

脳内硫化水素産生系とその代謝産物の機能に関する研究

Studies of a Novel Pathway of Hydrogen Sulfide Generation  
and Physiological Function of Polysulfide

平成 23 年度入学 小池 伸 (Koike, Shin)

指導教員 石井 一行

背景

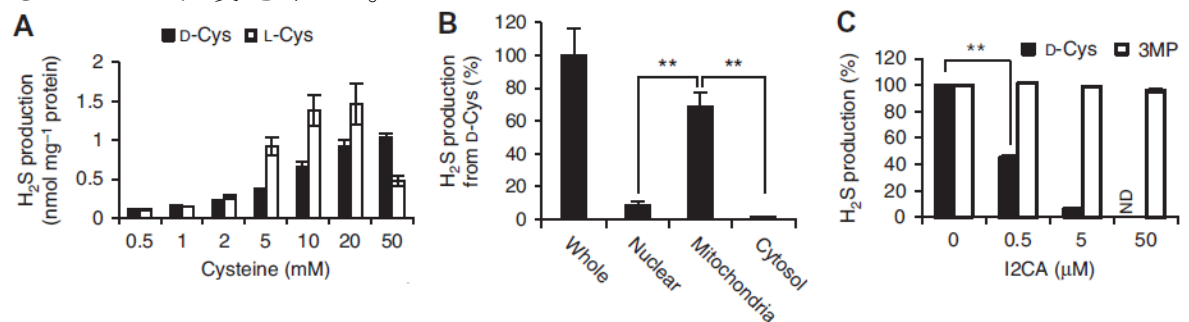
近年、微量ながら硫化水素が生体内で合成され、様々な臓器において多様な生理作用を有することが示され、注目を集めている。硫化水素は哺乳動物において L-cysteine (L-Cys) が cystathionine  $\gamma$ -lyase、cystathionine  $\beta$ -synthase、3-mercaptopyruvate sulfurtransferase と cysteine aminotransferase (3MST/CAT) によって代謝され産生されると考えられてきた。産生された硫化水素は、Bound Sulfur として細胞内に貯蔵されることが分かっているが、その生理的役割については、未だ不明な点も多い。

一方、哺乳動物の生体内には D-アミノ酸は常在せず、生体成分は全て L-アミノ酸から構成されていると考えられてきた。しかし、最近では分析技術の向上とともに、体内に D-アミノ酸が存在することが明らかになってきている。これまでに、D-cysteine (D-Cys) を基質とした硫化水素及び Bound Sulfur 産生系の存在は知られていないが、筆者らは、D-Cys をマウス脳ホモジネートに添加すると硫化水素が産生されることを発見した。第一部では、硫化水素及

び Bound Sulfur の D-Cys からの生合成経路の解明を試みた。第二部では、Bound Sulfur の生理機能を解明する目的で、その酸化ストレス障害に対する細胞保護効果に着目し、典型的な Bound Sulfur 種である Polysulfide(sodium tetrasulfide:Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>)を用い、細胞内抗酸化機構を統括的に制御する Keap1-Nrf2 系に与える Polysulfide の影響に注目して検討を行った。

### 第 1 部 1-1. D-Cys を基質とした硫化水素産生経路の解析 1)

マウス脳ホモジネートに L-Cys を添加すると硫化水素の産生が認められる。この時、偶発的に用いた D-Cys 添加によっても濃度依存的に硫化水素の産生が起こる事を見出した(Fig.1A)。この産生能はミトコンドリア画分で顕著に高い事が分かった(Fig.1B)。哺乳動物において D-Cys から硫化水素が産生されるという報告はなく、この硫化水素産生経路の存在と意義に注目した。D-amino acid oxidase (DAO)特異的阻害剤である、indole-2-carboxylic acid (I2CA)前処理によって濃度依存的にマウス脳ミトコンドリア画分における D-Cys からの硫化水素産生が抑制された(Fig.1C)。この結果から、D-Cys からの硫化水素の産生には DAO が関与していることが示唆された。

