

大腸菌アンモニア同化システムのダイナミックモデルの構築

前田 和勲^{1,a)} 倉田 博之^{1,2,b)}

概要: 大腸菌は、TCA 回路の中間代謝物である α -ケトグルタル酸にアンモニアを付加し、グルタミン酸とグルタミンを合成する。グルタミン酸とグルタミンから、その他のアミノ酸やヌクレオチドなどが合成される。このような理由から、大腸菌がどのようにアンモニアを同化し、グルタミン酸とグルタミンの供給を制御しているのか明らかにすることは重要である。我々は、代謝、タンパク質相互作用、遺伝子制御を含む、大腸菌アンモニア同化システムのダイナミックモデルを構築した。そして、動力学パラメータを遺伝的アルゴリズムで最適化した。このモデルは多くの実験データを再現できる。

1. はじめに

窒素は炭素と並んで生物にとって重要な元素である。大腸菌は環境中のアンモニアを取り込み、TCA 回路の中間代謝物である α -ケトグルタル酸に付加することで窒素の同化を行う。この反応によって合成されたグルタミン酸とグルタミンは、その他のアミノ酸やヌクレオチドの合成に利用される。従って、大腸菌がどのようにアンモニア同化を調整し、グルタミン酸とグルタミンの供給を維持しているのか明らかにすることは重要である。また、アミノ酸の効率的な発酵生産を実現する上でもアンモニア同化の制御機構を解明することが重要である。

我々と Bruggeman らはそれぞれ独立してアンモニア同化システムのダイナミックモデルを構築した。我々のモデルは、代謝、タンパク質相互作用、遺伝子制御を含む [3], [6]。主として制御構造を解析するために構築されたモデルであり、実験データを定性的に再現できる。多くの反応は質量作用則でモデリングされており、動力学パラメータの多くが推定値である。一方、Bruggeman らのモデルは、代謝とグルタミン合成酵素 (GS) 活性制御から成る [1]。反応機構の詳細が数式に反映されており、また、多くの動力学パラメータに測定値が使われている。しかし、遺伝子制御を含んでいないため、遺伝子発現の変化のない数分間のシミュレーションしか行うことができない。

本研究では、我々のモデルと Bruggeman らのモデルを統合し、遺伝子発現の変化を伴うシミュレーションを定量的に行えるモデルを構築する。まず、Bruggeman モデルに我々のモデルの遺伝子制御に関する部分を追加する。そして、Bruggeman モデルに由来する動力学パラメータを再調整した上で、新しく追加した遺伝子制御に関する動力学パラメータを推定する。

2. 方法

2.1 アンモニア同化システム

本稿で扱うアンモニア同化システムのネットワークマップを図 1 に示す。これは、NRI-NRII 2 コンポーネントシステムと遺伝子制御の部分 (図 1 左) を Bruggeman モデル (図 1 右) に追加したものである。アンモニア同化システムは、代謝、GS 活性制御、GS 合成制御の 3 つのモジュールに分割すると理解しやすい [6]。

2.1.1 代謝モジュール

代謝モジュールは図 1 の赤線で囲まれた部分である。アンモニア同化システムは、 α -ケトグルタル酸にアンモニアを付加してグルタミンの合成を行う。大腸菌のアンモニア同化反応にはグルタミン合成酵素 (GS)、グルタミン酸合成酵素 (GOGAT)、グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) の 3 つの酵素が関わる。

アンモニア同化経路は GDH 経路と GS/GOGAT 経路に分けられる。GDH 経路は主にアンモニアの豊富な条件下で働く。ATP を消費しないが、アンモニアとの親和性が低く ($K_m \approx 1\text{mM}$)、アンモニア低濃度時での触媒作用は極めて低い。一方、GS/GOGAT 経路は、アンモニア制限下で特に利用される。ATP を消費する代わりに、アンモニアとの親和性が高い ($K_m \approx 0.1\text{mM}$)。GS は大腸菌の窒素代謝の

