

生物の代謝フローを可視化する! 高感度! 分子内Stable Isotope Probing法の 開発と応用



水・物質循環部門 力石 嘉人／滝沢 侑子

安定同位体の存在量で物質の移動を見たい

同位体物質循環分野では、非生物と生物（無機物と有機物）、生物 A と生物 B（捕食や共生、図1）、もしくは、1つの生物の中にある有機分子 A と有機分子 B（生合成や代謝）などといった、様々なスケールにおける物質と物質のつながりを、水素・炭素・窒素などの元素が持つ「安定同位体の存在量の変化」を用いて見えています。

「安定同位体」とは、同一の原子番号を持ち（＝陽子の数が同じ）、中性子の数が異なる原子のうち、放射性崩壊を起こさない原子のことです（図2）。例えば、水素には、質量数1の水素（ ^1H ）と質量数2の重水素（ ^2H ）があり、炭素には、質量数12の炭素（ ^{12}C ）と質量数13の炭素（ ^{13}C ）があります。おそらく多くの方が、高校や大学で「同位体」を知り、「同位体は、陽子数と電子の配置が等しいため、物理・化学的性質が全く同じである」と学んでいると思います。しかし、本当は、質量の小さい同位体は、質量の大きい同位体に比べて、極僅かですが、確実に反応しやすいために、質量の異なる同位体は、様々な反応や現象において、常に異なる挙動を示します。そのため、地球上に存在する様々な物質の安定同位体の存在量には多様性が生まれ、図2に示されるように存在量の表記には、必ず「平均」という言葉をつけます。

では「安定同位体の存在量」は、どのくらいのスケールで変化しうるものなのでしょうか？具体的な例をひとつ挙

安定同位体	平均存在量(%)
水素 ^1H	99.9844
$^2\text{H(D)}$	0.0156
炭素 ^{12}C	98.890
^{13}C	1.110
窒素 ^{14}N	99.635
^{15}N	0.365
酸素 ^{16}O	99.760
^{17}O	0.040
^{18}O	0.200

図2 水素、炭素、窒素の安定同位体の平均存在量

げてみましょう。我々動物は、「餌を食べて、消化し、養分を吸収し、その養分に含まれているグルタミン酸（アミノ酸の一種）を分解して、エネルギーを得る」という代謝系を持っています。この時、養分に含まれているグルタミン酸が、約50%分解された場合、分解されずに残ったグルタミン酸が持つ ^{15}N の量は、分解される前と比べて、ほんの僅か、+0.0015%分だけ上昇するのです。私たちは、このような存在量の“超”微小なスケールの変化を精密に測ることによって、「何の物質が、どのような経路を通り、どのくらい反応したのか」を見ています。

なお、有機分子が持つ安定同位体の存在量を、どのような機器を用いて測定するのかは、研究室のホームページ (<http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/isophysiol/products/cn6/pg172.html>) に掲載していますので、こちらも読んで頂けると嬉しいです。



図1 研究室で飼育しているハゼとエビ。自然界では、このハゼとエビのように、異種の動物間の共生関係がしばしば見られます。これらの「共生」はどのようなメカニズムで成立しているのでしょうか？また、そこには、どのようなエネルギーの効率化（獲得、貯蓄、消費のバランスの最適化、価値交換）があるのでしょうか？

Stable Isotope Probing 法とは

つい先ほど、安定同位体の存在量の「超微小なスケールの変化」を精密に測ることによって、研究対象とする物質の反応経路と、その反応量を評価していると述べました。しかし、自然界でおこる安定同位体の存在量の変化には、現在の我々の技術力をもってしても捉えることができない「更に小さいスケールでの変化を持つ事象」がたくさん存在します。そこで登場するのが、「Stable Isotope Probing 法」です。Stable Isotope Probing 法とは、試料（生物そのものや、土壌などの環境試料）に、安定同位体の存在量を「人為的」に大きく変化させた基質（＝原料）を与え、その「人為的」な存在量を追跡することで、生体内で「どのような反応が起きているのか」、もしくは「その環境にどのような生物がいるのか」などを知るための技術です。これを用いることで、その「たくさんの事象」を研究することができるようになります。

この「Stable Isotope Probing 法」を用いたおそらく最も有名な例が、ピロリ菌の検査です。ピロリ菌は、我々人間の胃に感染し、胃炎や、胃・十二指腸潰瘍をもたらす菌です。彼らは強酸性の胃の中で生育するため、胃の中にある尿素を、アンモニアと二酸化炭素に分解し、その生産したアンモニアを用いて胃酸を中和していると考えられています。すなわち、ピロリ菌の感染の有無（もしくは、除去の成否）は、「 ^{13}C 量を人為的に大きく変化させた尿素」を経口投与し、ピロリ菌による尿素分解の生成物として「人為的な ^{13}C 量を持つ二酸化炭素」が発生するかどうか、を測定することで調べることができるのです。

