

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 4 月 27 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15758

研究課題名(和文) 硫黄選択的酸化反応および質量分析計を用いた新規含硫黄物質探索系の構築とその取得

研究課題名(英文) Establishment of screening for novel sulfur-containing metabolites by selective oxidation of sulfur atom combined liquid chromatography-mass spectrometry

研究代表者

松尾 洋孝 (Matsuo, Hirotaka)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター・研究員

研究者番号：70613694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：スルフィドを酸化する反応であるモリブデン酸化とLC/MSを組み合わせた含硫黄物質の探索系(MoS-screening)の構築に成功した。本探索系により微生物培養液をスクリーニングした結果、放線菌培養液より含硫黄物質であるkitasetalineを同定することができた。以上の結果から、MoS-screeningが含硫黄物質の探索に有効であることが示された。さらに探索を実施した結果、糸状菌培養液より2種の新規含硫黄物質の取得に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然化合物はこれまでに、医薬品として数多く利用されてきた。また、医薬品には窒素や硫黄元素を含むものが大半を占めており、そのような天然化合物を迅速に発見することは、医薬品開発において重要な要素となる。本研究では、これまで簡便な方法がなかった含硫黄天然化合物を発見する手法を確立することができた。本手法は微生物培養液ならず、植物などの他の天然資源からの探索にも応用可能であり、今後さらなる新規(新奇)な含硫黄天然化合物の発見に期待したい。

研究成果の概要(英文)：In this study, the MoS-screening that can identify sulfur compounds in microbial broth was established using molybdenum catalyzed oxidation and LC/MS. Kitasetaline, a sulfur compound produced by actinomycete, was identified by MoS-screening. This result suggested that MoS-screening is useful method for discovering sulfur compounds in microbial broths. Further investigation led to discover the two novel sulfur compounds from fungal broths.

研究分野：天然物化学

キーワード：含硫黄物質 スクリーニング 天然物 モリブデン酸化

1. 研究開始当初の背景

微生物由来天然物質は、医薬、農業、生化学分野などの様々な領域で利用されており、とりわけ医薬品のシードとして重要な資源のひとつである。特に、窒素や硫黄原子を構造内に含む天然物は強力かつ特異な作用を示すものが多く、天然物化学者たちを魅了してきた。例えば、天然物化学のルーツとも言えるフレミングが発見した青カビ由来のペニシリンは、構造内に窒素と硫黄を含んでおり、その抗菌作用は強力であり、人類の発展に大きく寄与したことは言うまでもない。また、ゲノム・疾患・医薬品データベースである KEGG MEDICUS (*Nucleic Acids Res.* 38, D355–360, 2010) に登録されている低分子医薬品 (0.1–1 kDa) における構成元素の割合を調べると、炭素、水素、酸素を基本構成元素とした場合、約 80% が含窒素医薬品、25% が含硫黄医薬品であった。つまり、含窒素あるいは含硫黄物質を選択的に取得することができれば、医薬品への応用が期待できる。

天然物に限って言えば、その構造は基本的に炭素、水素、酸素、窒素、硫黄、塩素、臭素 (稀にリン、ヨウ素、フッ素を含む) から成る。既知天然物質データベースである Dictionary of Natural Products (2017 年版) によると、炭素、水素、酸素を基本構成元素とした場合、約 27 万化合物収録されているうち含窒素物質は約 65,000 件 (24%)、含硫黄は約 9,800 件 (3.6%)、含塩素は約 5,400 件 (2%)、含臭素は約 4,000 件 (1.5%)、含リンは約 980 件 (0.4%)、含ヨウ素は 324 件 (0.1%)、含フッ素は 210 件 (0.08%) である。窒素を含む物質 (アルカロイド) の探索は容易で、古くから様々な方法が知られている。例えば、一級アミンを呈色するニンヒドリン反応 (田中治ら編 “天然物化学” 改定第 6 版 南江堂, 2002)、三級および四級アミンを呈色するドラージェンドルフ反応 (桑山健次ら, 日本法科学技術学会誌, 10 巻, 127–133, 2005) がある。質量分析では擬分子イオンピーク ($[M+H]^+$) が偶数であれば、窒素を奇数個含んでいることが分かる。しかし、窒素に次いで含有率の多い元素が硫黄であるにも関わらず、含硫黄物質を簡便に探索する方法はほとんどない。それゆえ、天然由来の含硫黄物質は積極的に探索されてこなかった。

