

徳島大学学位論文

活性イオウ分子種のレドックス制御機構の解明と  
抗酸化剤の開発への応用

Evaluation of redox control mechanism of reactive sulfur  
species and application to design of novel antioxidants

2020

今福（池田） 真由美

Mayumi Imafuku-Ikeda

## 目次

第1章 緒言 .....	3
第2章 ポリスルフィドの新規定量法の開発と生体液測定への応用 .....	8
第1節 序 .....	8
第2節 還元法によるポリスルフィド定量法の確立 .....	9
2-1 アスコルビン酸と塩基のポリスルフィドの還元能の評価 .....	9
2-2 アスコルビン酸と塩基によるポリスルフィドの還元剤の最適化 .....	11
2-3 ポリスルフィド測定の確認試験 .....	13
2-4 電極法を用いたスルフィドの測定の応用 .....	19
第3節 ヒト生体試料中に存在するポリスルフィドの定量 .....	21
第4節 マウスにおける精子活性とポリスルフィドの関連 .....	24
4-1 精子におけるポリスルフィドの検出 .....	24
4-2 精子ポリスルフィド合成酵素の発現評価 .....	25
4-3 加齢性不妊モデルマウスを用いた評価 .....	26
第5節 血漿ポリスルフィドの日内変動 .....	30
第6節 健康食品中ポリスルフィドの検出と経口摂取による影響評価 .....	31
6-1 ポリスルフィド含有健康食品のスクリーニング .....	31
6-2 ポリスルフィド含有健康食品摂取による影響評価 .....	33
第7節 血清中ポリスルフィド保持物質の同定 .....	34
第8節 PEG-MAL を基盤としたゲルシフト法による HSA のポリスルフィドの検出 .....	37
第9節 DTT を用いたポリスルフィド定量法の確立 .....	39
第10節 アルキル化還元によるポリスルフィド検出法の改善 .....	43
第11節 考察 .....	45
第12節 小括 .....	47
第3章 HSA におけるポリスルフィドの機能解析 .....	49
第1節 序 .....	49
2-1 SSP4 による HSA 中ポリスルフィドの引き抜きおよび構造活性評価 .....	50
2-2 $\beta$ -NADH によるポリスルフィドの引き抜きと構造活性 .....	54

2-3	SAOBにてポリスルフィドを遊離させた HSA の構造活性評価 .....	57
2-4	メチル水銀 (MeHg) および CN を用いたポリスルフィド脱離による構造変化 .....	59
2-5	アルキル化還元法を用いたポリスルフィドの引き抜きによる構造変化 .....	61
第 3 節	酸化ストレスが及ぼす HSA ポリスルフィドの変化 .....	63
第 4 節	酸化ストレス関連疾患患者血清における血清ポリスルフィドの変化 .....	69
第 5 節	急性腎障害モデルマウスにおける血清ポリスルフィドの変化 .....	72
第 6 節	考察 .....	76
第 7 節	小括 .....	82
第 4 章	ポリスルフィド付加 HSA の設計および有用性評価 .....	83
第 2 節	Sn-HSA の作製と評価 .....	84
2-1	Na <sub>2</sub> Sn による HSA へのポリスルフィドの供給 .....	84
2-2	イオウ付加効率に影響を及ぼす因子の探索 .....	85
第 3 節	Sn-HSA のメラニン産生抑制作用 .....	86
第 4 節	ミオグロビン誘発酸化ストレスに対する Sn-HSA の抑制効果 .....	93
第 5 節	Poly-NACSn-HSA の作製と活性評価 .....	95
5-1	Poly-NACSn-HSA の設計および物性評価 .....	95
5-2	細胞内酸化ストレスに対する poly-NACSn-HSA の抑制効果 .....	97
第 6 節	グリセロール誘発 AKI に対するポリスルフィドドナーの治療効果 .....	99
第 7 節	考察 .....	100
第 8 節	小括 .....	102
第 5 章	総括 .....	103
実験の部	.....	105
参考文献	.....	114

## 第1章 緒言

地球に生命が誕生したのは、約 38 億年前のことである<sup>1,2</sup>。最初の生命体は、古細菌や真正細菌だと言われている。当時地球は還元的な環境に覆われており、大量の二価鉄イオンが存在していたため<sup>3</sup>、水などから発生した酸素は速やかに酸化鉄となり、大気中に酸素分子は殆ど存在しなかった<sup>4</sup>。そのため、古細菌や真正細菌は、呼吸の原料として酸素の代わりに硫化水素 (H<sub>2</sub>S) を利用していた (式 1)<sup>5,6</sup>。



その後、鉄イオンが酸化し尽くされると大気や海洋中の酸素濃度が上昇し始め、約 6 億年前から現在の酸素濃度近くまで達した<sup>4</sup>。そのため、生物は呼吸に酸素を利用するようになったが、最近、古来の「硫黄呼吸」の仕組みが人類を含む現存の生物にも残っていることが発見された。

硫黄原子は酸素と同族で 6 個の価電子を有しており、-2 から+6 までの幅広い酸化数を変化させることが特徴である<sup>7</sup>。式 1 の硫黄呼吸では、硫黄原子の酸化数は 0 から-2 へ変化している。新たに発見された「硫黄呼吸」も硫黄原子の多様な酸化数を利用したものであるが、厳密には式 1 と異なる。その仕組みの鍵となる分子が、活性イオウ分子種 (Reactive sulfur species, RSS) である。RSS とは、硫黄原子が更に結合したチオール (SH) である、ポリスルフィド (RSS<sub>n</sub>H) を有する化合物の総称である<sup>8,9</sup>。SH に結合した硫黄原子は sulfane sulfur と呼ばれる (Fig.1)。ただし、S<sub>8</sub> のように環状化して安定となった硫黄は一般的には RSS に含まない。

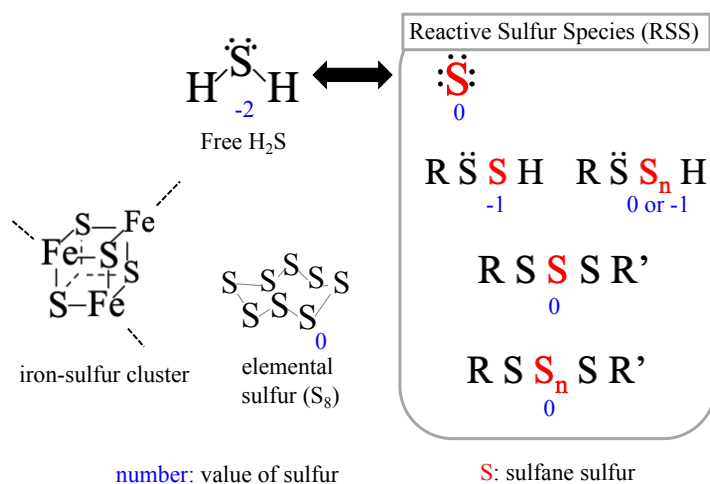
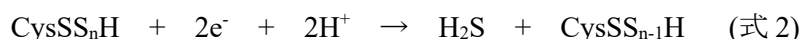


Fig. 1 Sulfur-related compounds and reactive sulfur species.



最近赤池らにより、RSS の 1 つであるシステインポリスルフィド (CysSS<sub>n</sub>H) が以下の式で細胞呼吸を行うことが証明された<sup>10</sup>。



H<sub>2</sub>S は sulfide quinone oxidase (SQR) を介して電子伝達系を回し、酸化・無毒化される<sup>11</sup>。この過程によってもエネルギーが産生されるため、こうした硫黄呼吸は実は酸素より効率が良いとも言える。酸素呼吸が主となった現在にこのような硫黄呼吸の仕組みが残されている理由は明らかになっていないが、SQR の発現が高いと低酸素に耐性を有することが報告されていることから、こうした硫黄呼吸の仕組みは嫌気的環境下に適応するのに有利であると考えられる。

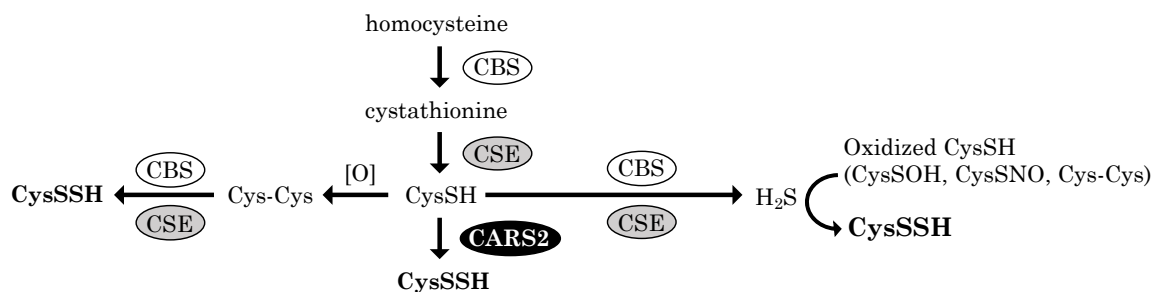
また、CysSS<sub>n</sub>Hは呼吸以外にも生物応用されているのではないかとする見方もある。硫黄原子が結合すると、α効果によりSHの求核性が高くなることから、ポリスルフィドは高い反応性を有するとされている<sup>12, 13</sup>。システインを例として挙げると、CysSHのpKaが8.29であるのに対しCysSSHのpKaは4.34である<sup>14</sup>。実際、CysSS<sub>n</sub>Hを材料に合成されるグルタチオンポリスルフィド (GSS<sub>n</sub>H) は、グルタチオン (GSH) よりも顕著に高い抗酸化作用を示す<sup>8</sup>。また、低分子ポリスルフィドはメチル水銀 (MeHg) などの親電子物質と反応して無毒化することも分かっている<sup>15</sup>。こうしたRSSの生理的役割の全貌は明らかになっていないが、病態時にその濃度が変化することが報告されており、人類の健康を左右する因子である可能性が伺える。例えば、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 罹患患者では、気管支上皮細胞中や肺胞上皮粘液中のシステインポリスルフィドやグルタチオンポリスルフィドなどの低分子ポリスルフィドが減少していることが分かっている<sup>16</sup>。反対に、糖尿病性網膜症患者の硝子体や眼房水中の低分子ポリスルフィドは、病態時に増加することが報告されている<sup>17</sup>。細胞や実験動物を用いた試験では、ポリスルフィドの供給により炎症や細胞死が抑制されることも分かっている<sup>8, 18, 19</sup>。

低分子中だけでなく、ポリスルフィドはタンパク質中にも存在する。例えば、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) や核内因子κB (NF-κB) などのタンパク質のポリスルフィド化が知られている<sup>20, 21</sup>。タンパク質ポリスルフィドの生理的な意義については、翻訳後修飾であればいくつかの報告で既に明らかになっている。例えば、Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap 1) の SH がポリスルフィドになると、NF-E2-related factor 2 (Nrf2) の制御を解除し、抗炎症・抗酸化シグナルを活性化する<sup>22</sup>。また、PPARγの C139 のポリスルフィド化は PPARγを活性化しグルコース取り込みや脂質の貯蔵を促進する<sup>23</sup>。NF-κB のポリスルフィド修飾は ribosomal protein S3 を介して抗酸化タンパク質の転写活性

を増強する<sup>20</sup>。

こうした RSS の合成酵素として、システニル tRNA 合成酵素 (CARS) が同定されている<sup>10</sup>。CARS はシステイン (CysSH) を基質に CysSS<sub>n</sub>H を合成する。CARS の中でも特にミトコンドリアに存在する CARS2 が CysSS<sub>n</sub>H の合成に重要な役割を示している。CARS2 のヘテロノックアウトマウスの CysSS<sub>n</sub>H 量は約 50%になることから、CARS2 は生体における最も主要なポリスルフィド合成酵素であると言われている。

また、H<sub>2</sub>S の合成酵素であるシスタチオニンβシンターゼ (CBS) やシスタチオニンγリアーゼ (CSE) も、酸化型 CysSH であるシスチン (Cys-Cys) を基質として、CysSS<sub>n</sub>H を合成する (Fig. 2)。ただし、CBS や CSE は、Cys-Cys は細胞内に殆ど存在しないことから、CBS や CSE だけは細胞内に存在する CysSS<sub>n</sub>H 濃度を証明できない<sup>7</sup>。したがって、現在は CARS2 が RSS の主要な合成酵素であると考えられている。一方、CBS や CSE は CARS2 の基質である CysSH の合成に関与するため、CBS や CSE の発現が変動することは結果的に RSS の量の変動要因になりうる。また、CSE や CBS により産生される H<sub>2</sub>S は、スルフェン酸やニトロソ基、ジスルフィド結合など酸化型の SH と反応すると、SSH を生成することも報告されている<sup>24</sup>。



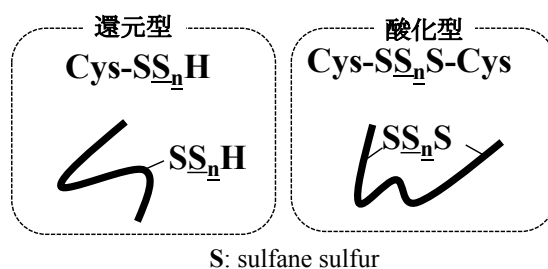
**Fig. 2** Pathways of the production of cysteine persulfide by the enzymes.

興味深いことに、CysSS<sub>n</sub>H はアミノ酸源としてタンパク質に組み込まれる。CARS2 により合成された CysSS<sub>n</sub>H は、システインとしてシステニル tRNA に運ばれることが報告されている<sup>10</sup>。つまり、タンパク質は翻訳される段階で既にポリスルフィドを保有しているということである。事実、ピューロマイシン標識とアルキル化剤を組み合わせることで翻訳中の GAPDH タンパク質を回収すると、そのシステインの 63%が CysSS<sub>n</sub>H であった<sup>10</sup>。

以上のように、RSS は CARS2 により合成され、硫黄呼吸の材料になる他、自身がアミノ酸やタンパク質の活性を制御する。加えて、CARS2 のホモノックアウトマウスが生存できないことから、RSS が生命を左右する重要な因子であると考えられる。

ところで生体液は、物質を運搬する他、浸透圧や pH、血圧などを調整する役割を有す

る<sup>25</sup>。レドックスバランスを制御することもその一つであり、生体液が酸化すると臓器障害や老化などに繋がることが分かっている。そのため、血清など細胞外のタンパク質におけるポリスルフィドの役割を明らかにすることは、生体の恒常性維持を理解する上で重要である。実際、血液や血清に  $\text{H}_2\text{S}$  を添加すると速やかに消失することから、血清中にはポリスルフィドの貯蔵機構が存在するのではないかと信じられてきた。筆者は、この貯蔵機構として、血清中に最も多く存在し、分子内に 17 対のジスルフィド結合と遊離型のシステイン残基を 1 個有するシステインリッチなタンパク質のヒト血清アルブミン (HSA) に着目した<sup>26</sup>。HSA は浸透圧調整やリガンド運搬以外にも、血清の主要な酸化防御系として機能している<sup>27</sup>。興味深いことに、1983 年 J. Westley らは、HSA をシアン化物で処理することでチオシアン (SCN) が産生されることに着目し、HSA1 分子あたり 6 つの反応性のある硫黄原子が何らかの形で存在することを報告した<sup>28</sup>。残念ながら、それ以降、HSA に結合した硫黄原子を対象とした研究報告は乏しく、その機能については全く明らかにされていないのが現状である。その原因の一つに、細胞内外のレドックスバランスの違いが挙げられる。細胞内は還元物質であるグルタチオンが 5-15 mM と高濃度存在しているのに対し、血管などの細胞外では数  $\mu\text{M}$  とごく僅かである<sup>29</sup>。そのため、ポリスルフィドの多くは末端がチオール ( $\text{R-SH}$ ) になった還元型で存在している細胞内環境とは異なり、細胞外である生体液中の酸化的環境においては、酸化型のものが優位であると考えられる (Fig. 3)。しかし、酸化型ポリスルフィドを定量する方法はほとんどなく、このことが細胞外 RSS 研究のボトルネックとなっていた。



**Fig. 3 Forms of polysulfide in cysteine and protein.**

このような背景の下、筆者は HSA に存在するポリスルフィドが HSA の酸化作用において重要な役割を果たしているのではないかと、またトリスルフィド結合は  $\text{CysSH}$  残基間の揺らぎを生じさせることから、ポリスルフィドの存在は HSA の立体構造やそのダイナミクスにも影響を及ぼしているのではないかと仮説を立てた。これらの点を明らかにすることができれば、RSS やアルブミン研究に新たな扉を開くだけでなく、ヒトにおける新規酸化ストレス評価系としての臨床応用も期待される。

そこで本研究では、生体液に含まれるポリスルフィドの新規定量法の開発と、血清タンパク質の構造・機能に及ぼすポリスルフィドの役割を解明することを目的とした。第2章では、ポリスルフィドを還元してスルフィドとして検出することで、細胞外のポリスルフィドも定量可能となるような新規測定法を開発した。加えて、還元剤の種類や処理条件の違いにより、反応性の異なるポリスルフィドを測り分けることに成功した。これら開発した手法を用い、生体液中のポリスルフィド濃度やその日内変動、各生体液ポリスルフィド量の関連性について評価した。血清ポリスルフィドにおいては、ポリスルフィド保持タンパク質の解析を行い、その一つとして HSA を同定した。第2章では、ポリスルフィド機能解明を果たすため、ポリスルフィドの引き抜かれた HSA を作製し、構造変化を測定した。また、酸化ストレスに対する影響を評価し、抗酸化活性との関連について評価した。さらに、慢性腎不全などの患者血清や、急性腎障害モデルマウス血清中のポリスルフィドを測定し、その病態変化について評価した。第4章では、第2章および第3章における知見を踏まえ、ポリスルフィドを付加した HSA を作製し、抗酸化剤としての生物活性を評価した。

以下に本研究で得られた知見を詳述する。

## 第2章 ポリスルフィドの新規定量法の開発と生体液測定への応用

### 第1節 序

現在報告されているポリスルフィドの定量法としては、アルキル化還元法<sup>30,31</sup>、蛍光プローブ法<sup>32,33</sup>、シアン (CN) 法<sup>34</sup>などがある。アルキル化還元法は、SH 及びポリスルフィドをヨードアセトアミド (IAA) や *S*-メチルメタンチオスルホナート (MMTS) などのアルキル化剤で修飾し (step 1)、その後還元処理を行う (step 2) という方法である (Fig. 4)。SH はアルキル化されると還元されないが、SSH はアルキル化されても還元剤により SH に還元される。つまり、ポリスルフィドのみが還元剤による還元を受けるため、step 1 と step 2 の標識量の違いによりポリスルフィドを検出できる。また、最後の課程でビオチンやマレイミドなどで SH を検出することで、SSH が検出される。質量分析と組み合わせることによってタンパク質のどのシステイン残基が SSH になっているかが分かるのが利点である。一方、ジスルフィドにさらに硫黄原子が組み込まれたポリスルフィド、つまり酸化型の状態ではアルキル化できないことから、酸化型ポリスルフィドを定量することはできない。

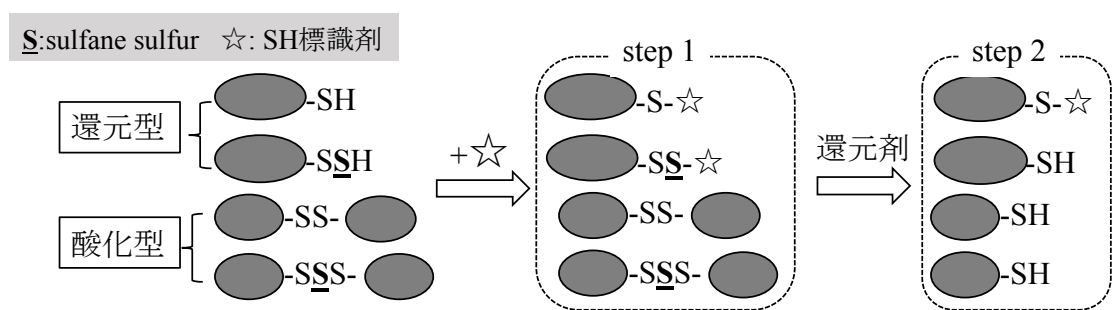


Fig. 4 Alkylation and reduction method for measuring polysulfide.

蛍光プローブ法は、測定が簡便であるため、最も汎用されているポリスルフィドの検出法の一つである。一方、HSAのような血清タンパク質の一部は、薬物結合サイトを有していることから、プローブ自体がタンパク質に結合してしまい、蛍光へ影響を及ぼしてしまうリスクがある。また、立体障害によりタンパク質の内部にはプローブのアクセスが制限されることが懸念され、分子内部に存在するポリスルフィドの定量精度には疑問が残る。

CN 法は、1960 年代に汎用されたポリスルフィドの測定法であり、CN がポリスルフィドにより SCN へ代謝される反応を利用したものである。しかし、SCN 検出の特異性が低いことや、CN の毒性が懸念されることから、現在はあまり使用されていない。

一方、 $\text{H}_2\text{S}$  や  $\text{HS}^-$ 、 $\text{S}^{2-}$  といったスルフィドに関しては、メチレンブルー法<sup>35,36</sup>をはじめ、電極法<sup>37</sup>、ビマン法<sup>38</sup>など、様々な定量法が確立されている。従って、理論的には、ポリスルフィドを安定なスルフィドに還元することができれば、スルフィド測定法を用いてポリスルフィドの定量が可能となるはずである。そこで、本測定方法を Elimination Method of Sulfide from Polysulfide (EMSP 法) と定義し、以下の検討を行った。まず、ポリスルフィドのスルフィドへの還元剤として、Sulfide Anti-oxidant Buffer (SAOB) に着目した。SAOB は、1960 年代に ORION 社から  $\text{H}_2\text{S}$  の酸化を防止する目的で開発された還元剤溶液である<sup>39</sup>。アスコルビン酸や水酸化ナトリウム ( $\text{NaOH}$ )、サリチル酸ナトリウムで構成される簡単な組成であり、現在でも電極法を行う際に汎用されている。しかしながら、血液や血清に SAOB を添加すると、誤検出が疑われるほど多量のスルフィドが検出されることが、2008 年に Whitfield らによって報告されている<sup>40</sup>。この現象に対する詳細な検討は現在まで行われておらず、唯一、2014 年に Olson らによって、 $\text{R-SH}$  がヒドロキシル ( $\text{R-OH}$ ) になる結果、スルフィドが遊離しているのではないかと考察されているのみである (式 3)<sup>41</sup>。



そのため、 $\text{NO}$  や  $\text{H}_2\text{S}$  関連の学会において「SAOB はタンパク質由来のイオウ原子を誤検出するので血清の  $\text{H}_2\text{S}$  測定には不向き」という共通認識として片付けられ、その実体は不明なままであった。この SAOB による「誤検出」は、血清の場合 5 mM 以上にも及び、タンパク質に含まれる  $\text{CysSH}$  の多くが  $\text{CysOH}$  へ変換することを意味しているが、この反応はそれほど効率的に起こるわけではないと考えられる。そこで、SAOB は抗酸化物質であるアスコルビン酸を高濃度に含むことから、SAOB がポリスルフィドをスルフィドに還元しているという仮説を立て、SAOB の組成を EMSP 法として最適化することを試みた。また、還元剤の種類や反応条件を変化させることで、還元型ポリスルフィドと酸化型ポリスルフィドの測り分けを試みた。さらに、確立した手法により、生体液中のポリスルフィドを測定した。

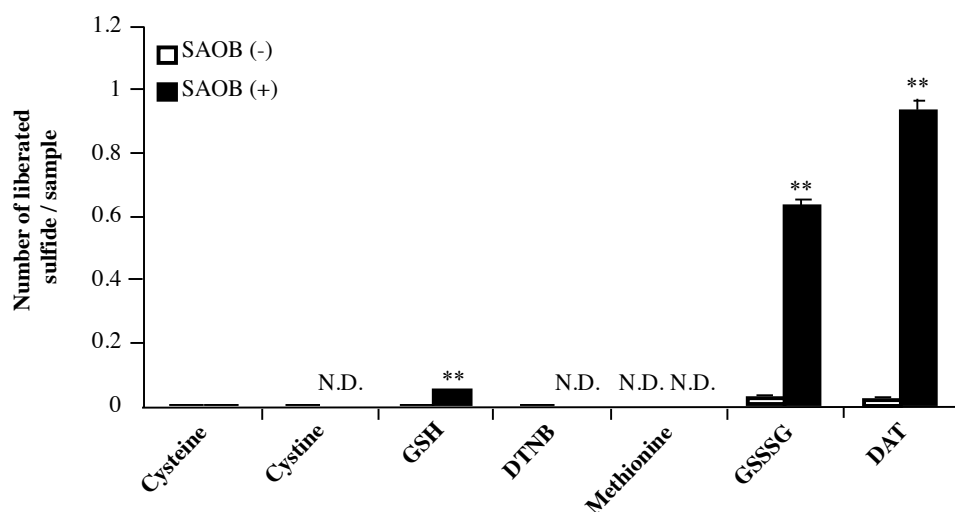
## 第 2 節 還元法によるポリスルフィド定量法の確立

### 2-1 アスコルビン酸と塩基のポリスルフィドの還元能の評価

まず、Olson らの仮説 (式 3) に従い、SAOB が  $\text{SH}$  由来のスルフィドを検出するか否かについて検討を行った。硫黄含有化合物を SAOB で前処理して遊離されるスルフィドをメ

チレンブルー法にて定量した。Whitfield の報告<sup>40</sup>では、SAOB による血清からのスルフィドの遊離は室温条件下 4 時間の検討で実施されていたため、今回もその手順に従った。

その結果、L-システインや GSH など還元型の SH 含有化合物、シスチンや 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic Acid) (DTNB) などのジスルフィド結合含有化合物からは、SAOB の処理の有無に関わらずほとんどスルフィドは検出されなかった。一方で、グルタチオントリスルフィド (GSSSG) やジアリルトリスルフィド (DAT) などのポリスルフィドを有する化合物を SAOB 処理をすると、化合物 1 分子当たりそれぞれ 0.6、0.9 個のスルフィドが検出された。従って、SAOB はポリスルフィド由来の硫黄原子をスルフィドに還元できる可能性が示された。なお、L-システイン以外の含硫アミノ酸である L-メチオニン (Met) の場合、SAOB を用いてもスルフィドは検出されなかった (Fig. 5)。したがって、SAOB は式 3 の反応のように SH を OH 基へと変換するのではなく、ポリスルフィドをスルフィドに還元することが示唆された。



**Fig. 5 Detection of sulfide released from polysulfide of low molecular weight sulfur compounds after sulfide anti-oxidant buffer (SAOB) treatment.**

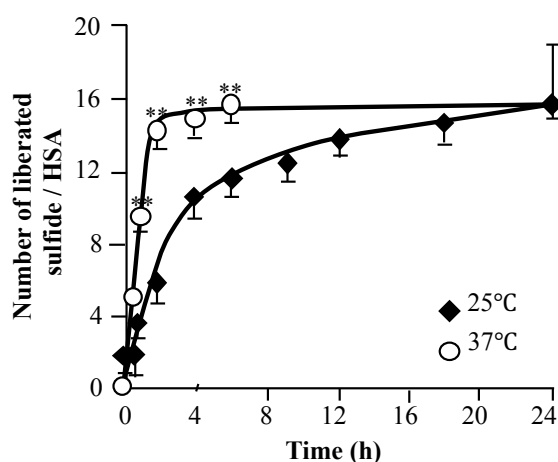
Methylene blue assay with SAOB was performed to low molecular thiol compounds, GSH; Glutathione, DTNB; Ellman's reagent, GSSSG; Glutathione trisulfide, DAT; Diallyl trisulfide. These compounds (400  $\mu$ M) were reacted with or without SAOB for 4 hr at 25°C. N.D., not detected.

\*\* $p < 0.01$  vs. SAOB (-).  $n = 3$ .

## 2-2 アスコルビン酸と塩基によるポリスルフィドの還元剤の最適化

前述の通り SAOB は  $\text{H}_2\text{S}$  の酸化防止剤として開発されたものであるため、ポリスルフィド還元剤への応用にはその組成や反応条件の最適化が求められる。この検討を行うには、ポリスルフィドの指標が必要となるが、EMSP 法の目的は緒言で述べたように血清などの細胞外のタンパク質に含まれるポリスルフィドの定量である。そこで、以下の検討では、まず HSA がポリスルフィド含有タンパク質であると仮定し、HSA から最もスルフィドが遊離するよう、SAOB の組成や反応条件の検討を行った。その後、最適化した条件下において、HSA からスルフィドが遊離することを確認した。

まず、SAOB を用いて反応温度および反応時間の最適化を試みた。その結果、 $25^\circ\text{C}$  よりも  $37^\circ\text{C}$  で反応させた方が高効率にスルフィドを遊離させた。また、 $37^\circ\text{C}$  で反応させた場合、スルフィドの産生は 6 時間でプラトーに達することが示された (Fig. 6)。

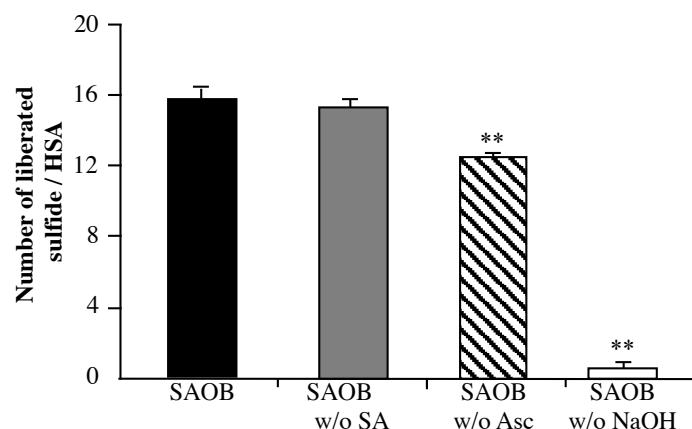


**Fig. 6 The time course of formation of sulfide by reaction of HSA with SAOB.**

Liberated sulfide concentration of the HSA sample reacted with SAOB for each time was measured by methylene blue assay. \*\* $p < 0.01$  vs.  $25^\circ\text{C}$  ( $n=3$ ).

次に、組成の最適化を企図し、SAOB の構成成分であるアスコルビン酸、NaOH、サリチル酸ナトリウムをそれぞれ 1 要素ずつ取り除き、ポリスルフィドの還元に寄与する因子の同定を試みた。その結果、SAOB の処理により、HSA 1 分子あたり約 15 個のスルフィドが検出された。また、NaOH 及びアスコルビン酸を取り除いた群では、検出されるスルフィドの数が有意に減少した。これらの知見から、NaOH 及びアスコルビン酸がポリスルフィドをスルフィドとして検出するのに必要な因子であることが示唆された (Fig. 7)。

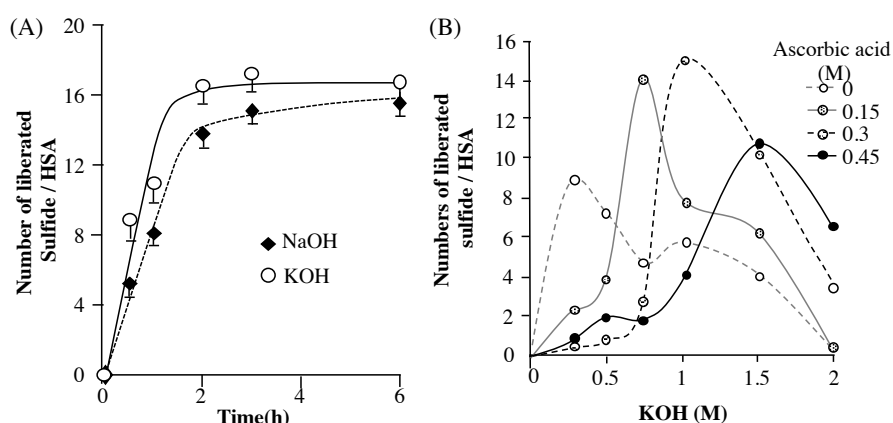




**Fig. 7 Effect of component of SAOB on the formation of sulfide from HSA reacted with SAOB.**

‘SAOB w/o Asc’ or ‘SAOB w/o SA’ or ‘SAOB w/o NaOH’ indicates a solution removing ascorbic acid or sodium salicylate from SAOB, respectively. \*\* $p < 0.01$  vs. SAOB.  $n=3$ .

ここで、ポリスルフィドの還元剤としては、塩基である NaOH が重要な因子であったため、次に塩基の最適化を試みるべく、NaOH 及び水酸化カリウム (KOH) を比較した。その結果、NaOH よりも KOH を用いた方が迅速にスルフィドを遊離させることが判明した (Fig. 8A)。またその時の至適反応条件は 37°C, 4 時間であることが示された。そこでさらに、KOH 及びアスコルビン酸の濃度を最適化すべく、KOH とアスコルビン酸を様々な濃度に設定し、遊離されるスルフィドを定量した。その結果、0.3 M アスコルビン酸及び 1 M KOH の条件が最も効率よくスルフィドを遊離した (Fig. 8B)。



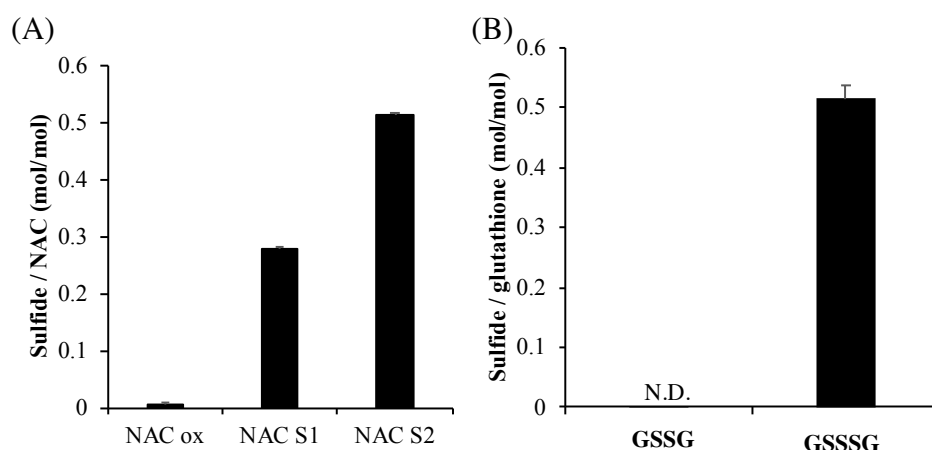
**Fig. 8 Evaluation of the effect of each component of SAOB on the concentration of sulfide released from polysulfide of HSA.**

(A) The time course of sulfide formation by HSA reaction with sodium salicylate, and L-ascorbic

acid in the presence of NaOH or KOH. n=4. (B) The sulfide formation by HSA reaction with various concentrations of KOH (0-2 M) and L-ascorbic acid (0-0.45 M). The sulfide derived was detected by using methylene blue assay.

### 2-3 ポリスルフィド測定の確認試験

以上、HSA からスルフィドを遊離するのに最適な条件は、0.3 M アスコルビン酸、1 M KOH 中で 37°C にて 4 時間反応することであることが判明した。そこで、この条件でグルタチオンジスルフィド (GSSG) およびグルタチオントリスルフィド (GSSSG) を反応させた時の、遊離スルフィド量について評価した。その結果、GSSG からスルフィドは全く遊離しなかったのに対し、GSSSG からは 1 分子あたり約 0.5 個のスルフィドが遊離した (Fig. 9A)。また、酸化型 N-acetyl cysteine (NAC) のポリスルフィド化体におけるスルフィドの遊離効率についても評価した。その結果、通常の酸化型 NAC (NACox) からはスルフィドはほとんど遊離しなかったのに対し、NAC のジスルフィド結合の間に sulfane sulfur が 1 つ入ったもの (NACS1) および 2 つ入ったもの (NACS2) からは、それぞれスルフィドが遊離した (Fig. 9B)。NACS2 から遊離したスルフィドは NACS1 から遊離した量の約 2 倍であった。従って、本法におけるスルフィドの遊離はポリスルフィドに由来すること、sulfane sulfur の数に応じて観察されることが示された。以降、0.3 M アスコルビン酸および 1 M KOH を 37°C、4 時間で反応させ、遊離するスルフィドをメチレンブルー法にて定量する方法を EMSP と呼称する。

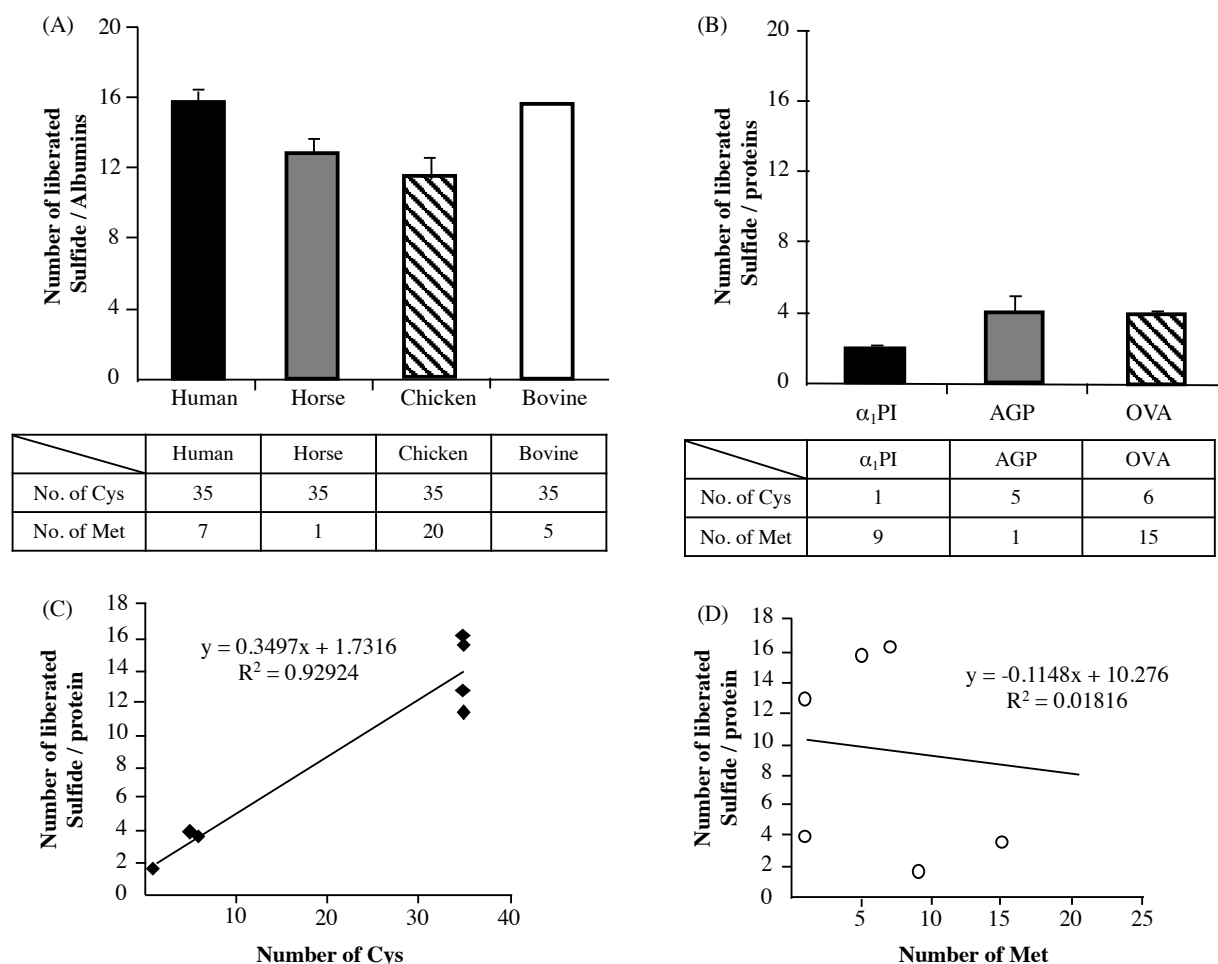


**Fig. 9 Detection of sulfide from polysulfides.** Numbers of liberated sulfide from NAC species (A) and glutathione species (B) by the treatment of 0.3 M ascorbic acid and 1 M KOH were measured by methylene blue assay.

次に、HSA においても EMSP によって得られるスルフィドがポリスルフィドに由来するか否かについて評価した。

まず、EMSP で検出されるスルフィドに対するシステインの関与について評価した。含硫アミノ酸は、システインだけでなくメチオニン (Met) も存在する。HSA には 1 分子あたり 7 個の Met が含まれる。Fig. 5 にてアミノ酸としての Met からはスルフィドは遊離されないことが分かったが、タンパク質中の Met 残基においても同様であるか否かについて検討する必要がある。アルブミンは哺乳類及び鳥類でシステインの数は保存されている一方、Met の数は個々の種で異なっている。そこで、Met が 1 つであるウマアルブミンや Met を 20 個有するニワトリアルブミンなど、Met の数の異なる HSA を用いて EMSP 法を行ったところ、どのアルブミンからも 11-16 のスルフィドが検出され、Met の数に対する依存性は見られなかった (Fig. 10A)。

また、アルブミン以外のタンパク質に対しても EMSP 法を行ったところシステインを 1 つ、Met を 9 つ有する $\alpha_1$ アンチトリプシン ( $\alpha_1$ PI) やシステインを 5 つ、Met を 1 つ有する $\alpha_1$ -酸性糖タンパク、に加えてオボアルブミンからも遊離したスルフィドが観察された (Fig. 10B)。興味深いことに、これらアルブミンやタンパク質に含まれる含硫アミノ酸数を横軸に、EMSP 法によって検出されたスルフィドを縦軸に取りプロットしたところ、CysSH 残基数には高い相関性を示した一方で (Fig. 10C)、Met 残基数にはまったく依存しなかった (Fig. 10D)。

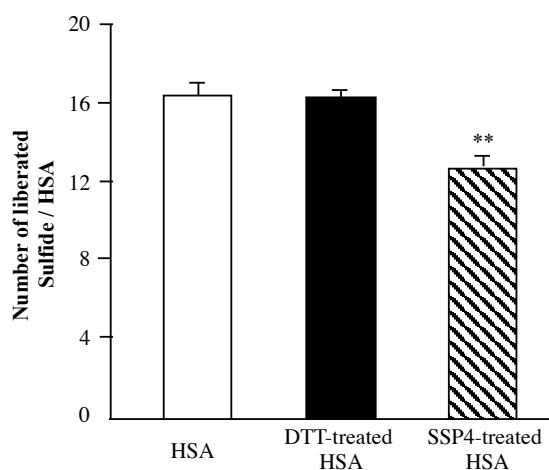


**Fig. 10 Detection of sulfide released from polysulfide of different species of albumins and other proteins by after EMSP treatment and the relationship between liberated sulfide and number of Cys or Met residues.**

Sulfide released from polysulfide of (A) four albumin species and (B) other proteins were measured with methylene blue assay after EMSP treatment. Polysulfide of  $\alpha_1$ -anti-trypsin ( $\alpha_1$ PI),  $\alpha_1$ -acid glycoprotein (AGP) and ovalbumin (OVA) were measured with methylene blue assay after EMSP treatment. The relationship between polysulfide and number of (C) Cys or (D) Met residues were analyzed using the data of polysulfide of albumin species and other proteins. Data were presented as means  $\pm$  S.D.

以上に示したように、得られた反応条件にて EMSP を行くと、HSA1 分子あたり約 16 個もの遊離したスルフィドが検出される。一方、DTT を 4°C で 1 時間処理すると、還元型ポリスルフィド由来のスルフィドが遊離されることが報告されている。そこで、EMSP 法で検出されるスルフィドが還元型ポリスルフィド由来であるか否か検討するために、1 mM

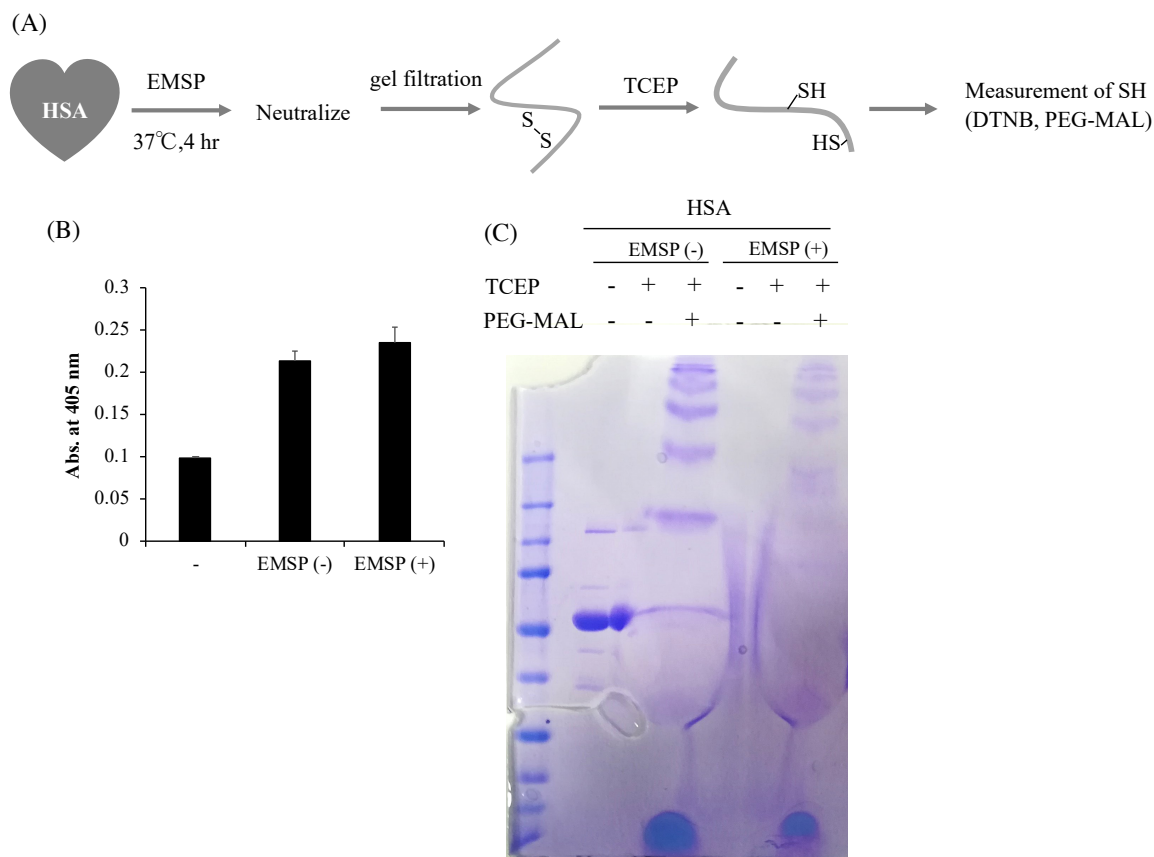
の DTT を HSA に 4°C で 1 時間前処理したのち、遊離されたスルフィドをゲル濾過にて除去し、EMSP を行った。その結果、DTT を処理したにも関わらず EMSP により検出されるポリスルフィドは変化しなかった (Fig. 11)。一方、酸化型ポリスルフィドを引き抜くことによって蛍光を示すプローブである Sulfane Sulfur Probe-4 (SSP4) を前処理すると、EMSP 法によって遊離するスルフィドが有意に減少した (Fig. 11)。よって、EMSP 法で検出されるスルフィドは酸化型ポリスルフィドであることが示唆された。



**Fig. 11 Identification of the source of sulfide from HSA after EMSP treatment.**

Amount of sulfide released from 1 mol of HSA, DTT-treated HSA or SSP4-treated by EMSP treatment. \*\* $p < 0.01$  vs. HSA ( $n=3$ ) Data were presented as means  $\pm$  S.D. ( $n=3$ ).

