

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11685

研究課題名（和文）ケミカルツールを駆使したミトコンドリア機能制御因子の探索

研究課題名（英文）Exploration of Mitochondrial Functional Regulators Using Chemical Tools

研究代表者

梅澤 啓太郎（Umezawa, Keitaro）

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：30505764

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、新たな抗酸化機序因子として発見された硫黄原子の多硫化修飾現象に着目し、多硫化タンパク質を検出するための新しいケミカルツールや、多硫化物産生因子であるCARS2の翻訳後修飾を解析するための新しいケミカルツールの開発を通じて、CARSタンパク質を中心とした様々な細胞内イベントを検出する新しい分析手法論の基礎を構築した。これらの分析手法の更なる先鋭化、最適化を経て、多硫化という現象が織り成す様々な生体内代謝経路の詳細の解明が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多硫化物質は、新しい抗酸化ストレス因子としてのみならず、生命活動において様々な機能や役割を担っていると考えられる重要な物質であり、生命現象の追究や疾患発生機序研究といった生命科学研究から、創薬やバイオマーカー探索のような医学・薬学研究など、その波及効果は広範に及ぶ。本研究において、多硫化という現象に対してその関連因子を分析する手法の基礎を構築できたことにより、これら広範な研究領域の進展に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the elucidation of the detailed function of CARS proteins, which is one of the polysulfur-produced enzymes. For this aim, we established new chemical tools to detect polysulfidated proteins and to analyze post-translational modifications of CARS2, and hence, we succeeded in creating a new methodology to evaluate CARS-involving cellular events. This will further contribute to unveil various metabolic pathways driven by protein polysulfidation.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

細胞のエネルギー産生を担うミトコンドリアの機能制御因子を探索することは、細胞老化現象や疾患発症メカニズムの解明等、健康長寿研究に大きく資する。その機能は、好気性 ATP 産生とその副産物である活性酸素種の除去という両機構の均衡のもと制御されるが、その均衡破綻に伴う酸化ストレス障害によるミトコンドリア機能不全が諸疾患の要因となるため、ミトコンドリア内抗酸化機序の解明がもたらす当該分野への寄与は大きい。その背景のもと、含硫黄化合物(システイン Cys-SH やグルタチオン GSH など)によるレドックス代謝が広く研究される中、これらに硫黄原子が余剰付加した多硫化物質(R-SSH 群: パースルフィドやポリスルフィドともいう)例えば Cys-SSH や GSSH などを中心としたミトコンドリア内での新奇なレドックス代謝経路の新たな可能性が注目され始めた( Ida, PNAS, 2014; Akaike, Nat. Commun. 2017)。以下に、2018 年時点で判明しているユニークな機能についていくつか紹介する。

- ・ R-SSH 群は *in vitro* においてシステインやグルタチオンよりも強い抗酸化性を示す。
- ・ R-SSH 群は下流タンパク質を多硫化修飾し、タンパク質機能を変化させる。
- ・ R-SSH 合成はミトコンドリア内で行われ、その責任酵素として CARS2 が発見される。

とりわけ、新しい硫黄代謝の中核を担うタンパク質として近年発見された CARS2 に対して、それがミトコンドリア機能制御にどう関わっているかは解明されていない。例えば、CARS2 の機能が何によって制御され、CARS2 がどのタンパク質群を制御するかは明らかにされていない。その主たる原因として、多硫化という新しい現象を解析する手法がいまだ確立されておらず、そのことが当該分野の飛躍的發展を妨げている。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、CARS2 のミトコンドリア内での機能を解明することを指標とした新しいケミカルツールの開発を行い、そしてそれらを駆使することで、CARS2 を取り巻く新しいストレス応答を解明するための新たなアプローチの礎を築く。

## 3. 研究の方法

まず、CARS2 が介在して起こるタンパク質の多硫化修飾という現象に着目し、多硫化修飾タンパク質を網羅的に検出が可能な分析技術の開発に取り組んだ。具体的には、パースルフィド基を標識可能なタグ化試薬を開発し、これを質量分析装置によるプロテオーム解析に展開するための各種実験系の評価を行った。

