

糖質代謝モデルネットワーク上の single-atom tracing による 経路計算と経路選択

太田潤^{†1}

概要：代謝ネットワーク上で2つの代謝産物をつなぐ経路を計算する研究が行われてきた。しかし、それらは、クエン酸回路など生物学的に重要な回路があるにもかかわらず、経路の一部として回路を含む経路を計算することを考慮してこなかった。2つの原子をつなぐ経路の計算法である single-atom tracing は、linear な経路に加えて、回路を含む経路を算出するが、精査することが困難な多数の経路を算出してしまふ。本稿では single-atom tracing により得られる経路から、生化学的意味を有する可能性に基づいて経路を選択する方法を提案する。この方法により、糖質代謝モデルネットワーク内に存在する、グルコースの炭素原子から二酸化炭素に至る合計 7876 の経路から 121 経路を選択することができた。選択した経路の中には、linear な経路に加えて、クエン酸回路とペントースリン酸経路の反応または代謝産物が複数回現れる、回路を含む経路が見られた。この結果は、提案する方法が、回路を含む経路を含む、生化学的意味を有する可能性のある、限られた数の経路を列挙することに貢献し得ることを示している。

キーワード：代謝ネットワーク，糖質代謝，connectivity matrix method

Single-atom tracing in a model network of carbohydrate metabolism and pathway selection

JUN OHTA^{†1}

1. はじめに

代謝工学において、目的とする代謝産物の生産に適した原料の代謝産物を知ることは重要である。このため、微生物における代謝フラックス分布を決定する目的で ^{13}C 代謝フラックス解析が行われ[1-4]、与えられた代謝ネットワークにおいて原料になり得ると考えられる代謝産物から目的の代謝産物に至る経路を計算する手法が報告されてきた。これらの経路計算の手法においては主に原子レベルで経路をたどることが可能かどうかにより経路の生化学的意味が判定されている[5-8]。

これらの経路計算の研究の大部分では[5-7]、酵素反応による代謝産物の変化を原子レベルでみているにもかかわらず原子ではなく代謝産物を代謝ネットワーク内のノードとして扱っている。そして、計算の目的が2つの代謝産物をつなぐ経路を発見することであるので、同一化合物が2回以上現れる経路については計算を行わないか[5]、論文で全く言及していない[6,7]。原子をノードとして扱っている少数の研究においても同一化合物が2回以上現れる経路には言及していない[8]。同一化合物が2回以上現れる経路は cycle を含む経路である。つまり、これまでは linear な経路と cycle を含む経路の両方を計算する方向のアプローチは考えられてこなかった。

グルコースの CO_2 への代謝においては linear な経路と cycle を含む経路の両方が重要である。グルコースは解糖系とそれに続くピルビン酸の酸化的脱炭酸によりアセチル

CoA のアセチル基部分と CO_2 に代謝される。この段階での CO_2 の生成はグルコースから始まる linear な経路による。次に、アセチル CoA のアセチル基部分はオキサロ酢酸と縮合してクエン酸の一部となりクエン酸回路により CO_2 に代謝される。アセチル CoA の2つの炭素原子はどちらもクエン酸回路の1周目では CO_2 にならず、2周目以降で CO_2 となる。この、グルコースからアセチル CoA とクエン酸回路を経て CO_2 に至る経路においては、経路上にクエン酸回路の代謝中間体が2回以上現れる。このような non-linear な経路を linear な経路と同様に計算するためには、1つの経路上に同一の化合物が2回以上現れることを許容する必要がある。

私は、代謝ネットワークを原子ネットワークとみる考え方を提案している[9,10]。この考え方では、ノードは代謝産物ではなく代謝産物中の原子であり、エッジは代謝産物の化学構造を規定する化学結合 (intra-metabolite connectivity) によるつながりと、反応を介する代謝産物 (基質) と代謝産物 (生成物) の間の原子から原子への対応 (inter-metabolite connectivity) によるつながりである。数学的実体である原子ネットワークの構造は、代謝産物の化学構造と酵素反応による変換の両方を含む、1つの代謝ネットワークの構造に関する殆どすべての情報を記述する。私は、原子ネットワークの着想を得た際の研究で、糖質代謝のモデルネットワーク上の、グルコースのアルデヒド炭素 C1 から CO_2 に至るすべての経路を計算し、253 経路が存在することを見つけた[11]。その研究では、特定の代謝産物から別の特定の代謝産物に至る経路を計算する代わりに、特定の単一の

