

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670131

研究課題名(和文) タンパク質ポリチオール化の制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of protein S-polythiolation

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質ポリチオール化は、タンパク質中のシステインチオール基(-SH基)にさらにイオウ原子が付加する(-SSH)翻訳後修飾である。本研究では、methylsulfonyl benzothiazoleにてポリチオール基を修飾した後、シアン化ビオチンにてポリチオール基にビオチン残基を導入する方法を構築した。本法により、内因性のポリチオール化タンパク質として、細胞内骨格タンパク質をはじめとする種々のタンパク質を同定した。当該方法により、タンパク質ポリチオール化を介したシグナル伝達経路の解明に向けた研究がより推進することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Protein S-polythiolation is a post-translational modification that introduces additional sulfur atoms on cysteine residues in proteins. We developed specific method that enables biotin-labeling on S-polythiolated cysteines by using methylsulfonyl benzothiazole and cyanide biotin. We successfully identified endogenous S-polythiolated proteins including cytoskeleton proteins. The method we developed may help further understanding of signal transduction mediated via protein S-polythiolation.

研究分野：生化学

キーワード：シグナル伝達 プロテオミクス 翻訳後修飾 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

タンパク質ポリチオール化は、タンパク質中のシステインチオール基 (-SH 基) にさらにイオウ原子が付加する (-SSH) 反応である。これまで、ある種の酵素反応の中間体としての生成が報告されている。また、最近では、タンパク質ポリチオール化を介したシグナル制御機構の可能性も示唆されている。これらの知見から、タンパク質ポリチオール化は、タンパク質機能の制御に関わる新しい翻訳後修飾としての側面が注目されている。

一方、これまでにタンパク質ポリチオール化を検出・同定する方法が報告されているものの、その選択性や特異性については、問題点が指摘されていた。Mustafa らは、タンパク質のチオール基とポリチオール基が親電子性のアルキル化剤との反応性が異なるとの前提において、ポリチオール化タンパク質の検出を行っているが (Sci. Signal., 2, ra72, 2009)、Pan らは、ポリチオール基も親電子性のアルキル化剤と反応することを指摘していた (ACS Chem. Biol., 8, 1110, 2013)。また、これまでにポリチオール化タンパク質を網羅的に解析するプロテオミクス法については、全く報告されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質ポリチオール化を選択的に検出する反応条件を検討し、それを基盤としたプロテオミクスを構築することを目的とした。これにより、これまでほとんどわかっていない生体内におけるポリチオール化反応の制御機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

① タンパク質ポリチオール基に対するビオチンラベル化法の構築

ポリチオール基と反応し、さらにそのチオール基を2段階目の反応を促進するような活性化をもたらす試薬を検討した。米国ワシントン州立大学の Ming Xian 博士らと共同で、MSBT (methylsulfonyl benzothiazole) という試薬の反応性について検討を進めた。MSBT は、Xian 博士らによって開発されたチオール基反応試薬であるが (Org. Lett., 14, 3396, 2012)、この MSBT がポリチオール基に対して反応するかどうかを検討した。引き続き活性化されたポリチオール基にシアノ化ビオチン誘導体を反応させることにより、ポリチオール基をビオチン標識した。ポリチオール基の活性化試薬は、(1) チオール基に対して選択的に反応すること (リジンやヒスチジンなどの求核性の残基に反応しない)、(2) チオール基、ポリチオール基の両方に反応すること、(3) ポリチオール基に反応することで、ジスルフィド結合を活性化できること、が必要である。

このような観点から、MSBT 以外にもポリチオール基の活性化試薬を検討した。

② ポリチオール化プロテオミクス法への展開

プロテオミクスへの展開では次の2つの方法を検討した。まず第1の方法では、ビオチン標識を行ったタンパク質サンプルを2次元電気泳動にて分離し、その後、アビジン結合西洋わさびペルオキシダーゼによって発色させることでビオチン化されたタンパク質を検出した。同じく2次元分離したゲルを銀染色し、タンパク質全体を検出した。ビオチン化タンパク質に該当するスポットを銀染色したゲルから切り出し、還元アルキル化・トリプシン消化して、最終的に質量分析にてタンパク質を同定した。我々は、同様の手法を用いて、タンパク質を同定できることを報告している (Antioxid. Redox Signal., 2014)。もう一つの方法では、ビオチン化タンパク質をアビジン結合担体にてまず吸着して、非ビオチン化タンパク質を除去した後、ビオチン化タンパク質を溶出した。得られたタンパク質サンプルを2次元分離し、そのゲルから直接スポットを切り出してタンパク質を同定した。この時、ビオチン化タンパク質の溶出を効率良く行うために、monomeric アビジン結合担体を用いた。

4. 研究成果

ポリチオール化タンパク質の特異的解析法の構築

ポリチオール化タンパク質を特異的に標識するビオチンラベル化法を構築した。具体的には、MSBT (methylsulfonyl benzothiazole) にてポリチオール基を修飾した後、シアノ化ビオチンにて特異的に置換反応を誘導することでポリチオール基にビオチン残基を導入した。これに対して、アビジン化ペルオキシダーゼを反応させることでウェスタンブロット法によってポリチオール化タンパク質の検出に成功した。さらに修飾タンパク質を2次元電気泳動で展開し、そのスポットを消化したサンプルを質量分析にて解析することで、ポリチオール化タンパク質の網羅的解析が可能であることを明らかにした。システインパースルフィドの生成酵素のひとつであるシスタチオニリナーゼの強制発現により、細胞内のポリチオール化タンパク質のバンド強度が増強した。このことから、当該法が細胞内のポリチオール化タンパク質の優れた検出法として適応可能であることが示された。

