

令和元年5月23日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15408

研究課題名(和文) 酵母における活性イオウ分子：システインパーサルフィドの生理的役割の解明

研究課題名(英文) Physiological and molecular analysis of cysteine hydropersulfide produced by cysteinyl-tRNA synthetase in yeast

研究代表者

西村 明 (Nishimura, Akira)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30781728

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)：本研究では、活性イオウ分子の生理的役割を明らかにするために、出芽酵母における活性イオウ分子の生成経路の同定および、その経路を破壊した変異体の表現型の探索を行った。まず、出芽酵母における活性イオウ分子の産生系が哺乳類や細菌類と同様であり、cysteinyl-tRNA synthetase(CARS)によって産生させることを見いだした。さらに、この経路の欠損株は寿命が大幅に短縮することを発見し、活性イオウ分子が寿命の新規制御因子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ヒトの抗老化戦略の構築のみならず、エネルギー代謝異常が関わる各種疾患(ミトコンドリア病、生活習慣病、がん等)の発症機構の理解と予防・治療法の開発に大きく寄与することが期待される。また、活性イオウ分子の産生系をターゲットにした抗真菌薬の開発も抗菌・真菌薬開発も期待される。

研究成果の概要(英文)：We attempted to understand physiological functions of reactive sulfur species (RSS) using yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a useful model for eukaryotic biology. First, we found that yeast has a pyridoxal phosphate (PLP)-dependent biosynthesis of RSS by cysteinyl-tRNA synthetase (CARS), similar to bacteria and mammal. Next, our study indicated that a yeast mutant of PLP-binding site, which possessed the intact protein synthesis, dramatically reduces chronological aging, compared with wild-type, suggesting that CARS-produced RSS may play an important role in regulating longevity and sustaining the life span.

研究分野：生化学

キーワード：活性イオウ分子 システインパーサルファイド 寿命 システニルRNA合成酵素 酵母

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、多くのアミノアシル tRNA 合成酵素がタンパク質合成過程以外にも機能を持つ「moonlight protein」として注目を集めている。当研究室(東北大・赤池研究室)は、システイン tRNA 合成酵素(CARS)もタンパク質合成過程以外に、活性イオウ分子:システインパースルフィド(cysteine hydropersulfide; CysSSH)をシステインから生合成する役割があることを世界で初めて発見した(cysteine persulfide synthase: CPERS)。活性イオウ分子は、通常チオール(-SH)基に複数のイオウ原子が付加したポリサルファー構造[-(S)<sub>n</sub>-SH]を有している。その中でも、還元型のヒドロスルフィド化合物は、イオウ原子が過剰に付加していることにより、通常チオール化合物に比べヒドロスルフィド自身の求核性・抗酸化能は顕著に高まる一方で、ポリスルフィドの構造内部に存在するイオウ側鎖も求核性を有しており、通常チオール化合物と比較すると実に多彩なレドックス活性を持っている。一方、酸化型のポリスルフィドは、通常ジスルフィドと同様に親電子的な反応性を発揮するので、ポリスルフィドは自身が求核性と親電子性の二面性を備えている。このようなユニークな物性と生物化学的反応性を持つこととで、文字通り、活性分子として生体内で多彩な生理機能を発現していると考えられている。しかしながら、活性イオウ分子の生理機能に関しては、不明な点が多く残されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、出芽酵母をモデル生物として活用することで、未だ解明されていない活性イオウ分子の生理機能を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 酵母における CysSSH 生合成経路の解明

酵母 CARS/CPERS の組換えタンパク質を調製し、CysSSH 合成活性を検出した。CysSSH の定量は安定同位体ラベル体を内部標準として使用し、LC-MS/MS 解析により定量的解析を行った。さらに、CARS/CPERS のヘテロ破壊株酵母(二倍体)を構築し、CysSSH 量の測定も行った。また、GFP-tag を使用した局在解析も行った。

#### (2) CysSSH 合成欠損株の作製とその表現型解析

CysSSH 合成活性の触媒部位(PLP 結合部位)リジンをアラニンに置換した株を CRISPR/Cas9 システムにより、構築した。この株のミトコンドリア膜電位および、小胞体ストレス応答を野生株と比べた。ミトコンドリア膜電位は JC1 assay、小胞体ストレス応答はセンタータンパク質: Hac1 のスプライシングを検出することで検討した。また、コロニー形成の測定することで、寿命の測定も行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 酵母における CysSSH 生合成経路の解明

