

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「生命システムの動作原理と基盤技術」
研究課題「シグナル伝達機構の情報コーディング」

研究終了報告書

研究期間 平成18年10月～平成24年3月

研究代表者：黒田 真也
(東京大学大学院理学系研究科、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

シグナル伝達機構の本質は、多彩な入力的情報を限られた種類の細胞内分子にコードすることにある。このコーディングには、入力的情報を活性化する分子の組み合わせにコードする以外にも分子活性の時間波形にコードする時間情報コーディングがある。シグナル伝達機構の種類は入力刺激や細胞の応答に比べると少なく、時間情報コーディングが細胞内の有限のリソースを最大限活用するための中心的メカニズムである可能性がある。本研究では、ERK シグナル伝達ネットワークが制御する細胞運命決定とインスリンの作用にフォーカスして、時間情報コーディングによる制御機能の解明を試みた。ERK 経路は同じ種類の刺激であっても時間波形に依存して異なる細胞運命を導くこと、インスリン作用はインスリン濃度の時間波形によって生理的効果が大きく異なることが分かっており、ともに刺激の時間波形が生命現象の制御に大きく関わっている。

当初、細胞運命決定とインスリン作用に焦点を絞って開始した研究であったが、クロストークする経路も時間情報コーディングによって制御されている可能性があることや、時間情報コーディングが蛋白質リン酸化によるシグナル伝達経路以外でも広く一般に使用されていることが予想された。そこで現在では、時間情報コーディングのセルワイドな適用を目指して (I) トランスオミクス解析によるグローバルな計測からシグナル伝達経路をアンバイアスに同定して、(II) その分子ネットワークの時間情報コードを解析し (細胞集団レベル)、(III) 1 細胞レベルでの細胞分布に基づいて情報論的に解析する (1 細胞レベル)、という大きなスケールから小さなスケールまで連続的に解析する体制を構築しており、その順に従い研究成果を記載する。

I) トランスオミクス解析 (4.5*)

インスリンのシグナル伝達経路を介した代謝制御のネットワークは不明な点が多い。そこで、メタボローム (慶應義塾大学、曾我研との共同研究) やリン酸化プロテオーム (九州大学、中山研との共同研究) を組み合わせたトランスオミクス解析を行い、インスリンの代謝制御を行うシグナル伝達経路をデータドリブンに同定する手法の開発に成功した。これにより、インスリンに限らず (II) や (III) の解析対象となるシグナル伝達を介した代謝制御ネットワークを自動的に同定することが可能となった。

II) 時間情報コード (4.1-4.6)

初期応答遺伝子が ERK 経路の時間パターンを選択的にデコードするメカニズムについて、定量的自動化ハイスループット計測手法 (QIC; Quantitative Image Cytometry) を開発して (4.1.1)、非線形自己回帰モデルを用いて解析した (4.3.1)。その結果、ERK の一過性の波形は EGR1 を、持続性の波形は c-FOS を選択的に誘導することを見出した (4.2.1)。NGF 刺激による細胞分化においては、準備期と伸長期という 2 つの連続するプロセスが必要であることを明らかにし、初期応答遺伝子の下流で機能すると考えられる準備期に必要な遺伝子を 3 つ同定した (4.1.2)。これらも同様にモデル化する予定である。また、細胞の増殖を制御する AKT 経路がローパスフィルタとして機能することを見出した。これは AKT 経路に限らない普遍的な特性であることを見出した (4.2.2)。時間情報コードの生理的意義を確立するため、インスリンの作用機構を解析して、AKT 経路がインスリンの一過性および持続性の分泌パターンの情報を多重にコードして、下流の経路がそれぞれの波形を選択的にデコードできることを見出した (4.4)。これらの結果を個体レベルで検討を試みるための下準備を行った (4.6)。

III) シャノンの情報理論に基づく情報コード (4.3)

情報コードの概念について、通信理論と関係の深いシャノンの情報理論の枠組みを用いてより一般的な解析を行うことを試みた。1 細胞レベルで ERK 経路の活性化と下流の遺伝子発現の細胞分布を解析し、刺激の種類によって刺激の情報が遺伝子発現に伝達される経路が異なること、一部の経路は刺激の情報をロバストに伝達することが明らかとなった (4.3.2)。

(*は § 4 研究実施内容及び成果における番号を示す)

(2) 顕著な成果

1. Toyoshima, Y., Kakuda, H., Fujita, K., Uda, S. and Kuroda, S., Sensitivity control through attenuation of signal transfer efficiency by negative regulation of cellular signaling, *Nature Communications*, 3:743, 2012

概要: 抗がん剤などの薬剤の濃度と、これに対する細胞の応答の強さとの関係は「感受性」と呼ばれ、薬剤の作用を知るうえで重要な指標として利用されている。しかし、この感受性がどのような仕組みにより調節されているかについてはこれまで不明だった。そこで、シグナル伝達分子の分解や不活性化などの負の制御機構が感受性変化を制御していることを見出した。この原理によって、薬剤により、標的分子を十分に阻害できても、最終的な応答は必ずしも十分に抑制できないことが明らかになった。この原理の発見は、薬剤応答の予測や創薬デザインなどに役立つことが期待される。

2. Fujita, K., Toyoshima, Y., Uda, S., Ozaki, Y., Kubota, H. and Kuroda, S., Decoupling of Receptor and Downstream Signals in the Akt Pathway by Its Low-Pass Filter Characteristics., *Science Signaling*, 3(132), ra56, 2010

概要: 細胞の成長を制御する Akt 経路において、強い一過性のシグナルよりも弱い持続性のシグナルの方が下流に効率的に伝わる現象を発見した。この直感に反する現象は Akt 経路のローパスフィルタ(低周波 通過フィルタ)特性によって生じていることを明らかにした。またこの特性によって、抗がん剤である EGF 受容体阻害剤を投与した場合に、意図した作用とは逆に下流の応答が増加することが分かった。

3. Ozaki, Y., Uda, S., Saito, T., Chung, J., Kubota, H. and Kuroda, S., A quantitative image cytometry technique for time series or population analyses of signaling networks., *PLoS ONE*, 5(4), e9955, 2010

概要: 従来は手作業で行われていた一連の実験・計測操作を全自動で行う自動実験システムを構築し、実験の大幅な効率化と正確で均質な実験操作を達成可能にした。これにより最短で 1 分間隔でのサンプリングが可能となり、シグナル伝達ネットワークの時系列解析への活用が期待される。

§ 2. 研究構想

(1) 当初の研究構想

当初の研究計画概要：時間情報コーディングの観点から、同じ刺激であっても時間波形に依存して異なる応答を示す生命現象である細胞運命決定と、生体内においてその分泌波形が重要であることが報告されているインスリン作用にフォーカスして、実験と微分方程式モデルを組み合わせることで時間情報コーディングのメカニズムを解明する。なお、細胞種に依存して各分子の発現量が異なるため、これらの刺激に対する応答は細胞種によっても異なる。その仕組みを各細胞種での発現量や応答の観測と統計的モデルを用いて明らかにする。これらのモデルを縮約してシグナル伝達の情報コーディングの基本原則を抽出する。

a) ERK 経路の情報コーディング

a-1) 細胞運命決定機構における時間情報コーディング

a-2) 細胞種に依存した ERK 経路の時間情報コーディング

b) インスリン作用の時間情報コーディング

(2) 新たに追加・修正など変更した研究構想

新展開について

1. トランスオミクス解析

当初は、文献ベースの事前知識に基づいたモデル化により時間情報コードの解析を行ってきたが、事前知識はバイアスがかかっており、実験結果をうまく再現できなかったり、そもそもモデル化ができないことがわかってきた。この問題を解決するために、グローバルな計測から分子ネットワークをアンバイアスに同定する必要性が生じた。同じ CREST の九州大学の中山研との共同研究でインスリン作用におけるリン酸化プロテオミクスの解析を始めた。これがグローバルな計測から、自動的にシグナル経路を同定して、時間情報を解析するアンバイアスな解析手法(トランスオミクス)の確立へとつながった。我々は代謝物質の変動をインスリンの作用点としてとらえ、それを制御する酵素のリン酸化やアロステリック分子に着目することにより、受容体からのリン酸化カスケードや、アロステリック分子によるフィードバック制御経路などをデータドリブンに自動的に同定することに成功した。CREST に参加することにより、上記の一連の解析を確立することが可能となった。

2. 時間情報コード解析における計測手法開発とデータドリブンモデル化手法

本研究前までは、文献ベースの事前知識に基づいた微分方程式モデルを用いた解析を行っていた。本研究計画開始後は、QIC の開発と、そのデータを用いたデータドリブンモデル(非線形自己回帰モデル)を用いて時間情報コーディングを解析した。この計測手法およびモデル化手法はどちらも新規に開発したものである。これにより文献データの無い系でも容易にモデル化が可能となったほか、1のトランスオミクス解析から得られるネットワークをデータドリブンに解析する枠組みができたことにより、グローバルからローカルなスケールへ研究者の主観を交えず客観的にスケールダウンできる方法が確立できた。

3. 情報理論にも基づくシグナル伝達経路の通信路特性の解析

本研究で開発した QIC を用いれば、シグナル分子の活性を1細胞レベルで計測するため、細胞の分布を取得できるようになった。これにより、シャノンの情報理論の枠組みのもとで、シグナル伝達経路が伝達可能な情報量が初めて解析できるようになり、シグナル伝達経路の通信路としての特性を明らかにできるものと期待される。この情報論的解析は、JST の日英戦略的国際科学技術協力推進事業、さらに HFSP へと継続発展している。

上記のいずれも解析の枠組みから組み立てる必要があり、かなりの時間的、金銭的なコストを必要とするものであった。CREST の枠組みにより初めて可能となったプロジェクトであり、深謝したい。

§ 3 研究実施体制

(1)「黒田」グループ

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
黒田 真也	東京大学大学院理学系研究科	教授	H18.10～
久保田 浩行	東京大学大学院理学系研究科	特任助教	H18.10～
尾崎 裕一	東京大学大学院理学系研究科	特任助教	H19.4～H22.3
浦久保 秀俊	東京大学大学院理学系研究科	特任助教	H19.4～H21.3
宇田 新介	東京大学大学院理学系研究科	特任助教	H19.1～
柚木 克之	東京大学大学院理学系研究科	特任助教	H22.4～
小森 靖則	東京大学大学院理学系研究科	特任助教	H23.4～
栗林 理沙	東京大学大学院理学系研究科	研究補助員	H21.4～
佐藤 みはる	東京大学大学院理学系研究科	研究補助員	H23.4～
藤田 一広	東京大学大学院新領域研究科	D5	H18.10～H23.3
鄭 載勲	東京大学大学院理学系研究科	D3	H19.4～H22.3
本田 稔	東京大学大学院新領域研究科	D3	H18.10～H23.3
豊島 有	東京大学大学院理学系研究科	D3	H19.4～
渡邊 可奈子	東京大学大学院理学系研究科	D3	H21.4～
齊藤 健	東京大学大学院理学系研究科	D2	H20.4～
野口 怜	東京大学大学院新領域研究科	D2	H20.4～
秋元 勇輝	東京大学大学院理学系研究科	D2	H22.4～
高橋 直裕	東京大学大学院新領域研究科	M2	H21.4～H23.3
角田 裕晶	東京大学大学院新領域研究科	M1	H23.4～

② 研究項目

- ・ERK のデコード
- ・ERK 経路のモデル
- ・モデル化手法開発
- ・インスリン作用の時系列データ取得
- ・インスリン作用のモデル

(2)「小川」グループ

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
小川 渉	神戸大学大学院医学系研究科	准教授	H18.10～H22.3
戸坂 真子	神戸大学大学院医学系研究科	技術補佐員	H19.4～H19.10
山内 由紀	神戸大学大学院医学系研究科	技術補佐員	H19.4～H19.12
林久 美子	神戸大学大学院医学系研究科	技術補佐員	H20.4～H22.3

② 研究項目

- ・インスリン作用の個体レベル解析

§ 4 研究実施内容及び成果

4.1 ERK のデコード(東京大学 黒田グループ)

4. 1. 1 自動化計測技術開発 QIC

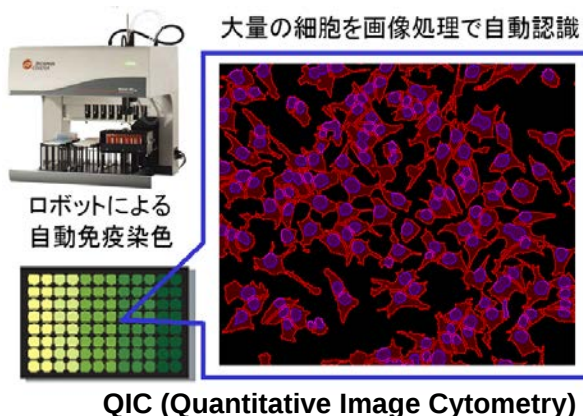
概要: ERK 経路などの時間情報コーディングを解析するためには、リン酸化やタンパク質発現を 1 分間隔で定量的にハイスループットに計測する技術が必要である (ERK 経路のモデル化、参照)。そのために、ロボットを用いたハイスループット自動化技術と免疫染色サンプルからの定量的データ取得を可能とする画像解析技術である QIC(Quantitative Image Cytometry)を開発した(論文 4、尾崎ら、2010、特許 1)。

