

代謝ネットワークにおける同位体分布の 経時変化シミュレーション

太田潤^{†1,a)}

概要: 同位体を用いる細胞の代謝フラックス解析では、同位体標識化合物を含む培地で培養した細胞の同位体分布(分子内同位体分布, isotopomer 存在比等)の測定を行う。並行して、細胞の代謝ネットワーク内の同位体分布を、様々な人工的なフラックス条件下でシミュレーションし、最も測定値に近い同位体分布を与えるフラックスを実際のフラックスとする。フラックス決定のための同位体分布測定値として、以前は、定常状態に達した後の測定値のみが利用されていたが、近年、定常状態に達する前の測定値も利用されるようになった。これに伴い、同位体分布の定常状態値に加えてその経時変化もフラックス値から理論的に予測・計算することが必要になっている。同位体分布の経時変化は、同位体分布の変化速度が同位体分布の関数に等しいとする微分方程式を数値的に解くことで求められるが、この方法は計算コストが高い。私は、与えられたフラックス条件下での同位体分布の変化とマルコフ連鎖における推移確率に基づく状態分布の変化の間の形式的類似性に気付いた。検討を行ったところ、ある時点の同位体分布が、その直前の時点の同位体分布からの推移として、フラックス値と代謝産物量を用いる計算により求められることがわかった。本稿では、同位体分布を初期値から始めて繰り返し更新していく、マルコフ連鎖を模倣した、同位体分布の経時変化計算法を提案する。そして、このマルコフ連鎖を模倣した方法と微分方程式を数値的に解く方法の比較を試みる。

キーワード: 代謝ネットワーク, 代謝フラックス解析, 同位体分布, マルコフ連鎖, 推移行列

Simulation of time course change of isotope distribution in metabolic networks

JUN OHTA^{†1,a)}

1. はじめに

生体内には、様々な代謝経路が存在している。生化学の通常の学習課程においては、これらの代謝経路を、それぞれが固有の機能を持つ別々のものとして学ぶ。しかし、実際の代謝経路は、すべての代謝経路と酵素反応が一体となって連動する代謝ネットワーク(生化学反応ネットワーク)として機能しており、代謝の状態は有機的な全体として理解する必要がある。このことは、医学や、目的とする化合物を微生物、哺乳動物等の細胞で効率よく産生することを目指して細胞の代謝を工学的に改変する代謝工学において重要である。代謝工学においては、目的とする化合物の産生増加のために導入・除去すべき酵素の提案や、特定の酵素の導入・除去が目的とする化合物の産生増加に有効であったかどうかの判定のため、代謝ネットワーク内のすべての酵素についてそれを通過する代謝流量を決定する(=代謝フラックス分布を決定する)代謝フラックス解析を行う。これまで、代謝フラックス分布を詳細に決定するために、¹³C代謝フラックス解析が広く行われてきた[1-4]。

¹³C代謝フラックス解析では、¹³Cで標識した炭素源を含む培地で培養した細胞の同位体分布(¹³C標識割合)の測定を行う。並行して、細胞の代謝ネットワーク内の同位体分布を、様々な人工的なフラックス条件下でシミュレーションし、最も測定値に近い同位体分布を与えるフラックスを

実際のフラックスとする。多くの場合、シミュレーションは、細胞が、代謝中間体濃度の変化しない代謝定常状態(metabolic steady state)にあることを仮定して行われる。¹³C代謝フラックス解析が開発された当初は、代謝定常状態にある細胞が¹³Cで標識した炭素源を含む培地での培養により同位体定常状態(isotopic steady state)に達した後に同位体分布の測定が行われていたため、シミュレーションは、同位体定常状態の同位体分布値のみ行えばよかった。しかし、最近、同位体定常状態に達する前の同位体分布の測定値からフラックスを求めることが行われるようになり、代謝定常状態にある細胞における同位体定常状態の同位体分布値に加えて、同位体定常状態に達するまでの同位体分布の経時変化についてもシミュレーションを行う必要性が生じてきた[5-8]。

これまで、同位体分布という言葉でまとめて述べてきたものは、一般に、それぞれの代謝産物における、次の3者(3種類の同位体分布)の何れかを指す[9-11]。

- ①分子内の各原子位置の同位体標識割合でみる同位体分布
- ②isotopomer (同位体の違いにより生ずる異性体)の存在割合でみる同位体分布
- ③elementary metabolite unit (EMU, 代謝産物分子の構造単位)の質量でみる同位体分布

①②③の同位体分布は、①では分子内の各原子位置の同位体標識割合[9]、②では各代謝産物に占める特定のisotopomerの存在割合[10]、③では各EMUに占める特定の

