

WAKO

Infomatic World

実験生物学者・
実験化学者のための
IT活用誌

2009

March No. 15

目 次

Hopfield Neural Networkを用いた分子重ね合わせ手法の3D-QSARへの応用 … 2

東京大学大学院 工学系研究科 化学システム工学専攻
教授 船津 公人

“Cell Illustrator”を使ってみよう

(3) シミュレーションを楽しむ …………… 8

東京大学 医科学研究所 ヒトゲノム解析センター
教授 宮野 悟、助教 長崎 正朗、技術職員 斉藤 あゆむ

代謝反応メカニズムをセルイラストレータで再現しよう ……………10

立命館大学 生命科学部 生命情報学科 助教 遠里 由佳子

配座探索システム

“CONFLEX Version 6【コンフレックス】” …………… 7

CoMFA 法をはじめとする多くの 3D-QSAR 手法において、対象とする分子構造を適切に重ね合わせることは、解析を成功させるための重要な因子であるため、種々の重ね合わせ手法が提案されている。著者らも Hopfield Neural Network (HNN) を用いた新しい分子構造重ね合わせ手法を提案している。ここではこの研究の中からこの重ね合わせ手法を紹介する意味で、human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) 阻害剤の 3D-QSAR 解析を取り上げた。HER2 阻害剤 27 化合物について CONFLEX による配座解析を行った後、HNN による重ね合わせを行い、活性配座を推定した。これを基に CoMFA 法による 3D-QSAR 解析を行った結果、 $R^2=0.805$ 、 $Q^2=0.701$ の良好な PLS モデルが得られた。また、その回帰係数の等高線図についての考察を行い、このモデルが妥当であるとの結論を得た。

はじめに

CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) 法[1]は代表的な 3D-QSAR 手法であり、これまで多くの研究が行われている。CoMFA 法をはじめとする 3D-QSAR 手法は、新規化合物の設計に有効であるが、実用にあたりいくつかの注意すべき点が存在する。それは、配座の問題、重ね合わせの問題などである。解析の対象となるすべての化合物について適切な配座を推定し、かつそれらを適切に重ね合わせることは、3D-QSAR 解析を成功させるために非常に重要である。配座の推定とそれらの重ね合わせは密接に関係しているため、それらを同時に求める手法が有効であろうとの考えから、著者は Multiway-PLS 法[2]を用いた配座/重ね合わせ推定手法を提案した[3][4][5]。この手法の概念は、候補となる配座および重ね合わせルールを複数用意し、それらすべての構造記述子について Multiway-PLS 回帰を行った後、そのモデルの回帰係数値を評価することにより、適切な配座および重ね合わせルールを統計的に決定するというものである。

分子の重ね合わせについては他にも多くの手法が開発されている[6][7][8][9]。著者らは 2001 年に Hopfield Neural Network (HNN) を用いた新しい分子構造重ね合わせ手法を提案した[10]。重ね合わせを行う 2 つの分子構造上に疎水性 (Hydrophobic)、水素結合供与 (Hydrogen-bonding donor)、水素結合受容 (Hydrogen-bonding acceptor)、水素結合供与/受容 (Hydrogen-bonding donor/acceptor) の 4 種類のプロパティを定義し、HNN を用いてこれらの対応付けを行うことにより重ね合わせを実現するというものである。この手法を PDB (Protein Data Bank) より引用した 12 組の酵素阻害剤に対して適用し重ね合わせ実験を行ったところ極めて良好な結果を得ることができた[10]。また、COX-2 阻害剤の 3D-QSAR 解析への応用を行い良好な結果も得られている[11]。

ここではこの手法のさらなる実用性を紹介する意味で、HER2 阻害剤の 3D-QSAR 解析へ適用した結果について紹介する。概要は、HER2 阻害剤 27 化合物について、HNN を用いた

重ね合わせおよび活性配座の推定を行った後、CoMFA によるモデリングを行った結果、 $R^2=0.805$ 、 $Q^2=0.701$ の PLS モデルが得られた。そして、回帰係数の等高線図についての考察を行い、妥当なモデルであることを確認したというものである。

手 法

HNN を用いた新しい分子重ね合わせ手法

CoMFA 解析の前処理として、著者らの提案した HNN による重ね合わせ手法[10]を用いた。まず対象とする 2 つの分子上に次の基準に基づいて化学プロパティを設定する。

- Hydrophobic group (HY)
 - ・ 3 つ以上の炭素原子鎖が連続に存在する場合
 - ・ trifluoromethyl の中心の炭素原子
 - ・ 芳香環の中心
- Hydrogen-bonding donor (HD)
 - ・ amine, amide, amidine, guanidine などの水素原子を持つ窒素原子
- Hydrogen-bonding acceptor (HA)
 - ・ carbonyl, sulfonyl, phosphoryl, ester, ether の酸素原子
- Hydrogen-bonding donor/acceptor (HDA)
 - ・ 水酸基の酸素原子
 - ・ thiol の硫黄原子

そして同種のプロパティ同士が対応するように、またそれらのプロパティ間距離の差の 2 乗和が最小となるようにプロパティの対応付けを行う。このプロパティ対応付け問題は組み合わせ最適化問題として定式化が可能であり、それは NP 完全な問題となる。従って対応付けを行うプロパティの数が多い場合、現実的な計算時間で厳密解を求めることは困難となる。これを避けるために、より短時間に精度の良い近似解を得るための最適化手法として次に述べる HNN を用いた。

Hopfield Neural Network (HNN)

HNN は Hopfield ら [12] により提案された人工ニューラルネットワークの一種である。図 1 にその概念図を示す。各ニューロンは互いに結合されておりその値として 0 あるいは 1 を持つ。まず、最小化する目的関数を次の形式で定義する。

$$E = -\frac{1}{2} \sum_i \sum_{j \neq i} W_{ij} S_i S_j + \sum_i \theta_i S_i \quad (1)$$

そして、すべてのニューロンの値をランダムに初期化した後、次のニューロン更新ルールに従ってすべてのニューロンの値を繰り返し更新することにより目的関数値の最小化を行うことが可能である。

$$\sum_j W_{ij} S_j - \theta_i > 0 : S_i = 1 \\ < 0 : S_i = 0 \quad (2)$$

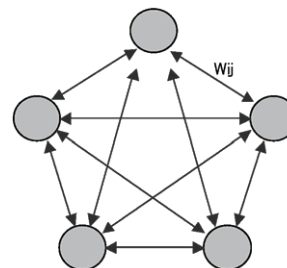
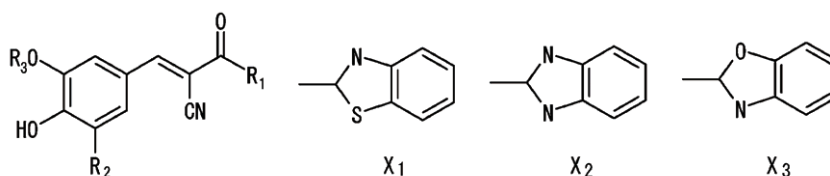
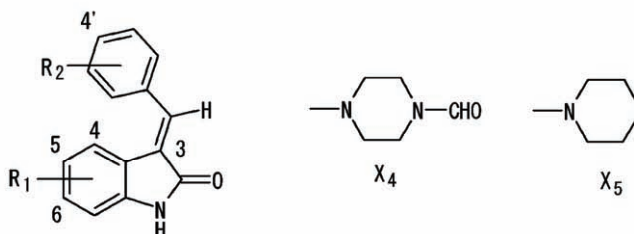


図 1. Hopfield Neural Network.

