

アミノ酸のシステムバイオロジー

岡本 正宏

これまでのアミノ酸の制御の研究の多くは、アミノ酸の代謝経路（パスウェイ情報）にとらわれすぎていたため、アミノ酸のフロー（flow）パスウェイとは異なる階層にある制御ネットワークを捉えることが困難であった。パスウェイは物の流れを記述したものであって、必ずしも、制御のネットワークを表したものではない可能性がある。必須アミノ酸マイナスワン試験＋回復試験を用いて、生体が異常を感知し、修復を図る制御連絡網を推定する手法、および、健常群と疾患群の血中アミノ酸プロファイルデータから、健常群と疾患群の血中アミノ酸相互作用ネットワークを推定し、疾患を引き起こすアミノ酸相互作用の推定・抽出を行う手法など、アミノ酸相互作用ネットワークに関するシステムバイオロジー研究の一端を紹介する。

1. はじめに

生体は、恒常性（homeostasis）と適応性（adaptation）という、一見矛盾する特性を保持している。アミノ酸代謝もこの例外でなく、通常、細胞内の各アミノ酸濃度は正常にバランスを取っている。一過的なアミノ酸摂取の過不足が起こると、恒常性を維持するための制御が働くが、その過不足が持続的に起こると、その環境に馴化し、新しい定常値に移行するものと考えられる。

システム生物学の分野では、代謝経路、細胞内シグナル伝達系等、ネットワークやパスウェイと呼ばれるものを研究対象にしている。ネットワーク解析、特にパスウェイ解析を行う上で最も心がけておかなければならないことは、「パスウェイは物の流れを記述したものであって、制御のネットワークを表したものではない」ということである。これまでのアミノ酸の制御の研究の多くは、アミノ酸の代謝パスウェイの情報にとらわれすぎていたため、アミノ酸のフローパスウェイとは異なる階層にある制御ネットワークを捉えることが困難であった。本稿では、まず、血中ア

ミノ酸プロファイルに焦点を当て、血中アミノ酸濃度の摂動を与えることで、異常を感知し、修復を図る制御連絡網を推定する手法を概説する。次に、健常群と疾患群の血中アミノ酸プロファイルデータから、健常群と疾患群の血中アミノ酸相互作用ネットワークの推定し、疾患を引き起こすアミノ酸相互作用の推定・抽出を行う手法を紹介する。

2. 必須アミノ酸マイナスワン試験

血中のアミノ酸は濃度バランスが保たれていることが知られているが、疾患等で濃度インバランス（不均衡）が生じたときに異常を感知し、修復を図る制御連絡網はどのようなものであろうか。我々はすでに、1 遺伝子破壊株を用いたマイクロアレイデータから遺伝子間相互作用を推定する手法を確立している¹⁻³⁾。この手法は、一般のネットワーク推定に適用可能であることから、この手法を用いて、血中アミノ酸どうしの制御ネットワークの推定を試みた⁴⁾。すなわち、必須アミノ酸の一つを抜いた食事（必須アミノ酸マイナスワン食）を長期にラットに与え、血中アミノ酸プロファイルの時間的変化（タイムコース）データを測定し、そのデータをもとに血中アミノ酸の制御ネットワークを推定した（図1参照）。必須アミノ酸マイナスワン食実験は、欠如した必須アミノ酸は体内でほとんど合成されないことから、1 遺伝子破壊実験に相当するものである。具体的には、ラットを用いて、ターゲットとする一つの必須アミノ酸のN量をGlnで置換した食餌（マイナスワン食）を6週間与え、尾静脈採血し、血中のアミノ酸濃度を測定した。コントロール食としては、AIN-93G 精製

九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門・主幹教授
(〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1 九州大学病院地区
ウエストウイング 8 階 812)

Systems biology of amino acids

Masahiro Okamoto (Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University: Distinguished Professor, West Wing #8-812, Kyushu University, Medical Campus, Maidashi, Fukuoka 812-8582, Japan)

