

| | |
|------------------|--|
| Title | 病態解析への応用に向けたヒト赤血球代謝シミュレーションモデルの構築 |
| Sub Title | Modeling of human erythrocyte towards its application to pathological analysis |
| Author | 木下, 綾子(Kinoshita, Ayako) 中山, 洋一(Nakayama, Yoichi) |
| Publisher | 慶應義塾大学湘南藤沢学会 |
| Publication year | 2004-06 |
| Jtitle | 優秀修士論文 |
| JaLC DOI | |
| Abstract | 本研究は、非常に制度の高いヒト赤血球の代謝シミュレーションモデルを構築し、根治療法のみ つかっていない酵素欠損症を再現したものである。その結果グルタチオンという活性酸素除去に 関わる重要な物質を生産する代謝経路がG6PD欠損症の細胞寿命に重大な影響を与える事を示唆 した。また、様々な異常赤血球の再現に向けた汎用モデルを構築するために、これまでに類を見 ない大規模な代謝経路の動的モデル構築を行った。 |
| Notes | 富田・内藤・中山研究プロジェクト 2003年 |
| Genre | Thesis or Dissertation |
| URL | https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=0302-0000-0464 |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

慶應義塾大学
修士論文

病

態解析への応用に向けたヒト赤血球
代謝シミュレーションモデルの構築
2003年

Keio University Shonan Fujisawa Academic Society

木下 綾子 大学院政策・メディア研究科 修士課程

富田・内藤・中山 研究プロジェクト

慶應義塾大学湘南藤沢学会

優秀修士論文推薦のことば

本研究は、非常に精度の高いヒト赤血球の代謝シミュレーションモデルを構築し、根治療法の見つかっていない酵素欠損症を再現したものである。その成果として、グルタチオンという活性酸素除去に関わる重要な物質を生産する代謝経路が、グルコース6リン酸脱水素酵素欠損症の細胞寿命に重大な影響を与える事を示唆した。

また、本研究では様々な異常赤血球の再現に向けた汎用モデルを構築するために、これまでに類を見ない大規模な代謝経路の動的モデル構築を行った。

本修士論文は上記の手法、結果について非常によくまとめられており、学術的に価値の高いものとなっている。以上のことから、優秀論文にふさわしいと考え、強く推薦する。

慶應義塾大学
環境情報学部専任講師
中山 洋一

病態解析への応用に向けた
ヒト赤血球代謝シミュレーションモデルの構築

[題目]

病態解析への応用に向けた ヒト赤血球シミュレーションモデルの構築

ヒト赤血球において主経路と言われる代謝反応を全て詳細な反応速度式で記述し、E-CELL System 上に再現した。マグネシウムイオンやヘモグロビンタンパクへの代謝物質の結合も考慮し、より実際の細胞内濃度に近い定常値を取得することに成功した。

構築したシミュレーションモデルを用いて G6PD 酵素欠損症の細胞内における代謝物質や酵素反応の挙動を予測したところ、ペントースリン酸回路の活性低下は再現できたものの、予測された細胞半減期は実際のものと比較して短かった。そこで、実際の細胞とシミュレーション結果の相違はモデル化の範囲にあるのではないかと考え、還元型グルタチオン (GSH) の生合成系、酸化型グルタチオン (GSSG) の能動的な排出系などを加えてモデリングを行った。G6PD 欠損症細胞の GSH の減少と GSSG の増加は膜やヘモグロビンを含む細胞内タンパクの酸化を引き起こす。今回、GSSG による解糖系酵素 PFK の活性低下も合わせて表現した。また、GSH 生合成系は GSH によるフィードバック阻害により、普段は活性が抑えられている。

モデル拡張を行った結果、解糖系活性や ATP 濃度が維持され、報告されている G6PD 欠損症の特徴とよく一致した。このことから G6PD 欠損症の細胞機能を維持するにはグルタチオン周辺の代謝や GSSG による活性低下が不可欠であることが予測された。

実験や過去の知見とシミュレーションの相違点から、それを埋める新しい知見を導くという、シミュレーション研究の応用例となった。また、細胞の異常状態における様々な代謝経路の変化に対応可能な全代謝モデルの構築が重要であることが示唆された。

そこで、モデリングに必要な情報を大幅に削減しつつ精緻なシミュレーションを可能にする動的/静的ハイブリッド手法を開発した(柚木克之氏、中山洋一氏ら)。本手法の精度検証の結果、非常に良い精度で完全動的モデルと一致し、大規模モデル構築への応用が可能であることがわかった。ヒト赤血球で活性のある代謝経路、動的部分の酵素反応機構やパラメータの網羅的な調査を行い、動的/静的ハイブリッド手法を用いて全代謝モデルの構築を行った。

[キーワード]

シミュレーション、赤血球、病態解析、代謝、酵素欠損症

政策・メディア研究科 修士2年 木下綾子

[Title]

Modeling of Human Erythrocyte Towards its Application to Pathological Analysis

A detailed computer model of the metabolic system in human erythrocyte was developed using E-CELL System, containing the pathways which has been considered to be sufficient for understanding the metabolic system of human erythrocyte. All enzymatic reactions included in this model were based on the reported kinetic mechanisms and parameters. A calculation of magnesium complexes in the erythrocytes under the oxy/deoxy hemoglobin states were also involved in this model.

A simulation experiment of G6PD-deficient erythrocyte using this model presented a problem of the range of simulation model; the longevity, estimated by activities of glycolytic enzymes and ATP level, was too short to regard it as a model representing the real cell. Therefore, the pathways were expanded: the reduced glutathione(GSH) synthesis, the oxidised glutathione(GSSG) transport process and the glyoxalase system. The changes of several enzymatic activities controlled by the ratio of GSH/GSSG were also taken into consideration in the model.

After the modification of the erythrocyte model, the simulation results of G6PD deficiency well agreed with the reported behavior in G6PD-deficient erythrocyte. This suggested that the expanded pathways, which have not been included in metabolic model of erythrocyte, play a significant role in retention of the function and structure of the G6PD-deficient erythrocyte.

These failures of the simulation experiments obtained from the simulation model pointed to gaps in our previous knowledge and understandings.

At the same time, these results suggested that it is necessary that the model involves all known metabolisms, in relation to metabolites, especially when it is focused on an abnormal conditions of cells.

Predicting the dynamic behavior of metabolic pathways using dynamic simulations requires accurate rate equations and kinetic parameters for precise modeling; however, these are infrequently found as a complete set. To supplement the shortage and at the same time representing the dynamic behavior, a new modeling method, by the name of hybrid algorithm, has been developed(K.Yugi and Y.Nakayama et al). Using a small virtual pathway and an erythrocyte model, we confirmed that the dynamic behavior of our hybrid model is almost identical to that of a dynamic simulation. These results suggested that it was possible to use this method as an alternative of dynamic kinetic equations.

To construct the large-scaled metabolic model, comprehensive surveys of metabolic pathways and kinetic information of its dynamic part and modeling with the hybrid method were carried out.

[Key Words]

simulation, erythrocyte, pathological analysis, metabolism, enzyme deficiency

Graduate School of Media and Governance
Ayako Kinoshita

目次

| | |
|--------------------------------|----|
| 第1章 序論 | 7 |
| 第2章 E-CELL 赤血球代謝モデルの構築 | 10 |
| 2.1 主経路代謝モデル | 10 |
| 2.1.1 解糖系 | 11 |
| 2.1.2 ペントースリン酸経路 | 17 |
| 2.1.3 プリンサルベージ系 | 20 |
| 2.1.4 膜輸送、ポンプ | 23 |
| 2.2 代謝物質とマグネシウムイオン、ヘモグロビンとの複合体 | 26 |
| 第3章 G6PD 欠損症の病態解析 | 31 |
| 3.1 G6PD 欠損症 | 31 |
| 3.1.1 G6PD の働き | 31 |
| 3.1.2 G6PD 欠損症の概要 | 32 |
| 3.2 病態解析 | 34 |
| 3.3 モデルの拡張 | 37 |
| 3.3.1 還元型グルタチオン (GSH) 生成系 | 37 |
| 3.3.2 酸化型グルタチオン排出系 | 39 |
| 3.3.3 glyoxalase system | 40 |
| 3.3.4 GSH/GSSG 比による酵素活性低下の表現 | 40 |
| 3.4 拡張後のモデルを用いた G6PD 欠損症の病態解析 | 41 |
| 第4章 全代謝モデルの構築と大規模モデリング手法開発 | 44 |
| 4.1 ハイブリッドモデリング手法の開発 | 44 |
| 4.1.1 理論 | 44 |
| 4.1.2 精度検証 | 46 |
| 4.1.3 手法適用範囲の決定方法 | 49 |
| 4.2 赤血球内の代謝経路に関する調査 | 51 |
| 4.3 副経路の動的表現 | 59 |
| 4.3.1 アミノ酸の膜輸送動態 | 59 |
| 4.3.2 糖類の輸送 | 59 |

| | | |
|--------------|---------------------------------|-----------|
| 4.3.3 | その他の動的表現部分 | 60 |
| 第 5 章 | 本研究の展開・展望 | 64 |
| 5.1 | 酸素飽和曲線の実装 | 65 |
| 5.2 | 膜タンパク Band3 と代謝の関連の実装 | 66 |
| 5.3 | E-CELL ヒト赤血球シミュレータの応用 | 67 |

表 目 次

| | | |
|-----|-------------------------------|----|
| 2.1 | E-CELL ヒト赤血球主経路モデル：解糖系 | 12 |
| 2.2 | E-CELL ヒト赤血球主経路モデル：ペントースリン酸回路 | 18 |
| 2.3 | E-CELL ヒト赤血球主経路モデル：プリンサルベージ系 | 21 |
| 2.4 | E-CELL ヒト赤血球主経路モデル：膜輸送、ポンプ | 24 |
| 2.5 | マグネシウムイオン、ヘモグロビンと代謝物質の結合定数 | 27 |
| 2.6 | ヘモグロビンの状態とヘモグロビン-代謝物質複合体濃度の関係 | 28 |
| 2.7 | マグネシウムイオン-代謝物質複合体濃度の関係 | 29 |
| 2.8 | 各代謝物質のマグネシウムイオン、ヘモグロビン複合体 | 30 |
| 3.1 | G6PD 欠損症の臨床段階 | 33 |
| 3.2 | G6PD 欠損症の主な溶血惹起剤 | 34 |
| 3.3 | G6PD 欠損症の酵素反応パラメータ | 35 |
| 4.1 | 哺乳類の赤血球で活性の確認されている酵素 1 | 53 |
| 4.2 | 哺乳類の赤血球で活性の確認されている酵素 2 | 54 |
| 4.3 | 細胞内代謝物質濃度 | 55 |
| 5.1 | Band3 タンパクとヘモグロビン/解糖系酵素の結合定数 | 67 |

目次

| | |
|--|----|
| 2.1 E-CELL ヒト赤血球主経路モデルの経路図 | 11 |
| 3.1 G6PD 周辺の経路図 | 32 |
| 3.2 G6PD 酵素欠損症のシミュレーション結果 | 36 |
| 3.3 拡張したグルタチオン周辺の経路図 | 37 |
| 3.4 GSHGSSG 比による PFK の活性変化 | 41 |
| 3.5 モデル拡張後の G6PD 欠損症シミュレーション結果 | 42 |
| 4.1 ハイブリッド手法の概念図 | 46 |
| 4.2 ハイブリッドモデルの静的部分に置き換えた経路 | 47 |
| 4.3 ハイブリッドモデルと完全動的モデルにおける挙動の一致度 | 48 |
| 4.4 ボトルネック酵素を静的部分に含めた場合の挙動 | 48 |
| 4.5 Elasticity 実験に用いた経路 | 50 |
| 4.6 Elasticity 実験結果 | 50 |
| 4.7 ヒト赤血球全代謝マップ | 52 |
| 5.1 E-CELL System 上に再現した酸素飽和度の変化 | 66 |

第1章 序論

ポストゲノムと言われる時代にあって、生命科学は広い意味で「相互関係」とそこから生まれる「機能」の理解・解明に向かっているとと言える。

これまでの塩基配列やタンパク質のデータベース構築、それを利用した遺伝子配列比較、または高速・並列処理が可能なコンピュータやアルゴリズムの開発に代わり、トランスクリプトーム解析による mRNA の相対的な定量やプロテオーム解析による細胞内タンパク質の同定が急速に進められている。

これらの mRNA やタンパク質は遺伝子発現やその後の翻訳の直接の産物であるが、それらの産物がさらに複雑に相互に関係し合っ起こる細胞レベルの挙動は想像を遥かに越えるほど複雑である。一つのタンパクの詳細な生体内機能を知るには、どうしても細胞挙動の近因となる物質を特定してその挙動を知る必要が出てくる。これを解釈するためには酵素タンパク機能の複雑なネットワーク網の産物である代謝反応を紐解く必要があるだろう。そこで、遺伝子情報に基づいて予測された代謝反応経路、または既知の酵素学の知見を統合してコンピュータ上に再構築し、シミュレーションを実行することで代謝ネットワークを包括的に理解しようという試みが行われている。

この動きを急速に実現に向かわせるのが代謝物質の一斉測定を可能にするメタボローム技術であろう。これらのシミュレーションモデル作成に必要な情報の取得は勿論のこと、シミュレーションの結果として予測された経路や物質の生体内機能を確認、矛盾を導き出すために不可欠であると考えられる。代謝ネットワークのシミュレーションと実際にメタボロームによって測定されたデータから、まず物質レベルの相互関係を予測し、そこに特定タンパクの過剰発現またはノックアウト細胞を使ったデータを重ねて初めて、タンパクが細胞挙動そのものに与える影響の輪郭が見えてくるであろう。

シミュレーションの領域は、単なる模倣に留まらない。既知の部品に関する知見を詳細に記述した上で、それらを統合した場合にどのような振る舞いを見せるのかを予測することは、部品と部品をつなぐ新たな関連性の考察につながる。実際の挙動とシミュレーションによる予測結果を比較することで、これまでの知見だけでは説明できない部分を見極めるという方向性が生まれることが期待されている。

また、シミュレーションの対象や手法に合わせてで部品の種類やサイズを柔軟に変化させていく必要がある。時には思いきった単純化が重要であるが、そのモデルの単純化の思考過程自体が示唆に富む研究領域となるであろう。

シミュレーションソフトウェア E-CELL System

次に、生命現象にスコープを当てた汎用シミュレーションソフトウェアである E-CELL System について触れる。細胞シミュレーションとは、細胞内で起こる反応を定量的なデータに基づいてコンピュータ上に再構築し、その振る舞いを再現しようというものである。これにより、対象の生命現象をシステムとして捉えた特性解析が可能になり、仮想細胞の動的特性を知ることで未知の経路や仕組みの予測といった応用が期待できる。

E-CELL システムは、細胞内で起こるあらゆるレベルの反応を丸ごとシミュレーションすることを目的として慶應義塾大学 高橋恒一氏、富田勝教授らによって開発されている ([98],[112],[133],[150])。このシステムは、反応速度式をベースとした動的シミュレーションのほかに、S-System、General Mass Action (GMA) などの非線形微分方程式を用いた表現や、確率論アルゴリズムによるシミュレーションを行うことができ、様々な生物種、組織における代謝モデルの構築 ([148]) や 遺伝子ネットワークの予測 ([149]) が行われている。この柔軟性により、シグナル伝達、代謝、転写、翻訳、さらには腫瘍形成といった物理的反応など、様々な細胞内-細胞間プロセスに対応した汎用シミュレーションソフトウェアとなっている ([136])。

赤血球細胞

ここまで、なぜ代謝のシミュレーションを行うのかについて述べてきた。ここからは、なぜ赤血球細胞を対象とするか、また赤血球代謝シミュレーションの先行研究について言及する。

赤血球細胞の主要な生体内機能は、酸素分子の運搬である。哺乳類の赤血球は成熟過程で脱核して、遺伝子発現を含まない袋状の細胞となる。細胞膜内にヘモグロビンと呼ばれる 4 量体タンパク質を高濃度で含み、このヘモグロビンへのガス分子の脱着を利用して酸素などのガスが体内で効率良く運搬される。収集の容易さ、無核であるという構造の単純さから赤血球は様々な分野で研究の対象または材料とされてきた。また、ヘモグロビンはタンパク質構造、赤血球細胞膜は膜タンパク構造の研究の最も核となる部分に寄与している。

生化学、医学、生命工学は勿論のこと、異常ヘモグロビンの解析による遺伝学的視点、ヘモグロビンの環境適応能力の解析による進化学的視点からの研究も歴史が深い。

1980年代にヒト赤血球内の代謝ネットワークを対象とした包括的なモデルが発表されて以来、数多くのコンピュータシミュレーションによる研究に材料として赤血球の代謝が用いられてきた。その理由には次のようなことが挙げられる。

- 先述したように、哺乳類の赤血球に関する研究はその収集のしやすさなどから古くから多岐に渡る分野で行われている。このため、他の細胞種に比べて酵素反応速度式やパラメーターなど、シミュレーションに必要な情報の蓄積も多い。
- 成熟細胞は無核であり、遺伝子発現やそれに伴うタンパクの産生などを考慮する必要がなく、単純化しやすい。
- 膜に包まれた袋状の形態をした細胞で、膜を介した物質移動と内部の代謝で表現が可能であることから、閉鎖系のシミュレーションに向いている。

赤血球代謝シミュレーションは、解糖系を始めとする代謝の機構解明の他、数多く存在する酵素欠損症の再現や考察に応用されている。Schuster R. らはモデルの注目する反応速度パラメータである最大速度 (V_{max}) と酵素反応速度に関して分岐解析を行い、臨床データと比較することで、速度パラメータの臨床的な閾値を考察している ([89])。また Palsson, B. Ø. らのグループは多くの酵素欠損症患者に関して一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms (SNPs)) の解析を行い、SNPs データと反応速度パラメータを対応づけた ([138])。このような SNPs データベースを構築することで、患者ごとのシミュレーションモデルを構築することが将来的に期待されている。

第2章 E-CELL 赤血球代謝モデルの構築

ヒト赤血球代謝シミュレーションモデルがこれまでに数多く発表されていることは既に述べたが、それらと今回新たに E-CELL System 上に構築したヒト赤血球代謝モデルの相違について言及しておく。

包括的に赤血球の代謝を再現した代表的な研究として、Palsson, B. Ø. らによるモデル ([63],[64],[65], [66])、Savageau, M. A. らによるモデル ([95])、Kuchel, P. W. らによるモデル ([115], [116], [117])、が挙げられる。

Palsson, Savageau らのモデルは解糖系、ペントースリン酸回路の他にアデニン核酸代謝部分を実装した大規模なものとなっており、更に定常状態を取得している。しかし、一部の解糖系酵素の反応は迅速平衡反応として記述されている。Kuchel らのモデルは解糖系とペントースリン酸回路、ATP 産生の一部反応のみであるが、NMR(核磁気共鳴分析) 実験を行っており、解糖系とペントースリン酸回路に関する反応速度論データを独自に取得している。このため、アロステリック酵素の反応機構に関しても非常に信憑性の高いものとなっている。

E-CELL ヒト赤血球モデルではこれらを全て統合して、解糖系、ペントースリン酸回路、アデニン核酸代謝 (プリン Salvage 系)、それらに伴う膜輸送系、イオンポンプを全て実装した大規模なモデルを構築した (図 2.1)。また文献調査の結果、迅速平衡反応は用いず全ての式を反応速度式で再現することに成功した。

2.1 主経路代謝モデル

本論文中で使用したモデルの反応速度式ならびに反応速度パラメーターを示す。本文中の酵素名や物質名の略表記については、添付した略表記リストを参照されたい。

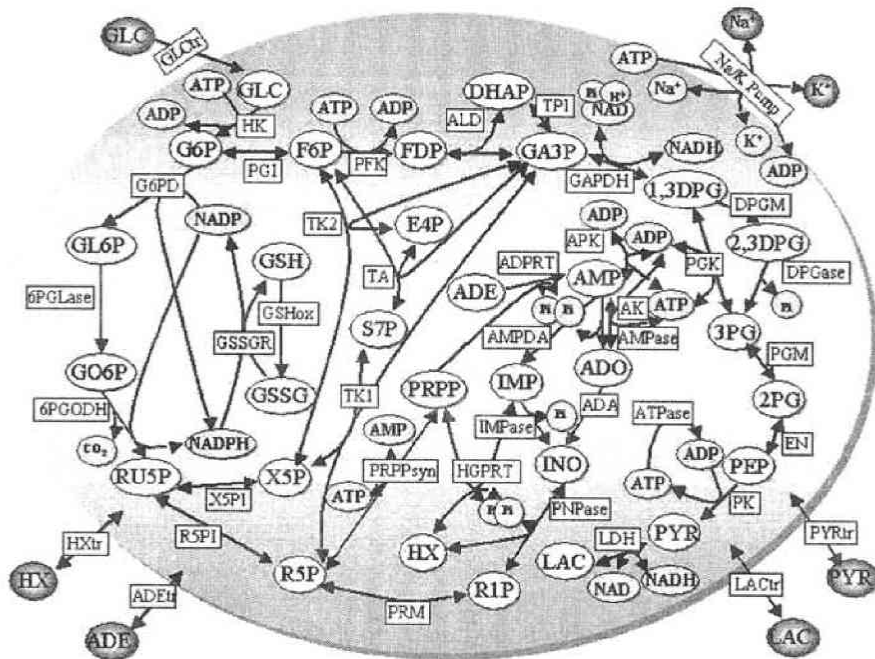


図 2.1: E-CELL ヒト赤血球主経路モデルの経路図

2.1.1 解糖系

哺乳類の赤血球はエネルギーの大部分をグルコースの解糖によって得る。グルコースがヘキソキナーゼ (HK) によって G6P になると、約 8 割の流量が解糖系に流れる。また、赤血球特異的に解糖系の中程 1,3DPG からリン酸基を取って 3PG を生成する迂回経路が存在している。2,3DPG shunt と呼ばれ、1,3DPG がリン酸基転移をして 2,3DPG となり、さらに脱リン酸が起こって 3PG となる。ヘモグロビンに 2,3DPG が結合すると酸素飽和度が低くなることが知られており、2,3DPG 量を巧みに調節している経路であると考えられている。

| 解糖系 (glycolysis) | 反応 |
|------------------|---------------------------------|
| HK | GLC + MgATP → G6P + MgADP |
| PGI | G6P ⇌ FDP |
| PFK | F6P MgATP → FDP + MgADP |
| ALD | FDP ⇌ DHAP + GA3P |
| TPI | DHAP ⇌ GA3P |
| GAPDH | GA3P + NAD + Pi ⇌ 1,3DPG + NADH |
| PGK | 1,3DPG + MgADP ⇌ 3PG + MgATP |
| PGM | 3PG ⇌ 2PG |
| DPGM | 1,3DPG → 2,3DPG |
| DPGase | 2,3DPG → 3PG + Pi |
| EN | 2PG ⇌ PEP(+Mg) |
| PK | PEP → PYR |
| LDH | PYR ⇌ LAC |

表 2.1: E-CELL ヒト赤血球主経路モデル：解糖系

HK

$$v = \frac{e_t \left(\frac{k_{catf} ab}{K_{iB} K_{mA}} - \frac{k_{catr} pq}{K_{iQ} K_{mP}} \right)}{1 + \frac{a}{K_{iA}} + \frac{b}{K_{iB}} + \frac{ab}{K_{iB} K_{mA}} + \frac{p}{K_{iP}} + \frac{q}{K_{iQ}} + \frac{pq}{K_{iQ} K_{mP}} + \sum_{j=1}^4 \frac{z_j b}{K'_{i,j} K_{iB}}$$

| Symbol | Metabolite |
|--------|------------|
| a | MgATP |
| b | GLC |
| p | G6P |
| q | MgADP |

| Parameter | Value ([116]) |
|------------------|----------------------|
| KmMgATP, KiMgATP | 1.0 mM |
| KmGLC, KiGLC | 47 μM |
| KmG6P, KiG6P | 47 μM |
| KmMgADP, KiMgADP | 1.0 mM |
| Ki2,3DPG | 4.0mM |
| KiGDP | 30 μM |
| KiGDP | 10 μM |
| KiGSH | 3.0 mM |
| kcatf | 180 s ⁻¹ |
| kcatr | 1.16 s ⁻¹ |
| kcatr | 1.16 s ⁻¹ |
| e _t | 24 nM |

PGI,TPI

$$v = \frac{e_t \left(\frac{k_{catf} a}{K_{mA}} - \frac{k_{catr} p}{K_{mP}} \right)}{1 + \frac{a}{K_{mA}} + \frac{p}{K_{mP}}}$$

| Symbol | PGI | TPI |
|--------|-----|------|
| a | G6P | DHAP |
| p | F6P | GA3P |

| Parameter | PGI ([116]) | TPI([116]) |
|-----------|----------------------|-----------------------|
| KmA | 181 μM | 162.4 μM |
| KmP | 71 μM | 446 μM |
| kcatf | 1470 s^{-1} | 14560 s^{-1} |
| kcatr | 1760 s^{-1} | 1280 s^{-1} |
| e_t | 218nM | 1.14 μM |