(1) 研究実施内容及び成果

①実施方法

シグナル伝達研究におけるシステムバイオロジーの主要なアプローチは、外部刺激に対するシグナル伝達分子の時間的、空間的な応答の計測に基づく細胞機能のモデリングである。このような研究のためには、細胞の内部状態の詳細かつ定量的な計測と細かい時間間隔でのサンプリングが必要となり、高い再現性を持ったハイスループットアッセイが欠かせない。このようなハイスループットアッセイを実現するために、我々は免疫染色法に基づくシグナル伝達ネットワークの自動計測システムを開発した(下図)。

自動計測システムはハイスループット自動サンプル調整技術と蛍光免疫染色画像の画像解析技術からなる。自動サンプル調整技術は、Beckman 社のリキッドハンドリングロボットおよび Liconic 社の CO2 incubator を組み合わせた装置からなり、96 ウェルプレートを用いることで最短 1 分間隔の細かい刺激を与えることが可能となる。その後、同装置を用いて免疫染色の基本的な処理であるホルマリン固定、膜透過処理、一次抗体染色、2次抗体染色を自動で行うシステムを構築する。得られたサンプルは、96 ウェルプレート用の cell worx 社の蛍光顕微鏡を用いて画像データを取得する。画像データにより定量的な蛍光輝度の計算を目指して、画像解析技術には独自のアルゴリズムを開発した。



②実施内容

蛍光免疫染色法に関して、実験条件の違い、人手による実験作法・試薬の濃度の細かいずれによってシグナル活性の輝度は大きく変わってしまうため、一般的には定量的な解析には向かないとされている。しかしながら、自動計測システムを用いて、実験条件(ホルマリン等各ステップ毎の試薬濃度・温度)を厳密にコントロールすることで、各ウェル間でのばらつきを CV 値で 10%以内に収め、ウェスタンブロッティングと同程度の定量性でシグナル活性を計測することに成功した。

画像解析アルゴリズムの開発に関して定量的なデータを取得するためには、バックグラウンドとシグナルの選別が重要になってくる。当研究室では蛍光顕微鏡で観察した画像は、視野のポジションに応じて S/N 比が変わることを見出している。この問題を解決するために、適応的 threshold とよばれるアルゴリズムを開発・実装することで定量的にバックグラウンドとシグナルを選別することに成功した。

③成果

本ハイスループット自動化技術の特徴として、その実験処理の簡便さにある。基本的な処理はホルマリン固定、膜透過処理、一次抗体染色、2次抗体染色で済むため、同時に複数のサンプル調整が可能であり、処理条件を全く等しくすることで、96 ウェルプレートを用い最短 1 分間隔の細かい時間間隔の精度の高い時系列データを得ることができた。画像解析によって、1 細胞毎のシグナル

活性を計測するため、細胞間のばらつき(分布)の情報を解析することが可能となった。分布をみることで、例えば双方向性の分布を示す場合、閾値応答やポジティブフィードバックが存在する場合ことが示唆されるなど、詳細なモデル構造を推定することが可能となる。

④位置づけと類似研究との比較

本研究の類似技術として、フローサイトメトリーによるシグナル活性およびタンパク発現量の計測方法がある。しかしながら、フローサイトメトリーは血球系細胞の計測・解析に適しているが、トリプシン処理の必要性などから接着系細胞には適していない。本システムでは、細胞を剥がさずにそのまま固定・染色し、画像解析技術により1細胞毎のシグナル活性を計測するため、接着系細胞においても細胞間のばらつき(分布)の情報を定量化することが可能である。

(2)研究成果の今後期待される効果

客観的なデータの解析のためには、なるべく大規模な定量的なデータを計測することが要であり、そのような測定手法の開発の遅れこそがシステムズバイオロジーの発展へのボトルネックとなっていると考えている。本自動化計測システムでは、複数のシグナルを同時に計測することから、シグナル同士の同時分布を計測することができる。同時分布を計測することで、信号間における情報伝達の正確さを示す指標となる相互情報量を計算することが可能であり、シグナルカスケードにおける情報伝達の仕組みに関する新たな発見が期待される。

4. 1. 2. 分化におけるデコード解析(1)

概要:持続的な ERK 活性は、PC12 細胞を神経分化させる。我々は ERK による細胞分化が、準備期(LP; latent process)と神経突起伸長期(extension process)の2段階のステップによりなることを見出した(論文5、Chungら、2010)。ERK は遺伝子発現を介して準備期を制御することを見出し、その期間を制御する LP 遺伝子として *Metrn1*、*Carp/Ania4*、*Serp1b1a* の3つを同定した(渡邊ら、J. Cell Science リバイス中)。

(1)研究実施内容及び成果

①実施方法

NGF 刺激により生み出される、持続的な ERK は神経分化を誘導するが、ERK の時間波形に含まれる情報がどのように後の神経分化へとデコードされているのかは明らかになっていない。そこで我々は、NGF 刺激による神経分化の時間変化、さらに NGF 下流の ERK 活性や遺伝子発現の時間変化に着目し、情報伝達がどのように行われているかに迫った。

②実施内容

②-1:神経分化過程の解析

神経分化における形態変化の指標として、我々は神経突起の長さを定量化した。NGF 刺激パターンとそれにより引き起こされる突起伸長を比較したところ、突起伸長過程には、プライミング現象、即ち、1 次刺激で誘導される準備期(0-12 時間)と2 次刺激で誘導される伸長期(12-24 時間)があることを明らかにした(上図)。さらに、準備期には、ERK 活性と遺伝子発現が、伸長期には、ERK と PI3K の活性が必要であることがわかった(論文5)

②-2:LP 遺伝子の同定

神経分化の開始に必要な遺伝子を同定する為、マイクロアレイにより網羅的な遺伝子選抜を行い、突起伸長の準備期に発現が上昇している約 50 の遺伝子が選抜された。プライマーを設計できた 30 遺伝子に関して定量 RT-PCR を行ったところ、22 の遺伝子が NGF 依存的な発現の上昇を示した。さらに siRNA による阻害実験を行い、その後の突起伸長に必要な遺伝子(LP 遺伝子: Latent Process 遺伝子)を同定した。

②-3:LP 遺伝子の発現、機能解析

LP 遺伝子について、その発現の時間変化や ERK 依存性について定量的 RT-PCR と阻害剤実験による解析を行った。また、これら遺伝子発現と突起伸長の定量的関係について、他の刺激(PACAP, forskolin, EGF, insulin)を用いた時の応答を調べた。さらに、LP 遺伝子を強制発現させた際の神経突起伸長への影響を調べた。

③成果

siRNA 実験の結果、3 つの遺伝子(*Metrn1*, *Dcl1k1* 及び *Serp1b1a*:LP 遺伝子)の発現が突起伸長

準備期に必要であった。LP 遺伝子の発現は、ピーク、持続性がそれぞれ異なる時間変化を示した(右図)。さらに、発現に必要なとされる ERK 活性の持続性はそれぞれ異なっていた。また、LP 遺伝子は神経突起の準備期を誘導する PACAP、forskolin 刺激によってのみ発現を誘導された。刺激濃度を振った解析から、準備期における LP 遺伝子の発現量と伸長期における突起伸長の長さの間には正の相関が見られた。即ち、LP 遺伝子は、突起伸長の長さをデコードしている因子と考えられた。

さらに、3 つの LP 遺伝子を同時に強制発現させたところ、突起伸長が有意に促進されていたことから、これら LP 遺伝子は突起伸長に対して協調的に働いていると考えられた(渡邊ら、Journal of Cell Science リバイス中)。

④位置づけと類似研究との比較

本研究は、時間変化に着目した解析から、神経分化過程を 2 段階に分け解析することで、その情報伝達機構を詳細化した。過去に神経分化に関わる遺伝子の解析は多くなされているが、突起伸長との定量的な関係については詳しく議論されていない。今回我々が同定した LP 遺伝子は神経突起伸長のデコーダーとして機能していると考えられ、準備期から伸長期への情報の担い手を同定したことは、神経分化機構の理解を進める上で、非常に意義深いものと考えられる。

(2)研究成果の今後期待される効果

今後、LP 遺伝子がどのように ERK 下流の情報伝達を担っているかを、モデル化により明らかにしようと考えている。これにより ERK 経路による神経分化機構における時間情報コーディングの概念をさらに具体化させることができると期待される。

4. 1. 2. 分化におけるデコード解析(2)

概要: PC12 細胞は異なる刺激の情報を共通する因子を介して伝達することから因子の組み合わせや時間変化の関係性が重要であると考えられる。本研究は回帰分析的手法である PLS(Partial Least Square)法により数理モデルを構築することで、シグナル伝達系を構成する複数の因子の時系列変化と各表現型との多対多の関係を定量的に解析している。この手法を用いて LP 遺伝子のモデル化の枠組みを提供することを目指している。

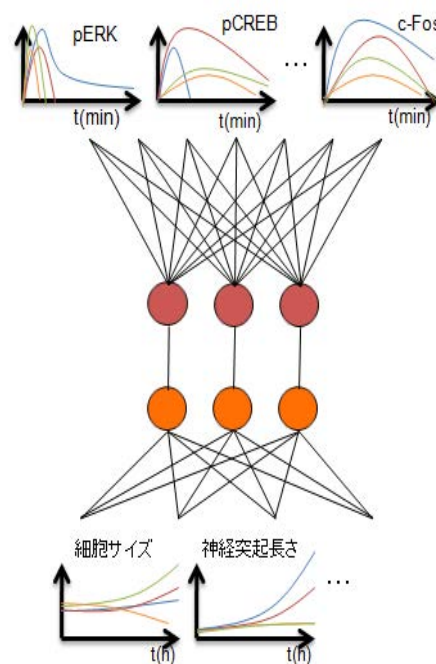
(1)研究実施内容及び成果

①実施方法

PC12 細胞は NGF や PACAP 刺激による細胞分化に加え、EGF 刺激による細胞増殖や Anisomycin 刺激によるアポトーシスなど多彩な表現型を見せることが報告されている。これらの刺激の情報は細胞内にて個別のシグナル伝達経路を介するのではなく、MAPK や一部の IEG 等が共通して情報を伝達している。つまり主要な因子の時間変化及び組み合わせ変化によって刺激の情報を下流に伝達していると考えられる。このようなシグナル伝達経路においては、個別分子の静的な変化ではなく複数分子の動的な変化に着目し、数理モデルによる定量的な解析を行うことが有効である。本研究では実験により MAPK 及び IEG など主要な因子の時系列データを取得し、さらに回帰分析的手法の一つである PLS(Partial Least Square)法を用いて数理モデルを構築することで、多数の因子と多数の表現型との関係を定量的に評価する(右図)。

②実施内容

我々はモデルの構築を実際に行うにあたり、先行して NGF と PACAP 刺激による神経突起の伸び方を予測するモデルを構築した。モデル構築に用いるデータは ERK を始めとする MAPK や Akt 等の主要なシグナル伝達系因子の活性を QIC により定量的かつ再現性の高いデータを取得した。さらに当研究室においてマイクロア



レイ解析を行い NGF 刺激にて特異的に発現している IEG を確かめた。その結果 *c-fos* や *c-jun* を始めとする AP-1 を構成する因子や *egr1* と呼ばれる遺伝子の発現が確認されたことからこれらの因子の細胞内での発現量を QIC にて取得した。また突起の長さは既存の画像解析ソフトを用い各刺激後の神経の長さを定量化した。

③成果

我々は PLS 法による予測モデルの構築に成功した。作製したモデルはクロスバリデーションにより精度を検証し、モデルから予測した値と実際の値とを比較したところ最終的モデルは実測値の約 80% を予測することを確認した。

④位置づけと類似研究との比較

従来の細胞生物学、特にシグナル伝達機構の研究分野では、生化学・分子生物学的手法により、分子活性の有無など個別の分子に着目して解析する方法が主流である。しかしこのような方法では、同一のシグナル伝達経路を利用しながらも個別の表現型を生み出す機構を解析することはできない。本研究は、複数分子の活性の時間パターンや情報の流れに着目することに加え、さらに数理的な解析手法を駆使することで、その制御機構を定量的に解析する新しいアプローチである。PLS 法をシグナル伝達機構に用いて解析した先行研究としては Janes 等(2006)がある。Janes 等は実験で得たデータよりモデルを構築し、シグナル伝達系の活性とアポトーシスとの未知の関係を予測して、実際に実験により検証した。これは PLS 法がシグナル伝達機構の解明に有効であることを示している。Janes 等は単一の表現型について解析を行ったが、我々は複数の表現型を予測するモデルを構築する。これにより、共通するシグナル伝達因子が異なる刺激の情報を下流に伝えるしくみの理解につながると考えられる。

(2)研究成果の今後期待される効果

現在は細胞分化に加え、細胞増殖、細胞死を予測するモデルを構築中である。表現型の指標として、Edu の取り込みによる細胞周期 S 期の割合、MTT アッセイによる細胞の生存率、アポトーシスの指標であるカスパーゼ-3 の活性、細胞の大きさ等を測定する。既に作成した分化予測のモデルに対しこれらのデータを加えることで、複数の表現型を予測するモデルを構築する。構築したモデルの予測と実験の結果とを比較することで、モデルが実際に生命現象を反映しているかを検証する。完成したモデルを解析することで、共通するシグナル伝達因子が異なる刺激の情報を下流へ伝えるメカニズムを明らかにする。

