

トランスオミクス医学研究センター  
Research Center for Transomics Medicine

## ゲノミクス分野

### Division of Genomics

准 教 授 : 柴 田 弘 紀

Associate Professor : Hiroki Shibata, Ph.D.

当研究室では、疾病や適応進化と深い関わりを持つ遺伝的多様性の解析を行うことにより、遺伝情報制御機構や分子進化の観点から生命現象を理解することを目指している。疾患原因遺伝子変異の同定のみならず、発症機序解明を目指した動物モデルによる遺伝子変異機能解析、及び新規診断法・治療法開発を目指したゲノム・エピゲノム疫学研究を展開している。さらに近年は非モデル生物のゲノム解析や、古人骨DNAのゲノム解析にも着手している。平成27年3月に大学院生（システム生命科学府）の賈 楊が、修士号取得後、退学した。同じく平成27年3月に大学院生（システム生命科学府）の藤岡竜太が、博士号を取得した。

#### A. 精神神経疾患の分子基盤の解明

##### a. 統合失調症分子基盤の解明

これまでのグルタミン酸受容体遺伝子群系統的関連解析から、メタボトロピック型グルタミン酸受容体3型遺伝子 (*GRM3*) を統合失調症感受性遺伝子として同定していた (Fujii et al 2003)。そこで、メタボトロピック型グルタミン酸受容体3型遺伝子 (*Grm3*) のノックアウト (KO) マウスを作製し、行動学的解析、電気生理学的解析および薬理学的解析を行った。16種類の試験からなる総合的な行動解析バッテリーの結果、*Grm3* の KO マウスでは、T 迷路試験 (作業記憶)、強制水泳試験 (参照記憶)、恐怖条件付け試験 (文脈記憶) などの記憶を評価する一連の試験において、いずれも有意な記憶の低下が確認できた。これを受けて、電気生理学的解析を行ったが、海馬における長期増強 (LTP) の有意な低下は確認できなかった。また、オープンフィールド試験、明暗選択試験、ホームケージ活動モニタリングなどの活動性を評価する一連の行動試験において、いずれも *Grm3* の KO マウスで活動性の有意な上昇 (過活動、hyperactivity) が確認できた。これを受けて、メタンフェタミン投与による側坐核におけるドパミン放出を *in vivo* で測定したところ、*Grm3* の KO マウスにおいてドパミン放出の有意な上昇を確認した。記憶の低下および過活動は、いずれも統合失調症の中間表現型 (endophenotype) として知られているため、*Grm3* の KO マウスが統合失調症の症状の一部を正しく再現できていると結論した。さらに、統合失調症に見られる過活動が、グルタミン酸伝達系とドパミン伝達系の相互作用によって引き起こされていることが示唆された (Fujioka et al 2014)。

## b. 本態性高 CK 血症の解析

久留米大学で見出された本態性高 CK (クレアチンキナーゼ) 血症一家系に対して、次世代シーケンサを用いたエクソームリシーケンシングと連鎖解析を併用することにより、責任変異の同定を行った。常染色体優性の本態性高 CK 血症家系の発症者 5 名を含む 4 世代家系の計 9 名を用いて SNP アレイによる連鎖解析を行った。その結果、1, 7, 10, 19 番染色体に LOD 値 1.4 から 1.5 の連鎖領域を見出した。次に発症者 1 名と家系内非発症者 1 名についてエクソームリシーケンシングを行った。その結果、発症者でのみ見られた新規の SNV (Single Nucleotide Variant) を 65,180 個見出した。この中から連鎖解析のデータおよび高 CK 血症を来す可能性のある 40 個の候補遺伝子領域で絞り込んだところ、発症者の *RYR1* (Ryanodine receptor 1 遺伝子) に、新規の非同義 SNV を見出した。Polyphen-2 及び PANTHER subPSEC により、本アミノ酸置換の RYR 遺伝子産物への機能的影響は probably damaging と予測された。また、個別のキャピラリーシーケンスにより、家系内において、本変異が疾患と共分離することを確認した。筋生検サンプルを用いた細胞免疫染色とウェスタンブロッティングで遺伝子産物 RYR1 の著名な発現低下が見られた。さらに、リアルタイム PCR により、mRNA の有意な発現低下も確認できた。RYR1 は 4 量体で機能するため、本変異により優性阻害が起きたと考えると、本疾患が優性遺伝形式であることと矛盾しない。以上から、上記非同義 SNV が本疾患の責任変異であると結論した。*RYR1* は悪性高熱 (malignant hyperthermia) の主要な原因遺伝子として知られており、本態性高 CK 血症と悪性高熱の発症機構になんらかの関連があることが示唆された (論文投稿中)。

## B. ゲノム・エピゲノム疫学研究

### a. 疫学解析のための細胞種間のエピゲノム比較

疫学研究における DNA メチル化解析用のバイオリソースとして最もよく用いられるのが、末梢血細胞 (PBCs) と EB 不死化リンパ球細胞 (LCLs) である。しかし DNA メチル化レベルが、これら 2 つの細胞種間で必ずしも一致しないことが近年の研究で明らかにされている。そこで我々はこの結果の再確認と差異の傾向を調べるため、PBCs を 192 検体、LCLs を 92 検体について、Human Methylation 450K array を用いてエピゲノム解析をおこなった。その結果、PBCs に比べ LCLs で低メチル化を示すサイトが多いという結果を得た。それと同時に、CpG island 外の領域や転写開始点から離れた領域及び CpG サイトの割合が小さいプロモーター領域において、DNA メチル化レベルの細胞種間の差が大きいサイトが多く観察された。更に *ELOVL2* と *FHL2* に存在する、年齢と相関することが知られているメチル化サイトの相関の程度が LCLs で低下していることがわかった。以上の結果から、LCLs と PBCs は異なるメチル化状態を持つため、相互に単純な代用をすることは

できず、エピゲノム相関解析を行う上で注意する必要があるということを示した。

## **b. 喫煙応答性エピゲノム変化の解析**

多くの多因子疾患の共通する環境的リスクである喫煙に着目し、喫煙による DNA メチル化変化を網羅的に解析した。地域住民集団コホート 480 名 (福岡コホート 288 名、北名古屋コホート 192 名) の末梢血 DNA について、イルミナ 450K メチル化チップを用い、約 45 万個のメチル化領域のメチル化レベルを取得し、性及び年齢で補正した一般化線形モデルにて喫煙者と非喫煙者間での相関解析を実施した。2 つのコホートセット各々の相関解析で共通して有意な差異 ( $p < 0.05$ ) を示す 1,177 領域を同定し、統合した 479 検体での再解析にて、補正後も有意となる 50 領域を最終的に同定した ( $p = 1.05 \times 10^{-7}$ )。この 50 領域は、発癌や心血管病との関連が知られる遺伝子群を含む 32 の遺伝子領域に位置していた。このうち、7 領域は喫煙との関連が欧米より最近報告されたものと一致し、残りは本研究により同定された新規の領域であった。変化の向きについては、喫煙によってメチル化が低下する領域が多かった。メチル化レベルの変化と一日あたりの喫煙本数や喫煙年数との相関は、ほとんどの領域で観察されず、喫煙量と関係なく喫煙後比較的早期に変化すると考えられた。喫煙中止者のメチル化レベルは、現喫煙者と非喫煙者の中間にあるものが多く、禁煙期間に応じた回復を認めた ( $p = 2.3 \times 10^{-3} - 3.9 \times 10^{-8}$ )。喫煙に感受性を有する DNA メチル化領域が存在し、また、その一部は禁煙期間に応じた回復を示した。これらの領域が位置する遺伝子は、エピゲノムレベルで喫煙の影響を直接的に受ける遺伝子であり、喫煙がリスクとなる多くの疾患の発症機序との関連が示唆された (論文投稿中)。

