

令和元年6月16日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19205

研究課題名(和文)細胞内サルファーダイナミクスの解明に向けた活性イオウメタボロミクスの構築

研究課題名(英文)Reactive sulfur metabolomics for the study of cellular sulfur dynamics

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) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：システインパースルフィドは活性酸素の消去とシグナル伝達制御、含硫化合物の生合成、酵素活性調節、有害物質の解毒など生体内で多彩な機能を司ることが明らかになりつつある。本研究では、簡便かつ効率的な安定同位体イオウ[^{34}S]でチオール基を標識したシステイン(Cys-[^{34}S]H)の合成法を確立し、Cys-[^{34}S]Hから生成するシステインパースルフィドおよびそのイオウ転移と代謝・分解を定量的かつ網羅的に解析できる活性イオウメタボロミクスを構築した。また、細胞に添加することで速やかに細胞内に透過し、さらに細胞内の活性イオウを顕著に増加させることができるケミカルドナーの作成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

システインパースルフィドの代謝は、システインパースルフィド合成酵素の存在も含めて、その分子実態については不明な点も多い。パースルフィドに由来するイオウ原子のユニークな特徴は、チオール分子の間で容易にそのイオウ原子の受渡しを行なうことである(イオウ転移)。このように細胞内でパースルフィドのイオウ代謝は極めてダイナミックである。本研究では、細胞内での多彩なイオウ代謝を網羅的に解析する上で極めて有用な活性イオウメタボロミクスを構築した。今回合成した活性イオウドナーと組み合わせ、詳細なイオウ代謝プロセスを明らかにし、その生理・病態生理研究が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cysteine persulfide is an L-cysteine derivative having one additional sulfur atom bound to a cysteinyl thiol group, and it serves as a reactive sulfur species that regulates redox homeostasis in cells. In this study, we established a rapid and efficient method of synthesis of L-cysteine derivatives containing isotopic sulfur atoms and application of this method to a reactive sulfur metabolome. We used bacterial cysteine syntheses to incorporate isotopic sulfur atoms into the sulfhydryl moiety of L-cysteine. The approach using isotopic sulfur labeling combined with mass spectrometry may thus contribute to greater understanding of reactive sulfur metabolome and redox biology. We further successfully synthesized chemical sulfur donors that efficiently donate sulfane sulfur atoms to acceptor cells.

研究分野：生化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：活性イオウ メタボロミクス 酸化ストレス システインパースルフィド 安定同位体

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

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。これまでは、システインの分解で生じる代謝物であり、積極的な生物機能はほとんど注目されていなかった。そのため、実際の細胞内における存在やその濃度などについてはほとんど分かっていなかった。本申請者のグループは、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) や蛋白質パースルフィド (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 (*PNAS 2014*)。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、その還元力が著しく高まっており、活性酸素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 (*PNAS 2014*)。

システインパースルフィドの生成は、これまでに報告のあったシステイン分解やシスチンの加水分解に加え、いまだ同定されていないシステインパースルフィド合成酵素の存在が予想されているが、その分子実態については分かっていない。パースルフィドに由来するイオウ原子 (図2にて丸で囲ったイオウ原子) のユニークな特徴の1つは、チオール分子の間で容易にそのイオウ原子の受渡しを行なうことである (イオウ転移)。その結果、細胞内には、グルタチオンパースルフィドや蛋白質パースルフィドなど多彩なパースルフィドとして存在する (*PNAS 2014*)。さらに還元では硫化水素を、酸化ではチオ硫酸など、様々な代謝経路を経る可能性が示唆されている。このように細胞内でパースルフィドのイオウ代謝は極めてダイナミックであり、パースルフィドの生理機能の解明には、そのダイナミックな代謝プロセスの理解が不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内で起こるパースルフィドに由来するイオウ原子そのもののダイナミックな挙動を解析できる活性イオウメタボロミクスを構築を目指した。具体的には、システインパースルフィドの基質であるシステインチオール基そのもののイオウ原子を安定同位体標識 (^{34}S) したシステイン (Cys- ^{34}S]H) を合成し、そのイオウの細胞内動態を解析できるシステムの構築を行った。Cys- ^{34}S]H の簡便かつ効率のよい合成法として、細菌のシステイン合成酵素を活用した方法を検討した [目的1]。Cys- ^{34}S]H からのシステインパースルフィドの生成、代謝をターゲット質量分析法を駆使した網羅的解析法 (活性イオウメタボロミクス) の構築を行った [目的2]。