¹ 九州工業大学大学院情報工学研究生命情報工学研究系
Department of Bioscience and Bioinformatics, Kyushu Institute of Technology, Fukuoka, Japan

² 九州工業大学バイオメディカルインフォマティクス研究開発センター
Biomedical Informatics R&D Center, Kyushu Institute of Technology, Fukuoka, Japan

a) h791008k@bio.kyutech.ac.jp

b) kurata@bio.kyutech.ac.jp

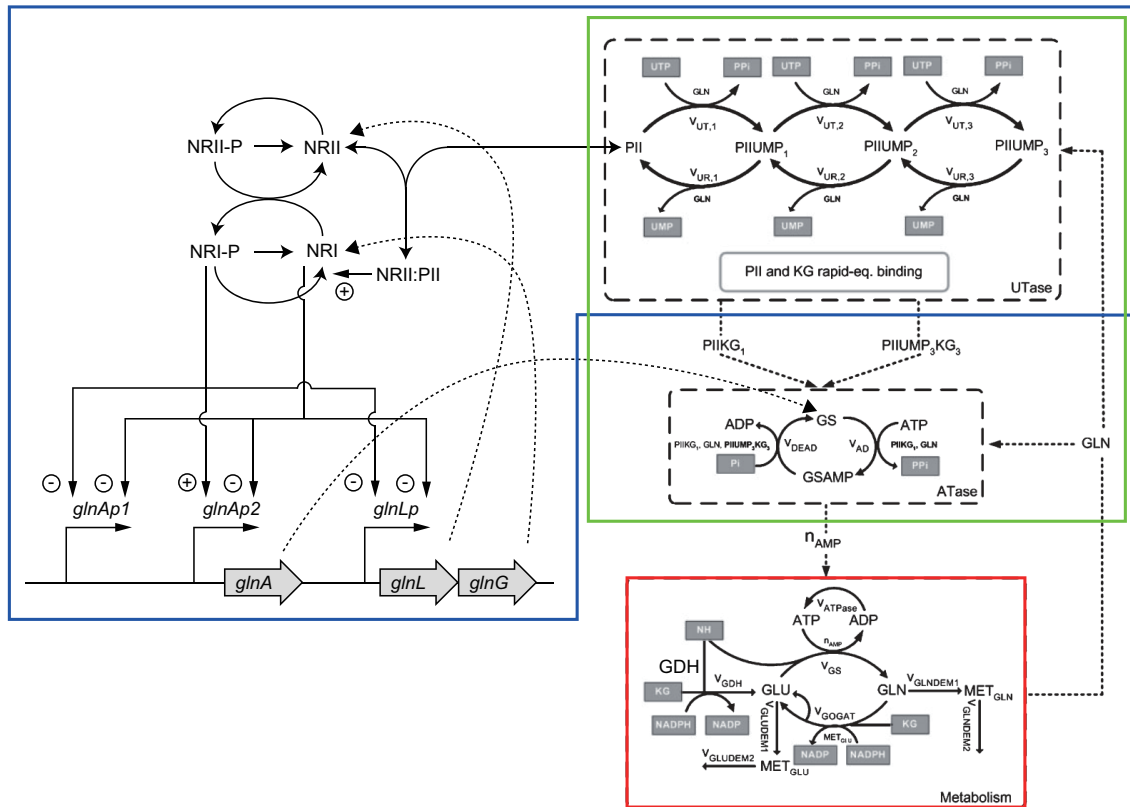


図 1 大腸菌アンモニア同化システムのネットワークマップ。左側は今回追加した NRI-NRII 2 コンポーネントシステムと遺伝子制御、右側は Bruggeman モデル [1]。赤で囲んだ部分は代謝モジュール、緑は GS 活性制御モジュール、青は GS 合成制御モジュール。

Fig. 1 Network map of the *E. coli* ammonia assimilation system. The left map shows NRI-NRII two-component system and gene regulations. The right shows Bruggeman model [1]. Metabolic module (red), GS activity control module (green), GS synthesis control module (blue).

