



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	神経系における硫化水素産生機序の解明
Author(s)	宮本, 亮
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第11741号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11741
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59593
Type	doctoral thesis
File Information	Ryo_Miyamoto.pdf



神経系における硫化水素産生機序の解明

宮本 亮

目次

序文	1
第1章 末梢神経系における H ₂ S 産生機序	
I 緒論	4
II 実験方法	6
A 材料	6
B 細胞培養	6
C H ₂ S 産生量測定法（メチレンブルー法）	8
D ウェスタンブロット解析	9
E RNA 干渉	12
F 免疫蛍光解析	12
G 統計解析	13
III 実験成績	14
A 肝臓と脳における CSE と CBS を介した H ₂ S 産生	14
B 末梢神経系の H ₂ S 産生に対する CSE と CBS の関与	17
C 末梢神経系の H ₂ S 産生に対する CAT/MPST の関与	19
D MPST の細胞内局在	25
E CAT/MPST による H ₂ S 産生の特性	25
IV 考察	29
第2章 中枢神経系における H ₂ S 産生機序	
I 緒論	33
II 実験方法	36
A 細胞培養	36

1) 脊髄アストロサイト培養系の作製	36
2) 脊髄ニューロン培養系および脊髄細胞混合培養系の作製	37
3) 脊髄ニューロン／アストロサイト共培養系の作製	37
B CBS 活性測定	38
C ウェスタンブロット法	38
D 免疫蛍光解析	39
E RT-PCR 法	39
F 統計解析	40
III 実験成績	41
A 培養脊髄アストロサイトにおける CBS 発現と H ₂ S 産生活性	41
B 新生ラット脊髄における CBS の分布	43
C 胎児ラット由来脊髄細胞混合培養における CBS 発現と H ₂ S 産生活性	43
D ニューロン／アストロサイト共培養系における CBS 発現	46
E アストロサイト CBS 発現と H ₂ S 産生活性への膜透過性 cAMP の効果	49
F アストロサイト CBS mRNA 発現への膜透過性 cAMP とニューロンの効果	53
IV 考察	55
総括	60
謝辞	63
参考文献	64
英文抄録	75

略語表

AOAA	aminooxyacetic acid
3MP	3-mercaptopyruvate
α -KG	α -ketoglutarate
AraC	cytosine arabinoside
AST	aspartate aminotransferase
CAT	cysteine aminotransferase
CBS	cystathionine β -synthase
cCAT	cytosolic cysteine aminotransferase
CSE	cystathionine γ -lyase
dbcAMP	dibutryl cAMP
DHLA	dihydrolipoic acid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DPD	<i>N,N</i> -dimethyl- <i>p</i> -phenylene diamine sulfate
DRG	dorsal root ganglion
DTT	dithiothreitol
EGF	epidermal growth factor
FBS	fetal bovine serum
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GOT	glutamate oxaloacetate transaminase
H ₂ S	hydrogen sulfide
HBSS	Hanks' balanced salt solution

M199	Medium 199
MAP-2	microtubule-associated protein 2
mCAT	mitochondrial cysteine aminotransferase
MPST	mercaptopyruvate sulfurtransferase
NaHS	sodium hydrosulfide
NGF	nerve growth factor
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartate
PAG	DL-propargylglycine
PGP 9.5	protein gene product 9.5
PLL	poly-L-lysine
PLP	pyridoxal 5'-phosphate
RIPA	radio immuno precipitation assay
SAMe	S-adenocyl-L-methionine
siRNA	small interfering RNA
TBST	tris-buffered saline (0.1% Tween-20)
TCA	trichloroacetic acid
TRPA1	transient receptor potential ankyrin 1
Tuj-1	β -III-tubulin

序文

硫化水素 (H_2S) は環境中に存在する特有の腐卵臭をもつ有毒ガスとして知られてきた。しかし H_2S は、哺乳動物の組織でも腸内細菌によって産生される他に、含硫アミノ酸代謝の過程で酵素反応によって生成される (Stipanuk and Beck, 1982; Blachier *et al.*, 2010)。1996 年、Abe と Kimura は H_2S が *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体の活性を増強することをラット海馬で示した (Abe and Kimura, 1996)。これ以後、 H_2S の生体内機能について多くの研究がなされ、現在、 H_2S は一酸化窒素 (NO) のような気体状生理活性物質として生体内で機能する可能性が指摘されている (Szabó, 2007; Paul and Snyder, 2012; Kimura, 2014)。

H_2S は、図 1 に示すように L-cysteine から 3 種類の酵素反応を介して産生されることが知られており、これらはすべてビタミン B6 活性型の pyridoxal 5'-phosphate (PLP) 依存性の反応である (Paul and Snyder, 2012)。Cystathionine γ -lyase (CSE) は L-cysteine から H_2S を産生するが、cystathionine β -synthase (CBS) は S-adenocyl-L-methionine (SAME) 存在下で L-cysteine と L-homocysteine の縮合反応を介して H_2S を産生する。Cysteine aminotransferase (CAT) と mercaptopyruvate sulfurtransferase (MPST) は共役して H_2S を産生する。CAT は α -ketoglutarate 存在下で L-cysteine を 3-mercaptopyrivate (3MP) に変換し、さらに MPST が還元剤存在下で 3MP から H_2S を生成する。CAT は aspartate aminotransferase (AST) / glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) と同一の酵素であり、細胞質型とミトコンドリア型が見つかっている (Ubuka *et al.*, 1978; Akagi, 1982)。これらの酵素の分布は組織により異なっており、それぞれの組織における H_2S 産生機構やその作用については依然不明な点が多い。

本研究では、神経系における H_2S 産生メカニズムについて検討を行った。まず第一章では、末梢神経系における H_2S 合成酵素の発現と 3 種類の H_2S 合成経路の活性を比較検討し

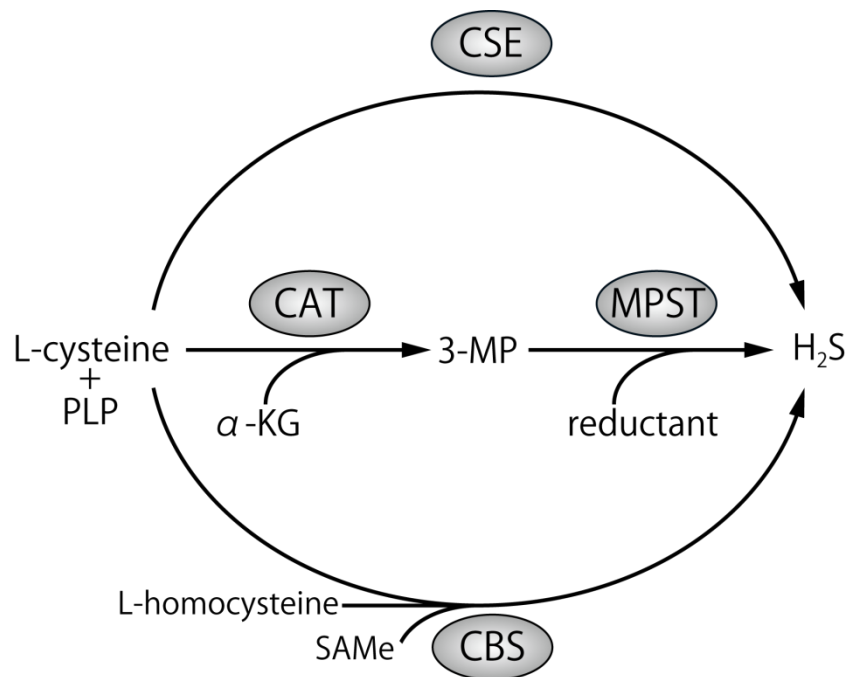


図1 H₂S 合成経路

H₂S は L-cysteine から cystathionine γ -lyase (CSE)、cystathionine β -synthase (CBS)、および cysteine aminotransferase (CAT) と mercaptopyruvate sulfurtransferase (MPST) によって生成される。これらの反応は全て補因子である pyridoxal 5'-phosphate (PLP) に依存する。CBS は S-adenocyl-L-methionine (SAdoMe) 存在下で L-cysteine と L-homocysteine を縮合して H₂S を生成する。CAT は α -ketoglutarate (α -KG) 存在下で 3-mercaptopyruvate (3MP) を生じ、さらに還元剤 (reductant) 存在下で MPST が 3MP から H₂S を生成する。

た。末梢神経系では CAT/MPST 経路が H_2S 産生に強く寄与することを報告する。第二章では中枢神経系における H_2S 産生メカニズムを検討し、特にアストロサイトに発現し、中枢神経系の主要な H_2S 合成酵素として機能する CBS に着目した。ここではニューロンの有無がアストロサイト CBS 発現に与える影響を調べ、アストロサイトの生理的な CBS 発現がニューロン性因子により維持されていることを明らかにした。

なお本論文の一部は誌上公表されている (Miyamoto *et al.*, 2014)。

第1章 末梢神経系における H₂S 産生機序

I. 緒論

末梢神経系において、筆者らは以前の報告で H₂S が知覚ニューロンの痛み受容体 transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) を活性化することを示した (Miyamoto *et al.*, 2011)。また H₂S の酸化産物であるポリスルフィドも H₂S より高い力価で TRPA1 を活性化することが報告されている (Kimura *et al.*, 2013)。さらに H₂S が知覚ニューロンに発現する Ca²⁺チャネルや Na⁺チャネルを感作することによって痛覚過敏を起こすことも報告された (Takahashi *et al.*, 2010; Okubo *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2013)。そのため H₂S は痛みや神経性炎症のメディエーターと考えられており (Andersson *et al.*, 2012; Ogawa *et al.*, 2012)、H₂S 合成酵素が知覚ニューロンを含む末梢神経系の生理・病態生理において重要な役割を果たしている可能性がある。

ラットでは知覚ニューロンの細胞体が存在する脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion、DRG) に CSE 発現が認められており、神経因性疼痛による痛覚過敏が CSE 阻害薬 DL-propargylglycine (PAG) により抑制されることから、CSE 由来の H₂S が痛覚過敏に関与すると報告されている (Takahashi *et al.*, 2010; Okubo *et al.*, 2011)。またラット DRG ニューロンでは CBS の発現も確認されており、ストレス誘発性の腹部痛覚過敏が H₂S 合成酵素阻害薬 aminooxyacetic acid (AOAA) により抑制されるため、CBS 経路の関与も示唆されている (Wang *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2013)。しかし PAG は高濃度では CAT 活性を阻害する (Tanase and Morino, 1976)。また AOAA は非特異的な H₂S 合成酵素阻害薬であり、どの酵素が H₂S 産生に関与するかを同定することはできない (Asimakopoulou *et al.*, 2013)。さらに、現在まで DRG ニューロンが CSE または CBS を介して H₂S を産生することを直接示した報告はない。

一方、CAT/MPST 経路は末梢神経系だけでなく他種臓器、細胞においても H₂S 産生に対しての関与は小さいと考えられていた (Paul and Snyder, 2012)。これはラット肝臓で、CAT/MPST による H₂S 産生がアルカリ環境下 (pH 9.7) では高いが、中性環境下 (pH 7.4) ではごくわずかでしかないという知見に起因する (Stipanuk and Beck, 1982)。しかし Shibuya ら (2009) はラット脳組織において、中性 pH でも還元条件下であれば CAT/MPST を介して効率よく H₂S が産生されることを示した。また MPST は細胞質だけでなくミトコンドリアにも存在する (Nagahara *et al.*, 1998)。重要なのは、通常ミトコンドリアは細胞質に比べてよりアルカリかつ還元的状態下におかれていることである (Hanson *et al.*, 2004; Casey *et al.*, 2010)。さらに CAT の基質である L-cysteine のミトコンドリア内濃度は、細胞質内濃度に比べ 3 倍から 4 倍高いと報告されている (Yao *et al.*, 1994; Fu *et al.*, 2012)。また最近、MPST ノックアウトマウスが作出され、高架式十字迷路などの行動実験で不安様行動の増加が認められたことから、MPST が神経系の生理機能に重要な役割を果たしていることが考えられる (Nagahara *et al.*, 2013)。以上の知見を考慮すると、神経系を含め、哺乳動物の体内における CAT/MPST の役割は大きく見過ごされてきた可能性がある。したがって末梢神経系における 3 種類の酵素経路 (CSE、CBS、CAT/MPST) の寄与について、それぞれの酵素反応に適切な条件下で評価し、比較検討する必要がある。

本研究ではラット DRG とラット副腎髄質由来の褐色細胞腫であり末梢神経のモデルとして広く用いられる PC12 細胞を用い、これらの組織、細胞における各酵素の発現量とその H₂S 産生活性を調べた。本章では CAT/MPST が末梢神経系の主要な H₂S 産生経路であることを示す。

II. 実験方法

本研究は、北海道大学の動物実験に関するガイドラインに従って行った（実験計画書番号：13-0029）。実験には自家繁殖した Wistar 系新生ラット（雌雄、生後 6–10 日齢）を用いた。繁殖に用いた親ラットは日本クレアより購入した。

A. 材料

L-Cysteine、DL-homocysteine、L-aspartate、oxaloacetate、 α -ketoglutarate (α -KG)、dithiothreitol (DTT)、aminoxyacetic acid (AOAA)、*N,N*-dimethyl-*p*-phenylene diamine sulfate (DPD)、iron (III) chloride (FeCl_3)、trichloroacetic acid (TCA) は和光純薬から購入した。S-Adenocyl-L-methionine (SAME)、pyridoxal 5'-phosphate (PLP)、DL-propargylglycine (PAG)、3-mercaptopyruvate (3MP)、dihydrolipoic acid (DHLA) は Sigma Aldrich から購入した。Sodium hydrosulfide (NaHS) は Strem Chemicals から購入した。NaHS (0.1 M)、DL-homocysteine (0.5 M)、DTT (1 M)、SAME (0.1 M)、3MP (0.1 M) のストック溶液は 30 分間窒素バブリングした蒸留水に各粉末を溶解して作製した。またこれらを含む保存用チューブは酸化を防ぐために窒素充填し、SAME を含むチューブのみ -80°C 、その他は -20°C で保存した。DHLA (0.25 M) は dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し、PLP (0.01 M) と α -KG (1 M) は蒸留水に溶解してストック溶液とし、 -20°C で保存した。L-Cysteine は蒸留水で用時調整した。

B. 細胞培養

PC12 細胞は理研バイオリソースセンターより購入し、10% horse serum、5% fetal bovine

serum (FBS)、100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin 含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 中で培養した。PC12 細胞は poly-L-lysine (PLL) コートした培養用フラスコまたはカバーガラス上に播種し、継代数 3–15 で実験に用いた。培養液は 3 日に 1 回交換し、細胞は 1 週間に 1 回継代した。Nerve growth factor (NGF) による分化誘導は、まず細胞を無血清 DMEM 中で一晩培養し、1% horse serum 含有 DMEM 中で 50 ng/ml の NGF (Life Technologies) を 3 日間処置することにより行った。培養液は毎日 NGF を含む培養液と全液交換した。未分化および NGF 分化 PC12 細胞を同一の実験で使用する際は、未分化 PC12 細胞を NGF 不含、1% horse serum 含有 DMEM 中で培養した。

培養 DRG ニューロンは以下のようにして得た。生後 6–10 日齢 (P 6–10) のラットを断頭により安楽殺した後、背側より皮膚を切開、剥離し、脊椎両側の肋骨を切断、胸腔内および腹腔内の諸臓器を除去した。胸椎から仙椎までの脊椎を標本作製用シャーレに移して 2 価陽イオン不含の Hanks' balanced salt solution (HBSS、Sigma) に浸し、ピンで背位に保定した。双眼実体顕微鏡下で眼科用ピンセットと眼科用ハサミを用いて腹側椎体を切り取り、脊髓腹側部を露出した。胸髄から仙髄までの背根神経節を摘出し、周囲組織を除去後、2 ml の HBSS を満たした 5 ml チューブに移した。Collagenase (1 mg/ml、Worthington) と DNase (0.1 mg/ml、Roche) を添加して 37°C、5% CO₂ in air 下で 30 分間静置した。酵素含有液を除去して新たに trypsin (1 mg/ml、Worthington) と DNase (0.1 mg/ml) を含む 2 ml の HBSS を加え、さらに 37°C、5% CO₂ in air 下で 15 分間静置した。酵素含有液を除去し、10% FBS、100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin を含む Medium 199 (M199、Sigma) を 2 ml 加え、パストゥールピペットで 30–60 回攪拌した。さらにより先端の細いパストゥールピペットを用いて同様に攪拌した後、15 ml ポリプロピレンチューブに移して 100 × g で 2 分間遠心した。上清を除去し、細胞を含む沈殿に上述した培養液を加えて細胞を懸濁し、PLL コートしたカバーガラス上に播種した。細胞は 37°C、

