

## 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3月31日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011~2012

課題番号：23790316

研究課題名(和文) 硫化水素の生産・放出と神経細胞保護作用

研究課題名(英文) Production, release and neuroprotective effect of hydrogen sulfide

研究代表者

三上 義礼(MIKAMI YOSHINORI)

東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号：80532671

研究成果の概要(和文)：

ガス状生理活性物質のひとつ硫化水素( $H_2S$ )は神経細胞において3-メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素(3MST)とシステインアミノ基転移酵素(CAT)によって生産される。本研究では3MSTが内在性補因子としてチオレドキシンやジヒドロリポ酸を必要とすることを示した。また3MST-CAT経路はカルシウムにより制御され、 $H_2S$ が網膜光受容細胞のカルシウム濃度を低く保ち、光障害から保護することを明らかにした。 $H_2S$ の医療応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：

Hydrogen sulfide ( $H_2S$ ) is produced by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST) and cysteine aminotransferase (CAT) in the neurons. Thioredoxin and dihydrolipoic acid are required for 3MST to produce  $H_2S$ . The production of  $H_2S$  is regulated by calcium ( $Ca^{2+}$ );  $H_2S$ , in turn, regulates  $Ca^{2+}$  influx into photoreceptor cells.  $H_2S$  protects retinal neurons from light-induced degeneration.  $H_2S$  can be applied for therapeutic use.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：硫化水素・カルシウム・ガスメディエータ・細胞保護・神経細胞・網膜

## 1. 研究開始当初の背景

硫化水素( $H_2S$ )は、一酸化窒素(NO)、一酸化炭素(CO)と同様に酵素により生体内で生産され、さまざまな生理機能を発揮するガス状生理活性物質である。1996年、酵素シスタチオニンβ-シンターゼ(CBS)により脳で生産される $H_2S$ が記憶モデルとされる海馬長期増強を促進することから、 $H_2S$ が神経伝達修飾物質であることが報告された(Abe and Kimura, *J. Neurosci.* 16, 1066-1071, 1996)。グリア細胞では細胞内 $Ca^{2+}$ が上昇して次々と隣のグリア細胞に伝搬する $Ca^{2+}$ ウェーブを誘起する(Nagai et al., *FASEB J.* 18, 557-559, 2004)。シスタチオニンγ-リアーゼ(CSE)によって生産された $H_2S$ は平滑筋弛緩因子と

して働く(Hosoki et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 527-531, 1997)。さらに、 $H_2S$ はグルタチオン合成を促進するほか、ミトコンドリアにおいて活性酸素スカベンジャーとして機能することにより、酸化ストレスから神経細胞を保護する(Kimura and Kimura, *FASEB J.* 18, 1165-1167, 2004; Kimura et al., *Antioxid. Redox Signal.* 12, 1-13, 2010)。

脳における $H_2S$ 生産酵素は、神経細胞では3-メルカプトピルビン酸イオウ転移酵素(3MST)、グリア細胞ではCBSが中心である(Shibuya et al., *Antioxid. Redox Signal.* 11, 703-714, 2009)。

## 2. 研究の目的

脳神経系で主に  $\text{H}_2\text{S}$  の生産を担う 3MST の酵素活性制御機構には未知な点が多い。さらに、 $\text{H}_2\text{S}$  の生理作用、特に神経保護作用については、そのメカニズムを明らかにすることが神経変性疾患や酸化ストレスによって引き起こされる細胞死に対する治療・創薬・予防につながる。そこで、本研究は、以下に挙げる項目を目的として研究を行った。

(1) 神経細胞内では主に、システインと  $\alpha$ -ケトグルタル酸を基質として、システインアミノ基転移酵素 (CAT) が 3-メルカプトピルビン酸 (3MP) を生成し、これを基質として 3MST が  $\text{H}_2\text{S}$  を生合成する。一連の酵素反応を活性化、あるいは、阻害する内在性の因子の同定を行い、生体内で  $\text{H}_2\text{S}$  生産を制御する分子メカニズムを明らかにする。

(2)  $\text{H}_2\text{S}$  は細胞内に結合型イオウという形で貯蔵されている。この貯蔵型  $\text{H}_2\text{S}$  がどのような生理的刺激によって遊離・放出されるかは分かっていない。 $\text{H}_2\text{S}$  の放出・遊離を促す生理活性物質を明らかにする。

