

87. 活性硫黄の求核性を利用した心不全治療戦略の構築

西田 基宏

Key words : 心不全, レドックス, 活性硫黄, 心循環

*自然科学研究機構 生理学研究所
統合バイオサイエンスセンター
時空間設計研究領域

緒言

硫化水素 (H_2S) は猛毒ガスとして知られている一方で、ヒトの身体の中でも酵素的に生成され、血管拡張など様々な薬理作用を引き起こす生理活性物質として働く可能性も示されている。 H_2S は一酸化窒素 (NO) などのガスと同様に化学的反応性が高いことから、特定のタンパク質システインチオール基と共有結合し、タンパク質に機能修飾を与えると考えられてきた。しかし、NO が電子を受け取りやすい「親電子性」を持つのに対し、 H_2S は生理的条件下 (pH 7.4 の溶液中) において約 80% が「求核性」の高いイオン (HS^-) になることから、両者が化学的に同じ振る舞いとは考えにくい。このような観点から、我々は NO 由来の内因性親電子物質 (8-nitro-cGMP) が心筋梗塞後の心臓に蓄積し、これが低分子量 G タンパク質 H-Ras に機能修飾 (S-グアニル化) を与え心筋早期老化を誘導する原因となること、 $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$ が心筋の求核性を高めることで 8-nitro-cGMP を消去することを明らかにしたり、しかしその後の解析により、 $\text{H}_2\text{S}/\text{HS}^-$ が酸化ストレスの原因である親電子物質を消去する実体ではなく、求核性の高い活性硫黄種を生成するため基質としての役割しかもたない可能性も明らかになってきた。我々は、毒性の低い求核物質として含硫食品に着目し、ポリ硫黄を豊富に含んだ食餌をマウスに与えることで心筋梗塞後の突然死リスクならびに慢性心不全を著しく軽減することに成功した。さらに、活性硫黄の実体がタンパク質のポリ硫黄鎖である可能性も示されてきた²⁾。以上の知見は、心臓への活性硫黄の蓄積が慢性心不全治療の新たな戦略となることを強く期待させるものである。

方法

ポリ硫黄量の測定は、Chen ら³⁾ の sulfane sulfur を特異的に検出できる試薬 (SSP2) ヒト組み換え精製 H-Ras タンパク質に反応させることで評価した。H-Ras の S-グアニル化修飾は、H-Ras タンパク質に 8-nitro-cGMP を処置した後、S-グアニル化抗体を用いたウェスタンブロット法により評価した。また、H-Ras が脂質ラフトから解離する機構を明らかにするため、高速原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて H-Ras の C 末端に His タグをつけ、そこに Ni^{2+} -NTA を付加することでマイカ基板から金コロイドまでの距離の変化を記録した。さらに、N 端側に His タグを付けた精製 H-Ras タンパク質に 8-nitro-cGMP を処置し、ニッケルカラムに吸着させた後、心臓ホモジネートを濾過することで酸化 HRas と特異的に結合するエフェクター分子の探索を行った。心臓への圧負荷モデルは、マウスの横行大動脈を狭窄 (TAC) することで作製し、心筋梗塞モデルは冠動脈左前下行枝を結紮することで作製した。ニンニク 5% 含有した食餌をマウスに 1 週間与え続け、その後冠動脈結紮を行い、心エコーおよび心カテーテル検査により心機能を評価した。

結果

1. 毒性の低いポリ硫黄含有化合物の慢性心不全に対する抑制効果

組み換え H-Ras タンパク質に SSP2 を反応させたところ、有意な蛍光増加が認められた。H-Ra に 8-nitro-cGMP を処置したところ、S-グアニル化修飾が観察された。この S-グアニル化は dithiothreitol (DTT) では還元されないものの、強還元剤 (2-mercaptoethanol) 下で脱 S-グアニル化されることがわかった。実際、ポリ硫黄 ($-\text{S}_m\text{H}$) を持つ化合物と親電

*現所属：自然科学研究機構 生理学研究所 統合バイオサイエンスセンター
心循環シグナル研究部門

子物質を試験管内で反応させたところ、NaHS と親電子物質を反応させた時よりもかなり強く親電子物質がスルフヒドリル化（消去）されることが確認できた。これらの結果は、タンパク質の親電子修飾が必ずしも不可逆的な修飾ではなく、親電子物質の標的となるタンパク質 Cys-SH 基がポリ硫黄鎖を形成することで可逆性が担保される可能性を示している（図1）。

