

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390082

研究課題名(和文)内因性親電子物質を介するレドックスシグナル伝達の制御メカニズム

研究課題名(英文)Regulatory mechanisms of redox signal transduction mediated by endogenous electrophiles

研究代表者

澤 智裕 (Sawa, Tomohiro)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：30284756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、活性酸素やそのシグナル伝達における2次メッセンジャーである8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate (8-nitro-cGMP)を代謝する新規制御因子として、システインチオール基(Cys-SH)にさらに過剰なイオウ原子が付加したシステインパーサルフィド(Cys-SSH)を同定した。システインパーサルフィドは、酸化ストレス制御にきわめて重要な役割を担っている可能性があり、今後、その生体内での発現制御機構や生理活性の解析が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study identified the endogenous formation of cysteine persulfide species that brings additional sulfur atom to cysteine thiol. It is noteworthy that cysteine persulfide species are capable of metabolizing reactive oxygen species and their second messenger molecules such as 8-nitro-cGMP. Further study is warranted to clarify regulatory mechanisms of cysteine persulfide species formation as well as their biological functions.

研究分野：医歯薬学

キーワード：活性酸素 酸化ストレス シグナル伝達 レドックス 親電子

## 1. 研究開始当初の背景

活性酸素は生体内のエネルギー代謝や感染防御過程において発生する一連の反応性分子種 ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  等) である。これまで活性酸素は酸素毒性の要因となる有害物質として取り扱われてきたが、活性酸素が細胞内でシグナル分子として機能し、細胞の分化、増殖、代謝機能など多彩な生命機能の制御に関わることが明らかになるに従い、その生理機能や疾患との関連が注目されていた (例えば Science 2006: 312, 1882; Nature Rev Mol Cell Biol 2007: 8, 813 など)。

活性酸素の代謝から生成する内因性の親電子物質は、活性酸素シグナルの2次メッセンジャーとして重要な役割を果たしている。すなわち、親電子物質は、レドックス反応性のシステイン残基を持つ活性酸素シグナル受容蛋白質と反応し、蛋白質の構造や機能 (例えば触媒活性など) の変化を介して、シグナル伝達を制御する。我々は、このような活性酸素のシグナル伝達における新しい2次メッセンジャーとして、一酸化窒素 (NO) の2次メッセンジャーである cGMP がニトロ化を受けた 8-nitro-cGMP (図 1) を発見した。さらに 8-nitro-cGMP による特筆すべき新しいシグナル伝達機構として、その親電子性に基づいて活性酸素シグナル受容蛋白質 (Keap1 等) の Cys チオール基と反応して、これまで知られていなかった蛋白質翻訳後修飾である cGMP 付加反応 (蛋白質 S-グアニル化) を介して活性酸素シグナル受容蛋白質を活性化することを明らかにした (図 1) (Nature Chem Biol, 2007; J Immunol, 2009; J Biol Chem, 2010 など)。一方、親電子物質によるレドックスシグナル伝達について、これを抑制的に制御するメカニズムについては、ほとんど解析が進んでいなかった。

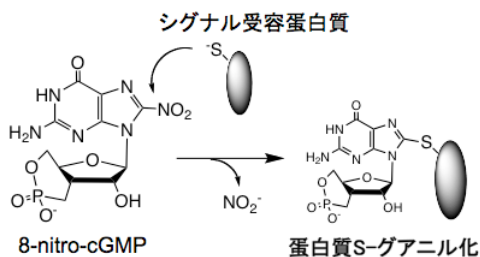


図1. 8-Nitro-cGMPによる蛋白質S-グアニル化

## 2. 研究の目的

本研究では、親電子性物質に対する新しい分解・代謝制御分子として、硫化水素および関連化合物に注目し、活性酸素シグナルの制御における役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

8-Nitro-cGMP と硫化水素や関連物質との反応から生成する産物については、高速液体クロマトグラフィーや精密質量分析にて解析した。その細胞内での生成には、各種培養細胞を用いた。また本研究にてその生成が示唆されたシステインパースルフィドの関連物質は、新しく質量分析に基づく網羅的解析法を構築した。

