

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：12102
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2021
課題番号：19K15727
研究課題名(和文)新規の硫黄分子種の分析化学的手法による新規抗酸化有用機能性のチオール分子種探索
研究課題名(英文)Exploration of new antioxidant thiol biomolecules with valuable function by a new chemical analytical method of sulfur molecules
研究代表者
河野 祐介 (Yusuke, Kawano)
筑波大学・生命環境系・助教
研究者番号：40558029
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体の酸化還元システムに深く関わり、全生物に必須の元素である「硫黄」に着目した。そして、従来は困難とされる“新規”の生体硫黄化合物(特に抗酸化性能を備えるチオール化合物)の発見・同定と特性解析に取り組んだ。探索対象は、地球生命系の「生産者」として光合成由来の「還元力(エネルギー)」を生産・供給する微生物である「藻類」(ユーグレナ)とした。当課題の推進には、一般的には困難な「硫黄代謝物種の一斉解析」を可能にしている「サルファーインデックス解析」をベース技術とした。その結果、単離精製には至らなかったが、藻類の新規硫黄化合物の候補を絞り込んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義
当研究成果で得られる新規知見により、重要性が高まる「硫黄生物学」の切り口から、「代謝機能」や「酸化還元システム」に対して、より拡張的で包括的な形の学術的理解の刷新を図れる。同時に、国民社会・経済産業的に有益な「新規の抗酸化機能性分子素材」としての潜在価値の評価が可能となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I focused on "sulfur", which is deeply involved in the oxidation system of living organisms, and is then essential for all creatures. I here worked on the study, exploration, identification, and characterization of a "new" biological sulfur compound (especially with antioxidant effect), which has been conventionally difficult. The target organism was algae (Euglena), a microorganism that produces and supplies "reductant (energy)" derived from photosynthesis as a "producer" of the global life system. The promotion of this study was based on the "Sulfur Index Analysis", which enables the most difficult "simultaneous analysis of sulfur metabolites". As a result, it did not reach isolation, but narrowed down the candidates for new sulfur compounds of algae.

研究分野：応用微生物学

キーワード：生体硫黄分子 硫黄代謝

1. 研究開始当初の背景

生命活動という複雑現象の本質は、その切り口の一つとして「多様で膨大な“酸化還元反応”の調和的な集合システム」と捉えることができる。生体の多くの酸化還元反応は「硫黄」化合物種を介している。これは、硫黄がその特性として幅広い酸化度(-2~+6)をとる性質に起因する。そこで、本研究では、全生物種で必須元素として重要な役割を担う「硫黄」に焦点を当てる。学術的に、硫黄の代謝は、炭素や窒素のそれと比べて理解の進展が遅れている。これは、硫黄代謝物種を「見ること(=定量)」の困難さに起因する。なぜなら、硫黄代謝物種は生体含量が極微量で、しかも、測定サンプル調製中に化学的な酸化還元反応(例;チオール基(-SH)の空気酸化、ジスルフィド交換等)が自動的に進行してしまうため、「生体時の状態」を正確に反映する定量が容易でないからである。しかし、最近、研究代表者らのグループ(主宰者;大津徹生准教授)では、上述の「望ましくない反応」を巧みに回避する方法論(後述)を適用し、世界でも最先端の硫黄代謝物の網羅的な一斉定量解析(液体クロマトグラフィー-質量分析法;LC-MS)を実現可能にした。当技術は、生物学的に意義深い新概念を掲げる学術領域(ガスバイオロジー(硫化水素)、ポリスルフィドミクス等)の樹立にも繋がり、現在、硫黄生物学の意義と重要性は顕著に高まっている。

以上、「既知」の生体硫黄化合物を網羅的に測定可能な技術体系が確立された現段階は、その発展型の次世代研究として「新規」の生体硫黄化合物の探索・同定を効率的に実践可能な適時と言える。その課題遂行は、「生物学的に重要な生体硫黄化合物種の未知なる存在の是非」という生物学の核心をなす学術的な「問い」に対して、当該化合物の発見、分子構造の決定、機能特性の解明という形で「答え」を提示可能である。

