

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20855

研究課題名(和文) 活性イオウ分子種を介した細胞内親電子シグナル制御機構の解明

研究課題名(英文) Study of the mechanism of electrophile signaling regulation by reactive persulfide species

研究代表者

笠松 真吾 (KASAMATSU, Shingo)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：80738807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、活性イオウ分子種のシグナル制御機能に着目し、外因性親電子物質であるメチル水銀の神経毒性発現機構の解析を行った。メチル水銀曝露は、細胞内の活性イオウ分子種を枯渇させ、活性イオウ分子により制御されている内因性シグナル分子8-ニトロ-cGMPのシグナル経路の異常な活性化をもたらす神経細胞毒性を発揮していることが示された。本研究の成果は環境化学物質の毒性発現機構や活性イオウ分子の生理機能の解明に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of neurotoxicity induced by environmental electrophile methylmercury focusing on the signal regulatory function of reactive persulfide species. We found that methylmercury exposure to cells induced depletion of intracellular reactive persulfides and subsequently evoked abnormal activation of signaling pathway mediated by endogenous signaling molecule 8-nitro-cGMP to cause neuronal death. The results of this study will contribute to the elucidation of the mechanism of toxic effect by environmental chemicals and physiological function of reactive persulfide species.

研究分野：生化学

キーワード：活性イオウ分子 親電子シグナル制御 酸化ストレス 8-ニトロ-cGMP メチル水銀

1. 研究開始当初の背景

生体内で生成する一酸化窒素 (NO)・活性酸素 (reactive oxygen species, ROS) は、ヌクレオチドや脂質を酸化・ニトロ化することで親電子物質を内因的に生成し、シグナルを伝達することが報告されている。我々はこれまで、ヌクレオチド由来の親電子物質である 8-ニトロ-cGMP に注目して研究を行い、安定同位体希釈法-質量分析を用いた 8-ニトロ-cGMP の定量法を確立し、8-ニトロ-cGMP の産生メカニズムを解明してきた。また、8-ニトロ-cGMP がラットの脳顆粒神経細胞内で NO・ROS に依存して生成し、ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) タンパク質の発現誘導を介して、ニコチン刺激性の神経保護効果を示すことを明らかにした。一方で、心筋梗塞誘発性心不全モデルマウスを用いた実験から、酸化ストレスにより内因的に産生される 8-ニトロ-cGMP が低分子量 G タンパク質 H-Ras の活性化を介して、心筋細胞の老化を促進し、心不全病態に関与することが明らかになってきた。このように 8-ニトロ-cGMP は多様なレドックスシグナル機構に関与しており、細胞の生死を決定する重要なシグナル分子として機能していることが明らかになってきた。

また、我々の研究グループでは、8-ニトロ-cGMP の代謝機構を探索する過程で、システインパルスルフィドなどの様々な活性イオウ分子種が、8-ニトロ-cGMP を全く新規の環状ヌクレオチドである 8-SH-cGMP に代謝することを見出した。活性イオウ分子種は、システインなどのチオール基 (SH 基) に過剰にイオウ原子が付加した活性種 (R-S-(S)_n-H) であり、親分子であるシステインよりも高いレドックス活性を持つことから、生体内で内因的に産生される親電子物質のレドックスシグナル伝達を定常的に負に制御している可能性が考えられた。

一方、メチル水銀 (MeHg) は強力な神経毒性を示す外因性親電子物質であり、酸化ストレス誘導を介した毒性発現機構が報告されている。MeHg は、その化学特性により、MeHg 曝露細胞内において、細胞内活性イオウ分子種の枯渇を惹起し、その下流のシグナル制御機構を破綻させることで、これまで負に制御されていた細胞内レドックスシグナル伝達機構の異常な活性化が起こり、神経細胞死などが誘導されることが予想された。

2. 研究の目的

本研究課題では、MeHg を細胞内活性イオウ分子種の枯渇を惹起する外因性親電子物質のモデル化合物として使用し、MeHg 曝露による細胞内活性イオウ分子種の枯渇と、それに伴う下流シグナル伝達機構の活性化を解析することで、活性イオウ分子種による親電子シグナル制御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MeHg による神経毒性発現と活性イオウ分子種との関連を調べるために、MeHg 曝露後のラット小脳顆粒神経細胞における活性イオウ分子種の動態解析を行った。細胞内活性イオウ分子種レベルは、活性イオウ分子特異的蛍光プローブを用いた蛍光顕微鏡解析および質量分析 (LC-MS/MS) により定量した。

