2版

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月　 ２ 日現在

機関番号： １７１０４
研究種目： 基盤研究(B)（一般）
研究期間： 2013～2015
課題番号： ２５２８０１０７
研究課題名（和文） バーチャルメタボリズム：代謝システムの標準ダイナミックモデル開発

研究課題名（英文） Virtual Metabolism: Development of a standard dynamic model of metabolic systems

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　14,100,000円

研究成果の概要（和文）：細胞機能の設計を目指す合成生物学のための基盤である物質変換・エネルギー代謝を担う中央代謝システム（解糖系、TCA回路、ペントースリン酸回路、補充経路）のダイナミックモデルを開発した。糖基質同化、細胞内の代謝物応答を担う遺伝子発現調節ネットワークを中央代謝反応回路に統合して、環境ストレスや遺伝的変化に対する細胞機能を予測した。世界最大規模のバーチャルメタボリズムモデルである。有用物質生産の設計、突然変異株の増殖適応メカニズムの解明に有用であった。

研究成果の概要（英文）：We have developed a dynamic model of the central metabolism (including glycolysis, TCA cycle, pentose phosphate pathways, and anaplerotic reactions) which is responsible for material conversion and energy metabolism. This is the largest-scale kinetic model for a batch culture and is a base for synthetic biology to aim at a design of cell functions. We integrated gene regulation networks that perform glucose uptake and intracellular metabolic changes into the central carbon metabolism and predicted the dynamic behaviors under different environmental and genetic conditions. It is employed to rationally design a microbial system for enhanced production of useful compounds and to understand how complex metabolisms are regulated at the molecular interaction level.

研究分野： 生命情報工学

キーワード： システム生物学　情報科学　シミュレーション　代謝　合成生物学　生物プロセス

１．研究開始当初の背景

システム生物学、合成生物学の進展によって、細胞の機能を合理的に設計する技術の開発が進んでいる。生物回路の数学モデルを構築、数値シミュレーションすることによって、生物機能を予測する技術が必要である。合成生物学では増殖速度を向上させたり、新規物質の生産能力を付加したりするために、ゲノム上の遺伝子を再構成したり、人工遺伝子回路を設計したりする[1, 2]。ゲノムの再構成では、不必要と推定される多数遺伝子を欠損させ、必要な多数の遺伝子群を集積することによって、有用代謝物質生産の基盤となる宿主細胞を創出することを目指している。

人工遺伝子回路の機能を定量的に予測するために、微分方程式のダイナミックモデルがしばしば用いられる。当然のことながら、動力学的パラメータ値や細胞内分子濃度の測定値が必要である。近年、遺伝子の転写・翻訳速度、転写因子とエンハンサやプロモータとの結合定数などの動力学的パラメータを含む生化学反応ライブラリ、生物学的標準パーツレジストリ（Registry of Standard Biological Parts）、iGEM などが構築されている。私たちは、生物学的基本回路の構造と機能の関係を体系化したデータベース BioFNet を開発した[3]。このように、基本的生化学反応を組合せて、大規模回路へと合成するボトムアップの研究が活発となっている。2012 年には、マイコプラズマの全細胞ダイナミックモデルが提案され、代謝や遺伝子発現に関する実験データを説明して、新規な細胞機能を予測することに成功した[4]。

さて、人工遺伝子回路は、増殖に係る物質変換やエネルギー生成システム、すなわち中心代謝システムと密接に相互作用するので、人工遺伝子回路の設計の基盤となる中心代謝システム全体を理解することは必須である。たとえば、エタノール発酵の強化は、嫌気的代謝システムと密接に関係する。有用物質の生産性向上によって、エネルギーや物質の細胞内における配分バランスが変化して、増殖速度が低下する可能性がある。細胞あたりの物質生産の収率は向上しても、培養系全体の生産性向上には結びつかないことが予想される。

中心代謝システムは、物質やエネルギー源である、炭素（C）、酸素（O）、窒素（N）、リン（P）の取込み、エネルギーと物質変換を行う中心的システムである。細胞の増殖、環境ストレス応答を含めてほぼすべての細胞機能に直接的に関わる。