2. 研究の目的

本研究は、“新規”の生体硫黄化合物の探索を、多種多様な藻類を標的探索源として推進し、その分子構造を決定し、機能特性(抗酸化能)を明らかにすることを目的とする。

研究代表者らは、「サルファーインデックス®解析」と称して「硫黄代謝物種の網羅的な一斉定量解析系」を既に確立している。当技術では、サンプル中のチオール分子種を、生体抽出と同時に化学的に特異的な修飾(モノプロモビマンによるビマン誘導体化)を施し、最新のLC-MSで検出する。この処理手順の導入により、従来は測定不可能である小分子(無機硫黄化合物類)や揮発性硫黄分子(オフフレーバー類)まで検出可能な形で、主要な硫黄代謝物やその前駆・中間体(50種以上)を網羅的・高感度・高精度・高速に定量可能である(図1)。当技術は、一般的なメタボローム解析が不得手とする、生体「硫黄」化合物の正確な定量が可能で、しかも、これを実行可能な研究者は世界でも極少数ゆえ、学術的な独自性は高い。

研究成果として取得する、“新規”のチオール化合物は、還元性を有する(はずの)ため、新規の抗酸化性等の有用な生理機能を備えている可能性は高い。しかも、現在、「健康寿命の延伸」に対する国民的なニーズが高まり、癌や成人病の発症要因となる「生体内で日々生じる活性酸素種」を消去可能な「抗酸化機能性成分」の日常的な継続摂取に対する関心は高い(例:ビタミンC配合やカテキン含有の飲食品)。よって、健康飲食品や医療等の産業分野では、上記の「未病」や「予防医療」の新概念を体現できる新規の抗酸化性分子素材が待望されている。つまり、本研究は、大きな経済効果を伴う産学界の活性化や、国民消費者の生活の質的向上にも貢献しうる、応用工学的にも十分な意義があるテーマとして構想しており、その創造性や波及効果も高い。

3. 研究の方法

【1】藻類種の選定と入手と培養

新規チオール分子の探索対象として、地球生命系の「生産者」として光合成由来の「還元力(エネルギー)」を生産・供給する微生物の「藻類」が有望と考え、100種程の規模(進捗に応じ300種)が妥当と考えた。株の入手先は、微生物保存機関(環境研、NITE、理研、遺伝研等)、株式会社ユーグレナ(藻類を原料に飲食品や燃料を開発)とする。株の選定は、各機関の担当者との目的・内容を協議し、「生理機能、系統・分類、ゲノム情報の有無、形質転換能の有無、コスト、培養の難易度等」の観点で、多様性や遺伝学・遺伝子工学実験への連携性をバランス良く考慮する。各藻類は、一般的もしくは硫黄源条件を振った培養系、(一過的な)酸化ストレス誘導系等によりチオール化合物の産生の促進が期待される条件で液体培養し、培養液及び細胞を得る。

【2】新規チオール化合物探索・選抜(サルファーインデックス解析等;LC-MS)

ビマン処理を「有」と「無」でサルファーインデックス解析、経時マススペクトル測定を実施する。

クロマトグラムの比較で、処理「無」に対し、「有」でのみ存在するピークを、ビマン化チオールのピークとして全てピックアップし一次候補とする。各推定チオールの分子量を算出する。

処理「有」で、各種のビマン化チオールに共通する「ビマン部位」を選択的に断片化して検

出可能な ($m/z = 192$) “プリカーサーイオンスキャン法” や “ニュートラルロススキャン法” を実施し、その検出ピークと、共通の溶出時間を持つピークを二次候補として選抜する。

サルファーインデックス解析メソッドに登録済みの “既知” のピマン化チオールと同等のピーク (m/z と溶出時間から判断) を二次選抜から除外し、残りを “新規” として三次候補とする。

他のチオール修飾剤 (ヨードアセトアミドやマレイミド) で ~ を行い、各三次選抜と同等のチオールに由来する誘導体 (m/z から判断) が、各処理共通で得られたものを四次候補とする。