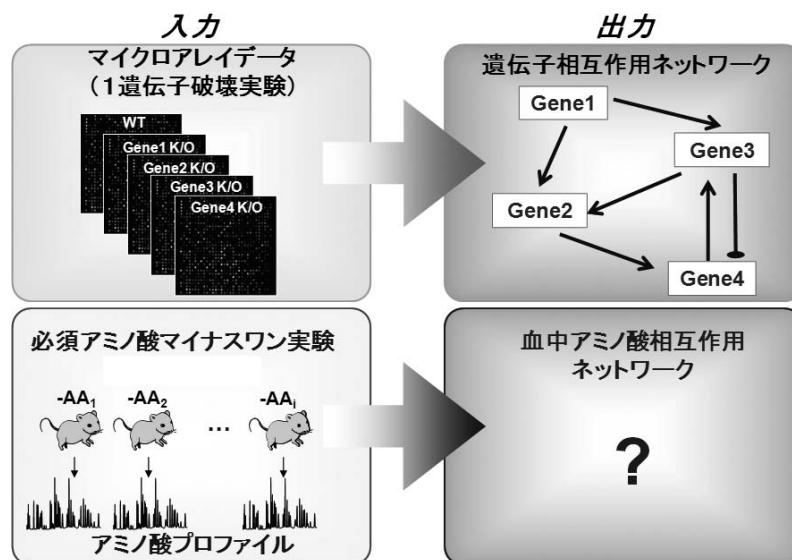


図1 ネットワーク構造推定のための1遺伝子破壊実験と必須アミノ酸マイナスワン実験との類似性

マイナスワンされる必須アミノ酸は体内でほとんど合成されないため、1遺伝子破壊と類似の効果を持つと考えられる。

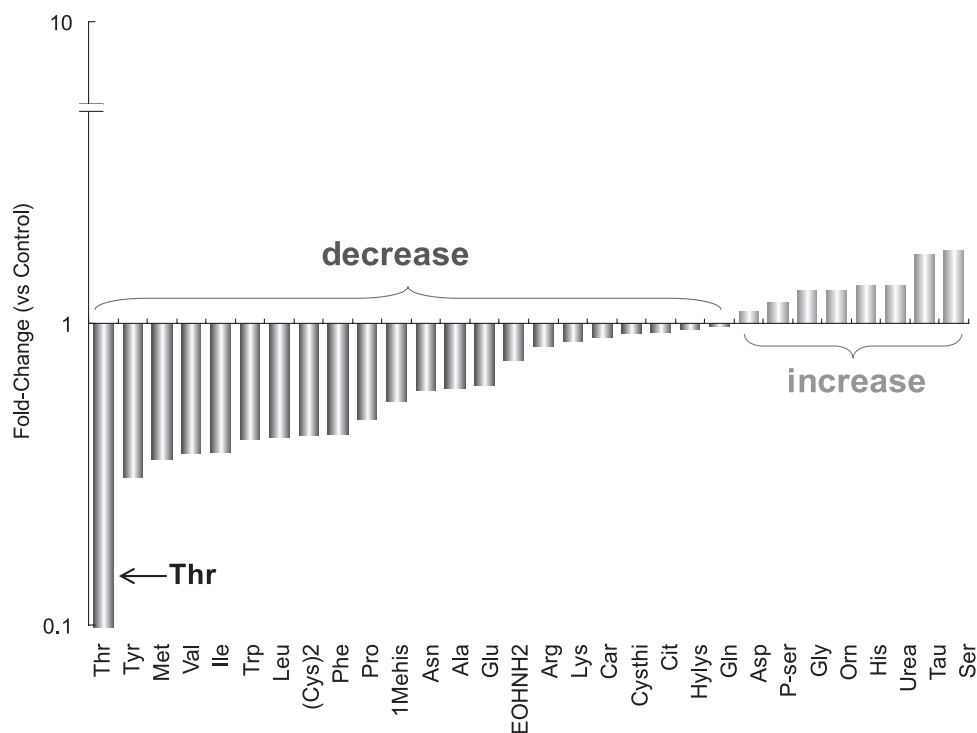


図2 Thr マイナスワン食の各種アミノ酸濃度に対する影響
縦軸は、コントロール食試験との比率を表す。

飼料をベースに、カゼインをカゼイン組成アミノ酸に置換したものを与えた。Thrを抜いた場合の結果を図2に示す。縦軸は、コントロール食との比 (Fold-Change) を表しており、1以上の場合、コントロールに比べて増加していることになる。図のように、Thrを加えない食餌を与え続けると、Tyr, Metをはじめ多くのアミノ酸が減少するが、SerやHisなどのアミノ酸は増加する。このような実験を、His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Trp, Valについ

ても行った。それらのデータをもとに、閾値検定モデルおよび多階層有向グラフモデルを用いて、実験結果を再現しうるアミノ酸どうしの相互作用ネットワークを推定した⁴⁾ (図3)。図において、黒塗りつぶし矢印は活性化を、中抜き矢印は抑制を、破線は相互作用の可能性 (活性化あるいは抑制) を表している。その結果は、次のようにまとめられる。① Lys濃度の変動はほかのほとんどすべてのアミノ酸の濃度に影響を及ぼし、アミノ酸ネットワークの司令塔

(オリジン)として機能する可能性がある, ② Thr は多数のアミノ酸と相互作用関係にあり, ネットワークハブとして位置づけられる, ③ Thr と Met の関係は, 互いに正と負の相互作用を掛け合っており, ダイナミックレンジを調節している可能性がある. 推定したネットワークは, いわ

ば緊急状態の制御連絡網であり, 物質の流れを表している代謝マップとはまったく異なる構造をしていることがわかる. この結果は, 代謝マップ情報のみからは決して推定できなかったものであり, 代謝物質のフローネットワークと制御ネットワークは異なることが予想される.

3. ネットワーク感度解析

図3のネットワークには, 多くの二つのアミノ酸相互作用が推定されているが, どの相互作用が必要不可欠なものであろうか? そのことを明らかにするために, マイナスワン食を用いて, 血中アミノ酸濃度の時間的変化(タイムコース)を測定した⁵⁾. 具体的には, マイナスワン食を与え始めて, 1日目, 2日目, 1週間後, 2週間後, …6週間後に尾静脈より採血し, 血中アミノ酸濃度を測定した. Met マイナスワン食の場合と, Thr マイナスワン食の場合の結果を, それぞれ図4および図5に示す. 図は, 注目する11種のアミノ酸の濃度をレーダグラフにしたものであり, 100がコントロール食の場合を示す. どちらの図からも明らかなように, マイナスワン食投与後, 2~3週間でアミノ酸バランスが形成されており, マイナスワンのアミノ酸の種類によって, 特異なレーダグラフパターンが作ら

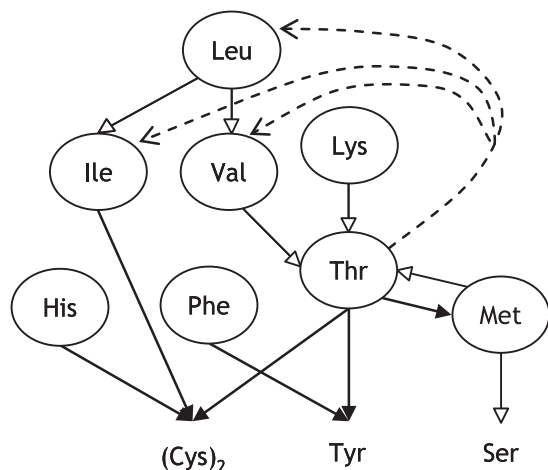


図3 必須アミノ酸マイナスワン試験結果より推定された血中アミノ酸相互作用ネットワーク構造
黒塗りつぶし三角は活性化, 白抜き三角は抑制を表す. 破線は, 相互作用の可能性(活性化あるいは抑制)を表す.

