

実習7日目:トランスオミクス解析(2) 多階層代謝制御ネットワークの再構築

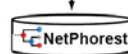
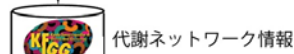
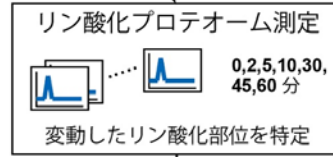
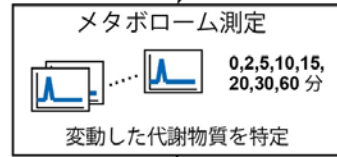
小鍛治 俊也

トランスオミクスStep (iii): 演習

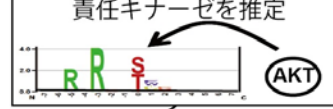
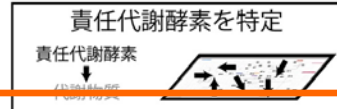
リン酸化された責任代謝酵素を同定する

インスリンで刺激したラット肝がん由来Fao細胞

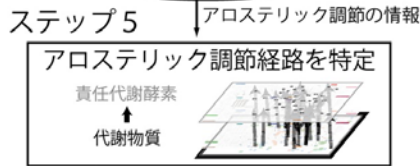
ステップ1



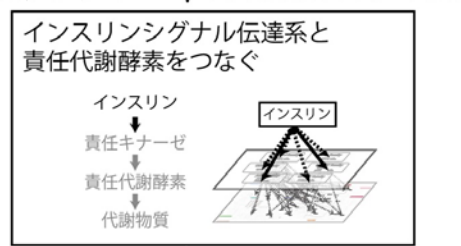
ステップ2



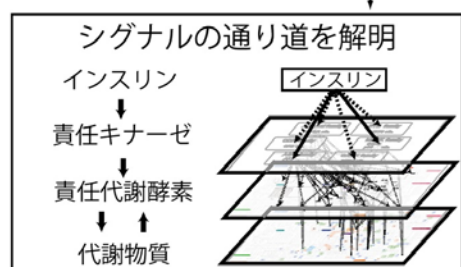
ステップ3



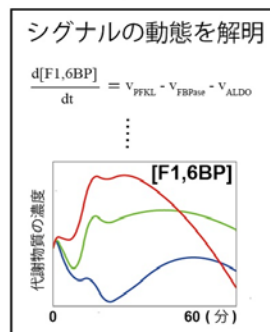
ステップ4



ステップ6



ステップ7



Yugi et al. (2014) Cell rep.

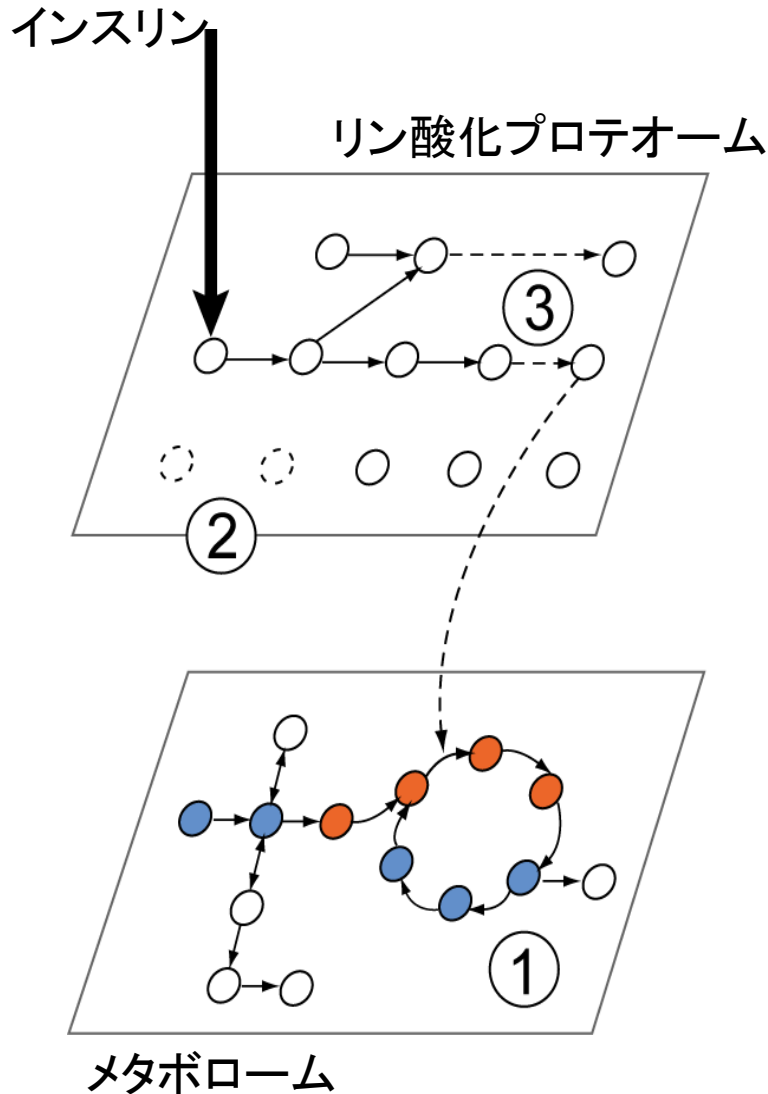
責任代謝酵素の反応速度を変える因子は？

1. 代謝酵素のリン酸化

2. アロステリック調節

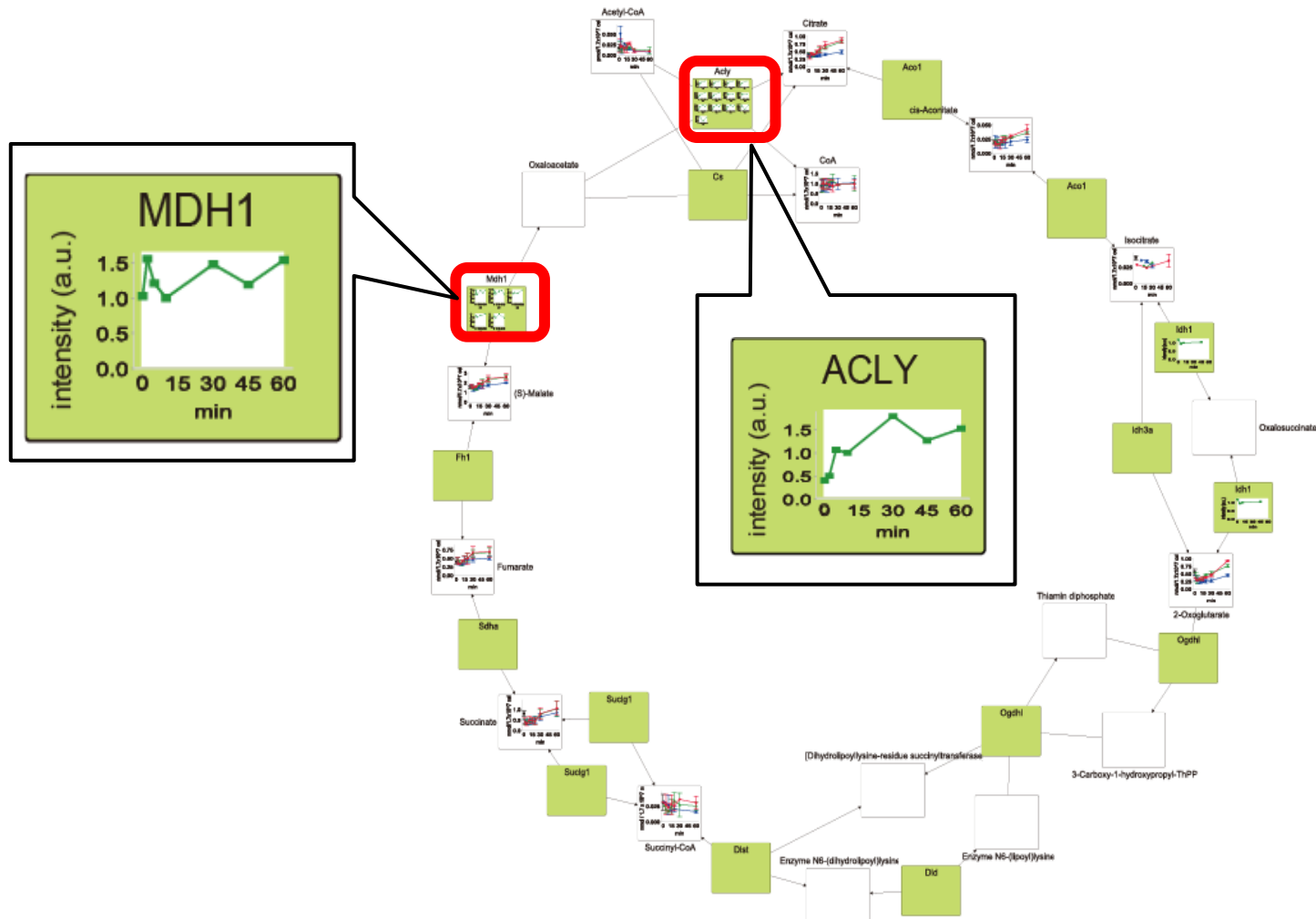
3. 遺伝子発現

多階層ネットワークのアンバイアスな再構築法



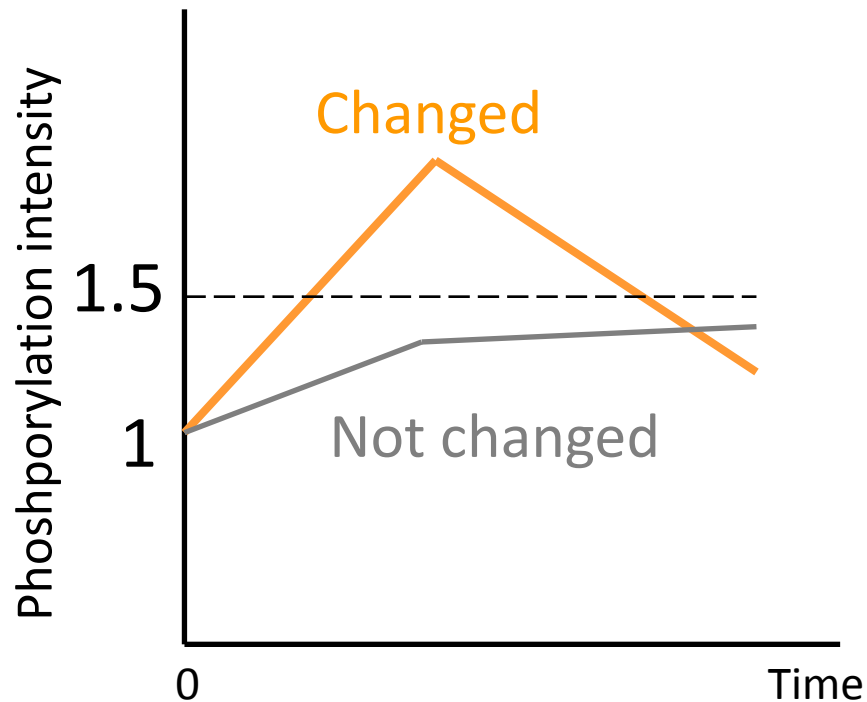
3. リン酸化された責任代謝 酵素の同定
2. 責任代謝酵素の同定
1. 変動した代謝物の同定

責任代謝酵素のリン酸化 (>1.5 倍)

