

代謝ネットワークにおける isotopomer 分布シミュレーションの収束性

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、様々なフラックス条件下で同位体標識化合物を代謝させた場合の代謝ネットワーク内同位体分布をシミュレーションし、実測値と一致するシミュレーション値を与えるフラックスを実際のフラックスとする。すべての種類の同位体分布値が isotopomer 分布から計算可能であるので、isotopomer 分布のシミュレーションには一定の意義がある。同位体定常状態に達した後の isotopomer 分布（定常 isotopomer 分布）は、isotopomer 分布の変化速度が isotopomer 分布の関数に等しいとする微分方程式における isotopomer 分布の収束値、すなわち、isotopomer 分布の変化速度がゼロに等しくなる isotopomer 分布である。定常 isotopomer 分布は、解析的な方法により決定できる。一方、定常 isotopomer 分布決定のための他のアプローチである反復計算法に関しては、exchange flux の存在が反復計算時の isotopomer 分布の収束性の問題を引き起こすことが指摘されている。exchange flux は正・逆両反応の共存と密接に関わる。本研究では、定常 isotopomer 分布決定のための、反復計算による上記微分方程式の数値解法を、正・逆両反応が共存する糖質代謝モデルネットワークにおいて試みた。通常のエイラー法は、様々なフラックス条件において isotopomer 分布の収束性の問題を引き起こしたが、これらの問題は、エイラー法の各ステップに isotopomer 分布標準化（誤差補正）の段階を挿入することで回避できた。この isotopomer 分布標準化の段階を含むエイラー法の変法は、isotopomer 分布シミュレーション成功のための有力な手段であると考えられる。

キーワード：代謝ネットワーク、代謝フラックス解析、isotopomer 分布

Convergence of isotopomer distribution simulation in metabolic networks

JUN OHTA^{†1,a)}

1. はじめに

1.1 代謝と同位体

1930 年代に Rudolf Schoenheimer により生化学研究に同位体トレーサーが導入され、一見、変化していないかのように思われる体タンパク質が、実はダイナミックに入れ替わっていることが明らかになった。同位体で標識した化合物を用いる様々な生化学研究が行われている。同位体で標識した化合物を基質として酵素反応を行うことにより、基質から生成物への原子の移動を確認する研究はその一例である。このような研究で得られる、酵素反応における原子の移動に関する情報を基礎として、代謝ネットワークの原子レベルのトポロジカルな性質の解析が可能となる。すなわち、同位体の利用は、代謝の定性的側面の理解に貢献する。他方、同位体で標識した化合物を生体・細胞に与えた後の同位体分布のデータに、代謝経路の分岐部の代謝流の分配割合が反映されることは容易に予想される。代謝工学分野の ^{13}C 代謝フラックス解析では、同位体分布のデータから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）ことが行われる[1-4]。すなわち、同位体の利用は、代謝の定量的側面の解明に貢献する。

1.2 ^{13}C 代謝フラックス解析における同位体分布シミュレーション

^{13}C 代謝フラックス解析では、 ^{13}C 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（ ^{13}C 標識割合）の測定値から、代謝フラックス分布を決定する。代謝フラックス分布を同位体分布の測定値から直接導き出すことは一般に難しい。そのため、代謝フラックス分布の決定のために、細胞の代謝ネットワーク内の同位体分布を、様々な人工的フラックス条件下でシミュレーションし、同位体分布の測定値と比較することが行われる。多くの場合、この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。代謝定常状態にある細胞を ^{13}C で標識した炭素源を含む培地で培養すると、同位体分布は経時的に変化し、十分な時間が経過した後に同位体分布値が変化しない同位体定常状態（isotopic steady state）に達する。 ^{13}C 代謝フラックス解析が開発された当初は、同位体定常状態に達した後の同位体分布が測定されていたので、同位体定常状態の同位体分布値のシミュレーションの研究が主に行われていた。近年は、同位体定常状態に達する前の測定値から代謝フラックス分布を決定することが試みられるようになり、同位体定常状態の同位体分布に加えて同位体分布の経時変化をシミュレーションすることが行われるようになっていく[5-8]。

^{†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

1.3 同位体分布の種類

同位体分布は、一般に、次の3種類の“割合(率)”の何れかで示される[9-11].

