

九州工業大学大学院情報工学研究科

博士学位論文

大腸菌の窒素同化システムの
システムバイオロジー

平成 24 年 3 月

眞崎 浩一

目次

1. 序章	1
1.1. 研究背景	1
1.2. 研究目的	3
2. 理論	5
2.1. 窒素同化システム	5
2.1.1. アンモニア同化経路	5
2.1.2. 窒素同化システムのネットワーク	6
2.1.3. 機能モジュール	9
2.1.4. GS 活性制御モジュール	15
2.1.5. GS 合成制御モジュール	18
2.2. 生命反応ネットワークの数式化	21
2.2.1. Conventional Mass Action (CMA)	21
2.2.2. 二相分離法	22
2.2.3. 代謝部分のモデリング	23
2.3. パラメタ最適化	24
2.3.1. 遺伝的アルゴリズム(GA)	24
2.4. CADLIVE	26
2.4.1. CADLIVE エディタ	27
2.4.2. CADLIVE シミュレータ	28
2.5. 感度解析	29
2.5.1. 感度の計算式	29
3. モデル作成	31
3.1. システムのモデリング	31
3.1.1. モデリング手順	31
3.1.2. 窒素同化システムの数学モデル	33
3.1.3. 窒素同化システムの初期値の決定	38
3.1.4. 窒素同化システムのパラメタ最適化	41
4. システムのシミュレーション	46
4.1. 環境中のアンモニア濃度変化時のシミュレーション	46
4.2. 実験値とシミュレーション結果との比較	47
4.3. 環境中のアンモニア濃度に対する N/C と GS 濃度	48
4.4. GlnK ノックアウト株のアンモニア濃度に対する N/C と GS 濃度	50
4.5. 制御モジュールごとのシミュレーション	51
4.5.1. GS 活性制御モジュールのシミュレーション	51
4.5.2. GS 合成制御モジュールのシミュレーション	52

4.5.3.	両制御モジュールを持つシステムのシミュレーション	53
4.6.	システムの感度解析	54
4.6.1.	各制御モジュールにおけるタンパク質の感度解析	55
4.6.2.	各タンパク質に対する感度解析	58
4.6.3.	広範囲のアンモニア濃度変化に対する相対的な N/C 変化	62
4.7.	ポジティブフィードバックによるシステムの遷移	64
5.	システムの理論解析	67
5.1.	ポジティブフィードバックの理論解析	67
5.1.1.	シンプルモデルの作成	67
5.1.2.	数学モデルの作成	69
5.1.3.	定常解の算出	71
5.1.4.	定常解の数	75
5.2.	双方向制御の理論解析	77
5.2.1.	GS 活性制御のシンプルモデル	77
5.2.2.	外乱に対する感度式 (片方向制御モデル A)	80
5.2.3.	外乱に対する感度計算 (片方向制御モデル A)	81
5.2.4.	外乱に対する感度式 (片方向制御モデル B)	83
5.2.5.	外乱に対する感度計算 (片方向制御モデル B)	84
5.2.6.	内部摂動に対する感度式	86
5.2.7.	内部摂動に対する感度	88
6.	実験	90
6.1.	大腸菌の培養	90
6.1.1.	使用した試薬、機器	90
6.1.2.	大腸菌の前々培養	90
6.1.3.	大腸菌の前培養	91
6.1.4.	大腸菌の本培養	92
6.2.	RNA の測定	94
6.2.1.	RNA の安定化	94
6.2.2.	RNA の抽出	95
6.2.3.	RT-PCR	96
6.2.4.	電気泳動	98
6.2.5.	蛍光度解析	99
6.3.	測定結果	100
6.3.1.	アンモニア濃度	100
6.3.2.	<i>GlnA</i> と <i>DnaA</i> の発現	101
6.3.3.	ヒステリシス挙動の観測	102
7.	考察とまとめ	103

7.1. 考察.....	103
7.1.1. ポジティブフィードバックの働き	103
7.1.2. GS 活性制御モジュールと GS 合成制御モジュールの役割	103
7.2. まとめ	105
8. 参考文献.....	107
謝辞	119

1. 序章

1.1. 研究背景

バイオインフォマティクス(生物情報科学)の進展に伴い、高い効率でゲノム配列を解読する手法が確立され、遺伝子発現データをはじめとした膨大な生命ネットワークに関する知見が得られ、タンパク質相互作用などの各種データベースが整備されつつある。それらの生命ネットワークに関するデータから、生命システムのダイナミクスを理解する事を目的とした試みが進んでいる。このような目的を持つ研究分野はシステムバイオロジーと呼ばれ^{[1][2][3][4]}、概日リズムや発生メカニズムの解明といった成果を上げている。これらシステムバイオロジーによる生命システムの動的挙動を解明する試みは、環境変化や遺伝子変異によるシステム挙動の変化を予測するだけでなく、生命の設計原理を明らかにする事を期待されている^[5]。システムバイオロジー研究は大きく分けて以下の4つの段階を持つ^[3]。

- 1) 物理構造を含めた遺伝子制御や生命分子ネットワークなどの構造を理解する段階
- 2) システムダイナミクスを理解するために定量的及び定性的システム解析を行い、高い予測能力を持つモデルと理論を構築する段階
- 3) システム解析結果に基づいて、システムを特定の状態に誘導する制御理論を構築する段階
- 4) 生命システムの設計原理を理解し、人間が求める動的挙動を再現するシステムを設計する段階

これら4つの段階を経て、生命の設計原理の解明というシステムバイオロジーの目的を達成するためには、従来の生物学的な実験に加えて、複雑な生命分子ネットワークのモデルの作成、シミュレーションやシステム解析が重要な役割を果たす。特に数学的シミュレーションを用いて分子間の相互作用レベルでのダイナミクスを再現し、理解する^{[6][7]}ことはシステムバイオロジーにおける大きな目的の一つとなっている。このモデル作成やシミュレーションを効率よく実行するために、様々なツール・ソフトウェア、マークアップ言語が開発されている^{[8][9][10][11][12][13][14][15]}。さらにバイオインフォマティクスの成果として得られたモ

デル作成に必要なデータに関するデータベースも数多く開発されており、その多くは公開されている^{[16][17]}。これらのデータベースを用いた生命ネットワーク解析も行われている^[18]。このようにシステムバイオロジーの手法を用いて、様々な生命現象や病気について、そのメカニズムの研究がなされている^{[19][20][21][22]}。

この生命システムの設計原理を知ることは、生命を作り出す、もしくは人工生命を合成するための鍵となる^{[23][24]}。これらの生命を作り出す事を目標とする分野として合成生物学を挙げる事ができる^{[25][26][27][28]}。さらにネットワーク解析から生物の進化について取り扱う進化生物学の研究も進められている^{[29][30]}。一般的なネットワークと生化学ネットワークを比較すると、類似した回路を有する点もあれば、生化学ネットワークに特徴的な機能を有している点もある^[31]。タンパク質相互作用ネットワークや代謝ネットワーク等の生化学ネットワークが、適応や代謝、ストレス応答といった特定の細胞機能を生み出している方法、及びその設計原理について、工学的制御アーキテクチャ^{[32][33]}と比較検討することは生命システムの設計原理を理解することにつながる。また、複雑な機能を実現している生化学ネットワークの構成を明らかにするため、ネットワークモチーフ^{[34][35]}と呼ばれる遺伝子制御回路の要素が生化学ネットワークの構成ブロックとして提案されている。生命は、これらの生化学ネットワークの組み合わせにより、外部や内部の摂動に対するロバスト性を保持している^{[36][37][38][39][40]}。

1.2. 研究目的

細胞は、環境ストレスや遺伝的な変化等の様々な変化に晒されている。このような環境からのストレスに対して、細胞は遺伝的ネットワークにより生み出されるロバスト性^{[36][37][41][42]}を有している。ロバスト性とは、システムが内部、もしくは外部の摂動に対し、どの程度堅牢であるかを示すものである。ネットワーク中のフィードフォワードループやフィードバックループ、経路の冗長性により、このようなロバスト性が生成されていると考えられる^{[43][44]}。

エンジニアリング回路においては、そのメカニズムの分析に対して、伝達関数や状態方程式を用いた方法が制御工学的に確立しているが、生化学ネットワークにおいては、分子間のネットワークがエンジニアリングの制御ブロック図や電気回路図^[45]に似ているとは言え、その複雑さや分子間相互作用の非線形性により、通常のエンジニアリング的な回路図に置き換える事は困難である。そこで、我々はシステムをモジュール単位に分解し、特定の機能を有する単位ごとにネットワークを分析する方法^{[46][47][48][49]}を用いた。ここでは、モジュールとは他のモジュールと分離可能な機能を有するサブシステムとして位置づけられている。生化学ネットワークでは、様々な生命の機能を遺伝子制御により実現するために階層型モジュール構造を示す例が多く示されている^{[50][51][52]}。

本研究では、1.1 で示すシステムバイオロジーの手法を用いて、大腸菌の持つ窒素同化システムの制御メカニズムを明らかにする事を目的としている。大腸菌の細胞は常に糖、リン酸、アンモニア等の栄養ストレスにさらされるため、栄養摂取に対する複雑な機能モジュールを進化させている。特に大腸菌は窒素含有化合物の源となる **glutamine** と **glutamate** を合成する為に、アンモニアの同化を必要とする。窒素同化システムはこの **glutamine** の合成反応を制御しているシステムである^[53]。この窒素同化システムでは環境中からのアンモニアの取り込みにおいて、細胞外のアンモニア濃度の変化に対する細胞内の炭素源と窒素源のバランスを維持するため、**glutamine** を生成する反応をグルタミン合成酵素(**GS**)の活性と発現量を制御することで調節しており^[54]、代謝とタンパク質相互作用、遺伝子発現という3つの生命反応から構成されたシステムとなっている。このシステムは、**GS** 活性制御モジュール^{[55][56]}と **GS** 合成制御モジュール^{[57][58][59]}を有しており、それぞれ異なった制御特性を示す。既往の研究として、本システムを対象とした

シミュレーションや解析の報告がある^{[60][53][61][62]}。

本システムの解析においては、数学モデル作成、シミュレーション、理論解析と言った手段を用い、グルタミン合成酵素の活性と発現の制御がどのようなネットワークで実現され、またこれらの制御がどのように使い分けられているかについて明らかにする。

2. 理論

2.1. 窒素同化システム

本研究で取り扱うシステムは大腸菌の窒素同化システムである。大腸菌は **glutamine** と **glutamate** を合成するためにアンモニアを必須としている。窒素同化システムはアンモニアを同化することで **glutamine** を生成する反応を制御するシステムである。**glutamine** と **glutamate** は、ほぼすべての窒素を含む化合物の材料となる。大腸菌におけるアンモニア同化は本システムが唯一であり、菌単体の窒素源を理解するうえでも重要である。

窒素同化システムは酵素の触媒作用により環境中のアンモニアを同化するアンモニア同化経路と **GS** の活性を調節するタンパク質相互作用ネットワーク^[63]、及び **glnA(GS)**、**Ntr** 遺伝子発現を調整する遺伝子ネットワークから成る^[64]。これらのネットワークは複数のフィードバックにより制御されている^[60]。

2.1.1. アンモニア同化経路

大腸菌は環境中のアンモニアを同化する酵素として、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**)を持つ^{[65][66][67]}。アンモニア同化反応では **TCA** 回路の中間代謝物である **2-ketoglutarate** に **GS**、**GOGAT**、**GDH** の触媒作用で環境中のアンモニアを付加し、**glutamine**、**glutamate** を生成する。アンモニア同化経路は、**GDH** 経路、**GS/GOGAT** 経路に分けられる。**GDH** 酵素はアンモニアとの親和性が低いので、アンモニア高濃度時でしか働かない。低濃度時にはその作用は極端に低い。逆に **GS** 酵素はアンモニアとの親和性が高い^[68]。これにより、アンモニアが低濃度時でもアンモニア同化作用の高い状態が維持できる。本シミュレーションでは、アンモニア低濃度時におけるシステムの制御メカニズムに焦点を絞るため、**GS/GOGAT** 経路を主要な同化経路として取り扱った。

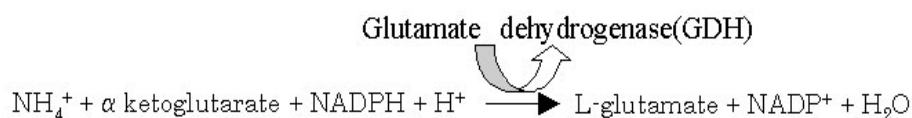


図 2.1-1 GDH 経路

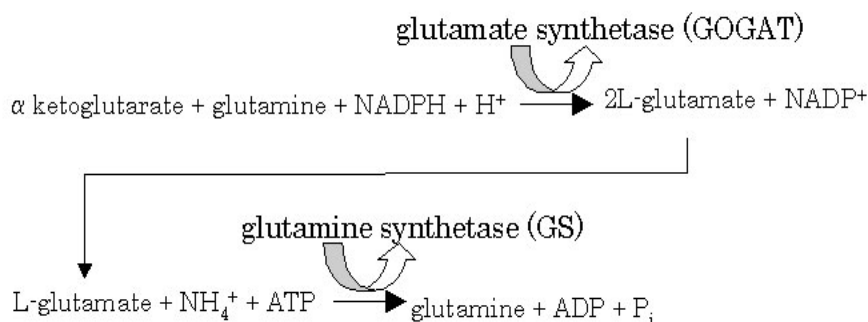

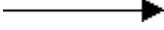
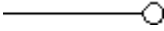
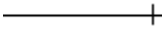
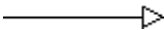



図 2.1-2 GS/GOGAT 経路

2.1.2. 窒素同化システムのネットワーク

窒素源としてアンモニアのみを含む培地中では、大腸菌の増殖はアンモニア濃度に制限される。大腸菌は環境中のアンモニアを細胞中に同化する酵素 **GS**、**GDH**、**GOGAT** を持つが、アンモニアの同化速度の調節において、中心的役割を果たす酵素は **GS(glutamine synthetase)** である。窒素同化システムは、TCA 回路の中間代謝物である 2-ketoglutarate と glutamine の濃度比を測定して **GS** の活性と発現量を調節する機構を持っている。ここで、2-ketoglutarate を炭素源(C)、glutamine を窒素源(N)とおき、この **N/C** の比率(**N/C** 比)をシステムが制御する対象として定義する。この **N/C** 比を調節するための **GS** の制御機構は、**GS** の活性と不活性を調節する制御と **GS** の合成速度を調整する制御の 2 つに分けることができる。ここで、窒素同化システムのネットワーク中の **GS** の活性と不活性を調節する制御機構を **GS** 活性制御モジュール、**GS** の合成速度を調整する制御機構を **GS** 合成制御モジュールと定義する。窒素同化システムのネットワークを図 2.1-3 に示す。なお、図中で用いる矢印については、以下の表 2.1-1 を参照の事。

表 2.1-1 ネットワーク図中の矢印

矢印	説明
	結合反応(●は複合体)
	転換反応
	反応の触媒
	反応の抑制
	反応の促進
	転写反応

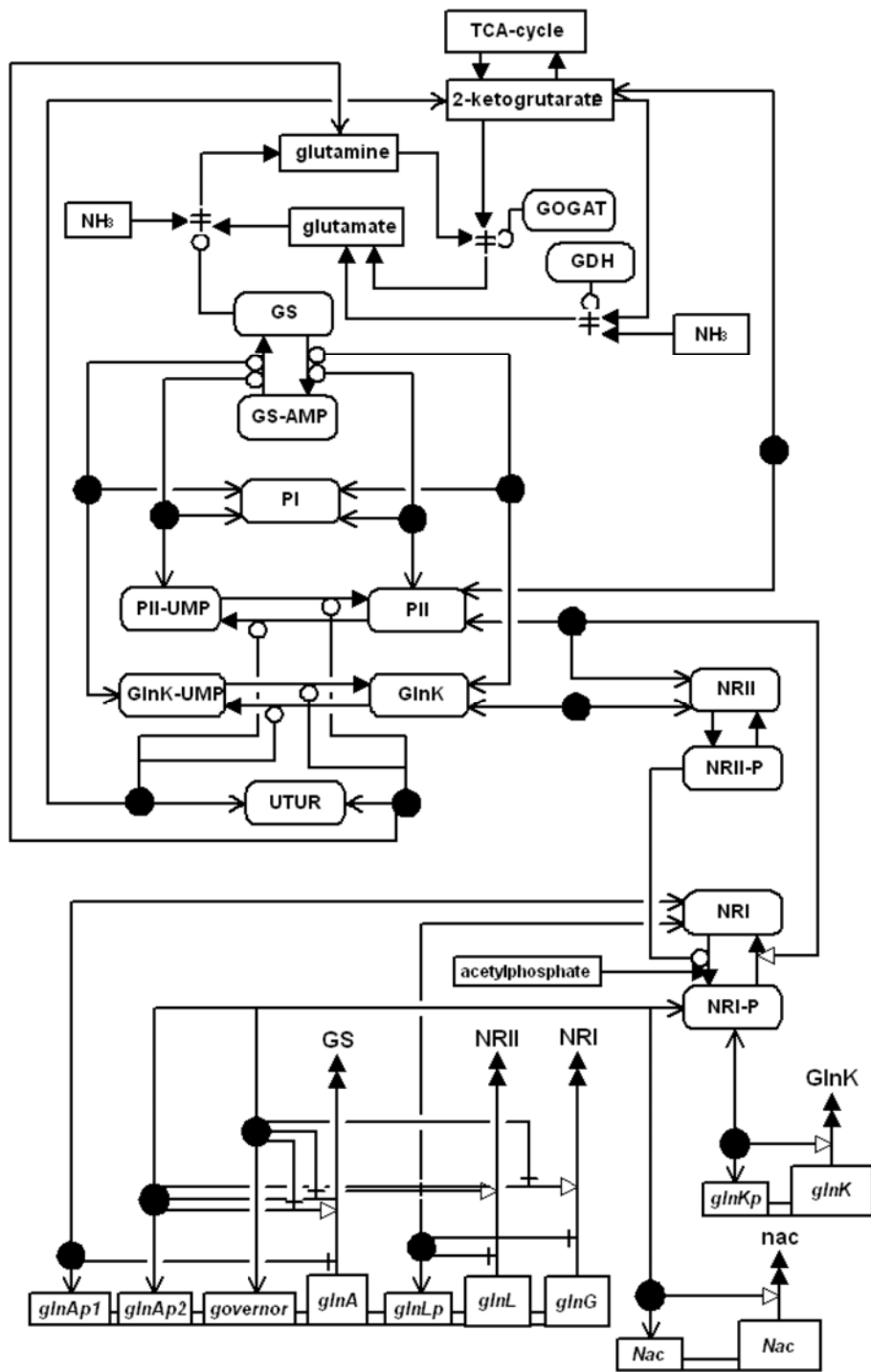


図 2.1-3 窒素同化システムネットワーク

2.1.3. 機能モジュール

システムをモジュール単位に分割するという考え方をを用いると、分子相互作用レベル（分子モジュール）という記述のスケールから制御ブロック図で記述できる機能モジュールへと記述のスケールを移すことができ、システムの持つ機能的な面を評価することができる。ここでは、システムの機能モジュールと制御工学のスキームで用いられるモジュールとの類似性を考慮した。さらに、特定の機能を実現するための分子群の相互作用の経路としてフラックスモジュールを定義する。各フラックスモジュールは独立して存在するものではなく、複雑に相互作用することで機能モジュールを形成している。このフラックスモジュールの組み合わせにより、振動、ヒステリシス、および不可逆性などの特性が生成される。

窒素同化システムをモジュール分割して考える際には、2.1.3 と 2.1.4 で示した **GS 活性制御モジュール** 及び **GS 合成制御モジュール** といった制御機構ごとに分割するのみではなく、その制御で担っている役割に着目して、機能単位のモジュールへと分割することができる。具体的には、**GS** により **glutamine** を生産する代謝反応を行う **Plant** モジュール、**Plant** モジュールからの **N/C** 比の情報を受け取る **UTUR**^[69] を **Sensor** モジュール、**Sensor** モジュールから伝達された **N/C** 比の情報を **PII**、**GlnK** で受け取り、**GS** の活性や不活性、もしくは発現等の指示を他の機能モジュールに伝達する **Computer** モジュール、**Computer** モジュールから伝達された情報を受けて **GS** の活性、不活性を調節する **GS Activity Actuator** モジュール、**Computer** モジュールから伝達された **GS** 発現の調節を行う **Regulator** モジュール、さらに **Regulator** モジュールからの情報により **GS** の発現を実行する **GS Synthesis Actuator** モジュールに分割した。窒素同化システムの機能モジュールを図 2.1-4 に示す。**GS 活性制御モジュール** や **GS 合成制御モジュール** も、これらの機能モジュールから構成されている。**GS 活性制御モジュール** は **Plant** モジュール、**Sensor** モジュール、**Computer** モジュール、**GS Activity Actuator** モジュールから構成される(図 2.1-5)。**GS 合成制御モジュール** は **Plant** モジュール、**Sensor** モジュール、**Computer** モジュール、**Regulator** モジュール、**GS Synthesis Actuator** モジュールから構成される(図 2.1-6)。

生化学ネットワークを工学的制御アーキテクチャと比較・分析するため、この機能モジュールを典型的な制御ブロック図として表記したものを図 2.1-7 に示す。各ブロックが、モジュールを表しており、相互接続してシステムを構成している。

Computer モジュールからの **GS** 合成の信号は **Regulator** モジュールで増幅され、**GS Synthesis Actuator** モジュールへと伝えられる。通常の工学的な制御ブロック

図との大きな違いとして、生化学ネットワークには不安定さを有するポジティブフィードバックが存在するという点を挙げる事ができる。

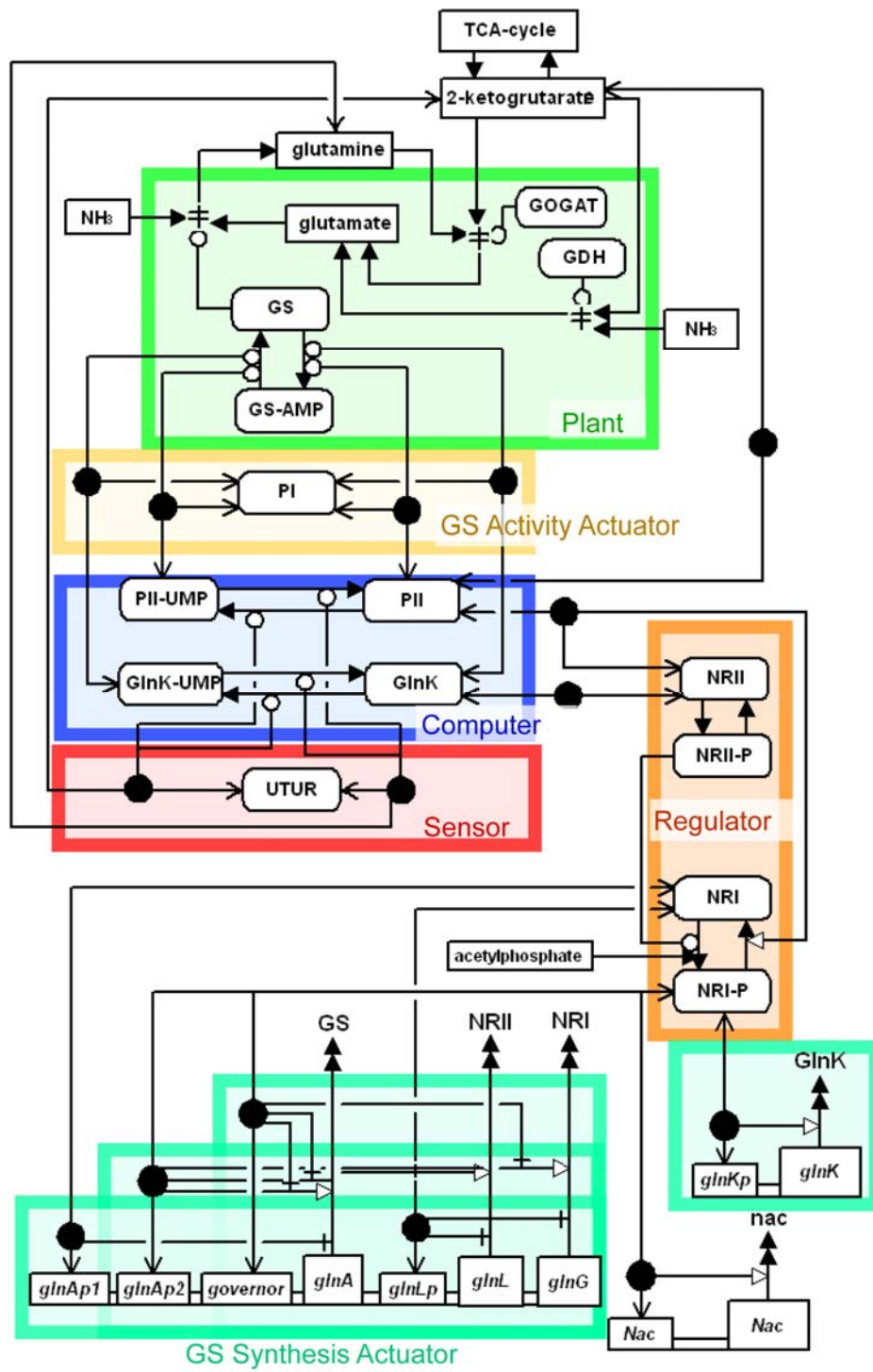


図 2.1-4 機能モジュール

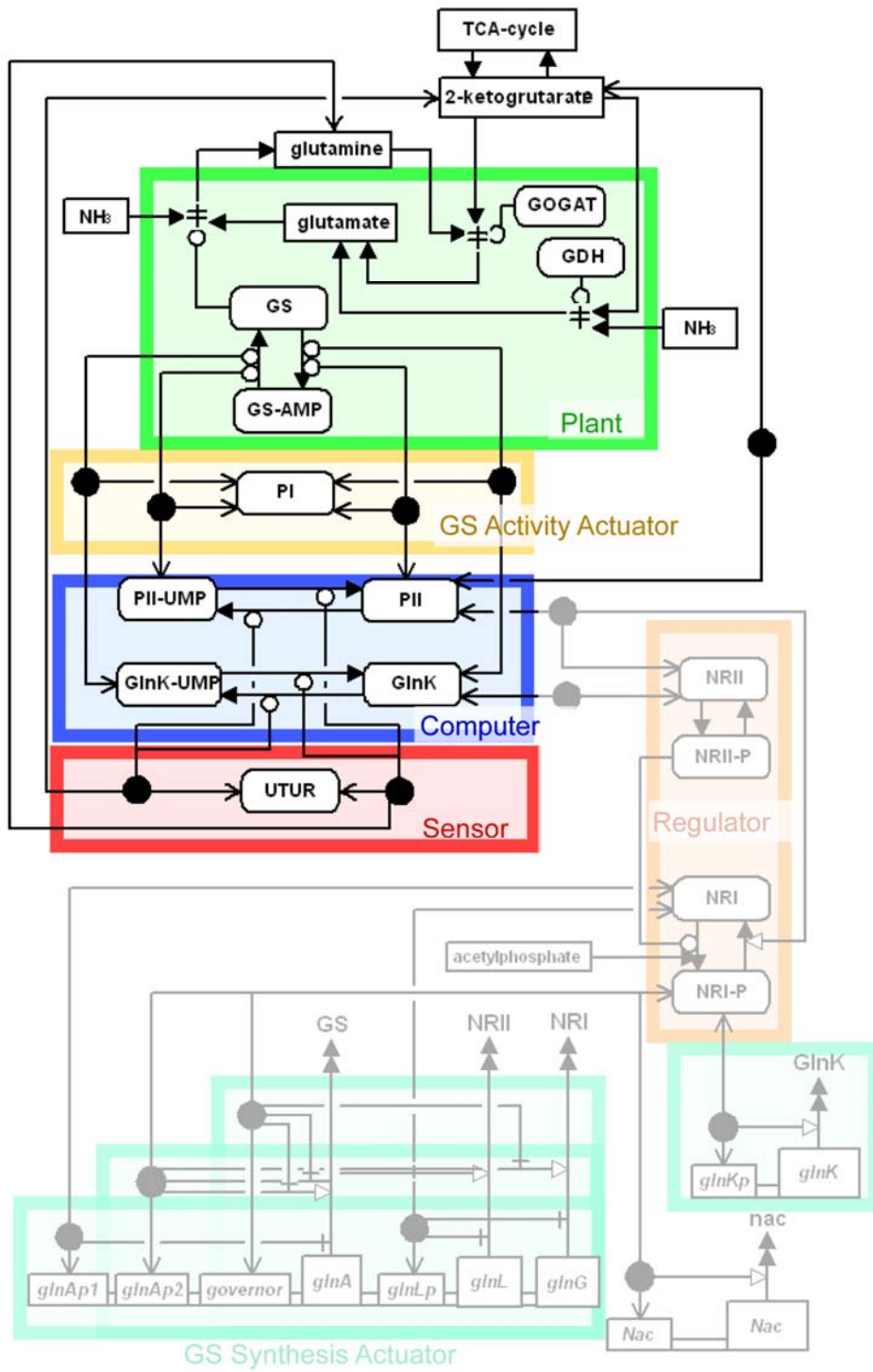


図 2.1-5 機能モジュール(GS 活性制御モジュール)

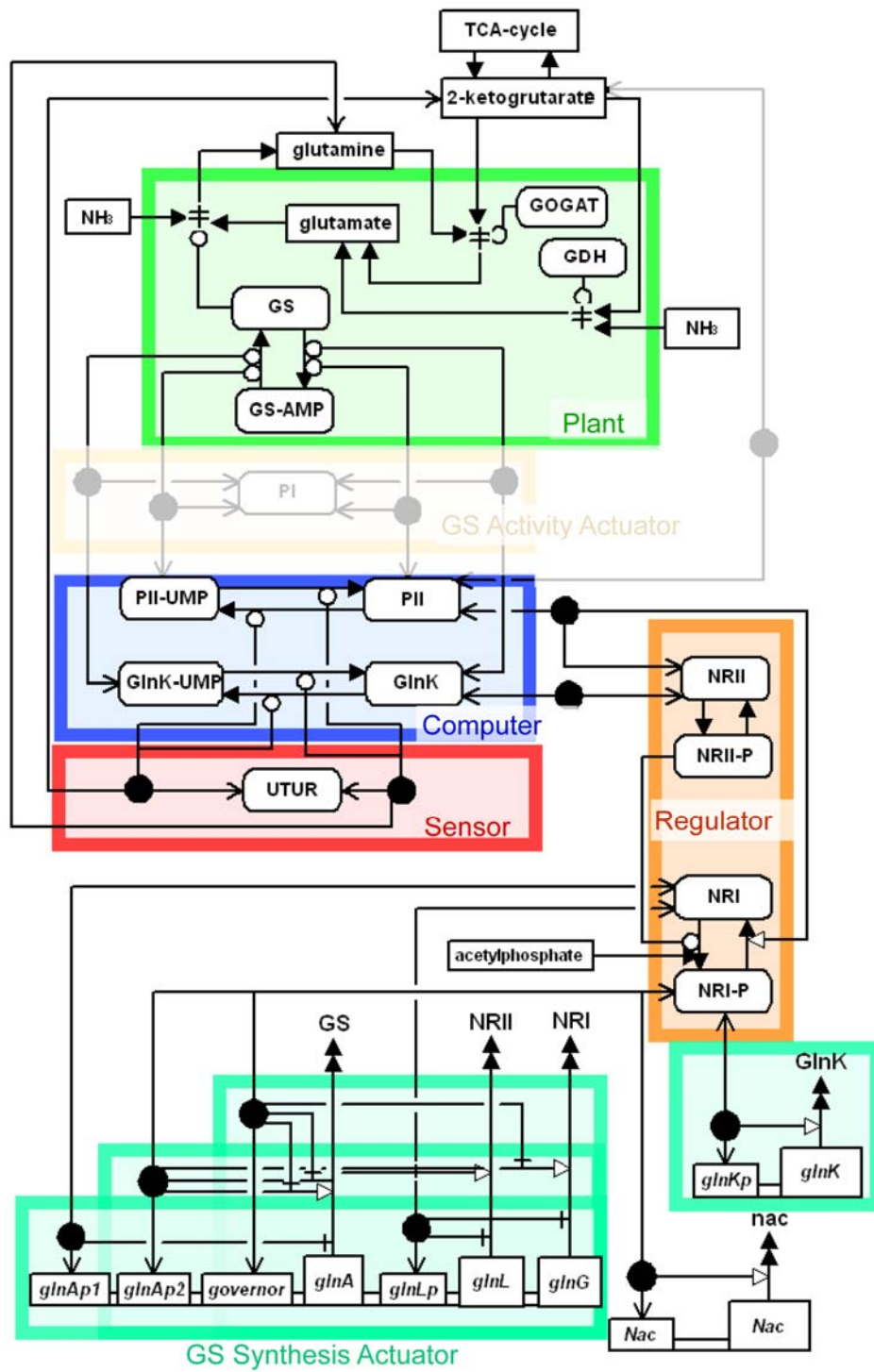


図 2.1-6 機能モジュール(GS 合成制御モジュール)

