

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15208

研究課題名(和文) 翻訳に共役したポリサルファ化タンパク質生合成機構の解明

研究課題名(英文) Study of the mechanism of biosynthesis of polysulfurated proteins coupled with translation

研究代表者

赤池 孝章 (AKAIKE, Takaaki)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20231798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ポリサルファはシステインのチオール基に過剰にイオウ原子が付加した活性イオウ分子種であり、タンパク質中にも豊富に含まれている。本研究ではシステイニル-tRNA合成酵素(CARS)による翻訳に共役したタンパク質ポリサルファ化のメカニズムとその生理機能について解析を行った。大腸菌や哺乳類などの各種生物のCARSはシステインパーサルフィド合成活性を有し、翻訳に共役したタンパク質ポリサルファ化に関与することが示された。また、CARSによるタンパク質ポリサルファ化は、ミトコンドリア機能などの細胞機能制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Polysulfur is reactive persulfide species which have extra sulfur atoms in cysteine thiol and cellular proteins contain polysulfur abundantly (protein polysulfuration). In this study, we investigated the translation-coupled mechanism of protein polysulfuration mediated by cysteinyl-tRNA synthetase (CARS) and its biological functions. CARSs from various biological species including bacteria and mammals are found to have cysteine persulfide-producing activity and to be critically involved in protein polysulfuration. Protein polysulfuration is suggested to play important roles in the regulation of cellular function such as mitochondrial morphogenesis.

研究分野：生化学

キーワード：タンパク質ポリサルファ化 システインポリスルフィド システイン-tRNA合成酵素 活性イオウ分子種

### 1. 研究開始当初の背景

生体内で産生される活性酸素は、酸化ストレスをもたらす様々な疾患病態に関わる一方で、細胞機能変化をもたらすシグナルとして機能していることが分かってきた。我々は活性酸素シグナルの二次メッセンジャーとして8-ニトロ-cGMPを発見しその機能解析を行ってきた。その研究の過程で、システインパースルフィドをはじめとする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。活性イオウ分子種は、システインのチオール基(-SH基)に過剰にイオウ原子が付加した活性分子種(-(S)n-SH; ポリサルファ)であり、生体内には多様な活性イオウ分子種が様々なレベルで存在していることが分かってきた。さらに、様々なタンパク質中のシステイン残基にも豊富にポリサルフィドが存在すること(タンパク質ポリサルファ化)が示唆されたが、生体内のポリサルフィド生成機構、タンパク質ポリサルファ化の分子メカニズムとその生理学的意義等については明らかではなかった。そのような中で、我々はタンパク質翻訳に関連した酵素であるシステニル-tRNA合成酵素(CARS)がシステインパースルフィド合成活性を有し、翻訳に共役したタンパク質ポリサルファ化に関与することを予備的ながら見出した。

### 2. 研究の目的

本研究では、活性イオウ分子のユニークな化学特性に基づくポリサルファ化タンパク質の特異的かつ高感度な解析法を開発するとともに、同解析システムを用いてシステニル-tRNA合成酵素による翻訳に共役したタンパク質ポリサルフィド化の分子メカニズムとその生理機能を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

翻訳に共役した新規タンパク質ポリサルファ化メカニズムとその生理機能の解析を目指して以下の解析を行った。

(1) 活性イオウ分子の化学特性の解析とタンパク質ポリサルファ化の解析システムの開発: 8-ニトロ-cGMPをはじめとした各種親電子物質とポリサルファを試験管内にて反応させ、質量分析(LC-MS/MS)による各種活性イオウ分子種の精緻な定量解析法を用いて、その反応産物を詳細に分析することにより、ポリサルファと親電子物質との反応性を調べた。さらに、この解析で明らかにしたポリサルファと親電子物質の化学反応性をもとに、タンパク質ポリサルファ化の新規検出・定量法の開発を行った。

(2) 翻訳酵素システニル-tRNA合成酵素(CARS)によるシステインポリサルファ化の解析: システニル-tRNA合成酵素(大腸菌CysRSおよび真核細胞CARS1/2)の組換えタンパク質を調製し、LC-MS/MSにより各酵素

の反応生成物を解析することにより、システインパースルフィド合成活性を調べた。また、同活性の反応速度論、基質特異性などの解析を行うとともに、各酵素の各種アミノ酸変異体を用いて、パースルフィド生成の酵素反応メカニズムの解析を行った。さらに、CARS1/2のノックダウン・ノックアウトによりCARS発現が欠失または低下したヒトおよびマウスの培養細胞を作製し活性イオウ分子レベルを定量することにより、細胞の活性イオウ分子産生におけるCARSの寄与を調べた。

