

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870549

研究課題名(和文)新規環状ヌクレオチド8-SH-cGMPの生体内動態とその細胞内シグナル機能の解明

研究課題名(英文)Clarification of the endogenous formation of the novel cyclic nucleotide 8-SH-cGMP and its signaling function

研究代表者

井田 智章 (IDA, Tomoaki)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70570406

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)：活性酸素シグナルの2次メッセンジャーである8-ニトロ-cGMPの代謝産物8-SH-cGMPの生成動態や生成機構は不明である。本研究では質量分析装置を用いたメタボローム解析により、8-SH-cGMP生成レベルを定量化した。また、8-SH-cGMP生成機構を解析するなかで、システインのチオール基が過イオウ化したシステインパースルフィドに代表される活性イオウ分子種の生体内生成を明らかにし、これが8-ニトロ-cGMPを8-SH-cGMPに代謝することを示した。さらに、S-S-グアニル化(タンパク質のチオール基へのS-S結合を介したcGMP付加反応)を特異的に同定した。

研究成果の概要(英文)：The cyclic nucleotide 8-SH-cGMP is produced by the metabolism of 8-nitro-cGMP, which serves as a secondary messenger for NO and reactive oxygen species signaling. However, the mechanisms controlling the formation and levels of intracellular 8-SH-cGMP have not yet been identified. In this study, the principal investigator precisely quantified the formation of 8-SH-cGMP via a mass spectrometry-based metabolomic method. The results revealed that 8-SH-cGMP is produced from 8-nitro-cGMP via sulfhydration by reactive sulfur species generated from the cystathione beta-synthase and cystathionine gamma-lyase systems. Moreover, the formation of S-S-guanylation (cGMP adduction to the thiol group of the protein via disulfide linkage) was specifically identified using proteome analysis of S-polythiolation.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：8-SH-cGMP 8-ニトロ-cGMP 活性イオウ分子種 S-S-グアニル化 S-ポリチオール化タンパク質 タンパク質翻訳後修飾 酸化ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

生体内で過剰に生成する活性酸素種 (ROS) や一酸化窒素 (NO) に由来する活性酸化窒素種は酸化ストレスをもたらす様々な疾患に関わることが知られている。最近、ROS と NO の産生に依存して、生体内においてニトロ化環状ヌクレオチドである 8-ニトロ-cGMP が生成し、タンパク質中のシステイン残基へ cGMP 構造を付加するユニークなタンパク質翻訳後修飾 (S-グアニル化) を介して、酸化ストレス適応応答などの様々な細胞機能制御に関わることが分かってきた<sup>1,2)</sup>。

一方、研究代表者らは、8-ニトロ-cGMP の代謝・分解機構を探索していく中で、硫化水素産生酵素として知られているシスタチオン β シンターゼ (CBS) およびシスタチオン γ リアーゼ (CSE) の関与を見だし、さらに、*in vitro* の実験により硫化水素に由来する関連化合物 (sulfane sulfur など) が 8-ニトロ-cGMP と反応し、新規環状ヌクレオチド 8-SH-cGMP へ変換することを明らかにした<sup>3)</sup>。さらに、研究代表者らは 8-SH-cGMP が 8-ニトロ-cGMP と同様にタンパク質のシステイン残基と反応し、システイン残基に S-cGMP を付加する翻訳後修飾 (S-S-グアニル化) を行うことを見出した。S-S-グアニル化は S-グアニル化と異なり、酸化されたシステイン残基を標的とすること、および、還元反応による可逆性を有することなどを予備的に分かってきたことから、S-S-グアニル化は S-グアニル化とは異なるシグナル伝達に関わることが予想される。

### 2. 研究の目的

新規環状ヌクレオチド 8-SH-cGMP の生体内生成メカニズムとそのシグナル伝達機能の解明を目指し、8-SH-cGMP の生成動態の解析と S-S-グアニル化反応機構と標的タンパク質を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 生体内 8-SH-cGMP の生成動態の解析  
濃度既知の安定同位体標識 8-SH-cGMP を調製し、質量分析装置 (LC-MS/MS) と安定同位体希釈法を用いた 8-SH-cGMP 定量的解析システムを構築した。この方法を用いてマウスの脳、心臓、肝臓、腎臓、さらにリポ多糖と炎症性サイトカインにより刺激したラットグリオーマ細胞 C6 細胞株における 8-SH-cGMP 生成レベルを定量的に解析した。

#### (2) 8-SH-cGMP 生成機構の解明

システチンを基質に組換え CSE により生成されるシステインパーサルフィドによる 8-ニトロ-cGMP の代謝機構について、LC-MS/MS を用いたメタボローム解析を行った。

