

令和元年6月21日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04674

研究課題名(和文) 神経系における活性イオウ分子種によるレドックスシグナル制御機構

研究課題名(英文) Regulation of redox signaling by reactive sulfur species 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)・教授

研究者番号：60254447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経系において活性酸素、レドックスシグナルは、病理・生理学的に重要であるが、その内在性制御因子である活性イオウ分子種に関する知見はほとんどなかった。神経変性の細胞モデル実験として、ラット小脳ニューロンを用いてメチル水銀毒性の分子メカニズムを解析した。メチル水銀は、レドックスシグナル二次分子である8-ニトロ-cGMPレベルを上昇させ、H-Ras/MAPK/細胞死シグナルを活性化すること、メチル水銀は、S-ビス体を形成することで活性イオウ分子種を枯渇させ、8-ニトロ-cGMPを介した毒性シグナルを増強していること、外因性の活性イオウドナーが毒性を軽減することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メチル水銀を用いた酸化ストレスを介する神経変性疾患モデルで、神経毒性の発現にレドックスシグナルの亢進と細胞内の活性イオウ分子種の枯渇が一因であることを明らかにした。また、外因的活性イオウ分子ドナーによる細胞内活性イオウ分子の補充が、神経毒性を緩和することを明らかにしている。これらの結果は、活性イオウ分子が神経変性疾患の治療ターゲットになることを示唆している。また、新規の活性イオウ分子ドナーの開発、活性イオウ分子の生合成酵素の同定も行っているため、今後これらの知見をベースにした神経変性疾患に対する新たな治療戦略が展開されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：It had become obvious that ROS/redox signaling is pathophysiologically important in the nervous system. However, little was known about the role of reactive sulfur species, which is endogenous regulator of ROS/redox signaling. We used MeHg as an environmental electrophile and found that exposure of cells to the exogenous electrophile elevated intracellular concentrations of 8-nitro-cGMP, accompanied by depletion of reactive persulfide species and 8-SH-cGMP which is a metabolite of 8-nitro-cGMP. Exposure to MeHg also induced S-guanylation and activation of H-Ras followed by activation of MAPK and injury to cerebellar granule neurons. The electrophile-induced activation of redox signaling and the consequent cell damage were attenuated by pretreatment with a reactive persulfide species donor. Our results suggest that reactive persulfide species may be potential therapeutic targets for attenuating neurodegeneration.

研究分野：神経化学、レドックスバイオロジー

キーワード：活性イオウ分子 レドックスシグナル 神経変性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

【研究開始当初の研究の現状】 活性酸素種 (ROS) や活性窒素酸化物 (RNS) は生体内のエネルギー代謝や感染防御の過程で産生される一連の反応性分子種である。研究開始当初、ROS/RNS は、生体分子に非特異的損傷を加える毒性因子として取り扱われてきた。しかし近年、ROS/RNS が細胞内でシグナル分子として機能し、細胞の分化、増殖、代謝機能など多彩な生命機能の制御に関わることが明らかになり、その生理機能や疾患との関連が注目されるようになった (Science 2006: 312, 1882、Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2007: 8, 813 など)。神経系においても、ROS/RNS レッドクスシグナルと神経変性疾患、記憶、神経発生などとの関連が注目されていた (Biochim. Biophys. Acta. 2015: 1850, 1588、Biochem. J. 2014: 463, 177、Arch. Biochem. Biophys. 2015: 576, 2 など)。

【研究開始当初までの研究成果】 ROS/RNS 代謝から産生される内因性の親電子分子は、ROS/RNS レッドクスシグナルの二次メッセンジャーとして重要な役割を果たしている。応募者らは、ROS/RNS レッドクスシグナルのセカンドメッセンジャーとして環状ヌクレオチドである cGMP のニトロ化誘導体 8-ニトロ cGMP を同定し (Nature Chem. Biol., 2007)、神経系 (グリア細胞、神経細胞、ラット、マウス脳) での産生、機能を明らかにしていた (J. Biol. Chem., 2010 等)。さらに、ROS/RNS レッドクスシグナルを負に調節する制御因子の探索を行う中で、システイン代謝に関わる酵素である cystathionine β -synthase (CBS) と cystathionine γ -lyase (CSE) が ROS/RNS レッドクスシグナルの制御に密接に関わることを発見していた (Nature Chem Biol., 2012)。CBS や CSE による ROS/RNS レッドクスシグナルの制御機構を解析した結果、両酵素が、システインチオール基にさらに過剰なイオウ原子が付加したシステインパースルフィドを生成していることを発見した (PNAS, 2014)。パースルフィドは、通常のスルフィド基と比べてより抗酸化能や求核性が高まっていて (効果) 活性化された状態にあるため、活性イオウ分子種と呼ばれている。応募者らは、さらに 8-ニトロ cGMP と活性イオウ分子種が反応し、8-メルカプト cGMP に変換されることを明らかにしている (PNAS, 2014)。これらの成果は、活性イオウ分子種が ROS の制御に関わる分子として機能することを世界に先駆けて示したものであり、レッドクスシグナルの新しい制御機構の発見として国内外で高く評価された (PNAS 誌や米国化学会の Chem. Res. Toxicol 誌のホットトピックスとして取り上げられた)。