5% CO₂ in air 下で培養し、1-2 日後に免疫蛍光解析に用いた。

C. H₂S 産生量測定法（メチレンブルー法）

新生ラットを断頭により安楽殺後、肝臓、脳、DRG を摘出し、氷冷した 50 mM Tris-HCl 中でホモゲナイザーおよび超音波破碎装置を用いて破碎した。酵素活性の pH 依存性測定時には、目的の pH に調整した 50 mM HEPES-KOH、または 50 mM Borate-KOH 緩衝液を用いた。PC12 細胞はトリプシン処置した後、血清を含む培養液で 1 回、PBS で 3 回洗浄し、氷冷した 50 mM Tris-HCl 中で超音波（10 秒を 5 回、2 分間隔）により破碎した。破碎物は 10,000 × g、4°C で 10 分間遠心し、上清を実験に用いた。タンパク質濃度は Quick Start Protein Assay Kit (Bio-Rad)を用いて測定した。

H₂S の定量はメチレンブルー生成反応を利用した分光光度法（Siegal, 1965; Huang *et al.*, 2010）により行った。ホモジネート (0.5 mg/ml) を 1.5 ml チューブに 125 μl 分取し、氷上に静置した。ブランク用サンプルは 95°C、5 分間の熱処理によりタンパク質を失活させた。チューブに 2 倍濃度の基質を含む反応液を 125 μl 加え、よく混合した後、37°C の恒温槽に移した。1 時間後、メチレンブルー生成用試薬 100 μl（7 M HCl に溶解した 20 mM DPD 30 μl、1 M HCl に溶解した 30 mM FeCl₃ 30 μl および 25% TCA 40 μl）を加え、30 分後に 10,000 × g で 2 分間遠心した。上清 300 μl を 96 well プレートに移し、670 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー（Corona）を用いて測定した。

CSE、CBS、CAT/MPST および MPST に特異的な H₂S 産生量は Stipanuk と Beck の方法（1982）に従い、次表の 4 種類の反応液を用いて測定した。特に記述しない限りそれぞれの反応液は 50 mM Tris-HCl を用いて調整した。

反応液	(酵素)	L-cys	PLP	DL-hcys	SAMe	α -KG	DTT	3MP	pH
I	(CSE)	10	0.05						8.0
II	(CBS)	10	0.05	10	0.2				8.5
III	(CAT/MPST)	10	0.05			0.3	1.0		8.5
IV	(MPST)						1.0	0.1	8.5

L-cys: L-cysteine、PLP: pyridoxal 5'-phosphate、DL-hcys: DL-homocysteine、SAMe: S-adenocyl-L-methionine、 α -KG: α -ketoglutarate、DTT: dithiothreitol、3MP: 3-mercaptopyruvate。単位は mM。

L-Cysteine などの硫黄化合物は H_2S によるメチレンブルー生成に影響を与える可能性がある (Siegal, 1965; Haddad and Heckenberg, 1988)。そこで本研究の酵素活性測定に用いる化合物のメチレンブルー法への影響を評価した。L-Cysteine (1、5、10 mM)、DL-homocysteine (1 mM)、DTT (1 mM)、3MP (0.1 mM) は 670 nm の吸光度を上昇させた (表 1)。また Siegal (1965) の報告に一致して、L-cysteine は H_2S ドナーの NaHS 存在下における 670 nm の吸光度を濃度依存性に減少させた。DL-Homocysteine と DTT も高濃度 (10 mM) で NaHS 存在下の吸光度を減少させた。なお、硫黄を含まない化合物は本実験で用いた濃度では影響を示さなかった。これらのことを考慮し、本研究では組織や細胞の H_2S 産生量は、ブランクサンプルの吸光度で修正した後、使用した反応液でそれぞれ検量線を作成して算出した。

D. ウェスタンブロット解析

細胞または組織をプロテアーゼインヒビターカクテル (Sigma) を含む radio immuno precipitation assay (RIPA) buffer (20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、0.5% sodium deoxycholate、0.1% sodium dodecyl sulfate、1% Triton X-100、pH 7.5) で懸濁した。ホモゲナイザーおよび超音波装置を用いて破碎後、 $10,000 \times g$ 、 $4^\circ C$ で 10 分間遠心し、上清をサンプルと

表 1.硫黄化合物によるメチレンブルー法への影響

硫黄化合物	濃度 (mM)	吸光度		吸光度
		(20 nmol NaHS 存在下)		(NaHS 非存在下)
Tris-HCl	50	0.640 ± 0.14	(100)	0.033 ± 0.001
L-cysteine	1	0.550 ± 0.10	(86 ± 2.6)	0.096 ± 0.003
	5	0.256 ± 0.04	(40 ± 1.9)	0.060 ± 0.001
	10	0.151 ± 0.03	(24 ± 0.8)	0.049 ± 0.001
DL-homocysteine	1	0.652 ± 0.11	(103 ± 7.2)	0.047 ± 0.003
	10	0.477 ± 0.07	(75 ± 5.6)	0.033 ± 0.001
DTT	1	0.687 ± 0.07	(107 ± 14.7)	0.039 ± 0.001
	10	0.310 ± 0.06	(48 ± 4.1)	0.032 ± 0.001
SAmE	0.1	0.659 ± 0.10	(103 ± 10.3)	0.033 ± 0.002
	1	0.585 ± 0.01	(91 ± 5.3)	0.034 ± 0.001
3MP	0.01	0.661 ± 0.07	(103 ± 14.0)	0.036 ± 0.005
	0.1	0.608 ± 0.09	(95 ± 7.3)	0.055 ± 0.010

メチレンブルーによる 670 nm の吸光度を NaHS (20 nmol) 存在下または非存在下で Tris-HCl (50 mM、pH 8.0、total 250 µl) 中で測定した。() 内は硫黄化合物不含時に対する相対値。値は平均値±標準偏差 (n = 3)。NaHS 存在下の吸光度は NaHS 非存在下の吸光度を差し引いた値を示す。

して用いた。

細胞質およびミトコンドリア画分は以下のようにして得た。PC12 細胞および DRG を 1.5 ml チューブ内の分画用緩衝液 (250 mM sucrose、20 mM HEPES-KOH、1 mM EGTA、1 mM EDTA、プロテアーゼインヒビター阻害薬、pH 7.4) 500 μ l に懸濁した。細胞および組織をプラスチックすりこぎで破碎した後、25G 注射針に 20 回通し、続いて 30G 注射針に 20 回通して破碎した。チューブを 720 $\times$ g で 5 分間遠心し、上清を別のチューブに移して 10,000 $\times$ g で 10 分間遠心した。得られた上清を細胞質分画とした。沈殿物を再度 500 μ l の分画用緩衝液に懸濁してピペッティングにより攪拌し、10,000 $\times$ g で 10 分間遠心した。沈殿物をもう一度洗浄し、上清を丁寧に取り除いた後、沈殿物を 100 μ l の RIPA buffer に懸濁し、超音波で破碎したものをミトコンドリア分画として得た。

タンパク質濃度は RC DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories) を用いてマイクロプレートリーダーで測定した。このサンプルをローディングバッファー (50 mM Tris-HCl、2% SDS、12.5% glycerol、0.01% bromophenol blue、100 mM DTT、pH 6.8) で溶解し、95°C で 5 分間処理してタンパク質を失活させた。等量のサンプルをポリアクリルアミドゲルにアプライし、電気泳動により分離後、PVDF メンブレンに転写した。抗原抗体反応では Tris buffered saline (137 mM NaCl、20 mM Tris-HCl、pH 7.6) に Tween-20 を 0.1%溶解したもの (TBST) を緩衝液として用いた。メンブレンを 5%スキムミルク含有 TBST 中で室温で 30 分間ゆるやかに振盪し、さらに 1%スキムミルクと一次抗体を含む TBST 中で 4°C で一晩ゆるやかに振盪した。メンブレンを TBST で 5 分間 $\times$ 3 回洗浄後、1%スキムミルクと horseradish peroxidase 結合二次抗体 (GE Healthcare) を含む TBST 中で室温で 1 時間ゆるやかに振盪した。メンブレンを TBST で洗浄後 (5 分間 $\times$ 3 回)、抗体は ECL Prime (GE Healthcare) を用いて発光させ、デジタルカメラ (Liponics) を用いて発光画像を取得した。用いた一次抗体を次表に示した。

標的蛋白 (由来)	一次抗体 希釈倍率	二次抗体 希釈倍率	製品番号	(製造元)
CSE (R)	3,000	3,000	12217-1-AP	(Protein Tech)
CBS (M)	5,000	5,000	H00000875-M01	(Abnova)
CBS (R)	4,000	3,000	14787-1-AP	(Protein Tech)
cCAT (R)	2,000	2,000	NBP1-54778	(Novus Biologicals)
mCAT (M)	2,000	2,000	LS-B3906	(Lifespan Biosciences)
MPST (R)	5,000	3,000	HPA001240	(Atlas Antibodies)
GAPDH (M)	100,000	—	G9295	(Abnova)
COX IV (R)	1,000	2,000	4850	(Cell Signaling)

R : rabbit、M : mouse。

抗 GAPDH 抗体は horseradish peroxidase 結合型の一次抗体を用いた。

E. RNA 干渉

RNA 導入 1 日前に PC12 細胞を PLL コートした培養用プレートおよびディッシュに $2-3 \times 10^4$ cells/cm² の割合で播種し、5 ml 培養液中で一晩培養した。Opti-MEM Reduced Serum Medium (Life Technologies) 500 μ l に Small interfering RNA (siRNA、10 μ M、Life Technologies) を 6 μ l 加えた。ネガティブコントロール siRNA (Life Technologies、#4390843) と 2 種類の MPST 特異的 siRNA (#4390771、ID : s140339 および s140340) を用いた。同様に Opti-MEM Reduced Serum Medium 500 μ l に Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) を 10 μ l 加え、これら 2 液を混合して室温に 20 分間静置した。この混合液を培養液に添加し (計 6 ml)、さらに 72 時間培養し、実験に供した。

F. 免疫蛍光解析

PC12細胞およびDRG細胞はそれぞれ200 nM、50 nMのMitoTracker Red CMXRos (Life Technologies)を含む培養液中で30分間、37°Cでインキュベーションし、4%パラホルムアルデヒド含有PBS中で30分間、37°C下に静置して固定した。細胞をブロッッキングバッファー(0.1% Triton X-100 および 3%牛血清アルブミン含有PBS)中で室温で30分間静置し、続いて一次抗体を含むブロッッキングバッファー中で4°Cで一晩静置した。一次抗体として抗MPST抗体(1:50)、抗PGP 9.5抗体(1:500、#ab63497、Abcam)を用いた。細胞を0.1% Triton X-100 含有PBSで5分間×3回洗浄後、Alexa Fluor 結合2次抗体を含むブロッッキングバッファー中に室温で2時間静置した。細胞を0.1% Triton X-100 含有PBSで5分間×3回洗浄後、封入し、共焦点顕微鏡により蛍光画像を取得した。

G. 統計解析

統計解析は分散分析に続いてDunnett's testにより行った。 $P < 0.05$ を統計的有意とした。

III. 実験成績

A. 肝臓と脳における CSE と CBS を介した H₂S 産生

哺乳類の細胞では CSE と CBS が H₂S 産生に関与する主な酵素と考えられていた (Paul and Snyder, 2012)。これらはビタミン B6 の活性型である pyridoxal 5'-phosphate (PLP) 依存性の酵素であり、PLP 存在下で H₂S を産生するために、CSE は L-cysteine を、CBS は L-cysteine の他に L-homocysteine や S-adenocyl-L-methionine (SAME) などのチオールを必要とする (図 1、Chen *et al.*, 2004; Kabil *et al.*, 2011)。マウス肝臓は CSE を、脳は CBS を発現している (Ishii *et al.*, 2004; Enokido *et al.*, 2005)。そこでまず CSE と CBS による H₂S 産生活性を確認するために反応液 I (for CSE: 50 mM Tris-HCl, 10 mM L-cysteine, 0.05 mM PLP, pH 8.0) と反応液 II (for CBS: 50 mM Tris-HCl, 10 mM L-cysteine, 10 mM DL-homocysteine, 0.05 mM PLP, 0.2 mM SAME, pH 8.5) を用いてラット肝臓と脳の H₂S 産生を測定した。肝臓タンパク質を反応液 I で処置すると H₂S が生じ、この H₂S 産生は L-cysteine 濃度、PLP 濃度および pH に依存した (図 2A–C)。L-Cysteine に対する K_m 値は 2.5 mM、V_{max} 値は 3.9 nmol/mg/min であり、至適 pH は 7.5–8.0 であった。この H₂S 産生は CSE 阻害薬 DL-propargylglycine (PAG) を反応の 15 分前から処置することで PAG 濃度依存性 (0–1 mM) に抑制された (図 2D)。一方前処置をせずに PAG を同時処置した時は有意な抑制効果が認められなかった。PAG は時間依存性に CSE に結合してその酵素活性を阻害するが、その結合は L-cysteine と競合する (Abeles and Walsh, 1973)。これらのことが PAG が L-cysteine と同時処置時に阻害効果を示さなかった原因と考えられる。

脳タンパク質を反応液 II で処置すると H₂S が生じ、この H₂S 産生は L-cysteine、DL-homocysteine、PLP、SAME 濃度および pH に依存した (図 3A–E)。L-Cysteine と

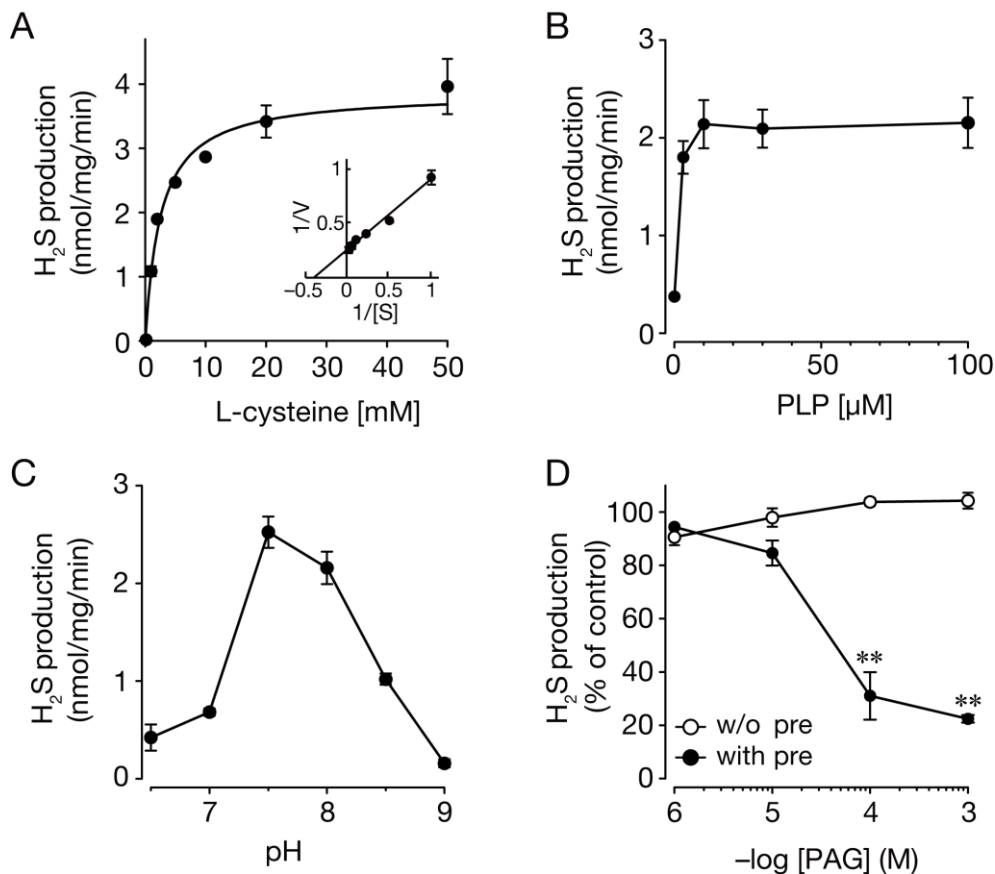


図2 肝臓における CSE による H₂S 産生

肝臓タンパク質を反応液 I で 30 分間 (A) または 1 時間 (B-D) インキュベーションした。反応液 I の組成は (mM) 50 Tris-HCl、10 L-cysteine、0.05 PLP、pH 8.0 であり、H₂S 産生量は被検試薬の濃度または pH のみを変えて測定した。(A) 反応液 I における H₂S 産生の L-cysteine (0–50 mM) 依存性。挿入図は基質濃度[S]の逆数に対する反応速度[V]の逆数の二重逆数プロット。L-Cysteine に対する K_m 値は 2.5 mM、V_{max} 値は 3.9 nmol/mg/min であった。(B、C) CSE による H₂S 産生の PLP (0–100 μM、B) および pH (6.5–9.0、C) 依存性。(D) 反応液 I における H₂S 産生への CSE 阻害薬 DL-propargylglycine (PAG、1 μM–1 mM) の効果。PAG は反応開始から (w/o pre)、または反応 15 分前から処置した (with pre)。データは平均値±標準誤差。n = 3。***P* < 0.01 v.s. control (Dunnett's test)。

