

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430069

研究課題名(和文) 脳神経系における硫化水素の二次メッセンジャー8-メルカプト-cGMPに関する研究

研究課題名(英文) Study on a second messenger, 8-mercapt-cGMP, of hydrogen sulfide in nervous system

研究代表者

居原 秀 (Ihara, Hideshi)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60254447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：硫化水素関連物質として、システインのSH基にイオウが過剰に付加したシステインパーサルファイドを同定し、生体内に多量に存在することを明らかにし、反応性の高さから「活性イオウ分子」と命名した。活性イオウ分子は、高い抗酸化活性とレドックスシグナル調節活性を有し、レドックスシグナルの二次メッセンジャーである8-ニトロ-cGMPを8-メルカプト-cGMPへと変換する。8-メルカプト-cGMPが脳や培養神経細胞で生成されることを質量分析法、免疫染色法で明らかにした。また、環境中親電子毒物であるメチル水銀による活性イオウ分子/レドックスシグナル調節機構の破綻による新奇の毒性発現メカニズムを解明した。

研究成果の概要(英文)：It is found that reactive persulfides and polysulfides are formed endogenously from both small molecule species and proteins in high amounts in mammalian cells and tissues. Quantitation of these species indicates that high concentrations of glutathione persulfide (perhydropersulfide >100 μM) and other cysteine persulfide and polysulfide derivatives in peptides/proteins were endogenously produced and maintained in the plasma, cells, and tissues of mammals (rodent and human). It is expected that persulfides are especially nucleophilic and reducing. This view was found to be the case, because they quickly react with H₂O₂ and a recently described biologically generated electrophile 8-nitro-cGMP to form 8-mercapt-cGMP. Indeed, 8-mercapt-cGMP formation in nervous system was confirmed by LC-MSMS and immunocytochemistry. Furthermore, a novel mechanism of methylmercury-induced cytotoxicity, that is disruption of redox signaling regulated reactive sulfur species, was also revealed.

研究分野：神経化学

キーワード：8-メルカプト-cGMP 8-ニトロ-cGMP システインパーサルファイド 活性イオウ分子 メチル水銀 レドックスシグナル

1. 研究開始当初の背景

近年、硫化水素(H_2S)が、一酸化窒素(NO)一酸化炭素(CO)に次ぐ第3のガス状メディエーターとして機能することが示され、神経伝達、神経保護などに関与していることが明らかとなってきた。また、活性酸素(ROS)も単なる毒性因子ではなくメディエーターとしても機能し、これらガス状メディエーターが脳神経系の様々な生理・病理機能に関与していることが明らかになってきている。

ガス状メディエーターによるシグナル伝達機構は不明な点が多かったが、近年の申請者らの研究により、cGMP およびその誘導体を介した経路の全貌が明らかとなってきた。これらの経路は、これまでに知られていないまったく新規なものもある。

従来から NO が可溶性グアニル酸サイクラーゼに作用し二次メッセンジャーとして cGMP を産生し (NO -cGMP 経路; 図1 点線枠) 下流シグナルを活性化して細胞シグナル伝達を行うことが知られていたが、申請者らは、2007年に、 NO と ROS の二次メッセンジャーとして 8-ニトロ-cGMP を世界に先駆けて発見し、その産生メカニズム、作用機構を解明してきた (図1 実線枠)。実際に、脳神経系においてグリア細胞、神経細胞などで 8-ニトロ-cGMP の産生が明らかにされ、酸化ストレス応答機構、細胞死誘導機構、神経伝達物質の放出調節機構を明らかにした。

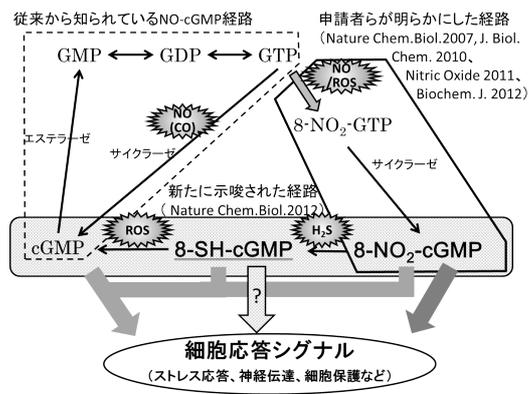


図1 グアニンヌクレオチドによる細胞応答シグナル機構の模式図

一方近年、システイン関連代謝経路において生成する H_2S の生理機能が注目されている。しかし H_2S のシグナル制御機構は不明な点が多かった。興味あることに、我々は 8-ニトロ-cGMP のシグナルが H_2S により制御されていることを見出した。 H_2S が 8-ニトロ-cGMP と反応し SH 基を付加することで、新規の環状ヌクレオチドである 8-SH-cGMP が生成される。また 8-SH-cGMP が ROS と反応すると SH 基が脱離し cGMP になることが分かった (Nature Chem.Biol. 2012、図1 網掛け)。さらに、8-SH-cGMP が、8-ニトロ-cGMP や cGMP には認められないユニークな化学的

