

領域略称名:硫黄生物学

領域番号:21A303

令和6年度
科学研究費助成事業「学術変革領域研究(A)」
に係る中間評価報告書

「新興硫黄生物学が拓く生命原理変革」

領域設定期間

令和3年度～令和7年度

令和6年6月

領域代表者 東北大学・大学院医学系研究科・教授・本橋ほづみ

目 次

研究組織

1 総括班・総括班以外の計画研究	2 頁
2 総括班・総括班以外の計画研究の研究代表者・研究分担者	4 頁
3 公募研究	9 頁

研究領域全体に係る事項

4 研究領域の目的及び概要	13 頁
5 審査結果の所見で指摘を受けた事項への対応状況	15 頁
6 研究の進展状況及び主な成果	17 頁
7 研究発表の状況	41 頁
8 研究組織の連携体制	46 頁
9 若手研究者の育成に係る取組状況	47 頁
10 アウトリーチ活動に係る取組状況	48 頁
11 研究費の使用状況・計画	49 頁
12 今後の研究領域の推進方策	50 頁
13 総括班評価者による評価	52 頁

研究組織

(令和6年6月末現在。ただし完了又は廃止した研究課題は完了・廃止時現在。)

1 総括班及び総括班以外の計画研究

研究項目[1]	課題番号 研究課題名	研究代表者 氏名	所属研究機関・部局・職	人数[2]
X00 総	21H05258 硫黄生物学研究推進のための国際連携 とインフラ整備	本橋 ほづみ	東北大学・医学系研究科・教授	14
A01 計	21H05259 超硫黄分子 in-cell ケミストリーの確立と その生命科学研究への応用	中川 秀彦	名古屋市立大学・医薬学総合 研究院(薬学)・教授	3
A01 計	21H05260 タンパク質構造生物化学に立脚した超硫 黄分子の可視化	和田 啓	宮崎大学・医学部・教授	1
A01 計	21H05261 非線形ラマン散乱を用いた細胞内超硫黄 分子の in situ 検出と動的変化の解明	中林 孝和	東北大学・薬学研究科・教授	1
A01 計	21H05262 超硫黄分子のマルチイメージングとその 生合成制御のためのケミカルツール開発	花岡 健二郎	慶應義塾大学・薬学部(芝共 立)・教授	3
A01 計	21H05263 定量的超硫黄オミックス・イメージング技 術の開発と標準化プロトコールの確立	赤池 孝章	東北大学・医学系研究科・教 授	2
A02 計	21H05264 ミトコンドリアでの超硫黄産生によるエネ ルギー代謝と低酸素適応	本橋 ほづみ	東北大学・医学系研究科・教 授	2
A02 計	21H05265 ミトコンドリアにおける超硫黄分子リレ ーの分子基盤と生理的意義の解明	魏 范研	東北大学・加齢医学研究所・ 教授	1
A02 計	21H05266 光合成における超硫黄分子の貢献	石丸 泰寛	東北大学・工学研究科・准教 授	3
A02 計	21H05267 NADPH オキシダーゼによる超硫黄分子 の活性化と感染・炎症制御機構の解明	澤 智裕	熊本大学・生命科学研究部・ 教授	2
A02 計	21H05268 タンパク質品質管理を支える電子移動媒 体としての超硫黄分子の役割	潮田 亮	京都産業大学・生命科学部・ 准教授	1

A03 計	21H05269 G タンパク質の超硫黄化による新奇シグナル制御とその生理的意義の解明	西田 基宏	九州大学・薬学研究院・教授	3
A03 計	21H05270 超硫黄分子とセレンのクロストークによるシグナル伝達制御	斎藤 芳郎	東北大学・薬学研究科・教授	2
A03 計	21H05271 硫化水素によるシグナル伝達	増田 真二	東京工業大学・生命理工学院・教授	2
A03 計	21H05272 タンパク質のスルホン酸化超硫黄による翻訳後修飾模倣とシグナル伝達	三木 裕明	京都大学・大学院工学研究科・教授	1
総括班及び総括班以外の計画研究 計 15 件（廃止を含む）				

[1] 総:総括班、計:総括班以外の計画研究

[2] 研究代表者及び研究分担者の人数(辞退又は削除した者を除く。)

2 総括班及び総括班以外の計画研究の研究代表者・研究分担者

研究項目：X00

研究課題名：硫黄生物学研究推進のための国際連携とインフラ整備

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	本橋 ほづみ	東北大学・医学系研究科・教授	領域の総括、総括班の運営総括
分担	中川 秀彦	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・教授	技術支援
分担	和田 啓	宮崎大学・医学部・教授	若手支援・アウトリーチ
分担	中林 孝和	東北大学・薬学研究科・教授	研究資源の共有化
分担	花岡 健二郎	慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・教授	技術支援
分担	赤池 孝章	東北大学・医学系研究科・教授	技術支援・国際連携
分担	魏 范研	東北大学・加齢医学研究所・教授	国際連携
分担	石丸 泰寛	東北大学・工学研究科・准教授	研究資源の共有化
分担	澤 智裕	熊本大学・生命科学研究部・教授	広報
分担	潮田 亮	京都産業大学・生命科学部・准教授	若手支援・アウトリーチ
分担	西田 基宏	九州大学・薬学研究院・教授	領域プログレス開催
分担	斎藤 芳郎	東北大学・薬学研究科・教授	国際連携
分担	増田 真二	東京工業大学・生命理工学院・教授	領域プログレス開催
分担	三木 裕明	京都大学・大学院工学研究科・教授	広報
合計 14 名			

研究項目：A01

研究課題名：超硫黄分子 in-cell ケミストリーの確立とその生命科学研究への応用

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
-----------	-------	-------------	------

代表	中川 秀彦	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・教授	研究の総括、超硫黄分子解析の化学ツール創製
分担	異島 優	京都薬科大学・薬学部・教授	超硫黄分子の簡便な測定法の開発とその生体サンプルへの基礎的検討
分担	梅澤 啓太郎	東京都健康長寿医療センター研究所・研究員	質量分析装置を用いた超硫黄タンパク質の網羅的解析法の創出
合計 3 名			

研究項目 : A01

研究課題名 : タンパク質構造生物化学に立脚した超硫黄分子の可視化

代表／分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	和田 啓	宮崎大学・医学部・教授	研究の総括、超硫黄分子のX線結晶構造解析、超硫黄分子結合タンパク質の発現精製
分担	田中 良和	東北大学・生命科学研究科・教授	超硫黄関連蛋白質のクライオ電子顕微鏡解析
合計 2 名			

研究項目 : A01

研究課題名 : 非線形ラマン散乱を用いた細胞内超硫黄分子の in situ 検出と動的変化の解明

代表／分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	中林 孝和	東北大学・薬学部・教授	装置開発と測定・全体の総括
合計 1 名			

研究項目 : A01

研究課題名 : 超硫黄分子のマルチイメージングとその生合成制御のためのケミカルツール開発

代表／分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	花岡 健二郎	慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・教授	研究の取りまとめ及び、超硫黄分子の可視化蛍光及びNMRプローブと生合成制御化合物の開発
分担	小松 徹	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教	超硫黄分子の可視化蛍光プローブと生合成制御化合物の開発(~R4, 現・班友)
分担	土屋 幸弘	昭和薬科大学・薬学部・准教授	超硫黄分子の生合成制御化合物の生細胞への応用・機能評価(R6~)
合計 3 名			

研究項目：A01**研究課題名：定量的超硫黄オミックス・イメージング技術の開発と標準化プロトコールの確立**

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	赤池 孝章	東北大学・医学系研究科・教授	研究の統括、超硫黄オミックス・イメージング開発
分担	居原 秀	大阪公立大学・理学研究科・教授	定量的超硫黄オミックスの標準化
合計 2 名			

研究項目：A02**研究課題名：ミトコンドリアでの超硫黄産生によるエネルギー代謝と低酸素適応**

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	本橋 ほづみ	東北大学・医学系研究科・教授	研究の統括、超硫黄産生障害モデルマウスの開発とミトコンドリアの生化学
分担	伊東 健	弘前大学・医学研究科・教授	超硫黄分子生合成の転写制御
合計 2 名			

研究項目：A02**研究課題名：ミトコンドリアにおける超硫黄分子リレーの分子基盤と生理的意義の解明**

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	魏 范研	東北大学・加齢医学研究所・教授	研究立案、実験結果まとめ、論文作成
合計 1 名			

研究項目：A02**研究課題名：光合成における超硫黄分子の貢献**

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	石丸 泰寛	東北大学・工学研究科・准教授	研究の統括、植物/シアノバクテリアの超硫黄分子による光合成電影伝達機構の解析
分担	河野 優	神奈川大学・付置研究所・研究員	植物の光合成活性の実時間測定

分担	浅井 智広	中央大学・理工学部・准教授	嫌気的環境化でのシアノバクテリアの解析
合計 3 名			

研究項目 : A02

研究課題名 : NADPH オキシダーゼによる超硫黄分子の活性化と感染・炎症制御機構の解明

代表／分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	澤 智裕	熊本大学・大学院生命科学 研究部・教授	研究全体の立案・実施・総括
分担	住本 英樹	九州大学・先端医療オープン イノベーションセンター・特任 教授	Nox の分子生物学的解析
合計 2 名			

研究項目 : A02

研究課題名 : タンパク質品質管理を支える電子移動媒体としての超硫黄分子の役割

代表／分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	潮田 亮	京都産業大学・生命科学部・ 准教授	研究全体の立案・実施・総括
合計 1 名			

研究項目 : A03

研究課題名 : G タンパク質の超硫黄化による新奇シグナル制御とその生理的意義の解明

代表／分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	西田 基宏	九州大学・大学院薬学研究 院・教授	研究の総括
分担	西村 明幸	生理学研究所・生体機能調 節研究領域・特任准教授	タンパク質超硫黄化検出技術の開発。生化学解析。
分担	HENGPHASATPORN Kowit	筑波大学・計算科学研究セ ンター・助教	分子シミュレーション。計算科学。
合計 3 名			

研究項目 : A03

研究課題名 : 超硫黄分子とセレンのクロストークによるシグナル伝達制御

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	斎藤 芳郎	東北大学・薬学研究科・教授	研究統括・論文作成
分担	山本 雅之	東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・教授	NRF2 関連研究の実施・論文作成
合計 2 名			

研究項目：A03

研究課題名：硫化水素によるシグナル伝達

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	増田 真二	東京工業大学・生命理工学院・教授	研究の統括・立案・実施（非イオウ細菌における硫化水素のシグナル伝達機構とその生理学的役割に関する研究）
分担	清水 隆之	奈良女子大学・研究院自然科学系・准教授	研究の立案・実施（紅色細菌を用いた硫化水素・超硫黄分子の検知機構と代謝に関する研究）
合計 2 名			

研究項目：A03

研究課題名：タンパク質のスルホン酸化超硫黄による翻訳後修飾模倣とシグナル伝達

代表／ 分担	研究者氏名	所属研究機関・部局・職	役割分担
代表	三木 裕明	京都大学・大学院工学研究科・教授	研究計画全体の立案、実施、総括
合計 1 名			

3 公募研究

研究項目 [1]	課題番号 研究課題名	研究期間	研究代表者 氏名	所属研究機関・部局・職	人数 [2]
A01 公	22H05555 脳における亜鉛制御に関わる超硫黄タンパク質の探索とその機能解析	令和4年度 ～ 令和5年度	新開 泰弘	東京薬科大学生命科学部・環境生物学研究室・教授	1
A01 公	22H05558 過酸化による機能調節メカニズムを解明するタンパク質 NMR 構造解析技術の開発	令和4年度 ～ 令和5年度	徳永 裕二	東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・助教	1
A01 公	22H05560 超分子カプセルを基盤とする超硫黄分析ツールの開発	令和4年度 ～ 令和5年度	Catti Lorenzo	東京工業大学・科学技術創成研究院・助教	1
A01 公	22H05564（廃止） 超硫黄化アミロイドに特異的な核酸プローブとエクソソームを用いた高感度検出法の開発	令和4年度 ～ 令和5年度	村上 一馬	京都大学・農学研究科・准教授	1
A01 公	22H05566 部位特異的な超硫黄化法の開発	令和4年度 ～ 令和5年度	松尾 和哉	京都工芸繊維大学・分子化学系・助教	1
A01 公	22H05569 硫黄導入試薬の合理的分子設計に基づく超硫黄分子の精密有機合成	令和4年度 ～ 令和5年度	猪熊 翼	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（薬学域）・助教	1
A02 公	22H05572 システイン含有蛋白質と反応する酸化脂質の網羅的解析・評価	令和4年度 ～ 令和5年度	山田 健一	九州大学・薬学研究院・教授	1
A02 公	22H05574 オルガネラ膜接触場を介した超硫黄分子制御機構の解明	令和4年度 ～ 令和5年度	椎葉 一心	学習院大学・理学部・助教	1
A02 公	22H05575 超硫黄分子代謝制御におけるグルタチオンペルオキシダーゼ4の機能と疾患への関与	令和4年度 ～ 令和5年度	幸村 知子	北里大学・薬学部・助教	1
A03 公	22H05556 動物発生における超硫黄分子	令和4年度 ～ 令和5年度	小林 麻己人	筑波大学・医学医療系・教授	1
A03 公	22H05568 活性硫黄分子種の炎症発癌に果たす意義の解明	令和4年度 ～ 令和5年度	岡田 太	鳥取大学・医学部・教授	1
A03 公	22H05570 硫化水素分子によるイオンチャネルの機能修飾機構の解明	令和4年度 ～ 令和5年度	川鍋 陽	香川大学・医学部・講師	1

A03 公	22H05573 植物の硫黄同化・代謝とその調節機構：超硫黄分子関与の可能性	令和4年度 ～ 令和5年度	丸山 明子	九州大学・農学研究院・准教授	1
A03 公	22H05576 腸内細菌による超硫黄分子産生機構の解明	令和4年度 ～ 令和5年度	秋山 雅博	昭和大学, 臨床薬理研究所, 准教授	1
A03 公	22H05579 超硫黄によるインスリンシグナル制御メカニズムの解析	令和4年度 ～ 令和5年度	三田 雄一郎	同志社大学・生命医科学部・助教	1
B01 公	22H05554 硫黄の柔軟な電子授受の制御による二酸化炭素の還元および次世代製鉄法への学際研究	令和4年度 ～ 令和5年度	田原 淳士	東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教	1
B01 公	22H05557 呼吸中枢における硫化水素合成が神経回路網の時空間ダイナミクスに果たす役割	令和4年度 ～ 令和5年度	小金澤 禎史	筑波大学・医学医療系・准教授	1
B01 公	22H05559 超硫黄分子に着目したアミノアシル tRNA 合成酵素の新規機能の探索	令和4年度 ～ 令和5年度	若杉 桂輔	東京大学・大学院総合文化研究科・准教授	1
B01 公	22H05567 特殊な硫黄間相互作用が要となる新奇チオ硫酸トランスポーターの解析	令和4年度 ～ 令和5年度	宮崎 亮次	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教	1
B01 公	22H05577 シアン解毒・硫黄転移二酵素の生理的役割の解明	令和4年度 ～ 令和5年度	石井 功	昭和薬科大学・薬学部・教授	1
A01 公	24H01315 部位特異的な光応答性超硫黄種スカベンジャーの開発	令和6年度 ～ 令和7年度	松尾 和哉	京都工芸繊維大学・分子化学系・助教	1
A01 公	24H01320 新規硫黄原子導入反応の開発と超硫黄ペプチドの精密有機合成への展開	令和6年度 ～ 令和7年度	猪熊 翼	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・講師	1
A01 公	24H01311 刺激応答型の超分子カプセル：超硫黄の捕捉・放出システムの開拓	令和6年度 ～ 令和7年度	Catti Lorenzo	東京工業大学・科学技術創成研究院・助教	1
A01 公	24H01322 有機合成化学的手法を活用した多様な超硫黄化合物の合成と特性	令和6年度 ～ 令和7年度	有澤 美枝子	九州大学・農学研究院・教授	1
A01 公	24H01329 超硫黄化による銅シャペロン保護メカニズムの解明	令和6年度 ～ 令和7年度	古川 良明	慶應義塾大学・理工学部(矢上)・教授	1

A01 公	24H01326 超硫黄分子センサータンパクを利用した新規超硫黄分子プローブの開発	令和6年度 ～ 令和7年度	西山 和宏	大阪公立大学・大学院獣医学研究科・准教授	1
A01 公	24H01339 ポリスルフィドミクスの拡張を可能とする新規タンパク質ラベル化試薬の創成	令和6年度 ～ 令和7年度	重永 章	福山大学・薬学部・教授	1
A02 公	24H01327 オルガネラ接触場に着目した超硫黄分子の新たな役割の解明	令和6年度 ～ 令和7年度	椎葉 一心	学習院大学・理学部・助教	1
A02 公	24H01337 硫黄還元菌における活性硫黄分子種を介した硫黄の生体膜透過機構	令和6年度 ～ 令和7年度	三原 久明	立命館大学・生命科学部・教授	1
A02 公	24H01328 超硫黄分子によるリポキシトーシス（脂質酸化依存的な細胞死）の制御機構解析	令和6年度 ～ 令和7年度	安田 柊	北里大学・薬学部・助教	1
A03 公	24H01305 動物発生における超硫黄分子の役割	令和6年度 ～ 令和7年度	小林 麻己人	筑波大学・医学医療系・教授	1
A03 公	24H01331 腸内細菌の環境ストレス制御における超硫黄分子の役割	令和6年度 ～ 令和7年度	秋山 雅博	昭和大学, 臨床薬理研究所, 准教授	1
A03 公	24H01334 小胞体環境によるシスチン輸送制御機構の解明	令和6年度 ～ 令和7年度	永森 收志	東京慈恵会医科大学・医学部・教授	1
A03 公	24H01318 活性硫黄分子種の炎症発癌に果たす疲弊T細胞分化の意義	令和6年度 ～ 令和7年度	岡田 太	鳥取大学・医学部・教授	1
A03 公	24H01338 Nox 酵素サブユニット p22phox の超硫黄分子を起点としたレドックス反応の精密制御化	令和6年度 ～ 令和7年度	宮野 佳	川崎医科大学・医学部・講師	1
A03 公	24H01330 貧栄養性微小環境を勘案した悪性形質を支持する膵がん-間質間の硫黄代謝連携の理解	令和6年度 ～ 令和7年度	山本 雄広	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師	1
A03 公	24H01333 超硫黄化修飾を介したカルシウム恒常性維持機構の解明	令和6年度 ～ 令和7年度	中村 貴	東京歯科大学・歯学部・講師	1
B01 公	24H01341	令和6年度 ～ 令和7年度	嶋 直樹	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・副ラボ長	1

	過酸化硫黄中間体を経由する硫黄化合物の生合成のしくみの多様性とその進化				
B01 公	24H01304 二酸化炭素に対し硫黄が示す多様な電子授受特性を学際融合させた循環型資源開発	令和6年度 ～ 令和7年度	田原 淳士	東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教	1
B01 公	24H01309 炭素-硫黄結合形成酵素における鉄硫黄クラスターの硫黄供与機能と再構築機構の解明	令和6年度 ～ 令和7年度	牛丸 理一郎	東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・助教	1
公募研究 計 40 件（廃止を含む）					

[1] 公:公募研究

[2] 公募研究は研究代表者が1名で実施

研究領域全体に係る事項

4 研究領域の目的及び概要

研究領域全体を通じ、本研究領域の研究目的及び全体構想について、応募時の領域計画書を基に、具体的かつ簡潔に2頁以内で記述すること。なお、記述に当たっては、どのような点が「これまでの学術の体系や方向を大きく変革・転換させる」ものであるか、研究の学術的背景や領域設定期間終了後に期待される成果等を明確にすること。

本研究領域の研究目的

これまで看過されてきた超硫黄の化学的・物理的な特性を理解し、その生物学的機能を解明することにより、全く新規の硫黄生命科学を確立し、物理化学・生物学の幅広い異分野融合と革新的学術領域の創成を目指すことである。

本研究領域の学術的背景

原始の海で誕生した生命は、現在の熱水噴出孔に棲息する化学合成細菌と同様のエネルギー代謝、すなわち、硫化水素やメタンを電子供与体として利用していたと考えられる。また、原始的な光合成生物は、現在の紅色硫黄細菌や緑色硫黄細菌と同様に、水(H₂O)より簡単に電子を取り出せる硫化水素(H₂S)を利用していたと考えられる。その後出現したシアノバクテリアが、進化した光合成系により水を電子の供給源として利用し始めたことで酸素が大気中に蓄積し、その結果、酸素を利用して効率的にエネルギー代謝を営む生物が繁栄するに至ったとされる。このように、硫黄は、酸素の出現以前に生命のエネルギー代謝において中心的な役割を担い、環境変化によりその役割を終えたとされてきた。ところが、本研究領域メンバーの研究により、酸素呼吸に依存するヒトやマウスなどの高等動物でも、硫黄に依存したエネルギー代謝が依然として旺盛に営まれていることが明らかになった(Ida et al., *PNAS* 2014; Akaike et al., *Nat Commun* 2017; Marutani et al., *Nat Commun* 2021)。

硫黄は酸素やセレンとともに、周期表の第16族に属する元素である。現在多くの生物が利用する酸素に比べて、硫黄は第一イオン化エネルギーが小さく、電子親和性は大きい。これは、硫黄が酸素よりも電子を放出しやすく、かつ、電子を受け取りやすいことを意味する。すなわち、硫黄は、酸素に比べて電子の授受に伴うエネルギーの変化が小さく、原始的生物にとっては酸化還元反応の媒体として利用しやすいという側面があった一方、この酸化還元を受けやすいという性質のため、これまで多くの硫黄代謝物の存在が見落とされてきた。しかし最近、本研究領域の研究者により、硫黄代謝物を分解することなく高精度に定量できる画期的な測定方法が開発され、超硫黄分子と総称される新規の生体分子の存在が明らかになった。超硫黄分子とは、直鎖状に連結した硫黄原子(硫黄カテナーション)を有する代謝物やタンパク質の総称である。興味深いことに、超硫黄代謝物が1 mMに近い濃度で生体内に豊富に存在すること(Ida et al., *PNAS* 2014; Dóka et al. *Sci Adv* 2020)、ヒトの血漿タンパク質の8割以上のシステイン側鎖に超硫黄が検出されること(梅澤 未発表)が明らかになった。そして、超硫黄分子の主たる産生酵素の同定に続く Loss-of-Function 実験により、超硫黄分子がミトコンドリアにおける酸素呼吸において必須の役割を果たしていることが明らかになった(Akaike et al., *Nat Commun* 2017)。これは、現在の教科書には記載のない新知見であり、超硫黄の存在を考慮して初めて解明できた生命現象として、生化学・生物学の歴史的な転換点をもたらしたといえる。

超硫黄分子は、システインパーサルスフィドやグルタチオンパーサルスフィドなどの低分子代謝物として存在するとともに、タンパク質のシステイン側鎖に硫黄カテナーションを形成した状態でも存在する。超硫黄は分子の屈曲と電子の偏りをもたらし、親電子性と求核性が共存する。すなわち、酸化、かつ、還元的でもあるため、ひとつの分子で電子授受を同時に行うことができる(Matsunaga et al., *Nat Commun* 2023)。このユニークな化学的特性により、超硫黄分子は他の分子に認められない多様で自己触媒的な機能を保持することが想定される。そこで、本研究領域では、超硫黄分子の化学的・物理的性質の理解に基づく新たな生物学の構築を目指し、エネルギー代謝、細胞間・細胞内情報伝達、タンパク質の翻訳と成熟、金属配位子結合、翻訳後修飾、輸送、機能変換、品質管理を含むプロテオスタシス、発生・分化、細胞増殖・細胞死、恒常性維持・ストレス応答、発がん・老化など、様々な幅広い生命現象において、従来の常識を覆す新しい分子基盤の解明に挑むことにした。

