HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	安定同位体標識を利用した動的代謝プロファイリング
Author(s)	蓮沼, 誠久; 原田, 和生; 三宅, 親弘; 福崎, 英一郎
Citation	低温科学, 67, 169-174 光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/39116
Type	bulletin (article)
Note	3章 単離・精製・活性測定 1. 代謝産物量の定量 b
File Information	67-027.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

1．代謝産物量の定量
b．安定同位体標識を利用した動的代謝プロファイリング

蓮沼　誠久[1)]，原田　和生[2)]，三宅　親弘[3)]，福崎英一郎[4)]

生体試料に含まれる代謝産物の量的情報をMSやNMRを利用して網羅的に解析する代謝プロファイリング技術は，微量な中間代謝物質を含む多様な化合物の一斉分析を可能にしたが，ここで得られる情報は代謝物質を抽出した時点での蓄積量のスナップショットであった．生体内で代謝物質が動的定常状態にある時，総量は変わらずに一定の同じ速度で分解と合成が行われて入れ替わっており，新規合成される物質の存在比率を知るためには安定同位体を用いた *in vivo* 標識が必須である．代謝プロファイリングと安定同位体標識法の組合せを利用した「動的代謝プロファイリング」は，代謝産物の量的変動を網羅的に観測することを可能にする．植物の環境変化やストレスに対する応答はシステマティックな代謝変動に基づくことが予想され，「動的代謝プロファイリング」はこうした複雑な応答機構の解明に寄与することが期待できる．

Dynamic metabolic profiling using *in vivo* stable isotope labeling

Tomohisa Hasunuma, Kazuo Harada, Chikahiro Miyake, Eiichiro Fukusaki

Metabolic profiling technique has enabled to analyze the level of various metabolites including minor intermediates by using MS or NMR simultaneously, but the information available from the technique was snapshot *in vivo* at the time of sampling metabolites. In the dynamic steady state, metabolites are replaced with newly-synthesized compounds at a constant rate and the total amount of metabolites remains unchanged. Therefore, *in vivo* labeling with stable isotopes is necessary for the determination of turnover rates of metabolites. Dynamic metabolic profiling formed by the combination of metabolic profiling and stable isotope labeling technique enables to determine changes in metabolic flux exhaustively. In plants, responses to stress or environmental changes would be based on systematic variations in metabolism. The dynamic metabolic profiling would contribute to elucidate the complicated response mechanism.

1.b.1　はじめに

同位体を利用して代謝経路の特定の原子や分子をラベル（標識）し，その変化を追跡するトレーサー実験は，代謝研究に必須の技法の一つである．基本的に元素の化学的性質は電子配置，つまり原子番号で決まり，原子量にはよらないため，代謝物質中の特定原子のたどる道は，その原子を同位体でラベルして代謝経路（図1）での行動を調べれば分かる（同位体の質量差による反応速度の差を同位体効果というが，一般には無視できる）．同位体には，不安定で放射能を持ち崩壊する放射性同位体と，安定で崩壊しない安定同位体とがある．放射性同位体を用いたトレーサー実験はトレーサーが放出する放射線を鋭敏に検出できるため，Calvinらが $^{14}CO_2$ を用いて還元的ペントースリン酸経路の構成化合物を決定した[1)]ように，代謝経路や生体内物質の分布などの研究に幅広く使用されてきた．ただし，放射性核種を使用する放射性トレーサー実験は放射線防護に注意する必要があり，標識率を定量化できない，分子内の標識部位を識別することができないという欠点を有している．

安定同位体は質量分析（MS）計や核磁気共鳴（NMR）装置で検出することによりトレーサー実験に適用される．天然存在比が100％に近い ^{1}H，^{31}P，^{12}C，^{14}N といった原子に対し，例えば ^{13}C は1.1％，^{15}N は0.4％しか存在しないため，これらの安定同位体を細胞内に取り込ませることにより，標識化された代謝反応を選択的に観測することが可能である．MSはイオン化した代謝産物を質量電荷比（m/z）にしたがって分離して検出するため，安定同位体標識された化合物は m/z が分子内に含まれる安定同位体の数だけ増加した値を示す（図2）．したがって，安定同位体が含まれない主分子イオンと安定同