## **C. 毒生物のオミクス解析**

生物毒は、生理活性物質の新たな創薬シーズとして、近年大変注目を浴びている。特に日本固有の毒蛇ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) は、毒成分タンパク質が加速進化していることがわかっており、進化学的にも大変興味深い。ハブにおける加速進化機構の解明と創薬シーズ開拓を目指して、次世代シーケンサを用いたハブのオミクス解析及び遺伝的多様性の解析を行っている。

### **a. ハブの全ゲノム配列決定**

#### **(1) 全ゲノムショットガン (WGS) 及びメイトペアシーケンス**

奄美大島産のメスの血液から抽出したゲノム DNA を用いて Roche454 用 WGS ライブラリを作製し、現在までに 28 ランを終了した。また同じメス個体由来のゲノム DNA を用いて、イルミナ用 WGS ライブラリを作製し、250-300 塩基両側読みを 12 ラン行った。FastqJoin

によるペアエンドリードの繋ぎ合わせを行った結果、合計で 98 Gb, 2 億リードを取得した。FACS で測定したハブのゲノムサイズの推定値 1.8 Gb (= 18 億塩基) から換算すると、このデータ量はハプロイドゲノムの 54 倍の読み取り深度に相当する。さらに同じメス由来のゲノム DNA を用いてイルミナ用メイトペアライブラリを 5 段階の異なった長さで作製し (1 kb、2 kb、4 kb、8 kb、12 kb) 75 塩基両側読みを行った (合計 3.9 億ペア、2.8 Gb)。さらに 500 塩基のインサート長の WGS ライブラリの通常のペアエンドデータ (6.2 億ペア、93 Gb) も取得した。

## (2) アセンブリ及びスキュッフォールディング

Platanus ソフトウェアにより上記の WGS リードのアセンブルを行った結果、192 万コンティグに繋ぎ合わされ、N50 は 3.8 kb であった。これらをペアエンドリードとしてコンティグに追加して、Platanus ソフトウェアによりスキュッフォールディングを行った。その結果 42 万本のスキュッフォールドに繋ぎ合わされ、N50 は 428 kb であった。さらに、ヘテロ接合座位を考慮してハプロタイプ統合を行った結果、最終的に 84,502 本のスキュッフォールドに統合され、N50 は 467 kb を達成した。得られたスキュッフォールドの合計長は 1.4 Gb であり、アセンブリの困難な繰り返し配列を除くゲノムの大部分が十分な深度で反映されていると判断できた。

### b. ハブのトランスクリプトーム解析 (RNA-seq)

奄美大島産ハブから得た毒腺、ピット器官、脳など 18 組織 20 サンプルから RNA を抽出し、Illumina HiSeq で配列決定を行った。その結果、トータルで 17 億リードペア、348 Gb の配列を取得した。全サンプルをプールしたアセンブリを Trinity ソフトウェアを用いて行ったところ、111 万の転写産物を同定し、N50 は 3,069bp であった。これらには、同一の遺伝子に由来する転写産物が複数含まれていると考えられるため、最長の転写産物のみを合計すると 367 Mb であった。これがハブゲノム中のタンパク質コード領域の長さにはほぼ対応すると考えられた。現在、RNA-seq の情報をヒントファイルとして参照しながら、a で得られたハブゲノムドラフト配列からの遺伝子モデルの作成を Augustus ソフトウェアにより進めている。

## 業績目録

### 原著論文

1. Y. Numata, L. Gotoh, A. Iwaki, K. Kurosawa, J. Takanashi, K. Deguchi, T. Yamamoto, H. Osaka, K. Inoue. 2014.

- Epidemiological, clinical, and genetic landscapes of hypomyelinating leukodystrophies.  
 J Neurol. 261(4):752-8.
2. R. Fujioka, T. Nii, A. Iwaki, A. Shibata, I. Ito, K. Kitaichi, M. Nomura, S. Hattori, K. Takao, T. Miyakawa, Y. Fukumaki. 2014.  
 Comprehensive behavioral study of mGluR3 knockout mice: implication in schizophrenia related endophenotypes.  
 Mol Brain, 7:31.
3. K. Yamaguchi, T. Chijiwa, N. Ikeda, H. Shibata, Y. Fukumaki, N. Oda-Ueda, S. Hattori, M. Ohno. 2014.  
 The finding of a group IIE phospholipase A2 gene in a specified segment of *Protobothrops flavoviridis* genome and its possible evolutionary relationship to group IIA phospholipase A2 genes.  
 Toxins 6(12): 3471-3487.

## 学会発表

1. 柴田弘紀, 山本真由美, タケット奈々, 小川智久, 森一樹, 千々岩崇仁, 服部正策, 上田直子, 久原哲, 大野素徳, 服巻保幸 (2014, 05/24-25).  
 ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) の全ゲノム配列決定の現状と展望  
 日本動物学会九州支部 (第67回), 九州沖縄植物学会 (第64回), 日本生態学会九州地区会 (第59回), 沖縄生物学会 (第51回) 合同沖縄大会, 那覇.
2. C. Iwaya, H. Kitajima, K. Yamamoto (2014, 06/10-13).  
 Identification of aging-related epigenetic biomarkers.  
 International Foundation on Aging 12th Global Conference on Ageing, Hyderabad, India.
3. K. Sano, S. Miura, T. Fujiwara, K. Yamamoto, A. Yorita, K. Noda, H. Kida, K. Azuma, S. Kaieda, T. Taniwaki, Y. Fukumaki, H. Shibata (2014, 10/18-22).  
 A novel missense mutation of ryanodine receptor 1 (*RYR1*) in a Japanese idiopathic hyper CK-emia family.  
 64th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, San Diego, CA, USA.
4. C. Iwaya, H. Kitajima, H. Shibata, N. Sonoda, T. Inoguchi, K. Yamamoto (2014, 11/07-08).  
 The study of tissue specific age-related DNA methylation change in mouse.  
 The 24th Hot Spring Harbor International Symposium, Recent Advances in Immunology and Inflammation, Fukuoka, Japan.
5. 財津将平, 柴田弘紀, 仁田坂英二 (2014, 11/08-09)  
 ヘビ類におけるアルビノ変異の原因遺伝子の解析  
 日本爬虫両棲類学会第53回大会, 神戸.
6. A. Isomoto, H. Kitajima, S. Ichihara, M. Nakatochi, T. Matsubara, M. Yokota, R. Takayanagi, K.

Yamamoto (2014, 11/25-27).

Smoking causes epigenetic change in humans.

第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.