また、冒頭で紹介した通り、アスコルビン酸と NaOH によって遊離するスルフィドは SH 由来ではないかという見解もある。この点を明らかにすべく、EMSP 前後で HSA の SH 量が増加するか否かを評価した。具体的には、還元剤と反応させた HSA をゲル濾過し、SH 基を含まない還元剤である tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) で処理した後、ゲル濾過によって TCEP を除去して SH 量を測定した (Fig. 12A)。その結果、SH 量は EMSP 処理の有無によって変化しなかった (Fig. 12B)。また、TCEP 処理後の HSA にポリエチレングリコール (PEG) 修飾マレイミド (PEG-MAL) を反応させ、SDS-PAGE で分離することによっても SH 基の存在を確認した。EMSP 処理により HSA のバンドが一部ラダーになるものの、PEG-MAL の結合による分子量のシフトアップは EMSP 処理前後で変化しなかった (Fig. 12C)。したがって、(式 3) のように SH が OH となることでスルフィドが遊離する、という反応は今回の EMSP では生じないことが示された。



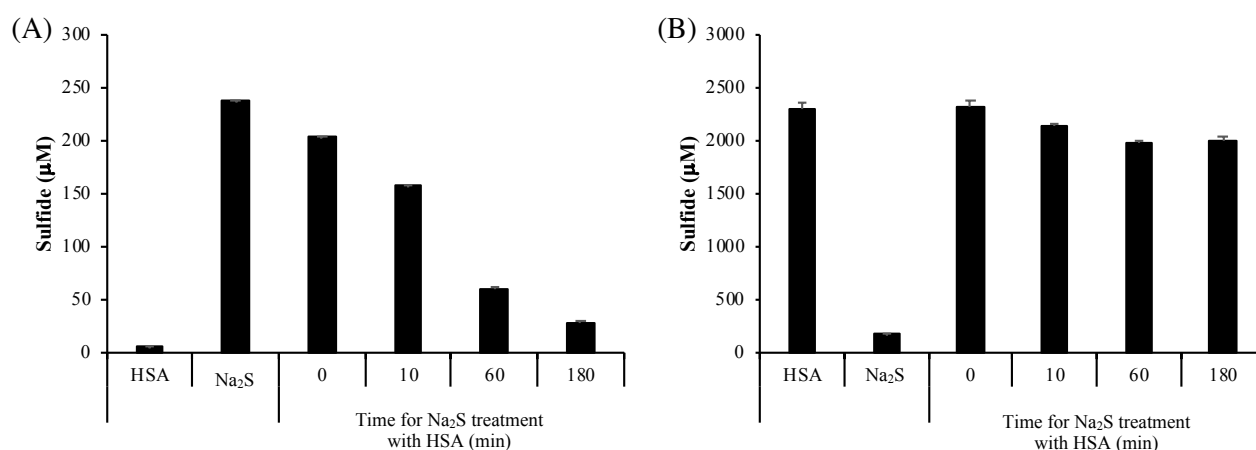
**Fig. 12 Thiol contents of HSA after the incubation with or without EMSP.**

(A) HSA and EMSP-treated HSA were incubated with tris(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) to reduce all disulfide bonds. (B) The thiols of HSA were quantified by DTNB assay. (C) The thiols of HSA were modified by PEG-maleimide. N.S., not significant.

EMSP 法によって、HSA は 1 分子あたり 16 分子以上のスルフィドが遊離してくることから、それらがシステイン依存的に組み込まれている可能性を見出した。HSA は 35 個のシステインを有しているが、そのうち遊離型のシステインは 1 つであり、残りの 34 個は酸化型として 17 対のジスルフィド結合を形成している。仮に、イオウ原子が全て遊離型のシステイン (Cys34) に組み込まれているとすると、16 個のイオウ原子が 1 つのシステイン残基に配位することになるが、イオウ原子は 8 つ連なると環状の硫黄  $S_8$  を形成し沈殿してしまうため、実際にはそのような形では存在していないと考えられる。従って、HSA に存在する 16 個のポリスルフィドの一部は酸化型 SSH (RSSSR')としてジスルフィド結合の中に組み込まれていることが予想される。

EMSP 法が酸化型ポリスルフィドを検出しているという仮説を証明するため、以下の評価を行った。HSA に  $Na_2S$  を添加すると、還元型ポリスルフィドが生じることが知られて

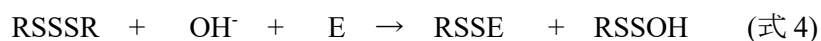
いる<sup>14</sup>。実際に HSA に当量の Na<sub>2</sub>S を加えて 37°C で反応したところ、メチレンブルーで定量されるスルフィドは検出されなくなった (Fig. 13A)。つまり、Na<sub>2</sub>S 由来のスルフィドが HSA へ還元型ポリスルフィドとして結合したと考えられる。このとき、同試料を EMSP 処理し、スルフィドの量をメチレンブルー法にて定量した。その結果、Na<sub>2</sub>S の反応の有無にかかわらず、EMSP で検出されるスルフィドは変化しなかった (Fig. 13B)。したがって、EMSP 処理によって還元型ポリスルフィドはスルフィドを遊離しないことが示された。



**Fig. 13 The levels of sulfide after the co-incubation of Na<sub>2</sub>S with HSA.**

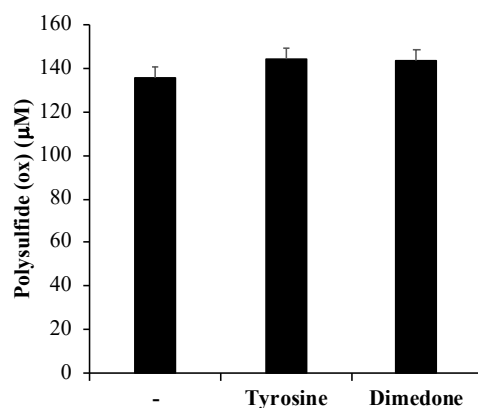
(A) Free sulfide in samples was measured by methylene blue. (B) Sulfide liberated from samples by EMSP was measured using methylene blue. Data were presented as means ± SD.

次に、加水分解の可能性について検討した。ポリスルフィドは、アルカリ環境下において、以下のように加水分解されることが知られている (式 4)<sup>42</sup>。したがって、EMSP のようなアルカリ環境下では、ポリスルフィドが加水分解されることで偽陰性となることが懸念される。



一方、チロシンのようなヒドロキシフェニル基化合物が存在すると、この加水分解が抑制されることが報告されている<sup>42</sup>。反対に、ジメドンは加水分解を促進する化合物である<sup>42, 43</sup>。加水分解によって偽陰性が生じるとすると、チロシンによりスルフィドの遊離効率は増加し、ジメドンによって減少することが予想される。そこで、チロシンあるいはジメドン存在下において、EMSP により遊離するスルフィドが増加するか否かを評価した。その結果、HSA から遊離するスルフィドは、チロシンやジメドンの存在下で変化しなかった

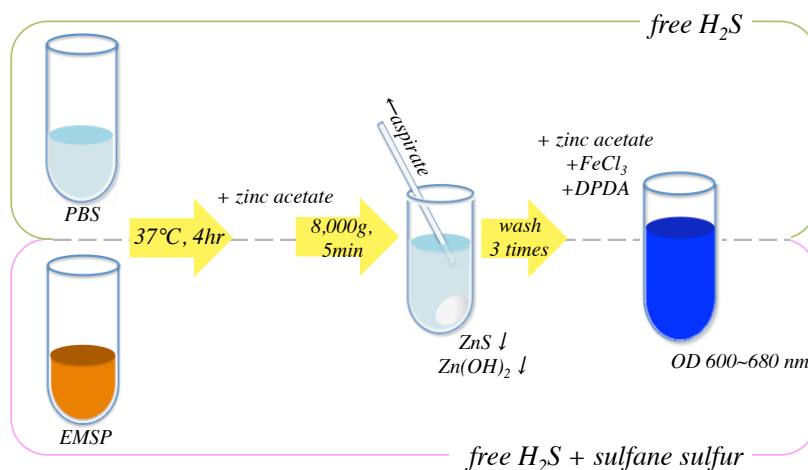
(Fig. 14)。したがって、EMSP 環境下では (式 4) のようなポリスルフィドの加水分解は生じないことが示唆された。何らかの形でアスコルビン酸が加水分解を防止している可能性が考えられる。



**Fig. 14 Effect of tyrosine and dimedone for efficacy of EMSP.**

Polysulfide of HSA (10 μM) was measured by EMSP in presence of tyrosine (1 mM) or dimedone (1 mM). Data were presented as means ± SD.

以上のことから、EMSP 法はタンパク質に存在する酸化型ポリスルフィドを定量できることが示された。Fig. 15 に本研究で確立した EMSP 法の測定手順を示す。



**Fig. 15 Scheme of EMSP.**

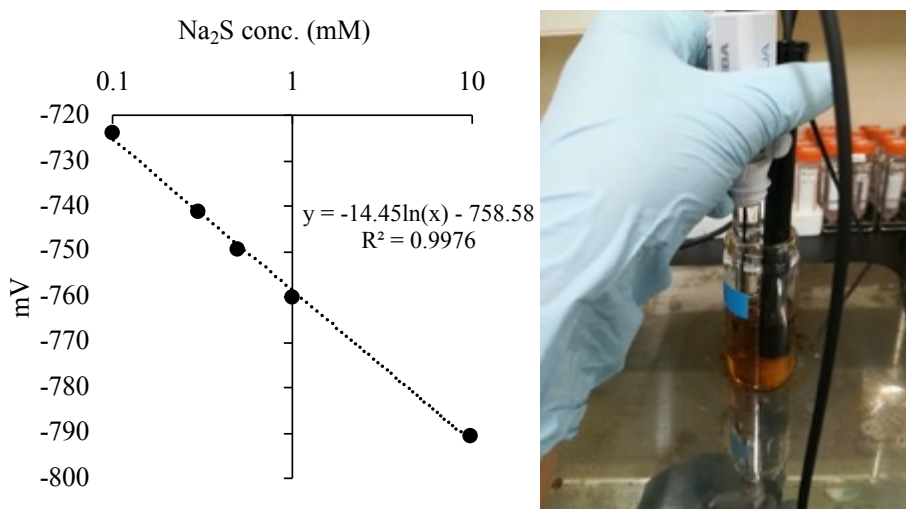
## 2-4 電極法を用いたスルフィドの測定の応用

EMSP 法は①酸化型ポリスルフィドからの硫化物イオンの遊離及び②硫化水素イオン濃度の測定の 2 つのステップにより構成される。現在②の硫化物イオンの測定には、メチレ



ンブルー法を使用している。しかし、①のステップで用いる還元剤がメチレンブルー法の反応を一部阻害することから、測定には未反応な還元剤の除去ステップが必要となり、操作が煩雑である。そこで、硫化物イオン濃度をメチレンブルー法でなく、イオン電極法で行うことにより、①の反応溶液をそのままの状態で定量できると考えた。

イオン電極によるスルフィドの測定を導入した結果、イオン電極を用いることで、EMSP 反応によって生じた硫化水素イオンを簡便かつ迅速に測定できることを見出した。実際に HSA 中のポリスルフィドを測定すると、メチレンブルー法と比較して 4% 以内の誤差で測定することができた。これにより、従来のメチレンブルー法で 1.5 時間掛かっていた操作を 10 分程度にまで短縮することに成功した。一方で、イオン電極法による硫化水素イオンの測定は誤差が大きく、これを抑制するためにスターラーによる常時攪拌が必要であったことから、イオン電極法による測定には血清量が 0.5 mL 以上必要と、従来のメチレンブルー法と比較して 50 倍多い量であることが問題点として挙げられる。これは、実臨床において困難な量ではないが、マウスを用いた *in vivo* 実験などの血清量としては多いため、以後の検討ではメチレンブルー法にてスルフィドを定量することとした。



**Fig. 16 Measurement of sulfide in EMSP by Ion Selective Electrode (ISE)**

(A) Standard curve of sodium sulfide measured by ISE. (B) Measuring sulfide by ISE with string.

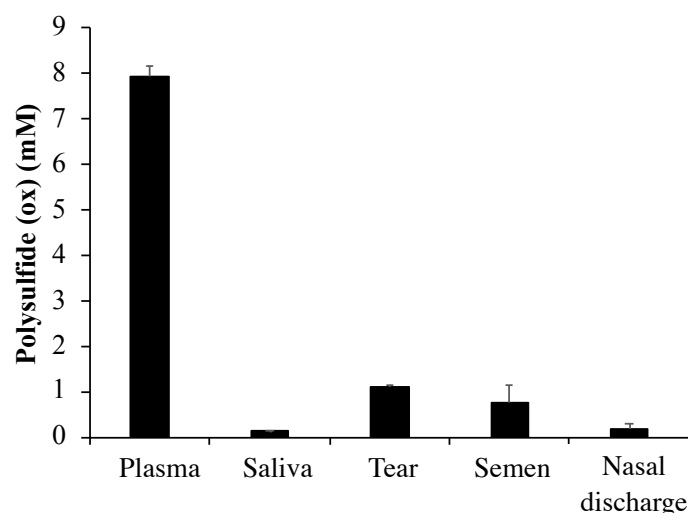
Fig. 5 で示したように、SAOB は L-システインなどの SH 含有化合物からはスルフィドを遊離しなかった。さらに、SAOB は HSA と反応するとスルフィドを遊離したが、HSA の SH の数を変動させなかった。加えて、ポリスルフィド含有化合物からのみスルフィドが遊離されたことを考慮し、SAOB に関して以下の反応（式 5）を推定した。



今回の検討により、アスコルビン酸及び塩基を用いてポリスルフィドをスルフィドに還元する還元剤を構築することができ、これを用いてポリスルフィドの新規定量法を確立することができた。この EMSP 法は、既存のポリスルフィド定量法に比べて、簡便かつ定量性に優れている上、メチレンブルーの反応過程で 96 well deep plate を活用することでハイスループットな定量系を可能とする利点を有している。

### 第3節 ヒト生体試料中に存在するポリスルフィドの定量

2-1 にて確立した EMSP 法にて、HSA や AGP などの血清タンパク質にポリスルフィドが存在することが判明した。HSA は血清に最も多く存在するタンパク質であり、その濃度は健常時に約 40 mg/mL (約 600  $\mu\text{M}$ ) である。1 分子あたり 16 個のポリスルフィドが存在すると仮定すると、血中ポリスルフィドは約 10 mM に達する。そこで、血清や他の生体試料として血清や涙液、唾液、鼻汁、精液のポリスルフィドを EMSP 法によって定量を試みた。それぞれのポリスルフィド濃度は、血清が約 7.5 mM、涙液が約 1 mM、唾液が約 41  $\mu\text{M}$ 、鼻汁 約 400  $\mu\text{M}$ 、精液約 600  $\mu\text{M}$  であった (Fig. 17)。なお、測定対象の健常人は 9 名中 5 名が男性であり、そのうち 4 名の精液を回収した。平均年齢は 28.44 歳で、BMI の平均は 20.85 であった (Table 1)。



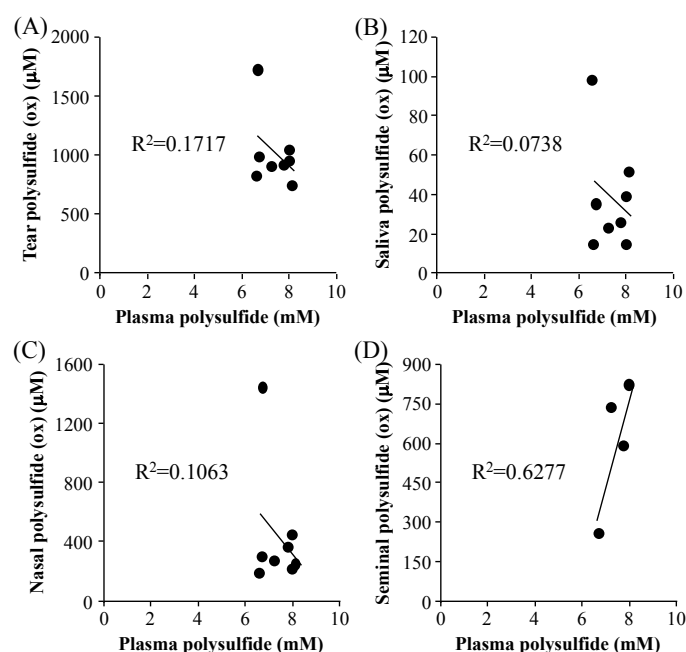
**Fig. 17 Sulfide concentrations of biological fluids from human subjects.**

Sulfide levels of plasma, saliva, tear, semen and nasal discharge from healthy human subjects (n=4-9) were treated with EMSP. Data were presented as means  $\pm$  S.D.

**Table 1 Characteristics of healthy human volunteers for analysis according to age, BMI, sex and results of polysulfide level.**

n (male)	9 (5)
Age (years)	28.44 ± 7.62
BMI	20.85 ± 2.86
<b>Polysulfides (μM)</b>	
Plasma	7469.4 ± 656.68
Tear	953.55 ± 244.98
Saliva	40.854 ± 27.348
Nasal discharge	397.61 ± 399.84
Semen	594.68 ± 244.98

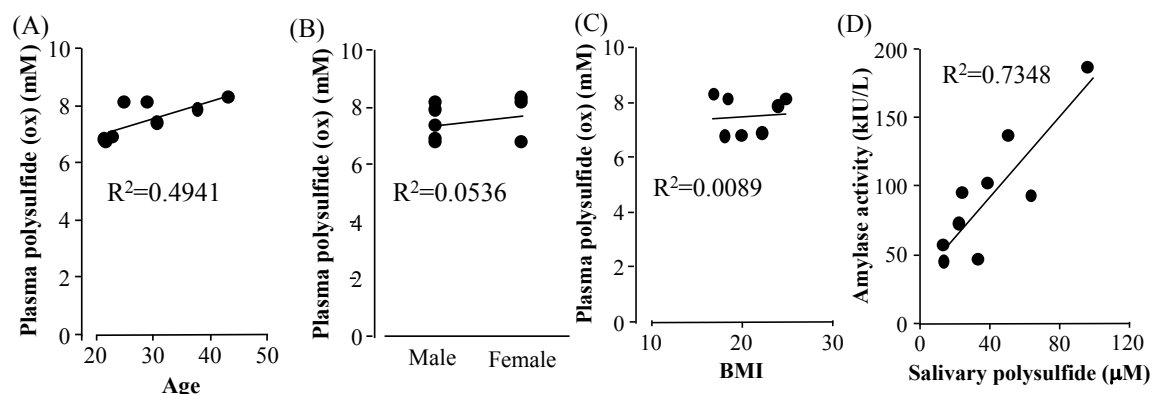
涙液や精液などの生体液は、血清と共通するタンパク質を有していることから、同一個体において各生体液ポリスルフィド濃度が相関する可能性が考えられる。そこで次に、健康人の血清や唾液、涙液に加え、精液および鼻汁に含まれるポリスルフィドを同一個体より採取することにより、それぞれの生体液中ポリスルフィド濃度の相関関係を評価した。まず、血清ポリスルフィド濃度とその他の各生体液の相関関係について調査した。その結果、涙液や唾液、鼻汁とは血清との相関関係は見られなかった (Fig. 18A-C)。一方、精液については、n 数が限られているものの、正の相関関係を示した (Fig. 18D)。



**Fig. 18 Correlation between the plasma polysulfide level and that of a biological fluid.**

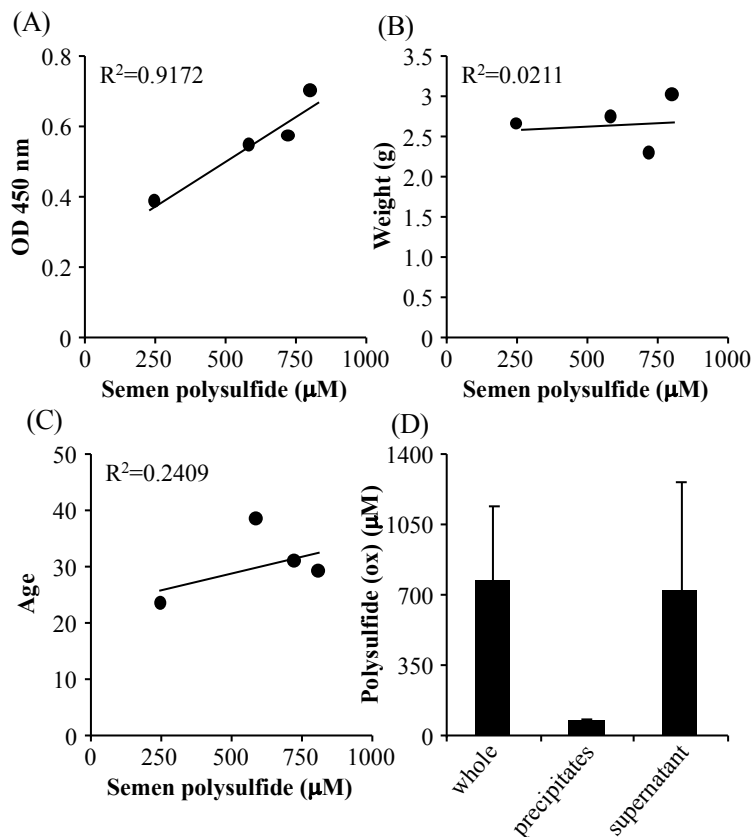
Each polysulfide level was measured by EMSP. (A) tear polysulfide, (B) saliva polysulfide, (C) polysulfide in nasal discharge and (D) seminal polysulfide.

次に、血清ポリスルフィド濃度と年齢、性差、BMI を比較調査した。その結果、測定した範囲内 (22-43 歳) では年齢が高いほど血清ポリスルフィドも高いことが示された (Fig. 19A)。一方、性差や BMI との関連は認められなかった (Fig. 19BC)。唾液については、アミラーゼ活性との相関関係を調査した。その結果、唾液中のポリスルフィド濃度が高いほど、アミラーゼ活性も高いことが示された (Fig. 19D)。



**Fig. 19 Comparison of the plasma polysulfide level to biological parameters, (A) age, (B) sex and (C) BMI. (D) Investigation of interrelation between salivary polysulfide and amylase activity.** Calculated polysulfide level was analyzed by EMSP. Amylase activity was measured by amylase monitor.

精液中のポリスルフィド濃度は、WST-8 で測定された生存精子量と高い正の相関関係を示した (Fig. 20A)。一方、射精量や年齢とは相関しなかった (Fig. 20BC)。遠心分離したところ、ポリスルフィドの多くは遠心上清、つまり精嚢腺分泌液中に含まれることが示されたが、一部のポリスルフィドは遠心後の沈殿、即ち精子画分にも含まれていた (Fig. 20D)。



**Fig. 20 Comparing seminal polysulfide with related factors.** Polysulfide level in seminal fluids was investigated for its correlation with (A) sperm activity was measured by WST-8, (B) weight of total semen, (C) age. (D) Semen was separated by differential centrifugation at 2000× g for 5 min. The precipitate was washed with PBS for 10 times and redissolved to the initial volume by PBS. Polysulfide level was measured by EMSP.

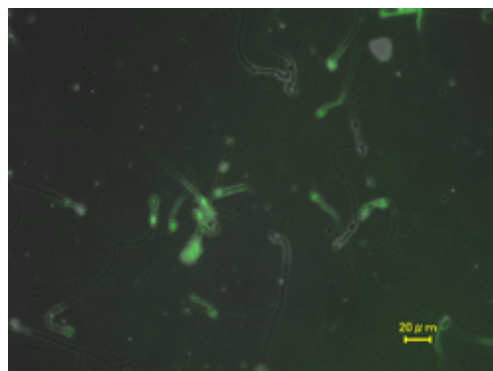
#### 第4節 マウスにおける精子活性とポリスルフィドの関連

##### 4-1 精子におけるポリスルフィドの検出

第2節のヒトの生体液を用いた試験にて、精液のポリスルフィド量と精子の運動の相関関係が示された。そこで、このことについてさらに詳細に解析すべく、マウスを用いた評価を行った。

まず、精子中のポリスルフィドについてポリスルフィドの蛍光プローブである SSP4 を用いて評価した。実験上、マウスの精液を回収するのは困難であるため、精巣上体尾部から直接成熟精子を回収した。室温で 10 分間反応後、蛍光顕微鏡にて評価した。その結果、

精子の頭部および軸索部にて、蛍光が観察された (Fig. 21)。

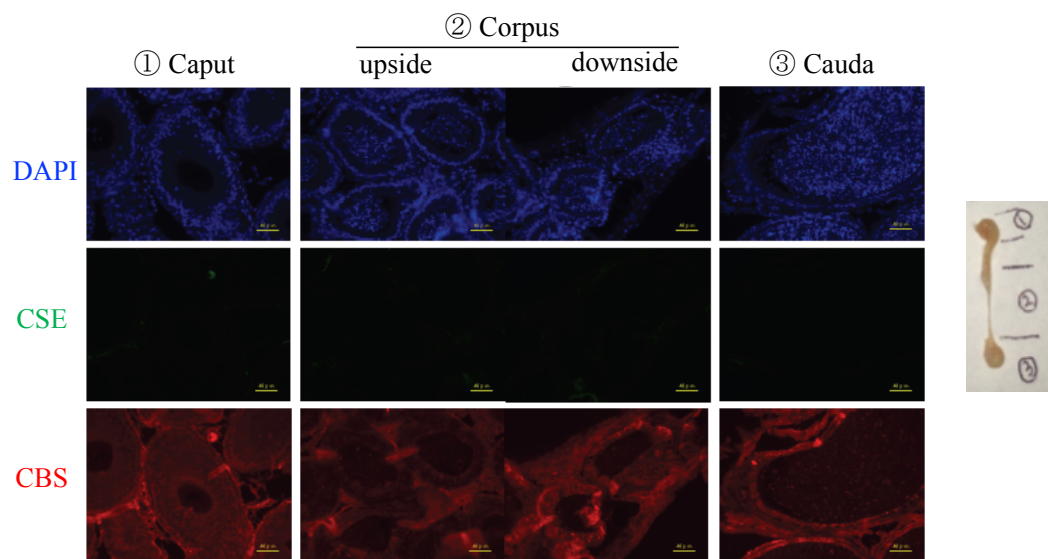


**Fig. 21 Detection of polysulfide in mice sperms using by SSP4.**

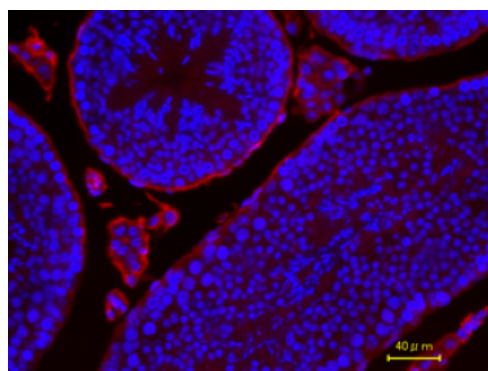
SSP4 (5  $\mu$ M) was treated to mice sperms and incubated 10 min at a room temperature. A fluorescence probe was observed by a fluorescence microscope.

#### 4-2 精子ポリスルフィド合成酵素の発現評価

次に、精子中ポリスルフィドの産生源について評価すべく、精子の合成および貯蔵の場である精巣上体および精巣における  $H_2S$  合成酵素の発現について評価した。緒言で述べたように、 $H_2S$  合成酵素である CSE および CSE は、CARS2 の基質である CysSH の量を増加させることにより、細胞内のポリスルフィド合成を促進する。そこで、精子の成熟が精巣上体の頭部から尾部にかけて進行することから、精巣上体全体および精巣における CSE および CBS の発現を評価した。その結果、精巣上体および精巣において広く CBS の発現を確認することができた (Fig. 22,23)。CBS の発現は間細胞 (ライデッヒ細胞) に認められ、精巣上体頭部および精巣組織では曲精細管内の細胞にも一部発現が見られた。その一方で、CSE の発現については、本検討では認められなかった。



**Fig. 22 Epididymis sections from C57BL6 mice were double stained with anti-CSE and anti-CBS antibodies.**

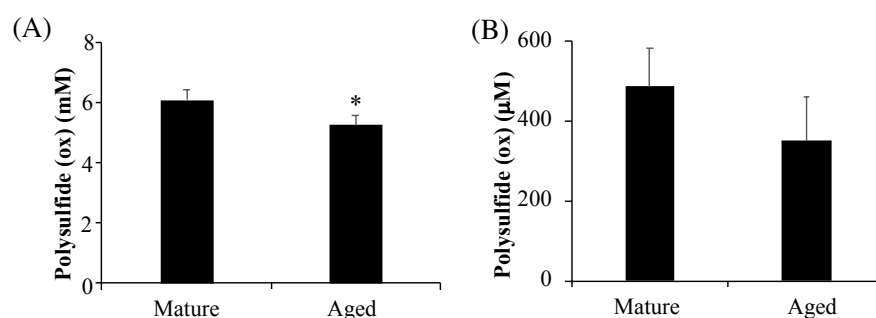


**Fig. 23 Testis sections from C57BL6 mice was immunostained with an anti-CBS antibody.**

#### 4-3 加齢性不妊モデルマウスを用いた評価

次に、不妊によるポリスルフィドの影響を評価するため、不妊モデルとして加齢マウスを評価した。C57BL6 雄マウスを週に 1 度 10 週齢の雌マウスと交配させ、交配することを確認したのちに雌マウスが妊娠する割合を評価したところ、100 週齢以降に受精率の低下が観察された。そこで、110-120 週齢のマウスを不妊の加齢マウスとし、血清や精子中のポリスルフィド量について EMSP にて評価した。その結果、10 週齢の若齢マウスと比較して、加齢マウスの血清中ポリスルフィド濃度が有意に低下していた (Fig. 24A)。更に、25,000 sperm/ $\mu$ L となるように培地で希釈した溶液中のポリスルフィド濃度も、加齢により低下する傾向が得られた (Fig. 24B)。また、酸化ストレスは精子の運動率を減少させ、不妊の原

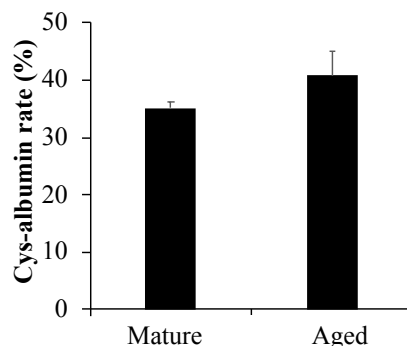
因となることが知られている<sup>44</sup>。そこで、酸化ストレスの指標として、血中アルブミンのシステイン付加率を ESI-TOF/MS にて測定したところ、システイン付加率は加齢により上昇する傾向が得られた (Fig. 25)。したがって、本加齢マウスの酸化ストレスが亢進していることが示された。



**Fig. 24 Quantitation of polysulfide in serum and sperm.**

Polysulfide was measured using by EMSP in (A) serum and (B) sperm. \* $p < 0.05$  vs. Mature (n=3)

Data were presented as means  $\pm$  S.D. n=3.



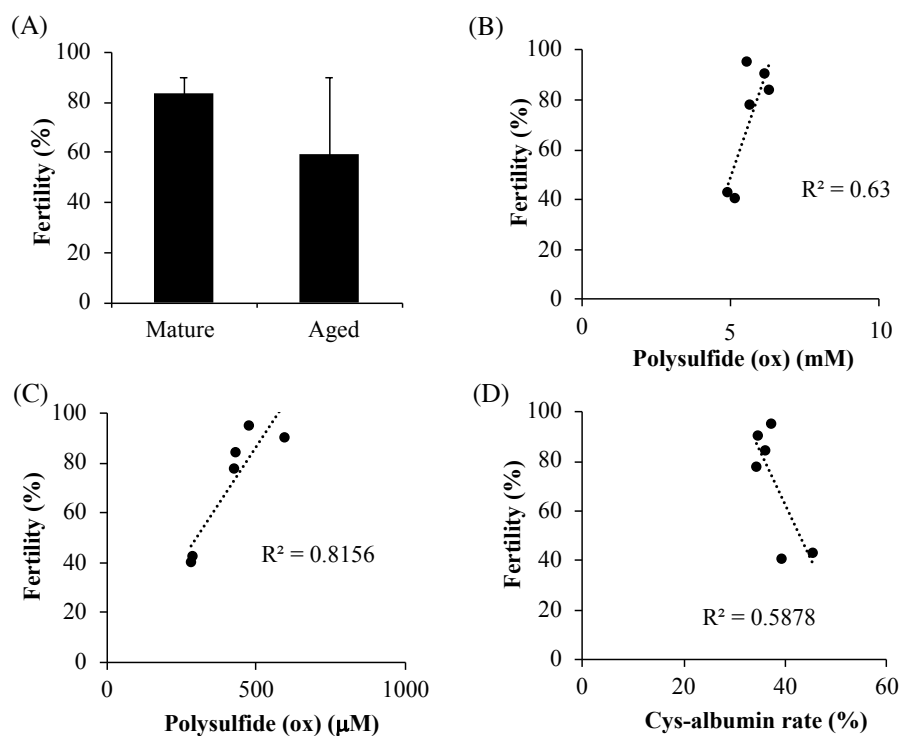
**Fig. 25 Cys-albumin ratio measured by ESI-TOF/MS.**

Ratio of cysteine modified mouse serum albumin was analyzed by ESI-TOF/MS. Data were presented as means  $\pm$  S.D. n=3.

次に、精巢上体尾部より回収した精子の一部を雌マウスより採取した卵子と培養し、分裂が観察された卵子を受精卵としてカウントした。受精卵を形成した割合を評価したところ、自然交配の時と同様に体外受精においても加齢マウスの受精率は低下する傾向にあった (Fig. 26A)。そこで、Fig. 24 にて得られた血清ポリスルフィド濃度および精子中ポリスルフィドと受精率の相関関係を評価したところ、血清ポリスルフィドおよび精子中ポリスルフィド



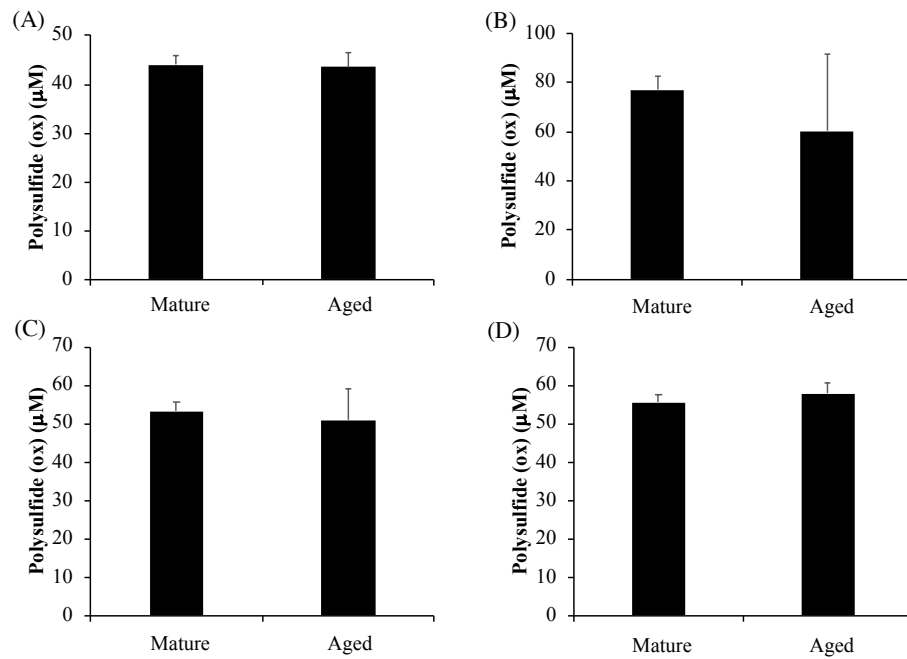
イドは、それぞれ受精率と高い正の相関関係を示した (Fig. 26BC)。また、血清アルブミンのシステイン付加率も受精率に対して負の相関関係を示した (Fig. 26D)。



**Fig. 26 Corerationship between ferility and sulfur parameters.**

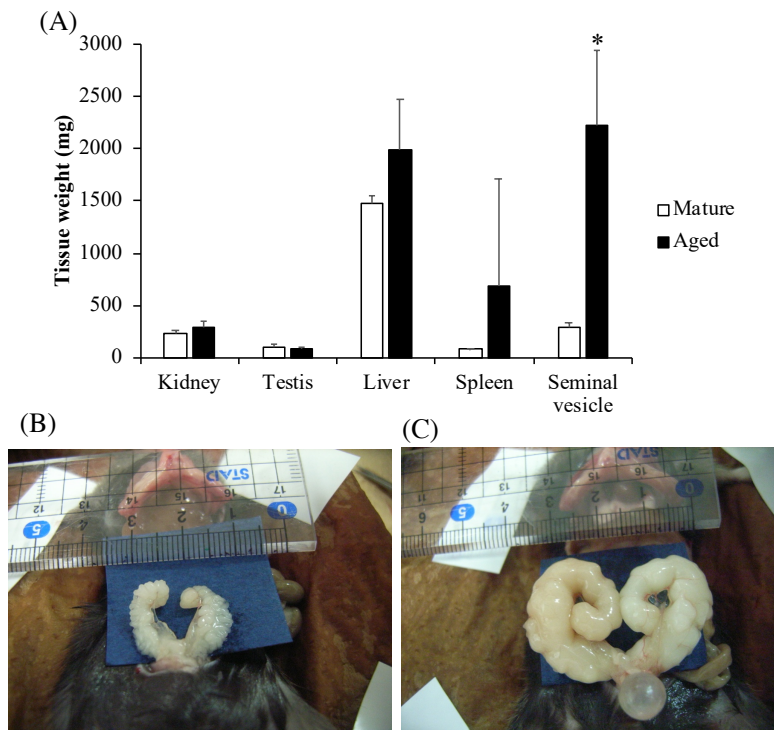
Sperms were corrected and incubated with ovums. (A) Fertilities were counted after the incubation. Corerationship between feriltities and sulfane sulfur in (B) serum, (C) sperm and (D) cys-albumin ratio. Data were presented as means  $\pm$  S.D. n=3.

次に、加齢マウスの臓器中ポリスルフィド濃度を成熟マウスと比較した。精巣および精嚢腺、肝臓、腎臓のホモジネートを EMSP にて測定したところ、精嚢腺ポリスルフィドが加齢により減少する傾向が得られたものの、その他の臓器においては特に変化しなかった (Fig. 27)。興味深いことに、加齢マウスの精嚢腺は3匹中全てが肥大化しており、臓器重量は7倍以上大きくなっていた (Fig. 28)。



**Fig. 27 Measurement of polysulfide in tissues.**

The concentration of polysulfide in (A) semen (B) seminal vesicle (C) liver (D) kidney were measured by EMSP. Data were presented as means  $\pm$  S.D. n=3.



**Fig. 28 A change of tissue weights and appearance of seminal vesicle by aging.**

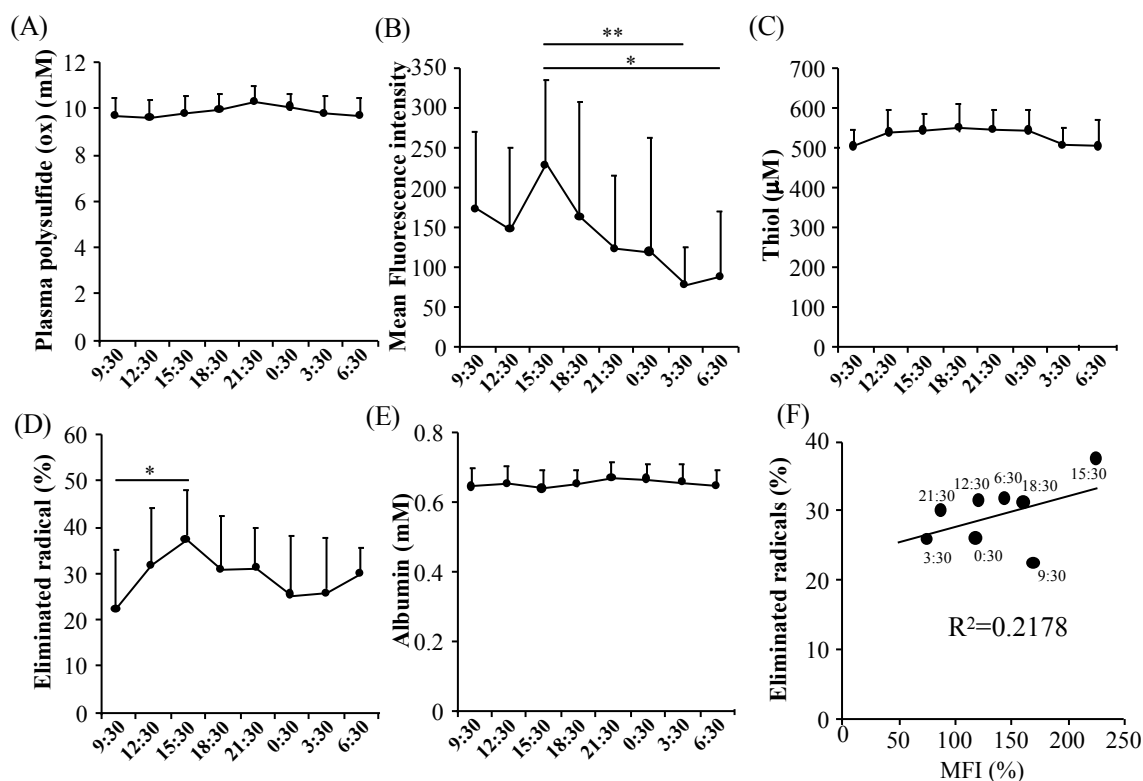
(A) Tissue weights were measured after sacrifices. An appearance of seminal vesicle in (B) mature (C) aged. Data were presented as means  $\pm$  SD. n=3.

以上の結果より、加齢は血清ポリスルフィド低下や血清の酸化ストレス亢進、男性不妊発症、精嚢腺肥大および精嚢腺中ポリスルフィド低下を引き起こすことが明らかになった。ヒトにおいても精子のポリスルフィドは受精率と高い正の相関関係を有していたことから、何らかの関連性を有しているものと推察されるため、今後のさらなる詳細な検討が望まれる。

## 第5節 血漿ポリスルフィドの日内変動

血漿中のポリスルフィド濃度を全身における酸化ストレスの指標として応用するためには、採血の時間帯による差異がないか事前に把握しておく必要がある。そこで、血漿ポリスルフィドの日内変動について調査した。なお、被験者の昼食および夕食は同一のものを同時に摂取した。まず、EMSP で測定される血漿中ポリスルフィド濃度については昼 12:30 から夜にかけて 21:30 をピークに上昇し、再び昼までに下降する傾向が観察されたものの、全体を通して変動の幅は 10%未満であった (Fig. 29A)。また、血漿のポリスルフィド濃度について、ポリスルフィドの蛍光プローブである SSP4 を用いた測定も試みた。その結果、個人差はあるものの、15:30 をピークに上昇し、夜 3:30 をピークに下降することが示された (Fig. 29B)。この時、15:30 の平均蛍光強度と 3:30、6:30 の平均蛍光強度には有意な差があった。血漿中 SH 濃度については深夜にわずかに下降するものの、特にリズムのある動きは見られなかった (Fig. 29C)。次に、血漿の抗酸化作用について、AAPH ラジカル消去試験を用いて評価した。その結果、抗酸化作用は 15:30 をピークに上昇することが示された (Fig. 29D)。血漿中アルブミン濃度は EMSP で測定されるポリスルフィド濃度と同様に 21:30 に最大値を示した (Fig. 29E)。

この時の各パラメーターの相関関係について解析したところ、SSP4 の蛍光強度と AAPH のラジカル消去活性との間に正の相関が認められた (Fig. 29F)。これらの結果から、血漿のポリスルフィド濃度の日内変動は 10%未満ではあるものの、可能な限り採血時間を揃える必要があると思われる。



**Fig. 29 Circadian rhythms of plasma redox parameters.**

Diurnal variation of (A) plasma polysulfide measured by EMSP, (B) sulfane sulfur detected by SSP4, (C) AAPH radical elimination activity, (D) thiol performed DTNB analysis were assessed and (E) albumin concentration measured by BCG assay. (F) Association between SSP4 and AAPH radical elimination activity by different time. Longitudinal axis shows the ratio of eliminated AAPH radical by plasma. Horizontal axis is the mean fluorescence intensity (MFI) of SSP4. Each point is the average score of the plasma samples collected from healthy subjects at the same time.

