

# 大腸菌窒素同化システムの ポジティブフィードバック制御のシンプルモデル

真崎 浩<sup>†,††</sup> 倉田 博之<sup>†</sup>

大腸菌 GlnK ノックアウト株の窒素同化システムのダイナミックシミュレーションによって、環境中のアンモニア濃度の変化に対してシステムがヒステリシスを示すことが予測されている。このヒステリシス挙動がポジティブフィードバック制御に起因することを、シンプルモデルを用いた理論解析により明らかにした。シンプルモデルにおいて立式した 3 次方程式を解くことによって、システムが複数の定常解を示すアンモニア濃度範囲が存在することが分かった。また、ポジティブフィードバック制御を強くすると、複数の定常解を示すアンモニアの濃度範囲が拡大し、逆に弱くすると、定常解が 1 つになることを示した。

## A Simple Model of Positive Feedback of the Nitrogen Assimilation System in *E. coli*

KOICHI MASAKI<sup>†,††</sup> and HIROYUKI KURATA<sup>†</sup>

Computer simulation predicted that the nitrogen assimilation system in the GlnK knock-out mutant of *E. coli* shows hysteresis with respect to changes in the extracellular ammonia concentration. To theoretically elucidate the mechanism of how hysteresis is generated, we reduced the dynamic model to a simple model with third-order equations. Theoretical analysis of the simple model shows that a positive feedback control is responsible for hysteresis. The system has two steady-state solutions within a specific range of ammonia concentrations. The range that provides two solutions expands when the positive feedback becomes strong, while the system has only one solution when the positive feedback is weakened.

### 1. はじめに

バイオインフォマティクスの進展により、遺伝子発現データをはじめとした膨大なデータが解析可能となった。これにより得られた結果から生命システムのダイナミクスを理解しようとする試みが進んでいる。このような目的を持つ研究分野としてシステムバイオロジがあげられる<sup>1)</sup>。その成果の一例として、概日リズムや発生メカニズムの解明がある。これらシステムバイオロジによる生命システムの動的挙動を解明する試みは、環境変化や遺伝子変異によるシステム挙動の変化を予測するだけにとどまらず、生命の設計原理の解明へとつながる。システムバイオロジ研究は大きくわけて以下の 4 つの段階を持つ<sup>2)</sup>。

- (1) 物理構造を含めた遺伝子制御や生命分子ネットワークなどの構造を理解する段階
- (2) システムダイナミクスを理解するために定量的および定性的システム解析を行い、高い予測能力を持つモデルと理論を構築する段階
- (3) システム解析結果に基づいて、システムを特定の状態に誘導する制御理論を構築する段階
- (4) 生命システムの設計原理を理解し、人間が求める動的挙動を再現するシステムを設計する段階

現段階でのシステムバイオロジの主要な目的は「生命分子ネットワークを作り、分子相互作用レベルの予測・理解をすること」にある。ここでは複雑な生命分子ネットワークのモデルの作成、シミュレーションや理論解析が重要な手段となる。しかし、多数のフィードバック制御が複雑に連動して成り立っている生命分子ネットワーク全体の性質をそのまま解析することは難しい。よって、特定の制御構造における動的特性をシミュレーションや理論解析に基づいて解明する必要がある。我々は先行研究として大腸菌の窒素同化システ

<sup>†</sup> 九州工業大学大学院情報工学研究科  
Graduate School of Computer Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology

<sup>††</sup> 日本学術振興会特別研究員  
Research Fellow of the Japan Society for the Promotion of Science

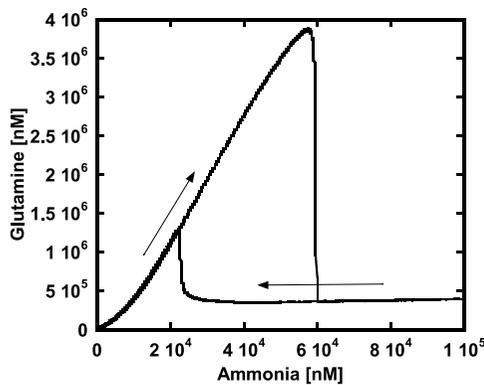


図1 シミュレーションによるヒステリシス

Fig.1 Hysteresis in the nitrogen assimilation system.

