



硫化水素アニオンによるレドックス恒常性制御とその臨床応用

1. はじめに

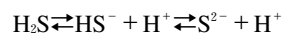
酸素毒の原因物質である活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) が、細胞の恒常性の維持に関わるシグナル仲介分子として働くことが次々と明らかにされてきている^{1,2)}。一方、ROS と生体内の脂質や核酸との反応から生成する親電子性をもった二次代謝物 (親電子物質) は、ROS とは異なるシグナル伝達様式を示す。すなわち、分子内に存在する ROS や親電子物質と反応しやすい、レドックス感受性の高いシステイン残基 (チオール基) をもつタンパク質 (センサータンパク質) に対し、親電子物質が求核置換あるいは Michael 付加によって反応 (*S*-アルキル化/*S*-アリル化) することで、センサータンパク質の構造や機能 (例えば酵素活性など) が変化し、それがシグナルとなって伝達される³⁾。このような ROS シグナルに関わる内因性の親電子物質として、ニトロ化環状スクレオチドである 8-ニトログアノシン 3',5'-環状一リン酸 (8-nitro-cGMP)、ニトロ化脂肪酸、プロスタグランジン J₂、ヒドロキシノネナールなどが報告されている^{1,3)}。好気性生物は ROS による酸化ストレスから身を守るために、様々な ROS 消去酵素システムや低分子の抗酸化物質を持っている。一方、ROS から生成する親電子物質によるシグナル活性や毒性に対しては、システイン含有ペプチドであるグルタチオンを除いてはこれまで明らかにされていない。

硫化水素 (H₂S) は火山から噴き出る卵の腐ったような臭いをもつ、生体にとって極めて有毒なガスとして知られている。その一方で、哺乳動物の脳内スルフィド量が報告され、H₂S 投与が血管拡張や長期記憶増強など様々な薬理作用を発揮することが示されたことから、H₂S が一酸化窒素 (NO) や一酸化炭素 (CO) に続く第3のガス状シグナ

ル分子として考えられるようになってきている⁴⁾。しかし、血中硫化物の濃度が約 100~300 μM 存在するにもかかわらず、血中 H₂S 濃度が 1 μM にも満たないことが最近明らかにされ⁵⁾、H₂S ガスが本当に主要なシグナル分子として働くのかどうか疑問視する声もある。我々は、H₂S から派生する硫化水素イオン (HS⁻) が内因性の親電子物質のスルヒドリル化 (SH 基付加) というユニークなメカニズムによってその代謝とシグナル活性を制御することを新たに見いだした⁶⁾。本稿では、HS⁻による慢性心不全抑制効果のメカニズムを化学の原理から読み解く。

2. HS⁻による親電子物質のスルヒドリル化と代謝

親電子物質が細胞内でどのように代謝されるのかを明らかにするために、RNAi を用いたスクリーニングアッセイを行った。特に、システイン代謝とレドックス関連代謝経路に焦点を当てた RNAi ライブラリーを用い、親電子物質として 8-nitro-cGMP の代謝を解析した。8-nitro-cGMP はタンパク質システインチオール基に求核置換反応し、cGMP 構造を付加する (*S*-グアニル化修飾)。システイン代謝酵素であるシスタチオニン β-シクターゼ (CBS) やシスタチオニン γ-リアーゼ (CSE) はともに H₂S 産生酵素である。これら酵素をノックダウンすると、A549 細胞、HepG2 細胞、C6 細胞などの培養細胞において、8-nitro-cGMP によるタンパク質 *S*-グアニル化が著しく増強した。H₂S は水溶液中で弱酸として働き、以下の平衡反応を示す。