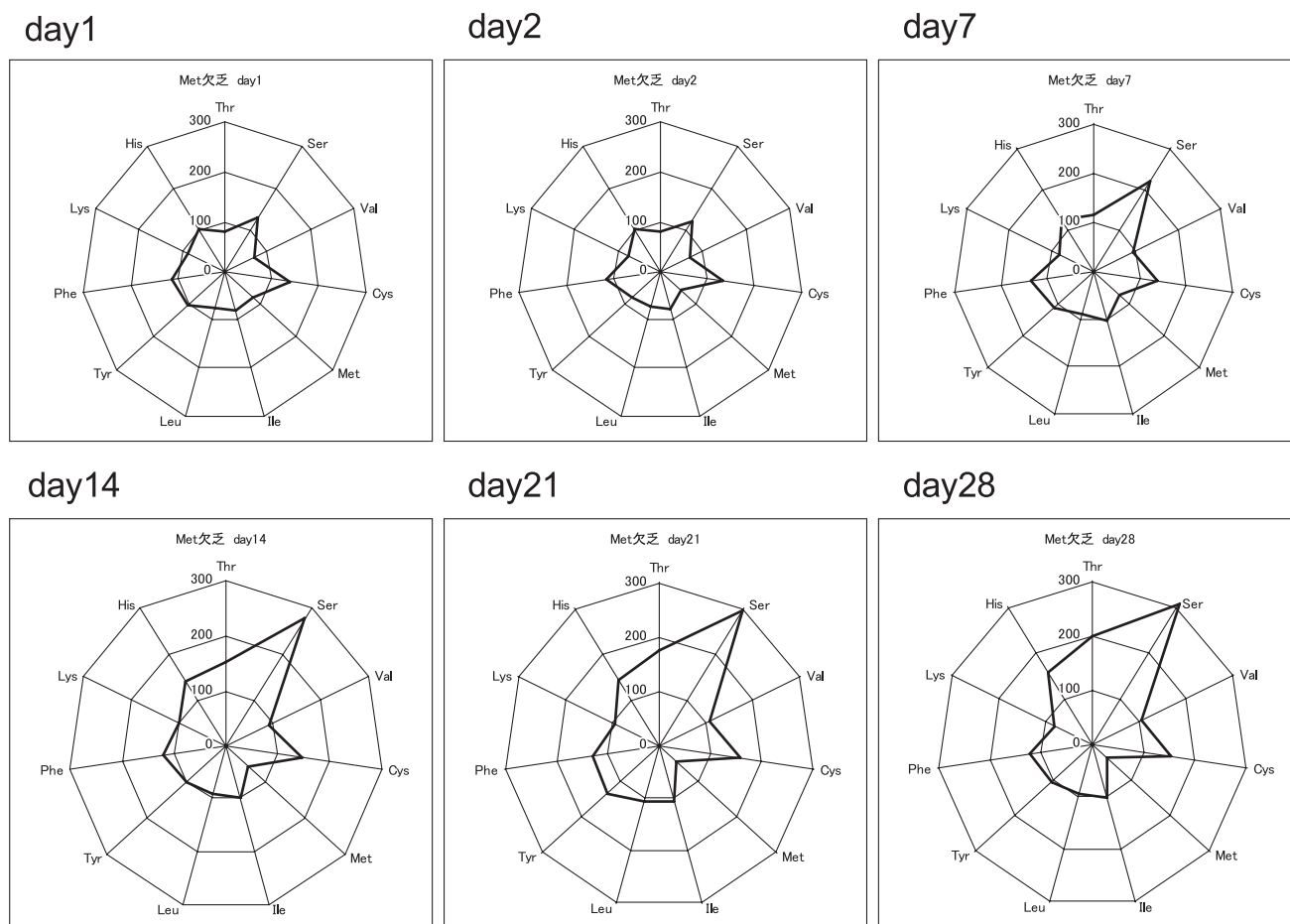


図4 Met マイナスワン食に伴う各種アミノ酸濃度の時間的変化を表すレーダチャート
図中の数値100は, コントロール食の場合のアミノ酸濃度を表す.

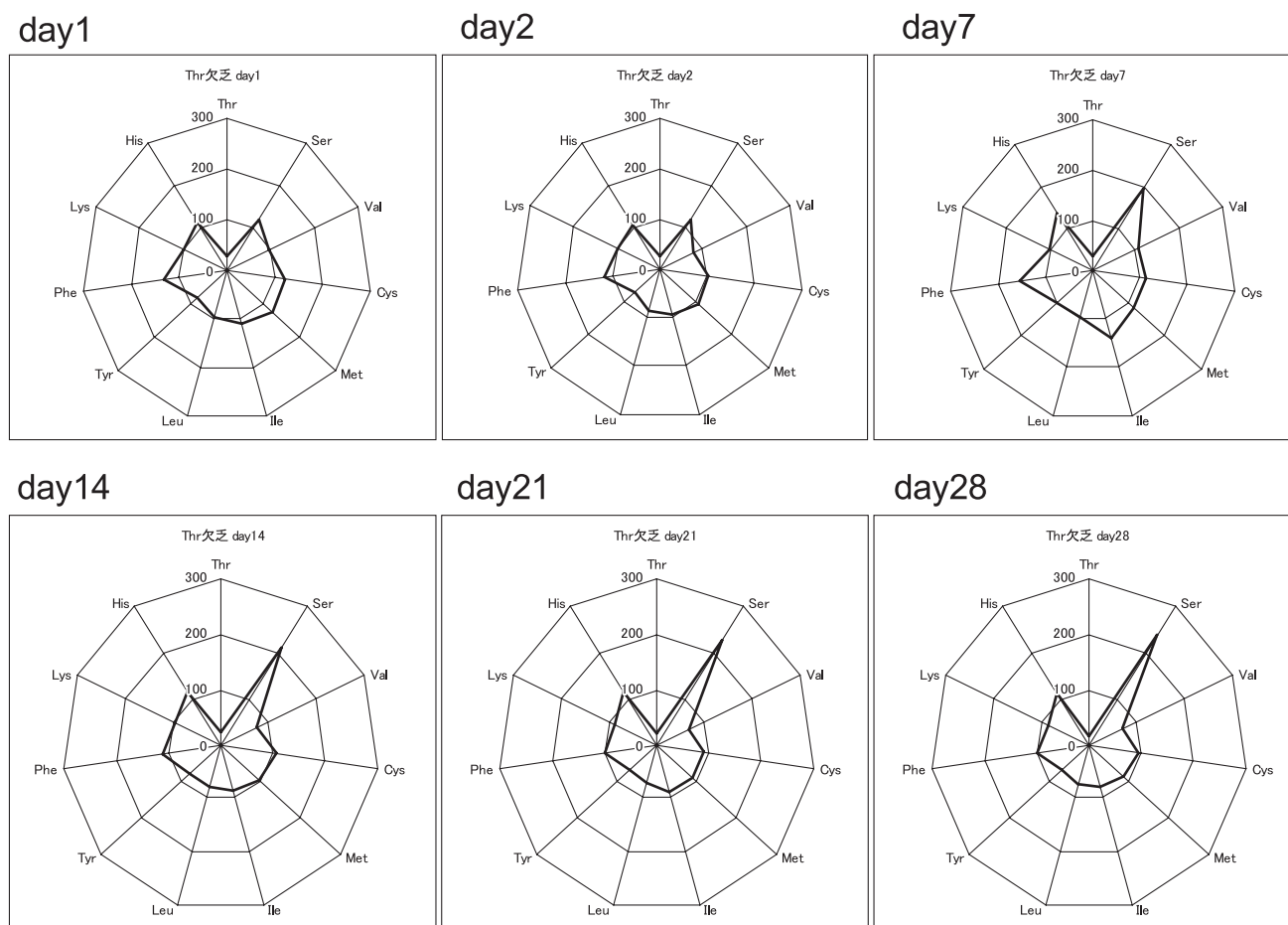


図5 Thr マイナスワン食に伴う各種アミノ酸濃度の時間的変化を表すレーダチャート
図中の数値 100 は、コントロール食の場合のアミノ酸濃度を表す。

れている。これらのタイムコース実験結果を再現しうる数理モデルのパラメータ値推定を行った。用いた数理モデルは、S-system モデル*であり、 n 個の要素（ここではアミノ酸）間の相互作用を表すことのできる微分方程式モデルとして広く用いられている（図6）。図の式において、 g_{ij} は実数値で、アミノ酸 X_i の合成過程に及ぼすアミノ酸 X_j の相互作用係数（プラスなら活性化、マイナスなら抑制、

ゼロなら相互作用なし）を表し、 h_{ij} は実数値で、アミノ酸 X_i の分解過程に及ぼすアミノ酸 X_j の相互作用係数（プラスなら活性化、マイナスなら抑制、ゼロなら相互作用なし）を表す。実験タイムコースが再現できるように、実数値パラメータ g_{ij} 、 h_{ij} の値を最適化手法を用いて推測する。なお、 h_{ij} については、 h_{ij} ($i \neq j$) は、ゼロとした。推定した g_{ij} の値を図7に示す。この相互作用係数の中で、どの

S-system モデル：

n 個のシステム構成要素（遺伝子、アミノ酸など、システムを構成している物質） X_i ($i=1, 2, \dots, n$) の値（濃度、発現量に相当）が時間的に変動し、 X_i どうしが相互作用しているネットワークシステムを考える。 X_i の時間的変化（速度式）を考えると、一般に次式で表される。

$$\frac{dX_i}{dt} = F_i^+(X_1, X_2, \dots, X_n) - F_i^-(X_1, X_2, \dots, X_n) \quad (i=1, 2, \dots, n) \quad (1)$$

式(1)において、右辺第1項、第2項はそれぞれ、物質 X_i の生成および分解を表す関数である。通常は、質量作用則に基づいて立式するが、遺伝子ネットワークやアミノ酸相互作用のように、反応のメカニズム、相互作用の仕方に関する情報がほとんど得られないものについては、下記のような、べき乗則に基づく S-system 記述法を用いる。

$$F_i^+(X_1, X_2, \dots, X_n) = \alpha_i \prod_{j=1}^n X_j^{g_{ij}} \quad (i=1, 2, \dots, n)$$

$$F_i^-(X_1, X_2, \dots, X_n) = \beta_i \prod_{j=1}^n X_j^{h_{ij}} \quad (i=1, 2, \dots, n) \quad (2)$$

