

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15011

研究課題名（和文）代謝関連分子の網羅的絶対定量に基づく骨格筋代謝研究の新展開

研究課題名（英文）Overview of the regulation of skeletal muscle metabolism based on comprehensive molecular quantification

研究代表者

松崎 芙美子 (Matsuzaki, Fumiko)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：10631773

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、インスリンを投与したマウスを用いて骨格筋構成分子の濃度やその時間変化を大規模に定量し、その存在量・時間変化・分子間相互作用の特徴を明らかにした。また、インスリンにตอบสนองして時間変化が見られた代謝物・タンパク質（発現量もしくはリン酸化修飾量が増加したもの）・RNAおよびそれらの制御分子候補の間の相互作用ネットワーク（約1万ノード・2万エッジ）を構築し、インスリンにより骨格筋で誘導される分子制御の全体像を可視化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網羅的な分子定量から分子間相互作用ネットワークの構築・特徴解析・可視化までのワークフローの開発により、大規模データと既存知識を統合して生物組織において誘導される分子制御の全体像の理解が可能になった。このアプローチは拡張性が高いことから、適用範囲は骨格筋代謝に限らない。今後、より幅広い生命現象の制御メカニズム理解への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this project, skeletal muscle composition was analyzed in terms of molecular concentration/proportion, and their temporal variation over four hours after insulin administration. A molecular interaction network consisting of approximately 10,000 insulin-responsive molecules (nodes) was constructed based on this analysis. This network illustrates about 20,000 interactions (edges) among metabolites, RNAs, and proteins that changed in their phosphorylation or expression levels. Such a comprehensive analysis provided an overview of major regulatory processes within skeletal muscles in response to insulin. Our investigation model enabled the design of scalable methods that could integrate multiple sources to characterize and visualize biologically relevant molecular interactions.

研究分野：マルチオミクス

キーワード：骨格筋 インスリン マルチオミクス

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は動物体内における最大のエネルギー消費・貯蔵器官であると同時に、インスリンの主要な標的である。そして栄養源の摂取や運動の実施といった体内のエネルギー状況の変化に対応して著しくその代謝を変化させる。例えば、食後はインスリンの作用を受けて、増加した血糖を速やかに取り込んでグリコーゲンを合成し、運動時には、貯蔵していたグリコーゲン等を異化して、安静時の数倍~数十倍ものエネルギーを消費する。しかし、肥満や2型糖尿病患者では、このような体内のエネルギーの需要と供給の状態に柔軟に対応することができなくなり、運動時や食後における骨格筋代謝改変の顕著な減弱が見られる。肥満や2型糖尿病の治療の根幹は、食事のコントロールと運動の実施により、血糖値を管理しつつ貯蔵エネルギーの消費を促すことであり、骨格筋代謝を理解し適切に制御することは肥満・糖尿病の治療や予防の上で極めて重要である。しかし、骨格筋の代謝はダイナミックに変化する上に、膨大な数の分子が関与するために著しい複雑性を包含しており、その異常を適確に特定するためには表面的な骨格筋代謝の解釈では不十分で、関与する多数の分子とそれらの関連性に鑑みた真の理解が必要になる。

2. 研究の目的

本研究では、インスリン投与によりマウス骨格筋の代謝改変を誘導し、骨格筋を構成する分子の量的・質的变化を経時的に定量する。そして、取得した定量データと各分子同士の既知の関連性を基に、多数の関連分子とそれらの関係が統合された骨格筋代謝とその制御経路の全体像を解明する。

3. 研究の方法

骨格筋構成分子の網羅的データ取得するために、12-16時間絶食後、C57BL/6J マウス（10週齢）にインスリンを腹腔内投与（0.7 U/kg）し、経時的（0-4時間の間の計13点）に両足の腓腹筋を採取した。各時点につき3個体実施し、コントロールとしてはPBSを投与した。採取した腓腹筋より代謝物・RNA・タンパク質・リン酸化ペプチドをそれぞれ抽出および濃縮して、代謝物・タンパク質・リン酸化ペプチドについては質量分析（CE-MSもしくはLC-MS/MS解析）を、RNAについてはディープシーケンシングにより定性・定量解析を行った。代謝物は外部標準法で絶対定量を行い、タンパク質およびRNAについては全分子あたりの各分子の発現量の割合をiBAQ値もしくはTPM値としてそれぞれ得た。骨格筋における分子間相互作用を明らかにするために、取得した時系列データと分子レベルでの事前知識を用いてインスリン投与時に誘導される分子間相互作用ネットワークを作成し、その細部および全体像を可視化した（詳細は次項参照）。

4. 研究成果

野生型マウスにインスリンを投与し4時間にわたり経時的に採取した骨格筋を用いて、その構成分子（代謝物・RNA・タンパク質・タンパク質リン酸化）の絶対量/発現割合と濃度の時間変化を大規模に定量した。計測コストやスループット等の問題から、代謝物は計13時点における定量を行ったのに対し、タンパク質リン酸化量は8時点で、タンパク質およびRNAの発現量は

5 時点で定量した。おおよそ 130 代謝物、16,000 RNA、2,000 タンパク質、4,000 リン酸化部位が同定・定量され、このうち約 30 の代謝物、3,000 RNA、300 タンパク質、2000 リン酸化部位はインスリン投与後に時間変化が見られ、それらは異なる変化パターンを示した [図 1]。タンパク質・RNA・代謝物については、その絶対量もしくは全定量分子に占める発現割合について KEGG class ごとの分布を確認したところ、代謝関連カテゴリーはタンパク質、mRNA で大きい傾向があり、特に炭水化物代謝関連は大きめに分布した。一方、代謝物濃度は、炭水化物関連のものが特に大きいということではなく、アミノ酸代謝関連が少なめなのが特徴的であった [図 2]。

mRNA-タンパク質の発現割合については高い相関が見られており、タンパク質の存在量はその mRNA 量を反映していることが伺えた [図 3]。一方で、炭水化物代謝に関わるいくつかのタンパク質において、発現量はあまり時間変化がないにも関わらずリン酸化量が劇的に変化するものが特徴的に見られた。インスリンへの短時間での応答に際して、非常に存在量が多い分子を量変化によらず質的に制御しているとすれば理にかなっている。

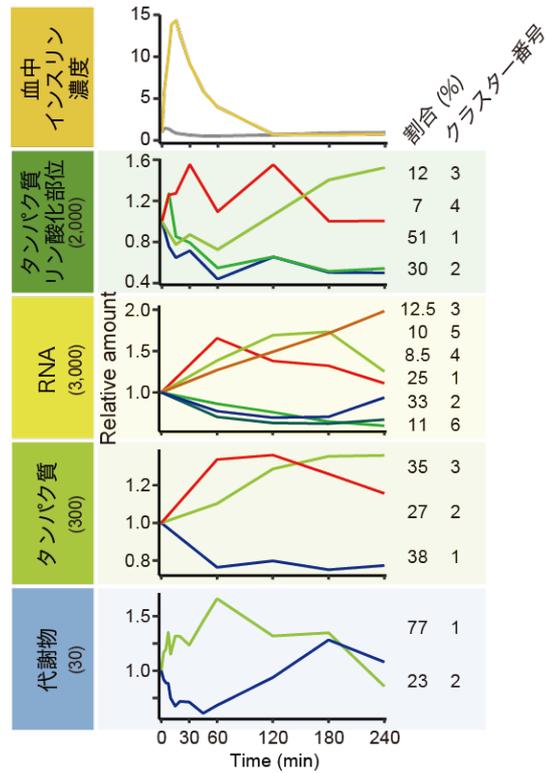


図 1. 骨格筋におけるインスリン応答分子の階層的クラスタリング結果

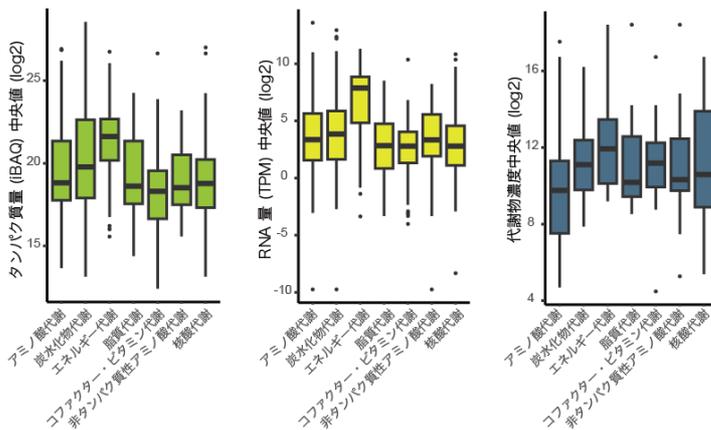


図 2. 骨格筋における分子濃度/発現割合の代謝カテゴリー毎の分布

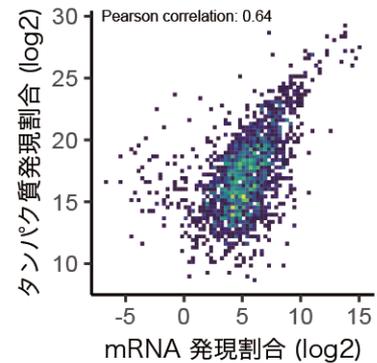


図 3. mRNA とタンパク質の発現割合の散布図

これらの多数の分子間の相互作用を解析可能にするために、分子間相互作用ネットワークの構築や、その構造/特性解析・可視化のためのワークフローを発展させた。簡単には、まず、インスリンに反応して時間変化が見られた分子をネットワークのノードとし、代謝物・タンパク質・RNA・タンパク質リン酸化を区別して階層的に配置した。そしてこれらのノード分子間の制御関係の有無を、種々のデータベースより取得した既存知識やそこから予想される時間変化が見

られるか等を考慮して判断し、制御関係の存在が期待される分子間にエッジを引くこととした。リン酸化はタンパク質安定性や機能に影響を及ぼし得るものとして組み入れた。さらに、これらのノード分子を制御し得るタンパク質リン酸化酵素・転写因子・microRNA 等から成る”媒介分子の階層”を追加することで、取得したデータと既存知識を基に可能な限り広範な分子間相互作用のネットワークを構築可能とした。その結果、化学的・生物学的性質の異なる分子の階層を跨ぐ、約 10,000 ノード・20,000 エッジから成る骨格筋インスリン応答ネットワークが構築された。同等の方法で作成した肝臓特異的ネットワークと比較すると、その規模は小さめとなっており構造特性にも違いが見られた。さらに、作成されたネットワークを用いて複雑な相互作用を直感的に理解し解釈可能にするために、その可視化にあたっては各階層上にノードを配置することに加えて、同じ種類のノードやエッジをまとめて図示したり、リン酸化情報伝達・分子発現制御・代謝応答といった生物学的プロセスに区画することで、ネットワーク構造の特徴を捉えやすくした他 [図 4]、特定のパスウェイや何らかの категорияに属するノードとそこに連結する部分をサブネットワークとして抽出することで、構造の詳細やノード機能等の解析をより容易にした。

代謝応答は、肝臓と比較すると代謝物の濃度変化としてはあまり観測されなかったものの、様々な代謝経路に影響するミトコンドリアやリボソームの制御を示唆するパスウェイが相互作用ネットワーク中に特徴的に見出されたことから、代謝物量の計測のみからでは推測できない幅広い代謝変化が誘導されている可能性が考えられた。網羅的な分子定量と相互作用ネットワーク作成によるアプローチにより、多様な分子間の個々の相互作用から全体像の解明までを包括的に行う道筋が示された。この枠組みのさらなる発展を通して、骨格筋代謝に加えてより幅広い生命現象の制御メカニズムの理解を目指したい。

