

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590527

研究課題名(和文) 内因性硫化水素イオンによるオートファジー制御とその生理機能の解明

研究課題名(英文) Regulation of autophagy by endogenously produced hydrogen sulfide anion and its physiological functions

研究代表者

藤井 重元 (FUJII, Shigemoto)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00325333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内消化機構であるオートファジーの誘導制御と細菌感染防御における硫化水素関連物質の役割に関する解析を行い、イオウ含有化合物であるシステインパーсульフィドとニトロ化環状ヌクレオチドである8-ニトロ-cGMPがオートファジーを介する細菌感染防御の制御に関与することを明らかにした。また、細菌が産生する硫化水素は、オートファジーの抑制により感染細胞内での菌の増殖に寄与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The present study revealed that a sulfur-containing compound cysteine persulfide and a nitrated cyclic nucleotide 8-nitro-cGMP are involved in the regulation of autophagy and antibacterial host defense. Also, it showed that hydrogen sulfide produced by bacteria inhibits the autophagy induction in host cells and may contribute to the growth of bacteria in infected cells.

研究分野：細菌学

キーワード：硫化水素 オートファジー 感染防御 細菌 病原性

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞内で生成される硫化水素 (H_2S) 関連物質が血管平滑筋弛緩作用や神経情報伝達機能を有していることが明らかになり、その細胞内シグナル伝達における役割が注目されている。哺乳類の細胞においては、システインの代謝にかかわるシスタチオニン-シンターゼ (CBS) やシスタチオニン-リアーゼ (CSE) などの酵素が硫化水素様物質を生成することが示唆されていたが、細胞内で内因性に生成する硫化水素関連物質がどのような生理機能を有しているのか、また、シグナル伝達制御にどのように関わるのか等については不明であった。

研究代表者らは、活性酸素および一酸化窒素 (NO) の細胞内シグナル伝達の分子機構とその感染防御における役割について研究をおこなってきた (Nature Chem Biol, 2007; J Immunol, 2009; J Biol Chem, 2010)。その中で、硫化水素イオン (HS^-) が、活性酸素・NO に関連する親電子シグナル分子と反応し、そのシグナル活性を制御していることを見出した。さらに、硫化水素イオンの生理機能に関する解析を進めたところ、ヒト肺がん A549 細胞において CBS を siRNA によりノックダウンすると、細胞内硫化水素イオン濃度の低下に伴い、細胞内消化機構であるオートファジーが促進することを見出した。

オートファジーは、オートファゴソームと呼ばれる小胞の形成とリソソーム融合による内容物の消化を含む一連の過程であり、蛋白質や細胞内小器官、貪食した細菌等を分解する細胞内処理機構である。オートファジーは、蛋白質の品質管理や、代謝、細菌に対する感染防御などに働いており、細胞の恒常性維持における重要性が明らかになってきている。オートファジーの生理機能と制御機構についての研究が急速に進んでいるが、細胞内 H_2S 産生とオートファジー誘導との関連については報告がなかった。

2. 研究の目的

本研究では、硫化水素の生理的機能の解明を目的として、細胞の恒常性維持に重要な役割を果たしているオートファジーに焦点をあて、その硫化水素イオンによる制御の分子機構を解析した。さらに、貪食された細菌のオートファジーによる細胞内消化に対する貪食細胞および細菌の産生する硫化水素関連物質の役割を解析し、感染防御と細菌の病原性の観点から、内因性硫化水素の生理的役割の解明に向けた研究をおこなった。

3. 研究の方法

(1) 哺乳類細胞内で生成する硫化水素関連物質によるオートファジーの制御機構を明らかにするために、各種培養細胞 (A549 ヒト肺がん細胞、RAW264.7 マウスマクロファージ細胞など) で siRNA による CBS や CSE のノックダウンをおこない、オートファジーの誘導

をオートファジーマーカー蛋白質 LC3-II のウエスタンブロット、および共焦点レーザー顕微鏡による細胞内顆粒 (オートファゴソーム) 形成の観察により解析した。上記細胞に硫化水素放出試薬である NaHS を添加し、同様の方法にてオートファジーの解析をおこなった。また、質量分析装置を用いて、CBS および CSE の酵素反応生成物を詳細に分析し、オートファジー誘導抑制の分子メカニズムについて解析した。

