

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03115

研究課題名(和文)細菌における活性イオウ分子の代謝機構とその抗菌剤感受性制御の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular mechanisms for metabolisms of bacterial reactive sulfur species: implication in antibacterial resistance

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：システインパースルフィドは、システインのチオール側鎖に、さらに過剰なイオウ原子が付加したアミノ酸誘導体である。本研究では、これまでほとんどわかっていなかった細菌でのパースルフィド分子の生成動態の解明を目指した。その結果、調べたすべてのグラム陰性菌において、システインパースルフィド、グルタチオンパースルフィドが内因性に生成していること、さらに細菌のパースルフィドが活性酸素に対して防御的に作用していることが示唆された。以上の結果より、パースルフィドは細菌の酸化ストレス抵抗性に大きく寄与しており、パースルフィド生成機構は抗菌治療の新しい標的となりうることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Antioxidative machineries that eliminate reactive oxygen species are of great benefit to bacteria to grow aerobically and to escape from oxygen-dependent bacterial killing by macrophages. Cysteine persulfide and glutathione persulfide are present abundantly in mammalian cells and act as potent antioxidants. Here we investigated the occurrence of persulfide in Gram-negative bacteria. Roles of persulfide species on bacterial resistance against oxidative stress was studied. Cysteine persulfide and glutathione persulfide/trisulfide were detected in all bacteria studied. Treatment of *Salmonella Typhimurium* with persulfide donors significantly increased intracellular persulfide levels. More importantly, persulfide boosted bacteria became highly resistant against oxidative stress-mediated bacterial killing induced by hydrogen peroxide challenging and by macrophages. These data suggest the importance of reactive persulfides in bacterial resistance against oxidative stress.

研究分野：細菌学

キーワード：生体機能物質 活性イオウ分子 酸化ストレス 抗生物質 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

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側鎖 (Cys-SH) に、さらに過剰なイオウ原子 (S) が付加したアミノ酸誘導体である。我々は、質量分析法を基盤としたシステインパースルフィドおよび関連分子に対する特異的かつ高感度な検出法を構築し、哺乳細胞におけるシステインパースルフィドを解析した結果、マウス、ヒトをはじめ哺乳細胞中に普遍的に存在すること、さらにシステインパースルフィドは、グルタチオンパースルフィド (GSSH) やタンパク質パースルフィド (Prot-SSH) など多彩な分子形態で存在することを世界に先駆けて明らかにした¹⁾。さらに、パースルフィドは元のチオールにわずかに1つのイオウ原子が付加しただけにも関わらず、その還元力や求核性が著しく高まっており、活性酸素のみならず内因性・外因性の親電子物質を強力に分解するいわゆる「活性イオウ」として重要な役割を担っていることを見出した^{1, 2)}。近年ではさらに、パースルフィドが様々な生理機能に密接に関わることが明らかになりつつある。一方、これまで細菌においてシステインパースルフィドの生成が示唆されているものの、実際にどのような分子種 (システイン、ホモシステイン、グルタチオン、あるいはペプチドやタンパク質など) が、どの程度の濃度存在し、さらにどのような代謝機構によって制御されているのかについては、ほとんど分かっていなかった。さらに細菌におけるパースルフィドが、細菌の活性酸素や酸化ストレスの制御にどのように関わっているのかについては全く解析が進んでいなかった。

2. 研究の目的

本研究では、システインパースルフィドを中心とする活性イオウ分子のハイスループット解析法を構築し、すでに確立した質量分析に基づく同定・精密定量と、大腸菌の網羅的遺伝子欠損株を駆使して、これまでほとんどわかっていない細菌における活性イオウ分子の代謝 (生成、分解) 機構を解明することを目的とした。さらに近年明らかになりつつある抗菌剤の殺菌機構における活性酸素の作用に対して、活性イオウ分子がどのように関わっているのか、その分子基盤を明らかにし、新しい抗菌剤感受性の制御機構の解明に向けた研究を推進した。

