

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22860056

研究課題名（和文）大腸菌の代謝・遺伝子発現の統合モデルの開発

研究課題名（英文）Development of gene expression metabolic model of *Escherichia coli*

研究代表者

戸谷 吉博（TOYA YOSHIHIRO）

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特任助教

研究者番号：70582162

研究成果の概要（和文）：

細胞の代謝は転写、翻訳、酵素反応のレベルで制御されており、これらの複数の階層に跨ってどのように代謝が調節されているのかは大変興味深い。私は大腸菌の野生株や *arcA* 株(硝酸条件)を複数の培養条件で連続培養し、トランスクリプトーム、メタボローム、代謝フラックスを測定し、それぞれの調節機構を明らかにした。また、測定したマルチオミクスデータを構築した動的モデルを使って統合することで動的モデルのチューニングを実施し、*arcA* 株の遺伝子発現比を元にシミュレーションしたところ、予測された反応速度は実測フラックスとほぼ一致することを示した。異なる階層のオミクスデータを統合し、細胞内の調節機構を解明するためのプラットフォームとしての有用性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：

Cellular metabolism is regulated at transcription, translation, and enzymatic reactions. It is of interest how the metabolism is controlled at the multi-levels system. We measured transcriptome, metabolome, and metabolic fluxes for wild-type *E. coli* and the $\Delta arcA$ mutant under various conditions in continuous culture, and revealed the regulatory mechanism in each condition. Furthermore, the measured multi-omics data were integrated using the dynamic model and the model parameters were tuned. The *arcA* gene knockout condition was simulated based on the measured gene expressions. The simulated reaction rates were well matched with the ^{13}C flux values. In this study, we demonstrated that the dynamic model has a potential as a platform for the integration of different levels omics data in order to reveal the intracellular regulatory mechanisms.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：大腸菌、中心炭素代謝経路、動的シミュレーション、代謝フラックス解析、トランスクリプトーム、硝酸代謝、メタボローム、*arcA* 遺伝子欠損株

1. 研究開始当初の背景

微生物を利用した工業生産はアミノ酸、アルコール、有機酸、タンパク質など様々な対象について行われており、その生産性の向上は重要な研究課題である。代謝フラックス解析は細胞内の代謝物質の流れを明らかにする手法であり、近年では様々なレベルのオミックスデータと統合的に扱うことで、細胞を包括的に理解しようという研究が盛んである。また、細胞システムのモデル化・シミュレーションは、様々な実験条件における結果を短時間に予想できるだけでなく、実験では直接測定することができない情報を観察し、そのシステムの性質を数学的に解析することも可能にする。しかし、既存のモデルの多くは代謝レベルに特化されており、細胞が置かれる環境の変化に対し、転写・翻訳レベルでの調節制御を経て代謝物質やフラックスがどのように振る舞うか予測できるモデルが要求されている。

本研究では、我々の研究機関が各種網羅的データを容易に取得できる環境にあることを利用し、これらの先行研究のモデルを土台に、よりハイスループットなモデルの構築とその応用を目指した。

2. 研究の目的

細胞代謝は転写、翻訳、酵素反応のレベルで制御されており、これらの複数の階層に跨ってどのように代謝が調節されているのかは大変興味深い。大腸菌は好気、嫌気、硝酸条件において大きく異なった代謝の表現型を示し、その仕組みは複雑である。例えばクエン酸回路の遺伝子発現はグローバルレギュレーターのアーク (Aerobic respiration control) や Fnr (Fumarate and nitrate reduction) によって調節されているが、そのフラックスレベルでの調節はよく分かっていない。我々は外部環境の変化に応じた細胞の遺伝子発現、代謝ネットワークの調節機構の解明を目的に、マルチオミックスデータの比較解析、及び取得したオミックスデータを用いて動的モデルを構築し、データを統合することを研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌マルチオミックスデータの取得

代謝・遺伝子発現の統合モデルを開発し、また細胞システムが有する調節機構を解明するには、遺伝子発現量やタンパク質量、代謝物質濃度、代謝フラックスのデータが不可欠である。研究開始当初の計画では我々が過去に取得した E. coli Multi-omics Database (<http://ecoli.iab.keio.ac.jp/>)に記載さ

れているデータセットを利用する予定であったが、これらは中心炭素代謝経路の酵素の一遺伝子破壊株のデータであり、またこれらの細胞は同一環境で培養されていたため、グローバルな遺伝子発現調節とそれが代謝に及ぼす影響を解析するには不十分であることが研究の過程で明らかになった。そのため、本研究に適したデータセットを新たに取得した。

