

平成 21 年 4 月 4 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18300098

研究課題名(和文) 大規模代謝・遺伝子ネットワークのダイナミックシミュレーションとシステム解析

研究課題名(英文) Dynamic simulation and system analysis for gene regulatory networks

研究代表者

倉田 博之(KURATA HIROYUKI)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授

研究者番号：90251371

研究成果の概要：

大腸菌アンモニア同化システムの動的モデルをシステム解析することにより環境中のアンモニア濃度の変化に対してシステムがヒステリシスを示すことを予測して、生物実験を用いて証明した。ヒステリシスがポジティブフィードバック制御に起因することを、理論解析により明らかにした。また、システムのロバストネス解析によって、窒素同化システムは、ロバストな部分とファインチューンの部分明確に分かれていることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2007年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：シミュレーション工学，生体生命情報学，ゲノム，微生物，ロバストネス

1. 研究開始当初の背景

システム生物学の目的のひとつは、細胞の生命分子ネットワークマップを構築して、生命を動的システムとして理解することである。コンピュータシミュレーションによって、生命システムをどのように理解すればよいだろうか？環境変化や遺伝的变化に対して、細胞中の分子濃度の時間変化を正確に予測することや、シミュレーション予測と実験の矛盾を発見して、新しい反応を発見し、ネットワークマップを改良していくことが行われている。いずれの場合も、動的挙動を精密にシミュレーションするために、正確な速度パラメータの測定が必要となる。問題は膨大な数の生化学パラメータの測定が難しいことである。一方、生命システムの本質的性質、たとえば、ロバストネス、エボルバビリティ、自己増殖性、を生命分子ネットワークに基づいて理解するために、生命システムのモデル化、シミュレーション、システム解析が行われている。もちろん生化学パラメータ値は重要であるが、生命分子ネットワークの制御構造（フィードバック、フィードフォワード、重複経路など）を理解することも大切である。このような考え方は、制御工学におけるシステム解析に由来するものであり、生命システムの解析に応用できる。

生命システムは、遺伝的变化や環境変化に対して、生命の恒常性を維持するというロバストネスを示す。ロバストネスは、生命システムの本質的性質である。遺伝子数が十以下の小規模なシステムに対して、フィードバック制御、経路の重複性、あるいはネットワーク自体の構造安定性などによってロバストネスが生じることが指摘されているが、大規模システムではどのような仕組みで実現されているのかはほとんど解明されていない。化学プラントのような大規模人工システムは、他のサブシステムと機能的に分離できる高い独立性をもつモジュールから、全体のシステムが構築されている。ロバストネスを生み出すメカニズムについては、十分な検討が行われ、システムの安定性、信頼性、安全性を保証している。しかし、生命システムの場合は、トポロジカルな構造に基づいて、モジュール分解が試みられているが、モジュールの機能的独立性は低く、モジュール間にさまざまなクロストークがある。

代表的な大規模動的モデルとして、Tysonらの細胞周期シミュレーションがある。彼らのモデルは、生化学パラメータの測定に基づくというよりは、既存の定性的実験事実、たとえば、変異株の分裂速度が低下するなど、と一致する数理モデルである。既存の実験データは十分に説明している。しかし、ネットワークの制御構造を同定していないので、シ

ステム解析はほとんど行われていない。

我々は、大規模代謝・遺伝子制御ネットワークのモデル化とシステム解析を目指して、CADLIVE (Computer-Aided Design of Living systEms) シミュレータを開発した。大規模な生命反応式を自動的に数学モデルに変換し、並列処理と組み合わせて高速シミュレーションを可能にした。そして、生命分子ネットワークが生み出すロバストネスを解析するために、ネットワークを機能モジュールに分解する方法を提案した。クロストークを含むネットワークに適用できる生命システムに適した方法である。これによって、ネットワークの制御構造が明らかになり、基本的制御ループの機能を個々に解析することが可能になる。

2. 研究の目的

生命システムは、遺伝的变化や環境変化に対して、生命の恒常性を維持するというロバストネスを示す。ロバストネスは、生命システムの本質的性質であるが、大規模システムではどのような仕組みで実現されているのかはほとんど解明されていない。

大腸菌中央代謝システム（解糖系・TCA 回路）とグルコース同化やアンモニア同化を制御する遺伝子ネットワークからなる大規模ダイナミックモデルのシミュレーションとシステム解析を行う手法を開発して、環境や遺伝的变化に対してロバストネスを生み出すメカニズムを解明する。コンピュータシミュレーションによって得られたシステム解析結果を生物実験によって証明する。このため、以下の新しい技術を開発する。