7. 岩谷千寿, 北島秀俊, 山本健 (2014, 11/25-27)  
マウスにおける加齢に伴う組織特異的な DNA メチル化変化の研究  
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
8. 財津将平, 柴田弘紀, 仁田坂英二 (2014, 11/25-27)  
へビ類におけるアルビノ変異の原因遺伝子の解析  
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
9. 山口 和晃, 千々岩 崇仁, 池田 直樹, 柴田 弘紀, 上田 直子, 服巻 保幸, 服部 正策, 大野  
素徳 (2014, 11/25-27)  
クサリヘビ科へビの分泌型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> 遺伝子クラスターの起源と分子進化  
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
10. 山田浩平, 三浦史郎, 藤岡竜太, 佐野謙, 山本健, 谷脇考恭, 柴田弘紀 (2014, 11/25-27)  
連鎖・エクソーム解析による常染色体優性ミオクローヌスてんかんの責任遺伝子検索  
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.

## エピゲノミクス分野

### Division of Epigenomics

教授：佐々木 裕之

Professor : Hiroyuki Sasaki, M.D., Ph.D.

当分野はトランスオミクス医学研究センターの設置に伴い、平成 25 年 4 月に開設された。平成 26 年度もエピゲノム制御学分野の主幹教授・佐々木裕之および准教授・一柳健司（7月に助教より昇任）が担当教員として兼任し、研究・教育に臨んだ。

エピゲノミクス分野では疾患における細胞の質的变化をエピゲノムの観点から理解することを目指し、3 台の高速シーケンサーを用いてエピゲノム解析を行っているほか、国際ヒトエピゲノムコンソーシアム (IHEC) の一員としてエピゲノム解読を進め、進化医学の観点からも研究を展開した。また、学内外の研究室との共同研究を積極的に行い、エピゲノム解析を支援した。最終的に、他のオミクス情報と合わせた横断的・統合的な研究を展開し、様々な病気を克服することを目指している。

具体的な研究成果は、エピゲノム制御学分野の A～H を参照。

## 業績目録

### 原著論文

1. Liu, S., Brind'Amour, J., Karimi, M.M., Shirane, K., Bogutz, A., Lefebvre, L., Sasaki, H., Shinkai, Y. & Lorincz, M.C. 2014  
Setdb1 is required for germ line development and silencing of H3K9me3 marked endogenous retroviruses in primordial germ cells.  
**Genes Dev.** 28, 2041-2055
2. Ichianagi, T., Ichianagi, K., Ogawa, A., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Chuma, S., Sasaki, H. & Udonon, H. 2014  
HSP90 $\alpha$  plays an important role in piRNA biogenesis and retrotransposon repression in mouse.  
**Nucl. Acids Res.** 42, 11903-11911

### 総説

1. Ichianagi, K. 2014  
Regulating Pol III transcription to change Pol II transcriptome.  
**Cell Cycle** 13, 3625-3626
2. 白根健次郎, 佐々木裕之. 2014

生殖系列におけるエピゲノムサイクルとその制御

実験医学 32, 847-852, 羊土社, 東京

3. 井上晃太, 一柳健司, 佐々木裕之. 2014

エピジェネティクス研究の歴史と今

生体の科学 65, 529-534

## 著書

1. 鵜木元香, 佐々木裕之. 2014

第5章: 生殖細胞形成と個体発生におけるエピジェネティクス

エピジェネティクスの産業応用 (畑田出穂, 久保田健夫監修), 78-89 シーエムシー出版, 東京

## 学会発表 (口頭発表)

1. 佐々木裕之 (2014.4.25) 招待講演

エピジェネティクスと細胞記憶と疾患

第87回日本内分泌学会学術総会, 福岡

2. Sasaki, H. (2014.5.6) 招待講演

Dynamic changes in DNA methylation and gene expression in spermatogonial stem cell differentiation in neonatal mouse testis

Epigenetics, chromatin & transcription, Cold Spring Harbor Conferences Asia, Suzhou, China

3. Sasaki, H. (2014.6.18-21) 招待講演

DNA methylation and gene expression profiles in mouse germ cell development.

International Society for Stem Cell Research 12th Annual Meeting Vancouver, Canada

4. Sasaki, H. (2014.6.24-26) 招待講演

Dynamic changes in DNA methylation and gene expression in spermatogonial stem cell differentiation in neonatal mouse testis.

2nd Canadian Conference on Epigenetics: Epigenetics, Eh!, Ontario, Canada

5. 一柳健司 (2014.6.29) 招待講演

SINE レトロトランスポゾンの転移を介したエピゲノム進化

国立遺伝学研究所研究会「ゲノム編集時代の分子進化」, 三島

6. Sasaki, H. (2014.6.30) 招待講演

Epigenetics, cell memory, and adult disease.

第123回福岡心臓血管研究会, 福岡

7. Sasaki, H. (2014.8.16) 招待講演

Epigenetics in human health

- 第 10 回中国河北省腫瘍学術大会, 中国河北省唐山
8. Ichiyanagi, K. (2014.8.21-23) 招待講演  
Epigenome evolution in primates  
日本進化学会第 16 回大阪大会シンポジウム, 高槻
  9. 一柳 健司 (2014.8.27) 招待講演  
進化的時間スケールでの霊長類生殖細胞エピゲノムのダイナミクス  
京都大学霊長類研究所研究会「霊長類への展開に向けた幹細胞・生殖細胞・エピゲノム研究」, 犬山
  10. 佐々木裕之 (2014.8.30) 招待講演  
エピジェネティクス -ゲノムインプリンティングを中心に-  
Pfizer Endocrinology Forum 2014, 東京
  11. 佐々木裕之 (2014.9.6) 招待講演  
細胞機能のエピゲノム制御  
第 5 回 Molecular Cardiovascular Conference II, 神戸
  12. 福田溪、一柳健司、佐々木裕之 (2014.9.16-9.19)  
霊長類の生殖細胞エピゲノムの進化  
日本遺伝学会第 86 回大会長浜大会, 長浜
  13. 大石裕晃、鷗木元香、福田溪、佐渡敬、佐々木裕之(2014.9.17-9.19)  
ZFP57 による単アレル性遺伝子発現の制御機構  
日本遺伝学会第 86 回大会長浜大会, 長浜
  14. 井上晃太、一柳健司、福田溪、下須賀健一、佐々木裕之 (2014.9.17-9.20)  
マウス雄性生殖細胞におけるレトロトランスポソンの制御機構は発生段階によって異なる  
日本遺伝学会第 86 回大会長浜大会, 長浜
  15. 一柳健司 (2014.9.17) 招待講演  
SINE レトロトランスポソンのエピジェネティック制御と機能  
日本遺伝学会第 86 回大会長浜大会ワークショップ「レトロトランスポソンと哺乳類ホストシステムの共存」, 長浜
  16. 佐々木裕之 (2014.9.27) 招待講演  
個体発生のエピゲノム制御: ゲノムインプリンティングをモデルとして  
第 56 回歯科基礎医学会学術大会・シンポジウム「発生・分化・癌化を決める遺伝子スイッチ」, 福岡
  17. Kubo, N., Toh, H., Shirane, K., Shirakawa, T., Kobayashi, H., Sato, T., Sone, H., Sato, Y., Tomizawa, S., Tsurusaki, Y., Shibata, H., Saitsu, H., Suzuki, Y., Matsumoto, N., Suyama, M., Kono, T., Ohbo, K. and Sasaki, H. (2014.10.6-8)

DNA methylation and gene expression dynamics during spermatogonial stem cell differentiation in early postnatal testis.