表 1. HER2 阻害剤とその活性値



no.	R ₁	R ₂	R ₃	pIC ₅₀
1	-NH-Ph	-H	-H	4.35
2	-NH-CH ₂ -Ph	-H	-H	4.92
3	-NH-(CH ₂) ₂ -Ph	-H	-H	5.03
4	-NH-(CH ₂) ₃ -Ph	-H	-H	4.48
5	-NH-(CH ₂) ₄ -Ph	-H	-H	4.66
6	-Ph	-H	-H	4.70
7	-NH-CH ₂ -(4'-OH)-Ph	-H	-H	5.54
8	-NH-(4'-Cl)-Ph	-H	-H	4.21
9	-NH-(2',4'-di-OMe)-Ph	-H	-H	4.70
10	-NH-(2',6'-di-Me)-Ph	-H	-H	4.36
11	-NH-(2',4',6'-tri-Me)-Ph	-H	-H	4.68
12	-NH-cyclo-C ₆ H ₁₁	-H	-H	4.72
13	-NH ₂	-CH ₂ -S-Ph	-Me	6.89
14	-NH ₂	-CH ₂ -S-(2'-COOH)-Ph	-Me	6.35
15	-NH ₂	-CH ₂ -S-(4'-Me)-Ph	-Me	5.78
16	-NH ₂	-CH ₂ -S-CH ₂ -Ph	-Me	6.70
17	-NH ₂	-CH ₂ -S-X ₁	-Me	6.46
18	-NH ₂	-CH ₂ -S-X ₂	-Me	5.82
19	-NH ₂	-CH ₂ -S-X ₃	-Me	5.21



no.	R ₁	R ₂	pIC ₅₀
20	H	4'-X ₄	4.04
21	H	4'-X ₅	4.03
22	H	3',5'-di-CMe ₃ ,4'-OH	4.19
23	5-Cl	3',5'-di-CHMe ₂ ,4'-OH	5.09
24	H	3'-CMe ₃ ,4'-OMe,5'-Br	4.72
25	H	4'-CHMe ₂	4.77
26	H	3',5'-di-CHMe ₂ ,4'-OH	5.15
27	H	3'-CHMe ₂ ,4'-OMe	4.88

解析データ

本手法を検証するためのデータとして、文献[14]より引用した human epidermal growth factor receptor-2 (HER2) 阻害剤 27 化合物を用いた。HER は c-erbB2 とも呼ばれるたんぱく質で、HER1 (EGFR/erbB1), HER2 (erbB2), HER3 (erbB3), HER4 (erbB4) の 4 つのサブタイプを持つことが知られている。このうち HER2 は乳がん患者の約 30%において過剰な状態となっており、乳がんと強い関係が確認されている。解析に用いた化合物の構造および、活性値 (pIC₅₀) を表 1 に示す。

解析手順

以下の手順にしたがって HER2 阻害剤に対する CoMFA 解析を行った。まず、構造の類似度により化合物を 2 つのグループに分割 (1-19, 20-27) し、それぞれのグループを代表する化合物 (13, 21) を決定する。次に、各グループを代表する化合物について CONFLEX[15] を用いてそれぞれ配座解析を行う。そして、配座の全組み合わせについて HNN を用いて重ね合わせを行い、最も良く重なり合う配座を選択し、活性配座の候補とする。こうして得られた代表化合物の活性配座を基準として、各グループに属する他の化合物構造の配座を決定し、CoMFA 解析を行う。

結果

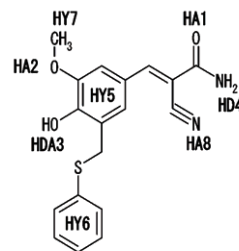
配座解析

各グループを代表する化合物 13、21 について、CONFLEX を用い、配座の発生を行った。化合物 13、21 についてそれぞれ得られた配座の数は 50 および 8 種類であった。そして、配座解析によって得られた全ての配座について、半経験的分子軌道法 (AM1) による構造の最適化を行った。

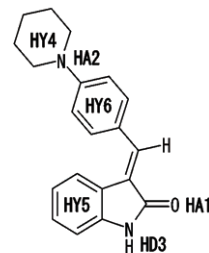
HNN による重ね合わせ

次に、HNN を用いた重ね合わせ手法により配座の全組み合わせについて重ね合わせを行い、良好な重ね合わせを示す配座の組を選択するという操作を通して活性配座の推定を行った。重ね合わせの基準として用いたプロパティの定義を図 2 に、HNN の結果を表 2 に示す。表 2 において、energy は HNN の目的関数値、Rank はその順位、13、22 の列はそれぞれの化合物の配座番号を示す。assignment は HNN により決定されたプロパティの対応関係を示している。例えば、“020765” の 4 番目の数字 7 は、化合物 13 の 7 番目のプロパティ (HY7) と化合物 21 の 4 番目のプロパティ (HY4) とが対応付けられたことを意味している。また、1 番目の数字 0 は、化合物 21 の 1 番目のプロパティ (HA1) が化合物 13 のどのプロパティとも対応付けられなかったことを示す。“020765” および “134705” の対応関係を Fig. 3 に示す。図 3 において同色で示されたプロパティ同士が対応付けられたことを示している。ただし、黒色で示したプロパティは、対応付けが行われなかったことを示す。

表 2 の結果から、全体で最小の目的関数値を示した Rank1 の 45_5 と assignment が 134705 の中で最小値を示した Rank33 の 43_5 の 2 組を活性配座の候補として選択し、CoMFA 解析を行った。この 2 組の配座を重ね合わせた結果を図 4 に示す。なお、assignment の種類としては上記の 2 つ以外に



(a) Compound 13

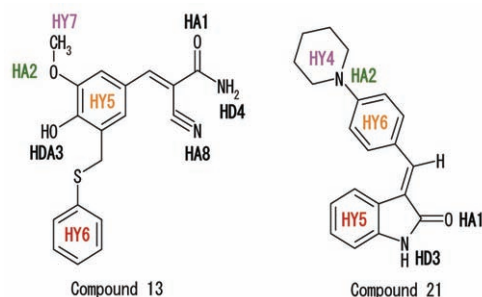


(b) Compound 21

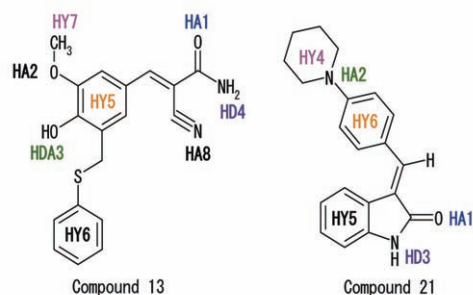
図 2. テンプレート構造に対する化学プロパティ

表 2. HNN の適用結果

Rank	13	22	assignment	energy
1	45	5	020765	-1.070
2	5	8	020765	-0.841
3	5	7	020765	-0.840
4	1	6	020765	-0.768
5	12	6	020765	-0.760
...			020765	
32	1	7	020765	-0.434
33	43	5	134705	-0.378
34	40	5	134705	-0.368
35	12	8	020765	-0.345
...				