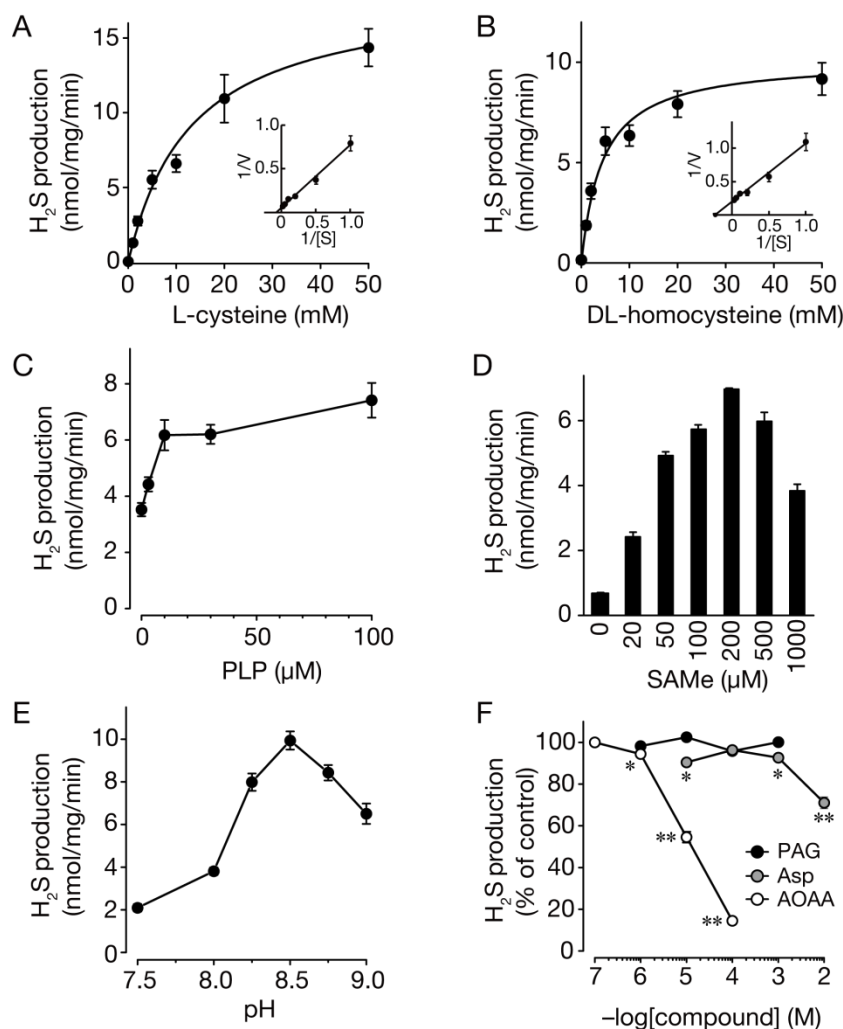


図3 脳におけるCBSによるH₂S産生

脳タンパク質を反応液II中で30分間(A、B)または1時間(C-F)インキュベーションした。反応液IIの組成は(mM)50 Tris-HCl、10 L-cysteine、10 DL-homocysteine、0.05 PLP、0.2 SAME、pH 8.5であり、H₂S産生量は被検試薬の濃度またはpHのみを変えて測定した。(A、B)CBSによるH₂S産生のL-cysteine(0-50 mM、A)およびDL-homocysteine(0-50 mM、B)依存性。挿入図は基質濃度[S]の逆数に対する反応速度[V]の逆数の二重逆数プロット。L-Cysteineに対する見かけのK_m値、V_{max}値は13.1 mM、18.2 nmol/mg/min、DL-homocysteineに対する見かけのK_m値、V_{max}値は4.4 mM、10.1 nmol/mg/minであった。(C-E)反応液IIにおけるH₂S産生のPLP(0-100 μM、C)、SAME(0-1000 μM、D)およびpH(7.5-9.0、E)依存性。(F)反応液IIにおけるH₂S産生に対するCSE阻害薬PAG(1 μM-1 mM)、CAT阻害薬L-aspartate(Asp、10 μM-10 mM)、非選択的H₂S合成酵素阻害薬aminooxyacetic acid(AOAA、0.1-100 μM)の効果。PAGは反応15分前から処置し、L-aspartateとAOAAは反応中のみ処置した。データは平均値±標準誤差。n=3。**P*<0.05、***P*<0.01 v.s. control (Dunnett's test)。

DL-homocysteine に対する見かけの K_m 値はそれぞれ 13.1 mM と 4.4 mM、 V_{max} 値は 18.2 nmol/mg/min と 10.1 nmol/mg/min であり、至適 pH は 8.5 であった。この H_2S 産生は非特異的 H_2S 合成酵素阻害薬 aminooxyacetic acid (AOAA) により抑制されたが、PAG を前処置しても抑制されず、高濃度 (10 mM) の CAT 競合基質 L-aspartate によってもおよそ 30%程度しか抑制されなかった (図 3F)。L-Aspartate は L-cysteine と同濃度用いた場合は CAT を介した H_2S 産生をおよそ 80%抑制すると報告されていることから (Shibuya *et al.*, 2009)、本実験で認められた L-aspartate による弱い抑制は非選択的な効果と考えられる。

B. 末梢神経系の H_2S 産生に対する CSE と CBS の関与

末梢一次知覚ニューロンの細胞体は脊髄の後根神経節 (DRG) に存在する。また副腎髄質由来細胞株である PC12 細胞は、NGF 処置により神経様突起伸長を示し、末梢神経細胞モデルとして用いられている。そこで本研究では DRG と未分化および NGF 分化 PC12 細胞を用い、末梢神経系における H_2S 産生機序について検討した。まず PC12 細胞と DRG の H_2S 産生に対する CSE と CBS の寄与について検討した。ウェスタンブロット解析のデータが示すように、CSE は肝臓に発現していたが、脳、PC12 細胞、DRG には発現していなかった (図 4A)。これらの組織や細胞の CSE による H_2S 産生を調べたところ、顕著な H_2S 産生が肝臓で認められたが、脳、PC12 細胞、DRG の H_2S 産生はわずかであった (図 4B)。一方、CBS は用いたすべての細胞、組織で発現しており、PC12 細胞と DRG の CBS 発現量は脳のおよそ 3 分の 1 であった (図 4C)。しかし、CBS を介した H_2S 産生を測定したところ、CSE 活性が認められなかった脳からは H_2S が生じたが、PC12 細胞と DRG はほとんど H_2S を産生しなかった (図 4D)。高濃度 (20 mM) の L-cysteine と DL-homocysteine を用いても PC12 細胞と DRG では顕著な H_2S 産生は認め

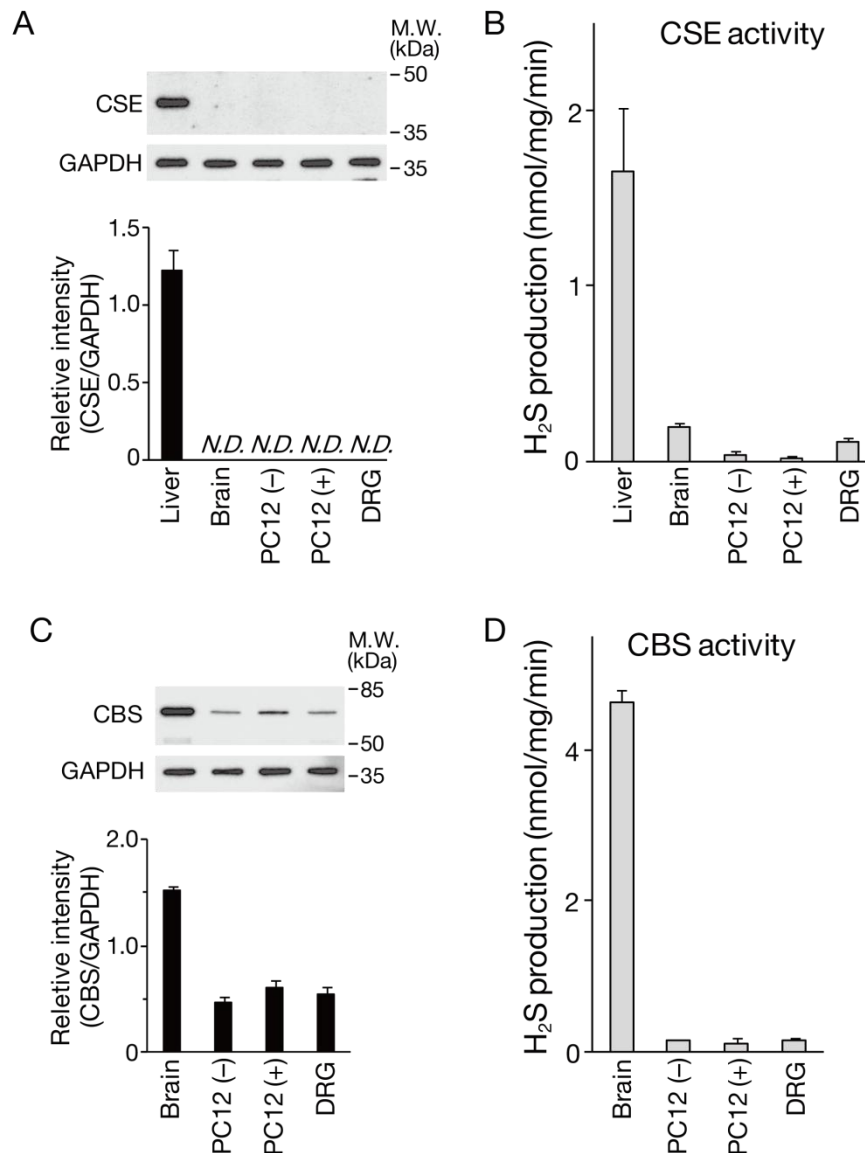


図4 PC12細胞とDRGのCSEとCBS活性

肝臓、脳、未分化PC12細胞(-)、NGF分化PC12細胞(+)およびDRGにおけるCSEとCBSの発現量とH₂S産生活性。(A、C：上図)CSE(43kDa)、CBS(63kDa)およびGAPDH(37kDa)のウェスタンブロット解析。(A、C：下図)CSEまたはCBSのバンドのGAPDHのバンド濃度に対する相対的濃度。(B、D)反応液I(B)およびII(D)におけるH₂S産生量。反応液Iの組成は(mM)50Tris-HCl、10L-cysteine、0.05PLP、pH8.0であり、反応液IIは10L-cysteine、10DL-homocysteine、0.05PLP、0.2SAmE、pH8.5であった。データは平均値±標準誤差。n=3。

られなかった（データは示さない）。以上の結果から、末梢神経系の H_2S 産生に対する CSE と CBS の関与は極めて低いことが示唆された。

C. 末梢神経系の H_2S 産生に対する CAT/MPST の関与

続いて CAT と MPST を介した第 3 の H_2S 産生経路について検討した。ウエスタンブロットの結果が示すように cytosolic (c) CAT、mitochondrial (m) CAT および MPST の全てが脳、PC12 細胞および DRG に発現していた（図 5A）。脳と比較すると cCAT の発現量は PC12 細胞と DRG で低かったが、mCAT の発現量は PC12 細胞は脳と同程度であり、DRG は比較的高かった（図 5B）。また本実験で用いた抗 MPST 抗体は、ラット MPST の分子量 (33 kDa) と同程度の大きさの、2 つの異なるタンパク質を認識した（図 5A）。脳と比較すると、高分子量タンパク質の発現レベルは PC12 細胞の方が比較的高かったが、低分子量タンパク質については逆に低かった（図 5B）。DRG では両タンパク質の発現レベルは脳でのそれと同程度であった。

CAT は α -ketoglutarate (α -KG) 存在下で L-cysteine を 3-mercaptopyruvate (3MP) に変換し、さらに還元剤存在下で MPST が 3MP から H_2S を合成する（図 1）。そこで反応液 I に α -KG (0.3 mM) と還元剤 dithiothreitol (DTT、1 mM) を加え（反応液 III）、 H_2S 産生を測定した。その結果、脳だけでなく PC12 細胞と DRG でも相当量の H_2S 産生が認められた（図 5C）。PC12 細胞と DRG の H_2S 産生量は肝臓の CSE または脳の CBS による H_2S 産生量と同程度であった（図 4、5）。これらの結果から、PC12 細胞と DRG では CAT/MPST が CSE や CBS に比べはるかに高い H_2S 産生活性をもつと考えられた。

そこで PC12 細胞と DRG で認められた顕著な H_2S 産生が、CAT/MPST を介したものであるかさらなる検討を行った。ここまでの実験から未分化 PC12 細胞、NGF 分化 PC12 細胞および DRG の、酵素発現および H_2S 産生活性がほぼ同じであったため、この実験

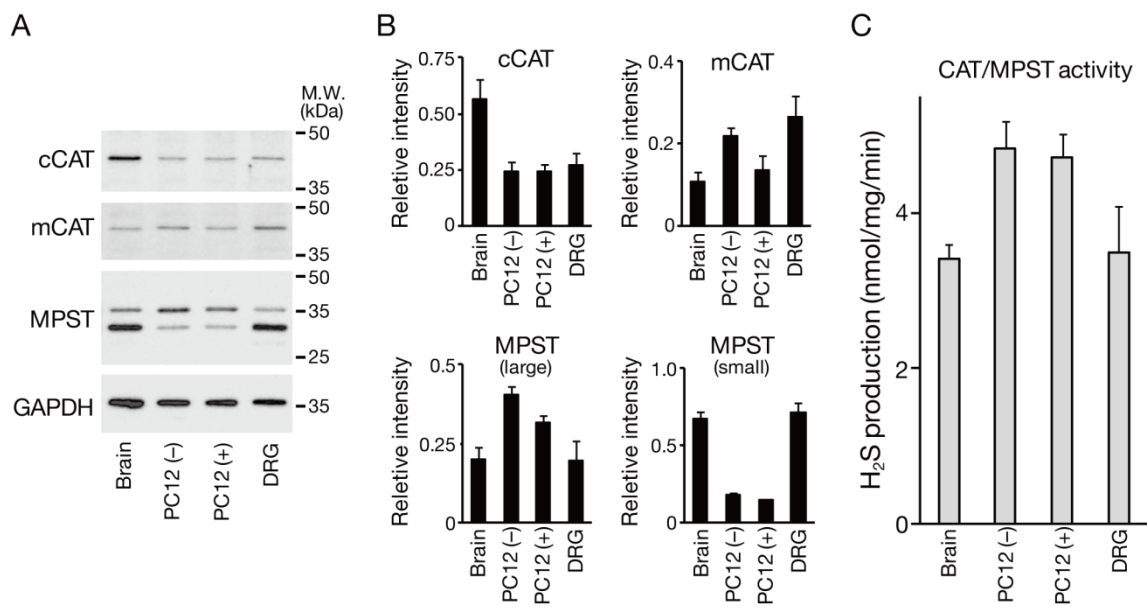


図5 PC12細胞とDRGのCAT/MPST活性

脳、未分化 PC12 細胞 (-)、NGF 分化 PC12 細胞 (+) および DRG における cytosolic (c) CAT、mitochondrial (m) CAT、MPST の発現量と CAT/MPST を介した H₂S 産生活性。(A) cCAT (46 kDa)、mCAT (46 kDa)、MPST (33 kDa) および GAPDH (37 kDa) のウェスタンブロット解析。(B) 各酵素のバンドの、GAPDH のバンド濃度に対する相対的濃度。MPST は 2 つのバンド (large と small) が認められた。(C) 反応液 III における H₂S 産生量。反応液 III の組成は (mM) 50 Tris-HCl、10 L-cysteine、0.05 PLP、0.3 α-KG、1 DTT、pH 8.5 であった。データは平均値±標準誤差。n = 3。

では、未分化型の PC12 細胞のみを用いた。DTT 存在下における PC12 細胞の H₂S 産生は α -KG 無しでは極めてわずかであったが、 α -KG (0.01–1 mM) の濃度依存性に大きく増加した (図 6A)。同様に、H₂S 産生は DTT (0.1–10 mM) および内因性還元剤の dihydrolipoic acid (DHLA, 0.1–3 mM) の濃度依存性に増加したが、これらの還元剤が無くてもある一定の H₂S 産生は認められた (図 6B、C)。また PC12 細胞の H₂S 産生は PLP 濃度にも依存し、30 μ M で最大活性を示した (図 6D)。

CAT は AST/GOT と同一の酵素であり、L-aspartate や oxaloacetate にも親和性をもつ。そこで PC12 細胞の H₂S 産生に対する L-aspartate、oxaloacetate、AOAA (非特異的 H₂S 合成酵素阻害薬) および PAG (CSE 阻害薬) の効果を調べたところ、H₂S 産生は L-aspartate (0.1–10 mM)、oxaloacetate (10 μ M–10 mM) および AOAA (0.1–100 μ M) の濃度依存性に抑制された (図 7)。一方、PAG は肝臓の CSE 依存性 H₂S 産生を抑制した濃度 (1 μ M–1 mM) では PC12 細胞の H₂S 産生に効果を示さなかった (図 7)。以上の結果から PC12 細胞の顕著な H₂S 産生は CAT を介していることが示唆された。

