

未来社会創造事業 探索加速型
「共通基盤」領域
終了報告書(探索研究期間)

令和3年度
研究開発終了報告書

令和元年度採択研究開発代表者

[研究開発代表者名：村田 昌之]

[国立大学法人東京工業大学 科学技術創成研究院・特任教授]

[研究開発課題名：超解像蛍光抗体法による共変動ネットワーク解析法の開発
/ Development of covariation network analysis using super-resolution
immunofluorescence microscopy]

実施期間：令和元年11月1日～令和4年3月31日

§ 1. 研究実施体制

(1)「村田」グループ(東京工業大学)

- ① 研究開発代表者:村田 昌之 (東京工業大学科学技術創成研究院、特任教授)
- ② 研究項目
 - ・病態進行の未病・病態を反映した糖尿病モデル肝細胞サンプルの作成
 - ・高精度 PLOM-CON 解析法を用いた薬剤の作用・副作用を司るマスター蛋白質群の抽出

(2)「佐藤」グループ(東京大学)

- ① 主たる共同研究者:佐藤 守俊 (東京大学大学院総合文化研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・超解像プローブを用いた超解像蛍光抗体法の構築

(3)「加納」グループ(東京工業大学)

- ① 主たる共同研究者:加納 ふみ (東京工業大学科学技術創成研究院、准教授)
- ② 研究項目
 - ・病態進行の未病・病態を反映した糖尿病モデル肝細胞サンプルの作成
 - ・高精度 PLOM-CON 解析法を用いた薬剤の作用・副作用を司るマスター蛋白質群の抽出

§ 2. 研究実施の概要

本研究開発課題では、外部からのホルモンなどの刺激が加わった、細胞内の蛋白質の「量・質・局在」の時間変化の同調性を指標にした共変動ネットワーク解析法「Protein localization and modification-based covariation network (PLOM-CON)解析法」を用い、これまでになかった“細胞状態”を規定する蛋白質ネットワーク作成技術を構築し、そこで得られた分子情報の多角的な検証と利用法を統合した先進的創薬支援技術確立し、前臨床での創薬プロセスの格段の効率化を目指している。探索研究の成果として、以下の3つの項目の開発について報告する。

(1) 病態進行の未病・発症を反映した糖尿病進行モデル肝細胞の作成 :

独自に開発してきた「リシール細胞」技術の利点をフルに活用し、疾患モデル動物の臓器から調製した正常または糖尿病細胞質を様々な混合比で保持した「糖尿病進行モデル肝細胞」系列を作成した。このモデル細胞系列を用いれば、今まで、「時間軸」で研究してきた生活習慣病などの病態進行が十数年かかる遅い発症過程を、「正常と病態の細胞質混合比」で置換することで、様々な病態進行過程の細胞系列を一度に作成し、同条件で同時に細胞状態を解析することができる。

(2) PLOM-CON 解析法を用いた正常・糖尿病態の培養肝細胞の共変動ネットワークの作成 :

PLOM-CON 解析法を用い、インスリン刺激した正常・糖尿病モデル肝臓培養細胞の蛋白質の共変動ネットワークを作成した。その結果、インスリンシグナル経路の中心的分子であるリン酸化 Akt を中心に、グリコーゲン合成、糖新生、蛋白合成に関わる蛋白質群をはじめ、初期エンドソームやアクチン及びその重合制御蛋白質及びそのリン酸化型蛋白質が、インスリン刺激によって強い時間的相関を持って変化

していることがわかった。これら一群の蛋白質をインスリン刺激した肝臓細胞における重要な「バイオマーカー蛋白質」とした。興味深いことに、同条件における糖尿病モデル肝細胞では、正常状態でネットワークの中心でハブ的存在であったリン酸化 Akt の下流に広がるこれらバイオマーカー蛋白質群との結合が切れて、シグナル制御系が攪乱していることが分かった。

(3)肝細胞が糖尿病状態に進行するバイオマーカーの同定：

インスリン刺激を「糖尿病進行モデル肝細胞」系列に加え、一定時間後に細胞を固定し、上記の「バイオマーカー蛋白質群」の細胞内状態の変化を蛍光抗体染色画像をもとに定量的に解析した。その結果、リン酸化 Akt を含むいくつかの蛋白質は、「病態進行の後期」を示す細胞状態を持つ病態進行モデル細胞で（相転移が起こるように）急激に変化する様子がわかった。これは、リン酸化 Akt が未病状態から糖尿病発症状態の「相」に移行することを示す良いバイオマーカーであることを示唆した。市販の糖尿病改善薬をこの病態進行モデル肝細胞系列に加えると、この相転移は観察されないことより、リン酸化 Akt が肝臓細胞における糖尿病発症のバイオマーカーの一つであることが実験的にも検証できた。

<PLOM-CON 解析法参考文献>

Noguchi, Y., Kano, F., Maiya, N., Iwamoto, C., Yamasaki, S., Otsubo, Y., Nakatsu, D., Kunishige, R., Murata, M. (2021) Microscopic image-based covariation network analysis for actin scaffold-modified insulin signaling. *iScience*, 24 (7), Article number: 102724. doi: 10.1016/j.isci.2021.102724.