、これらの解析で得られた結果を生物実験で検証を行う。

3. 研究の方法

数理モデルは、CARMA1, Bcl10, MALT1, TAK1, IKK, IκB, IκB, NF-κB, A20 を構成要素とし、結合・解離、リン酸化・脱リン酸化、転写、翻訳反応のネットワークを質量作用の法則、ミカエリスメンテン則、ヒル式で構築した。CARMA1, Bcl10, MALT1, TAK1, IKK, NF-κB のタンパク質総量は一定と仮定し、シグナル分子が次のタンパク質に情報を伝える活性状態の実験データをシミュレーションにより再現した。

再現された数理モデルから、各モデルパラメタの値を変化させて感度解析を行った。感度は次の式を用いた。

$$Sensitivity_i = \frac{\partial \ln q(\mathbf{p})}{\partial \ln p_i}$$

p_i はモデルパラメタ値、 $q(\mathbf{p})$ は振動とスイッチライク応答に関する次の値である。振動は振幅と周期、スイッチライク応答はヒル関数にフィッティングを行った時のヒル係数と EC50。パラメタの変動に対して、これらの値がどの程度変化するかを調べた。

また、タンパク質の総量は一定と仮定しているため、タンパク質の総量が増加したときに、振動またはスイッチライク応答が起きるかの摂動解析を行った。

感度解析で得られた振動やスイッチライク応答に影響を大きく与えるネットワークに絞って、シンプルモデルを構築し、数値解析だけでなく、理論解析でも振動とスイッチライク応答に変化を生み出すメカニズムが保証されるかを検証した。

数理モデルで予測されたメカニズムを生物実験で検証し、振動とスイッチライク応答の B 細胞の活性化における役割を調べた。

4. 研究成果

微分方程式 47、反応数 161、モデルパラメータ 189 の数理モデルを構築した(図 2)。このモデルは、NF-κB の振動とスイッチライク応答だけでなく、CARMA1, TAK1, IKK の活性も再現できた。

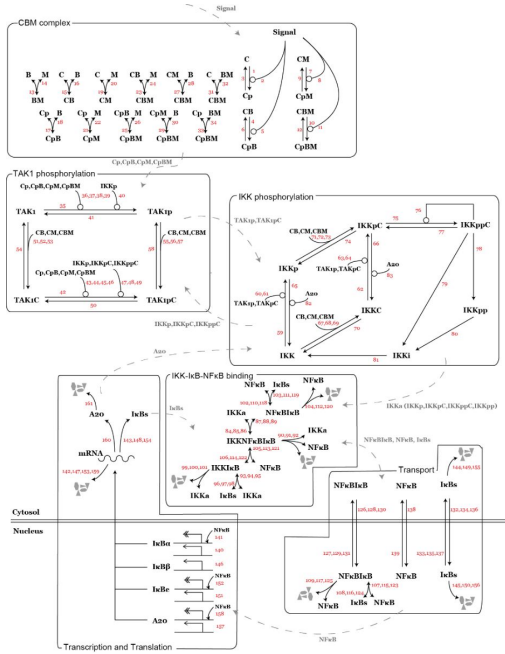


図 2: NF-κB パスウェイの数理モデル

感度解析の結果、振動に関しては IKK と IκB に関わる反応パラメータの感度が高かった(図 3 左)。スイッチライク応答は TAK1, IKK に関わる反応パラメータの感度が高かった(図 3 右)。これらのことから、NF-κB 活性の振動とスイッチライク応答という同じ分子の活性にもかかわらず、異なるダイナミクスに対する感受性に違いがあることが示された。この感受性の違いを確認するために、IκB の過剰発現、IKK のフィードバック阻害実験を行ったところ、これらの結果を支持する結果が得られた。

