酵素反応ネットワークの分割表現と双安定反応系の探索への応用

仲 隆

2022 年 1 月 26 日

細胞内の生化学反応系の制御機構として知られているシグナル伝達系は、近年研究が本格化している合成生物学の観点から、その設計手法が必要になってきている。シグナル伝達系の重要な基本構成要素であるリン酸化に代表される翻訳後修飾反応から構成される酵素反応ネットワークを対象に、集合の分割という新たな表現方法の提案と、その有効性を示すために双安定性を有する酵素反応ネットワークの探索を試みた。酵素反応ネットワークの分割表現には、探索への応用に際して、自然な形で分割修正子を導入することができる。その分割修正子をランダムに適宜適用することにより、4 つの翻訳後修飾反応からなる酵素反応ネットワークを対象として、双安定でリセット可能な酵素反応ネットワークの探索を行った。提案した探索アルゴリズムは、良好に機能し、様々な双安定な酵素反応ネットワークを見つけることができた。その中には、正の自己フィードバックをもち相互に負に制御し合う典型的な双安定の酵素反応ネットワークも含まれる。探索アルゴリズムは、探索対象の酵素反応ネットワークの特性に特有な評価関数と、独立なアルゴリズム部分に分かれているため、評価関数を別の特性用に置き換えることにより、適応応答のようなダイナミックな性質の探索にも応用可能であると思われる。

1 はじめに

細胞内シグナル伝達系は、細胞の増殖、自殺、分化、恒常性を制御する機構として機能しており、その異常が細胞の癌化の原因と考えられている。その制御機構は抗がん剤に代表される薬物の作用機序に深く係わるため、近年盛んに研究されている。そのうえ、近年研究が本格化している合成生物学の観点からも、シグナル伝達系の設計手法が必要になってきている。しかし、生化学反応は非線形であるため、理論的解析手法の構築が難しく、特にシグナル伝達系はその制御対象である細胞内代謝系と比較して相互作用が複雑であるため系統的な解析手法が確立されていない。解析対象の系毎にパラメータを固定し、コンピュータシミュレーションによる解析が行われているのが現状である。

代表的なシグナル伝達系である MAPK カスケードは、細胞成長因子（EGF）のシグナル伝達に関して細胞膜と細胞核を中継するシグナル伝達系であり、その異常が細胞の癌化の原因と考えられているため、多くの知見が得られている [1, 2, 3, 4, 5, 6]。MAPK カスケードに代表されるシグナル伝達系の主な構成要素として、酵素のリン酸化・脱リン酸化による酵素の活性化・不活性化サイクル反応系がある。サイクル反応系は 2 つの翻訳後修飾反応が組合さったものである。そこで、筆者らは、酵素の活性化・不活性化サイクル反応系を構成要素とし、それらが相互に制御し合う制御ネットワークを対象として、主にその安定性に関して、網羅的な解析を行ってきた [7]。そこでは、制御行列で、サイクル反応系相互の制御関係を表現する。制御行列とは隣接行列であるが、サイクル反応系 j の活性化酵素がサイクル反応系 i の活性化を触媒するときは 1，不活性化を触媒するときは -1 をその i 行 j 列成分とする行列である。

同様な研究として、Kuwahara ら [8] は、フィードバック制御を一つだけ有する 3〜5 ノードの制御ネットワークに関して、制御構造が確率論的特性に与える影響を網羅的に解析した。また、双安定性が出現する制御構造について言及した。Ramakrishnan[9] ら、Shah[10] ら、および、Siegal-Gaskins[11] らは、シグナル伝達系の超感度特性と双安定性について網羅的な解析を行っている。超感度とは、前述した代表的なシグナル伝達系である MAPK カスケードの応答特性として報告されたものである [1]。超感度を持つ系では、入力化学種の酵素濃度に対する出力化学種の定常状態での酵素濃度が、入力のある閾値を境に急激に増大する。双安定性とはこの超感度がさらに強く表れた場合であり、入力に対する出力の変化にヒステリシスが現れる。しかして、入力のある領域では対応する出力の定常状態値が二つ出現する。特に、細胞内で想定されるタンパク質濃度の範囲内で、入力化学種の総濃度を変化させることにより、2 つの定常状態間を相互に遷移できるという性質がある場合に、これをリセット可能であるという [12]。

Ma ら [13] 及び Yao ら [14] は、3 ノードの同様の制御ネットワークを用いて、生化学的適応応答特性、ロバスト特性について解析した。生化学的適応とは、定常状態にある系に対して入力化学種の濃度を増加させた時に、出力化学種の応答が一過的に増大し、その後元の定常状態値に近い値まで減少するという性質である [13]。ロバスト特性とは、系の様々な応答特性が系の他の化学種の濃度などに影響を受けにくいという性質である [12]。

また、Adler ら [15] は、細胞内の一過的な入力の変化に対するシステムの出力の時間パターンが入力変化の差でなく比に依存する動特性である fold-change detection に着目した解析を行っており、制御ネットワークを用いた網羅的解析の有効性が示されている。これらの研究では、酵素反応機構として、主に、計算量を抑えるために、ミカエリスメンテン近似式、あるいは、それをされに簡略化した一次式が使われている。しかし、系の双安定性やダイナミクスに関して、近似式は正確性を欠く原因になっていることを報告されている [16, 17]。正確に系の性質を解析するには、質量作用の法則のみで記述すればよいが、そうすると系のパラメータが増加し、元々、膨大な探索空間が、さらに膨大になり、網羅的解析の遂行を困難なものにしてしまう。そのため、上述した超感度、双安定性、生化学的適応応答特性、ロバスト特性、fold-change detection などの有用な性質をもつ酵素反応ネットワークを探索する方法の開発が求められている [18, 19, 20]。

本研究では、翻訳後修飾反応を要素とし、それらが相互に制御し合う制御ネットワークとして定式化される酵素反応ネットワークを解析対象とする。リン酸化に代表される翻訳後修飾反応は、サイクル反応系より小さな単位である。前述した制御行列の代わりに、その表現として、より探索に適すると考えられる集合の分割を用いる方法を提案する。さらに、その有効性を示す目的で、双安定でリセット可能な酵素反応ネットワークを探索した結果を報告する。リセット可能とは、細胞内で想定されるタンパク質濃度の範囲内で、入力化学種の総濃度を変化させることにより、2 つの定常状態間を相互に遷移できるという性質である [12]。

2　理論と方法

2.1　酵素反応ネットワークの分割表現

ミカエリスメンテン型酵素反応を反応機構とする翻訳後修飾反応を基本構成要素とし、その N 個から酵素反応ネットワークを構成することを考える。ただし、本研究では一つの基質に同時に複数の酵素が結合するような反応は対象としない。ミカエリスメンテン型酵素反応は、式 (1) に示すように、基質 (S) に酵素 (E) が結合し一時的に酵素基質複合体 (C) となり、複合体上で基質が生成

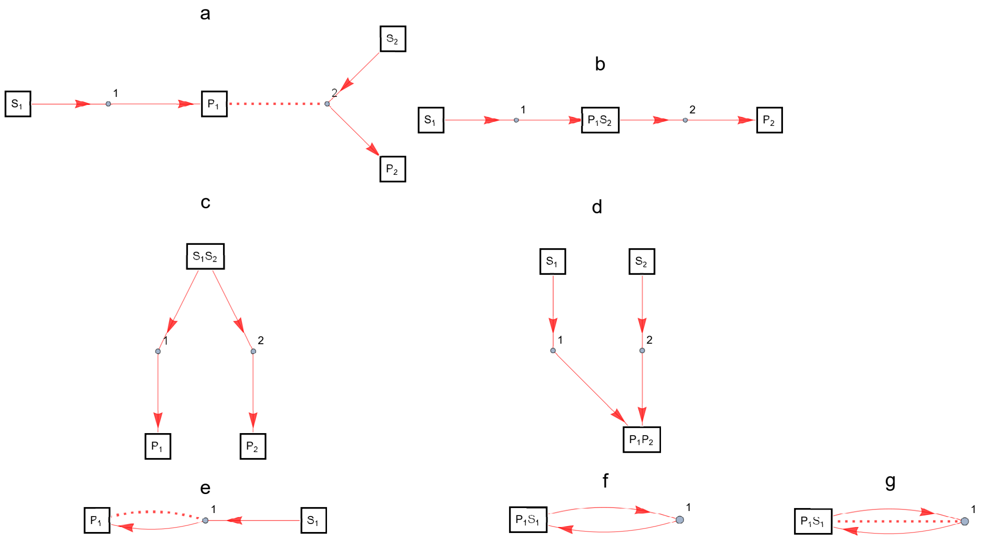

図 1: 翻訳後修飾反応から構成される基本的な酵素反応ネットワーク。翻訳後修飾反応を基本反応系とする酵素反応ネットワークの構成例。a：酵素反応 1 の生成物が酵素反応 2 を触媒、b：2 段階反応、c：分岐反応、d：合流反応、e：自己触媒反応、f：結合解離反応 、g：2 量体生成分離反応。基本構成要素である翻訳後修飾反応には連番を付けている。i 番目の翻訳後修飾反応の基質、酵素、生成物は、それぞれ、S_i、E_i、P_i と表記している。同一視する化学種が基質 S_i と生成物 P_i の場合は、同一視している化学種名を四角形の中に列挙している。酵素 E_i は赤の矢印の間にある小さな円で表し、酵素と同一視する化学種がある場合はその化学種と点線で結んでいる。

物 (P) に変化した後、生成物 (P) と酵素 (E) に分解する一連の化学反応である。式 (1) の a、d、および、k は反応速度定数である。

$$S + E \underset{d}{\overset{a}{\rightleftharpoons}} C \xrightarrow{k} P + E \tag{1}$$

N 個のミカエリスメンテン型酵素反応の基質と酵素と生成物を、それぞれ、S_i、E_i、P_i とし、その集合を M とする。すなわち、$M = \{S_1, E_1, P_1, S_2, E_2, P_2, \cdots, S_N, E_N, P_N\}$ である。集合 M の分割 P を一つとる。分割とは集合の互いに素な部分集合の族で、それらの和集合がもとの集合となるものである。分割の要素、すなわち、元の集合 M の一つの部分集合に属している化学種を同一視することにより、複数の翻訳後修飾反応から酵素反応ネットワークを構成する。

図 1 に翻訳後修飾反応から構成される基本的な酵素反応ネットワークの例を示す。基本構成要素である翻訳後修飾反応には連番を付けている。i 番目の翻訳後修飾反応の基質、酵素、生成物は、それぞれ、S_i、E_i、P_i と表記している。同一視する化学種が基質 S_i と生成物 P_i の場合は、同一視している化学種名を四角形の中に列挙している。酵素 E_i は赤の矢印の間にある小さな円で表し、酵素と同一視する化学種がある場合はその化学種と点線で結んでいる。小さな円を酵素基質複合体を表していると考えると直感的に分かりやすいかもしれない。

図 1a〜d が $N = 2$、すなわち、2 つの翻訳後修飾反応から構成される酵素反応ネットワークの例で、分割の元になる集合は $M = \{S_1, E_1, P_1, S_2, E_2, P_2\}$ である。図 1a はこの M の分割 $\{\{S_1\}, \{E_1\}, \{P_1, E_2\}, \{S_2\}, \{P_2\}\}$ で表される酵素反応ネットワークで、酵素反応 1 の生成物が酵素反応 2 の酵素として機能していることを示す。P_i と E_j の同一視は、酵素反応 i の生成物が酵