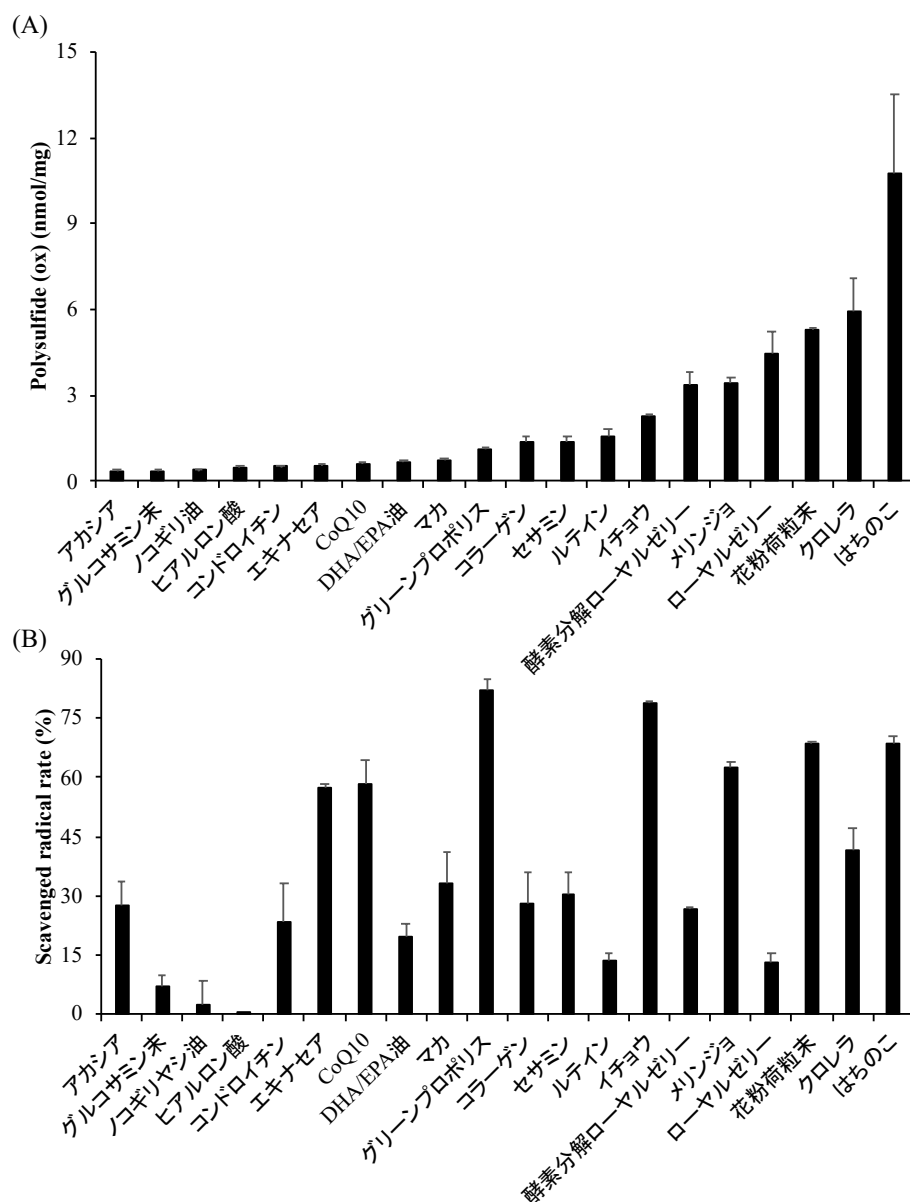
## 第 6 節 健康食品中ポリスルフィドの検出と経口摂取による影響評価

### 6-1 ポリスルフィド含有健康食品のスクリーニング

2-3 の結果より、血清のポリスルフィドが加齢により減少することが明らかになった。そこで次に、ポリスルフィドを健康食品などにより補給することができるか否かを評価した。本研究では、ローヤルゼリーがシステインを豊富に有し、さらに抗酸化活性を持っていることに着目し、山田養蜂場より供与頂いたミツバチ産品を主とした健康食品におけるポリスルフィド含量を評価した。

EMSP にてポリスルフィドを測定したところ、蜂の子や花粉荷、ローヤルゼリーなど複数

のミツバチ産品からポリスルフィドが検出された (Fig. 30A)。次に、これらミツバチ関連産品の抗酸化活性について、1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH ラジカル) 消去試験を用いて評価した。その結果、試料のうち多くが抗酸化活性を有することが明らかになった (Fig. 31B)。したがって、ミツバチ関連産品の一部がポリスルフィドを介して抗酸化活性を示す可能性が示された。



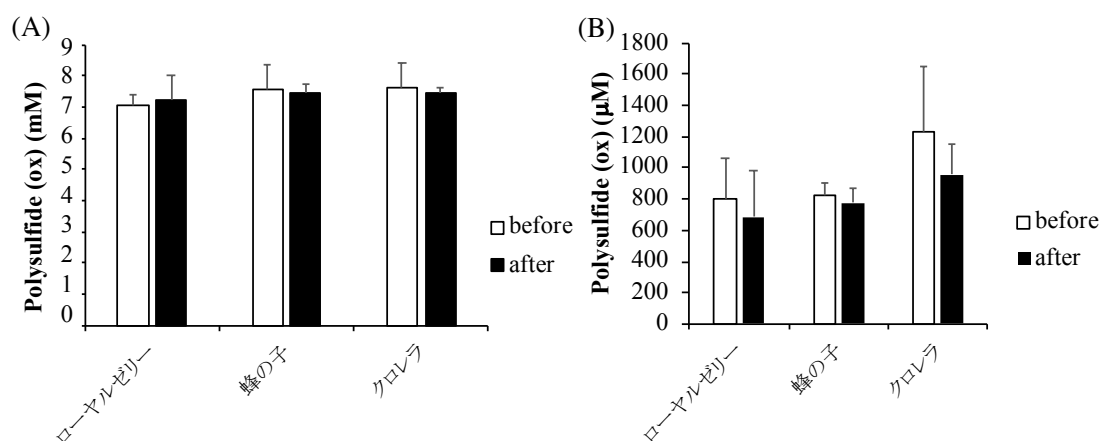
**Fig. 30 Detection of polysulfide and analysis of anti-oxidative activity of honeybee-related products.**

(A) Samples were performed EMSP. (B) Radical scavenging activities of samples were analyzed by DPPH radical. Data were presented as means  $\pm$  S.D. n=3.

## 6-2 ポリスルフィド含有健康食品摂取による影響評価

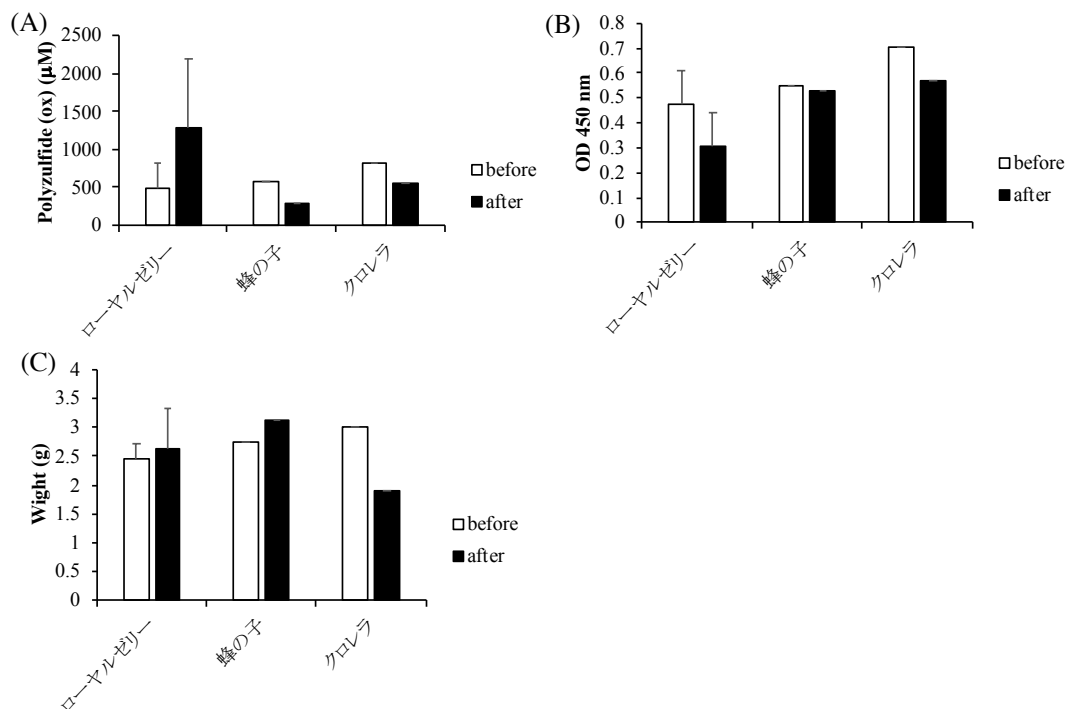
次に、ポリスルフィド含量が高く、抗酸化活性も有していた試料として蜂の子、ローヤルゼリー、クロレラの3つを選択し、これら健康食品を摂取することで生体液のポリスルフィド濃度が増加するか否かを評価した。

蜂の子およびローヤルゼリー、クロレラは、山田養蜂場より供与頂いたサプリメントを使用した。摂取量は各サプリメントの提示している目安量に従った。各サプリメントにつき3名ずつ被験者を充て、1ヶ月間毎日服用させた。服用前後の生体液中のポリスルフィド濃度変化について、血清は服用前後1回、涙液および精液は服用前後に3回採取して評価した。その結果、どのサプリメントの服用においても、服用前後で血清および涙液中のポリスルフィド濃度は変化しなかった (Fig. 31)。



**Fig. 31 Levels of polysulfide in an oxidized form before/after the administration of the products.** Polysulfide in (A) serum and (B) tear was measured using by EMSP. Data were presented as means  $\pm$  S.D. n=3.

次に、精液に対する影響を評価した。服用前後3日間、毎朝採取した精液中について、各種評価を行った。被験者の約半数が女性であったため、検体数は限られているものの、ローヤルゼリーの服用によりポリスルフィドが上昇する傾向が得られた (Fig. 23A)。しかし、精子の運動活性はローヤルゼリーの服用により上昇せず (Fig. 32B)、精液の重量にも有意な差は認められなかった (Fig. 32C)。



**Fig. 32 Effects of honeybee related products to human semen.**

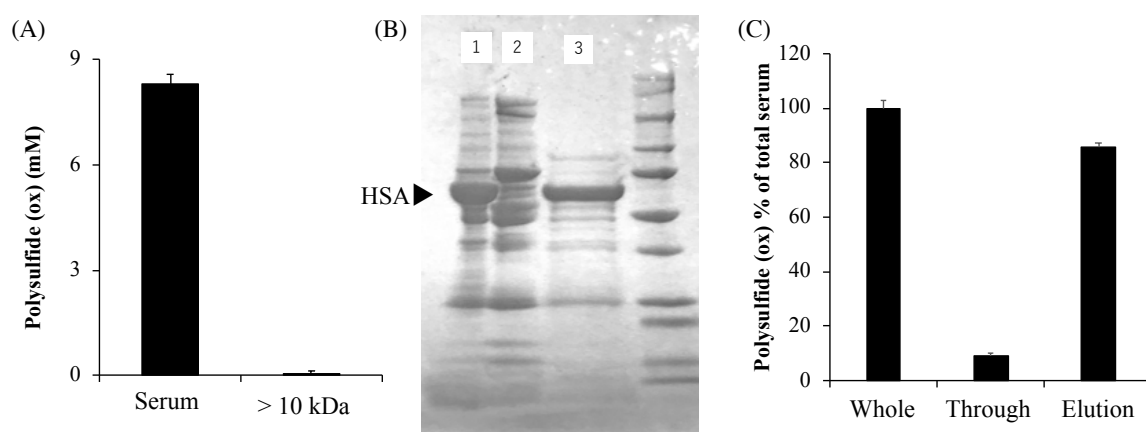
(A) Polysulfide in semen was analyzed by using EMSP. (B) Sperm activities measured using WST-8. (C) 3-days-average of seminal weight.

以上、ローヤルゼリーや蜂の子、クロレラなどのミツバチ関連製品中にポリスルフィドが含まれていること、およびこれらが抗酸化活性を有することが明らかになった。しかし、1ヶ月間これらを服用することは、血清や涙液などの生体液中のポリスルフィド濃度を上げるには至らなかった。精液においては、検体数がかなり少ないものの、ローヤルゼリーの服用によりポリスルフィド濃度が上昇した。今後、被験者規模を拡大し、服用期間を延伸した臨床試験を行い、さらに詳細な検討が望まれる。

## 第7節 血清中ポリスルフィド保持物質の同定

次に、ヒト生体液中で最もポリスルフィド濃度の高かった血漿に着目し、その詳細について評価することとした。以下、血漿の代わりに血清を用いて評価した。まず、カットオフ値 10 kDa の限外濾過カラムを用いて、血清の低分子画分を分離した。得られた溶液中のポリスルフィドを EMSP にて定量したところ、低分子画分にはポリスルフィドはほとんど存在していなかった (Fig. 33A)。そこで次に、血清タンパク質のうち最も多くを占めているタンパク質である、HSA に着目した。HSA に親和性を持つアフィニティーカラムである、

HiTrap Blue HP を用いて HSA を分離した。このとき、各レーンにてタンパク量を統一し SDS-PAGE を行い、分離の程度を確認した。レーン 2 の非結合画分に HSA のバンドがほとんどないこと、およびレーン 3 の NaCl 溶出画分で HSA が溶出されていることが確認できた (Fig. 33B)。そこで、これら試料のポリスルフィド量を EMSP 法にて測定した。その結果、ポリスルフィドは主に HSA 画分に含まれることが示された (Fig. 33C)。



**Fig. 33 Polysulfide concentrations of serum fraction from human subjects.**

(A) Polysulfide level of serum with removing protein fraction was detected using by EMSP. (B) HSA was purified using by affinity chromatography. CBB-stained SDS-PAGE gel of serum whole (lane 1), serum removed HSA (lane 2) and purified HSA (lane 3). Polysulfide in the fractions of (B) was measured by EMSP. Data were presented as means  $\pm$  SD.

次に、HSA のドメイン別のポリスルフィド量について評価した。HSA は、ドメイン I-III の 3 つのドメインにより構成されており、さらにこれらはそれぞれ A, B のサブドメインに分類される (Fig. 34)。そこで、これらドメイン毎に切断する分子として臭化シアン (CNBr) に着目した。CNBr は、メチオニン残基部分でタンパク質を非酵素的に切断することが知られている。HSA においては、Table 2 に示すように非還元条件下ではドメイン I A、ドメイン I B- II A、ドメイン II B- III の 3 つに、還元条件下ではさらに全部で 7 つのペプチドに切断されることが報告されている (Table 2)<sup>45</sup>。そこで、非還元下で HSA に CNBr を処理し、それぞれのペプチドを精製してポリスルフィドがどの断片物に含まれているかについて評価した。CNBr 反応後、切断された各ドメインはアセトン沈殿にて沈殿させ、上清を除去したのち、PBS で再懸濁した。さらに、血清アルブミンアフィニティカラムである HiTrap Blue HP Columns に吸着させ、溶媒の塩濃度や塩の種類を変化させることでそれぞれを分離した。

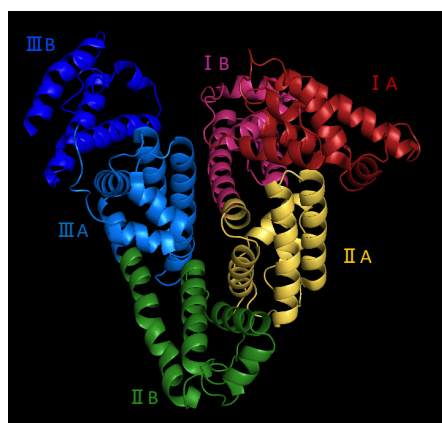


分離したペプチドは Fig. 35A のようになり、非吸着画分 (②) にドメイン I A が、1 M 塩化ナトリウム (NaCl) (③) および 0.5 M KSCN (④) 溶出画分にドメイン II B-III が、1 M チオシアン酸カリウム (KSCN) 溶出画分 (⑤) に I B-II A が含まれることが明らかになった。そこで、各試料を脱塩したのち、EMSP 法によりこれらペプチド中のポリスルフィド量を評価した。その結果、ペプチド 1 モルあたりのポリスルフィド量は Fig. 35B に示すように、全てのペプチドにポリスルフィドが含まれることが示された。一方、各ペプチド中のシステインあたりのポリスルフィド量として算出すると、I B-II A にわずかに多いものの、全体的に大きな差は認められなかった (Fig. 35C)。したがって、HSA 中のポリスルフィドは、HSA に普遍的に分布していることが示唆された。なお、CNBr 反応時に用いる 70%ギ酸は、HSA のポリスルフィド量に影響しなかったが、①の分離前の試料中のポリスルフィドが未処理の HSA と比べて減少していたことから、CNBr を処理することによってポリスルフィドが一部失われることが示された。

**Table 2 Cravage of HSA by CNBr.**

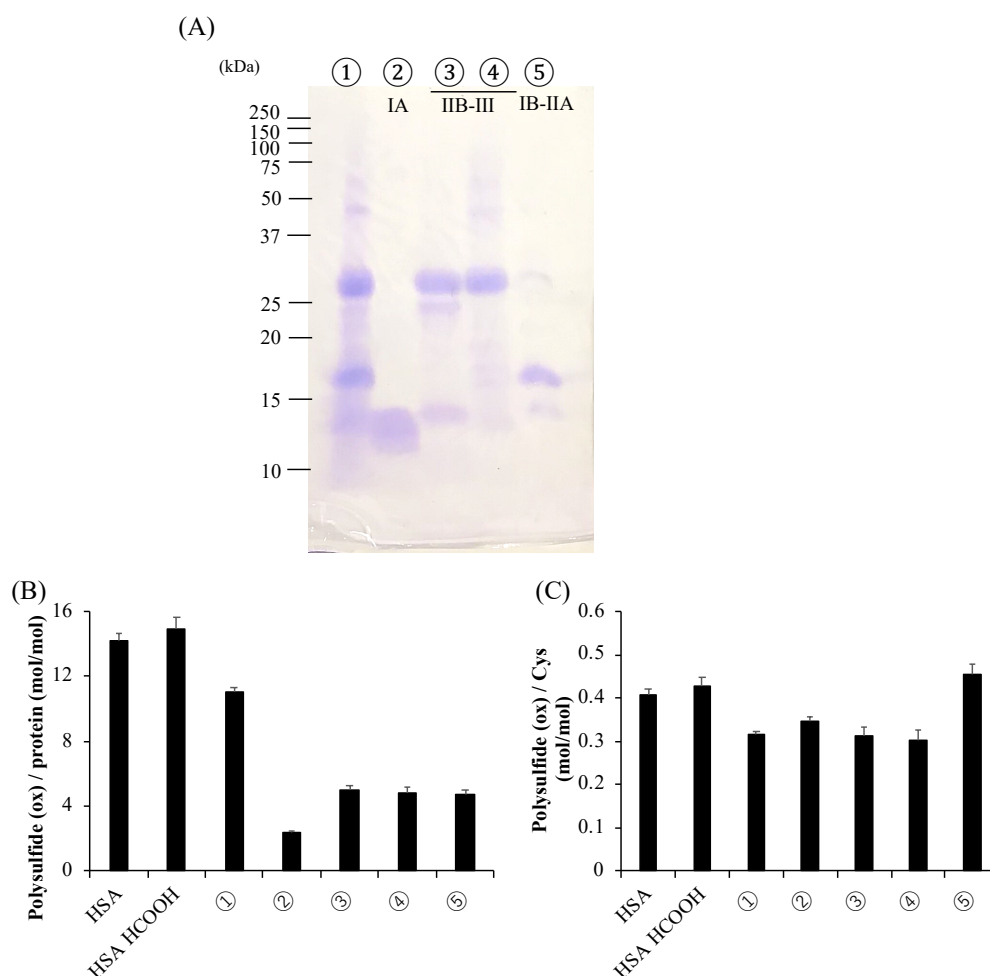
Domain	Amino acid	DTT(+)	DTT(-)
I A	1-87 88-123	9.8 kDa 4.1 kDa	13.9 kDa
I B- II A	124-298	20 kDa	20 kDa
II B-III	299-329 330-446 447-548 549-585	3.2 kDa 13.5 kDa 11.6 kDa 3.9 kDa	32.2 kDa

M: methionine



**Fig. 34 Crystal structure of HSA colored by subdomains.**

The illustration was made with MacPyMol PyMOL v1.7.4.5 Edu Enhanced for Mac OS X. Protein Data Bank (PDB) ID: 1AO6<sup>46</sup>.



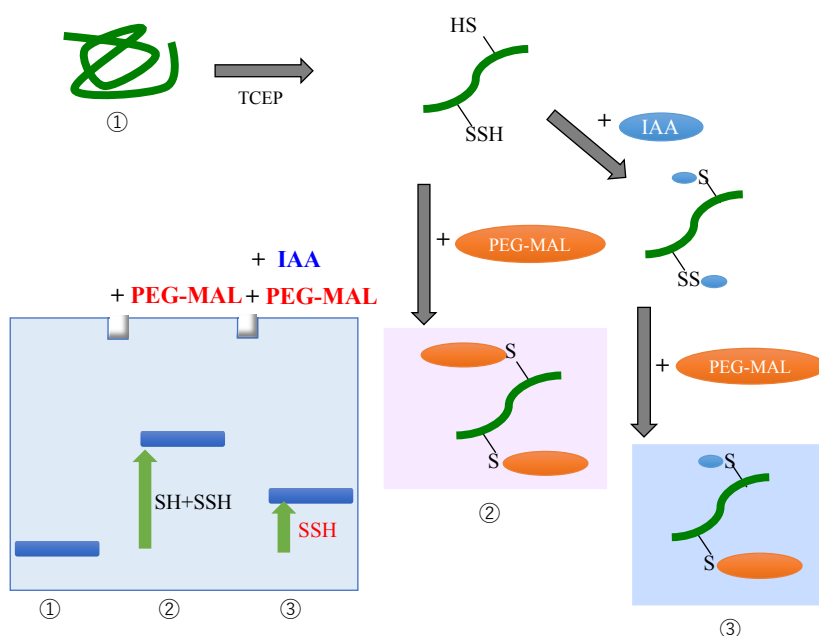
**Fig. 35 Polysulfide distribution in HSA domains.**

HSA was treated with CNBr in 70% HCOOH. Claved peptides were isolated using by a blue affinity column. Fragments were shown as ①; before the separation, ②; with 25 mM sodium phosphate buffer (NaPB) ③; with 1 M NaCl in 25 mM NaPB ④; with 0.5 M KSCN in 25 mM NaPB ⑤; with 1 M KSCN in 25 mM NaPB. (A) CBB stained SDS-PAGE gel without the reduction. (B)(C) Polysulfide in each peptide was measured using EMSP. Data were presented as means  $\pm$  SD.

## 第 8 節 PEG-MAL を基盤としたゲルシフト法による HSA のポリスルフィドの検出

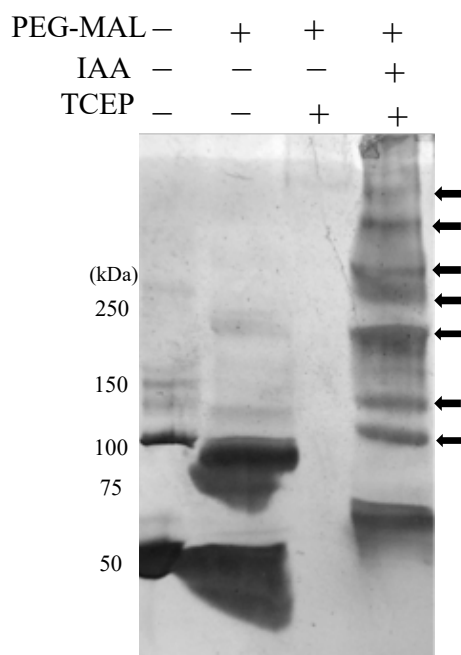
次に、HSA に存在するポリスルフィドの存在形態が、本当に RSSSR' のような酸化型であるか否かを明らかにすべく、赤池らの開発したポリエチレングリコール (PEG) - Maleimide based gel Shift Assay (PMSA)<sup>47</sup>を試みた。PMSA は、SH 基反応試薬の求核性の違いを利用して SSH を検出する方法である。Fig. 36 に、PMSA の概略を示す。ここで、tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) は、RSS<sub>n</sub>SR' 結合に対し、sulfane sulfur を保ったまま還元す

ることの出来る還元剤であると言われており、自身は S 原子を持たないため、この系で検出されるポリスルフィドは試料中のタンパク質に由来する。次に、TCEP 処理試料は、分子量 20 kDa のポリエチレングリコール (PEG) が付加した SH 反応試薬である PEG-MAL と反応させると、SH あるいは SSH と結合し、分子量が結合した PEG の個数分シフトアップする。ここで、PEG-MAL 反応の前に SH のアルキル化剤であるヨードアセトアミド (IAA) にて処理を行うと、SH と IAA の反応部位には、その後 PEG-MAL を反応させても結合しないが、SSH と IAA の反応部位は、ポリスルフィドを保持したままアルキル化されるため、IAA より高い求核性をもつ PEG-MAL が結合し、分子量はシフトアップする。これらの試料を SDS-PAGE にて電気泳動し、分子量の差からタンパク質の酸化型ポリスルフィドを評価することができる。



**Fig. 36 Scheme of PEG-Maleimide based gel Shift Assay (PMSA).**

HSA における PMSA の結果を Fig. 37 に示す。TCEP 処理した HSA に PEG-MAL だけを反応させると、未処理段階で観察されていたバンドが消失し、高分子側にわずかなバンドが観察されるのみであった。その理由としては、HSA のシステイン残基数は 35 残基であり、その全てに 20 kDa の PEG-MAL が付加した推定分子量は 767 kDa となることから、ほとんど泳動しなかったと考えられる。一方、IAA を前処理した試料に PEG-MAL を反応させた群では、複数の PEG が結合したと考えられるシフトアップしたバンドが多く観察された。この結果から、HSA には、ポリスルフィドの存在部位が少なくとも 7 カ所程度存在することが示唆された。



**Fig. 37 Image of PMSA for HSA sample.**

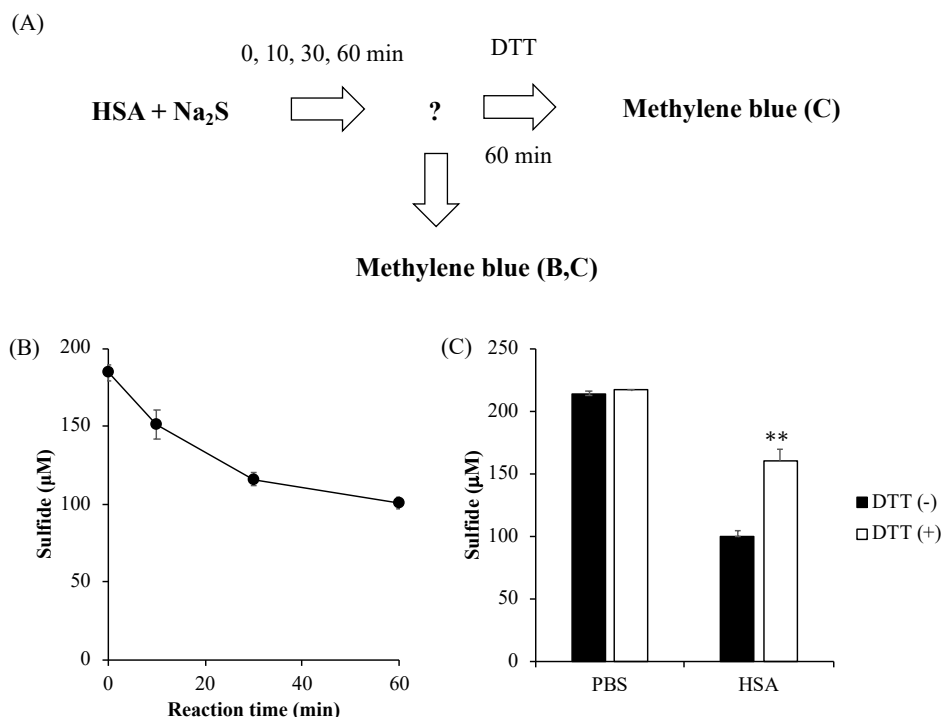
TCEP-reduced HSA was reacted PEG-MAL with/without pre-incubation with IAA. Samples were separated by electrical electrophoresis.

## 第 9 節 DTT を用いたポリスルフィド定量法の確立

前節の PMSA を用いた評価をする中で、TCEP の代わりにジチオトレイトール (DTT) を還元剤として用いると、IAA 存在下で PEG-MAL はほとんど結合しなかった (data not shown)。そこで、DTT はポリスルフィドを分解するのではないかと考え、以下、DTT によるポリスルフィドのスルフィドへの遊離について評価した。以下、DTT により遊離するスルフィドをメチレンブルー (MB) 法で求める手法を DTT-MB とする。

まず、100  $\mu$ M の HSA に 3 mM の DTT を添加し、遊離したスルフィドをメチレンブルー法にて評価した。このとき、遊離したスルフィドが  $H_2S$  ガスとして空气中に分散することがないように、DTT の還元適応範囲内で、かつアルカリ条件下である pH 8.0 とした。その結果、1 時間の DTT 反応により、HSA 1 分子あたり約 0.08 個のスルフィドが検出された。そこで、HSA と  $Na_2S$  を反応させ、生じた還元型ポリスルフィドに同条件の DTT を処理した際、再びスルフィドに還元されるか否かを評価した。250  $\mu$ M の  $Na_2S$  に対し、同濃度の HSA を混和すると、1 時間で約 50% のスルフィドが減少した。一方、反応後の試料に DTT を添加し、溶液中のスルフィドを測定したところ、スルフィド量は DTT(-)と比較し、有意に上

昇した (Fig. 38)。したがって、3 mM の DTT を pH 8.0 で 1 時間反応すると、式 6 に示す反応で還元型ポリスルフィドがスルフィドに還元されることが示唆された。

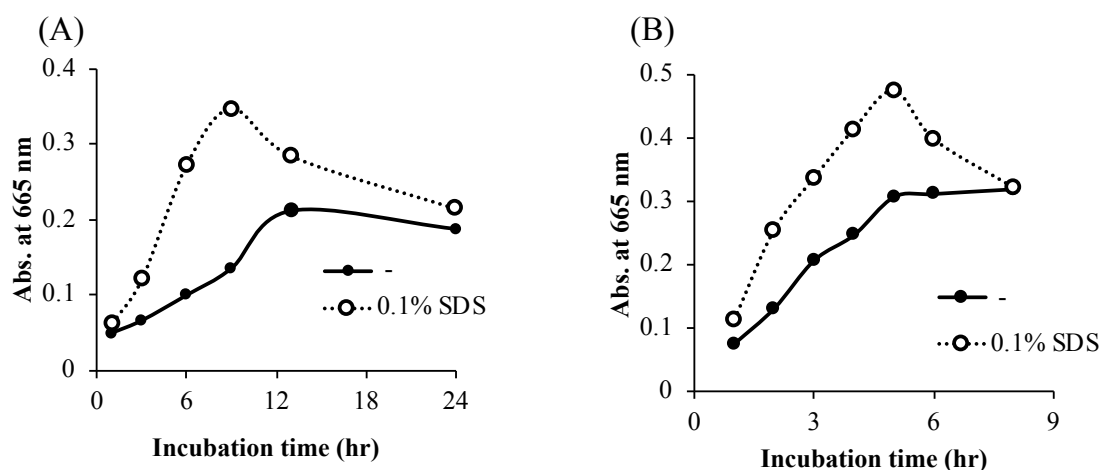


**Fig. 38 Liberation of sulfide from polysulfide with the treatment of DTT.**

Sodium sulfide was treated with HSA. Sulfide levels were measured by methylene blue assay. (A) Scheme of the reaction of HSA and sulfide with/without DTT. (B) The levels of free sulfide with HSA. (C) After the reaction of sulfide with HSA, DTT was treated with the sample. Data were presented as means  $\pm$  S.D.

以上のように 3 mM、1 時間の DTT 反応条件では 1 分子あたりわずか 0.08 個のスルフィドが遊離したのみであった。これは、EMSP で検出されるポリスルフィドが 10 個を超えることを考慮すると、極めてわずかである。DTT はジスルフィド結合を開裂させる還元剤であるため、より強い条件で反応させると酸化型ポリスルフィドからもスルフィドを遊離させることができるのではないかと考えた。そこで次に 100  $\mu$ M の HSA に対し 10 mM の DTT を 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) にて一定時間反応させたのち、遊離したスルフィドをメチレンブルー法にて定量した。Fig. 39AB の縦軸は、メチレンブルーの吸光度を示している。37°C で反応させた場合は、9–13 時間をピークにスルフィドが遊離し、さらに反応させる

と検出されるポリスルフィドは減少した (Fig. 39A)。60°C にて反応させた場合は、5 時間をピークにスルフィドが遊離した (Fig. 39B)。この時、HSA 存在時の溶液のメチレンブルーの吸光度は非存在時よりも十分に高かったが、わずかに検出された。したがって、以降の検討では試料以外からのポリスルフィドの混入の可能性を考慮するため、試料非存在下で DTT を同様に反応させた際の吸光度を差し引いて算出した。長時間反応させるとメチレンブルーの吸光度が減少したのは、遊離したスルフィドが H<sub>2</sub>S ガスとして空气中へ拡散したためか、もしくはスルフィドが酸化されたためだと考えられる。この反応はスルフィドが遊離しているまでの時間にも生じていると予想される。つまり、DTT により遊離するスルフィドを定量する本手法では、ポリスルフィド量として低く見積もってしまう恐れがあるため、この点に置いては EMSPの方が優れていると言える。今後、密封条件下での気相中 H<sub>2</sub>S 定量あるいは、酸化したスルフィドの定量などを行い、遊離したスルフィドの全量を測定可能な実験系にすべく、更なる改良が望まれる。



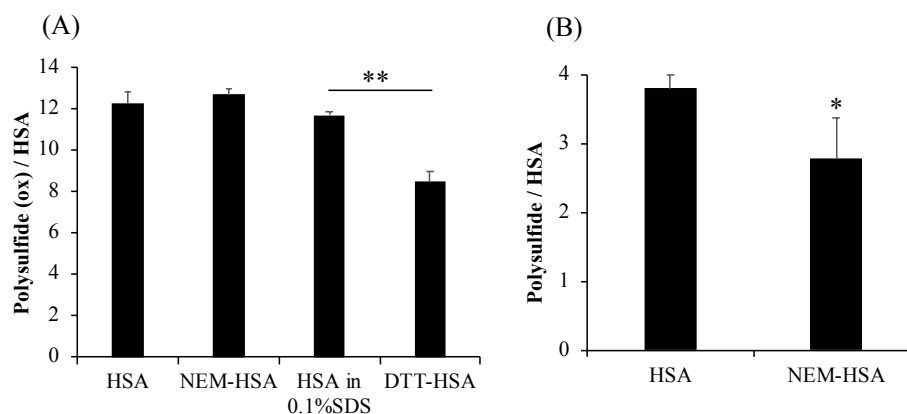
**Fig. 39 Eliminated sulfide by DTT in defferent incubation-time.**

Sulfide was eliminated with the incubation of DTT at (A) 37°C and (B) 60°C for each time and colored by N,N-dimethyl-p-phenylenediamine (DPDA) with forming methylene blue. Absorbance of methylene blue was detected by microplate reader.

以上、10 mM の DTT を 0.1%SDS 存在下で 60°C にて 5 時間反応させる条件を採用し、DTT-MB (strong) とした。対照的に、DTT (3 mM) で 37°C にて 1 時間反応させる条件を以下では DTT-MB (weak) とする。

次に、DTT-MB 法にて検出されるポリスルフィドの特徴について調べた。HSA に SH のアルキル化剤である N-ethylmaleimide (NEM) を反応させ、還元型で存在しているシステイ

ンを修飾し、未反応の NEM は透析にて除去した。このとき、DTNB 法にて SH は検出されないことを確認した。この NEM 化した HSA について、そのポリスルフィド量を求めた。その結果、EMSP 法でのポリスルフィド定量値には、NEM 化による影響は観察されなかった (Fig. 41A)。一方、DTT-MB (strong) でのポリスルフィド定量値は、NEM 化によって検出されるポリスルフィドが約 1 個減少した (Fig. 41B)。したがって、DTT-MB (strong) にて検出されるポリスルフィドは一部還元型ポリスルフィドを検出すること、さらに NEM 化によって安定化した酸化型ポリスルフィドは検出されないことが示された。一方、次に、0.1% SDS、20 mM Tris-HCl (pH 8.0) にて 10 mM DTT と 60°C で 5 hr 反応させた HSA を 0.1% SDS 中で透析させ、DTT を取り除いたものを EMSP 法にて測定した。その結果、0.1% 中の DTT 未処理の HSA と比較し、DTT 処理により検出されるポリスルフィドは約 3 個減少した (Fig. 41A)。従って、DTT-MB (strong) にて検出されるポリスルフィドは還元型のもとの一部の酸化型ポリスルフィドの両方を含むことが示された。以上のことから、HSA には酸化型ポリスルフィドが存在しているということが EMSP 法以外によっても実証された。加えて、DTT-MB (strong) での検出可能な酸化型ポリスルフィドは、NEM 化によって安定化した酸化型ポリスルフィドは検出せず、EMSP 法によって検出されるポリスルフィドの一部であることから、還元型ポリスルフィドに反応性が近い、比較的高い反応性を有するポリスルフィドであることが示唆された。

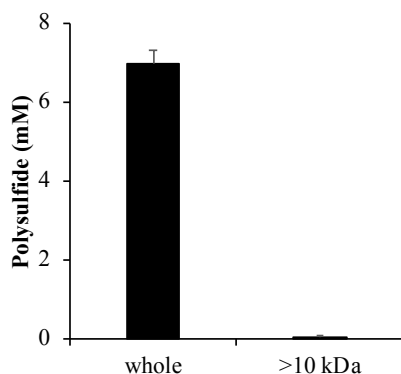


**Fig. 40 Levels of polysulfide in NEM-HSA and DTT-HSA.**

Polysulfide in each sample was measured by (A) EMSP and (B) DTT-MB (strong). Data were presented as means  $\pm$  S.D.

第2節より、EMSPによる検討では、血清中ポリスルフィドの99%以上が10 kDa以上の高分子に含まれていることが明らかになった (Fig. 34)。そこで次に、DTT-MB (strong) においてもポリスルフィドが低分子画分と高分子画分のどちらに含まれるかを評価した。Fig.

34 と同様に限外濾過により血清から 10 kDa 以上のものを除去したところ、検出されるポリスルフィドは 99%以上減少した (Fig. 42)。したがって血清においては、還元型ポリスルフィドと酸化型ポリスルフィドの両方が高分子画分に存在していることが示唆された。



**Fig. 41 Levels of polysulfide in serum with removing proteins.**

Polysulfide in serum removed protein was measured using by DTT-MB (strong). Data were presented as means  $\pm$  S.D.

## 第 10 節 アルキル化還元によるポリスルフィド検出法の改善

以上、還元剤の種類や反応条件を制御することにより、検出するポリスルフィドの形態を区別して定量することに成功した。一方、還元型ポリスルフィドを定量する DTT-MB (weak) においては、測定対象が低分子となると、一部酸化型ポリスルフィドも検出してしまいうことが分かった。そこで、必ず還元型ポリスルフィドを検出できる系として、アルキル化還元法に着目した。

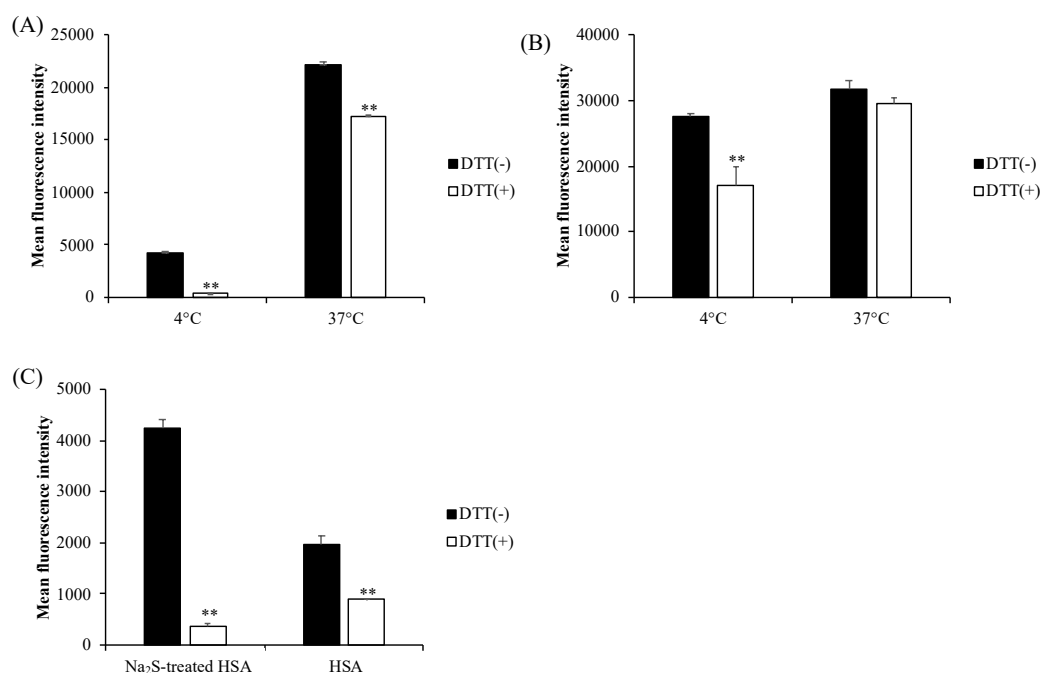
本章第 1 節にて述べたように、アルキル化還元法は還元型ポリスルフィドを検出する手法として既に確立されている。これまでに筆者らは、アルキル化剤としてビマンや Red-maleimide などの蛍光剤によりポリスルフィドを修飾し、これを DTT で還元するという系を立ち上げた<sup>48</sup>。一方、その後の研究により、これらビマンや MAL は、sulfane sulfur を消費しながらポリスルフィドと結合してしまうことから、そのため、本章第 1 節で示したようなポリスルフィドの検出に用いるのには不向きであることが報告された。対照的に、IAA は sulfane sulfur を維持したままポリスルフィドに結合することができると言われている。そこで、IAA の蛍光標識体である 5-iodoacetamido-fluorescein (5-IAF) を用いた際にも DTT 処理前後の蛍光の差によりポリスルフィドを検出できるか否か検討した。Fluorescein-IAA の代わりに MAL が結合した 5-maleimide5-IAF (5-MAF) を 5-IAF と比較した。還元型ポリ



スルフィドのポジティブコントロールには  $\text{Na}_2\text{S}$  を反応しゲル濾過により精製した HSA を用いて、未処理の HSA と比較した。また、ビマンや MAL がポリスルフィドを消費することを報告した論文において反応温度が室温であったのに対し、筆者らが報告したビマンや MAL によるポリスルフィドの検出法においては、 $4^\circ\text{C}$  である。そこで、反応温度の違いがポリスルフィド検出に与える影響についても併せて評価した。

その結果、 $4^\circ\text{C}$  で反応させた際は 5-IAF および 5-MAF の両方にて、 $\text{Na}_2\text{S}$  処理 HSA に結合後の DTT 処理でプローブが外れることが明らかになった (Fig. 43AB)。特に 5-IAF で標識した方が 5-MAF を用いた際より DTT 処理前後で変化した蛍光の割合が大きかった。また、5-IAF を  $4^\circ\text{C}$  で反応させる条件下では、 $\text{Na}_2\text{S}$  処理 HSA の代わりに HSA を用いた際にも DTT 処理により蛍光が有意に減少した (Fig. 43C)。つまり、HSA に 0.08 個存在する還元型ポリスルフィドの検出も可能であるということである。

以上、5-IAF によって高感度に還元型ポリスルフィドが検出できることが明らかになった。また、反応温度が高いと DTT によっても減少しにくくなる、つまり、IAA や MAL に消費されるポリスルフィドの割合が大きくなることが示された。



**Fig. 42 Detection of polysulfide in a reduced form using 5-IAF or 5-MAF.**

(A) 5-IAF or (B) 5-MAF was incubated with  $\text{Na}_2\text{S}$ -treated HSA. (C) 5-IAF was incubated with HSA and  $\text{Na}_2\text{S}$ -treated HSA. Probes were removed by gel filtration and DTT was added. After the removal of excess DTT, the fluorescence was measured. Data were presented as means  $\pm$  S.D. \*\* $p < 0.01$  vs. DTT(-).  $n=3$ .

