

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：82648

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14959

研究課題名(和文) 活性硫黄による心臓冬眠化の分子制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism underlying cardiac hibernation by reactive persulfide species

研究代表者

西田 基宏 (Motohiro, Nishida)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：90342641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は酸素を利用してエネルギーを産生している。その一方で、酸素はより親電子性の高い物質(親電子物質)に変換しやすい性質をもち、親電子物質は細胞内の生体分子と不可逆的に反応することで病態を引き起こす。我々は生体内に存在する求核性の高いイオウ(活性イオウ)が親電子物質の解毒・代謝に重要な役割を果たすことを見出した。活性イオウの生成酵素を同定し、これを発現させることで心不全リスクが軽減することがわかった。

研究成果の概要(英文)：We utilize oxygen as a source to generate energy. In contrast, oxygen easily converts to more electrophilic substrate (electrophile) and electrophile irreversibly modifies intracellular molecules, resulting in the development of diseases. We revealed that intracellular nucleophilic sulfur species (reactive persulfide species) act as chelator of electrophile to eliminate electrophilic modifications in cells. We also identified a key enzyme generating reactive persulfide species, and overexpression of this enzyme in cardiac cells was found to reduce the risk of heart failure in mice.

研究分野：薬理学

キーワード：循環器 薬理学 生理学 レドックス 親電子 イオウ

1. 研究開始当初の背景

冬眠は延命のための重要な生理機能である一方で、生命機能を極限まで低下させる死と隣合せの危険な行動でもある。例えばシマリスは、400回/分ある心拍を冬眠時に10回/分まで落とす。非冬眠動物の場合、低体温により心臓が活動停止するため冬眠できないと理解されている。その一方で、活性イオウ分子種 (reactive sulfur species; RSS) のドナーとなる硫化水素ガスがマウスを人工的に冬眠状態 (代謝と心臓機能の可逆的抑制) にできることが明らかにされ (Science, 2005)、医療応用への関心が高まっている。申請者らは最近、心筋梗塞後の非梗塞 (梗塞周辺) 領域の心筋細胞が冬眠様の表現型を示し、これが引き金となって心筋老化 (慢性心不全) が誘導される可能性を見出した。驚くべきことに、親電子性の高い内因性・外因性物質 (親電子物質) の代謝・消去を担う RSS が虚血後の冬眠心筋組織に多く蓄積していた。東北大学医学部・赤池孝章教授らとの共同研究により、RSS の分子実体がシステインのポリ硫黄鎖であること (Nature Chem Biol, 2012; PNAS, 2014)、RSS の多くが翻訳時にコードされるタンパク質ポリ硫黄鎖であることも明らかになってきた。RSS の役割についてはレドックス二元論 (活性酸素シグナルの善玉・悪玉説) の中でしか議論されてこなかったが、上記の知見は、RSS が心臓の生理的機能低下 (冬眠) の制御分子となる可能性を示している。

2. 研究の目的

本研究では、冬眠特異的タンパク質またはその結合タンパク質 (三量体 GTP 結合タンパク質) を、心機能低下を担う RSS の分子実体と捉え、RSS の基質となるポリ硫黄化システインの心筋取り込み機構および RSS 含有タンパク質による心筋冬眠誘導の分子機構解明を目的とする。これを基に、申請者が H24-25 年度挑戦的萌芽研究の成果として見出した病態心筋の RSS 枯渇を抑制する薬を心不全モデルマウスに適用し、適切な心筋 RSS 量の維持が予後改善に結びつくことを示す。

3. 研究の方法

低濃度の硫化水素ガスが心筋細胞の拍動数やエネルギー代謝を低下させることから、硫化水素ガスを長時間曝露したラット新生児心筋細胞を用いて RSS タンパク質のプロテオーム解析を行う。申請者らは、ポリ硫黄鎖 (Cys-Sn-SH) の真ん中の S が親電子性を持つことに着目し、求核性の高いシアン (CN) にビオチンを付加した化合物を反応させ、ポリ硫黄鎖を持つタンパク質をプルダウンする。得られたタンパク質サンプルを 2 次元電気泳動により分離し、質量分析により硫化水素ガスにより高度にポリ硫黄化されるタンパク質を同定する。昨年度までの挑戦的萌芽研

