

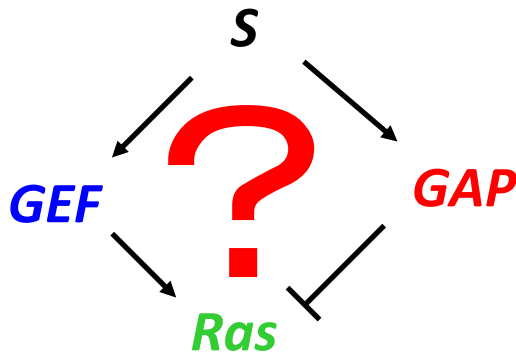
実習6日目:トランスオミクス解析(1) 多階層代謝制御ネットワークの再構築

担当:小鍛治 俊也

ここまでの実習

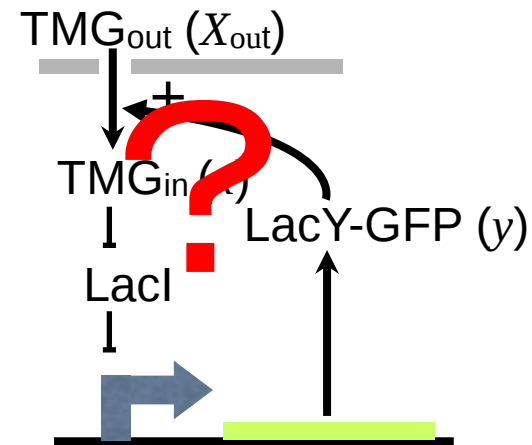
- ネットワーク構造が応答パターンを生み出す！

Rasモデル



Fold-change detection

Ozbudakモデル



双安定性

他にもSel'kovモデル→振動など様々

モデルの作り方

- 1. 論文やレビューをたくさん読む
 - well-curated, but biased
- 2. 経路データベースや推定ソフトを使う
 - unbiased, but not curated

マルチオミクスデータから 多階層にまたがるネットワークを再構築する

従来(



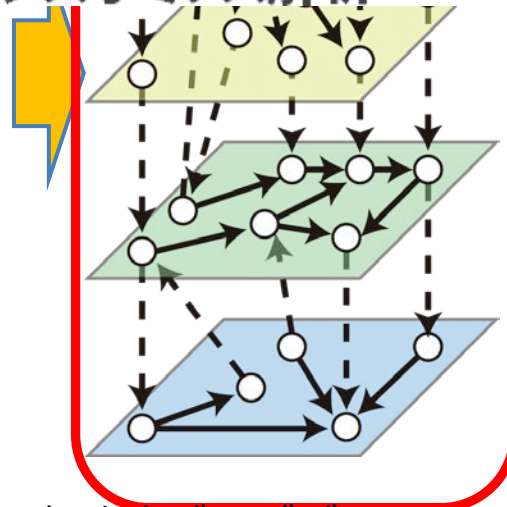
ス

トランスオミクス

文部科学省科学研究費 新学術領域研究(研究領域提案型) 平成29年度～平成33年度 領域番号3901

代謝統合オミクス

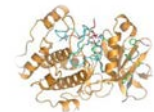
代謝アダプテーションのトランスオミクス解析



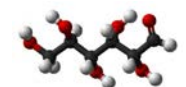
ne



Proteome



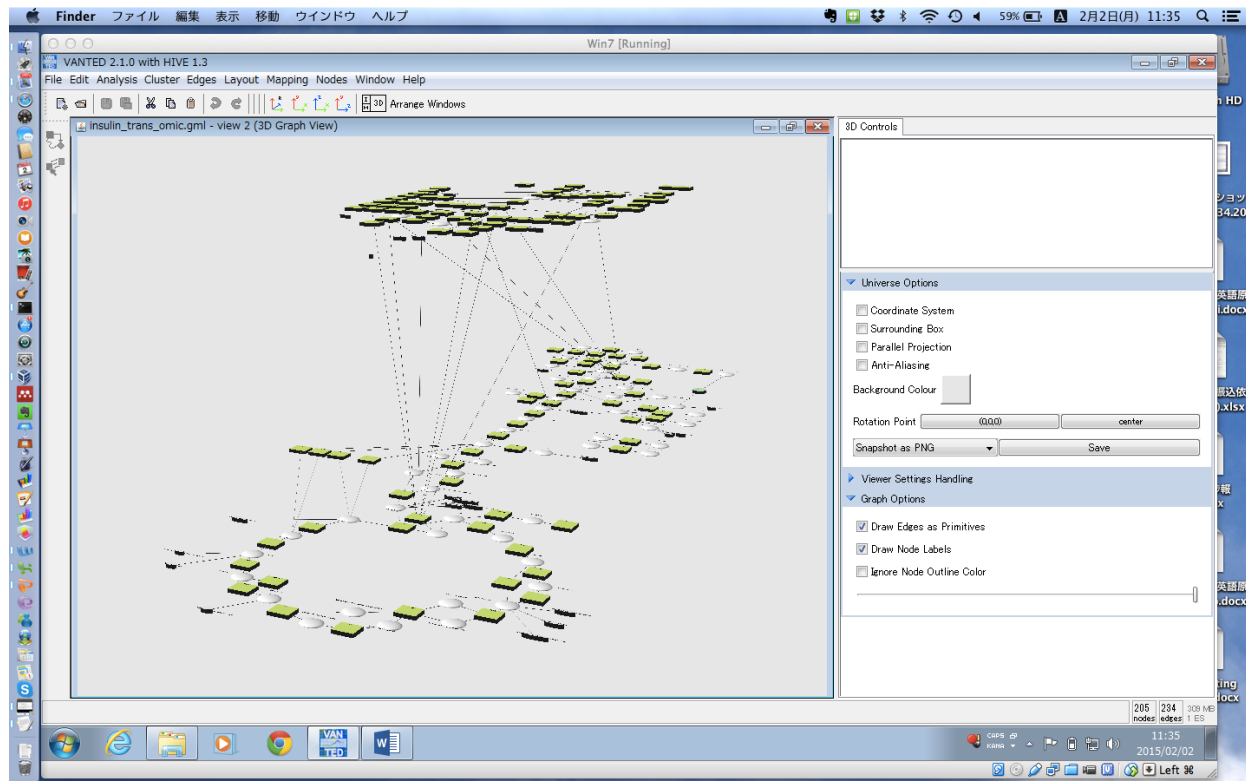
Metabolome



図：東京大学プレスリリース「インスリン作用の細胞内ビッグデータから大規模代謝制御地図を自動的に描く方法論を確立」より

この実習のゴール

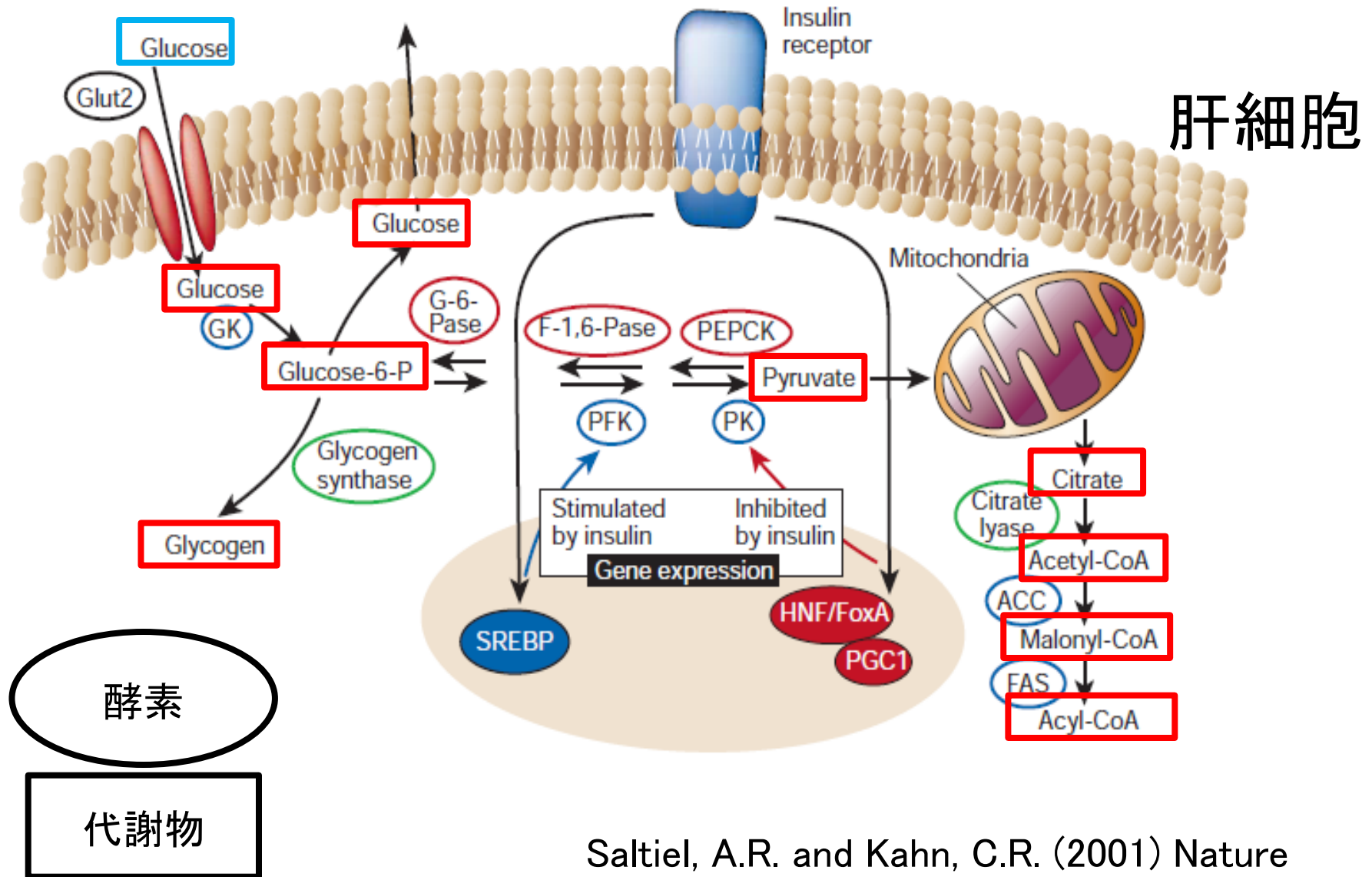
- マルチオミクスデータとバイオインフォマティクスを用いて、多階層ネットワークを再構築する



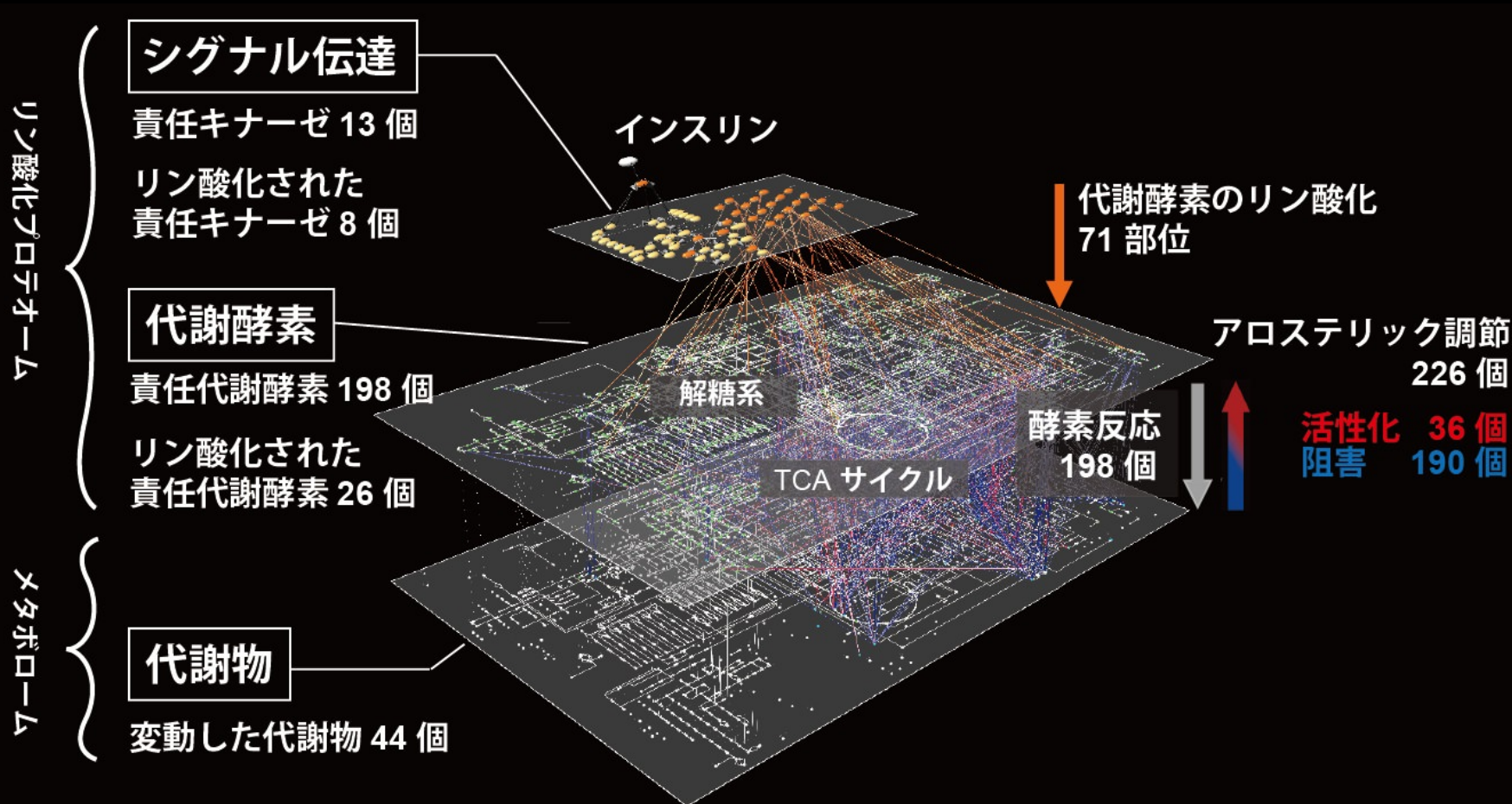
方針

- ネットワーク再構築の段階ごとに課題を出題
- 課題はトランスオミクス5題＋UNIX7題
 - 実データをUNIXシェルコマンドで処理
- Supporting Material
<http://kurodalab.bs.s.u-tokyo.ac.jp/class/Summer/2017/Day6>

