

2017年9月5日

国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター (NCNP)

Tel : 042-341-2711 (総務部 広報係)

酸化還元制御因子システインパーサルファイド及び グルタチオンパーサルファイド生合成経路の解明 —精神・神経疾患治療等応用に期待—

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター (NCNP、東京都小平市 理事長：水澤英洋) 神経研究所 (所長：武田伸一) の木村英雄らのグループは、明治薬科大学教授小笠原裕樹、ルイジアナ州立大学教授 David Lefer との共同研究により、新規酸化還元制御因子システインパーサルファイド (Cys-SSH) とグルタチオンパーサルファイド (GSSH) が、3-メルカプトピルビン酸転移酵素 (3MST) によって生合成されることを明らかにしました。これまで、細胞内還元環境恒常性を担う分子はシステイン (Cys-SH) やグルタチオン (GSH) と考えられていました。最近では、これら分子にさらにS原子が付加(過酸化)された Cys-SSH や GSSH がより強力な還元作用を持つことから、これら過酸化体が還元環境恒常性を担っていると考えられるようになってきました。しかし、その生合成酵素については不明でした。本研究において、硫化水素 (H_2S) やその過酸化体であるポリサルファイド (H_2S_2 , H_2S_3) を生合成する 3MST が、Cys-SSH や GSSH、さらには、タンパクの過酸化 (R-SSH) も行うことが明らかとなりました。

シグナル分子 H_2S の過酸化体 H_2S_2 、 H_2S_3 がシグナル分子に加わり、近年、過酸化物の生理的役割が注目されています。必須アミノ酸 Cys-SH や生体内抗酸化物質 GSH、そしてタンパク質も例外ではありません。最初に提案されたのは GSH でした。呼吸における電子伝達系に不可欠な因子チトクロム c は、電子の授受によって還元型と酸化型を行き来します。その酸化型を還元するのは GSH と考えられていました。ところが、GSSH や Cys-SSH がより効率よく還元することがわかったのです。その生合成については、2つの経路が提案されましたが、いずれも生理的に機能することが困難であると指摘され、生合成経路の同定が待たれていました。

過酸化によって活性が制御されているタンパクの例として、パーキンソン病の原因タンパク、パーキンが挙げられます。過酸化によって活性が上昇し、神経細胞を保護します。健常人脳では、パーキンは過酸化されており、患者脳では過酸化が減少していることが報告されています。

3MST 欠損はヒトでは精神遅滞が起こり、動物モデルではセロトニン系神経異常と不安症状が認められています。また、3MST は tRNA 合成に関わっていることが報告されています。

今後、抗不安薬・抗精神薬、パーキンソン病などの神経疾患への応用も期待されます。

本研究成果は、日本時間 2017 年 9 月 5 日午後 6 時（報道解禁日時：イギリス時間 9 月 5 日午前 10 時）に、Nature Publishing の英国オンライン科学雑誌「Scientific Reports（サイエンティフィック・リポーツ誌）」に掲載されました。

■硫化水素（H₂S）の研究経緯について

木村英雄らは、これまでに体内で生成される硫化水素 H₂S が神経伝達調節因子として機能していることを 1996 年に世界で初めて報告し、その後、硫化水素が血管弛緩を誘導すること及び神経細胞を酸化ストレスから保護する機能を発見、続いて、脳と腎臓内で H₂S が効率よく生合成される経路を発見、硫化水素が結合したポリサルファイド（H₂S_n）が脳内のシナプスによる神経伝達を活性化させる仕組みを発見、硫化水素からも生成される生理活性物質のトリサルファイド（H₂S₃）が主なポリサルファイドであること、H₂S と NO から H₂S_n ができ、これが H₂S と NO との相乗効果の実態であることを発見するなど、生合成経路や仕組みを次々と明らかにしてきています。

■研究の背景

本研究グループは、H₂S よりも S 数の多い H₂S_n が TRP チャネルを活性化する新規シグナル分子であることを 2006 年に発見し、2015 年にその生合成酵素が 3MST であることを報告しました（*1、2、3、4）。3MST は、本研究グループが H₂S 合成酵素として 2009 年に発表したもので、このとき細胞内の過硫化分子レベルが高くなることも報告していました（*5）。

1971 年に Massay らは、強力な還元力を示す Cys-SSH、GSSH が、これまで Cys-SH や GSH が担っていると考えられていた細胞内酸化還元反応を行う分子実態である可能性を指摘していました（*6）。その生合成については、1960 年に Cavallini らが、現在では H₂S 合成酵素の 1 つとして知られている cystathionine γ -lyase (CSE) がシスチンを基質として Cys-SSH を合成することを報告していました（*7）。その後、Ida らは、もう 1 つの H₂S 合成酵素 cystathionine β -synthase (CBS) もシスチンを基質として Cys-SSH を合成することを 2014 年に報告しました（*8）。しかし、CSE も CBS も共に細胞質に局在する酵素であり、細胞質にシスチンは存在せず、システインとして存在することから、CSE と CBS が Cys-SSH を合成するとは考えにくいと Banerjee らが反論し（*9）、生合成酵素の同定が待たれていました。

*1（引用元）Nagai, Y., Tsugane, M., Oka, J.-I., Kimura, H. Polysulfides induce calcium waves in rat hippocampal astrocytes. *J Pharmacol Sci* **100**, 200 (2006).

