

戦略的国際科学技術協力推進事業（日本－英国 BBSRC 研究交流）

1. 研究課題名：「高速定量的免疫染色手法と 1 細胞レベルのシグナル伝達ネットワークの確率的モデル化手法開発」
2. 研究期間：平成 21 年 4 月～平成 24 年 3 月
3. 支援額： 総額 17,276,455 円
4. 主な参加研究者名：

日本側（研究代表者を含め 6 名までを記載）

	氏名	所属	役職
研究代表者	黒田真也	東京大学大学院 理学系研究科	教授
研究者	久保田浩行	東京大学大学院 理学系研究科	助教
研究者	柚木克之	東京大学大学院 理学系研究科	特任助教
研究者	宇田新介	東京大学大学院 理学系研究科	特任助教
研究者	小森靖則	東京大学大学院 理学系研究科	特任助教
研究者	齋藤健	東京大学大学院 理学系研究科	学生
参加研究者 のべ 15 名			

英国側（研究代表者を含め 6 名までを記載）

	氏名	所属	役職
研究代表者	Michael Stumpf	Imperial College London, Division of Molecular Biosciences & Institute for Mathematical Sciences	Professor
研究者	Mauricio Barahina	Department of Bioengineering, Imperial College London	Reader
研究者	Reiko Tanaka	Imperial College London, Institute of Mathematical Sciences	EPSRC Advanced Fellow
研究者	David Klug	Imperial College London, Department of Chemistry,	Professor
研究者	Paul Kirk	Imperial College London, Division of Molecular Biosciences & Institute for Mathematical Sciences	Student
研究者	Maxime Huvet	Imperial College London, Division of Molecular Biosciences & Institute for Mathematical Sciences	Postdoc
参加研究者 のべ 15 名			

5. 研究・交流の目的

本研究交流では 1 細胞レベルでの各種シグナル分子活性の分布時間発展データを高速かつ大量に採取し、従来の解析対象である平均値に加えて、分散とそれ以上の高次モーメントを対象として細胞内シグナル分子の特性解析を行うことを目的とする。具体的には、日

本側の高速定量的自動免疫染色手法と確率微分方程式モデル、英国側のベイズ統計に基づいた解析を組み合わせ、PC12 細胞における ERK 経路や AKT 経路の特性を解明する。また、手段平均を用いても時系列解析を行い、シグナル伝達の時間情報コードを解析する。高速定量的自動免疫染色手法によりモデル選択や分布解析に必要なデータ取得を開始する。英国側はこれらの実験データをもとに MEK と ERK の相互作用のモデル選択をベイズ統計を用いて行う。さらに共同で、相互情報量や通信路容量などシグナル伝達経路の統計的性質を解析する手法を開発する。本共同研究で日英が交流を通じて相互的に取り組むことで、シグナル伝達経路の新しい特性と制御メカニズムが明らかになることが期待される。

## 6. 研究・交流の成果

### 6-1 研究の成果

- ・ 1 細胞レベルでの分布情報を用いた ERK のリン酸化・脱リン酸化のモデル選択 (英国側、日本側共同)

細胞内シグナル分子である MEK や ERK は細胞の増殖や分化などさまざまな細胞機能を制御している。しかし、細胞内におけるその制御機構はいまだ確立していない。本研究では、日本側が開発した高速定量的免疫染色手法と、英国側が開発した 1 細胞レベルのシグナル伝達ネットワークの統計的モデル選択手法開発を用いて、PC12 細胞における ERK のリン酸化・脱リン酸化のメカニズム解明を行った。その結果、ERK は 2 箇所リン酸化されることにより始めて活性化されるが、その脱リン酸化は独立過程 (Distributive) であることが明らかとなった。リン酸化過程は独立過程 (Distributive) か連続過程 (processive) かは判定できなかった。これまで、ERK のリン酸化過程については詳しく調べられているものの、脱リン酸化過程についてはまったく不明であった。本研究は、ERK の脱リン酸化過程が独立過程 (Distributive) であることをはじめて示したものであり、その意義は高い。この成果を英国側との共著論文として発表した (Toni ら、2012)。

- ・ 高速定量的免疫染色手法を用いたシステム同定と通信路特性の解析 (日本側)

高速定量的免疫染色手法を用いた ERK 経路の下流の遺伝子応答の詳細な時系列データを取得して、非線形時間フィルタによりシステム同定を行った。その結果、下流の遺伝子は ERK のリン酸化の周期的な振動や、NGF と PACAP の同時刺激に特異的に応答することが明らかとなった (斉藤ら、投稿中)。また、1 細胞レベルの分布情報を用いるとシグナル伝達と刺激、あるいはシグナル分子間の相互情報量が計算できる。これによりどの経路がメインに情報を伝達しているか、平均強度よりも相互情報量のほうがよりロバストであることが明らかとなった (宇田ら、投稿中)。これらの成果は、まだ採択はされていないものの、実質完成していると言える。