^{†1} 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 (医) 生化学分野

原子から別の特定の単一の原子に至る経路を計算した。本稿では、このような原子から原子に至る経路を計算するアプローチを *single-atom tracing* と称する。*single-atom tracing* においては、1つの経路上に同じ原子が2回以上現れることを禁ずるが同じ化合物が2回以上現れることは許容する。

上記の253経路は *linear* な経路と *cycle* を含む経路の両方が含むはずであるが、生化学的意味が小さい経路も含むと思われる。253は大きな数でありこれらの経路の中でどれが重要かを判断することは大変な作業である。この問題は *single-atom tracing* に特有のもので、代謝産物をノードと考える経路計算では存在しなかった。本稿では、*single-atom tracing* により得られる経路から生化学的意味がある経路を計算により選択するための方法を提案し、それを糖質代謝モデルネットワーク上のグルコースの6つの炭素原子から CO_2 に至る経路の計算に応用した例を示す。糖質代謝モデルネットワークは解糖系、ピルビン酸の酸化的脱炭酸、クエン酸回路、ペントースリン酸経路および糖新生の反応を含むものを用い、*single-atom tracing* のための *atom-mapping* 情報は既報[11]のものを使用した。

本稿においては次のような原則で“*cycle*”という用語を使用する。クエン酸回路は英語名が“*cycle*”を含む。また、ペントースリン酸経路はその反応の集合を *cycle* として理解して *pentose cycle* と呼ばれることもある。しかしながら、クエン酸回路もペントースリン酸経路もその一部が、同じ化合物・同じ反応が1回しか現れない *linear* な経路を形成することもあり得る。本稿においてはクエン酸回路とペントースリン酸経路の反応の *linear* な経路としての利用と *cycle* としての利用を厳密に区別する。

2. 結果と考察

2.1 経路選択の方法

生化学的意味がある経路を選択するために1つの経路上の2つの反応の共存を考えた。1つの経路上に2つの反応 R_1 と R_2 が共存することがその経路の生化学的意味に *potentially* に関係する場合が2つあると思われる。第一の場合は R_1 が R_2 の逆反応である、すなわち R_1 と R_2 の共存が *futile cycling* を起こす場合である。ここでは R_2 の逆反応である R_1 と R_2 が1つの経路の別のステップと考えられるので *futile cycling* という用語を使用している。第二の場合は R_1 と R_2 が *reciprocal* (逆向き) に調節されている、すなわち R_1 と R_2 の共存が協調した調節の目的に反すると思われる場合である。本稿で提案する考え方は、上記の2つの場合に当てはまる経路を除外するというものである。この考え方については別項目“経路選択法の理論的背景”で詳しく考察する。この考え方を一般の代謝ネットワークに適用するために、経路選択のための3つの *criteria* である Filter 1, Filter 2, Filter 3 を設定した。

- Filter 1: 反応がその逆反応と共存することを許容しない。
- Filter 2: A と B が反応の集合であり、A に属する反応が *upregulate* されるとき B に属する反応が *downregulate* される、逆に A に属する反応が *downregulate* されるとき B に属する反応が *upregulate* されるときとする。このとき、A に属する反応と B に属する反応が共存することを許容しない。
- Filter 3: Filter 1 と Filter 2 で許されなかった共存をどちらも許容しない。

