

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14650

研究課題名(和文) 生体機能を制御する活性イオウ分子種のシグナル伝達機構

研究課題名(英文) Molecular analysis of persulfide dependent signaling involved in bioactive regulation

研究代表者

清水 隆之 (Shimizu, Takayuki)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：90817214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多くの生物にとって毒として知られる硫化水素は、ほぼ全ての生物に普遍的な生理活性物質として機能することがわかってきたが、そのシグナル伝達機構には不明な点が多い。本研究では、硫化水素由来の過イオウ化分子である「活性イオウ分子種」に対するセンサータンパク質の生化学的な特性と活性イオウ分子種の代謝系を解析することで、本シグナル伝達機構の解明を目指した。その結果、本センサータンパク質が優先的に検知する活性イオウ分子種とその代謝酵素を決定し、本シグナル伝達機構の根幹となる分子機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性イオウ分子種を介したシグナル伝達系の分子基盤の一端を世界で始めた明らかにした本研究成果は、硫化水素・活性イオウ分子種に依存したシグナル伝達の詳細と、その生理的意義を明らかにする上で極めて重要である。また、硫化水素は、脳疾患である統合失調症や心臓疾患である心不全などの様々な疾患に関与することが報告されているため、様々な疾患に対するこれまでにない全く新しいアプローチ・治療法の開発につながることを期待される。したがって、本理学研究の成果は、医学・薬学研究にも大きく波及すると言える。

研究成果の概要(英文)：Hydrogen sulfide modulates important physiological processes and molecular species containing polysulfur that are called reactive sulfur species (RSS) are the actual signaling molecules. However, RSS signaling and metabolism are not fully understood. To elucidate this, I investigated biochemical properties of RSS sensor protein and RSS metabolic pathways. I revealed that the RSS sensor protein predominantly reacts with specific RSS. Moreover, RSS metabolic enzyme which is related to generation of its RSS was also identified. These results are important to understand the underlying mechanisms of RSS signaling.

研究分野：微生物生理学

キーワード：シグナル制御 システイン修飾 硫化水素 パースルフィド 細菌

1. 研究開始当初の背景

近年、毒物である硫化水素が、原核生物から真核生物に至る普遍的な生理活性シグナル伝達因子であることがわかってきた。この生理活性調節において、シグナル伝達因子の本体は、硫化水素自身ではなく、活性イオウ分子種 (RSS) と呼ばれる、過イオウ化された低分子 (システインパースルフィド; CysSSH、グルタチオンパースルフィド; GSSH など) であることが明らかになってきた (図 1)。RSS は、真核生物では血管新生、インスリン分泌や神経伝達の調節、抗アポトーシス作用などに、原核生物では抗生物質抵抗性の調節に関与することが報告されている。しかし、RSS からのシグナルをどのように各生理機能の調節に伝えているかは、良くわかっていない。

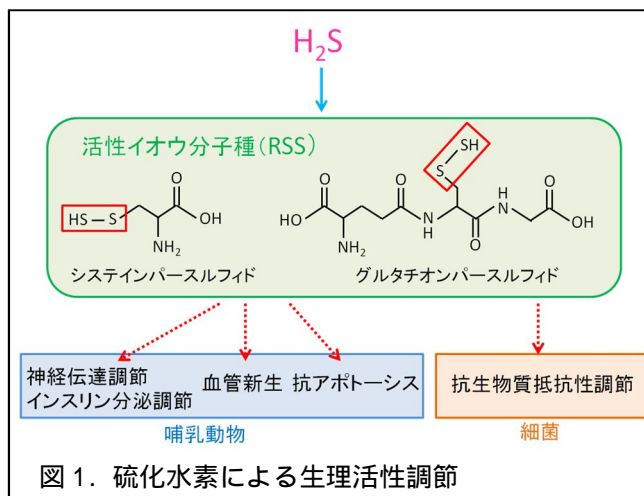


図 1. 硫化水素による生理活性調節

これらのシグナル伝達において、特定の親電子物質 (8-nitro-cGMP) が RSS によって過イオウ化されることで、その物質によるシグナル伝達が制御を受けることが知られており、RSS による低分子化合物やタンパク質の過イオウ化修飾がシグナル伝達に重要だと考えられている。実際、哺乳動物細胞から、RSS によって過イオウ化修飾を受けたタンパク質が数多く同定されている。しかし、その修飾の機能的意義はわかっておらず、RSS によるシグナル伝達機構の詳細は不明な点が多い。

RSS のシグナル伝達機構の詳細解明は、過イオウ化修飾に基づくシグナル伝達という新しい概念の理解を進め、原核生物から真核生物に至る生物一般に重要である RSS による新規生理活性調節機構を解明するために重要である。

