

Rho 族 GTP アーゼ・インタラクトーム・ ネットワークの再構築： 細胞核受容体とのクロストークの調整メカニズム

Reconstructing Rho Family GTPase Interactome Networks:
On the regulation mechanism of crosstalk with cellular nuclear receptors

劉 健勤† 下原 勝憲†
Jian-Qin Liu Katsunori Shimohara

1. まえがき

Rho 族 GTPase[1,2]は、細胞の信号伝達作用に重要な役割を担い、細胞筋肉をはじめ細胞にとっても不可欠のメッセンジャーである。それと関連が深いキナーゼや脱リン酸化酵素が実験により次々と発見された。一方、ゲノム情報に関わる技術の進展に伴い、創薬のための生物情報学の分野ではタンパク質からタンパク質相互作用[14]までのインタラクトーム・ネットワーク[11]が注目されている。

本報告では、Rho 族 GTP アーゼのネットワークの視点から創薬のための生物情報学的な支援ツールの設計への展開として、細胞信号伝達におけるクロストークなど未知のタンパク質間相互作用の解析を取り上げる。具体的には次の二つの課題がある：

- (1) Rho 族 GTP アーゼ・ネットワークの構造について、生化学的な実験データに基づいて、キナーゼと脱リン酸化酵素の相互作用による細胞コミュニケーションのクロストークの創発メカニズムを解明する。さらに細胞内の複数種の受容体[3,4,5,6]と相互作用する Rho 族 GTP アーゼによるパスウェイの同期や安定性を確保した上で、細胞内と細胞間コミュニケーションの調整機構を設計する。
- (2) 栄養条件下の哺乳細胞としてラットのプロテオームの配列に対する Rho 族 GTP アーゼのキナーゼ・ネットワークによって、実験の低コスト化が可能な線虫 (*C. elegans*) とシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いた GTP アーゼの効能を検討して、種を超えたタンパク質間相互作用であるインターログ (interlog)、遺伝子間相互作用を取り入れたトランスクリプトーム (transcriptome) を統合したタンパク質インタラクトーム (interactome) ネットワークの構築をめざす。

ナノバイオサイエンスの観点からはナノバイオマシンの実現、分子生物学の実験、生物情報学の理論など多彩な展開があるが[7, 8, 9, 15]、ここでは新しい方法論として、分子生物学の実験から未知のパスウェイのシグナリング (signaling) メカニズムの解明まで一体化したシステムの創出を狙っている。ポストゲノム時代の急務であるインタラクトーム (interactome) ・ネットワークに関して、単純な生物のものが明らかにされつつあるなか[11]、機能的側面から Rho 族 GTPase インタラクトーム・ネットワークの構築を試みる[10]。

2. Rho 族 GTP アーゼ・インタラクトーム・ネットワークの構造

現在の分子生物学の実験水準をみると、実験データから一つ一つのパスウェイを構造化でき、プロテオーム・レベルでの相互作用を対象とした Rho 族 GTP アーゼ・インタラクトーム・ネットワークモデルに対するシミュレーションは完全なインタラクトーム・マップ作りに必要なステップとなる。ここでは核受容体との相互作用、細胞内の信号経路の相互作用、細胞間の信号分子の相互作用を検討することとなる。キナーゼ・ネットワークに対する検討課題およびステップは以下のとおりである：

- (1) Rho 族 GTP アーゼに関する信号経路のモデリング；
- (2) キナーゼとリン酸化酵素に関する信号経路のモデリング；
- (3) クロストークとその信号作用；
- (4) Rho 族 GTP アーゼに関する信号経路のクロストーキング；
- (5) Rho 族 GTP アーゼの信号経路とキナーゼとリン酸化酵素の信号経路の相互作用；
- (6) キナーゼとリン酸化酵素の信号経路のクロストーキング；
- (7) 核受容体、細胞内の信号経路および細胞間の信号分子の相互作用；
- (8) 相互作用下の安定性メカニズム；
- (9) 相互作用下のロバスト性メカニズム；
- (10) 相互作用下の一般的な信号経路の複雑性の制御；
- (11) 部分経路からクロストーキングを含む大域的な信号経路の再構築。