IHEC Annual Meeting and Science Day 2014, Vancouver, Canada

18. Sasaki, H. (2014.10.18) 招待講演  
Parental imprinting as a response to sex differentiation  
第 87 回日本生化学会大会シンポジウム”The Role of Epigenome in Response to Environmental Cues”, 京都
19. Sasaki, H. (2014.11.4) 招待講演  
Dynamic changes in DNA methylation and gene expression in spermatogonial stem cell generation and differentiation in neonatal mouse testis  
International symposium on Tumor Biology in Kanazawa, Ishikawa
20. 佐々木裕之、有馬隆博、秦健一郎、須山幹太 (2014.11.20-21) 招待講演  
生殖発生にかかわるヒト細胞のエピゲノム解析  
日本人類遺伝学会第 59 回大会, 東京
21. 佐々木裕之 (2014.11.23) 招待講演  
エピジェネティクスと細胞記憶と疾患  
第 61 回日本臨床検査医学会学術集会, 福岡
22. Sasaki, H. (2014.12.3-5) 招待講演  
DNA methylation and gene expression dynamics during spermatogonial stem cell differentiation in the early postnatal mouse testis.  
The 2014 Max Planck Freiburg Epigenetics Meeting, MPI of Immunobiology and Epigenetics, Freiburg, Germany
23. 佐々木裕之(2015.2.6-7) 招待講演  
エピジェネティクスと細胞記憶と疾患  
第 17 回癌治療増感研究シンポジウム「がんの多様性の基礎と臨床」, 奈良
24. 井上晃太 (2015.2.25-27) 招待講演  
マウス生殖細胞において piRNA と DNA メチル化の役割は発生ステージごとに異なる  
国立遺伝学研究所研究集会「転移因子と宿主の相互作用による生命進化」, 三島
25. Ichiyanagi, K (2015.3.16-17) 招待講演  
Evolution of primate epigenomes and its association with regulatory elements, transposable elements, and nuclear architecture  
First Symposium of Progress 100: Kyushu-U and Stanford-U Joint Research and Education Program "From Genes to Human Diseases", Fukuoka
26. Ichiyanagi, K (2015.3.27) 招待講演  
Epigenetic regulation of mouse retrotransposons during male germ cell development

2nd International Seminar on Retroelement, Mobile Genetic Elements, and Genome Evolution,  
Kumamoto

27. Fukuda, K. (2015.3.27) 招待講演

Impact of retrotransposons on evolution of the germ-line epigenome in primates

2nd International Seminar on Retroelement, Mobile Genetic Elements, and Genome Evolution,  
Kumamoto

## プロテオミクス分野

### Division of Proteomics

教授：中山 敬一

Professor : Keiichi Nakayama, M.D., Ph.D.

プロテオミクス分野では、タンパク質の総体であるプロテオームを解析するための技術開発とその応用を目指すと共に、多くの研究者に対して最先端技術の提供を行っている。基本技術としては精密質量分析によるショットガン・プロテオミクス、ターゲット・プロテオミクス、ペプチドマスフィンガープリンティング等を用い、さらに ICAT, iTRAQ, SILAC, mTRAQ 等の安定同位体標識を用いた定量情報付加による高度のプロテオミクス技術を擁している。さらに従来個別解析であった MRM 技術を改変して大規模データ取得を目指す次世代プロテオミクス技術の開発を行っている。現在、15 台の質量分析計を有し、幅広いプロテオミクス技術への要請に対応が可能となっている。

プロテオミクス分野は、中山敬一が兼任として教授を務めている。さらに分野専任として松本雅記准教授とテクニカルスタッフ 1 名（崎山明恵）に加え、技術室所属の技官 1 名（木庭絵美子）とテクニカルスタッフ 1 名（小田瑞穂）、および研究所所属のテクニカルスタッフ 1 名（高見知代）で実際の研究開発及びサービス業務を進めている（2015 年 3 月 31 日現在）。

#### A. DDX24 によるリボソーム RNA 前駆体のプロセッシング制御機構の発見

MDM2 はがん抑制タンパク質である p53 をユビキチン化することでプロテアソーム依存的な分解へと導くことが知られているが、幾つかの p53 非依存的な制御機構にも関与することが遺伝学的な知見から示唆されている。われわれは、MDM2 結合タンパク質として、DEAD ボックス型 RNA ヘリカーゼである核小体タンパク質 DDX24 を同定した。DDX24 は MDM2 の中央領域（酸性ドメイン）に結合し、MDM2 によるポリユビキチン化修飾を受けることが示された。しかし、予想外なことに、このポリユビキチン化修飾は通常のプロテアソーム依存的な分解のシグナルではなく、リボソーム RNA 前駆体のプロセッシングに必須の役割を果たす pre-rRNP (preribosomal ribonucleoprotein) 複合体との結合を促進することが分かった。これらの知見と一致するデータとして、DDX24 をノックダウンした細胞ではリボソーム RNA 前駆体のプロセッシングが障害され、MDM2 の活性低下とそれに続く p53 の安定化がもたらされた。以上の解析結果から、MDM2 は DDX24 の非分解性ポリユビキチン化を促進することで、DDX24 と pre-rRNP 複合体との結合を安定化し、リボソーム RNA 前駆体のプロセッシングを制御することが明らかとなった。

## B. Fbx13によるサーカディアンリズム制御機構の分子論的解明

SCF (Skp1-Cul1-F-box タンパク質) 複合体は不変因子の Cul1, Skp1, Rbx1 と可変因子の F-box タンパク質から構成されるユビキチンリガーゼのサブファミリーの1つであり, その活性制御の1つに複合体形成が挙げられる. F-box タンパク質の1つである Fbx13 は Cryptochromes (Crys) を基質として認識し分解することが知られている. Fbx13 の F-box ドメインを解析したところ, Fbx13 の F-box ドメインは保存度が低く Skp1 や Cul1 との結合に必要なアミノ酸のいくつかが保存されていないことがわかった. 実際, HeLa 細胞での免疫沈降実験において Fbx13 は SCF 複合体を形成しなかった. しかし驚くべきことに, Cry1 を過剰発現させた細胞においては Fbx13 の SCF 複合体形成が確認できた. Fbx13 の C 末端に変異を入れ Cry1 との結合を阻害した Fbx13 は SCF 複合体形成ができなかったことから, Fbx13 と Cry1 との結合が SCF 複合体に重要であることが推測される. 一方, 基質結合ドメインを完全欠損させた変異体や Fbx13 の F-box ドメインに Skp2 の基質結合ドメインを付加させた変異体は Skp1 と結合できたことから, Fbx13 の C 末端が SCF 形成阻害効果をもつことが示唆された. 他の F-box タンパク質においては, 基質の結合は SCF 複合体形成には影響しなかった. 本研究の結果は, ユビキチンリガーゼの活性制御およびサーカディアンリズム制御の2つの面に重要な示唆を与えるものである.

## 業績目録

### 原著論文

1. Hashimoto, Y., Shirane, M., Matsuzaki, F., Saita, S., Ohnishi, T., Nakayama, K. I. 2014.  
Protrudin regulates endoplasmic reticulum morphology and function associated with the pathogenesis of hereditary spastic paraplegia.  
J. Biol. Chem., 289, 12946-12961.
2. Hashiguchi, T., Oyamada, A., Sakuraba, K., Shimoda, K., Nakayama, K. I., Iwamoto, Y., Yoshikai, Y., Yamada, H. 2014.  
Tyk2-dependent bystander activation of conventional and nonconventional Th1 cell subsets contributes to innate host defense against *Listeria monocytogenes* infection.  
J. Immunol., 192, 4739-4747.
3. Matsumoto, A., Takeishi, S., Nakayama, K. I. 2014.  
p57 regulates T-cell development and prevents lymphomagenesis by balancing p53 activity and pre-TCR signaling.  
Blood, 123, 3429-3439.