## 第 11 節 考察

CysSH には、還元型 (R-SH) と酸化型 (R-SS-R') が存在するが、ポリスルフィドにおいても還元型 (R-SSH) と酸化型 (R-SSS-R') の両方の存在形態があると考えられる。そのため、活性イオウを介した生体恒常性維持を理解するためには、両者をそれぞれ定量的に解析することが必要である。

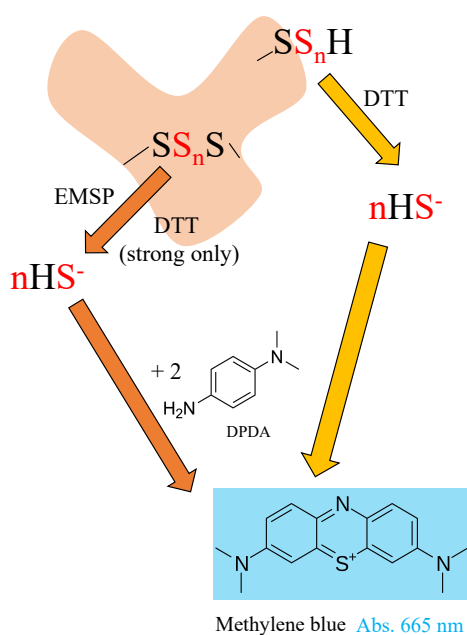
本研究にて、酸化型ポリスルフィドの測定法を世界に先駆けて確立することができた。このことにより、酸化的環境に支配される血清などの細胞外における RSS の発見に至った。血清、涙液、唾液、鼻汁および精液の中で、血清は最も高濃度にポリスルフィドを有し、涙液や唾液、鼻汁のポリスルフィド濃度は血清と独立していたが、精液中のポリスルフィドは血清ポリスルフィド濃度と正の相関関係を有していた。精液や精子に存在するポリスルフィドは、精子の生存に関係していたことから、精液または血清のポリスルフィド濃度は、不妊の指標になるうる可能性が示唆された。現在、本学倫理委員承認の下、健常ならびに不妊の外来患者の精液を集めることを開始しており、今後ポリスルフィドとの関連についてより詳細な検討が期待できる。

血清ポリスルフィドのほとんどは HSA に由来していた。HSA は 3 つのドメインを有しているが、ポリスルフィドは各ドメインに満遍なく分布していた。緒言にて述べたように、システインの約 7 割が翻訳時に sulfane sulfur を有していることが報告されている。HSA は 35 個のシステインを有していることを考慮すると、EMSP 法によって検出される HSA 中のポリスルフィドが 14 個、つまり、およそ 5 割が sulfane sulfur を有している比率は、ある程度妥当な検出値であると考えられる。

また、新たな還元型活性イオウ測定法として、DTT-MB 法を確立した。DTT-MB (weak) は、タンパク質においては還元型ポリスルフィドが測定される。一方、10 mM DTT と 60°C で反応させると、還元型と一部の酸化型ポリスルフィドが検出された。したがって、還元剤に対して HSA の還元型ポリスルフィドがより敏感に反応することや一部の酸化型ポリスルフィドも反応性を有することが明らかになった。

ただし、これらの手法は検量線に課題が残っている。EMSP と DTT-MB では、測定対象の全てのポリスルフィドがスルフィドへなる前提で、本研究では検量線に Na<sub>2</sub>S を用い、定量している。しかしながら、EMSP 反応により遊離したスルフィド量は、低分子の GSSSG や NAC ポリスルフィドでも全体の約 50-60% であった。そのため、仮に GSSSG や NACSI を検量線として用いると、試料中のポリスルフィド定量値は約 2 倍高いものとなる可能性がある。DTT-MB (strong) においては、HSA から還元されたスルフィドの反応液中での安定性が低いため、実際に検出している量よりも多くのスルフィドがポリスルフィドから遊

離していると推察している。事実、Fig. 39 のように、DTT との反応時間が 5 時間以降の 3 点を取ると、ほぼ一定の速度で遊離したスルフィドが消失していることがわかる。この消失速度を考慮した場合、DTT-MB (strong) により遊離するスルフィドは、現在算出されている HSA 1 分子あたり 4 つという量よりも約 2 倍ほど多くなる可能性がある。本論文では、EMSP のスルフィド追い出し効率や DTT-MB (strong) の遊離したスルフィドの分解効率を加味してないため、最適な検量線の探索やスルフィドの消失の抑制が今後の課題である。



**Fig. 43** Detection method of polysulfide with the combination of methylene blue assay.

酸化型ポリスルフィドについては、これまで解析されていないことから、その生理活性についてはほとんど未解明である。今回、還元型ポリスルフィドの定量法も同時に確立できたことは、生体液中ポリスルフィドの包括的な理解に繋がるものと期待できる。次章ではこれらの方法を駆使して、HSA や血清中のポリスルフィドの機能解析を試みた。

## 第 12 節 小括

本章では、ポリスルフィドの新規定量法を開発し、生体液中のポリスルフィド検出を試みた。以下に、得られた知見を小括する。

- 1) アスコルビン酸と水酸化カリウムにより、酸化型ポリスルフィドがスルフィドに還元された。得られたスルフィドをメチレンブルー法や電極法により定量化することで、酸化型ポリスルフィドの測定が可能となった。
- 2) 確立した酸化型ポリスルフィド測定法により、血清や涙液、唾液、精液などの生体液中の酸化型ポリスルフィドが検出された。血清ポリスルフィド濃度は精液ポリスルフィド濃度と正の相関関係を有していた。唾液中ポリスルフィドはアミラーゼ活性と、精液中ポリスルフィドは生存精子数にそれぞれ正に相関した。
- 3) 精子のポリスルフィドは頭部および軸索部に存在していた。精子形成および成熟の器官である精巣上体や精巣にポリスルフィド合成に関与する酵素である CBS の発現が認められた。不妊を示した加齢マウスにおいては、血清および精子中のポリスルフィドが減少傾向にあり、酸化ストレスの亢進も認められた。これらポリスルフィド濃度は、体外受精における受精の成功率と正に相関した。
- 4) 血漿中ポリスルフィドのうち、蛍光プローブで測定可能なものは 15:30 を最大とする日内リズムを有していた。アスコルビン酸および水酸化カリウムにより測定される酸化型ポリスルフィドは日内ではほぼ一定であった。
- 5) ミツバチ関連産品のうちローヤルゼリーや蜂の子、クロレラなどがポリスルフィドを有していた。これらを 1 ヶ月間服用しても、血清や涙液中ポリスルフィドは変化しなかったが、ローヤルゼリーの摂取により精液中ポリスルフィドが上昇する傾向が得られた。
- 6) ヒト血清中のポリスルフィドの 99%以上は 10 kDa 以上の高分子画分に含まれており、そのうち 85%以上は HSA に存在した。HSA のポリスルフィドは HSA を構成する 3 つのドメインに広く分布しており、システイン 1 分子あたりのポ

リスルフィドはドメイン I B-II A においてわずかに多かった。

- 7) PEG-Mal をベースとしたゲルシフト法により、HSA に酸化型ポリスルフィド結合箇所が複数個存在することが明らかになった。
- 8) 還元剤である DTT の反応条件を変えることで、ポリスルフィドから遊離するスルフィド量を制御することに成功した。HSA においては、3 mM の DTT を 37°C で 1 時間反応させると還元型ポリスルフィドが、10 mM の DTT を変性剤存在下で 60°C で 5 時間反応させると還元型および酸化型ポリスルフィドがスルフィドに還元された。これらは、メチレンブルー法にて定量可能であった。
- 9) 還元型ポリスルフィドの定量法であるアルキル化還元法のうち蛍光アルキル化剤を用いた測定法について、これまでに使用されていた 5-MAF を 5-IAF に変更することにより、より鋭敏に還元型ポリスルフィドを捕らえることに成功した。

以上、酸化型および還元型の両形態のポリスルフィドを定量する方法の確立に至った。特にタンパク質中の酸化型ポリスルフィドの検出法は世界に先駆けて樹立できたことから、これまで未解明であったようなポリスルフィドの検出や役割解明に貢献できると期待される。実際、これらの手法により、血清をはじめとする生体液中にポリスルフィドが含まれていること、特に HSA がポリスルフィドその多くを占めていることを明らかにした。以上の発見は、生体液のレドックスバランスをはじめとした恒常性維持解明に向けた有用な知見である。

### 第3章 HSA におけるポリスルフィドの機能解析

#### 第1節 序

酸化ストレスは、肝疾患や腎疾患や糖尿病、神経疾患など多様な疾病の発症や進展において重要な役割を果たしている。そのため、個々の酸化ストレス変動を日常的に評価することが、酸化ストレス関連疾患の早期発見において重要視されるようになってきた。これまでの酸化ストレス測定法の一つとして、タンパク質のシステイン残基やグルタチオンのSHの酸化度を定量的に解析する方法が汎用されているが、既に病的な酸化ストレスが進行した状態において変動する酸化ストレスマーカーであり、かなり疾患リスクが亢進してしまっている可能性が高い。そのため、疾患早期発見や予防の観点からは、より病態初期の段階を反映する鋭敏な酸化ストレスマーカーの開発が必要となる。

CysSS<sub>n</sub>H は CysSH と比較して抗酸化作用が顕著に高いことから、酸化ストレスに対してより鋭敏に反応することが想定される。したがって、EMSP 法や DTT-MB 法を用いたポリスルフィドの定量は、早期酸化ストレスの指標となることが期待される。しかしながら、これまで血清中のポリスルフィド定量法が確立されていなかったため、病態時におけるポリスルフィドレベルの変動については未だ不明である。本章の老齢マウスを用いた検討では、加齢によって血清ポリスルフィドが減少することが明らかになった。そこで、次章にてポリスルフィドの病態や酸化ストレスに対する応答について評価した。

緒論で述べたように、CysSSH の pKa は小さく反応性に富むために、還元型ポリスルフィドは一般的に高い抗酸化作用を有している。また、PTEN や PPAR $\gamma$ などの細胞内タンパク質では、CysSH に sulfane sulfur が付加して CysSS<sub>n</sub>H となることで生理活性を調節している。このように、還元型ポリスルフィドの特性や機能が明らかにされる一方で、酸化型ポリスルフィドの性質はほとんど分かっていない。仮に、酸化型ポリスルフィドが開裂して還元型ポリスルフィドに変化するのであれば、還元型ポリスルフィドと同様、高い抗酸化作用を発揮する可能性があり、酸化型ポリスルフィドも HSA の抗酸化防御系の一員として機能していることが想定される。加えて、17 対存在する HSA のジスルフィド結合 (RSSR') は、 $\alpha$ ヘリックスに富む HSA 固有の立体構造を保持する上で重要な役割を果たしていることから、ジスルフィド結合における sulfane sulfur の付加、すなわちポリスルフィド結合 (RSS<sub>n</sub>SR';  $n \geq 1$ ) の存在は、HSA の構造特性にも関与している可能性が十分考えられる。

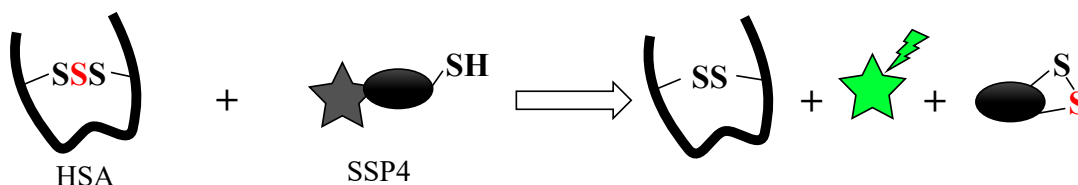
そこで本章では、HSA のポリスルフィドが酸化型のシステイン残基に含まれるか否かについて、アルキル化剤を応用したゲルシフト法により検討した。また、HSA のポリスルフ

イドの役割を、①抗酸化作用と②立体構造維持の2つの観点から解析した。

## 第2節 ポリスルフィドの引き抜きおよび構造活性評価

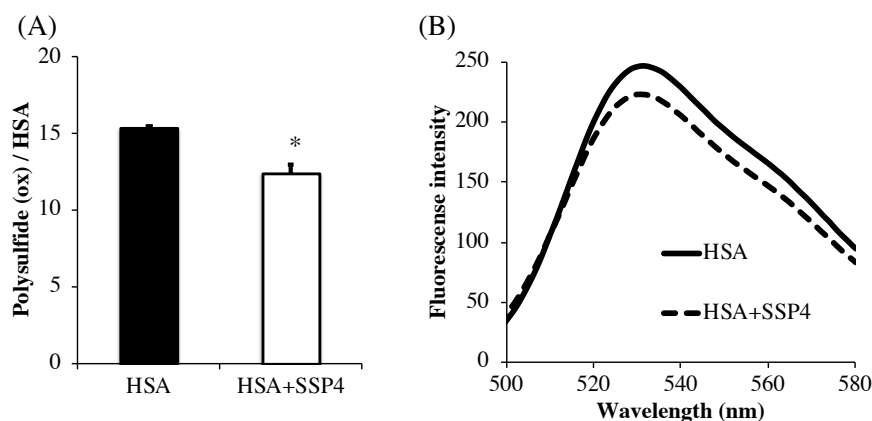
### 2-1 SSP4 による HSA 中ポリスルフィドの引き抜きおよび構造活性評価

ポリスルフィドの修飾度が異なる HSA を比較することで、HSA におけるポリスルフィドの機能解明を試みた。なお、ポリスルフィドの検出に使われる蛍光プローブ SSP は、ポリスルフィドを引き抜きプローブ自身に硫黄原子が結合することで、フルオレセインが外れて蛍光を示す。今回はこの現象を利用してポリスルフィド結合数が少ない HSA を作製し、未処理のものと比較した(Fig. 44)。具体的なプロトコルを以下に示す。



**Fig. 44 Preparation for polysulfide-removed HSA by SSP4.**

まず、HSA を SSP と室温で1時間反応させたのち、アセトン沈殿させ上清を除去した。次に、沈殿物をリン酸緩衝液 (PBS) にて再溶解させることで、反応した SSP 及び未反応の SSP を除去した。SSP によってどの程度ポリスルフィドが失われたかを確認するために、前章で構築した EMSP 法にて HSA 1 分子あたりのポリスルフィド結合数を測定したところ、平均で3個のポリスルフィドが取り除かれていることが判明した (Fig. 45A)。事実、この結果を反映して、SSP と反応させた際に発生する蛍光も減少していた (Fig. 45B)。

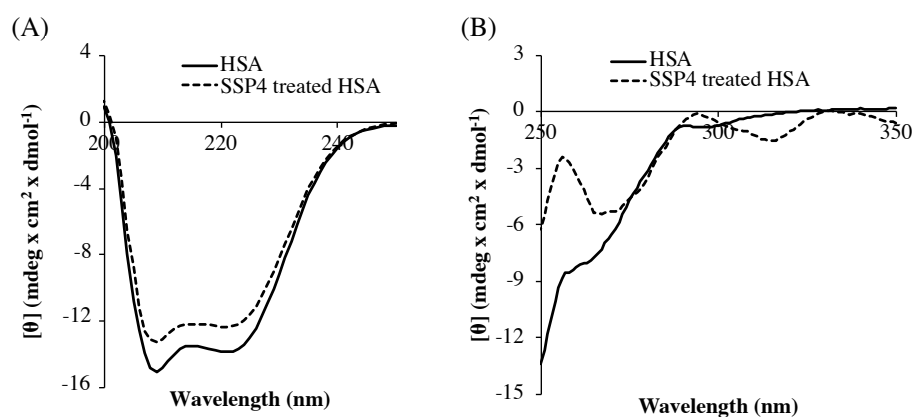


**Fig. 45 SSP4 decreased the number of polysulfide from HSA.**

HSA (150  $\mu$ M) were reacted with 1 mM of SSP4 for 1 hr at room temperature. After the reaction, abundant SSP4 were removed. (A) polysulfide contents were measured by EMSP. (B) Polysulfide in samples were detected by SSP4. Data were presented as means  $\pm$  S.D. \* $p < 0.05$  vs. HSA (n=3).

次に、HSA の立体構造特性に及ぼすポリスルフィドの役割を検討すべく、2-2 項で作製した SSP 処理 HSA の立体構造を解析した。まず、円二色性 (CD) スペクトルを測定したところ、二次構造 (Fig.46A) を反映する遠紫外領域及び三次構造 (Fig. 46B) を反映する近紫外領域のいずれにおいてもスペクトルに変化が観察された。Fig. 46A の 210–230 nm 付近のスペクトルはタンパク質の $\alpha$ ヘリックス含量を示していることから、ポリスルフィドの引き抜きによって、HSA の $\alpha$ ヘリックス含量が減少したことを示唆している。近紫外領域 (Fig. 46B) では、ジスルフィド構造に由来する 260 nm 近辺に特徴的な変化が観察されたことから、ポリスルフィドの引き抜きによってジスルフィド結合に何らかの変化をもたらした可能性が高いと考えられる。

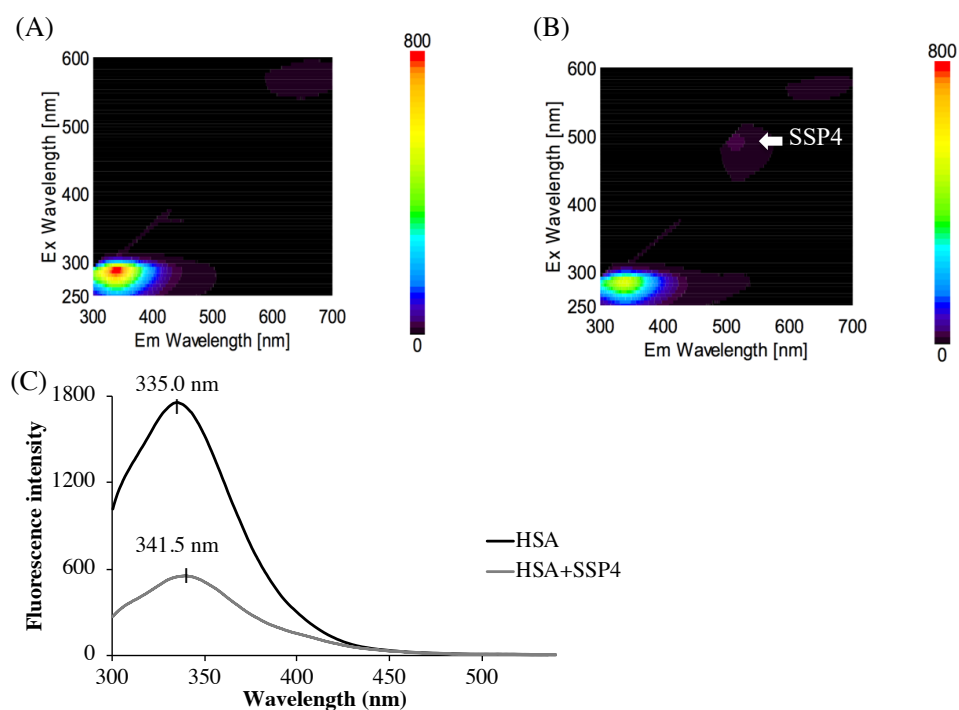




**Fig. 46 CD spectra of SSP4 treated HSA.**

(A) Far-UV spectra and (B) near-UV spectra of SSP4 treated HSA (10  $\mu$ M) were measured in PBS at room temperature.

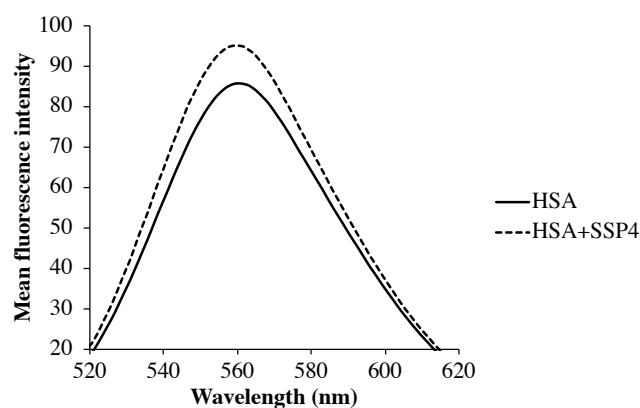
次に、CD スペクトル以外の構造特性に関する情報を得るべく、ポリスルフィドを除去した HSA のトリプトファンに由来する蛍光を測定した。トリプトファンは、280 nm の励起光によって蛍光を示す芳香族アミノ酸であり、HSA には 214 番目に唯一存在する。このトリプトファンは HSA の内側に存在し、HSA の構造が変化してトリプトファンが露出すると、運動エネルギーが大きくなることから、トリプトファンの蛍光が減弱し、波形も長波長側へシフトすることが報告されている。結果として、SSP 処理した HSA は未処理の HSA と比較してトリプトファンの蛍光が減少していた (Fig. 47AB)。また、そのピークも長波長側へとシフトしていた (Fig. 47C)。ここで、SSP4 由来の蛍光 (ex. 457 nm, em. 514 nm) はほとんど観察されなかったことから、SSP4 の除去に成功しており、HSA に SSP4 が結合したことで構造変化が惹起された可能性は小さいと推察される (Fig. 47B)。



**Fig. 47 Fluorescence of tryptophan in SSP4 treated HSA.**

3D fluorescence scanning of (A) HSA and (B) SSP4 treated HSA. (C) Absorption spectra with 295 nm excitation.

次に、疎水面に結合することで蛍光を発する疎水領域探索プローブである sypro orange を用いて構造特性を評価した。Sypro orange を HSA と反応させ、蛍光を測定したところ、SSP 処理群で蛍光の増大が僅かに観察され、ポリスルフィドを除去した HSA では、疎水面がより溶媒に露出していることが明らかとなった (Fig. 48)。

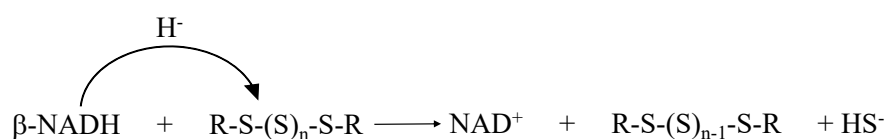


**Fig. 48 Effect of SSP4 treatment on the fluorescence of sypro orange.**

SSP4 treated HSA (10  $\mu$ M) was mixed with 500 time diluted sypro orange. The fluorescence was measured at ex. 470 nm, em. 520 – 620 nm.

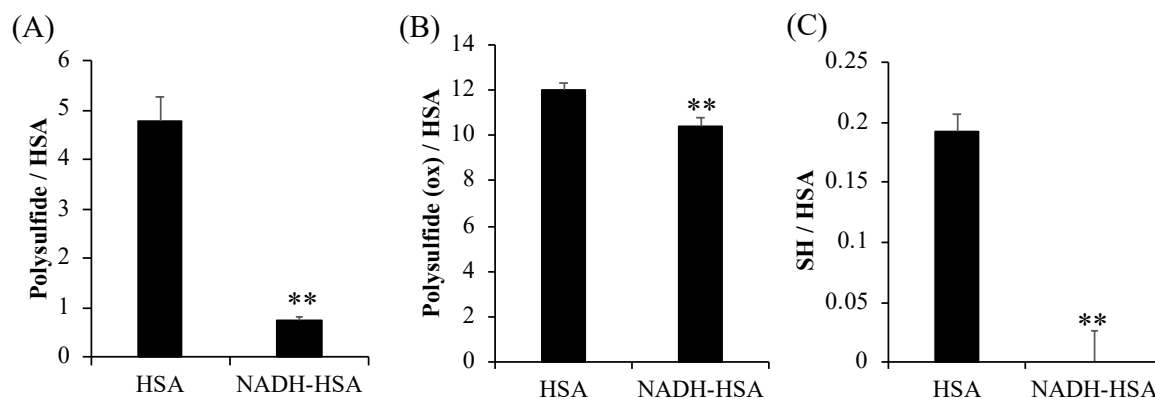
## 2-2 β-NADH によるポリスルフィドの引き抜きと構造活性

次に、β-Nicotinamide-adenine dinucleotide reduced form (β-NADH) によるポリスルフィドの引き抜きを試みた。Peng らは、β-NADH が生体内でポリスルフィドの還元を担っているのではないかと仮説立て、これをβ-NADH に類似した有機化合物である Hantzsch ester および 1-benzyl-1,4-dihydronicotinamide で証明した。Peng らによるβ-NADH とポリスルフィドの予想反応式を下記に示す。



(式 7) Reaction between NADH and polysulfide proposed by Peng<sup>49</sup>.

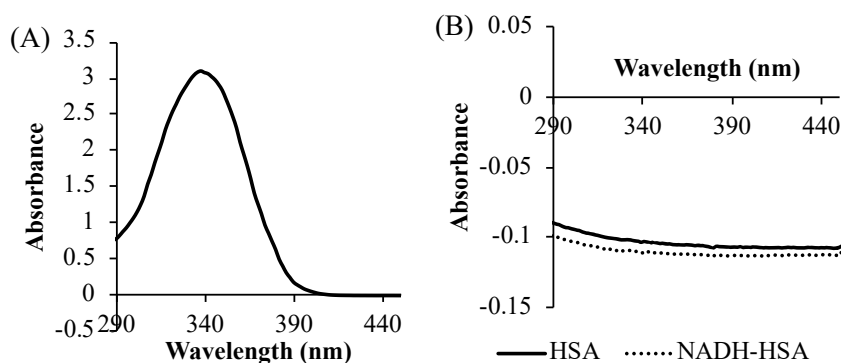
上記の反応が実際にβ-NADH で起これば、HSA のポリスルフィドの引き抜きにも応用できると考えられる。そこで、β-NADH が与える HSA ポリスルフィドへの影響を評価した。10 mg/mL の HSA に対し 100 mM のβ-NADH を 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 中で 24 時間反応させた。反応後、透析にてβ-NADH を除去し、ポリスルフィド量について評価した。以下、β-NADH 処理した HSA を NADH-HSA と表記する。DTT-MB (strong) および EMSP で定量されるポリスルフィドは、HSA 1 分子あたりそれぞれ約 4 個および約 2 個減少した (Fig. 49AB)。特に、DTT-MB にて検出されるポリスルフィドは、β-NADH 処理によりその多くを失っていることから、EMSP 法で測定されるポリスルフィドと比べて優先的にβ-NADH による還元を受けることが示唆された。このとき、DTNB 法を用いてチオールを定量したところ、HSA 1 分子あたりの SH は減少しており、少なくともシステイン間の結合の開裂は生じていないことが示された (Fig. 49C)。以上、β-NADH は HSA のポリスルフィドを式 7 のように引き抜くことが示された。



**Fig. 49 Sulfur parameters of β-NADH-HSA.**

Amount of polysulfide measured using by (A) DTT-MB (strong) and (B) EMSP. (C) Thiol contents of β-NADH-HSA. Data were presented as means ± S.D.

β-NADH は、約 340 nm に吸収を持つことが知られている。そこで、β-NADH 処理後の HSA にβ-NADH が残存していないことを確認するため、吸収スペクトルを測定した。その結果、Fig. 50A で示されるようなβ-NADH のスペクトルは、NADH-HSA 試料中には観察されなかった (Fig. 50B)。したがって、以降の実験に残存したβ-NADH が影響を与える可能性は極めて低いと言える。

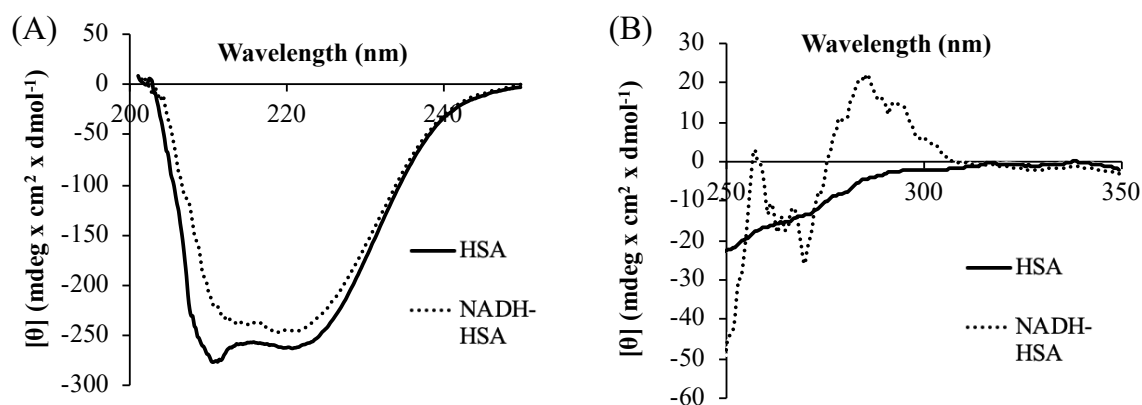


**Fig. 50 Absorption spectra of NADH-HSA.**

Absorption spectra of (A) β-NADH (100 μM) and (B) HSA or NADH-HSA (10 μM) measured by microplate reader.

そこで、β-NADH の構造活性について評価した。まず、円二色性 (CD) スペクトルを測定した。その結果、二次構造を示す 200-250 nm の近赤外領域において、αヘリックス含量の減少が観察された (Fig. 51A)。また、三次構造を示す 250-350 nm の遠赤外領域において

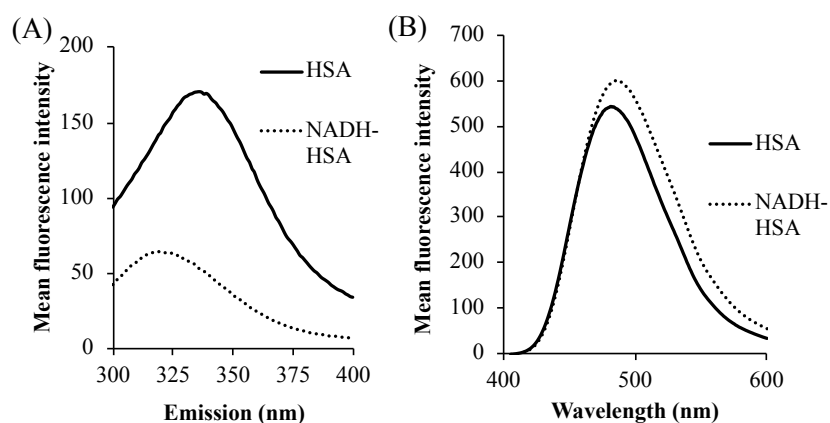
も、258 nm および 286 nm をピークとする山や 270 nm をピークとする谷など、スペクトルの変化が観察された (Fig. 51B)。



**Fig. 51 CD spectra of  $\beta$ -NADH-HSA.**

(A) Far-UV spectra and (B) near-UV spectra of NADH-HSA (10  $\mu$ M) were measured in PBS at room temperature.

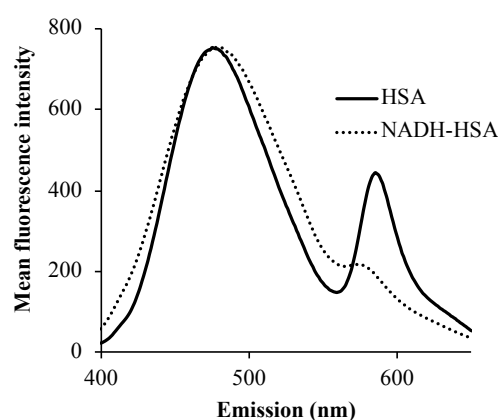
次に、構造の変化を疎水面の HSA 内部のトリプトファンの蛍光を測定したところ、 $\beta$ -NADH 処理により蛍光の消光が観察され、トリプトファンの露出が示された (Fig. 52A)。また、疎水面に結合して蛍光を示すプローブである bis-ANS を反応させたところ、HSA と反応した際の蛍光に対し、 $\beta$ -NADH-HSA との反応により得られた蛍光が高かったことから、疎水面の露出が示唆された (Fig. 52B)。したがって、SSP4 処理同様、 $\beta$ -NADH 処理によっても HSA の 3 次構造が変化していることが示唆された。



**Fig. 52 Structural analysis of  $\beta$ -NADH-HSA.**

(A) Fluorescence of tryptophane of HSA and  $\beta$ -NADH-HSA (10  $\mu$ M). (B) Fluorescence of HSA and  $\beta$ -NADH-HSA with bis-ANS.

HSA にはサイト I とサイト II と呼ばれる薬物結合ポケットが存在する。そこで、それぞれサイト I、サイト II に特異的に結合して蛍光を示すプローブであるダンシルアミドおよび BD140 を用いて  $\beta$ -NADH-HSA の薬物結合能を評価した。その結果、 $\beta$ -NADH-HSA では、485 nm の蛍光をピークとするダンシルアミドの蛍光は HSA とほとんど変わらなかったのに対し、590 nm をピークとする BD140 の結合活性が著しく減少していた (Fig.53)。従って、NADH により引き抜かれるポリスルフィドは、HSA の特にサイト II 近傍の構造維持に重要な役割を担っていることが示唆された。なお、未処理の HSA に BD140 を結合させ、50 倍以上量の  $\beta$ -NADH を加えても BD140 の蛍光は全く変化しなかったことから、残存した  $\beta$ -NADH が HSA のサイト II へ結合した結果ではないことを確認している。



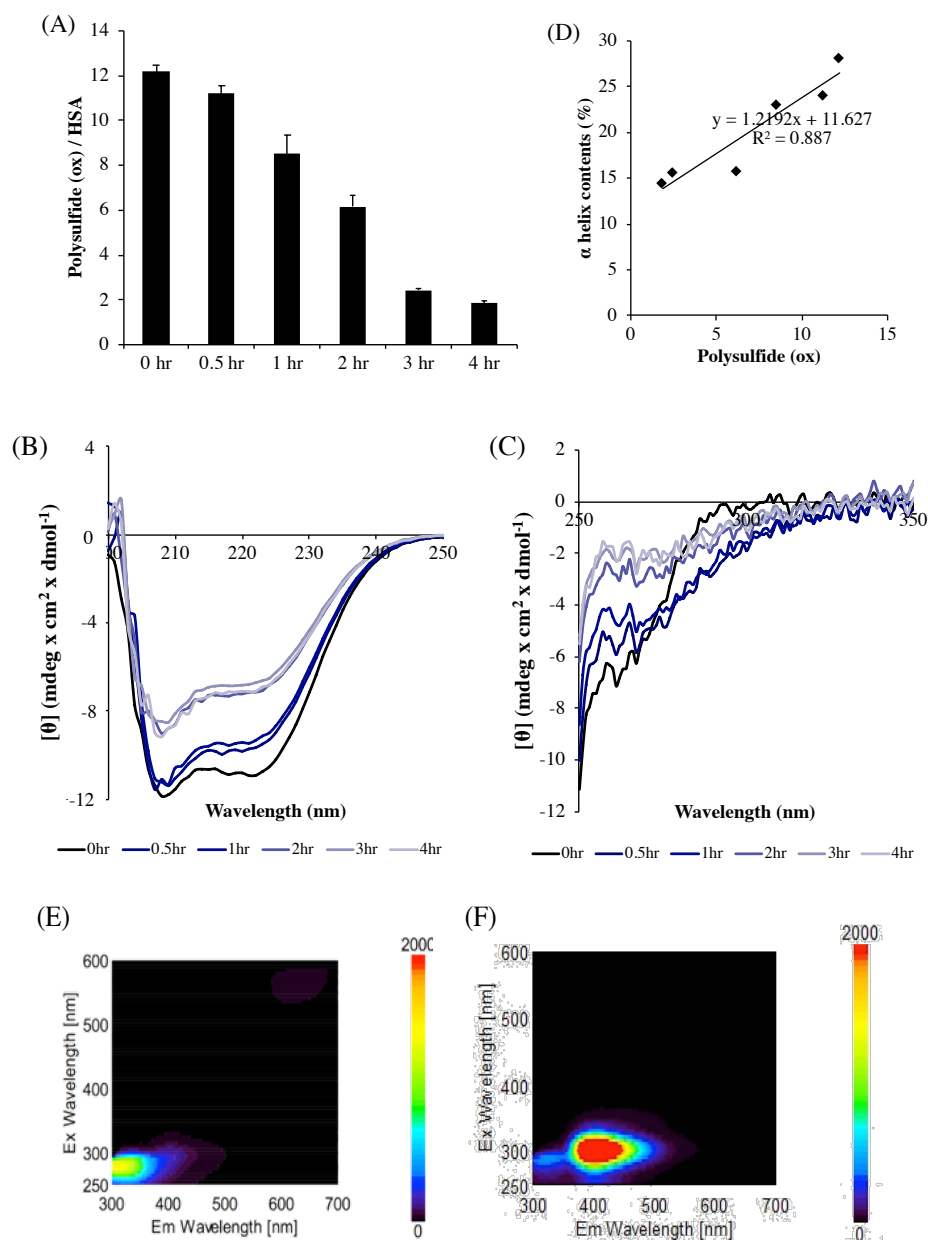
**Fig. 53 Binding efficacy of dansylamide and BD140 to  $\beta$ -NADH-HSA.**

Emission spectra of dansylamide ( $\lambda_{\text{max}} = 480 \text{ nm}$ ) and BD140 ( $\lambda_{\text{max}} = 585 \text{ nm}$ ) with HSA (straight) and  $\beta$ -NADH-HSA (dash) was measured by a microplate reader.  $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ .

### 2-3 SAOB にてポリスルフィドを遊離させた HSA の構造活性評価

他のポリスルフィドの引き抜き方法として、前章で用いたアスコルビン酸および塩基に着目した。EMSP で酸化型ポリスルフィドを定量する際に処理するものと同条件で HSA にアスコルビン酸および水酸化カリウムを処理し、透析したところ、不可逆的な凝集体ができてしまった。そこで、より穏やかにポリスルフィドを取り除くために、SAOB を用いた。SAOB は、アスコルビン酸やサリチル酸ナトリウムで構成され、ポリスルフィドをスルフィドに還元する緩衝液である。そこで、HSA を経時的に SAOB と反応させることで、ポリスルフィドの引き抜き数の異なる HSA を調製した (Fig. 54A)。ここで、各時間 SAOB 処理した HSA の構造活性について、CD スペクトルを測定したところ、SSP4 による引き抜き同様に、遠紫外線領域における  $\alpha$ -ヘリックス含量の減少や 260 nm 付近のスペクトルの変化が観察された (Fig. 54BC)。また、残存したポリスルフィドの数と  $\alpha$ -ヘリックス含量は正の

相関を示した (Fig.54D)。さらに、トリプトファンの蛍光の変化も観察された (Fig.54EF)。ここで、トリプトファンの蛍光と別に ex. 310 nm、em. 400 nm 付近に強い蛍光が観察されたが、これは残存したサリチル酸ナトリウム由来の蛍光であると推察される。

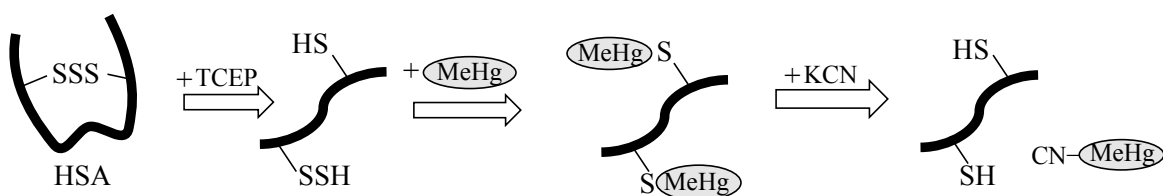


**Fig. 54 Structural change by removing polysulfide with SAOB.**

(A) Numbers of liberated sulfide from HSA reacted with SAOB were analyzed by EMSP. Data were presented as means  $\pm$  SD. (B) Far-UV spectra and (C) near-UV spectra of SAOB treated HSA (10  $\mu$ M) were measured in PBS at room temperature. (D) Correlation between  $\alpha$  helix contents and liberated polysulfide. 3D fluorescence scanning of (E) HSA and (F) HSA with treated SAOB for 4 hr.

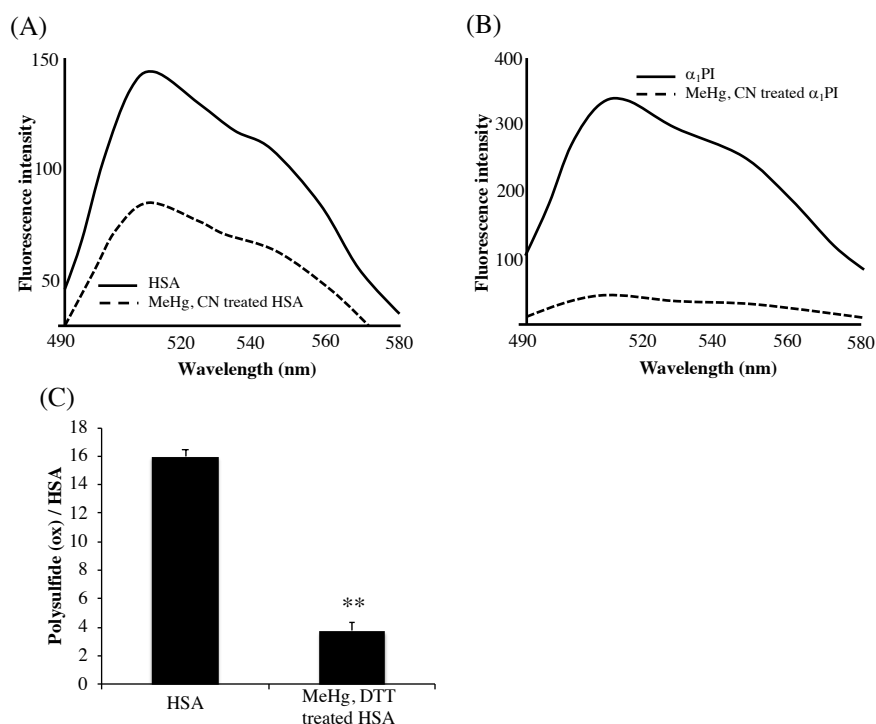
## 2-4 メチル水銀 (MeHg)および CN を用いたポリスルフィド脱離による構造変化

次に、MeHg 及び CN により、HSA からポリスルフィドの脱離を試みた。MeHg は求電子性が高く、SSH と反応させた際にポリスルフィドを脱離し、最終的にチオールに MeHg が結合した状態を取ることが報告されている。さらに RS-MeHg は CN-MeHg を生成物として CN による還元を受け、RSH となる (Fig.55)。そこでこの反応を利用し、HSA からポリスルフィドを引き抜いた HSA を調製した。その際、分子内にジスルフィド結合を持たず、遊離のシステインを1つ有する $\alpha_1$ アンチトリプシン( $\alpha_1$ PI)をネガティブコントロールのタンパク質として使用した。



**Fig. 55 Reduction of polysulfide by MeHg and CN.**

まず、MeHg 及び CN によってポリスルフィドが引き抜かれたことを、ポリスルフィド検出蛍光プローブである SSP2 と反応させることによって確認した。その結果、HSA 及び  $\alpha_1$ PI のいずれにおいても、ポリスルフィドの引き抜きが観察された (Fig.56)。



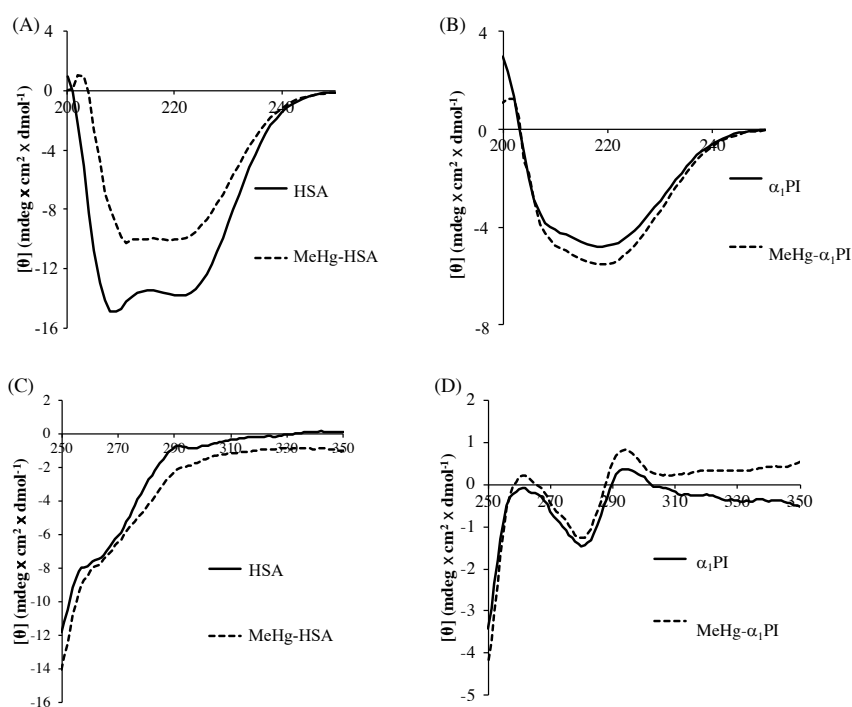


**Fig. 56 Change a polysulfide level by MeHg and CN.**

Fluorescence of SSP2 with MeHg and CN treated HSA (A) and  $\alpha_1$ PI (B) were detected on ex/em 457 nm/490-580 nm. (C) Numbers of polysulfide were analyzed by EMSP. Data were presented as means  $\pm$  S.D.\*\*p<0.01 vs. HSA. n=3.