インスリンによる代謝制御は 多階層現象である

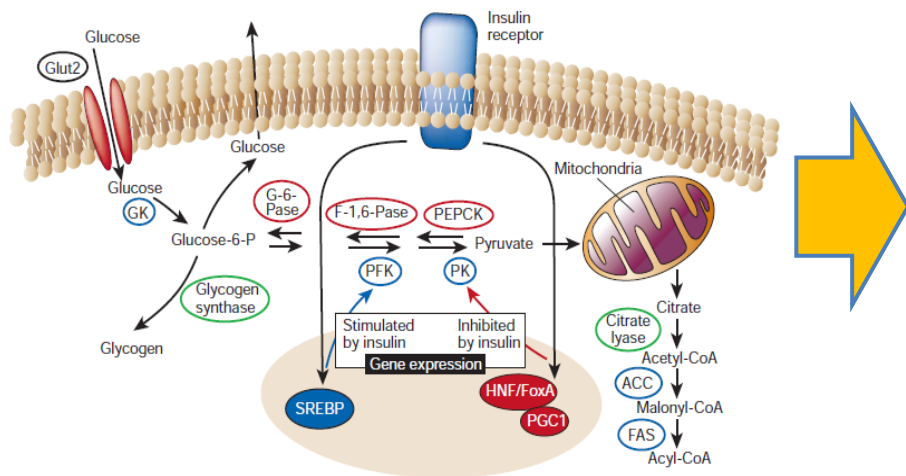


トランスオミクス解析で再構築した インスリン代謝制御ネットワーク



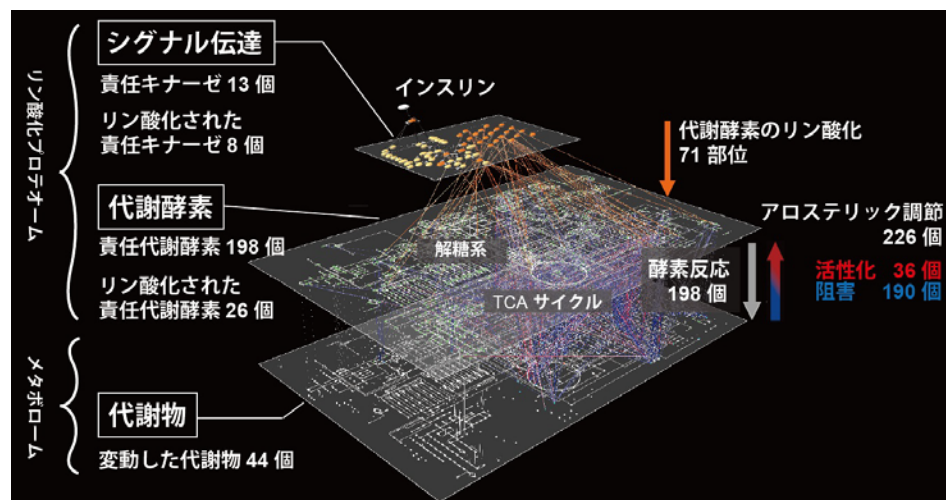
インスリンは従来考えられていたよりも 広範囲のネットワークに作用する

古典的描像



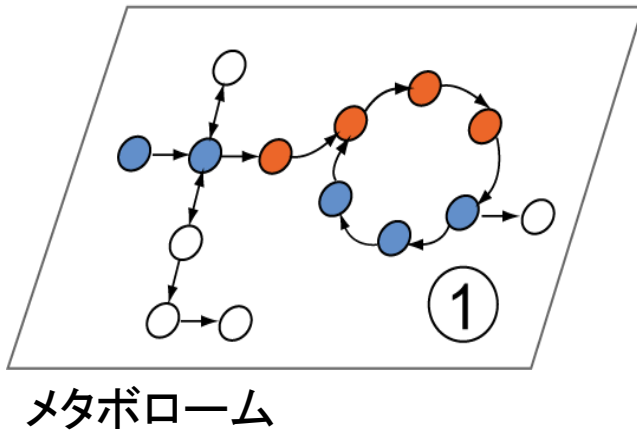
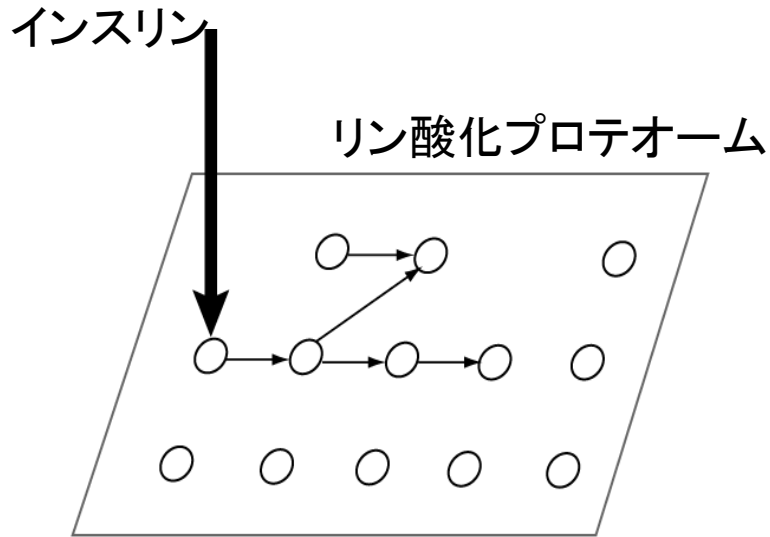
Saltiel and Kahn (2001) *Nature*

トランスオミクスで再構築



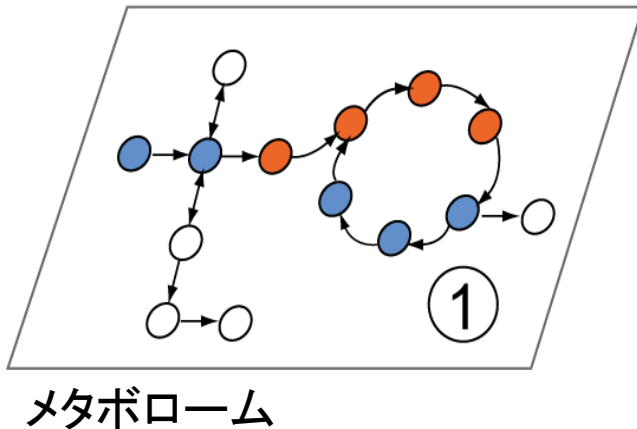
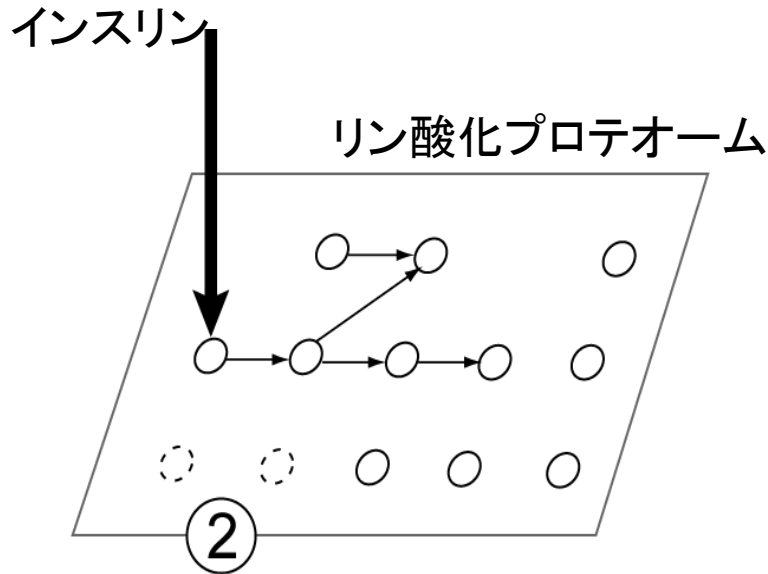
Yugi *et al.* (2014) *Cell Rep.*

多階層ネットワークのアンバイアスな再構築法 (これからやること)



1. 変動した代謝物の同定

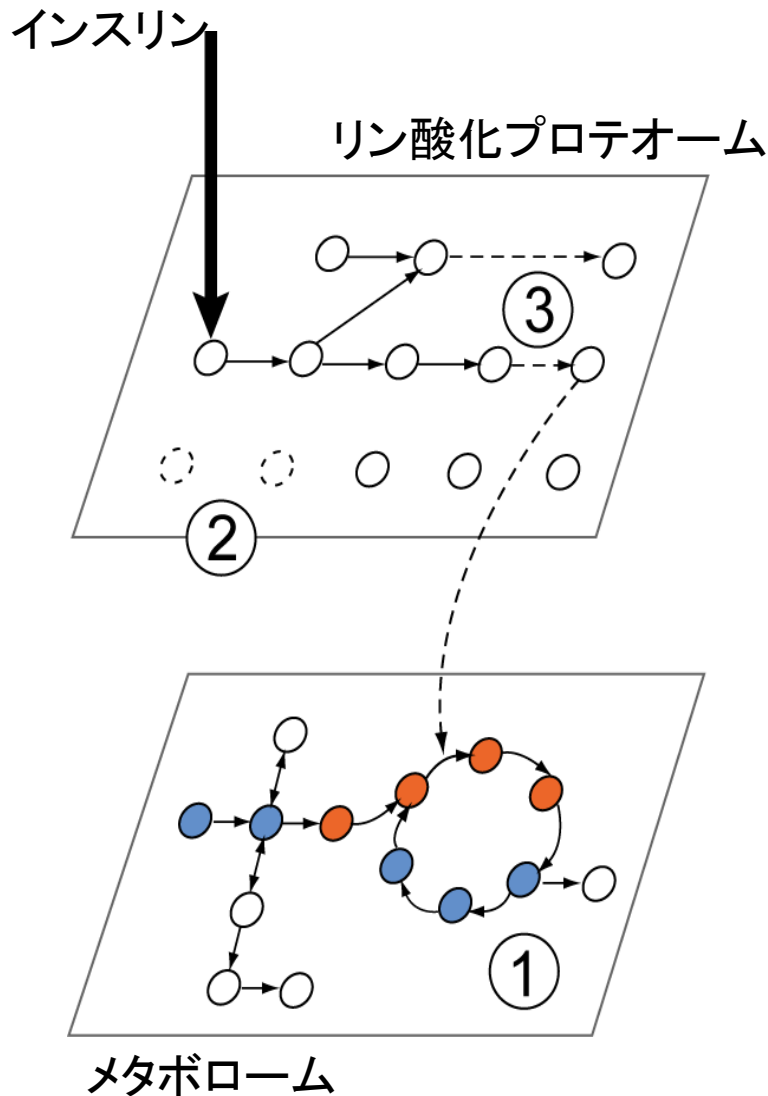
多階層ネットワークのアンバイアスな再構築法 (これからやること)



2. 責任代謝酵素の同定

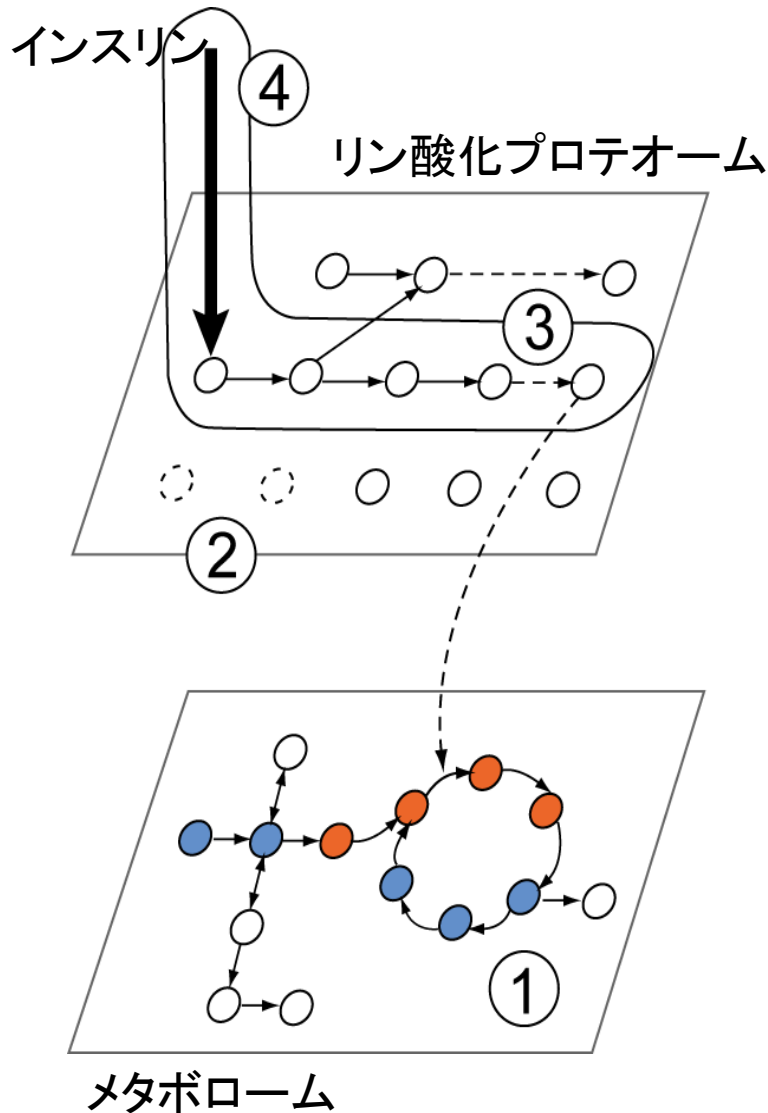
1. 変動した代謝物の同定

多階層ネットワークのアンバイアスな再構築法 (これからやること)



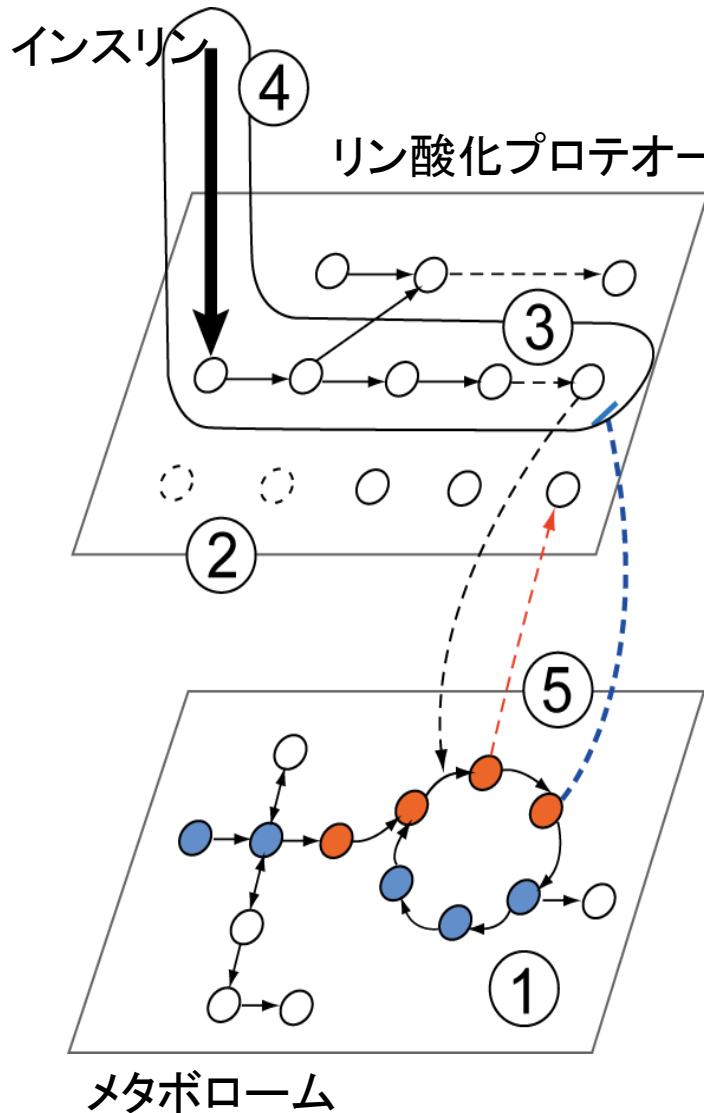
1. 変動した代謝物の同定
2. 責任代謝酵素の同定
3. リン酸化された責任代謝 酵素の同定

多階層ネットワークのアンバイアスな再構築法 (これからやること)



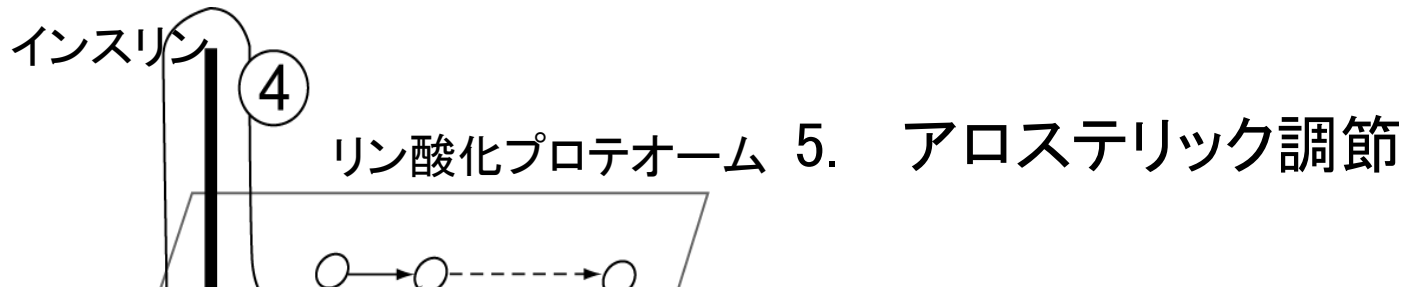
4. インスリンシグナル伝達と責任代謝酵素をつなぐ
3. リン酸化された責任代謝 酵素の同定
2. 責任代謝酵素の同定
1. 変動した代謝物の同定

