

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

太田潤^{†1}

概要: 代謝工学分野では、目的とする代謝産物を生物に作らせるのに適した原料代謝産物を探索するために、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いる。通常、代謝産物 A から代謝産物 B まで原子がトレースできる経路が存在する場合に A が B の原料となり得ると判断する。しかし、このような経路の存在は B の分子全体が A のみから生合成され得ることを保証しない。最近、与えられた代謝ネットワークで、代謝産物 B に含まれる炭素原子のすべてが代謝産物 A 由来であるような代謝産物 B 生成の経路が存在するかどうかを判定し、その経路を例示する手法を開発した。この手法では、最初に代謝ネットワークに与える原料 isotopomer の集合を決め、集合内の原料 isotopomer から代謝ネットワークに含まれる反応 1 段階により生成する isotopomer を列挙する。そして、列挙した isotopomer を原料 isotopomer の集合に加え、再び集合内の原料 isotopomer から代謝ネットワーク内に含まれる反応 1 段階により生成する isotopomer を列挙するという操作を基本的に繰り返していく。この操作を isotopomer tracing と呼ぶ。本稿では、この手法とその応用例を記す。

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

Isotopomer tracing: listing all the isotopomers synthesizable from source isotopomers through a given metabolic network

JUN OHTA^{†1}

1. はじめに

代謝工学分野においては、目的代謝産物を生成するのに適した原料代謝産物を知る目的で、実験的に微生物における代謝フラックス分布を決定する ¹³C 代謝フラックス解析が行われる [1-4] とともに情報学的に代謝ネットワーク上の2つの代謝産物をつなぐ経路を計算する手法が開発されてきた [5-8].

一方、生物が生育するのに必要な物質群が何かを知るとは非常に重要である。この大きな問の一部として、生体内の有機化合物が何を原料として作られるか、また、何からは作られないかという問題があり、この問題に答を与える可能性がある研究が、代謝ネットワーク内の2つの代謝産物をつなぐ経路の計算手法の研究である。

これまでの経路計算の手法は、その多くが“代謝産物 A が代謝産物 B の原料となり得るかどうかを判断するために A の原子を B までトレースできるかどうか調べる”というものであるが、それだけでは明らかにならないことがある。それは、B の分子全体が A から作られ得るかどうかということである。A の原子と B の原子の任意の組み合わせについて、A の原子から B の原子に至る経路が存在するかどうかは single-atom tracing によりわかる [9,10]. しかし、経路の存在は、B の特定の原子が A から供給され得ることを示すのみで B の分子全体が A から作られ得るかどうかについては有用な情報を与えない。文献 [8] の研究では、A から B に至る分岐する経路における原子のトレースを行って

いるが、B の分子全体の生合成可能性は考えていない。

“B の分子全体が A から作られ得るかどうか”という問いに答えることの重要性は、炭素原子を一つだけ持つ化合物 (C1 化合物) の炭素原子の同化を考える際に明白である。矢島らは、メタノールを炭素源として大腸菌を生育させて工業的に利用する考えと試みを学会報告している [11]. この試みは、ホルムアルデヒド分解酵素をノックアウトした大腸菌に、メタノールをホルムアルデヒド・3-hexulose-6-phosphate を経てフルクトース 6-リン酸に代謝する一連の反応に関わる3つの酵素の遺伝子を導入することにより、メタノールを唯一の炭素源として大腸菌を生育させようとするものである。この試みの成否を推定する上で、大腸菌に含まれる各有機化合物について、その化合物のすべての炭素原子がメタノール由来のものとなるような生合成経路が存在するか否かを知るとは非常に重要である。経路がもし存在しなければメタノール以外の炭素源が必要であることになる。また、確立しているとされている二酸化炭素のカルビン回路による同化においても“カルビン回路は他の経路から独立して二酸化炭素の同化を行っている”と主張するためには、カルビン回路の各中間体のすべての炭素原子が二酸化炭素由来のものとなるような生合成経路に、カルビン回路の反応のみで構成されているものがあることを証明しなければならない。

最近、私は、C1 化合物の同化に関するこのような問題に答えるための手法を開発した。具体的には、与えられた代謝ネットワークで、代謝産物 B に含まれる炭素原子のすべてが代謝産物 A 由来であるような代謝産物 B 生成の経路が

^{†1} 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 (医) 生化学分野

存在するかどうかを判定し、その経路を例示する手法を開発した。開発した手法の前半部分では、最初に代謝ネットワークに与える原料 isotopomer の集合を決め、集合内の原料 isotopomer から代謝ネットワークに含まれる反応 1 段階により生成する isotopomer を列挙する。そして、列挙した isotopomer を原料 isotopomer の集合に加え、再び集合内の原料 isotopomer から代謝ネットワーク内に含まれる反応 1 段階により生成する isotopomer を列挙するということを基本的に繰り返していく。この操作を isotopomer tracing と呼ぶ。すべての炭素原子が label された“代謝産物 A の isotopomer”に全く label されていない“A 以外の代謝産物の isotopomer”を加えた集合に対して行った isotopomer tracing で列挙される isotopomer に、すべての炭素原子が label された“代謝産物 B の isotopomer”が含まれれば、含まれる炭素原子のすべてが代謝産物 A 由来であるような代謝産物 B 生成の経路が存在すると言える。本稿では、isotopomer tracing の手法とそれをメタノール利用反応を含む糖質代謝モデルネットワークに応用した例を示す。

2. 方法

2.1 代謝産物、炭素原子とプロセスの番号付け

Isotopomer tracing においては、与えられた代謝ネットワークに含まれる代謝産物、炭素原子とプロセスに対して既報 [9,10] に従い以下のように番号付けを行う。本稿の説明で“プロセス”は、反応または膜輸送の過程のことを意味する。ネットワーク内の各代謝産物には代謝産物番号を付す。代謝産物の各炭素原子に、代謝産物内炭素番号を付け、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。各プロセスにはプロセス番号を付す。本稿では、上記の番号と表現を次のように取り扱う。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) として表現する。計算上 (m, c) は複素数 $m + ci$ として扱い、本稿でも (m, c) と複素数 $m + ci$ を同じ意味で用いる。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) とする。

2.2 Connectivity matrix (CM) による代謝ネットワーク内の代謝産物間の原子のつながりの記述

代謝ネットワーク内で各プロセスにより各代謝産物の各原子がどの代謝産物のどの原子に移るかは isotopomer tracing を行うための最も基本的な情報である。この情報(代謝ネットワーク内の原子のつながりの情報)を connectivity matrix (CM) の形式で記述する。

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 [9]。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。本稿(本研究)では、代謝ネットワーク内の代謝産物の原子を 1 つの複素数で記

述するので、CM の形式は、最も単純な形式である 3 列の CM を用いる [9,10]。 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。代謝ネットワーク内のすべての原子のつながりを単一の CM として表現する。

2.3 代謝産物番号の補足インデックス番号、補足インデックス行列、反応内代謝産物 ID ベクトル

m が代謝産物番号、 p がプロセス番号であり、プロセス p の反応式中の代謝産物 m の係数が 2 以上である(=代謝産物 m 分子が反応式の片側に 2 個以上現れる)とする。この場合“代謝産物 m の原子”には、CM のプロセス p に対応する部分行列の 1・2 列目のどちらか一方に 2 回以上現れる原子が 1 つ必ず存在するが、もし 2 回以上現れる原子が複数存在していれば、それらの“代謝産物 m の原子”が反応式の何個目の代謝産物 m 分子に属するかを割り当てるやり方が複数存在し、割り当て方により反応で切断・生成される結合が全く変わってしまう。そこで、次のように、反応式の片側に現れる同じ代謝産物の 2 個以上の分子それぞれを区別する補足インデックス番号 subsidiary index (sub-index) を決める。プロセス p の反応式の代謝産物 m の係数が n である場合、すなわち反応式に代謝産物 m 分子が n 個現れる場合、 n が 2 以上ならば n 個の代謝産物 m 分子に 1 から始まる通し番号の sub-index を付す。 n が 1 ならば 1 個の代謝産物 m 分子の sub-index は 1 とする。

各プロセスにおいて、代謝産物中の原子と代謝産物の isotopomer (後述) に代謝産物と同じ sub-index を与える。したがって、CM の 1 列目と 2 列目の各成分には対応する sub-index の値が存在する。必要な場合に sub-index が参照できるように CM と同じ行数を持つ 2 列の行列である sub-index-CM を作成し、CM の i 行 j 列の成分に対応する sub-index の値を sub-index-CM の i 行 j 列の成分として記述する。Isotopomer に関する後述の ICM についても sub-index-ICM を作成する。sub-index-CM と sub-index-ICM をそれぞれ CM と ICM の補足インデックス行列と呼ぶ。

また、代謝産物番号 m と sub-index (idx) からなる行ベクトル $[m, idx]$ を反応内代謝産物 ID ベクトルと呼び、このベクトルにより反応式に現れる特定の代謝産物分子を指す。

2.4 Isotopomer とその番号付け

本稿では、ある代謝産物 M 分子の c 番の炭素が、自然界に最も多い ^{12}C 以外の同位体である場合、 M 分子の c 番の炭素がその同位体により label されていると言う。特定の M 分子に含まれる各炭素が label されているかいないかは全体として一種の pattern であるのでこれを M 分子の labeling

pattern と呼ぶ。特定の labeling pattern を示す M の分子種は一般に M の isotopomer である。M の炭素に関する isotopomer の label の位置は文献 [12] のように炭素数と同じ桁数をもつ 2 進数の 1 の位置で表現される。たとえば 2 進数 001010 は炭素数 6 の化合物の 3 番と 5 番の炭素が label されていることを表現する。本稿では M の isotopomer の isotopomer 番号を、上記の label の位置を示す 2 進数を 10 進数に変換した値に 1 を加えたものと定義する。文献 [12] では isotopomer を指定する際 0 (zeroth) から数え始めている。しかし、数を数える場合には 1 から始める方が自然である。さらに、isotopomer を 1 から数え始めると isotopomer 番号が、文献 [12] で導入された isotopomer mapping matrix の行番号・列番号と一致する。非対称な分子では isotopomer 番号 (labeling pattern) と isotopomer が 1 対 1 に対応するが、対称性がある分子では、複数の isotopomer 番号 (labeling pattern) の isotopomer が対称性のため区別できない場合がある。この場合は、その isotopomer を示すために最も小さい isotopomer 番号を用いる。本稿では M の isotopomer を M の代謝産物番号 m と isotopomer 番号 t の組み合わせ (m, t) で表現する。計算上 (m, t) は複素数 $m + ti$ として扱う。

2.5 Isotopomer のつながりとその isotopomer connectivity matrix (ICM) による記述

p_1 をプロセス番号、 m_1 と m_2 を代謝産物番号とする。プロセス p_1 によりプロセス p_1 の基質 m_1 の一部がプロセス p_1 の生成物 m_2 の一部になるとき、一部の m_1 の原子と一部の m_2 の原子の間にはプロセス p_1 による 1 対 1 の対応関係がある。この、 m_1 と m_2 の、対応関係にある部分全体の labeling pattern を考える。これが m_1 と m_2 の間で完全に一致するとき、その labeling pattern を与える m_1 の isotopomer (m_1, t_1) と m_2 の isotopomer (m_2, t_2) は前者から後者に向けてプロセス p_1 によりつながっていると看做する。このつながりを行ベクトル $[(m_1, t_1), (m_2, t_2), p_1]$ で表現し、この行ベクトルを積み重ねて isotopomer connectivity matrix (ICM) を構成する。上記の行ベクトルの代謝産物 m_1 および代謝産物 m_2 は 2.3 で定義したプロセス p_1 における sub-index を持つ。プロセス p_1 の反応式で、代謝産物 m_1 または m_2 の係数が 2 以上である場合には、反応式上の複数の m_1 分子または m_2 分子にそれぞれ異なる sub-index が与えられる。同じ代謝産物の分子であっても 1 つのプロセス中の sub-index が異なっていれば、sub-index ごとに異なる変換を受け得るので、ICM に対応する sub-index からなる補足インデックス行列 sub-index-ICM をつくり sub-index を保持する。ICM と sub-index-ICM は CM と sub-index-CM の情報から計算により作成する。

2.6 Isotopomer connectivity matrix (ICM) の利用 1 : 与えられた isotopomer から 1 段階の反応で構造の一部が合成され得る isotopomer の列挙

ICM は、isotopomer tracing において、isotopomer (m, t) が与えられた時にそれを原料として 1 段階の反応で構造の一

部が合成され得る isotopomer を列挙することに利用される。具体的な手順は、ICM の第 1 列の成分が (m, t) である行だけをすべて取り出し ICM の部分行列を作成する。同時に対応する sub-index-ICM も作成する。この ICM の部分行列の第 2 列の成分が isotopomer (m, t) から 1 段階の反応で構造の一部が合成され得る isotopomer を示す。ただし、その isotopomer の構造の少なくとも一部が合成され得るという意味であり、構造全体が合成され得るという意味ではない。この isotopomer の sub-index は sub-index-ICM からわかる。

2.7 Isotopomer connectivity matrix (ICM) の利用 2 : 与えられた原料 isotopomer のみから特定の isotopomer 全体がプロセス p により合成できるかどうかの判定

ICM は、isotopomer tracing において、“代謝産物 m を生成するプロセス p により、代謝産物 m の isotopomer (m, t) の炭素骨格全体が、与えられた原料 isotopomer の集合に含まれる isotopomer のみから合成できるかどうか”の判定に利用される。このためには ICM の第 2 列の成分が (m, t) であり第 3 列の成分が p である行すべてからなる ICM の部分行列をつくる。部分行列の第 2 列の成分の sub-index 値が異なっていれば、この値により部分行列をさらに分割して部分行列を得る。得られた部分行列の第 1 列について、その成分 (代謝産物番号 + isotopomer 番号 × 虚数単位, isotopomer を示す) と成分に対応する“反応内代謝産物 ID ベクトル” ([代謝産物番号, sub-index]) の組の集合 S をつくる。集合 S の要素が含む“反応内代謝産物 ID ベクトル”が n 種類あれば、集合 S は、要素がどの“反応内代謝産物 ID ベクトル”を含むかにより n 個の集合、 S_1 から S_n に分割される。代謝産物 m は、 S_1 の要素を持つ“反応内代謝産物 ID ベクトル”が示す分子から始まって S_n の要素を持つ“反応内代謝産物 ID ベクトル”が示す分子に至るまでの n 個の分子すべてと構造上対応しており、それら n 個の分子の isotopomer がすべてそろって初めて全体が合成される。したがって代謝産物 m の isotopomer (m, t) の炭素骨格全体が合成されるためには S の部分集合 (S_1 から S_n) のすべてについて、その要素が含む isotopomer (複素数) のうち少なくとも 1 つが原料として供給されることが必要である。この条件が満たされるかどうかを調べることにより、“代謝産物 m の isotopomer (m, t) の炭素骨格全体が与えられた原料 isotopomer の集合に含まれる isotopomer のみから合成できるかどうか”の判定ができる。

2.8 Isotopomer tracing のアルゴリズム

最初に用意するのは、与えられた代謝ネットワークに対する ICM と sub-index-ICM および原料 isotopomer の集合である。まず、原料 isotopomer の集合に含まれる isotopomer に対応する複素数からなる列ベクトル source をつくる。与えられた代謝ネットワークで、代謝産物 B に含まれる炭素原子のすべてが代謝産物 A 由来であるような代謝産物 B 生成の経路が存在するかどうかを知りたい場合には、原料

isotopomer の集合を、すべての炭素原子が label された“代謝産物 A の isotopomer”と炭素原子が全く label されていない“代謝ネットワーク上の A 以外のすべての代謝産物の isotopomer”からなる集合とする。ICM, sub-index-ICM, source は下記の計算の過程で変更されるので元のデータを別名で保存しておく。

Step 1. source の各要素に順次 2.6 に示した処理を行うことにより、source に含まれる isotopomer を原料として 1 段階の反応で構造の一部が合成され得る isotopomer を列挙し、列挙される isotopomer (= isotopomer を示す複素数) と sub-index の組の、通し番号付きリストを作成する。また ICM の行数を求め、それを k とする。

Step 2. この Step では **Step 1** で得られたリスト上の isotopomer と sub-index の組を順次処理して行く。リスト上に未処理の組がある場合は、そのうち通し番号が最も小さいものに対して **Step 2-1** 以下の処理を行う。すべての組に対して処理が終了した時には、ICM の行数が k とは異なる場合 **Step 1** に戻る。ICM の行数が k に等しい場合にはここですべての処理が終了となる。終了時点の source は、開始時に与えた原料 isotopomer と、代謝ネットワークにより生成し得る isotopomer すべてを含んでいる。

Step 2-1. これから処理する組の isotopomer (= isotopomer を示す複素数) と sub-index をそれぞれ s と si とする。s が ICM の 2 列目に、si が sub-index-ICM の 2 列目に現れるような ICM と sub-index-ICM に共通の行番号をすべて求め、それらの行番号に相当する ICM の部分行列の 3 列目に現れるプロセス番号の、(プロセス番号の重複がない) 通し番号付きリストを作成する。

Step 2-2. この Step では **Step 2-1** で得られたリスト上のプロセス番号を順次処理して行く。リスト上に未処理のプロセス番号がある場合は、そのうち通し番号が最も小さいものに対して **Step 2-2-1** 以下の処理を行う。すべてのプロセス番号に対して処理が終了した場合は **Step 2** に戻る。

Step 2-2-1. これから処理するプロセス番号を p とする。p と **Step 2-1** で与えられた isotopomer を示す複素数 s および sub-index si について、s と p がそれぞれ ICM の 2 列目と 3 列目に、si が sub-index-ICM の 2 列目に現れるような ICM と sub-index-ICM に共通の行番号をすべて求め、それらの行番号に相当する ICM の部分行列を作成する。これは 2.7 の処理の途中までに相当し、この処理を 2.7 に従い更に進めれば、与えられた原料 isotopomer のみから s で表される isotopomer の炭素骨格全体がプロセス p により合成できるかどうか判定できる。

Step 2-2-2. 判定結果が“合成できる”であった場合には列ベクトル source の末尾に s を加え、**Step 2-2-1** で求めた行番号の行を ICM および sub-index-ICM から削除する。判定結果が“合成できない”であった場合は何もしない。

Step 2-2-3. **Step 2-2** に戻る。

2.9 計算

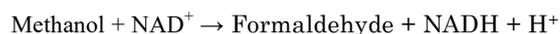
上記のように isotopomer tracing に必要な情報は行列の形で表現した。本研究では、この情報を用いて Matlab と GNU Octave 上で計算を行った。

3. 結果と考察

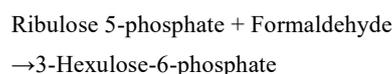
3.1 メタノール利用反応を含む糖質代謝モデルネットワークにおける isotopomer tracing

メタノール利用反応を含む糖質代謝モデルネットワークにおいて、炭素原子が label された“メタノールの isotopomer”と炭素原子が全く label されていない“currency metabolite を除くメタノール以外の代謝産物の isotopomer”を source として isotopomer tracing を行った。モデルネットワークは、文献 [10] の、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モデルネットワークにメタノールを利用するための下記の R1, R2, R3 で定義される反応 [11] とそれらの逆反応を加えたものを用いた。

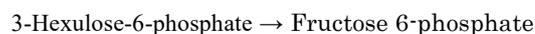
R1: Methanol dehydrogenase:



R2: 3-Hexulose-6-phosphate synthase:



R3: 6-Phospho-3-hexulose isomerase:



モデルネットワークは 49 の代謝産物(グルコースまたはメタノールの代謝産物が 35, currency metabolite が 14) と 38 のプロセス(反応または膜輸送)を含み、38 プロセスのうち 26 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。

方法に記したように、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。49 代謝産物のうちの、グルコースとメタノールの代謝産物である 35 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。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。49 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。アセチル CoA とサクシニル CoA はグルコースの代謝産物として扱い、“currency metabolite”としては扱わなかった。いくつかの代謝産物とプロセスについては細胞質内のものとミトコンドリア内のものに別々の番号を付けて区

別した。

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 148 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 144 種類であった。モデルネットワーク内のこれらの炭素原子のつながりを記述すると 321 行の CM となった。Isotopomer に関しては、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 1098 種類、考慮した場合 1086 種類の isotopomer が存在した。モデルネットワーク内のこれらの isotopomer のつながりを対称性による重複を避けて記述すると 8560 行の ICM となった。

計 35 の isotopomer に対応する 35 の成分を持つ列ベクトル source から isotopomer tracing を行った結果、2359 の成分を持つ source が得られた。Isotopomer tracing の Matlab での計算には 20 秒を、GNU Octave での計算には 300 秒を要した (Intel(R) Core(TM) i5-3320M CPU @ 2.60GHz)。2359 は上記の 1086 よりも大きい値である。このことは source の成分に同じ値を持つものが存在する、すなわち、source に複数回現れている isotopomer があることを示す。Isotopomer tracing 後の列ベクトル source 上の複数の異なる位置に現れる isotopomer は、isotopomer tracing の際にそれぞれ異なる isotopomer と反応からなる経路を経てその位置に至った (生成した) と言える。

モデルネットワーク内に存在し得る isotopomer であって、最初の source からは生成され得ないものがどの程度あるか知るために isotopomer tracing 後の source の成分の値の種類を数えたところ 1086 であった。この値はモデルネットワーク内に存在し得る isotopomer の最大数と一致していた。

このことは、一見、最初に与えた isotopomer からモデルネットワークの働きによりネットワーク内の代謝産物のすべての isotopomer が生成し得ることを示しているように思われる。しかし、ある isotopomer の生成経路のすべてにおいて、正プロセスと逆プロセスの共存が見られる場合、その isotopomer は生成されにくいとする考え方もある[10]。モデルネットワークは全 38 プロセス中、26 プロセスが可逆であると設定しているため、isotopomer tracing 後の source に含まれる isotopomer の中に正プロセスと逆プロセスが共存しないと生成し得ない isotopomer が含まれている可能性は否定できない。そこで、モデルネットワークの“可逆なプロセスを含まないサブネットワーク”で生成し得る isotopomer を調べることを考えた。

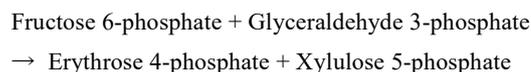
3.2 モデルネットワークのサブネットワークにおける isotopomer tracing

モデルネットワークの“可逆なプロセスを含まないサブネットワーク”は非常に多く存在するのでそれらすべてを調べることは困難である。そこで、メタノールからのグルコース生成に焦点を当て、メタノールからのグルコース生成に貢献する可能性が大きい反応のみからなるモデルネッ

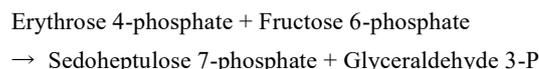
トワークのサブネットワークで isotopomer tracing を行うことにした。

モデルネットワーク内の反応の組み合わせに、currency metabolite の必要な供給・除去が行われた場合に 6 分子のメタノールから 1 分子のグルコースを生成するものがある。それは、上記の R1 から R3 で定義される 3 反応と下記の R4 から R13 で定義される 10 反応の組み合わせである。

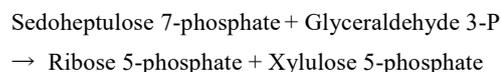
R4: Transketolase, reverse



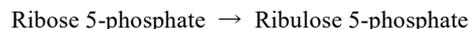
R5: Transaldolase, reverse



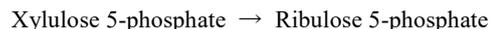
R6: Transketolase, reverse



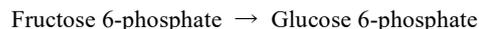
R7: Ribose-5-phosphate ketoisomerase, reverse



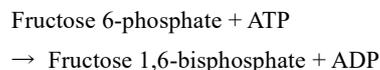
R8: Ribulose-5-phosphate 3-epimerase, reverse



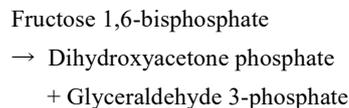
R9: Phosphohexose isomerase, reverse



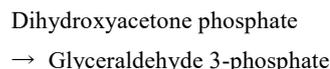
R10: Phosphofructokinase



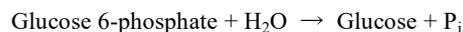
R11: Aldolase



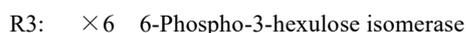
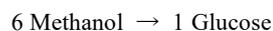
R12: Triose phosphate isomerase



R13: Glucose-6-phosphatase



反応の書き方を R4 を例に説明すると、“R4”の行の“Transketolase, reverse”は R4 の説明である。“R4”の行の次の行から“R5”の行の前の行までは R4 を定義する反応式である。R1 から R13 の反応を下記の回数行えば currency metabolite 以外の代謝産物について次のような化学量論的収支が得られる。



- R4: ×2 Transketolase, reverse
R5: ×2 Transaldolase, reverse
R6: ×2 Transketolase, reverse
R7: ×2 Ribose-5-phosphate ketoisomerase, reverse
R8: ×4 Ribulose-5-phosphate 3-epimerase, reverse
R9: ×1 Phosphohexose isomerase, reverse
R10: ×1 Phosphofructokinase
R11: ×1 Aldolase
R12: ×1 Triose phosphate isomerase
R13: ×1 Glucose-6-phosphatase

上述の化学量論的収支を得るよう反応が進行するためには R10 で 1 分子の ATP が必要であるが、その ATP 生成に必要な還元等量は R1 により充分量供給される。このことから、反応 R1 から R13 がメタノールからのグルコース生成に貢献する可能性が大きいと判断し、反応 R1 から R13 のみからなる、モデルネットワークのサブネットワークで isotopomer tracing を行った。最初に与える列ベクトル source は、モデルネットワークでの isotopomer tracing の際に与えた source と同じものを用いた。このサブネットワークの CM と ICM の行数はそれぞれ 79 と 3594 であった。

Isotopomer tracing を行った結果、692 の成分を持つ source が得られた。Isotopomer tracing の Matlab での計算には 3 秒を、GNU Octave での計算には 26 秒を要した (Intel(R) Core(TM) i5-3320M CPU @ 2.60GHz)。Isotopomer tracing 後の source の成分の値の種類を数えると 600 であり、それらには、Glucose, Glucose 6-phosphate, Fructose 6-phosphate, Fructose 1,6-bisphosphate, Glyceraldehyde 3-phosphate, Dihydroxyacetone phosphate, Ribulose 5-phosphate, Ribose 5-phosphate, Sedoheptulose 7-phosphate, Erythrose 4-phosphate, Xylulose 5-phosphate, Formaldehyde, 3-Hexulose 6-phosphate (R1 から R13 の反応に現れるメタノール以外の代謝産物) のすべての isotopomer が含まれていた。この結果は、通常の糖質代謝の反応に R1 から R3 の反応が加われば、メタノールのみを炭素源としてグルコースが合成され得ることを示している。

4. 結論

開発した手法の前半部分 isotopomer tracing の概要を説明し、それが実際に行い得る手法であることを示した。Isotopomer tracing は“生体内の有機化合物が何を原料として作られるか、また、何からは作られないか”という問題に答えを与える、すなわち、生物が生育するのに必要な物質群に関する情報を与える有力な手法である。開発した手法の後半部分“経路の例示”については別に報告する。

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. 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 ¹³C 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. 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
- [10] Ohta, J. Single-atom tracing in a model network of carbohydrate metabolism and pathway selection. *IPSJ Transactions on Bioinformatics* **2018**, *11*, 1–13.
- [11] 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.
- [12] Schmidt, K., Carlsen, M., Nielsen, J., and Villadsen, J. Modeling isotopomer distributions in biochemical networks using isotopomer mapping matrices. *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *55*, 831–840.