1. 大規模代謝・遺伝子制御ネットワークの数学モデル化と基本的制御ループの同定。
2. 大規模ダイナミックモデルの分割統合法による最適化技術
3. 制御ループの役割を決定するための数学モデル比較解析技術
4. 実験によるシステムのロバストネス解析（感度解析と安定性解析）法の提案

3. 研究の方法

(1) 遺伝子制御・代謝ネットワークの構築 CADLIVE を用いて、大腸菌中央代謝システム（解糖系・TCA 回路）とグルコース同化・アンモニア同化を制御する遺伝子ネットワークを統合するダイナミックモデルを構築する。環境中のグルコース同化速度は Phospho-Transfer System (PTS) システムによって制御される。PEP のリン酸基をリン酸化酵素群を介してグルコースに付加し、G6P

として細胞内に同化する。モニターされた G6P 濃度の情報は、cAMP に伝達されて、複数の正と負のフィードバックループから構成される、CRP, Mlc, CYA の遺伝子制御ネットワークを通して、リン酸化酵素群の発現量を調節する。アンモニア同化システムは、TCA 回路中の 2-ketoglutarate に環境中のアンモニアを付加して、glutamate, glutamine を生成する。この変換反応は、グルタミン合成酵素(GS) が触媒し、GS の活性と合成は多重の正負のフィードバックによって制御される。グルコース同化システムは、glucose, G6P, phosphoenolpyruvate (PEP), pyruvate (PYR) を通して、解糖系に結合している。アンモニア同化システムは、2-ketoglutarate, アセチルリン酸を通して、中央代謝システムに結合している。グルコース同化とアンモニア同化システムは、cAMP によって結合される。統合システムは、環境中のアンモニア濃度やグルコース濃度変化に対して、細胞内の窒素源 (N = glutamine) と炭素源 (C = 2-ketoglutarate) の比 (N/C 比) の恒常性を制御する重要な部分であり、微生物の栄養摂取調節に、本質的な役割を果たすシステムである。

(2) 大規模ネットワークのモジュール分解
大規模ネットワークをそのまま理解することは困難である。ネットワークを階層的なモジュールに分解してから、全体を統合し、解析することは適切な方法である。制御工学の観点から、生命分子ネットワークは、分子モジュール、機能モジュール、フラックスモジュール(制御モジュール、反応モジュールなど)に分解する(詳細は準備状況等参照)。分子モジュールは個々の分子である。機能モジュールは、制御の観点から特定の機能を発揮する分子モジュールの集合である。たとえば、アンモニア濃度を感知するセンサーモジュール、センサーからの信号を計算するコンピュータモジュール、信号を増幅するアンプリファイヤーモジュール、遺伝子からタンパク質を合成するアクチュエータモジュールなどである。制御モジュールは、機能モジュール間を結びつけ、特定の制御を実行するモジュールである。たとえば、フィードバック制御モジュールは、センサー、コンピュータ、アクチュエータの機能モジュールから構成されて、特定のパラメータを目標値に調節する。一方、反応モジュールは、物質変換やエネルギーの流れと考えてよい。たとえば、解糖系の物質変換の流れは反応モジュールである。反応モジュールにおける反応速度は、制御モジュールが調節する。

我々は、複雑な代謝・遺伝子制御システムを理解するために、ネットワークを制御モジュール(フィードバックループ、フィードフ

ォワードループ)や反応モジュールに分解する。個々の制御ループを集積して、より大きな制御モジュールが生成し、階層的モジュール構造を構成する。たとえば、PTS モデルは、リン酸化酵素群の合成量を制御する多数のフィードバックモジュールをひとつにまとめて、リン酸化酵素合成制御モジュールを構成する。アンモニア同化システムにおいては、多数のフィードバックループがあるが、それらは GS の合成と活性を調節するという点からみれば、ひとつの GS 合成活性制御モジュールにまとめられる。一方、中央代謝回路は、両制御モジュールが調節する反応モジュールである。反応モジュールとは、化学工場で考えれば、さまざまな反応が起こる反応槽にあたる。このように考えれば、複雑なシステムは、2つの制御モジュールと1つの反応モジュールから構成されることがわかる。

(3) 大規模ダイナミックモデルの最適化
統合された数学モデルは、複合体や修飾物を含めると約 300 の物質濃度パラメータをもつ大規模なモデルである。モデル中のすべての動力的パラメータを測定することはできないので、未知の動力的パラメータは、数学モデルが実験事実と適合するように最適化する。経験上 20 程度以上の生化学パラメータの最適化は非常に困難であるので、制御ループや反応モジュールの構造に基づいて、数学モデルをモジュール分割し、最適化された各モジュールを統合する。モジュール分割統合に基づく最適化のためのアルゴリズムを開発する。本システムでは、制御の構造に基づいて、中央代謝回路(解糖系+TCA 回路)、グルコース同化、アンモニア同化の3つのモジュールに分割する。各モジュールをそれぞれ最適化したのち、全体を統合するための最適化を行う。

