活性イオウ分子による細胞毒性の調節機構

居原 秀

要約：システインなどのチオール基に過剰のイオウ原子が付加したパースルフィド (R-SSH) は、高い求核性をもち反応性に富んだ“活性イオウ分子”である。活性イオウ分子は、ユニークな化学特性を持ち、強力な抗酸化能、親電子シグナル制御活性を有することが知られている。酸素に由来する活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) やメチル水銀など環境中の親電子性物質は、生体分子の求核置換基に共有結合することにより非特異的な分子損傷をもたらし、最終的に細胞毒性を引き起こす。また、レドックスセンサータンパク質のレドックスアクティブなシステイン残基のチオール基を親電子修飾することにより、親電子シグナルを活性化させ、細胞毒性が惹起される機構も報告されている。最近の研究で、このような親電子性物質に起因した細胞毒性が、活性イオウ分子により調節されていることが明らかになってきている。活性イオウ分子は、高い求核性を持つので、効率よく ROS の親電子性は消去することによって ROS 毒性を軽減する。また、活性イオウ分子は、メチル水銀などの親電子性毒物とイオウ付加反応、二量体形成反応することで、毒物の親電子性を減弱させ解毒している。さらに、活性イオウ分子は、8-ニトロ-cGMP のような内在性の親電子性セカンドメッセンジャーと反応し、イオウ付加体 (8-メルカプト-cGMP) を形成することによって親電子シグナルを調節し、その下流にある細胞毒性の制御を行っている。

1. はじめに

近年、硫化水素 (H_2S) が、一酸化窒素 (NO)、一酸化炭素 (CO) に次ぐ「第三のガス状メディエーター」として注目され、血管機能調節、細胞保護効果などが報告されてきた(1-3)。しかし、その実体と作用メカ

ニズムについては不明であった。これまでの研究で、動物細胞において硫化水素は、シスタチオニン β 合成酵素 (cystathionine β -synthase : CBS), シスタチオニン γ リアーゼ (cystathionine γ -lyase : CSE) により酵素的に産生され则认为られてきた(4)。ところが、CBS, CSE の酵素反応物を質量分析法で定量的な解析したところ、両酵素の主産物が硫化水素ではなく、システインパースルフィド (Cys-SSH) であることが明らかにされた(5)。パースルフィドは、チオール基に過剰のイオウ原子が付加し、求核反応性に富んだ“活性イオウ分子”である。生体内では、システインパースルフィド以外にも、グルタチオンパースルフィド、ホモシステニルシステインパースルフィドなどの低分子、タンパク質ポリスルフィドのような高分子活性イオウ分子が存在する(5,6)。

これまでに活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) 毒性(7)、環境由来の親電子性物質による毒性(8)、さらに親電子シグナルにより惹起される細胞毒性(3) のメカニズムが明らかにされてきている。これらの細胞毒性は、CBS, CSE の発現量、外因性の硫化水素により影響を受ける(3,5,9,11)。これらの結果から当初は、硫化水素が細胞毒性の制御に関与していると考えられてきた。しかし上述のように、CBS, CSE の主産物が活性イオウ分子であること、活性イオウ分子の抗酸化能が、グルタチオンや硫化水素よりも高いことから、ROS や親電子性物質の毒性調節における、活性イオウ分子の役割が注目されるようになってきている。この総説では、親電子物質に起因する細胞毒性と、活性イオウ分子による調節機構について概説する。

2. ROS 誘発性細胞毒性の調節

細胞内で、NADPH オキシダーゼ (Nox), NO 合成

キーワード：活性イオウ分子、活性酸素種、親電子性毒物、親電子シグナル、8-ニトロ-cGMP

大阪府立大学大学院 理学系研究科 (〒599-8531 大阪府堺市中区学園町 1-1)

E-mail: ihara@b.s.osakafu-u.ac.jp 原稿受領日：2016 年 2 月 13 日、依頼原稿

Title: Regulatory mechanism of cytotoxicity by reactive sulfur species Author: Hideshi Ihara