(2) MeHg 曝露による活性イオウ分子の枯渇と 8-ニトロ-cGMP 代謝との関連を調べるために、MeHg 曝露小脳顆粒神経細胞における 8-ニトロ-cGMP および 8-SH-cGMP の生成レベルの定量を行なった。8-ニトロ-cGMP および 8-SH-cGMP の定量は、それぞれに対する特異抗体を用いた免疫蛍光染色法および LC-MS/MS 法を用いて行った。

(3) MeHg による神経細胞死と 8-ニトロ-cGMP シグナルの活性化との関連を明らかにするために、MeHg 曝露小脳顆粒神経細胞において 8-ニトロ-cGMP の下流シグナル分子である H-Ras および ERK の活性化の解析を行った。H-Ras の活性化は活性化 H-Ras のプルダウンアッセイにより、ERK の活性化は抗リン酸化 ERK 抗体を用いたウエスタンブロットにより解析した。

4. 研究成果

(1) 各種標的分子特異的蛍光プローブおよび抗体を用いた蛍光顕微鏡解析により、MeHg 曝露後の小脳顆粒神経細胞内では、活性イオウ分子種および 8-SH-cGMP 産生が減少する一方で、活性酸素種とその下流シグナル分子である 8-ニトロ-cGMP 産生が増加することが確認された。このことから、MeHg 曝露は細胞内の活性イオウ分子種の枯渇をもたらし、それに伴い活性イオウ分子種による 8-ニトロ-cGMP から 8-SH-cGMP への代謝が低下し、8-ニトロ-cGMP が細胞内に蓄積することが示唆された (Chem Res Toxicol 2017)。

(2) MeHg 曝露小脳顆粒神経細胞における 8-ニトロ-cGMP の下流シグナル伝達の分子機構について解析を行った結果、MeHg 曝露によって 8-ニトロ-cGMP シグナルのエフェクタータンパク質として知られる H-Ras タンパク質が S-グアニル化および活性化し、その下流分子である ERK タンパク質も活性化していることが確認された。このことから、MeHg によりもたらされる細胞内活性イオウ分子の枯渇は、8-ニトロ-cGMP シグナル経路の活性化をもたらすことが示唆された (Chem Res Toxicol 2017)。

(3) 活性イオウ分子種ドナー (Na₂S₂) で前処理を行った MeHg 曝露小脳顆粒神経細胞について蛍光顕微鏡解析および細胞生存率の定量を行ったところ、MeHg 曝露のみの細胞に比べ、細胞内活性イオウ分子種レベルが増加し細胞死は軽減されることが示された。このことから、正常神経細胞では細胞内の活性イオウ分子が細胞の生存維持に寄与しており、MeHg 曝露は活性イオウ分子を枯渇させることで神経細胞死をもたらすことが示唆され

た。また、MeHg 投与ラットの小脳の 8-ニトロ-cGMP 生成を免疫組織染色で解析したところ、顆粒神経細胞やプルキンエ細胞における 8-ニトロ-cGMP レベルは MeHg 投与開始後一過性に増加し、その後神経細胞の脱落とともに低下することが明らかになり、動物個体レベルにおいても、MeHg の神経毒性発現に 8-ニトロ-cGMP シグナルの活性化が関わることを示唆された (Chem Res Toxicol 2017)。

(4) 本研究における細胞内の活性イオウ分子種産生動態解析の中で、全く新規な細胞内活性イオウ分子種産生系を発見した。これはタンパク質翻訳に関わるシステインル-tRNA 合成酵素 (CARS) によるものであり、本酵素が哺乳類細胞における活性イオウ分子種産生の大部分を担っていることが示された (Nat Commun 2017)。

以上の結果より、MeHg 曝露は、活性イオウ分子種による細胞内レドックスシグナル制御機構を破綻させることで、それまで負に制御されていた内因性親電子物質である 8-ニトロ-cGMP のシグナル経路が活性化し、神経細胞毒性が惹起されることが示唆された。本研究の成果は、各種環境親電子物質の毒性発現機構や活性イオウ分子種の生理機能の解明に貢献するものと期待される。

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 11 件)

