

32. シグナル分子としての硫化水素とポリサルファイド

木村 英雄

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 神経薬理研究部

Key words : 硫化水素, ポリサルファイド, 一酸化窒素, シグナル分子, TRPA1

緒言

H₂S は、神経伝達調節、血管弛緩、酸化ストレスからの細胞保護、抗炎症、など様々な作用を持つシグナル分子として機能している¹⁻³⁾。私たちは、H₂S と他のシグナル分子 NO とのクロストークとして、血管弛緩作用における相乗効果を報告した²⁾。その後、ほかの組織においても両分子のクロストークが報告された。そのメカニズムとしては、大きく2つに分類される。1つは、1) H₂S によって endothelial NO synthetase (eNOS) が活性化され、NO 放出亢進が起こる。2) H₂S により H₂S 合成酵素の1つである cystathionine gamma-lyase (CSE) の発現上昇が起こる。などが報告された。一方、大分類の2つ目として、H₂S と NO とが化学的反応により 1) HNO と H₂S_n ができ、HNO が TRPA1 チャネルを活性化する。2) SSNO⁻ と H₂S_n ができて、SSNO⁻ が NO キャリアとして働くことが報告された。HNO と SSNO⁻ については、それぞれのグループ間で批判的であるが、両グループとも H₂S_n ができることを報告しているものの、それについてほとんど検討を行っていない。これまでに私たちは、H₂S₂ や H₂S₃ が 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST) によって生合成され⁴⁾、TRPA1 チャネルのアミノ末端の2つのシステイン残基が標的であることを明らかにした^{5,6)}。その後、ほかのグループから、H₂S_n による抗腫瘍因子 phosphatase and tensin homolog (PTEN) の活性制御、抗酸化遺伝子群の転写因子 nuclear factor-like 2 (Nrf2) の核内移行促進⁷⁾、protein kinase Glalpha の活性化による血圧調節などが報告された。本研究は、H₂S と NO との相乗効果が、両分子から生成される H₂S_n によることを解明した。

方法および結果

1. H₂S と NO からの H₂S_n 産生

H₂S のナトリウム塩 Na₂S と NO 発生剤である diethylamine NONOate (DEA/NO) を混合し、生成物を thiol 特異的蛍光試薬 monobromobimane で標識し、LC-MS/MS で解析を行ったところ、NO 添加によって H₂S は減少していき、それに伴って H₂S₂ と H₂S₃ が生産された⁸⁾ (図1)。

