慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	数理モデルと進化的アルゴリズムを用いた、肝アンモニア代謝における代謝区域化の最適化の考察
Sub Title	
Author	山田, 一翔(Yamada, Kazuto)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2013
Jtitle	生命と情報 No.20 (2013.) ,p.39- 47
JaLC DOI	
Abstract	哺乳類の肝臓は, 肝細胞を主体とする肝小葉と呼ばれる組織単位の集合として捉えられる。肝小葉内では多孔質の特殊な毛細血管(類洞)に沿って肝細胞が並んでいる。肝小葉では, 入力血管である門脈側から, 出力血管である中心静脈(肝静脈側)にかけて, 種々の代謝経路について, 遺伝子発現強度, 酵素活性, 代謝物質濃度が不均質であることが知られており, 代謝区域化と呼ばれている。代謝区域化に関しては, 定量的な測定が報告されているが, その機能的•適応的意義は必ずしも明らかではない。本研究では, 肝アンモニア代謝に区域化が生じる要因を探求するため, 肝内に部位特異的な遺伝子発現制御が存在しない数理モデルを出発点とし, 進化的アルゴリズムを用いて数理モデルの最適化を行い, 結果として得られた代謝区域化のパターンを解析した。 本研究は, 酵素の部位特異的な遺伝子発現調節を対象とし, EAによって世代ごとに変異する変数は, 遺伝子発現調節パターンに限定した。最適化の際の選択圧(評価関数)としては, アンモニア除去速度, 尿素の産生速度, またその際のエネルギー効率など, 代謝区域化の原因となりうるものを用いた。探索の結果, glutamine synthaseなど限られた酵素の挙動がエネルギー効率の最大値を決定しているなど, 代謝区域化の制御因子についていくつかの示唆が得られたので, これらを議論する。
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2013年度学生論文集 修士論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000020-0039

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.

2013年度　修士論文　ダイジェスト

数理モデルと進化的アルゴリズムを用いた、肝アンモニア代謝における代謝区域化の最適化の考察

論文要旨

哺乳類の肝臓は、肝細胞を主体とする肝小葉と呼ばれる組織単位の集合として捉えられる。肝小葉内では多孔質の特殊な毛細血管（類洞）に沿って肝細胞が並んでいる。 肝小葉では、入力血管である門脈側から、出力血管である中心静脈（肝静脈側）にかけて、種々の代謝経路について、遺伝子発現強度、酵素活性、代謝物質濃度が不均質であることが知られており、代謝区域化と呼ばれている。代謝区域化に関しては、定量的な測定が報告されているが、その機能的・適応的意義は必ずしも明らかではない。本研究では、肝アンモニア代謝に区域化が生じる要因を探求するため、肝内に部位特異的な遺伝子発現制御が存在しない数理モデルを出発点とし、進化的アルゴリズムを用いて数理モデルの最適化を行い、結果として得られた代謝区域化のパターンを解析した。本研究は、酵素の部位特異的な遺伝子発現調節を対象とし、EAによって世代ごとに変異する変数は、遺伝子発現調節パターンに限定した。最適化の際の選択圧（評価関数）としては、アンモニア除去速度、尿素の産生速度、またその際のエネルギー効率など、代謝区域化の原因となりうるものを用いた。探索の結果、glutamine synthaseなど限られた酵素の挙動がエネルギー効率の最大値を決定しているなど、代謝区域化の制御因子についていくつかの示唆が得られたので、これらを議論する。

