

研究開発項目毎の成果

- ・デバイス関連技術開発
- ・時系列解析技術開発
- ・応用研究

課題：時系列測定・解析技術開発

産業技術総合研究所・生命情報工学研究センター

中津井雅彦、油谷幸代、富永大介、堀本勝久、浅井潔
京都大学・化学研究所

阿久津達也

東京大学・工学部

徳元康人、袴田知巳、三宅淳

目標：

生きた細胞内での刺激応答リン酸化cis-element活性化パスウェイの構造推定、動態解析、及びそれらの検証に基づく、創薬ターゲットの絞り込み技術を、産総研・CBRC、東大・三宅研、京都大学と連携し、開発する。

実施計画：

東大・三宅研が撮像した時系列画像データを数値化し、その数値データに基づき、活性化パスウェイを定量的に推定する技術をCBRCが開発し、さらにその結果に基づき創薬ターゲット絞り込みにつながる検証及び拡張技術を、CBRCと京都大学と連携して開発する。

背景→解析対象→技術課題

背景

「生きた細胞」

環境に応答したネットワークの変化

最小限に抑えた刺激

時系列計測

解析対象

「刺激応答リン酸化cis-element
活性化パスウェイ」

核内受容体(転写因子)

豊富な既知知見

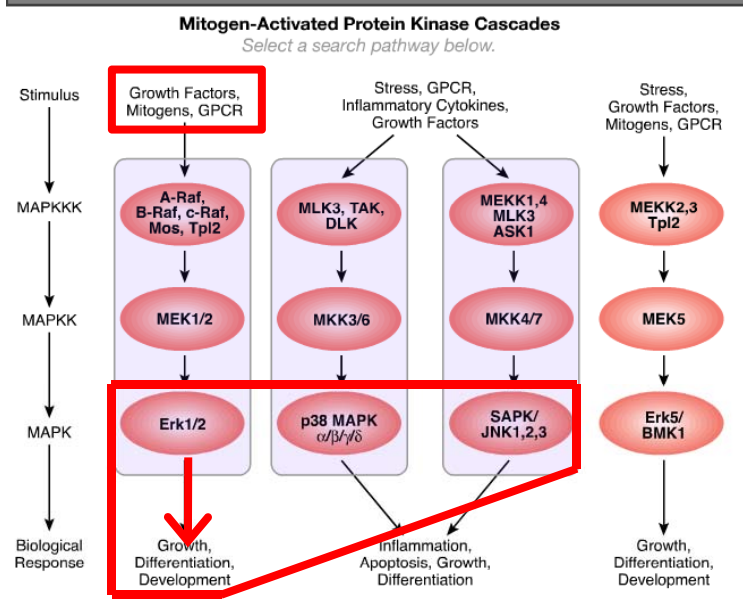
技術課題

「絞り込み技術」

「時系列画像データを数値化」

①微蛍光時系列計測・イメージング
(数値化)技術「活性化パスウェイを定量的に
推定」②非計測分子を含むネットワーク
動態解析③計測データに基づく活性化ネット
ワーク推定技術

背景→解析対象→技術課題

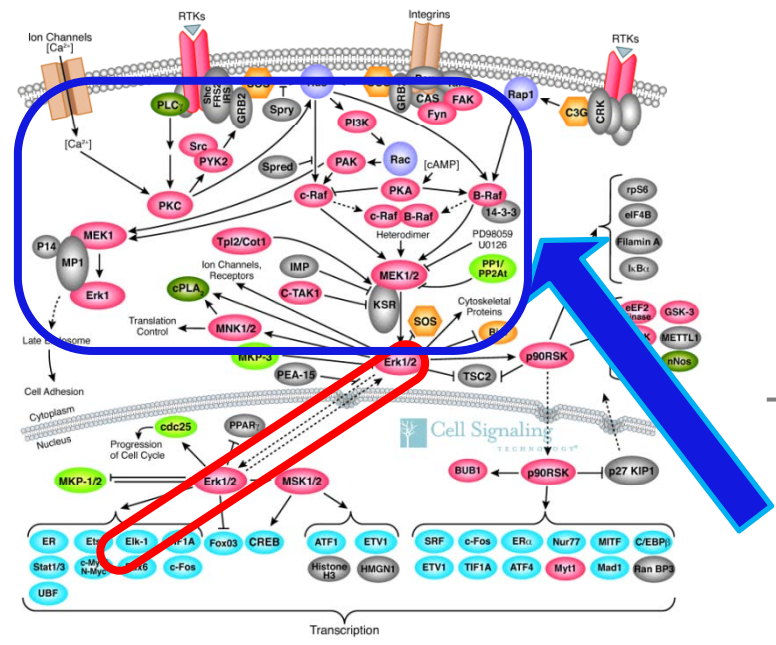


(方針)
 既知パスウェイ
 結果が確実に予測されるパスウェイ
 技術の精度向上

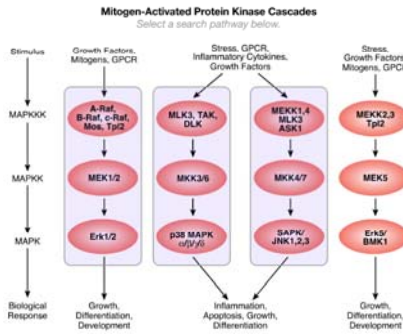
- (問題点)
- 転写因子活性化の可視化が困難
 (①微蛍光時系列計測・イメージング(数値化)技術)
 - 計測分子が限定
 (②非計測分子を含むネットワーク動態解析)

- (出口)
- 候補パス(ウェイ)
 - 併用剤効果の定量評価

- (進展)
- 複雑なリン酸化カスケード
 (③計測データに基づく活性化ネットワーク推定技術)

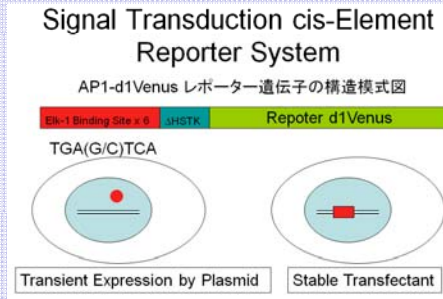


1) 解析対象の設定

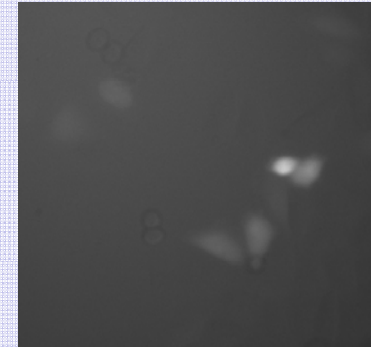


刺激応答リン酸化 cis-element 活性化ネットワーク

2) レポーター遺伝子の作成と導入

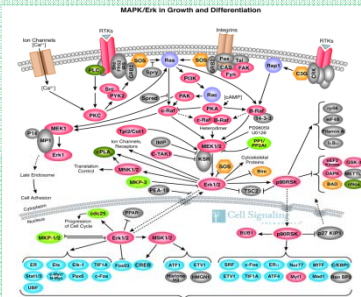


3) 時系列画像撮影



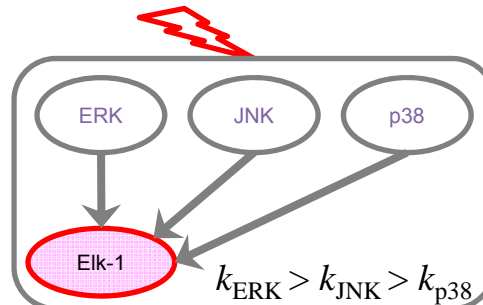
東大・三宅研

6) 推定結果の理論的検証と拡張



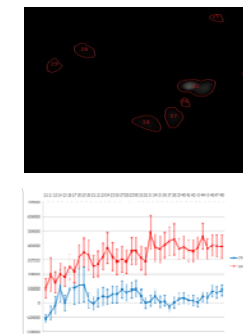
環境応答によるネットワーク変化追跡のための、③計測データに基づく活性化ネットワーク推定技術

