



## バイオテクノロジー分野における硫黄化合物の網羅的解析技術がもたらす可能性

新多智明<sup>1</sup>, 阿閉耕平<sup>1</sup>, 鈴木健吾<sup>1</sup>, 河野祐介<sup>1,2</sup>, 大津巖生<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>株式会社ユーグレナ, <sup>2</sup>筑波大学生命環境系

### 1. はじめに

硫黄は炭素や窒素と同様に、全生物に必須の元素であることをご存知だろうか。微生物や植物は無機性硫黄化合物（硫酸イオン、硫化物イオンなど）から有機性硫黄化合物（システイン、エルゴチオネインなど）を合成できる [1,2]。一方で、ヒトを含む動物は有機性硫黄化合物を合成することはできないため、食事から有機性硫黄化合物を摂取し、様々な生理機能性分子として活用し、最終的に無機性硫黄化合物に分解して、排泄する。そうして無機化された硫黄化合物を再び微生物や植物が吸収し、有機硫黄化合物へと合成する。このように、生体硫黄は微生物や植物の同化過程を頼りに、地球規模で持続的に循環している (Fig. 1)。

土壌や農作物、ヒト由来検体など様々なサンプルで硫黄化合物を網羅的に解析することは、どのようなものが、どのように代謝されたのか、生物学的移行を探る一助となる。本章では、バイオテクノロジー分野において、硫黄化合物の網羅的解析技術がもたらす可能性について説明したい。

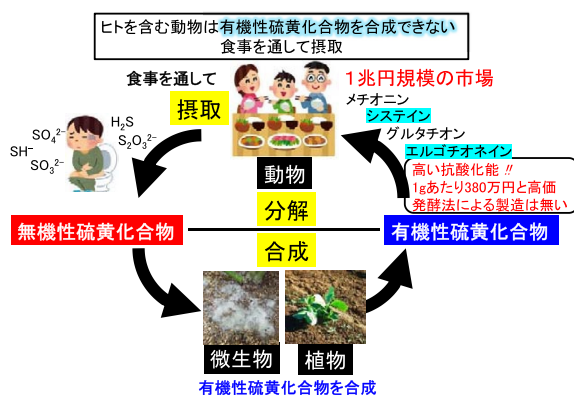


Fig. 1 地球規模での硫黄循環

### 2. サルファーインデックス®とは

網羅的な硫黄化合物の分析に関する研究は、硫黄化合物が様々な酸化還元状態をとることや、微生物が作り出す有機硫黄化合物の量のごく微量であることからこれまで遅れていた。しかし、著者らは慶応大学 末松誠教授らとの共同研究により、高速液体クロマトグラフ質量分析法 (LC-MS/MS) とモノプロモビマン分子によるチオール基 (R-SH) 特異的な誘導体化を用いることで、硫黄関連代謝物の網羅的解析手法を確立した [3,4]。本解析法を「サルファーインデックス®」と名付け [5]、2018年11月2日に特許を取得している [6]。

本解析の特色であるチオール基 (R-SH) の誘導体化は、サンプル調整時に進行してしまう、サンプル内分子間や空气中酸素との化学的な酸化還元反応を回避できる点で優れており、LC-MS/MSの利点を十分に活用しながら、しかも抽出時の状態を反映する検出・定量を可能としている (Fig. 2)。硫黄は全生物必須の元素であり、なおかつ生体内での環境に応じて様々な酸化還元状態をとることから、サルファーインデックス®は発酵工学、医学、環境工学など、生物が関連する酸化や酵素活性レベルのモニタリングに非常に有用であると考えられる。

### 3. サルファーインデックス®の食品への応用

サルファーインデックス®の食品への応用例として、69種類のワインの解析結果を示す (Fig. 3)。多次元尺度法を用いる統計解析により、マッピングして比較すると、酸化防止剤添加ワインと酸化防止剤無添加ワインとは、サンプル群が異なる群として区別された。また、酸化防止剤添加ワインは、酸化防止剤無添加ワインと比較して、酸素の存在が1 ppm以下であることを示す指標となる亜硫酸イオンをはじめ、多数の還元型硫黄化合物の割合が高い傾向がみられた。