本研究にて用いる PLS 法は多対多の変数から未知の関係を抽出することに有効な手法であるので、完成したモデルを解析することで、シグナル伝達系における従来の定性的なアプローチでは明らかではない関係を抽出することが可能である。シグナル伝達系に対する本研究のような数理的なアプローチは、微分方程式や ARX を用いたモデルを構築し、シグナル伝達系のシステムの特徴を同定していく上で重要な過程になると考える。

4. 2 ERK 経路のモデル(東京大学 黒田グループ)

4. 2. 1 自己回帰モデルを用いた IEG の解析

概要:PC12 細胞においては ERK の一過性の活性および持続性の活性がそれぞれ、増殖・分化を促す。我々は、ERK の時間パターンに依存して細胞の応答が異なるデコードのメカニズムを解析するため、ERK や CREB など上流のシグナル分子のリン酸化と、下流の初期応答遺伝子産物(IEGs; immediate early genes)の発現量を測定してデータドリブンモデルを用いて、デコード機構のメカニズムの解明を試みた。その結果、EGR1 は ERK の一過性成分により選択的に誘導されるが、c-FOS、c-JUN は ERK の持続性成分により選択的に誘導されることが明らかになった(斎藤ら、論文投稿準備中)。

(1)研究実施内容及び成果

① 実施方法

ERK 経路の下流は詳細が不明であるため従来の生化学反応モデルが構築できない。そこで、QIC により大量の定量的時系列データを取得して、これを用いてデータドリブンモデルを作成し、ERK の下流の動的特性を解析した。データドリブンモデルとしては時系列解析で主に用いられる自己回帰モデルと Hill 式による非線形変換を組み合わせた nonlinear ARX モデルを用いて、古典

的 MAP キナーゼファミリーとその直下で発現する immediate early gene (IEG)からなる比較的小規模なネットワークに適用して、成長因子刺激に対する古典的 MAP キナーゼファミリーから IEG 転写産物までの時間情報コーディングのメカニズムの解明を試みた。

②実施内容

<データの計測>

PC12 細胞を EGF,NGF で刺激し、マイクロアレイの解析により c-FOS、EGR1、c-JUN、FOSB、JUNB を刺激後初期に応答するデコーディング機構を担う遺伝子とした。PC12 細胞を EGF あるいは NGF で刺激し、マイクロアレイの解析により刺激後初期に応答する遺伝子として c-FOS、EGR1、c-JUN、FOSB、JUNB を同定しデコーディング機構を担う分子の候補として選定した。得られた IEGs の発現量およびその入力と考えられる MAPK(ERK,JNK,p38)、CREB の活性状態を QIC により計測した。刺激には NGF(3 パターン)、EGF(4 パターン)、PACAP(2 パターン)、Anisomycin(1 パターン)を用い、それぞれの分子に関して 3 分間隔の時系列データ、のべ 10000 ポイントのデータを取得した。

<モデル化(システム特性の解析)>

これらの時系列データを nonlinear ARX モデルを用いて解析したところ、各 IEGs に関して上流の依存性の違いおよびシステム特性(フィルター特性)の違いが明らかになった。特に IEGs のうち、c-FOS,c-JUN はローパスフィルター特性により ERK の持続性成分に選択的に誘導されること、EGR1 はバンドパスフィルター特性により ERK の一過性成分に強く誘導されることが明らかとなった。

<システム特性の検証実験>

増殖因子刺激時に ERK は振動することが報告されているがその生理的役割は分かっていない。本研究で作成したモデルから、EGR1 がそのバンドパスフィルター特性により ERK の振動に強く応答することが予測された。この特性を検証するため、NGF を連続パルス状に与え、ERK の振動応答を再現させる実験を行った(下図、青線)。その結果、モデルの予測は、実験結果をうまく再現することに成功し EGR1 は ERK の振動に選択的に応答できることを見出した。

③成果

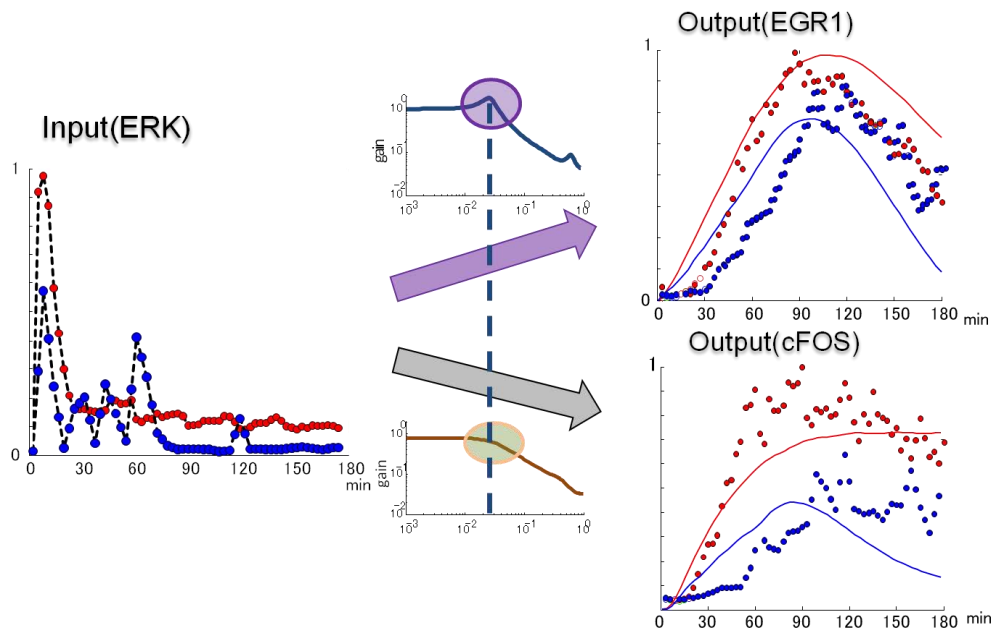
本研究は、遺伝子発現の制御機構において特定の時間パターン(周波数)に応答するバンドパスフィルター機構の存在を解析・実験的に見出した。本研究の成果が果たす生物学的意義は、未解明であった ERK の時間パターンが分化・増殖の違いを生み出すメカニズムの説明する手がかりを得たことにある。加えて、今まで未解明であった ERK の振動が及ぼす役割について、その意義を世界で初めて示すことに成功した。

④位置づけと類似研究との比較

微分方程式モデルを用いた c-FOS の制御機構のモデル化に関する論文が 2010 年に cell にて報告されている。本研究は c-FOS に加え、他の初期応答遺伝子も同時に計測しモデル化し、その応答特性の違いを見出している。また、モデル化手法に関して自己回帰モデルを用いて遺伝子発現機構を解析した研究は報告されているが、マイクロアレイのデータを利用しているため時間解像度が乏しく、新たな生物学的見地を見出すことには成功していない。本研究では自己回帰モデルに必要な時間解像度に優れた計測技術を開発・利用していることから、類似研究と比較し優れているといえる。

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究は、分子活性の時間パターンが細胞応答の共通原理として重要な役割を果たしていることを示すとともに、シグナル伝達機構における時間パターンの解析に本研究で用いたモデル化手法が非常に有効であることを示しており、今後のシグナル伝達におけるシステム生物学のモデル論文となることが期待できる。



4. 2. 2 AKT 経路の周波数応答解析(1)

概要:PC12 細胞を EGF で刺激すると、Akt 経路の上流と下流とで応答強度が逆転するという、直観に反する現象を見出した。逆転現象の原因を解明するため、実験データを取得し、モデルを作成して解析した。その結果、Akt 経路がローパスフィルタという特性をもち、これが逆転現象を生み出していることや、この特性のために抗癌剤の作用が逆転し得ることなどがわかった(論文 3、藤田ら、*Science signaling*, 2010)

(1) 研究実施内容及び成果

①実施方法

PC12 細胞を EGF で刺激した際の Akt 経路の応答を調べたところ、経路の上流分子(EGFR)と下流分子(S6)のリン酸化の強さが逆転する場合があった(下図)。つまり EGFR の強い一過的な活性化よりも、弱い持続的な活性化の方が下流の S6 の応答を強く誘起した。そこで、逆転現象のメカニズムを明らかにするため、この現象を再現できるモデルを作成し解析した。まず EGF の濃度を細かく変えながら PC12 細胞を刺激して、抗リン酸化抗体を用いたウェスタンブロットにより EGFR、Akt、S6 のリン酸化の詳細な時系列データを取得した。次に、文献を元に Akt 経路のネットワーク構造を作成し、これを単純な微分方程式のモデルとして生化学反応シミュレータ copasi 上に記述した。copasi に実装されたパラメータ推定アルゴリズムを用いて、取得した時系列データを再現できるようにモデルのパラメータを自動的に推定した。モデルが出力する時系列データに対して、数値計算ソフトウェア Matlab を用いて、工学分野でよく用いられる周波数応答解析を適用した。

②実施内容

まず 6 段階の濃度の EGF step 刺激によって PC12 細胞を刺激し、ウェスタンブロットにより EGFR、Akt、S6 のリン酸化時系列データを取得した(8 時点、n=3、計 387 点)。精度のよいデータを取得するために、同一ゲルで流すサンプル数を増やす、抗体の反応ムラを抑える、高精度の定量ソフトウェアを導入する、といった改善を重ね、CV 値の低減に成功した。このデータに基づいてモデルの

パラメータを推定し、実験データを非常によく再現するモデルを作成することができた。さらに当研究室で開発した pulse や ramp といった刺激パターンを与えた際の各分子のリン酸化の挙動を予測させた。実際に 6 段階の濃度の EGF pulse 実験 (8 時点、n=3、計 387 点)や 4 段階の濃度の EGF ramp 実験(10 時点、n=3、計 333 点)を行ったところ、モデルの予測と非常によく一致するデータを得たので、モデルが高い予測性能を持つことがわかった。モデルの出力する時系列データに対して周波数応答解析を行い、Akt 経路がローパスフィルタ特性を持つことを見出した。また S6 以外の Akt 下流分子や EGF 以外の刺激を与えたときの各分子の挙動を調べ、ローパスフィルタ特性の普遍性を確認した。またある種の EGFR 阻害剤が S6 のリン酸化を逆に亢進させる可能性がモデルから示唆された。そこで抗癌剤としても用いられる EGFR 阻害剤 lapatinib を、濃度を変えてあらかじめ投与しておき、EGF で PC12 細胞を刺激して、予測を検証した。

③成果

周波数応答解析の結果、EGFR-Akt と Akt-S6 の経路はいずれも低周波をよく通すローパスフィルタとして作用していることが分かった。信号の時間パターンが持続的であるほどローパスフィルタによる伝達効率が高いため、EGFR の弱い持続的な信号が効率よく下流へ伝わり、S6 の強い応答を誘起するという、逆転現象のメカニズムが明らかになった。このローパスフィルタ特性は逐次一次反応という非常に単純な生化学反応に内在する特性であることがわかった。また異なる種類の刺激として NGF の step 刺激を与えた際にも同様のローパスフィルタ特性が見られることを確認した。Akt の下流分子のうち S6 以外の分子のリン酸化の挙動を確認したところ、p70 S6K や eIF4B など複数の分子が S6 と同様の挙動を示すことがわかったので、これらのローパスフィルタ特性は特定の経路に限らない普遍的な特性であることが示唆された。さらに、ある種の EGFR 阻害剤が S6 のリン酸化を逆に亢進させる場合があることがモデルから予測された。実際に、抗癌剤としても用いられる EGFR 阻害剤 lapatinib は EGFR の活性を強い一過性から弱い持続性へと変化させ、結果として S6 の活性を亢進させた。つまり抗癌剤が下流の応答を逆に亢進させる場合があることを実際に確認した。

④成果の位置づけ

シグナル伝達の研究においては信号の強弱関係は経路中で保存されて伝わるという直観が広く信じられているが、我々の見出した逆転現象はこれに反するものである。逆転現象が起きているある一時点のデータからは上流分子が下流分子を抑制しているように見えるが、実際には単なる促進反応のカスケードで生じる現象である。逆転現象を生み出すローパスフィルタという特性は逐次一次反応という非常に単純で一般的な生化学反応に内在する特徴であり、どのような経路についても観察される。したがって我々の研究成果は、既存のシグナル伝達研究における多くの実験データの解釈の妥当性に疑問を投げかけるものである。また抗癌剤が作用標的の分子を十分抑制しているにもかかわらず下流分子の活性が亢進するという現象が実際に確認されたという事実は、薬剤開発などにおいて十分に考慮されるべきである。

また EGF をはじめとする幾つかのリガンドでは最適濃度が存在し、濃度が高すぎると逆に応答が減少するという convex 性を示す場合があることが古くから知られているが、今回の研究はこのような現象に対しても説明を与えるものである。また Akt-S6 経路が制御するタンパク合成は、細胞の大部分のエネルギーと長い時間を必要とする過程である。ローパスフィルタ特性は細胞が十分長時間刺激されたときのみ信号を伝えるので、タンパク合成が途中で停止し、消費したエネルギーが無駄になることを防いでいると考えられる。シグナル伝達経路自体がこのようなノイズフィルタの役割をもつことを実験的に明らかにした例は過去になく、非常に独創的な成果である。また信号の時間パターンに注目することでシグナル伝達経路のシステムとしての特性を明らかにできることを示した点は、システム生物学の観点から高く評価できる。さらに時間情報コードの観点からは、Akt 経路は時間パターンの低周波数成分に信号を乗せて下流へ送信していると考えられる。これは時間情報コードのなかでも特にデコードの枠組みを明らかにしたものであるといえ、周波数帯域の分割による多重化(multiplexing)などの可能性を示唆する画期的な成果である。