タンパク質へのイオウ転位反応の解析

これまでに細胞内では、低分子ポリチオール分子としてシステインパースルフィドやグ

ルタチオンパースルフィドが豊富に存在することが分かってきた。これら低分子ポリチオール分子からタンパク質チオール基へイオウ原子が転移する過程を、上述のタンパク質ポリチオール化解析法にて検討した。その結果、グルタチオンパースルフィドから、モデルタンパク質として用いた GAPDH へイオウ転位反応が効率よく起こっていることが明らかとなった。このことから、細胞内のパースルフィドプールが、タンパク質ポリチオール化レベルの制御に密接に関わる可能性が示唆された。

細胞内ポリチオール化タンパク質の網羅的解析

上述したタンパク質ポリチオール化解析法を用いて、細胞内にて内因性にポリチオール化されているタンパク質を網羅的に解析した。その結果、細胞内骨格タンパク質、解糖系タンパク質、シャペロンタンパク質をはじめとする種々のタンパク質が同定された。今後、当該方法を用いることにより、タンパク質ポリチオール化を介したシグナル伝達経路の解明に向けた研究がより推進することが期待される。

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12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 H₂S, hydropersulfides and derivaed species: implications to their possible biological activity and utility. *Free Radic. Biol. Med.*, 査読有, 77: 82-94, 2014.
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 Shinkai, Y., Abiko, Y., Ida, T., Miura, T., Kakehashi, H., Ishii, I., Nishida, M., Sawa, T., Akaike, T. and Kumagai, Y. Reactive sulfur species-mediated activation of the Keap1-Nrf2 pathway by 1,2-naphthoquinone through sulfenic acids formation under oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.*, 査読有, 28: 838-847, 2015.
DOI:10.1021/tx500416y.
- ⑩ Honda, K., Yamada, N., Yoshida, R., Ihara, H., Sawa, T., Akaike, T. and Iwai, S. 8-Mercapto-cyclic GMP mediates hydrogen sulfide-induced stomatal closure in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.*, 査読有, 56: 1481-1489, 2015.
DOI:10.1093/pcp/pcv069.
- ⑪ Kunieda, K., Tsutsuki, H., Ida, T., Kishimoto, Y., Kasamatsu, S., Sawa, T., Goshima, N., Itakura, M., Takahashi, M.,

Akaike, T. and Ihara, H. 8-Nitro-cGMP enhances SNARE complex formation through S-guanylation of Cys90 in SNAP25. *ACS Chem. Neurosci.*, 査読有, 6: 1715-1725, 2015.

DOI:10.1021/acscchemneuro.5b00196.

- ⑫ Akashi, S., Ahmed, K. A., Sawa, T., *Ono, K., Tsutsuki, H., Burgyne, J. R., Ida, T., Horio, E., Prysyzhna, O., Oike, Y., Rahaman, M. Md., Eaton, P., Fujii, S. and Akaike, T. Persistent activation of cGMP-dependent protein kinase by a nitrated cyclic nucleotide via site specific protein S-guanylation. *Biochemistry*, 査読有, 55: 751-761, 2016. (*corresponding author)
DOI:10.1021/acs.biochem.5b00774.

[学会発表] (計8件)

- ① 澤 智裕、小野勝彦、Ahtesham Ahmed、津々木博康、井田智章、藤井重元、赤池孝章. Persistent activation of protein kinase G via protein S-guanylation: Implication for endotoxin shock 第88回日本細菌学会総会、2015年3月28日、岐阜。
- ② 津々木博康、藤井重元、井田智章、小野勝彦、松永哲郎、居原 秀、赤池孝章、澤 智裕. Protein S-guanylation occurring in Escherichia coli and its association with growth condition. 第88回日本細菌学会総会、2015年3月26日、岐阜。
- ③ 澤 智裕. 活性イオウ分子による抗酸化システム制御 (特別講演). 第15回日本NO学会学術集会、2015年6月26日-27日、大阪。
- ④ 津々木博康、小野勝彦、井田智章、藤井重元、松永哲郎、居原 秀、赤池孝章、澤 智裕. 大腸菌における蛋白質 S-グアニル化: 制御因子と標的タンパク質の同定. 第15回日本NO学会学術集会、2015年6月26日-27日、大阪。
- ⑤ 澤 智裕. 蛋白質 S-グアニル化と活性酸素シグナル伝達(シンポジウム). 日本プロテオーム学会 2015年 年会 JHUP0 第13回大会、2015年7月23日-24日、熊本。
- ⑥ 小野勝彦、津々木博康、張 田力、赤池孝章、澤 智裕. 細菌におけるシステインパーサルフィドおよび関連分子の生成動態. 第68回日本細菌学会九州支部総会第52回日本ウイルス学会九州支部総会、2015年9月4日-5日、大分県別府市。
- ⑦ 津々木博康、小野勝彦、井田智章、張 田力、居原 秀、赤池孝章、澤 智裕. 大腸菌における蛋白質 S-グアニル化の制御

因子と標的タンパク質の同定. 第68回日本細菌学会九州支部総会第52回日本ウイルス学会九州支部総会、2015年9月4日-5日、大分県別府市。

- ⑧ 澤 智裕. 蛋白質 S-グアニル化とレドックスシグナル伝達制御. 第39回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム、2015年9月10日-12日、大分県別府市。

[図書] (計1件)

- ① Sawa, T. Oxidative stress regulation by reactive cysteine persulfides in inflammation. In "Chronic inflammation: Mechanisms and Regulation", Miyasaka, M. & Takatsu, K. eds., Springer, in press.

[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

井田智章 (IDA, Tomoaki)

東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 70570406