1）神戸大学大学院工学研究科
2）大阪大学大学院薬学研究科
3）神戸大学大学院農学研究科
4）大阪大学大学院工学研究科

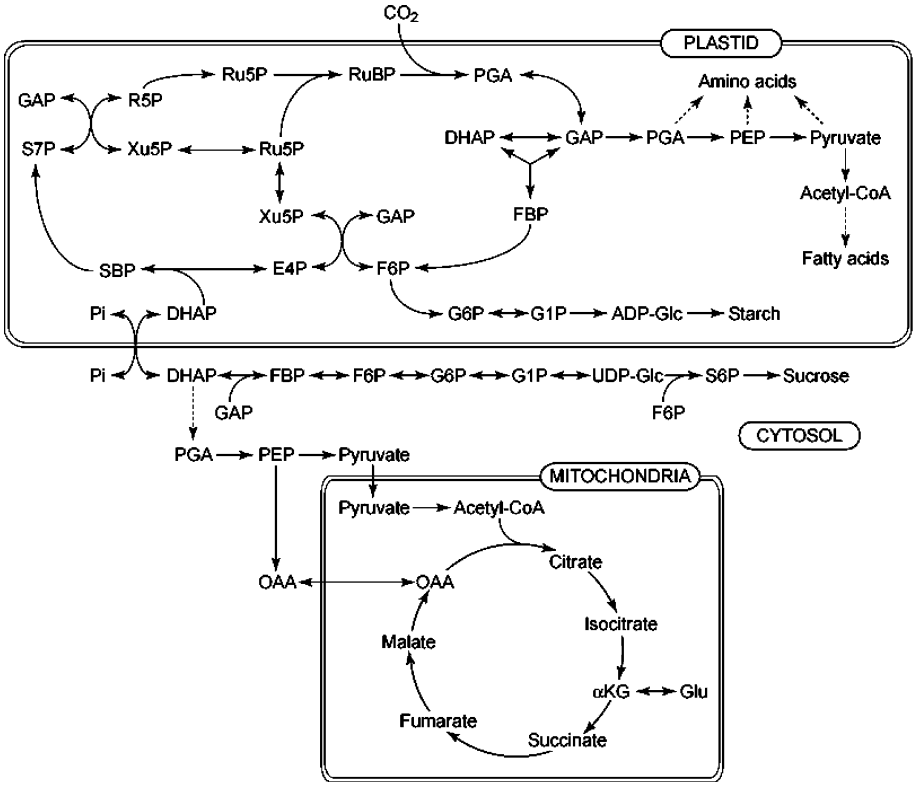

図1：炭素代謝の概略図
ADP-Glu; adenosine 5'-diphosphate glucose; DHAP, *dihydroxyacetonephosphate*; E4P, *erythrose* 4-phosphate; FBP, fructose 1, 6-bisphosphate; F6P, fructose 6-phosphate; GAP, *glyceraldehyde* 3-phosphate; G1P, glucose 1-phosphate; G6P, glucose 6-phosphate; *α*KG, *α-ketoglutarate*; OAA, *oxaloacetate*; PGA, *phosphoglycerate*; PEP, *phosphoenolpyruvate*; Pi, phosphoric acid; R5P, ribose 5-phosphate; *RuBP*, *ribulose* 1, 5-bisphosphate; Ru5P, *ribulose* 5-phosphate; S6P, sucrose 6-phosphate; S7P, sedoheptulose 7-phosphate; SBP, sedoheptulose 1, 7-bisphosphate; UDP-*Glu*, *uridine* 5'-diphosphate glucose; Xu5P, *xylulose* 5-phosphate

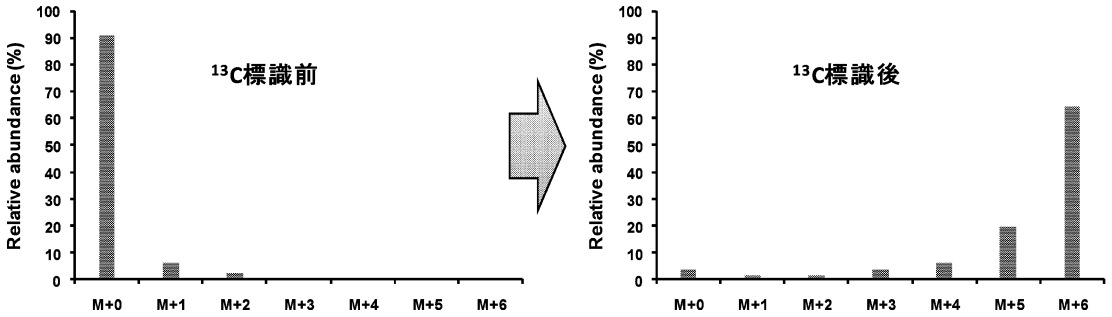

図2：^{13}C により標識化を受けた化合物（炭素数6，分子量M）の同位体濃縮を表す模式図．M＋*n* は *n* 個の ^{13}C が取り込まれた化合物を表し，図は各アイソトポマーのアバンダンスを意味する．

