

硫化水素 (H₂S) の生理機能と医療応用

木村 英雄

硫化水素 (H₂S) と言えば、「卵の腐敗臭」と「毒ガス」というキーワードがまず思い浮かぶ。「生理活性物質」とはつながりそうにない。しかし、地球にはその昔このガスで満たされていた時期があり、その名残とも言うべきか、H₂S が噴出する海底火山にはこれを利用する生物がいる。メチオニン、システイン、グルタチオン、コエンザイム A などに含まれる硫黄は生物界において極めて重要な働きを担っている。この硫黄を他の化合物に転移する酵素 sulfurtransferase の研究が 1950 年代から 1970 年代にかけて精力的に行われた。これら一連の研究で酵素活性マーカーとして登場したのが H₂S であり、あくまでも代謝経路の副産物としてしか捉えられていなかった。1989 年から翌年にかけて、哺乳類の脳に内在性 H₂S が存在することが報告され、H₂S が何らかの生理活性を持つことが予想された。ここでは、生理活性物質としての H₂S とその医療応用への取り組みについて概説する。

1. はじめに

1996 年に私たちは、シスタチオニン β-シンターゼ (cystathionine β-synthase: CBS) が脳で H₂S を生産し、H₂S が記憶のシナプスモデル、海馬長期増強 (long-term potentiation: LTP) の誘導促進を行うことから、神経調節物質 (neuromodulator) として機能していることを提案した¹⁾。翌 97 年に、H₂S のもう一つの生産酵素シスタチオニン γ-リアーゼ (cystathionine γ-lyase: CSE) が血管平滑筋、門脈、回腸などの平滑筋組織に局在し、H₂S がこれらの組織を弛緩させることから、平滑筋弛緩因子としての働きを提案した²⁾。これらは H₂S のシグナル分子としての局面である。それに加えて私たちは、H₂S の細胞保護作用を見つけた。「毒ガス」としての印象が強いために見落とされていた機能である。H₂S は神経細胞を酸化ストレスから保護

した³⁾。この研究は、心筋保護作用の発見へとつながった⁴⁾。このような研究の流れの中で、私たちは最近、第 3 番目の生合成酵素として 3-メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素 (3-mercaptopyruvate sulfurtransferase: 3MST) が神経細胞や血管内皮に局在することを見いだした^{5,6)}。

ここ数年、H₂S 研究論文数は年々増加し、抗炎症⁷⁾、インスリン分泌調節^{8,9)}、血管新生^{10,11)}、酸素センサー^{12,13)}、小胞体ストレス調節¹⁴⁾、NF-κB 調節を介した抗アポトーシス作用¹⁵⁾、さらには、細菌の抗生物質抵抗性も H₂S によって調節されているという報告が出るほどである¹⁶⁾。すなわち、H₂S の細胞保護機能は細菌から哺乳類に至るユニバーサルな自己防御機構であることを示している。生物研究においては、細菌で得られた結果を哺乳類で検証するというのが一般的な流れである。しかしここでは、哺乳類で見つかった三つの生産酵素 CBS, CSE, 3MST を細菌で欠失させると、細菌の抗生物質抵抗性が失われた。哺乳類での発見が細菌でも成立したという逆の流れになっている。このような、さまざまな働きを持つ H₂S の細胞内動態をリアルタイムで観察しようと、H₂S 蛍光プローブも昨年数種類開発された¹⁷⁻²¹⁾。

2. H₂S の性質

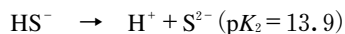
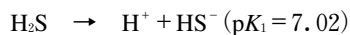
H₂S は水溶性であり、30℃ では水 314 ml に 1 g 溶解す

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 神経薬理研究部 (〒187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1)

Physiological functions of hydrogen sulfide (H₂S) and its therapeutic applications

Hideo Kimura (Department of Molecular Pharmacology, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan)

る。その上、脂溶性でもある。水溶液中では H^+ と HS^- に解離し、生理的条件下 (37°C, pH 7.4) では、約 4/5 が HS^- に解離し、残り 1/5 は解離せず H_2S として存在する。 S^{2-} まで解離することはほとんどない。



細胞内では、細胞質の pH は 7.0~7.2 で、細胞外より pH が低いために、細胞外に比べて非解離 H_2S の HS^- に対する存在比率が高くなるため、約半分が非解離 H_2S として存在する²²⁾。さらにゴルジ体では pH は 6.0~6.7, リソゾームで pH 4.7 であり、このような細胞内小器官では非解離 H_2S の存在比率がさらに高くなると考えられる。

H_2S 分子と H_2O 分子とを比較してみると、H-S 間距離は 0.134 nm であるのに対して H-O は 0.0957 nm, H-S-H の結合角度が 92 度, H-O-H は 104.52 度で、両者の構造は酷似している。そのため、 H_2S は水チャネル (aquaporin) を通過するのではないかと多くの研究者が予想した。ところが、Mathai らの研究によると、脂溶性でもある H_2S は人工脂質二重膜を自由に通過し、コレステロールやスフィンゴミエリンといった膜拡散性を減少させる物質が存在していても何ら妨害を受けずに通過できる²³⁾。一方、脂質二重膜に再構築した水チャネルは、水分子を良く通すものの H_2S 通過については脂質二重膜の単純拡散と同程度であった。先にも述べたように、細胞外に比べて、細胞内に H_2S が多く存在することから、 H_2S は存在比率の高い細胞内から細胞外に向かって脂質二重膜を通過し、その逆が起こる率は低いと考えられている (図 1)。

Mathai らはまた、生理的条件下での主たる存在形態 HS^- が陰イオンチャネルを透過する可能性について理論的な検討を行っており、現在知られている陰イオンチャネル

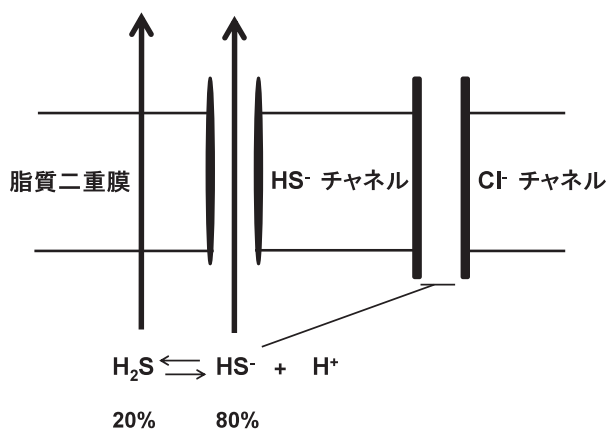


図 1 H_2S の脂質二重膜透過性

H_2S は脂質二重膜を自由に通過する。生理的条件下では、約 80% が解離した HS^- で、残り 20% が解離していない H_2S ガスである。現在知られている陰イオンチャネルは H_2S を通さない。しかし、最近、細菌で HS^- チャネルが発見された。

が HS^- を通過することはないと結論付けている²³⁾。ところが、今年に入って、細菌の HS^- チャネルが同定された。このチャネルは細胞内から細胞外へ HS^- を通す²⁴⁾。細菌においては、 H_2S は細胞外から脂質二重膜を通過して細胞内へ入り、細胞内からは HS^- チャネルを通過して細胞外に出るといのである。遺伝子の相同性などから判断するとこのチャネルは哺乳類には存在しないらしい。もっとも、アミノ酸配列上相同性はないが HS^- を通過させる機能を持つチャネルが哺乳類にも存在する可能性がないとは断言できない (図 1)。

3. 内在性 H_2S 濃度

遊離の H_2S に加えて、細胞には H_2S を放出する硫黄プールが少なくとも 2 種類存在する。一つは酸不安定型硫黄で、その主なものは、呼吸鎖を構成する酵素の活性中心に存在し、酸化還元反応をつかさどっている鉄硫黄クラスター中の硫黄原子である²⁵⁾。この硫黄原子は、酸性条件下で H_2S として放出されることから、このように呼ばれている。もう一つの硫黄プールは結合型硫黄である。これはタンパク質のシステイン残基などのチオール基にさらに硫黄が結合したもので、還元条件下で H_2S を放出する^{25, 26)}。

1) 酸不安定型硫黄

初期に測定された内在性 H_2S は、基本的にメチレンブルー法で測定された。これは HCl 存在下で、*N,N*-ジメチル-p-フェニレンジアミン硫酸と $FeCl_3$ とを H_2S と反応させるとメチレンブルーを形成する反応を利用しており、できたメチレンブルーを分光光度計で測定し、 H_2S を定量する測定法である。酵素的に産生される H_2S 量を測定するために、細胞ホモジネートを過剰の基質存在下で反応させ、生産されてくる大量の H_2S をメチレンブルー法で測定する場合は、酸不安定型硫黄から同時に放出される H_2S 量と酵素反応で産生される H_2S の両者を測定する。そこで、基質を除いたコントロール、すなわち組織ホモジネートに存在する酸不安定型硫黄から放出される H_2S 量、を全体 H_2S 量から差し引けば酵素によって産生された H_2S を算出することができる。しかし、この方法で、内在性 H_2S を測定しようとする、内在性遊離 H_2S に加えて、はるかに大量の酸不安定型硫黄由来の H_2S をも測定してしまうことになる。初期に測定された内在性 H_2S が、実際に存在する濃度より高かったのはこの理由による^{27~29)}。

酸不安定型硫黄量を、肝臓、心臓、脳で比較すると、心臓で最も高く、400 nmol/g タンパク質を超える。肝臓と脳がほぼ同程度で、150 nmol/g タンパク質前後である²⁵⁾。では、生体内でこの酸不安定型硫黄から遊離 H_2S に移行することがあるか、という疑問が湧いてくる。前述のように、酸不安定型硫黄は主として呼吸鎖を構成する酵素中の

鉄硫黄クラスターとして存在するが、これらの酵素はミトコンドリアに局在する。酸不安定型硫黄から H_2S が放出されるのは pH 5.4 以下の酸性条件下であるが、ミトコンドリア内は pH 8 付近であり、酸不安定型硫黄から H_2S が生理的に放出されることはないと思われる²⁵⁾。

2) 結合型硫黄

結合型硫黄量を、肝臓、脳、心臓で比較すると、酸不安定型とは対照的に、肝臓で最も高く約 $6 \mu\text{mol/g}$ タンパク質、脳で約 $2 \mu\text{mol/g}$ タンパク質、心臓が最も低く、約 $0.1 \mu\text{mol/g}$ タンパク質程度である²⁵⁾。それでは、結合型硫黄から遊離 H_2S が放出される可能性はあるのだろうか。結合型硫黄は、還元条件下で H_2S を放出するので、細胞内還元状態が強くなると放出されると考えられる。細胞内に豊富に存在する還元物質として、グルタチオンやシステインがあるが、これらの還元力はアルカリ性で強くなる(図2)。実際、生理的濃度のグルタチオンやシステインの存在下で、pH 8.4 までアルカリ側に持っていくと、神経細胞やグリア細胞のホモジネートから H_2S が放出される。それでは、生理的条件下で細胞内がアルカリ性に傾くことはあるだろうか。もちろんここで考える pH 変化は全身性のものではなく、あくまでも細胞局所における変化である。ちなみに、アシドーシスやアルカローシスにおける全身性の pH 変動はたかだか 0.2 である。神経細胞が興奮すると Na^+ が細胞内に流入し、 K^+ が細胞外に放出される。これによって神経細胞とそれを取り囲むアストロサイトとの細胞間 K^+ 濃度は 10~12 mM に達し、アストロサイトの膜電位が脱分極する。Brooks と Turner によると、これに続いてアストロサイトの $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ トランスポーターが活性化され、細胞内 HCO_3^- 濃度が上昇し、アルカリ性に

傾く³⁰⁾。このような条件下では約 1 割のアストロサイトの pH が 8.4 に達したが、放出量が低いこともあり、 H_2S 測定は成功していない²⁵⁾。

3) 遊離 H_2S

遊離 H_2S 測定には銀-硫黄電極が汎用されている。しかし、この方法も組織や血液などタンパク質含有サンプルの測定には適していない。なぜなら、この電極では、解離した S^{2-} (解離定数 $\text{pK}_a=13.9$) を測定するため、サンプルをアルカリ性にする必要があるが、このとき、タンパク質中の SH 基から H_2S が発生してしまい、遊離 H_2S 濃度をはるかにしのぐ値が観察されてしまうからである³¹⁾。最近、タンパク質から放出される H_2S の混入を防ぐ工夫を凝らした三つの方法が開発された。第1の方法は、三方コックに連結した2本のシリンジで組織をホモジナイズし、遊離した H_2S をコックから採取し、ガスクロマトグラフィーで測定する方法で、この方法では 10 数 nM という値が得られた^{32,33)}。ここでは組織非存在下で Na_2S から放出された H_2S をコントロールとしているが、遊離 H_2S は即時に組織に吸収されるため、サンプル値が低めに補正されてしまう。第2の方法は、チオールに結合する蛍光色素であるモノブロモビマン (monobromobimane) と質量分析を組み合わせた方法である³⁴⁾。組織ホモジネートにモノブロモビマンを加え、チオールと結合したモノブロモビマンを回収する。これを質量分析で解析し、 H_2S と結合したモノブロモビマン量から、 H_2S 量を決定する。この方法では数 μM の H_2S が検出された。第3の方法は、組織ホモジネートに銀粉を混ぜ、遊離 H_2S が銀粒子表面に硫化銀として補足されるという反応を利用するものである。銀粉を界面活性剤で洗浄し、表面に付着したタンパク質を除去した後、硫化

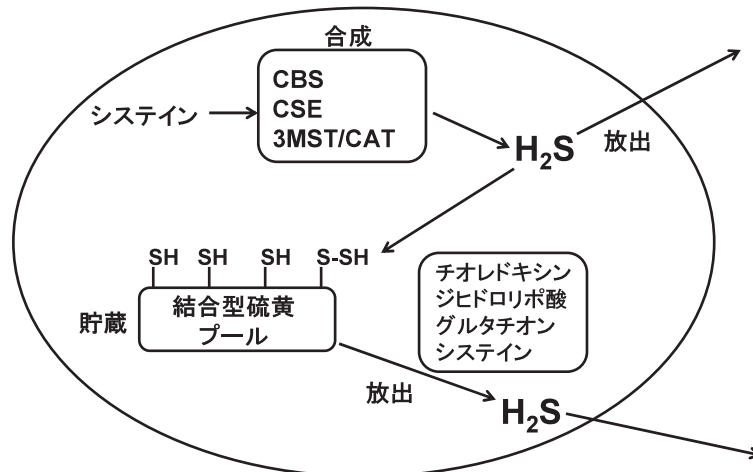


図2 H_2S 合成, 貯蔵, 放出

H_2S は CBS, CSE, 3MST/CAT 経路により生合成される。その後、シグナル分子として働き、結合硫黄プールに貯蔵される。細胞内がアルカリ側に傾くと貯蔵された H_2S が放出される。

銀をチオ尿素と硫酸で H_2S に変換してガスクロマトグラフィーで測定する²⁵⁾。この測定法の検出限界は、組織内濃度に換算して $9.2 \mu\text{M}$ となり、組織内遊離 H_2S は検出限界以下であった。前述のように、遊離 H_2S は組織に即座に吸収されてしまうため、これらの方法で測定された H_2S は吸収されきれずに残った余剰 H_2S が定常状態量として測定されたものである。

H_2S の生産、代謝、酸化、蒸発、そして結合型硫黄への取り込みは、いずれも速やかに行われるため、これらの測定法では、細胞内 H_2S 動態をリアルタイムで測定することはできない。そこで開発されたのが、次に述べる H_2S 感受性蛍光プローブである。

4. H_2S 感受性蛍光プローブ

H_2S 感受性蛍光プローブの開発は最近になって急速に進み、2011年に相次いで報告された。 H_2S との反応様式から3種類に分類される。1) アジ化物と H_2S からアミンができる反応により電子が移動し、蛍光発光体が蛍光を発する。SF1, SF2やDNS-Azなどのプローブがこれに属する^{17,19)}。2) H_2S が電子親和性基と反応しチオールを有する中間体を形成し、これが隣接するエステル基と反応して環状になる。このとき、蛍光発光体が遊離し、脱クエンチングにより蛍光を発する。または、電子が蛍光発光体に移動し、発光を発する。Probe1, SFP-1, SFP-2がこれに属する^{18,19)}。3) 銅イオンは環状のアザマクロ環と安定な複合体を形成して、蛍光発光体が発光しないように抑制をかけているが、 H_2S が銅イオンを追い出すと脱抑制により蛍光を発する。HSIP-1がこれに属する²¹⁾。

チオールを検出するプローブは早くから開発されていた。このプローブは、生体内で最も安定で、しかも mM オーダーで存在するグルタチオンと真っ先に反応する。システインも約 $100 \mu\text{M}$ 存在するため、それ以下の濃度で存在する物質はほとんど検出できない。もし検出されても両物質による大きなバックグラウンドのなかに埋没してしまう。そこで、 H_2S 蛍光プローブの開発では、特に、グルタチオンやシステイン存在下においても H_2S を明確に区別して測定できることに重点が置かれた。どのプローブも H_2S に対する親和性がグルタチオン、システインに対して高く、特に、HSIP-1では1,000倍の差があり、 $10 \mu\text{M}$ H_2S と 10 mM グルタチオンとの区別ができる。ただ、これら七つのプローブ間では、 H_2S との反応終了時間が大きく異なり、25秒から1時間と幅広い。反応終了時間が長いものはリアルタイムの検出とは言いがたい。また、どのプローブも非可逆反応で一旦 H_2S と反応すると元に戻らないため、周りの H_2S が消滅してしまった後も、蛍光を発し続けていることになる。また、 H_2S が刺激により減少する場合は、 H_2S の減少を測定できないことになる。このあ

りの改善が待たれる。

5. H_2S 合成酵素

合成酵素には CBS, CSE, 3MST の三つが知られている。

1) CBS

CBS はピリドキサル 5'-リン酸 (pyridoxal 5'-phosphate : PLP) 依存性酵素で、多くの組織に発現しており、肝臓、腎臓に特に多く、脳ではアストロサイトに局在する^{1,35~38)}。小脳のプルキンエ細胞や海馬の錐体細胞などの神経細胞にも局在するという報告もあるが、私たちのグループでも同じ抗体で検討を行ってはみたが、相変わらずアストロサイトにしか検出できなかった。CBS はシステインあるいはシステインとホモシステインを基質として、 H_2S 合成を行う³⁹⁾。酵素活性は S-アデノシルメチオニン (S-adenosyl methionine : SAM) によって増強されるため、SAM の細胞内濃度変化が、CBS による H_2S 合成を調節していると考えられる⁴⁾。この早い調節に加えて、上皮増殖因子 (epidermal growth factor : EGF)、トランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor : TGF) α 、環状アデノシンリン酸 (cyclic adenosine monophosphate : cAMP) やデキサメタゾンなどによる発現上昇により CBS のレベルがゆっくり増加する³⁶⁾。阻害剤としてはヒドロキシルアミンとアミノオキシ酢酸が知られているが、いずれも特異性が低く、新しい阻害剤の開発が待たれる。

2) CSE

CSE は肝臓、腎臓をはじめ胸部大動脈、回腸、門脈、子宮、膵島など多くの組織に認められる^{2,9,35,40)}。この酵素の発現は各種刺激に応じて変化する。例えば、インスリン分泌を刺激する濃度のグルコースにより CSE の発現が誘導される。CSE はシステインとホモシステインから H_2S を合成するが、その使用比率は、細胞内の両アミノ酸の量に応じて異なる。正常な状態では、70% がシステインから、残りの 30% がホモシステインから生産されるが、ホモシステイン血症など、ホモシステイン濃度が上昇する疾患では、ホモシステインからの生産が多くなる⁴¹⁾。私たちを含む複数のグループによるノーザンブロットやウェスタンブロットによる解析の結果から、脳には CSE が発現・局在しないことが示されたが、あるグループからの報告では脳にも CSE 酵素活性が認められるという^{1,42~44)}。CSE とのアミノ酸配列相同性がなく、CSE 活性を示す酵素が存在するのかもしれない。

3) 3MST/CAT

つい最近まで、 H_2S 合成酵素としては CBS と CSE の二つの酵素が研究の中心であった。ところが私たちは、CBS

ノックアウトマウス脳も H_2S を産生し得ることを見つけ、3MST/システインアミノトランスフェラーゼ (cysteine aminotransferase : CAT) 経路に行きついた^{5, 45, 46)}。

この合成経路ではまず、CATによって、

システイン + α -ケトグルタル酸

→ 3-メルカプトピルビン酸 + グルタミン酸

の反応が進み、続いて、3MSTによって H_2S が生産される。

3-メルカプトピルビン酸

→ ピルビン酸 + H_2S

脳においては、嗅球ミトラル細胞、小脳プルキンエ細胞、大脳及び海馬錐体細胞などの神経細胞に局在しており、CBS がアストロサイトに局在するのは対照的である⁵⁾。眼では視神経に、血管系では内皮細胞に局在している^{6, 47~50)}。

3MST/CAT 経路が H_2S を生産し得ることは、1970年代にすでに報告があった。ただ、①反応に使われた基質濃度が非生理的に高かったことや、②3MSTが3-メルカプトピルビン酸 (3MP) から H_2S を生産するとき、還元剤ジチオトレイトール (DTT) が必要であったこと (すなわち、DTT に対応する内在性物質がわからなかったこと)、また、③3MPの代謝物が尿中に存在することは確認されていたが、実際に3MPが生体内に存在するかどうかを確認されていなかったことから、3MST/CAT 経路が生理的な H_2S 合成経路とは考えられていなかった。そこで私たちは、DTT に対応する内在性の還元性補助因子を探索した。そして生体内濃度である $20 \mu M$ のチオレドキシシンが同濃度の DTT の4倍の効率で3MSTから H_2S 生産を促進すること、また、 $40 \mu M$ ジヒドロリポ酸 (dihydrolipoic acid : DHLA) が同濃度の DTT とほぼ同程度に促進することを明らかにした⁵¹⁾。また、3MPの測定法を確立し、中間体として3MPが存在していることを確認し、3MST/CAT 経路が生理的に機能し得ることを示した。

この研究の途上、CAT活性が細胞内 Ca^{2+} によって調節されることを発見した⁴⁷⁾。これは、3MST/CAT 経路による H_2S 合成が細胞内 Ca^{2+} によって制御されることを示している。この H_2S 合成経路は、細胞内 Ca^{2+} 濃度が低いときに活性が高く、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇すると酵素活性が抑制される。カルモジュリンやその阻害剤 W7 は活性には影響を及ぼさなかったため、カルモジュリンはこの経路調節に関与していない。CATには Ca^{2+} 結合モチーフやカルモジュリン結合部位などは見つかっていない。ミトコンドリアに局在する三つの脱水素酵素でも同様の現象が報告されている⁵²⁾。これらの酵素でもカルモジュリン結合部位や Ca^{2+} 結合モチーフなどが認められていないが、 Ca^{2+} によって活性が制御されている。

6. シグナル分子としての機能

1) シナプス活動の修飾

神経細胞は、シナプスに神経伝達物質を放出することにより、次の神経細胞に情報を伝達する。神経細胞をある条件で頻回刺激するとシナプス電位が増幅され、刺激後数時間以上その状態が継続する。シナプスにおける記憶形成モデルとして理解されている海馬の長期増強 (LTP) である。 H_2S 作用として初めて私たちが報告したのが、この LTP 誘導促進であった¹⁾。頻回刺激も刺激が弱い場合は LTP 誘導には至らないが、このような弱い刺激条件でも、 H_2S が同時に存在すると LTP が誘導される。同時に存在することが重要で、頻回刺激の前後に H_2S が存在していても LTP は誘導されない。二つの刺激が同時に入力された場合にその効果が大きくなるという Hebb のルールに従っている。

LTP の誘導には *N*-メチル-D-アスパラギン酸 (*N*-methyl-D-aspartate : NMDA) 受容体の活性化が必要であることは良く知られている。 H_2S は単独では NMDA 受容体に何ら作用を及ぼさないが、神経伝達物質によって活性化された NMDA 受容体の反応を増強する。一方、活性化された AMPA 受容体の反応性には影響を与えず、NMDA 受容体に特異的な作用である。その機序として考えられるのは、NMDA 受容体にあるシステイン残基のジスルフィド結合の還元である⁵³⁾。NMDA 受容体ではこのジスルフィド結合が還元され開裂すると活性が上昇し、酸化されジスルフィド結合を形成すると活性が減少することが知られている。この機序は、最初は還元剤 DTT による作用として見つかった。私たちは、この作用が NMDA 受容体の反応性のみならず、LTP の誘導についても当てはまることを明らかにした。DTT 共存下で頻回刺激を行うと LTP が誘導される。ところが、面白いことに、DTT による増強後、DTT の 1/10 濃度の H_2S を加えるとさらに大きな増強が起こった¹⁾。DTTの方が H_2S よりも還元力は強い。では、この違いは何に由来するのだろうか。 H_2S はジスルフィド結合を還元して開裂後、チオール基に S を結合させ、過酸化する。スルフヒドリル化である^{54, 55)}。一方、DTT はスルフヒドリル化を起こさず、ジスルフィド結合開裂で反応が終了する (図 3)。ここで、スルフヒドリル化について少し補足しておきたい。これは Kato らによって初めて報告された機構で、最近になって Snyder らによって再提案された。酵素や受容体のセリン、トレオニン、チロシンがリン酸化され、その活性が変調することはよく知られている。同じように、タンパク質のシステインに硫黄が付加すると、その活性が変調するという機構である。

他のガス性伝達物質である一酸化窒素 (NO) や一酸化炭素 (CO) でも LTP の誘導が起こるが、その機序は H_2S

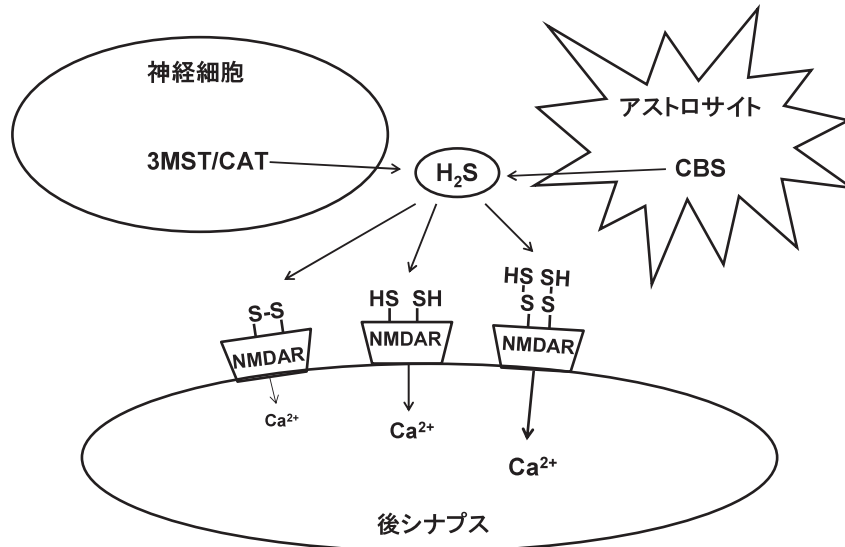


図3 H₂SによるNMDA受容体活性化メカニズム

H₂SはNMDA受容体のシステインジスルフィド結合を還元して開裂させ、受容体のグルタミン酸感受性を上昇させる。さらにスルフヒドリル化により、より一層感受性を高める。

とは異なる⁵⁶⁻⁵⁸。NOはアルギニンからNO合成酵素(NOS)によって、また、COはヘムからヘムオキシゲナーゼ(heme oxygenase: HO)によって、後シナプス性に生産される。両者とも、前シナプスに拡散し、グアニル酸シクラーゼを活性化し、cGMP合成を促す。これがG-キナーゼを活性化し、神経伝達物質グルタミン酸の放出量を増大する。H₂Sが後シナプスにおいてNMDA受容体の活性促進を行うのに対して、NOやCOは後シナプスで合成され、前シナプスに拡散して、伝達物質放出量を増大する。逆行性神経伝達物質と呼ばれるゆえんである。

H₂Sによるもう一つのシナプス伝達修飾はグリアの一種であるアストロサイトを介して行われる。シナプスの周りには、アストロサイトが取り巻いている。かつてアストロサイトは神経細胞に栄養を与えたり、支えたりするだけの細胞と考えられていた。しかし、現在では、神経伝達物質受容体を持ち、神経伝達物質に反応することがわかっている。また、反応したアストロサイトは、今度は逆にシナプス伝達を調節する。H₂SはNMDA受容体においては、単独では作用を示さず、グルタミン酸の作用を増強するだけであった。これに対して、アストロサイトではH₂S単独でCa²⁺流入を誘起する⁵⁹。この作用はLa³⁺、Gd³⁺、ルテニウムレッドなどのtransient receptor potential (TRP)チャネル阻害剤で抑制される。すなわち、H₂SはTRPチャネルを活性化することにより、アストロサイトにCa²⁺流入を起こす。一旦Ca²⁺流入が起こると隣り合うアストロサイトにCa²⁺waveとして次々と伝搬していく。このようにH₂Sによって活性化されたアストロサイトがシナプス伝達を修飾するという機序が、もう一つのシナプス伝達修飾機序である。ちなみに、H₂SによるTRPチャネルの活性化

については他の組織でいくつか報告がある。たとえば、排尿筋ではH₂SによりTRPチャネルが活性化されると収縮が起こるし、気道の収縮もH₂SによるTRPV1チャネルの活性化によることが報告されている^{60,61}。

アストロサイトによるLTP誘導調節に話を戻そう。LTP誘導に対するアストロサイトの関与は、アストロサイトの細胞内Ca²⁺を上昇させないようにする、あるいは、アストロサイトからの伝達物質放出を阻止するとLTP誘導が起こらないことから支持される⁶²。

面白いことに、成熟していないアストロサイトにはH₂S反応性がなく、成熟したアストロサイトのみにH₂S反応性が認められる⁶³。また、EGF、TGF α 、cAMP、インターロイキン1 β などによって活性化されたアストロサイトにも反応がない。脳が損傷を受けると、これらEGFなどの因子が神経やグリアから放出され、アストロサイトが活性化される。そのような状況下では、神経系が誤ったシグナルを伝搬しないように、アストロサイトのH₂S反応性がなくなるのかもしれない。

2) 視神経におけるCa²⁺制御

脳の神経細胞ではH₂Sによって、NMDA受容体を介したCa²⁺流入の増大が誘導され、アストロサイトではTRPチャネルを介したCa²⁺流入が起こる^{64,65}。一方、視神経ではH₂SによってCa²⁺流入が抑制される⁴⁷。私たちが視神経に興味をもったのは、3MSTとCATが視神経に共存していたこと、3MST/CAT経路が低濃度のCa²⁺によって活性化されることによる。光照射により光受容細胞内Ca²⁺濃度は10 nMまで減少し、暗闇では、Ca²⁺濃度が600 nMに上昇する⁶⁶。これは、脳の神経細胞では活性化状態によ

り、 Ca^{2+} 濃度が2~3 μM に上昇し、定常状態では100 nMに低下するのちょうど正反対である。しかも、視神経における Ca^{2+} 濃度変化は脳の神経細胞と比較して低濃度側にシフトしている。視神経ではこの低い Ca^{2+} 濃度範囲内で、3MST/CAT経路の H_2S 生産が大きく変化する。私たちの得た結果から、視神経において、 H_2S は次のような役割を果たすと考えられている。光受容細胞が照射されるとcGMP調節性チャネルが閉じて、 Ca^{2+} 流入が抑えられ、細胞内 Ca^{2+} 濃度が低く抑えられる。これにより、光受容細胞から水平細胞への神経伝達物質グルタミン酸の放出が抑えられる。一方、水平細胞では、グルタミン酸受容体が閉じた状態が継続されるため、細胞内 Ca^{2+} 濃度が低く抑えられる。かくして、光受容細胞と水平細胞において、3MST/CAT経路が活性化され、 H_2S の合成が促進される。水平細胞にある液胞型(vacuolar-type H^+ -ATPase: V-ATPase)の活性化部位にはシステインスルフィド結合が存在し、これが還元されるとV-ATPaseは活性化され、酸化されると不活性状態になる。 H_2S によりV-ATPaseが活性化されると H^+ が放出され、光受容細胞の Ca^{2+} チャネルを抑制し、細胞内 Ca^{2+} 濃度が低く保たれる。視神経細胞では、他の細胞に比べ Ca^{2+} 濃度が低く保たれていることを先に述べたが、この機構により、他の細胞に比べてさらに Ca^{2+} 濃度を低く保つことが可能になる。この役割を H_2S が担っていると考えている⁴⁷⁾(図4)。

3) 平滑筋弛緩

胸部大動脈を低濃度のアセチルコリンで刺激すると弛緩する。この時、内皮を取り除くと弛緩は起こらない。このことから、FurchgottとZawadzkiは内皮から血管平滑筋を

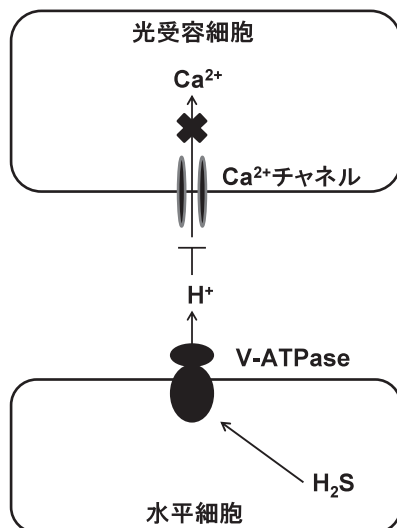


図4 視神経における H_2S の働き

H_2S は水平細胞のV-ATPaseを活性化し、 H^+ を放出させる。これが、光受容細胞のL型 Ca^{2+} チャネルを抑制し、細胞内 Ca^{2+} 濃度を低く保つ。

弛緩する拡散性物質が放出されると提案し、この物質をendothelium-derived relaxing factor (EDRF)と名付けた⁶⁷⁾。これが後に、NOとして同定されたことはご存じのとおりである。その後、GarthwaiteらによってEDRFが脳にも存在することが確認され、BredtとSnyderによってアルギニンからNOを合成するNO合成酵素(NOS)が脳で同定され、NOが脳においても生理作用を持つことが提案された^{68,69)}。多くの研究者によりその機能の探索が行われ、海馬長期増強を促進する逆行性神経伝達物質として機能することが明らかになったことはすでに述べた。NOは平滑筋弛緩因子として発見され、脳においても神経伝達物質として機能することが確認された。それなら、脳でLTPの誘導を促進する H_2S は、平滑筋でも機能するのではないか、という、大胆に行き過ぎた(ほぼ科学的根拠のない)仮定を立てた。実際、胸部大動脈、門脈、回腸では、CBSやCSEが発現しており、これらの組織は H_2S によって弛緩した²⁾。ただ、NOと違い H_2S は酸化されやすいため、酸素分圧の高い太い動脈では主にNOが弛緩作用を示し、酸素分圧の低い末梢血管では H_2S が作用すると考えられている⁷⁰⁾。末梢血管の方が、抵抗が大きく、血圧への影響が大きいと、 H_2S の調節によって血圧調節ができるのではないかという期待がもたれている。面白いことに、NOと H_2S の効果には相乗作用があり、低濃度でも強い弛緩が引き起こされる²⁾。一方、NOによって H_2S が酸化され、相乗作用が認められないという、相反する報告もある⁷¹⁾。最近、NOと H_2S との相乗効果を狙って、両者を放出する「NOSH化合物」が開発された⁷²⁾。この化合物は強い抗がん作用を示し、治療への応用が期待されている。

EDRFに話を戻そう。EDRFがNOと同定された後、いくつかの矛盾点が浮上した。そのうちの一つは、EDRFは平滑筋を弛緩し、平滑筋の膜電位を過分極する一方、NOは弛緩を起こすが、過分極効果は極めて弱いことである⁷³⁾。これより、EDRFにはNO以外のコンポーネントが存在するだろうと考えられている。そのうちの一つ、過分極を誘起する物質は、endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)と命名された。候補物質として、アラキドン酸代謝物、プロスタサイクリンやエポキシエイコサトリエン酸、過酸化水素やカリウムイオンなどが挙げられているが、まだ同定には至っていない⁷⁴⁾。 H_2S は平滑筋を弛緩し、ATP依存性 K^+ (K_{ATP})チャネルを活性化し、膜を過分極する。私たちのグループを含め他のグループもCSEは血管平滑筋に存在することを確認している。しかし、CSEは内皮には存在しないという自らの当初の結果を覆し、再精査によりCSEは内皮にも存在することが確認されたので、 H_2S はEDHFであると主張しているグループがある^{75,76)}。私たちもOlsonらも、CSEが内皮に存在することは否定的である^{6,77)}。私たちは、もう一つの生産経路の酵

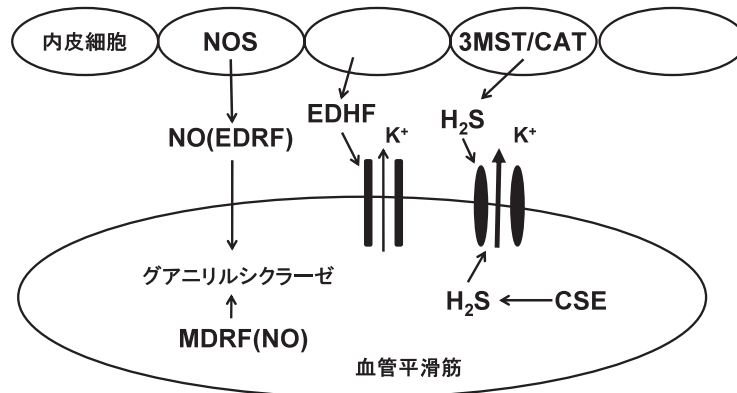


図5 血管平滑筋弛緩因子としてのH₂S

血管内皮に局在する3MST/CAT経路によってH₂Sが生成され、血管平滑筋を弛緩させる。また、血管平滑筋に局在するCSEもH₂Sを合成し、弛緩作用に寄与していると考えられる。

素3MSTとCATが内皮に共存しており、内皮ライセートに基質システインと α -ケトグルタル酸を加えるとH₂Sが生成されることを確認した。一方、CSEはシステインのみからH₂Sを生成し、 α -ケトグルタル酸を必要としない。内皮ライセートからのH₂S生成には α -ケトグルタル酸が不可欠であることを確認した。これより、内皮ではCSEではなく、3MST/CAT経路によってH₂Sが生成されると考えている。Olsonらも内皮における3MSTの局在を確認している。これらの結果から、内皮の3MST/CAT経路によって生産されたH₂Sが、EDRFの一つのコンポーネントとして働く可能性があると考えている。一方、EDHFによる過分極はアパミンによって阻害されるCa²⁺依存性K⁺チャンネルが担うという報告があり、K_{ATP}チャンネルに依存しないことから、H₂SはEDHFではないだろうと考えている(図5)。

CSEノックアウトマウスでは、血圧上昇が報告された⁷⁵⁾。H₂Sは血管平滑筋を弛緩するので、それを生産するCSEが欠損すれば、血圧は上昇することは予想される。ところが、他グループの作製したCSEノックアウトマウスでは血圧の変化は観察されなかった⁷⁶⁾。前述のように、3MST/CATが血管内皮に共局在しているため、平滑筋に局在しているCSEのみが欠損しても影響が見られないと思われる。NOにおいても、血管内皮から放出されるEDRFに加え、NO様の物質が血管平滑筋に存在し、muscle-derived relaxing factor (MDRF)と呼ばれている⁷⁹⁾。このようにH₂Sの場合も、内皮と平滑筋の両者から弛緩因子が放出され血管の収縮・弛緩を調節しているものと考えられる。WangらのグループはCSEノックアウトマウスの論文に、CSEの活性がCa²⁺/カルモジュリンによって制御されることを報告している⁷⁵⁾が、1~2 mM Ca²⁺という非生理的濃度で検討している。これは細胞外濃度であり、細胞内では細胞が興奮したときでも高々3 μ Mに達する程度である。これより、CSE活性がCa²⁺/カルモジュリンに

よって制御されているとは考えにくい。

7. 細胞保護因子としての機能

薬もさじ加減で毒になる。であれば、毒も薬になり得るはずである。H₂Sはシトクロムcオキシダーゼを阻害して細胞死を引き起こす、とされている。そこで、H₂Sを発生させるNaHSを培養神経細胞初め各種の細胞に加えてみた。ところが、100 μ Mまで濃度を上げて、細胞はいつこうに死ななかった。逆に、酸化毒性に対して強い抑制作用が認められた³⁾。ここでは、1、減少したグルタチオンレベルの回復、2、活性酸素(ROS)スカベンジャーとしての働き、3、抗アポトーシス効果、4、小胞体(ER)ストレス応答の調節、5、細胞内カルシウム濃度調節、6、K⁺チャンネル、Cl⁻チャンネルの活性化による異常興奮の抑制、について概説する(図6)。

1) 減少したグルタチオンレベルの回復

H₂Sを培養細胞に投与すると、MTTやWST-8などのテトラゾリウム塩を還元して青色を呈し、細胞の代謝活性を上昇させているように見える。このような現象は神経細胞で特徴的に観察された⁸⁰⁾。これはH₂Sの還元性物質としての効果と思われるかもしれないが、H₂Sは培養皿に加えて、数分で半減し、1時間もするとほとんど蒸散して消失する。MTTやWST-8などのテトラゾリウム塩を加えるのはその後である。この現象は当初、H₂Sによってシトクロムcオキシダーゼが阻害され呼吸鎖が抑制されることにより、細胞内が還元状態に傾いたためと考えられた。ところが、アジ化物によりシトクロムcオキシダーゼを阻害しても、このような現象は見られなかった。これより、この現象はシトクロムcオキシダーゼ阻害によるものではないと結論付けた。

グルタミン酸による神経細胞毒性には、①興奮毒性と②酸化毒性の2種類がある^{81,82)}。①はNMDA受容体から流

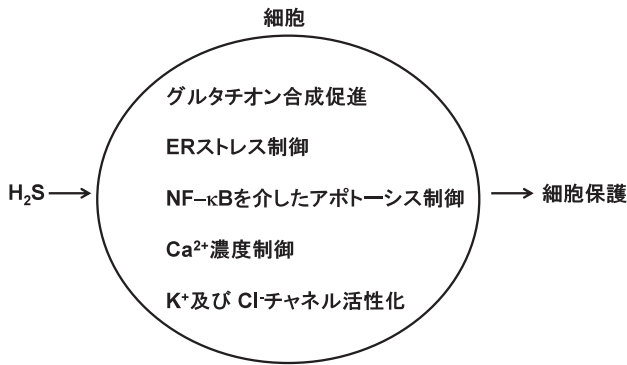


図6 H₂Sの細胞保護機能

H₂Sはシステイントランスポーターとシスチントランスポーターを活性化して、細胞内システイン濃度を上昇させ、また、生合成酵素を活性化することによりグルタチオン合成を促進する。ERストレスの制御、NF-κBを制御することにより、細胞死を抑制する。また、細胞内Ca²⁺濃度を低く保ち、抑制性チャネルを活性化することにより、細胞の異常興奮を抑制する。これらの働きにより、細胞をストレスから保護している。

入したCa²⁺や、AMPA受容体の活性化に伴う脱分極により膜電位依存性Ca²⁺チャネルから流入した過剰のCa²⁺によって細胞内Ca²⁺濃度が異常に上昇して引き起こされる。一方、②では高濃度のグルタミン酸により、グルタミン酸・シスチンアンチポーターが抑制され、細胞内へのシスチンの取り込みが減少し、細胞内で還元されてできるシステイン量が減少する。その結果、これを基質として生産される細胞内主要還元性物質であるグルタチオンの濃度が下がり、細胞は酸化ストレスに脆弱性を示すようになる。胎生17日目の胎児脳から調製した培養神経細胞で興奮毒性が見られるのはイオンチャネル型グルタミン酸受容体が発現する培養2週間後である。一方、グルタミン酸・シスチンアンチポーターは、調製直後の細胞でもすでに機能しているため、グルタミン酸酸化毒性の良いモデルとなる⁸²⁾。グルタミン酸によって神経細胞は死滅するが、H₂S共存下では生き生きとしている。細胞内グルタチオンの濃度は、グルタミン酸投与により減少するが、H₂Sによって還元型グルタチオンが増加する³⁾。血液中ではシステインは酸化型のシスチンとして存在すると考えられていた。しかし最近では、20 μM程度ではあるが、システインとしても存在することがわかり、グルタミン酸・シスチンアンチポーターによって取り込まれるシスチンよりもシステイントランスポーターによるシステインの取り込みの方が効率が良いことがわかった⁸³⁾。H₂Sはこのようにシスチン・システインの取り込みを増加させる。

グルタチオン合成には、グルタミン酸とシステインからジペプチドを合成する律速酵素γ-グルタミルシステインシンターゼ(γ-glutamylcysteine synthase: γ-GCS)と、このジペプチドにグリシンを付加するグルタチオンシンターゼ(glutathione synthase: GS)の二つの酵素が関与する。こ

のうち、γ-GCSの活性がH₂Sによって上昇するが、GSの活性には影響しない。このH₂Sの作用は、細胞のライセートに加えても効果はなく、あくまで細胞外に投与したときのみ認められる。これは、H₂Sの作用が細胞表面の感受性分子を活性化することによって起こることを示している。ポプラなどの植物は大気中からH₂Sを吸収して、グルタチオン合成を上昇させるが、ここでもγ-GCS活性が上昇しており、動物・植物を通して、共通の機構が働いているようである⁸⁴⁾。また、酵母では、酸化ストレスによりH₂Sが生産されることが報告されており、酸化ストレスを回避するためにH₂Sが機能しているようである⁸⁵⁾。

このH₂Sによる抗グルタミン酸酸化毒性作用はH₂S投与後16時間から24時間後に顕著に見られる。培養皿に添加したH₂Sはすぐに消失するが、この短い時間の間に細胞保護に関わるシグナルが伝搬し、細胞を酸化ストレス抵抗性にする。細胞内のH₂S濃度は低く、グルタチオンはmMオーダーで存在する。H₂S自身還元性物質であるが、より大量に存在するグルタチオン濃度を上昇させる方がより効率良く抗酸化を実現することができる。この項の最初に述べた、MTTやWST-8などのテトラゾリウム塩を還元する効果には、この上昇したグルタチオンが関与しているのではないかと考えられる。

2) ROSスカベンジャー

海藻において、含硫化合物ジメチルスルホニオプロピオナート(dimethylsulfoniopropionate: DMSF)やその代謝産物ジメチルスルフィド(dimethylsulfide: DMS)がROSスカベンジャーとして機能していることが発見された⁸⁶⁾。H₂Sも還元性物質であることから、グルタチオンを介する抗酸化作用に加え、直接ROSスカベンジャーとして機能しているのではないかと考えた。確かに、3MST/CATを発現した細胞では、グルタミン酸や過酸化水素による酸化ストレスに抵抗性を示す⁸³⁾。3MST/CATはROSが最も多く生成される細胞小器官ミトコンドリアに共局在しており、ここでは、H₂Sもスカベンジャーとして機能していると考えられる。また、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病などの神経疾患では、ペルオキシ亜硝酸(ONOO⁻)や次亜塩素酸(HOCl)が増加するが、これらによる細胞死に対してもH₂Sが有効であると報告されている^{87,88)}。

細菌が抗生物質に対して抵抗性を示すようになることは良く知られているが、この作用にH₂Sが関わっているらしいことが最近報告された¹⁶⁾。抗生物質によって細菌の呼吸鎖が活性化され、硫黄鉄クラスターから鉄が遊離し、フェントン反応によりROSが生産される。これによってDNAが損傷を受ける。細菌は、スーパーオキシドジスムターゼ(superoxide dismutase: SOD)、カタラーゼ、

NOSを活性化して、ROSに対抗することは良く知られている。最近の報告では、哺乳類のCBS, CSE, 3MSTに対応する細菌の酵素を欠損させると、細菌の抗生物質感受性が高くなり、抵抗性が見られなくなる。このような細菌にH₂Sを投与すると、抵抗性が回復するというのである。細菌はNOとH₂Sを生産し、両物質間には抗生物質抵抗性に対して相乗効果があることも報告されている。このことから、H₂Sの細胞保護作用は種を超えた防御機構であると考えられる。細菌のCBS, CSE, 3MSTの構造は進化により哺乳類のそれとはかなり異なっており、これをターゲットにすることにより、効果の高い新しい抗生剤が開発できるのではないかと期待されている。

3) アポトーシス抑制

虚血再還流によって、心筋に障害が残ることは良く知られている。神経細胞保護作用に続いて、H₂S投与によって虚血再還流障害を極力抑えられることが明らかになった。ミトコンドリアの構造と機能も良く保たれ、TUNEL陽性細胞の数も減少し、カスパーゼ活性も抑えられる⁹¹。また、心筋にCSEを高レベルで発現するトランスジェニックマウスでは、虚血再還流に抵抗性を示し、障害が抑えられることがわかった。これらの結果からH₂Sを外から補うか、あるいは、H₂S生合成系を活性化することによって、虚血再還流障害による疾患の治療が可能になるのではないかと期待されている。また、H₂Sはチオレドキシニンなどの抗酸化物質の発現を制御する転写因子Nrf2の核内移行を促進し、抗酸化物質量を増加することによって、心筋障害を抑えると報告されている⁸⁹。最近、SnyderらはH₂SがNF-κBをスルフヒドリル化することによって、アポトーシスを調節すると報告している¹⁵。

4) 小胞体ストレス応答の調節

タンパク質は小胞体(ER)で合成され、システインジスルフィド結合を形成し、機能を持つ立体構造を構成して、ゴルジ体へと運ばれる。このシステインジスルフィド結合形成の際に、ROSが発生する⁹⁰。タンパク質が適切な立体構造を形成し損ねて、ERに蓄積すると、細胞ではアポトーシスに向けてのカスケードが始動する。ERストレスによりH₂Sの生産が促進され、生成したH₂Sはチロシンホスファターゼ(protein tyrosine phosphatase: PTP)をスルフヒドリル化し、その活性を抑制する、とTonksらは報告している¹⁴。PTPはprotein kinase-like ER kinase(PERK)を抑制する。つまり、H₂Sは多くのタンパク質合成を調節することによってERストレスを制御することになる。ERストレスと酸化ストレスは密接な関係にあり、ここでのH₂Sのもう一つの重要な働きとして、酸化ストレスが強くなるERにおいて、タンパク質を酸化ストレスから

保護するスカベンジャーとしての働きがあることも加えておきたい。

5) 細胞内Ca²⁺濃度の制御

先にも述べたが、視神経においてH₂Sは細胞内Ca²⁺濃度を低く抑えるように働く。これは視神経の光に対する感受性を上げるのに役立っている。また、この機構のおかげで、Ca²⁺濃度上昇による細胞障害からも守られていることになる。視神経は酸素消費も多く、常に光にさらされており、酸化ストレスを受けやすい。強烈な光に曝露された場合は、H₂Sによる細胞内Ca²⁺濃度を低く抑える細胞保護機構が破たんし、視細胞が障害を受ける。多くの視細胞が死滅し、ROSによるDNAの損傷も観察される。このような状況下で、H₂S投与が視神経障害を軽減することがマウスで示された⁴⁷。酸化ストレスや光による視神経の障害の際、H₂S投与あるいはH₂S合成酵素を調節することで、視神経障害を治療できると期待される。

6) 膜電位の安定化

ATP依存性K⁺(K_{ATP})チャネルを活性化すると、グルタミン酸による興奮毒性が弱められることは良く知られている。酸化毒性においてもこれはあてはまるようである。K_{ATP}チャネルやcystic fibrosis transmembrane receptor (CFTR) Clチャネルを阻害すると、H₂Sによるグルタミン酸酸化毒性抑制効果が減弱する⁹¹。これは、神経細胞の異常な興奮を抑えることによる効果であろうと考えられる。虚血再還流による心筋障害においてもK_{ATP}チャネルが保護的に働くという報告もある。これに対し、K_{ATP}チャネルは関与しておらず、H₂Sによる心筋保護作用は、L型Ca²⁺チャネルの阻害によるという報告もあり、統一見解は得られていない^{92,93}。

8. 疾患への関与

良い面ばかりを書き連ねたが、H₂Sはやはり毒かと再確認する面もある。H₂S代謝が障害を受け恒常的にH₂S濃度が上昇する疾患も見つかっている。生成されたH₂Sは感受性分子あるいは受容体に働きさまざまな作用を発揮する。一部は結合型硫黄として細胞に貯蔵され、それ以外はミトコンドリア膜上にあるスルフィド-キノンオキシドレダクターゼ(sulfide-quinone oxidoreductase: SQR)とそれに続く経路によって代謝される。まず、SQR-ペルスルフィドができ、硫黄ジオキシゲナーゼによって亜硫酸(H₂SO₃)となり、さらにロダネーゼによりチオ硫酸(H₂S₂O₃)に代謝される⁹⁴。エチルマロン酸脳症では、硫黄ジオキシゲナーゼをコードした遺伝子ETHE1に変異が起こる。ETHE1ノックアウトマウスでは、この疾患同様にH₂Sが代謝されずに常に高濃度で存在するため、脳と骨格筋に障害が現れ、ETHE1欠損患者と良く似た症状を示

す⁹⁵⁾。同一グループの続報ではH₂Sの供給源として酵素によって生産されるものと、腸内細菌によって生産されたものと考えており(ただし、粘膜上皮がバリアーとなるためH₂Sは消化管からは吸収されず、血中にはほとんど入らないとされている)、腸内細菌を抑えるメトロニダゾールとグルタチオン合成を上昇させるN-アセチルシステインを投与すると、ETHE1ノックアウトマウスで見られる障害を抑えることができ、さらには疾患患者の病態を改善すると報告している⁹⁶⁾。

ダウン症患者では染色体21番がトリソミーを形成し、精神遅滞などを伴う。CBSも同じく染色体21番にコードされている(21q22.3)。ダウン症患者ではCBS mRNAの発現が健常人の12倍で、タンパク質レベルも3倍に増加している^{37,97)}。またダウン症では、H₂Sの代謝産物であるチオ硫酸の尿中濃度が高いこともH₂Sの生産増加を裏付けている⁹⁸⁾。CBS遺伝子多型がIQに関わるとの報告もあり、ダウン症患者ではエチルマロン酸脳症患者と同様に、H₂S濃度が恒常的に上昇し、症状に関わっているのかもしれない⁹⁹⁾。

長時間酸欠状態に曝されると脳に障害が現れる。このような状況では、血液の流れが脳機能を大きく左右し、酸素分圧が下がると脳血流が上昇するように調節されている。COは末梢においてはNOやH₂S同様血管弛緩を起こすが、中枢においては逆に血管を収縮させる。COは末梢では、NOと同様にグアニル酸シクラーゼのヘムに結合しこれを活性化し、生産されたcGMPにより血管弛緩を起こすが、脳においてはCOが、CBSのヘムに結合してこれを抑制する¹⁰⁰⁾。その結果H₂Sレベルが下がり、血管収縮が起こると考えられている。これは、酸欠時に起こる脳内血流増大が、CBSノックアウトマウスやCO合成酵素HO-2欠損マウスでは観察されないことから裏付けられる。すなわち、酸欠状態ではHO-2によるCO生産が低下し、その結果CBSの脱抑制が起こり、H₂S生産が上昇する。これより血管が弛緩し、血流が増大すると考えられる¹⁰¹⁾。

9. 治療応用

H₂Sを治療に応用しようという試みも盛んに行われている。非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)が胃腸に潰瘍を起こすことは良く知られているが、H₂Sがこれを抑えることから、H₂Sを徐々に発生させるNSAIDs誘導体が前臨床段階の医薬品として数種類開発されている¹⁰²⁾。また、パーキンソン治療薬として最も良く使われるレボドパ(L-Dopa)にもH₂S発生誘導体が開発されている¹⁰³⁾。パーキンソン病は進行性疾患でその主な原因として酸化ストレスが関わると考えられている。レボドパにはドーパミン濃度上昇効果はあるが、酸化ストレスを抑える働きはない。一方、H₂Sにはミクログリアから放出される神経障害性の炎

症性サイトカインの放出を抑え、グルタチオン濃度を上昇させることによって酸化ストレスを軽減する効果、さらにはモノアミノオキシダーゼ(monoamine oxidase: MAO)を抑制することによってドーパミンのシナプス滞留時間を延長する効果がある。パーキンソン動物モデルでは良い成績が得られている。H₂Sの心筋保護作用を利用して、心臓のバイパス手術にH₂Sを投与する臨床試験が第2相に入っていたが、現在中止されている。この試験ではNa₂Sを投与していたが、瞬時にH₂Sを発生してしまうため、濃度の調節が難しいなどの問題が挙げられていた¹⁰⁴⁾。一方、N-アセチルシステイン投与で生産されたH₂Sにより、慢性腎疾患治療を目指す臨床試験第3相が、2012年10月に終了した(ClinicalTrials.gov identifier: NCT01232257)。

10. おわりに

脳内に存在することが発見された後、その生理的機能の探索が脳に留まらず、心血管系、腎臓、免疫系、…と広がり、そして、その医療応用へと研究が進んでいる。H₂Sの生理機能を明らかにしていく基礎研究と、H₂Sの薬理作用を応用して医療に役立てていく、二つの方向へ研究が進んでいくと思われる。今後の生理機能研究の焦点は、H₂Sが細胞の局所においてどのような時間経過でどの程度の濃度に達しそして消滅していくかという、H₂S動態を明らかにしていくことである。H₂S蛍光プローブの利用はその第一歩であろう。H₂Sの動態が明らかになれば、提案されているH₂S感受性分子あるいは受容体の寄与の解明が期待される。もう一つは、H₂S放出を促す生理的刺激が何であるかが依然としてわかっていない。生産酵素を制御するメカニズムが明らかになってきた今、次はこの問題の解決が急がれる。

医療応用研究には二つの方向性がある。一つはH₂Sの薬理作用を利用するもの、二つ目は、生体内のH₂S生合成系を制御する方法を探索することである。一つ目は上述したように、すでにいくつかのプレクリニカル化合物が開発されている。二つ目については、CBSがS-アデノシルメチオニンによって活性促進されることと、3MST/CAT経路がCa²⁺によって制御されていることがわかってきた。CSEについてはいまだ不明である。これらを明らかにし、それを制御する化合物を開発すれば、生合成系制御による医療応用につながるができる。一方、H₂Sの生理機能について疑問を投げかける報告もある¹⁰⁵⁾。これらの疑問に明確に答え、H₂Sが生理活性物質として認識され、近い将来医療応用されることを願っている。

謝辞

原稿への意見・校正をいただいた木村由佳博士に感謝いたします。本研究は独立行政法人国立精神・神経医療研究

センターからの研究費補助金と日本学術振興会学術研究助成基金助成金挑戦的萌芽研究 (23659089) による助成を受けて行った。

校正中に、D-システインを基質として硫化水素を合成する経路を発見し、*Nature Communications*, 10, 1038/ncomms2371, 2013 に発表した。

文 献

- 1) Abe, K. & Kimura, H. (1996) *J. Neurosci.*, 16, 1066–1071.
- 2) Hosoki, R., Matsuki, N., & Kimura, H. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 237, 527–531.
- 3) Kimura, Y. & Kimura, H. (2004) *FASEB J.*, 18, 1165–1167.
- 4) Elrod, J.W., Calvert, J.W., Morrison, J., Doeller, J.E., Kraus, D.W., Tao, L., Jiao, X., Scalia, R., Kiss, L., & Szabo, C. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 104, 15560–15565.
- 5) Shibuya, N., Tanaka, M., Yoshida, M., Ogasawara, Y., Togawa, T., Ishii, K., & Kimura, H. (2009) *Antioxid. Redox Signal.*, 11, 703–714.
- 6) Shibuya, N., Mikami, Y., Kimura, Y., Nagahara, N., & Kimura, H. (2009) *J. Biochem.*, 146, 623–626.
- 7) Zano, R.C., Brancalione, V., Distrutti, E., Fiorucci, S., Cirino, G., & Wallace, J.L. (2006) *FASEB J.*, 20, 2118–2120.
- 8) Yang, W., Yang, G., Jia, X., Wu, L., & Wang, R. (2005) *J. Physiol.*, 569, 519–531.
- 9) Kaneko, Y., Kimura, Y., Kimura, H., & Niki, I. (2006) *Diabetes*, 55, 1391–1397.
- 10) Cai, W.J., Wang, M.J., Moore, P.K., Jin, H.M., Yao, T., & Zhu, Y.C. (2007) *Cardiovasc. Res.*, 76, 29–40.
- 11) Papapetropoulos, A., Pyriochou, A., Altaany, Z., Yang, G., Marazioti, A., Zhou, Z., Jeschke, M.G., Branski, L.K., Herndon, D.N., Wang, R., & Szabo, C. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 106, 21972–21977.
- 12) Olson, K.R., Dombkowski, R.A., Russell, M.J., Doellman, M. M., Head, S.K., Whitfield, N.L., & Madden, J.A. (2006) *J. Exp. Biol.*, 209, 4011–4023.
- 13) Peng, Y.J., Nanduri, J., Raghuraman, G., Souvannakitti, D., Gadalla, M.M., Kumar, G.K., Snyder, S.H., & Prabhakar, N.R. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 107, 10710–10724.
- 14) Krishnan, N., Fu, C., Pappin, D.J., & Tonks, N.K. (2011) *Science Sig.*, 4, ra86.
- 15) Sen, N., Paul, B.D., Gadalla, M.M., Mustafa, A.K., Sen, T., Xu, R., Kim, S., & Snyder, S.H. (2012) *Mol. Cell*, 45, 13–24.
- 16) Shatalin, K., Shatalina, E., Mironov, A., & Nudler, E. (2011) *Science*, 334, 986–990.
- 17) Lippert, A.R., New, E.J., & Chang, C.J. (2011) *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 10078–10080.
- 18) Liu, C., Pan, J., Li, S., Zhao, Y., Wu, L.Y., Berkman, C.E., Whorton, A.R., & Xian, M. (2011) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50, 10327–10329.
- 19) Peng, H., Cheng, Y., Dai, C., King, A.L., Predmore, B.L., Laffer, D.J., & Wang, B. (2011) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50, 9672–9675.
- 20) Qian, Y., Karpus, J., Klabil, O., Zhang, S.-Y., Zhu, H.-L., Banerjee, R., Zhao, J., & He, C. (2011) *Nat. Commun.*, 2, 495, DOI: 10.1038.
- 21) Sasakura, K., Hanaoka, K., Shibuya, N., Mikami, Y., Kimura, Y., Komatsu, T., Ueno, T., Terai, T., Kimura, H., & Nagano, T. (2011) *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 18003–18005.
- 22) Casey, J.R., Grinstein, S., & Orlowski, J. (2010) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11, 50–61.
- 23) Mathai, J.C., Missner, A., Kugler, P., Saporov, S.M., Zeidel, M.L., Lee, J.K., & Pohl, P. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 106, 16633–16638.
- 24) Czyzewski, B.K. & Wang, D.N. (2012) *Nature*, 483, 494–497.
- 25) Ishigami, M., Hiraki, K., Umemura, K., Ogasawara, Y., Ishii, K., & Kimura, H. (2009) *Antioxid. Redox Signal.*, 11, 205–214.
- 26) Ogasawara, Y., Isoda, S., & Tanabe, S. (1994) *Biol. Pharm. Bull.*, 17, 1535–1542.
- 27) Goodwin, L.R., Francom, D., Dieken, F.P., Taylor, J.D., Warena, M.W., Reiffenstein, R.J., & Dowling, G. (1989) *J. Anal. Toxicol.*, 13, 105–109.
- 28) Warena, M.W., Goodwin, L.R., Benishin, C.G., Reiffenstein, R.J., Grancom, D.M., Taylor, J.D., & Dieken, F.P. (1989) *Biochem. Pharmacol.*, 38, 973–981.
- 29) Savage, J.C. & Gould, D.H. (1990) *J. Chromatogr.*, 526, 540–545.
- 30) Brookes, N. & Turner, R.J. (1994) *Am. J. Physiol.*, 267, C1633–1640.
- 31) Whitfield, N.L., Kreimier, E.L., Verdial, F.C., Skovgaard, N., & Olson, K.R. (2008) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 294, R1930–R1937.
- 32) Furne, J., Saeed, A., & Levitt, M.D. (2008) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 295, R1479–R1498.
- 33) Levitt, M.D., Abdel-Rehim, M.S., & Furne, J. (2011) *Antioxid. Redox Signal.*, 15, 373–378.
- 34) Wintner, E.A., Deckwerth, T.L., Langston, W., Bengtsson, A., Leviten, D., Hill, P., Insko, M.A., Dumpit, R., VandenEkar, E., Toombs, C.F., & Szabo, C. (2010) *Br. J. Pharmacol.*, 160, 941–957.
- 35) Stipanuk, M.H. & Beck, P.W. (1982) *Biochem. J.*, 206, 267–277.
- 36) Enokido, Y., Suzuki, E., Iwasawa, K., Namekata, K., Okazawa, H., & Kimura, H. (2005) *FASEB J.*, 19, 1854–1856.
- 37) Ichinohe, A., Kanaumi, T., Takashima, S., Enokido, Y., Naai, Y., & Kimura, H. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338, 1547–1550.
- 38) Braunstein, A.E., Goryachenkova, E.V., Tolosa, E.A., Willhardt, I.H., & Yefremova, L.L. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, 242, 247–260.
- 39) Chen, X., Jhee, K.H., & Kruger, W.D. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 52082–52086.
- 40) Cavallini, D., Mondovi De Marco, C., & Scioscia-Santoro, A. (1962) *Enzymologia*, 24, 253–266.
- 41) Chiku, T., Padovani, D., Zhu, W., Singh, S., Vitvitsky, V., & Banerjee, R. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 11601–11612.
- 42) Finkelstein, J.D. (1990) *J. Nutr. Biochem.*, 1, 228–237.
- 43) Ishii, I., Akahoshi, N., Yu, X.-N., Kobayashi, Y., Namekata, K., Komaki, G., & Kimura, H. (2004) *Biochem. J.*, 381, 113–123.
- 44) Kabil, O., Vitvitsky, V., Xie, P., & Banerjee, R. (2011) *Antioxid. Redox Signal.*, 15, 363–372.
- 45) Meister, A., Fraser, P.E., & Tice, S.V. (1954) *J. Biol. Chem.*, 206, 561–575.
- 46) Nagahara, N., Okazaki, T., & Nishino, T. (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 16230–16235.
- 47) Mikami, Y., Shibuya, N., Kimura, Y., Nagahara, N., Yamada, M., & Kimura, H. (2011) *J. Biol. Chem.*, 286, 39379–39386.
- 48) Taniguchi, T. & Kimura, T. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, 364, 284–295.
- 49) Ubuka, T., Umemura, S., Yuasa, S., Kinuta, M., & Watanabe, K. (1978) *Physiol. Chem. Physics*, 10, 483–500.

- 50) Cooper, A.J.L. (1983) *Annu. Rev. Biochem.*, **52**, 187–222.
- 51) Mikami, Y., Shibuya, N., Kimura, Y., Nagahara, N., Ogasawara, Y., & Kimura, H. (2011) *Biochem. J.*, **439**, 479–485.
- 52) Denton, R.M. (2009) *Biochem. Biophys. Acta*, **1787**, 1309–1316.
- 53) Aizenman, E., Lipton, D.A., & Loring, R.H. (1989) *Neuron*, **2**, 1257–1263.
- 54) Kato, A., Ogura, M., & Suda, M. (1966) *J. Biochem.*, **59**, 40–48.
- 55) Gadalla, M.M. & Snyder, S.H. (2010) *J. Neurochem.*, **113**, 14–26.
- 56) O'Dell, T.J., Hawkins, R.D., Kandel, E.R., & Arancio, O. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 11285–11289.
- 57) Zhuo, M., Small, S.A., Kandel, E.R., & Hawkins, R.D. (1993) *Science*, **260**, 1946–1950.
- 58) Verma, A., Hirsch, D.J., Glatt, C.E., Ronnett, G.V., & Snyder, S.H. (1993) *Science*, **259**, 381–384.
- 59) Nagai, Y., Tsugane, M., Oka, J., & Kimura, H. (2004) *FASEB J.*, **18**, 557–559.
- 60) Patacchini, R., Santicoli, P., Giuliani, S., & Maggi, C.A. (2005) *Eur. J. Pharmacol.*, **509**, 171–177.
- 61) Streng, T., Axelsson, H.E., Hedlund, P., Andersson, D.A., Jordt, S.E., Bevan, S., Andersson, K.E., Hogestatt, E.D., & Zygmunt, P.M. (2008) *Eur. Urol.*, **53**, 391–399.
- 62) Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S.H.R., & Rusakov, D.A. (2010) *Nature*, **463**, 232–236.
- 63) Tsugane, M., Nagai, Y., Kimura, Y., Oka, J-I., & Kimura, H. (2007) *Antioxid. Redox Signal.*, **9**, 257–269.
- 64) Kimura, H. (2010) *Antioxid. Redox Signal.*, **12**, 1111–1123.
- 65) Kimura, H., Shibuya, N., & Kimura, Y. (2012) *Antioxid. Redox Signal.*, **17**, 45–57.
- 66) Krizaj, D. & Copenhagen, D.R. (2002) *Front. Biosci.*, **7**, d2023–d2044.
- 67) Furchgott, R.F. & Zawadzki, J.V. (1980) *Nature*, **288**, 373–376.
- 68) Garthwaite, J., Charles, S.L., & Chess-Williams, R. (1988) *Nature*, **336**, 385–388.
- 69) Bredt, D.S. & Snyder, S.H. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**, 682–685.
- 70) Koenitzer, J.R., Isbell, T.S., Patel, H.D., Benavides, G.A., Dickinson, D.A., Patel, R.P., Darley-Usmar, V.M., Lancaster, J. R., Jr., Doeller, J.E., & Kraus, D.W. (2007) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **292**, H1953–H1960.
- 71) Zhao, W. & Wang, R. (2002) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **283**, H474–H480.
- 72) Chattopadhyay, M., Kodala, R., Olson, K.R., & Kashfi, K. (2012) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **419**, 523–528.
- 73) Shikano, K., Long, C.J., Ohlstein, E.H., & Berkowitz, B.A. (1988) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **247**, 873–881.
- 74) Chen, G., Suzuki, H., & Weston, A.H. (1988) *Br. J. Pharmacol.*, **95**, 1165–1174.
- 75) Yang, G., Wu, L., Jiang, B., Yang, W., Qi, J., Cao, K., Meng, Q., Mustafa, A.K., Mu, W., Zhang, S., Snyder, S.H., & Wang, R. (2008) *Science*, **322**, 587–590.
- 76) Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., & Wang, R. (2001) *EMBO J.*, **20**, 6008–6016.
- 77) Olson, K.R., Whitfield, N.L., Bearden, S.E., Leger, J.S., Nilsson, E., Gao, Y., & Maddeen, J.A. (2010) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **298**, R51–R60.
- 78) Ishii, I., Akahoshi, N., Yamada, H., Nakano, S., Izumi, T., & Suematsu, M. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 26358–26368.
- 79) Wood, K.S., Buga, G.M., Byrns, R.E., & Ignarro, L.J. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **170**, 80–98.
- 80) Umemura, K. & Kimura, H. (2007) *Antioxid. Redox Signal.*, **9**, 2035–2041.
- 81) Choi, D.W. (1988) *Neuron*, **1**, 623–634.
- 82) Murphy, T.H., Miyamoto, M., Sastre, A., Schnaar, R.L., & Coyle, J.T. (1989) *Neuron*, **2**, 1547–1558.
- 83) Kimura, Y., Goto, Y-I., & Kimura, H. (2010) *Antioxid. Redox Signal.*, **12**, 1–13.
- 84) Noctor, G., Strohm, M., Jouanin, L., Kunert, K.J., Foyer, C.H., & Rennenberg, H. (1996) *Plant. Physiol.*, **112**, 1071–1078.
- 85) Kwak, W.J., Kwon, G.S., Jin, I., Kuriyama, H., & Sohn, H.Y. (2003) *FEMS Microbiol. Lett.*, **219**, 99–104.
- 86) Sunda, W., Kieber, D.J., Kiene, R.P., & Huntsman, S. (2002) *Nature*, **418**, 317–320.
- 87) Whiteman, M., Armstrong, J.S., Chu, S.H., Jia-Ling, S., Wong, B.S., Hheung, N.S., Halliwell, B., & Moore, P.K. (2004) *J. Neurochem.*, **90**, 765–768.
- 88) Whiteman, M., Cheung, N.S., Zhu, Y.Z., Chu, S.H., Siau, J.L., & Wong, B.S. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **326**, 794–798.
- 89) Calvert, J.W., Jha, S., Gundewar, S., Elrod, J.W., Ramachandran, A., Pattillo, C.B., Kevil, C.G., & Lefer, D.J. (2009) *Circ. Res.*, **105**, 365–374.
- 90) Malhotra, J.D. & Kaufman, R.J. (2007) *Antioxid. Redox Signal.*, **9**, 2277–2293.
- 91) Kimura, Y., Dargusch, R., Schubert, D., & Kimura, H. (2006) *Antioxid. Redox Signal.*, **8**, 661–670.
- 92) Johansen, D., Ytrehus, K., & Baxter, G.F. (2006) *Basic. Res. Cardiol.*, **101**, 53–60.
- 93) Sun, Y.G., Cao, Y.X., Wang, W.W., Ma, S.F., Yao, T., & Zhu, Y.C. (2008) *Cardiovasc. Res.*, **79**, 632–641.
- 94) Hildebrandt, T.M. & Grieshaber, M.K. (2008) *FEBS J.*, **275**, 3352–3361.
- 95) Tiranti, V., Viscomi, C., Hildebrandt, T., Di Meo, I., Mineri, R., Tiveron, C., Levitt, M.D., Prella, A., Fagiolari, G., Rimoldi, M., & Zeviani, M. (2009) *Nat. Med.*, **15**, 200–205.
- 96) Viscomi, C., Burlina, A.B., Dweikat, I., Savoirdo, M., Lamperti, C., Hildebrandt, T., Tiranti, V., & Zeviani, M. (2010) *Nat. Med.*, **16**, 869–871.
- 97) Taub, J.W., Huang, X., Matherly, L.H., Stout, M.L., Buck, S. A., Massey, G.V., Becton, D.L., Chang, M.N., Weinstein, H.J., & Ravindranath, Y. (1999) *Blood*, **94**, 1393–1400.
- 98) Kamoun, P., Belardinelli, M.C., Chabli, A., Lallouchi, K., & Chadefaux-Vekemans, B. (2003) *Am. J. Med. Genet.*, **116A**, 310–311.
- 99) Barboux, S., Plomin, R., & Whitehead, A.S. (2000) *Neuroreport*, **11**, 1133–1136.
- 100) Taoka, S. & Banerjee, R. (2001) *J. Inorg. Biochem.*, **87**, 245–251.
- 101) Morikawa, T., Kajimura, M., Nakamura, T., Hishiki, T., Nakanishi, T., Yukutake, Y., Nagahata, Y., Ishikawa, M., Hattori, K., Takenouchi, T., Takahashi, T., Ishii, I., Matsubara, K., Kabe, Y., Uchiyama, S., Nagata, E., Gadalla, M.M., Snyder, S.H., & Suematsu, M. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **109**, 1293–1298.
- 102) Caliendo, G., Cirino, G., Santagada, V., & Wallace, J.L. (2010) *J. Med. Chem.*, **53**, 6275–6286.
- 103) Lee, M., Tazzari, V., Glustarini, D., Rossi, R., Sparatore, A., Soldato, P.D., McGeer, E., & McGeer, P.L. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 17318–17328.
- 104) Predmore, B.L. & Lefer, D.J. (2010) *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, **3**, 487–498.
- 105) Toohey, J.I. (2011) *Anal. Biochem.*, **413**, 1–7.