

氏名	田 忠原
授与学位	博士(理学)
学位記番号	理工博甲620号
学位授与年月日	平成26年3月17日
学位授与の要件	学位規則第4条1項
研究科、専攻の名称	理工学研究科(博士後期課程) 自然科学基盤系専攻
学位論文題目	A Systematic Study on Glycogen Metabolism in <i>E. coli</i> and Its Regulatory Mechanisms (大腸菌におけるグリコーゲン代謝とその制御機構に関するシステム論的研究)

論文審査委員	主査	山口大学 教授	松野 浩 嗣
		山口大学 教授	内野 英 治
		山口大学 教授	村上 柳 太郎
		山口大学 教授	明石 真
		山口大学 准教授	堀 学

【学位論文内容の要旨】

生物は環境に対して物質の吸収と排出を行なうことでその生命活動を維持しており、代謝機構が重要な役割を果たしている。最も重要な糖であるグルコース代謝については、大腸菌を用いて多くの研究がなされているが、これに比較してグリコーゲン代謝の研究は極めて少ない。グリコーゲンは、細胞内に貯蔵し必要となき时使用する糖質であり、この機構の異常は、がん等の病気の原因になることが知られている。

システム生物学は、細胞内の個々の分子反応群等のメカニズムを計算機でモデル化して統合し、俯瞰的視点で細胞全体のメカニズムを明らかにしていこうとする学問である。モデル化手法には、トップダウン手法とボトムアップ手法があるが、システム生物学の研究にはどちらの手法も必要である。本研究では、どちらの手法も可能とするハイブリッド関数ペトリネット(HFPN)をモデル化手法として用いている。

本論文ではまず、生物学と情報科学の研究者の共同によってシステム論的に生物学的事実を導き出すという、システム生物学研究を实践した典型例を示す。(I)最終目標は112個の大腸菌代謝物濃度変化の実験データをシミュレーションできる計算モデルを構築することであるが、(II)まず第一段階として、グルコースをG6Pに変換する解糖経路の入り口部分のモデル化とシミュレーションを行なったところ、実験データと計算結果との相違点が明らかになった。(III)そこで計算機による解析を行なって、グリコーゲンがこの相違点を生じさせる原因となっていることを予測した。すなわち、大腸菌内に貯蔵されているグリコーゲンが、誘導期においてG6Pに変換されたのちに解糖経路等によって消費され、定常期では逆に、グルコースがグリコーゲンに変換されて細胞内に蓄えられるという仮説である。(IV)この仮説を実証するため、大腸菌の誘導期、対数期、定常期を通した細胞内グリコーゲンの時間変化を測定し、予想と一致する実験結果を得た。(V)以上のトップダウン手法によるモデル化と解析により、大腸菌はその生育のため、誘導期においてグリコーゲンを初期的に利用することが示唆された。

次に、最終目標である代謝経路の全体モデル構築に近づくため、主要代謝経路とその制御機構のモデル作成に取り組んだ。すなわち、グルコース取り込みシステム、ペントースリン酸経路、解糖経路、グリコーゲン経路、及びPTSリン酸リレー系を含む制御機構のHFPNモデルを以下のステップで作成した。

- 測定データと無矛盾な振る舞いをする、主要代謝経路のHFPNモデルの作成を行なった。解糖経路とペントースリン酸経路を既存の微分方程式モデルを基にボトムアップ的に作成した。グリコーゲン経路は文献情報に基づいて、質量作用則に従ったモデルをトップダウン的に作成した。
- 遺伝子発現や酵素反応による代謝経路の制御機構をHFPNによってモデル化するため、多くの文献を調査

した。その結果、PTS リン酸リレー系の HPr と EIIGlc の2つのタンパク質がグルコースとグリコーゲンの代謝制御に重要な働きをしていることが分った。代謝経路モデルにこれらの制御機構を組み込み、遺伝子レベル、代謝物レベル、局在レベル、フラックスレベル、酵素レベルの5階層からなるモデルに整理してまとめた。

- 上記で作成したモデルを HFPN 化した。具体的には、前に作成した代謝経路の HFPN モデルに、HPr タンパク質の局在制御、HPr::GlgP 複合体、PTS リン酸リレー系、遺伝子発現制御を組み込み、パラメータ調整を適切に行なうことで、測定された代謝物の濃度変化とほぼ一致するシミュレーション結果を出力する HFPN モデルを得た。

以上のように、既知の局所的な実験事実をシステム論的に結合・統合し、シミュレーション実行によりその整合性を確認することによって、グリコーゲン経路を含んだ大腸菌の主要代謝経路とその制御機構の全体像を初めて明らかにすることができた。今後の課題は、さらにこのモデルを拡大することで、最初に述べた112個の代謝物濃度変化をシミュレーションできるモデルを実現し、システム生物学の立場から、大腸菌の細胞機構のみならず、その生存戦略についても理解を深めることである。