PFK,PK

PFK、PK についてはアロステリック分子の結合の有無によって T-State と R-State の 2 つの状態をとる、two-state symmetry model として表現されている。

$$\rho = \frac{1}{1+L}$$

$$L_{PFK} = \frac{\left(\frac{h}{K_a}\right)^n \left(1 + \frac{atp}{K_{TATP}}\right)^4 \left(1 + \frac{Mg}{K_{TMg^{2+}}}\right) \left(1 + \frac{2,3DPG}{K_{T2,3DPG}}\right)^4}{\left(1 + \frac{F6P}{K_{mRF6P}} + \frac{FDP}{K_{mRFDP}}\right)^4 \left(1 + \frac{AMP}{K_{RAMP}}\right)^4 \left(1 + \frac{Pi}{K_{RPi}}\right)^4 \left(1 + \frac{GDP}{K_{RGDP}}\right)^4}$$

$$L_{PK} = \frac{\left(\frac{h}{K_a}\right)^n \left(1 + \frac{ATP}{K_{TATP}}\right)^4}{\left(1 + \frac{PEP}{K_{mRPEP}} + \frac{PYR}{K_{mRPYR}}\right)^4 \left(1 + \frac{FDP}{K_{RFDP}} + \frac{GDP}{K_{RGDP}}\right)^4}$$

$$v = \frac{e_t \left(\frac{k_{catf}ab}{K_{mRA}K_{mRB}} - \frac{k_{catr}pq}{K_{mRP}K_{mRQ}}\right)}{1 + \frac{a}{K_{mRA}} + \frac{b}{K_{mRB}} + \frac{ab}{K_{mRA}K_{mRB}} + \frac{p}{K_{mRP}} + \frac{q}{K_{mRQ}} + \frac{pq}{K_{mRP}K_{mRQ}}} \times \rho$$

| Parameter | PFK ([116]) |
|--------------|---------------------|
| KmF6P | 75 μM |
| KmMgATP(R,T) | 68 μM |
| KmFDP(R) | 500 μM |
| KmMgADP(R,T) | 540 μM |
| KtATP | 100 μM |
| Kt2,3DPG | 5.0 mM |
| KtMg | 4.0 mM |
| KrAMP | 300 μM |
| KrPi | 30 mM |
| KrGDP | 10nM |
| kcatf | 822 s^{-1} |
| kcatr | 36 s^{-1} |
| Ka | 0.00086741 |
| n | 5 |
| e_t | 56.3 nM (※) |

$$K_a(\text{PFK}) = e^{-pK_a},$$

$pK_a = 7.05$ より算出した。

(※)PFK の酵素濃度については、[116] による報告は $1.2 \times 10^7 \text{M}$ であったが、実験条件が pH 7.6 であること、生体内の酵素量としては多すぎることから、今回新たに文献調査を行った。酵素活性から計算を行った結果、56.3nM という値が得られた ([8])。

| Parameter | PK ([116]) |
|--------------|----------------------|
| KmPEP | 225 μM |
| KmMgADP(R,T) | 474 μM |
| KmPYR(R) | 2 mM |
| KmMgATP(R,T) | 3 mM |
| KtATP | 3390 μM |
| KrFDP | 5 μM |
| KrGDP | 100 μM |
| kcatf | 1386 s^{-1} |
| kcatr | 3.26 s^{-1} |
| Ka | 0.001113775149 |
| n | 1 nM |
| e_t | 87 nM |

$$K_a(\text{PK}) = e^{-pK_a}, pK_a = 6.8 \text{ より算出した。}$$

| Symbol | PFK | PK |
|--------|-------|-------|
| a | MgATP | MgADP |
| b | F6P | PEP |
| p | FDP | PYR |
| q | MgADP | MgATP |

ALD

$$v = \frac{e_t \left(\frac{k_{catf} a}{K_{mA}} - \frac{k_{catr} pq}{K_{iQ} K_{mP}} \right)}{1 + \frac{i}{K_{iI}} + \frac{a}{K_{mA}} + \frac{K_{mQ} p}{K_{mP} K_{iQ}} + \left(1 + \frac{i}{K_{iI}}\right) + \frac{q}{K_{iQ}} + \frac{K_{mQ} a p}{K_{iA} K_{mP} K_{iQ}} + \frac{pq}{K_{iQ} K_{mP}}}$$

| Symbol | Metabolite |
|--------|------------|
| a | FDP |
| p | GA3P |
| q | DHAP |
| i | 2,3DPG |

| Parameter | Value ([116]) |
|----------------|---------------------|
| KmA | 7.1 μM |
| KiA | 19.8 μM |
| KmP | 189 μM |
| KmQ | 35 μM |
| KiQ | 11 μM |
| KiI | 1.5 mM |
| kcatf | 68 s^{-1} |
| kcatr | 234 s^{-1} |
| e _t | 37 nM |

GAPDH

$$v = \frac{e_t \left(\frac{k_{catf} abc}{K_{mA} K_{iB} K_{iC}} - \frac{k_{catr} pgh}{K_{iP} K_{mQ}} \right)}{GAPDH_{rd}}$$

$$GAPDH_{rd} = \frac{c}{K_{iC}} \left(1 + \frac{c}{K'_{iC}}\right) + \frac{p}{K_{iP}} \left(1 + \frac{c}{K'_{iC}}\right) + \frac{K_{mP} qh}{K_{iP} K_{mQ}} + \frac{K_{mC} ab}{K_{mA} K_{iB} K_{iC}} + \frac{ac}{K_{iA} K_{iC}} + \frac{bc}{K_{iB} K_{iC}} \left(1 + \frac{c}{K'_{iC}}\right) + \frac{ap}{K_{iA} K_{iP}} + \frac{K_{mP} bqh}{K_{iB} K_{iP} K_{mQ}} + \frac{cqh}{K_{iC} K_{iQ}} + \frac{pgh}{K_{iP} K_{mQ}} + \frac{abc}{K_{mA} K_{iB} K_{iC}} + \frac{K_{mC} abp}{K_{iC} K_{mA} K_{iB} K'_{iP}} + \frac{bcqh}{K_{iB} K_{iC} K_{iQ}} + \frac{K_{mP} b p q h}{K_{iP} K_{mQ} K_{iB} K'_{iP}}$$

| Symbol | Metabolite |
|--------|----------------|
| a | NAD |
| b | Pi |
| c | GA3P |
| p | 1,3DPG |
| q | NADH |
| h | H ⁺ |

| Parameter | Value ([116]) |
|----------------|--------------------------|
| KmA, KiA | 45 μM |
| KmB, KiB | 3160 μM |
| KmC | 95 μM |
| KiCa | 0.06 μM (※) |
| KiCb | 31 μM |
| KmQ | 3.3 μM |
| KiQ | 10 μM |
| KiP | 0.09 μM (※※) |
| KdP | 1 μM |
| kcatf | 232 s^{-1} |
| kcatr | 2765 s^{-1} (※) |
| e _t | 7.66 μM |

(※)[116] で予測されたパラメータと実測値が大きく異なるため、ここでは実測値を採用した。

(※※) 実測値を示した先行研究はない。ここでは、最も酵素の挙動が安定すると思われた値を予測値として用いた。

PGK

$$v = \frac{e_t \left(\frac{k_{catf}ab}{K_{mA}K_{iB}} - \frac{k_{catr}pq}{K_{iQ}K_{mP}} \right)}{1 + \frac{a}{K_{iA}} + \frac{b}{K_{iB}} + \frac{ab}{K_{iB}K_{mA}} + \frac{p}{K_{iP}} + \frac{q}{K_{iQ}} + \frac{pq}{K_{iQ}K_{mP}}}$$

| Symbol | Metabolite |
|--------|------------|
| a | 1,3DPG |
| b | MgADP |
| p | 3PG |
| q | MgATP |

| Parameter | Value ([116]) |
|----------------|----------------------|
| KmB | 100 μ M |
| KiB | 80 μ M |
| KmA | 2 μ M |
| KiA | 1600 μ M |
| KmQ | 1000 μ M |
| KiQ | 1870 μ M(※) |
| KmP | 1100 μ M |
| KiP | 205 μ M |
| kcatf | 2290 s ⁻¹ |
| kcatr | 917 s ⁻¹ |
| e _t | 2.74 μ M |

(※) 文献でのシミュレーションによる予測値は KiQ=186 μ M であるが、ここでは実験値である 1870 μ M を採用した。

EN

$$v = \frac{e_t \left(\frac{k_{catf}ab}{K_{mA}K_{iB}} - \frac{k_{catr}pq}{K_{iQ}K_{mP}} \right)}{1 + \frac{a}{K_{iA}} + \frac{b}{K_{iB}} + \frac{ab}{K_{iB}K_{mA}} + \frac{q}{K_{iQ}} + \frac{pq}{K_{iQ}K_{mP}}}$$

| Symbol | Metabolite |
|--------|------------------|
| a | 2PG |
| b | Mg ²⁻ |
| p | Mg ²⁻ |
| q | PEP |

| Parameter | Value ([116]) |
|---|---------------------|
| Km2PG, Ki2PG | 140 μ M |
| KmPEP, KiPEP | 310 μ M(※) |
| KmMg ²⁺ , KiMg ²⁺ | 460 μ M(※) |
| kcatf | 190 s ⁻¹ |
| kcatr | 50 s ⁻¹ |
| e _t | 0.22 μ M |

(※) シミュレーションによる予測値と実験値が大きく異なるため、ここでは実験値を採用している。

LDH

$$v = \frac{e_t \left(\frac{k_{catf}ab}{K_{iA}K_{mB}} - \frac{k_{catr}pq}{K_{iQ}K_{mP}} \right)}{LDHrd}$$

$$LDHrd = \left(1 + \frac{K_{mA}b}{K_{iA}K_{mB}} + \frac{K_{mQP}}{K_{mP}K_{iQ}} \right) \left(1 + \frac{b}{K'_{iB}} \right) + \frac{a}{K_{iA}} + \frac{q}{K_{iQ}} + \frac{ab}{K_{iA}K_{mB}} +$$

$$\frac{K_{mQap}}{K_{iA}K_{mP}K_{iQ}} + \frac{K_{mAbq}}{K_{iA}K_{mB}K_{iQ}} + \frac{pq}{K_{iQ}K_{mP}} + \frac{abp}{K_{iA}K_{mB}K_{iP}} + \frac{bpq}{K_{iB}K_{mP}K_{iQ}}$$

| Symbol | Metabolite |
|--------|------------------|
| a | NADH |
| b | PYR |
| p | NAD ⁺ |
| q | LAC |

| Parameter | Value ([116]) |
|----------------|---------------------|
| KmA | 8.44 μM |
| KiA | 2.45 μM |
| KmB | 137 μM |
| KiB | 228 μM |
| KiBb | 101 μM |
| KmP | 107 μM |
| KiP | 503 μM |
| KmQ | 1070 μM |
| KiQ | 7330 μM |
| kcatf | 458 s^{-1} |
| kcatr | 115 s^{-1} |
| e _t | 3.43 μM |

2,3DPGshunt(DPGM,DPGase), PGM ([115])

赤血球には解糖系の途中、1,3DPG から 3PG の間に 2,3DPGshunt と呼ばれる迂回経路を持つ。PGM の反応は活性部位に結合したリン酸基が 3PG に移って、ビスホスホ型中間体を形成する。この中間体から酵素に、元の基質に結合していた別のリン酸基が転移すると生成物である 2PG となる。一見同一分子内でのリン酸基転移に見えるが、実際は分子間転移によって起こっている反応である。この反応の開始剤として 2,3DPG が必要であり、2,3DPG の存在下で PGM は活性型になる。実際には、反応開始に必要な量を遥かに超える 2,3DPG が赤血球には存在する。この濃度を維持しているのが 2,3DPGshunt である。これらの反応は、リン酸基のやり取りを通して密接に関わっている。このため、反応機構のスキームを同時に記述して反応速度式を導出する必要がある。

今回採用しているモデルは以下の式で表されている。

$$\begin{aligned} N1 &= k1k12(k15 + k16)k3k4(k10 + k7)k8 \\ N2 &= k1k10k12(k15 + k16)k3k6(k5 + k8) \\ N3 &= k1k14k16k3(k10(k12(k5 + k8) + k5k9) + k7(k11(k5 + k8) + k12(k5 + k8) + k5k9)) \\ N4 &= k13k14k16(k2 + k3)(k11k7(k5 + k8) + k5(k10 + k7)k9) \\ N5 &= k1k11(k15 + k16)k3k4k7k8 \\ N6 &= k1k10(k15 + k16)k3k6(k12(k5 + k8) + k5k9) \\ N7 &= k11k13k14k16(k2 + k3)k7(k5 + k8) \\ N8 &= k11k13(k15 + k16)(k2 + k3)k4k7k8 \\ N9 &= k10k13(k15 + k16)(k2 + k3)k5k6k9 \\ N11 &= k13k14k16(k2 + k3)k5(k10 + k7)k9 \\ D1 &= k1(k15 + k16)k3(k10(k12(k5 + k8) + k5k9) + k7(k11(k5 + k8) + k12(k5 + k8) + k5k9)) \\ D2 &= k12(k15 + k16)(k2k3)k4(k10k7)k8 \\ D3 &= k10k12(k15 + k16)(k2k3)k6(k5 + k8) \\ D4 &= k13(k15 + k16)(k2 + k3)(k11k7(k5 + k8) + k5(k10 + k7)k9) \\ D5 &= k14k16(k2 + k3)(k10(k12(k5 + k8) + k5k9) + k7(k11(k5 + k8) + k12(k5 + k8) + k5k9)) \\ D6 &= k1(k15 + k16)k4(k11k3(k7k8) + k10(k12(k3 + k8) + k3(k8 + k9)) + k7(k12(k3 + k8) + k3(k8 + k9))) \\ D7 &= k1(k15 + k16)k6(k3(k12k5 + k12k8 + k11(k5 + k8) + k5k9) + k10(k12(k5 + k8) + k3(k5 + k8 + k9))) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
D8 &= k1k14(k16 + k3)(k10(k12(k5 + k8) + k5k9) + k7(k11(k5 + k8) + k12(k5 + k8) + k5k9)) \\
D9 &= k13(k15 + k16)(k2 + k3)k4(k11(k7 + k8) + (k10 + k7)(k8 + k9)) \\
D10 &= k13(k15 + k16)(k2 + k3)k6(k11(k5 + k8) + k5k9 + k10(k5 + k8 + k9)) \\
D11 &= k13k14(k2 + k3)(k11(k16 + k7)(k5 + k8) + k10(k5k9 + k16(k5 + k8 + k9)) + k7(k5k9 + k16(k5 + k8 + k9)))
\end{aligned}$$

DPGM

$$v = \frac{e_r(N1[A][B] + N2[A][C] + N3[A][H])}{D1[A] + D2[B] + D3[C] + D4[D] + D5[H] + D6[A][B] + D7[A][C] + D8[A][H] + D9[B][D] + D10[C][D] + D11[D][H]}$$

DPGase

$$v = \frac{e_r(N3[A][H] + N7[D][H] + N11[D][H])}{D1[A] + D2[B] + D3[C] + D4[D] + D5[H] + D6[A][B] + D7[A][C] + D8[A][H] + D9[B][D] + D10[C][D] + D11[D][H]}$$

PGM

$$v = \frac{e_r(N5[A][B] + N6[A][C] + N7[D][H] + N8[B][D] + N9[C][D])}{D1[A] + D2[B] + D3[C] + D4[D] + D5[H] + D6[A][B] + D7[A][C] + D8[A][H] + D9[B][D] + D10[C][D] + D11[D][H]}$$

A,B,C,D,H はそれぞれ A:1,3DPG B:3PG C:2PG D:f2,3DPG H:Pi を示している。

| Parameter | DPGM,DPGase | PGM |
|-----------|-------------|------------|
| k1 | 80000000 | 1000000000 |
| k2 | 400 | 3100 |
| k3 | 9.9 | 1.1 |
| k4 | 185000000 | 1000000000 |
| k5 | 100000000 | 4200000 |
| k6 | 1000 | 1000000000 |
| k7 | 100000000 | 140000 |
| k8 | 10000 | 41000 |
| k9 | 0.55 | 880 |
| k10 | 1980 | 8000 |
| k11 | 0.01 | 880 |
| k12 | 1000 | 14 |
| k13 | 1800000 | 83000000 |
| k14 | 1000000000 | 1000000000 |
| k15 | 610000 | 3500000 |
| k16 | 0.19 | 0.00067 |

2.1.2 ペントースリン酸経路

G6P からの流束の残りの約 2 割は通常ペントースリン酸回路で消費される。ペントースリン酸回路では 2 分子の NADP を NADPH に還元する。この還元力を用いて 2 分子の酸化型グルタチオン (GSSG) を 1 分子の還元型グルタチオン (GSH) にしている。グルタチオンの働きについての詳細は後の章で言及するため本章では割愛する。ここでは、F6P や GA3P といった物質を通して解糖系につながっているペントースリン酸回路の他に、グルタチオン還元系、酸化系を併せて記載する。

(※)GSHox とは、GSH を還元反応に使用する反応をまとめて定義したものである。これらの反応の中には、ビタミン C と呼ばれるアスコルビン酸の還元反応やメトヘモグロビンの還元反応などが含まれる。

| ペントースリン酸経路 | 反応 |
|------------|---|
| G6PD | $G6P + NADP \rightarrow GL6P + NADPH$ |
| 6PGLase | $GL6P \rightarrow GO6P$ |
| 6PGODH | $GO6P + NADP \rightarrow RU5P + NADPH$ |
| X5PI | $RU5P \rightleftharpoons X5P$ |
| R5PI | $RU5P \rightleftharpoons R5P$ |
| TK1 | $X5P + R5P \rightleftharpoons X7P + GA3P$ |
| TK2 | $X5P + E4P \rightleftharpoons F6P + GA3P$ |
| TA | $GA3P + S7P \rightleftharpoons E4P + F6P$ |
| グルタチオン還元系 | 反応 |
| GSSGR | $2GSSG + NADPH \rightleftharpoons GSH + NADP$ |
| GSHox(※) | $GSH \rightarrow 2GSSG$ |

表 2.2: E-CELL ヒト赤血球主経路モデル：ペントースリン酸回路

G6PD

$$v = \frac{V_{max} \frac{[NADP^+][G6P]}{K_{NADP}K_{G6P}}}{1 + \frac{[NADP^+]}{K_{NADP}} \left(1 + \frac{[G6P]}{K_{G6P}}\right) + \frac{[NADPH]}{K_{NADPH}} + \frac{[ATP]}{K_{ATP}} + \frac{2,3DPG}{K_{2,3DPG}}}$$

| Parameter | Value ([70]) |
|-----------|-----------------|
| KmG6P | 67 μ M |
| KmNADP | 3.7 μ M |
| KiNADPH | 3.1 μ M |
| KiATP | 749 μ M |
| Ki2,3DPG | 2289 μ M |
| Vmax | 575 μ katal |

6PGODH

$$v = \frac{e_i(N_1ab - N_2PQ)}{D_1 + D_2a + D_3b + D_4p + D_5q + D_6ab + D_7ap + D_8bq + D_9pq + D_{10}abp + D_{11}bpq}$$

| | | |
|--|-----------|-------------|
| $N_1 = k1k3k5k7k9$ | Parameter | value [60] |
| $N_2 = k2k4k6k8k10$ | e_t | $2.1 \mu M$ |
| $D_1 = k2k9(k4k6 + k5k6 + k5k7)$ | k1 | 1200000 |
| $D_2 = k1k9(k4k6 + k5k6 + k5k7)$ | k2 | 410 |
| $D_3 = k3k5k7k9$ | k3 | 1000000000 |
| $D_4 = k2k4k6k8$ | k4 | 26000 |
| $D_5 = k2k10(k4k6 + k5k6 + k5k7)$ | k5 | 48 |
| $D_6 = k1k3(k5k7 + k5k9 + k6k9 + k7k9)$ | k6 | 30 |
| $D_7 = k1k4k6k8$ | k7 | 630 |
| $D_8 = k3k5k7k10$ | k8 | 36000 |
| $D_9 = k8k10(k2k4 + k2k5 + k2k6 + k4k6)$ | k9 | 800 |
| $D_{10} = k1k3k8(k5 + k6)$ | k10 | 450000 |
| $D_{11} = k3k8k10(k5 + k6)$ | k11 | 300 |
| | k12 | 9900000 |

GSSGR

$$v = \frac{e_t(N_1ab - N_2P^2Q)}{GSSGRrd}$$

$$GSSGRd = D_1 + D_2a + D_3b + D_4p + D_5q + D_6ab + D_7ap + D_8bq + D_9p^2 + (D_{10} + D_{11})pq + (D_{12} + D_{13})abp + D_{14}ap^2 + D_{15}bpq + D_{16}p^2q + D_{17}abp^2 + D_{18}bp^2q$$

| | | |
|--|-----------|---------------|
| $N_1 = k1k3k5k7k9k11$ | Parameter | value [60] |
| $N_2 = k2k4k6k8k10k12$ | e_t | $0.125 \mu M$ |
| $D_1 = k2k9k11(k4k6 + k4k7 + k5k7)$ | k1 | 85000000 |
| $D_2 = k1k9k11(k4k6 + k4k7 + k5k7)$ | k2 | 510 |
| $D_3 = k3k5k7k9k11$ | k3 | 100000000 |
| $D_4 = k2k4k6k8k11$ | k4 | 7200 |
| $D_5 = k2k9k12(k4k6 + k4k7 + k5k7)$ | k5 | 810 |
| $D_6 = k1k3(k5k9k11 + k6k9k11 + k7k9k11 + k5k7k9 + k5k7k11)$ | k6 | 1000 |
| $D_7 = k1k4k6k8k11$ | k7 | 1000000 |
| $D_8 = k3k5k7k9k12$ | k8 | 50000000 |
| $D_9 = k2k4k6k8k10$ | k9 | 1000000 |
| $D_{10} = k2k4k6k8k12$ | k10 | 50000000 |
| $D_{11} = k2k10k12(k4k6 + k4k7 + k5k7)$ | k11 | 7000 |
| $D_{12} = k1k3k8k11(k5 + k6)$ | k12 | 100000000 |
| $D_{13} = k1k3k5k7k10$ | | |
| $D_{14} = k1k4k6k8k10$ | | |
| $D_{15} = k3k5k7k10k12$ | | |
| $D_{16} = k8k10k12(k2k4 + k2k5 + k2k6 + k4k6)$ | | |
| $D_{17} = k1k3k8k10(k5 + k6)$ | | |
| $D_{18} = k3k8k10k12(k5 + k6)$ | | |

TK1,TK2,TA

$$v = \frac{e_t(N_1ab - N_2PQ)}{D_1a + D_2b + D_3p + D_4q + D_5ab + D_6pq + D_7bq + D_8ap}$$

$$\begin{aligned} N_1 &= k_1k_3k_5k_7 \\ N_2 &= k_2k_4k_6k_8 \\ D_1 &= k_1k_3(k_6 + k_7) \\ D_2 &= k_5k_7(k_2 + k_3) \\ D_3 &= k_2k_4(k_6 + k_7) \\ D_4 &= k_6k_8(k_2 + k_3) \\ D_5 &= k_1k_5(k_3 + k_7) \\ D_6 &= k_4k_8(k_2 + k_6) \\ D_7 &= k_5k_8(k_2 + k_3) \\ D_8 &= k_1k_4(k_6 + k_7) \end{aligned}$$

| Parameter | TK1 [60] | TK2 [60] | TA [60] |
|----------------|----------|----------|---------|
| k1 | 216000 | 216000 | 580000 |
| k2 | 38 | 38 | 45.3 |
| k3 | 34 | 34 | 16.3 |
| k4 | 156000 | 156000 | 1010000 |
| k5 | 329000 | 2240000 | 490000 |
| k6 | 175 | 175 | 60 |
| k7 | 40 | 40 | 17 |
| k8 | 44800 | 21300 | 79000 |
| e _t | 0.33 μM | 0.33 μM | 0.33 μM |

R5PI,X5PI

反応様式は解糖系の PGI,TPI と同じであるので、そちらを参照されたい。

| Symbol | R5PI | X5PI | Parameter | R5PI [60] | X5PI [60] |
|--------|------|------|----------------|----------------------|---------------------|
| a | R5P | RU5P | KmA | 2.2 mM | 0.19 mM |
| p | RU5P | X5P | KmP | 0.78 mM | 0.50 mM |
| | | | kcatf | 33.3 s ⁻¹ | 305 s ⁻¹ |
| | | | kcatr | 14.2 s ⁻¹ | 438 s ⁻¹ |
| | | | e _t | 4.2185 μM | 14.195 μM |

2.1.3 プリンサルベージ系

哺乳類の成熟赤血球は無核であるが、一部の核酸代謝経路は比較的活発に動いていることが知られている。ATP や ADP などの量を維持または調節するように働いている可能性もある。R5P を介してペントースリン酸回路とつながっており、AMP は PFK など解糖系酵素の強力なアロステリック阻害分子となるなど、本経路の活性が全体の代謝流量調節に強く関わっている。

ここでは、速度式表現している反応以外での ATP 消費をまとめて定義した ATPase や 2 分子の ADP と AMP+ATP のを触媒する APK などを含めてプリン salvate 系としている。

PRM, ADA, AMPDA

$$v = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]}$$

| プリンサルベージ系 | 反応 |
|-----------|---|
| PRM | $R5P \rightleftharpoons R1P$ |
| PRPPsyn | $R5P + MgATP \rightleftharpoons PRPP + MgAMP$ |
| ADPRT | $ADP + PRPP \rightleftharpoons AMP + 2Pi$ |
| AMPDA | $AMP \rightarrow IMP$ |
| AMPase | $AMP \rightarrow ADO + Pi$ |
| AK | $AMP + MgADP \rightleftharpoons ADO + MgATP$ |
| APK | $ADP + MgADP \rightleftharpoons AMP + MgATP$ |
| ADA | $ADO \rightarrow INO$ |
| PNPase | $INO + Pi \rightleftharpoons Hx + R1P$ |
| IMPase | $IMP \rightarrow INO + Pi$ |
| ATPase | $MgATP \rightarrow MgADP + Pi$ |
| HGPRT | $PRPP + HX \rightleftharpoons IMP + 2Pi$ |

表 2.3: E-CELL ヒト赤血球主経路モデル: プリンサルベージ系

| Parameter | PRM([33] ※) | ADA [95] | AMPDA [95] |
|-----------|-------------|----------|------------|
| Km(mM) | 0.063 | 0.052 | 0.8 |
| Vm(mM/h) | 0.283 | 20 | 0.01 |

(※) ラットの肝臓から精製した酵素を用いた実験による。keat = 17s⁻¹ より。酵素量が得られなかったため、暫定的に 16.6nM とおいて計算した。

PRPPsyn

$$v = \frac{V_m \frac{V_m}{K_v} ([R5P][ATP] - \frac{PRPP[AMP]}{K_{eq}})}{\frac{V_m}{K_v} K_{R5P}[ATP] + \frac{V_m}{K_v} K_{ATP}[R5P] + \frac{V_m K_{AMP}[PRPP]}{K_{eq}} + \frac{V_m K_{PRPP}[AMP]}{K_{eq}} + \frac{V_m}{K_v} [R5P][ATP] + V_m [PRPP]}$$

| Parameter | value [95] |
|------------|------------|
| K_{ATP} | 0.17mM |
| K_{R5P} | 0.65 mM |
| K_{eq} | 28.6 |
| K_v | 7.5 mM |
| K_{PRPP} | 0.09 mM |
| K_{AMP} | 0.275 mM |
| V_m | 0.554 mM/h |