究の中で、親電子物質が心筋細胞のミトコンドリア分裂を促進する GTP 結合タンパク質 (dynamin-related protein 1; Drp1) を活性化することでミトコンドリアの分裂を介したエネルギー代謝低下を引き起こすことを明らかにしている。そこで、特にミトコンドリアの分裂・融合を制御する G タンパク質やイオンチャネル、および冬眠特異的タンパク質 (hibernation-specific protein; HP) に着目して解析を行うこととする。

心筋梗塞後の慢性心不全において、非梗塞部位である周辺領域で著しい心筋老化とミトコンドリア巨大化を確認した。さらに、心筋梗塞初期 (1 週間後) のマウス左心室において、梗塞周辺領域で RSS の蓄積とエネルギー代謝異常 (ATP 蓄積)、ミトコンドリア分裂が確認されている。この際、Drp1 は顕著に活性化されるものの、4 週間後には Drp1 のジスルフィド結合が亢進し、逆に Drp1 活性を低下させることも明らかにしている。そこで、心臓への RSS 蓄積が Drp1 のポリ硫黄化を促進し、Drp1 のジスルフィド結合を抑制することで心筋老化を改善するかどうか検証する。また、RSS 蓄積がマクロファージ浸潤によるものかどうかについても検討を行う。

4. 研究成果

マウスに NaHS を腹腔内投与し、心機能および体温への影響を調べた。心不全を抑制する低濃度 (300ug/kg/day) を 4 週間持続的に投与することで、体温変化なく、心拍数の有意な低下が観察された。Ming Xian らのグループが開発した Sulfane sulfur 検出蛍光指示薬 SSP2 を用いてマウス心臓の凍結切片組織標本に処置したところ、正常マウス心臓ではほとんど蛍光増加が認められなかったものの、NaHS 投与マウス心臓では緩やかな蛍光増加が観察された。一方、心筋梗塞モデル心臓の梗塞周辺領域では NaHS 投与心臓よりも強い蛍光増加が観察された。そこで、梗塞周辺領域画分を可溶化させたタンパク抽出液を用いて CN-biotin (Tag-switch-tag) アッセイを行い、RSS をもつタンパク質を網羅的に解析した結果、非常に多くのタンパク質が高度にポリ硫黄化されていることがわかった。一方、摘出ラット心臓に低温 (20) 栄養液を 3 時間低容量負荷で灌流し、冬眠状態を模倣させたところ、SSP2 陽性の蛍光増加やポリイオウ化タンパク質量の増加は認められなかった。

次に、梗塞周辺領域の心筋細胞でミトコンドリアの過剰分裂が観察されたに着目し、そのメカニズム解析に着手した。ミトコンドリアの分裂は dynamin-related protein 1 (Drp1) によって厳密に制御されており、Drp1 はレドックス活性の高い GTP 結合タンパク質 (G タンパク質) であることも報告されている (Cho D-H et al., Science, 2009)。そこで、心筋 Drp1 タンパク質の活性状態を GTP-agarose を用いたプルダウンアッセイに

より評価したところ、梗塞周辺領域の心臓において確かに Drp1 の GTP 結合活性が増加していることが明らかになった。また、Tag-switch-Tag 法を用いて内因性 Drp1 のポリオウ量を調べた結果、内因性 Drp1 タンパク質は C 末端側の redox-active システイン依存的にポリオウ鎖を形成することがわかった。さらに、この Drp1 ポリオウ鎖は、低酸素ストレスや有機水銀などの環境化学物質を与えることで枯渇すること、心筋細胞における Drp1 のイオウ枯渇が NaHS 処置によってキャンセルさせることなどが明らかになった。これまで G タンパク質の GTP/GDP 交換サイクルは基本的にグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) と GTPase 活性化因子 (GAP) の 2 つによってのみ制御されるものと信じられてきたが、本研究により Drp1 の活性化が C 末端のシステインポリオウ鎖の長さ (枯渇と伸長) によっても調節されるという全く新しい概念が提唱された。