Filter 2 を本稿のモデルネットワークに適用する際に A は、主に解糖系で働く不可逆な反応、B は、主に糖新生で働く不可逆な反応とした。具体的には A は、ヘキソキナーゼ (グルコキナーゼ)、ホスホフルクトキナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、B はグルコース 6-ホスファターゼ、フルクトース 1,6-ビスホスファターゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼとした。A と B の反応は哺乳類の肝臓で *reciprocal* に調節されていることがよく知られている [12,13]。さらに、A の反応1つと B の反応1つの可能な組み合わせのうち、ヘキソキナーゼ (グルコキナーゼ) とグルコース 6-ホスファターゼ、ホスホフルクトキナーゼとフルクトース 1,6-ビスホスファターゼ、ピルビン酸キナーゼとホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの共存は *futile cycling* を起こすかそれに貢献する。また、本稿のモデルネットワークには輸送過程も含めて23の正反応と逆反応の組が存在した。

2.2 モデルネットワークにおける *single-atom tracing* と経路選択

グルコースの6つの炭素原子から細胞質内またはミトコンドリア内の CO_2 に至る経路をすべて計算した。この際、経路上に同じ代謝産物や反応が2回以上現れることは許容したが、代謝産物の同じ位置の原子が2回以上現れることは禁じた。グルコースの C1, C2, C3, C4, C5, C6 から CO_2 に至る経路はそれぞれ 253, 331, 428, 2576, 1848, 2440 存在した。経路数は C1, C2, C3 からの経路が C4, C5, C6 からの経路に比べてずっと少なかった。このことは解糖系においてグルコースが炭素3つから成る2つの部分に分割されることと関係しているかもしれない。

グルコースの各炭素原子からの経路のうち Filter 1, Filter 2, Filter 3 で選択された経路の数はそれぞれ、C1からの経路: 18, 59, 7; C2からの経路: 79, 69, 24; C3からの経路: 117, 96, 40; C4からの経路: 19, 24, 10; C5からの経路: 79, 48, 20; C6からの経路: 77, 32, 20であった。グルコースの6つの炭素原子からの経路は合計 7876 経路であり、その中から Filter 3 により 121 経路が選択された。

Filter 1 と Filter 2 の経路の除外率を比較すると C1 と C4 については Filter 1 の方が、C2, C3, C5, C6 については Filter 2 の方が除外率が高く、Filter 1 と Filter 2 は除外能において

相補的であると考えられた。Filter 3 による除外率はどの炭素原子についても Filter 1, Filter 2 よりも高く、Filter 3 は最も有効であった。

2.3 Filter 3 により選択された経路について

Filter 3 により選択された経路の特徴をみる。“はじめに”で述べたように single-atom tracing により linear な経路と、同じ化合物または反応が 2 回以上現れる cycle を含む経路の両方が計算でき、グルコースの炭素原子から CO₂ に至る経路には cycle を含む経路が必然的に含まれる。そこで、Filter 3 によって選択される経路に cycle が含まれるかどうか注目した。cycle の有無は同じ化合物または反応が 2 回以上現れるかどうかで判定した。

グルコースの各炭素原子から CO₂ に至る経路で Filter 3 により選択されたものについて、経路の総数、同じ代謝産物が 2 回以上現れる経路の数、同じ反応が 2 回以上現れる経路の数はそれぞれ、C1 からの経路: 7, 6, 4; C2 からの経路: 24, 22, 22; C3 からの経路: 40, 36, 36; C4 からの経路: 10, 0, 0; C5 からの経路: 20, 20, 20; C6 からの経路: 20, 20, 20 であった。C1, C2, C3, C5, C6 からの経路は 85%以上が同じ化合物が 2 回以上現れる cycle を含んでいたが、C4 からの経路に cycle を含むものはみられなかった。

C1 からの 7 経路については、同じ代謝産物が 2 回以上現れる経路の数と同じ反応が 2 回以上現れる経路の数が異なっていた。同じ代謝産物が 2 回以上現れる 6 経路のうち 4 経路は、クエン酸回路のクエン酸合成酵素反応を 2 から 3 回使うものであった。残りの 2 経路はフルクトース 6-リン酸 (F6P) を 2 回使いペントースリン酸経路内で cycle を形成していたがグルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PD) 反応の使用回数 2 回未満であった。

