

令和元年5月29日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17583

研究課題名(和文) タンパク質ポリスルフィド化を介したレドックスシグナル制御機構の解明

研究課題名(英文) Redox signal regulation via protein polysulfidation

研究代表者

笠松 真吾 (KASAMATSU, SHINGO)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：80738807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アルコールデヒドロゲナーゼ5(ADH5)を用いて、タンパク質ポリスルフィド化を介したレドックスシグナル制御機構の解明を目指した。大腸菌および哺乳類細胞で発現したヒトADH5タンパク質は高度にポリスルフィド化しており、ポリスルフィド化の維持に活性中心のCys174が重要であることが分かった。また、ADH5のタンパク質ポリスルフィド化レベルの変動と酵素活性に相関が見られた。これらの結果から、ADH5の活性中心のタンパク質ポリスルフィドの生体内レドックスシグナル制御系への関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で着目したアルコールデヒドロゲナーゼ5(ADH5)は、生体内で一酸化窒素(NO)を代謝する主要酵素の一つである。本研究により世界で初めて、ADH5酵素活性がタンパク質ポリスルフィドによって制御されていることを明らかにした。ADH5タンパク質ポリスルフィドによる生体内NO代謝機構をより詳細に解析することにより、感染・炎症などのNO・酸化ストレスが関与する疾患・病態の治療・予防戦略の開発への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated biological roles of protein polysulfidation of alcohol dehydrogenase 5 (ADH5) in a regulatory mechanism for redox signaling. It was revealed that human ADH5 protein was highly polysulfidated and the Cys174 residue, is known to be coordinated to the active site, played the important role to maintain its protein polysulfidation. Furthermore, we found that the protein polysulfidation level of ADH5 correlated with the enzymatic activity. These results suggest that polysulfidation at the active site of ADH5 protein may involve in the regulation of nitric oxide- and formaldehyde-related redox signaling.

研究分野：生化学、細胞生物学、分子生物学

キーワード：タンパク質ポリスルフィド化 システインパーサルフィド アルコールデヒドロゲナーゼ レドックスシグナル

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の機能は、タンパク質中のアミノ酸側鎖の修飾によって精密に制御されている。タンパク質分子内の反応性の高いシステインチオール基が細胞内外に存在する様々な親電子性シグナル分子によって化学修飾されることで、そのタンパク質の機能（例えば酵素活性）や構造を変化させ、細胞機能制御に関わることが報告されている。応募者はこれまで、一酸化窒素（NO）や活性酸素種の下流で産生されるヌクレオチド由来の親電子物質である 8-ニトロ-cGMP に注目し、そのシグナル伝達機構について研究を行ってきた（Nitric Oxide 2011; Biochem J 2012&2014; ACN Chem Neurosci 2015）。8-ニトロ-cGMP はタンパク質のシステイン残基に cGMP 構造を付加するユニークな修飾（S-グアニル化）を介して、多様なレドックスシグナル機構に関与し、細胞の重要なシグナル分子として機能していることが明らかになってきている。

また、応募者らの研究室では、8-ニトロ-cGMP の代謝機構を探索していく過程で、様々な活性イオウ分子種[R-S-(S)_n-H; 例えば CysSSH など]が生体内で内因的に産生され、親電子物質のレドックスシグナル伝達を定常的に負に制御することを明らかにしてきた（Nature Chem Biol 2012; PNAS 2014）。さらに最近、システインル tRNA 合成酵素（CARS）が CysSSH を生成し、CysSSH がポリペプチド鎖へと取込まれることで、翻訳時レベルでタンパク質ポリスルフィド化が起こること（翻訳共役型ポリスルフィド化）を見出していた。活性イオウ分子種は高い求核性、抗酸化活性をもつことから、活性イオウ分子種によるユニークなタンパク質のチオール基修飾（タンパク質ポリスルフィド化）が、新しいレドックスシグナル制御系として細胞機能制御に関与することが予想される。