^{†1} 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 (医) 生化学分野
a) jo25@md.okayama-u.ac.jp

質量の EMU の存在割合[11]であり、何れも 0 から 1 の間の値をとる割合（率）である。このことを明確に示す必要がある場合は、“率としての同位体分布”と呼ぶ。率としての①②③の同位体分布に、それぞれ、原子、分子、EMU の全体量を乗じた値も同位体分布と考えることができ、これを明確に示す必要がある場合には、“全体量としての同位体分布”と呼ぶ。

①②③の何れ場合も、同位体分布の経時変化は、同位体分布の変化速度が同位体分布の関数に等しいとする微分方程式を数値的に解くことで求められる[7,8,10,12,13]。現状では、同位体分布の測定値は①の代謝産物分子内の各原子位置の同位体標識割合としてではなく代謝産物分子の質量分布として得られる場合が多いこと、②よりも③の方が数学的な取り扱いの際の変数が少なく済むことから、③の同位体分布の経時変化シミュレーションが好まれている[13]。しかし、微分方程式を数値的に解く以上、反復計算に伴う計算コストは避けられない。一方、上述のように、正確に代謝フラックス分布を決定するためには、同位体分布の経時変化を多数の候補代謝フラックス分布に対して計算する必要がある。そのため、計算コストのより少ない、同位体分布の経時変化計算法の開発が望まれている。

私は、遺伝子導入・改変した大腸菌でメタノールのみを炭素源として有用物質を産生させるプロジェクト[14]を知り、モデル代謝ネットワーク上でメタノールの標識炭素がグルコースに入る過程を研究するようになった[15,16]。その過程で、微分方程式を数値的に解くことによる同位体分布の経時変化シミュレーションの手法を習得したが、“代謝経路の分岐点で代謝産物が分岐反応のフラックス比に基づき分配される”という原始的な考え方でシミュレーションができないかずっと考えていた。そういう時に、ベイズ統計学の本のマルコフ連鎖モンテカルロ法 (MCMC) の記述で、マルコフ連鎖の理論では状態分布が推移確率に基づき変化していくと考えることを知り、初期同位体分布から始めて同位体分布の推移を繰り返し計算して同位体分布の経時変化をシミュレーションするという方法（本稿でマルコフ連鎖法と呼ぶ方法）を着想した。本稿では、このマルコフ連鎖法の理論と実施手順を記載し、マルコフ連鎖法と従来の、微分方程式を数値的に解くことにより同位体分布の経時変化をシミュレーションする方法（本稿で微分方程式法と呼ぶもの）との関係を検討した結果を示す。本稿で検討した微分方程式法は、オイラー法である。

2. 理論

2.1 モデル代謝ネットワーク

図 1 のモデル代謝ネットワークにおいて、A, B, C, D を代謝産物とし、A, B, C, D とそれらをつなぐ矢印（反応）からなるネットワークを N で表す。

N 内の A と B はそれぞれ N 外の A と B である A_{ex} と B_{ex}

から N 内（系内）に流入する。N 内の D は流出して N 外（系外）の D である D_{ex} に加わる。

A, B, C, D, A_{ex} , B_{ex} , D_{ex} の率としての同位体分布を A, B, C, D, A_{ex} , B_{ex} , D_{ex} と表す。反応を次のように定義する。



反応 1, 反応 2, 反応 3 の速度をそれぞれ v_1 , v_2 , v_3 で、A と B の N 内（系内）への流入速度をそれぞれ v_{inA} , v_{inB} で、D の N 外（系外）への流出速度を v_{outD} で表す。また、A, B, C, D の量を、それぞれ Aa, Ba, Ca, Da と表す。

以下、N が代謝定常状態にあることと A_{ex} , B_{ex} の同位体分布 A_{ex} , B_{ex} が経時変化しないことを仮定する。すると、A, B, C, D の量である Aa, Ba, Ca, Da は一定で変化しないので、

$$v_{inA} = v_1$$

$$v_{inB} = v_2$$

$$v_1 + v_2 = v_3$$

$$v_3 = v_{outD}$$

(1)

が成り立つ。

代謝産物 X, Y が関与する反応または流入・流出過程である $X \rightarrow Y$ が存在する時、当量の $X \rightarrow Y$ に伴い増加する (X 由来の) 同位体分布 Y を $Y(X)$ と表す。たとえば、 $C(A)$ は当量の $A \rightarrow C$ に伴い増加する (A 由来の) 同位体分布 C を表し、 $C(B)$ は当量の $B \rightarrow C$ に伴い増加する (B 由来の) 同位体分布 C を表す。

