

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17537

研究課題名（和文）肥満から前糖尿病段階におけるミトコンドリア代謝経路の時系列・多階層数理解析

研究課題名（英文）Time series multi-omics and mathematical analysis of mitochondrial metabolic pathways in obesity and prediabetes

研究代表者

湯通堂 紀子（Yutsudo, Noriko）

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：00631649

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）：本研究は、タンパク質リン酸化に注目して、肥満から糖尿病が発症するまでの過程における、ミトコンドリア代謝経路の変動・シグナル動態を解明することを目的に、下記を行った。肥満から前糖尿病マウス肝臓の、肥満からインスリン抵抗性が生じる前後の時系列リン酸化プロテオーム測定、で得られた測定データを含む、3階層（リン酸化プロテオーム・プロテオーム・メタボローム）の時系列オミクスデータを用いた、ミトコンドリア代謝経路変動の数理解析。その結果、ミトコンドリア代謝経路中の、コレステロール合成や酸化関連の複数の経路中で、多階層にまたがる変動経路が検出され、時系列の変動を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満により生じるミトコンドリア機能異常は、二型糖尿病の主な原因の一つであるインスリン抵抗性発症に関与していることが知られているが、その詳細なメカニズムは未だ解明されていない。本研究で、「時系列」「3階層」オミクスデータの「数理解析」により、従来の実験方法では同定できなかった、ミトコンドリア代謝経路の複数の経路で、時系列・多階層での分子の変動パターン・時期が明らかになった。本研究により明らかになった変動経路・分子をターゲットにすることで、肥満・二型糖尿病の新たな治療方法や予防法の発見につながる可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study focused on protein phosphorylation to elucidate the dynamics of mitochondrial metabolic pathways and molecular signaling during the process from obesity to prediabetes.

(1) Time-series phosphoproteomics using the livers of obese and prediabetic mice before and after the development of insulin resistance. (2) Mathematical analysis of changes in mitochondrial metabolic pathway using time-series multi-omics (phosphoproteomics, proteomics, and metabolomics), including the measurement data in (1).

The results showed that multilayered pathways were detected in several mitochondrial metabolic pathways, including cholesterol synthesis and oxidation.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリア代謝経路 マルチオミクス エピゲノム トランスクリプトーム プロテオーム メタボローム 数理解析 時系列データ

### 1. 研究開始当初の背景

肥満により生じるミトコンドリア機能異常は、二型糖尿病の主な原因の一つであるインスリン抵抗性発症に関与していることが知られているが、その詳細なメカニズムは未だ解明されていない。研究代表者は、図1の通り、他研究の過程で、肥満～前糖尿病モデルマウス肝臓の時系列オミクス解析を行い、各階層でミトコンドリア代謝経路関連分子が経時的に変動していることを明らかにした。このことから、肥満～前糖尿病の過程で、転写制御や翻訳制御により、ミトコンドリア代謝経路関連分子が経時的に変動していることが示唆された。そこで本研究では、図1の通り、プロテオーム(P)、メタボローム(M)解析と共に、リン酸化プロテオーム(P')解析を追加し、3階層(P・P'・M)でミトコンドリア代謝経路の変動・シグナル動態を解析した。

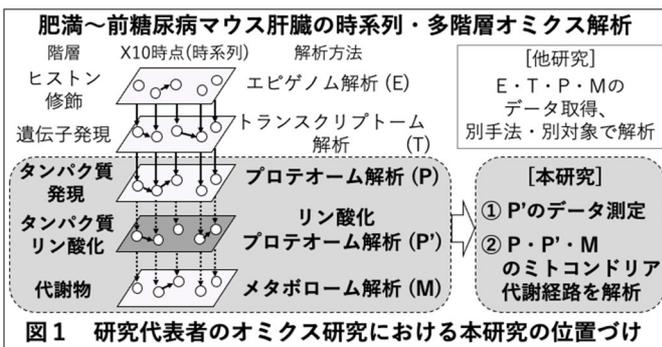


図1 研究代表者のオミクス研究における本研究の位置づけ

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、タンパク質リン酸化に注目して、肥満から糖尿病が発症するまでの過程における、ミトコンドリア代謝経路の変動・シグナル動態を解明することである。他グループの同様の時系列研究は、3時点までの解析のみであった。本研究ではインスリン抵抗性が生じる前後の10時点を時系列で解析するため、ミトコンドリア代謝経路の経時的な変化を詳細に解析することができた。また、血糖値・血中インスリン濃度から推定したインスリン抵抗性発症時期と対応させることで、ミトコンドリア代謝経路の変動とインスリン抵抗性の、どちらが先に起きているか(原因の可能性があるか)についても推測することができた。また、3階層データを測定する試料は、同一個体由来・同一条件であるため、3階層データを同一条件で比較することができた。