私は好気条件、嫌気条件、硝酸条件という細胞外環境や代謝状態が大きく変化する培養条件において、大腸菌野生株 (BW25113) のグルコース単一炭素源における連続培養を実施した。定常状態における細胞について、DNA マイクロアレイによってトランスクリプトーム (細胞内の転写物の総体) を、キャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) によりメタボローム (細胞内の代謝物質の総体) を測定した。さらに ^{13}C 安定同位体標識に基づいたフラックス解析を行なうことで代謝フラックス分布を測定した。また、好気呼吸に関するグローバルレギュレーターを破壊した *arcA* 遺伝子欠損株についても硝酸条件下で連続培養を行い、野生株と同様の手法でトランスクリプトーム、メタボローム、代謝フラックス分布のデータを取得した。

(2) 大腸菌の中心代謝経路のモデル構築

解糖系、クエン酸回路、ペントースリン酸経路、補充反応、発酵経路の酵素反応を含む動的モデルを構築した。それぞれの酵素の反応速度式やキネティックパラメータは先行研究のモデル (Chassagnole *et al.*, 2002; Usuda *et al.*, 2010, Kadir *et al.*, 2010) を元にした。また発酵反応など嫌気・硝酸条件のみ働く反応についても、別の文献より反応速度式やキネティックパラメータを取得し、モデルに実装した。

構築したモデルをプラットフォームとして、(1)で測定した実験データを入力し、マルチオミックスデータの統合を行った。モデルを構成する反応速度式では、フラックスは酵素量と反応に関与する代謝物質濃度の関数で表されているため、連続培養におけるフラックス (反応速度) とメタボロームデータから、それぞれの培養条件における定常状態を満たす酵素量を算出した。

(3) 同位体標識実験を利用したモデルパラメータの推定

動的モデルには多数の速度論パラメータが含まれており、精緻なモデルを構築するには、パラメータ取得の効率化が急務であった。我々は同位体標識技術を利用した酵素反応実験によって複数のパラメータを同条件下

において且つハイスループットに測定する手法を開発した。

本手法では、¹³C 代謝フラックス解析の技術を利用することで動的モデルを拡張し、中間代謝物質の濃度変化だけでなく、同位体標識パターンの変化もシミュレーションできるようにした。このモデルに含まれる速度論パラメータを最適化の対象として、実験で取得した中間代謝物質の同位体標識パターンの変化を説明できるモデルパラメータのセットを得た。

実験は、試験管内に同位体標識基質、補酵素、大腸菌の粗酵素液を加え、代謝反応を進行させた。CE-TOFMS を用いて時系列に代謝物質を測定し、解析対象経路上の中間代謝物質が同位体で標識される過程を測定した。

4. 研究成果

(1) 異なるレベルのオミックスデータを利用した大腸菌の代謝調節解析

我々は、大腸菌野生株の好気条件、嫌気条件、硝酸条件におけるマルチオミックスデータを取得し、好気条件や嫌気条件と比較することで、硝酸呼吸ではどのようなレベルでフラックスの調節がなされているかを調査した。

その結果、野生株の硝酸条件ではクエン酸回路遺伝子の発現レベルは低く抑えられているものの、好気条件と同じモードのフラックスがあることを示した。フラックス分布から求めた硝酸条件における ATP 生産速度は、好気条件に比べて約 10% 少なく、またその生産プロセスは大きく異なった。好気条件において ATP 生産の大部分は酸化リン酸化によるものであったが、硝酸条件では解糖系 (35%)、酸化リン酸化 (35%)、酢酸合成反応 (30%) で生産されていた。

また硝酸条件下の *arcA* 遺伝子欠損株では TCA 回路の遺伝子発現が増加し、硝酸を利用した呼吸鎖が働くことで、酸素がないにも関わらずクエン酸回路のフラックスが劇的に増加することを明らかにした (図 1)。また、図 2 に本研究で明らかになった遺伝子発現と代謝フラックスにおける調節の概要を示した。

クエン酸回路のフラックスが増加して細胞あたりの ATP 生産レベルが増加しても細胞増殖には殆んど影響しなかった。また、反応毎の遺伝子発現量とフラックスを比較し、経路ごとの相関に違いがあることを示した。