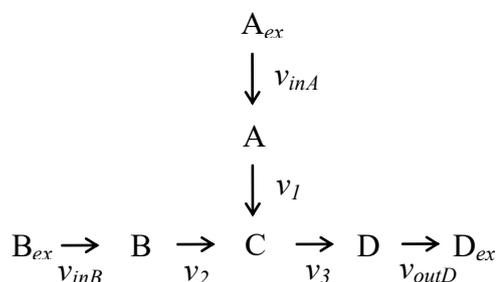


図 1 モデル代謝ネットワーク

2.2 微分方程式法による同位体分布の経時変化計算

微分方程式法においては、A の（率としてではなく全体量としての）同位体分布の変化の速度が $Aa \times dA/dt$ であると同時に、(A_{ex} から N 内（系内）への A の流入に伴う) A の増加速度 $v_{inA} \times A(A_{ex})$ から (A の C への代謝に伴う) A の減少速度 $v_1 \times A$ を差し引いたものでもあることから、

$$Aa \times dA/dt = v_{inA} \times A(A_{ex}) - v_1 \times A \quad (2)$$

を得る. B の (率としてではなく全体量としての) 同位体分布の変化の速度が $Ba \times dB/dt$ であると同時に, (B_{ex} から N 内(系内)への B の流入に伴う) B の増加速度 $v_{inB} \times B(B_{ex})$ から (B の C への代謝に伴う) B の減少速度 $v_2 \times B$ を差し引いたものでもあることから,

$$Ba \times dB/dt = v_{inB} \times B(B_{ex}) - v_2 \times B \quad (3)$$

を得る. C の (率としてではなく全体量としての) 同位体分布の変化の速度が $Ca \times dC/dt$ であると同時に, (C の生成に伴う) C の増加速度 $v_1 \times C(A) + v_2 \times C(B)$ から (C の D への代謝に伴う) C の減少速度 $v_3 \times C$ を差し引いたものでもあることから,

$$Ca \times dC/dt = v_1 \times C(A) + v_2 \times C(B) - v_3 \times C \quad (4)$$

を得る. D の (率としてではなく全体量としての) 同位体分布の変化の速度が $Da \times dD/dt$ であると同時に, (C の D への代謝に伴う) D の増加速度 $v_3 \times D(C)$ から (N 外(系外)の D_{ex} への D の流出に伴う) D の減少速度 $v_{outD} \times D$ を差し引いたものでもあることから,

$$Da \times dD/dt = v_3 \times D(C) - v_{outD} \times D \quad (5)$$

を得る.

今, Δt の間隔を持つ時間(経過時間)の増加する数列 $T_0, T_1, T_2, T_3, \dots, T_{n-1}, T_n$ を考え, 代謝産物 X の時点 T_m での率としての同位体分布を X_m と表す.

(2)の両辺を Aa で割った式を用いると時点 T_m での A の増加速度は $(v_{inA} \times A(A_{exm}) - v_1 \times A_m) \div Aa$ で近似できるので T_{m+1} の時点 ($T_m + \Delta t$ の時点) の A の率としての同位体分布 A_{m+1} は

$$A_{m+1} \doteq A_m + \Delta t \times (v_{inA} \times A(A_{exm}) - v_1 \times A_m) \div Aa \quad (6)$$

と近似計算できる.

(3)の両辺を Ba で割った式を用いると時点 T_m での B の増加速度は $(v_{inB} \times B(B_{exm}) - v_2 \times B_m) \div Ba$ で近似できるので T_{m+1} の時点 ($T_m + \Delta t$ の時点) の B の率としての同位体分布 B_{m+1} は

$$B_{m+1} \doteq B_m + \Delta t \times (v_{inB} \times B(B_{exm}) - v_2 \times B_m) \div Ba \quad (7)$$

と近似計算できる.

(4)の両辺を Ca で割った式を用いると時点 T_m での C の増加速度は $(v_1 \times C(A_m) + v_2 \times C(B_m) - v_3 \times C_m) \div Ca$ で近似で

きるので T_{m+1} の時点 ($T_m + \Delta t$ の時点) の C の率としての同位体分布 C_{m+1} は

$$C_{m+1} \doteq C_m + \Delta t \times (v_1 \times C(A_m) + v_2 \times C(B_m) - v_3 \times C_m) \div Ca \quad (8)$$

と近似計算できる.