幅広い化合物種をターゲットとする一般的なメタボローム解析では、複数のサンプルを Fig. 3 のように区

〒108-0014 東京都港区芝 5-29-11

† Fax: 03-5442-4907, E-mail: atsujii@euglena.jp

mbBr誘導体化試薬とLC-MSMSを組み合わせた方法で約50種の硫黄化合物を一掃解析

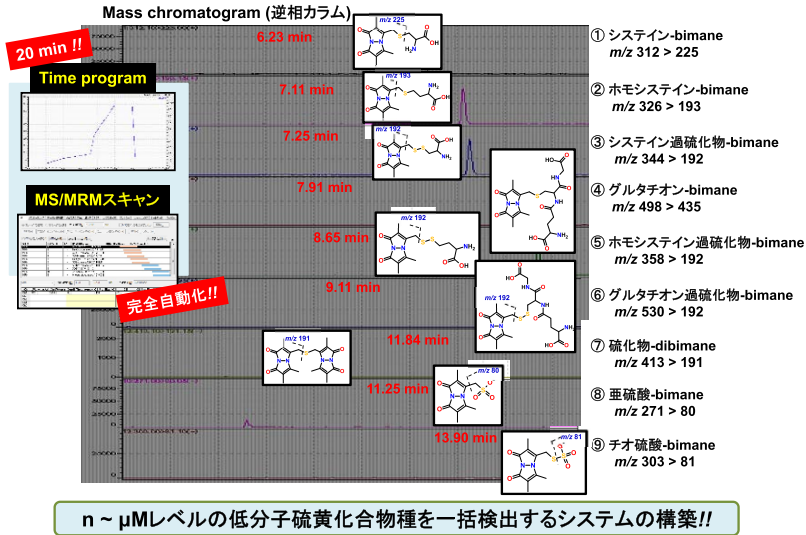


Fig. 2 サルファーインデックス®

サルファーインデックス指標の実例

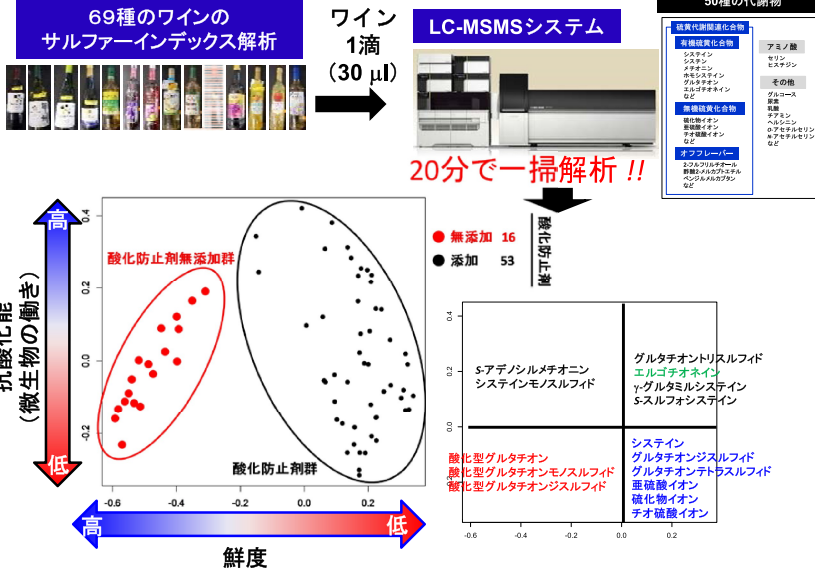


Fig. 3 抗酸化能が高く鮮度のよいワインが一目で判る

別することができたとしても、なぜそのように区別できたのか、原因を特定することが困難な場合が多い。しかし、サルファーインデックス®では硫黄化合物に着目することで、より直観的に理解しやすい解析結果が得られる場合が多く、これまでなかった新しい代謝機能に注目した分析サービスを展開することが可能となった [7]。Fig. 3では、横軸は酸化還元度（鮮度）を示す一方、縦軸はエルゴチオネイン含有量が各プロットの分布に影響している。エルゴチオネインは、キノコや麹菌などの一部の微生物のみが合成できる抗酸化物

質であるため、微生物の働き（抗酸化能）を示す指標として、今後活用が見込まれる。このようにサルファーインデックス®により硫黄化合物に絞って測定・解析をすることで、酸化還元度（鮮度）や微生物の働き（抗酸化能）などの新たな指標での評価が可能となった。

