

【総説】

活性イオウ分子によるエネルギー代謝制御

西村 明¹、本橋 ほづみ²、赤池 孝章¹

¹ 東北大学 大学院医学系研究科 環境医学分野

² 東北大学 加齢医学研究所 遺伝子発現制御分野

要約

システインパースルフィド (CysSSH) を代表とする活性イオウ分子は通常チオール基に複数のイオウ原子が付加したポリスルフィド構造を有している化合物であり、通常チオール化合物に比較すると多彩なレドックス活性を有している。最近、システニル tRNA 合成酵素 (cysteinyI-tRNA synthetase: CARS) が、生体内の主要な CysSSH 合成系であることが判明した。また、ミトコンドリア局在型 CARS から産生された CysSSH は、電子受容体およびプロトン供与体としてミトコンドリア膜電位形成に寄与し、新規エネルギー代謝経路「イオウ呼吸」を営み生命活動をコントロールしていることが明らかとなった。本稿では、活性イオウ分子の主要な生合成経路および新規エネルギー代謝経路「イオウ呼吸」に関して我々が得た最新の知見を紹介する。

キーワード : reactive sulfide species, cysteine persulfide, cysteinyI-tRNA synthetase, sulfur respiration, mitochondrial bioenergetics

1. はじめに

「イオウ (硫黄、元素記号:S)」は酸素と同じ第 16 原子族に属し、生体にとって必須元素である。アメリカ食品医薬品局に承認されている医薬品のうち約 25% の品目にイオウが含まれていることから、イオウ含有化合物の重要性が垣間見える。

最近まで、イオウ代謝物の研究は硫化水素の生理機能に関することが中心であり、硫化水素は一酸化窒素や一酸化炭素に続く第 3 のガス状メディエーターとして注目されてきた。しかし、硫化水素の pKa は約 7 であり、生体内ではほとんど (>80%) が硫化水素イオン (HS⁻) の状態で存在すること、そもそも硫化水素自体の化学的反応性 (特にその求核性) が極めて低いこと、また、イオウは酸化還元状態によって様々な多量体構造をとることから、ガス状の硫化水素そのものが本当に生理活性を

有しているかについては疑問視されていた [1]。また、最近、各種培養細胞やマウス個体レベルで、これまで硫化水素合成系として報告されてきたシスタチオニン-β-シクターゼ (CBS) やシスタチオニン-γ-リアーゼ (CSE)、3-メルカプトピルビン酸イオウ転移酵素の発現が低下・欠損しても、硫化水素産生量に有意な変動はないことが分かってきた。このことは、硫化水素の生理作用として報告されていた様々な現象が硫化水素以外のイオウ代謝物によるものであることを強く示唆している。実際、我々はこれまで、CBS や CSE の主要酵素産物は硫化水素でなく、活性イオウ分子の一種であるシステインパースルフィド (CysSSH; 図 1 A) であることを報告している [2]。現在では、硫化水素に関するこれまでの報告は解析方法の稚拙さ、低い精度 (低特異性・低感度など) と、残念なことであるが、科学的に不完全で不適切な検証により、CysSSH や関連ポリスルフィド代謝物の分解産物もしくはアーチファクトを見ていただけであり、真の活性分子は CysSSH を含む活性イオウ分子であると考えられる。パースルフィドやポリスルフィドに代表される活性イオウ分子は、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]_n-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