4. Moroishi, T., Yamauchi, T., Nishiyama, M., Nakayama, K. I. 2014.  
HERC2 targets the iron regulator FBXL5 for degradation and modulates iron metabolism.  
*J. Biol. Chem.*, 289, 16430-16441.
5. Kanatsu-Shinohara, M., Onoyama, I., Nakayama, K. I., Shinohara, T. 2014.  
Skp1-Cullin-F-box (SCF)-type ubiquitin ligase FBXW7 negatively regulates spermatogonial stem cell self-renewal.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 111, 8826-8831.
6. Kitagawa, K., Shibata, K., Matsumoto, A., Matsumoto, M., Ohhata, T., Nakayama, K. I., Niida, H., Kitagawa, M. 2014.  
Fbw7 targets GATA3 through cyclin-dependent kinase 2-dependent proteolysis and contributes to regulation of T-cell development.  
*Mol. Cell. Biol.*, 34, 2732-2744.
7. Yugi, K., Kubota, H., Toyoshima, Y., Noguchi, R., Kawata, K., Komori, Y., Uda, S., Kunida, K., Tomizawa, Y., Funato, Y., Miki, H., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Kashikura, K., Endo, K., Ikeda, K., Soga, T., Kuroda, S. 2014.  
Reconstruction of insulin signal flow from phosphoproteome and metabolome data.  
*Cell Rep.*, 8, 1171-1183.
8. Yamauchi, T., Nishiyama, M., Moroishi, T., Yumimoto, K., Nakayama, K. I. 2014.  
MDM2 mediates nonproteolytic polyubiquitylation of the DEAD-Box RNA helicase DDX24.  
*Mol. Cell. Biol.*, 34, 3321-3340.
9. Saita, S., Shirane, M., Ishitani, T., Shimizu, N., Nakayama, K. I. 2014.  
Role of the ANKMY2-FKBP38 Axis in Regulation of the Sonic Hedgehog (Shh) Signaling Pathway.  
*J. Biol. Chem.*, 289, 25639-25654.
10. Adachi, S., Homoto, M., Tanaka, R., Hioki, Y., Murakami, H., Suga, H., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Hatta, T., Iemura, S., Natsume, T. 2014.  
ZFP36L1 and ZFP36L2 control LDLR mRNA stability via the ERK-RSK pathway.  
*Nucleic Acids Res.*, 42, 10037-10049.
11. Lu, W., Liu, S., Li, B., Xie, Y., Adhiambo, C., Yang, Q., Ballard, B. R., Nakayama, K. I., Matusik, R. J., Chen, Z. 2015.  
SKP2 inactivation suppresses prostate tumorigenesis by mediating JARID1B ubiquitination.  
*Oncotarget*, 6, 771-788.
12. Yumimoto, K., Akiyoshi, S., Ueo, H., Sagara, Y., Onoyama, I., Ueo, H., Ohno, S., Mori, M., Mimori, K., Nakayama, K. I. 2015.  
F-box protein FBXW7 inhibits cancer metastasis in a non-cell-autonomous manner.  
*J. Clin. Invest.*, 125, 621-635.

13. Nakajima, T., Kitagawa, K., Ohhata, T., Sakai, S., Uchida, C., Shibata, K., Minegishi, N., Yumimoto, K., Nakayama, K. I., Masumoto, K., Katou, F., Niida, H., Kitagawa, M. 2015.  
Regulation of GATA binding protein 2 levels via ubiquitin-dependent degradation by Fbw7: involvement of cyclin B-cyclin-dependent kinase 1-mediated phosphorylation of Thr176 in GATA binding protein 2.  
J. Biol. Chem., in press.
14. Furutachi, S., Miya, H., Watanabe, T., Kawai, H., Yamasaki, N., Harada, Y., Imayoshi, I., Nelson, M., Nakayama, K. I., Hirabayashi, Y., Gotoh, Y. 2015.  
Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells.  
Nat. Neurosci., in press.

## 総説

1. Shirane-Kitsuji, M., Nakayama, K. I. 2014.  
Mitochondria: FKBP38 and mitochondrial degradation.  
Int. J. Biochem. Cell Biol., 51, 19-22.
2. Takeishi, S., Nakayama, K. I. 2014.  
Role of Fbxw7 in the maintenance of normal stem cells and cancer-initiating cells.  
Br. J. Cancer, 111, 1054-1059.
3. Yumimoto, K., Nakayama, K. I. 2015.  
Fbxw7 suppresses cancer metastasis by inhibiting niche formation.  
OncoImmunology,
4. 松崎英美子, 松本雅記, 中山敬一. 2014.  
がん代謝.  
がん分子標的治療, 12, 59-64.

## 学会発表

1. 中山敬一. (2014, 5/27).  
次世代プロテオミクスと数理科学の融合が解き明かすがんの秘密. (招待講演)  
生命科学系 3 分野がん・ゲノム・脳支援活動合同シンポジウム, 東京.
2. Nakayama, K. I. (2014, 5/31).  
FBXL12 targets ALDHs for degradation in trophoblast stem cells to induce differentiation.  
(Symposium)  
The 12th Stem Cell Research Symposium, Fukuoka.

3. Takeishi, S., Matsumoto, A., Nakayama, K. I. (2014, 5/31).  
Disruption of quiescence by p57 ablation confers oncogene addiction on leukemia stem cells through altered microenvironmental regulation. (Symposium)  
The 12th Stem Cell Research Symposium, Fukuoka.
4. 松本雅記, 中津海洋一, 中山敬一. (2014, 6/25).  
リン酸化定量プロテオミクスによるシグナル伝達研究. (ワークショップ)  
第14回日本蛋白質科学会年会, 横浜.
5. 中山敬一. (2014, 6/25).  
全タンパク質の絶対定量によるがん代謝シフトの解明. (ワークショップ)  
第14回日本蛋白質科学会年会, 横浜.
6. 中山敬一. (2014, 7/8).  
次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新天地: 90年来のがんの秘密を解き明かす. (招待講演)  
第7回KAITEKI Forum, 東京.
7. 中山敬一. (2014, 7/26).  
医学研究に貢献する最先端分析技術. (招待講演)  
九州プロサーチオープニングセミナー, 福岡.
8. 中山敬一. (2014, 7/27).  
がんの完治に向けた次世代型アプローチ. (招待講演)  
第50回姫路市医師会夏期大学, 姫路.
9. 中山敬一. (2014, 8/21).  
次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新天地: 90年来のがんの謎を解く. (特別講演)  
第8回レドックス・ライフイノベーション第170委員会, 宮崎.
10. 中山敬一. (2014, 9/6).  
ユビキチンリガーゼFBXL5による鉄代謝制御とその破綻. (シンポジウム)  
第38回鉄バイオサイエンス学会学術集会, 仙台.
11. 中山敬一. (2014, 9/25).  
次世代プロテオミクスと数理科学の融合が解き明かすがんの秘密. (ランチョンセミナー)  
第73回日本癌学会学術総会, 横浜.
12. 中山敬一. (2014, 9/26).  
癌幹細胞の理解と制御: 癌を完治させる治療戦略. (モーニングレクチャー)  
第73回日本癌学会学術総会, 横浜.
13. 中山敬一. (2014, 11/4).  
次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新天地: 90年来のがんの謎を解く. (特別講演)  
第23回長崎障害者支援再生医療研究会, 長崎.

