

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510268

研究課題名(和文) Fluxomic approaches for Yeast metabolism

研究課題名(英文) Fluxomic approaches for Yeast metabolism

研究代表者

Murray Douglas (Murray, Douglas)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科(藤沢)・特任准教授

研究者番号：50458965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物の代謝は、生物の生理機能に大きな影響を与える動的なプロセスである。我々はその主要なシステムについて多くの理解を得られているが、生理機能への影響の全体像は、未解決の問題である。この研究では特に、我々は計算及び経路フラックスの推定に焦点を置き、細胞呼吸と生体エネルギーが代謝に与える影響への理解に向けた実験手法、バイオインフォマティクスのパイプラインや計算ツールを開発。またパン酵母の連続培養システムにこれらを適用し、ヌクレオチド合成や脂質、炭酸同化の広範な動員が高呼吸状態間に行われることなどを明らかにした。現在、我々はこれらのデータの検証および統合を進めており、まもなく公有となる予定である。

研究成果の概要(英文)：Eukaryotic metabolism is a complex and highly dynamic process that can have a huge impact on the physiology of the organism. While we understand much about the major systems in metabolism a holistic view of how metabolic events impact metabolism remain elusive. In this project we developed experimental protocols, bioinformatic pipelines and computational tools to assist our understanding of how cellular respiration and bioenergetics influence metabolism. In particular, we concentrated on the calculation and estimation of pathway fluxes. We applied these methods to precisely controlled continuous cultures of bakers' yeast to reveal nucleotide biosynthesis, large-scale mobilisation of lipids and carbon dioxide assimilation occurs during high respiration states. Currently, we are validating and integrating these data and plan to publish our findings in the public domain soon.

研究分野：Systems Biology

キーワード：国際研究者交流 ドイツ:オーストリア:英国 計算および実験結果の交換

1. 研究開始当初の背景

真核生物の代謝は複雑で動的なプロセスを持ち、その調節は複数の時間スケールにおいて発生する。

代謝調節が故障した場合には、糖尿病や癌などをはじめとする多くの疾患につながり人間の健康に深刻な影響を及ぼすため、代謝の調節は真核生物において非常に重要な機構とされている。現在、個々の反応レベルまたは経路レベルでの研究は、大規模に行われており真核生物の代謝の知識は飛躍的に増加しているが、その一方で真核生物の生理機能の総合的な理解は未だ捉えどころのないままとされているのが現状である。

真核生物の生理学の知識を拡大するため、我々は呼吸のダイナミクスを研究するための典型的なモデル生物としてパン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を使用し、正確に制御された条件下で *S. cerevisiae* を成長させた。 *S. cerevisiae* は安定した呼吸振動 (Fig 1) を生成する細胞の自動同期が、細胞生理のすべての側面全体に浸透するため¹⁻³、このプロジェクトが真核生物の生理機能を探索するための理想的なテスト地盤になることが期待される。

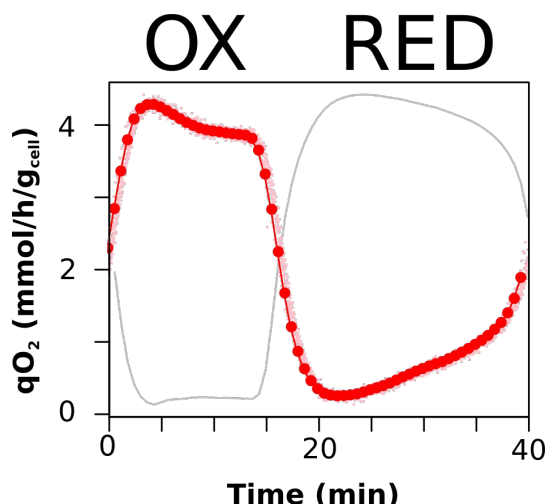


Fig 1. 酵母呼吸振動¹⁵時の酸素摂取速度を20サイクルのOff-gas酸素を測定することにより算出。1サイクルは円滑な3次スプライン¹⁶を使用し、これらのデータから作成した。灰色の線は、同じデータのための溶解酸素を表しており、OXとREDは酸化サイクル¹⁴の還元段階を示すものである。