(2) 細菌感染細胞の細胞内殺菌におけるオートファジーおよび硫化水素の役割を調べるために、マクロファージ (RAW264.7 細胞、マウス骨髄マクロファージなど) にネズミチフス菌 (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) を感染させ、感染後のオートファジー誘導の解析と細胞内生菌数の定量をおこなった。感染細胞に NaHS を添加し、オートファジー誘導および菌の増殖に対する硫化水素の作用を調べた。また、細菌感染に伴うオートファジー誘導の分子メカニズムとして、活性酸素と NO から生成する 2 次シグナル分子 8-ニトロ-cGMP の関与についての解析をおこなった。

(3) 細菌が産生する硫化水素がオートファジーによる感染防御に与える影響を調べるために、ネズミチフス菌の主要な硫化水素産生酵素である亜硫酸還元酵素 (Asr) およびチオ硫酸還元酵素 (Phs) をノックアウトした菌株を作製した。野生型および Asr/Phs ノックアウトネズミチフス菌株をマクロファージに感染させ、細胞内での菌の増殖とオートファジーの誘導を解析、比較した。

4. 研究成果

(1) A549 細胞や RAW264.7 細胞において、硫化水素関連物質の産生に関わる酵素である CBS や CSE をノックダウンすると、LC3-II の増加やオートファゴソーム形成の促進が観察され、オートファジーが誘導されることが分かった。また、これらの細胞に NaHS を添加するとオートファジーの誘導が抑制された。これらのことから、CBS や CSE により産生される硫化水素関連物質がオートファジー誘導を抑制していることが示唆された。

オートファジー誘導抑制の分子メカニズムを明らかにするために、CBS および CSE の酵素反応生成物を質量分析装置を用いて詳細に解析した。その結果、CBS や CSE はシステチンを基質として、システインのチオール基 (R-SH) に過剰にイオウ原子が付加した化合物 (R-(S)_n-SH) であるシステインパースルフィドを生成することが分かった。さらに、システインパースルフィドは、活性酸素と NO から生成する 2 次シグナル分子 8-ニトロ-cGMP を代謝・分解することにより細胞内シグナル制御に関わることを明らかにした (PNAS, 2014)。これらの成果は、硫化水素関連物質の生理機能の本態を明らかにしたものとして、PNAS 誌のコメンタリー欄をはじめ

め多数の学術誌で紹介され、大きな注目を集めた。

(2) マクロファージにネズミチフス菌を感染させると、活性酸素と NO の産生に伴いオートファジーの誘導が観察された。NaHS で処理をしたマクロファージではオートファジーの誘導が著明に抑制され、細胞内での菌の増殖が非処理細胞に比べて有意に増加した。これらのことから、ネズミチフス菌の細胞内殺菌においてオートファジーが重要な役割を果たしており、硫化水素関連物質が細菌感染に伴うオートファジー誘導を抑制することが示唆された。また、細菌感染によるオートファジー誘導の分子機構についての詳細な解析を行い、活性酸素と NO から生成する 8-ニトロ-cGMP が、オートファジー誘導と細胞内殺菌における細胞内メディエーターとして機能していることを明らかにした (Mol Cell, 2013)。この研究成果は、新しいオートファジー誘導機構の発見として、Mol Cell 誌の Preview 欄で紹介されるなど高い評価を受けた。

(3) 硫化水素産生酵素 (Asr, Phs) を欠損したネズミチフス菌株の作製に成功した。硫化水素産生酵素欠損ネズミチフス菌を感染させたマクロファージでは、野生型ネズミチフス菌を感染させた場合に比べ、オートファジーの誘導が著明に亢進した。硫化水素産生酵素欠損株の感染細胞内での増殖は、野生型菌株に比べて有意に低下していた。これらのことから、ネズミチフス菌が産生する硫化水素は、感染した宿主細胞のオートファジーを抑制することにより、感染細胞での菌の増殖に寄与していることが示唆された。これは、細菌が産生する硫化水素の新しい生理機能を示すものとして重要な知見と考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 18 件)

井田智章、藤井重元、赤池孝章. RSS による抗酸化・レドックスシグナル制御. **細胞工学**, 査読無, 34: 354-357 (2015). Kawamura Y, Tomida J, Morita Y, Fujii S, Okamoto T, Akaike T. Clinical and bacteriological characteristics of *Helicobacter cinaedi* infection. **J Infect Chemother**, 査読有, 20: 517-526 (2014). DOI: 10.1016/j.jiac.2014.06.007.