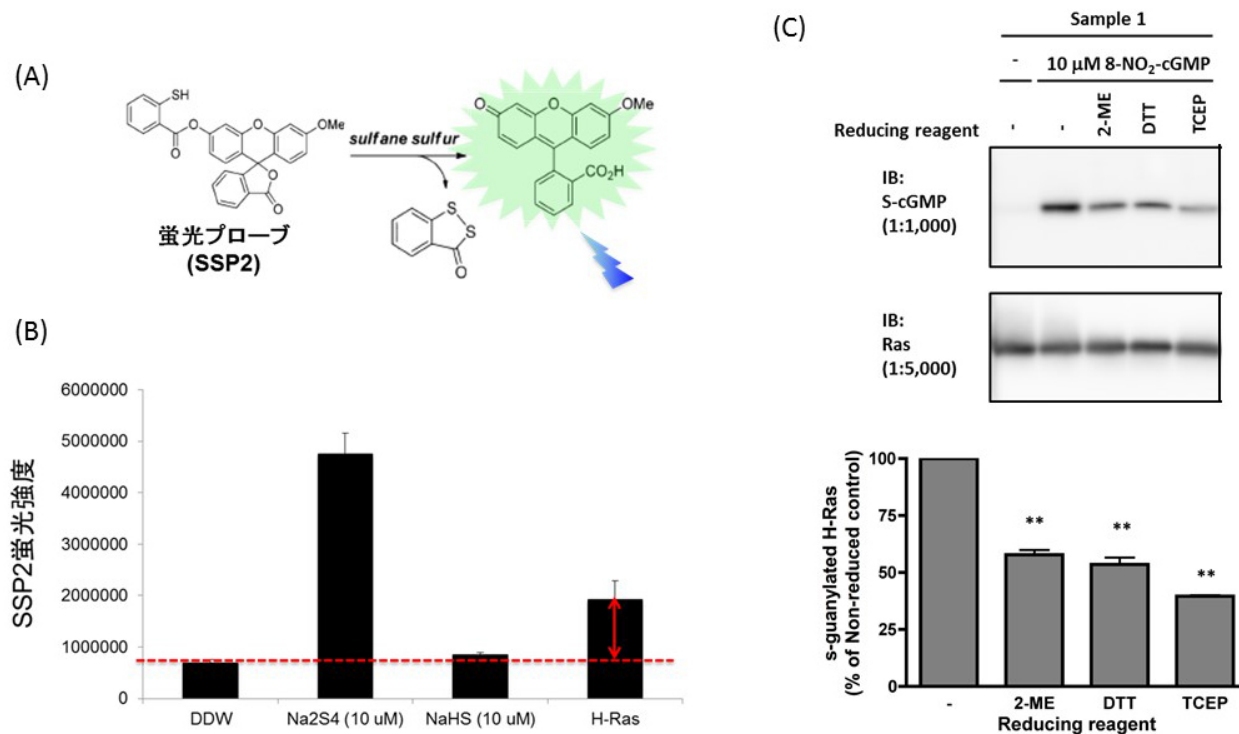


図1. タンパク質ポリ硫黄化による親電子修飾の可逆的制御。

(A) 活性硫黄検出蛍光プローブ (SSP2) の原理. (B) SSP2 を用いたヒト組み換え H-Ras タンパク質のポリ硫黄鎖形成. (C) ヒト組み換え H-Ras の S-グアニル化修飾に対する還元剤の効果. **p < 0.01 (by One-way ANOVA, Dunnett's post-hoc test).

実際、心臓に圧負荷を施し、H-Ras の S-グアニル化の関係を調べたところ、心臓が代償性心肥大（左室肥厚）から非代償性心肥大（左室拡張）へと移行する TAC 4 週目以降から H-Ras の不可逆的な S-グアニル化修飾が起り始めることが明らかになった。以上の結果は、タンパク質の親電子修飾が、標的 Cys-SH 基のポリ硫黄形成によって可逆的に消去されることを強く示唆している。

この知見をもとに、毒性の低いポリ硫黄化合物（アリシン）をマウスに投与し、心不全が抑制されるかどうか検討した。ニンニク 5% 含有した食餌をマウスに 1 週間与え続け、その後冠動脈結紮を行い心筋梗塞誘発性の慢性心不全を誘導した。その結果、通常食餌摂取群と比べてニンニクを摂取したマウス群では、血圧・心拍数に変化を与えずに心筋梗塞後の突然死およびその後の心機能低下が有意に改善された（図2）。

