

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：24405

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19159

研究課題名（和文）食品に含まれる新規活性硫黄分子探索法の開発

研究課題名（英文）Development of a method for searching novel reactive sulfur species in foods

研究代表者

居原 秀（Ihara, Hideshi）

大阪公立大学・大学院理学研究科・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）：近年、高等動物において活性硫黄分子（RSS）の生物学的重要性が明らかになってきている。硫黄、RSSの供給源は食品なので、食品中のRSSの存在様式を科学的に評価することが重要である。しかし食品中RSSの検出方法が確立されていないため、大部分が不明である。本申請研究では、応募者が開発したRSS解析に特化した新規標識試薬TME-IAMを用いたアルキル化剤補足法を改良し、食品に含まれる未知RSSを網羅的に探索する方法を確立することを目的とした。その結果、ブロッコリースプラウト中に既知のRSS以外の新規分子を多数同定できた。種子、発芽2日目、5日目で新規RSSの種類、量ともに増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに食品中に含まれるRSSに関する知見はほとんどなかった。本申請研究では、応募者が開発した技術を駆使し、新規RSSを網羅的に解析する方法を確立した。本申請研究で得られる知見は、RSSを基軸としたレドックスバイオロジー分野の発展に貢献し、さらに従来の食品科学分野にRSSという新たな概念を導入するブレークスルーとなり、学術体系を変換・転換させ、食品科学を飛躍的に発展させる潜在性を有すると考えられる。本申請研究で確立した食品中RSSの網羅的同定法は、今後新たな食品評価、機能性評価を可能にすることで将来の食品業界の発展に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In recent years, the biological significance of reactive sulfur species (RSS) in higher animals has become apparent. Since food is the source of sulfur and RSS, it is important to scientifically evaluate the pattern of distribution of RSS in food. However, the detection methods for RSS in food have not been established, and are largely unidentified. The aim of this study was to establish a method to comprehensively search for unidentified RSS in foods by improving the alkylating agent capture method using TME-IAM, a novel labeling reagent developed by the applicant specifically for RSS analysis. As a result, several novel molecules other than known RSS were identified in broccoli sprouts. Their distribution patterns differed from foods, and from growth stages.

研究分野：レドックスバイオロジー

キーワード：活性硫黄分子 アルキル化剤補足法 TME-IAM HPLC-MSMS

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通) 萌芽

1. 研究開始当初の背景

古くからニンニクなどの含硫食品には、様々な薬理効果があることが知られているが、薬理効果の活性本体、作用機構に関しては不明な点が多い。応募者らは、不安定で活性な硫黄化合物（活性硫黄分子：RSS）を同定し、高等動物における硫黄に依存したエネルギー代謝（硫黄呼吸）が行われていることを明らかにした。さらに RSS が、抗酸化作用、レドックスシグナル制御、ミトコンドリア品質管理、疾患の発症、予防などに関与していることを示してきた（PNAS 2014、Nat Commun 2017、2021）。

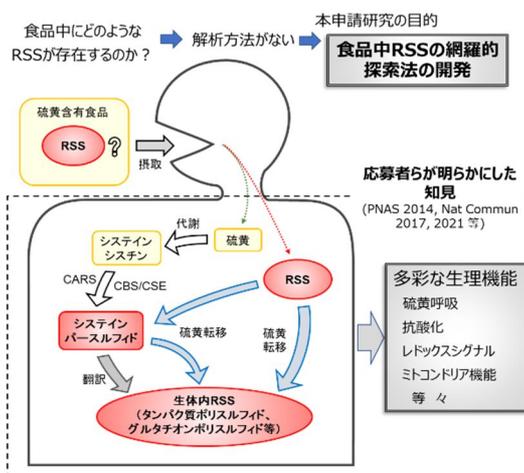


図1 高等動物におけるRSSの代謝、生理機能調節

高等動物において硫黄、RSSの供給源は食品なので、食品中のRSSの存在様式を科学的に評価することが重要である。しかし、食品中には従来の方法では解析が困難な、不安定な未知の硫黄化合物が多数存在する。食品中の不安定な硫黄化合物の存在様式を明らかにすることは、食品科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る。

