

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22258

研究課題名(和文) 活性イオウにより誘導される細胞内殺菌機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of intracellular bacterial killing induced by reactive sulfur species

研究代表者

澤 智裕 (Sawa, Tomohiro)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：30284756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージは食作用を介した殺菌により、重要な感染防御を担っている。システインパーсульフィド(Cys-SSH)は、チオール基に過剰なイオウ原子が付加した構造を持ち、その強力な抗酸化力により活性イオウと呼ばれている。本研究では、細胞内殺菌機構における活性イオウの役割を解析した。マウスマクロファージ細胞にグラム陰性菌であるネズミチフス菌を感染させ、一定時間後の細胞内生菌数を計測したところ、活性イオウドナーで処理した細胞内で生菌数が著しく減少した。詳細な解析の結果、活性イオウによる殺菌作用の増強は、これまでに知られている食細胞の殺菌経路とは異なる機構で起こっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、活性イオウドナーの作用により、感染にともなう活性酸素を消去しながら、一方で活性酸素の殺菌作用とは全く異なる機構で細胞内の細菌を排除している可能性を強く示唆する結果を得た。今後、より積極的に活性イオウを増やすことで、特に免疫力の低下した宿主に対する新しい感染予防あるいは治療の補助方法としての展開も期待される。具体的には含硫食品(卵、緑色野菜など)の摂取や、運動によるミトコンドリア量の増加による感染予防効果の検証などが含まれる。活性イオウドナーを従来の抗菌剤と併用することでより効果的な殺菌治療への展開も期待される。

研究成果の概要(英文)：Cysteine persulfide and polysulfides are cysteine derivatives having sulfane sulfur atoms bound to cysteine thiol. This study was conducted to clarify the impact of chemically synthesized polysulfide donors towards bacterial infections. We used N-Acetyl-L-cysteine polysulfide as potent polysulfide donors. Immune cells were infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. Extracellular bacteria were killed by using gentamycin. NAC polysulfides were added into infected-cells during gentamycin treatment. Treatment of NAC polysulfides remarkably decreased intracellular bacterial numbers. NAC polysulfides-enhanced bacterial killing was not ascribed to increased productions of nitric oxide, cytokines, and reactive oxygen species, suggesting a non-canonical bacterium killing route. Precise understanding of mechanisms by which NAC polysulfides-mediated bacterial killing in immune cells may be helpful to develop therapeutic strategies for bacterial infectious diseases.

研究分野：細菌学、生化学

キーワード：食細胞 活性イオウ 細胞内殺菌 マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

マクロファージによるファゴサイトーシス（食作用）を介した殺菌は重要な感染防御機構である。細菌を取り込んだマクロファージはその後、活性酸素と消化酵素を利用して細胞内で細菌を死滅させる (1)。

システインパースルフィド (Cys-SSH) は、システインのチオール基 (Cys-SH) に過剰なイオウ原子が付加しただけのシンプルな構造にもかかわらず、システインに比べて著しくその抗酸化力が高まっており活性イオウと呼ぶ作用を有することが明らかとなった (2-4)。最近の研究により、CysSSH はシステインを基質として cysteinyl-tRNA 合成酵素 (CARS) から産生されることがわかってきた (5)。CARS は原核生物である細菌から真核生物である哺乳類まで広く保存されている。組換え体 CARS を用いた検討から、大腸菌の CARS やヒト CARS のいずれも CysSSH を産生することが明らかとなっている (5)。これまでも、CysSSH などの活性イオウがその抗酸化力により、活性酸素を効率よく消去し、細胞を酸化ストレスから保護することがわかっている (2)。一方、上述したように、細菌を取り込んだマクロファージでは、その殺菌に活性酸素が重要である。このため、マクロファージによる殺菌過程において、活性イオウがどのような役割を担っているのかは研究が進んでいなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、マクロファージによる殺菌過程において活性イオウが担う役割を明らかにすることを目的とした。具体的には、殺菌過程においてマクロファージ内の活性イオウ量がどのように変動するかを、独自に開発した質量分析法によって定量解析した (2,5)。さらに新しく開発した活性イオウドナー (6) でマクロファージを処理したときに、殺菌活性がどのように影響を受けるかを解析した。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞内活性イオウの定量解析