含硫機能性食品ニンニクから産生される硫化水素とポリイオウ

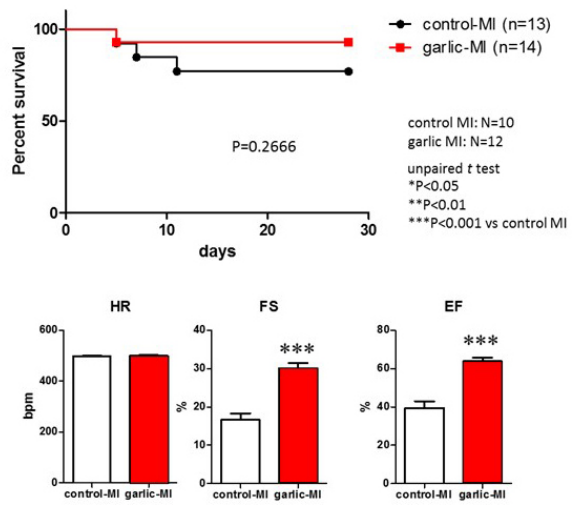
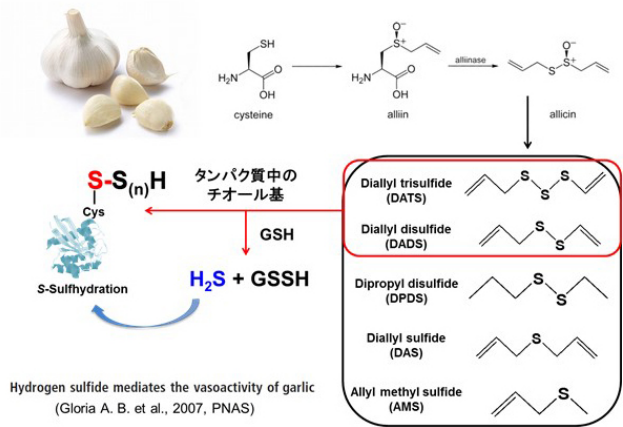


図2. 心筋梗塞後の心臓リスクに対する含硫食品摂取の効果。

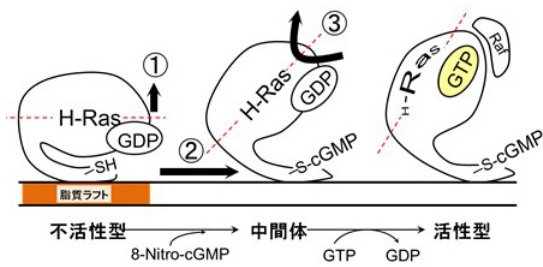
左) ニンニクに含まれる含硫成分の化学構造. 右) ニンニク摂取後マウスの冠動脈を結紮した後の生存率と心筋梗塞4週間後における心機能評価. HR: heart rate, FS: fractional shortening, EF: ejection fraction.

さらに、ニンニク食を与えたマウス心臓を摘出し、心臓中のポリ硫黄量を調べたところ、グルタチオンやシステインそのものが数 μ Mレベルでポリ硫黄化されていることも明らかになった。

2. H-Ras の1分子イメージングによる活性酸素センシングの分子機構の解析

GDP型に置換した精製 H-Ras にGTP 過剰量を添加したところ、H-Ras タンパク質とマイカ基板との距離が離れる画像が取得できた。また、GDP型 H-Ras に8-nitro-cGMP を処置したところ、GTP 負荷と同様に、H-Ras とマイカ基板との距離が遠くなる傾向が観察された。

(A)



①S-グアニル化→細胞膜から離れる

②脂質ラフトからラフト外へ移行

③構造変化による下流エフェクターの結合性の増加

(B)

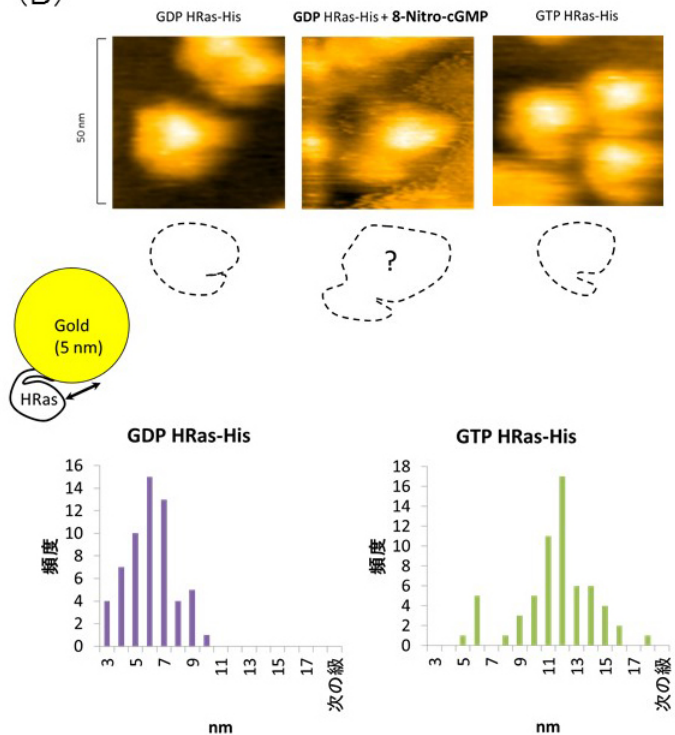


図3. 高速 AFM を用いた低分子量 G タンパク質 H-Ras のコンフォメーション変化イメージング.

(A) GTP/GDP 結合依存的な H-Ras コンフォメーション変化の基本原則と親電子修飾によって起こりうるコンフォメーション変化 (予想). (B) AFM を用いた H-Ras と結合させた金コロイドの高さ測定結果と 8-nitro-cGMP 処置による高さ変化のイメージ.

この結果は、8-nitro-cGMP の持つ親水性が H-Ras と脂質ラフトとの疎水的親和性を弱めることで H-Ras をラフトから解離しやすくさせている可能性を示している.

3. 酸化 H-Ras の特異的エフェクター分子の探索

N 末端側に His タグを付けた精製 H-Ras タンパク質に 8-nitro-cGMP を処置し、ニッケルカラムに吸着させた後、心臓ホモジネートを濾過し、酸化 H-Ras と特異的に結合するエフェクター分子を探索した. 複数のバンドが得られたものの、S-グアニル化特異的に結合が増加したのは Raf1 だけであった.

考 察

細胞老化特異的な高感度バイオセンサーを構築することはできなかったものの、H-Ras が親電子修飾により活性化する分子機構の一端を明らかにした. また、親電子物質の標的となる H-Ras タンパク質のシステインチオール基がポリ硫黄を形成することで親電子修飾に可逆性を与え、これが心臓のストレス適応・不適応を制御しうる可能性が新たに示された. この知見は、 H_2S/HS^- が求核物質の分子実体として機能するのではなく、体内に取り込まれたイオウが心臓に積極的に取り込まれることで心臓組織中に活性イオウ種(グルタチオンパースルフィドやシステインパースルフィドなど)を増加し、虚血により生成される親電子物質を消去していることを示唆している (図3) 4). 今後は循環血液中のポリ硫黄が心臓組織に取り込まれ蓄積する分子機構を明らかにしていくことで、タンパク質酸化修飾の可逆性担保を主眼とする新しいレドックス創薬基盤が構築できるものと期待される.

共同研究者

本研究は、東北大学医学部の赤池孝章教授、筑波大学医学医療系の熊谷嘉人教授、名古屋大学農学研究科の内田浩二教授、大阪府立大学理学部の居原秀准教授、熊本大学医学部の澤 智裕教授らとの共同研究による成果である.

文 献

- 1) 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. : Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulphydration. *Nat. Chem. Biol.*, **8** : 714-724, 2012.
- 2) Nishida, M., Toyama, T. & Akaike, T. : Role of 8-nitro-cGMP and its redox regulation in cardiovascular electrophilic signaling. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **73** : 10-17, 2014.
- 3) Chen, W., Liu, C., Peng, B., Zhao, Y., Pacheco, A. & Xian, M. : New fluorescent probes for sulfane sulfurs and the application in bioimaging. *Chem. Sci.*, **4** : 2892-2896, 2013.
- 4) Ida, T., Sawa, T., Ihara, H., Tsuchiya, Y., Watanabe, Y., Kumagai, Y., Suematsu, M., Motohashi, H., Fujii, S., Matsunaga, T., Yamamoto, M., Ono, K., Devarie-Baez, N. O., Xian, M., Fukuto, J. M. & Akaike, T. : Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **111** : 7606-7611, 2014.