

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08322

研究課題名(和文) 硫化水素および硫黄酸化物産生不全モデル・硫黄転移酵素ノックアウトマウスの病態代謝

研究課題名(英文) Hydrogen sulfide and sulfur oxides production failure model: metabolic disorder in sulfurtransferase-knockout mice

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素(MST)が下垂体の中葉、副甲状腺、副腎皮質の束状層、膵臓のランゲルハンス島などの内分泌細胞に局在することを、免疫組織化学等で明らかにした。また、MSTの反応中間体であるポリ(ペル)スルフィドから硫化水素やポリスルフィドを産生することを見出した。海外の研究施設との共同研究でMST-ノックアウト(KO)マウで再灌流障害が軽減されることが判明した。さらに、行動実験で再現性が得られない理由としてMST-KOマウスにおいて某酵素が過剰発現していたため、ダブルKOマウスを作成している。

研究成果の概要(英文)：We identified that mercaptopyruvate sulfurtransferase (MST) was localized in endocrine cells such as the intermediate lobe of the pituitary gland, the parathyroid gland, the zona fasciculata of the adrenal cortex, and the islet cells of the pancreas using immunohistochemical techniques. We also found that polysulfides and hydrogen sulfide were produced directly from per(poly)sulfide formed at the catalytic site cysteine in the reaction intermediate of MST. Collaborative investigation with foreign laboratories turned out that reperfusion injury in MST-KO mice was inhibited. Further, the reason why the reproducibility in our behavioral experiment was not confirmed was that a certain enzymatic activity was increased. So, we are producing double KO mice.

研究分野：病態生化学

キーワード：ノックアウトマウス 硫黄転移酵素 硫化水素 ポリスルフィド 内分泌細胞 メルカプトピルビン酸

1. 研究開始当初の背景

(1) メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素(MST)は硫化水素およびポリスルフィドを産生する：システイン分解反応を触媒するMSTは原核生物から真核生物に至るまで広く存在する。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CysSγ-Sn (ポリスルフィド) が形成され、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、新たにポリスルフィドが形成される[1-5]。還元により硫化水素あるいはポリスルフィドが産生される[6,7]。また、MSTは抗酸化作用を示す多機能タンパク質である[3-5]。

(2) 先天的にMSTが欠損するとメルカプト乳酸システイン尿症(MCDU) が発症する：精神発達遅延や形態異常を伴う先天性疾患MCDUが発症するが、先天性酵素欠損の従来の病態では説明できないため、新たな概念が必要とされる。

(3) MSTノックアウト(KO)マウスはヒト先天性疾患・MCDUモデルである：当初作成したコンディショナルMST-KOマウスは、雄に低精子形成症が発症し、繁殖が困難であったため、コンベンショナルMST-KOマウスの作成を試み、安定して繁殖するnullホモ型の作成に成功した。

2. 研究の目的

多機能タンパク質であるMSTはレドックス制御に関わり、抗酸化機能を有する[3,4]。最近、硫化水素やポリスルフィドを生成することが明らかになり、さらに反応中間体の触媒部位システイン残基に安定したpersulfideが形成され、レドックスサイクルを経て硫黄酸化物が生成される可能性が示唆された[8]。MSTの先天的欠損症・MUCDのモデル動物であるMST-KOマウスを作成に成功し、著明な不安様行動を認めた。また、海馬においてセロトニン2Aレセプターが増加を認めた[9]。本研究では不安様行動と硫化水素、ポリスルフィドや硫黄酸化物との関連を明らかにし、MUCDの病態とMSTの多様性との関連を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) MST-KOマウスの繁殖・飼育・系統維持等：本学の動物センターで、SPF化したnull type MST-KOマウスの繁殖、飼育および系統維持を行う。また同様の作業を本学薬理学教室で行う。胚の凍結管理を両者で行う。動物学的（形態、成長、加齢変化）および

行動学的観察を行う。なお、国立精神神経医療センター研究所、明治薬科大学、島根医大、ギリシャ・アテネ大学、ドイツ・マックスプランク研究所、米国・LSH健康科学センターにノックアウトマウスを供与して共同研究を進める上で、それぞれの研究施設で同マウスの繁殖・飼育・系統維持を行う。

(2) MST-KOマウスの生理的、病理形態的ならびに分子病理学的研究：胎児期、周産期、成体において、MST-KOマウスおよびコントロールマウスにおけるMSTの発現パターンの推移を明らかにするために、Western analysisおよび免疫組織化学的分析を行う。