5) 活性化ネットワークの推定



活性化パス予測のための、②非計測分子を含むネットワーク動態解析

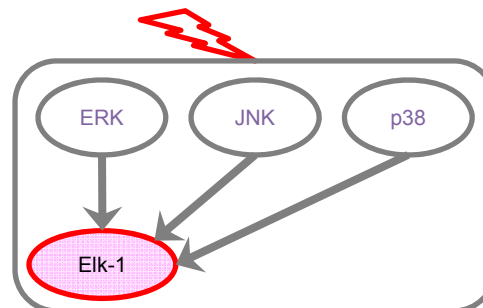
4) 時系列画像の数値化



最小限刺激下の①微蛍光時系列計測・イメージング(数値化)技術

①微蛍光時系列計測・イメージング(数値化)技術

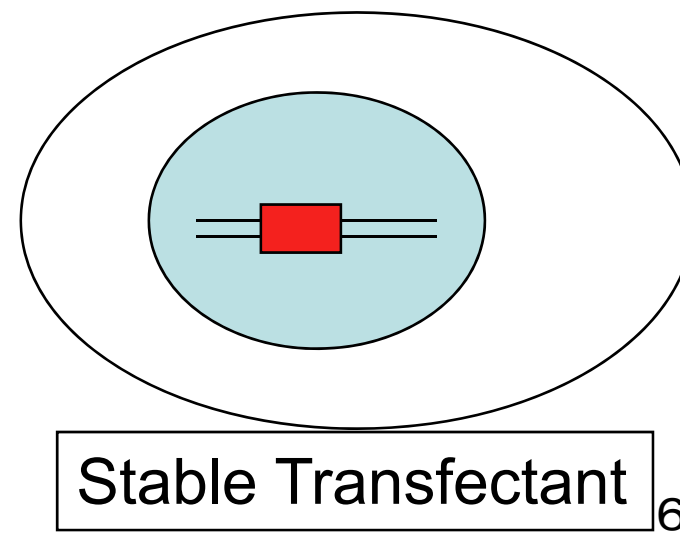
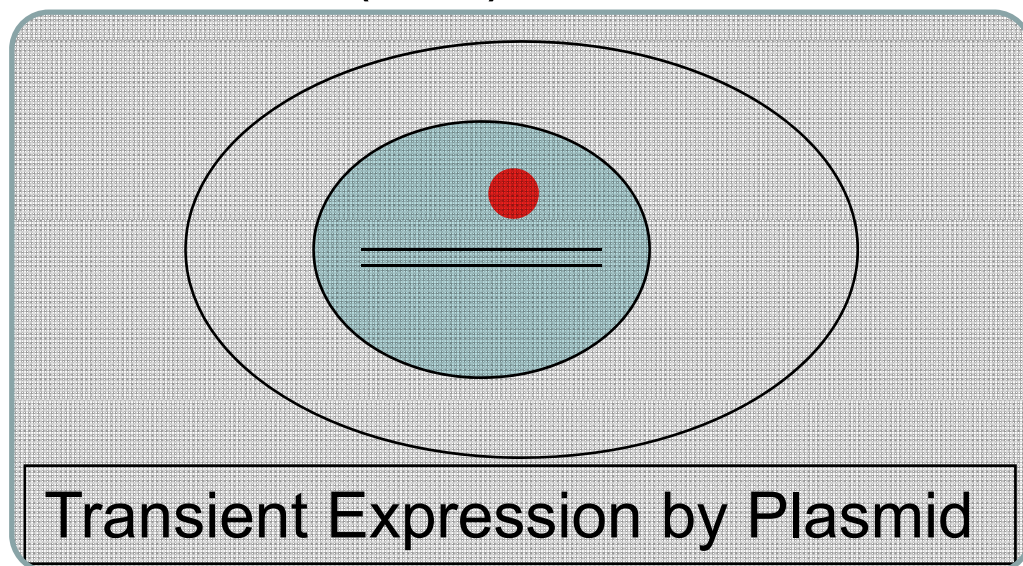
Signal Transduction cis-Element Reporter System



Elk1-d1Venus レポーター遺伝子の構造模式図



TGA(G/C)TCA

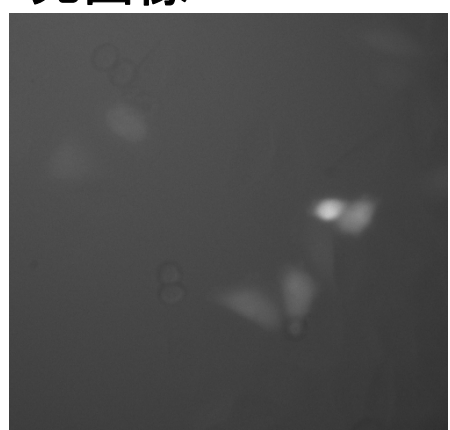


①微蛍光時系列計測・イメージング(数値化)技術

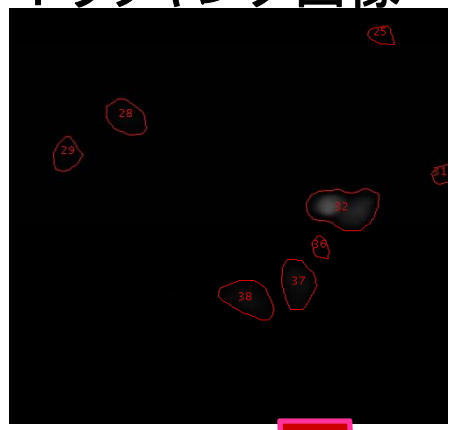
ハイスループット → 高精度

- 多重閾値設定による微弱蛍光の捕捉
- 細胞形状情報に基づくノイズ除去
- 時系列画像比較による細胞トラッキング
- 細胞トラッキングによる細胞総輝度の算出
- Offset値の算出と除去

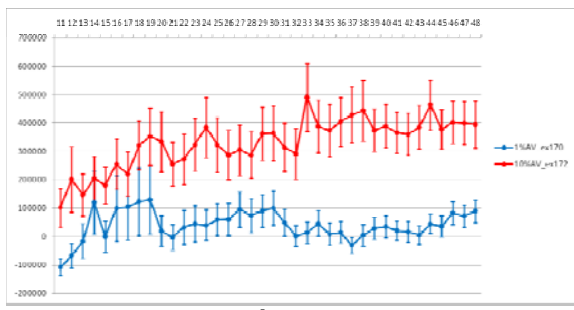
元画像



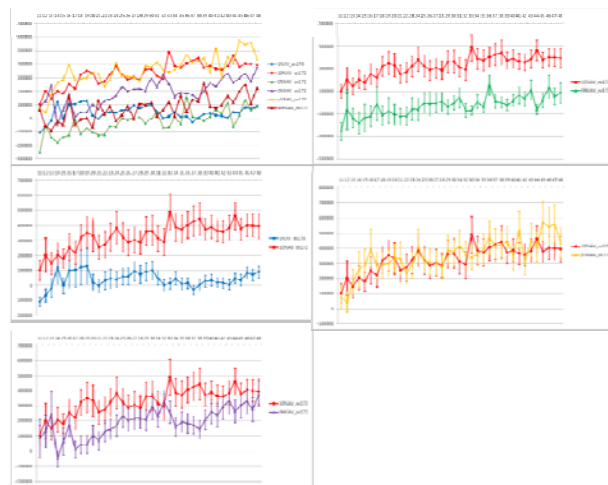
トラッキング画像



輝度



時間
(30分ごと24時間)

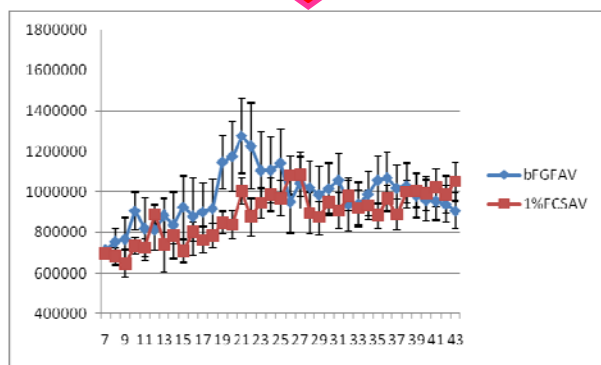
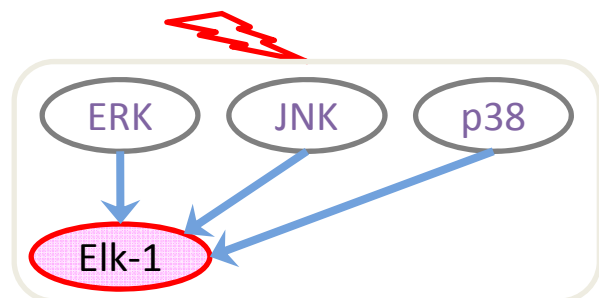


数値化

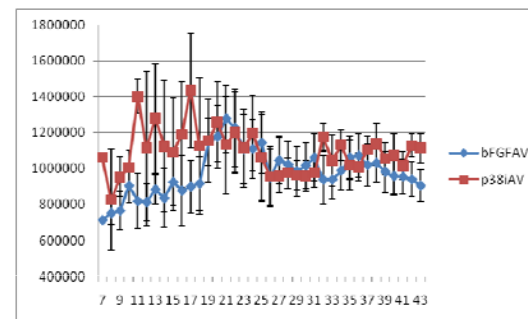
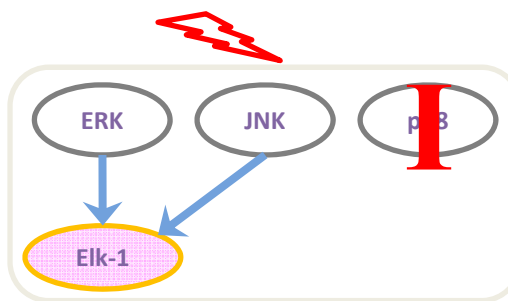
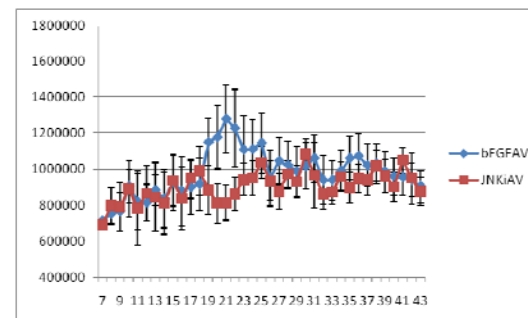
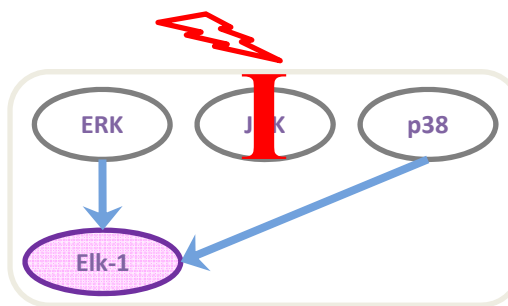
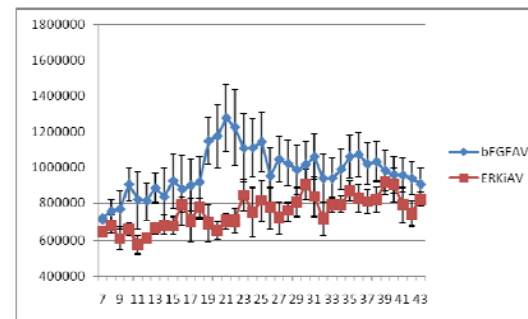
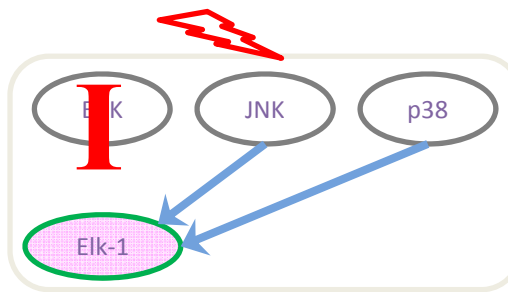
要素技術実証

bFGF刺激に応答するリン酸化ネットワーク転写制御因子

アッセイ



阻害剤添加



• 転写因子リン酸化パスの定性的重みづけ

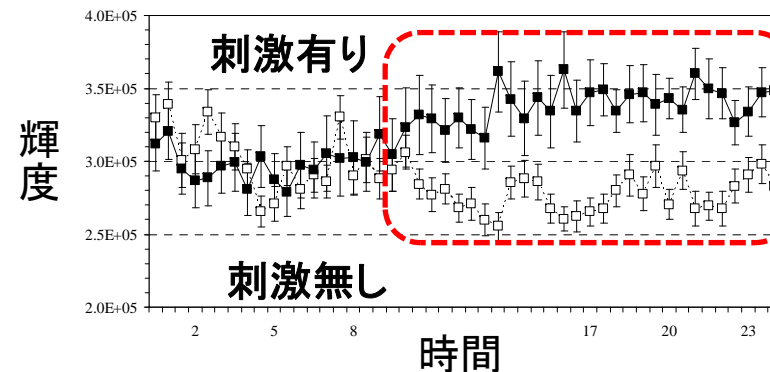
$$k_{\text{ERK}} > k_{\text{JNK}} > k_{\text{p38}}$$