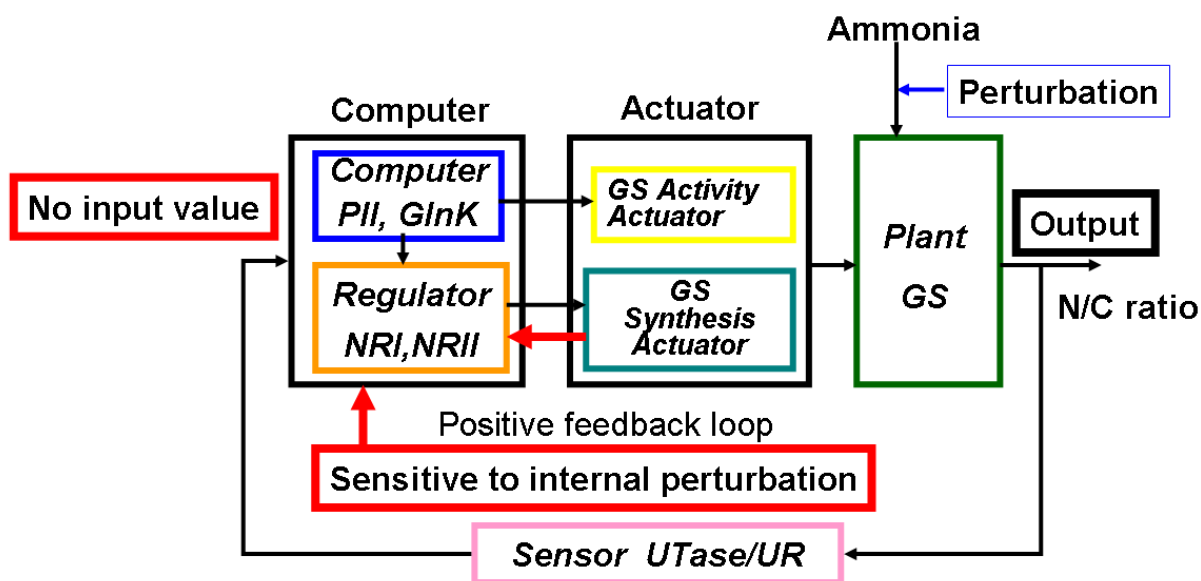


図 2.1-7 窒素同化システムの制御ダイアグラム

2.1.4. GS 活性制御モジュール

GS の活性は UTase/UR(UTUR), PI, PII, GlnK といったタンパク質により調節されている^[23]。ここで、GlnK は PII と同じような機能を持つタンパク質である^{[70][71][72]}。UTUR は 2 つの機能を持つ蛋白質であり、UTUR に 2-ketoglutarat が結合した場合には PII 及び GlnK をウリジル化(PII-UMP, GlnK-UMP)させる働きを示す。この PII-UMP 及び GlnK-UMP は GS をアデニル化(不活性化)させ、GS-AMP にする。逆に UTUR に glutamine が結合すると PII-UMP、GlnK-UMP を脱ウリジル化させる働きを示す。PII、GlnK は GS-AMP を脱アデニル化(活性化)させる働きを持つ^{[71][73][74]}。すなわち、GS 活性制御では、glutamine 濃度が低下すると GS が活性化され、結果としてアンモニアの同化速度は増加し、glutamine 濃度を回復させることとなり、UTUR を中心に 2-ketoglutarate , glutamine による双方向の制御がなされている^[71]。窒素同化システム中の GS 活性制御モジュールを図 2.1-8 に示す。また、GS 活性制御モジュールにおけるシグナルの流れを図 2.1-9 に示す。

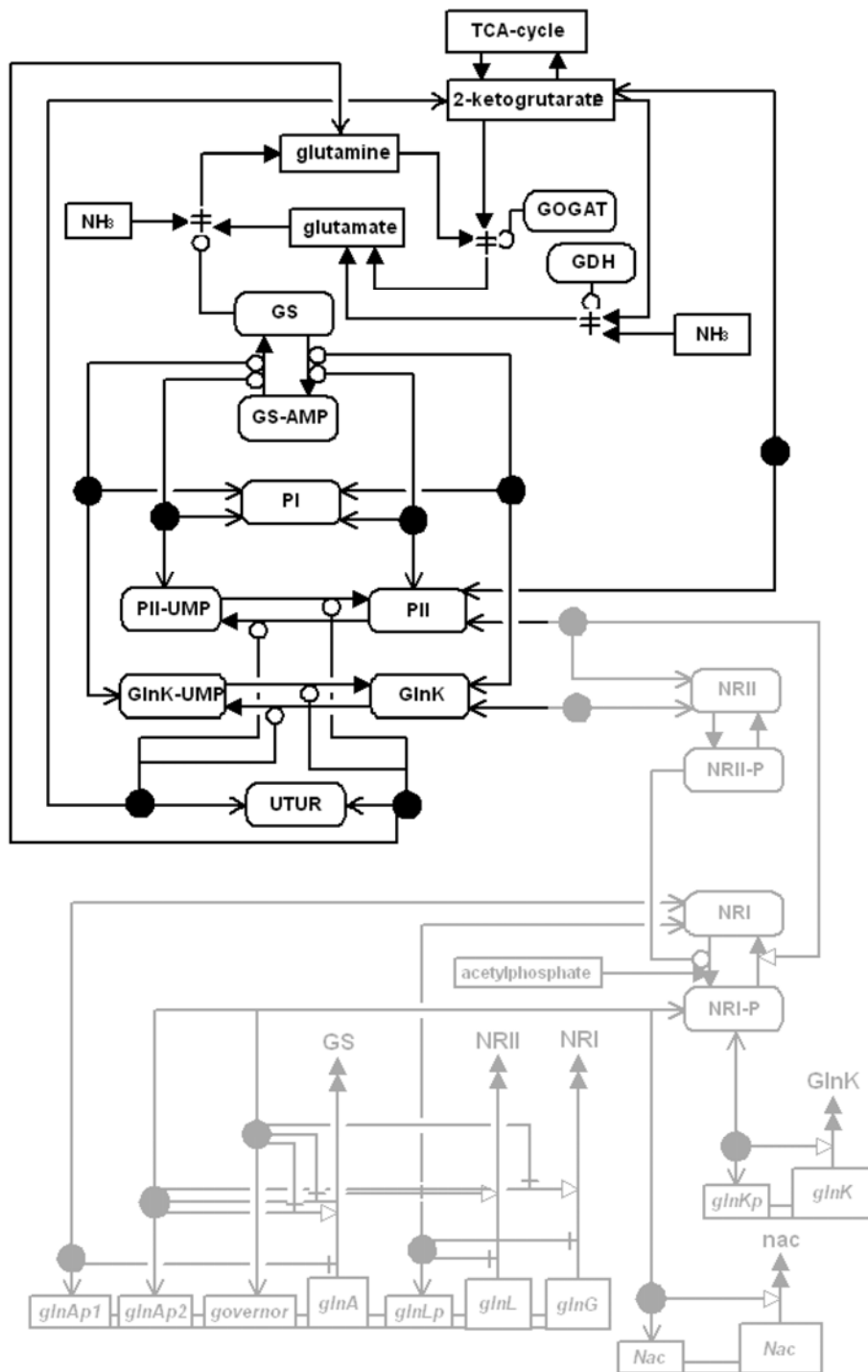


図 2.1-8 GS 活性制御モジュール

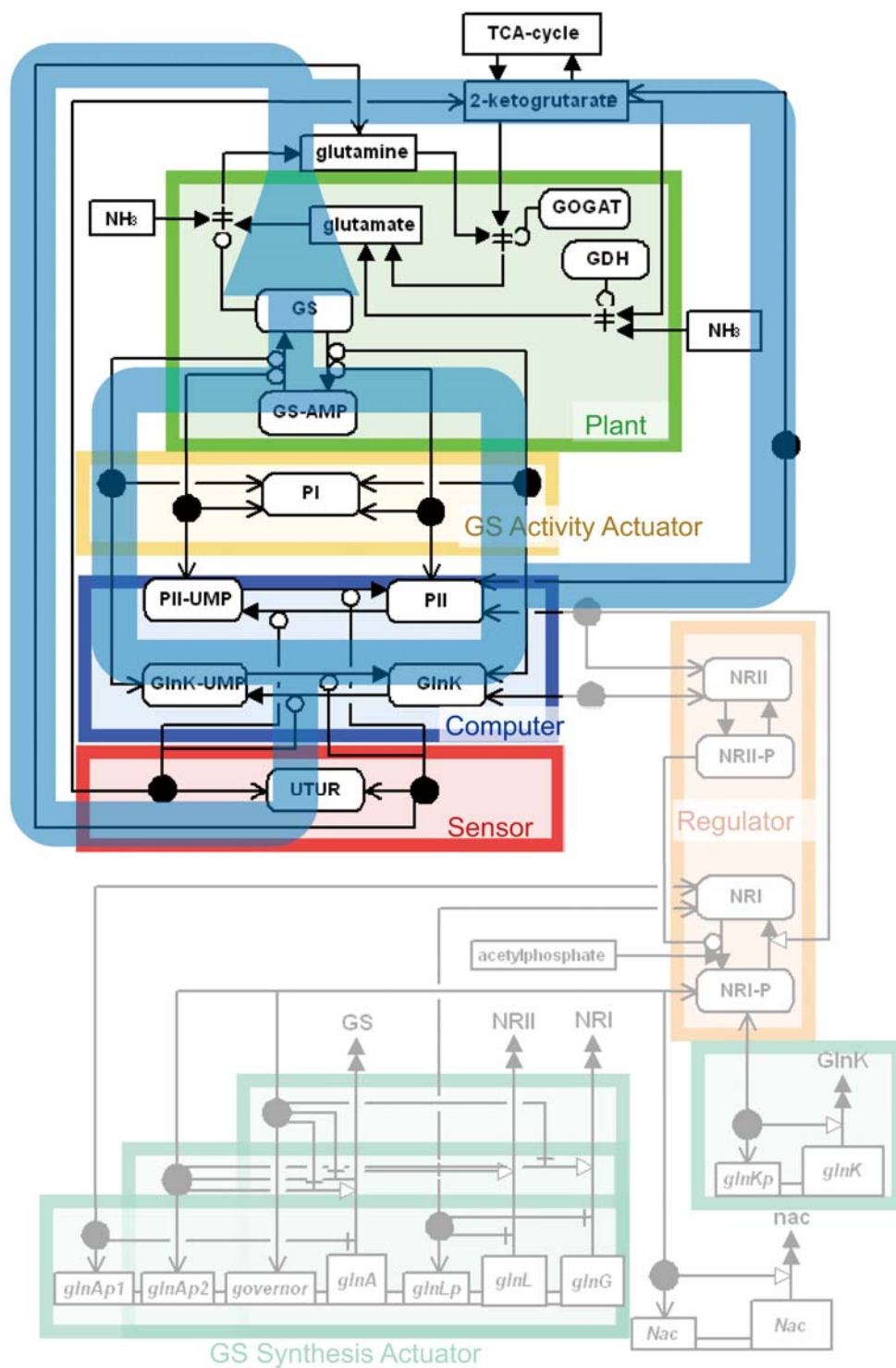


図 2.1-9 GS 活性制御モジュールのシグナルの流れ

2.1.5. GS 合成制御モジュール

GS の合成においては、*glnA*(GS)、Ntr 遺伝子発現が複数のプロモータにより調節されている^{[75][76]}。タンパク質 NR_{II}、NR_I はリン酸カスケード中にある。リン酸化した NR_{II}(NR_{II}-P)は NR_I をリン酸化する働きを示す。リン酸化した NR_I(NR_I-P)はプロモータ *glnAp2* に結合することで GS, NR_I, NR_{II}, GlnK, *nac* を転写誘導し^{[77][78]}、これらの発現量を増大させる。PII は NR_{II} と複合体を形成する。この複合体形成は NR_{II} の自己リン酸化を妨げ、さらに NR_I-P を脱リン酸化させる働きを示す^[79]。これにより、NR_I と NR_{II} からなるリン酸カスケードの流れを停止させる。glutamine 濃度が低い場合、UTase/UR により PII はウリジル化され、NR_{II} との複合体を形成しない。この場合、リン酸カスケードの働きにより NR_I はリン酸化され NR_I-P となる^[80]。NR_I-P は GS, NR_I, NR_{II} といった蛋白質をコードする遺伝子オペロンを転写誘導し、GS, NR_I, NR_{II} の発現量を増大させる。NR_I がリン酸化されない場合も GS の転写を誘導するが、その発現量は NR_I がリン酸化した場合よりも低く抑えられる^[81]。窒素同化システム中の GS 合成制御モジュールを図 2.1-10 に示す。また、GS 合成制御モジュールにおけるシグナルの流れを図 2.1-9 に示す。

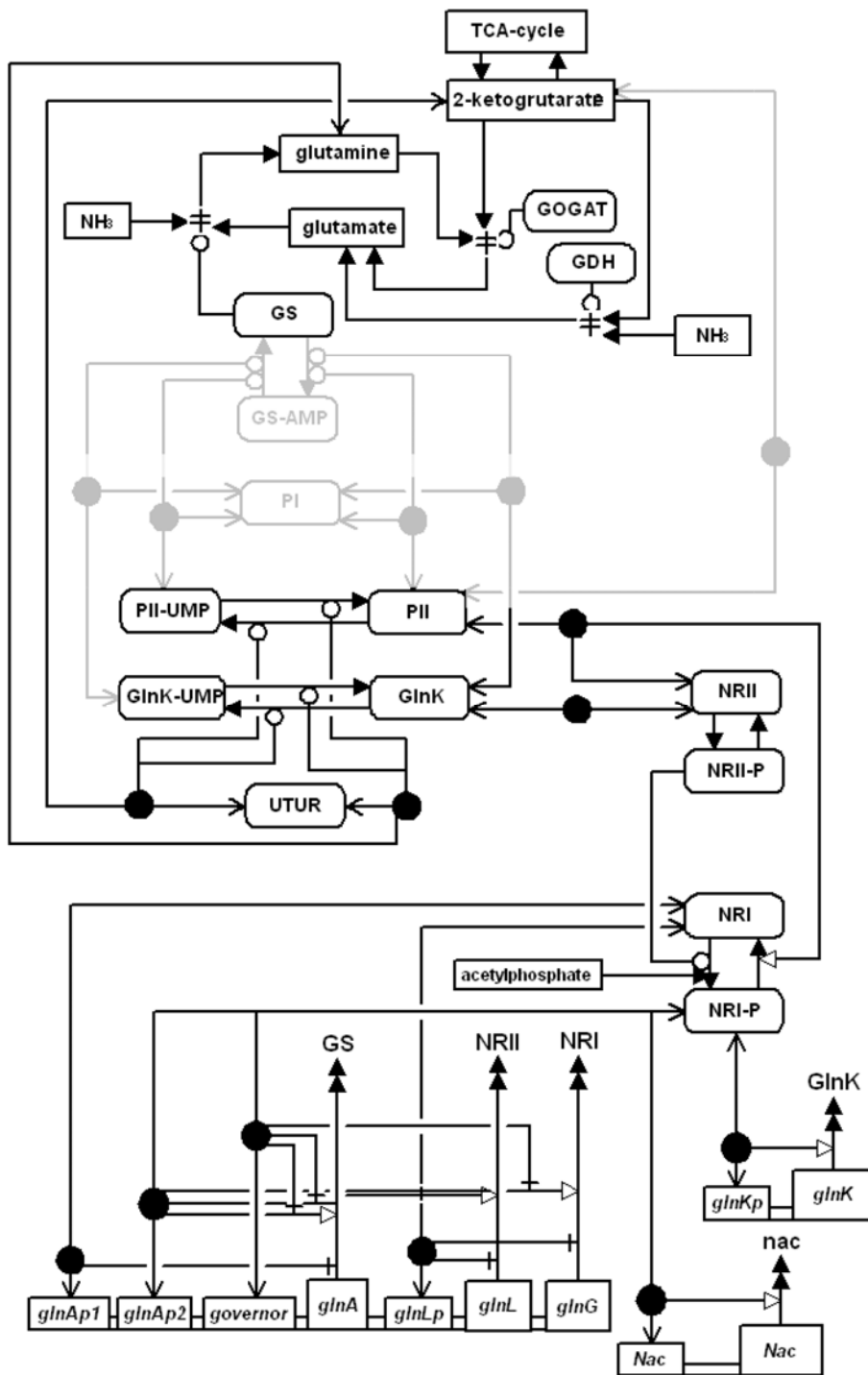


図 2.1-10 GS 合成制御モジュール

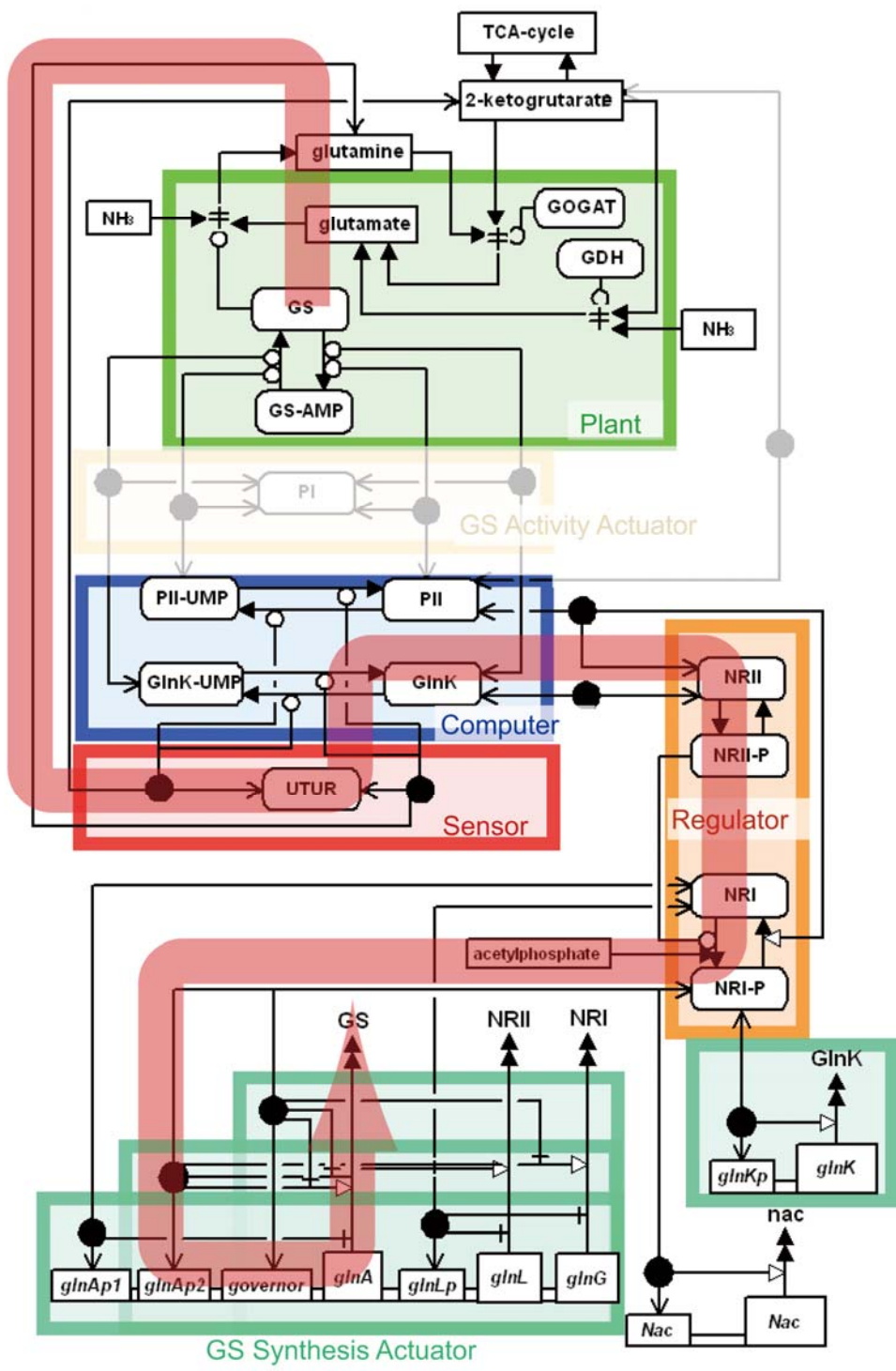


図 2.1-11 GS 合成制御モジュールのシグナルの流れ

2.2. 生命反応ネットワークの数式化

2.2.1. Conventional Mass Action (CMA)

一般の化学反応式が以下のように与えられたとき



各分子の時間変化を質量作用則(mass action law)であらわすと

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_a[E][S] + k_s[E : S]$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_a[E][S] + k_s[E : S]$$

$$\frac{d[E : S]}{dt} = +k_a[E][S] - (k_s + k_x)[E : S]$$

$$\frac{d[P]}{dt} = +k_x[E : S]$$

と表すことができる。

上記の微分方程式は単純で理解しやすいが、 k_a 、 k_s のオーダーの差が十万倍ほどになる。シミュレーションを行う際にはこのオーダーの差が問題を引き起こし、多くの場合に非常に長い計算時間が必要となる。従って、様々な近似法が考案されている^[82]。特に、実験では測定しづらい $E:S$ 複合体を取り除き生成反応を記述したミカエリス・メンテン式はその最たる例である。しかし、ミカエリス・メンテン式は基質と酵素の物質に極端な差がある場合を仮定しており、代謝などではその効果を発揮するがタンパク質相互作用には不向きである。実際に、遺伝子発現を含む反応経路では、ほとんどがタンパク質相互作用によるものである。したがって **CMA** ではなくタンパク質相互作用を表す計算法が必要となる。

2.2.2. 二相分離法

本研究においては、タンパク質相互作用を表す計算法として二相分離法^[83]を用いた。二相分離法は **CMA** に迅速平衡、定常状態近似を用いる。これにより計算を結合相と反応相の二つに分離し、結合相では代数方程式、反応相では微分方程式を用いることで計算の高速化を実現している。

具体的には、以下の反応式を



二相分離法で表すと、

$$\frac{d[E_{total}]}{dt} = 0$$

$$\frac{d[S_{total}]}{dt} = -k_x[E : S]$$

$$\frac{d[P_{total}]}{dt} = +k_x[E : S]$$

$$[E : S] = \frac{k_a}{k_s + k_x} [E][S]$$

$$[E_{total}] = [E] + [E : S]$$

$$[S_{total}] = [S] + [E : S]$$

と表すことができる。

二相分離法の利点は、結合、解離定数におけるオーダーを無くすことで複合体の物質濃度を詳細にシミュレーションが行えることである。しかし、結合相が非線形代数方程式になるためその方程式の初期解を見つけるのが難しい。この問題は一度、**CMA** で定常値をとるまでシミュレーションを行い、その解を用いることで解決可能である。

2.2.3. 代謝部分のモデリング

代謝によるアンモニア同化反応は、蛋白質相互作用のような反応と化学反応式の上では同じようだが、実際にモデリングを行う際には、かなりの差異がある。これはそれぞれの物質量の差に起因している。二相分離法は酵素、基質の物質量が同じ程度の場合、その近似が効果を発揮する。しかし、酵素、基質の物質量の差が大きければミカエリス・メンテン式を用いるべきである。よって代謝のような反応経路はミカエリス・メンテン式で記述を行う。

本システムのシミュレーションは、代謝系にはミカエリス・メンテン式を、その他の反応に対しては二相分離法を適用して数理モデルを作成した。

2.3. パラメタ最適化

2.3.1. 遺伝的アルゴリズム(GA)

生命システムのシミュレーションを行う場合、生化学パラメタを設定する必要がある。しかし、実験でそれらのパラメタの全てを得ることは非常に困難である上、実験時の条件によってもその値は大きく変化する。窒素同化システムにおいても代謝反応に関わるパラメタに関する報告^{[84][85]}は限られている。そこでシミュレーションモデルに用いるパラメタを最適な値にチューニングする必要がある。本研究では、その最適化のために遺伝的アルゴリズムを使用した^[86]。遺伝的アルゴリズムはある条件に対する最適解を求める最適化手法の一つである。対象とするモデルに使用するパラメタを遺伝子に見立て、最適化する複数のパラメタ1セットを1個体として、複数の個体に対して評価を実行、評価結果に応じて個体同士の交差や突然変異を行い、優秀な個体を次世代に残すという手法であり、生物進化の過程を模倣している。これによりシミュレーションに適したパラメタを得ることができる。

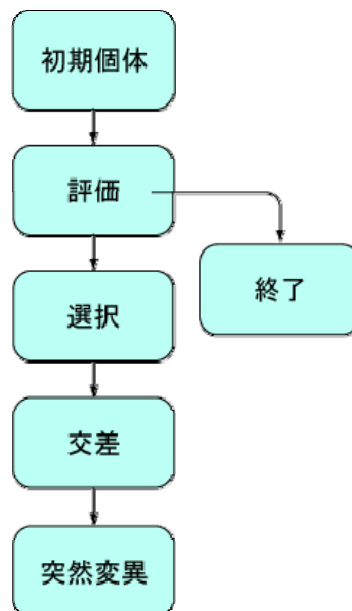


図 2.3-1 遺伝的アルゴリズムの概念図

以下に遺伝的アルゴリズムによる最適化手順の概要を説明する。

1. 初期個体の生成

広範囲の探索を行うためにはパラメタの多様性が必要である。個体は探索空間の指定範囲内にランダムに生成される。必要となる個体数は探索対象となる解空間によって大きく異なり、数千～数万以上の初期個体が必要となるケースもある。

2. 評価

生成された個体ごとに、評価関数を用いて評価値を計算する。この値が高いほど優れた個体と判断される。個体ごとにシミュレーションを実行する必要があるため、GAにおいては最も時間を必要とする手順である。この評価の段階で使用する評価関数の設定は、適切に最適化を進めるために最も重要な要素となる。

3. 選択

次の操作である交差において、次世代の個体を生成するために親個体を決定する必要がある。親個体は基本的に評価値が高い個体を用いるが、局所解に陥ることを避けるために、複数の親個体の中に評価値が高くない個体を混ぜる手法が取られることもある。

4. 交差

選択された個体から新たな個体を作り出す操作である。交叉方法は様々で UNDX、SPX、BLX 等の種類がある。本研究においては交差法として、UNDX 法を用いた。UNDX 法では両親を結ぶ直線状に第三の親との距離を基にした正規分布の近傍の子個体を形成する方法である。これは他の方法に比べて生成個体の多様性、収束の速さに優れる方法である。

5. 突然変異

個体のパラメタに偏りができると、それ以外の領域が探索されなくなる。そのため、ランダムでパラメタを変異させる必要がある。突然変異率が低いときは局所探索的性質が強い。逆に、高いときは検索点が広範囲に分散し、大域探索的だが収束し難い。この突然変異により、パラメタ探索が局所解に陥ることを防ぐ。

2.4. CADLIVE

生命のシステム解析の際には、シミュレーションが大きな役割を果たすが、そのためには、生命システムのネットワークを多数の数式から構成される数学モデルにまで書き下さなければならない。数学モデルを作成する作業は、非常に手間がかかる作業である。本研究では、九州工業大学の倉田研究室で開発された生命設計支援ソフト CADLIVE^{[8][87][88]}を用いる事で、この数学モデルを作成する労力を軽減させた。CADLIVE では生命システムネットワークをエディタ上に記載することで、自動的に各反応を数式化し、出力する機能、さらにはその作成したモデルを用いてシミュレーションを実行する機能までを備えている。CADLIVE は PC 上で起動する CADLIVE エディタ(図 2.4-1)と、Web 上で動く CADLIVE シミュレータ(図 2.4-2)に分かれている。

2.4.1. CADLIVE エディタ

CADLIVE エディタは、用意されているシンボルを規則に従って配置することで、生命システムネットワークを描写することができる。さらに、描写されたネットワークの制御反応式を自動で生成し、XML 形式のファイルに保存する。

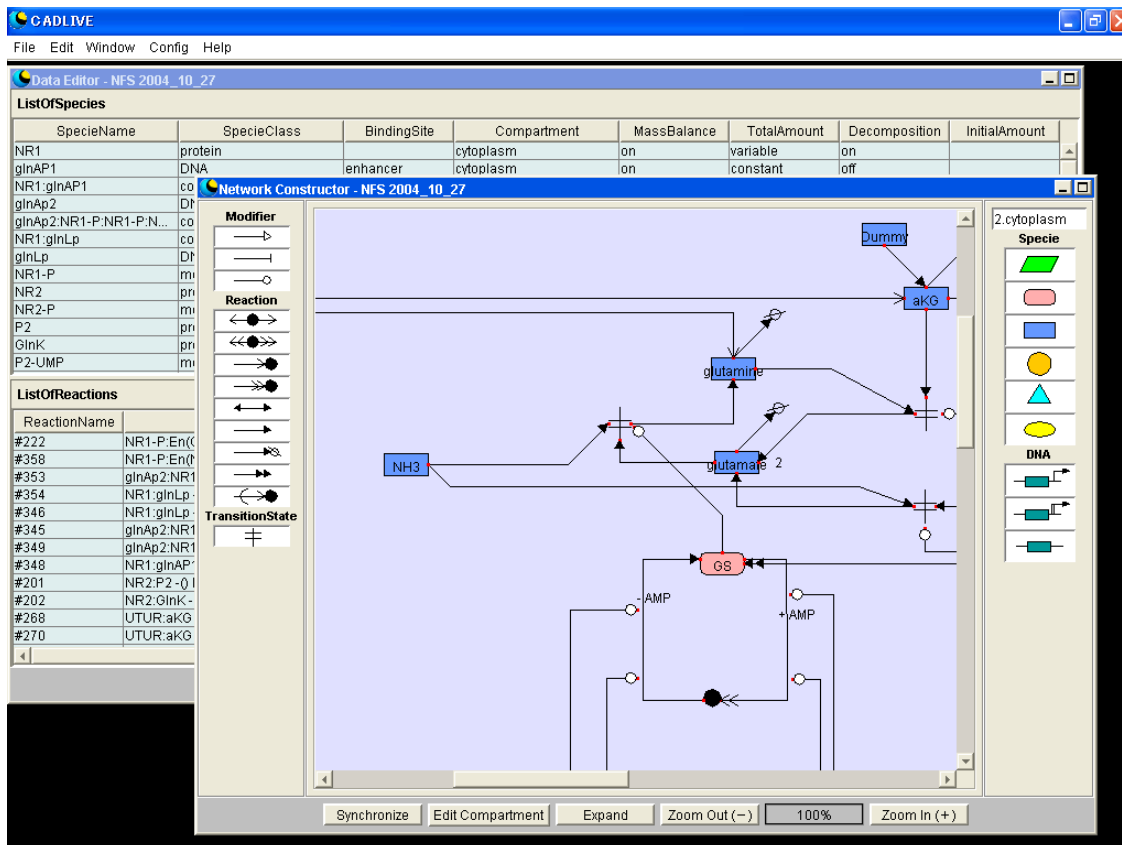


図 2.4-1 CADLIVE エディタの画面

2.4.2. CADLIVE シミュレータ

CADLIVE シミュレータは、CADLIVE エディタより生成された XML 形式のファイルを読み込み、描写されたネットワークの制御反応式を数式に変換する機能を有する。この数式をダウンロードする事で、C 言語等で記述した自作のシミュレーションプログラムで使用する事も可能である。もちろん、CADLIVE シミュレータ上でシミュレーションを実行させる事もでき、遺伝的アルゴリズムを用いたパラメタ最適化機能も備えられている。