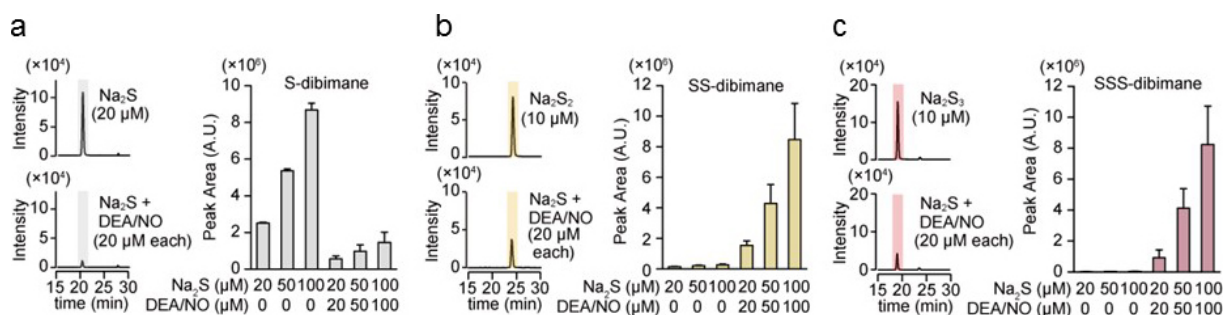


図1. H₂S と NO からの H₂S₂ 及び H₂S₃ 産生

LC-MS/MS によるビマン化した S の解析。H₂S と NO とを混合したときの a) H₂S、b) H₂S₂、c) H₂S₃ レベル。文献8 から転載。

2. H₂S と NO から生産された H₂S₂ と H₂S₃ による TRPA1 チャンネル活性化

H₂S_n がアストロサイトや後根神経節神経細胞の TRPA1 チャンネルを活性化することは私たちや他のグループの研究によって明らかになっていた。図1に示した結果から、H₂S と NO から H₂S₂ や H₂S₃ できることから、TRPA1 チャンネルが活性化されることが予想された。後根神経節神経細胞に、Ca²⁺インジケーター Fluo-4 や H₂S_n 特異的蛍光プローブ SSip-1⁹⁾ を取り込ませ、H₂S と NO 混合液を添加し、SSip-1 によって H₂S_n を検出し、TRPA1 チャンネル活性化による細胞内 Ca²⁺流入を Fluo-4 によって検出した。TRPA1 チャンネルアゴニストである allyl isothiocyanate (AITC) 反応性の後根神経節神経細胞では、SSip-1 によって H₂S_n が細胞内に取り込まれたことと、Fluo-4 によって細胞内 Ca²⁺流入が観察された⁸⁾ (図2)。これらの結果は、H₂S と NO から H₂S_n が産生し、TRPA1 チャンネルを活性化したことを示している。

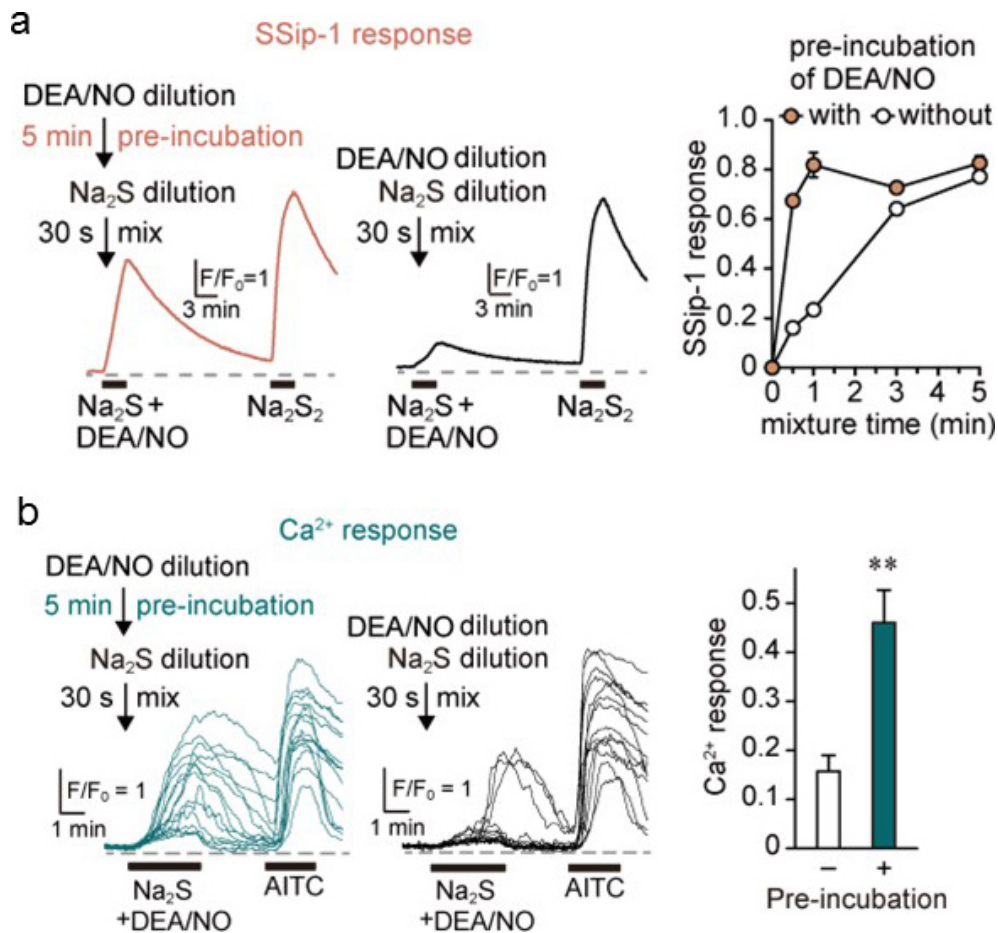


図2. H₂S と NO からの H₂S_n の生成と反応

a, b) 細胞内 H₂S_n の蛍光プローブでの検出。c, d) 細胞内 Ca²⁺流入の蛍光プローブでの検出。データはスチューデント t テストで解析し、平均 ± 標準誤差であらわした。**p < 0.01。文献8から転載。