C2 からの 24 経路については、22 経路がクエン酸合成酵素を 2 から 3 回使うか G6PD を 2 回使う経路であり、両方の酵素を 2 回以上使う経路は 22 経路のうち 8 経路存在した。G6PD を 2 回以上使うことなく F6P を 2 回以上使う経路は存在しなかった。

C3 からの 40 経路については、36 経路がクエン酸合成酵素または G6PD を 2 から 3 回使う経路であり、両方の酵素を 2 回以上使う経路は 36 経路のうち 16 経路存在した。G6PD を 2 回以上使うことなく F6P を 2 回以上使う経路が 4 経路存在した。これらはクエン酸合成酵素を 2 回以上使用していた。解糖系の反応は 3 反応を除いて可逆反応であり糖新生ではこれらの可逆反応が逆向きに使われることが知られている。G6PD を 2 回以上使う、C3 からの経路中の経路番号 20 は、これらの可逆反応の一部を解糖の方向に、他の一部を糖新生の方向に使うものであった。

C4 からの 10 経路に cycle を含むものは存在しなかった一方で、C5 からの 20 経路と C6 からの 20 経路はすべてがクエン酸合成酵素を 2 から 3 回使うが G6PD と F6P の使用回数が 2 回未満である経路であった。C5 からの 20 経路と

C6 からの 20 経路の間には興味深い対応関係がみられた。C5 からの経路のうちの短い方の 10 経路はピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体 (PDC) 反応を含んでいた。これらの経路上の PDC 反応をピルビン酸カルボキシラーゼ (PC) 反応で置き換えると C6 からの経路のうちの短い方の 10 経路が得られた。他方、C5 からの経路のうちの長い方の 10 経路は PC 反応を含んでいた。これらの経路上の PC 反応を PDC 反応で置き換えると C6 からの経路のうちの長い方の 10 経路が得られた。

さらに、本稿に詳細は記さないが、Filter 3 により選択された経路に、グルコースの 6 つの炭素原子を PDC 反応とクエン酸回路を経て CO₂ に代謝する、よく知られている伝統的な経路が含まれていたことを付記する。

モデルネットワーク上の single-atom tracing は多数の経路を算出したが、経路選択により個々の経路の精査が可能な数まで絞り込むことができた。C3 からの経路中の経路番号 20 のような経路は注意深く見ないと見過ごしてしまう性質のものである。概して Filter 3 は有効であったと言える。更に、計算により、選択された経路が linear な経路のみならず、ペントースリン酸経路やクエン酸回路内での cycling を含む経路を含んでいることが分かった。クエン酸回路や尿素回路の重要性はよく知られているが、これまでの研究は cycle を含む経路の計算に対して注意を払ってこなかった。これはおそらく経路計算の目的が有用物質の生合成経路の発見であったためであろう。本稿のアプローチでは linear な経路と cycle を含む経路の両方を算出することができる。このことは本稿のアプローチが、計算で求めたいすべての経路をカバーしていることを意味する。少なくとも本稿のアプローチは cycle の発見という点でこれまでのアプローチを補うものであると言える。

上述した、本稿の経路選択の方法が個々の経路の精査を可能にするということは主に中心代謝経路からなる比較的小さい代謝ネットワークでの経路計算には確実に当てはまる。しかし single-atom tracing で算出される経路数が 10 万を超えるような大ネットワークでは事情が少し異なる。この場合には Filter 3 による選択の除外率が 99%であるとしても経路選択後に 1000 経路が残ることになる。1000 経路は個別に精査するには多く、経路をさらに選択するための別の方法が必要になるかもしれない。それでも、本稿の経路選択のアプローチは多数の経路の選択除外に貢献するものであり、それが有用であることに変わりはない。

2.4 経路選択法の理論的背景

本稿では、ここまで“Filter 3 により選択された経路においては、正反応と逆反応の共存による futile cycling と、reciprocal に調節される反応の、協調した調節の目的に反する共存の両方がないので、生化学的に意味がある可能性がある”ということを述べてきたがその理論的背景については詳細に述べてこなかった。そのため、次のような疑問が

存在し得る。

“除外された経路は生化学的に意味がないのか？”