1. Masuda K, Tsutsuki H, Kasamatsu S, Ida T, Takata T, Sugiura K, Nishida M, Watanabe Y, Sawa T, Akaike T, Ihara H. Involvement of nitric oxide/reactive oxygen species signaling via 8-nitro-cGMP formation in 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells and rat cerebellar granule neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 495, 2165-2170 (2018). 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.12.088.
2. Akaike T, Ida T, Wei FY, Nishida M, Kumagai Y, Alam MM, Ihara H, Sawa T, Matsunaga T, Kasamatsu S, Nishimura A, Morita M, Tomizawa K, Nishimura A, Watanabe S, Inaba K, Shima H, Tanuma N, Jung M, Fujii S, Watanabe Y, Ohmuraya M, Nagy P, Feelisch M, Fukuto J, Motohashi H. Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nature Commun.* 8, 1177 (2017). 査読有
DOI: 10.1038/s41467-017-01311-y.
3. Ihara H, Kasamatsu S, Kitamura A, Nishimura A, Tsutsuki H, Ida T, Ishizaki K, Toyama T, Yoshida E, Abdul Hamid H, Jung M, Matsunaga T, Fujii S, Sawa T, Nishida M, Kumagai Y, Akaike T. Exposure to electrophiles impairs reactive persulfide-dependent redox signaling in neuronal cells. *Chem Res Toxicol.* 30, 1673-1684 (2017). 査読有
DOI: 10.1021/acs.chemrestox.7b00120.
4. 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.* 109, 132-140 (2017). 査読有
DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.024.
5. Ihara H, Kitamura A, Kasamatsu S, Ida T, Kakahana Y, Tsutsuki H, Sawa T, Watanabe Y, Akaike T. Superoxide generation from nNOS splice variants and its potential involvement in redox signal regulation. *Biochem J.* 474, 1149-1162 (2017). 査読有
DOI: 10.1042/BCJ20160999.
6. 笠松真吾, 守田匡伸, 赤池孝章. レドックスシグナルの活性イオウ分子制御. *ファルマシア.* 53, 210-214 (2017). 査読無
DOI: 10.1042/BCJ20160999.
7. Kasamatsu S, Nishimura A, Morita M, Matsunaga T, Abdul Hamid H, Akaike T. Redox signaling regulated by cysteine persulfide and protein polysulfidation. *Molecules.* 21, E1721 (2016). 査読有
DOI: 10.3390/molecules21121721
8. Jung M, Kasamatsu S, Matsunaga T, Akashi S, Ono K, Nishimura A, Morita M, Abdul Hamid H, Fujii S, Kitamura H, Sawa T, Ida T, Motohashi H, Akaike T. Protein polysulfidation-dependent persulfide dioxygenase activity of ethylmalonic encephalopathy protein 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 480, 180-186 (2016). 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.10.022.
9. 笠松真吾, 藤井重元, 赤池孝章. 活性イオウ分子種によるタンパク質チオール修飾: ポリスルフィド化タンパク質解析の最先端技法. *日本薬理学雑誌.* 147, 299-302 (2016). 査読有
DOI: 10.1254/fpj.147.299.
10. Kunieda K, Tsutsuki H, Ida T, Kishimoto Y, Kasamatsu S, Sawa T, Goshima N, Itakura M, Takahashi M, Akaike T, Ihara H. 8-Nitro-cGMP enhances SNARE complex formation through S-guanylation of Cys90 in SNAP25. *ACS Chem Neurosci.* 6, 1715-1725 (2015). 査読有
DOI: 10.1021/acschemneuro.5b00196.

11. 笠松真吾、井田智章、藤井重元、赤池孝章. 活性イオウ分子による酸化・ニトロ化ストレス制御. *Respiratory Medical Research*. 3, 70-75 (2015). 査読無 DOI:なし

〔学会発表〕(計8件)

1. 笠松真吾. 8-ニトロ-cGMP を介した細菌感染防御機構と硫化水素による制御. 第90回日本細菌学会総会、2017年
2. 笠松真吾. アルコールデヒドロゲナーゼ5の酵素活性制御におけるタンパク質ポリサルファ化の機能. 第89回日本生化学会大会、2016年
3. 笠松真吾. タンパク質ポリサルファ化によるアルコールデヒドロゲナーゼ5の新規酵素活性制御機構. 第69回日本酸化ストレス学会学術集会、2016年
4. Shingo Kasamatsu. Regulation of mechanisms of alcohol dehydrogenase 5 activity via protection polysulfuration. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, 2016年
5. Kasamatsu S. Translation-coupled protein polysulfuration, a unique biosynthesis pathway of cysteine persulfide. The 2016 Oxygen Radicals Gordon Research Conference, 2016年
6. 笠松真吾. タンパク質ポリサルファー解析法. 新学術領域研究「酸素生物学」・「レドックス委員会」合同シンポジウム2016「活性イオウ分子種の科学と生体機能の解明に向けて」、2016年
7. 笠松真吾. 活性イオウ分子のNO・活性酸素シグナル制御異常に起因する有機水銀の新規毒性発現機構の解析 第15回日本NO学会学術集会、2015年
8. 笠松真吾. 親電子性シグナル制御破綻による有機水銀毒性発現機構 日本生化学会東北支部第81回例会・シンポジウム、2015年

〔その他〕

ホームページ等

東北大学大学院医学系研究科環境医学分野

ホームページ

<http://www.toxicosci.med.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠松 真吾 (KASAMATSU, Shingo)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：80738807