次に末梢神経系の H₂S 産生における MPST の関与を調べた。現在、有効な MPST 特異的阻害薬が無いことから、RNA 干渉による MPST mRNA 発現抑制の効果について検討した。前述したように、抗 MPST 抗体は 2 つの異なるサイズのタンパク質を認識した (図 8A)。高分子タンパク質の発現は 2 種類の MPST 特異的 siRNA のうち一方 (siMPST-1) には抑制されなかったが、他方 (siMPST-2) では抑制された (図 8A、B)。低分子タンパク質の発現はどちらの siRNA によっても大きく抑制され、その抑制の程度は 2 つの siRNA で同程度であった (図 8A、B)。L-Cysteine または 3MP からの H₂S 産生は、どちらの siRNA の導入によっても有意に抑制された (図 8C、D)。以上を総括すると、末梢神経系では CAT と MPST を介して H₂S が産生されることが明らかとなった。

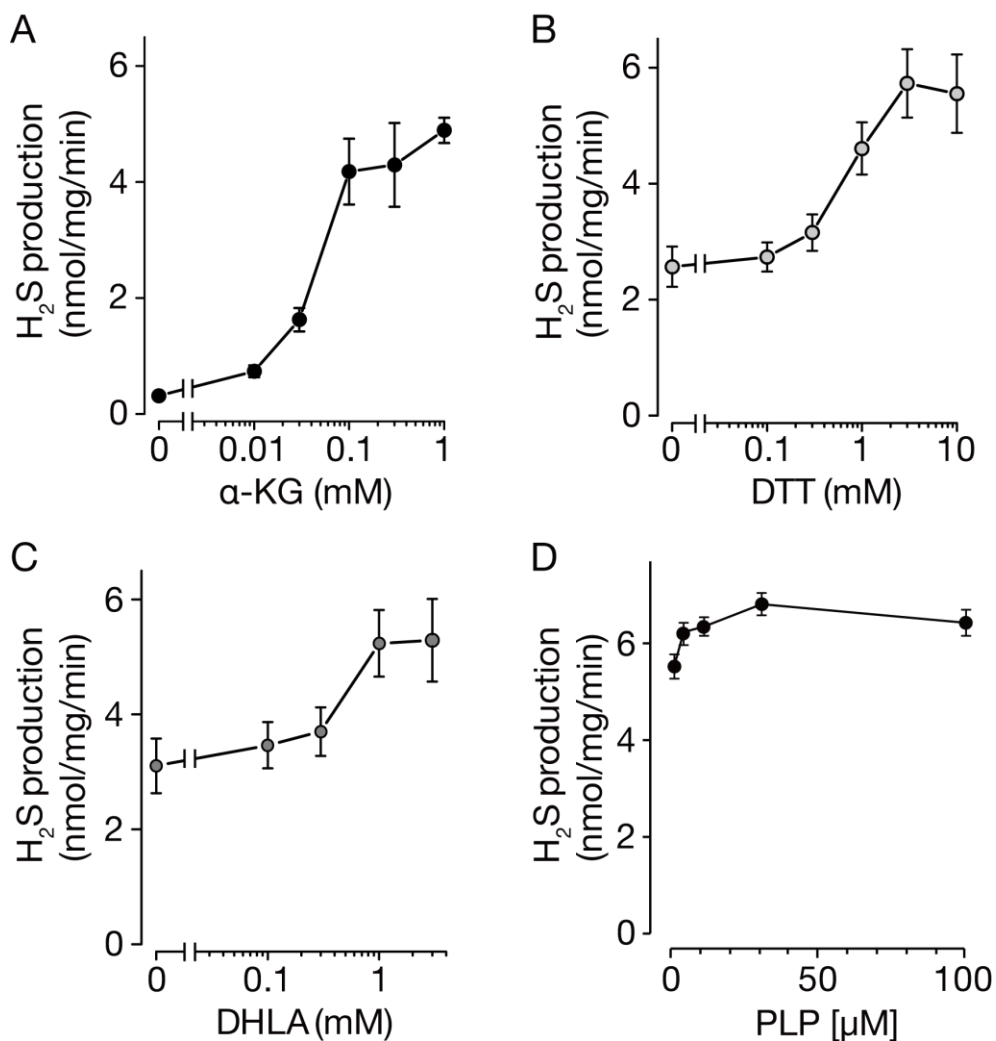


図6 PC12細胞のH₂S産生に対するCATとMPSTの関与

PC12細胞のH₂S産生のα-KG (0.01–1 mM、A)、DTT (0.1–10 mM、B)、dihydrolipoic acid (DHLA、0.1–3 mM、C) および PLP (0–100 μM、D) 依存性。PC12細胞の溶解タンパク質を、被検物質の濃度のみ変えた反応液 III (50 mM Tris-HCl、10 mM L-cysteine、0.05 mM PLP、0.3 mM α-KG、1 mM DTT、pH 8.5) でインキュベーションした。DHLAの効果の検討では DTT を除いた反応液を除いた。各ポイントは平均値±標準誤差。n = 3。

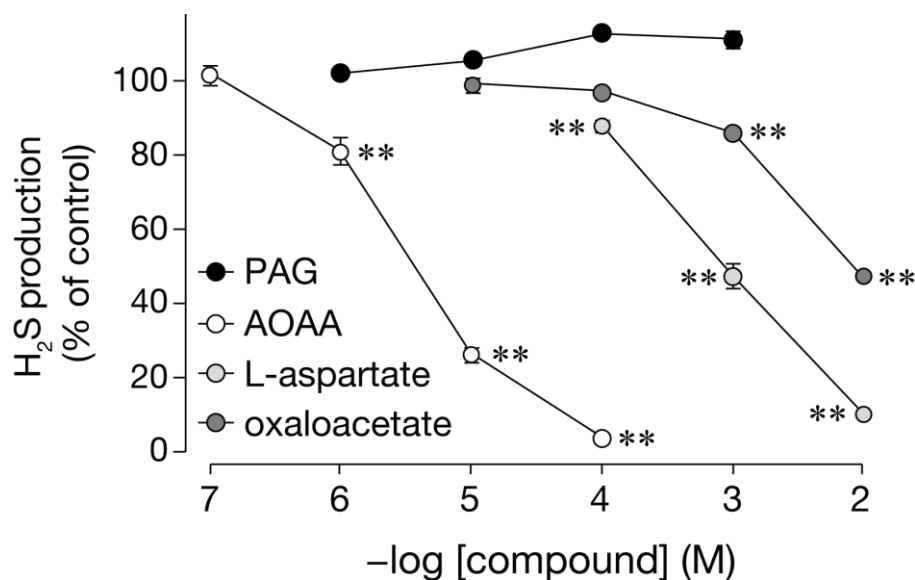


図7 PC12 細胞の H₂S 産生に対する H₂S 合成酵素阻害薬と競合基質の効果

PC12 細胞の H₂S 産生に対する CSE 阻害薬 PAG (1 μ M–1 mM)、非特異的 H₂S 合成酵素阻害薬 AOAA (0.1–100 μ M)、CAT 競合基質 L-aspartate (0.1–10 mM) および oxaloacetate (10 μ M–10 mM) の効果。PC12 細胞の溶解タンパク質を各物質を含む反応液 III (50 mM Tris-HCl、10 mM L-cysteine、0.05 mM PLP、0.3 mM α -KG、1 mM DTT、pH 8.5) でインキュベーションした。H₂S 産生量は各物質非存在下での産生量に対する割合 (%) で示した。PAG のみ反応 15 分前から前処置した。各ポイントは平均値 $\pm$ 標準誤差。n = 3。
 ** $P < 0.01$ v.s. control (Dunnett's test)

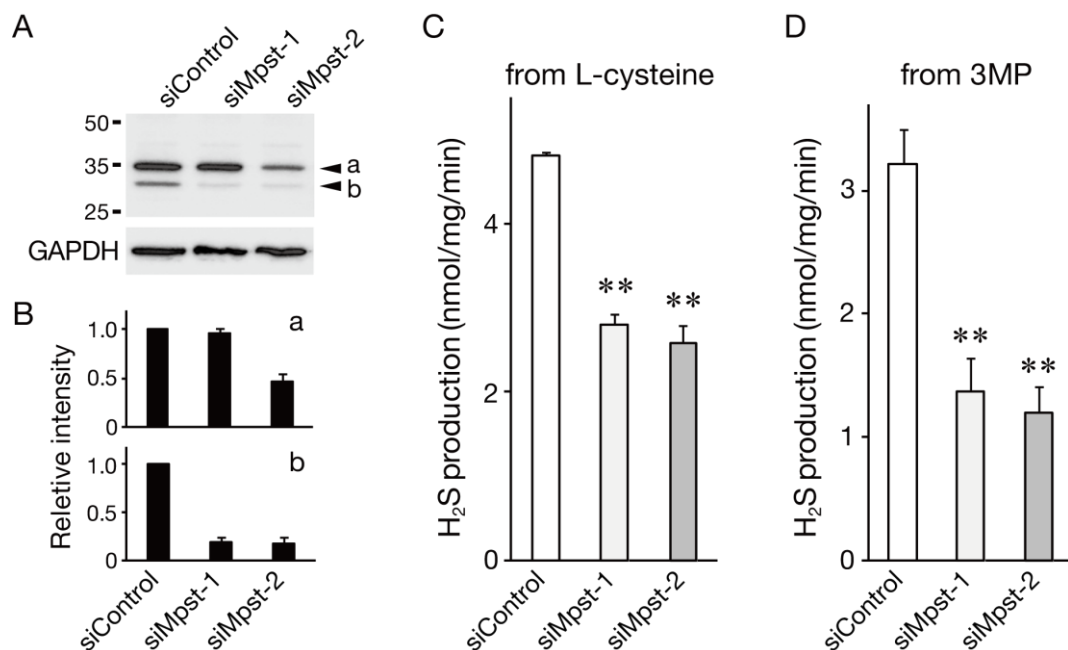


図8 PC12細胞のH₂S産生に対するMPSTノックダウンの効果

PC12細胞にネガティブコントロール siRNA (siControl) または MPST 特異的 siRNA (siMPST-1 または siMPST-2) を遺伝子導入し、72 時間後に酵素発現量と H₂S 産生量を測定した。(A) siRNA 導入後の MPST と GAPDH のウェスタンブロット解析。(B) MPST の 2 つのバンド (a と b) の GAPDH のバンド濃度に対する相対的濃度。数値はコントロール比。(C、D) RNA 干渉による、L-cysteine (C) または 3MP (D) を基質とした時の H₂S 産生に対する効果。PC12 細胞の溶解タンパク質をそれぞれ反応液 III (50 mM Tris-HCl、10 mM L-cysteine、0.05 mM PLP、0.3 mM α -KG、1 mM DTT、pH 8.5) および IV (50 mM Tris-HCl、0.1 mM 3MP、1 mM DTT、pH 8.5) でインキュベーションした。データは平均値 $\pm$ 標準誤差。n = 3。** $P < 0.01$ v.s. control (Dunnett's test)。

D. MPST の細胞内局在

H₂S が末梢神経細胞においてどの細胞内小器官で産生されるかを特定するため、PC12 細胞と培養 DRG ニューロンにおける MPST の細胞内局在を共焦点免疫蛍光解析により調べた。MPST は、未分化、NGF 分化 PC12 細胞および DRG ニューロンのいずれにおいても点状の染色像を示し、その分布様式はミトコンドリアマーカである Mito Tracker Red CMXRos の染色像と一致した (図 9A)。DRG 細胞のうち神経マーカである抗 PGP 9.5 抗体で染色されたものをニューロンと同定した (図 9A)。

さらに MPST の局在を細胞分画を用いたウェスタンブロット解析によって調べた (図 9B)。PC12 細胞と DRG では、抗 MPST 抗体で認識された 2 つのタンパク質のうち高分子量タンパク質はミトコンドリアに局限していた。一方、低分子量タンパク質は細胞質とミトコンドリアの両方に発現していたが、ミトコンドリアにより高度に発現していた。

E. CAT/MPST による H₂S 産生の特性

さらに、PC12 細胞の CAT/MPST による H₂S 産生の特性について調べた。CAT/MPST による H₂S 産生は至適 pH を 9.0 とする bell-shape 状の pH 依存性を示した (図 10)。ミトコンドリアの生理的 pH とされる 8.0 付近での H₂S 産生量は、肝臓の CSE や脳の CBS による H₂S 産生量と同程度であり、pH 8.0 から 9.0 へのアルカリ化によりさらに増加した。

CAT/MPST による H₂S 産生量は反応開始から少なくとも 30 分間は、反応時間と直線的比例関係にあった (図 11A)。30 分間での反応でカイネティクス解析したところ、PC12 細胞における、L-cysteine に対する見かけの Km 値は 9.2 mM であり、Vmax 値は 9.6 nmol/mg/min であった (図 11B)。

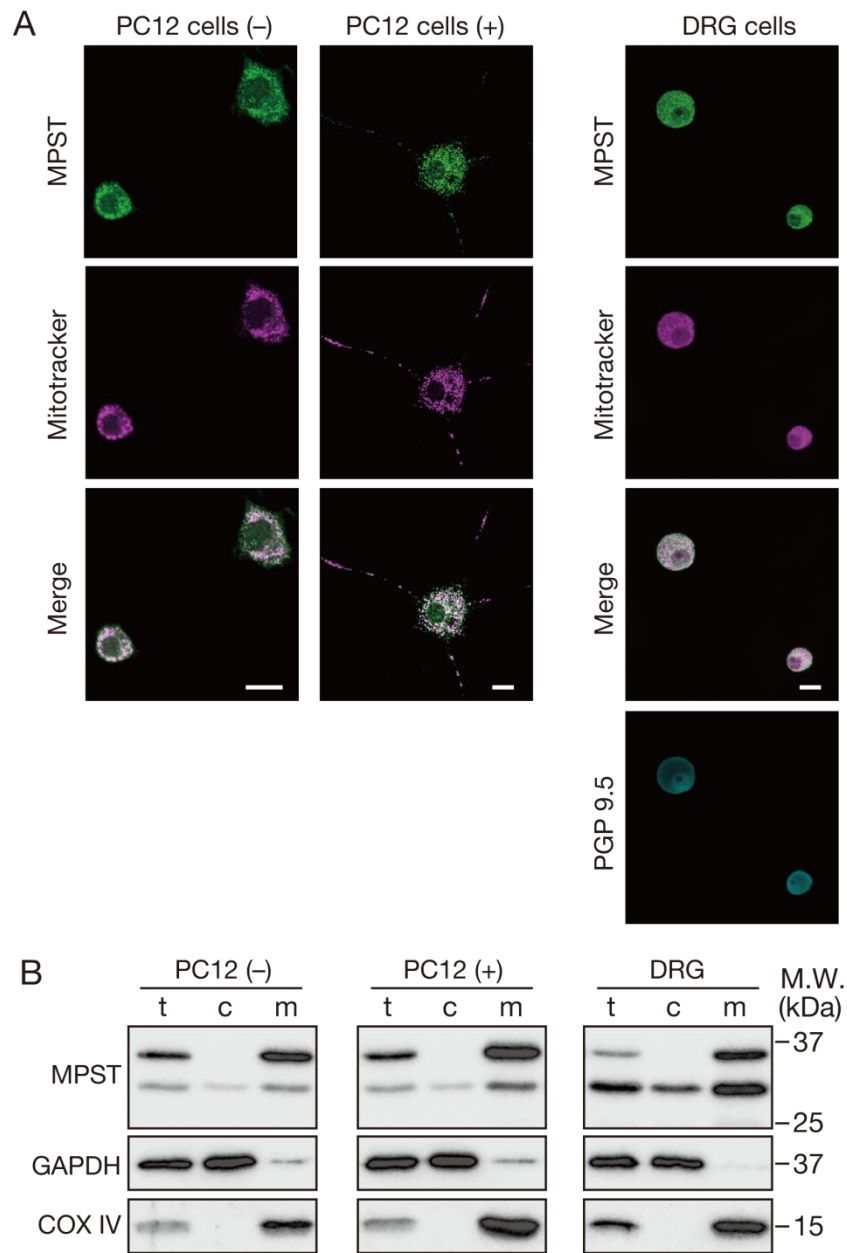


図9 PC12細胞とDRGニューロンにおけるMPSTの局在

(A) 未分化、NGF分化PC12細胞およびDRGニューロンにおけるMPST（グリーン）とミトコンドリア（マゼンタ）の分布を示す典型的な二重染色画像。各細胞を抗MPST抗体とミトコンドリアマーカーMitoTracker Red CMXRosを用いて蛍光染色し、共焦点顕微鏡で解析した。DRGニューロンは神経マーカーの抗PGP 9.5抗体を用いて特定した（シアン）。(B) PC12細胞とDRGの、細胞質とミトコンドリア画分のウェスタンブロット解析。GAPDH（37 kDa）とCOX IV（15 kDa）をそれぞれ細胞質とミトコンドリアマーカーとした。