中心であり、その活性と発現量は厳密に制御されている。

2.1.2 GS 活性制御モジュール

GS 活性制御モジュールは図 1 の緑線で囲まれた部分である。GS はアデニル化されると活性が低下する。GS のアデニル化の制御は ATase によって行われている。ATase はアデニル化と脱アデニル化の両方の活性を持つ。ATase にウリジリル化 PII が結合しているとき、ATase は脱アデニル化活性が優勢である。一方、PII がウリジリル化されていない場合、ATase はアデニル化活性が優勢である。PII のウリジリル化状態は UTase/UR によって制御されている。グルタミンは UTase/UR に結合し、PII のウリジリル化を阻害し、脱ウリジリル化活性を向上させる。以上をまとめると、グルタミンが増加すると GS 活性が低下、グルタミンが減少すると GS 活性が上昇することになる [7]。

2.1.3 GS 合成制御モジュール

GS 合成制御モジュールは図 1 の青線で囲まれた部分である。NRI と NRII は、原核生物によく見られるシグナル伝達システムである 2 コンポーネントシステムを構成す

る。ここでは、NRI がレスポンスレギュレーター、NRII がセンサーキナーゼである。NRII には自己リン酸化活性がある。NRII がリン酸化された後、そのリン酸基は NRI に転移される。リン酸化された NRI は *glnAp1* 上のエンハンサー配列に結合し、*glnAp2* からの転写を活性化する。NRI には自己脱リン酸化活性がある。また、NRII は脱リン酸化活性も持っており、PII と結合することで NRI を脱リン酸化する。

glnALG オペロンの構成を図 2 に示す。*glnA* は GS、*glnL* は NRII、*glnG* は NRI をコードしている。NRI 結合配列は、*glnAp1* 上に 2 つ、*glnLp* 上に 1 つ存在する。*glnA* と *glnLp* の間には転写終了配列がある。NRI が *glnAp1* 上の結合配列に結合すると *glnAp1* からの転写が抑制される。同様に *glnLp* 上の結合配列に結合すると *glnLp* からの転写が抑制される。一方、*glnAp1* 上の結合配列にリン酸化 NRI が結合すると *glnAp2* からの転写が活性化される。

glnAp1 と *glnLp* からの転写が σ^{70} 依存性であるのに対して、*glnAp2* からの転写は σ^{54} 依存性である。 σ^{54} 依存性の転写には ATP が必要である。低アンモニア条件下では、

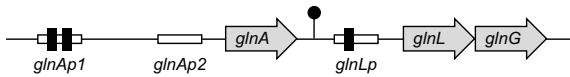


図 2 *glnALG* オペロンの構成. 黒の長方形は NRI 結合配列, 杖つきの円は転写終了配列.

Fig. 2 The structure of *glnALG* operon. Black rectangles indicate NRI-binding sites. Lollipop structure indicates a transcriptional terminator.

2つのリン酸化 NRI 二量体が *glnAp1* 上のエンハンサー領域に結合する. そして, DNA ループを形成し, *glnAp2* 上の RNA 合成酵素と相互作用する. NRI は ATP を加水分解して RNA 合成酵素を活性化, 転写が開始される [2].

2.2 数学モデル

図 1 に従って, 我々のモデルと Bruggeman モデルの数式を統合した結果, 31 変数, 157 定数から成る微分方程式が得られた. Bruggeman モデルに由来する, 代謝と GS 活性制御の部分は Michaelis-Menten 式で記述されている. 一方, 我々のモデルに由来する, NRI-NRII 2 コンポーネントシステムと遺伝子制御は質量作用則で記述されている.