⑤類似研究との比較

シグナル伝達経路を周波数応答の観点から研究した類似研究は酵母について 3 例あるのみで、哺乳類細胞については存在しない。類似研究の手法は、周期的刺激をシグナル伝達経路へ直接

与える必要があるため手法の適用範囲が極めて限定的である。我々の手法は直接周期的刺激を与える必要がないため適用範囲が広く、高等真核生物などでの解析に必須であるといえる。

また実験データに基づいてモデルを作成しダイナミクスを解析する類似研究は多数あるが、取得するデータの詳細さや、モデルによるダイナミクスの再現精度・予測性能はこれらの類似研究と比べて極めて優秀であり、実験とモデルを組み合わせる我々の手法の優位性を示している。

さらに、新規手法の適用や新規分子の発見ではなく、シグナル伝達特性の解明を当初から目指している点は、他に類を見ない非常に独創的な研究である。

(2)研究成果の今後期待される効果

シグナル伝達の研究においては信号の強弱関係は経路中で保存されて伝わるという直観が広く信じられているが、我々の見出した逆転現象はこれに反するものである。実際に、抗癌剤が作用標的の分子を十分抑制しているにもかかわらず下流分子の活性が亢進するという現象が確認された。これらの事実は薬剤開発などにおいて十分に考慮されるべきであり、システム生物学を生かした創薬などに活用されると考えられる。これらの事実は同時に、既存のシグナル伝達研究における多くの実験データの定性的解釈の妥当性に疑問を投げかけており、より定量的な生物学の進展を促すものである。

また信号の時間パターンに注目することでシグナル伝達経路のシステムとしての特性を明らかにできることを実証できた。特に時間情報コードの観点からは、周波数帯域の分割による多重情報伝送など、時間情報コードの概念をさらに発展させる可能性を含んでいる。これらの成果は、生命現象の理解におけるシステム生物学の重要性を示しており、同分野の研究が今後一層発展することが期待される。

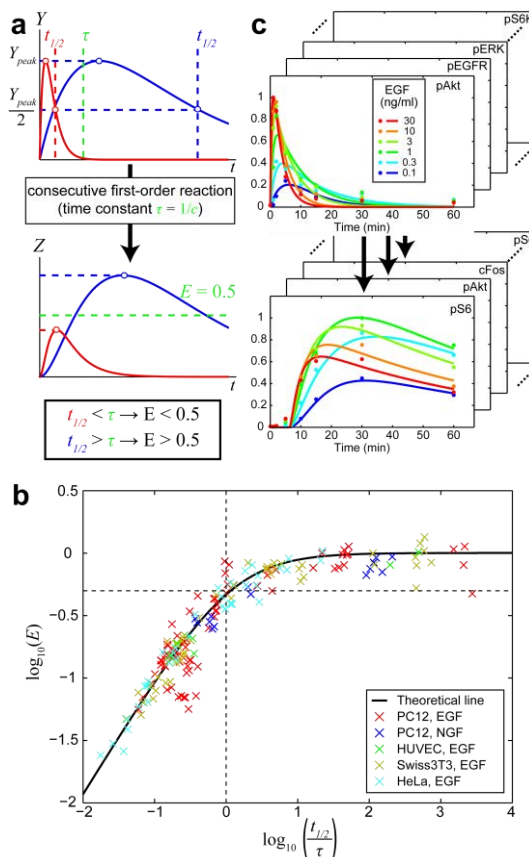
4. 2. 2 AKT 経路の周波数応答解析(2)

概要: 外部刺激に対する細胞応答の感受性がどのようにして調節されているかは重要な問題である。我々は上記で明らかにした信号強度の逆転現象のメカニズムが、細胞の刺激感受性に対してどのように影響するかを明らかにするため、モデルと実験を組み合わせた解析を行った。その結果、シグナル伝達経路の負の制御の強さにより、信号のピーク強度の伝達効率が変化し、結果としてピーク強度の刺激感受性が調節されることが分かった(豊島ら、Nature Communication、2012)

(1)研究実施内容及び成果

①実施方法

細胞の刺激に対する応答の感受性は、シグナル分子の活性のピーク強度や終端値、持続時間などで評価されることが多い。終端値についてはその調節メカニズムが以前から提出されているが、頻用されるピーク強度については全く報告がない。一方我々は逐次一次反応という単純な生化学反応によって信号の強度が変化することを明らかにした。そこでピーク強度の感受性の調節機構を明らかにするため、まず Matlab を用いて、逐次一次反応を含む簡単なシグナル伝達経路のモデルを作成し、シミュレーションによりピーク強度に対する逐次一次反応の影響を調べた。その結果、ピーク強度の伝達効率は逐次一次反応の負の制御の強さにより変化するという特性が分かった(右図 ab)。つぎに複数の培養細胞を用いてウェスタンブロットを行い、多様なシグナル分子の活性化の時系列データを大量に取得した。個々の時系列データに基づいてモデルのパラメータ推定を大量に行って、この特性が当てはまる経路が多数存在することを実証した(右図 bc)。さらにシミュレーションを行って、



活性化剤や阻害剤に対するピーク強度の感受性を調べたところ、ピーク強度の伝達効率の変化のため、経路の上流と下流とで感受性が変化する場合があることがわかった。PC12 細胞の Akt-S6 経路に注目してウェスタンブロットを行い、この現象を検証した。

②実施内容

単純な生化学反応である逐次一次反応はローパスフィルタ特性を示し、逐次一次反応の分解反応(負の制御)の強さにより経路の時定数(=ローパスフィルタの強さ)が決まる。そこで Akt 経路のモデルを元に、逐次一次反応を含む単純なシグナル伝達経路のモデル(activator モデル)を作成した。このモデルは Akt 経路の応答を概ね再現できた。次にこのモデルのパラメータを様々に変化させてシミュレーションを行ったところ、上流分子の合成(リン酸化)や分解(脱リン酸化)反応の速度定数が下流の逐次一次反応の分解反応の速度定数より大きいときに、上流分子から下流分子へのピーク強度の伝達効率が大きく減少することが分かった。この結果は、微分方程式モデルの近似的な解析解からも確認できた。

より詳細な解析を行ったところ、ピーク強度の伝達効率が上流分子の時間パターンの時定数と経路の時定数との比から求められることが示唆された(上図 ab)。これは、上流信号の時間パターンが経路の時定数と比べて急峻なほど伝達効率が低下することを意味している。この予測が実際に細胞内で成立していることを示すため、4 種類の細胞と 2 種類の刺激因子を用いて、のべ 16 種類のシグナル分子のタイムコースを測定した(15 時点、n=1、計 3596 点)。これらの実験データについて、それぞれの経路毎に activator モデルのパラメータを推定したところ、全 110 経路のうち 49 経路は逐次一次反応で精度よく近似できることがわかった。これらの経路では伝達効率の実測値は理論値と一致しており、上記の予測を実証することができた。パラメータ推定に際しては、copasi に実装されていたパラメータ推定アルゴリズムを matlab に移植・改良することで、matlab に保持された大量の実験データをシームレスに扱えるようにした。また matlab 上での計算速度を大幅に向上する仕掛けを導入し、さらに PC クラスタを用いた分散処理を利用することで、大量の実験データに対するパラメータ推定が初めて可能となった。

つぎに、activator モデルを用いたシミュレーションにより、刺激に対するシグナル分子のピーク強度の感受性(EC50)を調べた。その結果、ピーク強度の伝達効率の減少によって、ピーク強度の EC50 は経路の上流分子よりも下流分子の方が小さくなることが分かった。これは、下流分子の方が活性化剤に対する感受性が高いことを意味している。またシグナル伝達経路の負の制御(逐次一次反応の分解反応)が弱いほど感受性の変化の度合いが強くなることが分かった。

さらに、activator モデルに阻害剤の作用を加えた inhibitor モデルを作成し、activator モデルと同様にして、ピーク強度の阻害剤感受性(IC50)を調べた。その結果、ピーク強度の伝達効率の減少によって、ピーク強度の IC50 は経路の上流分子よりも下流分子の方が大きくなることが分かった。これは下流分子の方が阻害剤感受性が低いことを意味している。またシグナル伝達経路の負の制御(逐次一次反応の分解反応)が弱いほど感受性の変化の度合いが強くなることや、不可逆的阻害剤を用いるとこの感受性変化が抑圧されることが分かった。

最後に、PC12 細胞を用いて、EGF 刺激時の lapatinib(EGFR 阻害剤)感受性を調べた。8 種類の濃度の lapatinib を予め投与しておき、一定濃度の EGF 刺激を加えた際の Akt および S6 のリン酸化のタイムコースを取得した。その結果、lapatinib に対する Akt のリン酸化ピークの IC50 は 112nM であったのに対し、S6 の IC50 は 463nM となり、モデルから予測された阻害剤感受性の減弱を実証することができた。

③成果

刺激により引き起こされた信号がシグナル伝達経路を伝わる時、信号のピーク強度の伝達効率が経路の負の制御の強さによって異なることを明らかにした。さらに上流分子の時間パターンの時定数と経路の時定数との比から伝達効率が求められることをモデルから予測し、実際に実験を行って実証した。この実験は同時に、多くのシグナル伝達経路の入出力関係が逐次一次反応で近似できることを示唆しており、逐次一次反応に伴うローパスフィルタ特性が細胞や刺激、経路によらない普遍的な特性であることを明らかにした。

さらに、ピーク強度の伝達効率の低下によって、刺激の強度に対するピーク強度の感受性(EC50)が経路の下流で増強されることや、経路の負の制御が弱いほど増強が強くなることを見出し

た。また同様のメカニズムにより、ピーク強度の阻害剤感受性(IC50)は経路の下流で減弱することや、経路の負の制御が弱いほど減弱が強くなること、不可逆性の強い阻害剤を用いるとこの減弱が抑圧されることなどを見出した。さらに、抗癌剤として用いられる EGFR 阻害剤 lapatinib に対する感受性(IC50)が、Akt 経路下流の S6 で Akt よりも減弱していることを実際に実験を行って確認し、阻害剤感受性が減弱する現象を実証した。

④成果の位置づけ

シグナル伝達研究において信号のピーク強度は応答の強さの指標として頻用されるにもかかわらず、その伝達効率や刺激感受性がどのようにして決まるかは不明のままであった。我々は生化学反応の基本的な要素である逐次一次反応に注目し、信号のピーク強度の伝達効率や刺激感受性が逐次一次反応の負の制御の強さによって決まることを明らかにした。この成果は信号の伝達効率や刺激感受性の決定について、全く新たなメカニズムを提示するものである。また阻害剤の効果が下流分子ほど減弱するという発見は、薬剤開発の分子標的の選定などに役立つと考えられる。

また、負の制御の強さは脱リン酸化酵素やタンパク分解酵素といった負の調節因子の活性・発現量を反映すると考えられるので、細胞はこのような分子の活性調節を介して、刺激や阻害剤に対する自身の感受性を制御していることが示唆された。さらに、遺伝子発現から翻訳までの過程は逐次一次反応で近似できる場合が多く、またシグナル伝達経路と比して負の制御が弱い(時定数が大きい)と考えられるので、細胞は遺伝子発現の過程を介することで刺激に対する感受性を増強していることが示唆された。このように、個々の分子・経路ではなくシステムのレベルの特性を明らかにした点は、システム生物学の点から高く評価できる。

また一般にシグナル伝達経路は多数の分子からなる複雑で非線形なネットワークを形成していると考えられているが、本研究によって、多くのシグナル伝達経路の入出力関係が逐次一次反応で近似できることがわかった。この結果は、シグナル伝達のダイナミクスを解析する上では、詳細な分子ネットワークの構築は重要ではなく、詳細を省いた粗視化(単純化)が有効であることを実証するものである。この結果は同時に、逐次一次反応に伴うローパスフィルタ特性が細胞や刺激、経路によらない普遍的な特性であり、多くの経路に存在することを意味している。これによって、Akt 経路の解析において我々が開発した、周波数特性に注目してシグナル伝達経路を解析する手法の有効範囲が広がり、妥当性や意義が強まったといえる。

⑤類似研究との比較

信号の時間パターンのうち終端の信号強度(定常値)については、活性化剤や阻害剤に対する感受性のメカニズムを明らかにした研究が理論・実験ともに多数ある。しかし信号のピーク強度や持続時間といった特徴に関する同様の例はほとんどなく、本研究で提案したピーク強度の感受性調節のメカニズムはきわめて新規性・独創性が高いものである。

また実験データにもとづいてモデルのパラメータを推定する手法については、従来手法と比して大幅な効率化・高速化・大規模化が達成された。実験とモデルを組み合わせるうえでパラメータ推定は大変重要であり、類似手法に対する我々の手法の優位性を強めるものである。

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究では、細胞が負の調節因子の活性調節を介して、刺激や阻害剤に対する自身の感受性を制御していることや、遺伝子発現の過程を介することで刺激に対する感受性を増強していることが示唆された。これらの知見は今後の研究の過程で実証されられると思われる。