3. 研究の方法

常法に従いネズミチフス菌 LT2 株より3種のシステイン合成酵素 (CysE, CysK, CysM) をクローニングした。それぞれの基質を添加した反応溶液を質量分析似て解析した。培養細胞はおもに HeLa 細胞および Raw264.7 細胞を用いた。システイン、グルタチオンおよびそれらのパースルフィドはチオール反応性アルキル化剤である hydroxyphenylethyl iodoacetamide (HPE-IAM) で安定化させた後、細胞より抽出した。アルキル付加体を質量分析の多重反応モニタリング法にて同定・定量した。活性イオウドナーである NAC ポリスルフィド (下記図5参照) は、N-アセチルシステインと硫化水素ナトリウムを反応させて得た。

4. 研究成果

組換えシステイン合成酵素 (CysE, CysK, CysM) の調製

ネズミチフス菌 LT2 株より、CysE, CysK, CysM をクローニングし、それを大腸菌にて発現させ、Ni アフィニティークロマトグラフィーにより精製した (図1)。酵素の活性を調べたところ、いずれの組換え酵素も過去に報告のあったものと匹敵する酵素活性を持つことがわかった (図2) ²⁾。

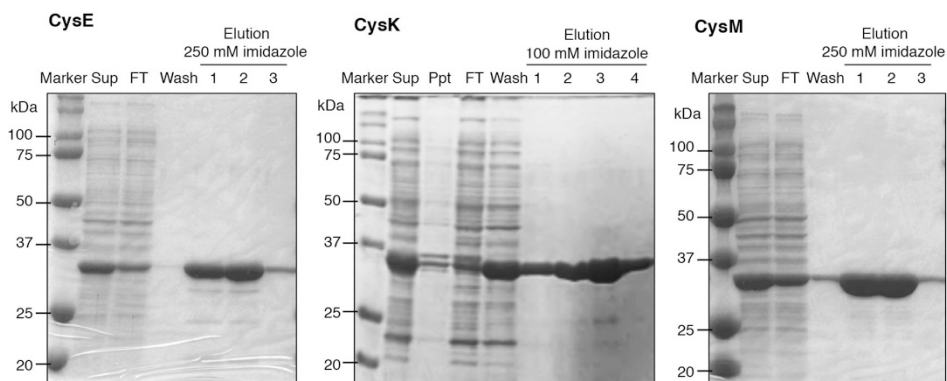


図1. ネズミチフス菌LT2株由来システイン合成酵素(CysE, CysK, CysM)の大腸菌による発現とNi-アフィニティークロマトグラフィーによる精製。

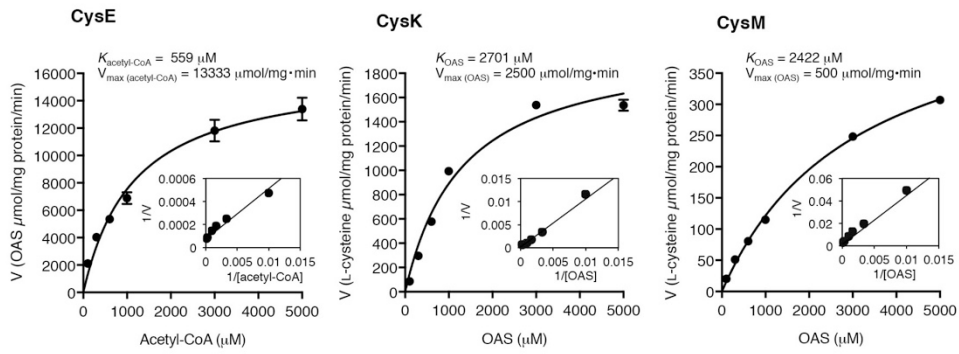


図2. 組換えシステイン合成酵素 (CysE, CysK, CysM) の酵素学的パラメーターの解析。

安定同位体標識システイン誘導体の合成

上述した組換えシステイン合成酵素を種々の基質のもとで反応させることにより、図3に示す様々な側鎖を有するシステイン誘導体の合成に成功した。またこの反応に安定同位体標識基質を用いることで任意の場所に安定同位体が導入できるようになった。

