

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651265

研究課題名(和文) 定量的質量分析イメージング技術の確立による硫化水素依存性虚血脳病態制御機能の解明

研究課題名(英文) Development of method for the determination of thiol-containing metabolites using quantitative mass spectrometry

研究代表者

菱木 貴子 (HISHIKI, TAKAKO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10338022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：硫化水素(H<sub>2</sub>S)は、血管拡張作用や心筋保護作用、海馬の長期増強などの生理機能を有するガス分子として注目されている。

本研究では、H<sub>2</sub>Sの蛍光プローブを用い、H<sub>2</sub>Sを初め、種々のチオール化合物の定量系を確立した。この手法でH<sub>2</sub>Sを分解するミトコンドリア膜タンパク質sulfide quinone reductase-likeをノックダウンしたマウスの心組織中のチオール類を定量した結果、H<sub>2</sub>Sのみならず、Cys-SH、GSSH、HmCysが野生型に比べ有意な増加が認められた。これらの結果はH<sub>2</sub>Sの生理機能の解明にはH<sub>2</sub>Sのみならず過酸化化合物を含むチオール類の網羅的検討が必須であることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S), physiological gaseous mediator, plays important roles in regulation of the vascular tone, cytoprotection, and long-term potentiation in hippocampus. In this study, we developed sensitive and quantitative analysis method for H<sub>2</sub>S and other thiol-containing metabolites, e.g., Cysteine, Cysteine persulfide (Cys-SH), Homocysteine(Hcy), Homocysteine persulfide (Hcy-SH), reduced-glutathione, reduced-glutathione persulfide (GSSH) with mass spectrometric technologies. We tried to quantify the thiol-containing molecules in the hearts of sulfide quinone reductase-like knockdown (SQR-KD) mice using this method. SQR has been identified to be responsible for the initial oxidation of sulfide in mitochondrial matrix. We could detect the higher level of thiol-containing metabolites (H<sub>2</sub>S, Cysteine persulfide, reduced-glutathione persulfide, and Homocysteine persulfide) in the SQR-KD mice hearts compared with control mice using this useful method.

研究分野：代謝生化学

キーワード：ガスシグナル分子 チオール化合物 硫化水素

1. 研究開始当初の背景

硫化水素 (H<sub>2</sub>S) はミトコンドリア呼吸鎖を阻害する致死性のガスとして知られているが、その毒性とは別に血管平滑筋拡張作用や心筋保護作用、海馬の長期増強現象の促進作用などの生理機能を有することが知られ、一酸化窒素 (NO) や一酸化炭素 (CO) とならんで生理的な第3のガスシグナル分子として注目されている。生体内では含流アミノ酸代謝酵素 CBS (cystathionine beta-synthase) や CSE (cystathionine gamma-lyase) によって合成され (図 1a)、CBS、CSE が存在するあらゆる組織で H<sub>2</sub>S は発生していると考えられる。また H<sub>2</sub>S は peroxyinitrite、次亜塩素酸などを消去する還元剤としての役割も知られており、その消去活性は還元型グルタチオンと同程度であるが、H<sub>2</sub>S の生理的役割は不明な点が多い。さらに、生体内の H<sub>2</sub>S 濃度が 1 μM 以下ならば H<sub>2</sub>S の抗酸化作用はほとんど意味がないと考えられるが、生体内の H<sub>2</sub>S の定量方法は確立されておらず、報告されている H<sub>2</sub>S の生体内濃度もまちまちで、正確な測定法の開発が望まれていた。

そのなか当研究室では、CO がメチオニン代謝作動性に糖代謝をリモデリングし、還元型グルタチオンを維持するために NADPH 量を増大させ、細胞保護作用を示すという結果を得た。ここで、(図 1b) に示すように、含流アミノ酸代謝経路はグルタチオンの合成経路として知られているが、H<sub>2</sub>S もまたこの代謝系から産出される副産物である。申請者は、参加ストレス応答としての含流アミノ酸代謝のリモデリングは、グルタチオンの還元力を増強させるだけでなく、CBS、CSE による H<sub>2</sub>S 産生量の制御も行っているのではないかと予測を立てた。さらに近年、申請者は、チ