キーワード

1代謝区域化2肝小葉3バイオシミュレーション4最適化5アンモニア代謝

慶應義塾大学大学院政策・メディア研究科

山田　一翔

第1章　序論

肝臓は「化学工場」と喩えられるほど、個体内で多くの代謝を担っている器官である。糖・脂質・アミノ酸の中間代謝は肝臓でほぼ独占的に行われている。消化管で吸収された糖質は、門脈を通ってまず肝臓に入り、そこでフルクトースやガラクトースなどのグルコース以外の単糖をグルコースに変換する、摂食によって得られた余剰分の血糖を吸収し、グリコーゲンの形で蓄える、といった処理を受ける。また、血糖が低下した場合には、アミノ酸やグリコーゲンからグルコースを生成し、血中に放出する、という形でその補充を行っている。トリグリセリドの処理、糖やアミノ酸からの脂質合成、リポタンパク質の合成といった脂質代謝も肝臓で行われる。必須アミノ酸からのアミノ酸の合成、アミノ酸の脱アミノ化、血漿タンパクの合成/分解、などのアミノ酸とタンパク質代謝も肝臓で行われている[1][2]。また、消化管内では、微生物によって生体に有害なアンモニアが発生しており、腸管内から門脈を通って流入するアンモニアの分解も、肝臓で行われる。アンモニアは腸管内だけでなく、体の各部でのアミノ酸分解や、肝臓内でのアミノ酸の分解の際にも生じており、これらも肝臓で分解される。肝臓内において、アンモニアは二通りの経路で分解されており、一つは尿素回路によって尿素となる経路、もう一つはグルタミンシンテターゼによってグルタミンとなる経路である[2]。特に尿素回路は、肝臓特異的な代謝系である。[2]

血管系という観点で肝臓を見た場合、肝臓に入った門脈は細かく枝分かれしていき、最終的に類洞と呼ばれる特殊な毛細血管まで枝分かれし、その後静脈系として再合流して心臓に戻っていく。他の器官における毛細血管と同様に、血液と肝細胞との間の代謝物質のやり取りは類洞で行われるため、必然的に肝臓の代謝活動は類洞周辺で行われる。故に、類洞の周囲の構造は、肝臓の機能単位であると看做すことができる。これを肝小葉と呼ぶ[1][2][3]。

肝小葉内において、入力血管である門脈・肝動脈周辺部(periportal zone)の肝細胞と、出力血管である中心静脈周辺部(perivenous zone)の肝細胞では、遺伝子発現・酵素活性・代謝物質濃度などの様々な要素が異なることが知られている。このような不均質性はmetabolic zonation(代謝区域化)と呼ばれている[4]。metabolic zonationは1978年にJungermannらが提唱した概念で、糖代謝における異質性の知見をベースに、酸化性エネルギー代謝・β酸化・アミノ酸異化・アミノ酸からの尿素形成などの他の肝臓代謝を含めた包括的概念として、門脈周辺部の肝細胞と中心静脈周辺部の肝細胞では代謝機能に不均質性が存在するとしたモデルである[4]。肝細胞が血中の代謝物質を消費し、あるいは代謝物質を生成して血中に放出すれば、その分類洞下流域での代謝物質濃度は下降あるいは上昇するため、不均質性の存在自体は不思議ではない。ただし、metabolic zonationにおいては、そのような受動的な不均質性だけでなく、酵素発現を部位特異的に調節することによる、能動的な不均質性が存在している。このような部位特異的な酵素発現調節機構はエネルギー消費的であるため、もし調節機構が適応的な性質を持たないのであれば、自然選択によって排除されていたはずである。従って、このような酵素発現におけるmetabolic zonationには、何らかの適応的な性質があると考えられる。この適応的な性質が具体的に何であるかを考察するのが、本研究の目的となる。

アンモニア代謝系において、中心静脈周辺部では、Glutamine synthetase（以下GSと表記する）が高発現しており、アンモニアとグルタミン酸の分解とグルタミンの生成が優勢であると考えられている[2][5][6]。また、尿素産生の中間代謝を担う酵素であるCarbamoyl phosphate synthetase-I(以下CPSと表記する)や尿素産生の最終反応を担う酵素であるArginaseは、門脈周辺部で高発現しており、尿素産生は門脈周辺部で優勢であると考えられている[2][6]。GSが中心静脈周辺部で高発現している適応的性質については、尿素産生系ではアンモニアに対する親和性が低く、アンモニア濃度が低濃度となる中心静脈周辺部でのアンモニア除去には適さないため、中心静脈周辺部ではアンモニア高親和性のGSがアンモニア除去を担当しているというスカベンジャーモデルが提唱されている[2][7]。ただし、Jurandirらは、低アンモニア濃度においては、門脈周辺部の尿素産生系の遺伝子発現は肝小葉全体の尿素産生系の遺伝子発現よりも低く、門脈周辺部