2. 研究の目的

このプロジェクトの最終的な目標は、真核生物の呼吸生理学を支配する主体を定義することである。これは培養制御、データ収集、代謝産物の分析、データ処理および計算モデルの統合などのごく最近の進歩により、可能となっている。

3. 研究の方法

我々は以前に発表された研究⁴から、呼吸振動のためのトランスクリプトームデータと多くのハイスループットな研究を統合するためのバイオインフォマティクスツールを開発し、酵母代謝のコミュニティモデル⁵

を統合するため、これを拡充した。

また、正確に高分子酵母⁶の組成及びそれらの酸消化を定量化する方法を開発した。

我々はさらに、極性および非極性代謝物⁷のための堅牢な代謝物の抽出プロトコルを開発。極性代謝産物を測定するため、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析装置 (CE-tof-MS) を使用し、液体クロマトグラフ-飛行時間型質量分析計 (LC-tof-MS) を用いて非極性代謝物を分析した。また伝統的な代謝モデルを得られるツール (SBML-cartographer) の開発した後、炭素原子の遷移モデル (FluxML) を作成した。これらのモデルは、INCA⁸。

などの¹³CMFA ツールで実行することが可能である。その後代謝のダイナミクスを解析するため、¹³炭素標識グルコースの混合物を最適化に使用し、動的な同位体非定常¹³炭素代謝フラックス分析 (DINS-¹³CMFA) のためのデータセットを提供する。我々は定量化可能な代謝物に基づいて定量化可能な代謝産物を使用し、酵母のコミュニティモデル⁵ (800の反応で、約200の代謝産物) の簡易版を構築した。

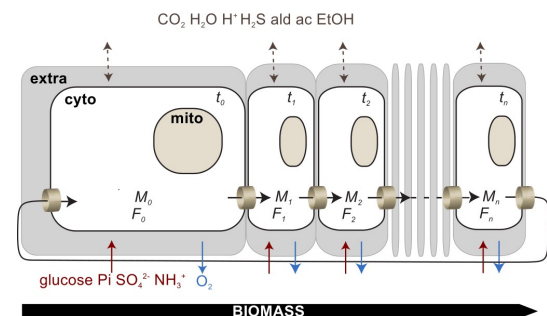


Fig 2. Cyclic FBA の体系概要. Cyclic FBA はグルコース、リン酸塩、硫酸塩、アンモニウムの入量フラックスおよび CO_2 、 H_2S 、アセトアルデヒド、酢酸、エタノールの変動フラックスの測定を含み、循環プロセス中に複数の時点でわたって酸素の取り込みが行われる。これらはモデルを制約するために使用される。フラックス (F_0) は初期状態 (t_0) に対して計算され、代謝物 (M_0) はバイオマス (不朽のプール) の入力、または次時点 (t_1) に転送される。このプロセスはこの過程を通じて反復的に繰り返される。全時間構造上のバイオマスは最適化され、最小化フラックスのさらなる制約は、シミュレーションの解 (投稿準備中) を生成するために使用される。

その後、我々はフラックスバランス解析 (FBA) を実行するためにこのモデルを区画化した。

当初静的 FBA を各時点で使用したところ、半分以上の時間点に対する解決策を得ることが出来なかった。そこで我々は Cyclic FBA を開発した。Cyclic FBA は動的 FBA のように動的データを使用することができ、なおかつ代謝物の蓄積を可能にするが、動的 FBA とは異なり初期状態は最終状態と同様であるにもかかわらず、少量の情報で解空間をより狭めることが可能である (Cyclic FBA の場合における入力と出力の代謝物フラックスは、Fig 2 に概説する)。

4. 研究成果

我々の比較バイオインフォマティクス解析は、以前に投稿された転写呼吸振動データとATPの利用可能性は遺伝子発現にフィードバックし、表現⁴を定義する上で重要な役割を有することを示したという他研究における大規模な概論を使用した。この電流試験のデータはDNA占有データと組み合わせて使用され、転写リセットポイントの開始をもたらすATP/ADPが減少していることを示した (Error: Reference source not found)^{4,9}。

