

【目的】ヒトは生活環境，ライフスタイル及び食生活を介して，酸化・親電子ストレスに日々曝されている．一方，サルフェン硫黄は 6 つの価電子からなる硫黄原子で，他の硫黄原子に可逆的に結合したものを指し，高い抗酸化性および高い求核性を有する．我々はサルフェン硫黄を有するシステインパーサルフィド (CysSSH) やグルタチオンパーサルフィド (GSSH) などの分子により，活性酸素種 (ROS) や親電子物質が不活性化されることを明らかにしてきた．また，先行研究により，新生ペプチドに導入する tRNA の合成酵素であるシステイン tRNA 合成酵素 (CARS) がシステイン (CysSH) を基質として CysSSH を生成することを見出した．このことは，細胞内タンパク質中に CysSSH が広範に存在する可能性を示唆している．本研究では，タンパク質結合性のサルフェン硫黄の機能を明らかにするために，生体内からサルフェン硫黄結合タンパク質 (SSBP) を同定し，その同定されたタンパク質をモデルとして，タンパク質におけるサルフェン硫黄の機能やサルフェン硫黄を介した生体防御システムの解明を試みた．

【対象と方法】SSBP の単離: マウス脳可溶性画分を各種カラムクロマトグラフィーにて分離し，得られた画分と親電子プローブである β -(4-hydroxyphenyl)ethyl iodoacetamide (HPE-IAM) を反応させ、生成した bis-S-HPE-IAM 付加体を UHPLC-ESI-MS/MS にて検出することで、SSBP を追跡した．タンパク質の同定: nanoUPLC-MS^E を用いた．リコンビナントタンパク質: 大腸菌の高発現系を用いて調製した．金属の定量: ICP-MS にて行った．タンパク質の 3 次元構造モデリング: 統合計算システム MOE を用いて解析した．培養細胞: ヒトグリア芽細胞腫 U87 細胞を用いた．

【結果】UHPLC-ESI-MS/MS によるサルフェン硫黄の定量法を用いて，マウス脳可溶性画分から SSBP を分離した結果，複数の SSBP の存在が観察されたが，最終的に SDS-PAGE 上で 16 kDa を示す高純度のタンパク質を得た．当該タンパク質のトリプシン消化断片を nanoUPLC-MS^E にて解析したところ，メタロチオネイン-3 (MT3) が同定された．次にヒトリコンビナント MT3 を調製し，本タンパク質中サルフェン硫黄を定量するための測定条件を最適化した．得られた結果を以下に示す．1) 分子内に 20 個の CysSH 残基および 7 個の亜鉛 (Zn) を有する MT3 は約 20 個のサルフェン硫黄を含有することが分かった．さらに，MT3 の CysSH 残基のアラニン置換によりサルフェン硫黄の含有量は減少した．2) MT3 および Zn 非結合型の apo-MT3 は共に同程度のサルフェン硫黄を含有したが，前者は 37°C で 28 日間安定的に保持された一方で，後者は 3 日以内に消失した．3) HPE-IAM またはシアンイオン処置により MT3 中からサルフェン硫黄を除くと，MT3 中の Zn も同様に減少した．4) MT3 を ROS である H₂O₂、NO 誘発剤あるいは親電子物質であるメチル水銀と反応させると，曝露濃度依存的にサルフェン硫黄と Zn は減

少した。5) U87 細胞を H_2O_2 あるいは親電子物質の曝露条件化において、MT3 のノックダウンにより細胞毒性の有意な増加が見られ、逆に MT3 の高発現でそれぞれの毒性は有意に軽減された。6) さらに、MT3 の 3 次元構造モデル解析を行った結果、サルフェン硫黄が結合した MT3 は、サルフェン硫黄非結合型の MT3 と比較してその 3 次元構造を維持したまま、熱安定性および Zn 結合の親和性が共に高いことが示唆された。

【考察】本研究より、MT3 は SSBP であり、MT 中 CysSH 残基と同程度のサルフェン硫黄が付加していることが明らかとなった。過去の論文を調べると、スペインの研究グループから種々の MT 分子種に酸不安定な硫黄 (硫化水素として検出) が付加していることが報告されており、彼らが検出した硫黄は MT 分子の CysSH 残基に付加したサルフェン硫黄に由来している可能性が高い。実際、MT3 の CysSH 変異体においてサルフェン硫黄の結合量は減少した。また、MT3 の Zn が CysSH 残基に結合することが知られているため、CysSH 残基に結合するサルフェン硫黄は Zn の保持に関与するのではないかと予想される。リコンビナント MT3 及び MOE を用いた解析により、MT3 がタンパク質内にサルフェン硫黄を保持することで、Zn 親和性が向上することが明らかとなった。一方、Zn 非結合型の apo-MT3 においては、サルフェン硫黄を安定的に保持することが難しいため、Zn の結合がサルフェン硫黄にとって必要不可欠であると考えられる。すなわち、MT3 に結合するサルフェン硫黄と Zn は相互依存の関係性にあることが示唆された。サルフェン硫黄は CysSH の炭素鎖に結合した硫黄に比べて高い抗酸化性および求核性を有する。実際に MT3 結合性のサルフェン硫黄は酸化・親電子ストレスのモデルとしての H_2O_2 、NO 誘発剤あるいはメチル水銀との反応により減少した。同時に認められた Zn の遊離は、細胞内においては Zn シグナルの活性化とそれに伴うストレス応答に関連することが考えられる。U87 細胞での検討より、MT3 は ROS 及び親電子物質に対して防御的に働くことが分かったが、その理由として 1) サルフェン硫黄の直接的な作用、2) Zn シグナルを介した抗酸化・抗親電子制御の間接的な作用が考えられる。MT3 以外の Zn 結合タンパク質もサルフェン硫黄を保持できることが報告されており、サルフェン硫黄はそれらのタンパク質の機能にも重要な役割を果たしていることが期待される。

【結論】マウスの脳より SSBP の 1 つとして同定された MT3 は、分子内に約 20 個のサルフェン硫黄および 7 個の Zn を有する。MT3 中のサルフェン硫黄と Zn は相互依存の関係性にあり、MT3 は自身にサルフェン硫黄を結合することで、抗酸化・抗親電子作用を有している。