

令和 5 年 4 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15038

研究課題名（和文）タンパク質の過イオウ化によるシグナル伝達機構の分子基盤

研究課題名（英文）Molecular basis of signaling mechanisms via protein polysulfidation

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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：活性イオウ（RSS）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、光合成細菌から同定したRSS応答性転写因子SqrRを起点としたシグナル伝達機構について、RSS代謝から転写制御までの素過程を明らかにすることを目指した。その結果、SqrRを介した転写制御に関わる活性硫黄代謝酵素を複数同定し、SqrRの制御に関わる活性硫黄の細胞内動態を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、RSSの代謝系とRSSによる転写制御を結びつける重要な情報を提供し、今後のRSSシグナル研究の展開を強く推進する。また、研究材料である紅色光合成細菌はミトコンドリアの細胞内共生のもとになった細菌であり、真核生物にも共通する硫黄代謝機構をもつことが知られている。そのため、SqrRを起点としたRSSの応答機構は、RSSセンシング研究のプラットフォームとして様々な研究へ展開することが期待される。さらに、統合失調症などのRSSが関わる疾患のこれまでにない治療法の開発といった応用研究への発展も期待できる。

研究成果の概要（英文）：Recent studies reveal that reactive sulfur species (RSS) functions as a universal bioactive substance in the physiology of nearly all organisms; however, its signaling mechanisms remain unclear. In this study, I aimed to elucidate the fundamental process from RSS metabolism to transcriptional regulation of the signaling mechanism originating from the RSS-responsive transcription factor SqrR, which was identified from photosynthetic bacteria. Several RSS metabolizing enzymes involved in SqrR-mediated transcriptional regulation were identified and the intracellular dynamics of RSS involved in SqrR regulation was clarified.

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 ポリスルフィド 硫黄代謝 細菌

### 1. 研究開始当初の背景

生物にとって毒である硫化水素は、生体内で生合成されて様々な生理機能の調節にも関わる「諸刃の剣」であることがわかってきた。例えば、硫化水素がミトコンドリアの Sulfide:Quinone Reductase (SQR) の基質となってマウスの人工冬眠を誘導することや、イオウ由来の還元物質の蓄積が線虫の寿命を延ばすことなどが報告されている。動物に限らず、硫化水素雰囲気下に置いた植物の葉の老化が抑制されることや、大腸菌が抗生物質への抵抗性を示すために硫化水素が必要であることが示されている。さらに、硫化水素やイオウ代謝の過程で、チオール基を持つ低分子に過剰なイオウ原子が付加したポリスルフィド類である“活性イオウ分子種 (RSS)”が生成され、それらが細胞内シグナル物質の実体として機能することも明らかとなってきた(図1)。このように、RSS による生理活性機能の調節が生物普遍的に重要な現象であることが、近年の研究から急速に明らかになってきた。しかし、細胞内の硫化水素・RSS のシグナル伝達の詳細は依然不明のままであった。

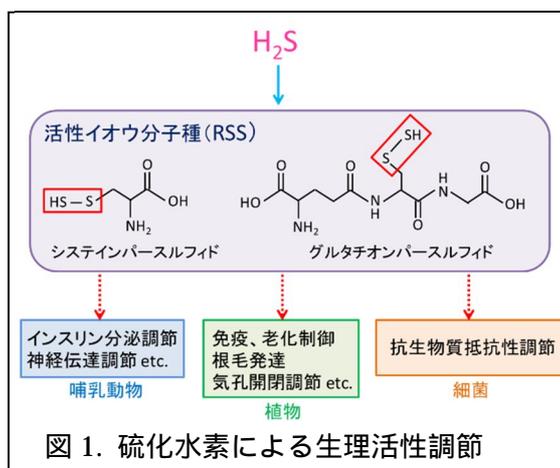


図1. 硫化水素による生理活性調節

このような背景の下、申請者は、硫化水素関連研究に新しい潮流を巻き起こすことができると考え、硫化水素を電子供与体に光合成を行う紅色光合成細菌を用いて、RSS 応答性転写因子 SqrR を同定し、その分子機構の解明に成功した。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ことで、RSS に応答した転写制御を行う(図2)。