解糖系、TCA 回路、ペントースリン酸回路、補充経路を含む中心代謝システムのダイナミックモデルは、九工大の清水らが 2010 年に発表した[5]。このモデルでは、酵素濃度は独立変数として、すなわち時間変化しないパラメータとして与えられる。現在は、遺伝子発現層やタンパク質信号伝達層のダイナミクスを代謝反応層に統合することは必須である。

一方で、代謝に係る遺伝子調節ネットワークのダイナミックモデルが開発された。私たちは、糖基質同化システム[6]、アンモニア同化システムのモデル[7]を提案した。アンモニア同化システムは、双方向反応、双機能酵素、正と負のフィードバックループ、Two-Component System を含む基本回路の組合せであることを示した。Kotte らは中心代謝システムに、転写調節因子を含む遺伝子調節ネットワークを統合したダイナミックモデルのプロトタイプを発表した[8]。酵素や代謝物間のローカルなフィードバックループだけでなく、遺伝子発現を含むグローバルなフィードバックループの役割の重要性が指摘された。

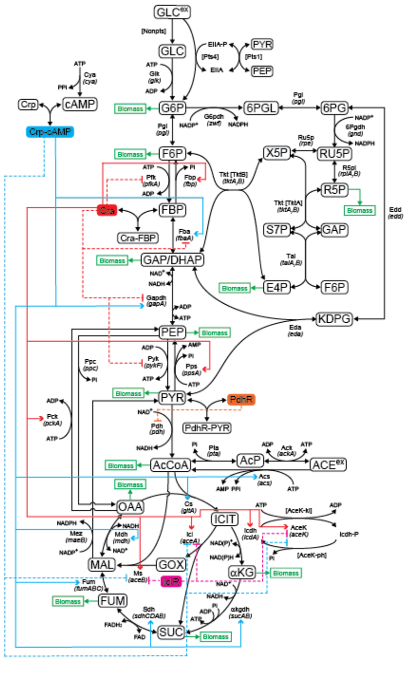

Figure 1

図１　An *E.coli* metabolic network map. The solid line indicates activation and the dotted line indicates repression.

２．研究の目的

本研究では、細胞機能向上を目指す合成生物学のための基盤となる、物質変換・エネルギー代謝を担う中央代謝システムの標準的ダイナミックモデル（図１）を開発する。世界初、世界最大規模のバーチャルメタボリズムモデルである。糖基質同化(Crp-cAMP/Cra)、細胞内の代謝物応答(FBP、cAMP、glyoxylate、pyruvate)を担う遺伝子発現調節ネットワークを中心代謝反応回路に統合して、環境ストレスや遺伝的変化に対する細胞機能を予測する。有用物質生産の設計、突然変異株の増殖適応メカニズムの解明、ヒト細胞の代謝モデルへの拡張に応用する。

３．研究の方法

3-1　中心代謝ネットワークマップ構築

図１のような中心代謝システムのネットワークマップを構築して、数学モデリングに必要なデータを文献やデータベースから収集した。シミュレーションによる予測を検証するデータを整理した。

3-2　ダイナミックモデルの構築

解糖系、TCA 回路、ペントースリン酸回路、Entner-Doudoroff（ED）パスウエイ、補充反応、グリオキシル酸回路、酸化的リン酸化、Pts と非 Pts を含む大腸菌の中心炭素代謝の詳細な動力学のモデルを開発した。4 つの転写因子（Crp、Cra、PdhR、IclR）は、代謝の遺伝子発現を調節する。用いたネットワークマップは、図１に示す。Crp はエネルギー代謝で含まれる多くの遺伝子を調節する転写因子である。Cra は糖新生経路、グリオキシル酸回路、TCA 回路の一部の遺伝子発現を活性化する一方、解糖系酵素をコードしている遺伝子の発現を抑制する。動力学モデルは、微分方程式モデルである。27 の代謝物質、22 の酵素と Pts タンパク質、38 の代謝流束、21 の遺伝子発現、12 の生物量生産速度式からなる。

3-3　増殖速度式の提案

中心代謝システムは細胞のエネルギーや物質生産の基盤であるので、増殖速度の数学モデル化は必須である。しかし、分子レベルでの知識や実験データの著しく不足しているので、増殖に係る分子メカニズムをブラックボックスとして、増殖速度と増殖に係る代謝流束との相関関係を求める問題に帰着させる。本研究では、ATP 合成流束と比増殖速度は比例すると仮定した。