2. 研究の目的

RSS（特に還元型RSS）は、不安定であるため検出が困難であったが、応募者はアルキル化剤でRSSを標識・安定化し、高速液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析装置（HPLC-MSMS）を用いて定量的に解析する方法（アルキル化剤補足法）を確立した（PNAS 2014、Nat Commun 2017、Redox Biol 2019）。また最近、RSS解析に特化した新規アルキル化剤（N-iodoacetyl L-tyrosine methyl ester：TME-IAM、図2）を開発した

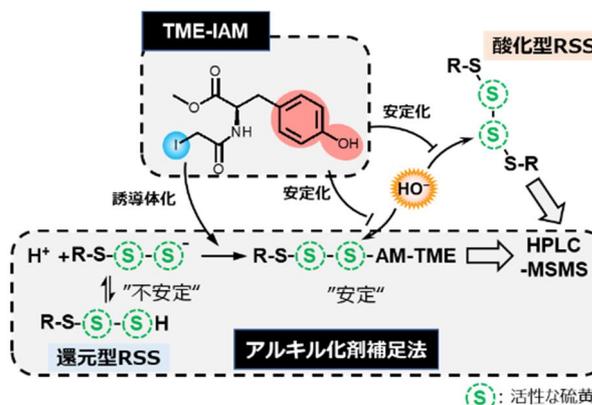


図2 TME-IAMを用いたアルキル化剤補足法によるRSSの定量

（Antioxid Redox Signal 2021、特許第 7233666 号）。TME-IAM を用いることにより、RSS を分解せず、標識・安定化して解析することが可能となった。

本申請研究では、TME-IAM を用いたアルキル化剤補足法を応用し、食品中に含まれる未知RSSの網羅的探索法を確立することを目的としている。

3. 研究の方法

還元型RSSの探索は、図3に示す方法で行う。Step 1 標識 TME-IAM を用いて中性条件で抽出と同時にRSSの標識・安定化を行う。なお、TME-IAM を用いることで、RSS構造の分解を抑制し、抽出過程におけるRSSの分解を抑制する。Step 2 で標識した抽出液の一部に、還元剤を加えてRSSを分解する。Step 3 前述した2つのサンプルをHPLC-MS/MSに供し多重反応モ

ニタリング (MRM) 法により解析する。プレカーサーイオンを1マスずつずらし、衝突誘起解離によりプロダクトイオンに分解する。このプロダクトイオンの段階で、TME 由来のシグナルが検出されるように設定する。両サンプルの分析結果を比較して、還元剤処理により消失するシグナルを、RSS 分子候補とする。Step 安定同位体標識 TME-IAM を用いた確認 IAM を安定同位体標識した TME-IAM を用いて、で確認したシグナルの成分が、TME-IAM に由来するシグナルかを確認する。安定同位体標識 TME-IAM を用いて、と同様の処理を行い、分子量が増加するかを確認する。

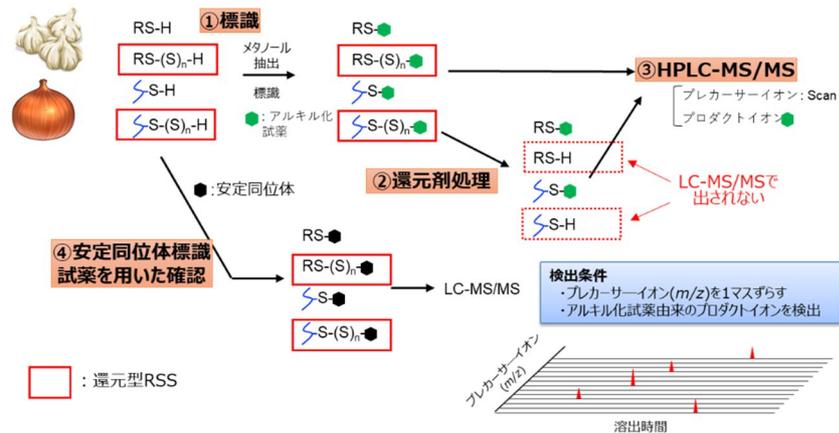


図3 食品中の未知RSSの網羅的探索法の概略

4. 研究成果

TME-IAM で誘導体化した既知 RSS 標準品 (システイン、グルタチオン、システインパースルフィド、グルタチオンパースルフィドなど) について LC-MS/MS を用いて解析することで誘導体に共通する TME-IAM 構造に由来するフラグメントイオン $m/z = 136$ を見出した (図4)。モデル化合物として、グルタチオンおよびグルタチオンパースルフィドを用いて検証したところ、グルタチオンおよびグルタチオンパースルフィドの誘導体ともにフラグメントイオン $m/z = 136$ で検出された。一方