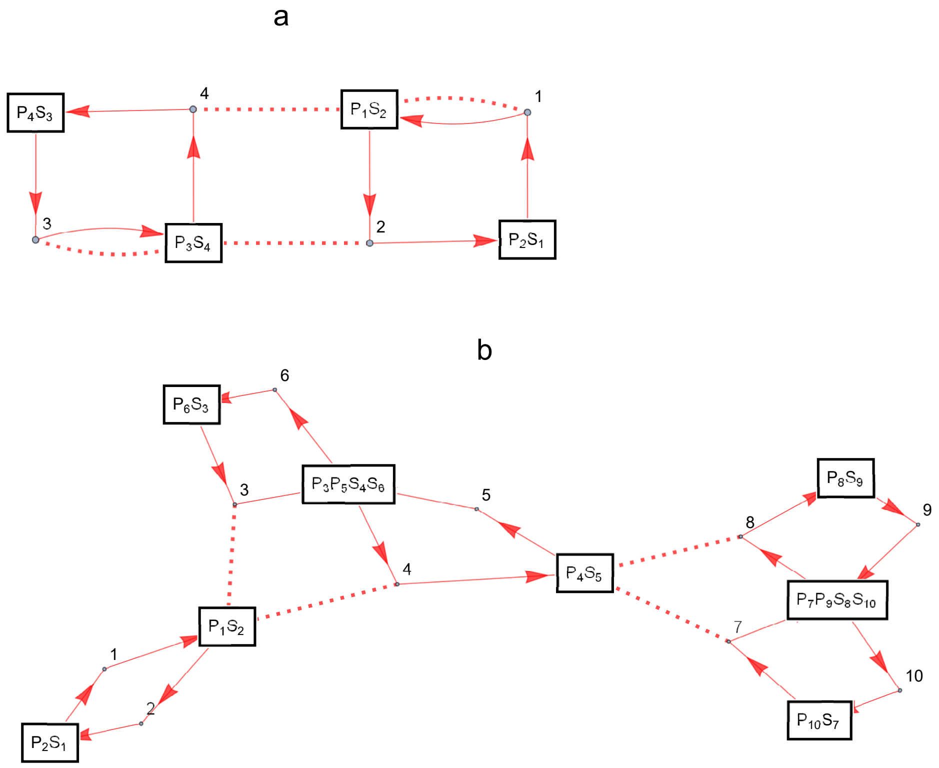

図 2: 翻訳後修飾反応から構成される少し複雑な酵素反応ネットワーク。図の見方は図 1 と同じ。a：自己活性化相互抑制ネットワーク、b：MAPK カスケード。

素反応 j の酵素として機能していることに対応する。これはシグナル伝達系にみられる活性化された酵素が他の酵素反応を触媒するという典型的な酵素反応の連鎖の様式である。図 1b は M の分割 $\{\{S_1\},\{E_1\},\{P_1,S_2\},\{E_2\},\{P_2\}\}$ で表される酵素反応ネットワークで、酵素反応 1 の生成物が酵素反応 2 の基質となっていることを示す。P_i と S_j の同一視は、S_i から P_j への 2 段階の酵素反応の表現になる。図 1cd は、それぞれ、M の分割、$\{\{S_1,S_2\},\{E_1\},\{P_1\},\{E_2\},\{P_2\}\}$ と $\{\{S_1\},\{E_1\},\{S_2\},\{E_2\},\{P_1,P_2\}\}$ で表される酵素反応ネットワークである。一般に、S_i と S_j、および、P_i と P_j の同一視は、それぞれ、2 つの酵素反応への分岐と合流の表現になる。

図 1e〜g は $N=1$、すなわち、1 つの翻訳後修飾反応から構成される酵素反応ネットワークの例で、分割の元になる集合は $M=\{S_1,E_1,P_1\}$ である。図 1e はこの M の分割 $\{\{S_1\},\{E_1,P_1\}\}$ で表される酵素反応ネットワークで、自己触媒反応の表現になる。図 1a で $i=j=1$ とした場合に対応する。図 1f は M の分割 $\{\{S_1,P_1\},\{E_1\}\}$ で表される酵素反応ネットワークで、同一視された基質と生成物 $S_1=P_1$ と酵素 E_1 との結合解離反応を示す。S_i と P_i の同一視は、その酵素との結合解離反応の表現になる。図 1g は M の分割 $\{\{S_1,P_1,E_1\}\}$ で表される酵素反応ネットワークで、同一視された基質と生成物と酵素 $S_1=P_1=E_1$ の自分自身との結合解離反応、すなわち、2 量体生成分離反応に対応する。S_i と P_i と E_i の同一視は、2 量体生成分離反応の表現になる。

図 2 にもう少し複雑な酵素反応ネットワークとその分割表現の例を示す。図 2a は $N=4$、すなわち、4 つの翻訳後修飾反応から構成される酵素反応ネットワークの例で、分割の元になる集合は $M=\{S_1,E_1,P_1,S_2,E_2,P_2,S_3,E_3,P_3,S_4,E_4,P_4\}$ で、その分割 $\{\{P_2,S_1\},\{P_1,S_2,E_1,E_4\}$ $,\{P_4,S_3\},\{P_3,S_4,E_3,E_2\}\}$ で表される。自己促進フィードバックと相互抑制フィードバックをも

つ２つのサイクル反応系から構成される酵素反応ネットワークで、双安定な性質をもつ典型的な酵素反応ネットワークの例である。代表的なシグナル伝達系の一つである MAPK カスケードを図 2b に示す。$N = 10$、すなわち、10 個の翻訳後修飾反応から構成される酵素反応ネットワークの例で、$M = \{S_1, E_1, P_1, S_2, E_2, P_2, \cdots, S_{10}, E_{10}, P_{10}\}$ の分割 $\{\{P_2, S_1\}, \{P_1, S_2, E_3, E_4\}, \{E_1\}, \{E_2\}$ $, \{P_6, S_3\}, \{P_3, P_5, S_4, S_6\}, \{P_4, S_5, E_7, E_8\}, \{P_{10}, S_7\}, \{P_7, P_9, S_8, S_{10}\}, \{P_8, S_9\}, \{E_5\}, \{E_6\},$ $\{E_9\}, \{E_{10}\}\}$ で表すことができる。MAPK カスケードは、MAPKKK、MAPKK、MAPK の 3 種のリン酸化酵素がカスケード状に連なった構造をしており、活性化した酵素が次の段階のリン酸化酵素を活性化することにより、細胞内でシグナルを伝達する。ここで、$\{P_2, S_1\}$ と $\{P_1, S_2, E_3, E_4\}$ が、それぞれ、不活性と活性の MAPKKK である。また、$\{P_6, S_3\}$、$\{P_3, P_5, S_4, S_6\}$、$\{P_4, S_5, E_7, E_8\}$ が、それぞれ、不活性、一つリン酸化、2 つリン酸化した MAPKK である。$\{P_{10}, S_7\}$、$\{P_7, P_9, S_8, S_{10}\}$、$\{P_8, S_9\}$ が、それぞれ、不活性、一つリン酸化、2 つリン酸化した MAPK である。

分割表現の利点は、全ての分割がなんらかの酵素反応ネットワークに対応しており、従って、分割と酵素反応ネットワークの間に 1 対 1 の関係があることである。N 個の翻訳後修飾反応から構成される酵素反応ネットワークの種類は、要素数 $3N$ の分割の総数と同じで、その値は式 (2) の漸化式で表されるベル数 B_{3N} として知られている数である。ただし、$B_0 = B_1 = 1$ である。

$$B_{3N+1} = \sum_{k=0}^{3N} {}_{3N}C_k B_{3N} \tag{2}$$

例えば、図 2a のような 4 つの翻訳後修飾反応から構成される酵素反応ネットワークの総数は $B_{12} = 4213597$ である。

分割を要素とする空間には、式 (3) に示すように集合 M の分割 $A = \{a_1, a_2, \cdots, a_m\}$ と分割 $B = \{b_1, b_2, \cdots, b_n\}$ との距離 $D(A, B)$ を導入することができる。ここで、a_i と b_j は集合 M の部分集合である。

$$\begin{gathered} s(a_i, b_j) = \sharp(a_i \cup b_j - a_i \cap b_j), \quad d(A, b_j) = \min_i s(a_i, b_j) \\ D(A, B) = \max(\max_j d(A, b_j), \max_j d(B, a_j)) \end{gathered} \tag{3}$$

記号 $\sharp$ は集合の要素数を返す関数である。従って、$\sharp(a_i \cup b_j - a_i \cap b_j)$ は集合 a_i と b_j で共通でない要素の個数になる。

例えば、分割の元となる集合を $M = \{x_1, x_2, x_3, x_4, x_5, x_6\}$ とし、3 つの分割、$A = \{a_1, a_2, a_3\}$、$B = \{b_1, b_2\}$、$C = \{c_1, c_2\}$ を考える。ここで、$a_1 = \{x_1, x_2, x_3\}$、$a_2 = \{x_4, x_5\}$、$a_3 = \{x_6\}$、$b_1 = \{x_1, x_2\}$、$b_2 = \{x_3, x_4, x_5, x_6\}$、$c_1 = \{x_1, x_2, x_3\}$、$c_2 = \{x_4, x_5, x_6\}$ とする。すると、$d(A, b_1) = \min_i s(a_i, b_1) = s(a_1, b_1) = 1$、$d(A, b_2) = \min_i s(a_i, b_2) = s(a_2, b_2) = 2$ なので $\max_j d(A, b_j) = d(A, b_2) = 2$、同様に、$\max_j d(B, a_j) = 3$ である。従って、$D(A, B) = 3$ となる。同様に、$D(B, C) = 1$、$D(A, C) = 2$ となることが分かる。すなわち、A と B が一番遠く、B と C が近い、A と C は中間の距離であることになる。これを酵素反応ネットワークで確認するために、例えば、元の化学種の集合を $M = \{S_1, P_2, E_2, P_1, E_1, S_2\}$ とする。つまり、$x_1 = S_1$、$x_2 = P_2$、$x_3 = E_2$、$x_4 = P_1$、$x_5 = E_1$、$x_6 = S_2$ である。すると分割 A は $\{\{S_1, P_2, E_2\}, \{P_1, E_1\}, \{S_2\}\}$、$B$ は $\{\{S_1, P_2\}, \{E_2, P_1, E_1, S_2\}\}$、$C$ は $\{\{S_1, P_2, E_2\}, \{P_1, E_1, S_2\}\}$ となり、図 3 に示す酵素反応ネットワークの a、b、c に対応することになる。酵素反応ネットワークの類似性がこの距離と相関があることが見て取れる。また、この分割間距離は三角不等式を満たすので、分割の分布を視覚化するのに用いることができる。

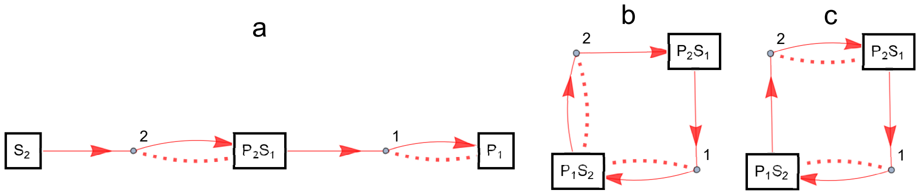

図 3: 分割で指定される酵素反応ネットワークと分割間距離。a：分割 $\{\{S_1, P_2, E_2\}, \{P_1, E_1\}, \{S_2\}\}$ で表される酵素反応ネットワーク、b：分割 $\{\{S_1, P_2\}, \{E_2, P_1, E_1, S_2\}\}$ で表される酵素反応ネットワーク、c：分割 $\{\{S_1, P_2, E_2\}, \{P_1, E_1, S_2\}\}$ で表される酵素反応ネットワーク

2.2 分割からの微分方程式系と保存則の導出

分割からは次のように対応する酵素反応ネットワークの挙動を記述する微分方程式系と保存則を導出することができる。酵素反応ネットワークを構成する翻訳後修飾反応の数を N とすると、分割の元となる集合の要素数は一つの翻訳後修飾反応に対して基質と酵素と生成物の 3 つの要素が対応するので、その総数は $3N$ である。従って、要素を x_i で表すとすると、分割の元となる集合は $M = \{x_1, x_2, \cdot, x_{3N}\}$ と表せる。M の分割のひとつを $A = \{a_1, a_2, \cdot, a_m\}$、その k 番目の要素 a_k の要素 x_i の添え字 i の集合を s_k とする。