さらに、Drp1 タンパク質にポリオウ鎖を供給する責任合成酵素の探索も行った。硫化水素やシステインパースルフィドの生成酵素として cystathionine β -synthase (CBS) や cystathionine γ -lyase (CSE) が過去に報告されている (Ida T et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2014)。しかし、げっ歯類の心臓や骨格筋組織に CBS や CSE がほとんど発現していないことを我々はすでに確認している (Nishida et al., Nat. Chem. Biol., 2012)。東北大学医学部・赤池グループとの共同研究によりシステインを基質に用いる酵素群に着目した解析を行った結果、心臓におけるシステインパースルフィドの主たる合成酵素が CysteinyI-tRNA synthetase 2 (CARS2) であることを明らかにした。CARS2 はミトコンドリア局在型の組織普遍的に発現するタンパク質である。HEK293 細胞に内因性に発現する CARS2 を CRISPR/Cas9 システムを用いて欠損させた細胞を樹立し、内因性 Drp1 の活性を測定したところ、驚くべきことに CARS2 欠損細胞において、Drp1 の著しい活性増加とポリオウ鎖の枯渇が観察された。以上の結果より、CARS2 が Drp1 にポリオウ鎖を供給し、ミトコンドリア分裂を負に制御する酵素であることが明らかとなった。

上記の知見をもとに、CARS2 を心筋細胞特異的に発現させるアデノ随伴ウイルスを作成し、生後 1 週令のマウスに投与した。その後 4 週間にわたって経過観察を行ったが、心筋細胞に CARS2 を過剰発現させても心機能 (収縮力と心拍数) に変化を与えないことがわかった。これと平行して、CRISPR/Cas9 システムを用いた CARS2 欠損マウスも作出し、2017 年 5 月に心機能解析をはじめられる状況にまで繁殖飼育が進んでいる。

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 21 件)

- Sunggip C, Nishimura A, Shimoda K, Numaga-Tomita T, Tsuda M, Nishida M. Purinergic P2Y6 receptors: A new therapeutic target of age-dependent hypertension. *Pharmacol. Res.* 120 (2017) 51-59. doi.org/10.1016/j.phrs.2017.03.013. (査読有)
- Nishida M, Nishimura A, Matsunaga T, Motohashi H, Kasamatsu S, Akaike T. Redox regulation of electrophilic signaling by reactive persulfides in cardiac cells. *Free Radic Biol Med.* pii: S0891-5849(17)30033-3, 2017. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.024. (査読有)
- Yamaguchi Y, Iribe G, Kaneko T, Takahashi K, Numaga-Tomita T, Nishida M, Birnbaumer L, Naruse K. TRPC3 participates in angiotensin II type 1 receptor-dependent stress-induced slow increase in intracellular Ca^{2+} concentration in mouse cardiomyocytes. *J. Physiol. Sci.* (2017) Jan 19. doi: 10.1007/s12576-016-0519-3. (査読有)
- Nakagawa Y, Nishikimi T, Kuwahara K, Fujishima A, Oka S, Tsutamoto T, Kinoshita H, Nakao K, Cho K, Inazumi H, Okamoto H, Nishida M, Kato T, Fukushima H, Yamashita JK, Wijnen WJ, Creemers EE, Kangawa K, Minamino N, Nakao K, Kimura T. MiR30-GALNT1/2 Axis-Mediated Glycosylation Contributes to the Increased Secretion of Inactive Human Prohormone for Brain Natriuretic Peptide (proBNP) From Failing Hearts. *J Am Heart Assoc.* 6(2), pii: e003601, 2017. doi: 10.1161/JAHA.116.003601. (査読有)
- 西村明幸, 西田基宏 プリン作動性シグナルの心血管系における役割 日本薬理学雑誌 149, 84 - 90, 2017. (査読無)
- 西村明幸, 西田基宏 プリン作動性 P2Y6 受容体はアンジオテンシン AT1 受容体とヘテロ二量体化を形成してアンジオテンシン II 誘発性高血圧を促進する Japanese Scientists in Science Signaling 2016 「シグナリングに載った日本人研究者」 2017 Issue (Science Signaling AAAS, Cosmo Bio Co. Inc.) . (査読無)
- Numaga-Tomita T, Nishida M*, Putney JW Jr. and Mori Y*. TRPC3 amplifies B cell receptor-induced ERK signaling via protein kinase D-dependent