3. H₂S と NO から即時に H₂S_n が産生する

H₂S と NO からの H₂S_n 産生が即時に起こるものか、あるいは緩徐な反応であるかについての検討を行った。Na₂S は溶解すると瞬時に H₂S を発生するが、DEA/NO は NO をゆっくりと放出する。Na₂S と DEA/NO を混合して 30 秒後に後根神経節神経細胞に投与すると、H₂S_n の取り込み量も Ca²⁺流入も僅かであった。一方、DEA/NO 溶解 5 分後に Na₂S と混合し、30 秒後に後根神経節神経細胞に投与すると H₂S_n の取り込み量も Ca²⁺流入もともに強い反応が観察さ

れた⁸⁾(図2)。このことは、DEA/NO からの NO 放出を十分に行った後、H₂S と NO との反応は即時に起こることを示している。

4. H₂S と NO から産生される H₂S_n はシアンによって分解されるが、HNO は分解されない

Ebenhardt らによって、H₂S と NO とから HNO ができ、これが TRPA1 チャンネルを活性化すると報告されていた。そこで、HNO と H₂S_n との大きく異なる性質であるシアンによる分解を利用して判別を行った。すなわち、HNO はシアンに抵抗性を示すが、H₂S_n はシアンによって分解される。H₂S と NO との混合液にシアンを加え、これを後根神経節神経細胞に添加し、SSip-1 で測定すると、H₂S_n はほとんど分解されて消失した(図3)。一方、HNO はシアンによって分解されず、Ca²⁺流入を誘導した⁸⁾(図3, 4)。この結果は、H₂S と NO とから産生される物質は、HNO ではなく、H₂S_n であることを示している。

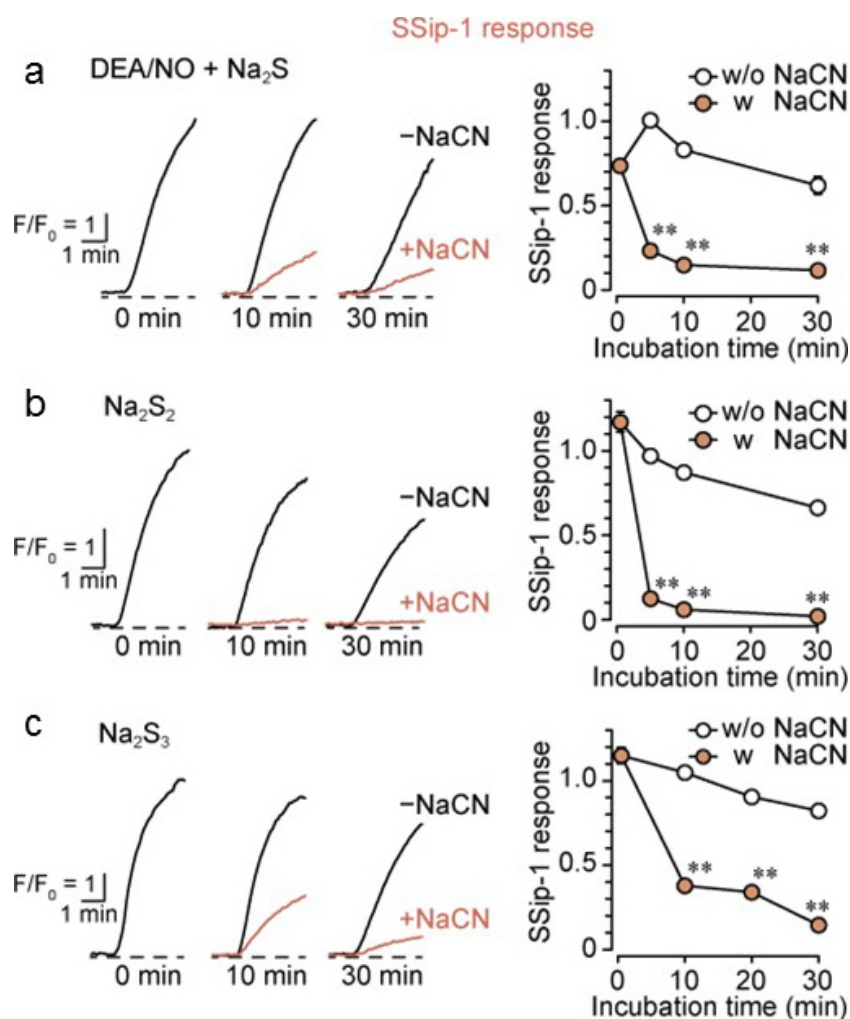


図3. H₂S と NO 産物のシアンによる分解

a) H₂S と NO 産物のシアンによる分解。b) H₂S₂ のシアンによる分解。c) H₂S₃ によるシアンによる分解。データは学生tテストで解析し、平均±標準誤差で表した。**p < 0.01。文献8から転載。

