

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08456

研究課題名(和文) 活性イオウ分子種による新規オートファジー制御機構と感染防御における役割

研究課題名(英文) Autophagy regulation mechanism via reactive persulfide species and its role in antimicrobial host defense

研究代表者

藤井 重元 (FUJII, Shigemoto)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00325333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細菌感染防御におけるオートファジーの役割を明らかにするために、活性イオウ分子とタンパク質S-グアニル化によるオートファジー制御機構と細菌が産生する活性イオウ分子種の影響の解析を行った。感染細胞内での菌体のS-グアニル化はオートファジーによる殺菌に働いているが、細菌が産生する活性イオウ分子はS-グアニル化を介するオートファジー誘導を抑制し、宿主細胞の感染防御機構からの回避に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the role of autophagy in antibacterial host defense, we investigated the regulation mechanism of autophagy mediated by reactive persulfide species and protein S-guanylation, and effects of reactive persulfides produced by bacteria. S-Guanylation of bacteria in infected-host cells was found to be involved in bacterial killing by autophagy in host cells, and reactive persulfides produced by bacteria were suggested to suppress S-guanylation-mediated autophagy induction and contribute to its escape from defense mechanism of host cells.

研究分野：細菌学

キーワード：細菌 感染防御 オートファジー 活性イオウ分子種 硫化水素

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、細胞内小器官やタンパク質、細胞内に侵入した細菌などを分解する細胞内消化機構であり、感染防御やストレス応答など生体の恒常性維持において重要な役割を果たしている。オートファジーは、オートファゴソームと呼ばれる細胞内小胞の形成とリソソーム融合による内容物の消化を含む一連の過程である。近年、オートファジーに関わる様々なタンパク質因子の同定が進み、複雑で精緻な制御メカニズムが明らかになりつつある。しかしながら、感染や酸化ストレスなどの刺激がオートファジーを誘導する詳細な分子メカニズムには依然多くの不明な点が残されている。

我々はこれまで、活性酸素と一酸化窒素(NO)のシグナル機能と感染防御における役割について研究を行ってきた(Nature Chem Biol, 2007; J Immunol, 2009; J Biol Chem, 2010)。最近、活性酸素とNOにより生成する親電子性シグナル分子である8-ニトロ-cGMPがタンパク質翻訳後修飾(タンパク質S-グアニル化)を介して化膿レンサ球菌やネズミチフス菌感染時のオートファジー誘導のメディエーターとして機能していることを明らかにした(Mol Cell, 2013)。またごく最近、活性酸素・親電子シグナルの新規制御因子を探索する中で、システインパースルフィド(CysSSH)などの活性イオウ分子種が8-ニトロ-cGMPを代謝・分解することにより、そのシグナル活性を制御していることを見出した(PNAS, 2014)。活性イオウ分子種は、チオール基に過剰にイオウ原子が付加した化合物(R-S-(S)_n-H)であり、哺乳類細胞においては、システイン合成に関わる酵素として知られているシスタチオニン-シターゼ(CBS)およびシスタチオニン-リアーゼ(CSE)により産生されることが知られていた。興味深いことに、我々は、CBSやCSEをノックダウンした細胞で著明にオートファジーが誘導されることを予備的ながら見いだした。このことから、活性イオウ分子は重要な生体内オートファジー制御因子として機能していることが示唆されたが、その詳細な生理的意義については不明であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、オートファジーの新しい制御因子として活性イオウ分子種に着目し、その細胞内動態とオートファジー誘導の解析により、その制御分子メカニズムを解明することを目的とした。さらに、細菌感染細胞において、その制御機構が細胞内殺菌に与える影響と細菌が産生する硫化水素のオートファジー抑制作用を解析することにより、オートファジーによる細菌感染防御機構の解明に向けた研究を推進した。

3. 研究の方法

細菌感染細胞における8-ニトロ-cGMPとタ

ンパク質S-グアニル化を介するオートファジー誘導機構と活性イオウ分子による制御の役割を解明するために以下の解析を行った。

(1) 活性イオウ分子種の細胞内動態の解析：宿主細胞における活性イオウ分子種の細胞内動態を明らかにするために、安定同位体希釈法-質量分析(LC-MS/MS)による高感度で特異的な活性イオウ分子の定量解析システムを用いて、各種培養細胞(マウスマクロファージRAW264.7細胞、ヒト肺がんA549細胞など)の細胞内活性イオウ分子種生成レベルを定量解析した。さらに、CBS、CSEをはじめとした各種タンパク質のノックアウト・ノックダウン細胞を調製し、その活性イオウ分子種生成レベルの変化を定量解析することにより、細胞内の活性イオウ分子種生成機構を調べた。