14. Nishiyama, M., Nita, A., Yumimoto, K., Nakayama, K. I. (2014, 11/7).  
FBXL12-mediated degradation of ALSH3 is essential for the exit program from the stem cell state.  
The 24rd Hot Spring Harbor Symposium: Recent Advances in Immunology and Inflammation 2014,  
Fukuoka.
15. Muto, Y., Nishiyama, M., Moroishi, T., Nakayama, K. I. (2014, 11/7).  
Role of the ubiquitin ligase FBXL5 controlling iron metabolism in hematopoietic stem cells.  
The 24rd Hot Spring Harbor Symposium: Recent Advances in Immunology and Inflammation 2014,  
Fukuoka.
16. Takeishi, S., Matsumoto, A., Nakayama, K. I. (2014, 11/7).  
Disruption of quiescence by p57 ablation confers oncogene addiction to leukemic stem cells through  
altered niche regulation. (Invited Speaker)  
The 24rd Hot Spring Harbor Symposium: Recent Advances in Immunology and Inflammation 2014,  
Fukuoka.
17. Nakatsumi, H., Matsumoto, M., Nakayama, K. I. (2014, 11/8).  
Nutrition signal induces inflammation via the mTOR-FOXK1-CCL2 pathway. (Invited Speaker)  
The 24rd Hot Spring Harbor Symposium: Recent Advances in Immunology and Inflammation 2014,  
Fukuoka.
18. 中山敬一. (2014, 11/9).  
がんにおける二つの謎：がん幹細胞とワールブルグ効果. (特別講演)  
第 134 回山口県医師会生涯研修セミナー, 山口.
19. Nakayama, K. I. (2014, 11/19).  
Deep and absolute quantification of human proteome unveils a global landscape of cancer metabolism.  
(Invited Speaker)  
The 4th Japan-France Cancer Workshop, Kyoto.
20. 中山敬一. (2014, 11/23).  
次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新天地：90 年来のがんの謎を解く. (教育講演)  
第 61 回日本臨床検査医学会学術集会, 福岡.
21. 武藤義治, 西山正章, 諸石寿朗, 中山敬一. (2014, 12/12).  
造血幹細胞の機能維持におけるユビキチンリガーゼ FBXL5 による鉄代謝制御の重要性.  
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
22. 片山雄太, 西山正章, 中山敬一. (2014, 12/12).  
CHD8L アイソフォームの発生と分化における機能の解析.  
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
23. 山内隆好, 西山正章, 諸石寿朗, 武藤義治, 中山敬一. (2014, 12/12).  
FBXL5-IRP2 軸による鉄代謝調節は神経幹細胞の恒常性維持に必須である.

- 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
24. 白根道子, 中山敬一. (2014, 12/12).  
ドーパミン制御による BDNF-TrkB シグナル調節機構. (ワークショップ)  
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
25. 松本結香, 中津海洋一, 松本雅記, 中山敬一. (2014, 12/12).  
mTORC1 依存的に脱リン酸化する転写因子 FOXK2 の解析. (ワークショップ)  
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
26. 渡辺紘己, 弓本佳苗, 中山敬一. (2014, 12/12).  
軟骨分化における Fbxw7 遺伝子の機能解析.  
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
27. 嘉山皓太, 渡邊心也, 松本雅記, 中山敬一, 吉田和真, 杉本のぞみ, 藤田雅俊. (2014, 12/12).  
GRWD1 による核小体ストレス応答 RP-MDM2-p53 経路の制御.  
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
28. 原瑞季, 浅原俊一郎, 伊原佑香, 井上裕行, 照山杏子, 松田友和, 木村(小柳)真希, 中山敬一,  
木戸良明. (2014, 12/12).  
膵  $\beta$  細胞における細胞周期調節蛋白 p57 の機能解析.  
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
29. 中津海洋一, 松本雅記, 中山敬一. (2014, 12/12).  
リン酸化プロテオミクス解析から明らかになった新規 mTORC1-FOXK1-CCL2 経路と腫瘍関  
連炎症との関連. (ワークショップ)  
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
30. 喜多泰之, 西山正章, 片山雄太, 中山敬一. (2014, 12/12).  
CHD8 は Ppar  $\gamma$  と C/ebp  $\alpha$  の転写活性化を介して脂肪分化を誘導する.  
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
31. 西山正章, 仁田暁大, 弓本佳苗, 中山敬一. (2014, 12/12).  
FBXL12 による ALDH3 の分解は幹細胞状態からの脱出プログラムに必須である.  
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
32. 武石昭一郎, 松本有樹修, 仲一仁, 平尾敦, 中山敬一. (2014, 12/12).  
p57 を欠損させた白血病幹細胞はニッチ制御の変化によりがん遺伝子依存性となる. (ワーク  
ショップ)  
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
33. 渡邊心也, 杉本のぞみ, 嘉山皓太, 松本雅記, 中山敬一, 吉田和真, 藤田雅俊. (2014, 12/12).  
GRWD1 は核小体ストレス誘導因子 RPL23 タンパク質量を制御している.  
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
34. 坂安優未, 住友明子, 間内清香, 津矢田(弘田)有紀, 疋田貴俊, 櫻井武, 中山敬一, 澤明, 友田

- 利文. (2014, 12/12).  
FEZ1 によるオートファージ制御および精神疾患様症状の抑制.  
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
35. 弓本佳苗, 秋吉清百合, 上尾裕紀, 小野山一郎, 上尾裕昭, 森正樹, 三森功士, 中山敬一. (2014, 12/12).  
癌周囲の微小環境における Fbxw7 の発現量が癌転移能を規定する. (ワークショップ)  
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
36. 井上一平, 弓本佳苗, 中山敬一. (2014, 12/12).  
ユビキチンリガーゼ Fbxw7 は KLF7 の分解を介して感覚神経の分化を制御する.  
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
37. Okada, M., Kitamura, A., Mori, S., Nada, S., Nakatsumi, H., I.Nakamura, K. (2014, 12/12).  
Function and molecular architecture of the lysosomal mTORC1 anchor: Regulator.  
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
38. Matsuzaki, F., Matsumoto, M., Oshikawa, K., Nakayama-I, K. (2014, 12/12).  
Absolute quantification of all human metabolic enzymes and metabolic systems analysis. (ワークショップ)  
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
39. 中山敬一. (2015, 1/13).  
次世代プロテオミクスを用いたがん特性の解明. (招待講演)  
第 45 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「がんの多様性に応じた研究・治療 ― 創薬のパラダイムシフト ―, 東京.
40. 中山敬一. (2015, 2/13).  
次世代プロテオミクスが拓く生命科学研究の新地平: 90 年来のがんの謎を解く. (特別講演)  
第 13 回群馬大学大学院医学系研究科・大学院生によるワークショップ「未来を切り拓く医学研究」, 前橋.
41. 中山敬一. (2015, 2/21).  
がんにおける二つの謎: がん幹細胞とワールブルグ効果. (招請講演)  
第 3 回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会, 福岡.
42. 中山敬一. (2015, 2/28).  
がん幹細胞の撲滅による新しいがん治療法. (特別講演)  
第 12 回日本免疫治療学研究会学術集会, 東京.

