

細菌細胞のコンピュータシミュレーション

●富田 勝^{1),2)} ◆曾我 朋義^{1),2)} ◆金井 昭夫^{1),2)}

1) 慶應義塾大学 環境情報学部 2) 同・先端生命科学研究所

〈研究の目的と進め方〉

我々はこれまで細胞内の代謝全体をコンピュータシミュレーションすることを究極的な目的に据えてE-CELLプロジェクトを発足、推進してきた。本研究では大腸菌の代謝に焦点を絞り、代謝物質の定量的なデータを自前で包括的に取得すると共に、大腸菌の具体的な代謝データに基づいた大腸菌代謝のシミュレーションモデル（プロトタイプ）をE-CELL上に構築することを目的とした。まず、大腸菌の代謝物質の網羅的な解析（メタボローム解析）による代謝物質の同定と定量、未知遺伝子産物を含めた代謝を担う酵素群の特定、及び、これらの代謝物質の流速分布などの実験データを取得する。これと並行する形でバイオインフォマティクスを駆使して、ゲノムデータから代謝経路の予測をするソフトウェアを作り上げると共に、ハイブリッドアルゴリズムを用いたシミュレーション環境の整備をはかる。最終的にこれらを統合する形で、実験データに根ざした大腸菌のシミュレーションモデルを完成させることを目的とした。

〈研究開始時の研究計画〉

研究開始当初もメタボローム解析に基づいた大腸菌の代謝システムを構築することを目的に据えていた。このため、大腸菌の代謝物質の網羅的な解析（CE-MSシステムによるメタボローム解析）による代謝物質の同定と定量、未知遺伝子産物を含めた代謝を担う酵素群の特定、及び、これらの代謝物質の流速分布などの実験データを取得する。また、コンピュータを駆使して、ゲノムデータから代謝経路の予測をするソフトウェアを作り上げると共に、ハイブリッドアルゴリズムを用いたシミュレーション環境の整備をはかり、実験データに根ざした大腸菌のシミュレーションモデルの完成を目指した。

〈研究期間の成果〉

(I) メタボローム解析の成果

1. メタノールを用いて瞬時に酵素を失活させ、微生物、植物、動物細胞から存在する代謝物質を網羅的に抽出するそれぞれの方法を開発した。この技術により、大腸菌、枯草菌、イネ、藍藻、赤血球、動物培養等の細胞中の代謝産物の抽出を可能にした(論文1)。
2. キャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) 法を用いて、3種類の分析条件で、陽イオン性、陰イオン性代謝物質およびヌクレオチド類を一斉に測定、定量する方法を確立した。この方法により1細胞内に2万分子以上（約10-21 mol）存在する代謝物の測定が可能になり、枯草菌から約1700種類の代謝物質を検出した。また、イネの葉中の88成分の主要代謝物質の24時間の代謝物質の動的な濃度変化をモニターした(論文1)。
3. キャピラリー電気泳動-タンデム質量分析法 (CE-MS/MS)、一飛行時間質量分析法 (CE-TOF-MS)、一イオントラップ質量分析法 (CE-ITMS) を開発した(論文9)。
4. 開発した3種類のキャピラリー電気泳動-質量分析法

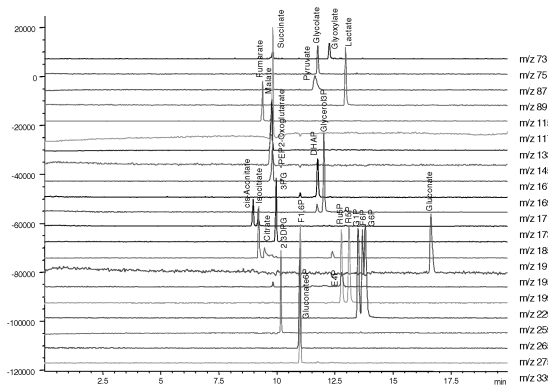
を用いて標準物質のMSスペクトルを測定し、それらを集めたスペクトルデータベースを構築した（さらにデータを蓄積する必要あり）。

5. 人工知能技術Artificial Neural Networkを用いて、化合物の構造式からCEの泳動時間を推定する方法を開発した。このソフトウェアを用いることで、CE-MSによる代謝物質の分析結果を自動的に判断し、物質毎に分類、定量していくことが可能になった(論文13)。
6. 大腸菌の組換え体蛋白質を用いた試験管内酵素反応系の確立とこの系を用いた代謝物質の変動解析を行なった。特に、解糖系を中心に主たる代謝酵素の組換え体蛋白質の産生、精製および試験管内反応系の構築を行い。各酵素のKm値、Vmax値などをはじめとしたキネティックパラメータの取得を行なった。さらに複数の酵素を用いて、その代謝物質の変動を時系列でCE-MSにて解析することにより、“In vitro解糖系”の開発にも成功した(論文10)。



図1 キャピラリー電気泳動-質量分析計(CE-MS)。大腸菌の代謝

Anionic Metabolite Standard (100 μM each)



