

酵素反応ネットワークの双安定性への ミカエリス・メンテン近似の影響

岩本 拓巳^{1,a)} 仲 隆^{1,b)}

概要：細胞内シグナル伝達系は、酵素が互いに活性化・不活性化を通して互いに制御し合う酵素反応ネットワークとして捉えることができ、その制御構造とパラメータ値により、双安定性などの様々な特性を示す。先行研究では、細胞内シグナル伝達系を酵素の活性化・不活性化のサイクル反応系をノードとする制御ネットワークとして定式化し、双安定性を同定する評価関数を提案している。本研究では、ミカエリス・メンテン近似を用いて評価関数の改良を試みた。その結果、双安定性の同定の速度は向上したが、双安定性の評価値には、10%程度の誤差が生じた。本研究は、酵素反応ネットワークの双安定性の同定において、近似手法の有効性を示すものである。

Effect of Michaelis-Menten approximation on bistability in enzymatic reaction networks

1. 序論

生物の基本的な構成要素は細胞であり、細胞内の生化学反応はエネルギー代謝を担う代謝系と代謝系を制御する細胞内シグナル伝達系の2つに分けられる。代表的なシグナル伝達系の1つにMAPKカスケードがあり、その主な構成要素として、酵素のリン酸化・脱リン酸化による酵素の活性化・不活性化サイクル反応系がある。サイクル反応系は2つの翻訳後修飾反応が組み合わさったものである。細胞内シグナル伝達系は、細胞の増減、異常細胞の自殺、細胞の分化、恒常性を制御する機構として機能しており、その制御機構は抗がん剤に代表される薬物の作用機序に深く関わるため、近年盛んに研究されている [1], [2], [3]。

酵素反応ネットワークとは、触媒機能を持たない不活性化酵素が他の触媒機能を持つ活性酵素と反応することによって触媒機能を持つ活性酵素になる酵素反応が網目状に繋がっているものである。先行研究では、酵素反応ネットワークを、サイクル反応系をノード、その間の制御関係をアークとする制御ネットワークとして単純化した [4]。双

安定とは、2つの安定状態を持つことである。ノイズや条件の変化によって別の状態に遷移せず、安定した状態を保ちやすい。この状態は実際の細胞内にも見られる性質である。4ノードと5ノードの全ての制御ネットワークに対して、質量作用の法則を適用し、導出された微分方程式系を解くことにより、双安定性を解析した。

本研究では、先行研究の制御ネットワークに質量作用の法則ではなくミカエリス・メンテン近似を適用し微分方程式系を導出する。導出した微分方程式系で制御ネットワークの双安定性を解析し、先行研究と解析速度および解析値を比較する。解析にはMathematicaを使用する [5]。Mathematicaは数式処理、数値処理を行うことが可能であり、数理モデルの構築やシミュレーション解析に適している。主に制御ネットワークからの微分方程式系の導出に数式処理を用い、導出された微分方程式系の解を求めるのに数値処理を行う。

2. 酵素反応ネットワークの双安定性

各細胞が行う外界との相互作用・情報通信の実態はタンパク質の相互作用から構成されている生化学反応ネットワークであり、細胞内シグナル伝達系と呼ばれている。酵素反応ネットワークとは細胞内シグナル伝達系を抽象化したものであり、網目状になっている細胞内シグナル伝達系

¹ 九州産業大学理工学部情報情報科学科
Department of Information Science
Kyushu Sangyo University,
2-3-1, Higashi-ku Fukuoka, 813-8503, Japan
^{a)} k21rs015@st.kyusan-u.ac.jp
^{b)} naka@is.kyusan-u.ac.jp