また、応募者は、ROS/RNS 産生を誘発する神経毒素 (メチル水銀、1-メチル-4-フェニルピリジニウム (MPP⁺) など) の毒性発現機構が、単に酸化ストレスによる非特異的損傷ではなく、レッドクスシグナル亢進 (8-ニトロ cGMP 産生上昇、H-Ras/Erk カスケードの活性化) によることを示していた。しかし、このようなレッドクスシグナルの異常に起因する神経毒性に活性イオウ分子種が関連しているかは不明であった。

2. 研究の目的

神経系において活性酸素、レッドクスシグナルは、病理・生理学的に重要であるが、その内在性制御因子である活性イオウ分子種に関する知見はほとんどなかった。本申請研究では、神経系における活性イオウ分子の動態、レッドクスシグナル制御機構を解明する。さらに神経毒素 (メチル水銀、1-メチル-4-フェニルピリジニウム (MPP⁺) など) を用いて発症、病態進行との関連を明らかにし、予防・治療効果についても検討する。本研究での成果は、神経系における活性イオウ分子種による生理・病理作用の制御メカニズムの解明、これらシグナル破綻が関わる病態の新しい治療標的や診断法の開発に貢献することが期待される。

3. 研究の方法

申請者がこれまでに開発した活性イオウメタボロミクス解析法、活性イオウ蛍光イメージング法などの分析方法を用いて、細胞、個体レベルで神経系における活性イオウ分子種の動態解析を行う。またレドックスシグナルを破綻するメチル水銀などで、神経細胞を処理し、活性イオウ分子種動態とレドックスシグナル（8-ニトロ-cGMP 産生、S-グアニル化、細胞死など）との関連性を明らかにした。

4. 研究成果

活性イオウ分子種の動態解析を行うために、アルキル化剤として *p*-(4-hydroxyphenyl)ethyl iodoacetamide (HPE-IAM)を用いた活性イオウ-メタボロミクス法を構築し、より正確な定量解析を行った (Nature Comm. 2017、Chem. Res. Toxicol. 2017)。また、タンパク質中に含まれているシステインパーサルファイドの解析法の確立、タンパク質合成途中のペプチド鎖に取り込まれているシステインパーサルファイドの解析なども行い、生体内におけるシステインパーサルファイドの生合成経路の解明、ミトコンドリア機能との関連について検討した (Nature Comm. 2017)。生体内におけるシステインパーサルファイドの生合成を担う酵素としてシステイニル tRNA 合成酵素を同定し、さらに哺乳動物のミトコンドリアで活性イオウ分子種を電子受容体とするイオウ呼吸が存在することを明らかにした (Nature Comm. 2017)。細菌のシステイン代謝関連酵素を用いた新規安定同位体化合物の合成法の確立 (Free Radic Biol Med. 2017)。様々な生体試料中の活性イオウ分子種の総量を測定する方法の確立 (Anal Chim Acta. 2017)。抗体を用いた全活性イオウ量の簡易測定法の開発 (特願特願 2017-31238) を行った。

神経変性の細胞モデル実験として、ラット小脳ニューロンを用いてメチル水銀毒性の分子メカニズムを解析した。メチル水銀は、ミトコンドリア、神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) に作用し、NO/ROS の産生を促進し、レドックスシグナル二次分子である 8-ニトロ-cGMP レベルを上昇させること、8-ニトロ-cGMP が低分子 GTP 結合タンパク質 H-Ras を活性化し、H-Ras/MAPK/細胞死シグナルを活性化することを明らかにした。また、メチル水銀は、メチル水銀そのものが活性イオウ分子種と反応して S-ビス体を形成することで活性イオウ分子種を枯渇させ、8-ニトロ-cGMP を介した毒性シグナルを増強していること、外因性の活性イオウドナーが毒性を軽減することを明らかにした (図 1 Chem. Res. Toxicol. 2017)。