T. Soga et al. Anal. Chem. 74, 2233-2239 (2002)

図2 キャピラリー電気泳動-質量分析計(CE-MS)を用いた網羅的な代謝物質の解析例

(II) 細胞シミュレーションの成果

1. シミュレーションのプラットフォームとなるE-CELLの

環境を整えた(論文2-5、7)。

2. 大規模モデル化のために各種のデータベースを参照しながら基本的なモデルを自動生成するGEMシステムや、システムバイオロジーにおける複雑なオミクスデータをその代謝経路において可視化できるツールを開発した(論文6、12)。
3. ハイブリッドアルゴリズムを用いた大規模な代謝シミュレーション解析法を考案した(論文11)。
4. 上記のGEMシステム並びに公共のデータベースによる既知情報、試験管内で取得した酵素のキネティクス等を用いて、190反応(153反応、212代謝物質)からなる代謝大規模モデルのプロトタイプをE-CELL上に構築した。このモデルに含まれる代謝経路は解糖系、TCA回路、電子伝達系、ペントースリン酸回路、プリン・ピリミジン生合成系などであり、基本的な代謝経路は構築できた(論文8、モデルは発表準備中)。

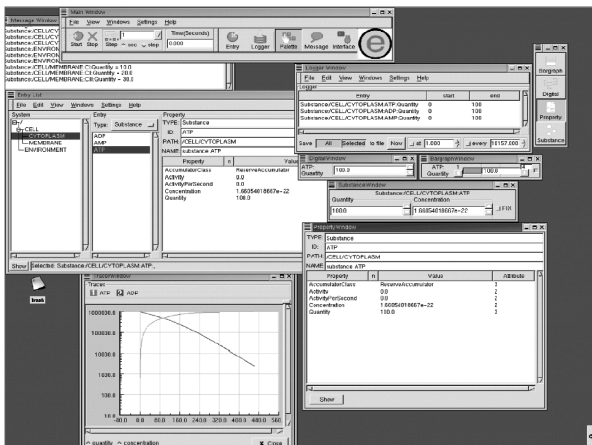


図3 E-CELL上に構築した大腸菌の代謝モデル

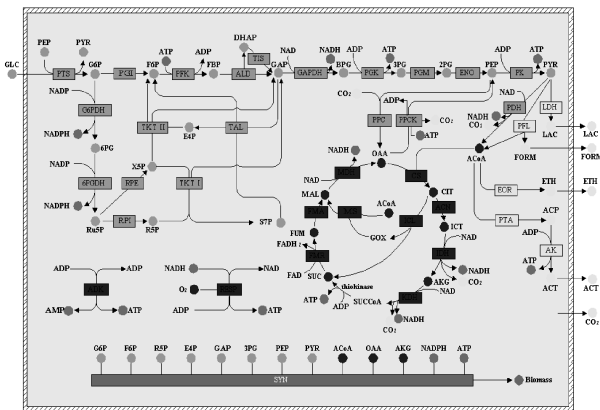


図4 モデルの作成に用いた大腸菌の代謝経路 (一部)

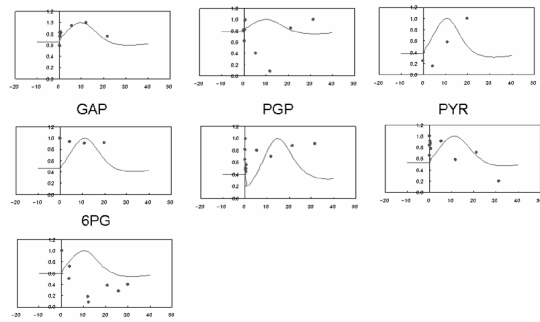


図5 E-CELL上で大腸菌の糖の代謝変動をシミュレーションした例

<国内外での成果の位置づけ>

本研究のように、網羅的に細菌内の代謝物質の動態を解明して、それを基軸にコンピュータシミュレーションをしていくというプロジェクトは国内において、知る限り、我々のグループのみがこれを推進する状況にある。これは世界的に見ても先端的な位置にいと云うことが出来る。しかしながら、最近では欧米を中心に細胞シミュレーションの重要性が認知されて来た。特に、米国エネルギー省や米国国立衛生研究所 (NIH)、カナダの大学のグループなどが各々に細胞モデリングのプロジェクトを立ち上げている。

メタボロームに関しては、代謝物質解析に関するハードウェア、ソフトウェアの両面において、当研究機関は世界をリードしていく状況にある。また、第一回の国際メタボローム会議を2005年初夏に山形県鶴岡市の先端生命科学研究所で開催し、日本国内のみならず、世界的な規模で啓蒙や教育、研究活動に従事した。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

代謝物質の分析時に検出されたピークを特定するためには標準物質の測定が必須になる。研究開始当初は市販の化学物質を利用すれば大腸菌における主要なメタボライトは同定できるものと判断していた。これまで、我々は市販の化学物質を約1,500種類購入し、そのうちの半分までのピークの同定を終えている。しかし、大腸菌などの生体材料を用いた場合は市販されていない、あるいはこれまで知られていないような多数の標準物質が必要になることが、我々の研究より明らかとなって来た。大腸菌サンプルに関しては、2004年の初めの段階で、約260ピークの同定が可能になったばかりである。そこで、同年の後半より、標準物質ばかりでなく、CE-MS/MSやCE-TOF/MSによる構造解析システムを活用して未知ピークの同定についても研究を進めることになった。

<今後の課題>

- 1) 機能未知酵素の機能同定については、分析時に大腸菌代謝物質の未知ピークが現在でも数多くある状態なので、任意の酵素による変動を追跡していくに及ばず、当初考えていたよりもその進展が遅れている。
 - 2) また、CE/MS解析時の標準物質に関しても、生体内で半減期が短いものや、不安定な物質に関しては、その同定を困難にしている。
- これらは、今後の重要課題である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

- (1) 0403262052
Soga, T., Ohashi, Y., Ueno, Y., Naraoka, H., Tomita, M. and Nishioka, T. Quantitative Metabolome Analysis Using CE-MS. *Journal of Proteome Research*, 2: 488-494 (2003)
- (2) 0403262056
Takahashi, K., Ishikawa, N., Sadamoto, Y., Sasamoto, H., Ohta, S., Shiozawa, A., Miyoshi, F., Naito, Y., Nakayama, Y., Tomita M. E-CELL2: Multi-platform E-CELL Simulation System. *Bioinformatics*, 19(13) 1727-1729 (2003)
- (3) 0403262045
Kikuchi, S. Fujimoto, K., Kitagawa, N. Fuchikawa, T. Abe, M. Oka, K. Takei, K. and Tomita, M. Kinetic simulation of signal transduction system in hippocampal long-term potentiation with dynamic modeling of protein phosphatase 2A. *Neural Networks*, 16(9):1389-1398 (2003)
- (4) 0403262102
Kikuchi, S., Tominaga, D., Arita, M. Takahashi, K. and Tomita, M. Dynamic modeling of genetic networks using genetic algorithm and S-system. *Bioinformatics*, 19(5):643-650 (2003)
- (5) 0403262105
M. Hucka, A. Finney, H. M. Sauro, H. Bolouri, J. C. Doyle, H. Kitano, A. P. Arkin, B. J. Bornstein, D. Bray, A. Cornish-Bowden et al. The Systems Biology Markup Language (SBML): A Medium for Representation and Exchange of Biochemical Network Models. *Bioinformatics*, 19(4): 524-531 (2003)
- (6) 0403262109
Arakawa, K., Mori, K., Ikeda, K., Matsuzaki, T., Kobayashi, Y., and Tomita, M. G-language Genome Analysis Environment: a workbench for nucleotide sequence data mining. *Bioinformatics*, 19:305-306 (2003).
- (7) 0403262035
Takahashi, K., Kaizu, K., Bin, H., Tomita, M. A multi-algorithm, multi-timescale method for cell simulation. *Bioinformatics*, 20(4): 538-546 (2004)
- (8) 0601231257
Ishii N., Robert M., Nakayama Y., Kanai A. and Tomita M. Toward large-scale modeling of the microbial cell for computer simulation. *Journal of Biotechnology* 113:1-3 281-294 (2004)
- (9) 0601231301
Soga T., Kakazu Y., Robert M., Tomita M. and Nishioka T. Qualitative and quantitative analysis of amino acids by capillary electrophoresis electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Electrophoresis* 25:1964-1972 (2004)
- (10) 0601231307
Itoh A., Ohashi Y., Soga T., Mori H., Nishioka T. and Tomita M. Application of capillary electrophoresis-mass spectrometry to synthetic in vitro glycolysis studies. *Electrophoresis* 25:1996-2002 (2004)
- (11) 0601231213
Yugi, K., Nakayama, Y., Kinoshita, A., and Tomita, M. Hybrid dynamic/static method for large-scale simulation of metabolism *Theoretical Biology and Medical*

- Modeling 2:42 (2005)
(12) 0601231216
Arakawa, K., Kono, N., Yamada, Y. and Tomita, M. KEGG-based pathway visualization tool for complex omics data *In Silico Biology* 5:0039 (2005)
- (13) 0601231220
Sugimoto M., Kikuchi S., Arita M., Soga T., Nishioka T. and Tomita M. Large-scale prediction of cationic metabolites identity and migration time in capillary electrophoresis mass spectrometry using artificial neural networks. *Analytical Chemistry* 77:1 78-84 (2005)
- 2) データベース/ソフトウェア
システムバイオロジーにおける複雑なオミクスデータをその代謝経路において可視化できるツールを開発した。 <http://www.g-language.org/data/marray/>
- 3) 特許など
曾我朋義, 「陰イオン性化合物の分離分析方法及び装置」特許第3341765号、2002
- 4) その他顕著なもの
以上の成果が評価されて、米国IBM本社から Shared University Research (SUR) Award (2003年11月)を受賞した。また、メタボローム解析技術については2003年7月に第17回先端科学技術大賞(日本工業新聞社賞)を受賞し、これらの技術をもとにベンチャー企業(ヒューマン・メタボローム・テクノロジー社)を設立した。

謝辞

本研究は慶應義塾大学先端生命科学研究所の中山洋一氏、荒川和晴氏及び石井伸佳氏らを中心メンバーとして遂行された。