(3) 無細胞タンパク質合成系でのポリサルファ化タンパク質合成機構の解析: CARSによる翻訳に共役したタンパク質ポリサルファ化を明らかにするために、再構成型無細胞タンパク質合成系(PUREflexシステム)において、様々なタンパク質遺伝子からタンパク質を合成(翻訳)し、タンパク質ポリサルファ化を上記項目(1)で開発したポリサルファ化解析手法を用いて解析した。

(4) ポリサルファ化タンパク質の機能解析: タンパク質ポリサルファ化の生理機能として、ミトコンドリアの分裂・伸長の制御に着目し、ミトコンドリアに局在するCARS2をノックアウトしたヒト培養細胞(HEK293T細胞)におけるミトコンドリアタンパク質のポリサルファ化、ミトコンドリアの形態について解析し、野生型細胞とCARS2ノックアウト細胞との差異を調べた。

### 4. 研究成果

(1) ポリサルファと各種親電子物質との反応生成物のLC-MS/MSによる詳細な分析により、反応する親電子物質の親電子性に依存してイオウ原子数の異なる反応産物が生成されることが分かった。このような各種親電子物質とポリサルファとの反応性の違いをもとに、ヨードアセトアミド誘導体とLC-MS/MSを用いたポリサルファの精緻な定量解析法、およびポリエチレングリコール-マレイミド標識-ゲルシフトアッセイ法によるタンパク質ポリサルファ化の特異的で高感度な検出・定量法の開発に成功した。これらの解析法によりタンパク質ポリサルファ化の詳細な解析が可能となった(Biochem Biophys Res Commun 2016; Nat Commun 2017)。

(2) 大腸菌、ヒト、マウスのCARS組換えタンパク質の解析により、CARSは細菌から哺乳類まで生物種横断的にシステインパースルフィド合成活性を有することが示された(Nat Commun 2017)。CARSによるシステインパースルフィド合成は、システインを基質としピリドキサルリン酸(PLP)に依存した酵素反応であることが分かった。また、アミノ酸変異体CARSの解析から、パースルフィド合成活性には、CARS本来のシステニル-tRNA合成活性とは異なるアミノ酸残基が関与していることが明らかになった。さらに、CARS1/2のノックアウト・ノックダウンの実験により、哺乳類細胞においては細胞内ポリ

サルファ合成の大部分を CARS が担っていることが示された。

(3) 無細胞タンパク質合成系を用いた解析により、様々なタンパク質において翻訳時にシステイン残基がポリサルファ化されていることが明らかになった。さらに、このタンパク質合成系に含まれる野生型 CARS をパーサルフィド合成活性が低下したアミノ酸変異体 CARS に置換すると、合成されたタンパク質のポリサルファ化が著明に減弱したことから、タンパク質翻訳に共役したポリサルフィド化は CARS のパーサルフィド合成活性によることが示された。

(4) ミトコンドリアに局在する CARS2 を欠損したヒト HEK293T 細胞では、野生型細胞に比べ、ミトコンドリアの短小化が観察され、ミトコンドリアの分裂を制御するタンパク質 Drp1 のポリサルファ化の低下が見られた。CARS2 欠損細胞にパーサルフィド合成活性を有する CARS2 を導入するとこれらの変化が見られなくなることから、タンパク質ポリサルファ化はミトコンドリアの機能制御に関わることが示された。

以上の結果より、CARS は新規パーサルフィド合成酵素として細胞内におけるポリサルフィド産生および翻訳に共役したタンパク質ポリサルファ化に重要な役割を果たしていることが示された。また、CARS によるタンパク質ポリサルファ化は、ミトコンドリア機能をはじめとした様々な細胞機能の維持・制御に深く関わっていることが示唆された。本研究において明らかにした CARS による翻訳に共役したタンパク質ポリサルファ化は、これまで知られていなかった全く新しいポリサルファ化のメカニズムであり、本研究の成果は未だ不明な点が多い活性イオウ分子種の生理機能解明に大きく貢献するものと考えられる。