各モジュールの最適化において、パラメータがローカル解に陥らないように、適応度(FITNESS)関数の評価に余裕をもたせて多様な解を作成する。さらに、統合後の全体システム中で解のグローバル性を消失させないようにするために、各モジュールを統合するとき、各パラメータ解のあらゆる組み合わせを効率的に探索するアルゴリズムを開発する。

(4) モデルの検証

数学モデルの最適化は、実験データの一部分を用いて行う。モデル作成に利用しなかった実験事実とシミュレーション結果を比較することによってモデルの検証を行う。次に、グルコース濃度やアンモニア濃度の変化に対する代謝物濃度や遺伝子発現量の時間変化を測定して、シミュレーション結果と比較することによって、モデルの検証を行う。

培養環境を正確に制御するために、連続培養槽を購入する。細胞中の代謝物濃度は酵素法を用いて測定する。遺伝子発現は、DNA マイクロアレイ、あるいは RT-PCR を用いて測定する。タンパク質濃度はウェスタンブロットを用いて、酵素活性のあるタンパク質は酵素法を用いて測定する。定常状態は、溶存酸素濃度、二酸化炭素濃度、グルコース濃度、アンモニア濃度測定によって確認する。実験は清水と共同で行う。RT-PCR で mRNA を定量するために、電気泳動などパターン撮影解析装置を購入する。

(5) シミュレータ公開

開発された代謝・遺伝子制御ネットワークのダイナミックモデルは WEB 上でフリーに利用できるシミュレータとして公開する。分子濃度や速度パラメータ、培養環境パラメータを GUI 上で、ユーザが設定してシミュレーションできるシステムとする。また、数学モデルをユーザの PC にダウンロードする仕組みを構築する。CADLIVE シミュレータの GUI 部分を強化し、数学モデルデータベースを構築する。WEB 上でのユーザフレンドリーなシミュレータやデータベース開発費用が必要である。

(6) システム解析

実験によって検証したダイナミックモデルを用いてシステム解析を行う。問題を設定し、それに解答するという形で解析する。大規模モデルでは、問題設定が曖昧であると、どのような評価をすればよいのかわからなくなる。本研究では、「どのような制御ループ(メカニズム)が、細胞内の窒素源(N = glutamine) と炭素源(C = 2-ketoglutarate) の比(N/C 比)のロバストネスを向上させるのか」という問題設定を行って、シミュレーションや実験を行って解答する。各制御ループの生物学的・制御工学的意味をシステム科学の言葉で説明する。

具体的には、環境変化や内部パラメータ変化に対して、細胞内の N/C 比にロバストネスを与えるメカニズムを解明するために、感度解析や安定性解析を行う。また、各制御ループの特性を理解するために、代替システムを提案し、それと実際のシステムと比較する(数学モデル比較解析法)。

(7) 数学モデル比較解析法

システム中の各制御ループの機能を評価するために、それと代替のシステムにおける数学モデルを構築して、両者を比較する。たとえば、アンモニア同化システムの GS 活性制御は、双方向フィードバック制御であるが、その制御工学的・生物学的意味を考察するためには、代替システムとして、片方向フィ-

ードバックを構築して比較解析する。双方向フィードバックが、アンモニア濃度変化に対する N/C 比のロバストネス向上に役立つのかという問題が設定できる。

一般に制御の構造とパラメータ値の両者がシステムのロバストネスを決める。もし、特定の値のパラメータにおける比較であれば、ローカルな結果なので、比較した結果の信頼性は低い。数学モデル比較からグローバルな解析結果を引き出すためには、システムの評価に重大な影響を及ぼすパラメータ(支配的パラメータ)を抽出して、さらに、評価する性質以外は同等となるような拘束条件下で、支配的パラメータ空間を探索し、代替モデルと比較する。特定のパラメータの値に依存しないグローバルな解析結果が期待できる。

(8) シミュレーションと実験による感度解析感度解析は、定常状態において、システム中のあるパラメータに摂動を与えたとき、特定のパラメータ変数の変化量を評価することである。小さい感度はロバストネスが高いことを示す。環境変化や遺伝的变化に対して、システムの感度(ロバストネス)をシミュレーションや実験によって調べる。定常状態は、連続培養槽を用いて構築する。

