

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：32624

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790263

研究課題名(和文)リン酸化修飾による硫化水素産生酵素の制御メカニズム

研究課題名(英文)Control mechanism of hydrogen sulfide producing enzyme by phosphorylation

研究代表者

土屋 幸弘(Tsuchiya, Yukihiro)

昭和薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：30455406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：含硫アミノ酸の代謝に関わるシスタチオニンβ-シンターゼ、シスタチオニンγ-リアーゼ、および3-メルカプトピルビン酸イオウ転移酵素について、その制御をリン酸化修飾に着目し研究を行った。これらの酵素をいくつかのタンパク質リン酸化酵素を用いてリン酸化修飾を試みたところ、シスタチオニンβ-シンターゼのみがリン酸化修飾されることが明らかになった。よってシスタチオニンβ-シンターゼはリン酸化修飾によりその働きが制御されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated control mechanism of sulfur-containing amino acid metabolic enzyme, cystathionine beta-synthase (CBS), cystathionine gamma-lyase and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase by phosphorylation. We found that CBS is phosphorylated by protein kinases. These data indicate that CBS might be controlled by its phosphorylation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 薬理学一般

キーワード：含硫アミノ酸代謝酵素 リン酸化修飾 翻訳後修飾

### 1. 研究開始当初の背景

シスタチオニン-シンターゼ (CBS)、シスタチオニン-リアーゼ (CSE)、および 3-メルカプトピルビン酸イオウ転移酵素 (3-MST) は、含硫アミノ酸の代謝に関わる酵素である。それぞれ、CBS はセリンとホモシステインからシスタチオニンを作る反応を、CSE はシスタチオニ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。また、これらの酵素は、近年シグナル分子として注目を浴びている硫化水素の産生に関わると報告されている。硫化水素の作用については様々な論文が数多く執筆されているが、それらの多くは硫化水素ナトリウムなどの硫化水素ドナーを用いた研究であり、硫化水素については未だ不明な点が多いのが現状である。現在 CBS、CSE、3-MST に着目した研究は少なく、その制御メカニズムを解明することは非常に意義深いものである。

### 2. 研究の目的

本研究は含硫アミノ酸の代謝に関わる酵素である CBS、CSE、3-MST について、その制御メカニズムの解明のために行なうものである。硫化水素などのイオウを含む分子はその注目度が日々増しており、その作用や生成について近年数多くの報告がなされている。CBS、CSE、3-MST は含イオウ分子の生成に関与するといわれており、その制御メカニズムの解明は含イオウ分子の生成過程の詳細な解明にもつながると考えられる。硫化水素についてはコントラバーシャルな点が多く、その解明の為に本研究は非常に重要な位置を占めるものである。本研究は、CBS、CSE、3-MST の制御メカニズムの解析を、翻訳後修飾、特にそのリン酸化修飾に着目し行う。

### 3. 研究の方法

CBS、CSE、3-MST 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* で行なった。

(1) リコンビナント CBS、CSE、3-MST の作成

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成した。

(2) 各種タンパク質リン酸化酵素を用いた *in vitro* リン酸化アッセイ

数種類のリコンビナントタンパク質リン酸化酵素を作成し、CBS、CSE、3-MST についてそれぞれのリン酸化修飾の有無を <sup>32</sup>P-ATP を用いた *in vitro* リン酸化アッセイにより検討した。

(3) リン酸化修飾部位の同定

リン酸化修飾が認められたものについて、そのリン酸化修飾部位の同定を、質量分析を用いた方法および特異的変異体を作成することにより行なった。

(4) 酵素活性の測定

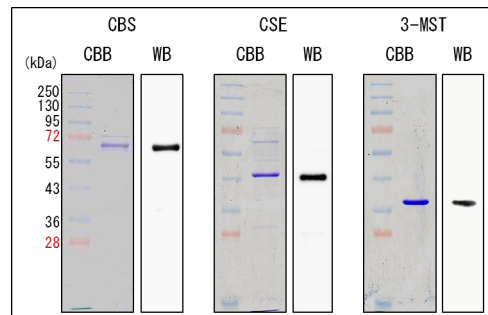
これらの酵素について、その活性を <sup>14</sup>C-セリンを基質とした RI トレーサー法および硫

化水素様物質検出蛍光プローブ HSip-1 を用いた方法により測定した。

### 4. 研究成果

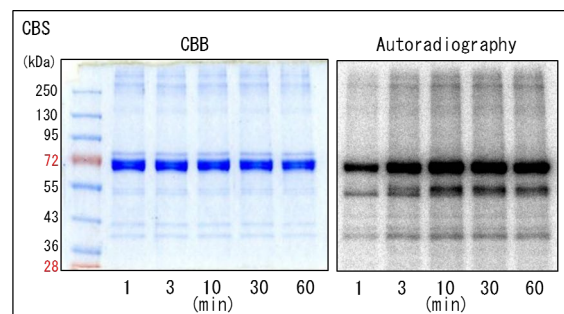
(1) リコンビナント CBS、CSE、3-MST の作成

大腸菌発現用の CBS、CSE、3-MST のプラスミドを構築し、大腸菌内で誘導後、アフィニティークロマトグラフィーを用いてリコンビナント CBS、CSE、3-MST を精製した。得られた酵素について、それぞれの特異抗体により認識されることを確認した。さらにこれらのリコンビナント酵素の活性を RI トレーサー法および蛍光プローブ HSip-1 を用い確認した。



