

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660084

研究課題名(和文)代謝工学による高等植物の代謝デザインと有用物質生産

研究課題名(英文)Metabolic design of higher plants for useful material production by metabolic engineering

研究代表者

平井 優美(Hirai, Masami)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：90415274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：微生物発酵等で行われてきた代謝工学の理論を高等植物に導入し、合理的な代謝改変をおこなって有用物質を多く生産する作物等を開発することを最終目標として、代謝系全体を視野に入れたゲノムスケールの数理モデルの構築を行った。代謝マップのみに基づいて文字式で微分方程式のモデルを構築し、シロイヌナズナに代謝攪乱を与えて得た時系列メタボロームデータを使ってパラメーター推定を行うことで、代謝の数理モデリングが可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Aiming at designing metabolism of higher plants for metabolic engineering and generating crops with enhanced useful material production, I established a method for genome-scale mathematical modeling of metabolism in *Arabidopsis thaliana*. Differential equations in a model were symbolically established based only on a metabolic map. Then parameters in the model were estimated by using time-series metabolome data which were obtained from metabolically perturbed *A. thaliana*. The established model were successfully used for system analyses.

研究分野：植物科学

キーワード：数理モデル 代謝 高等植物 メタボローム

1. 研究開始当初の背景

食糧、飼料として重要なマメ科植物の栄養価を高める(含硫黄アミノ酸含量を増大させる)ための遺伝子改変など、農学分野でも代謝改変による効率的な有用物質生産が求められている。しかし、目的物質の生合成経路にのみ部分的に着目し、植物の代謝系全体の理解が乏しいままにおこなう代謝改変は、予期しない植物側の反応によって目的物質が狙い通りに増加しないという結果に至ることも多い。そのため、効率的な有用物質生産のためには、代謝全体をシステムとして理解し、遺伝子改変などの代謝攪乱に対する植物の応答を予測して、合理的な代謝デザインをおこなうことが必要である。

2. 研究の目的

本研究課題は、微生物発酵等で行われてきた代謝工学の理論を高等植物に導入し、合理的な代謝改変をおこなって短期間に目的とする作物を開発することを最終目標として、モデル植物シロイヌナズナ等を用いて代謝系全体を視野に入れた(ゲノムスケール)数理モデルを構築して合理的な代謝デザインをおこなう。

3. 研究の方法

動物の必須アミノ酸のひとつであるメチオニンは、植物においてはリジン、スレオニン、イソロイシンとともにアスパラギン酸から生合成される(図1)。これらのアミノ酸はアスパラギン酸族アミノ酸と呼ばれる。その生合成経路はリジン、スレオニンほか複数のアミノ酸による複雑なフィードバック制御を受け、各アミノ酸の量が調節されている。

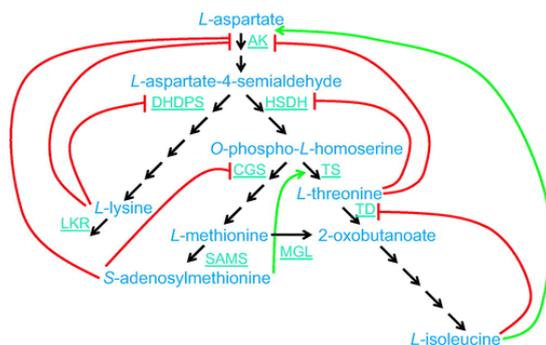


図1 アスパラギン酸族アミノ酸の生合成経路 (Jander and Joshi (2009) The Arabidopsis Book 7: e0121 より引用)。緑の矢印は活性化、赤の線は抑制を表す。AK = aspartate kinase, DHDPS = dihydrodipicolinate synthase, HSDH = homoserine dehydrogenase, CGS = cystathionine γ -synthase, TS = threonine synthase, LKR = lysine-ketoglutarate reductase, TD = threonine deaminase, MGL = methionine γ -lyase, and SAMS = S-adenosylmethionine synthase.

食糧、飼料としてのマメ科植物は、これを単一の窒素供給源として摂取する場合、メチ

オニンの量が他のアミノ酸に対して不足している。このため、メチオニンの量を増やす研究が古くからなされており、メチオニンの生合成に関わる酵素遺伝子を過剰発現させるなどのバイオテクノロジー研究が行われてきたが、必ずしも予想通りの代謝変化に至らなかった。

そこで本研究では、植物のアスパラギン酸族アミノ酸生合成経路を主な対象としてゲノムスケールの代謝数理モデルを構築して、代謝シミュレーションや律速段階(ボトルネック)の予測などをおこなうこととした。

代謝数理モデルはバイオケミカルシステム理論(BST)を利用して構築した。BSTでは、代謝マップ(代謝経路を図で表したもの、図2)の情報だけを基にして、代謝を表す連立微分方程式を文字式として構築することができる。