- ①分子内の各原子位置の同位体標識割合[9]
 - ②各代謝産物に占める特定の isotopomer の存在割合 (isotopomer 分布) [10]
 - ③各 EMU に占める特定の質量の EMU の存在割合[11]
- ①, ②, ③は何れも割合であるから0から1の間の値をとる. (②の) isotopomer は分子内の原子が同種原子の異なる同位体体置き換わることにより生じる異性体のことである. (③の) EMU は elementary metabolite unit の略である. EMU は代謝産物分子の構造単位であり, 代謝産物分子の任意の部分 EMU となり得る. 分子全体に対応する EMU に占める特定の質量の EMU の存在割合 (③の一種) は, 質量分析計により比較的容易に測定できる. isotopomer 分布値 (②の同位体分布値) の代謝産物当たりの合計は1である. ③の同位体分布値の EMU 当たりの合計も1である. 原理的に, ①と③の同位体分布は両方とも②の同位体分布 (isotopomer 分布) から求めることができる一方, ①あるいは③の同位体分布から②の同位体分布 (isotopomer 分布) を求めることはできない.

1.4 Isotopomer 分布シミュレーション

時間の関数としての同位体分布が満たすべき条件は, 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 (同位体分布収支微分方程式) として表現できる [7,8,10,12,13]. 同位体定常状態の同位体分布は, これらの同位体収支微分方程式の収束値であると同時に, 同微分方程式において同位体分布の変化速度の項をゼロとして得られる方程式 (同位体分布収支方程式) の解でもある. ここで, “同位体分布収支” という言葉を使っているのは, ①, ②, ③の何れかを特定することなく同位体分布の収支を表現するためである. 同位体分布収支微分方程式および同位体分布収支方程式の立式には, 一般に mapping matrix approach と transition matrix approach の2種類のアプローチがあり得る. この2種類のアプローチについて Wiechert らは, ①の同位体分布に関する場合と同様に②の同位体分布 (isotopomer 分布) に関しても同じく2種類のアプローチがあることと2種類のアプローチが数学的に同等であることを述べている [14]. 彼らは, ②の同位体分布 (isotopomer 分布) に関する同位体分布収支微分方程式および同位体分布収支方程式は非線形であるので, ②の同位体分布 (isotopomer 分布) のシミュレーションには過去に modified Euler algorithm [15], modified Jacobi iteration scheme [10], Newton formula [16] 等の反復計算法が使われてきたこと, どの反復計算法においても大きな exchange flux が存在すると大きな不安定性 (severe instability) あるいは収束性の問題 (convergence problems) が生じる [17] ことを述べている [14]. Schmidt らは, ②の同位体分布 (isotopomer 分布) に

関する mapping matrix approach を初めて報告した [10]. Schmidt らは彼らの isotopomer mapping matrix を用いる mapping matrix approach において, highly reversible reaction (Wiechert らの exchange flux と同じもの) が存在するとシステムが stiff に (硬く) なるので標準の Simulink™ equation solver で効率的に解くことができないという問題が生じることを記載している [10]. Schmidt らは, 反復計算の各ステップで isotopomer 分布値を各代謝産物の isotopomer 分布値の合計が1になるように補正 (scaling) することがこの問題を克服するために役立つことにも触れている [10]. しかし, 詳細については言及しておらず, 問題が克服されたという結論には至っていないと考えられる. Wiechert らは, これらの不安定性・収束性の問題, 硬さ (stiffness) の問題を避けて, 反復計算を行うことなく解析的に, 同位体定常状態の isotopomer 分布 (定常 isotopomer 分布) を求める方法を開発した [5,12,14]. EMU の枠組みを使って, 上記の isotopomer 分布のシミュレーションでみられる問題を避けて, isotopomer 分布ではなく③の同位体分布の定常分布と経時変化をシミュレーションする方法も開発された [7,8,11]. しかし, 最も原始的な反復計算による同位体分布微分方程式の数値解法による isotopomer 分布シミュレーションのその後の検討は必ずしも十分でない.