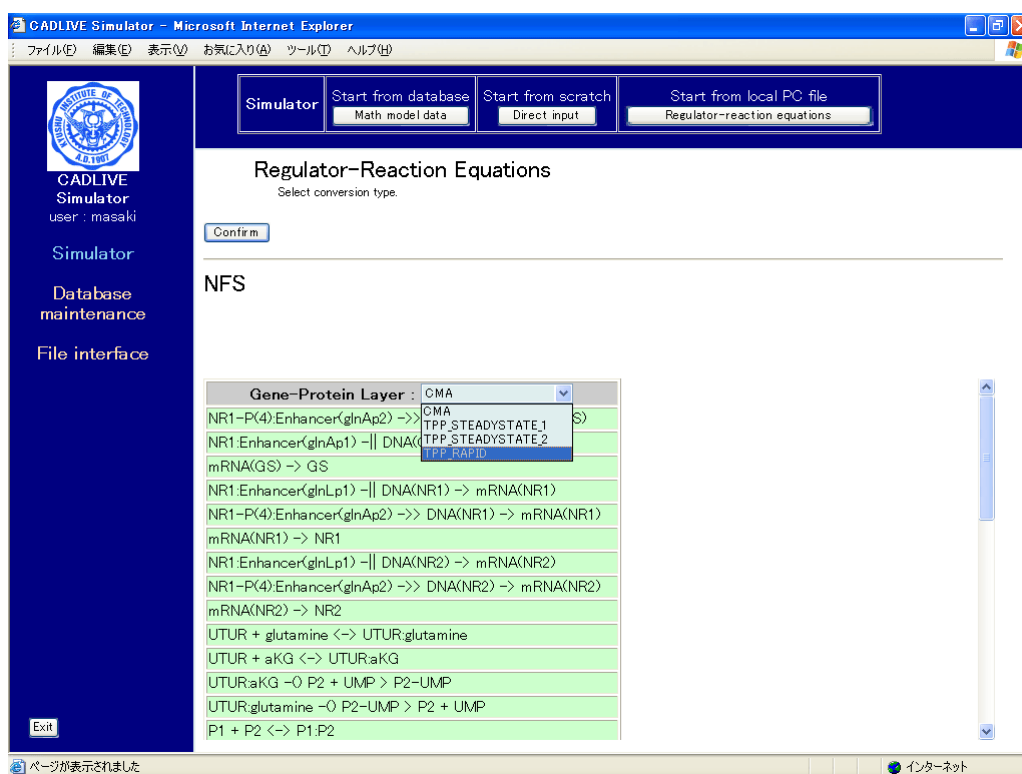


図 2.4-2 CADLIVE シミュレータの画面

2.5. 感度解析

システムの評価を行う際に、重要となるのがシステム感度(Sensitivity)^[89]である。これはあるパラメタの変化に対して、システムがどの程度の影響を受けるかを示すものである。パラメタの変化は、システム内部のものならば内乱、システム外部のものであれば外乱を示すものとなる。このパラメタに対する感度を調べる事で、システムの特徴が明らかになる事も多い。例えば、ある結合定数に対する感度が極めて高ければ、その反応に関わる蛋白質が重要な役割を果たしていると推測できる。

2.5.1. 感度の計算式

システムの感度を求める場合に最も正確な算出方法は、感度を調べたいシステムをあらわした数式を、求める感度のパラメタで微分することである。しかし、多くの場合は、システムは複雑な微分方程式や代数方程式の集合であるため、あるパラメタで微分する事は困難である。そこでパラメタに微小な変化を与え、その変化を与える前後におけるシステムの変化から算出する方法がとられる。すなわち、あるパラメタ(parameter)に対するシステムの感度は以下の式で与えられる。

$$Sensitivity = \frac{\ln S' - \ln S}{\ln(\text{parameter}') - \ln(\text{parameter})}$$

[']のついたものはパラメタ変化後の値であり、Sはシステムの出力値を示す。

本研究で対象とする窒素同化システムは、環境中のアンモニア濃度の変化に対して、窒素と炭素のバランスを保つ働きを示す。すなわち、N/Cがシステムの出力となる。ここで、パラメタの摂動としては外部摂動(外乱)と内部摂動が考えられ、外部摂動に対する感度(External sensitivity)と内部摂動に対する感度(Internal sensitivity)をそれぞれ以下の式で定義した。External sensitivityは、アンモニア濃度の変化に対するN/C変化と定義している。

$$\text{External sensitivity} = \frac{\Delta \ln N/C \text{ ratio}}{\Delta \ln NH_3}$$

Internal sensitivityは、内部摂動としてタンパク質の合成速度(k)の変化に対する

N/C 変化と定義している。

$$\text{Internal sensitivity} = \frac{\Delta \ln N/C \text{ ratio}}{\Delta \ln k}$$

また、これらの摂動に対する感度に加えて、アンモニア濃度の広範囲の変化に対する N/C の相対的な変化量を示す値として **Relative change** を定義した。

$$\text{Relative change} = \frac{\ln(N/C \text{ ratio}') - \ln(N/C \text{ ratio})}{\ln(NH_3') - \ln(NH_3)}$$

3. モデル作成

3.1. システムのモデリング

生命システムをシミュレーションにより解析するためには、モデリングが必要となる。もちろん、解析の目的に応じて、モデリングに要求される精度も異なる。仮に生命システムを詳細に再現する事を目的とするならば、モデリングの際にはシステムに関わるあらゆる反応を組み込む必要があり、さらにはパラメタについても高精度に調節する必要が生じる。本研究では、窒素同化システムの制御メカニズムを明らかにする事を目的としているため、最低でもシステムが持つ制御を再現可能なモデルを作成する必要がある。

システムをモデリングする具体的な手順としては、既存の生命システムに関する知見からシステムの特徴を抜き出し、それらを組み合わせて制御反応モデルを作成し、数学モデルに書き下す。今回のモデリングに関しては **CADLIVE** を使用した。

3.1.1. モデリング手順

本研究におけるモデル作成の手順は以下の通りである。

1. **CADLIVE** エディタを用いて、窒素同化システムのネットワークを描画する。
2. **CADLIVE** エディタにより生成された **XML** ファイルを **CADLIVE** シミュレータに送付する。
3. **CADLIVE** シミュレータ上で制御反応式から数式への変換を行う。選択できる数式から二相分離法を選択して、変換された数式をダウンロードする。
4. また、二相分離法とは別に **CMA** 形式に変換した数式をダウンロードする。
5. **MATLAB** を用いて **CMA** 形式のモデルから定常値を計算し、これを初期値として保存する。
6. 作成したシミュレーションプログラム上で、**3** 及び **5** で得た数式と初期値を用いて計算が可能である事を確認する。

7. 遺伝的アルゴリズムを用いて各種パラメタを最適化する。
8. 7の結果を踏まえ、微調整を加える。

3.1.2. 窒素同化システムの数学モデル

窒素同化システムを代数方程式及び微分方程式へと数式化した。結合相・全物質量は代数方程式に、反応相は微分方程式へと変換した。窒素同化システムの代数方程式・微分方程式について表 3.1-1 に示す。

表 3.1-1 窒素同化システムの数学モデルの代数方程式及び微分方程式

全物質量	* [X] _o means X of the total.
[UTUR] _o	= [UTUR] + [UTUR:glutamine] + [UTUR:aKG] + [P2:UMP:UTUR:aKG] + [UTUR:glutamine:P2-UMP] + [GlnK:UMP:aKG:UTUR] + [GlnK-UMP:glutamine:UTUR] + [aKG:P2-UMP:glutamine:UTUR] + [aKG:P2:UMP:aKG:UTUR]
[P2] _o	= [P2] + [P2:UMP:UTUR:aKG] + [P1:P2] + [GS:AMP:P1:P2] + [NR2:P2] + [NR2-P:P2:ADP] + [NR1-P:NR2:P2] + [aKG:P2] + [aKG:P2:UMP:aKG:UTUR]
[P2-UMP] _o	= [P2-UMP] + [UTUR:glutamine:P2-UMP] + [P1:P2-UMP] + [GS-AMP:P1:P2-UMP] + [aKG:P2-UMP:P1] + [aKG:P2-UMP:glutamine:UTUR] + [GS-AMP:aKG:P2-UMP:P1] + [aKG:P2-UMP]
[P1] _o	= [P1] + [P1:P2] + [P1:P2-UMP] + [GS:AMP:P1:P2] + [GS-AMP:P1:P2-UMP] + [GS-AMP:P1:GlnK-UMP] + [GS:AMP:P1:GlnK] + [GlnK-UMP:P1] + [GlnK:P1] + [aKG:P2-UMP:P1] + [GS-AMP:aKG:P2-UMP:P1]
[GS] _o	= [GS] + [GS:AMP:P1:P2] + [GS:AMP:P1:GlnK]
[GS-AMP] _o	= [GS-AMP] + [GS-AMP:P1:P2-UMP] + [GS-AMP:P1:GlnK-UMP] + [GS-AMP:aKG:P2-UMP:P1]
[NR2] _o	= [NR2] + [NR2:P2] + [NR2:ATP] + [NR1-P:NR2:P2] + [NR2:GlnK] + [NR1-P:NR2:GlnK]
[NR2-P] _o	= [NR2-P] + [NR2-P:P2:ADP] + [NR1:NR2-P] + [NR2-P:ADP:GlnK]
[NR1] _o	= [NR1] + [NR1:NR2-P] + [NR1:acetyl] + [NR1:Enhancer(glnAp1)] + [NR1:Enhancer(glnLp1)]
[NR1-P] _o	= [NR1-P] + [NR1-P:NR2:P2] + 4[NR1-P(4):Enhancer(glnAp2)] + [NR1-P:NR2:GlnK] + [NR1-P:Enhancer(GlnK)] + [NR1-P:governor] + [NR1-P:Enhancer(Nac)]
[Enhancer(glnAp1)] _o	= [Enhancer(glnAp1)] + [NR1:Enhancer(glnAp1)]
[Enhancer(glnLp1)] _o	= [Enhancer(glnLp1)] + [NR1:Enhancer(glnLp1)]
[Enhancer(glnAp2)] _o	= [Enhancer(glnAp2)] + [NR1-P(4):Enhancer(glnAp2)]

$$[\text{GlnK}]_o = [\text{GlnK}] + [\text{GlnK:P1}] + [\text{NR2:GlnK}] + [\text{GS:AMP:P1:GlnK}] + [\text{GlnK:UMP:aKG:UTUR}] +$$

$$[\text{NR2-P:ADP:GlnK}] + [\text{NR1-P:NR2:GlnK}]$$

$$[\text{GlnK-UMP}]_o = [\text{GlnK-UMP}] + [\text{GlnK-UMP:P1}] + [\text{GS-AMP:P1:GlnK-UMP}] +$$

$$\text{GlnK-UMP:glutamine:UTUR}]$$

$$[\text{governor}]_o = [\text{governor}] + [\text{NR1-P:governor}]$$

$$[\text{Enhancer(GlnK)}]_o = [\text{Enhancer(GlnK)}] + [\text{NR1-P:Enhancer(GlnK)}]$$

$$[\text{Enhancer(Nac)}]_o = [\text{Enhancer(Nac)}] + [\text{NR1-P:Enhancer(Nac)}]$$

結合相

$$[\text{UTUR:glutamine}] = K_b[1][\text{UTUR}][\text{glutamine}]$$

$$[\text{UTUR:aKG}] = K_b[2][\text{UTUR}][\text{aKG}]$$

$$[\text{P2:UMP:UTUR:aKG}] = K_b[3][\text{UTUR:aKG}][\text{P2}][\text{UMP}]$$

$$[\text{UTUR:glutamine:P2-UMP}] = K_b[4][\text{UTUR:glutamine}][\text{P2-UMP}]$$

$$[\text{P1:P2}] = K_b[5][\text{P1}][\text{P2}]$$

$$[\text{P1:P2-UMP}] = K_b[6][\text{P1}][\text{P2-UMP}]$$

$$[\text{GS:AMP:P1:P2}] = K_b[7][\text{P1:P2}][\text{GS}][\text{AMP}]$$

$$[\text{GS-AMP:P1:P2-UMP}] = K_b[8][\text{P1:P2-UMP}][\text{GS-AMP}]$$

$$[\text{NR2:P2}] = K_b[9][\text{NR2}][\text{P2}]$$

$$[\text{NR2:ATP}] = K_b[10][\text{NR2}][\text{ATP}]$$

$$[\text{NR2-P:P2:ADP}] = K_b[11][\text{P2}][\text{NR2-P}][\text{ADP}]$$

$$[\text{NR1:NR2-P}] = K_b[12][\text{NR1}][\text{NR2-P}]$$

$$[\text{NR1:acety}] = K_b[13][\text{NR1}][\text{acety}]$$

$$[\text{NR1-P:NR2:P2}] = K_b[14][\text{NR2:P2}][\text{NR1-P}]$$

$$[\text{NR1:Enhancer(glnAp1)}] = K_b[15][\text{NR1}][\text{Enhancer(glnAp1)}]$$

$$[\text{NR1:Enhancer(glnLp1)}] = K_b[16][\text{NR1}][\text{Enhancer(glnLp1)}]$$

$$[\text{NR1-P(4):Enhancer(glnAp2)}] = K_b[17]^4[\text{NR1-P}]^4[\text{Enhancer(glnAp2)}]$$

$$[\text{GS-AMP:P1:GlnK-UMP}] = K_b[18][\text{GlnK-UMP:P1}][\text{GS-AMP}]$$

$$[\text{GS:AMP:P1:GlnK}] = K_b[19][\text{GS}][\text{GlnK:P1}][\text{AMP}]$$

$$[\text{NR2-P:ADP:GlnK}] = K_b[20][\text{NR2-P}][\text{GlnK}][\text{ADP}]$$

$$[\text{NR1-P:NR2:GlnK}] = K_b[21][\text{NR1-P}][\text{NR2:GlnK}]$$

$$[\text{GlnK:UMP:aKG:UTUR}] = K_b[22][\text{GlnK}][\text{UTUR:aKG}][\text{UMP}]$$

$$[\text{GlnK-UMP:glutamine:UTUR}] = K_b[23][\text{GlnK-UMP}][\text{UTUR:glutamine}]$$

$$[\text{GlnK-UMP:P1}] = K_b[24][\text{GlnK-UMP}][\text{P1}]$$

$$[\text{GlnK:P1}] = K_b[25][\text{GlnK}][\text{P1}]$$

$$[NR1-P:Enhancer(GlnK)] = Kb[26][NR1-P][Enhancer(GlnK)]$$

$$[NR1-P:governor] = Kb[27][NR1-P][governor]$$

$$[NR2:GlnK] = Kb[28][GlnK][NR2]$$

$$[NR1-P:Enhancer(Nac)] = Kb[29][Enhancer(Nac)][NR1-P]$$

$$[aKG:P2] = Kb[30]^3[aKG]^3[P2]$$

$$[aKG:P2-UMP:P1] = Kb[31][aKG:P2-UMP][P1]$$

$$[GS-AMP:aKG:P2-UMP:P1] = Kb[32][aKG:P2-UMP:P1][GS-AMP]$$

$$[aKG:P2-UMP:glutamine:UTUR] = Kb[33][aKG:P2-UMP][UTUR:glutamine]$$

$$[aKG:P2:UMP:aKG:UTUR] = Kb[34][aKG:P2][UTUR:aKG][UMP]$$

$$[aKG:P2-UMP] = Kb[35]^3[aKG]^3[P2-UMP]$$

反応相

$$\begin{aligned} \frac{d[mRNA(GS)]}{dt} = & +km[1]([NR1-P(4):Enhancer(glnAp2)]/[Enhancer(glnAp2)]_o) \cdot [DNA(GS)] \\ & \cdot (1.3 - [NR-P:governor]/[governor]_o) \\ & + km[2](1.0 - ([NR1:Enhancer(glnAp1)]/[Enhancer(glnAp1)]_o)) \cdot [DNA(GS)] \\ & - kmd[2][mRNA(GS)] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[mRNA(NR1)]}{dt} = & + km[3](1.0 - ([NR1:Enhancer(glnLp1)]/[Enhancer(glnLp1)]_o)) \cdot [DNA(NR1)] \\ & + km[4]([NR1-P(4):Enhancer(glnAp2)]/[Enhancer(glnAp2)]_o) \cdot [DNA(NR1)] \\ & \cdot (1.3 - [NR-P:governor]/[governor]_o) \\ & - kmd[2][mRNA(NR1)] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[mRNA(NR2)]}{dt} = & + km[5](1.0 - ([NR1:Enhancer(glnLp1)]/[Enhancer(glnLp1)]_o)) \cdot [DNA(NR2)] \\ & + km[6]([NR1-P(4):Enhancer(glnAp2)]/[Enhancer(glnAp2)]_o) \cdot [DNA(NR2)] \\ & \cdot (1.3 - [NR-P:governor]/[governor]_o) \\ & - kmd[3][mRNA(NR2)] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[mRNA(GlnK)]}{dt} = & + km[7]([NR1-P:Enhancer(GlnK)]/[Enhancer(GlnK)]_o)[DNA(GlnK)] \\ & - kmd[4][mRNA(GlnK)] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[mRNA(nac)]}{dt} = & + km[8]([NR1-P:Enhancer(Nac)]/[Enhancer(Nac)]_o)[DNA(nac)] \\ & - kmd[5][mRNA(nac)] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[P2]}{dt} = & -kx[1][P2:UMP:UTUR:aKG] + kx[2][UTUR:glutamine:P2-UMP] \\ & - kx[3][aKG:P2:UMP:aKG:UTUR] + kx[4][aKG:P2-UMP:glutamine:UTUR] \end{aligned}$$

$$\frac{d[P2-UMP]}{dt} = -kx[2][UTUR : glutamine : P2-UMP] + kx[1][P2:UMP:UTUR:aKG] \\ + kx[3][aKG : P2:UMP:aKG:UTUR] - kx[4][aKG : P2-UMP : glutamine : UTUR]$$

$$\frac{d[GS]}{dt} = -kx[5][GS : AMP : P1 : P2] - kpd[1][GS : AMP : P1 : P2] + kx[6][GS - AMP : P1 : P2 - UMP] \\ + kp[1][mRNA(GS)] - kpd[2][GS] + kx[7][GS - AMP : P1 : GlnK - UMP] \\ - kx[8][GS : AMP : P1 : GlnK] - kpd[3][GS : AMP : P1 : GlnK] \\ + kx[9][GS - AMP : aKG : P2 - UMP : P1]$$

$$\frac{d[GS - AMP]}{dt} = -kx[6][GS - AMP : P1 : P2 - UMP] - kpd[4][GS - AMP : P1 : P2 - UMP] \\ + kx[5][GS : AMP : P1 : P2] + kx[8][GS : AMP : P1 : GlnK] \\ - kx[7][GS - AMP : P1 : GlnK - UMP] - kpd[5][GS - AMP] \\ - kpd[6][GS - AMP : P1 : GlnK - UMP] \\ - kpd[7][GS - AMP : aKG : P2 - UMP : P1] - kx[9][GS - AMP : aKG : P2 - UMP : P1]$$

$$\frac{d[NR2]}{dt} = -kpd[8][NR2 : P2] - kx[10][NR2 : ATP] - kpd[9][NR2 : ATP] + kx[11][NR2 - P : P2 : ADP] \\ + kx[12][NR1 : NR2 - P] + kp[2][mRNA(NR2)] - kpd[10][NR2] - kpd[11][NR1 - P : NR2 : P2] \\ + kx[13][NR2 - P : ADP : GlnK] - kpd[12][NR2 : GlnK] + kpd[13][NR1 - P : NR2 : GlnK]$$

$$\frac{d[NR2 - P]}{dt} = -kx[11][NR2 - P : P2 : ADP] - kpd[14][NR2 - P : P2 : ADP] - kx[12][NR1 : NR2 - P] \\ - kpd[15][NR1 : NR2 - P] + kx[10][NR2 : ATP] - kpd[16][NR2 - P] \\ - kx[13][NR2 - P : ADP : GlnK] - kpd[17][NR2 - P : ADP : GlnK]$$

$$\frac{d[NR1]}{dt} = -kx[14][NR1 : NR2 - P] - kpd[18][NR1 : NR2 - P] - kx[15][NR1 : acetly] - kpd[19][NR1 : acetly] \\ - kpd[20][NR1 : Enhancer(glnAp1)] - kpd[21][NR1 : Enhancer(glnLp1)] \\ + kx[16][NR1 - P : NR2 : P2] + kp[3][mRNA(NR1)] - kpd[22][NR1] \\ + kx[17][NR1 - P : NR2 : GlnK]$$

$$\frac{d[NR1 - P]}{dt} = -kx[16][NR1 - P : NR2 : P2] - kpd[23][NR1 - P : NR2 : P2] + kx[14][NR1 : NR2 - P] \\ + kx[15][NR1 : acetly] - kdp[24] \cdot 4[NR1 - P(4) : Enhancer(glnAp2)] \\ - kpd[25][NR1 - P] - kpd[26][NR1 - P : governor] \\ - kpd[27][NR1 - P : Enhancer(GlnK)] - kx[17][NR1 - P : NR2 : GlnK] \\ - kpd[28][NR1 - P : NR2 : GlnK] - kpd[29][NR1 - P : Enhancer(Nac)]$$

$$\frac{d[GlnK]}{dt} = +kp[4][mRNA(GlnK)] + kx[18][GlnK - UMP : glutamine : UTUR] - kpd[30][GlnK] \\ - kpd[31][GlnK : P1] - kpd[32][NR2 : GlnK] - kx[19][GlnK : UMP : aKG : UTUR] \\ - kpd[33][GS : AMP : GlnK : P1] - kpd[34][NR1 - P : NR2 : GlnK] \\ - kpd[35][GlnK : UMP : aKG : UTUR] - kpd[36][NR2 - P : ADP : GlnK]$$

$$\frac{d[\text{GlnK} - \text{UMP}]}{dt} = +kx[19][\text{GlnK} : \text{UMP} : a\text{KG} : \text{UTUR}] - kpd[37][\text{GS} - \text{AMP} : \text{GlnK} - \text{UMP} : \text{P1}]$$

$$- kpd[38][\text{GlnK} - \text{UMP} : \text{P1}] - kx[18][\text{GlnK} - \text{UMP} : \text{glutamine} : \text{UTUR}]$$

$$- kpd[39][\text{GlnK} - \text{UMP}] - kpd[40][\text{GlnK} - \text{UMP} : \text{glutamine} : \text{UTUR}]$$

$$\frac{d[\text{nac}]}{dt} = +kp[5][\text{mRNA}(\text{nac})] - kpd[41][\text{nac}]$$

代謝相

$$\frac{d[\text{Gln}]}{dt} = \frac{[\text{GS}] \cdot kf_2 \cdot \left([\text{Gln}][\text{ATP}][\text{NH}_4^+] - \frac{[\text{Gln}][\text{ADP}][\text{Pi}]}{K} \right)}{\left[(\text{Km}_6 + [\text{Glu}])([\text{NH}_4^+] + \text{Km}_{10}) + \text{Km}_6 \cdot \text{Km}_{10} \cdot \frac{[\text{Gln}]}{\text{Km}_7} \right] \left[\text{Km}_8 \cdot \left(1 + \frac{[\text{ADP}]}{\text{Km}_9} \right) \cdot \left(1 + \frac{[\text{Pi}]}{\text{Km}_{11}} \right) + [\text{ATP}] \right]}$$

$$- \frac{kf_3[\text{GOGAT}][\text{Gln}][\text{AKG}][\text{NADPH}]}{(\text{Km}_{12} + [\text{Gln}])(\text{Km}_{13} + [\text{AKG}])(\text{Km}_{14} + [\text{NADPH}])} - Q[1] \frac{[\text{Gln}]}{(\text{Km}_{16} + [\text{Gln}])}$$

$$\frac{d[\text{Glu}]}{dt} = \frac{[\text{GDH}] \left(\frac{kf_1[\text{AKG}][\text{NADPH}][\text{NH}_4^+]}{\text{Km}_1 \cdot \text{Km}_2 \cdot \text{Km}_3} - \frac{kr_1[\text{Glu}][\text{NADP}^+]}{\text{Km}_4 \cdot \text{Km}_5} \right)}{\left[\left(1 + \frac{[\text{AKG}]}{\text{Km}_1} \right) \left(1 + \frac{[\text{NH}_4^+]}{\text{Km}_3} \right) \cdot \frac{[\text{Glu}]}{\text{Km}_4} \right] \left[1 + \frac{[\text{NADPH}]}{\text{Km}_2} + \frac{[\text{NADP}^+]}{\text{Km}_5} \right]} + 2 \cdot \frac{kf_3[\text{GOGAT}][\text{Gln}][\text{AKG}][\text{NADPH}]}{(\text{Km}_{12} + [\text{Gln}])(\text{Km}_{13} + [\text{AKG}])(\text{Km}_{14} + [\text{NADPH}])}$$

$$- \frac{[\text{GS}] \cdot kf_2 \cdot \left([\text{Gln}][\text{ATP}][\text{NH}_4^+] - \frac{[\text{Gln}][\text{ADP}][\text{Pi}]}{K} \right)}{\left[(\text{Km}_6 + [\text{Glu}])([\text{NH}_4^+] + \text{Km}_{10}) + \text{Km}_6 \cdot \text{Km}_{10} \cdot \frac{[\text{Gln}]}{\text{Km}_7} \right] \left[\text{Km}_8 \cdot \left(1 + \frac{[\text{ADP}]}{\text{Km}_9} \right) \cdot \left(1 + \frac{[\text{Pi}]}{\text{Km}_{11}} \right) + [\text{ATP}] \right]} - Q[2] \frac{[\text{Glu}]}{(\text{Km}_{17} + [\text{Glu}])}$$

$$\frac{d[\text{AKG}]}{dt} = - \frac{kf_5[\text{GOGAT}][\text{Gln}][\text{AKG}][\text{NADPH}]}{(\text{Km}_{12} + [\text{Gln}])(\text{Km}_{13} + [\text{AKG}])(\text{Km}_{14} + [\text{NADPH}])} - \frac{[\text{GDH}] \left(\frac{kf_1[\text{AKG}][\text{NADPH}][\text{NH}_4^+]}{\text{Km}_1 \cdot \text{Km}_2 \cdot \text{Km}_3} - \frac{kr_1[\text{Glu}][\text{NADP}^+]}{\text{Km}_4 \cdot \text{Km}_5} \right)}{\left[\left(1 + \frac{[\text{AKG}]}{\text{Km}_1} \right) \left(1 + \frac{[\text{NH}_4^+]}{\text{Km}_3} \right) \cdot \frac{[\text{Glu}]}{\text{Km}_4} \right] \left[1 + \frac{[\text{NADPH}]}{\text{Km}_2} + \frac{[\text{NADP}^+]}{\text{Km}_5} \right]}$$

$$+ Q[3] \cdot [\text{Dummy}(\text{TCA})] \frac{[\text{Dummy}(\text{TCA})]}{(\text{Km}_{18} + [\text{Dummy}(\text{TCA})])} - Q[4] \frac{[\text{AKG}]}{(\text{Km}_{19} + [\text{AKG}])}$$

3.1.3. 窒素同化システムの初期値の決定

代数方程式を解くにあたっては、初期値の決定が非常に重要な問題となる。しかしながら、各種パラメタを設定する以前に初期値を決定することはできないので、まずは計算実行可能な仮の値を代入しておくことになる。本研究においては、二相分離法とは別に **CMA** 形式に変換した数式を用意し、数値計算ソフトウェア (**MATLAB**) を用いて定常値計算したものをを用いた。定常値計算における各種パラメタは、無理のない程度の適当な値とした。この初期値の決定に関しては、その他の手段でも適当な定常値が得られる方法ならば問題ない。この手順の後、**3.1.4** に示すパラメタの最適化を実施し、最適化されたパラメタを用いた計算で得られた定常値を窒素同化システムの初期値として用いた。この初期値を表 **3.1-2** に示す。

表 3.1-2 窒素同化システムの数学モデルで用いる初期値

構成要素	定義	濃度
UTUR	UTase/UR	2.763105×10^{-6} [nM]
P2	PII	5.418544×10^{-1} [nM]
P2-UMP	uridylated PII	6.748318×10^{-1} [nM]
GlnK	GlnK	7.964620×10 [nM]
GlnK-UMP	uridylated GlnK	4.724517×10 [nM]
GS	glutamine synthetase	1.535636×10^2 [nM]
GS-AMP	adenylylated GS	4.309176×10 [nM]
GOGAT	glutamate synthase	6.000000×10^2 [nM]
GDH	glutamine dehydrogenase	1.000000×10^2 [nM]
P1	PI, adenylyltransferase	3.427711 [nM]
NR1	NRI	4.687643×10^{-1} [nM]
NR1-P	phosphorylated NRI	6.554415×10 [nM]
NR2	NRII	1.214602×10^{-2} [nM]
NR2-P	phosphorylated NRII	1.075513×10^2 [nM]
nac		3.447690×10^{-1} [nM]
Enhancer(glnAp1)	enhancer	9.552226×10^{-1} [nM]
Enhancer(glnLp1)	enhancer	9.552226×10^{-1} [nM]
Enhancer(glnAp2)	enhancer	9.315546×10^{-1} [nM]

Enhancer(GlnK)	enhancer	1.502762×10^{-2} [nM]
Enhancer(Nac)	enhancer	9.384876×10^{-1} [nM]
AMP		1.00×10^6 [nM]
ADP		1.00×10^6 [nM]
ATP		1.00×10^6 [nM]
UMP		1.00×10^6 [nM]
mRNA(GS)	mRNA of GS	3.447689×10^{-1} [nM]
mRNA(NR1)	mRNA of NRI	2.811910×10^{-1} [nM]
mRNA(NR2)	mRNA of NRII	2.811910×10^{-1} [nM]
mRNA(GlnK)	mRNA of GlnK	2.462431×10^{-1} [nM]
mRNA(nac)	mRNA of nac	1.537818×10^{-2} [nM]
DNA1(GS)	gene encoding GS	1.00 [nM]
DNA1(NR1)	gene encoding NRI	1.00 [nM]
DNA1(NR2)	gene encoding NRII	1.00 [nM]
DNA(GlnK)	gene encoding GlnK	1.00 [nM]
DNA(nac)	gene encoding of nac	1.00 [nM]
ammonia		1.000000×10^5 [nM]
aKG	2-ketoglutarate (2-KG)	3.486786×10^6 [nM]
glutamine		3.983876×10^5 [nM]
glutamate		3.065781×10^7 [nM]
UTUR:glutamine	glutamine-bound UTase/UR	1.100787 [nM]
UTUR:aKG	2-ketoglutarate -bound UTase/UR	9.634354×10 [nM]
P2:UMP:UTUR:aKG	PII:UMP:UTase/UR: 2-ketoglutarate	5.220417×10^{-1} [nM]
UTUR:glutamine:P2-UMP	UTase/UR:glutamine:PII-UMP	7.428459×10^{-1} [nM]
P1:P2	PI:PII	1.857320×10 [nM]
P1:P2-UMP	PI:PII-UMP	2.313128×10^{-4} [nM]
NR2:P2	NRII:PII	6.581371×10^{-2} [nM]
NR2:ATP	NRII:ATP	1.214602 [nM]
NR2-P:P2:ADP	NRII-P:PII:ADP	5.827713×10^{-1} [nM]
NR1:NR2-P	NRI:NRII-P	5.041620×10^{-3} [nM]
NR1:acetyl	NRI:acetylphosphate	4.687643×10^1 [nM]
NR1-P:NR2:P2	NRI-P:NRII:PII	4.313704×10 [nM]

NR1:Enhancer(glnAp1)	NRI:Enhancer(glnAp1)	4.477742×10 ⁻² [nM]
NR1:Enhancer(glnLp1)	NRI:Enhancer(glnLp1)	4.477742×10 ⁻² [nM]
NR1-P(4):Enhancer(glnAp2)	NRI-P(4):Enhancer(glnAp2)	6.844537×10 ⁻² [nM]
GS:AMP:P1:P2	GS:AMP:PI:PII	2.852168×10 ⁻¹ [nM]
GS-AMP:P1:P2-UMP	GS-AMP:PI:PII-UMP	9.967678×10 ⁻⁷ [nM]
NR2:GlnK	NRII:GlnK	4.848405 [nM]
GS-AMP:P1:GlnK-UMP	GS-AMP:PI:GlnK-UMP	6.978399×10 ⁻² [nM]
GS:AMP:P1:GlnK	GS:AMP:PI:GlnK	4.192351×10 ⁻⁴ [nM]
NR2-P:ADP:GlnK	NRII-P:ADP:GlnK	8.566050×10 ⁻² [nM]
NR1-P:NR2:GlnK	NRI-P:NRII:GlnK	3.177846 [nM]
GlnK:UMP:aKG:UTUR	GlnK:UMP: 2-ketoglutarate:UTase/UR	7.673397×10 ⁻¹ [nM]
GlnK-UMP:glutamine:UTUR	GlnK-UMP:glutamine:UTase/UR	5.200685×10 ⁻¹ [nM]
GlnK-UMP:P1	GlnK-UMP:PI	1.619428 [nM]
GlnK:P1	GlnK:PI	2.730041 [nM]
NR1-P:Enhancer(GlnK)	NRI-P:Enhancer(GlnK)	9.849724×10 ⁻¹ [nM]
NR1-P:Enhancer(Nac)	NRI-P:Enhancer(Nac)	6.151237×10 ⁻² [nM]
governor	governor of glnAp2	9.384876×10 ⁻¹ [nM]
NR1-P:governor	NRI-P:governor	6.151237×10 ⁻² [nM]
aKG:P2	aKG:PII	2.296986×10 [nM]
aKG:P2-UMP:P1	2-ketoglutarate:PII-UMP:PI	9.805630×10 ⁻³ [nM]
GS-AMP:aKG:P2-UMP:P1	GS-AMP: 2-ketoglutarate:PII-UMP:PI	4.225419×10 ⁻⁵ [nM]
aKG:P2-UMP:glutamine:UTUR	2-ketoglutarate:PII-UMP:glutamine: UTase/UR	3.149013×10 ⁻³ [nM]
aKG:P2:UMP:aKG:UTUR	2-ketoglutarate:PII:UMP:aKG: UTase/UR	2.212998×10 ⁻⁴ [nM]
aKG:P2-UMP	2-ketoglutarate:PII-UMP	2.860693×10 [nM]

3.1.4. 窒素同化システムのパラメタ最適化

システムのシミュレーションを実行する際には、各種パラメタの値が重要である。数学モデルが解析対象となる挙動を再現可能か否かは、パラメタの値によって大きく左右される。しかしながら、ネットワークの制御反応に比べると、パラメタの値に関しては文献から得られる情報は限定的である。特にタンパク質の結合定数は実験による測定が困難であり、さらに試験管内での実験で得られた値が生体内での値と同一である保証はない。本研究では、結合定数 **[Keq]** について、遺伝的アルゴリズムを用いた最適化法を用いることで、数学モデルで使用する値を決定した。

2.3.1 で示すように、遺伝的アルゴリズムによる最適化手法は汎用性を持つが、評価を実施するための評価式は対象とするシステムの出力を考慮して作成する必要がある。すなわち、遺伝的アルゴリズムによる最適化においては適切な評価関数の設定が重要である。本窒素同化システムのパラメタ最適化においては、以下の様に評価値を与えた。

$$\text{評価値 : } Fitness = \frac{N/C \text{ ratio}(\text{low NH}_3 \text{ conc.}) - N/C \text{ ratio}(\text{Peak})}{N/C \text{ ratio}(\text{high NH}_3 \text{ conc.}) - N/C \text{ ratio}(\text{Peak})}$$

ここで、**low NH₃ conc.**は環境中のアンモニア濃度が低い状態を指し、**high NH₃ conc.**は環境中のアンモニア濃度の高い状態を示す。シミュレーションでは、アンモニア濃度を 1.000000×10^5 [nM] と与えており、シミュレーション内の時間が 1000[min] に達した時にアンモニア濃度を 1/10 へと低下させることで低濃度状態とした。環境中のアンモニア濃度が高い状態での **N/C** を **A**、急激なアンモニア濃度の低下により減少した **N/C** の最小値を **Peak**、その後のシステムの挙動により回復したアンモニア濃度が低い状態での **N/C** を **B** として、一旦減少した **N/C** がどこまで回復するかを $(B - \text{Peak}) / (A - \text{Peak})$ の式で表し、これを評価値とした。これにより、アンモニアの濃度低下に伴い、減少した **N/C** がシステムの働きにより回復する挙動を示すパラメタを得ることができた。本研究では、**GS** 濃度やその他のタンパク質濃度なども考慮した補助的な評価式を用いた最適化や手動によるパラメタの微調節を経て、最終的なパラメタを決定している。窒素同化システムの数学モデルで用いたパラメタを表 3.1-3 に示す。

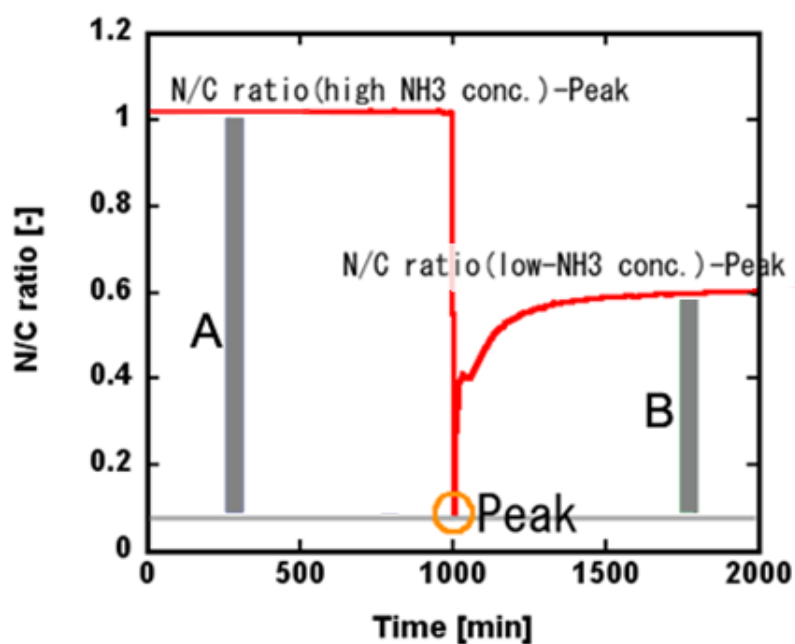


図 3.1-1 遺伝的アルゴリズムの評価値の決定

表 3.1-3 窒素同化システムの数学モデルのパラメタ

パラメタ	説明	値	補足
<i>Kb</i> [1]	association constant between glutamine and UTUR	$10^9 [M^{-1}]$	最適化
<i>Kb</i> [2]	association constant between aKG and UTUR	$10^{10} [M^{-1}]$	最適化
<i>Kb</i> [3]	association constant between P2, UMP and aKG:UTUR	$10^{10} [M^{-2}]$	最適化
<i>Kb</i> [4]	association constant between P2-UMP and glutamine:UTUR	$10^9 [M^{-1}]$	最適化
<i>Kb</i> [5]	association constant between P2 and P1	$10^9 [M^{-1}]$	最適化
<i>Kb</i> [6]	association constant between P2-UMP and P1	$10^5 [M^{-1}]$	最適化
<i>Kb</i> [7]	association constant between GS, AMP and P1:P2	$10^9 [M^{-2}]$	最適化
<i>Kb</i> [8]	association constant between GS-AMP and P1:P2-UMP	$10^5 [M^{-1}]$	最適化
<i>Kb</i> [9]	association constant between NR2 and P2	$10^{10} [M^{-1}]$	最適化
<i>Kb</i> [10]	association constant between NR2 and ATP	$10^5 [M^{-1}]$	最適化
<i>Kb</i> [11]	association constant between P2, ADP and NR2-P	$10^{10} [M^{-2}]$	最適化
<i>Kb</i> [12]	association constant between NR1 and NR2-P	$10^5 [M^{-2}]$	最適化

<i>Kb[13]</i>	association constant between NR1 and acety	$10^5 [M^{-2}]$	最適化
<i>Kb[14]</i>	association constant between NR2:P2 and NR1-P	$10^{10} [M^{-1}]$	最適化
<i>Kb[15]</i>	association constant between NR1 and Enhancer(glnAp1)	$10^8 [M^{-1}]$	最適化
<i>Kb[16]</i>	association constant between NR1 and Enhancer(glnLp1)	$10^8 [M^{-1}]$	最適化
<i>Kb[17]</i>	association constant between NR1-P and Enhancer(glnAp2)	$10^{6.9} [M^{-4}]$	最適化
<i>Kb[18]</i>	association constant between GS-AMP and GlnK-UMP :P1	$10^6 [M^{-1}]$	最適化
<i>Kb[19]</i>	association constant between GS, AMP and GlnK:P1	$10^6 [M^{-2}]$	最適化
<i>Kb[20]</i>	association constant between NR2-P, ADP and GlnK	$10^7 [M^{-2}]$	最適化
<i>Kb[21]</i>	association constant between NR1-P and NR2:GlnK	$10^7 [M^{-1}]$	最適化
<i>Kb[22]</i>	association constant between GlnK, UMP and UTUR:aKG	$10^8 [M^{-2}]$	最適化
<i>Kb[23]</i>	association constant between GlnK-UMP and UTUR:glutamine	$10^7 [M^{-1}]$	最適化
<i>Kb[24]</i>	association constant between GlnK-UMP and P1	$10^7 [M^{-1}]$	最適化
<i>Kb[25]</i>	association constant between GlnK and P1	$10^7 [M^{-1}]$	最適化
<i>Kb[26]</i>	association constant between NR1-P and Enhancer(GlnK)	$10^9 [M^{-1}]$	最適化
<i>Kb[27]</i>	association constant between NR1-P and governor	$10^6 [M^{-1}]$	最適化
<i>Kb[28]</i>	association constant between NR2 and GlnK	$10^{9.7} [M^{-1}]$	最適化
<i>Kb[29]</i>	association constant between NR1-P and Enhancer(Nac)	$10^6 [M^{-1}]$	最適化
<i>Kb[30]</i>	association constant between aKG and P2	$10^3 [M^{-3}]$	最適化
<i>Kb[31]</i>	association constant between aKG:P2-UMP and P1	$10^5 [M^{-1}]$	最適化
<i>Kb[32]</i>	association constant between GS-AMP and aKG:P2-UMP:P1	$10^5 [M^{-1}]$	最適化

<i>Kb[33]</i>	association constant between aKG:P2-UMP and glutamine:UTUR	10^5 [M ⁻¹]	最適化
<i>Kb[34]</i>	association constant between aKG:P2, aKG:UTUR and UMP	10^5 [M ⁻²]	最適化
<i>Kb[35]</i>	association constant between aKG and P2-UMP	10^3 [M ⁻³]	最適化
<i>km[1]</i>	transcription rate constant of mRNA(GS) enhanced by glnAp2	0.15 [min ⁻¹]	推定値
<i>km[2-3]</i>	transcription rate constant	0.03 [min ⁻¹]	推定値
<i>km[4]</i>	transcription rate constant of mRNA(NR1) enhanced by glnAp2	0.06 [min ⁻¹]	推定値
<i>km[5]</i>	transcription rate constant	0.03 [min ⁻¹]	推定値
<i>km[6]</i>	transcription rate constant of mRNA(NR2) enhanced by glnAp2	0.06 [min ⁻¹]	推定値
<i>km[7-11]</i>	transcription rate constant	0.03 [min ⁻¹]	推定値
<i>kmd[1-5]</i>	mRNA degradation rate constant	0.12 [min ⁻¹]	推定値
<i>kp[1-5]</i>	translation rate constant	20.0 [min ⁻¹]	推定値
<i>kpd[1-41]</i>]	protein degradation rate constant	0.035 [min ⁻¹]	文献値 ^[65]
<i>kx[1]</i>	reaction rate constant	10.0 [min ⁻¹]	推定値
<i>kx[2-19]</i>	reaction rate constant	7.0 [min ⁻¹]	推定値
<i>Q[1]</i>	synthesis rate of the glutamine(GS)	3×10^{-2} [G ⁻¹][min ⁻¹]	推定値
<i>Q[2]</i>	synthesis rate of the glutamate(GOGAT)	9×10^{-3} [G ⁻¹] [min ⁻¹]	推定値
<i>Q[3]</i>	synthesis rate of the glutamate(GDH)	1.8×10^{-1} [G ⁻¹] [min ⁻¹]	推定値
<i>Q[4]</i>	outflow and inflow rate of the aKG(TCA)	1.056×10^{-1} [min ⁻¹]	推定値
<i>kf[1]</i>	outflow rate of the glutamine	2.82×10^4 [min ⁻¹]	文献値 ^[66]
<i>kf[2]</i>	outflow rate of the glutamate	1.8×10^6 [min ⁻¹]	推定値
<i>kf[3]</i>	inflow rate of the aKG	2.184×10^4 [min ⁻¹]	推定値
<i>kr[1]</i>		2.88×10^3 [min ⁻¹]	文献値 ^[66]
<i>K[1]</i>		715.2 [-]	文献値 ^[67]
<i>ki[1]</i>		3.6×10^{-3} [min ⁻¹]	推定値
<i>Km[1]</i>	Michaelis constant of aKG	6.0×10^{-3} [M]	文献値 ^[66]
<i>Km[2]</i>	Michaelis constant of NADPH	1.3×10^{-5} [M]	文献値 ^[66]
<i>Km[3]</i>	Michaelis constant of ammonia	3.3×10^{-3} [M]	文献値 ^[66]

<i>Km</i> [4]	Michaelis constant of glutamate	3.8×10^{-3} [M]	文献值 ^[66]
<i>Km</i> [5]	Michaelis constant of NADP ⁺	6.1×10^{-6} [M]	文献值 ^[66]
<i>Km</i> [28]	Michaelis constant of glutamate	3.7×10^{-3} [M]	文献值 ^[67]
<i>Km</i> [7]	Michaelis constant of glutamine	2.5×10^{-3} [M]	文献值 ^[67]
<i>Km</i> [8]	Michaelis constant of ATP	5.0×10^{-4} [M]	文献值 ^[67]
<i>Km</i> [9]	Michaelis constant of ADP	4.4×10^{-5} [M]	文献值 ^[67]
<i>Km</i> [10]	Michaelis constant of ammonia	6.0×10^{-5} [M]	文献值 ^[67]
<i>Km</i> [11]	Michaelis constant of Pi	3.0×10^{-3} [M]	文献值 ^[67]
<i>Km</i> [12]	Michaelis constant of glutamine	2.5×10^{-4} [M]	文献值 ^[90]
<i>Km</i> [13]	Michaelis constant of aKG	7.3×10^{-6} [M]	文献值 ^[90]
<i>Km</i> [14]	Michaelis constant of NADPH	7.7×10^{-6} [M]	文献值 ^[90]
<i>Km</i> [15]	Michaelis constant of ammonia	3.6×10^{-5} [M]	推定値
<i>Km</i> [16]	Michaelis constant of glutamine	1.0×10^{-2} [M]	推定値
<i>Km</i> [17]	Michaelis constant of glutamate	1.0×10^{-2} [M]	推定値
<i>Km</i> [18]	Michaelis constant of Dummy (from TCA)	1.0×10^{-3} [M]	推定値
<i>Km</i> [19]	Michaelis constant of aKG	1.0×10^{-3} [M]	推定値

4. システムのシミュレーション

4.1. 環境中のアンモニア濃度変化時のシミュレーション^[91]

窒素同化システムは、環境中のアンモニア変化に対して N/C を一定に保つように制御が働く。作成した数学モデルを用いて環境中のアンモニア変化に対するシステムの挙動をシミュレーションした。環境中のアンモニア濃度をシミュレーション内の時間で 1000[min]経過時に 1/10 まで低下させ、その変化に対する N/C と GS 濃度の変化を調べた。プロットした結果を図 4.1-1 に示す。1000[min]の時点でアンモニア濃度の低下に伴い、N/C が急激に低下している事が示された。GS の濃度は、アンモニア濃度低下前の約 200[nM]からアンモニア濃度低下後は 800[nM]以上まで増加している事が示された。アンモニア濃度の低下に対して、システムが GS の発現量を増加させ、N/C を回復させる挙動が再現できた。

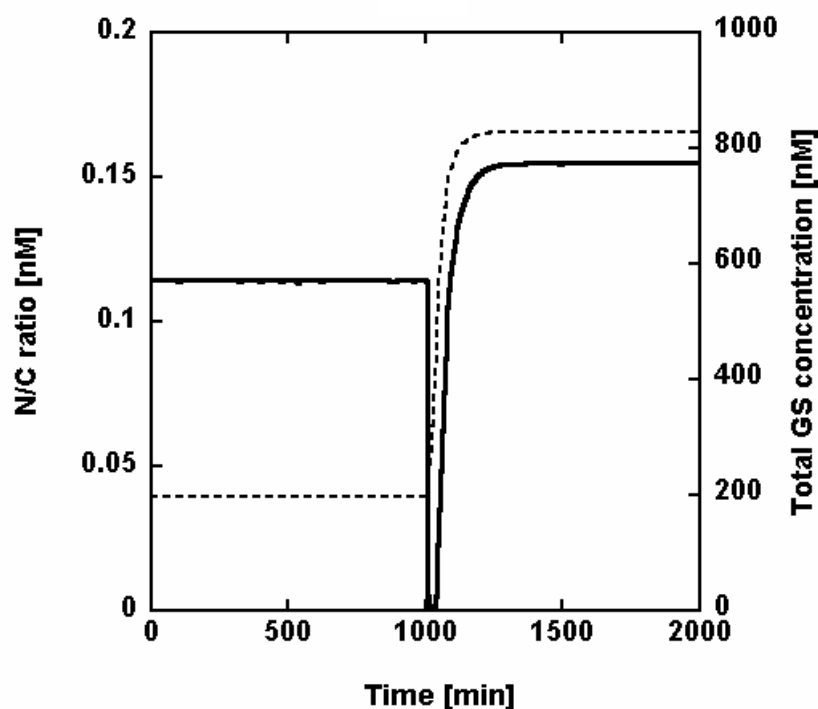


図 4.1-1 環境中のアンモニア濃度低下時のシステムの挙動
(実線が N/C 点線が GS 濃度)

4.2. 実験値とシミュレーション結果との比較

4.1 のシステムのシミュレーションにおいて、環境中のアンモニア濃度の減少に対して、システムが GS を調節する事で N/C を維持するように働く事が示された。ただし、この挙動のみでシステムを再現したと考慮する事はできず、その他の検証が必要とされる。本研究では、大腸菌の遺伝子ノックアウト株におけるアンモニア濃度の通常時、減少時の GS 活性を測定した実験結果^[92]と、対象のタンパク質の発現や濃度を 0 とすることでノックアウト株を模擬したモデルの GS 濃度とを比較した。結果を表 4.2-1 に示す。GS 活性値と GS 濃度の比較であるため、定性的な比較ではあるが、Wild Type と比較して、各遺伝子ノックアウト株の GS 活性の増減とシミュレーションで得られた GS 濃度の増減は一致した。

表 4.2-1 遺伝子ノックアウト実験とシミュレーションとの比較

	NH ₃ 通常時		NH ₃ 制限時	
	実験結果(n) A	Simulation [nM] B	実験結果(n) ^A	Simulation [nM] ^B
Wild Type	150	197.01	1000	828.20
$\Delta glnG$ (NRI)	70	142.86	50	142.86
$\Delta glnL$ (NRII)	500	854.25	700	854.25
$\Delta glnD$ (UTUR)	80	148.54	400	223.91
$\Delta glnB$ (PII)	900	868.25	1000	866.59
$\Delta glnK$ (GlnK)	200	233.20	1000	868.09

A: 透過性細胞内の GS 活性値(GS transferase activity)^[92]。

複数の実験結果の平均。

B: シミュレーションによる GS 濃度

4.3. 環境中のアンモニア濃度に対する N/C と GS 濃度

環境中のアンモニア濃度を 5.000000×10^{-5} [M] から徐々に減少させ、その後再び 5.000000×10^{-5} [M] まで増加させた場合の N/C 及び GS 濃度の値をシミュレーションした。その結果を図 4.3-1 に示す。アンモニア濃度が減少すると、N/C は徐々に増加するが、アンモニア濃度が 2.000000×10^{-5} [M] を下回ったあたりで急激に N/C が回復し、その後、アンモニア濃度の減少に伴って N/C も低下している。同様に GS 濃度もアンモニア濃度の減少に伴って増加しているが、アンモニア濃度が 1.500000×10^{-5} [M] を下回ると、GS 濃度の増加が頭打ちになり、N/C を維持する事ができなくなっている。さらに、アンモニア濃度を減少させた場合の挙動とアンモニア濃度を増加させた場合の挙動が異なっており、いったんアンモニア濃度を減少させた後にアンモニア濃度を増加させると、同じアンモニア濃度域でも N/C と GS 濃度の値が高い値を示し、いわゆるヒステリシス^{[38][93]}を示している。これは、GS の発現量の制御において、NRI、glnAp2 からなる遺伝子調節がポジティブフィードバック^[94]を形成している為と推測できる。すなわち、NRI-P は glnAp2 に結合し、GS, NRI, NR II といった蛋白質をコードする遺伝子オペロンを転写誘導し、GS, NRI, NR II の発現量を増大させるが、発現量が増大した NRI はリン酸化され、さらに NRI の発現量を増大させる。アンモニア濃度が減少する事で、一度ポジティブフィードバックが働くと、NRI が自身の発現量を増大させ続けようとするため、アンモニア濃度を増加させても GS 濃度が高く維持されたままになると推測できる。

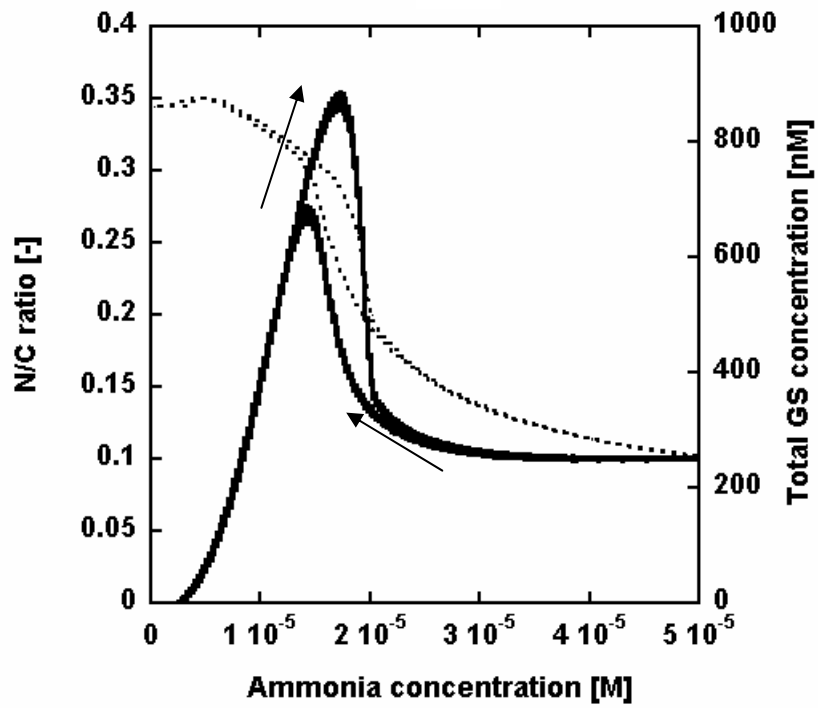


図 4.3-1 アンモニア濃度に対する N/C と GS 濃度
(実線が N/C 点線が GS 濃度)

4.4. GlnK ノックアウト株のアンモニア濃度に対する N/C と GS 濃度

4.2 において、アンモニア濃度に対して、N/C と GS 濃度はヒステリシスを示した。その原因としては、NRI と glnAp2 から構成されるポジティブフィードバックが考えられる。このポジティブフィードバックを抑制するフィードバックも存在しており、GlnK がそのフィードバックを形成している。仮にシステムネットワーク中に GlnK が存在しないとすると、ポジティブフィードバックはよりシステムに影響を及ぼすと推測できる。そこで、GlnK の発現量を 0 とすることで、GlnK をノックアウトした株を再現し、4.2 と同様にアンモニア濃度を 5.000000×10^{-5} [M] から徐々に減少させ、その後再び 5.000000×10^{-5} [M] まで増加させた。その際の N/C と GS 濃度を図 4.4-1 に示す。ポジティブフィードバックの効果が強くなり、アンモニア濃度を増加させても、N/C と GS 濃度が高い値を示したままになっている。このヒステリシス挙動については、5 章の理論解析で別途解析を進めた。

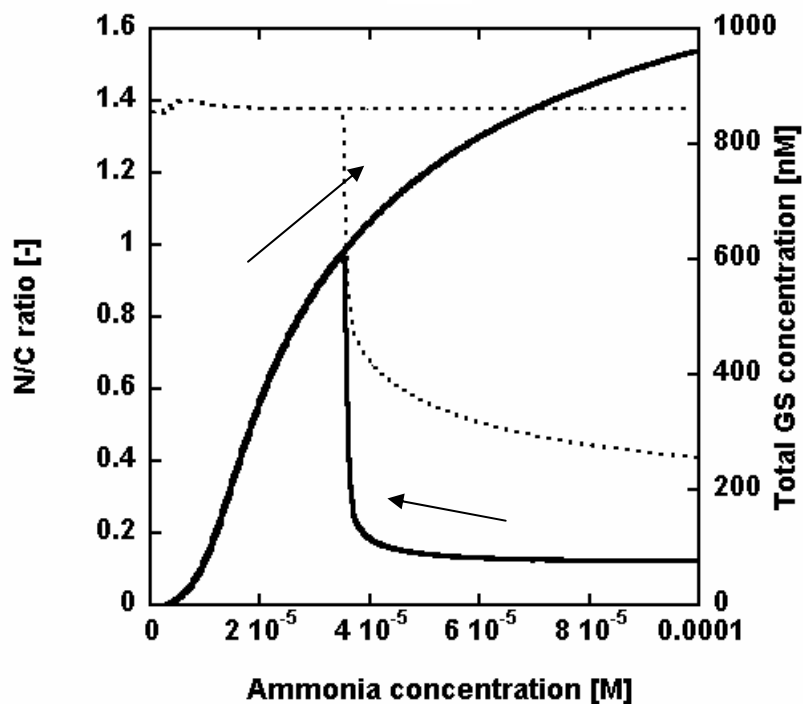


図 4.4-1 GlnK ノックアウト株のアンモニア濃度に対する N/C と GS 濃度
(実線が N/C 点線が GS 濃度)

4.5. 制御モジュールごとのシミュレーション

4.5.1. GS 活性制御モジュールのシミュレーション

窒素同化システムにおける GS の制御は GS 活性制御と GS 合成制御とに分ける事ができる。GS 活性制御の特徴を明らかにするために、GS 活性制御モジュールのみのシステム(図 2.1-5)でシミュレーションを実施した。GS 活性制御モジュールでは、N/C の変化に対し、GS の活性と不活性を調節する事で対応する。シミュレーションでは 1000[min]の時点でアンモニア濃度を 1/5 に減少させ、N/C の変化を調べた。結果を図 4.5-1 に示す。アンモニア濃度の減少に伴って N/C が減少しており、その回復率はわずかである事がわかる。

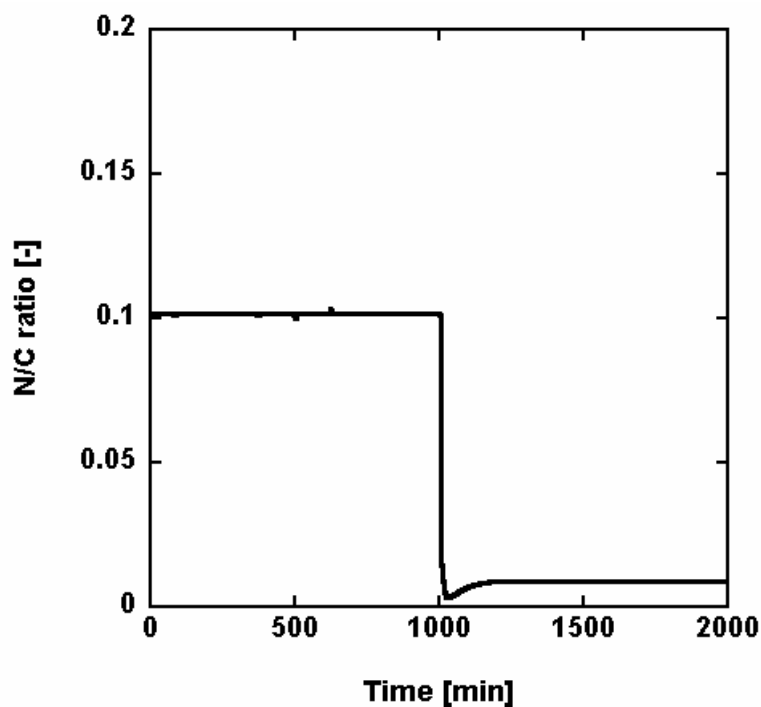


図 4.5-1 GS 活性制御モジュールにおけるアンモニア減少時の N/C

4.5.2. GS 合成制御モジュールのシミュレーション

続いて、GS 合成制御の特性を明らかにするために、GS 合成制御モジュールのみのシステム(図 2.1-6)でシミュレーションを実施した。GS 合成制御モジュールでは、N/C の変化に対し、GS の発現量を調節する事で対応する。シミュレーションでは、1000[min]の時点でアンモニア濃度を 1/5 に減少させ、N/C の変化を調べた。結果を図 4.5-2 に示す。アンモニア濃度の減少に伴って N/C が減少しているが、その後に急激な回復を示し、一時的に 0.15 よりも高い値を示した後に約 0.1 に落ち着いている。すなわち、GS 合成制御モジュールによる制御では、オーバーシュートが発生している事が分かる。

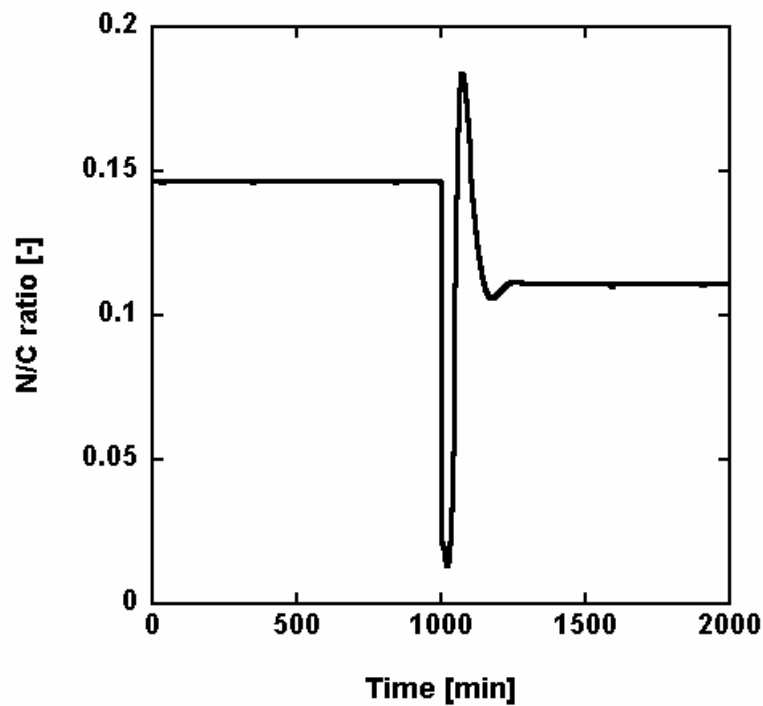


図 4.5-2 GS 合成制御モジュールにおけるアンモニア減少時の N/C

4.5.3. 両制御モジュールを持つシステムのシミュレーション

GS 活性制御モジュールと GS 合成制御モジュールの両モジュールを保持する通常の窒素同化システムについて、4.5.1 と 4.5.2 同様に 1000[min]の時点でアンモニア濃度を 1/5 に減少させ、N/C の変化を調べた。その結果を図 4.5-3 に示す。ここでは、4.5.2 で認められたオーバーシュートが緩和されている事が分かる。すなわち、GS 活性制御モジュールを備える事で、システムは GS の過剰な生産を抑制している事と考えられる。

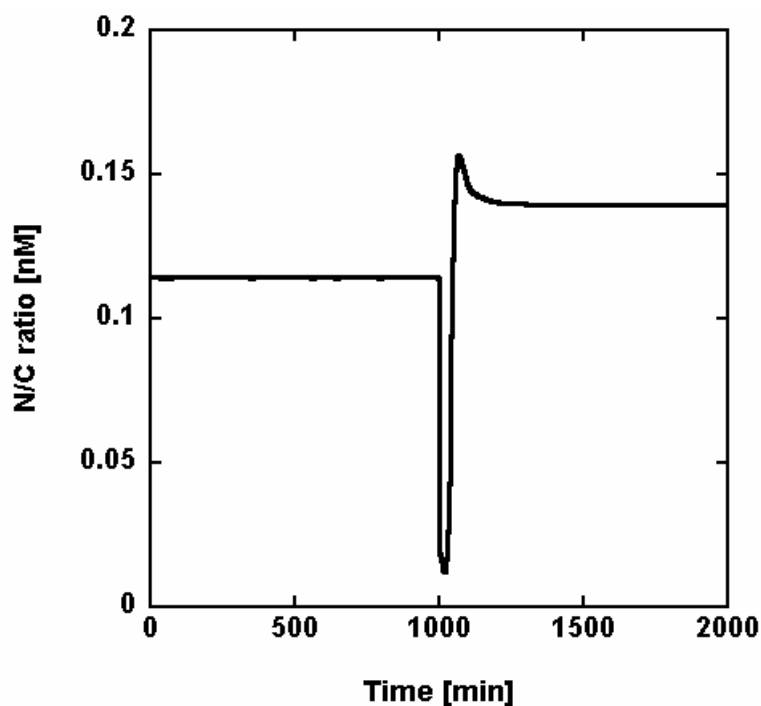


図 4.5-3 両方の制御モジュールを持つシステムにおけるアンモニア減少時の N/C

4.6. システムの感度解析

システムの特性を解明する際には、システムがどのような変化に対して頑強か、もしくは影響を受けるかについて明らかにする事が有用である。本研究では、2.5で示す感度解析について、以下の3種類の感度解析を実施した。それぞれの定義を以下に示す。