## 4. 研究成果

### 8-Nitro-cGMP と硫化水素の反応解析

8-Nitro-cGMP と硫化水素との反応を詳細に解析した。試験管内で 8-nitro-cGMP と硫化水素ナトリウムを反応させると、8-nitro-cGMP が減少するとともに、新しい反応産物が生成した。吸収スペクトルならびに精密質量分析から、この反応産物が、ニトロ基がメルカプト基に置換した 8-SH-cGMP であることが明らかとなった。さらに、8-SH-cGMP の生成は、重金属 (鉄など) と他の低分子量チオール化合物 (システインなど) の添加により著しく増強した。このことから、硫化水素、金属、チオール化合物から、8-nitro-cGMP の分解に関わる活性種が生成していることが示唆された。さらに、8-nitro-cGMP から 8-SH-cGMP への変換は、各種培養細胞においても確認され、その活性はシステイン代謝酵素である cystathionine beta-synthase (CBS) および cystathionine gamma-lyase (CSE) の発現に大きく依存していた。そこで、これら CBS, CSE から生成する親電子物質の代謝に関わる活性種の同定を試みた。

### 8-Nitro-cGMP のスルフヒドリル化の活性本体の解析

硫化水素、低分子チオール化合物、および重金属との反応から生成する非常に強力な 8-nitro-cGMP を 8-SH-cGMP へ返還する活性のある分子種の同定を試みた。精密質量分析を駆使して、上記反応において生成する活性種を探索した結果、チオール基にさらに過剰なイオウ原子が付加したパースルフィドが生成していることがわかった。

### 生体内パースルフィドの同定

上記の解析で明らかとなったパースルフィドが、実際の細胞内、特に CBS や CSE の反応によって生成しているかどうかを解析した。このために、これらパースルフィドを網羅的に解析できる質量分析システムを構築した。その結果、両酵素がシステインの酸化型 2 量体であるシスチンを基質として、システインチオール基 (Cys-SH) にさらに過剰なイオウ原子が付加したシステインパースルフィド (Cys-SSH) を生成していることを発見した。さらに驚くべきことに、生体内には、システインのみならず、ホモシステイン、グルタチ

オン、さらにはタンパク質システイン側鎖など様々な分子状態でパースルフィドが存在することや、その細胞内濃度がサブミリモラーで豊富に存在すること、また付加するイオウ原子が複数あるもの (Cys-S(S)nH; ポリスルフィド) も存在することが明らかとなった。これらの結果は、細胞内におけるパースルフィドの存在を、分子種・濃度レベルで明らかにした初めてのものであるとともに、酸化ストレスの極めて重要な制御分子であることを示しており、今後のさらなる検討が期待される。