1.5 本研究の目的

私は, 与えられた代謝ネットワークで代謝産物 A を原料として代謝産物 B の全体が生成し得るかどうかを判定する方法を開発している [18,19]. この判定のためのひとつの strategy として, 与えられた代謝ネットワークで, すべての原子を同位体標識した A からすべての原子が同位体標識された B が生成し得るかどうかを isotopomer 分布のシミュレーションにより調べることを考え, 糖質代謝モデルネットワークで isotopomer mapping matrix を用いる mapping matrix approach の立式でのオイラー法によるシミュレーションを試みた. 最初のシミュレーションは, 収束性の問題のため不成功であったが, 反復計算の各ステップに自ら思いついた isotopomer 分布標準化 (誤差補正) の段階を挿入すると収束性の問題を回避できた. 後に, この標準化の手法が Schmidt らにより言及された上記の補正法と同じものであること, 一般に exchange flux が大きいと収束性の問題が起こるとされていることを知った. しかし, isotopomer mapping matrix を用いる mapping matrix approach の立式で得られる微分方程式が極めて基本的な方程式であるにもかかわらず, その数値解法における exchange flux と収束性の問題の関係についての情報は多くない. また, 私が用いたモデル糖質ネットワークは正・両反応の共存から exchange flux を生じる可逆反応を多数含むものであった. これらのことから, 本研究では, isotopomer mapping matrix を用いる mapping matrix approach における exchange flux と収束性の問題の関係を再検討した.

2. 理論

モデル小代謝ネットワークを用いて isotopomer 分布についての同位体分布収支微分方程式 (isotopomer 分布収支微分方程式) の立式および本研究で用いたその微分方程式の反復計算による数値解法 (通常のアイラー法と isotopomer 分布標準化オイラー法) を説明する。

2.1 モデル小代謝ネットワーク

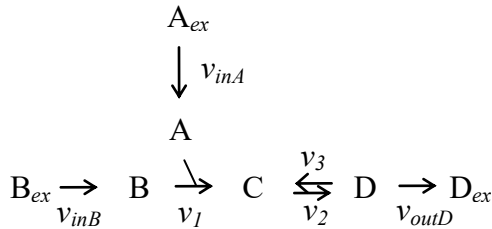
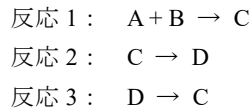


図 1 モデル小代謝ネットワーク

図 1 のモデル小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。

A_{ex} と B_{ex} で表される N 外 (系外) の A と B は N 内 (系内) に流入してそれぞれ N 内の A と B に加わる。N 内 (系内) 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 isotopomer 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 3 は反応 2 の逆反応である。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,

$$\begin{array}{l}
 v_{inA} = v_1 \\
 v_{inB} = v_1 \\
 v_1 + v_3 = v_2 \\
 v_2 = v_3 + v_{outD}
 \end{array} \quad (1)$$

が成り立つ。

2.2 代謝産物の isotopomer 分布と isotopomer mapping matrix

本稿における, ある代謝産物の isotopomer 分布はその代謝産物に占める各 isotopomer の存在割合を表す列ベクトルであり, その代謝産物の isotopomer の種類の数と同じ数の成分を持つ。Isotopomer には isotopomer 番号を付す[18]。ある代謝産物の isotopomer 分布の n 番目の成分は, その代謝産物の isotopomer 番号 n の isotopomer の存在量をその代謝産物の全体量で割った値に等しい。

また, 本稿では isotopomer mapping matrix [10]を M に下付の文字列を付して表現する。すなわち, 反応 i の左辺に代謝産物 X, 右辺に代謝産物 Y があり反応 i により X の少なくとも一部が Y の一部に変換されるとき定義される, 反応 i を介する X の isotopomer と Y の isotopomer の関係を記述する isotopomer mapping matrix を $M_{i,X>Y}$ と表す。