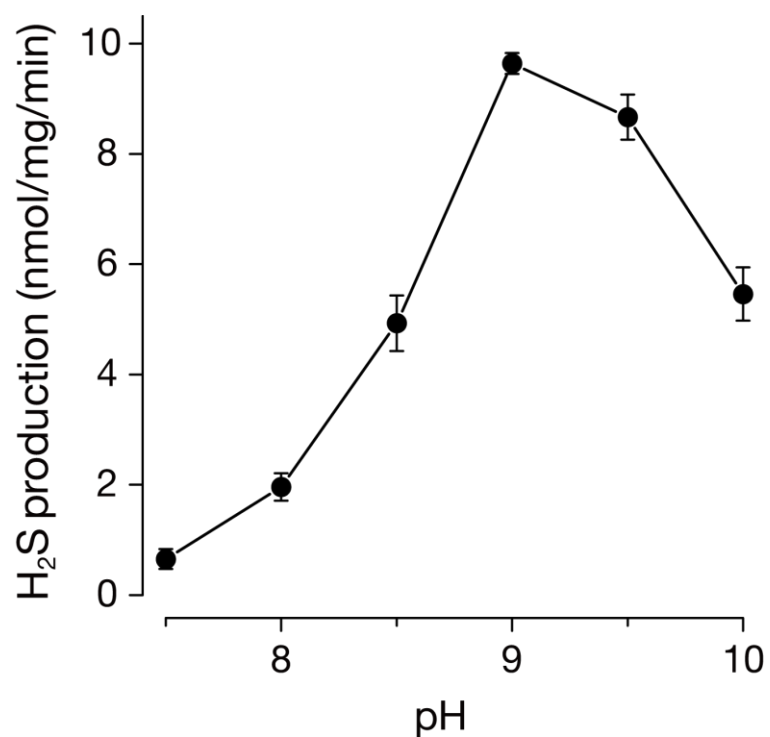


図 10 CAT/MPST による H₂S 産生の pH 依存性

PC12 細胞を pH を変えた反応液 III (50 mM Tris-HCl、10 mM L-cysteine、0.05 mM PLP、0.3 mM α -KG、1 mM DTT) でインキュベーションした。pH 7.5–8.5 は Tris-HCl 緩衝液を用い、pH 9.0–10.0 は Borate-KOH 緩衝液を用いて調整した。

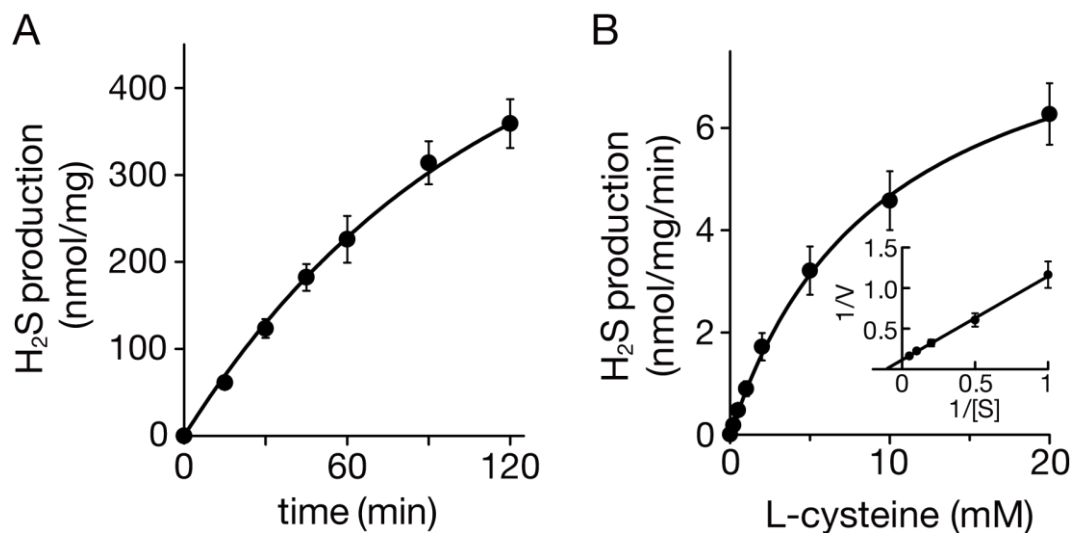


図 11 CAT/MPST による H₂S 産生の L-cysteine 依存性

(A) PC12 細胞の CAT/MPST を介した H₂S 産生の経時変化。CAT/MPST を介した H₂S 産生量は反応液 III (50 mM Tris-HCl、10 mM L-cysteine、0.05 mM PLP、0.3 mM α -KG、1 mM DTT、pH 8.5) を用いて測定した。(B) PC12 細胞の CAT/MPST を介した H₂S 産生の L-cysteine 依存性。PC12 細胞の溶解タンパク質を任意の L-cysteine 濃度を含んだ反応液 III で 30 分間インキュベーションした。挿入図は基質濃度[S]の逆数に対する反応速度[V]の逆数の二重逆数プロット。L-Cysteine に関する見かけの K_m 値は 9.2 mM、V_{max} 値は 9.6 nmol/mg/min であった。各ポイントは平均値±標準誤差。n = 3。

IV. 考察

本研究では末梢神経系のH₂S産生に対する3種類の反応経路の寄与について比較検討を行った。PC12細胞とDRGではCSEは検出されず、CBSの発現量は脳に比べて低かった。またCSEとCBSを介したH₂S産生もほとんど認められなかった。一方、PC12細胞とDRGではCATとMPSTが発現しており、これらの酵素によるH₂S産生活性は顕著で、アルカリ化でさらにH₂S産生量が増加した。MPSTはミトコンドリアに局在しており、ミトコンドリア内の代謝やpH変化が末梢神経系のH₂S産生に影響を与えることが示唆された。

末梢神経系のH₂S産生に対するCATとMPSTの寄与

CAT/MPSTが末梢神経系の主要なH₂S産生経路であることが、以下に述べる実験結果により示された。まずウエスタンブロット解析によってPC12細胞とDRGにcCAT、mCATおよびMPSTの全てが発現することがわかった。さらにL-cysteineからのH₂S産生はCATの共基質である α -KG非存在下ではほとんど見られず、CAT阻害薬のAOAA、L-cysteineのCATへの結合に拮抗するL-aspartateとoxaloacetate、およびMPSTのRNA干渉により抑制された。カインेटィクス解析では、PC12細胞のCAT/MPSTによるH₂S産生は、肝臓のCSEや脳のCBSによるH₂S産生と同等のV_{max}値を示した。これらの知見は、末梢神経系ではCAT/MPSTが他組織のCSEとCBSに代わって主要なH₂S産生経路として機能していることを示唆している。MPSTはH₂Sの生成に還元剤を必要とするが、PC12細胞ではDTT等の還元剤非存在下でも相当量のH₂Sが生じた。細胞内に存在する還元性タンパク質チオレドキシンや還元剤DHLA、さらにL-cysteineなどは還元的にMPSTによるH₂S生成を促進すると考えられており(Mikami *et al.*, 2011; Yadav *et al.*, 2013)、これら内因性物質や添加したL-cysteineがDTT非存在下のH₂S産生に寄与して

いたのかもしれない。

PC12 細胞と DRG のウェスタンブロット解析では、今回使用した抗 MPST 抗体は 35 kDa 付近に 2 種類の異なるタンパク質を認識した。RNA 干渉により低分子側のタンパク質発現が 80%減少した時、高分子側のタンパク質発現が減少していなくても 3MP からの H₂S 産生は 50%以上低下した。DNA Databank of Japan (DDBJ) ではラット MPST として登録されているのは分子量 33 kDa の転写産物だけであり、低分子側の MPST がこれと一致すると思われる。しかし Flannigan ら (2013) は、別の会社の抗 MPST 抗体を用いて、ラット結腸で同様に二重のバンドを検出しており、炎症条件で高分子側のバンドと H₂S 産生が共に増加することも報告している。そのため、今回認められた高分子側のバンドは、これまで登録されていない MPST のスプライスバリエーションや、あるいは MPST の何らかの修飾型の可能性もある。

末梢神経系の H₂S 産生に対する CSE と CBS の関与

PC12 細胞と DRG では CSE 発現は検出されず、H₂S 産生活性は低かった。一方、CBS は発現が検出されたが、その活性化に最適な反応液を用いたにも関わらず、H₂S 産生は極めてわずかであった。そのため CSE と CBS は末梢神経系の H₂S 産生に関与していないと結論付けた。PC12 細胞と DRG で CBS の H₂S 産生活性が低いのは発現量が低いためと考えられる。次章で詳しく述べるが、脳ではアストロサイトに CBS が発現しており (Enokido *et al.*, 2005)、本実験で見られた脳の高い CBS 発現量と H₂S 産生量は、神経ではなくアストロサイトによるものと考えられる。PC12 細胞において、L-cysteine 単独からでも H₂S が生じ、さらにこの反応が AOAA で抑制されることから、CBS を介して H₂S が産生されるとの報告もある (Tang *et al.*, 2011)。しかし、CBS は homocysteine や SAMe が欠如した条件下では効率的に H₂S を生成しない (Chen *et al.*, 2004; Kabil *et al.*, 2011)。また AOAA はしばしば CBS 特異的阻害薬として使用されているが、CBS 以外

の PLP 依存性酵素に対しても非特異的な抑制効果を示し、CSE や CAT の他に GABA アミノ基転移酵素、DOPA 脱炭酸酵素への抑制効果が報告されている (John and Charteris, 1978; Asimakopoulou *et al.*, 2013)。それゆえ、CBS が PC12 細胞の H₂S 産生に関与しているという以前の報告は懐疑的である。本研究の方法の項で記述したように、H₂S 量測定時に L-cysteine を添加する場合、適切な補正を行わないと H₂S 産生を過大評価する可能性がある。これが本研究結果と以前の報告 (Tang *et al.*, 2011) との相違の理由の一つと思われる。ストレス誘発性の痛覚過敏では、CBS を介して生じた H₂S が DRG ニューロンの Na⁺チャネルを感作しているという報告もあるが、これもチャネルの感作が AOAA により抑制されるという事実のみに基づいている (Wang *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2013)。さらに現在、DRG ニューロンが CBS を介して H₂S を産生することも示されていない。

末梢神経系における CAT/MPST の生理学的・病態生理学的役割

免疫蛍光法と細胞分画を用いたウエスタンブロット解析から、PC12 細胞と DRG ニューロンでは MPST は主にミトコンドリアに分布することが明らかとなった。これらの細胞では、H₂S は多くがミトコンドリアで産生されることが考えられる。CAT は AST/GOT と同一の酵素で、ミトコンドリアでは malate-aspartate shuttle の構成要素として oxaloacetate から aspartate への変換を行っている (Mckenna *et al.*, 2006)。ミトコンドリア内の aspartate と oxaloacetate の濃度はそれぞれ 0.2–0.3 mM と 0.002–0.005 mM と報告されているが (Siess *et al.*, 1984)、cysteine は 0.1–1.0 mM (Yao *et al.*, 1994; Fu *et al.*, 2012)、 α -KG は 1.1–1.6 mM (Siess *et al.*, 1984)であることを考慮すると、ミトコンドリア型 CAT は生理的環境下の H₂S 生成に寄与していることが示唆される。近年、Módis ら (2013) は MPST により生じた H₂S が、電子をミトコンドリア呼吸鎖に供与することで、 μ M 以下の低濃度で ATP 合成を促進することを示した。ゆえに CAT と MPST は H₂S 産生を介して ATP 合成調節に関与しているのかもしれない。H₂S はまた酸化リン酸化の副生成

物でもある活性酸素種を直接不活化させることも報告されている (Whiteman *et al.*, 2004; 2005)。さらに神経細胞株 Neuro2a 細胞における mCAT と MPST の過剰発現はグルタミン酸の興奮毒性を抑制する (Kimura *et al.*, 2010)。そのため CAT/MPST により産生された H₂S は神経細胞を保護する分子として働いている可能性がある。PC12 細胞の H₂S 産生は pH 8.0 で十分に高く、さらに pH 8.0 から 9.0 への上昇に伴い顕著に増加した。ミトコンドリアマトリックスの pH は通常 8.0 付近で、膜を介したプロトン勾配により細胞質より高く維持されており、またミトコンドリア呼吸に応じ律動的な上昇も示す (Casey *et al.*, 2010; Santo-Domingo *et al.*, 2013)。さらにグルタミン酸やアポトーシス惹起性刺激 (紫外線照射など) はミトコンドリア pH を 8.5 またはそれ以上に上昇させる (Llopis *et al.*, 1998; Matsuyama *et al.*, 2000; Abad *et al.*, 2004)。そのため CAT/MPST を介した H₂S 産生は、ミトコンドリア内の生理的および病態生理的な pH 変化によって調節されているのかもしれない。

末梢神経系の H₂S 産生は基質アミノ酸濃度変化によっても調節されうる。細胞内 cAMP 濃度が上昇すると glutathione の分解が促進され cysteine 濃度が増加する (Higashi *et al.*, 1976)。また飢餓や虚血といった代謝ストレスは oxaloacetate と aspartate レベルを減少させる (Williamson *et al.*, 1967; Hems and Brosnan, 1971)。Aspartate 濃度の減少はミトコンドリアのアスパラギン酸グルタミン酸輸送体の機能不全によっても生じることが報告されている (Jalil *et al.*, 2005)。生体内ではこれらの多岐にわたる生理的、病態生理的刺激が末梢神経系の CAT/MPST を介した H₂S 産生を増加させる可能性がある。H₂S は脂溶性が高く自由に細胞膜を透過する (Mathai *et al.*, 2009)。そのため知覚神経で過剰量に産生された H₂S が、自己分泌または傍分泌的に TRPA1 (Miyamoto *et al.*, 2011) や T-type Ca²⁺チャネル (Takahashi *et al.*, 2010; Okubo *et al.*, 2011) を活性化し、痛みや知覚過敏を誘発しているのかもしれない。

第2章 中枢神経系における H₂S 産生機序

I. 緒論

H₂S は哺乳動物の体内で CSE、CBS または CAT と MPST の共役により L-cysteine から生成される。筆者らは、H₂S が知覚ニューロンに発現する痛み受容体 TRPA1 を活性化すること、また知覚ニューロンなどの末梢神経系では CAT/MPST を介して H₂S が産生されることを示し（前章）、過剰な H₂S 産生が末梢神経系で痛みの発生に関与する可能性を提示してきた（Miyamoto *et al.*, 2011; 2014）。一方、中枢神経系では内因性に生じた低濃度の H₂S が、抗酸化物質や抗炎症物質として機能することが多くの研究で示唆されている（Szabó, 2007; Kimura, 2014）。さらに、投与した外因性 H₂S が治療効果を示すことも脊髄損傷、アルツハイマー病、パーキンソン病等の神経疾患の動物モデルで報告されており（Kida *et al.*, 2011; Xuan *et al.*, 2012; Campolo *et al.*, 2013）、H₂S 徐放作用をもつ物質を抗酸化薬や抗炎症薬として臨床応用しようとする試みも行われている（Caliendo *et al.*, 2010; Barr and Calvert, 2014）。

前章で示したように、末梢神経系とは異なり中枢神経系では CBS が H₂S 産生に寄与していた。CBS は L-cysteine と L-homocysteine を縮合して L-cystathionine を合成する過程で H₂S を産生するため（Kimura, 2014）、CBS の活性化により体内の L-homocysteine 量は減少する。CBS の先天異常患者では高ホモシステイン血症と重度の神経機能不全が認められる。そのため CBS は H₂S 合成酵素としてよりもホモシステイン代謝酵素として以前より多くの研究の対象となってきた（Mudd *et al.*, 1964; Beard and Bearden, 2011）。また高ホモシステイン血症は、脊髄損傷、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病など、偶発的、遅発的神経疾患の共通の症状でもある（Seshadri *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2006; Valentino *et al.*, 2010）。近年 homocysteine の神経毒性に加え、H₂S の神経保護作用が明ら

かにされつつあり (Mattson and Shea, 2003; Kimura, 2014)、後天的な CBS 欠損による homocysteine 濃度の増加と H₂S 産生量の低下の両者が、これら疾患の進行や増悪に深く関わっている可能性がある。

Enokido ら (2005) はマウス脳では CBS がアストロサイトに発現し、カニン酸誘発性のでんかんで発現量が増加することを示した。また epidermal growth factor や膜透過性 cAMP 類似体が培養アストロサイトの CBS 発現を増加させることを示し、成長因子や cAMP が病態時の CBS 発現増加のメディエーターであることを示唆した。しかしながら、生理的な CBS 発現がどのように維持されているか、またどのような条件下でそれが損なわれるかについては全くわかっていない。

