

論 文 要 旨

Polysulfide inhibits hypoxia-elicited hypoxia-inducible factor activation in a
mitochondria-dependent manner

(ポリスルフィドは低酸素による低酸素誘導因子の活性化をミトコンドリア
依存的に抑制する)

関西医科大学麻酔科学講座

(紹介：上林 卓彦 教授)

関西医科大学附属生命医学研究所侵襲反応制御部門

(指導：廣田 喜一 学長特命教授)

右馬 猛生

【はじめに】

近年、生体シグナル伝達における O_2 、 CO 、 NO 、 H_2S などのガス状分子の関与が注目を集めている。 H_2S の機能の解析は比較的新しい分野である。 H_2S の機能の一部がその代謝物ポリスルフィドによって担われているという学説が提唱されている。ポリスルフィドはさまざまな数の硫黄原子 (H_2S_n) を含む物質であり、イオンチャネル、特定の腫瘍抑制因子、およびプロテインキナーゼを調節する機能を持つことが報告されている。一方、低酸素条件下でエリスロポエチン発現を誘導する因子として最初に単離された低酸素誘導因子 hypoxia-inducible factor (HIF) は、各種解糖系酵素、グルコース輸送蛋白、血管内皮増殖因子、造血因子など多様な遺伝子の発現を転写レベルで制御し細胞の低酸素応答において中心的な役割を果たしている。しかし、低酸素状態の哺乳類細胞における HIF 活性化に及ぼすポリスルフィドの影響はほとんど知られていない。今回、低酸素 (1%酸素) 条件での HIF-1 活性化調節に薬理的濃度のポリスルフィドの果たす役割についてポリスルフィドドナーである多硫化ナトリウム (Na_2S_n) を用いて細胞生物学的に検討したのでその結果を報告する。

【実験・結果】

培養細胞株において、ポリスルフィド投与が低酸素条件下における HIF-1 活性に及ぼす影響を検討した。HIF-1 活性評価のため、HIF-1 転写活性を反映する α サブユニット (HIF-1 α) 発現量をウェスタンブロット法により評価し、グルコーストランスポーター1 や血管内皮増殖因子 A などの HIF-1 標的遺伝子発現を半定量的リアルタイム PCR 法を用いて検討した。ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞において、薬理的濃度のポリスルフィドは低酸素誘導性の HIF-1 α タンパク質の蓄積と HIF の下流遺伝子の発現誘導を阻害した。ただし、これらの影響は無酸素 (0.1%酸素) 条件下では観察されなかった。

ジスルフィド結合を切断する還元剤トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩による前処理は、ポリスルフィドの HIF 阻害作用を無効にした。この結果は、ポリスルフィドの効果は分子内のジスルフィド結合に依存することを示唆している。RNA シーケンシング (RNA-Seq) を用いた網羅的遺伝子発現評価の結果、ポリスルフィドが低酸素誘導性遺伝子応答に対して抑制効果を持っていることが示された。

HIF-1 α 酸素依存性分解ドメイン (ODD) を含むルシフェラーゼ融合タンパク質を使用して、ポリスルフィドが HIF-1 α 蛋白質の細胞内安定性に影響を与えるかを調べたところ、ポリスルフィドは低酸素条件下で HIF-1 α の半減期を短縮することが示された。

また、HIF-1 α 蛋白分解に関与する Von Hippel-Lindau (VHL) 蛋白を欠失する細胞 (RCC4 細胞) およびミトコンドリア DNA 欠損細胞 (EB8 細胞) において、ポリスルフィドは HIF-1 α 蛋白質合成に影響を与えなかったことから、ポリスルフィドによる HIF 抑制作用には VHL 蛋白およびミトコンドリアが重要な役割を果たしていると考えられた。

細胞外フラックスアナライザーを用いて細胞酸素消費量 (OCR) に対するポリスルフィドの影響を調べたところ、用量依存的な OCR の抑制が観察された。ポリスルフィドは細胞内の酸素代謝調節を介して HIF の活性および低酸素応答を制御する可能性が示唆された。

【結語】

薬理的濃度のポリスルフィドは低酸素条件下における HIF 活性化と、それに続く低酸素誘導性遺伝子発現を VHL 蛋白およびミトコンドリア依存的に抑制した。ポリスルフィドが細胞内酸素ホメオスタシスの制御に重要な役割を果たしていると考えられた。これらの知見における生理学的および病態生理学的意味は将来の研究対象になると考えられる。