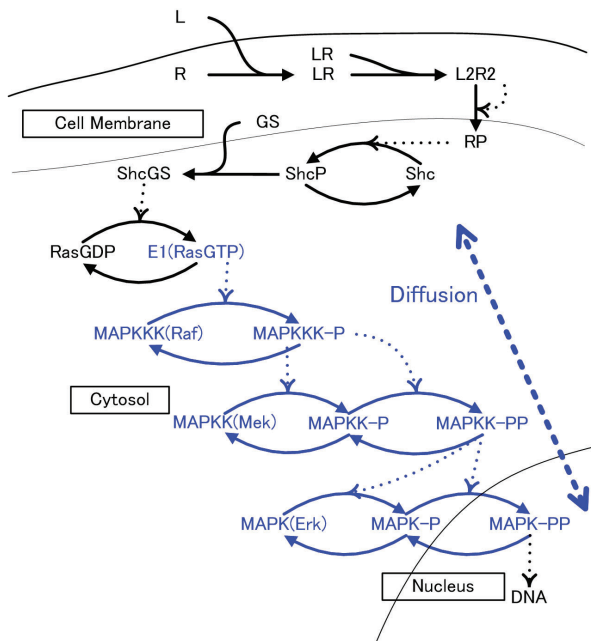


図 1 酵素反応ネットワーク
 Fig. 1 Enzymatic reaction network.

の中の翻訳後修飾反応だけを基本構成要素としたものである。図 1 は、細胞内の生化学反応を制御する細胞内シグナル伝達系の一つである細胞成長因子シグナル伝達系である。細胞表面に到達した成長因子が細胞核まで続く一連の酵素反応を引き起こし、遺伝子発現の制御を行っている [6], [7]. 中核にある青で示した部分が MAPK カスケードと呼ばれる酵素反応ネットワークである。3つのリン酸化反応を触媒する酵素から構成されている。酵素反応ネットワークを単純化したものを制御ネットワークという [4].

図 2 は MAPK カスケードの反応スキームである。青矢印が丸くなっているところは酵素のリン酸化による活性化と脱リン酸化による不活性化が組み合わさったサイクル反応系である。図 3 は 2段階リン酸化の過程を一段に単純化したものである。U が P になる制御を活性化といい正の制御、P が U になる制御を不活性化といい負の制御と呼ぶ。図 4 は図 3 を制御ネットワークとして表現したものである。青矢印が活性化を触媒する正の制御、赤矢印が不活性化を触媒する負の制御となる。

双安定性とは、2つの安定状態を持つことである。ノイズや条件の変化によって別の状態に遷移せず、安定した状態を保ちやすい [8], [9], [10]. この状態は実際の細胞内にも見られる制御特性である。制御特性は制御ネットワークの構造と総濃度や反応速度定数などの系のパラメータ値に依存する。

図 5 に、単安定の状態のグラフを示す。縦軸が濃度、横軸が時間を表す。青の線が定常状態値を表し、灰色の点線はそれぞれ異なる初期状態からの変化を表す。異なる初期状態から出発しても同じ定常状態値へ到達する。図 6 に、

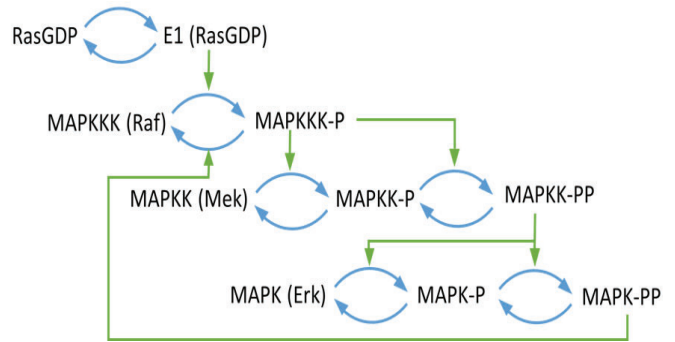


図 2 MAPK カスケード
 Fig. 2 MAPK cascade .

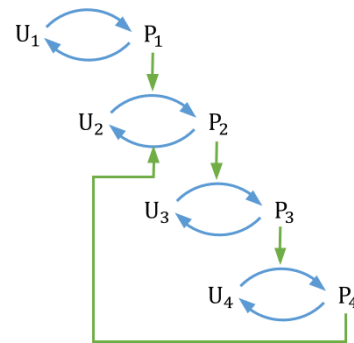


図 3 二重リン酸化を1重に
 Fig. 3 Convert dual phosphorylation to single phosphorylation.

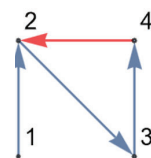


図 4 制御ネットワーク
 Fig. 4 Regulatory network.