現在の薬剤開発では高い特異性を得られるよう、受容体を標的分子として選定することが多い。しかし阻害剤の効果は下流へ行くほど減弱することが本研究により明らかになり、上流分子を標的とした場合細胞の応答を効果的に抑止できない可能性が示唆された。また不可逆性の強い阻害剤は一般に特異性が高いため好まれるが、本研究では不可逆性の強い阻害剤を用いることで下流における阻害剤感受性の減弱を抑止できる可能性が示唆された。このように本研究の成果は薬剤開発などの分野で活用されることが期待できる。

4. 3 モデル化手法開発(東京大学 黒田グループ)

4. 3. 1 自己回帰モデルからの情報抽出

概要:シグナル伝達系において、分子濃度の時系列を測定できても分子のネットワーク構造が分

からないことは多いため、測定できる分子の入出力データだけから分子のネットワーク構造を知ることが望まれている。本研究では、入出力関係が線形近似できることを仮定し、周波数応答関数から分子のネットワーク構造に関する情報を引き出すことを目的とする(谷村ら、みずほ情報総研技術報告書に掲載)。波数応答関数は、ARX モデルなどによって測定データから得ることができる。

(1) 研究実施内容及び成果

① 実施方法

常微分方程式を用いて、分子ネットワークの人工モデルを作成し、入出力の人工データを生成する。人工データに対して ARX モデルを適用し、周波数応答関数を数値的に得る。

入出力データから得られた周波数応答関数は冗長に次数が高くなりがちである。冗長に次数が高いとは、直感的に言えば、ほぼ同じ入出力関係をより次数の低い周波数応答関数で記述できることである。従って、冗長に次数を高くしている周波数応答関数から、冗長な極を取り除き、周波数応答関数の次数を下げる。

② 実施内容

周波数応答関数によって全ての入出力応答に関する結果を記述できるため、周波数応答関数を調べることで系に関する非常に多くのことがわかり得ると期待できる。従って、次数を下げて冗長性を除いた周波数応答関数から、分子ネットワークにおける反応のステップ数、分岐の数、合流の数を推定することを試みた。推定結果を人工モデルの分子ネットワークの構造と比較した結果、分子ネットワークの構造にもよるが、おおよそ 80% から 90% ぐらいの正答率であった。

③ 成果

周波数応答関数から、分子ネットワークの構造に関する情報を引き出す手法を開発した。

④ 位置づけと類似研究との比較

ERK 下流などの分子ネットワーク構造が未知の系において、適用することを想定して手法の開発を行った。手法の妥当性を調べるため、現段階では、人工モデルに適用している。

シグナル伝達系において、周波数応答関数から分子ネットワーク構造を推定することは、我々の知る限り先行研究がない。理由として、信頼性の高い周波数応答関数を得るためには、時系列で短い時間間隔で大量にサンプリングをしなければならないことがひとつの制約になっているためであると考えられるが、我々は QIC を用いることでその制約を乗り越えることができる。

(2) 研究成果の今後期待される効果

ERK 下流のネットワークは未知の部分が多いため、ARX モデルを適用して得られた周波数応答関数からネットワーク構造に関する情報を引き出すことを今後行うことを検討中である。

4. 3. 2 情報量による解析

概要: 本研究の目的は、ERK シグナル伝達ネットワークが細胞運命決定において要となる情報処理を行っていることを、情報量の観点から明らかにすることである。細胞は多様な表現型を制御するために分子種以外にも分子濃度(の違い)を用いていると考えられ、分子濃度に細胞を制御する情報が含まれていると考えることができる。本研究では、刺激の情報が ERK シグナル伝達ネットワークを経て早期応答遺伝子に伝わる情報量を、シャノンの情報理論の枠組みを用いて解析した。解析により、刺激の種類によって情報伝達される経路が異なること、一部の経路は情報をロバストに伝達することが明らかとなった(宇田ら、投稿準備中)。

(1) 研究実施内容及び成果

① 実施方法

PC12 細胞を用いて、刺激の情報が ERK シグナル伝達ネットワークを経て、下流の早期応答遺伝子に伝達される様子を調べた。NGF、PACAP、PMA を用いて、ステップ刺激を行い、ERK、CREB のリン酸化、及び、早期応答遺伝子である c-FOS、EGR1 の発現量を計測した。NGF、PACAP 刺激では刺激濃度に依存して、神経様突起の伸長が促進されることがわかっている。

ERK シグナル伝達ネットワークの情報量は、シグナル伝達経路をシャノンの情報理論における通信路とみなし、相互情報量を用いて定量的に解析する。相互情報量は、信号を使って通信するときに平均的に伝達可能な情報量を表すと解釈でき、単位にはしばしばビットが用いられる。直感的には、信号のパターンの数とばらつきによって伝達可能な情報の量は決まる(下図)。

シグナル伝達系の解析のために相互情報量を算出するには、1細胞レベルで分子濃度を大量に測定する必要がある。そこで、本CRESTの研究で開発したQICを用いて測定を行った。さらに、刺激濃度は12段階で細かく振っている。取得した標本データから、Adaptive Partitioning法によって分子濃度の経験分布関数を求める。相互情報量は、シグナル伝達経路を通信路とみなして、刺激と応答分子間、及び、上流分子と下流分子間に対し、それぞれ得られた経験分布関数から数値的に算出する。このとき、個体内で入力分布がどのようになっているかは分からないので、刺激の入力分布は、刺激と早期応答遺伝子間の相互情報量が最大、すなわち、刺激と早期応答遺伝子間が通信路容量を達成するように、入力分布を設定した。次に、算出した相互情報量を、連鎖法則を用いて経路ごとの寄与に分解し、シグナル伝達ネットワークにおける情報伝達を解析した。阻害剤PD, H89, BISをそれぞれ用いて各経路を阻害し、情報量に及ぼす影響を調べた。

②実施内容

シャノンの情報理論の枠組みを用い、シグナル伝達における経路を通信路とみなして、ERKシグナル伝達ネットワークにおける刺激から早期応答遺伝子までの情報伝達を、相互情報量を用いて解析した。より具体的には、QICで取得したデータから経験分布関数を求めて刺激と早期応答遺伝子間の相互情報量を算出し、経路ごとの寄与の寄与を調べた。経路ごとの寄与を分子ごとの寄与に換算した結果、NGF刺激においては、主にERKのリン酸化により刺激の情報が1ビット近くIEGsに伝達されることがわかった。PACAP刺激では、主にCREBのリン酸化により刺激の情報が1ビット近くc-FOSに、0.6ビット近くがEGR1にそれぞれ伝達されることがわかった。PMA刺激においては、主にERKとCREB以外の経路によってIEGsに1ビット弱の刺激の情報が伝達されることがわかった(右図)。

さらに、ERK上流のMEKを阻害するPD、CREB上流のPKAを阻害するH89、PMAが作用するPKCを阻害するBISをそれぞれ用いて刺激の情報伝達を調べた結果、NGF刺激におけるc-FOSとEGR1、及び、PACAP刺激におけるc-FOSは、阻害剤の効果によって信号の平均的強度が減少するのに比べ、情報量の減少は比較的弱く、細胞制御に重要な経路の情報伝達が外部などからの阻害に対してロバストにできている可能性があることがわかった。

③成果

阻害実験をせずとも、各経路ごとに刺激の情報伝達の寄与が算出できることがわかった。さらに、得られた結果が従来の生物学的知見に合致することに加え、阻害剤実験の結果においても整合性があることが確認できた。ただし、これらが必ずしも一般的に成り立つとは限らず、平均値とバラツキの間にある程度の相関関係がみられるような場合に限られると思われるが、シグナル伝達系では経験的に多くの場合が該当すると考えている。

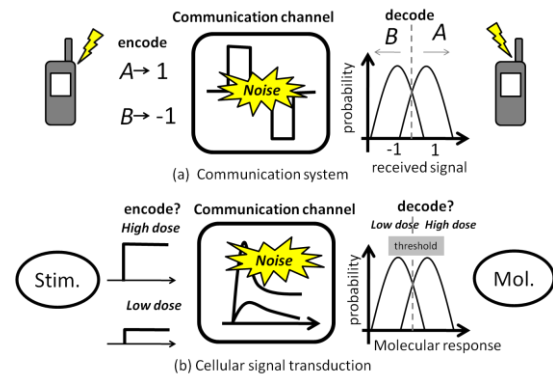


図1: 通信理論とシグナル伝達の類似性

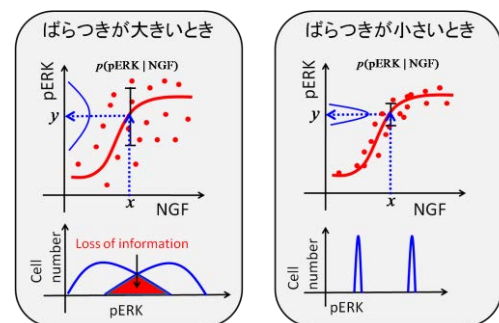


図2: ばらつきが大きいと、刺激があったときと刺激がなかったときの応答分子の分布が重なり、刺激の有無が応答分子から区別できなくなる。⇒ 刺激の情報が損失

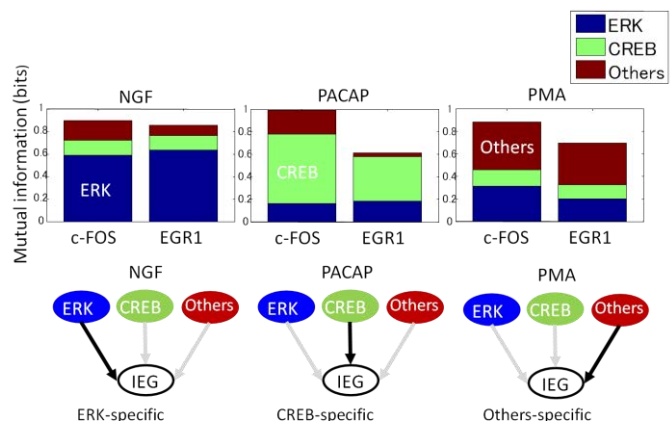


図3: 早期応答遺伝子に伝達される刺激の情報を分子ごとの寄与に分解した結果

シグナル伝達系において、情報量のロバスト性が示唆されたのは、初めてである。

④位置づけと類似研究との比較

細胞制御を担う信号を情報として捉え、どれぐらいの量の情報がどのように伝達されているかを知ることが、今後、シグナル伝達系を含めて、細胞を系統的に理解する上で非常に重要である。

従来では、リン酸化の分布データを 1 細胞レベルで情報量を算出できる程、大量、かつ、安定して定量的に取得するのは難しく、我々の知る限りでは先行研究において、シグナル伝達系におけるリン酸化によって伝達される情報量を解析している先行研究はない。さらに、複数分子種の実データを用いて、ネットワークとして相互情報量を解析している先行研究もない。

(2) 研究成果の今後期待される効果

本来、分子濃度の平均的強度と刺激の情報量は相関する必要がない。従って、分子濃度の平均的強度が小さくても、情報量の観点からは細胞制御に重要な影響を及ぼす分子が存在する可能性があり、情報量を用いた解析を行うことで、旧来の観点からは取りこばれていた生命現象を制御する新たな機構が発見される可能性がある。

情報量の観点からのロバスト性がシグナル伝達系の設計原理に働いている可能性の示唆は今までなく、今後、細胞の設計原理を探る上で重要な知見が提供される。

4. 4 インスリン作用の時系列データ取得 (東京大学 黒田グループ)

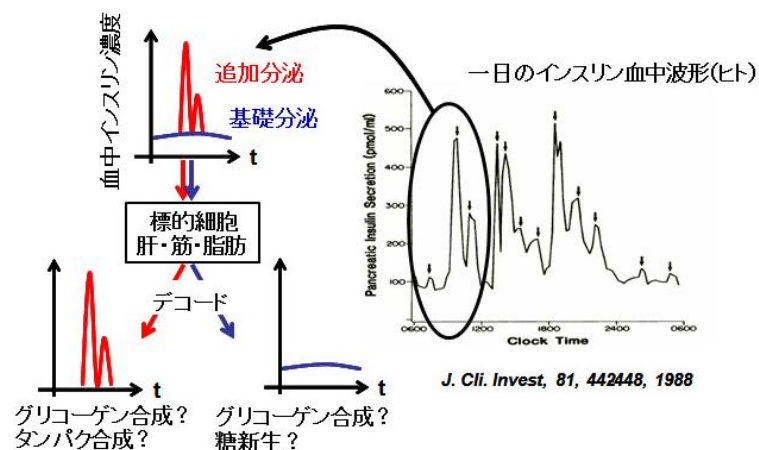
4. 4. 1 時系列データ取得

概要: 時間情報コーディングの生理的意義を明らかにするため、生体内において複数の波形が存在しその重要性が報告されているインスリンに注目した。インスリン刺激により変動する分子の時間波形を基に微分方程式モデルを作成し、モデルの検証と解析を行った。その結果、複数のインスリンの時間波形が AKT の活性化波形に同時に多重コード(Multiplexing)され、下流の分子を個別に制御し得ることを明らかにした(久保田ら、Cell 投稿中)。