次に、CARS2 の機能制御を担う関連タンパク質の探索に際して、CARS2 と同じく重要な抗酸化ストレス因子であるサーチュイン(脱アシル化酵素)に着目し、CARS2 のアシル化修飾状態、とりわけリシン残基のスクシニル修飾を検出するための新しい化学的手法の考案に着手した。具体的には、アルキン-アジドの生体直交型結合反応(ヒュスゲン環化反応、クリックケミストリー)に着目し、アルキン含有スクシニル基質を合成し、これを細胞内代謝標識機構を利用してタンパク質に修飾させ、さらにアルキニル基に対して任意のレポーター化合物(蛍光色素やビオチン化合物)をヒュスゲン環化反応により結合させ、スクシニル化タンパク質へのレポーター分子の選択的標識を試みた。さらに、本技術を質量分析装置によるプロテオーム解析へ展開するための各種実験系の評価を行った。

#### 4. 研究成果

一般的に、システインのパーサルフィド基(-SSH基)は、チオール基(-SH基)に比べてpKaが2~3桁程度低く、反応性が非常に高い。この反応性の差に注目し、パーサルフィド基に高い反応性を示す標識剤を検討した。まずは市販のアルキル化剤(ヨードアセトアミド誘導体)を用い、グルタチオン(GSH)およびその多硫化物質(GSSH, GSSSH)に対する反応性を高速液体クロマトグラフィー-質量分析装置(LC-MS/MS)にて評価したところ、GSH, GSSH, GSSSHいずれに対しても非常に高い反応性を示すことが分かった(タグ化試薬: 100  $\mu$ M, チオール種: 1 mM, 緩衝液: pH7.5, 37°C)。すなわち、これらが共存する環境(生体内環境)において、ヨードアセトアミド誘導体は全てのチオール種に対して効率的に反応するため、パーサルフィド基への相対的識別標識が困難であることが分かった。そこで次に、このアルキル化剤の反応速度を落とすことで、相対的な標識効率を高めることを狙い、有機合成戦略に基づく構造展開を行った。その結果、ヨウ素原子を塩素原子に置き換えたタグ試薬の基礎性能を評価したところ、GSHに対する反応速度は非常に遅い一方で、パーサルフィド基への反応速度は速いままであることがわかり、実用的な標識反応時間範囲において相対的標識効率が高くなることを見出した。また、本知見がGSH, GSSHのような低分子化合物だけでなく、タンパク質に対しても当てはまることを実証するため、多硫化アルブミン(市販のヒト血清アルブミンを二硫化ナトリウム添加により多硫化したもの)を用いて検証した。多硫化アルブミンに同様の条件でタグ化試薬を反応させ、さらにトリプシンによるペプチド消化及び脱塩処理を経て、タグ標識されたペプチドをLC-MS/MSにて解析したところ、塩素原子に置き換えたタグ試薬においては、アルブミンのシステイン残基がパーサルフィド化した構造の検出割合が高くなることを実証した(特許出願済)。

この知見をもとに、パーサルフィド化タンパク質をアフィニティー精製により選択的に回収できる技術へ拡張するため、ビオチン含有タグ化試薬を合成開発した。そしてこのタグ化試薬により標識された多硫化タンパク質をアビジンビーズにより精製する実験を経て、細胞抽出タンパク質に含まれる多硫化タンパク質のLC-MS/MSによるプロテオーム解析を試みた。その結果、ミトコンドリアタンパク質を含む多くのタンパク質が多硫化していることを見出した。現在これらの結果を詳細に解析しており、今後は、分子構造の精密設計による機能向上に加え、CARS2の過剰/欠損モデルにおける各種タンパク質のパーサルフィド化レベルの変動解析を行うことで、CARS2が介在するタンパク質の多硫化修飾変動を網羅的に解析することが可能となると期待される。