式(2)において、 g_{ij} は、 X_i の生成過程に参与する X_j の相互作用係数であり、同様に、 h_{ij} は、 X_i の分解過程に参与する X_j の相互作用係数である。どちらも、プラスの数値なら正の相互作用、マイナスなら負の相互作用、ゼロなら相互作用なしと定義する。また、 α_i および β_i は、速度定数を表す。 X_i の実験タイムコースデータを再現しうる α_i 、 β_i 、 g_{ij} 、 h_{ij} を最適化して、相互作用を推定する。

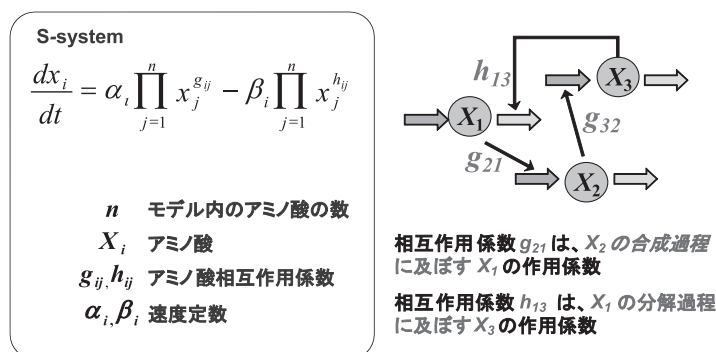
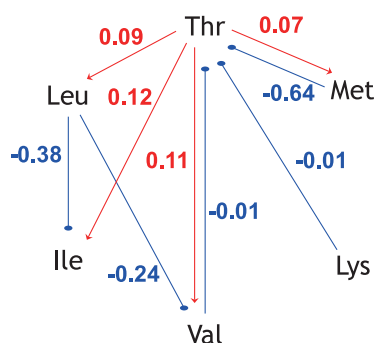


図6 アミノ酸濃度の時間的変化を表す微分方程式 S-system モデル

図7 推定された血中アミノ酸相互作用ネットワークと相互作用係数 (g_{ij})

正の数値は活性化を、負の数値は抑制を表す。

相互作用が必要不可欠なものであるのか感度解析法を用いて調べた。感度解析法とは、たとえば、推定した各パラメータ値を 10% 変動させたときに計算されたアミノ酸のタイムコースが実験タイムコースとどの程度異なってくるかを数値化して調べる手法である。数値が大きいほうが感度が高いことになり、ネットワークを推定する上で、重要なパラメータといえる。最大の感度を 100 として、すべてのアミノ酸相互作用の感度を表したものを図 8 に示す。感

度の高い相互作用のベスト 3 は、Leu から Val への負の相互作用（相対感度 100）、Met から Thr への負の相互作用（81.0）、Leu から Ile への負の相互作用（56.8）であった。この中で、Leu から Val への負の相互作用および Leu から Ile への負の相互作用は、分枝鎖アミノ酸（BCAA）であるロイシン、イソロイシン、バリンの間の制御関係を示しており、ロイシンの代謝産物（ α -ケトイソカプロン酸）は 3 者共通の分解酵素（branched chain α -keto acid dehydrogenase）を活性化することはすでに知られている。代謝マップの情報を考慮せずに 3 者の制御関係を推定できたことは推定法の有用性を示すものであろう。生物学的知見と推定結果を照らし合わせると、1) バリン単独投与による肝細胞再生促進効果は認められるものの、ロイシンとバリンの複合投与ではその効果が減少することが報告されており⁶⁾、その実験結果をこの推定は支持している、2) メチオニンが過剰になるとトレオニンが減少することが実験的にわかっている、また、8.5CMT [低カゼイン（8.5%）食（8.5C）に少量のメチオニンとトレオニンを添加したアミノ酸補足食]は、著しいタンパク質栄養障害を伴わない⁷⁾、などのように、推定結果と生物学的実験事象が一致している。