2.3 最適化の目標とする挙動

最適化の目標とする実験データを表 1 に示す. 低アンモニア条件ではアンモニア濃度は $50 \mu\text{M}$, 高アンモニア条件では 5mM である. 表 1 において, J_N はアンモニア同化速度, J_{GS}/J_N はアンモニア同化に対する GS の寄与率, n_{AMP} は GS のアデニル化状態である. n_{AMP} は十二量体を構成する GS サブユニットのうち, アデニル化されたサブユニットの数で表され, 0 から 12 までの値をとる.

高アンモニア環境 (5mM) で生育する大腸菌は, 低アンモニア環境 ($50 \mu\text{M}$) に比較して 5 倍から 6 倍の速度で増殖する. 従って, 高アンモニア環境でのアンモニア同化速度 (J_N) は, 低アンモニア環境に比較して 5 倍から 6 倍であると考えられる. アンモニア同化は GS と GDH によって行われるので, これらの酵素の反応速度を足し合わせたものがアンモニア同化速度となる ($J_N = J_{GS} + J_{GDH}$). アンモニア制限下ではアンモニア同化はほぼ GS だけで行われる. アンモニアが豊富な条件では GDH が働くために GS の寄与率は 60%程度になる. GS は, アンモニア制限下ではアデニル化されておらず高い活性を示す. 一方, アンモニアが豊富な条件ではアデニル化されて低い活性を示す. 低アンモニア条件では, *glnAp2* からの転写が活発になるため GS, NRI, NRII が高い発現を示す. 一方, 高アンモニア条件では, *glnAp2* は不活性であり, 弱いプロモーターである *glnAp1* と *glnLp* が働く.

細胞内では, アンモニア濃度の変化に応じて α -ケトグルタル酸濃度, GDH と GOGAT の発現量も変化する. これを再現するために, シミュレーションではアンモニア濃

表 1 パラメータ最適化において目標とする挙動.

Table 1 The target behaviours used in parameter optimizations.

	N-limit	N-rich
J_N	10 mM/min	60 mM/min
J_{GS}/J_N	>0.9	0.6
n_{AMP}	2	10
GS	12 μM	2 μM
NRI	100 nM	<10 nM
NRII	100 nM	<10 nM
Glutamine	1 mM	10 mM
Glutamate	50-75 mM	100-150 mM

度とともに α -ケトグルタル酸濃度, GDH と GOGAT の最大反応速度も変化させる. α -ケトグルタル酸は, 低アンモニア条件で 10 mM, 高アンモニア条件で 0.5 mM である. GDH の最大反応速度は低アンモニア条件, 高アンモニア条件でそれぞれ 360 mM/min, 205 mM/min, 同様に, GOGAT の最大反応速度はそれぞれ 85 mM/min, 55 mM/min とする.

3. 結果と考察

3.1 動力学パラメータの推定

大規模なモデルのパラメータ推定を行う際にはモデルの分割が有効である [4], [5]. まず, Bruggeman モデル (図 1 右) に含まれるパラメータを推定し, 次に, 2 コンポーネントシステムと遺伝子制御に含まれるパラメータを推定した. 動力学パラメータの推定には遺伝的アルゴリズム (GA) を用いた. GA において, 1つのパラメータセットは1つの「個体」とみなされる. そして, 実験データとシミュレーションの差が小さくなるように動力学パラメータの値が最適化される. 本研究では, 交叉法に UNDX (Unimodal Normal Distribution Crossover)[8], 選択法に MGG (Minimal Generation Gap)[9]を採用した. 突然変異は行っていない.

Bruggeman モデルに含まれる動力学パラメータの多くに測定値が使われているので, これらの変更を最小限に抑えることを目指した. 次の手順で変更すべきパラメータの最小セットを同定し, その値を最適化した.

- (1) 全ての動力学パラメータを探索対象としてセットする.
- (2) 探索対象パラメータを独立した複数の GA で最適化する.
- (3) それぞれの GA で得られた最適解の i 番目のパラメータ p_i の値が, もとの Bruggeman モデルの p_i の値の近くに分布するならば, p_i を変更する必要がない. 従って, p_i をもとの値に固定し, 探索対象から外す.
- (4) 探索対象パラメータが減らせなかった場合には最適化を終了する. そうでない場合には (2) に戻る.