4. ユーグレナ油脂生産時に発生する硫黄臭の原因説明

サルファーインデックス®の生物の代謝への応用例として、ユーグレナのワックスエステル発酵に関する解

析結果を紹介する。微細藻類であるユーグレナ (*Euglena gracilis* 和名：ミドリムシ) は嫌気条件において、細胞内にワックスエステルという油脂を蓄積する (ワックスエステル発酵) ことが知られている。このワックスエステルはバイオ燃料の原料として適していることから、ユーグレナのバイオ燃料への利用に期待が高まっている。

ユーグレナがワックスエステル発酵を行う際、同時に硫黄臭 (悪臭) が発生することが経験的に知られており、生産系の工業スケール化における懸念となっている。この臭いの発生は既知のワックスエステル発酵の反応系からは明確な説明がなされていない現象であった。そこで、硫黄臭の発生メカニズム解明を目的に、サルファーインデックス<sup>®</sup> 分析を行った結果、ワックスエステル発酵時の培養液上清に硫化水素が含まれていることが確認され、ワックスエステル発酵における臭いの原因である可能性が示唆された [8]。さらに、ワックスエステルの生産に対応して、細胞内のシステインやメチオニンなどの含硫アミノ酸も増加し、グルタチ

オンやタンパク質が減少していることが明らかとなった (Figs. 4, 5)。

本研究により、ワックスエステル発酵の過程で、細胞内のグルタチオンやタンパク質が分解された一方、システインやメチオニンなどの含硫アミノ酸が増加し、この含硫アミノ酸が分解されることで、エネルギーとともに硫化水素が発生するというワックスエステル発酵の副次的反応が新たに示唆された。本研究成果により、ユーグレナの油脂生産性を上げることや臭いの発生を抑制する技術の開発が可能になると考えられ、高効率バイオ燃料の研究などを加速させることに役立つことが期待される。

## 5. まとめと今後の展望

Fig. 3-5の例だけでなく、著者らは硫黄化合物の網羅的測定解析技術「サルファーインデックス<sup>®</sup>」により、大腸菌、藻類、モデルマウス、ヒトなど、様々なサンプルの硫黄代謝をモニタリングしてきた。現在は、メ

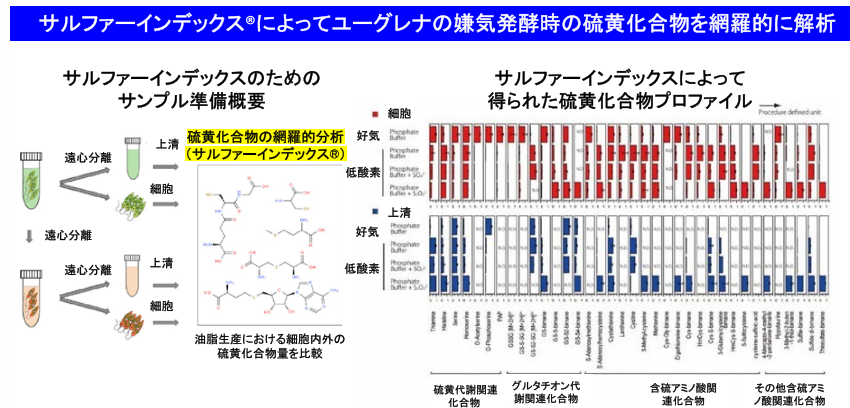
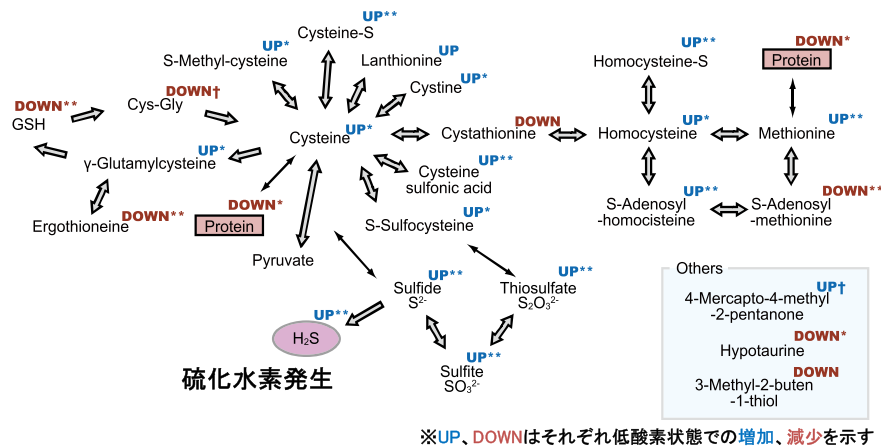