連絡先: 赤池孝章 〒 980-0872

宮城県仙台市青葉区星陵町 2-1 5 号館 8 階

TEL : 022-717-8101

FAX : 022-717-8219

E-mail : takaike@med.tohoku.ac.jp

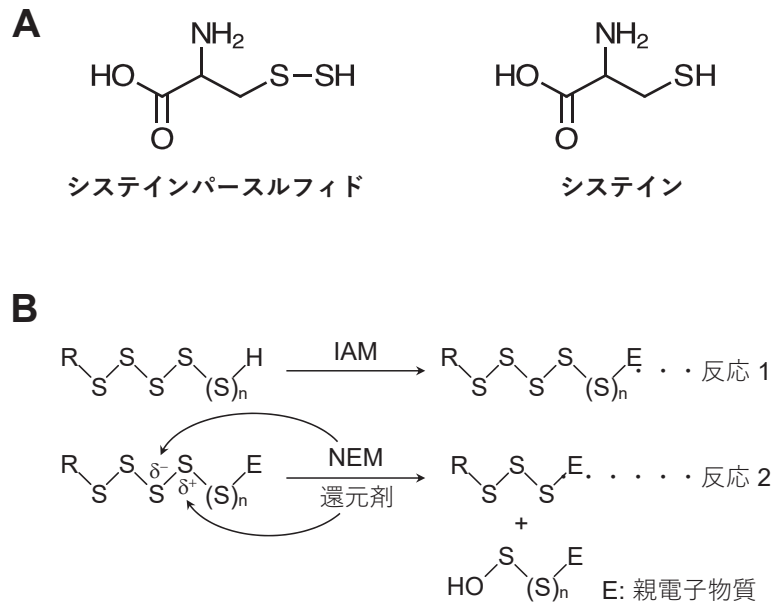


図1. システインパーサルフィドとシステインの構造、および、ポリスルフィドの化学的特性 (文献5より改変)

- A. システインパーサルフィドは、システインのチオール基にさらに過剰な硫黄が結合した構造を持っている。この僅かな違いにより、システインパーサルフィドは生体内でシステインには無い生理機能を発揮する。
- B. ヨードアセトアミド (IAM) などの親電子性が比較的弱い試薬はポリスルフィド末端のヒドロチオール部分と反応する (反応1)。一方、エチルマレイミド (NEM) などの比較的強い親電子性を有する試薬ではポリスルフィドの構造内部に存在するイオウ側鎖と繰り返し反応が起こり、ポリスルフィド構造が壊れる (反応2)。また、還元剤によってもポリスルフィド構造は分解される (反応2)。

オール化合物に比べヒドロチオール自身の求核性・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 (図1 B)、通常チオール化合物に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、通常の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的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、活性イオウ分子として生体内で多彩な生理機能を発現している [3, 4]。そこで、本稿では、近年ようやくその実体が見えてきた活性イオウ分子、特に CysSSH の主要な生合成経路およびその興味深い代謝・生理機能に焦点をあて最新の知見を紹介する。

2. CysSSH 生合成経路の発見

これまで我々は、生体内の CysSSH 産生系として、CBS および CSE が関与することを報告してきたが [2]、一方で CBS や CSE とは異なる CysSSH 産生機構の存在も予想していた。その理由として、心筋細胞のように CBS や CSE がほとんど発現していない細胞においても CysSSH 産生が観察されていたことが挙げられる。我々は CysSSH が低分子だけでなく、タンパク質中にもタンパク質ポリスルフィドとして豊富に存在していることを見出し [5]、翻訳に関連した酵素が活性イオウ分子の産生系であると推測した。そこで、翻訳時にシステインを tRNA に結合 (アミノアシル化) させるシステイニ

ル tRNA 合成酵素 (CARS) に着目し解析した結果、大腸菌 CARS が効率よく CysSSH を産生することを見出した。また、哺乳類の場合、細胞質に局在する CARS1 およびミトコンドリアに局在する CARS2 が存在するが、両酵素においても CysSSH 合成活性を検出している。次に、ゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 システムを用いて、ヒト胎児腎細胞 (HEK293T 細胞) の CARS2 遺伝子欠損株 (以下、CARS2 破壊株) を構築したところ、CysSSH および全ての関連硫黄代謝物 (システインおよびグルタチオンなどの各種パーサルフィド/ポリスルフィド、さらに硫化水素やチオ硫酸など) の有意な減少が認められた。さらに、アミノアシル化活性の発現に必要なシステインがセリンに変異した CARS2 変異体を作製し (「3. CPERS の酵素学的特徴」を参照)、プラスミドを介して CARS2 破壊株に導入・発現させたところ、ミトコンドリア固有のタンパク質合成は回復しないが、CysSSH および関連硫黄代謝物の産生は野生株のレベルまで回復した。続いて、CRISPR-Cas9 システムによって CARS2 遺伝子欠損マウスの作製を試みた。CARS2 完全 (ホモ) 欠損マウスは胎生致死であったが、CARS2 ヘテロ欠損マウスでは成体が得られた。CARS2 ヘテロ欠損マウスの肝臓および肺における CysSSH 量を測定した結果、野生型に比べて CysSSH および関連硫黄代謝物が半分減少していることが判明した。なお、CARS2 ヘテロ欠損マウスにおけるミトコンドリアのタンパク質合成は正常であった。よって、CysSSH をはじめとする全ての硫黄代謝物の生体内生成が CARS2 に依

存していることを示している。すなわち、システインル tRNA 合成酵素 CARS が翻訳のマスター酵素であると同時に CysSSH の主要な産生酵素 (cysteine persulfide synthase : CPERS と命名) であり、両者の活性は独立したものである [5,6]。一方、本稿では詳しく述べないが、低分子やタンパク質のポリスルフィドの制御システムとしてチオレドキシシ・チオレドキシシレダクターゼが分解代謝経路として機能していることが明らかになりつつある [7]。

3. CPERS の酵素学的特徴

CARS の CPERS 活性はシステインを基質とし、アミノアシル tRNA 合成に必要な ATP は要求しない。CPERS 活性の特徴として、アミノ基転移や脱炭酸に必要な補酵素であるピリドキサル -5'-リン酸 (PLP) を要求する。PLP の結合部位を解析した結果、生物間で高度に保存された KIIK や KMSK モチーフに存在するリジンに結合していることが質量分析解析および、立体構造モデリングから判明した (図 2) [5]。これらのリジンをアラニンに置換した CARS 変異体は PLP の結合量が減少し、CPERS 活性が優位に減少する。また、無細胞タンパク質合成系を用いてアミノアシル化活性を翻訳活性として検討した結果、これらの変異体は野生体と同レベルのアミノアシル化活性を維持していることがわかった。一方、アミノアシル化活性に必須であるシステイン (亜鉛の結合部位) を置換した変異体は報告通りアミノアシル化活性が完全に消失するが、興味深いことに CPERS 活性に関しては野生株と同等である。これらの

ことから、CPERS 活性とアミノアシル化活性は完全に独立したものであると示されている。

我々は、これまでに CSE や CBS も CysSSH 合成活性を有していることを報告しているが、両酵素と CARS は基質特異性に大きな違いがある。CARS はシステイン (CysSH) を基質とする一方で、CSE や CBS はシステインの酸化型であるシスチンを基質とする。酵素パラメータを求めたところ、大腸菌 CARS の K_m 値 (基質: システイン) は約 $10 \mu\text{M}$ であり、CSE の K_m 値 (基質: シスチン) は約 $300 \mu\text{M}$ であった [5]。従って、通常の細胞内システイン濃度 ($100\text{-}1000 \mu\text{M}$) やシスチン濃度 (数 μM) を考慮すると、生理的条件下では、CSE がシスチンを基質に CysSSH を産生するのではなく、CARS がシステインを基質に CysSSH を産生するものと思われる。むしろ、CSE や CBS は元来のシステイン合成系として働き、CSE と CBS により生成されたシステインから CARS が CysSSH を産生していることがわかっている (図 3)。実際、CSE や CBS をノックダウンすると、細胞内のシステイン量の減少が起こり、それに伴い CARS 依存的な CysSSH 産生が低下する。しかしながら、酸化ストレス条件下では細胞内のシステインが酸化されシスチン量が増加することが想定されるので、そのような環境では、CBS や CSE も CysSSH 産生系として機能するであろう。ちなみに、 V_{max} 値に関しては CSE (約 $50 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$) の方が大腸菌 CARS (約 $1.5 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{h}^{-1}$) より約 30 倍高いが、 k_{cat}/K_m は両酵素とも約 $2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ であるため、大腸菌 CARS と CSE の触媒効率は同程度である。

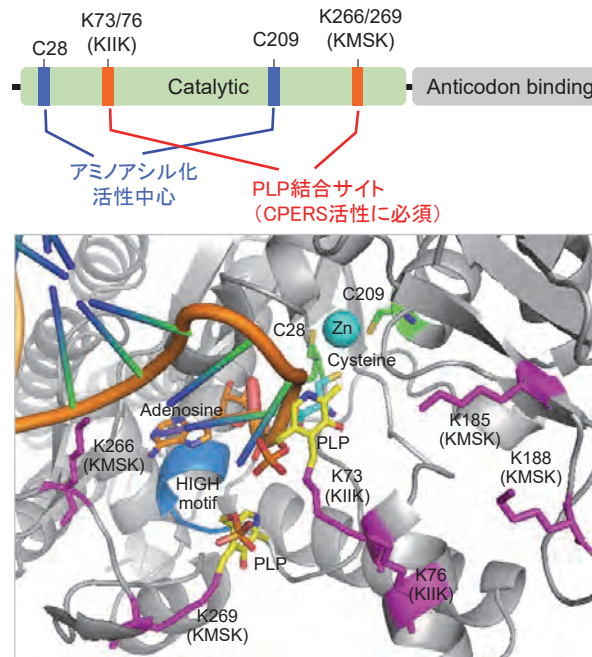


図 2. 大腸菌 CARS のドメイン構造と 3次元構造のコンピュータモデリング (文献 5 より改変)

SwissDock プログラムを利用して、大腸菌 CARS と PLP のドッキングシュミレーションを行った。KIIK や KMSK モチーフのリジンに PLP が結合している。

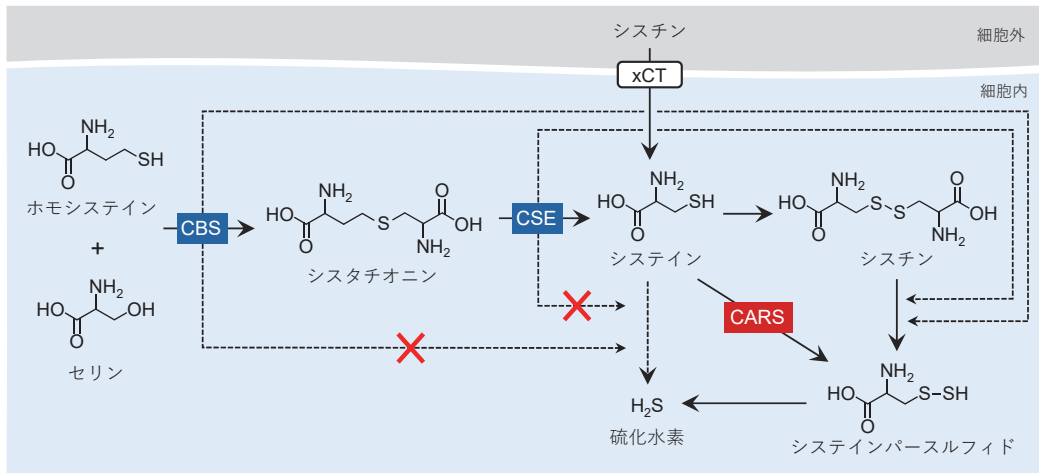


図3. CARS と CBS・CSE の代謝連関

生理的な細胞内環境において CBS や CSE が硫化水素を直接産生することはなく、通常は細胞内システインの供給経路となっている。CARS はシステインを基質に CysSSH を産生しており、硫化水素はその2次代謝物である。細胞内システイン量が増加するような環境(酸化ストレス条件下)では、CBS や CSE から CysSSH が産生される可能性がある。
xCT: シスチン/グルタミン酸トランスポーターシステム

4. イオウ呼吸の発見

CARS2 の PLP 結合部位の変異体(翻訳活性: 正常、CPERS 活性: 欠損)を発現させた HEK293T 細胞や HEK293T 細胞の CARS2 破壊株において、ミトコンドリアの膜電位形成が野生株に比べて大きく減少していた [5]。これは、CysSSH が膜電位形成を介してミトコンドリアのエネルギー代謝に貢献していることを示唆している。ミトコンドリアにおいては、電子伝達系では電子供与体である NADH から最終的な電子受容体である酸素分子に電子が移動する際にミトコンドリア内膜にプロトン勾配が生じることで膜電位が形成され、その膜電位に依存して ATP 合成が行われている。電子伝達系を構成