このような背景の中、2013 年に理化学研究所と山口大学の共同研究で、質量分析装置を用いて硫黄の天然存在比を指標とする含硫黄物質の網羅的解析法「S-オミクス」が報告された (*Anal. Chem.*, 85, 1310–1315, 2013)。一般的な分解能を有する質量分析計ではこの解析は不可能であり、超高分解能質量分析装置が必須となる。しかしながら、この分析装置は非常に高価であること、熟練した技術・経験が必要であり、国内でも限られた機関のみが所有しているため、汎用性に欠けているといった問題点がある。そこで申請者は、簡便な含硫黄物質の探索系を構築することができれば、これまでに類を見ない天然由来含硫黄物質が取得できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、モリブデン酸化を用いた簡便かつ一般的な質量分析計でも対応可能な含硫黄物質の選択的探索方法を構築し、微生物由来新規含硫黄物質の取得を目的とした。

3. 研究の方法

すでに構造の分かっている数種類の天然由来含硫黄物質を含むメタノール溶液に $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 水溶液 (10 mg/mL) および 30% H_2O_2 を 10 μ L ずつ加え、モリブデン酸化を行った。未酸化用として同様のメタノール溶液に濃度が同じになるように H_2O を 20 μ L 加え、それぞれ室温で 6 時間振盪し、LC/MS で測定した。酸化後および未酸化サンプルのクロマトグラムを比較し、それぞれの物質がどのように酸化されたかを解析した。

微生物培養液を用いた新規含硫黄物質のスクリーニングでは、50% エタノールに調製された培養液を分注した 96 ウェルプレートに 2 枚作成し、片方には $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 水溶液および 30% H_2O_2 を加えた。未酸化用としてもう一方のプレートに濃度が同じになるように各ウェルに H_2O を加え、それぞれ室温で 6 時間振盪し、LC/MS で測定し、酸化後および未酸化サンプルのクロマトグラムを比較した。含硫黄物質であると推定されたピークについて、その精密質量および UV スペクトルなどの情報を天然物データベースである Dictionary of Natural Products と照合し、該当する既知物質がなかった場合、新規含硫黄物質として選定した。生産菌を適切な培地で培養し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび ODS カラムクロマトグラフィーなどにより対象とした新規含硫黄物質を単離し、NMR 等を用いて構造解析した。構造内にキラル中心を有していた場合は、適切な手法によりその立体構造までを決定した。

得られた物質は各種抗菌活性、細胞毒性を評価した。抗菌活性は、グラム陽性菌として *Bacillus subtilis* KB-211, *Kocuria rhizophila* KB-212 を、グラム陰性菌として *Escherichia coli* KB-213, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* KB-88 を、真菌として *Candida albicans* KF-1, *Mucor racemosus* KF-233 を用いた。細胞毒性試験は、ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60, ヒト T 細胞性白血病細胞 Jurkat, ヒト急性単球性白血病細胞 THP-1, ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549, ヒト膵臓腺癌 PANC-1, ヒト子宮頸部類上皮癌細胞 HeLa S3, ヒト結腸腺癌細胞 HT29, ヒト肺腺癌細胞 H1299 を用いた。

4. 研究成果

Fig. 1 に示した硫黄原子の架橋構造を有する outovirin A, スルフィド構造を有する nanaomycin K および *N*-アセチルシステインを有する lactacystin をそれぞれモリブデン酸化した。未酸化サ

サンプルと比較した結果の LC/MS クロマトグラムを Fig. 2 に示した。Ootovirin A ($m/z = 481$, 13.44 min) は、酸化により完全にピークが消失し (Fig. 2A-i), 酸化後クロマトグラム上で酸素原子が 1 つ付加したピーク ($m/z = 497$, 12.55 min) として出現した (Fig. 2A-ii)。Nanaomycin K ($m/z = 548$, 13.38 min) もまた、酸化により完全にピークが消失し (Fig. 2B-i), 酸化後クロマトグラム上で酸素原子が 2 つ付加したピーク ($m/z = 580$, 12.08 min) として出現した (Fig. 2B-ii)。一方、lactacystin は酸化後クロマトグラム上で全くピークが検出されなかったため、酸化反応により分解したものと考えた。以上の結果から、天然物を用いた場合には、酸化反応に耐えうる含硫黄物質は、スルフィニルあるいはスルフォニル体として同定できることが分かった。