よりも下流域において尿素産生が活発であるという結果から、中心静脈周辺部におけるアンモニア除去においても尿素産生系が重要である、というスカベンジャーモデルに対して批判的な主張をしている[8]。

本研究の対象としたアンモニア代謝系のmetabolic zonationにおいては、このように定量的な測定を含めた数多くの知見があり、また分子的なメカニズムの解明も進んでいるものの[6]、適応的性質についての考察は仮説の域を出ていない[2]。これは肝小葉内の部位毎の代謝流束分布を実験的に測定するのが困難であることがまずあげられる。またより根本的な問題としては、metabolic zonationの適応的性質についての仮説を立てたとしても、現在肝小葉で観察される酵素発現の分布だけでは比較対象が存在しないため、さらに効率的な別の酵素発現分布が存在する可能性を否定できない。これを検証するためには、他の酵素発現分布(例えば、GSが中心静脈周辺部特異的な発現をしない場合など)と比較する必要があるが、そのような酵素発現を取る突然変異体を探索・作成することは、遺伝学的に困難である。そこで本研究では、肝アンモニア代謝におけるmetabolic zonationの適応的性質について、Ohnoらの肝小葉数理モデルによるアプローチを行った[2]。Ohnoらの数理モデルであれば、肝小葉内の部位毎の代謝流束を計算することは容易であるし、また、他の酵素発現分布を示す肝小葉を数理モデルで表現するのは比較的簡単であるからである。また、適応的性質についての仮説を評価関数として数式化し、最適化を行うことで、その仮説において、最も効率的と期待される酵素発現分布を数理的に求めた。もしその仮説が妥当なものであれば、最適化によって選択された最も適応的と期待される酵素発現分布は実際に観察されるmetabolic zonationに近いものとなるはずであり、逆に仮説が妥当なものでなければ、実際に観察されるmetabolic zonationとは異なるものとなるはずである。そのため、仮説の数理的な妥当性について、一定の考察を与えられると考えられる。

第2章　対象と手法

2.1部位特異的遺伝子発現勾配の数理モデル

metabolic zonationにおける、不均質な酵素発現分布を他の手法との兼ね合い上数理的に表現する必要があったため、Christoffelsらによる数理モデル(以下、Christoffelsモデルと表記する。)を用いて表現した[2][9]。これは、

(1)酵素発現の不均質性は、なんらかの代謝物質濃度に対する細胞の応答である。(2)その代謝物質は、細胞によって生産もしくは消費されていき、類洞を門脈側から静脈側へ進むほど、増加もしくは減少する。(3)その代謝物質は転写因子を活性化させ、それによって酵素発現を増やす働きをする。

という仮定を置いたうえで、

その代謝物質によって活性化された転写因子の濃度$[F]$を相対位置Xに対する関数

$$[F]=0.0125X \qquad \text{...(式1)}$$

もしくは

$$[F]=0.2-0.0125X \qquad \text{...(式2)}$$

X: portal triad を0、central vein を8とした時の、肝小葉内の相対位置（relative position）。

として定義し、

酵素の発現強度Yを、$[F]$に対して

$$Y=[F]^{n}/([F]^{n}+K^{n}) \qquad \text{...(式3)}$$

もしくは

$$Y=[F]^{na}/([F]^{na}+Ka^{na})+[F]^{nb}/([F]^{nb}+Kb^{nb}) \qquad \text{...(式4)}$$

Y:発現強度（相対値）

n, na, nb: Hill coefficient
K, Ka, Kb: dissociation constant.

