

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32624

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18994

研究課題名(和文) 活性イオウ分子産生酵素の翻訳後修飾とその役割

研究課題名(英文) Post-translational modification of reactive sulfur species producing enzymes

研究代表者

土屋 幸弘 (Tsuchiya, Yukihiro)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：30455406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：シスタチオニンβ-シントラーゼ(CBS)およびシスタチオニンγ-リアーゼ(CSE)は活性イオウ分子産生酵素として注目されているがそれ自身の翻訳後修飾に着目した研究はほぼない。本研究ではその翻訳後修飾に着目し研究を行った。

CBSのあるセリン残基の置換体を作製し活性を測定したところその活性は認められなかった。よってこの残基のリン酸化修飾がCBS活性を制御するものであると考えられる。CSEはS-ニトリシル化修飾について検討したところ、NOドナー依存的な活性制御を確認した。加えてS-ポリチオール化修飾による制御を確認した。これらはCBS、CSEの翻訳後修飾による制御の可能性を示した新たな知見である。

研究成果の概要(英文)：We investigated post-translational modification of reactive sulfur species producing enzymes, cystathionine beta-synthase (CBS) and cystathionine gamma-lyase (CSE).

We found that the serine-mutated CBS has no activity. Therefore, phosphorylation of the serine residue is crucial for its activity. Treatment of CSE with NO donor decreased its activity, and treatment with reactive sulfur species donor decreased its activity. These data indicate that CBS and CSE might be controlled by its post-translational modification.

研究分野：医歯薬学

キーワード：活性イオウ分子 翻訳後修飾

### 1. 研究開始当初の背景

活性イオウ分子はシステインにイオウが過剰に付加したシステインパースルフィドを代表とする「分子内の SH 基に多くのイオウが連なった分子」であり、非常に反応性が高い特徴がある。その存在や働きについては過去にいくつか報告されていたが、その詳細は不明であった。我々は最近、活性イオウ分子についてその生成過程や生体内での存在量、および作用について詳細に報告した。すなわち、生体内には数百  $\mu\text{M}$  という高濃度のシステインパースルフィドや、さらにイオウが付加したシステインポリスルフィドなどの活性イオウ分子が存在し、これらはシステインを基質としてシスタチオニン  $\beta$ -シターゼ (CBS) およびシスタチオニン  $\beta$ -リアーゼ (CSE) から産生されることを明らかにした。興味深いことに、システインパースルフィドなどの低分子の他にも、活性イオウ分子によりタンパク質の SH 基が修飾された S-ポリチオール化タンパク質の存在も明らかになった。多くのタンパク質についてその S-ポリチオール化修飾による制御が報告されている他、活性イオウ分子についての報告は近年爆発的に増加しておりその注目度は増す一方である。

### 2. 研究の目的

CBS および CSE は元来、メチオニンからシステインへの代謝経路に存在し、CBS はセリンとホモシステインからシスタチオンを生成する反応を、CSE はシスタチオンを分解してシステインを生成する反応を触媒する酵素であるが、加えて、近年 CBS および CSE ともに活性イオウ分子産生酵素として再注目されている。活性イオウ分子はその反応性の高さや機能の豊富さから現在ホットトピックとなっており、様々な論文が発表されているが、一方その産生酵素に着目した研究は少なく詳細は不明な点が多い。CBS および CSE の翻訳後修飾による制御に着目した研究はほとんど行われておらず、その解明は急務である。よって本研究では CBS および CSE の翻訳後修飾に着目し研究を行った。

### 3. 研究の方法

CBS および CSE についてその翻訳後修飾による制御メカニズムの解析を *in vitro* で行った。

#### (1) リコンビナント CBS、CSE およびそのアミノ酸置換体の作製

大腸菌発現系を用い、それぞれのリコンビナント酵素を作製した。また、常法によりそのアミノ酸置換体の作製を行った。

#### (2) 酵素活性の測定

CBS 活性は  $^{14}\text{C}$ -セリンを基質とした RI トレーサー法により測定した。CSE 活性は硫化水素検出蛍光プローブおよび活性イオウ分子検出蛍光プローブを用いた方法により測定した。

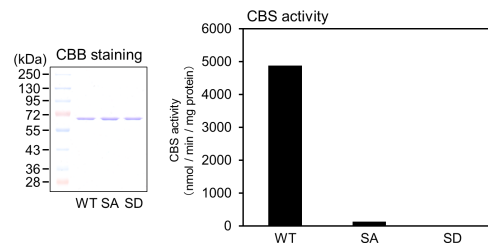
#### (3) CBS リン酸化部位特異的抗体の作製

CBS リン酸化部位特異的抗体はヒト CBS ペプチドを用い常法により作製した。

### 4. 研究成果

#### (1) シスタチオニン $\beta$ -シターゼ (CBS)

CBS はその活性に影響を与えるリン酸化修飾の探索を行った。CBS のある 1 つのセリン残基に着目し、そのアラニン (SA) およびアスパラギン酸 (SD) 置換体を作製しその活性を測定した。その結果、両置換体とも活性は認められなかった。よってこのセリン残基は CBS 活性に大きく影響を及ぼすことが判明し、このセリン残基のリン酸化修飾が CBS 活性を制御するものであると考えられる。よって CBS リン酸化部位特異的抗体の作製を行い、様々な刺激を加えた細胞をサンプルとし、作製した抗体の反応性を利用して CBS リン酸化修飾シグナルを探索している。あわせて、CBS リン酸化修飾調節についても検討を行う予定である。