の酸解離定数 (pK_a) は 37°C で 6.76 と低く、pH 7.4 の水溶液中では約 80% が HS⁻ として存在している。一方、HS⁻ ⇌ S²⁻ の pK_a は 11 以上と高いため、S²⁻ は生理的に存在しにくいと考えられる⁷⁾。より直接的に H₂S と 8-nitro-cGMP の反応を試験管内で検討したところ、H₂S そのものではなく、H₂S から派生した HS⁻ が 8-nitro-cGMP に求核的に反応して全く新規な化合物である 8-SH-cGMP を生成していることがわかった。この反応にはシステインと遷移金属が共存する必要があることから、金属錯体を形成するタンパク質群との相互作用の関与も示唆された。興味深いことに、8-SH-cGMP は過酸化水素などの ROS と反応し、SH 基が外れて cGMP へと変換することもわかった。以上から、8-nitro-cGMP は、細胞内に H₂S が生成すると、HS⁻ の作用によってスルヒドリル化されて 8-SH-cGMP を生成し、さらに ROS の作用によって cGMP へと代謝されることが示唆された。

HS⁻によるスルヒドリル化は 8-nitro-cGMP 以外の様々な親電子物質に対しても起こる。具体的には、内因性親電子物質であるプロスタグランジン J₂、ヒドロキシノネナール、ニトロ脂肪酸や、環境中・外因性の親電子物質であるアクロレイン、ナフトキノンなどが HS⁻と反応する。しかし、スルヒドリル化された親電子物質の分解・代謝経路は、親電子物質そのものの特性に大きく関わっていた。例えば、8-nitro-cGMP は比較的安定な SH 付加体である 8-SH-cGMP を生成するが、さらに ROS があると脱 SH 基反応というユニークな反応によって cGMP へと変換される。プロスタグランジン J₂ の場合、まず SH 化プロスタグランジンが生成されるが、共存する酸素によって SH 基が酸化され、硫酸化 (-SO₃H) プロスタグランジン J₂ が生成する。ニトロ脂肪酸やナフトキノン は SH 化された後、その SH 付加体に対してもう 1 分子の親電子物質が反応して、S 原子を架橋とする二量体を形成することが明らかになった (図 1)。

3. 生体 HS⁻量の新たな検出法の確立

血中 H₂S 濃度は、メチレンブルー分光光度法や S²⁻イオン選択的電極法を用いた間接的な測定結果から、100~300 μM 近く存在すると考えられていた。我々は、生体内

の HS⁻量を高感度かつ特異的に検出するため、親電子性の蛍光試薬であるモノプロモビマンを用いて、これと HS⁻との反応産物である S-ピマン二量体を液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法によって検出する新しい分析法を構築した。この分析法を用いて、種々の培養細胞から作られる HS⁻を定量した結果、A549 細胞、HepG2 細胞、C6 細胞などのがん細胞株では活発に HS⁻を産生しており、これらは CBS や CSE をノックダウンさせることで著しく減少することが確認できた。この方法の長所は、他の低分子チオール化合物 (グルタチオン、システイン、ホモシステイン) の定量も同時に行えることにある。例えば、CBS をノックダウンすると HS⁻量は著しく減少するが、グルタチオンやシステインの細胞内量は CBS ノックダウンの影響を受けない。一方、CBS の基質であるホモシステイン量は CBS ノックダウンによりわずかに増加する。こうした分析手法の構築により、CBS や CSE による親電子物質の代謝が、グルタチオンやシステインなどのチオール化合物ではなく、HS⁻によって制御されることが明らかにされてきた。