“分子内” Stable Isotope Probing 法とは

Stable Isotope Probing 法では、反応基質の「全体」の安定同位体の存在量を変化させていたのに対し、「分子内 Stable Isotope Probing 法」は、反応の基質となる有機分子の「特定の部位の元素のみ」の安定同位体の存在量を人為的に変化させ、その「人為的」な存在量を、有機分子の分子構造の中の「1つ1つの元素のレベル」で追跡できる、2000年頃から注目を集めている技術です。この「分子内 Stable Isotope Probing 法」を用いると、生物の生合成・代謝における物質の流れ（＝フロー）や、有機分子の生物間の移動を極めて正確に評価することができ、その結果として、生物や生物群が、与えられた環境で何

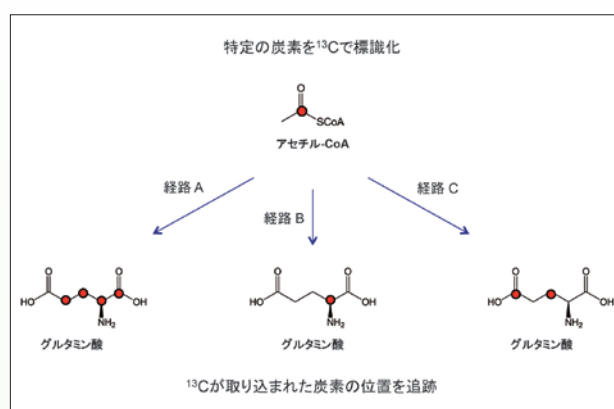


図3 分子内 Stable Isotope Probing 法概念図

をしているのか（＝どうやって生きているのか）を、正確に知ることが可能になります。

具体的な例を一つあげましょう。図3に示すように、生体内で、アセチル-CoA分子からグルタミン酸分子を作る経路として、A、B、Cの3つが考えられるとします。そのような場合に、アセチル-CoAのカルボニル基の炭素（図3の赤●）の ^{13}C 量を人為的に変化させ、新たに合成されたグルタミン酸の分子構造の中の「どの炭素の ^{13}C 量が変化しているのか」を追跡することができれば、グルタミン酸の合成経路A、B、Cのうち、どの経路が働いているのかを明確に知ることができるのです。

しかし、この「分子内 Stable Isotope Probing 法」は、開発当初から、非常に大きな問題を抱えていました。それは、安定同位体の「人為的」な存在量の測定に用いる「核磁気共鳴（NMR）」の感度がとても低いことです（図4）。例えば、多くの大学や研究機関で一般的に使用されているNMRを用いて測定する場合、 ^{13}C 量が50%以上の有機分子をmg～gスケールで用意する必要がありますが、この条件を満たす試料を用意することは、現実的には（お金と労力の面で）非常に難しいという課題がありました。このような背景から、新たな「高感度な測定技術」が強く求められていました。

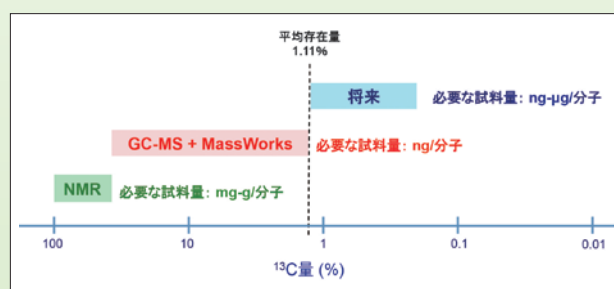


図4 分子内 Stable Isotope Probing 法の感度

“高感度”分子内 Stable Isotope Probing 法の開発

そこで我々は、従来よりも少ない試料量で、短時間で、安く、正確に測定できるという「夢の技術」の開発を目指し、一般的なガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS）に、GERSTEL 社が販売する MassWorks というソフトウェアを組み合わせて利用することで、

- (1) 研究対象の有機分子を高純度で得る
- (2) ng ~ μg オーダーの試料量で測定する
- (3) 1 ~ 99% の広い範囲の ^{13}C 量を測定する