図1 活性イオウ分子による ROS 誘発性細胞毒性の調節

酵素 (NOS), キサンチンオキシダーゼ (XO), ミトコンドリア電子伝達系などで産生される活性酸素は、過酸化水素、ヒドロキシラジカル、一重項酸素など他のROSに代謝される。ROSは、親電子性が高いので、過剰に産生されると、生体分子（タンパク質、脂質、核酸など）の求核性の置換基に共有結合し、非特異的損傷をもたらす。損傷的修飾を受けた分子は、機能不全が誘発され、細胞毒性の原因となる（図1）(7)。生体内には、ROS毒性に対応するために、グルタチオンがmMオーダーで存在し、ROS除去に機能していると考えられている。しかし、グルタチオンやシステインのチオール基のpKa値は8.3~8.9と高く(10)、生理的条件下ではほとんど解離しておらず反応性は低い。活性イオウ分子種は、システインやグルタチオンなどのチオール基よりも高い求核性を有すると考えられている(5, 6)。最近の報告では、システインパースルフィドのpKa値が4.34であると概算されている(10)。このことは、システインパースルフィドが、グルタチオンやシステインよりもはるかに反応性が高いことを示している。実際、過酸化水素は、試験管内でグルタチオンパースルフィドと反応し、分解消失するが、同じ条件でグルタチオンや硫化水素ナトリウムとは反応しない(5)。また、システインパースルフィドを合成する酵素CSEを過剰発現させた細胞は、酸化ストレス耐性を示すようになる(5)。これらの結果は、活性イオウ分子が、細胞内においても優れた抗酸化物質として機能し、細胞毒性を軽減させていることを示している（図1）。

最近、細胞内の活性イオウ分子レベルが、細胞保護効果に関与していることを示唆する報告がなされた(11)。パーキンソン病疾患の細胞モデル実験でよく使用される1-メチル-4-フェニルピリジウム (MPP⁺) は、神経細胞に酸化ストレスを誘発し毒性を発揮する。Marutaniらは、ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞に対

するMPP⁺神経毒性は、様々な硫化水素放出性NMDA受容体拮抗薬により軽減されることを示し、それぞれの硫化水素放出性拮抗薬による細胞保護効果と、細胞内および培地中の硫化水素、活性イオウ（論文ではsulfane sulfur）レベルを、それぞれの特異的蛍光プローブを用いて解析した。興味深いことに、細胞保護効果は、細胞内の活性イオウレベルとのみ相関があり、培地中の活性イオウ分子レベル、細胞内、培地中の硫化水素レベルとは相関が無かった(11)。これらの実験結果は、硫化水素放出試薬による細胞保護効果は、活性イオウ分子による細胞内での抗酸化ストレス活性に起因していることを示唆している。詳細なメカニズムは不明であるが、硫化水素は、直接的に抗酸化能を示すのではなく、細胞内でより求核性の高い活性イオウを形成するための基質となることで、抗酸化能に寄与していると考えられる。

3. 環境中の親電子性毒物の解毒

重金属（メチル水銀やカドニウムなど）、大気汚染物質（1, 2-ナフトキノン、クロトンアルデヒドなど）、建材に含有されるホルムアルデヒドは、環境中に存在する親電子物質で、細胞に対して毒性を示すことが知られている(8)。また、食物由来の毒物や化学発がん物質の中にも親電子性物質が多く存在する。このような親電子性毒物は、DNA塩基やタンパク質中の求核置換基に共有結合することにより、遺伝情報の変化や酵素機能不全を引き起こし、発がんや細胞毒性を惹起すると考えられている。親電子性毒物の解毒機構としては、細胞内に豊富（mMオーダー）に存在するグルタチオンと抱合体を形成し、最終的にトランスポーターを介して細胞外に排出される機構が知られている(8)。

様々な外因性および内因性（後述）親電子性物質と、活性イオウ分子（当初は、硫化水素と考えられていた）の反応機構が明らかになってきた(3)。親電子性物質はスルヒドリル化され、その親電子性を制御されている。親電子性物質のスルヒドリル化誘導体の代謝の行方は、様々であり、安定なSH誘導体の形成、比較的安定な二量体形成、SH付加後さらに代謝されるなどがある（図2）。大気汚染物質やたばこの煙に含まれる1, 2-ナフトキンは、試験管内で活性イオウ分子の前駆物質である硫化水素と反応し、SH結合体（1,2-NQ-SH）およびS-二量体（1,2-NQ-S-1,2-NQ）が形成されることが確認されている(3)。これらの化合物は、親電子性が消失しているため毒性はない。また、水俣病の原因物質であるメチル水銀も、硫化水素と反応してS-二量体（MeHg）₂Sを形成する(9)。（MeHg）₂Sは、グル