この分割 A に対して、微分方程式系は以下の手順で生成できる。

1. 式 (4) のように、それぞれの翻訳後修飾反応に含まれる基質 S_i、酵素 E_i、酵素基質複合体 C_i、生成物 P_i に対する $4N$ 個の反応速度式を生成する。ここで、$x_{3N+1}, x_{3N+2}, \cdot, x_{4N}$ は酵素基質複合体 C_i に対応することに注意されたい。

$$\dot{x}_j = f_j(x_1, \cdots, x_{4N}),\ j = 1, \cdots, 4N \tag{4}$$

2. 分割の各要素 a_k に対して、a_k の要素を同一視した化学種 y_k を生成し、a_k の要素に対する反応速度式を式 (5) で置き換える。さらに、右辺に現れる a_k の要素は全て y_k で置き換える。s_k は a_k の要素の添え字集合である。

$$\dot{y}_k = \sum_{l \in s_k} f_l(x_1, \cdots, x_{4N}),\ k = 1, \cdots, m \tag{5}$$

式 (1) の導出に関して、翻訳後修飾反応の反応式として質量作用の法則のみを用いた場合、変数名を x[化学種名] で表すと、導出される反応式は翻訳後修飾反応 i については次式となる。

$$\begin{aligned}
\dot{x}[S_i] &= -a_i x[S_i]x[E_i] + d_i x[C_i] \\
\dot{x}[E_i] &= -a_i x[S_i]x[E_i] + (d_i + k_i)x[C_i] \\
\dot{x}[C_i] &= a_i x[S_i]x[E_i] - (d_i + k_i)x[C_i] \\
\dot{x}[P_i] &= k_i x[C_i]
\end{aligned} \tag{6}$$

例えば、図 1a の分割の元の集合を $M = \{S_1, E_1, P_1, S_2, E_2, P_2\}$、分割を $A = \{\{S_1\}, \{E_1\}, \{P_1, E_2\}, \{S_2\}, \{P_2\}\}$ とすると、質量作用の法則を適用することにより上記の式 (4) は式 (7) となる。ただし、変数名を x[化学種名] で表している。特に、いくつかの化学種を同一視した場合はそれらを大

括弧の中に列挙している。

$$
\begin{aligned}
\dot{x}[S_1] &= -a_1 x[S_1]x[E_1] + d_1 x[C_1] \\
\dot{x}[E_1] &= -a_1 x[S_1]x[E_1] + (d_1 + k_1)x[C_1] \\
\dot{x}[C_1] &= a_1 x[S_1]x[E_1] - (d_1 + k_1)x[C_1] \\
\dot{x}[P_1] &= k_1 x[C_1] \\
\dot{x}[S_2] &= -a_2 x[S_2]x[E_2] + d_2 x[C_2] \\
\dot{x}[E_2] &= -a_2 x[S_2]x[E_2] + (d_2 + k_2)x[C_2] \\
\dot{x}[C_2] &= a_2 x[S_2]x[E_2] - (d_2 + k_2)x[C_2] \\
\dot{x}[P_2] &= k_2 x[C_2]
\end{aligned}
\tag{7}
$$

分割 A に従って、P_1 と E_2 を同一視することにより得られる式 (5) に相当する式は次の式 (8) となる。

$$
\begin{aligned}
\dot{x}[S_1] &= -a_1 x[S_1]x[E_1] + d_1 x[C_1] \\
\dot{x}[E_1] &= -a_1 x[S_1]x[E_1] + (d_1 + k_1)x[C_1] \\
\dot{x}[C_1] &= a_1 x[S_1]x[E_1] - (d_1 + k_1)x[C_1] \\
\dot{x}[P_1, E_2] &= k_1 x[C_1] - a_2 x[S_2]x[P_1, E_2] + (d_2 + k_2)x[C_2] \\
\dot{x}[S_2] &= -a_2 x[S_2]x[P_1, E_2] + d_2 x[C_2] \\
\dot{x}[C_2] &= a_2 x[S_2]x[P_1, E_2] - (d_2 + k_2)x[C_2] \\
\dot{x}[P_2] &= k_2 x[C_2]
\end{aligned}
\tag{8}
$$

保存則については、まず、それぞれの翻訳後修飾反応に対して、総濃度が保存される化学種のリストの集合 $Q = \{q_1, \cdots, q_i, \cdots, q_{2N}\}$ を生成する。総数が $2N$ になっているのは、それぞれの翻訳後修飾反応に対して、酵素に関する保存則と基質に関する保存則があるからである。次に、以下の手順を分割 A の各要素 a_k に、順次、適用する。

1. a_k と共通の要素を含む Q の要素のリストを全て結合し、そのリストを r_k とする。
2. リスト r_k から a_k の要素を削除し、a_k の要素を同一視した化学種 y_k を追加する。
3. a_k と共通の要素を含まない Q の要素に r_k を追加し、それを改めて Q とする。

上記の手順で、a_k と共通の要素を含む Q の要素に対して、和集合ではなく結合する点は重要である。結合するリストに共通の酵素基質複合体 C_i が含まれている場合に、その重複は本質的だからである。

翻訳後修飾反応の反応式として質量作用の法則のみを用いた場合、変数名を x[化学種名] で表すと、導出される保存則の集合 Q の初期要素は翻訳後修飾反応 i については下記となる。。

$$
\{x[S_i], x[C_i], x[P_i]\}, \quad \{x[E_i], x[C_i]\}
\tag{9}
$$

例えば図 1a では、分割は $A = \{\{S_1\}, \{E_1\}, \{P_1, E_2\}, \{S_2\}, \{P_2\}\}$ であり、上述の例と同様に、変数名を x[化学種名] で表すと、元の保存則のリストは $\{\{x[S_1], x[C_1], x[P_1]\}, \{x[E_1], x[C_1]\}, \{x[S_2], x[C_2], x[P_2]\}, \{x[E_2], x[C_2]\}\}$ であり、P_1 と E_2 を同一視することにより、$Q = \{\{x[S_1], x[C_1], x[P_1, E_2], x[C_2]\}, \{x[E_1], x[C_1]\}, \{x[S_2], x[C_2], x[P_2]\}\}$ が得られる。

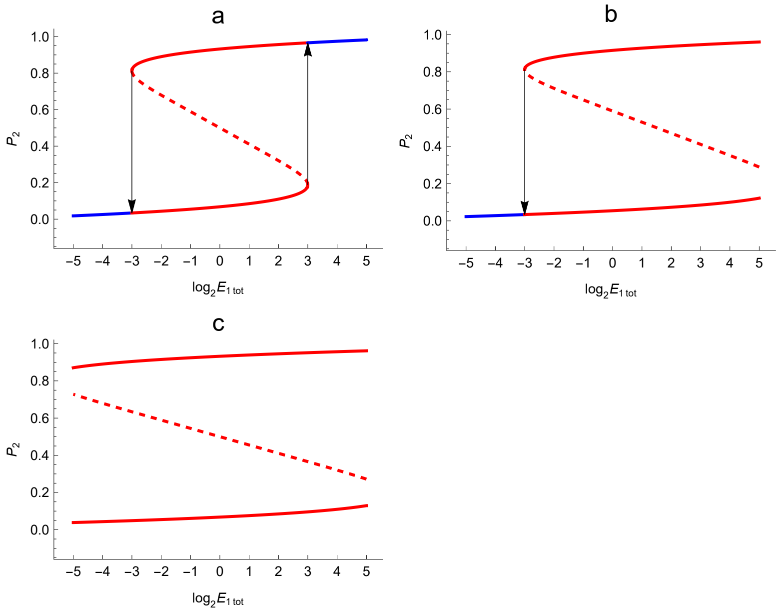

図 4: 双安定性とリセット可能性の関係。横軸は入力化学種である E_1 を含む酵素の総濃度で単位は $mmol/m^3$ で、縦軸は出力化学種の P_2 の総濃度に対する相対濃度である。実線は安定な平衡点、すなわち、定常状態値に対応し、破線は不安定な平衡点に対応している a：リセット可能な双安定。両端は青の実線は単安定状態、b：リセット可能でない双安定、ただし、上の安定状態から下へは遷移できる、c:リセット可能でない双安定

2.3 リセット可能性な双安定性

酵素反応ネットワークの分割表現の有効性を示す目的で双安定でリセット可能な酵素反応ネットワークの探索を試みた。リセット可能とは、細胞内で想定されるタンパク質濃度の範囲内で、入力化学種の総濃度を変化させることにより、2 つの定常状態間を相互に遷移できるという性質である。典型的なリセット可能な双安定性の酵素反応ネットワークは、図 2a に示したものである。入力化学種を E_1、出力化学種を P_2 とした場合の双安定性とリセット可能性の関係を図 4 に示す。例えば図 2a の酵素反応ネットワークでは、入力化学種 E_1 は 1 と表示された小さな丸に、出力化学種 P_2 は左下の S_1 と P_2 を同一視した矩形に対応する。横軸は入力化学種総濃度の 2 を底とする対数で、縦軸は 0 以上 1 以下に正規化した出力化学種濃度である。細胞内で想定されるタンパク質濃度の範囲を 2^{-5} から 2^5 としている。曲線は平衡状態での出力化学種濃度を表しており、実線は安定な平衡点、すなわち、定常状態値に対応し、破線は不安定な平衡点に対応している。図 4a がリセット可能な双安定の様相を示している。グラフの両端にみられる青の実線は定常状態がひとつであり、単安定な状態に対応する。中央の赤のグラフ部分は定常状態がふたつあり、双安定な状態に対応している。入力化学種総濃度を小さい方から大きくしていくと右側の黒の矢印のところで上の定常状態に不連続に飛び移り、右の青の単安定の状態へ移行する。その状態から入力化学種総濃度を小さくしていくと今度は左がわの黒の矢印のところで下の定常状態に飛び移る。従って、二つの定常状態間を相互に移行できるのでリセット可能な双安定というわけである。図 4b は図 4a のグラフが右に伸びて右の単安定の領域が細胞内で想定されるタンパク質濃度の範囲を超えている例である。この場合は黒の矢印で上の定常状態から下の定常状態へ飛び移ることはできるが、入力化学

種総濃度を細胞内で想定されるタンパク質濃度の範囲で高くしても、下の定常状態から上の定常状態へ飛び移ることはできない。これがリセット可能でない双安定の例である。図 4c はさらにグラフが左側にも伸びている例である。このような場合は系の初期状態が中央の赤の点線の上にあれば上の定常状態へ、下にあれば下の定常状態へ移行し、入力化学種総濃度を細胞内で想定されるタンパク質濃度の範囲で変化させてもその状態の変更はできない。これもリセット可能でない双安定の例である。

2.4 分割表現空間での酵素反応ネットワークの探索

酵素反応ネットワークの分割表現には、欲しい応答特性を持つ酵素反応ネットワークを探索するアルゴリズムを次の 2 つの分割修正子を逐次適用する形で、自然な形で実装することができる。

- 分離分割修正子：分割からランダムに選んだ要素をランダムに 2 つに分離する。例えば図 3 で示した酵素反応ネットワーク C に対応する分割 $\{\{S_1, P_2, E_2\}, \{P_1, E_1, S_2\}\}$ の 2 つめの要素 $\{P_1, E_1, S_2\}$ を、$\{P_1, E_1\}$ と $\{S_2\}$ の 2 つに分離しすることにより、酵素反応ネットワーク A に対応する分割 $\{\{S_1, P_2, E_2\}, \{P_1, E_1\}, \{S_2\}\}$ が得られる。
- 結合分割修正子：ランダムに選んだ 2 つの要素を結合する。例えば、上述の図 3 の例だと、酵素反応ネットワーク A に対応する分割の 2 つめと 3 つめの要素を結合することにより、酵素反応ネットワーク C に対応する分割が得られる。

まず、分割から生成される酵素反応ネットワークのダイナミクスまたは定常状態の、望ましい応答特性を定量する評価関数 $\phi(P, \nu)$ を設定する。$\phi(P, \nu)$ は分割 P の関数であり、分割に対応する酵素反応ネットワークを構成するそれぞれの翻訳後修飾反応の反応速度定数と酵素の総濃度の組をパラメータ ν として持つ。