ここで、原料の代謝産物から目的の代謝産物を生成する“典型的な経路”の特徴を考えることを通して、除外される経路は“例外的 irregular な経路”であることを述べたい。述べるに当たって“経路の機能はその経路全体の化学量論的収支として表現される”，“経路は合目的的である”の2点を前提とする。ここで“典型的な経路”と呼んでいる、大部分の、原料の代謝産物から目的の代謝産物を生成する経路は次の2つのRuleに従っている。

- Rule 1: 原料の代謝産物の1つまたは数個の原子を目的の代謝産物の原子までたどることが出来る。
- Rule 2: 各ステップの反応とそれを触媒する酵素の間に1対1対応の関係がある。

Rule 1 は、ある代謝産物が目的の代謝産物の原料であるために必須である。Rule 2 は経路を構成するステップとそれを触媒する酵素の対応関係についてであるが、Rule 2 には理論上、次のXとYの2タイプの例外が考えられる。

- X: 2つ以上のステップが単一の酵素で触媒される。
- Y: 単一のステップが2つ以上の異なった酵素で触媒される。

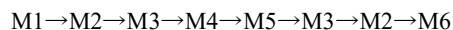
Xには次のX1, X2, X3の場合がある。

- X1: 経路上に正反応と逆反応の組が存在し、単一の酵素がその両方を触媒する。
- X2: 単一の酵素が、経路上の異なったステップとして2回以上現れる同じ反応を触媒する。
- X3: 単一の酵素が、経路上の異なるステップとなっている2種類以上の反応を触媒する。

X1とX2に当てはまる経路においては同じ代謝産物が2回以上現れる場合がある。X1とX2に当てはまる経路は、“はじめに”に記した、これまでの研究で考慮されることがなかった経路を含む。

Filter 1 を適用すると、Rule 1 に従う経路のうちRule 2 の例外であるX1に当てはまる経路が除外される。X1に当てはまる経路は部分的に合目的的でない。なぜなら経路上で、ある反応がその逆反応により相殺されるということが起こっているからである。さらに、表面に顕れる経路の実質的な機能は、経路全体の化学量論的収支を生成することであることができる。原料の代謝産物を使って目的の代謝産物を生成することも経路の化学量論的収支に他ならない。1つの経路上に、ある反応がその逆反応と共存するとき、両方の作用を合わせたものは経路の化学量論的収支に全く影響を与えない。したがって、もしRule 1に従うことを考えなければ、正反応と逆反応の組を意味がないものとして経路全体から省略することができる。その正反応と逆反応の組を触媒している酵素が経路の他のステップに関与していなければ、その酵素自体、存在する必要がない。ある経路上から、正反応と逆反応の組を省略すると、省略す

る反応が経路の両端に位置していない場合、経路全体を3つの部分に分割する。生じる部分のうちの1つはcycleである場合がある。このようなことが見られるのはX1に当てはまる経路だけである。Rule 2に従う典型的な経路とX2, X3またはYに当てはまるがX1には当てはまらない経路(Filter 1で選択される経路)では、各ステップが経路の最終的な化学量論的収支に実質的に貢献しており、どのようなステップまたはステップの組を省略したとしても経路の最終的な化学量論的収支を変えてしまう。このように、X1に当てはまる経路(Filter 1で除外される経路)は例外的である。ある経路がRule 1に従う限り、その経路が生化学的に無意味であるとはできないが、その経路は化学量論的収支への貢献の点では意味がないステップの組を含んでいるので、積極的に生化学的に意味がある経路であると結論することはできない。下記は経路の例Pw1を示している。



M1, M2, M3, M4, M5, M6 は代謝産物であり、Pw1 は M1 の1原子から M6 の1原子への single-atom tracing で計算される経路であるとする。Pw1 は正反応と逆反応の組(M2→M3とM3→M2)を含む。したがって、Pw1 はFilter 1で除外される。