2. 研究の目的

応募者らはこれまでに、システインパースルフィド（CysSSH）などの活性イオウ分子種の生体内産生を報告してきた。また、さまざまなタンパク質中のシステイン残基においても、翻訳時からイオウ原子が過剰に付加（ポリスルフィド化）していることがごく最近分かってきた。活性イオウ分子種は高いレドックス活性（求核性）を持つことから、タンパク質ポリスルフィドがタンパク質機能に何らかの形で寄与している可能性（例えば酵素触媒機能）が予想される。そこで、本研究課題では、応募者らの予備的検討によりポリスルフィド化タンパク質として同定されているアルコールデヒドロゲナーゼ 5（ADH5）をモデルタンパク質として使用し、タンパク質ポリスルフィド化を介したレドックスシグナル制御機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) ADH5 の酵素基質特性の検討

ADH5 は、GSH を用いて NO・ホルムアルデヒド代謝を行うことが報告されている。GSSH などの活性イオウ分子は分子内の過剰なイオウ原子により単純なチオール化合物よりも強い反応性（求核性）を持つため、生体内において活性イオウ分子は NO やホルムアルデヒドをすばやく捕捉しアダクトを形成することが予想される。実際 S-ニトロソグルタチオンパースルフィド（GSS-NO）の生成は報告されているが、活性イオウ分子とアルデヒドとの反応生成物に関する報告は全く無い。そこで、本項では GSSH をはじめとした GSH ポリスルフィドとホルムアルデヒドなどの各種アルデヒドの反応生成物について解析を行い、それらの反応生成物が ADH5 のホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ（FDH）活性の基質となるのかを速度論的に検討した。ADH5 の酵素活性は既報の文献に従い、分光光度計を用いて NADH の増加/減少から算定した。

(2) 各種システイン変異体の酵素活性とタンパク質ポリスルフィド化の解析

ADH5 は、Cys45 と Cys174 残基に亜鉛が配位し活性部位を形成することが報告されている。そこで、本項目では、システイン残基変異体を調製し、その酵素活性とタンパク質ポリスルフィドレベルを解析した。タンパク質ポリスルフィド化の解析は、応募者らがこれまでに開発したゲルシフトアッセイ法（PMSA 法）および質量分析装置を用いた方法にて行った。

(3) 酵素反応によるタンパク質ポリスルフィド化への影響の解析

(2) の検討において、変異体の酵素活性とポリスルフィドレベルで野生型に比べ変化が認められたので、野生型タンパク質と酵素基質として既報の S-ニトロソグルタチオン（GSNO）やヒドロキシメチルグルタチオン（HMSG）または (1) の GSH ポリスルフィド由来の NO/ホルムアルデヒド代謝物を用いて、酵素反応前後でのポリスルフィド化レベルを解析した。併せて、GSNO レダクターゼ（GSNOR）反応と FDH 反応を交互に連続して行い、そのポリスルフィド化レベルの動態の観察および、同処理を行った場合の酵素活性変化についても併せて解析を行うことで、ADH5 の酵素活性とタンパク質レベルの連関について検討した。

(4) 細胞内 ADH5 酵素活性とタンパク質ポリスルフィドレベルの解析

本項目では、応募者らが既に樹立している ADH5KO マウスより繊維芽細胞（ADH5KO 細胞）を用いて解析を行った。具体的には、(2) の検討で酵素活性やポリスルフィドレベルに変化が認められた変異体を上記の ADH5KO 細胞内で発現させ、細胞内における ADH5 タンパク質が

リスルフィド化レベルを解析するとともに、細胞に GSNO やアルデヒドを曝露し、その培養上清中での減少量を測定することで細胞内酵素活性を算定した。

4. 研究成果

(1) ADH5 の酵素基質特性の検討

FDH 酵素反応において、既知の基質である HMSG の他に、グルタチオンポリスルフィドとホルムアルデヒドの反応生成物であるヒドロキシメチルグルタチオンポリスルフィド (HM-(S)_n-SG) も同様に基質となることが分かった。