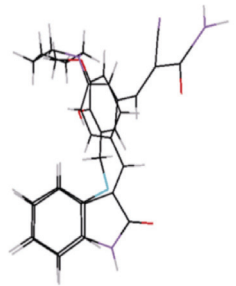
(a) 020765



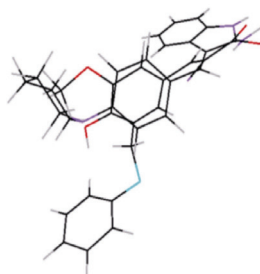
(b) 134705

図 3. 2 つのテンプレート構造間の化学プロパティの対応関係

“124705”、“024705”、“134005”などが見られたが、これらはいずれも Rank が 100 以下であり、また目的関数値が 0.5 以上であるため、詳細な検討はしていない。これらの計算は、C++言語および MATLAB 言語を用いて本研究室において開発されたプログラムを使用し、Microsoft Windows 2000 が動作するコンピュータを用いて行った。また、HNN においては、局所解への収束を防ぐために、シミュレーテッドアニーリング法を用いている。さらに初期値を変えて 50 回の学習を行い、最小の目的関数値を示した結果を採用した。



(a) 45_5

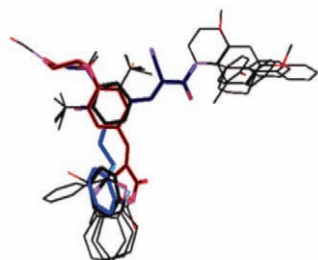


(b) 43_5

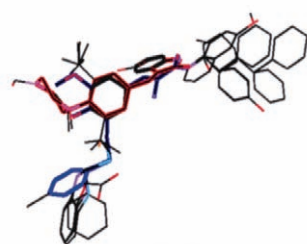
図 4. 2つのテンプレート間の重ね合わせ

CoMFA フィールド値の計算

次に、各グループの代表化合物の配座をもとに、他の化合物の配座を決定し、それらの重ね合わせを行った。また、各グループにおいては基本骨格が同じであるため、重ね合わせは共通の部分構造を基準として実行した。結果として得られた全化合物の重ね合わせ構造を図 5 に示す。化合物 13 は青色、化合物 21 は赤色で示した。なお、図を見やすくするため水素原子は描かれていない。



(a) 45_5



(b) 43_5

図 5. 全ての化合物構造の重ね合わせ

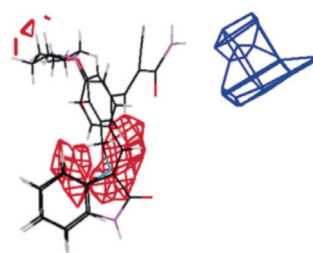
CoMFA による 3D-QSAR 解析を行うため、全構造に対する CoMFA フィールド値の計算を行った。計算範囲は各方向に最低 2Å の余裕をとり、45_5 については $x: -8 \sim 7$ 、 $y: -10 \sim 11$ 、 $z: -10 \sim 17$ 、43_5 については $x: -9 \sim 9$ 、 $y: -18 \sim 9$ 、 $z: -10 \sim 9$ とし、グリッド間隔は 1Å とした。プローブ原子は +1 の電荷を持つ sp^3 炭素を用い、立体、静電の各相互作用を計算した。形式電荷は AM1 チャージを使用した。

CoMFA 解析

CoMFA フィールド値と各化合物の活性値 (pIC_{50}) との間で PLS 法による回帰モデルを構築し、3D-QSAR 解析を行った。その結果、45_5 については成分数 2、 $R^2=0.805$ 、 $Q^2=0.701$ 、43_5 については成分数 2、 $R^2=0.781$ 、 $Q^2=0.646$ のモデルが得られた。最適成分数の決定は leave-one-out 法によるクロスバリデーションによって行った。 R^2 値、 Q^2 値、ともに 45_5 のセットがより良い値を示した。また、文献[14]において CATALYST による Hypothesis Generation を利用した重ね合わせを行っているが、45_5 はこの結果とほぼ一致するものである。以上の理由により、45_5 を最終モデルとして採用した。 R^2 値、 Q^2 値、ともに良好な値を示しており有益な CoMFA モデルが得られたといえる。なお、立体および静電相互作用の寄与率はそれぞれ 0.491、0.509 であった。

考察

図 6 に最終 CoMFA モデルの等高線図を示す。(a) が立体的相互作用、(b) が静電的相互作用についての等高線図であり、ともに赤い領域が正の回帰係数を、青い領域が負の回帰係数を示している。また、図中の構造は各グループの代表として用いた化合物 13 および、化合物 21 である。



(a) 立体相互作用



(b) 静電相互作用

図 6. CoMFA モデルの等高線図

立体的相互作用の等高線図においては、図 6 (a) 中央に赤い領域、右上に青い領域が見られる。赤い領域については、化合物 1-19 の置換位置 R2 に対応しており、この位置にサイズの大きい置換基がつくことにより、活性が上がることを示している。実際、比較的活性の低い化合物 1-12 では水素原

子のみであるのに対し、活性の高い化合物 13-19 ではサイズの大きい置換基が R2 に存在している。逆に青い領域は、周辺にサイズの大きい置換基が存在するときに活性値が下がるということを意味するものである。この位置は化合物 1-19 における R1 の位置に相当し、その位置に置換基が付いたときに活性が下がることを示している。活性の低い化合物 1-12 においてはフェニル基などを含む大きな置換基が R1 に存在するが、活性の高い 13-19 においてはアミノ基である。

図 6 (b) は静電的相互作用についての等高線図である。右上に赤い領域、中央に青い領域が見られる。右上の赤い領域は化合物 1-19 の置換位置 R1 に対応しており、この領域が静電的にプラスであれば活性が上がることを意味する。実際、比較的活性の低い化合物 1-12 においては主に炭素原子、活性の高い化合物 13-19 では水素原子が位置している。同様に、中央の青い領域は R2 に対応し、活性の低い化合物 1-12 では水素原子、活性の高い化合物 13-19 では炭素原子が位置している。

以上のことから最終的な CoMFA モデルから得られる等高線図は、構造-活性データを反映したものであるということが出来る。

本手法では、HNN による重ね合わせにより代表化合物の活性配座を推定した後、それらをもとにして QSAR 解析に用いる他の化合物の配座を決定する必要がある。これは、共通な骨格部位の配座を固定し、置換基を付け替えることによって

行われる。置換基の配座が一意的に定まらない場合には、この作業は QSAR 解析の結果へ影響を与える可能性があり、慎重に行わなければならない。特に比較的サイズの大きい置換基が存在する場合には注意が必要である。

結論

本稿で用いた HER2 阻害剤は、異なる基本骨格を持つ複数のシリーズからなっている。通常の重ね合わせ手法では、このような化合物を対象とする 3D-QSAR 解析は困難であるが、HNN を用いた重ね合わせ手法によりこの問題を解決し、良好な 3D-QSAR モデルを得ることが出来ることを示した。また、COX-2 阻害剤に続き HER2 阻害剤においても良好な結果が得られたことにより、本手法の一般性を示すことができたといえる。