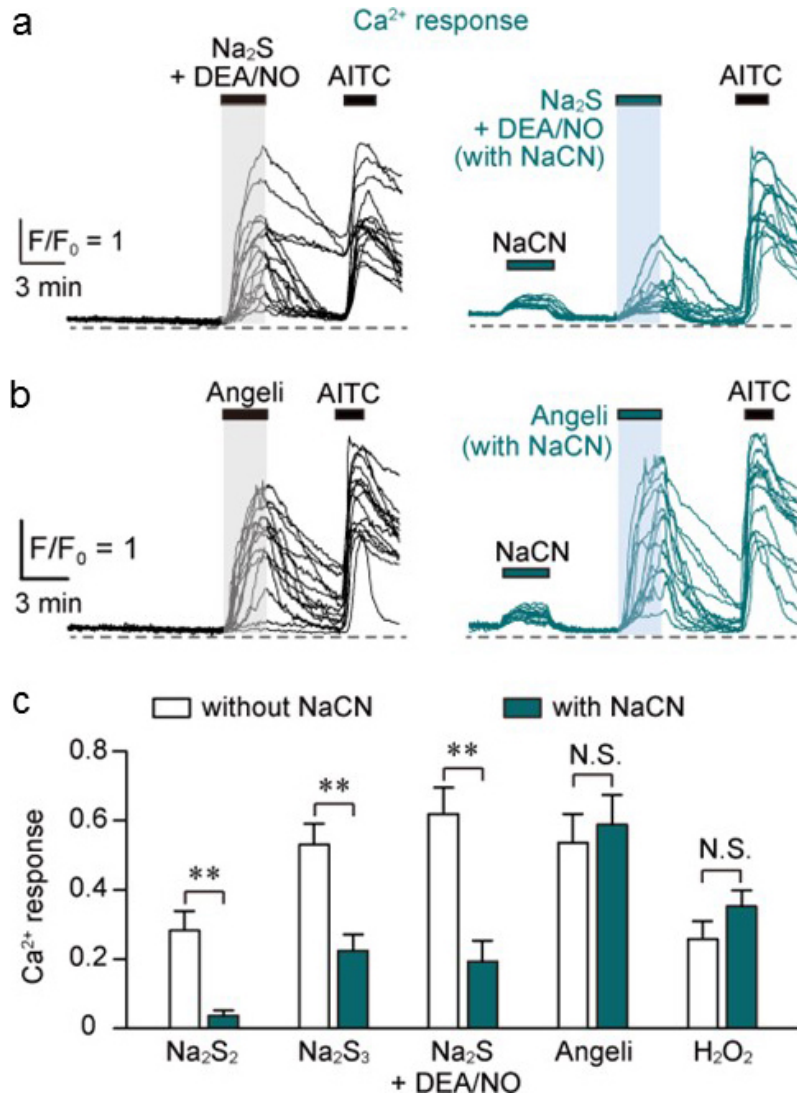


図4. H_2S と NO 産物のシアンによる分解と HNO のシアン抵抗性

a) H_2S と NO 産物のシアンによる分解。b) HNO のシアン抵抗性。c) シアンによる分解と抵抗性。データは学生tテストで解析し、平均±標準誤差で表した。** $p < 0.01$ 。文献8から転載。

5. H_2S と NO から産生される H_2S_n は還元剤で分解されるが、 SSNO^- は抵抗性を示す

Cortese-Krottらによって、 H_2S と NO から、 SSNO^- が産生されることが報告されていた。そこで、 SSNO^- と H_2S_n との違いである還元剤への感受性によって、どちらが TRPA1 チャンネル活性化を行うかを検討した。 H_2S と NO との産生物及び、 H_2S_n は cysteine、glutathione、DTT などの還元性物質によって分解されたが、 SSNO^- は抵抗性を示した。また、後根神経節神経細胞における H_2S_n 上昇や、 TRPA1 チャンネル活性化による Ca^{2+} 流入は、これら還元剤によって消失した⁸⁾ (図5, 6)。これらの結果は、 H_2S と NO から産生され TRPA1 チャンネル活性化を行うのは、 SSNO^- ではなく、 H_2S_n であることが示された。

