

平成 30 年 4 月 23 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08294

研究課題名(和文) 肝臓におけるトランススルフェーションによるシステイン取込みと硫化水素の役割の解明

研究課題名(英文) Roles of transsulfuration-mediated cysteine uptake and hydrogen sulfide in liver

研究代表者

藤井 順逸 (Fujii, Junichi)

山形大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00222258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：シスチン輸送体のxCTは健常な野生型マウスの肝臓には発現していないが、アセトアミノフェン過剰投与や初代培養することで発現誘導され、xCT欠損マウスでは強い肝障害を認めた。初代培養したxCT欠損マウス由来肝細胞にはシステイン-グルタチオン系に異常を認めなかったが、オファルミン酸の蓄積が増加した。以上の結果は、肝臓へのシステイン供給経路としてはトランススルフェーション経路が中心的な働きをしており、酸化ストレスなどによってグルタチオン量が低下した場合にはxCTが発現誘導され、肝臓のレドックスホメオスタシスに働くシステイン供給系のバックアップ経路として働いていることを示している。

研究成果の概要(英文)：xCT, a cystine transporter, was not expressed in liver of wild-type mice but induced by acetaminophen overdose or under cultivation conditions. Acetaminophen overdose aggravated the xCT-deficient mouse more strongly than the wild-type mouse. While xCT-deficient hepatocytes showed normal phenotype regarding the cysteine-glutathione system, ophthalmic acid accumulated more in the xCT-deficient hepatocytes. These results implied that the transsulfuration pathway plays a central role in supplying cysteine in the liver. When glutathione levels decline, such as the case of elevated oxidative stress, xCT is induced and functions as a backup system to supply cysteine to maintain liver redox homeostasis.

研究分野：生化学分子生物学

キーワード：グルタチオン システイン 肝障害



OPTの合成はむしろ亢進することが分かった。  
 以上の結果は、CysとともにTSPによって生成する2-オキソ酪酸から2-アミノ酪酸が合成され、それがCysの代わりにGSH合成系の基質として用いられた結果OPT量を増加させたことを示している(発表論文)(図1)。

### (3) 培養細胞を用いた検討

WTとxCT-KOマウスから樹立した初代培養肝細胞をCys/Met欠乏培地で培養し、LC-MS法によりMet・Cys・GSH・OPTの定量解析を行い、Hepa1-6細胞で行なった同様の検討と比較解析した。

・初代培養肝細胞では、xCT-KOとWT肝細胞の間に形態学的な違いを認めなかった。

・いずれの初代培養肝細胞でも培養に伴いGSHおよびOPTが増加したが、OPT合成量はxCT-KO肝細胞の方が多かった。

・Hepa1-6細胞はCys欠乏培地ではフェロトシスによる細胞死を起こし、Met欠乏培地では増殖停止した。Ferrostatin-1はこの細胞死を抑制した。

・Cys/Met欠乏培地では初代培養肝細胞とHepa1-6細胞のいずれにおいてもOPT産生が増しPropargylglycineによって阻害された。

以上の結果は、肝細胞では主にPSTによるCys合成が働くため、Cys/Met欠乏培地でも十分なGSHが合成されることを示している(図2)。しかし、Cys欠乏培養ではOPTの合成が増しPropargylglycineによって阻害されることから、Cys合成の過程で生成する2-アミノ酪酸のような代謝産物が増える結果OPT合成も増加したと考えられる。OPTの生成量はGSH量に匹敵するほどになるが、これまでのところその生理機能は不明なため、今後の説明が必要である(発表論文)。