External Sensitivity は、アンモニア濃度変化(外乱)に対する N/C の変化と定義した。環境中のアンモニアが微細に変化した場合の N/C の変化を示す。窒素同化システムは、環境中のアンモニア変化に対して N/C 変化を小さくするように働くため、この値が小さい方がシステムが効果的に機能していることを示す。

$$\text{External sensitivity} = \frac{\Delta \ln N/C \text{ ratio}}{\Delta \ln NH_3} \quad (1)$$

Internal sensitivity は、システム内のタンパク質濃度もしくは合成係数の変化(内部摂動)に対する N/C の変化と定義した。システムで用いているタンパク質は、一定値としているものと発現量がコントロールされているものがある。一定値としているタンパク質については、その値自体に摂動を与え、発現量がコントロールされているものについては、その合成係数に摂動を与えた。

$$\text{Internal sensitivity} = \frac{\Delta \ln N/C \text{ ratio}}{\Delta \ln k} \quad (2)$$

これらの感度に加えて、アンモニアの広範囲の変化に対する相対的な N/C 変化を **Relative change** として、定義した。

$$\text{Relative change} = \frac{\ln(N/C \text{ ratio}') - \ln(N/C \text{ ratio})}{\ln(NH_3') - \ln(NH_3)} \quad (3)$$

4.6.1. 各制御モジュールにおけるタンパク質の感度解析

GS 活性制御モジュールと GS 合成制御モジュールのシステム上の特性を明らかにする為に、各モジュールのネットワークを構成するタンパク質について、**Internal sensitivity** を計算した。ここでは、タンパク質の濃度もしくは発現速度を微小に変化させ、それに対する **N/C** の変化を示している。GS 活性制御モジュールの **Internal sensitivity** を図 4.6-1 に、GS 合成制御モジュールの **Internal sensitivity** を図 4.6-2 に、両方のモジュールを備えたシステムの **Internal sensitivity** を図 4.6-3 に示す。比較すると、GS 活性制御モジュールでは、GS 合成制御モジュールや両方のモジュールを備えたシステムよりも **Internal sensitivity** は低い値を示した。逆に GS 合成制御モジュールや両方のモジュールを備えたシステムでは、特に **NRII** と **NRI**、**PII** の感度が高い値を示した。**PII** の発現制御については、フィードバックループによる制御は報告されていない^[95]ため、一定の発現がなされていると考えられる。

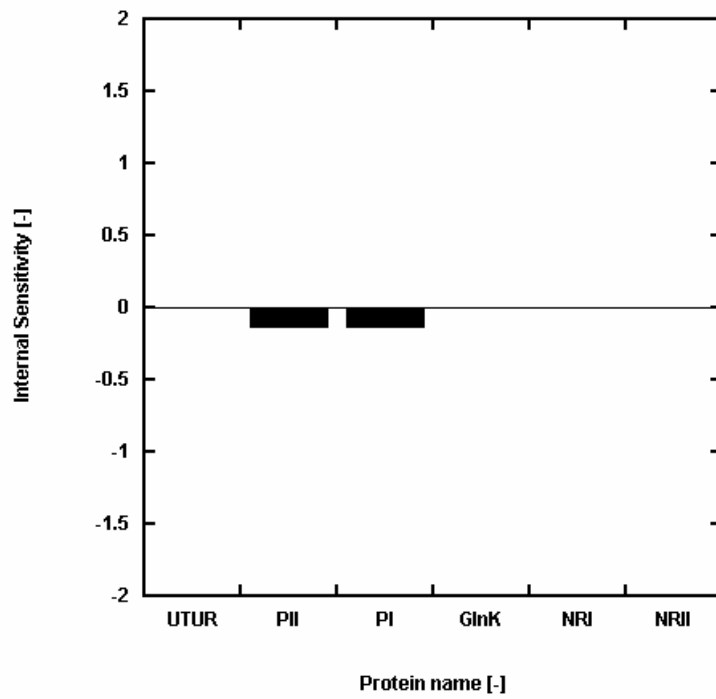


図 4.6-1 GS 活性制御モジュールにおける感度(Internal sensitivity)

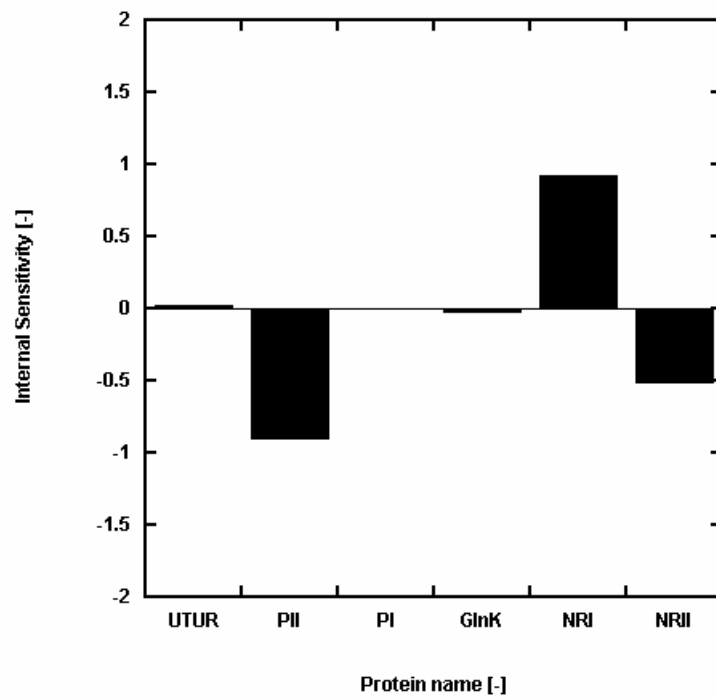


図 4.6-2 GS 合成制御モジュールにおける感度(Internal sensitivity)

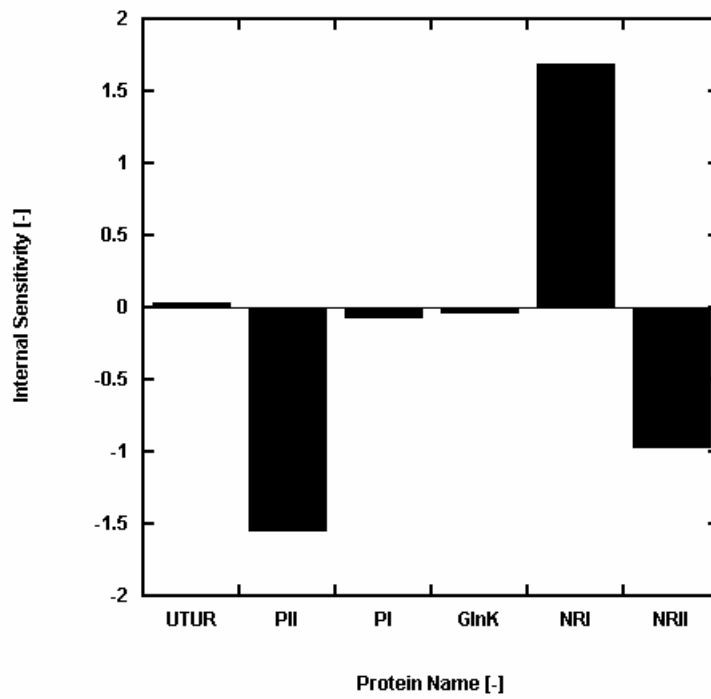


図 4.6-3 両 GS 制御モジュールを備えたシステムにおける感度(Internal sensitivity)

4.6.2. 各タンパク質に対する感度解析

窒素同化システムのネットワークを構成するタンパク質が、それぞれどのような役割を持っているのかを明らかにする為に、各タンパク質の濃度や発現量を 0～2 倍まで変化させ、その時のシステムの制御性能＝**External Sensitivity** と **GS** 濃度を計算した。タンパク質については、その発現機構が数学モデルに含まれるものは mRNA の転写速度係数を変化させ、それ以外のタンパク質については、濃度そのものを変化させた。

UTUR がシステムの **External Sensitivity** と **GS** 濃度に与える影響について図 4.6-4 に、PII がシステムの **External Sensitivity** と **GS** 濃度に与える影響について図 4.6-5 に、PI がシステムの **External Sensitivity** と **GS** 濃度に与える影響について図 4.6-6 に、GlnK がシステムの **External Sensitivity** と **GS** 濃度に与える影響について図 4.6-7 に、NRII がシステムの **External Sensitivity** と **GS** 濃度に与える影響について図 4.6-8 に、NRI がシステムの **External Sensitivity** と **GS** 濃度に与える影響について図 4.6-9 にそれぞれ示す。

4.6.1 の図 4.6-3 では、PII と NRII、NRI の感度が高い値を示していた。図 4.6-4～図 4.6-9 までを比較すると、PII、NRII、NRI のグラフには **GS** 濃度が急激に増加し、これに伴い **External Sensitivity** が急激に変化する領域が認められる。

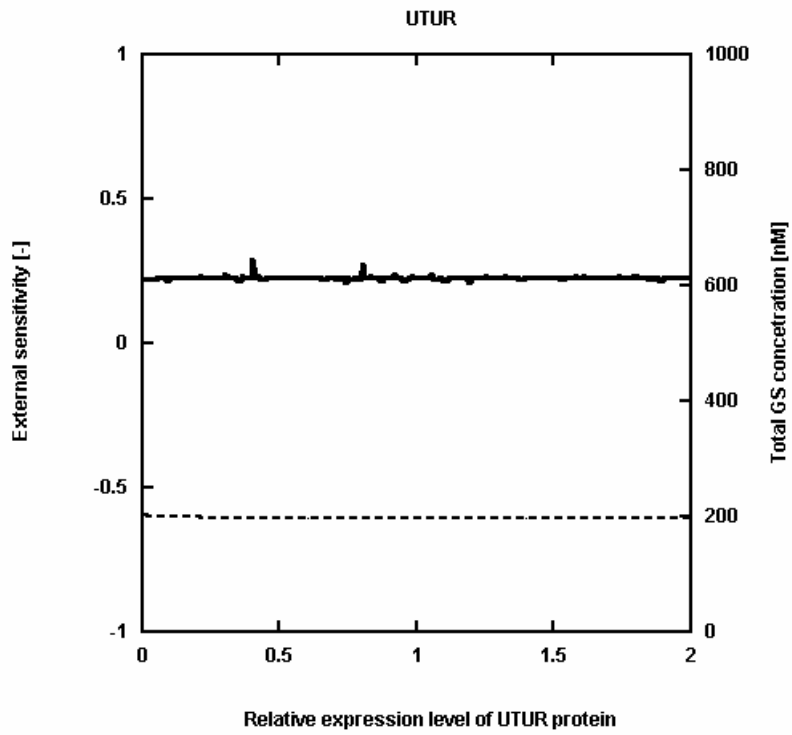


図 4.6-4 UTUR の External Sensitivity と GS 濃度への影響

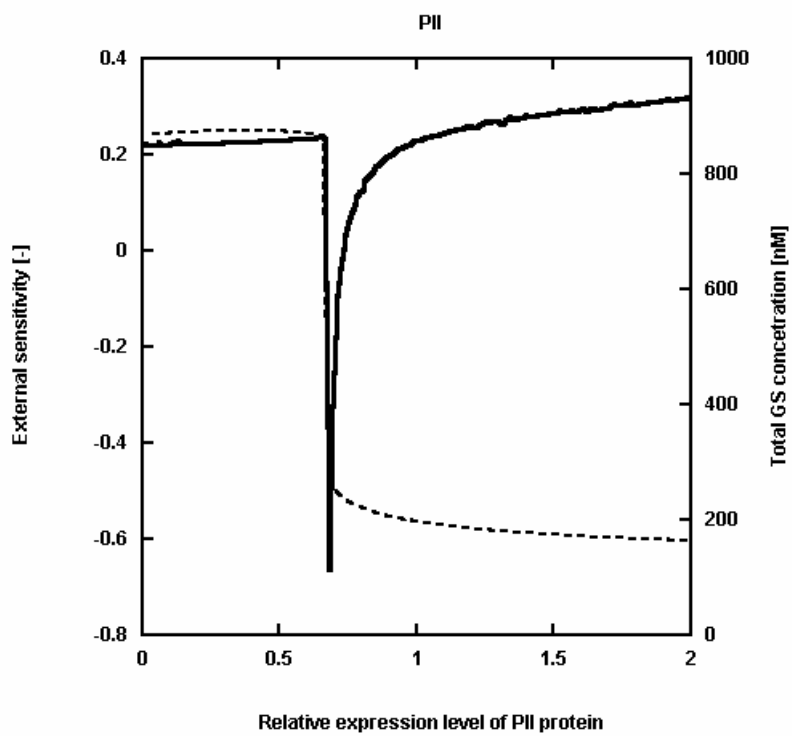


図 4.6-5 PII の External Sensitivity と GS 濃度への影響

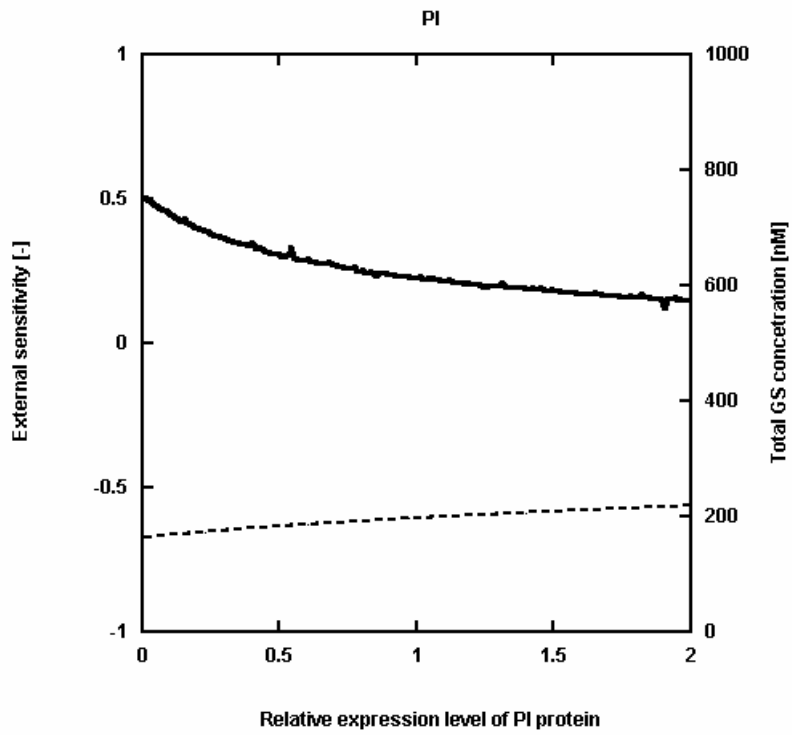


図 4.6-6 PI の External Sensitivity と GS 濃度への影響

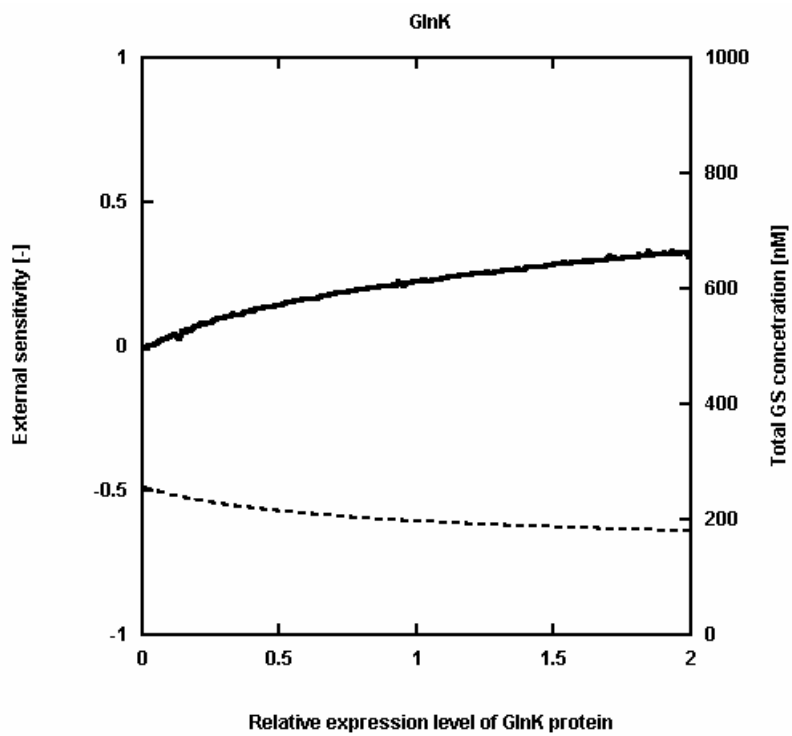
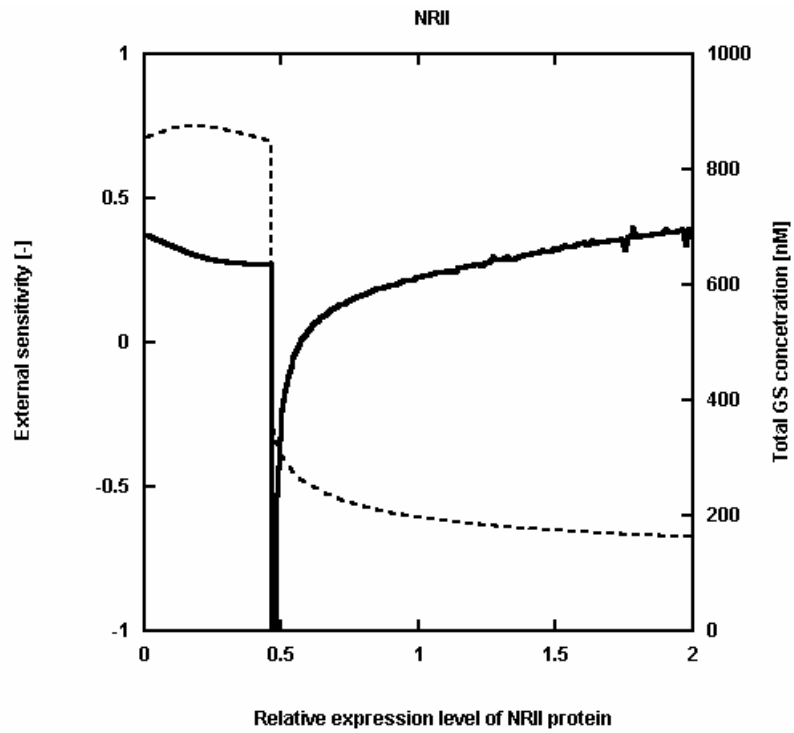
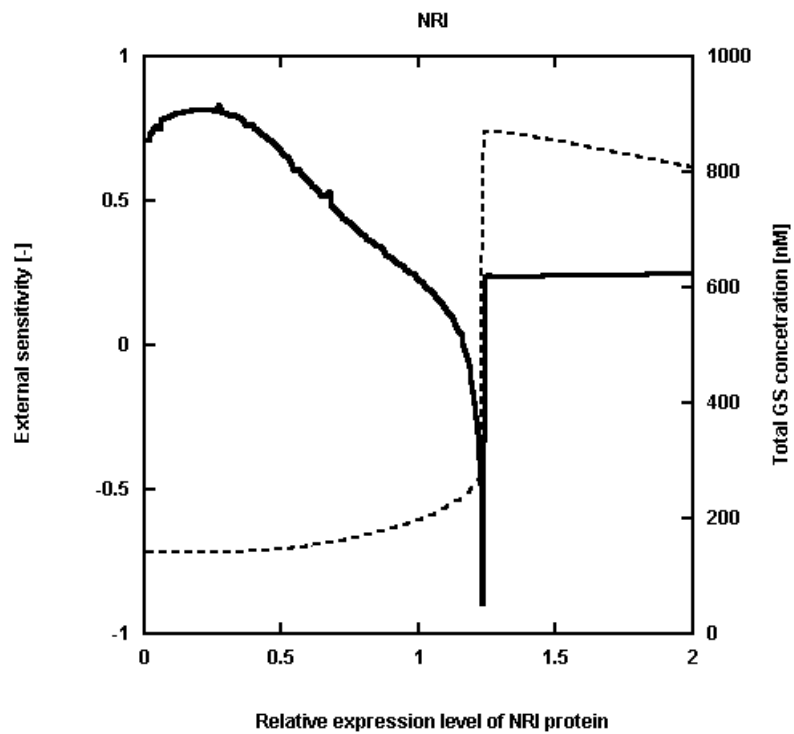


図 4.6-7 GlnK の External Sensitivity と GS 濃度への影響



☒ 4.6-8 NRII の External Sensitivity と GS 濃度への影響



☒ 4.6-9 NRI の External Sensitivity と GS 濃度への影響

4.6.3. 広範囲のアンモニア濃度変化に対する相対的な N/C 変化

実際の環境中では、アンモニア濃度の変化は微小なものではなく、大きく濃度変化を示す場合も考えられる。4.6.2 では、タンパク質濃度が大きく変化した場合にはシステムの **External sensitivity** が極端に変動する可能性があることが示された。窒素同化システムは、環境中のアンモニア濃度の変化に対して、**N/C** を維持するように制御しているが、アンモニア濃度変化が大きい場合に、**N/C** がどのような変化を示すかはシステムの特徴を理解する上では重要である。

ここでは、窒素同化システムの各制御モジュールがアンモニア濃度変化に対して、どの程度の **N/C** 制御を示すかを明らかにするために、アンモニア濃度を通常濃度から、目的の濃度まで急激に変化させた場合の **N/C** の変化を図 4.6-10 に示す。グラフにプロットした。すなわち、横軸で 50% の位置は、アンモニア濃度を通常値から 50% 増加させた場合の相対的な **N/C** 変化を示している。

ここでは、**GS** 活性モジュールのみのシステムではアンモニアが大きく減少した際に、**N/C** の変化が大きくなっており、**GS** 合成制御モジュールのみのシステム、もしくは両モジュールを有するシステムでは、アンモニアが大きく減少しても **N/C** の変化は小さい事が示されている。逆にアンモニアを増加させた場合には、**GS** 活性制御モジュールのみのシステムも、**GS** 合成制御モジュールのみのシステムも **N/C** の変化は小さいが、特に両モジュールを有するシステムでは **N/C** の変化は非常に小さい値を示している。

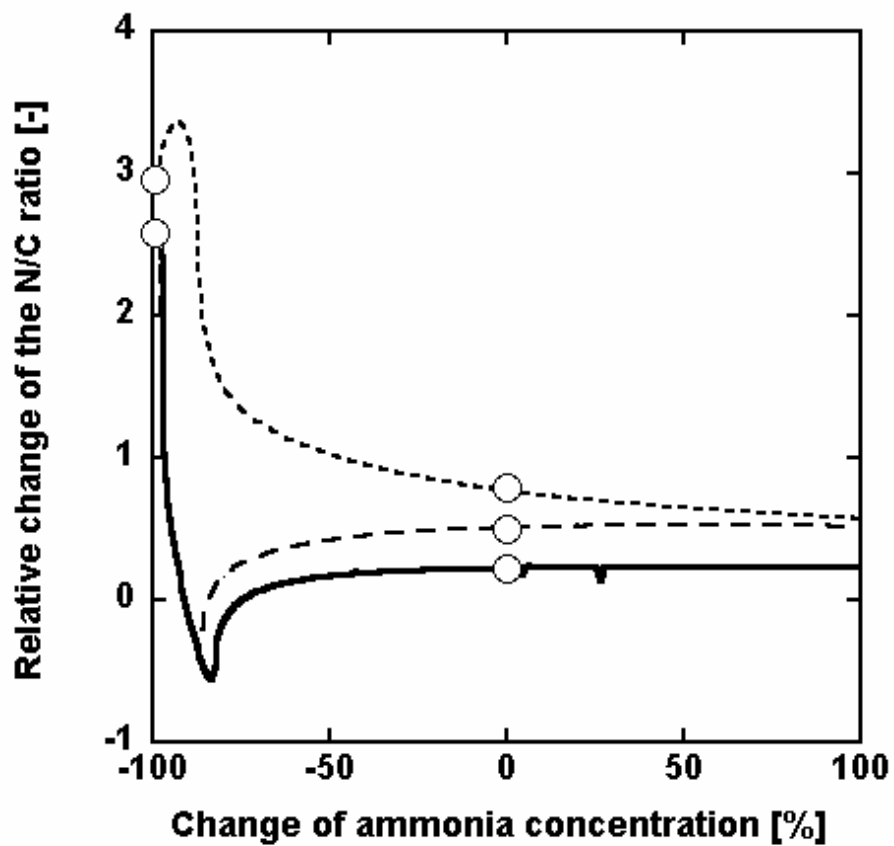


図 4.6-10 広範囲なアンモニア濃度変化に対する N/C の相対的な変化

- (—) : 窒素同化システム
- (.....) : GS 活性制御モジュール
- (- -) : GS 合成制御モジュール

4.7. ポジティブフィードバックによるシステムの遷移

4.6.2 の解析により、PII の濃度や NRI、NRII の発現量の変化によって、GS 濃度が非線形に変化する事が示された。これは、ポジティブフィードバックによる制御により、アンモニア濃度が低下した際には、システムの状態が通常状態から、アンモニア飢餓状態に対するものへと遷移していると推測される。このポジティブフィードバックの強さによるシステムの感度について、ポジティブフィードバックの強さを決定している NRI-P と $gInAp2$ エンハンサーとの結合定数の値 (Kb[17]) を変化させた場合にシステムの Internal sensitivity (NR, NRII) 及び External sensitivity の絶対値がどのような値を示すかについて図 4.7-1 に示す。ポジティブフィードバックが強くなることで、NRI や NRII に対する Internal sensitivity は上昇するが、外乱(環境中のアンモニア濃度の変化)に対する External sensitivity は下がっている。逆にポジティブフィードバックが弱くなると、NRI や NRII に対する Internal sensitivity は下降し、外乱に対する External sensitivity が上昇している。すなわち、ポジティブフィードバックの強弱で外乱に対する感度と内部摂動に対する感度がトレードオフの関係となっている。

この特性がシステム与える影響を解析する為に、ポジティブフィードバックを抑制している PII の濃度、環境中のアンモニア濃度の 2 つを変数とした場合の GS 濃度をシミュレーションし、3 次元的にプロットし、システムの遷移図を作成した。アンモニア濃度及び PII 濃度は通常時を基準に 0~2 倍まで変化させ、それに対する GS 濃度を計算した。結果を図 4.7-2 に示す。図 4.7-2 によると、システムは GS 濃度が 800[nM]以上の高い値となる状態と 200[nM]以下の低い値を示す状態に分けることができる。この 2 つの状態の境界となる領域では、GS 濃度が急激な変化となっており、システムの遷移が非線形的に発生する事を示している。システムの PII 濃度が減少すると GS 濃度が 800[nM]以上の高い値を示す状態へと遷移する。また、アンモニア濃度が大きく減少することで、やはりシステムは GS 濃度が高い値を示す状態へと遷移する^[91]。

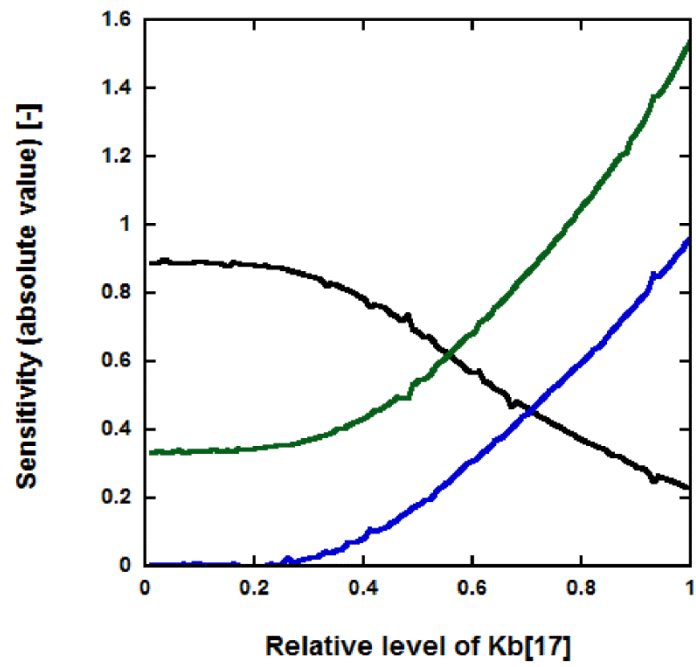


図 4.7-1 外乱と内部摂動の感度のトレードオフ
 青：NRI に対する Internal sensitivity
 緑：NR II に対する Internal sensitivity
 黒：外乱に対する External sensitivity

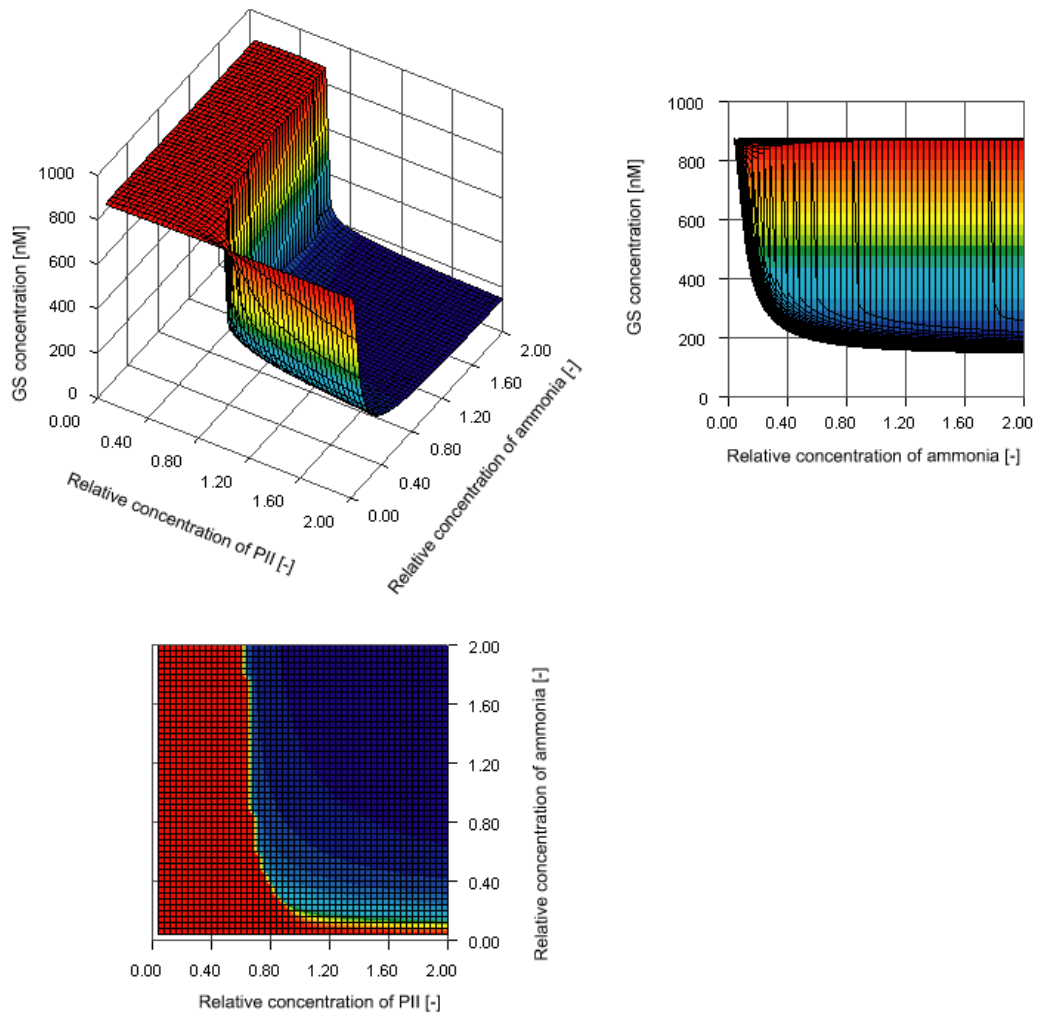


図 4.7-2 PII 濃度及びアンモニア濃度に対する GS 濃度の変化

5. システムの理論解析

4 章では、窒素同化システムがヒステリシス挙動や非線形な状態遷移を示す事を明らかにした。このような挙動は感度解析の結果より PII や NRII、NRI に関連している事が推測される。ここでは、ヒステリシス挙動や非線形な状態遷移は、ポジティブフィードバックに起因すると仮定し、その制御特性を明らかにする事を目的として、理論解析を実施した。具体的には、GS 合成制御モジュールが有するポジティブフィードバックを簡易化したモデルを作成し、そのモデルを数式で記述し、解析解を求めた^[58]。