当然ではあるが、HNN 法による構造重ね合わせ手法を利用することで、重ね合わせ対象の構造間の適切な配座の選択も行いながら化学プロパティの一致する Pharmacophore を求められることになる。この Pharmacophore をクエリとして仮想ライブラリの検索を行うことで、新たな薬物候補の獲得につながる可能性も同時に示せたと言える。この場合、水素結合の方向性の調整など細かな工夫は必要ではあるが、CONFLIX との組み合わせにより本 HNN 手法がもたらす利点は大きいと言える。

参考文献

- [1] R.D. Cramer, D.E. Patterson, J.D. Bunce, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 5959-5967 (1988).
- [2] R. Bro, *J. Chemom.*, **10**, 47-61 (1996).
- [3] K.Hasegawa, M.Arakawa, K.Funatsu, *Chemom. Intell. Lab.Syst.*, **47**, 33-40 (1999).
- [4] K.Hasegawa, M.Arakawa, K.Funatsu, *Chemom. Intell. Lab.Syst.*, **50**, 253-261 (2000).
- [5] K.Hasegawa, M.Arakawa, K.Funatsu, *Comput. Chem.*, in press.
- [6] K. Iwase, S. Hirono, *J. Comput.-Aided Mol. Design*, **13**, 499-512 (1999).
- [7] M. Feher, J. M. Schmidt, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **40**, 495-502 (2000).
- [8] P. Labute, C. Williams, M. Feher, E. Sourial, J. M. Schidt, *J. Med. Chem.*, **44**, 1483-1490 (2001).
- [9] J. E. J. Mills, I. J. P. de Esch, T. D. J. Perkins, P. M. Dean, *J. Comput.-Aided Mol. Design*, **15**, 81-96 (2001).
- [10] M. Arakawa, K. Hasegawa, K. Funatsu, *Journal of Computer Aided Chemistry*, **2**, 29-36 (2001).
- [11] M. Arakawa, K. Hasegawa, K. Funatsu, *Journal of Computer Aided Chemistry*, **3**, 63-72 (2002).
- [12] J. J. Hopfield, D. W. Tank, *Biol. Cybern.*, **52**, 141-152 (1985)
- [13] M. Martin-Valdivia, A. Ruiz-Sepulveda, F. Triguero-Ruiz, *Neural Networks*, **13**, 283-285 (2000).
- [14] L. L. Zhu, T. J. Hou, L. R. Chen, X. J. Xu, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **41**, 1032-1040 (2001).
- [15] *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 8950-8951.
J. Chem. Soc., PerkinTrans. 2, 1993, 187-198.
- [16] HNN 法の著者らによる論文としては以下のものがある。
 - 1) M. Arakawa, K. Hasegawa, K. Funatsu, Novel Alignment Method of Small Molecules Using Hopfield Neural Network, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **43**, 1390-1395 (2003).
 - 2) M. Arakawa, K. Hasegawa, K. Funatsu, Application of Novel Alignment Method Using Hopfield Neural Network to 3D-QSAR, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **43**, 1396-1402 (2003).
 - 3) K. Hasegawa, M. Arakawa, K. Funatsu, Novel Computational Approached in QSAR and Molecular Design Based on GA, Multi-Way PLS and NN, *Current Computer-Aided Drug Design*, **1**, 129-145 (2005).

配座探索システム“CONFLEX Version 6”

CONFLEX は、フレキシブルな分子の配座空間を探索し、化学的に重要な配座異性体の最適化構造をもれなく見つけ出します。今までの構造最適化プログラムでは、ユーザーが入力した初期構造に依存した局所的な最適化構造しか求めることができませんでした。

CONFLEX はその問題を解決し、フレキシブルな多配座分子の解析を可能にしました。

Version 6 新機能

■ 結晶構造最適化

- CONFLEX 独自のアルゴリズムに基づき、結晶構造計算を行うことが出来るようになりました。X 線結晶構造が既知である有機化合物に対して、配座異性体や分子配向の違いに由来する様々な結晶構造を最適化することが可能です。それにより、結晶多形のエネルギー評価を容易に検討することができます。

■ 溶媒効果を取り入れた構造最適化・振動解析計算 (MMFF94s)

- GB/SA モデルを用いた計算が、構造最適化・振動解析および配座解析まで適用範囲が広がりました。利用できる分子力場は MMFF94s です。
- LogP 自動計算機能を追加しました。

■ アミノ酸残基置換機能の追加：PDB ファイルオプション

- CONFLEX の入力ファイルとしてタンパク質構造データベース (PDB) のファイル形式 (.pdb ファイル) を用いた場合に限り、ユーザーが指定したアミノ酸残基を任意の必須アミノ酸残基に置換できるようになりました。この「アミノ酸残基置換機能」によって、構造既知のタンパク質の一次配列を変更することが可能になり、ホモロジーモデリングと同様な操作が可能になりました。

■ 配座探索オプションの追加

- 回転異性体が予想される場合の Stepwise Rotation のステップ数を指定できるようになりました。これにより、高分子材料や生体高分子の、限定的な配座探索も可能になりました。

■ MMFF94s 用力場パラメータの追加

- 弊社で開発した MMFF94s 用の力場パラメータを追加しました。
- これによって、MMFF94s 力場で計算できる分子種が増えました。

■ 遷移状態探索法の導入

- 配座変換の遷移状態を探索するため、独自に開発したフロンティア振動モード追跡法を導入しました。

動作環境

CONFLEX

OS : Redhat Linux8 以上
Windows XP
Mac OS X 10.4 以上
プロセッサ : 1.0GHz 以上
ディスク : 40GB
メモリー : 256MB 以上

PARALLEL CONFLEX

OS : Redhat Linux8 以上
プロセッサ : 1.0GHz 以上
ディスク : 40GB
メモリー : 256MB 以上

メーカーコード	品名	容量	希望納入価格(円)
CF5W1LC	CONFLEX, BARISTA (for Windows) Single License for Corporate コンプレックス バリスタ (ウィンドウズ版) 企業向け シングルライセンス	1 セット	2,000,000
CF5W1MC	CONFLEX, BARISTA (for Windows) Single Support Service for Corporate ^{*1} コンプレックス バリスタ (ウィンドウズ版) 企業向け シングルサポートサービス	1 セット	400,000
CF5W1VC	CONFLEX, BARISTA (for Windows) Single Version Up for Corporate ^{*2} コンプレックス バリスタ (ウィンドウズ版) 企業向け シングルバージョンアップ	1 セット	1,000,000
CF5W1RC	CONFLEX, BARISTA (for Windows) Single Revision Up for Corporate ^{*2} コンプレックス バリスタ (ウィンドウズ版) 企業向け シングルリビジョンアップ	1 セット	125,000
CF5W1LA	CONFLEX, BARISTA (for Windows) Single License for Education ^{*3} コンプレックス バリスタ (ウィンドウズ版) 教育機関向け シングルライセンス	1 セット	200,000
CF5W1MA	CONFLEX, BARISTA (for Windows) Single Support Service for Education ^{*1} コンプレックス バリスタ (ウィンドウズ版) 教育機関向け シングルサポートサービス	1 セット	200,000
CF5W1VA	CONFLEX, BARISTA (for Windows) Single Version Up for Education ^{*2} コンプレックス バリスタ (ウィンドウズ版) 教育機関向け シングルバージョンアップ	1 セット	150,000
CF5W1RA	CONFLEX, BARISTA (for Windows) Single Revision Up for Education ^{*2} コンプレックス バリスタ (ウィンドウズ版) 教育機関向け シングルリビジョンアップ	1 セット	30,000

