

分子ネットワークのコンピュータ支援設計法の開発とグルコース同化システムへの応用

●倉田 博之

九州工業大学大学院情報工学研究院

<研究の目的と進め方>

システム生物学は、細胞を多数の遺伝子の複雑な相互作用からなる分子ネットワークととらえて、さまざまな細胞機能をうみだす分子レベルのメカニズムを解明することを目指している。分子ネットワークの同定と数学的モデルの構築、シミュレーションによるシステム解析、解析結果にもとづくシステム制御とシステム設計の各段階がある。遺伝子レベルから設計した生命システムの予測が実際の実験結果と一致すれば、生命の完全な理解に近づいたといえる。真に生命システムを理解しているのであれば、生命システムを遺伝子レベルから合成できる。

我々は、「バイオアルゴリズム（生命設計原理）に基づく生命設計学」(<http://www.cadlive.jp>)を目標にして、数理モデルに基づいて細胞の分子ネットワークの構造とそれが生み出す機能の本質的關係（設計原理）を解明し、それに基づいて分子ネットワークを設計する方法論の開発を行っている。生命設計支援システム Computer-Aided Design of LIVING systEms (CADLIVE)を開発した。また、ロバストネスを生み出す複雑な制御構造の解明するために、シミュレーションや理論による予測を実験によって検証している。このように、設計という観点から、理論、シミュレーション、実験の研究スタイルの確立を目指している。

本研究では、有用物質を合成する微生物を育種するための細胞設計の基本的戦略を提案し、それを実際の生物システム設計に応用する。ここでは、有用物質生産の代表的な宿主である大腸菌のグルコース同化システム (glucose Phosphotransferase System = glucose PTS)に着目する。大腸菌のグルコース同化能力を向上させるために、数学モデリング、シミュレーション、システム解析に基づいて合理的遺伝子組み換え戦略を提案し、その戦略の正当性を実験によって証明する

<2008年度の研究の当初計画>

モデリング、シミュレーション、システム解析に基づいて、グルコース同化システムを遺伝子レベルから設計するための合理的戦略を計画し、計算機による予測を生物実験によって証明する。設計戦略は、(1) ネットワーク同定と動的モデルの構築、(2) 工学のアナロジーによるネットワークのモジュール分解とシステム解析、(3) 摂動解析による標的遺伝子の探索、(4) 生物実験による設計戦略の証明からなる。詳細なフローチャートを図1に示す。モジュール分解では、制御工学のアナロジーに基づいてネットワークを階層的モジュールに分解することによって、制御メカニズムと細胞機能の関係を理解する。人工物回路と類似の考え方で、分子ネットワークの構造と機能の関係を理解できる。正と負のフィードバックループやフィードフォワードループ、それらの組み合わせさせた制御構造の同定が重要になる。次にグルコース同化速度を向上させる遺伝子組換え戦略（複数遺伝子の同時制御）を立

案するために、遺伝子発現に対する摂動解析をコンピュータ上で行う。個々の遺伝子、あるいは複数の遺伝子に対してノックアウトや過剰発現したダイナミックモデルを構築し、グルコース同化速度の変化をシミュレーションする。グルコース同化を最大化する遺伝子組換え戦略を計画して、実際の大腸菌を用いた実験によって検証する。生物実験と予測が一致しないときは、再度ネットワーク設計を行う。計算機モデリングと生物実験のプロセスを繰り返しながら、合理的細胞設計技術を提案する

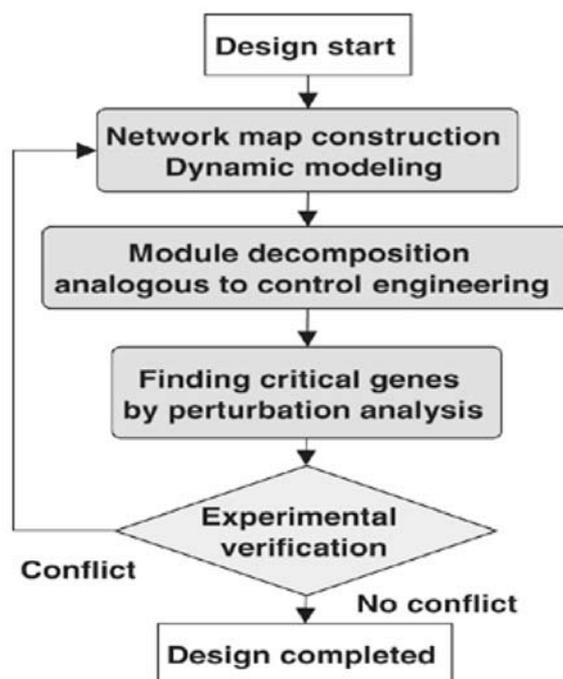


図1 細胞の合理的設計戦略

<2008年度の成果>

我々が開発したCADLIVE(Computer-Aided Design of LIVING systEms)を用いて、グルコース同化システムの分子ネットワークマップ(図2)を作成して、数学モデルを構築した。コンピュータシミュレーションを用いて摂動解析を行って、グルコース同化システムにおけるグルコース取り込み速度を向上させるために必要な遺伝子ノックアウトと戦略を立てた。mlc 遺伝子のノックアウト、ptsI 遺伝子の過剰発現が取り込み速度向上に効果のあることが示されたので、実験を用いて検証した。

コンピュータシミュレーションの予測どおり、グルコース取り込み速度は向上したが、増殖が抑制される傾向が見られた。

本研究の一部は味の素株式会社と共同で行った。

参考文献

Yousuke Nishio, Yoshihiro Usuda, Kazuhiko Matsui, Hiroyuki

Kurata, Computer-aided rational design of the phosphotransferase system for enhanced glucose uptake in *Escherichia coli*, *Mol Syst Biol*, 4:160, 2008

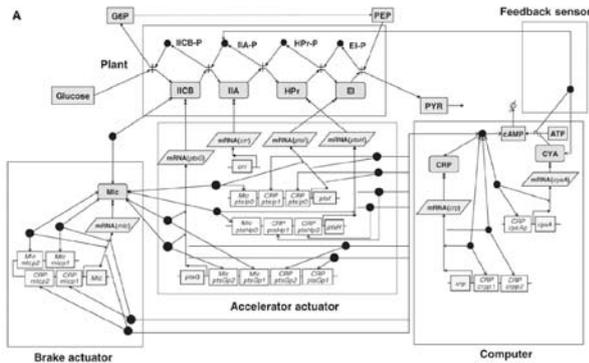


図2 大腸菌グルコース同化システムマップ

<国内外での成果の位置づけ>

工学ではCAD (Computer-Aided Design) がシステムの基本的設計手段となっているが、生命においては、CADの開発はまだ端緒についたばかりである。CADの要素技術であるネットワーク回路図作成、シミュレーション、システム解析などは個別に研究されているが、全体を統一するような細胞設計のフレームワークはない。本研究では、生命版CADを目指して、コンピュータ上のネットワーク構築から細胞の遺伝子組換え実験までの普遍的な方法論を提案する。モデリング、シミュレーション、システム解析がシステム生物学・生命設計学の重要な手法であることを証明することは新しい試みである。

物質生産の原料であるグルコースの同化速度を向上させることは、有用物質 (有機酸、アミノ酸、ヌクレオチド系代謝物など) の生産速度を向上につながる。しかし、突然変異株のスクリーニングによって高生産株を探索する従来法による生産性の向上はほぼ飽和に近づいている (Ikeda M, *Adv Biochem Eng Biotechnol* 79: 1-35, 2003. Wendisch VF, Bott M, Eikmanns BJ, *Curr Opin Microbiol* 9: 268-274, 2006)。一方で、理論モデル計算ではさらに生産速度の向上が期待される。このような理論と実際のギャップを埋めるために、数理モデルに基づく合理的設計が必要である。有用物質生産システムの合理的設計方法の開発は、システム生物学におけるブレークスルーとなると同時に、合成された微生物株は工業的に利用できる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

2008年度の計画は順調に進んだ。予想外のこととして、細胞増殖が抑制されたことである。その原因として、細胞内グルコースリン酸の増加などが考えられる。

<今後の課題>

遺伝子組換え細胞において、cAMPの濃度は、細胞内の増殖環境を知るための指標となるので、cAMP濃度測定を行う。また、上記に述べたが、増殖が抑制される原因について究明する。

グルコース同化システムは、多重のフィードバックループを含む複雑な反応経路からなっているが、各反応の機能を制御の観点から考察することが必要である。それらの反応群は、グルコース

同化システムをより安定かつロバストにするために使われているのかどうかを調べる。

近年、ネットワークモチーフというアイデアが提案されている。ネットワークモチーフは、フィードフォワードループ、単入力モジュール、自己フィードバックループ等がある。そのネットワーク構造と機能の関係は明確に定義されつつある。グルコース同化システムにもそのようなモチーフ構造が多々見られることから、各ネットワーク構造の機能を解明して、それらが組み合わさってどのような機能が生成するのかについて考察する。それによって、グルコース同化システムの複雑な反応が、どのようにして、必要な細胞機能を生み出すのかについて解明する。そのような細胞の設計原理を理解することによって、さらに効果的な細胞設計が可能となるであろう。

<成果公表リスト>

(1) 0901061748

Kazuhiro Maeda, Hiroyuki Kurata, Two-phase search (TPS) method: Nonbiased and high-speed parameter search for dynamic models of biochemical networks, *IPSI Transactions on Bioinformatics*, in press