本研究領域の全体構想

従来の生物学が超硫黄分子の存在を看過してきた最大の理由は、その測定の高難さである。超硫黄分子の存在を考慮した新たな生物学を創出するためには、その計測技術の改善と普及が必須である。現在は、超硫黄分子を誘導体化して質量分析法により測定する方法が主流であり、超硫黄分子の分解を最小限に抑えて測定できるよう、誘導体化試薬(超硫黄保護試薬)の改良をすすめてきた(居原、赤池ら *Sci Adv & Antioxid Redox Signal* 2020)。超硫黄分子を含む含硫代謝物・含硫タンパク質を測定対象とする硫黄メタボローム・硫黄プロテオーム解析では、 ^{34}S 安定同位体を用いた標準物質の合成技術が確立しており、かつ、安定同位体で置換した超硫黄保護試薬の利用により、定量的な解析技術として展開可能である。そこで、本領域を立ち上げて硫黄メタボローム・硫黄プロテオームの標準化を行い、硫黄計測技術の普及を図

る。さらに、より簡便かつ正確な定量を実現するために、蛍光法や、ラマン分光法・核磁気共鳴法(NMR)を応用した新たな超硫黄分子の計測・イメージング技術の開発に挑む。すなわち、超硫黄分子の計測技術・イメージング技術の開発とそれを支える硫黄の化学的特性の解明を強力に推進する。

これを基盤として、超硫黄分子が媒介する電子移動の実態とその生物学的意義、超硫黄分子が担う細胞内・細胞間シグナル伝達を解明する。このように超硫黄分子の存在を考慮した上で、様々な生化学反応、細胞内小器官の活動、細胞の挙動、組織・器官の機能、それらが統合された生命体個体としての生命活動を理解する。それを通して、超硫黄分子が関与する生命現象が、従来の生物学でどのように理解されてきたのかを検証し、1つの生体元素にすぎないという硫黄の理解から脱して、“硫黄は生体内で動的に機能性する元素”という認識にたち、超硫黄分子の存在を考慮した新しい生物学としての理論構築を行う。このようにして確立される新興硫黄生物学は、学問としての大きな変革をもたらすのみならず、我々の実生活における新技術開発において重要な礎を提供することが期待される。本領域では、技術革新への応用も見据えた基礎研究を展開する。以上の基本認識に基づき、本領域では3つの研究項目(A01:超硫黄分子の分析・計測・可視化、A02:超硫黄分子をめぐる電子フラックス、A03:超硫黄分子が担うシグナル伝達)を設けることとした。

超硫黄分子は長い間見落とされてきた生体分子であり、既存の概念や理論では説明ができない前人未踏の領域を、試行錯誤しながら切り拓いていかなくてはならない。新しい実験結果が出るたびに、それまでの解釈、理論の妥当性を不断に検証し、次の戦略を吟味し展開する必要がある。そして、超硫黄分子というユニークな化学的特性を主軸として生命現象を探求するために、化学・生化学の研究者と生物学の研究者の間で、新しい実験結果やそれに伴う仮説の変更などの情報を密接に共有する必要がある。そこで、「領域内情報ホットライン」を構築し、毎月一度のオンライン領域プロGRESSミーティングを開催している。また、超硫黄分子に関する実験に必要な試薬や生物資源はまだほとんど市販されておらず、超硫黄分子の計測技術も一般的な受託解析サービスを利用することは難しい。そこで、領域参加者がこれまでに独自に開発した、あるいは、本領域内での研究により開発する研究資源と技術を領域内で広く共有するために、領域ホームページを利用した総括班による支援体制を整備することにした。

終了後に期待される成果

これまで看過されてきた超硫黄分子の化学的・物理的な特性を理解し、その生物学的機能と代謝制御メカニズムを解明することにより、従来の生物学を再構築して超硫黄生命科学を確立することが期待される。本研究領域を基盤として、2023年度に国際先導研究「レドックス超分子の生命機能解明に向けたグローバルな研究先導」が採択になった。この枠組みと連携して、超硫黄生命科学をテーマとする国際頭脳循環と若手育成を図る。具体的に期待される成果としては以下の5点である。

- 1) 超硫黄分子の定量性・感度・再現性に優れた計測技術の世界標準として確立する
- 2) 超硫黄分子を考慮することで、これまで謎であった生命現象を合理的に解釈する
- 3) 地球環境の保全や持続可能な社会の構築に有益な超硫黄分子の利用方法を見出す
- 4) 海外の研究者コミュニティを巻き込み、わが国発の超硫黄生命科学から世界的な学術の潮流を生み出す
- 5) 超硫黄生命科学に参入する若手研究者を、世界で活躍する次世代のリーダーとして育成する

5 審査結果の所見で指摘を受けた事項への対応状況

研究領域全体を通じ、審査結果の所見において指摘を受けた事項があった場合には、当該指摘及びその対応状況等について、具体的かつ簡潔に2頁以内で記述すること。

1点目の指摘「審査において、領域計画書の記載が生物学的な研究・視点に偏重しており、化学・生化学的な研究や視点が乏しいことが指摘された。具体的には、超硫黄が Cys-tRNA 合成酵素だけでなく硫化水素からも合成されることが知られているのに記載されていないこと、硫黄による分子修飾がもたらす機能変化の確固たる化学・生化学基盤が不可欠であるのに欠如していること、ラマンや NMR は、細胞内の条件を調べる方法としてあまり適さないと思われ、質量分析では *in vitro* の計測が困難であるので、別の分析・計測手法も取り入れていくことが必要である、などの問題点が指摘された。」

以下、個別の点に対する対応状況について説明する。

・超硫黄が Cys-tRNA 合成酵素だけでなく硫化水素からも合成されることが知られているのに記載されていない

このコメントは、硫化水素が生体で産生されており、そこから超硫黄分子が生成する、という旧来の認識に立っているものと思われる。しかしながら、現在は、生体内でプライマリーに合成されているのが超硫黄分子であり、超硫黄分子が電子を受容することで二次的に硫化水素が生成することが明らかになっている。また、従来報告で、生体内の硫化水素とされたものは、検体のサンプル調製方法に問題があり、分析の過程で超硫黄分子が分解して生成したものであることも明らかになっている。よって、この評価は当該分野における研究の進展を十分に把握されずに下されたものと考えているが、このことは超硫黄分子の生成・分解機構に関する研究が目覚ましいスピードで進んでいることの反映でもあり、本領域で取り組むテーマの先端性や重要性を示すものと受け止めている。

本領域計画研究メンバーの赤池を中心に、居原、梅澤が協力して、本領域の採択以前より、超硫黄分子の分解を極力抑えたサンプル調製方法と分析技術を開発し、すでに世界の主要な研究者たちが本技術を利用している。一方で、超硫黄分子の分解により生じる硫化水素から、細胞外などの酸化的環境において超硫黄が再生成するのかどうかは、今後、領域研究の中で明らかになるものと認識している。

・硫黄による分子修飾がもたらす機能変化の確固たる化学・生化学基盤が不可欠であるのに欠如している

タンパク質の超硫黄化状態がその機能変換に果たす役割は、極めて重要な点であり、本研究領域の申請書の中でこれまでの実績を紹介し、研究計画に含めている。具体的には、計画研究メンバーの赤池・西田・本橋が、リボソームにおけるタンパク質翻訳時に超硫黄化されたシステインが新生ペプチドにとりこまれること、ミトコンドリアの分裂を制御する因子である Drp1 が特定のシステイン残基の超硫黄化によりその機能を変化させることを見出しており、また、梅澤がヒト血漿中のタンパク質の分析を行い、その8割以上に超硫黄化されたシステイン側鎖を検出していることなどを紹介している。研究計画としては、計画研究メンバーの和田が、超硫黄化されたタンパク質の構造解析をテーマとしており、潮田が小胞体におけるタンパク質の品質管理におけるタンパク質超硫黄化の意義を生化学的に解析することを提案しており、西田・三木・増田が、細胞内のシグナル伝達におけるタンパク質超硫黄化の意義を化学・生化学の観点からの解析を提案している。さらに、中川は、超硫黄化タンパク質を特異的に感度よく検出するためのプローブ開発を提案している。

現在、領域内でこれらの研究が進展しており、たとえば、超硫黄化が一部の抗酸化タンパク質の多量体形成を制御すること、核内因子の超硫黄化状態が活性酸素種のレベルに応じて変化する機能を変化させる可能性について生化学的な検討がすすんでいる。さらに、タンパク質内のジスルフィド結合に加えて、トリスルフィド結合の検出方法と、その部位の特定方法も確立されはじめており、多くのタンパク質の超硫黄化状態の網羅的で正確な解析が確立されつつある。

・ラマンやNMRは、細胞内の条件を調べる方法としてあまり適さないと思われ、質量分析では *in vitro* の計測が困難であるので、別の分析・計測手法も取り入れていくことが必要である

ラマンイメージングで細胞を調べることについては、ラマン分光の感度が不十分であるという懸念からこのようなコメントにつながったものと推測する。しかしながら、この点については最近大きな進展があった。計画研究メンバーの赤池は、細胞内の特に脂肪滴の中で、ラマンイメージングでも検出できるほどの大量の S_8 (cyclic octa-sulfur, 環化八硫黄) が生成することを発見している。これは、公募研究として参加している東京工業大学の吉沢道人教授により開発された S_8 を取り込む分子カプセルをもちいた質量分析によっても確認されている。さらに、興味深いことに、この様な S_8 生成はミトコンドリア内でも同定されている。また、閉環した S_8 のラマン波数とスペクトラムは、開環した長鎖硫黄のそれとは全く異なっており、それぞれの超硫黄分子が有する固有の長鎖硫黄構造とエネルギー状態が反映された量子化学特性により裏付けられた生体内超硫黄ラマン解析の最先端技術が確立されつつある。

NMRについては、計画研究として花岡が、 ^{33}S -NMRを用いた生体内硫黄分子の検出をすすめており、これまでに、硫酸、亜硫酸、タウリンの検出に成功している。 ^{33}S は、NMRシグナルの線幅広幅因子が大きいと、特定の分子軌道をもつ含硫黄分子しか検出できないことが知られている。そこで、どのような含硫黄分子が ^{33}S -NMR信号を示すかについて、計算化学を組み合わせることで明らかにし、それをもとに、セルライセートや組織ライセート中の含硫黄分子の ^{33}S -NMRによる定量法を確立する。さらに、 ^{33}S -MRI装置をセットアップして、生きた状態の動物での含硫黄分子の可視化を目指している。

質量分析についてのコメントには、評価者の書き間違い、あるいは勘違いと思われる部分があり、本コメントを受け取ったあとにすぐに担当調査官を通して修正を依頼した。「質量分析では *in vitro* の計測が困難であるので」→「質量分析では *in vivo* の計測が困難であるので」という内容を指摘したかったものと推測している。質量分析は、超硫黄分子の *in vitro* での計測の主力であり、上述のとおり、本領域の採択前から領域メンバーが数々の検討を積み重ねて技術革新を成し遂げてきた。現在では、サルファオミクスとして本技術を普及させており、世界の研究者たちが利用する世界標準になっている。質量分析を用いた細胞内の超硫黄分子の検出も、このサルファオミクス技術を応用して可能であると考え、来年度より質量顕微鏡を用いた定量的超硫黄分子イメージング系を立ち上げ、組織切片における超硫黄分子検出を行う。ちなみに、サルファオミクス技術については、企業への導出が完了しており、今後より多くの研究者が超硫黄分子の検出をそれぞれの実験系において検討することがさらに容易になると期待される。

2点目の指摘「領域研究の遂行においては、上記の様な指摘を受け止め、これらの化学・生化学的解析・分析技術を担いようとする研究者の参画・強化が求められる。」

14の計画研究のうち、A01の5つの計画研究は、化学・生化学・分析を中心として研究を推進するものである。さらに、その強化をはかるため、公募研究でA01として6つの公募研究を採択した。しかしながら、公募研究の審査では合議審査がなされず、硫黄の有機合成を専門とする研究者による公募研究計画2件を残念ながら採択することができなかった。そこで、この2名の研究者を班友として、領域研究に招待し、領域研究に甚大な貢献をしてもらった。令和6年度からの新しい公募研究には、硫黄の有機合成を専門とする研究者が採択になり、今後の活躍を期待している。

本領域では、総括班の活動として、硫黄の化学・生化学的解析・分析の支援を行っている。専用のウェブサイトを立て、支援の希望を受け付けている。領域代表者である本橋と技術支援担当の計画研究代表者である中川と花岡とで、支援を希望する領域内外の研究者に対してヒヤリングを行い、最適な支援者を選定して共同研究として支援のアレンジを実施している。

6 研究の進展状況及び主な成果

(1)及び(2)について、計画研究及びそれと連携している公募研究ごとに、具体的かつ簡潔に記述すること。(一つの計画研究及び連携する公募研究で2頁以内)

(1)領域設定期間内及び中間評価実施時までには何をどこまで明らかにしようとし、中間評価実施時までにはどこまで研究が進展しているのか

(2)各計画研究で得られた成果、及びそれぞれの計画研究と連携している公募研究で得られた成果について、(計画研究・連携する公募研究の順で記載すること。なお、本研究領域内の共同研究等による成果の場合はその旨を明確にすること。)

計画研究課題名：超硫黄分子 in-cell ケミストリーの確立とその生命科学研究への応用

(1)本研究では、細胞系(細胞内及び細胞表面・細胞間質)における超硫黄分子・超硫黄修飾の化学的性質、すなわち存在様態と反応性を明らかにする。多成分が混在する夾雑系での超硫黄の化学的特性を追求し、超硫黄 in-cell ケミストリーを確立することを目指す。参画研究者が有する質量分析・オミクス解析等の技術および蛍光・質量分析マルチタグ試薬等の独自新技術を融合・駆使して細胞内超硫黄分子の反応性を解析し、古典的硫黄化学と対比しつつ細胞内超硫黄分子の化学を明らかにする。さらに、その成果に立脚し超硫黄オミクスを含む多様な解析技術に研究展開し、超硫黄解析を一般的研究技術とするための化学的基盤を創生する。

中間評価実施時までには次の事項について開発・解明することを目指し、後述の通りほぼ達成できた。

1) 超硫黄修飾タンパク質のラベル化基本技術の確立と性能検証を目指し、同時にタンパク質超硫黄修飾の影響を評価するため、タンパク質に人為的に超硫黄を導入する手法の基本技術を開発することを目指す。

2) 実際の生体組織における超硫黄の実態を把握するために、ヒト組織において超硫黄量を定量する手法を開発するとともに、実際の組織での超硫黄量測定への応用を試みる。

3) 生体組織における超硫黄タンパク質の化学構造とその変化を解明するため、質量分析法を基礎として超硫黄構造を詳細かつ網羅的に解析する手法の開発を行う。

(2)以下が項目ごとに得られた成果である。

1) 超硫黄に特徴的な強い求核性を利用し、芳香族求核置換反応と組み合わせた還元型超硫黄検出・ラベル化プローブを設計・合成し、in vitro において、GAPDH 等の超硫黄化システイン残基のラベル化に成功し、同ラベル特異的抗体の作成によりウエスタンブロッティング法にて検出できる解析法を確立した。また、同検出・ラベル化プローブにより、培養細胞において超硫黄 (Na_2S_2 等) の外部添加による細胞内超硫黄増加を検出することに成功した。

2) 超硫黄修飾タンパク質の存在を明らかにすべく、全酸化型超硫黄分子を定量可能な EMSP 法や全還元型超硫黄分子の DTT-MB 法を用いた解析を、ヒト毛髪に対して行った。その結果、紫外線照射により毛髪の超硫黄分子は有意に減少し、毛髪強度も減少した。さらに毛髪に対して超硫黄分子の供給をしたところ、非常に興味深いことに毛髪強度も回復することが観察された。

3) 超硫黄タンパク質の網羅的解析を実現するために、アルキル化剤をモチーフとしたタンパク質ポリスルフィド修飾用タグ分子の構造展開を行った。その結果、脱離能や立体障害を制御することでポリスルフィド基への相対的反応性を制御することが可能となり、超硫黄プロテオミクス実現に向けて有力なタグ化試薬の分子構造の候補を見出した。続いて、超硫黄タンパク質の選択的濃縮を実現するため、アルキニル基を導入したタグ分子群の合成を実施し、クリックケミストリーによるビオチンの導入及びアフィニティー精製による超硫黄修飾タンパク質の選択的濃縮を介して、質量分析による検体中の超硫黄化タンパク質の検出に成功した。

公募研究課題名：部位特異的な超硫黄化法の開発

(1)既存の超硫黄研究では、チオール基 (R-SH) を超硫黄化する ($\text{R-S}_n\text{-H}$, $n \geq 2$) ために、ポリスルフィド (Na_2S_n) を外部から添加する。しかし、この手法では、細胞内に存在しているフリーのチオール基が一定の確率・割合で超硫黄化されてしまうことから、多種多様な超硫黄種が発生し、複雑なシングルとなるため、その解析は困難を極める。そこで、本研究では、チオール基特異的な化学修飾法を利用し、細胞内のチオール種を部位特異的に超硫黄化する化学ツールを開発した。

(2)開発した光ケージド型超硫黄化ツールを用いることで、細胞内で光照射依存的に超硫黄種を発生させ、種々のタンパク質の超硫黄化に成功した。また、オルガネラ局在能を付与した超硫黄化ツールの開発にも成功した。

公募研究課題名：硫黄導入試薬の合理的分子設計に基づく超硫黄分子の精密有機合成

(1)所望の硫黄数の超硫黄分子を自在に合成できる超硫黄分子の新規合成法確立を目指した。検討の結果、上記目的達成に必須となる新規な硫黄原子導入反応を見出し、超硫黄分子合成への展開も達成した。

(2)入手容易なジスルフィドに対して本研究で見出した新規硫黄原子導入反応を適用することで、超硫黄分子の1種であるトリスルフィドおよびテトラスルフィドを高純度で供給することに成功した。

計画研究課題名：タンパク質構造生物化学に立脚した超硫黄分子の可視化

(1)本研究では、タンパク質中における超硫黄分子の反応性を理論的に議論するために、原子・分子レベルでの「可視化」を進めることを目的としている。X線結晶構造解析(電子による散乱解析)とクライオ電子顕微鏡(原子による散乱解析)を組み合わせ、超硫黄分子がもつ立体化学的(硫黄原子間の距離や角度、フレキシビリティ)とその環境(タンパク質配位と硫黄超原子価状態)との相関を明らかにする。中間評価までに、超硫黄原子を必要とする生体内代謝系と関与する蛋白質を生化学実験などで精査し、超硫黄分子の生理的な機能解明に直結するターゲットを選抜した。さらに、これらのターゲット蛋白質の機能解析に加え、立体構造解析を進めた。

(2)これまでに、鉄硫黄クラスター生合成系およびグルタチオン代謝系において、超硫黄分子が実質的な機能を果たしていることを明らかにした。大型放射光施設 (SPring-8・BIBLS) およびクライオ電子顕微鏡 (東北大・BIBLS) を利用して構造データを収集し、超硫黄分子の可視化に加え、コア複合体のダイナミックな構造変化も捉えることができた。

公募研究課題名：過酸化による機能調節メカニズムを解明するタンパク質 NMR 構造解析技術の開発

(1)本研究では、タンパク質システイン残基の過酸化 (-SSH 化) がその生理機能等に与える影響を、溶液 NMR 法を用いることにより、立体構造およびダイナミクスの観点から解析する技術を確立し、大腸菌 tRNA s²U34 硫黄修飾系に適応することでその制御機構を明らかにすることを目的とした。

(2)化学的に不安定な過酸化状態を数日間安定に保持する NMR 試料調製法を確立した。これを応用し、tRNA 硫黄修飾系の構成タンパク質のひとつである TusE において、C108 の側鎖の過酸化状態として運搬する積荷硫黄を、分子構造の内部に保護することで、安定に硫黄を保持する機構を見出した。この内容は、公募研究期間中に複数の学会発表を行い、雑誌論文も準備中である。また、領域内において計画班の潮田亮博士らとの共同研究を推進し、共著として *Cell Reports* 誌に論文を発表した。

計画研究課題名：非線形ラマン散乱を用いた細胞内超硫黄分子の in situ 検出と動的変化の解明

(1) 振動スペクトルである非線形ラマン散乱 CARS (Coherent anti-Stokes Raman Scattering) 顕微鏡システムを製作し、単一生細胞内にある超硫黄分子のラマンイメージングを用いた観測・量子化学計算を用いた構造の同定・各種ラマン解析法を組み合わせた生理現象に伴う超硫黄分子の代謝変化の解明を目的とする。また領域内の様々な生理現象に対してラマン顕微鏡を用いた共同研究を行う。現在の期間までに、CARS 顕微鏡の製作と機械学習・各種ラマン解析手法の開発・整備、培養細胞内に導入された超硫黄分子のラマンイメージング測定、ラマンイメージングを用いた細胞内濃度定量法の開発と超硫黄分子への応用、タンパク質の超硫黄化のラマン検出と機能解析を行った。

(2) 以下が得られた成果である。

1) CARS 顕微鏡の製作と解析手法の開発

現有のピコ秒白色光レーザーとステージスキャン型の倒立顕微鏡に対して、近赤外域まで測定可能な分光器と CCD 検出器を購入し、CARS 顕微鏡システムの立ち上げを行った。1 秒以下の露光時間で高分子の C-H 伸縮振動などに由来する CARS バンドの観測に成功し、また単一生細胞のラマンイメージング測定も行うことができた。しかし CARS はレーザー光強度の 3 乗に比例して信号を得るために、信号強度の時間的な揺らぎが大きい。高速測定は可能であるが、強度の定量性が低い問題がまだ解決されていない。そこで現時点では、定量測定には現有のレーザー光強度の 1 乗に比例する自発放射型のラマン顕微鏡を用い、ダイナミクスなどの時間変化測定には CARS を用いて測定を行っている。今後、水のラマンバンドを用いた CARS の定量評価を行う手法について開発を進める。また、機械学習、二次元相関、多変量スペクトル解析などラマンスペクトルのビックデータ解析を行う様々な手法の開発・整備も併せて行った。これらの解析手法を用いて、ラマンイメージングの定量性の増加・時間変化の解析のみではなく、細胞内温度変化などの超硫黄分子の細胞内導入に伴う細胞状態変化のその場判別を行う予定である。

2) 細胞内超硫黄分子のラマン測定

ラマン散乱はラベルフリーで単一生細胞内の分子の同定・構造情報をその場で得ることができ、細胞内の超硫黄分子の観測では極めて有効な手法だが、生細胞内での超硫黄分子のラマン観測の例は知る限りではなく、単一生細胞内にある超硫黄分子の直接観測は行われていなかった。我々は、膜透過性高分子などを用いて生細胞内に超硫黄分子の高効率導入を行い、単一培養細胞内での超硫黄分子のイメージング、代謝過程についてラマン顕微鏡を用いた観測に成功した。

超硫黄分子の多くは難水溶性であり、高効率細胞内導入ができない。我々ははじめにオレイン酸とウシ血清アルブミンを用いて硫黄の基本単位 S_8 の細胞内導入を行い、 S_8 の細胞内観測に成功した（赤池グループ（東北大）との共同研究）。さらに、生体膜のリン脂質と同様の構造を持つ 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) 高分子を用いることで、以下のように超硫黄分子の水溶化と細胞内の高効率導入・ラマンイメージングによる超硫黄分子の細胞内濃度・代謝過程の測定に成功することができた。