の3課題の根本的な解決を試みました（図5）。GC-MS は、ガスクロマトグラフ（GC）部で、混合物から研究対象の有機分子をクロマトグラフィーで分離し、質量分析計（MS）部で、分子をイオン化し、分子イオンとそのフラグメントイオンの m/z を測定することで、有機分子の構造を決定する装置です。そして MassWorks は、式1に示すように、GC-MS で得られた質量の情報と、安定同位体の平均存在量を使って、研究対象の有機分子の精密質量を計算するソフトウェアです。

$$[\text{GC-MS の質量分析情報}] + [\text{安定同位体の平均存在量}] = [\text{精密質量}]$$

(式1)

この式1を用いて、研究対象である有機分子の「安定同位体の存在量」を得るためには、既知の精密質量に、

GC-MS の質量分析情報を与えればよいこととなります（式2）。

$$[\text{精密質量}] - [\text{GC-MS の質量分析情報}] = [\text{安定同位体の存在量}]$$

(式2)

また、MS 部で生じたフラグメントイオンをうまく使えば、理想的には、有機分子を構成する1つ1つの元素の安定同位体の存在量を計算することも可能になります。実際に ^{13}C 量が既知のアミノ酸の標準物質を用いて検証したところ、20ng ~ 20μg という少ない試料量で、 ^{13}C 量にして1~2%の誤差で、アミノ酸に含まれる個々の炭素の ^{13}C 量を求めることができる、ということがわかりました。

応用研究：始原的微生物が持つ TCA 回路の機能と役割を調べる

開発した「高感度分子内 Stable Isotope Probing 法」の応用先として、1つ研究を紹介したいと思います。この研究は、始原的な系統（＝地球上に最初に生まれた生命に近い系統）に属する水素酸化硫黄還元好熱細菌 *Thermosulfidibacter takaii* の TCA 回路（別名：クエン酸回路）が「可逆的」であり、回路の回転方向（機能と役割）が利用可能な炭素源に対応して柔軟に変化できることを証明したもので、2018年の2月にサイエンス誌

(Nunoura et al., 2018, Science 359. 559-563) に、布浦拓郎博士（海洋研究開発機構・主任研究員）、跡見晴幸教授（京都大学）と力石他の共同研究として掲載されました（詳細は論文を読んで頂けると嬉しいです）。

我々人間を含む全ての好気性動物のミトコンドリアが持つ「酸化型 TCA 回路」は、食事から得た有機分子を分解し、生じたアセチル-CoA を、完全に水と二酸化炭素に分解するとともに、有機分子が持つエネルギーを取り出す回路です。一方で、生物界全体を見渡すと「TCA 回路」と称されるものの中には、「酸化型」なもののみならず、嫌気性細菌が持つ「分

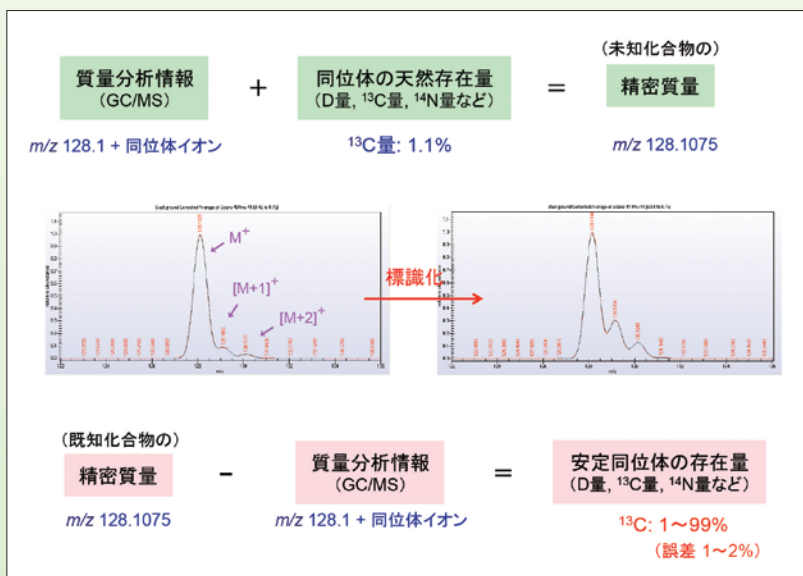


図5 GC-MS と MassWorks を組み合わせた高感度分子内 Stable Isotope Probing 法の仕組み

岐型」や、二酸化炭素を固定して有機分子を生成する「還元型」（逆 TCA 回路ともよばれる）もの、一部が欠損する「不完全型」や「バイパス型」など、基本的には同じような酵素群で動き、同じような反応系であるにも関わらず、その反応の経路や、回転の向きには多様性があることが知られています。