(5)の両辺を Da で割った式を用いると時点 T_m での D の増加速度は $(v_3 \times D(C_m) - v_{outD} \times D_m) \div Da$ で近似できるので T_{m+1} の時点 ($T_m + \Delta t$ の時点) の D の率としての同位体分布 D_{m+1} は

$$D_{m+1} \doteq D_m + \Delta t \times (v_3 \times D(C_m) - v_{outD} \times D_m) \div Da \quad (9)$$

と近似計算できる.

流入する A_{ex}, B_{ex} の同位体分布 A_{ex}, B_{ex} は経時変化せず, すべての自然数 m に対して $A_{exm} = A_{ex0}, B_{exm} = B_{ex0}$ であるので, 最初に T_0 時点の $A_0, B_0, C_0, D_0, A_{ex0}, B_{ex0}$ を与えて計算を反復すると, まず A_1, B_1, C_1, D_1 , 次に A_2, B_2, C_2, D_2 , その次に $A_3, B_3, C_3, D_3, \dots$ と順次 A, B, C, D の経時変化を求めることができる. これが, 微分方程式法の一種のオイラー法である. 微分方程式法には種々の変法があるが, どの方法の微分方程式法でも Δt の値を十分に小さくしないと精度が悪くなる・収束しなくなるといった問題が生じる. 一方, Δt の値を小さくするほど計算コストが高くなる.

2.3 マルコフ連鎖法による同位体分布の経時変化計算

マルコフ連鎖の理論においては, 状態分布が推移確率に基づき順次変化すると考える. 本稿で“マルコフ連鎖法”と呼んでいる方法では, マルコフ連鎖の理論における状態分布を代謝ネットワークにおける同位体分布に置き換えて考え, “時点 T_m での同位体分布から, その推移として, 時点 T_{m+1} での同位体分布を求める”ことを繰り返すことにより同位体分布の経時変化を求める. 代謝定常状態を仮定しているので代謝産物 A, B, C, D の量 Aa, Ba, Ca, Da は, 一定であり経時変化しない.

A については, 時点 T_m から時点 T_{m+1} に至るまでの間に, 量 Aa だけ存在する A のうち $\Delta t \times v_1 = \Delta t \times v_{inA}$ が C へと変化し, 代わりに同位体分布 A_{exm} の A_{ex} から $\Delta t \times v_{inA}$ の A が流入する. 量 Aa だけ存在する A のうち $Ar = Aa - \Delta t \times v_{inA}$ は変化せず同位体分布 A_m の A のままでとどまる. したがって, 時点 T_{m+1} での A の率としての同位体分布は, A の全体量としての同位体分布を A の量である $Aa = \Delta t \times v_{inA} + Ar$ で割ることにより,

$$A_{m+1} = (\Delta t \times v_{inA} \times A(A_{exm}) + Ar \times A_m) \div (\Delta t \times v_{inA} + Ar) \quad (10)$$

となる. 右辺の $A(A_{exm})$ と A_m の係数の和は 1 である.

B については, 時点 T_m から時点 T_{m+1} に至るまでの間に,

量 B_a だけ存在する B のうち $\Delta t \times v_2 = \Delta t \times v_{inB}$ が C へと変化し、代わりに同位体分布 B_{exm} の B_{ex} から $\Delta t \times v_{inB}$ の B が生成する。量 B_a だけ存在する B のうち $B_r = B_a - \Delta t \times v_{inB}$ は変化せず同位体分布 B_m の B のままでとどまる。したがって、時点 T_{m+1} での B の率としての同位体分布は、 B の全体量としての同位体分布を B の量である $B_a = \Delta t \times v_{inB} + B_r$ で割ることにより、

$$B_{m+1} = (\Delta t \times v_{inB} \times B(B_{exm}) + B_r \times B_m) \div (\Delta t \times v_{inB} + B_r) \quad (11)$$

となる。右辺の $B(B_{exm})$ と B_m の係数の和は 1 である。

C については、時点 T_m から時点 T_{m+1} に至るまでの間に、量 C_a だけ存在する C のうち $\Delta t \times v_3 = \Delta t \times (v_1 + v_2)$ が D へと変化し、代わりに同位体分布 A_m の A から $\Delta t \times v_1$ の C が、同位体分布 B_m の B から $\Delta t \times v_2$ の C が生成する。量 C_a だけ存在する C のうち $C_r = C_a - \Delta t \times (v_1 + v_2)$ は変化せず同位体分布 C_m の C のままでとどまる。したがって、時点 T_{m+1} での C の率としての同位体分布は、 C の全体量としての同位体分布を C の量である $C_a = \Delta t \times v_1 + \Delta t \times v_2 + C_r$ で割ることにより、

$$C_{m+1} = (\Delta t \times v_1 \times C(A_m) + \Delta t \times v_2 \times C(B_m) + C_r \times C_m) \div (\Delta t \times v_1 + \Delta t \times v_2 + C_r) \quad (12)$$