MPC の実験では、MPC を用いた難水溶性分子の細胞内導入とラマンイメージング観測のプロトコルの作成を目的として、難水溶性分子 *all-trans-retinoic acid* の細胞内導入とラマンイメージング測定・濃度定量をはじめに行った。次に、超硫黄分子として SSS 結合を持つジメチルトリスルフィド (Me_2S_3) と SSSS 結合を持つジメチルテトラスルフィド (Me_2S_4)、コントロールとして SS 結合を持つジメチルジスルフィド (Me_2S_2) の細胞内導入を行った。MPC を用いてこれらの化合物の水溶化に成功し、HeLa 細胞を培養している培地に導入した。用いたすべての分子で 500 cm^{-1} の領域にある S-S 伸縮振動バンドが細胞内で明瞭に観測され、単一培養細胞内での超硫黄分子の観測と S-S 伸縮バンドによるイメージング測定に成功した。イメージング測定から、細胞内に導入された Me_2S_3 は、脂肪滴とミトコンドリアに選択的に局在することを示した。一方、 Me_2S_2 は Me_2S_3 よりも細胞内導入量は少なく、また脂肪滴にある程度は局在するものの、ミトコンドリアへの局在は観測されなかった。硫黄鎖長がさらに長くなった Me_2S_4 は、 Me_2S_3 よりもさらに高効率で細胞内に導入され、脂肪滴とミトコンドリアに局在した。これらの結果から、硫黄鎖長が長くなるほど細胞内に取り込まれやすいこと、超硫黄分子は脂肪滴とミトコンドリアに局在することを示した。また、 Me_2S_3 および Me_2S_4 が導入された脂肪滴では、もとの化合物以外の複数の S-S 伸縮振動バンドが観測され、脂肪滴内での代謝過程を観測することができた。 Me_2S_2 が入った脂肪滴では Me_2S_2 以外のバンドは観測されなかった。オレイン酸のような脂質環境中では Me_2S_3 と Me_2S_4 は複数の S-S 伸縮バンドが生じないことから、脂肪滴内の酵素によって生じた代謝過程を観測

し、超硫黄分子で優先的に代謝が生じていると考えられる。このような細胞内の超硫黄分子のその場観測の例はなく、今後は CARS 顕微鏡を用いて超硫黄分子の導入と代謝過程の時間変化の観測を行う。

3) ラマン散乱を用いた細胞内分子の濃度定量法の開発

ラマンイメージングを用いて単一生細胞内にある超硫黄分子などの生体分子のその場濃度定量法を開発した。イメージングで同時に観測される細胞外の水のラマンバンドを内部標準として、細胞内の生体分子のラマン強度を定量化し、検量線と比較することで細胞内にある分子濃度をその場で得ることができる。単一細胞内にある DNA、RNA、タンパク質の濃度定量に成功し、PMC によって導入した超硫黄分子の細胞内濃度定量、濃度イメージングも得ることができた。

4) タンパク質の超硫黄構造検出法の開発

10-30 μM のタンパク質水溶液にポリエチレングリコール(PEG)が高濃度になるよう溶解させることで、タンパク質が数 mM に濃縮された液滴を作成し、ラマン顕微鏡を用いた液滴観測からタンパク質の高感度ラマン測定ができることを提案した。S-S 伸縮バンドが超硫黄化に伴い低波数シフトすることを利用し、タンパク質内の超硫黄構造の高感度検出に用いることができる。

5) S-S 結合によるタンパク質の機能変化

代表的な抗酸化タンパク質である SOD1 のオリゴマーが筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の発症と関係があることが指摘されており、オリゴマーの毒性起源・作用機序が注目されている。我々は SOD1 のオリゴマーが強い酸化作用を有することを示し、毒性の起源となりえることを提案した。さらに、SOD1 の分子内にある一つの S-S 結合の解離のみで強い酸化作用が生じることがわかった。S-S 結合の解離がオリゴマー形成を誘起することが知られているが、オリゴマーを形成しなくても、S-S 結合の解離のみで抗酸化力から酸化力を有するタンパク質にスイッチすることがわかった。

計画研究課題名：超硫黄分子のマルチイメージングとその生合成制御のためのケミカルツール開発

(1) 領域設定期間内において、各種超硫黄分子の解析のための蛍光プローブ及び NMR プローブの開発を行い、それによって、これまで不可能であった超硫黄分子のイメージングや定量計測を実現することを本研究の目的としている。さらに、本研究領域において、これらのツール開発を行うのみならず、これらのツールを基盤とした領域内共同研究を推し進める。さらに、開発する蛍光プローブを用いて独自の研究アプローチによって、硫黄代謝ダイナミクスを制御するタンパク質に対する生合成制御分子の開発や、硫黄代謝異常の高感度検出による疾患の診断技術の開発にも取り組み、超硫黄分子と疾患の関わりを理解も推進する。

(2) 以下がそれぞれの研究項目の進捗状況である。

1) 超硫黄分子種の産生酵素である cystathionine γ -lyase (CSE) の選択的阻害剤の開発 (Sci. Rep. 13:16456, 2023)

CSE 阻害剤のハイスループットスクリーニング (HTS) のために、独自に我々が開発した H₂S 選択的蛍光プローブ (HSip-1) (JACS 133, 18003-18005 (2011)) を用いてアッセイ系を構築した。本アッセイ系を用いて、東京大学創薬機構が所有する約 16 万化合物に対してスクリーニングを行い、CSE 選択的阻害剤を得ることに成功した。さらに得られた阻害剤について、CSE 選択性の評価や X 線結晶構造解析、SPR 測定、誘導体合成を通して、その機能評価や阻害機構について考察を行った。

2) 超硫黄分子種の産生酵素である cystathionine β -synthase (CBS) の選択的阻害剤の開発

CBS 阻害剤のハイスループットスクリーニングのために、独自に新たな H₂S 選択的蛍光プローブ (azideSiR600)を開発し、高感度に CBS の酵素活性を蛍光検出できるアッセイ系を構築した。本アッセイ系を用いて、東京大学創薬機構が所有する 32,000 化合物に対してスクリーニングを行い、CBS に高い選択性を示す阻害剤を得ることに成功した。現在、A01 班 和田グループに得られた阻害剤と CBS との共結晶の解析に取り組んで頂いている。

3) 硫黄代謝異常の高感度検出による疾患の診断技術の開発 (Adv. Sci. 2306559, 2023)

分担者である小松 (東大院薬) によって、マイクロチャンバーを用いた一分子の酵素の活性を検出するアッセイシステムを用いたリキッドバイオプシーの疾患診断技術の開発に取り組んでいる。各種酵素に対するアッセイ系の構築を行っているが、これまでにコリンエステラーゼの酵素活性を高感度に検出できるアッセイ系の構築に成功している。

4) γ -Glutamyltranspeptidase 5 (GGT5)の活性検出蛍光プローブの開発 (特許出願, 特願 2023-178650)

GGT5 は、glutathione (GSH)や leukotriene C₄ (LTC₄) などの γ -glutamyl 化合物を代謝することで炎症や免疫などに関与することが報告されている。近年、好酸球性副鼻腔炎患者の好酸球における GGT5 の発現とその代謝物の上昇が報告されており (Miyata et al., *Allergy* 2019)、喘息などのアレルギー疾患と GGT5 との関係が注目されている。これまでの研究によって、GGT5 の酵素活性によって 530 nm の蛍光強度が約 20 倍上昇する蛍光プローブの開発に成功した。さらに、GGT5 を一過性に過剰発現させた HEK293 細胞に蛍光プローブを加えたところ、上清の蛍光強度が経時的に上昇することが観測された。このように世界初の GGT5 活性検出蛍光プローブの開発に成功し、これら成果について特許出願を行った。今後は、本プローブを患者由来の好酸球などのヒト検体へと応用し、病態診断へと応用していく。

5) ミトコンドリアでの蛋白質合成を可視化する蛍光プローブの開発 (特許出願, 特願 2024-028006) (A02 班 魏グループとの共同研究)

ミトコンドリアは独自の DNA を有し、そこで合成されるタンパク質は、電子伝達系及び酸化リン酸化に必須である。本研究では、ミトコンドリア内のタンパク質合成を選択的に検出する蛍光プローブの開発を行った。ミトコンドリア局在性蛍光色素である Rhodamine B と、リボソーム内で伸長するペプチド鎖の C 末端に共有結合する Puromycin とをリンカーを介して結合させた蛍光プローブをデザイン・合成した。開発したプローブはミトコンドリアに局在し、再構成型無細胞翻訳系においてリボソーム内で翻訳途中のペプチド鎖に結合可能であることを示した (これら成果について特許出願を行った)。今後は、本プローブを正常細胞またはミトコンドリア病モデル細胞へと適用し、ミトコンドリア内で合成されるタンパク質の検出と解析を行う予定である。

6) 領域内共同研究の推進

- ・ A03 班 西田グループへの sulfane sulfur 検出蛍光プローブ SSip-1 DA の供与
- ・ A02 班 澤グループへの H₂S 検出蛍光プローブ HSip-1 の供与と阻害剤スクリーニングのサポート (Front. Microbiol., section Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy, 14, 1276447, (2023))

- ・ A01 班 中川グループへの HSip-1 の供与
- ・ 分担研究 小林グループへの HSip-1 および SSip-1 DA の供与
- ・ 分担研究 小金澤グループへの 3MST(3-mercaptopyruvate sulfurtransferase)の阻害剤(Sci Rep. 2017;40227)を供与

**分担研究課題名：超硫黄化アミロイドに特異的な核酸プローブとエクソソームを用いた高感度検出法の開発
(令和2年度のみ、学術変革領域 B への採択のため辞退)**

(1)本研究は、凝集性アミロイドのトリスルフィドアナログに対するアプタマーを作成し、動物由来のエクソソームを用いて高感度検出系を開発することを目的としている。目的アミロイドは Cys 残基を 2 つ有することから、この残基を含む配列で Cys トリスルフィドの配座固定アナログを計画した。トリスルフィド前駆体を含むペプタペプチド誘導体を Fmoc 固相法で合成した後、*N,N'*-チオジフタルイミド処理によってトリスルフィド体を得た。経時的な HPLC 分析より得られたトリスルフィドは光にやや不安定であることがわかった。ビオチン標識を行った後、ストレプトアビジン標識磁性ビーズに結合させることで、アプタマーの探索用プローブとした。

(2)高感度検出系の構築のための準備実験として、アプタマー結合駆動型の蛍光検出プローブを合成した。モデルアプタマーを用いた検証において、アプタマーが標的分子に結合することで感度良く蛍光を発するシステムを 96 穴プレート上で構築した。

計画研究課題名：定量的超硫黄オミックス・イメージング技術の開発と標準化プロトコールの確立

(1)本研究では、定量的超硫黄オミックスおよびイメージング技術の開発と世界標準化プロトコールとデータベースを構築する。この分析技術を基に、新たな疾病、老化制御・長寿医療の研究基盤を確立する。例えば、超硫黄オミックスやイメージングにより生体の硫黄代謝動態をモニタリングすることで、日常的な健康管理のみならず、動脈硬化などの生活習慣病、慢性炎症性肺疾患、心筋梗塞・心不全などの難治性心疾患などにおける病状把握や病態解明や予防・治療法の開発に繋げる。さらに、総括班のミッションである超硫黄のグローバルコンソーシアム構想と国際標準化・データベース化を支援し着実に遂行する。このことにより超硫黄生物学を世界的レベルで展開する。

(2)これまでに、生体内の多種多様な硫黄代謝物の統合メタボロームを確立し、培養細胞や各種組織・臓器、血液（ヒトおよびマウス）中に超硫黄分子がミリモルオーダーで存在することを見出した。加えて、超硫黄捕捉カプセルを用いた解析により、広く自然界に存在する環状八硫黄 S_8 が、生体内に高濃度で生成していることを明らかにした。現在、顕微質量計およびラマン分光法を用いた硫黄代謝物の生体内計測と *in vivo* イメージングの確立に向けた解析に取り組んでいる。引き続き、定量的な超硫黄分析技術を基にした超硫黄生物学研究を国際的展開も含めて強力に推進する。

公募研究課題名：超分子カプセルを基盤とする超硫黄分析ツールの開発

(1)本研究では、超硫黄の生物学的機能を合成化学的アプローチで解明するため、自己組織化によって精密合成した水溶性の「超分子カプセル」を活用して、人工および生体環境での1) 超硫黄の効率的捕捉と高安定化、2) 超硫黄の高選択捕捉と高感度検出に関する革新的な技術を開発する。さらに、新規な超硫黄薬剤を目指して3) 超硫黄の放出機能を有する刺激応答性の超分子カプセルを開発する。

(2)超分子カプセルを利用した「蛍光分析」により、簡便な超硫黄の検出法（Turn-on/off型）を開発して、インビトロで原理証明を達成した。生化学実験およびデータ解析は、赤池孝章 教授・松永哲郎 助教・Uladzimir Barayeu 博士（東北大学大学院医学系研究科）および増田真二 教授・野々山翔太 博士（東京工業大学 生命理工学院）が担当した。超分子カプセルの細胞内への導入と細胞内で捕捉した超硫黄の質量分析に成功している。超分子カプセル技術で細胞内の S_8 の量は定量的に確定できた。

公募研究課題名：システイン含有蛋白質と反応する酸化脂質の網羅的解析・評価

(1)本研究は、「システイン含有蛋白質と反応する酸化脂質の網羅的解析・評価」を目的とし、1) 求電子性分子検出蛍光プローブの合成、2) 酸化脂質由来求電子性分子の検出・解析及びリスト化、3) リスト化した酸化脂質と反応するシステイン含有蛋白質の特定、の3点を検討項目とした。

(2)蛍光団とSH基を結合させた新たな蛍光プローブを合成し、リン脂質としてPAPC (1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-phosphatidylcholine)、PLPC (リノール酸含有) や、PDPC (ドコサヘキサエン酸含有) との反応性を評価し、SH基と反応しうる酸化リン脂質をリスト化した。このリスト内には、これまでSH基と反応性の報告がない数十種類の酸化リン脂質が含まれている。そこで、これらリストをもとに、蛋白質との反応性を評価した。まず、tBHP刺激下の細胞内でこれら酸化リン脂質が生成しうることを上記検出プローブにて確認した。次に、これら生成しうる酸化リン脂質の分子量情報をもとに、モデル蛋白質 GAPDH と反応しうるか解析し、蛋白質内のSH基と酸化リン脂質分子が反応しうることを新たに見出した。さらに蛋白質抽出液と酸化リン脂質との反応解析を進め、非常に多くの蛋白質SH基と酸化リン脂質が反応しうるということがわかった。以上の結果は、生成した酸化リン脂質が、蛋白質内のSH基と共有結合できる可能性を強く示唆するものである。

計画研究課題名：ミトコンドリアでの超硫黄産生によるエネルギー代謝と低酸素適応

(1)本研究では、ミトコンドリアの電子伝達系における超硫黄分子の役割を解明し、酸素利用の効率化における超硫黄の必要性和、低酸素環境でのエネルギー代謝における超硫黄の貢献を明らかにすることを目的としている。1) 転写因子 NRF2 による硫黄代謝を介したミトコンドリア機能活性化機構、2) 誘導的 CARS2 変異がもたらす造血組織への影響、3) 慢性低酸素がもたらす代謝変化、4) GCN1 の生理的機能の解明、という4つの課題に挑んだ。

(2)以下に項目ごとの進捗を示す。

1) 転写因子 NRF2 による硫黄代謝を介したミトコンドリア機能活性化機構

転写因子 NRF2 は、シスチントランスポーターxCT を活性化することにより、細胞のシスチン利用を促進する。ミトコンドリアにおける超硫黄産生とそれに続く硫黄代謝が、電子伝達系と共役して酸素呼吸の効率化に貢献していることから、NRF2 は細胞への硫黄補給の促進を介してミトコンドリアにおけるエネルギー代謝を促進することが明らかになった (Alam et al., Redox Biol 2023)。

2) 誘導的 CARS2 変異がもたらす造血組織への影響

超硫黄産生活性を喪失した CARS2 AINK 変異体をノックインしたマウスを利用して、誘導的に CARS2 AINK のみを発現するマウスを作成したところ、重度の貧血と造血幹細胞の枯渇がおこることがわかった。造血細胞のミトコンドリアでは、電子伝達系を構成する因子の超硫黄化が低下している可能性が示唆された。

3) 慢性低酸素がもたらす代謝変化

慢性的な低酸素状態において、炎症応答が増悪することを見出した。詳細な解析から、ピリドキサルリン酸が激減していることがわかった。ピリドキサルリン酸は、超硫黄分子産生に必須の補酵素であることから、炎症の増悪には、超硫黄分子の低下が関与する可能性を考えて調べたところ、予想どおり慢性低酸素では超硫黄のレベルが低下し、その補充により炎症応答の増悪が解除された (図1、Seine et al., Nat Metab 2024)。

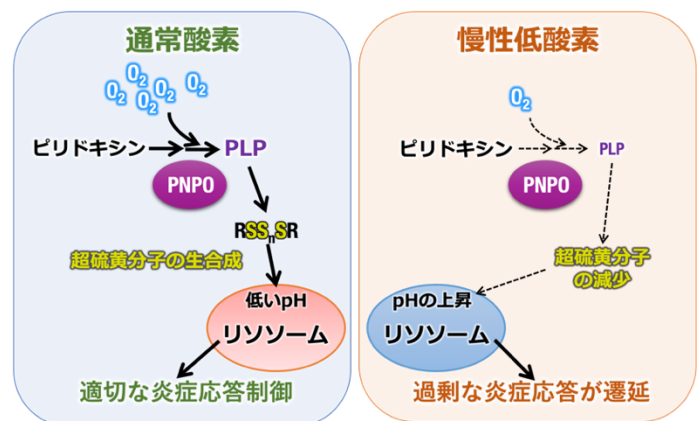


図1. 慢性低酸素状態では、酸素を必要とするPNPOの活性が低下するためPLP合成が抑制され、PLP依存性酵素である超硫黄分子産生酵素の機能が低下する。超硫黄分子は抗炎症作用を有することから、慢性低酸素では超硫黄分子の低下により、炎症の重篤化と遷延化が起こる。

4) GCN1 の生理的機能の解明

転写因子 ATF4 は CTH の発現誘導を介して超硫黄産生を制御する。ATF4 の上流活性化因子 GCN1 の生理的機能を明らかにするため、タモキシフェン誘導性 Cre 発現マウスを用いて *Gcn1* コンディショナルノックアウト (CKO) マウスを作製した。タモキシフェン投与後、*Gcn1* CKO マウスにおいて一過性の体重減少、肝臓および白色脂肪組織の中性脂肪の減少と血糖値および血中 VLDL の低下を観察した。これらの表現型はタモキシフェン投与中止により消失し、GCN1 遺伝子欠失後も更なるタモキシフェン投与により再発現することから、本表現型の発現には、GCN1 欠失とミトコンドリア毒性作用を持つタモキシフェン投与の両方が必要であることが明らかになった。*Gcn1* CKO マウス肝臓のプロテオーム解析により、ミトコンドリアβ酸化の低下とペルオキシソームでの脂質異化の亢進が示唆された。以上の結果より、GCN1 は環境に応答して全身のエネルギー代謝を制御することが明らかになった。

公募研究課題名：活性硫黄分子種の炎症発癌に果たす意義の解明

(1)活性硫黄分子種による炎症発癌の抑制の検討を目的とした。炎症発癌のドライバー分子の特定とシグナル分子修飾の解析のために、癌組織試料から網羅的抽出と絞込みによる活性硫黄による修飾分子の同定を計画した。これまでに、*Cars2* 遺伝子変異マウスを用いて、急性期炎症による炎症発癌モデルを用いた解析を実施し、活性硫黄分子種が半減したマウスにおいて腫瘍形成が抑制される結果を得た。

(2)代表研究者が確立した炎症発癌モデル(Am J Pathol 2003; Int J Cancer 2007)を用いて活性硫黄分子種の炎症発癌に果たす意義の解明に関する研究を実施した。CARS2^{+/+}マウスとWTマウスに対して、10×5×3 mm に細切したゼラチンスポンジを皮下に移入し、その移入スポンジ内に 10 万個の退縮型マウス線維肉腫細胞 (QR-32) を移植した。いずれの遺伝子型マウスも移植初期には全例で腫瘍増殖を開始し、腫瘍増殖は移植後 12 日目まで継続した。しかし、移植後 12 日目以降を境として CARS2^{+/+}マウスでは腫瘍の

自然退縮が始まり 34 日目以降には全例で腫瘍退縮した。WT マウスでは全例で致死増殖した。QR-32 細胞を単独皮下移植したところ遺伝子型に関わらず全てのマウスで自然退縮した。移植後 12 日以前の腫瘍組織から免疫細胞・炎症細胞を回収し、表面マーカーによる滲出細胞種の変化を解析した。その結果、WT マウスに比べて CARS2^{+/+} マウスでは、cDC1 細胞と疲弊 CD8T 細胞が減少していた。今後、活性硫黄分子種による疲弊 T 細胞の誘導機構を明らかにする。

公募研究課題名：超硫黄分子に着目したアミノアシル tRNA 合成酵素の新規機能の探索

(1) 本研究では、IFN- γ 刺激下でのトリプトファン tRNA 合成酵素(TrpRS)を介する高感度な Trp 取り込みの作用機序の解明に挑んだ。ヒト TrpRS がトリプトファン AMP の合成を介して高感度 Trp 取り込みを促進することを明らかにした。マウスでは、ヒト TrpRS と同じ分子長のものに加え、alternative splicing により 6 アミノ酸配列(Cys-Phe-Cys-Phe-Asp-Thr)を C 末端に付加された TrpRS バリエントが産生され、その TrpRS バリエントでは、6 アミノ酸配列内の Cys 残基の硫黄が機能制御に重要であることを明らかにした。

(2) 6 アミノ酸付加型 TrpRS の機能を通常型 TrpRS の場合と比較しながら解析した結果、6 アミノ酸付加型 TrpRS の tRNA に対するアミノアシル化活性は、通常型 TrpRS のアミノアシル化活性に比べると著しく低いことが明らかになった。また、6 アミノ酸付加型の 6 アミノ酸内の二つの Cys 残基に部位特異的に Ser に置換すると、tRNA アミノアシル化活性がマウス通常型 TrpRS の活性まで上昇し回復することが明らかになった。以上のことより、マウス TrpRS 内の 6 アミノ酸中の Cys 残基が機能制御に重要であることが判明した。

計画研究課題名：ミトコンドリアにおける超硫黄分子リレーの分子基盤と生理的意義の解明

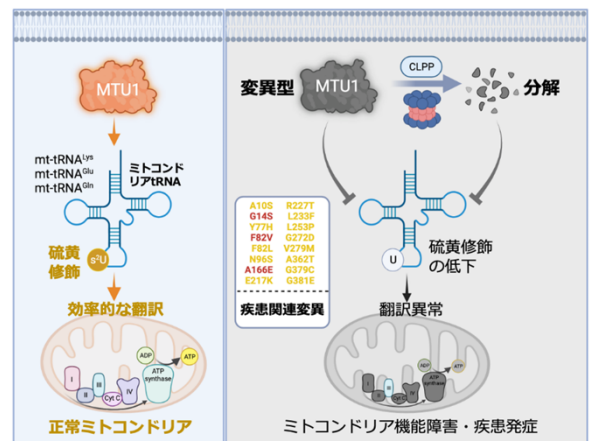
(1)哺乳動物ミトコンドリア DNA に由来する移転 RNA(tRNA)には超硫黄分子由来の硫黄修飾が付加されており、この硫黄は呼吸鎖複合体タンパクの生合成に不可欠であり、修飾の破綻がミトコンドリア機能低下とミトコンドリア病の発症に関連することが知られている。しかし、反応性の高い超硫黄分子がどのような経路で tRNA に伝達されるかが不明であり、超硫黄分子を起点とする翻訳と代謝制御の全貌解明に向けて、超硫黄分子リレーの巧妙な分子機構を理解する必要がある。そこで本研究は、1) 超硫黄分子をミトコンドリア tRNA に導くためのリレー因子ならびに同因子による翻訳制御機構の理解、2) 超硫黄分子に由来する新規硫黄修飾の同定と機能解明、3) 硫黄修飾の破綻による疾患発症機構の解明、以上3つの項目に取り組むことで、超硫黄分子による転写後遺伝子発現制御の基本原則の理解と疾患応用を目指す。中間評価実施までに上記のそれぞれの研究項目について、1) ミトコンドリア tRNA 硫黄修飾に関わる超硫黄リレー因子の同定、2) ミトコンドリア tRNA 新規硫黄修飾の発見、3) 硫黄修飾が関連するミトコンドリア病の発症機序の解明、が達成された。