## 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24件)

- ① 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 H<sub>2</sub>S, hydropersulfides and derivaed species: implications to their possible biological activity and utility. *Free Radic. Biol. Med.*, 査読有, DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.007.
- ② 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, 査読無, 34: 392-395, 2015.
- ③ 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*, 査読有, 111: 7606-7611, 2014. (\*equal contribution)  
DOI: 10.1073/pnas.1321232111.
- ④ Rahaman, Md. M., \* Sawa, T., \* Ahtesham, A. K., Khan, S., Inoue, H., Irie, A., Fujii, S., and Akaike, T. S-Guanylation proteomics for redox-based mitochondrial signaling. *Antioxid. Redox Signal.*, 査読有, 20: 295-307, 2014. (\*equal contribution)  
DOI: 10.1089/ars.2012.4606.
- ⑤ Kasamatsu, S., Watanabe, Y., Sawa, T., Akaike, T. and Ihara, H. Redox signal regulation via nNOS phosphorylation at Ser847 in PC12 cells and rat cerebellar granule neurons. *Biochem. J.*, 査読有, 459: 251-263, 2014.  
DOI:10.1042/BJ20131262
- ⑥ Yoshizawa, T., Karim, Md. F., Sato, Y., Senokuchi, T., Miyata, K., Fukuda, T., Go, C., Tasaki, M., Uchimura, K., Kadomatsu, T., Tian, Z., Smolka, C., Sawa, T., Kakeya, M., Tomizawa, K., Ando, Y., Araki, E., Akaike, T., Braun, T., Oike, Y., Bober, E., and Yamagata, K. SIRT7 controls hepatic lipid metabolism by regulating the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell Metab.*, 査読有, 19: 712-721, 2014.  
DOI: 10.1016/j.cmet.2014.03.006.
- ⑦ 澤 智裕、熊谷嘉人、赤池孝章. たくさん繋がるS-polysulfur化システインの生成機構と機能-. 実験医学 (増刊), 査読無, 32: 46-50, 2014.
- ⑧ 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.
- ⑨ Sawa, T., Ihara, H., Ida, T., Fujii, S., Nishida, M., Akaike, T. Formation, signaling functions, and metabolisms of nitrated cyclic nucleotide. *Nitric Oxide*, 査読有, 34: 10-8, 2013.  
DOI: 10.1016/j.niox.2013.04.004.
- ⑩ Ito, C., Saito, Y., Nozawa, T., Fujii, S., Sawa, T., Inoue, H., Matsunaga, T., Khan, S., Akashi, S., Hashimoto, R., Aikawa, C., Takahashi, E., Sagara, H., Komatsu, M., Tanaka, K., Akaike, T., Nakagawa, I. and Arimoto, H. Endogenous nitrated nucleotide is a key mediator of autophagy and innate defense against bacteria. *Mol. Cell*, 査読有, 52: 794-804, 2013.  
DOI: 10.1016/j.molcel.2013.10.024.
- ⑪ Saito, Y., Ito, C., Fujii, S., Sawa, T., Akaike, T. and Arimoto, H. Fluorescent probes for live cell imaging of endogenous guanine nitration. *ChemBiochem.*, 査読有, 14: 1068-71, 2013.  
DOI:10.1002/cbic.20130012.
- ⑫ Karim, Md. F., Yoshizawa, T., Sato, Y., Sawa, T., Tomizawa, K., Akaike, T., Yamagata, K. Inhibition of H3K18 deacetylation of SIRT7 by Myb-binding protein 1a (Mybbp1a). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 441: 157-63, 2013.  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.020.
- ⑬ Joudoi, T., Hatakeyama, T., Maeda, T., Akaike, T., Sawa, T. and Iwai, S. Nitrated cGMP: a new player in guard