(2) ネズミチフス菌の活性イオウ分子種産生の解析：ネズミチフス菌(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2)における活性イオウ分子種の産生機構を明らかにするために、ネズミチフス菌の主要な硫化水素産生酵素であるチオ硫酸還元酵素(Phs)および亜硫酸還元酵素(Asr)を欠損した菌株を作成し、(1)と同様の解析法を用いて菌体の活性イオウ分子種産生レベルを調べた。

(3) 活性イオウ分子種がオートファジーによる細胞内殺菌へ与える影響の解析：ネズミチフス菌をマウスマクロファージ(RAW264.7細胞、マウス骨髄マクロファージなど)に感染させ、細菌感染後のオートファジー誘導を解析した。オートファジーの誘導は、オートファゴソーム関連タンパク質(LC3、p62)の免疫染色と共焦点レーザー顕微鏡によるオートファゴソームの形態観察により解析した。オートファジー誘導と8-ニトロ-cGMPによるタンパク質S-グアニル化との関連を調べるために、感染細胞内における菌体のS-グアニル化を免疫細胞染色で解析するとともに、二次元電気泳動-ウエスタンブロットによりS-グアニル化標的タンパク質の同定を行った。さらに、野生型ネズミチフス菌と硫化水素産生酵素欠損菌株を感染させた細胞におけるオートファジー誘導、菌体タンパク質のS-グアニル化、細胞内での菌の増殖を比較解析することにより、細菌が産生する硫化水素・活性イオウ分子がオートファジーによる宿主細胞の感染防御機能へ与える影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 質量分析(LC-MS/MS)による活性イオウ分子種の定量解析系を用いて各種培養細胞を解析した結果、システインパースルフィド、グルタチオンパースルフィドをはじめとした各種活性イオウ分子種が様々なレベルで細胞内に存在することが分かった。これらの活性イオウ分子種の細胞内レベルは、シスタチオニン-シターゼ(CBS)およびシスタ

チオニン -リアーゼ (CSE) の siRNA による
ノックダウンにより、有意に低下した。また、
CBS、CSE をノックダウンした細胞では、共焦
点レーザー顕微鏡による形態観察および LC3
のウエスタンブロット解析により、オートフ
ァジーが誘導されていることが示され、細胞
内で生成するシステインパースルフィドな
どの活性イオウ分子種は、オートファジー誘
導制御に重要な役割を果たしていることが
示唆された。さらに大変興味深いことに、細
胞内の活性イオウ分子種の生成動態を詳細
に解析した結果、CBS、CSE 以外に、タンパク
質翻訳に共役した新たなシステインパース
ルフィド産生系が存在することが明らかにな
った (Nature Commun, 2017)。

(2) ネズミチフス菌の活性イオウ分子産生
について LC-MS/MS を用いて解析した結果、
野生型のネズミチフス菌菌体では様々な活
性イオウ分子種が高いレベルで産生されて
いることが分かった。硫化水素産生酵素であ
る Phs および Asr を欠損した菌株では、硫化
水素産生が低下するとともに、活性イオウ分
子種の産生レベルも有意に低下したことから、
これらの酵素が活性イオウ分子産生に関
わっていることが示された。

(3) ネズミチフス菌を感染させたマクロフ
ァージでは、著明なオートファジーの誘導が
観察された。感染細胞内において、オートフ
ァゴソーム内のサルモネラ菌体は著明に S-
グアニル化を受けており、S-グアニル化を受
けた菌体が LC-3 や p62 と共局在していたこ
とから、菌体のタンパク質 S-グアニル化が菌
体のオートファゴソームへの選択的取り込
みに関与することが示唆された。さらに、二
次元電気泳動とウエスタンブロットにより
S-グアニル化タンパク質の詳細な解析を行
った結果、様々な菌体タンパク質が S-グア
ニル化の標的となることが示され、特に線毛
関連タンパク質が顕著に S-グアニル化を受け
ていることが分かった。