興味深いことに、アストロサイトの形態やいくつかの機能的タンパク質の発現はニューロンにより調節される。例えば、アストロサイトの形態は単独培養時には多角形状であるが、ニューロンとの共培養により星状へと変化する (Hatten, 1985)。またアストロサイトのグルタミン酸トランスポーター GLT-1 の発現は、アストロサイト単独培養下で消失し、ニューロンとの共培養により回復する (Swanson *et al.*, 1997; Schlag *et al.*, 1998)。さらに Rouach ら (2000) は、ニューロン存在下におけるアストロサイトのコネキシン発現が、Na⁺チャネルやグルタミン酸受容体阻害により低下することから、その発現が神経活動依存的に調節されることを示した。注目すべきは、脊髄損傷や筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病などの神経疾患では病変部位において神経死が起こっており、高ホモシステイン血症を伴うことである (Mattson, 2000; Oyinbo, 2011)。しかし、これまでホモシステイン蓄積がニューロンに及ぼす影響については研究が行われてきたが、ニューロンの喪失がホモシステイン蓄積をもたらす可能性については調べられていない。

本研究では、ニューロンによるアストロサイト CBS への生理的寄与を明らかにするため、ニューロンとアストロサイトの構成比が異なる共培養系を作製し、CBS 発現量と

H₂S 産生活性を評価した。本章ではアストロサイトの CBS 発現量とその活性がニューロンの欠失により減少し、またそれらの減少がニューロンとの共培養や膜透過性 cAMP 類似体の処置により回復することを示す。

II. 実験方法

本研究は、北海道大学の動物実験に関するガイドラインに従って行った（実験計画書番号：13-0029、14-0111）。実験には妊娠ラット（妊娠 16 日、日本クレア）と自家繁殖した Wistar 系新生ラット(雌雄、P0-7 日齢)を用いた。繁殖に用いた親ラットは日本クレアより購入した。

A. 細胞培養

A-1) 脊髄アストロサイト培養系の作製

アストロサイトは McCarthy と deVellis (1980) が確立した方法に従って得た。断頭により安楽殺後、脊髄を P0-3 ラットより摘出し、髄膜を丁寧に除去した。脊髄組織をパイン (10 U/ml、Worthington) と DNase (0.1 mg/ml) を含む HBSS で 37°C で 20 分間インキュベーションし、緩やかにピペッティングして細胞を分離した。得られた細胞を 10% FBS、100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin を含む DMEM/Ham's F12 中に懸濁し PLL コートした培養フラスコに 5×10^4 cells/cm² の密度で播種した。細胞がコンフルエンスに達したところで（播種 7-8 日後）、フラスコを 37°C 、250 rpm で一晩振盪し、アストロサイト以外の細胞（ミクログリア、オリゴデンドロサイト）を剥離した。接着したまま残った細胞をトリプシン処置で剥がした後、PLL コートしたフラスコまたはカバーガラスに 2×10^4 cells/cm² の密度で再度播種した。さらに 3-10 日間細胞を培養し、これを培養アストロサイトとして用いた。アストロサイトマーカーの glial fibrillary acidic protein (GFAP) に対する抗体を用いた免疫蛍光解析により、およそ 90%の細胞が GFAP 陽性アストロサイトであることを確かめた。培養液は1週間に2回半量交換した。

Dibutyryl cAMP (dbcAMP、Sigma Aldrich) と epidermal growth factor (EGF、Life Technologies) を処置する場合は 80–90%コンフルエンスのアストロサイトに添加し、培養液は 2 日に 1 回これらを含む新鮮な培養液と全量交換した。

A-2) 脊髄ニューロン培養系および脊髄細胞混合培養系の作製

イソフルラン過剰吸入により妊娠ラットを安楽殺後、胚齢 16 日 (E16) の胎児ラットを取り出した。上述のように脊髄を胎児ラットより摘出し、パパインと DNase でインキュベーションした。脊髄組織を $1 \times$ B-27 supplement (Life Technologies)、2 mM L-glutamine、2% horse serum、100 U/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin を含む Neurobasal medium (Life Technologies) 中に懸濁した。ピペッティングにより細胞を分離し、PLL/ラミニンコートした培養フラスコまたはカバーガラスに 5×10^4 cells/cm² の密度で播種した。脊髄ニューロン培養系、脊髄細胞混合培養系を得るため、それぞれ播種 2 日または 7 日後に、DNA 複製を阻害してグリア細胞の増殖を抑制する cytosine arabinoside (AraC、1 μ M、Sigma Aldrich) を培養液に添加した。培養液は 1 週間に 2 回、AraC (1 μ M) を含む新鮮な培養液と半量交換した。14 日目の各培養系の細胞構成はアストロサイトマーカーの GFAP と神経マーカーの microtubule-associated protein 2 (MAP-2) に対する抗体を用いて免疫蛍光法により調べた。脊髄ニューロン培養系では GFAP 陽性細胞と MAP-2 陽性細胞はそれぞれ $11 \pm 7\%$ 、 $62 \pm 9\%$ であり、脊髄細胞混合培養系ではそれぞれ $28 \pm 2\%$ 、 $36 \pm 10\%$ であった (平均 $\pm$ 標準偏差、3 度の顕微鏡観察による)。

A-3) 脊髄ニューロン／アストロサイト共培養系の作製

ニューロンとアストロサイトの共培養系は先行研究 (Koulakoff *et al.*, 2008) に一部修

正を加えた方法に従って作製した。胎児（E16）ラットの脊髄細胞を上述したように酵素を用いて分離し、予め用意した 70–80%コンフルエンスの新生ラット由来培養アストロサイトに 5×10^4 cells/cm² の密度で直接播種した。播種 1 日前にアストロサイトの培養液はニューロン用培養液に替えた。アストロサイトの増殖を抑制するため、胎児脊髄細胞の播種 2 日後に AraC（1 μ M）を培養液に添加した。培養液は 1 週間に 2 回、AraC（1 μ M）を含む新鮮な培養液と半量交換した。

B. CBS 活性測定

CBS の H₂S 産生活性測定は 1 章で記述した方法に準じて行った。細胞および組織溶解タンパクを反応液 II（50 mM Tris-HCl、10 mM L-cysteine、10 mM DL-homocysteine、0.05 mM PLP、0.2 mM SAME、pH 8.5）で 1 時間 37°C でインキュベーションし、メチレンブルー法により、生じた H₂S 量を測定した。

C. ウェスタンブロット法

1 章に準じる。先述したものの他に以下の一次抗体を用いた。

標的蛋白 (由来)	一次抗体 希釈倍率	二次抗体 希釈倍率	製品番号	(製造元)
CBS (R)	4,000	3,000	14787-1-AP	(Protein Tech)
PGP 9.5 (C)	50,000	50,000	Ab63497	(Abcam)
GFAP (M)	4,000	3,000	11051	(Immuno-Biological Laboratories)
Vimentin (R)	20,000	10,000	5741	(Cell Signaling)

R : rabbit、C : chicken、M : mouse。

D. 免疫蛍光解析

脊髄を P5-7 ラットより摘出し、4%パラホルムアルデヒド含有 PBS 中で一晩、4°C 下で振盪して固定した。さらにパラフィン包埋した後、3 μm 厚の切片にスライスし、Tris-HCl buffer (20 mM、pH 9.0) 中で 15 分間 105°C でオートクレーブ処理することにより抗原賦活化を行った。培養細胞は-20°C のメタノールに 1 分間浸して固定し、その後 PBS で洗浄した (5 分間 $\times$ 3 回)。次いで 10%ヤギ血清を加えた 0.1% Triton X-100 含有 PBS (PBST) 中で室温、30 分間静置し、続いて一次抗体を加えた 1%ヤギ血清含有 PBST 中で 4°C、一晩静置した。細胞または組織を PBS で洗浄した後 (5 分間 $\times$ 3 回)、AlexaFluor 結合二次抗体 (1:500) を加えた 1%ヤギ血清含有 PBST 中で室温、30 分間静置した。PBS で洗浄後、細胞と組織を封入し、共焦点顕微鏡で蛍光解析した。脊髄切片には抗 CBS (1:500)、抗 GFAP (1:100)、抗 β -III tubulin (Tuj-1, 1:10,000、mouse、Abcam、#ab14545) 抗体を、培養細胞には抗 CBS (1:200)、抗 GFAP (1:50)、抗 MAP-2 (1:2,000、chicken、Abcam、#ab5392) 抗体を一次抗体として用いた。AlexaFluor 488、555、647 をそれぞれ rabbit、mouse、chicken 由来一次抗体に対して使用した。

E. RT-PCR 法

培養細胞と脊髄からの全 RNA 抽出は TRI reagent (Sigma) を用い、添付の使用説明書の手順に従って行った。RNA サンプルを cDNA 合成キット (ReverTra Ace、東洋紡) を用いて逆転写し、得られた cDNA は Taq ポリメラーゼ (Takara Ex Taq、Takara) を用いて増幅した。用いたプライマーは次表の通りである。PCR の行程は 98°C 10 秒、55°C 30 秒、72°C 30 秒を 35 サイクルで行った。

遺伝子	forward	reverse
CBS	5'-ATGCTGCAGAAAGGCTTCAT-3'	3'-GGTAGTCTGCTTCAGACGTT-5'
β -actin	5'-TGTCACCAACTGGGACGATA-3'	3'-ACCCTCATAGATGGGCACAG-5'

F. 統計解析

二群間の統計解析は unpaired Student's *t*-test により行った。多群間の統計解析は分散分析に続いて Dunnett's test または Tukey's test により行った。 $P < 0.05$ を統計的有意とした。

III. 実験成績

A. 培養脊髄アストロサイトにおける CBS 発現と H₂S 産生活性

中枢神経系の CBS はアストロサイトに局在することが報告されている (Enokido *et al.*, 2005)。そこでまず CBS 活性測定用反応液 II を用い、新生ラットの脊髄組織とそこから分離した培養アストロサイトにおける CBS の H₂S 産生活性を調べた。ラット脊髄では CBS による顕著な H₂S 産生が認められたが、培養アストロサイトの H₂S 産生量はごくわずかであった (図 12A)。そこで新生ラット脊髄とアストロサイトの分離培養過程における CBS、PGP 9.5 (神経マーカー) および GFAP (アストロサイトマーカー) の発現を比較検討した。脊髄では明瞭な CBS の発現が認められた (図 12B、C)。一方、脊髄組織から分離した培養脊髄細胞 (アストロサイトとそれ以外の細胞の混合) では酵素処理後の 7 日間で PGP 9.5 の発現レベル低下と並行して CBS 発現量が低下した。ニューロンはアストロサイト培養系作製の過程で死滅しやすく (McCarthy and deVellis, 1980)、PGP 9.5 の減少はニューロン数の減少を反映していると考えられる。

対照的に、アストロサイトは酵素処理後に増殖していることが顕微鏡観察により確認された。この増殖に一致して、新生ラット脊髄組織では比較的少なかった GFAP 発現量は、脊髄細胞では 7 日間の培養で顕著に増加した (図 12B、C)。この GFAP の発現変化は培養脳アストロサイトにおける以前の報告に一致している (Tardy *et al.*, 1989)。培養 7-8 日後、アストロサイト以外の細胞 (ミクログリアやオリゴデンドロサイト) を除去するため、培養細胞を含むフラスコを一晩激しく振盪した。フラスコ底面に残った細胞をさらに 3 日間以上培養したものを本実験では培養アストロサイトとして用いた。培養 10 日目と 14 日目、GFAP は培養アストロサイトに強く発現していたが、CBS と PGP 9.5 の発現量は低いままであった (図 12B、C)。PGP 9.5 はグリオーマ細胞にもわずかに発

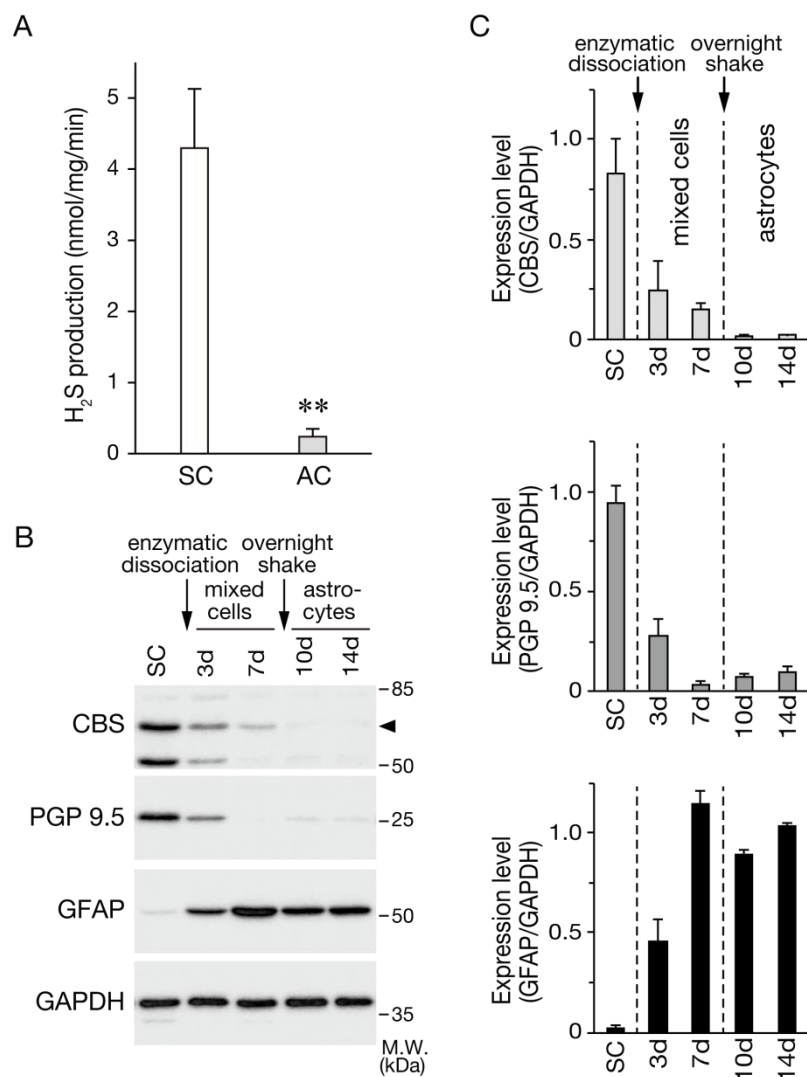


図 12 脊髄アストロサイトにおける CBS 発現と H₂S 産生

(A) 新生ラット (P3-7) 脊髄 (SC) および培養アストロサイト (AC) の CBS による H₂S 産生。H₂S 産生量は組織と細胞の溶解タンパク質を CBS 活性測定用反応液 II で 1 時間インキュベーションして測定した。(B、C) 新生ラット (P3-7) 脊髄と培養アストロサイトの分離培養過程における CBS、PGP 9.5、GFAP、GAPDH の発現変化。新生ラット (P0-3) 脊髄を酵素処理して脊髄細胞 (mixed cells) を得た (B、C の左側矢印)。培養 7 または 8 日目にコンフルエンスに達した後、培養アストロサイトを得るため培養フラスコを一晩激しく振盪した (B、C の右側矢印)。(B) CBS (63 kDa、矢頭)、PGP 9.5 (25 kDa)、GFAP (50 kDa)、GAPDH (37 kDa) のウエスタンブロット解析。脊髄と培養細胞の溶解タンパク質は同一個体から得た。(C) CBS、PGP 9.5、GFAP の発現量。各バンド濃度を GAPDH のバンド濃度で標準化した。各棒グラフは平均値±標準誤差。n = 3。***P* < 0.01 (unpaired Student's *t*-test)。

現しており (Giambanco *et al.*, 1991)、振盪後にも検出された PGP 9.5 はアストロサイトが発現していた可能性がある。

B. 新生ラット脊髄における CBS の分布

CBS のアストロサイトへの局在はマウス脳で報告されていたが (Enokido *et al.*, 2005)、本実験では CBS と PGP 9.5 の発現が並行して減少したことから、ラット脊髄の CBS はアストロサイトではなくニューロンに発現している可能性が生じた。そこで新生ラット脊髄における CBS 発現を免疫蛍光染色で解析した。脊髄において CBS 染色は繊維状に点在しており、GFAP の染色像と一致した (図 13A)。また CBS 染色は神経マーカーの Tuj-1 陰性細胞に局限していた (図 13B)。この結果は、脊髄の CBS がニューロンではなくアストロサイトに発現していることを示している。

C. 胎児ラット由来脊髄細胞混合培養における CBS 発現と H₂S 産生活性

ここまでの結果から、ニューロンの消失に伴ってアストロサイトの CBS 発現が減少することが示された。そこで、ニューロンによるアストロサイトの CBS 発現への影響を評価するため、培養下でもニューロンが生存可能である胎児 (E16) ラットの分離脊髄細胞を用いた。グリア細胞の増殖を抑制する cytosine arabinoside (AraC) を培養 2 日目または 7 日目から処置し、脊髄ニューロン培養系と脊髄細胞混合培養系をそれぞれ作製した。新生ラット由来の培養脊髄細胞とは異なり、胎児由来細胞では PGP 9.5 はどちらの培養系でも安定して発現しており、神経の持続的な生存が確認された (図 14A)。E16 では P0-3 と異なり、脊髄組織の CBS 発現量はわずかだった (図 14A、B)。ニューロンとアストロサイトが混在している脊髄細胞混合培養系では CBS と GFAP の発現量