(1) 研究実施内容及び成果

①実施方法

時間情報コーディングの生理的意義を明らかにするために、生体内において複数の血中波形が報告されているインスリンに注目した。インスリンは食後に一過的に分泌される追加分泌と、平時から微量に分泌されている基礎分泌、そして数分～15 分程度の周期的波形からなる事が報告されている。つまり、これらの波形がインスリンシグナル伝達経路の分子を特異的に制御しているのではないかと考えた(右図)。インスリンの標的臓器として肝臓、筋肉、脂肪細胞



が良く知られている。特に肝臓は膵臓から放出されたインスリンの最初の標的臓器であり、最もインスリン波形の影響を受けていると考えられる。実際に肝臓からのインスリンによる糖の放出抑制は、一定刺激よりも 15 分程度の繰り返し刺激の方が効果的に抑制されることが報告されている。そこで我々はラット肝ガン由来の Fao 細胞を用いて、シグナル分子ならびに遺伝子発現の時系列データの取得を行った。モデル作成には精度の良い大量データが必要である。そこで自動分抽ロボットを用いてウェスタンブロッティングと RT-PCR 用の時系列サンプリングを行う自動細胞刺激法を構築した。また、得られたデータから微分方程式モデルを作成するために必要なアルゴリズムの検討ならびに高速化に成功し、モデルの妥当性の検討を行うのに十分な環境を整備した。

②実施内容

まず初めにインスリンシグナル伝達経路の下流において、インスリンの追加分泌、基礎分泌、15

分程度の周期的波形に特異的に応答していると考えられる分子の探索を行った。実際には市販抗体 15 種、文献からインスリンの波形に特に応答していると考えられるリン酸化部位を認識する特注抗体 2 種、更にインスリンに応答するという報告がある 18 遺伝子の特異的プライマーを用いて各分子のインスリンステップ刺激に対する時系列データの取得を行った。これらの分子の中でインスリンの波形に応答していると考えられる代表的な分子 4 種(リン酸化 AKT (pAKT), リン酸化 GSK3 β (pGSK3 β), リン酸化 S6K (pS6K), G6Pase)を選び、モデル作成のための時系列データの取得を行った。実験データの取得には先に検討を行った自動細胞刺激法により再現性の良いデータを約 1200 点取得した。次に、既報のいくつかのネットワーク構造を基に単純化した微分方程式モデルを作成し、遺伝的アルゴリズムを用いて、得られた実験データを再現するようなパラメータの推定を行った。得られたモデルが十分に実験結果を再現できない場合には既報の他のモデル構造に変更、または新たに経路を仮定するなどして再びパラメータ推定を行った。

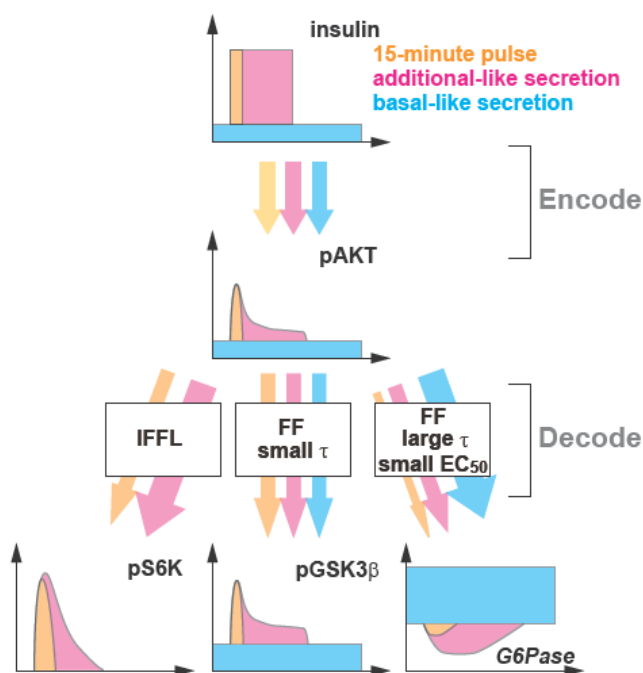
③ 成果

我々はモデルと実験による検証から pAKT, pGSK3 β , pS6K の一過的な波形はインスリンの投与速度を、pAKT, pGSK3 β , G6Pase の持続的な波形は最終濃度を検知していることを明らかにした。つまり同じ pAKT の下流に位置するにも関わらず、pS6K は一過的刺激に良く応答するが持続的刺激には応答せず、G6Pase は一過的刺激にあまり応答しないが持続的刺激には良く応答し、pGSK3 β はそのどちらにも良く応答することが明らかになった(下図)。これらの結果は pAKT の波形にインスリン波形の異なる情報を同時にコード可能であることを意味している(AKT による情報の multiplexing)。さらにモデルの解析から、pGSK3 β , pS6K, G6Pase による pAKT からの異なる波形のデコードのメカニズムは、異なるネットワーク構造や kinetics によって生み出されていることを明らかにした。これらの結果から、インスリンシグナル伝達経路においても時間情報コーディングを用いて情報の伝達を行っている、つまり、分子単体ではなく時間波形に情報がコードされていることが明らかになった。これらの結果は、追加分泌はグリコーゲン合成やタンパク質合成を、基礎分泌は糖新生の長時間の反応を誘導しやすいことを示唆している。また、測定した時間波形とネットワークの解析から pS6K の波形を再現するには未知のインスリン依存的な負の制御が必要であることも予測した。これらの結果は現在雑誌 (Cell) に投稿中である。

④位置づけと類似研究との比較

本研究により、インスリンシグナル伝達経路においても時間波形に情報がコードされることが明らかになった。特に本研究により明らかになった特性は、多くのシグナル伝達経路に見られる共通のネットワーク構造や kinetics の違いによって生み出されていることから、シグナル伝達経路一般に広く存在するメカニズムであると考えられる。また、分子の時間波形に情報がコードされている例として ERK や Ca²⁺が報告されており、時間情報コーディングの概念は細胞一般に使われている普遍的な概念である事が強く示唆された。

先にも述べたように、インスリンの分泌様式には幾つかの波形の存在が古くから知られていた。特に糖尿病との関連は良く調べられており、糖尿病の初期では追加分泌が減少するが基礎分泌は増加することが報告されている。また、15min 周期の波形も糖尿病患者では消失することから、糖尿病の関係が重要視されている。インスリンの投薬には追加分泌・基礎分泌を真似た処方や、インスリンの短い周期的刺激による治療も行われている。15min 程度の周期的刺激は持続的刺激より肝臓からの糖の放出抑制や、血糖値の減少、血中 FFA の減少を効果的に促進することが報告さ



れているがその分子メカニズムは全く不明のままである。また、糖尿病の初期においては肝臓からの糖の放出抑制は減少するが脂質の合成は促進されるなどインスリンの作用が一見矛盾するような病態も報告されている。今回我々が明らかにしたインスリンシグナル伝達経路における時間情報コーディングの概念を用いることで、これらのインスリン作用のメカニズムや矛盾に十分な説明を与えることが出来る。このような観点からインスリン作用のメカニズムを明らかにしようとした研究は現在まで皆無である。

(2) 研究成果の今後期待される効果

今後本研究が基礎となり、シグナル伝達分子全般の時間情報コーディングの存在と意義が明らかになることが期待される。また今後は、より *in vivo* に近く *output* に近い研究を行うことで時間情報コーディングの生理的意義を確固たるものにする。同時に糖尿病治療への応用を目指した研究も行う。また、インスリン以外にも多くのホルモンが周期的に分泌されている事が報告されており、他のホルモンでも同様にそれらの時間波形に情報がコードされている可能性が高い。特にホルモンの分泌異常と病気の関連性がある場合にはその分泌波形が生理的意義を持つ可能性が高いため、時間情報コーディングの概念を適用することで今後のホルモン研究に多大な影響を与えることが期待される。

4. 4. 2インスリンの早期応答分子の解析

概要: 上述の市販抗体を用いた解析から、インスリンの一過的波形に応答するような特徴的な挙動をする分子は pS6K しか存在しなかった。そこで九州大学の中山研究室との共同研究でこのような分子の網羅的な探索を行った。その結果、候補分子として 6 分子同定したが、インスリンシグナル伝達経路に対する位置づけが不明であったため更なる解析は中止とした。しかしながらこの結果は後述するトランスオミクス解析へと発展した。

(1) 研究実施内容及び成果

①実施方法

Fao 細胞を用いてインスリンのステップ刺激を行い、タイムコースを取得した。その後リン酸化ペプチドを濃縮し、iTRAQ 法により網羅的にリン酸化ペプチドを同定した。得られたデータを基に波形クラスタリングを行い、60 分以内に一過的にリン酸化される分子を同定した。

②実施内容

Fao 細胞を用いて 0, 2, 5, 10, 30, 45, 60min の時間でサンプルを取得した。その後、IMAC 法によりリン酸化ペプチドを濃縮し、iTRAQ 法によりリン酸化ペプチドを約 8000 個同定した。次にこれらのデータを元に波形クラスタリングを行い、インスリン刺激により一過的に 2 倍以上変動する分子を同定した。

③成果

インスリンのステップ刺激に対して一過的に 2 倍以上変動する分子を 6 分子同定した。得られた分子はインスリンシグナル伝達経路に対する位置づけが不明であるため、さらなる解析は中止とした。しかしながら、得られた大量のデータは後述するメタボロミクスと組み合わせたトランスオミクス解析へと発展、現在論文を作成中である。

④位置づけと類似研究との比較

多くのオミクス解析は実験条件が異なるサンプルを比較することで興味となる分子のスクリーニングを行ってきた。本研究では時間波形に注目して興味となる分子のスクリーニングを行ったことが非常に新しい。また、本研究から発展した後述するトランスオミクス解析の類似研究は非常に少なく、特に時間波形に注目した研究は非常にユニークである。

(2) 研究成果の今後期待される効果

優先順位の関係から同定した分子の解析を行っていないが、これらはインスリンシグナル伝達経路における時間情報コーディングの意義を明らかにする上で非常に重要な候補分子である。そこで今後順次に個別解析を行い、論文化を目指す。また、得られたリン酸化ペプチドの時間波形に基づく解析を行い、分子の時間波形とペプチドの 2 次、3 次の配列情報に注目したクラスタリング解析も行う予定である。また、前述したように本研究の過程でメタボロミクス解析とマイクロアレイ解析を行い、3つのオミクスデータを組み合わせることで新たな“トランスオミクス解析”の可能性に気が

ついた。後述するが、この解析は今後のシステム生物学、並びにオミクス解析において大きなインパクトを与える研究となることが期待される。

4. 5 インスリンの個体での作用（神戸大学 小川グループ）

・代謝関連遺伝子の個体レベルでの作用解析

概要：肝臓での代謝制御や代謝関連遺伝子発現の制御機構について解析し、この経路に関わる新規な分子機構の探索を行った。更に、遺伝子改変動物の作成を通じて **PDK1/PI3-kinase** 経路やその下流のシグナル伝達経路の個体レベルでの生理的意義の解析を行うことも試みた。これらの結果は複数の論文として報告した。

(1) 研究実施内容及び成果

①実施方法

インスリンの肝への作用における時間情報コーディングを明らかにするために、**PDK1** の **flox** マウスを用いて、臓器特異的な **PDK1/PI3-kinase** 経路のシグナル遮断モデルを作成し、個体レベルでの本経路の意義の解析を行った。また、マイクロアレイ解析などを通じて、**PDK1/PI3-kinase** 経路の下流で機能し、糖代謝に関わる新規な分子の同定を行った。

②実施内容

肝臓特異的 **PDK1** 欠損マウスやその他の生理的、病理的状态のマウスの肝臓における遺伝子発現のマイクロアレイ解析により、**PDK1/PI3-kinase** の下流で機能し、個体レベルでの代謝制御に関わる遺伝子の同定を試みた。更に、同定された分子 **Stra13** と **KLF15** について強制発現や発現抑制により生理的意義の解析を行った。**Stra13** の培養肝細胞やマウス肝臓での強制発現や発現抑制により、脂肪酸合成酵素遺伝子の発現と高中性脂肪血症の関係を検討した。また同様の研究により、**KLF15** の発現がインスリンによって **PDK1/PI3-kinase** 依存的に抑制されることも見出し、**KLF15** の培養肝細胞やマウス肝臓での強制発現や発現抑制により、糖新生系酵素遺伝子の発現と高血糖との関係も検討した。

③成果

bHLH 型転写制御因子である **Stra13** の発現が **PDK1/PI3-kinase** 経路依存性にインスリンにより肝臓で増強することが明らかとなった。実際に、培養肝細胞やマウス肝臓への **Stra13** の強制発現や発現抑制により、脂肪酸合成酵素遺伝子の発現が増強、低下することが明らかとなった。遺伝的肥満モデル動物である **db/db** マウスにアデノウイルスベクターを導入した実験から脂肪酸合成酵素遺伝子の発現は低下し、高中性脂肪血症も改善した。これらの結果から、**Stra13** は **PDK1/PI3-kinase** の下流で機能し、インスリンによる脂肪酸合成作用を制御する因子であるとともに、肥満に伴う、高中性脂肪血症の原因因子の一つである可能性が示唆された。また、転写因子 **KLF15** の発現が **PDK1/PI3-kinase** 経路依存性にインスリンにより抑制されることも見出した。実際に、培養肝細胞やマウス肝臓への **KLF15** の強制発現や発現抑制により、糖新生系酵素遺伝子の発現が増強、低下することが明らかとなった。遺伝的肥満モデル動物にアデノウイルスベクターを導入した実験から肝臓の糖新生系酵素遺伝子の発現は抑制され、高血糖の改善が見られた。これらの結果から **KLF15** はインスリンによる糖新生系酵素遺伝子の制御因子のひとつであり、糖尿病の治療標的として有用な分子である可能性が示唆された。

