

Flux Balance Analysis

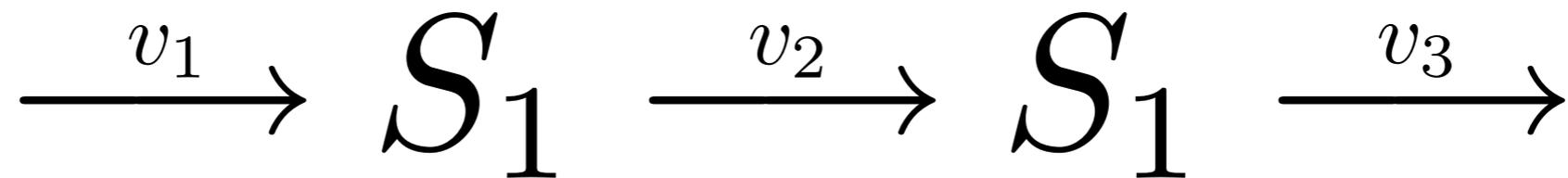
YUGI, Katsuyuki
Kuroda Lab., The University of Tokyo

今日の内容

- ・ 代謝流束 (flux) の定義
- ・ 代謝流束均衡解析 (Flux Balance Analysis)
- ・ 代謝工学への応用

定常状態 (steady state)

- 物質の生成と消費が釣り合っている状態



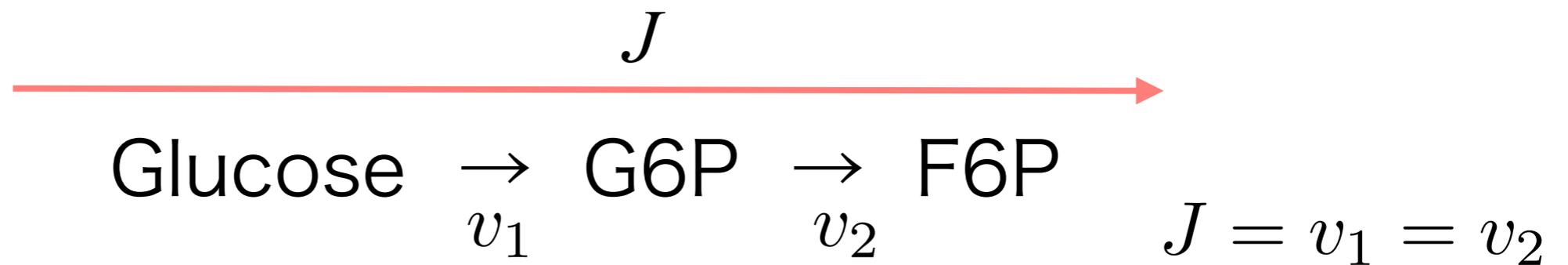
$$v_1 = v_2 = v_3$$

- 平衡状態 (equilibrium) とは異なる

- 平衡状態は $v_1 = v_2 = v_3 = 0$

代謝流束 (flux)

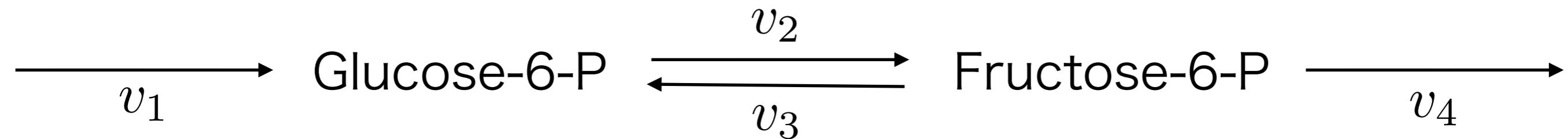
- ・ 定常状態における反応速度のこと



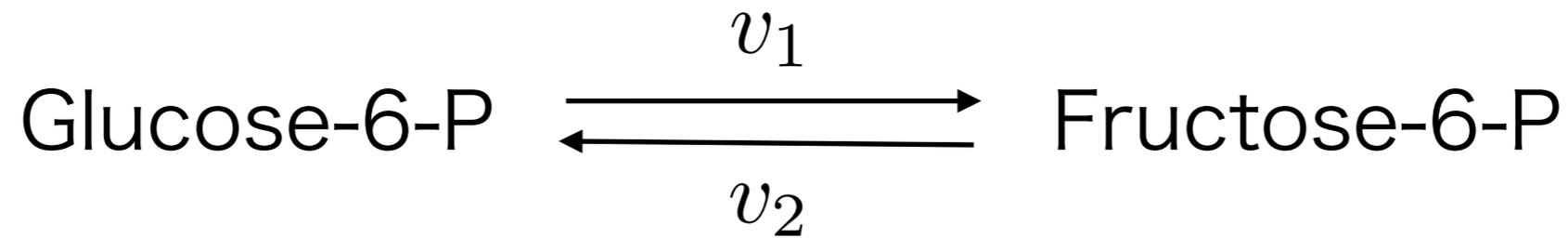
- ・ 反応速度 (v)
 - ・ ある1つの酵素の性質 (局所的)
- ・ 流束 (J)
 - ・ 複数の酵素にまたがる性質 (大域的)

定常と平衡の簡単な見分け方

末端が反応なら定常



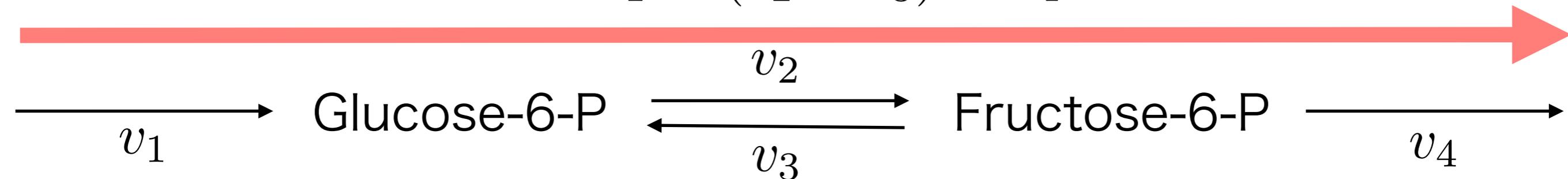
末端が物質なら平衡



代謝流束 (flux)