ここで、Rho 族 GTP アーゼに関する信号経路は上流経路であり、エフェクターの信号経路は下流経路である。この間にフィードバックは存在する。

3. Rho 族 GTP アーゼ・インタラクトーム・ネットワークのクロストーク・メカニズムの解析

3.1 新しい方法論をめざす仮説推論 (abduction) ・ネットワーク

細胞信号パスウェイの DOE (differential ordinary equation) を用いてパラメータを獲得し、その定量的なモデル化が可能となった。このレベルでの生物情報学のツール開発が現在最も活発であり、システム生物学ではインタラクトーム構築のための方法や技術は公開されている。CBI グランドチャレンジ[3]にあるように核受容体[4,5,6]に

† ATR ネットワーク情報学研究所, ATR Network Informatics Laboratories

関する細胞内の信号経路は重要な研究トピックスである。本研究は、分子計算の演算子に基づく生物情報学の方法論としてモデル化とシミュレーション（あるいはシミュレータ）とが一致することを特徴としており、次の三つ部分から構成される：

(1) システム生物学に向けた仮説推論（アブダクション/abduction）

全ての事例から一般的なルールを抽出するのが帰納であり、ルールを利用して特別な事例を説明するのが演繹である。但し、Rho 族 GTP アーゼ・インタラクトーム・ネットワークの場合には仮説推論によるしかない。即ち実験から得られた定量的な信号経路は局所的なものであり、全体のネットワークの構造ルールは未知である。従って仮説推論により、実験のデータとインタラクトームの現象からインタラクトーム構築の道を選択していくしかない。

(2) 計算論的分子生物学が導くモデル

数値的な DOE のシミュレーションにより安定性を有する信号経路の係数を確認できる。また Rho 族 GTP アーゼに関するタンパク質の相互作用の本質をオントロジーの実行可能性の論理関係から獲得できる。それらからクロストークを維持する制御メカニズムを設計する。

(3) 生物情報学による計算

スケールフリー（Scale Free）ネットワークなどのモデル化手法を利用して相互作用ネットワークを構造化することにより、族（ファミリー）内のパスウェイに関して実験で発現したパスウェイのシミュレーションを行う。ここで、局所性と大域性とを接合するネットワークを n_H に関する生化学反応の感度（sensitivity）理論[13]から導出する。

3.2 仮説推論（abduction）・ネットワークによる分子生物学の未知メカニズムの解明

本論文では、生物情報学の計算論的なモデルを提案する。そして、このモデルによって、たんぱく質相互作用ネットワークを研究する。このモデルの入力は、シグナリング・パスウェイの反応物とそれに関する生化学反応定数であり、このモデルの出力は、再構造されたパスウェイ・ネットワークの反応物である。このモデルの中核は要素としてシグナリング・パスウェイを利用し、グラフ書き換えのルールによって、パスウェイ・ネットワークの再構造を行う。ここで、パスウェイは超グラフのデータ構造によって表現される。書き換えルールは超グラフの中でどの頂点と辺を更新（delete と add）するかという操作を定義する。パスウェイ・ネットワークを再構造するために、(1) 生化学計算による関連生化学反応定数の同定、(2) 規格化 n_H 定数の比較によるパスウェイの同調は必要になる。ここで、(1) 濃度の変動範囲がしきい値以下であり、かつ(2) n_H 定数の値がしきい値以上になるという条件を満たすパスウェイを最終結果として採用する。

以下の式において A, B は GEFs, GAPs とする。C, D, E は Rho, Rac, Cdc42, F, G はキナーゼとリン酸化酵素とする。パスウェイは以下のように定義される：

```
FG(A,B) = pathway (A, B) = {C, D};
C = subpathway1 (A,B,e1,e2);
D = subpathway2 (A,B,e3,e4);
信号分子は A, B, C, D である。
```

定数は e1, e2, e3, e4 である。

```
Fk (F,G) = pathway (C,D,E) = {F,G};
```

```
F = subpathway3 (C,D,e5,e6);
```

```
G = subpathway4 (C,D,E,e7,e8,e9);
```

