

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：17401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23651239
 研究課題名（和文）親電子シグナルの硫化水素イオンによる制御メカニズムの解明
 研究課題名（英文）Regulation mechanism by hydrogen sulfide anion of electrophile signaling
 研究代表者
 赤池 孝章（AKAIKE TAKAAKI）
 熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
 研究者番号：20231798

研究成果の概要（和文）： 生体の酸化ストレス応答において、8-nitro-cGMP などの親電子物質はシグナルのメディエーターとして機能している。本研究では、生体内で生成する硫化水素関連物質と親電子シグナル分子の反応を詳細に解析し、シグナル制御における役割を調べた。硫化水素関連物質は、8-nitro-cGMP を 8-SH-cGMP へと分解・変換することにより、その親電子シグナル活性を制御していることが分かった。

研究成果の概要（英文）： In the cellular response to oxidative stress, electrophiles such as 8-nitro-cGMP function as important signal mediators. In this study, we examined the reaction mechanism of hydrogen sulfide-related compounds with electrophiles to reveal its role in the signal regulation. As a result, we found that hydrogen sulfide-related compounds react with 8-nitro-cGMP to produce 8-SH-cGMP, and are involved in the regulation of electrophile signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：硫化水素、親電子物質、シグナル伝達、8-nitro-cGMP、S-グアニル化

1. 研究開始当初の背景

生体外から加えられた diethylmalate (DEM) や有機水銀（メチル水銀）などの親電子物質は、毒物代謝系で代謝されるとともに、Keap1/Nrf2 経路などの生体防御系を活性化するシグナルとなることが知られている。また、細胞内の酸化ストレス応答では、内因性に 8-nitro-cGMP、4-hydroxynonenal (4-HNE)、15-deoxy-prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂)、nitro-fatty acid などの親電子物質が生成し、2次メッセンジャーとしてそのシグナルを担っていることが明らかになってきた。研究代表者らは、最近、一酸化窒素と活性酸素のシグナル伝達を担う親電子分子として 8-nitro-cGMP が生体内で生成することを明

らかにし、この分子が蛋白質中のシステイン残基と反応して cGMP を付加する翻訳後修飾（蛋白質 S-グアニル化）をもたらすことを明らかにした (Nature Chem Biol, 2007; Chem Commun, 2008; J Immunol, 2009; Bioconj Chem, 2010; J Biol Chem, 2010; Nitric Oxide, 2010)。

一方近年、生体内において、シスタチオンβ-シンターゼ (CBS) やシスタチオンγ-リアーゼ (CSE) などの各種酵素の作用により硫化水素関連物質が生成していることが報告され、その生理機能が注目されている。これまでに、神経情報伝達や血管弛緩反応など様々な生理現象に硫化水素関連物質が関わっていることが示唆されているが、その本

態は不明である。研究代表者らは、8-nitro-cGMP の化学的特性を解析する過程で、予備的ながら、硫化水素関連物質と 8-nitro-cGMP が水溶液中で反応し、8-nitro-cGMP の寿命と化学的反応性(求核物質 8-SH-cGMP への変換)を規定していることを見出した。そこで本研究課題では、細胞内親電子シグナルの硫化水素による制御機構に注目して解析を行った。

2. 研究の目的

本研究課題では、硫化水素と親電子シグナルの新たな生理機能を解明することを目的として、8-nitro-cGMP を親電子シグナルのモデル分子として、内因性硫化水素関連物質による親電子物質とのユニークな反応メカニズムを詳細に解析した。

3. 研究の方法

(1) 8-nitro-cGMP と硫化水素関連物質との反応機構を調べるために、試験管内にて 8-nitro-cGMP と硫化水素ドナー (NaHS) や各種硫化水素関連物質をさまざまな条件で反応させ、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)-UV 検出および HPLC-タンデム質量分析 (HPLC-MS/MS) を用いて、8-nitro-cGMP の分解と分解生成物の解析を行った。また、同様の方法により、4-HNE、15d-PGJ₂ などの 8-nitro-cGMP 以外の親電子物質と NaHS との反応性についても解析した。

(2) チオール反応試薬であるブロモビマンと HPLC-MS/MS を用いた高感度な硫化水素関連物質の定量法を開発し、各種培養細胞、マウス組織試料中の硫化水素関連物質の生成を定量した。また、安定同位体希釈法と HPLC-MS/MS を用いた 8-SH-cGMP の高感度定量法を開発し、生体内での 8-SH-cGMP の生成を調べた。