(2) 各種システイン変異体の酵素活性とタンパク質ポリスルフィド化の解析

活性中心を形成する Cys45 および Cys174 残基のセリン変異体 (C45S および C174S) を作製し、その酵素活性を測定した。その結果、C45S 変異体では、野生体に比べ、GSNOR 活性および FDH 活性は有意に低下していた。一方で、C174S 変異体は FDH 活性を示すものの、GSNOR 活性が完全に欠失していることが分かった。また、ポリスルフィド化タンパク質検出ゲルシフトアッセイ (PMSA 法) を行った結果、野生体は非常に高いレベルでポリスルフィド化されている一方で、C174S 変異体ではポリスルフィド化レベルが著しく減少していることが明らかになった。この結果は、質量分析装置を用いた定量的な解析においても同様に確認された。

(3) 酵素反応によるタンパク質ポリスルフィド化への影響の解析

これまでに ADH5 の活性中心に位置する Cys174 が酵素活性およびタンパク質ポリスルフィド化の維持に重要であることが示唆された。そこで、野生体を用いて、酵素反応前後におけるタンパク質ポリスルフィド化レベルを解析した。その結果、GSNOR 反応後に、タンパク質ポリスルフィド化レベルは減少し、この減少は FDH 反応によって回復することが分かった。また、同様の処理を行った ADH5 タンパク質について、GSNOR 酵素活性を測定した結果、ポリスルフィド化の増減と相関し、GSNOR 活性が変化していることが明らかになった。

(4) 細胞内 ADH5 酵素活性とタンパク質ポリスルフィドレベルの解析

ADH5 欠損マウスより調製したマウス胚性線維芽細胞 (MEF 細胞) に、野生体または C174S 変異体を発現し、その細胞内 ADH5 酵素活性を測定した。その結果、上記 (2) の組換えタンパク質を用いた結果と同様に、C174S 変異体発現細胞では NO 代謝活性が欠失しており、NO ストレスに対して脆弱であることが分かった。細胞内 ADH5 タンパク質ポリスルフィドレベルを解析した結果、C174S 変異体の著しいポリスルフィド化レベルの減少が認められた。また、CRISPR/Cas9 システムを用いて C174S 変異体発現マウスを作製し、このマウス由来の MEF 細胞においても同様の結果を確認している。

これらのことから、生体内 NO シグナル制御系とアルデヒド代謝機構は、ADH5 の活性中心のタンパク質ポリスルフィドを介して連関していることが示唆された (論文作成中)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1). Kishimoto Y., **Kasamatsu S.**, Yanai S., Endo S., Akaike T., Ihara H. 8-Nitro-cGMP attenuates context-dependent fear memory in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 査読あり 2019, 511, 141-147 DOI:10.1016/j.bbrc.2019.01.138
- (2). Kakinohana M., Marutani E., Tokuda K., Kida K., Kosugi S., **Kasamatsu S.**, Magliocca A., Ikeda K., Kai S., Sakaguchi M., Hirai S., Xian M., Kaneki M., Ichinose F. Breathing hydrogen sulfide prevents delayed paraplegia in mice. *Freeradical Biology & Medicine* 査読あり 2019, 131, 243-250 DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.003
- (3). 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 査読あり 2018, 495, 2165-2170 DOI:10.1016/j.bbrc.2017.12.088
- (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 JM., Motohashi H. Cysteinyln-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nature Communications* 査読あり 2017, 8, 1177 DOI:10.1038/s41467-017-01311-y
- (5). 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. *Chemical Research in Toxicology* 査読あり 2017, 30, 1673-1684

(6). Nishida M., Nishimura A., Matsunaga T., Motohashi H., **Kasamatsu S.**, Akaike T. Redox regulation of electrophilic signaling by reactive persulfides in cardiac cells. *Freeradical Biology & Medicine* 査読あり 2017, 109, 132-140 DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.024

〔学会発表〕(計 14 件)