信号分子は E, F, G である。

定数は e5, e6, e7, e8, e9 である。

以下は DOE に関する生化学反応を示している：

```
d/dt(C) = e1 * d/dt(A) + e2 * d/dt(B)
```

```
d/dt(D) = e3 * d/dt(A) + e4 * d/dt(B)
```

```
d/dt(F) = e5 * d/dt(C) + e6 * d/dt(D)
```

```
d/dt(G) = e7 * d/dt(C) + e8 * d/dt(D) + e9 * d/dt(E).
```

ここでネットワークの中核は、仮説推論とクロストークとの相互作用の統合メカニズムである。対応するアルゴリズムの中核部分は以下のように記述できる：

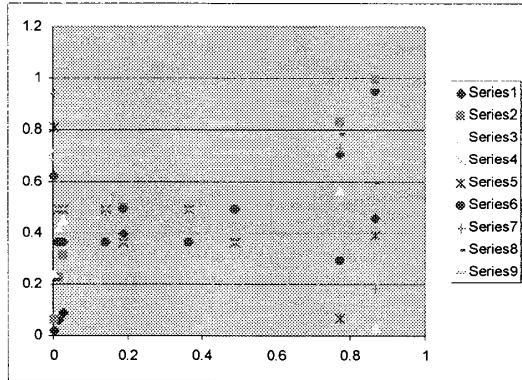
```
parallel-computing-module-for-crosstalked-interactome-
networking (pathway-set)
for i=0 to interactome-number
{
quantitative computation for pathways;
crosstalk design;
abduction-based verification;
Hill coefficient ( $n_H$ ) estimation;
sensitivity analysis for inference of sustainable pathways;
globally reconstructing the interactome network;
}
```

このモデルを用いて実験から得られた定量的な信号経路のシミュレーションを行っている。パスウェイに関する激発（activation）のアルゴリズムを以下に示す：

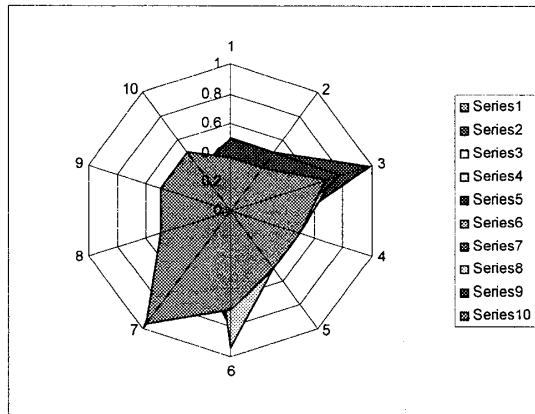
```
Pathway-activation (Readout)
{"engineered pathways"(この概念が[12]参照) for
computing, readout is realized by immunofluoroanalysis);
double Concentration-Threshold = 0.00005;
double Detected-concentration-of-labeled-molecules: real in
[0.00000, 1.00000];
int Kinase1, Phosphatase1; /* Boolean */
int Kinase2, Phosphatase2; /* Boolean */
{
Rho-GTPase-concentration := 0.99999;
Kinase1-concentration := 0.24999;
Kinase2-concentration := 0.24999;
Phosphatase1-concentration := 0.24999;
Phosphatase2-concentration := 0.24999;
initialization;
labelp:
Activating-the-pathways(Rho-GTPases);
Activating-the-pathway(Kinase1,
Phosphatase1);
Activating-the-pathway(Kinase2,
Phosphatase2);
Detected-concentration-of-labeled
-molecules-threshold;
if(the-concentration<threshold){goto labelp}
}
```

このプロセスに対する計算手順は次の通りである：① MDCK 細胞とその培養の準備、Rho 族 GTPases と関連する

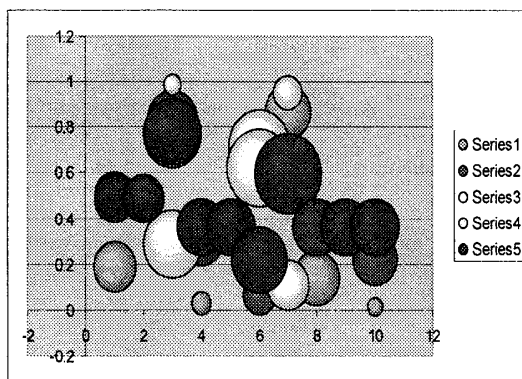
信号分子の抗体活性; ②調整された信号パスウェイに対するリン酸化の分析評価の実行; ③リン酸化の分析物への抗体の導入; ④免疫蛍光分析によるリン酸化と脱リン酸化結果の検出。