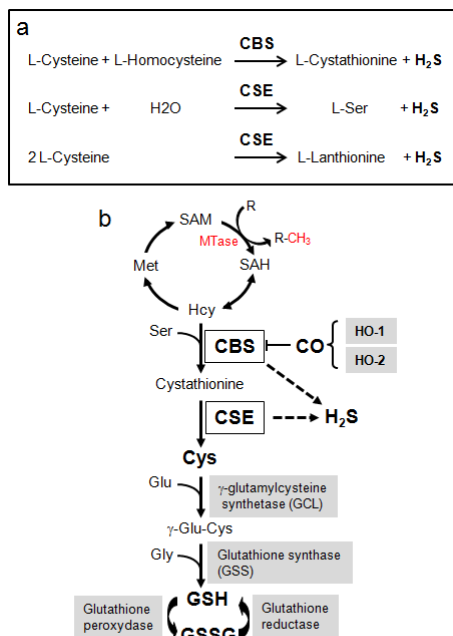


図1) a. CBS, CSEによる主なH<sub>2</sub>S産生反応式  
b. 含硫アミノ酸代謝

オールの蛍光プローブとして知られる monobromobimane (mBBBr) を利用し、質量分析技術を組み合わせるにより、生体内の H<sub>2</sub>S を定量する方法を確立した。

これらの結果をふまえて本研究では、酸化ストレスに対する H<sub>2</sub>S の産生制御機構を、質量分析技術を駆使した含流アミノ酸代謝の制御メカニズムの解明により検証を行う。

2. 研究の目的

H<sub>2</sub>S は、含流アミノ酸代謝酵素である CBS や CSE により産生されるガスシグナル分子である。H<sub>2</sub>S はあらゆる組織で発生しており、還元剤としての作用も知られているが、生理的な役割は不明である。

そこで本研究では、酸化ストレスに対する H<sub>2</sub>S の産生制御機構を、質量分析技術を駆使した含流アミノ酸代謝の制御メカニズムの解明により検証を行う。

これが明らかとなれば、従来機序が不明であった H<sub>2</sub>S の細胞保護作用を解明する画期的な発見となることが予想され、酸化ストレスに対する新しい代謝リモデリング応答の発見となることが期待される。

3. 研究の方法

mBBBr はもともとチオールの蛍光プローブとして開発された。申請者は酸化されて H<sub>2</sub>S になる NaHS をはじめ、他のチオール類である酸化型グルタチオン (GSSG)、還元型グルタチオン (GSH)、システイン (Cys)、ホモシステイン (HmCys) と mBBBr を試験管内で反応させた際の反応生成物を質量分析装置を用いて解析を行った結果、NaHS は mBBBr と反応して SDB (Sulphide dibimane) を産生し (図 2)、その他 GSSG を除くすべてのチオール類が mBBBr と反応して各チオール類固有の反応生成物を産生することが判明した。

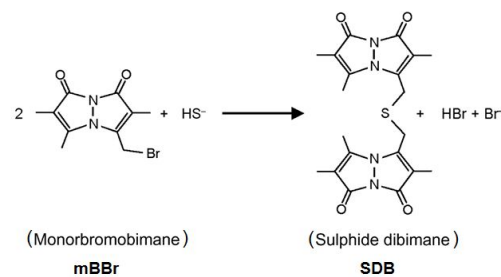


図 2) mBBBr の反応構造式

そこでこの測定系を利用し、遺伝子改変マウスを用いた実験系で検討を行うこととした。遺伝子改変マウスとしては、含流化合物の存在量を人工的にコントロールした下記の 2 種類を用いた。

1. CBS ヘテロノックアウトマウス：低含流化合物モデル。CBS のホモ欠損マウスは

成長不全・脂質代謝異常により4週齢までにそのほとんどが死亡してしまうため、ヘテロ欠損マウスを用いる。高ホモシステイン血症を示し、脂質代謝異常による脂肪肝に加え、中枢神経系の異常が認められる。