また、GS 活性制御モジュールは UTUR が 2-ketoglutarate と glutamine のそれぞれと結合することで、GS 活性化と GS 不活性化の双方向の反応を導く双方向の制御を有する。この特徴的な双方向制御の特性を明らかにするため、双方向制御のシンプルモデル、片方向制御のシンプルモデルを作成し、その制御特性を比較した^[96]。

5.1. ポジティブフィードバックの理論解析

5.1.1. シンプルモデルの作成

ポジティブフィードバックは、GS 合成制御モジュール内で NRI、NRII、glnAp2 等の構成要素から成り立っている。理論解析を実施するために、このポジティブフィードバック制御を含む GS 合成制御の特徴を抽出したシンプルなモデルを作成した。その手順を以下に示す。

1. GS 合成制御の制御機構を抜粋した図 5.1-1 に示すモデルを作成した。ここで、TGS は GS の総量であり、NR は NRI と NRII をまとめたものである。Tglutamine は glutamine の総量であり、N/C の C となる 2-ketoglutarate は一定値として、N/C は Tglutamine の変化と同一となる。
2. 1 のモデルから冗長なネットワークとなる PII の連絡を省略した。Tglutamine は直接 NR と結合する事で NR が自身の発現を促進する働きを抑制する。

3. 変数を減らすため、発現量が同一となる GS と NR を NR に統一した。NR は自身の発現を促進するのみではなく、NH₃ を同化し、Tglutamine を合成する働きも持つ。

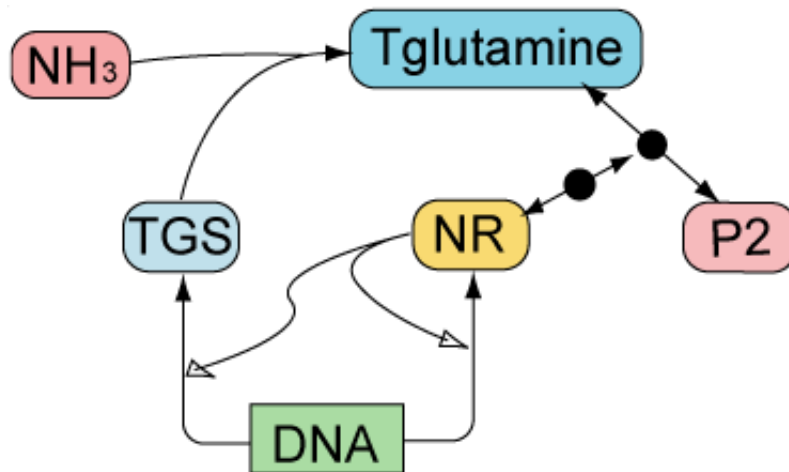


図 5.1-1 シンプルモデルの作成手順(その 1)

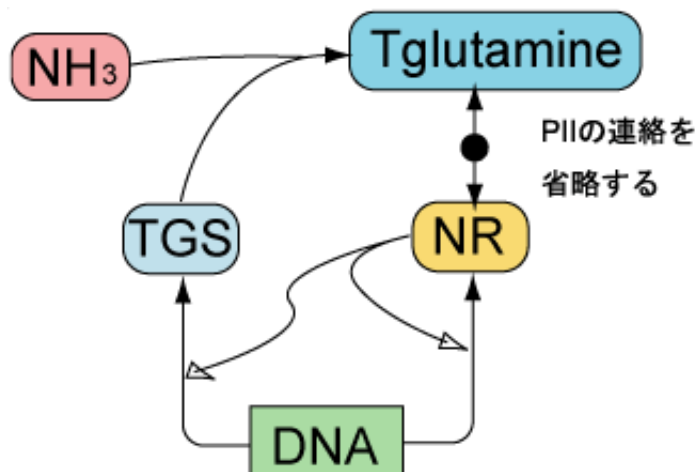


図 5.1-2 シンプルモデルの作成手順(その 2)

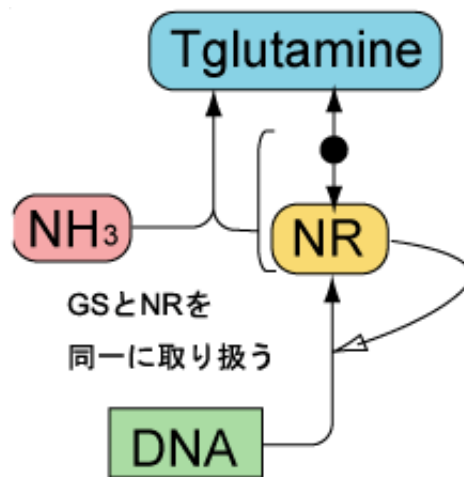


図 5.1-3 シンプルモデルの作成手順(その 3)

5.1.2. 数学モデルの作成

5.1 で作成したシンプルモデルを数式で表現すると以下の 4 式で示す事ができる。

$$\frac{dTNR}{dt} = a + k_1 \cdot \frac{NR}{NR + K_m} - k_2 \cdot TNR = 0 \quad \dots(4)$$

$$\frac{dTglutamine}{dt} = k_g \cdot NH_3 \cdot TNR - k_3 \cdot Tglutamine = 0 \quad \dots(5)$$

$$Tglutamine = glutamine + K \cdot glutamine \cdot NR \quad \dots(6)$$

$$TNR = NR + K \cdot glutamine \cdot NR \quad \dots(7)$$

式(6)及び式(7)中の T は Total の略であり、TNR であれば NR の総量を示す。ここで、 a は基本発現量、 k_1 は TNR の合成速度定数、 k_2 は TNR の分解速度定数、 k_3 は glutamine の分解速度定数、 k_g は glutamine の合成速度定数、 K は glutamine と NR の結合定数である。この 4 式に対して、微分方程式に定常状態近似を用い、展開、代入する事で Tglutamine についての 3 次方程式を得た。

$$\begin{aligned}
0 = & \{(K \cdot Km \cdot k1 \cdot k1 \cdot k2 \cdot k2) + k1 \cdot k1 \cdot k2 \cdot k2 / NH_3 \\
& - K \cdot Km \cdot k1 \cdot k1 \cdot k2 \cdot k2 / NH_3\} \text{Tglutamine}^3 \\
& + \{-2 \cdot K \cdot a \cdot Km \cdot k1 \cdot k2 \cdot NH_3 - 2 \cdot k1 \cdot k2 \cdot k2 - 2 \cdot a \cdot k1 \cdot k2 \cdot k2 \\
& + K \cdot k1 \cdot k1 \cdot k2 \cdot k2 + 2 \cdot K \cdot a \cdot Km \cdot k1 \cdot k2 \cdot k2 + K \cdot Km \cdot k1 \cdot k2 \cdot k2 \\
& - K \cdot Km \cdot Km \cdot k1 \cdot k1 \cdot k2 \cdot k2 - K \cdot Km \cdot NH_3 \cdot k1 \cdot k2\} \text{Tglutamine}^2 \\
& + \{K \cdot a \cdot Km \cdot NH_3 \cdot NH_3 - K \cdot a \cdot a \cdot Km \cdot k2 \cdot NH_3 - K \cdot a \cdot Km \cdot k2 \cdot NH_3 \\
& + K \cdot a \cdot a \cdot Km \cdot NH_3 \cdot NH_3 - 2 \cdot a \cdot Km \cdot k1 \cdot k2 \cdot NH_3 + 2 \cdot a \cdot k2 \cdot NH_3 \\
& - Km \cdot k1 \cdot k2 \cdot NH_3 + a \cdot a \cdot k2 \cdot NH_3 + k2 \cdot NH_3 \\
& + 2 \cdot K \cdot a \cdot Km \cdot Km \cdot k1 \cdot k2 \cdot NH_3\} \text{Tglutamine} \\
& + \{(a \cdot a \cdot Km \cdot NH_3 \cdot NH_3) + (a \cdot Km \cdot NH_3 \cdot NH_3) \\
& - K \cdot a \cdot a \cdot Km \cdot Km \cdot NH_3 \cdot NH_3\}
\end{aligned}$$

... (8)

5.1.3. 定常解の算出

5.1.2 で得られた 3 次方程式はカルダノ法を用いて解析的に解を得ることが可能である。ここで得られる解は Tglutamine の値であるため、正の実数のみを解として取り扱う事とした。カルダノ法を用いたプログラムにより、以下の表 5.1-1 の条件で解を求め、変数 NH₃ に対する Tglutamine の定常解をプロットしたものを図 5.1-4 に示す。変数 NH₃ の値が 15.5~23.6[nM]の範囲で、複数の定常解を持つ双安定性が示された。変数 NH₃ の値が 23.6[nM]以上となると、双安定性が崩れ、定常解が 1 つになった。NH₃ の値を 100[nM]から減少させると、Tglutamine の値は A から B へと移行していき、続いて B の段階から NH₃ の値を増加させた場合に C へ達すると仮定すると、その挙動はヒステリシス挙動を示す事になる。

表 5.1-1 シンプルモデルの計算条件

パラメタ	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

カルダノ法についての説明を以下に示す。

カルダノ法とは、三次方程式の解の公式である。まず、三次方程式をカルダノ法が使える形に変形する。主な方法は以下のとおりである。

① 二次の項がない形になおす

三次方程式

$$ax^3 + bx^2 + cx + d = 0$$

を適当な k をとって、 $y=x+k$ と置くことによって二次の項がない

$$ly^3 + my + n = 0$$

に書き換えることができる。

$y=x+k$ より、 $x=y-k$ となり、これをもとの三次方程式に代入すると、

$$\begin{aligned} ax^3 + bx^2 + cx + d &= a(y-k)^3 + b(y-k)^2 + c(y-k) + d \\ &= a(y^3 - 3ky^2 + 3k^2y - k^3) + b(y^2 - 2ky + k^2) + c(y-k) + d \\ &= ay^3 + (-3ak + b)y^2 + (3ak^2 - 2bk + c)y + (-ak^3 + bk^2 - ck + d) \\ &= 0 \end{aligned}$$

となることで、

$$-3ak + b = 0 \text{ つまり } k = \frac{b}{3a}$$

とすれば、二次の項は 0 になる。このとき、

$$l = a, \quad m = 3ak^2 - 2bk + c = -\frac{b^2}{3a} + c, \quad n = -ak^3 + bk^2 - ck + d = -\frac{2b^3}{27a^2} - \frac{bc}{3a} + d$$

となる。

② 二次の項のない三次方程式を解く

三次方程式 $ly^3 + my^2 + n=0$ に対し、

$$y = u + v$$

と置く。これを方程式に代入すると、

$$\begin{aligned} l(u+v)^3 + m(u+v) + n &= l(u^3 + 3u^2v + 3uv^2 + v^3) + m(u+v) + n \\ &= l(u^3 + v^3) + 3luv(u+v) + m(u+v) + n \\ &= l(u^3 + v^3) + (3luv + m)(u+v) + n \\ &= 0 \end{aligned}$$

となり、 $3luv+m=0$ とでき、このとき、

$$uv = -\frac{m}{3l}$$

となる。すると、方程式は

$$l(u^3 + v^3) + n = 0$$

つまり、

$$u^3 + v^3 = -\frac{n}{l}$$

となる。これと、さきほどの

$$uv = -\frac{m}{3l}$$

から、 n, v を求めることができる。両辺三乗すれば、

$$u^3 v^3 = -\frac{m^3}{27l^3}$$

となるので、解と係数の関係を用いると、二次方程式

$$w^2 + \frac{n}{l}w - \frac{m^3}{27l^3} = 0$$

の二解が u^3, v^3 となる。

$$\begin{aligned} v &= \frac{1}{2} \left(-\frac{m}{l} \pm \sqrt{\frac{m^2}{l^2} + \frac{4m^3}{27l^3}} \right) \\ &= \frac{1}{2} \left(-\frac{m}{l} \pm \left| \frac{m}{l} \right| \sqrt{1 + \frac{4m}{27l}} \right) \\ &= \frac{m}{2l} \left(-1 \pm \sqrt{1 + \frac{4m}{27l}} \right) \end{aligned}$$

ここで、二解は一般に複素数値をとる。 $U+v$ を求めるときの組み合わせは、条件である

$$uv = -\frac{m}{3l}$$

を満たさなければならず、その組のひとつを

$$(u_1, v_1) = \left(\sqrt[3]{\frac{m}{2l} \left(-1 + \sqrt{1 + \frac{4m}{27l}} \right)}, \sqrt[3]{\frac{m}{2l} \left(-1 - \sqrt{1 + \frac{4m}{27l}} \right)} \right)$$

とすると、

$$(u_2, v_2) = (u_1\omega, v_1\omega^2)$$

$$(u_3, v_3) = (u_1\omega^2, v_1\omega)$$

となる。以上より、

$$y = u_1 + v_1, u_2 + v_2, u_2 + v_2$$

と求めることができる。

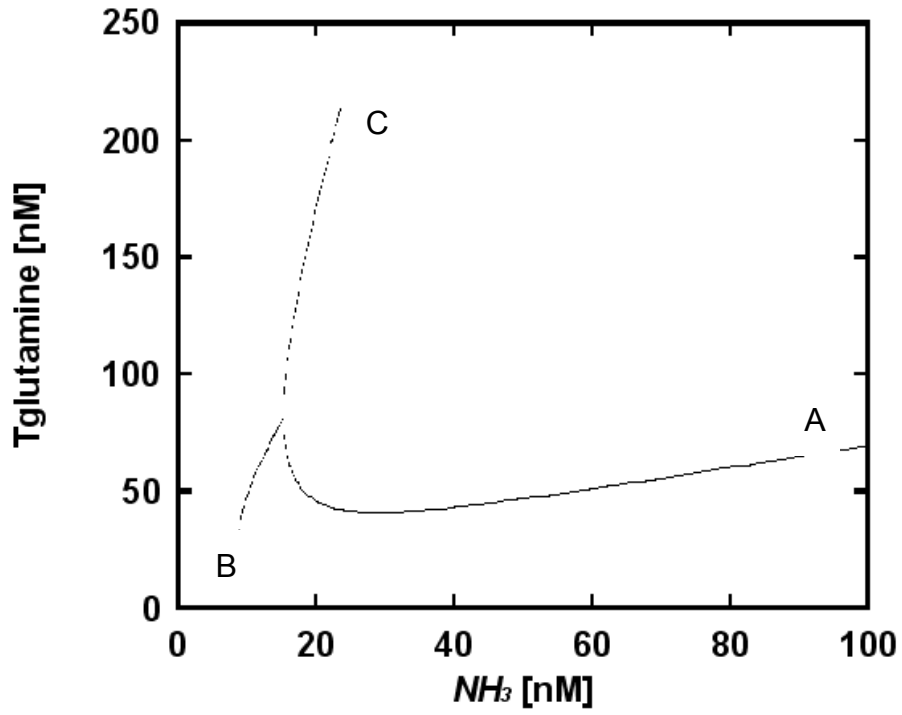


図 5.1-4 NH₃ に対する Tglutamine の定常解

5.1.4. 定常解の数

5.1.3 で Tglutamine が複数の定常解を持ちうる事が明らかとなった。そこで、ポジティブフィードバックにおいて重要なパラメタとなる K_m と NH_3 のパラメタ空間内における Tglutamine の解の個数を計算した。計算条件を表 5.1-2 に、結果をプロットしたものを図 5.1-5 に示す。ここで、 K_m の値が大きいほどポジティブフィードバックは弱まる。逆に K_m の値が小さいほどポジティブフィードバックは強く働く。図 5.1-5 によると、 K_m の値が 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強くなると、 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事が示された。すなわち、システムは NH_3 の値に対して可逆反応を示す。逆に K_m の値が 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 の値に対して 2 つの定常解を持つ状態が保持された。この状態のシステムは、 NH_3 の値に対して分化(不可逆反応)を示す事が考えられる。また、 K_m の値が 10~25[nM]の範囲では、アンモニア濃度の変化に対して、定常解が 1 つの領域と 2 つの領域が存在しており、この状態のシステムはヒステリシスを示すと考えられる。

表 5.1-2 シンプルモデルの計算条件 2

パラメタ	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

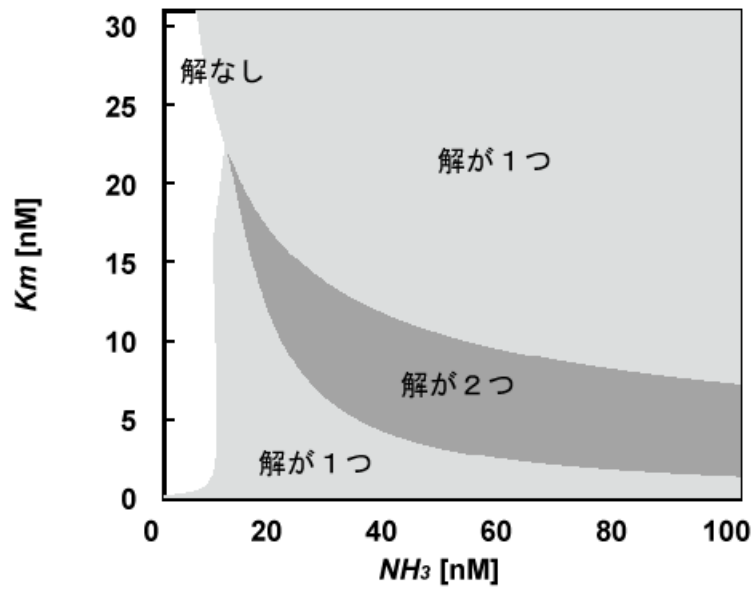


図 5.1-5 2次元パラメタ空間上の定常解の個数

5.2. 双方向制御の理論解析

GS 活性制御モジュールの特徴として、GS 活性化・不活性化における双方向の制御が挙げられる^[96]。すなわち、2-ketoglutarate は UTUR と結合することで GS-AMP を活性化させるように働き (図 5.2-1 赤線参照)、逆に glutamine は UTUR と結合することで GS を不活性化させるように働く (図 5.2-1 青線参照)。

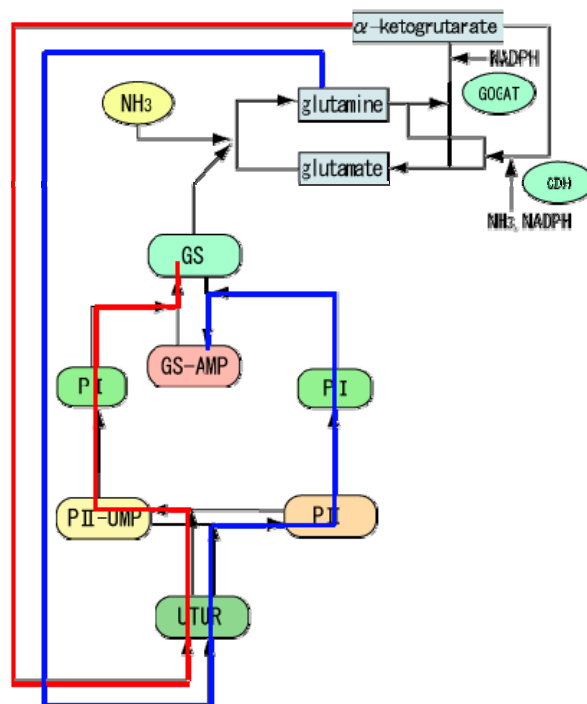


図 5.2-1 GS 活性制御モジュールにみる双方向制御

この双方向制御は、生物のネットワークとしても特徴的なものである。片方向の制御と比較してどのような利点があるのかを明らかにするため、シンプルモデルを作成し、双方向制御の外乱や内部摂動に対する感度を計算することでその制御特性について解析した^[96]。

5.2.1. GS 活性制御のシンプルモデル

GS 活性制御モジュールの双方向制御の特徴を抜き出したシンプルモデルを作成した。モデルを図 5.2-2 に示す。GS 活性制御モジュールにおける UTUR と PII、PII-UMP、PI のネットワークを簡略化し、直接タンパク質 P に対して 2-ketoglutarate と glutamine が結合し、GS を活性化及び不活性化させる。

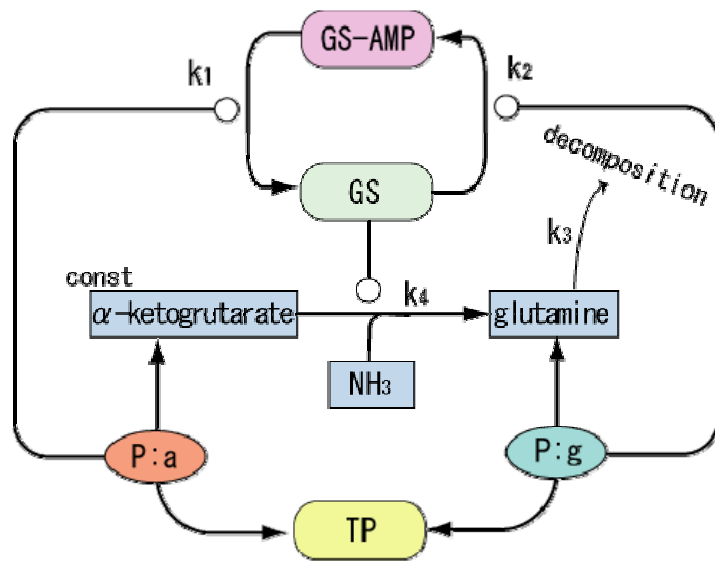


図 5.2-2 双方向制御のシンプルモデル

双方向制御との比較のために、制御を片方向にしたモデルを作成した。モデル A では、GS の不活性化について一定の係数を用い、モデル B では GS の活性化について一定の係数を用いた。ここで k_{sp} は片方方向制御時の活性化・不活性化の定数である。モデル A では GS の不活性化速度が、モデル B では GS-AMP の活性化速度が一定となっている。

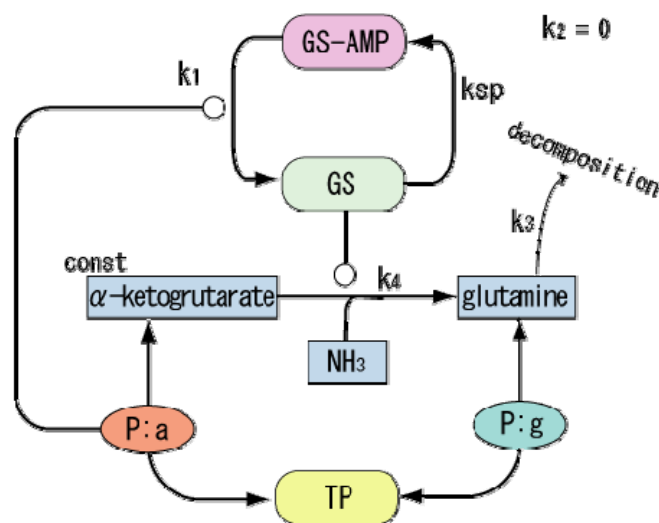


図 5.2-3 片方制御シンプルモデル A

5.2.2. 外乱に対する感度式（片方向制御モデル A）

5.2.1 で示したシンプルモデル(片方向制御モデル A)に定常状態近似を用いて、数式化した。ここで k_{sp} は片方向制御時の GS 不活性化定数である。以下の数式において、双方向制御を示す場合は $k_{sp}=0$ であり、片方向制御 A を示す場合は $k_2=0$ (GS-AMP 活性化のみ制御) とする。

$$\frac{dGS}{dt} = k_1 \cdot P : a \cdot GSAMP - k_2 \cdot P : g \cdot GS - k_{sp} \cdot GS \quad (1)$$

$$\frac{dGSAMP}{dt} = -k_1 \cdot P : a \cdot GSAMP + k_2 \cdot P : g \cdot GS + k_{sp} \cdot GS \quad (2)$$

$$P : a = \frac{a}{a+g} \cdot TP \quad (3) \quad P : g = \frac{g}{a+g} \cdot TP \quad (4)$$

$$a = const$$

$$\frac{dg}{dt} = -k_3 \cdot g + k_4 \cdot GS \cdot a \cdot NH_3 \quad (5)$$

$$\frac{dg}{dt} = -k_3 \cdot g + k_4 \cdot GS \cdot a \cdot NH_3 = 0$$

$$GS = \frac{k_3 \cdot g}{k_4 \cdot a \cdot NH_3} \quad \frac{dGS}{dt} = k_1 \cdot \frac{a}{a+g} \cdot TP \cdot GSAMP - (k_{sp} + k_2 \cdot \frac{g}{a+g} \cdot TP) \cdot \frac{k_3 \cdot g}{k_4 \cdot a \cdot NH_3} = 0$$

$$x = \frac{g}{a} = \frac{N}{C}$$

$$0 = (k_1 \cdot \frac{1}{1+x} \cdot TP) \cdot GSAMP - (k_{sp} + k_2 \cdot \frac{x}{1+x} \cdot TP) \cdot \frac{k_3 \cdot x}{k_4} \cdot \frac{1}{NH_3}$$

$$k_4 \cdot k_1 \cdot TP + NH_3 \cdot GSAMP - (1+x) \cdot x \cdot k_{sp} \cdot k_3 - k_2 \cdot TP \cdot x^2 \cdot k_3 = 0$$

$$GSAMP = \frac{x \cdot k_{sp} \cdot k_3 + k_3 \cdot x^2 \cdot (k_{sp} + k_2 \cdot TP)}{k_4 \cdot k_1 \cdot TP \cdot NH_3}$$

$$GS + GSAMP = C (Const)$$

$$\frac{k_3 \cdot x}{k_4} \cdot \frac{1}{NH_3} + \frac{x \cdot k_{sp} \cdot k_3 + k_3 \cdot x^2 \cdot (k_{sp} + k_2 \cdot TP)}{k_4 \cdot k_1 \cdot TP \cdot NH_3} = C$$

$$k_3 \cdot k_1 \cdot TP \cdot x + k_{sp} \cdot k_3 \cdot x + k_3 \cdot x^2 \cdot (k_{sp} + k_2 \cdot TP) = C \cdot k_4 \cdot k_1 \cdot TP \cdot NH_3$$

$$x^2 : \quad k_3 \cdot (k_{sp} + k_2 \cdot TP) \quad x : \quad k_3 (k_1 \cdot TP + k_{sp}) \quad 1 : \quad -C \cdot k_4 \cdot k_1 \cdot TP \cdot NH_3$$

$$x = \frac{-\{k_3 (k_1 \cdot TP + k_{sp})\} + \sqrt{\{k_3 (k_1 \cdot TP + k_{sp})\}^2 + 4 \cdot k_3 \cdot (k_{sp} + k_2 \cdot TP) \cdot C \cdot k_4 \cdot k_1 \cdot TP \cdot NH_3}}{2 \cdot k_3 \cdot (k_{sp} + k_2 \cdot TP)}$$

ここで x は N/C である。システムは NH_3 の変化に対して、 N/C を安定させるように働くので、システムの **Sensitivity** は x を NH_3 で微分する事で求める事ができる。よってシステムの N/C の NH_3 に対する **Sensitivity** は次式で得られる。

$$\frac{\partial x}{\partial NH_3} = \frac{C \cdot k_4 \cdot k_1 \cdot TP}{\sqrt{k_3 \cdot \{k_3 \cdot (k_1 \cdot TP + ksp)^2 + 4 \cdot C \cdot k_4 \cdot k_1 \cdot NH_3 \cdot TP \cdot (ksp + TP \cdot k_2)\}}}$$

5.2.3. 外乱に対する感度計算（片方向制御モデル A）

システムの働きはパラメタ依存性があると考えられる。ゆえに、1つのパラメタ群のみで **Sensitivity** を比較してもシステム制御の特性を比較した事にはならない。そのために様々なパラメタの値に渡って比較する必要がある。しかし、全てのパラメタ空間で比較すると数が膨大になるため、システム条件が異なる範囲（ $N/C=1$ を示す）での、パラメタセットを探索（表 5.2-1）し、その **Sensitivity** を計算した。結果を図 5.2-5 に示す。

表 5.2-1 外乱の感度計算のパラメタセット(片方向制御モデル A)

k_1	P:a 複合体による GS-AMP の活性化定数	0.1~2.0
k_2	P:g 複合体による GS の不活性化定数 (片方向制御モデル A では 0)	0.1~2.0 (0.0)
k_3	glutamine(g)の分解定数	0.1~2.0
k_4	GS による NH_3 の同化定数	0.1~2.0
ksp	GS の不活性化定数 (双方向制御モデルでは 0)	0.1~2.0 (0.0)
C	GS+GS-AMP の総量	1
TP	蛋白質 P の総量	1
NH_3	環境中のアンモニア濃度	2

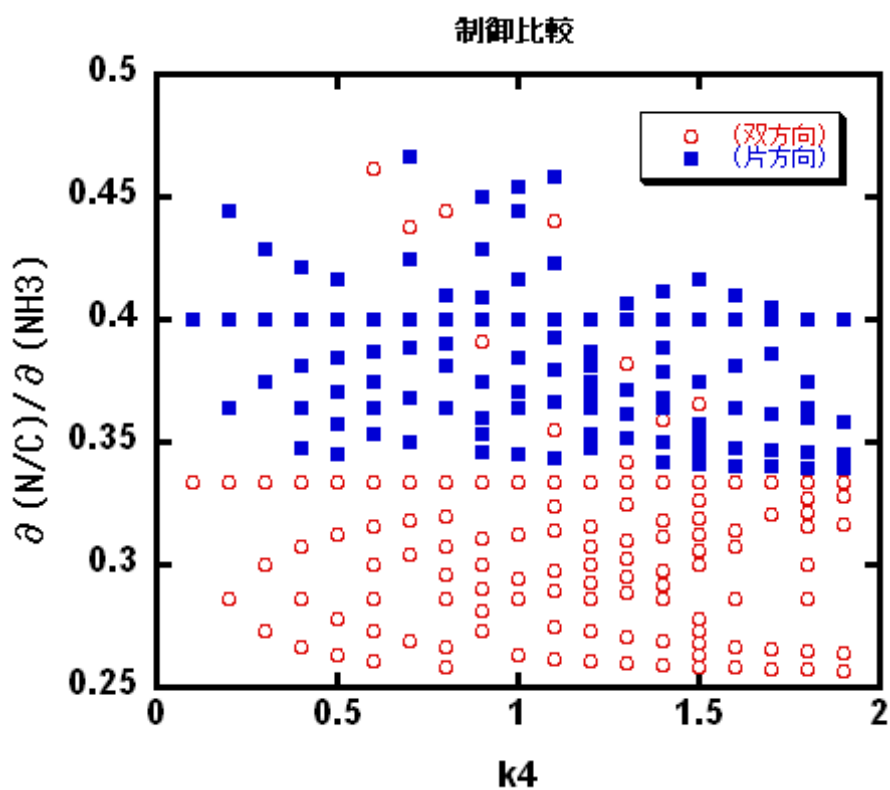


図 5.2-5 双方向モデルと片方向制御モデルAとの感度比較

システム的には **Sensitivity** が低ければ低いほどロバスト性は高い。図 5.2-5 に示すように、双方向制御における平均感度は **0.328** であり、片方向制御 A における平均感度は **0.383** である。双方向制御のほうが片方向制御に比べて感度が低く、ロバスト性が高い傾向を示している。