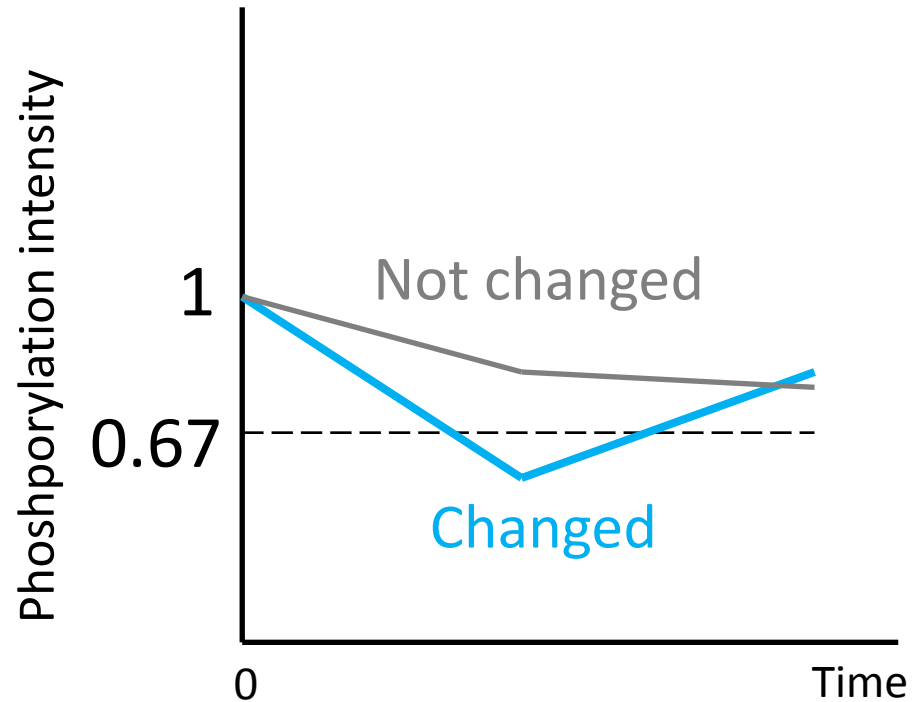


「有意に変動したリン酸化」の基準

- 0分時点比1.5倍以上

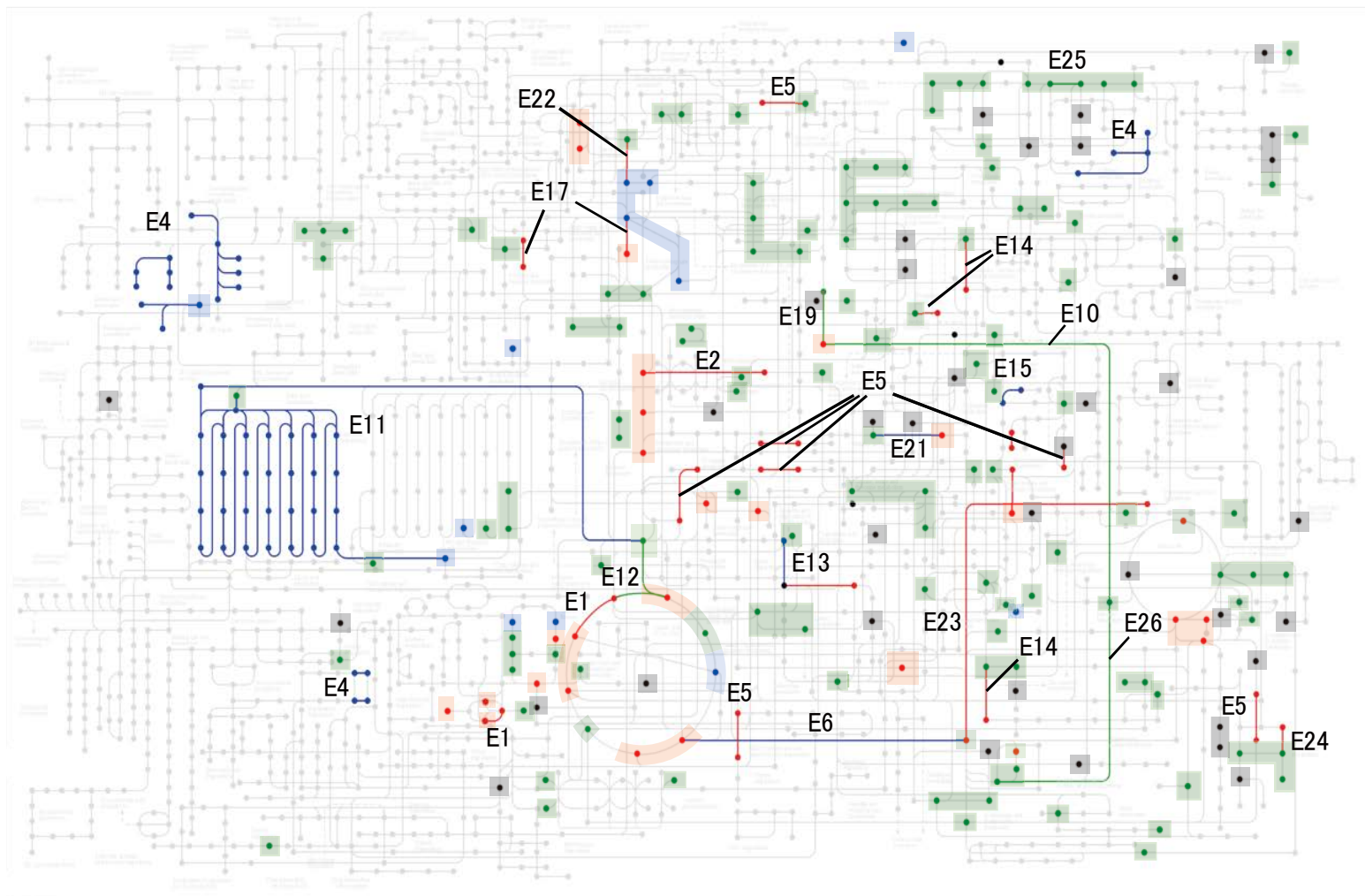


- 0分時点比2/3倍以下



インスリンによってリン酸化される 責任代謝酵素

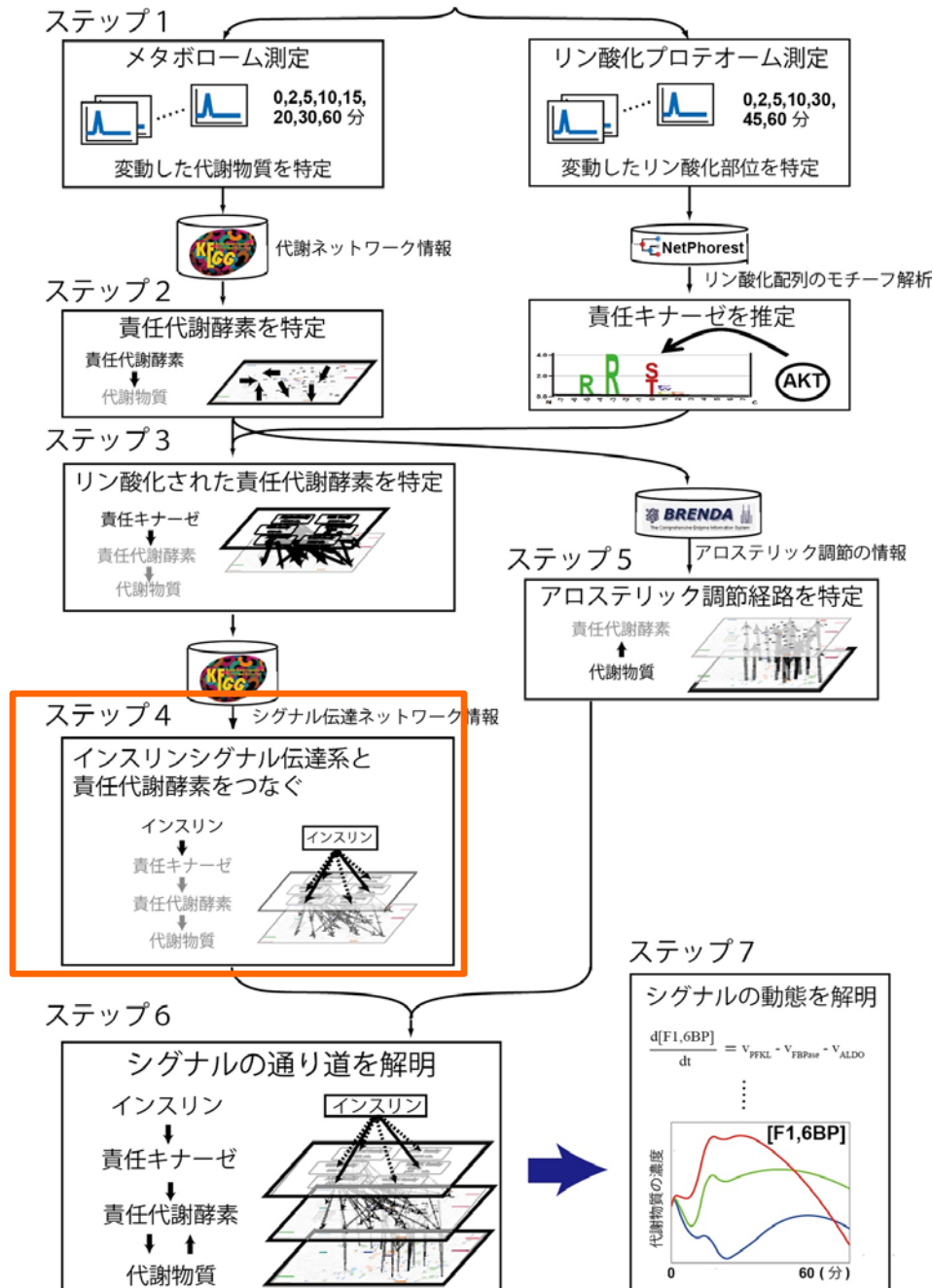
- — ● 26個のリン酸化された責任代謝酵素
- — ● Increased ● — ● Decreased ● — ● Increased and decreased



トランスオミクスStep (iv): 演習

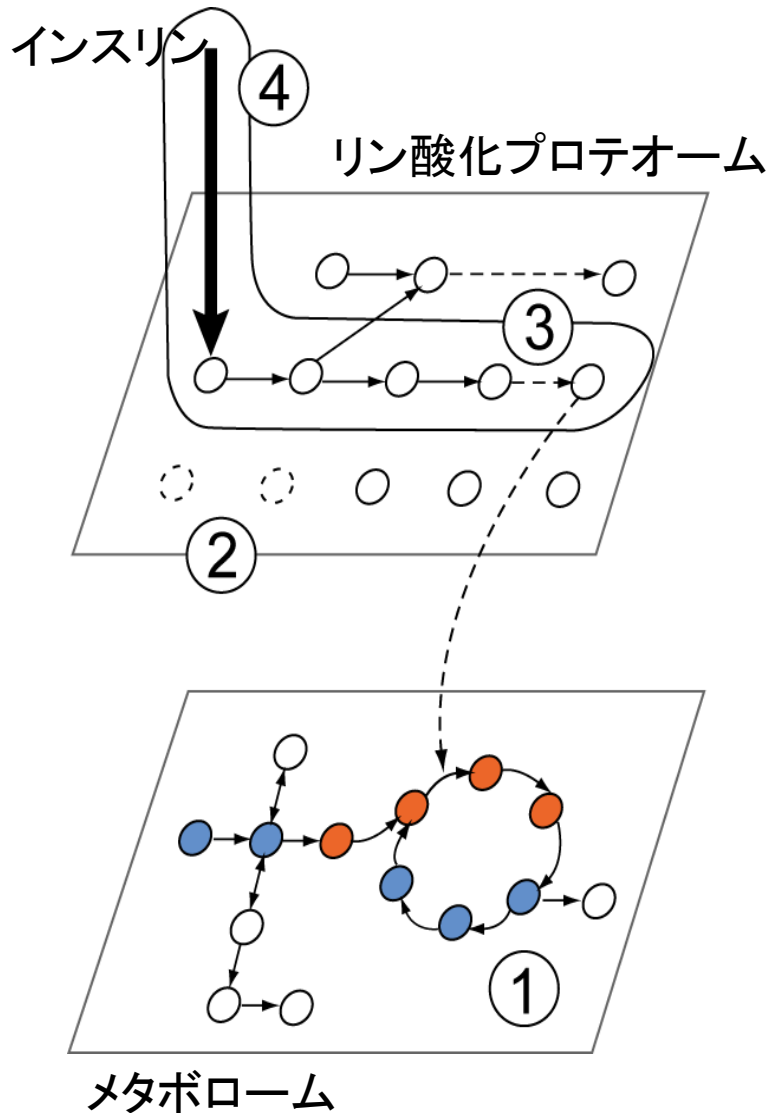
責任キナーゼの推定

インスリンで刺激したラット肝がん由来Fao細胞



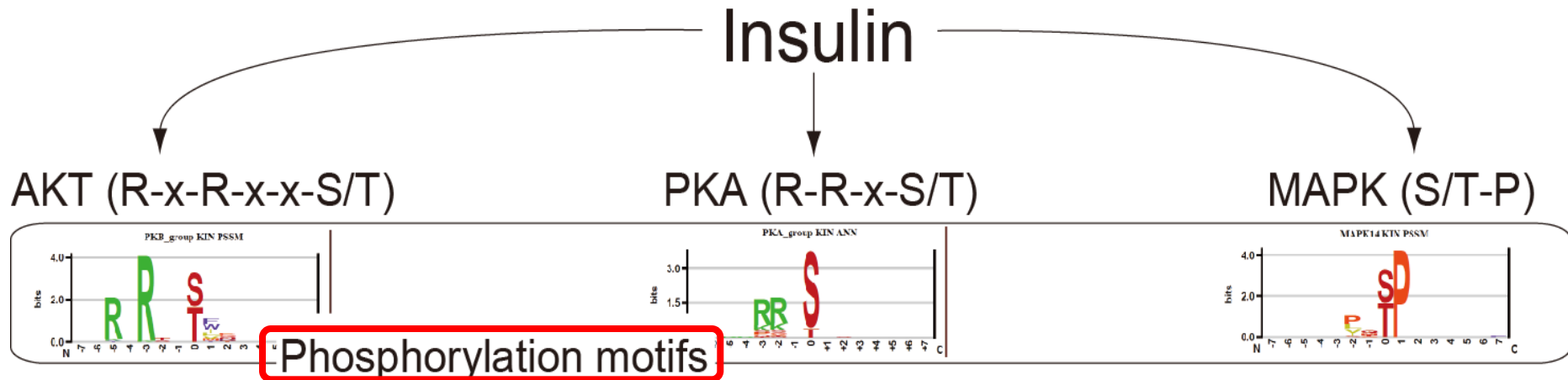
Yugi et al. (2014) Cell rep.