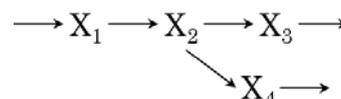


図2 代謝マップの例。X_iは代謝産物を表す。

$$\frac{dX_i}{dt} = \alpha_i \prod_{j=1}^n X_j^{g_{ij}} - \beta_i \prod_{j=1}^n X_j^{h_{ij}} \quad (i = 1, 2, \dots, n)$$

式1 BSTで用いる微分方程式。

X_i: 代謝物X_iの濃度

α_i, β_i : X_iへの流入および流出流束の速度定数

g_{ij}, h_{ij} : X_iへの流入および流出流束の反応次数

式中の文字 $\alpha_i, \beta_i, g_{ij}, h_{ij}$ 、すなわち代謝の特徴を表すパラメーターの大きさは、各代謝産物の濃度の時間変化を示すデータ(時系列データ)を利用して推定する。

私はこれまでに、ワイドターゲットメタボロミクスと名付けたハイスループットなメタボローム(細胞内全代謝産物)分析手法を確立し、多数の植物試料の分析を可能としてきた(Sawada et al. (2009) Plant Cell Physiol. 50: 37-47)。本研究ではこの分析系を利用して、代謝攪乱を与えた植物の代謝産物量の時系列データを取得し、パラメーター推定をおこなうこととした。

4. 研究成果

(1) 代謝マップとメタボローム時系列データを用いた代謝の数理モデリング

KEGGやAraCycなどのデータベースの代謝マップに基づいて、シロイヌナズナの数理モデル(連立微分方程式)を文字式として構築した。モデル中のパラメーター(速度定数、反応次数)を決定するため、シロイヌナズナのカルス液体培養にリジンとスレオニンを添加してカルスの代謝を攪乱し、経時的にサンプリングしてメタボローム分析をおこない時系列データを得た。時系列データを利用してパラメーター推定をおこなう際に、以下

の問題があった。(i)推定すべきパラメータの数に対してデータ数が少ないこと、(ii)モデル構築には代謝産物の絶対濃度が必要であるのに対してメタボロームデータは相対濃度として得られること、の2点である。少数の代謝産物に対しては既存の方法で絶対濃度を得ることができるが、モデル中に含まれる代謝産物には検出不可能なものも多く、検出可能な代謝産物についてもそのすべての絶対濃度を計測することは現実的ではない。これらの問題を回避するために、本課題では以下の2つの理論を確立した。

U (unity)-system (Sriyudthsak et al. (2014) BMC Syst. Biol. 8: S4)

代謝産物濃度の時間変化は、基本的には代謝ネットワーク(代謝反応とその制御)で規定される。このため、モデル中の速度定数を1、反応次数を1(代謝産物による酵素の活性化と阻害の場合はそれぞれ0.5と-0.5)とすることで、代謝産物量の変動や代謝システムの特徴を大まかに予測できることを示した。

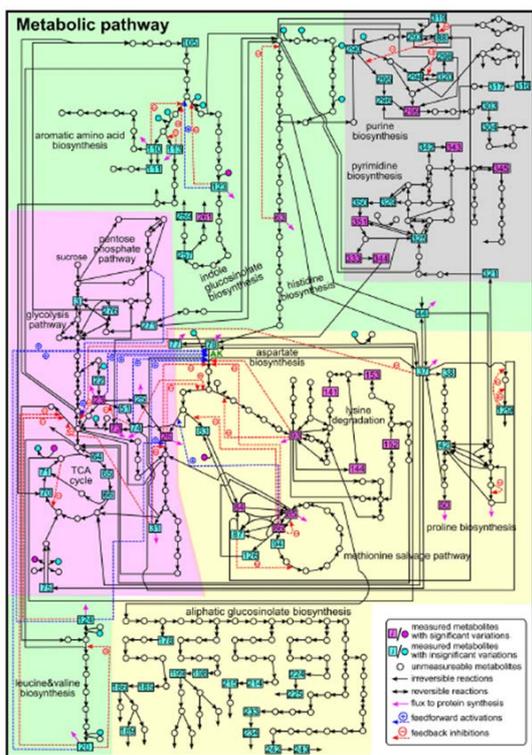


図3 U-systemの検証に用いたシロイヌナズナの代謝マップ (Sriyudthsak et al. (2014) BMC Syst. Biol. 8: S4より引用)。351個の代謝産物と441個のフラックスからなる。

PENDISC法 (Sriyudthsak et al. (2014) Bull. Math. Biol. 76: 1333-1351)

モデル中の代謝産物濃度を定常状態時の濃度で割ることで無次元化(相対値化)できること、またこれによりモデル中の速度定数の数をおよそ半分に減らすことができることを示した。

$$\frac{dx_i}{dt} = A_i \left(\prod_{j=1}^n x_j^{g_{ij}} - \prod_{j=1}^n x_j^{h_{ij}} \right) \quad (i = 1, 2, \dots, n)$$

$$x_i = X_i / X_i^*$$

式2 PENDISC法により無次元化した微分方程式。

- X_i : 代謝物 X_i の濃度
- X_i^* : 代謝物 X_i の定常状態での濃度
- x_i : 無次元化した代謝物 X_i の濃度
- A_i : 定常状態での速度定数
- g_{ij}, h_{ij} : x_i への流入および流出流束の反応次数

