

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14492

研究課題名(和文) 酸素-18安定同位体リン酸の酵素合成法の開発

研究課題名(英文) Development of methods for the enzymatic synthesis of 18O-phosphate

研究代表者

黒田 章夫 (Kuroda, Akio)

広島大学・先端物質科学研究科・教授

研究者番号：50205241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：リンには安定同位体が複数ないため、野外でリンの動態モニタリング実験が難しい。しかし、酸素の安定同位体(18O)をリン酸に導入すれば、18O-リン酸として追跡できる。18O置換数が異なる18O-リン酸を作るために、いくつかの酵素合成法を検討した。例えば、亜リン酸デヒドロゲナーゼは、NADを補酵素として、亜リン酸を酸化してリン酸を生成する酵素である。18O-H₂O中で反応を行えば、18O-リン酸が効率よく合成できた。また、ピロホスファターゼを用いれば、4カ所置換された18O-リン酸が生成した。

研究成果の概要(英文)：Due to the lack of multiple stable isotopes of phosphorus (P), it is difficult to use isotope pair ratios as a means to examine P dynamics in nature. However, if stable isotope of oxygen (18O) is incorporated into phosphate, 18O-phosphate can be used to trace P dynamics. In order to synthesize 18O-phosphate where the number of 18O substitution over 16O is different, we tested several enzymatic reactions. For example, phosphite dehydrogenase is an enzyme to oxidize phosphite to phosphate with a NAD cofactor. The 18O of 18O-H₂O was incorporated into phosphite, generating 18O-phosphate. On the contrary, all four oxygen of phosphate was substituted with 18O of 18O-H₂O using pyrophosphatase that converts pyrophosphate to phosphate in a reversible manner.

研究分野：応用生物学

キーワード：酸素の安定同位体リン酸 酵素合成法 亜リン酸デヒドロゲナーゼ ピロホスファターゼ ポリホスファターゼ

1. 研究開始当初の背景

質量数 32 のリン (^{32}P) はリンの放射性同位体で、これまで様々な分子生物学実験の中で、DNA、RNA、タンパク質 (リン酸化)、リン脂質を標識することに用いられてきた。しかし、高エネルギーのベータ線が放出されるため、放射線取り扱い区域のみでの使用が許可されている。残念ながらリンには安定同位体が一つしかないため、窒素等の様に安定同位体比による野外でのトレース実験が難しい。一方、生体中の核酸やリン脂質などに含まれるリンのほとんどは酸化数+5 のリン酸態 (PO_4) である。従って、酸素の安定同位体 (^{18}O) を利用すれば、酸素-18 安定同位体リン酸 (^{18}O -リン酸) として標識できると考えられる。しかも 4 カ所の酸素の置換が原理的には可能であり、質量数の異なる置換が可能である。酸素-18 安定同位体は自然界にも 0.2% の存在比で含まれており、生体や環境への有害な影響は全く認められていないので、生体実験や環境での利用が可能となる。

2. 研究の目的

輸入により入手可能な ^{18}O -リン酸は、すべての酸素が安定同位体に置換された一種類であり、しかも大変高価な試薬である (1g あたり 35 万円)。 ^{18}O -リン酸の国内生産が実現できれば、肥料に限らず、畜産、食品・医薬品製造や環境分野などリン酸の生物学的利用能の評価や動態モニタリングが可能になり、広範な産業分野で活用されることが考えられる。本研究では、より安価な ^{18}O - H_2O (1g あたり 1 万円、10% 純度であれば 1g あたり 800 円程度で入手できる) を使い、亜リン酸デヒドロゲナーゼやその他の酵素も含めて検討し、酸素-18 安定同位体の置換数が異なる ^{18}O -リン酸を作る酵素合成法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 亜リン酸デヒドロゲナーゼによる ^{18}O -リン酸合成

5mM の濃度にて亜リン酸 (Phosphonic acid、ナカライテスク) を含有する水溶液 10 μl 、10mM の濃度にて NAD^+ を含有する水溶液 10 μl 、1M の濃度にて MOPS 緩衝液 (pH7.3) を含有する水溶液 2 μl 、3mg/ml の濃度で亜リン酸デヒドロゲナーゼ (*Ralstonia* sp. 4506 株由来の亜リン酸デヒドロゲナーゼ、バイオエネックス社) を含有する水溶液 0.4 μl 、 ^{18}O - H_2O (大陽日酸株式会社) 77.6 μl を混合し、40 で 30 分間保温した。反応後の混合液を水で適宜希釈したサンプルを、フーリエ変換 - リニアイオントラップハイブリッド質量分析計 (LTQ Orbitrap XL、Thermo Fisher Scientific) に供し、 ^{18}O が導入されたリン酸の存在比を測定した。