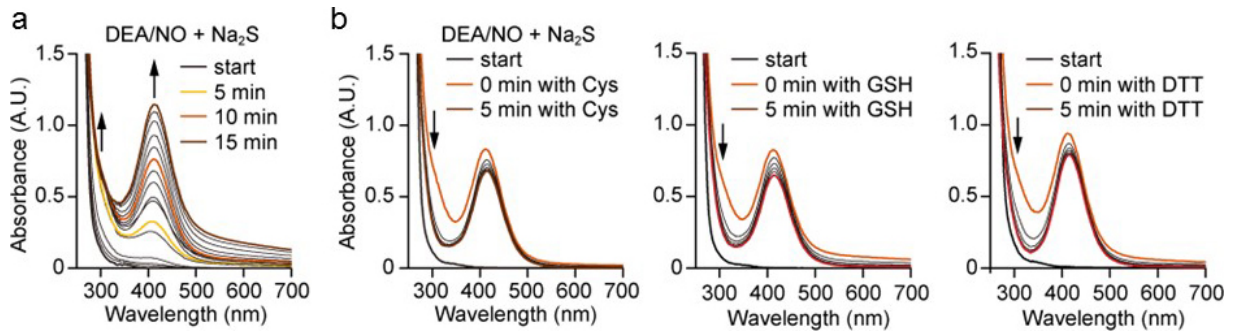


図5. H₂S と NO 産物の還元剤による分解の吸光度解析
 a) H₂S と NO 産物の吸光度解析。b) H₂S と NO 産物のシステイン、GSH、DTT による分解の吸光度解析。文献8から転載。

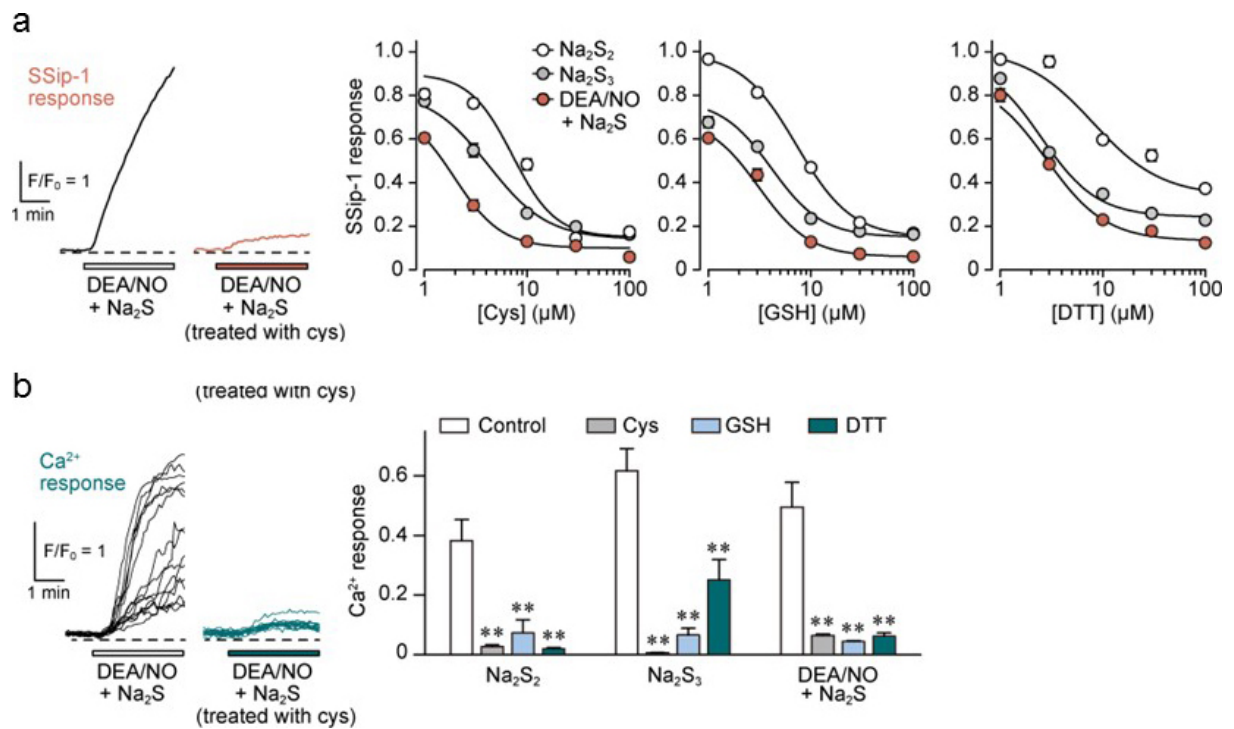


図6. H₂S と NO 産物の還元剤による分解の蛍光プローブを使つての解析
 a) H₂S と NO 産物のシステイン、GSH、DTT による分解の H₂S_n 感受性蛍光プローブを使つての解析。b) H₂S と NO 産物による Ca²⁺流入の Ca²⁺感受性蛍光プローブを使つての解析。データはダネットテストにより解析し、平均±標準誤差で表した。**p < 0.01。文献8から転載。