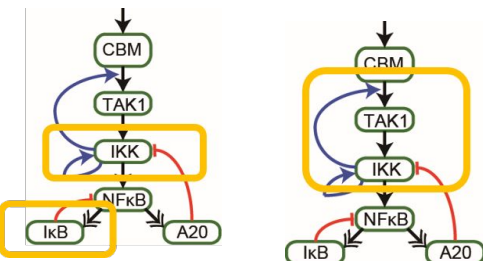


図 3: 振動(左)とスイッチライク応答(右)の感受性が高い反応(黄色の四角)

次に、タンパク質の総量を変化させたシミュレーションの結果、NF-κB 以外のタンパク質の総量を変化させても、振動とスイッチライク応答の有無は同様の結果を示していたが、NF-κB のタンパク質の総量を変化させたときには、振動とスイッチライク応答が起きる領域が異なった(図 4)。これは、実験的にも同様のことが確認された。

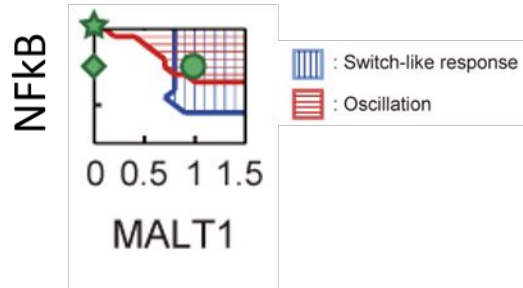


図 4: タンパク質の総量を変化による振動(赤)とスイッチライク応答(青)が起きる領域

図 4 の結果は、NF-κB の量が多いほど、振動しやすくなっているが、なぜこのような現象が起きるのかを、感度解析をもとにシンプルモデル(図 5)を構築して、理論的な解析を行った。

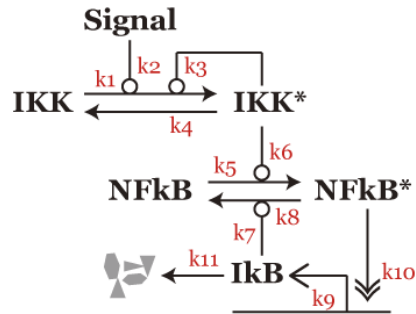


図 5: 感度解析に基づくシンプルモデル

シンプルモデルの解析では、分岐理論に基づいて、平衡状態におけるヤコビアン固有値を解き、減衰振動は固有値が実数解から虚数解になる分岐、スイッチライク応答は 2 つ目のサドルノードが現れる分岐を調べ、数値解析と一致するモデルを構築した。

このモデルから、NF-κB のタンパク質の総量を増加は、上流のシグナルの活性に対する感受性を増加させることが示された。これによって、上流の活性が低い場合(スイッチライク応答が起きない場合)でも減衰振動が起きやすくなることが示された。

また、このシンプルモデルを用いて、IKK の正のフィードバックに関して解析したところ、この正のフィードバックは単にスイ

チライク応答を引き起こすだけではなく、活性を短時間で急激に上げることによって、NF- κ Bの振幅の最大値を上げていることが示された。

最後に、数理モデルから予測された振動とスイッチライク応答が見られる状態と見られない状態の4つの組み合わせを生物実験で再現した。これらの組み合わせにおいて、振動とスイッチライク応答が細胞の活性化にどのように関わっているかを調べるために、B細胞の活性化マーカーであるCD83の発現を調べた。その結果、振動とスイッチライク応答の両方が見られるときだけ、CD83が十分に発現していた。このことから、振動とスイッチライク応答の両方がB細胞の活性化に必要であることが示唆された。

これらの研究成果は発表論文(1)として報告している。

今後はこのモデルを拡張していき、NF- κ B活性化メカニズムの全体像の解明につなげていきたい。

<引用文献>

Hayden, M. S. and S. Ghosh (2012). "NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions." *Genes & development* 26(3): 203-234.

Shinohara, H., and Kurosaki, T. (2009). Comprehending the complex connection between PKC β , 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- κ B activation. *Science* 344, 760-764.

Hoffmann, A., et al. (2002). "The I κ B-NF- κ B signaling module: temporal control and selective gene activation." *Science* 298(5596): 1241-1245.