と算出する数理モデルである。n, Kあるいはna, Ka, nb, Kbは発現勾配の形を決める重要なパラメーターであり、これらのパラメーターを変動させることで、様々な酵素発現分布を一つのモデルで表現することが可能である。

2.2 肝小葉アンモニア代謝のモデル

肝小葉におけるアンモニア代謝のモデルとしては、Ohnoらの数理モデルを用いた。肝小葉内には肝細胞が約50万個含まれており、これら一つ一つの代謝を全て計算するのは現実的ではない。また、仮に均質な細胞集団であれば、一つの細胞の代謝を計算すれば、その他の細胞の代謝も同様であると仮定でき、細胞集団全体の挙動を理解することが可能となるが、肝小葉にはmetabolic zonationが存在する以上、均質な細胞集団として扱うのは適切ではない。そこでOhnoらは、肝小葉を類洞とそれに隣接する肝細胞の集合体として捉え、類洞中の血液と、血液と代謝物質のやり取りを行う複数の肝細胞集団で構成された数理モデル（肝小葉モジュールモデル）によって肝小葉を表現する数理モデル（以下、Ohnoモデルと表記する。）を構築した[2](図1)。Ohnoモデルは細胞シミュレーションのための汎用ソフトウェアであるE-CELLを用いてシミュレーションされており[2][10]、各肝細胞集団の中では、物質濃度と代謝流束が動的にシミュレーションされている。

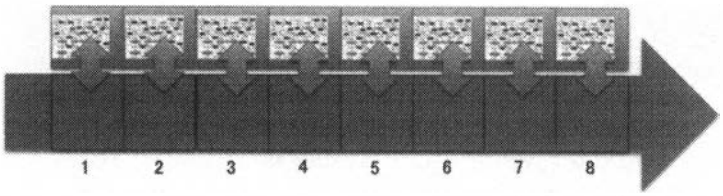

図 1:Ohnoモデルの概念図。図の下部分の左向きの矢印が類洞を表しており、矢印の方向に血流が流れている。血中の代謝物質は血流に沿って運ばれる。図の上部分の8つの長方形は、肝細胞集団を表している。肝細胞集団は隣接した類洞の血液と代謝物質の流出入を行っており、肝細胞集団同士では血液を介して間接的に代謝物質の移動が行われる。

2.3 最適化手法

本研究の目的は、metabolic zonationの適応的性質を考察することである。そのために、適応的性質についての仮説を評価関数として数式化し、最適化を行うことで、その仮説において、最も効率的と期待される酵素発現分布を数理的に求めた。最適化手法には、生命進化を模した最適化手法である、進化的アルゴリズムを用いた。具体的には以下の手順で評価関数（仮説）に対して最適な肝小葉を演算するものである。個体群の大きさは10個体とし、5世代たっても一切の評価の改善が起こらなかった場合には最適化をそこで終了する。

1. 最初の「個体」を生成し、「親」個体とする。親個体は、Christoffelsの数理モデルにおけるn, Kあるいはna, Ka, nb, Kbの値を「遺伝型」として保有している。
2. 親個体の持つ「遺伝型」をコピーし、複数の「子供」を作り、「個体群」を形成する。
3. 個体群の一部に「突然変異（「遺伝型」のランダムな変更）」を行う。この「突然変異」によって、「遺伝型」と対応する酵素発現分布も変化する。
4. 各個体の持つ「遺伝型」を元に各部位における酵素濃度を算出し、大野らのモデルに代入し、代謝シミュレーションを行う。
5. 代謝シミュレーションによって得られた各部位における流束・代謝物質濃度を元に、評価関数の値を算出する。
6. 最も評価が良かった個体を次の親個体とする。
7. ステップ2から6の処理を「1世代」とし、終了条件を満たすまで1世代の処理を繰り返す。