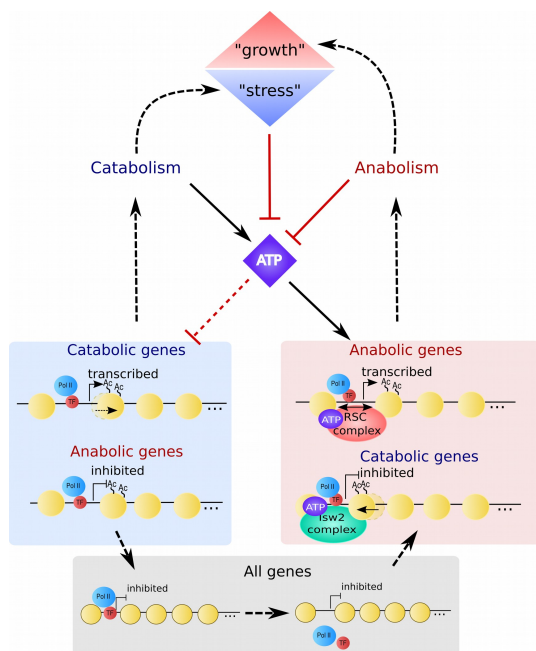


Fig 3. ATPの可用性は、DNAの占有下における二重ネガティブフィードバックループに関与し、転写の「リセット」ポイント^{4, 10}を開始する。赤い矢印は阻害を表しており、黄色の円はDNA上のヌクレオソームを表す線に沿って表示され、青と赤の円はそれぞれRNA PolIIIおよび転写因子を表している^{4,9}。RSCとIsw2複合体は、ATP依存性リモデリング酵素である。

しかしながら、これらの分析は振動代謝中になぜATP可用性を交互に行うのかという問いに対して、そのメカニズムの理解を提供し得なかった。そこで我々はメタボロームとリポドーム⁷のための高時間的分解能のデータを取得するためにCE-MS及びLC-MSを使用した。これを行うために、我々は強力な代謝産物の抽出およびデータ処理方法^{7,10}を開発した。その結果、酵母メタボロームのほとんどが振動挙動¹を示したことが確認された。

そこで¹³Cグルコース (Fig 4A) の混合物で標識した試料を分析したところ、特に高い信号対ノイズ比の代謝産物は、ペントースリン酸経路のセドヘプツロース-7-リン酸 (Fig 4B))およびホスホグルコン酸を含んでいた。これらは、高い呼吸状態および高ATP/ADP比との相関を示した。クエン酸 (Fig 4C), イソクエン酸およびシス型アコンニトは酸素摂取率と相関しており、さら

にリンゴ酸 (Fig 4D) とTCA回路のフマル酸合成のアームにおいても、抗酸素摂取速度と相関していた。これは還元段階中にTCAサイクルの差動調節が行われていることを示唆している。

DINS-¹³CMFAの分析は困難をきわめ¹¹。そこで我々は全てのMFAのように最初の原子遷移マップを構築した。ここでの目標は、代謝ネットワーク上における測定可能な代謝産物のカバレッジを最大化することであった。しかしながらこれを合理的に設計するツールは存在していなかった。そこで我々は、標準的なシステムバイオロジーマークアップ言語 (SBML) モデルから原子遷移マップを作成し、FluxML¹² 投稿準備中)に、それぞれの炭素原子に作成したマップをエクスポートすることができるPythonのツール (SBMLcartographer)を開発した。推定については現在INCA⁸。

初期推定値はペントースリン酸による高フラックスを示し、経路は生成/活性酸素種 (ROS) の解毒のために使用されるNAD (P) Hを生成することが推測された。実際に *denovo*ヌクレオチド経路を通るフラックスは、この段階でほぼ独占的に発生しており、また算出されたフラックスは、B-酸化アセチルCoAからかなりの入量を示していた。確かに、リポドミクスでは各サイクル中におけるリポドームの大規模な改造を明らかにした。酸化位相ではモノ-, ジ-, トリ-グリセリドのような「燃料」脂質に富んでおり、細胞膜の材料が高い呼吸活動の要求を満たすために利用されていたことを示した。