多階層ネットワークのアンバイアスな再構築法

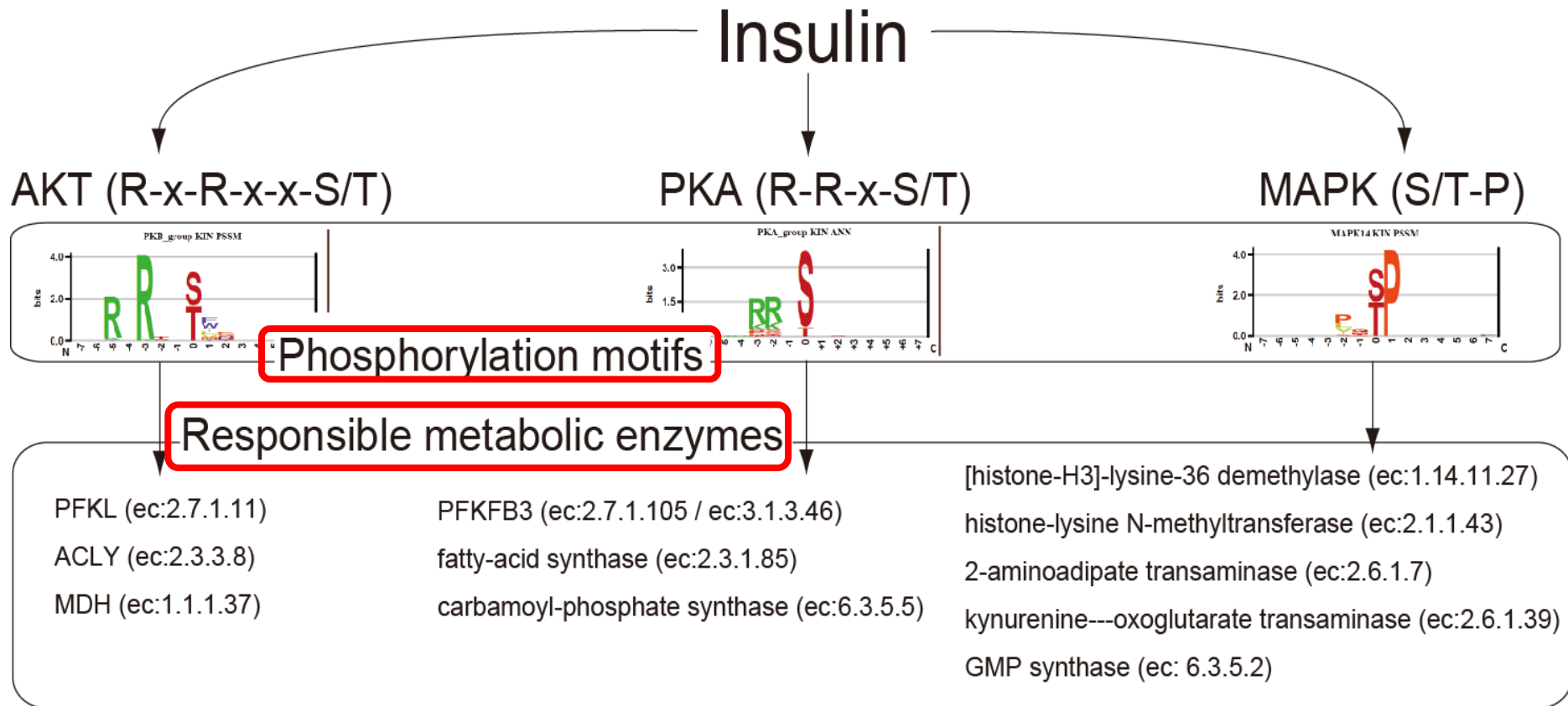


4. **インスリンシグナル伝達と責任代謝酵素をつなぐ**
3. リン酸化された責任代謝 酵素の同定
2. 責任代謝酵素の同定
1. 変動した代謝物の同定

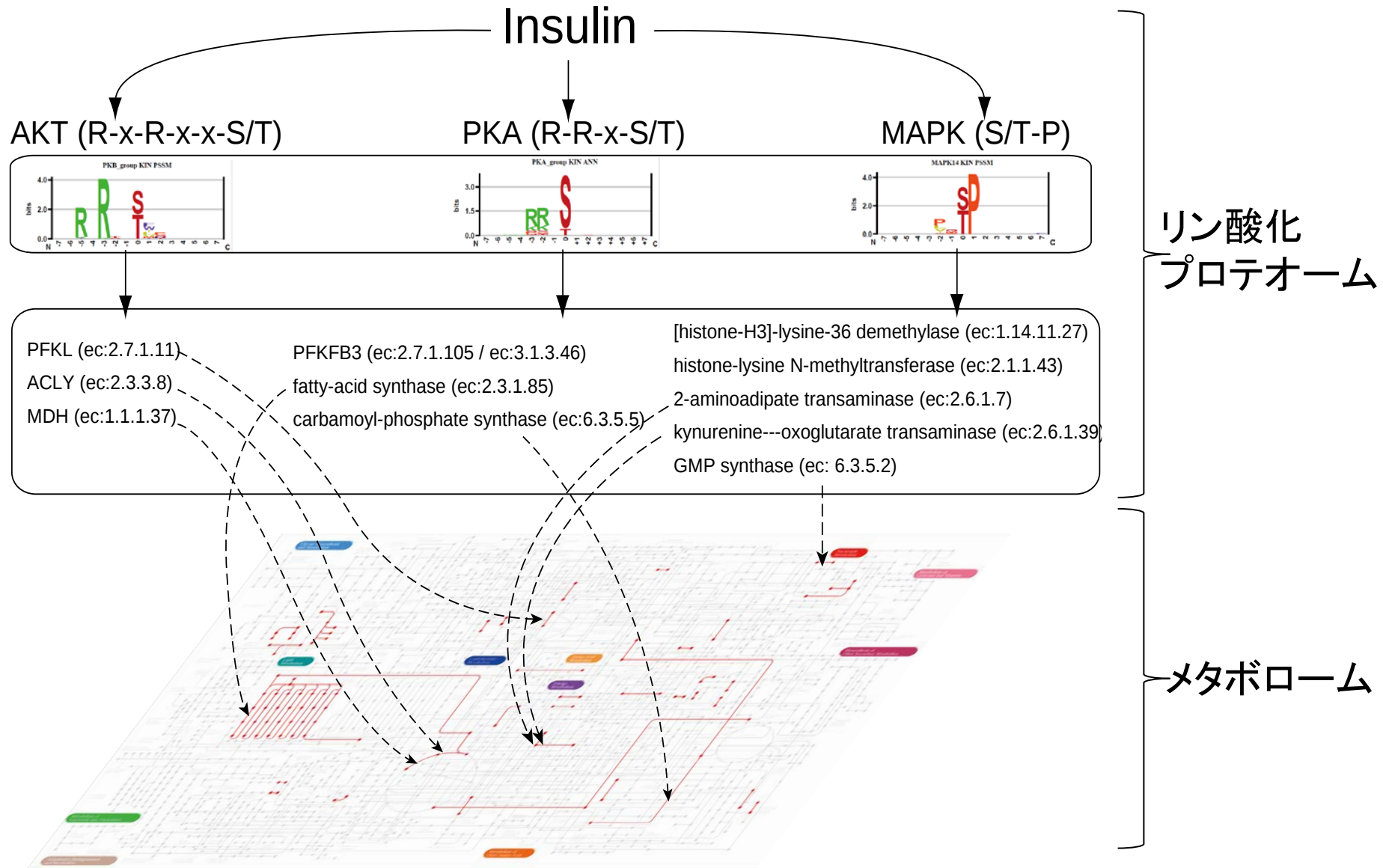
リン酸化モチーフ配列により インスリンと責任代謝酵素をつなぐ



リン酸化モチーフ配列により インスリンと責任代謝酵素をつなぐ



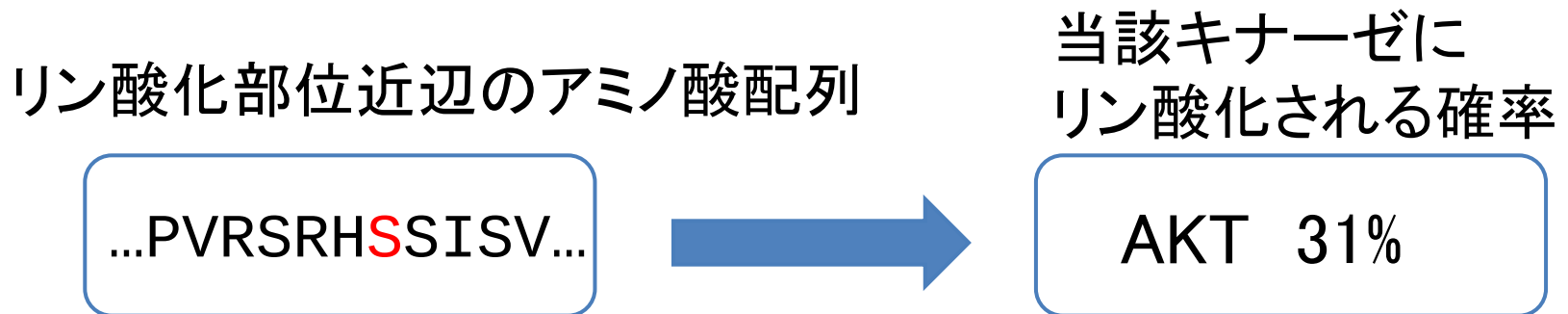
再構築された多階層ネットワーク



NetPhorest (Miller et al. 2008) を用いて責任kinaseを予測

責任キナーゼの推定

- NetPhorest (Miller et al. 2008)
 - リン酸化配列モチーフのPSSM、ANNに基づく
- 入力と出力



「この程度の配列相同度の場合、
AKTが責任キナーゼである確率は31%」

NetPhorestの入力画面

The screenshot shows the NetPhorest 2.0 web interface. The browser address bar shows 'netphorest.info'. The page has a yellow header with the NetPhorest logo, a 'switch to NetworkKIN' button, and navigation links: Home, Download, Help, and About.

Below the header, there is a section titled 'Set your organism' with a dropdown menu currently set to 'Human'. An orange arrow points from this dropdown to a text box containing 'Humanを選択' (Select Human).

Below this, instructions are provided: 'Paste sequences (FASTA format) or protein names (one per line) below. (For protein names, HGNC symbol is recommended.)' and 'In case you have more than 100 sequences, please consider using the [high throughput workflow](#).' An example is given: 'Example: [#1](#), [#2](#), [#3](#)'.

A large text area is provided for pasting sequences. An orange box highlights this area, and a text box inside it says 'ここにFASTA形式のアミノ酸配列をペースト' (Paste the amino acid sequence in FASTA format here).

At the bottom, there is a button labeled 'Select Phosphosites'. An orange arrow points from this button to a text box containing 'このボタンを最後にクリック' (Click this button at the end).

配列相同度の順に候補タンパク質が表示される

NetPhorest 2.0

netphorest.info/selectEntities.shtml?id=21673300174066569317850694396

NetPhorest 2.0

NetPhorest switch to NetworkKIN

Home Download Help About

The submitted sequences mapped to multiple targets in ENSEMBL.
Please specify the right one.

Next

RAT_AKT

- ☒ AKT1 (98.00% 480AA) ⓘ
- ☐ AKT2 (81.00% 477AA) ⓘ
- ☐ AKT3 (82.00% 478AA) ⓘ

Next

配列相同度が最も高いタンパク質を選択

「リン酸化される可能性あり」と 予測された残基が赤く表示される

NetPhorest 2.0

netphorest.info/selectPhospho.shtml?id=2167330017406656931785069439

NetPhorest 2.0

NetPhorest switch to NetworKIN

Home Download Help About

Select min/max score 0.00 1.00

☐ High throughput experiments

☐ Low throughput experiments

☐ Load sites from file: ファイルを選択

Start Prediction

1 RAT_AKT ENSP00000270202

MNDVAIVKEG	WLHKRGEYIK	TWRPRYFLLK	NDGTFISYKE	RPQDVEQRES	PLNNFSVAQC	QLMKTERPRP	NTEIIRCLQW	80
TTVIERTFHV	ETPEEREET	TAIQTVDGL	KRCEETMDF	RSGPSDMSG	AEEMEVALAK	PKHRVTMNEF	EYLLKLGKGT	160
FGKVILVKEK	ATGRYYAMKI	LKKEVIVAKP	EVAHTLTENR	VLQNSRHPFL	TALKYSFQTH	DRLCFVMEYA	NGGELFFHLS	240
RERVFSEDRA	RFYGAEIVSA	LDYLHSEKNV	VYRDLKLENL	MLDKDGHKI	TDFGLCKEGI	KDGATMKTEC	GTPEYLAPEV	320
LEDNDYGRAV	DWWGLGVVMY	EMICGRLPFY	NQDHEKLFEL	ILMEEIRFPR	TLGPEAKSLL	SGLLKKOPTQ	RLGGGSEDAK	400
EIMQHRFFAN	IVWQDVYEK	LSPPFKPQVT	SETDTRYFDE	EFTAQMITIT	PPDQDDSMEC	VDSEKRPHPF	QFSYSASGTA	480
								560

実際にリン酸化された残基のリストを選択
(ipi.resnum.txt)

クリックして責任キナーゼを予測

リン酸化サイトごとに 責任キナーゼ名とスコアを表示

NetPhorest 2.0

netphorest.info/showPrediction.shtml?id=2167330017406656931785069439

NetPhorest 2.0

NetPhorest switch to NetworkKIN

Home Download Help About

Minimum score 0.10 Max. difference 0.20 ☒ KIN ☐ SH2 ☐ PTP ☐ PTB ☐ 14-3-3 ☐ BRCT ☐ WW ☐ WD40 Max. # of Predictions 7 Real time filter for results ☒ save Update

RAT_AKT

T21	Kinase	PKC group	0.33	GEYIKTWRPRY
		MST group	0.19	GEYIKTWRPRY
		MSN group	0.18	GEYIKTWRPRY
		YSK group	0.17	GEYIKTWRPRY
		SLK group	0.14	GEYIKTWRPRY
T34	Kinase	PKC group	0.18	LKNDGTFIGYK
		GRK group	0.12	LKNDGTFIGYK
		PKD group	0.11	LKNDGTFIGYK
		DAPK group	0.11	LKNDGTFIGYK
		CK1 group	0.10	LKNDGTFIGYK
		ACT2/2B TGFbR2 group	0.10	LKNDGTFIGYK
S50	Kinase	p38 group	0.15	VEQRESPLNNF
		DMPK group	0.12	VEQRESPLNNF

残基番号

責任キナーゼ名

スコア(確率)