5.2.4. 外乱に対する感度式（片方向制御モデル B）

片方向制御モデル A と同様に、5.2.1 で示したシンプルモデル(片方向制御モデル B)に定常状態近似を用いて、数式化した。ここで k_{sp} は片方方向制御時の GS-AMP 活性化定数である。以下の数式において、双方向制御を示す場合は $k_{sp}=0$ であり、片方向制御 B を示す場合は $k_1=0$ （GS 不活性化のみ制御）とする。

$$\frac{dGS}{dt} = k_1 \cdot P : a \cdot GSAMP + k_{sp} \cdot GSAMP - k_2 \cdot P : g \cdot GS \quad (1)$$

$$\frac{dGSAMP}{dt} = -k_1 \cdot P : a \cdot GSAMP - k_{sp} \cdot GSAMP + k_2 \cdot P : g \cdot GS \quad (2)$$

$$P : a = \frac{a}{a+g} \cdot TP \quad (3)$$

$$P : g = \frac{g}{a+g} \cdot TP \quad (4)$$

$$a = const$$

$$\frac{dg}{dt} = -k_3 \cdot g + k_4 \cdot GS \cdot a \cdot NH_3 \quad (5)$$

$$a = const$$

$$\frac{dg}{dt} = -k_3 \cdot g + k_4 \cdot GS \cdot a \cdot NH_3 = 0$$

$$GS = \frac{k_3 \cdot g}{k_4 \cdot a} \cdot \frac{1}{NH_3}$$

$$\frac{dGS}{dt} = k_1 \cdot \frac{a}{a+g} \cdot TP \cdot GSAMP + k_{sp} \cdot GSAMP - k_2 \cdot \frac{g}{a+g} \cdot TP \cdot \frac{k_3 \cdot g}{k_4 \cdot a} \cdot \frac{1}{NH_3} = 0$$

$$x = \frac{g}{a} = \frac{N}{C}$$

$$0 = (k_1 \cdot \frac{1}{1+x} \cdot TP + ksp) \cdot GSAMP - k_2 \cdot \frac{x}{1+x} \cdot TP \cdot \frac{k_3}{k_4} \cdot x \cdot \frac{1}{NH_3}$$

$$k_4 \cdot (k_1 \cdot TP + ksp \cdot (x+1)) \cdot GSAMP - k_2 \cdot k_3 \cdot TP \cdot x^2 \cdot \frac{1}{NH_3} = 0$$

$$GSAMP = \frac{k_2 \cdot k_3 \cdot TP \cdot x^2}{k_4 \cdot \{k_1 \cdot TP + ksp \cdot (x+1)\} \cdot NH_3}$$

$$GS + GSAMP = C(Const)$$

$$\frac{k_3}{k_4} \cdot x \cdot \frac{1}{NH_3} + \frac{k_2 \cdot k_3 \cdot TP \cdot x^2}{k_4 \cdot \{k_1 \cdot TP + ksp \cdot (x+1)\} \cdot NH_3} = C$$

$$k_3 \cdot \{k_1 \cdot TP + ksp \cdot (x+1)\} \cdot x + k_2 \cdot k_3 \cdot TP \cdot x^2 = (C \cdot NH_3) \cdot k_4 \cdot \{k_1 \cdot TP + ksp \cdot (x+1)\}$$

$$x^2: \quad k_2 \cdot k_3 \cdot TP + k_3 \cdot ksp$$

$$x: \quad k_1 \cdot k_3 \cdot TP + k_3 \cdot ksp - (C \cdot NH_3) \cdot k_4 \cdot ksp$$

$$1: \quad -(C \cdot NH_3) \cdot k_1 \cdot k_4 \cdot TP - (C \cdot NH_3) \cdot k_4 \cdot ksp$$

解の公式より

$$x = \frac{\left\{ -\{k_1 \cdot k_3 \cdot TP + k_3 \cdot ksp - (C \cdot NH_3) \cdot k_4 \cdot ksp\} \right.}{\left. + \sqrt{\{k_1 \cdot k_3 \cdot TP + k_3 \cdot ksp - (C \cdot NH_3) \cdot k_4 \cdot ksp\}^2 + 4 \cdot (C \cdot NH_3 \cdot k_4) \cdot (k_2 \cdot k_3 \cdot TP + k_3 \cdot ksp)(k_1 \cdot TP + ksp)} \right\}}{2 \cdot (k_2 \cdot k_3 \cdot TP + k_3 \cdot ksp)}$$

前モデルと同じく x は **N/C** 比率である。システムは **NH₃** の変化に対して、**N/C** 比を安定させるように働くので、システムの **Sensitivity** は x を **NH₃** で微分する事で求める事ができる。

$$\frac{\partial x}{\partial NH_3} = \frac{C \cdot k_4 \cdot \left\{ ksp + \frac{C \cdot k_4 \cdot NH_3 \cdot ksp^2 + (k_1 \cdot TP + ksp) \cdot k_3 \cdot (ksp + 2 \cdot TP \cdot k_2)}{\sqrt{(C \cdot k_4 \cdot NH_3 \cdot ksp - (k_1 \cdot TP + ksp) \cdot k_3)^2 + 4 \cdot C \cdot k_4 \cdot NH_3 \cdot (k_1 \cdot TP + ksp) \cdot k_3 \cdot (ksp + TP \cdot k_2)}} \right\}}{2 \cdot k_3 \cdot (ksp + TP \cdot k_2)}$$

5.2.5. 外乱に対する感度計算（片方向制御モデル B）

片方向制御モデル **A** と同様に、システム条件が異なる範囲（**N/C** = 1 を示す）での、パラメタセット（表 5.2-2）を探索し、その **Sensitivity** を計算した。結果を図 5.2-6 にプロットした。

表 5.2-2 外乱の感度計算のパラメタセット(片方向制御モデル B)

k_1	P:a 複合体による GS-AMP の活性化定数 (片方向制御モデル B では 0)	0.1~2.0 (0.0)
k_2	P:g 複合体による GS の不活性化定数	0.1~2.0
k_3	glutamine(g)の分解定数	0.1~2.0
k_4	GS による NH ₃ の同化定数	0.1~2.0
ksp	GS の不活性化定数 (双方向制御モデルでは 0)	0.1~2.0 (0.0)
C	GS+GS-AMP の総量	1
TP	蛋白質 P の総量	1
NH ₃	環境中のアンモニア濃度	2

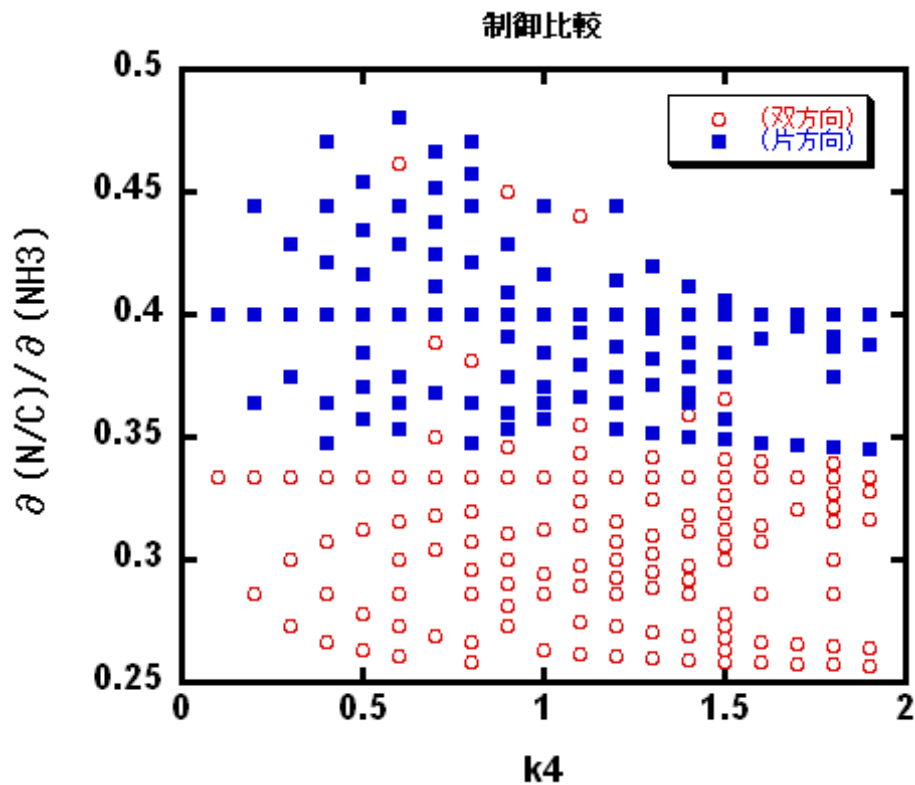


図 5.2-6 双方向モデルと片方向制御モデル B との感度比較

図 5.2-6 によると、双方向制御における平均感度は 0.328、片方向制御 B にお

ける平均感度は **0.403** となっており、双方向制御のほうが片方向制御に比べて、安定性が高い傾向を示している。

5.2.6. 内部摂動に対する感度式

次に、システムの内部摂動に対する **Sensitivity** を解析した。システムの外乱としては NH_3 の変化であったので、内部摂動としては **TP (Total Protein)** の変化が挙げられる。シンプルモデルでは、**a-KG** と **glutamine** は **TP** を介して、**GS** の活性化及び不活性化の制御を行う。**N/C** が **TP** の値の変化に対して、どの程度の **Sensitivity** を持っているかについて、双方向制御モデルと片方向制御モデル **A** 及び **B** の計 3 モデルで比較した。

片方向制御モデル **A** では

$$x = \frac{-\{k_3(k_1 \cdot TP + ksp)\} + \sqrt{\{k_3(k_1 \cdot TP + ksp)\}^2 + 4 \cdot k_3 \cdot (ksp + k_2 \cdot TP) \cdot C \cdot k_4 \cdot k_1 \cdot TP \cdot NH_3}}{2 \cdot k_3 \cdot (ksp + k_2 \cdot TP)}$$

x を **TP** で微分する事で **N/C** の **TP** に対する **Sensitivity** 式となるので、

$$\frac{\partial x}{\partial TP} = \frac{ksp \left\{ \begin{array}{l} 2 \cdot C \cdot k_4 \cdot k_1 \cdot NH_3 \cdot (ksp + TP \cdot k_2) \\ + (k_1 - k_2) \left(k_1 \cdot TP \cdot k_3 + ksp \cdot k_3 - \sqrt{k_3 \left(k_3 (k_1 \cdot TP + ksp)^2 + 4 \cdot C \cdot k_4 \cdot k_1 \cdot NH_3 \cdot TP (ksp + TP \cdot k_2) \right)} \right) \end{array} \right\}}{2 \cdot (ksp + TP \cdot k_2)^2 \sqrt{k_3 \left(k_3 (k_1 \cdot TP + ksp)^2 + 4 \cdot C \cdot k_4 \cdot k_1 \cdot NH_3 \cdot TP (ksp + TP \cdot k_2) \right)}}$$

という感度式を得られる。

片方向制御モデル **B** では

$$x = \frac{-\{k_1 \cdot k_3 \cdot TP + k_3 \cdot ksp - (C \cdot NH_3) \cdot k_4 \cdot ksp\} + \sqrt{\{k_1 \cdot k_3 \cdot TP + k_3 \cdot ksp - (C \cdot NH_3) \cdot k_4 \cdot ksp\}^2 + 4 \cdot (C \cdot NH_3 \cdot k_4) \cdot (k_2 \cdot k_3 \cdot TP + k_3 \cdot ksp)(k_1 \cdot TP + ksp)}}{2 \cdot (k_2 \cdot k_3 \cdot TP + k_3 \cdot ksp)}$$

同じく x を **TP** で微分すると

$$\frac{\partial x}{\partial TP} = \frac{-ksp \left\{ C^2 \cdot k_4^2 \cdot ksp \cdot k_2 \cdot NH_3^2 + C \cdot k_4 \left(k_2 \left(2 \cdot TP \cdot k_3 \cdot k_2 + \sqrt{C^2 \cdot k_4^2 \cdot NH_3^2 \cdot ksp^2 + (k_1 \cdot TP + ksp)^2 \cdot k_3^2} + 2 \cdot C \cdot k_4 \cdot NH_3 \cdot (k_1 \cdot TP + ksp) \cdot k_3 \cdot (ksp + 2 \cdot TP \cdot k_2) \right) - k_1 \cdot k_3 \cdot (ksp + 3 \cdot TP \cdot k_2) \right) \cdot NH_3 \right.}{\left. + k_3 \cdot (k_1 - k_2) \left(-k_1 \cdot TP \cdot k_3 - ksp \cdot k_3 + \sqrt{C^2 \cdot k_4^2 \cdot NH_3^2 \cdot ksp^2 + (k_1 \cdot TP + ksp)^2 \cdot k_3^2} + 2 \cdot C \cdot k_4 \cdot NH_3 \cdot (k_1 \cdot TP + ksp) \cdot k_3 \cdot (ksp + 2 \cdot TP \cdot k_2) \right) \right\}}{2 \cdot k_3 \cdot (ksp + TP \cdot k_2)^2 \sqrt{(C \cdot k_4 \cdot NH_3 \cdot ksp - (k_1 \cdot TP + ksp) \cdot k_3)^2 + 4 \cdot C \cdot k_4 \cdot NH_3 \cdot (k_1 \cdot TP + ksp) \cdot k_3 \cdot (ksp + TP \cdot k_2)}}$$

の感度式を得る。

5.2.7. 内部摂動に対する感度

5.2.6 の 2 式を用いて、以下の条件で Sensitivity を解析した。パラメタ範囲の中から、 $N/C = 1$ を示すパラメタセット(表 5.2-3)を用いて感度計算を実施し、その結果を図 5.2-7 に示す。

表 5.2-3 内部摂動の感度計算のパラメタセット

片方向 A		
k_1	P:a 複合体による GS-AMP の活性化定数	0.1~2.0
k_2	P:g 複合体による GS の不活性化定数 (片方向制御モデル A では 0)	0.1~2.0 (0.0)
k_3	glutamine(g)の分解定数	0.1~2.0
k_4	GS による NH ₃ の同化定数	0.1~2.0
ksp	GS の不活性化定数 (双方向制御モデルでは 0)	0.1~2.0 (0.0)
C	GS+GS-AMP の総量	1
TP	蛋白質 P の総量	1
NH ₃	環境中のアンモニア濃度	2

片方向 B		
k_1	P:a 複合体による GS-AMP の活性化定数 (片方向制御モデル B では 0)	0.1~2.0 (0.0)
k_2	P:g 複合体による GS の不活性化定数	0.1~2.0
k_3	glutamine(g)の分解定数	0.1~2.0
k_4	GS による NH ₃ の同化定数	0.1~2.0
ksp	GS の不活性化定数 (双方向制御モデルでは 0)	0.1~2.0 (0.0)
C	GS+GS-AMP の総量	1
TP	蛋白質 P の総量	1
NH ₃	環境中のアンモニア濃度	2

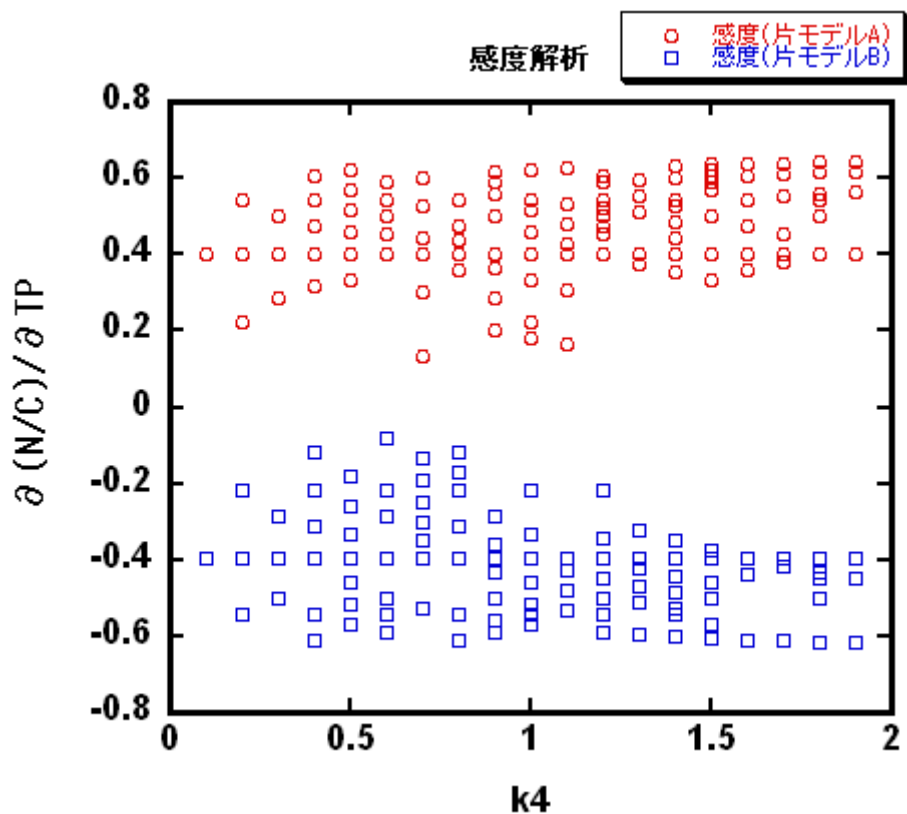


図 5.2-7 片方向制御A,Bの内乱に対する Sensitivity

内部摂動に対する感度式では、双方向制御は $k_{sp}=0$ となり、感度式に代入すると、他のパラメタの値に関わらず常に感度が 0 となる。すなわち、双方向制御では TP 濃度変化に対する Sensitivity が常に 0 となることが示される。

6. 実験

窒素同化システムのシミュレーション及び理論解析において、ポジティブフィードバックの働きによるヒステリシスが予測されたが、実際にヒステリシス挙動を示すか否かについて確認するための生物学的な実験^[97]を行った。ここでは、大腸菌を培養する培地中のアンモニア濃度を徐々に減少させ、その後通常まで増加させた際の大腸菌の **GS** 発現量として mRNA(*GlnA*)の量を調べた。*GlnA* の発現量については、基準としてハウスキーピング遺伝子である *DnaA* の発現量を同時に測定し、相対的な発現量を測定した^{[98][99]}。

6.1. 大腸菌の培養

6.1.1. 使用した試薬、機器

実験において使用した大腸菌株及び機器は以下の通りである。

使用した大腸菌株

- ・ -80°C で保存した大腸菌株 BW25113

使用した機器

- ・ アンモニアメータ Ti-9001Ka
- ・ スターラ LABORATORY STIRRER/ HOT PLATE CORNING MODEL PC-420

ここで、炭素源は **glucose 10 g/l**、培養条件温度は 37°C とした。

6.1.2. 大腸菌の前々培養

大腸菌の前々培養については、以下の手順で行った。

- ・ BGLB 培地を **40g/l** の濃度で **10ml** 用意し、 121°C で **20** 分間オートクレーブを行った。
- ・ 手の消毒を行い、大腸菌を **100 μl** (培地の **1%**) 入れて試験管やフラスコの口をアルコールランプ (または、ガスバーナー) で滅菌した。
- ・ **8** 時間培養を行った。

前々培養の培地の組成を表 6.1-1 に示した。

表 6.1-1 BGLB 培地 (前々培養)

Peptone	10 g/l
Lactose	5 g/l
Bile Salts	10 g/l
Brilliant Green	0.0133g/l

6.1.3. 大腸菌の前培養

大腸菌の前培養について以下の手順で行った。

- ① Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaCl を 80ml、glucose 20ml を 121°C で 20 分間オートクレーブを行った。合成培地の組成は表 2-2 に示す。(合成培地にグルコースを加えるので合計で 100ml になる。最終濃度が培地の組成の通りになるように 80ml の蒸留水に溶かす。同様に、グルコースは最終濃度が 10g/l になるように 20ml の蒸留水に溶かす。)
- ② 手の消毒を行った。
- ③ 合成培地 80ml にグルコース 20ml を加えた。
- ④ MgSO_4 、VB、を 100 μ l (培地の 0.1%) 加え CaCl_2 、trace elements を 10 μ l (培地の 0.01%) 加えた。(これら 4 つの試薬は培地に加えたときに合成培地の組成通りになるように濃くつくっておく)
- ⑤ 大腸菌を 1ml (培地の 1%) 入れて試験管やフラスコの口をアルコールランプ (または、ガスバーナー) で滅菌した。
- ⑥ 前々培養で増殖させた大腸菌を 1ml (培地の 1%) 入れた。
- ⑦ 10 時間培養を行った。また、そのサンプルを用いて本培養を行った。

表 6.1-2 合成培地 (前培養、本培養)

Na_2HPO_4	6.81 g/l
KH_2PO_4	2.99 g/l

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5.94 g/l
NaCl	0.58 g/l
MgSO_4	0.12 g/l
CaCl_2	3×10^{-5} g/l
VB	1×10^{-6} g/l
trace elements	
CaCl_2	5.5×10^{-4} g/l
FeCl_3	1×10^{-3} g/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1×10^{-4} g/l
ZnCl_2	1.7×10^{-4} g/l
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.3×10^{-5} g/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	6×10^{-5} g/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6×10^{-5} g/l

6.1.4. 大腸菌の本培養

大腸菌の本培養については以下の手順で行った。

- ① 前培養と同様の操作を①から⑥まで行った。
- ② 培養時間は安定期に入る 8 時間である。
- ③ 8 時間後から 1 時間ごとにサンプルを採取し、培地のアンモニア濃度を測定し、変化させた。

アンモニアメータの校正スパンは 0.1~1mg/l で行った。そのため、サンプル溶液を 1/1000~1/10 倍に希釈した。

1. 蒸留水を吹きかけて電極ボディの先端部及び、間膜部分を洗浄する。
2. アンモニアメータの電極を洗浄用 0.1N 水酸化ナトリウム溶液に 2 分間浸漬する。
3. 蒸留水を吹きかけて電極ボディの先端部及び、間膜部分を洗浄する。
4. 電極を希釈したサンプル溶液 100ml(校正を 50ml で行った場合 50ml)に浸けスターラの攪拌をはじめめる。
5. サンプル溶液に pH 調整溶液(10N 水酸化ナトリウム)を 1ml(溶液

が 50ml の場合は 0.5ml) 加えアンモニアメータで濃度を測定する。

- ④ サンプルを氷上に保存した。
- ⑤ サンプルを採取した後にサンプルを含め、15ml 培地を抜き取り、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を含まない合成培地を 15ml 入れてアンモニア濃度を減少させた。
- ⑥ アンモニア濃度を 0M 付近まで下げたあと濃度を増加させた。アンモニア濃度 0.01M までは急激な濃度の増加を防ぐため、サンプルを含め、培地から 10ml 抜き取り (10ml 以下でもよい)、新しい合成培地を 10ml 加え濃度を増加させた。
- ⑦ アンモニア濃度 0.01M 以降はサンプルを含め培地から 15ml 抜き取り、新しい合成培地を 15ml 入れてアンモニア濃度を増加させた。(アンモニア濃度をあげても、大腸菌がアンモニアを消費してしまうので、思ったように濃度が増加しない場合がある。また、濃度を増加させても大腸菌のアンモニア同化速度が上回って減少する場合もある。)

6.2. RNA の測定

6.2.1. RNA の安定化

RNA は非常に不安定であるので、目的の RNA を増幅するために、培養した大腸菌の RNA を安定化・抽出する必要がある。今回の実験では、QIAGEN 社の大腸菌培養液からのトータル RNA の安定化と分離用の実験キット RNAProtect Bacteria Reagent を用いて、培養した大腸菌の RNA を安定化した。RNA 安定化の主な手順は以下のとおりである。また、安定化するために選んだ RNA はアンモニア濃度を減少させたときと、増加させたときで、ほぼ同じ濃度を示す時間を選んだ。

対象とした大腸菌

- ・ 対数増殖期の大腸菌

使用した試薬

- ・ RNAProtect Bacteria Reagent

- ① オートクレーブ済みのエッペンチューブに、RNAProtect Bacteria Reagent を 1000 μ l 入れた。
- ② ①に対数増殖期の大腸菌を 500 μ l 加え、5 秒間ボルテックスし、室温で 5 分間インキュベートした。
- ③ 5000xg で 10 分間遠心操作した。
- ④ 上清を捨て、-20 $^{\circ}$ C で保存した。(-20 $^{\circ}$ C で 2 週間保存可)

6.2.2. RNA の抽出

QIAGEN 社の大腸菌からのトータル RNA 分離用の実験キット RNeasy Mini を用いて安定化した RNA の抽出を行った。主な手順は以下のとおりである。

使用した試薬

- RNA 安定化された対数増殖期の大腸菌
- TEbuffer(pH8.0)
- BufferRPE
- BufferRLT
- BufferRW1
- エタノール(96~100%)
- RNase フリー水

- ① RNA 安定化された対数増殖期の大腸菌を 4°C で 5 分間遠心後、上清を捨てた。
- ② チューブの底をたたいてルーズにし、TEbuffer(pH8.0)100 μ l 加えてボルテックスし、室温で 5 分間インキュベートした。
- ③ BufferRPE350 μ l 加えてボルテックスした。
- ④ 250 μ l エタノールをピペットで加え、混合した。
- ⑤ ④を 2ml コレクションチューブについているミニカラムにアプライし、> 10000rpm で 15 秒間遠心した (20°C)。コレクションチューブの液体は捨てた。
- ⑥ ⑤のミニカラムに 700 μ l BufferRW1 を加え、> 10000rpm で 15 秒間遠心した (20°C)。コレクションチューブは捨てた。
- ⑦ 新たな 2ml コレクションチューブをミニカラムにセットし、ミニカラムに 500 μ l BufferRPE を加え、10000rpm で 15 秒間遠心した (20°C)。コレクションチューブの液体は捨てる。
- ⑧ ミニカラムに 500 μ l BufferRPE を加え、10000rpm で 2 分間遠心した (20°C)。コレクションチューブは捨てる。
- ⑨ ミニカラムに 1.5ml コレクションチューブをセットし、50 μ l の RNase フリー水を加え、10000rpm で 1 分間遠心した (20°C)。コレクションチューブに、RNA が抽出された。

※ -20°C で 2 週間まで、-80°C で長期保存可

6.2.3. RT-PCR

RT-PCR 法はポリメラーゼ逆転写連鎖反応ともよばれ、逆転写酵素を用いて RNA を鋳型とした DNA の合成反応(逆転写反応)を行い、その DNA を鋳型として PCR を行う方法である^[100]。PCRを行うと、サイクルごとに対数的な増幅を示すが、増幅産物の量がある限度を超えると、増幅率が低下し、最終的には反応生成物量はプラトーに達して一定の値をとるようになる。反応が停止する原因としては DNA ポリメラーゼの失活や反応気質・プライマーの枯渇などがあげられる。よって、プラトーに達して以降のサイクルでは、プライミングと新生鎖の合成は行われず、単に DNA の熱変性と再合成を繰り返しているに過ぎないので、増幅産物の定量は、対数増幅領域で行わなくてはならない。そこで、サンプルを希釈して RT-PCR を行うことで発現状況を確認する。

今回増幅させたい RNA は、GS を合成する *GlnA* である。また、大腸菌 1 細胞中に恒常的に存在する *DnaA* も *GlnA* と同様に増幅させる。*DnaA* との比をとることで大腸菌 1 細胞中の *DnaA* に対する相対的な *GlnA* 発現量が求められる。QIAGEN 社の実験キット OneStep RT-PCR Kit を用いて RT-PCR を行った。主な手順は以下のとおりである。

使用した試薬

- ・ 対数増殖期の大腸菌から抽出された RNA (RNA テンプレート)
- ・ マスターミックス

RNase フリー水	
25μ		
1.5 × QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	10μl
d NTP Mix	
2.0μl		
プライマーA (dnaA-Sense or GlnA-Sense)	3μl
プライマーB (dnaA-Anti or GlnA-Anti)	3μl
QIAGEN OneStep RT-PCRnzyme Mix	2μl

使用した機器

- ・ プログラムコントロールシステム PC-800

① RNA テンプレート、プライマー溶液、d NTP Mix、5 × QIAGEN OneStep

RT-PCR Buffer、RNase フリー水を氷上で解凍した。

- ② エッペンチューブで、サンプルの数に合わせてマスターミックスを必要量の 10%増しに調節した。
- ③ マスターミックスを PCR チューブに分注した。
- ④ RNA テンプレートを 0.1、0.2、0.3 倍に希釈しチューブに入れた。
- ⑤ プログラムコントロールシステム PC-800 を下の通りにセットした。

逆転写反応	: 50°C	30 分
PCR 初期活性化ステップ	: 95°C	15 分
熱変性温度	: 94°C	0.5~1 分
アニーリング温度	: それぞれの Tm-5°C	0.5~1 分
伸長反応温度	: 72°C	1 分、25 サイクル
サイクル数	: 25 サイクル	
最終エクステンション	: 72°C	10 分

- ⑤ PCR チューブは氷上に置いたままで、PT-PCR プログラムをセットする。プログラムコントロールシステム PC-800 が 50°C に達するまで待ち、プログラムコントロールシステム PC-800 に PCR チューブを入れた。

※-20°Cで長期保存可能

表 6.2-1 使用したプライマー

Sequence name	Prificatio n	Synthesi s scale	Sequence	Lengt h	MW (g/mol)	100μ M (μl)	Tm
dnaA-Sense	standard	0.05	gtgtcactttcgcttggca	20	6,090	488	46.7
dnaA-Anti	standard	0.05	ttacgatgacaatgttctga	20	6,131	586	40.5
GlnA-Sense	standard	0.05	gccagaacctgaattcttc t	21	6,341	423	47.3
GlnA-Anti	standard	0.05	agacgctgtagtacagctc aa	21	6,439	430	47.3

6.2.4. 電気泳動

RT-PCR 法で増幅された RNA の発現を電気泳動で観察した。主な手順を下に示す。

使用した試薬

- ・ アガロース S
- ・ 50×TAEbuffer
- ・ Ethidium Bromide Solution 5 μ l/100ml
- ・ ローディングバッファー

使用した機器

- ・ 核酸用電気泳動システム i yRun.N

①490ml の蒸留水をオートクレーブし、冷めたところで 50×TAEbuffer を 10ml 加えた。

②①100ml とアガロース S1g を電子レンジで加熱して透明になるまで溶かした。

③Ethidium Bromide 5 μ l 加え型に流し、室温で固め、ゲルを完成させた。

④固まったゲルからくしを外し、核酸用電気泳動システム i yRun.N にセットした。

⑤①を、ゲルの表面が隠れる程度加えた。

⑥ローディングバッファー 1 μ l と増幅させた RNA 5 μ l をパラフィルム上で混合し、ゲルにのせた。

⑦100V で約 20 分間電気泳動を行った。

6.2.5. 蛍光度解析

電気泳動後のゲルに対して以下の手順で蛍光度解析を行った。蛍光度により RNA の濃度を推定する。

使用した機器

- ・ DIGITAL IMAGE STOCKER DS-30

使用したソフト

- ・ Gel-Pro Analyzer3.1

- ① DIGITAL IMAGE STOCKER DS-30 でゲルの写真を撮影した。
- ② Gel-Pro Analyzer3.1 で蛍光度解析を行った。

6.3. 測定結果

6.3.1. アンモニア濃度

各培養時間におけるアンモニア濃度を表 6.3-1 に示した。この表中のアンモニア濃度減少時と濃度増加時で、アンモニア濃度が近い値を示すサンプルを選び RT-PCR を行った。RT-PCR を実施したサンプルはサンプル番号 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 29 である。

表 6.3-1 各培養時間におけるアンモニア濃度

濃度減少			濃度増加		
サンプル番号	時間[h]	アンモニア濃度[M]	サンプル番号	時間[h]	アンモニア濃度[M]
1	8	0.835294	18	25	0.061647
2	9	0.676471	19	26	0.070588
3	10	0.511765	20	27	0.094118
4	11	0.441176	21	28	0.176471
5	12	0.376471	22	29	0.276471
6	13	0.335294	23	30	0.352941
7	14	0.294118	24	31	0.447059
8	15	0.264706	25	32	0.435294
9	16	0.252941	26	33	0.541176
10	17	0.200000	27	34	0.588235
11	18	0.147059	28	35	0.623529
12	19	0.105882	29	36	0.664706
13	20	0.076471			
14	21	0.051176			
15	22	0.025882			
16	23	0.009412			
17	24	5.88E-05			

6.3.2. *GlnA* と *DnaA* の発現

6.3.1 で選んだサンプルから *GlnA* と *DnaA* を RT-PCR を用いて増幅させた。RT-PCR では、予備実験において希釈率 0.5 倍以降にプラトーに達したため、今回の実験では希釈率 0.1、0.2、0.3 倍について増幅を実施した。*GlnA* の発現量を図 6.3-1、*DnaA* の発現量を図 6.3-2 に示した。図 6.3-1、図 6.3-2 の *GlnA* と *DnaA* のプラトーに達する前の発現値を用いて *GlnA* と *DnaA* の比をとることで大腸菌 1 細胞中の相対的な *GlnA* 発現量とした。