以上の研究成果を Molecular BioSystems 誌に論文投稿し、掲載が決定した (DOI: 10.1039/C2MB25069A)。

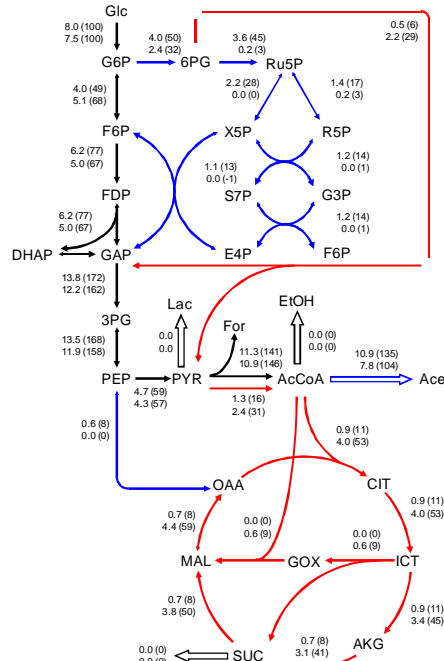


図 1 硝酸条件における野生株(上)と *arcA* 遺伝子欠損株(下)の代謝フラックス分布。フラックスの単位は $\text{mmol gDCW}^{-1} \text{h}^{-1}$ 、括弧内はグルコース消費に対する相対値 (%)。矢印は野生株に比べて *arcA* 遺伝子欠損株でフラックスが増加した反応 (赤)、減少した反応 (青) を示した。

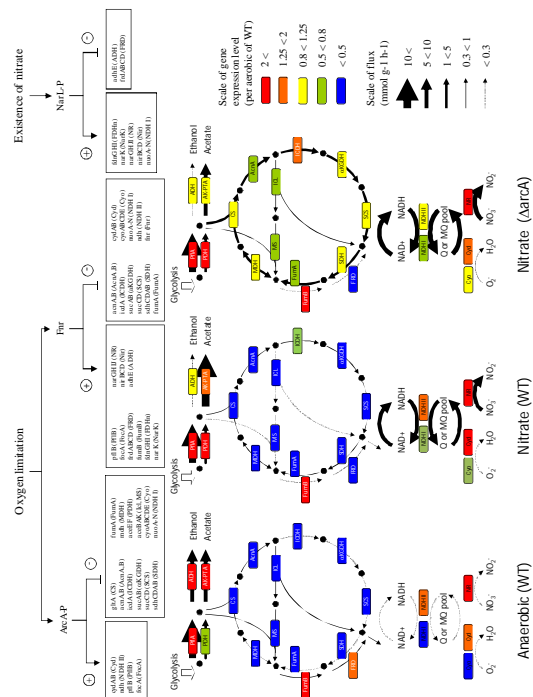


図 2 嫌気条件、硝酸条件における遺伝子発現調節と代謝フラックスの概要

図の上部は環境要因に対する転写制御を、下部は嫌気・硝酸条件における野生株と *arcA* 遺伝子欠損株の代謝と呼吸鎖の調節を表している。

(2) 動的モデルを利用した大腸菌のマルチオミックスデータの統合

大腸菌の動的モデルに含まれる反応速度式に、フラックスと中間代謝物質の濃度を入力し、酵素量を算出した。CE-TOFMSは細胞内の中間代謝物質を多数測定することができる優れた分析手法だが、中心炭素代謝経路の幾つかの中間代謝物質は測定することができない(PGP、SucCoA、X5P、E4Pなど)。そのため、CE-TOFMSにより定量的に測定することができなかった代謝物質の濃度については、測定できた中間代謝物質濃度やフラックス分布は全て満たしつつ、全ての酵素量の合計を最小にする評価関数を設定して、遺伝的アルゴリズムを用いて最適化した。同方法によって推定した中間代謝物質濃度の多くは、先行研究で報告されている酵素反応の平衡を仮定して求めた推定値と近く、妥当な結果を得ることができたと判断した。

マイクロアレイで取得した遺伝子発現情報を酵素濃度に適用するため、硝酸条件の代謝モデルが定常状態を維持できる酵素濃度の変動幅(酵素濃度変化に対するモデルの頑健性)を調査した。その結果Pyk、G6PDH、KGなどの一部の反応以外は0.1倍から10倍の範囲で定常状態を維持する安定したモデルであることが分かった。

次に *arcA* 遺伝子欠損の影響をシミュレーションするため、(1)で取得した遺伝子発現情報を野生株の酵素濃度に反映させた。シミュレーションの結果、モデルの代謝は定常状態に到達し、その際の反応速度は実験で求めたフラックスの値とほぼ一致することが分かった(図3)。ただしペントースリン酸(PP)経路のフラックスのシミュレーション値が実測値よりも低いのは、NADP/NADPHを定数として扱ったためと考えられ、より実用的なモデルを構築する上では、補酵素についても時間変化を微分方程式で表現する必要があるものの、異なる階層のオミックスデータを統合し、細胞内の調節機構を解明するためのプラットフォームとしての可能性を示すことができた。