*2（引用元）Oosumi, K., Tsugane, M., Ishigami, M., Nagai, Y., Iwai, T., Oka, J.-I., Kimura, H. Polysulfide activates TRP channels and increases intracellular Ca²⁺ in astrocytes. *Neurosci Res* **68**, e109-e222 (2010).

*3（引用元）Kimura, Y., Mikami, YI, Osumi, K., Tsugane, M., Oka, J.-I., Kimura, H. Polysulfides are possible H₂S-derived signaling molecules in rat brain. *FASEB J* **27**, 2451-2457 (2013).

*4 (引用元) 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).

*5 (引用元) Shibuya, N., Tanaka, M., Yoshida, M., Ogasawara, Y., Togawa, T., Ishii, K., Kimura, H. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxid Redox Signal* **11**, 703-714 (2009).

*6 (引用元) Massey V, Williams CH, Palmer G. The presence of S₀-containing impurities in commercial samples of oxidized glutathione and their catalytic effect in the reduction of cytochrome c. *Biochem Biophys Res Commun* **42**, 730-738 (1971).

*7 (引用元) Cavallini, D., Marco, C.D., Mondavi, B., Mori, B.G. The cleavage of cystine by cystathionase and the transulfuration of hypotaurine. *Enzymologia* **22**, 161-173 (1960).

*8 (引用元) Ida T, Sawa T, Ihara H, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Kumagai Y, Suematsu M, Motohashi H, Fujii S, Matsunaga T, Yamamoto M, Ono K, Davarie-Baez NO, Xian M, Fukuto JM, Akaike T. Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 7606-7611 (2014).

*9 (引用元) Yadav, P.K., Martinov, M., Vitvitsky, V., Seravalli, J., Wedmann, R., Filipovic, M.R., Banerjee, R. Biosynthesis and reactivity of cysteine persulfides in signaling. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 289-299 (2016).

■研究内容

本研究では、3MST がシグナル分子 H₂S, H₂S₂, H₂S₃に加えて、細胞内還元状態恒常性を担う過酸化分子を合成することが細胞及び生体レベルで明らかになりました。3MSTがH₂S_nを合成し、Cys-SH や GSH をより反応性に富む Cys-SSH や GSSH に転換します。細胞や単離した酵素を使って、生理的条件下では H₂S₂, H₂S₃,に加えて Cys-SSH と GSSH ができることを示し、さらに、生体においてこれを確認しました。これらの結果は、3MST 欠損動物を使い、質量分析計 (LC-MS/MS) で分析することにより実現できました。

■今後の展望

過酸化に関わる生理・病態生理的所見として、1. パーキンソン病患者脳では過酸化分子の減少が認められ、2. 神経伝達が過酸化分子によって制御されていること、3. 過酸化分子が神経細胞を酸化ストレスから保護すること、4. 過酸化分子を生合成する酵素 3MST の欠損によって不安症状や精神遅滞を呈することが挙げられます。また、過酸化分子は、精神・神経における働きに留まらず、がん増殖因子の制御、血管弛緩作用による血圧制御にも関与しています。さらに、3MST は、過酸化による tRNA 合成制御を介して、タンパク合成に関わっています。この酵素の活性を制御または補完することにより、様々な疾患の治療につながることを期待されます。

■用語解説

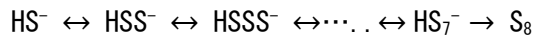
・システインパーサルファイド、グルタチオンパーサルファイド

システイン、グルタチオンのチオール（-SH）が過酸化され（-SSH）となっている化合物。それぞれシステイン、グルタチオンよりも還元力が強く、生体中では、これら過酸化体が酸化還元反応に関わっている分子実態である可能性が示唆されている。

・ポリサルファイド（ H_2S_n ）：

H_2S よりも S の数が多い化合物。常温では H_2S のようなガスとしては存在しない。ポリサルファイドが脳内でも微量に生成されていることが分かっている。ポリサルファイドは H_2S が酸素によって酸化されても生成される（ $2nH_2S + 1/2(2n-1)O_2 \rightarrow H_2S_{2n} + (2n-1)H_2O$ ）。この経路も 3MST によって触媒される。また、ニューロンを取り囲むアストロサイトのカルシウムイオンチャネルを活性化して、カルシウム流入を促進させ、神経伝達物質を生成することで神経伝達活性化を調整している。