以下のアルゴリズムでは、与えられた分割 P に対してパラメータ値 ν に関するランダム検索を行う関数 $\Phi(P)$ を用いる。関数 $\Phi(P)$ は、パラメータ ν の値の候補の集合 Λ からランダムに選んだ λ 個のパラメータ値での評価値を $\phi(P, \nu)$ で定量し、最大の評価値とその際のパラメータ ν の組を値として返す。

アルゴリズムの主ループは下記の通りである。

1. 分割 P をランダムにひとつ決める。
2. 評価関数 $\Phi(P)$ の値が ρ 未満または繰り返し回数が γ 回未満なら $P = \psi(P, P, \sigma)$ を繰り返す。
3. P を値として返す。

分割探索関数 $\psi(P_0, P, \sigma)$ は、以下で記述される初期分割 P_0、分割 P、分割深度 σ を引数とする再帰的な関数である。$\psi(P_0, P, \sigma)$ は、評価関数の値が $\Phi(P_0)$ 以上の分割を返す。

1. もし σ が 0 なら P_0 を値として返す。
2. 結合分割修正子で P から P' を生成する。
3. もし $\Phi(P') > \Phi(P_0)$ なら P' を値として返す。
4. 分離分割修正子で P から P'' を生成する。
5. もし $\Phi(P'') > \Phi(P_0)$ なら P'' を値として返す。

6. $P = \psi(P_0, P', \sigma - 1)$ とする。

7. もし $\Phi(P) > \Phi(P_0)$ なら P を値として返す。

8. $P = \psi(P_0, P'', \sigma - 1)$ とする。

9. もし $\Phi(P) > \Phi(P_0)$ なら P を値として返す。

10. 上記のどの条件も満たさなかった場合は、P_0 を値として返す。

本研究では、このランダム探索アルゴリズムを酵素反応ネットワークの分割表現の有効性を示す目的で、前述のリセット可能な双安定性を持つ酵素反応ネットワークの探索に適用する。すなわち、リセット可能な双安定性に対する評価関数 $\phi(P, \nu)$ を設計しこのアルゴリズムで用いる。

3 結果

3.1 リセット可能な双安定性の評価関数

双安定とは前述したように与えられたパラメータ値 ν に対して定常状態値が 2 つ存在する性質である。さらに、リセット可能とは入力化学種を含む酵素の総濃度の値を変化させることにより、この 2 つの定常状態の間を遷移させることができる性質である。ここでは、図 4a に示すような典型的なリセット可能な双安定の様相、すなわち、入力化学種の総濃度のとる範囲の端の方で単安定、中央部分で双安定になるような酵素反応ネットワークに対して高い評価値を与える評価関数 $\phi(P, \nu)$ を作成する。

$\phi(P, \nu)$ は分割 P の関数であり、分割に対応する酵素反応ネットワークを構成するそれぞれの翻訳後修飾反応の反応速度定数と酵素の総濃度をパラメータ ν として持つ。入力化学種を含む酵素の総濃度のバリエーションを $\Omega = \{2^{-5}, 2^{-4.5}, \cdots, 2^5\}$ の 21 個の離散的な値とした。これらの値は、ν として設定する反応速度定数と同様、典型的な細胞内シグナル伝達系として知られている MAPK カスケードを構成するリン酸化酵素に関して報告されている値をおおよそ含むように設定している。

以下の手順が評価関数 $\phi(P, \nu)$ に相当する。P と ν は引数として与えられる。

1. 所与のパラメータ値 ν のうち入力化学種を含む酵素の総濃度だけを、$\Omega = \{2^{-5}, 2^{-4.5}, \cdots, 2^5\}$ の 21 個の値に対して、順次、離散的に変化させ、各酵素の総濃度を各酵素の保存則を満たすようにランダムに初期値として割振り、出力化学種の定常状態値の 21 個の組を求める。定常状態値は、生成された微分方程式を数値的に解き、適当に収束判定をすることにより求めた。詳細については次節で記述する。ここで、出力酵素種の定常状態値はその総濃度に対して正規化し、0 以上 1 以下の値とする。

2. 上記を θ 回繰返し、入力化学種の、異なる 21 の総濃度それぞれに対して θ 個の正規化された定常状態値の組を得る。ただし、21 個の全ての値が収束しているデータのみ用いる。従ってその個数は最大で θ 個である。入力化学種の、異なる 21 の総濃度からひとつ固定すると、高々θ 個の定常状態値が得られていることになる。これらの値が全て同じ値の場合は単安定を意味し、2 種の値に分かれる場合が双安定を意味する。

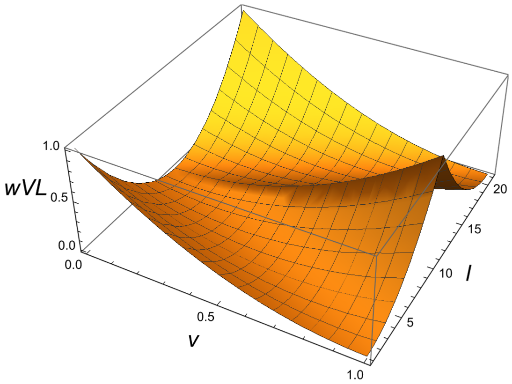

図 5: 制御可能な双安定性の評価用関数 wVL。v は 4 倍の分散値で、l はベクトル V における v の位置である。wVL は、領域の端では単安定で最大値を、中央では双安定で最大値をとる。

3. 双安定性の度合いは異なる初期状態から得られる複数の定常状態値の分散で定量的に評価することができる。この値は、完全な双安定状態、すなわち、半数の値が 0 で残りが 1 の時、最大値 1/4 をとり、単安定状態、すなわち、全ての値が同じ時、最小値 0 をとる。また、混じった状態では中間の値を取る。分散の値の 4 倍することにより、双安定の度合いを表す数値を 0 から 1 に正規化することができる。
4. ここまでで、入力化学種を含む酵素の総濃度である $2^{-5}, 2^{-4.5}, \cdots, 2^{5}$ の 21 個のそれぞれの値に対して双安定性の度合いを示す 21 個の正規化された分散 $V = \{V_1, V_2, \cdots, V_{21}\}$ を得る。
5. この V に対する関数 eVL の値、$eVL(V)$ を評価値として返す。

関数 eVL は式 (10) で定義する関数である。

$$
\begin{aligned}
eVL(V) &= \alpha \sum_{i=1}^{2} 1wVL(V_i, i) \\
wVL(v, l) &= (v - |l - 11|/10)^2
\end{aligned}
\tag{10}
$$

リセット可能な双安定性は、図 4 で説明したように、入力化学種の総濃度のとる範囲の端の方で単安定、中央部分で双安定になるという性質である。eVL はこの性質の度合いを評価する。その入力 V は上記の 21 個の分散値のベクトルで V_i はその要素である。関数 eVL の値は、0 から 1 の値となるようにその最大値で正規化している。α はそのための係数で、右辺の総和式が $V = \{0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 0, 0, 0, 0, 0, 0\}$ の時にとる最大値 0.604762 の逆数である。関数 eVL を構成する関数 wVL の形状を図 5 に示す。その入力 v は正規化された分散値 V_i で l はベクトル V における V_i の位置 i である。wVL は、領域の端では完全な単安定（$v = 0$）の場合に最大値を、中央では完全な双安定（$v = 1$）の場合に最大値をとり、その中間の位置では連続的に中間の評価値になるように設計してある。

3.2 探索アルゴリズムのハイパーパラメータ

以下に分割表現の応用であるリセット可能な双安定な酵素反応ネットワークを探索するアルゴリズムに含まれるハイパーパラメータと実際の探索の際に用いた値について整理しておく。まず、探索対象とする酵素反応ネットワークの特性と独立なハイパーパラメータには以下がある。

- 翻訳後修飾反応の数 N：4
- 入力化学種と出力化学種：入力が E_1 で出力が P_2
- 分割深度（二分木で再帰的に探索する深さ）σ：4
- 分割を変更するループの最大回数 γ：150
- 収束と判定する評価関数の値 ρ：0.8
- ランダムに試すパラメータの値の候補の集合 Λ：$\{2^{-5}, 2^{-4.5}, \cdots, 2^5\}$
- ランダムに試すパラメータ値の組の数 λ：5

前述したように図 2b に示す酵素反応ネットワークはリセット可能な双安定の典型的な例として知られており、それを構成する翻訳後修飾反応の数は 4 なので、N の値は 4 とした。入力化学種と出力化学種は同一の翻訳後修飾反応の化学種にしてしまうと探索される酵素反応ネットワークが著しく制限されるので、異なる翻訳後修飾反応の E_1 と P_2 とした。分割深度 σ とループ最大回数 γ については選んだ値が最適かどうかは分からない。いくつかの組合せを試したのち、ひとつの酵素反応ネットワークの探索が少なくとも数日で終わる値の組合せを採用した。酵素の総濃度、および、酵素反応の反応速度定数に用いている値の集合 Λ は、典型的なシグナル伝達系として知られている MAPK カスケードを構成するリン酸化酵素での $mmol/m^3 - s$ 系での報告されている値をおおよそ含むように設定した [21, 22, 23, 24, 25]。λ については、他にいくつかの値で試したが、あまり大きな違いはみられなかった。

探索対象、すなわち、双安定な酵素反応ネットワークの探索のために特有なハイパーパラメータには以下がある。一般には、これらは異なる探索対象に対しては違うものになる。

- 定常状態値を計算する際に用いる入力化学種の総濃度の値の集合 (Ω)：$\{2^{-5}, 2^{-4.5}, \cdots, 2^5\}$
- 1 つのパラメータ値の組に対してランダムな初期値で生成する定常状態値の個数 (θ)：5

Ω については、上述した Λ と同じバリエーションを用いた。θ については、他にいくつかの値で試したが、あまり大きな違いはみられなかった。

上記の定常状態値を得るには生成された微分方程式を初期値を更新しながら数値的に何回も解いて、その収束を判定するという方法を用いた。この部分には以下のハイパーパラメータがあり、これらは探索の過程で定常状態値を必要とする場合に共通のものである。

- 1 ステップ計算時間 τ：10 秒
- ステップの最大繰返し数 κ：360
- 収束判定誤差 ϵ：10^{-3}

微分方程式を数値的に解くのに Wolfram Mathematica の NDSolve 関数を用いた。NDSolve で τ 秒後のタンパク質濃度を計算し、その変化の相対誤差、すなわち、全てのタンパク質に関して、総濃度に対する変化の割合が ϵ より小さくなったら収束したと判定する。収束していない場合はさらに τ 秒後のタンパク質濃度を計算し、同様の判定を行う。これを κ 回繰返しても収束しない場合は、収束しなかったという結果を返している。τ と κ の積の 3600 秒、すなわち、1 時間を定常状態に達するまでの限界時間とした。この時間は、細胞内のシグナル伝達系の応答時間を参考にした。1 ステップ計算時間 τ と収束判定誤差 ϵ の値については試行錯誤した後、これらの値を採用した。

3.3 探索アルゴリズムで見つかった酵素反応ネットワーク

探索は、CPU が 3.4GHz の i7-3770 プロセッサで、メモリは 16GB、OS は Windows10 のマシンを用いた。探索プログラムは Wolfram Mathematica 12.0 で実装した。

上述のハイパーパラメータの値での探索で見つかった双安定の酵素反応ネットワークを図 6a-h に示す。それぞれ初期設定での乱数の種として異なるものを使っている。一つの酵素反応ネットワークを発見するのに要した CPU 時間は最大およそ 30 時間であった。

例えば、図 6a の酵素反応ネットワークは、3 種の化学種から構成されており、入力は E_1、E_2、P_1、P_4、S_1、S_4 を同一視した化学種で、出力は P_2 と S_3 を同一視した化学種である。残りは、E_3、E_4、P_3、S_2 を同一視した化学種である。特に入力化学種はその 2 量体との平衡状態にある。図 6g は、図 2a に示した典型的な双安定の酵素反応ネットワークと同一である。