(2)以下にそれぞれの項目の進捗を示す。

1) ミトコンドリア tRNA 硫黄修飾のリレー因子を同定するため、ミトコンドリア tRNA 硫黄修飾酵素に相互作用するタンパクの同定に取り組んだ。Bio-ID や IP-MS など先進的な実験系を構築しオミックス解析を行った結果、修飾酵素に結合する複数の新規因子を同定し、またその後の2次バリデーションでも結合が認められた。さらに、超硫黄を対象とするプロテオミクスを実施し、硫黄修飾酵素に存在する複数の超硫黄化部位の同定に成功した。このように、本研究項目は当初の計画通り中間マイルストーンを達成し、超硫黄リレーの全貌が明らかになりつつある。

2) ミトコンドリア tRNA の新規硫黄修飾を同定するため、質量分析装置を用いて硫黄修飾を標的に解析を行い、哺乳動物ミトコンドリア tRNA ではこれまで報告されていない硫黄修飾を発見した。また、本学術変革領域内の研究者との共同研究により、この新規硫黄修飾は細胞内の酸化ストレス状態に密接に関係しており、酸化ストレス下におけるミトコンドリアの機能変容に重要な役割を有する可能性が示唆された。

3) 小児急性肝障害は新生児期にごくまれに発症する希少疾患であり、世界で50数例報告されている。患者は急激な肝機能障害、心不全、腎機能低下といった症状を呈し、死に至る症例も多数報告されている。小児急性肝障害患者において、ミトコンドリア tRNA 硫黄修飾酵素 MTU1 の一アミノ酸置換変異が多数報告されているが、変異による疾患発症の分子機構が不明であり、対症療法以外に治療法が存在しない。中間評価までの研究期間中に、ミトコンドリア tRNA 硫黄修飾関連するミトコンドリア病発症の分子機序を明らかにし、核酸研究のトップジャーナルである *Nucleic Acids Research* 誌に論文発表した(Ahmad RNR ら、2024)。本研究では具体的に小児急性肝障害患者で報告されている17種類の疾患関連変異が MTU1 の安定性や MTU1 の硫黄修飾活性にどのように影響するかを検討した。その結果、疾患型 MTU1 は正常型 MTU1 と比べて、タンパク質の安定性が著しく低下し、ミトコンドリア tRNA 硫黄修飾とミトコンドリアタンパク質翻訳が顕著に低下することを見いだした(図2)。また、疾患型 MTU1 の構造に関して本学術変革領域の研究者(筑波大学重田教授)と共同研究を実施し、1アミノ酸変異が超硫黄化を受ける活性中心に歪みを生じるさせる結果、構造変化を誘導することを明らかにした。加えて、疾患型 MTU1 の不安定化の原因として、ミトコンドリアに局在するプロテアーゼである CLPP が疾患型 MTU1 を積極的に分解していることをつきとめた。さらに、CLPP の阻害が疾患型 MTU1 の分解を抑制し、硫黄修飾の亢進と翻訳の改善につながった。これらの結果から、疾患型 MTU1 による疾患発症機構の一端を明らかにし、硫黄修飾酵素の分解を標的とする新しい治療法の開発に道筋をつけた。



Nucleic Acids Research, gkad1197, <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1197>

Published: 19 December 2023 Article history ▼

図2. MTU1 変異によるミトコンドリア機能障害。

公募研究課題名：オルガネラ膜接触場を介した超硫黄分子制御機構の解明

(1)近年のオルガネラバイオロジーの発展はめざましく、各々独立した小器官ではなく、2つないしは3つのオルガネラ同士がコンタクトし、さまざまな物質輸送を介して互いにコミュニケーションをとるこ

とが明らかにされてきた。新たにオルガネラコンタクトと超硫黄の関係を解析するために、可逆的かつ生細胞でオルガネラコンタクトを解析できるツール開発に取り組んだ。結果、NanoBiT システムを応用したミトコンドリア-小胞体コンタクト(MAM)解析ツール、MERBiT の開発に成功した。また、本ツールを活用し、MAM と超硫黄の新たな関係性を見出すことができた。現在、本内容は論文投稿中である。

(2)ミトコンドリア-小胞体コンタクト(MAM)解析ツールを開発後、本研究領域内での共同研究にて、超硫黄合成酵素の siRNA を供与していただき、超硫黄量がオルガネラコンタクトに及ぼす影響を検討した。結果、超硫黄合成酵素の発現抑制で、MAM が増加することが明らかとなった。本結果から、ミトコンドリア由来の活性酸素種(ROS)が MAM を増加させる、これまで未知だった生理的現象の発見に繋がった。また、計画研究の澤班との共同研究により、超硫黄ドナーを供与していただき、ROS が誘導する MAM と超硫黄の密接な関係が明らかとなった。

計画研究課題名：光合成における超硫黄分子の貢献

(1)本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナの CARS の解析を主軸にして、世界初となる超硫黄分子による光合成サイクリック電子伝達経路を証明し、植物が営む光合成の電子伝達系における超硫黄分子の役割を解明することが最終目的である。領域設定期間内に下記の4つの課題の達成を通じて、既存の光合成のメカニズムでは十分に説明できなかったサイクリック電子伝達機構を見だし、新たな光合成の体系を提唱する。

- 1) 植物における AtCARS に起因する超硫黄分子の役割の解明
- 2) 葉緑体/シアノバクテリアの CARS に起因する超硫黄分子の電子伝達機構の解明
- 3) 葉緑体/シアノバクテリアの SQR による PQ への電子伝達機構の解明
- 4) 超硫黄分子を介したサイクリック電子伝達経路による ATP/NADPH の算出

中間報告までに、1) では AtCARS の酵素活性測定と AtCARS の欠損植物の作製、2) では SynCARS の酵素活性測定と SynCARS 欠損株の作製、3) では SynSQR の酵素活性測定と SynSQR 欠損株の作製、4) では植物やシアノバクテリア、緑色硫黄細菌を用いたサイクリックな電子伝達経路を明らかにすることを目標とした。

(2)以下にそれぞれの項目の進捗を示す。

1) AtCARS と SynCARS にシステインパールスルフィド生合成活性があることを見出した。またこれらのアミノ酸置換変異株も作製した。AtCARS のシステインパールスルフィド生合成活性は温度依存的であることを明らかにした。

2) シロイヌナズナ CARS 変異体を用いた解析から、標的とした超硫黄関連因子が光合成および成長に関与しているか調べた。植物の生育には影響が出たものの、光合成速度には差がなかったりしたことから、葉緑体非局在および光合成とは異なる反応に関与していることが示唆された。

3) SynSQR は、大腸菌を用いたタンパク質が十分に発現せず、コドン最適化や発現条件を検討している。また、中間報告以降に予定している超硫黄と光合成の関係性を証明するための AtCARS/SynCARS/SynSQR 欠損株 (植物とシアノバクテリア) の作製に概ね成功した。通常条件において既に生育に異常 (クロロシス等) を示す欠損株も存在しており、CARS による超硫黄分子が植物の生育に影響を与えることが示された。

4) 嫌気性の光合成細菌である緑色硫黄細菌の研究から、硫化水素を酸化して生成される超硫黄分子が光阻害現象を媒介する可能性が示された。一方、酸素発生型光合成を行う細菌であるシアノバクテリアでは、細胞外からの超硫黄分子の添加の効果が好気環境では不明確であったのに対し、光合成電子伝達系の停滞が発生しやすい無酸素環境下において顕著な増殖促進効果をもつことがわかった。

公募研究課題名：植物の硫黄同化・代謝とその調節機構の再考：超硫黄分子関与の可能性

(1)植物における硫黄(S)不足(-S)応答のマスター調節因子である SLIM1 転写因子について、1) 高等植物における機能分化に至る分子進化、2) S 栄養に応じた SLIM1 の機能発現機構、3) 過酸化 GSH が植物の生育促進や S 貯蔵に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

(2)以下にそれぞれの項目の進捗を示す。

1) シロイヌナズナでは6種の分子種がエチレン応答と-S 応答に機能分化を遂げているのに対し、ゼニゴケでは機能未知の EIL 転写因子が1種(Mp_EIL)のみ存在することを受け、Mp_EIL の機能解析に取り組んだ。Mp_EIL はシロイヌナズナのエチレン応答と-S 応答の双方を部分的に相補した。ゼニゴケで欠損株を取得し、-S 応答に働くこと、その他多くの機能を持つことを示した。

2) SLIM1 の機能発現に C 末端の 24 アミノ酸が必要であることを見出した。関連して、SLIM1 の制御下で働くグルコシノレート分解酵素 BGLU28, 30 が-S 下での S 分配を通して生育調節に働くことを明らかにした。

3) 硫酸イオン輸送体 SULTR2;1 欠損株ではロゼット葉のグルタチオン(GSH)が高蓄積し、抽台が早めることを見出した。

計画研究課題名：NADPH オキシダーゼによる超硫黄分子の活性化と感染・炎症制御機構の解明

(1) NADPH オキシダーゼ (Nox) はこれまで、Nox は酸素分子に電子を渡すことで、スーパーオキシド等を生成するとされてきた。しかし、最近、赤池班との共同により、Nox ファミリー因子である Nox2 と Nox4 がそれぞれ、極めて効率よく超硫黄分子に電子を渡して、硫黄側鎖が伸長した高反応性の超硫黄分子を産生することが明らかとなってきた。さらに、一酸化窒素合成酵素 NOS も同様の活性を有することを見出した。本課題では、Nox と NOS がともに NADPH 依存的に超硫黄分子を活性化する可能性を検討し、これらの酵素を、硫黄の酸化還元酵素という機能特性に基づき、NADPH:Sulfur Oxidoreductase (NSOR) として再定義する。さらに、活性酸素や一酸化窒素と超硫黄分子による抗菌・抗炎症制御のクロストークを明らかにして、NSOR 活性に基づき抗菌・抗炎症を誘導するという新たな発想に立脚した超硫黄分子創薬を目指す。

(2) これまでに得られた成果を下記にまとめる。

1) 様々な炎症性刺激がマクロファージに対して Nox の活性化 (Nox2) や NOS の誘導 (iNOS) をもたらし、炎症応答に密接に関わっている。このような炎症活性化において超硫黄分子がどのように炎症の制御に関わるかについては殆どわかっていなかった。これまでに赤池 (A01 班)、本橋 (A02 班) らと共同し、超硫黄産生酵素として cysteinyl-tRNA 合成酵素 (CARS) を同定したが (Nat Commun 2017 など)、この CARS の炎症制御における役割を解析した。その結果、CARS に由来する超硫黄分子は炎症の抑制・収束にきわめて重要な役割を担っており、その産生が低下すると炎症が過剰となり (いわゆるサイトカインストーム状態)、例えば新型コロナウイルスやインフルエンザウイルス肺炎の増悪をもたらすことを明らかにした (Nat Commun 2023; 赤池・本橋らとの共同研究)。したがって、Nox2 や iNOS はそれら自身が活性酸素や一酸化窒素を産生して病原体の排除をもたらすとともに、超硫黄のリモデリングを介して、宿主自身の炎症をコントロールする重要な役割を担っていることを明らかにした。さらにマクロファージ炎症モデルにおける超硫黄の抑制制御の重要性について、CARS の基質取り込みを制御しているシスチントランスポーター (xCT) のノックアウトマウスを用いた実験からも明らかにした (Redox Biol 2023 ; 本橋・赤池らとの共同研究)。

2) 赤池班との共同により「Nox が NADPH 依存的に超硫黄分子を活性化する」ことが明らかになりつつある。そこで、細胞内で超硫黄分子が活性化される場所、つまり細胞内のどこに Nox が局在化されるか、ということが問題となる。Nox ファミリー (ヒトでは Nox1~Nox5 および Duox1 と Duox2 の 7 メンバー) は膜貫通型の酵素であるが、本研究により私達は、上皮細胞ではそれぞれが異なる膜に局在することを示した。例えば、Nox1/2 と Duox1/2 は apical 側の細胞膜 (apical 膜) に局在する。

3) Nox1/2 を apical 膜に局在化させる分子機構について解析し、その局在化にはアダプタータンパク質 GRAF3 が必要であることを明らかにした。Trans-Golgi network から recycling endosome を経て apical 膜に輸送される過程に GRAF3 が関与する。GRAF3 は、Nox1/2 のヘテロ 2 量体を形成している p22phox に直接結合するとともに、液液相分離活性をもち、apical 膜への輸送を担う新規な複合体形成の中核となるタンパク質であることを新たに見出した (論文準備中)。Duox1/2 の apical 膜局在には、Duox1/2 とヘテロ 2 量体を形成する DuoxA1/2 が重要な働きをすることも見出した (論文準備中)。

4) Nox ファミリーの酵素は一般にカルシウムイオンやリン酸化により翻訳後調節を受けているが、唯一の例外が Nox4 である。すなわち、Nox4 ではそのタンパク質量の調節が大切であり、Nox4 量が増えるに従い、超硫黄分子の活性化も上昇すると考えられる。血管内皮細胞では低酸素刺激により Hif 依存性に Nox4 の転写が上昇しタンパク質量も増えることが知られている。本研究により、心筋細胞でも低酸素刺激で Nox4 は増加するが、この上昇は転写レベルでの上昇によるものではなく、タンパク質の安定化によることを明らかにした (論文発表済み)。興味深いことに Nox4 は、血管内皮細胞では主として ubiquitin-proteasome 系で分解されるが、心筋細胞では主として autophagy-lysosome 系 (ER-phagy) で分解される (論文発表済み)。

公募研究課題名：呼吸中枢における硫化水素合成が神経回路網の時空間ダイナミクスに果たす役割

(1) 硫化水素は毒ガスとして知られているが、近年、体内で合成された硫化水素および超硫黄分子が様々な生体システムの調節に関与していることが明らかになってきた。研究代表者は、先行研究において、脳全体での硫化水素の合成阻害は正常な呼吸運動の形成を妨げることを報告している。一方で、呼吸中枢は機能の異なる呼吸ニューロン群から構成されていることが知られている。中でも、延髄呼吸中枢のニューロン群は、呼吸形成における主要なニューロン群であることが知られている。そこで、延髄呼吸中枢の各ニューロン群における硫化水素合成の機能的役割を検討した。

(2)実験では、脳内循環が一定な条件で呼吸出力の変化を解析するために、ラットの経血管灌流標本を用い、呼吸出力変化に寄らずに脳内循環を一定に保った。その上で、脳内にその発現が確認されている硫化水素合成酵素 (cystathionine- β -synthase (CBS)) の阻害薬を、延髄呼吸中枢を構成する各脳領域へ微量投与し、呼吸神経からの呼吸出力に対する影響を解析した。その結果、延髄呼吸中枢の各脳領域における CBS 阻害は、阻害脳領域に特異的な呼吸出力の変化を引き起こした。このことは、脳内で合成された硫化水素は、延髄呼吸中枢の各脳領域において、異なる機能的役割を有していることを示唆した。さらに、CBS 阻害による延髄呼吸中枢神経回路網の時空間ダイナミクスをより詳細に捉えるために、多電極シリコンプローブを延髄呼吸中枢へ留置し、呼吸中枢のマルチニューロン活動の同時記録を行い、記録されたニューロン活動に対して主成分分析を行った。その結果、脳座標および主成分座標上において、呼吸中枢ニューロン群の活動を呼吸相に依存した時空間依存的な変動として表現することに成功した。したがって、呼吸中枢の神経回路網の時空間ダイナミクスについて、延髄呼吸中枢全体を対象として捉えることが可能となった。

公募研究課題名：シアン解毒・硫黄転移二酵素の生理的役割の解明

(1)シアン解毒・硫黄転移に関わる2つの酵素、MPST と TST の生理的役割の解明を目的とした。新規作成した MPST 欠損マウス、TST(ロダネーゼ)欠損マウス、その両者を欠損したダブル欠損マウスを用いて、シアン化物(CN⁻)イオン及び青酸配糖体に対する毒性を野生型マウスと比較した。その結果、マウス生体における定常時(食事由来)あるいは急性のCN⁻解毒に TST が重要な役割を果たすことが判明した。

(2)TST 欠損マウスとダブル欠損マウスは極めて脆弱で、MPST 欠損マウスはわずかに脆弱であった。血中・尿中の CN⁻及びチオシアン酸(SCN⁻)イオンを測定すると、野生型及び MPST 欠損マウスでは、それぞれ投与後に速やかに血中 SCN⁻濃度が上がる一方で血中 CN⁻イオン濃度に変化はなく、多くが SCN⁻として尿中排泄された。対照的に、TST 欠損マウスとダブル欠損マウスでは、血中 SCN⁻濃度の上昇はなく CN⁻濃度が急騰しており、主に CN⁻のまま尿中排泄されることが判明した。血中 CN⁻濃度の上昇に伴って血中乳酸濃度が急騰しており、乳酸アシドーシスが死因となりうることが判明した。臨床現場ではチオ硫酸ナトリウムあるいはヒドロキソコバラミンが CN⁻解毒剤として利用されるが、野生型及び MPST 欠損マウスにおいてその両者がシアン解毒に有効であった一方、TST 欠損マウスとダブル欠損マウスでは前者のみ無効であった。

計画研究課題名：タンパク質品質管理を支える電子移動媒体としての超硫黄分子の役割

(1)本研究では、[1]タンパク質品質管理を支える電子シグナルがどのように構築されるかを明らかにする。[2]小胞体内腔のレドックス環境がどのように維持されるのかを明らかにするという2つの課題を掲げ、タンパク質品質管理を支える電子伝達機構を解明することを目的として研究を進めてきた。期間内までに、還元酵素 ERdj5 から基質への電子伝達、また ERdj5 への電子伝達を明らかにし、タンパク質品質管理を支える小胞体の電子移動経路を明らかにすることを計画した。また、小胞体のレドックス環境を構築するグルタチオン輸送体の同定を目指した。ERdj5 を中心した電子伝達に関しては、新たに IP3 受容体への電子伝達を明らかにした。さらに、還元酵素 ERdj5 への電子伝達が、酸化酵素 Ero1 を介してタンパク質翻訳と共役して成立するという非常に興味深い知見を得ることが出来た。さらに新たな還元酵素 ERp18 が硫黄原子を介して亜鉛イオンと結合し、小胞体内腔の過酸化水素を除去していることが新たに分かった。このことは計画以上の成果であり、小胞体のレドックス環境を作る全く新しい因子を同定したことになる。また、小胞体のレドックス環境の基盤を作るグルタチオン輸送体も候補因子が見つかり、構造解析およびノックアウトマウスの樹立に着手している。こちららも現段階での進捗としては、当初の計画と比較して順調に研究が進んでいる。

(2)硫黄分子の役割を通じて小胞体のレドックス環境の構築機構を明らかにし、タンパク質品質管理に必要な環境基盤の理解を深めることが出来た。小胞体はこれまで酸化的環境とされてきたが、潮田らは小胞体内腔で還元反応の重要性を次々と明らかにしてきた。小胞体は細胞内ではカルシウムイオンの貯蔵庫として機能し、カルシウムイオンの恒常性はタンパク質品質管理の環境基盤として重要とされる。以前、小胞体内腔のジスルフィド還元酵素 ERdj5 が小胞体カルシウムイオンポンプ SERCA2b のジスルフィド結合 (S-S 結合) を還元し、カルシウムイオンの取り込み効率を促進することを見出していた (*PNAS*, 2016)。今回、小胞体カルシウムイオンチャネル IP3 受容体に着目し、小胞体内腔の酸化還元酵素が IP3 受容体のカルシウムイオン放出活性にどのような影響を及ぼすかを調べた。興味深いことに、還元酵素 ERdj5 は IP3 受容体のジスルフィド結合を切断し、カルシウムイオンチャネルの放出活性を負に制御することを明らかにした。一方、酸化酵素 ERp46、PDI、Ero1 は硫黄原子を介した電子伝達によって IP3 受容体のジスルフィド結合形成を触媒し、チャネル活性を正に制御することがわかった。ERdj5 に着目すれば、自身の還元活性によって、カルシウムイオンの取り込みを促進し、放出することで小胞体のカルシウムイオン恒常性を維持することを明らかにした (図 3. *PNAS*, 2023)。また、ERdj5 欠損細胞では、小胞体内腔のカルシウムイオン恒常性維持だけではなく、サイトゾルのカルシウムイオン恒常性維持にも影響を与えることが分かった。ERdj5 の欠損によってサイトゾルのカルシウムイオン濃度が異常に上昇することによって、ミトコンドリアの断裂に関わる Drp1 がカルシニューリンを介して異常に活性化することが分かった。この結果、ERdj5 の欠損は、ミトコンドリアの異常断裂を引き起こし、活性酸素種の蓄積を引き起こすことで細胞老化や線虫での個体老化が亢進することが分かった (*Sci. Rep.*, 2021)。これらの知見は小胞体におけるカルシウムイオン恒常性が、硫黄原子を介したレドックス制御によって、どのように維持され、タンパク質品質管理の環境基盤を作るのか、重要な知見となった。

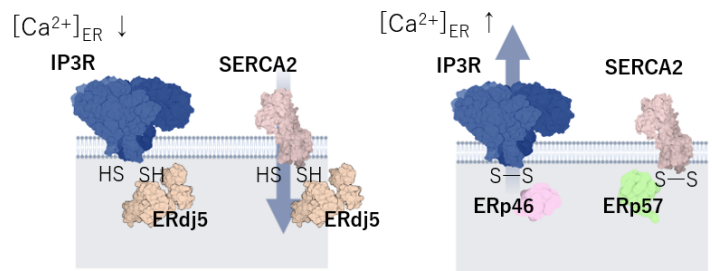


図 3 . レドックス制御を介した小胞体カルシウム恒常性維持

これまで小胞体における還元反応の生物学的重要性を明らかにしてきたが、酸化的小胞体内腔でどのように還元酵素にどのように電子が到達されるかは全く不明であった。潮田らは、ERdj5 に電子を与える因子として酸化酵素 Ero1 を同定し、Ero1 を介した酸化的フォールディングによって得られる電子を ERdj5 が自身の還元力に利用するというまったく新しい電子伝達機構を明らかにした (図 4. *Cell Rep.*, 2023)。

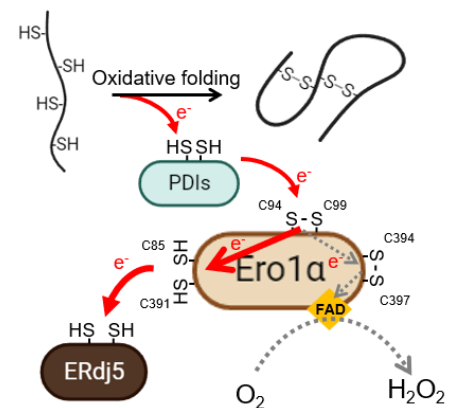


図 4 . Ero1 を介した ERdj5 への電子伝達

さらに潮田らは、硫黄原子を介して小胞体還元酵素 ERp18 が亜鉛イオンと結合することを見出した。小胞体内腔の亜鉛イオンの役割は不明な点が多いのが現状であったが、ERp18 は亜鉛イオンと結合