ADPRT

$$v = \frac{V_m [A][B]}{K_m A [A][B] + K_m B [A] + [A][B]} \text{ (PingPongBiBi)}$$

| Parameter | value [100](※) |
|-----------|----------------|
| KmA | 0.0023mM |
| KmB | 0.0195mM |
| Vm | 0.078mM/h |

(※)[100] は酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) から精製した酵素を用いた実験であるが、ヒトと酵母の本酵素が非常に似ているという報告から、このデータを用いることにした。

HGPRT

([107] から式を導出)

$$v = \frac{e_t(N1[A][B]-N2[P][Q])}{HGPRTrd}$$

$$HGPRTrd = k5kd1D1 + [A]k1k5D1 + [B]\frac{N1}{k1} + [P]\frac{N2}{kd5} + [Q]kd1kd5D1 + [A][B]k1k2D2 + [P][Q]kd4kd5D3 + [A][P]k1kd2kd3kd4 + [B][Q]k2k3k4kd5 + [A][B][P]k1k2kd4(k3+kd3) + [B][P][Q]k2kd4kd5(k3+kd3)(OrderedBiBi)$$

$$N1 = k1k2k3k4k5$$

$$N2 = kd1kd2kd3kd4kd5$$

$$D1 = k3k4 + k4kd2 + kd2kd3$$

$$D2 = k3k4 + k3k5 + k4k5 + k5kd3$$

$$D3 = k3kd1 + kd1kd2 + kd1kd3 + kd2kd3$$

| Parameter | value [107] |
|----------------|-------------|
| k1 | 200000 |
| k2 | 19000000 |
| k3 | 131 |
| k4 | 12 |
| k5 | 6 |
| kd1 | 0.24 |
| kd2 | 9.5 |
| kd3 | 9 |
| kd4 | 9000000(※) |
| kd5 | 90000 |
| e _t | 4.24pM (※※) |

(※)>90000

(※※)Vmax=14nmol/h/mgHb [139], kcat = 131/sec [107] から算出した。

AMPase, IMPase, ATPase

$$v = k[S] \text{ (MassAction)}$$

| Parameter | AMPase[95] | IMPase[95] | ATPase[95] |
|-----------|------------|------------|------------|
| k(/h) | 1.58 | 0.09 | 0.356 |

APK

$$v = \frac{e_t(kcatf \frac{[ADP]}{K_mADP} \frac{[MgADP]}{K_mMgADP} - kcatr \frac{[AMP]}{K_mAMP} \frac{[MgATP]}{K_mMgATP})}{1 + \frac{[ADP]}{K_mADP} + \frac{[MgADP]}{K_mMgADP} + \frac{[ADP]}{K_mADP} \frac{[MgADP]}{K_mMgADP} + \frac{[AMP]}{K_mAMP} + \frac{[MgATP]}{K_mMgATP} + \frac{[AMP]}{K_mAMP} \frac{[MgATP]}{K_mMgATP}}$$

| Parameter | Value [116](※) |
|----------------|----------------------|
| KmADP | 0.01 mM |
| KmMgADP | 0.3 mM |
| KmAMP | 0.11 mM |
| KmMgATP | 0.067 mM |
| kcatf | 2060 s ⁻¹ |
| kcatr | 3800 s ⁻¹ |
| e _t | 0.97 μM |

(※) 論文中の予測値ではなく、実験による値を採用している。

AK

$$v = \frac{V_m[A][B]}{K_iAK_mB + K_mA[B] + K_mB[A] + [A][B]} \text{ (OrderedBiBi)}$$

| Parameter | Value [52][87] |
|-----------|----------------|
| KiA | 0.54 μM |
| KmA | 0.16 μM |
| KmB | 27 μM |
| Vm | 2.19 pmol/min |

PNPase

[86] より導出。

$$v = \frac{e_t(k_1k_2k_3[A][B] - kd_1kd_2kd_3[P][Q])}{kd_1k_3 + k_1k_3[A] + k_2k_3[B] + kd_1kd_2[P] + kd_1kd_3[Q] + k_1k_2[A][B] + k_1kd_2[A][P] + k_2kd_3[B][Q] + kd_2kd_3[P][Q]} \text{ (TheorellChanceBiBi)}$$

| Parameter | value |
|----------------|----------|
| k1 | 587000 |
| k2 | 2240 |
| k3 | 29.33 |
| kd1 | 23.9 |
| kd2 | 105000 |
| kd3 | 613000 |
| e _t | 14.89 μM |

2.1.4 膜輸送、ポンプ

一部の核酸代謝系が残存して動いていることは先に述べたが、それらの材料となる物質の一部は膜輸送によって補われている。アデニン (ADE)、イノシン (INO)、アデノシン (ADO)、ヒポキサンチン (HX) などがそれにあたる。

| 膜輸送、ポンプ | 反応 |
|----------|---|
| ADEtr | $ADE \rightleftharpoons ADEc$ |
| INOtr | $INO \rightleftharpoons INOc$ |
| ADOtr | $ADO \rightleftharpoons ADOc$ |
| HXtr | $Hxi \rightleftharpoons Hxc$ |
| PYRtr | $PYR \rightleftharpoons PYRc$ |
| LACtr | $LAC \rightleftharpoons LACc$ |
| Pitr | $Pi \rightleftharpoons Pic$ |
| NaK pump | $3Na_i + 2K_c + MgATP \rightleftharpoons 3Na_c + 2K_i + MgADP + Pi$ |
| Na Leak | $Na_i \rightleftharpoons Na_c$ |
| K Leak | $K_i \rightleftharpoons K_c$ |

表 2.4: E-CELL ヒト赤血球主経路モデル：膜輸送、ポンプ

解糖系の生成物である LAC は常に細胞外に排出されており、PYR の輸送系も存在している。同様に解糖系代謝物質である PEP も極少量ながら輸送が行われていることがわかっているが ([53][54] [81])、輸送の最大速度が非常に遅いことから今回のモデルには実装されていない。しかし PEP の輸送は、Band3 の動態や解糖系の速度に深く関わっているという報告もあり ([34][38][39])、非常に興味深い。

また、赤血球が解糖によって作り出したエネルギー (ATP) を消費する主な反応にナトリウム/カリウム イオン交換ポンプがある。一般に細胞外ナトリウム濃度は高く、細胞内ではカリウム濃度が高く保たれている。ナトリウムが細胞内に侵入すると細胞内浸透圧が高まり、細胞が膨張してしまう。これを防ぐために ATP のエネルギーを使ってカリウムイオンを細胞外から積極的に取り込んで、ナトリウムイオンを排出するのがこのポンプの役割である。カリウムとナトリウムは 2:3 の割合で交換される。

濃度勾配による受動的なナトリウムイオンの侵入、カリウムイオンの排出を リーク (Leak) として表現している。

ピルビン酸 (PYR)、乳酸 (LAC)、リン酸 (Phosphate) 輸送

$$v = k_0[Xin] - k_1[Xex]$$

| Parameter | PYR | LAC | Phosphate |
|---------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| $k_0(\times)$ | 0.0261 s^{-1} | 0.00733 s^{-1} | 0.000606 s^{-1} |
| $k_1([116])$ | 0.018 s^{-1} | 0.00506 s^{-1} | 0.00056 s^{-1} |
| Keq | 0.69 | 0.69 | 0.924 |

※ k0 の値は、以下の式を元に算出した Keq から $k_0 = k_1 / Keq$ として計算した。

$$Keq = 1 + \frac{10^{pHi - pKa}}{1} + 10^{pHi - r \cdot pKa}$$

ここで、r はドナン平衡定数、pHi は細胞内 pH を指す。
 計算過程では、pHi=7.2、Donnan ratio(r)=0.69、pKa(PYR)= 2.39、pKa(LAC)= 0.00506、
 pKa(Pi)=6.75(ヘマトクリット値 (Hct)=0.5 として算出) をそれぞれ代入して求めた。

Nucleotide(イノシン、アデノシン、アデニン) 輸送

$$v = Vm \left(\frac{[Xin]}{Km + [Xin]} \right) - \left(\frac{[Xex]}{Km + [Xex]} \right)$$

| Parameter | INO [64] | ADO [64] | ADE [64] |
|-----------|------------------------|------------------------|----------------------|
| Km | 0.12 mM | 0.12 mM | 2.6 mM |
| Vm | 61.2 mMs ⁻¹ | 61.2 mMs ⁻¹ | 90 mMs ⁻¹ |

ナトリウム/カリウムポンプ

$$v = \frac{\left(\frac{[ATP]}{[ATP] + Km} \right) \left(\frac{Vm}{2} \right) \left([Ke]^2 + \frac{B2[Ke]z}{2} \right)}{B1B2 + 2B2[Ke] + [Ke]^2 + \left(\frac{B3}{Na1} + 1 \right)^3 (B1B2k2k1 + k3k1([Ke]^2) + B2[Ke]z)}$$

| Parameter | Value [64] |
|-----------|------------------------|
| B1 | 0.0617mM |
| B2 | 0.1328 mM |
| B3 | 6.2672 mM |
| k2k1 | 0.0082 |
| k3k1 | 0.0501 |
| z | 0.7114 |
| Km | 0.764 mM |
| Vm | 2.32 mMs ⁻¹ |

イオンリーク (Leak)

$$v = \frac{Kxz \log(r)([X_{ex}] - r[X_{in}])}{r-1} + Vm \left(\frac{[X_{ex}]}{(K_m + [X_{ex}]) - r \frac{[X_{in}]}{(K_m + r[X_{in}]})} \right)$$

| Parameter | Na Leak [64] | K Leak [64] |
|-----------|-------------------------|-------------------------|
| Kx | 0.00706 s ⁻¹ | 0.00635 s ⁻¹ |
| z | 1 | 1 |
| r | 0.62 | 0.62 |
| Km | 21 mM | 4 mM |
| Vm | 2.82 mMs ⁻¹ | 3.12 mMs ⁻¹ |

2.2 代謝物質とマグネシウムイオン、ヘモグロビンとの複合体

次に、マグネシウムイオン (Mg²⁺) といくつかの代謝物質が細胞内で複合体を形成して存在していることに注目した。

ATP からリン酸基を転移する反応 (キナーゼ類と呼ばれる酵素) の基質として代謝に用いられるのは、遊離 (ここでは、fATP と書くことにする) して存在するものではなく、マグネシウムイオンを配位した、マグネシウムイオンとの複合体 (MgATP と書くことにする) であることがわかっている。マグネシウムイオンは分子の向きを決め、リン酸基の負電荷を静電的に遮へいすることで電子的に安定な状態にする ([158])。

ATP のリン酸基転移によって生じる ADP もまた、マグネシウムイオンとの複合体を形成する。しかし、ATP と比較してその結合定数は小さい。他にも、解糖系の代謝物質である FDP、1,3DPG や、解糖系の酵素活性を調節している GDP、更にヘモグロビン酸素飽和度の調節因子として重要な機能を果たす 2,3DPG がそれぞれマグネシウムイオンと 1:1 の複合体を形成する。これらの代謝物質は ATP や ADP とは違い、遊離の形で代謝反応の基質として用いられる。

先行研究 ([102],[120]) では、更に細胞内の pH 状態によるヘモグロビンとの結合状態の変化を考慮している。しかし、生体内では pH の変化はほとんど無視できる範囲であること、計算コストの面から、現在シミュレーションモデル上で pH の変化やそれに伴う代謝の変化を表現していないため、pH = 7.2 に固定して計算を行っている。

計算手法は Storer, Cornish-Bowden らによるマグネシウムイオン複合体の計算法 ([18]) を用いている。各代謝物質の総量は、それぞれの複合体に分配された後の合計で計算される。

また、赤血球中で非常に高濃度で存在するタンパクであるヘモグロビンは、非常に高い結合度でこれらの代謝物質と複合体を形成する。また、酸素飽和されたオキシヘモグロ

ピン (oxyhemoglobin) と酸素の結合していないデオキシヘモグロビン (deoxyhemoglobin) でその結合度に大きな違いがあることがわかっている。2,3DPG は特に デオキシヘモグロビン との結合度が非常に高く、低酸素状態では約 70%、通常でも約 40%がヘモグロビンとの複合体として存在している可能性がシミュレーションによる先行研究から示唆されている。

解糖系の最初の酵素であるヘキソキナーゼ (HK) はマグネシウム複合体 ATP を基質とするにも関わらず、遊離の ATP ではむしろ阻害されることがわかっており、これらの知見を考慮した式で表現されている (前項参照)。このように、マグネシウムイオンやヘモグロビンとの複合体の形成が代謝活性や遊離代謝物質量の調節に強く影響を及ぼしている可能性がある。

代謝物質のマグネシウムイオン、ヘモグロビンとの結合定数は表の通りである。

温度、pH、カリウムイオン濃度 ($[K^+]$)、塩化物イオン濃度 ($[Cl^-]$) によってそれぞれの結合定数が変わるが、本モデルでは温度 37 度、pH = 7.2、 $[K^+] = 0.15M$ 、 $[Cl^-] = 0.15M$ で一定としている。

| Apparent association constant | Association reaction | $K^{app} (M^{-1})$ | Ref. |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------|-------|
| K_{MgATP} | $Mg + ATP$ | 2.6×10^4 | [102] |
| K_{MgADP} | $Mg + ADP$ | 2.3×10^3 | [102] |
| $K_{Mg2,3DPG}$ | $Mg + 2,3DPG$ | 6.7×10^2 | [102] |
| $K_{Mg1,3DPG}$ | $Mg + 1,3DPG$ | 1.9×10^2 | [102] |
| K_{MgFDP} | $Mg + FDP$ | 4.0×10^2 | [102] |
| K_{MgGDP} | $Mg + GDP$ | 4.0×10^2 | [102] |
| K_{MgPi} | $Mg + Pi$ | 3.4×10 | [102] |
| K_{MgAMP} | $Mg + AMP$ | 4.5×10 | [64] |
| $K_{oxyHbMgATP}$ | oxyhemoglobin + MgATP | 3.9×10 | [102] |
| $K_{oxyHbATP}$ | oxyhemoglobin + ATP | 3.6×10^2 | [102] |
| $K_{oxyHbADP}$ | oxyhemoglobin + ADP | 2.6×10^4 | [102] |
| $K_{oxyHb2,3DPG}$ | oxyhemoglobin + 2,3DPG | 2.5×10^2 | [102] |
| $K_{oxyHb1,3DPG}$ | oxyhemoglobin + 1,3DPG | 3.17×10^2 | [102] |
| $K_{oxyHbFDP}$ | oxyhemoglobin + FDP | negligible | [102] |
| $K_{oxyHbGDP}$ | oxyhemoglobin + GDP | negligible | [102] |
| $K_{deoxyHbMgATP}$ | deoxyhemoglobin + MgATP | 1.4×10^2 | [102] |
| $K_{deoxyHbATP}$ | deoxyhemoglobin + ATP | 2.6×10^3 | [102] |
| $K_{deoxyHbADP}$ | deoxyhemoglobin + ADP | 1.2×10^3 | [102] |
| $K_{deoxyHb2,3DPG}$ | deoxyhemoglobin + 2,3DPG | 5.0×10^3 | [102] |
| $K_{deoxyHb1,3DPG}$ | deoxyhemoglobin + 1,3DPG | 1.55×10^3 | [102] |
| $K_{deoxyHbFDP}$ | deoxyhemoglobin + FDP | 1.01×10^3 | [102] |
| $K_{deoxyHbGDP}$ | deoxyhemoglobin + GDP | 1.01×10^3 | [102] |

表 2.5: マグネシウムイオン、ヘモグロビンと代謝物質の結合定数

全てが酸素ヘモグロビン (oxyhemoglobin) の場合と、全てが還元ヘモグロビン (deoxy-

hemoglobin) の場合を検証した。一般に動脈と言われる部位ではシグモイド型のヘモグロビン酸素飽和曲線が示す酸素飽和度はほぼ 100% を示しており、大部分のヘモグロビンは酸素ヘモグロビンとして存在することになる。また逆に低酸素状態に一定時間赤血球をさらすとほぼ全てのヘモグロビンが還元ヘモグロビンとなる。

ヘモグロビン、マグネシウム、ATP、ADP、2,3DPG、FDP、GDP、AMP、Pi それぞれの総量が同じになるように物質濃度を設定してシミュレーションを行った。また、物質ごとに総量に対する複合体の割合を計算して考察した。表の結果は、有効数字 2 桁で示している。

| Ion/Complex | oxy-state[% total] | deoxy-state[% total] |
|-------------|-----------------------|-----------------------|
| Hb total | 7.0mM [100] | 7.0mM [100] |
| HbMgATP | 0.23mM [3.3] | 0.28mM [4] |
| HbATP | 0.20mM [2.85] | 0.27mM [3.8] |
| HbADP | 0.10mM [1.47] | 0.12mM [1.66] |
| Hb2,3DPG | 2.59mM [37.0] | 4.90mM [70.0] |
| Hb1,3DPG | 0.37 μ M [0.0053] | 0.45 μ M [0.0065] |
| HbFDP | 0 [0] | 1.40 μ M [0.02] |
| HbGDP | 0 [0] | 0.063mM [0.89] |
| fHb | 3.87mM [55.3] | 1.39mM [19.4] |

表 2.6: ヘモグロビンの状態とヘモグロビン-代謝物質複合体濃度の関係

高酸素状態 (oxy-state) と低酸素状態 (deoxy-state) を比較した結果、遊離の状態で存在するヘモグロビンが高酸素状態で半分以上であるのに対し、低酸素状態では 20% 以下と非常に少なくなっている。この原因は細胞内で濃度の高い 2,3DPG との結合が還元ヘモグロビンで非常に強く、ヘモグロビンの多くが deoxyhemoglobin-2,3DPG 複合体となることにあると考えられる。2,3DPG はヘモグロビンの酸素飽和度そのものに強いアロステリック作用を持つ物質として知られており、飽和曲線を右側にシフトさせる。つまり、ヘモグロビンが酸素をより離しやすい状態になり、生体内では抹消組織により多くの酸素を供給することが可能になる。

還元ヘモグロビンに 2,3DPG が多く結合することで、遊離の 2,3DPG を基質とする反応の活性が低下し、逆に生成物とする反応活性が上昇する。これによって 2,3DPG 濃度が一時的に上昇すると、益々飽和曲線は右側へシフトし、酸素を離しやすい状態になると考えられる。しかし酸素分圧が高い状態に細胞がおかれるとこの逆の反応が起こり、遊離の 2,3DPG 量が急激に増えることで 2,3DPG の代謝による消費が活発になり、より酸素を吸着しやすい状態になると考えられる。

表 2.6 の結果は、ヘモグロビンが代謝物質と複合体を形成することでヘモグロビン自身の性質を変化させ、より効果的に酸素の運搬を行っている可能性を示唆している。

次にマグネシウムイオンと代謝物質の複合体の関係を示す。結果から、赤血球細胞内に存在するマグネシウムイオンの約半分量が ATP と結合して存在していることが予測され

| Ion/Complex | oxy-state[% total] | deoxy-state[% total] |
|------------------------|--------------------|----------------------|
| total Mg ²⁺ | 3.0 mM | 3.0 mM |
| free Mg ²⁺ | 0.41mM [13.5] | 0.75 mM [24.7] |
| MgATP | 1.53mM [50.33] | 1.48mM [48.68] |
| HbMgATP | 0.23mM [7.6] | 0.28mM [9.26] |
| MgADP | 0.10mM [3.3] | 0.12mM [4.05] |
| Mg2,3DPG | 0.73mM [24.2] | 0.36mM [11.98] |
| Mg1,3DPG | 0.024μM [0.00078] | 0.031μM [0.0010] |
| MgFDP | 0.38μM [0.013] | 0.30μM [0.010] |
| MgGDP | 0.017mM [0.57] | 0.014mM [0.45] |
| MgPi | 13.7μM [0.45] | 24.8μM [0.82] |
| MgAMP | 0.47μM [0.016] | 0.85μM [0.028] |

表 2.7: マグネシウムイオン-代謝物質複合体濃度の関係

る。ヘモグロビンに結合している hemoglobin-MgATP 複合体を考慮すると約 58%にもなる。興味深いことに、ヘモグロビンとの複合体を合わせた ATP 複合体の合計は高酸素、低酸素でほぼ同量になる。先にも述べたが、ATP はマグネシウムイオンによって電子的に安定な状態になるため、代謝全体にマグネシウムイオンが深く関わってくることがわかる。

また、注目すべきことに高酸素と低酸素の状態では遊離のマグネシウムイオン濃度に大きな差があることが予測された。低酸素状態で 2,3DPG が還元ヘモグロビンに多く結合し、遊離の 2,3DPG が減少して、2,3DPG に結合していたマグネシウムイオンが遊離の状態になることが直接の原因と考えられる。

生体内でのマグネシウムイオンの重要性は臨床的、経験的に広く知られているものの、カルシウムポンプの挙動に関わる可能性や代謝の重要な要素となること以外、その具体的な動態についてはあまり知られていない現状がある。しかし、酸素分圧の変化による遊離のマグネシウムイオン量の変動が生体内の赤血球細胞で実際に起こっているとすれば、細胞機能に何らかの役割を果たしている可能性も十分に考えられる。

代謝物質ごとにマグネシウムイオン、ヘモグロビンとの複合体濃度を表に示す。ヘモグロビンに結合しているものを含めるとマグネシウムイオンと ATP の複合体は総 ATP 量の 83.7%もの割合を占めることが予測される。

deoxyhemoglobin-2,3DPG 複合体はヘモグロビンが完全に還元型で存在している場合、総 2,3DPG 量の 80%にも上る。低酸素状態では遊離の 2,3DPG 量は約 1/3 にも低下しているため、2,3DPG shunt は 2,3DPG を作る方向に大きく変動することが予想される。また、低酸素状態では FDP と GDP が還元ヘモグロビンに結合して複合体を形成し、遊離の FDP と GDP が有意に減少することが示唆されており、代謝に大きな影響を及ぼす可能性がある。

| Ion/Complex | oxy-state[% total] | deoxy-state[% total] |
|--------------|--------------------------|--------------------------|
| total ATP | 2.09925 mM [100.0] | 2.09924mM [100.0] |
| fATP | 0.14mM [6.8] | 0.076mM [3.6] |
| MgATP | 1.53mM [72.7] | 1.48mM [70.3] |
| HbATP | 0.20mM [9.5] | 0.267mM [12.7] |
| HbMgATP | 0.23mM [11.0] | 0.28mM [13.4] |
| total ADP | 0.30989mM [100.0] | 0.30989mM [100.0] |
| fADP | 0.10648mM [34.4] | 0.0711792mM [23.0] |
| MgADP | 0.100284mM [32.4] | 0.122707mM [39.6] |
| HbADP | 0.103127mM [33.3] | 0.116003mM [37.4] |
| total 2,3DPG | 5.99787mM [100.0] | 5.99786mM [100.0] |
| f2,3DPG | 2.6742mM [44.6] | 0.723266mM [12.1] |
| Mg2,3DPG | 0.733676mM [12.2] | 0.363213mM [6.1] |
| Hb2,3DPG | 2.58999mM [43.2] | 4.91138mM [81.9] |
| total 1,3DPG | 0.699752 μ M [100.0] | 0.699758 μ M [100.0] |
| f1,3DPG | 0.303465 μ M [43.4] | 0.215477 μ M [30.8] |
| Mg1,3DPG | 0.0236101 μ M [3.8] | 0.0306862 μ M [4.4] |
| Hb1,3DPG | 0.372677 μ M [53.3] | 0.453595 μ M [64.8] |
| total FDP | 2.69904 μ M [100.0] | 2.69904 μ M [100.0] |
| fFDP | 2.31918 μ M [85.9] | 1.01031 μ M [37.4] |
| MgFDP | 0.379865 μ M [14.1] | 0.302902 μ M [11.2] |
| HbFDP | 0 [0] | 1.38583 μ M [51.3] |
| total GDP | 0.121957mM [100.0] | 0.121957mM [100.0] |
| fGDP | 0.104792mM [85.9] | 0.045651mM [37.4] |
| MgGDP | 0.0171643mM [14.1] | 0.0136867mM [11.2] |
| HbGDP | 0 [0] | 0.0626191mM [51.3] |
| total Pi | 0.999645mM [100.0] | 0.999645mM [100.0] |
| free Pi | 0.985919mM [98.6] | 0.974803mM [97.5] |
| MgPi | 0.0137264mM [1.4] | 0.0248419mM [2.5] |
| total AMP | 25.9908 μ M [100.0] | 25.9908 μ M [100.0] |
| fAMP | 25.5201 μ M [98.2] | 25.1419 μ M [96.7] |
| MgAMP | 0.470721 μ M [1.8] | 0.848856 μ M [3.3] |

表 2.8: 各代謝物質のマグネシウムイオン、ヘモグロビン複合体

第3章 G6PD 欠損症の病態解析

赤血球を標識して、溶血性貧血患者と健康な人の赤血球細胞寿命を観察した結果、輸血した環境ではなく細胞そのものに溶血の原因があることが報告された。その後 1955 年に還元型グルタチオン (GSH) 濃度の著減が見いだされ ([1])、翌年にペントースリン酸回路の律速酵素である G6PD (Glucose-6-phosphatedehydrogenase) の活性低下が原因であることが発見された ([2])。この G6PD 欠損症を皮切りに解糖系酵素群の欠損症など多くの酵素異常症が発見された。今日でも、新たな酵素異常症や様々なタイプの症例が研究され報告されている。また、ほとんどの赤血球酵素異常症が量的な欠乏ではなく、構造遺伝子変異による活性異常、すなわち分子病であることが判明している。赤血球酵素異常症の解明の最初の手がかりにもなった G6PD 欠損症は患者数が非常に多く、これまで血液学、生化学、遺伝学、人類学など多方面からの研究が進められてきた。しかし、治療は対症療法に留まっており原因療法はいまだに発見されていないのが現状である。

そこで、正常細胞を再現した E-CELL ヒト赤血球シミュレータの G6PD に関する反応速度パラメータを欠損症患者のものに入れ換えることで酵素欠損の状態を再現することを試みた。正常の状態と比較して溶血に致る細胞内代謝物質質量の変化を追い、症状発生の機序と原因療法を探ることが目的である。

