

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18200021

研究課題名 (和文) ERK 経路のシステム生物学

研究課題名 (英文) Systems biology of ERK signaling networks

研究代表者 黒田 真也 (KURODA SHINYA)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：50273850

研究成果の概要 (和文) : ERK 経路は極めて多彩な生命現象を制御する。このように同じ分子ネットワークを用いて異なる作用を制御する点がシグナル伝達機構の本質的な特徴である。例えば、PC12 細胞では同じ ERK 分子が一過性あるいは持続性に活性化することで、それぞれ細胞の増殖あるいは分化という異なる細胞運命を導く。本研究では、ERK 経路のシステム生物学に関して、ERK 経路による細胞の増殖と分化のスイッチ機構を、実験と数理モデルのどちらも踏まえてシステム生物学手法により解析を行った。まず、PC12 細胞における NGF の刺激パターンによる分化応答の計測を行い、PC12 細胞の神経突起伸張過程は、およそ 12 時間の突起伸張準備期間とその後の突起伸張期間にわけられることを見出した(プライミング現象)。このプライミング現象にかかわるシグナル伝達経路の同定およびプライミング期間中に誘導される遺伝子の同定を行った。突起伸張準備機構は、ERK の活性と転写活性を必要とし、突起伸張機構は、ERK と PI3K の活性を必要とすることを見出した。PC12 細胞の神経細胞への分化は、時間的に分離された、非連続的なプロセスにより誘導されることを初めて明らかにした (Chung, J. *et al*, 2010)。以上から、突起伸張準備機構は、持続的 ERK 活性化のデコーディング機構に該当すると考えられ、関連遺伝子の同定を試みた。その結果、マイクロアレイ実験により、約 50 の遺伝子が同定された。その内約 30 の遺伝子を、siRNA 実験により調べた結果、3 つの遺伝子が突起伸張に重要と思われた。これら遺伝子は持続的 ERK 活性化に特異的に応答し、神経分化の初期過程である、突起伸張準備にかかわると期待される。現在、これらの遺伝子群を応答としたモデル化を行っている。また、遺伝子群の時間波形を取得している過程で手動を自動化することができる可能性が判明したため、ERK による下流の遺伝子群の時間波形計測を自動的に高速に計測する手法を開発に成功した (Ozaki, Y. *et al*, 2010)。この計測手法を用いて ERK とその下流の初期応答遺伝子群産物の時間波形を計測して、自己回帰モデルによる解析して、準備的に時間情報コーディングメカニズムを明らかにしつつある。

研究成果の概要 (英文) : ERK signaling networks can regulate various cellular processes. One of the remarkable features of signaling networks is that the same signaling networks can regulate multiple cellular functions. In PC12 cells, EGF and NGF induces transient and sustained ERK activation, leading to cell proliferation and differentiation, respectively. In this study, we analyzed how ERK signaling networks can regulate cell proliferation and differentiation, depending on the distinct temporal activation patterns by use of systems biology approach. First, we tried to analyze the differentiation processes. We performed a discontinuous stimulation assay consisting of a first transient stimulation followed by an interval and then a second sustained stimulation and quantified the neurite extension level (Chung, J. *et al*, 2010). Consequently, we observed a timing-dependent action of NGF on cell differentiation, and discontinuous NGF stimulation similarly induced differentiation. The first stimulation did not induce neurite extension, whereas the second stimulation induced

fast neurite extension; therefore, the first stimulation is likely required as a prerequisite condition. These observations indicate that the action of NGF can be divided into two processes: an initial stimulation-driven latent process and a second stimulation-driven extension process. The latent process appears to require the activities of ERK and transcription, but not PI3K, whereas the extension-process requires the activities of ERK and PI3K, but not transcription. We screened the possible genes involved in the latent process, and identified 3 genes as a possible candidates. We developed a fully automatable assay technique, termed quantitative image cytometry, which integrates a quantitative immunostaining technique and a high precision image-processing algorithm for cell identification (Ozaki, Y. *et al*, 2010). With the aid of an automated sample preparation system, this device can quantify protein expression, phosphorylation and localization with subcellular resolution at one-minute intervals. We will investigate the signaling dynamics of the ERK pathway in PC12 cells, demonstrating using QIC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18年度	15,700,000	4,710,000	20,410,000
19年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
20年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
年度			
年度			
総計	37,700,000	11,310,000	49,010,000