- cell signaling. *Plant Cell*, 査読有, 25: 558-571, 2013.  
DOI: 10.1105/tpc.112.105049.
- ⑭ Watanabe, K., Ishima, Y., Akaike, T., Sawa, T., Kuroda, T., Ogawa, W., Watanabe, H., Suenaga, A., Kai, T., Otagiri, M., and Maruyama, T. S-nitrosylated  $\alpha$ -1-acid glycoprotein kills drug-resistant bacteria and aids survival in sepsis. *FASEB J.*, 査読有, 27: 391-398, 2013.  
DOI: 10.1096/fj.12-217794.
- ⑮ Kurauchi, Y., Hisatsune, A., Isohama, Y., Sawa, T., Akaike, T. and Katsuki, H. Nitric oxide/soluble guanylyl cyclase signaling mediates depolarization-induced protection of rat mesencephalic dopaminergic neurons from MPP+ cytotoxicity. *Neurosci.*, 査読有, 231: 206-215, 2013.  
DOI:10.1016/j.neuroscience.2012.11.044.
- ⑯ 澤 智裕、赤池孝章. NO シグナリング研究の最前線. *Heart View*, 査読無, 17: 88-92, 2013.
- ⑰ 西田基宏、澤 智裕. 硫化水素アニオンによるレドックス恒常性制御とその臨床応用. *生化学*, 査読無, 85: 996-999, 2013.
- ⑱ 澤 智裕、赤池孝章. 活性酸素とガス状分子のシグナルネットワーク. *医学のあゆみ*, 査読無, 247: 776-780, 2013.
- ⑲ Saito, Y., Sawa, T., Yoshitake, J., Ito, C., Fujii, S., Akaike, T. and Arimoto, H. Nitric oxide promotes recycling of 8-nitro-cGMP, a cytoprotective mediator, into intact cGMP in cells. *Mol. BioSystems*, 査読有, 8: 2909-2915, 2012.  
DOI: 10.1039/C2MB25189B
- ⑳ Nishida, M., \*Sawa, T., \*, Kitajima, N., Ono, K., Inoue, H., Ihara, H., Motohashi, H., Yamamoto, M., Suematsu, M., Kurose, H., van der Vliet, A., Freeman, B. A., Shibata, T., Uchida, K., Kumagai, Y., and Akaike, T. Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nature Chem. Biol.*, 査読有, 8: 714-724, 2012. (\*equal contribution).  
DOI:10.1038/nchembio.1018
- ㉑ Ishima, Y., Hoshino, H., Shinagawa, T., Watanabe, K., Akaike, T., Sawa, T., Kragh-Hansen, U., Kai, T., Watanabe, H., Maruyama, T., and Otagiri, M. S-guanylation of human serum albumin is a unique posttranslational modification and results in a novel class of antibacterial agents. *J. Pharm. Sci.*, 査読有, 101: 3222-3229, 2012.  
DOI:10.1002/jps.23143
- ㉒ Sato, Y., Hatta, M., Kalim, M.F., Sawa, T., Wei, F.Y., Sato, S., Magnuson, M.A., Gonzalez, F.J., Tomizawa, K., Akaike, T., Yoshizawa, T. and Yamagata, K. Anks4b, a novel target of HNF4  $\alpha$  protein, interacts with GRP78 protein and regulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in pancreatic  $\beta$ -cells. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 287: 23236-23245, 2012.  
DOI: 10.1074/jbc.M112.368779.
- ㉓ 西田基宏、澤 智裕. 心不全におけるGタンパク質の酸化修飾と活性酸素・親電子シグナル制御. *細胞工学*, 査読無, 31: 150-154, 2012.
- ㉔ 澤 智裕、赤池孝章. 活性酸素のシグナル伝達系と分子標的. *日本臨床 (増刊号)*, 査読無, 70: 273-276, 2012.
- [学会発表] (計5件)
- ① 澤 智裕、井田智章、赤池孝章. ポリサルファーバイオロジーによるROS/NOシグナル制御. 第13回日本NO学会学術集会 (シンポジウム), 2013年6月28日, 沖縄.
- ② 澤 智裕、井田智章、赤池孝章. 過イオウ化システイン誘導体による活性酸素シグナル制御. 第24回日本生体防御学会学術総会 (シンポジウム), 2013年7月12日, 熊本.
- ③ 澤 智裕. 新規活性イオウ分子システインパースルフィドの生成と酸化ストレス制御. 第12回生物化学若手研究者セミナー, 2013年9月7日, 仙台.
- ④ 澤 智裕、井田智章、赤池孝章. システインパースルフィドの生体内生成と酸化ストレス制御. 第86回日本生化学会大会 (シンポジウム), 2013年9月13日, 横浜.
- ⑤ 澤 智裕、井田智章、赤池孝章. 過イオウ化システイン誘導体の生体内生成と酸化ストレス制御. 第1回がんと代謝研究会 (シンポジウム), 2013年10月31日, 鶴岡.
- [図書] (計1件)
- ① 澤 智裕、居原 秀、赤池孝章. 細胞の酸化ストレスを量る-親電子化合物8-nitro-cGMPの定量を例に-. 見つける、

量る、可視化する！質量分析実験ガイド：実験医学別冊（杉浦悠毅、末松 誠編）、羊土社、151-158, 2013.

〔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・教授

研究者番号：30284756

### (2) 研究分担者

赤池孝章 (AKAIKE, Takaaki)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20231798

吉武 淳 (YOSHITAKE, Jun)

国立長寿医療研究センター・研究院

研究者番号：70414349

(平成24年度まで)

### (3) 連携研究者

熊谷嘉人 (KUMAGAI, Yoshito)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

授

研究者番号：00250100