

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14895

研究課題名（和文）活性イオウ分子による新たな還元ストレス/レドックス制御機構の解明

研究課題名（英文）Extracellular efflux of reactive sulfur species and its transporters

研究代表者

秋山 雅博（Akiyama, Masahiro）

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：60754570

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：酸化ストレスに対し還元ストレスという概念が近年提唱されたが、未だ還元ストレスの本体（主要因子）が何であるかは明確でない。本研究は還元ストレスの主要因子として高い抗酸化能と求核性を有する活性イオウ分子を同定し、その生体内における還元ストレス制御機構として、活性イオウ分子の細胞外排出システムを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの研究により酸化ストレスと疾患との関連が示唆され、抗酸化物質が治療薬として期待されている。しかし一方、抗酸化物質による還元ストレスという健康リスクも懸念される。本研究成果は還元ストレス/レドックス制御における、新たな仕組みを明らかにしたものであり、還元ストレスに起因する病態の発症メカニズムの解明に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：We found that there are antiporters to uptake cystine, oxidized form of cysteine, into the cells inside in exchange for cysteine persulfide excreted into extracellular space, and probably plays an important role in redox homeostasis in the cells.

研究分野：環境生物学

キーワード：還元ストレス 活性イオウ分子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

従来、Cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE)は硫化水素を産生する酵素として知られていた。しかし、近年 CSE の主要産生物はシスチン(CysSSCys)を基質としたパースルフィド (CysSSH 等) やポリスルフィド (CysSSSH 等) のように分子内に“可動性イオウ”を有する活性イオウ分子であることが明らかにされ、その高い抗酸化性/求核性から酸化・親電子ストレスに対する重要な防御因子であると考えられた。

実際、我々はこれまでに CSE を欠損させることで、生体内活性イオウ分子の量を減少させ、活性イオウ分子の生体内量の維持がメチル水銀やカドミウムなどの環境中親電子物質に対する毒性防御に重要であることを報告してきた。さらに、外因性の活性イオウ分子であるニンニク抽出液やポリサルファー化合物の投与が、活性イオウ分子の細胞内量及び環境中親電子物質に対する抵抗性を向上させることを報告している。

一方、適度な酸化反応は生体において重要な役割を担っている。例えば、ミトコンドリアで産生される活性酸素種は、タンパク質の正常な構造を維持するのに必要なジスルフィド結合の形成などに重要である。そのため、過剰な抗酸化物質による過度の活性酸素の消去は、ジスルフィド結合形成の損失による ER ストレスやミトコンドリア活性の低下を引き起こし、様々な病態との関連が示唆されている。

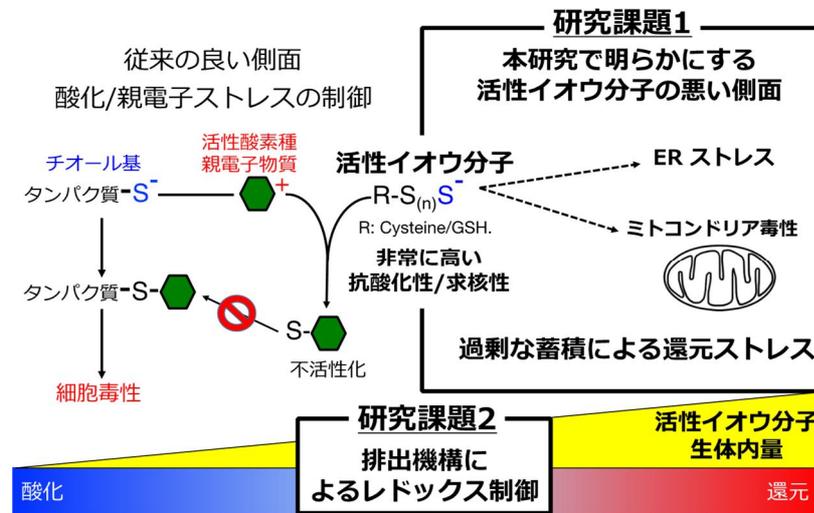
活性イオウ分子に対する研究は、活性イオウ分子が CysSH や GSH に比べて遥かに高い活性酸素消去活性を示すことから、酸化ストレスに対する役割が中心的に行われてきた。また、酸化ストレスに対し還元ストレスという概念が近年提唱されたが、未だ還元ストレスの本体(主要因子)が何であるかは明確でない。

### 2. 研究の目的

高い抗酸化性/求核性を有する活性イオウ分子は酸化/親電子ストレスに対する新たな防御因子として注目される。一方、生体内での過剰な抗酸化物質の蓄積はレドックスバランスを乱し、還元ストレスによる健康リスクを引き起こすことが知られる。しかし、現在、活性イオウ分子に対しこれらリスクの検討はなされていない。

