

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 29 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590392

研究課題名(和文) 硫化水素産生不全を伴う硫黄転移酵素ノックアウトマウスに関する網羅的研究

研究課題名(英文) Comprehensive study of sulfurtransferase-knockout mice associated with insufficiency of hydrogen sulfide production

研究代表者

永原 則之 (NAGAHARA, Noriyuki)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10208043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：知能発達遅延を伴う遺伝性疾患・メルカプト乳酸システイン尿症のモデルとして、メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素ノックアウトマウスを作成した。奇形は伴わないが、著明な不安様行動を認めた。脳内ドーパミン含量の変動はないが、セロトニンと5-ヒドロキシインドール酢酸は増加傾向を示した。また、セロトニン1A受容体の発現量に変化はないが、セロトニン2A受容体の発現量は海馬で増加していた。硫化水素やポリスルフィドとの関連について研究を進めている。

研究成果の概要(英文)：We produced 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase-knockout mice as model of an inherited disease, mercaptolactate-cysteine disulfiduria which is complicated by mental retardation. No malformation was observed, however, anxiety-like behavior was significantly increased. In the brain, dopamine level was unchanged. On the other hand, levels of serotonin and 5-hydroxyindolamine were increased. The expression of serotonin type 1A receptor was not changed. On the other hand, serotonin type 2A receptor was significantly increased. The relationships of hydrogen sulfide and/or polysulfide to the pathogenesis are investigating.

研究分野：病態生化学、環境医学

キーワード：ノックアウトマウス、メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素、硫化水素、抗酸化作用、不安様行動、メルカプト乳酸システイン尿症、セロトニン、セロトニン受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) 酵素と硫化水素との関連：原核生物から真核生物に至るまで広く存在するメルカプトピルビン酸硫黄転移酵素 (MST) はシステイン分解反応を触媒し、反応中間体として触媒部位のシステイン残基に安定したCysS_γ-S(ペルスルフィド)が形成される。外側の硫黄原子は受容基質のシステイン残基に転移され、新たにペルスルフィドが形成される¹⁻⁵。この分子は不安定で、還元により硫化水素が産生される^{6,7}。硫化水素は酸化ストレスから神経細胞を保護する⁸。MSTは抗酸化タンパク質としても機能する³⁻⁵多機能タンパク質である。

(2) メルカプト乳酸システイン尿症(MCDU)との関連：精神発達遅延や形態異常を伴う先天性疾患MCDUはMSTが欠損するために発症するが、「基質のメルカプトピルビン酸は容易に排泄されるため、過剰による変性」に因るものではない。また、ピルビン酸は解糖系で十分に産生されるため、「代謝産物の欠乏」によるものでもない。先天性酵素欠損の従来の病態概念では説明できない。

(3) MSTの生理的役割に関して：胎児期におけるMSTの作用に注目した。地球進化の過程で酸化的大気下に出現した生物にレドックス制御タンパクとしてグルタチオン、チオレドキシンやそのファミリーが出現して、酸化ストレスから防御できるようになった⁹。マウスの個体発生中では胎児期3日にMSTが発現し、成人期よりも高発現している。そこでMCDU

の病態仮説を抗酸化作用不全あるいは硫化水素産生不全に集約することができる。

(4) MST ノックアウト(KO)マウスに関して：ヒトの先天性疾患・MCDUモデルである。コンディショナル MST-KO マウスを作成したが、繁殖が困難であるため改良を要する。

2. 研究の目的

(1) 疾患モデルである MST-KO マウスを用いて MCDU の病態を明らかにする。特に神経細胞における MST の機能を明らかにする。

(2) MST-KO マウスを恒常的に得られるように、作成ストラテジーを新たに確立する。

(3) MST-KO マウスの生物学的特徴(形態、成長、寿命など)や行動異常(高度脳機能障害)を総合的に観察する。特に脳の形態的、生化学的、薬理学的特徴を解析する。

