

## 論文審査の結果の要旨

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

論文提出者 小池 伸 (Koike, Shin)

硫化水素は、微量ながら生体内で合成され、多様な生理作用を有することで注目を集めている。硫化水素は哺乳動物において L-cysteine(L-Cys)が代謝されて産生されると考えられており、哺乳動物において D-cysteine(D-Cys)を基質とした硫化水素/Bound Sulfur 産生系の存在は知られていない。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不明な点も多い。第1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2部では、Bound Sulfur の生理機能を解明する目的で、その細胞保護効果に着目して、典型的な Bound Sulfur 種である Polysulfide (sodium tetrasulfide:Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>) を用い、種々の検討を行った。

第1部 1-1. D-Cys を基質とした硫化水素産生経路の解析 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が、D-Cys 添加によっても硫化水素が産生することを見出した。この硫化水素産生は D-amino acid oxidase (DAO)特異的阻害剤である indole-2-carboxylic acid

前処理によって抑制され、D-Cys からの硫化水素産生には DAO が関与していることが示唆された。また、マウスに D-Cys を経口投与すると、DAO が存在する小脳において、投与 30 分後に、Bound Sulfur レベルの顕著な増加が確認されたが、DAO が存在しない大脳では Bound Sulfur レベルに変動はなかった。一方、大脳、小脳において L-Cys 投与群では Bound Sulfur レベルに変化はなく、経口摂取した D-Cys は L-Cys よりも効率的に脳に到達し、小脳において速やかに Bound Sulfur に代謝されることが示唆された。

1-2. D-Cys の酸化ストレス障害に対する細胞保護効果 Bound Sulfur の酸化ストレスに対する神経保護効果を評価するため、過酸化水素によって酸化ストレス障害を誘導したマウス小脳初代培養神経細胞に D-Cys を処理した。その結果、D-Cys 処理により、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とより、酸化ストレス障害が軽減されることが分かり、Bound Sulfur がその保護作用に関与する可能性が示唆された。

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 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)細胞を用いて検討を行った。その結果、Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub> 処理により、細胞内 GSH レベルの有意な上昇を確認した。また、Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub> 前処理により *tert*-butylhydroperoxide 由来の N2A に対する細胞障害性が軽減されたことにより、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分かった。

2-2. Bound Sulfur の Keap1-Nrf2 系に与える影響 Keap1-Nrf2 系は細胞内 GSH レベルを制御する。そこで Bound Sulfur の Keap1-Nrf2 系に対する影響について検討した。その結果、Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub> 処理によって N2A 細胞の核内に Nrf2 の蓄積が確認された。次に、Nrf2 の負の制御因子である Keap1

に対する **Bound Sulfur** の影響を検討したところ、 $\text{Na}_2\text{S}_4$  処理によって **Keap1** のダイマー体が形成される事が示唆された。また、**PI3K** 阻害剤前処理によって  $\text{Na}_2\text{S}_4$  による **Nrf2** の核内移行が有意に抑制され、**PI3K/AKT** 経路の活性化が  $\text{Na}_2\text{S}_4$  による **Nrf2** の核内移行促進作用に関与していることが示唆された。

平成 26 年 3 月 1 日

主査 明治薬科大学 教授

石井 一行

副査 明治薬科大学 教授

兔川 忠靖

副査 明治薬科大学 教授

本島 清人