(2) 加熱による亜リン酸からの ^{18}O -リン酸合成

加熱による亜リン酸からリン酸への酸化反応に際し、 ^{18}O - H_2O の酸素が使われるかどうか確認した。1 M の亜リン酸を ^{18}O - H_2O で溶解して NaOH で中和後、121 で 2 時間加熱した。水で適宜希釈したサンプルを質量分析計に供し、 ^{18}O が導入されたリン酸に該当するピークの強度からその存在比を算出した。

(3) 大腸菌由来アルカリホスファターゼ (BAP) による ^{18}O -リン酸合成

最初に、BAP の亜リン酸酸化活性を確認した。40 mM 亜リン酸、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM MgCl_2 、BAP あるいは仔牛小腸由来アルカリホスファターゼ (CIAP) (ともに Takara) を含む溶液を調製し、37 で 4 時間インキュベートした。リン酸の生成は、マラカイトグリーン法により定量した。実際に ^{18}O - H_2O を用いて同様の反応を行い、質量分析計により ^{18}O が導入されたリン酸の存在比を測定した。

(4) ピロリン酸とピロホスファターゼの酸素交換反応による ^{18}O -リン酸合成

0.25 M リン酸 4 μl 、0.25 M MgCl_2 4 μl 、0.25 U/ μL ピロホスファターゼ

(Pyrophosphatase, inorganic from baker's yeast、シグマ) 4 μl 、 ^{18}O - H_2O (大陽日酸株式会社) 88 μl を混合し、25 で 12 時間インキュベートした。80 で 10 分間加熱してピロホスファターゼを失活させた後、水で適宜希釈したサンプルをフーリエ変換 - リニアイオントラップハイブリッド質量分析計にかけ、 ^{18}O が導入されたリン酸の存在比を測定した。

(5) ポリリン酸の加水分解による [^{18}O] ラベルリン酸の調製

メタリン酸ナトリウム (Sodium metaphosphate、シグマ) 50 mg、濃塩酸 4.2 μl 、 ^{18}O - H_2O (大陽日酸) 45.8 μl を混合し、100 で加熱した。攪拌しながら 30 分反応後、室温まで冷却した。水で適宜希釈したサンプルをフーリエ変換 - リニアイオントラップハイブリッド質量分析計にかけ、 ^{18}O が導入されたリン酸の存在比を測定した。

4. 研究成果

(1) 亜リン酸デヒドロゲナーゼによる ^{18}O -リン酸合成法の検討

次亜リン酸 (H_3PO_2 、酸化数+1) は無電解ニッケルメッキ法の還元剤として利用され、その結果廃棄物として大量の亜リン酸 (H_3PO_3 、酸化数+3) が生じている。亜リン酸を用いて、 ^{18}O -リン酸が合成できれば、亜リン酸の有効利用にもつながる。亜リン酸は、水中でも加熱によりある程度酸化される。 ^{18}O - H_2O 存在下で酸化される際にどの程度 ^{18}O -リン酸が合成できるかを検討した。その結果、加熱 (121、2 時間) により約 50% の亜リン酸が酸化されてリン酸が生成されていた。 ^{18}O でラベルされたリン酸の割合を測定したところ、その割合は 2% 程度にとど

まった。主に溶存酸素 (O_2) によって亜リン酸が酸化されたことが原因であると考えられる。

続いて、亜リン酸デヒドロゲナーゼによる酸化と ^{18}O -リン酸の合成を検討した。研究代表者らは、亜リン酸の利用方法を模索するために、亜リン酸を唯一のリン源とする培地で非常に高い増殖能を示す *Ralstonia* sp. 4506 株を単離している (J. Biosci. Bioeng., 113, 445-450, 2012)。また、本菌から亜リン酸を酸化する亜リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を分離し、大腸菌内で大量に発現させることに成功している。亜リン酸と共役した NAD^+ の還元酸化還元電位は +0.335 V (自由エネルギーに換算すると -63 kJ/mol) であり、ほぼ不可逆的にリン酸が生成することから、本酵素を利用して ^{18}O -リン酸の合成が可能である。