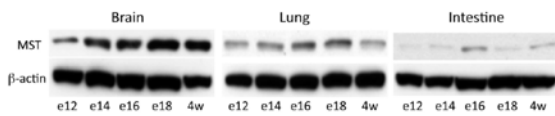
(3) MST-KOマウスの行動学的および分子精神薬理学的研究：薬理学講座の施設でヘテロ・MST-KOマウスの繁殖、飼育を行い、交配によりホモ・MST-KOマウスを作成する。同腹コントロールを用いて、前回と同様の行動学実験[10]を行い、再現性を確認する。また、不安様異常行動とセロトニンA2レセプターの分子機構を明らかにする。レセプターのマスマージングの準備を開始する。

(4) MST-KOマウスの医化学的および物理学的研究：MST-KOマウスの臓器、血液、尿の質量分析装置を用いたメタボミクス分析を行う。分析には質量分析装置 (MALDI-TOF-MS/MSおよびLC-MS/MS)を用いる。なお、硫化水素やポリスルフィドの分析にはmonobromobimaneで修飾してLC-MS/MSおよびHPLC-fluorescenceを用いる。また、組織内における微量硫黄酸化物の測定法がないため、直接定量する電極法を開発する準備を行う。

4. 研究成果

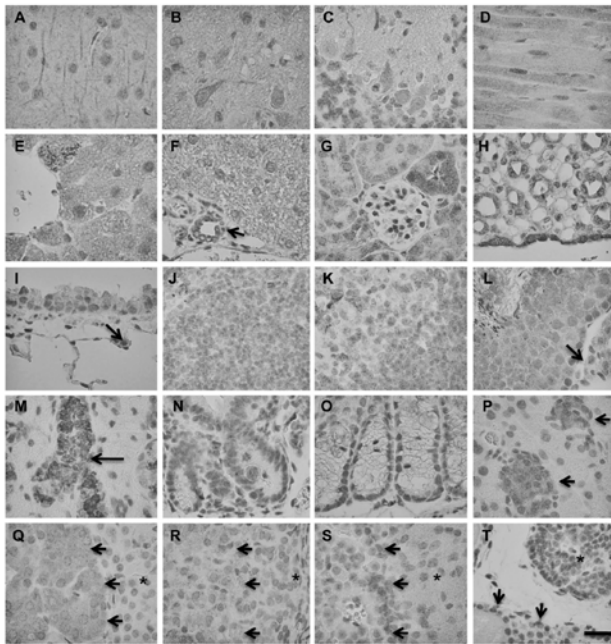
(1)病理形態的ならびに分子病理学的研究：熊本大学・医学部・病理学講座・伊藤と協力して実施した。MSTが内分泌分泌組織(細胞)に局在することを新たに発見した。以前に発表[11]した免疫組織化学は凍結切片を用いたが、今回はホルマリン固定の組織に対して検索を行った。若干結果は異なるが、特に下垂体の中葉、副甲状腺、副腎皮質においては束状層、睪臓のランゲルハンス島などに分布することが明らかになった。また、胎児期の脳、肺、肝臓および腸管におけるMST発現パターンも明らかにした。(学会：Nagahara et al., 第89回日本生化学会大会、2016および論文:[12]。

図1 胎児期のMST発現パターン



(参考文献12のFigure 3より)

図2 各組織における免疫組織化学



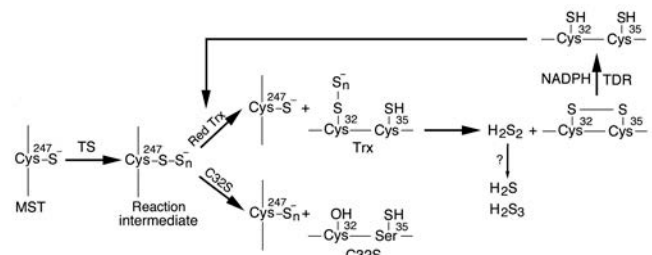
A 大脳皮質、B 視床、C 小脳、D 心筋、E 肝臓 (中心静脈近辺)、F 肝臓 (門脈領域)、G 腎皮質、H 腎髄質、I 肺、J 脾臓、K 胸腺、L 辜丸、M 顎下腺、N 小腸、O 大腸、P 膵臓、Q 副腎髄質、R 副腎皮質、S 下垂体、T 甲状腺

(参考文献12のFigure 2より)

(2) 行動学および分子薬理学的研究：本学の薬理学分野・永野と協力して実施した。同腹仔の野生型を用いた行動実験を行ったが、再現性が良くなかったため、原因を調べた (後述)。今後も再試を行う予定である。