3-4　ダイナミックモデルの最適化

予測力の高いダイナミックモデル構築のためには、生物学的に信頼できる測定値を用いること、モデルの動力学的パラメータの値を調節することが必要である。当然のことながら、すべてのパラメータを測定することは困難なので、動力学パラメータの値を推定する最適化技術を開発した。

一般に、実験データと完全に一致するグローバル解を探索することが注目されてきたが、実際は、実験データ数は少なく、測定値は不確定なので、動力学的パラメータを一意に決めることは、実用的ではない。本研究では、実験データを説明できる解を遺伝的アルゴリズムを用いて探索した。解の生物学的妥当性は、感度解析や安定性解析によって評価した。モデルの修正と評価を繰り返しながら、予測精度の高いモデルを作成した。

４．研究成果

４-1 シミュレーション

動力学モデルが実験データを再現することができるかどうか調べるために、野生株、*pykF* ノックアウト突然変異株（Δ*pykF*)、*pgi* ノックアウト突然変異株（Δ*pgi*)、*ppc* ノックアウト突然変異株（Δ*ppc*）の回分培養におけるシミュレーション結果を、細胞濃度、細胞外ブドウ糖と酢酸塩の濃度に関する実験データと比較した（**図２**)。Pyk は解糖系の最終ステップで PEP を PYR に変換し、Pgi は解糖系の最初のステップで G6P を F6P に変換し、Ppc は PEP を OAA に変換する補充反応を触媒する。全ての細胞内の代謝物質濃度、酵素濃度、代謝流束（酵素の反応速度）の時間変化をシミュレーションした。細胞濃度は、ブドウ糖の減少にともなって増加した。野生株では、ブドウ糖はおよそ８時間で完全に消費された。酢酸塩は、増殖期に生産されて、その後消失した。野生株と Δ*pykF* の時間変化シミュレーションは、実験データと一致していた。動力学モデルが野生株だけでなく遺伝子ノックアウト突然変異株のダイナミクスを正確に再現することを証明した。Δ*pykF* の増殖速度は、野生株のものとほぼ一致した。我々のモデルは、Δ*pgi* と Δ*ppc* の細胞増殖とブドウ糖取込みの遅れを再現したが、シミュレーションと実験データの間に若干の矛盾があった。Δ*pgi* では、細胞外のブドウ糖の時間変化シミュレーションは、実験データと一致したが、細胞増殖シミュレーション結果は、実験データより低かった。すなわち、モデルは Δ*pgi* の細胞増殖を過小評価した。Δ*ppc* では、細胞濃度の時間変化シミュレーションは、実験データを再現したが、ブドウ糖取込み速度は実験データより速かった。モデルはブドウ糖取り込み速度を過大評価した。

4-2 妥当性検証

モデル構築に使わなかった実験データを用いて、動力学モデルの妥当性を検証するために、私たちは、連続培養条件で、定常状態流束分布をシミュレーションした。図３は、希釈率 D = 0.2、0.4、0.5　0.7h-1 のとき、野生株の流束予測値を実験データと比較した。希釈率が高いとき、実験値とシミュレーション値は比較的一致したが、希釈率が低いときは、両者はあまり一致しなかった。増殖速度が遅いとき、モデルによる予測が外れることが示唆された。

4-3 シミュレーションと実験データの相違

パラメータの大規模な最適化にもかかわらず、実験データと一致しないシミュレーション結果が一部あった。そのような矛盾は、最適化の数学的困難さより、むしろ生物学的複雑さを示唆する。Δ*pgi* の細胞増殖の不一致と Δ*ppc* のブドウ糖取り込みの不一致は、Δ*pgi* と Δ*ppc* のモデルが消費したブドウ糖を効率

的に細胞増殖、または ATP 生産に変えていないことを示す。モデルは、Δ*pgi* または低い希釈速度に対して、TCA 回路流束を過小評価した。増殖抑制下では、ブドウ糖取込みや TCA 回路を調節するモデルに用いたメカニズムが不十分であることを示唆する。