^{18}O - H_2O 中で亜リン酸デヒドロゲナーゼによる亜リン酸の酸化を行った結果、約 75% が酸素-18 安定同位体である ^{18}O -リン酸が合成できた (図 1)。反応後の ^{18}O -リン酸/リン酸の存在比は、元々反応液に存在する水の ^{18}O と ^{16}O の比率と一致した。

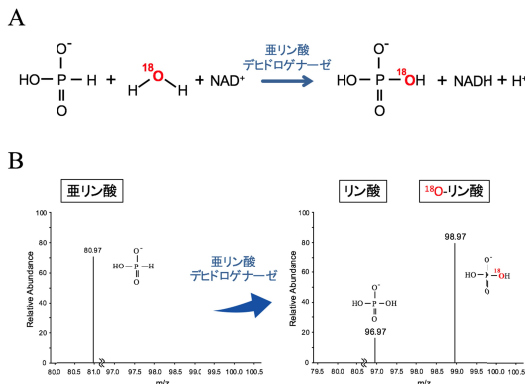


図1、亜リン酸と亜リン酸デヒドロゲナーゼによる ^{18}O -リン酸合成。A は反応式、B は実際の反応前後の分子量の分析。反応後は、約 75% が酸素-18 安定同位体である ^{18}O -リン酸であると確認できた。

(2) アルカリホスファターゼによる ^{18}O -リン酸合成法の検討

大腸菌のアルカリホスファターゼ (BAP) は、亜リン酸を酸化することが報告されている (Proc Natl Acad Sci USA, 101, 7919-7924 2004)。そこで まず BAP の亜リン酸酸化活性を確認した。対照として、仔牛小腸由来アルカリホスファターゼ (CIAP) を用いた。37 °C で 4 時間反応の結果、CIAP ではリン酸濃度が増加しなかったのに対し、BAP を含むサンプルでは約 400 μM のリン酸が生成されたことが分かった。ただし、基質の転換率は約 1% であり、反応効率としては非常に悪いものであった。加水分解酵素が酸化反応を行うことは大変興味深い。

次に、 ^{18}O - H_2O 存在下で同様の反応を行い、 ^{18}O -リン酸の生成を測定した。質量分析計により ^{18}O が導入されたリン酸の存在比を測定した結果、 ^{18}O でラベルされたリン酸の割合は 0.4% 程度にとどまった。亜リン酸の酸化、 $[^{18}O]$ ラベリングとともに非常に効率が悪いことから、BAP を $[^{18}O]$ ラベル化に用いることは現実的ではないと考えられた。

(3) ピロホスファターゼによる ^{18}O -リン酸合成法の検討

亜リン酸の酸化による方法の場合、 ^{18}O はリン酸の中の一カ所に導入される。さらに ^{18}O -置換体のバリエーションを考えた場合、2 つ以上の置換が望まれる。ピロリン酸ホスファターゼは、可逆的にピロリン酸を分解する。この平衡反応を利用すれば、 ^{18}O の 2 つ以上の置換が可能になるものと考えた。

ピロホスファターゼによるピロリン酸の加水分解時に一カ所 ^{18}O で置換される (図 2A)。この反応は可逆的に起こるため、再び ^{18}O - H_2O が生成する可能性はあるが、 ^{18}O で置換されていないリン酸同士、あるいは置換されていない水酸基の間での縮合も起こる (図 2A)。さらに ^{18}O - H_2O による加水分解反応が繰り返されて、最終的に平衡状態に達した場合には、4 カ所置換された ^{18}O -

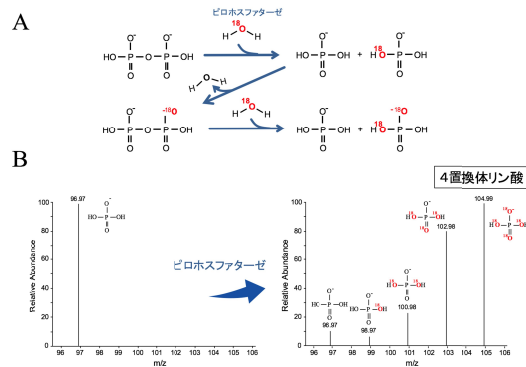


図2、リン酸とピロホスファターゼによる ^{18}O -リン酸合成。A は反応式、B は実際の反応前後の分子量の分析。

リン酸が生成した (図 2B)。

(4) ポリリン酸分解酵素による ^{18}O -リン酸合成法の検討

ポリリン酸はリン酸のポリマーであり、長いもので 1,000 個のリン酸がつながったポリマーである。ポリリン酸分解酵素はポリリン酸を加水分解する酵素である。酵母のポリリン酸分解酵素はエンド型とエキソ型のものがあるが、エキソ型の酵素はプロセッパにリン酸まで分解する (図 3A)。本酵素を利用することで、 ^{18}O -リン酸が合成できた (図 3B)。また、ポリリン酸は酸加水分解でもリン酸にまで分解できる。この場合安価な合成法になり得る。酸加水分解により生じるリン酸の置換数を測定したところ、リン酸の 2 カ所に ^{18}O が導入されるもの

と、置換されないものが生じていることがわかった(図3C)。

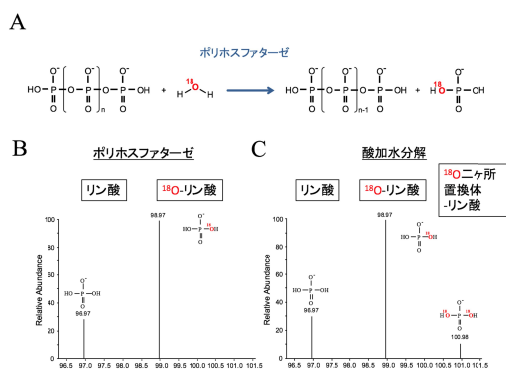


図3、ポリリン酸とポリホスファターゼによる¹⁸O-リン酸合成。Aは反応式、Bは実際の反応前後の分子量の分析。Cは酸加水分解による¹⁸O-リン酸合成。

(5)まとめ

本研究では、¹⁸O-リン酸合成のための基質として、亜リン酸、リン酸、ポリリン酸を用いた。また、酵素としてはそれぞれ、亜リン酸デヒドロゲナーゼ、ピロホスファターゼ、ポリホスファターゼを用いた。ポリリン酸の加水分解は有効な技術と考えられる。ポリホスファターゼを用いることで、均一な¹⁸O-リン酸が合成できた。一方、亜リン酸デヒドロゲナーゼを用いれば、利用用途のない亜リン酸を有効利用できると考えられた。また、ピロホスファターゼを用いれば、4置換体を含め、様々な¹⁸O-リン酸が合成できた。

(6)今後の展開

Delaware大学ではリン酸中に天然に微量に存在する酸素同位体の比率の変化を指標にして、自然界でのリンの循環を解明しようとしている。リン酸中の酸素同位体の比率は無生物の土壌中では変化しないが、通常の土壌では生物に取り込まれた後、縮合と加水分解を繰り返すことによって水の酸素と置換されることから、天然の水の中の存在する¹⁸Oの比率に近づく。従ってリン酸中に存在する酸素同位体の比率の変化は、リンの生物利用(Bioavailability)の指標になると考えられている。肥料中のリン酸と土壌中のリン酸と区別し、どの程度有効に肥料が利用されるかを評価することにも応用できる。さらに、北海道大学で開発された同位体顕微鏡を用いれば、酸素同位体の分布を画像化でき、土壌へリン酸が固定される過程が観察できると考えられる。

また、¹⁸O-リン酸を利用して、細胞の代謝活性評価と病気の診断に応用しようとしている。安価な¹⁸O-リン酸が普及すれば、リン酸化合物の動向解析が可能になり、病気の診断に応用できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

黒田章夫、リンの生物学、第3回 持続的リン利用シンポジウム、2017年11月21日、早稲田大学

黒田章夫、亜リン酸を有効利用するためのバイオ技術、リンアトラス研究所セミナー、2016年9月6日、早稲田大学

廣田隆一、池田文、黒田章夫、バクテリアの還元型リン化合物代謝機能を活用したバイオテクノロジー、環境バイオテクノロジー学会大会、2016年6月13日、広島

〔図書〕(計2件)

黒田章夫、「生物とリン」、リンの事典、p.78-79、朝倉書店、2017年

黒田章夫、「脱リン」、応用微生物学第3版、p.265-266、2016年

〔産業財産権〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/akuroda/Research/phos.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒田 章夫 (Akio Kuroda)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・教授

研究者番号：50205241