研究分野： 複合領域

科研費の分科・細目： 情報学・生体生命情報学

キーワード： シグナル伝達、システム生物学

1. 研究開始当初の背景

生命現象の究極的な理解には、それを制御する分子ネットワーク（シグナル伝達）の定量的な理解が必須である。シグナル伝達は多数の分子ネットワークから形成されている。このシグナル伝達のメカニズムを明らかにするためには、文献情報に基づいたボトムアップ的なシミュレーションモデル構築とカギとなる細胞内の分子ダイナミクス計測を密接にフィードバックさせるシステム生物学的アプローチが必須である。このような手法は、特に同じ分子や経路がなぜ異なる作用を遂行できるかという問題に対して非常に強力である。例えば、PC12細胞では同じERK分子が一過性または持続性に活性化されるだけでそれぞれ細胞の増殖や分化といった異なる細胞運命を制御できる。

2. 研究の目的

本研究では、シグナル伝達機構の多彩な機能を解明する目的で、システム生物学的手法を用いて、なぜERK分子が一過性と持続性に活性化されるだけでそれぞれ細胞の増殖と分化といった異なる応答を制御できるかを時

間情報コーディングの視点から解析する。細胞の増殖と分化は、最終的には異なる遺伝子セットが発現することにより制御されている。しかし、細胞分化におけるメカニズムや遺伝子セットについては不明である。本研究では、これらの問題を明らかにする。さらに、システム生物学的手法を用いて時間情報コーディングのメカニズムを明らかにする。時間情報コーディングの解析には、定量性の高いハイスループット解析手法が必須である。本研究では計測手法の開発も行う。

3. 研究の方法

PC12細胞のメカニズムについては、NGF刺激の非連続刺激を用いることにより、潜在的に分離可能なプロセスを明らかにする。また、分離可能なプロセスに分解した後、各シグナル伝達経路や遺伝子発現についてNGF以外の刺激やさまざまな刺激パターンを解析する。また、時系列解析については、定量性の高いハイスループット解析手法の開発を行う。シグナル伝達においてはリン酸化反応が重要であるので、各分子のリン酸化を外乱を加えず定量的に高速に計測できる手法をロボッ

トによる自動化と、画像解析による定量化を組み合わせて行う。

4. 研究成果

PC12細胞におけるNGFの刺激パターンによる分化応答の計測を行い、PC12細胞の神経突起伸張過程は、およそ12時間の突起伸張準備期間とその後の突起伸張期間にわけられることを昨年度見出している(プライミング現象)。本年度は、プライミング現象にかかわるシグナル伝達経路の同定およびプライミング期間中に誘導される遺伝子の同定を行った。突起伸張準備機構は、ERKの活性と転写活性を必要とし、突起伸張機構は、ERKとPI3Kの活性を必要とすることを見出した。PC12細胞の神経細胞への分化は、時間的に分離された、非連続的なプロセスにより誘導されることを初めて明らかにした(Chung, J. et al, 2010)。以上から、突起伸張準備機構は、持続的ERK活性化のデコーディング機構に該当すると考えられ、関連遺伝子の同定を試みた。その結果、マイクロアレイ実験により、約50の遺伝子が同定された。その内約30の遺伝子を、siRNA実験により調べた結果、3つの遺伝子が突起伸張に重要と思われた。これら遺伝子は持続的ERK活性化に特異的に応答し、神経分化の初期過程である、突起伸張準備にかかわると期待される。また、自動化計測技術開発については、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技術を実用化するために、画像解析プログラムの改良および実験プロトコルの最適化を行った。この結果、従来のウェスタンブロット法と同等の定量性と再現性を備え、かつサンプル調製からデータ解析までの操作をほぼ全自動で行う自動実験システムの構築に成功した(Ozaki, Y. et al, 2010)。現在、本計測技術を用いてERKの下流の遺伝子群の応答のモデル化を試みている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Ozaki Y, Uda S, Saito TH, Chung J, Kubota H, and Kuroda S. A quantitative image cytometry technique for time series or population analyses of signaling networks. PLoS ONE, e9955, 2010.
2. Chung J, Kubota H, Ozaki Y, Uda S, and Kuroda S. Timing-dependent actions of NGF required for cell differentiation. PLoS ONE, e9011, 2010
3. 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

