

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460115

研究課題名(和文) 内在性硫化水素の生理機能

研究課題名(英文) Physiological roles of endogenous hydrogen sulfide

研究代表者

木村 英雄 (Kimura, Hideo)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・その他

研究者番号：30321889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：硫化水素は生体内において酵素によって生産され、シグナル分子として働いている。また、硫化水素よりもイオウ原子数の多いポリサルファイドも3MSTによって酵素的に生産されるシグナル分子に加わった。ポリサルファイドは疼痛伝達を行うTRPA1チャンネルのアミノ末端に存在する2つのシステイン残基を加硫化するによって活性化することが明らかとなった。本研究では、ポリサルファイドの生合成経路と、TRPA1チャンネル活性化メカニズムを明らかにした。また、3MST特異的阻害剤およびポリサルファイド特異的蛍光プローブを完成した。

研究成果の概要(英文)：Hydrogen sulfide is produced by enzymes and functions as a signaling molecule. Polysulfides, which have a higher number of sulfur atoms than hydrogen sulfide, were found to be produced by 3MST and transmit signals. Polysulfides activate TRPA1 channels, which are involved in the transmission of pain, by sulfurating two cysteine residues at the amino terminus of the channels. In the present study, we identified the producing pathways of polysulfides and the mechanism for the activation of TRPA1 channels. We also developed specific inhibitors of 3MST and a polysulfide specific fluorescence probe.

研究分野：シグナル分子としての硫化水素とポリサルファイド

キーワード：硫化水素 ポリサルファイド シグナル分子 TRPA1チャンネル 3MST

1. 研究開始当初の背景

- (1) 1989年及び1990年にヒト、ウシ、ラットの脳にH₂Sが存在することが報告され、H₂Sが生理機能を持つことが予想された (Kimura, *Antioxid. Red. Signal.* 12, 1111-1123, 2010)。
- (2) 申請者は、H₂S生産酵素の存在とH₂Sの機能を発見し、世界で初めて報告した。脳ではcystathionine beta-synthase (CBS)がH₂Sを生産し、H₂Sが海馬長期増強(LTP)誘導を促進する神経伝達修飾物質であること (Abe & Kimura, *J. Neurosci.* 16, 1066-1071, 1996)、そして翌年には、第2の生産酵素cystathionine gamma-lyase (CSE)が胸部大動脈でH₂Sを生産し、一酸化窒素(NO)との相乗効果で血管弛緩を起こす平滑筋弛緩因子として機能していることを提案した (Hosoki et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 527-531, 1997)。
- (3) このようなシグナル分子としての役割に加え、これまでは毒ガスとしての印象が強く、見逃されていた細胞保護因子としての働き、すなわち、H₂Sが酸化ストレスから神経細胞を保護する機能を発見した (Kimura & Kimura, *FASEB J.* 18, 1165-1167, 2004)。この発見は、Emory UniversityのDavid Leferとの共同研究による、虚血再還流障害からの心筋保護作用の解明につながった (Elrod et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 11560-11565, 2007)。その後、多くの臓器保護作用が明らかとなった。
- (4) H₂Sによる細胞保護のメカニズムとしては、NF-κB制御による抗アポトーシス効果及び、小胞体ストレス応答の調節などが報告されている (Sen et al., *Mol. Cell* 45, 13-24, 2012; Krishnan et al., *Sci. Sig.* 4:ra86, 2011)。H₂Sが細菌の抗生物質抵抗性を制御していることが報告されるに至り、H₂Sの細胞保護作用は哺乳類のみならず細菌にも認められる、ユニバーサルな防御機構であると認識されるようになった (Science 334, 986-990, 2011)。
- (5) H₂S研究における申請者らの大きな貢献として、H₂S合成酵素CBS、CSEに加えて、第3の酵素3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST)も世界に先駆けて発表したことを追記しておきたい (Abe & Kimura, 1996; Hosoki et al., 1997; Shibuya et al., *Antioxid. Red. Signal.* 11, 703-714, 2009)。
- (6) 最近、申請者らは、D-cysteineからH₂S