それぞれの酵素反応ネットワークの反応速度定数、各化学種の総濃度、導出された微分方程式系を、それぞれ、付録の表 A.1、表 A.2、表 A.3 と表 A.4 と表 A.5 に示す。

図 7 は、それぞれの酵素反応ネットワークの双安定の様相を示したものである。a-h は図 6 の a-h に対応している。双安定な様相をプロットするためにモンテカルロ法を用いて、入力化学種を含む酵素の総濃度のそれぞれの値に対する出力化学種の定常状態値を求めた。すなわち、分割から導出された微分方程式系を数値的に解く時の初期値を、各保存則に含まれる化学種にランダムに配分した。全ての得られた酵素反応ネットワークで、リセット可能な双安定が表れているのが分かる。

図 8 に探索の過程の様相を示す。a は探索の進行に対する評価値の変遷を示す。横軸は酵素反応ネットワークの構造あるいはパラメータ値を変更した回数である。縦軸は評価値で最大が 1 である。a-h は図 6 の a-h に対応している。最初の数ステップで全ての場合で評価値が 0.6 に到達しており、そこまではほぼ全てのグラフが重なってしまっているため、縦軸の範囲を 0.55 以上として、それ以後の重なりが少なるようにしている。探索は 150 回を上限としており、評価値が 0.8 を超えると探索を打ち切るようにしている。収束の様相は、初期値とした乱数の種により様々であることが分かる。図 8b は、分割間の距離に基づく、分割空間内での移動を示している。描画には Wolfram Mathematica の Graph 関数を用いた。全分割間の距離を導入した分割間距離関数で測りその値を EdgeWeight オプションで用いた。GrpahLayout オプションでは SpringEmbedding を指定し、分割間距離に相当する力のバネで相互に結合された分割のトータルのエネルギーが最小になるように配置されている。a-h は図 6 の a-h に対応している。赤丸が最終の分割に対応する。探索により分割空間を全体的に移動していることが分かる。

4 議論

翻訳後修飾反応を基本構成要素とする酵素反応ネットワークは、その酵素、基質、生成物を要素とする集合の分割で表現することができることを示した。分割の各要素である部分集合の要素を同じ化学種として同一視することにより、酵素反応ネットワークを構成することができる。特に、同じ翻訳後修飾反応内の基質と生成物を同一視することにより、酵素と基質＝生成物との結合解離反応を表現することもできる。しかし、足場タンパク質や膜受容体タンパク質などにみられる複数のタンパク質の結合を表現することはできない。分割表現の拡張として酵素基質複合体を元の集合の要素として加えることが考えられるが、分割からの微分方程式系と保存則の導出のアルゴリズムを創案する必要がある。

さらに、酵素反応ネットワークの分割表現を双安定ネットワークの探索に応用し、分割表現に導入した 2 つの分割修正子は、良好に機能し、様々な双安定の酵素反応ネットワークを得ることがで

きた。探索で得られた酵素反応ネットワークの中には、正の自己制御フィードバックをもつ 2 つのサイクル反応系が相互に負に制御する典型的な双安定の酵素反応ネットワークもあった。

また、探索アルゴリズムの性能については、許容できる処理時間内で探索が終了することを確認した。特に、網羅的な探索に比べて、大幅に探索に要する時間を縮められたのは特筆に値する。また、分割に導入した分割間の距離を用いた探索経路の視覚化により、探索の様相を示すことはできた。基本構成要素を翻訳後修飾反応からサイクル反応系に粒度を上げることは、難しくない。元の集合の要素を翻訳後修飾反応の基質、酵素、生成物の代わりに、活性型酵素、不活性型酵素、不活性型酵素を活性型酵素にする反応を触媒する活性化酵素、その逆の不活性化酵素の 4 種類にすればよい。今後試してみる予定である。

探索アルゴリズムのハイパーパラメータである探索深度 σ とひとつの酵素反応ネットワークの構造に対して評価を行う際のパラメータ値である反応速度定数と各化学種の総濃度をランダムに試す回数 λ については、今回は探索深度は 4、ランダムに試す回数は 5 として実行したが、他の値で系統的には試してはいない。これらの値を調整することにより高速化ができる可能性はある。さらに高速化するには、GPU の利用、あるいは、質量作用の法則の代わりにミカエリスメンテン近似の改良型である tQCCM[16] を反応機構の定式化として用いることが考えられる。

本研究で対象とした双安定性は定常状態での性質であるが、探索アルゴリズムは、探索対象の酵素反応ネットワークの特性に特有な評価関数と、独立なアルゴリズム部分に分かれているため、評価関数を別の特性用に置き換えることにより、適応応答のようなダイナミックな性質の探索にも応用可能であると思われる。今後試してみる予定である。基本構成要素である翻訳後修飾反応の数 N を 4 として試したが、3 とした場合でも、双安定な酵素反応ネットワークは見つけることができている。この翻訳後修飾反応の数の自動増減を探索アルゴリズムに含めることができるとさらなる最適な酵素反応ネットワークをみつけることができるようになる。

参考文献

[1] Ferrell JE, Jr. How regulated protein translocation can produce switch-like responses. Trends Biochem Sci. 1998;23:461-5.

[2] Jeschke M, Baumgartner S, Legewie S. Determinants of cell-to-cell variability in protein kinase signaling. PLoS Comput Biol. 2013;9(12):e1003357. Epub 2013/12/18. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003357 PCOMPBIOL-D-13-00825 [pii]. PubMed PMID: 24339758; PubMed Central PMCID: PMC3854479.

[3] Kholodenko BN. Cell-signalling dynamics in time and space. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006;7(3):165-76. PubMed PMID: 16482094.

[4] Mai Z, Liu H. Random parameter sampling of a generic three-tier MAPK cascade model reveals major factors affecting its versatile dynamics. PLoS One. 2013;8(1):e54441. Epub 2013/02/01. doi: 10.1371/journal.pone.0054441 PONE-D-12-24261 [pii]. PubMed PMID: 23365667; PubMed Central PMCID: PMC3554771.

[5] Qiao L, Nachbar RB, Kevrekidis IG, Shvartsman SY. Bistability and oscillations in the Huang-Ferrell model of MAPK signaling. PLoS Comput Biol. 2007;3(9):1819-26. Epub 2007/10/03. doi: 07-PLCB-RA-0294 [pii] 10.1371/journal.pcbi.0030184. PubMed PMID: 17907797; PubMed Central PMCID: PMC1994985.

[6] Volinsky N, Kholodenko BN. Complexity of receptor tyrosine kinase signal processing. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013;5(8):a009043. Epub 2013/08/03. doi: 10.1101/cshperspect.a009043 a009043 [pii] 5/8/a009043 [pii]. PubMed PMID: 23906711.

[7] Sueyoshi C, Naka T. Stability Analysis for the Cellular Signaling Systems Composed of Two Phosphorylation-Dephosphorylation Cyclic Reactions. Computational Molecular Bioscience. 2017;7:33-45.

[8] Kuwahara H, Gao X. Stochastic effects as a force to increase the complexity of signaling networks. Sci Rep. 2013;3:2297. Epub 2013/07/31. doi: 10.1038/srep02297 srep02297 [pii]. PubMed PMID: 23892365; PubMed Central PMCID: PMC3725509.

[9] Ramakrishnan N, Bhalla US. Memory switches in chemical reaction space. PLoS Comput Biol. 2008;4(7):e1000122. Epub 2008/07/19. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000122. PubMed PMID: 18636099; PubMed Central PMCID: PMC2440819.

[10] Shah NA, Sarkar CA. Robust network topologies for generating switch-like cellular responses. PLoS Comput Biol. 2011;7(6):e1002085. Epub 2011/07/07. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002085 10-PLCB-RA-2608 [pii]. PubMed PMID: 21731481; PubMed Central PMCID: PMC3121696.

[11] Siegal-Gaskins D, Mejia-Guerra MK, Smith GD, Grotewold E. Emergence of switch-like behavior in a large family of simple biochemical networks. PLoS Comput Biol. 2011;7(5):e1002039. Epub 2011/05/19. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002039 PCOMPBIOL-D-10-00298 [pii]. PubMed PMID: 21589886; PubMed Central PMCID: PMC3093349.

[12] Gedeon T, Cummins B, Harker S, Mischaikow K. Identifying robust hysteresis in networks. PLoS Comput Biol. 2018;14(4):e1006121. Epub 2018/04/24. doi: 10.1371/journal.pcbi.1006121. PubMed PMID: 29684007; PubMed Central PMCID: PMCPMC5933818.

[13] Ma W, Trusina A, El-Samad H, Lim WA, Tang C. Defining network topologies that can achieve biochemical adaptation. Cell. 2009;138(4):760-73. Epub 2009/08/26. doi: 10.1016/j.cell.2009.06.013 S0092-8674(09)00712-0 [pii]. PubMed PMID: 19703401; PubMed Central PMCID: PMC3068210.

[14] Yao G, Tan C, West M, Nevins JR, You L. Origin of bistability underlying mammalian cell cycle entry. Molecular systems biology [electronic resource]. 2011;7:485. Epub 2011/04/29. doi: 10.1038/msb.2011.19 msb201119 [pii]. PubMed PMID: 21525871; PubMed Central PMCID: PMC3101952.

[15] Adler M, Szekely P, Mayo A, Alon U. Optimal Regulatory Circuit Topologies for Fold-Change Detection. Cell Syst. 2017;4(2):171-81 e8. Epub 2017/01/17. doi: S2405-4712(16)30419-7 [pii] 10.1016/j.cels.2016.12.009. PubMed PMID: 28089543.

[16] Kim JK, Tyson JJ. Misuse of the Michaelis-Menten rate law for protein interaction networks and its remedy. PLoS Comput Biol. 2020;16(10):e1008258. Epub 2020/10/23. doi: 10.1371/journal.pcbi.1008258. PubMed PMID: 33090989; PubMed Central PMCID: PMCPMC7581366.

[17] Naka T. Validity of the Michaelis-Menten Approximation for the Stability Analysis in Regulatory Reaction Networks. BIOSTEC 2020 (13th International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies); February; Valletta, Malta2020. p. 176-82.

[18] Cho DY, Cho KH, Zhang BT. Identification of biochemical networks by S-tree based genetic programming. Bioinformatics. 2006;22(13):1631-40. PubMed PMID: 16585066.

[19] Lok L, Brent R. Automatic generation of cellular reaction networks with Moleculizer 1.0. Nat Biotechnol. 2005;23(1):131-6. PubMed PMID: 15637632.

[20] Gabel M, Hohl T, Imle A, Fackler OT, Graw F. FAMoS: A Flexible and dynamic Algorithm for Model Selection to analyse complex systems dynamics. PLoS Comput Biol. 2019;15(8):e1007230. Epub 2019/08/17. doi: 10.1371/journal.pcbi.1007230. PubMed PMID: 31419221; PubMed Central PMCID: PMCPMC6697322.

[21] Brightman FA, Fell DA. Differential feedback regulation of the MAPK cascade underlies the quantitative differences in EGF and NGF signalling in PC12 cells. FEBS Lett. 2000;482:169-74.

[22] Hatakeyama M, Kimura S, Naka T, Kawasaki T, Yumoto N, Ichikawa M, et al. A computational model on the modulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and Akt pathways in heregulin-induced ErbB signalling. Biochem J. 2003;373(Pt 2):451-63. PubMed PMID: 12691603.

[23] Huang CF, Ferrell JE, Jr. Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93:10078-83.

[24] Levchenko A, Bruck J, Sternberg PW. Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signaling and reduce its threshold properties. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97(11):5818-23.

[25] Schoeberl B, Eichler-Jonsson C, Gilles ED, Muller G. Computational modeling of the dynamics of the MAP kinase cascade activated by surface and internalized EGF receptors. Nat Biotechnol. 2002;20:370-5.