藤井重元、井田智章、澤 智裕、赤池孝章. フリーラジカル制御系：硫化水素・活性イオウ分子と炎症. **実験医学増刊号**, 査読無, 32: 2803-2809 (2014).

井田智章、赤池孝章、澤 智裕、藤井重元. 活性酸素と炎症. **感染・炎症・免疫**, 査読無, 44: 104-109 (2014).

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**, 査読有, 111: 7606-7611 (2014). DOI: 10.1073/pnas.1321232111.

Khan S, Rahman HN, Okamoto T, Matsunaga T, Fujiwara Y, Sawa T, Yoshitake J, Ono K, Ahmed KA, Rahaman MM, Oyama K, Takeya M, Ida T, Kawamura Y, Fujii S, Akaike T. Promotion of atherosclerosis by *Helicobacter cinaedi* infection that involves macrophage-driven proinflammatory responses. **Sci Rep**, 査読有, 4: 4680 (2014). DOI: 10.1038/srep04680.

赤池孝章、藤井重元、岡本竜哉、河村好章. ヘリコバクター・シネディ感染症. **臨床と微生物**, 査読無, 41: 21-25 (2014).

Rahaman MM, Sawa T, Ahtesham AK, Khan S, Inoue H, Irie A, Fujii S, Akaike T. S-Guanylation proteomics for redox-based mitochondrial signaling. **Antioxid Redox Signal**, 査読有, 20: 295-307 (2014). DOI: 10.1089/ars.2012.4606.

Ito C, Saito Y, Nozawa T, Fujii S, Sawa T, Inoue H, Matsunaga T, Khan S, Akashi S, Hashimoto R, Aikawa C, Takahashi E, Sagara H, Komatsu M, Tanaka K, Akaike T, Nakagawa I, Arimoto H. Endogenous nitrated nucleotide is a key mediator of autophagy and innate defense against bacteria. **Mol Cell**, 査読有, 52: 794-804 (2013). DOI: 10.1016/j.molcel.2013.10.024.

藤井重元、有本博一. 酸化ストレスとオートファジー. **医学のあゆみ**, 査読無, 247: 781-785 (2013).

Sawa T, Ihara H, Ida T, Fujii S, Nishida M, Akaike T. Formation, signaling functions, and metabolisms of nitrated cyclic nucleotide. **Nitric Oxide**, 査読有, 34: 10-18 (2013). DOI: 10.1016/j.niox.2013.04.004.

Fujii S and Akaike T. Redox signaling by 8-nitro-cyclic guanosine monophosphate: nitric oxide- and reactive oxygen species-derived electrophilic messenger. **Antioxid Redox Signal**, 査読有, 19: 1236-1246 (2013). DOI: 10.1089/ars.2012.5067.

Saito Y, Ito C, Fujii S, Sawa T, Akaike T, Arimoto H. Fluorescent probes for live cell imaging of endogenous guanine

nitration. *Chembiochem*, 査読有, 14: 1068-1071 (2013). DOI: 10.1002/cbic.201300129.

赤池孝章、藤井重元. レドックスシグナル制御と酸化ストレスバイオマーカー. **精神科救急**, 査読無, 16: 69-72 (2013).

Akaike T, Nishida M, Fujii S. Regulation of redox signaling by an electrophilic cyclic nucleotide. *J Biochem*, 査読有, 153: 131-138 (2013). DOI: 10.1093/jb/mvs145.

Oyama K, Khan S, Okamoto T, Fujii S, Ono K, Matsunaga T, Yoshitake J, Sawa T, Tomida J, Kawamura Y, Akaike T. Identification of and screening for human *Helicobacter cinaedi* infections and carriers via nested PCR. *J Clin Microbiol*, 査読有, 50: 3893-3900 (2012). DOI: 10.1128/JCM.01622-12.

Saito Y, Sawa T, Yoshitake J, Ito C, Fujii S, Akaike T, Arimoto H. Nitric oxide promotes recycling of 8-nitro-cGMP, a cytoprotective mediator, into intact cGMP in cells. *Mol Biosyst*, 査読有, 8: 2909-2915 (2012). DOI: 10.1039/c2mb25189b.

藤井重元、赤池孝章. 硫化水素と炎症. **感染・炎症・免疫**, 査読無, 42: 235-237 (2012).

[学会発表](計24件)

藤井重元 他. タンパク質 S-グアニル化を介したオートファジー誘導と細菌感染防御における役割. 第 88 回日本細菌学会総会、2015 年 3 月 26 - 28 日、長良川国際会議場 (岐阜県岐阜市)

藤井重元 他. 8-ニトロ-cGMP によるオートファジー誘導を介した感染防御機構と細菌由来硫化水素による抑制. 第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15 - 18 日、国立京都国際会館 (京都府京都市左京区)

藤井重元 他. タンパク質ポリサルファー化による酸化ストレス・レドックスシグナル制御. 生理学研究所研究会「新規シグナル伝達分子とその生理学的可能性」、2014 年 9 月 18 - 19 日、大学共同利用機関法人自然科学研究機構 NIPS 生理学研究所 1 階大会議室 (愛知県岡崎市)

藤井重元 他. 8-ニトロ-cGMP による cGMP 依存性プロテインキナーゼの持続的活性化とエンドトキシンショック病態への関与. 第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会、2014 年 9 月 4 - 5 日、同志社大学今出川キャンパス良心館 (京都府京都市上京区)

藤井重元 他. Nested PCR 法による健常者における新興感染症菌 *Helicobacter cinaedi* 感染のスクリーニング. 第 25 回日本生体防御学会学術総会、2014 年 7 月

9 - 11 日、東北大学 片平さくらホール (宮城県仙台市青葉区)

伊藤千秋、藤井重元 他. 8-ニトロ-cGMP によるオートファジーの誘導機構と細菌感染防御における役割. 第 46 回レンサ球菌研究会、2014 年 6 月 27 - 28 日、東京大学農学部弥生キャンパス内フードサイエンス棟中島董一郎記念ホール (東京都文京区)

Shigemoto Fujii, et al. 8-Nitro-cGMP-mediated autophagy in host defense and its regulation by hydrogen sulfide produced by bacteria. 8th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Application of Nitric Oxide, June 16 - 20, 2014, Renaissance Cleveland Hotel, Cleveland (USA)

井上博文、藤井重元 他. H-Ras の S-グアニル化を介したオートファジーのレドックス制御. 第 14 回日本 NO 学会学術集会、2014 年 5 月 16 - 17 日、ホテルニューオータニ佐賀 (佐賀県佐賀市)

藤井重元 他. 細菌の新しいシグナル伝達物質 8-ニトロ-cGMP の同定と機能解析. 第 14 回日本 NO 学会学術集会、2014 年 5 月 16 - 17 日、ホテルニューオータニ佐賀 (佐賀県佐賀市)

Shigemoto Fujii, et al. Formation and signaling functions of 8-nitro-cGMP in bacteria. 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International、2014 年 3 月 23 - 26 日、国立京都国際会館 (京都府京都市左京区)

藤井重元、シャザダ カーン、岡本竜哉、松永哲郎、小野勝彦、井田智章、澤 智裕、赤池孝章. 8-ニトロ-cGMP を介するオートファジーによる細菌感染防御機構と硫化水素による制御. 第 19 回 MPO 研究会、2013 年 10 月 25 - 26 日、国立国際医療研究センター大会議室 (東京都新宿区)

藤井重元、Khan Shahzada、松永哲郎、小野勝彦、井田智章、澤 智裕、赤池孝章. タンパク質 S-グアニル化を介したオートファジーによる細菌感染防御機構と硫化水素による制御. 第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 - 13 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市西区)

藤井重元、Khan Shahzada、松永哲郎、小野勝彦、井田智章、澤 智裕、赤池孝章. タンパク質 S-グアニル化を介した細菌感染防御機構と硫化水素による制御. 第 24 回日本生体防御学会学術総会、2013 年 7 月 10 - 12 日、くまもと森都心プラザ プラザホール (熊本県熊本市西区)

赤池孝章、藤井重元. ヘリコバクター・シネディ感染症. 第 19 回日本ヘリコバクター学会学術集会、2013 年 6 月 28 - 29 日、長崎大学医学部 良順会館・医学部

記念講堂・ポンペ会館（長崎県長崎市）
藤井重元、シャザダカーン、岡本竜哉、松永哲郎、小野勝彦、井田智章、澤 智裕、赤池孝章． ニトロ化環状ヌクレオチドにより誘導されるオートファジーによる感染防御機構と硫化水素による制御．第 13 回日本 NO 学会学術集会、2013 年 6 月 28 - 29 日、沖縄県医師会館（沖縄県南風原町）

藤井重元、Khan Shahzada、岡本竜哉、松永哲郎、小野勝彦、井田智章、澤 智裕、赤池孝章． オートファジーによる細菌感染防御機構と硫化水素による制御．第 66 回日本酸化ストレス学会学術集会、2013 年 6 月 13 - 14 日、ウインクあいち、（愛知県名古屋市中村区）

藤井重元、Shahzada Khan、岡本竜哉、藤原章雄、松永哲郎、H. N. Ashiqur Rahman、小山耕太、澤 智裕、竹屋元裕、赤池孝章． ヘリコバクター・シネディ感染による動脈硬化の促進作用．第 86 回日本細菌学会総会、2013 年 3 月 18 - 20 日、幕張メッセ（千葉県千葉市美浜区）

藤井重元、KA Ahmed、澤 智裕、小野勝彦、JR Burgoyne、井田智章、P Eaton、赤池孝章． The site specific Cys195 S-guanylation in protein kinase G1a responsible for persistent hypotension in sepsis．第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 14 - 16 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡（福岡県福岡市）

Shigemoto Fujii, Khandaker Ahtesham Ahmed, Tomohiro Sawa, Hideshi Ihara, Shingo Kasamatsu, Jun Yoshitake, Md. Mizanur Rahaman, Tatsuya Okamoto, Takaaki Akaike. Regulation by mitochondrial superoxide and NADPH oxidase of cellular formation of nitrated cyclic GMP: Potential implications for NO and ROS signaling. The 7th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Application on Nitric Oxide, July 22 - 26, 2012, Edinburgh (UK)

Shigemoto Fujii, Tomohiro Sawa, Motohiro Nishida, Hirofumi Inoue, Takaaki Akaike. Hydrogen sulfide regulates H-Ras-induced autophagy. The 33rd Naito Conference on Oxygen Biology: Hypoxia, Oxidative Stress and Diseases, June 26 - 29, 2012, CHÂTERAISÉ Gateaux Kingdom SAPPORO（北海道札幌市）

〔図書〕（計 4 件）

藤井重元． 2.10 オートファジー． **毒性の科学 分子・細胞から人間集団まで**（熊谷嘉人、姫野誠一郎、渡辺知保 編）東京大学出版会、p.68-71（2014）．

赤池孝章、藤井重元． 第 6 章：活性酸素は情報伝達分子． **活性酸素の本当の姿**（鈴木敬一郎 編）有限会社 ナップ、p.97-112（2014）．

赤池孝章、藤井重元． 第 9 章：劇症型 ARDS の動物モデル． **重症新型インフルエンザ診断と治療の手引：鳥インフルエンザウイルスはヒトに感染する、メディカル・サイエンス・インターナショナル社**、p.147-157（2013）．

藤井重元、赤池孝章． NO シグナリング NO signaling． **イラストで徹底理解するシグナル伝達キーワード事典**（山本 雅、仙波憲太郎、山梨裕司 編）羊土社、p.67-69（2012）．

〔その他〕

所属研究室のホームページ：

<http://www.toxicosci.med.tohoku.ac.jp/>

6．研究組織

(1) 研究代表者

藤井 重元 (FUJII, Shigemoto)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号： 00325333