

令和元年6月3日現在

機関番号：82611

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15123

研究課題名(和文) 硫化水素の新規産生経路の解析

研究課題名(英文) Analysis of a novel pathway to produce hydrogen sulfide

研究代表者

渋谷 典広 (Shibuya, Norihiro)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 神経薬理研究部・流動研究員

研究者番号：40466214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：硫化水素(H₂S)には細胞保護作用が認められるが、D-システインを投与することでH₂Sを産生できることがわかっている。本研究では、D-システインの脂溶性を高めたN-アセチル-D-システインを投与することによりD-システインよりも効果的に腎虚血再灌流障害を軽減できる可能性を示した。虚血再灌流障害の軽減機構には不明点が残されているが、H₂Sの産生酵素である3-メルカプトビルビン酸サルファトランスフェラーゼ(3MST)が再灌流障害の発生初期段階において他の産生酵素に先んじて低下することを見出した。3MSTの低下を防ぐことができれば、腎虚血再灌流障害を従前よりも軽減できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎障害は生命を脅かす危険性があり、治療には透析療法を導入することが少なくない。しかしながら、一旦導入すると長期間の透析を強いられるなどの負担が大きい。これに対して本研究では、D-システインもしくはN-アセチル-D-システインを腎不全の予防や重篤化の防止に役立てることができる可能性を示した。

虚血再灌流障害の軽減機構を解明するためには、再灌流障害の発生初期段階におけるH₂S産生酵素群の量的変化の観点から解析を進める必要があると考えられる。本研究によって、H₂S産生酵素群の時系列変化という新たな視点から腎虚血再灌流障害の発症、進展、あるいは軽減機構を解明できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Hydrogen sulfide (H₂S) modulates synaptic activity in the brain and relaxes vasculature. In addition to its function as a signaling molecule, H₂S has a cytoprotective effect. H₂S is produced from L-cysteine by three different H₂S-producing enzymes, cystathionine β -synthase (CBS), cystathionine γ -lyase (CSE), and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST) along with cysteine aminotransferase (CAT). An additional pathway for the production of H₂S is from D-cysteine by 3MST and D-amino acid oxidase (DAO). We found that N-acetyl-D-cysteine attenuates ischaemia-reperfusion injury caused in the kidney more effectively than D-cysteine. We also found that 3MST protein levels decreased at early-time points after the renal insult, but not CSE and CBS levels, suggesting that 3MST is susceptible to ischaemia-reperfusion injury. This study presents a new therapeutic approach to deliver H₂S to the kidney and provides novel approach to examine the mechanisms of ischaemia-reperfusion injury.

研究分野：薬理学、生化学

キーワード：硫化水素 D-システイン 3MST 虚血再灌流障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

硫化水素 (H_2S) は、古くから有毒物質として広く知られている。しかしながら、シグナル分子としての H_2S が見出されて以来、その生理作用を解明する研究が数多く行われている。その結果、 H_2S の作用としては、神経伝達調節、平滑筋弛緩、細胞保護、インスリン分泌調節、血管新生など極めて多岐におよぶことがわかっている。

生体内には H_2S の産生酵素が存在しており、ピリドキサルリン酸依存性のシスタチオン-シターゼ (CBS) とシスタチオン-リアーゼ (CSE) が知られている。CBS と CSE は L-システインから H_2S を産生するが、筆者らは脳内の産生酵素を探索する過程で 3-メルカプトピルビン酸サルファトランスフェラーゼ (3MST) に着目し解析を進めてきた。3MST の基質は 3-メルカプトピルビン酸 (3MP) と考えられている。光学活性をもたない 3MP は、L-システインと α -ケトグルタル酸からシステインアミノトランスフェラーゼ (CAT) によって供給される。CAT-3MST は、生理的環境下では活性が低いとの理由からあまり重視されていなかった酵素であるが、意外なことに脳では CBS 以上に多くの H_2S を産生し得る。

その後我々は、L-システインのネガティブコントロールとして用いた D-システインからも H_2S が産生されることを見出し、D-アミノ酸化酵素 (DAO) - 3MST による経路を同定した。DAO-3MST は、小脳と腎臓で認められ、腎臓抽出液を用いた検討では L-システイン経路の約 80 倍もの活性を示す。D-システインは、腎虚血再還流障害を L-システインよりも効果的に減弱することから、腎疾患の新規治療薬になり得ると考えられた。

2. 研究の目的

(1) D-システインは腎疾患の新規治療薬になり得ると考えられたが、マウスを用いた腎虚血再還流障害の検討結果を体重 50 kg に換算すると、1日約 70 g の D-システインが必要となる。現状では医療応用を指向することが難しいため、投与量を低減化するための検討を試みた。