多階層ネットワークのアンバイアスな再構築法 (これからやること)



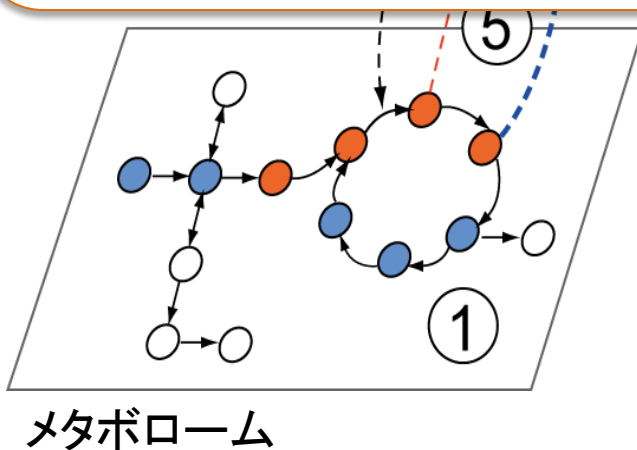
1. 変動した代謝物の同定
2. 責任代謝酵素の同定
3. リン酸化された責任代謝 酵素の同定
4. インスリンシグナル伝達と責任代謝酵素をつなぐ
5. アロステリック調節

多階層ネットワークのアンバイアスな再構築法 (これからやること)



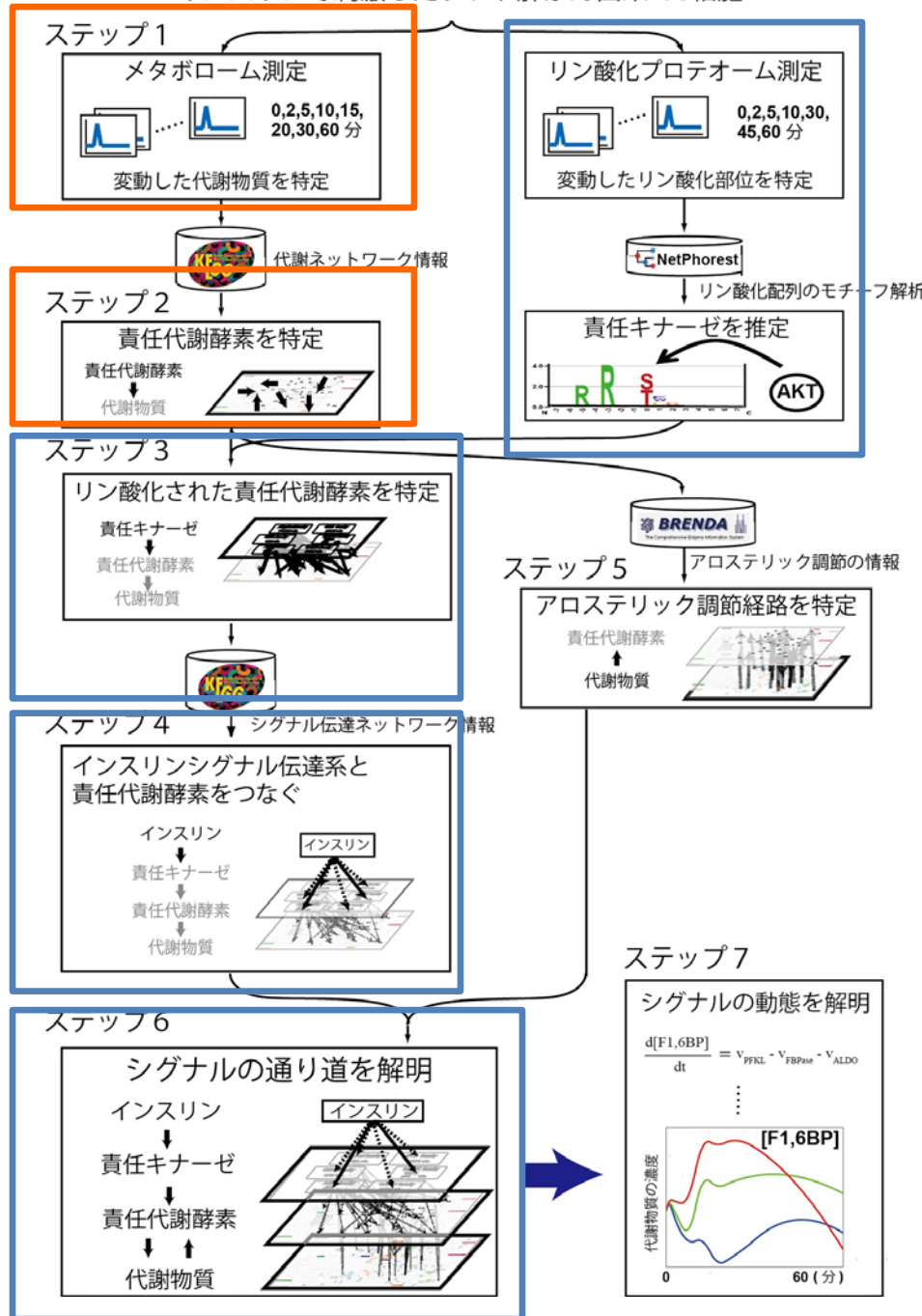
ポイント:

1. 代謝を起点に階層をさかのぼる
2. オミクスデータ + Pathway DB



2. 責任代謝酵素の同定
1. 変動した代謝物の同定

インスリンで刺激したラット肝がん由来Fao細胞



1日め

- ・UNIXの基本
- ・ステップ1~2

2日め

- ・ステップ3~6

Yugi et al. (2014) Cell rep.

実習の前に...

ファイルを以下のアドレスから以下のフォルダにダウンロード

サイト [http://kurodalab.bs.s.u-tokyo.ac.jp/
class/Summer/2019/Day6/](http://kurodalab.bs.s.u-tokyo.ac.jp/class/Summer/2019/Day6/)

フォルダ /Users/(自分の番号)/Transomics/

▪ day6_slide.pdf このスライド

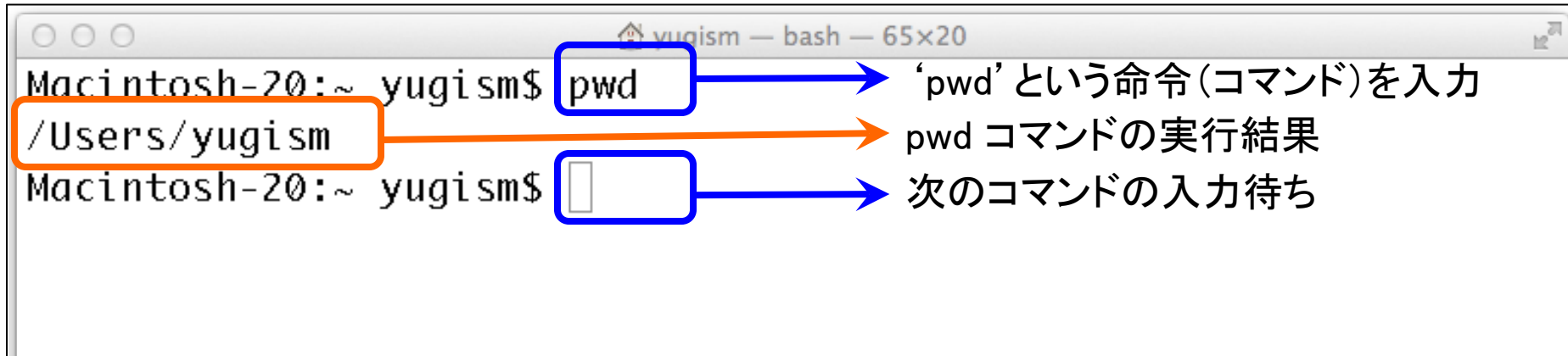
▪ day6_handson.docx 課題ファイル

▪ transomics_data.zip 課題に必要なデータ
 ↳ 解凍が必要
 (右クリック→この場で解凍)

UNIX課題1:UNIXの初歩を体験する

UNIXシェルとは

- キーボードから打ち込んだ命令を解釈・実行するプログラム



※ ‘pwd’ は現在のフォルダの場所を出力するコマンド

標準入力(stdin) コマンドを入力するスペースのこと

標準出力(stdout) コマンドの実行結果を表示するスペースのこと

なぜMATLABではなく UNIXコマンドを使うのか？

- 一言でいうと「適材適所」

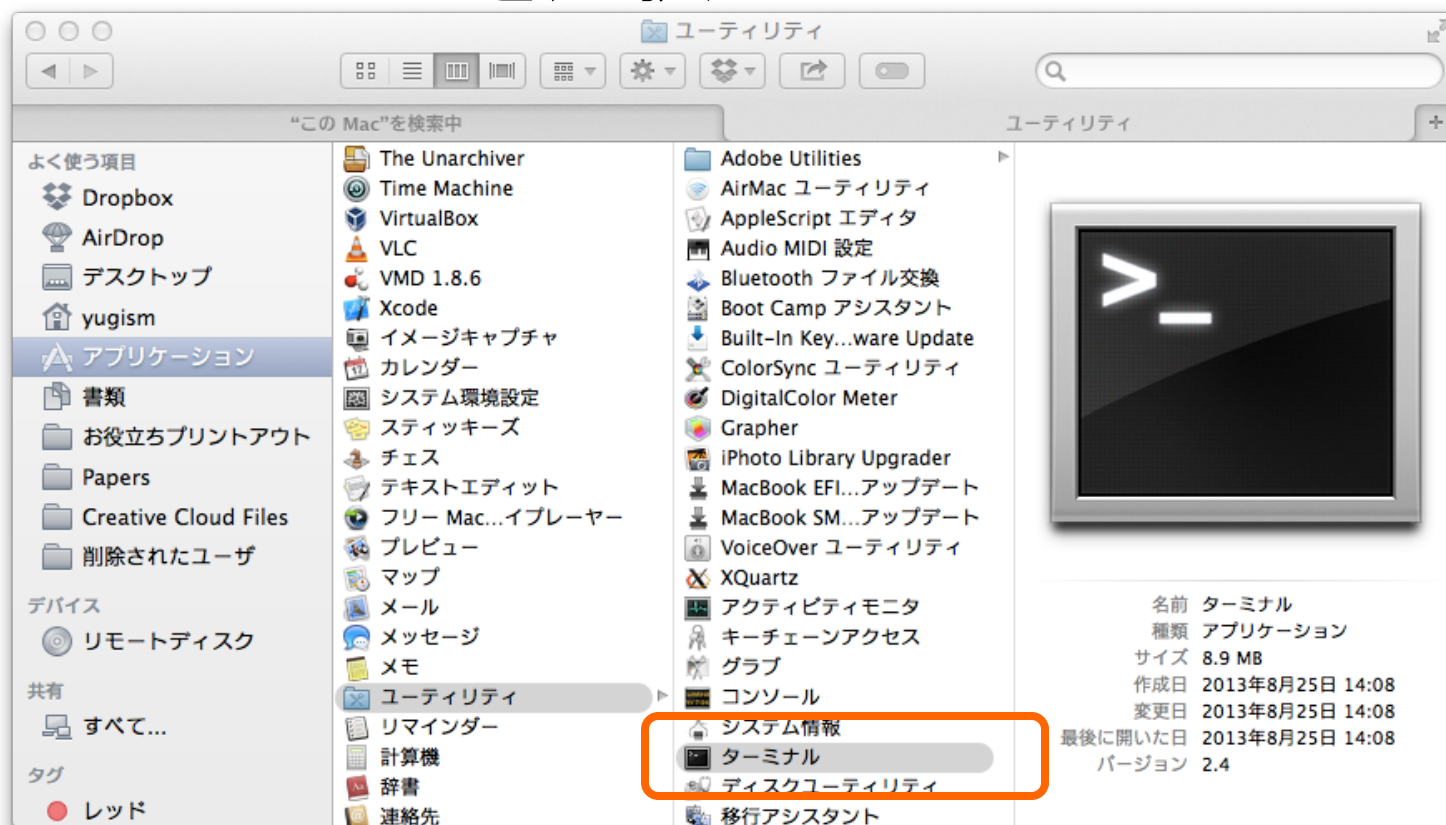
	微分方程式	テキスト処理 ファイル処理	ターンオーバー
MATLAB	+	—	—
UNIXコマンド	—	+	+

今日と明日の実習内容にマッチしている

※ターンオーバー: プログラムを最初に書いてから、
実行・修正を繰り返して完成させるまでの時間的手間

ターミナル: MacでUNIXシェル

- Finder → アプリケーション → ユーティリティ → ターミナル を選択



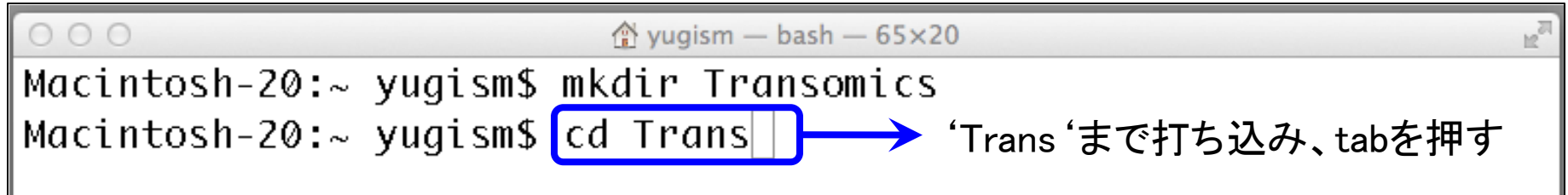
色々なコマンド

- pwd 今いるフォルダを表示
- ls 今いるフォルダ内のファイルを表示
- cd フォルダ間を移動する
- more ファイルの中身を見してみる
- wc ファイルの文字数を数える

他多数

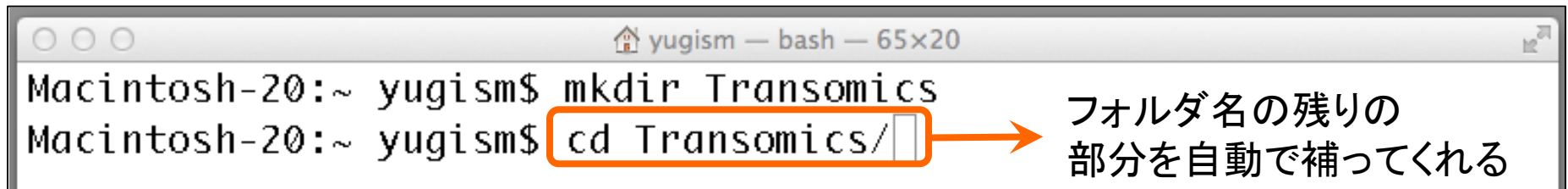
補完とは

- 途中までコマンドを打ち込み、tabを押す



A terminal window titled 'yugism — bash — 65x20'. The first line shows the command 'mkdir Transomics' being executed. The second line shows the command 'cd Trans' with a blue box highlighting the text and a blue arrow pointing to the right, indicating the next step in the process.

```
Macintosh-20:~ yugism$ mkdir Transomics
Macintosh-20:~ yugism$ cd Trans
```



A terminal window titled 'yugism — bash — 65x20'. The first line shows the command 'mkdir Transomics' being executed. The second line shows the command 'cd Transomics/' with an orange box highlighting the text and an orange arrow pointing to the right, indicating the next step in the process.