3.1 G6PD 欠損症

3.1.1 G6PD の働き

G6PD は解糖系からペントースリン酸回路に入る最初の反応を触媒する律速酵素である。律速酵素とは、ある系の流量を決定するボトルネックとなる酵素の事をさす。この反応では、G6P (Glucose-6-phosphate) 1 分子から GL6P (6-phosphogluconolactone) 1 分子が生成され、その際補酵素として NADP を用い、NADPH に還元している。NADPH は酸化型グルタチオン GSSG (oxidized glutathione) を還元型である GSH (reduced glutathione) にする働きを持ち、ペントースリン酸回路は赤血球の代謝経路における NADPH 産生の大部分を担っている。還元型グルタチオンはその還元力を利用して活性酸素などの酸化的侵襲から SH 基を含む酵素タンパクや赤血球膜を保護している。GSH/GSSG 比を高い正常値に保ち、赤血球内のタンパクを酸化から守るにはペントースリン酸回路の活性が非常に重要である。G6PD はペントースリン酸回路のボトルネックとなっており、解糖系から

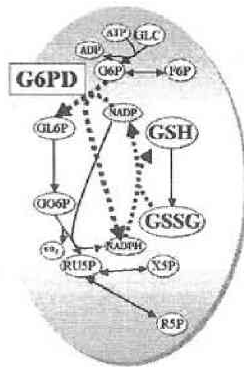


図 3.1: G6PD 周辺の経路図

ペントースリン酸回路に流れ込む流量、つまりは産生する NADPH の量と GSH を用いた細胞の還元力に大きな影響を与えている。

3.1.2 G6PD 欠損症の概要

機序

G6PD 欠損症は構造上の変異酵素産出によっておこる X 連鎖劣性遺伝性疾患である。最も頻度の高い赤血球酵素欠損症であり、世界で4億人以上、すなわち世界人口の10数人に1人が G6PD の異常遺伝子を持つとされる。赤血球酵素異常では、酵素を作り出す遺伝子の欠陥によって充分量の酵素が生成されない、または活性が異常に低い酵素の産生が起これる疾患に至る。これまでに同定されている分子異常のほとんどが1種か2種のミスセンス変異による(例: G6PD Vancouver)。塩基欠失が原因の場合 (G6PD Sunderland, G6PD Urayasu, G6PD Tsukui, G6PD North Dallas 以上は3塩基欠失, G6PD Stonybrook(6塩基欠失), G6PD Nara(24塩基欠失)が明らかになっている)は比較的小範囲で3の倍数ずつ欠失しているためにフレームシフト変異を起こさないのが特徴である。G6PD の遺伝子に関する異常症は、5つの段階に分けられる。酵素活性が低下する一般的な例の他に、塩基欠失が起こっても酵素活性が変化しないもの、逆に異常な活性上昇が起こる例もある。

これらのうち、臨床上問題となるのは主に class1, class2 である。class1 では二量体形成部位周辺に異常が集積している。重度の構造異常の場合は二量体形成が阻害され、PPP 回路が代謝の変化に対応して進まず、GSH の低下がおこる。赤血球細胞では急激な酸化ストレスを受けてヘモグロビンが変性すると、細胞膜の SH 基との間に S-S 結合を作り、

| | |
|--------|---|
| class1 | 慢性非球状性溶血性貧血 (chronic non-spherocytic hemolytic anemia;CNSHA) |
| class2 | G6PD の酵素活性が正常の 10 %以下 |
| class3 | G6PD の酵素活性が正常の 10~60 % (軽度ないし中程度) |
| class4 | G6PD の酵素活性正常 |
| class5 | G6PD の酵素活性増加 |

表 3.1: G6PD 欠損症の臨床段階

Heinz 小体を形成する。それによって膜の変形能が低下し、狭い脾洞内皮細胞間を通過することができないか、マクロファージに貪食されて溶血に至る。GSH は還元力を用いて酸化ストレスを軽減する働きを担っているが、GSH の顕著に低下した G6PD 欠損症の細胞では酸化ストレスに敏感になる。

症候

G6PD 欠損症の臨床症状は変異酵素の性質によって異なる。多くの例では以下の表に示す薬剤の服用後や細菌、ウィルス感染後、手術後、あるいは糖尿病性アシドーシス後にコーラ様色調を呈するヘモグロビン尿を伴って、急性溶血発作を生じる。さらに、より高度な異常になると(class1,2)、慢性溶血を呈する。また、地中海沿岸の住民のうちあるものは、ソラマメ (fava bean) の摂取または花粉の吸入によって短時間内に重症の溶血発作を起こし (favism という)、G6PD 欠損症患者には抗マラリア耐性があるという報告もある。これらは G6PD 異常に加えて、何らか他の遺伝的要素も関与していると思われるが、明らかにはなっていない。主な溶血惹起薬剤を以下に挙げておく。

診断と治療の現状

末梢血塗抹標本によって Heinz 小体を認めることでヘモグロビンの異常は発見できるが、G6PD に固有の現象ではないため、病因の同定はできない。従って確定診断は直接赤血球酵素活性の測定によってなされる。診断確定後は変異酵素の性質の検討、分子異常の同定を行い、予後の判定の材料とする。治療は、現在も非常に対症的なものでしかない。予防としては先の表に挙げた薬剤の服用、投与を避けることを徹底させるのが最も重要である。急性増悪の場合は輸血をし、新生児で溶血が高度の場合は交換輸血が行われるが、いずれも原因を根本から断つ対処ではない。

| 薬剤名 | 溶血が確実な薬剤 | 溶血の可能性のある薬剤 | 溶血が疑わしい薬剤 |
|----------|--|---|--|
| 抗マラリア剤 | Primaquine | Chloroquine | Quinacrine Quinic |
| サルファ剤 | Sulfanilamide Sulfapyridine Sulfamethoxazole | Sulfametho- -xypyridazine Sulfamidine | Sulfoxone Sulfadiazine Sulfamerizine Sulfisoxazole |
| スルホン剤 | Thiazolesulfone Diaminodiaphenyl- -sulphone | | |
| ニトロフラゾン剤 | Nitrofurantoin | | |
| 解熱剤 | Acetanilide | | Aspirin Acetaminophen Phenacetin Aminopyrine |
| その他 | Nalidixic acid Methylene blue Naphthalene Niridazole Phenylhydrazine Toluidine blue Trinitroluene Phenazopyridine | Vitamin K analogues Chloramphenicol | Vitamin C PAS L-Dopa Dimercaprol Doxorubicin Probenecid |

表 3.2: G6PD 欠損症の主な溶血惹起剤

3.2 病態解析

G6PD の触媒反応に ATP と 2,3DPG(2,3-Bisphosphoglycerate) が阻害剤として関与することが報告された。これらを反映させるためにリアクターを以下の式に書き換えた。

$$v = \frac{V_{max} \frac{[NADP^+][G6P]}{K_{NADP}K_{G6P}}}{1 + \frac{[NADP^+]}{K_{NADP}} \left(1 + \frac{[G6P]}{K_{G6P}}\right) + \frac{[NADPH]}{K_{NADPH}} + \frac{[ATP]}{K_{ATP}} + \frac{2,3DPG}{K_{2,3DPG}}}$$

まず、臨床 G6PD 欠損症患者に関するデータを入手し、パラメーターを正常のものに入れ換えたルールファイルを作成してシミュレーションを行った。使用したデータは次の

通りである ([70])。

| Proband | Vmax | KmG6P | KmNADP | KiNADPH | KiATP | Ki2,3DPG | 半減期 |
|---------|------|-------|--------|---------|-------|----------|-------|
| 正常 | 575 | 67 | 3.7 | 3.1 | 749 | 2289 | 25-35 |
| 欠損症 | 10 | 152 | 3.8 | 0.62 | 180 | 520 | 2.5 |

表 3.3: G6PD 欠損症の酵素反応パラメータ

G6PD の反応速度パラメータを欠損症のものに入れ換えてシミュレーションを行った結果、G6PD の活性が非常に低くなり、NADPH の減少と NADP の上昇、それに伴う GSH の急激な減少が見られた (図 3.2-A,3.2-B,3.2-C)。

NADPH/NADP 比の急激な減少はシミュレーションを始めた約 3 時間後に起きており、GSH は約 30 時間後に完全に枯渇した。

また、解糖系酵素である HK,PFK,PK の活性が低下する過程は GSH/GSSG 比の低下の速度とほぼ一致して起こっており、20 時間後には活性がほぼなくなっている (図 3.2-B,3.2-D)。一方、ATP 量は最初の 20 時間ほぼ初期濃度を保っており、ATP 消費と生成の均衡がとれていることが伺える (図 3.2-E)。この原因は、解糖系の残りの酵素の活性にあると考えられる。PFK,ALD,GAPDH の活性を見ると、活性がなくなるのは約 50 時間後である (図 3.2-F)。PK の活性低下による ATP 産生の滞りと HK,PFK の ATP 消費の滞りが釣り合っており、ATP や ADP 量は最初の 20 時間有意に変化しなかったため ATP を生成する PGK が約 20 時間ほぼ初期活性を保っていたと考えられる。

しかし、GSH や HK,PFK,PK などの酵素活性が完全に枯渇すると、他の解糖系酵素活性も減少をはじめ、ATP 量は約 50 時間で完全に枯渇する。パラメータを用いた G6PD 欠損細胞の半減期 2.5 日ということを考慮すると枯渇が早すぎる結果であった。通常 G6PD 欠損症の赤血球細胞では、解糖系諸酵素の活性は正常細胞とほぼ変わらず、ATP 濃度にもほぼほとんど変化がないことが NMR を用いた実験で証明されている ([79])。半減期が患者ごとに異なるのは、主に GSH や NADPH 量の違い、すなわちペントースリン酸回路の活性の違いによるものである。

従って、このモデルを用いたシミュレーション実験では、ペントースリン酸回路の活性低下は再現できたものの、解糖系活性や ATP 量の維持、または活性変動の時間を再現できていなかった。

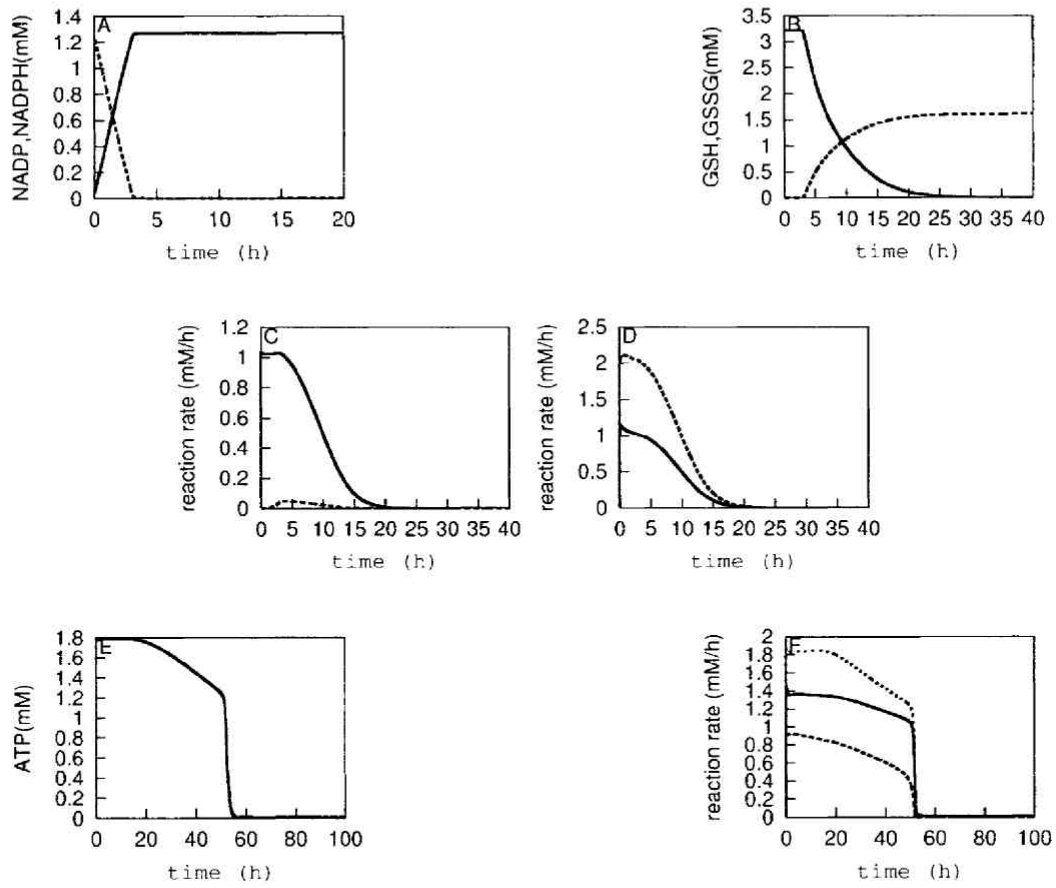


図 3.2: G6PD 酵素欠損症のシミュレーション結果

- (A) Concentration of (-)NADP(-)NADPH.
- (B) Concentration of (-)GSH(-)GSSG.
- (C) Flux of (-)HK(-)G6PD
- (D) Flux of (-)PFK(-)PK
- (E) Concentration of ATP
- (F) Flux of (-)PGK(-)ALD(..)GAPDH

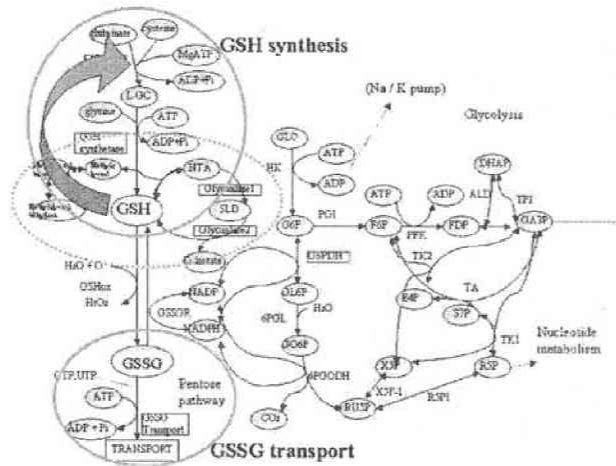


図 3.3: 拡張したグルタチオン周辺の経路図

3.3 モデルの拡張

G6PD 欠損症の酵素パラメータを入力してシミュレーションした結果、特に解糖系について実際の細胞との挙動の違いが見られた。その違いがどこから生まれるのかを考察するうち、赤血球では3種類のアミノ酸(グルタミン酸、システイン、グリシン)と2分子のATPを使ってGSHを生合成する経路が動いていることがわかった([13],[73])。また、溶血に到る赤血球内GSSG濃度は正常とほぼ変わらないにも関わらず、血漿中のGSSG濃度は急激に上昇しているという報告([93])から、何らかのGSSG排出機構が存在することが示唆された。調査の結果、GSSGはATPによって能動的に細胞外に輸送されていることがわかった。そこで、これらの経路に関してモデリングを行い、主経路モデルに加えた。

また、GSSGが解糖系の律速酵素であるPFKの活性低下を引き起こすことがわかった([59])。これもG6PD欠損症を再現する上で必要な現象である可能性があると考えてモデル化を行った。

3.3.1 還元型グルタチオン(GSH)生成系

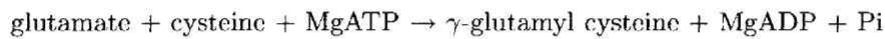
赤血球細胞にはタンパクを合成する系は存在しないが、膜を介したアミノ酸輸送を行い、それらを使ってGSHを合成している([11],[31]etc)。

GSH合成は、システインとグルタミン酸から γ -glutamyl cysteine synthetase(γ -GCS)を触媒酵素として γ -glutamyl cysteine(γ -GC)を生成する段階と、 γ -GCとグリシンを

基質とし、GSH synthetase(GSHsyn) によって GSH を生成する段階で構成されている。GSH 生合成経路の律速段階は最初の反応であり、この反応は GSH 自身による強力なフィードバック阻害を受ける ([15])。

GSH は正常状態下において約 3mM という高濃度で存在するため、普段 GSH 生合成経路の活性は抑えられている。しかし、一旦酵素欠損や酸化ストレスを受けて GSH 濃度が減少すると合成経路が活性化され、GSH 濃度を維持する機構として働くと考えられる。

γ -glutamyl cysteine synthetase の反応機構



ラットの腎臓から抽出された本酵素の解析から反応機構は Random BC Random PQ mechanism に従うことがわかった ([29])。

$$v = \frac{V_{max}[ATP][Glu][Cys]}{\alpha K_{mATP} K_{mGlu}' K_{mCys}} \frac{1}{1 + \frac{[Glu]}{K_{mGlu}} + \frac{[Glu][Cys]}{K_{mGlu}' K_{mCys}} + \frac{[Glu][ATP]}{K_{mGlu}' K_{mATP}} + \frac{[Glu][Cys][ATP]}{\alpha K_{mGlu}' K_{mCys} K_{mATP}}}$$

(Ordered Ter Mechanism)

α については、ラットの腎臓を用いた実験 ([19]) のグラフから算出し、その他のパラメータはヒト赤血球の組み換え体を用いた実験値を得た。

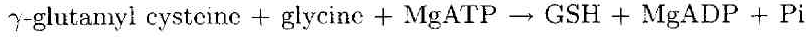
| Parameter | value | Ref |
|------------|-------------------------------|---|
| K_{mATP} | 0.4 mM | [110] |
| K_{mGlu} | 1.8 mM | [110] |
| K_{mCys} | 0.1 mM | [110] |
| K_{iGSH} | 3.4 mM | [110] |
| α | 0.2 | ラットの腎臓を用いた実験 ([19]) のグラフから算出 |
| V_{max} | 141.57 $\mu\text{M}/\text{h}$ | $V_{max} = 1650 \pm 100 \mu\text{mol}/\text{h}/\text{mg protein}$ ([110])、ヒト赤血球における酵素濃度 0.54~1.49 $\mu\text{mol}/\text{gHb}$ ([129]) より算出 (*) |

(*) 1gHb = 0.7LRBC より、[GSHsynthetase] = 1.43 $\mu\text{mol}/\text{L RBC}$. MW = 60000 ([73]) より 85.8 mg/L RBC. $\therefore V_{max} = 1.65 * 85.8 = 141.57 \mu\text{M}/\text{h}$

ここで、GSH によるフィードバック阻害を考慮するため、阻害様式の調査を行った。その結果、GSH はグルタミン酸 (Gly) と競合することによって反応を阻害することがわかり ([20])、グルタミン酸に関する K_m を以下のように展開して反応式を作成した。その際の阻害定数 K_i は 3.4mM であり、赤血球細胞内の GSH 濃度とほぼ等しい。

$$K_{mGlu}' = K_{mGlu} \frac{1+[GSH]}{K_{iGSH}}$$

GSH synthetase の反応速度式



文献調査の結果、GSHsyn の反応機構は Ordered A, Random B-C Mechanism であることがわかった ([128])。

$$v = \frac{V_{max}[\gamma\text{-GC}][\text{Gly}][\text{ATP}]}{\alpha K_{m_{\gamma\text{-GC}}} K_{m_{\text{Gly}}} K_{m_{\text{ATP}}} + \frac{[\gamma\text{-GC}][\text{Gly}]}{K_{m_{\gamma\text{-GC}}} + K_{m_{\gamma\text{-GC}}} K_{m_{\text{Gly}}}} + \frac{[\gamma\text{-GC}][\text{ATP}]}{K_{m_{\gamma\text{-GC}}} K_{m_{\text{ATP}}} + \alpha K_{m_{\gamma\text{-GC}}} K_{m_{\text{Gly}}} K_{m_{\text{ATP}}}}$$

(Ordered Ter Mechanism)

| Parameter | value | Ref |
|----------------------------|-----------|-------|
| $K_{m_{\gamma\text{-GC}}}$ | 0.99 mM | [128] |
| $K_{m_{\text{Gly}}}$ | 1.37 mM | [128] |
| $K_{m_{\text{ATP}}}$ | 0.23 mM | [128] |
| α | 2.6 | [135] |
| V_{max} | 88.4 mM/h | [128] |

3.3.2 酸化型グルタチオン排出系

GSH/GSSG 比の急激な低下が起こったとき、それを食い止める機構として、前項で述べた GSH 合成系の他に ATP による GSSG の細胞外能動輸送がある ([3],[24], [51],[93])。

この反応は MichaelisBiBi mechanism を基にした酵素反応に見立て、ATP の存在下で GSSG が transported GSSG になる反応として表現した。GSSG の細胞内濃度によって GSSG、ATP それぞれの K_m や V_{max} といったパラメーターが変化し、GSSG 濃度が高くなるほど迅速な輸送がなされ、細胞内の GSH/GSSG 比を高く保とうとする働きが強くなる。 V_{max} 及び $K_{m_{\text{GSSG}}}$ については、GSSG 濃度が 2mM の時を境に異なるため、GSSG 濃度で場合分けをし、それぞれ異なった値を V_{max} 、 K_m に読み込んで計算を行っている。また、 $K_{m_{\text{ATP}}}$ については、GSSG 濃度が充分にあるときの K_m 値、その約半分の値をとる GSSG 濃度をグラフから得て計算した。

GSSG 濃度が 2mM 以上の時：

$$v = V_{max1} \left(\frac{[\text{GSSG}]}{[\text{GSSG}] + K_{m_{\text{GSSG}1}} \right) \left(\frac{[\text{MgATP}]}{[\text{MgATP}] + K_{m_{\text{ATP}}}} \right)$$

GSSG 濃度が 2mM 以下の時：

$$v = V_{max2} \left(\frac{[\text{GSSG}]}{[\text{GSSG}] + K_{m_{\text{GSSG}2}} \right) \left(\frac{[\text{MgATP}]}{[\text{MgATP}] + K_{m_{\text{ATP}}}} \right)$$

| Parameter | value | Ref |
|---------------------|---------------------------|------|
| KmGSSG ₁ | 7.1 mM | [24] |
| KmGSSG ₂ | 0.1 mM | [24] |
| KmATP | 0.63 mM | [24] |
| Vm ₁ | 0.0528 mMs ⁻¹ | [24] |
| Vm ₂ | 0.00556 mMs ⁻¹ | [24] |

3.3.3 glyoxalase system

Glyoxalase1: HTA → S.LG

Glyoxalase2: S.LG → GSH + LAC

赤血球は、上に挙げたグルタチオン代謝の周辺経路として、GSH を代謝して乳酸 (LAC) を産生する glyoxalase system を有する。ヒト赤血球における glyoxalase 経路の反応速度式及びパラメータを入手し ([69],[101])、モデリングした。

Glyoxalase 1,2 は以下の様式に従う。

$$v = \frac{Vmax[S]}{Km(1 + \frac{K_i^I}{[I]}) + [S]}$$

Glyoxalase1: S は HTA, I は GSH

Glyoxalase2: S は D.LG, I は HTA をそれぞれ示している。

| Parameter | Glyoxalase1 | Glyoxalase2 | Ref |
|-----------|-------------|-------------|------|
| Km | 0.46 mM | 1.5 mM | [69] |
| Ki | 7.88 mM | 0.29 mM | [69] |
| Vm | 1.17 mM/s | 0.4 mM/s | [69] |

3.3.4 GSH/GSSG 比による酵素活性低下の表現

解糖系のいくつかの律速酵素について、酵素タンパクが有する SH 基が GSSG と混合ジスルフィドを形成し、不活性化される現象が知られている [59]。細胞内では GSH/GSSG は常に高い値を保っているが、何らかの酸化ストレスを受けて GSH が急激に減少した時、混合ジスルフィド形成が活発に起こり、代謝を滞らせることで生体を防御する働きを担っていると考えられる。細胞の異常事態を再現するには、この機構を表現することが不可欠であろう。活性修飾を受ける主な酵素に G6PD、HK(Hexokinase)、PFK(Phospho fructokinase)、PK(Pyruvate kinase) などがある。PFK については、活性修飾を表す具体

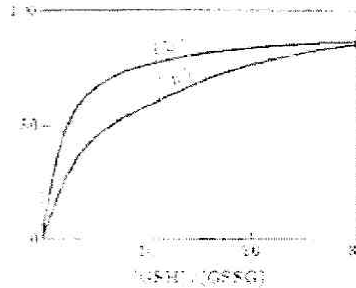


図 3.4: GSH/GSSG 比による PFK の活性変化
 PFK 活性の低下 (最大活性との割合%で示す) は GSH/GSSG 比の上昇によって起こる
 (Sugiyama et al [59] から転載)。

的な式が得られなかったため、 $[GSH]/[GSSG]$ と酵素活性 (%) の関係を示す右のグラフを用いてリアクター内での表現を行った。具体的には、グラフの概形から $[GSH]/[GSSG]$ を基質、活性の割合を生成物とする Michaelis-Menten 式に見立て、 $[GSH]/[GSSG]$ の値によって V_{max} に掛ける割合を変化させてリアクターに組み込むことで表現した。

3.4 拡張後のモデルを用いた G6PD 欠損症の病態解析

GSH 周辺経路の拡張、GSH/GSSG 比の低下に伴う PFK 活性の低下をモデルに組み込んで再び同様の G6PD 欠損症のシミュレーションを行った。

その結果、これらの要素を組み込む前 (図 3.2) と大きな変化が見られた。解糖系酵素活性 (図 3.4-D, 3.4-E) は 80 時間を過ぎてもほぼ初期活性を維持しており、ATP に関しても初期濃度を維持していた (図 3.4-E)。

一方で NADPH の減少、NADP の増加、GSH の減少からペントースリン酸回路の活性は低下していることがわかる。細胞外に排出されているため GSSG の増加は抑えられているが、GSH の生合成経路が働いて GSH は枯渇せずに定常に向かっている。GSH/GSSG 比の低下が PFK の活性を下げ、解糖系に流れ込む流量が少なくなった分がペントースリン酸回路に流れ込み、回路の活性の枯渇を止めている可能性が示唆された。

これらの結果は、実際の G6PD 欠損細胞内で起こる挙動 ([79]) とよく一致していた。

モデル拡張前後の G6PD 欠損症のシミュレーション解析を通して、G6PD 欠損症における細胞内の挙動を再現するには拡張した GSH 生合成経路、GSSG 細胞外排出機構、および GSH 周辺経路と GSH/GSSG 比による PFK の活性低下が必須であることが示唆された。これらの経路や制御によって G6PD 欠損症における解糖系活性や細胞内 ATP 濃度

