

令和元年6月1日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19028

研究課題名（和文）骨格筋におけるインスリンシグナル伝達経路の選択的制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of selective control mechanism of insulin signaling pathway in skeletal muscle

研究代表者

国田 勝行 (KUNIDA, Katsuyuki)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：40709888

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、蛍光バイオセンサーが安定発現した骨格筋を用いたライブセルイメージングデータから分化骨格筋領域を自動的に抽出・定量化を行う画像解析システムの開発を行った。複数インスリン濃度で刺激した際のシングルチューブごとのS6K活性（タンパク質合成の制御分子）の応答多様性の定量化を行った（Inoue et al, Cell Struct Funct, 2018）。また応答多様性を定量的に評価する指標として、インスリンからS6K活性間の通信路容量（最大相互情報量）を計算し、情報工学の観点からのインスリンシグナル伝達経路の情報伝送効率の評価を行った（学会発表多数、論文準備中）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発を行った分化骨格筋領域を自動的に抽出・定量化する画像解析システムは、骨格筋を用いた様々なライブセルイメージングデータに適用可能であり、手法としての汎用性は非常に高い。また情報工学の解析方法を用いたシグナル分子の応答多様性の定量化は、新規の細胞間変動のシステム特性の知見であり、システム生物学の研究成果としての学術的意義は高い。本研究対象のインスリンシグナル伝達経路は、糖尿病などの生活習慣病と深い関わりがあり、その動作原理の解明は新薬開発の加速や生活習慣病の予防・治療への貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed the image analysis system that automatically extracts and quantifies the differentiated skeletal muscle region from live-cell imaging data using skeletal muscle in which the fluorescent biosensor is stably expressed. We quantified the response diversity of S6K activity (this molecule regulates protein synthesis) per single tube when stimulated with multiple insulin concentrations (Inoue et al, Cell Struct Funct, 2018). Furthermore, we also calculate the channel capacity (maximum mutual information) between insulin and S6K activity as a quantitative index to evaluate response diversity, and evaluate the information transmission efficiency of the insulin signaling pathway from the viewpoint of information theory (in preparation).

研究分野：システム生物学、細胞生物学

キーワード：骨格筋 インスリンシグナル伝達 システム生物学 情報工学 ライブセルイメージング 画像解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

生物は限られたシグナル伝達経路を用いて数多くの刺激パターンに対応している。シグナル伝達経路の本質の一つは、多彩な出力を限られた分子またはネットワークにコードするシステム機構にある。特に生体内において複数の時間パターンを持つインスリンは、筋肉（骨格筋、心筋）、脂肪組織、肝臓で大きく作用し代謝制御の中核をなす重要なホルモンの1つである。例えば骨格筋においては、インスリンシグナル伝達経路 IRS-PI3K-Akt 活性から mTOR-S6K 活性経路を通してタンパク質合成、グリコーゲン生成を制御している。また Akt 活性から転写因子 Foxo1 の核外移行を通じて遺伝子発現も調節している。このように、インスリンから Akt 経路を介した選択的な細胞機能の分子基盤は、これまでの生化学・分子生物学研究より十分に明らかにされている。一方で、インスリンシグナル伝達経路を「分子ネットワーク」として捉えた場合、上記の分子群とその対応関係は、ネットワーク上の節点（ノード）と経路（エッジ）に対応し、上述の通りすでに多く同定されている。しかし、骨格筋におけるインスリンシグナル伝達経路の情報の流れ（フロー）はまだ十分に明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、骨格筋に着目しインスリンシグナル伝達経路を介した細胞機能の選択的制御機構を解明することである。細胞機能として、タンパク質合成と遺伝子発現に着目する。定量的な計測データに基づく数理解析よりインスリンシグナル伝達の情報の流れ（フロー）を推定し、インスリンシグナル伝達経路の選択的なシステム特性を解明する。

## 3. 研究の方法

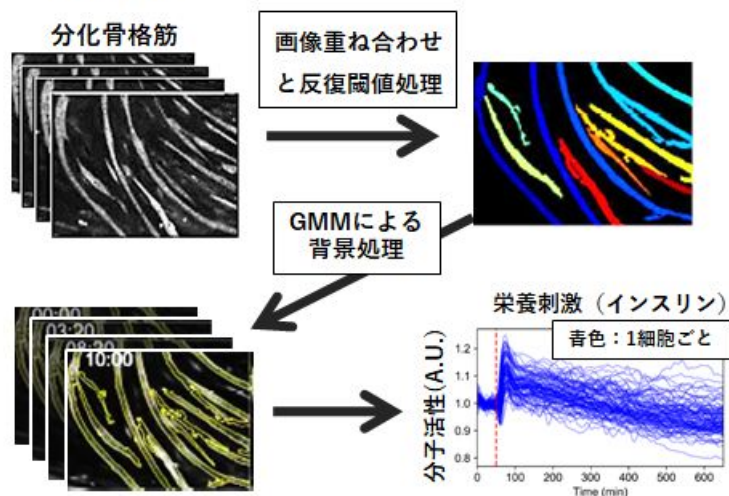
計測方法として、ライブセルイメージングを用いた。特に細胞内シグナル活性をモニターすることができる Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) 原理に基づく蛍光バイオセンサーを主に使用した。インスリン作用に対する細胞内シグナル活性の変動を定量的に評価するためにアンバイアスは画像解析システムの開発を行った。開発にはフリーのプログラム言語である Python を使用した。またシグナル伝達経路の情報の流れを評価するための解析手法として、情報工学の Shannon 情報理論を用いた。これらの数理解析にはプログラム言語 MATLAB を使用した。

## 4. 研究成果

研究成果は以下の3点である。

- 1) 蛍光バイオセンサーが安定発現した骨格筋の作成:** Akt 及び S6K 活性(タンパク質合成の制御分子)をモニターすることができる FRET バイオセンサー (Komatsu et al., *Mol Biol Cell*, 2011) 及び Foxo1-RFP が安定発現したマウス筋管細胞 C2C12(未分化)の作成を行った(FRET バイオセンサーは基礎生物学研究所青木一洋博士より分与頂いた)。安定発現株の作成には、PiggyBac トランスポゾンシステムを用いた。筋分化誘導性ライブイメージング計測を行った。0 から 100nM までの 10 インスリン濃度を用いてインスリンステップ刺激を行い、骨格筋における Akt 及び S6K 活性のライブセルイメージングデータを取得した。
- 2) 骨格筋領域の自動認識・定量する画像解析システムの開発:** ライブセルイメージングから自動的に骨格筋領域を認識・定量化する画像解析アルゴリズムの開発を行った。蛍光画像の重ね合わせと反復閾値処理による複雑な形状に分化した多細胞(分化骨格筋)の領域認識と GMM(混合ガウスモデル)による背景ノイズ軽減処理を組み込んだ画像処理系を開発し、蛍光プローブが発現した分化細胞の画像データからの自動認識定量化に成功した(図 A、Inoue et al., *Cell Struct Funct*, 2018)
- 3) Shannon 情報理論によるインスリンシグナル伝達経路の情報伝達の定量化:** 複数のインスリン濃度(0nM から 100nM まで 10 濃度)で刺激した際の S6K 活性のライブセルイメージングデータに対して定量的な画像解析法を適用し、シングルセルごとの時系列データを定量化した。さらに各時系列から応答特徴量(時定数、最大値、AUC など)の情報抽出を行った。これらのインスリン濃度ごとのシングルセル応答分布データを用いて、インスリンから S6K 活性への通信路容量(最大相互情報量)の推定を行った。結果として、各時点や最大値、AUC などの応答強度の特徴量よりも時定数つまり応答時間に関する特徴量が最も情報伝送能力が高いことを明らかにした(図 B、未発表データ、論文準備中)。