2. SQR (sulfide quinone reductase-like) ノックダウンマウス：高含流化合物モデル。硫化水素を細胞内で分解するミトコンドリア膜タンパク質 SQR をノックダウンしたマウス。当研究室におけるこれまでの研究から SQR ノックダウンマウスはミトコンドリアの障害を引き起こすことが明らかとなっている。

本研究課題では、これらのマウスを用いて、含流化合物の動態と抗酸化作用との関連について個体レベルでの検討を行う。

#### 4. 研究成果

本研究では、酸化ストレスに対する硫化水素 ( $H_2S$ ) の応答メカニズムを、含硫アミノ酸代謝調節の観点から明らかにすることを目的とする。

$H_2S$  はガス状分子の  $H_2S$  とイオン状の  $HS^-$  の平衡状態で存在しているが、チオールの蛍光プローブとして知られる monobromobimane (mBBr) は、 $HS^-$  と反応することにより SDB (sulphide dibimane) を産生する。これを利用し、組織中の  $H_2S$  を定量する方法を確立した。この方法を用いて、定常酸素濃度条件 (20%) と低酸素濃度条件 (8%) それぞれで飼育したマウスから摘出した脳組織中の  $H_2S$  を定量したところ、低酸素濃度条件下で  $H_2S$  の有意な増加が認められた。

この結果は、低酸素濃度条件下ではヘムオキシゲナーゼ-1 の酸素添加反応活性が低下し、一酸化炭素産生量が低下することによって、含硫アミノ酸代謝酵素である CBS の活性阻害がはずれ、含硫アミノ酸代謝が活性化することによって硫化水素の産生量が上昇するという我々の作業仮説に矛盾しない。

そこで次に、CBS ノックアウトマウスについても同様の手法で低酸素条件下での脳の  $H_2S$  産生量について検討を行うため、まず定常酸素分圧下で、野生型と CBS ノックアウトマウスでの比較を行ったが、脳組織中の  $H_2S$  濃度に有意な差は認められなかった。脳では部位ごとに CBS の発現量が異なり、特に小脳で発現が高いことが知られている。そこで、マウスの脳を部位ごとに分け、大脳、小脳それぞれで  $H_2S$  を定量した結果、大脳 (3.74 pmol/mg tissue) に比べて小脳 (5.43 pmol/mg tissue) で  $H_2S$  が多く検出された。よって、CBS ノックアウトマウスについては小脳で硫化水素産生量の検討を行うことが必要であると考えた。

そのなか、 $H_2S$  は生体内でフリーの状態に留まらず、GSH、Cys、HmCys、亜硫酸 ( $H_2SO_3$ ) と反応し、硫黄原子を付加することによって

ジスルフィド (R-S-S-H) を形成することが報告された (Ida T, *et al.*, *Proc Natl Acad USA*, 2014)。よって  $H_2S$  の産生量を検討するにはこれらのジスルフィドも同時に定量することが必須であると考え、GSH、Cys、HmCys それぞれに NaHS、mBBr を試験管内で反応させた際の反応生成物を質量分析装置を用いて検討を行った結果、Cys、HmCys、GSH、 $H_2SO_3$  とこれらのジスルフィド分子は各1モルに対して mBBr 1モルと反応し、それぞれ別々の分子を産生することがわかった。よって、質量分析装置を駆使し、これらを同時に定量する系を構築した。

この質量分析技術を用いたチオール定量系を用い、定常酸素濃度条件 (21%) と低酸素濃度条件 (6%) それぞれで飼育したマウスから摘出した脳組織抽出液中のチオール類を定量した結果、SDB には有意な差はみられなかったが、Cys と Cys のジスルフィド (Cys-SH)、そして亜硫酸のジスルフィドであるチオ硫酸 ( $H_2S_2O_3$ ) は定常酸素濃度条件に比べて低酸素濃度条件下で有意に増加した。よって硫酸代謝を検討するには、 $H_2S$  のみならずこれらのチオール、ジスルフィドも含めて系統的に検討を行う必要があることがわかった (図3)。