#### (3) S-S-グアニル化反応機能の解明

S-ポリチオール化モデルタンパク質として組換えグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) と 8-ニトロ-cGMP による

反応を抗 RS-cGMP 抗体を用いたウェスタンブロット法により検討した。一般に、タンパク質 S-グアニル化は還元剤に耐性を示す不可逆的な翻訳後修飾である。しかし、S-S-グアニル化は dithiothreitol などの還元剤処理により、ジスルフィド結合が切断されることが予想される。そこで、還元剤処理の有無により、S-S-グアニル化を検出・解析した。

#### (4) S-S-グアニル化タンパク質の同定

親電子性アルキル化剤である Methylsulfonyl Benzothiazole (MSBT) と CN-ビオチンを用いたビオチンスイッチアッセイ (tag switch-tag assay) と LC-Q-TOF を用いたプロテオーム解析により、S-ポリチオール化タンパク質を同定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 生体内における 8-SH-cGMP の生成動態の解明

LC-MS/MS と安定同位体希釈法を用いた 8-SH-cGMP 定量的解析システムにより、マウス各組織における 8-SH-cGMP 生成レベルを定量化した。その結果、腎臓以外の組織において cGMP を超えるレベルで 8-SH-cGMP が生成されていることが示された。さらに、リポ多糖と炎症性サイトカインで刺激した C6 細胞株において、刺激時間依存的に 8-SH-cGMP の生成が増加することが定量的に示された (図 1)。また、リポ多糖と炎症性サイトカインで刺激した C6 細胞株の 8-ニトロ-cGMP と 8-SH-cGMP 生成タイムプロファイルの相関関係が示唆された。

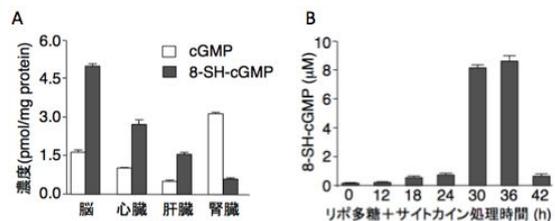


図1. マウス各組織における 8-SH-cGMP 生成レベル (A) と リポ多糖+サイトカイン処理 C6 細胞における 8-SH-cGMP 生成レベル (B)

#### (2) 8-SH-cGMP 生成機構の解明

研究代表者らは、8-ニトロ-cGMP の代謝機構に CBS や CSE が深く関与していることを報告してきたが、その詳細な機構については不明な点が多く残っている。そこで、8-SH-cGMP 生成機構を解析するために LC-MS/MS を用いた CBS、CSE 酵素反応におけるメタボローム解析を行った結果、CBS、CSE はシステチンを基質に CS リアーゼ活性により、システチンのチオール基にイオウ原子が付加したシステイン (ヒドロ) パースルフィドと呼ばれる活性イオウ分子種を非常に効率よく生成することが示された。さらに生体内ではシステインパーサルフィドだけでなく、グルタチオンなどのチール基が過イオウ化したグルタチオンパーサルフィドなどが高いレベルで生成されていることがわかった。活性イオウ分子種は、過剰なイオウ分子の付加により、システチンなどの単純なチオール化合物に比較して、よ

り強い求核性を有していることが示唆される(図2)。そこで、これらシステインパルスフィドによる8-ニトロ-cGMPの代謝を検討した結果、非常に効率よく8-ニトロ-cGMPを8-SH-cGMPへと代謝されることが示された(図3)。これらの結果より、活性イオウ分子種が真の8-ニトロ-cGMP代謝活性本態であることが示され、活性イオウ分子種はその高い求核性により、生体内の親電子物質の代謝に深く関与していることが示唆され、レドックスシグナルの重要なエフェクター分子として機能することが示唆された。

