

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14431

研究課題名（和文）酵素学的定量法を用いた新規の食品中ビタミンB12分析法の開発

研究課題名（英文）Development of B12 analysis method for vitamins in foods using enzymatic quantification

研究代表者

鈴木 一平（Suzuki, Ippei）

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部・研究員

研究者番号：00812439

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：食品中のビタミンB12（VB12）を酵素活性を指標にすることで簡易に定量する方法の開発を目的に研究を遂行した。VB12を補酵素として要求するRibonucleoside triphosphate reductase（RNR）について検討した。His-tagを付与したリコンビナントRNR（reHis-RNR）の精製を行った。LC-MSを用いて反応産物であるdNTPの産生量を活性指標とした。この結果食品中のVB12を簡便に測定するためにはreHis-RNR反応条件のさらなる最適化が必要であるものの、reHis-RNR活性をVB12濃度測定の指標とする事は一定の妥当性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳酸菌由来ビタミンB12依存性リボヌクレオチドリダクターゼの大量発現系を構築するとともに、DNAシーケンシング解析によって、変異個所を明らかにした。LC-MSを用いてリボヌクレオチドリダクターゼの反応産物であるdNTPの産生量を活性指標とした測定法を検討した結果、VB12を簡便に測定するためにはreHis-RNR反応条件のさらなる最適化が必要であるものの、より簡便なVB12測定法の開発に繋がると期待された。

研究成果の概要（英文）：Research was conducted with the aim of developing a method for easily quantifying vitamin B12 (VB12) in foods by using enzymatic quantification. We investigated Ribonucleoside triphosphate reductase (RNR), which requires VB12 as a coenzyme. Recombinant RNR (reHis-RNR) with His-tag was purified. Using LC-MS, the production amount of dNTP, which is a reaction product, was used as an activity index. As a result, although it is necessary to further optimize the reHis-RNR reaction conditions in order to easily measure VB12 in foods, it is considered that there is some validity in using reHis-RNR activity as an index for measuring VB12 concentration.

研究分野：食品分析

キーワード：ビタミンB12 リボヌクレオチドリダクターゼ Lactobacillus 微生物学的定量法 酵素学的定量法
乳酸菌

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ビタミンは人間の生体内で合成できず、飲食によって外部から摂取する必要のある微量有機化合物である。このうちビタミン B₁₂ (VB₁₂) は、必要摂取量は 2 μg/day 程度と微量であるが、不足すると悪性貧血などを引き起こす。そのため日常的に摂取する食品中の VB₁₂ の調査は健康維持の観点から重要であり、その分析法は高感度かつ高精度が求められ、また普遍的に行う試験であるため、簡便・迅速かつ低コストあることが求められる。しかし、食品は油分の多いもの、塩類の多いもの、粘度の高いものなど食品によってマトリクスや性状は様々であり、この影響を除くために試料調製は複雑になりがちで、また食品中の微量な VB₁₂ の定量は現代の高感度な機器分析技術であっても定量に十分な感度に達しない場合も多い。

現在、食品中 VB₁₂ 分析法として世界的に最も広く使用されている手法は乳酸菌を用いた微生物学的定量法 (MBA) である。MBA とは生育環境中の VB₁₂ に濃度対して生育量が相関するという特徴を持つ乳酸菌栄養要求株 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (*L. del.*)) を用いる手法であり、標準溶液の VB₁₂ 濃度と乳酸菌の生育量 (濁度) をプロットして検量線を作成し、未知試料中の VB₁₂ 定量を行う (図 1)。MBA は食品マトリクスの影響を受けにくい、特異性が高い、高感度かつ低コストなどの優位性を持ち、広範な食品中の VB₁₂ 測定が可能な優れた分析法である。しかし、MBA は測定に 3 日間と長時間を要するという問題があり、この時間の大半は培養時間であるため微生物の生育量を測定する以上、短縮は困難である。また、MBA で再現性の高い試験を行うためには、微生物培養技術に習熟する必要がある。加えて、VB₁₂ 濃度と微生物の生育は相関性が認められるが、相関が得られる濃度範囲は 0~25 ng/mL 程度と狭く、未知試料の VB₁₂ 濃度を検量線範囲内に調整するのは煩雑であり、安定した定量には高度な技術を要する。

