

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：17104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870432

研究課題名(和文)大腸菌アンモニア同化制御の定量的ダイナミックモデル構築とシステムの理解

研究課題名(英文)Quantitative modeling and systemic understanding of the regulatory mechanisms of the E. coli ammonium assimilation

研究代表者

前田 和勲 (Maeda, Kazuhiro)

九州工業大学・若手研究者フロンティア研究アカデミー・特任助教

研究者番号：50631230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌にとって、グルタミン酸とグルタミンは、アミノ酸やヌクレオチドの前駆体として重要であるが、このグルタミン酸とグルタミンの合成にはアンモニアが必要である。アンモニア同化の複雑な制御機構を理解するには数学モデルの構築が不可欠である。本研究では、大腸菌アンモニア同化の定量的ダイナミックモデルを構築した。そして、それを用いて、これまでアンモニアチャンネルだと考えられていたAmtBがアクティブトランスポーターであることを指摘した。また、モデル構築の過程で、新規の生化学パラメータ推定法を開発し、それを支援するためのC言語のライブラリを開発した。

研究成果の概要(英文)：For E. coli, glutamate and glutamine are important as precursors for amino acids and nucleotides, and ammonium is necessary for the synthesis of glutamate and glutamine. Construction of a mathematical model is indispensable for understanding the complex control mechanism of ammonium assimilation. In this study, we constructed a quantitative dynamic model of the E. coli ammonium assimilation network. We pointed out that AmtB, which was considered to be an ammonia channel so far, is an active ammonium transporter. In addition, we developed a novel kinetic parameter estimation method to accelerate the kinetic modeling and developed a C language library to support it.

研究分野：システム生物学

キーワード：大腸菌 窒素代謝 生化学パラメータ推定 シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

アンモニアは大腸菌にとって最適な窒素源であり、アンモニアを窒素源とした場合に最大の増殖速度を達成できる。細胞内の窒素原子の88%はグルタミン酸、残りはグルタミンに由来する。アンモニアは、TCA回路の中間代謝物である α -ケトグルタル酸からグルタミン酸とグルタミンを合成するのに必要である(図1)。従って、アンモニア同化制御機構を理解することは、大腸菌の代謝を理解する上で重要である。

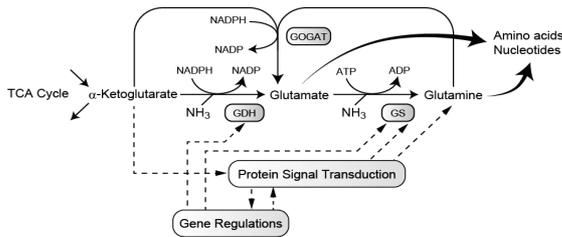


図1 アンモニア同化のネットワーク

アンモニア同化の制御は複雑であり、これを理解するためには数学モデルの構築が不可欠である。実験で得られた知識を集約して数学モデルを構築し、モデルによる仮説提唱と実験による検証を繰り返すことが必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大腸菌アンモニア同化の定量的ダイナミックモデル構築とその制御構造の理解である。グルタミン酸とグルタミンは、アミノ酸やヌクレオチドの前駆体として重要であるが、このグルタミン酸とグルタミンの合成にはアンモニアが必要である。アンモニア同化の複雑な制御機構を理解するには数学モデルの構築が不可欠である。本研究では、シミュレーションとウェット実験を組み合わせ、大腸菌アンモニア同化システムの定量的なダイナミックモデルを開発する。そして、代謝、タンパク質、遺伝子の各階層の制御がどのように協調しているのかが明らかにする。

本研究では、(1) 大腸菌アンモニア同化の定量的シミュレーションモデルを構築し、その解析を行った。(2) また、その過程で新規の生化学パラメータ推定法を開発した。

(1) 大腸菌アンモニア同化モデルの構築

これまでいくつかのシミュレーションモデルが開発されてきたが、定量的な予測ができないなどの問題があった。そこで、これまでに提案されているモデルの中で最も詳細に酵素反応をモデル化している Bruggeman モデル (Bruggeman et al., 2005) をベースにして、大腸菌窒素代謝の包括的なモデルを構築す

る。

(2) 生化学パラメータ推定法の開発

生化学システムのシミュレーションモデルは、多くの生化学パラメータを含む。しかし、その多くは測定されていない。そこで、シミュレーションモデルを構築するためには、その挙動が実験データと一致するように生化学パラメータを推定する必要がある。また、測定値が存在したとしても測定には誤差がある上に、測定は多くの場合、in vitro で行われる。従って、測定値がそのまま in vivo でも成り立つとは考えにくい。このような測定値の問題点を考慮しつつ利用可能な測定値は最大限利用するという現実的なアプローチが必要である。

速度パラメータの測定値だけでなく、代謝物やタンパク質の濃度の測定値にも誤差がある。従って、モデルによる予測が代謝物やタンパク質濃度の測定値に正確に合うようにパラメータ推定を行ってもあまり意味がない。やはり、代謝物やタンパク質の測定値に関して、どの程度信頼できるのかを考慮して利用することが重要である。