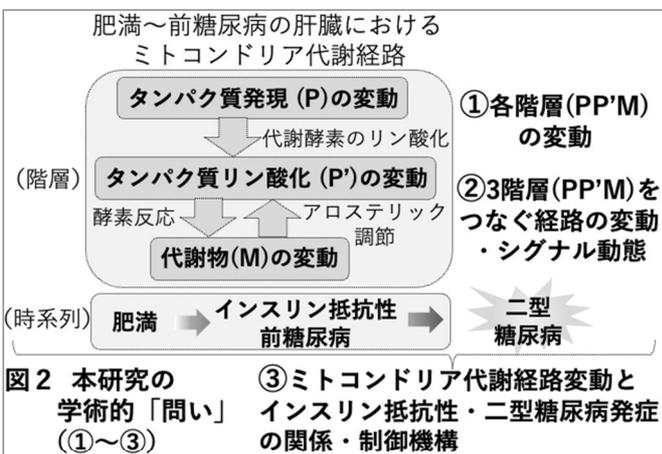


図2 本研究の学術的「問い」(①～③) ③ミトコンドリア代謝経路変動とインスリン抵抗性・二型糖尿病発症の関係・制御機構

### 3. 研究の方法

研究項目は、①肥満～前糖尿病マウス肝臓の、肥満からインスリン抵抗性が生じる前後の時系列リン酸化プロテオーム測定、で得られた測定データを含む、3階層(リン酸化プロテオーム・プロテオーム・メタボローム)の時系列オミクスデータを用いた、ミトコンドリア代謝経路変動の数理解析である。研究代表者は他研究で、肥満モデルマウス(高脂肪食群)と、コントロールマウス(通常食群)から、5~20週齢の10時点で肝臓を回収、ドライアイス中で凍結粉砕し、チューブに分配した。同時に回収した尾静脈血の血糖値・血中インスリン濃度から、インスリン抵抗性の発症時期を特定した。分配した試料のうち1本をリン酸化プロテオーム解析(図1-P')に行いた。残りの試料は、他研究で、4階層オミクスデータ(図1-E,T,P,M)を取得する際に用いた。これらの5階層データ(図1-E,T,P,P',M)は他研究と共有し、異なる対象・異なる方法で解析した。本研究では、3階層データ(図1-P',P,M)を用いて、数理解析により、3階層をつなぐミトコンドリア代謝経路の変動を解析し、そのシグナル動態を明らかにした。解析対象は、KEGGに記載のミトコンドリア代謝経路と関連経路の分子とした。図3にデータ解析方法を示した。

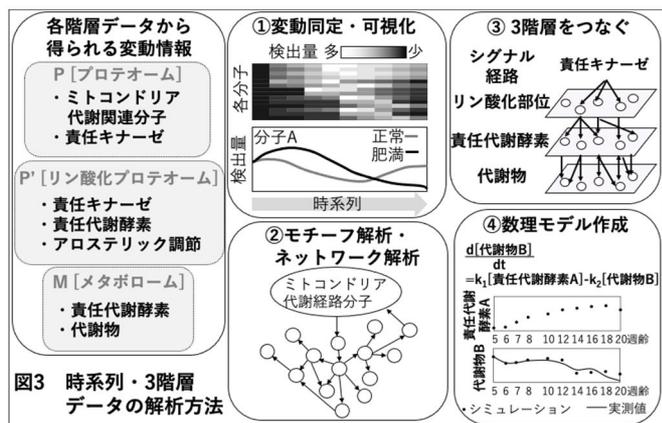


図3 時系列・3階層データの解析方法

[1] 時系列リン酸化プロテオーム測定と3階層オミクスデータの階層別変動解析

図3- タンパク質発現(P)・リン酸化タンパク質(P')・代謝物(M)の各階層で、ミトコンドリア代謝関連分子の変動を同定・可視化した。

図3- KEGG や NetworkKIN 等のソフトウェアを用いて、 のデータからミトコンドリア代謝経路のモチーフ解析・ネットワーク解析を行い、各階層でミトコンドリア代謝経路の詳細な変動情報を得た。