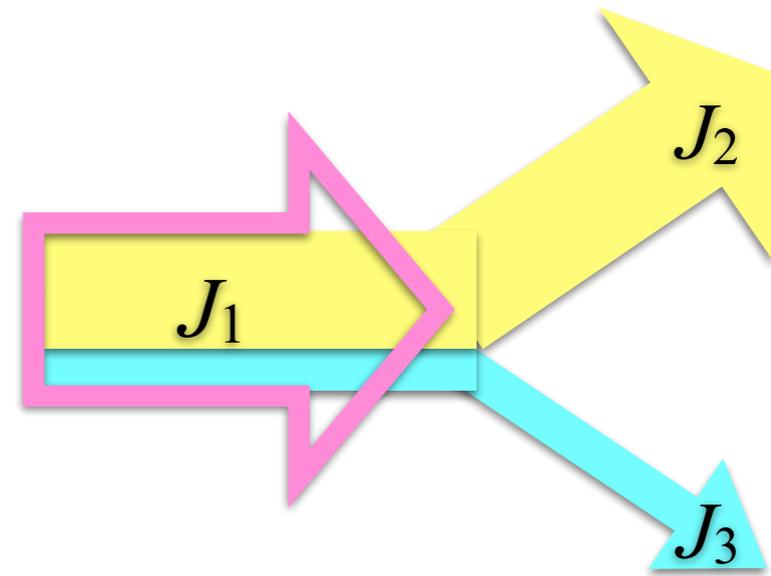
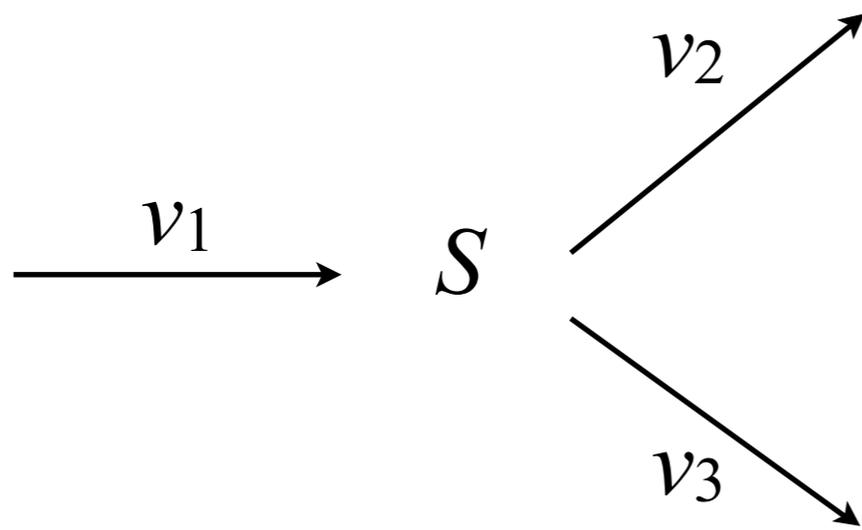
- ・ 定常状態における反応速度のこと

$$J = v_1 = (v_2 - v_3) = v_4$$



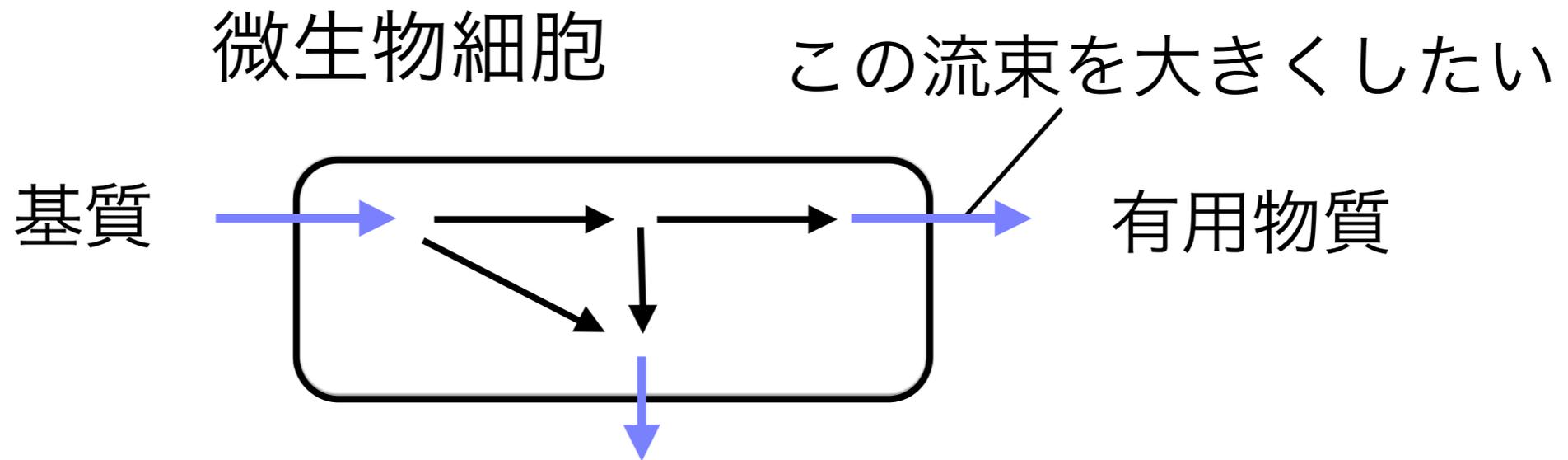
- ・ 反応速度 (v)
 - ・ ある1つの酵素の性質 (局所的)
- ・ 流束 (J)
 - ・ 複数の酵素にまたがる性質 (大域的)

分岐点での流束



代謝工学

- ・ 目的
 - ・ 微生物を使った物質生産



- ・ 手段
 - ・ 組換えDNA技術による代謝流束の改変

初期の試み

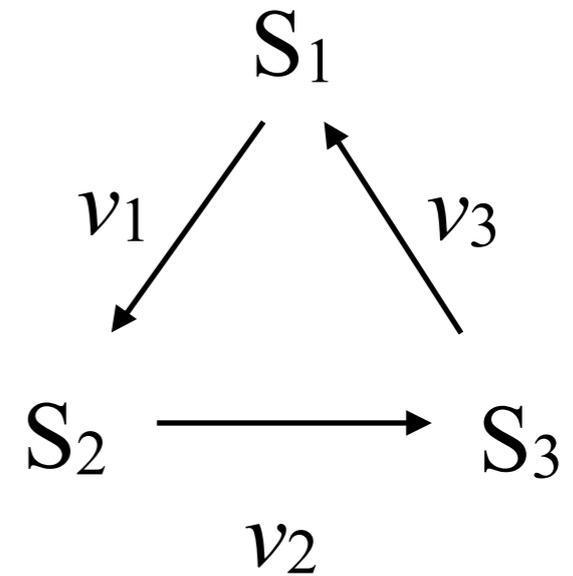
- ・ 「律速酵素」の発現量を増やす
 - ・ 流速は上がらず
- ・ 成功しなかった理由は？
 - ・ 「律速酵素」の定義が経験的
 - ・ 研究者によって「律速酵素」が異なる
- ・ 代謝系を大域的に調べてみよう

化学量論係数行列

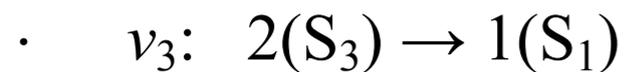
・ 化学量論係数 (Stoichiometric coefficient) とは