④位置づけと類似研究との比較

培養細胞を用いたインスリン作用の研究は広く行われている。しかしながら、得られた結果がそのまま *in vivo* に適用できるとは限らない。本研究では単に培養細胞モデルでの解析だけでなく、遺伝子改変動物の作成を通じて **PDK1/PI3-kinase** 経路やその下流のシグナル伝達経路の個体レベルでの生理的意義の解析を行ったことが非常にユニークな点である。実際に培養細胞モデルで得られた結果を遺伝的肥満モデル動物に適用している。これらの結果は今後のインスリン作用の研究ならびに糖尿病の病態解明に大きな貢献をするものと期待される。

(2) 研究成果の今後期待される効果

今後も肝臓特異的 **PDK1** 欠損マウスの表現型を解析することで、インスリン作用に対する **PDK1** の役割を明らかにする。また先にも述べたように、本研究は培養細胞モデルで得られた結果を、遺伝的肥満モデル動物を用いて確認している。つまり、得られた研究結果がそのまま糖尿病治療の

ターゲットとなる可能性を秘めている。なお、本研究は中間評価のコメントを踏まえ、方針変更により期間途中で中止した。

§ 5 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際 (欧文) 誌 18 件)

「黒田」グループ

1. Toyoshima, Y., Kakuda, H., Fujita, K., Uda, S. and Kuroda, S., Sensitivity control through attenuation of signal transfer efficiency by negative regulation of cellular signaling, *Nature Communications*, 3:743, 2012
2. Watanabe, K., Akimoto, Y., Yugi, K., Uda, S., Chung, J., Nakamuta, S., Kaibuchi, K. and Kuroda, S., Latent process genes for cell differentiation are common decoders of neurite extension length, *J Cell Sci.*, 2012
3. Honda, M., Urakubo, H., Tanaka, K. and Kuroda, S., Analysis of development of direction selectivity in retinotectum by a neural circuit model with Spike Timing Dependent Plasticity., *J. Neurosci.*, 31(4), 1516-27, 2011
4. Otsuji, M., Terashima, Y., Ishihara, S., Kuroda, S. and Matsushima, K., A Conceptual Molecular Network for Chemotactic Behaviors Characterized by Feedback of Molecules Cycling Between the Membrane and the Cytosol., *Science Signaling*, 3(152), ra89, 2010
5. Fujita, K., Toyoshima, Y., Uda, S., Ozaki, Y., Kubota, H. and Kuroda, S., Decoupling of Receptor and Downstream Signals in the Akt Pathway by Its Low-Pass Filter Characteristics., *Science Signaling*, 3(132), ra56, 2010
6. Ozaki, Y., Uda, S., Saito, T., Chung, J., Kubota, H. and Kuroda, S., A quantitative image cytometry technique for time series or population analyses of signaling networks., *PLoS ONE*, 5(4), e9955, 2010
7. Chung, J., Kubota, H., Ozaki, Y., Uda, S. and Kuroda, S., Timing-Dependent Actions of NGF Required for Cell Differentiation., *PLoS ONE*, 5(2), e9011, 2010
8. Urakubo H, Honda M, Tanaka K, Kuroda S., Experimental and computational aspects of signaling mechanisms of spike-timing-dependent plasticity., *HFSP J.*, 3(4):240-254, 2009
9. Urakubo, H., Honda, M., Froemke, R.C. and Kuroda, S., Requirement of an allosteric kinetics of NMDA receptors for spike-timing-dependent plasticity., *J. Neurosci.*, 28(13), 3310-3323, 2008

「小川」グループ

1. Takashima, M., Ogawa, W., Hayashi, K., Inoue, H., Kinoshita, S., Okamoto, Y., Sakaue, H., Wataoka, Y., Emi, A., Senga, Y., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R. and Kasuga, M., Role of KLF15 in regulation of hepatic gluconeogenesis and metformin action, *Diabetes*, 59, 7, 1608-1615, 2010
2. Nagare, T., Sakaue, H., Takashima, M., Takahashi, K., Gomi, H., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R., Ogawa, W. and Kasuga, M., The Kruppel-like factor KLF15 inhibits transcription of the adrenomedullin gene in adipocytes, *Biochem Biophys Res Commun.*, 379, 1, 98-103, 2009
3. Nakamichi, S., Senga, Y., Inoue, H., Emi, A., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R., Ogawa, W. and Kasuga, M., Role of the E3 ubiquitin ligase GRAIL in glucose and lipid metabolism in the liver. *J Mol Endocrinol.*, 42, 161-169, 2009
4. Ito, K., Akazawa, H., Tamagawa, M., Furukawa, K., Ogawa, W., Yasuda, N., Kudo, Y., Liao, CH., Yamamoto, R., Sato, T., Molkentin, JD., Kasuga, M., Noda, T., Nakaya, H. and Komuro, I., PDK1 coordinates survival pathways and beta-adrenergic response in the heart, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106(21), 8689-8694, 2009
5. Park SG, Schulze-Luehrman J., Hayden, MS., Hashimoto, N., Ogawa, W., Kasuga, M. and Ghosh, S., The kinase PDK1 integrates T cell antigen receptor and CD28 coreceptor signaling to induce NF-kappaB and activate T cells, *Nat Immunol.*, 10(2), 158-66, 2009
6. Yoshioka, T., Inagaki, K., Noguchi, T., Sakai, M., Ogawa, W., Hosooka, T., Iguchi, H., Watanabe, E., Matsuki, Y., Hiramatsu, R. and Kasuga, M., Identification and characterization of an alternative promoter of the human PGC-1alpha gene, *Biochem Biophys Res Commun.*, 381(4), 537-543, 2009

7. Nagare, T., Sakaue, H., Takashima, M., Takahashi, K., Gomi, H., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R., Ogawa, W. and Kasuga, M., The Kruppel-like factor KLF15 inhibits transcription of the adrenomedullin gene in adipocytes, *Biochem Biophys Res Commun.*, 379(1),98-103, 2009
8. Nakamichi, S., Senga, Y., Inoue, H., Emi, A., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R., Ogawa, W. and Kasuga, M., Role of the E3 ubiquitin ligase GRAIL in glucose and lipid metabolism in the liver, *J Mol Endocrinol.*, 42(2),161-169, 2009
9. Nakamura, K., Sakaue, H., Nishizawa, A., Matsuki, Y., Gomi, H., Watanabe, E., Hiramatsua, R., Tamamori-Adachi, M., Kitajima, S., Noda, T., Ogawa, W. and Kasuga, M., PDK1 regulates cell proliferation and cell cycle progression through control of cyclin D1 and p27Kip1 expression, *J Biol Chem.*, 283(25),17702-17711, 2008

(2) その他の著作物(総説、書籍など)

「黒田」グループ

1. Ozaki, Y. and Kuroda, S., Imaging and Single-Cell Measurement Technology, *Handbook of Statistical Systems Biology*, Wiley Blackwell, in press
2. 黒田真也、動き出す次世代システムズバイオロジー:研究が広がる定量的データ取得と解析、細胞工学、29,4,2010
3. 望月敦史、石原秀至、杉村薫、柴田達夫、黒澤元、齋藤大助、津元国親、小林徹也、上田昌宏、澤井哲、大浪修一、本田稔、黒田真也、小林亮、中垣俊之、三浦岳、本多久夫、森下喜弘、生命科学の新しい潮流 理論生物学、共立出版、3-4、2010
4. 近藤滋、北野宏明、金子邦彦、黒田真也、現代生物科学入門 8 システムバイオロジー岩波書店、2010
5. Ozaki, Y., Uda, S. and Kuroda, S., Specific features of transient Ras and sustained Rap1 activation. In *Systems Biology, the Challenge of Complexity* Springer, 121-127, 2009
6. Hidetoshi Urakubo, Minoru Honda, Keiko Tanaka, and Shinya Kuroda, Experimental and computational aspects of signaling mechanisms of spike-timing-dependent plasticity, *HFSP Journal*, 3,(4)240-254, 2009
7. 黒田真也、浦久保秀俊、スパイクタイミング依存シナプス可塑性のシステム生物学、生体の科学、59,5,416-4167, 2008

「小川」グループ

1. Ogawa, W. and Kasuga, M., Fat stress and liver resistance, *Science*, 322, 1483-1484, 2008

(3) 国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 8 件、国際会議 6 件)

「黒田」グループ

1. 黒田真也(東京大学大学院理学系研究科)、Unbiased quantitative biology for trans-OMIC study、第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011 年 12 月 14 日
2. 黒田真也(東京大学大学院理学系研究科)、インスリン作用の AKT 経路による多重情報コード、第 84 回日本生化学会大会、京都、2011 年 9 月 21 日
3. 黒田真也(東京大学大学院理学系研究科)、ERK シグナル伝達経路の情報コーディング、第 49 回日本生物物理学会、姫路、2011 年 9 月 17 日
4. *Kuroda, S. (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo), Temporal coding of AKT and ERK signaling networks, *GRC Signal Transduction within the Nucleus*, Ventura, CA, March 3, 2011
5. 黒田真也(東京大学大学院理学系研究科)、Temporal coding of ERK and AKT signaling networks、2010 年日本バイオインフォマティクス学会年会、福岡、2010 年 12 月 14 日
6. 黒田真也(東京大学大学院理学系研究科)、Systems biology of spike-timing dependent

synaptic plasticity, US-Japan Brain Research Cooperative Program Workshop, 沖縄, 2010 年 10 月 4 日

7. *Kuroda, S. (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo), Temporal coding of ERK and AKT signaling pathway, Sino-Japan Workshop, Shanghai, March 14, 2010
8. 黒田真也(東京大学大学院理学系研究科), Temporal coding of ERK and Akt signaling pathway, 第 13 回国際細胞膜研究フォーラム, 京都, 2010 年 1 月 27 日
9. Ozaki, Y. (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo), High throughput quantification of single cellular signaling events by use of immunostaining and image cytometry, 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月 11 日
10. Kuroda, S. (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo), Temporal coding of ERK and AKT signaling pathway, International symposium on cellular signaling-principles and functions-, Tsukuba, November 18, 2009
11. 黒田 真也(東京大学大学院理学系研究科), システムズバイオロジー: 本質は複雑でなくシンプル! 第 61 回日本細胞生物学会大会, 名古屋, 2009 年 6 月 2 日
12. 黒田 真也(東京大学大学院理学系研究科), ERK 経路のシステム生物学, 第 9 回日本蛋白質科学会年会, 熊本, 2009 年 5 月 22 日
13. 黒田 真也(東京大学大学院理学系研究科), スパイクタイミング依存シナプス可塑性による学習, 千里ライフサイエンスセミナー, 大阪, 2009 年 3 月 16 日
14. *Kuroda, S. (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo), Temporal coding of ERK signaling network, NIBB-EMBL-CRG Workshop on Systems Biology, Barcelona, April 19, 2008

「小川」グループ (国内会議 3 件、国際会議 1 件)

1. Ogawa, W. (Kobe University Graduate School of Medicine), Regulation of hepatic energy metabolism by insulin, 13th International Congress of Endocrinology, Rio de Janeiro, Brazil, November 19, 2008
2. 小川渉(神戸大学大学院医学系研究科), 栄養/摂食による肝糖代謝遺伝子発現制御機構, 第 29 回日本肥満学会, 大分, 2008 年 10 月 19 日
3. 小川渉(神戸大学大学院医学系研究科), 肝臓の遺伝子転写とメタボリックシンドローム, 第 81 回日本内分泌学会学術総会, 青森, 2008 年 5 月 17 日
4. 小川渉(神戸大学大学院医学系研究科), Role of Kruppel-like Factor 15 in Hepatic Glucose Metabolism, 第 51 回日本糖尿病学会学術集会, 東京, 2008 年 5 月 23 日

② 口頭発表 (国内会議 9 件、国際会議 6 件)

発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日

「黒田」グループ

1. Watanabe, K. (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo), Latent process genes for cell differentiation are common decoders of neurite extension length, ASCB Annual Meeting, Denver Colorado USA, December 5, 2011
2. Uda, S. (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo), Analysis of ERK pathway in PC12 cells from information theoretical approach, 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2010 年 12 月 8 日
3. Uda, S. (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo), Information theoretic analysis of ERK pathway in PC12 Cell, The 11th International Conference on Systems Biology ICSB2010, Edinburgh, October 15, 2010
4. Saito, T. (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo), Decoding of temporal patterns of MAPKs by IEGs using ARX model, 第 48 回日本生物物理学会年会, 仙台, 2010 年 9 月 20 日
5. Noguchi, R. (Department of Computational Biology, Graduate School of Frontier Sciences,