2.3 Isotopomer 分布収支微分方程式

A の isotopomer 分布の変化速度に A の量 Aa を掛けて得られる $Aa \times dA/dt$ は A の各 isotopomer 量の変化速度からなるベクトルである。これは, (A_{ex} から N 内 (系内) への A の流入に伴う) A の増加速度 $v_{inA} \times A_{ex}$ から (反応 1 による A の C への代謝に伴う) A の減少速度 $v_1 \times A$ を差し引いたものに等しいから,

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

を得る。同様に B の isotopomer 分布の変化速度について

$$Ba \times dB/dt = v_{inB} \times B_{ex} - v_1 \times B \quad (3)$$

を得る。C の isotopomer 分布の変化速度に C の量 Ca を掛けて得られる $Ca \times dC/dt$ は C の各 isotopomer 量の変化速度からなるベクトルである。これは, C の増加速度から (反応 2 による C の D への代謝に伴う) C の減少速度 $v_2 \times C$ を差し引いたものに等しい。C の増加速度は反応 1 による C の増加速度 $v_1 \times (M_{1,A>C} \times A) \boxtimes (M_{1,B>C} \times B)$ と反応 3 による C の増加速度 $v_3 \times M_{3,D>C} \times D$ の和である。ただし, \boxtimes は成分数が同じ 2 つの列ベクトルの同じ番号の成分同士を掛ける操作を示す。これらのことから,

$$\begin{aligned}
 Ca \times dC/dt = & v_1 \times (M_{1,A>C} \times A) \boxtimes (M_{1,B>C} \times B) \\
 & + v_3 \times M_{3,D>C} \times D - v_2 \times C
 \end{aligned} \quad (4)$$

を得る。D の isotopomer 分布の変化速度に D の量 Da を掛けて得られる $Da \times dD/dt$ は D の各 isotopomer 量の変化速度からなるベクトルである。これは, (反応 2 による C の D への代謝に伴う) D の増加速度 $v_2 \times M_{2,C>D} \times C$ から D の減少速度を差し引いたものに等しい。D の減少速度は反応 3 による D の減少速度 $v_3 \times D$ と (N 外 (系外) の D_{ex} への D

の流出に伴う) D の減少速度 $v_{outD} \times D$ の和である。これらのことから、

$$Da \times dD/dt = v_2 \times M_{2,C>D} \times C - v_3 \times D - v_{outD} \times D \quad (5)$$

を得る。

2.4 Isotopomer 分布収支微分方程式の数値解法

まず、通常のオイラー法による数値解法を説明する。その後、オイラー法の反復計算の各ステップに isotopomer 分布標準化 (誤差補正) の段階を挿入した isotopomer 分布標準化オイラー法による数値解法を説明する。isotopomer 分布標準化オイラー法は、isotopomer 分布収支微分方程式にのみ適用可能である。

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、時点 T_m での代謝産物 X の isotopomer 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 $(v_{inA} \times A_{ex} - v_l \times A) \div Aa$ で近似できるので T_{m+1} の時点 ($T_m + \Delta t$ の時点) の A の isotopomer 分布 A_{m+1} は

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

と近似計算できる。

同様に(3), (4), (5)の両辺をそれぞれ Ba, Ca, Da で割った式を用いると時点 T_m での B, C, D の増加速度の近似式が得られ、 T_{m+1} の時点 ($T_m + \Delta t$ の時点) の B, C, D の isotopomer 分布 $B_{m+1}, C_{m+1}, D_{m+1}$ は

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

$$C_{m+1} \doteq C_m + \Delta t \times (v_l \times (M_{1,A>C} \times A) \boxtimes (M_{1,B>C} \times B) + v_3 \times M_{3,D>C} \times D - v_2 \times C) \div Ca \quad (8)$$

$$D_{m+1} \doteq D_m + \Delta t \times (v_2 \times M_{2,C>D} \times C - v_3 \times D - v_{outD} \times D) \div Da \quad (9)$$