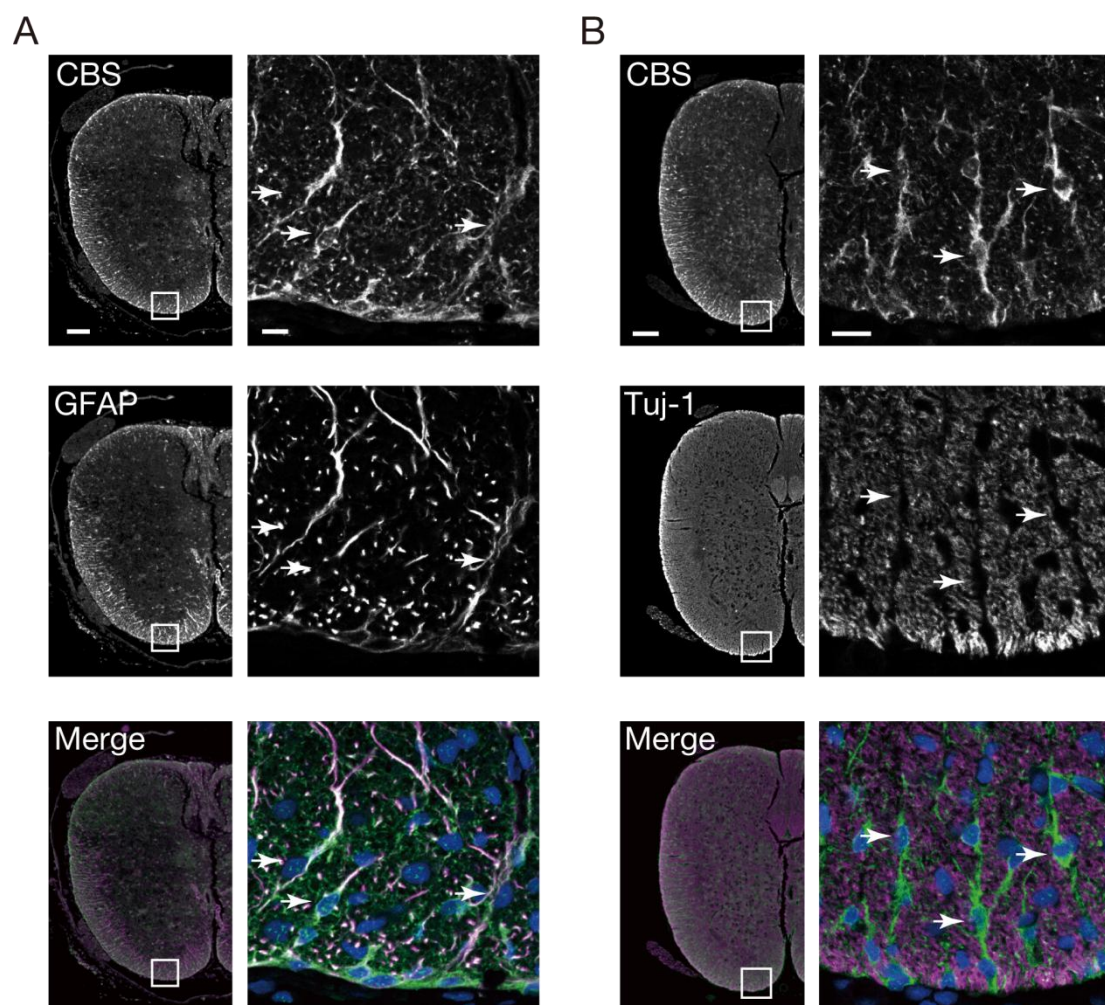


図 13 ラット脊髄における CBS の分布

(A、B) パラフィン包埋した脊髄切片 (P5-7 ラット) に抗原賦活化処置を施し、CBS、GFAP (アストロサイトマーカー) および Tuj-1 (神経マーカー) に対する抗体を用いて免疫蛍光染色した。最下段は (A) CBS (グリーン) と GFAP (マゼンタ) および (B) CBS (グリーン) と Tuj-1 (マゼンタ) の典型的な二重染色像。ブルーカラーは DAPI 染色を示す。A と B の右図は対応する左図枠内の拡大画像である。矢印は CBS 陽性細胞を示す。低倍率像、高倍率像のスケールバーはそれぞれ 100 μm 、10 μm を示す。

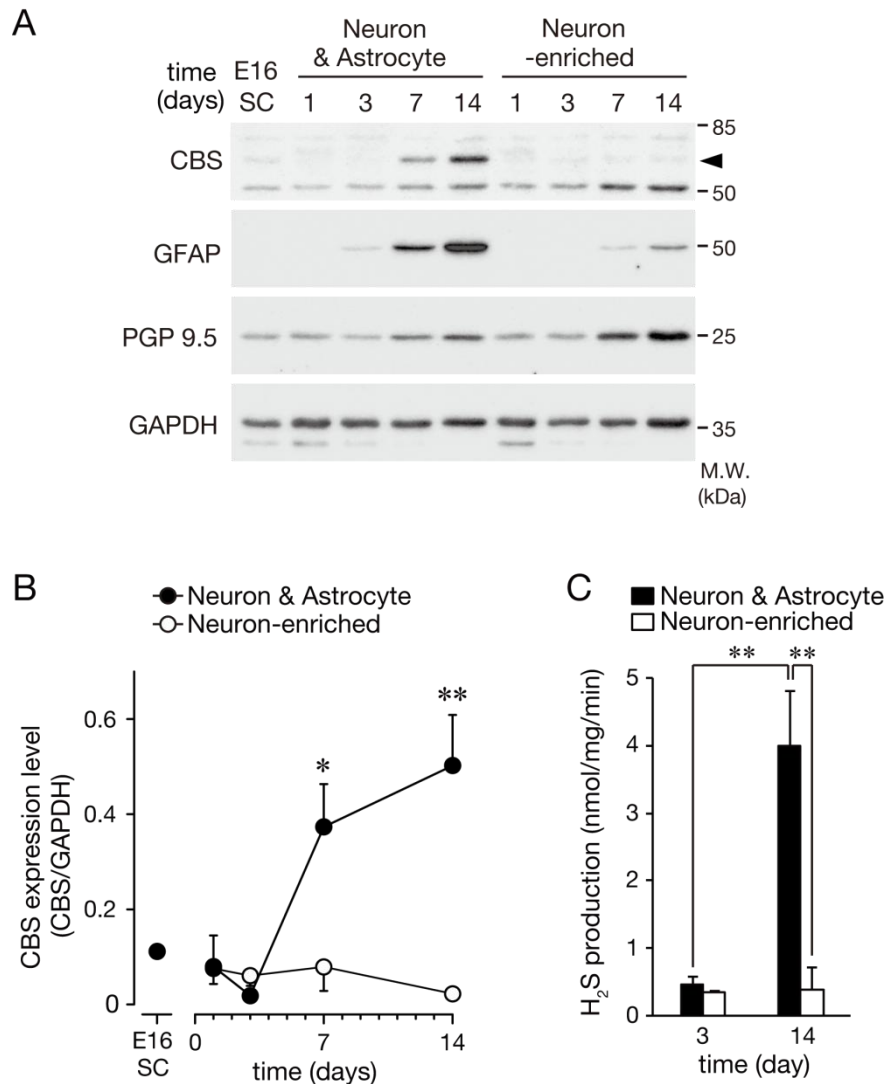


図 14 脊髄細胞混合培養系と脊髄ニューロン培養系における CBS 発現と H₂S 産生

(A) CBS (63 kDa、矢頭)、GFAP (50 kDa)、PGP 9.5 (25 kDa)、GAPDH (37 kDa) のウエスタンブロット解析。E16 ラットの脊髄と、図で示された期間培養した細胞を解析に用いた。これらは同一個体から得た。Neuron & Astrocyte：脊髄細胞混合培養。

Neuron-enriched：脊髄ニューロン培養。(B) 脊髄細胞混合培養系と脊髄ニューロン培養系の CBS 発現量の経時変化。CBS 発現量はバンド濃度を GAPDH のバンド濃度で標準化して表わした。各ポイントは平均値±標準誤差。n = 3。**P* < 0.05、***P* < 0.01 v.s. E16 SC (Dunnett's test)。(C) 脊髄細胞混合培養系と脊髄ニューロン培養系の培養 3 日と 14 日の CBS による H₂S 産生量。各棒グラフは平均値±標準誤差。n = 3。***P* < 0.01 (Tukey's test)。

が並行して増加した（図 14A、B）。一方、脊髄ニューロン培養系では CBS はほとんど変化せず、GFAP もわずかな増加しか示さなかった。これらの実験結果は、CBS 発現の増加にはアストロサイトの増殖が必要であることを示している。酵素発現レベルと一致して、CBS を介した H₂S 産生量は脊髄細胞混合培養系において培養 3 日目では低かったが、14 日目で顕著に高くなった（図 14C）。しかし脊髄ニューロン培養系ではそのような H₂S 産生量の増加は認められなかった。

脊髄細胞混合培養系では、大きな細胞体を持ち星状の形態を示す細胞に CBS が発現しており、これら細胞の突起の多くが GFAP と共染色された（図 15、105 細胞中 83 細胞、6 度の観察による）。CBS 発現細胞は神経マーカーの MAP-2 に対して陰性だった。GFAP 陰性の CBS 陽性細胞もまたアストロサイト様の形態を示したため、これらの細胞は GFAP の発現レベルが低いアストロサイトと推測される。以上の結果は、CBS はアストロサイトに発現しており、その発現量と H₂S 産生活性の増加にはニューロンが必要であることを示している。

D. ニューロン／アストロサイト共培養系における CBS 発現

E16 では中枢神経系細胞の大部分はニューロンであり、分化したグリア細胞はほとんどない（Qian *et al.*, 2000）。そこでさらに、ニューロンによるアストロサイトの CBS 発現への影響を検討するため、E16 ラット脊髄から分離した細胞を CBS がほとんど発現しない新生ラット脊髄由来の培養アストロサイト上に直接播種し、ニューロン／アストロサイト共培養系を作製した。播種 2 日後に AraC を培養液に添加してアストロサイトの増殖を阻害した。アストロサイトと胎児脊髄細胞を共培養すると CBS 発現量が培養日数に伴って徐々に増加し（図 16）、有意な発現量増加は培養 3 日目から認められた。GFAP の発現量は全培養期間を通じて変化しなかったことから、アストロサイトの増殖

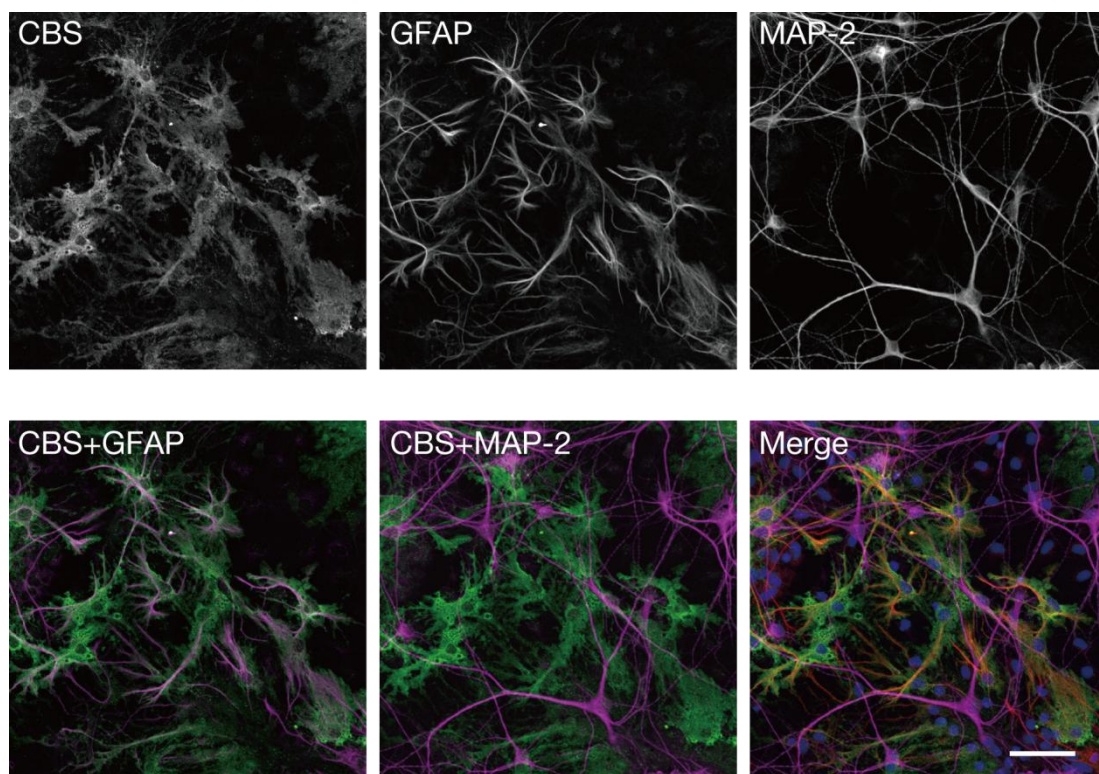


図 15 脊髄細胞混合培養系における免疫蛍光解析

脊髄細胞混合培養 14 日の免疫蛍光解析の典型画像。上図は CBS、GFAP、MAP-2 の染色像を、下図は左から、CBS（グリーン）と GFAP（マゼンタ）、CBS（グリーン）と MAP-2（マゼンタ）、さらに CBS（グリーン）、GFAP（レッド）、MAP-2（マゼンタ）および DAPI（ブルー）の多重染色像を示す。スケールバーは 50 μm を示す。

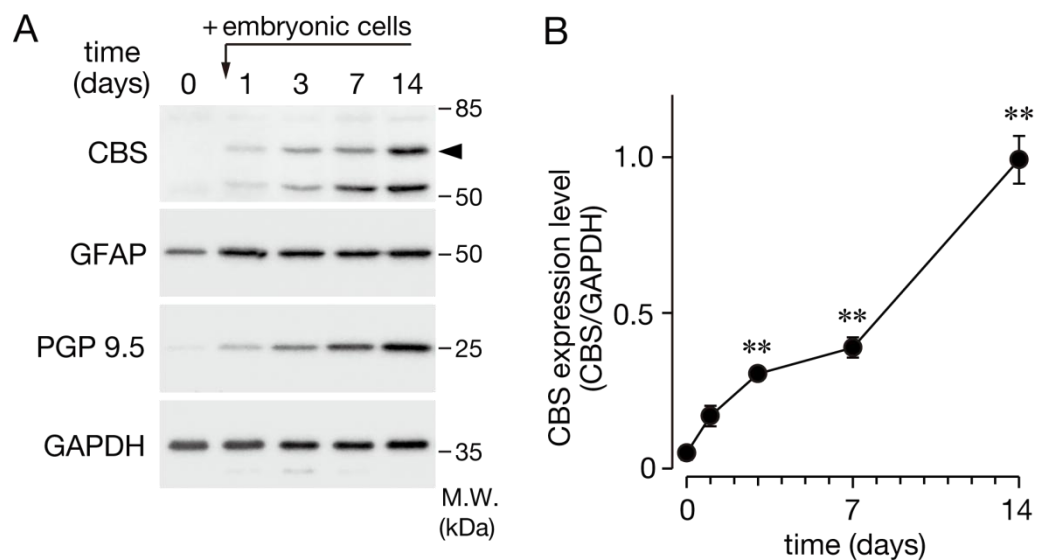


図 16 ニューロン／アストロサイト共培養系の CBS 発現

E16 ラットから分離した脊髄細胞 (embryonic cells) を、70–80%コンフルエンスの新生ラット由来培養アストロサイトに直接播種した。アストロサイトの増殖を防ぐため AraC (1 μ M) を播種 2 日後から処置した。(A) CBS (63 kDa、矢頭)、GFAP (50 kDa)、PGP 9.5 (25 kDa)、GAPDH (37 kDa) のウェスタンブロット解析。(B) 共培養系の CBS 発現量の経時変化。発現量は CBS のバンド濃度を GAPDH のバンド濃度で標準化して表わした。各ポイントは平均値 $\pm$ 標準誤差。n = 3。** $P < 0.01$ v.s. 0 d (Dunnett's test)。

はほとんどないことが示唆された。AraC (1 μ M) を含んだ新鮮ニューロン用培養液それ自体は培養アストロサイトの CBS 発現量に影響を与えなかった(データは示さない)。以上の結果は培養アストロサイトにおいて減少した CBS 発現レベルが、後から加えたニューロンによって回復したことを示唆している。単独で培養したアストロサイトは CBS 陰性で多角形状を示したが (図 17A)、ニューロンと共培養したアストロサイトは CBS 陽性であり、かつ図 15 で認められたような星状の形態を示した (図 17B)。この形態変化は報告されているニューロンによるアストロサイト形態への効果に一致しており (Hatten, 1985)、ニューロンがアストロサイト CBS 発現を調節することを支持するものである。