(3) 硫化水素関連物質と 8-nitro-cGMP の反応がシグナル伝達に与える影響を調べるために、培養細胞 (A549 ヒト肺がん細胞、C6 ラットグリオーマ細胞など) の CBS、CSE をノックダウンし、8-nitro-cGMP 処理後の蛋白質 S-グアニル化をウエスタンブロットにより解析した。

4. 研究成果

(1) 試験管内で 8-nitro-cGMP と NaHS を重金金属存在下で反応させると、脱ニトロ化反応により 8-SH-cGMP が生成することが明らかになった。また、4-HNE、15d-PGJ₂ などの 8-nitro-cGMP 以外の各種親電子物質も NaHS と反応し分解することが分かった。

(2) 生体内で生成している硫化水素関連物質を HPLC-MS/MS で解析したところ、培養細胞やマウス臓器中において、各種チオール化

合物に硫黄原子が付加した化合物 (ポリスルフィド; R-S-S_(n)H) が主要な硫化水素関連物質として生成していることが明らかになった。特にグルタチオンポリスルフィドは 100 μM を超える高い濃度で存在することが示された。

(3) グルタチオンポリスルフィドなどの各種ポリスルフィドと 8-nitro-cGMP を反応させ反応生成物を解析したところ、8-nitro-cGMP が分解して、8-SH-cGMP が生成することが明らかになった。

(4) CBS や CSE をノックダウンした A549 細胞や C6 細胞では、8-nitro-cGMP の分解 (8-SH-cGMP への代謝) が抑制され、蛋白質 S-グアニル化が著明に増加した。

以上より、生体内において CBS や CSE により生成する硫化水素関連物質 (ポリスルフィド) は、8-nitro-cGMP などの親電子性シグナル分子と反応することにより、細胞機能制御に関わっていることが示唆された。

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 28 件)

- 1) Fujii S and Akaike T. Redox signaling by 8-nitro-cyclic guanosine monophosphate: nitric oxide- and reactive oxygen species-derived electrophilic messenger. *Antioxid Redox Signal.* in press, 2013. 査読有
- 2) Rahaman MM, Sawa T, Ahmed KA, Khan S, Inoue H, Irie A, Fujii S, and Akaike T. S-Guanylation proteomics for redox-based mitochondrial signaling. *Antioxid Redox Signal.* in press, 2013. 査読有
- 3) Joudoi T, Shichiri Y, Kamizono N, Akaike T, Sawa T, Yoshitake J, Yamada N, and Iwai S. Nitrated cyclic GMP modulate guard cell signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 25: 558-571, 2013. 査読有
- 4) Akaike T, Nishida M, and Fujii S. Regulation of redox signalling by an electrophilic cyclic nucleotide. *J Biochem.* 153: 131-138, 2013. 査読有
- 5) Kurauchi Y, Hisatsune A, Isohama Y, Sawa T, Akaike T, and Katsuki H. Nitric oxide/soluble guanylyl cyclase signaling mediates depolarization-induced protection of rat mesencephalic dopaminergic neurons from MPP(+) cytotoxicity.