(3)  $\text{H}_2\text{S}$  を外部から与えると神経保護作用を示す。本研究では生体内で実際に生産されている  $\text{H}_2\text{S}$  が神経保護因子として働いていることを示し、そのメカニズムを明らかにする。内在的な  $\text{H}_2\text{S}$  生産を高めることから神経細胞保護に導く経路を解析し、創薬・医療応用につながる研究を推進する。

## 3. 研究の方法

### (1) $\text{H}_2\text{S}$ 定量法

$\text{H}_2\text{S}$  はシステインを基質とし、CSE、CBS、および 3MST などの酵素によって生合成される。酵素活性を調べるために、C57BL/6 マウス脳より生化学的手法により  $\text{H}_2\text{S}$  産生酵素を含む画分を精製した。このほか目的に応じて、リポフェクション法により遺伝子導入した HEK293F 細胞抽出液、および、ラット肝臓から精製した CSE を用いた。

各サンプル液に基質を加え、密閉したプラスチックチューブ内で  $\text{H}_2\text{S}$  を生産させた。 $\text{H}_2\text{S}$  の定量はガスクロマトグラフにて行った。

### (2) カルシウムイメージング

マウス網膜スライス標本、ラット脳アストロサイト初代培養細胞、および、遺伝子導入した HEK293T 細胞におけるカルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) イメージングは、 $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬 CalciumGreen-1 を用い、光学顕微鏡法にて行った。

### (3) 網膜光障害の解析

網膜における  $\text{H}_2\text{S}$  の役割を明らかにするために、マウス網膜の凍結切片を作製し、免疫組織化学による抗体染色法により  $\text{H}_2\text{S}$  産生酵素の局在を調べた。さらに、網膜光障害モデルマウスを作製した。TUNEL 法や抗 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-ODdG) 抗体による染色を行い、神経細胞死や活性酸素種からの影響を調べた。光学顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡でデータを取得した。

これらの方法を通して、 $\text{H}_2\text{S}$  の生理的意義を細胞・組織・個体レベルで詳細に解析した。

## 4. 研究成果

### (1) $\text{H}_2\text{S}$ 産生酵素 3MST の補因子の同定：チオレドキシシンとジヒドロリポ酸

$\text{H}_2\text{S}$  産生酵素 3MST は活性化に還元性物質が必要とするが、対応する生体分子は不明であった。本研究では、内在性補因子としてチオレドキシシン (Trx) とジヒドロリポ酸 (DHLA) を同定した。分子内に 2 つの還元活性を有するチオール基を持つ構造が酵素反応に重要であり、3MST による  $\text{H}_2\text{S}$  生産の分子機構を提唱した (図 1)。

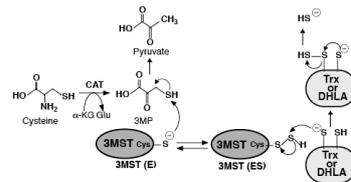


図 1: 3MST による  $\text{H}_2\text{S}$  生産の分子機構

### (2) $\text{H}_2\text{S}$ の代謝・放出経路の解析

3MST がチオ硫酸 ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) から  $\text{H}_2\text{S}$  を生産し、この酵素反応が亜硫酸イオン ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) 存在下で抑制されることを示した。チオ硫酸イオウ転移酵素 (別名: ロダナーゼ) に加え、3MST も  $\text{H}_2\text{S}$  代謝経路に関与するという、新規知見を加えた (図 2)。

細胞内で生産された  $\text{H}_2\text{S}$  は「結合型イオウ」として貯蔵され、還元条件下で放出される。本研究では DHLA が結合型イオウを切断・放出しうることも明らかにした。これらの研究が発展すれば、生体内の  $\text{H}_2\text{S}$  生合成系の制御から医療応用につなげるアプローチが可能となる。

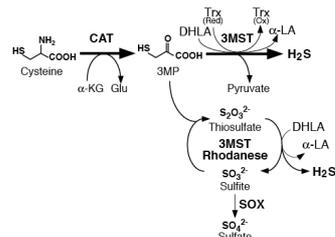


図 2:  $\text{H}_2\text{S}$  の生合成・代謝経路

(3) H<sub>2</sub>S 生合成の制御機構：カルシウムによる H<sub>2</sub>S 生産制御

3MST/CAT 経路はカルシウムイオン (Ca<sup>2+</sup>) による制御を受け、100 nM 以下の低い Ca<sup>2+</sup> 濃度で生産活性が上昇することを示した。生体内で実際にこの制御が機能していることを示すために、網膜に着目した。明環境下で網膜光受容細胞の Ca<sup>2+</sup> 濃度は約 10 nM まで減少する。