まず、ゲノム情報から酵母 CARS/CPERS を同定した結果、酵母 CARS/CPERS 遺伝子(CRS1)は他の生物種で認められるようなサイトゾル型やミトコンドリア型の区別がないことが示唆された。GFP-tag による細胞内局在解析においても、CARS/CPERS 遺伝子の翻訳産物はサイトゾルとミトコンドリアに両局在していることが確認された。両局在化のメカニズムを解析した結果、CARS/CPERS 遺伝子は複数の転写開始点を持つことで、1つの遺伝子から2つのタンパク質(サイトゾル型とミトコンドリア型)を発現していることを見出した。次に、酵母 CARS/CPERS の CysSSH 合成活性を確認するために、酵母 CARS/CPERS の組換えタンパク質を調製したところ、酵母 CARS/CPERS は他の生物と同様に CysSSH 合成活性を有していることがわかった。さらに、CARS/CPERS ヘテロ破壊株(二倍体)を構築し、この株の細胞内 CysSSH を LC-MS/MS により定量した結果、野生株に比べて CysSSH 量が約半分に減少することを確認した。以上より、出芽酵母も CARS/CPERS による CysSSH 合成経路が保存されていることが明らかとなった。

#### (2) CysSSH 合成欠損株の作製とその表現型解析

CARS/CPERS に変異(PLP 結合部位のリジンをアラニンに置換)を導入し、細胞内 CysSSH 含量が低下した変異株(K 変異体)を作製した。K 変異体の表現型を解析したところ、ミトコンドリア膜電位および、細胞内 ATP 含量が低下していることを見出した。また、K 変異体は野生株より小胞体ストレスが起こりやすくなっていることを見いだした。さらに、K 変異体は経時寿命が顕著に減少していることを見いだした。加えて、低下した寿命は活性パースルフィドドナーの添加によりほぼ完全に回復することも確認した。これらの結果から、CARS/CPERS によって産生される CysSSH は内因性の寿命制御因子であることが考えられた。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計11件)

1. Hamid HA, Tanaka A, Ida T, Nishimura A, Matsunaga T, Fujii S, Morita M, Sawa T, Fukuto JM, Nagy P, Tsutsumi R, Motohashi H, Ihara H, Akaike T: Polysulfide stabilization by tyrosine and hydroxyphenyl-containing derivatives that is important for a reactive sulfur metabolomics analysis. *Redox Biology*, 21:101096, (2019) 査読有  
doi: 10.1016/j.redox.2019.101096.
2. 西村 明, 本橋 ほづみ, 赤池 孝章: 活性イオウ分子によるエネルギー代謝制御, 基礎老化研究, 43: 7-12, (2019) 査読無  
doi:なし
3. Khan S, Fujii S, Matsunaga T, Nishimura A, Ono K, Ida T, Ahmed KA, Okamoto T, Tsutsuki H, Sawa T, Akaike T: Reactive Persulfides From Salmonella Typhimurium Downregulate Autophagy-mediated Innate Immunity in Macrophages by Inhibiting Electrophilic Signaling. *Cell Chemical Biology*, 25: 1403-1413, (2018) 査読有  
doi: 10.1016/j.chembiol.2018.08.007.
4. 西村 明, 赤池 孝章: 哺乳類におけるイオウ呼吸の発見, 医学のあゆみ, 267: 532-533, (2018) 査読無  
doi:なし
5. 西村 明, 井田智章, 赤池孝章: タンパク質・核酸の分子修飾 II.細胞質/オルガネラでの分子修飾 酸化還元状態 ポリスルフィド化, 生体の科学, 69: 446 447, (2018) 査読無  
doi:なし
6. 西村 明, 井田智章, 赤池孝章: タンパク質・核酸の分子修飾 II.細胞質/オルガネラでの分子修飾 酸化還元状態 SH(ポリスルフィド)酸化, 生体の科学, 69: 448 449, (2018) 査読無  
doi:なし
7. 西村 明, 赤池孝章: 活性イオウ分子:システインパーズルフィドの新規生合成経路の発見とその生理機能, 化学と生物, 56: 518 519, (2018) 査読無  
doi:なし
8. 西村 明, 赤池 孝章: 硫黄呼吸の発見: ペルズルフィド産生酵素による新しいエネルギー代謝, 現代化学, 565: 55-59, (2018) 査読無  
doi:なし
9. Akaike T, Ida T, Fan-Yan Wei FY, Nishida M, Kumagai Y, Alam MM, Ihara H, Sawa T, Matsunaga T, Kasamatsu S, Nishimura A, Morita M, Tomizawa K, Nishimura A, Watanabe S, Inaba K, Shima H, Tanuma N, Jung M, Fujii S, Watanabe Y, Ohmuraya M, Nagy P, Feelisch M, Fukuto JM, Motohashi H: CysteinyI-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nature Communications*, 27: 1177 (2017) 査読有  
doi: 10.1038/s41467-017-01311-y.
10. Ihara H, Kasamatsu S, Kitamura A, Nishimura A, Tsutsuki H, Ida T, Ishizaki K, Toyama T, Yoshida E, Abdul Hamid H, Jung M, Matsunaga T, Fujii S, Sawa T, Nishida M, Kumagai Y, 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.
11. 西村 明, 赤池 孝章: 活性イオウ分子: システインパーズルフィドの新規生合成経路の発見とその生理機能, 硫酸と工業, 70: 143-151, (2017) 査読無  
doi:なし