位体を含む同位体イオンの強度比を観測することにより安定同位体標識率を算出することができる．また観測したい化合物が開裂して生じるフラグメントイオンは，試料分子の部分構造を反映するため，その構造が帰属できれば分子内の標識部位を識別することが可能になる[2]．MS は通常，ガスクロマトグラフィ（GC）や液体クロマトグラフィ（LC），キャピラリー電気泳動（CE）などの分離装置と連結して用いるため，分離モードを変えることにより幅広い化合物の分析に適用することが可能であり，分子量情報も得られるために分子種の同定においても有用である．NMR は，スペクトル情報から得られる化学シフトやスピン－スピン結合定数などの構造パラメーターを基に，標識化合物の同定や標識部位の特定を可能にする．混合物からでも複数種類の化合物の同定が可能な C-H COSY（correlation spectroscopy）や HMQC（hetero nuclear multiple quantum correlation）等の二

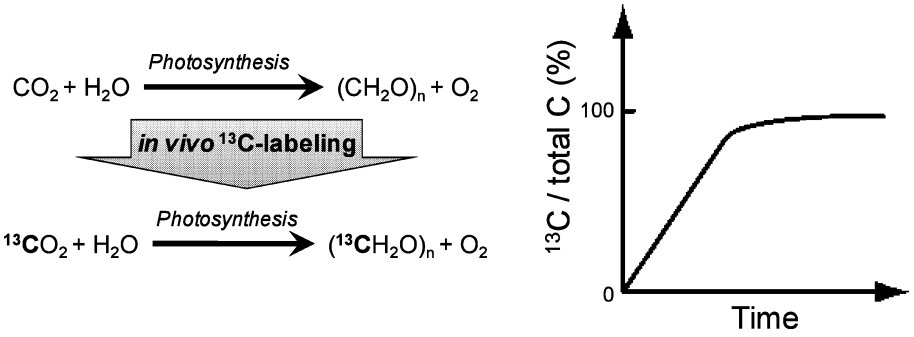

図3：安定同位体を利用した *in vivo* 標識のコンセプト
定常状態から *in vivo* 標識を開始すると，生体内物質の炭素原子は ^{13}C に置換される（左）．同位体による標識率の経時変化（右グラフの初期勾配）がターンオーバー速度を表す．

次元 NMR が汎用され[3,4]，化合物内での安定同位体標識の分布を定量的な情報として得ることができるのが NMR の強みである．一方 NMR には，感度がさほど高くないため微量な代謝中間体を検出できない，絶対量の測定には向かないといった弱点も有している．

安定同位体を利用した *in vivo* 標識後に，同位体標識の濃縮度分率を経時観測すれば，代謝のターンオーバーに関する情報を得ることができる（図3）．近年，生体試料に含まれる代謝産物の量的情報を MS や NMR を利用して網羅的に解析する「代謝プロファイリング技術」の開発が進み，微量な中間体生成物を含む多様な化合物の一斉分析が可能になってきた[5-7]．こうしたメタボロミクス的手法のトレーサー実験への適用は，代謝物質の合成・分解といったターンオーバーに関する動的代謝プロファイリングを実現する．本稿では，トレーサー実験に広く用いられる安定同位体である ^{13}C や ^{15}N を用いた動的代謝プロファイリングについて記述する．