(3) 医化学的および物理化学的研究：永原が実施した。従来の反応は受容基質が硫黄原子を授受し、ペルスルフィドが生成され、還元剤・還元チオレドキシンにより還元され、硫化水素が生成される。本実験では「MSTの反応中間体であるペルスルフィドあるいはポリスルフィドから硫化水素やポリスルフィドを産生する」ことを見出した。論文は受理された。

図3 反応中間体から硫化水素およびポリスルフィドが産生される推定反応機構



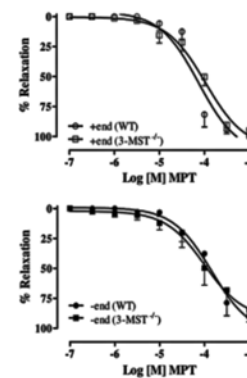
(Nagahara et al., 第89回日本生化学会大会、2016より)

また、行動実験で再現性が得られなかった原因として、MST-KOマウスにおいて他の酵素が過剰発現していた。現在、再現性等を調べている。本機序の解明は次年度以降の研究課題とする。現在、この事実を基にMSTとのダブルKOマウスを作成している。

(4) 国外 (アテネ大学・ギリシャ) との共同研究で MST-KOマウスに虚血性心疾患である梗塞病変が少ないことが分かった。すなわちMSTを欠損している方が、虚血性心疾患が起こりにくいことが分かった。また、再灌流障害を軽減することが判明した (学会：4th Int. Conf. Biol. Hydrogen Sulfide, 2016およびAm Heart Assoc, 2017で発表し、論文作成をしている)。

(5) 国外 (アテネ大学・ギリシャ) との共同研究で MST-KOマウスを利用した実験を実施した。MST-KOマウスにおいて血管収縮は mercaptopyruvateで惹起されることが明らかになった。すなわちmercaptopyruvateは硫化水素の受容体になり、MST活性に関与せず血管収縮を起こすことが明らかになった (雑誌: Mitidieria E. & Nagahara N. et al. Nitric Oxide, 2018掲載予定)。

図4 メルカプトピルビン酸の単独による血管収縮作用



end, endothelium; MPT, mercaptopyruvate (Mitidieria et al. Nitric Oxide, 2018掲載予定, Fig.2より)

(6) その他、国立精神神経医療センター研究所、明治薬科大学、島根医大、マックスプランク研究所(ドイツ)、LSH健康科学センター(アメリカ)にMST-KOマウスを供与して共同研究を進めている。

(7) 研究全体を総説 (Nagahara, Br J Pharmacol, 2018 掲載予定) 及び分担書 (Suwanai and Nagahara, Nanoscale Fabrication, Optimization, Scale-up and Biological Aspects of Pharmaceutical Nanotechnology, 2018出版予定) にまとめた。

<引用文献>

- ① Nagahara N, Okazaki T, Nishino T: Cytosolic mercaptopyruvate sulfurtransferase is evolutionarily related to mitochondrial rhodanese. J Biol Chem. 270: 16230-16235, 1995
- ② 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
- ③ 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
- ④ Nagahara N, Yoshii T, Abe Y, Matsumura T: Thioredoxin-dependent enzymatic activation of mercaptopyruvate sulfurtransferase. J Biol Chem. 282: 1561-1569, 2007
- ⑤ 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
- ⑥ 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
- ⑦ 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

⑧ 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

⑨ Nagahara N, Nagano M, Ito T, Suzuki H: Redox regulation of Mammalian 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. Methods Enzymol. 554: 229-254, 2015

⑩ 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

⑪ 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

⑫ Tomita M, Nagahara N, Ito T: Expression of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the mouse. Molecules. 2016, 21(12). pii: E1707

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

① Kimura Y, Toyofuku Y, Koike S, Shibuya N, Nagahara N, Lefer D, Ogasawara Y, Kimura H: Identification of H₂S₃ and H₂S produced by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the brain. SciRep. 2015 Oct 6;5:14774. doi: 10.1038/srep14774

② Suwanai Y, Nagahara N: Relationship between thioredoxin-dependent redox-sensing molecular switches in 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and production of hydrogen sulfide and/or polysulfides. Cell Mol Med, 1:5, 2015

③ Suwanai Y, Nagahara N, Naito Z, Orimo H: Functional analysis of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase using knockout mice. Adv Tech Biol Med, 4, 167, 2016, doi.org/10.4172/2379-1764.1000167

④ Tomita M, Nagahara N, Ito T: Expression of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the mouse. Molecules. 2016, 21(12). pii: E1707

⑤ Nagahara N: Multiple role of 3-mercaptopyruvate

sulfurtransferase: antioxidative function, H₂S and polysulfide production, and possible SO_x production. Br J Pharmacol. 2017 doi: 10.1111/bph.14100.

