

審査の結果の要旨

氏名 三 上 義 礼

本研究は、ガス状生理活性物質である硫化水素 ( $\text{H}_2\text{S}$ ) について、生合成経路の制御機構および生理機能を明らかにすることを目的としており、マウス脳における  $\text{H}_2\text{S}$  生産酵素の活性化因子の探索および網膜における  $\text{H}_2\text{S}$  の生理機能の解析を試みたもので、下記の結果を得ている。

1. Cysteine aminotransferase (CAT) はシステインと $\alpha$ -ケトグルタル酸 ( $\alpha$ -KG) から 3-メルカプトピルビン酸(3MP)を生合成し、それを基質として 3MST が  $\text{H}_2\text{S}$  を生産する。3MST は、 $\text{H}_2\text{S}$  生産に還元性物質が必要とするが、生体内で実際に機能している補因子は不明であった。そこで、3MST が豊富に存在するマウス脳ミトコンドリア画分に基質 3MP を添加しガスクロマトグラフィーで  $\text{H}_2\text{S}$  生産を測定する方法を用い、3MST の還元性補因子を探索した。その結果、チオレドキシシンとジヒドロリポ酸 (DHLA) を還元性補因子として同定した。分子内に 2 つの還元活性を有するチオール基が存在する構造が重要であり、3MST による  $\text{H}_2\text{S}$  生産の分子機序を提唱した。
2. 3MST は、チオ硫酸イオウ転移酵素 (ロダネーゼ) と相同性が高いことから、チオ硫酸 ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) 代謝に関与する可能性が考えられる。そこで、3MST を過剰発現させた HEK293F 細胞を用いてチオ硫酸を基質とした場合の 3MST による  $\text{H}_2\text{S}$  生産を確認した。その結果、3MST はチオ硫酸から  $\text{H}_2\text{S}$  を生産し、亜硫酸イオン ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) 存在下で抑制されることを明らかにした。ロダネーゼに加え、3MST もチオ硫酸代謝に関与するという知見を加えた。
3. 細胞内で生産された  $\text{H}_2\text{S}$  は、結合型イオウとして貯蔵され、還元条件下で放出されることが知られている。そこで、結合型イオウ放出に対する生体内還元性物質の寄与を検証した。その結果、DHLA が結合型イオウを切断・放出しうることを明らかにした。生体内に貯蔵される  $\text{H}_2\text{S}$  を放出する因子の一つを新たに同定した。
4. 網膜における 3MST と CAT の局在を明らかにすることを目的として、免疫組織化学的手法による解析を行った。その結果、3MST と CAT がマウス網膜の神経細胞に広く共局在すること、さらに水平細胞特異的マーカーのカルビンジンと 3MST が共局在することを確かめた。他の  $\text{H}_2\text{S}$  生産酵素の局在は確認できなかったことから、網膜における主要な  $\text{H}_2\text{S}$  生産酵素は 3MST であると考えられる。
5. 組織学的解析の結果を受けて、 $\text{H}_2\text{S}$  生産経路を生化学的に検討した。網膜ではシステインと $\alpha$ -KG の組み合わせから  $\text{H}_2\text{S}$  が生産された。3MST/CAT 経路が主経路であることが確認できた。さらに、 $\text{H}_2\text{S}$  生産の制御因子の検討を行った。その結果、 $\text{Ca}^{2+}$  による制御を受け、100 nM 以下の低い  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度領域で 3MST/CAT 経路からの  $\text{H}_2\text{S}$  生産量が上昇すること、 $\text{Ca}^{2+}$

〔課程-2〕

による制御を受ける酵素は CAT であることを示した。視細胞は明時に  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が 10 nM 程度にまで減少することが知られており、 $\text{H}_2\text{S}$  生産が明時において起こることが示唆された。

6. 網膜で生産された  $\text{H}_2\text{S}$  による生理作用を明らかにするために、細胞内のセカンドメッセンジャーとして重要な  $\text{Ca}^{2+}$  動態に着目した。マウス網膜のスライス標本を作製し、蛍光顕微鏡を利用した  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行った。その結果、視細胞の脱分極によって起こる細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入が、 $\text{H}_2\text{S}$  の共存によって抑制されることを見出した。さらに、この抑制現象はプロトンポンプ vacuolar type  $\text{H}^+$ -ATPase (V-ATPase) の阻害剤によって消失した。これらの結果から、 $\text{H}_2\text{S}$  が V-ATPase を活性化してプロトン放出を促進し、視細胞-水平細胞間の酸性化を起こして電位依存性 L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルを抑制するというメカニズムが明らかとなった。 $\text{H}_2\text{S}$  は視細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を低く保っていると考えられる。

7. 眼に強い光を照射すると、視細胞が変性し細胞死を起こす。この現象を「網膜光障害」と呼び、活性酸素種による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇やミトコンドリア機能不全などが原因とされる。 $\text{H}_2\text{S}$  を外から補うことによって障害を予防できると考え、網膜光障害モデルマウスを作製して検証を行った。その結果、光照射前にマウスへ  $\text{H}_2\text{S}$  を投与することにより、光障害による形態異常・細胞死・酸化ストレスによる DNA 損傷が緩和された。 $\text{H}_2\text{S}$  は網膜光障害から視細胞を保護しうることを明らかにした。

以上、本論文はガス状生理活性物質  $\text{H}_2\text{S}$  を生産する 3MST/CAT 経路の制御因子とその分子メカニズムを明らかにした。さらに、網膜における  $\text{H}_2\text{S}$  の生理機能を示し、網膜光障害から視細胞を保護する作用を明らかにした。本研究は、日常光環境下での網膜における  $\text{H}_2\text{S}$  の生理的な役割を提唱すると共に、網膜光障害や網膜変性疾患等への予防・治療に貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。