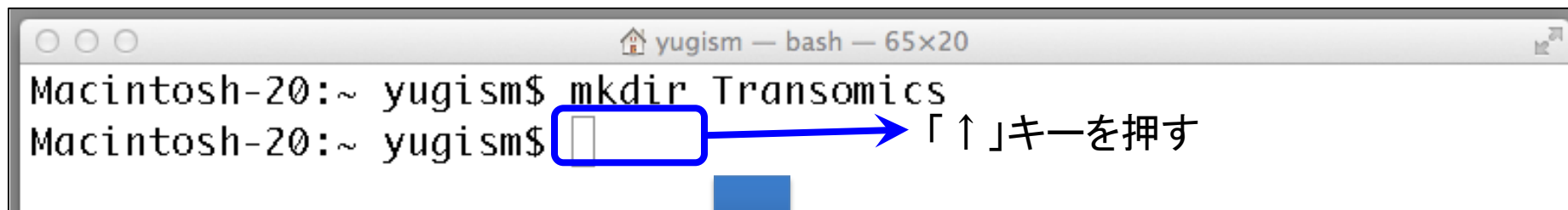
```
Macintosh-20:~ yugism$ mkdir Transomics
Macintosh-20:~ yugism$ cd Transomics/
```

フォルダ名の残りの
部分を自動で補ってくれる

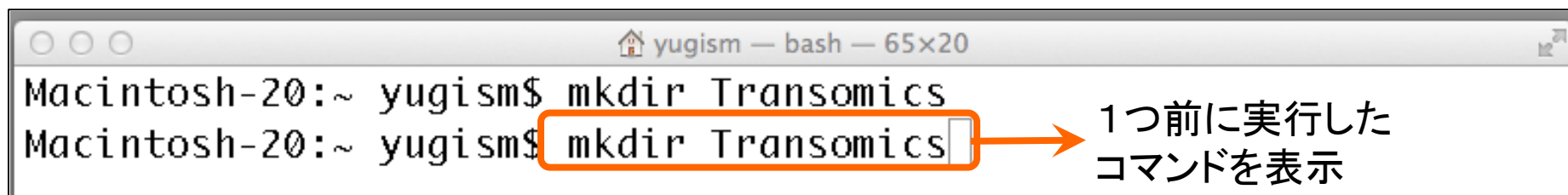
打ち間違いが減る！

履歴とは

- 標準入力で「↑」を押すと前に実行したコマンドが表示される



```
Macintosh-20:~ yugism$ mkdir Transomics
Macintosh-20:~ yugism$
```



```
Macintosh-20:~ yugism$ mkdir Transomics
Macintosh-20:~ yugism$ mkdir Transomics
```

打ち間違いが減る！

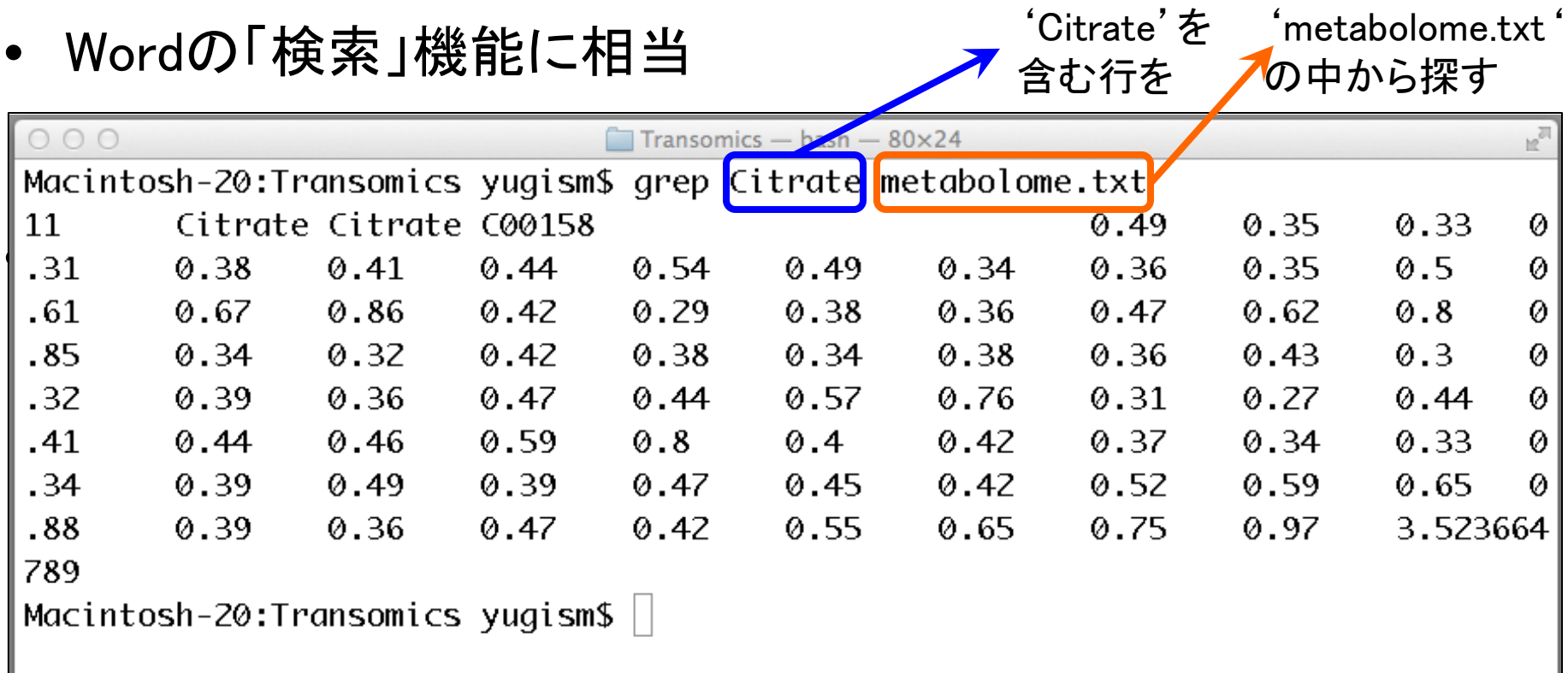
UNIX課題1: TODO

- いくつかのUNIXコマンドを使ってみる
- 補完および履歴機能を実際に使ってみる
- 課題集PDFファイルの通りにやってみる

UNIX課題2: パターンマッチ入門

パターンマッチとは

- Wordの「検索」機能に相当



‘Citrate’を含む行を

‘metabolome.txt’の中から探す

```
Macintosh-20:Transomics yugism$ grep Citrate metabolome.txt
11      Citrate Citrate C00158                                0.49      0.35      0.33      0
.31      0.38      0.41      0.44      0.54      0.49      0.34      0.36      0.35      0.5      0
.61      0.67      0.86      0.42      0.29      0.38      0.36      0.47      0.62      0.8      0
.85      0.34      0.32      0.42      0.38      0.34      0.38      0.36      0.43      0.3      0
.32      0.39      0.36      0.47      0.44      0.57      0.76      0.31      0.27      0.44      0
.41      0.44      0.46      0.59      0.8      0.4      0.42      0.37      0.34      0.33      0
.34      0.39      0.49      0.39      0.47      0.45      0.42      0.52      0.59      0.65      0
.88      0.39      0.36      0.47      0.42      0.55      0.65      0.75      0.97      3.523664
789
Macintosh-20:Transomics yugism$
```

- 「検索したい文字列」を含む行をファイル中から探す
\$ grep [検索したい文字列] [ファイル名]

- TODO: 課題集の通り

UNIX課題2: TODO

- grepを実際に試してみる
- 課題集PDFファイルの通りに試してみる

UNIX課題3:

パイプとリダイレクション、
ファイル取り扱いの基本

リダイレクションとは

- コマンドの実行結果をファイルに書き込む

```
Transomics — bash — 85x24
Macintosh-20:Transomics yugism$ ls
metabolome.txt      mmc4.xlsx           posterior.txt
mmc2.xlsx            phosphoproteome.txt  rpk.txt
Macintosh-20:Transomics yugism$ grep CoA metabolome.txt > metabolome_CoA.txt
Macintosh-20:Transomics yugism$ ls
metabolome.txt      mmc2.xlsx            phosphoproteome.txt  rpk.txt
metabolome_CoA.txt  mmc4.xlsx            posterior.txt
Macintosh-20:Transomics yugism$ grep -i glucose metabolome.txt >> metabolome_CoA.txt
Macintosh-20:Transomics yugism$
```

「左のコマンドの結果を
右のファイルに書き込む」

\$ grep CoA metabolite.txtの実行結果を格納したファイル

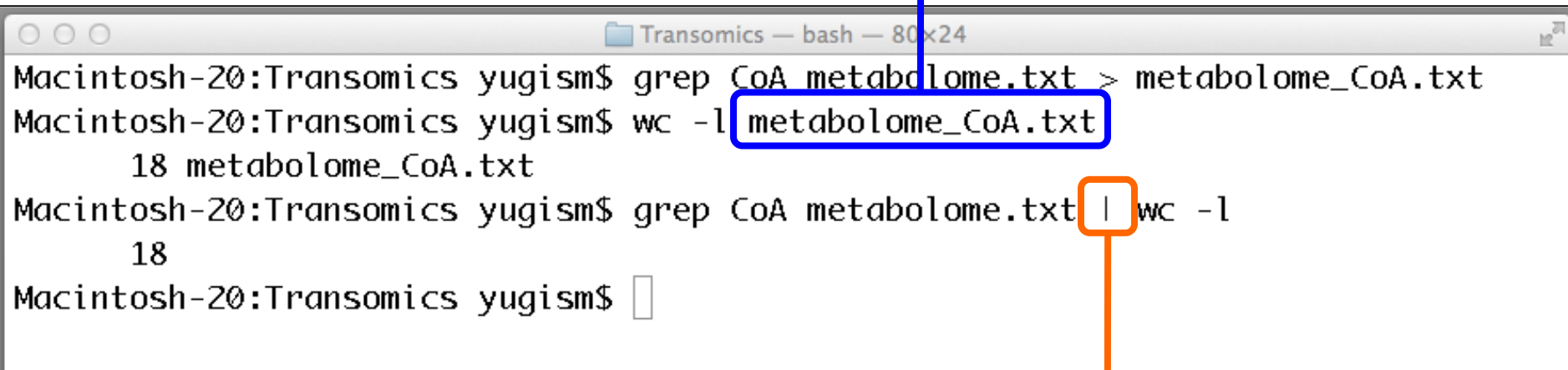
「左のコマンドの結果を右のファイルの
末尾に追加書き込みする」

- 標準出力に書き出すはずのデータの行き先をファイルに変更するので「リダイレクション」

パイプとは

- コマンドAの実行結果をコマンドBの入力データにする

wc コマンドの入力データ



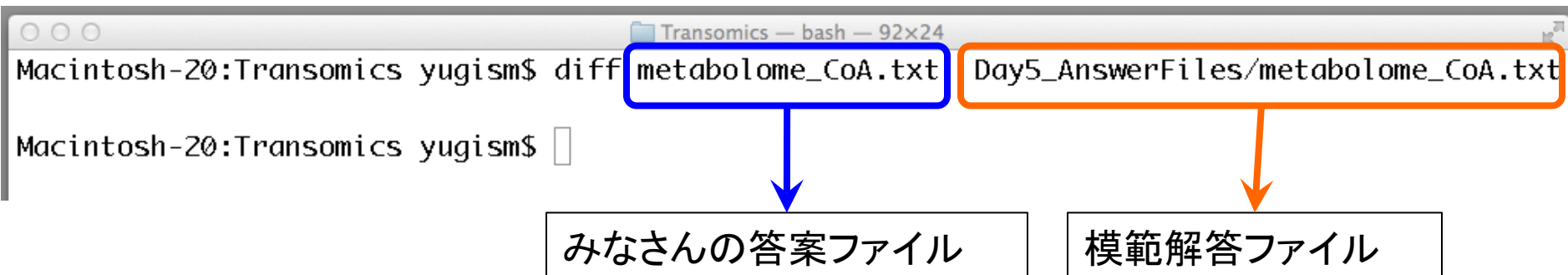
```
Transomics — bash — 80x24
Macintosh-20:Transomics yugism$ grep CoA metabolome.txt > metabolome_CoA.txt
Macintosh-20:Transomics yugism$ wc -l metabolome_CoA.txt
    18 metabolome_CoA.txt
Macintosh-20:Transomics yugism$ grep CoA metabolome.txt | wc -l
    18
Macintosh-20:Transomics yugism$
```

「左のコマンドの結果を
右のコマンドの入力データにする」

- 前後2つのコマンドをつなぐので「パイプ」と呼ばれる

diffコマンドで答え合わせ

- diffコマンドを用いて、2つのファイルの異なる部分（差分）を表示する



- diffコマンドが何も表示しない = 答案と模範解答が一致

UNIX課題3: TODO

- パイプとリダイレクションを前スライドの例のように使ってみる
- 課題集PDFファイルの通りにやってみる
- diffコマンドを用いて答え合わせする

UNIX課題4: awk

awk(オーク)とは

- タブなどで区切られた表形式データを処理する

The image shows a terminal window titled "Transomics — bash — 94x24". It displays the contents of a file named "phosphoproteome_example.txt" and the results of three different awk commands. Annotations with arrows explain the parts of the commands and the resulting output.

awk コマンドの入力データ (Input data for the awk command)

ec	IPI	rno	Protein
1.1.1.37	IPI00198717	24551	Mdh1
1.1.1.95	IPI00475835	58835	Phgdh
1.14.11.27	IPI00569603	304495	Kdm2b
1.14.11.27	IPI00764764	304495	Kdm2b
1.14.11.27	IPI00782333	361700	Kdm2a

表形式データの2列目を表示する (Display the 2nd column of the table format data)

```
Macintosh-20:Transomics yugism$ cat phosphoproteome_example.txt
ec:1.1.1.37      IPI00198717      rno:24551      Mdh1
ec:1.1.1.95      IPI00475835      rno:58835      Phgdh
ec:1.14.11.27    IPI00569603      rno:304495     Kdm2b
ec:1.14.11.27    IPI00764764      rno:304495     Kdm2b
ec:1.14.11.27    IPI00782333      rno:361700     Kdm2a
Macintosh-20:Transomics yugism$ awk '{ print $2 }' phosphoproteome_example.txt
IPI00198717
IPI00475835
IPI00569603
IPI00764764
IPI00782333
```

4列目に Kdm という文字列を含む (Contains the string "Kdm" in the 4th column)

```
Macintosh-20:Transomics yugism$ awk '$4 ~ /Kdm/{ print $2 }' phosphoproteome_example.txt
IPI00569603
IPI00764764
IPI00782333
```

4列目が Kdm2b という文字列と一致 (Matches the string "Kdm2b" in the 4th column)

```
Macintosh-20:Transomics yugism$ awk '($4 == "Kdm2b"){ print $2 }' phosphoproteome_example.txt
IPI00569603
IPI00764764
Macintosh-20:Transomics yugism$
```

- とりあえずの基本はこれで十分

UNIX課題4: TODO

- awkを前スライドの例のように使ってみる
- 課題集PDFファイルの通りにやってみる

UNIX課題5: sortとuniq

sort, uniqとは

```
Macintosh-20:Transomics yugism$ cut -f4 phosphoproteome_example.txt
Mdh1
Phgdh
Kdm2b
Kdm2b
Kdm2a
Macintosh-20:Transomics yugism$ cut -f4 phosphoproteome_example.txt | sort
Kdm2a
Kdm2b
Kdm2b
Mdh1
Phgdh
Macintosh-20:Transomics yugism$ cut -f4 phosphoproteome_example.txt | sort | uniq
Kdm2a
Kdm2b
Mdh1
Phgdh
Macintosh-20:Transomics yugism$ cut -f4 phosphoproteome_example.txt | sort | uniq -c
 1 Kdm2a
 2 Kdm2b
 1 Mdh1
 1 Phgdh
Macintosh-20:Transomics yugism$
```