(4) ネズミチフス菌の主要な硫化水素産生
酵素 (Phs および Asr) を欠損させた菌株を
感染させたマクロファージでは、野生型菌株
を感染させた場合に比べ、オートファジー誘
導が亢進し、宿主細胞内の生菌数は有意な低
下が観察された。また、感染細胞内の S-グア
ニル化を受けた菌体の割合は、野生型菌株を
感染させた場合に比べ、硫化水素産生酵素欠
損菌株を感染させた場合では有意に増加し
た。硫化水素産生酵素欠損菌株を感染させた
細胞に硫化水素ドナーである NaHS を添加す
ると、細胞内での菌の増殖は有意に増加した。

これらのことから、ネズミチフス菌が産生
する硫化水素・活性イオウ分子種は、8-ニト
ロ-cGMP の分解を介して菌体の S-グアニル化
を抑制し宿主のオートファジーによる感染
防御からの回避に働いていることが示唆さ
れた。本研究の成果は、オートファジーによ
る細菌感染防御機構や硫化水素産生菌の病
原性発現機構の解明、および細菌感染症の新

規予防・治療法の開発に寄与するものと考え
られる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

[雑誌論文](計 21 件)

1. Fujii S, Sawa T, Motohashi H, Akaike T.
Persulfide synthases function coupled
with translation and mediate sulfur
respiration. Br J Pharmacol. in press
(2018). 査読有
DOI: 10.1111/bph.14356.
2. Saito H, Godo S, Sato S, Ito A, Ikumi
Y, Tanaka S, Ida T, Fujii S, Akaike T,
Shimokawa H. Important role of
endothelial caveolin-1 in the
protective role of
endothelium-dependent
hyperpolarization against nitric
oxide-mediated nitrate stress in
microcirculation in mice. J Cardiovasc
Pharmacol. 71, 113-126 (2018). 査読
有
DOI: 10.1097/FJC.0000000000000552.
3. Kaneko K, Miyamoto Y, Tsukuura R, Sasa
K, Akaike T, Fujii S, Yoshimura K,
Nagayama K, Hoshino M, Inoue S, Maki K,
Baba K, Chikazu D, Kamijo R.
8-Nitro-cGMP is a promoter of
osteoclast differentiation induced by
RANKL. Nitric Oxide. 72, 46-51 (2018).
査読有
DOI: 10.1016/j.niox.2017.11.006.
4. Akaike T, Ida T, Wei FY, Nishida M,
Kumagai Y, Alam MM, Ihara H, Sawa T,
Matsunaga T, Kasamatsu S, Nishimura A,
Morita M, Tomizawa K, Nishimura A,
Watanabe S, Inaba K, Shima H, Tanuma N,
Jung M, Fujii S, Watanabe Y, Ohmuraya
M, Nagy P, Feelisch M, Fukuto J,
Motohashi H. CysteinyI-tRNA synthetase
governs cysteine polysulfidation and
mitochondrial bioenergetics. Nature
Commun. 8, 1177 (2017). 査読有
DOI: 10.1038/s41467-017-01311-y.
5. Numakura T, Sugiura H, Akaike T, Ida T,
Fujii S, Koarai A, Yamada M, Onodera K,
Hashimoto Y, Tanaka R, Sato K,
Shishikura Y, Hirano T, Yanagisawa S,
Fujino N, Okazaki T, Tamada T,
Hoshikawa Y, Okada Y, Ichinose M.
Production of reactive persulfide
species in chronic obstructive
pulmonary disease. Thorax. 72,
1074-1083 (2017). 査読有
DOI: 10.1136/thoraxjnl-2016-209359.
6. Ihara H, Kasamatsu S, Kitamura A,
Nishimura A, Tsutsuki H, Ida T,

- Ishizaki K, Toyama T, Yoshida E, Abdul Hamid H, Jung M, Matsunaga T, Fujii S, Sawa T, Nishida M, Kumagai Y, Akaike T. Exposure to electrophiles impairs reactive persulfide-dependent redox signaling in neuronal cells. *Chem Res Toxicol.* 30, 1673-1684 (2017). 査読有
DOI: 10.1021/acs.chemrestox.7b00120.
7. Hoshino M, Kaneko K, Miyamoto Y, Yoshimura K, Suzuki D, Akaike T, Sawa T, Ida T, Fujii S, Ihara H, Tanaka J, Tsukuura R, Chikazu D, Mishima K, Baba K, Kamijo R. 8-Nitro-cGMP promotes bone growth through expansion of growth plate cartilage. *Free Radic Biol Med.* 110, 63-71 (2017). 査読有
DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.05.022.
8. 藤井重元, 赤池孝章. ニトロ化環状ヌクレオチドと活性イオウ分子によるレドックスシグナル制御と生理機能. *化学療法の領域.* 33, 2194-2195 (2017). 査読無
DOI:なし
9. Kunikata H, Ida T, Sato K, Aizawa N, Sawa T, Tawarayama H, Murayama N, Fujii S, Akaike T, Nakazawa T. Metabolomic profiling of reactive persulfides and polysulfides in the aqueous and vitreous humors. *Sci Rep.* 7, 41984 (2017). 査読有
DOI: 10.1038/srep41984.
10. Jung M, Kasamatsu S, Matsunaga T, Akashi S, Ono K, Nishimura A, Morita M, Abdul Hamid H, Fujii S, Kitamura H, Sawa T, Ida T, Motohashi H, Akaike T. Protein polysulfidation-dependent persulfide dioxygenase activity of ethylmalonic encephalopathy protein 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 480, 180-186 (2016). 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.10.022.
11. Yugami M, Odagiri H, Endo M, Tsutsuki H, Fujii S, Kadomatsu T, Masuda T, Miyata K, Terada K, Tanoue H, Ito H, Morinaga J, Horiguchi H, Sugizaki T, Akaike T, Gotoh T, Takai T, Sawa T, Mizuta H, Oike Y. Mice deficient in Angiopoietin-like protein 2 (Angptl2) gene show increased susceptibility to bacterial infection due to attenuated macrophage activity. *J Biol Chem.* 291, 18843-18852 (2016). 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M116.720870.
12. Fujii S, Sawa T, Nishida M, Ihara H, Ida T, Motohashi H, Akaike T. Redox signaling regulated by an electrophilic cyclic nucleotide and reactive cysteine persulfides. *Arch Biochem Biophys.* 595, 140-146 (2016). 査読有
DOI: 10.106/j.abb.2015.11.008.
13. 藤井重元, 赤池孝章. 酸化ストレス病態とバイオマーカー. *生体の科学.* 67, 418-419 (2016). 査読無
DOI:なし
14. 笠松真吾, 藤井重元, 赤池孝章. 活性イオウ分子種によるタンパク質チオール修飾: ポリスルフィド化タンパク質解析の最先端技法. *日本薬理学雑誌.* 147, 299-302 (2016). 査読無
DOI: 10.1254/fpj.147.299.
15. 井田智章, 松永哲郎, 藤井重元, 澤智裕, 赤池孝章. 活性イオウ含有分子の再発見とその生物活性. *日本薬理学雑誌.* 147, 278-284 (2016). 査読無
DOI: 10.1254/fpj.147.278.
16. Nishida M, Kumagai Y, Ihara H, Fujii S, Motohashi H, Akaike T. Redox signaling regulated by electrophiles and reactive sulfur species. *J Clin Biochem Nutr.* 58, 91-98 (2016). 査読有
DOI: 10.3164/jcfn.15-111.
17. Akashi S, Ahmed KA, Sawa T, Ono K, Tsutsuki H, Burgoyne JR, Ida T, Horio E, Pryszyzna O, Oike Y, Rahaman MM, Eaton P, Fujii S, Akaike T. Persistent activation of cGMP-dependent protein kinase by a nitrated cyclic nucleotide via site specific protein S-guanylation. *Biochemistry.* 55, 751-761 (2016). 査読有
DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00774.
18. 赤池孝章, 藤井重元. Nitric Oxide (NO). *生体の科学.* 66, 396-397 (2015). 査読無
DOI:なし
19. 赤池孝章, 藤井重元. 活性イオウ分子種による酸化ストレス制御. *臨床免疫・アレルギー科.* 63, 502-506 (2015). 査読無
DOI:なし
20. 笠松真吾, 井田智章, 藤井重元, 赤池孝章. 活性イオウ分子による酸化・ニトロ化ストレス制御. *Respiratory Medical Research.* 3, 70-75 (2015). 査読無
DOI:なし
21. 松永哲郎, 藤井重元, 赤池孝章. 感染性微生物: *H. cinaedi*. *動脈硬化予防.* 14, 66-71 (2015). 査読無
DOI:なし
- [学会発表](計 18 件)
1. 藤井重元, 他. 細菌の活性イオウ産生によるオートファジー制御と宿主内増殖への影響. 第 91 回日本細菌学会総会. 2018 年
2. 藤井重元, 他. ホルムアルデヒド代謝酵素アルコールデヒドロゲナーゼ 5 のタン