と近似計算できる。

流入する A_{ex}, B_{ex} の isotopomer 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(6), (7), (8), (9) 4 式の計算を反復すると、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、通常のオイラー法による数値解法である。

Isotopomer 分布標準化オイラー法においては(6), (7), (8), (9)で A_m, B_m, C_m, D_m から得られる $A_{m+1}, B_{m+1}, C_{m+1}, D_{m+1}$ をそのまま次のステップの A_m, B_m, C_m, D_m とはしない。 A_{m+1} の成分の合計を $\text{sum}(A_{m+1})$, 同様に $B_{m+1}, C_{m+1}, D_{m+1}$ の成分の合計をそれぞれ $\text{sum}(B_{m+1}), \text{sum}(C_{m+1}), \text{sum}(D_{m+1})$ と表すとき

$$A_{m+1} = A_{m+1} \div \text{sum}(A_{m+1})$$

$$B_{m+1} = B_{m+1} \div \text{sum}(B_{m+1})$$

$$C_{m+1} = C_{m+1} \div \text{sum}(C_{m+1})$$

$$D_{m+1} = D_{m+1} \div \text{sum}(D_{m+1})$$

による標準化 (誤差補正) で得られる $A_{m+1}, B_{m+1}, C_{m+1}, D_{m+1}$ を次のステップの A_m, B_m, C_m, D_m とする。

もしも計算誤差がなければ、(6), (7), (8), (9)で正規の A_m, B_m, C_m, D_m から得られる $A_{m+1}, B_{m+1}, C_{m+1}, D_{m+1}$ に対する $\text{sum}(A_{m+1}), \text{sum}(B_{m+1}), \text{sum}(C_{m+1}), \text{sum}(D_{m+1})$ は、数学的にすべて 1 となるべきものであり、isotopomer 分布標準化オイラー法と通常のオイラー法の結果は一致する筈である。しかし、isotopomer 分布標準化オイラー法と通常のオイラー法の結果が一致しない場合があることが以下に示される。

3. 計算実験とその結果

3.1 計算実験の概略

糖質代謝モデルネットワークにおいて、代謝産物の系の出入りに関してグルコースの系内への流入と乳酸の系外への流出のみを許すような代謝定常状態を仮定して isotopomer 分布収支微分方程式を立式し、系に $C1$ 位を ^{13}C で 100% 標識したグルコースを流入した際の各代謝産物の isotopomer 分布を通常のオイラー法と isotopomer 分布標準化オイラー法によりシミュレーションした。代謝定常状態を与える種々のフラックス条件下でシミュレーションを行うことを通じて、isotopomer 分布の収束性に影響を与える因子を調べた。行ったすべてのシミュレーションで系内のすべての代謝産物量が 1 であることを仮定した。計算は Matlab 上で行った。

3.2 糖質代謝モデルネットワーク

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、糖新生の反応からなるものを用いた[20]。モデルネットワークは 46 の代謝産物 (グルコースの代謝産物が 32, currency metabolite が 14) と 35 のプロセス (反応または膜輸送) を含み、35 プロセスのうち 23 プロセスは可逆であるとした。ここでは、あるプロセスにそれに対する逆プロセスがある場合、正プロセスと逆プロセスを合わせて 1 つのプロセスと数えている。糖質代謝モデルネットワーク内の各代謝産物・各プロセスには代謝産物番号・プロセス番号を付した。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 IUPAC 命名法に従い代謝産物内炭素番号を付した。モデルネットワーク内には、代謝産物内炭素番号を付した 140 種類の炭素原子が存在した。コハク酸とフマル酸の対称性のためトポロジカルに区別できる炭素原子は 136 種類であった。糖質代謝モデルネットワーク内に、コハク酸とフマル酸の対称性による重複を考慮しなかった場合 1030 種類、考慮した場合 1018 種類の isotopomer が存

在した。糖質代謝モデルネットワーク内のこれらの isotopomer のつながりの情報を isotopomer connectivity matrix [18]として表現した後に、isotopomer mapping matrix の形式に変換して利用した。

3.3 代謝定常状態を与えるフラックス分布の生成

上述の代謝定常状態を与えるようなフラックス分布を系統的に生成するために、糖質代謝モデルネットワークの、代謝産物の系の出入りに関してグルコースの系内への流入と乳酸の系外への流出のみを許すような stoichiometric matrix を生成し、これから FluxModeCalculator [21] を用いて elementary flux mode (EFM) を計算した。糖質代謝モデルネットワークの正・逆を区別したすべてのプロセス（反応、膜輸送、系の出入り）計 60 に対して 0 から 2 の間の整数値のフラックスが割り当てられた計 27 の EFM (EFM1 から EFM27 と名付ける) が算出された。系の境界における代謝産物の移動を伴う EFM は 1 当量のグルコースを消費して 2 当量の乳酸を産生する（解糖系に相当する）1 つの EFM (EFM4) のみであった。EFM4 以外の EFM でプロセスに整数値 2 のフラックスが割り当てられているものはなかった。3 つ以上のプロセスが関与する EFM が EFM4 以外にもう 1 つあり、それ (EFM25) はピルビン酸から出発してミトコンドリア内と細胞質内のリンゴ酸を経てピルビン酸に戻る回路を形成しているフラックスであった。それら 2 つ (EFM4 と EFM25) 以外の 25 の EFM は、すべて exchange flux であった。25 の EFM のうち 23 は可逆反応によるもので、残りの 2 つ (EFM1 と EFM3) は解糖系と糖新生の酵素が同時に働くことによる相互変換であった。本稿のシミュレーションでは、EFM4 にそれ以外の EFM を正の整数倍して加えて生成したフラックス分布を、代謝定常状態を与えるフラックス分布として用いた。

Exchange flux である EFM で exchange される 2 代謝産物のうちの少なくとも一方が EFM4 上の代謝産物であるような EFM は、下記の計 14 の EFM であった。

EFM1	Glucose ↔ Glucose 6-P
EFM2	Glucose 6-P ↔ Fructose 6-P
EFM3	Fructose 6-P ↔ Fructose 1,6-P ₂
EFM5	Dihydroxyacetone P ↔ Glyceraldehyde 3-P
EFM6	Glyceraldehyde 3-P ↔ 1,3-Bisphosphoglycerate
EFM7	1,3-Bisphosphoglycerate ↔ 3-Phosphoglycerate
EFM8	3-Phosphoglycerate ↔ 2-Phosphoglycerate
EFM9	2-Phosphoglycerate ↔ Phosphoenolpyruvate
EFM10	Pyruvate ↔ Lactate
EFM18	Glucose 6-P ↔ Gluconolactone 6-P
EFM21	Ribose 5-P + Xylulose 5-P ↔ Sedoheptulose 7-P + Glyceraldehyde 3-P
EFM22	Sedoheptulose 7-P + Glyceraldehyde 3-P ↔ Erythrose 4-P + Fructose 6-P

EFM26	Erythrose 4-P + Xylulose 5-P ↔ Fructose 6-P + Glyceraldehyde 3-P
EFM27	Fructose 1,6-P ₂ ↔ Dihydroxyacetone P + Glyceraldehyde 3-P

上記の EFM 式にはグルコースの代謝産物のみ (currency metabolite 以外) を記した。EFM1, EFM3 以外は、可逆反応である。上記の EFM で両辺が何れも単一の代謝産物の 1 当量である EFM1 から 3, 5 から 10, 18 の計 10 の EFM を exchange flux group 1 と呼ぶ。両辺の何れかが複数代謝産物である EFM21, 22, 26, 27 の計 4 の EFM を exchange flux group 2 と呼ぶ。Exchange flux に対応する計 25 の EFM のうち exchange flux group 1, 2 のどちらにも含まれない 11 の EFM (EFM11 から 17, 19, 20, 23, 24) はすべて EFM4 上の代謝産物の変換に直接の関係がないものであった。

