

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：32624
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18K11083
研究課題名(和文) 栄養飢餓時の活性イオウ分子産生酵素CSE発現誘導による細胞老化制御経路の解析

研究課題名(英文) Regulation of cellular senescence via starvation-induced reactive sulfur species-signal

研究代表者
渡辺 泰男 (Watanabe, Yasuo)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：10273228
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：栄養飢餓による寿命延長には、硫化水素代謝亢進が関与するとされる。この研究では、この現象を細胞レベルで再現した系を用いて、脂肪やグリコーゲン分解に関わる分子や細菌由来の毒素の刺激によって栄養飢餓を模倣できることを見出した。また、それらの刺激によって、細胞分裂促進に関与する酵素の1つが選択的に働いていることを明らかにした。つまり、食事制限だけに頼らずに健康長寿を目指せるきっかけになるかもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「人生100年時代」を謳う我が国において、健康寿命の延長は極めて重要な課題である。本研究では、カロリー制限による個体長寿を細胞レベルで模倣した。そして、カロリー制限は、イオウ代謝効率を上げて細胞の増殖を遅く(省エネ)していることや、運動や炎症によって、イオウ代謝効率上がることを示唆した。このことは、正常細胞の健康にとどまらず、一部の腫瘍細胞の増殖を制御できる可能性も含んでいる。

研究成果の概要(英文)：Rate of hydrogen sulfide (H₂S) metabolism has recently emerged as the most important factor for calorie restriction-induced longevity in vivo. Here we found increased cystathionine γ -lyase (CSE)-induced cysteine polysulfides, a source of H₂S, in a cell upon serum withdrawal in vitro. And cyclic AMP and lipopolysaccharid mimic the increased CSE expression of serum withdrawal. Thus, they might lead to target signaling that mimic the consequences of calorie restriction without the fasting regimens.

研究分野：薬理学

キーワード：血清飢餓 活性イオウ シスタチオンin γ -リアーゼ(CSE) MAPキナーゼ 細胞遊走能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 含硫アミノ酸代謝酵素のシスタチオニン-リアーゼ (CSE) は、シスタチオニン-合成酵素 (CBS) と共に生体内でシステイン、活性イオウ分子やその還元代謝物 H_2S の産生に関わる。

(2) アミノ酸制限がもたらす mTOR の不活性化による CSE 発現は、ミトコンドリアで H_2S を分解する呼吸鎖タンパク質 sulfide quinone oxidoreductase (SQR) を介して、長寿に関わる (Cell 2015, 160, 132-144)。

(3) 私共は、活性イオウ分子は、全身で抗酸化力を発揮することを報告した (PNAS 2014, 111, 7606-7611)。また、ミトコンドリアでは、CSE によって産生されたシステインを基質として、タンパク質翻訳時にシステニル tRNA 合成酵素が活性イオウ分子を産生し、SQR 機能を介してミトコンドリア呼吸に関わることを見いだした (Nat. Commun. 2017, 8 1177)。つまり、CSE 発現誘導-呼吸鎖 SQR に細胞長寿の鍵がある。

2. 研究の目的

栄養飢餓による細胞ならびに個体長寿に関連する分子として注目を集めている含硫アミノ酸代謝酵素のシスタチオニン-リアーゼ (CSE) の発現誘導とその活性に焦点を当て、細胞増殖経路と細胞長寿経路の相互作用の時間的変化を比較する。この研究を通じて CSE 誘導発現による細胞長寿の仕組みを理解して、細胞増殖を抑制し、かつ細胞長寿を獲得する CSE の発現経路の解明を目指したい。

3. 研究の方法

(1) 血清除去依存的な CSE 発現細胞の検索ならびにタイムプロファイルの検討：CSE 活性は、活性イオウ検出蛍光指示薬 (Sulfane Sulfur Probe4:SSP4) を用いて蛍光顕微鏡観察で行なった。

(2) 血清除去依存的な CSE 発現誘導による細胞増殖能の検討：細胞の形態を顕微鏡下で観察した。

(3) CSE 発現を誘導する血清除去による細胞内シグナルの解：細胞内 Ras/Raf/MEK/ERK 経路をウエスタンブロット法による MAP キナーゼ群の活性化で検討した。

(4) 細胞長寿誘導薬スクリーニング系の確立：既存のシグナル活性化薬/阻害薬による CSE 発現誘導の試み：-1) 細胞は HEK293 細胞に加え、-2) マウスマクロファージ Raw 264.7 細胞を使用した。

4. 研究成果

(1) HEK293 細胞において、血清除去により CSE 発現誘導とともに活性イオウ検出に成功した。また、siRNA による CSE 発現抑制により、活性イオウは検出されなかった。さらに、血清除去依存的な CSE 発現誘導は血清再添加によって停止したことより、CSE 発現誘導は可逆的な機構によって制御されていることが確認された (図 1)。

(2) HEK293 細胞での血清除去 24 時間後に細胞形態は、細胞静止期に見られる丸く、平坦な形状が見られたが、血清再添加後 24 時間で増殖様細胞に戻った。一方、siRNA による CSE 発現抑制により、血清除去による細胞形態変化は見られなかった (図 1)。

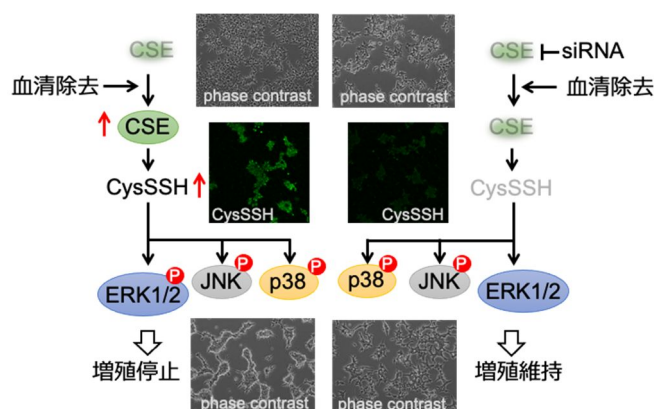


図 1 HEK293 細胞における血清除去による CSE 発現の意義

図 1 HEK293 細胞における血清除去による CSE 発現抑制により、血清除去による細胞形態変化は見られなかった (図 1)。

(3) 血清除去により3種のMAPキナーゼ(ERK1/2、JNK、p38)は活性化されたが、siRNAによるCSE発現抑制により抑制されたMAPキナーゼはERK1/2のみであった。さらに、ERK1/2の上流の酵素であるMEKの阻害剤(U0126)の前処置ではCSE発現誘導は不変であった。つまり、ヒト培養細胞において、血清除去(栄養飢餓) CSE発現誘導 ERK1/2活性化の信号系が作動しており、JNK、p38信号系の活性化はCSE発現誘導と同時に起こっているものの、何らかの別の機構によるものと思われた(図1)。

(4) HEK293細胞において血清飢餓によるCSE発現誘導は、抗酸化作用を有するN-アセチルシステイン(NAC)やアルブミンの処置により影響を受けなかったため、血清飢餓によって産生する活性酸素の関与は否定された。

-1) HEK293細胞において、脂肪やグリコーゲン分解に関わるcAMP増加薬であるフォルスコリンの処置によって血清含有時にCSEの発現誘導が認められた。また、cAMP依存性タンパク質リン酸化酵素(PKA)の阻害剤の前処置により、このCSE発現誘導は阻害された。さらに、恒常活性型PKAの遺伝子導入によってもCSE発現誘導が観察され、細胞内cAMP PKA CREBを介したCSE発現誘導が示唆された。

-2) Raw 264.7細胞において、自然免疫に関わるグラム陰性菌のリポ多糖(LPS)刺激によって誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)とともにCSEの発現誘導が認められた(図2、Antioxidants & redox signaling 33, 1308-1319, 2020)。同時に、iNOSとCSE信号系の相互作用を見出し、各情報系の相互作用(情報ネットワーク)を明らかにする必要がある。

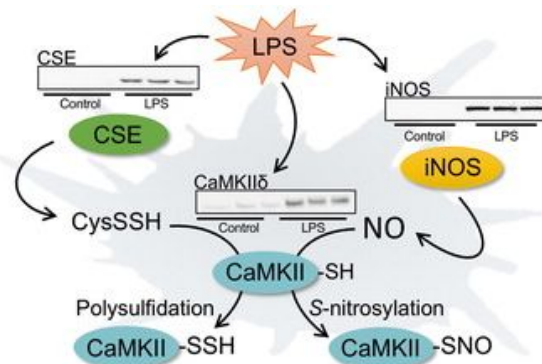


図2 Raw 264.7細胞におけるLPS刺激によるCSE、iNOSの誘導

(5) このように、増殖可能細胞では、血清除去による一過性細胞増殖の休止は、少なくとも1部は、CSE発現誘導とその活性に依存したERK1/2の選択的作動によることが示唆された。また、血清除去によらないCSE発現誘導にはcAMP信号系とLPSを介した自然免疫系の活性化が有用であることがわかった。個体長寿に関わるとされるCSEの発現誘導とその下流シグナルの解析は、正常細胞の健康にとどまらず、一部の腫瘍細胞の増殖を制御できる可能性も含んでいる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takata Tsuyoshi, Araki Shoma, Tsuchiya Yukihiro, Watanabe Yasuo	4. 巻 21
2. 論文標題 Oxidative Stress Orchestrates MAPK and Nitric-Oxide Synthase Signal	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8750 ~ 8750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21228750	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Araki Shoma, Osuka Koji, Takata Tsuyoshi, Tsuchiya Yukihiro, Watanabe Yasuo	4. 巻 21
2. 論文標題 Coordination between Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and Neuronal Nitric Oxide Synthase in Neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7997 ~ 7997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21217997	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takata Tsuyoshi, Araki Shoma, Tsuchiya Yukihiro, Watanabe Yasuo	4. 巻 33
2. 論文標題 Persulfide Signaling in Stress-Initiated Calmodulin Kinase Response	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidants & Redox Signaling	6. 最初と最後の頁 1308 ~ 1319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ars.2020.8138	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takata Tsuyoshi, Tsukuda Ayaka, Tsuchiya Yukihiro, Akaike Takaaki, Watanabe Yasuo	4. 巻 86
2. 論文標題 The active-site cysteine residue of Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase I is protected from irreversible modification via generation of polysulfidation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nitric Oxide	6. 最初と最後の頁 68 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.niox.2019.02.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Araki Shoma, Takata Tsuyoshi, Tsuchiya Yukihiro, Watanabe Yasuo	4. 巻 508
2. 論文標題 Reactive sulfur species impair Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II via polysulfidation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 550 ~ 555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.11.134	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takata Tsuyoshi, Kimura Jun, Ihara Hideshi, Hatano Naoya, Tsuchiya Yukihiro, Watanabe Yasuo	4. 巻 130
2. 論文標題 Redox regulation of Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase IV via oxidation of its active-site cysteine residue	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 99 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.440	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 荒木笙馬、海老澤芳、土屋幸弘、渡邊泰男
2. 発表標題 血清飢餓によるシスタチオニン -リアーゼ発現誘導の意義
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会・第20回日本N0学会 合同学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高田剛、井田智章、松永哲郎、守田匡伸、土屋幸弘、渡邊泰男、住本英樹、赤池孝章
2. 発表標題 NADPHオキシダーゼおよび一酸化窒素合成酵素による新規活性硫黄代謝メカニズムの解明