3. 研究の方法

(1) 菌体内パースルフィドの定量: グラム陰性菌 (大腸菌、ネズミチフス菌など) を LB 培地に接種し、4 時間静置培養した。遠心にて菌体を集め、生理食塩水にて菌体を洗浄した。チオール特異的アルキル化剤 (モノプロモビマンあるいはヒドロキシフェニルヨードアセトアミド) メタノール溶液を菌体沈殿に加え、超音波で菌体を破砕した。上清を回収して、希釈後、タンデム質量分析にて各種パースル

フィド関連分子を定量した。またメタノールで沈殿した成分のタンパク質を定量した。

(2) パースルフィドドナーによる菌体内パースルフィドの増加効果: アセチルシステインを骨格として有する新しいパースルフィドドナーを合成した。そのドナー試薬で菌体を処理し、菌体内のパースルフィド含量が増加するかどうかを上述したタンデム質量分析法にて検討した。

(3) パースルフィドの増加による酸化ストレス抵抗性の検討: 上記(2)で合成したパースルフィドドナーで菌体を処理し、その過酸化水素による殺菌効果に対する抵抗性を解析した。

(4) マクロファージによる殺菌作用に対するパースルフィドドナーの作用解析: マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞に、パースルフィド含量を増やした菌を感染させ、細胞内での殺菌作用に対する抵抗性の変化を解析した。

4. 研究成果

調べた 8 種すべてのグラム陰性菌においてシステインパースルフィド、グルタチオンパースルフィドが存在することが明らかになった。イオウ代謝関連酵素を欠損した大腸菌を解析した結果、これまで硫化水素を生成すると報告されていた mercaptopyruvate sulfurtransferase (sseA) 欠損株は野生型に比べて、これまでの報告とは逆に硫化水素を多く産生すること結果となった。この点についてはさらなる検討を進めている。ネズミチフス菌をパースルフィドドナーで処理すると、菌体内のパースルフィド含量が著明に増加した。さらにパースルフィドが増加した細菌は、過酸化水素による殺菌作用に顕著に抵抗性を示した。またマクロファージによる食作用に対しても抵抗性を示した。一方、タンパク質翻訳に関わる酵素である cysteinyl-tRNA synthetase (CARS) が、システインを基質としてシステインパースルフィドを直接合成する活性を有することが明らかとなった。これまでグラム陰性菌では、哺乳類のシステインパースルフィド合成に関わることが示唆されている cystathionine γ -lyase や cystathionine β -synthase をもたないものが多くあり、グラム陰性菌でのパースルフィド合成経路は不明な点が多く残されていた。CARS はグラム陰性菌に発現しており、菌体内でのパースルフィド合成に重要な役割を担っている可能性が示唆された。以上の結果より、パースルフィドは細菌の酸化ストレス抵抗性に大きく寄与しており、パースルフィド生成機構は抗菌治療の新しい標的となりうることを期待される。

<引用文献>

- ① 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, N. O., Xian, M., Fukuto, J. M., and Akaike, T.

Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111: 7606-7611, 2014.

- ② Ono, K., Akaike T., Sawa, T., Kumagai, Y., Wink, D. A., Tantillo, D. J., Hobbs, A. J., Nagy, P., Xian, M., Lin, J., Fukuto, J. The redox chemistry and chemical biology of H₂S, hydropersulfides and derived species: implications to their possible biological activity and utility. *Free Radic. Biol. Med.*, 77: 82-94, 2014.

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 23 件)