- パク質ポリスルフィド化による活性制御機構. 異分野融合を見据えた次世代レドックス生理科学シンポジウム. 2018年
3. 藤井重元、他. アルコールデヒドロゲナーゼ 5 によるホルムアルデヒド代謝機構とタンパク質ポリスルフィド化による制御. 第 17 回分子予防環境医学研究会. 2018 年
 4. Shigemoto Fujii, 他. Reactive persulfide-dependent redox signaling in neuronal cells and its impairment by exposure to electrophiles. 8th Joint Meeting of Society for Free Radical Research Australasia and Japan with International Symposium on Coenzyme Q10. 2017 年
 5. 藤井重元、他. 活性イオウ分子によるオートファジー制御:8-ニトロ-cGMP を介するメカニズム. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会. 2017 年
 6. 藤井重元、他. 8-ニトロ-cGMP と S-グアニル化を介する細菌感染防御機構と硫化水素による制御. 第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会. 2017 年
 7. 藤井重元、他. 8-ニトロ-cGMP によるオートファジー誘導を介した感染防御機構と硫化水素による制御. 第 17 回日本 NO 学会学術集会. 2017 年
 8. 藤井重元、他. マクロファージにおけるヘリコバクター・シネディの持続感染の解析. 第 90 回日本細菌学会総会. 2017 年
 9. 藤井重元、他. 生体内ポリサルファー代謝とレドックス制御機能. 第 89 回日本生化学会大会. 2016 年
 10. 藤井重元、他. ニトロ化環状ヌクレオチドによる細菌感染防御機構と硫化水素による制御. 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会. 2016 年
 11. 藤井重元、他. 8-ニトロ-cGMP とオートファジーによる細菌感染防御機構と硫化水素による制御. 第 27 回日本生体防御学会学術総会. 2016 年
 12. Shigemoto Fujii, 他. Nitrated nucleotide-mediated antibacterial host defense and its regulation by hydrogen sulfide produced by bacteria. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. 2016 年
 13. 藤井重元、他. ニトロ化環状ヌクレオチドによる感染防御機構と細菌由来硫化水素による制御. 日本農芸化学会 2016 年度大会. 2016 年
 14. 藤井重元、他. オートファジーによる細菌感染防御機構と細菌由来硫化水素による制御. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016 年
 15. 藤井重元、他. 有機水銀の神経毒性発現における 8-ニトロ-cGMP の役割と活性イ

オウ分子による制御. 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会. 2015 年

16. 藤井重元、他. 8-ニトロ-cGMP とタンパク質 S-グアニル化を介する細菌感染防御機構と硫化水素による制御. 第 21 回 MPO 研究会. 2015 年
17. 藤井重元、他. タンパク質ポリチオール化によるアルコールデヒドロゲナーゼ 5 の活性制御機構 第 15 回日本 NO 学会学術集会. 2015 年
18. 藤井重元、他. アルコールデヒドロゲナーゼ 5 の活性発現におけるタンパク質 S-ポリチオール化の役割 第 68 回日本酸化ストレス学会学術集会. 2015 年

〔図書〕(計 1 件)

1. 赤池孝章、藤井重元. 活性システインパーサルフィド. 別冊・医学のあゆみ「レドックス UPDATE ストレス制御の臨床医学・健康科学」(淀井淳司、平家俊男 監修 / 生田孝一、杉田昌彦、塚原孝一、豊國伸哉、前田裕弘 編) 医歯薬出版社 p.41-44 (2015). 総ページ数 341 ページ

〔その他〕

ホームページ等
東北大学大学院医学系研究科環境医学分野
ホームページ
<http://www.toxicosci.med.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 重元 (FUJII, Shigemoto)
東北大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 00325333