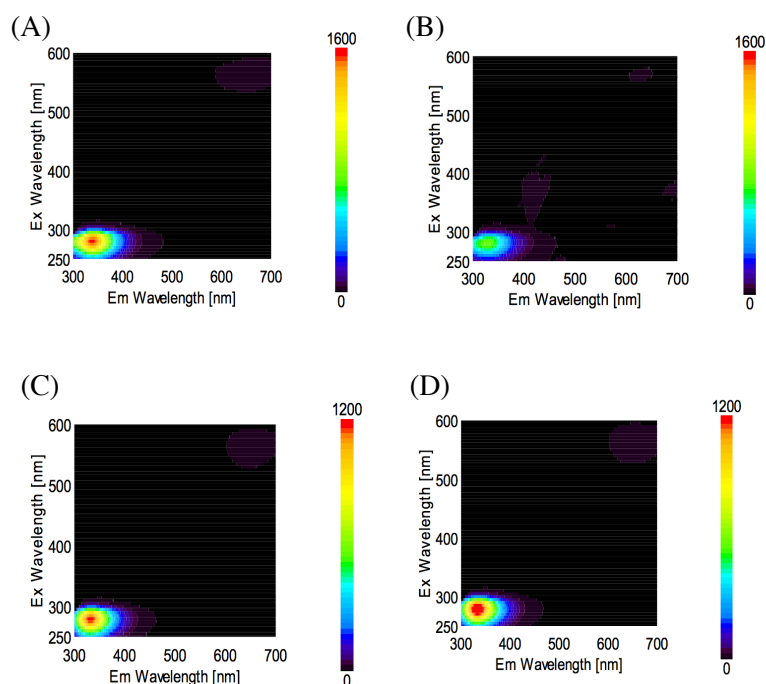
次に、同サンプルの構造活性を CD スペクトルによって評価した。その結果、分子内にジスルフィド結合を持たない $\alpha_1$ PI では、MeHg と CN で処理しても立体構造の変化は観察されなかった。対照的に、HSA では、MeHg と CN の反応により $\alpha$ ヘリックス含量の低下が観察された (Fig. 57A,B)。また、3 次構造を示す近紫外線領域においては 290 nm 付近のスペクトルの変化が見られたが、前項の SAOB による引き抜きと比較するとその変化はわずかであった (Fig. 57C,D)。

同様に、同サンプルのトリプトファンに由来する蛍光スペクトルを測定したところ、 $\alpha_1$ PI でトリプトファン蛍光の変化は観察されなかった一方で、HSA のトリプトファン蛍光は MeHg 及び CN との反応によって顕著に消光した (Fig. 58)。



**Fig. 57 Change a CD spectra by MeHg and CN.**

Far-UV spectra and (C) near-UV spectra of MeHg and CN treated HSA and  $\alpha_1$ PI (10  $\mu$ M) were measured in PBS at room temperature.

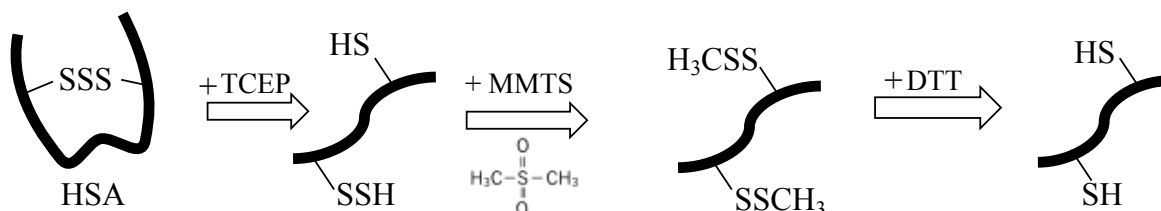


**Fig. 58 Change a fluorescence of tryptophan by MeHg and CN.**

3D fluorescence scanning of (A) HSA, (B) MeHg and CN treated HSA, (C)  $\alpha_1$ PI and (D) MeHg-CN treated  $\alpha_1$ PI.

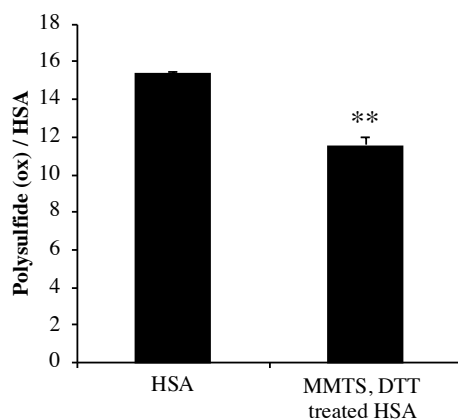
## 2-5 アルキル化還元法を用いたポリスルフィドの引き抜きによる構造変化

最後に、SH 基を標的としたアルキル化剤である methyl methanethiosulfonate (MMTS)及び還元剤 DTT を用いたポリスルフィドの引き抜きを試みた。MeHg 同様、MMTS は SSH と反応する結果、ポリスルフィドを脱離し RS-MMTS の様式で結合することが知られている<sup>50, 51</sup>。その後、RS-MMTS は DTT と反応させることによって遊離するため、RSH へと還元される (Fig. 59)。



**Fig. 59 Reduction of polysulfide by MMTS and DTT.**

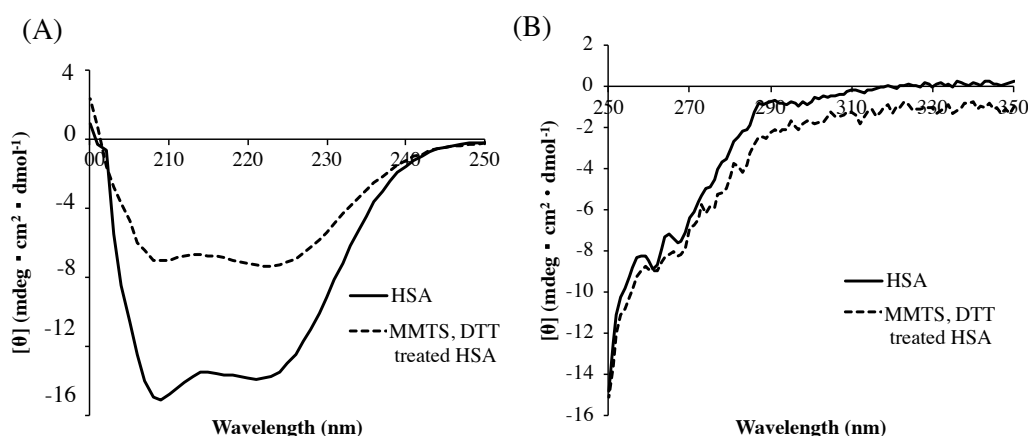
まず、MMTS 及び DTT 処理によってポリスルフィドが HSA から遊離されるか否かについて EMSP 法による検討を行った。その結果、MMTS 及び DTT 処理により、HSA 1 分子あたり 4 つのポリスルフィドが遊離することが示された (Fig. 60)。



**Fig. 60 Elimination of polysulfide from HSA with MMTS and DTT.**

Polysulfide concentration was analyzed by EMSP. Data were presented as means  $\pm$  S.D. \*\* $p < 0.01$  vs. HSA.  $n=3$ .

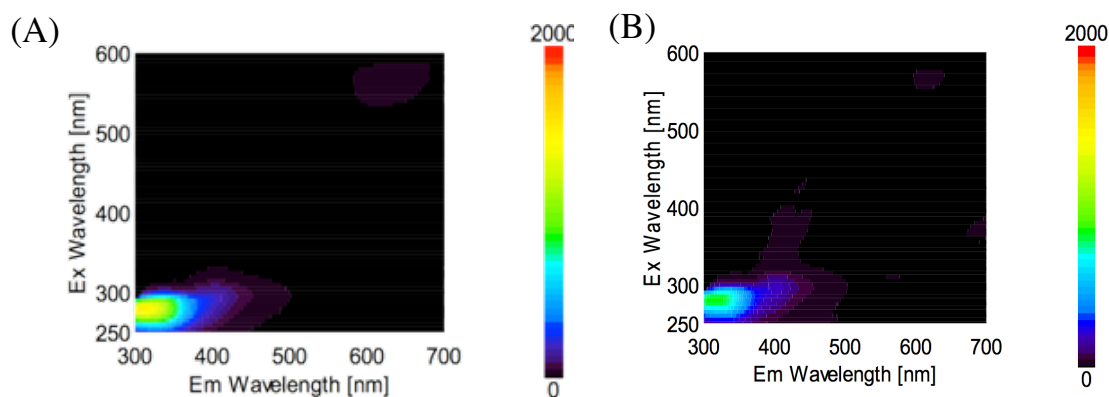
次に、得られたサンプルの立体構造を測定した。CD スペクトル解析の結果、MMTS 及び DTT 処理 HSA では、 $\alpha$ ヘリックス含量の低下が観察された (Fig. 61A)。近紫外領域における CD スペクトルの変化は認められなかった (Fig. 61B)。



**Fig. 61 Change CD spectra by MMTS and DTT.**

The CD spectra of (A) HSA, (B) MMTS-DTT treated HSA (10  $\mu$ M) were measured in PBS at room temperature.

次に、トリプトファン由来の蛍光を測定したところ、MMTS 及び DTT 処理 HSA で蛍光の減少が観察された (Fig. 62)。これらの結果から、MMTS 及び DTT によるアルキル化・還元によるポリスルフィドの引き抜きでも、HSA の構造変化を惹起することが示唆された。

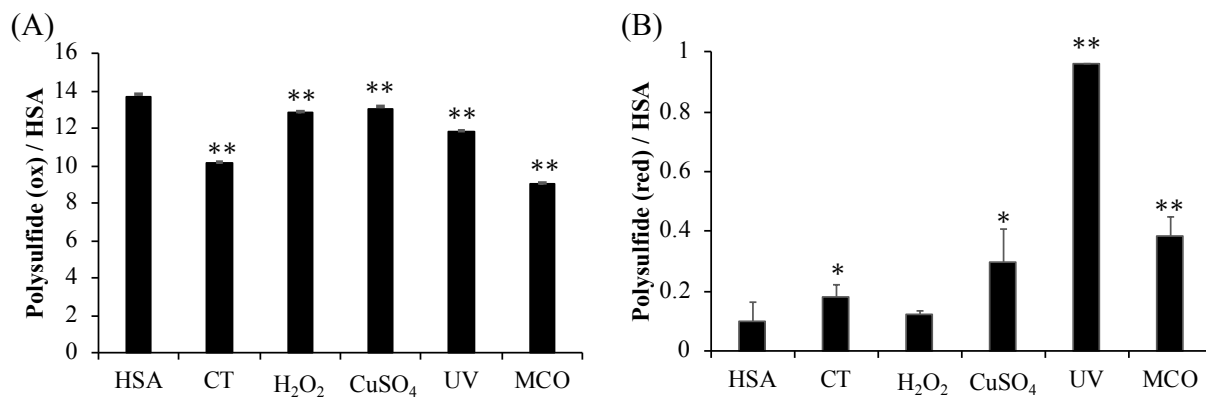


**Fig. 62 Change a fluorescence of tryptophan by MMTS and DTT.**

3D fluorescence scanning of (A) MMTS, (B) MMTS and DTT treated HSA.

### 第3節 酸化ストレスが及ぼす HSA ポリスルフィドの変化

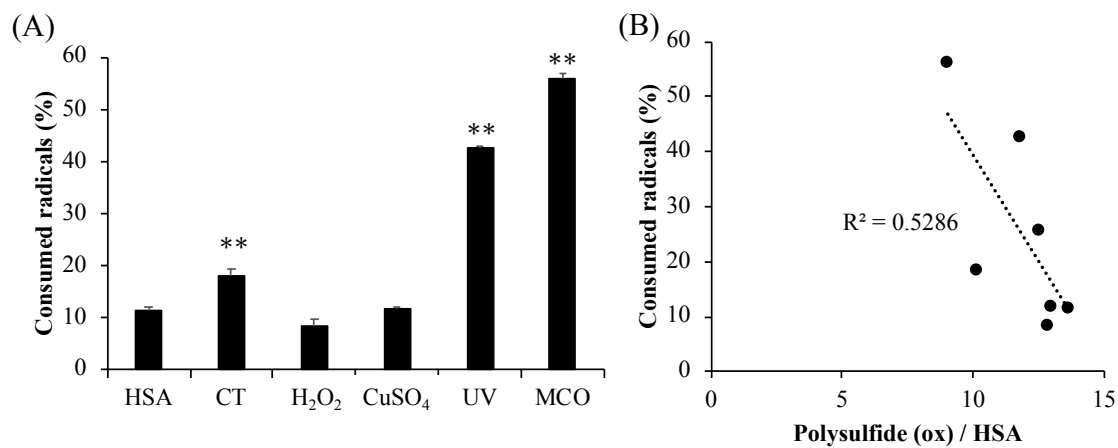
次に、酸化ストレスに対する HSA ポリスルフィドの応答について評価した。生体が酸化ストレスを受けると、HSA が酸化修飾を受けることが報告されている<sup>27,52</sup>。そこで、既報に従って酸化 HSA を作製し、ポリスルフィドの変化を評価した。既報に従い、HSA をクロラミン T (CT)<sup>53</sup>、過酸化水素 ( $H_2O_2$ )<sup>54</sup>、硫酸銅<sup>55</sup>、紫外線 (UV)<sup>56</sup>、金属触媒酸化 (MCO)<sup>57, 58</sup> にて酸化させた。それぞれのポリスルフィド含量を評価した。その結果、EMSP で観察される酸化型ポリスルフィドは全ての酸化方法によって減少した (Fig. 63A)。また、DTT-MB (weak) によって還元型ポリスルフィドを求めたところ、還元型ポリスルフィドは、クロラミン T や  $CuSO_4$ 、UV、MCO による酸化によって増加していた (Fig. 63B)。

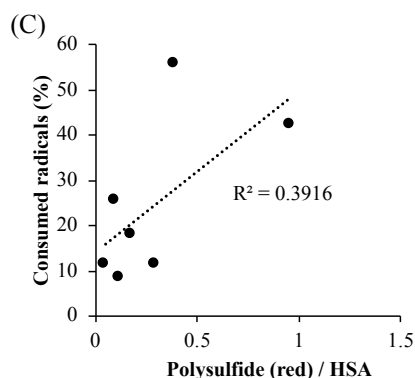


**Fig. 63 Change of HSA polysulfide by oxidation.**

Polysulfide of oxidized HSA was measured by (A) EMSP and (B) DTT-MB (weak). Data were presented as means  $\pm$  SD. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 vs. HSA (n=3).

そこで次に、酸化 HSA の抗酸化作用を DPPH ラジカル試験にて評価した。驚くべきことに CT や UV、MCO による酸化にて DPPH ラジカル消去活性が上昇していた (Fig. 64)。各ポリスルフィドとラジカル消去活性の相関関係を調べたところ、EMSP で検出されるポリスルフィドは抗酸化活性に対し負の相関を、DTT-MB (weak) で検出されるポリスルフィドは正の相関を示した (Fig. 64BC)。

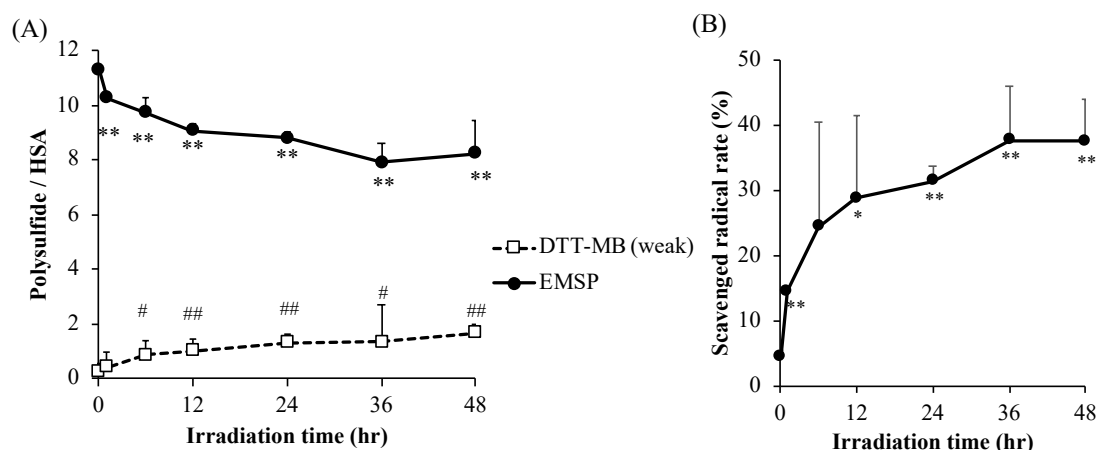




**Fig. 64 Anti-oxidant activities of oxidized HSA and relationship between polysulfide.**

(A) DPPH radical were measured in the presence of oxidized HSA. Data were presented as means  $\pm$  S.D. \*\* $p < 0.01$  vs. HSA.  $n=3$ . Correlations between anti-oxidant effect and polysulfide measured by (B) EMSP and (C) DTT-MB (weak).

次に、UV による酸化について、経時的な変化を観察した。254 nm の紫外線を HSA に照射し、経時的にポリスルフィドを測定した。その結果、DTT-MB (weak) にて検出される還元型ポリスルフィドは照射時間依存的に増えた一方、EMSP にて測定される酸化型ポリスルフィドは減少した (Fig. 65A)。この時の HSA の抗酸化作用について、DPPH ラジカル消去試験にて評価したところ、照射時間が長くなるにつれて、HSA の DPPH ラジカル消去率は高くなった (Fig. 65B)。

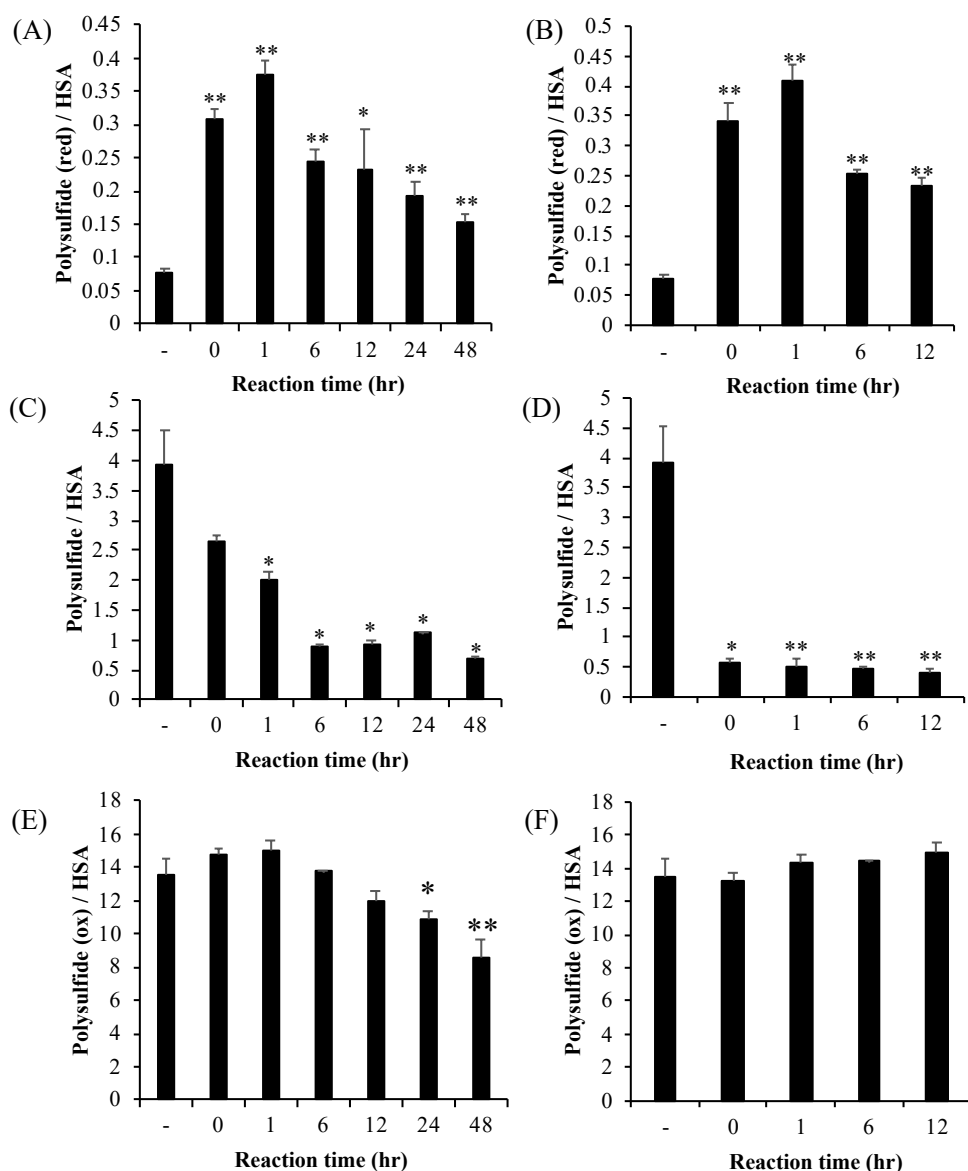


**Fig. 65 Effect of UV irradiation on HSA polysulfide.**

(A) HSA in PBS was irradiated of 254 nm of UV and the contents of polysulfide was measured using by DTT-MB (weak) and EMSP. (B) Radical scavenging activities of UV-irradiated HSA was measured using by DPPH. Data were presented as means  $\pm$  S.D. \*\* $p < 0.01$  vs. HSA.  $n=3$ .

そこで次に、CT と MCO による酸化について、継時的な変化を測定した。その結果、CT による酸化により、DTT-MB (weak) にて検出されるポリスルフィドは 1 時間をピークに増加し、その後減少した (Fig. 66A)。MCO による酸化の場合も同様に酸化開始から 1 時間後に最も還元型ポリスルフィドが高いことが示された (Fig. 66B)。DTT-MB (strong) で測定されるポリスルフィド量および EMSP で測定される酸化型ポリスルフィドは CT との反応により継時的に減少した (Fig. 66CE)。MCO による酸化においては、酸化開始直後から DTT-MB (strong) により測定されるポリスルフィドが減少した一方、酸化型ポリスルフィドは変化しなかった (Fig. 66DF)。

UV を HSA に照射した際は、酸化型ポリスルフィドの減少量と還元型のポリスルフィドの増加量はほぼ同程度であった。また、還元型ポリスルフィドは 48 時間の照射の間で一定の割合で増加を続けた (Fig. 65A)。一方、CT や MCO によって酸化した際は、一度増加した還元型ポリスルフィドは、時間経過と共に減少し続けた (Fig. 66AB)。この違いについて、還元型ポリスルフィドがまた MCO による酸化を受けると HSA のチロシンが酸化されることが報告されている<sup>59</sup>。チロシンは還元型ポリスルフィドを安定化させることから<sup>42</sup>、MCO によりチロシンが酸化されることによって、ポリスルフィドが失われていった可能性も考えられる。



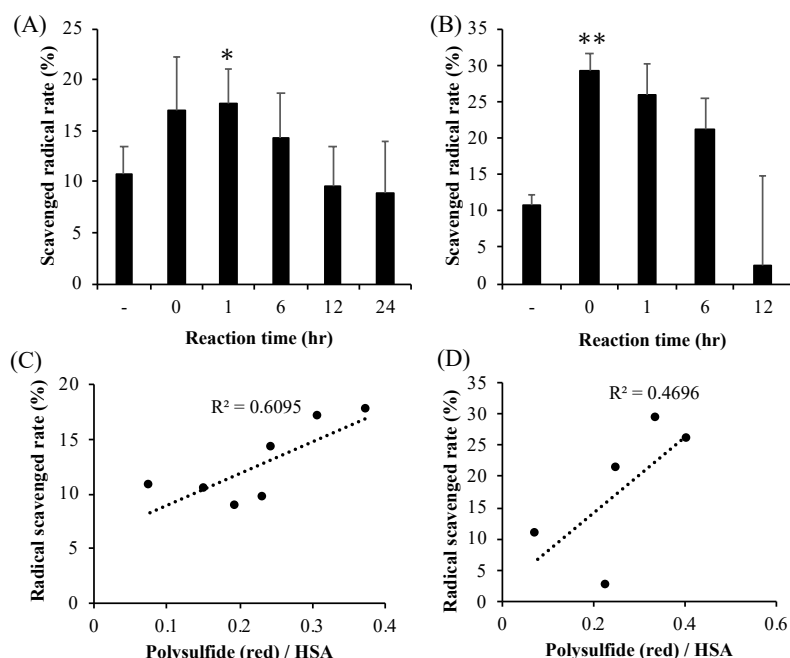
**Fig. 66 Shift of polysulfide contents in HSA by oxidation.**

HSA was oxidized by (A) CT or (B) MCO and the contents of polysulfide in a reduced form were measured using by DTT-MB (weak). HSA was oxidized by (C) CT or (D) MCO and the contents of polysulfide were measured using by DTT-MB (strong). HSA was oxidized by (C) CT or (D) MCO and the contents of polysulfide in a oxidized form were measured using by EMSP. Data were presented as means  $\pm$  S.D. \*\*p<0.01 vs. untreated HSA. n=3.

また、この時の抗酸化活性について、DPPH ラジカル消去試験により評価した。その結果、CTによる酸化開始から1時間後に抗酸化作用の増加が確認された (Fig. 67A)。MCOによる酸化の場合は、酸化直後よりHSAの抗酸化活性が増加した (Fig. 67B)。いずれの場合も、



酸化剤との反応が長くなるにつれ、獲得した抗酸化活性は減弱した。還元型ポリスルフィド量と DPPH ラジカルの消去活性を比較したところ、それぞれ正の相関関係が得られた (Fig. 67CD)。

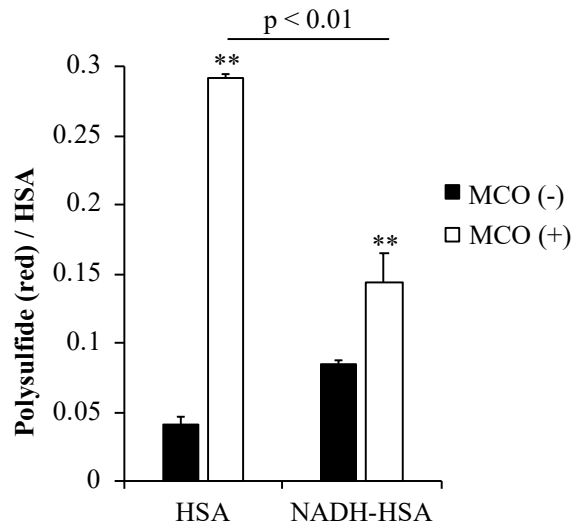


**Fig. 67 Change of the antioxidative activity of HSA by oxidation.**

Radical scavenging activity of HSA oxidized by (A) CT and (B) MCO. Comparison of anti-oxidative activity with polysulfide in an reduced form of HSA oxidized by (C) CT and (D) MCO.

次に、 $\beta$ -NADH-HSA のを酸化させた際の還元型ポリスルフィドについて、DTT-MB (weak) によって評価した。HSA および $\beta$ -NADH-HSA を MCO にて酸化させ、ポリスルフィド量を DTT-MB (weak) にて評価した。その結果、 $\beta$ -NADH-HSA が MCO 酸化により獲得したポリスルフィドは HSA と比較して有意に少なかった (Fig. 68)。よって、 $\beta$ -NADH が引き抜く酸化型ポリスルフィドの一部が酸化により獲得する還元型ポリスルフィドの供給源になっていることが示された。

以上の結果により、酸化型ポリスルフィドが酸化により、開裂または硫黄の転移を介して還元型ポリスルフィドとなっていることが示唆された。

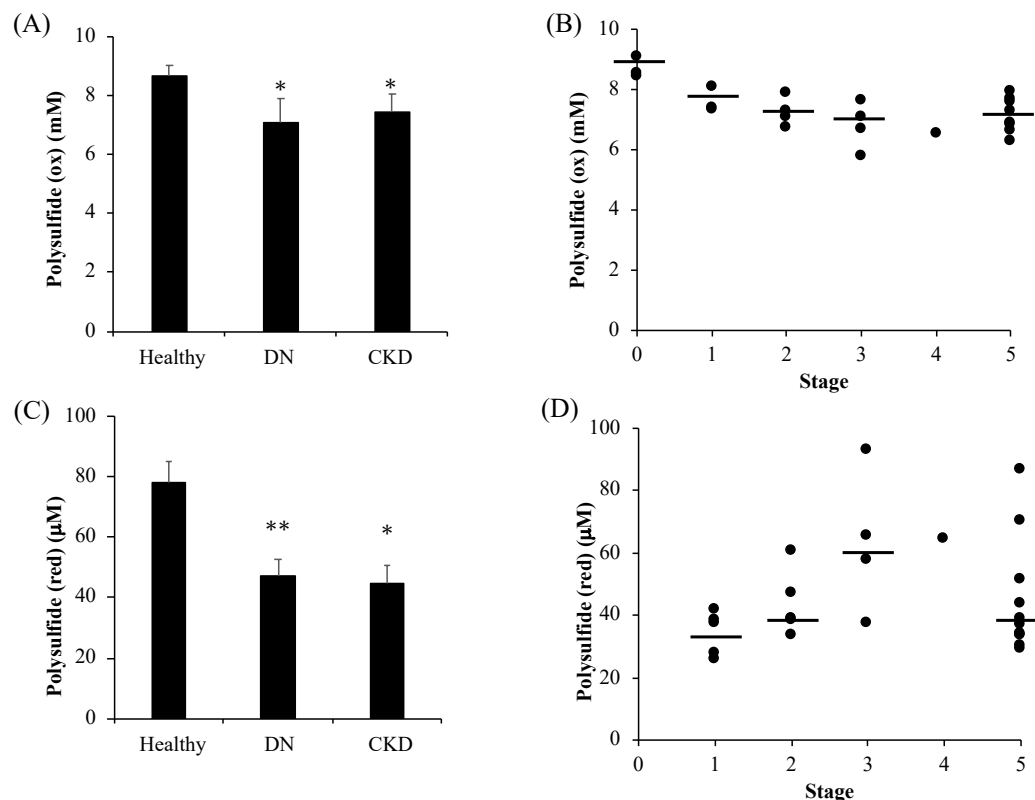


**Fig. 68 Levels of polysulfide of oxidized NADH-HSA.**

NADH-HSA was oxidized by MCO and measured the levels of polysulfide by DTT-MB (weak). Data were presented as means  $\pm$  SD. \*\* $p < 0.01$  vs. MCO (-).  $n = 3$ .

#### 第4節 酸化ストレス関連疾患患者血清における血清ポリスルフィドの変化

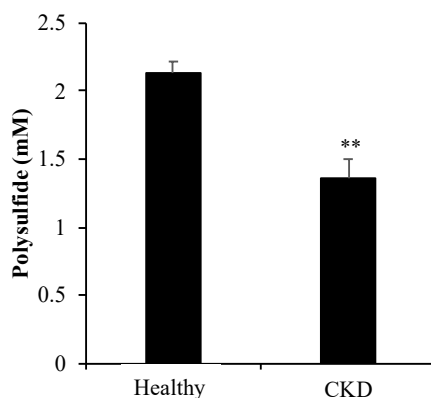
次に、ヒト血清中ポリスルフィドの酸化ストレス応答について評価した。腎障害のステージが1-4の糖尿病性腎症 (DN) 患者およびステージ5の透析導入慢性腎不全患者 (CKD) 血清のポリスルフィド含量を健常血清と比較した。その結果、EMSP 法にて測定される酸化型ポリスルフィド含量は、各病態において有意に少なかった (Fig. 69A)。また、糖尿病性腎症においては、腎障害のステージが進行するにつれ、ポリスルフィドは少ない傾向が得られた (Fig. 69B)。同様に DTT-MB (weak) にて還元型ポリスルフィド濃度を求めたところ、どちらの病態でも健常血清と比較して有意に少なかった (Fig. 69C)。興味深いことに、腎障害の重症度ごとに評価すると、病態にてステージ1より還元型ポリスルフィドは減少するものの、ステージ1-3にて還元型ポリスルフィドは病態進行に伴い上昇し、さらにステージが進行すると再び減少するという傾向が得られた (Fig. 69D)。



**Fig. 69 Polysulfide levels of patients' sera.**

Polysulfide in sera were measured by (A)(B) EMSP and (C)(D) DTT-MB (weak). Data were presented as means  $\pm$  S.D. \*\* $p < 0.01$  vs. Healthy subjects.

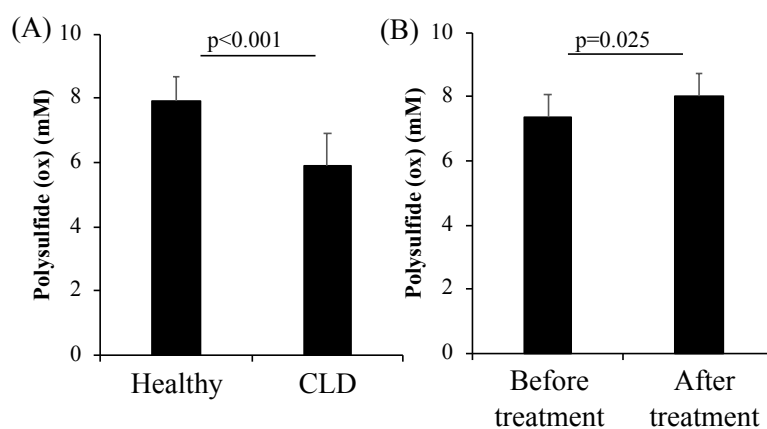
Fig.69にて測定したDN患者血清について、DTT-MB (strong) による測定も試みた。しかし、メチレンブルーの吸光度は検出限界以下で測定することができなかった。その原因として、血清にクエン酸緩衝液が存在していたことが挙げられる。CKD患者については、クエン酸が入っていない血清を用いたので、測定することができた。その結果、DTT-MB (strong) で測定されるDN患者血清中のポリスルフィド濃度は、健常血清と比較して優位に少なかった (Fig. 70)。また、減少した割合はFig. 69AでEMSPにて測定した酸化型ポリスルフィドの場合よりも大きかった。



**Fig. 70 Change the level of polysulfide in serum of CKD patients.**

The levels of polysulfide of sera were measured using DTT-MB (strong). Data were presented as means  $\pm$  S.D. \*\* $p < 0.01$  vs. Healthy subjects.

酸化型ポリスルフィドの減少は、肝硬変患者血清や ICU 入院患者血清でも観察された (Fig. 71AB)。ICU 入院患者においては、退院後の回復も観察された (Fig. 71B)。



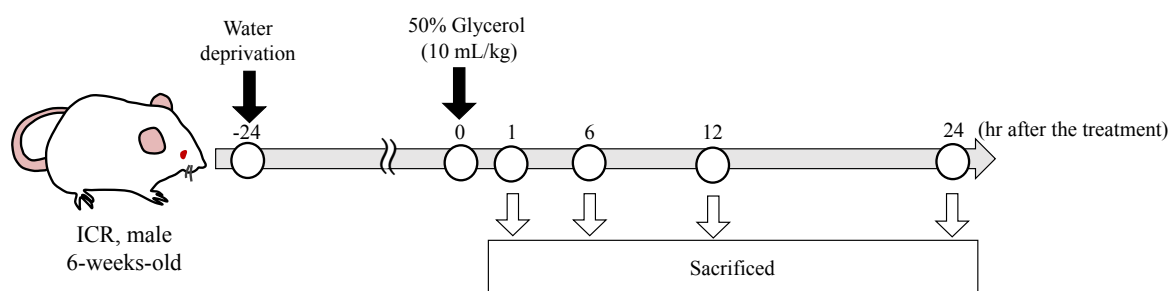
**Fig. 71 Polysulfide contents of CLD patients and ICU-inpatients.**

Polysulfide in sera of (A) CLD and (B) ICU-inpatients were measured by EMSP. Data were presented as means  $\pm$  S.D.

## 第5節 急性腎障害モデルマウスにおける血清ポリスルフィドの変化

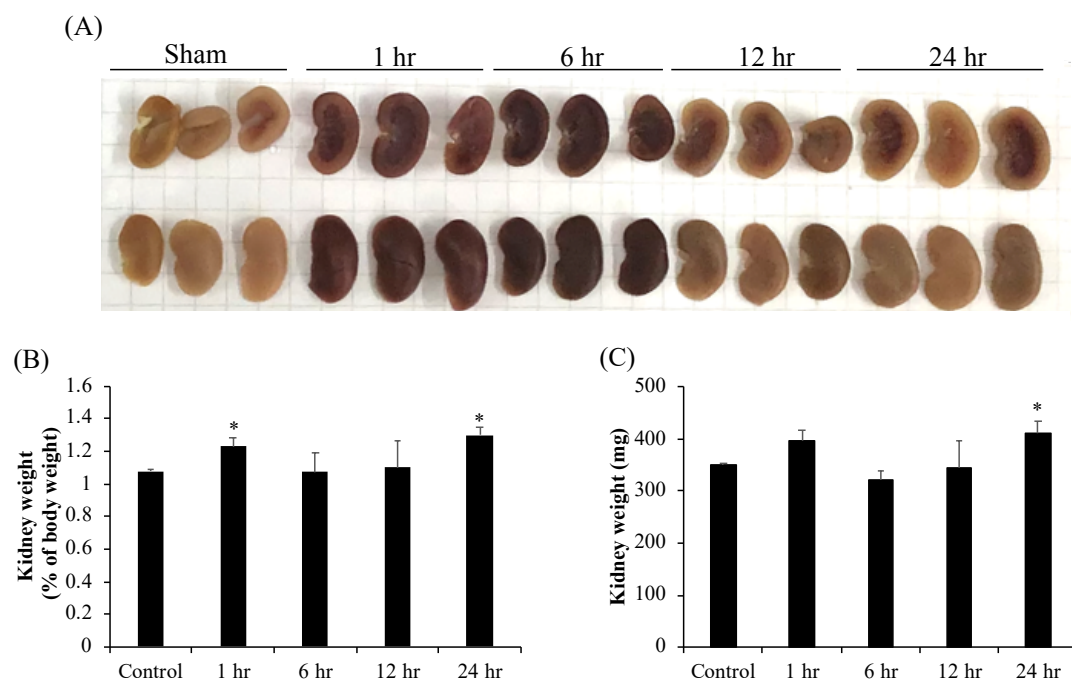
以上、慢性腎不全や慢性肝障害などの酸化ストレス関連疾患患者血清中のポリスルフィドが変化していることが示された。そこで次に、急性期のポリスルフィドの変化について評価すべく、急性腎障害のモデルマウスを作製し、検討を行った。グリセロールの筋肉内投与で惹起される横紋筋融解症誘発の急性腎障害について評価した。本モデルでは、グリセロール投与により生じる浸透圧で筋肉が融解してミオグロビンが血中に遊離し、これが酸化ストレスを惹起することで、腎臓が障害される。これまでの報告により、グリセロール投与後1時間後をピークに血中の酸化ストレスが高まり、さらに23時間後に腎障害の所見が得られることが分かっている。そこで、本モデルマウスにおけるポリスルフィドの濃度や形態の変化について各種評価を行った。

マウスを24時間絶水し、両下肢50%グリセロールを半量ずつ、10 mL/kgとなるように投与した。投与から1, 6, 12, 24時間後にマウスを解剖し、膀胱から尿を、下大静脈から血液を回収した (Fig. 72)。採血後、心臓よりPBSで全身を灌流したのち、腎臓を回収した。



**Fig. 72 A schedule in the model of rhabdomyolysis.**

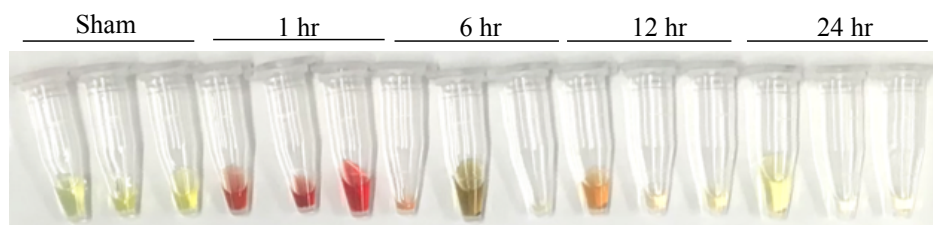
採取後、10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定した腎臓の写真を Fig. 71A に示す。グリセロール投与後1時間後から6時間後まで、腎組織は赤褐色を帯びていた。これは、筋肉から遊離したミオグロビンの蓄積に由来していると考えられる。また、腎重量の増加が観察された (Fig. 73B,C)。尿中および血清中においても、グリセロール投与後1時間後から6時間後まで遊離ミオグロビンによるものと推察される赤色が観察された (Fig. 74, 75)。



**Fig. 73 Kidneys after the administration of glycerol.**

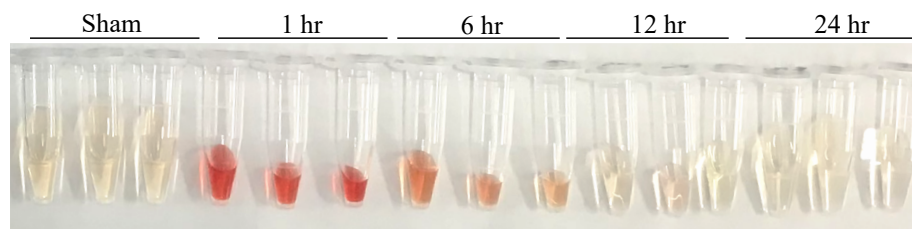
Right kidneys were sampled after the perfusion by PBS. Data were presented as means  $\pm$  S.D.

\* $p < 0.05$  vs. control.  $n = 3$ .



**Fig. 74 Urine after the administration of glycerol.**

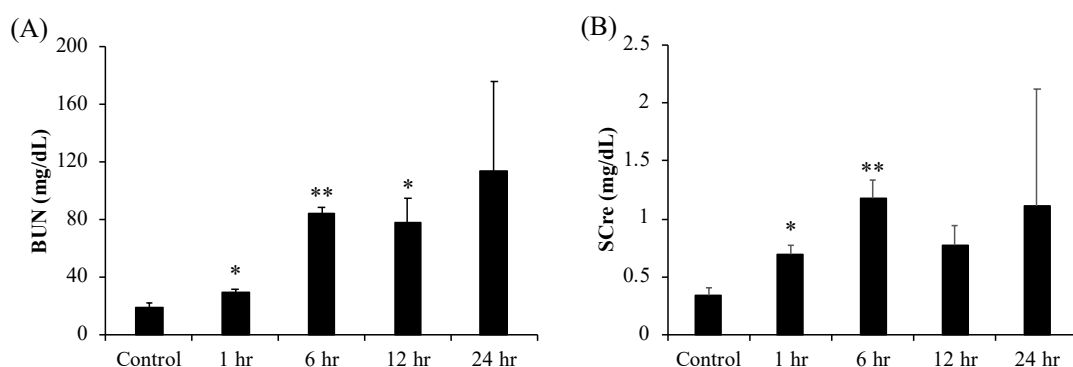
Urine of the model mice was collected directly from the bladders.



**Fig. 75 Urine after the administration of glycerol.**

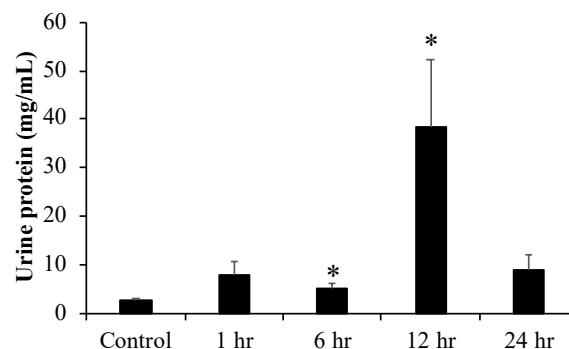
Urine of the model mice was collected directly from the bladders.

次に、これらマウスの腎障害の程度について評価した。まず、血清尿素窒素 (BUN) および血清クレアチニン (SCr) 濃度を測定した。BUN とは、血中の尿素量を示しており、クレアチニンは、筋肉に存在するクレアチンの代謝物である。どちらも腎障害時に排泄が遅延するため、これらの高値は腎障害が生じていることを示す。本モデルマウスにてこれらを測定した結果、グリセロール投与後の時間経過に伴い上昇した (Fig. 76)。次に、タンパク尿について評価したところ、グリセロール投与後 12 時間をピークに尿中にタンパク質が漏出していることが明らかになった (Fig. 77)。



**Fig. 76 Change in the renal functions on glycerol-administrated mice.**

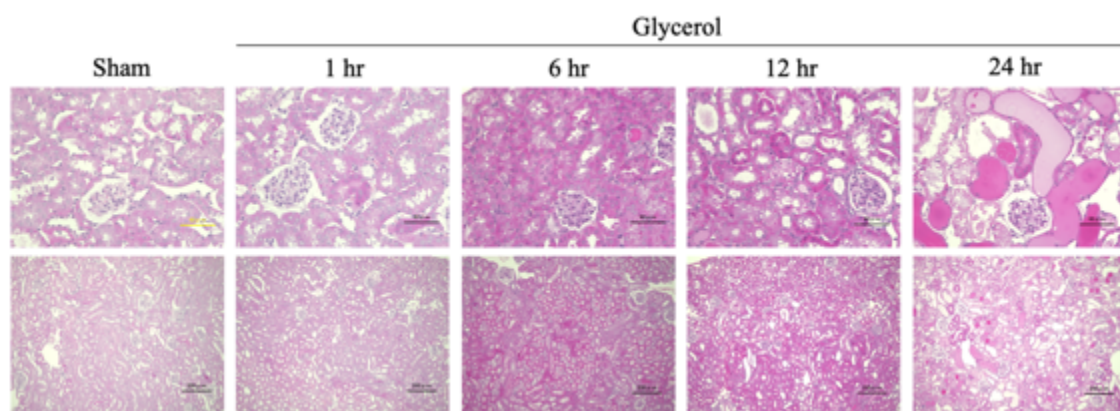
The levels blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (SCr) were measured after the treatment of 50% glycerol. Data were presented as means  $\pm$  S.D. \*p<0.05 and \*\*p<0.01 vs. control. n=3.



**Fig. 77 Levels of urine protein.**

The concentrations of protein in collected urine from the bladders were diluted in 40 times and measured using by Bradford method. Data were presented as means  $\pm$  S.D. \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. control. n=3.