なお、本研究成果について「哺乳類における硫黄呼吸の発見」としてプレスリリースを行い、国内外のメディアで大きく取り上げられた。

## 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 43 件)

1. Fukuto JM, Ignarro LJ, Nagy P, Wink DA, Kevil CG, Feelisch M, Cortese-Krott MM, Bianco CL, Kumagai Y, Hobbs AJ, Lin J, Ida T, Akaike T. Biological hydropersulfides and related polysulfides: A new concept and perspective in redox biology. *FEBS Lett.* in press (2018). 査読有  
DOI:10.1002/1873-3468.13090.
2. 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.
3. Heppner DE, Hristova M, Ida T, Mijuskovic A, Dustin CM, Bogdandi V, Fukuto JM, Dick TP, Nagy P, Li J, Akaike T, van der Vliet A. Cysteine perthiosulfenic acid (Cys-SSOH): A novel intermediate in thiol-based redox signaling? *Redox Biol.* 14, 379-385 (2018). 査読有  
DOI: 10.1016/j.redox.2017.10.006.
4. Kishimoto Y, Kunieda K, Kitamura A, Kakahana Y, Akaike T, Ihara H. 8-Nitro-cGMP attenuates the interaction between SNARE complex and complexin through S-guanylation of SNAP-25. *ACS Chem Neurosci.* 9, 217-223 (2018). 査読有  
DOI: 10.1021/acscchemneuro.7b00363.
5. Masuda K, Tsutsuki H, Kasamatsu S, Ida T, Takata T, Sugiura K, Nishida M, Watanabe Y, Sawa T, Akaike T, Ihara H. Involvement of nitric oxide/reactive oxygen species signaling via 8-nitro-cGMP formation in 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells and rat cerebellar granule neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 495, 2165-2170 (2018). 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.12.088.
6. 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. Cysteinyln-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nature Commun.* 8, 1177 (2017). 査読有  
DOI: 10.1038/s41467-017-01311-y.
7. 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.
8. Álvarez L, Bianco CL, Toscano JP, Lin J, Akaike T, Fukuto J. The chemical biology of hydropersulfides and related species: Possible roles in cellular protection and redox

- signaling. *Antioxid Redox Signal.* 27, 622-633 (2017). 査読有  
DOI: 10.1089/ars.2017.7081.
9. 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.
  10. Nishida M, Nishimura A, Matsunaga T, Motohashi H, Kasamatsu S, Akaike T. Redox regulation of electrophilic signaling by reactive persulfides in cardiac cells. *Free Radic Biol Med.* 109, 132-140 (2017). 査読有  
DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.024.
  11. Ono K, Jung M, Zhang T, Tsutsuki H, Sezaki H, Ihara H, Wei FY, Tomizawa K, Akaike T, Sawa T. Synthesis of L-cysteine derivatives containing stable sulfur isotopes and application of this synthesis to reactive sulfur metabolome. *Free Radic Biol Med.* 106, 69-79 (2017). 査読有  
DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.023.
  12. 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.
  13. Takahashi N, Wei FY, Watanabe S, Hirayama M, Ohuchi Y, Fujimura A, Kaituka T, Ishii I, Sawa T, Nakayama H, Akaike T, Tomizawa K. Reactive sulfur species regulate tRNA methylthiolation and contribute to insulin secretion. *Nucleic Acids Res.* 45, 435-445 (2017). 査読有  
DOI: 10.1093/nar/gkw745.
  14. Kasamatsu S, Nishimura A, Morita M, Matsunaga T, Abdul Hamid H, Akaike T. Redox signaling regulated by cysteine persulfide and protein polysulfidation. *Molecules.* 21, E1721 (2016). 査読有  
DOI: 10.3390/molecules21121721
  15. 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.
  16. Yoshitake J, Soeda Y, Ida T, Sumioka A, Yoshikawa M, Matsushita K, Akaike T, Takashima A. Modification of tau by 8-nitro-cGMP: effects of nitric oxide-linked chemical modification on tau aggregation. *J Biol Chem.* 291, 22714-22720 (2016). 査読有  
DOI: 10.1074/jbc.M116.734350.
  17. Tsutsuki H, Jung M, Zhang T, Ono K, Ida T, Kunieda K, Ihara H, Akaike T, Sawa T. Endogenous occurrence of protein S-guanylation in *Echerichia coli*: Target identification and genetic regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 478, 7-11 (2016). 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.07110.
  18. 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.
  19. Millikin R, Bianco CL, White C, Saund SS, Henriquez S, Sosa V, Akaike T, Kumagai Y, Soeda S, Toscano JP, Lin J, Fukuto JM. The chemical biology of protein hydropersulfides: Studies of a possible protective function of biological hydropersulfide generation. *Free Radic Biol Med.* 97, 136-147 (2016). 査読有  
DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.013.
  20. 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.
- [学会発表](計28件)
1. Akaike T, 他. Sulfur respiration in mammals and its implication for tumor biology. The Cold Spring Harbor Asia Conference on Cancer & Metabolism. 2018年
  2. Akaike T, 他. Cysteine persulfide

