

心血管系におけるポリスルフィド化依存的 ADH5 の活性制御とその生理機能の解明

[1] 組織

代表者：西田 基宏
(自然科学研究機構生理学研究所)
 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)
 西村 明幸
(自然科学研究機構生理学研究所)
 下田 翔
(自然科学研究機構生理学研究所)

研究費：物件費1万4千円，旅費28万6千円

[2] 研究経過

強力な親電子性をもつ環境化学物質ホルムアルデヒドは、生体分子の固定（機能低下）に深く関わっている。アルコールデヒドロゲナーゼ5 (ADH5)は、NAD の還元でホルムアルデヒドをギ酸に酸化する解毒酵素である一方で、NADH の酸化に共役してグルタチオンに結合した一酸化窒素 (GSNO)をヒドロキシルアミンに還元してNOの消去を促進する酵素でもある。これまでの本橋・赤池らの解析から、ADH5のシステイン残基には、複数のイオウ原子が取り込まれてポリスルフィド化していること、174番目のシステイン残基をセリンに置換すると(ADH5 C174S)、ADH5の他のシステイン残基におけるポリサルファー化が大幅に低下すること、さらに、ADH5 C174Sは、ホルムアルデヒドの酸化活性は維持しているものの、NOの還元活性を失っていることが、明らかにされてきた。ヒトにおいては、ADH5遺伝子の非同義一塩基多型(SNP)がタコツボ心筋症と呼ばれる心血管系の機能異常をもたらすことが報告されている(Goodloe et al, Eur J Heart Fail 2014)。本橋の解析から、このSNPによりADH5タンパク質が不安定化することが明らかになっている。

我々はこれまで、心臓・血管系の恒常性を維持する分子機構の解明をすすめており、とりわけ、タン

パク質の翻訳後修飾、レドックス制御による機能変換機構の研究を行ってきた。生体分子の中で活発なレドックス反応を行うのはイオウ原子であり、我々は、タンパク質のシステインSH基の修飾とシグナルの解析を通して、心筋細胞の老化とNOとの関係を解明してきた(Nishida et al., Nat. Chem. Biol., 2012)。その延長上で、赤池・本橋らはシステインSH基にさらにSが付加したパースルフィド(-SSH)やポリスルフィド(-SS_nH)が親電子物質とのレドックス反応を担う求核実体であることを明らかにしている(Ida et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2014)。特にGSNOは心血管病の予防・治療に働くことが報告されており、心臓におけるADH5のGSNO還元酵素(GSNOR)は重要視されている。

こうした背景を基盤に、本研究では、ADH5のポリスルフィド化の細胞老化における意義解明を目的に、赤池教授のグループが作出したADH5欠損マウスおよびADH5 C174S導入マウスの心機能解析を本橋教授のご助言をいただきながら解析を行った。

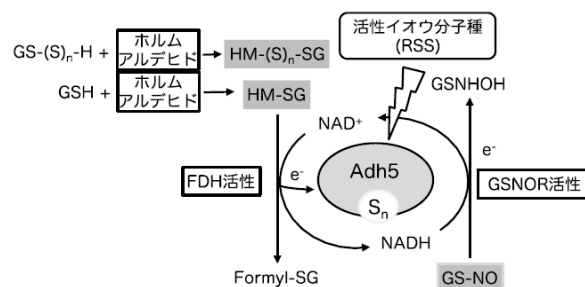


図 Adh5 のホルムアルデヒド解毒代謝とNO消去における活性イオウの役割 (概念図)

[3] 成果

(3-1) 研究成果

赤池教授らがCRISPR-Cas9ゲノム編集技術を用いて作出したADH5欠損(-/-)マウスとADH C174Sを戻し導入した変異マウス(ADH C174S/C174S)の心機能を解析した。マウスはイソフルラン投与により麻酔処置を施し、左頸動脈よりマイクロカテーテル(Millar 1.4F, SPR 671 (Millar Instruments, Houston, TX))を左心室内まで挿入す