[学会発表] (計 13 件)

- ① 木村由佳、三上義礼、大隅貴美子、津金麻美子、岡淳一郎、豊福優希子、小池伸、渋谷典広、永原則之、小笠原祐樹、木村英雄：脳の TRPA1 チャンネルを活性化するシグナル分子としてのポリサルファイドとその生合成、第 88 回日本生化学会大会、神戸、2015
- ② 渋谷典広、小池伸、田中真紀子、湯浅-石上磨里、木村由佳、小笠原祐樹、福井清、永原則之、木村英雄：生理活性物質硫化水素の産生経路、第 88 回日本生化学会大会、神戸、2015
- ③ Bibli SI, Katsouda A, Pavlidou A, Nagahara N, Papapetropoulos A: Alterations in the cardiovascular system of 3-MST knockout mice. 4th Int. Conf. Biol. Hydrogen Sulfide, Naples, Italy, 2016
- ④ 木村由佳、小池伸、豊福優希子、渋谷典広、小笠原祐樹、永原則之：硫化水素 (H₂S) とポリサルファイド (H₂Sn) によるシグナル伝達. 第 89 回日本生化学会大会、仙台、2016
- ⑤ Kimura Y, Toyofuku Y, Koike S, Shibuya N, Nagahara N, Ogasawara Y, Kimura H : Identification of H₂S and H₂S produced by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. 第 89 回日本生化学会大会、仙台、2016
- ⑥ 渋谷典広、小池伸、田中真紀子、湯浅磨里、木村由佳、小笠原祐樹、福井清、永原則之、木村英雄：D-システインからの硫化水素産生. 第 89 回日本生化学会大会、仙台、2016
- ⑦ Nagahara N, Tomita M, Suwanai Y, Ito T: Tissue distribution of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the mouse. 第 89 回日本生化学会大会、仙台、2016
- ⑧ Bibli SI, Katsouda A, Pavlidou A, Nagahara N, Papapetropoulos A: Alterations in the cardiovascular system of 3-MST knockout mice. 4th Int. Conf. Biol. Hydrogen Sulfide, Naples, Italy, 2016
- ⑨ Bibli SI, Davos H C, Li Z, Chatzianastasiou A, Varela A, Katsouda A, Nagahara N, Lefer J D,

Papapetropoulos A. Role of 3-mercaptopyruvate sulfur transferase (3MST) in cardiac ischemia/reperfusion injury. Am. Heart Assoc. Sci. Sessions, Anaheim, California, U.S.A. Nov. 2017

- ⑩ 木村 英雄、宮本 亮、小池 伸、渋谷 典広、木村 由佳、小笠原 裕樹、高野 陽子、花岡 健二郎、浦野 泰照、永原則之：シグナル分子：硫化水素とポリサルファイド. 第 90 回日本生化学会、神戸、2016
- ⑪ Nagahara N, Koike S, Nirasawa T, Kimura H, Ogasawara Y: Hydrogen sulfide and polysulfides production form reaction intermediate of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. 第 90 回日本生化学会、2017
- ⑫ 木村 由佳、豊福 優希子、小池 伸、渋谷 典広、永原則之、David Lefer、宮本 亮、小笠原祐樹、木村 英雄：ポリサルファイドの生体内合成メカニズム：酵素による生合成と、硫化水素/一酸化窒素の化学的相互作用. 第 90 回日本生化学会、神戸、2017
- ⑬ 渋谷 典広、小池 伸、宮本 亮、湯浅 磨里、田中 真紀子、木村 由佳、高野 陽子、花岡 健二郎、永原則之、福井 清、浦野 泰照、小笠原 裕樹、木村 英雄：生理活性物質硫化水素とポリサルファイドの産生機構. 第 90 回日本生化学会、神戸、2017

[シンポジウム] (計 1 件)

- ① 永原則之、永野昌俊、伊藤隆明、秋元敏雄、鈴木秀典：多機能酵素・3-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の網羅的解析 (硫化水素 (H₂S) とポリサルファイド (H₂Sn) のシグナル分子としての機能) 第 88 回日本生化学会大会、神戸、2015

[招待講演] (計 2 件)

- ① Nagahara N, Nagano M, Ito T, Suzuki H: Redox regulation of a multifunctional enzyme, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. 14th Int. Cong. Amino Acids, Peptides and Proteins, Vienna, Austria, 2015
- ② Nagahara N, Suwanai Y: 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase and biological functions. 9th int. Conf. Nitric oxide, Sendai, 2016

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

① 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

② 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