反応性や薬理活性を発揮することが分かってきた。以上の知見は、「8-SH-cGMP が、 H_2S シグナル伝達機能を担う二次メッセンジャーである」ことを示唆している。

しかしながら、これまでの 8-SH-cGMP に関する研究成果は、主として、 H_2S と 8-ニトロ-cGMP との試験管内での再構成モデルにより得られた解析結果をもとに演繹されたものであった。このため、細胞、組織から個体での高次レベルのシグナル制御の実体を見極めるには至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 脳神経系における 8-SH-cGMP の産生機構、(2) 8-SH-cGMP の生理・病理作用を明らかにすることを目的とする。

(1) 8-SH-cGMP の産生機構 ; 8-SH-cGMP の検出方法を確立し、脳神経系の細胞および組織を用いて解析する。検出方法としては、液体クロマトグラフトンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いた定量的検出法、また抗体を作製し蛍光免疫染色による細胞、組織における産生部位の解析を行う。各種ガス状メディエーターのシグナル関連試薬 (阻害剤、活性化剤、発生剤) などで処理し、8-SH-cGMP の産生メカニズムを解明する。

(2) 8-SH-cGMP の生理・病理作用 ; 8-SH-cGMP は膜を透過できないので、膜透過性誘導体を作製する。脳神経系の細胞、組織を膜透過性 8-SH-cGMP で処理し、細胞毒性、保護効果、伝達物質放出に及ぼす効果などを解析する。また、従来から知られている MAP キナーゼ、NF κ B などの様々なシグナル経路との関連性を解析する。

3. 研究の方法

(1) 脳神経系における 8-SH-cGMP の産生 ; LC-MS/MS を行いた定量的検出法の確立 内部標準となる安定同位体標準 8-SH-cGMP (+10 mass) の作製、多重反応モニタリング法の条件設定を行い、8-SH-cGMP の検出条件を確立している。予備的検討で、グリオーマ細胞を大腸菌リポ多糖とサイトカインで処理した時に内在性 8-SH-cGMP が産生されることを確認している。他の脳神経系の細胞 (PC12 細胞、初代培養神経細胞やアストロサイトなど) でも、同様に定量的検出を行い内因性に 8-SH-cGMP が産生していることを明らかにする。

特異的抗体の作製、蛍光免疫染色法の確立

8-SH-cGMP の SH 基は反応性が高いので、SH 基と反応する試薬であらかじめ SH 基を誘導体化し安定化させる。さらにスクシニル化した後、タンパク質に共有結合し、抗原とする。予備的検討により、抗原の調製に成功している。ウサギ、ラットまたはマウスに免疫し、抗体を作製し実験に使用する。免疫染色用に固定化した細胞、組織に関しても誘導

体化処理を行い、蛍光免疫染色を行う。

(2) 8-SH-cGMP の生理・病理作用；
膜透過性 8-SH-cGMP の作製

8-SH-cGMP は細胞膜を通過できないので、疎水性を高め細胞膜を通過できる 8-SH-cGMP を作製する。この化合物は、細胞膜を通過して細胞内に移行すると、細胞内エステラーゼによりブチリル基が切り離され 8-SH-cGMP となるため、機能解析するのに適していると考えられる。実際に細胞膜を通過し、細胞内で 8-SH-cGMP に変換しているかを上述の LC-MS/MS、蛍光免疫染色法で確認する。

メチル水銀毒性

環境中に存在する神経毒素であるメチル水銀 (MeHg) をモデル化合物として、MeHg 神経毒性の発現機構を、硫化水素関連分子種、一酸化窒素、ROS、8-ニトロ-cGMP、8-SH-cGMP の観点から解析した。

4. 研究成果

(1) 活性イオウ分子種の発見

研究開始当初は、H₂S が、脳神経系において様々な生理・病理機能を発揮すると考えられていたが、LC-MS/MS 法などを用いた詳細な解析の結果、H₂S ではなく、L-システインのチオール基に過剰にイオウ分子が付加したシステインパーサルファイド (CysSSH) が、機能していることが明らかとなってきた (図 2)。このパーサルファイド関連物質は、イオウ分子の反応性が高まって活性化された状態にあるため、活性イオウ分子種 (reactive sulfur species; RSS) と呼ばれている。RSS には、システインやグルタチオンのような低分子型と、タンパク質中のシステインチオール基に硫黄が付加した高分子型が存在する。また、低分子型、高分子型ともに、酸化型と還元型が存在することを明らかにしている (図 2、発表論文、)。

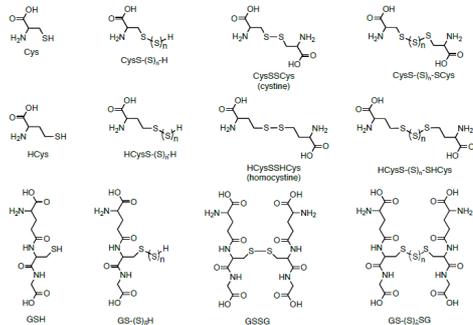


図 2 様々な活性イオウ分子種の構造

RSS は、非常に高い抗酸化活性を示し、また、興味深いことに、8-ニトロ-cGMP を 8-SH-cGMP へと変換する (図 3)。

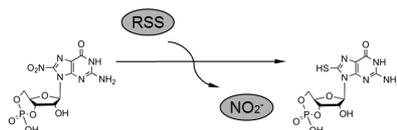


図 3 RSS による 8-ニトロ-cGMP から 8-SH-cGMP への変換

実際に、マウスの脳において 8-SH-cGMP が、8-ニトロ-cGMP、cGMP と同程度存在することを、LC-MS/MS を用いた多重層のモニタリング法、安定導体希釈法で確認している (発表論文)

(2) メチル水銀毒性

メチル水銀毒性を病理モデルとして、毒性の発現機構を、RSS、一酸化窒素、ROS、8-ニトロ-cGMP、8-SH-cGMP の観点から解析した。様々な培養細胞を用いてメチル水銀細胞毒性と細胞内神経型 NO 合成酵素 (nNOS) の発現量を検討したところ、nNOS 発現がメチル水銀毒性の増悪に関与していることが示された。nNOS は、NO 産生と共にアンカップリング反応により ROS も産生するので、メチル水銀毒性の増悪にレドックスシグナルが関与することが示唆された。実際、ラット小脳顆粒神経 (CGN) 細胞でメチル水銀処理による ROS 産生、8-ニトロ-cGMP 産生の増加が確認された。一方で、CGN をメチル水銀処理すると活性イオウ分子、8-SH-cGMP は減少した。

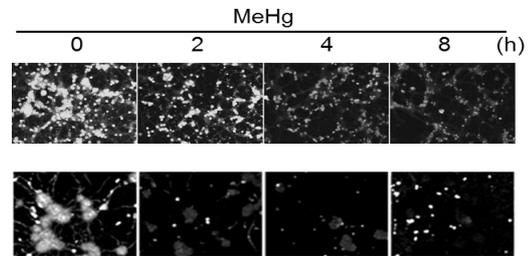


図 4 メチル水銀処理による細胞内 RSS (上段) 8-SH-cGMP (下段) の減少

細胞に外因性の活性イオウ分子を処理すると、メチル水銀毒性が軽減されたことから、メチル水銀毒性発現制御に、活性イオウ分子が重要な役割を果たしていることが示された。活性イオウ分子種の減少による 8-ニトロ-cGMP の増加は、H-Ras/Erk 経路を活性化し、細胞死を誘導していた。以上より MeHg の毒性発現機構として、活性イオウ分子によるレドックスシグナル制御を破綻させる新規な機構を明らかにした (図 5)。

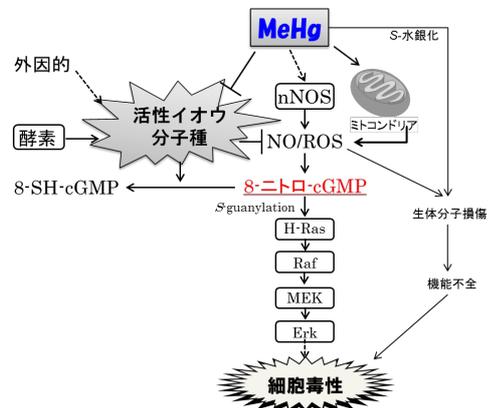


図 5 神経細胞におけるメチル水銀毒性の発現機構

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 16 件)