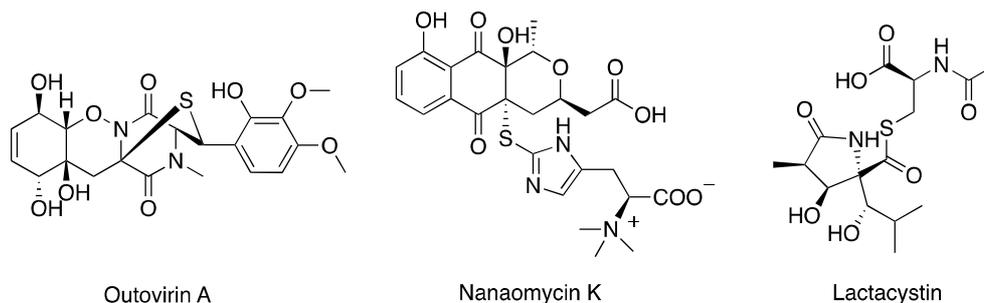


Fig. 1 酸化反応に用いた天然由来含硫黄物質の構造

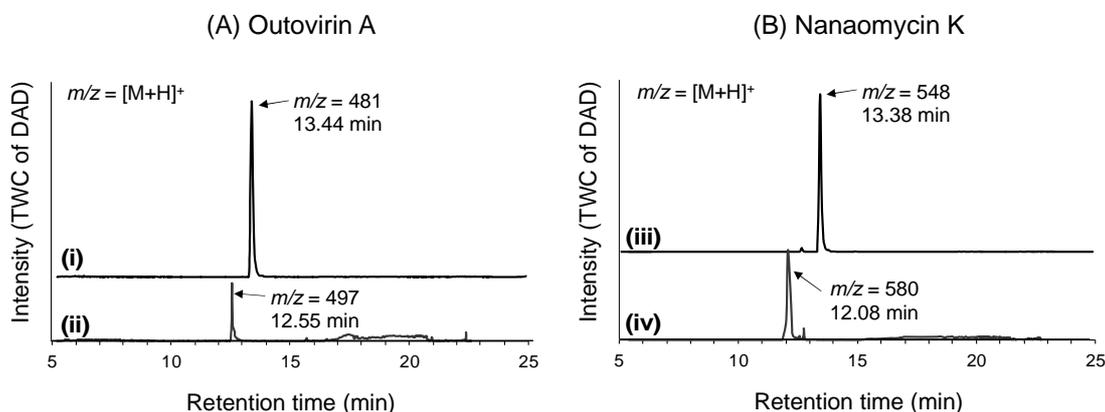


Fig. 2 Ootovirin A および nanaomycin K の酸化後および未酸化サンプルの LC/MS クロマトグラムの比較図

次に、これらの含硫黄物質が混合物中でも同定できるのかどうかを検討した (Fig. 3)。硫黄非含有物質として tanzawaic acid B (peak 1 and 1'), beauvericin (peak 2 and 2'), SF-227 (peak 3), acremoline B (peak 4 and 4')を用い、含硫黄物質として ootovirin A (peak 5) および nanaomycin K (peak 6) を用いた。それぞれ 1 mg を含んだメタノール溶液 1 mL を、酸化用および未酸化用として 100 μ L ずつ分注し、片方はモリブデン酸化し、もう片方は濃度を合わせるために H₂O を加えて 6 時間室温で反応後、LC/MS で測定した。酸化後クロマトグラム上では (Fig. 3B), その保持時間、UV スペクトルおよび m/z 値から、peak 1' (11.56 min), peak 2' (11.16 min) および peak 4' (7.10 min) をそれぞれ tanzawaic acid B, beauvericin および acremoline B と同定した。Peak 5 (6.52 min) および peak 6 (6.45 min) は、酸化後クロマトグラム上では消失しており、新たに peak 5a (5.72 min), peak 6a (5.62 min) および peak 6b (6.21 min) が出現した。Peak 6a および peak 6b はそれぞれ、 $m/z = 564$ および 580 $[M+H]^+$ に擬分子イオンピークを示し、peak 6 と同様の UV スペクトルを示した。また、peak 5a は $m/z = 497$ $[M+H]^+$ に擬分子イオンピークを示し、peak 5 と同様の UV スペクトルを示した。以上のことから、peak 5a, peak 6a および peak 6b はそれぞれ、スルフィニル ootovirin A, スルフィニル nanaomycin K およびスルフォニル nanaomycin K と同定した。Peak 3 (SF-227) の酸化体 ($m/z = 297$) は酸化後クロマトグラム上で検出されなかったため、モリブデン酸化により分解したと考えられた。Ootovirin A (peak 5) とスルフィニル ootovirin A (peak 5a) のように、UV スペクトルにはほとんど変化がないため、同定は容易であった。以上の結果から、混合物中の含硫黄物質はモリブデン酸化により、スルフィニル体、スルフォニル体あるいは両方の酸化体としてオリジナルのピーク付近に検出されることが明らかになり、混合物中における含硫黄物質の同定が可能であることが示唆された。本探索系をモリブデン (Mo) 酸化を用いた硫黄 (S) 物質の探索系にちなみ、MoS-screening と名付けた。