評価関数は、以下の3種を用いた。

1. 尿素産生のエネルギー効率(尿素一分子を生成する際に消費されるATP分子の数)。
2. 中心静脈周辺部における血中アンモニア濃度。
3. 式5で表される評価関数1と2の線形結合。線形結合の重みづけKは完全に恣意的なものであり、科学的根拠に基づいたものではない。

$$EV=K[NH_3]+E \quad \text{...(式5)}$$

EV:評価関数の値

K: 2.6e5/M

E:尿素産生のエネルギー効率（無次元量）

$[NH_3]$:中心静脈周辺部におけるアンモニア濃度(M)

第3章　結果

3.1血中アンモニア濃度を効率的に調節する設計

肝アンモニア代謝の適応的性質を説明する有力な仮説として、スカベンジャーモデルがある。尿素産生系ではアンモニアに対する親和性が低く、アンモニアが尿素産生で消費されて比較的低濃度となる門脈周辺部でのアンモニア除去には適さないため、門脈周辺部ではアンモニア高親和性のGSがアンモニア除去を担当し、アンモニア濃度を有害とならない範囲まで低下させるというものである[2][7]。スカベンジャーモデルが正しいとすれば、中心静脈周辺部における血中アンモニア濃度が代謝区域化の重要な要因となるため、これを評価関数として用いた。最適化の結果、GS, OATが門脈周辺部特異的に高発現し、CPSが中心静脈周辺部で高発現する濃度勾配が選択された（図2）。

3.2 エネルギー効率を最大にする設計

3.1と同じ条件下で、評価関数だけをエネルギー効率に置き換えて最適化を行った。最適化の結果、GSが中心静脈周辺部で特異的に発現し、CPSが門脈周辺部で特異的に高発現する濃度勾配が選択された。(図3)

3.3 エネルギー効率とアンモニア濃度の線形結合を最適化する設計

3.1、3.2と同じ条件下で、エネルギーとアンモニア濃度を線形結合した（式5）ものを評価関数に置き換えて最適化を行った。最適化の結果、GS、OATは中心静脈周辺部で特異的に高発現する濃度勾配が、CPSは門脈周辺部および中流域で高発現し、中心静脈周辺部において比較的低発現する濃度勾配が選択された。(図4)