(4) MST は酸素濃度が上昇する地球進化に伴い分子進化を遂げる。「個体発生において酸素濃度が上昇する時期、すなわち胎生期に機能する」という仮説をたて、証明する。

3. 研究の方法

(1) MST-KO マウス作成および改良:C57BL/6J系 ES 細胞、Balb/c 系インジェクション用胚盤胞、ICR 系仮親用マウス、キメラマウスとの交配用の野生型マウスとして C57BL/6 を使用する。コンディショナル KO マウス (Cre/loxP/loxP)を作成したが、繁殖が困難であ

るため、ホモ型マウス(Cre/loxP/loxP)と Cre トランスジェニックマウスと交配して、ヘテロ型の KO マウスを作成する。さらに野生型マウスを交配してヘテロ型の KO マウス(loxP)を作成し、この雄雌マウスを交配してホモ型の null KO マウス(loxP)を作成する。遺伝子型を Southern analysis で、表現型を Western analysis で確認する。以後、繁殖、飼育および系統維持を学外施設および本学で行い、以下の研究を協力して行い、MCDU の病態と MST の生理的役割を明らかにする。

(2) 動物学的観察:本学実験動物管理室で行う(永原・秋元が担当)。形態、成長、加齢変化、寿命などの観察を行う。

(3) 病理形態的研究:熊本大学・医学部・病理学講座で行う(伊藤が担当)。肉眼的観察、顕微鏡的観察、電子顕微鏡的観察、抗 MST 抗体を用いた Western analysis および免疫組織化学的観察を行う¹⁰。

(4) 行動学的・薬理学的研究:日本医大・薬理学講座・行動観察実験室で行う(永野が担当)。MCDU の症状として異常行動等の観察を行う。短期記憶試験だけでなく、オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、強制水泳試験、ロータロッド試験、恐怖条件付け試験、プレパルスインヒビション試験を行う。さらに、脳内モノアミン分析(HPLC)および受容体の分析(RT-PCR)を行う。

(5) 医化学的研究:本学で行う(永原が担当)。

MST 活性測定:各臓器における酵素活性測定を行う^{1,2}。

硫化水素分析:脳、肝臓、腎臓の細胞分画¹⁰について、硫化水素産生の分析を行う⁶。

sulfane sulfur 分析:脳、肝臓、腎臓内の sulfane sulfur を分析する⁸)。また、MALDI-TOF/MS を用いて高分解能質量分析を行う。

4. 研究成果

(1) 知能発達遅延を伴う遺伝疾患 MCDU のモデルとして、当初作成したコンディショナル MST-KO マウス (Cre/loxP/loxP) を改良し、安定して繁殖できる null ホモ型同士 (loxP) の作成に成功した。硫化水素の生理作用の解明が促進される。

(2) 病理形態的には、コンディショナル(ヘテロ型)KOマウスの雄に低精子形成が発症したが、改良したnull KOマウス (loxP) は正常であった。脳にも形態異常は認めなかった。

(3) 行動学的研究では、高架式十字迷路試験で open arm に出てきた回数と滞在時間は有意に減少しており、不安様行動が認められた(図1)¹¹。知能発達遅延を伴うMCDUと同様に高度脳機能障害が認められ、疾患モデルマウスが確立されたと考える。病態の解明により、精神発達遅延や認知症の新たな治療法の開発が期待される。

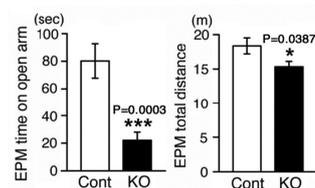


図1 高架式十字迷路試験

(4) 脳内ドーパミン(DA)含量の分析では、前頭葉と海馬において変化はなかった。一方、セロトニン(5-HT)は前頭葉で、代謝産物5-ヒドロキシインドール酢(5-HIAA)は両者で有意に増加していた(図2)¹¹。

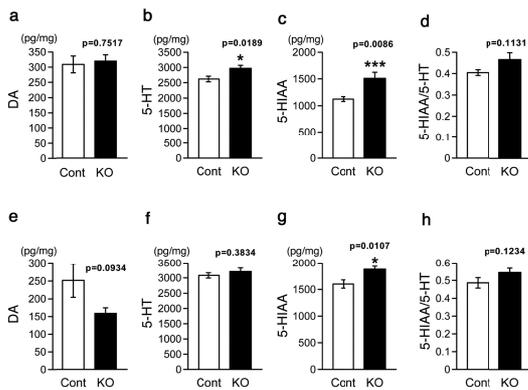


図2 脳内モノアミン濃度

前頭葉(a-d)と海馬(e-h)

また、前頭葉と海馬においてセロトニン1A受容体(5-HT_{1A})の発現量はコントロールと差はなかったが、セロトニン2A受容体(5-HT_{2A})は海馬で有意に増加していた(図3)¹²。MSTと高度脳機能との関連が示唆された。

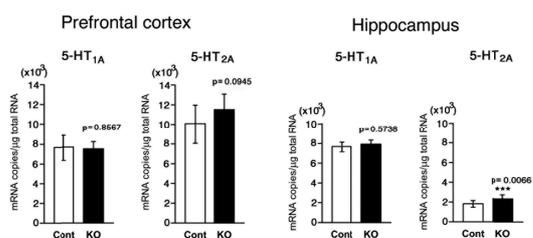


図3 前頭葉と海馬におけるセロトニン1Aおよび2A受容体発現量

(5) 海外(アテネ大学)と国内(明治薬科大学)にMST-KOマウスを提供して、血管内皮細胞が関与する循環不全の病態および脳内レセプ

ターの異常と統合失調症との関連について共同研究を行っている。

<引用文献>

Nagahara N, Okazaki T, Nishino T: Cytosolic mercaptopyruvate sulfurtransferase is evolutionarily related to mitochondrial rhodanese. *J Biol Chem.* 270: 16230-16235, 1995

Nagahara N, Nishino T: Role of amino acid residues in the active site of rat liver mercaptopyruvate sulfurtransferase. *J Biol Chem.* 271: 27395-27401, 1996

Nagahara N, Katayama A: Post-translational regulation of mercaptopyruvate sulfurtransferase via a low redox potential cysteine-sulfenate in the maintenance of redox homeostasis. *J Biol Chem.* 280: 34569-34576, 2005

Nagahara N, Yoshii T, Abe Y, Matsumura T: Thioredoxin-dependent enzymatic activation of mercaptopyruvate sulfurtransferase. *J Biol Chem.* 282: 1561-1569, 2007

Nagahara N: A novel thioredoxin-dependent redox-sensing molecular switch of mercaptopyruvate sulfurtransferase: maintenance of cellular redox equilibrium. *Mini Rev Med Chem.* 8: 585-589, 2008

Shibuya N, Tanaka M, Yoshida M, Ogasawara Y, Togawa T, Ishii K, Kimura H :

3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxid Redox Signal*. 11: 703-714, 2009

Mikami Y, Shibuya N, Kimura Y, Nagahara N, Ogasawara Y, Kimura H: Thioredoxin and dihydrolipoic acid are required for 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase to produce hydrogen sulfide. *Biochem J*. 439: 479-486, 2011

Mikami Y, Shibuya N, Kimura Y, Nagahara N, Yamada M, Kimura H: Hydrogen sulfide protects the retina from light-induced degeneration by the modulation of Ca²⁺ influx. *J Biol Chem*. 286: 39379-39986, 2011

Nagahara, N: Molecular evolution of thioredoxin-dependent redox-sensing switch in mercaptopyruvate sulfurtransferase. *Research Advances in Biological Chemistry*, Mohan RM, ed, Global Research Network. Kerala, India, pp19-26, 2007

Nagahara N, Ito T, Kitamura H, Nishino T: Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat. *Histochem Cell Biol*. 110: 243-50, 1998

主な発表論文等 [雑誌論文]

主な発表論文等 [図書]

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Yamanobe Y, Nagahara N, Matsukawa T, Ito T, Niimori-Kita K, Chiba M, Yokoyama K, Takizawa T: Sex differences in shotgun proteome analyses for chronic oral intake of cadmium in mice. *PLoS One*. 10, 2015, e0121819. doi: 10.1371/journal.pone.0121819

Niimori-Kita K, Ogino K, Mikami S, Kudoh S, Koizumi D, Kudoh N, Nakamura F, Misumi M, Shimomura T, Hasegawa K, Usui F, Nagahara N, Ito T: Identification of nuclear phosphoproteins as novel tobacco markers in mouse lung tissue following short-term exposure to tobacco smoke. *FEBS Open Bio*. 4: 746-54. 2014. doi: 10.1016/j.fob.2014.08.002

Okudela K, Katayama A, Woo T, Mitsui H, Suzuki T, Tateishi Y, Umeda S, Tajiri M, Masuda M, Nagahara N, Kitamura H, Ohashi K: Proteome Analysis for Downstream Targets of Oncogenic KRAS - the Potential Participation of CLIC4 in Carcinogenesis in the Lung. *PLoS One*. 9. 2014. e87193. doi: 10.1371/journal.pone.0087193

Nagahara N, Nagano M, Ito T, Shimamura K, Akimoto K, Suzuki H: Antioxidant enzyme, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase-knockout mice exhibit increased anxiety-like behaviors: a model for human mercaptolactate-cysteine disulfiduria. *Sci Rep*. 3: 1986, 2013. doi:10.1038/srep01986

Shibuya N, Koike S, Tanaka M, Ishigami-Yuasa M, Kimura Y, Ogasawara Y, Fukui K, Nagahara N, Kimura H: A novel pathway for producing hydrogen sulfide from D-cysteine. Nat Commun. 4: 1366, 2013. doi: 10.1038/ncomms2371

Nagahara N: Regulation of mercaptopyruvate sulfurtransferase activity via intrasubunit and intersubunit redox-sensing switches, In: Forum Review on Redox Molecular Machines. Antioxid Redox Signal. 19: 1792-1802, 2013. doi: 10.1089/ars.2012.5031 (総説)

[国内学会] (計2件)

Nagahara N: A mechanism of inactivation of rat mercaptopyruvate sulfurtransferase by bromopyruvate. 第87回日本生化学会大会、京都、10/16, 生化学、2014

Nagahara N, Nagano M, Ito T, Shimamura K, Akimoto T, Suzuki H: Comprehensive analysis of MST knockout mouse: exhibition of increased anxiety-like behaviors. 第86回日本生化学会大会、横浜、9/13, 生化学、85: 168, 2013

[招待講演] (計2件)

永原則之: 酵素から硫化水素は産生されるか: 3-mercaptopruvate sulfurtransferase の分子進化と生理的役割、フォーラム・イン・ドージン、熊本、11/15, 2013

Nagahara N: Mercaptopyruvate sulfurtransferase and hydrogen sulfide. 3rd

International Congress on H₂S Biology and Medicine, Kyoto, Japan, 6/6, Nitric Oxide. p512, 2013

[図書] (計1件)

Nagahara N, Nagano M, Ito T, Suzuki H: Redox regulation of Mammalian 3-mercaptopruvate sulfurtransferase. Methods Enzymol. 554: 229-254. 2015. doi: 10.1016/bs.mie.2014.11.017

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永原則之 (NAGAHARA Noriyuki)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 10208043

(2) 研究分担者

伊藤隆明 (ITO Takaaki)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号: 70168392

永野昌俊 (NAGANO Masatoshi)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号: 60271350

(3) 連携研究者

秋元敏雄 (AKIMOTO Toshio)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 30184112