私たちは、ブドウ糖取り込みと TCA 回路に議論に的を絞る。Δ*ppc* では、PEP は蓄積され、ブドウ糖取込み流束（Pts4 反応）を上げる。Δ*ppc* は TCA 回路に OAA を供給しないので、TCA 回路流束は抑制された。OAA は TCA 回路を駆動する重要な代謝物質である。Δ*ppc* の増殖は、蓄積した PEP によるブドウ糖取込みの増加と補充反応の欠落による TCA 回路の流束減少の間の釣合いによって決定される。Δ*pgi* の増殖抑制は、PEP と AcCoA の減少がブドウ糖取込みと TCA 回路の流束をそれぞれ減少させるというメカニズに起因した。TCA 回路は、酸化的リン酸化が促進する ATP 生産に必要な NADH と $FADH_2$ の補因子の主な供給源であるので、動力学モデルは細胞増殖速度または ATP 生産を変えるためには、TCA 回路の流束を調節すればよい。ATP は、細胞増殖のためだけでなく、遺伝子や環境条件の変化（例えば遺伝子ノックアウトと低い希釈速度）に対して代謝を調節する適合/ストレス反応のためにも使われる。ATP 生産に係る TCA 回路調節を改善する余地がある。

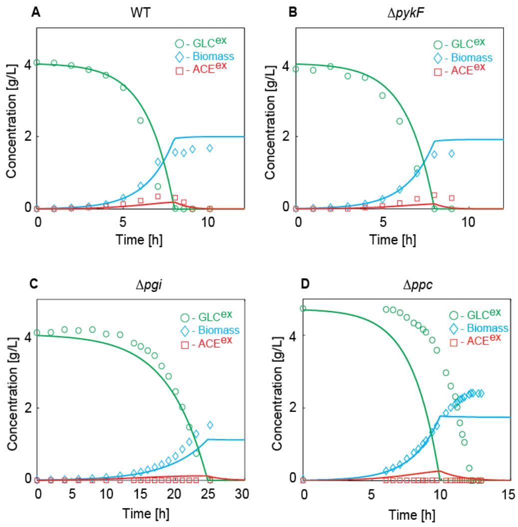

図２ The experimental validation of WT and genetic mutant strains in a batch culture. The green, blue and red lines represent the simulation results of the extracellular glucose, biomass and acetate, respectively. The corresponding open circles represent the experimental data.

(**A**) WT. (**B**) Δ*pykF*. (**C**) Δ*pgi*. (**D**) Δ*ppc*.

4-4　モデルの長所

提案した動力学モデルは、回分培養における好気性条件で複数の遺伝子組換え株のダイナミクスを再現する最初のモデルである。我々のモデルは、過去のモデルに勝る利点を持つ：(i) 回分培養において、野生株と複数の遺伝子組換え株のダイナミクスを正確に再現する詳細な動力学式を開発する一方で、ATP 生産メカニズムに基づいて細胞増殖を推定する方法を提案した。(ii) 多くの動力学パラメータの値をスーパーコンピュータ上で拘束条件付き最適化技術によって推定する技術を開発した。(iii) 動力学モデルを用いて、中心炭素代謝の多層の調節機構（アロステリック効果と遺伝子発現）の効果を予測して、増殖の早い細胞の合理的デザインを可能にした。

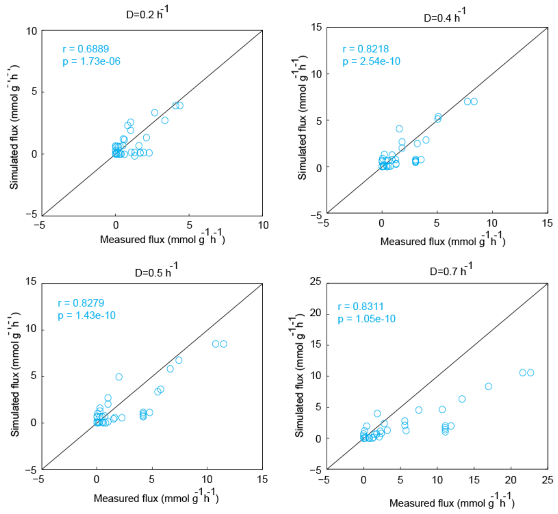

図３ Comparison of the simulated flux with experimental data for WT at different dilution rate (*D*) in a continuous culture.