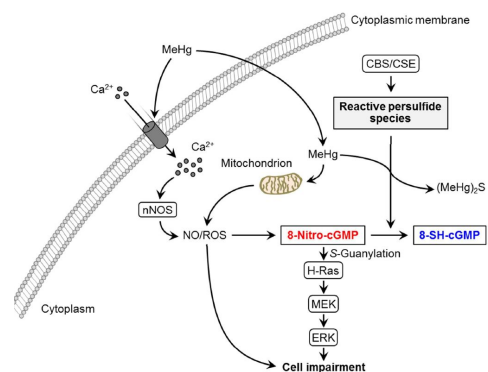


図 1 メチル水銀によるレドックスシグナル/活性イオウ制御系の破綻

また、アルツハイマー病の原因物質であるアミロイドベータペプチドによる細胞毒性モデルにおいて、アミロイドベータ処理により細胞内活性イオウ分子種レベルが減少すること、外因性の活性イオウ分子ドナーがアミロイドベータ毒性を軽減することを明らかにした (第 17 回日本 NO 学会学術集会、投稿準備中)。

さらに、活性イオウ分子種の動態解析を行うために、質量分析による活性イオウ-メタボロミクス法について各種親電子性アルキル化剤について検討した。その結果ヒドロキシフェニル基を持つ HPE-IAM が活性イオウを安定化することを見出した。さらに様々なヒドロキシ基を持つ化合物の安定化能を解析したところ、チロシンが非常に高い活性イオウ安定化能を有するこ

とを見出した (Redox Biol. 2019)。この知見を利用し、活性イオウメタボロミクス解析に適した新規のアルキル化剤の開発に成功した (論文投稿準備中)。活性イオウ-メタボロミクス解析法によりアルツハイマー病モデルマウスにおいて病態進行と活性イオウレベルのとの間に相関があることを見出した (論文投稿準備中)。また、新規の活性イオウドナーを開発し、炎症疾患モデル細胞または動物を用いて生体内における活性イオウレベルの上昇が、炎症抑制に有効であることを明らかにした (Cell Chem. Biol. 2019)。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件)

- 1 Zhang, T., Ono, K., Tsutsuki, H., Ihara, H., Islam, W., Akaike, T. and Sawa, T. (2019) Enhanced Cellular Polysulfides Negatively Regulate TLR4 Signaling and Mitigate Lethal Endotoxin Shock. Cell Chem. Biol. in press
- 2 Takata, T., Kimura, J., Ihara, H., Hatano, N., Tsuchiya, Y. and Watanabe, Y. (2019) Redox regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV via oxidation of its active-site cysteine residue. Free Radic. Biol. Med. 130, 99-106
- 3 Kishimoto, Y., Kasamatsu, S., Yanai, S., Endo, S., Akaike, T. and Ihara, H. (2019) 8-Nitro-cGMP attenuates context-dependent fear memory in mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 511, 141-147
- 4 Kishimoto, Y., Akaike, T. and Ihara, H. (2019) SNAP-25 S-Guanylation and SNARE Complex Formation. Methods Mol. Biol. 1860, 163-173
- 5 Ihara, H., Kakihana, Y., Yamakage, A., Kai, K., Shibata, T., Nishida, M., Yamada, K. I. and Uchida, K. (2019) 2-Oxo-histidine-containing dipeptides are functional oxidation products. J. Biol. Chem. 294, 1279-1289
- 6 Hamid, H. A., Tanaka, A., Ida, T., Nishimura, A., Matsunaga, T., Fujii, S., Morita, M., Sawa, T., Fukuto, J. M., Nagy, P., Tsutsumi, R., Motohashi, H., Ihara, H. and Akaike, T. (2019) Polysulfide stabilization by tyrosine and hydroxyphenyl-containing derivatives that is important for a reactive sulfur metabolomics analysis. Redox Biology. 21, 101096
- 7 Masuda, K., Tsutsuki, H., Kasamatsu, S., Ida, T., Takata, T., Sugiura, K., Nishida, M., Watanabe, Y., Sawa, T., Akaike, T. and Ihara, H. (2018) Involvement of nitric oxide/reactive oxygen species signaling via 8-nitro-cGMP formation in 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells and rat cerebellar granule neurons. Biochem. Biophys. Res. Commun. 495, 2165-2170
- 8 Takata, T., Ihara, H., Hatano, N., Tsuchiya, Y., Akaike, T. and Watanabe, Y. (2017) Reactive sulfur species inactivate Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV via S-polysulfidation of its active-site cysteine residue. Biochem. J. 474, 2547-2562
- 9 Ono, K., Jung, M., Zhang, T., Tsutsuki, H., Sezaki, H., Ihara, H., Wei, F. Y., Tomizawa, K., Akaike, T. and Sawa, T. (2017) Synthesis of L-cysteine derivatives containing stable sulfur isotopes and application of this synthesis to reactive sulfur metabolome. Free Radic. Biol. Med. 106, 69-79
- 10 Kishimoto, Y., Kunieda, K., Kitamura, A., Kakihana, Y., Akaike, T. and Ihara, H. (2017) 8-Nitro-cGMP Attenuates the Interaction between SNARE Complex and Complexin through S-Guanylation of SNAP-25. ACS Chem. Neurosci. 9, 217-223
- 11 Kikugawa, M., Ida, T., Ihara, H. and Sakamoto, T. (2017) Ferulic acid and its water-soluble