Fig. 4 ユーグレナワックスエステル発酵における硫黄化合物プロファイルの取得



※UP、DOWNはそれぞれ低酸素状態での増加、減少を示す

Fig. 5 細胞内の硫黄化合物の増減

タボローム解析に留まらず、サルファーインデックス<sup>®</sup>に基づく代謝情報に、次世代シーケンスに基づく菌叢情報を組み合わせて統合的な解析を行う「サルファーゲノミクス<sup>™</sup>」の開発を推進している [9]。近年の次世代シーケンサーの性能向上に伴い、微生物叢の研究は健康・医療の分野で大きく進展し、その全容解明と人為的な制御技術の開発に向けた取り組みが活発に行われている。こうした取り組みにより、膨大な数に及ぶ細菌叢メタゲノムデータへのアクセスが可能となったが、解析対象試料で注目する性質に対して、どの微生物種が、あるいは、どの微生物種の組み合わせが影響を与えているかを抽出・導出する方法論については、寧ろ技術の遅れが際立ってしまっている状況にある。その解決策の一端として、著者らは「サルファーゲノミクス<sup>™</sup>」によって着目形質との相関・因果関係を伴う微生物種の効果的な抽出や、更にはその関係性を導出できる実例の実験的な検証を重ねている [9]。現在、この解析を基盤技術とする土壌フローラ診断やセルフメディケーションへの応用を目指し、新たな挑戦を続けている。

#### 引用文献

- 1) T. Nakatani, I. Ohtsu, G. Nonaka, N. Wiriyathanawudhiwong, S. Morigasaki, H. Takagi; Enhancement of thioredoxin/glutaredoxin-mediated L-cysteine synthesis from S-sulfocysteine increases L-cysteine production in *Escherichia coli.*, *Microb. Cell Fact.*, **11**, 62 (2012).
- 2) R. Osawa, T. Kamide, Y. Satoh, Y. Kawano, I. Ohtsu, T. Dairi; Heterologous and High Production of Ergothioneine in *Escherichia coli.*, *J. Agric. Food Chem.*, **66**, 1191-1196 (2018).
- 3) E. Funahashi, K. Saiki, K. Honda, Y. Sugiura, Y. Kawano, I. Ohtsu, D. Watanabe, Y. Wakabayashi, T. Abe, T. Nakanishi, M. Suematsu, H. Takagi; Finding of thiosulfate pathway for synthesis of organic sulfur compounds in *Saccharomyces cerevisiae* and improvement of ethanol production., *J. Biosci. Bioeng.*, **120**, 666-669 (2015).
- 4) Y. Kawano, I. Ohtsu, A. Tamakoshi, M. Shiroyama, A. Tsuruoka, K. Saiki, K. Takumi, G. Nonaka, T. Nakanishi, T. Hishiki, M. Suematsu, H. Takagi; Involvement of the *yciW* gene in L-cysteine and L-methionine metabolism in *Escherichia coli.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **119**, 310-313 (2015).
- 5) euglena Co.,Ltd., *suifurindex* (Trademark), 5965744 (Registration number)
- 6) I. Ohtsu, S. Oshiro, euglena Co., Ltd., Japan patent JP6426329; Determination method of volatile low molecular sulfur compounds, the evaluation method of a sulfur compound-containing material.
- 7) euglena Co.,Ltd. HP [<http://www.euglena.jp/sulfurindex/>]
- 8) K. Yamada, T. Nitta, K. Atsuji, M. Shiroyama, K. Inoue, C. Higuchi, C. Higuchi, N. Nitta, S. Oshiro, K. Mochida, O. Iwata, I. Ohtsu, K. Suzuki; Characterization of sulfur-compound metabolism underlying wax-ester fermentation in *Euglena gracilis.*, *Sci. Rep.*, **9**, 853 (2019).
- 9) Y. Kawano, I. Ohtsu, K. Yamada, K. Suzuki, "Charm and outlook of sulfur metabolism with microorganisms (Biseibutsu ga Yusuru Ioutaisya no Miryoku to Tennbou)" *Chemical Engineering*, **63**, 66-72 (2018).