我々は食品成分分析法開発とその一般化について研究を行っており、本研究では MBA と同等以上の特異性と感度を担保しつつ、簡便な試料調製で迅速に食品中の VB₁₂ を定量可能な酵素学的定量法の開発を重要な研究課題として設定した。

2. 研究の目的

本研究では特異性が高く高感度という MBA の特徴を継承し、かつ、簡便・迅速な食品中 VB₁₂ の酵素学的定量法の開発を目的とした。着目した酵素は、VB₁₂ を補酵素として要求するリボヌクレオチドリダクターゼ (ribonucleoside reductase, RNR) である。本研究では、まず測定に適した活性の高い RNR を持つ乳酸菌株をスクリーニングし、ゲノム情報から RNR 遺伝子を大腸菌に組み込んだ精製系を構築し、RNR を用いた食品中 VB₁₂ 定量法の検討及び分析バリデーションを行う。これにより、簡便で高感度の VB₁₂ 分析法を開発できると考え、研究を行った (図 1)。

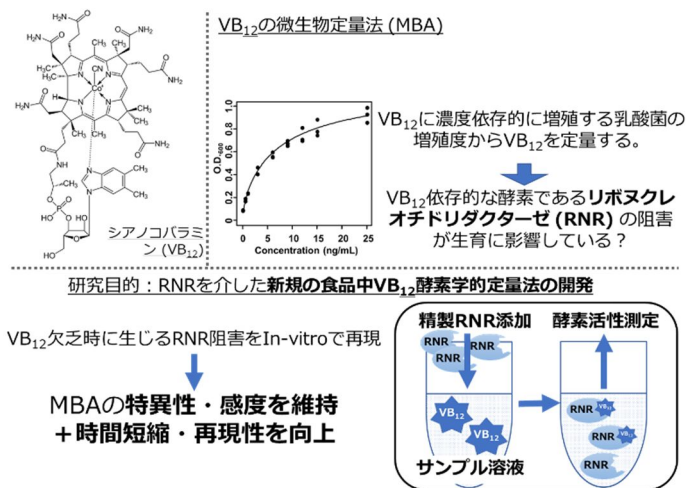


図1. 本研究の概要

3. 研究の方法

(1) *L. del.*からの RNR 遺伝子のクローニング及び reHis-RNR 大量発現系の構築

VB₁₂ の微生物学的定量法に用いられる乳酸菌である、*L. del.*のゲノム情報から VB₁₂ 定量に利用可能と考えられる(RNR)をコードする遺伝子を探索した。次いで、RNR 遺伝子に His-tag 配列を付与した RNR (His-RNR) をコードする遺伝子配列を pColdIII[®]DNA コールドショック発現ベクターにクローニングし、クローニングされた配列の塩基配列を DNA シーケンス解析した。最後に、調製したベクターを用いて大腸菌 (DE3) の形質転換を行い、リコンビナント His-RNR (reHis-RNR) の大量発現系を構築した。

(2) re-HisRNR の精製

構築した大腸菌による大量発現系を培養し、16 °Cの Cold shock により reHis-RNR を過剰発現させた。培養した大腸菌を集菌、破碎し、無細胞抽出液を調製した。精製には HisTrap HP カラムを用い、精製が不十分な場合は Butyl-650S カラムを用いて再度精製を行った。精製後、濃縮を行い、25 %のグリセロールを添加した上で-30°Cで保存した。