- derivatives inhibit nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in rat primary astrocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81, 1607-1611
- 12 Ikeda, M., Ishima, Y., Shibata, A., Chuang, V. T. G., Sawa, T., Ihara, H., Watanabe, H., Xian, M., Ouchi, Y., Shimizu, T., Ando, H., Ukawa, M., Ishida, T., Akaike, T., Otagiri, M. and Maruyama, T. (2017) Quantitative determination of polysulfide in albumins, plasma proteins and biological fluid samples using a novel combined assays approach. *Anal. Chim. Acta.* 969, 18-25
 - 13 Ihara, H., Kitamura, A., Kasamatsu, S., Ida, T., Kakihana, Y., Tsutsuki, H., Sawa, T., Watanabe, Y. and Akaike, T. (2017) Superoxide generation from nNOS splice variants and its potential involvement in redox signal regulation. *Biochem. J.* 474, 1149-1162
 - 14 Ihara, H., Kasamatsu, S., Kitamura, A., Nishimura, A., Tsutsuki, H., Ida, T., Ishizaki, K., Toyama, T., Yoshida, E., Abdul Hamid, H., Jung, M., Matsunaga, T., Fujii, S., Sawa, T., Nishida, M., Kumagai, Y. and Akaike, T. (2017) Exposure to Electrophiles Impairs Reactive Persulfide-dependent Redox Signaling in Neuronal Cells. *Chem. Res. Toxicol.* 30, 1673-1684
 - 15 Hoshino, M., Kaneko, K., Miyamoto, Y., Yoshimura, K., Suzuki, D., Akaike, T., Sawa, T., Ida, T., Fujii, S., Ihara, H., Tanaka, J., Tsukuura, R., Chikazu, D., Mishima, K., Baba, K. and Kamijo, R. (2017) 8-Nitro-cGMP promotes bone growth through expansion of growth plate cartilage. *Free Radic. Biol. Med.* 110, 63-71
 - 16 Akaike, T., Ida, T., Wei, F. Y., Nishida, M., Kumagai, Y., Alam, M. M., Ihara, H., Sawa, T., Matsunaga, T., Kasamatsu, S., Nishimura, A., Morita, M., Tomizawa, K., Nishimura, A., Watanabe, S., Inaba, K., Shima, H., Tanuma, N., Jung, M., Fujii, S., Watanabe, Y., Ohmuraya, M., Nagy, P., Feelisch, M., Fukuto, J. M. and Motohashi, H. (2017) CysteinyI-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat Commun.* 8, 1177

〔学会発表〕(計 31 件) (うち招待講演 5 件/うち国際学会 5 件)

招待講演

1. 居原秀(2017) 内因性親電子シグナル経路と活性イオウ分子のクロストークと環境毒性学、第 44 回日本毒性学会学
2. 居原秀(2018) 活性イオウ分子解析システムの開発と応用、第 18 回日本 NO 学会
3. 居原秀(2018) メチル水銀の新規毒性発現機構 活性イオウ分子/レドクスシグナル制御系の破綻、第 72 回日本細菌学会東北支部総会
4. 居原秀(2018) イミダゾールジペプチドによる抗酸化メカニズムの解明、第 16 回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム
5. H Ihara(2018) Exposure to Electrophiles Impairs Reactive Persulfide-dependent Redox Signaling in Neuronal Cells、第 91 回日本生化学会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：特定のサルファイド化合物に結合する抗体及びその使用

発明者：居原 秀

権利者：大阪府立大学

種類：特許

番号：特願 2 0 1 7 - 3 1 2 3 8

出願年：2017

国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：澤 智裕

ローマ字氏名：Sawa Tomohiro

所属研究機関名：熊本大学

部局名：大学院生命科学研究部（医）

職名：教授

研究者番号（8桁）：30284756

研究分担者氏名：中嶋 秀満

ローマ字氏名：Nakajima Hidemitsu

所属研究機関名：大阪府立大学

部局名：大学院生命環境科学研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：30405360

(2)研究協力者

なし