アストロサイトを活性化するポリサルファイドは S が 2 個から 7 個まで直鎖状に繋がったもの。この状態で水溶性であるが、8 個つなぐと環状になり不溶性になり機能しないと考えられる。



・Nrf2: 転写因子。Keap1 と複合体を形成し細胞質に存在するが、刺激により、Keap1 から離れて核内に移行し、抗酸化遺伝子群の転写亢進を誘導する。

・TRPA1 チャンネル： Ca^{2+} 透過性チャンネルで、疼痛などに関わる。

・PTEN: 癌抑制因子。

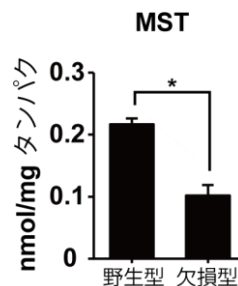
・3MST:細胞質およびミトコンドリアに存在し、3MP を基質として H_2S や H_2S_n を合成する酵素。

tRNA 合成にも関与している。

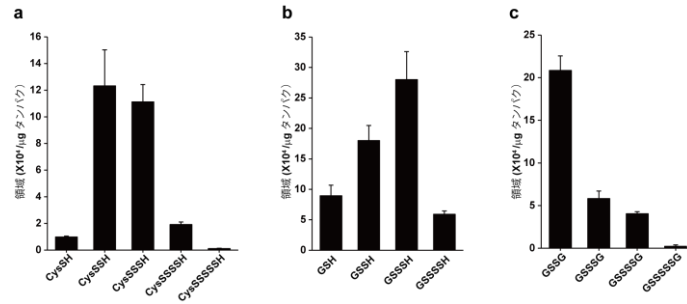
■挿入図と解説

(図1) 脳内過酸化分子の 3MST 欠損マウスと野生型マウスとの比較

3MST 欠損マウス脳内 Cys-SSH, GSSH, R-SSH, H_2S_n レベルは、野生型マウス脳に比較して、顕著に低い。

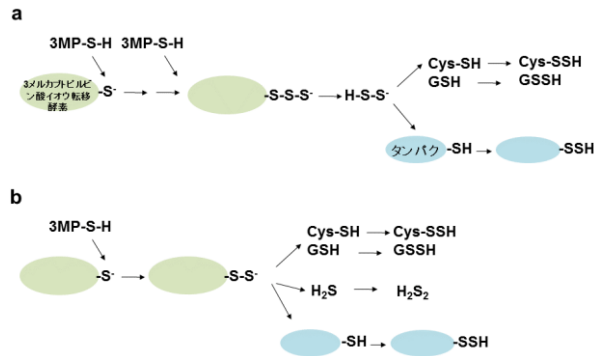


(図2) 3MST を発現した COS 細胞ライセートに基質 3MP を投与して生産される過酸化分子



(図3) 3MST による Cys-SSH, GSSH, R-SSH, H₂S_n 生合成経路。

生合成メカニズムとして、3MST が基質 3メルカプトピルビン酸 (3MP) から H₂S₂ や H₂S₃ を生合成し、それが Cys-SH, GSH, R-SH と反応し、Cys-SSH, GSSH, R-SSH ができる。3MST が 3MP から直接 H₂S₂, H₂S₃, Cys-SSH, GSSH, R-SSH を合成するというメカニズムと、この両者を混合したメカニズムも考えられる。



■原論文情報

論文名 : 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces potential redox regulators cysteine- and glutathione-persulfide (Cys-SSH and GSSH) together with signaling molecules H₂S₂, H₂S₃ and H₂S.

著者 : Yuka Kimura, Shin Koike, Norihiro Shibuya, David Lefer, Yuki Ogasawara, Hideo Kimura.

掲載誌 : Scientific Reports

DOI : 10.1038/s41598-017-11004-7

URL : www.nature.com/articles/s41598-017-11004-7

■助成金

本研究は、木村英雄 : JPSP 科研費 (26460115, 17K08331)、AMED(脳プロ)、上原記念生命科学財団助成金、渋谷典広 : JPSP 科研費 (16K15123)、木村由佳 : JPSP 科研費 (26460352, 17k08613) の助成を受けて行われました。

■お問い合わせ先：

【研究に関するお問い合わせ】

木村英雄（きむら ひでお）

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

〒187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1

TEL： 042-341-2711（代表）

E-mail： kimura@ncnp.go.jp

【報道に関するお問い合わせ】

国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター

総務課 広報係

〒187-8551 東京都小平市小川東町 4-1-1

TEL： 042-341-2711（代表） Fax： 042-344-6745

【AMED 事業に関するお問い合わせ】

国立研究開発法人 日本医療研究開発機構（AMED）

戦略推進部 脳と心の研究課

TEL： 03-6870-2222 Fax： 03-6870-2244