することで過酸化水素の除去活性を持つことを明らかにした。ERp18 による小胞体の過酸化水素除去活性は、小胞体からサイトゾルへの過酸化水素の漏洩を防ぎ、酸化ストレスを低減することで細胞および個体の老化に影響を与えることがわかった (*Cell Rep.*, 2024)。このことは、亜鉛イオン依存的なユニークな酵素発現メカニズムの発見であり、また小胞体レドックス環境の維持に亜鉛イオンが関わるという新しい知見を得ることが出来たと考えている。

公募研究課題名：脳における亜鉛制御に関わる超硫黄タンパク質の探索とその機能解析

(1)本研究では、超硫黄が Zn フィンガードメイン構造を有するような広範なタンパク質において亜鉛の結合・遊離のメカニズムに関与していると予想し、脳内においてサルフェン硫黄と亜鉛の両方を結合しているタンパク質を網羅的に探索し、亜鉛の制御における超硫黄の機能性をより明らかにすることを目的としている。

(2)マウス脳サンプルを使用し、細胞質、核、ミトコンドリア内の高分子画分中に結合している超硫黄と亜鉛量を調べたところ、超硫黄と亜鉛が共に核画分のタンパク質に最も多く結合していることを見出した。そこで、マウス脳核画分中のタンパク質を各種クロマトグラフィーで分離し、超硫黄と亜鉛が結合しているタンパク質を部分精製することに成功した。残念ながら単離・同定までには至っていないが、核内の多くのタンパク質に超硫黄が結合していることが分かった。更に、リコンビナントタンパク質を用いた検討により、複数の Zn フィンガータンパク質に超硫黄が結合していることも明らかにした。

公募研究課題名：硫黄の柔軟な電子授受の制御による二酸化炭素の還元および次世代製鉄法への学際研究

(1)本研究では硫黄の酸化還元特性を活かして、二酸化炭素の還元および炭素資源としての利用を目的とする学際研究である。硫黄アニオンによる二酸化炭素への直接的な 1 電子還元、および二酸化炭素の水素化体であるギ酸アニオンからの硫黄ラジカルによる水素原子引き抜きを併用したカルボン酸合成に適した硫黄試薬を明らかにしようとしており、当初想定通りの有機硫黄試薬が適用可能であることを確認した他、生体硫黄分子を用いた際にも適応可能であることを見出すなど、当初想定以上に研究に広がりを見出しつつある。

(2)芳香族チオールを用いて、二酸化炭素を用いたカルボン酸合成に成功した他、芳香族チオールと光触媒との共存により、ギ酸塩を原料としたカルボン酸合成にも成功した。またこれらの反応を、システインを用いた際にも適応可能であることを見出した。合成したシュウ酸を用いた NZE 型の鉄の還元にも成功した。

計画研究課題名：G タンパク質の超硫黄化による新奇シグナル制御とその生理的意義の解明

(1)本研究課題は、レドックス感受性 G タンパク質の超硫黄化によって引き起こされる新奇シグナル機構を生化学的・構造学的視点から明らかにすると共に、その生理的意義を解き明かすことを目的としている。G タンパク質超硫黄化の制御機構を心臓の生理応答と心疾患の観点から明らかにするとともに、G タンパク質の超硫黄化がオルガネラ品質管理やエネルギー代謝に果たす役割を追求することで、心筋や骨格筋のストレス抵抗性（頑健性）制御に果たす役割を個体レベルで明らかにする。中間評価実施時までには、ミトコンドリア制御 G タンパク質 Drp1 をモデルに Drp1 の超硫黄化が心筋細胞の虚血耐性に果たす役割を個体レベルで明らかにすることを目標に検証を進めてきた。

(2)これまでに得られた成果を下記にまとめる。

1) タンパク質超硫黄化を網羅的に解析する実験系を構築し、心筋梗塞後の心臓や低酸素培養した心筋細胞において Drp1 の超硫黄化が減少することを明らかにした。また、赤池班、中川班と連携して質量分析から Cys644 が超硫黄化されることを見出した。低酸素ストレスやタバコ副流煙などの環境親電子物質により Drp1 Cys644 の超硫黄鎖が脱硫黄化されると Cys644 のかさ高さが減ることで Drp1 活性が増加することを生化学および計算科学的解析から実証した (図 5)。

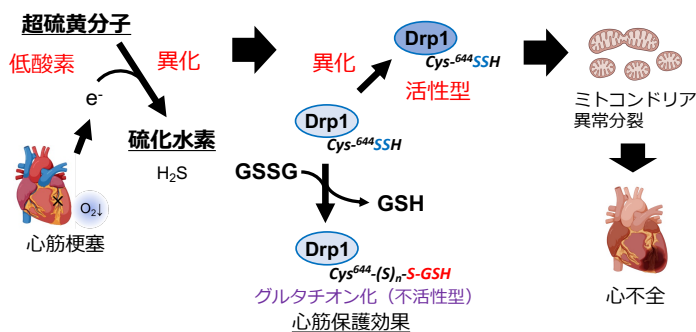


図 5. Drp1 Cys644 硫黄修飾を介した心筋の虚血耐性機構

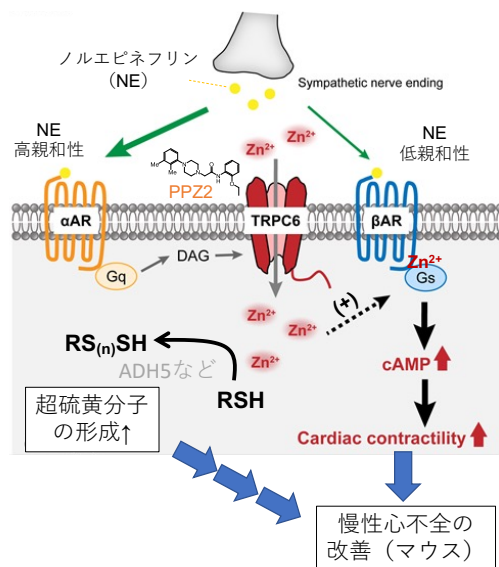
2) 超硫黄分子に選択的な蛍光指示薬を用いて心臓組織での硫黄イメージング手法を確立し、虚血ストレスによって超硫黄分子が硫化物 (H₂S/HS⁻) へと還元代謝されることを見出し、これが Drp1 の脱硫黄化を引き起こすことを明らかにした。還元ストレス (超硫黄分子の還元代謝) を伴う虚血性心筋障害の長期予後に対して、グルタチオンなどの従来の還元剤よりむしろ酸化型グルタチオンの方が心筋保護に有効であることをマウス実験から実証した。その作用機序として GSSG は Drp1 の Cys644 のグルタチオン化を促進することで虚血時に起こるミトコンドリア過剰分裂を防ぐことを明らかにした。

3) 海洋天然物由来の抽出物である Echinochrome A (Ech-A) は複数の臨床試験から虚血性心疾患に対する治療効果が報告されている。Ech-A は低酸素曝露時に起こる心筋細胞での超硫黄分子から硫化物への代謝 (還元ストレス) を抑制することで心筋梗塞モデルマウスの予後を改善することを明らかにした。

4) 赤池班・本橋班と連携して、ADH5 (Alcohol dehydrogenase 5) による NO 分解代謝活性に超硫黄分子による超硫黄触媒反応が関与すること、そしてそれが心臓の機能向上に関わることを明らかにした。

5) Brown 大学の Xian 教授および赤池班と連携して、H₂S を H₂S₂ に変換する新しい超硫黄分子産生プローブを開発し、このプローブが心筋細胞において産生される内在性の H₂S を超硫黄分子に変換する能力を有していることを明らかにした。

6) 鉛とタンパク質のシステイン側鎖間で形成される亜鉛-硫黄クラスターはタンパク質の機能調節に関与する。近年、このクラスター形成に超硫黄分子が関与することが明らかになりつつある。ノルアドレナリン刺激による心筋収縮応答の増強に受容体作動性陽イオンチャネル TRPC6 を介した Zn²⁺流入が関与することを明らかにした。TRPC6 活性化剤によって Zn²⁺流入を増強すると細胞内超硫黄分子の増加が確認され、一方、細胞内 Zn²⁺をキレートすると細胞内超硫黄分子は減少することを見出した。この結果から、TRPC6 による Zn²⁺流入を介した超硫黄レドックス動態の制御が心臓の恒常性維持に寄与することが示唆された (図 6)。



Oda S & Nishiyama K et al., Nat. Commun., 2022
国際特許出願 (PCT/JP2023/030211)

図 6. Zn²⁺透過型 TRPC6 チャネル活性化薬による超硫黄分子の形成を介した心不全改善。

公募研究課題名：動物発生における超硫黄分子

(1)動物発生における超硫黄分子の機能を明らかにするために、ゼブラフィッシュ胚・稚魚における超硫黄分子量を増減させ、その影響を観察する。このとき、胚・稚魚の各組織における超硫黄分子の量的変化も測定する。超硫黄分子を減らすためには、複数ある超硫黄分子産生酵素 (*cars2*, *cars1*, *cbsa*, *cbsb*, *cth*, *cthl*) の破壊系統を含めて作成・解析する。超硫黄分子を増やすためには、硫化水素ドナー硫化ナトリウム等をゼブラフィッシュに添加するか、*cbsb* の発現上昇が観察される *keap1a;keap1b* 二重破壊系統など遺伝子破壊により超硫黄分子の産生量が増える系統の作成・解析に取り組む。

(2)*cars2*, *cbsa*, *cbsb*, *cth*, *cthl* の遺伝子破壊系統は系統化し、また、*keap1a;keap1b* 二重破壊系統を系統化し、そのうち *cars2*, *cbsb*, *cth*, *keap1a;keap1b* 破壊系統の致死性は解析した。いずれもホモ破壊成魚は致死となることから、生体における硫黄代謝の重要性が示唆された。

公募研究課題名：硫化水素分子によるイオンチャネルの機能修飾機構の解明

(1)近年、神経障害性疼痛の抑制に生体内の硫化水素 H_2S が関わっていると提唱されている。そして H_2S の分子レベルでの標的が、神経細胞における興奮のしやすさを制御する電位依存性カリウムチャネル $Kv7.2/7.3$ ($Kv7.2$ と $Kv7.3$ のヘテロマルチマー) であると考えられている。本研究では、 $Kv7.2/7.3$ に対する H_2S の作用を電気生理学的手法で検証し、その機能修飾メカニズムの理解を目的とした。その結果、 H_2S による修飾効果の定量化および、修飾部位の推測まですることができた。

(2)具体的に得られた成果：①培養細胞 CHO に発現させた $Kv7.2/7.3$ に H_2S を添加したところ、電流が有意に増大した。詳細な解析の結果、「チャネルの電位依存性の変化」と「最大電流の増大(最大開口確率の増大)」の2つの効果であることが判明した。②内耳に発現する $Kv7.4$ ($Kv7$ ファミリー)でも同様の実験を実施したところ、 H_2S により電流が増大した。しかし詳細な解析から、「電位依存性の変化」及び「常時開状態の成分の出現」という、 $Kv7.2/7.3$ とは異なる効果であることが判明した。③ $Kv7.2/7.3$ と $Kv7.4$ に対する H_2S 効果の違いから、修飾部位を検討した。 $Kv7.2/7.3$ は電位センサーの細胞質 S2-S3 リンカー上の Cys であると考えられる一方で、 $Kv7.4$ は細胞膜中の Cys であることが示唆された。

計画研究課題名：超硫黄分子とセレンのクロストークによるシグナル伝達制御

(1) 必須微量元素セレンは、硫黄と同じ周期表第 16 属元素であるが、電子軌道が大きく、超硫黄分子と同等の高い反応性を示す。セレンは、生体内では主にタンパク質中に含まれ、セレノシステイン（システインの硫黄がセレンに置き換わったアミノ酸）としてその機能を発揮する。セレノシステインを含むタンパク質は、セレノプロテインと総称され、各種過酸化物質や親電子物質の解毒に係わるグルタチオンペルオキシダーゼ（GPX）やチオレドキシシン還元酵素が含まれる。本研究課題では、超硫黄分子とセレンの反応性を比較し、両者を介した生体内レドックス環境の形成、および抗酸化システムのマスターレギュレーターである転写因子 NRF2 の関与を明らかにする事を目的として行う。領域設定期間内において、セレン-超硫黄分子-NRF2 の生理/病理的意義を統合的に理解し、細胞内シグナル伝達の制御機構を明らかにする。中間評価実施時までには、超硫黄分子のレドックス反応性を理解し、セレン-超硫黄分子-NRF2 の制御機構を明らかにする。

(2) 硫黄分子が生体内で重要なレドックス制御因子であることが明らかになってきたが、その反応性と構造との関係は未解明な部分が多く残されていた。特に、フリーラジカルを介した脂質酸化反応との関連が不明であった。本研究では、超硫黄分子のラジカルスカベンジ作用を解析した。Na₂S₂, Na₂S₃, Na₂S₄ は強いラジカル消去作用を示し、カテネーションの増加に伴いその速度が上昇することが明らかとなった。これらの分子はビタミン E 誘導体 Trolox と同等の抗酸化作用を示した。一方、Na₂S はラジカル消去能を示さず、アルキル化された diallyl per/polysulfide もほとんど効果がないことが判明した。血漿中における超硫黄分子種の脂質過酸化抑制能も評価し、いずれも Trolox やアスコルビン酸と比較して強力な抑制活性を示した。また、diallyl tetrasulfide も脂質過酸化抑制活性を持つことが確認された。培養細胞においても、超硫黄分子種がフェロトーシスを抑制できることが確認された。超硫黄分子種は優れたラジカルスカベンジ作用を介して、フェロトーシスに対して防御的に作用することが示された

(Free Rad Res 2023)。さらに、超硫黄を豊富に含むブロッコリースプラウトに含まれるスルフォラファン (SFN) が、SeP の発現を抑制することが明らかとなった。SFN は SeP の mRNA レベルには影響せず、タンパク質量を減少させ、リソソーム阻害剤でこの効果がキャンセルされることから、分解亢進が関与していると考えられる。NRF2 の関与を調べたところ、SFN の効果は NRF2 非依存的であり、NRF2 siRNA 処理により SeP 発現が増加することから、通常状態の NRF2 が SeP 発現を負に制御していることが示唆された (Commun Biol 2023)。

公募研究課題名：超硫黄分子代謝制御におけるグルタチオンペルオキシダーゼ 4 の機能と疾患への関与

(1) 超硫黄分子システインパルスルフィドやグルタチオンパルスルフィドが、フェロトーシスやリポキシトーシスで見られる脂質酸化依存的な細胞死に対して抑制効果を示すか、明らかにすることを目的とした。

(2) RSL3 によるフェロトーシスやタモキシフェン誘導型 GPx4MEF 細胞を用いたリポキシトーシスに対する超硫黄分子の作用について、熊本大の澤教授より供与いただいた超硫黄分子誘導剤である NAC-S2 を用いて解析した。その結果、フェロトーシスに対しては強い抑制効果を示したものの、リポキシトーシスに対しては部分的な抑制効果しか示さなかった。フェロトーシス誘導時の脂質酸化を脂質ラジカルプローブである NBD-PEN により検証したところ、RSL3 によって亢進した酸化脂質の蓄積が NAC-S2 によって抑制されたことが明らかとなった。これより、脂質酸化を抑制することでフェロトーシスを抑制することを確かめた。精巣特異的非ミトコンドリア型 GPx4 欠損マウスの雄は不妊傾向を示し、このマウスはビタミン E の摂取により不妊傾向が改善することが明らかになっている。九州大の有澤教授より供与いただいた GSSSG の摂取により、不妊傾向が改善するかを調べたが、雌マウスの出産回数や産仔数に有意な改善効果は認められなかった。

公募研究課題名：超硫黄によるインスリンシグナル制御メカニズムの解析

(1) Se 運搬タンパク質 Selenoprotein P (SeP) は Se 運搬能非依存的に筋肉のインスリン抵抗性を引き起こす。本課題では、SeP によって引き起こされるインスリン抵抗性のメカニズムの解明を目指した。その結果、SeP によるインスリン抵抗性誘導メカニズムとして、シスチントランスポーター xCT の増加による細胞内 Cys 量の増加とそれに伴った超硫黄化の減少が確認され、インスリンシグナルの脱超硫黄化が、SeP によるインスリン抵抗性の原因であることが示唆された。

(2) 筋分化 C2C12 細胞は、超硫黄化誘導剤 Na₂S₄ によってインスリン感受性が亢進するが、細胞内 Cys を増加させることで感受性の亢進が阻害される。SeP 刺激によって筋分化 C2C12 細胞の xCT の増加を

介して Cys を増加させることでインスリン感受性が低下した。SeP による xCT の増加には転写因子 NRF2 や ATF4 の関連が認められなかった。その後の解析によって、SeP による xCT の増加は、SeP の細胞内取り込み受容体である LRP1 の siRNA 処理で阻害されること、LRP1 の細胞内ドメイン切断産物で転写調整活性を持つ LRP1-ICD が核内で増加することが分かり、LRP1 が xCT や Cys の増加に関連していると考えられる。

計画研究課題名：硫化水素によるシグナル伝達

(1)イオウ細菌と非イオウ細菌それぞれの硫化水素シグナル伝達機構とその生理的意義を明らかにすることを目的としている。具体的には、1) 硫化水素を電子源に生育する紅色細菌由来の硫化水素応答性転写因子 SqrR の超硫黄分子検知機構と超硫黄分子代謝の素過程、および、2) 非イオウ細菌（大腸菌と土壌細菌）の硫化水素応答機構、を明らかにすることで、細菌の持つ硫化水素シグナル伝達系と、それがどのような生理機能を制御しているのかを包括的に理解することを目指している。得られた知見を元に、細菌の硫化水素に依存した抗生物質耐性獲得の仕組みや新薬創出への応用、さらには細菌が関与する生物間相互作用を利用したバイオマス増産の方策の提供を目指している。

中間評価までに、SqrR の活性制御に関与する超硫黄分子代謝酵素を複数同定し、SqrR を起点とした紅色細菌の超硫黄分子代謝動態と転写制御の関係を明らかにした。特に、硫化水素酸化酵素 (SQR) が産生するシステインパールスフィド (CysSSH) が SqrR による超硫黄分子検知に重要であることを見出した。また大腸菌の SqrR ホモログである YgaV の遺伝学的解析を行ない、YgaV が嫌気呼吸に関連した遺伝子の発現を硫化水素依存的に制御することを明らかにした。

(2)紅色細菌の超硫黄分子代謝酵素の欠損株の解析において、本領域内の赤池班との共同研究により超硫黄分子の定量解析を行い、SqrR による転写制御活性と超硫黄分子レベルの関係性を調べた。その結果、SQR が供給する CysSSH が SqrR のポリスルフィド修飾を維持するために重要であることが明確に示された (PNAS-Nexus 2023)。非イオウ細菌である大腸菌の硫化水素応答性転写因子 YgaV の遺伝学的解析を行い、YgaV は SqrR 同様に外界の硫化水素依存的に分子内テトラスルフィド結合を形成することで自身の転写抑制活性を変化させることや、嫌気呼吸に関連した遺伝子の発現を硫化水素依存的に制御することで活性酸素の生成を抑え、その機能が抗生物質耐性に寄与することを明らかにした。大腸菌の YgaV の生化学的解析において、本領域内の赤池班 (居原 G) との共同研究により、YgaV が硫化水素・超硫黄分子に依存して形成する分子内テトラスルフィド結合を分子量解析により明らかにした (Antioxidants 2022)。

公募研究課題名：腸内細菌による超硫黄分子産生機構の解明

(1)腸内細菌が産生する多種多様な代謝物は宿主生理機能に影響を与えている。しかし、腸内細菌が産生する硫黄代謝物については研究が不十分である。この研究では、腸内細菌による超硫黄分子産生メカニズムとその役割の解明を目指した。

(2)はじめに、超硫黄分子高産生能を有する腸内細菌の Whole Genome Sequencing を実施し、超硫黄分子産生酵素の候補遺伝子の絞り込みを実施した。その結果、cystathionine beta-lyase に分類される遺伝子を多く同定した。しかしながら、これらの遺伝子を欠損させた大腸菌株ではシスチンを基質にした際の超硫黄分子産生量の減少は観られなかった。一方で超硫黄分子産生酵素の局在を調べた結果、細胞膜上に局在する腸内細菌と細胞質内に局在する腸内細菌が存在する可能性が示された。これらの結果から腸内細菌における超硫黄分子産生酵素の局在は腸内細菌の菌種によって異なることが明らかとなり、局在による違いが超硫黄分子の産生量の違いに関与している可能性が示された。また、特定の腸内細菌は好気刺激 (酸化ストレス) により超硫黄分子産生能が大幅に向上することを発見した。その際、増減した菌体内タンパク質や mRNA をプロテオーム解析 (梅澤先生との共同研究) と RNAseq を用い解析した結果、硫黄代謝に関連する酵素やタンパク質も含め、多くのタンパク質・遺伝子群の変動が確認された。これらの結果は超硫黄分子が腸内細菌の酸化ストレス制御に寄与することを示唆するものであり、宿主だけでなく腸内細菌自身における超硫黄分子の新たな役割の解明に繋がる可能性がある。

計画研究課題名：タンパク質のスルホン酸化超硫黄による翻訳後修飾模倣とシグナル伝達

(1)本研究では、タンパク質のシステイン残基チオール超硫黄化、特にその酸化・過酸化型超硫黄（スルホン酸化超硫黄）化による、シグナル伝達因子としてのタンパク質の可逆的な機能制御の仕組みとその機能的な重要性に関する解析を進めることを目的としていた。スルホン酸化超硫黄は、主要なタンパク質の翻訳後修飾であるリン酸化セリンや、私たちが見つけていたユニークな翻訳後修飾であるリン酸化システインと構造的に相同であり、タンパク質のダイナミックな機能制御に関わる可能性が期待された。特に研究代表者が長らく解析に取り組み、システインリン酸化が定常的に起こっているがん悪性化因子 phosphatase of regenerating liver (PRL) と、過酸化水素など過酸化物の還元除去に働く peroxiredoxin (PRX) に関する詳細な解析に取り組み、その超硫黄化や酸化・過酸化によるタンパク質への新規機能付与の仕組み、また、その細胞・生物個体などマクロなレベルでの医学生物学的重要性を明らかにすることを領域設定期間全体の目標と位置付けていた。中間評価の実施時においては、特にその分子レベルでの機能改変の実体を明らかにすることと、遺伝子改変マウスの作成など、マクロなレベルでの解析を進めてゆくための準備等を進めることとしていた。

(2)PRX は内在性タンパク質がかなりの割合で超硫黄化されており、活性システインが過酸化されることが知られる。超硫黄化ドナー (Na_2S_4) や過酸化水素で処理した際の効果について、細胞に発現させた6種 (PRX-1~PRX-6) のファミリー分子で調べたところ、PRX-1 が数十 nM 程度の Na_2S_4 刺激で巨大なオリゴマーを作ることが分かった。PRX-1 と配列的によく似た PRX-2 ではオリゴマー形成は見られず、PRX-1 にユニークなシステイン残基が重要な役割を果たしていることがアミノ酸置換変異体解析により確認された。さらに、内在性の PRX-1 タンパク質でも、 Na_2S_4 超硫黄ドナー刺激によって明確なオリゴマー形成を引き起こすことができた。