辞書順に並べ直す

重複が削除された

重複している行を削除

Kdm2bは2回出現

重複の回数をカウント

※uniqで重複行を削除するには、先にsortを済ませておくことが必要

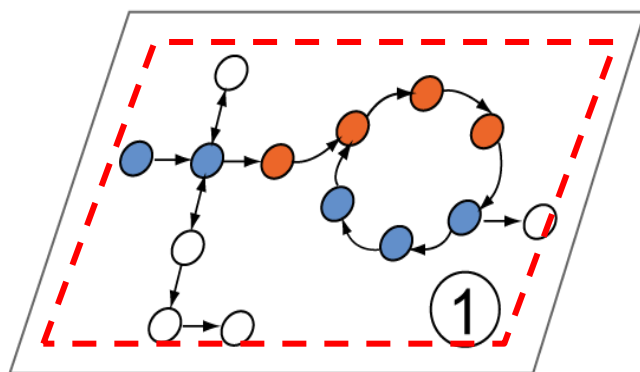
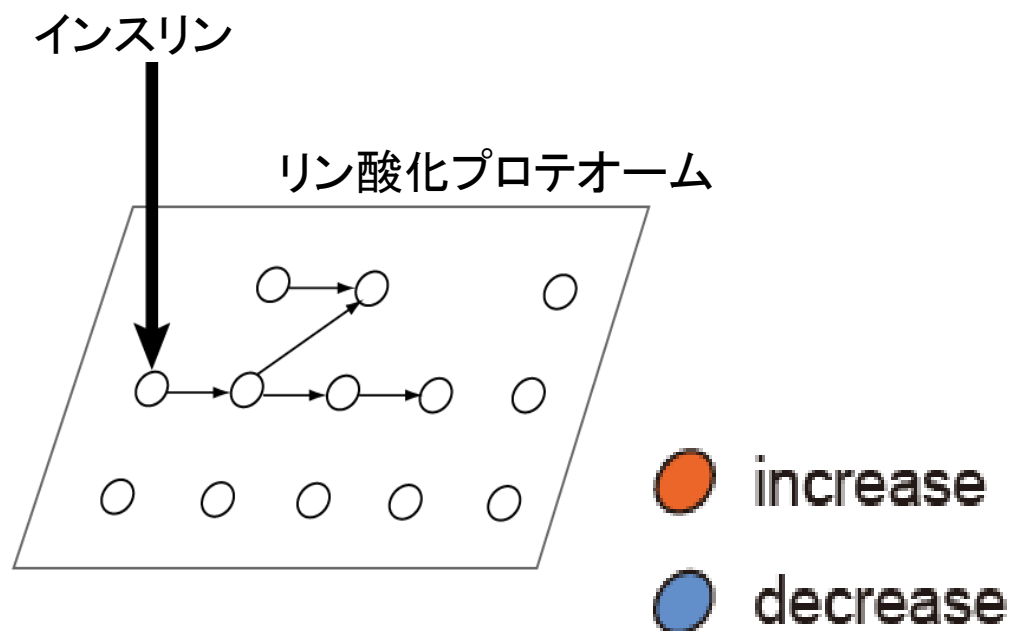
UNIX課題5: TODO

- sort, uniqを前スライドの例のように使ってみる
 - ファイル名は phosphoproteome_example.txtの代わりに phosphoproteome.txt にすること
- 課題集PDFファイルの通りにやってみる

トランスオミクスStep (i): 演習

変動した代謝物の同定

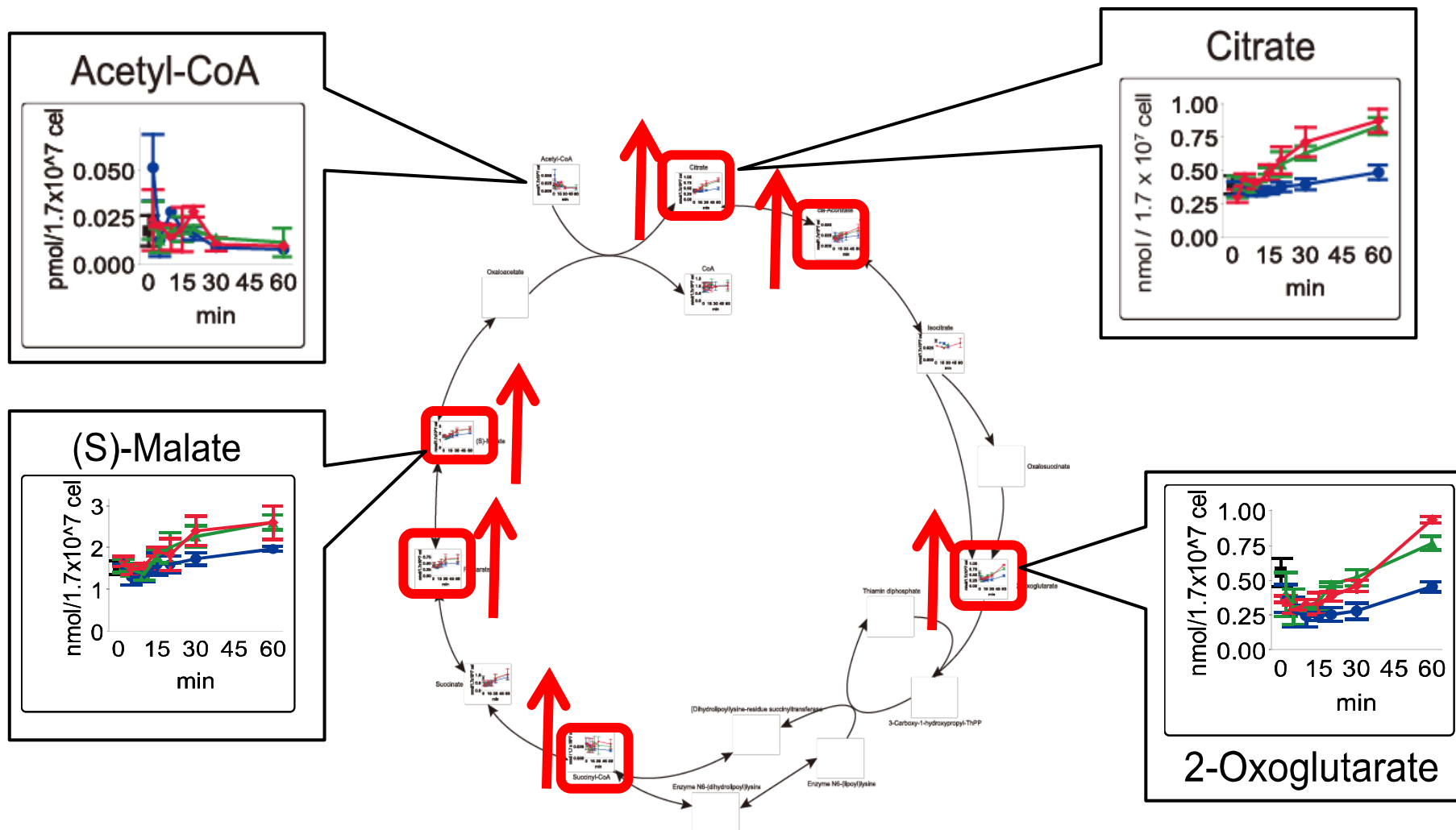
多階層ネットワークのアンバイアスな再構築法



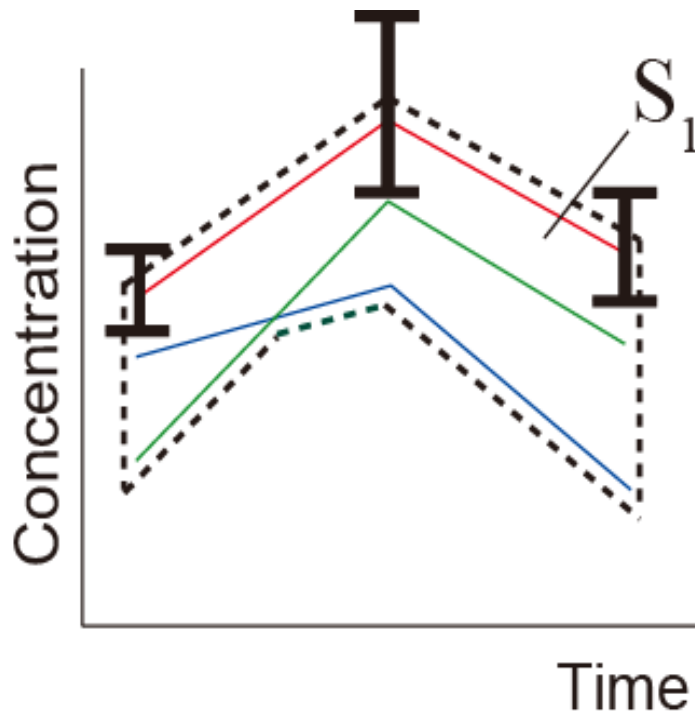
メタボローム

1. 変動した代謝物の同定

インスリン依存の代謝物濃度変動



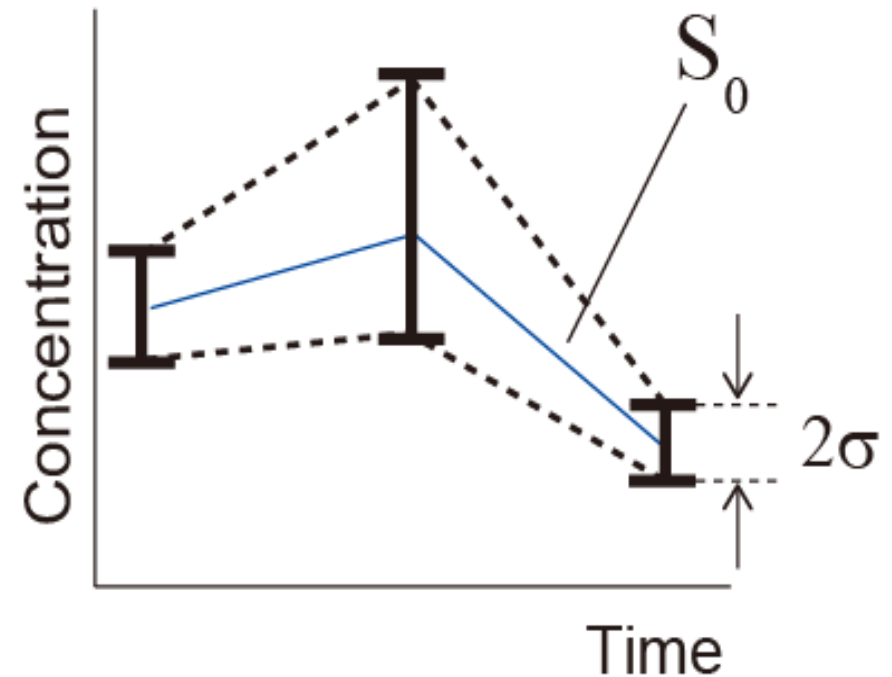
変動代謝物の判定基準



青: Insulin dose = 0.01nM (Control)

