

令和元年6月4日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01937

研究課題名(和文)新規質量分析イメージングによるパースルフィド依存性虚血再灌流障害制御機構の解明

研究課題名(英文) Functional analyses of sulfur-containing amino acid-derived thiol compounds in the ischemic reperfusion disorder by MALDI MS imaging

研究代表者

菱木 貴子 (HISHIKI, TAKAKO)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：10338022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：「活性含硫化合物(分子内に-SH基あるいは-SSH基を持つ化合物)」と虚血再灌流障害時の酸化ストレス軽減機能との関連について、質量分析技術を用いて検証を行った結果、すでにその抗酸化作用が知られている硫化水素のみならず、ホモシステイン、システイン、グルタチオン、そしてそれらの分子にさらに過剰な硫黄原子(S)が結合したパースルフィド化合物が虚血再灌流障害の軽減に効果があることがわかった。さらに、組織中のパースルフィド化合物を「空間的情報」を保持したまま可視化する手法として新たにSERS(Surface-enhanced Raman spectroscopy) imaging法の確立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで硫化水素が虚血再灌流障害を軽減する効果を持つことは知られていたが、本研究により硫化水素よりもむしろ、ホモシステイン、システイン、グルタチオン等の含硫アミノ酸にさらに過剰な硫黄原子が結合したパースルフィド化合物が重要であることが示唆された。パースルフィド化合物は様々な生理機能を持つことが近年多数報告されているが、本研究ではこの反応性が高く不安定なパースルフィド化合物を組織切片上で可視化するSERS(Surface-enhanced Raman spectroscopy) imaging技術を確立した。この手法は様々な活性含硫化合物の研究に応用可能な画期的な手法であると確信する。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to be clarified the mechanisms that the thiol (containing -SH group) and persulfide (containing -SSH group that is one of the most powerful anti-oxidant thiol compounds) species could reduce intracellular oxidative stresses in the ischemic diseases. First, we performed measurements of the thiol and persulfide in the ischemic mice heart, suggesting that many thiol-containing metabolites play important roles to prevent from heart failure. Besides quantifications of thiol-compounds, we tried the MALDI (Matrix-Assisted Laser/Desorption Ionization) MS imaging for the visualization of the thiol and persulfide on the tissue sections. However, MALDI-MS could oxidize the thiol group easily, making us underestimate the contents of thiol compound on the tissue. Therefore, we apply another method, SERS (Surface-enhanced Raman spectroscopy) imaging technology. SERS enabled us to visualize the tissue distribution of the thiol and persulfide without labelling or staining.

研究分野：代謝生化学

キーワード：活性含硫化合物

## 1. 研究開始当初の背景

含硫アミノ酸代謝経路は、抗酸化物質として知られるグルタチオンをはじめ、近年その抗酸化作用が注目されている硫化水素( $H_2S$ )やチオール(分子内に-SH基を持つ)化合物を合成する代謝経路である(図1)。この経路の主要な代謝酵素であるCBS(cystathionine beta-synthase)やCSE(cystathionine gamma-lyase)は、酸化ストレスを軽減することで様々な臓器において虚血再灌流障害を軽減させることが報告されているが、その分子メカニズムについては解明されておらず、これら酵素群から産生される $H_2S$ の還元効果によるものという説が広く認められている。

近年、システイン、ホモシステイン、還元型グルタチオン等のチオール化合物は、その分子にさらに過剰な硫黄原子(S)が結合したパースルフィド化合物が生体内で産生されており、中でもシステインに硫黄原子が結合したシステイン・パースルフィド(Cys-SSH)は極めて強力な還元能を持つことが報告された( Ida T, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014)。このシステイン・パースルフィド分子も、CBS、CSEよりシステインを基質として産生されることから、これまでCBSやCSEによる虚血再灌流障害の減弱効果は $H_2S$ の還元効果によるものと考えられてきたが、むしろパースルフィド化合物が最も重要な因子なのではないかという新たな仮説が生じた。

