

課題番号 9

イオウ代謝とストレス応答機構

[1] 組織

代表者：居原 秀
(大阪府立大学大学院理学系研究科)

対応者：本橋ほづみ
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：旅費 15 万円

[2] 研究経過

最近、申請者らは、ミトコンドリアにおけるシステインを基質としたイオウ代謝の重要性を明らかにした。すなわち、システインパースルフィドなどのチオール基に過剰なイオウ原子を含むポリスルフィド代謝物がミトコンドリアの膜電位維持に重要であり、効率的なエネルギー産生を支えている可能性を見いだした。そこに関わる酵素として、シスチニル tRNA 合成酵素である CARS2、硫化水素酸化酵素である SQR、グルタチオンパースルフィド酸化酵素である ETHE1 の重要性を、培養細胞やマウス個体を用いた loss-of-function 解析により明らかにしつつある。これらの結果は、生体内へのシスチン供給がエネルギー産生に重要であることを示唆している。一方、酸化ストレス応答の鍵因子である NRF2 は、シスチントランスポーターや、グルタチオン合成酵素などのイオウ代謝関連因子を統括的に制御しており、細胞内へのシステイン供給において重要な役割を果たしている。しかし、システインの供給の増減や NRF2 活性の変化が、細胞のエネルギー産生効率にどのような影響を及ぼすのかについては不明である。

そこで、本研究では、ミトコンドリアにおけるエネルギー産生とイオウ関連代謝物、酸化ストレス応答の鍵因子である NRF2 の関係を明らかにすることを目的としている。これまでに代表者は、高速液体クロマトグラフィー - タンデムマスペクトロメトリー (HPLC-MSMS) を用いた親電子性を有するニトロ化核酸である 8-ニトロ-cGMP や、高い求核性を持つシステインパースルフィドやグルタチオンパースルフィドなどのポリスルフィド代謝物のような不安定なレドックス代謝物の分析法を確立

し、その生物学的意義の解明を行ってきた。本研究では、マウス肝臓よりミトコンドリアを単離し、様々な条件で酸素消費量をモニターすると同時にミトコンドリア内のポリスルフィド代謝物および ATP を HPLC-MSMS で定量した。

対応者の本橋教授とは、これまでも共同研究を行っていた。本研究を進めるにあたって、大阪府立大学にて予備的検討を繰り返し、その結果報告も含め電子メールで研究打ち合わせを行った。その後平成 31 年 1 月に、東北大学加齢医学研究所にて、居原、本橋、大阪府立大学大学院理学系研究科の学生二人、東北大学加齢医学研究所の学生一人で、研究打ち合わせ、および野生型マウスの肝臓よりミトコンドリアを単離し、酸素消費量測定、エネルギー産生、ポリスルフィド代謝物の解析を行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

予備的検討を行い、ミトコンドリアの酸素消費、エネルギー産生、ポリスルフィド代謝物の定量を評価する系を確立した。本研究の実験の流れを図 1 に示す。

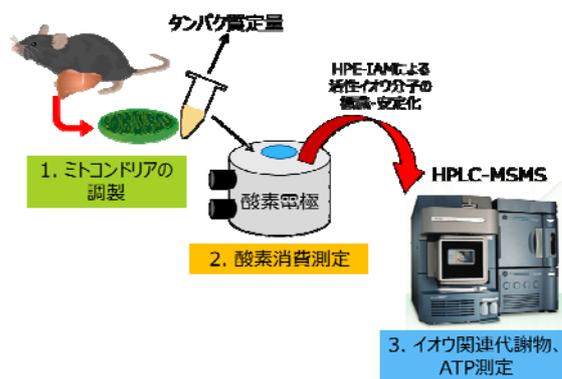


図1 本実験の流れ

具体的には、ミトコンドリアの単離を Frezza らの方法 (Nat. Protoc., 2, 287-295, 2007) に準じて行った。マウスより肝臓を摘出し、テフロンホモジナイザーで均一化した後、600g で 10 分間遠心した。

