助成番号　210247	５－２

研 究 成 果 報 告 書

研究テーマ（和文）	超硫黄分子による生理活性調節のためのシグナル伝達機構の分子基盤			
研究テーマ（英文）	Molecular basis of supersulfide response involved in sulfide-mediated regulation of physiological activities			
研究期間	2021年 ～ 2023年		研究機関名　東京大学	
研究代表者	氏名	（漢字）	清水　隆之	
		（カタカナ）	シミズ　タカユキ	
		（英文）	Takayuki Shimizu	
	所属機関・職名		東京大学大学院総合文化研究科・助教	
共同研究者 ＊２名をこえる場合は、【別紙追加用紙】(P3)に３人目以降を追記してください。	氏名	（漢字）		
		（カタカナ）		
		（英文）		
	所属機関・職名			
	氏名	（漢字）		
		（カタカナ）		
		（英文）		
	所属機関・職名			

概要 （600 字～800 字程度にまとめてください。）

超硫黄分子は、ほぼ全ての生物に普遍的な生理活性物質として機能することがわかってきたが、そのシグナル伝達機構には不明な点が多い。私は、紅色細菌から同定した超硫黄分子応答性転写因子 SqrR を起点とした、シグナル伝達機構の一端を明らかにした。

SqrR は、超硫黄分子によって 2 つのシステイン残基の間で分子内ポリスルフィド架橋が形成されることで、転写制御活性が変化する。このように、超硫黄分子によるシグナル伝達は、硫黄転移に基づいて行われるが、シグナル伝達に関わる硫黄の細胞内動態はよくわかっていない。そこで私は、SqrR によって転写制御を受ける超硫黄代謝関連酵素について、その酵素活性と細胞内超硫黄分子の代謝変化への影響を検証することで、SqrR 依存的なシグナル伝達に関わる硫黄転移経路の解明を試みた。

SqrR 依存的な超硫黄分子シグナル伝達に関与する超硫黄分子代謝系を明らかにするために、SqrR の転写活性を指標にして、逆遺伝学的に関連遺伝子の同定を試みた。その結果、3 種類の酵素を同定した。

1 つは主要な超硫黄分子代謝酵素として知られる SQR であり、*sqr* 遺伝子を破壊すると、外来性硫化物による SqrR の転写抑制能の不活化が持続せず、この転写調節の時間動態は細胞内ポリスルフィド量の変化に相関することがわかった。この *sqr* 欠損株における SqrR とポリスルフィド動態の減衰は、細胞へのシステインパースルフィド（CysSSH）の添加によって完全に回復するが、グルタチオンパースルフィド（GSSH）の添加では回復しなかった。さらに、ポリスルフィド修飾に基づいた SqrR の DNA からの解離速度が、GSSH に比べて CysSSH では速く生じることがわかった。また、質量分析から、CysSSH と GSSH で得られるポリスルフィド架橋生成物は異なることが示された。

残りの 2 つについては、シグナル伝達の解消に寄与することが示唆されている。少なくとも 1 つは、SqrR のポリスルフィド架橋を還元することで、SqrR の転写活性の調節に関わる可能性が示されている。

これらの結果は、ポリスルフィドの代謝と SqrR を介したポリスルフィド応答性転写調節の間の新しい関係を確立するものである。

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）

雑誌	論文課題	Polysulfide metabolizing enzymes influence SqrR-mediated sulfide-induced transcription by impacting intracellular polysulfide dynamics				
	著者名	T. Shimizu et al.	雑誌名	PNAS Nexus		
	ページ	Pgad048	発行年	2 0 2 3	巻号	2 (3)
雑誌	論文課題	Thioredoxin-2 regulates SqrR-mediated polysulfide-responsive transcription via reduction of a polysulfide link in SqrR				
	著者名	T. Shimizu et al.	雑誌名	Antioxidants		
	ページ	699	発行年	2 0 2 3	巻号	12 (3)
雑誌	論文課題					
	著者名		雑誌名			
	ページ	～	発行年		巻号	
図書	書名					
	著者名					
	出版社		発行年		総ﾍﾟｰｼﾞ	
図書	書名					
	著者名					
	出版社		発行年		総ﾍﾟｰｼﾞ	

英文抄録（100 語～200 語程度にまとめてください。）

Polysulfide plays an essential role in controlling various physiological activities in almost all organisms. We recently identified the polysulfide-responsive transcription factor SqrR from alphaproteobacteria and elucidated the mechanism of persulfide responsiveness.

Previous study revealed that SqrR forms an intramolecular tetrasulfide bond between two conserved cysteine residues in SqrR homologues when incubated with the polysulfide donor and then losts the repressor activity. However, it is unclear which kind of polysulfide modifies SqrR *in vivo*, and how these polysulfide are generated.

In an effort to better define the intersection of polysulfide metabolism and polysulfide sensing in cells, I investigated the impact of polysulfide metabolic enzymes on the temporal dynamics of cellular polysulfide speciation and transcriptional regulation by SqrR. I show that exogenous sulfide-induced SqrR de-repression at longer culture times is lost upon disruption of the *sqr* gene in a way that tracks with the intracellular polysulfide levels in Δ*sqr* vs. wild-type strains. This attenuated response of SqrR and polysulfide dynamics in the Δ*sqr* strain is fully reversed by the addition of cysteine persulfide (CysSSH), but not by glutathione persulfide (GSSH), to cells. Furthermore, we observe a faster rate of SqrR cysteine thiol oxidation of DNA-bound SqrR with CysSSH relative to GSSH, which leads to DNA dissociation in vitro. The MS-based kinetic profiling strategy showed distinct polysulfide-crosslinked products obtained with CysSSH vs. GSSH.

These results establish a novel association between sustained polysulfide production and SqrR-mediated polysulfide-induced transcription.