*1 : バージョンアップ・リビジョンアップ、操作方法・計算方法に関するご質問への対応(E-mail)

*2 : サポートサービス契約外のユーザー向け

*3 : 教育機関向けのシングルライセンスは、研究室内の皆様でお使いいただけます。

*4 : Linux 版、Mac 版につきましては、別途お問合せください。

注) BARISTA (CONFLEX の GUI) は、Windows 版のみの対応となります

“Cell Illustrator” を使ってみよう

(3) シミュレーションを楽しむ

東京大学 医科学研究所 ヒトゲノム解析センター

教授 宮野 悟、助教 長崎 正朗、技術職員 齊藤 あゆむ

セルイラストレータ (Cell Illustrator ; CI) を使ったパスウェイ作成の第三回は、第二回「パスウェイを動かす」で完成させた、シミュレーション可能な線虫の ASE 細胞の運命決定モデルを使い、シミュレーションの手順を説明します。

1. Chart Settings ダイアログ



シミュレーションの結果は、チャート表示があることで評価が容易になります。CI ではシミュレーション中に注目したいエンティティの値の変化をチャートに表示して観察することができます。第二回ではチャートを作成しシミュレーションを行うところまで行いました。このようなチャートを一括して管理するための道具が Chart Settings ダイアログです (図 1)。ダイアログの左半分にはモデル中のエンティティのリストが、右半分には作られているチャートのツリーが表示されています。チャートツリーの中でチャートをクリックすると該当するチャートのウィンドウが前面に表示されます。

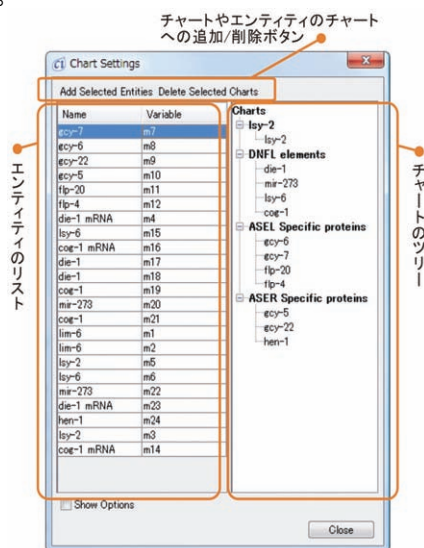



図 1. Chart Settings ダイアログ。このダイアログは右ツールバーの  ボタンで表示することができます。

チャートの作成・追加

繰り返しになりますが、チャートの作成は、チャートにしたいエンティティを選択し、「Create Chart」を行うことでした。

チャートにしたいエンティティの選択は、直観的にキャンバス上で選ぶ方法と Chart Settings ダイアログのエンティティリスト上で選ぶ方法があり、どちらの方法でも Ctrl キーを押しながらのクリックによって、複数のエンティティを選択することができます。また、エンティティリストでは、

Shift キーを押しながら、あるいはドラッグによって複数のエンティティを連続して選択することができます。

選択エンティティを含むチャートを作成する「Create Chart」の操作は 3 通りあります。

1. メニューの [Elements] → [Create Chart]
2. 選択されたいずれかのエンティティの上で右クリック → [Create Chart]
3. Chart Settings ダイアログの (右側の) チャートツリーの要素がどれも選択されていない状態で、Chart Settings ダイアログ上部の [Add Selected Entities] ボタン

3 番目の Chart Settings ダイアログを使う方法は、少しだけ高度なこと、すでにあるチャートにエンティティを追加することもできます。エンティティの追加方法は、Chart Settings ダイアログのチャートツリーでエンティティ要素を増やしたいチャートを選択した状態で Chart Settings ダイアログ上部の [Add Selected Entities] ボタンを押します。

チャートとチャート中のエンティティの削除

作成したチャートを削除するときは、Chart Settings ダイアログの (右側の) チャートツリーで削除するチャートを選択し、Chart Settings ダイアログ上部の [Delete Selected Charts] ボタンを押します。チャートの中の一つのエンティティを削除するときもほぼ同様ですが、選択するものはチャートではなく、その配下のエンティティになります。チャートツリーで削除するエンティティを選択し、[Delete Selected Charts] ボタンで削除できます。

チャートの名前の変更

Chart Settings ダイアログ右側のチャートツリーでは各チャートの名前を変更することができます。この名前はチャートの各ダイアログのタイトルになります。名前の変更の操作は、OS の仕様に準拠しますが、一般的には、ツリーでチャートが選択されているときに、同じチャート名をクリックすることで名前を編集できるようになります。ただし、はじめのチャートを選択するときに選択したチャートのダイアログがアクティブになるために、チャート名をクリックする前に Chart Settings ダイアログをアクティブにし直すためのクリックが必要になります。戸惑う部分ですが、変更したいチャート名の部分を (ダブルクリックにならないように) ゆっくりと 2 回クリックしてしばらく待つ感覚でできると思えます。なお、2 回目のクリックの代わりに F2 キーを押すことでも名前の編集ができます。

Rasterize ボタン

Chart Settings ダイアログから場所が変わりますが、各チャートのウィンドウには Rasterize ボタンがあります。これを押すと、その時のチャートの表示上の複製が作られます。今のシミュレーション結果を次のシミュレーション結果と比較するときに便利です。

2. パラメータを変更してのシミュレーション

ここまでのチャートを追加する操作を用いて図 1 のツリ一部分のように 4 つのチャートが作成できています。これらのチャートは次のとおりです。

1. 左側細胞の ASEL でのみ発現がみられる *flp-4*、*flp-20*、*gcy-6*、*gcy-7* のチャート
2. 右側細胞の ASER でのみ発現がみられる *hen-1*、*gcy-5*、*gcy-22* のチャート
3. 運命決定のキーとなる *Isy-2* のチャート (キャンパスに 2 つある *Isy-2* のうち細胞質中の方をチャートにしました)
4. Double Negative Feedback Loop (DNFL) 内の (細胞質内の) *cog-1*、*die-1* タンパク質と *Isy-6*、*mir-273* マイクロ RNA の 4 エンティティのチャート

この状態で左ツールバーの Play Simulation ボタンでシミュレーションを開始すると、図 3 の左と同様なチャートが表示されます (第二回の図 4 と同じです)。

さて今回は、細胞質中に存在する *Isy-2* の初期値を変更してシミュレーションを行います。ASE 細胞は *Isy-2* の発現が多ければ ASEL に、少なければ ASER になっていることが知られています。では、いままで 0 であった値を 1 にしてみたいと思います (図 2)。この変更によって *Isy-2* が存在している場合を表現します。シミュレーション開始の前には *Isy-2* = 0 であったときとの比較のため、それぞれのチャートにある Rasterize ボタンによって複製を作っておくとよいでしょう。