緑: Insulin dose = 1nM

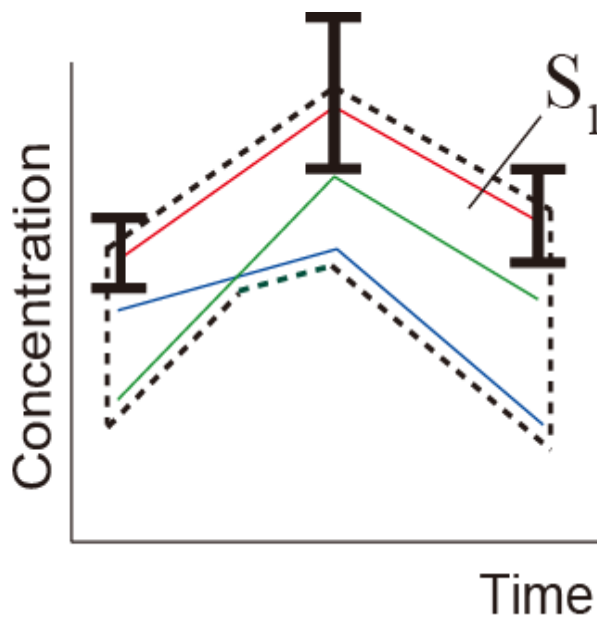
赤: Insulin dose = 100nM



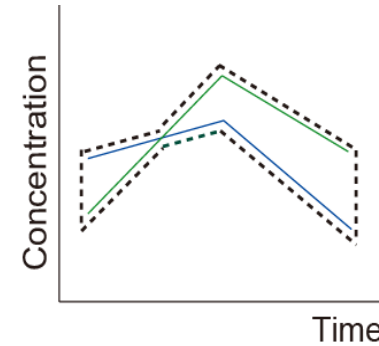
変動あり : $S_1 / S_0 > 1$

変動なし : otherwise

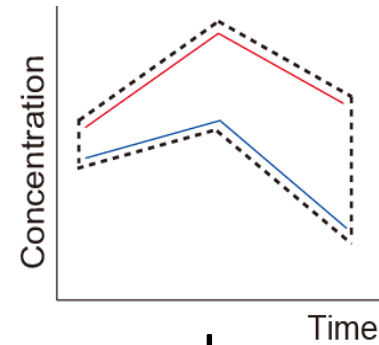
S_1 はコントロールからの乖離の 大きさを反映する



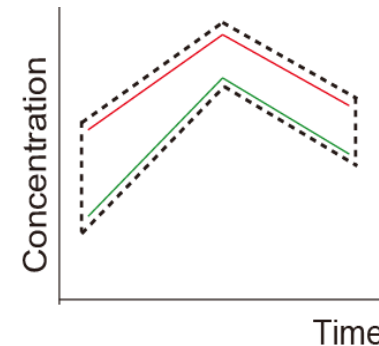
$$S_1 \times 2 =$$



+



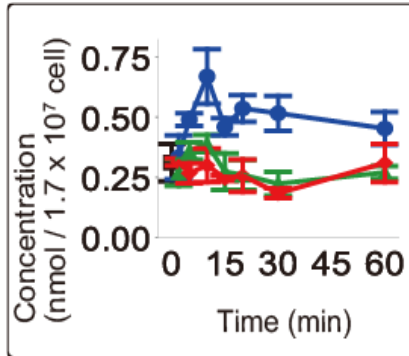
+



実際の代謝物の S_1 / S_0 値

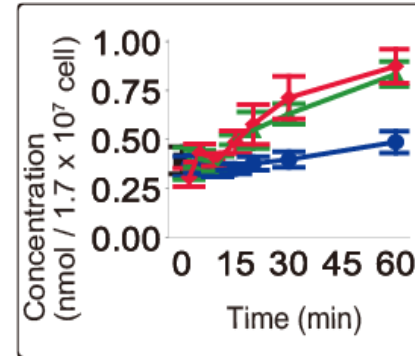
$$S_1 / S_0 = -2.53$$

F6P



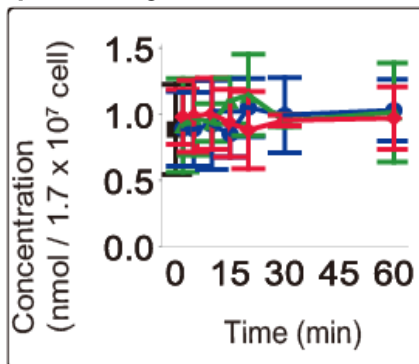
$$S_1 / S_0 = 3.52$$

Citrate



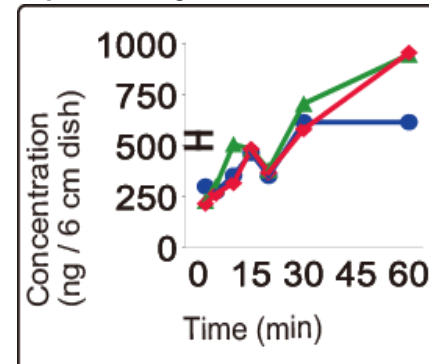
$$S_1 / S_0 = -0.22$$

CoA



$$S_1 / S_0 = 2.35$$

Glycogen



変動した代謝物は44個

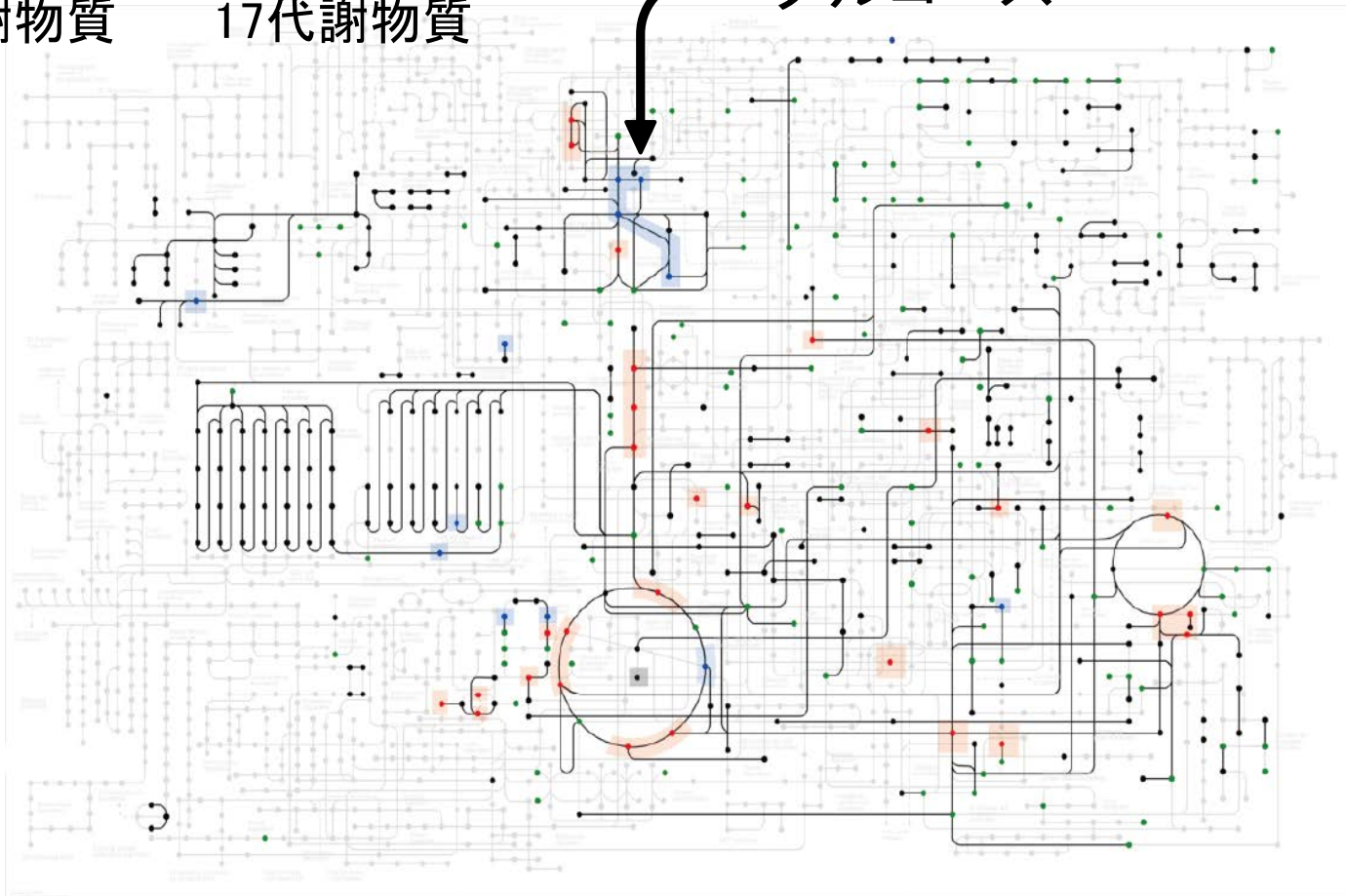
増加

減少

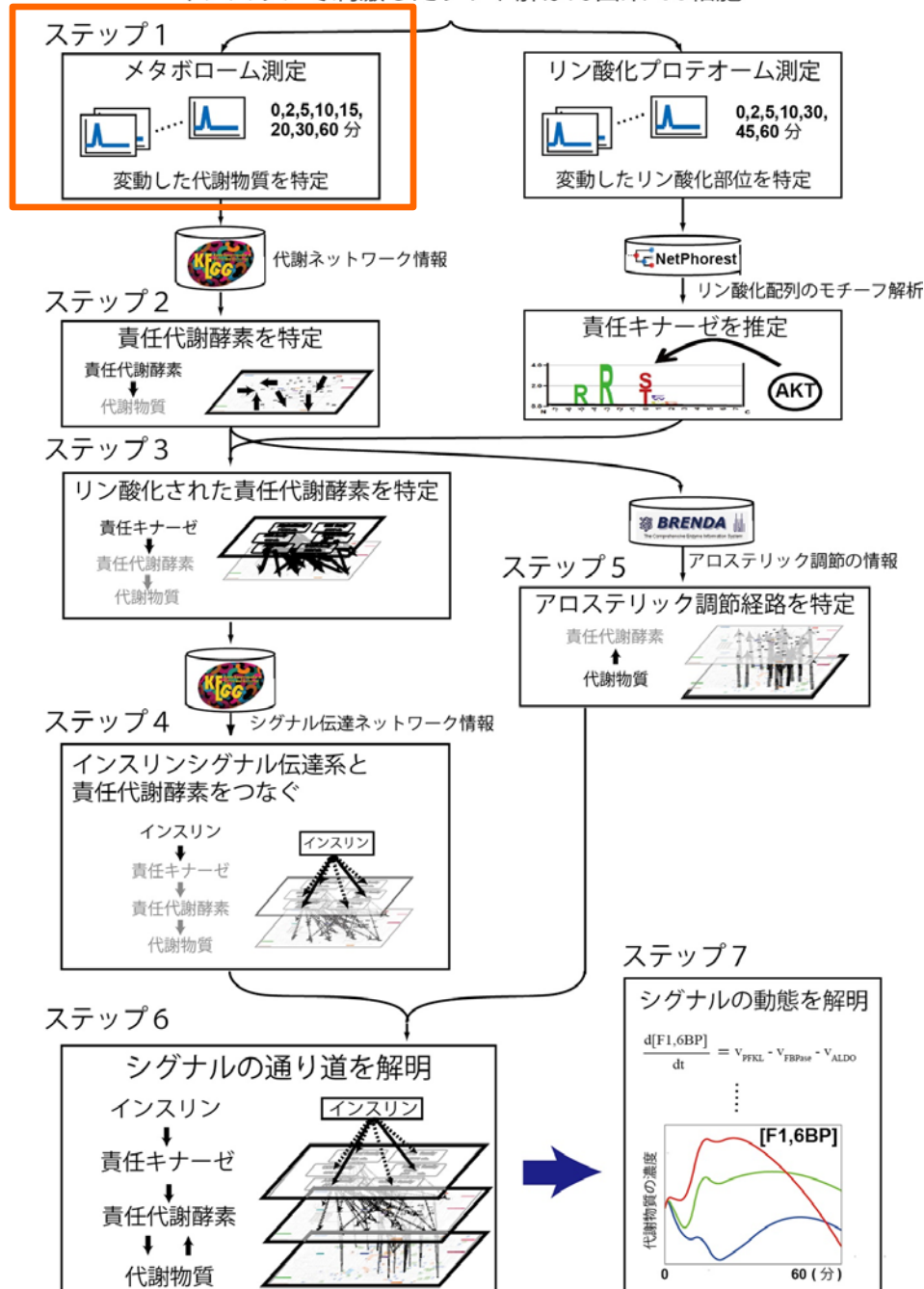
27 代謝物質

17代謝物質

グルコース



インスリンで刺激したラット肝がん由来Fao細胞



Yugi et al. (2014) Cell rep.

生物種を選択。この場合はラットを表す“rno”。

Search against

rno

Enter: map, ko, ec, rn, hsadd, or

org

Primary ID: KEGG identifiers

(Outside IDs for organism-specific pathways only)

Enter objects one per line followed by bgcolor, fgcolor:

ec:2.3.3.8 blue
ec:4.2.1.3 purple
ec:1.1.1.41 black
ec:1.2.4.2 red
ec:6.2.1.4 orange
ec:1.3.5.1 yellow
ec:4.2.1.2 green
ec:1.1.1.37 #228B22
C00024 magenta
C00158 red

Examples:

Select

酵素または代謝物のIDと色を指定

Alternatively, enter the file name containing the data:

ファイルを選択

ファイル未選択

If necessary, change default bgcolor: pink

☒ Include aliases

☒ Use uncolored diagrams

Use uncolored diagramsをチェック

☒ Display objects not found in the search

☐ Search pathways containing all the objects (AND search)

Exec

Clear

最後に Exec をクリック

About KEGG Mapper

Search Pathway

Search&Color Pathway

Color Pathway

Color Pathway WebGL

Search Brite

Search&Color Brite

Join Brite

Search Module

Search&Color Module

Annotate Sequence

BlastKOALA

Reconstruct Pathway

Reconstruct Brite

Reconstruct Module

Map Taxonomy

KEGG Atlas

KEGG

代謝マップを選択する

Pathway Search Result

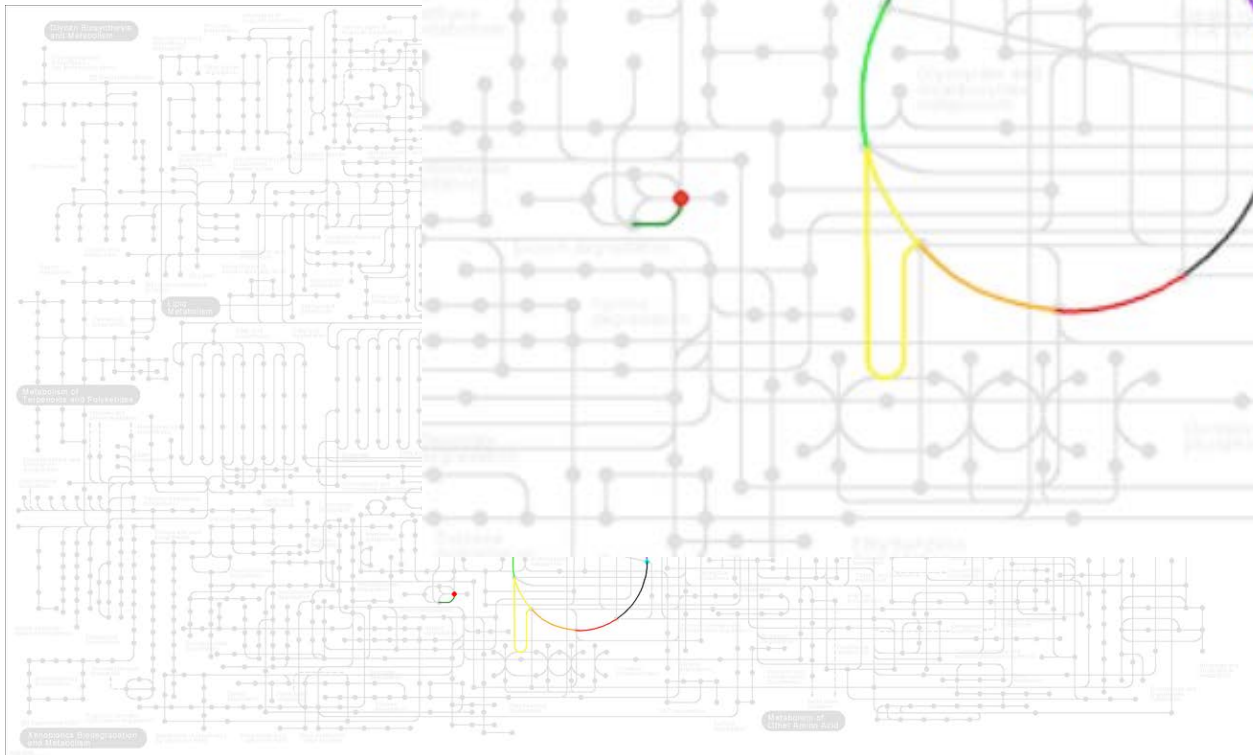
Sort by the pathway list

Show all objects

- **rno01100 Metabolic pathways** - Rattus norvegicus (rat) (22)
- rno00020 Citrate cycle (TCA cycle) - Rattus norvegicus (rat) (22)
- rno01200 Carbon metabolism - Rattus norvegicus (rat) (21)
- rno01210 2-Oxocarboxylic acid metabolism - Rattus norvegicus (rat) (10)
- rno01230 Biosynthesis of amino acids - Rattus norvegicus (rat) (10)