(3) VB₁₂ 依存的な reHis-RNR 活性の測定

RNR 活性を測定する反応条件を調査した結果¹から、500 μM GTP、50 mM DTT、15 μM VB₁₂、

300 μ M dATP、10 mM CaCl₂、50 mM Tris-HCl (pH 8) の混合溶液に、適宜精製した reHis-RNR を加え、超純水で 50 μ L に調整した。これを 37 °C で 30 min 反応させたものを 100 °C、5 min で処理し、14,000 g 10 min 遠心分離により不溶物を除去したものに等量の内部標準溶液を添加し、試験溶液とした。吸光度測定は UV-1800 (Shimadzu)、参考文献²より dNTP の分離は ODP-50 2D (Shodex)カラムで行い、LCMS-2020 (Shimadzu)ネガティブモード ESI で *m/z* 522(GTP) 及び 506 (dGTP) を測定した。

4. 研究成果

(1) *L. del.*からの RNR 遺伝子のクローニング及び reHis-RNR 大量発現系の構築

文献調査³⁻⁶及び NCBI に登録された *L. del.*のゲノム情報から、NCBI データベースに登録された ribonucleoside-triphosphate reductase, adenosylcobalamin-dependent をコードする領域 NLDL72_00535 をクローニングの対象とする事にした。発現ベクターにクローニングした遺伝子配列のシーケンスを行った結果、テンプレートとした *L. del.*の RNR 遺伝子配列は、NCBI に登録された遺伝子配列 (LDL72_00535) と比較して、翻訳後のアミノ酸配列の 73 位が K→E、325 位が L→P、531 位が A→D となる変異を伴っていたが活性中心と推定される Cys に変異は無かった (図 2)。また Swiss model を用いた立体構造解析でも、大きな立体構造の変化は観察されなかった。

```

RNR          -----MSEEI SLSAEF IDRVKASVKPHWGKLGWV TYKR TYARWLPEKGRSENWDETVKR
His-RNRfromDNAseq MHHHHHHHSEEI SLSAEF IDRVKASVKPHWGKLGWV TYKR TYARWLPEKGRSENWDETVKR
                *****

RNR          VVEGNINLDPRLQDSPSLK LKQSLTEEAERLYKLI YGLGATPSGRNLWISGTDYQRRTGD
His-RNRfromDNAseq VVEGNINLDPRLQDSPSL LKQSLTEEAERLYKLI YGLGATPSGRNLWISGTDYQRRTGD
                *****:*****

RNR          SLNNCFVAIRPQKYGDSKI VPSYLGKQEKAVSMPFSLFDELKMGKGGVGFVSARSNISQ
His-RNRfromDNAseq SLNNCFVAIRPQKYGDSKI VPSYLGKQEKAVSMPFSLFDELKMGKGGVGFVSARSNISQ
                *****

RNR          IPRVDFAI DLQLVDETSSEYDASVKVGVGKNELVQDADS IYR LPTREGWVLANALL
His-RNRfromDNAseq IPRVDFAI DLQLVDETSSEYDASVKVGVGKNELVQDADS IYR LPTREGWVLANALL
                *****

RNR          IDLHFAQTNPDRKQKLI LDLSDIRPYGAE IHGFGGTASGPMPLI SMLLDVNEVLNNKAGG
His-RNRfromDNAseq IDLHFAQTNPDRKQKLI LDLSDIRPYGAE IHGFGGTASGPMPLI SMLLDVNEVLNNKAGG
                *****

RNR          RLTAVDAADICNLI GKAVVAGNVRRSAEL ALGSNDQDQFI SMKQDQEKLMHHRWASNNSV
His-RNRfromDNAseq RLTAVDAADICNLI GKAVVAGNVRRSAEL ALGSNDQDQFI SMKQDQEKLMHHRWASNNSV
                ***** *****

RNR          AVDSAFSGYQPI AAGIRENGEPGI VNLDL SKNYGR IVDGYQAGIDGDVEGTNPGCEI SLA
His-RNRfromDNAseq AVDSAFSGYQPI AAGIRENGEPGI VNLDL SKNYGR IVDGYQAGIDGDVEGTNPGCEI SLA
                *****

RNR          NGEPCNLFVFP LI AEEQGWDLQEVF ALAARYAKRVTFSPYDWEI SREI I GKNNRRI GISM
His-RNRfromDNAseq NGEPCNLFVFP LI AEEQGWDLQEVF ALAARYAKRVTFSPYDWEI SREI I GKNNRRI GISM
                *****

RNR          SGIQDWLLTRLGNRVVTGFKDDFDPE THEAIKVPVYDKRAIKMVDQLYKAVVKADQAYSK
His-RNRfromDNAseq SGIQDWLLTRLGNRVVTGFKDDFDPE THEAIKVPVYDKRAIKMVDQLYKAVVKADQAYSK
                ***** *****

RNR          TLGCNESIKHTTVKPSGTVAKL AGASEGMHFHYGAYLI QRIRFQDSDP LLLPALKACGYRT
His-RNRfromDNAseq TLGCNESIKHTTVKPSGTVAKL AGASEGMHFHYGAYLI QRIRFQDSDP LLLPALKACGYRT
                *****

RNR          EADIY TENTT VEFPIKAVGADNPNFASAGTVSIAEQFATQAF LQTYWSDNAVSCITITFQ
His-RNRfromDNAseq EADIY TENTT VEFPIKAVGADNPNFASAGTVSIAEQFATQAF LQTYWSDNAVSCITITFQ
                *****

RNR          DSEGDQVESLLRQYRFITKSTSLLPYFGGSLQQAPKEPIDKETEYKRSQEI TGNVVEEVFS
His-RNRfromDNAseq DSEGDQVESLLRQYRFITKSTSLLPYFGGSLQQAPKEPIDKETEYKRSQEI TGNVVEEVFS
                *****

RNR          QLNSDVKDLELVDQTDCEGGACPIK
His-RNRfromDNAseq QLNSDVKDLELVDQTDCEGGACPIK
                *****