PRX ファミリーは過酸化水素などの過酸化物を還元除去する機能で知られるが、酵母の PRX は活性システインが過酸化された際に巨大なオリゴマーを作り、シャペロンとして機能することが知られている。精製した PRX-1 タンパク質を用いて *in vitro* でシャペロン機能を調べたところ、超硫黄化に伴ってタンパク質の凝集を抑制する効果を示した。過酸化水素処理ではこのような効果は観察されず、PRX-1 の超硫黄化がシャペロン機能を強力に付与していることが明らかになった。さらに、細胞内で変異型の蛍光タンパク質を発現させ、温度ストレス依存性に凝集体を作らせる実験系で超硫黄ドナー Na_2S_4 の効果や内在性の PRX-1 タンパク質の機能を検討した。その結果、 Na_2S_4 刺激によって細胞内での凝集体形成が阻害されること、さらに内在性 PRX-1 を RNAi で発現抑制するとその効果が消失することも明らかとなった。これらの結果は超硫黄化された PRX-1 が細胞内にできたタンパク質の凝集体をほぐすことでストレス応答に関わっている可能性を示している。

さらに、私たちが長らく解析に取り組んできた PRL は標的分子 Mg^{2+} トランスポーター CNNM と結合・機能阻害するが、PRL の持つ活性システインがリン酸化によって CNNM との結合が動的に調節されている。リン酸化システインはスルホン酸化超硫黄と同様にリン酸化セリンと構造的に類似しており、可逆的なタンパク質機能調節の仕組みとして働くユニークな翻訳後修飾である。この活性システインは CNNM への結合にも重要なため、変異体を用いた解析は困難だったが、アスパラギン酸に置換することで CNNM への結合力を保持できることを見つけた。PRL ファミリーの中でも最も主要に発現する PRL-2 について、活性システインをアスパラギン酸に置換した変異体 (C101D 変異体) 遺伝子を持つノックインマウスを CRISPR/Cas9 で作成しており、そのホモマウスも数が少ないながら出生して成長することを確認した。PRL のリン酸化システインのマクロな重要性をこの C101D ノックインマウスを用いて今後検証してゆく。

本研究は研究分担者を置いていないが、タンパク質の超硫黄化状態の質量分析装置を用いた解析は、**大阪公立大学・居原教授**の研究グループとの共同研究である。また、タンパク質の凝集機能を解除する働きのあることがわかった PRX1 の超硫黄のマクロなレベルでの機能解析を進めるため、**熊本大学・澤教授**の研究グループで作成された生体投与可能な超硫黄ドナー NAC-S2 の供与を受け、また脳内への到達度合いなどに関する解析を共同で進めている。いずれもこの学術変革領域研究に参画しており、領域会議や関連ミーティング等の機会を活用して緊密な連携体制を構築して共同研究を進めている。

公募研究課題名：特殊な硫黄間相互作用が要となる新奇チオ硫酸トランスポーターの解析

(1)硫黄は生物にとって必須元素の一つである。細菌等は環境中から無機硫黄を取り込み、システイン等の有機硫黄を合成することが可能である。申請者のグループは、膜タンパク質 YeeE がチオ硫酸イオ

ンの取り込みに関わることを示し、その構造・機能を明らかにした。加えて、YeeE と協働してチオ硫酸イオンの分解に関わると推測される細胞質の硫黄転移酵素 YeeD もチオ硫酸イオンの取り込みに重要であると見出している。しかし、それらがどのように協働するかは分かっておらず、また、YeeE 等が持つ機能に重要な保存されたシステイン残基の具体的な役割も依然として不明であった。本研究では、YeeE、YeeD による細菌のチオ硫酸イオンの取り込み機構を解明すべく研究を進めた。

(2) 精製 YeeE を用いた解析から YeeE 単体でチオ硫酸イオンを取り込むことができることを示唆する結果を得た。また、精製 YeeD を用いた解析から、YeeD が保存されたシステイン残基を用いてチオ硫酸イオンと直接反応して、それを分解することを示した。さらに、YeeE と YeeD の協働機構を解明するために、これらをリンカー配列で融合したタンパク質を構築し、その複合体構造を X 線結晶構造解析で達成し、YeeE-YeeD 複合体の立体構造を解明した。解かれた立体構造に基づいた変異解析から、細胞内でもこの構造を取りうることを示した。この YeeE-YeeD 複合体構造では、YeeD 活性部位システインは YeeE の出口に配置され、YeeE のチオ硫酸イオンの輸送に関わる 3 つのシステインと同様に等間隔で並んでいた。そのため、YeeD の活性部位のシステイン残基はチオ硫酸イオンの分解だけではなく輸送にも関わることを示唆された。以上の結果などから、YeeE と YeeD が保存されたシステイン残基を利用して細胞質へとチオ硫酸イオンを輸送・分解する機構を明らかにすることができた。

7 研究発表の状況

研究項目ごとに計画研究・公募研究の順で、本研究領域により得られた研究成果の発表の状況(主な雑誌論文、学会発表、書籍、産業財産権、主催シンポジウム等の状況。令和6年6月末までに掲載等が確定しているものに限る。)について、具体的かつ簡潔に5頁以内で記述すること。なお、雑誌論文の記述に当たっては、新しいものから順に発表年次をさかのぼり、研究代表者(発表当時、以下同様。)には二重下線、研究分担者には一重下線、corresponding author には左に*印を付すこと。

計画研究 <論文発表>

- Kanemaru E, Shimoda K, Marutani E, Morita M, Miranda M, Miyazaki Y, Sinow C, Sharma R, Mootha VK, Bloch DB, Akaike T, Ichinose F. Exclusion of sulfide:quinone oxidoreductase from mitochondria causes Leigh-like disease in mice by impairing sulfide metabolism. *J Clin Invest* (2024) in press.
- *Sekine H, Takeda H, Takeda N, Kishino A, Anzawa H, Isagawa T, Ohta N, Murakami S, Iwaki H, Kato N, Kimura S, Liu Z, Kato K, Katsuoka F, Yamamoto M, Miura F, Ito T, Takahashi M, Izumi Y, Fujita H, Yamagata H, Bamba T, Akaike T, Suzuki N, Kinoshita K, *Motohashi H. PNPO-PLP axis senses prolonged hypoxia in macrophages by regulating lysosomal activity. *Nat Metab*, in press (2024). doi: 10.1038/s42255-024-01053-4
- Hirai T, Ikeda-Imafuku M, Tasaka N, Tuan Giam Chuang V, Xian M, Ishida T, Akaike T, *Ishima Y. Human hair keratin responds to oxidative stress via reactive sulfur and supersulfides, *Adv Redox Res*, 10, 100091 (2024). doi: 10.1016/j.arres.2023.100091
- Koga K, Kajimoto S, Yoshizaki Y, Takahashi H, Kageyama L, *Konno T, *Nakabayashi T. Establishment of a Method for the Introduction of Poorly Water-Soluble Drugs in Cells and Evaluation of Intracellular Concentration Distribution Using Resonance Raman Imaging. *J Phys Chem B*, 128, 1350-1359 (2024). doi: 10.1021/acs.jpcc.3c06601
- *Hanaoka K, Ikeno T, Iwaki S, Deguchi S, Takayama K, Mizuguchi H, Tao F, Kojima N, Ohno H, Sasaki E, Komatsu T, Ueno T, Maeda K, Kusuvara H, *Urano Y. A general fluorescence off/on strategy for fluorogenic probes: Steric repulsion-induced twisted intramolecular charge transfer (sr-TICT). *Sci Adv*, 10, eadi8847 (2024). doi: 10.1126/sciadv.adi8847
- Fujita H, Tanaka Y, Ogata S, Suzuki N, Kuno S, Barayeu U, Akaike T, Ogra Y, *Iwai K. PRDX6 augments selenium utilization to limit iron toxicity and ferroptosis. *Nat Struct Mo Biol*, (2024). Provisionally accepted.
- Cui Q, Shieh M, Pan TW, Nishimura A, Matsunaga T, Kelly SS, Xu S, Jung M, Ogata S, Morita W, Yoshitake J, Chen X, Robinson JR, Qian WJ, Nishida M, *Akaike T, *Xian M. 2H-Thiopyran-2-thione sulfine, a compound for converting H₂S to HSOH/H₂S₂ and increasing intracellular sulfane sulfur levels. *Nat Commun*, 15, 2453 (2024). doi: 10.1038/s41467-024-46652-7
- Nishimura A, Yoon S, Matsunaga T, Ida T, Jung M, Ogata S, Morita M, Yoshitake J, Unno Y, Barayeu U, Takata T, Takagi H, Motohashi H, van der Vliet A, *Akaike T. Longevity control by supersulfide-mediated mitochondrial respiration and regulation of protein quality. *Redox Biol*, 69, 103018 (2024). doi: 10.1016/j.redox.2023.103018
- Ahmad RNR, Zhang LT, Morita R, Tani H, Wu Y, Chujo T, Ogawa A, Harada R, Shigeta Y, Tomizawa K, *Weil FY. Pathological mutations promote proteolysis of mitochondrial tRNA-specific 2-thiouridylase 1 (MTU1) via mitochondrial caseinolytic peptidase (CLPP). *Nucleic Acids Res*, 52(3), 1341-1358, (2024). doi: 10.1093/nar/gkad1197
- Kamakura S, Hayase J, Kohda A, Iwakiri Y, Chishiki K, Izaki T, *Sumimoto H. TMEM25 is a Par3-binding protein that attenuates claudin assembly during tight junction development. *EMBO Rep*, 25, 144-167 (2024). doi: 10.1038/s44319-023-00018-0
- Lindahl S, Shieh M, Zhang T, Guo C, Robinson JR, *Sawa T, *Xian M. Thioglucose-derived tetrasulfide, a unique polysulfide model compound. *Redox Biol*, 70, 103045, (2024). doi: 10.1016/j.redox.2024.103045
- Tsutsumi C, Uegaki K, Yamashita R, *Ushioda R, *Nagata K. Zn²⁺-dependent functional switching of ERp18, an ER-resident thioredoxin-like protein. *Cell Reports*, 43(2), 113682 (2024). doi: 10.1016/j.celrep.2024.113682
- Tsutsumi R, Ueberheide B, Liang FX, Neel BG, Sakai R, Saito Y. Endocytic vesicles act as vehicles for glucose uptake in response to growth factor stimulation, *Nat Commun*, 15, 2843 (2024). doi: 10.1038/s41467-024-46971-9
- Takahashi J, Suzuki T, Sato M, Nitta S, Yaguchi N, Muta T, Tsuchida K, Suda H, Morita M, Hamada S, Masamune A, Takahashi S, Kamei T, *Yamamoto M. Differential squamous cell fates elicited by NRF2 gain of function versus KEAP1 loss of function. *Cell Rep*, 43, 114104 (2024). doi: 10.1016/j.celrep.2024.114104
- *Ieda N, Sawada M, Oguchi R, Itoh M, Hirakata S, Saitoh D, Nakao A, Kawaguchi M, Sawamoto K, Yoshihara T, Mori Y, *Nakagawa H. An Optochemical Oxygen Scavenger Enabling Spatiotemporal Control of Hypoxia. *Angew Chem Int E*, 62, e202217585 (2023). doi: 10.1002/anie.202217585
- Funaoka Y, Hiromoto H, Morimoto D, Takahashi M, *Wada K, *Nagasaki K. Diversity in Infection Specificity between the Bloom-forming Microalga Heterosigma akashiwo and Its dsDNA Virus, Heterosigma akashiwo Virus. *Microbes Environ*, 38(2), ME23036 (2023). doi: 10.1264/jisme2.ME23036

- Barayeu U, [Sawa T](#), [Nishida M](#), [Wei FY](#), [Motohashi H](#), *[Akaike T](#). Supersulfide biology and translational medicine for disease control. *Br J Pharmacol*, (2023). doi: 10.1111/bph.16271
- Kasamatsu S, Owaki T, Komae S, Kinno A, Ida T, [Akaike T](#), *[Ihara H](#). Untargeted polysulfide omics analysis of alternations in polysulfide production during the germination of broccoli sprouts. *Redox Biol*, 67, 102875 (2023). doi: 10.1016/j.redox.2023.102875
- Kasamatsu S, Nishimura A, Alam MM, Morita M, Shimoda K, Matsunaga T, Jung M, Ogata S, Barayeu U, Ida T, [Nishida M](#), [Nishimura A](#), *[Motohashi H](#), *[Akaike T](#). Supersulfide catalysis for nitric oxide and aldehyde metabolism. *Sci Adv*, 9, eadg8631 (2023). doi: 10.1126/sciadv.adg8631
- Matsunaga T, Sano H, Takita K, Morita M, Yamanaka S, Ichikawa T, Numakura T, Ida T, Jung M, Ogata S, Yoon S, Fujino N, Kyogoku Y, Sasaki Y, Koarai A, Tamada T, Toyama A, Nakabayashi T, Kageyama L, Kyuwa S, Inaba K, Watanabe S, Nagy P, Sawa T, Oshiumi H, Ichinose M, Yamada M, *[Sugiura H](#), [Wei FY](#), *[Motohashi H](#), *[Akaike T](#). Supersulphides provide airway protection in viral and chronic lung diseases. *Nat Commun*, 14, 4476 (2023). doi: 10.1038/s41467-023-40182-4
- Takeda H, Murakami S, Liu Z, Sawa T, Takahashi M, Izumi Y, Bamba T, Sato H, Akaike T, Sekine H, *[Motohashi H](#). Sulfur metabolic response in macrophage limits excessive inflammatory response by creating a negative feedback loop. *Redox Biol*, 65:102834 (2023). doi: 10.1016/j.redox.2023.102834
- Alam MM, Kishino A, Sung E, Sekine H, Abe T, Murakami S, *[Akaike T](#), *[Motohashi H](#). Contribution of NRF2 to Sulfur Metabolism and Mitochondrial Activity. *Redox Biol*, 60, 102624 (2023). doi: 10.1016/j.redox.2023.102624
- Uchiyama T, Saito S, Yamanashi T, Kato M, Takebayashi K, Hamamoto S, Tsujii M, Takagi T, Nagata N, Ikeda H, Kikunaga H, Suda T, Toyama S, Miwa M, Matsuyama S, Seo M, Horie T, Kuromori T, Yamagami M, [Ishimaru Y](#), Uozumi N. The HKT1 Na⁺ transporter protects plant fertility by decreasing Na⁺ content in stamen filaments. *Sci Adv*, 9, eadg5495 (2023). doi: 10.1126/sciadv.adg5495
- Kishimoto H, [Azai C](#), Yamamoto T, Mutoh R, Nakaniwa T, Tanaka H, Miyanomori Y, Kurisu G, *[Oh-oka H](#). Soluble domains of cytochrome *c*-556 and Rieske iron–sulfur protein from *Chlorobaculum tepidum*: Crystal structures and interaction analysis. *Curr Res Struct Biol*, 5, 100101 (2023). doi: 10.1016/j.crstbi.2023.100101
- Uegaki K, [Tokunaga Y](#)([公募研究代表者](#)), Inoue M, Takashima S, Inaba K, Takeuchi K, *[Ushioda R](#), *[Nagata K](#). The oxidative folding of nascent polypeptides provides electrons for reductive reactions in the ER. *Cell Reports*, 42(7), 112742 (2023). doi: 10.1016/j.celrep.2023.112742
- Ye X, Toyama T, Taguchi K, Arisawa K, Kaneko T, Tsutsumi R, [Yamamoto M](#), *[Saito Y](#). Sulforaphane decreases serum selenoprotein P levels through enhancement of lysosomal degradation independent of Nrf2. *Commun Biol*, 6 (1), 2060 (2023). doi: 10.1038/s42003-023-05449-y
- *[Shimizu T](#), Ida T, Antelo GT, Ihara Y, Fakhoury JN, [Masuda S](#), Giedroc DP, [Akaike T](#), Capdevila DA, Masuda T. Polysulfide metabolizing enzymes influence SqrR-mediated sulfide-induced transcription by impacting intracellular polysulfide dynamics. *PNAS Nexus*, 2(3) (2023). doi: 10.1093/pnasnexus/pgad048
- Watari H, Kageyama H, Masubuchi N, Nakajima H, Onodera K, Focia PJ, Oshiro T, Matsui T, Kodera Y, Ogawa T, Yokoyama T, Hirayama M, Hori K, Freymann DM, Imai M, Komatsu N, Araki M, [Tanaka Y](#), *[Sakai R](#). A marine sponge-derived lectin reveals hidden pathway for thrombopoietin receptor activation. *Nat Commun*, 13(1), 7262 (2022). doi: 10.1038/s41467-022-34921-2
- *[Hanaoka K](#), Iwaki S, Yagi K, Myochin T, Ikeno T, Ohno H, Sasaki E, [Komatsu T](#), Ueno T, Uchigashima M, Mikuni T, Tainaka K, Tahara S, Takeuchi S, Tahara T, Uchiyama M, Nagano T, *[Urano Y](#). General design strategy to precisely control the emission of fluorophores via a twisted intramolecular charge transfer (TICT) process. *J Am Chem Soc*, 144, 19778-19790 (2022). doi: 10.1021/jacs.2c06397
- Akiyama M, Unoki T, Aoki H, Nishimura A, Shinkai Y, Warabi E, Nishiyama K, Furumoto Y, Anzai N, [Akaike T](#), [Nishida M](#), *[Kumagai Y](#). Cystine-dependent antiporters buffer against excess intracellular reactive sulfur species-induced stress. *Redox Biol*, 57, 102514 (2022). doi: 10.1016/j.redox.2022.102514
- Shieh M, Ni X, Xu S, Lindahl SP, Yang M, Matsunaga T, Flaumenhaft R, [Akaike T](#), *[Xian M](#). Shining a light on SSP4: A comprehensive analysis and biological applications for the detection of sulfane sulfurs. *Redox Biol*, 56, 102433 (2022). doi: 10.1016/j.redox.2022.102433
- Oda S, Nishiyama K, Furumoto Y, Yamaguchi Y, [Nishimura A](#), Tang X, Kato Y, Numaga-Tomita T, Kaneko T, Mangmool S, Kuroda T, Okubo R, Sanbo M, Hirabayashi M, Sato Y, Nakagawa Y, Kuwahara K, Nagata R, Iribe G, Mori Y, *[Nishida M](#). Myocardial TRPC6-mediated Zn²⁺ influx induces beneficial positive inotropy through β -adrenoceptors. *Nat Commun*, 13, 6374 (2022). doi: 10.1038/s41467-022-34194-9
- Nishiyama K, [Nishimura A](#), Shimoda K, Tanaka T, Kato Y, Shibata T, Tanaka H, Kurose H, Azuma Y-T, Ihara H, Kumagai K, [Akaike T](#), Eaton P, Uchida K, *[Nishida M](#). Redox-dependent internalization of purinergic P2Y6 receptor limits colitis progression. *Science Signal*, 15, eabj0644 (2022). doi: 10.1126/scisignal.abj0644
- Kaneko T, [Mita Y](#)([公募研究代表者](#)), Nozawa-Kumada K, Yazaki M, Arisawa M, Niki E, Noguchi N, *[Saito Y](#). Antioxidant action of persulfides and polysulfides against free radical-mediated lipid peroxidation. *Free Radic Res*, 56(9-10), 677-690 (2022). doi: 10.1080/10715762.2023.2165918
- Balasubramanian R, Hori K, [Shimizu T](#), Kasamatsu S, Okamura K, Tanaka K, [Ihara H](#), *[Masuda S](#). The sulfide-responsive SqrR/BigR homologous regulator YgaV of Escherichia coli controls expression of anaerobic respiratory genes and antibiotic tolerance. *Antioxidants*, 11, 12 (2022). doi: 10.3390/antiox11122359
- Nagayoshi Y, Chujo T, Hirata S, Nakatsuka H, Chen CW, Takakura M, Miyauchi K, Ikeuchi Y, Carlyle BC, Kitchen

- RR, Suzuki T, Katsuoka F, Yamamoto M, Goto Y, Tanaka M, Natsume K, Nairn AC, Suzuki T, Tomizawa K, ***Wei FY**. Loss of Ftsj1 perturbs codon-specific translation efficiency in the brain and is associated with X-linked intellectual disability. *Sci Adv*, 7(13), eabf3072 (2021). doi: 10.1126/sciadv.abf3072
- Ogawa A, Nagiri C, Shihoya W, Inoue A, Kawakami K, Hiratsuka S, Aoki J, Ito Y, Suzuki T, Suzuki T, Inoue T, Nureki O, Tanihara H, Tomizawa K, ***Wei FY**. N6-methyladenosine (m6A) is an endogenous A3 adenosine receptor ligand. *Mol Cell*, 81(4), 659-674, e7 (2021). doi: 10.1016/j.molcel.2020.12.038
- Okumura S, Konishi Y, Narukawa M, Sugiura Y, Yoshimoto S, Arai Y, Sato S, Yoshida, Y, Tsuji S, Uemura K, Wakita M, Matsudaira T, Matsumoto T, Kawamoto S, Takahashi A, Itatani Y, **Miki H**, Takamatsu M, Obama ., Takeuchi K, Suematsu M, Ohtani N, Fukunaga Y, Ueno M, Sakai Y, Nagayama S, *Hara E. Gut bacteria identified in colorectal cancer patients promote tumourigenesis via butyrate secretion. *Nat Commun*, 12, 5674 (2021). doi: 10.1038/s41467-021-25965-x
- Funato Y, Yamazaki D, Okuzaki D, Yamamoto N, ***Miki H**. Importance of the renal ion channel TRPM6 in the circadian secretion of renin to raise blood pressure. *Nat Commun*, 12, 3683 (2021). doi: 10.1038/s41467-021-24063-2

