

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21256

研究課題名(和文) 活性イオウ化イミダゾール-メタボロミクスの開発；レドックスバイオロジーの新展開

研究課題名(英文) Development of reactive sulfurized imidazole - metabolomics; New phases in Redox Biology.

研究代表者

居原 秀 (Ihara, Hideshi)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60254447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：試験管内で活性イオウ分子種、チオール化合物、カルノシンを反応させると、様々なイオウ含有カルノシン誘導体が産生された。LC-MS/MS解析で、ラットの脳中に新規に2-システイニル-カルノシン[Cys-Car]、2-システイニル-カルノシンパルスルフィド[CysSS-Car]、2-グルタチオニル-カルノシン[GS-Car]が同定された。GS-Carは、前駆体カルノシンの1/1000、酸化体である2-オキソカルノシンの10倍存在し、加齢に伴い減少していた。さらに、CysS-Car、CysSS-Car、GS-Carの抗酸化活性は、前駆体であるカルノシンよりも100倍以上高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内には様々な代謝物が存在しているが、すべてが同定されているわけではない。レドックス活性を持つ代謝物は、不安定なため解析が困難で、生体内での存在様式、動態など不明な点が多い。しかし、レドックス代謝物は、近年急速に進歩しつつあるレドックスバイオロジー分野において新たな知見を提供し、生物学の発展に大きく貢献するブレークスルーになると期待されている。本研究では、従来から生理活性が注目されている「イオウ」と「イミダゾール化合物」に着目し、レドックス活性を持つ新規の抗酸化物質を同定している。この発見は、動物の酸化ストレス耐性メカニズムの解明につながり、人類の健康増進、疾病予防に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：In vitro reaction of reactive sulfur species, thiol-compounds, and carnosine produced a variety of sulfur-containing carnosine derivatives. LC-MS/MS analysis identified novel 2-cysteinyln-carnosine [CysS-Car], 2-cysteinyln-carnosine persulfide [CysSS-Car] and 2-glutathionyl-carnosine [GS-Car] in rat brain. GS-Car was 1/1000 of the precursor carnosine and 10 times more abundant than the oxidized form, 2-oxocarnosine, and decreased with aging. Furthermore, the antioxidant activities of CysS-Car, CysSS-Car, and GS-Car were 100-fold higher than that of the precursor carnosine.

研究分野：レドックスバイオロジー

キーワード：イミダゾールジペプチド 活性イオウ 活性イオウ化イミダゾール

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内には様々な代謝物(メタボライト)が存在しているが、すべてが同定されているわけではない。レドックス活性を持つ代謝物「レドックスメタボライト」は、不安定なため同定、定量が困難で、生体内での存在様式、動態など不明な点が多い。レドックスメタボライトの網羅的解析(レドックスメタボロミクス)は、近年急速に進歩しつつあるレドックスバイオロジー分野において新たな知見を提供し、生物学の発展に大きく貢献するブレークスルーになると期待されている。

応募者は、質量分析法を基盤としたレドックスメタボライト解析法を確立し、様々な生理・病理機能を明らかにしてきた(Nat Chem Biol 2007, 2012, JBC 2010, 2018, PNAS 2014, Nat Commun 2017, 2021, Redox Biology 2019, Cell Chem Biol 2019)。これまでに、グアニン 8 位がニトロ化された環状ヌクレオチド「8-ニトロ-cGMP」(Nat Chem Biol 2007, 2012 等)、システインチオール基に過剰にイオウが付加したシステインパーサルファイドなどの「活性イオウ分子種:RSS」(PNAS 2014, Nat Commun 2017, 2021 Redox Biology 2019, Cell Chem Biol 2019 等)や、カルノシンやアンセリンなどのイミダゾールジペプチドに含まれるイミダゾール基 2 位が酸化された「2-オキシイミダゾール」(JBC 2019 等)を同定している。しかし、これらのレドックスメタボライトは、ごく一部であり、生体内には、未同定のレドックスメタボライトが多数存在していると考えられ、本研究で着目する「活性イオウ化イミダゾール:RS-IDPs」に関する知見は皆無であった。

2. 研究の目的

本研究では、イミダゾール基 2 位にイオウが付加した新規レドックスメタボライトである「活性イオウ化イミダゾール:RS-IDPs」に注目した。RS-IDPs は、その構造や、活性イオウとイミダゾールの組み合わせなどから、これまで見出してきたレドックスメタボライトとは異なる特徴・性質を持つことが期待される。網羅的かつ定量的に解析するためには、安定同位体化合物も含む標準物質のケミカルライブラリーを作製し、高速液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析装置(LC-MS/MS)を用いた測定条件の決定、生体内のRS-IDPsの存在様式、動態を明らかにする必要がある。本研究では、新規アルキル化剤など新たな試薬や技術を導入し、RS-IDPs-レドックスメタボライトの網羅的かつ定量的解析方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