【3】 新規チオール性硫黄化合物の分子構造決定

四次候補の新規ピマン化チオールの精製画分を得る。必要に応じ、LC カラム及び溶出条件等は検討し最適化する。次に、当該化合物の分子構造の決定に向け、まず、精密質量の測定により化学組成を決定し (例; CaNbScPdOeHf)。また、MS 解析において、当該分子の物理的開裂をさせた際の各フラグメントの m/z から判断して部分構造を推定する。NMR や FT-IR 等の分光解析を行い、当該分子の (部分) 構造を更に推定する。元素分析や X 線構造解析も組み合わせて、全体構造をより詳細に推定する。推定した構造の化学合成標品化合物を入手し、上記実験結果が、精製化合物一致することを確認し、構造決定とする。 は学内共同機器利用もしくは外注で実施する。

【3.1】 研究の進捗状況に応じて適宜を検討・対応すべき実験項目 (適切な時期)

上記の探索実験では、その探索の確度の向上を目的に、必要に応じて、「標的化合物種の濃縮兼粗精製」を実施する。例えば、サンプル中のピマン化チオールを、ピマン部位の疎水的性質を利用して、逆相カラム系への結合とその溶出により、濃縮兼粗精製を実現する。また、ピマン部位に特異的に結合するモノクローナル抗体を調達し、ピマン化チオールをアフィニティー精製する方法もあり得る。更に、後から脱離可能な様式で支持担体に固定化したモノプロモピマン等のアルキル化剤もしくはジスルフィド結合保有分子で、サンプル中のチオールを修飾もしくはジスルフィド結合化すると、アフィニティー精製と濃縮が可能となる。

一方、最終年度開始時に、もし四次候補が未取得の進捗の場合は、探索生物種を変更する。具体的には、抗生物質等の二次代謝産物の生合成や分泌が盛んな種が多い放線菌や糸状菌とする。

【4】 同定した新規チオールの特性解析 (機能性や有用性の一次評価) (2~3年目)

同定した新規のチオール化合物の精製物、もしくは化学合成標品を用いて、抗酸化能に関する機能特性を評価する。具体例として、活性酸素種のうち、極めて毒性が高い「ヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$)」の直接消去活性を *in vitro* で試験し (グルタチオン、エルゴチオネイン、尿素などの既存の抗酸化性分子と比較) 抗酸化機能性分子としての産業的な有用性を評価する。なお、進捗が順調な場合には、癌高発症の病態モデルマウスや癌発症処置マウスにおいて、新規のチオール化合物が、その摂取により、発症に対する予防効果があるかを *in vivo* 試験で評価をする (共同研究予定)。

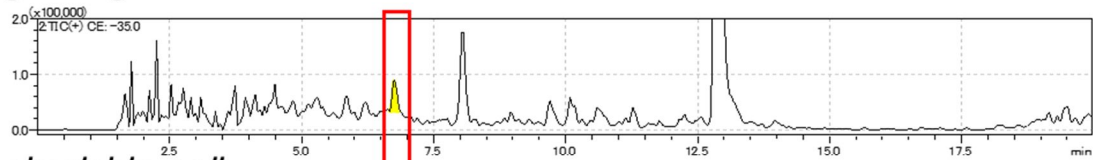
4. 研究成果

藻類 (ユーグレナ) や出芽酵母、大腸菌、枯草菌等の微生物を対象に硫黄代謝物のメタボローム解析を行った。各クロマトグラムデータでは、多くのピークが出現し、サンプル間や標準化合物試料との比較から新規の硫黄化合物の可能性のあるピークを選定した (図1)。具体的には、サルファーインデックス法に基づき、各生体試料から抽出と同時にモノプロモピマンで化学的にチオールを修飾したサンプルにてプレカーサーイオンスキャンを行った。