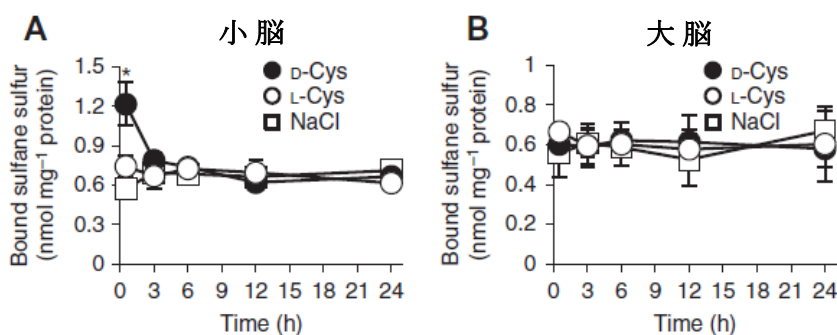


**Fig.1** D-Cys を基質としたマウス脳ホモジネートにおける硫化水素の産生

(A) D-Cys または L-Cys を添加したマウス脳ホモジネートにおける硫化水素産生量を測定した。  
 (B) D-Cys を添加したときのマウス脳の各画分における硫化水素産生量を測定した。Whole brain の硫化水素産生量を 100% として表した。\**P* < 0.01 (C) ミトコンドリア画分における DAO 阻害剤の硫化水素産生能に対する影響を検討した。ミトコンドリア画分に DAO 阻害剤処理後、D-Cys または 3 mercaptopyruvate(3MP) を添加し硫化水素産生量を測定した。  
 \*\**P* < 0.01 means ± SE, (n=3)

## 1-2. D-Cys 経口投与による脳内 Bound Sulfur レベルの変動

ヒトは D-Cys を主に食品から摂取すると考えられている。そこで、マウスに D-Cys を経口投与した際の脳内 Bound Sulfur レベルの変化を調べたところ、DAO が存在する小脳においては、経口投与 30 分後に、Bound Sulfur レベルの顕著な増加が見出されたが、投与 3 時間後には Bound Sulfur は定常レベルにまで減少した (Fig.2A)。また、DAO が存在しない大脳では Bound Sulfur レベルに変動は観られなかった (Fig.2B)。一方、大脳、小脳いずれにおいても L-Cys の経口投与群では Bound Sulfur レベルに変化は観られなかった (Fig.2A,B)。この結果から、経口摂取した D-Cys は L-Cys よりも効率的に脳に到達し、DAO が発現している小脳において速やかに Bound Sulfur に代謝されると共に、その後更に代謝され、恒常性を保つことが示唆された。



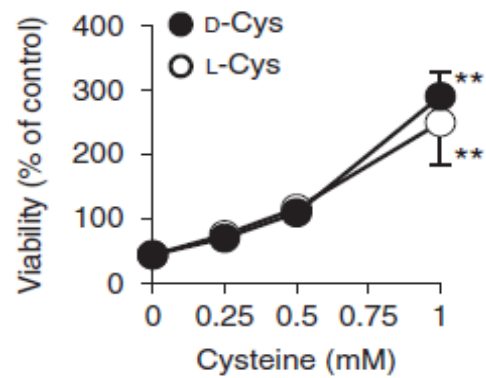
**Fig.2** D-Cys マウス経口投与による脳内 Bound Sulfur レベルの変化

8 mmol/kg body weight D-Cys または L-Cys をマウスに経口投与後、各時間後における (A)小脳、(B)大脳中の Bound Sulfur レベルを測定した。\*  $P < 0.05$  means  $\pm$  SE, (n=3)

## 1-3. D-Cys の酸化ストレス障害に対する細胞保護効果

硫化水素には酸化ストレス障害に対する神経保護効果があることが報告されている。我々は、Bound Sulfur に酸化ストレスに対する神経保護効果があるかどうかを評価するため、マウス小脳初代培養神経細胞に過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) を添加して、酸化ストレス障害を誘導し、それに対する D-Cys 前処理による細胞保護効果につ

いて検討した。Fig.3 に示すように小脳初代培養神経細胞に 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  を処理すると 21 時間後には約 40%まで生存率が低下したが、D-Cys または L-Cys を添加すると、cysteine 濃度依存的に小脳初代培養神経細胞の生存率が上昇した。この結果から、D-Cys、L-Cys 共に、酸化ストレス障害か