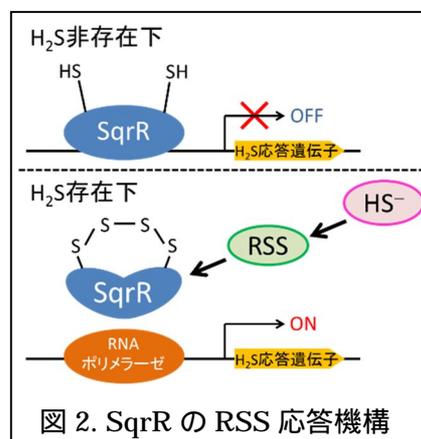


図2. SqrR の RSS 応答機構

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 の生成機構、また、可逆的な転写制御を行う上での RSS 分解機構は明らかになっていない。SqrR のユニークな修飾(分子内テトラスルフィド結合)の選択性や特異性の高さがどのような分子機構により達成されているのかはよくわかっておらず、その解明は今後の課題として残されている。ジスルフィド結合などのよく知られているシステイン残基の酸化反応は、生体内の様々なシグナル伝達や酸化ストレスへの応答、さらにはタンパク質の正しい折り畳み構造の形成などに関与している。RSS によるシステイン修飾の特異性を解明することは、硫化水素・RSS 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。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、RSS シグナル伝達機構とそれに関わる RSS 代謝経路を解明することである。具体的には、申請者が同定した RSS 応答性転写因子 SqrR と、その制御を受ける RSS 代謝関連因子を研究の中心に据え、

- 1) SqrR のシステインを *in vivo* で修飾する RSS とその生成経路
- 2) RSS シグナル解消のための RSS・過イオウ化修飾の分解経路を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) SqrR 依存的な転写制御に関わる RSS 代謝系を同定するために、SqrR による転写制御を受ける RSS 代謝関連遺伝子の欠損株を作成し、硫化水素に応答した転写物量の変化に異常が生じるか解析する。また、この時の細胞内 RSS の網羅的な定量を行うことで、細胞内 RSS と転写制御の関係性を精査する。

(2) 同定された RSS 代謝関連酵素の酵素活性を測定し、細胞内 RSS 量の変化との関係を検証する。さらに、RSS 代謝関連酵素の欠損による影響が、細胞の RSS 処理によって相補されるか検証することで、SqrR 依存的な転写制御に関わる RSS の種類を推定する。

(3) SqrR による転写制御に関わると推定された RSS についての化学的性質を精査するために、SqrR と各種 RSS との反応性や修飾状態を解析する。

#### 4. 研究成果

##### (1) SqrR 依存的な RSS に応答した転写制御に関わる RSS 代謝関連酵素の同定

SqrR の転写活性を指標にして、逆遺伝学的に関連遺伝子の同定を試みた。その結果、硫黄転移活性を持つ 3 種類の酵素を同定した。1 つは主要な RSS 代謝酵素として知られる SQR であった。野生株を硫化水素処理すると、ポリスルフィド修飾の形成による SqrR の転写抑制活性の低下が生じ、少なくとも 2 時間はこの状態が維持された。一方で、*sqr* 欠損株では、60 分ほどで元の転写抑制状態に戻ってしまうことがわかった。さらに、細胞内 RSS 量を同様に経時的に定量した結果、転写物量変化と一致する変化が観察された。これより、SQR は、SqrR のポリスルフィド修飾を維持するための RSS の供給に寄与することが示された。つまり、SQR は SqrR の転写抑制活性を不活化し、転写促進状態を維持するために必要な代謝酵素であると言える。

残りの 2 つの RSS 代謝関連酵素については、SqrR のポリスルフィド修飾の解消を介して転写抑制状態に戻す経路に関与することが示唆された。1 つは、ロダネースの 1 種で RSS 代謝への寄与が考えられる。もう 1 つはチオレドキシンで、SqrR のポリスルフィド架橋を還元することで、SqrR の転写活性の調節に関わることがわかった。

##### (2) SqrR 依存的な転写制御に関わる RSS の種類の同定

SQR とロダネースの酵素活性を測定したところ、SQR は硫化水素の硫黄原子をシステインおよびグルタチオンに転移することで、RSS の一種であるシステインパーズルフィド (CysSSH) とグルタチオンパーズルフィド (GSSH) の合成活性をもつことがわかった。一方、ロダネースは、チオ硫酸の硫黄原子をユニバーサルなイオウ受容体であるシアン化カリウムに受け渡す硫黄転移活性をもつことがわかったが、生体内での基質は決定できなかった。

さらに、*sqr* 欠損株の硫化水素応答が、CysSSH や GSSH 処理によって野生株と似た状態に相補されるか検証したところ、CysSSH で処理をしたときのみ、野生株と同様に、硫黄化合物処理 2 時間後でも転写物量が維持されていた。したがって、SqrR による転写制御には、CysSSH がより優位に寄与することが示唆された。