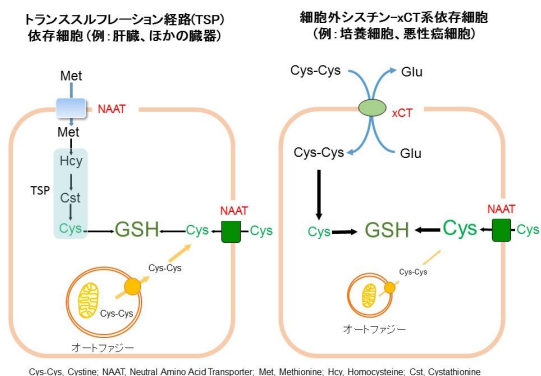


図2 細胞により異なるCys供給経路

### <引用文献>

1) McBean GJ. The transsulfuration pathway: a source of cysteine for glutathione in astrocytes. *Amino Acids*. 42:199-205; 2012.  
 2) Conrad M, Sato H. The oxidative stress-inducibile cystine/glutamate antiporter, system x (c) (-) : cystine supplier and beyond. *Amino Acids* 42:231-246; 2012.

3) Sato H, Shiyy, A, Kimata M, et al. Redox imbalance in cystine/glutamate transporter-deficient mice. *J Biol Chem*. 280:7423-37429; 2005.

### 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26件)

Jaeyong Lee, Hideyo Sato (5番目) et al. Junichi Fujii (7番目)(全7名). The viability of primary hepatocytes is maintained under a low cysteine-glutathione redox state with a marked elevation in ophthalmic acid production.

*Exp Cell Res*, 361:178-191 (2017) doi: 10.1016/j.yexcr.2017.10.017.

Shinji Hamashima, Takujiro Homma, Hideyo Sato (6番目) et al. Junichi Fujii (7番目) (全7名). Decreased reproductive performance in xCT-knockout male mice.

*Free Radic Res*, 51:851-860 (2017) doi: 10.1080/10715762.2017.1388504

Sho Kobayashi, Jaeyong Lee, Toshifumi Takao, Junichi Fujii.

Increased ophthalmic acid production is supported by amino acid catabolism under fasting conditions in mice.

*Biochem Biophys Res Commun*.

491:649-655 (2017) doi:

10.1016/j.bbrc.2017.07.149.

Eun Sil Kang, Jaeyong Lee, Hideyo Sato (10番目) et al. Junichi Fujii (11番目) (全11名). xCT deficiency aggravates acetaminophen-induced hepatotoxicity under inhibition of the transsulfuration pathway

*Free Radic Res*, 51, 80-90 (2017) doi: 10.1080/10715762.2017.1282157

Takaya Shirato, Takujiro Homma, Jaeyong Lee, Toshihiro Kurahashi, Junichi Fujii. Oxidative stress caused by a SOD1 deficiency ameliorates thioacetamide-triggered cell death via CYP2E1 inhibition but stimulates liver steatosis. *Arch Toxicol*,

91:1319-1333 (2017) doi: 10.1016/j.abb.2016.06.004.

Takujiro Homma, Ryusuke Akihara, et al. Junichi Fujii (9番目/9).

Heightened aggressive behavior in mice deficient in aldo-keto reductase 1a (Akr1a). *Behav Brain Res*,

319:219-224 (2017) doi:

10.1016/j.bbr.2016.11.038.

Junitsu Ito, Naoki Ishii, Toshihiro Kurahashi (4番目) et al. Junichi Fujii (8番目) (全8名). A high fat diet

temporarily renders Sod1-deficient mice resistant to an oxidative insult. *J Nutr Biochem*,40:44-52 (2017) doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.10.018.

Takujiro Homma, Junichi Fujii. Heat stress promotes the down-regulation of IRE1 in cells: An atypical modulation of the UPR pathway. *Exp Cell Res*, 349:128-138 (2016) doi: 10.1016/j.yexcr.2016.10.006.

Toshihiro Kurahashi (1 番目), Jaeyong Lee, et al. Junichi Fujii (11 番目) (全 11 名). Ascorbic acid prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice by ameliorating glutathione recovery and autophagy. *Arch Biochem Biophys*, 604:36-46 (2016) doi: 10.1016/j.abb.2016.06.004.

Takujiro Homma, Toshihiro Kurahashi (2 番目), et al. Junichi Fujii (5 番目) (全 5 名). SOD1 deficiency decreases proteasomal function, leading to the accumulation of ubiquitinated proteins in erythrocytes. *Arch Biochem Biophys*, 583:65-72 (2015) doi: 10.1016/j.abb.2015.07.023.

Ye Yan, Cynthia Wladyka, Junichi Fujii, Shanthini Sockanathan. Prdx4 is a compartment-specific H2O2 sensor that regulates neurogenesis by controlling surface expression of GDE2. *Nat Commun*,6:7006 (2015) doi: 10.1038/ncomms8006.

Junichi Fujii, Yoshitaka Ikeda, Toshihiro Kurahashi, Takujiro Homma. Physiological and Pathological Views of Prdx4. *Free Radic. Biol. Med*, 83:373-379 (2015) doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.025.

Sho Kobayashi, Junichi Fujii(12 番目), Hideyo Sato (15 番目) et al (全 15 名). Cystathionine is a novel substrate of cystine/glutamate transporter: implications for immune function. *J Biol Chem*, 290(14):8778-8788. (2015) doi: 10.1074/jbc.M114.625053.

Toshihiro Kurahashi, Junichi Fujii. Roles of Antioxidative Enzymes in Wound Healing. *J Dev Biol*, 3(2):57-70 (2015) doi: 10.5527/wjn.v4.i2.213.

Takujiro Homma, Junichi Fujii. Application of glutathione as anti-oxidative and anti-aging drug. *Curr Drug Metab*, 16:560-571 (2015) doi:10.2174/1389200216666151015114515.

[学会発表](計 27 件)

Sho Kobayashi, Shinji Hamashima,

Takujiro Homma, Junichi Fujii, Hideyo Sato. Macrophages from xCT-deficient mice survive under low cysteine/glutathione redox conditions with high oxidative stress. OCC World Congress 2017 and Annual SFRR-E Conference; METABOLIC STRESS AND REDOX REGULATION. Jun 21-23, 2017, Radisson Blu Hotel, Berlin, Germany.

Junichi Fujii, Naoki Ishii, Takujiro Homma, Jaeyong Lee, Sho Kobayashi, Hikaru Mitsuhashi, Naoko Kimura, Yorihiro Yamamoto. CoQ10 and ascorbic acid ameliorate reproductive ability of SOD1-deficient female mice.

The 8th Joint Meeting of Society for Free Radical Research Australasia and Japan with International Symposium on Coenzyme Q10, Dec 9-12, 2017, Tokyo, Japan.

Jaeyong Lee, Sho Kobayashi, Takujiro Homma, Eun Sil Kang, Hideyo Sato, Han Geuk Seo, Toshifumi Takao, Junichi Fujii. Production of ophthalmic acid by the glutathione-synthesizing pathway in mouse hepatocytes under cysteine insufficiency. The 8th Joint Meeting of Society for Free Radical Research Australasia and Japan with International Symposium on Coenzyme Q10, Dec 9-12, 2017, Tokyo, Japan.

小林翔、李在勇、高尾敏文、藤井順逸。絶食によるアミノ酸代謝の亢進はオファルミン酸合成を促進する。

2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)。神戸ポートアイランド、神戸、2017 年 12 月 6-9 日

小林翔、浜島真司、本間拓二郎、藤井順逸、佐藤英世。マクロファージの酸化ストレス防御と NO 産生におけるシスチン・グルタミン酸トランスポーターの役割。第 17 回日本 NO 学会、阿波観光ホテル、徳島、2017 年 5 月 19-20 日。

本間拓二郎、浜島真司、小林翔、倉橋敏裕、渡辺連、木村直子、佐藤英世、藤井順逸。シスチントランスポーター・xCT の男性生殖能における役割の検討。第 70 回日本酸化ストレス学会、つくば国際会議場、つくば、2017 年 6 月 28-29 日

Eun Sil Kang, Jaeyong Lee, Takujiro Homma, Sho Kobayashi, Toshihiro Kurahashi, Han Geuk Seo, Junichi Fujii. Differential contribution of xCT and the transsulfuration pathway as cysteine-supply systems in hepatocytes. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. Sendai International Center, Sendai, May 20-23, 2016

Takujiro Homma, Takaya Shirato, Jaeyong Lee, Toshihiro Kurahashi, Junichi Fujii. SOD1-knockout mice are resistant to lethal effects of thioacetamide-induced hepatotoxicity. The 23rd Annual Meeting, a joint meeting with the Society for Free Radical Research International (SfRBM/SFRR 2016), Nov 16-19, 2016, San Francisco, USA.

小林翔、姜恩實、李在勇、本間拓二郎、倉橋敏裕、徐漢克、佐藤英世、藤井順逸。肝臓へのシステイン供給における xCT と Transsulfuration 経路の役割。第 69 回日本酸化ストレス学会、仙台国際センター会議棟、仙台、2016 年 8 月 30-31 日。

本間拓二郎、藤井順逸。

熱ストレス障害に対する小胞体ストレス応答の解析：酸化ストレスは IRE1 発現を減少させる。第 89 回日本生化学会大会、仙台国際センター/東北大学川内キャンパス、仙台、2016 年 9 月 25-27 日。

Junichi Fujii, Toshihiro Kurahashi, Takujiro Homma, Jaeyong Lee, Eun Sil Kang, Shinji Hamashima, Atsunori Nabeshima, Sohuke Yamada, Toshiyuki Nakayama, Hideyo Sato.

On the cysteine supply for glutathione synthesis in the liver under oxidative insult. 7th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia), Nov29-Dec 2, 2015, Chiang Mai, Thailand.

Takujiro Homma, Junichi Fujii. Intrinsic oxidative stress induces accumulation of ubiquitinated and carbonylated proteins in mouse erythrocytes. 7th Joint Meeting of the Societies for Free Radical Research Australasia and Japan, Dec 7-10, 2015, Christchurch, New Zealand.

姜恩實、李在勇、倉橋敏裕、本間拓二郎、小林翔、佐藤英世、藤井順逸。肝臓のシステイン・ホメオスタシスにおける xCT とトランススルフィレーション経路の役割。第 15 回日本 NO 学会、千里ライフサイエンスセンター、吹田、2015 年 6 月 26-27 日。

倉橋敏裕、鍋島篤典、李在勇、本間拓二郎、山田壮亮、中山敏幸、宮田哲、藤井順逸。アスコルビン酸によるアセトアミノフェン誘導性酸化ストレスからの肝臓保護作用。第 68 回日本酸化ストレス学会、かごしま県民交流センター、鹿児島、2015 年 6 月 11-12 日。

〔図書〕(計 2 件)

Junichi Fujii, Takujiro Homma, Sho Kobayashi. Chapter 11: Ascorbic Acid as a Multifunctional Nutrient in

Mammals; Our Understanding based on Studies using Genetically Modified Mice. In "Ascorbic Acid: Properties, Synthesis and Applications" (Emma Parsons, ed.)

Nova Science Publishers, Inc, 239-265 (2016)

Takujiro Homma, Junichi Fujii. Chapter 2; Indispensable Roles of Superoxide Dismutation in Mammalian Erythrocytes. In "Superoxide Dismutase (SOD): Sources, Therapeutic Uses and Health Benefits." (Nancy H. Phillips, ed.) Nova Science Publishers, Inc, 37-57 (2016)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.id.yamagata-u.ac.jp/Biochem1/b2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 順逸 (FUJII, Junichi)

山形大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：00222258

(2) 研究分担者

倉橋 敏裕 (KURAHASHI, Toshihiro)

京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号：00596570

(平成 27 年 10 月辞退)

(3) 連携研究者

佐藤 英世 (SATO, Hideyo)

新潟大学・医歯学系研究科・教授  
研究者番号：60235380

(4) 研究協力者

本間 拓二郎 (HOMMA, Takujiro)

山形大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：70743566

小林 翔 (KOBAYASHI, Sho)

山形大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：10779490

李 在勇 (LEE, Jaeyong)

山形大学・大学院医学系研究科・大学院生