・ 1 反応で生成・消滅する分子数



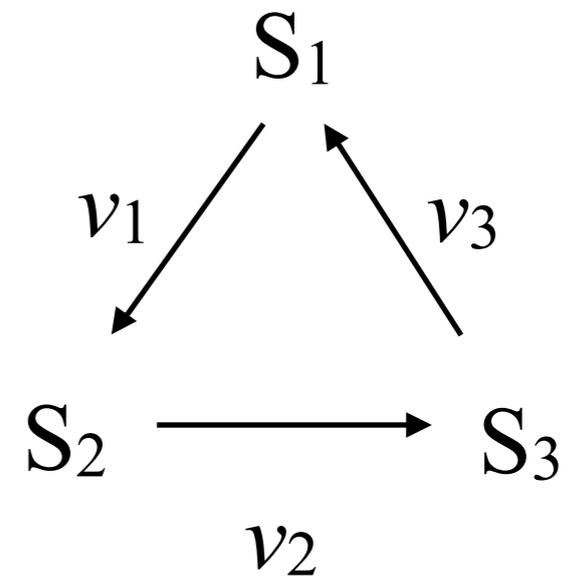
・ 例



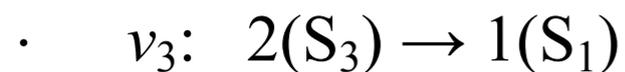
化学量論係数行列

- ・ 行列の作り方

- ・ 行ラベルが代謝物質、列ラベルが反応
- ・ ネットワークの構造に関する全情報を含む

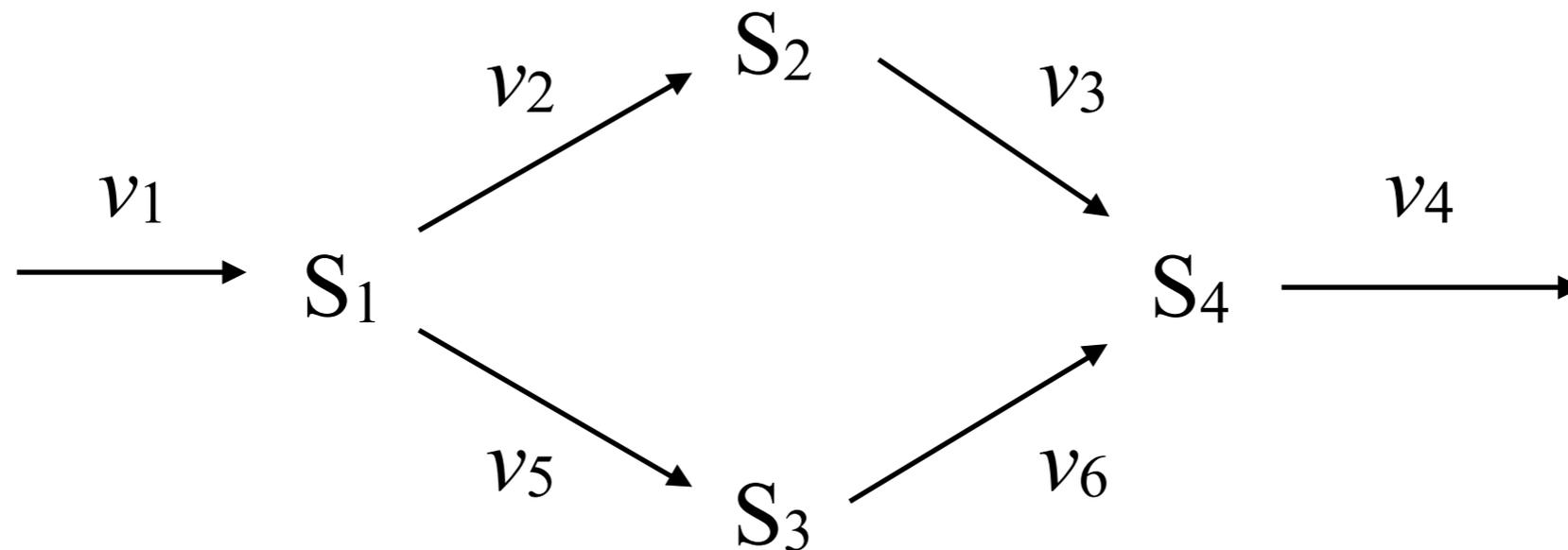


- ・ 例



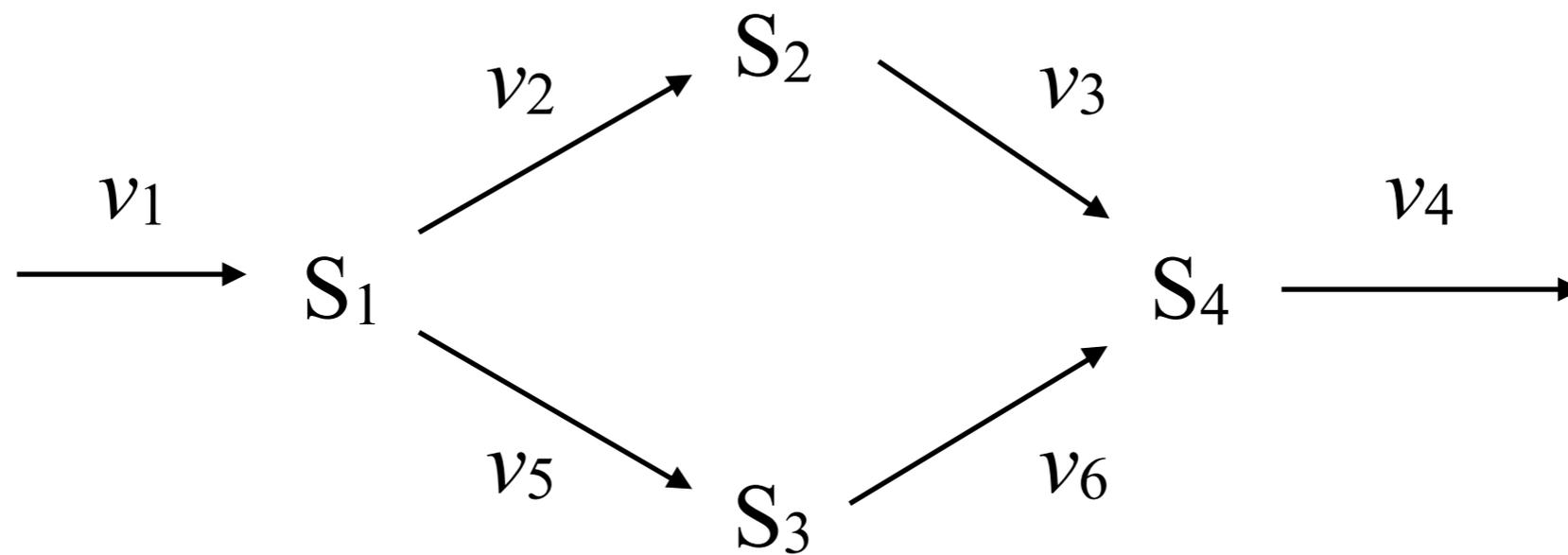
$$\begin{array}{c} S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{array} \begin{array}{ccc} v_1 & v_2 & v_3 \\ \left(\begin{array}{ccc} -1 & 0 & 1 \\ 2 & -1 & 0 \\ 0 & 1 & -2 \end{array} \right) \end{array}$$

演習1



- ・ 上の化学反応経路の化学量論係数行列を書きなさい。
各反応の化学量論係数はすべて1とする。

演習1の解答



$$\begin{array}{l} S_1 \\ S_2 \\ S_3 \\ S_4 \end{array} \begin{pmatrix} v_1 & v_2 & v_3 & v_4 & v_5 & v_6 \\ 1 & -1 & 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

零空間 (Nullspace または Kernel)