するタンパク質の一部はミトコンドリア DNA (mtDNA) にコードされているため、エチジウムブロマイドにより mtDNA を複製阻害することで電子伝達系の機能が低下する。HEK293T 細胞の電子伝達系抑制細胞のイオウ関連化合物の定量的メタボローム解析を行ったところ、電子伝達系の低下により細胞内 CysSSH 量が増加し、硫化水素量が減少することを見出した。また、CysSSH と硫化水素の物質収支がほぼ一致しており、正常細胞では電子伝達系に依存して CysSSH が2電子還元され硫化水素に変換されていることが示された。つまり、CysSSH が電子受容体として機能していることが分かった。このことから、我々は哺乳類における「イオウ呼吸」(図4)

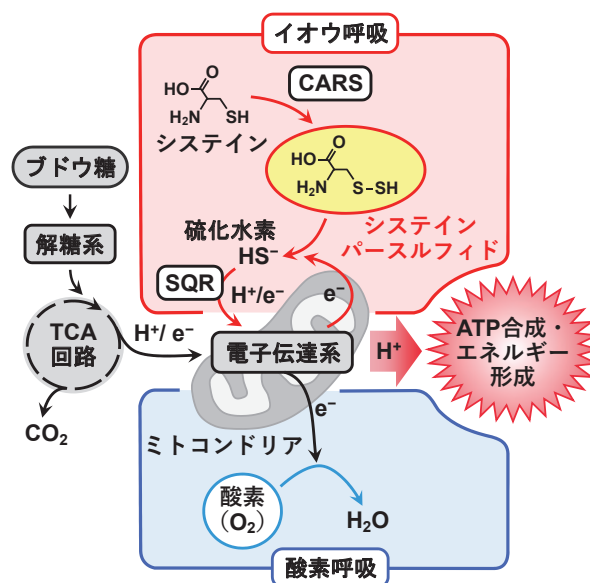


図4. イオウ呼吸のモデル図(仮説)

CARS2 由来の CysSSH から電子伝達系と共役して二次的に発生する硫化水素が SQR の働きによって、Q サイクルを介してプロトン勾配を形成している。この際、酸素呼吸とは異なり、電子はサイクリックな電子伝達の側副路のなかで再利用される。

を提唱している [5,6,8]。すなわち、イオウ呼吸では、電子伝達系の最終的な電子受容体が、通常の酸素呼吸の酸素分子 (O_2) ではなくパースルフィド (S_2 , CysSSH) であり、酸素呼吸の場合、電子伝達系の電子は、酸素分子の最終的な還元代謝産物である水分子として排出されるが、イオウ呼吸の場合、CysSSH に電子が受け渡され硫化水素が発生する。ミトコンドリア内には硫化水素のプロトンキノン (Q) サイクルに供与する酵素である sulfide:quinone oxidoreductase (SQR) が存在する。つまり、CysSSH が電子伝達系と共役して二次的に発生する硫化水素が SQR の働きによって、Q サイクルを介してプロトン勾配を形成しているものと推察される。これまで、硫黄酸化細菌 (*Thiobacillus* 等) は、SQR によって無機イオウ化合物を酸化し、エネルギー生産を行っていることが知られている。また、光合成細菌において、SQR が効率的な光合成に重要であることが示唆されている。このような代謝システムが哺乳類におけるイオウ呼吸の起源なのかもしれない。

5. 活性イオウ分子による寿命制御

これまで、栄養飢餓により寿命が延長することが示唆されているが、その分子メカニズムは不明であった。近年、硫化水素代謝と寿命の関連が示唆されている [9]。すなわち、線虫において CBS 過剰発現株の寿命が延長すること、また CBS ノックダウン株の寿命が減少することも示されている。CBS の主酵素産物が硫化水素でなく CysSSH であることを考慮すると [2]、CysSSH が寿命制御因子である可能性が高い。実際、我々は寿命研究のモデル生物である出芽酵母において、CARS から産生される CysSSH が寿命調整に関わっていることを示唆する知見を得ている (未発表データ)。さらに、活性イオウ分子を添加することで、出芽酵母の寿命が延長する結果も得ている (未発表データ)。今後、CysSSH や活性イオウ分子代謝系、すなわち、イオウ呼吸による新たな寿命制御メカニズムの解明が大きな課題であろう。また、活性イオウ分子・イオウ呼吸によってサポートされる老化防止・長寿効果は、幹細胞生物学などの代謝維持・活性化メカニズムの理解への一筋の光となるであろう。

6. おわりに

好気呼吸によるエネルギー産生では活性酸素の産生は避けることが出来ない。システインパースルフィドあるいはその代謝物であるグルタチオンパースルフィドは、活性酸素を強力に消去する新しい内因性の抗酸化物質として、その生物機能が再発見された「活性イオウ分子」である。その生成酵素を探索する中で、ミトコンドリアに局在する CARS2 から生成したシステインパースルフィドが「イオウ呼吸」を維持する極めて驚くべき発見へと展開した。シアノバクテリアが繁栄する以前の環境では、地球上に酸素がほとんど存在せず、生体はイオウ

ウを利用したエネルギー代謝をしていたと考えられている。今回の発見は、大酸化イベント後に大きな進化を遂げた哺乳細胞において、システインパースルフィドを利用した「イオウ呼吸」が重要であることを示している。今後、「イオウ呼吸」を自在に調節し、生体内のエネルギー産生量を増加させることで、老化防止・長寿や慢性難治性の呼吸器や心疾患の予防・治療法の開発へと繋がることを期待される。一方、悪性腫瘍 (がん) では酸素に依存しないエネルギー代謝が知られているが、これらがんでは「イオウ呼吸」を積極的に利用していることが予想される。今後、イオウ代謝物をがんのバイオマーカーにした診断法や「イオウ呼吸」を制御することによる新しいがん予防や治療法の開発が期待される。

参考文献

1. Nishida M, Sawa T, Kitajima N, *et al.* Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nature Chem Biol* 8 : 714-724, 2012.
2. Ida T, Sawa T, Ihara H, *et al.* Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 111 : 7606-7611, 2014.
3. Takahashi N, Wei FY, Watanabe S, *et al.* Reactive sulfur species regulate tRNA methylation and contribute to insulin secretion. *Nucleic Acids Res* 45 : 435-445, 2017.
4. Heppner DE, Hristova M, Ida T, *et al.* Cysteine perthiosulfenic acid (Cys-SSOH): A novel intermediate in thiol- based redox signaling? *Redox Biol* 14 : 379-385, 2018.
5. Akaike T, Ida T, Wei FY, *et al.* Cysteinylation of tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat Commun* 8 : 1177, 2017.
6. Fukuto JM, Ignarro LJ, Nagy P, *et al.* Biological hydropersulfides and related polysulfides - a new concept and perspective in redox biology. *FEBS Lett* 592 : 2140-2152, 2018
7. Dóka É, Pader I, Bíró A, *et al.* A novel persulfide detection method reveals protein persulfide- and polysulfide-reducing functions of thioredoxin and glutathione systems. *Sci Adv* 2 : e1500968, 2016
8. Fujii S, Sawa T, Motohashi H, *et al.* Persulfide synthases that are functionally coupled with translation mediate sulfur respiration in mammalian cells. *Br J Pharmacol* doi: 10.1111/bph.14356., 2018
9. Hine, C. *et al.* Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits. *Cell* 160 : 132-144, 2015

Energy metabolism regulated by reactive sulfur species

Akira Nishimura¹, Hozumi Motohashi², Takaaki Akaike¹

¹Department of Environmental Medicine and Molecular Toxicology, Tohoku University
Graduate School of Medicine

²Department of Gene Expression Regulation, Institute of Development, Aging and Cancer,
Tohoku University

Abstract

Reactive sulfide species (RSS) including cysteine persulfide (CysSSH) are produced in prokaryotic/eukaryotic cells and play critical roles in the regulation of redox and electrophilic signaling. However, little is known about these biosynthesis and physiological functions. We recently demonstrated that cysteinyl-tRNA synthetase (CARS) is a novel CysSSH synthase. Most importantly, mitochondrial function in bioenergetics is supported by CysSSH derived from mitochondrial CARS. Here, we provide an overview of recent advances in RSS research and our understanding of the mechanisms underlying the formation and the physiological roles of RSS, with a primary focus on the formation of CysSSH by CARS and the most fundamental mitochondrial bioenergetics mediated by RSS, that is, sulfur respiration.

Keywords : reactive sulfide species, cysteine persulfide, cysteinyl-tRNA synthetase, sulfur respiration, mitochondrial bioenergetics