双安定の状態のグラフを示す。縦軸が濃度、横軸が時間を表す。赤い線は定常状態値を表し、灰色の点線は初期値からの変化を表す。異なる初期状態から出発すると異なる定常状態値へ到達する。図 7 は、パラメータの値に対して定常状態値をプロットしたものである。縦軸が濃度、横軸がパラメータ値を表す。双安定な系に対しては、この図のような S 字が出現する。パラメータ値を上昇させた時と下降させた時の定常状態値が異なる領域があり、それをヒステリシスと呼ぶ。合成生物学では、自然に存在している細胞を人工的に合成することを目的としている。双安定な系は、細胞内のようなノイズのある状態で、コンピュータのメモリのように2つの状態を保持することができる。このような特性は、合成生物学で反応系を設計する際に部品として用いることができると思われる [11].

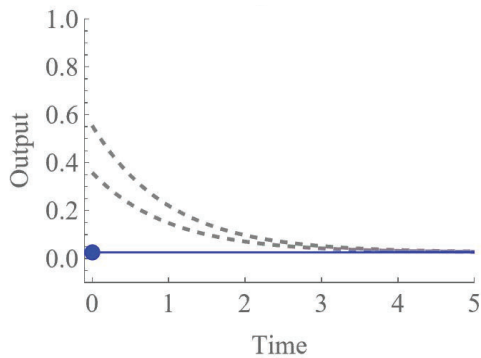


図 5 単安定の状態

Fig. 5 Monostable state.

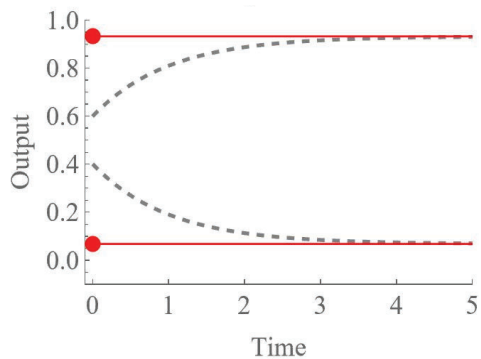


図 6 双安定の状態

Fig. 6 Bistable state.

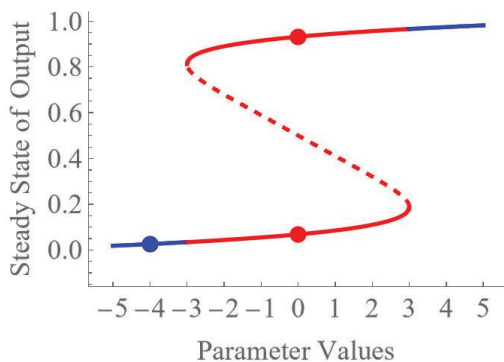
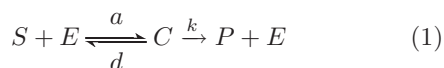


図 7 パラメータ値と安定性

Fig. 7 Parameter values and stability.

3. 質量作用の法則とミカエリス・メンテン近似による定式化

ミカエリス・メンテン型酵素反応を式 (1) に示す。基質 S に酵素 E が結合し一時的に酵素基質複合体 C となり、複合体上で基質が生成物 P に変化した後、生成物 P と酵素 E に分解する一連の反応である。式 (1) の a , d , および k は反応速度定数である。



このような反応式から系のダイナミクスを計算するために系の挙動を記述する微分方程式系を導出する。導出には

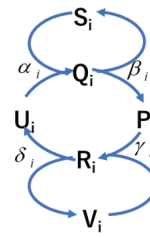


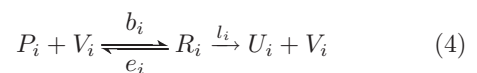
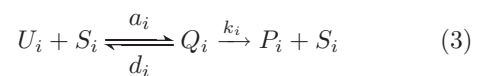
図 8 サイクル反応系の反応スキーム

Fig. 8 Reaction scheme of cyclic reaction system.