この研究では、生化学パラメータと代謝物濃度の測定値の不確実性を考慮した生化学パラメータ推定法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌アンモニア同化モデルの構築

定量的なモデルを構築するには、定量的な実験データが必要である。今回は Rabinowitz グループ (Yuan et al., 2009) と Hwa グループ (Kim et al., 2012) の実験データをモデリングに用いる。Rabinowitz グループの実験では、大腸菌は、固体培地上のフィルターの上に培養される。そして、フィルターをアンモニア同化濃度の異なる培地に移すことで、大腸菌にとっての環境アンモニア濃度をシフトさせる。このときの代謝物濃度の変化が測定されている。一方、Hwa グループはマイクロ流体チャンバーを用いた培養を行っている。チャンバー内で細胞を培養し、液体培地を流すことで、アンモニア濃度が数 μ M 環境下での増殖速度を測定し、そこからアンモニア取り込み速度を計算している。我々は、定量的なモデルを構築するためにこれらの実験データを説明できるモデルを構築することを目指した。

アンモニートランスポーター AmtB、シグナルタンパク GlnK、細胞膜を挟んだアンモニアの受動拡散などを Bruggeman モデル拡張した (図2)。

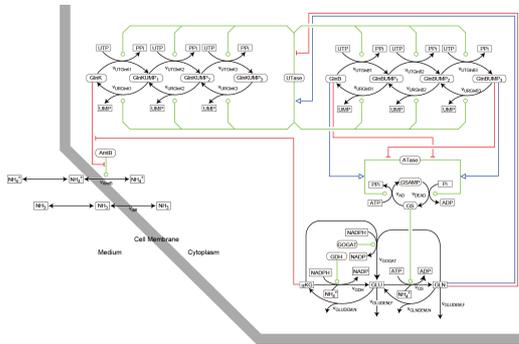


図2 大腸菌アンモニア同化モデルのネットワークマップ

(2) 生化学パラメータ推定法の開発

まず、高速な生化学パラメータ推定を支援するためのC言語ライブラリを開発する。そして、既存のライブラリと比較することでその性能を評価する。次に、開発したライブラリを用いて大腸菌アンモニア同化モデルのパラメータ推定を行う。

4. 研究成果

(1) 大腸菌アンモニア同化モデルの構築

アンモニアトランスポーターAmtB、シグナルタンパク GlnK、細胞膜を通じたアンモニアの受動拡散などモデル化することで、2つのグループの実験データを矛盾なく定量的に説明できるモデルを構築できた。図3にRabinowitzらの実験データとの比較を示す。興味深いことに、Rabinowitzらの実験データを再現するには、培地から細胞表面までのアンモニアの拡散を考慮する必要があった。従って、Rabinowitzらの実験では、アンモニアの拡散が遅く、細胞表面のアンモニア濃度が培地よりもかなり低くなっていると予想される。

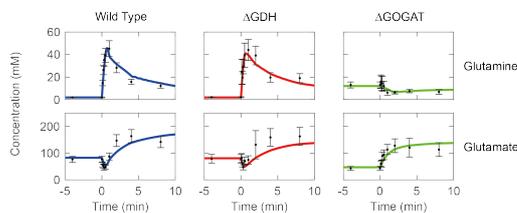


図3 Rabinowitzらの実験データとの比較

また、パラメータ推定によって得られたパラメータ値は測定値に非常に近かった(図4)。これは、我々のモデルが現実的なパラメータ値を使って実験データを定量的に再現できる良いモデルであることを示している。シグナルタンパク GlnKはGlnBのホモログである。しかし、GlnK関連のパラメータはGlnB関連

パラメータとはかなり異なる値をとることが、今回のパラメータ推定結果から予想された。GlnKとGlnBはホモログではあるが、大腸菌では異なる役割を果たしている。前者は、アンモニアトランスポーターAmtBの制御を担う。一方、後者はグルタミン合成酵素GSの制御を担う。この役割の違いを考慮すればパラメータ値の違いは妥当であると言える。

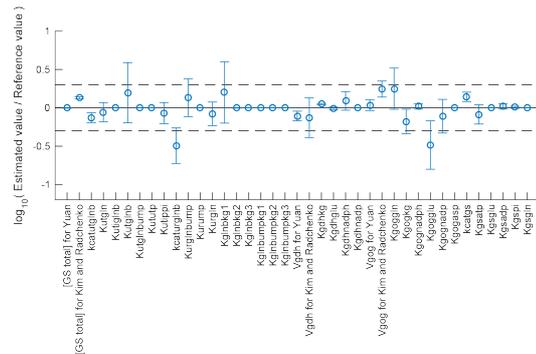


図4 パラメータ推定値の測定値からのずれ

信頼できるモデルが構築できたので、次に、このモデルを使ってアンモニアトランスポーターのアクティブトランスポーター説とチャンネル説を検証した。AmtBがアクティブトランスポーターであると仮定すると実験データを再現できるが、チャンネルを仮定すると実験データを再現できないことから、アクティブトランスポーター説がより有力であると結論づけた。この成果に関して、2015年11月にシンガポールで行われたシステムバイオロジー国際会議で口頭発表を行った。