- formation via cysteinyl-tRNA synthetase and its involvement in mitochondrial bioenergetics. 8th Joint Meeting of Society for Free Radical Research Australasia and Japan with International Symposium on Coenzyme Q10. 2017 年
3. 赤池孝章. Cysteinyl-tRNA synthetase (CARS) は活性パースルフィド産生とミトコンドリア機能をコントロールしている. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会. 2017 年
  4. Akaike T. Cysteinyl-tRNA synthetase governs endogenous hydropersulfide production and mediates mitochondrial functions and bioenergetics. AARS2017: IUBMB Focused Meeting on Aminoacyl-tRNA Synthetase. 2017 年
  5. Akaike T. Discovery of a novel persulfide synthase that mediates mitochondrial sulfur respiration. 2nd Karolinska-Tohoku Joint Symposium on Medical Sciences. 2017 年
  6. Akaike T. Cysteinyl-tRNA synthetase (CARS) controls endogenous hydropersulfide production and mediates mitochondrial functions and bioenergetics. S-Bio 2017: Plant and Human Sulfur Biology Conference 2017. 2017 年
  7. Akaike T. Cysteine polysulfidation governed by cysteinyl-tRNA synthetase (CARSs). Se2017 - 200 Years of Selenium Research (The 11th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine and The 5th International Conference on Selenium in the Environment and Human Health). 2017 年
  8. 赤池孝章、他. イオウ呼吸とイオウストレス：新しいエネルギー代謝とレドックス病態の提案. 第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会. 2017 年
  9. 赤池孝章、他. イオウ呼吸とイオウストレス：ほ乳類における新しいエネルギー代謝とレドックス病態. 2017 年度生理学研究所研究会「オルガネラダイナミクスの新規制御機構とその病態生理」. 2017 年
  10. 赤池孝章. システインパースルフィド産生酵素 (Cysteine Persulfide Synthase, CPERS) の発見. 第 17 回日本 NO 学会学術集会. 2017 年
  11. 赤池孝章、他. 細菌のイオウ呼吸はすべての生物種に保存されている：ほ乳類における新しいエネルギー代謝経路・イオウ呼吸の発見. 第 90 回日本細菌学会総会. 2017 年
  12. Akaike T. Persulfide regulation of mitochondrial number and function. The 2017 NO Gordon Research Conference. 2017 年
  13. 赤池孝章. 活性イオウ生成酵素の発見：ミトコンドリア形態形成とエネルギー代謝の新しいメカニズム. 第 14 回がんとハイポキシア研究会. 2016 年
  14. Akaike T. Cysteinyl-tRNA synthetase is a major source of reactive persulfide and controls mitochondrial biology. 第 89 回日本生化学会大会. 2016 年
  15. 赤池孝章、他. 活性イオウ分子種によるミトコンドリア機能制御. 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会. 2016 年
  16. 赤池孝章. 活性システインパースルフィドによるレドックス制御の分子基盤. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会. 2016 年
  17. Akaike T. Cysteinyl-tRNA synthetase controls protein polysulfidation and mitochondrial functions. The 2016 Thiol-Based Redox Regulation & Signaling Gordon Research Conference. 2016 年
  18. 赤池孝章. 生体防御応答のレドックス制御機構. 第 27 回日本生体防御学会学術総会. 2016 年
  19. Akaike T. Cysteine transfer RNA synthetases moonlighting as novel cysteine persulfide synthases (CPERSs). The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. 2016 年
  20. Akaike T. Host defense and oxidative stress signaling in microbial infections. The 13th Korea-Japan International Symposium on Microbiology. 2016 年
- 〔図書〕(計 1 件)
1. Sawa T, Kumagai Y, Akaike T. Regulation of redox signaling by a nitrated nucleotide and reactive cysteine persulfides. In: Ignarro LJ, Freeman BA, eds. Nitric Oxide: Biology and Pathobiology. 3rd ed. London, UK: Academic Press; p.231-235 (2017). 総ページ数 431 ページ
- 〔その他〕
- プレスリリース
1. 『湯けむりの国に、太古の記憶が息づいている。世界が驚いた「硫黄呼吸」の発見。【東北大学・赤池孝章教授に聞く】』 Tohoku Web Magazine みちの 2018.1.27.
  2. 『哺乳類が硫黄でエネルギー代謝 「硫黄呼吸」を世界で初めて発見』 科学技術振興機構 (JST) ホームページ サイエンスポータル 2017.11.13.
  3. 『世界初：哺乳類における「硫黄呼吸」

を発見』 東北大学ホームページ プレス  
リリース 2017.10.30.

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

赤池 孝章 (AKAIKE, Takaaki)  
東北大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：20231798

### (2) 研究分担者

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

井田 智章 (IDA, Tomoaki)  
東北大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：70570406