3.4 糖質代謝モデルネットワークにおける isotopomer 分布シミュレーション

C1 位を ¹³C で 100% 標識したグルコースが系に流入したときの各代謝産物の isotopomer 分布を“理論”で述べた方法でシミュレーションした。EFM4 以外の EFM の正の整数倍を EFM4 に加えたものをフラックス分布として用いた。

EFM4 に残りの 26 の EFM すべてを加えたフラックス分布を用いて Δt が 0.01 の条件下でシミュレーションを行ったところ、isotopomer 分布は、通常のオイラー法では収束しなかったが、isotopomer 分布標準化オイラー法では問題なく収束した。このときの収束性の判定は、全 32 代謝産物の isotopomer 分布 (全 1030 種類の isotopomer の存在比) の経時変化を視覚的に確認することにより行ったが、予備的な検討で、収束性を、全 32 代謝産物の isotopomer 分布の合計が一定に保たれるかどうかで判定できることがわかった。以降のシミュレーションでは、全 32 代謝産物の isotopomer 分布の合計の経時変化を記録し、その最大値と最小値を求め、最小値 ÷ 最大値の値が 1 に一致する場合には収束する、一致しない場合は収束しないと判定した。

Exchange flux の存在と収束性のかかわりを知る目的で、上記の EFM1 から 3, 5 から 10 (exchange flux group 1), EFM18, 21, 22, 26, 27 (exchange flux group 2) のうちの 1 つの 1 倍から 200 倍を EFM4 に加えたフラックス分布すべてにおいて経過時間が 100 になるまでシミュレーションを行った。シミュレーションは Δt 値の 2 つの値 (0.01 と 0.005) からの選択と 2 種類の反復計算アルゴリズム (通常のオイラー法と isotopomer 分布標準化オイラー法) からの選択の組み合わせによりできる 4 条件すべてで行った。EFM4 に或る EFM の k 倍を加えたフラックス分布では収束性するが k+1 倍を加えたフラックス分布では収束しない場合に k をその EFM の収束最大値 (MVC) と呼ぶこととし、各 EFM の収束性への影響の指標として用いた。

通常のオイラー法で Δt が 0.01 の場合の MVC は exchange

flux group 1 では98 または 99 であったが exchange flux group 2 では1 以下であった. Δt を 0.005 と半分にすると exchange flux group 1 では MVC が 198 または 199 まで増加して収束性が改善したが exchange flux group 2 では MVC が 1 以下のままで収束性の改善がみられなかった.

Isotopomer 分布標準化オイラー法で Δt が 0.01 の場合の MVC は exchange flux group 1 では 98 または 99 と通常のオイラー法と同じ値であったが, exchange flux group 2 では 99 (exchange flux group 1 と同程度) と通常のオイラー法の場合の 1 以下より非常に大きな値であった. Δt を 0.005 と半分小さくすると exchange flux group 1 では MVC が 198 または 199 まで増加し, 通常のオイラー法の場合と MVC 増加 (収束性の改善) と増加後の MVC 値の両方において一致したが, isotopomer 分布標準化オイラー法の exchange flux group 2 では Δt を 0.005 と半分小さくすると MVC が 199 まで増加 (収束性が改善) し, 通常のオイラー法の exchange flux group 2 の結果 (Δt を半分小さくしても MVC が増加せず, 収束性が改善しなかった) と異なっていた.

Exchange flux group 1 と 2 と同様の検討を EFM25 に行うと, EFM25 の MVC は通常のオイラー法での値が 4 であった以外は exchange flux group 2 と全く同じ挙動を示した.

4. 考察

Exchange flux の存在が isotopomer 分布の収束性の問題を引き起こすことが指摘されてきたが, 引き起こされる問題の性質が exchange flux のタイプにより異なることが本研究で示された. すなわち exchange flux group 1 よりも exchange flux group 2 の方が収束性の問題を引き起こしやすい. これは, 反応式の少なくとも片方の辺に複数の代謝産物がある exchange flux group 2 のシミュレーションにおいては, 方程式の非線形性のため必要となる掛け算により計算誤差が生じるからであると考えられる. 本研究の結果から, 通常のオイラー法における exchange flux group 1 のタイプの exchange flux の存在による収束性の問題は Δt を小さくすることにより解決し, 同法における exchange flux group 2 のタイプの exchange flux の存在による収束性の問題は isotopomer 分布標準化オイラー法を使用し Δt を小さくすることにより解決することが推測される. Isotopomer 分布標準化オイラー法が収束性の問題の低減のために有効であることは明らかであるが, 今後, exchange flux と収束性の問題の関係に関する報告をより精査することが必要である.

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.
- [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.
- [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.
- [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.
- [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] Wiechert, W.; Möllney, M.; Isermann, N.; Wurzel, M.; de Graaf, A.A. Bidirectional reaction steps in metabolic networks: III. Explicit solution and analysis of isotopomer labeling systems. *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *66*, 69–85.
- [15] Wiechert, W. *Metabolische Kohlenstoff-Markierungssysteme-Modellierung, Simulation, Analyse, Datenauswertung*. Doctoral thesis, University of Bonn. **1996**.
- [16] Wiechert, W.; Möllney, M.; Wurzel, M. Modelling, analysis and simulation of metabolic isotopomer labeling systems. *15th IMACS World Congress, Berlin 1997*. Vissenshaft & Technik Verlag: Berlin.
- [17] Wurzel, M. *Stabilität und eindeutige Lösbarkeit von Isotopomerer-Bilanzgleichungssystemen*. Doctoral thesis, University of Bonn. **1997**.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] Ohta, J. Single-atom tracing in a model network of carbohydrate metabolism and pathway selection. *IPSJ Transactions on Bioinformatics* **2018**, *11*, 1-13.
- [21] van Klinken, J.B.; Willems van Dijk, K. FluxModeCalculator: an efficient tool for large-scale flux mode computation. *Bioinformatics* **2016**, *32*, 1265-6.

正誤表

“代謝ネットワークにおける isotopomer 分布シミュレーションの収束性” (太田潤)

3 ページ 2.2 の項のタイトル

(正) **isotopomer mapping matrix**

(誤) **isotopoemr mapping matrnx**

3 ページ 2.2 の項の本文の 13 行目

(正) isotopomer mapping matrix

(誤) isotopoemr mapping matrnx

4 ページ “2.4 Isotopomer 分布収支微分方程式の数値解法”
の項の本文の 11 行目

(正) $(v_{inA} \times A_{exm} - v_l \times A_m) \div Aa$

(誤) $(v_{inA} \times A_{ex} - v_l \times A) \div Aa$

4 ページ (6)式

(正)

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

(誤)

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

4 ページ (7)式

(正)

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

(誤)

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

4 ページ (8)式

(正)

$$C_{m+1} \doteq C_m + \Delta t \times (v_l \times (M_{1,A>C} \times A_m) \boxtimes (M_{1,B>C} \times B_m) \\ + v_3 \times M_{3,D>C} \times D_m - v_2 \times C_m) \div Ca \quad (8)$$

(誤)

$$C_{m+1} \doteq C_m + \Delta t \times (v_l \times (M_{1,A>C} \times A) \boxtimes (M_{1,B>C} \times B) \\ + v_3 \times M_{3,D>C} \times D - v_2 \times C) \div Ca \quad (8)$$

4 ページ (9)式

(正)

$$D_{m+1} \doteq D_m + \Delta t \times (v_2 \times M_{2,C>D} \times C_m - v_3 \times D_m \\ - v_{outD} \times D_m) \div Da \quad (9)$$

(誤)

$$D_{m+1} \doteq D_m + \Delta t \times (v_2 \times M_{2,C>D} \times C - v_3 \times D - v_{outD} \times D) \div Da \quad (9)$$