要素技術実証

bFGF刺激に応答するリン酸化ネットワーク転写制御因子

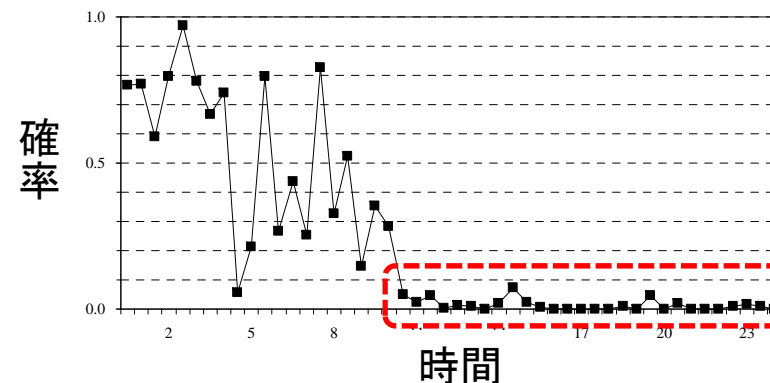
時系列画像数値化データの統計比較

◆各時点での細胞輝度の平均と標準誤差の算出



◆平均輝度のZ testによる各時点の輝度の検定

$$T = \frac{|AV^C - AV^E|}{\sqrt{\frac{VAR^C}{N^C} + \frac{VAR^E}{N^E}}} \sim N(0,1)$$



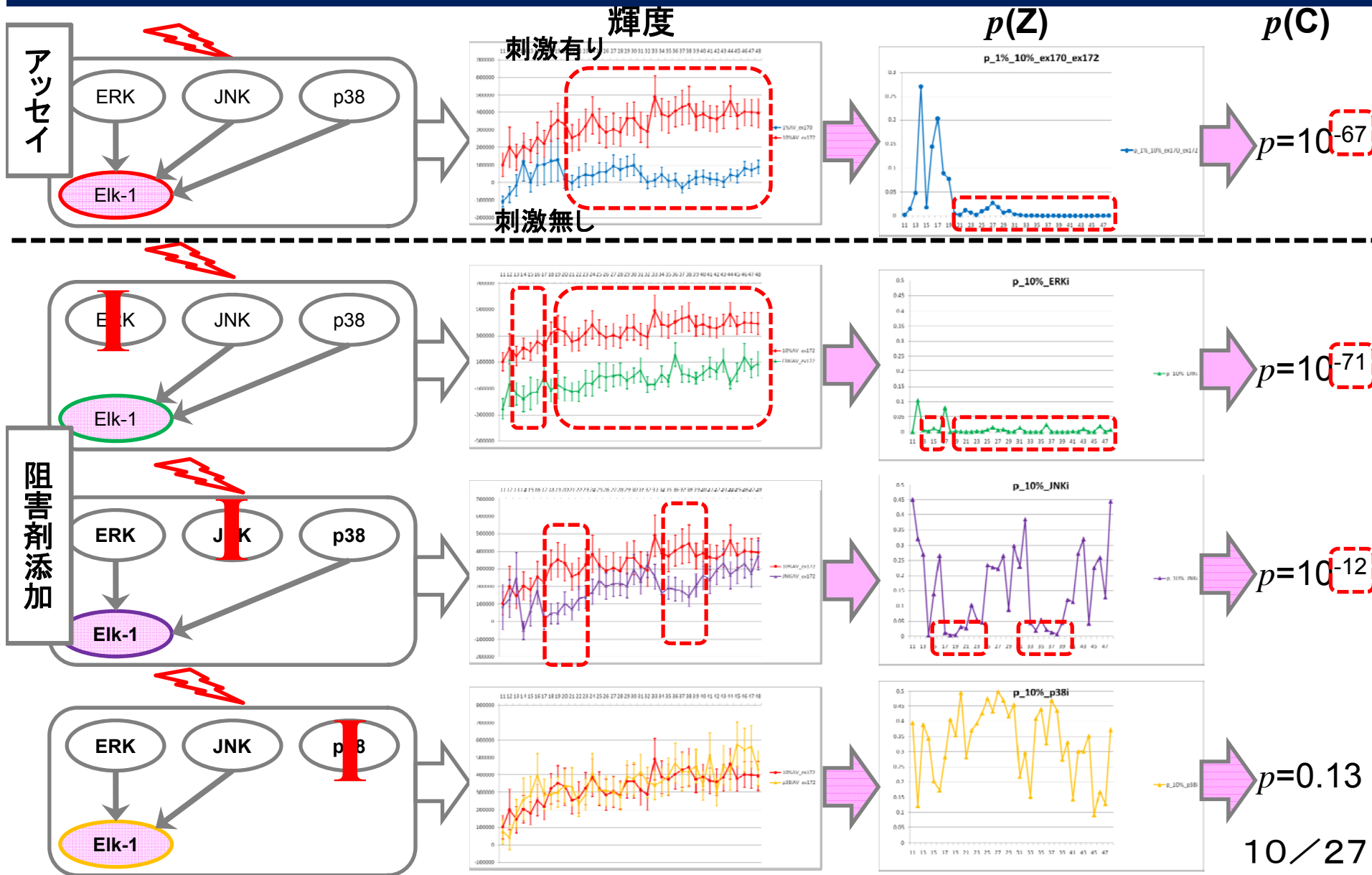
◆Z testによる確率のFisher's C testによる時系列輝度の検定

$$C = -2 \sum_{i=1}^k \ln(p_i) \sim \chi_{df=2k}^2$$

$$p = \chi_{df=2k}^2(C)$$

要素技術実証

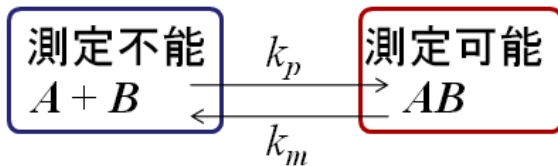
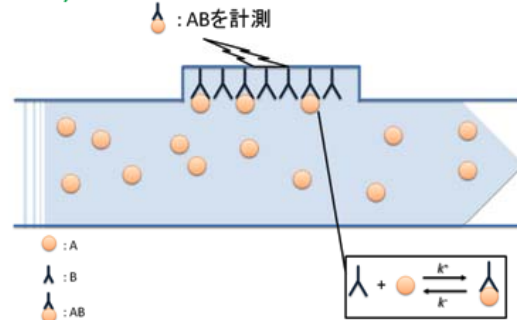
bFGF刺激に反応するリン酸化ネットワーク転写制御因子



②非計測分子を含むネットワーク動態解析技術 問題点

公開

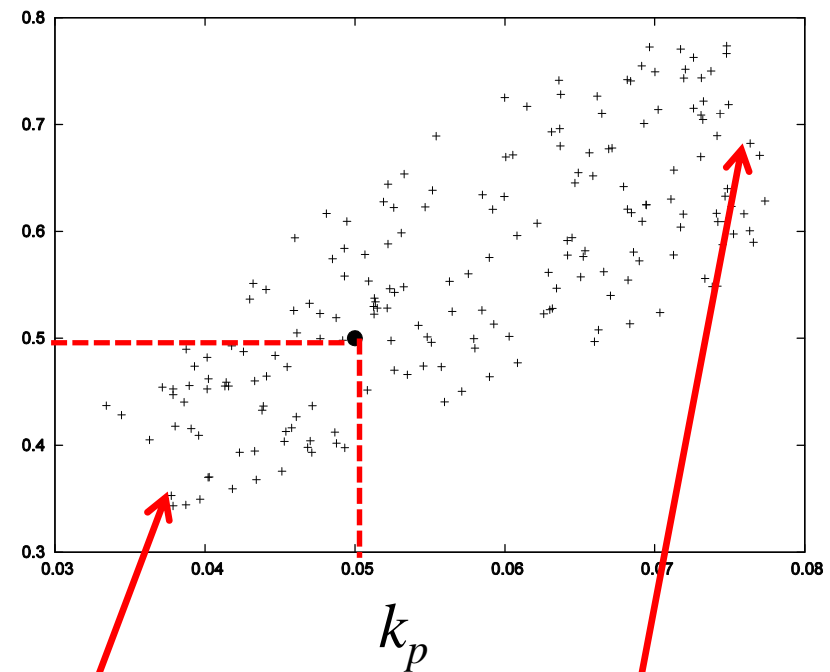
例) 結合と解離



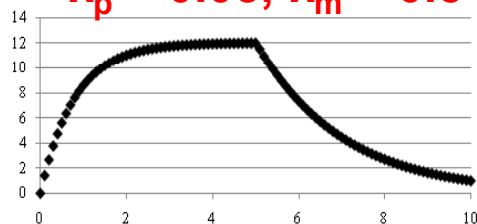
$$\begin{cases} \frac{d[B]}{dt} = k_m[AB] - k_p[A][B] \\ \frac{d[AB]}{dt} = k_p[A][B] - k_m[AB], \end{cases}$$

where $\begin{cases} [A] = a & \text{if } t \leq t_c \\ [A] = 0 & \text{otherwise} \end{cases}$

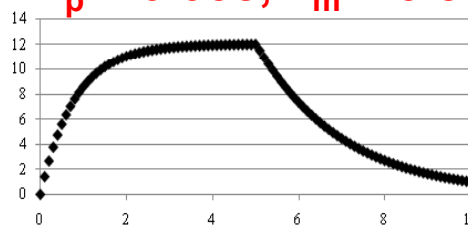
推定パラメータ値の不安定性



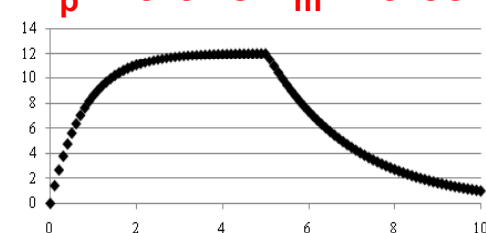
$k_p = 0.05, k_m = 0.5$



$k_p = 0.038, k_m = 0.33$



$k_p = 0.078, k_m = 0.69$



②非計測分子を含むネットワーク動態解析技術 アイデア

公開

制約条件を追加し、
反応パラメータの自由度を制限する

$$E = \sum_{t=1}^T \left| \frac{X_{1,t}^{\text{cal}} - X_{1,t}^{\text{exp}}}{X_{1,t}^{\text{exp}}} \right| \quad + \quad ?$$

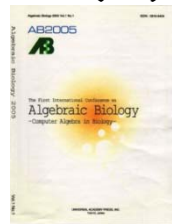
誤差関数

Differential Elimination

François Boulier, Differential Elimination and Biological Modelling, *Johann Radon Institute for Computational and Applied Mathematics (RICAM) Book Series*. Volume 2, pages 111-139. 2007.