計画研究 <学会発表>

- 中林孝和**. 分子分光学的手法を駆使した生体分子および細胞内現象のその場解析. 日本化学会第 104 春季年会 船橋 2024.3.18-21 (学術賞受賞講演・招待講演)
- 清水隆之**. 紅色光合成細菌をモデルとした超硫黄分子シグナル制御システムの解析. 第 3 回原核光合成生物シンポジウム 神戸 2024.3.17
- 潮田亮**, 上垣日育, 永田和宏. 硫黄修飾が織りなす新たな電子伝達とオルガネラ恒常性維持. 第 46 回日本分子生物学会年会 神戸 2023.12.7 (口頭発表・ポスター発表)
- 異島優**. 簡便な超硫黄分子測定系を用いた生化学への新たなアプローチ. 第 96 回日本生化学会大会 福岡 2023.10.31-11.2 (シンポジウム発表)
- 赤池孝章**. 超硫黄分子の発見と生理機能の解明. 第96回日本生化学会大会 福岡 2023.10.31 (特別講演)
- Nishida M**. Regulation of cardiac robustness by reactive sulfur species. The 26th BOMUN Excellent Science & Technology 2023 (BEST2023), Korean Society of Biochemistry and Molecular Biology (KSBMB), Fukuoka. 2023.10.26
- 和田啓**. 創薬基盤の確立を見据えた鉄硫黄クラスター生合成に関わるコア複合体の構造・機能解析. 第 7 回黒潮カンファレンス 宮崎 2023.7.22-23 (招待講演)
- Nakabayashi T**. Application of Water Raman Bands to Evaluate Intracellular Environments and Liquid-Liquid Phase Separation. The Eighth Taiwan International Symposium on Raman Spectroscopy. Hsinchu, Taiwan. 2023.6.30 (招待講演)
- Nishimura A, Nishida M**. Sulfide metabolism has principal roles in ischemic resistance of the heart. Society for Heart and Vascular Metabolism, Graz, Austria. 2023.6.26
- 魏范研**. 呼吸オミックス・エアロバイオミックス. 第 76 回日本酸化ストレス学会学術集会 神戸 2023.5.25
- 澤智裕**. 超硫黄分子による炎症応答制御. 第 76 回日本酸化ストレス学会学術集会 神戸 2023.5.24
- Saito Y**. Excess Antioxidative Protein "Selenoprotein P" as an Exacerbation Factor for Several Diseases—Its Relation to Diabetes and Cancer. 12th International Conference on NAPA 2023, Seoul, Korea. 2023.5.11
- Ushioda R**. A new platform formed by JDP-Hsp70 for protein quality control in the ER. J-domain proteins from molecular mechanisms to diseases. International Workshop (CSSI), Poland. 2023.3.31 (招待講演)
- 中川秀彦**. 超硫黄分子の生体内挙動・反応性探索のためのケミカルツール. 日本薬学会第 143 年会 札幌 2023.3.26 (シンポジウム発表)
- 花岡健二郎**. 超硫黄分子の検出蛍光プローブの開発と生合成制御のためのケミカルツール創製. 日本薬学会第 143 年会 札幌 2023.3.25-28
- Motohashi H**. NRF2 as a regulator of mitochondrial activity, NO signaling and sulfur metabolism. Gordon Research Conference "Nitric Oxide", Ventura, CA, USA. 2023.2.12-17 (招待講演)
- Akaike T**. Nitric Oxide Synthases, a New Family of NADPH-Dependent Sulfur Oxidoreductases. Nitric Oxide Gordon Research Conference, Ventura, CA, USA. 2023.2.13 (招待講演表)
- Wada K**. Molecular mechanism of the SUF system involved in the iron-sulfur cluster biogenesis. 10th Asian Biological Inorganic Chemistry (AsBIC10) 神戸 2022.11.28-12.3 (招待講演)
- 花岡健二郎**. 蛍光プローブを活用した超硫黄分子種産生酵素の選択的阻害剤の開発. 第 95 回日本生化学会大会 名古屋 2022.11.9-11
- 石丸泰寛**. 小林歩夢, 金澤理貴, 辻井雅, 魚住信之. 光合成に関与する超硫黄分子. 第 95 回日本生化学会大会 名古屋 2022.11.9-11
- Saito Y**. Selenium biology and redox reactions: Application to lifestyle-related diseases and pandemic. SFRR-Asia 2022 New Paradigm for Research on Oxidative Stress & Inflammation, Symposium 5 (S-5), Seoul, Korea. 2022.11.4
- Higashiguchi M, Terauchi K, **Azai C**. Sulfane sulfur mediates anaerobic photoinhibition in the green sulfur bacterium *Chlorobaculum tepidum*. The 12th International NO Conference, Sendai. 2022.10.29-30
- Nishida M**. Regulation of cardiac robustness by reactive sulfide species. Society for Heart and Vascular Metabolism (SHVM) 2022, Symposium, Seoul, Korea. 2022.10.16-19

- Sawa T.** Regulation of innate immune responses by supersulfides. The 15th Korea-Japan International Symposium on Microbiology, Seoul, Korea. 2022.10.14
- Akaike T.** Sulfur biology and redox signaling in energy metabolism, infection, and immunity. The 15th Korea-Japan International Symposium on Microbiology, Yeosu, Korea. 2022.10.13 (招待講演)
- Motohashi H.** NRF2 enhances mitochondrial activity by regulating sulfur metabolism. Cold Spring Harbor Asia “Iron, Reactive Oxygen Species & Ferroptosis in Life, Death and Disease”, Awaji. 2022.10.10-14 (招待講演)
- Masuda S.** Mechanism of sulfide/supersulfide sensing in bacteria. 第60回日本生物物理学会シンポジウム 函館 2022.9.30
- Akaike T.** Cyclo-octasulfur, S₈, formed endogenously in mammals: its biosynthesis and physiological functions. Gordon Research Conference “Thiol-Based Redox Regulation and Signaling: The Chemical Biology of Sulfur”, Castelldefels, Spain. 2022.7.10 (招待講演)
- Motohashi H.** NRF2 addiction of cancer cells. IUBMB-FEBS-PABMB The Biochemistry Global Summit 2022, Lisbon Congress Center, Lisbon, Portugal. 2022.7.10 (招待講演)
- 梅澤啓太郎**, 津元裕樹, 川上恭司郎, 三浦ゆり. 超硫黄修飾タンパク質の網羅的解析に資するタグ分子の開発. 第75回日本酸化ストレス学会学術集会 Live-Web 開催 2022.5.25-26
- Masuda S.** Mechanism of sulfide/supersulfide sensing in bacteria: Forming and breakage of the tetrasulfide-crosslink between two cysteine residues are crucial for sulfide sensing in bacteria. 第95回日本細菌学会シンポジウム web 開催 2022. 3.31
- 魏范研**. Extracellular transport of modified RNA nucleosides and its pathophysiological implications. 第94回日本生化学会年会 Web 開催 2021.11.3-5
- 梅澤啓太郎**. 超硫黄生物学を支える化学プローブの開発. 第94回日本生化学会大会 Web 開催 2021.11.3-5

計画研究 <産業財産権>

- 「抗ウイルス剤」外山喬士、有澤美枝子、齋藤芳郎、矢崎雅菜、千田大智、赤池孝章、松永哲郎 出願番号 2023-036858、2023/03/09・国際出願番号：PCT/JP2024/8889 (2024)
- 「ミトコンドリアにおけるタンパク質合成を検出する蛍光プローブ」花岡 健二郎、佐々木 栄太、大野久史、炭谷 峻 (慶應義塾) . 特願 2024-028006, 2024-02-28. (2024)
- 「γ-グルタミルトランスペプチダーゼ5 (GGT5) を検出する蛍光色素」花岡 健二郎、佐々木 栄太、小川 奨真、有田 誠、磯部 洋輔、前川 大志、夏目 怜. 特願 2023-178650, 2023-10-17. (2023)
- 「糖鎖結合剤、糖鎖検出キット及び医薬品」和田啓・長崎慶三、特許出願 2023-000895 (2023)
- 「炎症性疾患の治療薬、及び治療薬のスクリーニング方法」岩城 英也・正宗 淳・角田 洋一・関根 弘樹・本橋 ほづみ, 特願 2023-176062. (2023) .
- 「ポリスルフィド標識用アルキル化剤及びそれを用いたポリスルフィドの標識方法」梅澤啓太郎、PCT/JP2022/18215 (2022)
- 「慢性低酸素状態による炎症を改善する医薬組成物」関根弘樹、本橋ほづみ. 特願 2022-170181. (2022)
- 「TRPC3/6/7 チャンネル活性化による強心作用を介した心不全治療」西田基宏、西山和宏、加藤百合、西村明幸、永田龍、森泰生、中川靖章、桑原宏一郎、特願 2022-132533 (2022)
- 「検出方法、検出基板、及び検出キット」長崎 慶三、竹岡 敬和、入江 崇、和田 啓 特開 2022-119414 (2022)
- 「活性硫黄の定量方法」國澤研大、遠山敦彦、赤池孝章、飯伏翼 (島津製作所, 国立大学法人東北大学, 島津テクノリサーチ) . 特願 2022-209942 (2022)
- 「感染症のバイオマーカー」赤池孝章. 特願 2021-084723 (2021)
- 「Cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics regulated by cysteinyl-tRNA synthetase」赤池孝章. (2021)
- 「Reactive persulfides mediate sulfur respiration in mitochondria via sulfide:quinone oxidoreductase」赤池孝章. (2021)
- 「COVID-19 治療剤」東光佳、吹上知穂、今田岐、岸本矢誉衣、平澤典保、齋藤芳郎、外山喬士 出願番号 PCT/JP2021/040153 (WO2022/092299) (2021)

計画研究 <学会主催・シンポジウム企画>

- Wei FY, Akaike T.** The 2nd International G-ReXS symposium in Sendai. Tohoku University Seiryō Campus, Sendai. 2024.5.20
- 本橋ほづみ、赤池孝章**. 第77回日本酸化ストレス学会・第23回日本NO学会合同学術集会 国際シンポジウム「Supersulfides as new fundamental biomolecules for life」神奈川歯科大学 横須賀 2024.5.19
- Wei FY, Akaike T.** The 1st International G-ReXS conference in Sendai. Tohoku University Seiryō Campus, Sendai. 2024.3.30-4.1
- 齋藤芳郎**. 第96回日本生化学会大会シンポジウム「革新的解析法で挑む生体内脂質酸化反応とレドックス制御研究の最先端」福岡国際会議場福岡 2023.11.2
- 中川秀彦、花岡健二郎**. 第96回日本生化学会大会 シンポジウム「革新的なケミカルバイオロジーと生化学への展開」福岡国際会議場 福岡 2023.11.2
- 本橋ほづみ、魏范研**. 第96回日本生化学会大会 企画シンポジウム 学術変革領域「硫黄生物学」共催「硫黄代謝研究が拓く新たな生命現象の理解」福岡国際会議場 福岡 2023.11.1

- 住本英樹. 第 96 回日本生化学会大会主催 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 B 館 福岡 2023.10.31-11.2
- 西田基宏. 第 3 回レドックス R&D 戦略委員会 春のシンポジウム「ワンヘルスの実現を目指したレドックス生命科学の温故創新」九州大学 福岡 2023.3.17-18
- 西田基宏. 第 11 回日本酸化ストレス学会東海支部会 自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター 岡崎 2023.2.18
- 西田基宏, 本橋ほづみ. 第 95 回日本生化学会大会 企画シンポジウム 学術変革領域「硫黄生物学」共催「硫黄生物学が切り拓く生命原理変革」名古屋国際会議場 名古屋 2022.11.10
- 潮田亮, 斎藤芳朗. 第 95 回日本生化学会大会 シンポジウム 学術変革領域「硫黄生物学」共催「革新的硫黄研究が明らかにする細胞内情報伝達の多様性」名古屋国際会議場 名古屋 2022.11.10
- Akaike T. Tohoku Forum of Creativity 主催. “Evolving and Emerging Redox Biology for Medicine and Human Health” Tohoku University Seiry Campus, Sendai. 2022.10.29-11.1
- Nishida M, Motohashi H. The 12th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide / The 22nd Annual Scientific Meeting of the Nitric Oxide Society of Japan 主催. Tohoku University Seiry Campus, Sendai. 2022.10.29-11.1
- Sawa T. 4th International Conference on Peruslfide and Sulfur Metabolism in Biology and Medicine 主催. Tohoku University Seiry Campus, Sendai. 2022.10.29-11.1
- Saito Y, Yamamoto M. 2nd STINT-JSPS Joint Symposium “Redox Biology for Human Health and Drug Development”. Tohoku University Seiry Campus, Sendai. 2022.10.28
- Motohashi H. Cold Spring Harbor Asia “Iron, Reactive Oxygen Species & Ferroptosis in Life, Death & Disease”, Awaji Yumebutai Conference Center, Awaji. 2022.10.10-14
- 増田真二, 中林孝和. 第 60 回日本生物物理学会年会 シンポジウム「硫黄のタンパク質科学の最前線」函館アリーナ 函館 2022.9.28-30
- Saito Y. XVIth International Congress of Toxicolog (ICT2022) Symposium “Electrophiles-induced modification and biological response- Cutting edge research on oxidative stress for toxicology” Maastricht, Netherlands. 2022.9.21
- 斎藤芳朗. 第 2 回レドックス R&D 戦略委員会 春のシンポジウム「先端技術が切り拓くレドックスバイオロジー」オンライン 2022.3.4
- 赤池孝章. 第 3 回国際活性硫黄研究会 オンライン 2021.5.20

公募研究 <論文発表>

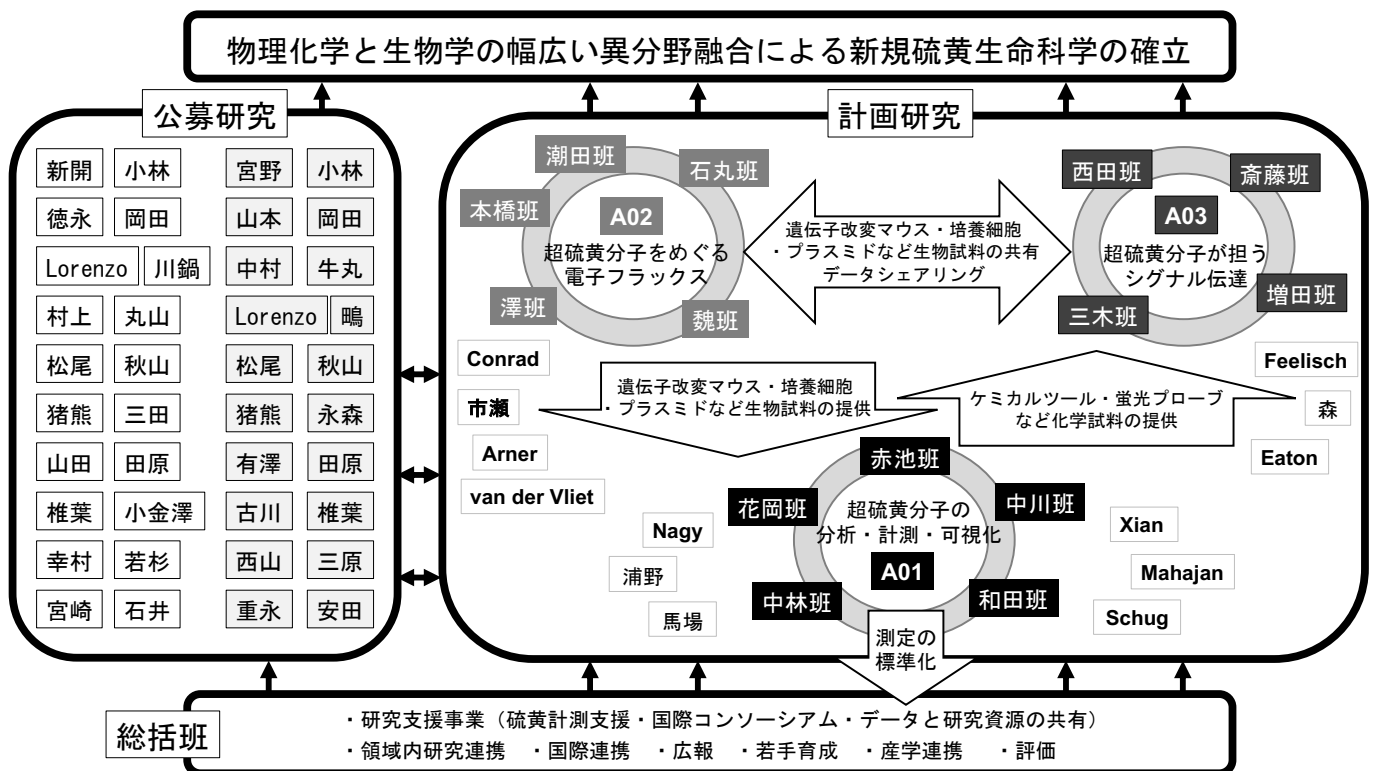
- Endo M, Aoyama S, Tsuchido Y, *Catti L, *Yoshizawa M. Umbrella-shaped Amphiphiles: Internal Alkylation of an Aromatic Micelle and Its Impact on Cavity Features, *Angew Chem Int Ed*, 63, e202404088 (2024). doi: 10.1002/anie.202404088
- Ikei M, Miyazaki R, Monden K, Naito Y, Takeuchi A, Takahashi SY, Tanaka Y, Murata K, Mori T, Ichikawa M, Tsukazaki T. YeeD is an essential partner for YeeE-mediated thiosulfate uptake in bacteria and regulates thiosulfate ion decomposition, *PLOS Biol*, in press (2024). doi: 10.1371/journal.pbio.3002601
- Yamada N, Karasawa T, Ito J, Yamamuro D, Morimoto K, Nakamura T, Komada T, Baatarjav C, Saimoto Y, Jinnouchi Y, Watanabe K, Miura K, Yahagi N, Nakagawa K, Matsumura T, Yamada KI, Ishibashi S, Sata N, Conrad M, Takahashi M. Inhibition of 7-dehydrocholesterol reductase prevents hepatic ferroptosis under an active state of sterol synthesis. *Nat Commun*, 15(1), 2195 (2024). doi: 10.1038/s41467-024-46386-6
- Zhang W, Miura A, Abu Saleh MM, Shimizu K, Mita Y, Tanida R, Hirako S, Shioda S, Gmyr V, Kerr-Conte J, Pattou F, Jin C, Kanai Y, Sasaki K, Minamino N, Sakoda H, Nakazato M. The NERP-4-SNAT2 axis regulates pancreatic β -cell maintenance and function. *Nat Commun*, 14(1), 8158 (2023). doi: 10.1038/s41467-023-43976-8
- Zhang L, Kawaguchi R, Enomoto T, Nishida S, Burow M, Maruyama-Nakashita A. Glucosinolate catabolism maintains glucosinolate profiles and transport in sulfur-starved *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 64, 1524-1550 (2023). doi: 10.1093/pcp/pcad075
- Tokuyama T, Uosaki H, Sugiura A, Nishitai G, Takeda K, Nagashima S, Shiiba I, Ito N, Amo T, Mohri S, Nishimura A, Nishida M, Konno A, Hirai H, Ishido S, Yoshizawa T, Shindo T, Takada S, Kinugawa S, Inatome R, Yanagi S. Protective roles of MITOL against myocardial senescence and ischemic injury partly via Drp1 regulation. *iScience*, 25(7), 104582 (2022). doi: 10.1016/j.isci.2022.104582
- Goto K, Morimoto M, Osaki M, Tanio A, Izutsu R, Fujiwara Y, *Okada F. The impact of AMIGO2 on prognosis and hepatic metastasis in gastric cancer patients. *BMC Cancer*, 22(1), 280 (2022). doi: 10.1186/s12885-022-09339-0
- Mizutani N, Kawanabe A, Jinno Y, Narita H, Yonezawa T, Nakagawa A, Okamura Y. Interaction between S4 and the phosphatase domain mediates electrochemical coupling in voltage-sensing phosphatase (VSP). *Proc Natl Acad Sci USA*, 119(26), e2200364119 (2022). doi: 10.1073/pnas.2200364119
- Mishima E, Ito J, Wu Z, Nakamura T, Wahida A, Doll S, Tonnus W, Nepachalovich P, Eggenhofer E, Aldrovandi M, Henkelmann B, Yamada KI, Wanninger J, Zilka O, Sato E, Feederle R, Hass D, Maida A, Mourão AASD, Linkermann A, Geissler EK, Nakagawa K, Abe T, Fedorova M, Proneth B, Pratt DA, Conrad M. A non-canonical vitamin K cycle is a potent ferroptosis suppressor. *Nature*, 608(7924), 778-783 (2022). doi: 10.1038/s41586-022-05022-3

8 研究組織の連携体制

研究領域全体を通じ、本研究領域内の研究項目間、計画研究及び公募研究間の連携体制について、図表などを用いて具体的かつ簡潔に1頁以内で記述すること。

研究項目 A01 の計画研究は、超硫黄分子の分析と計測、さらに可視化を目標にしており、領域全体の研究活動を支える極めて重要な貢献を果たしている。超硫黄分子の計測は、本研究領域においてもっとも重要な要素であり、主として赤池班が担っており、A02 と A03 の計画研究とともに、多くの公募研究メンバーに対して支援を実施している。また、超硫黄分子の検出に必要な蛍光プローブは化学プローブが中川班と花岡班により開発されており、それらは広く領域内で共有されている。

研究項目 A02 と A03 は、超硫黄分子の解析プロトコルや遺伝子改変マウスや細胞株の共有により相互に、また、A01 や公募研究メンバーと共同研究をすすめている。特に、化学を専門にする計画研究・公募研究メンバーと、生物学を専門にする計画研究・公募研究メンバーの間に、複数の共同研究が生まれており、本領域が創出した分野融合による新しい硫黄生命科学が順調に展開しつつある。中でも、それぞれの研究チームの若手研究者同士のネットワークから新たな共同研究が生まれていることは大変好ましいことである。これは、年1回の領域会議に加えて、毎月実施している領域プロGRESSによる情報交換、また、日本生化学会や日本薬学会、日本酸化ストレス学会などで企画するシンポジウム、令和5年度から開始した国際先導研究との共催による国際シンポジウムの開催などで、若手研究者相互の交流の機会を多く設定していることの効果であると理解している。



9 若手研究者の育成に係る取組状況

研究領域全体を通じ、本研究領域の研究遂行に携わった若手研究者（研究協力者やポスドク、途中で追加・削除した者を含む。）の育成に係る取組状況について、具体的かつ簡潔に1頁以内で記述すること。なお、本研究領域が育成に取り組んだ「若手研究者」の定義を始めに示すこと。

本領域では、医学系の領域が含まれることから、「若手研究者」を年齢で定義するのではなく、大学院生とポスドク・助教・講師という職位によって定義した。また、広い意味では准教授も含めることとし、教授昇任の推進力となるよう、個々の研究プロジェクトを支援した。

本領域の最も特徴的な取り組みは、毎月実施してきているオンラインによる領域プロGRESSである。計画研究の代表者、分担者、公募研究代表者と、それぞれの研究室に所属する若手研究者で希望するもの全員による研究進捗報告会を開催している。これは、領域が採択になった令和3年の11月から、領域会議の開催月以外は毎月1度実施しているものである。1回の領域プロGRESSでは、3つの研究チームから20分程度で代表者もしくは若手研究者に進捗を発表してもらい、10分から20分で質疑応答を行いつつ、さまざまな議論を行ってきた。毎回100名近くの参加者があり、若手研究者からの質問も活発で、領域プロGRESSにより、それぞれの研究チームが保有する生物資源や解析技術の情報が領域内で広く共有され、若手研究者の間で自発的に数々の共同研究が生まれている。そのなかのいくつかはすでに論文として発表されるに至っている。この領域プロGRESSでは、未発表データを積極的に発表し議論して、質の高い共同研究に繋げるために、参加者全員に秘密保持の誓約書の提出を求めており、特許出願などの場合にも障害が発生しないよう配慮をしている。本領域の領域プロGRESSは、若手研究者を領域参加者全員で育成する体制の構築を可能にしていると自負するところである。また、令和5年度の領域会議では、研究代表者・分担者による各研究グループからの報告に加えて、若手研究者によるセッションを2つ設定して、若手研究者相互の議論をエンカレッジした。

一方、技術支援体制も整備しており、領域ホームページから、超硫黄代謝物のメタボローム解析や超硫黄化タンパク質のプロテオーム解析の技術支援、超硫黄ドナーや超硫黄検出プローブなどケミカルツールの提供、超硫黄化タンパク質の解析プロトコルの提供など、ユニークな生物資源や解析技術の支援の要請ができるシステムを構築した。支援の希望があれば、領域代表者である本橋と技術支援担当の中川、花岡の3名で内容を精査の上、適当な領域メンバーとのオンラインによる打ち合わせを設定し、依頼者と支援者のマッチングを図っている。計画研究を中心に、これまでに60件を超える支援を実施している。令和5年度には、若手研究者を対象にした技術講習会を実施し、11名の参加者を対象に超硫黄代謝物の解析とタンパク質の超硫黄化の解析について、1週間にわたり実技講習を実施した。

本領域で支援した若手研究者のうち、これまでに准教授から教授に昇任したものが5名、助教や講師から独立准教授に昇任したものが3名にのぼる。これらの「シニア」な若手研究者に加えて、令和5年度に赤池を代表として、本領域の計画研究代表者が分担者として参加する国際先導研究「レドックス超分子の生命機能解明に向けたグローバルな研究先導 Global Exploration for Redox Supermolecules Evolving in Life Functions (G-ReXS)」が採択になり、大学院生とポスドクを積極的に海外に派遣し、海外で活躍する研究者を育成するための手厚い支援が可能になった。令和6年度初頭と5月20日に、東北大学星陵キャンパスにおいて、本領域との共催として第1回、第2回のG-ReXS会議を開催した。第1回では海外から10名、第2回では海外から3名、国内から2名の研究者を招聘し、領域に参加する若手研究者との交流を図った。すでに、領域内の大学院生6名とポスドク1名が、本制度の支援を受けて海外に派遣されており、共同研究を進めつつある。この枠組みを使用しながら、領域内の若手研究者をGordon Research ConferenceやKeystone Symposiumなどの海外学会に積極的に派遣し、海外の研究者コミュニティに参加させる予定である。