- Neuroscience*. 231: 206-215, 2013. 査読有
- 6) Watanabe K, Ishima Y, Akaike T, Sawa T, Kuroda T, Ogawa W, Watanabe H, Suenaga A, Kai T, Otagiri M, and Maruyama T. S-nitrosated α -1-acid glycoprotein kills drug-resistant bacteria and aids survival in sepsis. *FASEB J*. 27: 391-398, 2013. 査読有
 - 7) Oyama K, Khan S, Okamoto T, Fujii S, Ono K, Matsunaga T, Yoshitake J, Sawa T, Tomida J, Kawamura Y, and Akaike T. Identification of and screening for human *Helicobacter cinaedi* infections and carriers via nested PCR *J Clin Microbiol*. 50: 3893-3900, 2012. 査読有
 - 8) Saito Y, Sawa T, Yoshitake J, Ito C, Fujii S, Akaike T, and Arimoto H. Nitric oxide promotes recycling of 8-nitro-cGMP, a cytoprotective mediator, into intact cGMP in cells. *Mol Biosyst*. 8: 2909-2915, 2012. 査読有
 - 9) Nishida M, Sawa T, Kitajima N, Ono K, Inoue H, Ihara H, Motohashi H, Yamamoto M, Suematsu M, Kurose H, van der Vliet A, Freeman BA, Shibata T, Uchida K, Kumagai Y, and Akaike T. Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulphydration. *Nat Chem Biol*. 8: 714-724, 2012. 査読有
 - 10) Guoguo S, Akaike T, Tao J, Qi C, Nong Z, and Hui L. HGF-mediated inhibition of oxidative stress by 8-nitro-cGMP in high glucose-treated rat mesangial cells. *Free Radic Res*. 46: 1238-1248, 2012. 査読有
 - 11) Sato Y, Hatta M, Karim MF, Sawa T, Wei F-Y, Sato S, Magnuson MA, Gonzalez FJ, Tomizawa K, Akaike T, Yoshizawa T, and Yamagata K. Anks4b, a novel target of HNF4 α interacts with GRP78 and regulates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in pancreatic β -cells. *J Biol Chem*. 287: 23236-23245, 2012. 査読有
 - 12) Goto T, Ogura Y, Hirakawa H, Tomida J, Morita Y, Akaike T, Hayashi T, and Kawamura Y. Complete genome sequence of *Helicobacter cinaedi* strain PAGU611, isolated in a case of human bacteremia. *J Bacteriol*. 194: 3744-3745, 2012. 査読有
 - 13) Ishima Y, Hoshino H, Shinagawa T, Watanabe K, Akaike T, Sawa T, Kragh-hansen U, Kai T, Watanabe H, Maruyama T, and Otagiri M. S-Guanylation of human serum albumin is a unique posttranslational modification and results in a novel class of antibacterial agents. *J Pharm Sci*. 101: 3222-3229, 2012. 査読有
 - 14) 藤井重元、赤池孝章. 硫化水素と炎症. *感染・炎症・免疫* 42: 235-237, 2012. 査読無
 - 15) 赤池孝章. 概論: 活性酸素によるレドックス制御の新たなパラダイム転換に迫る. *実験医学増刊: 活性酸素・ガス状分子による恒常性制御と疾患* (山本雅之監修, 赤池孝章, 一條秀憲, 森 泰生編集) 30: 2690-2696, 2012. 査読無
 - 16) 澤 智裕、赤池孝章. ROS・親電子リガンドとガス状分子のシグナルネットワーク. *実験医学増刊: 活性酸素・ガス状分子による恒常性制御と疾患* (山本雅之監修, 赤池孝章, 一條秀憲, 森 泰生編集) 30: 2740-2745, 2012. 査読無
 - 17) Khan S, Okamoto T, Enomoto K, Sakashita N, Oyama K, Fujii S, Sawa T, Takeya M, Ogawa H, Yamabe H, and Akaike T. Potential association of *Helicobacter cinaedi* with atrial arrhythmia and atherosclerosis. *Microbiol Immunol*. 56: 145-154, 2012. 査読有
 - 18) Ahmed KA, Sawa T, Ihara H, Kasamatsu S, Yoshitake J, Rahaman MM, Okamoto T, Fujii S, and Akaike T. Regulation by mitochondrial superoxide and NADPH oxidase of cellular formation of nitrated cyclic GMP: potential implications for ROS signalling. *Biochem J*. 441: 719-730, 2012. 査読有
 - 19) Ishima Y, Yoshida F, Kragh-Hansen U, Watanabe K, Katayama N, Nakajou K, Akaike T, Kai T, Maruyama T, and Otagiri M. Cellular uptake mechanisms and responses to NO transferred from mono- and poly-S-nitrosated human serum albumin. *Free Radic Res*. 45: 1196-1206, 2011. 査読有
 - 20) Yoshida E, Toyama T, Shinkai Y, Sawa T, Akaike T, and Kumagai Y. Detoxification of methylmercury by hydrogen sulfide-producing enzyme in mammalian cells. *Chem Res Toxicol*. 24: 1633-1635, 2011. 査読有
 - 21) Tokutomi Y, Kataoka K, Yamamoto E,