次に、グリセロール投与から各時間経過後の腎組織の切片を作成し、HE 染色により形態を観察した。その結果、グリセロール投与から 24 時間後に円柱の形成や尿細管の変性が観察された (Fig. 78)。以上の結果により、本モデルによって腎障害が生じていることが確認された。障害は投与後 1 時間後から少しずつ強くなり、24 時間後には腎組織の形態変化に至ることが明らかになった。

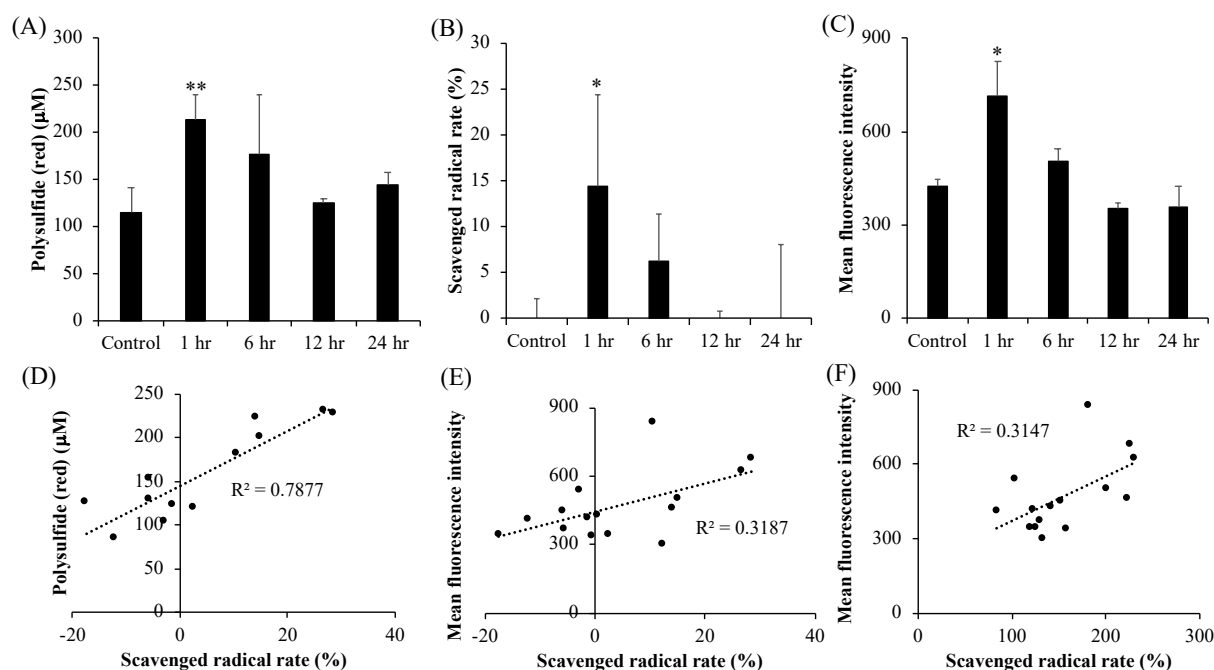


**Fig. 78 Histological assessment of the kidneys of glycerol-induced rhabdomyolysis.**

The right kidneys of the mice after the administration of glycerol stained by hematoxylin and eosin.

そこで、本モデルにおけるポリスルフィド量および血清の抗酸化活性について評価した。還元型ポリスルフィドは、グリセロール投与後 1 時間後をピークに増加しており、その後減少した (Fig. 78A)。次に、血清の抗酸化活性を 2,2'-アゾビス(2-アミジノプロパン)二塩酸塩 (AAPH) ラジカル消去試験にて評価した。AAPH は、熱によりペルオキシラジカルを発生させる試薬であり、生じたペルオキシラジカルをリノール酸へラジカル転移することにより、234 nm の吸収を持つ脂質ラジカルが生成される。マウス血清の抗酸化活性は、グリセロール投与から 1 時間後に増加し、その後継時的に減少した (Fig. 78B)。この時、ラジカル消去活性と還元型ポリスルフィド濃度は高い正の相関関係を有していた (Fig. 79D)。また、SSP4 によってもポリスルフィドを測定したところ、DTT-MB (weak) と同様に投与から 1 時間後にポリスルフィドの増加が観察された。





**Fig. 79 Anti-oxidative activity of serum and the levels of serum polysulfide**

(A) The levels of polysulfide in a reduced form in mice sera of glycerol-induced model mice were measured using by DTT-MB. (B) Mice sera were co-incubated with AAPH radical and linoleic acid. Peroxidized lipid were analyzed by measuring the absorption of 234 nm. (C) Polysulfide in mice sera was detected using SSP4. (D) Correlationshop between polysulfide in a reduced form and radical scavenging activity of the sera on glycerol-i-induced AKI model mice. (E) Correlationshop between polysulfide detected by SSP4 and radical scavenging activity. (F) Correlationshop between polysulfide in a reduced form and polysulfide detected by SSP4.

## 第 6 節 考察

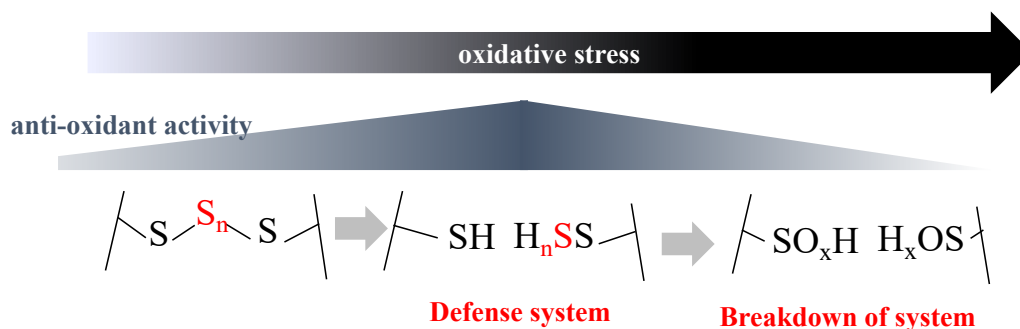
本章では、第 2 章でその存在を明らかにした HSA が有するポリスルフィドの構造・機能に対する役割を、HSA からポリスルフィドを引き抜くことで評価した。

すなわちジスルフィド結合は、タンパク質の立体構造に深く関与するため、ポリスルフィドを引き抜いた HSA の立体構造を解析することにより、ポリスルフィドの役割を明らかにしようと試みた。今回は、HSA の酸化型ポリスルフィドの引き抜き方法として、①蛍光プローブによる除去、②SAOB による還元、③MeHg 及び CN による脱離、④MMTS 及び DTT によるアルキル化・還元、⑤ $\beta$ -NADH による除去の 5 つの方法を使用した。上記の様々な方法を用いた理由として、それぞれの試薬による特異的な影響を排除するため

ある。全ての方法から共通に得られた結果として、酸化型ポリスルフィドの結合数の減少に伴い、HSA の二次構造や三次構造の変化と疎水面の露出が観察されたことから、HSA の酸化型ポリスルフィドは自身の立体構造特性にも深く関与していることが示唆された。これらの共通結果とは対照的に、三次構造を反映する CD スペクトルの変化は、引き抜き方法毎に異なっていた。この原因は、引き抜き方法毎に標的とするシステインが異なっていた可能性が考えられる。最近、Hu らによって、green-fluorescent-protein (GFP) のジスルフィド結合をトリスルフィド結合にすることにより、ポリスルフィドの検出をする方法が開発された<sup>60</sup>。Hu らは、ジスルフィド結合を組むことはできないが、トリスルフィド結合は組める距離に CysSH を配置することを試みている。その結果、トリスルフィド結合の形成には約 7 Å の距離が必要であったことを報告している。CysSH 間が結合した後の距離は解析されていないものの、ジスルフィド結合よりも長くなることは疑いようがない。以上を踏まえて考察すると、ポリスルフィドは CysSH 間の結合の距離を調節していると考えられる。

また HSA の酸化型ポリスルフィドの応答として、酸化ストレスを受けると開裂し、還元型ポリスルフィドとなることによって抗酸化作用を上昇させることが明らかになった。これは、酸化ストレスに対抗するための非常に巧みな生体防御機構であると言える。酸化されると抗酸化力が上昇するということは、一見矛盾しているようであるが、同様の反応は Marisol らによっても報告されている<sup>56</sup>。Marisol らは、HSA が酸化ストレスを受けると、構造が変化することでジスルフィド結合が開裂して SH となることで、抗酸化力を獲得することを明らかにした。ただし、ポリスルフィドの観点からは言及されておらず、こうした開裂がジスルフィド結合でも本当に生じるのか、ポリスルフィド結合を有しているからこそ起きるのかは更なる検討が必要かと思われる。少なくとも、本研究において  $\beta$ -NADH によって引き抜かれた酸化型ポリスルフィドは、還元型ポリスルフィドの獲得に高い寄与率を示したことから、抗酸化力の増大にはポリスルフィド結合が重要な要素であると考えている。

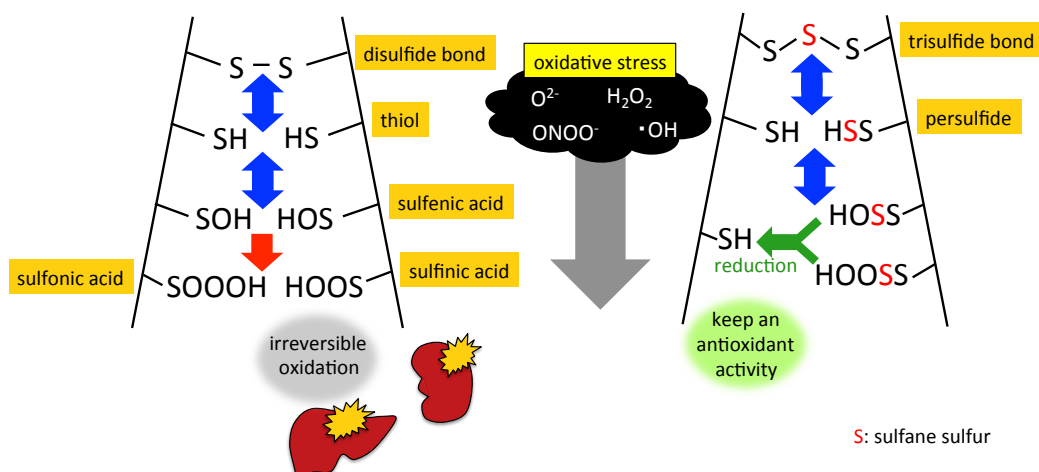
上述の酸化ストレス応答は、糖尿病性腎症や慢性腎不全の患者血清や横紋筋融解症誘発の AKI マウス血清においても認められた。一方、HSA を用いた試験によっても、病態血清においても、酸化が過度に進行した状態では獲得した還元型ポリスルフィドが消費されていた。このような状態では、ポリスルフィドは抗酸化活性を示すことができず、生態防御システムが破綻した状態であると言える (Fig. 80)。したがって、ポリスルフィドの形態や量をモニタリングすることが、酸化ストレスの状態や予後予測に繋がる可能性が期待できる。



**Fig. 80 Relationship between oxidative stress and polysulfide.**

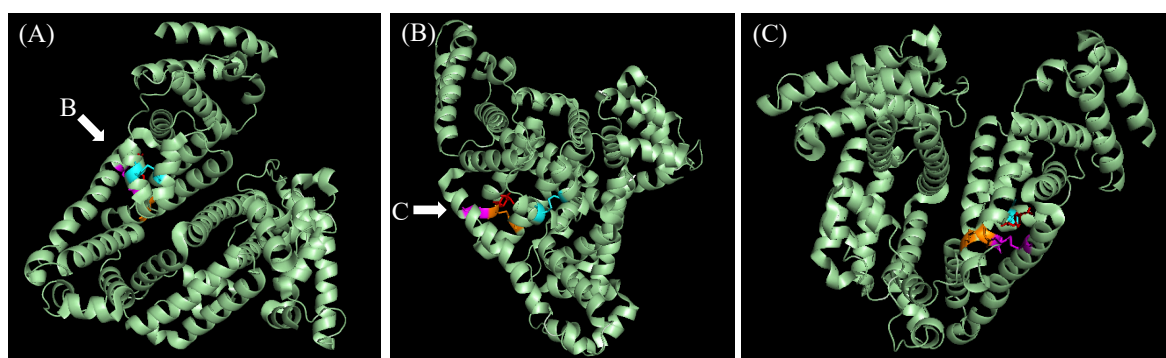
酸化型ポリスルフィドの測定系について、EMSP よりも DTT-MB (strong) で測定した方が酸化ストレスに対する応答をより顕著に観察することができた (Fig. 67, 70)。EMSP で測定される酸化型ポリスルフィドはHSA1分子あたり14個であるのに対し、DTT-MB (strong) で測定されるポリスルフィドの個数は4つと少ない。このことから、DTT-MB (strong) で測定されるポリスルフィドは、酸化ストレスに対してより反応性の高いものであることが推察される。これに対して、DTT-MB (strong) で測定されずにEMSP で測定されるポリスルフィドは、タンパク質の構造安定性に重要であるために、DTTによる還元を受けにくかったのではないかと推察している。

SHの抗酸化作用はSSR'やSOH、SOOHなど自身が酸化を受けることに起因しているため、SOOHやSSOOHのように不可逆的な酸化物となると、抗酸化作用が回復することはない (Fig. 81)。一方、酸化されてSSOOHやSSOOOHとなったSSHは、還元反応によってSHが再生し、抗酸化作用が回復すると考えられている<sup>61</sup>。これらの知見を考え合わせると、HSAのポリスルフィド結合は、パースルフィドへ開裂することにより抗酸化作用を発揮するが、例え一旦酸化されてSSOOHやSSOOOHとなっても、SHへ還元されて抗酸化活性を持続する可能性が推察される (Fig. 81)。従って、ポリスルフィドはHSAのシステイン残基に局在することによって、HSAの抗酸化システムのリサイクリング化を促し、HSA自体の長寿命化を担っているのではないかと考えられる。



**Fig. 81 Oxidation of disulfide bond and trisulfide bond.**

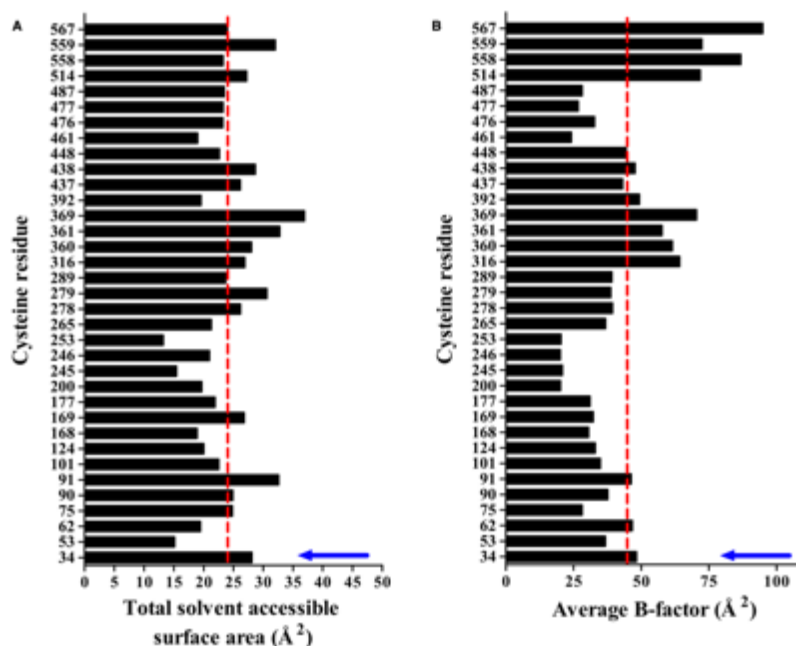
酸化ストレスに応答する HSA の CysSH の可能性の一つとして、筆者は Cys392-Cys438 を想定している。その理由は、以下の 4 つである。まず、① $\beta$ -NADH によって引き抜かれたポリスルフィドが HSA の結合サイト II 近傍に存在する可能性が高いことである。 $\beta$ -NADH によって HSA から酸化型ポリスルフィドを一部除去すると、酸化した際に獲得できるポリスルフィドが減少した (Fig. 68)。以上のことは、 $\beta$ -NADH と酸化の標的システインが一部同じである可能性を示している。NADH-HSA は結合サイト II におけるリガンド親和性を著しく消失していたことから、酸化ストレス応答する CysSH の一部がサイト II 付近であると考えられる。サイト II 付近には Cys392-Cys438、Cys437-Cys448、Cys476-Cys487 の 3 組のシステイン結合が存在する (Fig. 82)<sup>26</sup>。このうち、②Cys-392-Cys438 はチオレドキシン (Trx) / Trx レダクターゼ / NADPH システムによる還元を受ける、レドックス反応性のあるシステイン残基であることが報告されている<sup>45</sup>。また、③HSA を *tert*-ブチルアルコール溶液中で放射線照射すると、CysSH 残基のうち Cys200 および Cys392、Cys514 の 3 箇所が酸化修飾されることが質量分析により明らかになっている<sup>62</sup>。さらに、④脂質異常患者の HSA の CysSH やホモシステインの一部が、本来は分子内でジスルフィド結合を組んでいるはずの CysSH である Cys392 に結合していることも報告されている<sup>63</sup>。上記の 4 つの根拠はいずれもポリスルフィドの存在を直接証明するものではないが、Cys392-Cys438 のジスルフィド結合に揺らぎがあることを示唆する知見であり、Cys392-Cys438 を酸化ストレスに応答する酸化型ポリスルフィドの候補として有力視している。



**Fig. 82 HSA structure with coloring CysSH nearby site II.**

The data of the HSA structure was obtained from PDB (ID:2BXG)<sup>64</sup>. Cys392-Cys438 is colored magenta. Cys437-Cys448 is presented orange. Cys476-Cys487 is colored cyan. Ibuprofen is expressed red.

また、ポリスルフィドを有しているシステイン残基を予想する方法として、B ファクターにも注目している。B ファクターとは、X 線結晶構造解析より得られる「原子の揺らぎ」を示す値で、温度因子とも言われる<sup>65</sup>。B ファクターは他のアミノ酸の要因によっても変動するため一概には言えないが、酸化ストレスに応答するポリスルフィドは、通常のジスルフィド結合と比べてフレキシブルであることが予想され、B ファクターも大きくなると考えられる。これまでに、Buceddi らにより、HSA の X 線結晶構造解析データから求めたシステインの分子表面からの距離と B ファクターの平均が算出されている<sup>66</sup>。これらを比較すると、ドメインⅢに存在する 4 つのシステイン残基 (Cys 514, Cys558, Cys559, Cys567) は表面からの距離が平均程度であるにも関わらず、大きな B ファクターを有している (Fig. 83)。そのため、酸化ストレス応答型のポリスルフィドの候補となる可能性を秘めている。一方、X 線結晶構造を測定する際、あるいは結晶化の際にポリスルフィドが残存しているか否かについては、疑問が残る。立体構造からポリスルフィド基を予想するには、今後、クライオ電子顕微鏡などの結晶化せずに立体構造を測定可能な技術による解析が必要だと考えられる。



**Fig. 83 Dynamic characters of cysteine residues in HSA<sup>66</sup>.**

(A) Total solvent accessible surface area and (B) average B-factor calculated by Bocedi. Each red line shows the average.

第 2 章で開発した手法でポリスルフィドを測ることが全身の酸化ストレスを反映する指標となる可能性は十分にあるものの、もし酸化ストレスに応答し得るシステインの動きだけを捉えることができれば、より鋭敏なマーカーになることが期待出来る。例えば、アリピプラゾールのハロゲン元素は Cys392 とハロゲン結合することから、これを応用することで Cys392 の酸化還元状態を予測できる可能性が考えられる<sup>63</sup>。したがって今後は酸化ストレスに応答性を示すシステイン残基の同定が重要な課題である。

## 第7節 小括

本章では、血清や HSA に存在するポリスルフィドの生理的意義解明を試みた。以下に得られた知見を小括する。

- 1) SSP4 や $\beta$ -NADH を用いて、HSA のポリスルフィドの一部を減少することに成功した。これらの方法で HSA からポリスルフィドを引き抜くことにより、疎水面の露出や $\alpha$ ヘリックスの減少、薬物結合能の低下などの立体構造変化が観察された。
- 2) HSA を酸化させると、酸化型ポリスルフィドが減少して、還元型ポリスルフィドが増加した。さらに、HSA の抗酸化活性が上昇し、還元型ポリスルフィドと抗酸化活性は高い正の相関関係を有していた。酸化が進行すると還元型ポリスルフィドは減少し、抗酸化活性も低下した。
- 3) 慢性肝炎患者や ICU 入院患者、糖尿病性腎症患者、慢性腎不全患者血清にて酸化型ポリスルフィドが減少していた。腎障害のステージごとに解析すると、酸化型ポリスルフィドは障害の進行と共に減少するのに対し、還元型ポリスルフィドはステージの初期～中期に上昇し、後期に減少する傾向が観察された。
- 4) グリセロール筋中投与により横紋筋融解症誘発の急性腎障害モデルマウスを作製した。同マウスの血清ポリスルフィドは腎障害の初期ステージであるグリセロール投与後 1 時間をピークに高く、この間血清は高い抗酸化活性を有していた。さらに時間経過すると、還元型ポリスルフィドは減少し、腎障害は更に進行した。

以上の知見により、酸化型ポリスルフィドは HSA の立体構造を維持する上で重要であること、および、酸化ストレスを受けた際に還元型ポリスルフィドの供給源となることによって抗酸化活性を発揮することが示唆された。これは、酸化ストレスに拮抗するための生態防御反応であると考えられる。血清酸化型ポリスルフィドと還元型ポリスルフィドの定量は、酸化ストレスの指標となり得ることが期待される。また、酸化ストレスが過剰に進行した状態では両形態のポリスルフィドが減少することから、ポリスルフィドを補充することが酸化ストレス関連疾患の治療となり得る可能性が期待される。

## 第4章 ポリスルフィド付加 HSA の設計および有用性評価

### 第1節 序

第2、3章にて前述した通り、内因的な HSA における RSS の存在が確認され、その生理学的な意義として、抗酸化作用や立体構造の保持において重要な役割を果たしていることが示唆された。特に、HSA の還元型ポリスルフィドは即効性の抗酸化物質であることが示された。その一方で、HSA 中のポリスルフィドが、様々な病態の進行度・重症度に伴い減少していくことを突き止めた。これらのことから、ポリスルフィドの外因的な供給は、酸化ストレス関連疾患の発症・進展に対し、抑制的に働くことが期待される。事実、RSS は、高い抗酸化作用を有しているだけでなく、抗炎症作用や解毒作用を有していることから、様々な治療への応用が試みられている。しかしながら、活性イオウ供与剤である多硫化ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{S}_n$ ) は、中性溶液中での安定性が悪く、血中半減期も極めて短いため、マウスなどの動物を用いた *in vivo* 条件下では、頻回投与や高投与量での検討が行われており、ヒトへの応用には製剤的工夫が必須である。また、ニンニクやタマネギに含まれるイオウ化合物である三硫化アリルはバイオアベイラビリティが低く、医薬品としての応用例は見当たらない。そのため、RSS を治療薬として臨床応用するためには、ポリスルフィドの新規送達システムの開発が必須である。

HSA は、その高い生体適合性や優れた血中滞留性から、薬物輸送担体として汎用されている。当研究室でもこれまでに、不安定なガス分子である一酸化窒素を HSA の Cys34 の SH に付加させた mono-S-ニトロソ化 HSA (mono-SNO-HSA) や HSA のリジン残基に SH を導入し、複数個の NO を付加させた poly-SNO-HSA が NO のキャリアとして優れていることを実証している<sup>67-69</sup>。そこで筆者は、これらの SNO-HSA のように、HSA にポリスルフィドを付加させることができれば、RSS の安定なキャリアとして機能するのではないかと考えた。以下に、得られた知見を示す。



## 第2節 Sn-HSA の作製と評価

### 2-1 $\text{Na}_2\text{S}_n$ による HSA へのポリスルフィドの供給

活性イオウの供給体として、多硫化二ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{S}_n$ ) 及び三硫化アリル、ジメチルトリスルフィドが挙げられる。三硫化アリルは高い脂溶性及び溶媒の揮発性のために HSA と相性が良くないと予想されたため、 $\text{Na}_2\text{S}_n$  に着目した。 $\text{Na}_2\text{S}_n$  の  $n$  は、市販されている 1-4 を用いた。

1992 年に小笠原らは、硫化水素の多面的な作用を期待して、硫黄原子が付加したアルブミン (Sulfur Bound Albumin, 以下 SBA) の作製事例を報告している。SBA はラットの肝臓ミクロゾームの過酸化脂質蓄積を抑制したが、残念ながら、その後 SBA の生物活性に関する報告はない。SBA は、ウシ血清アルブミン (BSA) と硫化水素ナトリウム (NaHS) を混合することで簡便に調製でき、HSA の遊離の Cys34 にイオウ原子が 1 つ付加している事が明らかにされている。そこで、 $\text{Na}_2\text{S}_n$  を HSA と反応させることによって活性イオウ付加アルブミンの作製を試みた (Fig. 84)。その際、未反応の  $\text{Na}_2\text{S}_n$  はゲル濾過によって取り除いた。以下、 $\text{Na}_2\text{S}_n$  と HSA の反応物を Sn-HSA ( $n=1-4$ ) と表記する。

ポリスルフィドの蛍光プローブである SSP を用いて、作製した Sn-HSA にポリスルフィドが結合しているか否か検討した。その結果、Sn-HSA は SSP2 と反応して、原料とする硫化ナトリウムの価数依存的に蛍光を増大させた (Fig. 85A)。また、第2章にて確立した DTT-MB (weak) 法によって、S4-HSA におけるポリスルフィド含量を測定したところ、HSA 1 分子当たり約 4 個のポリスルフィドを保有していた (Fig. 85B)。

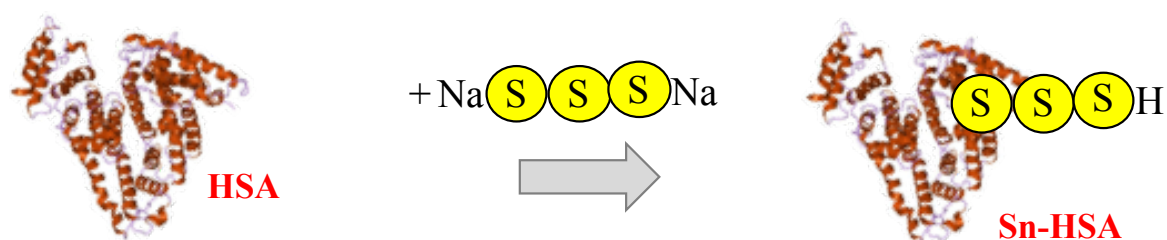
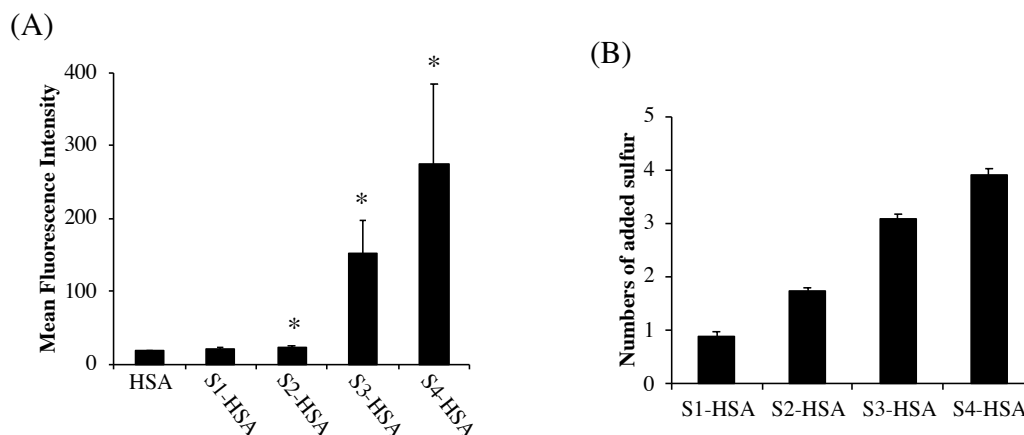


Fig. 84 Preparation of Sn-HSA by sodium polysulfide.



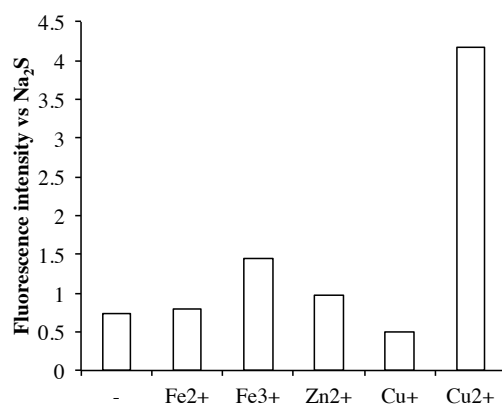
**Fig. 85 Valence dependency sulfur addition of HSA reacted with  $\text{Na}_2\text{S}_n$ .**

Polysulfide of Sn-HSA samples were detected by (A) SSP2 and (B) DTT-MB (weak). Data were presented as means  $\pm$  S.D. \* $P < 0.05$  vs HSA.  $n=3$ .

## 2-2 イオウ付加効率に影響を及ぼす因子の探索

SNO や SOH など、可逆的な酸化を受けた SH は、 $\alpha$ 効果によって反応性が高まる。したがって、硫化ナトリウムと HSA の反応溶液中への酸化剤の添加は、HSA へのイオウ付加反応効率を向上することが期待される。

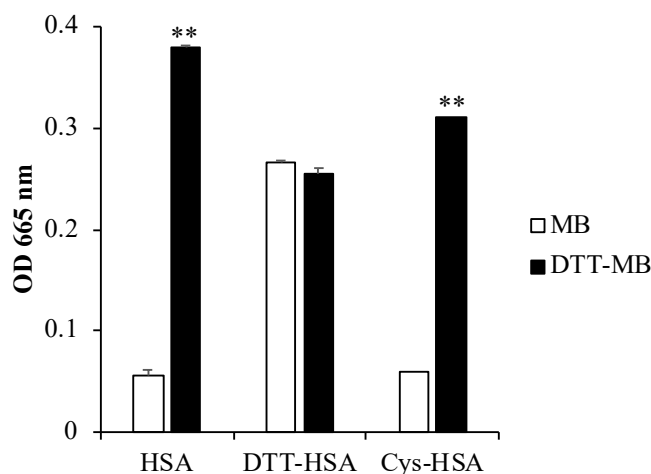
そこで、HSA と  $\text{Na}_2\text{S}$  の反応溶液中に  $\text{Fe}^{2+}$  や  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^+$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  を共存させ、反応後ゲル濾過にて HSA を単離した。SSP2 を用いてポリスルフィドの存在を確認したところ、 $\text{Fe}^{3+}$  及び  $\text{Cu}^{2+}$  といった、酸化力を有する金属イオンの存在下で HSA のポリスルフィドの付加効率が向上した (Fig. 86)。



**Fig. 86 SSP2 fluorescence rate with treatment  $\text{Na}_2\text{S}$ / untreated.**

Polysulfide level was analyzed by SSP2. HSA and metal ion were co-incubated with/without  $\text{Na}_2\text{S}$ .

そこで、システインの酸化状態がポリスルフィドとの反応に与える影響について評価した。HSA に 1 mM の DTT を 4°C で 1 時間反応させることにより、ジスルフィド結合を切断せずに還元型ポリスルフィドのない HSA (DTT-HSA) を作製した<sup>70</sup>。また、HSA を Cys-Cys と反応させることにより、Cys34 にほぼ 100%のシステインが付加した状態の HSA (Cys-HSA) を作製した<sup>71</sup>。これらに同量の Na<sub>2</sub>S を加え、MB 法で残存した Na<sub>2</sub>S を、DTT-MB 法で還元型ポリスルフィドを測定した。その結果、HSA および Cys-HSA においては還元型ポリスルフィドの結合が見られたものの、DTT-HSA においては Na<sub>2</sub>S は全く結合しなかった (Fig. 87)。したがって、Cys34 の酸化状態が HSA のポリスルフィド化に大きく影響することが示唆された。



**Fig. 87 Effect of redox condition on Cys34 for S-sulfydration efficacy.**

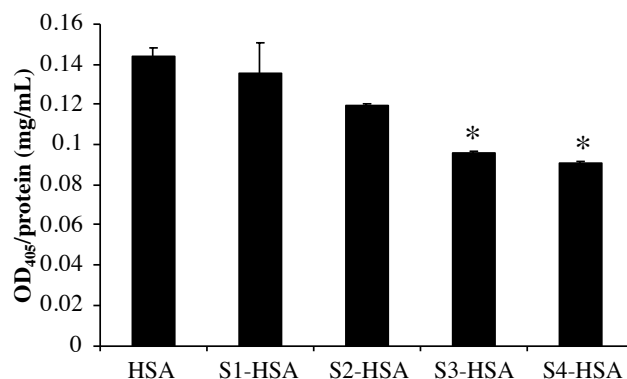
HSA or DTT-HSA, Cys-HSA (100 μM) were treated with Na<sub>2</sub>S (100 μM) at 37°C for 1 hr. Free sulfide and polysulfide in a reduced form were measured by MB and DTT-MB respectively. Data were presented as means ± S.D. \*\*P<0.01 vs DTT-MB. n=3.

### 第3節 Sn-HSA のメラニン産生抑制作用

作製した Sn-HSA の有効性を、皮膚におけるメラニンの生成系で検討した。皮膚のメラノサイトは、紫外線 (UV) などの酸化的なストレスの存在によって、チロシンを原料にメラニンを産生される。その機構の一つに、活性酸素種 (ROS) や NO のセカンドメッセンジャーである cGMP により、チロシナーゼが活性化されることが報告されている。活性イオウは高い ROS 消去作用を有することから、Sn-HSA はメラニン産生抑制作用を有する可能性が考えられる。

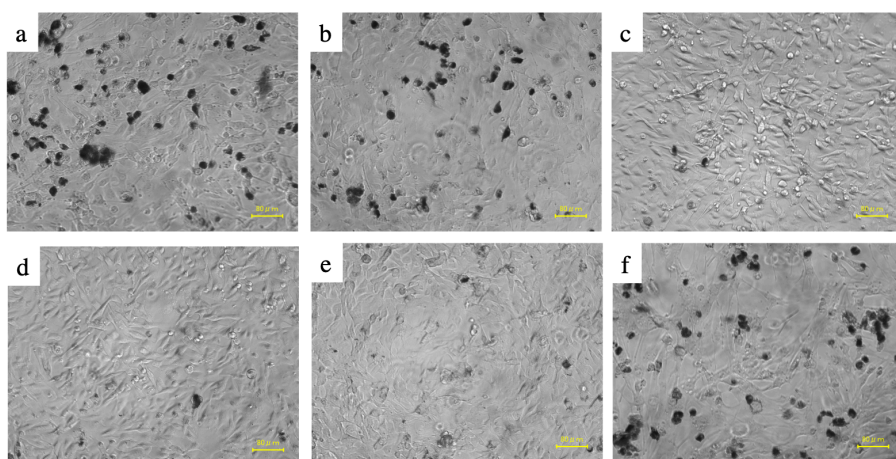
そこで、既報に従ってマウスメラノーマ細胞である B16 細胞をチロシン含有培地で培養

し、メラニンの産生を促進させた環境下において Sn-HSA を添加したところ、材料の  $\text{Na}_2\text{S}_n$  の価数依存的にメラニンの産生が抑制された (Fig. 88)。顕微鏡による観察の結果、Sn-HSA 添加群における、メラニン産生陽性細胞の割合が減少していることが示唆された (Fig. 89)。



**Fig. 88 Effect of Sn-HSA for melanin synthesis in B16 cells.**

Melanin contents were measured by the absorption of 405 nm per protein contents after the 72 h treatment of Sn-HSA in the presence of 0.4 mM tyrosine and 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Cells were washed and dissolved by 1 N NaOH. After the 2 hr incubation on 60°C, the absorption were measured by micro-plate reader. Protein contents were analyzed by BCA protein Assay. Data were presented as means  $\pm$  S.D. n=3.

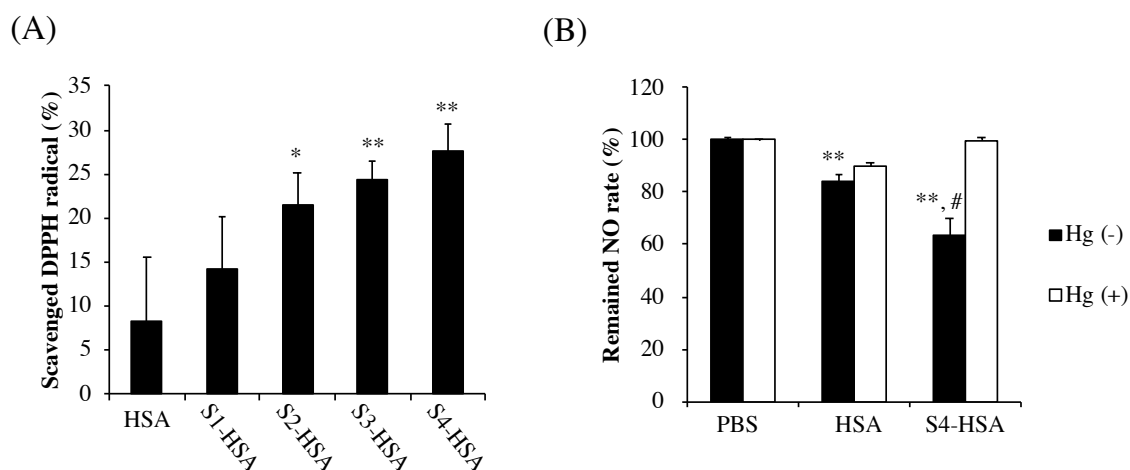


**Fig. 89 Cell image after the treatment of Sn-HSA in B16 cells.**

The photo were taken after the 72 h treatment of Sn-HSA in the presence of 0.4 mM tyrosine and 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . a; HSA, b; S1-HSA, c; S2-HSA, d; S3-HSA, e; S4-HSA, f; commercial lotion containing arbutine.

前述の通り Sn-HSA のメラニン産生抑制作用はその抗酸化作用によるものであると考え

られたため、まず、DPPH ラジカル試験を用いて Sn-HSA の抗酸化力を確認した。その結果、Sn-HSA はイオウの数が多いほど高い DPPH ラジカル消去能を有していた (Fig. 90A)。次に、Sn-HSA が一酸化窒素ラジカル (NO) の消去活性を有しているか否かを評価した。NO 放出剤である NOC7 と室温で 30 分反応させたのち、溶液中の残存 NO を Griess 法にて定量した。その結果、S4-HSA は Control や HSA 処理群と比較して有意に溶液中の NO を減少させた (Fig. 90B)。この結果は、NO が S4-HSA に SNO 化されたためではないかと考え、これを確かめるべく、無機水銀 ( $\text{Hg}^{2+}$ ) を用いた検討を行った。 $\text{Hg}^{2+}$ は、SNO を還元して NO を放出させることが知られているため、S4-HSA と NOC7 との反応溶液を  $\text{Hg}^{2+}$  で処理したところ、S4-HSA 処理溶液からほとんど全ての NO が遊離した。このことから、S4-HSA は SNO 化を介して NO を消去することが示唆された。

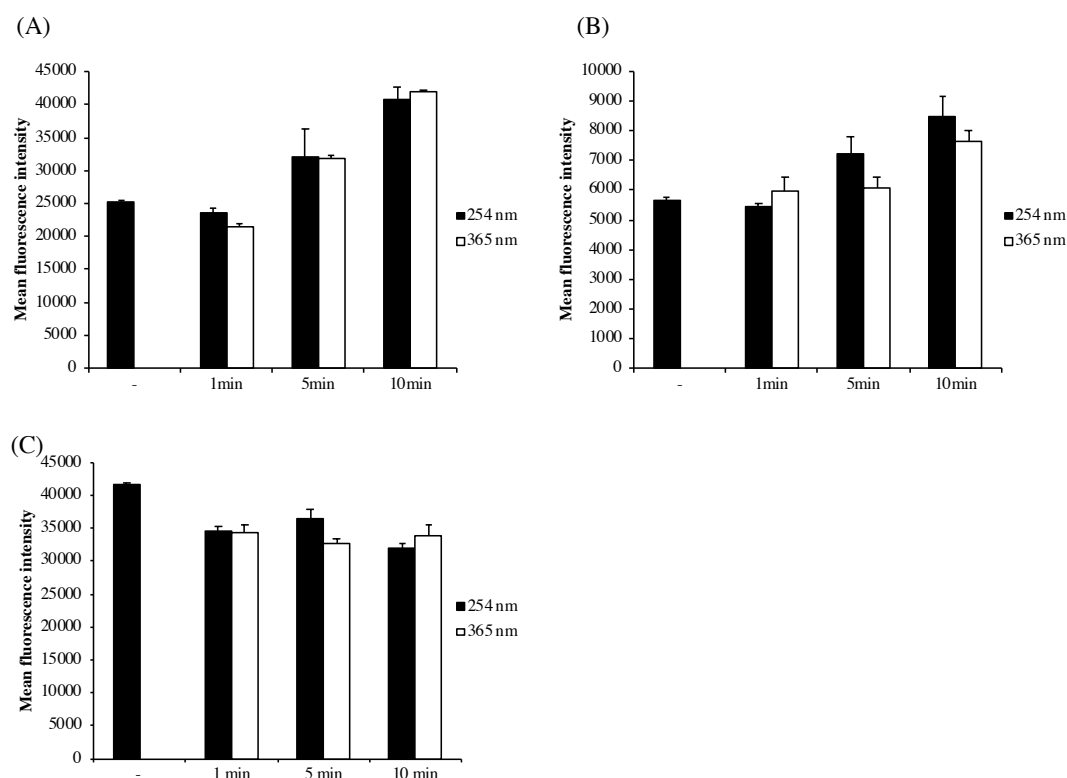


**Fig. 90 Anti-oxidant properties of Sn-HSA.**

(A) DPPH radical scavenging activity of HSA and Sn-HSA. The concentration of DPPH radicals was measured by the oxidation of linoleic acid in the presence of HSA and Sn-HSA samples. (B) Scavenging of NO by Sn-HSA. NO concentration was measured by a Griess assay after the reaction with Sn-HSA (50  $\mu\text{M}$ ) and NOC7 (200  $\mu\text{M}$ ). Each value represents the mean  $\pm$  S.D.  $n = 3$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  as compared with control. # $p < 0.05$  as compared with HSA.

次に、Sn-HSA が UV による酸化ストレスに対しても抑制効果を発揮するか否かを検討すべく、B16 を用いた酸化ストレス試験の構築を試みた。B16 細胞に、異なる 2 つの波長の UV を照射し、産生される ROS や NO を蛍光プローブである CM- $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  及び DAF-FM-DA を用いて測定した。両プローブは、細胞内に取り込まれて細胞内にて分解されることで活性を示し、かつ細胞外にも漏出しにくいことから、細胞内の ROS 及び NO の検出に

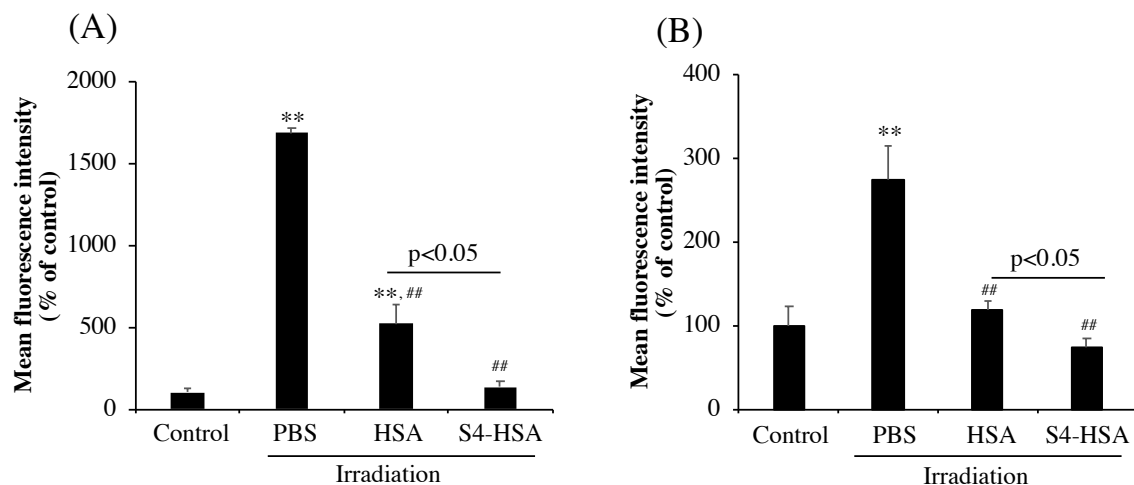
適している。その結果、254 nm 及び 365 nm のいずれの照射時においても、照射時間依存的に細胞内の ROS 及び NO の産生が亢進した (Fig. 91AB)。このとき、同じ条件下で SSP4 を用いてポリスルフィドを測定したところ、興味深いことに、UV 照射によってポリスルフィドは速やかに減少した (Fig. 91C)。



**Fig. 91 Time profiles of ROS, NO and polysulfide productions in B16 cells under the irradiation of UVs.**

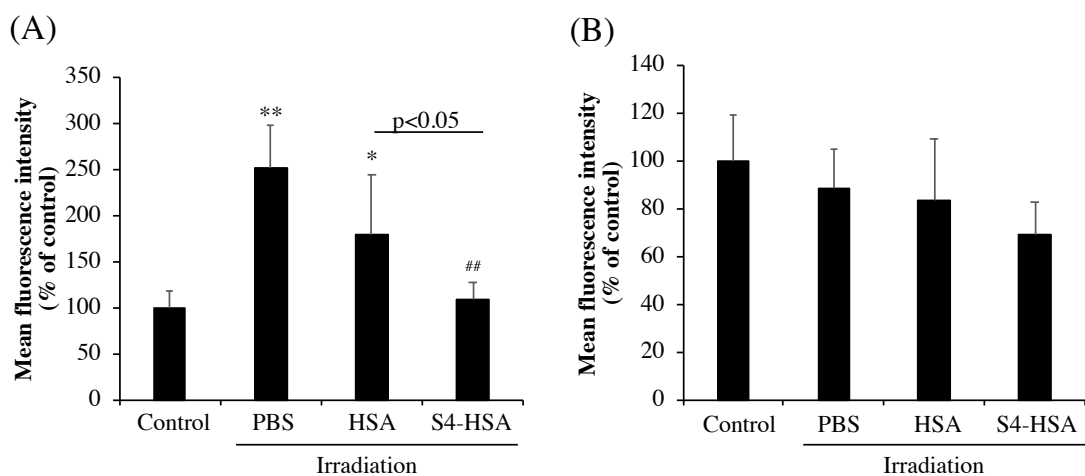
B16 cells were irradiated of 2 different UV spectra, 254 nm and 365 nm. (A) ROS production was detected by a fluorescence probe, CM-H<sub>2</sub>DCF-DA. (B) NO synthesis was measured by DAF-FM-DA. (C) Sulfane sulfur was detected by SSP4. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. n=3.