培養細胞に対して、CysSSH および関連化合物のチオール基末端を安定化させる目的で、アルキル化剤である  $\beta$ -(4-hydroxyphenyl)ethyl iodoacetamide (HPE-IAM) を処理した。その後、タンパク質を除去した上清を希釈し、タンデム質量分析にて活性イオウ関連化合物のメタボロミクス解析を行った。

### (2) 細胞内殺菌の解析

マウスマクロファージ細胞株 Raw264.7 細胞あるいはヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞をホルボールエステル処理によりマクロファージ様細胞に分化させた細胞 (以下、THP-1 細胞と略す) を用いた。これら細胞に細菌を 30 分間感染させた。その後、培養外液を取り除き、ゲンタマイシン (0.2 mM) で 2 時間処理し、細胞外に存在する細菌を殺菌除去した。それ以降は培養液に 0.05 mM ゲンタマイシンを添加し、細胞外に出てきた細菌を殺菌処理した。感染後、一定時間を経た後、細胞を破碎し、細胞内に生存している細菌をコロニー形成法にて定量解析した。用いた細菌は、グラム陰性菌がネズミチフス菌、大腸菌、肺炎レジオネラ菌、グラム陽性菌が黄色ブドウ球菌である。

### (3) 活性イオウドナーの合成

細胞内透過性の活性イオウドナーとして、N-アセチルシステインイオウ付加体 (NAC polysulfide) を開発した (図 1)。本研究ではイオウ付加数が 2 原子の NAC-S2 を用いた。イオウ供与能のないコントロールとして酸化型 N-アセチルシステイン (oxNAC) を用いた。

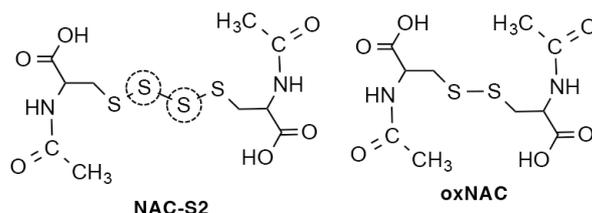


図1. 活性イオウドナーNAC-S2の構造式。

図中破線の丸で囲んだイオウ原子が細胞内のチオール受容体に転移してパースルフィドを生成する。oxNACはイオウ供与能のないコントロール。

#### (4) 細胞内活性酸素の定量

酸化されると蛍光を発するようになる蛍光プローブ DCDHF-DA を用いた。細胞を DCDHF-DA で処理した後、細胞内の蛍光強度を共焦点レーザー顕微鏡で蛍光強度を定量解析した。得られた結果を、コントロール実験を 1 とした相対強度で求めた。

### 4. 研究成果

#### (1) 細菌感染に伴う細胞内活性イオウ量の変動

ヒトマクロファージ様細胞の THP-1 細胞にネズミチフス菌を感染させ、20 時間後の THP-1 細胞内の活性イオウ量を測定した。その結果、通常の還元型グルタチオン (GSH) の細胞内濃度は感染の有無によって有意な変化は見られなかった (図 2)。一方、グルタチオンの活性イオウ化体であるグルタチオンパースルフィド (GSSH) およびグルタチオントリスルフィド (GSSSH) は感染によってその細胞内濃度が大きく減少した。これらの結果から、細菌感染はマクロファージ内の活性イオウ量を減少させることが示された。

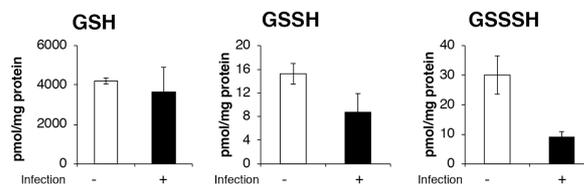


図2. ネズミチフス菌感染によるTHP-1細胞内のグルタチオン(GSH)およびその活性イオウ化体量の変動。THP-1細胞にmultiplicity = 1でネズミチフス菌を感染させ、20時間後に細胞内の活性イオウをタンデム質量分析法により定量解析した。