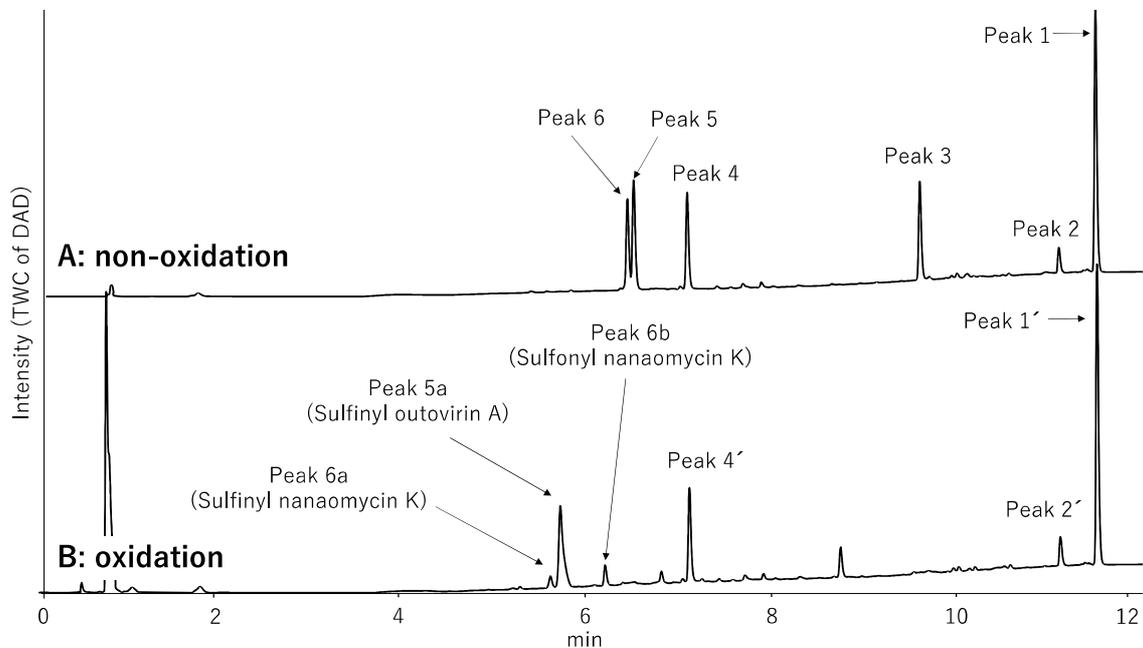


Fig. 3 各物質の混合溶液中における酸化後および未酸化サンプルのLC/MS クロマトグラム比較

最終的に, MoS-screening を用いて微生物培養液中から含硫黄物質の探索を行なった. 放線菌および糸状菌それぞれ 150 株の培養液 (50% エタノールブロス) を 96 well plate に分注し, 同様のプレート を 2 枚作成した. 1 枚目はモリブデン酸化用の試薬を添加し, 2 枚目 (未酸化用 plate) には濃度調整のため H_2O を加えた. 室温で 6 時間, プレートシェーカーで振盪後, 各サンプルを LC/MS で分析した. 解析の結果, 放線菌 *Kitasatospora setae* KM-6054^T 株が生産する物質を含硫黄物質と推定した. 本物質は, $m/z = 402.1103 [M+H]^+$ に擬分子イオンピークを示し, 分子式は $C_{19}H_{20}N_3O_5S$ (calculated value for m/z 402.1124) と推定され, 214, 242, 276, 310, 384 nm に特徴的な UV 極大吸収を示す物質であった. これらの物理化学的性状を天然物データベース Dictionary of Natural Products (DNP) で検索した結果 *kitasetaline* (*J. Biosci. Bioeng.* 114, 56–58, 2012) と良く一致した. *Kitasetaline* は, 2012 年に放線菌 *Kitasatospora setae* NBRC 14216^T 株から単離された β -carboline 物質である. 各種物理化学的性状と生産菌が一致していることから, 本物質を *kitasetaline* と同定した. *Kitasetaline* は, 構造内に *N*-アセチルシステインを有しており, モリブデン酸化によってスルフィドがスルホンへと酸化され, 酸化後のクロマトグラム上で $m/z = 434.1018 [M+H]^+$ (酸素 2 つ分が増加した質量) を示すピークとして出現したと考えられる. 以上のように, 微生物培養液中の含硫黄物質の同定に成功し, MoS-screening が含硫黄物質の探索に有効であることが示された. さらなる探索の結果, *Trichoderma polypori* FKI-7382 株および *Leptobacillum leptobactrum* FKI-7961 株が生産する物質を新規含硫黄物質と推定した.