これまでに申請者は、光合成細菌から新規の RSS 応答性転写因子 SqrR を同定し、その応答機構を明らかにしてきた。光合成細菌は、硫化水素を電子供与体としたエネルギー代謝能を持っており、硫化水素酸化に関連する酵素の遺伝子群は硫化水素濃度依存的に制御されていると考えられた。実際、同定された SqrR は、本制御機構のマスターレギュレーターとして機能していることがわかった。SqrR は、細胞が硫化水素にさらされた際、それに由来する RSS によって 2 つの保存されたシステイン残基の間で分子内テトラスルフィド結合が形成され、標的遺伝子のオペレーター領域への DNA 結合親和性が低下する (図 2)。このような分子機構で SqrR が RSS に応答した転写制御を行っていることが明らかになった。しかし、1) 実際に SqrR のシステインを細胞内で修飾する RSS の種類、および、2) その RSS の代謝経路はわかっていない。

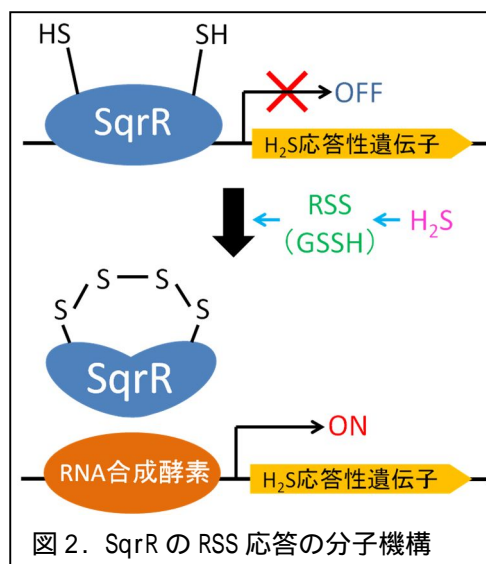


図 2. SqrR の RSS 応答の分子機構

2. 研究の目的

これまで RSS が様々な生理機能の調節に関わっていることは示されてきたが、RSS からのシグナル伝達機構はほとんどわかっていない。本研究は、申請者が同定・解析した新規の RSS 応答因子 SqrR の RSS 応答機構を分子レベルで詳細に調べることで、RSS によるタンパク質の過イオウ化修飾を介したシグナル伝達制御機構を明らかにすることを目的とする。具体的には、1) SqrR のシステインを *in vivo* で修飾する RSS の決定、2) その RSS の代謝経路の決定を行う。

3. 研究の方法

(1) 各種 RSS に対する SqrR のテトラスルフィド架橋の形成具合を、チオール基修飾試薬を用いて定量することで、各種 RSS への反応性を解析する。さらに、システインが受ける修飾の種類 (ジスルフィド、トリスルフィド、テトラスルフィド、ポリスルフィド) を質量分析によって解析する。

(2) 光合成細菌精製した SqrR の修飾を質量分析で解析することで、SqrR の細胞内での修飾を決定する。ゲノム上の *sqrR* 遺伝子に FLAG-tag を付加した細菌株を用いて、硫化水素存在・非存

在下で培養した細胞から SqrR-FLAG を抗体アフィニティー精製し、質量分析によって、各条件での SqrR の修飾を確認する。

(3) これまでの申請者の研究から、SqrR が制御に関わる遺伝子が網羅的に同定されている。この情報をもとに、RSS 代謝への寄与が期待される遺伝子を複数見出し、各遺伝子の欠損株を作成した。これら遺伝子に着目して RSS 代謝経路を推定していく。

(4) RSS 代謝への寄与が確認された酵素について、大腸菌を用いてリコンビナントタンパク質を精製し、RSS 触媒活性を生化学的に測定する。

以上の結果を統合し、SqrR による RSS シグナル伝達機構の分子基盤を解明する。

4 . 研究成果

(1) RSS に対する SqrR の反応性の解析。

細胞内の主要な RSS である CysSSH と GSSH に対する SqrR の反応性を解析したところ、CysSSH に対して有意に高い反応性を示した。現在、質量分析による解析を進めている。

(2) SqrR-FLAG の精製に成功したので、トリプシン消化後に質量分析によって解析を行った。しかし、おそらく精製されたタンパク質の純度と量が少ないために、解析ができなかった。今後は、純度を上げるために、SDS-PAGE 後のバンドからタンパク質を抽出する方法を試みる。さらに、SqrR-FLAG の過剰発現株を作成し、精製量の向上を図る。

(3) SqrR による RSS シグナル伝達に関わる RSS 代謝酵素の同定

各遺伝子欠損株における硫化水素応答を SqrR によって制御を受ける遺伝子の転写量を指標に解析したところ、野生株と応答が異なる変異株が 2 株見つかった。これらは、どちらもイオウ転移活性を持つことが期待される、硫化水素酸化酵素 (SQR) とロダネースであった。