- Rap1 activation. **Biochem J.** Jan 15;473(2):201-10 (2016). doi: 10.1042/BJ20150596. (*corresponding author) (査読有)
- . Mangmool S, Denkaew T, Phosri S, Pinthong D, Parichatikanond W, Shimauchi T, Nishida M. Sustained β AR stimulation mediates cardiac insulin resistance in a PKA-dependent manner. **Mol Endocrinol.** 30(1), 118-132 (2016). doi: 10.1210/me.2015-1201. (査読有)
- . Sawamura S, Hatano M, Takada Y, Hino K, Kawamura T, Tanikawa J, Nakagawa H, Hase H, Nakao A, Hirano M, Rotrattanadumrong R, Kiyonaka S, Mori MX, Nishida M, Hu Y, Inoue R, Nagata R, Mori Y. **Mol Pharmacol.** 89(3), 348-63 (2016). doi: 10.1124/mol.115.102863. (査読有)
- . Nishimura A, Sunggip C, Tozaki-Saitoh H, Shimauchi T, Numaga-Tomita T, Hirano K, Ide T, Boeynaems J-M, Kurose H, Tsuda M, Robaye B, Inoue K, Nishida M*. The purinergic P2Y6 receptor heterodimerizes with the angiotensin AT1 receptor to promote angiotensin II-induced hypertension. **Sci. Signal.** 9(411), ra7 (2016). doi: 10.1126/scisignal.aac9187. (査読有)
- . Hagimori M, Murakami T, Shimizu K, Nishida M, Ohshima T, Mukai T. Synthesis of radioiodinated probes to evaluate the biodistribution of a potent TRPC3 inhibitor. **Med. Chem. Comm.** 7(5), 1003-1006 (2016). DOI: 10.1039/c6md00023a. (査読有)
- . Unoki T, Abiko Y, Toyama T, Uehara T, Tsuboi K, Nishida M, Kaji T, Kumagai Y. Methylmercury, an environmental electrophile capable of activation and disruption of the Akt/CREB/Bcl-2 signal transduction pathway in SH-SY5Y cells. **Sci Rep.**, Jun 30;6:28944 (2016). doi: 10.1038/srep28944. (査読有)
- . Kitajima N., Numaga-Tomita T., Watanabe M., Kuroda T., Nishimura A., Miyano K., Yasuda S., Kuwahara K., Sato Y., Ide T., Birnbaumer L., Sumimoto H., Mori Y. and Nishida M*. TRPC3 positively regulates reactive oxygen species driving maladaptive cardiac remodeling. **Sci. Rep.** 6, 37001 (2016). doi: 10.1038/srep37001. (査読有)
- . Numaga-Tomita T., Kitajima N., Kuroda T., Nishimura A., Miyano K., Yasuda S., Kuwahara K., Sato Y., Ide T., Birnbaumer L., Sumimoto H., Mori Y. and Nishida M*. TRPC3-GEF-H1 axis mediates pressure overload-induced cardiac fibrosis. **Sci. Rep.** 6, 39383 (2016); doi: 10.1038/srep39383. (査読有)
- . Nishida M, Kumagai Y, Ihara H, Fujii S, Motohashi H, Akaike T. Redox signaling regulated by electrophiles and reactive sulfur species. **J. Clin. Biochem. Nutr.** 58(2):91-98 (2016). doi: 10.3164/jcfn.15-111. (査読有)
- . Fujii S, Sawa T, Nishida M, Ihara H, Ida T, Motohashi H, Akaike T. Redox signaling regulated by an electrophilic cyclic nucleotide and reactive cysteine persulfides. **Arch Biochem Biophys.**;595:140-146 (2016). doi: 10.1016/j.abb.2015.11.008. (査読有)
- . Shinkai Y, Abiko Y, Ida T, Miura T, Kakehashi H, Ishii I, Nishida M, Sawa T, Akaike T, 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.** 28(5), 838-847 (2015). doi: 10.1021/tx500416y. (査読有)
- . Gentry LR, Nishimura A, Cox AD, Martin TD, Tsygankov D, Nishida M, Elston TC, Der CJ. Divergent Roles of CAAX Motif-signaled Posttranslational Modifications in the Regulation and Subcellular Localization of Ral GTPases. **J Biol Chem.** 290(37), 22851-22861 (2015). doi: 10.1074/jbc.M115.656710. (査読有)
- . 西田基宏、島内司 ガス様シグナルの破綻と疾患 医学のあゆみ (2015年8月号) (査読無)
- . 西田基宏、西村明幸 酸素シグナル 実験医学 (2015年6月増刊号) (査読無)
- ②. 西田基宏、森泰生 Gタンパク質、TRPシグナルと活性イオウ分子 細胞工學 (2015年4月特集号) (査読無)
- [学会発表] (計22件)
- . Nishida M, "New strategies for drug development of heart failure" Medical Research Seminar in Malaysia Sabah University, Jan 23 (2017). Kota Kinabalu Sabah, Malaysia.
- . Nishida M, "Myocardial early senescence mediated by mitochondria-cytoskeleton interaction" The 39th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (international symposium), Dec. 2 (2016). Pacifico Yokohama, Yokohama,