Trichoderma polypori FKI-7382 株が生産する FKI-7382A および B 物質は, それぞれ UV 極大吸収 233 nm, $m/z = 372.1835 [M+H]^+$ ($C_{18}H_{29}NO_5S$) および UV 極大吸収 232 nm, $m/z = 372.1837 [M+H]^+$ ($C_{18}H_{29}NO_5S$) を示し, UV スペクトルが似ていることから, FKI-7382A および B 物質は類縁体の関係にあると推定された. DNP 検索の結果, これら物理化学的性状と一致する既知物質はなく, 新規含硫黄物質と推定された. そこで, FKI-7382 株を大量培養後, 各種カラムクロマトグラフィーにより精製した結果, FKI-7382A および B 物質をそれぞれ 15.4 mg, 6.3 mg 取得した. NMR 解析の結果, FKI-7382A および B 物質は互いに立体異性体の関係にあることが分かり, *N*-アセチルシステインを部分構造に有する新規含硫黄物質であることが明らかとなった (Fig. 4). 生産菌の種名および部分構造から thioporidiol A および B と命名した.

Thioporidiol A および B は, 1,2-ジオール部位および *N*-アセチルシステイン部位にキラル中心を有するため, 立体構造の検討を行った. 1,2-ジオール部位の相対立体構造は, Freire らの報告 (*J. Org. Chem.*, 72, 2297–2301, 2007) を参考に, thioporidiol A のアルファ-メトキシ-アルファ-(トリフルオロメチル)フェニル酢酸 (MPA) ジエステルを調製し, 25°C およびマイナス 30°C の 1H -NMR ケミカルシフトの差から Fig. 4 のように決定した. また, thioporidiol A をラネーニッケルにより脱硫し, 加水分解により生じたアラニンに FDLA を修飾後, 改良マーフィー法を適用することにより *N*-アセチルシステイン部分の絶対構造を決定した. 取得量の少なかった thioporidiol B は立体構造を決定することができなかった.

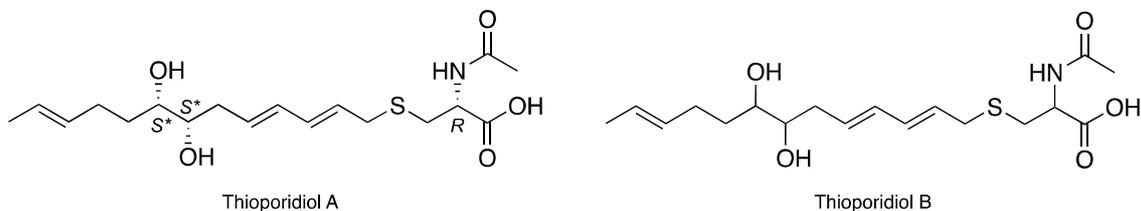


Fig. 4 Thioporiol A および B の構造

Thioporiol A および B の抗菌活性、細胞毒性を評価した結果、thioporiol B が *Candida albicans* に対して抗菌活性を示した。6 mm ペーパーディスクを用い、30 μg の thioporiol B を用いたとき、8 mm の阻止円を形成した。

糸状菌由来の二次代謝産物で、*N*-アセチルシステインを部分構造に有する物質の報告は、DNP で調べた限り、存在しない。放線菌では、*N*-アセチルシステインを部分構造に有する物質の報告は比較的多く、nanaomycin H (*J. Biosci. Bioeng.* 123, 765–770, 2017) のように、マイコチオールの一部として存在している。マイコチオールは、多くのアクチノバクテリアが生産していることが知られており、酸化ストレスに対する耐性に関与していると考えられている。糸状菌でも、*N*-アセチルシステインによるそのような作用を有することが考えられるが、その由来や役割などはまだ分かっておらず、今後の解明が期待される。