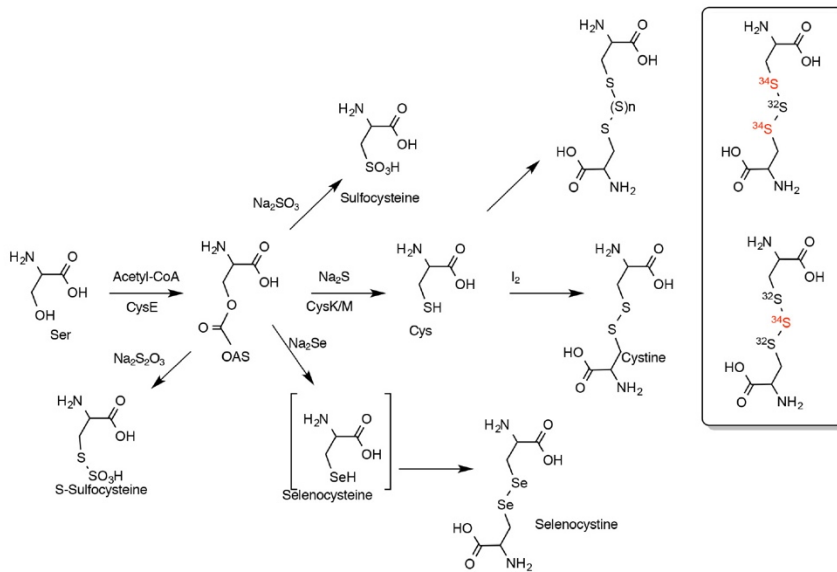


図3. 組換えシステイン合成酵素 (CysE, CysK, CysM) を用いた安定同位体標識システイン誘導体の合成スキーム。

安定同位体標識システインを用いた活性イオウ代謝の解析

培養細胞に本研究にて合成した ^{34}S 標識システインを添加し、一定時間培養した後、細胞より各種含硫低分子を抽出した。その成分を質量分析にて解析した結果、細胞に取り込まれたシステインは、その後、システインパルスルフィドに変換され、さらにそこからグルタチオンパー

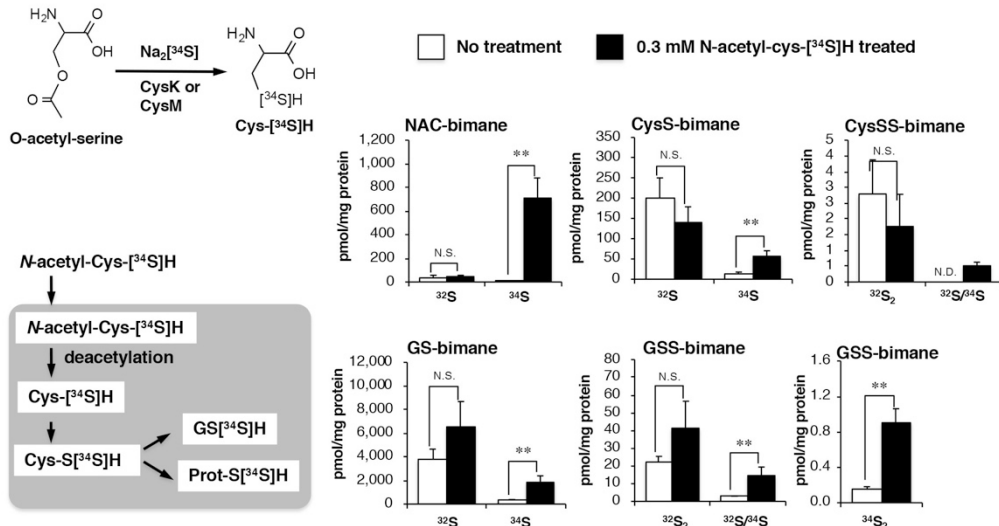


図4. ^{34}S 標識N-アセチルシステインの細胞への取り込みと細胞内代謝を介した活性イオウへの変換機構。HeLa細胞に ^{34}S 標識NACを取り込ませ、3時間培養した後、細胞内の各種イオウ関連化合物を質量分析にて定量解析した。