- ① Masuda, K., Tsutsuki, H., Kasamatsu, S., Ida, T., Takata, T., Sugiura, K., Nishida, M., Watanabe, Y., Sawa, T., Akaike, T. and Ihara, H. Involvement of nitric oxide/reactive oxygen species signaling via 8-nitro-cGMP formation in 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells and rat cerebellar granule neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 495: 2165, 2018. 査読有 DOI: 10.1246/cl.171022.
- ② Kyaw, K., Motoyama, N., Ichimura, H., Arada, A., Morimura, S., Ono, K., Tsutsuki, H., Sawa, T., Miyazawa, Y., Mizoguchi, D., Niidome, T. A simple PLGA-AgNPL film for antibiofilm formation by contact bactericidal activity. *Chem. Lett.*, 47: 308-310, 2018. 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.12.088.
- ③ Sawa, T., Ono, K., Tsutsuki, H., Zhang, T., Ida, T., Nishida, M., Akaike, T. Reactive cysteine persulfides: occurrence, biosynthesis, antioxidant activity, methodologies, and bacterial persulfide signalling. *Adv Microb Physiol.*, in press. 査読有 DOI: 10.1016/bs.ampbs.2018.01.002.
- ④ 澤 智裕, 赤池孝章. 活性イオウによる生体防御応答、エネルギー代謝と寿命制御. 実験医学 (増刊), 36: 17-23, 2018.
- ⑤ Akaike, T., Ida, T., Wei, F.Y., Nishida, M., Matsunaga, T., Alam, M., Kasamatsu, S., Nishimura, A., Morita, M., Tomizawa, K., Nishimura, A., Sawa, T., Ihara, H., Inaba, K., Shima, H., Tanuma, N., Jung, M., Fujii, S., Nagy, P., Feelisch, M., Fukuto, J.M., Motohashi, H. and Kumagai, Y. Cysteinyl-tRNA synthetase governs protein polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nature Commun.*, 8: 1177, 2017. 査読有 DOI: 10.1038/s41467-017-01311-y.
- ⑥ Ahmed, K. A., Zhang, T., Ono, K., Tsutsuki, H., Ida, T., Akashi, S., Miyata, K., Oike, Y., Akaike, T. and Sawa, T.* Synthesis and characterization of 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphorothioate Rp-isomer as a potent inhibitor for protein kinase G1a. *Biol. Pharm. Bull.*, 40: 365-374, 2017. 査読有 DOI: 10.1248/bpb.b16-00880.
- ⑦ Ono, K., Jung, M., Zhang, T., Tsutsuki, H., Sezaki, H., Ihara, H., Wei, F.Y., Tomizawa, K., Akaike, T. and Sawa, T. Synthesis of L-cysteine derivatives containing stable sulfur isotopes and application of this synthesis to reactive sulfur metabolome. *Free Radic. Biol. Med.*, 106: 69-79, 2017. 査読有 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.023.
- ⑧ Ihara, H., Kitamura, A., Kasamatsu, S., Ida, T., Tsutsuki, H., Sawa, T., Watanabe, Y. and Akaike, T. Superoxide generation from nNOS splice variants and its potential involvement in redox signal regulation. *Biochem. J.*, 474: 1149-1162, 2017. 査読有 DOI: 10.1042/BCJ20160999.
- ⑨ Kunikata, H., Ida, T., Sato, K., Aizawa, N., Sawa, T., Tawarayama, H., Murayama, N., Fujii, S., Akaike, T. and Nakazawa, T. Metabolomic profiling of reactive persulfides and polysulfides in the aqueous and vitreous humors. *Sci. Rep.*, 7: 41984, 2017. 査読有 DOI: 10.1038/srep41984.
- ⑩ Kyaw, K., Harada, A., Ichimaru, H., Kawagoe, T., Yahiro, K., Morimura, S., Ono, K., Tsutsuki, H., Sawa, T. and Niidome, T. Silver nanoparticles as potential antibiofilm agents against human pathogenic bacteria. *Chem. Lett.*, 46: 594-596, 2017. 査読有 DOI: 10.1246/cl.161198.
- ⑪ Ikeda, M., Ishima, Y., Shibata, A., Chuang, V.T.G., Sawa, T., Ihara, H., Watanabe, H., Xian, M., Ouchi, T., Shimizu, T., Ando, H., Ukawa, M., Ishida, T., Akaike, T., Otagiri, M., and Maruyama, T. Quantitative determination of polysulfide in albumins, plasma proteins and biological fluid samples using a novel combined assays approach. *Anal. Chim. Acta*, 969: 18-25, 2017. 査読有 DOI: 10.1016/j.aca.2017.03.027.
- ⑫ Takahashi, N., Wei, F., Watanabe, S., Ohuchi, Y., Fujimura, A., Kaitsuka, T., Sawa, T., Nakayama, H., Akaike, T. and Tomizawa, K. Reactive sulfur species regulate tRNA methylthiolation and contribute to insulin secretion. *Nucleic Acids Res.*, 45: 435-445, 2017. 査読有 DOI: 10.1093/nar/gkw745.
- ⑬ Ihara, H., Kasamatsu, S., Kitamura, A., Nishimura, A., Tsutsuki, H., Ida, T., Ishizaki, K., Toyama, T., Yoshida, E., Abdul Hmid H., Jung, M., Matsunaga, T., Fujii, S., Sawa, T., Nishida, M., Kumagai, Y., and Akaike, T. Exposure to electrophiles impairs reactive persulfide-dependent redox signaling in neuronal cells. *Chem. Res. Toxicol.*, 30: 1673-1684, 2017. 査読有 DOI: 10.1021/acs.chemrestox.7b00120.
- ⑭ Hoshino, M., Kaneko, K., Miyamoto, Y.,