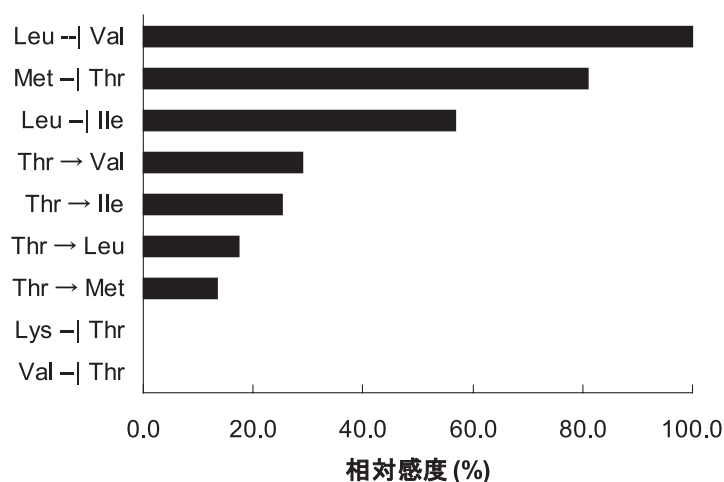


図8 図7のネットワークの相互作用係数の感度解析結果
 最も感度の高い相互作用係数の感度を 100 として表している。→は抑制作用を、←は活性化作用を表す。

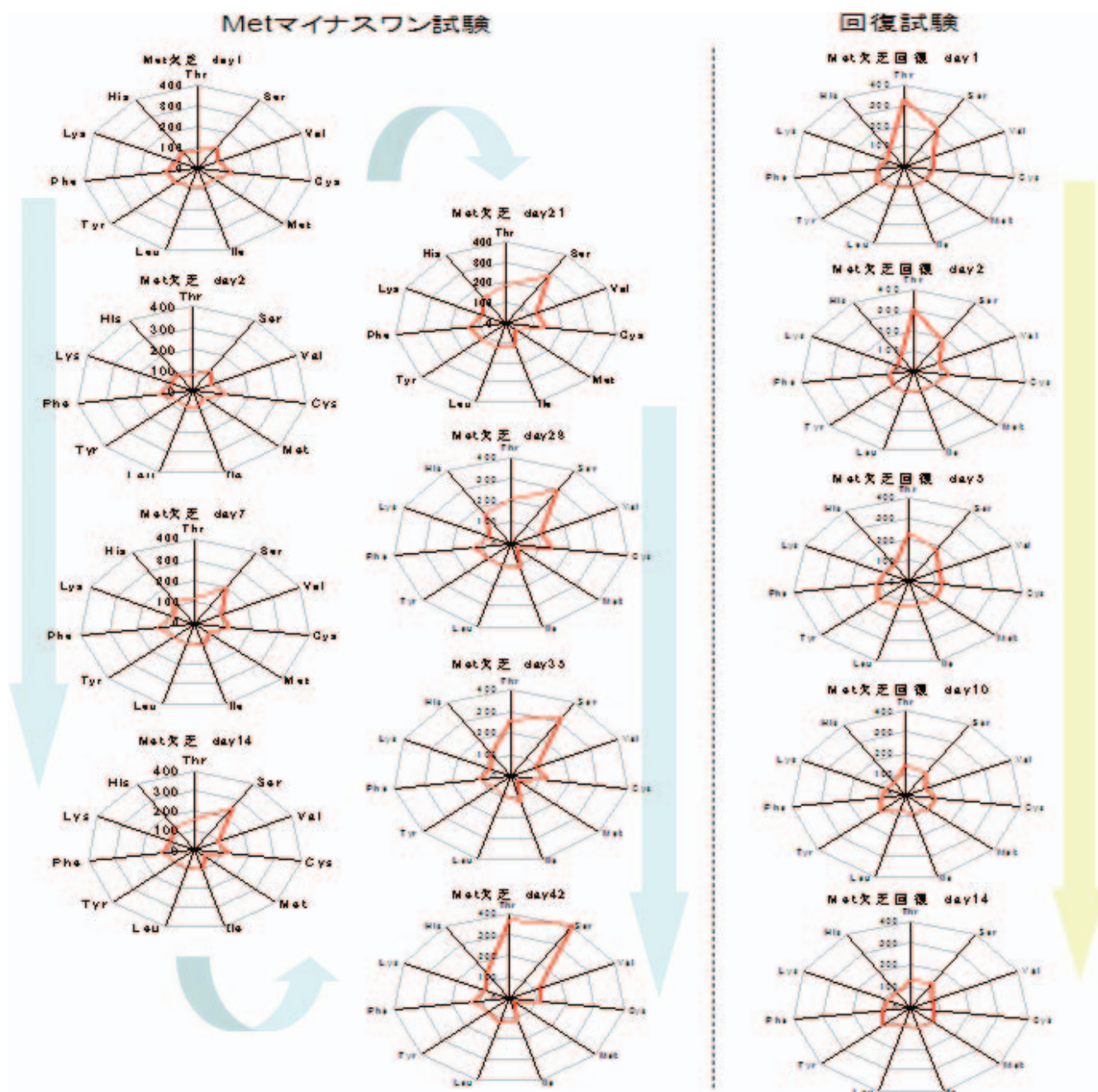


図9 Met マイナスワン試験およびその回復試験に伴う各種アミノ酸濃度の時間的変化を表すレーダチャート
 図中の数値100は、コントロール食の場合のアミノ酸濃度を表す。図の左半分はMet マイナスワン試験期間の結果を、右半分は回復試験期間の結果を表す。

4. 回復試験

これまでは、コントロール食（AIN-93Gベースで、カゼインはカゼイン組成アミノ酸に置換したもの）の代わりに、一つの必須アミノ酸を抜いたマイナスワン食を6週間食餌として与えて、血中アミノ酸濃度を測定した。次に、6週間後に標準食（コントロール食）に戻し（これを0日とする）、その後、1日目、2日目、…14日目に同様に尾静脈より採血し、血中アミノ酸濃度を測定するという回復試験を行った。Met マイナスワン試験+回復試験、Thrマ

イナスワン試験+回復試験、Leu マイナスワン試験+回復試験の結果をそれぞれ、図9～図11に示す。図において左半分がマイナスワン食餌期間（～6週間）、右半分が回復期間（標準食に戻す）の各アミノ酸濃度のレーダチャートである。どの場合も回復は非常に早く、標準食切り替え後3日目には、マイナスワン6週間後（day42）のレーダチャートとまったく異なるパターンを呈し、正常の状態に回復しつつあることがわかる。回復期間の各アミノ酸濃度が正常状態（数値100）に戻る過程に注目すると、Thr（レーダチャートの12時の位置）とSer（レーダチャートの1時付近）の動きがほかのアミノ酸に比べて特異であり、特

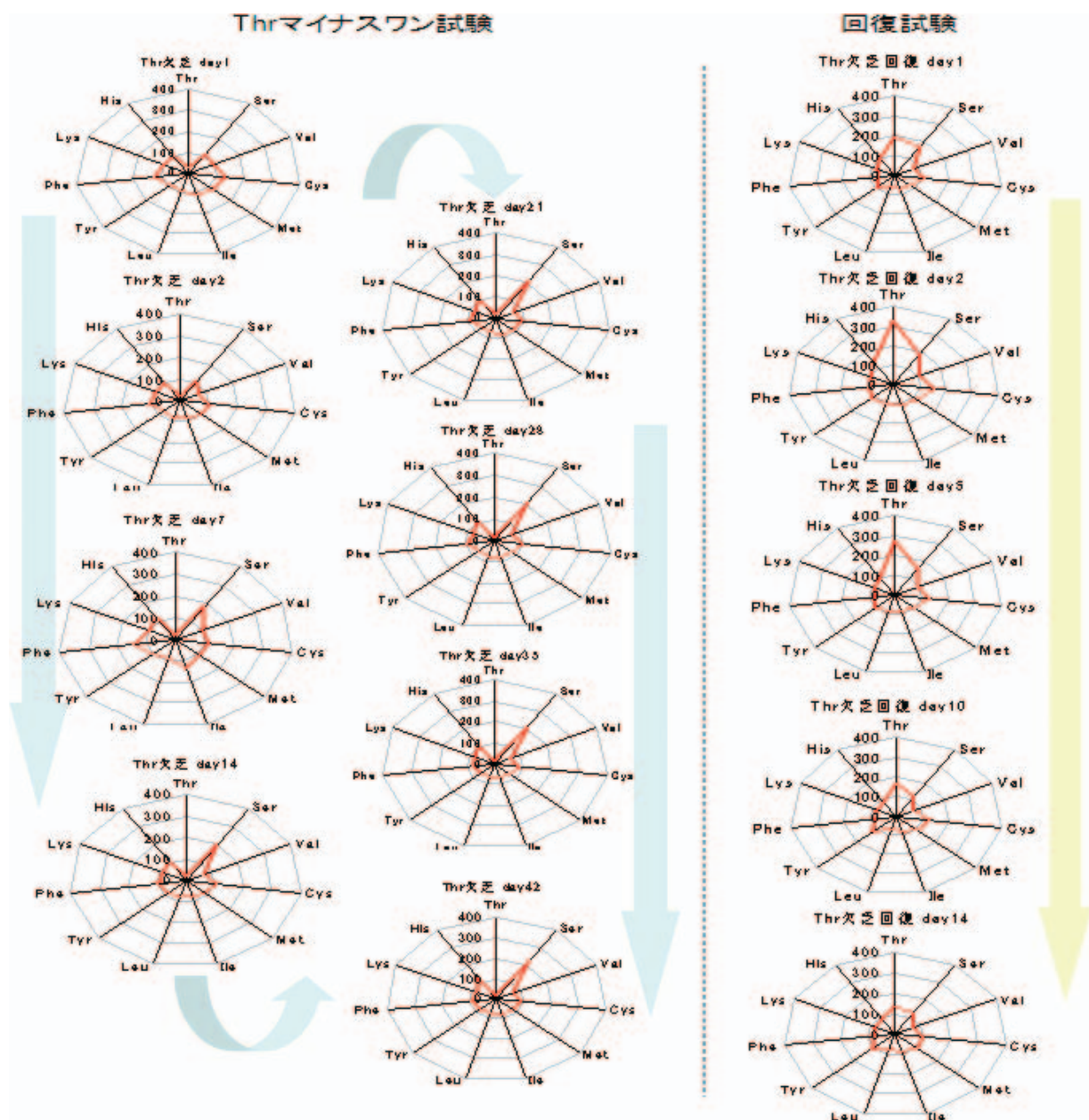


図10 Thr マイナスワン試験およびその回復試験に伴う各種アミノ酸濃度の時間的変化を表すレーダチャート
図中の数値100は、コントロール食の場合のアミノ酸濃度を表す。図の左半分はThr マイナスワン試験期間の結果を、右半分は回復試験期間の結果を表す。