文献

1. Drubin DA, Way JC, Silver PA (2007) Genes Dev 21: 242-254.
2. Itaya M, Fujita K, Kuroki A, Tsuge K (2008) Nat Methods 5: 41-43.
3. H. Kurata, K. Maeda, T. Onaka, T. Takata, Briefings in Bioinformatics (2014) 15:699-709.
4. Karr JR, Sanghvi JC, Macklin DN, Gutschow MV, Jacobs JM, et al. (2012) Cell 150: 389-401.
5. Kadir TA, Mannan AA, Kierzek AM, McFadden J, Shimizu K (2010) Microb Cell Fact 9: 88.
6. Nishio Y, Usuda Y, Matsui K, Kurata H (2008) Mol Syst Biol 4: 160.
7. Masaki K, Maeda K, Kurata H (2012) Artificial Life 18: 53-90.
8. Kotte O, Zaugg JB, Heinemann M (2010) Mol Syst Biol 6: 355.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計９件）

(1) Yu Matsuoka, Nusrat Jahan, Hiroyuki Kurata.

S-system-based Analysis of the Robust Properties Common to Many Biochemical Network Models. 39:735–746, 2016. (10.1007/s00449-016-1554-4) (査読有)

(2) Noorlin Mohd Ali, Ryo Tsuboi, Yuta Matsumoto, Daisuke Koishi, Kazuhiro Maeda, Hiroyuki Kurata. Web application for genetic modification flux with database to estimate metabolic fluxes of genetic mutants. in press. (10.1016/j.jbiosc.2015.12.013) (査読有)

(3) Kazuhiro Maeda, Hiroyuki Kurata, Analytical study of robustness of a negative feedback oscillator by multiparameter sensitivity. BMC Syst. Biol., 8 (Suppl 5): S1, 2014. (10.1186/1752-0509-8-S5-S1) (査読有)

(4) Md. Bahadur Badsha, Ryo Tsuboi, Hiroyuki Kurata, Complementary elementary modes for fast and efficient analysis of metabolic networks. Biochem. Eng. J., 90:121–130, 2014. (10.1016/j.bej.2014.05.022) (査読有)

(5) Kentaro Inoue, Kazuhiro Maeda, Takaaki Miyabe, Yu Matsuoka, Hiroyuki Kurata, CADLIVE toolbox for MATLAB: automatic dynamic modeling of biochemical networks with comprehensive system analysis. Bioproc. Biosyst. Eng., 37:1925–1927, 2014. (10.1007/s00449-014-1167-8) (査読有)

(6) Hiroyuki Kurata, Kazuhiro Maeda, Yu Matsuoka, Dynamic modeling of metabolic and gene regulatory systems toward developing virtual microbes. J. Chem. Eng. Japan, 90:121–130, 2014. (10.1252/jcej.13we152) (査読有)

(7) Hiroyuki Kurata, Kazuhiro Maeda, Toshikazu Onaka, Takenori Takata, BioFNet: Biological functional network database for analysis and synthesis of biological systems. Briefings in Bioinformatics, 15:699-709, 2014. (10.1252/jcej.13we152) (査読有)

(8) Ruilian Yao, Hiroyuki Kurata, Kazuyuki Shimizu, Effect of cra gene mutation on the metabolism of Escherichia coli for a mixture of multiple carbon sources. Advances in Bioscience and Biotechnology, 4:477-486, 2013. (10.4236/abb.2013.43A063) (査読有)

(9) Kazuhiro Maeda, Keisuke Yoshida, Hiroyuki Kurata, Flux module decomposition for parameter estimation in a multiple-feedback loop model of biochemical networks. Bioproc. Biosyst. Eng., 36:333–344, 2013. (10.1007/s00449-012-0789-y) (査読有)

〔学会発表〕（計１７件）

(1) Nusrat Jahan, Kazuhiro Maeda, Yu Matsuoka, Yurie Sugimoto, Hiroyuki Kurata, A detailed kinetic model of E. coli central metabolism in a batch culture. Proceedings of Asian Congress on Biotechnology 2015 (ACB2015), Kuala Lumpur, Malaysia, Nov. 15-19, 2015.

(2) Nusrat Jahan, Kazuhiro Maeda, Yu Matsuoka, Yurie Sugimoto, Hiroyuki Kurata, Construction of a dynamic model for the central metabolism of Escherichia coli. Proceedings of GIW/InCoB, 118, Odaiba, Tokyo, Sep 9-11, 2015.