Algebraic Biology

2005(1st)



Universal Academy Press
JPYen10,000

2007 (2nd)



LNCS 4545 from
Springer 52,00 €

2008(3rd)



LNCS 5147 from
Springer 45,00 €

Algebraic and Numeric Biology

Algebraic and Numeric Biology 2010

RISC, Castle of Hagenberg, Austria, July 31 - August 2

②非計測分子を含むネットワーク動態解析技術 Differential Elimination (DE)

公開

- Rosenfeld-Gröbner

- 微分を含む代数に関する理論
- 微分方程式系を、他の等価な方程式系へと書き換える

- 例(Ritt Reduction)

$$\begin{cases} \ddot{u} = v\dot{u} \\ \dot{u}^2 = -v \end{cases} \xrightarrow{u \text{を消去}} \begin{cases} f_0 = \ddot{u} - v\dot{u} = 0 \\ g_0 = \dot{u}^2 + v = 0 \end{cases}$$

$$\dot{g}_0 = 2\dot{u}\ddot{u} + \dot{v} = 0$$

$$f_0 \xrightarrow{g_0^*} f_0 - \frac{\ddot{u}}{2\dot{u}\ddot{u}} \dot{g}_0 = \ddot{u} - v\dot{u} - \frac{2\dot{u}\ddot{u}}{2\dot{u}} - \frac{\dot{v}}{2\dot{u}} = -v\dot{u} - \frac{\dot{v}}{2\dot{u}} = f_1 = 0$$

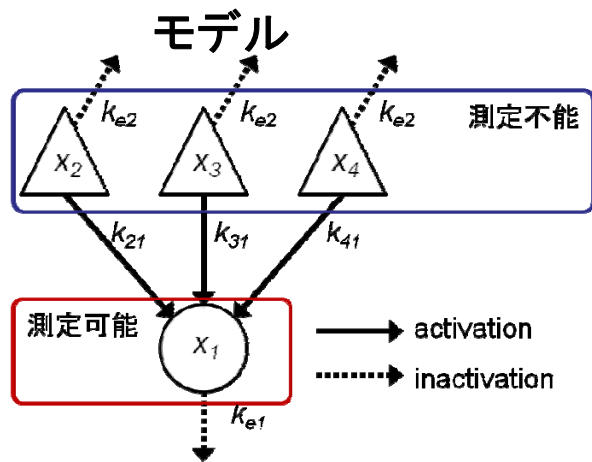
$$f_2 = -2v\dot{u}^2 - \dot{v} = 0$$

$$f_2 \xrightarrow{g_0^*} f_2 - \frac{-2v\dot{u}^2}{\dot{u}^2} g_0 = -2v\dot{u}^2 - \dot{v} + 2v\dot{u}^2 + 2v^2 = -\dot{v} + 2v^2 = 0$$

新しい制約条件として
使用

②非計測分子を含むネットワーク動態解析技術 DEによる等号制約

公開



微分方程式モデル

$$\begin{cases} \frac{dx_1}{dt} = k_{21}x_2 + k_{31}x_3 + k_{41}x_4 - k_{e1}x_1 \\ \frac{dx_2}{dt} = -k_{e2}x_2 - k_{21}x_2 \\ \frac{dx_3}{dt} = -k_{e2}x_3 - k_{31}x_3 \\ \frac{dx_4}{dt} = -k_{e2}x_4 - k_{41}x_4 \end{cases}$$



数値最適化法の評価関数

$$\begin{aligned} C_{1,t} &= \frac{1.0}{k_{21}(k_{21}-k_{31})(k_{21}-k_{41})} \left(\frac{d^3}{dt^3}x_1(t) + (k_{31}+k_{41}+k_{e1}+2k_{e2}) \frac{d^2}{dt^2}x_1(t) \right. \\ &\quad \left. + (k_{31}k_{41}+k_{31}k_{e1}+k_{41}k_{e1}+k_{31}k_{e2}+k_{41}k_{e2}+2k_{e1}k_{e2}+k_{e2}^2) \frac{d}{dt}x_1(t) \right. \\ &\quad \left. + k_{e1}(k_{31}+k_{e2})(k_{41}+k_{e2})x_1(t) - k_{21}(k_{21}-k_{31})(k_{21}-k_{41})x_2(t) \right) = 0 \\ C_{2,t} &= \frac{1.0}{(k_{21}-k_{31})k_{31}(k_{31}-k_{41})} \left(\frac{d^3}{dt^3}x_1(t) + (k_{21}+k_{41}+k_{e1}+2k_{e2}) \frac{d^2}{dt^2}x_1(t) \right. \\ &\quad \left. + (k_{41}(k_{e1}+k_{e2})+k_{21}(k_{41}+k_{e1}+k_{e2})+k_{e2}(2k_{e1}+k_{e2})) \frac{d}{dt}x_1(t) \right. \\ &\quad \left. + k_{e1}(k_{21}+k_{e2})(k_{41}+k_{e2})x_1(t) + x_3(t) \right) = 0 \\ C_{3,t} &= \frac{1.0}{(k_{21}-k_{41})(k_{31}-k_{41})k_{41}} \left(\frac{d^3}{dt^3}x_1(t) + (k_{21}+k_{31}+k_{e1}+2k_{e2}) \frac{d^2}{dt^2}x_1(t) \right. \\ &\quad \left. + (k_{21}k_{31}+k_{21}k_{e1}+k_{31}k_{e1}+k_{21}k_{e2}+k_{31}k_{e2}+2k_{e1}k_{e2}+k_{e2}^2) \frac{d}{dt}x_1(t) \right. \\ &\quad \left. + k_{e1}(k_{21}+k_{e2})(k_{31}+k_{e2})x_1(t) + (k_{21}-k_{41})k_{41}(-k_{31}+k_{41})x_4(t) \right) = 0 \\ C_{4,t} &= \frac{d^4}{dt^4}x_1(t) + (k_{21}+k_{31}+k_{41}+k_{e1}+3k_{e2}) \frac{d^3}{dt^3}x_1(t) \\ &\quad + (k_{21}k_{31}+k_{21}k_{41}+k_{31}k_{41}+k_{21}k_{e1}+k_{31}k_{e1}+k_{41}k_{e1} \\ &\quad + 2k_{21}k_{e2}+2k_{31}k_{e2}+2k_{41}k_{e2}+3k_{e1}k_{e2}+3k_{e2}^2) \frac{d^2}{dt^2}x_1(t) \\ &\quad + (k_{31}(k_{41}(k_{e1}+k_{e2})+k_{e2}(2k_{e1}+k_{e2}))+k_{21}(k_{41}(k_{e1}+k_{e2})+k_{31}(k_{41}+k_{e1}+k_{e2}) \\ &\quad + k_{e2}(2k_{e1}+k_{e2}))+k_{e2}(k_{41}(2k_{e1}+k_{e2})+k_{e2}(3k_{e1}+k_{e2}))) \frac{d}{dt}x_1(t) \\ &\quad + k_{e1}(k_{21}+k_{e2})(k_{31}+k_{e2})(k_{41}+k_{e2})x_1(t) = 0 \end{aligned}$$

②非計測分子を含むネットワーク動態解析技術 DE等号制約の算出

$$C_{1,t} = \frac{1.0}{k_{21}k_{31}k_{41}k_{e1}k_{e2} + (k_{31}k_{41} + k_{31}k_{e1} + k_{41}k_{e1} + 2k_{e1}k_{e2} + k_{e2}^2) \frac{d}{dt} x_1(t) + (k_{31}k_{41}k_{e1} + k_{41}k_{e1} + k_{e1}(k_{31} + k_{e2})) \frac{d^2}{dt^2} x_1(t) + (k_{31} + k_{41} + k_{e1} + 2k_{e2}) \frac{d^3}{dt^3} x_1(t)}$$

$k_{21}, k_{31}, k_{41}, k_{e1}, k_{e2}$
: 推定された反応パラメータ.

$$C_{2,t} = \frac{1.0}{(k_{21}k_{31}k_{41}k_{e1}k_{e2} + (k_{31}k_{41} + k_{31}k_{e1} + k_{41}k_{e1} + 2k_{e1}k_{e2} + k_{e2}^2) \frac{d}{dt} x_1(t) + (k_{31}k_{41}k_{e1} + k_{41}k_{e1} + k_{e1}(k_{31} + k_{e2})) \frac{d^2}{dt^2} x_1(t) + (k_{31} + k_{41} + k_{e1} + 2k_{e2}) \frac{d^3}{dt^3} x_1(t))} x_1(t)$$

$x_1(t)$: 測定された時系列データ

$$C_{3,t} = \frac{d}{dt} x_1(t), \frac{d^2}{dt^2} x_1(t), \frac{d^3}{dt^3} x_1(t), \frac{d^4}{dt^4} x_1(t)$$