そこで、本研究では活性イオウ分子が持つ

健康リスクを検討し、その安全域値を明らかにすることを目的とした(研究課題 1)。また、先行研究において、活性イオウ分子を細胞外へ排出する機構の存在を報告しており、同機構は活性イオウ分子による還元ストレスの回避に重要な役割を担っている可能性がある。そこで、活性イオウ分子の排出トランスポーターを同定し、活性イオウ分子排出機構がレドックスバランスの維持に参与しているかを検討を目的とした(研究課題 2)。



### 3. 研究の方法

マウス：C57BL/6J マウスを野生型 (WT) マウス、および活性イオウ分子産生酵素である CSE の高発現マウス (CSE-Tg) マウスを用いた。細胞：WT および CSE-Tg マウスから作製した初代肝細胞、または HepG2 細胞を用いた。活性イオウ分子の測定：親電子プローブと安定同位体希釈法を用いた LC-MS 解析法により定量解析を行った。ポリサルファー化合物： $\text{Na}_2\text{S}_4$  および CysSH トリスルフィド (CysSSSCys) を使用した。高シスチン食：一般的なマウス飼育に用いられる MF 食をコントロール食とし、MF 食をベースに CSE 基質含有量を変化させた飼料を作製した。

### 4. 研究成果

CSE-Tg マウスは、各臓器で高い CSE 発現を示したにもかかわらず、WT と比べ、臓器中の活性イオウ分子の量に大きな変化は見られなかった。一方興味深い事に、臓器 (細胞) 外である血漿中の活性イオウ分子の量は、WT に比べ顕著に増加していた。同様に、CSE-Tg マウス初代肝細胞においても、細胞内活性イオウ分子の量は WT と比べ大差ないものの、細胞外 (培地中)での活性イオウ分子の量は顕著に増加していた。これらの結果は、細胞中で産生された余剰の活性イオウ分子は、細胞外へと排出されることを示唆している。

一方、CSE の基質である CysSSCys 高含有食を CSE-Tg マウスを与えると活性イオウ分子の過剰産生と、肝臓や骨格筋に対する組織障害 (還元ストレス) を引き起こす事を見出した。

さらに、ポリサルファー化合物の投与により増加した細胞内活性イオウ分子の量は、細胞外へ放出されることで一定期間で定常レベルに戻ることに、また、ある一定量以上の投与は、逆に細胞毒性を引き起こすことを見出した。つまり、生体は余剰な活性イオウ分子を細胞外へと積極的に排出する輸送システムを介して、細胞内の恒常性を維持していることを示唆している。

興味深い事に、培地中（細胞外）からアミノ酸を除去すると、活性イオウ分子のひとつであるシステインパースルフィド（CysSSH）の細胞外排出が抑制された。さらに、この排出抑制はCysSSCys 添加により、通常レベルまで回復した。

一連の結果は、少なくともCysSSHの細胞外排出にはアミノ酸要求性アンチポーターが寄与しており、そのカウンターパートのひとつがシスチンであることを示唆している。

WTおよびCSE-Tgマウスの各種臓器中CysSSH濃度は厳密に制御されており、余剰のCysSSHが血漿中に排泄されている事実からすると、細胞内レドックスバランスの維持にCysSSHの細胞外排泄は重要なプロセスである可能性が高い。細胞外において、CysSSHは酸化/親電子ストレスを制御する求核低分子として機能し、結果的に生じる還元性を消失したCysSSCysは、CysSSCysアンチポーターを介して細胞内に取り込まれて、CSEにより還元性の高いCysSSHに再生されるレドックスホメオスタシスが想定される。

本研究は、本研究成果は、還元ストレス/レドックス制御における、新たな仕組みを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akiyama M, Unoki T, Shinkai Y, Ishii I, Ida T, Akaike T, Yamamoto M, Kumagai Y.	4. 巻 127
2. 論文標題 Environmental Electrophile-Mediated Toxicity in Mice Lacking Nrf2, CSE, or Both.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environmental Health Perspectives	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI: 10.1289/EHP4949	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 秋山雅博
2. 発表標題 活性イオウ分子による還元ストレスのリスクとその制御機構
3. 学会等名 酸化ストレス学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahiro Akiyama
2. 発表標題 Phase-zero Reaction as a Primary Defense System Against Electrophilic Stress in out of Cell: Involvement of Reactive Persulfides
3. 学会等名 26th Annual Meeting of the Society-for-Redox-Biology-and-Medicine
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋山雅博
2. 発表標題 活性イオウ分子の細胞外排出機構
3. 学会等名 第19回分子予防環境医学研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masahiro Akiyama
2. 発表標題 Phase-zero reaction as a primary defense system against electrophilic stress in out of cell: Involvement of reactive persulfides.
3. 学会等名 1st International Conference on Persulfide and Sulfur Metabolism in Biology and Medicine
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋山雅博
2. 発表標題 活性イオウ分子排出輸送機構によるレドックス制御
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考