4. HS⁻の心筋保護作用のメカニズム

心筋梗塞後の慢性心不全は世界的にも主要な死因であ

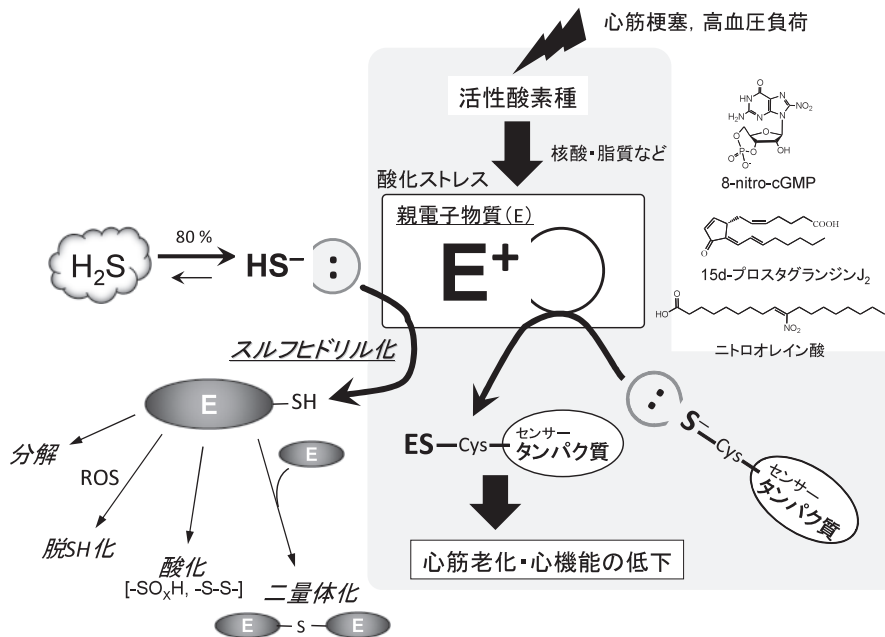


図 1 HS⁻による親電子物質 (E) のスルヒドリル化とその後の代謝経路
HS⁻は E と求核置換反応し、タンパク質の酸化的機能修飾を抑制することで心筋老化や心機能不全を抑制すると考えられる。

り、その病態メカニズムの理解と治療法の開発は重要である⁸⁾。心不全の進展において炎症反応に基づく酸化ストレスの関与が示唆されている。面白いことに、マウス心臓やラット初代培養心筋細胞における HS⁻ 生成量は、がん細胞と比べると極めて少ないことがわかった。これと相関して、心臓組織中では CBS および CSE がほとんど発現していなかった。すなわち、心臓組織は内因性に作られる HS⁻ が少ない分、親電子物質に対する応答性が高い臓器であると考えられる。実際、心筋梗塞および圧負荷による心不全モデルマウスを作製して酸化ストレスを誘発したところ、誘導型の NO 合成酵素の発現増加に伴って著しい 8-nitro-cGMP の蓄積が観察された。

慢性心不全の病態・成因には、心筋細胞の早期老化（細胞毒性により老化が短期間のうちに誘導される現象）が関与している。細胞老化を誘導する要因として、酸化・ニトロ化ストレス、ヌクレオチド損傷、がん遺伝子産物の活性化などがあげられる。ヒト心不全患者の心臓では、がん遺伝子産物である低分子量 GTP 結合タンパク質（G タンパク質）や酸化ヌクレオチド、ニトロチロシンなどの発現増加が報告されている。G タンパク質がレドックスセンサータンパク質として機能することは我々を含めた複数のグループが報告している^{9,10)}。ROS による G タンパク質の活性化については、G タンパク質に共通して保存されているヌクレオチド結合配列（NKCD）にあるシステイン（Cys118）のチオール基が酸化あるいは S-ニトロ化されることで GDP の解離が促進するという考えで説明されている⁹⁾。実際に、我々は心筋梗塞後のマウス心臓において H-Ras が強く活性化されていることを見いだした。しかしながら、H-Ras の S-ニトロ化や S-グルタチオン化の程度と H-Ras 活性化の程度はほとんど相関していなかった。そこで 8-nitro-cGMP が H-Ras を活性化するかどうかを検討した結果、心筋梗塞マウスの心臓組織において H-Ras が顕著に活性化されており、活性化 H-Ras タンパク質が S-グアニル化修飾されていた。ヒト組換え H-Ras タンパク質を用いた質量分析の結果、184 番目のシステイン残基（Cys184）が 8-nitro-cGMP によって特異的に S-グアニル化されていることが明らかとなった。さらに、心筋梗塞マウスに対して HS⁻ ドナーである硫化水素ナトリウム（NaHS）を冠動脈結紮 1 日後から持続投与することにより、心臓組織における 8-nitro-cGMP の蓄積、H-Ras の活性化、H-Ras の S-グアニル化はいずれも著明に減少し、これらに相関して心機能不全も有意に改善された。すなわち、心筋梗塞後の心臓組織において過剰に生成した ROS は、8-nitro-cGMP の生