[学会発表] (計 16 件)

国際学会

1. Sino-Japan Workshop March14-15,2010,Shanghai,Invited) , Temporal coding of ERK and AKT signaling pathway, Shinya Kuroda
2. International symposium on cellular signaling-principles and functions-(November18-19,2009,Tsukuba,Invited) Temporal coding of ERK and AKT signaling pathway, Shinya Kuroda
3. Dynamics of signal transduction and of gene-protein regulatory networks (November 2-6, 2009,Ohio,USA,Oral,Poster) Temporal coding of Akt signaling networks, Shinya Kuroda, Kazuhiro Fujita, Yu Toyoshima
4. The 10th International Conference on Systems Biology (August30,2009,CA,USA,Poster) Low-pass filter characteristics of the Akt pathway decouple EGF receptor and downstream phosphorylation, Fujita, K., Toyoshima, Y., Uda, S., Ozaki, Y., Kubota, H. and Kuroda,S.
5. Computational Cell Biology (March2009,Cold Spring Harbor, NY, USA,Oral), Systems analysis of ERK signaling networks using automated immunofluorescent cytometry, Shinya Kuroda and Yu-ichi Ozaki
6. NIBB-EMBL-CRG Workshop on Systems Biology (April 2008, Barcelona), Temporal coding of ERK signaling network, Shinya Kuroda
7. Japan-Taiwan Young Researchers Conference on Computational and Systems Biology(March2008, Taiwan), Systems biology of ERK signaling networks, Shinya Kuroda
8. FCSB2008 International Workshop on Future Challenges for Systems Biology(February2008,Tokyo), Temporal coding of ERK signaling networks, Shinya Kuroda

国内学会

1. 第13回国際細胞膜研究フォーラム(2010年1月27日、招待講演、京都)、**Temporal coding of ERK and Akt signaling pathway**、黒田真也
2. 第32回日本分子生物学会年会(2009年12月12日、ポスター、横浜)、**NGF-dependent differentiation requires two distinct processes; ERK-and transcription-driven protentiation process and ERK-and PI3K-driven neurite-extension process**、Jaehoon Chung, Hiroyuki Kubota, Yu-ichi Ozaki, Shinsuke Uda, Shinya Kuroda
3. 第32回日本分子生物学会年会(2009年12月11日、招待講演、口頭、横浜)、**High throughput quantification of single cellular signaling events by use of immunostaining and image cytometry**、Yu-ichi Ozaki, Shinsuke Uda, Takeshi Saito, Chung Jaehoon, Hiroyuki Kubota, Shinya Kuroda
4. 第61回日本細胞生物学会大会(2009年6月2日、口頭・招待講演、名古屋)、システムズバイオロジー：本質は複雑でなくシンプル!、黒田真也
5. 第9回日本蛋白質科学会年会(2009年5月22日、口頭・招待講演、熊本)、**ERK経路のシステム生物学**、黒田真也、尾崎裕一
6. 第31回日本分子生物学会年会(2008年12月10日、口頭)、第81回日本生化学会大会合同大会(BMB2008)、**Systems analysis of ERK signaling network using automated immunofluorescence method**、尾崎裕一、黒田真也
7. 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会 合同大会(2007年12月11日、ポスター)、**自動化免疫染色法を用いた ERK 経路のシステム解析**、尾崎裕一、黒田真也
8. 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会 合同大会(2007年12月11日、招待講演)、**ERK 経路のシステム生物学**、黒田真也、尾崎裕一

〔図書〕(計 1 件)

システムバイオロジー(現代生物科学入門第8巻) 岩波書店(2010)

〔その他〕

ホームページ

www.kurodalab.org

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒田 真也(KURODA SHINYA)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号：50273850