実際、需要はCO₂の同化が発生することが予想されたように高いものであった。これは、この段階¹³中における1以下の呼吸商滴下と、入力したガス中の1%¹³CO₂を供給することにより確認した。我々の計算は、細胞内の全ての炭素取り込みの8%が、この段階でCO₂固定に起因する可能性があることを示している。

還元位相間に細胞壁およびアミノ酸生成においてフラックスは有意に増加した。リポドミクスではセラミドやステロール及びリン脂質などのより複雑な構造脂質が富化することが示された。例えばセリンの生合成が増加していたことを例に挙げると、セリンは両方のタンパク質とセラミド産生に関与しており、さらに細胞壁生合成のフラックスはこの位相間中ほぼ独占的に発生することが示唆された。

しかしながら、DINS-¹³CMFAは区画化の事象を決定することは出来ない。例えば、イソクエン酸脱水素酵素はサイトゾル中のROSの解毒 (NADP依存型) またはNADHおよびミトコンドリア中の2-オキソグルタル酸 (グルタミン酸前駆体) の生成に関与することが出来る。この相対的な寄与を推定するために、我々は区画モデルおよびCyclic

FBA(Fig 2). を使用している.

この方法は特にシステムの初期および最終状態が等価である(少しの入力および出力フラックスの)先験的知識と同等の(例えば酵母の呼吸振動や細胞分裂周期のような)概日時計という時間依存性の周期的なプロセスから実現可能なソリューションを作成するために、このプロジェクトで開発されたものである。現在、シミュレートされ蓄積された代謝物は概してデータと一致している。要約すると、我々はシステムのフラックス分析を支援するために多くの新しい方法を開発した。さらに我々はすぐにパブリックドメインに公開する予定の大規模で無類のデータセットを持っている。MFAとFBAデータの統合と確認が現在進行中のプロジェクトである。

我々はそれらが呼吸生理学に新たな多くの洞察を提供することを確信している。

1. Murray, D. B., Beckmann, M. & Kitano, H. Regulation of yeast oscillatory dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 2241-6 (2007).
2. Lloyd, D. & Murray, D. B. Ultradian metronome: timekeeper for orchestration of cellular coherence. *Trends Biochem Sci* **30**, 373-377 (2005).
3. Klevecz, R. R., Bolen, J., Forrest, G. & Murray, D. B. A genomewide oscillation in transcription gates DNA replication and cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 1200-5 (2004).
4. Machné, R. & Murray, D. B. The Yin and Yang of Yeast Transcription: Elements of a Global Feedback System between Metabolism and Chromatin. *PLoS One* **7**, e37906 (2012).
5. Dobson, P. D. *et al.* Further developments towards a genome-scale metabolic model of yeast. *BMC Syst. Biol.* **4**, 145 (2010).
6. Sasidharan, K., Amariei, C., Tomita, M. & Murray, D. B. Rapid DNA, RNA and protein extraction protocols optimised for slow continuously growing yeast cultures. *Yeast* (2012). doi:10.1002/yea.2911
7. Sasidharan, K., Soga, T., Tomita, M. & Murray, D. B. A yeast metabolite extraction protocol optimised for time-series analyses. *PLoS One* **7**, e44283 (2012).
8. Young, J. D. INCA: a computational platform for isotopically non-stationary metabolic flux analysis. *Bioinformatics* **30**, 1333-5 (2014).
9. Amariei, C. *et al.* Time resolved DNA occupancy dynamics during the respiratory oscillation uncover a global reset point in the yeast growth program. *Microb. Cell* **1**, 279-288 (2014).
10. Amariei, C., Tomita, M. & Murray, D. B. Quantifying periodicity in omics data. *Front. cell Dev. Biol.* **2**, 40 (2014).
11. Buescher, J. M. *et al.* A roadmap for interpreting ^{13}C metabolite labeling patterns from cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* **34**, 189-201 (2015).
12. Weitzel, M. *et al.* 13CFLUX2--high-performance software suite for ^{13}C -metabolic flux analysis. *Bioinformatics* **29**, 143-5 (2013).
13. Amariei, C. *et al.* The dynamics of cellular energetics during continuous yeast culture. *Conf. Proc. Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Annu. Conf.* **2013**, 2708-11 (2013).
14. Sasidharan, K., Tomita, M., Aon, M. A., Lloyd, D. & Murray, D. B. Time structure of the yeast metabolism in vivo. *Adv. Exp. Med. Biol.* **736**, 359-79 (2012).
15. Satrudinov, A. D., Kuriyama, H. & Kobayashi, H. Oscillatory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**, 261-7 (1992).

