シグナル分子としての硫化水素 (H_2S), ポリサルファイド (H_2S_n), 亜硫酸 (H_2SO_3)

木村 英雄

要約: シグナル分子としての硫化水素 (H_2S) を提案してから 20 数年が経つが, 神経伝達修飾, 平滑筋弛緩, 細胞保護, 抗炎症, 酸素センサー等, 様々な役割が報告されている. 一方, H_2S の神経伝達修飾作用機序を検討中に, アストロサイトの transient receptor potential (TRP) チャネル活性化を介した Ca^{2+} 流入惹起に関わることが分かり, さらに, この作用を惹起する分子実態がポリサルファイド (H_2S_n) であることが明らかとなった. H_2S が一酸化窒素 (NO) との相乗効果によって血管平滑筋を弛緩することは, H_2S 研究の初期に既に分かっていたが, 最近になって, H_2S_n が H_2S と NO との相互作用によりできることが判明し, H_2S と NO との相乗効果のメカニズムのひとつと考えられるようになった. H_2S や H_2S_n がさらに酸化されてできる亜硫酸 (H_2SO_3) が, H_2S や H_2S_n とは異なったメカニズムで神経細胞を酸化ストレスから保護することが分かり, これら分子の生体での重要性が注目されている.

1. 緒言

硫化水素 (H_2S) 中毒患者では, 主に中枢に障害が残ることや, 実験動物では神経伝達物質に変化が生じることから, 脳が主な標的と考えられた(1). 1989 年に脳内 H_2S 濃度が測定されたが, このときは適切な測定法ではなかったために, 実際よりもかなり高濃度存在すると報告された. 1986 年に一酸化窒素 (NO) がガス性シグナル分子として発見され, 1993 年には一酸化炭素 (CO) がこれに加わった. そのような背景のもと 1996 年に, 脳に H_2S 合成酵素として cystathionine beta-synthase (CBS) が存在し, H_2S がシナプスにおける記憶モデル海馬長期増強 (long-term potentiation: LTP) の誘導促進を行うことを示した(2). そのメカニズムとしては, NMDA 受容体のグルタミン酸結合

部位が錠状に合わさる部位の disulfide 結合が還元され, NMDA 受容体活性を亢進することによってと考えられた. ところが, より還元性の強い DTT よりも H_2S の方が強い作用を示すことから, H_2S による LTP 誘導亢進は単なる還元性によるものではないことが予想された.

シナプスを囲むグリアの一種であるアストロサイトから放出される D-serine などの gliotransmitter によって, シナプス伝達は調節される(3). H_2S がアストロサイトの transient receptor potential (TRP) チャネルを活性化し, Ca^{2+} 流入を誘導することがわかり(4), さらに, H_2S よりも S 数の多いポリサルファイド (H_2S_n) がより強い TRP ankyrin 1 (TRPA1) チャネルを活性化することが見つかった(5). これらの結果から, H_2S_n がアストロサイトの TRPA1 チャネルを活性化することにより流入した Ca^{2+} によって D-serine が放出され, NMDA 受容体活性亢進を行うことにより, LTP 誘導促進すると報告された(6, 7).

血管平滑筋では, H_2S 合成酵素として cystathionine gamma-lyase (CSE) が局在し, 平滑筋を弱いながら弛緩する. ところが, NO との相乗効果により強い弛緩作用を示した(8). H_2S と NO による相乗効果は回腸でも報告され, そのメカニズムの探索が進められた. 先ず, H_2S と NO とが反応することにより nitrosothiol ができることが提案された. その後, HSNO, HNO, HSSNO, H_2S_n が報告された(9).

H_2S 合成酵素としては, CBS, CSE, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST) がある. 3MST は, H_2S_n , cysteine persulfide (Cys-SSH), glutathione persulfide (GSSH) の合成やタンパク質を過硫化する(10, 11). この酵素は transfer RNA (tRNA) を過硫化することでも知られている. これらの酵素は cysteine を基質とするが, 3MST は cysteine aminotransferase (CAT) あるいは D-amino acid oxidase (DAO) を必要とする(12, 13).

