

中山人間科学振興財団活動報告書 2022 年度国際交流助成(海外渡航)

研究テーマ

NADPH 酸化還元酵素による新規超硫黄代謝を介した感染防御機構の解明

氏名

高田 剛

所属

Indiana University School of Medicine – South Bend
(Indiana, USA)

【背景】

硫黄は、酸素と同じく周期表の第 16 族に属する元素であるが、酸素に比べて電子の授受に伴うエネルギーの変化が小さく、酸化還元を受けやすい性質を持っている。そのため、酸化還元反応を繰り返すことで直鎖状に連結した分子構造(カテナーション)を形成しやすく、自然界では環状八硫黄 S₈ に代表される多彩な同素体が存在している。しかし、酸化還元を受けやすい性質のために正確な定性・定量が困難であり、これまで多くの硫黄代謝物の存在が見落とされてきた。

我々は、硫黄カテナーションの分解を最小限にとどめて検出・定量する精密な解析技法を開発してきた(文献 3, 4)。この最先端技術により、システインパーサルスフィド(CysSSH)やグルタチオンパーサルスフィド(GSSH)などの超硫黄分子が、生体内に豊富に存在することを明らかにしている(文献 2)。さらに、ミトコンドリアで産生された超硫黄分子が、電子伝達系において電子供与体および受容体として機能することで、エネルギー生成に関わることを発見した。これは、酸素分子のかわりに硫黄分子が電子受容体としてエネルギー産生に用いられることを示唆している。加えて、超硫黄分子は、低分子のみならずタンパク質のシステイン側鎖にも連結した状態で存在し、多彩な生理機能を発揮することを明らかにしている(文献 1, 5, 7, 8, 10)。また、超硫黄分子と同様に、活性酸素種(ROS)により同様に酵素活性が制御される事例を多数報告している(文献 6, 9, 11-12)。

生体内の主要な活性酸素産生酵素である NADPH オキシダーゼ (NOX) が、NADPH の電子を酸素分子に与えるだけでなく、極めて効率良く酸化型超硫黄分子(スーパーサルスフィド)に渡して、硫黄側鎖が伸長した高反応性の還元型超硫黄分子を産生するという驚くべき事実が明らかになった。さらに、NO 合成酵素 (NOS) も同様に超硫黄分子を基質とする知見が得られている。

【研究目的】

本研究では、NADPH 依存的な酸化還元酵素である NOX と NOS による全く新規の超硫黄分子産生を介した感染防御機能を解明し、感染症の新たな予防・治療戦略を構築する。

受入先の Kenneth R. Olson 教授は、ROS の影響のいくつかは超硫黄分子に起因する可能性について逸早く注目している。ROS の検出試薬が超硫黄分子と親和性高く

反応することを見出し、これまで ROS や NO による作用として観測されてきた生命現象が、実は超硫黄分子由来のものである可能性を示している。このように ROS および NO と超硫黄分子の誤認の問題について逸早く言及しており、これまで ROS や NO によってもたらされると考えられてきた NOX および NOS による感染防御機能を見直すという本研究課題と非常に親和性が高く、効果的な研究環境とよい刺激が得られると考えられた。

【研究方法、研究内容】

NOX および NOS は GSSSG へ電子を供給することで、GSSH や GSSSH を産生すると考えられるが、ROS や NO を産生できる通常酸素下では、産生される GSSH や GSSSH と ROS/NO が反応し、反応性が高い GSSNO や GSSSNO が産生され、これらがさらに GSSH などと反応することで、GSSSSG や GSSSSSG が産生されると考えられる。すなわち、低酸素条件下や、一般的な NOS 阻害薬投与状態においては NO だけが産生できなくなるため、超硫黄分子の酸化・伸長反応(カテネーション)が抑えられ、還元反応が増強すると考えられる。本研究では低酸素下において培養した細胞における超硫黄分子、ROS および NO 産生量を測定し、酸素供給量に依存した硫黄プロファイルを明らかにする。

【現時点での成果と今後の展望】

(1) 超硫黄分子測定系の構築

硫黄は酸化還元を受けやすい性質のために正確な定性・定量が困難であり、多くの硫黄代謝物の存在が見落とされてきた。最初に、我々が独自に開発した超硫黄分子の分解を最小限にとどめて検出・定量する精密な解析技法を渡航先に導入することから取り掛かった。無細胞系における硫黄の反応により生成した各種硫黄代謝物の測定に成功している。現在、その定量化に向けて、各種硫黄代謝物の標準物質を合成し、精製中である。