(2) D-システインを投与することで腎虚血再還流障害が顕著に軽減されることが判明しているが、その軽減機構には不明点が残されている。本研究では、「D-システイン- H_2S 産生システム」の観点から産生酵素の発現量に着目し、腎虚血再還流障害の軽減機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) D-システイン投与量を低減化するための検討は以下の方法で行った。一般に D-システインは、アミノ酸トランスポーターを介して細胞内に取り込まれると考えられている。これに対して本研究では、トランスポーター非依存的な細胞への取込みを促すため、D-システインにアセチル基を付加することで脂溶性を高めた N-アセチル-D-システインの効果を検討した。8-10 週齢の ICR 雄性マウスに対して、食塩、D-システイン、N-アセチル-D-システインをそれぞれ経口投与した後、左腎動脈をクレンメで 45 分間閉塞した。再灌流 24 時間後に腎臓を摘出し、腎切片上でのホルマザン色素 (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, TTC) 染色による細胞活性の測定を行った。

(2) 腎虚血再還流障害の軽減機構を解明するための検討は以下の方法で行った。8-12 週齢の C57BL/6N 雄性マウスに対して、左腎動脈の閉塞時間を 25 分から 10 分間隔で段階的に 55 分まで増やし、再灌流 24 時間後に腎臓を摘出した。その後、腎障害の指標である血清クレアチニン値を測定するとともに産生酵素 (CBS, CSE, 3MST) の発現量をウエスタンブロット法で解析した。

3MST と機能的に類似すると考えられるロダナーゼ (TST) の発現量については、野生型及び 3MST ノックアウトマウスを対象とし、ウエスタンブロット法で解析した。

4. 研究成果

(1) D-システイン投与量を低減化するための検討

ホルマザン色素 (TTC) は、細胞内ミトコンドリアの還元酵素によって赤色を呈する色素である。虚血再灌流を施していない腎臓の切片を TTC で染色すると、食塩、D-システイン、N-アセチル D-システイン投与のいずれにおいても髄質および皮質が赤色を呈した。一方、虚血再灌流を施した腎臓では、食塩投与群で皮質・髄質ともに TTC で染色されず、N-アセチル D-システイン投与群では皮質において D-システイン投与群よりも TTC による染色が顕著であった。

システインは水溶性であり、細胞膜の透過性は低いと考えられる。システインはアミノ酸トランスポーターによって細胞内に取り込まれるが、その効率は L-システインよりも D-システインのほうが低いと考えられている。今回の検討では、トランスポーター非依存的に D-システインを取り込ませるため、N-アセチル D-システインを用いた検討を行った。脂溶性を高めた N-アセチル D-システインを投与することによって D-システインよりも著効を示し得ることがわかった。

L-システインは、興奮毒性を有するアミノ酸として知られている。そのため、L-システインの大量投与には危険性を伴うことが懸念される。一方、D-システインは比較的毒性が低いとの報告がある。今回の結果から、N-アセチル D-システインを腎不全の予防や重篤化の防止

に役立てることができる可能性があると考えられる。

(2) 腎虚血再還流障害の軽減機構を解明するための検討

左腎動脈の閉塞時間を25分から55分まで段階的に増やし、再灌流24時間後に腎障害の指標である血清クレアチニン値を測定したところ、35分間の虚血によって障害が認められ始めた。25分間の虚血では、CBS、CSE、3MSTのいずれのタンパク質量は変化しなかったが、障害の認められ始めた35分間の虚血では、3MSTのみタンパク質量が低下していた。さらに、45分間の虚血では、再灌流障害が悪化するとともに、3MST、CBS、CSEのいずれにおいてもタンパク質量が低下していた。以上から、3MSTは、CBSやCSEよりも虚血再灌流に対して不安定な酵素であることが明らかとなった。仮に、この3MSTの低下を防ぐことができれば、腎虚血再灌流障害を従前よりも軽減できると考えられる。

上記の検討では、腎虚血再灌流障害の発生初期段階において、3MSTがCBSやCSEに先んじて減少していた。この結果から、 H_2S 産生酵素群の時系列変化という新たな視点から腎虚血再灌流障害の発症、進展、あるいは軽減機構を解明できると考えられた。しかしながら、3MSTと機能的に類似すると考えられているロダネーゼ(TST)に関する動態についてはほとんど明らかにされていない。腎虚血再還流障害の軽減機構をより幅広い観点から解明するため、TSTの動態についても以下の通り検討を行った。

今回新たに3MSTノックアウトマウスを用いてTSTタンパク質量をウエスタンブロット法で解析したところ、3MSTとTSTの両者は発現量において逆相関していることが判明した。具体的には、3MSTがノックアウトされた臓器ではTSTのタンパク質量が増加する結果であった。一方、腎臓におけるCBSとCSEに関しては、3MSTの量的変動によらず一定であった。