- ① 居原秀, 北村篤志, **笠松真吾**, 井田智章, 西田基宏, 澤智裕, 熊谷嘉人, 赤池孝章 メチル水銀による活性イオウ分子種依存的レドックスシグナルの破綻 第 45 回日本毒性学会学術年会, 2018 年
- ② 藤井重元, **笠松真吾**, MORSHEDUL Alam Md, 井田智章, 守田匡伸, 居原秀, 西村明, 松永哲郎, 本橋ほづみ, 赤池孝章 ニトロソグルタチオン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 第 71 回日本酸化ストレス学会学術集会, 2018 年
- ③ 藤井重元, **笠松真吾**, Md. Morshedul Alam, 井田智章, 守田匡伸, 居原秀, 西村明, 松永哲郎, 本橋ほづみ, 赤池孝章 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 S. Fujii, H. Ihara, **S. Kasamatsu**, A. Nishimura, T. Ida, M. Nishida, Y. Kumagai, T. Akaike 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
- ⑤ 松永哲郎, 西村明, **笠松真吾**, Md. Morshedul Alam, 井田智章, 守田匡伸, 居原秀, 藤井重元, 下田翔, 西田基宏, 本橋ほづみ, 赤池孝章 ニトロソグルタチオン還元酵素 (GSNOR) 選択的欠損マウスの開発 2017 年度生命科学系学会合同年次大会
- ⑥ 守田匡伸, 松永哲郎, 井田智章, 西村明, **笠松真吾**, 藤井重元, 赤池孝章 硫化水素代謝酵素 sulfide quinone reductase の生体における機能解析 第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会, 2017 年
- ⑦ Jung Minkyung, 西村明, **笠松真吾**, Md. Morshedul Alam, 井田智章, 松永哲郎, 藤井重元, 居原秀, 本橋ほづみ, 赤池孝章 アルコールデヒドロゲナーゼ 5 タンパク質ポリスルフィド化の酵素活性制御機能 第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会, 2017 年
- ⑧ 西村明, 那須野亮, 松永哲郎, 井田智章, **笠松真吾**, 守田匡伸, 藤井重元, 高木博史, 赤池孝章 酵母におけるシステインパースルフィド合成経路とその生理的役割の解明 第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会, 2017 年
- ⑨ 西村明, 井田智章, 赤司壮一郎, 守田匡伸, 松永哲郎, **笠松真吾**, 藤井重元, 赤池孝章 種横断的システインパースルフィド産生酵素: Cysteinyl-tRNA synthetase 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」
- ⑩ 赤司壮一郎, **笠松真吾**, ジョン ミンギョン, 松永哲郎, 井田智章, 藤井重元, 澤智裕, 熊谷嘉人, 本橋ほづみ, 赤池孝章 8-ニトロ-cGMP とタンパク質 poly-S-グアニル化を介した親電子シグナル制御 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」
- ⑪ 守田匡伸, 松永哲郎, 井田智章, 西村明, **笠松真吾**, 藤井重元, 赤池孝章 Sulfide quinone reductase (SQR) 欠損マウスの作製とイオウ代謝解析 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」
- ⑫ 井田智章, **笠松真吾**, Md. Morshedul Alam, 守田匡伸, 居原秀, 西村明, 松永哲郎, 藤井重元, 本橋ほづみ, 赤池孝章 アルコールデヒドロゲナーゼ 5 の酵素活性制御におけるタンパク質ポリスルフィド化機能 第 17 回日本 NO 学会学術集会, 2017 年
- ⑬ 守田匡伸, 南嶋洋司, 井田智章, 松永哲郎, **笠松真吾**, 西村明, 藤井重元, 市瀬史, 赤池孝章 硫化水素代謝酵素 Sqr1 の生体における機能解析 第 17 回日本 NO 学会学術集会, 2017 年
- ⑭ 西村明, 那須野亮, 松永哲郎, 井田智章, **笠松真吾**, 守田匡伸, 藤井重元, 高木博史, 赤池孝章 酵母におけるシステインパースルフィド合成経路と生理的役割の解明 第 17 回日本 NO 学会学術集会, 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔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教室ホームページ

<http://www.toxicosci.med.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究分担者 該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：守田 匡伸

ローマ字氏名：Masanobu Morita

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。