Leptobacillum leptobactrum FKI-7961 株が生産する FKI-7961A 物質は、UV 極大吸収 233 nm, $m/z = 513.1313$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ ($\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}$) を示し、DNP 検索の結果、これらと一致する既知物質はなく、新規含硫黄物質と推定された。そこで、FKI-7961 株を大量培養後、各種カラムクロマトグラフィーにより精製し FKI-7961A 物質を 6.3 mg 取得した。NMR 解析の結果、シスタチオンを部分構造に有する新規含硫黄物質であることが明らかとなり、生産菌の属名および部分構造から leptothionine と命名した。

Leptothionine は、シスタチオン部位に 2 つのキラル中心を有するため、絶対立体構造の検討を行った。Leptothionine を加水分解後、生じたシスタチオンをラネーニッケルにより脱硫し、アラニンと 2-アミノ酪酸の混合物を得た。次に、混合物を FDLA で修飾し、D, L-アラニンと D, L-2-アミノ酪酸の標品もそれぞれ FDLA 修飾し、改良マーフィー法にて leptothionine 由来のアラニンと 2-アミノ酪酸の立体構造を検討した。その結果、leptothionine 由来の各アミノ酸は L-アラニンおよび L-2-アミノ酪酸であることが明らかとなったため、leptothionine の絶対構造を Fig. 5 のように決定した。

Leptothionine の抗菌活性、細胞毒性を評価した結果、6 種の癌細胞、HL-60, THP-1, HeLa S3, A549, Panc1, HT-29, H1299 に対し、それぞれ IC_{50} 18.1 \pm 5.3, 4.1 \pm 0.4, 33.0 \pm 4.8, 76.7 \pm 8.5, 52.6 \pm 5.3, 71.1 \pm 8.2, 87.7 \pm 6.9 μM で毒性を示した。

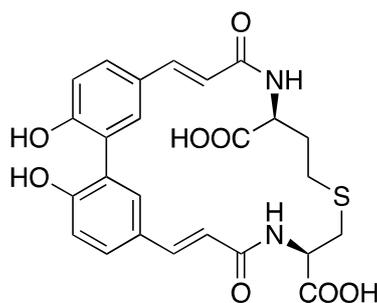


Fig. 5 Leptothionine の構造

シスタチオンは、メチオニンからシステインが生合成される際の間体として知られている。これまでに、シスタチオンを含む天然物の報告は 1974 年に報告されたエゾマイシン類のみである (*Arg. Biol. Chem.* 38, 1883–1890, 1974)。したがって、シスタチオンを含む天然物の発見は、実に 35 年振りとなった。このように、MoS-screening により発見された thioporiol A や leptothionine は、非常にユニークな新規含硫黄物質であった。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Hiroataka Matsuo, Yu Hanamure, Rei Miyano, Yoko Takahashi, Satoshi Omura, Takuji Nakashima	4. 巻 25
2. 論文標題 Screening for Sulfur Compounds by Molybdenum-Catalyzed Oxidation Combined with Liquid Chromatography-Mass Spectrometry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules25020240	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 該当する

1. 著者名 Hiroataka Matsuo, Yoshihiko Noguchi, Rei Miyano, Mayuka Higo, Kenichi Nonaka, Toshiaki Sunazuka, Yoko Takahashi, Satoshi Omura and Takuji Nakashima	4. 巻 9
2. 論文標題 Thioporiols A and B: Two New Sulfur Compounds Discovered by Molybdenum-Catalyzed Oxidation Screening from <i>Trichoderma polypori</i> FKI-7382	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antibiotics9050236	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroataka Matsuo, Yu Hanamure, Rei Miyano, Yoko Takahashi, Satoshi Omura, Takuji Nakashima
2. 発表標題 The search for novel sulfur compounds using molybdenum-catalyzed oxidation with liquid chromatography-mass spectrometry
3. 学会等名 3rd International Conference on Natural Products Discovery & Development in the Genomic Era（国際学会）
4. 発表年 2020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
研究協力者	野中 健一 (Nonaka Kenichi)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	松本 厚子 (Matsumoto Atsuko)		
研究協力者	野口 吉彦 (Yoshihiko Noguchi)		
研究協力者	廣瀬 友靖 (Hirose Tomoyasu)		
研究協力者	砂塚 敏明 (Sunazuka Toshiaki)		

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