#### (2) 細菌ない殺菌に対する活性イオウドナー処理の影響

THP-1 細胞にネズミチフス菌を感染させ、その際、同時に活性イオウドナーで処理を行った。24 時間後の細胞内で生存している細菌数を測定した。その結果を図 3 に示す。このようにマクロファージ内で生存していた細菌数は、活性イオウドナーで処理することによって、著しく減少していた。一方、ネズミチフス菌を活性イオウドナーで直接処理した場合には、生菌数に違いは見られなかった (図 3 右)。これらのことから、活性イオウドナーは直接的な殺菌作用はないこと、さらにマクロファージに作用することで、細胞内殺菌活性が増強され、その結果、生菌数が減少したと考えられた。同様に、活性イオウドナー処理による細胞内殺菌の増強作用は、マウスマクロファージ様 Raw264.7 細胞においても観察された (データ未提示)。また、両細胞において、他のグラム陰性菌である大腸菌、肺炎レジオネラ菌に対しても認められた (データ未提示)。一方、グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌に対しては、活性イオウ処理による細胞内殺菌作用の増強は認められなかった (データ未提示)。

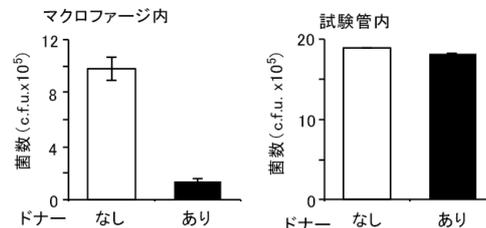


図3. 活性イオウドナーによる細胞内菌数の減少。THP-1細胞にネズミチフス菌を感染させ、24時間後の細胞内の生菌数を測定した(左)。活性イオウドナーを菌に直接作用させた時の生菌数(右)。

#### (3) 細胞内活性酸素の変動

マクロファージに細菌が感染すると、食胞が形成されるが、その時、食胞膜において NADPH オキシダーゼが活性化され、食胞内に活性酸素が放出される。実際、ネズミチフス菌を THP-1 細胞に感染させたときの細胞内の活性酸素を蛍光プローブで解析したところ、非感染状態に比べて活性酸素量の増加が見られた (図 4)。一方、細菌感染時に活性イオウドナーで処理すると、感染によって増加した活性酸素が、非感染時と同等にまで減少することがわかった (図 4)。上述したように、活性イオウは強力な還元力を持つことから、活性イオウドナー処理によって細胞内の活性イオウが増加したことにより、それが活性酸素の消去に働いた可能性が示唆される。

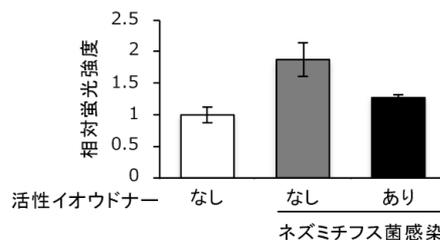


図4. 活性イオウドナーによる活性酸素抑制。THP-1細胞にネズミチフス菌を感染させ、細胞内の活性酸素を酸化応答性蛍光プローブDCDFHIにより定量した。ドナー濃度、0.5 mM。

以上のように、細菌感染時では細胞内の活性イオウ量が大きく変動すること、さらに減少した活性イオウを活性イオウドナーで補充すると、細胞内の殺菌作用が著しく強まることがわかった。このとき、細胞内では活性酸素が減少していたことから、従来知られていた活性酸素を介した殺菌とは異なる仕組みで細胞内殺菌が更新している可能性が示唆された。今後、活性イオウ増加によってなぜ細胞内殺菌が増強されるのか、そのメカニズムが解明できれば、新しい感染防御法の開発に大きく貢献することが期待される。