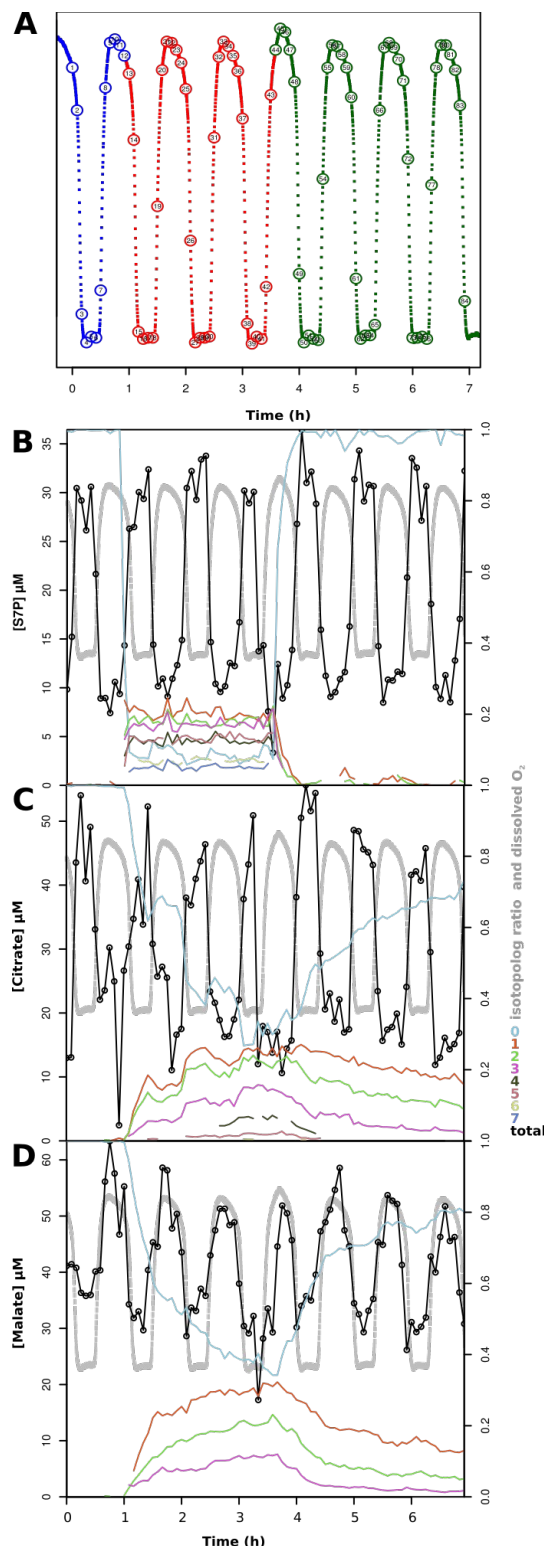


Fig 4. 呼吸振(A)中の時系列 ^{13}C 標識。バイオリアクターの非標識培地(青)の供給は、D-グルコース 1- ^{13}C 及び D-グルコース- $^{13}\text{C}_6$ 標識ミックスに切り替え(70:30; 赤), その後の残りの非標識培地(緑)に戻し実験を継続した。サンプルはすべて4分毎に得ており、細胞内極性や細胞内非極性および細胞外代謝物を生成するために処理される。乾燥細胞重量、細胞数、サイズを測定し、バイオマスは単量体組成のために酸を消化した。これらのサンプルは、その後840質量スペクトル(原稿準備中)を生成するために、陰イオン性および陽イオン性においてCE/LC-MSを用いて分析した。

中心炭素代謝の大部分では、例えばセドヘブツロース-7リン酸(B)とTCA回路やクエン酸(C)およびリンゴ酸(D)など、ペントースリン酸経路の中間体を含む振動がみられた。

16. Mueller, S., Machné, R. & Murray, D. B. A new dynamic model for highly efficient mass transfer in aerated bioreactors and consequences for kLa. *Biotechnol. Bioeng.* (2012).