にThrはほかのアミノ酸がほぼ正常に戻った後に戻るといふ動きを観察することができる。このことから、トレオニンは、アミノ酸のインバランスセンサーのような役目をしているのではないかと推測することができる。このことについては今後、詳細な実験を行う必要がある。

5. I型糖尿病発症に伴う血中アミノ酸変動の代謝制御ネットワーク解析

インスリン2 (Ins2) 遺伝子の異常を持ち、常染色体優性遺伝形式で糖尿病を発症するI型糖尿病 (DM) モデルマウス⁸⁾ (AKITA マウス, DM 群) と健常マウス (健常群) を用いて、糖尿病の遠因となるメタボリックシンドローム

との相関が高い五つのアミノ酸 (Ala, Gly, Leu, Ile, Val) の週齢3から週齢20までの血中濃度変化を調べ、それらのアミノ酸プロファイルデータを再現するS-systemのパラメータ (g_{ij} , 図6参照) の推定を行った⁹⁾。その結果を図12, 図13に示す。シンボルは実験結果で、曲線がS-systemの推定結果を示す。推定したS-systemパラメータ g_{ij} は、五つのアミノ酸間の相互作用を表し、その結果を健常群, DM群で比較したものを図14に示す。図中の数字は g_{ij} の値であり、プラスならば活性化, マイナスならば抑制を表す。図14から、健常群とDM群とでは、Val → Ala, Leu → Ala, Ala → Ile, Gly → Val 間の相互作用が逆転していることがわかる。図14に示す相互作用係数 g_{ij} の中で、どの相互作用が必要不可欠なものであるのを、3節

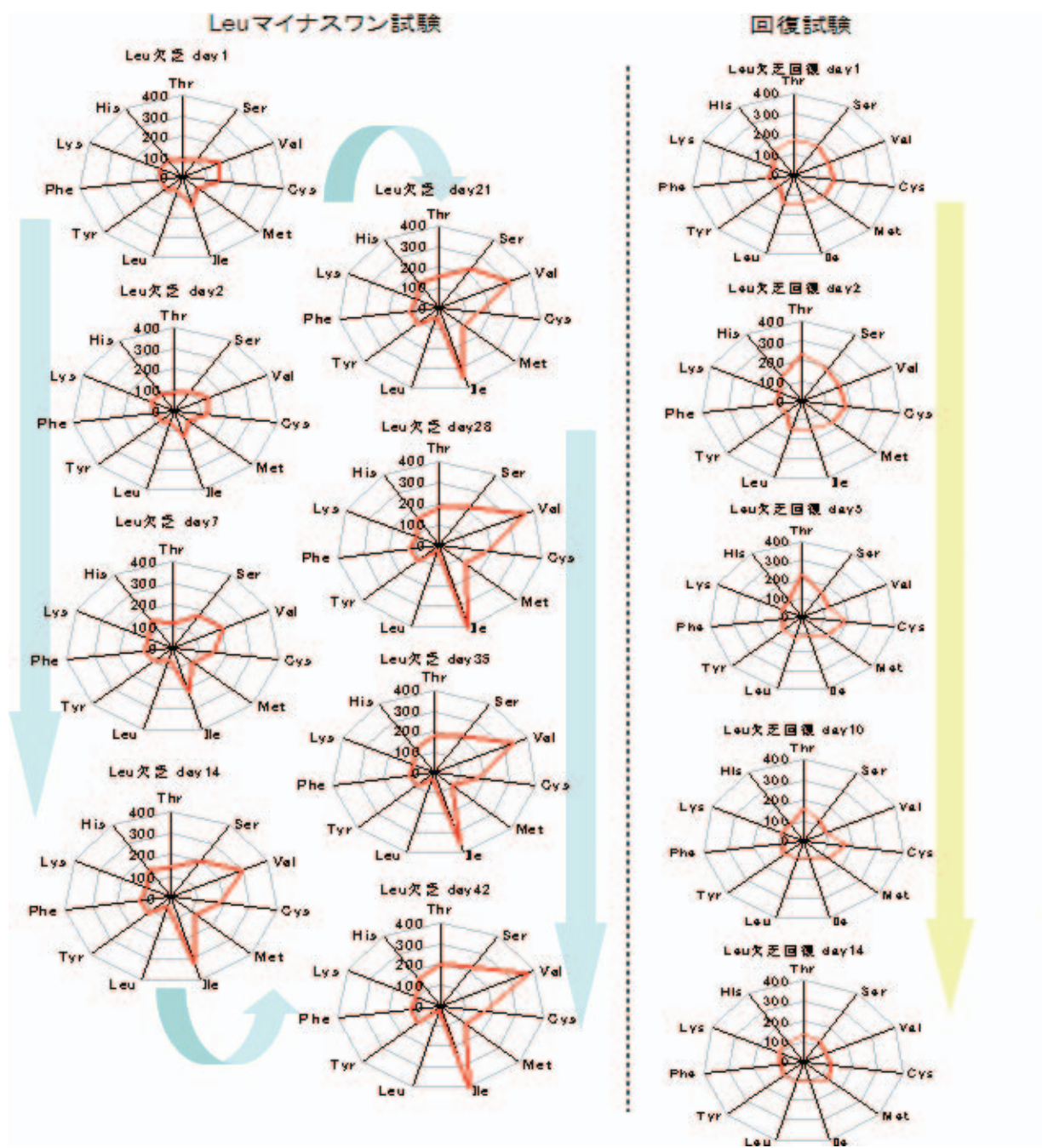


図 11 Leu マイナスワン試験およびその回復試験に伴う各種アミノ酸濃度の時間的変化を表すレーダチャート
図中の数値 100 は、コントロール食の場合のアミノ酸濃度を表す。図の左半分は Leu マイナスワン試験期間の結果を、右半分は回復試験期間の結果を表す。

の「ネットワーク感度解析」で述べた手法を用いて調べた。結果を図 15 に示す。矢印は正の相互作用，T バーは、負の相互作用を表す。図中の横棒グラフは、最も感度の高い相互作用を 100% とした、相対感度である。ネットワーク構造中で最も感度が高かったアミノ酸相互作用は健常群では Gly から Ile への正の相互作用，DM 群では Ala から Gly への正の相互作用であった。DM 群で最も感度の高かった Ala から Gly への正の相互作用は、健常群では 3 番目に、健常群で最も感度の高かった Gly から Ile への正の相互作用は、DM 群で 7 番目になっている。さらに、図 15 の健常群と DM 群の各相互作用の相対感度の全体像を

比較すると、健常群では全体的に感度が分散しているのに対して、DM 群では、1 番目の Ala から Gly への正の相互作用に感度が集中しており、2 番目以下の感度は 30% 以下になっている。以上の結果から、健常群から疾患群（この場合は、DM 群）に移行する段階で、相互作用やその感度が変化する可能性が考えられる。このことは今後、詳細に検討する必要があるが、未病・疾患の早期スクリーニングへの可能性が期待でき、図 16 のようにまとめられる。

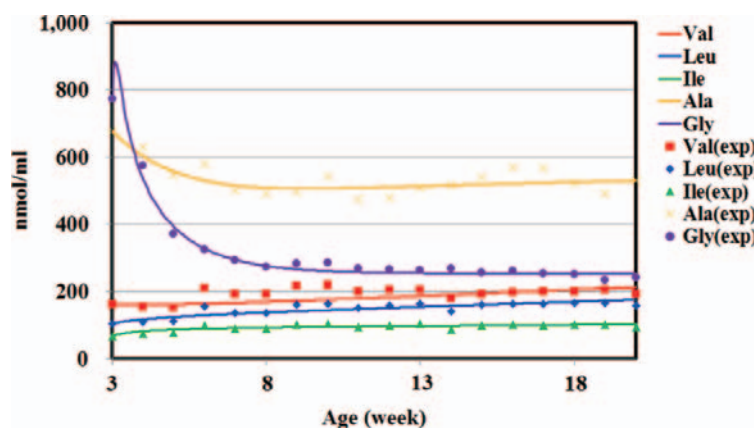


図 12 健常群の血中アミノ酸 (Ala, Gly, Leu, Ile, Val) プロファイル
タイムコース

シンボルは実験結果で、曲線は S-system モデルでパラメータフィッティングした計算タイムコース。実験結果と計算結果の 1 点あたりの平均二乗誤差は 7.37%。

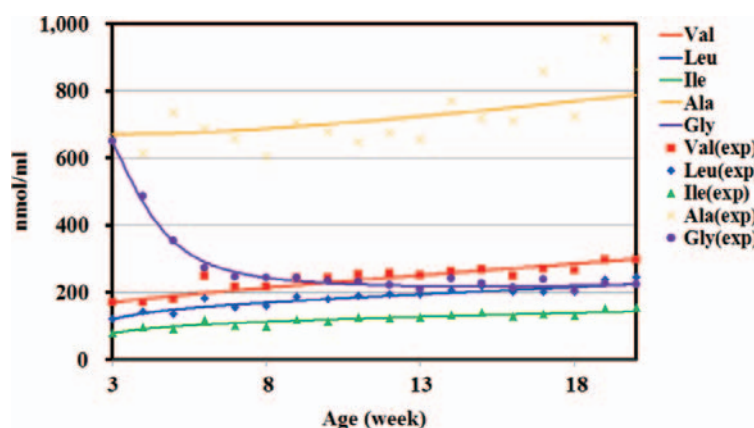


図 13 DM 群の血中アミノ酸 (Ala, Gly, Leu, Ile, Val) プロファイル
タイムコース

シンボルは実験結果で、曲線は S-system モデルでパラメータフィッティングした計算タイムコース。実験結果と計算結果の 1 点あたりの平均二乗誤差は 6.63%。

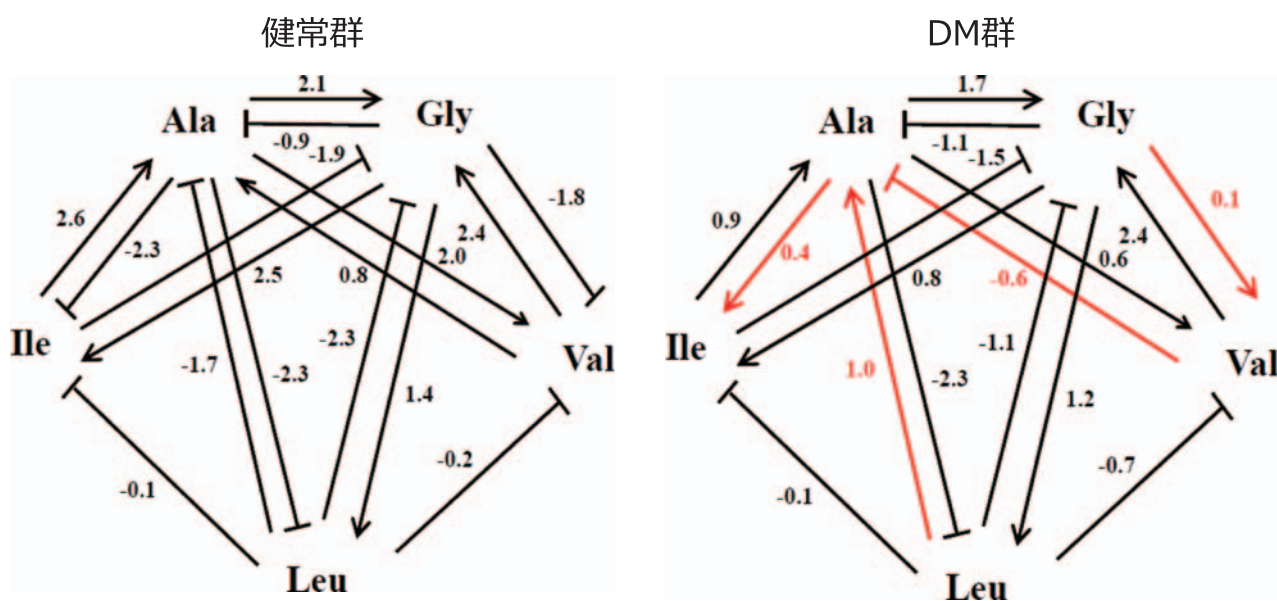


図 14 健常群と DM 群の血中アミノ酸代謝制御

ネットワーク解析結果。→は正の相互作用，⊥は負の相互作用，数字は推定した S-system のパラメータ (g_{ij}) の値を表す。

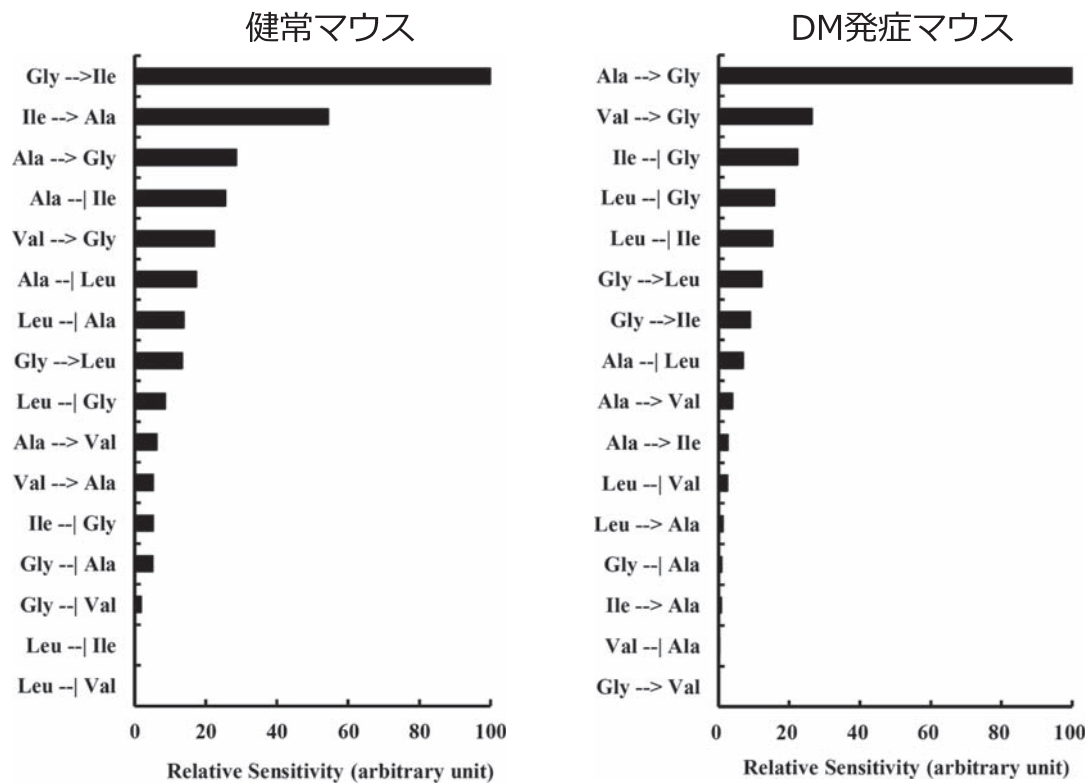


図 15 健常群と DM 群の血中アミノ酸代謝制御ネットワークにおける感度解析
それぞれの図において、横棒は最も感度の高い相互作用を 100% とした相対感度を表す。

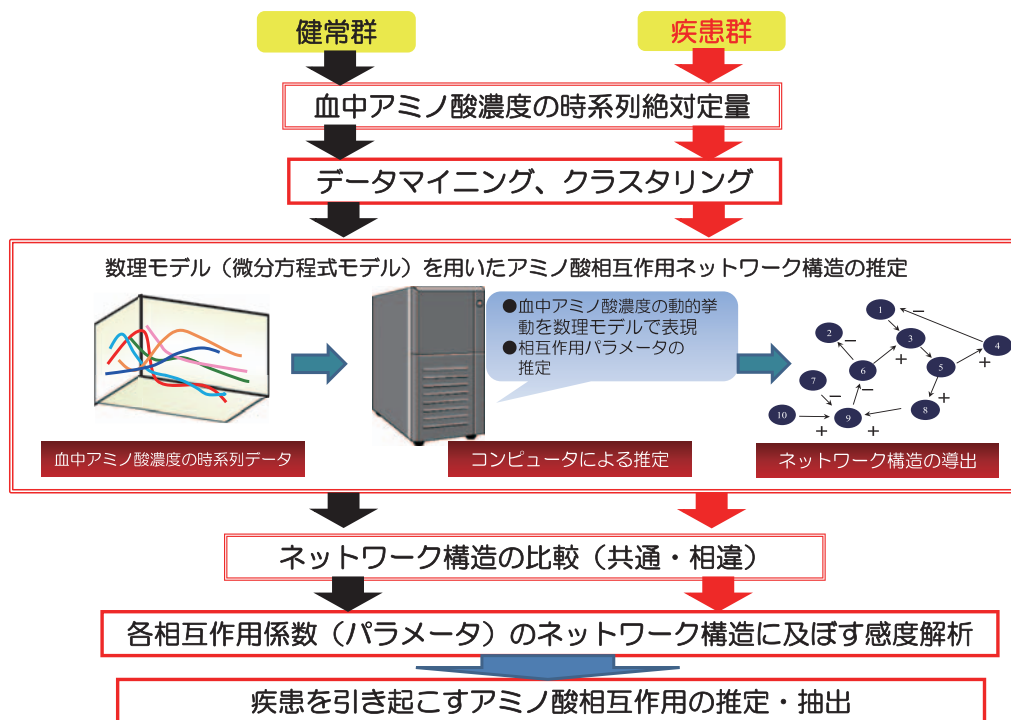


図 16 疾患を引き起こすアミノ酸相互作用の推定・抽出を目指したネットワーク解析のストラテジー

6. まとめ

1 節「はじめに」でも述べたように、生体は、恒常性と適応性という特徴を併せ持つ。細胞内のアミノ酸の濃度もその例外ではなく、健常では一過性の摂動（外乱）を受けても、代謝制御が働き、恒常性が保たれるが、その摂動が持続的になると、次第にその外部環境に馴化して、疾患に移行する可能性が考えられる。本稿で述べた手法は、健常から疾患へ移行する段階をシステム生物学的手法でとらえることができることを示した。今後、図 16 で示したストラテジーが各種疾患に適応されることを期待する。

謝辞

本稿の一部は、味の素株式会社イノベーション研究所の四方奈穂子博士および田中孝幸博士の博士学位論文（九州大学）の内容を含んでいます。

文 献

- 1) 岡本正宏 (2000) ゲノム情報生物学 (富田 勝, 高木利久

編), pp. 165–188, 中山書店.

- 2) Maki, Y., Takahashi, Y., Arikawa, Y., Watanabe, S., Aoshima, K., Eguchi, Y., Ueda, T., Aburatani, S., Kuhara, S., & Okamoto, M. (2004) *J. Bioinform. Comput. Biol.*, 2, 533–550.
- 3) Nakatsui, M., Ueda, T., Maki, Y., Ono, I., & Okamoto, M. (2008) *Math. Biosci.*, 215, 105–114.
- 4) Shikata, N., Maki, Y., Noguchi, Y., Mori, M., Hanai, T., Takahashi, M., & Okamoto, M. (2007) *Amino Acids*, 33, 113–121.
- 5) Shikata, N., Maki, Y., Nakatsui, M., Mori, M., Noguchi, Y., Yoshida, S., Takahashi, M., Kondo, N., & Okamoto, M. (2010) *Amino Acids*, 38, 179–187.
- 6) 千田明紀, 土井秀之, 小松博道, 佐藤和重, 上田乙也, 林盛彦, 高橋雄大, 名久井雅樹, 大原勝人, 里見 進 (2003) 外科と代謝・栄養, 37, 179–188.
- 7) 矢ヶ崎一三 (2009) 日本栄養・食糧学会誌, 62, 61–74.
- 8) Mochida, T., Tanaka, T., Shiraki, Y., Tajiri, H., Matsumoto, S., Shimbo, K., Ando, T., Nakamura, K., Okamoto, M., & Endo, F. (2011) *Mol. Genet. Metab.*, 103, 406–409.
- 9) Tanaka, T., Mochida, T., Maki, Y., Shiraki, Y., Mori, H., Matsumoto, S., Shimbo, K., Ando, T., Nakamura, K., Endo, F., & Okamoto, M. (2013) *Springer Plus*, 2: 287.
<http://www.springerplus.com/content/2/1/287>

著者寸描

●岡本正宏 (おかもと まさひろ)



九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門主幹教授。農学博士。

■略歴 1952 年大分県に生る。75 年九州大学農学部農芸化学科卒業。80 年同大学院農学研究科農芸化学専攻博士後期課程修了（農学博士）。82～85 年米国ミシガン大学医学部博士研究員。89 年九州工業大学情報工学部生物化学システム工学科助教授。2000 年九州大学大学院生物機能科学部門教授。11 年より現職。

■研究テーマと抱負 システム生物学および合成生物学の数理・情報科学的研究。生命創発的 (bio-inspired) 工学システムの設計・開発（酵素反応系のフィードバック制御機構をモデルにした情報通信および交通渋滞解消システムの設計・開発）。

■ホームページ <http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K001587/index.html>

■趣味 料理。