Filter 2 は、reciprocal に調節される2反応が共存する経路を除外する。本稿のモデルネットワークでは2つの不可逆反応の集合AとBを考えた。Aはヘキソキナーゼ(グルコキナーゼ)、ホスホフルクトキナーゼ、ピルビン酸キナーゼからなり、Bはグルコース6-ホスファターゼ、フルクトース1,6-ビスホスファターゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼからなる。Aに属する反応は解糖系で働くが糖新生では働かない。Bに属する反応は糖新生で働くが解糖系では働かない。解糖系はグルコースを分解しATPを生成する。糖新生はATPを使いグルコースを生成する。したがって解糖系と糖新生が同時に働くとは解糖系は糖新生によるグルコース生成を打ち消し、糖新生は解糖系によるATP生成を打ち消す。しかし、上述のようにAに属する反応とBに属する反応はreciprocalに調節されていて同時に起こらないようになっている。解糖系と糖新生はグルコースとATPの生成において相殺するので、この調節は合目的的である。経路がこのような調節の下にあるとすればAに属する反応とBに属する反応が共存することはないか、もしあったとしても例外的である。本稿のFilter 2はこのように説明できる。ここで“典型的な経路”に従うRule 3を次のように設定する。

- Rule 3: 1つの経路上にreciprocalに調節される2反応が共存することはない。
ホスホフルクトキナーゼ反応とフルクトース1,6-ビスホ

スファターゼ反応が共存すると F6P がフルクトース 1,6-ビスリン酸になった後に F6P に戻る cycle が生じるがこの cycle は “futile cycle” のかわりに “substrate cycle” と呼ばれることがある. “substrate cycle は代謝シグナルを増幅する点で生物学的に重要である”, あるいは “substrate cycle は ATP の加水分解によって熱を産生するという生物学的な役割がある” といった可能性を認める記載がある[14]. したがって Filter 2 で除外される経路は Rule 1 に従う限り、生化学的意味がないということではできない. しかしながら reciprocal に調節される 2 反応が 1 つの経路に共存することは調節の目的に反して合目的的であるとはいえず、そのような共存がみられる経路はやはり例外的である. 本稿のモデルネットワーク上の経路を Filter 2 によって区別することには正当な理由があると思われる. Filter 2 の使用は他の代謝ネットワークに拡張することが可能である. Filter 1 と Filter 2 で除外される経路が例外的である理由について説明してきた. Filter 3 は Filter 1 と Filter 2 の組み合わせであり、上述のように Filter 1 と Filter 2 のどちらもそれにより経路を区別する正当な理由があると思われる. したがって Filter 3 で経路を区別することにも正当な理由があると思われる. Filter 3 により選択される経路は Filter 1 と Filter 2 のどちらによっても例外的であると判定されなかった経路である. この意味で、それらは生化学的に意味がある経路であり得る.

結論として、経路上の反応の共存に関する criteria にもとづいて経路を選択あるいは区別することにより、精査するには多すぎる経路を算出してしまうという single-atom tracing の問題点は、少なくとも比較的小さな代謝ネットワークでは克服され、生化学的意味があると思われる経路を linear な経路と cycle を含む経路の両方について見つけることができるようになった. 本稿の single-atom tracing と経路選択法の組み合わせは、wet な実験でその生化学的意義を調べる価値がある経路、特に cycle を含む経路の提示に貢献するものである.

3. 方法

3.1 糖質代謝モデルネットワーク

本研究で用いた糖質代謝モデルネットワークは既報[11]のネットワークをもとに、反応の可逆性を一般的な生化学の教科書の記載に合うよう改訂したものである. ネットワークは “はじめに” で述べたように、解糖系、ピルビン酸の酸化的脱炭酸、クエン酸回路、ペントースリン酸経路、糖新生の反応からなる. 46 の代謝産物と 35 の反応または膜輸送を含む. 各代謝産物と反応は、次項のように番号付けした. いくつかの代謝産物と反応については細胞質内のものでミトコンドリア内のものとで別の番号を付けた.