- Kanagawa, Japan.
- . 西村明幸、島内司、石川達也、富田拓郎、西田基宏 (2016年12月2日) Drp1-細胞骨格の相互作用による心筋ミトコンドリアの品質管理 第26回日本循環薬理学会 (信州大学、長野県松本市)
 - . 西村明幸、島内司、富田拓郎、西田基宏 (2016年10月24日) 活性イオウによる心筋ミトコンドリア品質管理の分子機構 心血管膜輸送研究会 (九州大学、福岡県福岡市)
 - . Nishida M, "Regulation of cardiac oxygen remodeling via electrophilic modification of Drp1" The 89th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (international symposium), Sep. 25-27 (2016). Sendai International Conference Center, Miyagi, Sendai, Japan.
 - . 西村明幸、富田拓郎、西田基宏 (2016年7月28日) 活性イオウによる H-Ras パルミトイル化の調節機構 オルガネラ研究会 (生理学研究所、愛知県岡崎市)
 - . 島内司、西村明幸、富田拓郎、西田基宏 (2016年7月28日) Drp1 - 細胞骨格の相互作用による心筋ミトコンドリア品質管理 オルガネラ研究会 (生理学研究所、愛知県岡崎市)
 - . Nishida M, "Redox regulation of G proteins in cardiac remodeling" The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, May 20-22 (2016). Sendai International Conference Center, Miyagi, Sendai, Japan.
 - . Akiyuki Nishimura, Tomoya Ito, Takuro Numaga-Tomita, Motohiro Nishida (2016年5月22日) Redox-dependent Regulation of H-Ras palmitoylation. 第9回国際 NO 学会 第16回日本 NO 学会 (仙台国際センター、宮城県仙台市)
 - . 西田基宏 (2016年3月29日) 活性イオウによる生体レドックス恒常性制御基盤の構築 . 第136回日本薬学会年会 (パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)
 - . 島内司、石川達也、西田基宏 (2016年3月11日) Eco-Pharma of approved drugs focused on inhibition of mitochondrial fission 第89回日本薬理学会年会パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)
 - . 西田基宏 (2016年3月10日) Increase in cardiac risk via electrophile-mediated activation of dynamin-related protein 1. 第89回日本薬理学会年会 (パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)
 - . 西田基宏、島内司、富田拓郎、西村明幸、石川達也 (2015年12月10日) ミトコンドリア品質管理を主眼とするエコファーマ研究 第36回日本臨床薬理学会学術総会 (新宿京王プラザホテル、東京都新宿区)