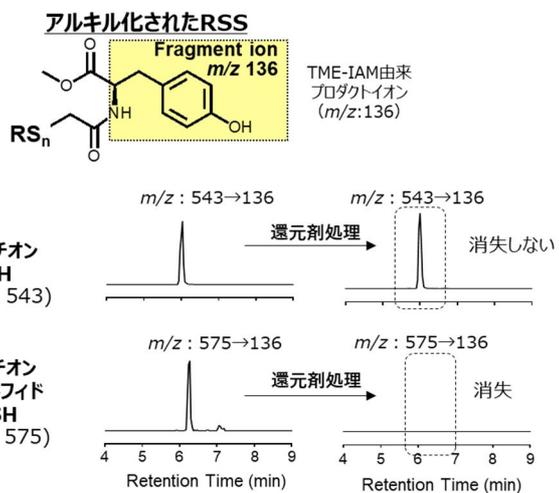


図4 HPLC-MSMSによるRSSの検出

で、還元剤処理サンプルでは、通常のグルタチオン誘導体においては還元剤未処理サンプルと同程度の強度で誘導体が検出されたが、RSS であるグルタチオンパースルフィド誘導体においてはピークの消失が確認された (図4)。以上の結果から、本法が RSS の特異的検出に利用できることが示された。

実際に本法を用いて、ブロッコリースプラウト (種子、発芽2, 5日目) に存在する RSS を解析した結果を図5に示す。種子においてみられた新規 RSS シグナルの数は5つであった。また、既知の超硫黄分子であるシステインパースルフィド (CysS2H)、システイントリスルフィド (CysS3H)、グルタチオンパースルフィド (GS2H)、グルタチオントリスルフィド (GS3H)、グルタチオンテトラスルフィド (GS4H) のシグナルも検出された。発芽2日目では、種子より7個多く合計14つの新規 RSS が検出された。新規 RSS シグナル強度は、種子と比較して増加していた。既知 RSS である、CysS2H、CysS3H、システイントリスルフィド (CysS4H)、GS2H、GS3H、

GS4H のシグナルも検出された。これらの既知 RSS のシグナル強度は種子と比較して増加していた。発芽 5 日目では、発芽 2 日目より 19 個多く合計 33 個の新規 RSS が検出できた。これらの新規 RSS シグナル強度は発芽 2 日目と比較して、ほとんどが増加していた。既知超硫黄分子である、CysS2H、CysS3H、CysS4H、GS2H、GS3H、GS4H のシグナルも検出された。

本法を用いることで、食品中の不安定な硫黄化合物の存在様式を明らかにすることが可能となり、今後、食品科学の発展に大きく貢献することが期待される。

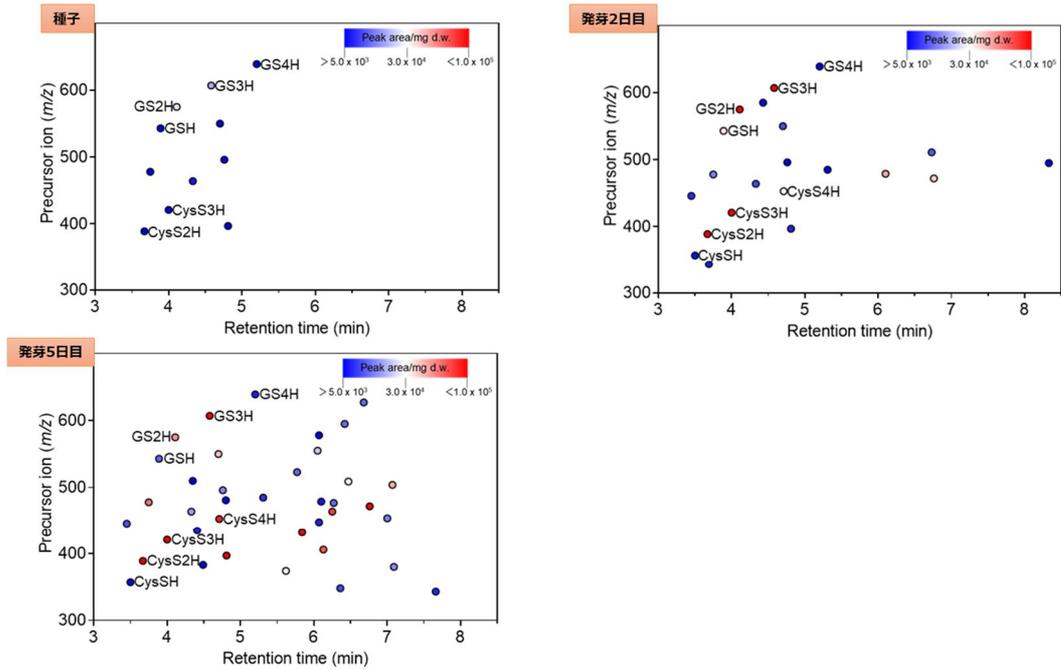


図5 ブロッコリースプラウト中の新規RSS

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Switzer Christopher H., Kasamatsu Shingo, Ihara Hideshi, Eaton Philip	4. 巻 120
2. 論文標題 SOD1 is an essential H ₂ S detoxifying enzyme	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2205044120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2205044120	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 Kasamatsu Shingo, Kinno Ayaka, Hishiyama Jun-ichi, Akaike Takaaki, Hideshi IharaIhara Hideshi	4. 巻 413
2. 論文標題 Development of methods for quantitative determination of the total and reactive polysulfides: Reactive polysulfide profiling in vegetables	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 135610 ~ 135610
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.foodchem.2023.135610	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 Takemura Shigekazu, Ihara Hideshi, Nakagawa Kanako, Minamiyama Yukiko	4. 巻 9
2. 論文標題 S-allyl cysteine increases blood flow in NO-dependent and-independent manners	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Glycative Stress Research	6. 最初と最後の頁 146-157
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 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, Kinno Ayaka, Miura Chiharu, Hishiyama Jun-ichi, Fukui Kensuke, Kure Shoji, Tsumura Kazunobu, Ida Tomoaki, Matsunaga Tetsuro, Akaike Takaaki, Ihara Hideshi	4. 巻 685
2. 論文標題 Quantitative profiling of supersulfides naturally occurring in dietary meats and beans	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 115392 ~ 115392
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ab.2023.115392	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 -

1. 著者名 Kasamatsu Shingo, Owaki Takuma, Komae Somei, Kinno Ayaka, Ida Tomoaki, Akaike Takaaki, Ihara Hideshi	4. 巻 67
2. 論文標題 Untargeted polysulfide omics analysis of alternations in polysulfide production during the germination of broccoli sprouts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Redox Biology	6. 最初と最後の頁 102875 ~ 102875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.redox.2023.102875	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 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 1件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Shingo kasamatsu, Hideshi Ihara
2. 発表標題 A mass spectrometry-based technology for exploration of endogenous persulfides/polysulfides
3. 学会等名 The 12th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shingo Kasamatsu, Tomoaki Ida, Kosho Asada, Taisei Koga, Hozumi Motohashi, Takaaki Akaike, Hideshi Ihara
2. 発表標題 High precision sulfur metabolomics innovated by a new specific probe for trapping reactive sulfur species
3. 学会等名 6th World congress on hydrogen sulfide in biology & medicine (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笠松真吾、金野文香、菱山純一、赤池孝章、居原秀
2. 発表標題 食品中のポリスルフィドの解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大脇拓真、笠松真吾、居原秀
2. 発表標題 ブロッコリーの発芽段階における活性硫黄の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 居原秀、小前奏明、笠松真吾
2. 発表標題 活性硫黄分子保護効果を有する大豆成分の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mahiro Kuryu, Shingo Kasamatsu, Hideshi Ihara
2. 発表標題 Analysis of the effects of germination on endogenous polysulfide production in soybean
3. 学会等名 The 12th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuma Owaki, Shingo Kasamatsu, Hideshi Ihara
2. 発表標題 Analysis of polysulfide profile changes in broccoli during germination
3. 学会等名 The 12th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (国際学会)
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
---------	---------