(4) RSS 代謝酵素の生化学的解析

同定された SQR とロダネースの酵素活性を測定したところ、どちらもイオウ転移活性を持つことがわかった。SQR は硫化水素を基質としてシステイン (Cys) およびグルタチオン (GSH) にイオウを転移することがわかった。一方、ロダネースは、硫化水素を基質とすることはわかったが、少なくとも Cys、GSH、チオ硫酸、亜硫酸にはイオウを転移せず、イオウ受容体となる分子はまだわかっていない。

以上の結果から、SqrR による RSS シグナル伝達機構では、細胞が硫化水素にさらされた際、おそらく SQR によって産生される CysSSH と GSSH のうち特に CysSSH によって SqrR がパーシルフィド修飾を受けることで、シグナルを伝達していることが考えられた。

今後は、細胞内の RSS の挙動を併せて解析することで、本シグナル伝達機構の詳細な理解を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shimizu Takayuki, Masuda Shinji	4. 巻 167
2. 論文標題 Persulphide-responsive transcriptional regulation and metabolism in bacteria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 125-132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvz063	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 Shimizu Takayuki, Kacprzak Sylwia M., Mochizuki Nobuyoshi, Nagatani Akira, Watanabe Satoru, Shimada Tomohiro, Tanaka Kan, Hayashi Yuuki, Arai Munehito, Leister Dario, Okamoto Haruko, Terry Matthew J., Masuda Tatsuru	4. 巻 116
2. 論文標題 The retrograde signaling protein GUN1 regulates tetrapyrrole biosynthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 24900-24906
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1911251116	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 該当する
1. 著者名 Shimizu Takayuki, Yasuda Rintaro, Mukai Yui, Tanoue Ryo, Shimada Tomohiro, Imamura Sousuke, Tanaka Kan, Watanabe Satoru, Masuda Tatsuru	4. 巻 375
2. 論文標題 Proteomic analysis of haem-binding protein from Arabidopsis thaliana and Cyanidioschyzon merolae	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences	6. 最初と最後の頁 20190488
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rstb.2019.0488	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 Shimizu Takayuki, Hayashi Yuuki, Arai Munehito, McGlynn Shawn E, Masuda Tatsuru, Masuda Shinji	4. 巻 62
2. 論文標題 Repressor Activity of SqrR, a Master Regulator of Persulfide-Responsive Genes, Is Regulated by Heme Coordination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 100-110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcaa144	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 Shimizu Takayuki、Masuda Tatsuru	4. 巻 10
2. 論文標題 The Role of Tetrapyrrole- and GUN1-Dependent Signaling on Chloroplast Biogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants10020196	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 -

〔学会発表〕 計10件(うち招待講演 2件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 清水隆之、増田建、増田真二
2. 発表標題 硫化水素依存的な光合成の制御因子SqrRを起点としたパースルフィド代謝経路の解析
3. 学会等名 第10回日本光合成学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水隆之
2. 発表標題 硫化水素による生理活性調節とそのシグナル伝達機構
3. 学会等名 静岡大学招待講演(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水隆之、増田真二、増田建
2. 発表標題 硫化水素による生理活性調節におけるパースルフィド検知機構の分子基盤
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水隆之、増田建、増田真二
2. 発表標題 硫化水素依存的な光合成の制御因子SqrRはヘム応答性転写因子として機能する
3. 学会等名 第9回日本光合成学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayuki Shimizu, Jiangchuan Shen, Mingxu Fang, Yixiang Zhang, Koichi Hori, Jonathan C. Trinidad, Carl E. Bauer, David P. Giedroc and Shinji Masuda
2. 発表標題 Persulfide-responsive transcriptional repressor SqrR regulates sulfide-dependent photosynthesis
3. 学会等名 18th International Symposium of Phototrophic Prokaryotes (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayuki Shimizu, Jiangchuan Shen, Mingxu Fang, Yixiang Zhang, Koichi Hori, Jonathan C. Trinidad, Carl E. Bauer, David P. Giedroc and Shinji Masuda
2. 発表標題 Persulfide-responsive transcriptional repressor SqrR regulates sulfide-dependent photosynthesis
3. 学会等名 1st Asia-Oceania International Congress on Photosynthesis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水隆之、増田建、増田真二
2. 発表標題 生理活性物質としての硫化水素のシグナル伝達機構に関与するパースルフィド代謝系の解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水隆之、増田真二、増田建
2. 発表標題 硫化水素による生理活性調節におけるパースルフィド検知機構の分子基盤
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水隆之、増田真二、増田建
2. 発表標題 硫化水素依存的な生理活性調節におけるパースルフィド応答機構の分子基盤
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水隆之
2. 発表標題 葉緑体形成の制御に関わる葉緑体から核へのシグナル伝達
3. 学会等名 光合成学会オンラインミニシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------