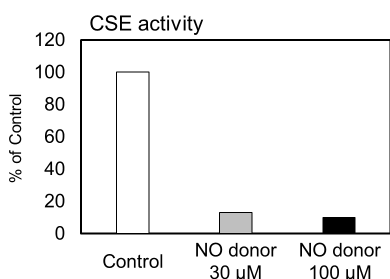


#### (2) シスタチオニン $\beta$ -リアーゼ (CSE)

CSE は作製した全てのシステイン残基のバリン置換体のうち 2 つに着目し検討を行った。これらの置換体について硫化水素検出プローブおよび活性イオウ分子検出プローブを用い検討したところ、1 つの置換体は両プローブで活性が認められないのに対し、一方の置換体は硫化水素検出プローブでは活性が認められないが活性イオウ分子検出プローブでは活性が認められた。これは非常に興味深い結果であり、今後得られた 2 つの置換体の解析を続ける。CSE の翻訳後修飾では、S-ニトリシル化修飾について検討したところ、NO ドナー依存的な活性制御が認められた。加えて NO ドナー非感受性の CSE アミノ酸置換体の作製を行い、その修飾部位を決定した。S-ポリチオール化修飾について、プルダウン法を用いることにより活性イオウ分子ドナー依存的な活性制御が認められた。

これらに加えて、CBS および CSE それぞれの恒常発現細胞を樹立しその影響について検討を行っている。

これらの結果は CBS および CSE の翻訳後修飾による制御の可能性を具体的に示した新たな知見である。本研究は一定の成果を挙げた他、解析に有利な方法およびツールを開発しており今後の展開が期待されるものである。



## 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 3 件)

- Hanaoka K., Sasakura K., Suwanai Y., Toma-Fukai S., Shimamoto K., Takano Y., Shibuya N., Terai T., Komatsu T., Ueno T., Ogasawara Y., Tsuchiya Y., Watanabe Y., Kimura H., Wang C., Uchiyama M., Kojima H., Okabe T., Urano Y., Shimizu T., Nagano T. Discovery and Mechanistic Characterization of Selective Inhibitors of H<sub>2</sub>S-producing Enzyme: 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase (3MST) Targeting Active-site Cysteine Persulfide. *Sci. Rep.*, 7:40227 (2017). DOI: 10.1038/srep40227  
査読有
- Abiko Y., Sha L., Shinkai Y., Unoki T., Luong N. C., Tsuchiya Y., Watanabe Y., Hirose R., Akaike T., Kumagai Y. 1,4-Naphthoquinone activates the HSP90/HSF1 pathway through the S-arylation of HSP90 in A431 cells: Negative regulation of the redox signal transduction pathway by persulfides/polysulfides. *Free Radic. Biol. Med.*, 104, 118-128 (2017). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.047  
査読有
- Abiko Y., Ishii I., Kamata S., Tsuchiya Y., Watanabe Y., Ihara H., Akaike T., Kumagai Y. Formation of Sulfur Adducts of N-Acetyl-p-benzoquinoneimine, an Electrophilic Metabolite of Acetaminophen in Vivo: Participation of Reactive Persulfides. *Chem. Res. Toxicol.*, 28, 1796-1802 (2015). DOI: 10.1021/acs.chemrestox.5b00245  
査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

- Abdul Hamid Hisyam, 井田智章, 笠松真吾, 居原秀, 土屋幸弘, 渡邊泰男, 澤智裕, 藤井重元, 赤池孝章  
活性イオウ分子種の新しい解析法の構築  
第 8 9 回日本生化学会大会  
2016 年 9 月 25 日 ~ 27 日  
仙台国際センター・東北大学川内北キャンパス (宮城県・仙台市)
- Hisyam Abdul Hamid, Tomoaki Ida, Shingo Kasamatsu, Hideshi Ihara, Yukihiro Tsuchiya, Yasuo Watanabe, Tomohiro Sawa, Shigemoto Fujii, Takaaki Akaike  
Development of a new detection system of reactive sulfur species.  
The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide  
The 16th Annual Scientific Meeting of the Nitric Oxide Society of Japan  
2016 年 5 月 20 日 ~ 22 日  
仙台国際センター (宮城県・仙台市)
- 中村麻里江, 松本卓巳, 松原守, 高田剛, 土屋幸弘, 渡邊泰男  
シスタチオニン リアーゼの一酸化窒素応答性とその意義  
第 132 回日本薬理学会関東部会  
2015 年 7 月 4 日  
明海大学浦安キャンパス (千葉県・浦安市)
- ジョン ミンギョン, 井田智章, 笠松真吾, 松永哲郎, 土屋幸弘, 渡邊泰男, 藤井重元, 赤池孝章  
HPLC-蛍光検出法によるシステインパー  
スルフィドの新しい定量システムの構築  
第 15 回日本 NO 学会学術集会  
2015 年 6 月 26 日 ~ 27 日  
千里ライフサイエンスセンター (大阪府・豊中市)
- 井田智章, 居原秀, 澤智裕, 土屋幸弘, 渡邊泰男, 藤井重元, 熊谷嘉人, 本橋ほづみ, 赤池孝章  
活性システインパー  
スルフィドのメタ  
ボロームおよびプロテオーム解析  
第 15 回日本 NO 学会学術集会  
2015 年 6 月 26 日 ~ 27 日  
千里ライフサイエンスセンター (大阪府・豊中市)
- 中村麻里江, 松本卓巳, 高田剛, 土屋幸弘, 井田智章, 澤智裕, 赤池孝章, 渡邊泰男

活性イオウ分子産生酵素のNO応答性  
第15回日本NO学会学術集会  
2015年6月26日～27日  
千里ライフサイエンスセンター（大阪  
府・豊中市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shoyaku.ac.jp/research/laboratory/yakuri/teacher/79>

6．研究組織

(1)研究代表者

土屋 幸弘 (TSUCHIYA, Yukihiro)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：30455406