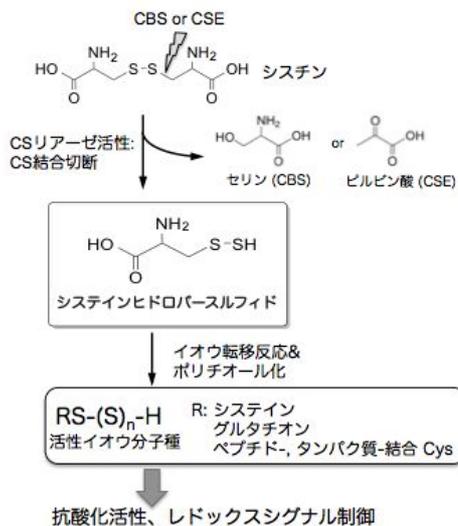


図2. CBS, CSEによるシステインパルスフィド生成と活性イオウ分子種の機能

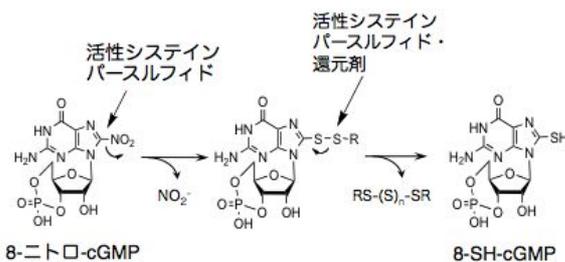


図3. 活性シスチンパルスフィドによる8-ニトロ-cGMPから8-SH-cGMPへの代謝機構

### (3) 新規タンパク質翻訳後修飾S-S-グアニル化反応機構の解明

低分子システイン残基だけでなく、タンパク質システイン残基も過イオウ化(タンパク質S-ポリチオール化)されていることがわかってきた。そこで、S-ポリチオール化モデルタンパク質としてグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)を用いて、8-ニトロ-cGMPによるS-S-グアニル化を検討した。その結果、還元剤処理により制御される可逆的翻訳後修飾S-S-グアニル化を特異的に検出した。これらの結果より、S-S-グアニル化は細胞内レドックスにより制御されることが示唆された。

### (4) 8-SH-cGMPによるS-S-グアニル化タンパク質の同定

S-ポリチオール化タンパク質と8-ニトロ-cGMPとの求核置換反応により、S-S-グアニル化が形成されることがわかってきた。そこで、ポリチオール化タンパク質を特異的に検出するtag switch tag法を構築した。このプロテオーム解析によりGAPDHをはじめとする様々なS-ポリチオール化タンパク質を同定した。実際、同定したS-ポリチオール化タンパク質のなかには、S-ポリチオール化モデルタンパク質として用いたGAPDHなどレドックス関連タンパク質が同定された。これらの結果より、レドックスシグナル伝達に関与した様々なタンパク質がS-ポリチオール化されていることが示され、S-ポリチオール化を介したレドックス制御機構が示唆された。

本研究を進める中で発見された活性イオウ分子種は生体内で極めて高い抗酸化活性を発揮することを発見し、今後、酸化ストレスに関連する多くの疾患の新しい予防法・診断法・治療法の確立へ大きく貢献するものと期待される。本研究の一部は、PNAS誌に掲載され<sup>4)</sup>、同誌のCommentaryやChemical Research in Toxicology誌のSpotlight等で取り上げられた他、科学論文データベースWeb of Scienceの高頻度引用文献およびホットペーパーに選ばれるなど、世界的に注目を浴びている。

### <引用文献>

- 1). Sawa T, et al. *Nature Chem Biol*, 2007
- 2). Fujii S, et al. *J Biol Chem*, 2010
- 3). Nishida M, et al. *Nature Chem Biol*, 2012
- 4). Ida T, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 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 10件)

笠松真吾、井田智章、藤井重元、赤池孝章. 活性イオウ分子による参加・ニトロ化ストレス制御. *Respiratory Medical Research*. 査読無. 3: 70-75. (2015).

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).

Shinkai Y, Abiko Y, Ida T, Miura T, Kakehashi H, 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*, 査読有. 28: 838-847, (2015), doi: 10.1021/tx500416y.

Nakano S, Ishii I, Shinmura K, Tamaki K, Hishiki T, Akahoshi N, Ida T, Nakanishi T, Kamata S, Kumagai Y, Akaike T, Fukuda K,

Sano M, and Suematsu M. Hyperhomocysteinemia abrogates fasting-induced cardioprotection against ischemia/reperfusion by limiting bioavailability of hydrogen sulfide anions. *J Mol Med*. 査読有. in press, (2015), doi: 10.1007/s00109-015-1271-5.

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: 131-137. (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, and 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, and Akaike T. Promotion of atherosclerosis by *Helicobacter cinaedi* infection that involves macrophage-driven proinflammatory responses. *Sci Rep*. 査読有. 15: 4680, (2014), doi: 10.1038/srep04680.

Sawa T, Ihara H, Ida T, Fujii S, Nishida M, and 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.

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: 16-21. (2014).

居原 秀、井田智章、赤池孝章. 活性酸素シグナルの調節機構？ROS 毒性説から脱却した新たな概念. *Fragrance Journal*. 査読無. 41: 75-80, (2013).