質量作用の法則を適用する。質量作用の法則とは反応速度が反応物の濃度の積に比例するという法則である。上記の式 (1) では、酵素基質複合体 C が S と E に解離する反応の速度は、 C の濃度に比例する。その比例定数が反応速度定数 d で、反応速度は dC となる。 S と E から C が生成される結合反応ではその速度は aSE となる。同様に C から P が生成される速度は kC となる。従って例えば C の変化速度である微分は $aSE - (d+k)C$ と書くことができる。式 (1) から質量作用の法則により導出される微分方程式系は式 (2) のようになる。

$$\begin{aligned} \frac{dS}{dt} &= -aSE + dC \\ \frac{dE}{dt} &= -aSE + (d+k)C \\ \frac{dC}{dt} &= aSE - (d+k)C \\ \frac{dP}{dt} &= kC \end{aligned} \quad (2)$$

図 8 は、サイクル反応系の反応スキームである。 U_i はノード i の不活性化酵素、 P_i はノード i の活性化酵素、 S_i はノード i の酵素の活性化酵素、 V_i はノード i の酵素の不活性化酵素、 α_i , β_i , γ_i , δ_i はそれぞれの反応の反応速度である。図 8 の反応機構の式を式 (3) と式 (4) に示す。式 (3) と式 (4) に質量作用の法則を用いて微分方程式系を導出すると式 (5) となる。 a_i , d_i と k_i は活性化過程の反応速度定数、 b_i , e_i と l_i は不活性化過程の反応速度定数である。



$$\begin{aligned}
 \frac{dU_i}{dt} &= -\alpha_i + \delta_i \\
 \frac{dS_i}{dt} &= -\alpha_i + \beta_i \\
 \frac{dQ_i}{dt} &= \alpha_i - \beta_i \\
 \frac{dP_i}{dt} &= \beta_i - \gamma_i \\
 \frac{dV_i}{dt} &= -\gamma_i + \beta_i \\
 \frac{dR_i}{dt} &= \gamma_i - \beta_i
 \end{aligned}
 \tag{5}$$

$$\begin{aligned}
 \alpha_i &= a_i U_i S_i - d_i Q_i \\
 \beta_i &= k_i Q_i \\
 \gamma_i &= b_i P_i V_i - e_i R_i \\
 \beta_i &= l_i R_i
 \end{aligned}$$

先行研究では、これらの定式化を用いたが、本研究では、ミカエリス・メンテン近似を適用する。反応機構の式 (3) と式 (4) にミカエリス・メンテン近似を用いて微分方程式系を導出すると式 (6) となる。 K_i と L_i はミカエリス定数である。

$$\begin{aligned}
 \frac{dU_i}{dt} &= -\frac{k_i U_i S_i}{K_i + U_i} + \frac{l_i P_i V_i}{L_i + P_i} \\
 \frac{dS_i}{dt} &= 0 \\
 \frac{dP_i}{dt} &= \frac{k_i U_i S_i}{K_i + U_i} - \frac{l_i P_i V_i}{L_i + P_i} \\
 \frac{dV_i}{dt} &= 0 \\
 K_i &= \frac{d_i + k_i}{a_i} \\
 L_i &= \frac{e_i + l_i}{b_i}
 \end{aligned}
 \tag{6}$$

4. 双安定な酵素反応ネットワークの同定

先行研究では、細胞内シグナル伝達系を酵素の活性化・不活性化のサイクル反応系をノードとする制御ネットワークとして定式化し、それらに対し少ない計算コストで双安定を同定できる評価関数を提案した [6]。また、その有効性を示す目的で、4ノードと5ノードの制御ネットワークで双安定を示すものを同定している。

図 9 に、解析対象とした以下の条件を満たす 80 の 4 ノードの制御ネットワークを示す。

- ノード 1 が入力ノード
- ノード 4 が出力ノード
- 中間ノードを經由して結合
- 他のノードから最大で、正と負の 2 つの制御
- 自己制御はなし
- 入力ノードと出力ノードは外部とのインターフェース

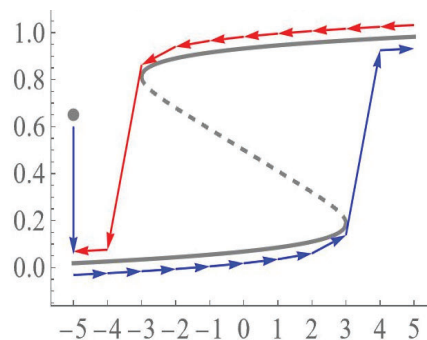


図 10 ヒステリシス応答法
Fig. 10 Hysteresis response method.

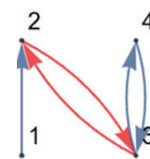


図 11 双安定な制御ネットワーク
Fig. 11 Bistable regulatory network.