この手順を終えたとき, 残ったパラメータセットが実験データを再現するために変更すべき最小のパラメータセッ

トとなる。これを行った結果、Bruggeman モデルに含まれる 82 個のパラメータのうち、15 個のパラメータが変更すべきパラメータとして同定された。これらを変更することで (Bruggeman モデルに含まれていない NRI, NRII を除いて) 表 1 に示した挙動を再現することができた。変更した 15 個のパラメータのうち、7 つは Bruggeman モデルにおいても推定された値であるので、変更した測定値は 8 つだけである。

次に、Bruggeman モデル (図 1 右) に 2 コンポーネントシステムと遺伝子制御の部分 (図 1 左) を接続し、2 コンポーネントシステムと遺伝子制御に関する 29 個のパラメータを最適化した。最適化後のモデルの挙動を表 1 と比較できる形で表 2 に示した。アンモニア豊富条件下でのアンモニア同化速度 (J_N) は、アンモニア制限下に対して 3.4 倍である。これは 5-6 倍という実験データと比較して低い。アンモニア同化に対する GS の寄与率 (J_{GS}/J_N) と n_{AMP} に関しては概ね実験データを再現できた。また、GS, NRI, NRII の発現量に関する実験データを再現することができた。グルタミンとグルタミン酸の濃度は実験データよりも若干低いが、グルタミン酸濃度はグルタミン濃度の 10-20 倍以上という、一般的に知られている挙動は再現できた。

3.2 アンモニア濃度変化に対する応答の予測

最適化後のパラメータを使って、アンモニア濃度変化時のシステムの応答を予測した (図 3)。ここでは、 α -ケトグルタル酸濃度、GDH と GOGAT の最大反応速度も同時に変化させている。アンモニア濃度が 0.05 mM と 5 mM の場合が表 2 で示した値に対応している。

アンモニア濃度が上昇するとグルタミンとグルタミン酸の濃度が上昇する (図 3A)。これに伴って、PII が脱ウリジリル化される (図 3B)。脱ウリジリル化 PII は ATase のアデニル化活性を向上させるので、GS がアデニル化されて n_{AMP} が上昇する (図 3C)。一方、脱ウリジリル化 PII は NRI-NRII 2 コンポーネントシステムのリン酸化を阻害し、GS, NRI, NRII の発現量が低下する (図 3DE)。アンモニア濃度が上昇するに従って、GS と GDH の反応速度は増加する (図 3F)。つまり、アンモニア同化速度は増加する (図 3G)。GDH の方が増加率が大きいので、アンモニア同化速度に対する GS の寄与率 (J_{GS}/J_N) は低下する (図 3H)。図 3F に見られる GOGAT の反応速度の低下は生成物であるグルタミン酸の蓄積に起因すると考えられる。

アンモニア濃度が 0.5 mM 以上では n_{AMP} と GS 発現量に変化がないので、見かけの最大反応速度 ($V_{MAX,GS}^{APP}$) は変化しない (図 3CD)。アンモニア濃度 0.5 mM 以上における GS の反応速度の変化はアンモニア濃度の増加によるものである。このように、GS 制御機構が働く範囲はアンモニア濃度 0.5 mM 以下であると予想された。アンモニア

表 2 パラメータ最適化後のシミュレーション結果。

Table 2 Simulation results after parameter optimizations.