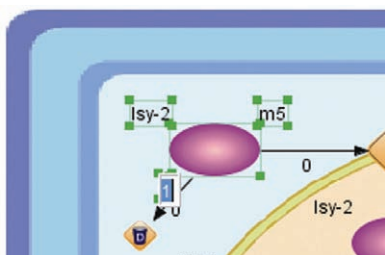


図 2. 細胞質の *Isy-2* の初期値を変更している。

シミュレーションを実行すると、*Isy-2* が 0 であった時は違う雰囲気チャートが描かれると思います。DNFL 部分の様子が反転し、最終的に細胞は ASER に特徴的なタンパク質の発現がなくなり、ASEL で特徴的なタンパク質を発現するようになります (図 3)。このように *Isy-2* の存在によって細胞の運命決定ができていることをシミュレーションでも見ることができます。

さらに *Isy-2* の初期値を編集し、「 $\text{rand}() * 0.2$ 」としてみてください (図 4)。これは、シミュレーション開始のたびに 0 以上 0.2 未満の範囲の一樣乱数を初期値にする表現です。今のこの範囲は経験に基づく適当な値ですが、このよ

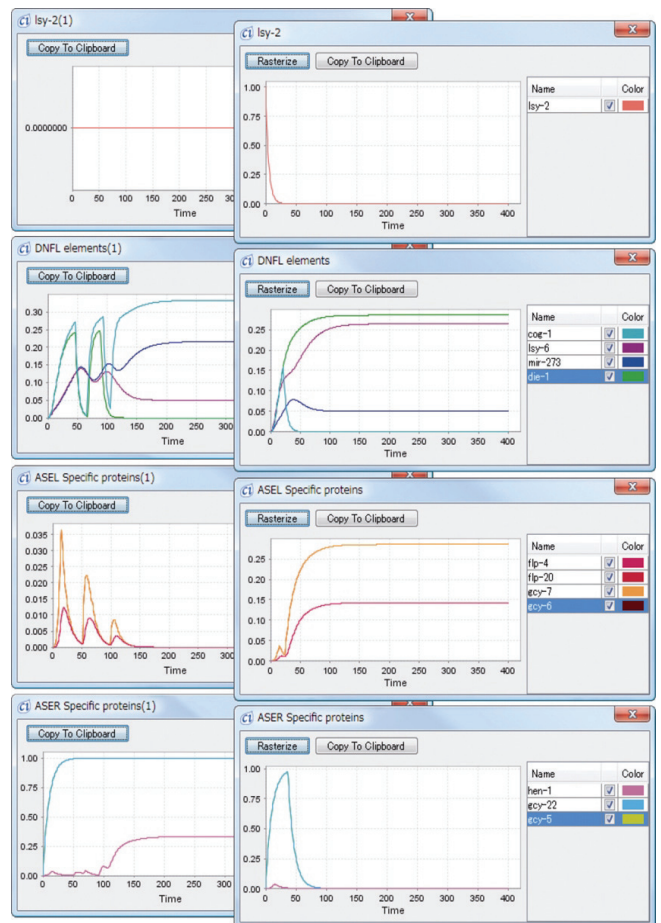


図 3. *Isy-2* の初期値が 0 のとき (左) と 1 のとき (右) のシミュレーション結果のチャート

うにすることでシミュレーション実行ごとに異なる挙動が観察でき、ASE 細胞の運命決定が *Isy-2* の初期値次第でコントロールされることがおもしろく見えるのではないのでしょうか。

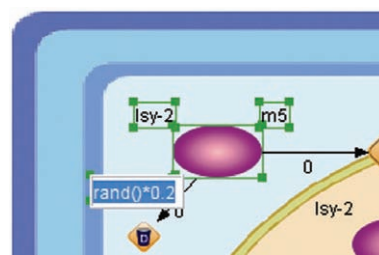


図 4. 細胞質の *Isy-2* の初期値を関数に変更している。

CI ではこの $\text{rand}()$ のようにいくつかの関数も表現できます。興味があれば、Elements Settings ダイアログの Entity タブの Initial Value の欄の右端にあるボタンをクリックし Script Editor を眺めてみてください (Process ならば Process タブの Speed のところに同様のボタンがあります)。

今回のモデルは、定量的な情報を含めずにプロセスの速度やエンティティの初期値などを、おおよそ感覚的に一律に決定したのですが、それでも大局的には実際と矛盾しないようなシミュレーションができました。深く考えることのないモデリングでも、なかなかリアルなシミュレーションを実現できるところが CI らしい魅力となっています。

代謝反応メカニズムをセルイラストレータで再現しよう

立命館大学 生命科学部 生命情報学科 助教 遠里 由佳子

KEGG などの代謝反応データベースにある情報は、細胞内の酵素反応の関係を抽出して整理した静的な知識です。遺伝子欠失や過剰発現の代謝過程への影響や、代謝物質の濃度の違いの影響などを理論的に予測したい場合、そのメカニズムを動的なものとして扱う必要があります。そうした解析には、ミカエリス-メンテン式に基づく微分方程式や、質量作用則に基づく行列式を解き、そのメカニズムをシミュレートしなくてはなりません。しかし、まったくの一新からプログラムを組みつつそれを実現するのは困難を極める作業です。その点、セルイラストレータは絵を描く感覚で細胞内の反応をモデル化でき、シミュレーションを行うことができます。そして、静的な知識だけからは得ることができないシステムの動的な挙動を解析したり、生命システムの設計原理や新たな仮説を作り出したりすることが可能になります。そこで、セルイラストレータを使った代謝の単純な反応メカニズムの再現例や、それらを組み合わせたモデルを紹介します。

1. 1 基質 1 生成物の代謝メカニズムのモデル化

代謝の最も基本的な反応メカニズムは、1つの基質を1つの生成物に変換する可逆的な酵素反応で、Reversible Uni-Uni と呼ばれます。例えば、リボース 5 リン酸イソメラーゼの酵素反応（リボース 5 リン酸⇌リボース 5 リン酸）は、Reversible Uni-Uni に相当します。これをセルイラストレータで再現すると以下ようになります。

図 1 で、タンパク質は青色の部品（●）、リボース 5 リン酸とリボース 5 リン酸は、二重丸型の部品（◎）で表されています。これらの部品はセルイラストレータにおいて「エンティティ」と呼ばれます。ここで、リボース 5 リン酸イソメラーゼの酵素を 3、リボース 5 リン酸の濃度を 100、リボース 5 リン酸の濃度を 0 に設定しました。それらの間を結ぶひし形部品（◇）は「プロセス」です。ここでは、プロセスの速度が化合物の移行速度（＝酵素反応の速度）となります。化合物とプロセス間にはプロセスコネクタで接続しますが、酵素とプロセス間では、酵素自体は変化しないため補助コネクタと呼ばれる接続にします。