【論文審査結果の要旨】

生物は、外界から取り入れた物質を基にエネルギーを作りだし、タンパク質・核酸・多糖・脂質などの細胞の構成要素を合成する代謝によってその生命活動を維持している。代謝は酵素による化学物質の連鎖変換の反応プロセスであり、その体系は代謝経路と呼ばれている。特に最近では、がん、うつ病、脳卒中等の疾病と代謝の変異の関係が活発に研究されており、代謝経路の機構と機能を統合的に理解することの重要性が増している。

代謝経路の中心部分は、下等な微生物から高等な哺乳類に渡る多くの生物で共通であることから、代謝の研究には大腸菌がよく用いられている。本論文は、大腸菌のライフサイクルにおける代謝物利用の時間的経過を表現できる計算モデルを、代謝物の測定データ、文献から得た遺伝子発現やタンパク質相互作用の知識、過去に作成された計算モデル等の情報を総合的に利用して構築し、シミュレーションを実行することによって、システム論的に新しい生物学的な知見を導き出すことを試みたものである。シミュレーション技法としてハイブリッド関数ペトリネットを用い、解糖経路、ペントースリン酸経路、PTS リン酸リレー系を含み、それらを働かせる酵素等の制御因子も組み入れ、過去に発表されたものと比較しても大規模でかつ、細胞内分子発現の時間的因果関係と整合した結果を出力するシミュレーションモデルの構築に成功し、以下の成果を得ている。

(1) 大腸菌の解糖経路代謝物の濃度変化、生育曲線、及び培地中グルコースの濃度変化のデータを用い、代謝経路の入り口であるグルコースからグルコース6-リン酸への変換過程のモデル化とシミュレーションを実施している。その結果として、最も代謝が盛んな対数増殖期では、グルコースが使われると同時にグリコーゲンへの変換と貯蓄が始まり、安定期になると、グルコースはグリコーゲンとして貯蓄され、次の細胞増殖に備えることを示している。

(2) これまで比較的軽視されてきた、代謝物制御に関わるタンパク質局在の影響を積極的に考慮し、新しい知見を得ている。すなわち、HPr タンパク質の局在がグリコーゲン分解の決定要因として強く働いていることを、この機構を組み込んだシミュレーションの実行結果が生物学的事実と無矛盾に対応することを示すことによって主張している。

(3) PTS タンパク質の HPr と EIIGlc の作用がグリコーゲン代謝の制御に重要な働きをしていることを示している。具体的には、大腸菌の生活環におけるグリコーゲン利用の仮説、すなわち、誘導期初期では補助的エネルギーとして使われるが、誘導期後期から対数期の間で大腸菌内に蓄積され、定常期においてゆるやかな生存のために少量ずつ消費される、という一連のグリコーゲン利用は、HPr と EIIGlc を中心とする因子群によって制御されることをシミュレーションによって検証している。

公聴会では、閉路をなしているリン酸リレーの働きや、鍵となるタンパク質の局在情報を把握するためのシミュレーション利用の方法について質問がなされ、発表者は具体的な分子名を挙げながら、その反応メカニズムについて丁寧な回答を行っていた。また、シミュレーションから予測した未同定反応の確からしさに関する質問については、同様な現象を引き起こす可能性のある他反応も調査し、比較検討の結果に行なった

予測であるので、その確度は高いことが説明された。さらに、生物学研究室と情報科学研究室との協働によりモデルを作成することの有用性など、システム生物学への興味からくる一般的な質問もなされたが、いずれについても的確な回答が発表者からなされた。

以上により、本論文は、グリコーゲンとそれに関わる広範囲な代謝経路モデルをハイブリッド関数ペトリネットを用いて作成してシミュレーションを実行することで、中心的にグリコーゲン代謝を制御しているHPrとEIIA^{Glc}の働きをその局在作用を含めて初めて明らかにし、大腸菌のライフサイクルにおいて重要な働きをしているにも関わらず、これまで殆ど調べられてこなかったグリコーゲンの利用プロセスを明快に説明している。以上の成果から、本論文の内容は博士（理学）の学位に十分値するものと判断した。

論文内容及び審査会、公聴会での質問に対する回答などから、最終試験は合格とした。

なお、主要な関連論文の発表状況は下記のとおりである。（関連論文 計2編、参考論文 なし）

- 1) Yamamotoya, T., Dose, H., Tian, Z., Faure, A., Toya, Y., Honma, M., Igarashi, K., Nakahigashi, K., Soga, T., Mori, H., Matsuno, H., Glycogen is the primary source of glucose during the lag phase of *E. coli* proliferation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1824:1442-1448, 2012.
- 2) Tian, Z., Faure, A., Mori, H., Matsuno, H., Identification of key regulators in glycogen utilization in *E. coli* based on the simulations from a hybrid functional Petri net model, *BMC Systems Biology*, 7(6):1-10, 2013.