1.b.2 *in vivo* ^{13}C 標識による動的代謝プロファイリング

^{13}C 標識した炭素源基質を細胞外から取り込ませ，代謝経路の中間代謝物の同位体分布を検出することができれば，含炭素化合物の代謝フラックスの観測が可能になる．代謝フラックスとは代謝ネットワーク中の物質の流れであり，代謝フラックスの観測は物質代謝の調節機構の理解に必須の手段である．代謝フラックスの観測手法は，はじめ，微生物（大腸菌や枯草菌，コリネ型細菌，酵母など）を対象に確立され，^{13}C 標識グルコースなどを炭素源として培養液中に加え，一定時間後の代謝産物の同位体分配率を調べることで，解糖系，ペントースリン酸経路，TCA 回路などの代謝フラックスが観測された．さらに個々の代謝経路のフラックス情報を統合し，物質収支や酵素反応速度のパラメーターを与えることにより，代謝ネットワークのモデル化が可能になった[8]．一方，植物の場合には，微生物と違って様々な制約があり，ネットワークレベルでのフラックス解析は難しいのが現状である．例えば，貯蔵組織の存在や転流，細胞内コンパートメント間の物質移動は代謝フラックスの数値モデル化を複雑化させる．さらに，物質代謝の定常状態を作り出すことが不可能であるため，外部から付与する摂動の影響を直接的に解析することができず，定常状態法による代謝フラックス解析[8]を適用することが原理的に不可能である．そこで，代謝フラックスの観測対象を植物材料に求める場合，培養細胞や胚，組織切片等が利用されている[9]．^{13}C 標識したグルコースやスクロースを炭素源として培地中に添加し，アミノ酸，有機酸，脂肪酸，スクロース，デンプン等の標識率と標識パターンを GC/MS や NMR で観測することにより解糖系や酸化的ペントースリン酸回路，TCA 回路に関する代謝フラックスが調べられてきた[10-13]．

光合成産物の生合成系を解析するためには，安定同位体標識した $^{13}CO_2$ を炭素源として植物に与え，代謝産物の ^{13}C 標識率を求める実験が必要になる．$^{13}CO_2$ を利用した植物体の標識実験は30年以上前から行われているが[14]，多くの場合，分析対象となる化合物は糖類や二次代謝物質といった細胞内蓄積量の多い物質に限られていた．しかしながら近年，分析装置の検出機能の高感度化，スペクトル情報の高解像度化，データ取得速度の高速化等により網羅的な代謝プロファイリングが可能になり，代謝ネットワーク上の分岐点に位置する微量な中間代謝物質の分析が可能になってきた[15]．代表例として，Huege ら[2]はまず，水耕栽培したシロイヌナズナ幼植物体を光強度，CO_2 濃度，温度および湿度の制御が可能なバイオチャンバーに移し，800 ppm $^{13}CO_2$ 雰囲気内で育種することにより，植物個体を丸ごと ^{13}C 標識した（地上部では

91.5±10.5%，根では90.2±9.7%の^{13}C標識率であった）．次に，標識個体に与える炭素源を$^{12}CO_2$に切換えて安定同位体希釈を行い，一定時間後に採取した組織から代謝成分の抽出液を調製した．これをGC/MS分析に供して，有機酸やアミノ酸，スクロースの経時的な標識化率の減少を観測することで代謝物質のターンオーバーを評価した．一般に水溶性の一次代謝産物には不揮発性の化合物が多く，GC/MS分析の場合，揮発性を付与するための誘導体化（メトキシアミノ化およびトリメチルシリル化）処理が前処理として必要である．化合物の同定は，電子イオン化（electron ionization；EI）法により生じるフラグメントパターン（マススペクトル）とキャピラリカラムにおける保持時間の情報をもとに行った後，個々の化合物について^{13}C標識率を算出した．また，GC/EI-MSによる標準化合物の分析結果はデータベース化されており，webサイト（http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb/gmd/gmd.html）からの照合が可能である．Huegeらの実験では，約100のマスフラグメントの同定に成功し，経時的な同位体標識率の減少を観測することができた．

カルビン回路の中間代謝物である糖リン酸や糖ヌクレオチドを対象とした動的代謝プロファイリングを行う場合には，$^{13}CO_2$による標識と標識化組織のサンプリングおよび化合物分析の方法に工夫が必要である．カルビン回路をはじめ，糖代謝の主要経路のターンオーバー速度は非常に速く[16]，*in vivo*のターンオーバーを正確に観測するためには，標識化組織の採集から代謝反応のクエンチングに要する時間をできるだけ短くすることが重要となる．また，短時間で標識を行う場合にはCO_2固定速度を厳密に管理する必要があり，光合成速度に影響を与えるファクター（光強度，CO_2濃度など）の制御も必須となる．以下に標識化試料の調製手法を記す．