- Yoshimura, K., Suzuki, D., Akaike, T., Sawa, T., Ida, T., Fujii, S., Ihara, H., Tanaka, J., Tsukuura, R., Chikazu, D., Mishima, K., Baba, K., and Kamijo, R. 8-Nitro-cGMP promotes bone growth through expansion of growth plate cartilage. *Free Radic. Biol. Med.*, 110: 63-71, 2017. 査読有 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.05.022.
- ⑮ Akashi, S., Ahmed, K. A., Sawa, T.,* Ono, K., Tsutsuki, H., Burgyne, J. R., Ida, T., Horio, E., Prsyazhna, O., Oike, Y., Rahaman, M. Md., Eaton, P., Fujii, S. and Akaike, T. Persistent activation of cGMP-dependent protein kinase by a nitrated cyclic nucleotide via site specific protein S-guanylation. *Biochemistry*, 55: 751-761, 2016. 査読有 DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00774.
- ⑯ Tsutsuki, H., Jung, M., Zhang, T., Ono, K., Ida, T., Kunieda, K., Ihara, H., Akaike, T. and Sawa, T.* Endogenous occurrence of protein S-guanylation in *Escherichia coli*: target identification and genetic regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 478: 7-11, 2016. 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.07.
- ⑰ Jung, M., Kasamatsu, S., Matsunaga, T., Akashi, S., Ono, K., Nishimura, A., Morita, M., Hamid, H. A., Fujii, S., Kitamura, H., Sawa, T., Ida, T., Motohashi, H. and Akaike, T.* Protein polysulfidation-dependent persulfide dioxygenase activity of ethylmalonic encephalopathy protein 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 480: 180-186, 2016. 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.10.022.
- ⑱ 井田智章、松永哲朗、藤井重元、澤 智裕、赤池孝章. 活性イオウ含有分子の再発見とその生物活性. 日本薬理学雑誌, 147: 278-284, 2016.
- ⑲ Kunieda, K., Tsutsuki, H., Ida, T., Kishimoto, Y., Kasamatsu, S., Sawa, T., Goshima, N., Itakura, M., Takahashi, M., Akaike, T. and Ihara, H.* 8-Nitro-cGMP enhances SNARE complex formation through S-guanylation of Cys90 in SNAP25. *ACS Chem. Neurosci.*, 6: 1715-1725, 2015. 査読有 DOI: 10.1021/acschemneuro.5b00196.
- ⑳ Honda, K., Yamada, N., Yoshida, R., Ihara, H., Sawa, T., Akaike, T. and Iwai, S.* 8-Mercapto-cyclic GMP mediates hydrogen sulfide-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.*, 56: 1481-1489, 2015. 査読有 DOI: 10.1093/pcp/pcv069.
- ㉑ Shinkai, Y., Abiko, Y., Ida, T., Miura, T., Kakehashi, H., Ishii, I., Nishida, M., Sawa, T., Akaike, T. and Kumagai, Y.* Reactive sulfur species-mediated activation of the Keap1-Nrf2 pathway by 1,2-naphthoquinone through sulfenic acids formation under oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.*, 28: 838-847, 2015. 査読有 DOI: 10.1021/tx500416y.
- ㉒ 津々木博康、小野勝彦、澤 智裕. 細菌の硫化水素・RSSの代謝シグナル制御. 細胞工学, 34: 392-395, 2015.
- ㉓ 河村好章、富田純子、岡本竜哉、澤 智裕、赤池孝章. *H. cinaedi*と敗血症. 臨床と微生物, 42: 177-182, 2015.
- [学会発表] (計12件)
- ① 澤 智裕. 活性イオウ分子による抗酸化システム制御. 第15回日本NO学会学術集会(特別講演), 2015年6月27日, 大阪.
- ② 澤 智裕. 酸化ストレスを抑える新しい分子の発見: 炎症性疾患治療への展開を目指して. 第9回アトピー・乾癬学術講演会(指定講演), 2016年1月28日, 熊本.
- ③ Sawa, T. Cysteine persulfides provide antioxidative resistance in bacteria to survive under oxidative stress conditions. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, May 20-22, 2016, Sendai, Japan.
- ④ 澤 智裕. 親電子性ヌクレオチドによるcGMP依存性プロテインキナーゼのシステイン残基修飾を介した制御機能. 第16回日本蛋白質科学年會(シンポジウム), 2016年6月7-9日, 福岡.
- ⑤ 澤 智裕. 親電子性ヌクレオチドによる細胞内レドックス調節機構とその制御. 第43回日本毒性学会学術集会(シンポジウム), 2016年6月29日-7月1日, 名古屋.
- ⑥ 澤 智裕. 活性イオウによる酸化ストレス制御の分子機構. 第69回日本酸化ストレス学会学術集会(シンポジウム), 2016年8月30-31日, 仙台.
- ⑦ 澤 智裕. 活性イオウによる酸化ストレス制御の分子機構. 第89回日本生化学会大会(シンポジウム), 2016年9月25-27日, 仙台.
- ⑧ 澤 智裕、赤池孝章. Exposome and sulfur metabolome. 第90回日本細菌学会総会(シンポジウム), 2017年3月21日, 仙台.
- ⑨ 澤 智裕. 活性イオウによる酸化ストレス応答制御とレドックスシグナル伝達. 平成29年度日本生化学会九州支部例会(シンポジウム), 2017年5月13日, 宮崎.
- ⑩ 澤 智裕. 活性システインパースルフィドによる酸化ストレス応答制御. 第17回日本NO学会学術集会(シンポジウム), 2017年5月19日, 徳島.
- ⑪ 澤 智裕. システインパースルフィドによる抗酸化応答制御と環境毒性予防医学. 第44回日本毒性学会学術年會(シンポジウム), 2017年7月11日, 横浜.
- ⑫ 澤 智裕. 活性イオウ代謝を基軸とするエキスポーム研究の新展開. ConBio2017(ワークショップ), 2017年12月7日, 神

戸.

〔図書〕（計 2 件）

- ① Sawa, T. Oxidative stress regulation by reactive cysteine persulfides in inflammation. In: ***Chronic Inflammation: Elucidation and Control of the Mechanisms*** (K. Takatsu and M. Miyasaka eds), Springer, Tokyo, pp309-316, 2016.
- ② Sawa, T., Kumagai, Y. and Akaike, T. Regulation of redox signaling by a nitrated nucleotide and reactive cysteine persulfides. In: ***Nitric Oxide: Biology and Pathology Third Edition*** (L. J. Ignarro, B. A. Freeman eds), Academic Press, London, pp231-234, 2017.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：イオウ原子を同位体標識したシステイン及びシステイン誘導体の合成法の確立

発明者：小野勝彦、澤智裕

権利者：熊本大学

番号：特願 2016-090864

出願年月日：平成 28 年 4 月 28 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://kumadai-bisei.com>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

赤池孝章 (AKAIKE, Takaaki)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20231798

居原 秀 (IHARA, Hideshi)

大阪府立大学・理学系研究科・教授

研究者番号：60254447