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. Mueller, S., Machné, R. & Murray, D. B. A new dynamic model for highly efficient mass transfer in aerated bioreactors and consequences for kLa. *Biotechnol. Bioeng.* (2012). DOI: 10.1002/bit.24594

2. Machné, R. & Murray, D. B. The Yin and Yang of Yeast Transcription: Elements of a Global Feedback System between Metabolism and Chromatin. *PLoS One* 7, e37906 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0037906

3. Sasidharan, K., Tomita, M., Aon, M. A., Lloyd, D. & Murray, D. B. Time structure of the yeast metabolism *in vivo*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 736, 359-79 (2012). DOI: 10.1007/978-1-4419-7210-1_21

4. Sasidharan, K., Amariei, C., Tomita, M. & Murray, D. B. Rapid DNA, RNA and protein extraction protocols optimised for slow continuously growing yeast cultures. *Yeast* (2012). DOI: 10.1002/yea.2911

5. Sasidharan, K., Soga, T., Tomita, M. & Murray, D. B. A yeast metabolite extraction protocol optimised for time-series analyses. *PLoS One* 7, e44283 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0044283

6. Amariei, C., Machné, R., Sasidharan, K., Gottstein, W., Tomita, M., Soga, T., Lloyd, D. & Murray D. B. The dynamics of cellular energetics during continuous yeast culture. *Conf. Proc. Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Annu. Conf.* 2013, 2708-11 (2013). DOI: 10.1109/EMBC.2013.6610099

7. Amariei, C., Tomita, M. & Murray, D. B. Quantifying periodicity in omics data. *Front. cell Dev. Biol.* 2, 40 (2014).

DOI: 10.3389/fcell.2014.00040.
eCollection 2014

8. Amariei, C., Soga, S. Tomita, M. & Murray, D. B. Time resolved DNA occupancy dynamics during the respiratory oscillation uncover a global reset point in the yeast growth program. *Microb. Cell* 1, 279-288 (2014). DOI: 10.15698/mic2014.09.166.

[学会発表] (計 5 件)

1. Douglas Murray. The dynamics of cellular energetics during continuous yeast culture. Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2013 35th Annual International Conference of the IEEE. 2013年07月03日~2013年07月07日 Osaka, Japan

2. Douglas B. Murray. Yeast Respiratory Oscillation: Fluxomic Approaches. Stoichiometric modelling (SM) of microbial metabolism(招待講演) 2014年11月04日~2014年11月04日. Isaac Newton Institute for Mathematical Science, Cambridge University (UK)

3. Sabrina Hoffmann, Willi Gottstein, Rainer Machne, Ralf Steuer, Douglas Murray Optimal metabolic dynamics resolved by cyclic FBA. Stoichiometric modelling (SM) of microbial metabolism(招待講演) 2014年11月04日~2014年11月04日. Isaac Newton Institute for Mathematical Science, Cambridge University (UK).

4. Douglas B. Murray. Energetic feedback on chromatin state defines a system-wide reset point. Understanding Microbial Communities; Function, Structure and Dynamics(招待講演) 2014年11月05日~2014年11月05日. Isaac Newton Institute for Mathematical Science, Cambridge University (UK)

5. Douglas B. Murray. Fluxomic approaches in Yeast Metabolomics 2014年06月23日~2014年06月26日. Tsuruoka (Yamagata, Japan)

[図書] (計 1 件)

1. Douglas B. Murray, Cornelia Amariei, Kalesh Sasidharan, Rainer Machné, Miguel A. Aon, David Lloyd Temporal Partitioning of the Yeast Cellular Network, Springer Series in

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

Murray Douglas

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特
任准教授

研究者番号：50458965

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：