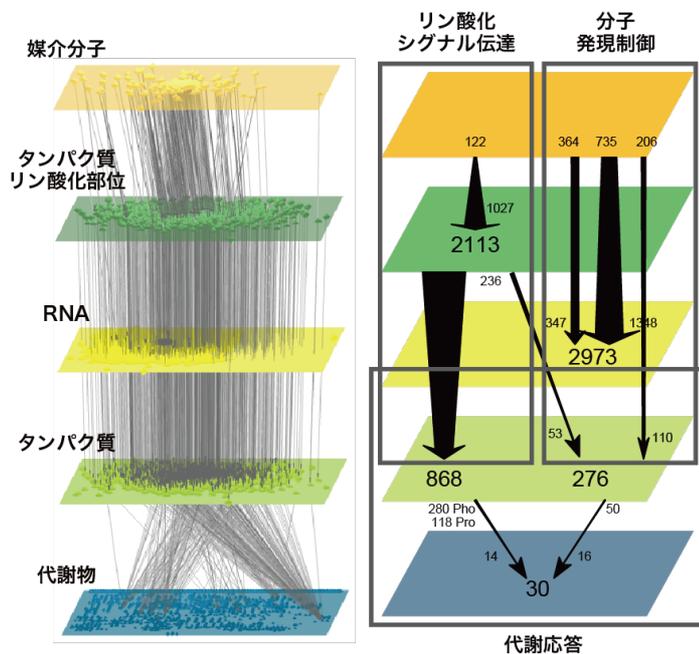


図 4. 骨格筋におけるインスリン応答の分子間相互作用ネットワーク。構造の細部 (左) および全体像 (右) を解析可能とした

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fumiko Matsuzaki, Shinsuke Uda, Yukiyo Yamauchi, Masaki Matsumoto, Tomoyoshi Soga, Kazumitsu Maehara, Yasuyuki Ohkawa, Keiichi I. Nakayama, Shinya Kuroda, Hiroyuki Kubota	4. 巻 36
2. 論文標題 An extensive and dynamic trans-omic network illustrating prominent regulatory mechanisms in response to insulin in the liver	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109569
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.109569	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 松崎英美子
2. 発表標題 肝臓インスリン応答の時系列トランスオミクス解析
3. 学会等名 IIBMP2021（2021年日本バイオインフォマティクス学会年会 第10回生命医薬情報学連合大会）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fumiko Matsuzaki, Shinsuke Uda, Yukiyo Yamauchi, Hiroyuki Kubota
2. 発表標題 Trans-omic analysis of insulin response in the liver
3. 学会等名 International Symposium on Evolutionary Genomics and Bioinformatics 2022 (ISEGB2022)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松崎英美子, 宇田新介, 山内幸代, 松本雅記, 曾我朋義, 前原一満, 大川恭行, 中山敬一, 黒田真也, 久保田浩行
2. 発表標題 時系列トランスオミクス解析
3. 学会等名 IIBMP2020（2020年日本バイオインフォマティクス学会年会 第9回生命医薬情報学連合大会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fumiko Matsuzaki, Shinsuke Uda, Yukiyo Yamauchi, Masaki Matsumoto, Tomoyoshi Soga, Kazumitsu Maehara, Yasuyuki Ohkawa, Keiichi I. Nakayama, Shinya Kuroda, Hiroyuki Kubota
2. 発表標題 Integrated analysis through multiple molecular layers: transomic network dynamics
3. 学会等名 The 29th Hot Spring Harbor International Symposium, Cutting Edge of Technical Innovations in Trans-Omics (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松崎芙美子, 宇田新介, 山内幸代, 松本雅記, 曾我朋義, 前原一満, 大川恭行, 中山敬一, 黒田真也, 久保田浩行
2. 発表標題 時系列トランスオミクス解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumiko Matsuzaki, Shinsuke Uda, Yukiyo Yamauchi, Masaki Matsumoto, Tomoyoshi Soga, Kazumitsu Maehara, Yasuyuki Ohkawa, Keiichi I. Nakayama, Shinya Kuroda, Hiroyuki Kubota
2. 発表標題 Time Series Transomics: Integrated analysis through multiple molecular layers
3. 学会等名 The 20th International Conference on Systems Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumiko Matsuzaki, Shinsuke Uda, Yukiyo Yamauchi, Hiroyuki Kubota
2. 発表標題 TRANSOMICS: Integrated Analysis Through Multiple Molecular Layers
3. 学会等名 The 19th International Conference on Systems Biology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumiko Matsuzaki, Shinsuke Uda, Yukiyo Yamauchi, Kazumitsu Maehara, Yasuyuki Ohkawa, Masaki Matsumoto, Keiichi I. Nakayama, Hiroyuki Kubota
2. 発表標題 TRANSOMICS: Integrated Analysis Through Multiple Molecular Layers
3. 学会等名 The Joint Symposium of the 13th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences and the 28th Hot Spring Harbor International Symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumiko Matsuzaki, Shinsuke Uda, Yukiyo Yamauchi, Masaki Matsumoto, Keiichi I. Nakayama, Hiroyuki Kubota
2. 発表標題 Time Series Transomics: Integrated analysis through multiple molecular layers
3. 学会等名 1st International symposium on interdisciplinary approaches to integrative understanding of biological signaling networks (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumiko Matsuzaki, Shinsuke Uda, Yukiyo Yamauchi, Hiroyuki Kubota
2. 発表標題 Time Series Transomics: Integrated analysis through multiple molecular layers
3. 学会等名 2nd Diversity Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松崎美子, 宇田新介, 山内幸代, 黒田真也, 久保田浩行
2. 発表標題 時系列トランスオミクス解析
3. 学会等名 定量生物学の会 第九回年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 執筆者：81名、技術情報協会	4. 発行年 2022年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 530
3. 書名 疾患原因遺伝子・タンパク質の解析技術と創薬/診断技術への応用	

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学 生体防御医学研究所 統合オミクス分野 https://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/labo/omics/
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------