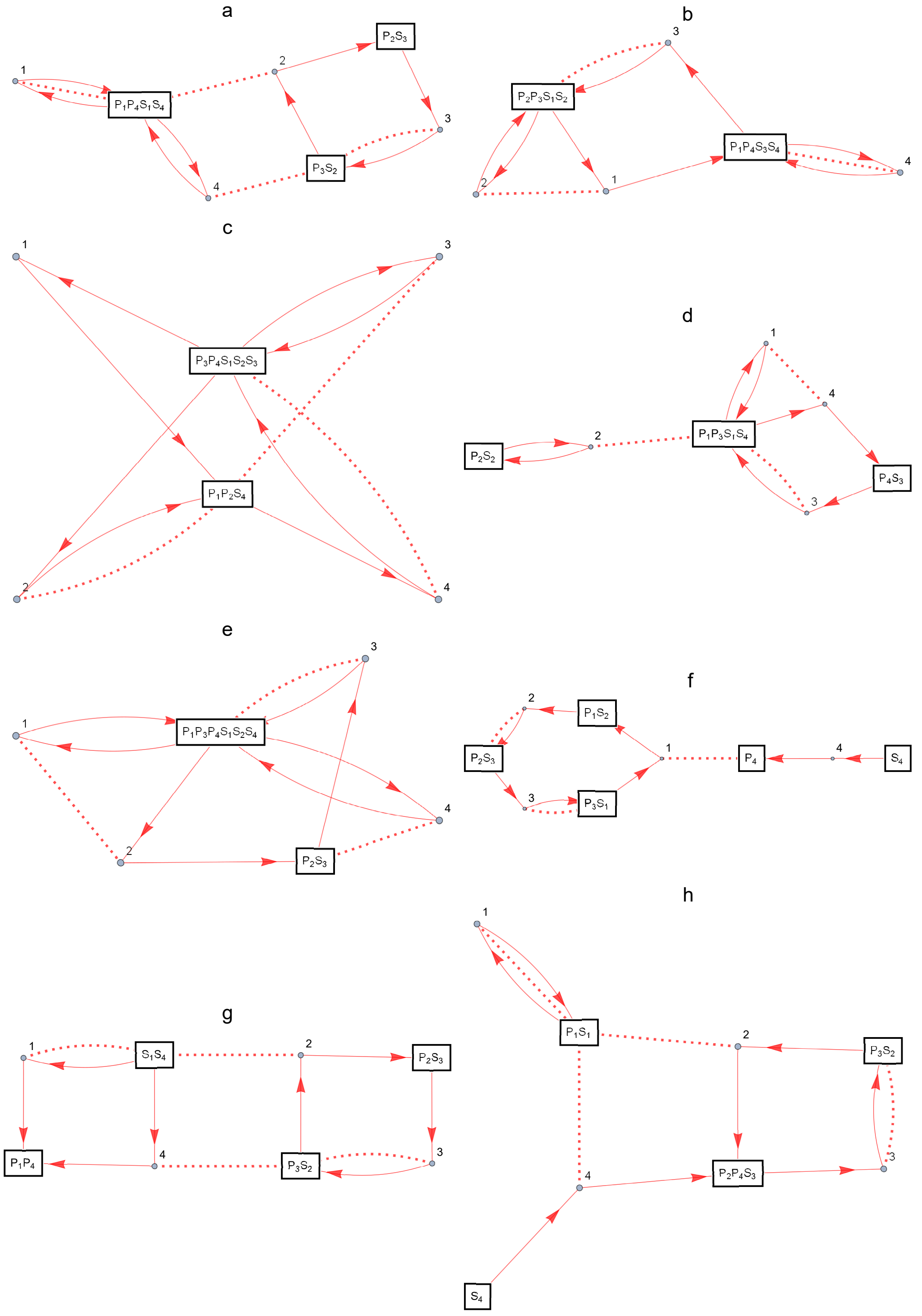

図 6: 探索でみつかった双安定な酵素反応ネットワーク。a-h は乱数の種が異なる。図の見方は図 1 と同じ。

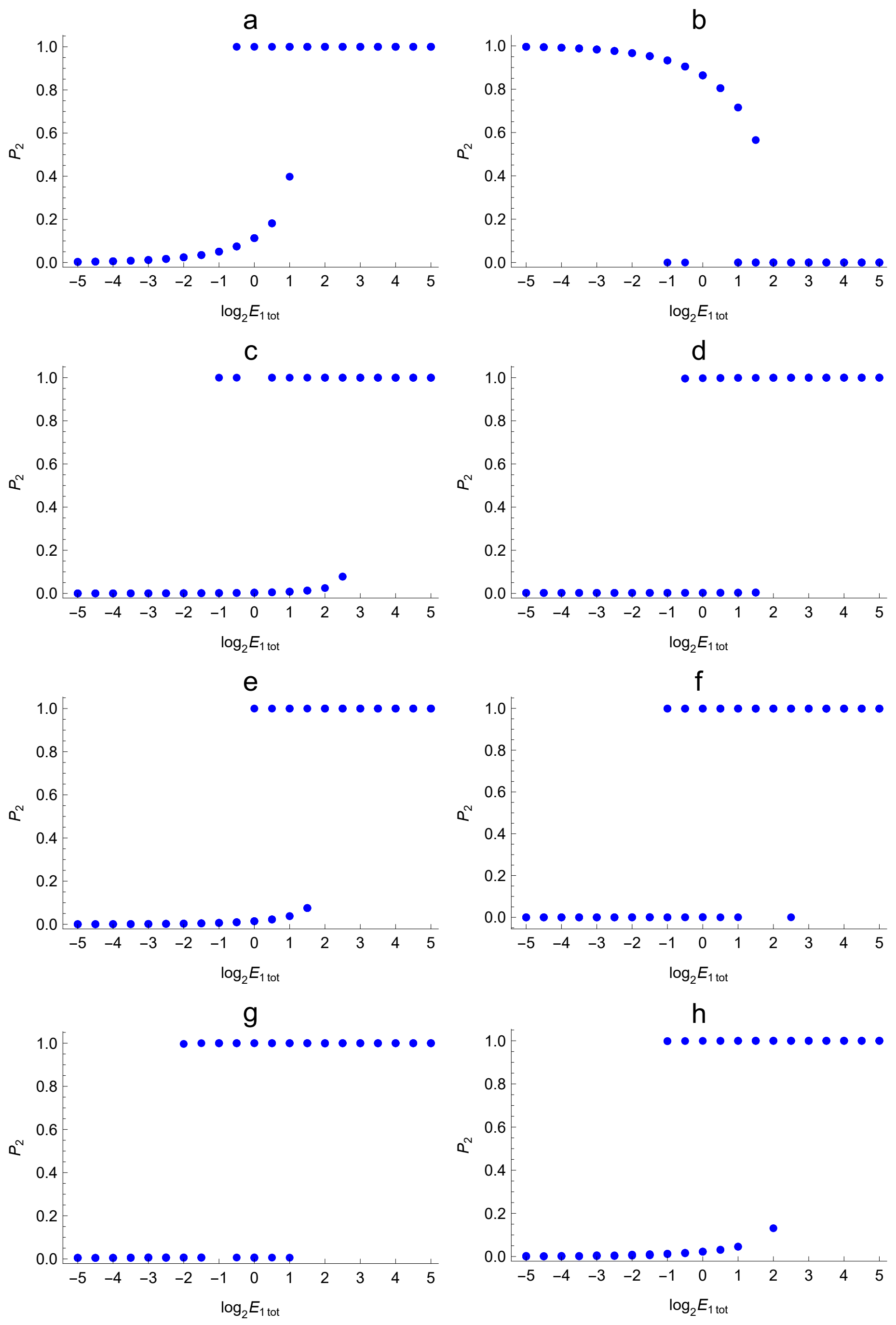

図 7: 探索でみつかった酵素反応ネットワークの双安定の様相。a-h は図 6a-h に対応している。横軸は入力化学種である E_1 を含む酵素の総濃度で単位は $mmol/m^3$ で、縦軸は出力化学種の P_2 の総濃度に対する相対濃度である。

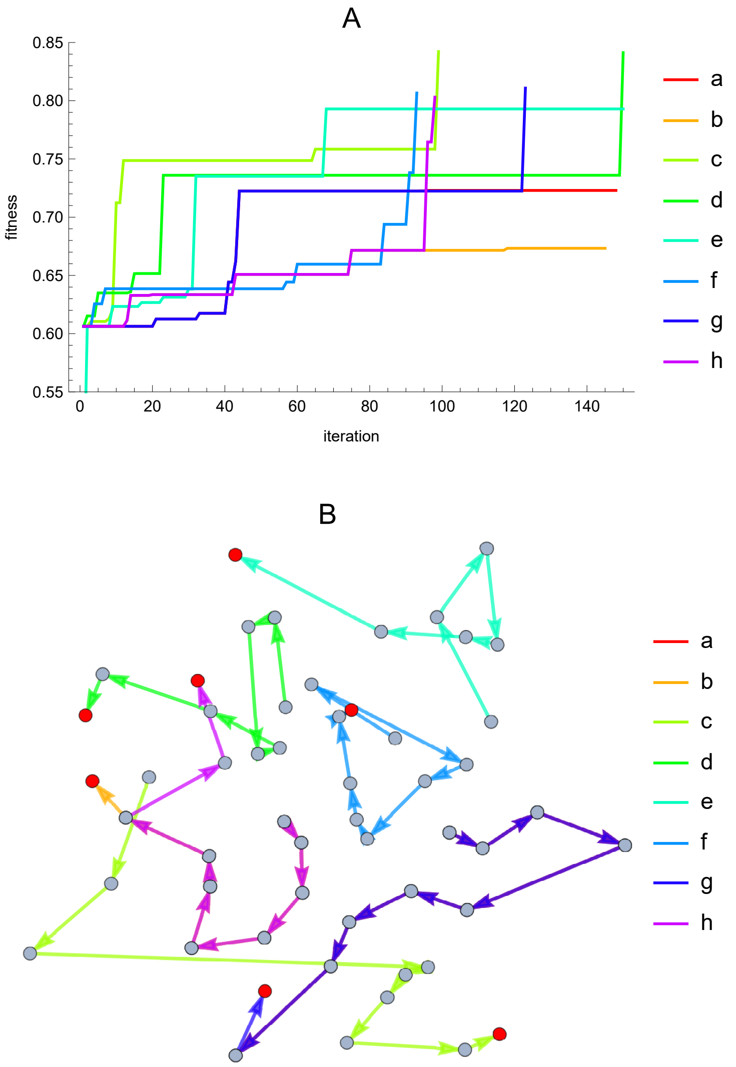

図 8: 探索の過程の様相。a-h は図 6a-h に対応している。A：収束の様相。横軸は探索の繰返し回数。縦軸は評価値。評価値が 0.8 より大きくなるか、繰返し回数 150 で収束としている。B：分割間の距離に基づいた探索過程の分割の分布。矢印の方向に探索が進み、赤丸が最終地点である。