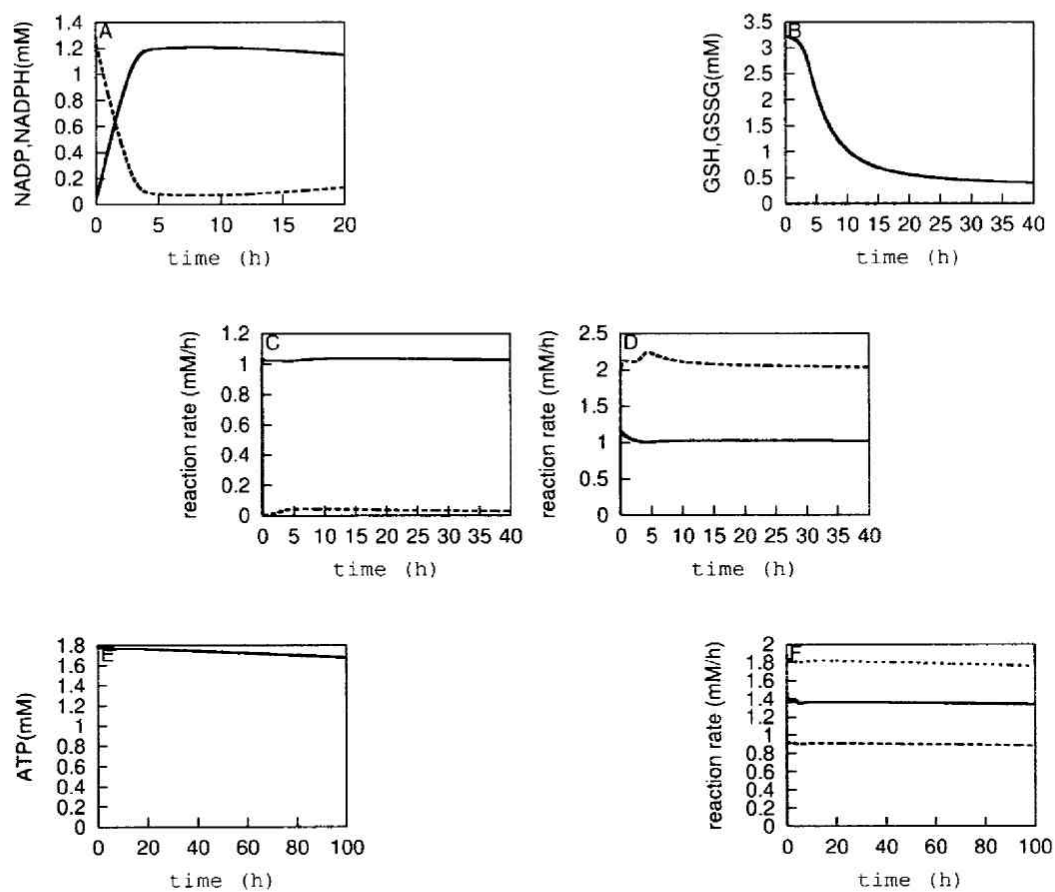


図 3.5: モデル拡張後の G6PD 欠損症シミュレーション結果

- (A) Concentration of (-)NADP (-)NADPH.
- (B) Concentration of (-)GSH (-)GSSG.
- (C) Flux of (-)HK (-)G6PD
- (D) Flux of (-)PFK (-)PK
- (E) Concentration of ATP
- (F) Flux of (-)PGK (-)ALD (-)GAPDH

が高く保たれ、酸化ストレス侵襲時以外は細胞が維持されていると考えられる。

実際の細胞内挙動とシミュレーションモデルの相違点を検証し、その原因を考察することで欠損症細胞における物質変動の鍵を握る経路を見つけることが可能になった。

またこの結果は同時に、シミュレーションする対象によってモデル化の範囲決定を慎重に行う必要があることを強く示唆している。特に病理状態やストレス侵襲を受けた時の挙動を再現する場合、GSH 生合成経路における GSH のフィードバック阻害のように、これまで活性の低かった経路が活性化されて重要な役割を果たす可能性がある。次章では、病態解析への応用に向けて始まった、様々な代謝上の可能性を網羅した全代謝シミュレーションモデルの構築について述べる。

第4章 全代謝モデルの構築と大規模モデリング手法開発

対象を定めてシミュレーションで再現するには、目的に合わせた範囲決定や手法の選択が大きな鍵を握る事は先に述べたとおりである。筆者らが構築している E-Cell ヒト赤血球シミュレータの目的は、様々な病理状態、異常状態下における細胞の振る舞いを再現することであり、あらゆる反応が複雑な制御機構を経て重要な役割を果たす可能性を考慮する必要がある。そこで、ヒト赤血球内で起こっている代謝的側面からの素反応について網羅的に組み込んだシミュレータ、「ヒト赤血球全代謝シミュレータ」の構築を試みた。

4.1 ハイブリッドモデリング手法の開発

しかし、ここで酵素反応速度式やそれに付随するパラメーター群の収集に限界があることが問題となった。ある反応が進む速度は、反応に関わる物質（基質、生成物、影響因子、反応を触媒する酵素など）の量に依存し、更に様々な段階で、それぞれの物質の化学的性質による環境からの影響を受ける。この、関連する物質の量と、酵素ごとに固有の反応機構、パラメーターに従って各々の反応様式が決まる。ひとつの酵素反応を再現するには、これら全ての情報が必要となる。物質濃度の測定については、CE/MS ([145][146] [147])を用いた質量一斉分析手法が確立されつつあり、網羅的な情報収集が視野に入ってきた。しかし、反応機構やパラメーターといった酵素の特性については、酵素精製過程の難しさなどから一斉測定という形態はとれず、特性の未知な酵素は数多く存在する。全代謝レベルの反応数になると一つ一つを調べるのは時間とコストの面からも現実的ではない。

この問題をシミュレーションのアルゴリズムから解決する手法として、動的/静的ハイブリッド・シミュレーションアルゴリズムの開発、改良を筆者らの所属する慶應義塾大学先端生命科学研究所の柚木克之氏、中山洋一氏らと行った。

4.1.1 理論

ここで言う動的手法とは、既に述べてきた反応速度式をはじめとする常微分方程式で表されるものを指す。また、静的手法とは、代謝工学の分野で発表され、発展してきた代謝流束法を指す ([111])。

代謝流束法によるシミュレーションでは、定常状態を仮定したある系において、量論係数を要素として構成した行列と反応の流束分布から線形的に解を求める。反応の量論係数と流束分布という、収集の容易なデータのみで構築できる反面、得られるのは定常状態の流束に関する一意解のみで、動的な挙動を追うのには適さない。

新たに開発、改良したアルゴリズムは、静的手法の制御項に、流束既知の動的に表現された反応を行列として加え、定常状態にあるという仮定のもとに解くというものである。これにより、量論係数のみの情報で静的に表現された反応群の挙動が、動的に表現された部分に従ってダイナミックに変動し、擬似動的に振舞う。結果的に、必要となる酵素反応に関する情報を最小限に抑えたまま動的挙動を追う事が可能になる。

代謝流束手法を構成する式のうち、流入、流出に関する項は反応速度式などによる動的な演算結果が入力され、積分計算が行われるごとに更新される。流束未知の反応に関する量論行列とこの動的演算結果があれば、未知部分の流束が求まる。また、演算結果を動的/静的の切り替わる境界上にある物質に毎回反映させることで、静的に演算された流束が系全体に与える影響を考慮できる。つまり、境界にある物質の量の増減は、ある積分時間で動的・静的両方の流束演算結果によって起こり、この変化が次の微分値計算時に動的反応の速度決定要因として伝播されていくのである。

また、動的部分と静的部分の演算は同じ数値積分のステップで行われるため、一意に求めた静的部分の流束を幾重にも重ねることで、あたかも連続な数値積分が行われているように見せることができると考えられる。突き詰めれば、動的部分の演算も常微分方程式を数値積分する際に積分幅で一意に切り取られているものであるから、動的/静的ハイブリッドアルゴリズムで構築されたものと完全に動的な式で構築されたものは、我々の目には同じように映るのではないかと考えた。

実際の演算を行う際のいくつかの問題について、解決法と共に述べる。本手法において静的部分の流束を求めるには、量論行列の逆行列を解く必要があるが、逆行列が一意に求まるには、行列が正則かつ正方（この場合、静的部分の反応数と物質の数が同数）であるという条件が成り立っていないなければならない。しかし、実際の細胞ではこの条件に当てはまらない例が大多数を占める。そのような問題の解法として、代謝工学の分野で開発されてきた手法を用いることにした。物質数が反応数を上回る、over-determined systemと言われる形態をとる場合、解の流束セットが多数存在してしまい、一意に定まらないが、これは Moore-Penrose 型一般化逆行列を用いて解くのが一般的である。また逆に、反応数が物質数を上回るケースでは、流束を決定する条件式が不足しており、解空間が生じてしまいこれも一意に定まらない。これを解決するため、理想状態下の流束を定義し、解空間の中であってその点との距離が最も近くなる一点（最小ノルム）を解とすることにした。通常、最適化手法の一つである線形計画法を用いるのが一般的だが、制約条

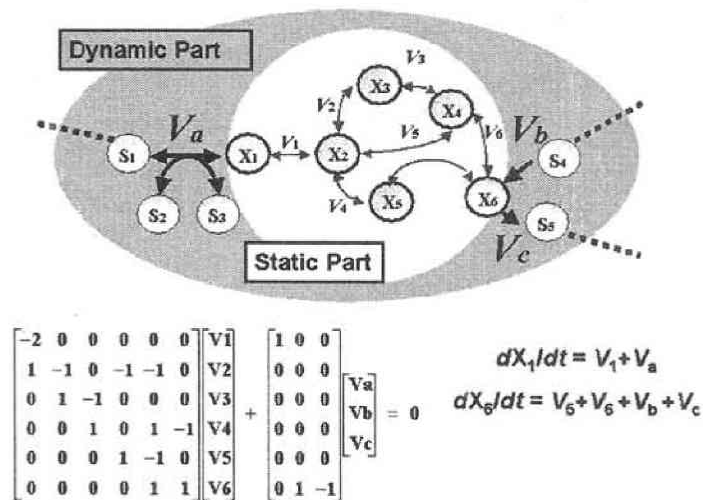


図 4.1: ハイブリッド手法の概念図

件や評価関数の設定が必要であり、また、規模によっては計算コストが非常に高くなってしまふ。本手法では、毎回の数値積分で演算を行うため、より高速な解法として最小ノルム解を採用して実装した。最小ノルム解を用いた解法でも、理想状態としてのベクトルの定義が必要であるが、何も指定しないと解空間の重心となる。

4.1.2 精度検証

直線状の全ての式を一次反応式、最初のステップを零次反応として定常状態を実現した簡単なモデルを作り、アルゴリズムの精度検証を行った。その結果、通常の代謝反応で想定される速度かつ5反応程度の規模であればほぼ完全に完全動的モデルと一致することがわかった。そこで次に、先に述べた E-CELL ヒト赤血球シミュレーションモデルの一部の反応を動的表現から静的表現に置き換えたハイブリッド・モデルを作成し、従来モデルとの比較シミュレーションを行った。上述の適用条件から、ペントースリン酸回路の5反応を静的表現することにした(図 4.1.2)。

結果、ハイブリッド・モデルは、従来モデルとほぼ同じ定常状態を再現することができ、流束の誤差は最大のもので僅か0.0745%という高い精度であった。また、誤差のあった反応は静的部分周辺の5反応のみで、その他は完全に一致した。

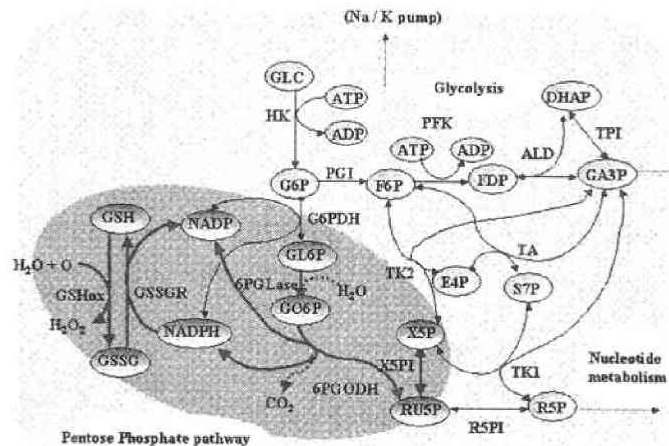


図 4.2: ハイブリッドモデルの静的部分に置き換えた経路

次に、定常状態が完全動的シミュレータとほぼ完全に一致したハイブリッド・モデルを使って、ある物質に摂動を与えた場合の挙動を比較する実験を行った。Fructose-1,6-bisphosphate(FDP) をシミュレーション開始から一定時間に同時に3倍にしたところ、両者とも摂動を吸収してもとの定常状態に戻り、その挙動は極めてよく一致していた。静的表現の可能な反応は、ハイブリッドアルゴリズムによって情報が減らされても、すべての式を動的に記述したものと同等の精度が保たれることが裏付けられた。

また、適用条件にあてはまらない反応を静的部分に含めた場合、どのような挙動を示すかを観察するシミュレーション実験を行った。G6PD はペントースリン酸回路に流れ込む流量を決定するボトルネック酵素であり、静的表現すべきでない反応であると考えられる。G6PD を含めた部分を静的に表現すると、定常を保っている間は問題がないが、ひとたび何らかの刺激によって定常が崩れると、量論係数比のみで流束が分配されなくなり、完全動的モデルとの誤差が大きくなると予測される。

この仮説を検証するため、先ほどの5反応にG6PDが触媒する反応を加えた計6反応を静的表現に置き換えてシミュレーションを行った。先と同じFDPを3倍にする摂動を与えた結果、完全動的モデルの挙動から大きく外れることがわかった(図4.4)。

ひとつのボトルネック反応がモデルの精度に大きく関わることから、静的表現する範囲を慎重に選択することの重要性がわかる。

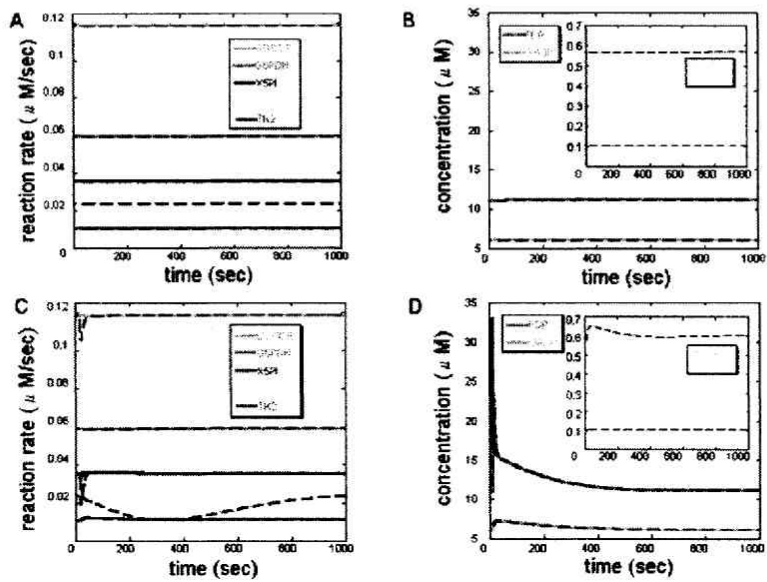


図 4.3: ハイブリッドモデルと完全動的モデルにおける挙動の一致度



図 4.4: ボトルネック酵素を静的部分に含めた場合の挙動

4.1.3 手法適用範囲の決定方法

ここで、ハイブリッドアルゴリズムにおける静的表現の適用条件と、その判断基準について言及しておく。

静的部分は、周囲の動的反応の流量と量論係数行列によってのみ流束が決定される。このため、それ以外の要因が流束決定に強く関わるような反応は除外しなければならない。例えば、非常に迅速な反応で、基質と生成物の比が常に一定に保たれるような平衡反応の場合、平衡定数という新たな要因を考慮しなければならない。また、阻害剤や活性化剤などによって、酵素の活性が強い制御を受けているような場合もこれにあたりと考えられる。このような、量論係数だけで流束を予測できない反応が系のボトルネックであり、こういった反応に関しては、従来のとおり反応速度式を得て動的に表現しなければならない。

その反応がボトルネックであるか否かの判断のための定量的な指標として、代謝工学の分野で発展してきた代謝制御解析 (Metabolic Control Analysis, MCA) を用いることができよう。MCA とは、定常状態か、またはその近傍にある系を想定し、その代謝ネットワークにおける流束制御を線形的かつ定量的に記述する感受性解析手法である。MCA における指標の主なものに、物質に摂動を与えた時の反応速度の応答を示す弾力性係数 (Elasticity, EC) や、酵素の活性に変化を与えた時の流束の応答を表す代謝制御係数 (Flux Control Coefficient, FCC) などがある。一般に、FCC の高い反応はその系の流束を決定しやすいため、FCC を実験的に測定する事が最も理想的であるが、実験で酵素の活性を瞬時に変化させる事は非常に困難である。そこで、物質濃度に摂動を与えて、その後の流束を測定してまず EC を出し、経路と量論係数情報から FCC を算出する方法が現実的であると考えている。概ねこの指標値を用いて判断できるが、例えば既に平衡状態に達している反応などでは、摂動に対する流束の変化が小さく FCC は低い、別の状態下ではその平衡反応が系の流束を決定する要因になる、といった例外も想定でき、注意を要する。

Metabolic Control Coefficient を指標に用いることができるかを検証するため、単純な試験モデルを作成して検証した (図 4.1.3)。直線経路では、FCC と Elasticity は反比例の関係にある。

$$\sum_{i=1}^L \cdot C_i^{Jk} \varepsilon x_j^i = 0$$

$$(\text{但し、}\sum_{i=1}^N \cdot C_{ei}^N = 1)$$

この関係は代謝工学の最も重要な定理のひとつであり、結合定理と呼ぶ。そこで、図 4.1.3 の E2 のパラメーターと物質濃度を定常状態を保ちつつ様々な値に設定して図 4.1.3 の E2 に関する elasticity が異なる 5 つのモデルを作成した。次に、E2 を静的表現に置き

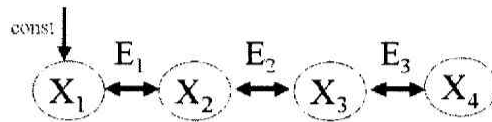


図 4.5: Elasticity 実験に用いた経路



図 4.6: Elasticity 実験結果

換えたモデルを作成し、ハイブリッドモデルと動的モデルの挙動を比較した。

その結果、ハイブリッドモデルに最も近い挙動を示すのは elasticity の高い順にモデル E > モデル D > モデル C > モデル B > モデル A となることがわかった。

(図 4.1.3)

この結果から、少なくとも直線の経路に関しては elasticity やそれから算出される FCC が静的表現可能な反応の識別に有効であると言える。

また、この他、静的部分への適用条件として、そこに含まれる反応数の問題が挙げられる。通常、ある酵素が触媒する反応では、一連の酵素反応が起こる速度が決まっており、段階を経て影響が伝播されていく。しかし、静的表現した部分の流束は、毎積分時間ごとに周囲の動的流束から演算されて更新されるため、静的部分に含まれる反応が多くなると反応にかかる時間遅延を無視できず、誤差が大きくなる。しかし、同時に複数の静的部分を動かす事は可能であるため、静的部分を分割して表現することで対処し得るであろう。

以上の事から、ハイブリッドアルゴリズムを用いてシミュレータを構築する際、静的表現の適用が可能な反応の条件は、
・流束の分配が、量論係数の比に従って起こる反応であり、
・ひとつの静的部分内に含まれるのは、反応時間の考慮を必要としない程度の反応数であることがわかる。

FCCの高い酵素、ボトルネックの酵素をどのように見分けるか、また、それら静的表現できない反応と予測された酵素のアッセイをどのように行っていくかは今後更なる議論を要する問題である。分岐がある場合の FCC を各々の反応の elasticity から算出する手法も提唱されている ([49][76])。これらの手法と物質量の測定、代謝流束の測定実験などを組み合わせて網羅的な FCC 測定を行う必要もあると考えられる。

4.2 赤血球内の代謝経路に関する調査

成熟赤血球細胞は高度に分化して、核、ミトコンドリア、リボソームなどの細胞小器官を欠いており、代謝の様式は非常に特異である。また、効率よく酸素と二酸化炭素の変換を行うために独特の円盤型の形状をとることから、生産されたエネルギーの使い途も他の細胞と異なる場合が多い。しかし、主要代謝系ごとにまとめた文献は存在するが、赤血球全代謝経路を総括した経路図は存在しないため、これを作成する必要がある。経路を決定するにあたっては、代謝マップや各種酵素データベースなどを用いるが、その経路が赤血球細胞に存在するか否か、あるいは機能を果たすだけの活性が存在するか否かを判断しなければならず、十分な注意が必要である。例えば、赤血球では細胞分裂、核酸、タンパク、脂質の生合成は行われておらず、TCA サイクルや電子伝達系も働いていない。また、2,3DPG shunt のような赤血球に特異的に存在する経路もある。この経路は、解糖系の中間代謝物質である 3PG や 1,3DPG のリン酸基の配位を利用して 2,3DPG を産生する経路である。また、生物種によっても赤血球細胞の性質が大きく異なるため、ヒト赤血球に特化した代謝経路を判別することは困難な作業である。赤血球だけに特化された経路について注目することも興味深い示唆を得られる。

まず赤血球に特化して書かれた本や論文から確実に赤血球細胞に存在する主要経路を導きだし、代謝マップで該当する部分を調べる。従来モデルの経路に含まれていない部分を発見した場合は、酵素データベースや PubMed 論文検索システム、文献などを用いて赤血球細胞に含まれるか、また機能しているか否かを判断し、付け足して行くという方法で赤血球内代謝経路についての調査を行った。次に、代謝マップを用いて網羅的に代謝経路を調査した。

ここでは、まずその系自体が機能しているかを判断する必要がある。そこで、反応物質名、酵素名をキーワードとして論文検索し、赤血球に存在すると判明した場合、その物質、酵素を中心として再度範囲を拡げて検索する、ということを繰り返した(表 4.1,4.2)。

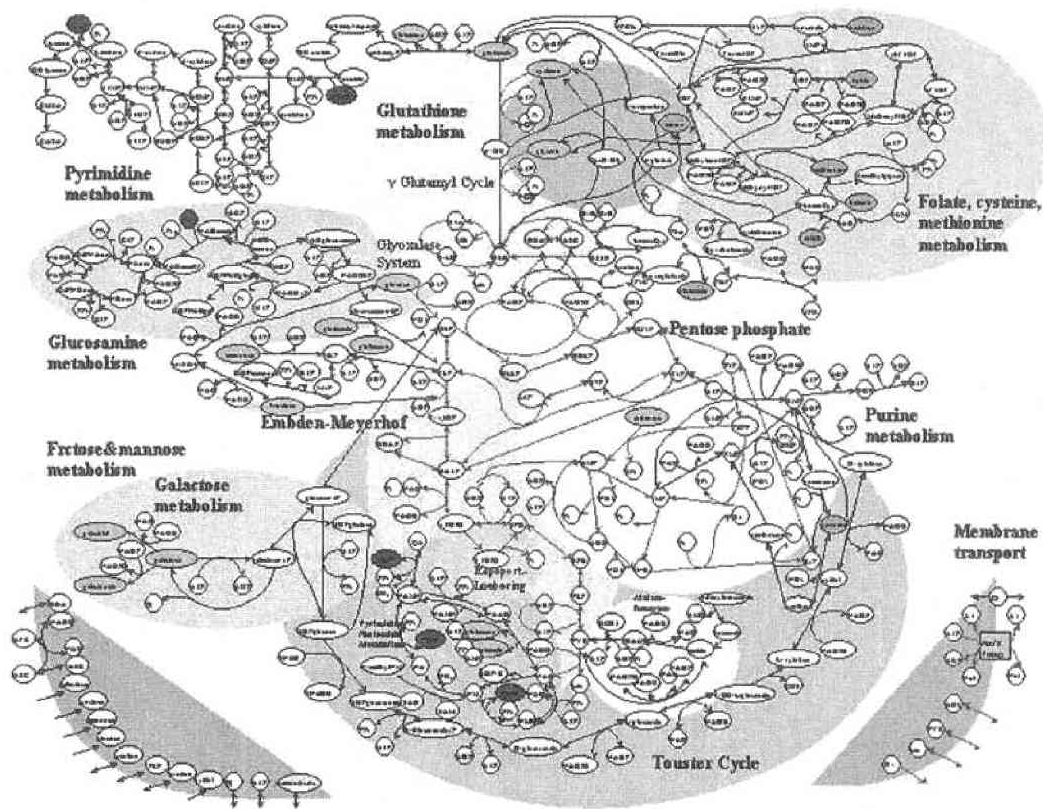


図 4.7: ヒト赤血球全代謝マップ

その際に酵素や副経路の機能を調べ、主要経路に関連の深い系を優先的に検索を進めた。また、実際にこれらの経路をモデル化する際、視覚的な把握は不可欠であると考え、反応経路図を作成した (図 4.7)。

| | Enzyme | EC Number |
|----|---|-----------|
| 1 | γ -glutamyltransferase | 2.3.2.2 |
| 2 | γ -glutamylcyclotransferase | 2.3.2.4 |
| 3 | 5-oxoprolinase | 3.5.2.9 |
| 4 | cysteinylglycine dipeptidase | 3.4.11.2 |
| 5 | Methionine adenosyltransferase | 2.5.1.6 |
| 6 | Cystathionine β -synthase | 4.2.1.22 |
| 7 | 5-methyltetrahydrofolate homocysteine S-methyltransferase | 2.1.1.13 |
| 8 | Methionine S-methyltransferase | 2.1.1.12 |
| 9 | Aminomethyltransferase | 2.1.2.10 |
| 10 | Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase | 1.5.1.5 |
| 11 | Methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase | 3.5.4.9 |
| 12 | 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase | 1.7.99.5 |
| 13 | Formyltetrahydrofolate deformylase | 3.5.1.10 |
| 14 | Dihydrofolate reductase | 1.5.1.3 |
| 15 | Thymidylate synthase | 2.1.1.45 |
| 16 | Glutamate formiminotransferase | 2.1.2.5 |
| 17 | Adenosylhomocysteinase | 3.3.1.1 |
| 18 | Betaine-homocysteine S-methyltransferase | 2.1.1.5 |
| 19 | Cystathionine γ -lyase | 4.4.1.1 |
| 20 | Phosphoglucomutase | 5.4.2.2 |
| 21 | UDP-glucose hexose-1-phosphate uridyltransferase | 2.7.7.12 |