そのような中研究代表者は、チオールの蛍光プローブとして知られる mBBR (monobromobimane) (Wintner EA, *et al.*, *Br J Pharmacol*, 2010)を利用して質量分析技術と組み合わせることにより、生体内の $H_2S$ 、チオール化合物、そしてパースルフィド化合物等の含硫化合物を定量する方法を確立した。これまでも $H_2S$ の定量データは数多く報告されているが、それらのほとんどは $H_2S$ 合成酵素であるCBSやCSEの基質となるシステインやホモシステインをexogenousに添加することで、「 $H_2S$ 産生能」をみているだけであり、内在性の $H_2S$ の量を全く反映していないことが問題点であった。さらに、これまで報告されている生体内の $H_2S$ の濃度はまちまちで、統一された測定方法が確立されていないことが当該分野の進展を妨げていた。しかしながら、研究代表者らが確立した方法は、 $H_2S$ を初めとする含硫化合物をmBBR付加体として生理的条件下で定量可能であり、脳や肝臓の組織のみならず血漿サンプルや培養細胞にも応用できることから、各含硫化合物の生体内での濃度を正確に定量することが可能になるものと期待できる。

また研究代表者らは、組織切片をサンプルとして、ターゲット化合物の空間的情報を検証することが出来る顕微質量分析(MALDI-MS-imaging)技術を確立し、マウスの脳梗塞モデルや胆癌肝転移モデルでのATP、ADP、AMP、グルタチオン、アミノ酸等の解析技術を確立しており、含硫化合物のMALDI-MS-imaging解析条件についても検討中である。このMALDI-MS-imaging法を用いることにより、心臓や肝臓の虚血部位における含硫化合物産生動態とミトコンドリア機能との関連について、局在【空間的情報】を含めた検証を行うことが可能となる。

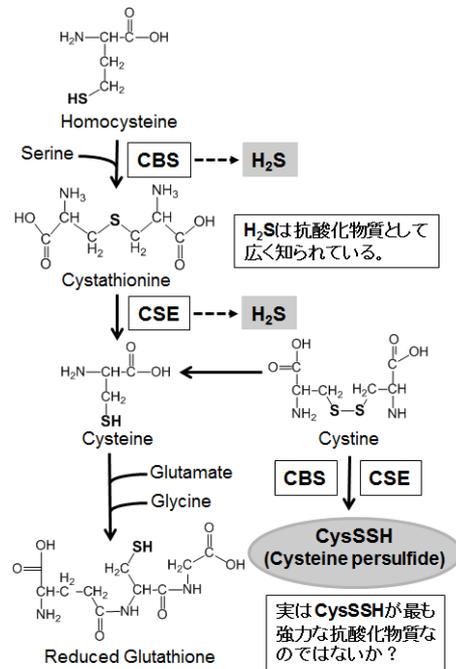
## 2. 研究の目的

硫化水素産生酵素且つ含硫アミノ酸代謝酵素であるCBSやCSEには、心臓、肝臓、腎臓、肺における虚血再灌流障害時の酸化ストレスを軽減する機能があることが報告されているが、その分子メカニズムについては解明されていない。本研究では、CBSやCSEより産生される硫化水素、チオール(分子内に-SH基を持つ)化合物、そしてパースルフィド(分子内に-SSH基を持つ)化合物等の「含硫化合物」に焦点をあて、研究代表者らが確立した質量分析技術を駆使した含硫化合物定量法と、顕微質量分析法(MALDI-MS-imaging法)を主たる手法として用い、含硫化合物動態と虚血再灌流障害時の酸化ストレス軽減機能との関連について検証を行う。

## 3. 研究の方法

### 【遺伝子改変モデルマウス】

実験モデルとしては以下の2種類の含硫化合物産生に関わる酵素の遺伝子改変マウスを用いた。



(図1) 含硫アミノ酸代謝経路

(1) SQR (sulfide quinone reductase-like)ノックダウンマウス(高含硫化合物モデル)  
 H<sub>2</sub>Sを細胞内で分解するミトコンドリア膜タンパク質であるSQRをノックダウンしたマウス  
 (2) CSEノックアウトマウス(低含硫化合物モデル)  
 これらの遺伝子改変マウスを用い、含硫化合物の動態と抗酸化作用との関連について以下の3つの含硫化合物解析法を駆使して個体レベルでの検証を行った。