［実験方法］

1．光強度，CO_2濃度，相対湿度およびチャンバー温度の外部制御が可能な光合成チャンバーを作製し，この中で生葉の光合成を開始させる（この時点で用いるCO_2は$^{12}CO_2$とする．20,000 ppm CO_2と20%O_2 airを混合して調製したガスをチャンバー内に供給する．）．生葉の光合成速度はLI-COR社製LI-7000 CO_2/H_2Oガスアナラザー等を用いてガス交換法により計測する．
2．30－60分後に光合成速度が定常化したら，フィードするCO_2ガスを$^{13}CO_2$に切り替える．
3．一定の時間，$^{13}CO_2$で光合成させる．
4．フリーズクランプシステム（筆者らが用いているのは光信理化学製作所製光合成同化箱フリーズクランパー）を用いてϕ 30 mmの葉切片をカットすると同時に液体窒素でこれを凍結させる．
5．凍結切片をピンセットで取り出して液体窒素につけた後，－80°Cで保管しておく．

糖リン酸や糖ヌクレオチドは，生体内含量が微量であり，高い極性を有する点で分析方法についても工夫が必要である．筆者らはCE/MSによる分離・検出を行っているが，以下に分析上の注意点を挙げる．まず，高極性化合物は汎用的な逆相のHPLCでの分離が困難であるため，陰イオン交換クロマトグラフィやイオンペア液体クロマトグラフィ，キャピラリー電気泳動（CE）などによる分離が必要になる．一般に，陰イオン交換クロマトグラフィではMS導入前に中和用のサプレッサーを導入する必要がある，イオンペア液体クロマトグラフィではイオンペア試薬によるイオン化抑制効果が避けられない，といった難点があり，MSと連動して使用する場合には条件設定に注意を要する．一方でCEは汎用性が高いとはいえず，安定した分離と保持時間を得るためには分析対象組織に合わせた分離条件の最適化が必要である．CEの分離条件については「1）CE/MSによる陰イオン性代謝物の定量点」に詳細な記述がある．次に，微量成分の検出については，より高感度な検出が可能な質量分析装置を用いることが望ましく，分析試料は前処理操作により夾雑物をできるだけ排除しておくことが重要である．以下に分析試料の調製方法[17]を記す．

［実験方法］

1．100 mg湿重量の植物組織を水／メタノール／クロロホルム（2：5：5）の混合溶液中で攪拌・破砕する．
2．上記混合液の1/6容量の水を添加・混合・遠心した後，水溶性画分を回収する
3．回収液を分子量カット5,000の限外濾過膜を通過させて得られた濾液を減圧乾固する．
4．得られた残渣を蒸留水で溶解したものを分析試料としてCE/MSに供する．

筆者らは検出に三連四重極リニアトラップ型の質量分析装置を用いてmultiple reaction monitoring（MRM）方式による観測を行っている．図4にはホスホグリセリン酸，リブロース1,5-ビスリン酸およびUDP-グルコースの代謝ターンオーバーの観測結果を示す．対象とする化合物毎にMRMのパラメーターを最適化することに

より，カルビン回路内の主要代謝産物とグルコース 6-リン酸，ADP－グルコース，UDP-グルコースといったスクロース・デンプン生合成経路の代謝中間体や，アミノ酸，有機酸，アセチル CoA 等を検出することが可能である（表 1）[17]．

1.b.3 *in vivo* ^{15}N 標識による動的代謝プロファイリング

植物は光合成に由来する化学エネルギーを用いて二酸化炭素，水，無機塩だけで生育することが可能である．植物体内に多く存在する炭素，酸素，水素は大気と水から得ることが可能である．次いで最も多く存在する窒素はそのほとんどが土壌中から吸収されるが，自然環境下では当該元素が最も欠乏しやすい．従って，カリウム，リンと並んで窒素は植物の成長速度を決定する栄養源となる場合が多い．また，光合成によって獲得した炭素は，植物体の窒素栄養状態によって分配先が制御され，その結果として植物の生長，形態形成にも影響を与える[18]．つまり，植物の生育にとって重要な窒素代謝は光合成とも密接に関係しており，C/N バランスによる代謝ネットワークの変動，それに伴う分化，形態形成の制御機構の解明は非常に重要な研究課題である．