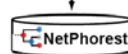
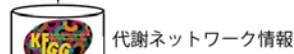
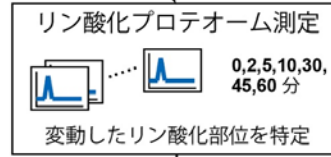
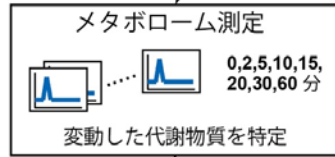
‘KIN’のみ選択

トランスオミクスStep (v)

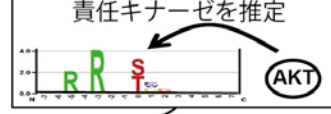
シグナル伝達経路と代謝経路を視覚化する

インスリンで刺激したラット肝がん由来Fao細胞

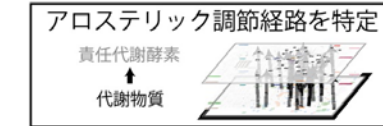
ステップ1



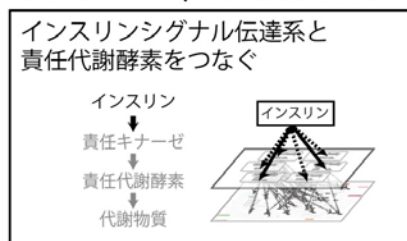
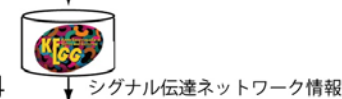
ステップ2



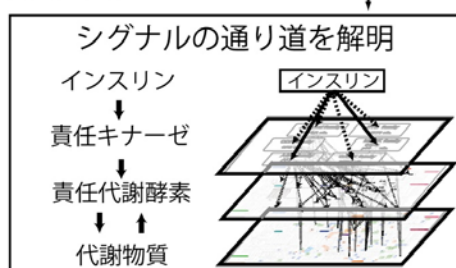
ステップ3



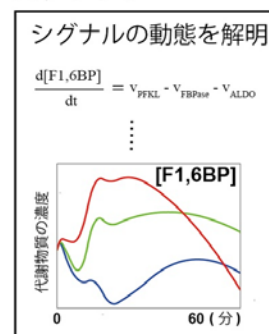
ステップ4



ステップ6



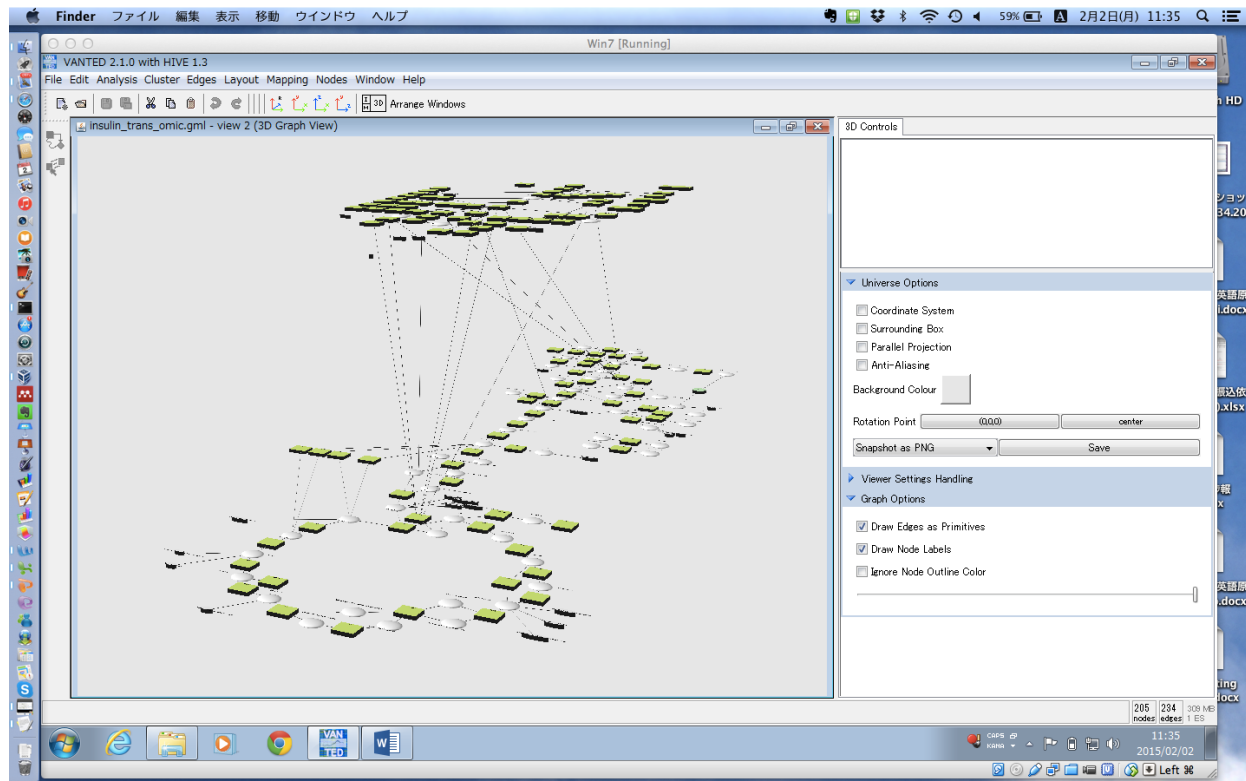
ステップ7



Yugi et al. (2014) Cell rep.