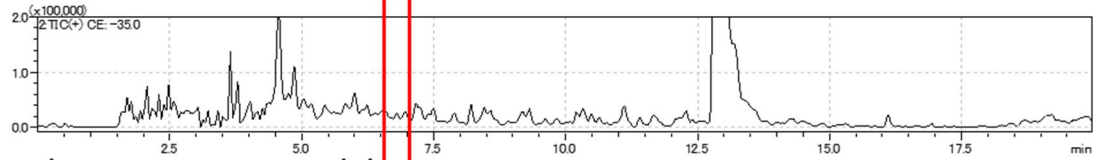
ただし、その溶出液を実際に分取すると、取得試料を再解析しても LC-MS で検出ができなかった (シグナル/ノイズ比の悪いクロマトグラム)。原因は明快ではないものの、この操作間にかんりのロス (もしくは化学的変換や分解) が生じている可能性が高い。対処として、試料投入量の増大、代謝物の抽出液の濃縮、分取溶出液の濃縮等 (乾固後に再溶解) により、目的単離物 (粗精製物) の検出を試みたがベースラインが上昇する結果となり、シグナル/ノイズ比の改善は果たされなかった。現在利用している LC-MS 分析系は化合物の分離度が高く精細な解析が可能で「分析」に特化しているタイプのため、未知の新規硫黄化合物候補の「精製」を進めるには、分離度を多少犠牲にしても、大量の試料導入が可能で「分画」に特化したクロマトグラフィー系が必要と思われる。もしくは、LC 装置での分離系の前段階で、目的物より遥かに大量に存在する他の生体分子種量をかなり減らしておく (粗精製) 必要がある。もし、目的物が不安定な分子種であるとすると、例えばその理由が酸化反応等の場合、目的物のロスではなく減少の可能性もあり得る。この場合、抽出時~精製操作のプロセスで溶液に常に還元剤を入れておく対応で、目的化合物の単離精製が実現できる可能性がある。この実験は、本科研費期間内に実施できなかったが、引き続き実験を継続する所存である。本研究は、新規のチオール化合物の探索が目的であるが、その可能性を広げうる解析系として、「揮発性のチオール化合物の LC-MS での解析系」について、本研究と同様の誘導体化法を適用することで可能になることを実験的に示した論文が採択に至った。

(a) mass chromatogram

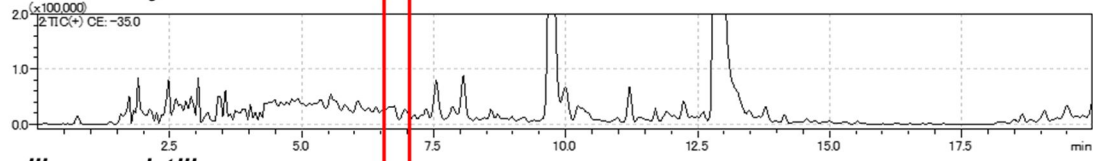
Euglena gracilis



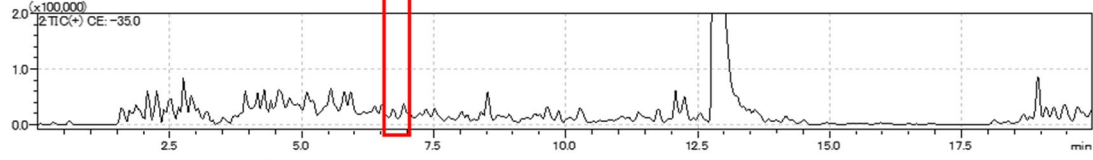
Escherichia coli



Saccharomyces cerevisiae

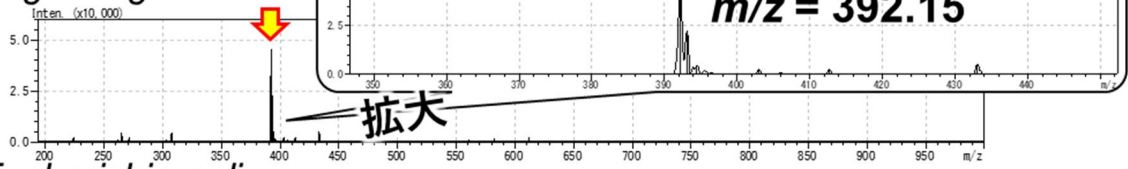


Bacillus subtilis

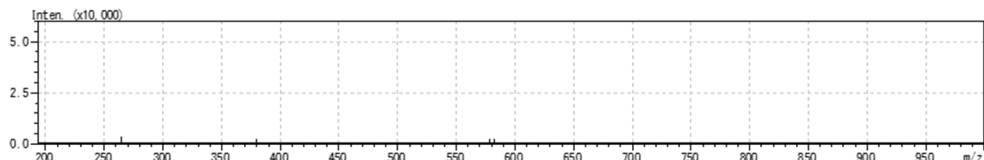


(b) mass spectrum

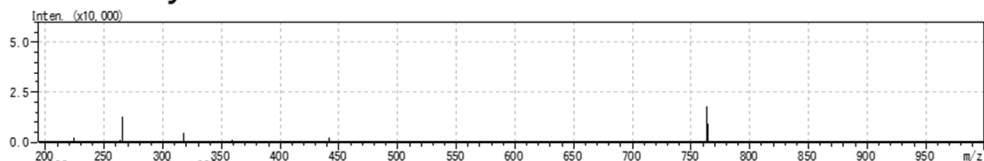
Euglena gracilis



Escherichia coli



Saccharomyces cerevisiae



Bacillus subtilis

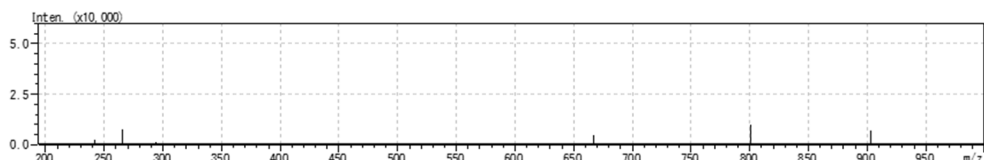


図1. 藻類ユーグレナやその他の微生物種における新規チオール化合物種の探索.

上記の生物種にて代謝物の抽出並びにモノプロモビタンによるチオールの誘導体化処理を行い、LC-MSにてプリカーサーイオンスキャン解析（プロダクトイオン $m/z=192$ を追跡）を行った。

(a); マスクロマトグラムデータ、着目したユーグレナ種に特有のピークを黄色で強調.

(b); (a) マスクロマトグラムにおける赤四角枠の時間帯のマススペクトル.

矢頭は、上記クロマトグラムにおける注目ピークの主要成分と目される.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Morigasaki Susumu, Umeyama Akinori, Kawano Yusuke, Aizawa Yasushi, Ohtsu Iwao	4. 巻 66
2. 論文標題 Defect of RNA pyrophosphohydrolase RppH enhances fermentative production of L-cysteine in <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 307 ~ 314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2323/jgam.2019.12.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawano Yusuke, Shiroyama Maeka, Kanazawa Koji, Suzuki Yasushi A., Ohtsu Iwao	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Development of high-throughput quantitative analytical method for l-cysteine-containing dipeptides by LC/MS/MS toward its fermentative production	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 AMB Express	6. 最初と最後の頁 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13568-019-0817-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 新多智明、阿閉耕平、鈴木健吾、河野祐介、大津厳生	4. 巻 20(2)
2. 論文標題 バイオテクノロジー分野における硫黄化合物の網羅的解析技術がもたらす可能性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本食品工学会誌	6. 最初と最後の頁 4-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 丸山明子、河野祐介、大津厳生、中嶋孝嗣、大津直子、川口諒太、塩塚直輝、山口千仁、Khamalath Soudthelath、一瀬智美
2. 発表標題 様々な硫黄源が植物の生育と硫黄代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 日本土壌肥科学会2020年度岡山大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒澤亮、杉本良太、今井裕恵、阿閉耕平、山田康嗣、河野祐介、大津巖生、鈴木健吾
2. 発表標題 硫黄代謝物の減少が宇宙滞在における肝障害に寄与している可能性
3. 学会等名 第10回 超異分野学会 本大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大津巖生、河野祐介、鈴木健吾
2. 発表標題 微生物の働きや酸化度の新たな評価方法: サルファーインデックス
3. 学会等名 日本薬学会第139年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Kawano, Kengo Suzuki, Iwao Ohtsu
2. 発表標題 Metabolomic analysis of biological sulfur compounds using LC-MS/MS system and its potential
3. 学会等名 Hyper Interdisciplinary Conference in Malaysia 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河野祐介、鈴木健吾、大津巖生
2. 発表標題 微生物が産生する特異な硫黄代謝物に基づくサルファーインダストリーの創出
3. 学会等名 第13回メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石口竜誠、河野祐介、大津厳生
2. 発表標題 微生物の育種によるエルゴチオネイン生産系の構築
3. 学会等名 第2回 エルゴチオネイン・セレノ研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野 祐介、大津 厳生
2. 発表標題 コーヒーの香り成分2-フランメタンチオール測定系の開発
3. 学会等名 2021年度 遺伝研究会「微生物バイオプロダクションの深化と展望」
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------