図2 活性イオウ分子による親電子物質の代謝

タチオンパースルフィドのような活性イオウ分子とメチル水銀との反応でも産生されることが明らかにされている(12)。メチル水銀を暴露した細胞や、メチル水銀を投与したラット臓器中から $(\text{MeHg})_2\text{S}$ が同定されていることから、生体内において $(\text{MeHg})_2\text{S}$ は、メチル水銀の代謝物として産生されていると考えられる(9)。また、メチル水銀と $(\text{MeHg})_2\text{S}$ の細胞毒性を比較したところ、 $(\text{MeHg})_2\text{S}$ は、メチル水銀よりも有意に低い毒性を示した。さらにマウスの実験で、 $(\text{MeHg})_2\text{S}$ が、メチル水銀が急性致死効果を示す用量で、無害であることが示されている(9)。これらの結果から、 $(\text{MeHg})_2\text{S}$ は、メチル水銀の“解毒”代謝物であると考えられている。

4. 親電子シグナルを介した細胞毒性の調節

上述のROSや環境由来の親電子性毒物による毒性発現機構のほかにも、細胞内シグナルを介し、生体成分の非特異損傷によるカオス状態に陥る前に、穏やかに細胞を処理する機構（アポトーシスや細胞老化など）が報告されている(3)。ROSや、ROSと一酸化窒素の反応物である活性窒素種（reactive nitrogen species: RNS）は、生体内の脂質や核酸と反応し、比較的安定ではあるが親電子性を持った二次代謝産物を生成する。内因性の親電子性二次代謝物として、8-ニトログアノシン 3',5'-環状一リン酸（8-ニトロ-cGMP）、ニトロ化リノール酸、ニトロ化オレイン酸、15-デオキシ- $\Delta^{12,14}$ -プロスタグランジン J2（15d-PGJ2）、ヒドロキシノネナールなどが報告されている(9)。これらの親電子性分子は、タンパク質中のレドックスアクティブなシステイン（生理的pHでプロトンが解離している）に化学修飾することで、タンパク質の構造、機能を変化さ

せ、シグナルを伝達する。このようなシグナルを、“親電子シグナル”とよび、上述の親電子物質は、親電子性セカンドメッセンジャーとして機能する。特に8-ニトロ-cGMPのニトロ基は、タンパク質システインのチオール基と求核置換反応され、タンパク質中にcGMP構造を付加する翻訳後修飾（S-グアニル化）を行う(13)。8-ニトロ-cGMPは、レドックスアクティブなシステイン残基を有するセンサータンパク質を優先的にS-グアニル化し、そのタンパク質の活性を変化させることで細胞機能（抗酸化応答、オートファジー、細胞老化、開口放出など）の変化をもたらす(3, 13-17)。一方、8-ニトロ-cGMPを含む親電子性セカンドメッセンジャーは、活性イオウ分子（当初は、硫化水素と考えられていた）によりスルヒドリル化され、その親電子性を制御されていることが示されている。8-ニトロ-cGMPは、ニトロ基がスルヒドリル化され、8-メルカプト-cGMPに変換される（図3）(3, 5)。8-メルカプト-cGMPは、親電子性を持たないので、親電子シグナルのメッセンジャーとしては機能しないが、cGMP依存性キナーゼの活性化などcGMP様の活性を持ち、さらにホスホジエステラーゼに耐性を示すなどユニークな性質を持つ求核シグナルのセカンドメッセンジャーとして機能している可能性がある。