となる。右辺の $C(A_m)$ 、 $C(B_m)$ 、 C_m の係数の和は 1 である。

D については、時点 T_m から時点 T_{m+1} に至るまでの間に、量 D_a だけ存在する D のうち $\Delta t \times v_{outD} = \Delta t \times v_3$ が D_{ex} へと流出し、代わりに同位体分布 C_m の C から $\Delta t \times v_3$ の D が生成する。量 D_a だけ存在する D のうち $D_r = D_a - \Delta t \times v_3$ は変化せず同位体分布 D_m の D のままでとどまる。したがって、時点 T_{m+1} での D の率としての同位体分布は、 D の全体量としての同位体分布を D の量である $D_a = \Delta t \times v_3 + D_r$ で割ることにより、

$$D_{m+1} = (\Delta t \times v_3 \times D(C_m) + D_r \times D_m) \div (\Delta t \times v_3 + D_r) \quad (13)$$

となる。右辺の $D(C_m)$ と D_m の係数の和は 1 である。

これで、 A_{m+1} 、 B_{m+1} 、 C_{m+1} 、 D_{m+1} がすべて A_m 、 B_m 、 C_m 、 D_m 、 A_{exm} 、 B_{exm} からの推移として表現されたことになる。すべての自然数 m に対して $A_{exm} = A_{ex0}$ 、 $B_{exm} = B_{ex0}$ であるので、マルコフ連鎖法の場合も微分方程式法の場合と同様に、最初に T_0 時点の A_0 、 B_0 、 C_0 、 D_0 、 A_{ex0} 、 B_{ex0} を与えて計算を反復することにより、まず A_1 、 B_1 、 C_1 、 D_1 、次に A_2 、 B_2 、 C_2 、 D_2 、その次に A_3 、 B_3 、 C_3 、 D_3 、・・・と順次 A 、 B 、 C 、 D の経時変化を求めることができる。マルコフ連鎖法では、同位体分布の経時変化を、同位体分布の（本来のマルコフ連鎖の理論で謂う所の）“推移”の繰り返しと考える。

2.4 微分方程式法とマルコフ連鎖法の同等性

(6)に $v_1 = v_{inA}$ と $A_a = \Delta t \times v_{inA} + A_r$ ((1)および前項 2.3 より) を代入すると(10)が得られる。

(7)に $v_2 = v_{inB}$ と $B_a = \Delta t \times v_{inB} + B_r$ ((1)および前項 2.3 より) を代入すると(11)が得られる。

(8)に $v_3 = v_1 + v_2$ と $C_a = \Delta t \times (v_1 + v_2) + C_r$ ((1)および前項 2.3 より) を代入すると(12)が得られる。

(9)に $v_{outD} = v_3$ と $D_a = \Delta t \times v_3 + D_r$ ((1)および前項 2.3 より) を代入すると(13)が得られる。

逆に(10)から(6)、(11)から(7)、(12)から(8)、(13)から(9)を得ることも容易にできる。したがって、同位体分布の経時変化計算のための微分方程式法（オイラー法）とマルコフ連鎖法は数学的に同等である。

2.5 マルコフ連鎖法とマルコフ連鎖の理論の対応

①の同位体分布を扱う場合には、 N 以外の代謝ネットワークに対しても N に対する(10)、(11)、(12)、(13)式と同様の式が導出できることと、それらの、各ネットワークにより定まる式の組から、マルコフ連鎖の理論で謂う所の推移行列に相当するものが導出できることを確認した。図 1 の A 、 B 、 C 、 D 、 A_{ex} 、 B_{ex} のそれぞれを構成する原子の数が 1 であり、 A 、 B 、 C 、 D 、 A_{ex} 、 B_{ex} が同位体の標識割合を示すスカラーであるものとして、(10)、(11)、(12)、(13)式から推移行列に相当するものを導出する手順を示す。

A 、 B 、 C 、 D 、 A_{ex} 、 B_{ex} のそれぞれを構成する原子の数が 1 であり、 A 、 B 、 C 、 D 、 A_{ex} 、 B_{ex} が同位体の標識割合を示すスカラーであることから、 $A(A_{exm}) = A_{exm}$ 、 $B(B_{exm}) = B_{exm}$ 、 $C(A_m) = A_m$ 、 $C(B_m) = B_m$ 、 $D(C_m) = C_m$ である。