**Fig.3** D-Cys の酸化ストレス障害に対する小脳神経細胞保護効果の検討

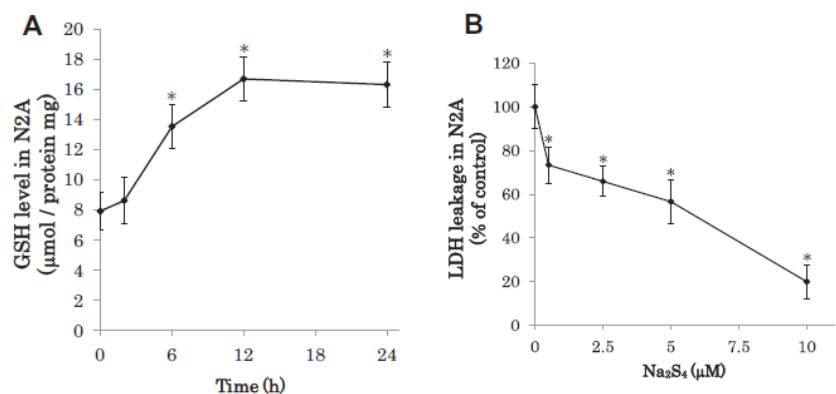
マウス小脳初代培養神経細胞に 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  を D-Cys または L-Cys 各濃度前処理したときの、細胞生存率を測定した。  
\*\*  $P < 0.01$ . means  $\pm$  SE, (n=3)

ら小脳初代培養神経細胞を保護する効果があることが分かり、Bound Sulfur がその保護作用に関与する可能性が考えられた。

## 第 2 部 2-1. Bound Sulfur の細胞内グルタチオン(GSH)レベルに与える影響と、その細胞保護効果 2)

硫化水素の貯蔵体である Bound Sulfur の細胞内 GSH レベルに与える影響をマウス脳由来樹立神経細胞株 Neuro 2A(N2A)細胞を用いて検討した

ところ、N2A 細胞に 25  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{S}_4$  を前処理した後、6 時間後において細胞内 GSH レベルの有意な上昇が観られた (Fig.4A)。この有意



**Fig.4**  $\text{Na}_2\text{S}_4$  処理による N2A 細胞内 GSH レベルの変動と細胞保護効果の解析

(A)25  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{S}_4$  処理時の細胞質内 GSH レベルの時間的推移。  
(B)各濃度の  $\text{Na}_2\text{S}_4$  を N2A 細胞に 2 時間前処理後、100  $\mu\text{M}$  *t*-BHP を N2A 細胞に 6 時間処理した。その培養上清を用いて LDH assay による細胞障害評価を行った。 means  $\pm$  SD, \*  $P < 0.05$  (n=3)

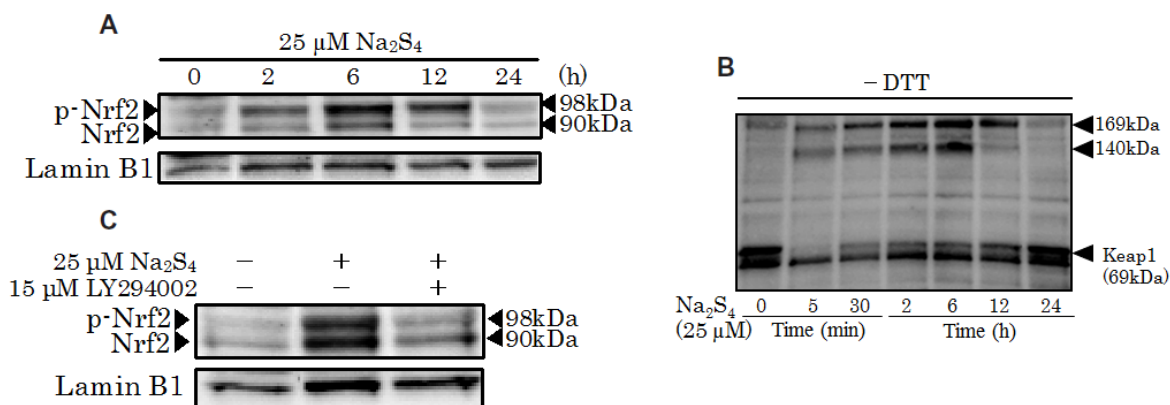
な増加を踏まえて、Bound Sulfur の *tert*-butylhydroperoxide(*t*-