3.2 代謝産物、炭素原子とプロセスの番号付け

既報[11]に従って番号付けを行った. 以下の説明で “プ

ロセス” は、反応または膜輸送の過程のことを意味する. モデルネットワーク内の各代謝産物には代謝産物番号を付した. 46 代謝産物のうちの、グルコースの代謝産物である 32 代謝産物については、代謝産物の各炭素原子に、IUPAC 命名法に従って代謝産物内炭素番号を付け、該当する代謝産物の代謝産物番号と代謝産物内炭素番号の組により炭素原子を表現するようにした. アセチル CoA のアセチル基部分については、カルボニル基の炭素とメチル基の炭素にそれぞれ代謝産物内炭素番号 1 と 2 を付した. サクシニル CoA のサクシニル基部分については、チオエステル結合の硫黄原子に結合している炭素原子に代謝産物内炭素番号 1 を付した. 対称性を持つ分子であるフマル酸とコハク酸については対称な関係にある炭素原子には同じ代謝産物内炭素番号を付した. 46 代謝産物のうち 14 代謝産物はいわゆる “currency metabolite” であり、これらの炭素原子には番号付けしなかった. ATP, NADH, CoA, H₂O などは “currency metabolite” として扱ったが、アセチル CoA とサクシニル CoA は “currency metabolite” としては扱わなかった. 各プロセスにはプロセス番号を付した. 上記の番号と表現の具体的な取り扱いは次の通りである. 代謝産物番号を m 、代謝産物内原子番号を c とするとき各炭素原子は (m, c) として表現した. 計算上 (m, c) は複素数 $m + ci$ として扱った. 本稿では (m, c) は複素数 $m + ci$ も意味するものとする. あるプロセスのプロセス番号が p であるとき、そのプロセスの逆プロセスのプロセス番号を $-p$ (マイナス p) とした.

3.3 代謝ネットワーク内の代謝産物間の原子のつながり inter-metabolite atom-level connectivity の記述

Connectivity matrix (CM) はネットワーク内のつながりを記述するための一般的な形式である[11]. CM の各行は、ノードを表す行ベクトル 2 つとエッジを表す行ベクトル 1 つを結合したものであり、1 つのつながりを表現する. 本研究では、モデルネットワーク内のグルコースの代謝産物間のすべての可能な原子のつながりを記述するために、CM の最も単純な形式である 3 列の CM を用いた[11]. m_1 と m_2 が代謝産物を、 (m_1, c_1) と (m_2, c_2) が原子を、 p_1 がプロセスを表現するとするとき、CM の行 $[(m_1, c_1), (m_2, c_2), p_1]$ は、代謝産物 m_1 中の原子 (m_1, c_1) がプロセス p_1 により別の代謝産物 m_2 中の原子 (m_2, c_2) に変換されることを意味する. 別の言葉で表現すると、各行は、第 3 列がつながりに直接かかわるプロセスを、第 1 列がプロセスの基質中の原子を、第 2 列がプロセスの生成物中の対応する原子を示す. 本研究で用いた CM は 291 行の行列であった.

3.4 CM を用いる、特定の 1 原子から別の特定の 1 原子に至るすべての経路の算出

既報の方法で行った[11]. 簡単に説明すると、特定の原子 s から別の特定の原子 d に至るすべての経路を、CM の行として表現された 2 原子の配列をつないでいくことによ

り生成した。経路を生成する際には、経路に対応する CM の行番号の配列を記録し、これを後で経路上の代謝産物の配列、プロセスの配列を計算する際に用いた。原子の配列を延長していく際には 1 つの経路の原子の配列上に同じ代謝産物の同じ原子が 1 回しか現れないようにした。

3.5 経路の選択

p_1 と p_2 をプロセス番号とする。プロセス p_1 と p_2 が“結果と考察”の項に記した生化学的な理由で同じ経路上に共存できないとき、 p_1 と p_2 のような組（対）を“not-allowed pair”と呼ぶ。ネットワーク内の、プロセスに関するすべての“not-allowed pair”の情報を 2 列の行列 M に保存した。 M の各行は“not-allowed pair”を構成する 2 つのプロセス番号からなる。上記の経路計算の後に、各経路のプロセス番号配列を、経路計算の際に記録した CM の行番号の配列から計算する。得られたプロセス番号配列上に“not-allowed pair”を構成する 2 つのプロセス番号の両方がある場合、そのプロセス番号配列に対応する経路は除外する。プロセス番号配列上に“not-allowed pair”を構成する 2 つのプロセス番号の両方があるという条件が満たされない場合、そのプロセス番号配列に対応する経路を、生化学的な意味がある可能性があるとして選択する。