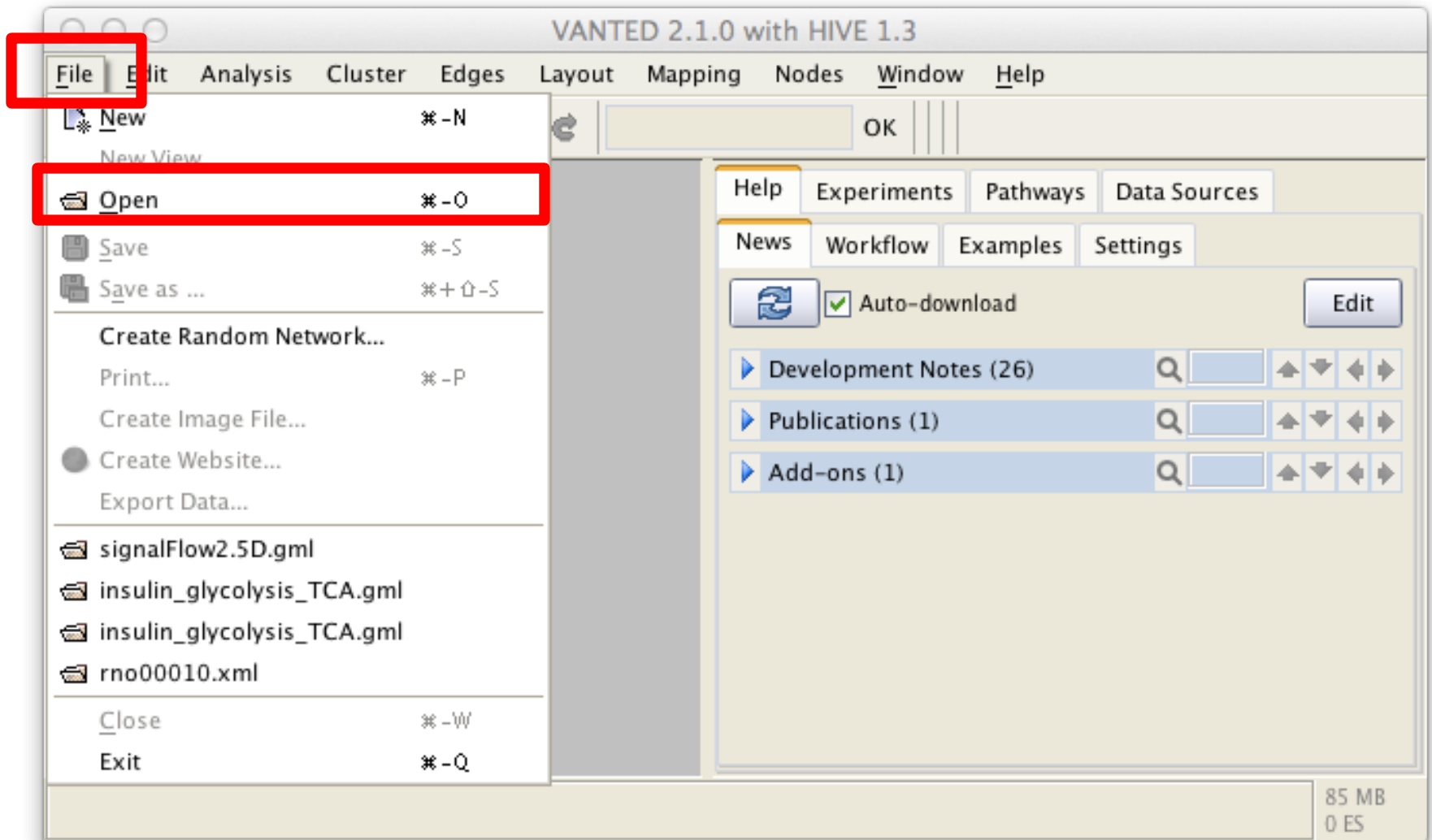
この実習のゴール

- マルチオミクスデータから多階層ネットワークを再構築する



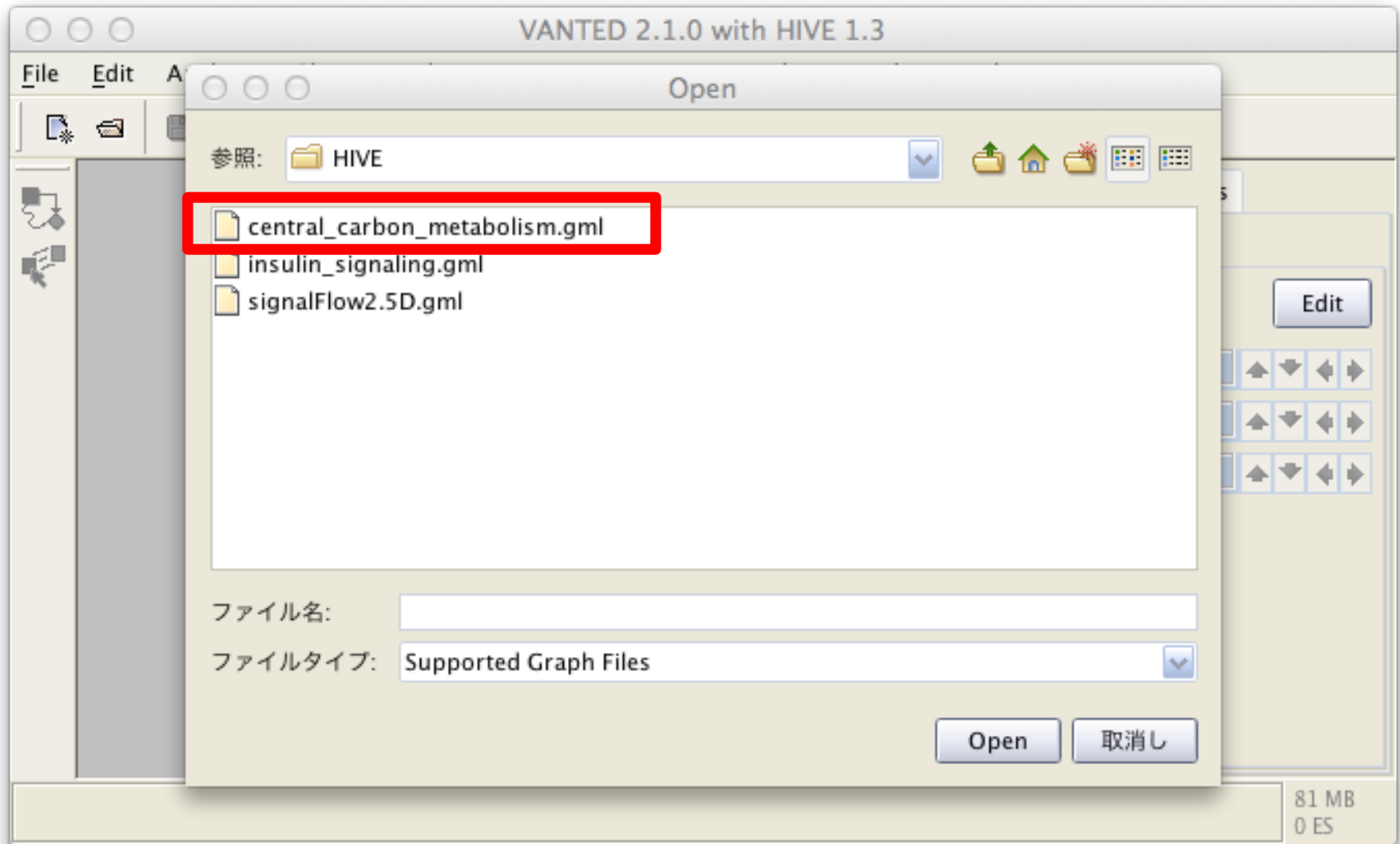
マップのファイルの開き方

- まずは File → Open



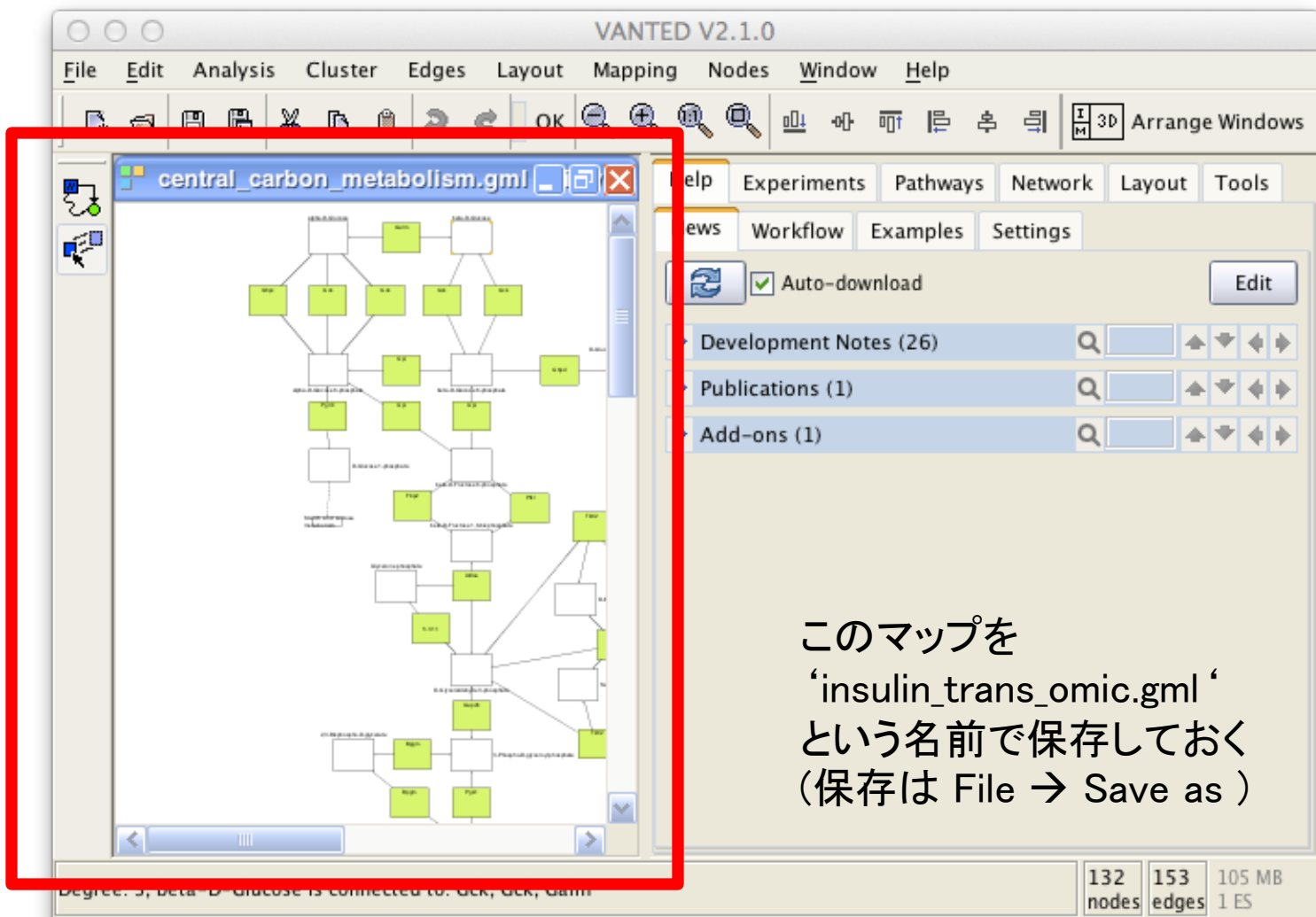
ファイルを選択する

- ‘inssigpath_ccm.gml’ を選ぶ



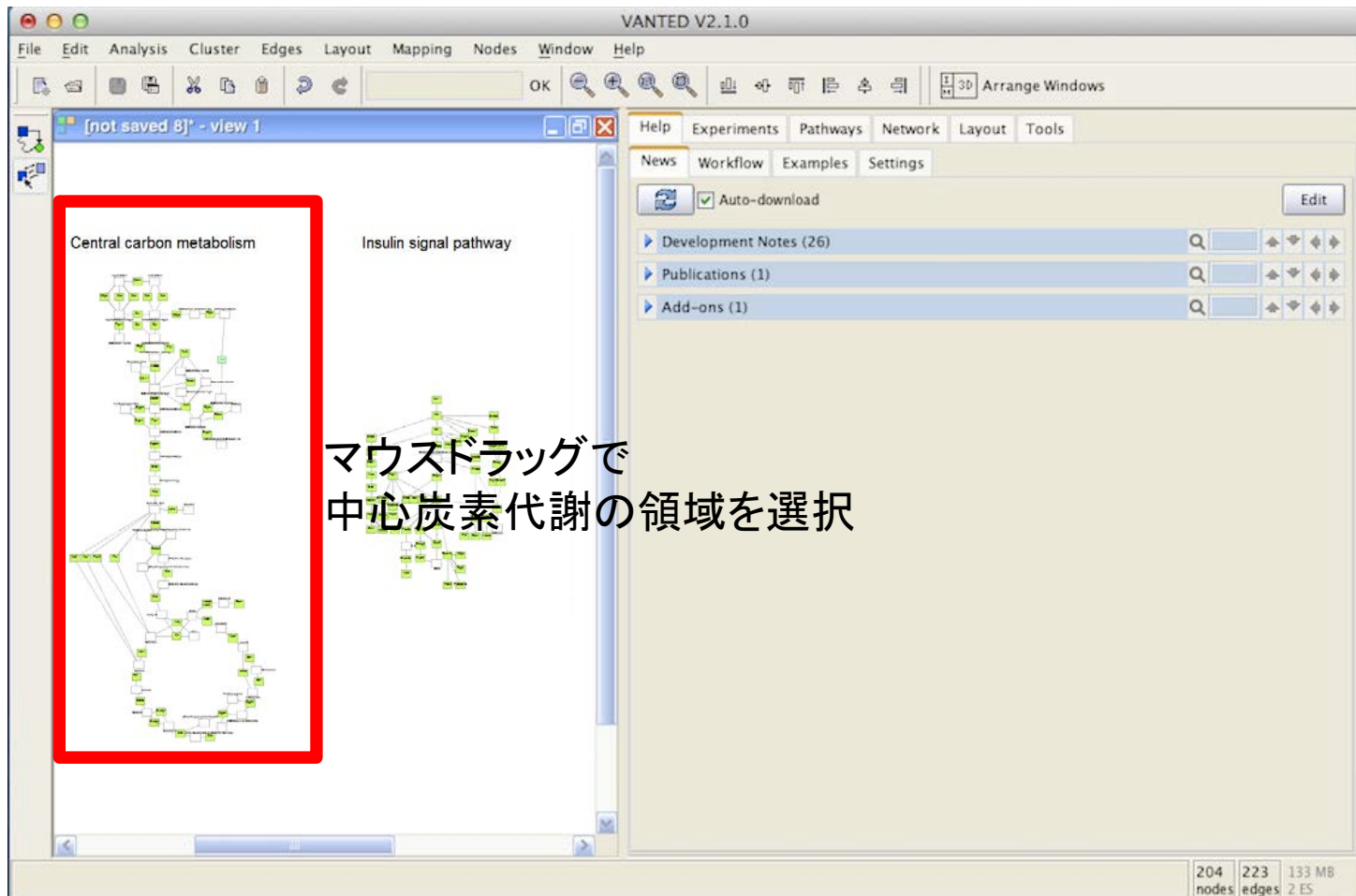
マップが表示される

- 中ボタンまたは2本指スワイプでズーム調節



左の代謝経路にCluster ID入力

- マウスで選択したら Cluster → Enter cluster ID
 - Cluster ID は 'signaling' とする



左の代謝経路にCluster ID入力

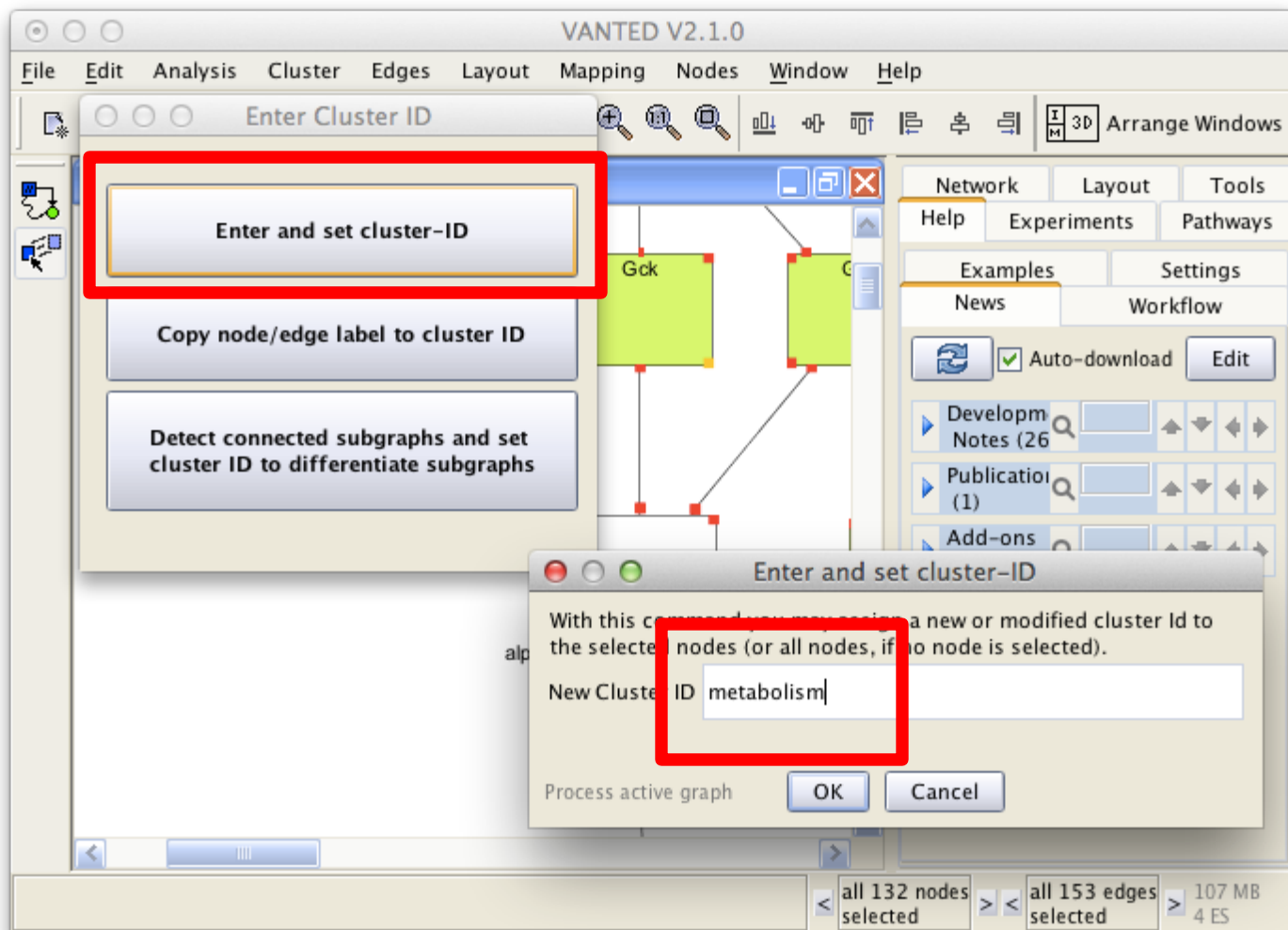
- ひとまとまりの経路に与えられるID

The screenshot displays the VANTED V2.1.0 software interface. The main window shows a metabolic pathway diagram with several green rectangular nodes and connecting lines. The nodes are labeled 'Gbp', 'Gck', 'alpha-D-Glucose 6-phosphate', and 'Pgm1'. A red rectangle highlights the 'Cluster' menu, which is open, showing options: 'Color Clusters', 'Enter Cluster ID', 'Layout Subgraphs', and 'Process Overview-Graph...'. The 'Enter Cluster ID' option is highlighted. On the right side, there is a sidebar with tabs for 'Network', 'Layout', and 'Tools'. The 'Network' tab is active, showing a list of 'Examples' (Developm, Notes (26), Publication (1), Add-ons (1)) and a search bar. Below the sidebar, there is a status bar showing 'all 132 nodes selected', 'all 153 edges selected', and '116 MB 4 ES'.

マウスドラッグで
中心単体者領域を選択

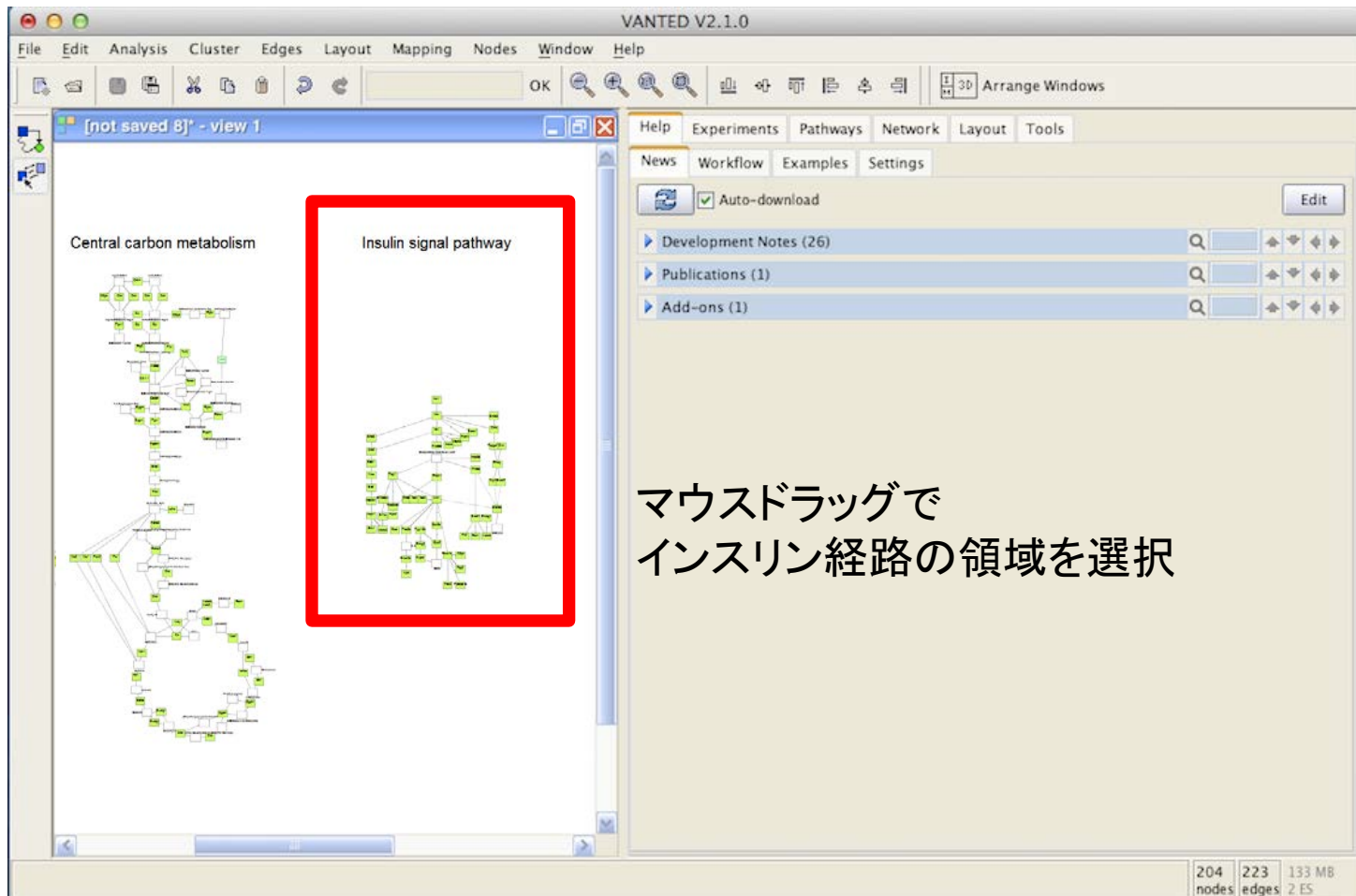
Cluster ID の指定

- ‘Enter and set cluster-ID ‘ をクリックする
- 出てきたダイアログにcluster ID入力（‘metabolism’）



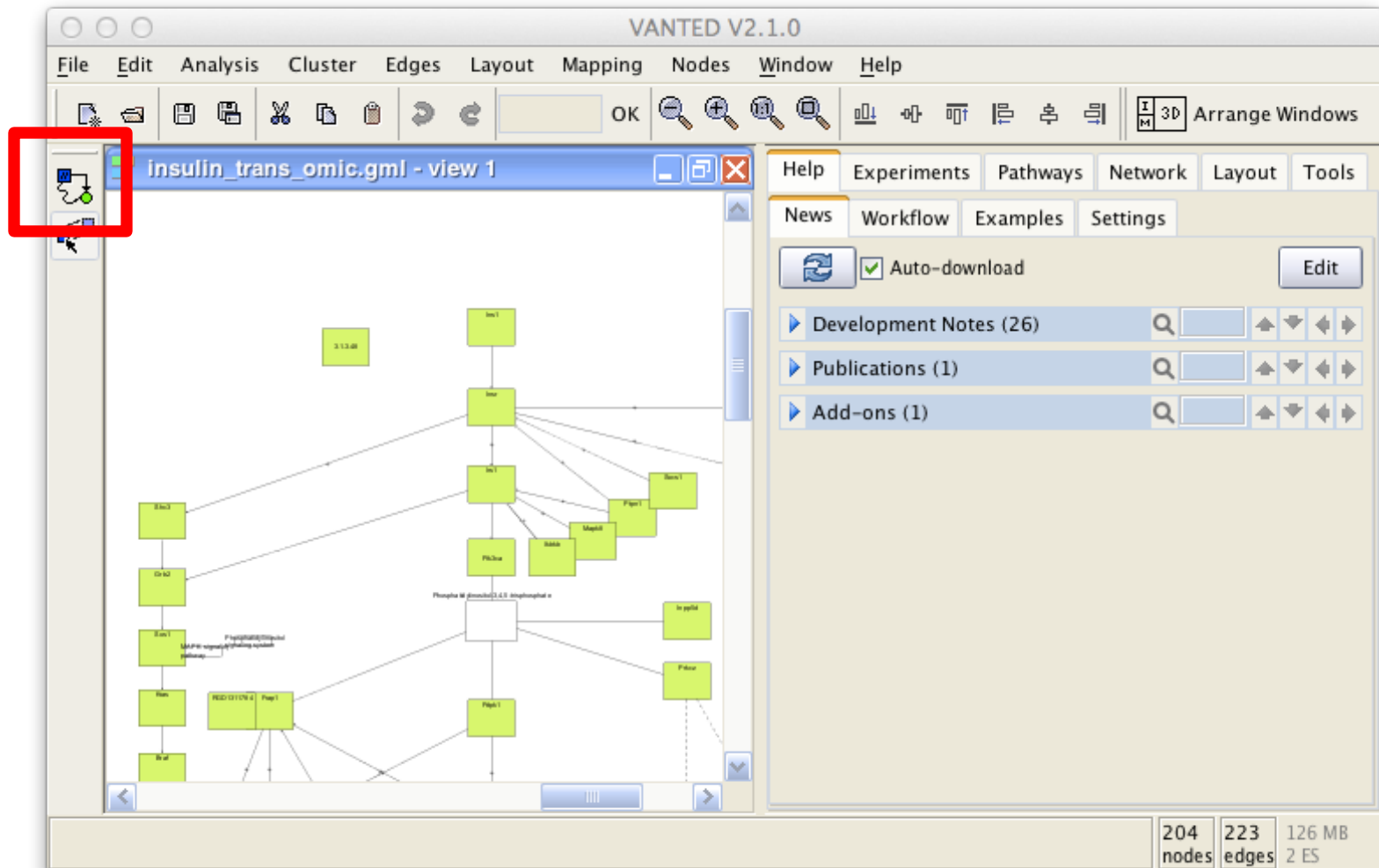
右のインスリン経路にCluster ID入力

- マウスで選択したら Cluster → Enter cluster ID
 - Cluster ID は 'signaling' とする



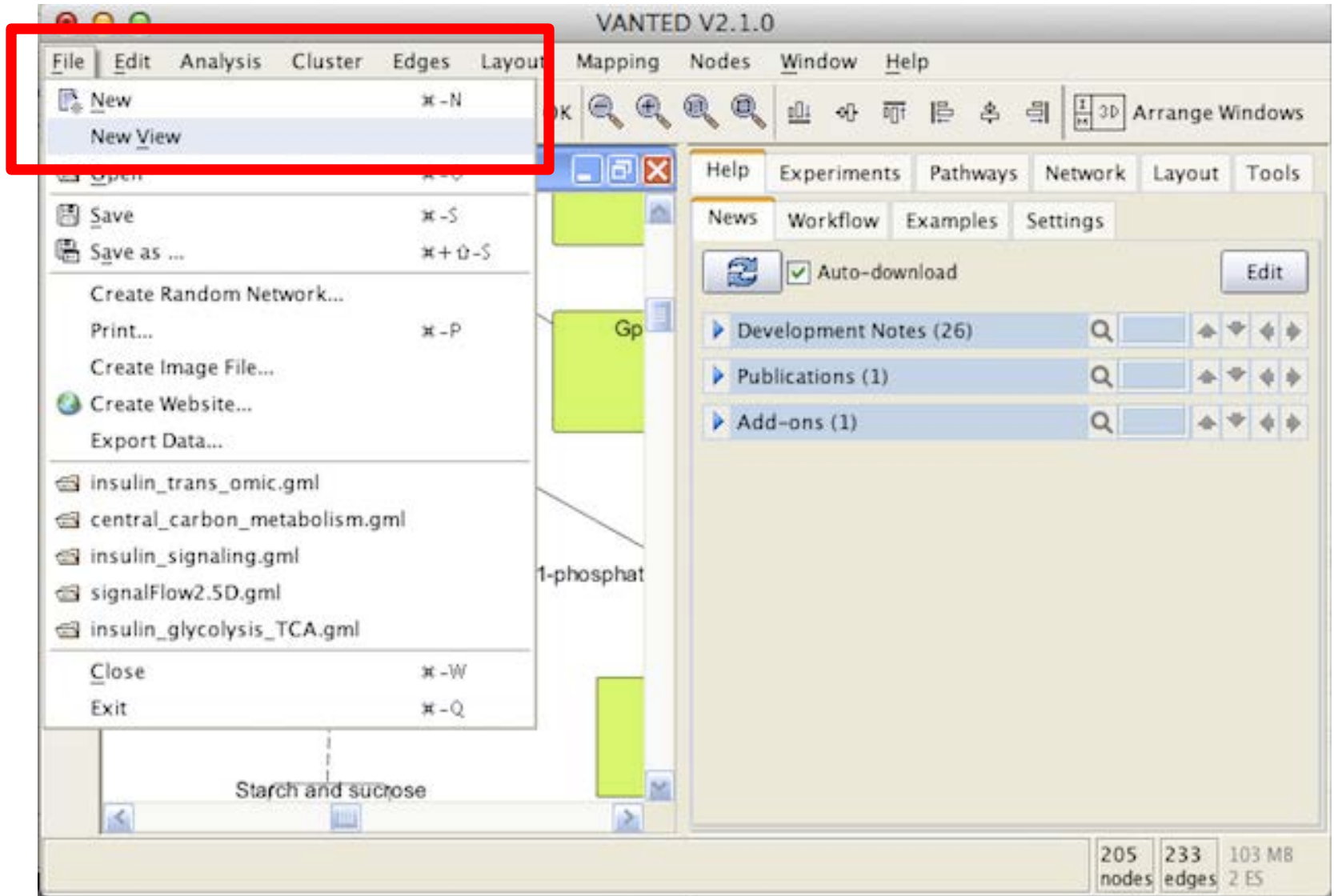
責任kinaseと代謝酵素をつなぐ

- 赤枠で囲ったボタン(‘Create nodes and edges’)を押す
- エッジを引きたい2つのノードを順にクリック
- Command + f で、任意の名称のノードを検索できる



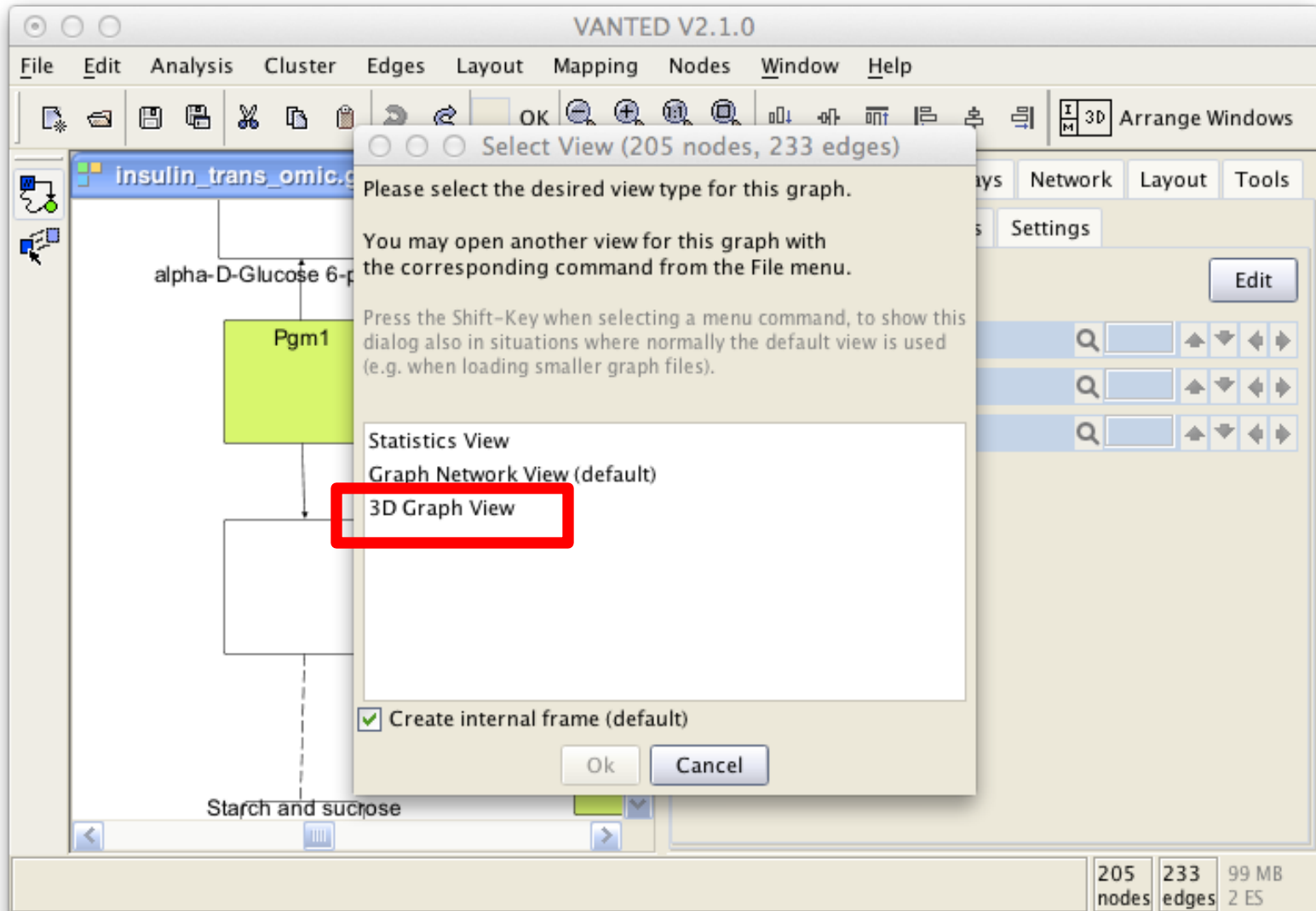
3D Graph viewを開く

- File → New View



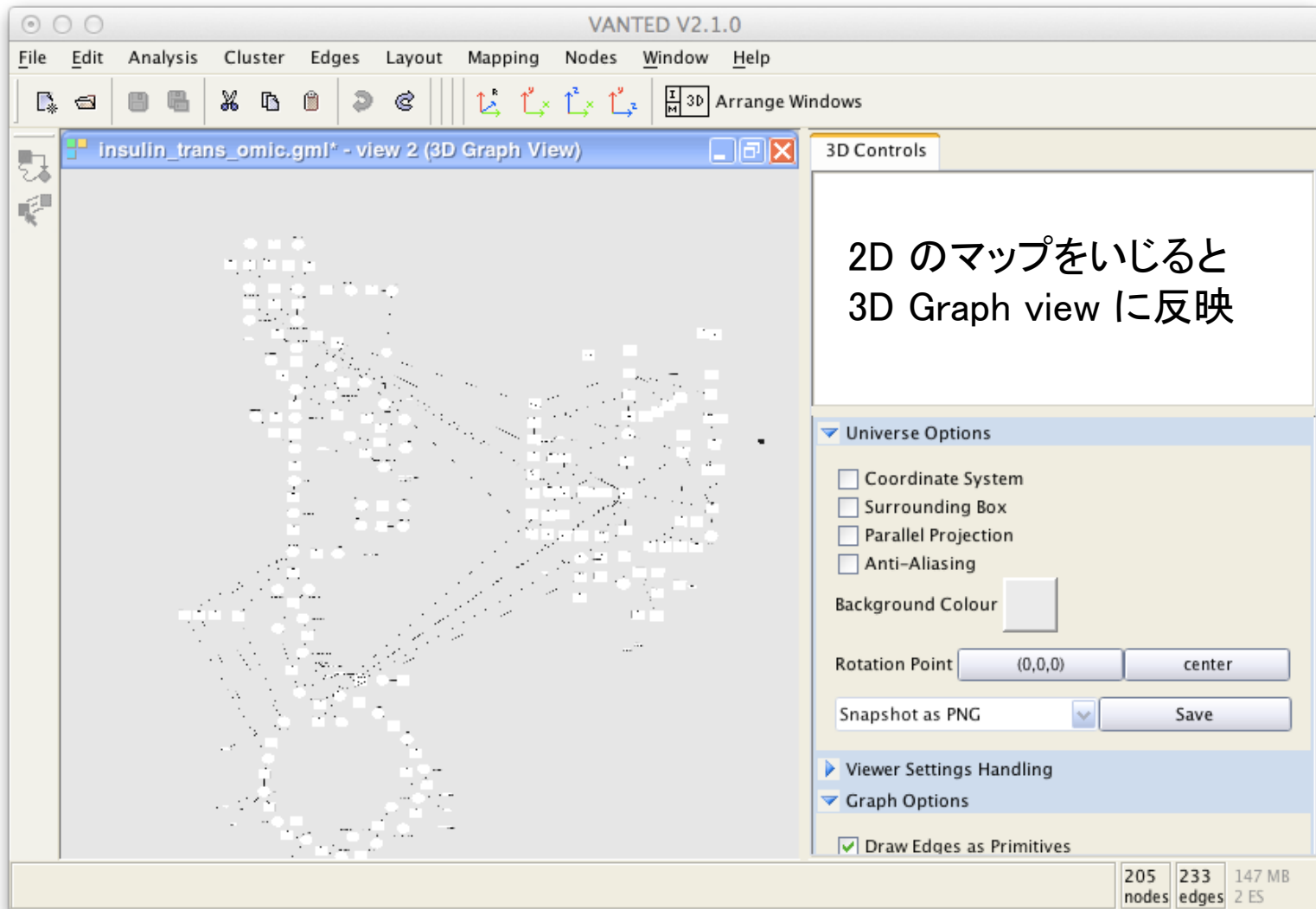
3D Graph viewを開く

- ダイアログから '3D Graph View' を選択



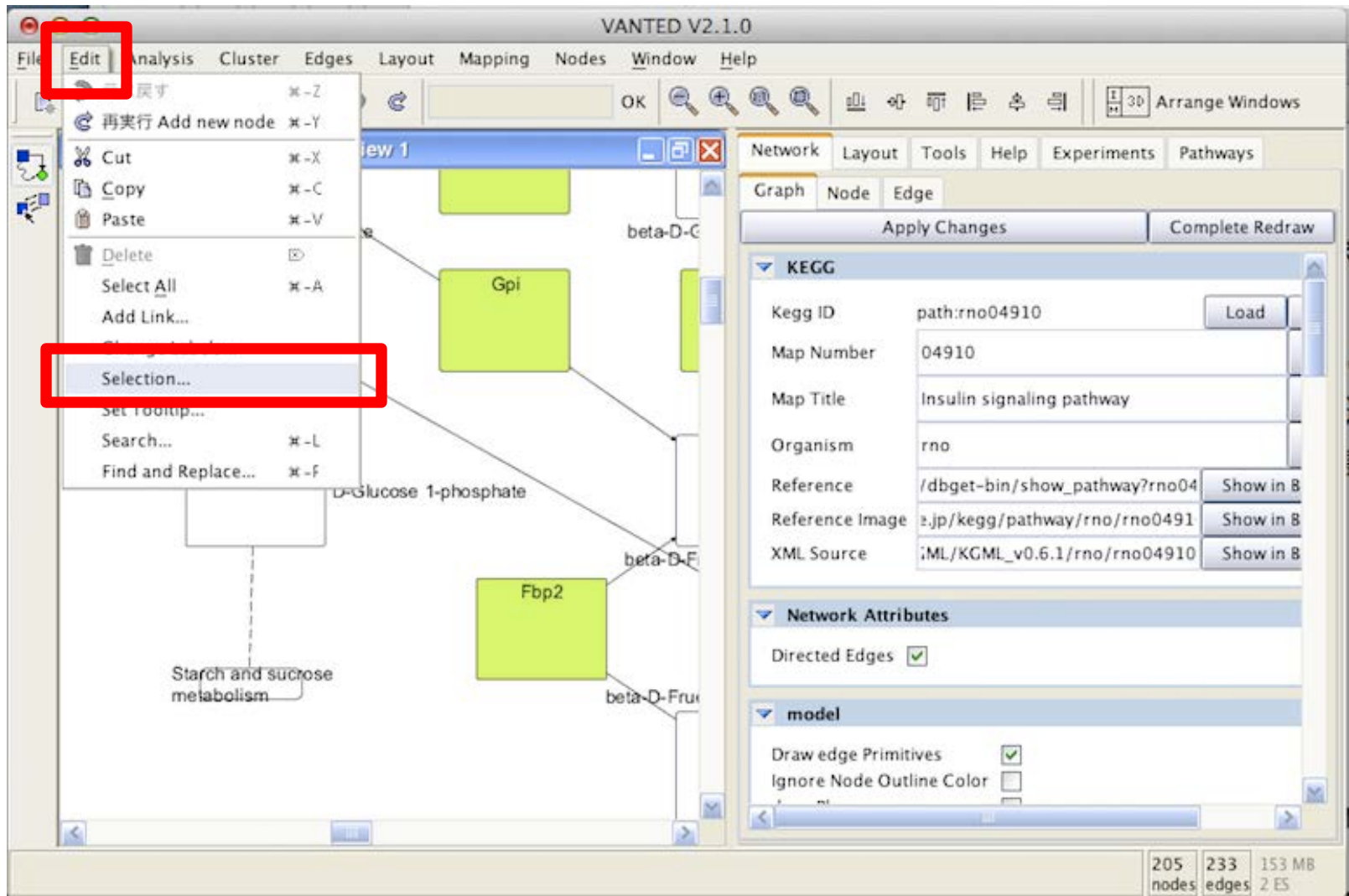
3D Graph viewの操作法

- 左ボタン: 回転、中: ズーム、右: 並進



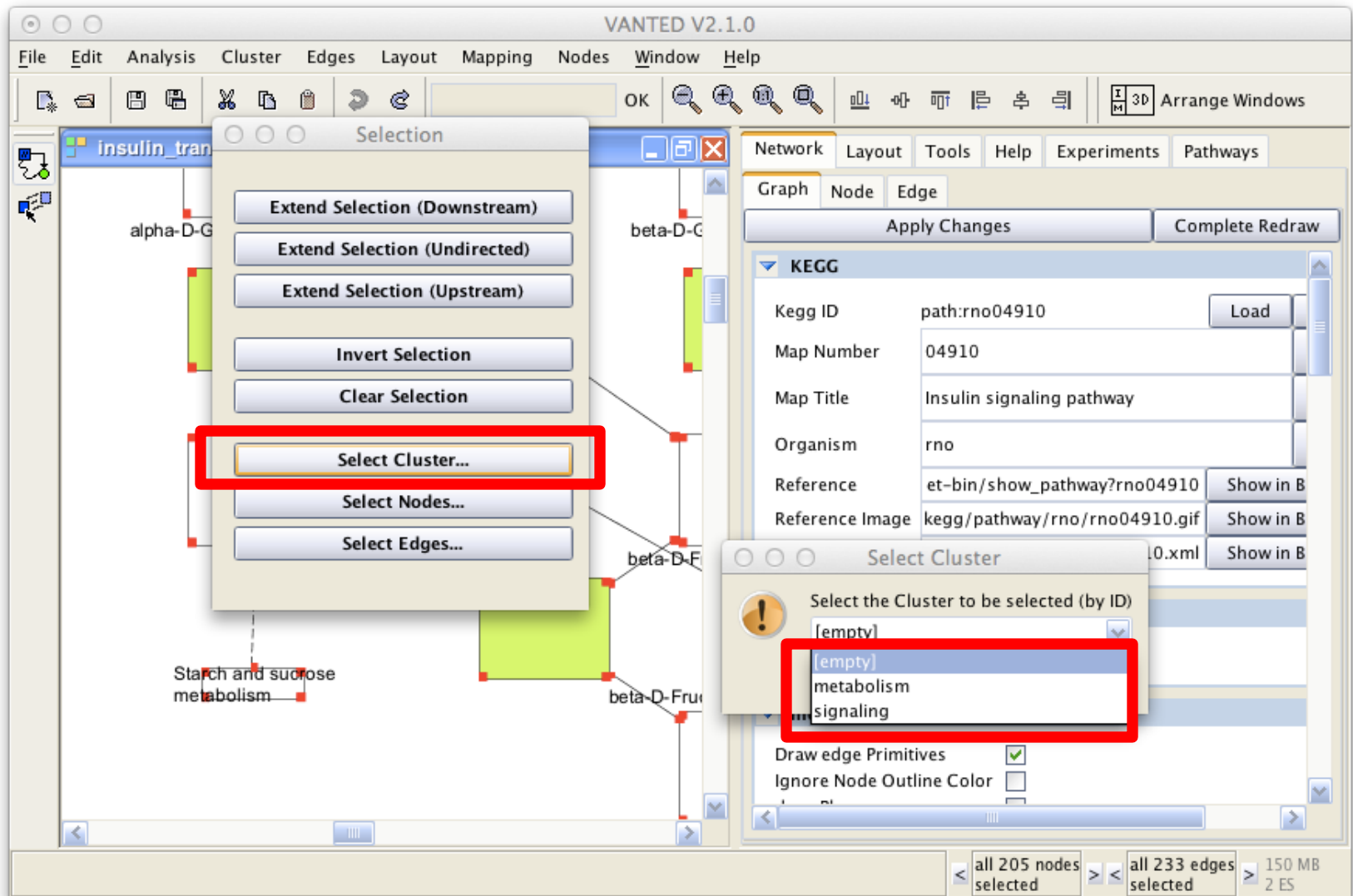
Cluster IDを使ってパスウェイを選択

- Edit → Selection



Cluster IDを使ってパスウェイを選択

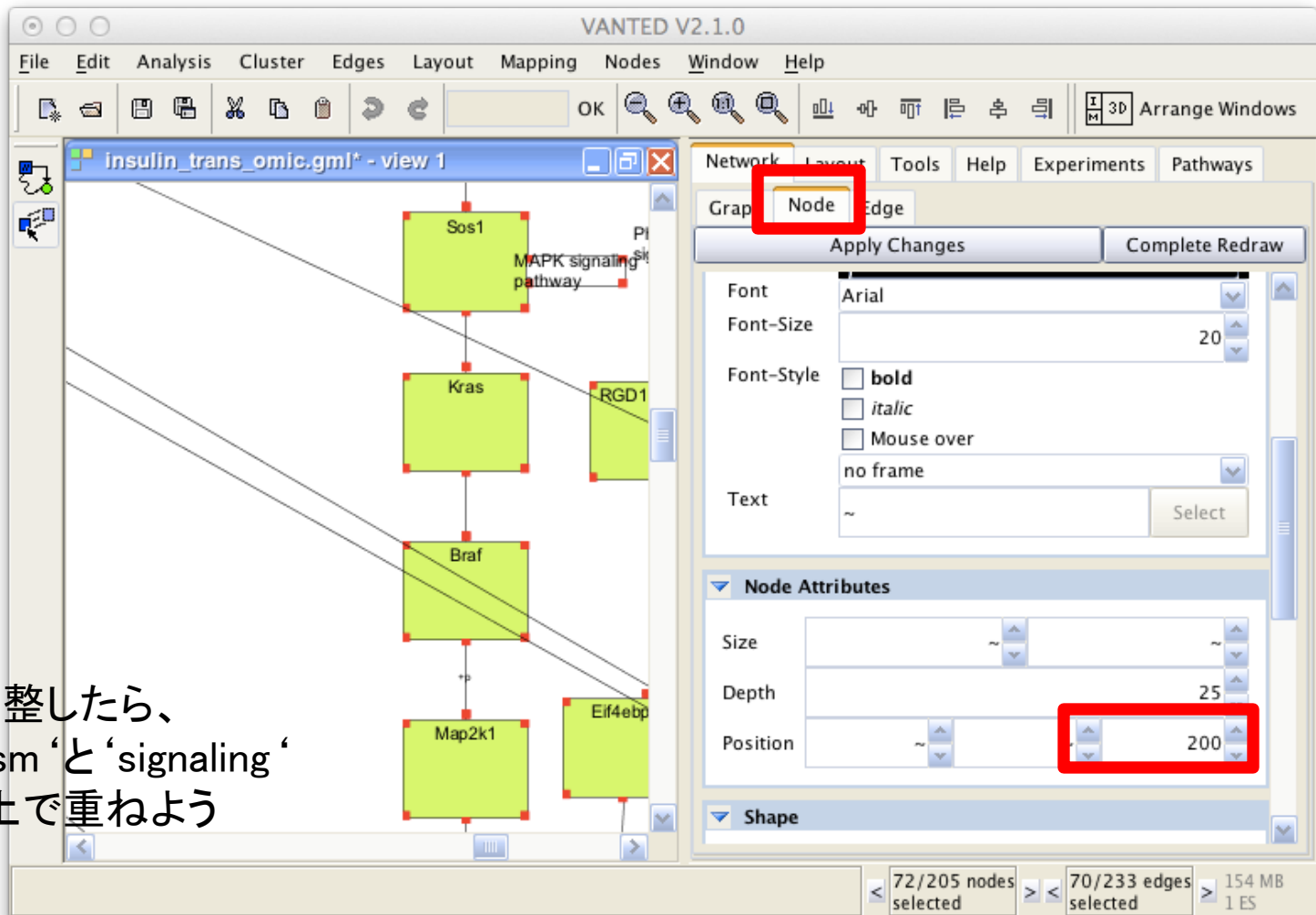
- ‘Select Cluster’ → ‘metabolism’ or ‘signaling’



選択したパスウェイの位置を調整