```

図2. reHis-RNRアライメント結果
上)LDL72_00535、下)reHis-RNR

(2) reHis-RNR の精製

大腸菌大量発現株から得られた無細胞抽出液から reHis-RNR を精製した。濃縮後 SDS-PAGE に供した所、アミノ酸配列から推定される分子量である 83.7 kDa 付近にシングルバンドを観察し (図 3)、reHis-RNR の十分な精製を確認した。

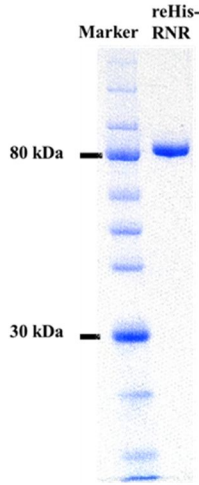


図3. 精製reHis-RNR SDS-PAGE結果

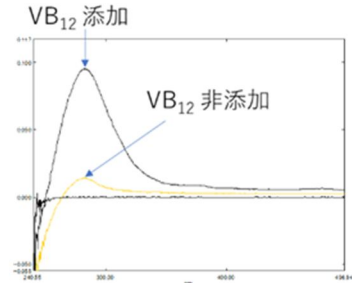
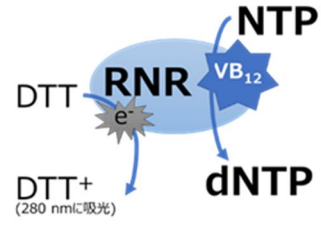


図4. B₁₂添加による吸光度の変化

(3) VB₁₂ 依存的な reHis-RNR 活性の測定

次いで、reRNR の VB₁₂ 依存的な触媒反応の検討を行った。reRNR は還元剤である DTT により配位した VB₁₂ が還元され、この電子がリボヌクレオチドに渡されることでデオキシリボヌクレオチド (dNTP) を生じる反応を触媒する (図 4 上)。DTT は酸化することで 280 nm に特異的な