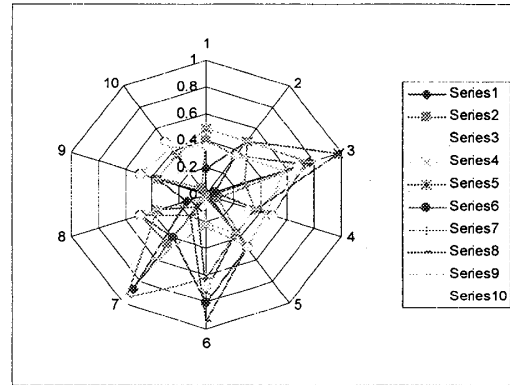
(a)



(b)

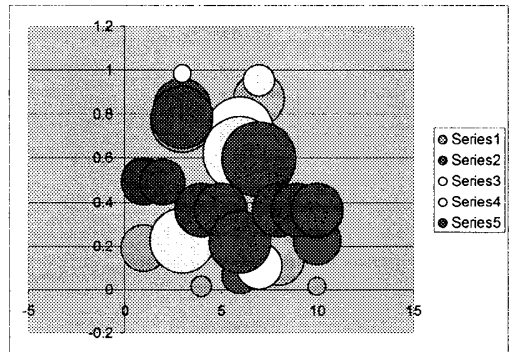


(c)

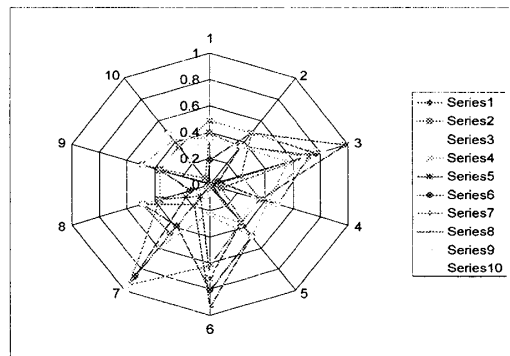


(d)

図1 平均値による導出されたネットワーク

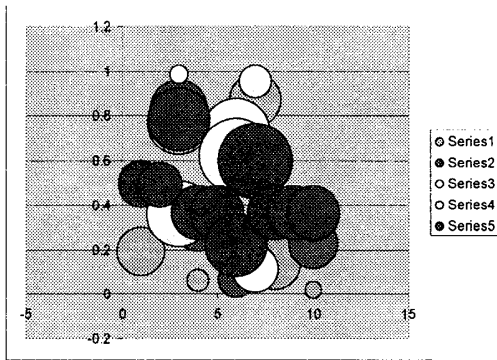


(a)

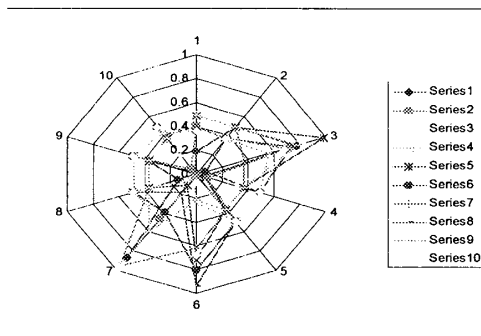


(b)

図2 下限による導出されたネットワーク



(a)



(b)

図3 上限による導出されたネットワーク

これまで我々10対10個のリン酸化と脱リン酸化酵素の相互作用を計算し、安定性を有するパスウェイに対する規格化 n_H 感度理論により計算されるネットワークを得た。この規格化 n_H は我々の考案したものである。図1(a)は10族(ファミリー)間の関連性、(b)は安定性の領域を10階段で表している。図1(c)、図2(a)、図3(a)はパスウェイの安定性に対するGTPaseの飽和状態に達する値域を示す: Rho, Rac, Cdc42の規格化 n_H の平均値は: 0.021879, 0.241363, 0.470093である。上限は0.059652, 0.360967, 0.4888111であり、下限は0.015142, 0.224374, 0.42122である。図1(d)と図2、3の(b)はそれらに対応する相互作用ネットワークを示す。それらに核受容体、細胞内の信号経路および細胞間の信号分子の相互作用を導入して安定なパスウェイが得られた。

3. 結論

本報告では、細胞内でのRho族GTPアーゼによりリン酸化酵素と非リン酸化酵素の信号分子の相互作用を制御するメカニズムを利用した、信号伝達ネットワークのクロストーク・メカニズムの探索について述べた。得られた結論は以下のとおりである: ①核受容体との相互作用下で、細胞内で安定なパスウェイを獲得するために必要なRho族・GTPアーゼ・インタラクトーム・ネットワークを構築した; ②一定的な規格化 n_H 感度理論の尺度を確認した; ③シミュレーションによりRho族GTPアーゼ・インタラクトーム・ネットワークの中での核受容体との相互作用を確認した。本結果の重要性は“核受容体との相互作用”に関す

る知見として創薬研究の方法論や技術への波及する点にあると確信する。今後は生細胞におけるRho族GTPアーゼ・インタラクトーム・ネットワークの医薬品効果のシミュレーション・モデルとそのシミュレータの設計を進めていく。

謝辞

本研究は、独立行政法人情報通信研究機構の研究委託「人間情報コミュニケーションの研究開発」により実施したものである。貝淵宏三教授、黒田真也特任助教授、天野睦紀講師、神沼二真教授からのご助言に感謝する。

(主要な)参考文献:

1. Sandrine Etienne-Manneville, Alan Hall, Rho GTPases in cell biology, *Nature* 420, 2002; 629-635.
2. K. Kaibuchi, S. Kuroda, M. Amano, Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells, *Annu. Rev. Biochem.* 68 (1999) 459-486.
3. CBIのグランドチャレンジ
<http://www.cbi.or.jp/cbi/jigyuu/grandJ.html>
4. 核内受容体(NR)サイト
http://www.cbi.or.jp/cbi/NR_Support_Site/NR_Support_Site.html
5. <http://www.cbi.or.jp/cbi/seminar/2004.04.27.00.html>
6. Tsuguchika Kaminuma, Pathways and networks of nuclear receptors and modeling of syndrome X, *Chem-Bio Informatics Journal*, Vol. 3, No. 3, 2003, pp.130-156.
7. M. Kanehisa, P. Bork, Bioinformatics in the post-sequence era, *Nature Genetics* 33, 2003; 305-310.
8. M. Hayashida, N. Ueda and T. Akutsu, Inferring strengths of protein-protein interactions from experimental data using linear programming, *Bioinformatics*, 19, ii58-ii65, 2003.
9. Shuhei Kimura, Mariko Hatakeyama and Akihiko Konagaya, Inference of S-system Models of Genetic Networks from Noisy Time-series Data, *Chem-Bio Informatics Journal*, Vol. 4 No. 1 2004, pp.1-14.
10. 劉健勤、下原勝憲、キナーゼコンピューティングの理論からナノバイオインフォマティクスへの展開 I: クロストーク・メカニズムの探索, 情報処理学会研究報告, Vol.2004, No.42, 2004年5月7日, pp.1-4.
11. Siming Li, Christopher M. Armstrong, Nicolas Bertin, et al., A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*, *Science*, 303, 2004; 540-543.
12. Lluís Masip, Jonathan L. Pan, Suranjana Haldar, et al., An engineered pathway for the formation of protein disulfide bonds, *Science*, 303, 2004; 1185-1189.
13. Daniel E. Koshland Jr. The era of pathway quantification, *Science*, 280, 1998; 852-853.
14. L. Giot, J.S. Bader, C. Brouwer, et al., A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*, *Science*, 302, 2003; 1727-1736.
15. KEGG PATHWAY Database:
<http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway.html>