[2] 3階層をつなぐミトコンドリア代謝経路の時系列変動の数理解析

図3- 時系列・3階層オミクスデータ(P', P, M)を統合し、3階層をつなぐ経路を同定した。階層をつなぐ方法は、所属研究室で開発したメタボロームデータとリン酸化プロテオームデータをつなぐ方法 (Yugi, K. and Kubota, H. et. al., Cell Reports 2014) を応用し、プロテオームデータを加えた3階層をつなぐ新たな方法の開発を試みた。

図3- 3階層をつなぐ経路の各階層データから時系列の変動の数理モデル(常微分方程式モデル)を作成し、ミトコンドリア代謝経路のシグナル動態を解明した。

#### 4. 研究成果

本研究では、時系列リン酸化プロテオームデータ(P')を取得した。他研究において、同じサンプルを分配し、測定したプロテオームデータ(P)とメタボロームデータ(M)とともに、ミトコンドリア代謝関連分子の変動を同定・可視化した。KEGG データベースの情報をを用いたネットワーク解析により、酸化関連やコレステロール関連経路など、ミトコンドリア関連の複数の経路・分子に変動が見られた。また、NetworkKIN を用いて、リン酸化プロテオームデータのモチーフ解析を行い、変動したリン酸化部位の責任キナーゼが推定された。推定された上位の責任キナーゼのうち、頻度の高かった4キナーゼの変動を、ウェスタンブロッティングで確認したところ、2つのキナーゼで有意な変動が確認された。これらのキナーゼは、ミトコンドリア機能に重要であることが知られているキナーゼであった。

次に、時系列・3階層オミクスデータ(P', P, M)を統合し、3階層をつなぐ経路を同定した。階層を繋ぐ方法は、当初、所属研究室で開発したメタボロームデータ(M)とリン酸化プロテオームデータ(P')を繋ぐ方法を応用しようと考えて、複数の方法を試みた。その結果最終的に、リン酸化プロテオームデータ(P')とプロテオームデータ(P)は、同じSymbolでつなぎ、プロテオームデータ(P)とメタボロームデータ(M)は、KEGG データベースから取得した、EC number と代謝物情報を用いてつなぐこととした。多階層でつながった経路について、各階層データから時系列の変動の数理モデルを作成し、変動したミトコンドリア代謝経路のシグナル動態が確認できた。これらのデータを用いて、Arena3dwebによりネットワークを再構築し、可視化した(図4)。推定された経路は、推定責任キナーゼから多階層にまたがるリン酸化制御のシグナル伝達経路であり、肥満や糖尿病の新たな治療ターゲットとなる可能性が考えられた。

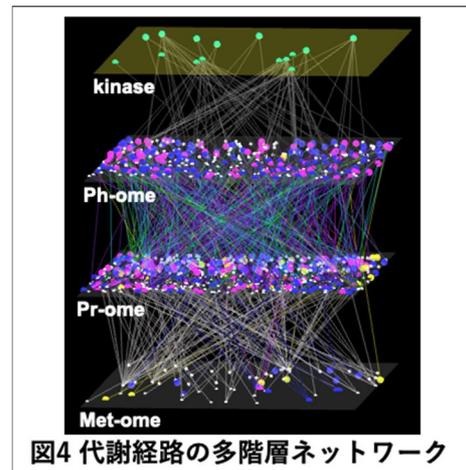


図4 代謝経路の多階層ネットワーク

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 湯通堂 紀子、松崎 芙美子、宇田 新介、和泉 自泰、高橋 政友、中尾 素直、油屋 駿介、馬場 健史、菊竹 智恵、須山 幹太、原田 哲仁、大川 恭行、松本 雅記、中山 敬一、久保田 浩行
2. 発表標題 食餌性肥満によるマウス肝臓変容の時系列トランスオミクス解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------