キーワード: 硫化水素, ポリサルファイド, 亜硫酸, シグナル分子

山陽小野田市立山口東京理科大学 薬学部 薬理学 (〒756-0884 山口県山陽小野田市大学通 1-1-1)

E-mail: kimura@rs.socu.ac.jp 原稿受領日: 2019 年 6 月 3 日, 依頼原稿

CATはL-cysteineと α -ketoglutarateから3MSTの基質となる3-mercaptopyruvate (3MP)を生合成し、DAOはD-cysteineから3MPを生合成する。

H_2S の作用の一つとして細胞保護作用がある。Cystine/glutamate antiporter 及び cysteine transporterの活性を亢進し、細胞内にcystineとcysteineの取り込みを上昇することで、細胞内cysteine濃度を上昇する。さらに、glutathione合成律速酵素であるcysteine glutamate ligase (CGL)活性を上昇させる。これらの統合的作用によって細胞内主要還元物質であるglutathione量を増やすことにより、酸化ストレスを抑制する(14)。また、 H_2S には、ATP-dependent K^+ チャネル (K_{ATP})や、cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl^- チャネルを活性化し、異常な細胞膜興奮を抑制することにより、神経細胞を保護する作用もある(15)。

H_2S_n の神経細胞保護作用も報告されている。Keap1のシステインを過硫化するることによってKeap1/Nrf2複合体からNrf2を遊離し、核内に移行させる。Nrf2は、CGLなどの抗酸化遺伝子群の転写を亢進し、グルタチオン合成を上昇させ、細胞を酸化ストレスから保護する(16)。

2. 過硫酸化分子と結合型イオウ

細胞内には、還元状態で H_2S を発生させるイオウ分子が存在し、結合型イオウと呼ばれている。これらは、 H_2S , Cys-SSH, GSSH, persulfurated proteins等からなり、3MSTによって生合成される(10, 11)。このことは、3つの観察結果から予想されていた。①3MSTを発現している細胞では、コントロールに比べ、結合型イオウレベルが有意に高い。活性中心欠損3MSTでは、 H_2S や H_2S_n を生合成できず、これを発現している細胞では結合型イオウのレベルはコントロールと差が認められない。②LやD-cysteineをマウスに経口投与すると、3MST, CAT, DAOを発現している組織での結合型イオウ量がコントロールと比較して有意に上昇する。③3MSTノックアウトマウス脳の結合型イオウ量は、野生型マウス脳の半分以下である。結合型イオウは、 H_2S の保存型として、また、酸化還元恒常性に寄与していると考えられている。

3. 標的タンパク質の過硫酸化によるシグナル伝達

過硫酸化による酵素活性調節は、serine dehydrataseで初めて報告された。一方、細胞内に過硫酸化されたタンパク質が存在することは、Warencyaらによって発見された。これは、組織ホモジネートにDTTを加え

図1 S-sulfurationとphosphorylationの比較(文献9からの転載)

ると H_2S が発生することから見つかった。このような背景のもと、Snyderらは、 H_2S のシグナル伝達様式として、標的タンパク質のcysteine残基を過硫化するることによって構造変化を引き起こし、その活性を調節すると考え、S-sulfhydration (S-sulfuration)と名付けた(17)。この過硫酸化による標的タンパク質の活性調節は、リン酸化のそれとよく比較される(図1)。リン酸化は、標的タンパク質のserine, threonine, tyrosineにkinaseによってリン酸基が付加される。この時、2つの負イオンにより、周りの正あるいは負イオンとの引力・斥力によって構造変化が起こる。一方、S-sulfurationでは、負イオン一つが加わる。Cys-SHのpKaは8.29であり、Cys-SSHのそれは4.34であることから、生理的pHにおいては、Cys-SSHはCys-SS⁻とH⁺とに解離する。一方、Cys-SHは解離しない。S-sulfurationは拡散した H_2S や H_2S_n 、あるいは3MSTによるtranssulfurationによってできる。分子量の増加についてみると、リン酸化では95増加するが、S-sulfurationでは32の増加にとどまる。しかし、過硫酸化したcysteine残基(Cys-SS⁻)としていないCys-SH間との反応により、cysteine disulfide bondができる。これによって効率的に構造変化を起こすと考えられる(9)(図2)。

同じ酸化数を持つ原子間では酸化還元反応は起こらない。タンパク質cysteine残基のSの酸化数と H_2S のそれとはともに-2で反応しない。一方、酸化されたS、例えば、Cys-SOHやCys-SNOと H_2S は反応し、過硫酸化し、Cys-SSHができる。ここで興味深い例として、パーキンソン病の原因タンパク質と考えられているパーキンが挙げられる。パーキンソン病患者脳では、パーキンのcysteine残基はS-nitrosylate (Cys-SNO)されている。一方、健常人脳ではS-sulfurate (Cys-SSH)されていることが報告されている(18)。この場合、

図2 S-sulfurationによる標的タンパク質の活性制御（文献9からの転載）

Cys-SNO は、 H_2S によって効率よく Cys-SSH に還元される。

内在性 H_2S_n 、Cys-SSH、GSSH が存在することから、S-sulfuration が細胞内でのシグナルや酸化還元恒常性に関与していることが予想された。内在性 H_2S_n は脳で最初に見つかり、TRPA1 チャンネルを活性化することが明らかとなった。Protein kinase G1 α やがん抑制因子 PTEN の活性も H_2S_n で制御されることが報告されている。

これら H_2S_n の標的では2つの cysteine 残基が標的になっているタンパク質が多く見受けられる。TRPA1 では cys422 と cys634、PTEN では cys71 と cys124、Keap1 では cys266 と cys613、protein kinase G1 α ではそれぞれモノマーの cysteine 残基が cysteine disulfide bond を形成しダイマーとなることで、活性化される(9) (図2)。これらでは、上述したが、一方の cysteine 残基が過硫化 (Cys-SS $^-$) され、他方の cysteine 残基 (Cys-SH) と反応することによって disulfide bond ができる。両方の cysteine 残基が過硫化 (Cys-SSH) される可能性もあるが、disulfide bond 形成に比較して、構造変化は小さく、活性の変化もそれに伴って小さいことが予想される。

一方で、ひとつの cysteine 残基の過硫化で、活性が調節されるタンパク質もある。K_{ATP} は、cys43 の過硫化によって活性化される。

4. H_2S_n の生合成

H_2S_n がアストロサイトに強い Ca^{2+} 流入作用を持つことがわかり、生体内物質として存在している可能性について検討し、まずは、脳に存在し、3MST によって

生合成されることを確認した。線虫の 3MST はその構造中に thioredoxin domain が存在することから、哺乳類の 3MST は thioredoxin と相互作用することが予想された。確かに、3MST は thioredoxin 存在下に効率よく H_2S を生産する(19)。野生型マウス脳細胞では、 H_2S_2 や H_2S_3 が効率よく生産されるが、3MST ノックアウトマウス脳では、ほとんど生産されない。永原らによると、3MST の活性中心に trisulfide ができ、これが thioredoxin によって還元され、まず H_2S_2 ができ、その後、 H_2S や H_2S_3 ができると考えられている(20)。最近の計測では、脳において H_2S_2 は H_2S とほぼ同じ濃度存在していることが報告されている(21)。

Thiol や polysulfides はアルキル化剤でラベルして測定されるが、これらの分子は反応性が高いために、それぞれ自身との反応とアルキル化剤によるラベル化との競合になってしまう。アルキル化剤のひとつである monobromobimane は、アルカリ性で反応させるが、小池らの検討によると、アルカリ性条件では、 H_2S が多く見積もられてしまい、 H_2S_2 や H_2S_3 は過小に評価されてしまう。これを防ぐ方法として、中性で反応することを勧めている。この条件では、 H_2S_2 や H_2S_3 も安定に測定可能であると報告している(21)。そのほかのアルキル化剤として iodoacetamide (IAM) や N-ethylmaleimide (NEM) が使われているが、反応時間が3時間と長く、 H_2S_3 が cysteine や glutathione と15秒という短時間にほとんど反応してしまうことを考えると、生体内にある状態を反映しているとは考えにくい(10)。

5. Cys-SSH や GSSH の産生

3MST による H_2S_n 合成を検討中に反応溶液中の cysteine や glutathione が減少していくことに気づき、合成された H_2S_n が cysteine や glutathione と反応し、Cys-SSH や GSSH ができるためであろうと考えた。確かに、Cys-SSH、GSSH、Cys-SS $_n$ H や GSS $_n$ H が合成されていた。しかし、脳細胞では、Cys-SSH と GSSH が主産物であり、Cys-SS $_n$ H や GSS $_n$ H はほとんど検出されなかった(10)。これら産物は、共存する cysteine や glutathione の濃度に依存しており、生理的濃度条件下においては、Cys-SSH と GSSH が主に生産されることが明らかになった。 H_2S_2 を介さずに Cys-SSH と GSSH を生産するメカニズムとしては、3MST がその活性中心 cysteine 残基に 3MP から S を受け取り、それを Cys-SH や GSH に直接受け渡すことも考えられる。

3MST は細胞質とミトコンドリアとに存在し、tRNA thiouridine modification protein としても知られている。

Uridine のチオール化は遺伝コードの正確な解釈と tRNA 構造の安定化に必要と考えられている。3MST は 3MP から S を引き抜き、他の 3MP に S を加えて過酸化することもできるが、cysteine の方が S の良い受け手であり、これを過酸化する(9)。ミトコンドリアの 3MST は、 H_2S を合成し、電子輸送と酸化的リン酸化を制御しており、3MST を抑制すると、ATP 合成や酸素消費が減少する。

最近、tRNA にアデニル化 cysteine を付加する cysteinyl tRNA synthetase (CARS) が、Cys-SSH を合成することが報告された(22)。CARS は cysteine から S を取り出すが、cysteine は 3MP ほど反応性が高くないため、pyridoxal phosphate (PLP) の助けを必要とする。取り出された S は、他の cysteine が受け手となり、これを過酸化する。

そのほかにも、過酸化を行う酵素が報告されている。生体内の H_2S 濃度は、その合成と分解のバランスによって制御されている。 H_2S はミトコンドリアで主に分解されるが、その最初のステップは、sulfide-quinone oxidoreductase (SQR) によって行われる。SQR の活性中心の cysteine が過酸化され、これを GSH、 H_2SO_3 、 H_2S 、cysteine、homocysteine に付加し、GSSH、 H_2SSO_3 、 H_2S_2 、Cys-SSH、Hcy-SSH ができる(23)。この経路は酸化的リン酸化とカップルしており、2 電子が SQR 結合 flavin adenine dinucleotide (FAD) から FADH2 そして coenzymeQ へと移動する。

H_2S のミトコンドリアでの分解系の酵素である persulfide dioxygenase (ETHE1) の損傷により H_2S が分解されず高濃度になる ethylmalonic encephalopathy という疾患が知られている。この疾患では主に、骨格筋と脳が障害を受ける(24)。

ヘムタンパク質である hemoglobin, myoglobin, neuroglobin や catalase も H_2S を酸化して polysulfides を産生する。中心の Fe^{3+} に H_2S が結合し、 Fe^{2+} の sulfhemoglobin ができる。 H_2S と酸素との比率が重要で、 H_2S が低濃度の場合は、thiosulfate が主に産生され、高濃度では polysulfides ができる(25)。

Neuroglobin は主に神経系で発現しており、 H_2S の酸化効率率は hemoglobin や myoglobin に比べ低い(26)。SQR は脳ではほとんど発現していないため、neuroglobin が H_2S の代謝を担っているのではないかと考えられている。

Copper/zinc superoxide dismutase (SOD) や manganese SOD も H_2S を酸化し、polysulfides を合成する(27)。また、lactoperoxidase や myeloperoxidase も H_2O_2 の存在下で、polysulfides を産生する(28)。

6. H_2S と NO とのクロストークと H_2S_n の産生

H_2S 単独では弱い血管弛緩作用しか示さないが、NO が共存すると非常に強い弛緩作用を示す。同様の相乗効果が回腸でも報告された。 H_2S と NO とのクロストークは大きく分けて 2 様式に集約される。① H_2S と NO が反応して新たな分子ができ、それが相乗効果を示す。② H_2S が NO 合成酵素の活性を亢進し、強い作用を示すようになる。Whiteman らは、 H_2S と NO から nitrosothiol ができると報告した(29)。その後、HSNO、HNO、HSSNO、 H_2S_n ができることが次々と示された。HSNO は非常に不安定で HNO になる。Ebenhardt らも Cortese-Krott らもいずれも H_2S_n ができるとも示したが、もっぱらその研究は、それぞれ HNO と HSSNO に注がれた(30, 31)。しかし、私たちは、 H_2S と NO からできる活性分子は、 H_2S_n と結論付けた(32)。それは以下の理由による。① H_2S と NO からできる活性分子は H_2S_n 同様、シアンによって分解される。一方、HNO はシアン抵抗性である。② HSSNO は還元に対して抵抗性であるが、 H_2S と NO からできる活性分子は H_2S_n 同様、還元によって分解する。

7. 亜硫酸 (H_2SO_3) による神経細胞保護

H_2S や H_2S_n がそれぞれ glutathione 合成を促進して神経細胞を酸化ストレスから保護する(14, 16)。これら分子のさらに酸化された亜硫酸が脳に存在し、細胞外 cystine を cysteine に変換し、細胞内に取り込みやすくしている(図 3)。その結果として、 H_2S や H_2S_n 同様、細胞内 glutathione 合成を亢進し、細胞を酸化ストレスから保護する(33)。ただ、cystine と亜硫酸が反応し、cysteine ができるときに S-cysteinesulfonate もできる。これは、NMDA 受容体アゴニストであり、興奮性毒性を示す物質でもある。内在性亜硫酸は低濃度であるが、酸化ストレスによる神経疾患への治療応用を考えると、留意しなければならない。また、亜硫酸はワインなど食品保存料としても使われているが、これに対してアレルギーのある人には注意が必要となる。

8. がんと H_2S

肺 adenocarcinoma ではその周りの正常な細胞に比べ CBS、CSE、3MST の発現が高い。 H_2S は、ミトコンドリア DNA をその特異的修復酵素活性亢進によって修復する(34)。また、細胞内 ATP 産生を上昇する。これらの活性はまた、大腸がん、乳がん、卵巣がんにもみられる。それとは対照的に、CBS が抑制された glioma では、VEGF や HIF2a レベルが上昇し、浸潤、

図3 H₂S, H₂S_n, H₂SO₃による酸化ストレスからの神経細胞保護メカニズム (文献 38 からの転載)

細胞増殖が活発化している。ここでは、CBS/H₂S は glioma を抑制する方向に働く (35)。このようにがんの種類によって H₂S への反応性が異なることについては今後の研究に期待したい。

H₂S_n 等 polysulfides についてみると、悪性の高い glioma では polysulfides レベルが正常脳に比べて高い (36)。同様に、glioblastoma は、それを含まない脳半球に比べ H₂S_n レベルが高いと報告されている (37)。これらのことから、polysulfides は glioma の増殖を亢進し、悪性度との間に相関があるようである。

9. 結語

H₂S に加えて、H₂S_n, Cys-SSH, GSSH, persulfurated proteins などの過硫化分子が生体内に存在し、シグナル分子や酸化還元恒常性に寄与していることが分かってきた。そしてこれらを産生する酵素や反応分子も明らかになっている。ただ、これらの分子は非常に反応性が高く、不安定でもあり、生体内での状態はまだ明らかになっていない。脳では、H₂S₂ が H₂S とほぼ同濃度存在することが報告されており、小分子であるためにタンパク質内部の cysteine 残基にも接近可能で、それらを過硫化し、シグナルを伝達すると考えられる。反応後は、細胞内に大量に存在する GSH によって還元され、元の cysteine 残基に戻り、反応が終息すると考えられる。ただ、これら合成酵素の活性がどのような生理的刺激によって調節されているかはまだ明らかになっていない。

3MST ノックアウトマウス脳では結合型イオウ量が半分以下になるが、残りの半分が他の酵素によって産生されているのか、あるいは、全く性質の異なった分子群からなるのかはこれから解決していかなければならない問題である。

Parkin では、特定の cysteine 残基が S-nitrosylate されていると、より発症の方に向かい、S-sulfurate されていると、健常が保たれると考えられる。特に、同一の cysteine 残基の場合は、S-nitrosylate された残基は H₂S によって S-sulfurate されることが予想され、過硫化分子よりも H₂S が治療に応用できそうである。

H₂S や polysulfides あるいはこれらの生産酵素を調節することで、がん細胞の増殖や浸潤の抑制に応用し、酸化還元に関わる神経変性疾患や心疾患の治療への応用も視野に入ってくるのではないかと期待している。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Reiffenstein RJ, et al. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1992;32:109-134.
- 2) Abe K, et al. J Neurosci. 1996;16:1066-1071.
- 3) Nedergaard M. Science. 1994;263:1768-1771.
- 4) Nagai Y, et al. FASEB J. 2004;18:557-559.
- 5) Nagai Y, et al. J Pharmacol Sci. 2006;100:200.
- 6) Kimura Y, et al. FASEB J. 2013;27:2451-2457.
- 7) Shigetomi E, et al. J Neurosci. 2013;33:10143-10153.
- 8) Hosoki R, et al. Biochem Biophys Res Commun. 1997;237:527-531.
- 9) Kimura H. Br J Pharmacol. 2019 in press.
- 10) Kimura Y, et al. Sci Rep. 2017;7:10459.
- 11) Kimura Y, et al. Sci Rep. 2015;5:14774.

- 12) Shibuya N, et al. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11:703-714.
- 13) Shibuya N, et al. *Nat Commun*. 2013;4:1366.
- 14) Kimura Y, et al. *FASEB J*. 2004;18:1165-1167.
- 15) Kimura Y, et al. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8:661-670.
- 16) Koike S, et al. *FEBS Lett*. 2013;587:3548-3555.
- 17) Mustafa AK, et al. *Sci Signal*. 2009;2:ra72.
- 18) Vandiver MS, et al. *Nat Commun*. 2013;4:1626.
- 19) Mikami Y, et al. *Biochem J*. 2011;439:476-485.
- 20) Nagahara N, et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;496:648-653.
- 21) Koike S, et al. *Free Rad Biol Med*. 2017;113:355-362.
- 22) Akaike T, et al. *Nat Commun*. 2017;8:1177.
- 23) Landry AP, et al. *J Biol Chem*. 2017;292:11641-11649.
- 24) Tiranti V, et al. *Nat Med*. 2009;15:200-205.
- 25) Bostelaar T, et al. *J Am Chem Soc*. 2016;138:8476-8488.
- 26) Ruetz M, et al. *J Biol Chem*. 2017;292:6512-6528.
- 27) Olson KR, et al. *Redox Biol*. 2018;15:74-85.
- 28) Garai D, et al. *Free Radic Biol Med*. 2017;113:551-563.
- 29) Whiteman M, et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;343:303-310.
- 30) Eberhardt M, et al. *Nat Commun*. 2014;5:4381.
- 31) Cortese-Krott MM, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:E4651-E4660.
- 32) Miyamoto, et al. *Sci Rep*. 2017;7:45995.
- 33) Kimura Y, et al. *Br J Pharmacol*. 2019;176:571-582.
- 34) Szczesny B, et al. *Sci Rep*. 2016;6:36125.
- 35) Tanako N, et al. *Mol Cancer Res*. 2014;12:1398-1406.
- 36) Wrobel M, et al. *Molecules*. 2014;19:21350-21362.
- 37) Shiota M, et al. *Nat Commun*. 2018;9:1561.
- 38) Kimura H. *Int Neurochem*. 2019;126:118-125.

Signaling molecules hydrogen sulfide (H₂S), polysulfides (H₂S_n), and sulfite (H₂SO₃)

Hideo Kimura

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Science, Sanyo Onoda City University

Abstract. More than twenty years have passed since the demonstration of hydrogen sulfide (H₂S) as a signaling molecule. Various roles of this molecule have been reported including neuromodulation, vascular relaxation, cytoprotection, anti-inflammation, and oxygen sensing. During the study of its effect on neuromodulation, we found TRP channels as a target of H₂S, and later identified polysulfides (H₂S_n) as chemical entity of the ligand. We found that H₂S relaxes vasculatures in synergy with NO, and recently identified H₂S_n as products produced by the chemical interaction between H₂S and NO to exert the effect, suggesting that it may be a mechanism for the synergy between the two molecules. It has attracted attention that sulfite, a further metabolite of H₂S and H₂S_n, protects neurons from oxidative stress by a mechanism different from that by H₂S and H₂S_n.