吸光を示すことから、試験の簡便性を考慮して試験溶液の 280 nm 吸光波長の変化を指標として RNR 活性の測定を試みた。この結果、re-HisRNR 存在環境において、VB₁₂ 依存的に試験溶液のスペクトル上の 280 nm が変動する事を確認した (図 4 下)。

しかし、さらなる検討の結果、DTT は反応液中の VB₁₂ との無機的な酸化還元反応により還元される事から、安定的な指標とはならないことが明らかとなった。そこで、高速液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC-MS) を用いて反応産物である dNTP の産生量を測定し、reHis-RNR の活性指標とすることを検討した。この結果、GTP を基質として dGTP へ変換する RNR 活性の検出に成功した。しかし、文献情報に基づく反応条件では時間経過により GTP 及び dGTP イオンが次第に減少し、それぞれ GDP や GMP、dGDP や dGMP に次第に変換される現象が観察された (図 5)。これにより十分に安定した定量値が得られず、VB₁₂ 濃度との相関関係を確認するに至らなかった。食品中の VB₁₂ を簡便に測定するためには反応条件のさらなる最適化が必要であり、産生された dGTP を始めとする dNTP を完全に dNMP にまで分解する反応を加えることにより安定した測定が可能になると考えられ、これにより RNR 活性を指標とした VB₁₂ 濃度測定は一定の妥当性がある測定法となると推察された。

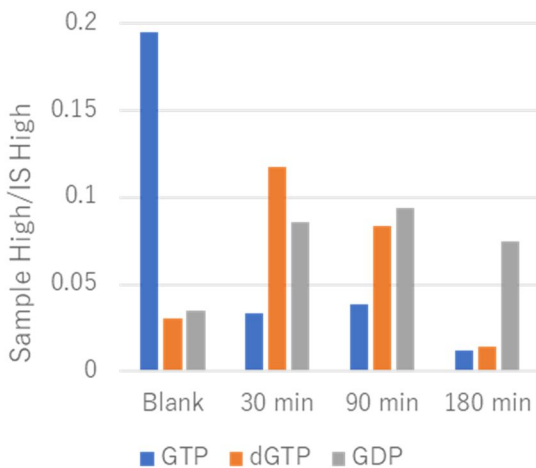


図5. 時間経過によるGTP及びその反応産物の増減

参考文献

1. Jordan, A. *et al.* B12-dependent ribonucleotide reductases from deeply rooted eubacteria are structurally related to the aerobic enzyme from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 13487–92 (1997).
2. Chen, P. *et al.* A LC-MS/MS method for the analysis of intracellular nucleoside triphosphate levels. *Pharm. Res.* **26**, 1504–1515 (2009).
3. Hendricks, S. P. & Mathews, C. K. Allosteric regulation of vaccinia virus ribonucleotide reductase, analyzed by simultaneous monitoring of its four activities. *J. Biol. Chem.* **273**, 29512–8 (1998).
4. Booker, S. & Stubbe, J. Cloning, sequencing, and expression of the adenosylcobalamin-dependent ribonucleotide reductase from *Lactobacillus leichmannii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 8352–6 (1993).
5. Eliasson, R., Pontis, E., Jordan, A. & Reichard, P. Allosteric Control of Three B₁₂-dependent (Class II) Ribonucleotide Reductases. *J. Biol. Chem.* **274**, 7182–7189 (1999).
6. Lawrence, C. C. *et al.* Binding of Cob(II)alamin to the adenosylcobalamin-dependent ribonucleotide reductase from *Lactobacillus leichmannii*. Identification of dimethylbenzimidazole as the axial ligand. *J. Biol. Chem.* **274**, 7039–42 (1999).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------