- University of Tokyo), Temporal coding of the insulin signaling pathway in Fao hepatoma cells, 第 48 回日本生物物理学会年会、仙台、2010 年 9 月 20 日
6. 本田稔(東京大学大学院新領域研究科)、カエル視覚系における STDP による方向選択性の学習、第 29 回日本シミュレーション学会大会、山形、2010 年 6 月 19 日
 7. Ozaki, Y. (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo), High throughput quantification of single cellular signaling events by use of immunostaining and image cytometry、分子研研究会「Molecular Imaging for Systems Biology」、岡崎、2009 年 11 月 6 日
 8. Kuroda, S. (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo), Temporal coding of Akt signaling networks, Dynamics of signal transduction and of gene-protein regulatory networks, Ohio, USA, November 2-6, 2009
 9. Toyoshima, Y. (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo), Decoupling of receptor and downstream phosphorylation in Akt pathway by its low-pass filter characteristics、第 47 回日本生物物理学会年会、徳島、2009 年 10 月 30 日
 10. Urakubo, H. (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo), Biophysical modeling of spike-timing-dependent plasticity, ASIA SIMULATION CONFERENCE 2009, Shiga, October 8-9, 2009
 11. Honda, M. (Department of Computational Biology, Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo), Acquirement of direction selectivity through STDP in retinotectum、第 32 回日本神経科学大会、名古屋、2009 年 9 月 18 日
 12. Kuroda, S. (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo), Systems analysis of ERK signaling networks using automated immunofluorescent cytometry, Computational Cell Biology、Cold Spring Harbor, USA, March 24-27, 2009
 13. 藤田一広(東京大学大学院理学系研究科)、Temporal filtering in Akt pathway governs downstream responses、第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2008 年 12 月 11 日
 14. 尾崎裕一(東京大学大学院理学系研究科)、Systems analysis of ERK signaling network using automated immunofluorescence method、第 31 回日本分子生物学会年会第 81 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2008 年 12 月 10 日
 15. Fujita K. (Department of Computational Biology, Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo), Akt pathway serves as a series of low pass filters, The 2nd Taiwan-Japan Young Researchers Conference on Computational and System Biology, Tokyo, November 4-6, 2008

「小川」グループ (国内会議 4 件、国際会議 0 件)

1. 高嶋基嗣(神戸大学大学院医学系研究科)、肝糖代謝制御とメトホルミン作用における転写因子 KLF15 の役割、第 82 回日本内分泌学会学術添総会、群馬、2009 年 4 月 24 日。
2. 高嶋基嗣(神戸大学大学院医学系研究科)、メトホルミンは KLF15 の発現抑制を介して肝糖産生を抑制する、第 52 回日本糖尿病学会学術集会、大阪、2009 年 5 月 22 日
3. 永禮智基(神戸大学大学院医学系研究科)、肥満・糖尿病発症における転写因子 KLF15 の役割、第 51 回日本糖尿病学会学術集会、東京、2008 年 5 月 24 日
4. 高嶋基嗣(神戸大学大学院医学系研究科)、メトホルミンによる KLF15 の発現制御と肝糖代謝における意義、第 51 回日本糖尿病学会学術集会、東京、2008 年 5 月 23 日

③ ポスター発表 (国内会議 16 件、国際会議 8 件)

発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日

「黒田」グループ

1. Yugi, K. (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo), A trans-omics analysis of insulin-stimulated Fao rat hepatoma cell, Keystone

Symposia Pathogenesis of Diabetes: Emerging Insights into Molecular Mechanisms, Santa Fe, New Mexico, February 2, 2012

2. 久保田浩行(東京大学大学院理学系研究科)、インスリン波形による AKT 経路の多重情報コード、第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011 年 12 月 16 日
3. Toyoshima, Y.(Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo)、Negative regulation of a signaling pathway alters sensitivity through attenuation of signal transfer efficiency、第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011 年 12 月 14 日
4. Yugi, K.(Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo)、A trans-omics analysis of insulin-stimulated Fao rat hepatoma cell、第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011 年 12 月 14 日
5. Watanabe, K. (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo)、Novel essential genes for a latent process of cell differentiation as common predictors for neurite extension、第 84 回日本生化学会大会、京都、2011 年 9 月 22 日
6. Watanabe, K.(Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo)、Latent process genes for cell differentiation are common decoders of neurite extension length, ASCB Annual Meeting, Denver Colorado USA, December 5, 2011
7. Kubota, H.(Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo)、Temporal coding of insulin action through multiplexing of the AKT pathway, The 12th International Conference on Systems Biology ICSB2011, Heidelberg, August 30, 2011
8. Toyoshima, Y.(Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo)、Negative regulation of a signaling pathway alters efficiency and sensitivity, The 11th International Conference on Systems Biology ICSB2011, Heidelberg, August 29, 2011
9. 浦久保秀俊(東京大学大学院理学系研究科)、Emerging direction sensitivity through STDP in a model of Xenopus visual system、第 3 回バイオスーパーコンピューティングシンポジウム、神戸、2011 年 2 月 22 日
10. Watanabe, K. (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo)、Identification of genes involved in the latent process of NGF-dependent cell differentiation in PC12 cells、第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010 年 12 月 10 日
11. Toyoshima, Y. (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo)、Low-pass filter characteristics of signaling pathway can convert inhibitor into activator、第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010 年 12 月 10 日
12. 久保田浩行(東京大学大学院理学系研究科)、インスリンシグナル伝達経路の時系列解析、第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010 年 12 月 10 日
13. Saito, TH. (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo)、Decoding of Temporal patterns of MAPKs by IEGs using Auto Regressive Model, The 11th International Conference on Systems Biology ICSB2010, Edinburgh, October 11, 2010
14. 豊島有(東京大学大学院理学系研究科)、ローパスフィルタ特性がシグナル伝達の時間パターンに与える影響、第 48 回日本生物物理学会年会、仙台、2010 年 9 月 22 日
15. Honda, M. (Department of Computational Biology, Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo)、Emerging direction sensitivity through STDP in a model of Xenopus visual system、Neuro2010、神戸、2010 年 9 月 4 日
16. 本田稔(東京大学大学院新領域研究科)、Emerging direction sensitivity through STDP in a model of Xenopus visual system、第 2 回バイオスーパーコンピューティングシンポジウム、東京、2010 年 3 月 19 日
17. 藤田一広(東京大学大学院新領域研究科)、Decoupling of receptor and downstream signals in Akt pathway by its low-pass filter characteristics、第 13 回国際細胞膜研究フォーラム、京都、

2010 年 1 月 28 日

18. Chung, J. (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo), NGF-dependent differentiation requires two distinct processes; ERK-and transcription-driven protentiation process and ERK-and PI3K-driven neurite-extension process, 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、2009 年 12 月 12 日
19. Fujita, K. (Department of Computational Biology, Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo), Decoupling of receptor and downstream signals in Akt pathway by its low-pass filter characteristics, 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、2009 年 12 月 12 日
20. Toyoshima, Y. (Department of Biophysics and Biochemistry, Graduate School of Science, University of Tokyo), Decoupling of receptor and downstream phosphorylation in Akt pathway by its low-pass filter characteristics, 第 47 回日本生物物理学会年会、徳島、2009 年 10 月 30 日
21. Fujita, K. (Department of Computational Biology, Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo), Low-pass filter characteristics of the Akt pathway decouple EGF receptor and downstream phosphorylation, The 10th International Conference on Systems Biology, CA, USA, August 30, 2009
22. Honda, M. (Department of Computational Biology, Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo), Simulation Analysis of Spike-Timing Dependent Synaptic Plasticity from Signal Transduction Pathway to Visual Neuronal Network, Joint Computational Science Workshop 2009, 神奈川、2009 年 7 月 9 日
23. 本田稔(東京大学大学院新領域研究科), STDP による網膜視蓋系での方向選択性の学習、バイオスーパーコンピューティング・シンポジウム 2008、東京、2008 年 12 月 25 日
24. Honda, M. (Department of Computational Biology, Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo), Simulation Analysis of Spike-Timing Dependent Synaptic Plasticity from Signal Transduction Pathway to Visual Neuronal Network, The 2nd Taiwan-Japan Young Researchers Conference on Computational and System Biology, Tokyo, November 4-6, 2008

「小川」グループ (国内会議 6 件、国際会議 0 件)

1. 千賀陽子(神戸大学大学院医学系研究科)、AMP キナーゼを介した KLF15 の細胞内局在制御、第 52 回日本糖尿病学会学術集会、大阪、2009 年 5 月 23 日
2. 衣斐亜季(神戸大学大学院医学系研究科)、SREBP1c の転写制御における Stra13 の重要性、第 52 回日本糖尿病学会学術集会、大阪、2009 年 5 月 23 日
3. 高嶋基嗣(神戸大学大学院医学系研究科)、肝臓の糖代謝制御とメトホルミン作用における転写因子 KLF15 の役割、第 46 回日本臨床分子医学会学術集会、東京、2009 年 4 月 12 日
4. 衣斐亜季(神戸大学大学院医学系研究科)、転写因子 Stra13 のインスリンによる脂質代謝制御機構における役割、第 45 回日本臨床分子医学会学術集会、神戸、2008 年 7 月 25 日
5. 永禮智基(神戸大学大学院医学系研究科)、肥満・糖尿病発症における転写因子 KLF15 の役割、第 45 回日本臨床分子医学会学術集会、神戸、2008 年 7 月 24 日
6. 高嶋基嗣(神戸大学大学院医学系研究科)、肝糖産生制御とメトホルミン作用における KLF15 の役割、第 45 回日本臨床分子医学会学術集会、神戸、2008 年 7 月 24 日

(4) 知財出願

① 国内出願 (1 件)

《発明の名称、発明者、出願人、出願日、出願番号》

1. 測定対象分子の定量的解析方法及び装置、尾崎裕一・黒田真也、2010 年 3 月 8 日、特願 2010-050910

(5) 受賞・報道等

① 受賞

該当なし

② マスコミ(新聞・TV等)報道

1. 日刊工業新聞、News ウェーブ 21、「東大、抗がん剤に対する細胞反応の一端解明-正確な薬効予測に一役」、2012 年 3 月 16 日
2. プレスリリースサービス、「東大など、細胞内シグナル伝達経路の感受性制御機能を解明」、2012 年 3 月 14 日
3. 日経速報ニュース、「東大など、細胞内シグナル伝達経路の感受性制御機能を解明」、2012 年 3 月 14 日
4. 日経バイオテク、「東京大学、低濃度の抗がん剤をゆっくり投与するのは逆効果の可能性も、とシミュレーションで予測」、2010 年 8 月 30 日
5. 日刊工業、細胞の成長を制御する信号「伝達メカニズム解明」、2010 年 7 月 28 日
6. 化学工業日報、Akt 経路の信号処理「シグナル強度の逆転解明」薬物効果・副作用などより正確な予測可能に、2010 年 7 月 28 日

§ 6 研究期間中の主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

2010 年 12 月 8 日	第 33 回日本分子生物 学会年会・第 83 回日本 生化学会大会合同大会	神戸ポート アイランド	200 人	ワークショップ テーマ: 定量計算システム生 物学
2009 年 12 月 11 日	第 32 回日本分子生物 学会年会	パシフィコ 横浜	300 人	シンポジウム テーマ: Systems biology of cellular signaling
2008 年 12 月 10 日	第 31 回日本分子生物 学会年会・第 81 回日本 生化学会大会合同大会	神戸ポート アイランド	300 人	シンポジウム テーマ: ネットワークの動的 な性質が生み出す生命機 能
2011 年 9 月 17 日	第 49 回日本生物物理 学会年会	兵庫県立大 学	未定	シンポジウム テーマ: 生命システムの情報 処理
2011 年 9 月 21 日	第 84 回日本生化学会 大会	国立京都国 際会館	未定	シンポジウム テーマ: データ駆動型システ ム生物学
2011 年 12 月 14 日	第 34 回日本分子生物 学会年会	パシフィコ 横浜	未定	シンポジウム テーマ: トランスオミクスに向 けたアンバイアス定量生物 学

§ 7 結び

【研究の目標等から見た達成度】

当初の研究目標であった時間情報コードについては、期待通りの成果が得られた。その過程で、トランスオミクス解析、計測手法開発とデータドリブンモデル化手法、情報理論解析などの新展開があった。新展開は、それぞれの個別の展開だけでなく、大きなスケールから小さなスケールまで連続的に解析する体制を構築できたことが一番の進展と言える。

【得られた成果の意義等の自己評価】

時間情報コードについては、この数年論文が散見されるようになったが、多重コードやその生理的意義まで踏み込めたのは、我々のインスリンの時間情報コードのみであると言える。実験・計測手法や、解析手法の開発は思いのほか時間がかかった。

【今後の研究の展開】

今後は、トランスオミクス解析、時間情報コード、情報理論解析という、大きなスケールから小さなスケールまで連続的に解析手法を用いて、インスリンの作用機構などに焦点を当てながらシグナル伝達機構の情報コードを明らかにしたい。

【研究代表者としてのプロジェクト運営について】

システム生物学は、バイオ、理論、工学などのさまざまな知識・技術が必要とされる。CRESTのおかげでこれらの異なる分野の人材を一つの研究室に集めることができ理想的なチームが組むことができた。特に上記の新展開は、同じ分野の研究者のみでは見出すことができないものであったと言える。



【その他戦略的創造研究推進事業に対する意見予算】

CREST の予算と年数については非常に満足している。ただ、研究が5年で終了するとは限らないので、科研費のように繰り越し制度を検討してもらえるとよりチャレンジングな課題にも取り組むことが可能となる。