酸化型RS-IDPsの解析は、以下のように行った。イミダゾールジペプチドであるカルノシンを臭素と反応させイミダゾール基 2 位を活性化した後、グルタチオン、二硫化水素と反応させ、反応生成物をLC-MS/MSを用いて解析した。また、試験管内合成の確認されたRS-IDPsについて、多重反応モニタリング(MRM)法パラメーターを決定した。

ラット臓器（脳、腎臓、骨格筋）からの RS-IDPs の検出を試みた。生体内産生が認められた RS-IDPs について安定同位体標識標準物質を調製した後、安定同位体希釈法による絶対定量系を用いて、RS-IDPs のラット生体内産生を解析した。

また、生体内生成の確認された RS-IDPs の抗酸化活性を 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical antioxidant assay (DPPH assay) を用いて解析した。

不安定な還元型 RS-IDPs を解析するために、末端 SH 基を標識、保護し、活性イオウ構造を安定化させるアルキル化剤「N-ヨードアセチルチロシンメチルエステル：TME-IAM」を開発した。TME-IAM を用いて、還元型 RS-IDPs 付加体の調製を試みた。試験管内で活性イオウ分子、酸化型硫黄化カルノシンを反応させた後、TME-IAM を用いて還元型末端構造の標識・安定化を行い、LC-MS/MS で解析を行った。

4. 研究成果

(1) 酸化型 RS-IDPs の合成

RSS とカルノシンの反応生成物について LC-MS/MS を用いて解析した結果、RS-IDPs と推定される 6 種の物質（2-L-cysteinyln carnosine [CysS-Car]、2-L-cysteinyln carnosine persulfide [CysSS-Car]、2-L-cysteinyln carnosine trisulfide [CysSSS-Car]、2-L-glutathionyl carnosine [GS-Car]、2-L-glutathionyl carnosine persulfide [GSS-Car]、2-L-glutathionyl carnosine trisulfide [GSSS-Car]）の生成を確認した（図 1）。さらに各化合物について、最適 MRM パラメーターを決定し、以下の分析を行った。

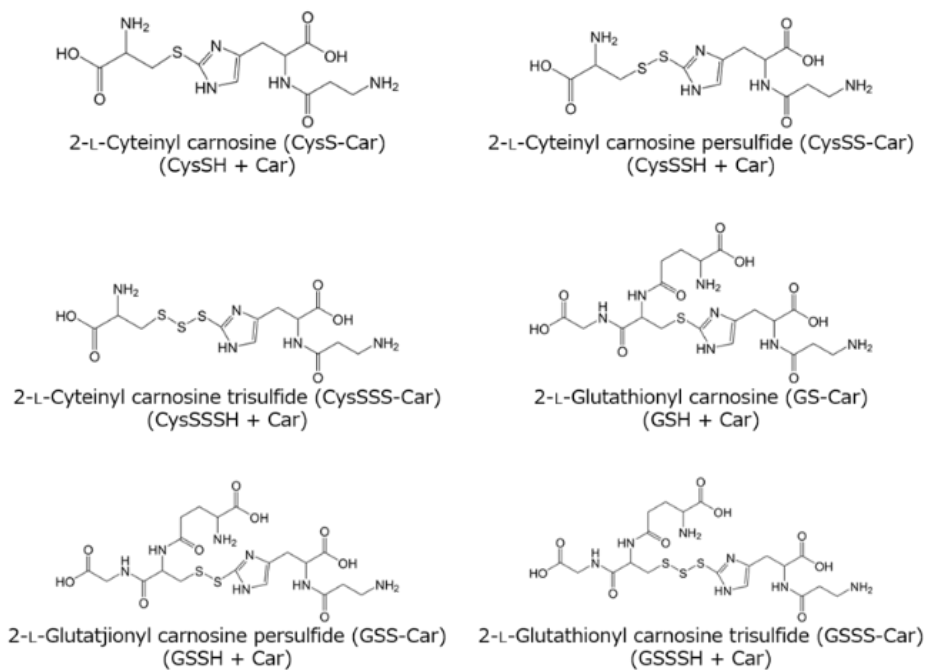


図 1 RS-IDPs の構造

(2) 酸化型 RS-IDPs の生体内産生

ラット脳から 6 種類の RS-IDPs の内、CysS-Car、CysSS-Car、GS-Car を検出した (図 2)。しかし、CysSSS-Car、GSS-Car、GSSS-Car は検出されなかった。また、筋肉、腎臓からはいずれの RS-IDPs も検出されなかった。安定同位体希釈法による絶対的定量解析の結果、ラット脳内 GS-Car は 1-3pmol/mg protein オーダーで検出され、前駆体であるカルノシンの約 1/1000、カルノシンの酸化体である 2-oxo-carnosine の約 10 倍存在していることが明らかとなった。