- ・ 1 細胞レベルでの解析を可能にする高速定量的免疫染色手法の開発 (日本側)

日本側は、高速定量的免疫染色手法を完成した。この手法は、リン酸化を 1 細胞レベルで 1 分間隔で計測可能にする画期的な手法である。浮遊細胞では類似の手法としてフローサイトメトリーが存在するが、接着培養細胞に広く応用できる汎用性において本手法の法が優れている。また、ロボットを用いた精密性やスループットを劇的に上昇させている点も特徴的である。上記の論文以外にも、現在本研究室で取得するデータはほぼこの手法に置き換わりつつある。

- ・ シグナル伝達の時間情報コードの解析 (日本側)

1 細胞レベルの解析のみならず、細胞集団平均での情報コードも詳しく解析されていない。そこで、本手法も応用しながら、AKT 経路 (藤田ら、2010)、シグナル伝達一般 (豊島ら、2012)、インスリンシグナリング (久保田ら、2012) において、時間パターンによる細胞の応答制御メカニズムを明らかにした。これらの解析により時間情報コードは広くシグナル伝達一般に認められる特性であることが明らかとなった。

- ・ 今後の展開

HFSP「Cellular Information Processing and Decision Making: from Noise to Robust Phenotypes」による本研究課題の継続・発展（英国側、日本側）

本研究は、英国側の Stumpf 博士が PI、日本側の黒田が co-PI として、さらに David Klung、Mustafa Khammash からも新たに参画して HFSP にて国際的な共同研究として発展させることとなった。これは 1 細胞レベルでの分布情報を用いてなぜシグナル伝達がノイズがあるにもかかわらずロバストな表現形をもたらすかを解析するものである。本事業により開始した研究成果が、さらに規模を大きくして発展・継続することとなった。

## 6-2 人的交流の成果

- ・ 相互研究室訪問（英国側、日本側）

日本側と英国側は、相互に研究室訪問を行い密接な研究交流を行った（日本側が訪問 3 回、英国側が 4 回）。また、研究開始に先立ち、英国側の Tina Toni 氏が日本側研究室に短期に滞在して（平成 20 年 11 月 3 日～同年 12 月 13 日）、高速定量的免疫染色手法を用いた準備的な分布時間発展データから MEK と ERK の相互作用をベイズ統計に基づいた解析を開始している。この成果が論文として採択された。人材交流は、HFSP により今後も継続的に行う予定である。

- ・ 共同シンポジウム、ワークショップ（英国側、日本側）

日本側と英国側は、研究成果発表として、同じ領域の小澤・White らとともに JST/BBSRC シンポジウム（Molecular Imaging and Systems Biology, [http://www.chem.s.u-tokyo.ac.jp/users/analyt/joint\\_symposium.html](http://www.chem.s.u-tokyo.ac.jp/users/analyt/joint_symposium.html)）を平成 24 年 1 月 30 日、31 日に東大弥生講堂にて開催して、本研究課題の成果発表を行った。また、日本分子生物学会などでワークショップやシンポジウムを Stumpf と黒田が共同で座長として合同で開催するなど、頻繁に成果発表を行った。

## 7. 主な論文発表・特許等（5 件以内）

相手国側との共著論文については、その旨を備考欄にご記載ください。

論文 or 特許	・論文の場合： 著者名、タイトル、掲載誌名、巻、号、ページ、発行年 ・特許の場合： 知的財産権の種類、発明等の名称、出願国、出願日、 出願番号、出願人、発明者等	特記 事項
論文	Toni, T., Ozaki, Y., Kirk, P., Kuroda, S. and Stumpf, M. P. H. Elucidating the in vivo phosphorylation dynamics of the ERK MAP kinase using quantitative proteomics data and Bayesian model selection. <i>Mol. Bio. Syst.</i> , in press	
論文	Kubota, H., Noguchi, R., Toyoshima, Y., Ozaki, Y., Uda, S., Watanabe, K., Ogawa, W. and Kuroda, S., Temporal Coding of Insulin Action through Multiplexing of the AKT Pathway, <i>Mol. Cell</i> , in press	
論文	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, <i>Nat. Commun.</i> , 3, 743,2012	
論文	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. <i>Science Signaling</i> ,3(132),ra56,2010	
論文	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. <i>PLoS ONE</i> , 5(4), e9955,2010	