**A** 複雑な形状に分化した多細胞（分化骨格筋）の自動認識定量システム



**B** インスリン-S6K活性化間の通信路容量（最大相互情報量）  
（左：応答時点、右：応答特徴量）

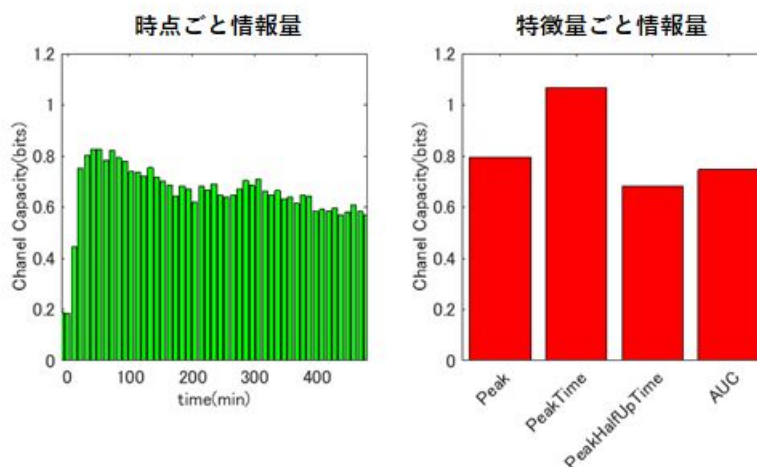


図 A：骨格筋領域の自動認識・定量する画像解析システムのフローチャート、図 B：Shannon 情報理論によるインスリンシグナル伝達経路の情報伝送の定量結果

**5 . 主な発表論文等**

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Inoue, H. Kunida, K. Matsuda, N. et al. Automatic quantitative segmentation of myotubes reveals single-cell dynamics of S6 kinase activation. *Cell Struct Funct* 43, 18012 (2018). doi: 10.1247/csf.18012. 査読あり
2. Tsuchiya, T. Fujii, M. Matsuda, N. et al. System identification of signaling dependent gene expression with different time-scale data. *Plos Comput Biol* 13, e1005913 (2017). doi: 10.1371/journal.pcbi.1005913. 査読あり
3. Filippi, S. Barnes, C P. Kirk, P D. et al. Robustness of MEK-ERK Dynamics and Origins of Cell-to-Cell Variability in MAPK Signaling. *Cell Reports* 15, 2524–2535 (2016). doi: 10.1016/j.celrep.2016.05.024. 査読あり
4. Sano, T. Kawata, K. Ohno, S. et al. Selective control of up-regulated and down-regulated genes by temporal patterns and doses of insulin. *Sci Signal* 9, ra112–ra112 (2016). doi:10.1126/scisignal.aaf3739. 査読あり

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 国田ら、Frequency Response of Intracellular Signal Transduction Based on Live-Cell Active Sensing

and Nonlinear System Identification、BDR symposium 2019 (2019)

2. 国田ら、Information transmission of insulin signal transduction based on live-cell sensing and information theoretic approach、定量生物学の会第9回年会(2019)
3. 国田ら、Frequency Response of Intracellular Signal Transduction Based on Live-Cell Active Sensing and Nonlinear System Identification、SICE Annual Conference 2018 (2018). 査読あり
4. 国田ら、Information transmission of insulin signal transduction based on live-cell sensing and information theoretic approach、第70回日本細胞生物学会年会(2018)
5. 松田ら、電気刺激時 C2C12 筋管細胞におけるミトコンドリア ATP のダイナミクスとその応答特性、第69回日本細胞生物学会大会(2017)
6. 国田、骨格筋におけるインスリン代謝・シグナル伝達経路のシステム生物学、DM(Diabetes Mellitus)フォーラム(2017)
7. 国田ら、ライブセル能動計測と情報理論に基づく骨格筋インスリンシグナル伝達経路の情報伝送、第5回骨格筋研究会(2017)
8. 国田ら、ライブセル能動計測と情報理論に基づく骨格筋インスリンシグナル伝達経路の情報伝送、定量生物学の会第8回年会(2017)
9. 国田ら、定量的ライブセルイメージングと情報理論に基づくインスリンシグナル伝達経路の情報伝送、理論と実験 2016、(2016)
10. 国田、骨格筋におけるインスリン代謝・シグナル伝達経路のオンライン制御に向けての試み、第8回分子骨格筋代謝研究会(2016)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：時系列画像を用いた多核で細長い細胞の自動的細胞認識法

発明者：黒田真也 井上晴幾 国田勝行

権利者：同上

種類：特許

番号：特許願 2017-242177 号

出願年：2017

国内外の別：国内

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://researchmap.jp/kkunida/>

## 6. 研究組織

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。