続いて、CARS2のアシル化修飾状態、とりわけリシン残基のスクシニル修飾を検出するための新しい化学的手法の考案に着手した。前項に記載されたアルキン含有スクシニル基質を合成した後、さらに基質に含まれるカルボキシ基に対して適切なエステル保護を行うことで、細胞膜透過性を向上させることに成功した。この保護基は、細胞内のエステラーゼにより容易に加水分解され、スクシニル基質細胞内では本来の形(カルボキシ基)に戻るため、細胞内代謝標識機能等に影響はない。そして、合成基質を培養細胞(HEK293T)に添加して1時間培養した後、NP-40バッファーにて細胞からタンパク質を抽出し、次いでアジド含有蛍光色素と反応させ(一般的なクリックケミストリー反応条件に基づいて反応を実施し)、SDS-PAGEにて蛍光イメージングを行ったところ、非常に多くのタンパク質が蛍光ラベル化されていることがわかり、合成したスクシニル基質が代謝標識プロセスに則ってタンパク質に導入されていることを確認した。また、スクシニル基質が結合しているアミノ酸残基をLC-MS/MSにて解析した結果、当初の狙い

通りアルキン含有スクシニル基質がタンパク質のリシン残基に結合していることを確認した。

続いて、同じタンパク質抽出液に対し、アジド含有蛍光色素の代わりにアジド含有ビオチン化合物を反応させ、アビジンビーズを用いてアフィニティー精製を施したビオチン化タンパク質を LC-MS/MS にて計測し、どのようなタンパク質がスクシニル化されているかをプロテオーム解析手法により評価した。その結果、ミトコンドリア関連タンパク質を含む 1000 種類以上のタンパク質を同定した（論文投稿中）。当初の作業仮説である CARS2 のスクシニル化を裏付ける直接的な結果はまだ得られていない一方で、CARS2 のサブタイプである CARS1( CysteinyI-tRNA, cytoplasm ) が検出され、CARS1 がスクシニル化されていることを示唆する結果を得た。CARS1 も CARS2 同様、パースルフィド産生能を有することが判明しているため、スクシニル化修飾と CARS のパースルフィド産生能との関連性を伺う示唆に富んだ結果である。なお、CARS2 に関しては、おそらく CARS2 の発現量が他のタンパク質に比べて少ないことが主因であると考え、CARS2 過剰発現細胞を用いて解析することを検討している。すでに、CARS2 の C 末端に His タグを結合した CARS2-His プラスミドの作製が完了し、このプラスミドを用いて CARS2 過剰発現細胞を作製できるところまで確認済である。また同時に、共免疫沈降法を用い、CARS2 とサーチュイン (SIRT3-5) の関連を調べる実験を行っており、現在はその結果の妥当性について現在詳細に検討をしている。

以上の結果より、新しいケミカルツールの開発を通じて、CARS タンパク質を中心とした様々な細胞内イベントを検出する新しい手法論の創出に成功した。今後、これらの分析手法の更なる先鋭化、最適化を図ることで、CARS2 を取り巻く様々な代謝経路の全容を明らかにできることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 梅澤啓太郎, 津元裕樹, 神谷真子, 浦野泰照, 三浦ゆり
2. 発表標題 生体中の多硫化物質を検出可能な化学プローブ群の創製
3. 学会等名 第8回TOBIRA研究交流フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keitaro Umezawa
2. 発表標題 Fluorescent probes for selective and reversible imaging of reactive sulfur species
3. 学会等名 1st International Conference on Persulfide and Sulfur Metabolism in Biology and Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅澤啓太郎, 津元裕樹, 川上恭司郎, 遠藤玉夫, 三浦ゆり
2. 発表標題 アシル化修飾タンパク質の新規検出法の開発
3. 学会等名 第43回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梅澤啓太郎, 津元裕樹, 川上恭司郎, 神谷真子, 浦野泰照, 浦野泰照, 遠藤玉夫, 三浦ゆり
2. 発表標題 化学タグ技術を用いたスクシニル化タンパク質の網羅的解析法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅澤啓太郎
2. 発表標題 超硫黄生物学を支える化学プローブの開発
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keitaro Umezawa, Hiroki Tsumoto, Kyojiro Kawakami, Mako Kamiya, Yasuteru Urano, Tamao Endo, Yuri Miura
2. 発表標題 Development of a new chemical probe for specific detection of lysine-succinylated proteins
3. 学会等名 Pacifichem2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ポリスルフィド標識用アルキル化剤及びそれを用いたポリスルフィドの標識方法	発明者 梅澤啓太郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-070477	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------