3MST と CAT は網膜の神経細胞に広く共局在していた。一方、他の H<sub>2</sub>S 生産酵素 (CSE、および、CBS) の局在は確認できなかった。

生化学的手法により、網膜では 3MST/CAT 経路から H<sub>2</sub>S が生産され、Ca<sup>2+</sup> によって制御されていることを示した (図 3)。

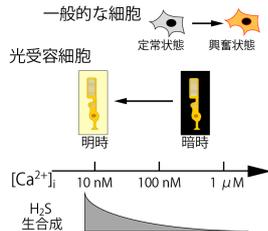


図 3：低 Ca<sup>2+</sup> 濃度において、3MST/CAT 経路から H<sub>2</sub>S が生産

(4) H<sub>2</sub>S の生理機能：H<sub>2</sub>S による網膜光受容細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度調節機構

網膜スライス標本を作製し Ca<sup>2+</sup> イメージングを行った。その結果、脱分極によって引き起こされる光受容細胞内への Ca<sup>2+</sup> 流入が、H<sub>2</sub>S の共存下で抑制されることを発見した。さらに、この抑制現象はプロトンポンプ vacuolar type H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) 阻害薬により消失した。薬理的な解析から、H<sub>2</sub>S が V-ATPase を活性化してプロトン放出を促進し、光受容細胞-水平細胞間の酸性化を起し、電位依存性 L 型 Ca<sup>2+</sup> チャネルを抑制するメカニズムを明らかにした (図 4)。H<sub>2</sub>S は、網膜光受容細胞内の Ca<sup>2+</sup> 濃度を低く抑える役割を担っている。

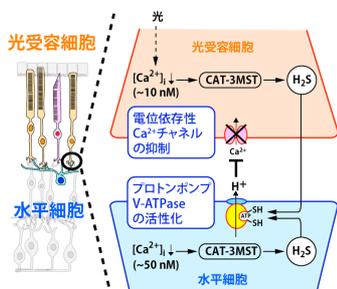


図 4：H<sub>2</sub>S によって光受容細胞の Ca<sup>2+</sup> 濃度が低く保持される。

(5) 網膜光障害に対する H<sub>2</sub>S の神経細胞保護効果

眼に強い光を照射すると、光受容細胞が変性し細胞死を起こす。この現象を「網膜光障害 (light-induced retinal degeneration)」といい、活性酸素種による細胞内 Ca<sup>2+</sup> 上昇やミトコンドリア機能不全が原因とされる。H<sub>2</sub>S を外から補うことで障害を予防できると考え、網膜光障害モデルマウスを作製し、解析を行った。

光照射を行う前に H<sub>2</sub>S ドナー化合物をマウスに腹腔内投与すると、光障害による網膜の細胞形態異常が軽減された。TUNEL 法により、H<sub>2</sub>S 投与マウスでは網膜光受容細胞の細胞死が軽減されることを示した。さらに、活性酸素種に起因する DNA 過酸化によって生じる 8-OHdG に対する抗体で染色したところ、H<sub>2</sub>S 投与個体でシグナルが減弱しており、酸化ストレスによる DNA 損傷が H<sub>2</sub>S によって緩和されていることが明らかとなった。

H<sub>2</sub>S は酸化ストレスを減少し、網膜障害を軽減して損傷の進行や悪化を阻止することから、網膜光障害や種々の神経変性疾患の治療に向けて医療応用が期待される (図 5)。

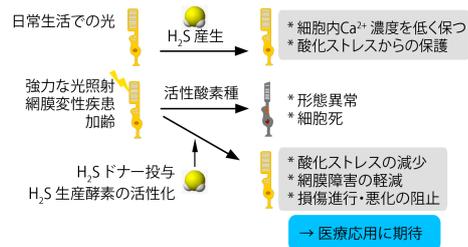


図 5：H<sub>2</sub>S は網膜光障害から光受容細胞を保護する。

(6) H<sub>2</sub>S 生産酵素シスタチオンγ-リアーゼの酵素制御機構

H<sub>2</sub>S 生産酵素のひとつシスタチオン γ-リアーゼ (CSE) は Ca<sup>2+</sup> 濃度依存的に H<sub>2</sub>S を生産し、カルモジュリンが活性を制御しているとの報告が出ていた (Yang et al., Science, 322, 587-590, 2008)。しかし、この実験に使用されていた Ca<sup>2+</sup> 濃度は生理的範囲からほど遠い条件であった。