### [学会発表](計14件)

1. Akira Nishimura, Tomoaki Ida, Masanobu Morita, Tetsuro Matsunaga, Hiroshi Takagi, Hozumi Motohashi, Takaaki Akaike: Biosynthesis and physiological functions of reactive cysteine persulfides, SFRR Asia, (2019)
2. Akira Nishimura, Masanobu Morita, Tomoaki Ida, Tomohiro Tanaka, Tetsuro Matsunaga, Motohiro Nishida, Hozumi Motohashi, Takaaki Akaike: In vivo proof of sulfide:quinone oxidoreductase (SQR) function directly contributing to sulfur respiration in mammals, NO Gordon Research Conference, (2019)
3. 西村 明: 再生医療における細胞培養～臨床培養士に求められること～, 沖縄高等専門学校, (2018)
4. 西村 明: 種横断的なシステインパーズルフィド産生経路とその生理的意義, 酵母細胞研究会例会 (2018)
5. 西村 明, 吉川 雄樹, 那須野 亮, 井田 智章, 松永 哲郎, 守田 匡伸, 高木 博史, 赤池 孝章: 酵母におけるシステインパーズルフィド産生機構とその生理的意義, 酵母遺伝学フォーラム, (2018)
6. Akira Nishimura, Tomoaki Ida, Masanobu Morita, Tetsuro Matsunaga, Hiroshi Takagi,

- Hozumi Motohashi, Takaaki Akaike: BIOSYNTHESIS MECHANISMS AND PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS OF REACTIVE PERSULFIDES, International Nitric Oxide Society meeting, (2018)
7. Akira Nishimura, Tomoaki Ida, Masanobu Morita, Tetsuro Matsunaga, Hiroshi Takagi, Hozumi Motohashi, Takaaki Akaike: Biosynthesis pathway and physiological functions of reactive persulfides, 日本生化学会, (2018)
  8. 西村 明, 松永 哲郎, 井田 智章, 守田 匡伸, 藤井 重元, 本橋ほづみ, 赤池 孝章: 硫化水素解毒酵素 sulfide-quinone oxidoreductase の機能解析, 日本毒性学会, (2018)
  9. 西村 明, 松永 哲郎, 井田 智章, 守田 匡伸, 藤井 重元, 本橋ほづみ, 赤池 孝章: 病原細菌の活性パースルフィド産生によるオートファジー制御と生体防御異常, 日本生体防御学会学術総会 (2018)
  10. 西村 明, 本橋ほづみ, 赤池 孝章: 種横断的なシステインパースルフィド産生経路とその生理的意義, 日本酸化ストレス学会・日本 NO 学会合同学術集会, (2018)
  11. 西村 明, 吉川 雄樹, 那須野 亮, 井田 智章, 松永 哲郎, 守田 匡伸, 高木 博史, 赤池 孝章: 細菌と真菌におけるシステインパースルフィド産生機構とその生理的意義, 日本細菌学会総会, (2018)
  12. 西村 明, 松永 哲郎, 井田 智章, 守田 匡伸, 藤井 重元, 本橋ほづみ, 赤池 孝章: *Helicobacter cinaedi* の骨髄内持続感染と動脈硬化病因論, 分子予防環境会, (2018)
  13. 西村 明: 再生医療における細胞培養-臨床培養土が誕生した理由-, 沖縄高等専門学校, (2018)
  14. Akira Nishimura, Tomoaki Ida, Masanobu Morita, Tetsuro Matsunaga, Hiroshi Takagi, Hozumi Motohashi, Takaaki Akaike: Characterization of cysteinyl-tRNA synthetase for production of cysteine hydropersulfide, 11th International Symposium on Aminoacyl-tRNA Synthetase-AARS2017, (2017)
- [ 図書 ] (計 1 件)
1. 井田 智章, 西村 明, 守田 匡伸: 活性イオウメタボローム: イオウ代謝物とレドックスバイオマーカー, 実験医学 36: 865-873, (2018)
- [ その他 ]
1. 研究室ホームページ: <http://www.toxicosci.med.tohoku.ac.jp/index.html>
  2. リサーチマップ: [https://researchmap.jp/akira\\_nishimura/](https://researchmap.jp/akira_nishimura/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名: 高木 博史

ローマ字氏名: Hiroshi Takagi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。