A　付録

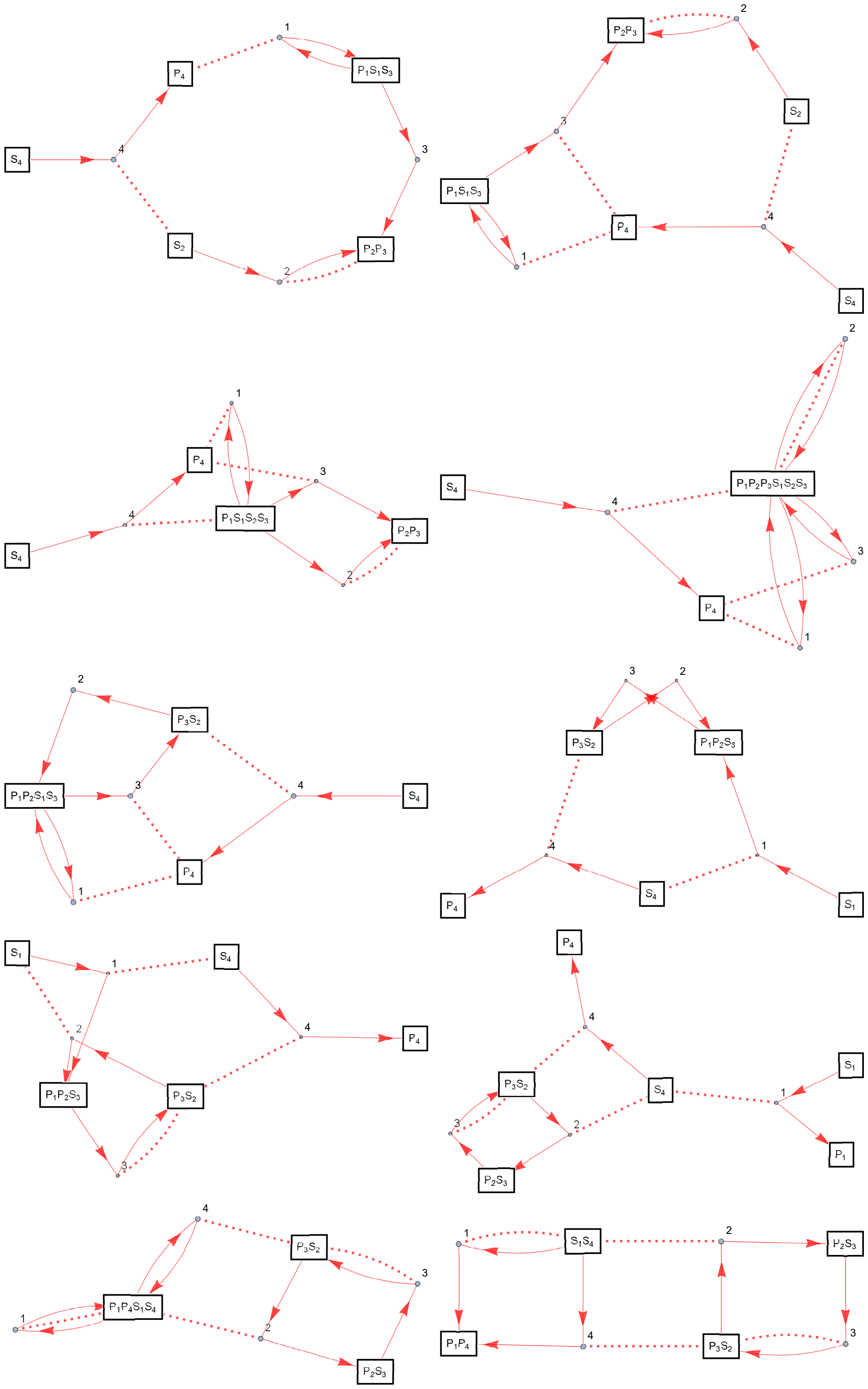

図 A.1: 探索での酵素反応ネットワークの遷移の例。発見した酵素反応ネットワーク図 6g の探索の過程での酵素反応ネットワークの遷移である。左上が初期値で右に遷移し、2 行目に移り左から右に遷移し、3 行目も同様に左から右に遷移している。右下が最終的に得られた酵素反応ネットワークである。

表 A.1: 見つかった酵素反応ネットワークの反応速度定数値。各行は図 6 の a-h に対応している。各列はそれぞれの反応速度定数の値である。a_i の単位は $m^3(mmols)^{-1}$ で、d_i と k_i の単位は s^{-1} である。

	a_1	d_1	k_1	a_2	d_2	k_2	a_3	d_3	k_3	a_4	d_4	k_4
a	1/8	16	1	32	16	8	1/16	1/4	8	1/4	1/4	1/4
b	1/2	1/2	32	32	4	1/16	1/2	8	4	32	8	1/16
c	32	1/16	1/8	1/16	32	1/8	1/8	32	1/4	1/4	1/8	1/4
d	8	1/8	1	16	1/32	1/2	1/16	32	32	8	2	1
e	1/8	1/4	16	32	1/32	1	2	16	32	4	2	16
f	32	32	32	1/16	4	1/2	8	1/8	32	32	1/32	8
g	1/16	32	4	4	2	1/4	1/8	2	1/32	1/8	1	1/8
h	1/8	32	8	8	1/32	1/2	1/4	2	2	1/4	4	2

表 A.2: 見つかったそれぞれの酵素反応ネットワークの酵素の総濃度。各行は図 6 の a-h に対応している。第 2 列は保存則に対応する化学種の集合のリストである。第 3 列は第 2 列と同じ順序で、それらの総濃度である。ただし、入力化学種である E_1 を含む集合については、表の値ではなく、2^{-5} から 2^5 の範囲で動かしている。単位は $mmol/m^3$ である。

	Preserved Chemical Sets	Values
a	$\{\{C_1 , C_1 , C_2 , C_4 , E_1\ E_2\ P_1\ P_4\ S_1\ S_4\ \}, \{C_2 , C_3 , C_3 , C_4 , E_3\ E_4\ P_3\ S_2 , P_2\ S_3\ \}\}$	{1/16, 32}
b	$\{\{C_1 , C_2 , E_1\ E_2\ \}, \{C_2 , C_3 , C_1 , C_3 , C_4 , C_4 , E_4\ P_1\ P_4\ S_3\ S_4 , E_3\ P_2\ P_3\ S_1\ S_2\ \}\}$	{1, 8}
c	$\{\{C_1 , E_1\ \}, \{C_2 , C_3 , C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_4 , E_4\ P_3\ P_4\ S_1\ S_2\ S_3 , E_2\ E_3\ P_1\ P_2\ S_4\ \}\}$	{32, 16}
d	$\{\{C_1 , C_4 , E_1\ E_4\ \}, \{C_2 , P_2\ S_2\ \}, \{C_1 , C_2 , C_3 , C_3 , C_4 , E_2\ E_3\ P_1\ P_3\ S_1\ S_4 , P_4\ S_3\ \}\}$	{1/2, 2, 16}
e	$\{\{C_1 , C_2 , E_1\ E_2\ \}, \{C_4 , C_1 , C_2 , C_3 , C_3 , C_4 , E_3\ P_1\ P_3\ P_4\ S_1\ S_2\ S_4 , E_4\ P_2\ S_3\ \}\}$	{1/16, 8}
f	$\{\{C_4 , E_4\ \}, \{C_1 , C_4 , S_4 , E_1\ P_4\ \}, \{C_3 , C_1 , C_2 , C_2 , C_3 , E_2\ P_2\ S_3 , P_1\ S_2 , E_3\ P_3\ S_1\ \}\}$	{1/8, 1/2, 8}
g	$\{\{C_2 , C_3 , C_3 , C_4 , E_3\ E_4\ P_3\ S_2 , P_2\ S_3\ \}, \{C_1 , C_1 , C_2 , C_4 , E_1\ E_2\ S_1\ S_4 , P_1\ P_4\ \}\}$	{8, 1/2}
h	$\{\{C_3 , C_2 , C_3 , C_4 , S_4 , P_2\ P_4\ S_3 , E_3\ P_3\ S_2\ \}, \{C_1 , C_1 , C_2 , C_4 , E_1\ E_2\ E_4\ P_1\ S_1\ \}\}$	{16, 1/16}

表 A.3: 見つかったそれぞれの酵素反応ネットワークの微分方程式系（a-c）。第 1 列は図 6 の a-c に対応している。第 2 列は微分方程式の左辺の微分される変数名で第 3 列が微分方程式の右辺である。変数名は x[化学種名] で表している。特に、いくつかの化学種を同一視した場合はそれらを大括弧の中に列挙している。

	Chemicals	Rate Equations
a	x[E_3 E_4 P_3 S_2]	d_2 x[C_2] + d_3 x[C_3] + 2k_3 x[C_3] + d_4 x[C_4] + k_4 x[C_4] - a_2 x[E_1 E_2 P_1 P_4 S_1 S_4]x[E_3 E_4 P_3 S_2] - a_4 x[E_1 E_2 P_1 P_4 S_1 S_4]x[E_3 E_4 P_3 S_2] - a_3 x[E_3 E_4 P_3 S_2]x[P_2 S_3]
	x[E_1 E_2 P_1 P_4 S_1 S_4]	2d_1 x[C_1] + 2k_1 x[C_1] + d_2 x[C_2] + k_2 x[C_2] + d_4 x[C_4] + k_4 x[C_4] - 2a_1 x[E_1 E_2 P_1 P_4 S_1 S_4]2 - a_2 x[E_1 E_2 P_1 P_4 S_1 S_4]x[E_3 E_4 P_3 S_2] - a_4 x[E_1 E_2 P_1 P_4 S_1 S_4]x[E_3 E_4 P_3 S_2]
	x[P_2 S_3]	k_2 x[C_2] + d_3 x[C_3] - a_3 x[E_3 E_4 P_3 S_2]x[P_2 S_3]
	x[C_1]	-(d_1 x[C_1]) - k_1 x[C_1] + a_1 x[E_1 E_2 P_1 P_4 S_1 S_4]2
	x[C_2]	-(d_2 x[C_2]) - k_2 x[C_2] + a_2 x[E_1 E_2 P_1 P_4 S_1 S_4]x[E_3 E_4 P_3 S_2]
	x[C_3]	-(d_3 x[C_3]) - k_3 x[C_3] + a_3 x[E_3 E_4 P_3 S_2]x[P_2 S_3]
	x[C_4]	-(d_4 x[C_4]) - k_4 x[C_4] + a_4 x[E_1 E_2 P_1 P_4 S_1 S_4]x[E_3 E_4 P_3 S_2]
b	x[E_4 P_1 P_4 S_3 S_4]	k_1 x[C_1] + d_3 x[C_3] + 2d_4 x[C_4] + 2k_4 x[C_4] - a_3 x[E_3 P_2 P_3 S_1 S_2]x[E_4 P_1 P_4 S_3 S_4] - 2a_4 x[E_4 P_1 P_4 S_3 S_4]2
	x[E_1 E_2]	d_1 x[C_1] + k_1 x[C_1] + d_2 x[C_2] + k_2 x[C_2] - a_1 x[E_1 E_2]x[E_3 P_2 P_3 S_1 S_2] - a_2 x[E_1 E_2]x[E_3 P_2 P_3 S_1 S_2]
	x[E_3 P_2 P_3 S_1 S_2]	d_1 x[C_1] + d_2 x[C_2] + k_2 x[C_2] + d_3 x[C_3] + 2k_3 x[C_3] - a_1 x[E_1 E_2]x[E_3 P_2 P_3 S_1 S_2] - a_2 x[E_1 E_2]x[E_3 P_2 P_3 S_1 S_2] - a_3 x[E_3 P_2 P_3 S_1 S_2]x[E_4 P_1 P_4 S_3 S_4]
	x[C_1]	-(d_1 x[C_1]) - k_1 x[C_1] + a_1 x[E_1 E_2]x[E_3 P_2 P_3 S_1 S_2]
	x[C_2]	-(d_2 x[C_2]) - k_2 x[C_2] + a_2 x[E_1 E_2]x[E_3 P_2 P_3 S_1 S_2]
	x[C_3]	-(d_3 x[C_3]) - k_3 x[C_3] + a_3 x[E_3 P_2 P_3 S_1 S_2]x[E_4 P_1 P_4 S_3 S_4]
	x[C_4]	-(d_4 x[C_4]) - k_4 x[C_4] + a_4 x[E_4 P_1 P_4 S_3 S_4]2
c	x[E_4 P_3 P_4 S_1 S_2 S_3]	d_1 x[C_1] + d_2 x[C_2] + d_3 x[C_3] + k_3 x[C_3] + d_4 x[C_4] + 2k_4 x[C_4] - a_1 x[E_1]x[E_4 P_3 P_4 S_1 S_2 S_3] - a_2 x[E_2 E_3 P_1 P_2 S_4]x[E_4 P_3 P_4 S_1 S_2 S_3] - a_3 x[E_2 E_3 P_1 P_2 S_4]x[E_4 P_3 P_4 S_1 S_2 S_3] - a_4 x[E_2 E_3 P_1 P_2 S_4]x[E_4 P_3 P_4 S_1 S_2 S_3]
	x[E_1]	d_1 x[C_1] + k_1 x[C_1] - a_1 x[E_1]x[E_4 P_3 P_4 S_1 S_2 S_3]
	x[E_2 E_3 P_1 P_2 S_4]	k_1 x[C_1] + d_2 x[C_2] + 2k_2 x[C_2] + d_3 x[C_3] + k_3 x[C_3] + d_4 x[C_4] - a_2 x[E_2 E_3 P_1 P_2 S_4]x[E_4 P_3 P_4 S_1 S_2 S_3] - a_3 x[E_2 E_3 P_1 P_2 S_4]x[E_4 P_3 P_4 S_1 S_2 S_3] - a_4 x[E_2 E_3 P_1 P_2 S_4]x[E_4 P_3 P_4 S_1 S_2 S_3]
	x[C_1]	-(d_1 x[C_1]) - k_1 x[C_1] + a_1 x[E_1]x[E_4 P_3 P_4 S_1 S_2 S_3]
	x[C_2]	-(d_2 x[C_2]) - k_2 x[C_2] + a_2 x[E_2 E_3 P_1 P_2 S_4]x[E_4 P_3 P_4 S_1 S_2 S_3]
	x[C_3]	-(d_3 x[C_3]) - k_3 x[C_3] + a_3 x[E_2 E_3 P_1 P_2 S_4]x[E_4 P_3 P_4 S_1 S_2 S_3]
	x[C_4]	-(d_4 x[C_4]) - k_4 x[C_4] + a_4 x[E_2 E_3 P_1 P_2 S_4]x[E_4 P_3 P_4 S_1 S_2 S_3]