- ・ 行列Nの零空間とは

$$\mathbf{NK}=\mathbf{0}$$

を満たす \mathbf{K} のこと

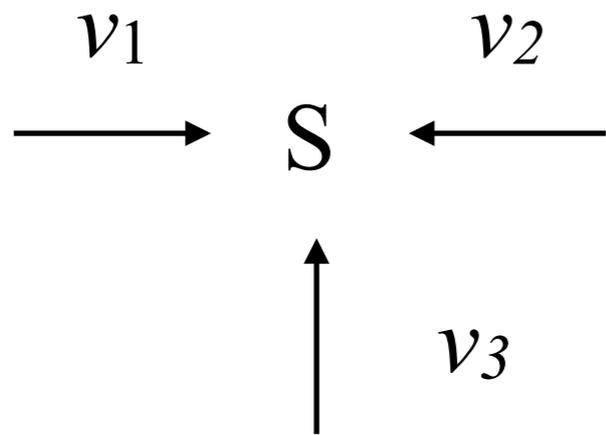
- ・ \mathbf{K} の列数 = 反応の総数(すなわち \mathbf{N} の列数) - rank(\mathbf{N})

- ・ 定常状態は $\mathbf{N}\mathbf{v}=\mathbf{0}$

- ・ \mathbf{K} の列要素は定常状態になる反応速度

- ・ $\mathbf{N}\mathbf{v}=\mathbf{0}$ 満たす流束 \mathbf{v} は \mathbf{K} の列要素の線形結合である

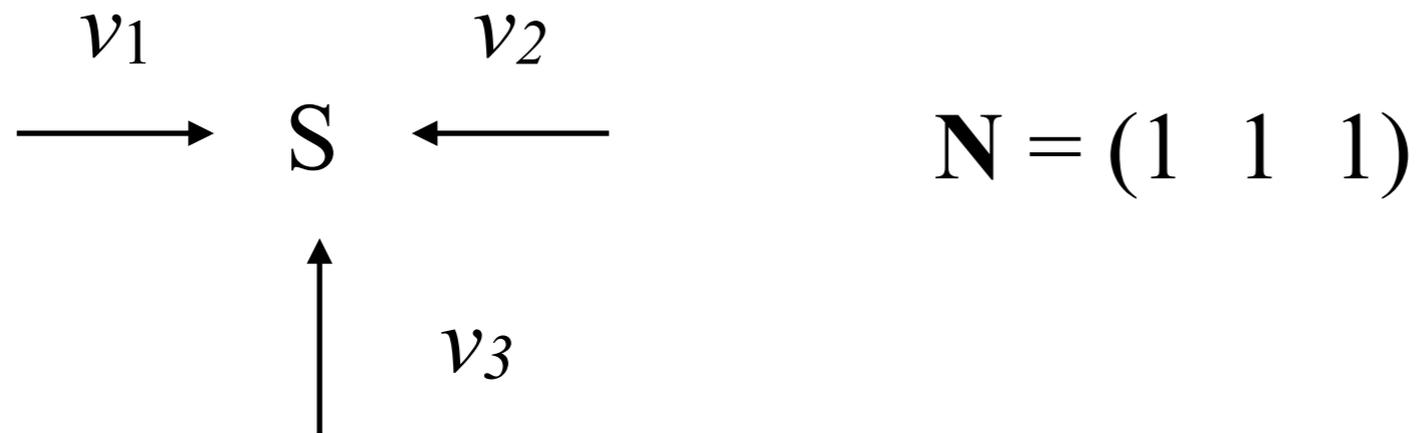
演習2



$$\mathbf{N} = (1 \ 1 \ 1)$$

- ・ 図の経路の零空間を求めなさい。

演習2の解答



\mathbf{K} の列数 = 反応の総数(すなわち \mathbf{N} の列数) - $\text{rank}(\mathbf{N})$ より、 \mathbf{K} の列数 = $3 - 1 = 2$ である。

$\mathbf{NK} = \mathbf{0}$ より $(1 \ 1 \ 1)(\mathbf{k}_1 \ \mathbf{k}_2) = (0 \ 0)$ を満たす $\mathbf{k}_1, \mathbf{k}_2$ を求めればよい。

$\mathbf{k}_1, \mathbf{k}_2$ は一意に決まらないが、単純なものでは $\mathbf{k}_1 = \begin{pmatrix} 1 \\ -1 \\ 0 \end{pmatrix} \quad \mathbf{k}_2 = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ -1 \end{pmatrix}$ がある。

よって求める零空間 \mathbf{K} は

$$\mathbf{K} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ -1 & 0 \\ 0 & -1 \end{pmatrix}$$

代謝経路上の流束分布を求めたい

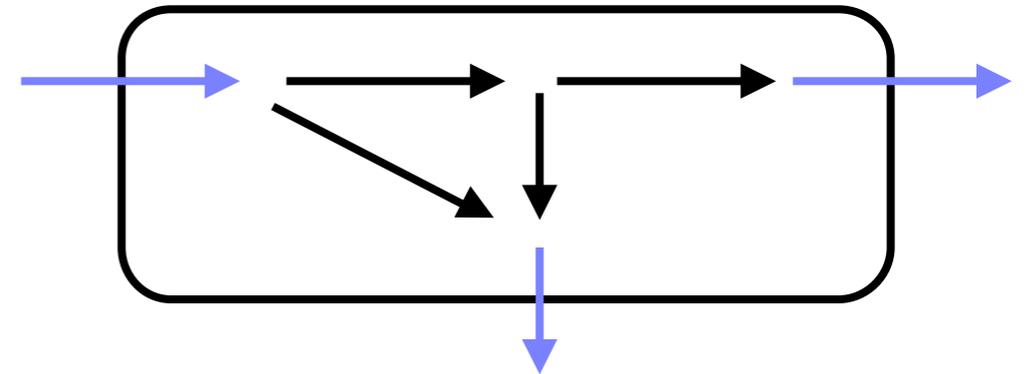
$$\mathbf{N}\mathbf{v}_{ss} = \mathbf{0}$$

- ・ 解は \mathbf{N} の零空間 (\mathbf{K}) に存在
- ・ 問題点: 解が一意に定まらない
 - ・ Underdetermined (#変数 > #方程式) 解が一意に定まらない
 - ・ Overdetermined (#変数 < #方程式) 解が定まる保証が無い

解の求め方 (Overdetermined)

- 細胞と外界との物質のやりとりの流束は計測可能

- Exchange flux (右図青色矢印)



- 式変形

- $\mathbf{N}\mathbf{v} = \mathbf{0} \rightarrow \mathbf{N}\mathbf{v} = \mathbf{b}$

- Moore-Penroseの一般逆行列

- 最小自乗誤差解を与える (下式の \mathbf{v}_{LS})

- $\mathbf{v}_{LS} = \mathbf{N}^{\#} \mathbf{b}$

$$\left(\begin{array}{ccc|c} -1 & \cdots & 0 & 1 \\ \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ 0 & \cdots & 1 & 0 \end{array} \right) \begin{pmatrix} v_1 \\ \vdots \\ v_n \\ v_{ex} \end{pmatrix} = \mathbf{0}$$

$$\left(\begin{array}{ccc|c} -1 & \cdots & 0 \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & \cdots & 1 \end{array} \right) \begin{pmatrix} v_1 \\ \vdots \\ v_n \end{pmatrix} = - \begin{pmatrix} 1 \\ \vdots \\ 0 \end{pmatrix} v_{ex}$$