: 測定データから

$$C_{4,t} = \frac{d^4}{dt^4} x_1(t) + (k_{21} + k_{31} + k_{41} + k_{e1} + 3k_{e2}) \frac{d^3}{dt^3} x_1(t) + (k_{31}k_{41}k_{e1} + k_{41}k_{e1} + 2k_{21}k_{e2} + 2k_{31}k_{e2} + 2k_{41}k_{e2} + 3k_{e1}k_{e2} + 3k_{e2}^2) \frac{d^2}{dt^2} x_1(t) + (k_{31}(k_{41}(k_{e1} + k_{e2}) + k_{e2}(2k_{e1} + k_{e2})) + k_{41}(k_{e1} + k_{e2}) + k_{e1}(k_{41}k_{e1} + k_{e2}(2k_{e1} + k_{e2}))) \frac{d}{dt} x_1(t) + k_{e2}(2k_{e1} + k_{e2}) x_1(t)$$

$x_2(t), x_3(t), x_4(t)$
: ネットワークモデルの微分方程式から
解析的に求めたもの

解析的に求められない場合は、
数值的に計算した値を使用することも可能

$C_{1,t}, C_{2,t}, C_{3,t}, C_{4,t}$ の値を、各サンプリングポイント t について計算

②非計測分子を含むネットワーク動態解析技術 DE等号制約の評価

公開

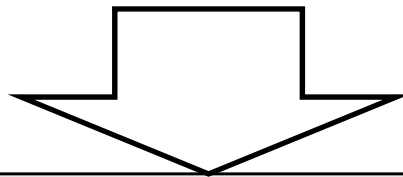
C_t (サンプリング時刻 t における制約条件の値)

$$C = \sum_{t=1}^T (C_t) \quad \text{DE Constraints}$$

ここで $C_t = |C_{1,t}| + |C_{2,t}| + |C_{3,t}| + |C_{4,t}|$

C は反応パラメータ ($k_{21}, k_{31}, k_{41}, k_{e1}, k_{e2}$) の関数である

真の反応パラメータ及び時系列データ、導関数が与えられたとき、 $C=0$ である



C を最小化する反応パラメータを求める

②非計測分子を含むネットワーク動態解析技術 新規開発法の概要

公開

従来法

- 誤差関数

$$E = \sum_{t=1}^T \left| \frac{X_{1,t}^s - X_{1,t}^m}{X_{1,t}^m} \right|$$

新規開発法(記号・数値最適化)

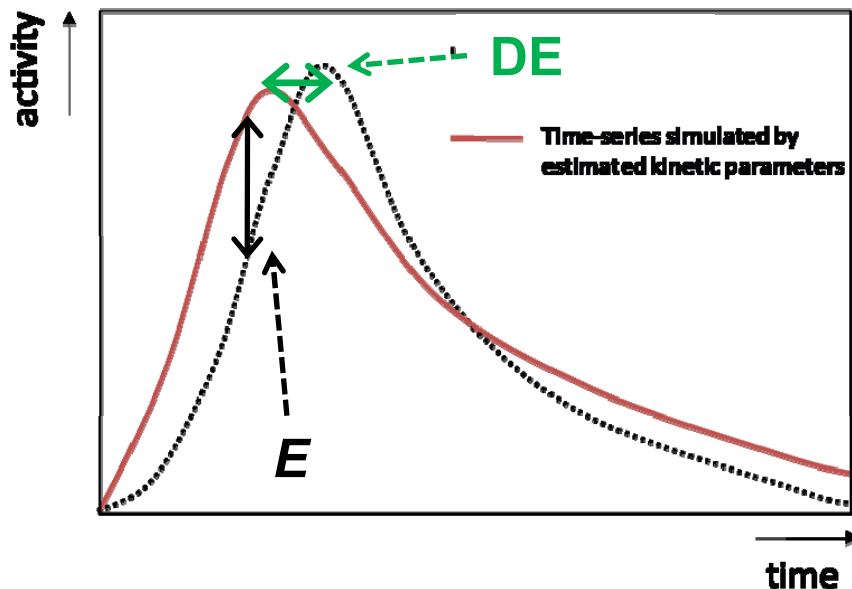
- E + 新規制約式(DE)

$$E' = \alpha \sum_{t=1}^T \left| \frac{X_{1,t}^s - X_{1,t}^m}{X_{1,t}^m} \right|$$

$$+ (1-\alpha) \sum_{t=1}^T (|C_1| + |C_2| + |C_3| + |C_4|)$$

α : 重み

従来法と新規開発法との直感的比較



代数算法による新規制約式の導入

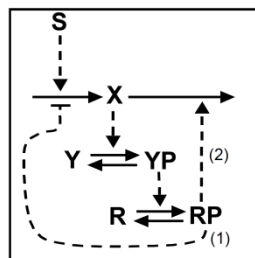
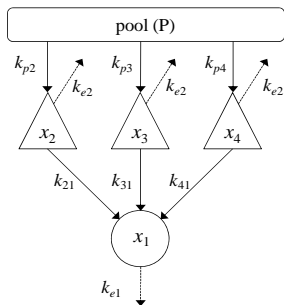
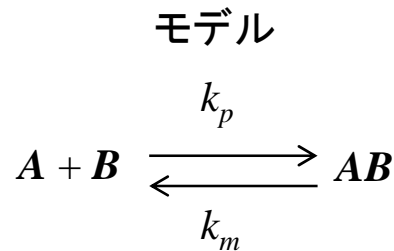
微分可能であればすべてのモデルに適用可能

工学分野への波及が期待される
汎用推定精度向上法

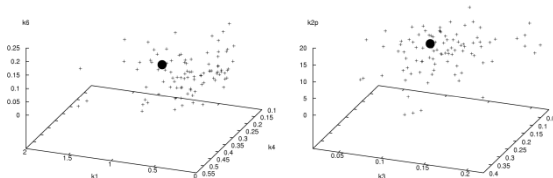
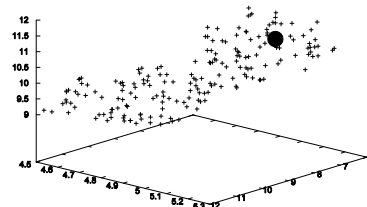
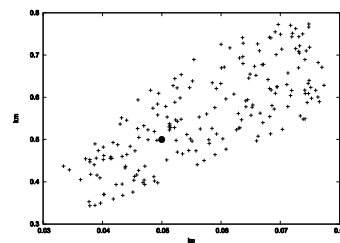
②非計測分子を含むネットワーク動態解析技術 シミュレーション 1

公開

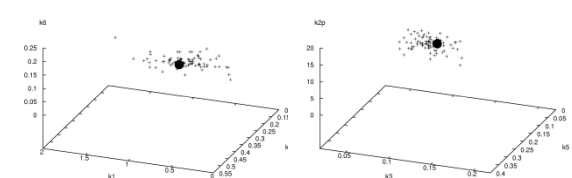
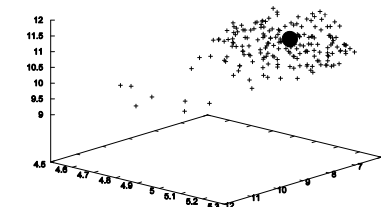
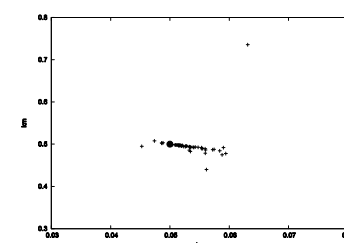
パラメータ推定精度の比較



従来法
(標準誤差関数)



新規開発手法
(標準誤差関数+DE Constraints)



圧倒的な精度を実現

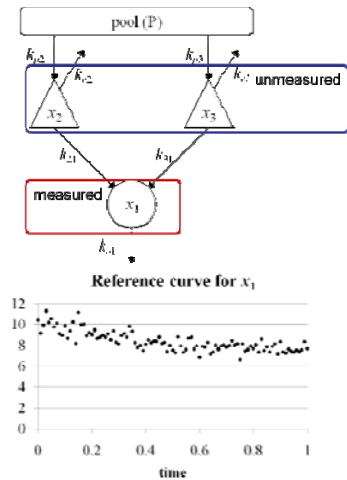
- Proc. of OSB2009, pp. 245–253, 2009.
- Proc. of ISB2010, in press.
- BMC Sys. Biol. in press.
- IET Sys. Biol. in press

- より複雑なモデルへの対応 → Dr. Boulierグループ (Lille Univ., France)と共同研究
- 実問題への適用 → 九大・生防研、韓国科学院と共同研究

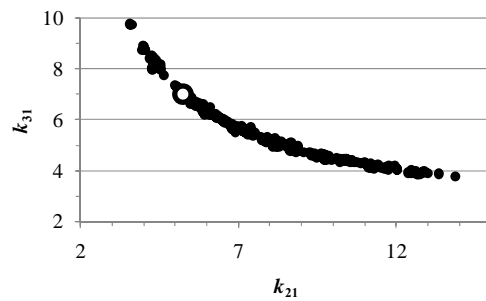
②非計測分子を含むネットワーク動態解析技術 シミュレーション 2

公開

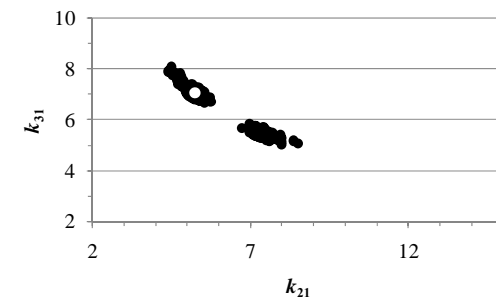
ノイズの含むデータ



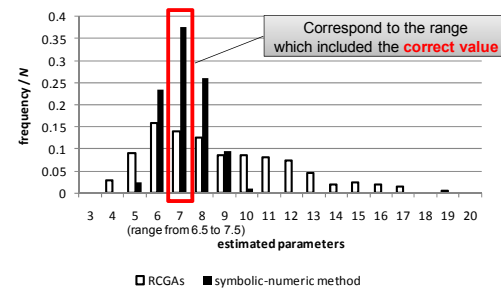
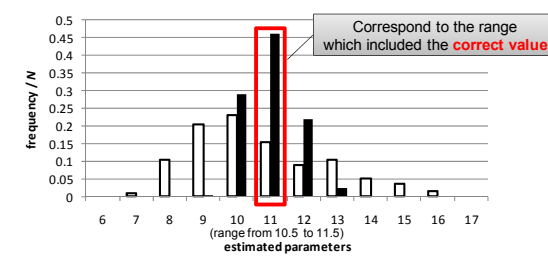
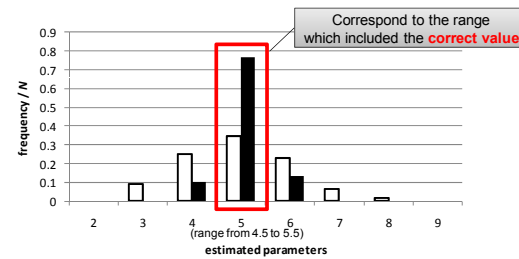
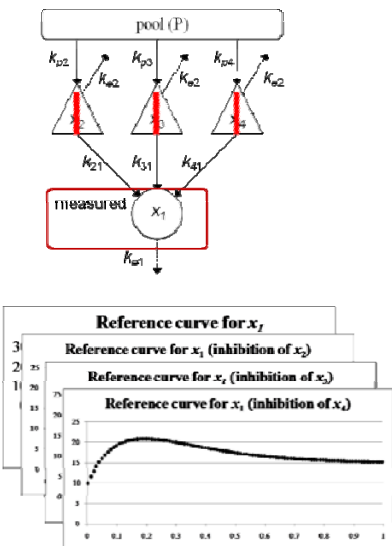
従来法
(標準誤差関数)