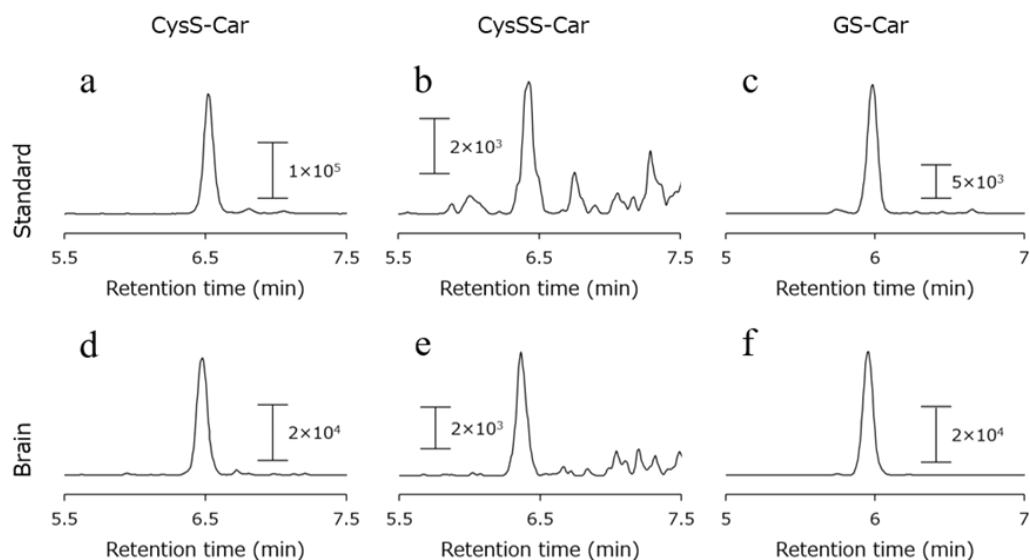


図 2 ラット脳における RS-IDPs の検出

a-c : 標準物質、d-f : 脳抽出液

また、加齢に伴うラットメス脳内の GS-Car の含有量の変化を、安定同位体希釈法を用いて定量的に解析した結果、3 ヶ月齢のラット脳内で最も高く、9 ヶ月齢では約 1/3 に減少し、13 ヶ月齢でさらなる減少は認められなかった (図 3)。また、9 ヶ月齢のオス脳内の GS-Car 量は、雌と比較して有意な差はなかった。このような加齢による含有量の減少は、カルノシン、アンセリン、ホモカルノシンなどの IDPs、IDPs の構成アミノ酸である β -アラニンや γ -アミノ酪酸、カルノシンの酸化体である 2-オキソ-カルノシンでは認められなかった (data not shown)。

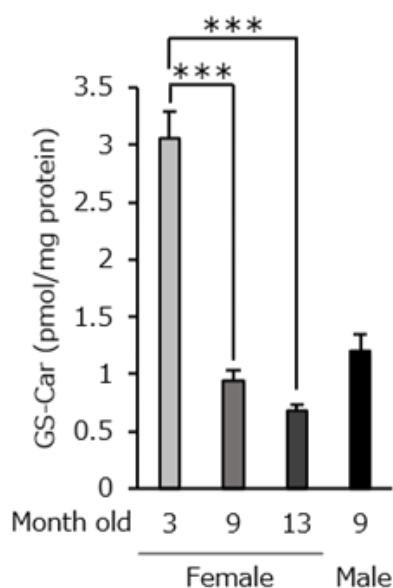


図 3 加齢に伴う GS-Car の変化

(3) 酸化型 RS-IDPs の抗酸化活性

CysS-Car、CysSS-Car、GS-Car の抗酸化活性を DPPH assay で評価した。CysS-Car、CysSS-Car、GS-Car はいずれも前駆体であるカルノシンよりも高い抗酸化活性を示し、それぞれ、カルノシンの 189 倍、267 倍、575 倍であった。一方、2-オキソ-カルノシン (600 nmol TE / μmol) よりも、有意に低い抗酸化活性を示し、それぞれ 2-オキソ-カルノシンの 1/18、1/13、1/6 であった (data not shown)。