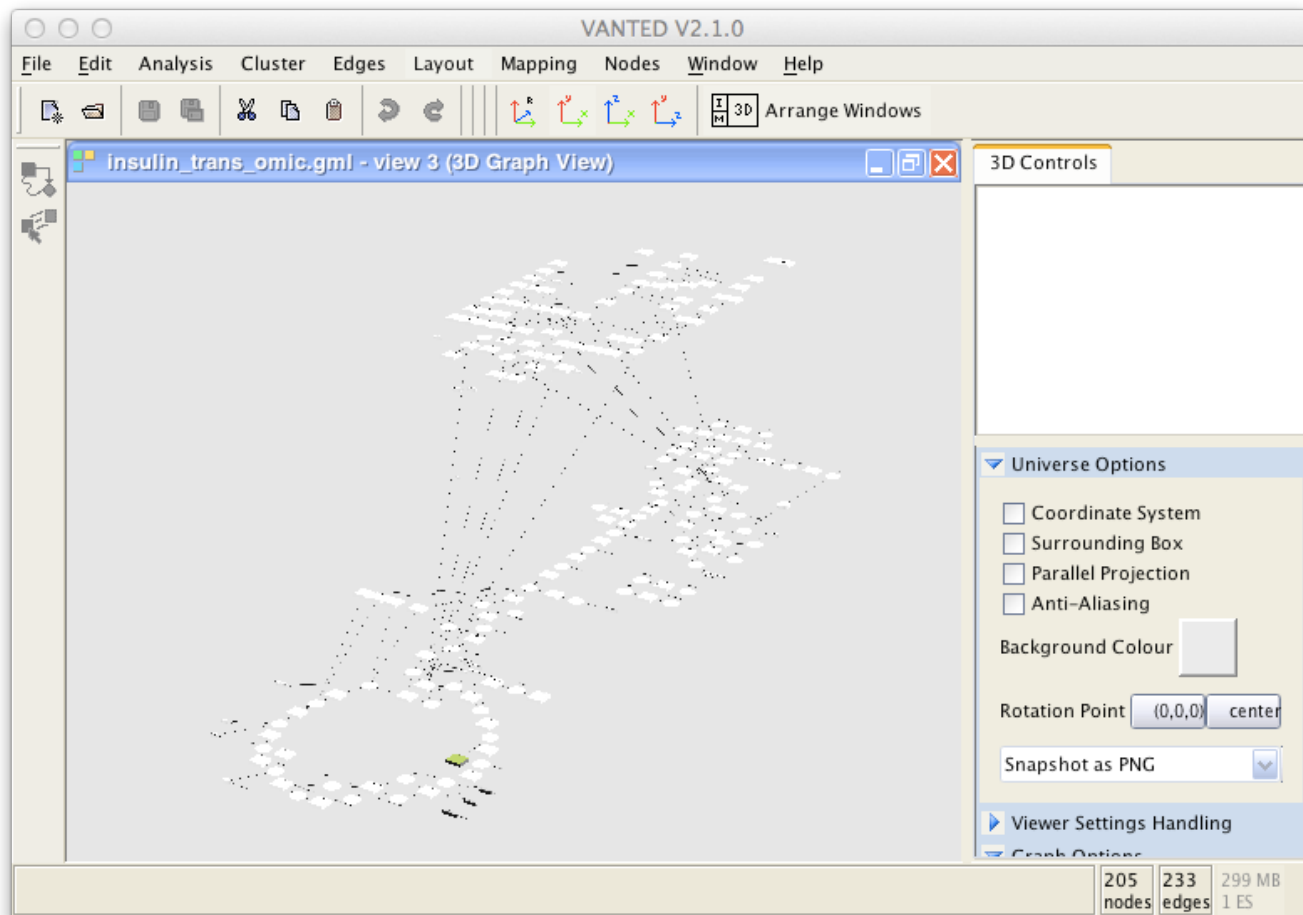
- 右側の‘Node’ タブ→ ‘Position’ の一番右が z 座標
- 例えば ‘signaling’ 部分について z 座標を調整できる

z座標を調整したら、
‘metabolism’ と ‘signaling’
をxy平面上で重ねよう

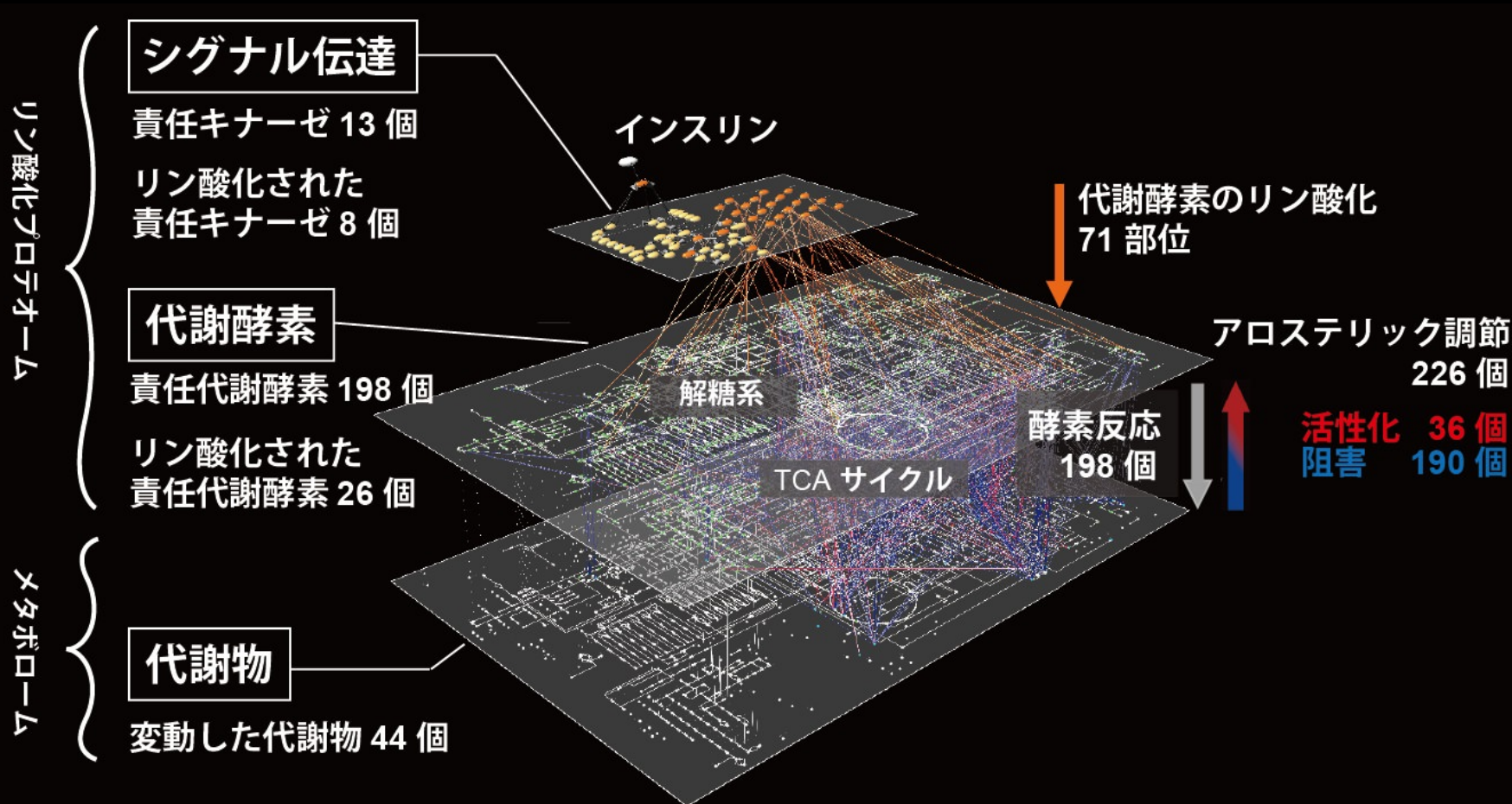


3D viewに位置の調整が反映される

- これで実習の目的を達成！



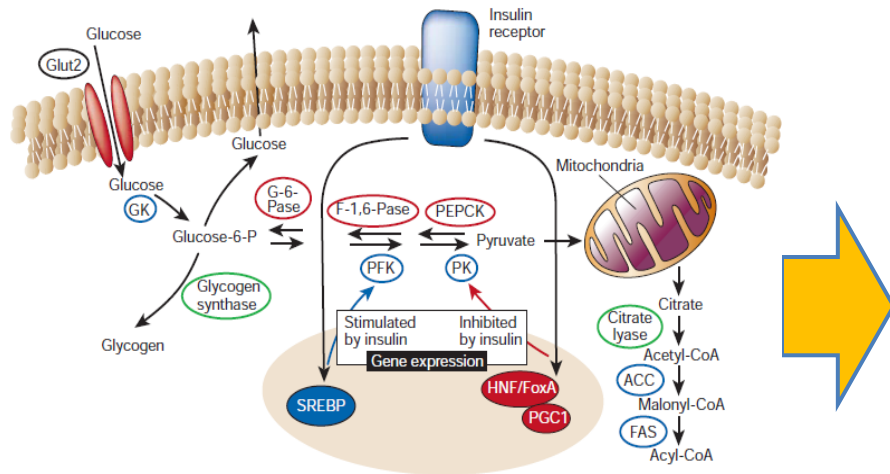
トランスオミクス解析で再構築した インスリン代謝制御ネットワーク



まとめ

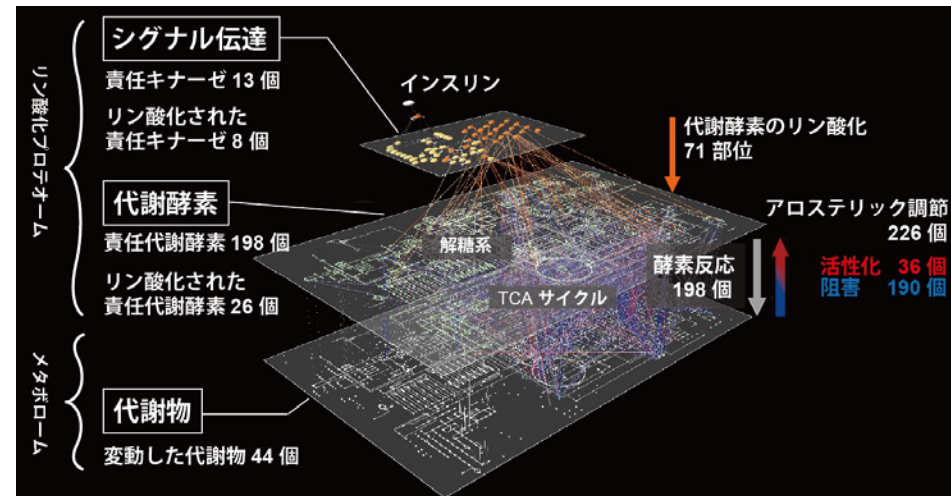
- マルチオミクスデータから多階層ネットワークを再構築
- メタボローム階層を起点に、シグナルの流れをさかのぼる
- インスリンシグナルは従来考えられていたよりも広く伝播する

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.*