3.6 計算

上記のように single-atom tracing と経路の選択に必要な情報は行列の形で表現した。本研究ではこの情報を用いて GNU Octave と Matlab 上で計算を行った。

参考文献

- [1] Toya, Y.; Shimizu, H. Flux analysis and metabolomics for systematic metabolic engineering of microorganisms. *Biotechnol Adv* **2013**, *31*, 818–826. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.05.002
- [2] Kohlstedt, M.; Becker, J.; Wittmann, C. Metabolic fluxes and beyond-systems biology understanding and engineering of microbial metabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *88*, 1065–1075. DOI: 10.1007/s00253-010-2854-2
- [3] Buscher, J. M.; Czernik, D.; Ewald, J. C.; Sauer, U.; Zamboni, N. Cross-platform comparison of methods for quantitative metabolomics of primary metabolism. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2135–2143. DOI: 10.1021/ac8022857
- [4] McAtee, A. G.; Jazmin, L. J.; Young, J. D. Application of isotope labeling experiments and ^{13}C flux analysis to enable rational pathway engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *36*, 50–56. DOI: 10.1016/j.copbio.2015.08.004
- [5] Arita, M. In silico atomic tracing by substrate-product relationship in Escherichia coli intermediary metabolism. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2455–2466. DOI: 10.1101/gr.1212003
- [6] Latendresse, M.; Krummenacker, M.; Karp, P.D. Optimal metabolic route search based on atom mappings. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2043–2050. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu150
- [7] Heath, A.P.; Bennett, G.N.; Kavraki, L.E. Finding metabolic pathways using atom tracking. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 1548–1555. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq223
- [8] Pitkänen, E.; Jouhten, P.; Rousu, J. Inferring branching pathways in genome-scale metabolic networks. *BMC Syst. Biol.* **2009**, *3*, 1–22. DOI: 10.1186/1752-0509-3-103
- [9] Ohta, J. Visualization of Metabolic Networks as Networks of Atoms by Pajek: An Application of Connectivity Matrix Method. *Genome Informatics, Volume 17 Poster and Software demonstrations*, **2006**, P146, Genome Informatics Online. Available online: <http://www.jsbi.org/pdfs/journal1/GIW06/GIW06P146.pdf> (accessed on 5 February, 2018)
- [10] Ohta, J. Strategy for Exploring Metabolic Pathways: Generation of Hypothetical Metabolic Network... *J. Comput. Sci. Syst. Biol.* **2015**, *8*, 55–58. DOI: 10.4172/jcsb.1000171
- [11] Ohta, J. Connectivity matrix method for analyses of biological networks and its application to atom-level analysis of a model network of carbohydrate metabolism. *IEE Proc. Syst. Biol.* **2006**, *153*, 372–374. DOI: 10.1049/ip-syb:20060018
- [12] Pilkis, S.J.; Claus, T.H. Hepatic gluconeogenesis/glycolysis: regulation and structure/function relationships of substrate cycle enzymes. *Annu. Rev. Nutr.* **1991**, *11*, 465–515. DOI: 10.1146/annurev.nu.11.070191.002341
- [13] MacGrane, M.M. Carbohydrate Metabolism: Synthesis and Oxidation, In *Biochemical, Physiological, & Molecular Aspects of Humane Nutrition*, 2nd ed.; Stipanuk, M.H., Ed; Saunders: St. Louis, U.S.A., 2006, pp. 257–318; ISBN-13: 978-1-4160-0209-3.
- [14] Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. Glycolysis and Gluconeogenesis, In *Biochemistry*, 5th ed.; Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L., Eds; W. H. Freeman: New York, U.S.A., 2002, pp. 425–464; ISBN-10: 0-7167-3051-0.