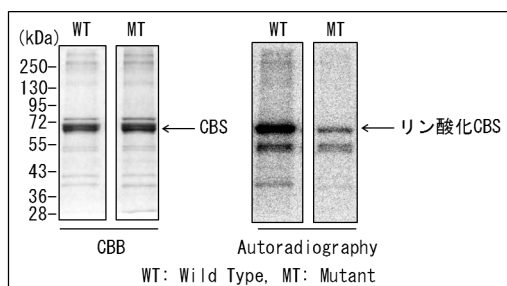
(2) CBS、CSE、3-MST のリン酸化修飾の有無の検討

得られたリコンビナント CBS、CSE、3-MST について、数種類のタンパク質リン酸化酵素を用いて *in vitro* リン酸化アッセイによりその修飾の有無を検討した。その結果、CBS のみがリン酸化修飾されることが明らかになった。CSE、3-MST については、今回用いたタンパク質リン酸化酵素によるリン酸化修飾は認められなかった。



(3) リン酸化修飾部位の同定

リン酸化修飾が認められた CBS について、質量分析を用いた方法および特異的変異体作成によりその修飾部位を同定した。さらに、リン酸化修飾されない CBS 変異体の作成に成功した。



現在、本研究で明らかになった CBS のリン酸化修飾の意義について精力的に研究を進めている。

これらの結果は CBS の翻訳後修飾による、特にリン酸化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り、今後の展開が期待されるものである。

最近、活性イオウ含有分子がホットトピックスとなっている。システインパーサルファイドやポリサルファイドなどの活性イオウ含有分子はその存在は昔から知られていたものの、その働きや生成過程は不明な点が多かった。我々のグループはごく最近 CBS、CSE がシステインパーサルファイドやポリサルファイドの生成に関わることを報告しており、またその正確な生成量やその働きを合わせて報告している。今後システインパーサルファイドやポリサルファイドなどの活性イオウ含有分子への注目はさらに高まるものと考えられ、その生成酵素である CBS、CSE の制御メカニズムに着目した本研究は、非常に重要であると考えられる。

##### 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 1件)

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., Akaike T., Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., (2014) in press.  
doi: 10.1073/pnas.1321232111  
査読有

[学会発表](計 8件)

1. 島本一史、花岡健二郎、土屋幸弘、渡邊泰男、岡部隆義、長野哲雄、浦野泰照 硫化水素(H<sub>2</sub>S)産生酵素 cystathionine-lyase (CSE)の阻害剤探索 日本薬学会 第134年会 2014年3月27日～30日 熊本大学(熊本市)

2. 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ローム解析 第86回日本生化学会大会 2013年9月11日～13日 パシフィコ横浜(横浜市)
3. 石上紋名、土屋幸弘、高田剛、長野哲雄、渡邊泰男 Sulfur transferase の酵素反応メカニズム 第128回日本薬理学会関東部会 2013年7月14日 早稲田大学国際会議場(東京)
4. 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サルファイドの生成動態とその生理機能の解明 第13回日本NO学会学術集会 2013年6月28日～29日 沖縄医師会館(那覇市)
5. 土屋幸弘、渡邊泰男 生体内 sulfur transferase の酵素反応メカニズムについて シンポジウム1「活性酸素とガス様分子によるレドックスシグナル制御」 第66回日本酸化ストレス学会学術集会 2013年6月13日 ウィンクあいち(名古屋市)
6. 土屋幸弘、久野竜弥、山田薫、波多野直哉、渋谷典広、木村英雄、渡邊泰男 CaMKII および PKC による硫化水素産生酵素 CBS のリン酸化について 第85回日本生化学会大会 2012年12月14日～16日 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡市)
7. 山田薫、久野竜弥、土屋幸弘、波多野直哉、渡邊泰男 硫化水素産生酵素シスタチオンシンターゼの CaMKII によるリン酸化修飾の検討 第126回日本薬理学会関東部会 2012年7月14日 北里大学薬学部(東京)
8. 土屋幸弘、波多野直哉、久野竜弥、山田薫、渡邊泰男 硫化水素産生酵素の CaMKII、PKA、PKC によるリン酸化修飾の検討 第12回日本NO学会学術集会 2012年6月29日～30日 神戸国際会議場(神戸市)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.shoyaku.ac.jp/labosite/yakuri/2010/08/post\\_1.html](http://www.shoyaku.ac.jp/labosite/yakuri/2010/08/post_1.html)

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・助教

研究者番号：30455406