そこで、Sn-HSA の存在下で、各 UV を 15 分照射した際に、産生される細胞内 ROS を検出したところ、Sn-HSA 処理群では、PBS 群及び HSA 群のいずれに対しても有意に ROS を消去していた (Fig. 92)。NO についても同様の結果が得られた (Fig. 93)。これらの結果から、Sn-HSA は、HSA よりも強力な ROS 及び NO 産生抑制効果を獲得していることが判明した。従って、Sn-HSA の優れた抗酸化効果がメラニンの産生を抑制した可能性が強く示唆された。



**Fig. 92 ROS scavenging effect of Sn-HSA under the irradiation of UV.**

ROS in B16 cells was detected by CM-H<sub>2</sub>DCF-DA in the presence of HSA and Sn-HSA with 15 min irradiation of 2 different UV, (A) 254 nm, (B) 365 nm. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. n=3. \*\*p<0.01 as compared with control. ##p<0.01 as compared with HSA.



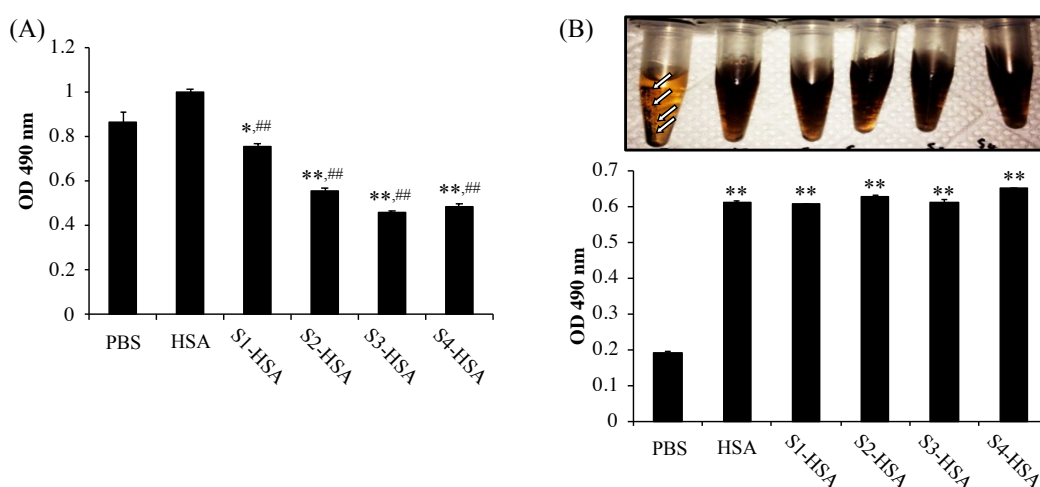
**Fig. 93 NO composed effect of Sn-HSA under the irradiation of UV.**

NO in B16 cells was detected by DAF-FM-DA in the presence of HSA and Sn-HSA with 15 min irradiation of 2 different UV, (A) 254 nm, (B) 365 nm. NO synthesis was measured by DAF-FM-DA. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. n=3. \*\*p<0.01 as compared with control. ##p<0.01 as compared with HSA.

次に、チロシナーゼ活性に与える影響を評価した。アルブチンやトラネキサム酸など、市販の美白化粧品の有効成分の多くは、チロシナーゼ活性を阻害することでメラニン産生

を抑制する。そこで、マッシュルーム由来のチロシナーゼを用いて、Sn-HSA がチロシナーゼ活性に与える影響を評価した。チロシナーゼと試料を予め反応させて 10 分放置後、チロシナーゼの基質である L-DOPA を加え室温で 30 分反応させた。チロシナーゼ活性として、L-DOPA を基質に生じたメラニン量を 490 nm の吸光度を測定することにより求めた。その結果、Sn-HSA は HSA と比べてチロシナーゼ活性を有意に低下させた (Fig. 94A)。

また、メラニンは凝集する性質を持っており、これによりしみが生じることが分かっている。そこで次に、Sn-HSA のメラニン凝集に対する影響を評価した。チロシナーゼと L-DOPA を反応させ、メラニンを合成した。合成したメラニンと Sn-HSA を混和して 3 時間反応させたのち、遠心して凝集したメラニンを沈殿させた。上清の吸光度を測定することで、凝集していないメラニン量を測定した。その結果、Sn-HSA と反応させると、PBS と比較して上清中のメラニン量が高かったことから、Sn-HSA はメラニン凝集抑制効果を有していることが明らかになった (Fig. 94B)。一方、本効果は HSA によっても観察されたことから、細胞実験にて観察されたメラニン抑制効果は、メラニン凝集を抑制した結果によるものではなく、メラニン合成阻害作用によるものであることが示唆された。

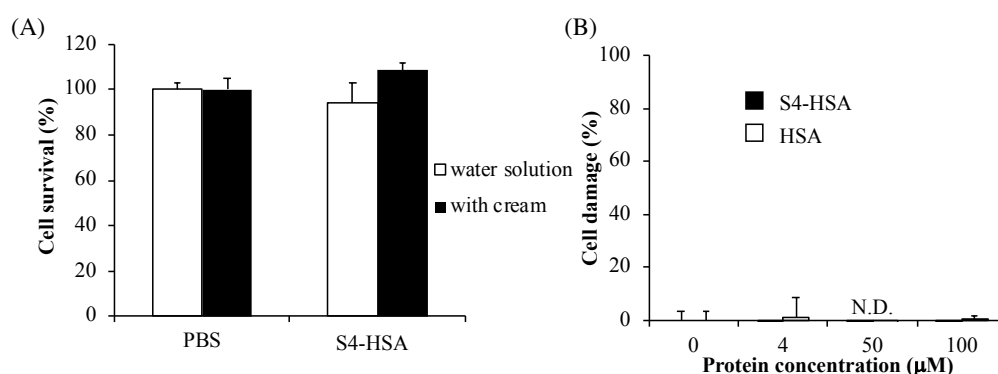


**Fig. 94 Sn-HSA inhibit the oxidation of L-DOPA by tyrosinase.**

(A) Melanin synthesis from tyrosinase and L-DOPA incubated with HSA and Sn-HSA. Tyrosinase and samples were mixed and incubated at room temperature for 10 min. After the reaction, L-DOPA was added and incubated after 30 min. (B) Non-aggregated melanin contents in supernatant. Tyrosinase and L-DOPA were co-incubated for 10 min and added HSA samples. After 3 h, the mixture was centrifuged for 20,000 g, 15 min. White arrow showed the aggregation.



以上示したように、Sn-HSA は抗酸化作用および NO 消去作用を介してメラニン産生を抑制することから、皮膚に塗布することで美白化粧品としての応用が期待される。そこで、経済協力開発機構 (OECD) のガイドラインに基づいた 3D 培養皮膚細胞を用いた皮膚刺激性試験で、Sn-HSA の安全性を評価した。その結果、PBS 溶液中及び基剤 (クリーム) 中のいずれの状態でも細胞障害性は観察されなかった (Fig. 95)。



**Fig. 95 Safety test of Sn-HSA for 3D cultured human epidermis.**

(A) Cell survival test was performed using Autologous Cultured Epidermis kit with in PBS solution (white column) and in cream (black). (B) Cell damage test was performed using LDH Cytotoxicity Detection Kit.

以上、Sn-HSA は①紫外線照射などに発生する ROS や NO を抑制する、および②チロシナーゼ活性を抑制するという 2つのメカニズムによりメラニン産生を抑制することが示唆された (Fig. 96)。

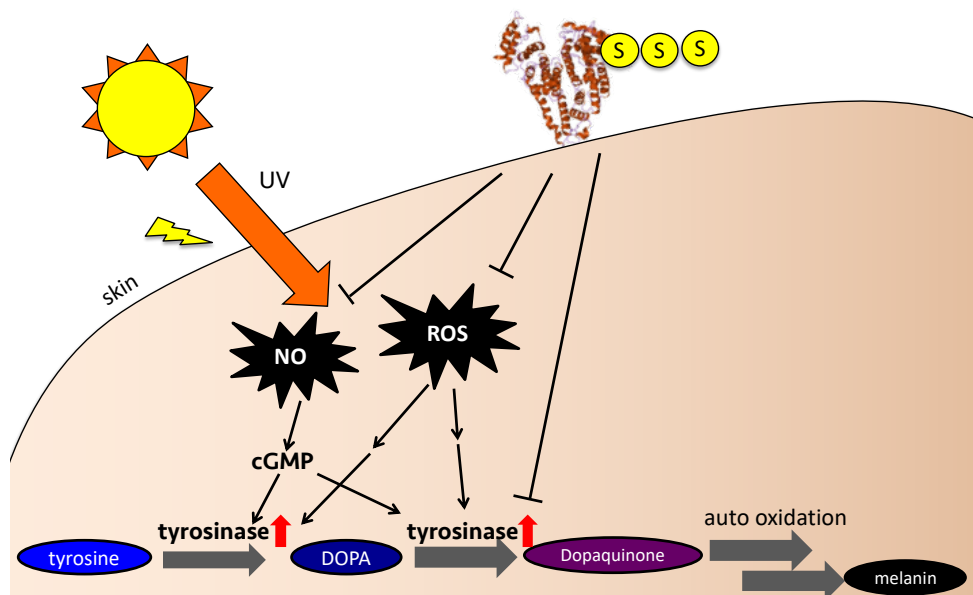
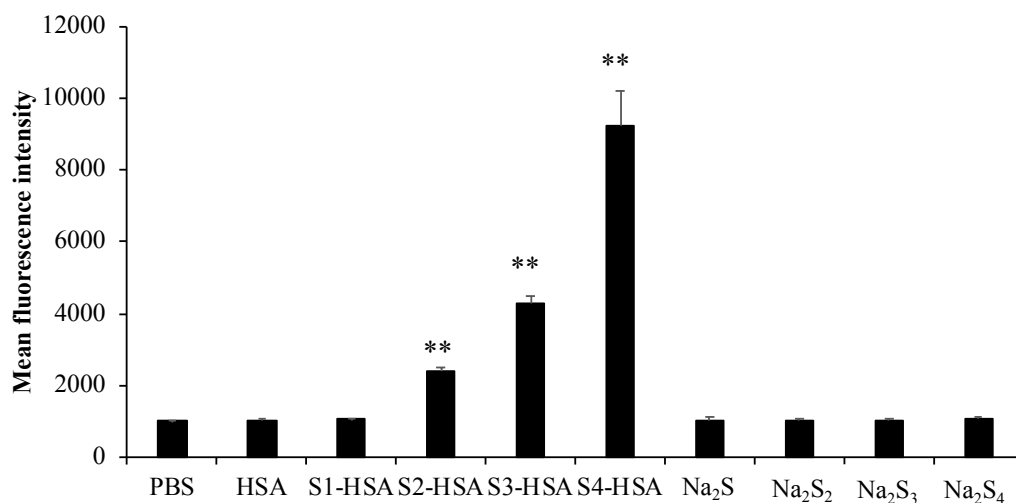


Fig. 96 Melanin-inhibition mechanisms of Sn-HSA.

#### 第4節 ミオグロビン誘発酸化ストレスに対する Sn-HSA の抑制効果

次に、酸化ストレス疾患に対する治療効果を評価すべく、ミオグロビン誘発の急性腎障害に着目した。ミオグロビンはヘムタンパクの1つであり、横紋筋融解症など筋肉が損傷した際に血中に遊離する。遊離したミオグロビンは血中でフェントン反応により酸化ストレスを発生し、腎障害を惹起する。そこで、Sn-HSAがミオグロビン誘発の酸化ストレスを抑制するか否かを評価した。

まず、Sn-HSAにより細胞内にポリスルフィドが供給されるか否かを評価した。ブタ近位尿細管上皮細胞である LLC-PK1 細胞に HSA、Sn-HSA および  $\text{Na}_2\text{S}_n$  を添加し、2 時間後、上清を除去してさらに PBS (+) にて細胞を洗浄した。上清を除去後、界面活性剤である CTAB とともにポリスルフィドの蛍光プローブである SSP4 を添加し、細胞内に供給されたポリスルフィドを評価した。その結果、同濃度の  $\text{Na}_2\text{S}_n$  と比較しても Sn-HSA は効率良くポリスルフィドを細胞内に供給することが示唆された (Fig. 97)。

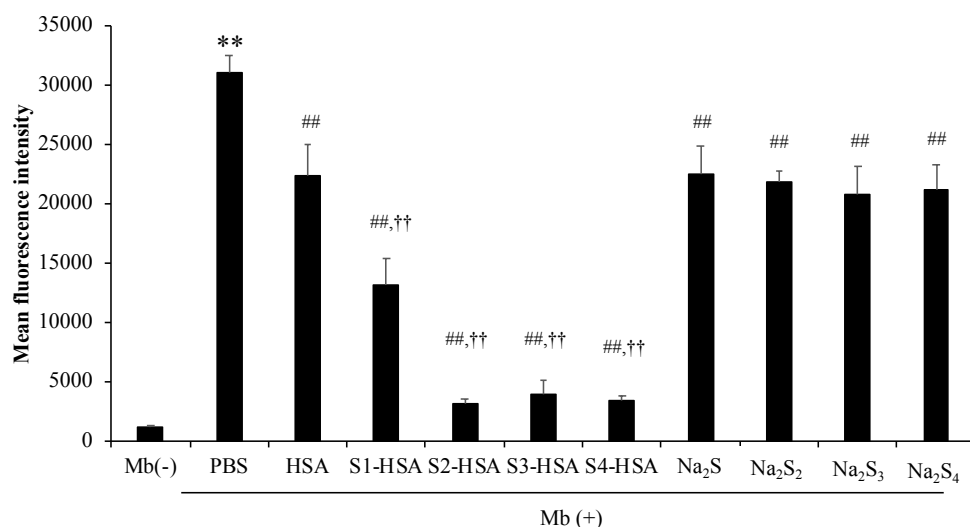


**Fig. 97 Intracellular uptake of polysulfide by Sn-HSA.**

Samples (20  $\mu$ M) were treated to LLC-PK1 cells for 2 hr. After the treatment, cells were washed and treated SSP4 (5  $\mu$ M) with CTAB (1 mM) in PBS (+). The fluorescence intensity was measured using a microplate reader. Each value represents the mean $\pm$ S.D. n = 3. \*\*p<0.01 vs. PBS.

次に、Sn-HSA による酸化ストレス抑制効果を評価した。LLC-PK1 細胞に ROS の検出プローブである CMH<sub>2</sub>CDF-DA を取り込ませ、上清を除去したのち、ミオグロビン HSA または Sn-HSA、Na<sub>2</sub>S<sub>n</sub> と同時に添加した。2 時間後、細胞内の ROS をマイクロプレートリーダーにより定量した。

その結果、Sn-HSA は HSA と比較して細胞内の活性酸素を有意に抑制することが示唆された (Fig. 98)。その抗酸化活性は特に n $\geq$ 2 の Sn-HSA において高く、同濃度の Na<sub>2</sub>S<sub>n</sub> より高効率に ROS を抑制した。



**Fig. 98 Sn-HSA suppressed the intracellular ROS induced by myoglobin.**

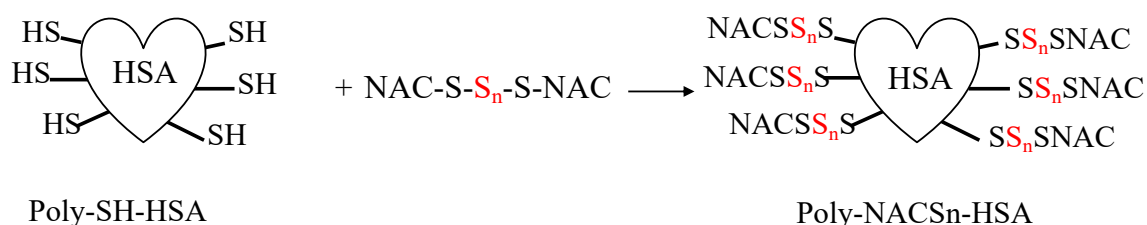
Intracellular ROS was measured using CMH<sub>2</sub>DCF-DA. CMH<sub>2</sub>DCF-DA (5  $\mu$ M) was treated to LLC-PK1 cells for 30 min and washed well. 0.1 mg/mL of myoglobin and samples (10  $\mu$ M) were treated to the cell and incubated for 2 hr. After the treatment, Fluorescence intensity (ex. 485 nm/em. 535 nm) of each well was measured by a micro-platereader. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. n=3. \*\*p<0.01 as compared with Mb (-). ##p<0.01 as compared with PBS (Mb(+)). ††p<0.01 as compared with HSA.

## 第5節 Poly-NACSn-HSA の作製と活性評価

### 5-1 Poly-NACSn-HSA の設計および物性評価

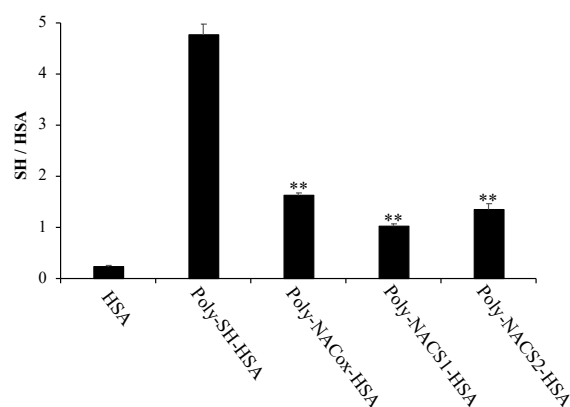
前節において、還元型ポリスルフィドを付加した HSA を作製することに成功した。還元型ポリスルフィドは即効性の抗酸化力を有している。一方、製剤化する上では酸化されやすいなどのデメリットを有している。そこで、ポリスルフィドのドナーである NAC ポリスルフィドに着目した。NAC ポリスルフィドは酸化型ポリスルフィドであり、水溶液中で安定であることが報告されている。一方、NAC の血中半減期は約 2 時間と短く、製剤化には工夫が必要である<sup>72, 73</sup>。そこで、NAC ポリスルフィドを HSA へ導入することで、糸球体濾過を回避し、長時間作用型となることが期待されるポリスルフィドドナーの開発に着手した。NAC ポリスルフィドは酸化型であるため、SH と SS 交換反応を介して結合することが期待できる。これまでに、HSA にリジン残基に SH を導入する試薬であるイミノチオランを反応させると、SH が複数個導入されることが報告されている<sup>69</sup>。

<sup>74</sup>。HSA にイミノチオランを反応させた Poly-SH-HSA を調製し、NAC ポリスルフィドと反応させることで、NAC ポリスルフィドの付加した HSA (poly-NACSn-HSA) の作製を試みた (Fig. 99)。



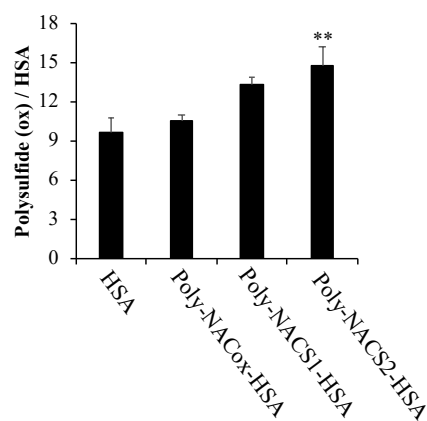
**Fig. 99 Scheme of synthesis of poly-NACSn-HSA.**

まず、残存した SH 量について、SH の定量法である DTNB 法を用いて評価した。その結果、イミノチオランにより HSA へ約 5 個の SH が導入され、そのうち約 3 個が NAC ジスルフィドや NAC ポリスルフィドとの反応により酸化された (Fig. 100)。次に、導入されたポリスルフィドの個数について、EMSP 法により求めたところ、HSA と比較して poly-NACS1-HSA は約 4 個の、poly-NACS2-HSA は約 5.5 個のポリスルフィドを新たに獲得していることが明らかになった (Fig. 101)。



**Fig. 100 The levels of thiol in poly-SH-HSA and poly-NACs-HSA.**

Poly-SH-HSA was synthesized by the treatment of iminothiolane with HSA. NAC disulfide (NACox) and NAC polysulfide (NACS1 and NACS2) were incubated with poly-SH-HSA. The levels of thiol in the samples were measured using by DTNB. Each value represents the mean±S.D. n = 3. \*\*p<0.01 vs. Poly-SH-HSA.

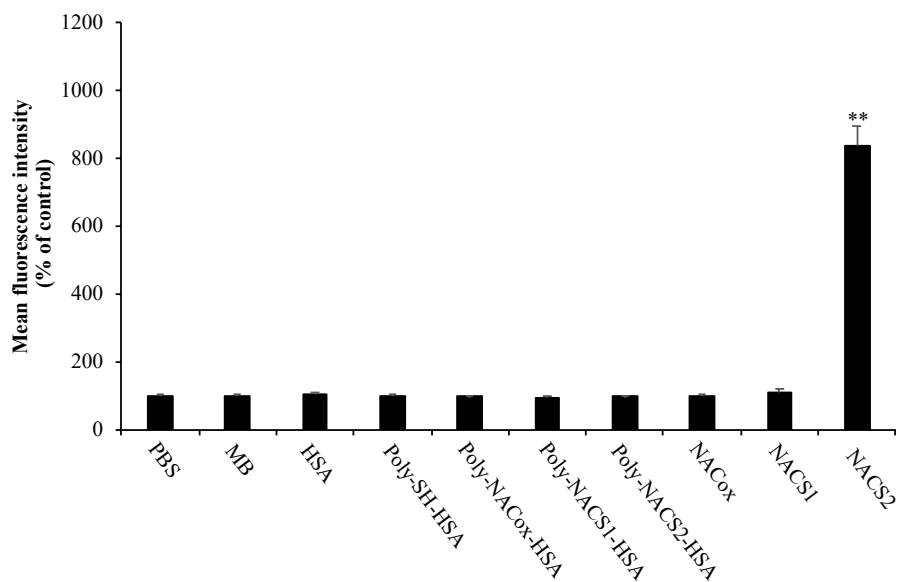


**Fig. 101 Numbers of polysulfide in an oxidized form in Poly-NACS2-HSA.**

The levels of polysulfide in an oxidized form were measured using by EMSP. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. n = 3. \*\*p<0.01 vs. HSA.

## 5-2 細胞内酸化ストレスに対する poly-NACSn-HSA の抑制効果

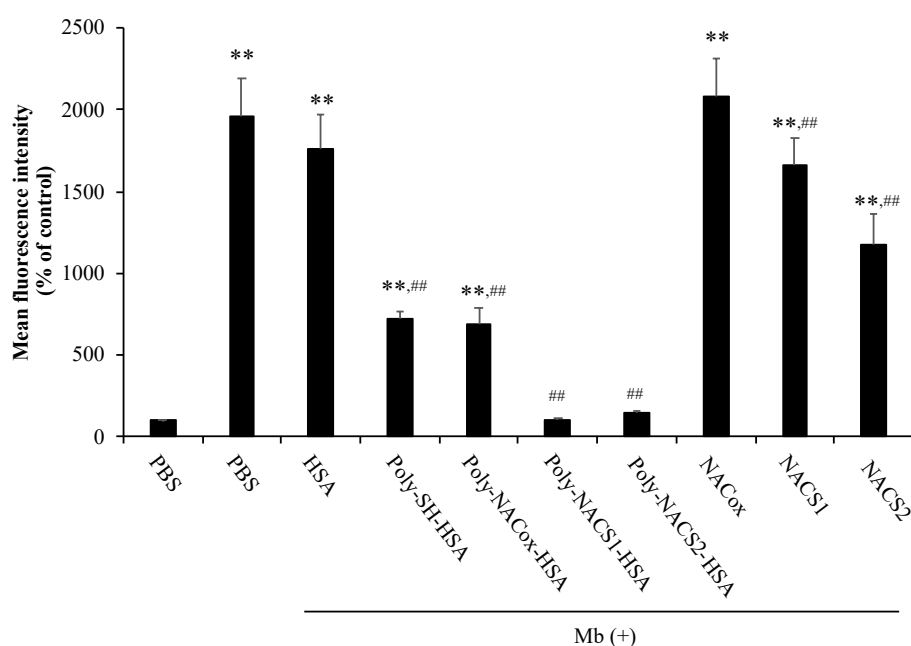
次に、Poly-NAC-HSA の細胞内へのポリスルフィドの供給能について、Sn-HSA と同様の手法で評価した。その結果、NACS2 が LLC-PK1 細胞にポリスルフィドを供給したのに対し、Poly-NACSn-HSA は細胞内へ全くポリスルフィドを供給しなかった (Fig. 102)。



**Fig. 102 Intracellular uptake of polysulfide by poly-NACSn-HSA or NAC polysulfide.**

Samples (20  $\mu$ M) were treated to LLC-PK1 cells for 2 hr. After the treatment, cells were washed and treated SSP4 (5  $\mu$ M) with CTAB (1 mM) in PBS (+). The fluorescence intensity was measured using a microplate reader. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. n = 3. \*\*p<0.01 vs. PBS.

そこで、poly-NACs-HSA の抗酸化力について、ミオグロビン誘発の酸化ストレスに対する抑制効果を測定することで評価した。その結果、poly-NACS1-HSA および poly-NACS2-HSA は細胞内の酸化ストレスをコントロールレベルまで抑制した (Fig. 103)。Poly-NACS1-HSA、poly-NAC-S2-HSA の抗酸化活性は同濃度の poly-NACox-HSA より高かったことから、その抗酸化活性の少なくとも一部はポリスルフィドを介していることが考察される。また、これらの抗酸化活性は同量の HSA や 5 倍量の NAC ポリスルフィドよりも顕著に高かったことから、HSA と結合させることで相乗的な抗酸化効果を獲得した可能性がある。

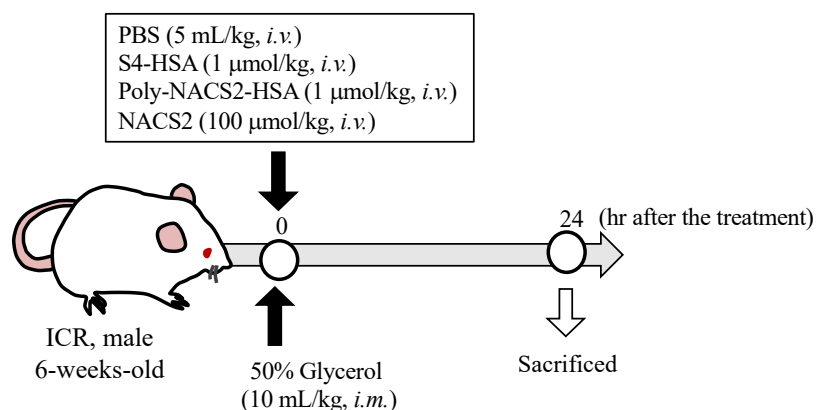


**Fig. 103 Effect of poly-NACSn-HSA and NAC polysulfide to the intracellular ROS induced by myoglobin.**

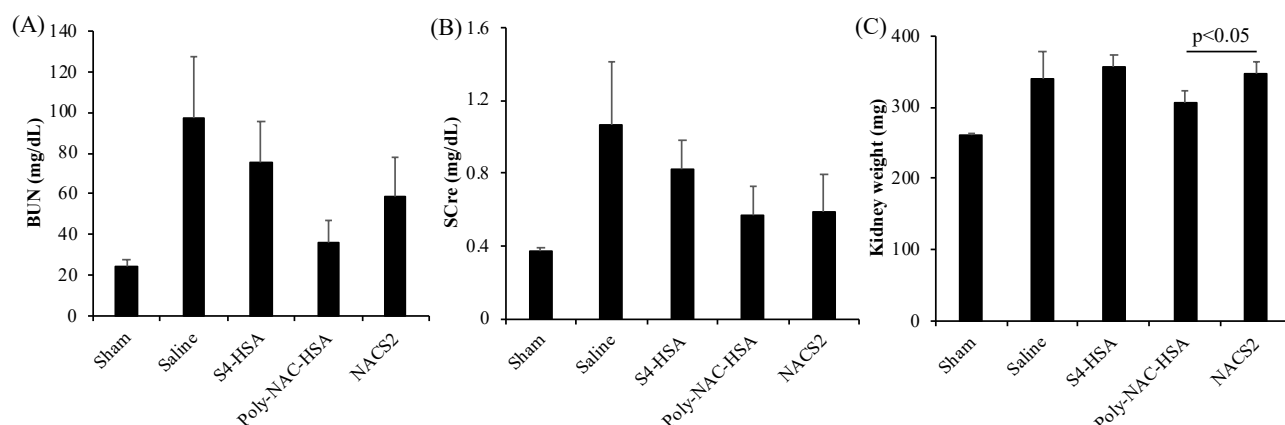
Intracellular ROS was measured using CMH<sub>2</sub>DCF-DA. CMH<sub>2</sub>DCF-DA (5  $\mu$ M) was treated to LLC-PK1 cells for 30 min and washed well. 0.1 mg/mL of myoglobin and HSA or poly-NACs-HSA (10  $\mu$ M), NACs (50  $\mu$ M) were treated to the cell and incubated for 2 hr. After the treatment, Fluorescence intensity (ex. 485 nm/ em. 535 nm) of each well was measured by a micro-platereader. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. n=3. \*\*p<0.01 as compared with Mb (-). ##p<0.01 as compared with PBS (Mb (+)). ††p<0.01 as compared with HSA.

## 第6節 グリセロール誘発 AKI に対するポリスルフィドドナーの治療効果

最後に、S4-HSA や poly-NACS2-HSA、NACS2 の *in vivo* における治療効果について評価した。病態モデルとして、第3章第6節にて評価した横紋筋融解症誘発 AKI を用いた。同節の結果より、酸化ストレスはグリセロール投与から早期に上昇することから、ポリスルフィドドナーはグリセロール投与の直前に行った (Fig. 104)。投与から 24 時間後、血清や尿を採取し、血液灌流したのちに腎臓を回収した。腎機能の指標として、BUN および血清クレアチニン、腎重量を測定した。その結果、モデル群の誤差が大きいため有意差は見られなかったものの、poly-NACS2-HSA 投与群で BUN や SCr の減少傾向および腎肥大化の抑制傾向が観察された (Fig. 105)。



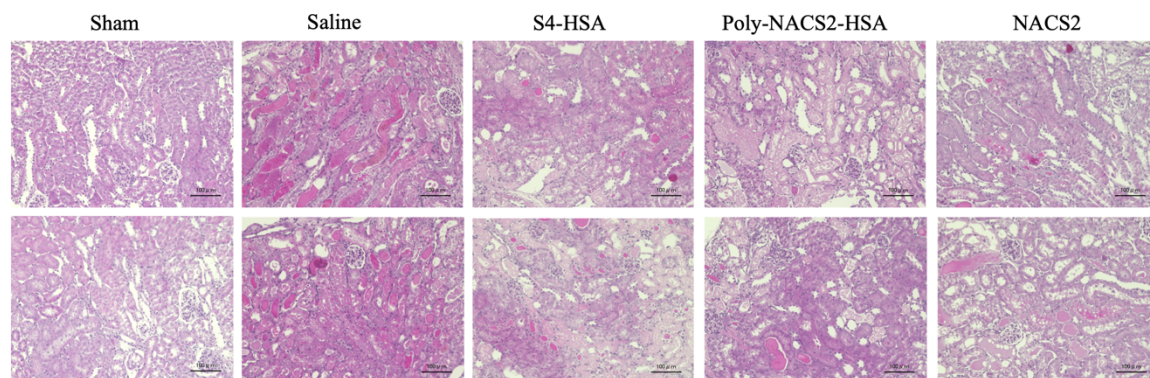
**Fig. 104** Schedule for evaluation of polysulfide donors on glycerol-induced AKI model mice.



**Fig. 105** Effect of kidney functions of polysulfide donors on glycerol-induced AKI model mice. Change in the levels of (A) BUN, (B) SCr and (C) kidney weight were measured after the injection of glycerol and donors. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. n = 3-4.



最後に、グリセロールの投与から 24 時間後の腎組織切片を作成し、H.E.染色を試みた。その結果、グリセロール投与により形成される円柱などの腎障害は、ポリスルフィドドナーの同時投与により一部抑制される傾向が得られた (Fig. 106)。今後、試料数を増やしてこれらポリスルフィドドナーの治療についてより明確な評価が必要であるが、その効果が十分に期待できる結果となった。



**Fig. 106 Effect of polysulfide donors on kidney damage caused by rhabdmyorosis.**

H.E. stained kidney section at 24 hr after the administration of glycerol.

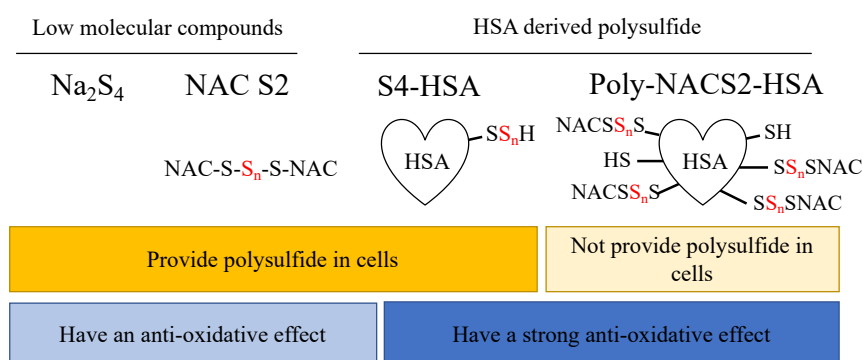
## 第 7 節 考察

多硫化ナトリウムと HSA を反応させることにより、新規活性イオウ供与剤である Sn-HSA の開発に成功した。Sn-HSA は高い抗酸化作用、NO 消去作用を有しており、メラノサイトの UV 照射に伴う酸化ストレスを抑制することで、メラニン産生抑制作用を示した。一般に、美白化粧品に含まれるトラネキサム酸やアルブチンは、炎症に伴うプロスタグランジン類の産生抑制やチロシナーゼとチロシンの結合阻害を作用機構としており、酸化ストレスに対する保護効果は有していない。しかし、メラニンの存在意義は、紫外線による酸化ストレスを含む障害を防ぐというものであるため、酸化ストレスを除去しないままにメラニンの産生を抑えることは皮膚の炎症や老化に繋がってしまう恐れがある。その点、Sn-HSA は、酸化ストレスを除去することで、メラニンの産生を亢進しにくい環境を整えることができるため、次世代型の美白化粧品としての有効性が期待される。

また筆者は、還元型ポリスルフィドを有し、即効性の抗酸化剤となることが期待される Sn-HSA と対照的に、酸化型ポリスルフィドのドナーである poly-NACSn-HSA を開発

した。Poly-NACSn-HSA は Sn-HSA と有しているポリスルフィドの種類が異なることから、性質の違うポリスルフィド供与剤として機能することが期待される (Fig. 107)。本研究では、S4-HSA は細胞内にポリスルフィドを速やかに供給するのにに対し、poly-NACS2-HSA は細胞内にポリスルフィドを供給しなかった。尿細管上皮細胞を用いた *in vitro* 試験においては、S4-HSA と poly-NACS2-HSA の両方が高い抗酸化活性を示した。NACS2 は速やかにポリスルフィドを細胞内に供給したことから、HSA と結合させることによって NACS2 のポリスルフィドは異なる特性を獲得したものと考えられる。一方、予備的試験ではあるものの、横紋筋融解症誘発 AKI モデルマウスにおいては、poly-NACS2-HSA が腎障害を抑制する傾向が得られた。今後、各ドナーの安定性試験を含め、酸化ストレス疾患治療薬としてのより詳細な有用性評価が求められる。

既報のポリスルフィドの生理活性の中には、抗酸化活性以外に硫黄を利用することで示す作用もある。例えば、システインへ硫黄原子が結合することでタンパク質の活性を変化させることによって生じるものがある。パーキンのシステインがポリスルフィド化すると、異常タンパク質のユビキチン化が促進され、黒色神経細胞の細胞死が抑制されることが報告されている<sup>75</sup>。また、硫黄原子が生理活性物質へ結合して不活化する例もある。例えば、ポリスルフィドが MeHg と反応すると、ビス体である (MeHg)<sub>2</sub>S を形成し、MeHg を解毒することが知られている<sup>76</sup>。Sn-HSA や poly-NACS2-HSA は、抗酸化作用以外にもポリスルフィドドナーとして多彩な作用を示す可能性が期待できる。



**Fig. 107 Defferent characotors of polysulfide donors.**

## 第8節 小括

本章では、抗酸化剤としての応用を目標に、HSA を基盤としたポリスルフィドのドナーを作製した。以下に得られた知見を小括する。

- 1)  $\text{Na}_2\text{S}_n$  と HSA を反応させることで、還元型ポリスルフィドが結合した HSA である Sn-HSA を作製した。反応させる  $\text{Na}_2\text{S}_n$  の硫黄の数に応じて結合するポリスルフィドは高く、最大で HSA 1 分子あたり 4 つの sulfane sulfur が結合した。Cys34 が酸化状態にあるほど、 $\text{Na}_2\text{S}_n$  の結合効率が高かった。
- 2) Sn-HSA は、メラノーマ細胞においてメラニン産生をポリスルフィド依存的に抑制した。そのメカニズムとして、高い ROS および NO の消去活性を有していたこと、およびチロシナーゼ活性を抑制したことが示唆された。
- 3) 近位尿細管上皮細胞を用いた *in vitro* 試験にて、Sn-HSA は細胞内へポリスルフィドを供給可能なことが示された。また Sn-HSA は、ミオグロビン添加により惹起される酸化ストレスを HSA や  $\text{Na}_2\text{S}_n$  と比較して高効率に抑制した。
- 4) 酸化型ポリスルフィドの供与体として、NAC ポリスルフィドが結合した HSA である poly-NACSn-HSA を作製した。HSA を化学修飾して導入した約 5 つの SH のうち約 3 個が NAC ポリスルフィドと結合し、合計で 5 つの酸化型ポリスルフィドが HSA へ導入された。Poly-NACSn-HSA は近位尿細管上皮細胞内にポリスルフィドを供給せず、また、ミオグロビン誘発の酸化ストレスの消去活性を有していた。
- 5) 十分な評価には至っていないものの、poly-NACS2-HSA はグリセロール投与による横紋筋融解症誘発 AKI モデルマウスにおいて、腎障害を軽減する傾向が得られた。

以上、還元型および酸化型ポリスルフィドドナーを作製することに成功し、さらにこれらが高い抗酸化活性を有していることを見出した。これらのドナーは、HSA がそれぞれの形態のポリスルフィドを利用して抗酸化作用を示すことを模倣したものであり、生体適合性の高い抗酸化剤としての応用が期待できる。

## 第5章 総括

これまで「 $\text{H}_2\text{S}$  と  $\text{SH}$  の反応物」と考えられていたポリスルフィドが、実は生体内で恒常的に合成されることが明らかになり、活性イオウ研究はこの5年間で大きく変化した。質量分析を駆使した解析や蛍光プローブの開発など測定技術の発達も伴い、ポリスルフィドが抗酸化作用を有することやタンパクの機能に関与することが続々と明らかになってきた。一方、*in vitro* にて血清に  $\text{Na}_2\text{S}$  を添加すると血清タンパク質に結合してスルフィドとして観察されなくなることから、血清タンパク質にイオウのプールがあると言われている<sup>36</sup>。 $\text{H}_2\text{S}$  は可逆的酸化状態にある  $\text{SH}$  と反応してポリスルフィドを形成する<sup>24</sup>ことから、このプールの実態は  $\text{RSS}$  であることが推察される。しかし、血清は酸化的環境にあること、および、酸化型ポリスルフィドの定量法の欠如がボトルネックとなり、血清やその他の生体液中のポリスルフィドの存在は現在まであまり報告されていない。低分子に関しては、 $\text{CysSS}_n\text{H}$  の存在が報告されているものの、その濃度は数 $\mu\text{M}$  と組織中ポリスルフィドと比較してわずかであり、「プール」と呼ぶには乏しい<sup>8</sup>。筆者は、 $\text{RSS}$  の包括的理解を達成すべく、新規ポリスルフィド測定法の確立を試みた(第2章)。さらに、確立した手法で生体液中のポリスルフィドを検出し、その役割解明を試みた(第2、3章)。第4章では、得られた知見を応用し、ポリスルフィドを利用した新規抗酸化剤の開発に取り組んだ。

以下に、本研究にて得られた知見を総括する。

### 第2章 ポリスルフィドの新規定量法の開発と生体液測定への応用

アスコルビン酸および塩基がポリスルフィドをスルフィドに還元することを発見し、これを応用することで、ポリスルフィドの定量法を世界に先駆けて確立することに成功した。この定量系により血清や精液などの生体液中にポリスルフィドが存在することや、HSA が酸化型ポリスルフィドを高濃度に保持していることが明らかとなった。血清中の酸化型ポリスルフィドはわずかに概日リズムを有していたことから、血清ポリスルフィドを比較する際は同時刻に採決した血清を用いることが望ましいことが分かった。カラムを用いた分離により、血清の酸化型ポリスルフィドの85%以上はHSAに結合した状態で存在していることが示された。精液中のポリスルフィドは精子や精囊腺分泌液に存在しており、受精率に関与する可能性が示唆された。以上、酸化型ポリスルフィドを中心に、ポリスルフィド測定系の基盤を構築することに成功した。

### 第3章 HSA におけるポリスルフィドの機能解析

まず、第2章にて存在が明らかになった HSA に存在するポリスルフィドについて、その役割解明を試みた。システイン間の結合はタンパク質の立体構造を形成する重要因子の一つである。 $\beta$ -NADH などにより HSA からポリスルフィドを引き抜くと、その立体構造が変化したことから、ポリスルフィドはシステイン残基同士の結合の距離を調節する役割を有している可能性が示唆された。また、酸化ストレスを受けると HSA の酸化型ポリスルフィドが開裂し、還元型ポリスルフィドを得ることにより、抗酸化作用が増強されることが示された。更に、酸化ストレスが進行すると、両形態のポリスルフィドが消費され、HSA の抗酸化作用も減弱することが示された。本酸化ストレス応答は、酸化ストレス関連疾患の1つである糖尿病性腎症や急性腎障害時にも観察されたことから、ポリスルフィドの状態をモニタリングすることにより血清の酸化状態をより詳細に理解できる可能性が示唆された。

### 第4章 ポリスルフィド付加 HSA の設計および有用性評価

第3章にて明らかにした、酸化ストレスが進行した際にポリスルフィドが失われることに着目し、ポリスルフィド補充による酸化ストレス疾患の治療効果を評価すべく、ポリスルフィドドナーの開発を試みた。還元型ポリスルフィドドナーとして、 $\text{Na}_2\text{S}_n$  と HSA を結合させることにより Sn-HSA を作製した。Sn-HSA は、ポリスルフィドを介して高い抗酸化活性を示し、メラニン産生を抑制した。酸化型ポリスルフィドのドナーとして、SH を導入した HSA である poly-SH-HSA を NAC ポリスルフィドと反応させることで、poly-NACSn-HSA を作製した。Poly-NAC $\text{S}_2$ -HSA も Sn-HSA 同様に抗酸化活性を有し、ミオグロビン由来の ROS を抑制した。また、横紋筋融解症誘発 AKI モデルマウスにおいて、腎障害を抑制する傾向が得られた。Poly-NAC $\text{S}_2$ -HSA の抗酸化活性は、ポリスルフィドを持たない poly-NACox-HSA と比較して高かったことから、poly-NAC $\text{S}_2$ -HSA はポリスルフィドを介した抗酸化力を有していることが示された。

以上述べてきたように、本研究では血清をはじめとする細胞外環境下でのポリスルフィドに関する基礎的な知見を得るための新規ポリスルフィド測定法の開発を行った。本法により、HSA にポリスルフィドが存在することや、ポリスルフィドが抗酸化作用や構造維持に重要な因子であることを突き止めた。更に、酸化ストレス疾患時に血清ポリスルフィドが減少することが明らかとなった。これらの知見は、RSS によるタンパク質の機能制御の解明や酸化ストレス疾患の診断マーカーのみならず、新規予防・治療方法の確立のための重要な基礎資料となりえると考えられる。