① 環境からの摂動

グルコース濃度とアンモニア濃度を変化させ、N/C 比を測定して、感度解析を行う。濃度の変化量は、2 から 4 倍程度として、システムの状態が極端に変化しない定常状態付近で実験する。それによって、システムの遺伝子発現分布や代謝流束の変化を抑え、システムの不可逆的变化を抑制して、正確な感度解析が可能となる。

同様の感度解析を野生株と一遺伝子ノックアウト株(Δ Mlc, Δ CYA, Δ CRP, Δ UTUR, Δ PI, Δ PII, Δ GlnK, Δ NRI, Δ NRII など)について行う。ノックアウト株の感度解析によって、各遺伝子が担っている制御ループの全体における寄与を推定する。ある制御ループを担う遺伝子のノックアウトに対して、N/C 比の変化が大きければ、それに関わる制御ループは支配的な役割をもつことが分かる。各制御ループが相乗的に機能してロバストネスを生み出すメカニズムを解明する。

次に、グルコース濃度やアンモニア濃度を大きく変化させて、システムの N/C 比や GS 酵素を含むタンパク質の発現量変化を調べる。ネットワークの構造をみると、グルコース同化やアンモニア同化システムは、正のフィードバックループをもつので、大きな環境変化に対して、不可逆的变化を示す可能性がある。よって、グルコースやアンモニア濃度

の変化に対してN/C比や各タンパク質がヒステリシス現象を含む不可逆的变化が起こすかどうか調べる。タンパク質の発現レベルはDNAマイクロアレイのデータから推定する。DNAマイクロアレイは奈良先端大学院の森と協力する。

②内部パラメータ変化

内部パラメータとして、遺伝子発現量を変化させて、N/C比を測定する。野生株と同じ発現制御領域をもつ遺伝子をプラスミドに載せて、発現量を数倍増加させて、遺伝子発現量変化に対するN/C比の感度解析を行う。システムの遺伝的変異に対するロバストネスを評価する。各制御ループがどのようにして、内部パラメータ変化に対してロバストネスを与えているのか解明する。

(9) シミュレーションと実験による安定性解析

安定性解析とは、システムに摂動をあたえたとき、元の状態にもどるまでの時間応答を理解することである。アンモニア濃度やグルコース濃度を変化させたとき、システムが、新しい定常状態に達するまでの時間変化を測定する。一般に応答速度が速いシステムは優れたシステムであるが、本モデルの場合、グルコース同化モジュールとアンモニア同化モジュールが、ネットワーク上では離れているので、どのようなメカニズムが応答速度を制御しているのかを解明する。ネットワーク上でアンモニア同化システムとグルコース同化システムを接近させた代替モデルを作成して、時間応答を比較解析する。

また、一時的に大きな濃度変化を受けるときは、遺伝子制御ネットワークが活発に働き、システム全体が大きく変化し、不可逆的にシステムが変化する可能性がある。実験とシミュレーションを用いて、そのような応答特性について調べる。

4. 研究成果

大腸菌の窒素同化システムの大規模な動的モデルを開発して、シミュレーションやシステム解析をすることにより環境中のアンモニア濃度の変化に対してシステム(GSやNRIのタンパク質)がヒステリシスを示すことが予測した。この予測は生物実験によって証明した。このヒステリシス挙動がポジティブフィードバック制御に起因することを、シンプルモデルを用いた理論解析により明らかにした。シンプルモデルにおいて立式した3次方程式を解くことによって、システムが複数の定常解を示すアンモニア濃度範囲があることがわかった。また、ポジティブフィード

バック制御を強くすると、複数の定常解を示すアンモニアの濃度範囲が拡大し、逆に弱くすると、定常解が1つになることを示した。以上からポジティブフィードバック制御が、ヒステリシスを生み出すメカニズムであることが明らかになった。

また、システムのロバストネスを調べるために、各速度パラメータに摂動を与えて、細胞内の窒素濃度と炭素濃度のバランスを調べた。GSの合成に関わる速度パラメータの変化に対して、そのバランスは比較的大きく変化したが、そのほかの速度パラメータ変化に対してはロバストであった。窒素同化システムは、ロバストな部分とファインチューンの部分がはっきりと分かれていることわかった。ロバストな部分は、環境からの選択圧が強く、そのようなロバストネスを生み出す必要があったと思われるが、ファインチューンな部分は、環境からの選択圧が弱いことがわかる。このような性質の分離から、システムが何を目的に設計されているのかが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

(1)Emi Shiraishi Kazuhiro Maeda Hiroyuki Kurata, A gradual update method for simulating the steady-state solution of stiff differential equations in metabolic circuits, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 32:283-288, 2009. 2月.

査読有

(2)Li W., Kurata H., Visualizing Global Properties of Large Complex Networks. *PLoS ONE* 3: e2541, 2008. 7月2日.

査読有

(3)Yousuke Nishio, Yoshihiro Usuda, Kazuhiko Matsui, Hiroyuki Kurata, Computer-aided rational design of the phosphotransferase system for enhanced glucose uptake in *Escherichia coli*, *Molecular Systems Biology*, 4: 160, 2008. 1月15日.

査読有

(4)Hiroyuki Kurata, Kentaro Inoue, Kazuhiro Maeda, Koichi Masaki, Yuki Shimokawa, Quanyu Zhao, Extended CADLIVE: a novel graphical notation for designing a biochemical network map that

enables computational pathway analysis, *Nucleic Acids Res.* 35:e134, 2007. 11月.
査読有

(5) H. Kurata, T. Tanaka, F. Ohnishi, Mathematical identification of critical reactions in the interlocked feedback model, *PLoS One*, 2:e1103, 2007. 10月31日
査読有

(6) Kouichi Masaki, Hiroyuki Kurata, A simple model of positive feedback of the nitrogen assimilation system in *E. coli*, *IPSJ Transactions on Mathematical Modeling and Its Applications*, 48:104-109, 2007. 3月15日
査読有

(7) H. Kurata*, H. El Samad*, R. Iwasaki, H. Othake, J.C. Doyle, I. Grigorova, C. Gross, and M. Khammash, Module-Based Analysis of Robustness Tradeoffs in the Heat Shock Response System, *PLoS Computational Biology*, 2:e59, 2006. 7月28日
査読有

(8) Shin Tanaka, Hiroyuki Kurata, Takeshi Ohashi, Effective and fast optimization for a dynamic model of the *Drosophila* circadian oscillator, *IEEE International Conference on Systems, Man, and Cybernetics*, 3596-3601, Taipei, Taiwan, October 8-11, 2006.
査読有

[学会発表] (計 8件)

(1) Kentaro Inoue, Tetsuya Shimabara, Toshikazu Onaka, Erika Fujiura, Hiroyuki Kurata, Extended CADLIVE: Computer-aided rational design of living systems. The proceedings of the 2th annual conference of the Japanese Society for Bioinformatics, Osaka, S02-1-2, 2008. December 15-16.

(2) Kazuhiro Maeda, Hiroyuki Kurata, Searching multiple sets of kinetic parameters values reproducing target experimental data in dynamic biochemical models. The proceedings of the 2008th annual conference of the Japanese Society for Bioinformatics, Osaka, S063-1-2, 2008. December 15-16.

(3) Hiroyuki Kurata, CADLIVE: Computer aided design of biochemical systems.

Supplement of *Journal of Biotechnology*: 13th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2008), Dailen, China, October 12-17, 2008. (Oral Presentation)

(4) Quanyu Zhao, Hiroyuki Kurata, Prediction of flux distribution of mutants by enzyme control fluxes with maximum entropy principal. Supplement of *Journal of Biotechnology*: 13th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2008), Dailen, China, October 12-17, 2008. (Oral Presentation)

(5) Yousuke Nishio, Yoshihiro Usuda, Kazuhiko Matsui, Hiroyuki Kurata, Computer-aided rational design of the phosphotransferase system for enhanced glucose uptake in *Escherichia coli*. Supplement of *Journal of Biotechnology*: 13th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2008), Dailen, China, October 12-17, 2008. (Oral Presentation)

(6) Kazuhiro Maeda, Hiroyuki Kurata, CADLIVE for Construction and Dynamic Simulation of Biochemical Networks, *Proceedings of Asia Pacific Biochemical Engineering Conference*, November 4-7, Taipei 2007.

(7) 真崎浩一, 倉田博之 大腸菌窒素同化システムのポジティブフィードバック制御シンプルモデル, 数理モデル化と問題解決研究報告, 名古屋大学, MPS-59:61-64 2006.5月26-26日

(8) Koichi Masaki, Hiroyuki Kurata, Sensitivity analysis for the *E. coli* nitrogen assimilation system, *The 16th International Conference on Genome Informatics*, Yokohama, 16:P010-1-2, 2006. December 18-20.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉田 博之 (KURATA HIROYUKI)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授
研究者番号: 90251371

(2) 研究分担者

清水 和幸 (SHIMIZU KAZUYUKI)

九州工業大学・大学院情報工学研究院・教授
研究者番号: 00150318

(3) 連携研究者

なし。