グローバル代謝マップ。今回はこのマップを選択する。

酵素・代謝物を指定した色で表示



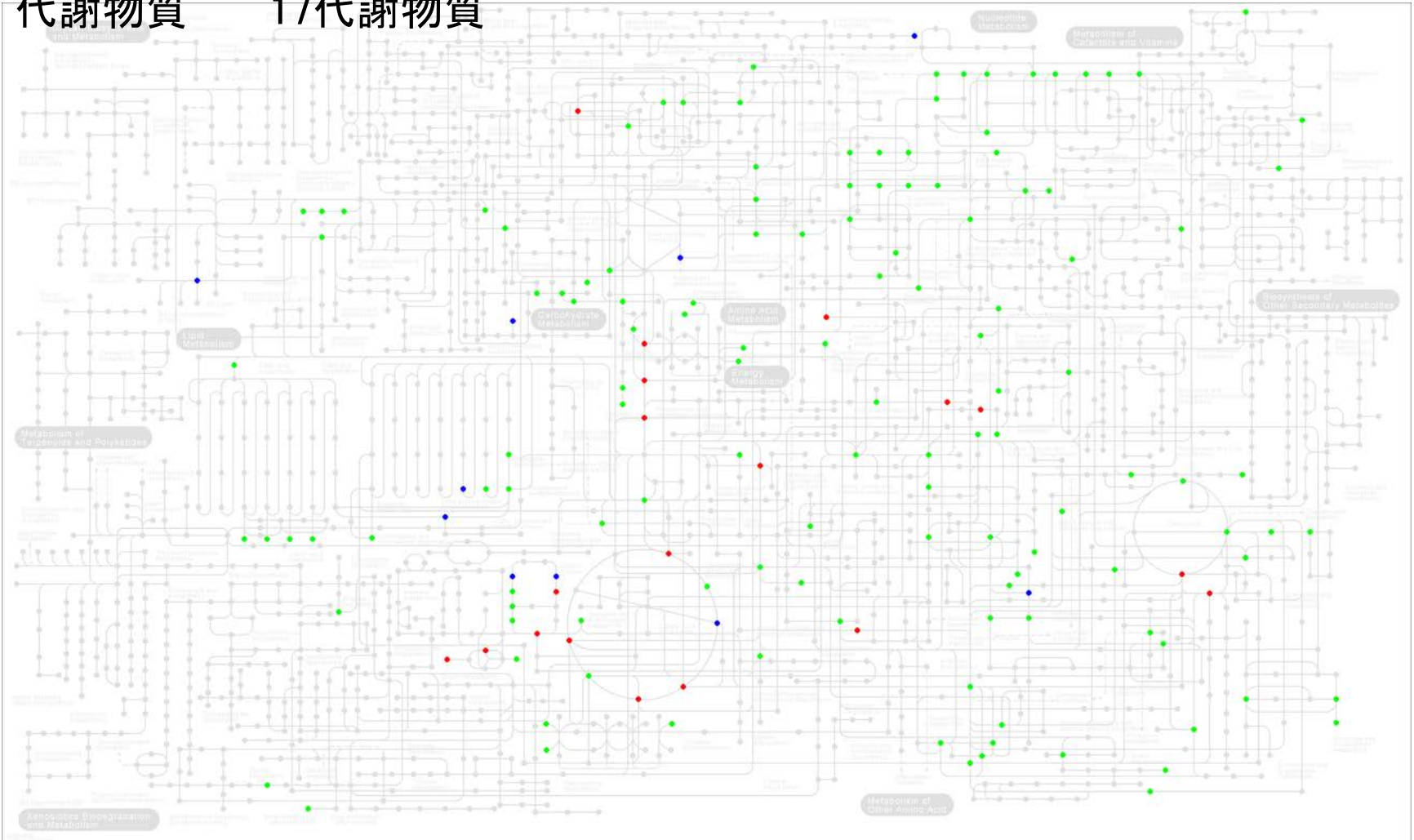
正解はこんな感じ

増加

減少

27 代謝物質

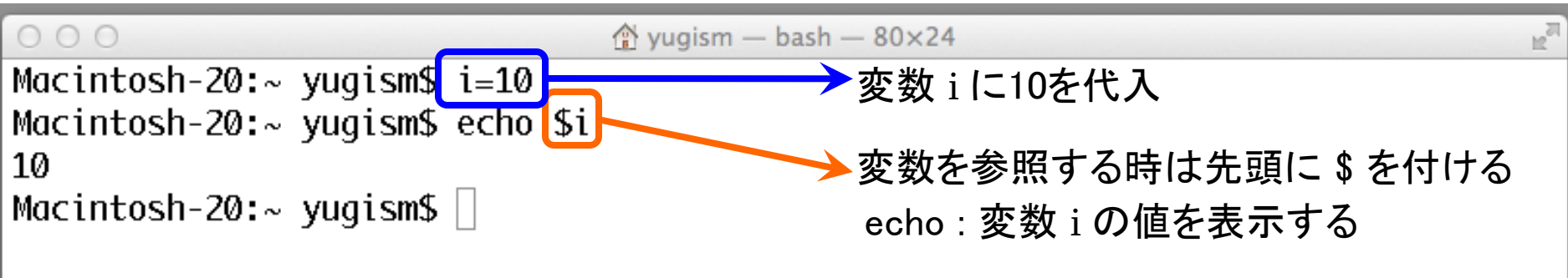
17代謝物質



UNIX課題6: 変数

UNIXシェルの変数

- MATLAB同様、データを一時格納する箱



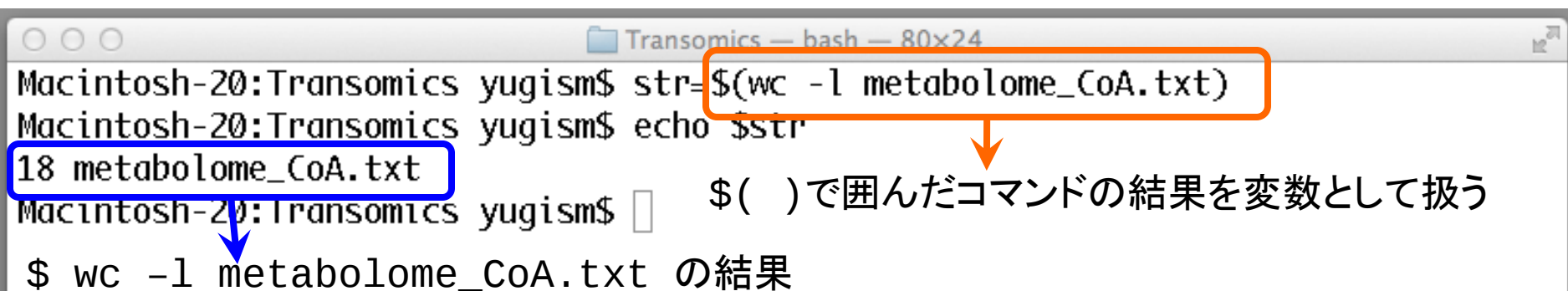
A terminal window titled 'yugism — bash — 80x24' showing the following commands and output:

```
Macintosh-20:~ yugism$ i=10
Macintosh-20:~ yugism$ echo $i
10
Macintosh-20:~ yugism$
```

Annotations:

- A blue box highlights `i=10` with an arrow pointing to the text: 変数 i に10を代入
- An orange box highlights `$i` with an arrow pointing to the text: 変数を参照する時は先頭に \$ を付ける
echo : 変数 i の値を表示する

- コマンドの結果も変数に格納できる



A terminal window titled 'Transomics — bash — 80x24' showing the following commands and output:

```
Macintosh-20:Transomics yugism$ str=$(wc -l metabolome_CoA.txt)
Macintosh-20:Transomics yugism$ echo $str
18 metabolome_CoA.txt
Macintosh-20:Transomics yugism$
```

Annotations:

- An orange box highlights `str=$(wc -l metabolome_CoA.txt)` with an arrow pointing to the text: \$() で囲んだコマンドの結果を変数として扱う
- A blue box highlights `18 metabolome_CoA.txt` with an arrow pointing to the text: \$ wc -l metabolome_CoA.txt の結果

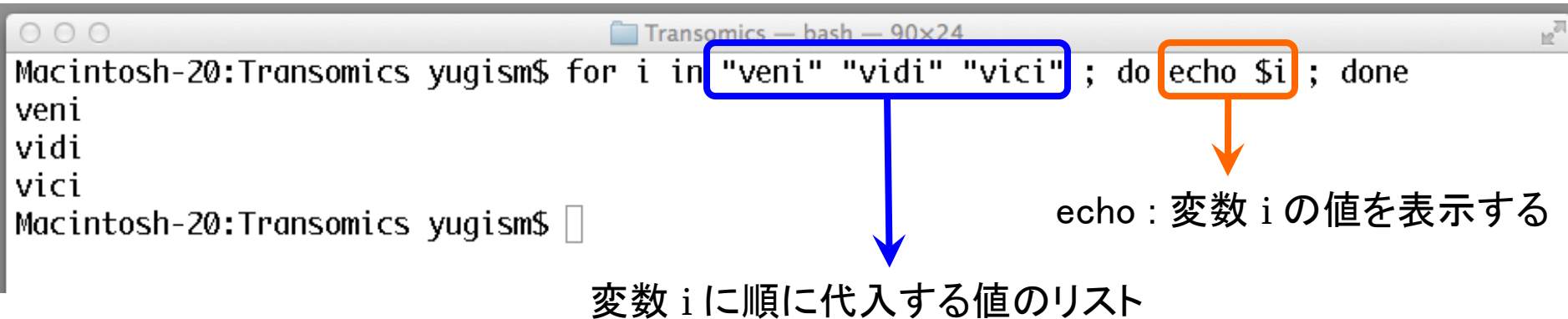
- 課題集PDFのUNIX課題6をやってみる

UNIX課題7: for

for文

- UNIXシェルのfor文の基本型

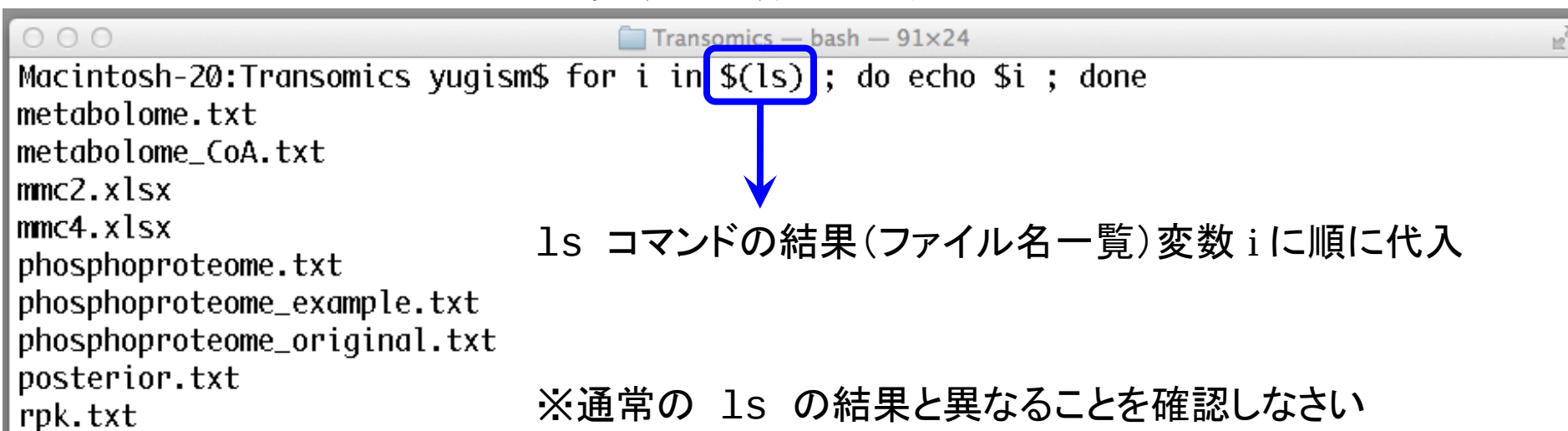
– for i in (iリスト); do (コマンド1); (コマンド2); done



Macintosh-20:Transomics yugism\$ for i in "veni" "vidi" "vici"; do echo \$i; done
veni
vidi
vici
Macintosh-20:Transomics yugism\$

変数 i に順に代入する値のリスト

echo: 変数 i の値を表示する



Macintosh-20:Transomics yugism\$ for i in \$(ls); do echo \$i; done
metabolome.txt
metabolome_CoA.txt
mmc2.xlsx
mmc4.xlsx
phosphoproteome.txt
phosphoproteome_example.txt
phosphoproteome_original.txt
posterior.txt
rpk.txt

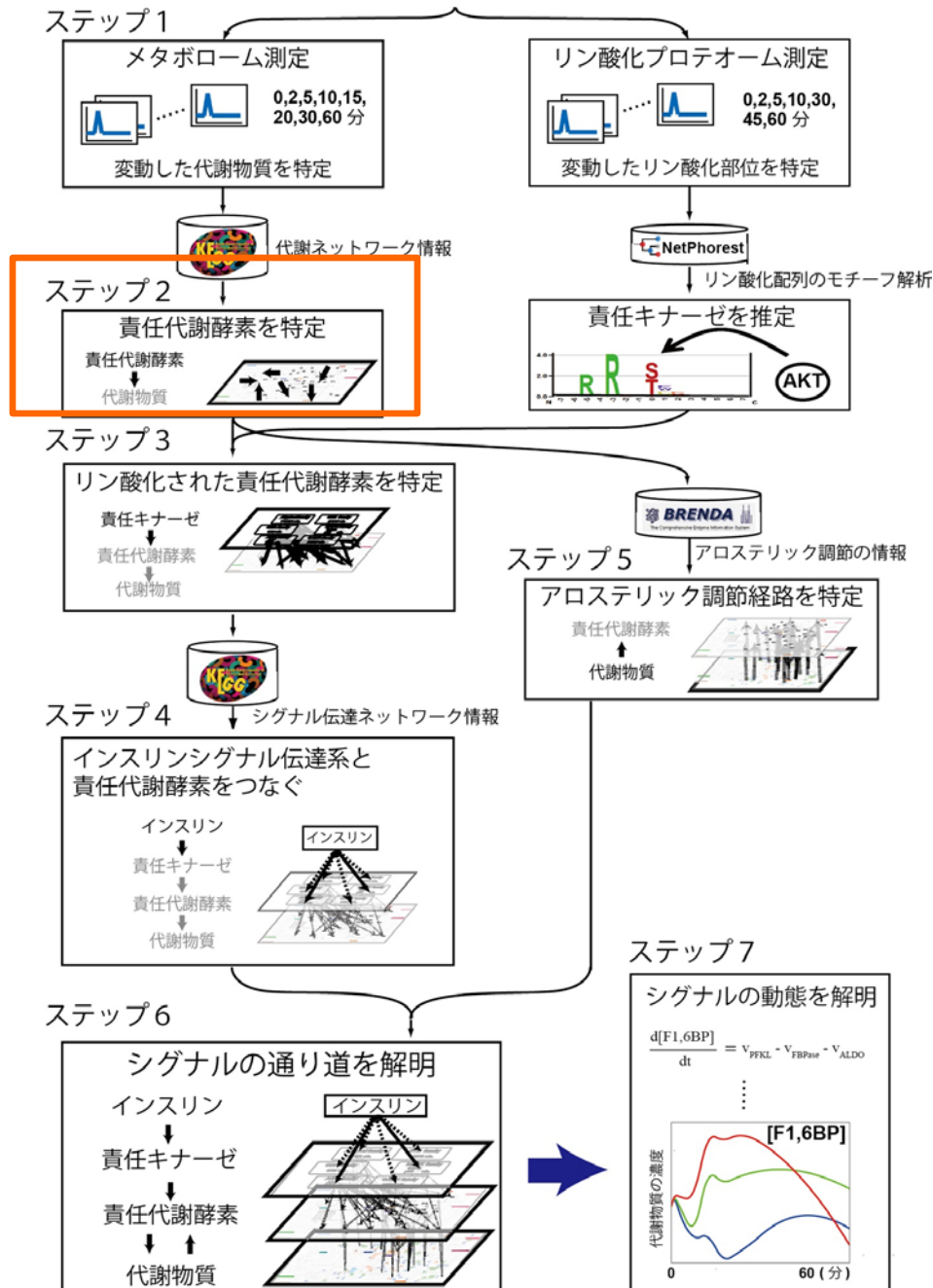
ls コマンドの結果(ファイル名一覧)変数 i に順に代入

※通常の ls の結果と異なることを確認しなさい

トランスオミクス Step (ii): 演習

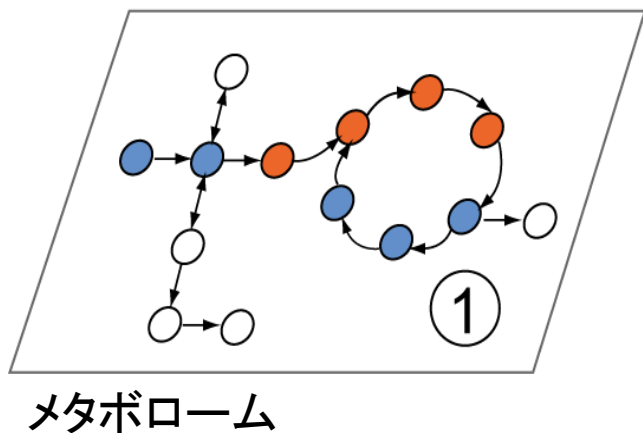
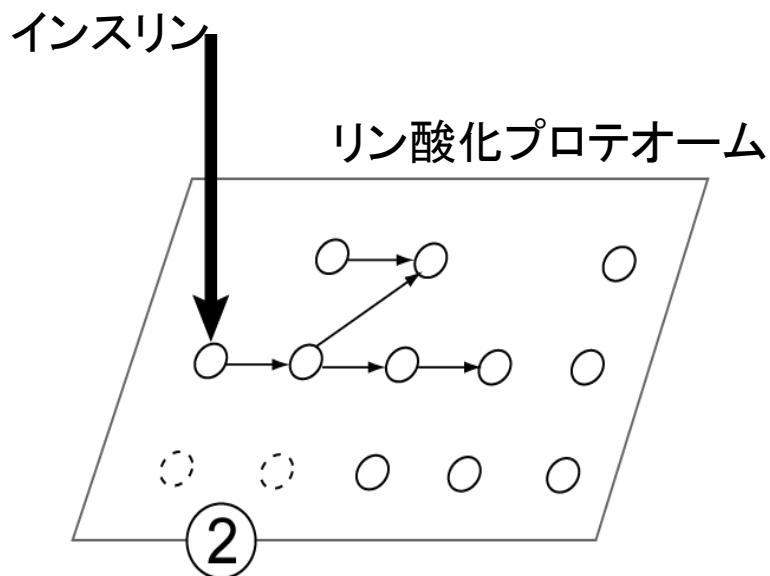
責任代謝酵素の同定

インスリンで刺激したラット肝がん由来Fao細胞



Yugi et al. (2014) Cell rep.