10 アウトリーチ活動に係る取組状況

研究領域全体を通じ、一般向けのアウトリーチ活動に係る取組状況について、具体的かつ簡潔に1頁以内で記述すること。

それぞれの計画研究代表者と分担者が、所属する大学のオープンキャンパスや高校の出前授業で、高校生やその保護者を対象に、超硫黄分子を紹介し硫黄研究の最前線をわかりやすく解説した。以下にその一部を記載する。

- 京都市立紫野高等学校 高大接続授業「タンパク質が光る！？病気の原因になる！？タンパク質が織りなす不思議な世界」(by 京都産業大学生命科学部 潮田 2023年4月12日)
- 名古屋市立向陽高校 高大接続授業「タンパク質が光る！？病気の原因になる！？タンパク質が織りなす不思議な世界」(by 京都産業大学生命科学部 潮田 2023年4月12日)
- 長野県松本深志高校 研究室訪問「ラマンってなに？」(by 東北大学 中林 2023年9月28日)
- 薬学部ファーマサイエンスショートコース(PSSC)「蛍光物質を創ってみよう」(高校生が研究体験するプログラム)(by 慶応義塾大学 花岡 2023年8月22, 23日)
- 山形県立米沢興譲館高等学校 出前授業「薬を創る“薬学研究”とは？—新型コロナウイルス感染症治療薬を例に」(by 東北大学 斎藤 2022年10月3日)
- 大阪公立大学オープンキャンパス「温泉やニンニクはどうして健康に良い？～見落とされてきた超硫黄分子の生物学的意義」(by 大阪公立大学理学部 居原 2022年8月6日)
- 兵庫県立宝塚高等学校 出前授業「生かすも殺すもイオウ次第！？～これまで見落とされていたイオウの生物学的意義」兵庫県立宝塚高等学校 (by 大阪公立大学理学部 居原 2022年12月15日)
- 大阪府立いちりつ高等学校 理数講座「生かすも殺すも硫黄次第！？～これまで見落とされていた超硫黄分子の生物学的意義～大阪府立いちりつ高等学校」(by 大阪公立大学理学部 居原 2023年1月26日)
- 東北大学オープンキャンパス「超硫黄ってなに？硫黄呼吸の不思議」(by 東北大学加齢医学研究所 本橋 2023年7月26, 27日)
- 女子高校生のためのサイエンス体験講座 in 宮崎大学スペシャル企画 宮崎大学木花キャンパス「硫黄と生命」(by 東北大学 本橋 2024年3月5日)

小学生や一般市民を対象とするものとして、主なものは以下の通りである。

- 第94回 Q-AOS ブラウンバックセミナー「心臓の研究から健康長寿、そしてワンヘルスの実現を目指して」(by 九州大学 西田 2023年5月10日)
- すずかけサイエンスディ「自己組織化を利用した便利なナノ道具」(by 東京工業大学・化学生命科学研究所 Lorenzo 2023年5月13-14日)
- 片平まつり2023「色の変化で見る酸素を運ぶタンパク質」(小学生向け体験実験)(by 東北大学 学際科学フロンティア研究所 田原 2023年10月7日)
- サイエンスカフェ in 宮崎「暮らしを支える×暮らしを彩る“結晶学”～チョコレートから抗ウイルス薬まで、美しいだけじゃない、ここに結晶ありき～」(by 宮崎大学地域デザイン棟 和田 2023年5月27日)
- 東北大学 SA カレッジ21年度コース III 月例会「呼気オミックスと未来型医療：ヒューマンエアローム事業の創成」(by 東北大学 赤池 2022年2月24日)
- シニア大学「分子の形をみるとわかること」仙台市八木山市民センター (by 東北大学 中林 2022年5月11日)
- 日本テレビ カズレーザーと学ぶ「ダイエット・日焼け・シミ・シワに効果的 昨年9月発見!!超硫黄分子を増やす最強食材！」(by 大阪公立大学 居原・笠松/東北大学 赤池 2024年6月11日)

また、計画研究分担者の清水は、奈良県西大和学園高校 SSH (スーパーサイエンスハイスクール) から「光合成細菌を用いて硫化水素を硫黄顆粒の形で除去する」という研究のアドバイザーを依頼され、研究室にて実験についての助言と研究材料の提供等を行った。今後は研究内容への助言、当研究室の解析設備の提供、発表会への参加といった形でサポートを行うことになっている。

11 研究費の使用状況・計画

研究領域全体を通じ、研究費の使用状況や今後の使用計画、研究費の効果的使用の工夫、設備等（本研究領域内で共用する設備・装置の購入・開発・運用、実験資料・資材の提供など）の活用状況について、総括班研究課題の活動状況と併せて具体的かつ簡潔に1頁以内で記述すること。

本領域において、実質的に支援活動の中核を担う計画研究 A01 のメンバーに、超硫黄プローブ合成、細胞・組織超硫黄解析、超硫黄代謝物質量分析を行う体制を整えてもらった。中川班では、2021 年度に、超硫黄プローブ合成のために LC オートサンプラーを導入し既存の HPLC システムに接続することで迅速に合成化合物を分離・解析できる体制とし、さらに防爆型冷凍冷蔵庫を導入し貴重な化合物・試料を安全に保管できる体制とした。さらに、同じく 2021 年度に購入した卓上型核磁気共鳴分光装置を活用することで、質量分析用化合物として合成したタグ分子群の評価を行える環境を整えた。また 2022 年度には、高精度に中圧カラム分離が可能となる分離システムを導入して合成効率を改善した。2023 年度には、開発したプローブによる超硫黄化タンパク質検出法の検証・応用のためウエスタンブロッティング解析を迅速に行う装置を導入した。このように、研究の進展に沿って適切に機器等を整備しつつ、消耗品等も購入して研究を遂行している。また、ホログラフィック顕微鏡システムは、細胞の 3D タイムラプス解析が可能である顕微鏡システムであるが、精密な調整が必要であり、2023 年度にセットアップが完了し、本領域内での共用により、今後効果的な使用ができる状況である。和田班では、クロマトグラフィーシステム一式を購入し、領域内共同研究の蛋白質の大量精製に活用している。既に、領域内 7 グループとの共同研究を進めており、それぞれの研究チームが標的とするタンパク質の発現系を構築し、大量精製を実施している。酸素に対して不安定な鉄硫黄クラスターを有するタンパク質の精製には嫌気性チャンバーが必要であり、これも和田班で購入し、共同研究で利用している。中林班では、八硫黄の検出と可視化を行うため、ラマン分光装置の充実を図り、かつ、若手研究者 1 名を雇用し、共同研究を加速させた。花岡班では、開発した超硫黄検出プローブを分与するために必要な各種設備の購入やアップグレードを実施した。さらに赤池班では、超硫黄メタボローム解析に必須の安定同位体 ^{34}S を含む各種超硫黄分子の合成と精製に必要な材料の購入と機器の整備を行った。

海外の関連する研究領域の研究者を本領域の研究活動に巻き込み、超硫黄研究の世界的潮流を我が国から発出するため、2022 年 10 月には、東北大学星陵キャンパスで 5 日間に渡り Redox Week in Sendai 2022 を開催した。これはコロナ禍になって以降、最初の対面による大規模な国際会議であった。海外から 80 名を超えるオンサイト参加者があり、海外からのオンサイト招待者は 60 名、オンライン招待者は 30 名にのぼった。この開催のために、総括班経費を含む本領域の経費から海外オンサイト招待者 20 名分の旅費・滞在費を負担し、領域に参加している若手研究者との密な交流を図った。

総括班からは、さまざまな領域活動に必要な経費を支出した。2021 年度に領域が立ち上がって以降、毎年の領域会議の開催・運営にかかる経費や領域内の技術支援に必要な消耗品の購入、日本生化学会大会や日本薬学会のシンポジウム共催費、領域運営と支援業務のための人件費などを支出した。2022 年には、Redox Week in Sendai の開催にかかる経費や、海外研究者の招聘にかかる経費を支出した。2023 年度には、若手研究者を対象にした技術講習会を開催し、会場の手配を含めて運営にかかる経費を総括班から支出した。

また、本領域の参加者の中に、昇任に伴い新たな研究室のセットアップが必要になったメンバーがいた。特に、計画研究代表者の花岡は東京大学から慶應義塾大学に異動し、計画研究分担者の清水は東京大学から奈良女子大学に異動となり、それぞれ、本領域研究の予算の活用により、備品や消耗品の購入が可能となり順調なスタートを切ることができ、優れた研究成果に繋がっている。

昨今の円安により、海外への渡航費、論文の掲載料、海外から輸入する試薬類の価格が高騰しており、研究費の実施的な目減りが起こっている。領域内での試薬、生物資源、機器類の共用化などを推進することで、研究費の有効活用を図る。オンラインによる情報交換と海外の学会参加の機会を利用して、本領域で独自に確立する定量的超硫黄オミックスのプロトコールの国際標準化を実現し、国内外の超硫黄生物学コンソーシアムの形成を進める。

12 今後の研究領域の推進方策

研究領域全体を通じ、今後の本研究領域の推進方策について、「これまでの学術の体系や方向を大きく変革・転換させることを先導する」観点から、具体的かつ簡潔に2頁以内で記述すること。なお、記述に当たっては、今後実施する公募研究の役割を明確にすること。また、研究推進上の問題点がある場合や、国際的なネットワークの構築等の取組を行う場合は、その対応策や計画についても記述すること。

今後の研究領域の推進

従来の学術を変革させ先導するために重要な課題を研究項目ごとに記載する。

A01. 超硫黄分子の分析・計測・可視化

超硫黄分子 in-cell ケミストリーの確立のために次の3点を進める。ケージド原子状硫黄（ケージド超硫黄）を標的オルガネラ・標的タンパク質に送達し、細胞内超硫黄状態を制御する手法を開発する。ヒト病態での超硫黄変動を独自測定法の適用でさらに定量解析し超硫黄制御による病態改善を検討する。質量分析によるプロテオミクス解析を進め領域内での様々な病態・モデル生物の超硫黄状態をカタログ化する。

構造生物学的なアプローチとしては、鉄硫黄クラスター生合成およびグルタチオン分解系などに着目し、タンパク質に結合したインタクト且つ機能状態の超硫黄分子の立体構造解析を進める。X線結晶構造（電子散乱解析）とクライオ電子顕微鏡構造（原子散乱解析）を組み合わせ、それぞれのタンパク質環境において超硫黄分子がもつ硫黄原子間の結合距離・角度、フレキシビリティを実験的に解き明かし、従来の代謝生化学の概念では想定されていない新しい生体反応機序の構造化学基盤を確立する。

ラマン分光法を用いた超硫黄の検出では、これまでに細胞内での代謝過程を、ラマン顕微鏡を用いて観測することができている。今後、CARS 顕微鏡を用いて代謝の時間変化の直接観測を行う。また、膜透過性高分子の改良などを行い、導入できる超硫黄分子を拡張させ、超硫黄分子の細胞内導入とラマン観測までのプロトコルを確立する。また、蛍光寿命などと組み合わせたマルチモーダル化を行い、各種生理現象へと応用する。さらに、超硫黄分子の細胞内導入に伴う細胞内温度などの細胞状態変化を、機械学習などを用いて in situ で検出する。このほか、超硫黄分子の解析のためのケミカルツール群の開発としては、各種超硫黄分子種の産生酵素の阻害剤の開発、超硫黄分子の代謝に関わる蛍光プローブの開発、³³S-NMR による生体内硫黄分子の検出法の開発を行う。また、生体内の新規超硫黄分子として *cyclo-octasulfur* (S₈) を発見したことから、その代謝動態解析を通じて、S₈ 生合成と代謝メカニズムを解明する。すでに、ミトコンドリア呼吸における電子受容体と、脂肪細胞における抗酸化物質としての S₈ の重要性を解明しつつある。これに加えて、すべての超硫黄代謝経路のデータベース構築を目指す。

A02. 超硫黄分子をめぐる電子フラックス

システイニル tRNA 合成酵素 CARS が有する超硫黄合成活性の生体における意義の検証を完了させる。すなわち、CARS2 によるミトコンドリアでの超硫黄産生と、CARS1 による細胞質での超硫黄産生の意義を、タンパク質の超硫黄化の視点から解析する。CARS2 による超硫黄化については、ミトコンドリア内のタンパク質翻訳に共役した超硫黄導入の重要性が、CARS1 による超硫黄化については、核内の転写共役因子の機能における重要性が明らかになりつつある。

ミトコンドリア tRNA の硫黄修飾については、2つの観点から解析する。ミトコンドリア tRNA の硫黄修飾酵素 MTU1 の制御因子と因子間における硫黄リレーのメカニズムの解明に挑む。一方、本領域で新たに見出した新規ミトコンドリア tRNA 硫黄修飾である ms2A 修飾の意義を理解するため、関連修飾酵素の同定と修飾に至る経路の解明に挑み、酸化ストレス応答マーカーとしての有用性を検討する。

光合成における超硫黄の役割としては、直接的な超硫黄修飾によって活性制御を受ける FNR/ATPase に注目してリニア/サイクリック光合成電子伝達系を解析することで明らかにする。超硫黄の存在を想定することにより、これまで収支が合わなかった電子の量や NADPH/ATP の生産量の整合性がとれると期待される。さらに超硫黄分子による AtCARS1 自身の活性制御や、光合成関連タンパク質の化学的翻訳後修飾についても研究を展開し、超硫黄分子による光合成電子伝達機構の全体像の解明を目指す。

NADPH 依存的な超硫黄のリモデリングの分子機構の解明では、触媒酵素としての NADPH オキシダーゼ (Nox) と NO 合成酵素 (NOS) に着目し、Nox/NOS 系を標的とした新しい抗菌・抗炎症創薬を目指す。特に、Nox/NOS-超硫黄に基づく創薬に注力する。抗炎症創薬については、インフラマソームの阻害をはじめとする成果が得られてきており、抗菌創薬については、細菌由来 Nox に対する超硫黄リモデリングを介した新規な抗菌薬開発の可能性を探索する。

小胞体のタンパク質品質管理に対する超硫黄分子の役割では、超硫黄修飾された特定の分子シャペロンや酸化異性化酵素の役割を明らかにする。また、硫黄制御による小胞体ストレス応答への影響を観察する。発生や分化、癌化など疾患プロセス、環境ストレス、老化に伴うレドックス環境の変化を硫黄修飾に着目して追跡し、疾患治療法開発の基盤とする。

A03. 超硫黄分子が担うシグナル伝達

治療抵抗性心不全の心臓で観察される還元ストレスの実態解明では、超硫黄分子の代謝や膜輸送に着目する。還元ストレス曝露によって誘発される G タンパク質凝集化のメカニズムと心臓におけるその病態生理的意義を明らかにするとともに、G タンパク質凝集抑制を主眼とする治療戦略も確立させる。

各種生命現象における超硫黄とセレノプロテインの相互作用の生理的意義解明では、トランスフェリンの超硫黄化に着目し、超硫黄化による活性の変化や受容体との親和性に与える影響を解明する。過剰セレノプロテインが関わる疾患における超硫黄分子の変化やそのラジカル消去作用の生理的役割を明らかにするとともに、超硫黄代謝を制御する NRF2/セレノプロテインによって作られるレドックス環境の制御機構を明らかにする。

バクテリアにおける超硫黄の重要性の検討では、これまでに *cyclo-octasulfur* (S_8) のトランスポーターを同定したので、その解析を進める。紅色イオウ細菌から同定した S_8 のトランスポーターの機能を精査し、細胞の S_8 膜透過機構を明らかにする。またタマネギに感染する非イオウ細菌 *Burkholderia* から単離したアリシン応答性転写因子の機能と生理的役割を明らかにすることで、細菌-植物間の相互作用における超硫黄分子の新たな役割を明らかにし、農業への応用展開を図る。

タンパク質のシステイン残基の修飾については、超硫黄化に伴う PRX-1 の巨大オリゴマー形成におけるシステイン硫黄原子の状態などの化学的な基盤を解明し、タンパク質の凝集体形成を阻害する分子機能のマクロな高次生命機能における役割を解明する。また、PRL の C101D ノックインマウスの解析から、PRL の活性システイン硫黄原子の化学修飾の生物学的重要性を明らかにする。

今後実施する公募研究の役割

今後の公募研究には、計画研究ではカバーしきれない以下の内容における新たな展開を期待する。

- 1) 超硫黄分子の生体膜をまたぐ輸送機構
- 2) 金属イオンの配位における超硫黄の役割
- 3) 腸内細菌における超硫黄産生と利用
- 4) オルガネラの相互作用における超硫黄
- 5) 工業資源開発における超硫黄

また、計画研究と密接に関わる課題としては、以下の内容に要約される。

- 1) 超硫黄の制御・可視化・合成
- 2) がんの悪性化における超硫黄の役割
- 3) 含硫代謝物、含硫構造体の生合成における超硫黄の役割
- 4) 発生・分化における超硫黄の役割

国際的なネットワークの構築

令和5年度に、赤池を代表者とし、本領域の計画研究代表者を分担者として、国際先導研究「レドックス超分子の生命機能解明に向けたグローバルな研究先導 Global Exploration for Redox Supermolecules Evolving in Life Functions (G-ReXS)」が採択になった。令和11年度までの7年間にわたり、超硫黄分子を中心とする活性分子種の生体内機能をテーマとする新しい生命科学研究を、我が国の研究者がリーダーシップを取る形で展開しつつ、若手研究者を育成する。我が国の若手研究者を関連する海外の有力な研究室に派遣する、もしくは、海外の有力な研究者を招聘することにより、我が国発の超硫黄研究の裾野を世界に広げる。その基盤として、超硫黄の計測系の世界標準化を図り、技術基盤の普及を図ることが重要であり、これは本領域における活動として達成すべき最重要課題である。

令和7年4月には、東北大学において国内外の関連する研究者が一同に会する国際会議を開催する。本領域で育成しつつある若手研究者に、彼らの派遣先となりえる海外の研究者との交流の機会を提供する。合わせて、技術講習会を開催し、超硫黄の計測技術の世界への普及を図る。さらに、超硫黄メタボロームのデータベース化を推進して、論文発表後には世界に向けて公開する。

13 総括班評価者による評価

研究領域全体を通じ、総括班評価者による評価体制(総括班評価者の氏名や所属等)や本研究領域に対する評価コメントについて、具体的かつ簡潔に2頁以内で記述すること。

本領域では、毎年開催している領域会議に総括班評価者を招待しており、計画研究と公募研究の成果報告を聞いていただき、それぞれの代表者や分担者と交流していただきながら、さまざまな視点からのご助言をいただいている。現段階での3名の総括班評価者からのコメントを以下に示す。

森 泰生先生(京都大学 大学院工学研究科, 教授)

生命の起源・進化に始まり現存生物の機能に至るまで、枢要かつ普遍的な役割を果たす硫黄に注目するユニークな研究領域である。特に、近年、硫黄代謝物の定性・定量技術が開発されたことをきっかけとして同定された、硫黄原子が直鎖状に連結し生成する分子、「超硫黄」(Supersulfide)に焦点を当てている。本領域のメンバーらが中心となって超硫黄分子の遍在性を示して、まだ日が浅いことから、主としてその誘導体や付加体タンパク質等の生体内における同定、そのために必要な検出や或いは人工的な振動技術の開発に注力しており、着実な業績を達成している。中でも、この観点においては、超硫黄分子の細胞内イメージングを可能にする技術開発が **Hallmark** であるといえる。また、酸素分子の独壇場と思われてきたミトコンドリアの酸化リン酸化においても、超硫黄分子の欠かせない機能が明らかになるようとしており、今後の発展がますます楽しみである。一方、代表のリーダーシップの下、頻りに系統的な会合を持つことにより、班員が情報や方向性をしっかりと共有するように気配りがなされており、領域内の班員の相互作用は顕著である。計画班員、公募班員による有機的連携から、新展開が生まれる期待が大である。本領域研究により、我が国を端緒とする超硫黄の独創性がさらに国際的に認知され、様々な生命機能の理解に大きな貢献を為す研究分野へと発展することに疑いをはさむ余地はない。

浦野泰照先生(東京大学 大学院薬学系研究科, 教授)

本領域研究では、非常に新しい硫黄の化学的理解に基づく生命科学研究が展開されている。元来硫黄は、-2 から+6 までの幅広い酸化数を取りうる元素であり、それぞれの酸化数に応じて異なる化学反応性を有している。これが生体内でどのような役割を果たしているかは、生物学的観点のみならず化学的な観点からも非常に興味深く、本領域研究では広範な攻め口での研究が展開されている。具体的には、新しい原理に基づく超硫黄検出ケミカルプローブの開発とその可視化、質量分析やラマン分光法による新しい超硫黄の計測技術の開発、構造生物学的手法を駆使した超硫黄の可視化など、多くの挑戦がなされており、ケミカルバイオロジーを専門とする研究者目線で見ても、極めて面白い成果が数多く得られている。

さらに総括班の活動として、こうして開発した新しい技術を領域内に広く共有するシステムが構築されており、超硫黄研究の裾野の広がりが期待され、本領域が目指す新しい生物学の構築に向けた確実な基盤の確立がなされつつある。また、若手研究者の育成に力を入れている点も特筆すべき点であり、毎月、オンラインによる領域プログ्रेसミーティングを開催し、大学院生を含む多くの若手研究者に未発表データを供覧して活発な議論の機会を提供している。昨年度に採択された国際先導研究との連携により、国際的な頭脳循環と若手研究者の育成が、硫黄生物学を主軸としてさらに強化されると思われる。

これからの後半2年間で、さらに多くの優れた成果が得られる可能性は非常に高く、本研究領域から、新しい学術の潮流をリードする国際的なハブが生まれるものと大いに期待される。

馬場健史先生(九州大学 生体防御医学研究所, 教授)

本研究領域では、「超硫黄の化学的・物理的な特性を理解し、その生物学的機能を解明することにより、全く新規の硫黄生命科学を確立し、物理化学・生物学の幅広い異分野融合と革新的学術領域の創成

を目指す」という目的に向けて硫黄関連の研究に取り組んでいる生化学、化学、分析化学などの幅広い分野の第一線の研究者が集合し、新たな「硫黄生物学」の創成に向けた広範囲の取り組みがなされている。これまでに、計画研究班、公募班で多くの優れた成果が得られており、「硫黄生物学」構築に向けた計測技術開発ならびに超硫黄分子の機能解析が計画通りに進んでいる。特に、*cyclo-octasulfur* (S_8) の測定系の確立による生体内における存在の証明は画期的な成果であり、領域の発展に貢献する重要な研究と言える。運営面に関しては、研究代表の強いリーダーシップのもと、研究計画班だけでなく公募班も含めて密なやり取りができています。特に、毎月オンラインによる領域プログ्रेसミーティングを実施し、それぞれの研究チームが保有する生物資源や解析技術の情報が領域内で広く共有され、若手研究者の間で自発的に数々の共同研究が生まれている点、若手研究者を領域研究者全員で育成する取り組みがなされている点が高く評価できる。総括班の活動として、硫黄の化学・生化学的解析・分析の支援を行っており、領域ホームページからメタボローム解析、プロテオーム解析、超硫黄ドナーや超硫黄検出プローブなどケミカルツールの提供などの支援の要請ができるシステムが構築されている。また技術講習会も実施しており、研究領域における支援体制も充実している。

上記とおり、本研究領域の目的に向けて計画された研究内容を実施し、領域内の連携や若手育成を含めて期待以上の成果が挙げられている。今後のさらなる進展に期待したい。