ることで定常状態の左心室機能を計測した。得られた血行動態パラメーターは LabChart software (AD Instruments, Colorado Springs, CO)を用いて解析した。我々のグループは、主にカテーテルの貸与とマウス外科手術、心機能計測の技術指導、統計を含めた解析技術の指導を担当し、実質的な実験については、東北大学動物実験委員会から実験承認を受けている赤池研究室の守田助教・井田助教に行っていた。心機能計測については、東北大学医学部循環器内科・下川宏明教授が保有する計測機器を使わせていただいた。

12~16週令の野生型 (ADH5 +/+) マウス (n=5)、ADH5 -/- マウス (n=4)、ADH5 C174S/C174S マウス (n=3) の麻酔科における左心室機能を測定した結果、ADH5 +/+ マウスと比べて、ADH5 C174S/C174S マウスでは basal level における左心室収縮率 (LVdP/dtmax) が増加傾向にあり、左室内末期圧 (LVEDP) が減少傾向にあることを初めて明らかにした。米国グループが我々とは別に ADH5 欠損マウスを作出し、ADH5 欠損により心筋の type-II リアノジン受容体の S-ニトロソ化が亢進し、それに伴って心機能が增加することを報告している (Beigi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2012)。しかし、ADH5 -/- マウスでは、心重量、心拍数および他の左心室収縮拡張機能すべてにおいて、野生型マウスのそれらとの間に有意な差は認められなかった。これらの結果は、米国グループらが主張するように、ADH5 C174S/C174S マウスにおける心機能増加が ADH5 の GSNOR 活性のみ欠損しており、ホルムアルデヒド解毒代謝活性の欠損は心機能増加に関与していないことを強く示唆している。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究の成果から、ADH5 の機能発現とイオウ代謝との関係が明らかとなり、タンパク質機能を理解するために、システイン残基のポリスルフィド化を考慮することが重要であることを明確に示すことができた。さらに、酸化反応と還元反応の両者を異なった基質を対象に触媒する ADH5 が、両方の機能を発揮することで酸化還元反応のバランスを維持することが、心臓をはじめとする様々な組織の機能維持に重要であることが示唆された。今後は、心筋梗塞や圧負荷モデルとの掛け合わせも行うことで、心臓が最も脆弱性を示す還元ストレスにおける ADH5 の役割を明らかにしていくことが可能となり、得られた知見をもとに、心血管老化防止の新たな戦略を構築することも期待できるだろう。

本共同研究を通じて、異分野連携交流が飛躍的に活性化し、生理学研究所が主催する研究会「生命の

エネルギー獲得戦略における多様性と共通原理の理解にむけて」(2018年4月26日(木)岡崎開催)に発展した。こうした異分野交流の場を続けることで、新しい学問領域の構築を目指したい。

[4] 成果資料

1. Akaike T, Ida T, Wei F-Y, Nishida M, Kumagai Y, Alam MM, Ihara H, Sawa T, Matsunaga T, Kasamatsu S, Nishimura A, Morita M, Tomizawa K, Nishimura A, Watanabe S, Inaba K, Shima H, Tanuma N, Jung M, Fujii S, Watanabe Y, Ohmuraya M, Nagy P, Feelisch M, Fukuto JM, Motohashi H. Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. **Nature Commun.** 8(1):1177 (2017).
2. Ihara H, Kasamatsu S, Kitamura A, Nishimura A, Tsutsuki H, Ida T, Ishizaki K, Toyama T, Yoshida E, Hamid HA, Jung M, Matsunaga T, Fujii S, Sawa T, Nishida M, Kumagai Y, Akaike T. Exposure to Electrophiles Impairs Reactive Persulfide-dependent Redox Signaling in Neuronal Cells. **Chem. Res. Toxicol.** 30(9):1673-1684 (2017).
3. Masuda K, Tsutsuki H, Kasamatsu S, Ida T, Takata T, Sugiura K, Nishida M, Watanabe Y, Sawa T, Akaike T, Ihara H. Involvement of nitric oxide/reactive oxygen species signaling via 8-nitro-cGMP formation in 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells and rat cerebellar granule neurons. **Biochem Biophys Res Commun.** 495(3):2165-2170 (2018).
4. Nishida M*, Nishimura A, Matsunaga T, Motohashi H, Kasamatsu S, Akaike T*. Redox regulation of electrophilic signaling by reactive persulfides in cardiac cells. **Free Radic Biol Med.** 109, 132-140, 2017.