BHP)由来の酸化ストレス障害に対する細胞保護効果を評価した。100  $\mu$ M *t*-BHPを曝露する2時間前にNa<sub>2</sub>S<sub>4</sub>を前処理した細胞は、その細胞障害性がNa<sub>2</sub>S<sub>4</sub>未処理の細胞に比べてNa<sub>2</sub>S<sub>4</sub>濃度依存的に軽減され(Fig.4B)、Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>が酸化ストレスに対する細胞保護効果を示すことが明らかとなった。

## 2-2. Bound SulfurのKeap1-Nrf2系に与える影響

細胞内GSHレベルはKeap1-Nrf2系によって緻密に制御されている。そこでBound SulfurのKeap1-Nrf2系に対する影響について調べた。25  $\mu$ M Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>処理によってN2A細胞の核内Nrf2の蓄積量の増大が、処理後6時間をピークとして確認された(Fig.5A)。通常の状態では、Nrf2は細胞質内でKeap1によってユビキチン化されプロテアソームによって分解されている。そこで、Bound SulfurのKeap1に与える影響について検討した。非還元条件下で行ったウェスタンブロッティングの結果、Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>処理によって139 kDaと160 kDaの二つのバンドが出現し、約69 kDaのバンドが消失した(Fig.5B)。Keap1の分子量は69 kDaであることから、Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>処理によってKeap1の立体構造変化が誘導され、Keap1のダイマー体が形成される事が示唆された。この結果から、Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>はKeap1の立体構造変化をトリガーとしてNrf2の核内移行を促進させるものと考えられる。また、Nrf2は細胞質内でリン酸化されることによって核内に安定的に移行すると考えられていることから、Bound SulfurがPI3K/AKT経路に及ぼす影響について検討したところ、PI3K阻害剤であるLY294002の前処理によってNa<sub>2</sub>S<sub>4</sub>によるNrf2の核内移行が有意に抑制された(Fig.5C)。これは、PI3K/AKT経路によるNrf2のリン酸化がNa<sub>2</sub>S<sub>4</sub>によるNrf2の核内促進作用に関与

していることを強く示唆するものである。



**Fig.5**  $\text{Na}_2\text{S}_4$  処理による Keap1-Nrf2 系に対する影響

(A)25  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{S}_4$  処理した N2A 細胞の核画分における各処理時間での Nrf2 のウェスタンブロットリング法による検出を行った。(B)25  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{S}_4$  処理した N2A 細胞の全抽出物における各処理時間での非還元条件下でのウェスタンブロットリング法による Keap1 の検出を行った。(C)15  $\mu\text{M}$  LY294002 を 30 分間前処理または未処理後、25  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{S}_4$  を 6 時間処理した N2A 細胞の核画分における Nrf2 のウェスタンブロットリング法による検出を行った。

## まとめ

本研究により、従来 L-Cys からのみ産生されると考えられてきた硫化水素あるいは Bound Sulfur が、D-Cys から DAO/3MST 経路依存的に産生されることが初めて明らかになった。今後、摂取または投与した場合に、D-Cys は L-Cys よりも毒性は少ないことから、D-Cys の臨床的な応用も期待される。また、本研究の結果から、Bound Sulfur は Keap1 の立体構造変化と、PI3K/AKT 経路の活性化という二つの作用によって Nrf2 の核内移行を促進し、酸化ストレス障害に対する細胞保護効果を発揮することが明らかとなった。この事により、これまで硫化水素のみを反応種と想定した様々な生理作用の中で、Bound Sulfur が関与する可能性を示していくことが更に重要になる事が予想される。

## 参考文献

- 1) Shibuya N., Koike S., Tanaka M., Ishigami-Yuasa M., Kimura Y., Ogasawara Y., Fukui K., Nagahara N., Kimura H., *Nature communications.*, **4**, 1366 (2013).
- 2) Koike S., Ogasawara Y., Shibuya N., Kimura H., Ishii K., *FEBS letters.*, **587**, 3548-3555 (2013).