	N-limit	N-rich
J_N	14.9 mM/min	50.0 mM/min
J_{GS}/J_N	0.900	0.503
n_{AMP}	2.06	9.50
GS	11.5 μ M	1.97 μ M
NRI	85.1 nM	9.16 nM
NRII	87.0 nM	9.36 nM
Glutamine	0.500 mM	5.42 mM
Glutamate	9.81 mM	54.3 mM

濃度変化に対する定常状態の応答を見る限り、GS のアデニル化制御と発現制御の間に機能上の大差はない。2 つの制御は両方ともアンモニア濃度 0.5 mM 以下で働き、GS 活性を 5 倍程度変化させることができる。

4. おわりに

本研究では、様々な実験データを再現できる、新しいアンモニア同化システムのダイナミックモデルを構築した。まず、Bruggeman モデルに我々のモデルの 2 コンポーネントシステムと遺伝子制御を統合した。そして、Bruggeman モデルの変更を最小限に抑えて、実験データを再現できるように動力学パラメータを推定した。最後に、アンモニア濃度変化時のシステムの応答をシミュレーションした。我々のモデルでは、GS 制御機構はアンモニア濃度が 0.5 mM 以下のときに働き、それ以上の濃度では GS の活性と発現量は最低値をとったまま変化しない。今後は、この予測を実験によって検証したい。

アンモニア同化システムは、アデニル化状態の制御と発現量の制御という 2 つの方法で GS を制御している。アンモニア濃度変化に対する定常状態の応答を見る限り、この 2 つの制御に大きな違いはない。アデニル化による GS 活性の制御は、発現量の制御よりも応答速度が速いと考えられる。今後はアンモニア濃度変化に対する過渡応答を解析し、2 つの制御の役割の違いを明らかにする。

現在のモデルでは、細胞内アンモニア濃度をシステムへの入力として与えている。しかし、実際の大腸菌では、アンモニアトランスポーター AmtB が環境中のアンモニアを取り込んでおり、AmtB の発現は NRI に制御されている。このように、アンモニア同化システムとアンモニアの取り込みは協調的に働いている。現在のモデルは AmtB を含んでいないので、AmtB が発現するアンモニア濃度 50 μ M 以下の場合のシミュレーションを行うことができない。アンモニアの輸送とアンモニア同化システムが協調する機構を明らかにするために、今後は AmtB をモデルに組み込む予定である。

謝辞 We thank Dr. Hans V. Westerhoff, Dr. Fred C. Boogerd, Dr. Frank J. Bruggeman and Dr. Ettore Mura-