次に上清を 7000 g で 10 分間遠心し、沈殿にミトコンドリアを得た。単離ミトコンドリアの酸素消費量は、クラーク型酸素電極 (Oxygraph, Hansatech 社) を用いて測定した。グルタミン酸、リンゴ酸、ADP、システイン、電子伝達系複合体 I の阻害剤ロテノンなどを添加し、酸素消費量を比較した (図 2)。

また、ミトコンドリアを 4 倍量の 1.25 mM β -(4-Hydroxyphenyl) ethyl iodoacetoamide (HPE-IAM) を含むメタノールで希釈し、ポリスフィド代謝物の抽出と標識を行った。試料に安定同位体標準物質を添加し、HPLC-MSMS (Waters 社 HPLC (alliance)-トリプル四重極型質量分析装置 Xevo TQD) に供し、多重反応モニタリング法、安定同位体希釈法により ATP、システインパースルフィド、硫化水素の定量を行った。

予備的検討ではあるが、野生型マウスの肝臓から調製したミトコンドリアを用いた解析結果から、基質存在下における酸素消費の増大と ATP 産生が確

認され、この時システインパースルフィドは増加、硫化水素は減少していた。また、電子伝達系阻害剤ロテノンで処理すると、ATP 産生の減少が認められ、システインパースルフィド、硫化水素産生は変化なかった。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究の成果は、ポリスフィド代謝物がミトコンドリアにおけるエネルギー産生に関与していることを示唆するものである。今後、本共同研究より確立された解析方法を用いて、様々なイオウ代謝異常遺伝子改変動物、イオウ代謝関連因子を統括的に制御し酸化ストレス応答の鍵因子である NRF2 改変動物由来のミトコンドリアを解析することにより、ストレス応答、エネルギー産生、イオウ代謝の関連性が明らかになることが予測される。

[4] 成果資料

本共同研究成果はまだ成果発表には至っていない。

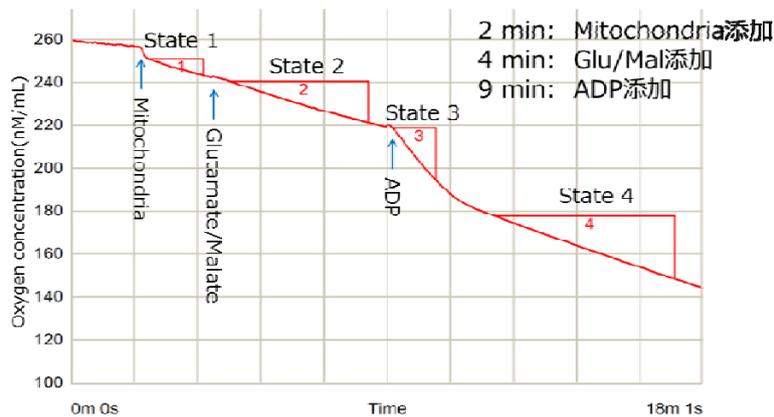
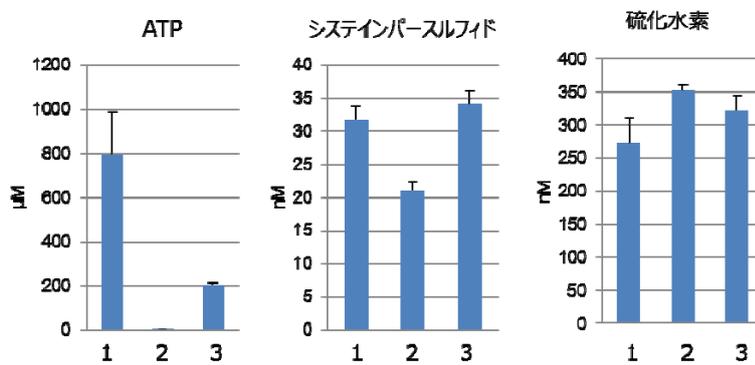


図 2 ミトコンドリアにおける酸素消費の解析



1: 5 mM グルタミン酸、2.5 mM リンゴ酸、1.5 mM ADP
 2: 5 mM グルタミン酸、2.5 mM リンゴ酸
 3: 5 mM グルタミン酸、2.5 mM リンゴ酸、1.5 mM ADP、20 μM ロテノン

図 3 HPLC-MSMS による ATP、システインパースルフィド、硫化水素の定量