表 4.1: 哺乳類の赤血球で活性の確認されている酵素 1

赤血球から精製した酵素を用いた酵素学的研究などから、哺乳類の成熟赤血球で活性があることが確認できた反応は表 4.1, 4.2 の反応である。

| | Enzyme | EC Number |
|----|---|-----------|
| 22 | Galactokinase | 2.7.1.6 |
| 23 | UDP-glucose 6-dehydrogenase | 1.1.1.22 |
| 24 | Glucuronate reductase | 1.1.1.19 |
| 25 | L-gulonate 3-dehydrogenase | 1.1.1.45 |
| 26 | Dehydro-L-gulonate decarboxylase | 4.1.1.34 |
| 27 | Glucuronate-1-phosphate uridylyltransferase | 2.7.7.44 |
| 28 | Glucuronokinase | 2.7.1.43 |
| 29 | UDP-glucose 4-epimerase | 5.1.3.2 |
| 30 | UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase | 2.7.7.9 |
| 31 | L-xylulose reductase | 1.1.1.10 |
| 32 | D-xylulose reductase | 1.1.1.9 |
| 33 | Xylulokinase | 2.7.1.17 |
| 34 | Malate dehydrogenase | 1.1.1.37 |
| 35 | Phosphoenolpyruvate carboxykinase | 4.1.1.49 |
| 36 | Pyruvate carboxykinase | 6.4.1.1 |
| 37 | Malate dehydrogenase(decarboxylating) | 1.1.1.39 |
| 38 | Mannose-6-phosphate isomerase | 5.3.1.8 |
| 39 | Mannokinase | 2.7.1.7 |
| 40 | Purine-nucleoside phosphorylase | 2.4.2.1 |
| 41 | IMP dehydrogenase | 1.1.1.205 |
| 42 | 5'-nucleotidase | 3.1.3.5 |
| 43 | GMP reductase | 1.7.1.7 |
| 44 | GMP synthase | 6.3.5.2 |
| 45 | Hypoxanthine phosphoryltransferase | 2.4.2.8 |
| 46 | Aldehyde reductase | 1.1.1.21 |
| 47 | L-iditol 2-dehydrogenase | 1.1.1.14 |
| 48 | Fructokinase | 2.7.1.4 |
| 49 | Nicotinate-nucleotide adenylyltransferase | 2.7.7.18 |
| 50 | Nicotinate phosphoribosyltransferase | 2.4.2.11 |
| 51 | Nicotinamide phosphoribosyltransferase | 2.4.2.12 |
| 52 | Nicotinamide-nucleotide adenylyltransferase | 2.7.7.1 |
| 53 | Nicotinamidase | 3.5.1.19 |
| 54 | NAD nucleosidase | 3.2.2.5 |
| 55 | NAD synthase | 6.3.5.1 |
| 56 | Guanine deaminase | 3.5.4.3 |

表 4.2: 哺乳類の赤血球で活性の確認されている酵素 2

表 4.3: 細胞内代謝物質濃度

| Substance | Cytoplasm Conc. | Reference |
|---------------|-------------------------------|-----------|
| Folate | 726 ± 327 nmol/l | [121] |
| Homocysteine | 7.9 ± 3.2 μ mol/l | [121] |
| Fructose | 20 μ mol/ml | [12] |
| GDP | 5.88 ± 0.64 nmol/ml | [83] |
| GTP | 58.4 ± 10.5 nmol/ml | [83] |
| IMP | 2.62 ± 0.29 nmol/ml | [83] |
| SAM | 680.7 ± 30.9 nM | [104] |
| SAH | 1.3 ± 0.5 μ mol/l | [35] |
| Gal1P | 0.2 μ M | [60] |
| UDP-galactose | 26 pM | [60] |
| UDP-glucose | 0.2 μ M | [60] |
| Methionine | 27 ± 4 μ M | [122] |
| Serine | 211 μmol/l | [103] |
| Galactose | 0.43 ± 0.20 mol/l | [151] |
| Guanosine | 0.2 μmol/10 ¹² RBC | [152] |
| Guanine | 93 μM | [58] |
| NAMN | 323 ± 35 nmol/ml | [123] |
| Xanthosine | 60.3 μM | CE/MS |
| Xanthine | 0.193 μmol/ml | [124] |
| M6P | 2.83 mM | [60] |

次に、動的部分のシミュレーションを行う際に不可欠な初期物質濃度を決定するために、動的反応の基質または生成物となっている代謝物質の赤血球内濃度の調査を行った。将来的には、CE/MSによる網羅的な代謝物質濃度測定が望まれるが、ここでは文献から得られた以下の値を暫定的に代入した(表 4.3)。

また、これまでに新たに判明した赤血球代謝経路を挙げ、従来の主要代謝経路との関係性、系の中で果たす役割を述べる。

γ-glutamyl-cycle

グルタチオン代謝の副経路である。GSH 合成に必要なアミノ酸を代謝産物とし、グルタチオン代謝と共に環状サイクルを作っている。

ascorbete metabolism

GSH が GSSG に代謝される反応を利用して dehydroascorbic acid(DHA) を ascorbate(ASC) に代謝する。この活性を利用した細胞内酸化ストレス除去が注目されている。DHA は細胞外から供給されており、ASC 細胞外へ輸送されている。

fructose metabolism

fructose を代謝して解糖系に入る。その際、ATP を消費する。

galactose metabolism

galactose から UDP 代謝を介して glucose-6-phosphate(G6P) となり、解糖系に入る。galactokinase、galactose-1-phosphouridyltransferase は先天性酵素異常が報告されており、特に前者は日本において発見された。

gluconeogenesis

G6P から glucose へ、fructose-1,6bisphosphate(FDP) から fructose 6 phosphate(F6P) への反応をまとめて、糖新生として表現した。

glucosamine metabolism

糖ヌクレオチドの代謝に関与する。glucosamine を介して解糖系に繋がっており、その過程で glutamate を代謝する。また、経路の途中で phospho enolpyruvate(PEP) を代謝しており、糖代謝における主経路の影響を大きく受けることが予測される。

glutamine cycle

glutamate \rightleftharpoons glutamine 間の反応。

mannose metabolism

mannose を代謝して、F6P として解糖系に入る。

glycogen cycle

glycogen から glucose-1-phosphate を経て解糖系に入るサイクルである。UDPglucose を代謝する反応を Touster 回路と共有している。

sorbitol metabolism(Polyol pathway)

glucose を fructose に代謝する。補酵素として NAD を要する。過度の糖分を摂取すると、普段活性の低いアルドース還元酵素の活性が急激に上昇し、グルコースからソルビトールを産生する。しかし、ポリオール代謝異常では sorbitol から fructose への反応が追い付かず、sorbitol の蓄積が起こる。sorbitol は細胞外への輸送ができないため、赤血球細胞内の浸透圧が上昇し、水分が細胞内に流れ込んで膨潤をきたす。糖尿病患者の赤血球に sorbitol 値が高いのはこのためで、赤血球の形状維持に深刻な影響を及ぼす。

thiamine metabolism

pyrimidine 経路に密接に関わり、thiamine から TTP を生じる過程で 2 モルの ATP を ADP とする。

folate · cysteine · methionine metabolism

folate は葉酸と呼ばれる、p-aminobenzoic acid および glutamate(グルタミン酸) から成るビタミンである。葉酸欠損症では溶血をおこすことが知られている。また、VitaminB12 欠損に伴う巨赤芽球性貧血では葉酸を投与することにより症状が改善する。葉酸、システイン、メチオニンの代謝は相互の関わりが深く、生理的機能としては主に 4 つの特徴を持つ ([156])。

1. histidine(ヒスチジン) 分解において、formiminoglutamate(FIGlu) から formimino 基を奪い、glutamate を生じる
2. dUMP→dTMP の反応を促進する
3. serine(セリン) からヒドロキシメチル基を奪い、glycine(グリシン) を生じる
4. VitaminB12 と共に homocysteine にメチル基を付加して methionine を生じる

proline metabolism

proline に関与する酵素として pyrroline-5-carboxylate reductase が唯一赤血球中に存在する。本酵素の活性上昇は補酵素として用いる NADPH、NADP の量に影響を与え、結果的にペントースリン酸回路を著しく活性化させることが判明している。また、生体内

では気質である pyrroline-5-carboxylate と生成物である proline が肝臓から供給されている可能性が指摘されており、臓器間の代謝調節という新しい観点からも注目すべき経路であると考えている。

purine metabolism

ATP や GTP を産生する。guanine、guanosine に関与する purine nucleotide phosphorylase(PNP) の欠損症では巨赤芽球性貧血を呈する。また、既に反応速度論によるモデリングがされている adenosine deaminase(ADA)、adenylate kinase(AK) 異常症が広く知られており、前者については多くの解析がなされているが、後者についての詳細は明らかになっていない。一部サルベージ経路については主経路としてすでにモデリングされている。

pyrimidine metabolism

glutamine から orotate を経て uridine-5'-monophosphate(UMP) を産生する。この UMP 合成に関わる 2 種の酵素欠損症例が報告されている。また、pyrimidine-5'-nucleotidase(P5N) 欠損症も報告されている。CTP、UTP の蓄積がペントースリン酸回路を阻害して溶血症状を呈するとされているが、明らかではない ([153])。

touster(uronate) cycle

glucose の代替物として臨床現場で用いられる xylitol を代謝する。glucose の C₆ を脱炭酸して C₅ とし、ペントースリン酸回路に入る。この回路では、糖がリン酸化を受けずに代謝される点で他の主経路とは大きく異なる。また、系全体への影響として、NADPH の消費と NADP の供給が挙げられる。この回路でキシリトールが代謝されるが、キシリトールは赤血球内に能動的に輸送されていることがわかっている。また、G6PD 欠損症患者にキシリトールを投与することで症状が改善することが報告されている ([4],[83], [96])。これは NADPH 量をこの回路が調節しているためと考えられるが、詳細はわかっていない。その輸送動態に関しても研究例は非常に少なくないのが現状である。

pyrimidine nucleotide metabolism

様々な経路において補酵素として用いられる NAD を産生する。トリプトファンから合成される経路であり、葉酸代謝経路ともつながっているところが興味深い。

4.3 副経路の動的表現

4.3.1 アミノ酸の膜輸送動態

アミノ酸の多くは赤血球細胞に受動的に輸送されることがわかっている。その輸送動態は大きくわけて、細胞内外のナトリウムイオン (Na^+) 濃度に依存した受動輸送で取り込まれるものと、それとは独立に受動輸送されるものにわかれている。前者は、MichaelisMenten 型の式に拡散項 (拡散定数: Kd) を加えて表現される。後者は単純な MichaelisMenten 型の式で表される。そこで、アミノ酸輸送動態を系への流入流束として動的に表現した。使用したパラメータは以下の通りである ([25],[46],[32],[130])。

equation 1:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} + Kd[S]$$

| アミノ酸 | Km(mM) (37 度) | Vmax(mMmin ⁻¹) | Kd(min ⁻¹) |
|---------------|---------------|----------------------------|------------------------|
| Glycine(Gly) | 0.06 | 0.9 | 2.3×10^{-3} |
| Serine(Ser) | 0.3 | 8.3 | 3.2×10^{-3} |
| Alanine(Ala) | 0.22, 0.4 | 7 | 6.8×10^{-3} |
| Cysteine(Cys) | 0.027 | 0.00217 | 0.01516 |
| L-Lysine(Lys) | 0.068 | 0.00817 | 6.7×10^{-3} |
| Arginine(Arg) | 0.057 | 0.00667 | 4.83×10^{-3} |

equation 2:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

| アミノ酸 | Km(mM) (37 度) | Vmax(mMmin ⁻¹) |
|------------------|---------------|----------------------------|
| Methionine(Mct) | 5.2 | - |
| Threonine(Thr) | 0.09 | 3.5 |
| Tryptophan(Trp) | 1.6 | 12 |
| D-Leucine(D-Leu) | 19 | 3.55 |
| L-Leucine(L-Leu) | 5.8 | 1.98 |
| Phenylalanine | 2.9 | 690 |
| Valine(Val) | 7.1 | 560 |

4.3.2 糖類の輸送

赤血球の解糖系ではグルコースが唯一の出発物質となる。そのため、膜状の Band タンパクを介してインシュリン非依存性にグルコースを活発に取り込んでいるが、それ以外の糖についても同じ Band3 タンパクを通して細胞内に輸送していることがわかってい

る。フルクトースはフルクトース6リン酸(F6P)となり、マンノースもマンノース6リン酸(M6P)を経てF6Pとなって解糖系に入る。また、ガラクトースはグルコース1リン酸(G1P)からG6Pとなって解糖系に入るものと、Touster回路に入るものがある。

糖の輸送はミカエリスメンテン式で近似できるということ、また、各糖のVmaxは同程度であることが広く知られている([154])。実際の反応はBand3の構造変化を伴って非常に複雑なモデルがたてられているが([75])、今回は系への入力としての流入速度のみが必要であるため、パラメータが比較的揃いやすいミカエリスメンテン式を採用し、文献調査を行った。

以下に、初期値として設定した血漿中の糖の濃度とミカエリス定数を示す。

| 糖 | Plasma Conc.(μM) | Km(mM) | Vmax($\mu\text{M}/\text{h}$) | Ref. |
|-----------|-------------------------------------|--------|--------------------------------|-----------------------|
| Glucose | $5.4 \times 10^3 - 7.3 \times 10^3$ | 1.5 | 500 | [9], [22], [91], [99] |
| Mannose | 39 ± 12 | 1.5 | 500 | [9], [22], [91] |
| Galactose | 0.9 ± 0.5 | 7.5 | 500 | [9], [22], [126] |
| Fructose | 31 ± 20 | 1.2 | 500 | [9], [22], [91], [99] |

4.3.3 その他の動的表現部分

葉酸、システイン代謝に関わる Methionine S-methyltransferase は、生成物であるSAH(S-adenosyl-L-homocysteine)の強い阻害を受ける。阻害様式は、SAMとの競合阻害(competitive inhibition)である。

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m(1 + \frac{[P]}{K_i}) + [S]}$$

| Enzyme | KmSAM | Vmax | KiSAH(μM) | Ref |
|---|-------------------|---|------------------------|--------------------|
| Methionine S-methyltransferase SAM \rightarrow SAH | $1.78\mu\text{M}$ | 420 nmolmin^{-1} /mg protein | $1.6\mu\text{M}$ | [35], [27] [14] |

*Abbreviation used: SAM(S-adenosyl-L-methionine)

メチオニンからSAMを生成する反応を触媒する Methionine adenosyltransferase は、生成物であるSAMの阻害を受ける。この阻害はメチオニン(Met)に対する非競合阻害(uncompetitive)である。メチオニンとATPに関するKmとVmax、阻害定数を得て以下の式で表現した。

$$v = V_{max} \left(\frac{[S1]}{K_{m1} + [S1] \left(1 + \frac{[P]}{K_i} \right)} \right) \left(\frac{[S2]}{K_{m2} + [S2]} \right)$$

| Enzyme | KmMet (μM) | KmATP (μM) | KiSAM (μM) | Vmax (nMmin ⁻¹) | Ref |
|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|------|
| Methionine adenosyl- transferase ATP + Met \rightarrow Pi + Ppi + SAM | 2.2 \pm 0.6 | 450 \pm 130 | 2.9 | 15.6 | [35] |

以下の表に示す2基質反応については、それぞれの基質に対するKmとVmaxのパラメータが得られたため、以下の式で表現した。Galactokinaseはガラクトース代謝経路の律速酵素である。但し、Cystathionine β -synthase についてはヒトの肝臓、5-methyltetrahydrofolate-homocysteine S-methyltransferase についてはラットの肝臓のデータを用いている。

$$v = Vmax \left(\frac{[S1]}{Km_{S1} + [S1]} \right) \left(\frac{[S2]}{Km_{S2} + [S2]} \right)$$

| Enzyme | Km(mM) | Vmax | Ref |
|---|--|---|--|
| Cystathionine β -synthase Ser + HomoCys \rightarrow Cystathionine | 1.15(Ser) 0.59(HCy) | 160(units /mg protein) | [21] |
| Galactokinase Gal + ATP \rightarrow Gal1P + ADP | 0.125(Gal) 0.225(ATP) | 150(nunits/ mg protein) | [7] [10] |
| IMP dehydrogenase IMP + NAD \rightarrow XMP + NADH | 0.2(IMP) 0.1(NAD) | 85(pmol/ h/mg Hb) | [125] |
| Nicotinate-nucleotide adenyltransferase NAMN + ATP \rightarrow NAAD + Ppi | 0.139(NAMN) 0.495(ATP) | 550(nmol/ h/g Hb) | [71], [105] [74] |
| Nicotinate phospho-ribosyltransferase NA + PRPP \rightarrow NAMN + Ppi | 1.2 \times 10 ⁻³ (NA) 0.128(PRPP) | 0.28(μ mol/ h/g Hb) | [47], [85] [71], [105] [132], [56] |
| Nicotinamide phospho- ribosyltransferase NM + PRPP \rightarrow NMN + Ppi | 1.3 \times 10 ⁻⁴ (NM) 5.4 \times 10 ⁻⁴ (PRPP) | 15(nmol/ h/g Hb) | [71], [105] [80] |
| Nicotinamide-nucleotide adenyltransferase NMN + ATP \rightarrow NAD + Ppi | 0.303(NMN) 0.103(ATP) | 396(nmol/ h/g Hb) | [71], [105] [74], [84] |
| 5-methyltetrahydro-folate- homocysteine S-methyltransferase methylTHF + HomoCys \rightarrow THF + Met | 75 \times 10 ⁻³ (methyl- THF) 1.7 \times 10 ⁻³ (HomoCys) | 1.75 (μ mol/ min/mg protein) | [106] |

*Abbreviation used: Gal1P(Galactose 1-phosphate), XMP(Xanthosine 5'-phosphate), NAMN(Nicotinate ribonucleotide), NAAD(Deamido-NAD), NA(Nicotinate), NM(Nicotinamide), NMN(Nicotinamide D-ribonucleotide),HomoCys(Homocysteine), THF(tetrahydrofolate)

$$v = \frac{kcat f \frac{[S]}{Km_S} - kcat r \frac{[P]}{Km_P}}{1 + \frac{[S]}{Km_S} + \frac{[P]}{Km_P}}$$

| Enzyme | Km(mM) | kcatf (s ⁻¹) | kcatr (s ⁻¹) | Ref |
|---|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Phosphoglucumutase G1P ⇌ G6P | 0.077(G1P) 0.449(G6P) | 243 | 80.9 | [36], [60] [43], [44] |
| Mannose-6-phosphate isomerase M6P ⇌ F6P | 1.3(M6P) 1.34(F6P) | 800 | 800 | [60] |
| Purine-nucleoside phosphorylase Xanthine + R1P ⇌ Xanthosine + Pi | 0.425(Xanthine) 1.6(Xanthosine) | 12.48 | 5.04 | [140] |

$$v = \frac{N1S1S2 - N2P1P2}{D1S1 + D2S2 + D3P1 + D4P2 + D5S1S2 + D6P1P2 + D7S2P2 + D8S1P1}$$

$$D1 = k_1k_3(k_6 + k_7)$$

$$D2 = k_5k_7(k_2 + k_3)$$

$$D3 = k_2k_4(k_6 + k_7)$$

$$D4 = k_6k_8(k_2 + k_3)$$

$$D5 = k_1k_5(k_3 + k_7)$$

$$D6 = k_4k_8(k_2 + k_6)$$

$$D7 = k_5k_8(k_2 + k_3)$$

$$D8 = k_1k_4(k_6 + k_7)$$

$$N1 = k_1k_3k_5k_7 \quad N2 = k_2k_4k_6k_8$$

| Enzyme | Parameter | Ref |
|---|--|--------------------------|
| UDP-glucose-hexose-1-phosphate uridyltransferase | $k_1 = 7.58 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ $k_4 = 8.75 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ | [60], [30] [43], [44] |
| UDP-glucose + Gal1P ⇌ UDP-galactose + G1P | $k_5 = 3.96 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ $k_8 = 8.73 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ $k_2 = 100 s^{-1}, k_3 = 150 s^{-1}$ $k_6 = 110 s^{-1}, k_7 = 113 s^{-1}$ | |

$$v = \frac{N1S1S2 - N2P1P2}{XyluloseReductase_{rd}}$$

$$XyluloseReductase_{rd} = k_5(kd_1 + S_1k_1)D1 + S_1S_2k_1k_2D2 + P_1P_2kd_4kd_5D3 + S_1P_1k_1kd_2kd_3kd_4 + S_2P_2k_2k_3k_4kd_5 + S_1S_2P_1k_1k_2kd_4(k_3 + kd_3) + S_2P_1P_2k_2kd_4kd_5(k_3 + kd_3)$$

| Enzyme | Parameter | Ref |
|-------------------------------------|---|------|
| L-xylulose reductase | $k_1 = 1.2 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}, k_2 = 174 s^{-1}$ | [90] |
| Xylitol + NADP \rightleftharpoons | $k_3 = 89 s^{-1}, k_4 = 0.83 s^{-1}$ | |
| L-xylulose + NADPH | $k_5 = 220 M^{-1} s^{-1}, k_6 = 25 s^{-1}$ $k_7 = 130 s^{-1}, k_8 = 0.60 s^{-1}$ $k_9 = 1.0 \times 10^6 s^{-1}, k_{10} = 5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ $k_{11} = 0.23 s^{-1}, k_{12} = 150 s^{-1}$ $k_{13} = 623 s^{-1}, k_{14} = 2.0 \times 10^8 M^{-1} s^{-1}$ | |

$$v = \frac{k_1 k_2 k_3 S_1 S_2 - k_{d_1} k_{d_2} k_{d_3} P_1 P_2}{k_{d_1} k_3 + k_1 k_3 S_1 + k_2 k_3 S_2 + k_{d_1} k_{d_2} P_1 + k_{d_1} k_{d_3} P_2 + k_1 k_2 S_1 S_2 + k_1 k_{d_2} S_1 P_1 + k_2 k_{d_3} S_2 P_2 + k_{d_2} k_{d_3} P_1 P_2}$$

| Enzyme | Parameter | Ref |
|---|---|------|
| Purine-nucleoside phosphorylase | $k_1 = 1510 M^{-1} s^{-1}, k_2 = 5.11 M^{-1} s^{-1}$ | [72] |
| Guanosine + Pi \rightleftharpoons Guanine + R1P | $k_3 = 0.55 M^{-1} s^{-1}, k_{d_1} = 0.151 M^{-1} s^{-1}$ | [23] |
| | $k_{d_2} = 3840 M^{-1} s^{-1}, k_{d_3} = 519 M^{-1} s^{-1}$ | [17] |

以上をハイブリッドモデルの動的部分として表現し、他の反応をハイブリッドの静的部分として表現してヒト赤血球全代謝プロトタイプモデルを構築した。

第5章 本研究の展開・展望

動的/静的ハイブリッド手法を用いて構築したヒト赤血球全代謝シミュレーションモデルのプロトタイプモデルが完成した。今後は、CE/MSによる細胞内代謝物質濃度の実測値と比較し、シミュレーションモデルの修正や、様々な状況下で活性化される経路の予測などを行っていく。

例えば、次のような実験が考えられる。

- アミノ基や炭素基に CE/MS で判別可能な標識を施し、その物質を含む溶液に赤血球を浸して一定時間後の代謝物質量を測る。

この実験によって、細胞膜を透過して流入、または流出した物質を特定し、更にこれらの物質が代謝される経路を知ることが可能になる。これによって、全代謝シミュレーションモデルに不足している経路情報を追加することができる。

- 様々な濃度に設定したグルコース溶液に浸した後の赤血球内の代謝物質濃度を測定する。

この実測結果とシミュレーション結果を比較することで、異常条件下で活性化される代謝経路の予測を行うことができる可能性がある。

- 酸素分圧を様々な濃度に変化させた赤血球の代謝物質濃度を測定する。

赤血球は非常に効率よくかつ高速に酸素を取り込み、抹消組織に分配することが知られている。その働きの大部分をヘモグロビンが担っているが、一部の代謝物質がヘモグロビン酸素親和性を巧みに調節している。また、ヘモグロビンの状態によって代謝の挙動自体が大きく変化する可能性が本研究中で示唆された(第2.2章参照)。しかし、酸素分圧(ヘモグロビンの状態)と代謝状態を関連づけ、生体内の酸素運搬能における代謝の役割を説明した研究はこれまで行われてこなかった。酸素分圧を加味したシミュレーションモデルを構築し、CE/MSの結果と比較することで、ヘモグロビンの状態の変化が実際の代謝にどのように関係していくのかを知ることができると考えられる。

酸素分圧と代謝の関係について少し触れたが、現在、慶應義塾大学医学部医化学研究室と共同でガス代謝を勘案したシミュレーションモデルの構築が全代謝モデル構築と並行して進められている。以下、現在構築中のモデルの概要とそこから得られた知見について述べる。

5.1 酸素飽和曲線の実装

まず、酸素分圧によるヘモグロビンの酸素飽和度の変化を考慮に入れるため、Hill 式を拡張したヘモグロビンの酸素度予測モデル ([141]) を E-CELL System に実装した。このモデルの特徴は、二酸化炭素分子 (CO₂) と、酸素分子 (O₂) の競合を考慮したモデルになっていることである。また、2,3DPG 濃度による飽和度の変化も考慮されている。

S_{HbO_2} はヘモグロビン飽和度を示し、 HbO_2 は酸素結合ヘモグロビン、 Hb はヘモグロビンの総量を表す。

$$S_{HbO_2} = \frac{[HbO_2]}{[Hb]} = \frac{K_{HbO_2}[O_2]^n}{1+K_{HbO_2}[O_2]^n}$$

$$K_{HbO_2} = \frac{K'_4(K'_3[CO_2](1+\frac{K''_2}{[H^+]})+(1+\frac{[H^+]}{K''_6}))}{(K''_2[CO_2](1+\frac{K''_2}{[H^+]})+(1+\frac{[H^+]}{K''_6}))}$$

$$K'_4 = K''_4(\frac{[H^+]_s}{[H^+]})^{n1}(\frac{[CO_2]_s}{[CO_2]})^{n2}(\frac{[2,3DPG]_s}{[2,3DPG]})^{n3}(\frac{T_s}{T})^{n4}$$

$$n1 = -6.775 + 2.0372pH + -0.1235pH^2$$

$$n2 = -0.008765 + 0.00086P_{CO_2} + 6.3 \times 10^{-7}P_{CO_2}^2$$

$$n3 = 0.2583 + 28.6978[2,3DPG] - 917.69[DPG]^2$$

$$n4 = 1.6914 + 0.0618T + 0.00048T^2$$

[X]_s は、標準的な状態での濃度を示している。[H⁺]_s は pH = 7.24、[CO₂]_s は二酸化炭素分圧 $P_{CO_2} = 40$ mmHg に設定した時の濃度を用いている。従って、以下のように書き換えることができる。

$$K'_4 = K''_4(\frac{57.5(nM)}{[H^+]})^{n1}(\frac{0.85(mM)}{[CO_2]})^{n2}(\frac{4.65(mM)}{[2,3DPG]})^{n3}(\frac{37}{T})^{n4}$$