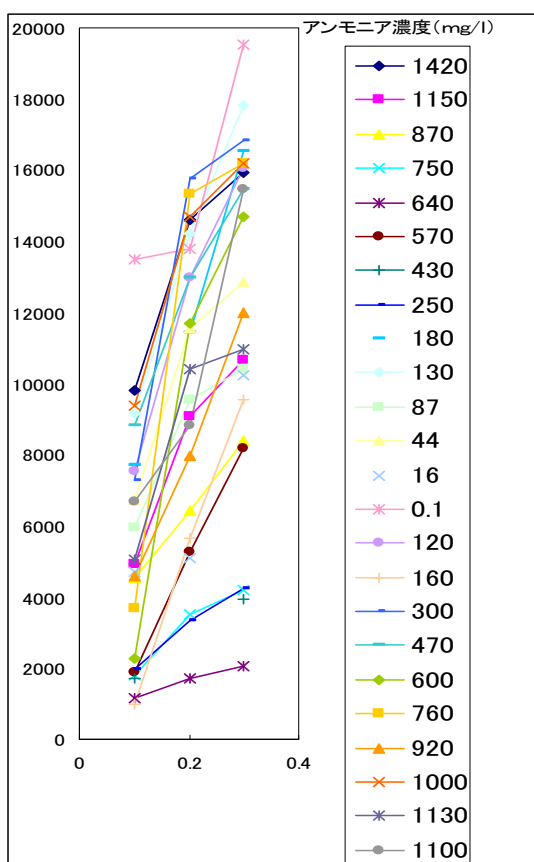


図 6.3-1 *GlnA* の発現量

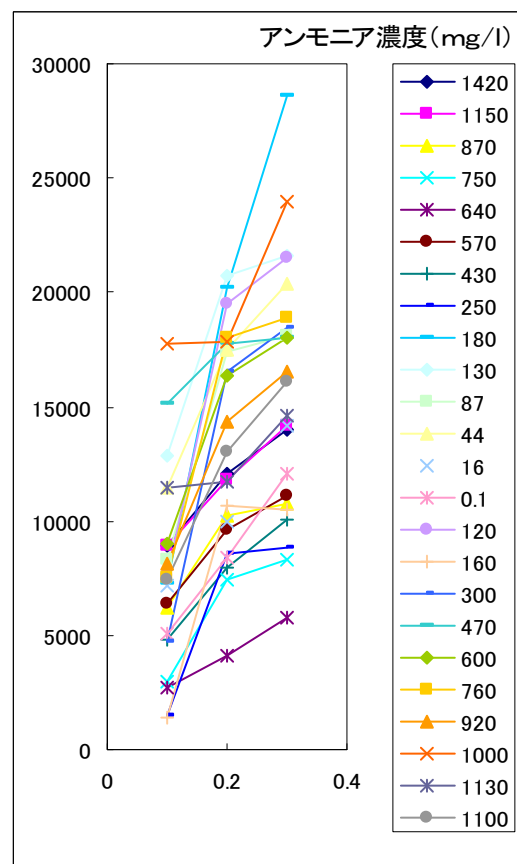


図 6.3-2 *DnaA* の発現量

6.3.3. ヒステリシス挙動の観測

図 6.3-3 から、アンモニア濃度 0.6×10^5 nM 付近から濃度を減少させていく場合は点線の経路をたどり、0nM 付近まで濃度を下げたあとに濃度を増加させた場合には実線の経路をたどった。また、アンモニア濃度が 0nM 付近と 0.5×10^5 nM 以上の濃度で経路が一致した。実験誤差等を考慮しても、アンモニア濃度が低濃度時には、アンモニア濃度減少時と増加時の *GlnA* 発現量が異なっており、4 章、5 章で予測されたヒステリシス挙動を示していると考えられる。

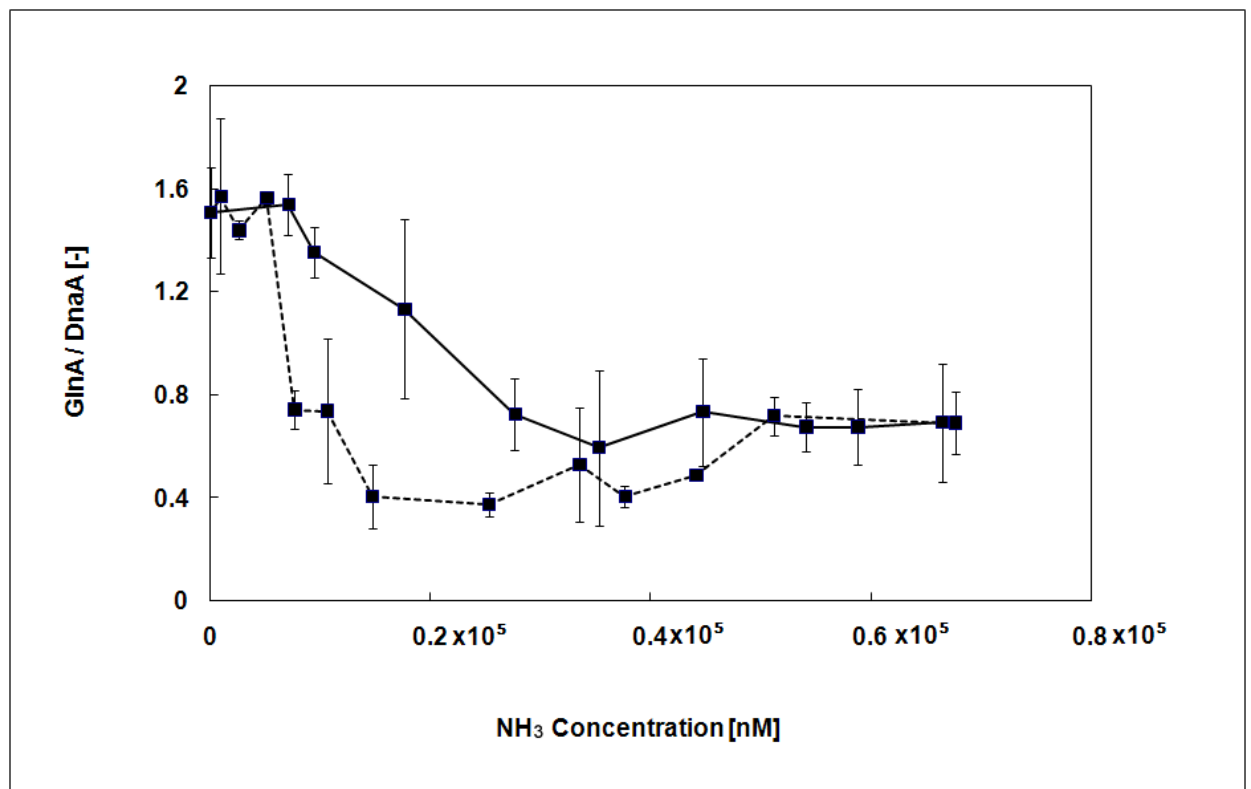


図 6.3-3 アンモニア濃度に変化に対する大腸菌の相対的な *GlnA* 発現量

7. 考察とまとめ

7.1. 考察

7.1.1. ポジティブフィードバックの働き

窒素同化システムの **GS** 合成制御モジュールはポジティブフィードバックを備えている。このポジティブフィードバックはスイッチのような働きを示し、一度スイッチが **ON** になると、ポジティブフィードバック中の **NRI** が自身の発現を促進し続けるため、同時に発現が促進されている **GS** の濃度も急激に増加する。その為、システムにはポジティブフィードバックが **ON** になった場合と **OFF** になった場合の 2 つの状態が存在し、その状態の違いが 5.2 では定常解の個数として示されたと考えられる。5.1.4 では、ポジティブフィードバックが強まる事で、定常解が 2 つの状態が広い NH_3 濃度域で維持される事が認められたが、窒素同化システムにおいてポジティブフィードバックの抑制を行うタンパク質は **GlnK** であり、**GlnK** をロックアウトしたシステムでは、ポジティブフィードバックが強くと考えられる。この **GlnK** をロックアウトしたシステムのシミュレーション結果は図 4.4-1 で示す通りであり、5.1.4 の結果と同様に一度減少させたアンモニアを増加させても、**GS** 濃度は高濃度のままである。既往の実験^[57]においても、**GlnK** 欠損株においては、10 時間以上アンモニアが制限された環境に置かれることで、制限状態をメモリーし、“runaway expression”を示す事が明らかになっている。この現象もポジティブフィードバックを抑制する **GlnK** の欠損により、ポジティブフィードバックを **OFF** にできない事に起因すると考えられる。

7.1.2. **GS** 活性制御モジュールと **GS** 合成制御モジュールの役割

窒素同化システムは、**GS** 活性制御モジュールと **GS** 合成制御モジュールの 2 つの制御機構を備えている。図 4.5-1、図 4.5-2、図 4.5-3 で示す通り、**GS** 活性制御はアンモニアが大きく減少した際に、**N/C** を維持する働きが弱い。これは **GS** の総量を変えずに、**GS** の活性と不活性を切り替えて制御を実行している為であると考えられる。ただし、4.6 の感度解析及び 5.2 の理論解析で明らかのように **GS** 活性制御モジュールを構成するタンパク質の感度は **GS** 合成制御モジュール

を構成するタンパク質よりも低く、GS 活性制御モジュールは安定した制御モジュールである事が推測される。逆に GS を発現させる事でアンモニア濃度の低下に対応する GS 合成制御モジュールは、N/C を回復させる機能が強い。ただし、GS 合成制御モジュールはポジティブフィードバックを備えているために、GS の発現量を増加させる際にオーバーシュートが発生していると考えられる。さらに、4.6 の感度解析において、GS 合成制御モジュールを構成するタンパク質の感度が高かった事から、GS 合成制御は GS 活性制御に比べて不安定な制御であると推測できる。オーバーシュートに見られる過剰なタンパク質の発現は、生物の生存においては不利となる為、GS の増加が生存に必須となる緊急時以外は GS 合成制御のポジティブフィードバックが働かない事が望ましい。

窒素同化システムでは、アンモニア濃度の微小な変化に対しては、GS 活性制御による GS の活性化と不活性化による調節を行い、アンモニア濃度が急激に減少するような非常時において、ポジティブフィードバックを備える GS 合成制御を働かせ、GS の発現量を一気に増加させていると推測される。4.7 で示すシステムの状態遷移の結果もこの考察を支持する結果となっており、アンモニア濃度がある程度以上の減少を示すと、システムが GS 高濃度状態へと遷移している。

7.2. まとめ

本研究の成果は以下の通りである。

1. モデリング

- ・窒素同化システムネットワークの数学モデルを作成した。

2. シミュレーション

- ・アンモニア濃度の減少に対する **N/C** 回復反応を再現した。
- ・遺伝子変異実験とシミュレーションとを比較しモデルの検証を実施した。
- ・**GS** 活性制御モジュールの特徴を示した。
- ・**GS** 合成制御モジュールの特徴を示した。
- ・ポジティブフィードバックによるヒステリシスを示した。

3. 理論解析

- ・ポジティブフィードバックの特徴を抽出したシンプルモデルを作成した。
- ・シンプルモデルから数式を作成し、**glutamine** の定常解を求めた。
- ・シンプルモデルが条件によっては複数の定常解を持つ事を示した。
- ・定常解の個数がポジティブフィードバックの強さにより変化する事を示した。
- ・双方向制御が構成タンパク質の濃度変化に対し、高いロバスト性を持つことを示した。

4. 実験

- ・大腸菌をアンモニア濃度を経時的に変化させた培地で培養した。
- ・**GS** の mRNA 発現量を **RT-PCR** を用いて測定した。
- ・アンモニア濃度減少時とアンモニア濃度増加時で、大腸菌の **GS** の mRNA 発現量が異なる事を示した。

窒素同化システムをモデリングし、シミュレーションを実行する事で、**GS** 活性制御モジュールと **GS** 合成制御モジュールの持つ役割を考察する上で有用な知見を得る事ができた。**GS** 活性制御モジュールは、高い安定性を持ち、アンモニア濃度の変化が微小な場合に働くことで、無駄な **GS** の発現を抑えていると考えられる。**GS** 合成制御モジュールは、ポジティブフィードバックを備えることで、

緊急時に **GS** の発現量を一気に増加させる働きを持つと考えられる。この 2 つの制御機構をバランスよく働かせる事で大腸菌は環境中のアンモニアの濃度変化に対し、高い **N/C** 維持性能を発揮する事が可能となっていると推測できる。

また、理論解析によりポジティブフィードバックとヒステリシスの関連性について、明らかにする事に成功した。ポジティブフィードバックの強弱により、システムがアンモニア濃度に対して示す挙動は大きく異なり、ヒステリシスや不可逆反応を示す事もあり得る事が分かった。**GlnK** 欠損株の示す挙動^[57]についても、この結果から説明可能であり、窒素同化システムの制御メカニズムの解明を進める事ができた。

同じく理論解析により、双方向制御が高いロバスト性を持つことを明らかにした。双方向制御は、**GS** 活性制御モジュールを構成するタンパク質の濃度変化に対して、高いロバスト性を示すことが示された。

実際にシミュレーションと理論解析で得られた予測を実験で実証した。大腸菌を経時的にアンモニア濃度を変化させた培地で培養し、その際の **GS** の mRNA 発現量を測定し、予測された挙動に近い挙動を示す事が確認できた。

8. 参考文献

- [1] Ideker, T. Galitski, T. Hood, L. (2001). A new approach to decoding life: systems biology, *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2 : 343-72.
- [2] Kitano, H. (2002). Systems biology: A brief overview. *Science*, 295: 1662–1664.
- [3] Kitano, H. (2002). Computational systems biology. *Nature*, 420(6912): 206-10.
- [4] Wolkenhauer O. (2001). Systems biology: the reincarnation of systems theory applied in biology? *Brief Bioinform.*, 2001 2(3): 258-70.
- [5] Westerhoff HV, Palsson BO. (2004). The evolution of molecular biology into systems biology. *Nat Biotechnol.*, 22(10): 1249-52.
- [6] Gardner, T.S., Cantor, C.R., and Collins, J.J. (2000). Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature*, 403: 339–342.
- [7] Bruggeman FJ, Westerhoff HV. (2007). The nature of systems biology. *Trends Microbiol.*, 15(1): 45-50.
- [8] 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.
- [9] Mendes, P. (1993). GEPASI: A software package for modeling the dynamics, steady state and control of biochemical and other systems. *Comput. Appl. Biosci.*, 9: 563–571.

- [10] Goryanin, I., Hodgman, T.C., and Selkov, E. (1999). Mathematical simulation and analysis of cellular metabolism and regulation. *Bioinformatics*, 15: 749–758.
- [11] Tomita, M., Hashimoto, K., Takahashi, K., Shimizu, T., Matsuzaki, Y., Miyoshi, F., Saito, K., Tanida, S., Yugi, K., Venter, J.C., et al. (1999). Software environment for whole cell simulation. *Bioinformatics*, 15: 72–84.
- [12] Hucka, M., Finney, A., Sauro, H.M., Bolouri, H., Doyle, J., and Kitano, H. (2002). The ERATO Systems Biology Workbench: Enabling interaction and exchange between software tools for computational biology. *Pac. Symp. Biocomput.*, 450–461.
- [13] Hucka, M., Finney, A., Sauro, H.M., Bolouri, H., Doyle, J.C., Kitano, H., Arkin, A.P., Bornstein, B.J., Bray, D. et al. (2003). The systems biology markup language (SBML): a medium for representation and exchange of biochemical network models. *Bioinformatics*, 19, 524–531.
- [14] Mario A Marchisio, Jörg Stelling. (2009). Computational design tools for synthetic biology. *Curr Opin Biotechnol.*, 20(4): 479-85.
- [15] Schmidt H, Jirstrand M. (2006). Systems Biology Toolbox for MATLAB: a computational platform for research in systems biology. *Bioinformatics*, 22(4): 514-5.
- [16] KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
(<http://www.genome.jp/kegg/>)
- [17] Shujiro Okuda, Takuji Yamada, Masami Hamajima, Masumi Itoh, Toshiaki Katayama, Peer Bork, Susumu Goto, Minoru Kanehisa. (2008). KEGG Atlas mapping for global analysis of metabolic pathways. *Nucleic Acids Res.* 36(Web Server issue): W423-6.
- [18] Naoki Kiyosawa, Sunao Manabe, Atsushi Sanbuissho, Takashi Yamoto.

- (2010). Gene set-level network analysis using a toxicogenomics database. *Genomics*, 96(1): 39-49
- [19] Shin SY, Rath O, Zebisch A, Choo SM, Kolch W, Cho KH. (2010). Functional roles of multiple feedback loops in extracellular signal-regulated kinase and Wnt signaling pathways that regulate epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.*, 70(17): 6715-24.
- [20] Herrgård MJ, Swainston N, Dobson P, Dunn WB, Arga KY, Arvas M, Blüthgen N, Borger S, Mendes P, Nielsen J, Kell DB. et al. (2008). A consensus yeast metabolic network reconstruction obtained from a community approach to systems biology. *Nat Biotechnol.*, 26(10): 1155-60.
- [21] Hornberg JJ, Bruggeman FJ, Westerhoff HV, Lankelma J. (2006). Cancer: a Systems Biology disease. *Biosystems.*, 83(2-3): 81-90.
- [22] Cloutier M, Chen J, De Dobbeleer C, Perrier M, Jolicoeur M. (2009). A systems approach to plant bioprocess optimization. *Plant Biotechnol J.*, 7(9): 939-51.
- [23] Le Novere, N., Bornstein, B., Broicher, A., Courtot, M., Donizelli, M., Dharuri, H., Li, L., Sauro, H., Schilstra, M., Shapiro, B., Snoep, J. L., & Hucka, M. (2006). BioModels Database: a free, centralized database of curated, published, quantitative kinetic models of biochemical and cellular systems. *Nucleic Acids Res*, 34(Database issue), D689-691.
- [24] Carrera J, Rodrigo G, Jaramillo A. (2009). Model-based redesign of global transcription regulation. *Nucleic Acids Res.*, 37(5): e38.
- [25] Nagarajan Nandagopal, Michael B Elowitz. (2011). Synthetic biology: integrated gene circuits. *Science*, 333(6047), 1244-8.

- [26] Wu CH, Lee HC, Chen BS. (2011). Robust synthetic gene network design via library-based search method. *Bioinformatics.*, 27(19): 2700-6.
- [27] Rodrigo G, Carrera J, Jaramillo A. (2011). Computational design of synthetic regulatory networks from a genetic library to characterize the designability of dynamical behaviors. *Nucleic Acids Res.*, 39(20): e138.
- [28] Marchisio MA. (2012). In silico implementation of synthetic gene networks. *Methods Mol Biol.*, 813: 3-21.
- [29] Chen BS, Hsu CY, Liou JJ. (2011). Robust design of biological circuits: evolutionary systems biology approach. *J Biomed Biotechnol.*, 304236.
- [30] Rodrigo G, Carrera J, Elena SF. (2010). Network design meets in silico evolutionary biology. *Biochimie.*, 92(7): 746-52.
- [31] Wynand S Verwoerd. (2011). A new computational method to split large biochemical networks into coherent subnets. *BMC Syst Biol.*, 5: 25.
- [32] El-Samad, H., Kurata, H., Doyle, J. C., Gross, C. A., &Khammash, M. (2005). Surviving heat shock: control strategies for robustness and performance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(8), 2736-2741.
- [33] Kurata, H., El-Samad, H., Iwasaki, R., Ohtake, H., Doyle, J. C., Grigorova, I., Gross, C. A., &Khammash, M. (2006). Module-based analysis of robustness tradeoffs in the heat shock response system. *PLoS Comput Biol*, 2(7), e59.
- [34] Shen-Orr, S. S., Milo, R., Mangan, S., &Alon, U. (2002). Network motifs in the transcriptional regulation network of Escherichia coli. *Nat Genet*, 31(1), 64-68.
- [35] Carrera J, Rodrigo G, Jaramillo A. (2009). Dynamic modeling and analysis of cancer cellular network motifs. *Integr Biol. (Camb)*. 3(7): 724-32.

- [36] Csete, M. E., & Doyle, J. C. (2002). Reverse engineering of biological complexity. *Science*, 295:1664-1669.
- [37] Stelling, J., Sauer, U., Szallasi, Z., Doyle, F. J., 3rd, & Doyle, J. (2004). Robustness of cellular functions. *Cell*, 118(6), 675-685.
- [38] Tyson, J.J., Chen, K.C., and Novak, B. (2003). Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: Dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 15: 221–231.
- [39] Yi, T.-M., Huang, Y., Simon, M.I., and Doyle, J. (2000). Robust perfect adaptation in bacterial chemotaxis through integral feedback control. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97: 4649–4653.
- [40] Zhang J, Yuan Z, Li HX, Zhou T. (2009). Architecture-dependent robustness and bistability in a class of genetic circuits. *Biophys J.*, 99(4): 1034-42.
- [41] Barkai, N., & Leibler, S. (1997). Robustness in simple biochemical networks. *Nature (London)*, 387:913-917.
- [42] Ferrazzi F, Engel FB, Wu E, Moseman AP, Kohane IS, Bellazzi R, Ramoni MF. (2011). Inferring cell cycle feedback regulation from gene expression data. *J Biomed Inform.*, 44(4): 565-75.
- [43] Birtwistle MR, Kolch W. (2011). Biology using engineering tools: the negative feedback amplifier. *Cell Cycle*. 10(13): 2069-76.
- [44] Rodrigo G, Carrera J, Elena SF, Jaramillo A. (2010). Robust dynamical pattern formation from a multifunctional minimal genetic circuit. *BMC Syst Biol.*, 4: 48.
- [45] McAdams, H. H., & Arkin, A. (2000). Towards a circuit engineering discipline. *Curr Biol*, 10(8), R318-320.

- [46] Del Vecchio, D., Ninfa, A. J., & Sontag, E. D. (2008). Modular cell biology: retroactivity and insulation. *Mol Syst Biol*, 4161.
- [47] Hartwell, L. H., Hopfield, J. J., Leibler, S., & Murray, A. W. (1999). From molecular to modular cell biology. *Nature*, 402(6761 Suppl), C47-52.
- [48] Ravasz, E., Somera, A. L., Mongru, D. A., Oltvai, Z. N., & Barabasi, A. L. (2002). Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. *Science*, 297(5586), 1551-1555.
- [49] Schuster, S., Dandekar, T., & Fell, D. A. (1999). Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering. *Trends Biotechnol*, 17(2), 53-60.
- [50] Hasty, J., McMillen, D., & Collins, J. J. (2002). Engineered gene circuits. *Nature*, 420(6912), 224-230.
- [51] Nishio, Y., Usuda, Y., Matsui, K., & Kurata, H. (2008). Computer-aided rational design of the phosphotransferase system for enhanced glucose uptake in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol*, 4160.
- [52] Sprinzak, D., & Elowitz, M. B. (2005). Reconstruction of genetic circuits. *Nature*, 438(7067), 443-448.
- [53] Wang L, Lai L, Ouyang Q, Tang C. (2011). Flux balance analysis of ammonia assimilation network in *E. coli* predicts preferred regulation point. *PLoS One*. 6(1): e16362.
- [54] Hart Y, Madar D, Yuan J, Bren A, Mayo AE, Rabinowitz JD, Alon U. (2011). Robust control of nitrogen assimilation by a bifunctional enzyme in *E. coli*. *Mol Cell.*, 41(1): 117-27.

- [55] Kurata, H., &Taira, K. (2000). Evolution of Ammonia Assimilation System in *E. coli*. *Technical Report of IEICE*, AI2000-1217-24.
- [56] Mutalik, V. K., Shah, P., &Venkatesh, K. V. (2003). Allosteric interactions and bifunctionality make the response of glutamine synthetase cascade system of *Escherichia coli* robust and ultrasensitive. *J Biol Chem*, 278(29), 26327-26332.
- [57] Bruggeman, F. J., Boogerd, F. C., &Westerhoff, H. V. (2005). The multifarious short-term regulation of ammonium assimilation of *Escherichia coli*: dissection using an in silico replica. *Febs J*, 272(8), 1965-1985.
- [58] Kouichi Masaki, Hiroyuki Kurata, (2007). A simple model of positive feedback of the nitrogen assimilation system in *E. coli*, *IP SJ Transactions on Mathematical Modeling and Its Applications*, 48: 104-109.
- [59] Mutalik, V. K., &Venkatesh, K. V. (2007). A theoretical steady state analysis indicates that induction of *Escherichia coli* glnALG operon can display all-or-none behavior. *Biosystems*, 90(1), 1-19.
- [60] Ma H, Boogerd FC, Goryanin I. (2009). Modelling nitrogen assimilation of *Escherichia coli* at low ammonium concentration. *J Biotechnol.*, 144(3): 175-83.
- [61] Yuan J, Doucette CD, Fowler WU, Feng XJ, Piazza M, Rabitz HA, Wingreen NS, Rabinowitz JD. (2009). Metabolomics-driven quantitative analysis of ammonia assimilation in *E. coli*. *Mol Syst Biol.*, 5:302.
- [62] Mao XJ, Huo YX, Buck M, Kolb A, Wang YP. (2007). Interplay between CRP-cAMP and PII-Ntr systems forms novel regulatory network between carbon metabolism and nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, 35(5): 1432-40.
- [63] Jiang, P., Peliska, J. A., &Ninfa, A. J. (1998). Enzymological characterization

- of the signal-transducing uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (EC 2.7.7.59) of *Escherichia coli* and its interaction with the PII protein. *Biochemistry*, 37(37), 12782-12794.
- [64] Jiang, P., Peliska, J. A., & Ninfa, A. J. (1998). Reconstitution of the signal-transduction bicyclic cascade responsible for the regulation of Ntr gene transcription in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 37(37), 12795-12801.
- [65] Bremer, H. & Dennis, P. P. (1996). Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell by Growth Rate. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* (Neidhardt, F. C., ed.), pp. 1553-1569. ACM Press, Washington (D. C.).
- [66] McPherson, M. J., Baron, A. J., Jones, K. M., Price, G. J. & Wootton, J. C. (1988). Multiple interactions of lysine-128 of *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase revealed by site-directed mutagenesis studies. *Protein Engineering*, 2, 147-152.
- [67] Meek, T. D. & Villafranca, J. J. (1980). Kinetic mechanism of *Escherichia coli* glutamine synthetase. *Biochemistry*, 19, 5513-5519.
- [68] Ninfa, A. J., & Atkinson, M. R. (2000). PII signal transduction proteins. *Trends Microbiol*, 8(4), 172-179.
- [69] Kamberov, E. S., Atkinson, M. R., & Ninfa, A. J. (1995). The *Escherichia coli* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. *J Biol Chem*, 270(30), 17797-17807.
- [70] Pioszak, A.A., Jiang, P., and Ninfa, A.J. (2000). The *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates the activities of the two-component system transmitter protein NRII by direct interaction with the kinase domain of the transmitter module. *Biochemistry* 39: 13450–13461.
- [71] Mariette, R., Atkinson, M. R., Alexander, M., Ninfa, A. J. (1998). "Role of the GlnK signal

transduction protein in the regulation of the nitrogen assimilation in *Escherichia coli*“, *Molecular Microbiology* 29:431-447.

- [72] He S, Chen M, Xie Z, Yan Y, Li H, Fan Y, Ping S, Lin M, Elmerich C. (2008). Involvement of GlnK, a PII protein, in control of nitrogen fixation and ammonia assimilation in *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Arch Microbiol.*, 190(1): 1-10.
- [73] Atkinson, M. R., & Ninfa, A. J. (1999). Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 32(2), 301-313.
- [74] Blauwkamp, T. A., & Ninfa, A. J. (2002). Physiological role of the GlnK signal transduction protein of *Escherichia coli*: survival of nitrogen starvation. *Mol Microbiol*, 46(1), 203-214.
- [75] Dworkin, J., Ninfa, A. J., & Model, P. (1998). A protein-induced DNA bend increases the specificity of a prokaryotic enhancer-binding protein. *Genes Dev*, 12(6), 894-900.
- [76] Atkinson, M. R., Pattaramanon, N., & Ninfa, A. J. (2002). Governor of the *glnAp2* promoter of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 46(5), 1247-1257.
- [77] 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.
- [78] Atkinson, M.R., Blauwkamp, T.A., Bondarenko, V., Studitsky, V., and Ninfa, A.J. (2002). Activation of the *glnA*, *glnK*, and *nac* promoters as *Escherichia coli* undergoes the transition from nitrogen excess growth to nitrogen starvation. *J. Bacteriol.*, 184: 5358–5363.
- [79] Jiang, P., Peliska, J. A., & Ninfa, A. J. (2000). Asymmetry in the autophosphorylation of the two-component regulatory system transmitter protein nitrogen regulator II of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 39(17),

5057-5065.

- [80] McCleary, W. R., Stock, J. B., & Ninfa, A. J. (1993). Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? *J Bacteriol*, 175(10), 2793-2798.
- [81] Ninfa, A.J. and 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.
- [82] Ciliberto, A., Capuani, F., & Tyson, J. J. (2007). Modeling networks of coupled enzymatic reactions using the total quasi-steady state approximation. *PLoS Comput Biol*, 3(3), e45.
- [83] Kurata, H. and K, Taira (2000). "Two-phase partition method for simulating a biological system at an extremely high speed.", *Genome Informatics* 11:185-195.
- [84] Alibhai, M., & Villafranca, J. J. (1994). Kinetic and mutagenic studies of the role of the active site residues Asp-50 and Glu-327 of *Escherichia coli* glutamine synthetase. *Biochemistry*, 33(3), 682-686.
- [85] Meek, T. D., & Villafranca, J. J. (1980). Kinetic mechanism of *Escherichia coli* glutamine synthetase. *Biochemistry*, 19(24), 5513-5519.
- [86] Yoshida, K. and Kurata, H. (2004). Decomposition and integration of functional modules optimizes a dynamic model of large-scale biochemical networks., *ISPJ Symp. Series* 2004: 97–102.
- [87] Kurata, H., Matoba, N., and Shimizu, N. (2003). CADLIVE for constructing a large-scale biochemical network based on a simulation-directed notation and its application to yeast cell cycle. *Nucleic Acids Res.* 31: 4071–4084.
- [88] Kurata, H., Inoue, K., Maeda, K., Masaki, K., Shimokawa, Y., & Zhao, Q. (2007). Extended CADLIVE: a novel graphical notation for design of

biochemical network maps and computational pathway analysis. *Nucleic Acids Res*, 35(20), e134.

- [89] Fumihide Shiraishi and Michael A. Savageau S. (1992). The Tricarboxylic Acid Cycle in *Dictyostelium discoideum*. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(32), 22919-22925.
- [90] Miller, R. E. & Stadtman, E. R. (1972). Glutamate synthase from *Escherichia coli*. An iron-sulfide flavoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 247, 7407-7419.
- [91] Masaki, Koichi, Kazuhiro Maeda, & Hiroyuki Kurata. (2012). Biological design principles of complex feedback modules in the *E. coli* ammonia assimilation system. *Artificial Life*, 18(1): 53-90
- [92] Ninfa, A. J., Jiang, P., Atkinson, M. R., & Peliska, J. A. (2000). Integration of antagonistic signals in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Curr Top Cell Regul*, 3631-75.
- [93] Ferrell Jr., J.E. (2002). Self-perpetuating states in signal transduction: Positive feedback, double-negative feedback and bistability. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 14: 140–148.
- [94] Tyson, J. J., Chen, K. C., & Novak, B. (2003). Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Curr Opin Cell Biol*, 15(2), 221-231.
- [95] He, B., Choi, K. Y., & Zalkin, H. (1993). Regulation of *Escherichia coli* *glnB*, *prsA*, and *speA* by the purine repressor. *J Bacteriol*, 175(11), 3598-3606.
- [96] 眞崎 浩一 (2005) “窒素同化システムのマルチフィードバックシステムのシミュレーションとシステム解析” (修士論文)

- [97] 中山宏樹 秀潤社 “新版 バイオ実験 イラストレイテッド3+”
- [98] 山口 孝信 (2007) “アンモニア同化システムにおけるヒステリシスのシミュレーションと実験による証明” (学士論文)
- [99] 渡邊 美雪 (2007) “アンモニア同化システムのポジティブフィードバック制御の理論解析と実験” (学士論文)
- [100] 谷口武利 羊土社 “PCR 実験ノート”

謝辞

本研究を行うにあたり、長い期間において御指導、御助言を賜りました九州工業大学 教授 倉田博之 先生に心より感謝の意を表します。

また、本研究は日本学術振興会 特別研究員として実施したものです。