新規開発手法
(標準誤差関数+DE Constraints)

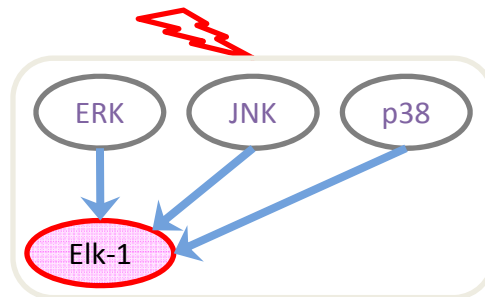
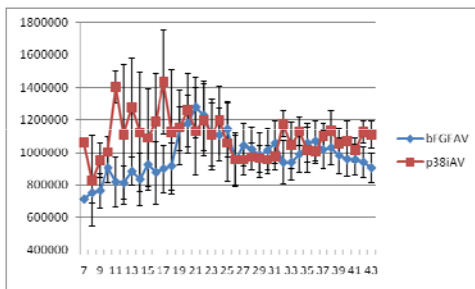
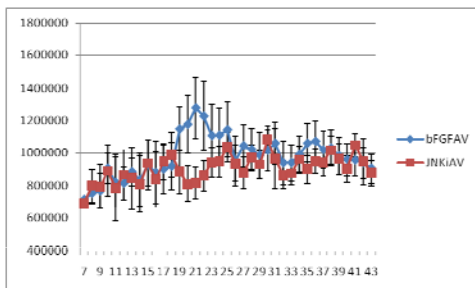
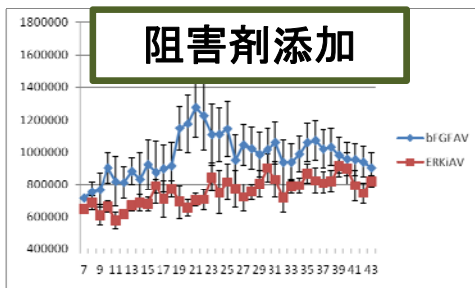
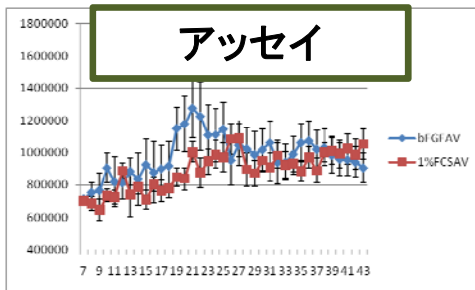


阻害剤を仮定したデータ



要素技術実証

bFGF刺激に応答するリン酸化ネットワーク転写制御因子



定性的結果を定量的結果で検証
→ 高精度シミュレーション

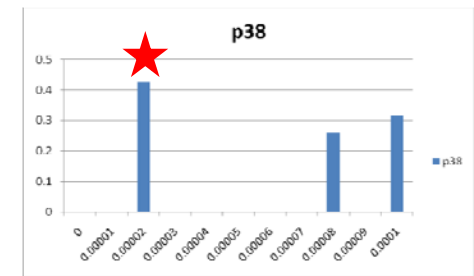
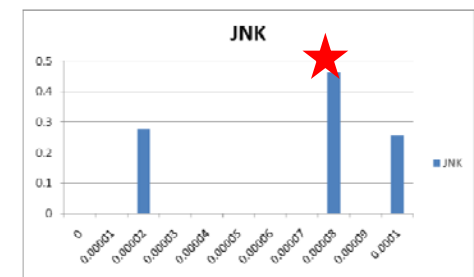
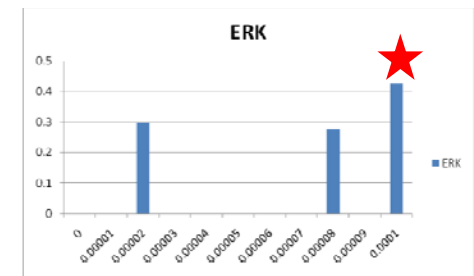
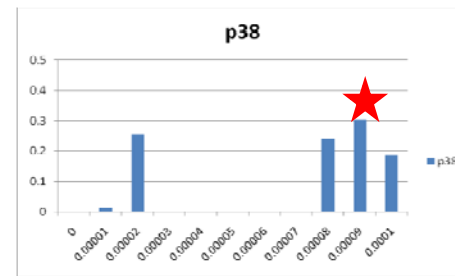
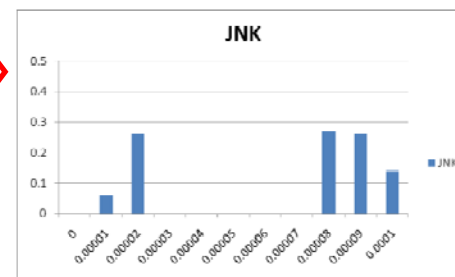
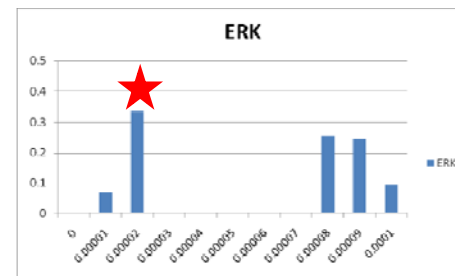
?

従来法

$$k_{ERK} > k_{JNK} > k_{p38}$$

新規開発法

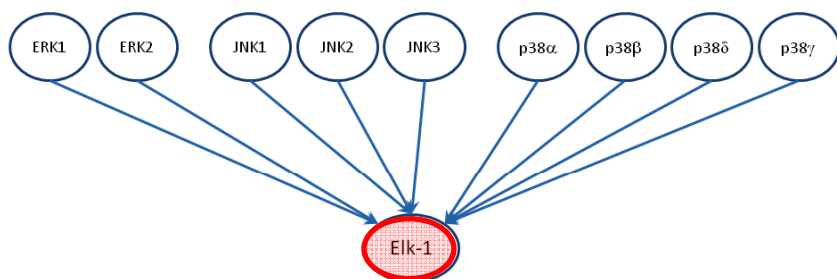
- Proc. Of OSB2009, pp. 245–253, 2009.
- BMC Sys. Biol. in press.
- IET Sys. Biol. in press



要素技術実証

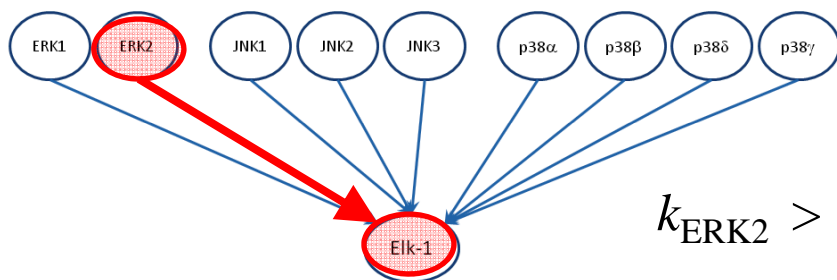
bFGF刺激に応答するリン酸化ネットワーク転写制御因子

モデル



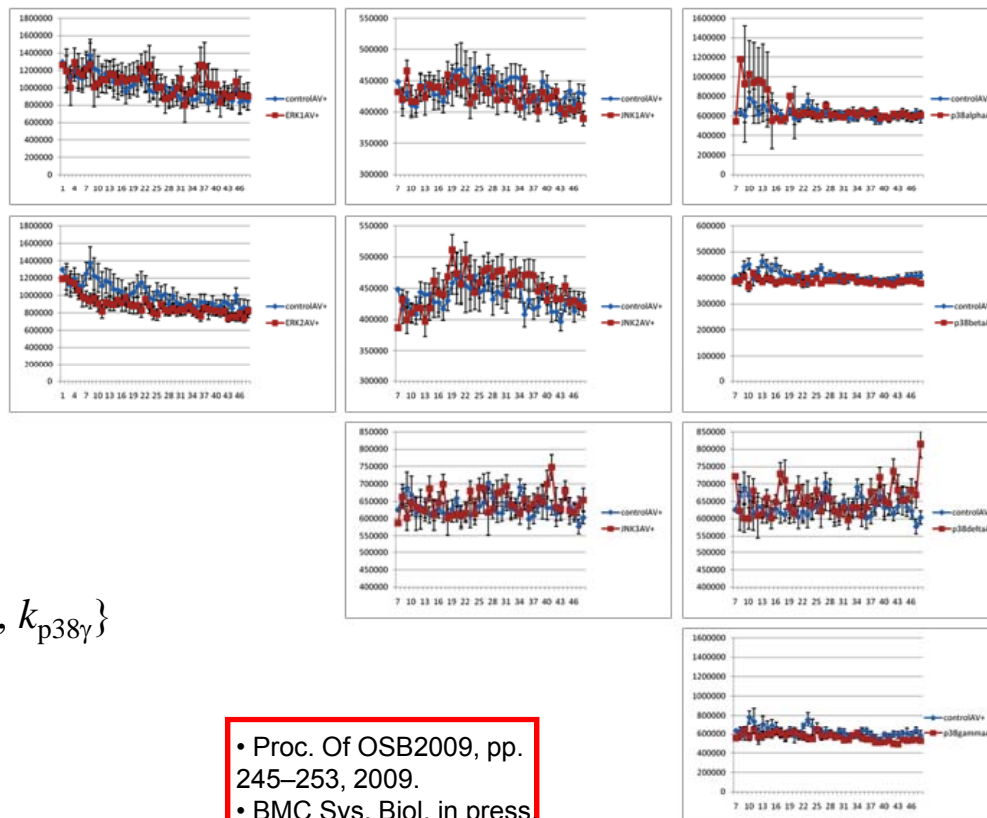
9遺伝子に対するsiRNA干渉実験下でElk-1の時系列計測データから、9パラメータを推定

$$\{k_{ERK1}, k_{ERK2}, k_{JNK1}, k_{JNK2}, k_{JNK3}, k_{p38\alpha}, k_{p38\beta}, k_{p38\delta}, k_{p38\gamma}\}$$



$$k_{ERK2} > \{k_{ERK1}, k_{JNK1}, k_{JNK2}, k_{JNK3}, k_{p38\alpha}, k_{p38\beta}, k_{p38\delta}, k_{p38\gamma}\}$$

siRNAによる干渉実験計測値

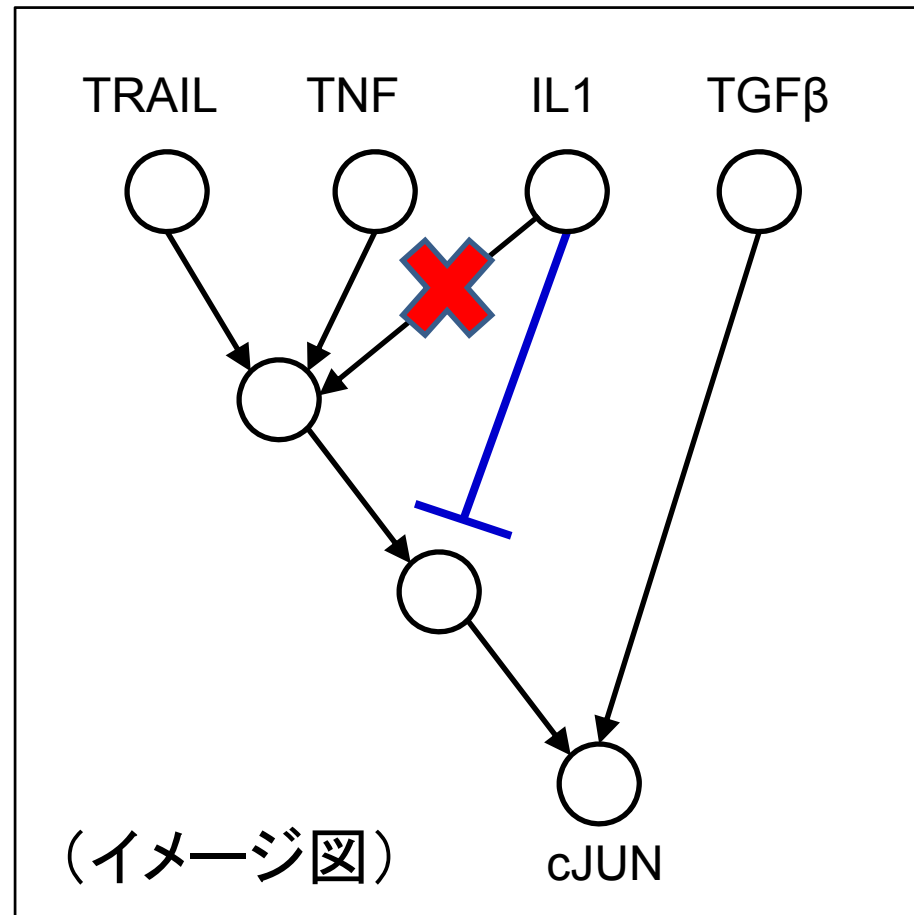
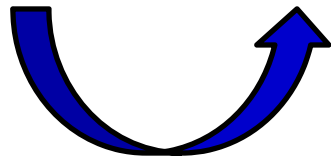


- Proc. Of OSB2009, pp. 245–253, 2009.
- BMC Sys. Biol. in press.
- IET Sys. Biol. in press

③計測データに基づく活性化ネットワーク推定技術 公開 ネットワーク補完技術

- 現在のネットワークに最小の修正を行って実験結果と一致するようにする

| | cJUN (現ネットワーク) | cJUN (実験結果) |
|-------|-------------------|----------------|
| TRAIL | ○ | ○ |
| TNF | ○ | ○ |
| IL1 | ○ | × |
| TGFβ | ○ | ○ |

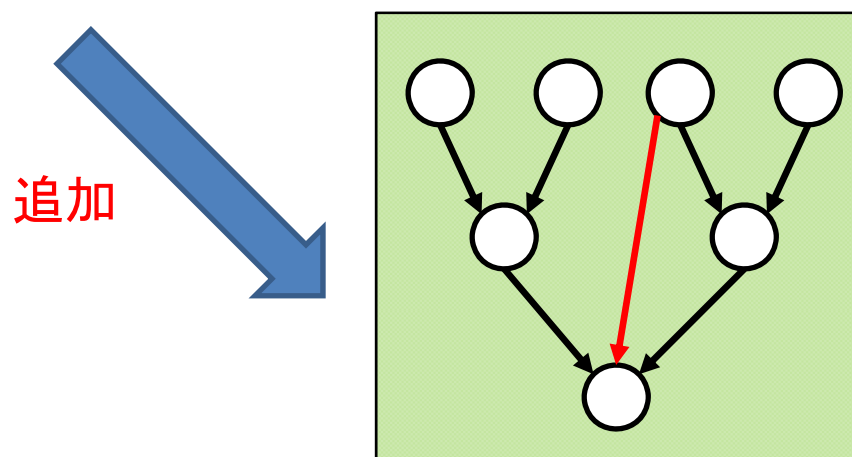
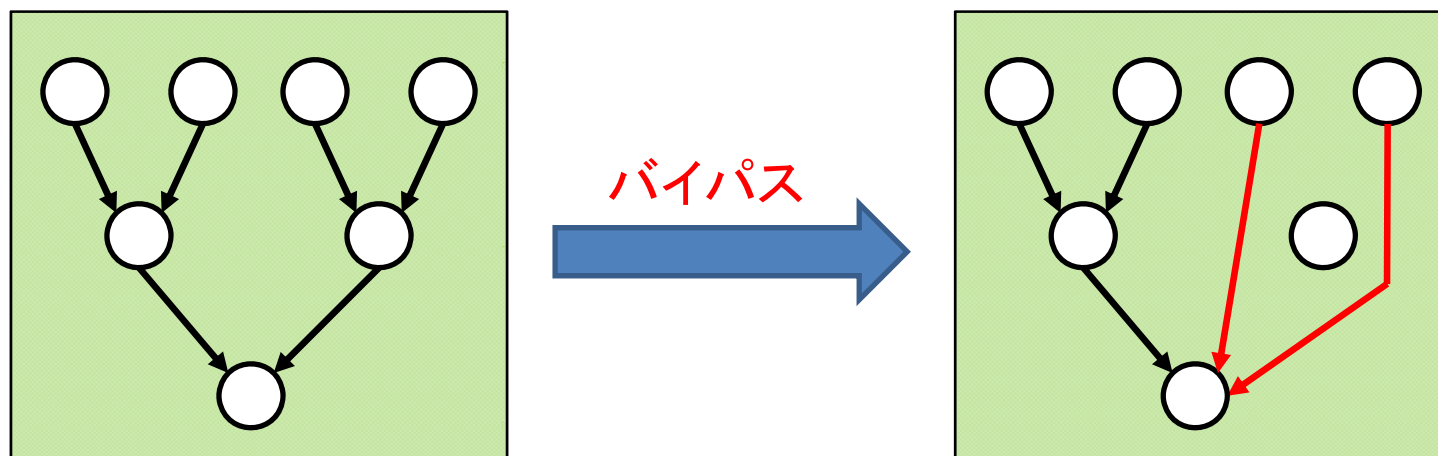


③計測データに基づく活性化ネットワーク推定技術 公開

ネットワーク補完技術

二種類の補完

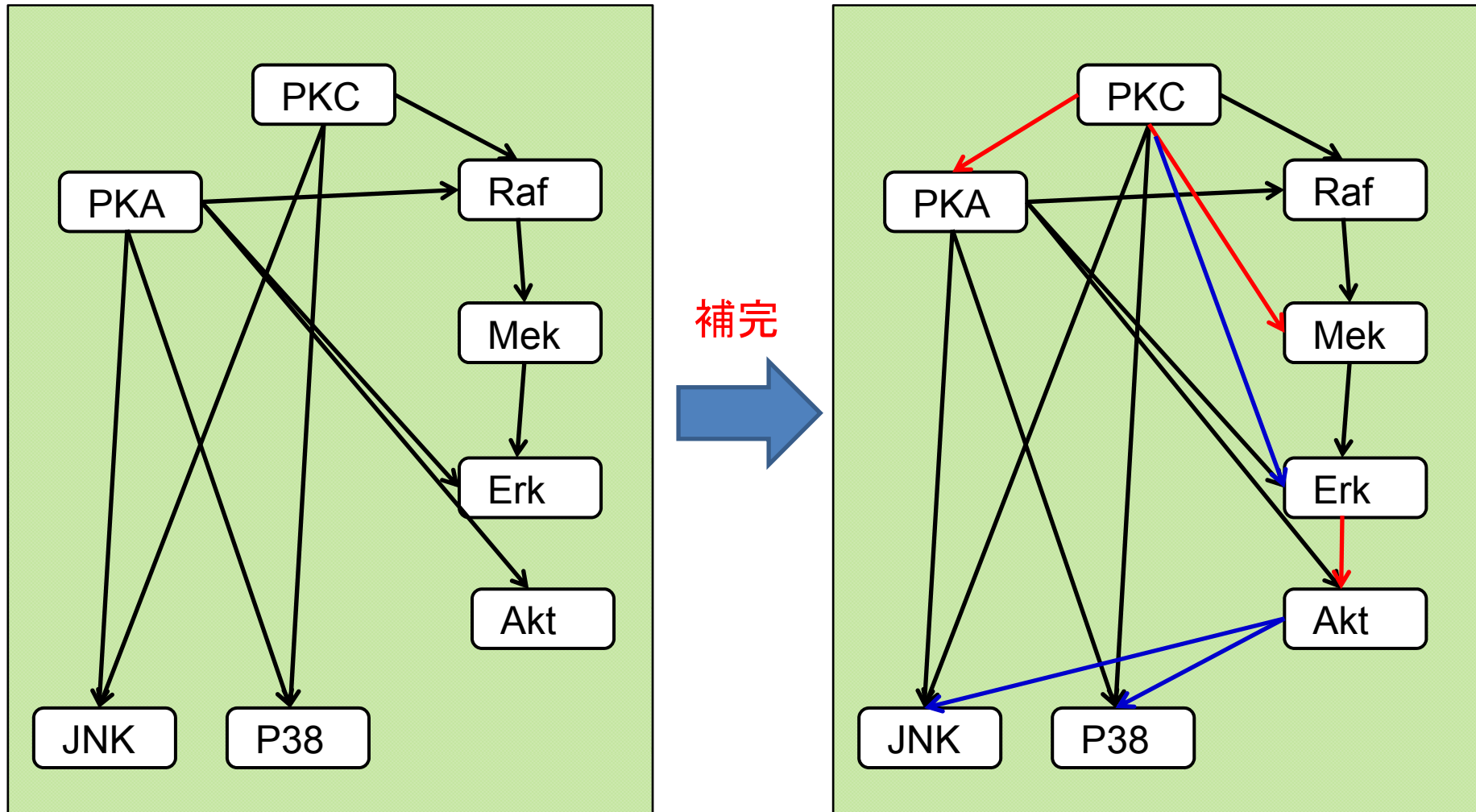
- 頂点の**バイパス**(ノイズが多すぎる場合)
- 辺の**追加**(新たな関係の追加)



頂点ごとに可能な補完を試して、
最も実験データとの誤差が
少なくなった補完結果を採用

③計測データに基づく活性化ネットワーク推定技術 公開 ネットワーク補完技術

シグナル伝達ネットワークへの適用



→ ほぼ確実

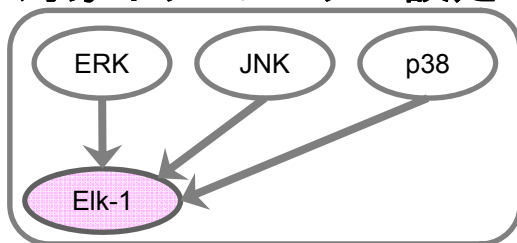
→ 可能性あり

まとめ

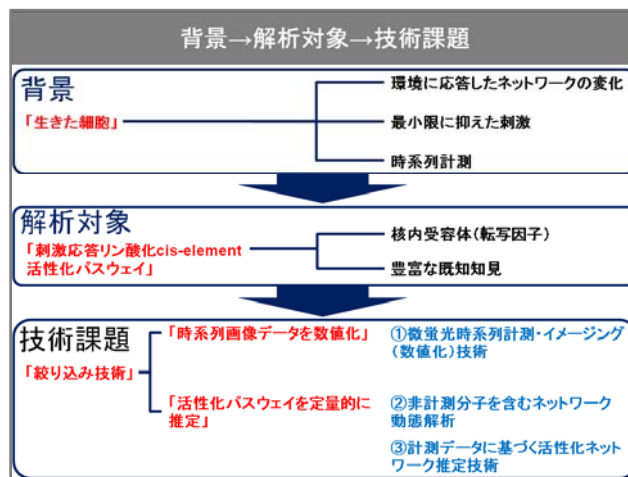
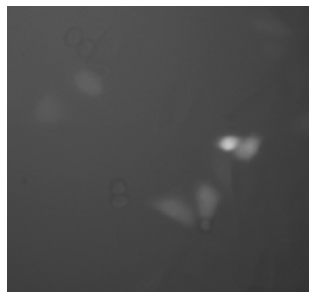
刺激応答リン酸化cis-elementに関して、
生きた細胞内で活性化ネットワークの同定
を可能にする新要素技術を開発した。

Input

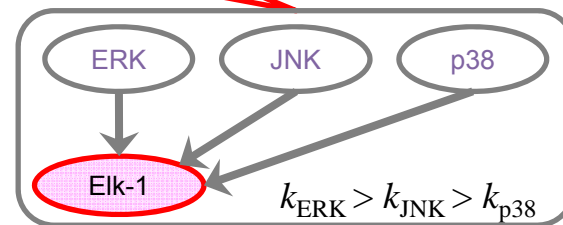
対象ネットワークの設定



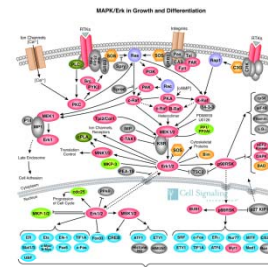
細胞アレイ(well)による
撮像



Output



高精度パラメータ推定



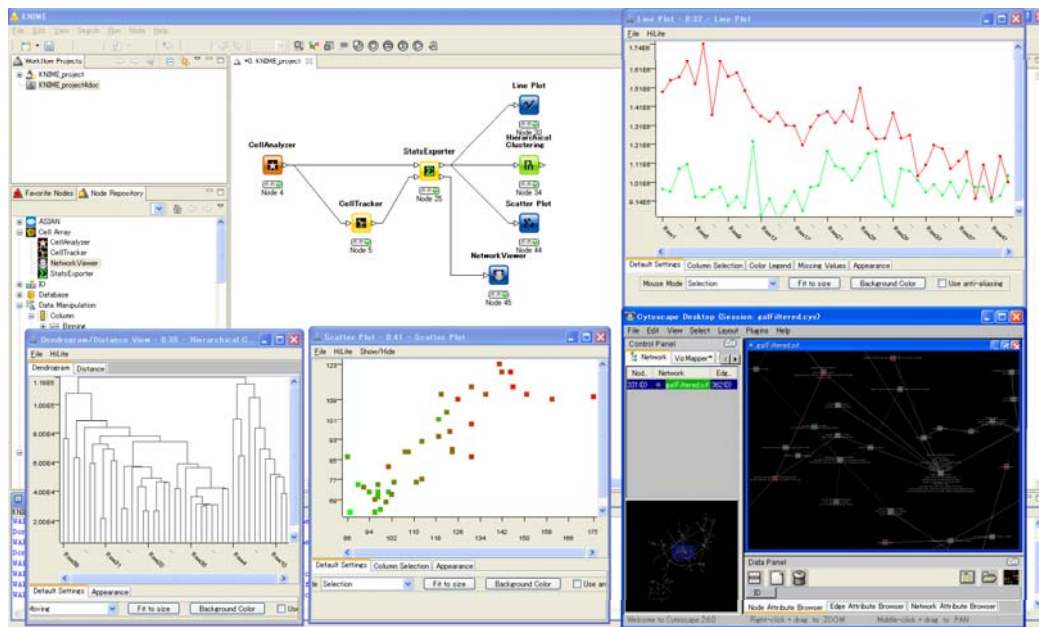
ネットワーク補完

生細胞内の活性化ネットワーク
を同定・検証・拡張

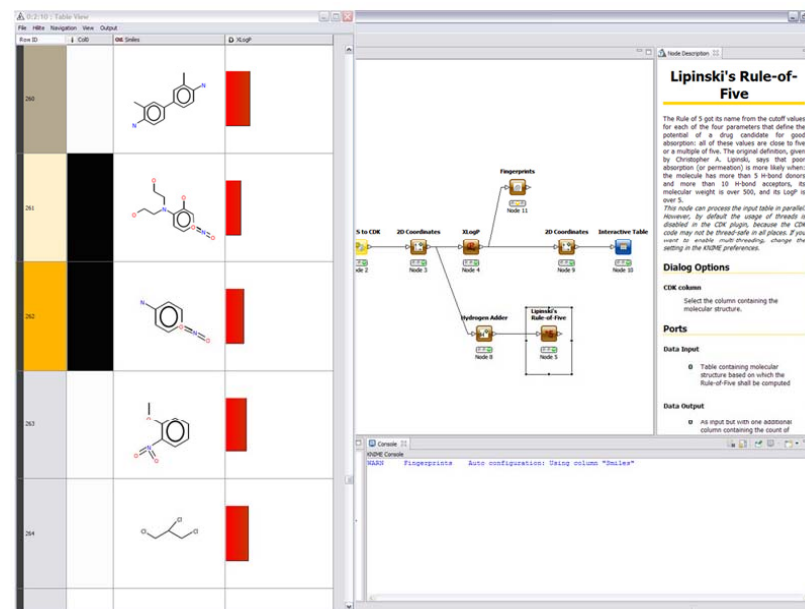
要素技術に基づく解析ソフトウェア

1. 「細胞組織の連続動画画像情報からの高精度特徴抽出システム」
2. 「Cell Array KNIMEワークフロー」

KNIME化による解析の可視化と利便性の向上



KNIME化によるChem-Bio解析への拡張



成果と実用化可能性

成果

- 特許 2
- 論文 97
- 学会発表・講演 78

実用化可能性

①細胞組織の連続動画画像情報からの高精度特徴抽出システム

・多重閾値の設定等の微弱蛍光を捉えるアルゴリズムは新規性があり一般的なものであるため、計測機器付属の既存ソフトウェアへの組み込みにより市場化が可能な段階にある。

② Cell Array KNIMEワークフロー

・数理解析に不案内な利用者の利便性を考慮して、KNIMEによって可視化と各解析段階のコンパートメント化を実現した。これにより、利用者は複雑な解析を、可視化された手続きに沿って容易に実行できる。これらのソフトウェアは、コンピュータのOSに依存せず通常のPCに実装可能であり、提供が容易である。

・動態解析ソフトウェアは、採用した既存技術の一つであるDifferential Eliminationが実装されているMapleソフトへの組み込みを計画している。