【含硫化合物の解析手法】

(1) 質量分析技術を用いた mBBr 付加体含硫化合物の絶対定量

チオールの蛍光プローブとして知られる mBBr を利用し質量分析技術と組み合わせることにより、生体内の H<sub>2</sub>S、チオール化合物、そしてパースルフィド化合物等、含硫化合物の絶対定量を行った。

(2) 顕微質量分析法 (MALDI-MS-imaging 法)を用いた含硫化合物動態の局在の検討

マウス心臓の組織切片を用い、MALDI-MS-imaging 測定を実施し、組織切片上の局在「空間情報」を含めた検証を試みたが、申請者が用いた大気圧イオン源を用いたイメージング法は、イオン化の過程で-SH基、-SSH基ともにスルホン酸化(-SO<sub>3</sub>H)してしまうことがわかったことから組織切片上の局在を含めた検証は(3) SERS imaging 法へ移行した(詳細は「研究成果」の項に記載)。

(3) Surface-enhanced Raman spectroscopy imaging (SERS-imaging)

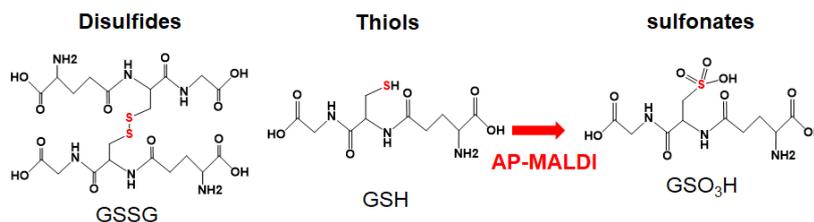
試料を乗せるガラス基板に金属微粒子を配置することによりラマン散乱光が増強されることを利用した SERS-imaging という手法を用いると、チオール原子が金属粒子と結合しスペクトルが特に増強される。この手法を用い、組織中の含硫化合物の局在を含めた検証を行った。

4. 研究成果

本研究課題では、CBSやCSEより産生される硫化水素 (H<sub>2</sub>S)、チオール(分子内に-SH基を持つ)化合物、そしてパースルフィド(分子内に-SSH基を持つ)化合物等「含硫化合物」の生体機能メカニズムの解明を目的とする。

まず、高含硫化合物モデルとして、SQR (sulfide quinone reductase-like : H<sub>2</sub>Sを細胞内で分解するミトコンドリア膜タンパク質)をノックダウンしたマウス (SQR KD)の心臓をサンプルとして、チオールの蛍光プローブであるmBBrを用いた含硫化合物の網羅的絶対定量系により測定を行った結果、H<sub>2</sub>S、ホモシステイン (Hcy)、システインパースルフィド (Cys-SSH)、還元型グルタチオン (GSH)、GSHのパースルフィド (GSSG)が野生型に比べてSQR KDで有意に増加していることがわかった。さらに、低含硫化合物モデルとしてCSEをノックアウトしたマウス (CSE KO)の心臓についても同様の検討を行ったところ、CSE KOでは野生型に比べてH<sub>2</sub>Sは減少傾向ではあるが有意な差はみられず、一方、Hcy、ホモシステインパースルフィド、Cys-SSHは有意に増加していた。SQR KDはミトコンドリアの損傷による心不全を発症し、またCSE KOは酸化ストレスに脆弱であることがわかっている。今回の結果から、H<sub>2</sub>SのみならずHcy、Cys、GSHそしてそれらのパースルフィドが心機能に重要であることが示唆された。

そこで次に、組織中の含硫化合物について、空間情報を含めた詳細な検討を行うことを目的とし、MALDI-MS-imaging法による含硫化合物の検出を試みた。しかし、研究代表者が用いた大気圧イオン源を用いたイメージング