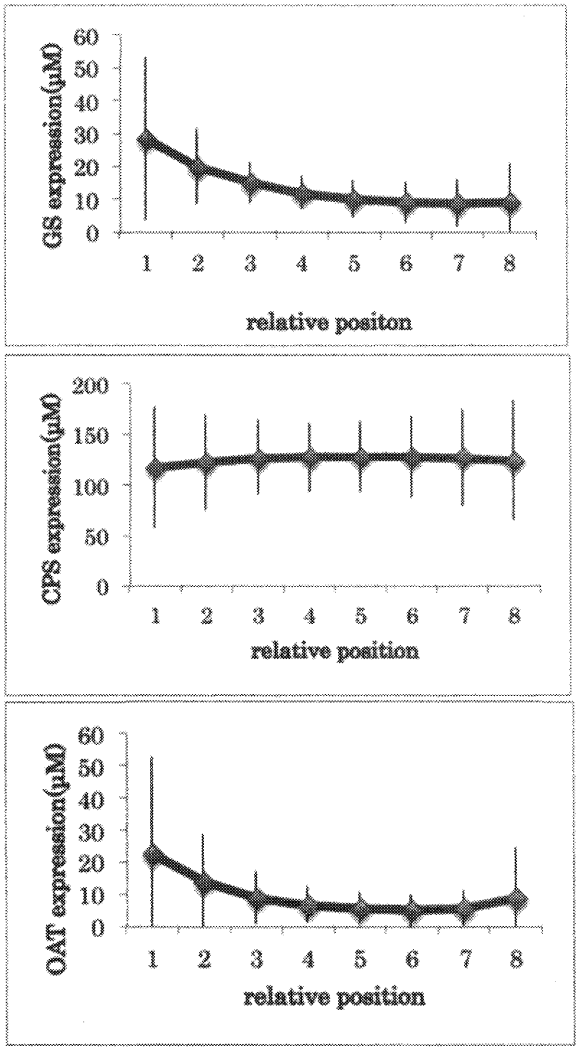

図 2: 評価関数としてアンモニア濃度を用いて最適化した場合のGS、CPS、OATの濃度勾配（平均値）。エラーバーは標準偏差。

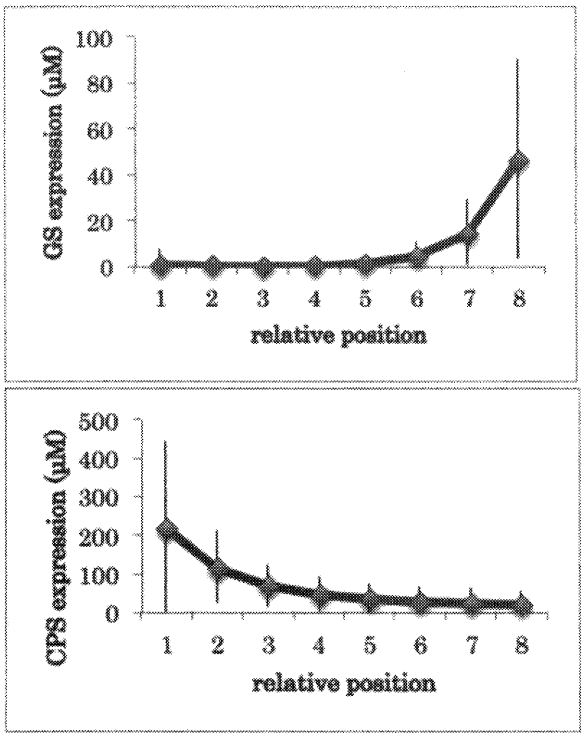

図 3:評価関数として尿素産生のエネルギー効率を用いて最適化した場合の、GS、CPSの濃度勾配（平均

値）。エラーバーは標準偏差

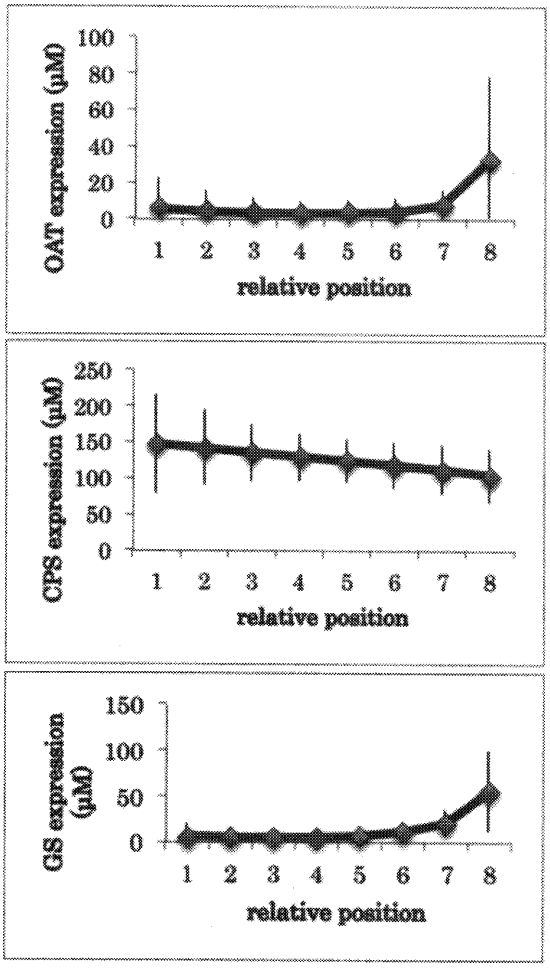

図 4: 尿素産生のエネルギー効率と中心静脈周辺部におけるアンモニア濃度を線形結合した評価関数で最適化した場合の、OAT、CPS、GSの濃度勾配（平均値）。エラーバーは標準偏差。