問題となるのは酵素反応の速度ですが、Reversible

Uni-Uni メカニズムは一般に以下のような式で表せることが知られています。

$$v = \left(V^+ \times \frac{S}{K_s} - V^- \times \frac{P}{K_p} \right) / \left(1 + \frac{S}{K_s} + \frac{P}{K_p} \right) \quad (1)$$

S は基質濃度、 P は生成物濃度、 K_s と K_p はミカエリスメンテン定数、 V^+ と V^- は正の向きおよび負の向きの酵素反応の最大速度です。そこで、リボース 5 リン酸イソメラーゼの反応速度論的パラメータ $V^+ = 3457$, $V^- = 3458$, $K_s = 1.6$, $K_p = 1.6$ を BRENDA データベースから取得し、式(1)に当てはめたものをプロセスの式に採用しました。図 1 の速度式の $m1$ と $m2$ は各化合物の濃度に相当するため、それぞれの濃度変化が、酵素反応の速度に影響を与えることがわかります。

2. 発現プロセスの導入

さらに、図 1 の酵素反応に転写（◇）と翻訳（◇）、分解（◇）のプロセスも簡単に導入することができます（図 2）。ここでは転写と翻訳の速度を 1、分解の速度は元になる物質の濃度の 10 分の 1 としました。

図 2 のモデルのシミュレーションは、左ツールバーにある PlaySimulation ボタン（▶）を押すだけで実行できます。実行途中の基質の濃度変化は、各エンティティの値の変化でもわかりますが、観察しやすいように、選択したエンティティをチャートに追加することもできます。ここでは、リボース 5 リン酸とリボース 5 リン酸のエンティティを Ctrl キーを押しながら選択しチャートに追加した後、シミュレーションを実行しました（図 3）。赤はリボース 5 リン酸の、青はリボース 5 リン酸の基質の濃度変化です。

あらかじめチャートを準備しておけば、シミュレーション自体に実行に時間がかかる場合でも、早送りボタン（▶▶）で加速して済まし、その後、ゆっくりチャートからその結果を確認することができます。

3. より複雑なメカニズムの再現にむけて

1 基質 1 生成物の酵素反応を紹介しましたが、2 基質 2 生成物など、より一般的なケースも簡単に実現できます。2 基

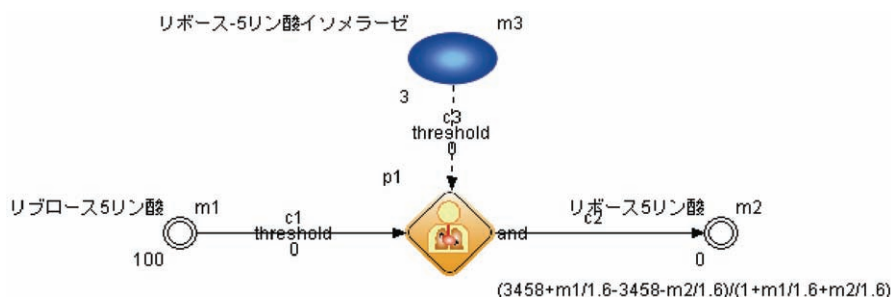


図 1. リボース 5 リン酸イソメラーゼの酵素反応

質 2 生成物の酵素反応は、Reversible Bi-Bi と呼ばれるメカニズムで、以下のような速度式になります。

$$v = \left(V^+ \times \frac{S1}{K_{s1}} \times \frac{S2}{K_{s2}} - V^- \times \frac{P1}{K_{p1}} \times \frac{P2}{K_{p2}} \right) / \left(\left(1 + \frac{S1}{K_{s1}} + \frac{P1}{K_{p1}} \right) \times \left(1 + \frac{S2}{K_{s2}} + \frac{P2}{K_{p2}} \right) \right) \quad (2)$$

式の詳細は省きますが、これを Reversible Uni-Uni のときと同じようにトランスケターゼ（キシルロス 5 リン酸 + エリトロス 4 リン酸 ⇌ フルクトース 6 リン酸 + グリセルアルデヒド 3 リン酸）の酵素反応をセルイラストレータで

再現し、シミュレーションした結果は図 4 のようになります（ $V^+ = 43$, $V^- = 3.2$, $K_{s1} = 0.09$, $K_{s2} = 0.16$, $K_{p1} = 2.1$, $K_{p2} = 1.1$, $S1$ および $S2$ の初期値を 100、酵素量の初期値を 3 に設定）。

このように、1つ1つ絵パーツをつなぎ合わせていくことで、細胞内の個々の酵素反応から、より大規模な代謝反応のネットワークのモデル化することができます（図 5）。

シミュレーションを行う場合、モデルを作成したあとに確認したい現象に沿うよう、式の調節やパラメータフィッティングの作業が不可欠ですが、セルイラストレータを用いるとこれらの作業がより感覚的に操作することができ、すぐに再度シミュレーションした結果を得ることができます。