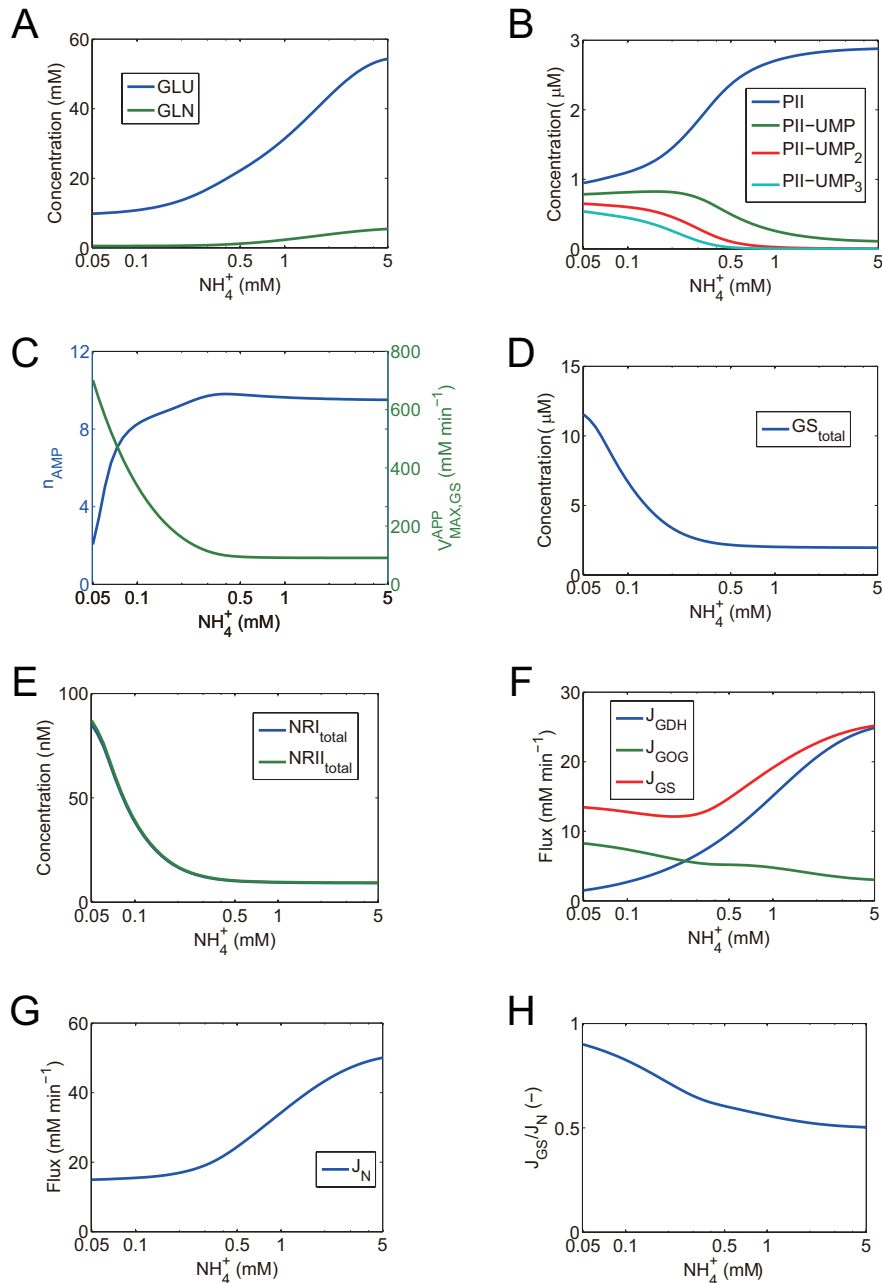


図 3 モデルから予測された、アンモニア濃度変化時のシステムの応答。
Fig. 3 Predicted steady-state characteristics as function of the ammonia concentration.

bito for constructive discussions.

参考文献

- [1] Bruggeman, F.J., Boogerd, F.C. and Westerhoff, H.V.: The multifarious short-term regulation of ammonium assimilation of *Escherichia coli*: dissection using an in silico replica, *FEBS J*, Vol.272, No.8, pp.1965-1985 (2005).
- [2] Heeswijk, W.C.: The glutamine synthetase adenylylation cascade: A search for its control and regulation, Thesis (1998).
- [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, No.4, pp.590-600 (2005).
- [4] Maeda, K., Fukano, Y., Yamamichi, S., Nitta, S. and Kurata, H.: An integrative and practical evolutionary optimization for a complex, dynamic model of biological networks, *Bioproc Biosyst Eng*, Vol.34, No.4, pp.433-446 (2011).
- [5] Maeda, K., Minamida, H., Yoshida, K. and Kurata, H.: Flux module decomposition for parameter estimation in a multiple-feedback loop model of biochemical networks, *Bioproc Biosyst Eng*, in press
- [6] Masaki, K., Maeda, K. and Kurata, H.: Biological Design Principles of Complex Feedback Modules in the *E. coli* Ammonia Assimilation System, *Artif Life*, Vol.18, No.1, pp.53-90 (2012).
- [7] Ninfa, A.J., Jiang, P., Atkinson, M.R. and Peliska, J.A.: Integration of antagonistic signals in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*, *Curr Top Cell Regul*, Vol.36, pp.31-75 (2000).

- [8] Ono, I. and Kobayashi, S.: A real-coded genetic algorithm for function optimization using unimodal distribution crossover, Proc. 7th Int Conf on Genetic Algorithms, pp.246-253 (1997).
- [9] Satoh, H., Yamamura, M. and Kobayashi, S.: Minimal generation gap model for GAs considering both exploration and exploitation, Proc of Int Conf on Fuzzy Logic, Neural Networks and Soft Computing, pp.494-497 (1997).