(3) Kazuhiro Maeda, Fred C. Boogerd, Hans V. Westerhoff, Hiroyuki Kurata, Developing a kinetic model of the E. coli ammonium assimilation network. Proceedings of the 16th International Conference on Systems Biology, Singapore, Nov. 23-26, 2015.

(4) Kazuhiro Maeda, Fred Boogerd, Hans Westerhoff, Hiroyuki Kurata, Dynamic modeling of the E. coli ammonium assimilation network. Proceedings of GIW/InCoB, 134, Odaiba, Tokyo, Sep 9-11, 2015.

(5) 倉田博之，アンモニア同化システムの詳細なダイナミックモデル，化学工学第 80 回年会 G306, 芝浦工業大学, 3 月 19-21 日, 2015. (口頭発表)

(6) Md Bahadur Badsha, Hiroyuki Kurata, Integration of omics into metabolic flux distribution by complementary elementary mode analysis for large-scale metabolic networks, Proceedings of 3rd International Conference and Exhibition on Metabolomics & Systems Biology, San Antonio, USA, March 24-26, 2014. (Oral presentation, selected)

(7) Yu Matsuoka, Hiroyuki Kurata, S-system based sensitivity analysis for the central metabolic network in Escherichia coli. GIW / ISCB-Asia 2014, Tokyo, Japan, December 15-17, 2014 (Poster).

(8) Nusrat Jahan, Yu Matsuoka, Hiroyuki Kurata, Dynamic modeling and simulation of the central metabolism in Escherichia coli. GIW / ISCB-Asia 2014, Tokyo, Japan, December 15-17, 2014 (Poster).

(9) Hiroyuki Kurata, Yurie Sugimoto and Kazuhiro Maeda, BioFNet Database for Rational Design of Biological Systems. GIW / ISCB-Asia 2014, Tokyo, Japan, December 15-17, 2014 (Poster).

(10) Yu Matsuoka, Nusrat Jahan, Hiroyuki Kurata, S-system-based Analysis of the Robust Properties Common to Many Biochemical Network Models, IIBMP2014, C-01, Sendai, Japan, October 2-4, 2014 (Poster)

(11) Hiroyuki Kurata, Kazuhiro Maeda, BioFNet database supports analysis and synthesis of biochemical networks, ICSB 2014 (The International Conference on Systems Biology), Poster 125, Melbourne, Australia, September 14-18, 2014 (Poster)

(12) 松岡結, Nusrat Jahan, 倉田博之, S-systemを用いた代謝反応モデルの感度解析, IPSJ SIG technical reports 2014-BIO-37(1), 1-2, 2014-02-26, 九州工業大学 (口頭発表)

(13)倉田博之，生物システムの合理的設計を支援する BioFNet データベース，化学工学会第 46 回秋季大会 E207，九州大学，9 月 17-19 日，2014. (口頭発表)

(14) 倉田博之，前田和勲，生物学的基本ネットワークの組み立てによるダイナミックモデルの合理的設計，化学工学会第 79 年会 C322，岐阜大学，3 月 18-20 日，2014. (口頭発表)

(15) Md. Bahadur Badsha , Ryo Tsuboi , Hiroyuki Kurata, Complementary elementary mode analysis for large-scale metabolic networks, IPSJ SIG technical reports 2013-BIO-35(5), 1-2, 2013-09-12　北海道大学 (口頭発表)

(16) Noorlin MohdAli , Kentaro Inoue , Hiroyuki Kurata, Database for predicting a metabolic flux distribution within a cell, IPSJ SIG technical reports 2013-BIO-35(6), 1-2, 2013-09-12　北海道大学 (口頭発表)

(17) 倉田博之，Badsha Md. Bahadur, 坪井遼，ゲノムスケールヒト代謝ネットワークの高速エレメンタリモード解析，化学工学会第 45 回秋季大会，E105、岡山大学，9 月 16-18 日，2013. (口頭発表)

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0 件）

〔その他〕
ホームページ等
http://www.cadlive.jp

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
無

(3)連携研究者
森　浩禎（MORI,Hirotada）
奈良先端科学技術大学院大学・
バイオサイエンス研究科・教授
研究者番号：90182203