成を介して H-Ras を活性化し、心筋細胞の早期老化を誘発すること、さらに HS⁻ は親電子物質をスルヒドリル化することで、H-Ras の親電子修飾を介した心筋老化を効率よく抑制していることが示唆された。

H-Ras の C 末端側には 181, 184, 186 の三つのシステイン残基があり、それらへの脂質修飾により細胞膜への局在が制御されている¹¹⁾。特に Cys184 は膜脂質ラフトへの移行による H-Ras・GDP の安定化にも関わっている。ラット成熟心臓の細胞膜成分を密度勾配によってラフトと非ラフトに分画し、ラフト画分に 8-nitro-cGMP を処置したところ、H-Ras の非ラフト画分への移行が観察された。さらに、移行した H-Ras の多くは S-グアニル化修飾を受け活性化されていた。一方、ラフト画分に残っている H-Ras は S-グアニル化されていなかった。活性化型 H-Ras は、そのエフェクター分子である Raf と結合する。GFP 融合 H-Ras タンパク質と DsRed 融合 cRaf を共発現したラット心線維芽細胞を 8-nitro-cGMP で処理したところ、細胞膜上に H-Ras と Raf が共局在することが明らかとなった。さらに Cys184 をセリンに置換した変異体を発現させた場合では、8-nitro-cGMP による Ras の細胞膜移行および Raf との共局在は全く見られなかった。以上の結果から、H-Ras の Cys184 が内因性の親電子物質の機能的なセンサーとして働くことで、H-Ras の細胞膜移行および脂質ラフトからの解離を促進し、下流のリン酸化シグナル伝達経路を活性化することが初めて示された。

5. H₂S/HS⁻によるタンパク質のスルフヒドリル化

H₂S/HS⁻もまた ROS や NO と同様に、タンパク質のシステインチオール基と反応し、タンパク質に機能修飾を与えることが報告されている⁵⁾。最近、H₂S/HS⁻が ATP 感受性 K チャネル（K_{ATP}）の開口活性化を介して血管を弛緩させる内皮細胞由来過分極因子（endothelium-derived hyperpolarizing factor : EDHF）であることが報告された¹²⁾。K_{ATP} は細胞内 ATP により負に制御される一方で、ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸（PIP₂）との結合により開口活性化されるチャネルである。Snyder のグループは、H₂S/HS⁻による K_{ATP} の Cys43 のスルフヒドリル化（-S-SH）が K_{ATP} の PIP₂ 結合親和性を増大させることを示している。しかし、求核性の高いシステインチオール基と HS⁻ が直接反応するとは考えにくく、スルフヒドリル化を起こすためには、Cys43 があらかじめ親電子修飾（酸化または S-ニトロ化）を受ける必要がある。したがって、H₂S/HS⁻による血管弛緩作用は ROS や NO 依存的に起こる応答かも

しれない。

6. おわりに

H₂Sの生理機能については、H₂Sガスそのものがシグナル伝達分子だと信じられ、薬理学的知見に基づいて議論されてきた。しかし、我々はHS⁻の化学特性(求核性)に着目することで、親電子物質のスルフィドリル化というユニークなレドックス制御機構を見いだした。今後は、H₂S/HS⁻そのものが生体内のレドックス恒常性を制御する分子実体かどうか解明することで、レドックスシグナルの統合的理解がいつそう進展すると期待される。また、ROSシグナルの異常による慢性心不全の予防、治療という観点からも、親電子物質のスルフィドリル化は興味深い。H₂Sそのものは毒性や安定性に問題があることから、今後はH₂Sと同様の求核性をもち、安全で取り扱いの容易な薬または機能性食品の開発が期待される。

謝辞

本研究は文部科学省科研費新学術領域研究「活性酸素シグナル伝達」の領域的連携により得られた成果であり、公私にわたって御指導・御支援を賜りました、熊本大学・赤池孝章教授、筑波大学・熊谷嘉人教授、東北大学・山本雅之教授、本橋ほづみ先生、名古屋大学・内田浩二教授、大阪府立大学理学部・居原秀先生ならびに各研究室の皆様へ深謝致します。