したがって、(10)に $A(A_{exm}) = A_{exm}$ と $\Delta t \times v_{inA} + A_r = A_a$ (前々項 2.3 より) を代入して両辺に A_a をかけて、

$$A_a \times A_{m+1} = \Delta t \times v_{inA} \times A_{exm} + A_r \times A_m \quad (14)$$

(11)に $B(B_{exm}) = B_{exm}$ と $\Delta t \times v_{inB} + B_r = B_a$ (前々項 2.3 より) を代入して両辺に B_a をかけて、

$$B_a \times B_{m+1} = \Delta t \times v_{inB} \times B_{exm} + B_r \times B_m \quad (15)$$

(12)に $C(A_m) = A_m$ 、 $C(B_m) = B_m$ と $\Delta t \times v_1 + \Delta t \times v_2 + C_r = C_a$ (前々項 2.3 より) を代入して両辺に C_a をかけて、

$$C_a \times C_{m+1} = \Delta t \times v_1 \times A_m + \Delta t \times v_2 \times B_m + C_r \times C_m \quad (16)$$

(13)に $D(C_m) = C_m$ と $\Delta t \times v_3 + D_r = D_a$ (前々項 2.3 より) を代入して両辺に D_a をかけて、

$$D_a \times D_{m+1} = \Delta t \times v_3 \times C_m + D_r \times D_m \quad (17)$$

となる。

今、 4×4 の行列 P を

$$\begin{pmatrix} Ar \div Aa & 0 & \Delta t \times v_1 \div Aa & 0 \\ 0 & Br \div Ba & \Delta t \times v_2 \div Ba & 0 \\ 0 & 0 & Cr \div Ca & \Delta t \times v_3 \div Ca \\ 0 & 0 & 0 & (Dr + \Delta t \times v_{outD}) \div Da \end{pmatrix}$$

とし、さらに、 0 以上の任意の整数 m に対して

$$\begin{aligned} U_m &= (Aa \times A_m, Ba \times B_m, Ca \times C_m, Da \times D_m) \\ V_{inm} &= \Delta t \times (v_{inA} \times A_{exm}, v_{inB} \times B_{exm}, 0, 0) \\ V_{outm} &= \Delta t \times (0, 0, 0, v_{outD} \times D_m) \end{aligned}$$

とすると、(14), (15), (16), (17) は、

$$U_{m+1} = V_{inm} + U_m \times P - V_{outm} \quad (18)$$

とまとめて表現できる。

(1)と Ar, Br, Cr, Dr の定義より(18)の P の各行の和は 1 に等しいので、 Ar, Br, Cr が 0 以上の場合、 P はマルコフ連鎖理論の推移行列の性質を満たし、(18)は V_{inm} と V_{outm} の項がなければマルコフ連鎖の式と形式上同じとなる。実際には、(18)には V_{inm} と V_{outm} の項があり、 P の各行の和が 1 であるのは V_{inm} と V_{outm} の項があるためなので、 U_m の逐次的変化をマルコフ連鎖のそれと同じものとみなすことはできない。しかし、 V_{inm} と V_{outm} が時間 Δt の間の N 内 (系内) への流入分と N 外 (系外) への流出分として意味付けできること、 U_{m+1} の (流入・流出しない C に対応する) 第 3 成分を計算する際に $U_m \times P$ の第 3 成分に加える V_{inm} と V_{outm} の第 3 成分がともに 0 であることに注意したい。流入に対応する V_{inm} は A_{exm} と B_{exm} の値が経時変化しないため V_{in0} のままで一定であるが、流出に対応する V_{outm} は D_m の値に依存して変動する。また、マルコフ連鎖の理論の確率分布に対応する部分である U_m は、確率分布ではなく同位体分布、その中でも、全体量としての同位体分布である。

①の同位体分布を扱う場合は、どのような代謝ネットワークに対しても(18)と同じ式を導くことができ、マルコフ連鎖法のマルコフ連鎖の理論との対応関係が明らかである。②③の同位体分布を扱う場合も、全く同じ考え方で、任意の代謝ネットワークに対して(10), (11), (12), (13)と同様の関係式の導出ができると考えられる、すなわち、ある時点の同位体分布の推移としてその次の時点の同位体分布を生成する、マルコフ連鎖的な考え方、マルコフ連鎖法は可能であると考えられる。しかし、②③の同位体分布を扱う場合、それらの(10), (11), (12), (13)と同様の関係式のうち基質反応等の多基質反応が関わる関係式の右辺に同位体分布の積の項が現われることがある。この場合には、線形の関係式である(18)を導くことはできない。

3. 結果

3.1 微分方程式法とマルコフ連鎖法の比較

理論のセクションで述べた方法により、図1のモデル代謝ネットワークにおいて $A, B, C, D, A_{ex}, B_{ex}$ のそれぞれを構成する原子の数が 1 であるとしてシミュレーションを行った。シミュレーションにおいては A, B, C, D の初期状態 A_0, B_0, C_0, D_0 (最初の率としての同位体分布) がすべて 0 , A, B, C, D の存在量 Aa, Ba, Ca, Da がすべて 1 である N に $A_{ex} = 1, B_{ex} = 0$ の A と B を常時供給することと、代謝フラックスを $v_{inA} = 8, v_{inB} = 2, v_1 = 8, v_2 = 2, v_3 = 10, v_{outD} = 10$ として代謝定常状態が維持されていることを仮定した。

Δt を 0.01 から 0.01 刻みで 0.2 まで増加させたところ、すべての Δt 値に対して、微分方程式法とマルコフ連鎖法は同じシミュレーション結果であった。 A, B, C, D の率としての同位体分布は、 A は時点 $T_0 = 0$ のみ 0 , B は常に 0 であり、 C は時点 $T_1 = \Delta t$ まで 0 , D は時点 $T_2 = 2 \times \Delta t$ まで 0 にとどまった。 Δt が 0.20 の場合は、 C は一定の振幅で増減を繰り返すように、 D は振幅を増加させながら増減を繰り返すようになり、一定の値に収束しなかった。 Δt が 0.19 以下の場合、 A, B, C, D はそれぞれ一定の値 $1, 0, 0.8, 0.8$ に収束した。 Δt が 0.11 以上 0.19 以下の場合、 A, B, C, D がそれぞれ一定の値に収束する以前に値の減少または増減の繰り返しがみられた。 Δt が 0.10 以下の場合、 A, B, C, D はそれぞれ一度も減少することなく一定の値に収束した。このことから、 A, B, C, D の変化のパターンは Δt 値 0.10 を境に大きく変わると言える。 Δt 値 0.10 においては、マルコフ連鎖法で現れる Cr と Dr の値が 0 となる。このことから、同位体分布の経時変化シミュレーションを正しく行うためには、系内のすべての代謝産物 X に対して Xr 値が 0 以上になるような Δt 値を用いる必要があると考えられる。ただし、 Xr は、時点 T_m から時点 T_{m+1} に至る際に同位体分布 X_m のままでとどまる X の量の目安となる “ $\Delta t \times v$ (v は単位時間に X に入るフラックスの総量) を X の量 Xa から減じた値” とする。

3.2 マルコフ連鎖法の修正プログラムの検討

同位体分布の経時変化シミュレーションにおいては、精度の低下が許される範囲であれば、計算の高速化のために Δt 値を増加させることが行われてもよいが、前述したように、 Δt をある一定値 (具体的には Xr が 0 となる Δt 値) を超えて増加させることは精度と収束性の点から許されならしいことがわかった。そこで、ある Δt 値に対して Xr が 0 よりも小さくなった場合にはその Xr を 0 で置き換えてシミュレーションを行うよう、マルコフ連鎖法のプログラムを修正して、同位体分布の経時変化のパターンと収束値が変化するかどうかを調べた。

Xr が 0 よりも小さくなった場合にその Xr を 0 で置き換えることは、 X 量である Xa を増加させてシミュレーショ

ンを行うことと同等である。収束値は、理論的には(2), (3), (4), (5)の左辺を0とした連立方程式を満たす値として求まるので代謝産物量 X_r の変動の影響は受けないと予想した。修正プログラムでの計算では、調べた1以下の Δt 値のすべてに対して、同位体分布の収束値は同じであった。時間の経過とともに同位体分布はA, C, Dの順に0からの増加を開始し、以降、収束値まで単調増加した。 Δt 値が大きいほど、最初に0より大きい同位体分布が確認できるまでの時間が長くなった。マルコフ連鎖法の修正プログラムは、このような特徴に注意すれば、粗視的なシミュレーションに有効であると考えられる。また、今回のテーマである同位体分布の経時変化シミュレーションとは異なるが、修正プログラムによるシミュレーションで Δt 値を漸増していくとき、すべての X_r 値が0で置き換わる Δt 値に到達するまでの間は、同位体分布が収束値に達するのに必要な反復計算の回数が減少していくことが期待できる。