## 統合オミクス分野

### Division of Integrated Omics

教授：久保田 浩行

Professor : Hiroyuki Kubota, Ph.D.

統合オミクス分野ではゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム・メタボロームなどのいわゆる「オームデータ」を統合するための手法開発を行うと同時に、細胞または個体の応答をまるごと理解することを目的としている。解析手法としてはデータベースなどを用いた情報学的手法や統計的手法の開発に、実験条件についても同一サンプルからのオミクス測定ができる調整法の開発に取り組んでいる。現在、多階層にまたがるネットワークを介して主に代謝を制御している個体のインスリン作用に注目して研究を行っている。また、多階層にまたがるネットワークの動的特性を解析するための微分方程式モデルなどを用いた分子のダイナミクスの解析も行っている。

統合オミクス分野は 26 年 4 月に開設され、担当教員として、久保田浩行および、准教授として宇田新介、助教として松崎芙美子が着任した。

#### A. インスリン作用を対象としたトランスオミクス解析

生命現象は DNA・RNA・タンパク質・代謝物などの各階層にまたがる膨大な数の分子の相互作用、すなわちネットワークによって制御されている。つまり、生命現象を理解するには多階層にまたがる複雑なネットワークを同定する必要がある。従来の生物学では、研究者の興味ある数個の分子が注目され研究が行われてきた。これまでの研究により多くの生命現象の理解が進んできたが、これらの研究結果から生命現象全体を俯瞰しようとしても、実験条件が異なるために難しい。その一方で、近年の網羅的測定技術の進歩により DNA・RNA・タンパク質・代謝物などの各階層にける網羅的データ、いわゆる「オームデータ」が高精度かつ高スループットに取得できるようになってきた。これらの技術により、各階層における全体像を俯瞰することができるようになってきたが、単階層のデータから多階層にまたがるネットワークを明らかにすることはできない。

多階層にまたがるネットワークを構築する手法の一つとして、各オームデータを同一実験条件で取得し、統合するアプローチが考えられるが、現在までのところそのような一般的手法は存在しない。なぜなら、一言で「オームデータの統合」と言っても、これには生物の知識のみならずシステム生物学のようなコンピュータサイエンスや、統計学の知識も不可欠だからである。そこで統合オミクス分野では、生物学やシステム生物学、統計学の知識を融合し、オームデータの統合、つまりトランスオミクス解析手法の開発を行い、生命現象を俯瞰することで生物の生存戦略の理解を目的としている。具体的に

は、多階層にまたがるネットワークを介して主に代謝物量を制御しているインスリン作用に注目し、トランスオミクス解析のための解析手法や実験条件の検討、そしてインスリン作用の全体像を明らかにすることを目的としている。

#### a. リン酸化プロテオームとメタボロームデータの統合

われわれは、遺伝子発現が関与せずリン酸化を介したシグナル伝達が中心となって代謝物量を制御していると考えられる1時間以内のインスリン作用に注目した。そして、肝がん由来のFao細胞を用いて同一実験条件下でインスリン刺激を行い、リン酸化プロテオーム（九州大学・生医研・プロテオミクス分野，中山・松本先生との共同研究）とメタボローム（慶応大学，曾我先生との共同研究）の測定を行った。次に，データベースや予測ツールのソフトウェアを用いることで，以下に説明する手法を開発し（特許取得済み），リン酸化プロテオームとメタボロームのデータの統合を行った。

##### (i) 変動代謝物の同定

メタボロームデータから濃度が有意に変動した代謝物をインスリン刺激の標的代謝物として，44個同定した。

##### (ii) 責任代謝酵素の同定

代謝物の量は「生成」と「消費」のバランスによって制御されている。つまり，代謝物の変動するためには，「生成」と「消費」のバランスが変化が必要がある。「生成」と「消費」は，それぞれ代謝物の前後に位置する代謝酵素によって制御されている。つまり(i)で変動した代謝物量においても，これらの代謝物の前後に位置する代謝酵素の活性が変わり，「生成」と「消費」のバランスが変化するために代謝物量の変動したと考えられる。そこで，有意に濃度に変動した代謝物の前後に位置する代謝酵素を変動した代謝物の原因の候補と考え，これらの代謝酵素を「責任代謝酵素」としてKEGGデータベースを用いて探索し，198個同定した。

##### (iii) リン酸化された責任代謝酵素の同定

代謝酵素の活性は，①代謝酵素量の変化，②リン酸化（など）による活性の変化，③アロステリック作用による活性の変化，の3つによって制御されていると考えられる。先にも述べたように，「代謝酵素量の変化」は無視できると考えられるので，「②リン酸化による活性の変化」について考えた。そこで，リン酸化プロテオームのデータからインスリン刺激により変動するリン酸化を含む代謝酵素を探索し，26個同定した。

##### (iv) リン酸化された責任代謝酵素とインスリンを繋ぐ

次に，これらのリン酸化された責任代謝酵素をインスリン刺激まで繋ぐために，リン酸化された責任酵素をリン酸化する「責任キナーゼ」を，NetPhorestを用いて

推定した。NetPhorest は、リン酸化されたアミノ酸の前後配列からこのアミノ酸をリン酸化した酵素を確率的に求める Web ベースのソフトウェアである。推定された「責任キナーゼ」は、KEGG データベースを用いてインスリンレセプターまで繋いだ。

#### (v) アロステリック制御の同定

上記で述べた通り、代謝酵素は代謝物からのアロステリック制御によっても活性が調節されている。そこで、責任代謝酵素に作用するアロステリック分子を、BRENDA データベースを用いることで同定した。変動代謝物 44 個の中からアロステリック作用を抽出し、35 個の変動代謝物がアロステリック分子として同定された (35 個のアロステリック分子が複数の責任代謝酵素に作用し、合計 226 個のアロステリック作用が同定された)。

上記の結果、3 つのデータベースや予測ツールであるソフトウェアを用いることで、リン酸化プロテオームとメタボロームのデータを統合し、2 つの階層にまたがるネットワークが同定された。

得られた多階層ネットワークの解析の結果、インスリンは S6K を介した PFKL のリン酸化や、AKT を介した ACLY のリン酸化を介してインスリンによるアナボリックな代謝を制御している可能性が示唆された。また、本研究により世界に先駆けてリン酸化プロテオームとメタボロームデータの統合手法が開発され、今後の他の階層も含めたトランスオミクス解析に繋がると期待される。

### b. 代謝酵素の制御に重要な分子の推定

得られた多階層ネットワークには、実際には機能していないネットワークが存在している可能性がある。この原因として、用いたデータベースが様々な条件下で行われた実験結果に基づいていることが挙げられる。そこで、実際に代謝酵素の制御に作用していると考えられる分子を、微分方程式モデルを用いることで推定する手法を開発した。これは、内部状態を再現できる数理モデルを作成することで、測定されたデータから測定されなかった分子の挙動やパラメータなどを推定する、工学分野の「ソフトセンサー」という考えに基づいている。この手法により、代謝酵素の制御に重要な分子を推定することに成功した。この手法は、トランスオミクス解析のみならず、様々な生命現象にも応用できることが期待される。