ムについての詳細なモデリングと動的シミュレーションを行ってきた。このシミュレーションにより、窒素同化システムはアンモニア濃度変化に対してヒステリシスを示すことが予測されている<sup>3)</sup>(図1)。また、シミュレーションによるとGlnKをノックアウトした場合、ヒステリシスがより顕著となることも示されている。このシミュレーションを支持する実験結果としてGlnKをノックアウトした株では、10時間以上の間、窒素が欠乏した環境に晒されると、その後アンモニアが与えられても正常状態へ回復できないという報告がある<sup>4)</sup>。この実験結果はヒステリシスを示す挙動であると推測される。本研究の目的は、GlnK欠損株の窒素同化システムにおけるヒステリシスの発生機構を、シンプルモデルを用いて理論的に解析することである。

## 2. 窒素同化システム

本章では、対象とした窒素同化システムについて説明を行う。大腸菌はグルタミンを合成するためにアンモニアが必須である。グルタミンは、グルタミン合成酵素(GS)がグルタミン酸にアンモニアを付加することによって合成される。このグルタミン酸はTCA回路の中間代謝物である $\alpha$ ケトグルタル酸から生成される。システムは環境中のアンモニア濃度が変化した場合に、GSの活性や発現量を変化させることによって、アンモニア同化速度を調節し、グルタミンと $\alpha$ ケトグルタル酸のバランス(N/C ratio)を一定に保つように機能する<sup>5)</sup>。

窒素同化システムはGSの制御という観点から、活性制御モジュールと合成制御モジュールに分けられる。前者はGSの活性・不活性をタンパク質レベルで調節する役割を持つ系であり、後者は遺伝子転写のレベルでGSの発現量を制御している系である。

既往のシミュレーションでは、アンモニア濃度変化に応じてGS発現量が変化することにより、ヒステリシスが見られる。よって本研究では活性を調節する活性制御モジュールではなく、合成制御モジュールを対象とする。GSの合成制御モジュールは複数のタンパク質により調節されている。タンパク質NRII, NRIはリン酸カスケードを形成している。リン酸化したNRI(NRI-P)はプロモータ*glnAp2*に結合することでGS, NRI, NRIIを転写誘導<sup>6)</sup>、これらの発現量を増大させる。すなわち、リン酸化NRIがNRI自体の転写を促進させるというポジティブフィードバックとなっている。PIIおよびGlnKは、その転写制御は異なるが、ほぼ同じ機能を示すタンパク質である。glutamineはUTURと結合し、PII-UMPとGlnK-UMPを脱ウリジル化させる。脱ウリジル化されたPIIおよびGlnKは、NRIIと結合することでNRII-NRIのリン酸カスケード反応を抑制する。それによってGSの合成が抑制され、glutamine合成が低下する。これはネガティブフィードバックを形成している。同時に、NRI合成のポジティブフィードバックを抑制する働きを示す。ウリジル化したPII-UMPおよびGlnK-UMPはNRIIと結合しないため、ポジティブフィードバックを抑制しない。

GlnKをノックアウトした株では、ポジティブフィードバックを抑制する因子がPIIのみとなるために、野生株よりもポジティブフィードバックの影響が支配的になる。

## 3. ヒステリシス

ヒステリシスとは、あるパラメータ変化に対して特定の挙動の変化を調べたとき、そのパラメータ変化の経路に依存して挙動が異なる現象である<sup>7)</sup>。たとえば、ヒステリシスを示す系では、ある変数の増加時と減少時では、系は異なるルートをたどり、双安定性を示す状態を持つ。ヒステリシスはポジティブフィードバックとネガティブフィードバックにより生み出される<sup>7)</sup>。

本研究の対象である窒素同化システムでは、細胞内のglutamine濃度が環境中のアンモニア濃度の増減に対してヒステリシスを示すと予測されている。

## 4. シンプルモデルの作成

我々は、ヒステリシス挙動がGS合成制御モジュール内のネガティブ・ポジティブフィードバックに起因すると推測した。そこで、ヒステリシス発生メカニズムを理論的に解析するため、ポジティブフィードバック制御とネガティブフィードバック制御を持つシ

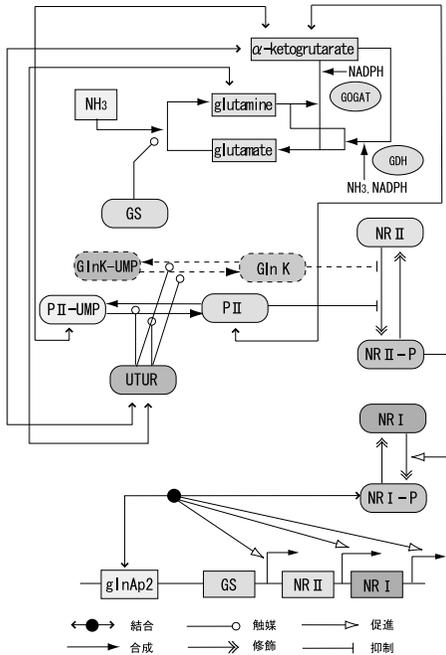


図 2 GS 合成制御モジュールから抽出したフィードバック  
Fig. 2 Feedbacks extracted from the GS synthesis module.

ンプルな数学モデルを作成する．我々は、ヒステリシスを顕著に示す GlnK ノックアウトモデルの数学モデルを作成した．図 2 は GS 合成制御モジュール内のフィードバック制御を抜き出した図である．記述は CADLIVE の記述方式に従った<sup>8)</sup>．図 2 に示されたフィードバックループからシンプルモデルを作成する．GlnK に関する反応はノックアウトモデルなので点線で示してある．

図 3 は図 2 のフィードバックループを簡略化した図である．NRI と NR II の機能をまとめた仮想タンパク質として NR を定義することによって，NR II-NRI のリン酸カスケードを簡略化した．NR は，プロモータに結合することによって，NR と GS の合成を促進する．すなわち，DNA 結合タンパク質（転写因子）として働く．ここで NR は NR 自身の転写を促進するポジティブフィードバックを形成している．一方，酵素である GS は NH<sub>3</sub> の同化反応を触媒して，glutamine を生産する．glutamine は UTUR を介して信号を PII に伝達するが，図 3 ではその反応を省略して，glutamine が PII と結合し，複合体 glutamine:PII を形成することにした．つまり，glutamine，UTUR，PII の反応カスケード（直列に並ぶ反応群）を短縮した．複合体 glutamine:PII は NR と結合することによって，NR の DNA への結合を抑制し，その結果 GS と NR の合成が抑制される．この一連の反応では，GS は GS 自

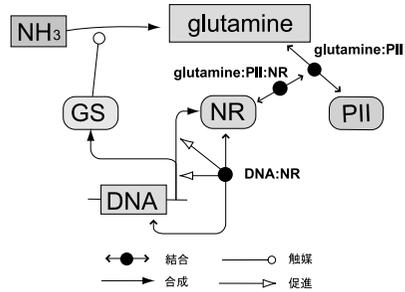


図 3 簡略化したフィードバックループ  
Fig. 3 Simplified feedback loops.

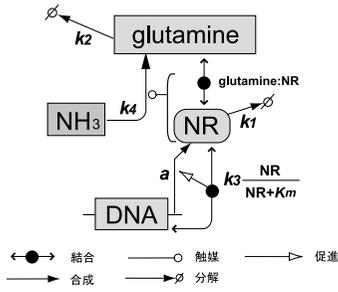


図 4 シンプルモデルのネットワーク  
Fig. 4 A network of a simplified model.

身の転写を抑制するネガティブフィードバックを形成している．今回は GlnK ノックアウトモデルを解析するので，GlnK はシンプルモデルから省略する．

図 3 のネットワークをさらに簡略化することによってシンプルモデルを作成した（図 4）．まず，複合体 glutamine:PII が，NR と複合体を形成する反応を省略し，直接 glutamine が NR と結合するとした．続いて，GS と全 NR (TNR, T は総濃度を表す接頭文字) の発現量は等しいと仮定して， $GS = TNR$  とした．すなわち，GS は TNR によって置き換えた．また，NR とプロモータの結合はミカエリス・メンテン型の式で表現した．以上により，シンプルモデルは 2 つの微分方程式と 2 つの代数方程式で表される．代数方程式は迅速平衡近似を用いて導出した．このシンプルモデルは NR が NR 自身の転写促進を行うポジティブフィードバック構造と，GS (TNR) が glutamine を合成し，glutamine と NR が結合することで GS (TNR) の転写を抑制するネガティブフィードバック構造とを保持している．すなわち，図 2 の GS 合成モジュールの制御構造を保持している．

$$\frac{dTNR}{dt} = a + k_1 \cdot \frac{NR}{NR + K_m} - k_2 \cdot TNR = 0 \tag{1}$$

$$\frac{dTglutamine}{dt} = k_g \cdot NH_3 \cdot TNR - k_3 \cdot Tglutamine = 0 \quad (2)$$

$$Tglutamine = glutamine + K \cdot glutamine \cdot NR \quad (3)$$

$$TNR = NR + K \cdot glutamine \cdot NR \quad (4)$$

ここで、 $K$  は  $NR$  と  $glutamine$  の結合定数、 $a$  は  $TNR$  の基礎合成速度定数、 $K_m$  は  $NR$  とプロモータの結合定数、 $k_1$  は  $TNR$  の合成速度定数、 $k_2$  は  $TNR$  の分解速度定数、 $k_3$  は全  $glutamine$  ( $Tglutamine$ ) の分解速度定数である。 $k_g$  は  $Tglutamine$  の合成速度定数で、今回は  $1 [s^{-1}M^{-1}]$  とした。シンプルモデルの微分方程式には定常状態近似を用いた。上記式 (1)~(4) を展開、代入することにより、 $Tglutamine$  についての 3 次方程式を得た。

$$\left( \frac{K \cdot K_m \cdot k_2 \cdot k_3^2}{k_1^2} + \frac{k_2 \cdot k_3^2}{k_1^2 \cdot NH_3} + \frac{K \cdot K_m \cdot k_2 \cdot k_3^2}{k_1^2 \cdot NH_3} \right) \cdot Tglutamine^3 + \left( \frac{2 \cdot K \cdot a \cdot K_m \cdot k_2 \cdot k_3 \cdot NH_3}{k_1^2} + \frac{2 \cdot k_2 \cdot k_3^2}{k_1} + \frac{2 \cdot a \cdot k_2 \cdot k_3^2}{k_1^2} - \frac{K_m \cdot k_2 \cdot k_3^2}{k_1^2} \right) \cdot Tglutamine^2 + \left( \frac{2 \cdot K \cdot a \cdot K_m \cdot k_2 \cdot k_3^2}{k_1^2} - \frac{K \cdot K_m \cdot k_2 \cdot k_3^2}{k_1} + \frac{K \cdot K_m^2 \cdot k_2 \cdot k_3^2}{k_1^2} + \frac{NH_3 \cdot K \cdot K_m \cdot k_2 \cdot k_3}{k_1} \right) \cdot Tglutamine + \left( \frac{K \cdot a \cdot K_m \cdot NH_3^2}{k_1} + \frac{K \cdot a^2 \cdot K_m \cdot k_3 \cdot NH_3}{k_1^2} + \frac{K \cdot a \cdot K_m \cdot k_3 \cdot NH_3}{k_1} - \frac{K \cdot a^2 \cdot K_m \cdot NH_3^2}{k_1^2} + \frac{2 \cdot a \cdot K_m \cdot k_2 \cdot k_3 \cdot NH_3}{k_1^2} - \frac{2 \cdot a \cdot k_3 \cdot NH_3}{k_1} + \frac{K_m \cdot k_2 \cdot k_3 \cdot NH_3}{k_1} - \frac{k_3 \cdot NH_3 \cdot a^2}{k_1^2} - k_3 \cdot NH_3 \right) \cdot Tglutamine - \frac{a^2 \cdot K_m \cdot NH_3^2}{k_1^2} - \frac{a \cdot K_m \cdot NH_3^2}{k_1} + \frac{K \cdot a^2 \cdot K_m \cdot NH_3^2}{k_1^2} = 0$$

この 3 次方程式はカルダノ法を用いて解いた。カルダノ法の仕組みは以下のとおりである。

3 次方程式

$$ax^3 + bx^2 + cx + d = 0 \quad (5)$$

に対して、 $t = \frac{b}{3a}$  とおくと

$$a \left( t - \frac{b}{3a} \right)^3 + b \left( t - \frac{b}{3a} \right)^2 + c \left( t - \frac{b}{3a} \right) + d = at^3 + \left( -\frac{b^2}{3a} + c \right) t + \left( \frac{2b^3}{27a^2} - \frac{bc}{3a} + d \right)$$

となる。ここで、

$$p = -\frac{b^2}{3a} + \frac{c}{a}, \quad q = \frac{2b^3}{27a^3} - \frac{bc}{3a^2} + \frac{d}{a}$$

とすると、

$$t^3 + pt + q = 0 \quad (6)$$

となる。さらに  $t = u + v$  とおき式 (6) に代入すると、

$$t^3 + pt + q = (u + v)^3 + p(u + v) + q = u^3 + v^3 + (3uv + p)(u + v) + q$$

である。ゆえに

$$\begin{cases} u^3 + v^3 + q = 0 \\ 3uv + p = 0 \end{cases} \quad (7)$$

である。

$$u^3 v^3 = -\frac{p^3}{27} \\ u^3 + v^3 = -q$$

であるので、 $u^3, v^3$  を解とする、 $t$  の 2 次方程式は、 $t^2 + qt - \frac{p^3}{27} = 0$  となる。

2 次方程式の解の公式より

$$u^3, v^3 = -\frac{q}{2} \pm \sqrt{\frac{q^2}{4} - \frac{p^3}{27}} \\ u = \sqrt[3]{-\frac{q}{2} + \sqrt{\frac{q^2}{4} + \frac{p^3}{27}}} \\ v = \sqrt[3]{-\frac{q}{2} - \sqrt{\frac{q^2}{4} + \frac{p^3}{27}}}$$

ここで  $\omega = \frac{-1 + \sqrt{3}i}{2}$  とすると、解は  $\omega^k u + \omega^{3-k} v$  ( $k = 0, 1, 2$ ) となる。

## 5. 結果

カルダノ法を用いて表 1 の条件における 3 次方程式の解を算出した。シンプルモデルが生化学モデルであることを考慮して、 $NR$  や  $glutamine$  が負の値をとる解や虚数解は除外した。

変数  $NH_3$  に対する  $Tglutamine$  の定常解をプロットしたものを図 5 に示した。変数  $NH_3$  の値が 15.5 ~ 23.6 [nM] の範囲で複数の定常解を持つ双安定性が示された。 $NH_3$  が 23.6 [nM] 以上になると双安定性が

表 1 計算条件 1

Table 1 Lists of parameter values.

パラメータ	値
$K [M^{-1}]$	0.4
$K_m [nM]$	15
$k_1 [s^{-1}]$	10
$k_2 [s^{-1}]$	0.1
$k_3 [s^{-1}]$	10
$a [s^{-1}]$	0.5
$NH_3 [nM]$	0 ~ 100

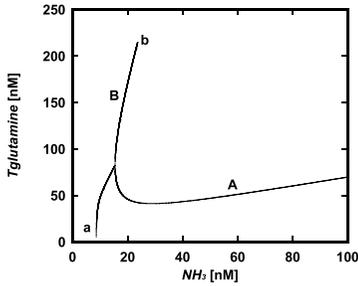


図 5  $NH_3$  に対する  $Tglutamine$  の定常解

Fig. 5 Steady state solutions of the *glutamine* concentration with respect to the  $NH_3$  concentration.

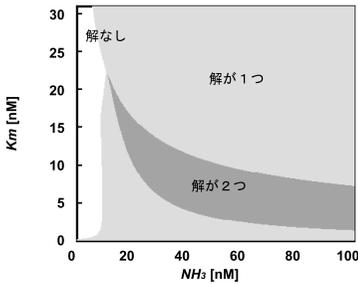


図 6 2次元パラメータ空間上での定常解の存在

Fig. 6 Steady state solutions in the two dimensional parameter space.

崩れ、定常解が1つとなった。このように、ある  $NH_3$  濃度範囲においては2つの解を持ち、その濃度域以外では1つに戻っている。システムはアンモニアが高濃度から低濃度へと移行する際にはAの経路をたどり、点aまで達すると考えられる。逆に低濃度から高濃度へと移行する場合は、システムは点aからBの経路をたどり点bへ達し、以降は不安定となりAの経路へと移行すると考えられる。これはシミュレーションのヒステリシス挙動(図1)に一致している。

続いて、ポジティブフィードバックにおいて重要なパラメータである  $K_m$  と  $NH_3$  に関してのパラメータ空間における定常解の個数をプロットした(図6)。条件は表2のとおりである。 $K_m$  はNRとプロモータとの結合定数であり、ポジティブフィードバックの強さを決める。 $K_m$  の値が大きければ、ポジティブフィードバックは弱まる。逆に  $K_m$  の値が小さければ、ポジティブフィードバックは強くなる。

図6より  $K_m$  が22[nM]以上になり、ポジティブフィードバックの働きが弱まると、2つの定常解が存在する  $NH_3$  濃度範囲が消失することが示された。システムの解が1つとなり、広い  $NH_3$  濃度範囲において可逆反応を示す。また  $K_m$  が22~2[nM]に小さくなり、ポジティブフィードバックが強まると、解を

表 2 計算条件 2  
Table 2 Lists of parameter values.

パラメータ	値
$K [M^{-1}]$	0.4
$K_m [nM]$	0~30
$k_1 [s^{-1}]$	10
$k_2 [s^{-1}]$	0.1
$k_3 [s^{-1}]$	10
$a [s^{-1}]$	0.5
$NH_3 [nM]$	0~100

2つ持つアンモニア濃度範囲が出現した。 $K_m$  が7~22[nM]の範囲では、アンモニア濃度の変化に対して、定常解が1つの場合と2つの場合とが混在している。これはヒステリシスの挙動を示している。 $K_m$  が2~7[nM]のとき、 $NH_3$  濃度100[nM]においても、2つの定常解を持つ状態が保持された。これは100[nM]以下の範囲において  $NH_3$  濃度に対する不可逆反応を示唆している。さらに  $K_m$  が2[nM]以下となると、再び  $NH_3$  濃度0~100[nM]の範囲では定常解が1つのみとなった。

6. おわりに

理論解析により、ポジティブフィードバック制御のパラメータの変化によっては複数の定常解を持つことが明らかとなった。この複数の定常解の存在によりシステムにヒステリシスが引き起こされることが示された。シンプルモデルは理論解析のため単純化したモデルであるが、制御の構造を失わないようにモデルの変数や式数を減少させた。シンプルモデルでは、glutamine、UTUR、PII、NRI-NRIIという反応カスケード(直列に並ぶ反応群)を glutamine と NR からなる1つの反応にまとめ、同じ転写制御メカニズムを持つGSとNRをまとめている。GS合成モジュールの持つポジティブフィードバックおよびネガティブフィードバック構造は維持され、制御の本質的構造を消失しないシンプルモデルが導出された。よって、シンプルモデルにおいて、実際のモジュールと同様の制御が行われていると考えられる。シンプルモデル解析においてヒステリシスを示す解が得られたことは、GlnK欠損株におけるヒステリシスは合成制御モジュールのフィードバック制御に起因するものであると推測できる。また、図6の結果より、ヒステリシスの発生はポジティブフィードバックの強さによって決定されることが示された。GlnKはポジティブフィードバックの影響を弱めることで、ヒステリシスを抑制していると考えられる。実験によるとGlnK欠損株は窒素欠乏下から正常状態へ回復できないことが報告されている<sup>4)</sup>。これは

GlnK のノックアウトによりポジティブフィードバックの抑制効果が低下し、ヒステリシス、もしくは不可逆変化を示したものと推測される。

謝辞 本研究は文部科学省科学技術研究費補助金基盤研究(B)18300098 および日本学術振興会特別研究員制度の支援による成果である。ここに謝意を表する。

### 参 考 文 献

- 1) Ideker, T., Galitski, T. and Hood, L.: A new approach to decoding life: Systems biology, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, Vol.2, pp.343-372 (2001).
- 2) Kitano, H.: Computational Systems Biology, *Nature*, Vol.420, pp.206-210 (2002).
- 3) Kurata, H., Masaki, K., Sumida, Y. and Iwasaki, R.: CADLIVE dynamic simulator: Direct link of biochemical networks to dynamic models, *Genome Res.*, Vol.15, pp.590-600 (2005).
- 4) Blauwkamp, T.A. and Ninfa, A.J.: Physiological role of the GlnK signal transduction protein of *Escherichia coli*: Survival of nitrogen starvation, *Molecular Microbiology*, Vol.46, pp.203-214 (2002).
- 5) Ninfa, A. and Jiang, P., et al.: Integration of antagonistic signals in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli.*, *Curr. Top Cell Regul.*, Vol.36, pp.31-75 (2000).
- 6) Ninfa, A.J., Reitzer, L.J. and Magasanik, B.: Initiation of transcription at the bacterial *glnAp2* promoter by purified *E. coli* components is facilitated by enhancers, *Cell*, Vol.50, pp.1039-1046 (1987).
- 7) Tyson, J.J., et al., K.C.C.: Sniffers, buzzers,

toggles and blinkers: Dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell, *Curr. Opin Cell Biol.*, Vol.15, pp.221-231 (2003).

- 8) H, K., N, M. and N, S.: CADLIVE for constructing a large-scale biochemical network based on a simulation-directed notation and its application to yeast cell cycle, *Nucleic Acids Res.*, Vol.14, pp.4071-4084 (2003).

(平成 18 年 4 月 27 日受付)

(平成 18 年 5 月 12 日再受付)

(平成 18 年 10 月 26 日再々受付)

(平成 18 年 12 月 11 日採録)



真崎 浩一 (学生会員)

昭和 55 年生。現在九州工業大学大学院情報工学研究科情報科学専攻博士後期課程在籍。日本学術振興会特別研究員。



倉田 博之

昭和 39 年生。平成 5 年東京大学大学院工学系研究科化学工学専攻博士課程修了。現在、九州工業大学情報工学部生命情報工学科教授。システム生物学およびバイオインフォマティクスの研究に従事。工学博士。平成 8 年化学工学会玉置明善賞受賞。化学工学会、日本生物工学会、日本バイオインフォマティクス学会、分子生物学会、計測自動制御学会生物制御調査研究会各会員。