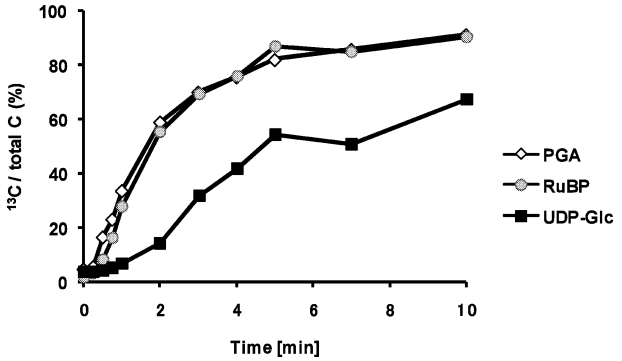

図 4：糖リン酸，糖ヌクレオチド類の ^{13}C 濃縮度分率の経時変化
光強度 1,000 μmol m^{-2}s^{-1}，CO_2 濃度 1,000 ppm，相対湿度 60%，チャンバー温度 25℃で光合成を行ったタバコ葉から抽出した成分を CE/MS 分析に供して各標識時間における ^{13}C 標識率を調べた（蓮沼ら，論文準備中）．

表 1：CE/MS により ^{13}C 標識率が測定可能なアニオン性代謝産物

リンゴ酸
ホスホエノールピルビン酸
グリセルアルデヒド 3-リン酸
ジヒドロキシアセトンリン酸
3-ホスホグリセリン酸
クエン酸
イソクエン酸
リボース 5-リン酸
リブロース 5-リン酸
グルコース 6-リン酸
フルクトース 6-リン酸
グルコース 1-リン酸
セドヘプツロース 7-リン酸
リブロース 1, 5-ビスリン酸
フルクトース 1, 6-ビスリン酸
フルクトース 2, 6-ビスリン酸
セドヘプツロース 1, 7-ビスリン酸
UDP-グルコース
ADP-グルコース
アセチルコエンザイムA

植物に含まれる代謝産物にはアミノ酸，ポリアミン，核酸，アルカロイドなど窒素を含む有機化合物が非常に多い．このことは安定同位体である ^{15}N で標識した硝酸カリウムや硝酸アンモニウムなどの無機塩のみを窒素源とすることで，多くの化合物を同位体標識することが可能となり，ネットワークレベルでの動的代謝プロファイリングが実行できることを示している．従って，*in vivo* ^{15}N 標識による動的代謝プロファイリングは窒素代謝の代謝変動，そして窒素代謝と光合成の関係を解明する上で非常に有用であると考えられる．

in vivo ^{15}N 標識による動的代謝プロファイリングの特徴として次のような点が挙げられる．i) 多くの含窒素化合物はアミノ酸から派生して合成されるので，前駆体であるアミノ酸から測定対象となる含窒素化合物までの中間体の ^{15}N 標識率を経時的に測定することにより，当該経路の詳細な代謝フラックスを解析することが可能である．ii) 無機態窒素の ^{15}N 標識体は ^{13}C, ^{18}O 標識化合物に比べ非常に安価であり，取り込みも簡便に行うことができる．iii) 炭素とは異なる，細胞内での窒素の分配，フラックスに関する知見を得ることができる．

in vivo ^{15}N 標識による動的代謝プロファイリングではアミノ酸，ポリアミン，核酸などのような含窒素化合物が分析対象化合物となる．これらは前項で述べた糖リン酸，糖ヌクレオチドと同様に極性が非常に高く，汎用の HPLC では分離が困難である．従って，含窒素化合物を網羅的にプロファイリングする分析手法にも工夫が必要である．この場合においても前項で述べた CE/MS は非常に有用である．あらゆるアミノ酸，ポリアミン，核酸は pH が 2 以下の溶液中で正に帯電する．従って，pH が 2 以下の電解質を用いれば，これらの化合物群を誘導体化せずに CE によって分離することが可能である．また，通常 CE で用いられるフューズドシリカキャピラ

リーは酸性溶液に対し非常に安定であるため，低 pH の電解質を用いた CE は HPLC に匹敵する再現性を達成することが可能である[19]．さらに，解糖系やカルビンベンソン回路の中間体に比べ，アミノ酸やポリアミンは植物細胞内に高濃度で蓄積しているため，試料調製の際，濃縮の必要がない．また，MS 測定時に MRM ではなく，広範囲の m/z 領域をスキャンすることでも十分検出可能であるため，同時に測定可能な化合物の数も増え，ノンターゲットの代謝プロファイリングも可能である．含窒素化合物を対象とした CE/MS プロファイリングにはこのような分析技術の面でも優位性が存在する．

著者らはモデル植物であるシロイヌナズナの培養細胞 T 87 を明，暗条件，各々において *in vivo* ^{15}N 標識による動的代謝プロファイリングを行った[20]．代謝プロファイリングには CE/MS を用いた．その結果，無機窒素体の受容体であるグルタミンやグルタミン酸の ^{15}N 標識率は大きく変化しないにも関わらず，プロリンや芳香族アミノ酸の ^{15}N 標識率が暗黒下で大きく低下していることを明らかにした．

^{15}N 標識無機窒素塩による *in vivo* 標識はタンパク質のような高分子のターンオーバー解析にも用いることが可能である．$^{13}CO_2$ を取り込ませ，タンパク質あるいはその消化物であるペプチドを MS により解析した場合，スペクトルは非常に複雑になり，解析が困難であるが，^{15}N で標識する場合，分子内に存在する窒素原子の数が炭素に比べ，圧倒的に少なく，解析が容易である．^{15}N 標識した硝酸カリウムで培養し，体内の窒素がほぼ 100％となった植物体を作成し，タンパク質の構造を NMR により解析した例も報告されている[21]．ルビスコや光化学系複合体を構成するタンパク質は，他のタンパク質に比べ圧倒的に量が多く，光合成活性に直接関与する．様々な環境下においてこれら光合成に直接関与するタンパク質のターンオーバーを解析することにより，光合成の制御機構解明につながることが期待される．

1.b.4　おわりに

in vivo 安定同位体標識法と代謝プロファイリング技術の組み合わせは，代謝物質の合成・分解に関するダイナミックな量的変動の網羅的な観測を可能にするため，代謝変動の全体像を定量化することができる．植物の環境変化やストレスに対する応答は遺伝子レベルや代謝レベルでのシステマティックな変動に基づくことが予想され，「動的代謝プロファイリング」はこうした複雑な応答機構の理解に寄与することが期待できる．また応用面からは，炭素や窒素の分配の速度論的な理解を可能にし，植物の物質生産性の向上につながる律速酵素反応を明らかにすることが期待できる．例えば遺伝子工学的手法による律速酵素の過剰発現は当該代謝フラックスを強化し，最終産物の生産量を増大させる可能性が高い．一方で，*in vivo* での代謝変動をより正確に把握できるか否かは同位体標識を施す試料の調製方法と標識方法の成否が鍵を握っており，今後も研究目的に応じた標識システムの構築に取り組んでいく必要がある．

参考文献

1）M. Calvin. *J. Chem. Soc. (London)* (1956) p.1895
2）J. Huege et al., *Phytochemistry* **68** (2007) p.2258
3）G. Sriram et al., *Plant Physiol*. **136** (2004) p.3043
4）G. Sriram et al., *Phytochemistry* **68** (2007) p.2243
5）O. Fiehn et al., *Nat Biotechnol*. **18** (2000) p.1157
6）J. Kikuchi et al., *Plant Cell Physiol*. **45** (2004) p.1099
7）S. Sato et al., *Plant J*. **40** (2004) p.151
8）G. Stephanopoulos et al., Metabolic Engineering, Principles and Methodologies, Academic Press, San Diego (1998)
9）J. Schwender. *Curr. Opin Biotechnol*. **19** (2008) p.131
10）M. Dieuaide-Noubhani et al., *J. Biol. Chem*. **270** (1995) p.13147
11）V. Iyer et al., *Plant Cell Environ*. **31** (2008) p.506
12）D. Rontein et al., *J. Biol Chem*. **277** (2002) p.43948
13）J. Schwender et al., *J. Biol. Chem*. **278** (2003) p.29442
14）J. Schaefer et al., *Plant Physiol*. **55** (1975) p.1048
15）W. Römisch-Margl et al., *Phytochemistry* **68** (2007) p.2273
16）T. C. Sharkey et al., *Plant Physiol*. **81** (1986) p.788
17）K. Harada et al., *J. Biosci. Bioeng*. **105** (2008) p.249
18）A. Ikeda et al., *Protein, Nucleic Acid and Enzyme* **48** (2003) p.2103
19）T. Soga et al., *Electrophoresis* **25** (2004) p.1964
20）K. Harada et al., *Biotechnol. Prog*. **22** (2006) p.1003
21）J. H. Ippel et al. *Proteomics* **4** (2004) p.226