 - . 永井直杜、西村明幸、浜瀬健司、井手友美、西田基宏 (2015年11月21日) 有機水銀による Drp1 ポリ硫黄枯渇を介した心臓リスク増加 第68回日本薬理学会西南部会 (海峡メッセ下関、山口県下関市)
 - . 島内司、西村明幸、富田拓郎、西田基宏 (2015年11月20日) 心筋梗塞後の心筋老化誘導におけるミトコンドリア GTP 結合タンパク質 Drp1 の役割 . 第128回日本薬理学会近畿部会 (千里ライフサイエンスセンター、大阪府豊中市)
 - . 島内司、石川達也、富田拓郎、西村明幸、西田基宏 (2015年10月29日) ミトコンドリア品質管理に着目した Ca²⁺拮抗薬の適応拡大 . 心血管膜輸送研究会 2015 (生理学研究所、愛知県岡崎市)
 - . 永井直杜、外山喬士、西村明幸、浜瀬健司、井手友美、西田基宏 (2015年10月29日) 有機水銀による Drp1 ポリ硫黄枯渇を介した心臓リスク増加 . 心血管膜輸送研究会 2015 (愛知県岡崎市、生理学研究所)
 - . 伊藤智哉、西村明幸、永井直杜、西田基宏 (2015年9月19日) 活性硫黄によるミトコンドリアの品質機能管理 . 名大合同シンポ (愛知県、生理学研究所)
 - . 西田基宏 (2015年9月1日) Negative regulation of cardiac remodeling by S-polythiolation of G proteins . 2nd Symposium of SPU Innovative Project for Pharmaceutical Analyses of Covalent Modification in Biomolecule. Showa Pharmaceutical University, Machida, Tokyo, Japan.
 - . 西田基宏 (2015年7月16日) がん遺伝子産物 Ras の親電子シグナル制御 . 第3回がん代謝研究会 (石川県立音楽堂ホール、石川県金沢市)
 - ②. 西田基宏、西村明幸、永井直杜、外山喬士、富田 (沼賀) 拓郎、熊谷義人、赤池孝章 (2015年6月26日) Dynamin-related protein 1 の酸化修飾による病的な心臓リモデリング制御 . 第15回日本 NO 学会学術集会 (千里ライフサイエンスセンター、大阪府豊中市)
 - ②. Tomoya Ito, Akiyuki Nishimura, Takuro Tomita and Motohiro Nishida (2015年5月22日) Suppression of adriamycin-induced cardiotoxicity by isothiocyanate. 第9回国際 NO 学会 第16回日本 NO 学会 (仙台国際センター、宮城県仙台市)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 1 件)

名称：Drp1 重合阻害剤
発明者：西田基宏、石川達也
権利者：自然科学研究機構、EA ファーマ
種類：用途特許
番号：PC-21131 (51502330483)
出願年月日：平成 27 年 11 月 20 日
国内外の別： 国際

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/circulation/>

6．研究組織

(1)研究代表者

西田 基宏 (Motohiro, Nishida)

大学共同利用機関法人 自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・

岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：9 0 3 4 2 6 4 1

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし