

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15983

研究課題名(和文) パースルフィドによるタンパク質酸化損傷修復メカニズムの解明

研究課題名(英文) Control of protein function and its oxidative damage by reactive persulfides

研究代表者

高田 剛 (Takata, Tsuyoshi)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：20733257

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)：近年、パースルフィドなどの活性硫黄分子種による酸化ストレスに対する防御的役割が注目されているが、詳細なメカニズムはこれまで不明であった。本研究では、パースルフィドによるタンパク質酸化損傷修復メカニズムの解明を目指した。まず、チロシン脱リン酸化酵素(PTP1B)がパースルフィド化を介して可逆的に修復されることを明らかにした。また、活性酸素合成酵素であるNADPHオキシダーゼ(Nox)と一酸化窒素合成酵素(NOS)による新規の硫黄代謝系を見出した。以上の結果から、パースルフィド化がタンパク質酸化損傷修復において重要な役割を果たし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

酸化ストレス下における不可逆的な酸化修飾からタンパク質のシステイン残基を保護する手段として、パースルフィドによる保護メカニズムを見出したのは、これまでに報告のない応募者ら独自のものであり、その独創性は極めて高い。本研究を進めることで、酸化ストレスに対する新規防御機能を明らかにし、酸化ストレスの関わる動脈硬化症・心疾患、生活習慣病及び、癌、神経変性疾患を含めた難治性疾患 まで幅広い疾病を標的とした創薬や予防・治療法の開発への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Irreversible oxidation of Cys residues to sulfinic/sulfonic forms typically impairs protein function. We found that persulfidation (CysSSH) protects Cys from irreversible oxidative loss of function by the formation of CysSS01-3H derivatives that can subsequently be reduced back to native thiols. Reductive reactivation of oxidized persulfides by the thioredoxin system was demonstrated in PTP1B. In cells, this mechanism protects and regulates key proteins of signaling pathways, including PTP1B. Using quantitative mass spectrometry, we show that (i) CysSSH and CysSS03H species are abundant in mouse liver and enzymatically regulated by the thioredoxin systems and (ii) deletion of the thioredoxin-related protein TRP14 in mice altered CysSSH levels on a subset of proteins, predicting a role for TRP14 in persulfide signaling.

研究分野：硫黄生物学

キーワード：パースルフィド 超硫黄分子 酸化修飾 レドックスシグナル 酸化ストレス リン酸化修飾 カルモデュリンキナーゼ チオレドキン

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、パーサルフィドなどの活性硫黄分子種による酸化ストレスに対する防御的役割が注目されているが、不可逆的な酸化損傷からタンパク質システイン残基を保護する機構はこれまで不明であった。最近、所属研究グループにおいて、パーサルフィドがタンパク質システイン残基の過度な酸化修飾に対する防御機能を有していることを明らかにし、レドックスシグナル研究に新たな道を開いた。本研究では、これまで全く知られていなかった「パーサルフィドによるタンパク質酸化損傷修復メカニズム」を解明する課題に取り組んだ。本研究により、酸化ストレスに対する新規防御機能を解明し、酸化ストレスが関わる難治性疾患の新しい診断・治療法の開発や創薬に向けた基盤的研究を展開した。

2. 研究の目的

システインパーサルフィド(Cys-SSH)は、通常のチオール化合物に比べて高い求核性を有すると共に、求電子性の両方の性質を有しており、複雑なレドックス活性を持つ「活性硫黄分子」として生体内で多彩な生理機能を発揮している。最近我々は、パーサルフィドがタンパク質システイン残基の過度な酸化修飾に対する防御機能を有していることを明らかにした。本研究では、全く知られていなかった「パーサルフィドによるタンパク質酸化損傷修復メカニズム」を解明するために、(1) 硫黄プロテオミクスによるタンパク質酸化修復機構の解析、(2) パーサルフィド化によるタンパク質システイン残基保護メカニズムの解析、(3) パーサルフィドの酸化還元反応によるリン酸化シグナル制御機構の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 硫黄プロテオミクスによるタンパク質酸化修復機構の解析

パーサルフィド化および他の硫黄種の存在量を評価するために、マウス組織における、硫黄プロテオミクスを実施した。我々の開発したタンパク質中のパーサルフィド量を測定するための新しい質量分析法を用いて、各種組織サンプル中のタンパク質および代謝物のパーサルフィド量を解析した。さらに、チオレドキシシン(Trx)やチオレドキシシン還元酵素(TrxR)などの欠損マウスを解析し、種々の還元系によるパーサルフィド化および他の硫黄種への影響を解析した。

(2) パーサルフィド化によるタンパク質システイン残基保護メカニズムの解析

予備的な検討により、チロシン脱リン酸化酵素(PTP1B)の不可逆的な酸化修飾とそれによる活性阻害に対して、パーサルフィド化が可逆性を付与し、チオレドキシシン系(Trx1, TRP14, TRP32)により酵素的に還元されることを証明した。これを応用し、CaMK 群のパーサルフィド化による保護メカニズムの解析を行った。さらに、分子ごとにパーサルフィドの還元系が異なる知見を得ていることから、分子ごとにパーサルフィドを還元する酵素系の特定を試みた。加えて、上記(1)の硫黄プロテオミクスにより特定される新規パーサルフィド標的分子の保護メカニズムの解析を行った。

(3) パーサルフィドの酸化還元反応によるリン酸化シグナル制御機構の解析

細胞の老化や各種ストレスによりタンパク質が酸化され、不可逆的な酸化損傷を受けることが報告されている。すでに我々は、小胞体ストレスの誘導により CaMK 群のシステインが酸化修飾され、それにより下流のリン酸化シグナルが制御されることを確認している。そこで、酸化タンパク質が増加する種々のストレス下においてパーサルフィド化およびパーチオ酸化修飾を検出し、細胞内リン酸化シグナルに対するパーサルフィドの寄与を解析した。さらに、チオレドキシシン系の欠損細胞では、パーサルフィド化の還元が抑制されることにより、PTP1B の酸化と不活性化が引き起こされ、細胞内リン酸化シグナルが亢進する知見を得ている。よって、各種還元酵素系の欠損細胞を用いてパーサルフィド化の還元を抑制することで、還元酵素を介したパーサルフィドのリン酸化シグナル制御機構の解明に取り組んだ。

4. 研究成果

(1) タンパク質酸化修飾と酵素活性阻害の相関解析

アルツハイマー病やパーキンソン病など高齢者に多い脳の病気において、酸化したタンパク質が蓄積し、細胞が損傷を受け、最終的に細胞死に至ることが知られている。近年、多くの精神・神経疾患の原因の1つとして活性酸素が注目されているが、不可逆的な酸化状態からタンパク質システイン残基を保護する機構は不明なままであった。そこで、パースルフィドによるタンパク質酸化損傷修復機構に関する解析を行った。その結果、チロシン脱リン酸化酵素(PTP1B)の不可逆的な酸化修飾とそれによる酵素活性阻害に対して、パースルフィド化が可逆性を付与し、チオレドキシシン系(Trx1, TRP14, TRP32)により酵素的に還元されることを証明した。また、カルモデュリンキナーゼ(CaMK)群において、不可逆的な親電子物質による修飾とそれによる酵素活性阻害に対して、パースルフィド化が可逆性を付与する結果が得られている。

(2) 環状 S₈ 硫黄の生体内生成と新規の硫黄代謝経路の解析

広く自然界に存在する環状 S₈ 硫黄が哺乳類・ヒトの生体内において、当初の想定を超える高濃度で蓄積していることを見出した。さらに、環状 S₈ 硫黄がヒト細胞におけるミトコンドリアの硫黄呼吸に関与する可能性を見出した。さらに、活性酸素産生酵素である NOX(NADPH oxidase) や NO 合成酵素(NOS)が、実際は、NADPH の電子・プロトン優先的に超硫黄(GSSSG)に渡して超硫黄の伸長反応(catenation, カテネーション)を触媒して S₈ 産生酵素(S8synthase)として機能していることを見出した。この新規硫黄代謝経路によりパースルフィドの再活性化が確認されていることから、本研究課題であるパースルフィドによるタンパク質酸化損傷修復メカニズムと密接に関連することが予想された。

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 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Zainol Abidin Qamarul Hafiz, Ida Tomoaki, Morita Masanobu, Matsunaga Tetsuro, Nishimura Akira, Jung Minkyung, Hassan Naim, Takata Tsuyoshi, Ishii Isao, Kruger Warren, Wang Rui, Motohashi Hozumi, Tsutsui Masato, Akaike Takaaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Synthesis of sulfides and persulfides is not impeded by disruption of three canonical enzymes in sulfur metabolism	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 868 ~ 868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox12040868	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 Takata Tsuyoshi, Jung Minkyung, Matsunaga Tetsuro, Ida Tomoaki, Morita Masanobu, Motohashi Hozumi, Shen Xingguo, Kevil Christopher G., Fukuto Jon M., Akaike Takaaki	4. 巻 116
2. 論文標題 Methods in sulfide and persulfide research	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nitric Oxide	6. 最初と最後の頁 47 ~ 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.niox.2021.09.002	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 Sawa Tomohiro, Takata Tsuyoshi, Matsunaga Tetsuro, Ihara Hideshi, Motohashi Hozumi, Akaike Takaaki	4. 巻 36
2. 論文標題 Chemical Biology of Reactive sulfur species: Hydrolysis-driven equilibrium of polysulfides as a determinant of physiological functions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants & Redox Signaling	6. 最初と最後の頁 327 ~ 336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ars.2021.0170	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、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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高田剛、井田智章、松永哲郎、守田匡伸、Jung Minkyung、土屋幸弘、渡邊泰男、本橋ほづみ、吉沢道人、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超硫黄分子産生を介した感染防御機能
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022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、本橋ほづみ、住本英樹、赤池孝章
2. 発表標題 NADPH酸化還元酵素による超硫黄分子活性化機構の解明
3. 学会等名 第21回分子予防環境医学研究会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高田剛、井田智章、松永哲郎、守田匡伸、Jung Minkyung、土屋幸弘、渡邊泰男、本橋ほづみ、住本英樹、赤池孝章
2. 発表標題 NADPHオキシダーゼおよびNO合成酵素による超硫黄活性化機構
3. 学会等名 レドックスR&D戦略委員会 第1回若手シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田剛、井田智章、松永哲郎、守田匡伸、Jung Minkyung、土屋幸弘、渡邊泰男、本橋ほづみ、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超硫黄活性化メカニズム
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田剛、井田智章、松永哲郎、守田匡伸、Jung Minkyung、土屋幸弘、渡邊泰男、本橋ほづみ、住本英樹、赤池孝章
2. 発表標題 感染防御における一酸化窒素合成酵素およびNADPHオキシダーゼによる超硫黄代謝機構の解明
3. 学会等名 第32回日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田剛、井田智章、松永哲郎、守田匡伸、Jung Minkyung、土屋幸弘、渡邊泰男、本橋ほづみ、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超硫黄活性化機構
3. 学会等名 生理研究会2021「生命を支える硫黄生物学の最前線」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田剛、井田智章、松永哲郎、守田匡伸、Jung Minkyung、土屋幸弘、渡邊泰男、本橋ほづみ、住本英樹、赤池孝章
2. 発表標題 NO合成酵素およびNADPHオキシダーゼによる超硫黄種活性化機構の解明
3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会・第21回日本NO学会合同学術集会
4. 発表年 2021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、本橋ほづみ、赤池孝章
2. 発表標題 感染防御における一酸化窒素合成酵素およびNADPHオキシダーゼによる新規活性硫黄代謝機構の解明
3. 学会等名 第31回日本生体防御学会学術総会
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NO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、本橋ほづみ、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超硫黄種活性化と宿主防御機構
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計7件

1. 著者名 荒木笙馬、高田剛、土屋幸弘、渡邊泰男	4. 発行年 2021年
2. 出版社 硫酸協会	5. 総ページ数 9
3. 書名 硫酸と工業 75(3), 超硫黄分子とその細胞内シグナル伝達への影響 リン酸化シグナル制御	
1. 著者名 赤池孝章、松永哲郎、高田剛	4. 発行年 2021年
2. 出版社 公益社団法人 日本生化学会	5. 総ページ数 9
3. 書名 生化学 93(5), 超硫黄分子の化学と代謝: 超硫黄生物学の創成とオミックス先制医療への展望	
1. 著者名 高田剛、松永哲郎、赤池孝章	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 4
3. 書名 実験医学 39(13), 超硫黄代謝物の化学と代謝	
1. 著者名 Tsuyoshi Takata, Masanobu Morita, Tetsuro Matsunaga, Hozumi Motohashi, Takaaki Akaike	4. 発行年 2021年
2. 出版社 CRC Press	5. 総ページ数 11
3. 書名 "Chapter 16: Supersulfide-mediated signaling during differentiation and de-differentiation", In: Carsten Berndt, Christopher Horst Lillig, (eds) "Redox regulation of differentiation and de-differentiation", in the series "Oxidative stress and disease"	

1. 著者名 高田剛、松永哲郎、赤池孝章	4. 発行年 2021年
2. 出版社 バイオインダストリー協会	5. 総ページ数 3
3. 書名 バイオサイエンスとインダストリー，活性硫黄分子種によるエネルギー代謝とタンパク質劣化防止機能	

1. 著者名 高田剛、松永哲郎、赤池孝章	4. 発行年 2020年
2. 出版社 硫酸協会	5. 総ページ数 8
3. 書名 硫酸と工業，活性硫黄分子の新規生成経路とその代謝制御機能	

1. 著者名 高田剛、松永哲郎、赤池孝章	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 6
3. 書名 食と健康を結ぶメディカルサイエンス，抗酸化：活性パースルフィドによる制御	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p> 東北大学大学院医学系研究科環境医学分野ホームページ http://www.toxicosci.med.tohoku.ac.jp/index.html Research Mapマイポータル https://researchmap.jp/Takata_T 東北大学大学院医学系研究科環境医学分野ホームページ http://www.toxicosci.med.tohoku.ac.jp/index.html Research Mapマイポータル https://researchmap.jp/Takata_T </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
---------	---------