### c. トランスオミクス解析のためのサンプル調整法の検討

培養細胞のように、単一でほぼ均一な条件を仮定できれば問題ないが、臓器やガンなどを含んだ生体組織からのトランスオミクス解析には注意すべき点が少なくとも 2 つある。一つ目は臓器や組織に依存した細胞集団の不均一性である。トランスオミクス解析

のために複数のオーム階層を測定する場合には、それぞれのオミクス測定を行うためのサンプルが（ほぼ）同一である必要がある。例えば、同一のガン検体から異なる複数のオミクス測定のためのサンプル調製を行う場合、健常組織とガン組織の含有率を同一にしてそれぞれのオミクス測定のためのサンプル調整を行うことは簡単ではない。さらに、ガンなどの細胞の含有率の異なるサンプルから異なるオミクス測定を行い、データ解析を行ったとしても、比較・統合することは非常に難しい。二つ目は同一サンプルから複数のオミクス測定を行うための前処理の問題である。当然ながら、測定するオーム階層によってサンプルの調整法が全く異なる。上記の二つの問題から、臓器や組織などからトランスオミクス解析に必要な複数のオミクス測定を行うためには、サンプルを均一化し、複数のオミクス測定ができる調整法を開発する必要がある。そこでわれわれは、生体組織を低温で破碎・均一化し分配することで、同一サンプルから異なるオミクス測定を行える手法を開発した。実際に、この手法により同一の肝臓と筋肉からトランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームの測定を精度よく行えることを確認している。この手法により、今後、様々なサンプルからトランスオミクス解析が可能になると考えられる。

#### **d. 統計的手法を用いた統合技術の開発**

上記のデータベースを用いた知識は非常に有用であるが、データベースの知見は偏った場合が多い。また、データベースに収録されている情報が間違っている場合もあれば、収録されていない未知の相互作用が存在する場合もある。つまり、データベースを用いた統合技術ではどうしても限界がある。そこでわれわれは、統計的手法を用いたデータ駆動型のトランスオミクス解析の技術開発も行っている。得られたデータのみからオームデータを統合できるのが理想であるが、そのハードルは非常に高い。そこで、データベースの知識もある程度利用しつつ、統計的手法により多階層ネットワークを推定する手法の開発を行っている。

## **B. 血中インスリンパターンの意義の解明**

血中インスリンは食後に分泌される「追加分泌」や、平時から微量に放出されている「基礎分泌」そして、10分程度の周期的分泌からなっていることが知られている。これらの分泌パターンはインスリン作用、そして糖尿病と深く関係があることが知られているが、そのメカニズムは不明のままである。そこでわれわれは、これらのインスリンの分泌パターンにより代謝を中心とした分子がどのように制御されているのかを、微分方程式モデルを用いて明らかにすることを目的としている。将来的には、トランスオミクス解析で推定される重要なネットワークを抜き出し、その動的特性の解析も行っていく予定である。

## 業績目録

### 原著論文

1. Yugi, K\*, Kubota, H\*, Toyoshima, Y., Noguchi, R., Kawata, K., Komori, Y., Uda, S., Kunida, K., Tomizawa, Y., Funato, Y., Miki, H., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Kashikura, K., Endo, K., Ikeda, K., Soga, T. and Kuroda, S. 2014. \*Co-first author  
Reconstruction of insulin signal flow from phosphoproteome and metabolome data.  
Cell Rep., 8(4), 1171-1183

### 総説

1. 松崎英美子, 松本雅記, 中山敬一.  
がん代謝, がん分子標的治療 (2014, 06).

### 著書

1. Hiroyuki Kubota and Shinya Kuroda. 2015  
Temporal Coding of Insulin Signaling.  
Protein modification in pathogenic dysregulation of signaling, Springer, in press

### 学会発表 (口頭発表のみ)

1. Hiroyuki Kubota and Shinya Kuroda. (2014, 6/26).  
Temporal Coding of Insulin Action through Multiplexing of the AKT Pathway.  
14<sup>th</sup> Annual meeting of the Protein Science Society of Japan, Yokohama. (招聘講演)
2. 久保田浩行, 柚木克之, 黒田真也. (2014, 7/17).  
インスリン作用のトランスオミクス解析.  
第12回日本プロテオーム学会 2014 年会, 筑波. (招聘講演)
3. Hiroyuki Kubota, Yugi Katsuyuki and Shinya Kuroda. (2015, 1/24).  
Reconstruction of Insulin Signal Flow from Phosphoproteome and Metabolome Data.  
2<sup>nd</sup> International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling. (招聘講演)
4. 松崎英美子, 松本雅記, 押川清孝, 中山敬一. (2014, 7/26)  
ヒト全代謝酵素の絶対定量とグローバル代謝の数理解析.  
第2回数理解デザイン道場, 伊豆
5. Shinsuke Uda and Shinya Kuroda (2014, 7/30)  
Robustness and compensation of information transmission of signaling pathways despite perturbation.  
The Joint Annual Meeting of the Japanese Society for Mathematical Biology and the Society for

- Mathematical Biology. (招聘講演)
6. Fumiko Matsuzaki. (2014, 9/16)  
Absolute quantification of all metabolic enzymes by information-based proteomics and computational analysis for cancer metabolism.  
Kyushu University, Fukuoka, Japan (招聘講演)
  7. 松崎芙美子, 松本雅記, 押川清孝, 中山敬一. (2014, 10/15)  
ヒト全代謝酵素の絶対定量によるがん代謝ネットワークの統合解析.  
第 87 回生化学会大会, 京都 (招聘講演)
  8. 松本雅記, 押川清孝, 松崎芙美子, 五島 直樹, 夏目 徹, 中山敬一. (2014, 10/17)  
次世代ターゲットプロテオミクスによるヒト全代謝経路の絶対定量マッピング.  
第 87 回生化学会大会, 京都 (招聘講演)
  9. 宇田新介 (2014, 11/17)  
tanh 関数を正則化項に用いた圧縮センシングの信号復元法.  
第 17 回情報論的学習理論ワークショップ(IBIS2014)
  10. Fumiko Matsuzaki, Masaki Matsumoto, Kiyotaka Oshikawa and Keiichi I. Nakayama. (2014, 11/26)  
Absolute quantification of all human metabolic enzymes and metabolic systems analysis.  
The 37th annual meeting of the molecular biology society of Japan, Yokohama, Japan
  11. 宇田新介 (2014, 12/16)  
疎性を用いた多階層ネットワークの同定.  
新学術領域研究「スパースモデリングの深化と高次元データ駆動科学の創成」2014 年度公開シンポジウム
  12. 松崎芙美子, 松本雅記, 押川清孝, 中山敬一. (2015, 1/11-12)  
ヒト全代謝酵素の絶対定量と代謝システム解析.  
定量生物学の会 第七回年会, 福岡
  13. Fumiko Matsuzaki, Masaki Matsumoto, Kiyotaka Oshikawa and Keiichi I. Nakayama. (2015, 3/6)  
Absolute quantification of all human metabolic enzymes and metabolic systems analysis.  
The Third BMIRC International Symposium for Virtual Physiological Human, Iizuka, Japan
  14. Fumiko Matsuzaki, Masaki Matsumoto, Kiyotaka Oshikawa and Keiichi I. Nakayama. (2015, 3/17)  
Absolute quantification of all human metabolic enzymes and metabolic systems analysis.  
First symposium: From genes to human diseases, Fukuoka, Japan (招聘講演)