この「TCA 回路がどのような向きで動いていたのか」を、とくに始原的な系統に属する微生物について調べることは、「原始生命が、無機物から有機物を作れる独立栄養生物であったか？有機物を利用して生きる従属栄養生物であったか？」という、長きにわたり議論されてきた疑問の解決に貢献できます。たとえば、初期の生命が従属栄養生物として誕生した場合、炭素や他の元素を固定する者が存在しないので、彼らは一方的に消費するばかりで、すぐに絶滅してしまうでしょう。一方で、生命は有機物プールの中から生まれたとされる仮説がありますが、もしそうだとするならば、有機物が有り余っている状態の中で、新たに有機物を生産する独立栄養型生物が果たして生まれるのか？という疑問が残ります。

そこで、我々は、始原的な系統に属する *T. takaii* が、どのような TCA 回路を持っているのかを理解するために、 ^{13}C 量を変化させた CO_2 、酢酸、コハク酸などを用いて培養し、生合成されたアミノ酸の 1 つ 1 つの炭素の ^{13}C 量を測定しました。その結果、

- (1) 独立栄養での培養条件 (CO_2 の添加) においては、還元的 TCA 回路が機能する
- (2) 酢酸、コハク酸のどちらか 1 つを添加すると、分岐型の TCA 回路が機能する
- (3) 酢酸、コハク酸の両方を添加すると、酸化的 TCA 回路が機能する

ということを明らかにできました (図 6)。そしてこの発見は、始原的な系統に属する生命が、「独立栄養的に、無機物から有機物を作れる機能」を持つと同時に、「従属栄養的に、有機物からエネルギーを獲得できる機能」を、柔軟に使い分けられる「混合栄養生物」であった、と考える世界で初めての重要な証拠になりました。

なお、この研究は、約 100 細胞/ml 程度しか増えない *T. takaii* について、数〜数十 ml の培養液を用いて、実施したものであり、わずか数十 ng の有機分子があれば、1〜2% の誤差で有機分子の個々の炭素の ^{13}C 量を測定できる (図 4)、という「高感度分子内 Stable Isotope Probing 法」のデモンストレーションという点でも、重要な研究になりました。

今後の展望

前述したように「Stable Isotope Probing 法」は、現在の我々の技術力では、「自然界でおこる安定同位体の存在量の極々微小の変化」を捉えることができない多くの事象に関して、安定同位体の存在量を「人為的に」大きくコントロールした基質を試料 (生物そのものや、土壤などの環境試料) に与え、その「人為的な存在量」を追跡する技術です。すなわち、この技術を用いる時には、必ず、飼育や培養実験が必要になります。また、自然界ではあり得ない濃度の「重い同位体」やそれが含まれる有機物を、環境に散布することは、その環境に少なくないダメージを与えます。そこで、我々は原点に戻り、自然界から採取した試料を用いて、「自然界でおこる安定同位体の存在量の極々微小の変化」の痕跡を、「Stable Isotope Probing 法」を使わずに、なんとか有機分子に含まれる 1 つ 1 つの原子のレベルで、見たい、見られるようにしたい！と思い、現在は新たな研究手法の開発と、その応用研究に取り組んでいます (図 4)。近い将来、皆さんに良い報告ができることを楽しみにしています。

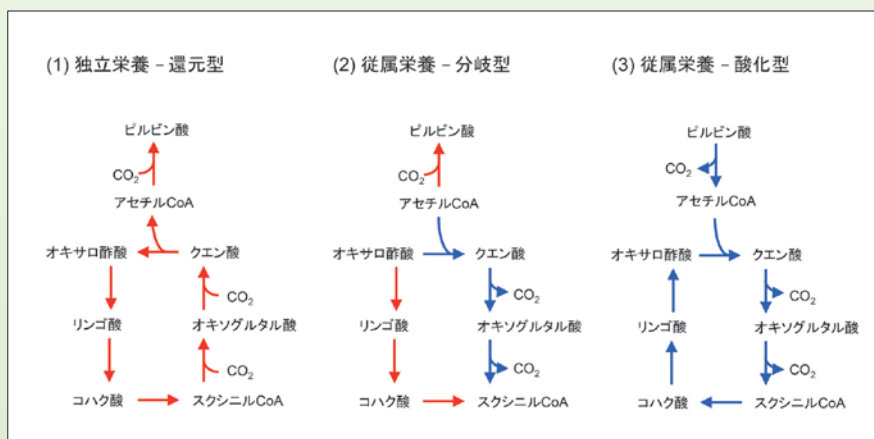


図 6 各種の培養条件における *Thermosulfidibacter takaii* の TCA 回路のふるまい。赤矢印が還元的 TCA 回路の向き、青矢印が酸化的 TCA 回路の向き