4. 考察

isotopomer の同位体分布の経時変化を計算するための微分方程式は、SchmidtらやWiechertらにより記載されてきた[10,12]。Stephanopoulosのグループは、同位体定常状態を少ない計算コストで計算するEMUの枠組みとEMUの同位体分布の経時変化のシミュレーション法を發表している[7,11]。KajihataらはEMUの同位体分布の経時変化のシミュレーション機能を持つソフトウェアOpenMebiusを發表している[13]。これらの同位体分布の経時変化シミュレーションはすべて、同位体分布に関する微分方程式を数値的に解く方法(微分方程式法)を想定している。本稿では、同位体分布の経時変化を同位体分布の推移と考えるとシミュレーションする“マルコフ連鎖法”を理論的に考えてきた。理論的な考察の結果、マルコフ連鎖法が微分方程式法(オイラー法)と数学的には同等であることが明らかになった。

マルコフ連鎖法で同位体分布をその前の時点の同位体分布の推移として理解する場合、代謝産物Xの同位体分布のX自身への推移を示す X_r の値が0以上であることが理論的に要請される。モデル代謝ネットワークの実験で Δt 値0.10を境に同位体分布の経時変化のパターンが大きく変わったことはマルコフ連鎖法のモデルからよく理解できる。また、マルコフ連鎖法のモデルから、0より小さな X_r 値を0で置き換えるという新たな近似計算strategyの可能性が見いだされた。

Wiechertらはpath tracingという、すべてのpathの合計として同位体定常状態を計算する方法に“マルコフ連鎖の推移行列に類似する行列influx probability matrix”が出現することを記載している[17]。この行列はdownstream oriented efflux probabilitiesではなくupstream oriented influx probabilitiesを成分とし、マルコフ連鎖を得るために使うべきdownstream oriented efflux probabilitiesを成分とする本稿

2.5の行列Pとは明らかに異なる。また、彼らは、同位体分布の推移によりその経時変化を計算するという考えを記載していない。

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] Wiechert, W.; Möllney, M.; Petersen S.; de Graaf, A. A. A universal framework for ^{13}C metabolic flux analysis. *Metab. Eng.* **2001**, *3*, 265–283.
- [6] Nöh, K.; Grönke, K.; Luo, B.; Takors, R.; Oldiges, M.; Wiechert, W. Metabolic flux analysis at ultra short time scale: Isotopically non-stationary ^{13}C labeling experiments. *J. Biotechnol.* **2007**, *129*, 249–267.
- [7] Young, J. D.; Walther, J. L.; Antoniewicz, M. R.; Yoo, H.; Stephanopoulos, G. An elementary metabolite unit (EMU) based method of isotopically nonstationary flux analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99*, 686–699.
- [8] Jazmin, L. J.; Young, J. D. Isotopically nonstationary ^{13}C metabolic flux analysis. *Methods in Molecular Biology* **2013**, *985*, 367–390.
- [9] Zupke, C.; Stephanopoulos, G. Modeling of isotope distributions and intracellular fluxes in metabolic networks using atom mapping matrices. *Biotechnol. Prog.* **1994**, *10*, 489–498.
- [10] Schmidt, K.; Carlsen, M.; Nielsen, J.; Villadsen, J. Modeling isotopomer distributions in biochemical networks using isotopomer mapping matrices. *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *55*, 831–840.
- [11] Antoniewicz, M.R.; Kelleher, J.K.; Stephanopoulos, G. Elementary metabolite units (EMU): A novel framework for modeling isotopic distributions. *Metab. Eng.* **2007**, *9*, 68–86.
- [12] Wiechert, W.; Wurzel, M. Metabolic isotopomer labeling systems Part I: global dynamic behavior. *Math. Biosci.* **2001**, *169*, 173–205.
- [13] Kajihata, S.; Furusawa, C.; Matsuda, F.; Shimizu, H. OpenMebius: An open source software for isotopically nonstationary ^{13}C -based metabolic flux analysis. *BioMed Res. Int.* **2014**, 627014.
- [14] 矢島 宙岳, 平沢 敬 大腸菌によるメタノール資化に向けたBacillus属細菌由来メタノール資化代謝経路の実装. 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 3P-1338.
- [15] 太田 潤 Isotopomer tracing: 与えられた代謝ネットワークにより原料 isotopomer から生成し得る isotopomer の列挙. 研究報告バイオ情報学(BIO), **2018**, 2018-BIO-54(48),1-6.
- [16] 太田 潤 EMU tracing: 与えられた代謝ネットワークにより原料 elementary metabolite unit (EMU) から生成し得る代謝産物 EMU の列挙. 研究報告バイオ情報学(BIO), **2018**, 2018-BIO-55(6),1-7.
- [17] Wiechert, W.; Nöh, K.; Weizel, M. Metabolic isotopomer labeling systems Part III: Path tracing. *Math. Biosci.* **2013**, *244*, 1–12.