

代謝流量の線形解析

有田 正規

生命情報科学研究センター, 科学技術振興事業団 さきがけ

概要

最近盛んに行われている代謝流量の解析における、代表的な3手法を紹介する。これらの解析法は統一して捉えることができ、その見方を分析するとともに、今後どのような解析が必要かを述べる。特に水門モデルと呼ばれる、実験系生物学者の直感に近いモデルを紹介する。

Linear Analysis of Metabolic Flux

Abstract

This brief report introduces major three approaches in metabolic flux analysis, which is of increasing interest in the post-genome age. These approaches are formulated in the same framework, and their (dis)advantages are discussed. This report also introduces 'watergate' model, which takes the amount of metabolites into consideration. The assumptions of this model is straightforward and intuitive especially to experimental biologists.

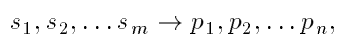
1 背景

酵素反応の定量的モデリングには長い歴史がある [7, 9]。しかし現在の技術を持ってしても、細胞内の全酵素について生化学的パラメータを測定するのは困難である。このため、代謝流量を定性的にモデルする手法が提案されている。それらの手法が利用するデータは、化学量論式と反応の(不)可逆性である。簡単に言えば、化学反応における質量保存則と反応の方向性だけから代謝をモデルすることになる。

3つの代表的手法が提唱されているが、利用する制約が同じである以上、基本的アイデアは共通になる。ここで取り扱う問題は以下ようになる。

- 入力：酵素反応式の集合と、入出力となる代謝物質の集合(物質の構造や、酵素の反応パラメータを用いる場合もある。)
- 出力：各酵素反応式をつなげてできる、代謝パスウェイとその流量

代謝物質のうち、外部物質とは、系の入出力物質、内部物質とは系の内部にあり、その消費と生成がバランスした物質である。可逆な反応は二つの不可逆反応に分けて考える。各反応は、



の形をとる。ここで s_i は消費される物質、 p_i は生成される物質である。

ここで紹介するのは、(1)Mavrovouniotis による定性的パス生成 (Qualitative Pathway Synthesis; QPS) [5], (2)Schuster らによる既約流態 (Elementary Flux Mode; EFM)[8], (3)Palsson らによる流量バランス解析 (Flux Balance Analysis; FBA)[1] である。

1.1 定性的パス生成

Mavrovouniotis [5] は LISP 表現した酵素反応式を足し引きして内部物質を順次消去することで、外部物質のペアを結ぶ全経路を生成するアルゴリズムを提唱した。全経路を生成するために、各内部物質を消去する際、全ての消去パターンを試して結果を保持している。内部物質を介した経路を単純に全てつなげて保持すると組み合わせが大きくなりすぎるため、Gibbs の自由エネルギー等を考慮し、生物学的に意味のある経路だけを生成する工夫も施している。Mavrovouniotis はこの手法でアミノ酸リシンの合成経路を求め、代謝流量の解析に役立てている。

1.2 既約流態

Schuster ら [8] は行列の形で酵素反応式の集合を記述し、ガウスの消去法で外部物質のペアを結ぶ経路を生成している。Gibbs の自由エネルギーは考慮していない。Schuster らは結果として得られ

るあらゆる経路の集合をベクトルとみなしたときの、基底となる経路集合の生成を目標としている。実際、解糖系とペントースリン酸系の基底となる経路集合を求めているが、文献 [8] に見られるアルゴリズムではこの目標は達せられていない。

1.3 流量バランス解析

以上の二つを含むような、より大きな枠組みが流量バランス解析である。ここでは、反応における質量保存則を以下の形で記述する。

$$S^T \cdot v = 0,$$

S は反応式における係数を並べた行列で、各行が反応式、列が物質に対応する。 v は各反応式の流量を示す実数のベクトルである。これを満たす v は無数にあるが、ここで以下の制約を満たす最適な v を線形計画法で求めている。

条件 $S^T \cdot v = 0$ のもとで $\sum c_i v_i$ を最小化。

ここでベクトル c は生物が最適な成長をするためのベクトルで、外部から与えられる。また、各反応の流量には限界値を定めてある。

$$\alpha_i \leq v_i \leq \beta_i$$

この解空間を特定の 2 軸で切断したものを phenotype phase plane と呼ぶ。流量バランス解析は、ベクトル c というオラクルを用いて流量を計算しているため、計算結果の確らしさは c に依存する。

1.4 考察

いずれの解析も、定常状態における内部物質の流量保存（電子回路におけるキルヒホッフ則）を中心に経路を決定する。こうして求まる流量は代謝物の量とは独立なため、古くから微分方程式系で扱われてきた化学平衡のモデルを考慮していないことになる。代謝流量をより正確にモデルするには、更なる情報が必要になる。

参考：流量の基底

代謝経路をグラフとして捉えられる場合、流量保存則にもとづく解析は簡単におこなえる。簡単のためグラフが 2 連結であると仮定し、以下の定理を使う。

Theorem 1 (Hubicka and Syslo [4]) グラフの辺 e を含む最短サイクル C は、グラフ中のサイクルが張る空間の基底集合に含まれる。逆に、どの基底集合も e を含む最短サイクルを含む。

この定理より、グラフのサイクルがなす基底集合は、各辺を通るように最短経路アルゴリズムを用いて決定できる [3]。こうして求まる基底の次元は $|E| - |V|$ である。実際は、代謝経路をグラフに変換する際の制約がかかるため、自由度が更に低くなる。この自由度が 0 以上の際に役立つのが線形計画法による流量のバランス解析である。自由度がない場合、つまり制約過多の場合は、最小二乗法などによるエラー最適化の手法を用いねばならない。

2 代謝物の量

定量モデリングの分野では、酵素反応を化学反応の平衡状態として解析してきた。しかしメタボローム解析で代謝物の量が測定されることを考えると、化学反応モデルと上記の流量モデルとを橋渡しする理論が必要になる。この橋渡しとして以下の対応を仮定しよう。

(代謝物の増減) \rightarrow (流量の増減)

この対応は、代謝物の増減情報に従ってグラフの各辺を“増加”、“減少”、“不変”の三色に塗り分ける。ここで代謝物の増減をコントロールする手段は、外部物質の増減に限定しておく。

2.1 水門モデル

一般に、代謝は化学反応の平衡状態が繋がったものという見方をされている。Metabolic Control Analysis (MCA) はこの仮定に基づき、全体の平衡状態における各酵素反応の寄与率を解析的に求める手段を提供している。しかし、酵素反応ではアロステリック効果や拮抗阻害など様々なメカニズムが働いており、それらを一律に平衡反応として取り扱うのは難しい。

全ての代謝物は細胞内にまんべんなく存在してはいない。例えばバクテリアの基礎代謝には基本 12 物質が存在し、これらの量変化が代謝の大まかな調節を司っている [6]。この状態を表現するために紹介するのが水門 (watergate) モデルである。基本 12 物質のすぐ下流にある酵素反応がいわば水門の役割をしており、この酵素反応以下次の水門までは自然に流れる代謝とみなす。

G6P	↔	FBP
FBP	↔	2 G3P
G6P	→	CO ₂ , B5P
B5P	↔	X5P
B5P	↔	R5P
R5P, X5P	↔	S7P, G3P
S7P, G3P	↔	E4P, F6P
E4P, X5P	↔	F6P, G3P
G3P	→	Pyr

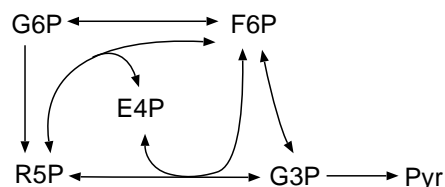


Figure 2: Fig.1 のダイアグラム

Figure 1: 解糖系とペントースリン酸経路の酵素反応

G6P … glucose 6-phosphate
 FBP … fructose 1,6-bisphosphate
 G3P … glyceraldehyde 3-phosphate
 B5P … ribulose 5-phosphate
 R5P … ribose 5-phosphate
 X5P … xylulose 5-phosphate
 S7P … sedoheptulose 7-phosphate
 E4P … erythrose 4-phosphate
 Pyr … pyruvate

2.2 具体例

ここでは解糖系とペントースリン酸経路を組み合わせた代謝系を例に、上記の仮説に基づく解析を示す。考慮する経路は以下ようになる。

水門モデルでは、基本物質以外の代謝物は考慮しない。そのため、Fig.1 内の基本物質以外のものを背景で述べた手法を用いて消去すると、Fig.2 のダイアグラムが得られる。(実際は、代謝物の量を測定して大きく変動するものを基本物質とみなす。)

ある遺伝子欠損株において E4P が蓄積していた場合、E4P の下流にある酵素反応が阻害されていると考える。阻害されている反応のうち最も上流にある酵素反応が欠損遺伝子の候補として考えられる。

2.3 考察

代謝の流量を決定すると、その流れは培地の栄養物質から水、二酸化炭素等への DAG とみなすことができる。このうち物質量が大きく変化する物質の最上流を見つけるアルゴリズムは nearest common ancestor として計算可能である [2]。問題は、どの程度の変化があれば基本物質とみなす

かの判断であり、今後の代謝物測定の結果が待たれている。

References

- [1] J. Edwards, R. Ibarra, and B. Palsson. In silico predictions of escherichia coli metabolic capabilities are consistent with experimental data. *Nature Biotechnology*, 19:125–130, 2001.
- [2] D. Harel and R. E. Tarjan. Fast algorithms for finding nearest common ancestor. *Computer and System Science*, 13:338–355, 1984.
- [3] J. Horton. A Polynomial-time Algorithm to Find the Shortest Cycle Basis of a Graph. *SIAM J Comput*, 16(2):358–366, 1987.
- [4] E. Hubicka and M. Syslo. Minimal Bases of Cycles of a Graph. In M. Fiedler, editor, *Recent Advances in Graph Theory, Proc of the symp in Prague (Jun 1974)*, pages 283–293. Academia Praha, 1975.
- [5] M. L. Mavrouniotis. Identification of Qualitatively Feasible Metabolic Pathways. In L. Hunter, editor, *Artificial Intelligence and Mol Bio*, chapter 9. AAAI/MIT Press, 1993.
- [6] A. Moat and J. Foster. *Microbial physiology*. Wiley-Liss, New York, 1995.
- [7] J. Murray and S. Levin, editors. *Mathematical Biology*, volume 19 of *Biomathematics*. Springer, 1993.
- [8] S. Schuster, D. A. Fell, and T. Dandekar. A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks. *Nature Biotechnology*, 18:326–332, 2000.
- [9] G. Stephanopoulos, A. A.A., and N. J. *Metabolic Engineering*. Academic Press, 1998.