次に、我々は、アンモニアトランスポーターAmtB欠損株がアンモニアのAcid trappingを行っている可能性を指摘した。我々の予測では、AmtB欠損株は低アンモニア培養時に増殖速度が著しく低下する。しかし、実験データによると、現実のAmtB欠損株は我々の予測よりも増殖速度が高い。この結果から、AmtB欠損株がAmtBを利用せずにアンモニアを輸送していることが予想された。1つの説明として、細胞内pHを下げることで、拡散によるアンモニアの取り込みを促進している可能性を指摘した。現在、この研究成果に関する論文を準備中である。

(2) 生化学パラメータ推定法の開発

まず、実数値遺伝的アルゴリズムのC言語ライブラリを開発した。ライブラリではREX^{star}/JGG (Kobayashi, 2009) と呼ばれるアルゴリズムを実装した。一般に、生化学パラメータ推定は、適合度計算で微分方程式の数値積分を行う必要がある。このため、適合度計算の計算コストが非常に高い。そこで、

我々のライブラリでは適合度計算を並列化した。これにより、スーパーコンピュータのような高性能計算機環境の恩恵を最大限に受けることができる。

次に、我々のライブラリの性能を既存のライブラリである libSRES (Ji and Xu, 2006) と比較した。その結果、特に多峰性の問題において、我々のライブラリが優れていることが分かった。また、libSRES が解くことができる問題であっても、我々のライブラリは libSRES の 1/10 程度の計算コストで解を得られることがわかった (図 5)。

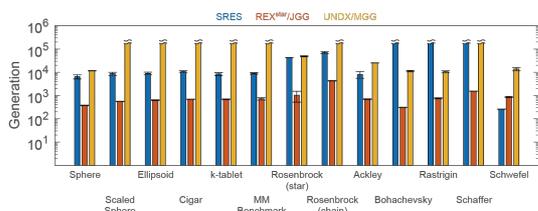


図 5 ベンチマーク結果。縦軸は、解が得られるまでに必要な世代数。

次に、開発したライブラリを用いて大腸菌アンモニア同化モデルのパラメータ推定を行った。速度パラメータと代謝物濃度の測定値の不確実性を考慮したパラメータ推定を行うために、パラメータ推定問題を制約付き最適化問題として定式化した。また、制約付き最適化問題を扱えるように REX^{star}/JGG を改良した。パラメータ推定の結果、上述のように、既知のパラメータ測定値からの変更を最小化しながら、2つの実験データを定量的に説明できるモデルを構築することができた。このパラメータ推定は、UNDX/MGG という古い遺伝的アルゴリズムでは非常に時間がかかっていたが、我々のライブラリの REX^{star}/JGG は、東大医科研のスーパーコンピュータ-Shirokane3 の 101 コアを使って2日でパラメータ推定を終えることができた。現在、このC言語ライブラリに関する論文を準備中である。

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6件)

- (1) Nusrat Jahan, Kazuhiro Maeda, Yu Matsuoka, Yurie Sugimoto, Hiroyuki Kurata, Development of an accurate kinetic model for the central carbon metabolism of Escherichia coli, Microbial Cell Factories, 15(1), 112, 2016. DOI: 10.1186/s12934-016-0511-x (査読有)
- (2) Kazuhiro Maeda and Hiroyuki Kurata,

Analytical study of robustness of a negative feedback oscillator by multiparameter sensitivity, BMC Systems Biology, 8(Suppl 5): S1, 2014. DOI: 10.1186/1752-0509-8-S5-S1 (査読有)

〔学会発表〕(計16件)

- (1) Kazuhiro Maeda, Fred C. Boogerd, Hans V. Westerhoff, and Hiroyuki Kurata, Developing a kinetic model of the E. coli ammonium assimilation network for the metabolic engineering of efficient glutamate fermentation, ICSB 2015 (The International Conference on Systems Biology), Singapore (Singapore), November 2015
- (2) Kazuhiro Maeda and Hiroyuki Kurata, Multiparameter Sensitivity Analysis of Simple Oscillator Models, International Symposium on Synthetic Systems Biology: Synthetic Metabolic Pathway, Mathematical System Analysis and Design of Bio-inspired Systems Joint 14th Symposium of Biochemical Systems Theory (BST 2015), The Luigans (Fukuoka city, Fukuoka), September 2015
- (3) Kazuhiro Maeda and Hiroyuki Kurata, Analytical study of robustness of a negative feedback oscillator by multiparameter sensitivity, GIW/ISCB-Asia 2014, Tokyo International Exchange Center (Odaiba, Tokyo), December 2014

〔その他〕

研究成果のリスト

<http://kurata21.bio.kyutech.ac.jp/maeda/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 和勲 (Maeda Kazuhiro)

九州工業大学・若手研究者フロンティア研究
アカデミー・特任助教

研究者番号：50631230