TSTを過剰発現させた腎培養細胞内では H_2S の貯蔵型が増加する傾向が見られたが、CBSとCSEを過剰発現させた細胞内では変動しないことから、3MSTと機能的に類似すると考えられているTSTが腎機能に影響している可能性が考えられる。

これまでの検討から、3MSTに加えてTSTが腎虚血再灌流障害に関与している可能性が示唆された。今後は、 H_2S 産生酵素群の時系列変化という視点から腎虚血再還流障害の発症、進展、あるいは軽減機構を解明できると考えられるが、その際には3MSTとTSTの両者を視野に入れた解析が必要と思われる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

- 1) Kimura Y, Shibuya N, Kimura H. Sulfite protects neurons from oxidative stress. *British Journal of Pharmacology*. 査読有, Vol. 176, 571-582, 2019. doi: 10.1111/bph.14373.
- 2) 渋谷 典広. 硫化水素とポリサルファイドの産生機構. *日本薬理学雑誌*, 152巻, 216-222, 2018. doi: 10.1254/fpj.152.216.
- 3) Kimura Y, Koike S, Shibuya N, Lefer D, Ogasawara Y, Kimura H. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces potential redox regulators cysteine- and glutathione-persulfide (Cys-SSH and GSSH) together with signaling molecules H_2S_2 , H_2S_3 and H_2S . *Scientific Reports*. 査読有, Vol. 7, 10459, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-11004-7.
- 4) 渋谷 典広, 木村英雄. 生体における硫化水素とポリサルファイドの生成機構と生理機能. *硫酸と工業*. 査読無, 70巻, 1-14, 2017.
- 5) Koike S, Kawamura K, Kimura Y, Shibuya N, Kimura H, Ogasawara Y. Analysis of endogenous H_2S and H_2S_n in mouse brain by high-performance liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometric detection. *Free Radical Biology & Medicine*. 査読有, Vol. 113, 355-362, 2017. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.346.
- 6) Hanaoka K, Sasakura K, Suwanai Y, Toma-Fukai S, Shimamoto K, Takano Y, Shibuya N, Terai T, Komatsu T, Ueno T, Ogasawara Y, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Kimura H, Wang C, Uchiyama M, Kojima H, Okabe T, Urano Y, Shimizu T, Nagano T. Discovery and Mechanistic Characterization of Selective Inhibitors of H_2S -producing Enzyme: 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase (3MST) Targeting Active-site Cysteine Persulfide. *Scientific Reports*. 査読有, Vol. 7, 45995, 2017. doi: 10.1038/srep40227.

- 7) Miyamoto R, Koike S, Takano Y, Shibuya N, Kimura Y, Hanaoka K, Urano Y, Ogasawara Y, Kimura H. Polysulfides (H_2S_n) produced from the interaction of hydrogen sulfide (H_2S) and nitric oxide (NO) activate TRPA1 channels. Scientific Reports. 査読有, Vol. 7, 45995, 2017. doi: 10.1038/srep45995.

〔学会発表〕(計 16 件)

- 1) 渋谷 典広、小池 伸、木村 由佳、宮本 亮、小笠原 裕樹、木村 英雄. 生理活性物質硫化水素とポリサルファイドの産生と機能. 第 92 回日本薬理学会年会、2019 年.
- 2) 木村 由佳、小池 伸、渋谷 典広、David Lefer、小笠原 祐樹、木村 英雄. 3-メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素はシグナル分子 H_2S_2 、 H_2S_3 、 H_2S に加え、レドックス調節因子候補であるシステインパーサルファイド、GSHパーサルファイドを産生する. 第91回日本生化学会大会、2018年.
- 3) 渋谷 典広. 生理活性物質硫化水素とポリサルファイドの産生機構. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年.
- 4) 渋谷 典広、小池 伸、田中 真紀子、湯浅 磨里、木村 由佳、小笠原 裕樹、福井 清、永原則之、木村 英雄. D-システインからの硫化水素産生. 第 89 回日本生化学会大会、2016 年.
- 5) Yuka Kimura, Yukiko Toyofuku, Shin Koike, Norihiro Shibuya, Noriyuki Nagahara, David Lefer, Hideo Kimura. Identification of H_2S_3 as a novel signaling molecule in the brain, and its biosynthesis by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. 第 39 回日本神経科学大会、2016 年.
- 6) Norihiro Shibuya, Shin Koike, Makiko Tanaka, Mari Yuasa, Yuka Kimura, Yuki Ogasawara, Kiyoshi Fukui, Noriyuki Nagahara, Hideo Kimura. Another pathway to produce H_2S . 第 39 回日本神経科学大会、2016 年.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当者なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：木村 英雄、小笠原 裕樹

ローマ字氏名：Kimura Hideo、Ogasawara Yuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。