8-ニトロ-cGMPによるS-グアニル化を介した細胞老化の誘導機構が明らかにされている（図3）(3)。低分子量GTP結合タンパク質H-Rasには、レドックスアクティブなシステイン（Cys184）が存在する。8-ニトロ-cGMPは、Cys184をS-グアニル化し、Rasシグナリングを活性化し、下流のタンパク質キナーゼの活性化を介し、細胞老化を誘導する。初代培養心線維芽細胞や心筋細胞を8-ニトロ-cGMPで処理すると、S-グアニル化によるH-Rasの持続的な活性化、シグナル下流のタンパク質キナーゼの活性化、それに伴う細胞老化が誘導される。この結果は、心筋梗塞後のマウス心臓においてH-Ras活性が顕著に増大しており、活性化型H-RasがS-グアニル化されているというin vivoの結果と一致している。親電子性を制御している活性イオウ分子（または前駆物質）が、親電子シグナル誘導性の細胞毒性を調節していることが予測され、実際に細胞、マウス個体で検証されている(3)。マウスに活性イオウ分子の前駆物質である硫化水素ナトリウムを投与することにより、心筋梗塞後の8-ニトロ-cGMPの蓄積および左心室機能の低下が抑制され、初代培養心線維芽細胞においても、硫化水素ナトリウムが、8-ニトロ-cGMPにより誘導されるH-RasのS-グアニル化、下流シグナルの活性化および細胞老化を抑制することが示されて

図3 活性イオウ分子による親電子シグナルを介した細胞老化の調節

いる。上述のように、硫化水素は、細胞内で活性イオウ分子へと代謝されると考えられているので、実際は、活性イオウ分子が、8-ニトロ-cGMPを8-メルカプト-cGMPに変換することによって、親電子シグナルを介した細胞老化を抑制していると考えられる（図3）。

5. おわりに

親電子物質と求核物質のかかわりは、おそらく前生物的な“化学進化”の時代から、“生物進化”を経て、現在まで続いている。生物は常に親電子物質と接し、その反応性を利用しつつ、ときにはその反応性の高さに起因する毒性に苦しめられてきた。生物進化の過程で、親電子性を制御できるシステムを構築できた種は、毒性を回避することができ、生存に有利になったであろう。初期の親電子対策システムは、おそらく単純なもので、親電子物質の持つ毒性（あるいは高い反応性）を直接的に消去するものであり、進化が進むにつれ、高度で巧妙な（上述の親電子シグナルのような）システムが構築されたと考えられる。毒性であれシグナルであれ親電子性を制御するには、求核性が必要である。これまでに、ROSをはじめとする高い親電子性を持つ物質に関する研究は、多数なされてきた。一方で、求

核物質に関する研究は、グルタチオンや硫化水素など、比較的穏やかな反応性を持つ物質に限られていた。再発見された活性イオウ分子は、高い求核性、ユニークな化学特性、生体内含量などの点から、非常に興味深く、様々な細胞毒性の調節機構を理解する上で重要な分子となることが期待される。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Toohey JI. Anal Biochem. 2011;413:1-7.
- 2) Wang R. Physiol Rev. 2012;92:791-896.
- 3) Nishida M, et al. Nat Chem Biol. 2012;8:714-724.
- 4) Paul BD, et al. Nat Rev Mol Cell Biol. 2012;13:499-507.
- 5) Ida T, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111:7606-7611.
- 6) Ono K, et al. Free Radic Biol Med. 2014;77:82-94.
- 7) Halliwell B, et al. Free radicals in biology and medicine 2nd Ed. Oxford University Press; 1989.
- 8) Kumagai Y, et al. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2012;52:221-247.
- 9) Yoshida E, et al. Chem Res Toxicol. 2011;24:1633-1635.
- 10) Cuevasanta E, et al. J Biol Chem. 2015;290:26866-26880.
- 11) Marutani E, et al. Med Chem Comm. 2014;5:1577-1583.
- 12) Abiko Y, et al. Chem Res Toxicol. 2015;28:1796-1802.
- 13) Sawa T, et al. Nat Chem Biol. 2007;3:727-735.
- 14) Fujii S, et al. J Biol Chem. 2010;285:23970-23984.
- 15) Kasamatsu S, et al. Biochem J. 2014;459:251-263.
- 16) Ito C, et al. Mol Cell. 2013;52:794-804.
- 17) Kunieda K, et al. ACS Chem Neurosci. 2015;6:1715-1725.