スルフィドへと代謝されることが明らかとなった(図4)。このようにこれまで解析が困難であったシステインからシステインパーズルフィド、さらにはグルタチオンパーズルフィドへの硫黄原子の移動が本実験系を用いることによって詳細に解析できることが示された。

活性イオウドナーの合成

本研究ではさらに、細胞に添加することで速やかに細胞内に透過し、細胞内の活性イオウを顕著に増加させることができるケミカルドナーの合成に取り組んだ。その結果、N-アセチルシステイン(NAC)で sulfane sulfur を安定化させた NAC ポリスルフィド(図5)が活性イオウドナーとして極めて優れた性質を持つことを明らかにした。

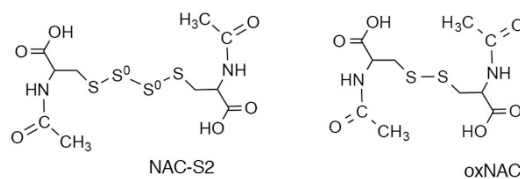


図5. 活性イオウドナーNACポリスルフィドの構造。図中S^oは sulfane sulfur原子。oxNACはコントロール試薬。

NAC ポリスルフィドによる細胞内活性イオウの安定同位体標識

NAC ポリスルフィドの硫黄原子を ³⁴S で標識しておくこと、細胞内の活性イオウが容易に ³⁴S で標識でき、さらに細胞内での代謝プロセスを詳細に追跡できることを明らかにした(図6)。以上のように、安定同位体イオウの新規導入法、新規ケミカルドナーを駆使した質量分析法によるサルファーメタボロミクスを構築することができた。

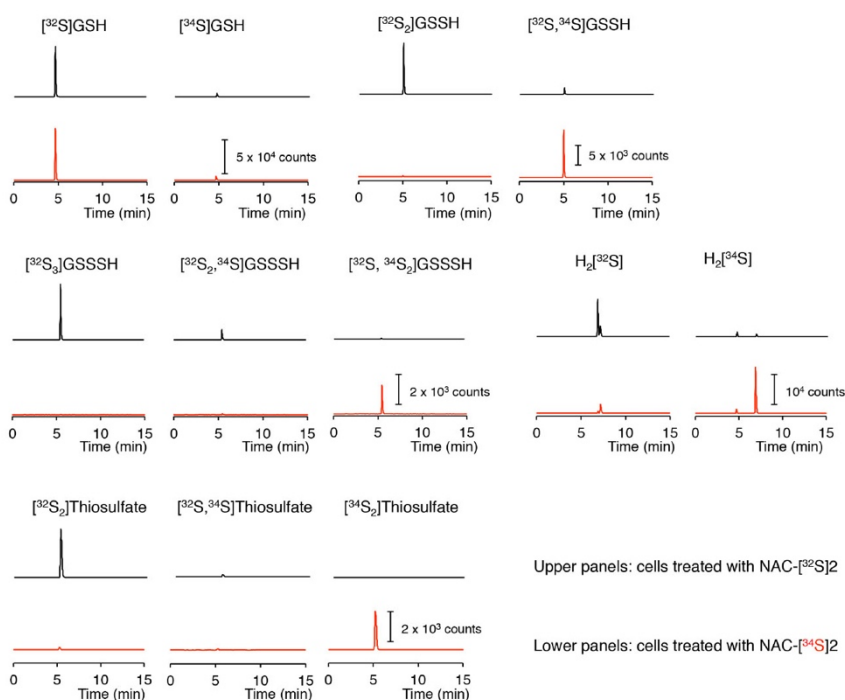


図6. ³⁴S標識NACポリスルフィドによる細胞内活性イオウの解析。Raw264.7細胞を³²Sあるいは³⁴SNACポリスルフィドを添加した培地で培養し、細胞内のシステイン関連分子を質量分析で解析した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件) (すべて査読あり)