(図2)大気圧MALDIではチオール基はスルホン酸化される

法は、イオン化の過程で-SH基、-SSH基ともにスルホン酸化(-SO<sub>3</sub>H)してしまうことがわかった。つまり、高い抗酸化能を有し、組織中濃度が高いチオール化合物である還元型グルタチオン(GSH)とその酸化型である酸化型グルタチオン(GSSG)は、どちらもスルホン酸化されGS(O<sub>3</sub>H)として検出される(図2)(業績(5))。その他のチオール化合物についても同様の現象が確認され、この手法では組織中の含硫化合物について正確な情報が得られないことがわかった。そこで、MALDI-MS-imaging法にかわる手法としてラマンイメージング法を試みることにした。物質固有の波長を持つ散乱光が生じる「ラマン散乱」を利用した手法で、試料を乗せるガラス基板に金属微粒子を配置することにより散乱光が増強されるSurface-enhanced Raman spectroscopy(SERS)という手法を用いると、チオール原子が金属粒子と結合しスペクトルが特に増強される。この手法を用い、組織中の含硫化合物の検出を試みた。

まず、GSH、ヒポタウリン等の標準品による検証から各物質由来のラマンシグナルパターンを得ることが出来、特にGSHについては300cm<sup>-1</sup>に強いシグナルを持つことがわかった(業績(5))。さらにNa<sub>2</sub>S<sub>3</sub>、Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>の標品を用いた検証からポリサルファー由来のシグナル波数(480cm<sup>-1</sup>)が明

らかとなった。そこでマウス心臓組織の凍結切片でSERS imagingを実施したところ、心臓組織内に300cm<sup>-1</sup>と480cm<sup>-1</sup>のシグナルが検出され、さらにこれらのシグナルがチオール蛍光プローブであるmBBrを心臓組織切片に滴下することにより消去されたことから心臓組織切片で検出された300cm<sup>-1</sup>、480cm<sup>-1</sup>は活性含硫化合物由来のシグナルであることが確認出来た。

組織切片を用いたSERS imaging技術は世界でも類を見ない手法であり、生体を構成する低分子化合物の組織内分布を捉えることのできる新しい解析技術としてあらゆる分野への応用が期待できる。

今後はこれらの手法を駆使し、含硫化合物動態と虚血再灌流障害時の酸化ストレス軽減機能との関連についてマウス心臓組織を用いた検証を引き続き行う予定である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

1. Nurkanto A, Jeelani G, Yamamoto T, **Hishiki T**, Naito Y, Suematsu M, Hashimoto T, Nozaki T; Biochemical, Metabolomic, and Genetic Analyses of Dephospho Coenzyme A Kinase Involved in Coenzyme A Biosynthesis in the Human Enteric Parasite *Entamoeba histolytica*. *Front Microbiol.* 9:2902. doi: 10.3389/fmicb.2018.02902. eCollection (2018) 査読有
2. Umbarawan Y, Syamsunarno MRAA, Koitabashi N, Obinata H, Yamaguchi A, Hanaoka H, **Hishiki T**, Hayakawa N, Sano M, Sunaga H, Matsui H, Tsushima Y, Suematsu M, Kurabayashi M, Iso T; Myocardial fatty acid uptake through CD36 is indispensable for sufficient bioenergetic metabolism to prevent progression of pressure overload-induced heart failure. *Sci Rep.* 13;8(1):12035. doi: 10.1038/s41598-018-30616-1. (2018) 査読有
3. Kabe Y, Suematsu M, Sakamoto S, Hirai M, Koike I, **Hishiki T**, Matsuda A, Hasegawa Y, Tsujita K, Ono M, Minegishi N, Hozawa A, Murakami Y, Kubo M, Itonaga M, Handa H; Development of a Highly Sensitive Device for Counting the Number of Disease-Specific Exosomes in Human Sera. *Clin Chem.* 64(10):1463-1473. doi: 10.1373/clinchem.2018.291963. (2018) 査読有
4. Mashima K, Takahashi S, Minami K, Izawa Y, Abe T, Tsukada N, **Hishiki T**, Suematsu M, Kajimura M, Suzuki N; Neuroprotective Role of Astroglia in Parkinson Disease by Reducing Oxidative Stress Through Dopamine-Induced Activation of Pentose-Phosphate Pathway. *ASN Neuro.* doi: 10.1177/1759091418775562. (2018) 査読有
5. Shiota M, Naya M, Yamamoto T, **Hishiki T**, Tani T, Takahashi H, Kubo A, Koike D, Itoh M, Ohmura M, Kabe Y, Sugiura Y, Hiraoka N, Morikawa T, Takubo K, Suina K, Nagashima H, Sampetean O, Nagano O, Saya H, Yamazoe S, Watanabe H, Suematsu M; Gold-nanofève surface-enhanced Raman spectroscopy visualizes hypotaurine as a robust anti-oxidant consumed in cancer survival. *Nature Communications.* doi: 10.1038/s41467-018-03899-1. (2018) 査読有
6. Umbarawan Y, Syamsunarno MRAA, Koitabashi N, Yamaguchi A, Hanaoka H, **Hishiki T**, Nagahata-Naito Y, Obinata H, Sano M, Sunaga H, Matsui H, Tsushima Y, Suematsu M, Kurabayashi M, Iso T; Glucose is preferentially utilized for biomass synthesis in pressure-overloaded hearts: Evidence from fatty acid binding protein-4 and -5 knockout mice. *Cardiovasc Res.* doi: 10.1093/cvr/cvy063. (2018) 査読有
7. Nurkanto A, Jeelani G, Yamamoto T, Naito Y, **Hishiki T**, Mori M, Suematsu M, Shiomi K, Hashimoto T, Nozaki T; Characterization and validation of *Entamoeba histolytica* pantothenate kinase as a novel anti-amebic drug target. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 8(1):125-136. doi: 10.1016/j.ijpddr.2018.02.004. (2018) 査読有

8. Umbarawan Y, Syamsunarno MR, Obinata H, Yamaguchi A, Sunaga H, Matsui H, **Hishiki T**, Matsuura T, Koitabashi N, Obokata M, Hanaoka H, Haque A, Kunimoto F, Tsushima Y, Suematsu M, Kurabayashi M, Iso T; Robust suppression of cardiac energy catabolism with marked accumulation of energy substrates during lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction in mice. *Metabolism, clinical and experimental*. pii: S0026-0495(17)30233-0. doi: 10.1016/j.metabol.2017.09.003 (2017) 査読有
9. Oyaizu-Toramaru T, Suhara T, Hayakawa N, Nakamura T, Kubo A, Minamishima S, Yamaguchi K, **Hishiki T**, Morisaki H, Suematsu M, Minamishima YA; Targeting oxygen sensing prolyl hydroxylase (PHD) for metformin-associated lactic acidosis treatment. *Mol Cell Biol*. 37(16) pii: e00248-17. doi: 10.1128/MCB.00248-17. (2017) 査読有
10. Ono T, Kamimura N, Matsushashi T, Nagai T, Nishiyama T, Endo J, **Hishiki T**, Nakanishi T, Shimizu N, Tanaka H, Ohta S, Suematsu M, Ieda M, Sano M, Fukuda K, Kaneda R; The histone 3 lysine 9 methyltransferase inhibitor chaetocin improves prognosis in a rat model of high salt diet-induced heart failure. *Scientific Reports*. 4; 7: 39752. doi: 10.1038/srep39752. (2017) 査読有
11. Iizumi T, Takahashi S, Mashima K, Minami K, Izawa Y, Abe T, **Hishiki T**, Suematsu M, Kajimura M, Suzuki N; A possible role of microglia-derived nitric oxide by lipopolysaccharide in activation of astroglial pentose-phosphate pathway via the Keap1/Nrf2 system. *J Neuroinflammation*. 13(1):99. doi: 10.1186/s12974-016-0564-0. (2016) 査読有
12. Tohyama S, Fujita J, **Hishiki T**, Matsuura T, Hattori F, Ohno R, Kanazawa H, Seki T, Nakajima K, Kishino Y, Okada M, Hirano A, Kuroda T, Yasuda S, Sato Y, Yuasa S, Sano M, Suematsu M, Fukuda K; Glutamine Oxidation Is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Metab*. 23(4): 663-74. doi: 10.1016/j.cmet.2016.03.001. (2016) 査読有

〔学会発表〕(計 1件)

1. 第39回 日本分子生物学会大会 2016年

ヒト多能性幹細胞におけるグルタミン代謝を利用した心臓再生医療(口頭発表)

遠山周吾, 藤田淳, **菱木貴子**, 末松誠, 福田恵一

6. 研究組織

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、研究者個人に帰属されます。