第４章　考察

アンモニア濃度を評価関数として最適化を行った場合、GSは門脈周辺部特異的に高発現する濃度勾配が選択されており、実際の肝小葉におけるGSの中心静脈特異的な高発現と食い違っていた[2][5][6]。また、実際の肝小葉では門脈周辺部で高発現するCPSは、中心静脈周辺部で優勢である濃度勾配が選択されるなど、全体的に実際の肝小葉で観察される代謝区域化とは食い違っていた[2][6]。このような結果になった理由としては、CPSがアンモニア低親和性であるために、アンモニア濃度が相対的に低下し、除去能力が低下する下流域において、酵素濃度を高めることで除去能力を補っているということが考えられる。またGSはアンモニア高親和性であるために、下流域において濃度が低下しても除去能力の低下が小さく、むしろアンモニア濃度が高い上流域において高発現することで高い親和性により大量のアンモニアを除去した方がアンモニア濃度を効率的に減少させられるということが考えられる。

エネルギー効率を評価関数として最適化を行った場合、GSは中心静脈周辺部特異的に発現する濃度勾配が選択されており、実際の肝小葉におけるGSの中心静脈特異的な高発現と良く似ていた[2][5][6]。CPSは門脈周辺部のみで高発現する濃度勾配が選択されており、門脈周辺部で高発現しているという点では似るものの、実際の肝小葉においてCPSは中流域においても高発現しているため、門脈周辺部のみで高発現するというこの結果は必ずしも妥当なものではない[2][6]。この最適化において、CPS,GSがこのような濃度勾配とな

ったのは、両者がアンモニアという同じ基質を用いる競合関係にあり、しかも双方ともにATPを消費するため、アンモニアが豊富な門脈周辺部において尿素産生系の酵素であるCPSを促進し、GSを抑制した方が、尿素産生のエネルギー効率が高まるためであると考えられる。ただしこの説明は、門脈周辺部でCPSが高発現し、GSが低発現している理由の説明としては妥当なものの、GSが中心静脈周辺部で高発現している事実と矛盾する。従って、この最適化の結果は、GS,CPSの濃度勾配の部分的な説明としては有用であるものの、完全な説明になるとは言えない。

アンモニア濃度とエネルギー効率を線形結合したものを評価関数として用いた場合、GS,OATは中心静脈周辺部で特異的に高発現する濃度勾配が選択された。GS,OATは実際の肝小葉では中心静脈周辺部特異的に発現しており、実際の肝小葉と近い濃度勾配が選択されたと言える[2][5][6]。また、CPSは門脈周辺部および中流域で高発現し、中心静脈周辺部において比較的低発現する濃度勾配が選択された。こちらも、実際の肝小葉においてCPSは類洞上流域・中流域において高発現し、中心静脈周辺部において低発現するため、最適化の結果と類似性があった[2][6]。ただし、中心静脈周辺部におけるCPSの低発現は、実際の肝小葉で観察されるほど顕著では無かった。GSが中心静脈周辺部で特異的に高発現する濃度勾配が選択された理由としては、前述の通り、CPS,GSはアンモニアという同じ基質を用いる競合関係にあるが、中心静脈周辺部でのGSがアンモニアを除去するならば、CPSなどの尿素産生系との競合を抑えつつ、アンモニア濃度を低下させることが可能なため、エネルギー効率とアンモニア濃度の双方を両立させることができるためだと考えられる。OATが中心静脈周辺部で高発現している濃度勾配が選択された理由としては、OATはGSの基質であるグルタミン酸を産生するため、GSの流束を増加させるからだと考えられる。CPSは門脈周辺部（上流）で高発現しつつ、中流・下流においてもある程度の量発現している。これはおそらく、エネルギー効率としてみれば門脈周辺部のみで発現した方が有利である一方、アンモニア濃度の観点から言えば中流・下流域において発現した方が有利であるというトレードオフが働いた結果であると考えられる。