- ① Zhang T., Ono K., Tsutsuki H., Ihara H., Islam W., Akaike T., Sawa T. Enhanced Cellular Polysulfides Negatively Regulate TLR4 Signaling and Mitigate Lethal Endotoxin Shock. *Cell Chem Biol.*, pii: S2451-9456(19)30037-6, 2019.
- ② Hamid H.A., Tanaka A., Ida T., Nishimura A., Matsunaga T., Fujii S., Morita M., Sawa T., Fukuto J.M., 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 Biol.*, 21:101096, 2019.
- ③ Khan, S., Fujii, S., Matsunaga, T., Nishimura, A., Ono, K., Ida, T., Ahmed, K.A., 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 Chem. Biol.*, 25(11):1403-1413.e4., 2018.
- ④ Sawa, T., Ono, K., Tsutsuki, H., Zhang, T., Ida, T., Nishida, M., Akaike, T. Reactive cysteine persulfides: occurrence, biosynthesis, antioxidant activity, methodologies, and bacterial

persulphide signalling. *Adv Microb Physiol.*, 72: 1-28, 2018.

- ⑤ Fujii, S., Sawa, T., Motohashi, H., Akaike, T. Persulfide synthases that are functionally coupled with translation mediate sulfur respiration in mammalian cells. *Br. J. Pharmacol.*, 176(4):607-615, 2019.
- ⑥ 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.
- ⑦ 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: 2165-2170, 2018.
- ⑧ 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.
- ⑨ 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.
- ⑩ 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 methylation and contribute to insulin secretion. *Nucleic Acids Res.*, 45: 435-445, 2017.
- ⑪ Ikeda M., Ishima Y., Shibata A., Chuang V.T.G., Sawa T., Ihara H., Watanabe H., Xian M., Ouchi Y., Shimizu T., Ando H., Ukawa M., Ishida T., Akaike T., Otagiri M., 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
- ⑫ 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. CysteinyI-tRNA synthetase governs protein polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nature Commun.*, 8: 1177, 2017.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 澤 智裕. システインパーサルフィドを介した酸化ストレス防御機構の発見. 第 71 回日本酸化ストレス学会・第 18 回日本 NO 学会合同学術集会 (日本酸化ストレス学会学術賞受賞講演), 2018 年 5 月 17 日, 京都.
- ② 澤 智裕, 張 田力, 津々木博康, 小野勝彦. 活性イオウによる自然免疫応答の制御機構. 第 45 回日本毒性学会学術集会 (シンポジウム), 2018 年 7 月 19 日, 大阪.
- ③ 澤 智裕. 活性イオウ代謝を基軸とするエキスポゾーム研究の新展開. ConBio2017 (ワークショップ), 2017 年 12 月 7 日.
- ④ 澤 智裕. システインパーサ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会 (シンポジウム), 2017 年 7 月 11 日, 横浜.
- ⑤ 澤 智裕. 活性システインパーサ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.
- ⑥ 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.

[図書] (計 2 件)

- ① 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.
- ② 津々木博康, 澤 智裕, 居原 秀. ニトロ化・S-グアニル化. *生体の科学 (特集 タンパク質・核酸の分子修飾)*, 69: 450-451, 2018.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://kumadai-bisei.com>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：小野勝彦

ローマ字氏名：Katsuhiko Ono

所属研究機関名：熊本大学

部局名：大学院生命科学研究部

職名：助教

研究者番号（8桁）：80573592

研究協力者氏名：津々木博康

ローマ字氏名：Hiroyasu Tsutsuki

所属研究機関名：熊本大学

部局名：大学院生命科学研究部

職名：助教

研究者番号（8桁）：40586608

※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。