解の求め方 (Underdetermined)

- ・ 昔の方法：追加実験を行い、式を Determined にする
 - ・ 複数の流束を計測 → 正則行列にする → 逆行列が求まる
 - ・ Aiba and Matsuoka (1979) で用いられた方法
- ・ 最近の方法：最適化問題
 - ・ 単細胞生物の場合 → 細胞の成長を最大にする解を採用
 - ・ 多細胞生物の場合 → 流束の総和を最小にする解を採用
 - ・ Fell and Small (1986) がおそらく最初の例

目的関数 (objective function) : 単細胞生物の場合

- ・ 単細胞生物の場合は「細胞成長速度を最大化する流束分布」を解にすることが多い
 - ・ 「成長速度が最大の細胞は他を圧して増殖するので、その流束分布がそのまま細胞集団の流束分布になる」という考えに基づく
 - ・ 実験データとの整合性は Ibarra et al. (2002), Shlomi et al. (2005) など参照
- ・ 「1gの E. coli 菌体の形成に必要な流束」を元につくられた目的関数の例 (下記)

$$Z_{\text{biomass}} = Z_{\text{precursors}} + Z_{\text{cofactors}}$$

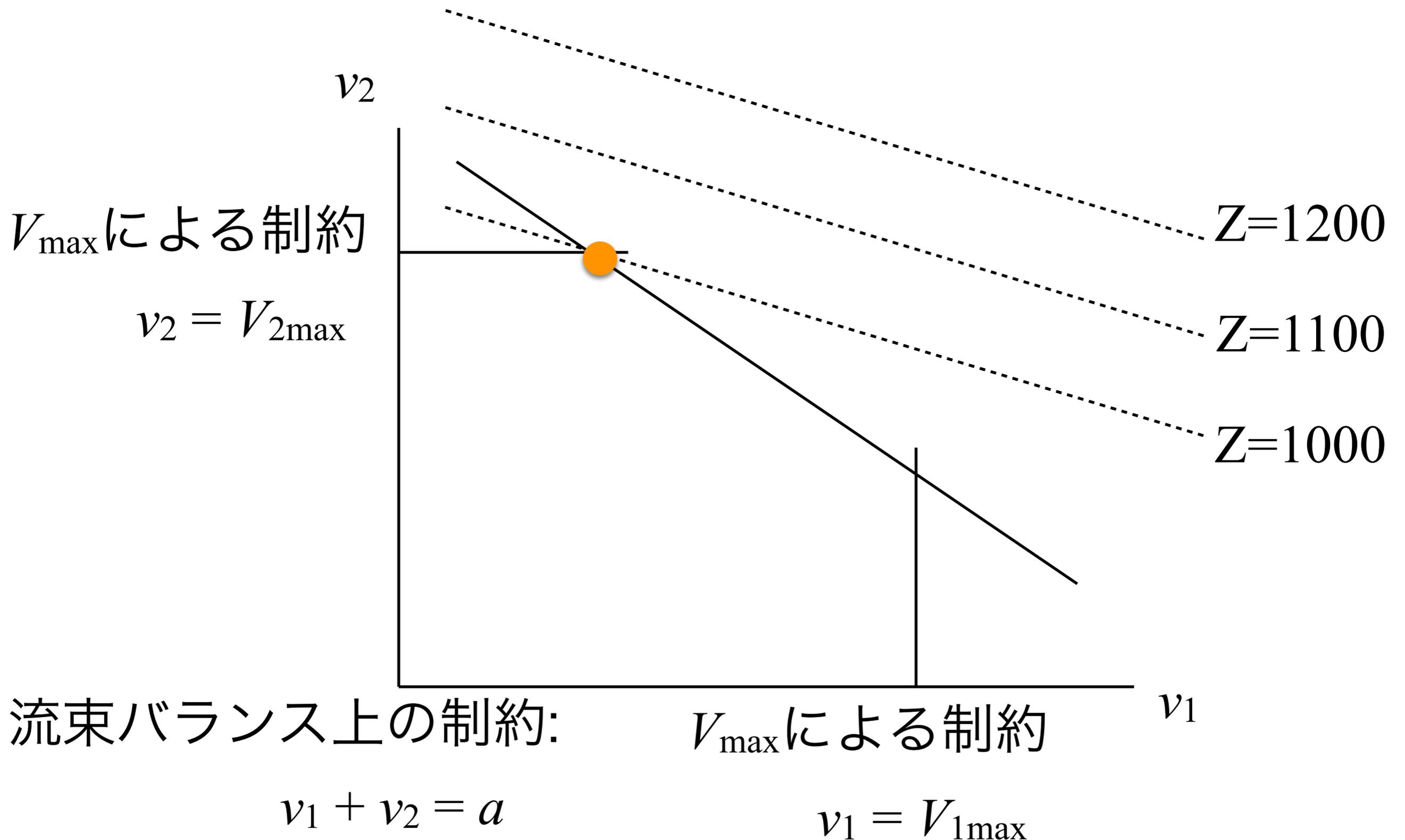
$$\begin{aligned} Z_{\text{precursors}} &= 0.205v_{G6P} + 0.071v_{F6P} + 0.898v_{R5P} \\ &+ 0.361v_{E4P} + 0.129v_{T3P} + 1.496v_{3PG} \\ &+ 0.519v_{PEP} + 2.833v_{PYR} + 3.748v_{AcCoA} \\ &+ 1.787v_{OAA} + 1.079v_{\alpha KG} \end{aligned}$$

$$Z_{\text{cofactors}} = 42.703v_{ATP} - 3.547v_{NADH} + 18.22v_{NADPH}$$

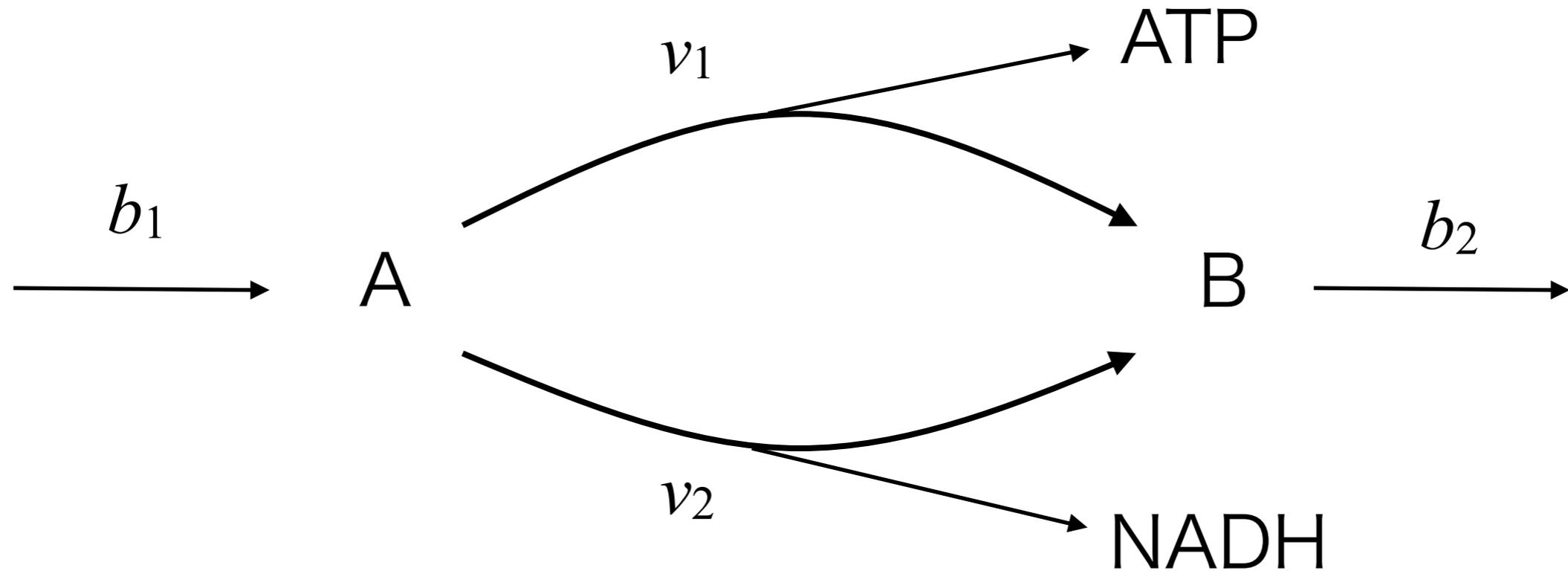
目的関数 (objective function) : 多細胞生物の場合

- ・ 多細胞生物に「細胞の成長速度最大化」をあてはめるのは不適切
 - ・ がん細胞の流束は予測できても健常な細胞には応用できない
- ・ 「流束の総和を最小にする流束分布」を解にするのが一つの方法
 - ・ 「細胞は必要のないタンパク質を作らない」 (economy of protein) の考えに基づく
 - ・ 流束の総和は代謝に関わるタンパク質の総量の proxy
 - ・ Holzhütter (2004) など
- ・ 適切な目的関数のデザインは現在でも議論されているが (Schuetz et al. 2007, 2012)、当面は「成長最大化」と「流束最小化」の2つを覚えておけばよい

線形計画法で最適流束分布を求める



演習3



v_1, v_2 の最適解を求めなさい。ただし、 $b_1 = b_2 = 10 \text{ mmol} / \text{gDW} / \text{h}$ 、

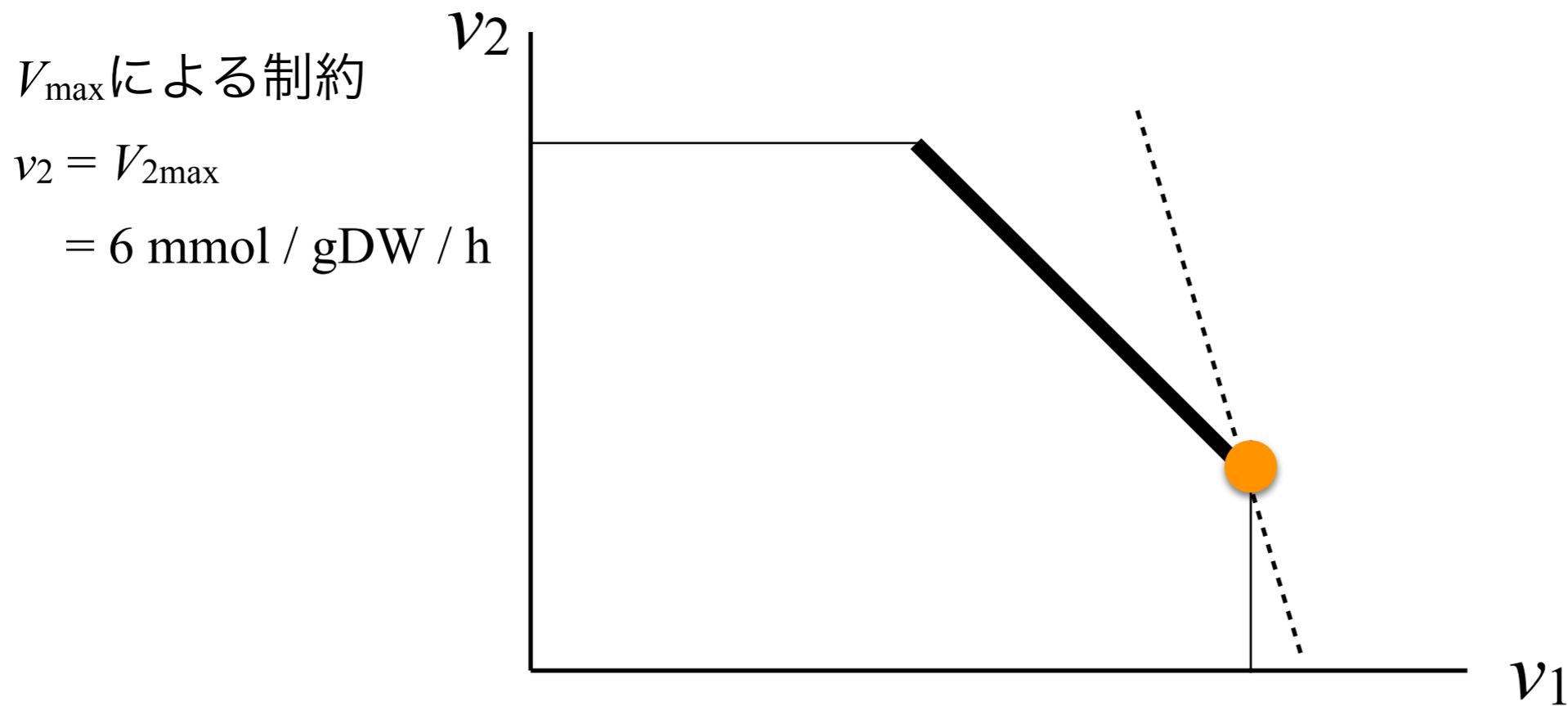
v_1, v_2 の最大流束はそれぞれ $8 \text{ mmol} / \text{gDW} / \text{h}$ 、 $6 \text{ mmol} / \text{gDW} / \text{h}$ 、

目的関数は細胞成長速度 $Z = 40 v_{\text{ATP}} + 3.5 v_{\text{NADH}}$ とする。

(ヒント： v_{ATP} 、 v_{NADH} はそれぞれATP, NADHの合成速度を表す。すなわち v_1, v_2 にそれぞれ対応する。)

演習 3 の解答

横軸に v_1 、縦軸に v_2 をとると、最大流束と流束バランスの制約条件を満たす解の集合は下図の太い黒の実線で示される。また、目的関数 $Z = 40 v_{\text{ATP}} + 3.5 v_{\text{NADH}} = 40 v_1 + 3.5 v_2$ を、 $v_2 = -40 / 3.5 v_1 + Z$ と書き換えると、目的関数と解の集合の傾きの大きさの関係より、 Z を最大にする解は下図における太い黒の実線と点線（目的関数）の交点として示される。よって、 v_1, v_2 の最適解はそれぞれ $8 \text{ mmol} / \text{gDW} / \text{h}$, $2 \text{ mmol} / \text{gDW} / \text{h}$ である。



流束バランスによる制約:

$$v_1 + v_2 = b_1 = b_2 = 10 \text{ mmol} / \text{gDW} / \text{h}$$

V_{max} による制約

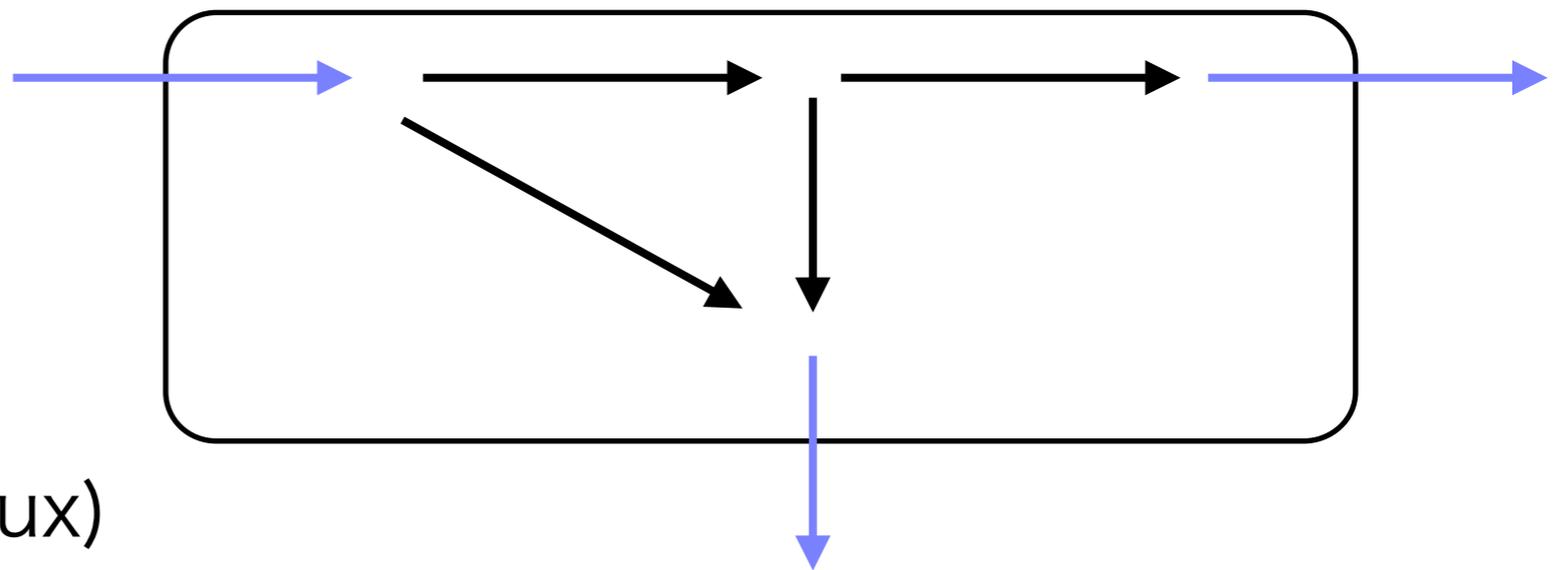
$$v_1 = V_{1\text{max}} = 8 \text{ mmol} / \text{gDW} / \text{h}$$

用語の整理: 流束を2つに分類

- ・ 内部流束 (internal flux)

- ・ 通常 v_i のように表記

- ・ 右図の黒矢印



- ・ 輸送流束 (exchange flux)

- ・ b_i のように表記

- ・ 右図では青矢印

流束に対する目的関数の感受性

- Shadow price が 0 の物質
 - 増殖に使わないので分泌可能

Shadow Price

$$\pi_i = -\frac{\partial Z}{\partial b_i}$$

- Shadow price が負の物質
 - 増殖に役立つので分泌しない

Reduced Cost

$$\rho_i = -\frac{\partial Z}{\partial v_i}$$

- Reduced cost が 0
 - その酵素の deletion / overexpression は増殖に影響しない

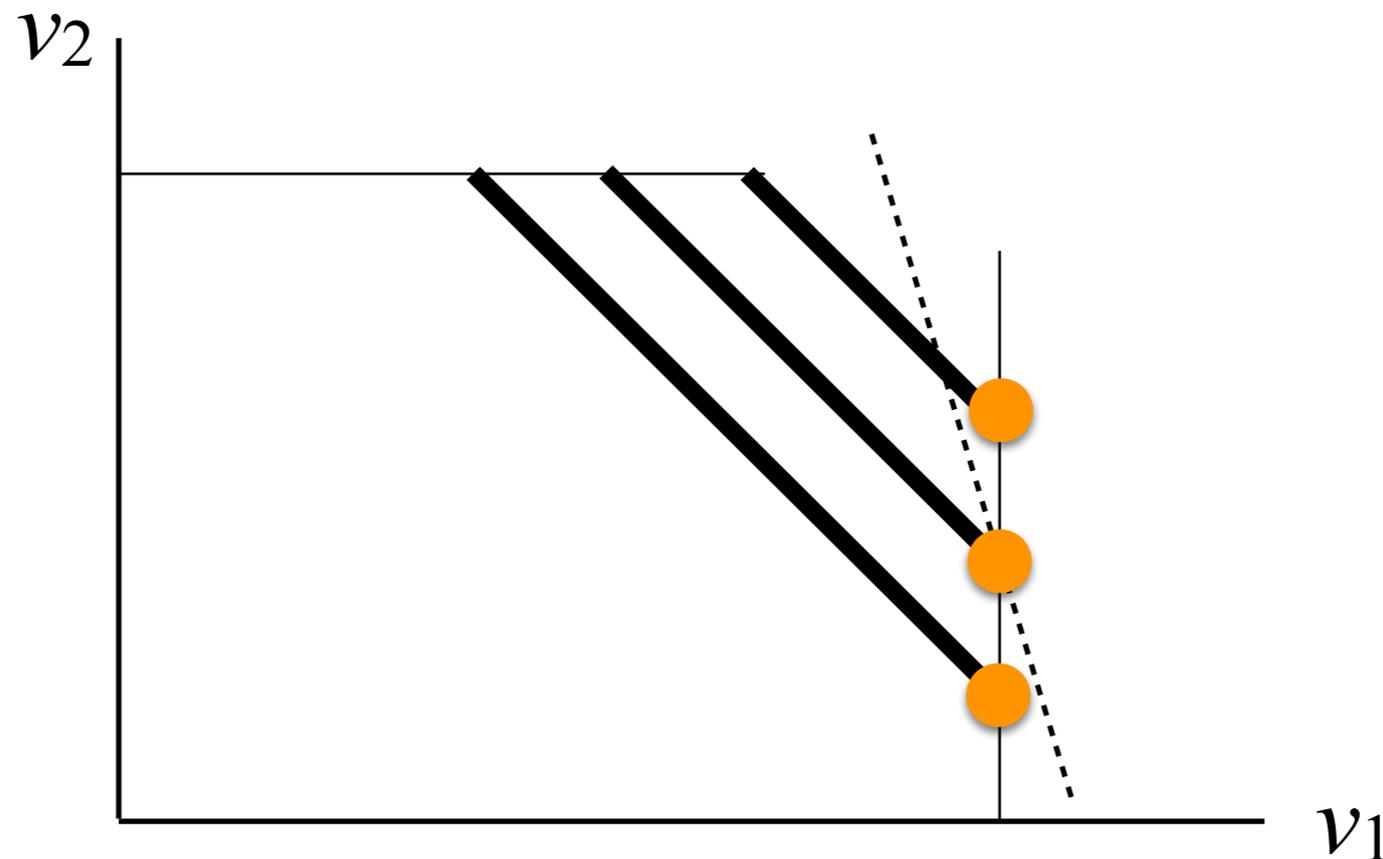
演習4

- ・ 演習3で求めた最適解について、流入量 b_1 に対する Shadow Price を求めなさい

演習4の解答

演習3で求めた最適解は v_1 の最大値と流束バランス条件の交点にあった。いま、シャドウプライスの定義に従って b_1 を変動させると、最適解は v_1 の最大値の上を移動する（下図）。

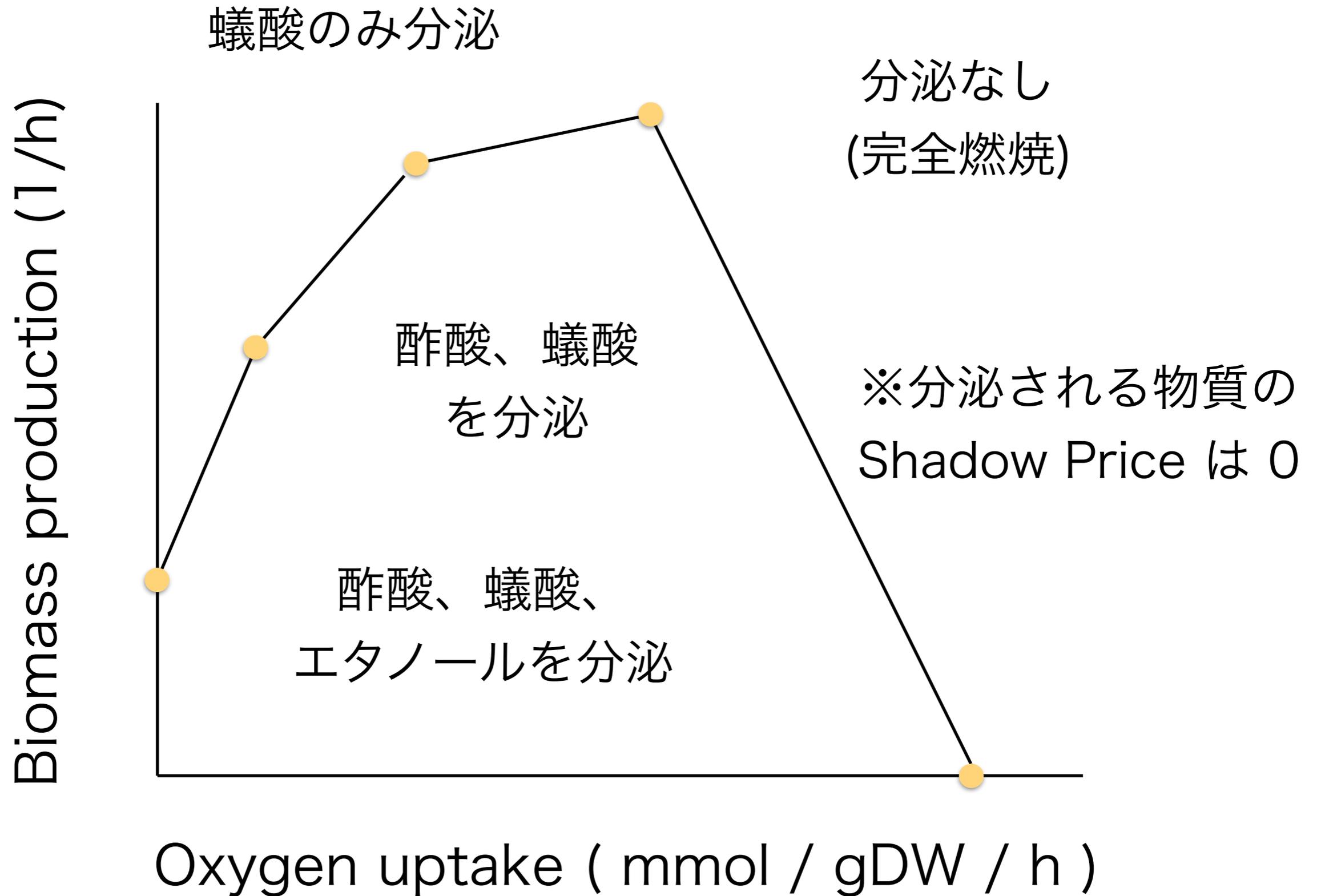
よって、 v_1 は定数、 v_2 は変数として扱わねばならない。 $Z = 40 v_{\text{ATP}} + 3.5 v_{\text{NADH}} = 40 v_1 + 3.5 v_2$ に $v_1 = 8 \text{ mmol / gDW / h}$, $v_2 = b_1 - v_1 = b_1 - 8$ をそれぞれ代入すると $Z = 40 \times 8 + 3.5 (b_1 - 8)$ となる。シャドウプライスの定義式より、シャドウプライスは $\pi_i = -3.5$ である。



増殖速度の感受性

- ・ 流束1つを操作
 - ・ “Robustness analysis”
 - ・ 例: 酸素取り込み速度と増殖速度の関係
- ・ 流束2つを操作
 - ・ “Phenotypic Phase Plane (PhPP)”
 - ・ 例: 酸素、コハク酸の取り込み速度と増殖の関係
- ・ 計算手順
 - ・ 注目している流束の値を決める
 - ・ その流束値を固定したまま $Nv = 0$ を解く
 - ・ さまざまな物質の Shadow Price を計算

Robustness Analysis



参考文献

- ・ ステファノポーラス、アリスティド、ニールセン 「代謝工学 原理と方法論」 東京電機大学出版局
- ・ Bernhard Ø. Palsson “Systems biology: properties of reconstructed networks”, Cambridge Univ. Press
- ・ Reinhart Heinrich and Stefan Schuster “The regulation of cellular systems”, Chapman & Hall
- ・ Edda Klipp et al. “Systems biology in practice”, Wiley VCH
- ・ Aiba and Matsuoka (1979) Biotechnol. Bioeng. 21:1373-1386
- ・ Fell and Small (1986) Biochem J. 238: 781–786.
- ・ Ibarra et al. (2002) Nature, 420:186-189
- ・ Shlomi et al. (2005) PNAS, 102:7695–7700
- ・ Holzhütter (2004) Eur J Biochem 271:2905-22.
- ・ Schuetz et al. (2007) Mol. Syst. Biol. 3:119.
- ・ Schuetz et al. (2012) Science 336:601-4.