多階層ネットワークのアンバイアスな再構築法



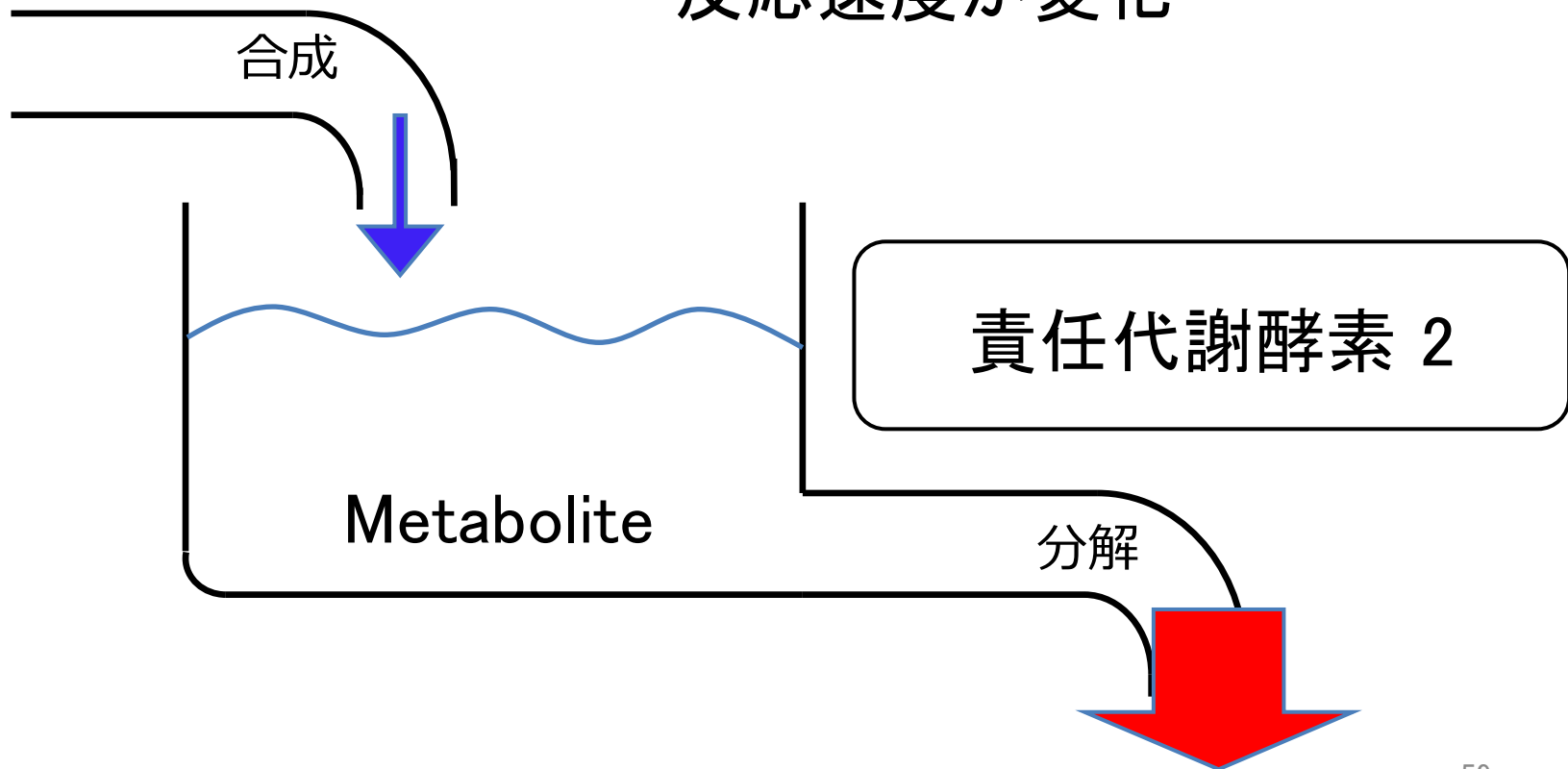
2. 責任代謝酵素の同定

1. 変動した代謝物の同定

Q.代謝物の変動を起こした原因は何か?

責任代謝酵素 1

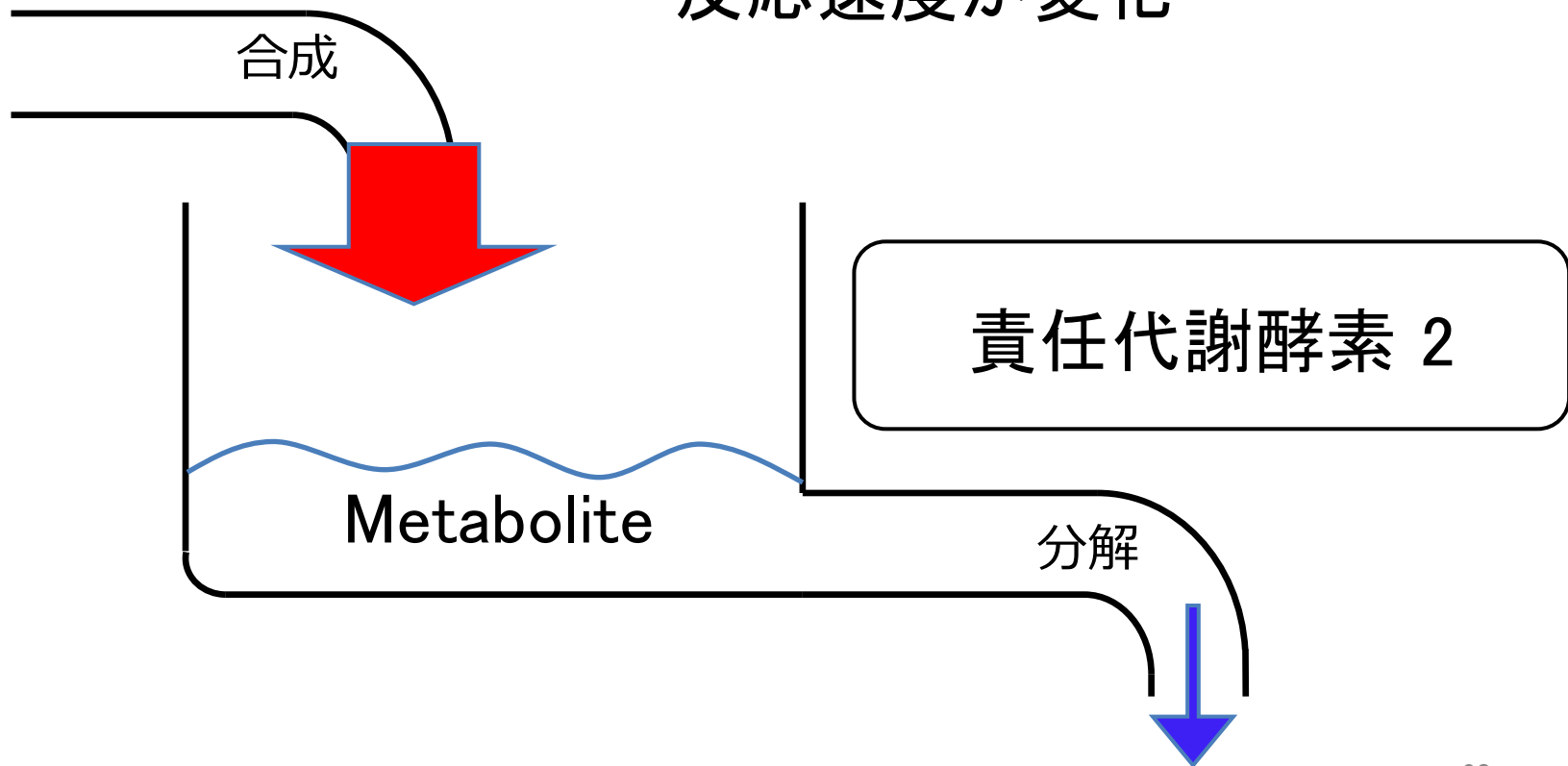
A. 責任代謝酵素の
反応速度が変化



Q.代謝物の変動を起こした原因は何か?

責任代謝酵素 1

A. 責任代謝酵素の
反応速度が変化



正解はこんな感じ

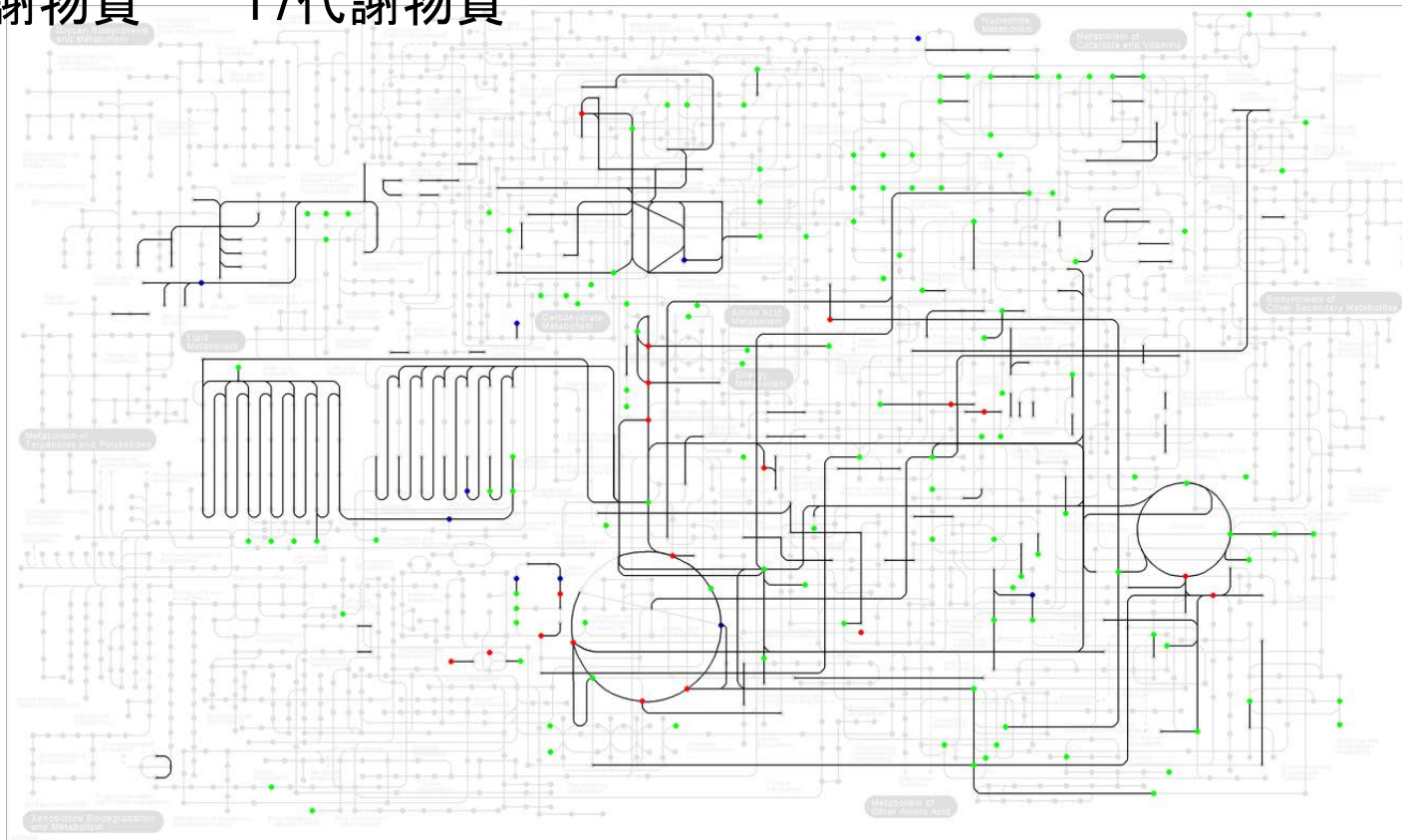
●——● 198個の責任代謝酵素

増加

減少

27 代謝物質

17代謝物質



予備スライド

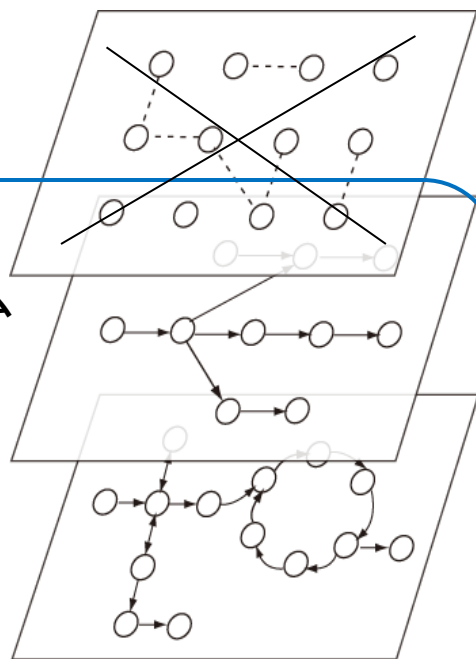
短期のインスリン作用(<1hr)は 2つのオミクス階層で説明できる

同一条件のラット肝がん由来
Fao 細胞からサンプル調製

トランスクリプトーム

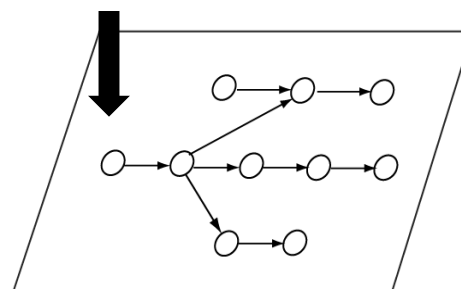
リン酸化
プロテオーム
(中山先生
・松本先生)

メタボローム
(曾我先生
・池田先生)

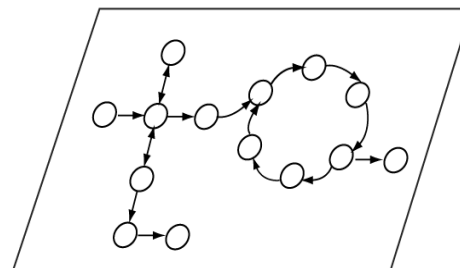


< 1 hr

インスリン



シグナル伝達
(リン酸化プロテオーム)



代謝系 (メタボローム)

サンプル調製

- ラット肝がん由来 Fao 細胞
- 10 cm dishes
- RPMI1640 培地を交換するタイミング
 - (1) -4hr
 - (2) -2hr
 - (3) Time zero ← インスリンを培地に滴下

リン酸化プロテオーム

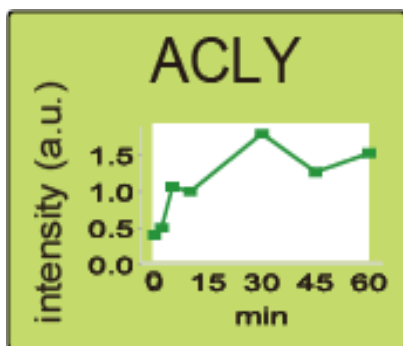
- 計測

- iTRAQ
- nanoLC-MS/MS



中山敬一先生(九大) 松本雅記先生(九大)

- データ概要



Seven time points

0, 2, 5, 10, 30, 45, 60 min

インスリン 1 dose (1 nM)

7929個のリン酸化ペプチド (IPI)

メタボローム・リピドーム

- 計測

- CE-TOFMS
- LC-MS/MS



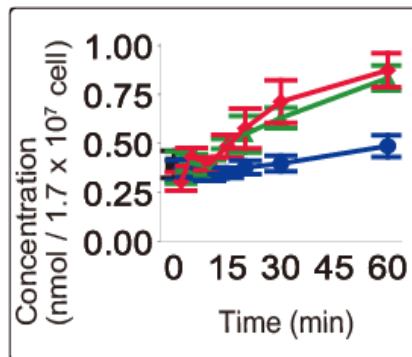
曽我朋義先生(慶大)



池田和貴先生(理研)

- データ概要

Citrate (クエン酸)



Eight time points

0, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 60 min

インスリン 3 doses (0.01, 1, 100 nM)

代謝物 304 個 ([KEGG Comound ID](#))