(2) 低酸素条件下における細胞内超硫黄分子の測定

これまで多くの細胞培養実験が通常酸素下において実施されており、低酸素下における細胞内硫黄代謝物量を厳密に測定した報告はない。そこで、正常酸素細胞と

低酸素細胞の硫黄代謝物を測定する。現在、測定に向けて正常酸素細胞と低酸素細胞を培養中である。また、炎症性マクロファージ(M1)は iNOS を高発現していることが知られており、活性酸素種を産生することで殺菌作用を示すことがわかっている。そこで培養条件下にて、M1 マクロファージにおける iNOS による NO 産生能と GSSSG 消費の変化を通常酸素状態と低酸素状態で比較する。この時、低酸素条件下では NO 基質となるアルギニンの消費が低下する一方で、細胞内 GSSSG の消費が増加すると予想される。同時に、GSH や GSSH などは増加すると考えられる。以上より、細胞内において、酸素濃度依存的に iNOS の酵素活性に変化が見られるか検討する。

最後に、ROS や NO は単なる毒性因子ではなく、巧妙に制御されたシグナル伝達機構の担い手として多彩な生命現象と疾患病態に関わることが明らかになってきている。本研究により、これまで ROS や NO による作用として観測されてきた生命現象を見直し、NSOR とその超硫黄代謝系に関わる疾病の診断・治療や創薬に向けた基盤を確立できると考えている。現在進行中のプロジェクトに関して、残された留学期間を活用し有益な研究成果として還元できるよう努力したい。

【謝辞】

留学にあたり、助成いただきました公益財団法人、中山人間科学振興財団の皆様には厚く御礼を申し上げます。また、今回の留学においてご指導をいただいております Indiana University School of Medicine – South Bend の先生方や、留学前よりご指導を賜りました東北大学大学院、環境医学分野の先生方にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

【引用文献】

1. Araki S, Takata T, Ono K, Sawa T, Kasamatsu S, Ihara H, Kumagai Y, Akaike T, Watanabe Y, Tsuchiya Y, Cystathionine γ -lyase self-inactivates by polysulfidation during cystine metabolism. *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, 24, 9982.
2. Zainol Abidin QH, Ida T, Morita M, Matsunaga T, Nishimura A, Jung M, Hassan N, Takata T, Ishii I, Kruger W, Wang R, Motohashi H, Tsutsui M, Akaike T, Synthesis of sulfides and persulfides is not impeded by disruption of three canonical

- enzymes in sulfur metabolism. *Antioxidants*, 2023, 12, 868.
3. Sawa T, Takata T, Matsunaga T, Ihara H, Motohashi H, Akaike T: Chemical biology of reactive sulfur species: Hydrolysis-driven equilibrium of polysulfides as a determinant of physiological functions. *Antioxid Redox Signal*, 2022, 36, 4–6.
 4. Takata T, Jung M, Matsunaga T, Ida T, Morita M, Motohashi H, Shen X, Kevil CG, Fukuto JM, Akaike T: Methods in sulfide and persulfide research. *Nitric Oxide*, 2021, 116, 47–64.
 5. Takata T, Tsuchiya Y, Akaike T, Watanabe Y: Persulfide signaling in stress-initiated calmodulin kinase response. *Antioxid Redox Signal*, 2020, 33, 1308–1319.
 6. Takata T, Araki S, Tsuchiya Y, Watanabe Y: Oxidative stress orchestrates MAPK and nitric-oxide synthase signal. *Int J Mol Sci*, 2020, 21, 8750.
 7. Dóka É, Ida T, Dagnell M, Abiko Y, Luong NC, Balog N, Takata T, Espinosa B, Nishimura A, Cheng Q, Funato Y, Miki H, Fukuto J, Prigge JR, Schmidt EE, Arnér ESJ, Kumagai Y, Akaike T, Nagy P: Control of protein function through oxidation and reduction of persulfidated states. *Sci Adv*, 2020, 6, eaax8358.
 8. Takata T, Tsukuda A, Tsuchiya Y, Akaike T, Watanabe Y: The active-site cysteine residue of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I is protected from irreversible modification via generation of polysulfidation. *Nitric Oxide*, 2019, 86, 68–75.
 9. Takata T, Kimura J, Ihara H, Hatano N, Tsuchiya Y, Watanabe Y: Redox regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV via oxidation of its active-site cysteine residue. *Free Radic Biol Med*, 2019, 130, 99–106.
 10. Takata T, Ihara H, Hatano N, Tsuchiya Y, Akaike T, Watanabe Y: Reactive sulfur species inactivate Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV via S-polysulfidation of its active-site cysteine residue. *Biochem J*, 2017, 474, 2547–2562.
 11. Takata T, Tsuchiya Y, Watanabe Y: 90-kDa ribosomal S6 kinase 1 is inhibited by S-glutathionylation of its active-site cysteine residue during oxidative stress. *FEBS Lett*, 2013, 587, 1681–1686.
 12. Takata T, Kimura J, Tsuchiya Y, Naito Y, Watanabe Y: Calcium/calmodulin-

dependent protein kinases as potential targets of nitric oxide. *Nitric Oxide*, 2011, 25, 145-152.