生体内における Ca<sup>2+</sup> による CSE からの H<sub>2</sub>S 生産制御を確かめるために、生理的条件下での酵素活性を測定した。その結果、補酵素ピリドキサルリン酸 (PLP) 存在下では、細胞の定常状態 Ca<sup>2+</sup> 濃度で酵素が活性化され、Ca<sup>2+</sup> 濃度上昇によって H<sub>2</sub>S 生産が抑制された。PLP 非存在下では、全く逆の挙動を示した。またこの制御にカルモジュリンは影響を及ぼさなかった。血管平滑筋に局在する CSE は血圧調節に重要とされている。H<sub>2</sub>S 生合成系の制御による心血管疾患治療に結びつく成果である (図 6)。

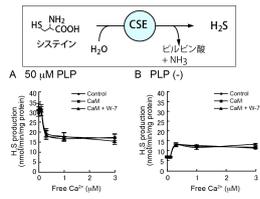


図6: Ca<sup>2+</sup>とPLPによるCSE酵素活性制御

### (7) アストロサイトにおける新規情報伝達修飾物質ポリサルファイドの作用機序

脳内ではH<sub>2</sub>Sが結合してポリサルファイドが生成される。ポリサルファイドをアストロサイト初代培養細胞に作用すると、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇した。薬理的解析から、この現象は、ポリサルファイドによるTransient receptor potential A1 (TRPA1) チャンネルの活性化によって引き起こされることを明らかにした。ポリサルファイドはアストロサイトのカルシウムシグナルを介して神経情報伝達を修飾する新規分子である(図7)。

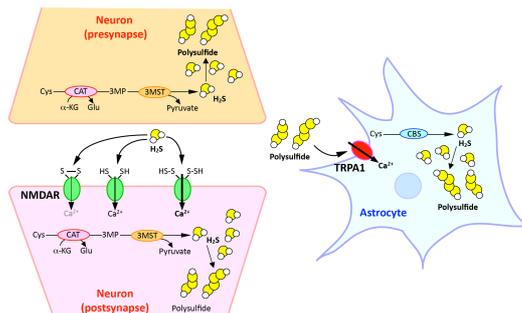


図7: 中枢神経系におけるH<sub>2</sub>Sおよびポリサルファイドの生合成とCa<sup>2+</sup>チャンネルの活性化機構

本研究の成果は、神経変性疾患や加齢、生活習慣病の予防や治療に神経細胞保護因子としてのH<sub>2</sub>Sが有効であることを示しており、今後の医療応用につながる意義を持つ。

さらに、神経細胞死に至る分子メカニズム解明を目指した研究に取り組んでいる。神経変性疾患や脳血管障害、脳炎・外傷等に起因する脳損傷などの結果、神経細胞死が引き起こされる。その引き金となる現象、および、関連する分子メカニズムを解析し、神経細胞死に結びつくシグナル経路を明らかにすることを目的としている。これまでの研究によって得られた神経細胞保護効果を合わせて活用することで、脳神経疾患の治療戦略に対する基盤が得られる。

## 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7件)

- (1) Yuka Kimura, Yoshinori Mikami, Kimiko Osumi, Mamiko Tsugane, Jun-Ichiro Oka and Hideo Kimura. (2013) Polysulfides are possible H<sub>2</sub>S-derived signaling molecules in rat brain. **FASEB Journal**. 27, 2451-2457. 査読有  
DOI: 10.1096/fj.12-226415
- (2) Yoshinori Mikami, Norihiro Shibuya, Yuki Ogasawara and Hideo Kimura. (2013). Hydrogen sulfide is produced by cystathionine γ-lyase at the steady-state low intracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 431, 131-135. 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.01.010
- (3) Yoshinori Mikami and Hideo Kimura. (2012). A mechanism of retinal protection from light-induced degeneration by hydrogen sulfide. **Communicative and Integrative Biology**. 5, 169-171. 査読有  
DOI: 10.4161/cib.18679
- (4) Kiyoshi Sasakura, Kenjiro Hanaoka, Norihiro Shibuya, Yoshinori Mikami, Yuka Kimura, Toru Komatsu, Tasuku Ueno, Takuya Terai, Hideo Kimura and Tetsuo Nagano. (2011). Development of a highly selective fluorescence probe for hydrogen sulfide. **Journal of the American Chemical Society**. 133, 18003-18005. 査読有  
DOI: 10.1021/ja207851s
- (5) Yoshinori Mikami, Norihiro Shibuya, Yuka Kimura, Noriyuki Nagahara, Masahiro Yamada and Hideo Kimura. (2011). Hydrogen sulfide protects the retina from light-induced degeneration by the modulation of Ca<sup>2+</sup> influx. **Journal of Biological Chemistry**. 286, 39379-39386. 査読有  
DOI: 10.1074/jbc.M111.298208
- (6) Xigui Chen, Tomoyuki Yoshida, Hiroshi Sagara, Yoshinori Mikami and Masayoshi Mishina. (2011). Protein tyrosine phosphatase σ regulates the synapse number of zebrafish olfactory sensory neurons. **Journal of Neurochemistry**. 119, 532-543. 査読有  
DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07411.x