を合成する、D-amino acid oxidase (DAO)と3MSTからなる経路を発見した (Shibuya et al., *Nature Commun.* 4:1366, 2013)。この経路は脳と腎臓に局在しており、特に腎臓ではL-cysteineに比べ80倍も効率よくH₂Sを合成する。虚血再還流障害から腎臓をL-cysteineよりも効果的に保護し、腎疾患や腎移植への応用が期待されている (Transplantation: Hydrogen sulfide reduces warm renal ischemic injury. Razzak, *Nature Review Urology* 9, 670, 2012)。国際特許出願 (PCT/JP2013/004428)「D-システインを有効成分として含有する硫化水素産生誘導剤」を行った。

- (7) 申請者らは、H₂Sが酸化されてできるポリサルファイドH₂S_n (n=3~7)がH₂Sよりも300倍以上強力にアストロサイトのtransient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channelを活性化し、細胞内カルシウム濃度を上昇させることを発見した (Kimura et al., *FASEB J.* 27, 2451-2457, 2013)。これに続いて、phosphoinositide-3-kinase (PI3K)-Aktパスウェイ抑制剤として働くlipid phosphatase and tensin homolog (PTEN)は、腫瘍抑制活性をもち、ポリサルファイドがこのPTENの働きを制御していることが報告された (Greiner et al., *Antioxid. Redox Signal.* in press 2013)。

2. 研究の目的

- (1) ポリサルファイド感受性分子TRPA1チャネルの活性化機構を解明する。
- (2) H₂S生産酵素CBS、CSE、3MSTに対する特異性の高い阻害剤がなく開発が待たれている。これら阻害剤の開発を東京大学薬学部の花岡健二郎准教授との共同研究により進める。

3. 研究の方法

- (1) ポリサルファイドによるTRPA1活性化
申請者らは、H₂Sが酸化されてできるポリサルファイドがアストロサイトのTRPA1チャネルを活性化し、細胞内Ca²⁺濃度上昇を誘起することを発見した (Kimura et al., *FASEB J.* 2013)。ポリサルファイドによるTRPA1活性化メカニズムを解明する。TRPA1のアミノ末端のシステイン残基がさまざまな刺激性物質に対して感受性を示す。このシステイン残基はポリサルファイドの良い標的で、これを過硫化して活性化する可能性が高い。このシステインをセリンなどの他のアミノ酸に置換した変異体を作成し、感受性の違いを検討する。過硫化されて活性化されたチャネルは還元剤DTTによって過硫化が削除され、不活

性になることが予想される。これについても検討を行う。HPLCによる検討では、脳内に内在性のポリサルファイドが存在していることが分かっており (Kimura et al., FASEB J. 2013)、脳内での局在についても脳各部サンプルを HPLC で解析する検討を始める。

(2) H₂S 生産酵素 CBS, CSE, 3MST 阻害剤の開発

H₂S の生理機能を解析するためにはその生産酵素の特異的阻害剤が不可欠である。

東大薬学部には化合物ライブラリーがあり、H₂S 生産酵素阻害剤として可能性のある化合物を先ず、構造活性相関により絞り込む。CBS、CSE、3MST が H₂S を生産する酵素反応系の測定法はすでに本研究部で確立しており、この反応系にこれらの候補化合物を添加することにより、酵素反応の阻害効果を測定し、特異的阻害剤を選定する。

これまでの東大薬学部との共同研究における成果としては、H₂S 感受性蛍光プローブの作成が挙げられる。2011年にそれぞれ特徴のある7つのH₂S感受性蛍光プローブが報告されたが、東大薬学部との共同研究により、最もH₂Sに対して特異性が高く、早い反応性を示す蛍光プローブの開発に成功している (Sasakura et al., J. Am. Chem. Soc. 133, 18003-18005, 2011)。

4. 研究成果

(1) ポリサルファイドの作用として、neuroblastoma 細胞のカルシウム流入を増加することによって、神経様細胞への分化を促すことや、急性疼痛の神経伝達に TRPA1 チャネルを介して関与していることを明らかにした (Koike et al., 2015; Hatakeyama et al., 2015)。ポリサルファイドは、TRPA1 チャネルのアミノ末端に存在する2つのシステイン残基を過硫化し、それに続くジスルフィド結合形成により、構造変化を引き起こし、チャネルの活性化をおこない、カルシウム透過を誘導することを明らかにした。

(2) 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST) が 3-mercaptopyruvate (3MP) を基質として、ポリサルファイドを合成することを明治薬科大学との共同研究により明らかにした (Kimura et al., 2015)。精製 3MST および、3MST を発現した培養細胞に 3MP を投与すると、H₂S₂ や H₂S₃ が合成されることを示した。また、3MST ノックアウトマウス脳では、これらポリサルファイドが合成されず、野生型マウスでは合成される。また、3MST の活性中心や活性に関わるアミノ酸変異体では、ポリサルファイド合成能がないことを示した。これらの結