これらの理論を利用することで、パラメータの数と比べて少数の代謝産物の時系列データを用いて、モデル中の主要なパラメータの値を推定し、シロイヌナズナの代謝モデルを構築した。構築したモデルの感度解析をおこない、メチオニンを増やすためにはどういった代謝改変をするのがよいか推定した。また、これまで知られていなかった遺伝子発現制御を予測した(投稿準備中)。

(2)メタボローム時系列データを利用した代謝産物量の変化の因果関係予測

「グレンジャーの因果性検定」という経済学等でも使われる統計的手法、およびBSTに基づく数理解析的手法を利用して、代謝産物量の経時変化から因果関係を予測して代謝ネットワークを推定する方法であるBST-loglem法を開発した(Sriyudthsak et al. (2013) TSB2013 Conference Proceedings. pp. 94-98)。

(3)ウェブツールの構築

ユーザーが自分のメタボローム時系列データをアップロードすることでBST-loglem法により代謝ネットワークを予測したり、数理モデルをアップロードして感度解析をおこなったりできるウェブツールPASMmetを開発した(Sriyudthsak et al. Nucl. Acid Res., accepted)。

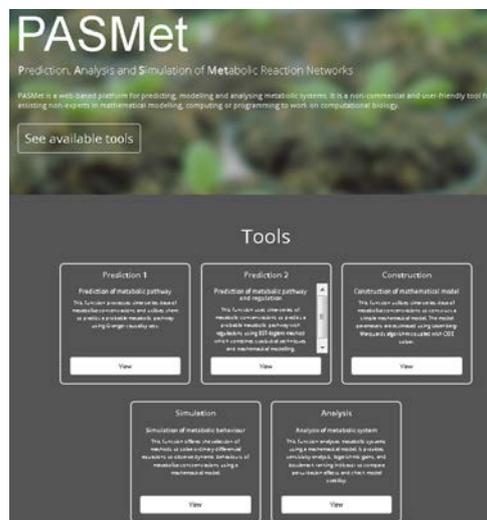


図4 PASMmet (<http://pasmnet.riken.jp/>)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Srijudthsak K, Shiraishi F, Hirai MY (2016) Mathematical modeling and dynamic simulation of metabolic reaction systems using metabolome time series data. *Front. Mol. Biosci.* **3**. DOI: 10.3389/fmolb.2016.00015, 査読有
- ② Srijudthsak K, Sawada Y, Chiba Y, Yamashita Y, Kanaya S, Onouchi H, Fujiwara T, Naito S, Voit E, Shiraishi F, Hirai MY (2014) A U-system approach for predicting metabolic behaviors and responses based on an alleged metabolic reaction network. *BMC Syst. Biol.* **8**: S4. DOI: 10.1186/1752-0509-8-S5-S4, 査読有
- ③ Srijudthsak K, Iwata M, Hirai MY, Shiraishi F (2014) PENDISC: A simple method for constructing a mathematical model from time-series data of metabolite concentrations. *Bull. Math. Biol.* **76**: 1333-1351. DOI: 10.1007/s11538-014-9960-8, 査読有
- ④ Srijudthsak K, Shiraishi F, Hirai MY (2013) BST-loglem: Parameter and network estimations based on BST modeling using LOESS, Granger causality and Levenberg-Marquardt method. TSB2013 Conference Proceedings. pp. 94-98, 査読有

[学会発表] (計 11 件)

- ① 平井優美、時系列オミクスデータに基づく代謝ネットワーク解析、CRESTシンポジウム「トランスオミクスによる生命システムの解明」、2016年3月4日、東京大学福武ホールラーニングシアター (東京)、招待講演
- ② Masami Y. Hirai, Understanding of plant metabolism via metabolomics-based mathematical modeling, GIW/ISCB-Asia 2014, 2014. 12. 15, Tokyo International Exchange Center (Tokyo), 招待講演
- ③ 平井優美、メタボロミクスによる植物の代謝制御機構の解明、第87回日本生化学会大会シンポジウム「代謝とシステムバイオロジー」、2014年10月17日、国立京都国際会館 (京都)、招待講演
- ④ 平井優美、メタボロミクスによる植物科学研究—農作物への展開—、2013 植物科学シンポジウム「持続可能資源の開発に向け

た植物科学」、2013年12月4日、コクヨホール (東京)、招待講演

- ⑤ 平井優美、メタボロームデータを用いた代謝の数理モデリング、第36回日本分子生物学会年会 ワークショップ「トランスオミクスへ向けた定量生物学」、神戸ポートアイランド (神戸)、2013年12月3日、招待講演

[その他]

研究室ホームページ

<http://www.csr.riken.jp/labs/msrt/index.html>

開発したウェブツール PASMmet

<http://pasm.riken.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 優美 (HIRAI, Masami)

理化学研究所・環境資源科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：90415274