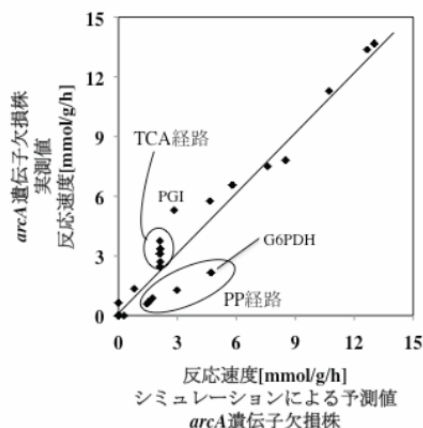


図3 定常状態における *arcA* 遺伝子欠損株のフラックスの実測値とシミュレーションで予測された反応速度の比較

(3) 同位体標識実験を利用したモデルパラメータの推定法の開発

同位体標識を利用してモデルパラメータをハイスループットに取得するための方法を開発し、大腸菌中心炭素代謝経路の酵素について検討した。

従来の代謝物質濃度だけを利用したパラメータチューニングに比べて、同位体を利用することにより情報量が格段に増えることと、濃度という絶対値ではなく同位体標識パターン(比)という相対値を利用することで、実験誤差(代謝物質の抽出効率、前処理における分解)の影響を減らすことができた。Toyモデルにおいては、代謝物質の濃度だけを利用したパラメータチューニングに比べ、本手法がより正しい解を求めることができることを示すことができた。

図4は大腸菌の粗酵素液を利用した同位体標識実験において、CE-TOFMSで測定した解糖系中間代謝物質のプールが同位体に置き換わるまでの時間変化を示した(図はF6Pだけを表示)。また、大腸菌のモデルにおいて、先行研究で推定値とされていたパラメータ(ミカエリスメンテン定数や阻害定数)を対象として、実測した9個の中間代謝物質についての同位体標識パターンをよく説明できる、パラメータセットを得ることに成功した(図4の実線は最適化後のF6Pの同位体標識パターンのシミュレーション結果)。現在、個々の最適化したパラメータについて、その妥当性と同位体標識の情報を利用した効果を検証している。

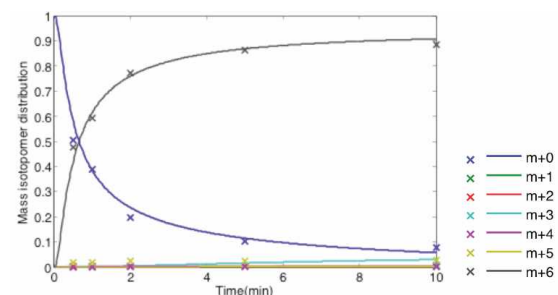


図4 試験管内同位体標識実験における中間代謝物質の標識パターンの変化と最適化後のシミュレーション結果(F6P) 記号は実験値、実線はシミュレーション結果、mはF6Pの質量荷電比(159.02)

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 2 件)

Yoshihiro Toya, Kenji Nakahigashi, Masaru Tomita, Kazuyuki Shimizu, Metabolic regulation analysis of wild-type and arcA mutant Escherichia coli under nitrate conditions using different levels of omics data, Molecular BioSystems, 査読有, 2012, Accepted on 15 May 2012
DOI: 10.1039/C2MB25069A

Yoshihiro Toya, Nobuaki Kono, Kazuharu Arakawa, Masaru Tomita, Metabolic flux analysis and visualization, Journal of Proteome Research, 査読有, Vol. 10, No. 8, 2011, pp. 3313-3323

[学会発表](計 5 件)

Yoshihiro Toya, Kenji Nakahigashi, Masaru Tomita, Kazuyuki Shimizu, ^{13}C Metabolic flux analysis of Escherichia coli under nitrate respiration with integration of different levels of omics data, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology, 2011, Korea, 口頭発表

戸谷吉博, 中東憲治, 富田勝, 清水和幸, ^{13}C 代謝フラックス解析とマルチオミックスデータの統合に基づく大腸菌の硝酸呼吸代謝の解明, 第 6 回メタボロームシンポジウム, 2011, 大阪, 口頭発表

佐伯憲和, 戸谷吉博, 西野泰子, 富田勝, ^{13}C 同位体標識メタボロミクスデータを用いた酵素キネティクス最適化手法の開発, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011, 横浜, ポスター発表

Yoshihiro Toya, Nobuyoshi Ishii, Kenji Nakahigashi, Takashi Hirasawa, Tomoyoshi Soga, Masaru Tomita, Kazuyuki Shimizu, ^{13}C metabolic flux analysis based on mass isotopomers of intracellular metabolites and integration of different levels of information for metabolic regulation analysis, 11th International Conference on Systems Biology, 2010, Scotland, UK, ポスター発表

Norikazu Saiki, Yoshihiro Toya, Taiko Nishino, Masaru Tomita, Kinetic Parameter Optimization of Human Erythrocyte Model Using Metabolomics approach based on ^{13}C -labeling, 11th International Conference on Systems

Biology, 2010, Scotland, UK, ポスター発表

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸谷 吉博 (TOYA YOSHIHIRO)
慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特任助教
研究者番号: 70582162

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし