

## 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 浩一 †‡ 倉田 博之 †

† 九州工業大学 情報工学研究科 ‡ 日本学術振興会 特別研究員

### 要旨

大腸菌の窒素同化システムにおいて、シミュレーションにより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あることがわかった。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 †‡ Hiroyuki KURATA †

† Graduate School of Computer Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology

‡ Research Fellow of the Japan Society for the Promotion of Science

### Abstract

Computer simulation predicted that the nitrogen assimilation system shows hysteresis with respect to the change in ammonia concentration in environment. To theoretically elucidate the mechanism of how hysteresis is generated, we reduced the dynamic model to the simple model with the third-order equations. Theoretical analysis of the simple model shows that the positive feedback control is responsible for hysteresis. The system has two steady-state solutions for the ammonia concentration within specific ranges. The range of an ammonia concentration 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多くのデータが得られるようになった。これらのデータ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北野らによりシステムバイオロジーが提案された[1]。現段階でのシステムバイオロジーの主要な目

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、そしてシミュレーションが重要な手段となる。だが、生命分子ネットワークはいくつものフィードバック制御が複雑に連動して成り立っており、一部の制御を取り出して、全体における性質を明らかにするのは難しい。しかし、特定の制御

構造における特性を解明することができれば、別の生命分子ネットワーク上に似たような制御構造を認めた際、その特性を予測することが可能となる。そのためには生命分子ネットワークに見られる制御構造の理論解析が必要となる。

我々は先行研究として大腸菌の窒素同化システムについての詳細なモデリング(Fig1)と動的シミュレーションを行ってきた。シミュレーションにより、システムがアンモニア濃度に対してヒステリシスを示すことが予測されている[2]。

本研究の目的は、大規模で複雑な窒素同化システムで予測された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及びグルタミン酸を合成するためにアンモニアが必須である。グルタミンとグルタミン酸は、グルタミン合成酵素(GS)、グルタミン酸合成酵素(GOGAT)、およびグルタミン酸脱水素酵素(GDH)を通して TCA 回路の中間代謝物である  $\alpha$  ケトグルタル酸にアンモニアを同化することで合成される。これらの酵素において中心的働きを担うのがグルタミン合成酵素(GS)である。システムは環境中のアンモニア濃度に変化した場合に、グルタミン合成酵素の活性や発現量を変化させることで、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) を一定に保つよう機能する[3]。

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。

この GS の発現は複数のプロモータにより調節されている。タンパク質 NR II、NRI はリン酸カスケード中にある。リン酸化した NRI (NRI-P) はプロモーター *glnAp2* に結合することで GS, NRI, NR II, GlnK, *nac* を転写誘導し[4]、これらの発現量を増大させる。すなわち、NRI が NRI 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。

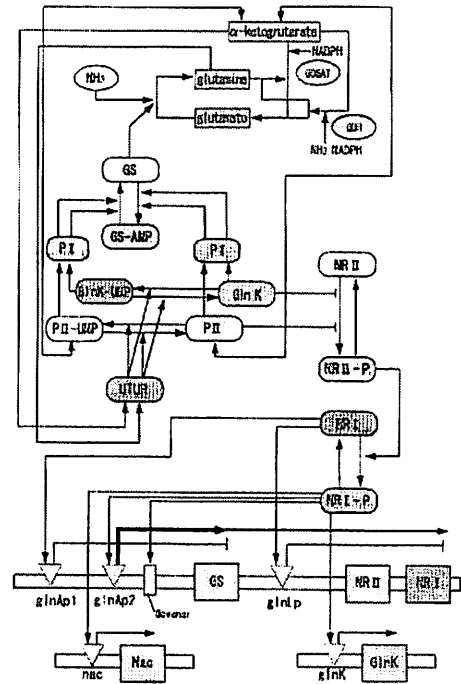


Fig1. 窒素同化システムモデル

## 3. シンプルモデルの作成

我々はシミュレーションにより予測されたヒステリシスは、GS 合成制御モジュール内のポジティブフィードバック (Fig2) に起因すると推測した。そこで、ポジティブフィードバック制御を持つシンプルな数学モデルを作成する。

Fig2は、NR は DNA と結合することで NR と全 GS (TGS) の合成を促進するプロモータとして働く。TGS は酵素として  $\text{NH}_3$  を同化し、glutamine を生産する。glutamine は PII と結合し、複合体 PII:glutamine を形成する。この PII:glutamine 複合体はさらに NR と結合することで、NR が DNA と結合し、GS と NR の合成を促進することを妨げる。

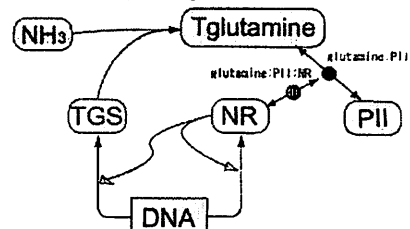


Fig2. GS 合成制御モジュールから抽出したポジティブフィードバック

Fig2 のネットワークをさらに簡略化することでシンプルモデルを作成した。まず、PII と glutamine の複合体 PII:glutamine 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、TGS と全 NR(TNR)の発現量は等しいため、数値的に TGS=TNR とした。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。

$$\frac{dTNR}{dt} = a + k_3 \cdot \frac{NR}{NR + K_m} - k_1 \cdot TNR = 0 \quad \dots(1)$$

$$\frac{dTglutamine}{dt} = k_4 \cdot NH_3 \cdot TNR - k_2 \cdot Tglutamine = 0 \quad \dots(2)$$

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

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

ここで、 $K$ はNR と glutamine の結合定数、 $a$  は TNR の基礎発現速度定数、 $K_m$ はNRのプロモータとの結合割合を定めるための定数、 $k_1$ はTNRの分解速度定数、 $k_2$ は全 glutamine (Tglutamine)の分解速度定数である。 $k_4$ 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対しては定常状態近似を用い、この(1)~(4)式を展開し、代入することにより、Tglutamine についての3次方程式:

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

を得た。この3次方程式はカルダノ法を用いて解いた。

#### 4. 結果

カルダノ法を用いて以下の条件 (Table1) で3次方程式の解を算出した。生命反応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。

Table1. 計算条件 1

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

変数  $NH_3$  に対する Tglutamine の定常解をプロットしたものを Fig3 に示した。変数  $NH_3$  の値が  $15.5 \sim 23.6 [nM]$  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崩れ、定常解が1つとなった。

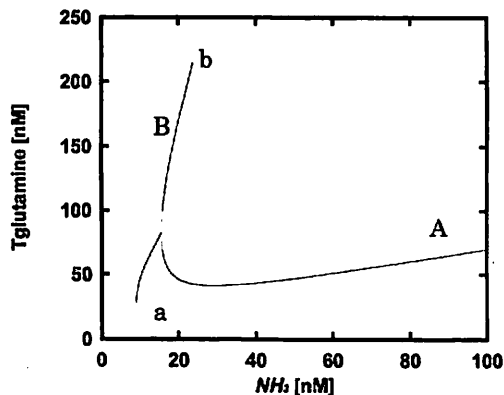


Fig3.  $NH_3$  に対する Tglutamine の定常解

具体的にはアンモニアが高濃度から低濃度へと移行する際にはシステムは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。

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 (Fig4)。条件は Table2 の通りである。 $K_m$  は NR とプロモータとの結合割合を示すパラメータであり、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。

Table2. 計算条件 2

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

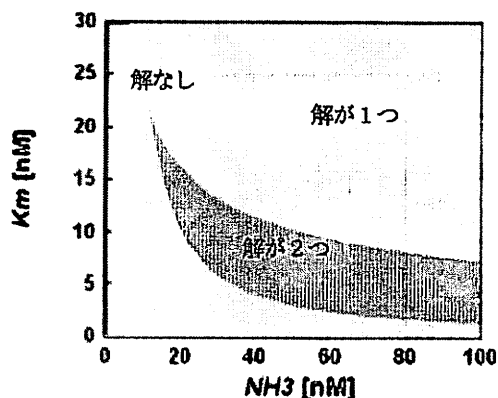


Fig4. 2次元パラメータ空間上での定常解の存在

これにより  $K_m$  が 20 [nM] 以上に大きくなり、ポジティブフィードバックの働きが弱まると、 $NH_3$  の値に関わらず定常解が 1 つしか存在しない状態となることが示された。すなわちシステムは  $NH_3$  濃度変化に対して可逆反応を示す。逆に  $K_m$  が 10 [nM] 以下に小さくなり、ポジティブフィードバックが強まると、広い範囲の  $NH_3$  濃度 (100 [nM] の状態でも) において 2 つの定常解をもつ状態が保持された。これは分化 (不可逆反応) を示唆している。また  $K_m$  が 10~25 [nM] の範囲

では、アンモニア濃度に変化に対して、定常解が 1 つの場合と定常解が 2 つの場合が存在しており、ヒステリシスを示している。

## 5. おわりに

本研究の理論解析により、ポジティブフィードバック制御がヒステリシスを引き起こすことが示された。また、パラメータの値によっては定常解を 2 つ保持し続けることも示された。これは分化の挙動を示している。すなわち、ポジティブフィードバックが生命の発生段階に分化スイッチとして働いている可能性も考えられる。他の生命システムネットワークにおいて同様の構造が認められれば、ヒステリシスや分化を予測できるであろう。

## 参考文献

- [1] H. Kitano.(2002)  
Computational Systems Biology,  
Nature, 420:206-210.
- [2] Kurata, H. Masaki, K. Sumida, Y. and Iwasaki, R. (2005)  
CADLIVE dynamic simulator: direct link of biochemical networks to dynamic models.  
Genome Res. 15, 590-600.
- [3] Ninfa, A., J. P. Jiang, et al. (2000)  
Integration of antagonistic signals in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*.  
Curr Top Cell Regul 36, 31-75.
- [4] Alexander J. Ninfa, Lawrence J. Reitzer, and Boris Magasanik. (1987)  
Initiation of Transcription at the Bacterial *glnAp2* Promoter by Purified *E. coli* Components Is Facilitated by Enhancers.  
Cell 50, 1039-1046.