考 察

Ebenhardt らは、H₂S と NO から HNO と H₂S_n ができることを報告し、HNO が TRPA1 チャネルを活性化すると結論した。しかし、この研究において、TRPA1 チャネルを活性化した物質についてのシアンへの安定性の検討がなされていなかった。本研究では、シアンによって分解されることから、HNO ではなく H₂S_n であると結論した。また、Cortese-Krott らは、H₂S と NO から SSNO⁻ と H₂S_n ができることを報告した。しかし、この研究において、その産物

の還元性物質に対する感受性についての検討は行っていなかった。本研究では、還元性物質への感受性から、SSNO⁻ではなく H₂S_nであることを結論付けた。

H₂S と NO から H₂S_n ができる反応は非常に早く、このことはまた生理的に重要な意味を持つ。すなわち、神経系では、3MST が H₂S を合成し、nNOS によって NO が合成され、瞬時に H₂S_n ができることにより、TRPA1 チャネルなどが活性化を受けることにより、神経伝達が調節される。また、血管系においては、3MST や CSE によって H₂S が合成され、eNOS によって合成された NO と反応し、H₂S_n が産生され、protein kinase G1 *a* が活性化されることにより血管弛緩が起こる。

これらの結果は、H₂S と NO から産生した H₂S_n が生理的に機能しうること、また、これらの分子が関わる疾患の治療標的となることを示している。

共同研究者

本研究の共同研究者は、明治薬科大学の小笠原祐樹および小池伸、東京大学薬学部の浦野泰照、花岡健二郎、高野陽子である。最後に、本研究にご支援賜りました上原記念生命科学財団に心より感謝いたします。

文 献

- 1) Abe, K. & Kimura, H.: The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neuroscience*. 16, 1066-1071 (1996). PMID:8558235
- 2) Hosoki, R., Matsuki, N. & Kimura, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 237, 527-531 (1997). PMID: 9299397
- 3) Kimura, Y. and Kimura, H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J.* 18, 1165-1167, 2004. PMID:15155563
- 4) Kimura, Y., Toyofuku, Y., Koike, S., Shibuya, N., Nagahara, N., Lefler, D., Ogasawara, Y., Kimura, H. Identification of H₂S₃ and H₂S produced by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the brain. *Sci. Rep.* 5:14774, 2015. DOI: 10.1038/srep14774.
- 5) Kimura, Y., Mikami, Y., Osumi, K., Tsugane, M., Oka, J-I, and Kimura, H. Polysulfides are possible H₂S-derived signaling molecules in rat brain. *FASEB J.* 27, 2451-2457, 2013. doi: 10.1096/fj.12-226415.
- 6) Hatakeyama, Y., Takahashi, K., Tominaga, M., Kimura, H., Ohta, T. Polysulfide evokes acute pain through the activation of nociceptive TRPA1 in mouse sensory neurons. *Mol. Pain* 11:24, 2015. Doi 10.1186/s12990-015-0023-4.
- 7) Koike, S., Ogasawara, Y., Shibuya, N., Kimura, H., Ishii, K. Polysulfide exerts a protective effect against cytotoxicity caused by t-butylhydroperoxide through Nrf2 signaling in neuroblastoma cells. *FEBS Lett.* 587, 3548-3555, 2013. doi: 10.1016/j.febslet.2013.09.013.
- 8) Miyamoto, R., Koike, S., Takano, Y., Shibuya, N., Kimura, Y., Hanaoka, K., Urano, Y., Ogasawara, Y., Kimura, H. Polysulfides (H₂S_n) produced from the interaction of hydrogen sulfide (H₂S) and nitric oxide (NO) activate TRPA1 channels. *Sci. Rep.* 7: 45995, 2017. DOI: 10.1038/srep45995.
- 9) Takano, Y., Hanaoka, K., Shijimamoto, K., Miyamoto, R., Komatsu, T., Ueno, T., Terai, T., Kimura, H., Nagano, T., Urano, Y. Development of a reversible fluorescent probe for reactive sulfur species, sulfane sulfur, and its biological application. *Chem. Commun.* 53, 1064-1067, 2017. DOI: 10.1039/c6cc08372b.