肝小葉において、GSは門脈周辺部特異的に高発現し、CPSは門脈周辺部と中流域（中心静脈周辺部を除く肝小葉全体）において高発現する。エネルギー効率のみ、アンモニア濃度のみを評価関数として、シミュレーションと最適化を行った場合、これらの結果を再現することはできなかったが、両者を線形結合した評価関数を用いた所、実際の肝小葉と良く似た結果が得られた。このことから、肝アンモニア代謝における代謝区域化の進化の中で、エネルギー効率とアンモニア濃度の二つの淘汰圧が同時に働いていたことが示唆された。

本研究のシミュレーション結果は、尿素産生系が除去できなかったアンモニアをGSが除去するとしたスカベンジャーモデル[7]と全く矛盾するわけではないものの、スカベンジャーが進化の中で選択されてきた理由については、アンモニア除去という観点だけでは不十分であり、尿素産生のエネルギー効率という観点も必要なのではないかということが示唆された。

また、CPSの中流・下流域での発現がアンモニア除去において有用であるというシミュレーション結果も得られており、中心静脈周辺部におけるアンモニア除去においても尿素産生系が重要であるとするJurandirらの主張[8]を支持する結果となった。

謝辞

慶應義塾大学環境情報学部 内藤泰宏准教授には、研究全般に渡り、長年お世話になり、多くの有益なアドバイスを頂きました。Ecellプロジェクトの皆様にも数多くのサポートを頂きました。最後に、学部在籍中より長期に渡って、たくさんのチャンスと、素晴らしい研究の場を与えてくださった慶應義塾大学　環境情報学部　冨田勝教授に、心より御礼申し上げます。

参考文献

[1] 泉井 亮 、 金田 研司. カラー図解 人体の正常構造と機能 IV 肝・胆・膵 日本医事新報社(2001)

[2] Ohno H, Naito Y, Nakajima H and Tomita M. Construction of a biological tissue model based on a single-cell model: a computer simulation of metabolic heterogeneity in the liver lobule. Artif Life. 2008 Winter;14(1):3-28.

[3] Norbert R. Katz. Methods for the study of liver cell heterogeneity.
The Histochemical Journal. SEPTEMBER/OCTOBER 1989, Volume 21, Issue 9-10, pp 517-529

[4] Jungermann K, D Sasse . Heterogeneity of liver parenchymal cells. Trends BioChem Sci.1978 July : 198–202.

[5] Watford M, Smith EM. Distribution of hepatic glutaminase activity and mRNA in perivenous and periportal rat hepatocytes. Biochem J. 1990 Apr 1;267(1):265-7.

[6] Sekine S, Ogawa R, Mcmanus MT, Kanai Y, Hebrok M. Dicer is required for proper liver zonation. J Pathol. 2009 Nov;219(3):365-72.

[7] Häussinger D. R6gulation of hepatic metabolism by extracellular nucleotides and eicosanoids. The role of cell heterogeneity. J Hepatol. 1989 Mar;8(2):259-66.

[8] Comar JF, Suzuki-Kemmelmeier F, Constantin J, Bracht A. Hepatic zonation of carbon and nitrogen fluxes derived from glutamine and ammonia transformations. J Biomed Sci. 2010 Jan 7;17:1

[9] Christoffels VM, Sassi H, Ruijter JM, Moorman AF, Grange T, Lamers WH. A mechanistic model for the development and maintenance of portocentral gradients in gene expression in the liver. Hepatology. 1999 Apr;29(4):1180-92.

[10] Tomita M, Hashimoto K, Takahashi K, Shimizu TS, Matsuzaki Y, Miyoshi F, Saito K, Tanida S, Yugi K, Venter JC, Hutchison CA 3rd. E-CELL: software environment for whole-cell simulation. Bioinformatics 15(1):72-84 (1999)