- Nakamura T, Fukuda M, Nako H, Toyama K, Yi-Fei Dong Y-F, Ahmed KA, Sawa T, Akaike T, and Kim-Mitsuyama S. Vascular responses to 8-nitro-cyclic GMP in non-diabetic and diabetic mice. *Br J Pharmacol*. 162: 1884-1893, 2011. 査読有
- 22) Sawa T, Ihara H, and Akaike T. Antioxidant effect of a nitrated cyclic nucleotide functioning as an endogenous electrophile. *Curr Top Med Chem*. 11: 1854-1860, 2011. 査読有
- 23) Ihara H, Ahmed KA, Ida T, Kasamatsu S, Kunieda K, Okamoto T, Sawa T, and Akaike T. Methodological proof of immunochemistry for specific identification of 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate formed in glia cells. *Nitric Oxide*. 25: 169-175, 2011. 査読有
- 24) Akaike T, van der Vliet A, and Eaton P. Frontiers in nitric oxide and redox signaling. *Nitric Oxide*. 25: 57-58, 2011. 査読有
- 25) Ahmed KA, Sawa T, and Akaike T. Protein cysteine S-guanylation and electrophilic signal transduction by endogenous nitro-nucleotides. *Amino Acids*. 41: 123-130, 2011. 査読有
- 26) 澤 智裕、小野勝彦、赤池孝章. 活性酸素・一酸化窒素によるニトロ化シグナルと抗炎症作用. *感染・炎症・免疫*. 41: 12-19, 2011. 査読無
- 27) 岡本竜哉、居原 秀、赤池孝章. 喫煙と酸化ストレス: Oxidative stress induced by cigarette smoking. *最新精神医学*. 特集号「精神障害者と喫煙」16: 431-439, 2011. 査読無
- 28) 今吉理恵子、岡本竜哉、永尾潤一、長環、松永勝政、赤池孝章、上西秀則. 植物精油 citral のインフルエンザウイルス感染能抑制効果について: Experimental study of a citral on the preventive effect of influenza virus infection. *医学と生物学*. 155: 489-494, 2011. 査読有
- [学会発表] (計 2 4 件)
- 1) Takaaki Akaike. Persulfide regulation of redox signaling involving unique polysulfur biology. 第 85 回日本生化学会大会 (2012. 12. 14-16、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、福岡)
- 2) 藤井重元、他. The site specific Cys195 S-guanylation in protein kinase G 1 α responsible for persistent hypotension in sepsis. 第 85 回日本生化学会大会 (2012. 12. 14-16、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、福岡)
- 3) 赤池孝章. レドックスシグナル制御と酸化ストレスバイオマーカー. 第 20 回日本精神科救急学会学術総会 (2012. 10. 27-28、奈良県新公会堂、奈良)
- 4) 赤池孝章. 感染防御における活性酸素シグナル制御と破綻. 第 65 回日本細菌学会中国・四国支部総会 (2012. 10. 20-21、徳島大学長井記念ホール、徳島)
- 5) Takaaki Akaike. Hydrogen sulfide regulation for electrophile-mediated ROS signaling. Second International Conference on H₂S Biology and Medicine. (2012. 9. 20-22, Sheraton Atlanta Hotel, Atlanta, USA)
- 6) 藤井重元、他. オートファジーによるサルモネラの細胞内殺菌と硫化水素による制御. 第 65 回日本細菌学会九州支部総会 (2012. 8. 24-25、那覇市ぶんかテンプス館テンプスホール、那覇市)
- 7) Takaaki Akaike, Hideshi Ihara, and Tomohiro Sawa. 8-SH-cGMP endogenously formed from 8-nitro-cGMP as a second messenger of hydrogen sulfide. The 7th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Application of Nitric Oxide. (2012. 7. 22-26, McIntyre Conference Center, Edinburgh, UK)
- 8) Shigemoto Fujii, et al. Regulation by mitochondrial superoxide and NADPH oxidase of cellular formation of nitrated cyclic GMP: Potential implications for NO and ROS signaling. The 7th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Application of Nitric Oxide. (2012. 7. 22-26, McIntyre Conference Center, Edinburgh, UK)
- 9) 赤池孝章. 硫化水素によるレドックスシグナル制御: 新しいセカンドメッセンジャー 8-SH-cGMP の発見. 第 12 回日本 NO 学会学術集会 (2012. 6. 29-30、神戸国際会議場、神戸)
- 10) Takaaki Akaike, Motohiro Nishida, and Tomohiro Sawa. Nitrated cyclic nucleotide mediates endogenous electrophilic signaling for Ras-dependent senescence and autophagy. The 33rd Naito Conference on Oxygen Biology: Hypoxia, Oxidative

- Stress and Diseases. (2012.6.26-29, CHATERAISE Gateaux Kingdom SAPPORO、札幌)
- 11) Shigemoto Fujii, et al. Hydrogen sulfide regulates H-Ras-induced autophagy. The 33rd Naito Conference on Oxygen Biology: Hypoxia, Oxidative Stress and Diseases. (2012.6.26-29, CHATERAISE Gateaux Kingdom SAPPORO、札幌)
 - 12) 赤池孝章. トップジャーナル七転び八起き. 第85回日本総会 (2012.3.27、長崎ブリックホール、長細菌学会崎)
 - 13) 藤井重元、赤池孝章. 硫化水素の抗酸化機能と酸化ストレスバイオマーカー. 第8回呼吸器バイオマーカー研究会 (2012.3.10、都市センターホテル、東京)
 - 14) Takaaki Akaike. Cellular signaling mediated by nitrated cyclic nucleotides and its regulation by hydrogen sulfide. The 23rd Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology. (2011.10.6, COEX, ソウル、韓国)
 - 15) 赤池孝章、他. ROS and electrophilic cellular signaling regulated by hydrogen sulfide. 第84回日本生化学会大会 (2011.9.21、国立京都国際会館、京都)
 - 16) Takaaki Akaike. Antimicrobial cell signaling mediated by nitrated cyclic nucleotide. 第84回日本細菌学会総会 (2011.9.6、札幌コンベンションセンター、札幌)
 - 17) 赤池孝章. 内因性硫化水素イオンによる ROS・親電子シグナル制御. 第2回 Molecular Cardiovascular Conference II (2011.9.2、ホテルピアノ、キコロ 北海道)
 - 18) 赤池孝章. 生体内ガス分子と活性酸素による多次元シグナルネットワーク. 第8回 Heme Oxygenase 研究フォーラム (2011.8.26、京都府立医科大学 青蓮会館、京都)
 - 19) Takaaki Akaike. Protein S-guanylation and its unique regulation mechanisms involving cysteine metabolism. 12th International congress on amino acids, peptides and proteins. (2011.8.1, Beijing International Convention Center, 北京、中国)
 - 20) 赤池孝章. 親電子シグナルと硫化水素. 九州大学生体防御医学研究所共同利用研

究集会 (2011.7.22、九州大学 生体防御医学研究所会議室、福岡)

- 21) 赤池孝章. 内因性硫化水素イオンによる親電子シグナル制御. 第64回日本酸化ストレス学会学術集会 (2011.7.2、ルスツリゾートホテル&コンベンション、留寿都 北海道)
- 22) Takaaki Akaike. Cellular signaling mediated by nitrated cyclic nucleotide and regulated by hydrogen sulfide. 第5回 cGMP 国際会議 (2011.6.23, Lowengebäude, Halle, Germany)
- 23) 赤池孝章. 活性酸素シグナルと加齢. 第11回日本抗加齢医学会総会 (2011.5.27、国立京都国際会館、京都)
- 24) Takaaki Akaike. Electrophilic cellular signaling regulated by H₂S-mediated sulfhydration. 第11回日本 NO 学会学術集会 (2011.5.13、昭和薬科大学、町田市 東京都)

[図書] (計3件)

- 1) 藤井重元、赤池孝章. NO シグナリング NO signaling. イラストで徹底理解するシグナル伝達キーワード事典 (山本雅, 仙波憲太郎, 山梨裕司 編). 羊土社, pp.67-69, 2012.
- 2) 澤 智裕、赤池孝章. 一酸化窒素 nitric oxide/NO. 免疫の事典 (桂 義元, 河本宏, 小安重夫, 山本一彦 編). 朝倉書店, pp. 39, 2011.
- 3) 澤 智裕、赤池孝章. 活性酸素 reactive oxygen species (ROS). 免疫の事典 (桂 義元, 河本 宏, 小安重夫, 山本一彦 編). 朝倉書店, pp. 109, 2011.

[その他]

ホームページ等
<http://kumadai-bisei.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤池 孝章 (AKAIKE TAKAAKI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：20231798

(2) 研究分担者

藤井 重元 (FUJII SHIGEMOTO)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：00325333