果から、3MST がポリサルファイド合成能をもつことを示唆した。科学新聞に成果が掲載された。

(3) 東大薬学部との共同研究により、硫化水素及びポリサルファイド合成酵素 3MST の阻害剤を開発した。東大薬学部の化合物ライブラリーを使い、H₂S 生産酵素阻害剤として可能性のある化合物を先ず、構造活性相関により絞り込んだ。3MST が H₂S を生産する酵素反応系の測定法はすでに本研究部で確立しており、この反応系にこれらの候補化合物を添加することにより、酵素反応の阻害効果を測定し、特異的阻害剤を選定した (Hanaoka et al., 2017)。

(4) 硫化水素 (H₂S) による血管平滑筋弛緩作用は一酸化窒素 (NO) によって増強されることから、H₂S と NO との間には相乗効果があることを 1997 年に世界で初めて報告した (Hosoki et al., 2017)。そのメカニズムはこれまでよくわかっていなかった。本研究では、H₂S と NO からポリサルファイド (H₂S_n) ができることを明治薬科大との LC-MS/MS を使った研究により明らかにした。H₂S と NO からは、他に HNO や HSSNO ができることが報告されていたが、H₂S と NO の産物及び H₂S_n は TRPA1 を活性化し、シアン及び還元剤で不活性化されるのに対して、HNO はシアンで不活性化されず、HSSNO は還元剤で不活性化されないことから、H₂S_n が活性を持つ産物であることを示した (Miyamoto et al., 2017)。本研究では、東大薬学部との共同研究で開発したポリサルファイド特異的蛍光プローブを使用した (Takano et al., 2017)。

(5) 細胞内の酸化還元環境維持に寄与していると考えられている cysteine persulfide や glutathione persulfide がどのように合成されるかについてはよくわかっていなかった。3MST ノックアウトマウスと LC-MS/MS を使った本研究により、3MST によって 3MP から合成された H₂S₂ や H₂S₃ などのポリサルファイドが cysteine や glutathione と反応してできることが明らかとなった (Kimura et al., 2017)。また、明治薬科大学との共同研究による脳内在性のポリサルファイドの同定及び定量にも成功した (Koike et al., 2017)。さらに、thiosulfate を基質としても 3MST からポリサルファイドが合成されることを示した (Nagahara et al., 2018)。

(6) 研究代表者は平成 28 年、シグナル分子としての硫化水素とポリサルファイド研究に対して、トムソンロイターの第 4 回リサーチフロントアワードを受賞した。また、平成 29 年には、クラリベートアナリティクスの Highly Cited Researcher に選出された。

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 18 件)