5. 主な発表論文等

〔発表論文〕

(1) Kentaro Inoue, Hisaaki Shinohara, Marcelo Behar, Noriko Yumoto, Gouhei Tanaka, Alexander Hoffmann, Kazuyuki Aihara, Mariko Okada-Hatakeyama, Oscillation dynamics underlie functional switching of NF- κ B for B-cell activation, *npj Systems Biology and Applications* 2, 16024, 2016. doi:10.1038/npjbsa.2016.24. (査読あり)

(2) Hisaaki Shinohara, Kentaro Inoue, Noriko Yumoto, Takeshi Nagashima, Mariko Okada-Hatakeyama, Stimulus-Dependent Inhibitor of Apoptosis Protein Expression Prolongs the Duration of B Cell Signalling, *Scientific Reports*, 6, 27706, 2016. doi:10.1038/srep27706. (査読あり)

〔学会発表〕(計12件)

(1) Kentaro Inoue, Hisaaki Shinohara, Mathematical model and experiments for canonical NF- κ B signaling, 新学術領域「数理シグナル」第2回シンポジウム, 東京大学(東京), 2018年2月10日

(2) 井上健太郎, シグナル伝達系における大規模モデルのシミュレーションに向けた研究, ConBio2017 (第40回分子生物学会年会), 神戸ポートピアホテル(兵庫), 2017年12月6~9日

(3) 井上健太郎, シグナル伝達系の大規模数理モデルにおけるパラメタ推定法, 情報処理学会第51回バイオ情報学研究会, 北海道大学(札幌), 2017年9月26日

(4) 井上健太郎, シグナル伝達系の数理モデル解析, JSBi九州地域部会セミナー, 海峡メッセ(下関), 2017年3月10日

(5) Kentaro Inoue, Hisaaki Shinohara, Gouhei Tanaka, Kazuyuki Aihara, Mariko Okada-Hatakeyama, Mathematical model for NF- κ B signal transduction system, The 2016 (26th) annual meeting of the Japanese Society for Mathematical Biology (JSMB2016), Kyushu University (Fukuoka), September 7-9, 2016.

(6) 井上健太郎, 実験と数理モデルによるNF- κ Bシグナル伝達システムの解析, 第38回BMIRC研究会, 九州工業大学(福岡), 2016年5月2日.

(7) Kentaro Inoue, Hisaaki Shinohara, Mariko Okada-Hatakeyama, 定量的実験と数学モデルによるNF- κ B活性化システムの統合解析, 第38回分子生物学会年会, 神戸ポートピアホテル(兵庫), 2015年12月1-4日

(8) Kentaro Inoue, Hisaaki Shinohara, Mariko Okada-Hatakeyama, Dynamic modeling for oscillatory and switch-like behavior of NF- κ B activity, International Conference of Systems Biology (ICSB2015),

Biopolis (Singapore), November
23-24, 2015.

- (9) Kentaro Inoue, Hisaaki Shinohara,
Mariko Okada-Hatakeyama,
Dynamic model and experimental
validation for oscillation and
switch-like response of NF- κ B
activity, 生命医薬情報学連合大会
2015, 京都大学(京都), 2015年10月
29-31日.
- (10) Kentaro Inoue, Positive Feedback
Within a Kinase Signaling Complex
Functions as a Switch Mechanism for
NF- κ B Activation, GIW/InCoB 2015,
MIRAIKAN(Tokyo), September 9-11,
2015.
- (11) Kentaro Inoue, Hisaaki Shinohara,
Mariko Okada-Hatakeyama,
Dynamic modeling of BCR signaling
pathway to NF- κ B activation,
2nd Symposium on Complex
Biodynamics & Networks, Keio
University (Yamagata), May 11-13,
2015.
- (12) 井上健太郎, NF κ B 活性化システムの
数理モデル, 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), 2015年4月2,3日

〔その他〕

6. 研究組織

- (1)研究代表者
井上 健太郎 (INOUE, Kentaro)
宮崎大学・工学部・情報システム工学科・
助教
研究者番号：80708529