(7) Yoshinori Mikami, Norihiro Shibuya, Yuka Kimura, Noriyuki Nagahara, Yuki Ogasawara and Hideo Kimura. (2011). Thioredoxin and dihydrolipoic acid are required for 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase to produce hydrogen sulfide. **Biochemical Journal**. 439, 479-485. 査読有  
DOI: 10.1042/BJ20110841

[学会発表] (計 11 件)

- (1) 木村英雄、三上義礼、渋谷典広、木村由佳、永原則之、山田雅弘. Production of H<sub>2</sub>S and its protection of retinal neurons from light-induced degeneration. 第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 22 日、福岡国際会議場 (福岡県).
- (2) 木村英雄、三上義礼、渋谷典広、木村由佳、小笠原裕樹、永原則之. Regulation of H<sub>2</sub>S production by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. 第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県).
- (3) 三上義礼、渋谷典広、木村由佳、永原則之、山田雅弘、木村英雄. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) protects retinal photoreceptor cells from light-induced degeneration. 第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 20 日、名古屋国際会議場 (愛知県).
- (4) 三上義礼、渋谷典広、木村由佳、永原則之、山田雅弘、木村英雄. Cytoprotective effect of hydrogen sulfide on light-induced retinal degeneration. 第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 16 日、国立京都国際会館 (京都府).
- (5) 木村英雄、三上義礼、渋谷典広、木村由佳、永原則之、小笠原裕樹. Thioredoxin and dihydrolipoic acid are required for 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase to produce hydrogen sulfide. 第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 15 日、国立京都国際会館 (京都府).
- (6) 木村英雄、三上義礼、渋谷典広、木村由佳、小笠原裕樹. 3-メルカプトピルピン酸硫黄転移酵素の硫化水素生産補因子. 第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 23 日、国立京都国際会館 (京都府).

(7) 三上義礼、渋谷典広、木村由佳、永原則之、山田雅弘、木村英雄. 網膜における硫化水素の生合成と細胞保護作用. 第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 22 日、国立京都国際会館 (京都府).

(8) Xigui Chen, Tomoyuki Yoshida, Hiroshi Sagara, Yoshinori Mikami and Masayoshi Mishina. Regulation of synapse number by protein tyrosine phosphatase  $\sigma$ . The 4th Molecular and Cellular Cognition Society-ASIA Symposium. 2011 年 9 月 19 日~20 日.ソウル、大韓民国.

(9) 木村英雄、三上義礼、渋谷典広、木村由佳、小笠原裕樹. Endogenous reductants required for 3MST to produce H<sub>2</sub>S. 第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 17 日、パシフィコ横浜 (神奈川県).

(10) 三上義礼、渋谷典広、木村由佳、永原則之、山田雅弘、木村英雄. Regulation of hydrogen sulfide production and its cytoprotective effect in the retina. 第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 16 日、パシフィコ横浜 (神奈川県).

(11) 陳西貴、吉田知之、相良洋、三上義礼、三品昌美. Regulation of synapse number by presynaptic PTP $\sigma$  in zebrafish olfactory sensory neurons. 第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 15 日、パシフィコ横浜 (神奈川県).

[その他]

ホームページ等

- (1) [http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r\\_dna/index.html](http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_dna/index.html)
- (2) <http://calcium.cmp.m.u-tokyo.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三上 義礼 (MIKAMI YOSHINORI)

東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号 : 8 0 5 3 2 6 7 1