- ① Koike, S., Shibuya, N., Kimura, H., Ishii, K., Ogasawara, Y. Polysulfide promotes neuroblastoma cell differentiation by accelerating calcium influx. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 459, 488-492, 2015. Doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.133.
- ② Hatakeyama, Y., Takahashi, K., Tominaga, M., Kimura, H., Ohta, T. Polysulfide evokes acute pain through the activation of nociceptive TRPA1 in mouse sensory neurons. **Mol. Pain** 11:24, 2015. Doi 10.1186/s12990-015-0023-4.
- ③ 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. **Sci. Rep.** 5:14774, 2015. DOI: 10.1038/srep14774.
- ④ Hanaoka, K., Sasakura, K., Suwanai, Y., Toma-Fukai, S., Shimamoto, K., Takano, Y., Shibuya, N., Terai, T., Komatsu, T., Ueno, T., Ogasawara, Y., Tsuchiya, Y., Watanabe, Y., Kimura, H., Wang, C., Uchiyama, M., Kojima, H., Okabe, T., Urano, Y., Shimizu, T., Nagano, T. Discovery and mechanistic characterization of selective inhibitors of H₂S-producing enzyme:: 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST) targeting active-site cysteine persulfide. **Sci. Rep.** 7:40227, 2017. DOI:10.1038/srep40227.
- ⑤ Takano, Y., Hanaoka, K., Shjimamoto, K., Miyamoto, R., Komatsu, T., Ueno, T., Terai, T., Kimura, H., Nagano, T., Urano, Y. Development of a reversible fluorescent probe for reactive sulfur species, sulfane sulfur, and its biological application. **Chem. Commun.** 53, 1064-1067, 2017. DOI: 10.1039/c6cc08372b.
- ⑥ Miyamoto, R., Koike, S., Takano, Y., Shibuya, N., Kimura, Y., Hanaoka, K., Urano, Y., Ogasawara, Y., Kimura, H. Polysulfides (H₂S_n) produced from the interaction of hydrogen sulfide (H₂S) and nitric oxide (NO) activate TRPA1 channels. **Sci. Rep.** 7: 45995, 2017. DOI: 10.1038/srep45995.
- ⑦ Kimura, Y., Koike, S., Shibuya, N., Lefer, D., Ogasawara, Y., Kimura, H. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces potential redox regularots cysteine- and glutathione-persulfide (Cys-SSH and GSSH) together with signaling molecules H₂S₂, H₂S₃ and H₂S. **Sci. Rep.** 7: 10459, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-11004-7.
- ⑧ Koike, S., Kawamura, K., Kimura, Y., Shibuya, N., Kimura, H., Ogasawara, Y. Analysis of endogenous H₂S and H₂S_n in mouse brain by high-performance liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometric detection. **Free Rad. Biol. Med.** 113, 355-362, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.346>.
- ⑨ Nagahara, N., Koike, S., Nirasawa, T., Kimura, H., Ogasawara, Y. Alternative pathway of H₂S and polysulfides production from sulfurated catalytic-cysteine of reaction intermediates of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 496, 648-653, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.056>.
- ⑩ Kimura, H. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. **Nitric Oxide** 41, 4-10, 2014. doi: 10.1016/j.niox.2014.01.002.
- ⑪ Kimura, H. Production and physiological effects of hydrogen sulfide. **Antioxid. Redox Signal.** 20, 783-793, 2014. doi: 10.1089/ars.2013.5309.
- ⑫ Kimura, H. Hydrogen sulfide and polysulfides as biological

- mediators. **Molecules** 19, 16146-16157, 2014. Doi:10.3390/molecules191016146.
- ⑬ Kimura, H. Signaling of hydrogen sulfide and polysulfides. **Antioxid. Redox Signal.** 22, 347-349, 2015. Doi:10.1089/ars.2014.6082.
- ⑭ Kimura, H. Signaling molecules: Hydrogen sulfide and polysulfide. **Antioxid. Redox Signal.** 22, 362-376, 2015. doi:10.1089/ars.2014.5869.
- ⑮ Kimura, H. H₂S2014 in Kyoto: The 3rd International Conference on H₂S in Biology and Medicine. **Nitric Oxide** 46, 1-6, 2015. Doi.org/10.1016/j.niox.2014.10.001.
- ⑯ Kimura, H. Hydrogen sulfide and polysulfides as signaling molecules. **Proc. Jpn. Acad., Ser. B** 91, 131-159, 2015. Doi:10.2183/pjab.91.131.
- ⑰ Kimura, H. Hydrogen polysulfide (H₂S_n) signaling along with hydrogen sulfide (H₂S) and nitric oxide (NO). **J. Neural Transm.** 123, 1235-1245, 2016. Doi: 10.1007/s00702-016-1600-z.
- ⑱ Kimura, H. Hydrogen sulfide and polysulfide signaling. **Antioxid. Redox Signal.** 27, 619-621, 2017. Doi: 10.1089/ars.2017.7076.

[学会発表] (計 52 件)

国際学会

- ① Kimura, H. Hydrogen sulfide: overview of its production and function. Experimental Biology (EB) 2014, San Diego, USA, April 30, 2014. 招待講演
- ② Kimura, H. Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfides. International Symposium on: Hydrogen Sulfide and Nitric Oxide in Health and Disease. Naples, Italy, May 16, 2014. 招待講演
- ③ Kimura, H. H₂S and beyond. Third International Conference on Hydrogen Sulfide in Biology and Medicine, Kyoto, Japan, June 4, 2014. 大会長
- ④ Kimura, H. Physiological roles of hydrogen sulfide and