これまで構築してきた代謝モデルでは温度や pH を固定していたが、ここでは pH を 7.2 から 7.6 に (図 5.1-A)、2,3DPG 濃度を 6.7mM とその約半分の 3.35mM に (図 5.1-B)、二酸化炭素分圧を 40,50,80Torr (図 5.1-C)、温度を 35,37,39 度 (図 5.1-D) にそれぞれ設定し、酸素分圧が 0 から 100Torr までの酸素飽和度をプロットした。

pH の小さな上昇と温度の下降が飽和度を急激に上げることから、pH や細胞内温度の安定性を守る機構が厳重になっているのうなずける。

2,3DPG の他に ATP や ADP といった物質がヘモグロビンのアロステリを変える働きを持つことがわかっている。今後これらの物質が与える影響についても調査を行う。

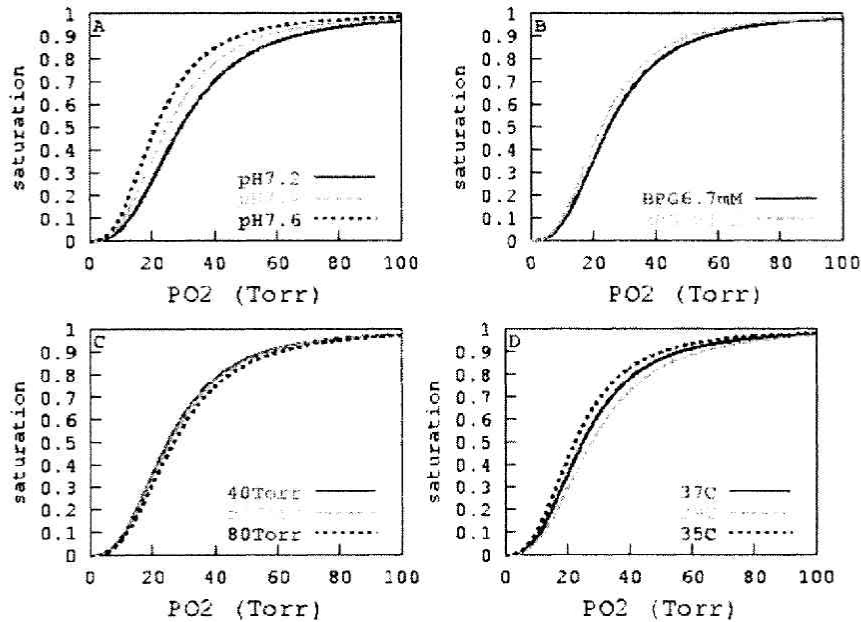


図 5.1: E-CELL System 上に再現した酸素飽和度の変化

5.2 膜タンパク Band3 と代謝の関連の実装

近年、酸素/還元ヘモグロビンの状態の違いによって代謝の状態が変化する様子を赤血球細胞膜タンパクである Band3 の機能と関連づけて説明した研究が発表されつつある ([97], [143],[144])。

Band3 はヘモグロビンと結合するドメインを持ち、その結合定数は還元ヘモグロビン (deoxyhemoglobin) が酸素ヘモグロビン (oxyhemoglobin) の 100 倍も高いことがわかっている ([37])。低酸素状態の赤血球では、より多くのヘモグロビンが膜に結合して存在していることになる。

また、ヘモグロビンと同じ部位に解糖系の酵素である PFK が結合し、ヘモグロビンと Band3 の結合部位を取り合うことがわかった ([40],[45])。更に、Band3 と結合した酵素は活性をほぼ完全に失うこともわかっている。その後の Low らの調査により、同じく解糖系の酵素である ALD や GAPDH、LDH も PFK と同様に Band3 に結合し、ヘモグロビンと競合しあうことがわかった ([48],[57],[142])。

高酸素状態では Band3 に解糖系酵素が多く結合して解糖系の活性が下がり、逆に低酸素状態では Band3 がデオキシヘモグロビンに占有されて解糖系酵素が放出され、解糖

| Ka with Band3 | value (/M) | Ref |
|-----------------|------------|-----------|
| ヘモグロビン | | |
| deoxyhemoglobin | 10000 | [37] |
| oxyhemoglobin | 100 | [37] |
| 解糖系酵素 | | |
| PFK | 5000000 | [40],[45] |
| ALD | 1000000 | [142] |
| GAPDH | 2000000 | [142] |

表 5.1: Band3 タンパクとヘモグロビン/解糖系酵素の結合定数

系が活性化されるのではないかという仮説が立てられ、Messana らによって検証された ([97])。結果、高酸素状態ではペントースリン酸回路の活性が低酸素状態の約 2 倍にまで上昇することがわかった。これは、解糖系活性が低下した分がペントースリン酸回路に流れ込んだものと考えられる。

ペントースリン酸回路の生成物である NADPH や CO_2 が多く放出され、GSH の増加などによって細胞の状態に何らかの変化を与える可能性があるが、実際にこれらの現象が生体内でどのような役割を果たしているのかについてはわかっていない。

そこで、E-CELL ヒト赤血球シミュレータ上で Band3 とヘモグロビンの結合、またそれに競合する解糖系酵素の結合を表現することを試みている。結合定数などを簡単に操作することができ、また、同時に起こっている周辺の代謝反応に与える影響も勘案しつつ目的の反応を時系列で予測することが可能である。

マグネシウム複合体の計算と同様に結合定数を用いて表現している (表 5.1)。

5.3 E-CELL ヒト赤血球シミュレータの応用

全代謝反応を網羅し、更にガスの代謝機能や膜との連関を実装した E-CELL 赤血球シミュレータを用いて今後様々な場面での応用を考えている。

応用の具体例として人工酸素運搬体の設計が挙げられる。人工酸素運搬体の利点として、細胞膜がなく血液型に依存しないことやウィルスの検査を厳重に行えることなどがあり、災害など緊急時における実用化が強く望まれている。しかし、保存血液から作成する場合、ウィルス除去の段階で多くの酵素が取り除かれてしまっており、代謝が正常に機能しないために生体内での寿命が非常に短いという問題点がある。また、前章までに述べたような膜との連関が酸素の運搬に何らかの重要な役割を果たしているとすれば、臨床応用

ではそれらの機能を持たない事の問題点も多く出てくるものと思われる。

このような可能性をシミュレーションモデルで検証し、運搬体の設計に還元するというサイクルを繰り返すことで臨床応用に向けた知見の蓄積を加速させることが可能になると考えている。

また、ヘモグロビンの酸素飽和度にはかなりの個人差があることが知られているが、患者ごとの酸素飽和度に関するデータをシミュレーションモデルに反映させ、より効果的な薬の種類や投与量などを予測する、いわゆる「診断」への応用も期待できる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、慶應義塾大学環境情報学部 中山洋一講師には初期よりアドバイザーとして常に適切な指導と助言をいただいた。また研究の方向性についても多く議論をさせていただき、深く感謝をしている。同 内藤泰宏講師には本研究全体を通して多くの示唆と重要な転機を与えていただいた。

また、全代謝モデル構築は同学部 4年 彦坂圭介氏との共同研究である。調査から始まり、モデリングの全過程において彼なくしては完成を見ることができなかつたであろう。アミノ酸輸送動態に関しては同学部 2年 足立清香氏との共同で研究が行われた。

ハイブリッド手法に関しては同大政策・メディア研究科博士課程 3年 柚木克之氏、中山洋一講師との共同研究である。柚木氏には赤血球モデリングに関しても、多大な助言をいただいた。

同大政策・メディア研究科博士課程 3年 三由文彦氏、同学部 4年 山田洋平氏には研究を進める上で多大な協力と助言をいただいた。

同大医学部医化学研究科 末松誠教授にはガス代謝を考慮したモデル構築を進める上で示唆に富んだ助言を多くいただいた。

また、同大環境情報学部 金井昭夫助教授、同 曾我朋義助教授、同 菊地進一助手、博士課程 櫻田剛史氏、米田元洋氏、松崎由理氏、高橋恒一氏、環境情報学部 海津一成氏、北山朝也氏、修士課程 荒川和晴氏、石井伸佳氏、E-CELL プロジェクトの皆様はこの場を借りて深くお礼申し上げたい。

また、修士課程 2年 大野浩氏、鈴木良介氏、妹尾紗恵氏、森航哉氏、山田洋平氏の協力は本論文執筆にあたって不可欠であった。ここに深く感謝したい。

最後に、学部時代から研究の機会と素晴らしい環境を与えてくださった富田勝教授に厚く感謝の意を表したい。

成果発表一覧

印刷、刊行物

1. 木下綾子
「G6PD 欠損症における酸化ストレスが及ぼす影響のシミュレーション解析」生命と情報 vol.9:99-106 2000
2. 木下綾子
「E-CELL System を用いたヒト赤血球全代謝モデル構築への試み」生命と情報 vol.10:309-18 2001
3. Kinoshita A and Yugi K.
“Experimental Demonstrations of Hybrid Algorithm and its Application to Human Erythrocyte Model on E-CELL System” 生命と情報 vol.11:215-24 2002
4. Nakayama Y, Kinoshita A. and Tomita M.
“Computer Simulation of Enzyme Deficiency in Human Erythrocyte Using the E-CELL System” Genome Informatics 2002 11:460-461
5. Kinoshita A., Nakayama Y and Tomita M.
“Towards Simulation of Whole Metabolic Pathways in Human Erythrocyte” Genome Informatics 2002 12:312-313
6. Yamada Y, Kinoshita A. Nakayama Y. and Tomita M.
“Automatic Transformation of Kinetic Equations into S-System and GMA Forms” Genome Informatics 2002 13:482-483
7. 木下綾子 中山洋一 末松誠 富田勝
「ヒト赤血球の大規模なコンピュータシミュレーション」血液・腫瘍科 2003 47(2):149-157

国際学会口頭発表

Kinoshita A, Nakayama Y, Yugi K and Tomita M.
“Computer simulation of whole metabolic system in human erythrocyte” Okinawa International Symposium(Okinawa, Japan 2003/10)

国際学会ポスター発表

1. Kinoshita A., Nakayama Y and Tomita M.
“Towards Simulation of Whole Metabolic Pathways in Human Erythrocyte” International Conference on Genome Informatics (Tokyo, Japan 2001/12)
2. Kinoshita A., Nakayama Y and Tomita M.
”In silico analysis of human erythrocyte using E-CELL System” 2nd International Conference on Systems Biology (California, USA 2001/11)
3. Kinoshita A., Nakayama Y and Tomita M.
“Towards simulation of human erythrocyte and its application to pathological analysis of enzyme deficiency” The International Conference on Bioinformatics 2002 (Bangkok, Thailand 2002/2)
4. Nakayama Y, Yugi K, Kinoshita A. and Tomita M.
“Hybrid Algorithm for Large-Scale Modeling of the Cell and its Implementation in the E-CELL system.” 10th International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (Edmonton, Canada 2002/8)
5. Kinoshita A., Hikosaka K, Yamada Y, Nakayama Y and Tomita M.
“Towards large-scale Modeling of Human Erythrocytes using E-Cell System” US-JAPAN Joint Workshop on Systems Biology of Useful Microorganisms (Tsuruoka, Japan 2002/9)
6. Kinoshita A., Hikosaka K, Nakayama Y and Tomita M.
“Towards large-scale Modeling of Human Erythrocytes using E-CELL System” 3rd International Conference on Systems Biology (Stockholm, Sweden 2002/12)
7. Kinoshita A., Hikosaka K, Adachi S, Nakayama Y and Tomita M.
“Hybrid Modeling and in silico Analysis of Human Erythrocyte” 1st IECA Conference on Systems Biology of E.coli (Tsuruoka, Japan 2003/6)
8. Kinoshita A., Nakayama Y, Katsuyuki Yugi and Tomita M.
“Computer simulation of whole metabolic system in human erythrocyte” Okinawa International Symposium (Okinawa, Japan 2003/10)

国内学会ポスター発表

1. 木下綾子 中山洋一 富田勝
「G6PD 欠損症における酸化ストレスが及ぼす影響のシミュレーション解析」
第 23 回分子生物学会 (神戸 2000/12)
2. 木下綾子 中山洋一 富田勝
「E-CELL ヒト赤血球モデルを用いた酵素欠損症の解析」
IAB オープニングシンポジウム (鶴岡 2001/9)
3. 木下綾子 中山洋一 富田勝

- 「E-CELL System を用いたヒト赤血球全代謝モデル構築への試み」
第 24 回分子生物学会（横浜 2001/12）
4. 中山洋一 木下綾子 富田勝
「大規模な細胞・個体シミュレーションモデル開発」
第 24 回分子生物学会（横浜 2001/12）
 5. 木下綾子 彦坂圭介 山田洋平 中山洋一 富田勝
「ヒト赤血球全代謝モデル構築と病理解析への応用」
第 25 回分子生物学会（横浜 2002/12）
 6. 山田洋平 木下綾子 ヒケットクリス 中山洋一 富田勝
「CMA 型・S-System 型への自動変換ツールの開発」
第 25 回分子生物学会（横浜 2002/12）
 7. 中山洋一 柚木克之 木下綾子 ワンエミリー 富田勝
「e-Rice プロジェクト：二次代謝を含めたモデル化を可能とするハイブリッドアルゴリズム」
第 25 回分子生物学会（横浜 2002/12）
 8. ワンエミリー 中山洋一 石井公太郎 橋本健太 ダールハワン 柚木克之 木下綾子 富田勝
「e-Rice プロジェクト：E-CELL System を用いたイネシミュレーションモデルの開発」
第 25 回分子生物学会（横浜 2002/12）
 9. 木下綾子 中山洋一 末松誠 富田勝
「ヒト赤血球の代謝シミュレーションモデルの構築と病態解析への応用」
第 65 回日本血液学会・第 45 回日本臨床血液学会（大阪 2003/8）
 10. 木下綾子 彦坂圭介 中山洋一 末松誠 富田勝
「ガス代謝を考慮したヒト赤血球の全代謝シミュレーションにむけて」
第 26 回分子生物学会（神戸 2003/12）

| Enzymes | | | |
|---------------------|--|--------|--|
| HK | hexokinase | PGI | phosphoglucoisomerase |
| PFK | phosphofructokinase | ALD | fructose bisphosphate aldolase |
| TPI | triose-P isomerase | GAPDH | glyceraldehyde dehydrogenase |
| PGM | phosphoglyceromutase | PGK | 3-phospho-glycerate kinase |
| EN | enolase | PK | pyruvate kinase |
| LDH | lactate dehydrogenase | DPGM | 2,3DPG synthase |
| DPGase | 2,3DPG phosphatase | | |
| 6PGLase | 6-P-gluconolactonase | 6PGODH | P-gluconate dehydrogenase |
| TK2 | transketonase 2 | R5PI | ribose 5-phosphate isomerase |
| TK1 | transketonase 1 | X5PI | xylulose 5-phosphate isomerase |
| TA | transaldolase | APK | adenylate kinase |
| ADPRT | adenine phosphoribosyltransferase | AMPDA | AMP deaminase |
| AK | adenosine kinase | AMPase | AMP phosphohydrolase |
| PRPP _{syn} | PRPP synthetase | PRM | phosphoribomutase. |
| PNPase | purine nucleoside phosphorylase | IMPase | inosine monophosphatase |
| HGPRT | hypoxanthine phosphoribosyltransferase | ADA | adenosine deaminase |
| Metabolites | | | |
| GLC | glucose | G6P | glucose-6-phosphate |
| F6P | fructose 6-phosphate | FDP | fructose 1,6-bisphosphate |
| PYR | pyruvate | GA3P | glyceraldehyde 3-phosphate |
| 1,3DPG | 1,3-bisphosphoglycerate | 2,3DPG | 2,3-bisphosphoglycerate |
| 3PG | 3-phosphoglycerate | 2PG | 2-phosphoglycerate |
| PEP | phosphoenolpyruvate | DHAP | dihydroxyacetone phosphate |
| LAC | lactate | GL6P | 6-phosphogluconolactone |
| GO6P | 6-phosphogluconate | RU5P | ribulose 5-phosphate |
| X5P | xylulose-5-phosphate | E4P | erythrose 4-phosphate |
| S7P | sedoheptulose 7-phosphate | R5P | ribose-5-phosphate |
| PRPP | phosphoribose 1-diphosphate | ADF | adenine |
| IMP | inosine monophosphate | R1P | 5-phospho-alpha-D-ribose 1-diphosphate |
| INO | inosine | ADO | adenosine |
| HX | hypoxanthine | AMP | adenosine monophosphate |
| NADP | nicotinamide adenine phosphate | NADPH | nicotinamide adenine phosphate |
| NAD | nicotinamide adenine dinucleotide | NADH | nicotinamide adenine dinucleotide |

本文中で使用された主な物質/酵素の省略語一覧

関連図書

- [1] Beutler E, Dern RJ and Alving AS. **The hemolytic effect of primaquine VI. An in vitro test for sensitivity of erythrocytes to primaquine.** J Lab Clin Med. 45:40-50, 1955
- [2] Alving AS, Carson PE, Flanagan CL and Ickes CE. **Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes.** Science 124: 484-5, 1956
- [3] Srivastava SK and Beutler E. **The transport of oxidized form of glutathione from human erythrocytes.** J Biol Chem. 244:9-16, 1969
- [4] Wang YM, Patterson JH and Van Eys J. **The potential use of xylitol in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency anemia.** J Clin Invest. 50(7):1421-8, 1971
- [5] Orłowski M. and Meister A.: **Partial Reactions Catalyzed by γ -glutamylcysteine Synthetase and Evidence for an Activated Glutamate Intermediate** J Biol Chem. 246(23):7095-105, 1971
- [6] Orłowski M and Meister A. **Isolation of Highly Purified γ -glutamylcysteine Synthetase from Rat Kidney** Biochemistry, 10.3, 372-380 1971
- [7] Blume KG and Beutler E. **Purification and properties of galactokinase from human red blood cells.** J Biol Chem. 246(21):6507-10, 1971
- [8] Wenzel K, Gauer J, Zimmermann G and Hofmann E. **Purification of human erythrocyte phosphofructokinase.** FEBS Lett. 19(4):281-4, 1972
- [9] Eilam Y and Stein WD. **A simple resolution of the kinetic anomaly in the exchange of different sugars across the membrane of the human red blood cell.** Biochim Biophys Acta. 14:266(1):161-73, 1972
- [10] Srivastava SK, Blume KG, Van Loon C and Beutler E. **Purification and kinetic properties of galactokinase from human placenta.** Arch Biochem Biophys. 150(1):191-8, 1972
- [11] Wendel A, Flohe L. **[Glutathione biosynthesis. II. A kinetic approach to the reaction mechanism of glutathione synthetase (EC 6.3.2.3)]** Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 353(4):523-30, 1972 German.
- [12] Moses SW, Bashan N.: **Fructose metabolism in the human red blood cell.** Isr J Med Sci. 10(7):707-11, 1974
- [13] Meister A. **Glutathione: Metabolism and function via the gamma-glutamyl cycle** Life Sciences 15: 177-190, 1974

- [14] Kim S. **S-adenosylmethionine: protein-carboxyl methyltransferase from erythrocyte.** Arch Biochem Biophys. 161(2):652-7, 1974
- [15] Richman PG and Meister A. **Regulation of gamma-Glutamyl-Cysteine Synthetase by Nonallosteric Feedback Inhibition by Glutathione** J Biol Chem. 250(4):1422-1426, 1975
- [16] Tedesco TA. **Studies on the Molecular Defect in Galactosemia** UCLA Forum Med Sci.18:467-77, 1975
- [17] Agarwal KC, Agarwal RP, Stoeckler JD and Parks RE Jr. **Purine nucleoside phosphorylase. Microheterogeneity and comparison of kinetic behavior of the enzyme from several tissues and species.** Biochemistry 14(1):79-84, 1975
- [18] Storer AC and Cornish-Bowden A. **Calculation of the true concentrations of species present in mixtures of associating ions** Biochem J. 159:1-5, 1976
- [19] Yip B and Rudolph FB. **The kinetic mechanism of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase** J Biol Chem. 251(12):3563-8, 1976
- [20] Sakura R and Meister A. **Covalent interaction of L-2-amino-4-oxo-5-chloropentanoate at glutamate binding site of gamma-glutamylcysteine synthetase.** J Biol Chem. 252(8):2606-2610, 1977
- [21] Kraus J, Packman S, Fowler B and Rosenberg LE. **Purification and properties of cystathionine beta-synthase from human liver. Evidence for identical subunits.**J Biol Chem.253(18):6523-8,1978
- [22] Ginsburg H. **Galactose transport in human erythrocytes. The transport mechanism is resolved into two simple asymmetric antiparallel carriers.**Biochim Biophys Acta. 506(1):119-35, 1978
- [23] Lewis AS, Lowy BA. **Human erythrocyte purine nucleoside phosphorylase: molecular weight and physical properties. A Theorell-Chance catalytic mechanism.** J Biol Chem.254(19):9927-32, 1979
- [24] Kondo T, Dale GL and Beutler E. **Glutathione transport by inside-out vesicles from human erythrocytes** Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77(11):6359-62,1980
- [25] Young JD, Jones EM and Ellory JC. **Amino Acid Transport in Human and Sheep Erythrocytes.** Proc R soc Lond B. Biological Sciences 209:355-75, 1980
- [26] Holzman TF. and Baldwin TO.; **Proteolytic inactivation of luciferases from three species of luminous marine bacteria, Beneckea harveyi, Photobacterium fischeri, and Photobacterium phosphoreum: Evidence of a conserved structural feature** Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 77(11)6363-6367 1980
- [27] Freitag C and Clarke S. **Reversible methylation of cytoskeletal and membrane proteins in intact human erythrocytes.** J Biol Chem. 256(12):6102-8, 1981
- [28] Kondo T, Dale GL and Beutler E. **Studies on glutathione transport utilizing inside-out vesicles prepared from human erythrocytes** Biochim Biophys Acta,645,132-136 1981

- [29] Schandle VB and Rudolph FB. **Isotope exchange at equilibrium studies with rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase.** J Biol Chem. 25;256(14):7590-4, 1981
- [30] Banroques J, Gregori C and Schapira F. **Purification and characterization of human erythrocyte uridylyl transferase.** Biochim Biophys Acta. 657(2):374-82., 1981
- [31] York MJ, Kuchel PW, Chapman BE and Jones AJ. **Incorporation of labelled glycine into reduced glutathione of intact human erythrocytes by enzyme-catalysed exchange** Biochem.J.207,65-72 1982
- [32] Al-saleh EA and Wheeler KP. **Transport of neutral amino acids by human erythrocytes.** Biochim Biophys Acta. 684: 157-71, 1982
- [33] Barsky DL and Hoffee PA. **Purification and characterization of phosphopentomutase from rat liver** Biochim Biophys Acta 743:162-71, 1983
- [34] Hamasaki N, Matsuyama H and Hirota-Chigita C. **Characterization of phosphoenolpyruvate transport across the erythrocyte membrane. Evidence for involvement of band 3 in the transport system.** Eur J Biochem. 132(3):531-6, 1983
- [35] Oden KL and Clarke S. **S-adenosyl-L-methionine synthetase from human erythrocytes: role in the regulation of cellular S-adenosylmethionine levels.** Biochemistry 22(12):2978-86, 1983
- [36] Ninfali P, Accorsi A, Palma F, Fazi A, Piatti E, Chiarantini L and Fornaini G. **Human erythrocyte phosphoglucomutase: comparison of the kinetic properties of PGM1 and PGM2 isoenzymes.** Biochimie. 66(9-10):617-23, 1984
- [37] Walder JA, Chatterjee R, Steck TL, Low PS, Musso GF, Kaiser ET, Rogers PH and Arnone A. **The interaction of hemoglobin with the cytoplasmic domain of Band3 of the human erythrocyte membrane** J Biol Chem. 259(16):10238-46, 1984
- [38] Hamasaki N. **[Transport of phosphoenolpyruvate across the erythrocyte membrane]** Seikagaku. 56(6):388-401, 1984 Japanese
- [39] Hamasaki N. **2,3-Bisphosphoglycerate inhibits the transport of phosphoenolpyruvate across the erythrocyte membrane.** Biochem Biophys Res Commun. 122(2):609-12, 1984
- [40] Jenkins JD, Madden DP and Steck TL. **Association of phosphofructokinase and aldolase with the membrane and the intact erythrocyte** J Biol Chem. 259(15):9374-8, 1984
- [41] Werner A and Heinrich R. **A kinetic model for the interaction of energy metabolism and osmotic states of human erythrocytes. Analysis of the stationary "in vivo" state and of time dependent variations under blood preservation conditions.** Biomed Biochim Acta. 44(2):185-212, 1985
- [42] Thorburn DR and Kuchel PW. **Regulation of the human-erythrocyte hexose-monophosphate shunt under conditions of oxidative stress** Eur.J.Biochem 150,pp.371-386,1985

- [43] Accorsi A, Fazi A, Ninfali P, Piatti E, Palma F, Piacentini MP and Fornaini G. **Glucose-1,6-P2 synthesis, phosphoglucomutase and phosphoribomutase correlate with glucose-1,6-P2 concentration in mammals red blood cells.** *Comp Biochem Physiol B* 80(4):839-42, 1985
- [44] Jamil H and Clarke JB. **Mechanism of action of rabbit liver phosphoglucomutase.** *Biochem J* 230(3):791-5, 1985
- [45] Jenkins JD, Kenzdy FJ and Steck TL **Mode of interaction of phosphofructokinase with the erythrocyte membrane** *J Biol Chem.* 260(19):10426-33, 1985
- [46] Lerner J and Larimore DL. **Comparative aspects of the apparent Michaelis constant for the neutral amino acids transport in several animal tissue.** *Comp Biochem Physiol.* 84B(3):235-48, 1986
- [47] Micheli V, Sestini S and Ricci C. **Purine and pyridine nucleotide production in human erythrocytes.** *Arch Biochem Biophys* 244(2):454-8, 1986
- [48] Low PS. **Structure and function of the cytoplasmic domain of band 3: center of erythrocyte membrane-peripheral protein interactions.** *Biochim Biophys Acta.* 864: 145-67, 1986
- [49] Torres NV, Mateo F, Melendez-Hevia E and Kacser H. **Kinetics of metabolic pathways. A system in vitro to study the control of flux.** *Biochem J.* 234(1):169-74, 1986
- [50] Palsson BØ, Joshi A and Ozturk SS. **Reducing complexity in metabolic networks: making metabolic meshes manageable.** *Fed Proc.* 46(8):1485-9, 1987
- [51] Kondo T, Ohtsuka Y, Shimada M, Kawakami Y, Hiyoshi Y, Tsuji Y, Fujii H and Miwa S. **Erythrocyte-Oxidized Glutathione Transport in Pyrimidine 5-Nucleotidase Deficiency** *American Journal of Hematology* 26 1987
- [52] Hawkins CF and Bagnara AS. **Adenosine kinase from human erythrocytes: kinetic studies and characterization of adenosine binding sites.** *Biochemistry* 26(7):1982-7, 1987
- [53] Hamasaki N, Kawano Y and Inoue H. **The active center of transport for phosphoenolpyruvate and inorganic phosphate in the human erythrocyte membrane.** *Biomed Biochim Acta.* 46(2-3):51-4, 1987
- [54] Hamasaki N. [Transport of inorganic phosphoric acid and phosphoenolpyruvic acid through the erythrocyte membrane: protein chemistry of the transport activities] *Rinsho Byori.* 74:47-55. 1987 Japanese
- [55] Jacobasch G, Buckwitz D, Jurowski R, Gerth C, Plonka A and Kuckelkorn U. **Heterogeneity of Glucose-6-phosphate dehydrogenase enzymopathies in the GDR** *Biomed. Biochim. Acta* 46 177-181, 1987
- [56] Micheli V, Sestini S, Rocchigiani M, Pescaglioni M and Ricci C. **Nucleotide synthesis in human erythrocyte: correlations between purines and pyridines.** *Biomed Biochim Acta.* 46(2-3):268-72, 1987

- [57] Low PS, Allen DP, Zioncheck TF, Chari P, Willardson BM, Geahlen RL and Harrison ML. **Tyrosine phosphorylation of Band3 inhibits peripheral protein binding** J Biol Chem. 262(10):2592-6, 1987
- [58] Domin BA, Mahony WB, Zimmerman TP.: **Purine nucleobase transport in human erythrocytes. Reinvestigation with a novel "inhibitor-stop" assay.**J Biol Chem.263(19):9276-84, 1988
- [59] 杉山俊博 [酵素蛋白質のグルタチオンによる活性修飾 (Modification of enzyme activity by glutathione)] 蛋白質 核酸 酵素 Vol.33 1988
- [60] McIntyre LM, Thorburn DR, Bubb WA and Kuchel PW. **Comparison of computer simulations of the F-type and L-type non-oxidative hexose monophosphate shunts with ³¹P-NMR experimental data from human erythrocytes** Eur.J.Biochem 180,pp 399-420(1989)
- [61] Schuster R, Jacobasch G and Holzhutter HG. **Mathematical modelling of metabolic pathways affected by an enzyme deficiency** Eur J Biochem 182(3):605-12, 1989
- [62] Palsson BØ, Narang A and Joshi A. **Computer model of human erythrocyte metabolism.** Prog Clin Biol Res. 319:133-50, 1989
- [63] Joshi A and Palsson BØ; **Metabolic Dynamics in the Human Red Cell. PartI –A comprehensive kinetic model.** J Theor Biol. 141(4):515-28,1989
- [64] Joshi A and Palsson BØ; **Metabolic Dynamics in the Human Red Cell. PartII –Interactions with the environment.** J Theor Biol. 141(4):529-45,1989
- [65] Joshi A and Palsson BØ; **Metabolic Dynamics in the Human Red Cell. PartIII –Metabolic Reaction Rates** J Theor Biol. 142(1):41-68,1990
- [66] Joshi A and Palsson BØ; **Metabolic Dynamics in the Human Red Cell. PartIV –Data prediction and some model computations.** J Theor Biol. 142(1):69-85,1990
- [67] Lee ID and Palsson BØ. **A comprehensive model of human erythrocyte metabolism: extensions to include pH effects.** Biomed Biochim Acta. 49(8-9):771-89,1990
- [68] 近藤宇史; 「グルタチオンの代謝異常と溶血性貧血」(臨床病理 1990)
- [69] Caroline R, BERNERS-PRICE SJ, BULLIMAN and KUCHEL PW.; **Kinetic analysis of the human erythrocyte glyoxalase system using H-NMR and a computer model** Eur.J.Biochem.193,83-90 1990
- [70] Buckwitz D, Jacobasch G, Kuckelkorn U, Plonka A and Gerth C. **Glucose-6-phosphate dehydrogenase from plasmodium berhei: kinetic and electrophoretic characterization** Experimental parasitology 70,264-275 1990
- [71] Micheli V, Simmonds HA, Sestini S and Ricci C. **Importance of nicotinamide as an NAD precursor in the human erythrocyte.** Arch Biochem Biophys 15,283(1):40-5,1990

- [72] Montero C, Smolenski RT, Duley JA and Simmonds HA. **S-adenosylmethionine increases erythrocyte ATP in vitro by a route independent of adenosine kinase.** *Biochem Pharmacol* 40(12):2617-23, 1990
- [73] Murakami K. [**Glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus.**](Article in Japanese) *Hokkaido Igaku Zasshi* 66(1):29-40, 1991
- [74] Sestini S, Pescaglioni M, Magagnoli C, Jacomelli G, Rocchigiani M and Simmonds HA. **NAD synthesis in human erythrocytes: study of adenylyl transferase activities in patients bearing purine enzyme disorders.** *Adv Exp Med Biol* 309B:319-22, 1991
- [75] Widdas WF and Baker GF. **The role of the surface energy of water in the conformational changes of the human erythrocyte glucose transporter.** *Cytobios* 66(266-267):179-204, 1991
- [76] Torres NV and Melendez-Hevia E. **Detailed protocol and critical view for the analysis of control in metabolic systems by shortening and enzyme titration.** *Mol Cell Biochem.* 101(1):1-10, 1997
- [77] Terada T, Oshida T, Nishimura M, Maeda H, Hara T, Hosomi S, Mizoguchi T and Nishihara T. **Study on Human Erythrocyte Thioltransferase: Comparative Characterization with Bovine Enzyme and Its Physiological Role under Oxidative Stress** *J. Biochem.* 111, 688-692 1992
- [78] Lee ID and Palsson BØ. **A Macintosh software package for simulation of human red blood cell metabolism** *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 38:195-226, 1992
- [79] Ferretti A, Bozzi A, Di Vito M, Podo F and Strom R. **¹³C and ³¹P NMR studies of glucose and 2-deoxyglucose metabolism in normal and enzyme-deficient human erythrocytes.** *Clin Chim Acta* 1992 208(1-2):39-61, 1992
- [80] Rocchigiani M, Micheli V, Duley JA and Simmonds HA. **Determination of nicotinamide phosphoribosyltransferase activity in human erythrocytes: high-performance liquid chromatography-linked method.** *Anal Biochem.* 205(2):334-6, 1992
- [81] Ideguchi H, Okubo K, Ishikawa A, Futata Y and Hamasaki N. **Band 3-Memphis is associated with a lower transport rate of phosphoenolpyruvate.** *Br J Haematol.* 82(1):122-5, 1992
- [82] Sriram R and Ali-Osman F. **Purification and Biochemical Characterization of γ -glytamylcysteine Synthetase from a Human Malignant Astrocytoma Cell Line** *Biochem Mol Biol Int.* 30(6):1053-1060, 1993
- [83] Yamamoto T, Moriwaki Y, Suda M, Agbedana EO, Takahashi S, Nasako Y, Higashino K, Nakamo T and Hiroishi K. **Xylitol-induced increase in purine degradation: a role of erythrocytes.** *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.* 31(1):35-9, 1993
- [84] Sestini S, Ricci C, Micheli V and Pompucci G. **Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase Activity in Human Erythrocytes.** *Arch Biochem Biophys.* 302(1) 206-11, 1993

- [85] Pescaglioni M, Micheli V, Simmonds HA, Rocchigiani M and Pompucci G. **Nicotinic acid phosphoribosyltransferase activity in human erythrocytes: studies using a new HPLC method.** Clin Chim Acta 229(1-2):15-25, 1994
- [86] Lundberg P, Roy S and Kuchel PW. **Fructose 3-phosphate and 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate formation in perfused human erythrocytes: ³¹P NMR studies.** Magn Reson Med. 31(2):110-21, 1994
- [87] Mimouni M, Bontemps F and Van den Berghe G. **Kinetic studies of rat liver adenosine kinase. Explanation of exchange reaction between adenosine and AMP.** Biol Chem. 269(27):17820-5, 1994
- [88] Weidanz JA, Campbell P, DeLucas LJ, Jin J, Moore D, Roden L, Yu H, Heilmann E, Vezza AC. **Glucosamine 6-phosphate deaminase in normal human erythrocyte** British Journal of Haematology 91:72-79,1995
- [89] Schuster R and Holzhutter HG. **Use of mathematical models for predicting the metabolic effect of large-scale enzyme activity alterations Application to enzyme deficiencies of red blood cells** Eur J Biochem 1995
- [90] Grimshaw CE, Bohren KM, Lai CJ and Gabbay KH. **Human aldose reductase: rate constants for a mechanism including interconversion of ternary complexes by recombinant wild-type enzyme.** Biochemistry. 34(44):14356-65, 1995
- [91] Pitkanen E. **Mannose, mannitol, fructose and 1,5-anhydroglucitol concentrations measured by gas chromatography/mass spectrometry in blood plasma of diabetic patients.**Clin Chim Acta. 251(1):91-103, 1996
- [92] Jacobasch G and Rapoport SM. **Hemolytic anemias due to erythrocyte enzyme deficiencies.** Mol Aspects Med. 17(2):143-70, 1996
- [93] Pasaoglu H, Muhtaroglu S, Gunes M, Utas C. **The role of the oxidative state of glutathione and glutathione-related enzymes in anemia of hemodialysis patients.** Clin Biochem. 29(6):567-72, 1996
- [94] Ubbink JB, van der Merwe A, Delpont R, Allen RH, Stabler SP, Riezler R and Vermaak WJ. **The Effect of a Subnormal Vitamin B-6 Status on Homocysteine Metabolism** J Clin invest. 98(1):177-184,1996
- [95] Ni T and Savageau MA; **Model Assessment and Refinement using Strategies from Biochemical Systems Theory:Application to Metabolism in Human Red Blood Cells** J Theor Biol.179(4):329-368,1996
- [96] Yamamoto T, Moriwaki Y, Takahashi S, Ohata H, Nakano T, Yamakita J and Higashino K. **Effect of glucagon on the xylitol-induced increase in the plasma concentration and urinary excretion of purine bases.** Metabolism 45(11):1354-9, 1996
- [97] Messana I, Orlando M, Cassiano L, Pennacchietti L, Zuppi C, Castagnola M and Giardina B. **Human erythrocyte metabolism is modulated by the O₂-linked transition of hemoglobin** FEBS Letters 390:25-8, 1996

- [98] Tomita M, Hashimoto K, Takahashi K, Shimizu T, Matsuzaki Y, Miyoshi F, Saito K, Tanida S, Yugi K, Venter JC and Hutchison CA. **E-CELL: Software Environment for Whole Cell Simulation**. Genome Inform Ser Workshop Genome Inform. 8:147-55,1997
- [99] Horowitz JF, Mora-Rodriguez R, Byerley LO and Coyle EF. **Lipolytic suppression following carbohydrate ingestion limits fat oxidation during exercise**. Am J Physiol. 273(4 Pt1):768-75, 1997
- [100] Alfonzo JD, Sahota A and Taylor MW. **Purification and characterization of adenine phosphoribosyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae***. Biochim Biophys Acta. 1341(2):173-82, 1997
- [101] Ahth MJ, Edinger JW and Creighton DJ. **Diffusion-dependent kinetic properties of glyoxalase 1 and estimates of the steady-state concentrations of glyoxalase-pathway intermediates in glycolyzing erythrocytes** Eur J Biochem. 244:852-857, 1997
- [102] Mulquiney PJ and Kuchel PW. **Model of the pH-dependence of the concentrations of complexes involving metabolites, hemoglobin and magnesium ions in the human erythrocyte** Eur J Biochem. 245:71-83,1997
- [103] Divino Filho JC, Barany P, Stehle P, Furst P, Bergstrom J. **Free amino-acid levels simultaneously collected in plasma, muscle, and erythrocytes of uraemic patients**. Nephrol Dial Transplant. 12(11):2339-48, 1997
- [104] Cheng H, Gomes-Trolin C, Aquilonius SM, Steinberg A, Lofberg C, Ekblom J, Orelund L. **Levels of L-methionine S-adenosyltransferase activity in erythrocytes and concentrations of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in whole blood of patients with Parkinson's disease**. Exp Neurol. 145(2 Pt 1):580-5. 1997
- [105] Micheli V and Sestini S. **Determining NAD synthesis in erythrocytes**. Methods Enzymol 280:211-21,1997
- [106] Yamada K, Tobimatsu T, Kawata T, Wada M, Maekawa A and Toraya T. **Purification and some properties of cobalamin-dependent methionine synthase from rat liver**. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 43(2):177-86. 1997
- [107] Xu Y and Grubmeyer G. **Catalysis in human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: Asp 137 acts as a general acid/base** Biochemistry 37:4114-24, 1998
- [108] Inoue S, Lin SL, Chang T, Wu SH, Yao CW, Chu TY, Troy FA 2nd and Inoue Y. **Identification of Free Deaminated Sialic Acid(2-Keto-3-deoxy-D-galacto-nononic Acid)in Human Red Blood Cells and Its Elevated Expression in Fetal Cord Red Blood Cells and Ovarian Cancer Cells** J Biol Chem. 273(42):27199-27204,1998
- [109] Nixon AE, Hunter JL, Bonifacio G, Eccleston JF and Webb MR. **Purine nucleoside phosphorylase:its use in a spectroscopic assay for inorganic phosphate and for removing inorganic phosphate with the aid of phosphodeoxyribomutase**. Anal Biochem. 265(2):299-307. 1998

- [110] Misra I and Griffith OW. **Expression and purification of human gamma-glutamylcysteine synthetase.** *Protein Expr Purif.* 13(2):268-76, 1998
- [111] Nielsen J. **Metabolic engineering: techniques for analysis of targets for genetic manipulations.** *Biotechnol Bioeng.* 58(2-3):125-32, 1998
- [112] Tomita M, Hashimoto K, Takahashi K, Shimizu TS, Matsuzaki Y, Miyoshi F, Saito K, Tanida S, Yugi K, Venter JC and Hutchison CA 3rd **E-CELL: software environment for whole-cell simulation.** *Bioinformatics.* 15(1):72-84, 1999
- [113] Barbagallo M, Dominguez LJ, Tagliamonte MR, Resnick LM and Paolisso G. **Effects of Glutathione on Red Blood Cell Intercellular Magnesium -Relation to Glucose Metabolism** *Hypertension* July 1999
- [114] Selhub J. **Homocysteine metabolism** *Annu Rev Nutr.* 19:217-246, 1999
- [115] Mulquiney PJ and Kuchel PW. **Model of 2,3-bisphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations:in vivo kinetic characterization of 2,3-bisphosphoglycerate synthase/phosphatase using ^{13}C and ^{31}P NMR.** *Biochem J.* 1999 342 Pt 3:567-80, 1999
- [116] Mulquiney PJ ,Bubb WA and Kuchel PW. **Model of 2,3-bisphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations:equations and parameter refinement.** *Biochem J.* 342 Pt 3:581-96, 1999
- [117] Mulquiney PJ and Kuchel PW. **Model of 2,3-bisphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations:computer simulation and metabolic control analysis.** *Biochem J.* 1999 342 Pt 3:597-604, 1999
- [118] Sheng XR, Li X and Pan XM. **An iso-random Bi Bi mechanism for adenylate kinase.** *J Biol Chem.* 1999 Aug 6;274(32):22238-42.
- [119] Griffith OW and Mulcahy RT. **The enzymes of glutathione synthesis:gamma-glutamylcysteine synthetase.** *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 73:209-67, xii ,1999
- [120] Raftos JE, Lew VL and Flatman PW. **Refinement and evaluation of a model of Mg^{2+} buffering in human red cells** *Eur J Biochem.* 1999;263:235-45
- [121] Christensen B, Arbour L, Tran P, Leclerc D, Sabbaghian N, Platt R, Gilfix BM, Rosenblatt DS, Gravel RA, Forbes P, Rozen R.: **Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects.** *Am J Med Genet.* 84(2):151-7, 1999
- [122] Suliman ME, Divino Filho JC, Barany P, Anderstam B, Lindholm B, Bergstrom J.: **Effects of high-dose folic acid and pyridoxine on plasma and erythrocyte sulfur amino acids in hemodialysis patients.** *J Am Soc Nephrol.* 10(6):1287-96, 1999
- [123] Micheli V, Sestini S, Rocchigiani M, Jacomelli G, Manzoni F, Peruzzi L, Gathof BS, Zammarchi E, Pompucci G.: **Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency and erythrocyte synthesis of pyridine coenzymes.** *Life Sci.* 64(26):2479-87, 1999

- [124] Cavaliere F, Meo F, Scapigliati A, Sciarra M, Schiavello R.: **Red blood cell energy metabolism during cardiopulmonary bypass.** *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 40(5):653–7, 1999
- [125] Nimmesgern E, Black J, Futer O, Fulghum JR, Chambers SP, Brummel CL, Raybuck SA and Sintchak MD. **Biochemical analysis of the modular enzyme inosine 5'-monophosphate dehydrogenase.** *Protein Expr Purif*. 17(2):282–9, 1999
- [126] Schadewaldt P, Hammen HW, Loganathan K, Bodner-Leidecker A and Wendel U. **Analysis of concentration and (13)C enrichment of D-galactose in human plasma.** *Clin Chem*. 46(5):612–9, 2000
- [127] Ayabe T, Park SK, Takenaka H, Takenaka O, Maruyama H, Sumida M, Onitsuka T and Hamada M. **The steady-state kinetics of the enzyme reaction tested by site-directed mutagenesis of hydrophobic residues (Val, Leu, and Cys) in the C-terminal alpha-helix of human adenylate kinase.** *J Biochem (Tokyo)*128(2):181–7, 2000
- [128] Njalsson R, Carlsson K, Olin B, Carlsson B, Whitbread L, Polekhina G, Parker MW, Norgren S, Mannervik B, Board PG and Larsson A. **Kinetic properties of missense mutations in patients with glutathione synthetase deficiency.** *Biochem J*. 349(Pt 1):275–9, 2000
- [129] Ristoff E, Augustson C, Geissler J, de Rijk T, Carlsson K, Luo JL, Andersson K, Weening RS, van Zwieten R, Larsson A and Roos D. **A missense mutation in the heavy subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase gene causes hemolytic anemia.** *Blood* 95(7):2193–6, 2000
- [130] Nefyodov LI . Uglyanitska KN , Smirnov VY , Karavay AV and Brzosko AV. **Comparative Evaluation of Blood Plasma and Tumor Tissue Amino Acid Pool in Radiation of Neoadjuvant Preoperative Therapies of Breast Cancer With the Antitumor Drug Ukrain.** *Drugs Exptl Clin Res*. 26:231–7, 2000
- [131] Lawrence SM, Huddleston KA, Pitts LR, Nguyen N, Lee YC, Vann WF, Coleman TA and Betenbaugh MJ. **Cloning and Expression of the Human N-Acetylneuraminic Acid Phosphate Synthase Gene with 2-Keto-3-deoxy-D-glycero-D-galactononic Acid Biosynthetic Aility** *J Biol Chem*. 275(23):17869–77,2000
- [132] Sestini S, Jacomelli G, Pescaglioni M, Micheli V and Pompucci G. **Enzyme Activities Leading to NAD Synthesis in Human Lymphocytes.***Arch Biochem Biophys* 379(2):277–82,2000
- [133] Tomita M. **Whole-cell simulation: a grand challenge of the 21st century.** *Trends Biotechnol*. 19(6):205–10, 2001
- [134] Suliman ME, Filho JC, Barany P, Anderstam B, Lindholm B and Bergstrom J. **Effects of methionine loading on plasma and erythrocyte sulphur amino acids and sulph-hydryls before and after co-factor supplementation in haemodialysis patients** *Nephrol Dial Transplant* 16:102–110,2001
- [135] Njalsson R, Norgren S, Larsson A, Huang CS, Anderson ME and Luo JO. **Cooperative binding of gamma-glutamyl substrate to human glutathione synthetase.** *Biochem Biophys Res Commun*. 289(1):80–4, 2001

- [136] Takahashi K, Yugi K, Hashimoto K, Yamada Y, Chris P and Tomita M. **Computational challenges in cell simulation.** IEEE Intelligent Systems 17:49–53, 2002
- [137] Wiback SJ and Palsson BØ. **Extreme pathway analysis of human red blood cell metabolism** Biophys J 83(2):808–18, 2002
- [138] Jamshidi N, Wiback SJ and Palsson BØ. **In silico model-driven assessment of the effects of single nucleotide polymorphisms(SNPs) on human red blood cell metabolism** Genome Research 12(11):1687–92, 2002
- [139] Micheli V, Gathof BS, Rocchigiani M, Jacomelli G, Sestini S, Peruzzi L, Notarantonio L, Cerboni B, Hayek G and Pompucci G. **Biochemical and molecular study of mentally retarded patient with partial deficiency of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase.** Biochim Biophys Acta. 1587(1):45–52, 2002
- [140] Stoychev G, Kierdaszuk B and Shugar D. **Xanthosine and xanthine. Substrate properties with purine nucleoside phosphorylases, and relevance to other enzyme systems.** Eur J Biochem. 269(16):4048–57, 2002
- [141] **Circulatory Transport and Exchange** National Simulation Resource(NSR) University of Washington 11(1), 2002
- [142] Ruckmann B and Schubert D. **The complex of band3 protein of the human erythrocyte membrane and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: stoichiometry and competition by aldase** Biochim Biophys Acta. 1559:43–55, 2002
- [143] Demehin AA, Abugo OO, Jayakumar R, Lakowicz JR and Rifkind JM. **Binding of hemoglobin to red cell membranes with Eosin-5-maleimide-labeled band3: Analysis of centrifugation and fluorescence lifetime data** Biochemistry 41:8630–7, 2002
- [144] Galtieri A, Tellone E, Romano L, Misiti F, Bellocco E, Ficarra S, Russo A, Rosa DD, Castagnola M, Giardina B and Messana I. **Band3 protein function in human erythrocytes: effect of oxygenation-deoxygenation** Biochim Biophys Acta. 1564:214–8, 2002
- [145] Soga T, Ueno Y, Naraoka H, Ohashi Y, Tomita M and Nishioka T. **Simultaneous determination of anionic intermediates for Bacillus subtilis metabolic pathways by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry.** Anal Chem.74(10):2233–9, 2002
- [146] Soga T, Ueno Y, Naraoka H, Matsuda K, Tomita M and Nishioka T. **Pressure-assisted capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry for analysis of multivalent anions.** Anal Chem.74(24):6224–9, 2002
- [147] Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, Naraoka H, Tomita M and Nishioka T. **Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry.** J Proteome Res.2(5):488–94, 2003
- [148] Ishii N, Nakayama Y and Tomita M. **[Computer models of plant metabolism]** Tanpakushitsu Kakusan Koso.48(15 Suppl):2205–10, 2003 Japanese

- [149] Miyoshi F, Nakayama Y and Tomita M [**E-Cell simulation system and its application to the modeling of circadian rhythm**] *Seikagaku*.75(1):5-16.. 2003 Japanese
- [150] Takahashi K, Ishikawa N, Sadamoto Y, Sasamoto H, Ohta S, Shiozawa A, Miyoshi F, Naito Y, Nakayama Y and Tomita M. **E-Cell 2: Multi-platform E-Cell simulation system** *Bioinformatics*. 19(13):1727-9, 2003
- [151] Schadevaldt P, Kamalanathan L, Hammen HW, Wendel U.: **Stable-isotope dilution analysis of galactose metabolites in human erythrocytes**.*Rapid Commun Mass Spectrom*.17(24):2833-8, 2003
- [152] Baranowska-Bosiacka I, Hlyniczak A.J.: **The effect of lead ions on the energy metabolism of human erythrocytes in vitro**.*Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*.134(3):403-16, 2003
- [153] 藤井寿一**赤血球の機能と異常**中外医学社, 1992
- [154] 水上茂樹**赤血球の生化学**東京大学出版,1977
- [155] 日本生化学学会（編）**細胞機能と代謝マップ** 東京化学同人, 1997
- [156] Bailey LB and Gregory JF 3rd. **Folate Metabolism and Requirements** *J Nutr*. 129(4):779-82, 1999
- [157] 廣野晃、三輪史朗
ヒト赤血球内代謝経路ならびに関連酵素とその病態
赤血球の構造と機能（溶血性貧血）31:2326-2330
- [158] Voet D and Voet JG.(著) **ヴォート生化学 (上)** Chapter 14
- [159] Luzzatto L, Mehta A and Vulliamy T. **Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency** *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th Edition Chapter 179
- [160] Voit EO. **Computational Analysis of Biochemical Systems(A practical Guide for Biochemists and Molecular Biologists)** Cambridge University Press(2000)

病態解析への応用に向けたヒト赤血球代謝シミュレーションモデルの構築

2004年6月10日 初版発行

著者 木下綾子

監修 中山洋一

発行 慶應義塾大学 湘南藤沢学会

〒252-0816 神奈川県藤沢市遠藤5322

TEL:0466-49-3437

Printed in Japan 印刷・製本 ワキプリントピア

ISBN 4-87762-128-8
SFC-MT 2003-002

■ 本論文は修士論文優秀と認められ、出版されたものです。