##### (3) SqrR と各種 RSS の反応性の解析

SqrR は RSS によって 2 つのシステインの間で分子内ポリスルフィド架橋が形成されることで DNA 結合能が低下する。還元状態の SqrR-DNA 複合体に対して、CysSSH および GSSH で処理をしたときの解離速度を測定した。すると、CysSSH 処理は、GSSH 処理よりも 4 倍速い解離速度を示した。これより、SqrR は CysSSH とより速やかに反応することがわかった。

過去の解析から、SqrR を GSSH で処理するとテトラスルフィド架橋が形成されることがわかっている。今回、CysSSH による修飾状態を解析したところ、テトラ、ペンタ、ヘキサスルフィド架橋が混合した状態で、かつ、ペンタスルフィド架橋が最も多く形成されることがわかった。したがって、SqrR と CysSSH の反応は GSSH とのそれに比べてより複雑であることがわかった。

以上より、SqrR 依存的な RSS に応答した転写制御に関わる RSS 代謝のダイナミクスが明らかとなった (図 3)。細胞が外因性あるいは内因性の硫化水素 ( $H_2S/H_2S^-$ ) にさらされると、恒常的な代謝経路によって産生された超硫黄分子 ( $RSS_nH$ ,  $H_2S_n$ ,  $S_8$  など) によって、SqrR に分子内ポリスルフィド架橋構造が形成されて、硫化水素応答遺伝子に対する転写抑制活性が抑制される。その結果、硫化水素酸化酵素 SQR やロダネースなどの RSS 代謝酵素の発現が誘導される。SQR は誘導的な代謝経路として持続的に RSS の産生を行い、SqrR のポリスルフィド架橋構造を維持するための RSS を供給することで、硫化水素応答遺伝子の発現促進を持続する。一方で、反応性の高い RSS の高蓄積を避けるために、ロダネースなどの硫黄転移酵素によって超硫黄分子は還元される。これにより、細胞内の超硫黄分子濃度が低下し、SqrR による転写抑制状態が回復する。

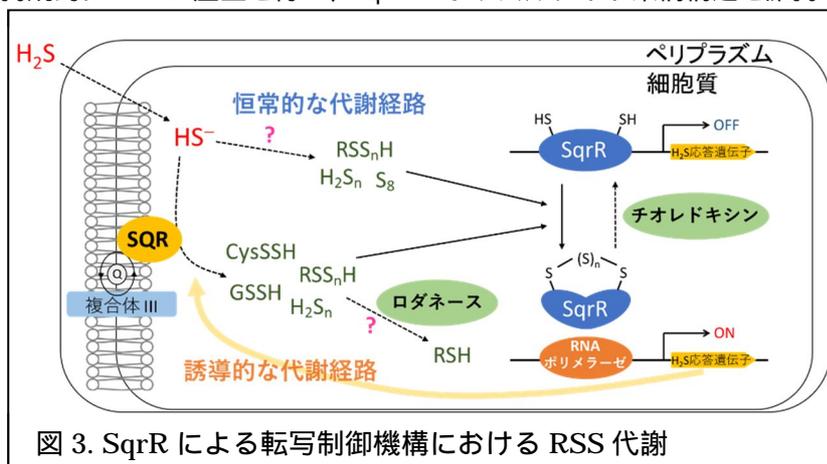


図 3. SqrR による転写制御機構における RSS 代謝

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 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shimizu Takayuki, Hashimoto Masaru, Masuda Tatsuru	4. 巻 12
2. 論文標題 Thioredoxin-2 Regulates SqrR-Mediated Polysulfide-Responsive Transcription via Reduction of a Polysulfide Link in SqrR	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 699 ~ 699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox12030699	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, Ida Tomoaki, Antelo Giuliano T, Ihara Yuta, Fakhoury Joseph N, Masuda Shinji, Giedroc David P, Akaike Takaaki, Capdevila Daiana A, Masuda Tatsuru	4. 巻 2
2. 論文標題 Polysulfide metabolizing enzymes influence SqrR-mediated sulfide-induced transcription by impacting intracellular polysulfide dynamics	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 pgad048
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pnasnexus/pgad048	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 Balasubramanian Rajalakshmi, Hori Koichi, Shimizu Takayuki, Kasamatsu Shingo, Okamura Kae, Tanaka Kan, Ihara Hideshi, Masuda Shinji	4. 巻 11
2. 論文標題 The Sulfide-Responsive SqrR/BigR Homologous Regulator YgaV of Escherichia coli Controls Expression of Anaerobic Respiratory Genes and Antibiotic Tolerance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 2359 ~ 2359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox11122359	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, Aritoshi Toma, Beatty J. Thomas, Masuda Tatsuru	4. 巻 10
2. 論文標題 Persulfide-Responsive Transcription Factor SqrR Regulates Gene Transfer and Biofilm Formation via the Metabolic Modulation of Cyclic di-GMP in Rhodobacter capsulatus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 908 ~ 908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms10050908	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, 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 ~ 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17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、井田智章、Giuliano T. Antelo、井原雄太、増田真二、David P. Giedroc、赤池孝章、Daiana A. Capdevila、増田建
2. 発表標題 硫化水素依存的な光合成の転写制御に関わるポリスルフィド代謝の解析
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yingxi Chen, Kohji Nishimura, Yoshiharu Yamamoto, Yoshito Oka, Tomonao Matsushita, Takayuki Shimizu, Tatsuru Masuda
2. 発表標題 Light mediates transcription start sites of heme oxygenase 1 for a cytoplasmic heme decomposition bypass in Arabidopsis
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Zurina Osuman, Takayuki Shimizu, Tatsuru Masuda
2. 発表標題 Enhancement of accumulation of photosynthetic pigments and proteins during chloroplast biogenesis by sulfide in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩田健太郎、後藤千恵子、福村日向丸、清水隆之、丸山海成、古谷朋之、近藤侑貴、笠原博幸、増田建、石崎公庸、深城英弘
2. 発表標題 植物の器官発生におけるシトクロムb5様ヘム結合タンパク質RLFの機能解析
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高柳なつ、荒江星拓、高橋洋和、清水隆之、堀口吾朗、相田光宏、深城英弘、増田建、大谷美沙都
2. 発表標題 地上部ヘムシグナルはpre-mRNAスプライシング制御を介して側根形態を制御する
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takayuki Shimizu
2. 発表標題 Reactive sulfur species (RSS) metabolizing enzymes influence RSS sensing by impacting intracellular persulfide dynamics in bacteria
3. 学会等名 4th International Conference on Persulfide and Sulfur Metabolism in Biology and Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kae Okamura, Shingo Kasamatsu, Takayuki Shimizu, Shinji Masuda and Hideshi Ihara
2. 発表標題 Development of ionization-coupled cleavage of oxidized polysulfide structure (iCOPS): a novel detection method for oxidized polysulfide modifications on proteins
3. 学会等名 4th International Conference on Persulfide and Sulfur Metabolism in Biology and Medicine (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水隆之
2. 発表標題 紅色細菌をモデルとした超硫黄分子によるシグナル伝達機構の分子基盤
3. 学会等名 日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Zurina Osuman, Takayuki Shimizu, Tatsuru Masuda
2. 発表標題 Effect of Sulfide on phytochrome-dependent photomorphogenesis in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 第86回日本植物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yingxi Chen, Kohji Nishimura, Yoshiharu Yamamoto, Takayuki Shimizu, Tatsuru Masuda
2. 発表標題 Phytochromes mediated transcription start sites of heme oxygenase 1 in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 第86回日本植物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高柳なつ、荒江星拓、高橋洋和、清水隆之、堀口吾朗、相田光宏、深城英弘、増田建、大谷美沙都
2. 発表標題 ヘムシグナルによる側根形成制御にはpre-mRNAスプライシング制御が介在する
3. 学会等名 第86回日本植物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水隆之、有年統真、J. Thomas Batty、増田建
2. 発表標題 紅色光合成細菌における硫化水素応答性転写因子SqrRによるファージ様粒子GTAを介した遺伝子伝播の制御機構
3. 学会等名 第12回日本光合成学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有年統真、清水隆之、増田建
2. 発表標題 紅色光合成細菌におけるファージ様粒子GTAを介した遺伝子水平伝播の酸化ストレス応答性制御機構
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yingxi Chen, Kohji Nishimura, Yoshiharu Yamamoto, Takayuki Shimizu, Tatsuru Masuda
2. 発表標題 Light regulated transcription start sites of heme oxygenase 1 in Arabidopsis thaliana
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会
4. 発表年 2022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シグナル伝達機構の解明
3. 学会等名 第85回日本植物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高柳なつ、荒江星拓、高橋洋和、清水隆之、堀口吾朗、相田光宏、深城英弘、増田建、大谷美沙都
2. 発表標題 プラスチックシグナル依存的な側根形成制御におけるpre-mRNAスプライシングの役割
3. 学会等名 第85回日本植物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有年統真、清水隆之、増田建
2. 発表標題 硫化水素応答性転写因子SqrRによる酸化ストレスに応答した細菌性ファージ様粒子GTAの制御機構
3. 学会等名 第11回日本光合成学会
4. 発表年 2021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		
米国	インディアナ大学		