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会・第20回日本N0学会 合同学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土屋幸弘、荒木笙馬、渡邊泰男
2. 発表標題 レドックスセンサーとしてのシスタチオニン -リアーゼ
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会・第20回日本NO学会 合同学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊泰男
2. 発表標題 Persulfide signaling in LPS-initiated macrophage response
3. 学会等名 1st International Conference on Persulfide and Sulfur Metabolism in Biology and Medicine Date (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高田剛、土屋幸弘、赤池孝章、渡邊泰男
2. 発表標題 カルモデュリンキナーゼ群の活性イオウ分子応答性の差異
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒木笙馬、高田剛、土屋幸弘、渡邊泰男
2. 発表標題 炎症応答における活性イオウ分子によるカルモデュリンキナーゼII活性制御
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸康二郎、高田剛、土屋幸弘、赤池孝章、渡邊泰男
2. 発表標題 カルモデュリンキナーゼIに対する活性イオウ分子の生理的役割
3. 学会等名 日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩田千宏、土屋幸弘、松下莉子、高田剛、居原秀、渡邊泰男
2. 発表標題 抗コリン薬として働くノピレチン
3. 学会等名 日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保寺傑、荒木笙馬、高田剛、土屋幸弘、渡邊泰男
2. 発表標題 活性イオウ分子によるマクロファージでのカルモデュリンキナーゼII活性制御
3. 学会等名 日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高田剛、佃彩華、土屋幸弘、赤池孝章、渡邊泰男
2. 発表標題 カルモデュリンキナーゼIのポリスルフィド化とその意義
3. 学会等名 第19回日本NO学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土屋幸弘、松下莉子、高田剛、居原秀、渡邊泰男
2. 発表標題 PC12細胞におけるアセチルコリン信号系とその阻害薬としてのノビレチン
3. 学会等名 第19回日本NO学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒木笙馬、高田剛、土屋幸弘、渡邊泰男
2. 発表標題 マクロファージのLPS応答における活性イオウ分子によるカルモデュリンキナーゼII活性制御
3. 学会等名 第19回日本NO学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊泰男
2. 発表標題 活性イオウによるリン酸化シグナル制御
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高田剛、土屋幸弘、渡邊泰男
2. 発表標題 カルモデュリンキナーゼIの活性イオウ分子応答性の解明
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荒木笙馬、高田剛、土屋幸弘、渡邊泰男
2. 発表標題 部位特異的S-ポリスルフィド化修飾を介したカルモデュリンキナーゼII活性制御
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shoma Araki, Tsuyoshi Takata, Yukihiro Tsuchiya, Yasuo Watanabe
2. 発表標題 REACTIVE SULFUR SPECIES INHIBIT Ca ²⁺ / CALMODULIN DEPENDENT PROTEIN KINASE II ACTIVITY VIA SITE SPECIFIC S-POLYSULFIDATION
3. 学会等名 The 10th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuo Watanabe, Shoma Araki, Tsuyoshi Takata, Yukihiro Tsuchiya ¹ , Takaaki Akaike
2. 発表標題 REGULATION OF CYSTATHIONINE -LYASE BY CYSTEINE HYDROPER-SULFIDE
3. 学会等名 The 10th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuyoshi Takata, Yukihiro Tsuchiya, Yasuo Watanabe
2. 発表標題 REGULATION OF CALCIUM ION/CALMODULIN-DEPENDENT PROTEIN KINASE I BY S-POLYSULFIDATION
3. 学会等名 The 10th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高田剛、居原秀、土屋幸弘、渡邊泰男
2. 発表標題 過酸化水素によるカルモデュリンキナーゼ の活性制御
3. 学会等名 第71回日本酸化ストレス学会・第18回日本N0学会 合同学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 高田剛・土屋幸弘・渡邊泰男	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 143
3. 書名 タンパク質・核酸の分子修飾	

1. 著者名 渡邊泰男、居原秀	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 276
3. 書名 レドックス疾患学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>昭和薬科大学薬理学研究室HP https://www.shoyaku.ac.jp/research/laboratory/yakuri/teacher/102</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------