## 実験の部

### 実験試料

ヒト血清アルブミンは、化学及び血清療法研究所またはニチャク、ベネシスから購入したものを Chen らの方法に従い脂肪酸を除去し、透析したのち凍結乾燥したものを実験に供した。平均分子量は 66,500 とした。 $\alpha_1$ -アンチトリプシン ( $\alpha_1$ PI) 及び  $\alpha_1$ -酸性糖タンパク (AGP) は化学及び血清療法研究所から恵与されたものを使用した。GSSSG および NAC polysulfide は熊本大学医学部微生物学分野の澤 智裕教授より恵与いただいた。メチレンブルーアッセイキット (1% 酢酸亜鉛、N,N-dimethyl-p-phenylenediamine (DPDA)、 $\text{FeCl}_3$  及び 硫化ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{S}$ )) 及び 多硫化ナトリウムは同仁化学より恵与されたものを実験に使用した。ポリスルフィド fluorescent probe 2 (SSP2) および 4 (SSP4) はワシントン州立大学 Ming Xian 博士より恵与いただいた。ミツバチ関連製品は、山田養蜂場より供与いただいた。DTT、水酸化ナトリウム、グルタチオン (還元型および酸化型)、5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)、ヒスト VT ワンおよびサリチル酸ナトリウムはナカライテスクより購入した。アスコルビン酸、DTT、クロラミン T、1,2-ジフェニル 2-ピクリルヒドラジル、ラボアッセイ<sup>TM</sup> クレアチニン、2-イミノチオラン塩酸塩、ギ酸、臭化シアン、塩酸 (HCl) は富士フィルム和光純薬より購入した。5-Iodoacetoamidofluorescein は、Thermo Scientific より購入した。BUN Colorimetric Detection Kit は、Invitrogen より購入した。ICR マウスは、日本 SLC より購入した。Dimethyl disulfide および dimethyl trisulfide は東京化成工業より購入した。硫化物イオン電極は、HORIBA のものを使用した。Diallyl trisulfide は Cayman 化学社より購入した。Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit は Thermo Fisher Scientific 社より購入した。Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) は gibco 社のものを購入した。Medium 188 および亜硝酸ナトリウム、シアン化カリウム、ウシ血清アルブミンは Sigma-Aldrich 社のものを購入して使用した。透析膜は、REPLIGEN 社のスペクトラポア 7 透析膜 (分画分子量=3,500) のものを購入し、透析液にて直前で洗浄した後に使用した。固相抽出カラム (Bond Elute-C18 EQP 200 mg/3cc) は Varian 社のものを使用した。UV ランプは、アズワンのハンディーUV ランプ (長波長・短波長切り替えタイプ、SLUV-4) を使用した。その他、試薬、溶媒類は全て市販特級品を使用した。HiTrap Blue HP Columns および Blue Sepharose 6 Fast Flow、HiTrap Desalting は GE ヘルスケアサイエンス社より購入した。水は Merck Millipore 社の超純水製造装置で超純水を用事調製して使用した。

### 統計解析

実験データは平均値±標準誤差で示した。2群間比較の有意差検定は Student の t-検定を用いて行った。多群間の有意差検定には、ANOVA 検定を用いた。危険値が 0.05 以下であるとき統計学的に有意差があると判断した。

## 第2章に関する実験

### メチレンブルー法によるスルフィドの定量

200  $\mu\text{L}$  の試料に 1% 酢酸亜鉛水溶液を 200  $\mu\text{L}$ 、1.5 N NaOH を 25  $\mu\text{L}$  添加し混合した。遠心して上清を除去し、脱イオン化蒸留水で 2 回洗浄した。もう一度遠心して得られた沈殿物に 200  $\mu\text{L}$  の脱イオン化蒸留水を加え、ほぐしたのちに 1% 酢酸亜鉛水溶液 300  $\mu\text{L}$ 、20 mM DPDA/ 7.2 N HCl 溶液を 50  $\mu\text{L}$ 、30 mM  $\text{FeCl}_3$ / 1.2 N HCl 溶液を 50  $\mu\text{L}$  添加し、室温にて 30 分間反応後、マイクロプレートリーダーを用いて 665 nm の吸光度を測定した。検量線には  $\text{Na}_2\text{S}$  を用い、吸光度から濃度を算出した。

結句型イオウの定量には、試料を終濃度 1 mM となるように DTT を加え、37°C で 10 分間前処理させた後、同様の操作を行った。

### Sulfide Anti-oxidant Buffer との反応物中スルフィド量の定量

SAOB は 1.25 g の サリチル酸ナトリウム、312.5 mg の L-アスコビン酸を 2.2 N の NaOH に 5 mL となるように溶解することで 3  $\times$  SAOB として調製した。133.3  $\mu\text{L}$  の試料に 66.7  $\mu\text{L}$  の 3  $\times$  SAOB を加え 200  $\mu\text{L}$  とし、25°C または 37°C で 4 時間反応させた。反応後、各試料に 1% 酢酸亜鉛水溶液を 600  $\mu\text{L}$  添加し、よく震盪した。8,000  $\times$  g で 5 分間遠心したのち、沈殿を吸わないように上清を 650  $\mu\text{L}$  除去した。得られた沈殿物にイオン交換水を 1 mL 加えてよくピペッティングし、沈殿物をほぐした。8,000  $\times$  g で 5 分間遠心したのち、沈殿を吸わないように上清を 1 mL 除去した。得られた沈殿物に 200  $\mu\text{L}$  のイオン交換水を加え、良くピペッティングして沈殿物をほぐした。1% 酢酸亜鉛水溶液を 300  $\mu\text{L}$ 、20 mM DPDA/ 7.2 N HCl 溶液を 50  $\mu\text{L}$ 、30 mM  $\text{FeCl}_3$ / 1.2 N HCl 溶液を 50  $\mu\text{L}$  添加し、よく震盪し混合した。室温で 30 分間反応した後、8,000  $\times$  g で 1 分間遠心し、96-well plate に上清を 200  $\mu\text{L}$  ずつ添加した。665 nm の吸光度を測定し、 $\text{Na}_2\text{S}$  による検量線から濃度を求めた。

### EMSP 法

133.3  $\mu\text{L}$  の試料に 66.7  $\mu\text{L}$  の 3×EMSP (0.9 M L-アスコルビン酸/ 3 N KOH) を加え 200  $\mu\text{L}$  とし、37°C で 4 時間反応させた。反応後、各試料に 1% 酢酸亜鉛水溶液を 600  $\mu\text{L}$  添加し、よく震盪した。8,000×g で 5 分間遠心したのち、沈殿を吸わないように上清を 650  $\mu\text{L}$  除去した。得られた沈殿物にイオン交換水を 1 mL 加えてよくピペッティングし、沈殿物をほぐした。この洗浄操作をさらに 2 度繰り返した。得られた沈殿物に 200  $\mu\text{L}$  のイオン交換水を加え懸濁したのち、1% 酢酸亜鉛水溶液を 300  $\mu\text{L}$ 、20 mM DPDA / 7.2 N HCl 溶液を 50  $\mu\text{L}$ 、30 mM FeCl<sub>3</sub>/ 1.2 N HCl 溶液を 50  $\mu\text{L}$  添加し、よく震盪し混合した。室温で 30 分間反応した後、8,000×g で 1 分間遠心し、96-well plate に上清を 200  $\mu\text{L}$  ずつ添加した。665 nm の吸光度を測定し、Na<sub>2</sub>S による検量線から濃度を求めた。

### タンパク質定量

タンパク質の濃度は、BCA 法または Bradford 法により求めた。基本的には BCA 法を使用し、ポリスルフィド付加アルブミンの定量には Bradford 法を用いた。検量線には、ウシ血清アルブミンを使用した。

### 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic Acid) (DTNB) による SH の定量

DTNB 1.98 mg を 10 mL の 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (KPB)/ 1 mM DTPA 溶液 (pH 7.0) に溶解し、DTNB 溶液を調製した。検量線には、還元型グルタチオンを用いた。96 well plate に試料及び検量線を 20  $\mu\text{l}$  ずつ添加し、DTNB 溶液を各 well に 100  $\mu\text{l}$  ずつ加えた。室温で 30 分反応後、412 nm の吸光度を測定した。

### 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) Dihydrochloride (AAPH) ラジカル消去試験

37°C の PBS (920  $\mu\text{L}$ ) を 1.5 mL エッペンチューブに入れ、さらに 20  $\mu\text{L}$  の試料溶液 (HSA: 100  $\mu\text{M}$  または血清: 10 倍希釈したもの) を加えた。10  $\mu\text{L}$  の 16 mM リノール酸溶液を加え、さらに 50  $\mu\text{L}$  の 50 mM AAPH 溶液またはイオン交換水を加えた。37°C で 90 分反応後、96 well UV プレートに 200  $\mu\text{L}$  ずつ分注し、234 nm の吸光度を測定した。以下の式に従って、ラジカル消去率を算出した。

$$\text{ラジカル消去率 (\%)} = \frac{(\text{試料 OD}_{234} \text{ AAPH (+)} - \text{試料 OD}_{234} \text{ AAPH (-)})}{(\text{PBS OD}_{234} \text{ AAPH (+)} - \text{PBS OD}_{234} \text{ AAPH (-)})} \times 100$$



### DPPH ラジカル消去活性の測定

エタノールに溶解した DPPH 溶液 (250  $\mu$ M) を同量の 50 mM MES 緩衝液 (pH 7.4) と混和し、PBS で 40  $\mu$ M に調整した試料と 30 分室温で反応させたのち、540 nm の吸光度を測定した。以下のように、試料の代わりに PBS を使用したものの吸光度に対する試料の吸光度の比をラジカル消去率として算出した。

$$\text{ラジカル消去率 (\%)} = \frac{(\text{試料 OD517 DPPH (+)} - \text{試料 OD517 DPPH (-)})}{(\text{PBS OD517 DPPH (+)} - \text{PBS OD517 DPPH (-)})} \times 100$$

### 蛍光プローブを用いたポリスルフィドの検出

1 mM Hexadecyltrimethylammonium Bromide (CTAB) / PBS (pH 7.4) 溶液に試料を加え、DMSO に溶解した 5  $\mu$ M の SSP2 と室温で 10 分間反応させたのち、励起波長 457 nm、蛍光波長 490-580 nm の蛍光強度を蛍光分光光度計 (日本分光、FP-8200) にて測定した。

### アフィニティークロマトグラフィーによる HSA の分離

5 mL の HiTrap Blue HP Columns を 25 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) にて平衡化したのち、試料をカラムに加えた。25 mL の 25 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) でカラムを洗浄したのち、1.5 M NaCl / 25 mM リン酸ナトリウム緩衝液で HSA を溶出した。

### 臭化シアン (CNBr) による HSA の切断

試料中のメチオニン残基 (Met) に対して 200 倍のモル数の CNBr を試料と 70%ギ酸溶液中で 24 時間、室温にて反応させた。反応後、-20°C で予冷していたアセトンに 4 倍量加えボルテックスにて混和したのち、-20°C で 2 時間冷却した。試料を 15,000 $\times$ g で 30 分遠心し、上清を除去して沈殿を 25 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) にて溶解した。50 mL の Blue Sepharose 6 Fast Flow を 25 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) にて平衡化したのち、試料をカラムに供した。その後、非吸着画分、1 M NaCl 溶出画分、0.5 M KSCN 溶出画分ならびに 1 M KSCN 溶出画分を分取し、SDS-PAGE の結果から、それぞれの HSA フラグメントの純度を確認した。

### PEG-Maleimide based gel Shift Assay (PMSA)

1 mg/mL の試料タンパク質 500  $\mu$ L に 100 mM TCEP を 5  $\mu$ L ずつ加え、室温で 1 時間反応させた。G-25 スピンカラムで脱塩して、10  $\mu$ L の 0.3 mg/mL 試料タンパク質に 2 mM の IAM を 10  $\mu$ L 加え、37°C で 1 時間反応した。さらに 3  $\mu$ L の 2.5 mM PEG<sub>20,000</sub>-Maleimide を加え、37°C で 1 時間反応させ、SDS-PAGE を行い、銀染色を行った。

#### DTT-MB (strong)

終濃度がそれぞれ 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM DTT、0.1% SDS となるように試料 200  $\mu$ L を調製した。試料は血清の場合 40 倍希釈で、血清アルブミンの場合は 10-20  $\mu$ M となるようにした。60°C で 5 時間インキュベートしたのち、300  $\mu$ L の 1%酢酸亜鉛水溶液および 7.5  $\mu$ L の 1 N NaOH を加え、よく混和した。8,000 $\times$ g で 5 分間遠心し、沈殿を吸わないように上清を 450  $\mu$ L 除去した。得られた沈殿物にイオン交換水を 0.5 mL 加えてよくピペティングし、沈殿物をほぐした。この洗浄操作をもう一度繰り返した。得られた沈殿物を 500  $\mu$ L の超純水で懸濁し、20 mM DPDA / 7.2 N HCl および 30 mM FeCl<sub>3</sub> / 1.2 N HCl 溶液を直前で 1:1 で混和した溶液を 100  $\mu$ L 加え、よく震盪し混合した。室温で 30 分間反応した後、8,000 $\times$ g で 1 分間遠心し、96-well plate に上清を 200  $\mu$ L ずつ添加した。665 nm の吸光度を測定し、Na<sub>2</sub>S による検量線から濃度を求めた。

#### DTT-MB (weak)

終濃度がそれぞれ 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、3 mM DTT となるように試料 200  $\mu$ L を調製した。試料は血清の場合 10-20 倍希釈で、血清アルブミンの場合は 20-100  $\mu$ M となるようにした。37°C で 1 時間インキュベートしたのち、300  $\mu$ L の 1%酢酸亜鉛水溶液および 7.5  $\mu$ L の 1 N NaOH を加え、よく混和した。8,000 $\times$ g で 5 分間遠心し、沈殿を吸わないように上清を 450  $\mu$ L 除去した。得られた沈殿物にイオン交換水を 0.5 mL 加えてよくピペティングし、沈殿物をほぐした。この洗浄操作をもう一度繰り返した。得られた沈殿物を 500  $\mu$ L の超純水で懸濁し、20 mM DPDA / 7.2 N HCl および 30 mM FeCl<sub>3</sub> / 1.2 N HCl 溶液を直前で 1:1 で混和した溶液を 100  $\mu$ L 加え、よく震盪し混合した。室温で 30 分間反応した後、8,000 $\times$ g で 1 分間遠心し、96-well plate に上清を 200  $\mu$ L ずつ添加した。665 nm の吸光度を測定し、Na<sub>2</sub>S による検量線から濃度を求めた。

#### 蛍光アルキル化剤を用いた還元型ポリスルフィドの検出

25 mM リン酸ナトリウム緩衝液にて、試料と 5-IAF または 5-MAF を混和し、4°C または 37°C で 2 時間反応した。反応後、溶液 500  $\mu$ L を 25 mM リン酸ナトリウム緩衝液で平衡化しておいた G-25 スピнкаラム (カラム容量 : 2 mL) に加え、1,000  $\times$ g で 2 分遠心した。得られた試料 200  $\mu$ L に 1 M DTT を 2  $\mu$ L 加え、37°C で 6 時間反応した。反応後の溶液を 25 mM リン酸ナトリウム緩衝液で洗浄および平衡化しておいた G-25 スピнкаラムに加え、1,000 $\times$ g で 2 分間遠心し、溶出した試料を 96-well plate に添加し、ex = 395 nm / em = 485 nm の蛍光を測定した。

### 第3章に関する実験

#### ポリスルフィド除去 HSA の調製

##### ①蛍光プローブによる除去

HSA (150  $\mu$ M) を 1 mM の SSP4 または DMSO と室温で 10 分反応させたのち、同量の冷アセトンを加え、タンパク質を沈殿させた。1,000 $\times$ g で 10 分遠心分離後上清を除去し、沈殿物を PBS にて再溶解した。

##### ② $\beta$ -NADH による除去

HSA 10 mg/mL と  $\beta$ -NADH 100 mM を 0.2 M Tris-HCl (pH 8.0) 中で混和し、37 $^{\circ}$ C で 24 時間反応させ、透析により HSA を精製した。

#### CD スペクトルの測定

JASCO J-820 型分光偏光計を用いた。タンパク質を PBS (pH 7.4) 中にて 10  $\mu$ M の濃度になるよう調整した。近赤外領域の CD スペクトルは 10 mm セルを、遠赤外領域の CD は 1 mm セルを用いてそれぞれ測定を行った。

$\alpha$ -ヘリックス含量は Chen らの方法に従い、222 nm における  $[\theta]$  を用いて、式 (8) により算出した。

$$\alpha\text{-helix contents (\%)} = -([\theta]_{222\text{ nm}} + 2340) / 30300 \times 100 \quad (8)$$

#### 蛍光プローブによる薬物結合サイトの解析

BD140 (3  $\mu$ M)、DNSA (10  $\mu$ M)、HSA (10  $\mu$ M) および samples (100  $\mu$ M) を 10 mM リン酸緩衝液 (1% DMSO, pH 7.3) 中で室温にて反応させた (全量 1 mL)。試料をガラスセルに移し、蛍光分光光度計 (FP-6600、日本分光) を用いて、365 nm で励起した際の蛍光をスキャンモードにて測定した。

#### クロラミン T (CT) による HSA の酸化

20 mg/mL の HSA を 67 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) にて 100 mM クロラミン T と好気条件下で 37 $^{\circ}$ C で 6 時間反応後、イオン交換水にて透析した。透析終了後、1/20 量の 20 $\times$ PBS を加えた。

#### 金属触媒酸化 (MCO)

Meucci らの報告を参考に、HSA を MCO した<sup>57</sup>。20 mg/mL の HSA を 50 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM 塩化カリウム、10 mM 塩化マグネシウム中で 25 mM アスコルビン酸および

100  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub> と好気条件下で 37°C、6 時間反応後、イオン交換水にて透析した。透析終了後、1/20 量の 20×PBS を加え、実験に供した。

#### グリセロール誘発急性腎障害 (AKI) モデルマウスの作製

6 週齢の ICR 雄性マウスに 24 時間の絶水処置を施したのち、イソフルラン吸入麻酔下で 10 mg/kg の 50%グリセロールを半量ずつ両側大腿部に筋肉内投与した。投与後、第 3 章では 1、6、12、24 時間後に、第 4 章では 24 時間に、イソフルラン吸入麻酔下でマウスの膀胱より尿を、下大静脈より血液を回収した。採血シリンジには予めヘパリンを通しておいた。PBS にて心臓より全身血管を灌流し、腎臓を回収した。

### 第 4 章に関する実験

#### Sn-HSA の調製

300  $\mu$ M (20 mg/mL) の脱脂ヒト血清アルブミン 1 mL に 100 mM の Na<sub>2</sub>S<sub>n</sub> を 10  $\mu$ L 加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、HiTrap Desalting カラムを用いてゲル濾過を行い、未反応の Na<sub>2</sub>S<sub>n</sub> を除去した。

#### B16 細胞および LLC-PK1 細胞の培養と継代

B16 細胞の培養液は、DMEM に 10% FBS、100 U penicillin/mL、100  $\mu$ g streptomycin /mL を添加して調製した。LLC-PK1 細胞の培養液は、Medium 188 に 10% FBS、100 U penicillin/mL、100  $\mu$ g streptomycin /mL を添加して調製した。液体窒素にて保管した細胞を 37°C に予熱した培養液 10 mL で直ちに溶解し遠心分離 (室温、1000×g、5 分)した。培養液を除去し、新たに培養液で懸濁後、プラスチック製培養ディッシュに播種し、37°C、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。コンフルエントに達する前に CO<sub>2</sub> インキュベーターからディッシュを取り出し、培養上清を除去したのち、PBS で洗浄した。その後、トリプシン代替物である TrypLE にて回収し、培養液を加え、直ちに遠心分離 (室温、1000×g、5 分)した。上清を除去し、再度培養液を加えて懸濁したのち、培養ディッシュに播種することで継代を行った。

#### メラニン産生量の測定

B16 細胞を  $2.5 \times 10^4$  cells/well となるように 24-well plate に播種した。24 時間後、試料を DMEM (+) にて希釈したチロシンおよび NH<sub>4</sub>Cl をそれぞれ 0.4 mM と 10 mM の終濃度になるよう添加した。37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養し、72 時間後 PBS で洗浄したのち 1 N NaOH を

200  $\mu$ L ずつ加え、60°C で 1 時間反応した。細胞溶解液を回収し、405 nm の吸光度を測定した。405 nm の吸光度を BCA 法にて測定したタンパク定量で除したものをメラニン産生量とした。

#### UV 照射

96-well plate に播種した B16 細胞への UV 照射は、ハンディー UV ランプを plate の下面から 5 cm の距離から行った。なお、用いた UV ランプを 5 cm 離れた際の紫外線放射強度は、254 nm および 365 nm において、それぞれ 614 および 743  $\mu$ W/cm<sup>2</sup> であることを確認している。

#### NO および SNO の定量

Griess 試薬として、2% (W/V) sulfanilamide in 4% phosphoric acid と 2% (W/V) sulfanilamide in 4% phosphoric acid を直前で混合したものを用いた。緩衝液には、0.1 M NaCl+ 0.5 mM DTPA+10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5)) を用いた。Griess 試薬および緩衝液、塩化水銀溶液 (3 mM HgCl<sub>2</sub> in 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5)) を 11:3:6 で混和し、この溶液 100 mL と試料 20 mL を 96-well plate 上で 37°C で 15 分反応させた。反応後、540 nm における吸光度を測定した。検量線には亜硝酸ナトリウムを用いた。

#### B16 における細胞内 ROS および NO の測定

B16 における細胞内 ROS および NO の測定は、それぞれの蛍光試薬である CM-H<sub>2</sub>DCF-DA および DAF-FM-DA を用いて行った。B16 細胞を 96-well plate に  $1 \times 10^4$  cells/well で播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 24 時間培養した。その後、PBS (+) にて希釈した CM-H<sub>2</sub>DCF-DA (最終濃度 5  $\mu$ M) もしくは DAF-FM-DA (最終濃度 10  $\mu$ M) を添加し、37°C で 30 分反応することで、細胞内へプローブを取り込ませた。その後、上清を除去して PBS に溶解した試料を添加し、蛍光を測定したのち UV 照射をした。照射後、蛍光強度 (Ex. 485 nm、Em. 535 nm) をマイクロプレートリーダーにより測定した。

#### B16 における細胞内ポリスルフィドの検出

B16 細胞を 96-well plate に  $1 \times 10^4$  cells/well で播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 24 時間培養した。PBS (+) に上清を置換して一定時間 UV を照射したのち、上清を除去し、5 mM SSP4/2 mM CTAB/PBS を加えた。室温で 10 分反応したのち、Ex. 485 nm、Em. 535 nm の蛍光強度をマイクロプレートリーダーにて測定した。

#### チロシナーゼ活性の測定<sup>77</sup>

20  $\mu$ L のマッシュルーム由来チロシナーゼ (537 U/mL) と 100  $\mu$ L の Sn-HSA または HSA、60  $\mu$ L の PBS を 96-well plate 上で混和し、さらに 5 mM の L-DOPA を 20  $\mu$ L 加えた。室温で 30 分間反応後、490 nm の吸光度を測定した。

#### メラニン凝集の評価<sup>77</sup>

マッシュルーム由来チロシナーゼ (終濃度 53.7 U/mL) と L-DOPA (終濃度 0.5 mM) をエッペンチューブ内で混和し、室温で 10 分反応させた。反応後、終濃度 20  $\mu$ M の試料を加え、室温で 3 時間反応した。反応後の溶液を 20,000 $\times$ g で 15 分間遠心し、上清 200  $\mu$ L を 96-well plate に加え、490 nm の吸光度を測定した。

#### 細胞生存率および細胞障害性の評価

超純水 (30 mL) およびホホバ油 (15 mL)、乳化ワックス (5 g) を 60°C で回転混和することで、クリームを調製した。室温まで冷却したのち、終濃度 20  $\mu$ M となるように Sn-HSA を混和した。ヒト正常表皮細胞を重層培養したヒト 3 次元培養表皮モデルとして、ラボサイト エピ・モデルを購入し、経済協力開発機構 (OECD) のガイドライン (TG439) に基づいて皮膚刺激性を評価した。具体的には、エピ・モデルを 24 時間、37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境下で前培養したのち、クリームに混和した Sn-HSA または PBS にて溶解した Sn-HSA を 15 分間暴露した。クリームを除去後、PBS にて洗浄したのち、42 時間培養した。培養後、MTT 試験にて細胞生存率を、LDH 試験にて細胞障害率を求めた。

#### ミオグロビン誘発 ROS の測定

LLC-PK1 細胞を 96-well plate に  $1 \times 10^4$  cells/well で播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 環境下で 24 時間培養した。その後、培地に CM-H<sub>2</sub>DCF-DA (最終濃度 5  $\mu$ M) を添加し、37°C で 30 分反応することで、細胞内へプローブを取り込ませた。その後、上清を除去して PBS に溶解した試料および 0.1 mg/mL のミオグロビンを添加し、37°C、5%CO<sub>2</sub> で 2 時間反応した。反応後、蛍光強度 (Ex. 485 nm、Em. 535 nm) を蛍光マイクロプレートリーダーにより測定した。

#### Poly-NACSn-HSA の調整

終濃度 150  $\mu$ M の HSA を終濃度 3 mM の 2-イミノチオラン塩酸塩と 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) / 1 mM ジエチレントリアミン五酢酸中にて 37°C で 1 時間反応させた。反応後、終濃度 1 mM となるように NAC ポリスルフィドを加え、37°C で 3 時間反応した。反応後、試料を HiTrap Desalting カラムにて精製した。

## 参考文献

1. Urey, H. C., On the early chemical history of the earth and the origin of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1952**, 38 (4), 351.
2. Miller, S. L., A production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science* **1953**, 117 (3046), 528-529.
3. Ahrens, T. J., Equations of state of iron sulfide and constraints on the sulfur content of the Earth. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth* **1979**, 84 (B3), 985-998.
4. Planavsky, N. J.; McGoldrick, P.; Scott, C. T.; Li, C.; Reinhard, C. T.; Kelly, A. E.; Chu, X.; Bekker, A.; Love, G. D.; Lyons, T. W., Widespread iron-rich conditions in the mid-Proterozoic ocean. *Nature* **2011**, 477 (7365), 448.
5. Olson, K. R., Hydrogen sulfide, reactive sulfide species and coping with reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine* **2019**.
6. Barton, L. L.; Fardeau, M.-L.; Fauque, G. D., Hydrogen sulfide: a toxic gas produced by dissimilatory sulfate and sulfur reduction and consumed by microbial oxidation. In *The Metal-Driven Biogeochemistry of Gaseous Compounds in the Environment*, Springer: 2014; pp 237-277.
7. Mishanina, T. V.; Libiad, M.; Banerjee, R., Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways. *Nature chemical biology* **2015**, 11 (7), 457.
8. Ida, T.; Sawa, T.; Ihara, H.; Tsuchiya, Y.; Watanabe, Y.; Kumagai, Y.; Suematsu, M.; Motohashi, H.; Fujii, S.; Matsunaga, T.; Yamamoto, M.; Ono, K.; Devarie-Baez, N. O.; Xian, M.; Fukuto, J. M.; Akaike, T., Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**, 111 (21), 7606-7611.
9. Gruhlke, M. C.; Slusarenko, A. J., The biology of reactive sulfur species (RSS). *Plant Physiol Biochem* **2012**, 59, 98-107.
10. Akaike, T.; Ida, T.; Wei, F. Y.; Nishida, M.; Kumagai, Y.; Alam, M. M.; 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, J. M.; Motohashi, H., CysteinyI-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat Commun* **2017**, 8 (1), 1177.
11. Mishanina, T. V.; Yadav, P. K.; Ballou, D. P.; Banerjee, R., Transient kinetic analysis of hydrogen sulfide oxidation catalyzed by human sulfide quinone oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, 290 (41), 25072-25080.

12. Castro, E. A., Kinetics and mechanisms of reactions of thiol, thiono, and dithio analogues of carboxylic esters with nucleophiles. *Chemical reviews* **1999**, *99* (12), 3505-3524.
13. Alvarez, L.; Bianco, C. L.; Toscano, J. P.; Lin, J.; Akaike, T.; Fukuto, J. M., Chemical biology of hydropersulfides and related species: possible roles in cellular protection and redox signaling. *Antioxidants & redox signaling* **2017**, *27* (10), 622-633.
14. Cuevasanta, E.; Lange, M.; Bonanata, J.; Coitino, E. L.; Ferrer-Sueta, G.; Filipovic, M. R.; Alvarez, B., Reaction of Hydrogen Sulfide with Disulfide and Sulfenic Acid to Form the Strongly Nucleophilic Persulfide. *J Biol Chem* **2015**, *290* (45), 26866-80.
15. Nishida, M.; Kumagai, Y.; Ihara, H.; Fujii, S.; Motohashi, H.; Akaike, T., Redox signaling regulated by electrophiles and reactive sulfur species. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* **2016**, *58* (2), 91-98.
16. Numakura, T.; Sugiura, H.; Akaike, T.; Ida, T.; Fujii, S.; Koarai, A.; Yamada, M.; Onodera, K.; Hashimoto, Y.; Tanaka, R., Production of reactive persulfide species in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* **2017**, *72* (12), 1074-1083.
17. Kunikata, H.; Ida, T.; Sato, K.; Aizawa, N.; Sawa, T.; Tawarayama, H.; Murayama, N.; Fujii, S.; Akaike, T.; Nakazawa, T., Metabolomic profiling of reactive persulfides and polysulfides in the aqueous and vitreous humors. *Scientific reports* **2017**, *7*, 41984.
18. Zhang, T.; Ono, K.; Tsutsuki, H.; Ihara, H.; Islam, W.; Akaike, T.; Sawa, T., Enhanced Cellular Polysulfides Negatively Regulate TLR4 Signaling and Mitigate Lethal Endotoxin Shock. *Cell chemical biology* **2019**, *26* (5), 686-698. e4.
19. Sawa, T., Oxidative Stress Regulation by Reactive Cysteine Persulfides in Inflammation. In *Chronic Inflammation*, Springer: 2016; pp 309-316.
20. Sen, N.; Paul, B. D.; Gadalla, M. M.; Mustafa, A. K.; Sen, T.; Xu, R.; Kim, S.; Snyder, S. H., Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NF- $\kappa$ B mediates its antiapoptotic actions. *Molecular cell* **2012**, *45* (1), 13-24.
21. Dóka, É.; Pader, I.; Bíró, A.; Johansson, K.; Cheng, Q.; Ballagó, K.; Prigge, J. R.; Pastor-Flores, D.; Dick, T. P.; Schmidt, E. E., A novel persulfide detection method reveals protein persulfide-and polysulfide-reducing functions of thioredoxin and glutathione systems. *Science advances* **2016**, *2* (1), e1500968.
22. Xie, L.; Gu, Y.; Wen, M.; Zhao, S.; Wang, W.; Ma, Y.; Meng, G.; Han, Y.; Wang, Y.; Liu, G., Hydrogen sulfide induces Keap1 S-sulfhydration and suppresses diabetes-accelerated atherosclerosis via Nrf2 activation. *Diabetes* **2016**, *65* (10), 3171-3184.
23. Cai, J.; Shi, X.; Wang, H.; Fan, J.; Feng, Y.; Lin, X.; Yang, J.; Cui, Q.;



Tang, C.; Xu, G., Cystathionine  $\gamma$  lyase–hydrogen sulfide increases peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activity by sulfhydrylation at C139 site thereby promoting glucose uptake and lipid storage in adipocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2016**, *1861* (5), 419-429.

24. Cuevasanta, E.; Lange, M.; Bonanata, J.; Coitiño, E. L.; Ferrer-Sueta, G.; Filipovic, M. R.; Alvarez, B., Reaction of hydrogen sulfide with disulfide and sulfenic acid to form the strongly nucleophilic persulfide. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, *290* (45), 26866-26880.

25. Skalak, R.; Ozkaya, N.; Skalak, T. C., Biofluid mechanics. *Annual review of fluid mechanics* **1989**, *21* (1), 167-200.

26. Kragh-Hansen, U., Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Danish medical bulletin* **1990**, *37* (1), 57-84.

27. Anraku, M.; Chuang, V. T. G.; Maruyama, T.; Otagiri, M., Redox properties of serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **2013**, *1830* (12), 5465-5472.

28. Westley, J.; Adler, H.; Westley, L.; Nishida, C., The sulfurtransferases. *Fundamental and Applied Toxicology* **1983**, *3* (5), 377-382.

29. Koster, J.; Biemond, P.; Swaak, A., Intracellular and extracellular sulphhydryl levels in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* **1986**, *45* (1), 44-46.

30. Dóka, É.; Arnér, E. S.; Schmidt, E. E.; Nagy, P., ProPerDP: A Protein Persulfide Detection Protocol. In *Vascular Effects of Hydrogen Sulfide*, Springer: 2019; pp 51-77.

31. Forrester, M. T.; Foster, M. W.; Benhar, M.; Stamler, J. S., Detection of protein S-nitrosylation with the biotin-switch technique. *Free Radical Biology and Medicine* **2009**, *46* (2), 119-126.

32. Chen, W.; Liu, C.; Peng, B.; Zhao, Y.; Pacheco, A.; Xian, M., New fluorescent probes for sulfane sulfurs and the application in bioimaging. *Chem Sci* **2013**, *4* (7), 2892-2896.

33. Takano, Y.; Hanaoka, K.; Shimamoto, K.; Miyamoto, R.; Komatsu, T.; Ueno, T.; Terai, T.; Kimura, H.; Nagano, T.; Urano, Y., Development of a reversible fluorescent probe for reactive sulfur species, sulfane sulfur, and its biological application. *Chem Commun (Camb)* **2017**, *53* (6), 1064-1067.

34. Wood, J. L., Sulfane sulfur. In *Methods in enzymology*, Elsevier: 1987; Vol. 143, pp 25-29.

35. Moest, R., Hydrogen sulfide determination by the methylene blue method. *Analytical Chemistry* **1975**, *47* (7), 1204-1205.

36. Shen, X.; Pattillo, C. B.; Pardue, S.; Bir, S. C.; Wang, R.; Kevil, C. G.,

Measurement of plasma hydrogen sulfide in vivo and in vitro. *Free Radical Biology and Medicine* **2011**, *50* (9), 1021-1031.

37. Balasubramanian, S.; Pugalenthi, V., A comparative study of the determination of sulphide in tannery waste water by ion selective electrode (ISE) and iodimetry. *Water Research* **2000**, *34* (17), 4201-4206.

38. Wintner, E. A.; Deckwerth, T. L.; Langston, W.; Bengtsson, A.; Leviten, D.; Hill, P.; Insko, M. A.; Dumpit, R.; VandenEckart, E.; Toombs, C. F., A monobromobimane - based assay to measure the pharmacokinetic profile of reactive sulphide species in blood. *British journal of pharmacology* **2010**, *160* (4), 941-957.

39. Donaldson, E. L.; McMullan, D. C., Technique for Prolonging the Shelf Life of Sulphide Anti-Oxidant Buffer Solution (SAOB) in Sulphide Determinations. *Analytical Letters* **1978**, *11* (1), 39-41.

40. Whitfield, N. L.; Kreimier, E. L.; Verdial, F. C.; Skovgaard, N.; Olson, K. R., Reappraisal of H<sub>2</sub>S/sulfide concentration in vertebrate blood and its potential significance in ischemic preconditioning and vascular signaling. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **2008**, *294* (6), R1930-R1937.

41. Olson, K. R.; DeLeon, E. R.; Liu, F., Controversies and conundrums in hydrogen sulfide biology. *Nitric oxide* **2014**, *41*, 11-26.

42. Hamid, H. A.; Tanaka, A.; Ida, T.; Nishimura, A.; Matsunaga, T.; Fujii, S.; Morita, M.; Sawa, T.; Fukuto, J. M.; Nagy, P., Polysulfide stabilization by tyrosine and hydroxyphenyl-containing derivatives that is important for a reactive sulfur metabolomics analysis. *Redox biology* **2019**, *21*, 101096.

43. Charles, R. L.; Schröder, E.; May, G.; Free, P.; Gaffney, P. R.; Wait, R.; Begum, S.; Heads, R. J.; Eaton, P., Protein sulfenation as a redox sensor: proteomics studies using a novel biotinylated dimedone analogue. *Molecular & Cellular Proteomics* **2007**, *6* (9), 1473-1484.

44. Aitken, R. J.; Gibb, Z.; Mitchell, L. A.; Lambourne, S. R.; Connaughton, H. S.; De Iuliis, G. N., Sperm motility is lost in vitro as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols. *Biology of reproduction* **2012**, *87* (5), 110, 1-11.

45. Cha, M.-K.; Kim, I.-H., Disulfide between Cys392 and Cys438 of human serum albumin is redox-active, which is responsible for the thioredoxin-supported lipid peroxidase activity. *Archives of biochemistry and biophysics* **2006**, *445* (1), 19-25.

46. Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K., Crystal structure

of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein engineering* **1999**, *12* (6), 439-446.

47. Jung, M.; Kasamatsu, S.; Matsunaga, T.; Akashi, S.; Ono, K.; Nishimura, A.; Morita, M.; Hamid, H. A.; Fujii, S.; Kitamura, H., Protein polysulfidation-dependent persulfide dioxygenase activity of ethylmalonic encephalopathy protein 1. *Biochemical and biophysical research communications* **2016**, *480* (2), 180-186.

48. Ikeda, M.; Ishima, Y.; Shibata, A.; Chuang, V. T. G.; Sawa, T.; Ihara, H.; Watanabe, H.; Xian, M.; Ouchi, Y.; Shimizu, T.; Ando, H.; Ukawa, M.; Ishida, T.; Akaike, T.; Otagiri, M.; Maruyama, T., Quantitative determination of polysulfide in albumins, plasma proteins and biological fluid samples using a novel combined assays approach. *Anal Chim Acta* **2017**, *969*, 18-25.

49. Peng, B.; Liu, C.; Li, Z.; Day, J. J.; Lu, Y.; Lefer, D. J.; Xian, M., Slow generation of hydrogen sulfide from sulfane sulfurs and NADH models. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2017**, *27* (3), 542-545.

50. Ju, Y.; Fu, M.; Wu, L.; Yang, G., Strategies and tools for detection of protein S-nitrosylation and S-sulhydrylation. *Biochem Anal Biochem* **2015**, *4* (224), 2161-1009.1000224.

51. Pan, Q.; Angelina, A.; Marrone, M.; Stark, W. J.; Akpek, E. K., Autologous serum eye drops for dry eye. *Cochrane Database Syst Rev* **2017**, *2*, CD009327.

52. Carballal, S.; Radi, R.; Kirk, M. C.; Barnes, S.; Freeman, B. A.; Alvarez, B., Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Biochemistry* **2003**, *42* (33), 9906-9914.

53. Anraku, M.; Kragh-Hansen, U.; Kawai, K.; Maruyama, T.; Yamasaki, Y.; Takakura, Y.; Otagiri, M., Validation of the chloramine-T induced oxidation of human serum albumin as a model for oxidative damage in vivo. *Pharmaceutical research* **2003**, *20* (4), 684-692.

54. Anraku, M.; Yamasaki, K.; Maruyama, T.; Kragh-Hansen, U.; Otagiri, M., Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin. *Pharmaceutical research* **2001**, *18* (5), 632-639.

55. Bourdon, E.; Loreau, N.; Blache, D., Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *The FASEB journal* **1999**, *13* (2), 233-244.

56. Rosas-Díaz, M.; Camarillo-Cadena, M.; Hernández-Arana, A.; Ramón-Gallegos, E.; Medina-Navarro, R., Antioxidant capacity and structural changes of human serum albumin from patients in advanced stages of diabetic nephropathy and the effect of the dialysis. *Molecular and cellular biochemistry* **2015**, *404* (1-2), 193-201.

57. Meucci, E.; Mordente, A.; Martorana, G., Metal-catalyzed oxidation of human serum

albumin: conformational and functional changes. Implications in protein aging. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, 266 (8), 4692-4699.

58. Iwao, Y.; Anraku, M.; Yamasaki, K.; Kragh-Hansen, U.; Kawai, K.; Maruyama, T.; Otagiri, M., Oxidation of Arg-410 promotes the elimination of human serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* **2006**, 1764 (4), 743-749.

59. Iwao, Y.; Anraku, M.; Hiraike, M.; Kawai, K.; Nakajou, K.; Kai, T.; Suenaga, A.; Otagiri, M., The structural and pharmacokinetic properties of oxidized human serum albumin, advanced oxidation protein products (AOPP). *Drug metabolism and pharmacokinetics* **2006**, 21 (2), 140-146.

60. Hu, X.; Li, H.; Zhang, X.; Chen, Z.; Zhao, R.; Hou, N.; Liu, J.; Xun, L.; Liu, H., Developing Polysulfide-Sensitive GFPs for Real-Time Analysis of Polysulfides in Live Cells and Subcellular Organelles. *Analytical chemistry* **2019**, 91 (6), 3893-3901.

61. Dóka, É.; Ida, T.; Dagnell, M.; Abiko, Y.; Luong, N.; Balog, N.; Takata, T.; Espinosa, B.; Nishimura, A.; Cheng, Q., Control of protein function through oxidation and reduction of persulfidated states. *Science Advances* **2020**, 6 (1), eaax8358.

62. Salzano, A. M.; Renzone, G.; Scaloni, A.; Torreggiani, A.; Ferreri, C.; Chatgililoglu, C., Human serum albumin modifications associated with reductive radical stress. *Molecular BioSystems* **2011**, 7 (3), 889-898.

63. Nakashima, F.; Shibata, T.; Kamiya, K.; Yoshitake, J.; Kikuchi, R.; Matsushita, T.; Ishii, I.; Giménez-Bastida, J. A.; Schneider, C.; Uchida, K., Structural and functional insights into S-thiolation of human serum albumins. *Scientific reports* **2018**, 8 (1), 932.

64. Ghuman, J.; Zunszain, P. A.; Petitpas, I.; Bhattacharya, A. A.; Otagiri, M.; Curry, S., Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *Journal of molecular biology* **2005**, 353 (1), 38-52.

65. 木寺詔紀, X 線結晶解析より得られるタンパク質の動的構造. *生物物理* **1992**, 32 (6), 294-299.

66. Bocedi, A.; Cattani, G.; Stella, L.; Massoud, R.; Ricci, G., Thiol disulfide exchange reactions in human serum albumin: the apparent paradox of the redox transitions of Cys34. *The FEBS journal* **2018**, 285 (17), 3225-3237.

67. Oshiro, S.; Ishima, Y.; Maeda, H.; Honda, N.; Bi, J.; Kinoshita, R.; Ikeda, M.; Iwao, Y.; Imafuku, T.; Nishida, K., Dual therapeutic effects of an albumin-based nitric oxide donor on 2 experimental models of chronic kidney disease. *Journal of pharmaceutical sciences* **2018**, 107 (3), 848-855.

68. Ishima, Y.; Kragh-Hansen, U.; Maruyama, T.; Otagiri, M., Albumin as a nitric oxide-traffic protein: characterization, biochemistry and possible future therapeutic applications. *Drug metabolism and pharmacokinetics* **2009**, *24* (4), 308-317.
69. Ishima, Y.; Yoshida, F.; Kragh-Hansen, U.; Watanabe, K.; Katayama, N.; Nakajou, K.; Akaike, T.; Kai, T.; Maruyama, T.; Otagiri, M., Cellular uptake mechanisms and responses to NO transferred from mono-and poly-S-nitrosated human serum albumin. *Free radical research* **2011**, *45* (10), 1196-1206.
70. Shibata, A.; Ishima, Y.; Ikeda, M.; Sato, H.; Imafuku, T.; Chuang, V. T.; Ouchi, Y.; Abe, T.; Watanabe, H.; Ishida, T., Human serum albumin hydropersulfide is a potent reactive oxygen species scavenger in oxidative stress conditions such as chronic kidney disease. *Biochemical and biophysical research communications* **2016**, *479* (3), 578-583.
71. Nagumo, K.; Tanaka, M.; Chuang, V. T. G.; Setoyama, H.; Watanabe, H.; Yamada, N.; Kubota, K.; Tanaka, M.; Matsushita, K.; Yoshida, A., Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. *PLoS One* **2014**, *9* (1).
72. Borgström, L.; Kågedal, B.; Paulsen, O., Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. *European journal of clinical pharmacology* **1986**, *31* (2), 217-222.
73. Olsson, B.; Johansson, M.; Gabrielsson, J.; Bolme, P., Pharmacokinetics and bioavailability of reduced and oxidized N-acetylcysteine. *European journal of clinical pharmacology* **1988**, *34* (1), 77-82.
74. Maeda, H.; Hirata, K.; Watanabe, H.; Ishima, Y.; Chuang, V. T. G.; Taguchi, K.; Inatsu, A.; Kinoshita, M.; Tanaka, M.; Sasaki, Y., Polythiol-Containing, Recombinant Mannosylated-Albumin Is a Superior CD68+/CD206+ Kupffer Cell-Targeted Nanoantioxidant for Treatment of Two Acute Hepatitis Models. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2015**, *352* (2), 244-257.
75. Vandiver, M. S.; Paul, B. D.; Xu, R.; Karuppagounder, S.; Rao, F.; Snowman, A. M.; Ko, H. S.; Lee, Y. I.; Dawson, V. L.; Dawson, T. M.; Sen, N.; Snyder, S. H., Sulfhydration mediates neuroprotective actions of parkin. *Nat Commun* **2013**, *4*, 1626.
76. Abiko, Y.; Yoshida, E.; Ishii, I.; Fukuto, J. M.; Akaike, T.; Kumagai, Y., Involvement of reactive persulfides in biological bismethylmercury sulfide formation. *Chemical research in toxicology* **2015**, *28* (6), 1301-1306.
77. 松本光雄; 渡部俊彦; 小笠原綾子; 三上健; 松本達二, グルタチオンのメラニン合成阻害機構. *YAKUGAKU ZASSHI* **2008**, *128* (8), 1203-1207.