<参考文献>

1. Kaufmann SHE, Dorhoi A. Molecular Determinants in Phagocyte-Bacteria Interactions. *Immunity* 44: 476-491, 2016.
2. Ida T, Sawa T, Ihara H, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Kumagai Y, Suematsu M, Motohashi H, Fujii S, Matsunaga T, Yamamoto M, Ono K, Devarie-Baez NO, Xian M, Fukuto JM, Akaike T. Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 7606-11, 2014.
3. Sawa T, Ono K, Tsutsuki H, Zhang T, Ida T, Nishida M, Akaike T. Reactive Cysteine Persulphides: Occurrence, Biosynthesis, Antioxidant Activity, Methodologies, and Bacterial Persulphide Signalling. *Adv Microb Physiol* 72: 1-28, 2018.
4. Sawa T, Motohashi H, Ihara H, Akaike T. Enzymatic Regulation and Biological Functions of Reactive Cysteine Persulfides and Polysulfides. *Biomolecules* 10, 2020.
5. 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. CysteinyI-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat Commun* 8: 1177, 2017.
6. Zhang T, Ono K, Tsutsuki H, Ihara H, Islam W, Akaike T, Sawa T. Enhanced Cellular Polysulfides Negatively Regulate TLR4 Signaling and Mitigate Lethal Endotoxin Shock. *Cell Chem Biol* 26: 686-698 e4, 2019.

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 3件）

1. 著者名 Harada Ayaka, Tsutsuki Hiroyasu, Zhang Tianli, Lee Ruda, Yahiro KinnoSuke, Sawa Tomohiro, Niidome Takuro	4. 巻 68
2. 論文標題 Preparation of Biodegradable PLGA-Nanoparticles Used for pH-Sensitive Intracellular Delivery of an Anti-inflammatory Bacterial Toxin to Macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 363 ~ 368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c19-00917	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 Zhang Tianli, Ono Katsuhiko, Tsutsuki Hiroyasu, Ihara Hideshi, Islam Waliul, Akaike Takaaki, Sawa Tomohiro	4. 巻 26
2. 論文標題 Enhanced Cellular Polysulfides Negatively Regulate TLR4 Signaling and Mitigate Lethal Endotoxin Shock	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 686 ~ 698.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2019.02.003	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 Zhang Tianli, Fang Jun, Tsutsuki Hiroyasu, Ono Katsuhiko, Islam Waliul, Sawa Tomohiro	4. 巻 42
2. 論文標題 Synthesis of Pegylated Manganese Protoporphyrin as a Catalase Mimic and Its Therapeutic Application to Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1199 ~ 1206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-00152	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 Tsutsuki Hiroyasu, Zhang Tianli, Harada Ayaka, Rahman Azizur, Ono Katsuhiko, Yahiro KinnoSuke, Niidome Takuro, Sawa Tomohiro	4. 巻 525
2. 論文標題 Involvement of protein disulfide isomerase in subtilase cytotoxin-induced cell death in HeLa cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1068 ~ 1073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.008	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 Ono Katsuhiko, Kitamura Yusuke, Zhang Tianli, Tsutsuki Hiroyasu, Rahman Azizur, Ihara Toshihiro, Akaike Takaaki, Sawa Tomohiro	4. 巻 16
2. 論文標題 Cysteine Hydropersulfide Inactivates $\beta$ -Lactam Antibiotics with Formation of Ring-Opened Carbothioic S-Acids in Bacteria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 731 ~ 739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.1c00027	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 Sawa Tomohiro, Motohashi Hozumi, Ihara Hideshi, Akaike Takaaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Enzymatic Regulation and Biological Functions of Reactive Cysteine Persulfides and Polysulfides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1245 ~ 1245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10091245	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3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Zhang, T., Ono, K., Tsutsuki, H., Ihara, H., Islam, W., Akaike, T., Sawa, T.
2. 発表標題 N-Acetyl-L-cysteine polysulfides act as potent polysulfide donors and mitigate lethal endotoxin shock via their anti-inflammatory effects.
3. 学会等名 The 9th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sawa, T.
2. 発表標題 N-Acetyl-L-cystine polysulfides act as potent persulfide/polysulfide donors and ameliorate lethal endotoxin shock via their anti-inflammatory effects.
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 澤 智裕
2. 発表標題 活性イオウによるNLRP3インフラマソームのレドックス調節機構
3. 学会等名 第19回分子予防環境医学研究会（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
研究分担者	津々木 博康  (Tsutsuki Hiroyasu)  (40586608)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教   (17401)	
研究分担者	荒木 令江  (Araki Norie)  (80253722)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授   (17401)	
研究分担者	小野 勝彦  (Ono Katsuhiko)  (80573592)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教   (17401)	

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