[学会発表](計14件)

井田智章、赤池孝章. 活性イオウ含有分子の再発見とその生物活性. 第88回日本薬理学会年会. 2015年3月18-20日. 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市熱田区)

井田智章、Md. Morshedul Alam、松永哲郎、藤井重元、居原 秀、本橋ほづみ、赤池孝章. 活性イオウ分子とADH3によるホルムアルデヒド解毒代謝機構. 第14回分子予防環境医学研究会. 2015年2月13-14日. 大阪市立大学医学部(大阪府・大阪市阿倍野区)

井田智章、澤 智裕、居原 秀、土屋幸弘、渡邊泰男、熊谷嘉人、末松 誠、本橋ほづみ、藤井重元、松永哲郎、山本雅之、

Ming Xian、Jon M Fukuto、赤池孝章. 活性システインパーサルファイドとS-ポリチオレーションが酸化ストレスを制御する. 第87回日本生化学会. 2014年10月15-18日. 国立京都国際会館(京都府・京都市左京区)

井田智章、澤 智裕、居原 秀、土屋幸弘、渡邊泰男、熊谷嘉人、藤井重元、松永哲郎、Jon M Fukuto、赤池孝章. 活性システインパーサルファイドによる酸化ストレス制御. 第67回日本酸化ストレス学会. 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)

井田智章、松永哲郎、赤司壮一郎、ジョン ミンギョン、津々木博康、藤井重元、居原 秀、澤 智裕、赤池孝章. 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)

井田智章、澤 智裕、居原 秀、土屋幸弘、渡邊泰男、熊谷嘉人、本橋ほづみ、藤井重元、松永哲郎、Ming Xian、Jon M Fukuto、赤池孝章. 活性イオウ分子種システインパーサルファイドによる酸化ストレス制御. 第8回レドックス・ライフイノベーション第170委員会. 2014年8月21-23日. シーガイアコンションセンター(宮城県・宮崎市)

Tomoaki Ida, Tomohiro Sawa, Hideshi Ihara, Yukihiro Tsuchiya, Yasuo Watanabe, Yoshito Kumagai, Hozumi Motohashi, Shigemoto Fujii, Tetsuro Matsunaga, Masayuki Yamamoto, Katsuhiko Ono, Jon M. Fukuto, Takaaki Akaike. Metabolism of 8-nitro-cGMP and regulation of electrophilic signaling by reactive sulfur species. Nitric Oxide-Nitrite/Nitrate Conference. 2014年6月16-20日. (Cleveland, Ohio, USA)

井田智章、澤 智裕、居原 秀、土屋幸弘、渡邊泰男、熊谷嘉人、本橋ほづみ、藤井重元、松永哲郎、Ming Xian、Jon M Fukuto、赤池孝章. 活性システインパーサルファイドとS-ポリチオレーションが酸化ストレスとレドックスシグナルを制御する. 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)

井田智章、松永哲郎、赤司壮一郎、ジョン ミンギョン、津々木博康、藤井重元、居原 秀、澤 智裕、赤池孝章. 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87回日本細菌学会総会. 2014年3月26-28日. タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

Tomoaki Ida, Tomohiro Sawa, Hideshi Ihara, Shingo Kasamatsu, Kohei Kunieda,

Shigemoto Fujii, Takaaki Akaike. Unique thiolation mechanism of a nitrated nucleotide involving sulfur metabolizing enzymes. 17<sup>th</sup> 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・京都市上京区)

Tomoaki Ida, Ahmed Khandaker Ahtesham, Tomohiro Sawa, Shigemoto Fujii, and Takaaki Akaike. Protein S-guanylation in cGMP binding domain of PKG: implication for persistent hypotension in sepsis. 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)

井田智章、澤 智裕、土屋幸弘、小野勝彦、藤井重元、渡邊泰男、居原 秀、赤池孝章. 新規レドックス制御因子：過イオウ化システイン誘導体のメタボローム解析. 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)

井田智章、澤 智裕、土屋幸弘、小野勝彦、藤井重元、渡邊泰男、居原 秀、赤池孝章. 生体内システインパースルフィドの生成動態とその生理機能の解析. 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)

井田智章、澤 智裕、居原 秀、赤池孝章. 過イオウ化システインメタボローム解析による新規レドックス制御機構の解明. 第66回日本酸化ストレス学会学術集会. 2013年6月13-14日. ウイングあいち (愛知県・名古屋市中村区)

#### 〔その他〕

東北大学大学院医学系研究科環境保健医学分野ホームページ

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

1

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

井田智章 (IDA, Tomoaki)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70570406