表 A.4: 見つかったそれぞれの酵素反応ネットワークの微分方程式系（d,e）。第 1 列は図 6 の d と e に対応している。第 2 列は微分方程式の左辺の微分される変数名で第 3 列が微分方程式の右辺である。変数名は x[化学種名] で表している。特に、いくつかの化学種を同一視した場合はそれらを大括弧の中に列挙している。

	Chemicals	Rate Equations
d	x[E_1 E_4]	d_1 x[C_1] + k_1 x[C_1] + d_4 x[C_4] + k_4 x[C_4] - a_1 x[E_1 E_4]x[E_2 E_3 P_1 P_3 S_1 S_4] - a_4 x[E_1 E_4]x[E_2 E_3 P_1 P_3 S_1 S_4]
	x[E_2 E_3 P_1 P_3 S_1 S_4]	d_1 x[C_1] + k_1 x[C_1] + d_2 x[C_2] + k_2 x[C_2] + d_3 x[C_3] + $2k_3$ x[C_3] + d_4 x[C_4] - a_1 x[E_1 E_4]x[E_2 E_3 P_1 P_3 S_1 S_4] - a_4 x[E_1 E_4]x[E_2 E_3 P_1 P_3 S_1 S_4] - a_2 x[E_2 E_3 P_1 P_3 S_1 S_4]x[P_2 S_2] - a_3 x[E_2 E_3 P_1 P_3 S_1 S_4]x[P_4 S_3]
	x[P_2 S_2]	d_2 x[C_2] + k_2 x[C_2] - a_2 x[E_2 E_3 P_1 P_3 S_1 S_4]x[P_2 S_2]
	x[P_4 S_3]	d_3 x[C_3] + k_4 x[C_4] - a_3 x[E_2 E_3 P_1 P_3 S_1 S_4]x[P_4 S_3]
	x[C_1]	-(d_1 x[C_1]) - k_1 x[C_1] + a_1 x[E_1 E_4]x[E_2 E_3 P_1 P_3 S_1 S_4]
	x[C_2]	-(d_2 x[C_2]) - k_2 x[C_2] + a_2 x[E_2 E_3 P_1 P_3 S_1 S_4]x[P_2 S_2]
	x[C_3]	-(d_3 x[C_3]) - k_3 x[C_3] + a_3 x[E_2 E_3 P_1 P_3 S_1 S_4]x[P_4 S_3]
	x[C_4]	-(d_4 x[C_4]) - k_4 x[C_4] + a_4 x[E_1 E_4]x[E_2 E_3 P_1 P_3 S_1 S_4]
e	x[E_1 E_2]	d_1 x[C_1] + k_1 x[C_1] + d_2 x[C_2] + k_2 x[C_2] - a_1 x[E_1 E_2]x[E_3 P_1 P_3 P_4 S_1 S_2 S_4] - a_2 x[E_1 E_2]x[E_3 P_1 P_3 P_4 S_1 S_2 S_4]
	x[E_3 P_1 P_3 P_4 S_1 S_2 S_4]	d_1 x[C_1] + k_1 x[C_1] + d_2 x[C_2] + d_3 x[C_3] + $2k_3$ x[C_3] + d_4 x[C_4] + k_4 x[C_4] - a_1 x[E_1 E_2]x[E_3 P_1 P_3 P_4 S_1 S_2 S_4] - a_2 x[E_1 E_2]x[E_3 P_1 P_3 P_4 S_1 S_2 S_4] - a_3 x[E_3 P_1 P_3 P_4 S_1 S_2 S_4]x[E_4 P_2 S_3] - a_4 x[E_3 P_1 P_3 P_4 S_1 S_2 S_4]x[E_4 P_2 S_3]
	x[E_4 P_2 S_3]	k_2 x[C_2] + d_3 x[C_3] + d_4 x[C_4] + k_4 x[C_4] - a_3 x[E_3 P_1 P_3 P_4 S_1 S_2 S_4]x[E_4 P_2 S_3] - a_4 x[E_3 P_1 P_3 P_4 S_1 S_2 S_4]x[E_4 P_2 S_3]
	x[C_1]	-(d_1 x[C_1]) - k_1 x[C_1] + a_1 x[E_1 E_2]x[E_3 P_1 P_3 P_4 S_1 S_2 S_4]
	x[C_2]	-(d_2 x[C_2]) - k_2 x[C_2] + a_2 x[E_1 E_2]x[E_3 P_1 P_3 P_4 S_1 S_2 S_4]
	x[C_3]	-(d_3 x[C_3]) - k_3 x[C_3] + a_3 x[E_3 P_1 P_3 P_4 S_1 S_2 S_4]x[E_4 P_2 S_3]
	x[C_4]	-(d_4 x[C_4]) - k_4 x[C_4] + a_4 x[E_3 P_1 P_3 P_4 S_1 S_2 S_4]x[E_4 P_2 S_3]

表 A.5: 見つかったそれぞれの酵素反応ネットワークの微分方程式系（f-h）。第 1 列は図 6 の f-h に対応している。第 2 列は微分方程式の左辺の微分される変数名で第 3 列が微分方程式の右辺である。変数名は x[化学種名] で表している。特に、いくつかの化学種を同一視した場合はそれらを大括弧の中に列挙している。

	Chemicals	Rate Equations
f	x[E_4]	d_4 x[C_4] + k_4 x[C_4] - a_4 x[E_4]x[S_4]
	x[S_4]	d_4 x[C_4] - a_4 x[E_4]x[S_4]
	x[E_2 P_2 S_3]	d_2 x[C_2] + 2k_2 x[C_2] + d_3 x[C_3] - a_3 x[E_2 P_2 S_3]x[E_3 P_3 S_1] - a_2 x[E_2 P_2 S_3]x[P_1 S_2]
	x[E_1 P_4]	d_1 x[C_1] + k_1 x[C_1] + k_4 x[C_4] - a_1 x[E_1 P_4]x[E_3 P_3 S_1]
	x[P_1 S_2]	k_1 x[C_1] + d_2 x[C_2] - a_2 x[E_2 P_2 S_3]x[P_1 S_2]
	x[E_3 P_3 S_1]	d_1 x[C_1] + d_3 x[C_3] + 2k_3 x[C_3] - a_1 x[E_1 P_4]x[E_3 P_3 S_1] - a_3 x[E_2 P_2 S_3]x[E_3 P_3 S_1]
	x[C_1]	-(d_1 x[C_1]) - k_1 x[C_1] + a_1 x[E_1 P_4]x[E_3 P_3 S_1]
	x[C_2]	-(d_2 x[C_2]) - k_2 x[C_2] + a_2 x[E_2 P_2 S_3]x[P_1 S_2]
	x[C_3]	-(d_3 x[C_3]) - k_3 x[C_3] + a_3 x[E_2 P_2 S_3]x[E_3 P_3 S_1]
	x[C_4]	-(d_4 x[C_4]) - k_4 x[C_4] + a_4 x[E_4]x[S_4]
g	x[E_3 E_4 P_3 S_2]	d_2 x[C_2] + d_3 x[C_3] + 2k_3 x[C_3] + d_4 x[C_4] + k_4 x[C_4] - a_2 x[E_1 E_2 S_1 S_4]x[E_3 E_4 P_3 S_2] - a_4 x[E_1 E_2 S_1 S_4]x[E_3 E_4 P_3 S_2] - a_3 x[E_3 E_4 P_3 S_2]x[P_2 S_3]
	x[P_2 S_3]	k_2 x[C_2] + d_3 x[C_3] - a_3 x[E_3 E_4 P_3 S_2]x[P_2 S_3]
	x[E_1 E_2 S_1 S_4]	2d_1 x[C_1] + k_1 x[C_1] + d_2 x[C_2] + k_2 x[C_2] + d_4 x[C_4] - 2a_1 x[E_1 E_2 S_1 S_4]2 - a_2 x[E_1 E_2 S_1 S_4]x[E_3 E_4 P_3 S_2] - a_4 x[E_1 E_2 S_1 S_4]x[E_3 E_4 P_3 S_2]
	x[P_1 P_4]	k_1 x[C_1] + k_4 x[C_4]
	x[C_1]	-(d_1 x[C_1]) - k_1 x[C_1] + a_1 x[E_1 E_2 S_1 S_4]2
	x[C_2]	-(d_2 x[C_2]) - k_2 x[C_2] + a_2 x[E_1 E_2 S_1 S_4]x[E_3 E_4 P_3 S_2]
	x[C_3]	-(d_3 x[C_3]) - k_3 x[C_3] + a_3 x[E_3 E_4 P_3 S_2]x[P_2 S_3]
	x[C_4]	-(d_4 x[C_4]) - k_4 x[C_4] + a_4 x[E_1 E_2 S_1 S_4]x[E_3 E_4 P_3 S_2]
h	x[S_4]	d_4 x[C_4] - a_4 x[E_1 E_2 E_4 P_1 S_1]x[S_4]
	x[P_2 P_4 S_3]	k_2 x[C_2] + d_3 x[C_3] + k_4 x[C_4] - a_3 x[E_3 P_3 S_2]x[P_2 P_4 S_3]
	x[E_3 P_3 S_2]	d_2 x[C_2] + d_3 x[C_3] + 2k_3 x[C_3] - a_2 x[E_1 E_2 E_4 P_1 S_1]x[E_3 P_3 S_2] - a_3 x[E_3 P_3 S_2]x[P_2 P_4 S_3]
	x[E_1 E_2 E_4 P_1 S_1]	2d_1 x[C_1] + 2k_1 x[C_1] + d_2 x[C_2] + k_2 x[C_2] + d_4 x[C_4] + k_4 x[C_4] - 2a_1 x[E_1 E_2 E_4 P_1 S_1]2 - a_2 x[E_1 E_2 E_4 P_1 S_1]x[E_3 P_3 S_2] - a_4 x[E_1 E_2 E_4 P_1 S_1]x[S_4]
	x[C_1]	-(d_1 x[C_1]) - k_1 x[C_1] + a_1 x[E_1 E_2 E_4 P_1 S_1]2
	x[C_2]	-(d_2 x[C_2]) - k_2 x[C_2] + a_2 x[E_1 E_2 E_4 P_1 S_1]x[E_3 P_3 S_2]
	x[C_3]	-(d_3 x[C_3]) - k_3 x[C_3] + a_3 x[E_3 P_3 S_2]x[P_2 P_4 S_3]
	x[C_4]	-(d_4 x[C_4]) - k_4 x[C_4] + a_4 x[E_1 E_2 E_4 P_1 S_1]x[S_4]