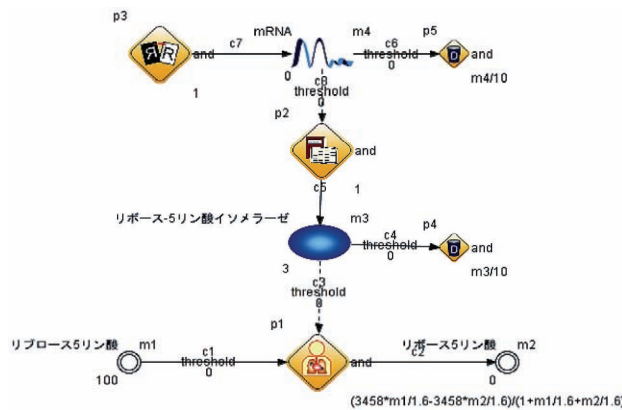


図 2. リボース 5 リン酸イソメラーゼの酵素反応（改訂版）

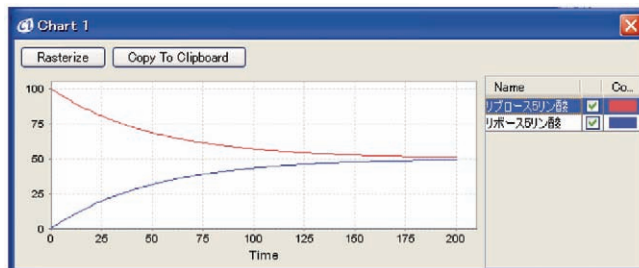


図 3. リボース 5 リン酸イソメラーゼのシミュレーション結果

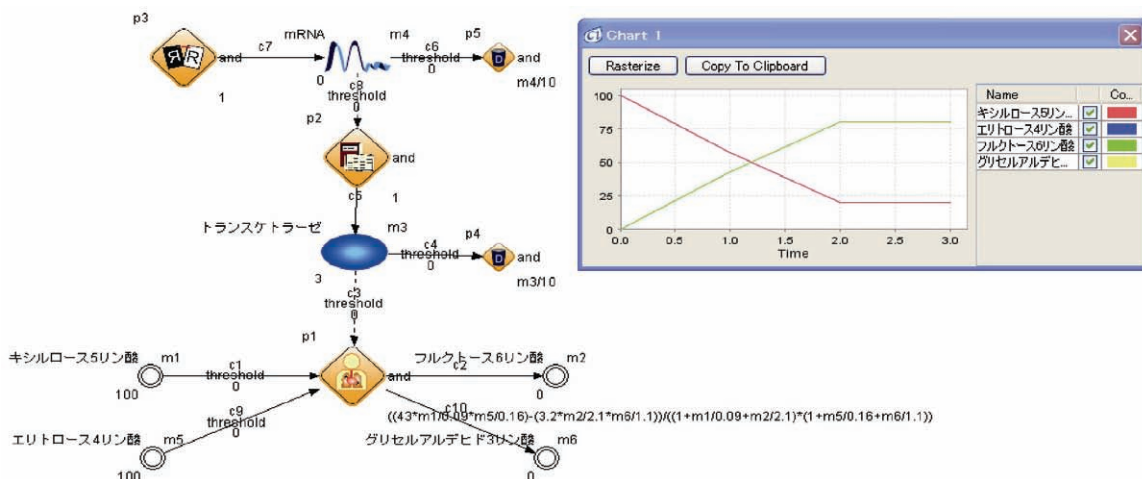


図 4. トランスケターゼのモデルとシミュレーション結果

注) 横軸の「Time」は pt (ペトリネットタイム) で、シミュレーションにおける「秒」のような単位時間と考えて下さい。

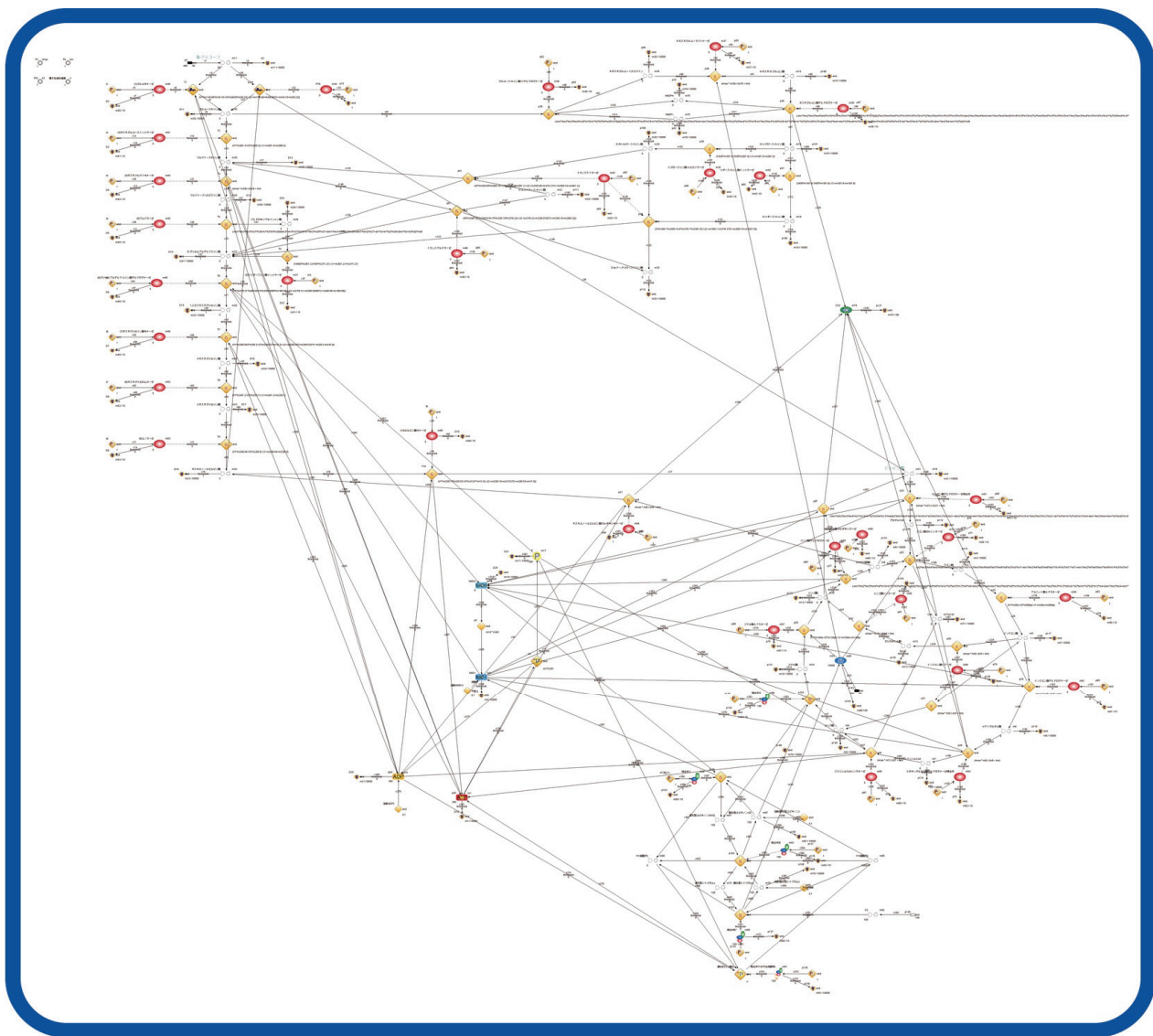


図 5. 中央代謝経路のモデル

参考文献

1. 土井淳, 長崎正朗, 齊藤あゆむ, 松野浩嗣, 宮野悟: システム生物学がわかる!, 共立出版(2007).
2. Daniel L. Purich and R. Donald Allison : Handbook of Biochemical Kinetics, Academic Press(2000).
3. Antje Chang, Maurice Scheer, Andreas Grote, Ida Schomburg and Dietmar Schomburg: BRENDA, AMENDA and FRENDA the enzyme information system : new content and tools in 2009, *Nucleic Acids Research*, Vol. 37, pp.D588-D592 (2009) <http://www.brenda-enzymes.info/>.

本文に記載しております試薬は試験・研究の目的にのみ使用されるもので、「医療品」、「食品」、「家庭用品」などとして使用できません。価格はすべて希望納入価格であり、消費税等が含まれておりません。

和光純薬工業株式会社

本社 ☎540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号 ☎(06)6203-1788 (試薬学術部)
支店 ☎103-0023 東京都中央区日本橋本町四丁目5番13号 ☎(03)3270-8243 (試薬学術部)

- 九州営業所 ☎(092)622-1005(代) ●横浜営業所 ☎(045)476-2061(代)
- 東海営業所 ☎(052)772-0788(代) ●筑波営業所 ☎(029)858-2278(代)
- 東北営業所 ☎(022)222-3072(代) ●北海道営業所 ☎(011)271-0285(代)
- 中国営業所 ☎(082)285-6381(代)

フリーダイヤル 0120-052-099 フリーファックス 0120-052-806

■ご意見・お問い合わせ、本誌のDM新規登録・変更等については、

E-mail : org@wako-chem.co.jp まで

Wako Chemicals USA, Inc.
<http://www.wakousa.com>

●Head Office (Richmond, VA)

Tel: +1-804-714-1920

●Los Angeles Sales Office

Tel: +1-949-679-1700

●Boston Sales Office

Tel: +1-617-354-6772

Wako Chemicals GmbH
European Office

<http://www.wako-chemicals.de>

Tel: +49-2131-311-0

URL : <http://www.wako-chem.co.jp>