Redox signaling regulated by electrophiles and reactive sulfur species., Nishida M, Kumagai Y, Ihara H, Fujii S, Motohashi H, Akaike T., *J Clin Biochem Nutr.* 2016, 58:91-8. doi: 10.3164/jcbn.15-111. 査読有

Redox signaling regulated by an electrophilic cyclic nucleotide and reactive cysteine persulfides., Fujii S, Sawa T, Nishida M, Ihara H, Ida T, Motohashi H, Akaike T., *Arch Biochem Biophys.* 2016, 595:140-6., doi: 10.1016/j.abb.2015.11.008. 査読有

Water-soluble ferulic acid derivatives improve amyloid- β -induced neuronal cell death and dysmnnesia through inhibition of amyloid- β aggregation., Kikugawa M, Tsutsuki H, Ida T, Nakajima H, Ihara H, Sakamoto T., *Biosci Biotechnol Biochem.* 2016, 80:547-53. doi: 10.1080/09168451.2015.1107463. 査読有

Formation of sulfur adducts of N-acetyl-p-benzoquinoneimine, an electrophilic metabolite of acetaminophen in vivo: participation of reactive persulfides., Abiko Y, Ishii I, Kamata S, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Ihara H, Akaike T, Kumagai Y., *Chem Res Toxicol.* 2015, 28:1796-802. doi: 10.1021/acs.chemrestox.5b00245. 査読有

8-Nitro-cGMP Enhances SNARE Complex Formation through S-Guanylation of Cys90 in SNAP25., Kunieda K, Tsutsuki H, Ida T, Kishimoto Y, Kasamatsu S, Sawa T, Goshima N, Itakura M, Takahashi M, Akaike T, Ihara H., *ACS Chem Neurosci.* 2015, 6:1715-25., doi: 10.1021/acschemneuro.5b00196. 査読有

8-Mercapto-Cyclic GMP Mediates Hydrogen Sulfide-Induced Stomatal Closure in Arabidopsis., Honda K, Yamada N, Yoshida R, Ihara H, Sawa T, Akaike T, Iwai S., *Plant Cell Physiol.* 2015, 56:1481-9., doi: 10.1093/pcp/pcv069. 査読有

Nuclear-translocated Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Promotes Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Activation during Oxidative/Nitrosative Stress in Stroke., Nakajima H, Kubo T, Ihara H, Hikida T, Danjo T, Nakatsuji M, Shahani N, Itakura M, Ono Y, Azuma YT, Inui T, Kamiya A, Sawa A, Takeuchi T., *J Biol Chem.* 2015, 290:14493-503., doi: 10.1074/jbc.M114.635607. 査読有

居原 秀, 大内雄也. RSS の生体内検出とイメージング. *細胞工学*, 34, 397-401, 2015. 査読無

Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling., Ida T, Sawa T, Ihara H, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Kumagai Y, Suematsu M, Motohashi H, Fujii S, Matsunaga T,

Yamamoto M, Ono K, Devarie-Baez NO, Xian M, Fukuto JM, Akaike T., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2014, 111:7606-11., doi: 10.1073/pnas.1321232111., 査読有

Redox signal regulation via nNOS phosphorylation at Ser847 in PC12 cells and rat cerebellar granule neurons., Kasamatsu S, Watanabe Y, Sawa T, Akaike T, Ihara H., *Biochem J.* 2014, 459:251-63., doi: 10.1042/BJ20131262. 査読有

Theophylline potentiates lipopolysaccharide-induced NO production in cultured astrocytes., Ogawa M, Takano K, Kawabe K, Moriyama M, Ihara H, Nakamura Y., *Neurochem Res.* 2014, 39:107-16. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11064-013-1195-9> 査読有

Nitric oxide enhances increase in cytosolic Ca^{2+} and promotes nicotine-triggered MAPK pathway in PC12 cells., Kajiwara A, Tsuchiya Y, Takata T, Nyunoya M, Nozaki N, Ihara H, Watanabe Y., *Nitric Oxide.* 2013, 34:3-9., doi: 10.1016/j.niox.2013.04.002. 査読有

Formation, signaling functions, and metabolisms of nitrated cyclic nucleotide., Sawa T, Ihara H, Ida T, Fujii S, Nishida M, Akaike T., *Nitric Oxide.* 2013, 34:10-8., doi: 10.1016/j.niox.2013.04.004. 査読有

澤 智裕、居原 秀、赤池孝章. 細胞の酸化ストレスを量る. *実験医学別冊*, 151-158, 2013. 査読無

居原 秀、井田智章、赤池孝章. 活性酸素シグナルの調節機構-ROS 毒性説から脱却した新たな概念. *フレグランスジャーナル*, 41: 75-80, 2013. 査読無

居原 秀. レドックスメタボロミクス. *医学のあゆみ*, 247: 832-8, 2013. 査読無

〔学会発表〕(計 16 件)

居原 秀, 活性イオウシグナルの分子基盤、第 32 回印象フリーラジカル会議 (招待講演)、2016 年 1 月 29 日、けぶりかわ (京都府亀岡市)

居原 秀, 活性イオウ分子のレドックスシグナル制御異常によるメチル水銀毒性の発現機構、第 42 回日本毒性学会 (招待講演) 2015 年 6 月 30 日、金沢市アートホール (石川県金沢市)

居原 秀, 有機水銀の新規毒性発現機構: 活性イオウ分子による NO/ROS レドックスシグナル制御の破綻、第 88 回日本薬理学会 (招待講演) 2015 年 3 月 20 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

居原 秀, 有機水銀の新規毒性発現機構: 活性イオウ分子の NO/ROS レドックスシグナル制御異常、フォーラム 2014 (招待講演) 2014 年 9 月 19 日、つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

Ihara H et al., Redox signal regulation via nNOS phosphorylation at Ser847 in PC12 cells

and rat verbellar granule neurons, 第8回国際NO学会、2014年6月16日、Cleaveland(USA)

Ida T, Ihara H et al., Metabolism of 8-nitro-cGMP and regulation of electrophilic signaling by reactive sulfur species, 第8回国際NO学会、2014年6月16日、Cleaveland(USA)

井田智章、居原 秀ら、活性システインパーサルファイドとS-ポリチオレーションが酸化ストレスとレドックスシグナルを制御する、第14回日本NO学会、2014年5月16日、ニューオータニ佐賀(佐賀県佐賀市)

笠松真吾、居原 秀ら、nNOSのSer847リン酸化を介したNO/ROSレドックスシグナル制御、第14回日本NO学会、2014年5月16日、ニューオータニ佐賀(佐賀県佐賀市)

石崎健人、居原 秀ら、有機水銀の新規毒性発現機構：活性イオウ分子種のNO/ROSシグナル制御異常、第14回日本NO学会、2014年5月16日、ニューオータニ佐賀(佐賀県佐賀市)

Tsutsuki H, Ihara H et al., Superoxide generation from neuronal nitric oxide synthase and its involvement in the regulation of nitric oxide / reactive oxygen species signaling, SFRR12014, 2014年3月23日、Kyoto (Japan)

笠松真吾、居原 秀ら、有機水銀の新規毒性発現機構：活性イオウ分子の親電子シグナル制御異常、第30回印象フリーラジカル会議(招待講演)、2013年12月13日、けぶりかわ(京都府亀岡市)

笠松真吾、居原 秀ら、小脳顆粒神経細胞におけるニコチンの神経保護効果：nNOSリン酸化によるNO/ROSシグナル制御の関与、第86回日本生化学会大会、2013年9月11日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

井田智章、居原 秀ら、新規レドックス制御因子：過イオウ化システイン誘導体のメタボローム解析、第86回日本生化学会大会、2013年9月11日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

居原 秀ら、Synaptosomal-associated protein 25(SNAP25)のS-guanyl化によるSNARE複合体形成の調節、第13回日本NO学会、2013年6月28日、沖縄県医師会館(沖縄県那覇市)

井田智章、居原 秀ら、生体内システインパーサルファイドの生体動態とその生理機能の解析、第13回日本NO学会、2013年6月28日、沖縄県医師会館(沖縄県那覇市)

土屋幸宏、居原 秀ら、NOによるp38MAPKリン酸化シグナルの増強とそのカルシウムの関与、第13回日本NO学会、2013年6月28日、沖縄県医師会館(沖縄県那覇市)

{図書}(計 0件)

{産業財産権}
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

{その他}
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

居原 秀(IHARA Hideshi)
大阪府立大学・理学系研究科・准教授
研究者番号：60254447

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：