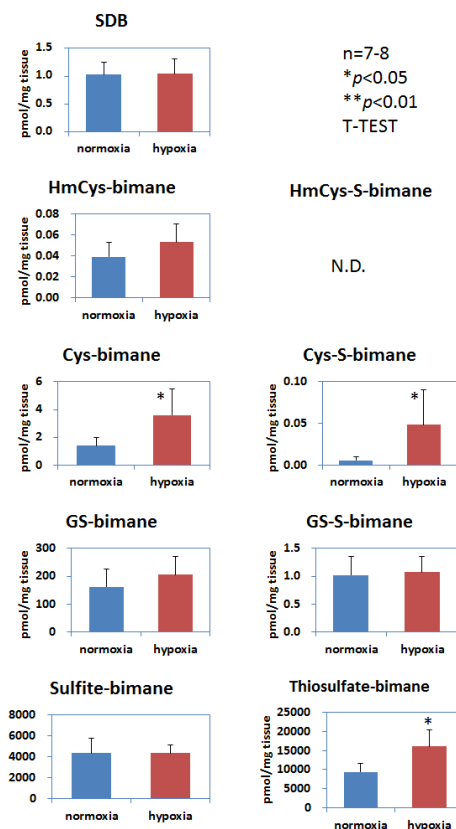


図3) Normoxia (20% O<sub>2</sub>), Hypoxia (8% O<sub>2</sub>)でのマウス脳組織のチオール定量

そこで次に、硫化水素を細胞内で分解するミトコンドリア膜タンパク質である SQR (sulfide quinone reductase-like) をノックダウンしたマウスを用いた検討を行った。SQR ノックダウンマウスは、心筋におけるミトコンドリアの損傷による心不全の障害を

引き起こす。そこで SQR ノックダウンマウスを高含硫化合物モデルと捉え、まずは心臓組織中のチオール類の定量を行ったところ、H<sub>2</sub>Sのみならず Cys-SH、GSSH、HmCys が野生型に比べて有意に増加していることが確認出来た。

以上の結果から、これまで H<sub>2</sub>S の還元効果によるものと考えられてきた CBS や CSE による血管平滑筋拡張作用や心筋保護作用、海馬の長期増強現象の促進作用などの生理機能は、パースルフィド化合物を含む他のチオール化合物が重要な因子である可能性もあり、これらのチオール化合物の網羅的検討が必須であることがわかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Nakano S, Ishii I, Shinmura K, Tamaki K, **Hishiki T**, Akahoshi N, Ida T, Nakanishi T, Kamata S, Kumagai Y, Akaike T, Fukuda K, Sano M, Suematsu M, Hyperhomocysteinemia abrogates fasting-induced cardioprotection against ischemia/reperfusion by limiting bioavailability of hydrogen sulfide anions. *J Mol Med*. doi: 10.1007/s00109-015-1271-5. (2015) 査読有
2. Ohmura M, **Hishiki T**, Yamamoto T, Nakanishi T, Kubo A, Tsuchihashi K, Tamada M, Toue S, Kabe Y, Saya H, Suematsu M, Impacts of CD44 knockdown in cancer cells on tumor and host metabolic systems revealed by quantitative imaging mass spectrometry. *Nitric Oxide*. 30 (46) : 102-13. doi: 10.1016/j.niox.2014.11.005. (2014) 査読有
3. Kawano Y, Ohtsu I, Tamakoshi A, Shiroyama M, Tsuruoka A, Saiki K, Takumi K, Nonaka G, Nakanishi T, **Hishiki T**, Suematsu M, Takagi H, Involvement of the yciW gene in l-cysteine and l-methionine metabolism in Escherichia coli. *J Biosci Bioeng*. S1389-1723(14):00302-8. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.08.012. (2014) 査読有

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計1件)

1. **菱木貴子**、「見つける、量る、可視化する！質量分析実験ガイド」実験医学

別冊 132-143, (2013) 羊土社

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者  
菱木 貴子 (HISHIKI, Takako)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号: 10338022

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし