

課題番号 27

内因性ホルムアルデヒドの解毒代謝機構解明と 抗酸化・老化制御、がん予防・治療戦略の開発

[1] 組織

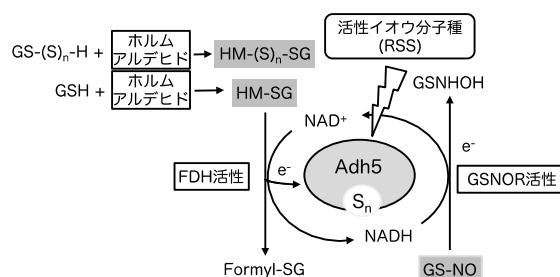
代表者：井田 智章
(東北大学大学院医学系研究科)
対応者：本橋 ほづみ
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：赤池 孝章
(東北大学大学院医学系研究科)
藤井 重元
(東北大学大学院医学系研究科)
松永 哲郎
(東北大学大学院医学系研究科)
笠松 真吾
(東北大学大学院医学系研究科)

研究費：物件費30万円，旅費0円

[2] 研究経過

環境化学物質であるホルムアルデヒドは、強力な親電子性を有し、生体分子の発がんや組織傷害等に関与している。さらに、ホルムアルデヒドは生体内で産生されることがわかってきたが、その生成・代謝機構については不明な点が多く残っている。Alcohol dehydrogenase 5 (Adh5)は、ホルムアルデヒド-グルタチオン抱合体 (S-hydroxymethyl glutathione, HM-SG) を酸化代謝する formaldehyde dehydrogenase (FDH)活性と S-ニトロソグルタチオン (GS-NO) を還元代謝する GSN0 reductase (GSNOR)活性とを有し、酸化還元両方向の反応を触媒するユニークな酵素である。しかしながら、その反応機構と真の生理機能は十分理解されていない。最近我々は、生体内において、チオール基に過剰にイオウ原

子が付加 (ポリサルファ化) した活性イオウ分子種 (reactive sulfur species, RSS) が生成し、親電子物質や活性酸素の強力な消去活性を発揮していることやタンパク質中のシステイン残基がポリサルファ化していることを報告した。本研究では、Adh5 のホルムアルデヒドの解毒代謝の分子機構、さらにタンパク質ポリサルファ化との関連を明らかにし、ホルムアルデヒドに関わる酸化ストレス、老化、発がんの新たな制御戦略の確立を目指した。以下、研究活動状況の概要を記す。本橋教授より、各種組換えヒト Adh5 や Adh5 ノックアウト mouse embryonic fibroblasts (MEFs) 細胞を分与して頂き、酵素反応、ポリサルファ化レベル、細胞内ホルムアルデヒド生成動態を解析した。数ヶ月ごとに研究進捗状況について打ち合わせを行い、本橋教授よりご助言を頂いた。



研究テーマ：① Adh5によるホルムアルデヒド解毒代謝の分子メカニズムの解明
② 内因性ホルムアルデヒド生成とRSS生成に及ぼすAdh5の影響
③ Adh5のポリサルファ化レベルの解明
④ タンパク質ポリサルファ化とAdh5活性との関連

[3] 成果

(3-1) 研究成果

①組換えヒト Adh5 の酵素反応機構の解明

Adh5 によるホルムアルデヒド代謝機構を明らかにするため、組換えヒト Adh5 による FDH 活性と GSNOR 活性の多面的な代謝機構について解析した。その結果、野生型 Adh5 が FDH、GSNOR 活性を持つことが確認された。さらに、Zn 配位子である 45、174

番目のシステインをセリンに置換した変異体(C45S、C174S)では、FDHとGSNOR活性が有意に低下した。

②ホルムアルデヒド生成動態の解明

Adh5ノックアウトMEF細胞における内因性ホルムアルデヒド生成動態を質量分析装置(LC-MS/MS)を用いて定量的に解析した結果、内因性ホルムアルデヒド生成が確認された。さらに、これはAdh5ノックアウトMEF細胞において有意に増加した。これらの結果よりAdh5は細胞内においてもホルムアルデヒドを代謝することが示された。

③RSS生成動態の解明

上記MEFにおけるRSSの生成動態をLC-MS/MSを用いて解析した結果、Adh5ノックアウト細胞のGSSH生成レベルが有意に減少した。そこで、試験管内において、GSH、GSSHとホルムアルデヒドを混合し、GSH、GSSHレベルを解析した結果、GSSHがより代謝された。これらの結果より、GSSHとホルムアルデヒドによりS-hydroxymethyl glutathione persulfide(HM-SSG)が形成され、Adh5のFDH活性の基質として代謝されることが示唆された。

④組換えヒトAdh5のポリサルファ化レベル

ポリサルファ化システイン残基と親電子性化合物とのユニークな反応性を利用したタンパク質ポリサルファ化検出法とLC-MS/MSを用いた解析法により、組換えヒトAdh5と細胞内Adh5のポリサルファ化レベルを解析した結果、高度にポリサルファ化されていることが示された。さらに、C45S、C174Sにおいて、ポリサルファ化レベルが減少し、C45、C174はAdh5のポリサルファ化および酵素活性に重要であることが示唆された。

⑤組換えヒトAdh5のFDHおよびGSNOR活性とタンパク質ポリサルファ化との連関

Adh5のポリサルファ化による酵素反応への影響を解析した結果、GSNOR反応により、ポリサルファ化レベルが減少した。次に、GSNOR反応後にFDH反応を続けて行い、ポリサルファ化レベルを解析した結果、GSNOR反応後に見られたポリサルファ化レベルの低下は、FDH反応によって回復した。さらにこの回復は、HM-SSGによって、より高い回復効果が観察され、低下したGSNOR活性能も回復した。これら

のことから、Adh5のポリサルファ化レベルの変動とGSNOR活性の変化に相関が認められた。

(3-2)波及効果と発展性など

本研究はAdh5の代謝酵素反応論とRSSによる新規ホルムアルデヒド代謝機構に焦点をあて、RSSのレドックスバイオロジーとケミカルバイオロジーの観点から内因性ホルムアルデヒドの生理・病態生理機能の全貌の解明に繋がり、さらに、一酸化窒素の機能制御の破綻に起因する動脈硬化症・心血管疾患などの生活習慣病、炎症、老化、発がんなどの新しい疾病予防、治療戦略の開発に貢献する知見となった。

[4] 成果資料

- (1) Nishida M, Kumagai Y, Ihara H, Fujii S, Motohashi H, Akaike T. Redox signaling regulated by electrophiles and reactive sulfur species. *J Clin Biochem Nutr*. 2016, 58: 91-98.
- (2) Chen W, Rosser EW, Matsunaga T, Pacheco A, Akaike T, Xian M. The development of fluorescent probes for visualizing intracellular hydrogen polysulfides. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2015, 54: 13961-13965.
- (3) Nakano S, Ishii I, Shinmura K, Tamaki K, Hishiki T, Akahoshi N, Ida T, Nakanishi T, Kamata S, Kumagai Y, Akaike T, Fukuda K, Sano M, Suematsu M. Hyperhomocysteinemia abrogates fasting-induced cardioprotection against ischemia/reperfusion by limiting bioavailability of hydrogen sulfide anions. *J Mol Med (Berl)*. 2015, 93: 879-889.
- (4) Marutani E, Yamada M, Ida T, Tokuda K, Ikeda K, Kai S, Shirozu K, Hayashida K, Kosugi S, Hanaoka K, Kaneki M, Akaike T, Ichinose F. Thiosulfate mediates cytoprotective effects of hydrogen sulfide against neuronal ischemia. *J Am Heart Assoc*. 2015, 4.
- (5) 笠松真吾, Md. Morshedul Alam, 井田智章, 松永哲郎, 藤井重元, 居原秀, 赤池孝章, 本橋ほづみ. タンパク質ポリサルファ化を介したアルコールデヒドロゲナーゼ5の酵素活性制御機構. 第38回日本分子生物学会年会/第88回日本生化学会大会合同大会. 神戸ポートアイランド. 神戸. 2015.12.1-4.