- polysulfides. A joint Meeting of 8th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Application of Nitric Oxide and 6th International Meeting on the Role of Nitrite and Nitrate in Physiology, Pathophysiology, and Therapeutics. Cleveland, USA, June 16, 2014. 招待講演
- ⑤ Kimura, H. The pharmacology of H₂S. 17th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2014), Cape Town, South Africa, July 17, 2014. 招待講演
- ⑥ Kimura, H. Physiological roles of hydrogen sulfide and polysulfides. International Symposium. Gasotransmitters: Physiology and pathophysiology. Kazan, Russia, September 23, 2014. 招待講演
- ⑦ Norihiro Shibuya, Shin Koike, Makiko Tanaka, Mari Ishigami-Yuasa, Yuka Kimura, Yuki Ogasawara, Kiyoshi Fukui, Noriyuki Nagahara, Hideo Kimura: A novel pathway for the production of the hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. Third International Conference on Hydrogen Sulfide in Biology and Medicine, Kyoto Japan, 6.4, 2014.
- ⑧ Yuka Kimura, Yoshinori Mikami, Kimiko Osumi, Mamiko Tsugane, Jun-ichiro Oka, Hideo Kimura. Polysulfides are possible H₂S-derived signaling molecules in rat brain. Third International Conference on Hydrogen Sulfide in Biology and Medicine, Kyoto Japan, 6.4, 2014
- ⑨ Shin Koike, Yuki Ogasawara, Norihiro Shibuya, Kazuyuki Ishii, Hideo Kimura: Polysulfide exerts protective effect against cytotoxicity through Nrf2 signaling in neuronal cells. Third International Conference on Hydrogen Sulfide in Biology and Medicine, Kyoto Japan, 6.4, 2014
- ⑩ Yuki Ogasawara, Shin Koike, Norihiro Shibuya, Kazuyuki Ishii, Hideo Kimura: Bound sulfur exerts protective

effect against cytotoxicity through Nrf2 signaling in neuronal cells. Third International Conference on Hydrogen Sulfide in Biology and Medicine, Kyoto Japan, 6.4, 2014

- ⑪ Kimura, H. (Invited Speaker) Hydrogen sulfide and polysulfides as signaling molecules. 3rd European Conference on the Biology of Hydrogen Sulfide (H₂S2015). Athens, May 4, 2015.
- ⑫ Kimura, H. (Invited Speaker) The physiological roles of hydrogen sulfide and polysulfides. In Symposium: Sulfur Amino Acids and Hydrogen Sulfide Biology. 14th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins. Vienna, August 7th, 2015.
- ⑬ Kimura, H. A Symposium on Pharmacology of Gaseous Mediators. Pharmacological Society of Singapore and Department of Pharmacology Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Health System, Singapore. “The signaling molecules: hydrogen sulfide (H₂S) and hydrogen polysulfides (H₂S_n)” . **Plenary Lecture**, Singapore, April 18, 2016.
- ⑭ Kimura, H. (招待講演) Annual Meeting of the Society for Free Radical Research Europe. “Signaling molecules: hydrogen sulfide and polysulfides” Budapest, Hungary, June 9, 2016.
- ⑮ Kimura, H. (招待講演) 4th International Conference on Hydrogen Sulfide in Biology and Medicine. “Production and Functions of Hydrogen Sulfide and Hydrogen Polysulfides” Naples, Italy. June 4, 2016.
- ⑯ Kimura, H. (招待講演) 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. “Hydrogen sulfide (H₂S) and hydrogen polysulfides (H₂S_n) as signaling molecules” . Sendai, Japan, May 21, 2016.

国内学会 36 件。ページ制限から省略する。

〔図書〕 (計 1 件)

- ① Kimura, H. Physiological roles of hydrogen sulfide and polysulfides. In **Chemistry, Biochemistry and pharmacology of Hydrogen Sulfide**. Ed by Moore P.K. and Whiteman M. Pp 61-84, 2015, Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London. DOI 10.1007/978-3-319-18144-8_3.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.amed.go.jp/news/seika/jyusho/20160725.html>

<https://www.amed.go.jp/news/release/20170905-03.html>

<https://www.amed.go.jp/seika/jusyolist.html>

https://www.amed.go.jp/news/seika/2016_index.html

<https://www.ncnp.go.jp/press/release.html?no=342>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 英雄 (KIMURA Hideo)
国立精神・神経医療研究センター神経研究所・部長 (29 年より研究員)
研究者番号 : 30321889

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

花岡 健次郎 (HANAOKA Kenjiro)
東京大学・大学院薬学系研究科・准教授
研究者番号 : 70451854

(4) 研究協力者

()