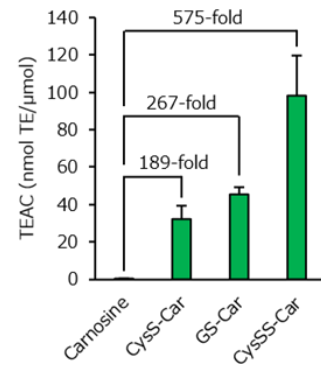


図 4 CysS-Car、CysSS-Car、GS-Car の抗酸化活性

(4) 末端 SH 基を標識、保護し、活性イオウ構造を安定化させるアルキル化剤「N-ヨードアセチルチロシンメチルエステル：TME-IAM」を開発した (図 5)。TME-IAM を用いて、還元型 RS-IDPs 付加体の調製を試みた。試験管内で活性イオウ分子、酸化型硫黄化カルノシンを反応させた後、TME-IAM を用いて還元型末端構造の標識・安定化を行い、LC-MS/MS で解析を行ったところ、メルカプトカルノシンの TME-IAM 付加体 (Car-S-AM-TME) は検出されたが、さらに硫黄が過付加した活性イオウ化カルノシンの TME-IAM 付加体 (Car-Sn-AM-TME) は検出されなかった (data not shown)。

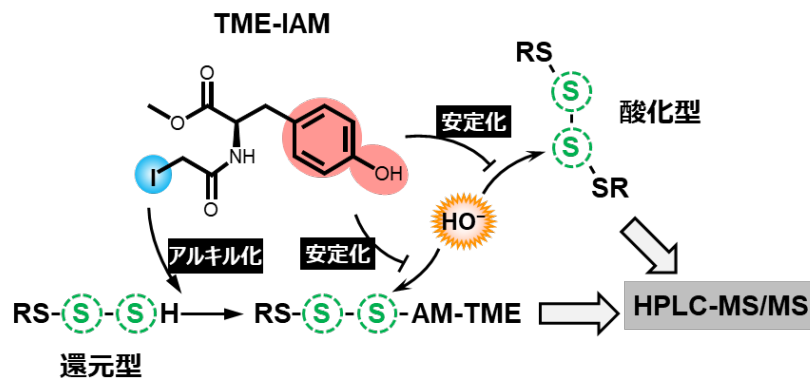


図 5 活性イオウ解析に特化したアルキル化試薬

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Kasamatsu Shingo, Ida Tomoaki, Koga Taisei, Asada Kosho, Motohashi Hozumi, Ihara Hideshi, Akaike Takaaki	4. 巻 -
2. 論文標題 High-Precision Sulfur Metabolomics Innovated by a New Specific Probe for Trapping Reactive Sulfur Species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants & Redox Signaling	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ars.2020.8073	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 Kasamatsu Shingo, Kakihana Yuki, Koga Taisei, Yoshioka Hisashi, Ihara Hideshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Generation of Rat Monoclonal Antibody to Detect Hydrogen Sulfide and Polysulfides in Biological Samples	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1160 ~ 1160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox9111160	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 Kakihana Yuki, Kasamatsu Shingo, Uchida Koji, Ihara Hideshi	4. 巻 55
2. 論文標題 Distribution and quantitative analysis of homoanserine and its 2-oxo derivative in mouse tissues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 579 ~ 588
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10715762.2021.1888945	査読の有無 有
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6件（うち招待講演 5件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 居原秀
2. 発表標題 2-オキソ-イミダゾールジペプチドは内在性の強力な抗酸化物質である
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 居原秀
2. 発表標題 硫黄メタボローム解析の先端技術開発
3. 学会等名 第20回日本NO学会/第73回日本酸化ストレス学会合同学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 居原秀
2. 発表標題 活性硫黄による親電子ストレス制御
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 居原秀
2. 発表標題 硫黄解析の先端技術開発
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 居原秀
2. 発表標題 超硫黄分子メタボロミクス
3. 学会等名 第1回レドックスR&D戦略委員会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 居原秀
2. 発表標題 2-オキソ-イミダゾールジペプチドの抗酸化活性
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 垣花優希、笠松真吾、居原秀 内田浩二 編集	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 242
3. 書名 食と健康を結ぶメディカルサイエンス	

〔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
---------	---------