- 1) Sawa, T., Zaki, M.H., Okamoto, T., Akuta, T., Tokutomi, Y., Kim-Mitsuyama, S., Ihara, H., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Fujii, S., Arimoto, H., & Akaike, T. (2007) *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 727-735.
- 2) D'Autréaux, B. & Toledano, M.B. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 813-824.
- 3) Akaike, T., Fujii, S., Sawa, T., & Ihara, H. (2010) *Nitric Oxide*, **23**, 166-174.
- 4) Li, L., Rose, P., & Moore, P.K. (2011) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **51**, 169-187.
- 5) Paul, B.D. & Snyder, S.H. (2012) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 499-507.
- 6) Nishida, M., Sawa, T., Kitajima, N., Ono, K., Inoue, H., Ihara, H., Motohashi, H., Yamamoto, M., Suematsu, M., Kurose, H., van der Vliet, A., Freeman, B.A., Shibata, T., Uchida, K., Kumagai, Y., & Akaike, T. (2012) *Nat. Chem. Biol.*, **8**, 714-724.
- 7) Dombkowski, R.A., Russell, M.J., & Olson K.R. (2004) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **286**, R678-R685.
- 8) Shih, H., Lee, B., Lee R.J., & Boyle, A.J. (2011) *J. Am. Coll. Cardiol.*, **57**, 9-17.
- 9) Nishida, M., Maruyama, Y., Tanaka, R., Kontani, K., Nagao,

- T., & Kurose, H. (2000) *Nature*, **408**, 492-495.
- 10) Lander, H.M., Milbank, A.J., Tauras, J.M., Hajjar, D.P., Hempstead, B.L., Schwartz, G.D., Kraemer, R.T., Mirza, U.A., Chait, B.T., Burk, S.C., & Quilliam, L.A. (1996) *Nature*, **381**, 380-381.
- 11) Hancock, J.F. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 373-384.
- 12) Mustafa, A.K., Sikka, G., Gazi, S.K., Steppan, J., Jung, S.M., Bhunia, A.K., Barodka, V.M., Gazi, F.K., Barrow, R.K., Wang, R., Amzel, L.M., Berkowitz, D.E., & Snyder, S.H. (2011) *Circ. Res.*, **109**, 1259-1268.

西田 基宏^{1,2,3}, 澤 智裕^{4,5}

(¹自然科学研究機構

岡崎統合バイオサイエンスセンター(生理学研究所)

心循環シグナル研究部門

²九州大学大学院薬学研究院創薬産学官連携講座

³JST さきがけ「疾患代謝」

⁴東北大学大学院医学系研究科環境保健医学分野

⁵JST さきがけ「炎症の慢性化機構の解明と制御」)

Regulation of redox homeostasis by hydrogen sulfide anion and its clinical application

Motohiro Nishida^{1,2} and Tomohiro Sawa^{3,4} (¹Division of Cardiocirculatory Signaling, National Institute of Physiological Sciences, ²Department of Biodesign Research, Okazaki Institute for Integrative Biosciences, National Institutes of Natural Sciences, 5-1 Higashiyama, Myodaijichou, Okazaki 444-8787, Aichi; ³Department of Environmental Health Sciences and Molecular Toxicology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai 980-8575, Japan, ⁴PRESTO, Japan Science and Technology Agency (JST), Saitama 332-0012, Japan)

活動電位依存性の髄鞘化制御機構

1. はじめに

髄鞘は軸索周囲を何層にもシート状に巻くことにより、跳躍伝導によって50倍まで神経伝道速度を速めることが知られている。髄鞘化によって神経伝導速度が調節されることにより神経回路における情報処理を効率よく行うことができ、また神経回路の情報処理のパターンを変化させることができると考えられる。このように神経回路における情報処理が髄鞘化によって効率化されるためには個々の軸索が神経活動のフィードバックを受けて、適切に髄鞘化される必要がある。このため軸索における神経活動の情報が