- 入力ノードは制御されない
- 出力ノードは最大 1 つ他のノードを制御

これらの 80 の制御ネットワークから双安定性を示すものを同定した。

図 10 に先行研究で双安定な制御ネットワークを同定するために提案されたヒステリシス応答法を示す。縦軸が、最大濃度を 1 とした酵素の濃度、横軸は系のパラメータ値で対数目盛である。ヒステリシス応答法とは、定常状態は最初の初期状態で 1 回だけ求め、あとは定常状態を維持するように、パラメータ値を連続的に十分ゆっくりと変化させていく方法である。先行研究ではこのヒステリシス応答法で双安定性を同定した。灰色の点が初期値であり、青色から赤色の矢印で移動している。灰色の実線は定常状態を表す。点線は不安定な平衡状態に対応する。図 11 に、先行研究で同定された双安定な制御ネットワークを示す。ノード 2 と 3 が相互に負に制御し、ノード 3 と 4 が相互に正に制御している。

入力ノードの反応速度定数 k_1 を式 (7) のような sin 関数により振動させる。

$$k_1 = \frac{\sin(\frac{2\pi}{T}(t - \frac{T}{4})) + 1}{2}
 \tag{7}$$

図 12 に、振動入力に対する図 11 に示した 4 ノードの制御ネットワークの応答の例を示す。各酵素の総濃度と反応速度定数は、変化させる入力の k_1 を除き、全て 1 としている。単位系は $\mu\text{M}\cdot\text{sec}$ 系である。図 11 の青の曲線が系の入力である k_1 の時間変化である。2 周期分を表示している。赤色の曲線が系の出力である P_4 の相対濃度の時間変化である。入力が増加する時と減少する時で、出力の時

表 1 解析にかかった時間の最大値, 最小値, 平均値

Table 1 The maximum, minimum, and average analysis time.

	最大値	最小値	平均値
先行研究	7.73438	9.51563	9.58281
本研究	7.73438	6.70313	7.12031

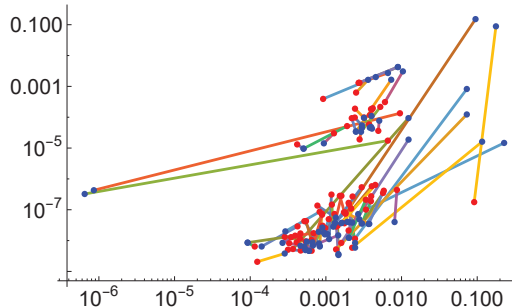


図 14 先行研究と本研究のヒステリシス損失と収束率

Fig. 14 Hysteresis losses and convergence rates in previous studies and this study.

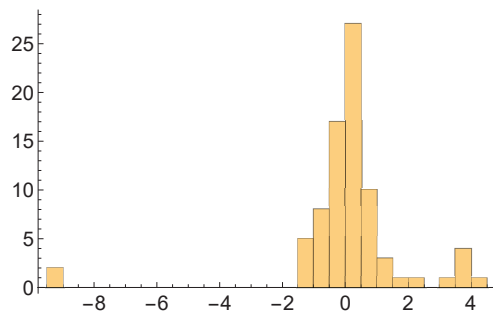


図 15 先行研究と本研究のヒステリシス損失の比

Fig. 15 Ratio of hysteresis loss between previous and this study.

率を 1 つのグラフにまとめたものである。横軸がヒステリシス損失で、縦軸が収束率である。赤色が先行研究、青色が本研究で同じ制御ネットワークを線で結んでいる。すべての点が一致しているわけではなく、先行研究の値と大きく離れている点も確認することができる。さらに、制御ネットワークごとにそれぞれ違う離れ方をしていることを確認することもできる。

図 15 は、同じ制御ネットワークに対して本研究のヒステリシス損失の値を先行研究のヒステリシス損失で割り、その対数値をヒストグラムにしたものである。図 15 を見ると、多くの制御ネットワークの誤差は、10% の範囲にほぼ入っていることがわかる。

図 16 に、図 12 の制御ネットワークに対するヒステリシス損失を示す。先行研究と同じく双安定性を示している。図 16 の方が図 13 より三角形の領域が大きく出現している。

6. 考察

本研究では、酵素反応ネットワークを質量作用の法則の

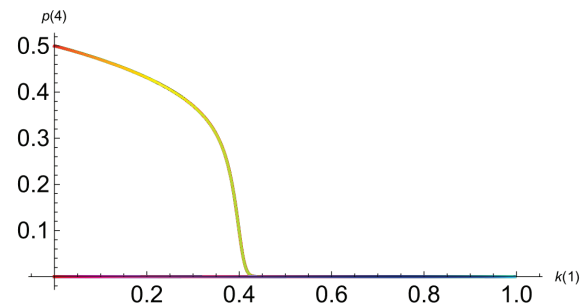


図 16 ミカエリス・メンテン近似によるヒステリシス損失

Fig. 16 Hysteresis loss by michaelis-Menten approximation.

代わりにミカエリス・メンテン近似を用いて定式化し、双安定性の同定を行った。本研究と先行研究との解析速度の比較では、解析回数を 50 回にして最大値, 最小値, 平均値にどのような違いがあるのかを調べた。最大値, 最小値, 平均値の先行研究との比は最大値は 0.8 倍, 最小値は 0.7 倍, 平均値が 0.7 倍になった。すなわち、ミカエリス・メンテン近似を用いることにより解析に要する時間を短縮できた。ただし、双安定性の定量的尺度であるヒステリシス損失に 10% 程度の誤差を生じたが、許容範囲と思われる。これは、酵素反応ネットワークの双安定性の同定において、近似手法の有効性を示すものである。

以上のように、近似度は十分に高く保たれ、さらに解析速度が向上することが確認された。この特性は、ネットワークのノード数が増加するほど顕著に現れると考えられる。例えば、5 ノード以上の系に対して同様の解析を行うことで、近似手法の有効性をより詳細に検証できる可能性がある。

本研究では、総濃度や反応速度定数などの系のパラメータ値を全て 1 として設定している。そのため、これらのパラメータを変化させた場合にどのような影響が現れるかを解析することも重要である。

また、ミカエリス・メンテン近似にはモジュラリティがあるため、個々の反応過程を独立したモジュールとして扱いやすくなる。この特性を活かすことで、各モジュールの影響を分離して解析でき、ネットワーク全体の構造と機能の関係をより明確に捉えることができると考えられる。

参考文献

- [1] Volinsky, N., & Kholodenko, B. N.: Complexity of receptor tyrosine kinase signal processing. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(8), a009043 (2013).
- [2] Jeschke, M., Baumgartner, S., & Legewie, S.: Determinants of cell-to-cell variability in protein kinase signaling. *PLoS Comput Biol*, 9(12), e1003357. (2013).
- [3] Mai, Z., & Liu, H.: Random parameter sampling of a generic three-tier MAPK cascade model reveals major factors affecting its versatile dynamics. *PLoS One*, 8(1), e54441. (2013).
- [4] Takashi Naka.: Identification of Bistability in Enzymatic

- Reaction Networks Using Hysteresis Response, Proceedings of BIOSTEC , Proceedings of BIOSTEC 2022(17th International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies) (2022).
- [5] 東京電気大学出版局: 入門 Mathematica, 日本 Mathematica ユーザー会 (2009)
- [6] Schoeberl, B., Eichler-Jonsson, C., Gilles, E. D., & Muller, G.: Computational modeling of the dynamics of the MAP kinase cascade activated by surface and internalized EGF receptors. *Nature Biotechnology*, 20, 370-375. (2002).
- [7] Brightman, F. A., & Fell, D. A.: Differential feedback regulation of the MAPK cascade underlies the quantitative differences in EGF and NGF signalling in PC12 cells. *FEBS* (2000).
- [8] Gedeon, T., Cummins, B., Harker, S., & Mischaikow, K.: Identifying robust hysteresis in networks. *PLoS Comput Biol*, 14(4), e1006121. (2018).
- [9] Naka, T.: The partition representation of enzymatic reaction networks and its application for searching bi-stable reaction systems. *PLoS One*, 17(1), e0263111. (2022).
- [10] Yao, G., Tan, C., West, M., Nevins, J. R., & You, L.: Origin of bistability underlying mammalian cell cycle entry. *Mol Syst Biol*, 7, 485. (2011).
- [11] Doncic, A., Atay, O., Valk, E., Grande, A., Bush, A., Vasen, G., Colman-Lerner, A., Loog, M., & Skotheim, J. M.: Compartmentalization of a bistable switch enables memory to cross a feedback-driven transition. *Cell*, 160(6), 1182-1195. (2015).