E. アストロサイト CBS 発現と H₂S 産生活性への膜透過性 cAMP の効果

膜透過性 cAMP 類似体で処置するとアストロサイトの CBS 発現量が増加することが報告されている (Enokido *et al.*, 2005)。また膜透過性 cAMP 類似体はニューロンによるアストロサイトの形態やタンパク合成への影響を模倣することも示唆されている (Swanson *et al.*, 1997; Hertz *et al.*, 1998; Schlag *et al.*, 1998)。そこで次に膜透過性 cAMP 類似体 dibutyryl cAMP (dbcAMP) による培養アストロサイトの CBS 発現量と H₂S 産生活性に対する効果を調べた。dbcAMP は処置時間と濃度に依存してアストロサイト CBS の発現量と活性を顕著に増加させた (図 18)。dbcAMP (1 mM) の 4 日間の処置により培養アストロサイトの CBS の発現量と活性は脊髄組織のそれと同等のレベルにまで戻った (図 19A)。dbcAMP 処置したアストロサイトは抗 CBS 抗体で明瞭に染色され、ニューロンと共培養したアストロサイトと同様、星状の形態を示した (図 19B)。活性型アストロサイトマーカーである vimentin (Robel *et al.*, 2011) の発現量は dbcAMP 処置の影響を受けず、dbcAMP による CBS の発現誘導はアストロサイトの活性化反応を反

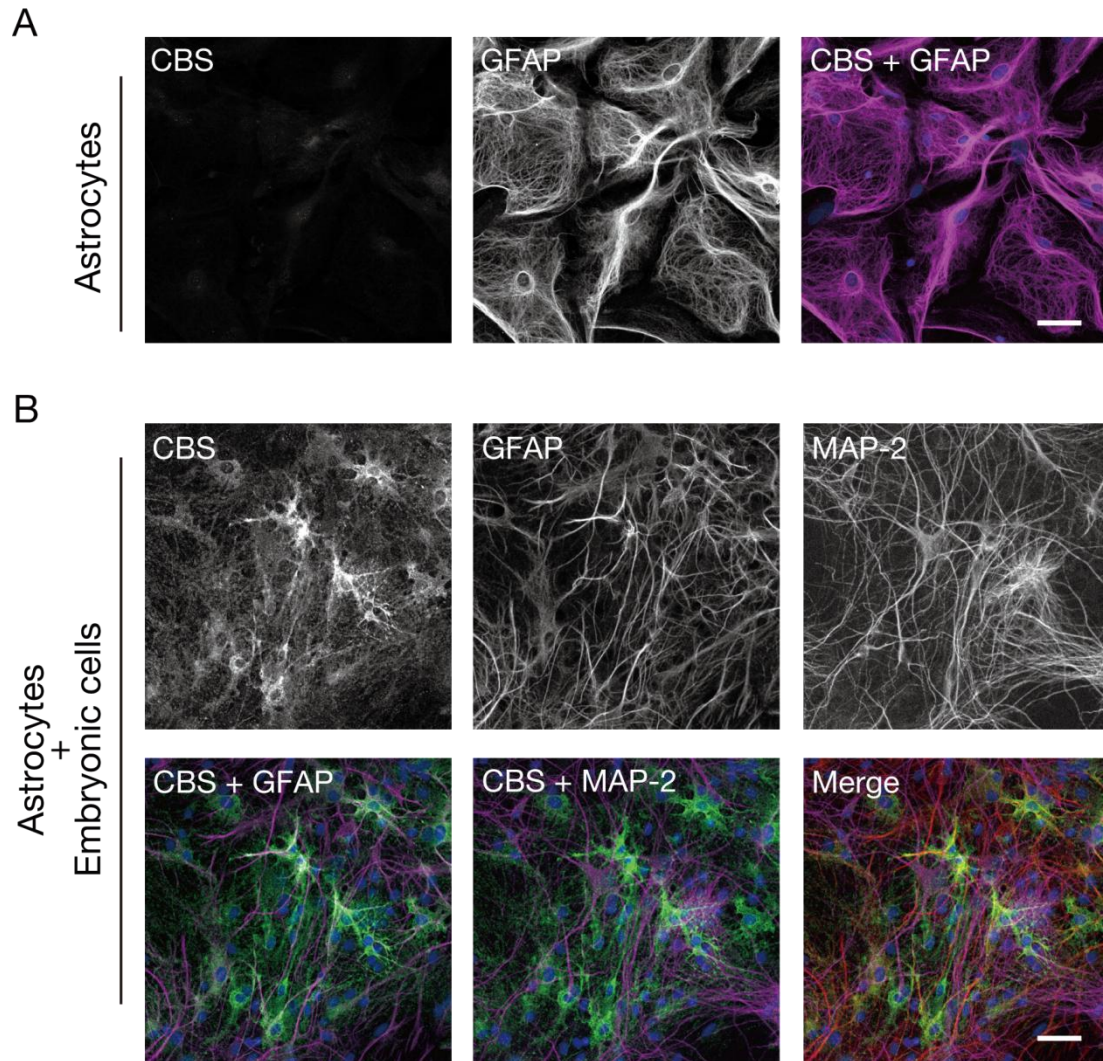


図 17 ニューロン／アストロサイト共培養系の免疫蛍光解析

(A) 培養アストロサイトの免疫蛍光解析の CBS と GFAP の典型的な染色像とそのマージ像 (CBS : グリーン、GFAP : マゼンタ)。(B) ニューロン／アストロサイト共培養系 14 日目の免疫蛍光解析の典型的な染色像。上図は CBS、GFAP、MAP-2 の染色像を、下図は左から、CBS (グリーン) と GFAP (マゼンタ)、CBS (グリーン) と MAP-2 (マゼンタ)、さらに CBS (グリーン)、GFAP (レッド)、MAP-2 (マゼンタ) の多重染色像を示す。ブルーカラーは DAPI 染色を示す。各スケールバーは 50 μm を示す。

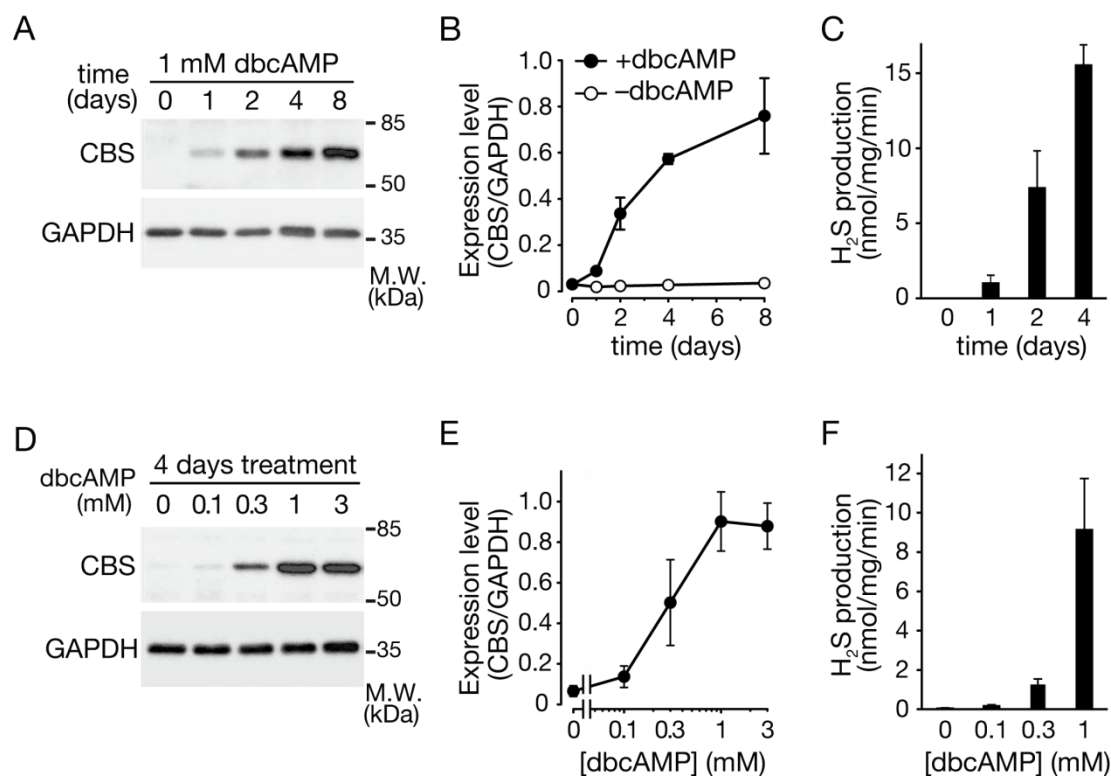


図 18 膜透過性 cAMP のアストロサイト CBS 発現への効果

(A–C) 培養アストロサイトにおける膜透過性 dibutyl cAMP (dbcAMP) による CBS 発現誘導の時間依存性。培養アストロサイトを dbcAMP (1 mM) 含有/不含培養液中で一定期間 (0–8 日間) 培養した。(D–F) 培養アストロサイトにおける dbcAMP による CBS 発現誘導の濃度依存性。培養アストロサイトを一定濃度の dbcAMP (0–3 mM) を含む培養液中で 4 日間培養した。(A、D) CBS (63 kDa) と GAPDH (37 kDa) のウェスタンブロット解析。(B、E) CBS 発現量の dbcAMP 処置時間 (B) と濃度 (E) 依存性。(C、F) CBS を介した H₂S 産生の dbcAMP 処置時間 (C) と濃度 (F) 依存性。各データは平均値±標準誤差。n = 3。

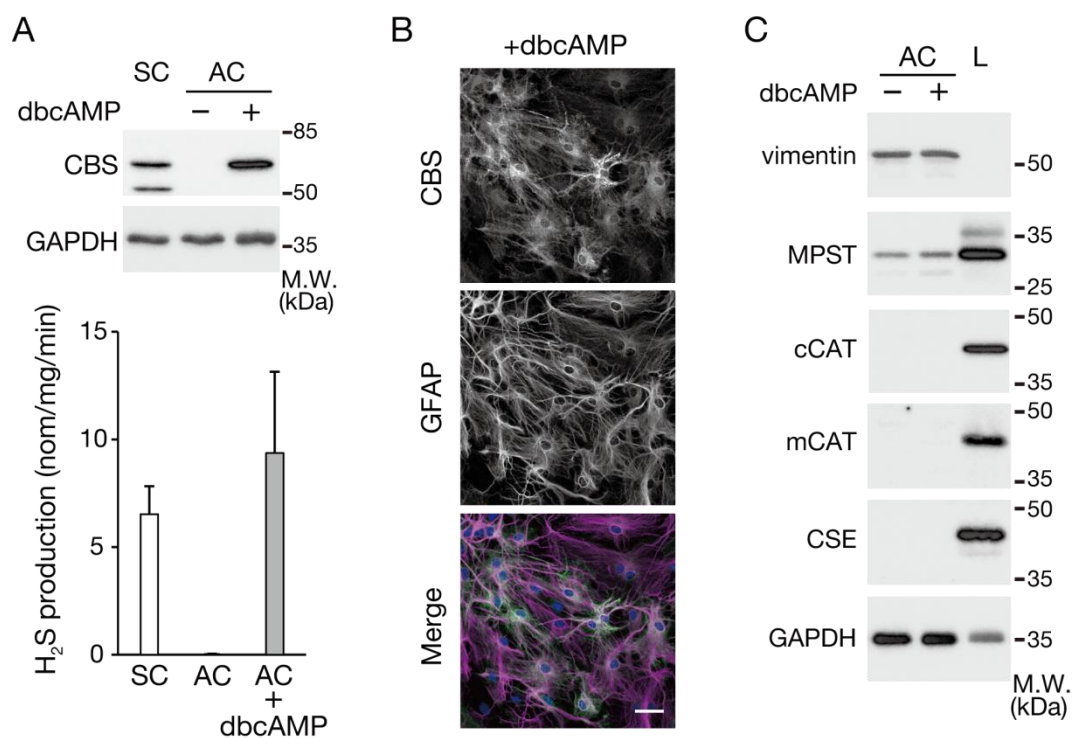


図 19 膜透過性 cAMP のアストロサイト H₂S 産生と形態への効果

(A) 新生ラット脊髄 (SC) と、dbcAMP 未処置 (-) および処置 (+, 1 mM、4 日間) アストロサイト (AC) の CBS 発現量と H₂S 産生量。(上図) CBS (63 kDa) と GAPDH (37 kDa) のウエスタンブロット解析。(下図) CBS による H₂S 産生。(B) dbcAMP 処置アストロサイトの CBS と GFAP の免疫蛍光解析。最下図は CBS (グリーン) と GFAP (マゼンタ) 二重染色の典型例。ブルーカラーは DAPI 染色を示す。スケールバーは 50 μ m を示す。(C) dbcAMP 未処置 (-) と処置 (+, 1 mM、4 日間) アストロサイト (AC) および肝臓 (L) における vimentin (37 kDa)、H₂S 合成酵素、GAPDH (37 kDa) のウエスタンブロット解析。MPST (33 kDa)、cytosolic (c) CAT (46 kDa)、mitochondrial (m) CAT (46 kDa)、CSE (43 kDa) を解析した。

映したものではないことが示唆された (図 19C)。また、アストロサイトの活性化を誘発する EGF (Liu *et al.*, 2006) の処置 (50 ng/ml、4 日間) も CBS の発現誘導を起こさなかった (データは示さない)。CBS 以外の H₂S 産生酵素への dbcAMP の効果も調べた。培養アストロサイトでは CSE と CAT は検出されなかったが、一定量の MPST の発現は認められた (図 19C)。dbcAMP のアストロサイトへの処置はこれらの酵素の発現に影響を与えなかった。

F. アストロサイト CBS mRNA 発現への膜透過性 cAMP とニューロンの効果

CBS 発現の調節メカニズムを調べるため mRNA 量を RT-PCR により半定量的に調べた。新生ラット脊髄と比較して、培養アストロサイトの mRNA 量は検出できないくらい少なかった (図 20)。一方、dbcAMP 処置したアストロサイトと胎児ラットから得た脊髄細胞混合培養 (培養 14 日目) では脊髄組織と同程度の mRNA 発現が認められた。

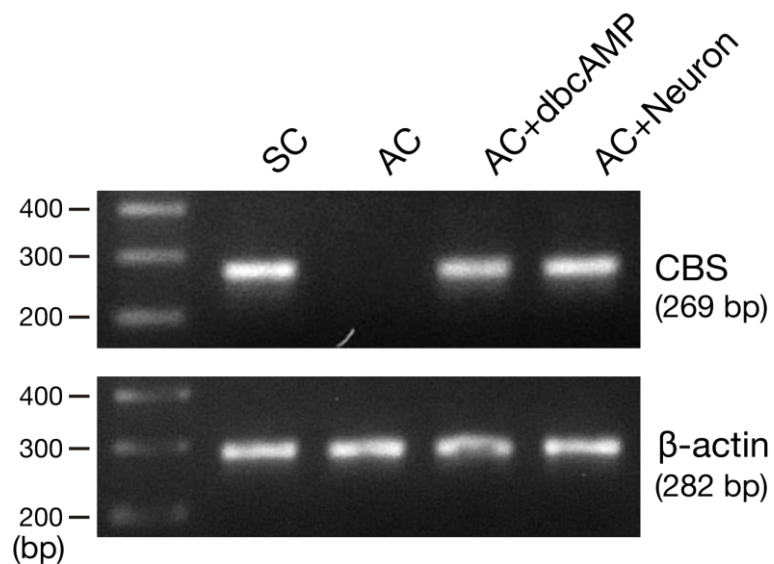


図 20 膜透過性 cAMP とニューロンによるアストロサイト CBS の mRNA への効果
CBS（生成物サイズ：269 bp）と β-actin（生成物サイズ：282 bp）の典型的 RT-PCR データ。新生ラット（P3-7）脊髄、dbcAMP 未処置または処置アストロサイト、および E16 ラット由来脊髄細胞混合培養から全 RNA を抽出し、解析に用いた。

IV. 考察

本研究ではラット脊髄から得た培養細胞の CBS 発現量と H₂S 産生量を調べ、アストロサイト CBS の発現量がニューロンの減少に伴って低下すること、またその発現低下がニューロンとの共培養や dbcAMP の処置により回復することを示した。本研究結果はニューロン・アストロサイト相互作用が CBS の発現と H₂S 産生活性維持に必要不可欠であることを示唆している。

中枢神経系における H₂S 産生酵素

本研究ではラット脊髄アストロサイトにおいて、CBS の発現が認められた。一方、脊髄アストロサイトには他の H₂S 産生酵素 CSE、cCAT、mCAT は検出されなかった。脳では CSE は発現しておらず、また CAT はニューロンに局在することが示されている (Donoghue *et al.*, 1985; Ishii *et al.*, 2004)。そのため、脊髄アストロサイトは主に CBS を介して H₂S を産生すると推測される。前章で脳組織は CBS と CAT/MPST の両方の活性を示した。脊髄においてもアストロサイトの CBS とニューロンの CAT/MPST の両方が H₂S 産生源であると考えられる。

また本研究で使用した抗 CBS 抗体は、一般的な CBS (63 kDa) 以外におよそ 50 kDa の別のサイズのタンパク質を認識した。これは転写後修飾により酵素タンパクが一部切断された CBS (48 kDa) とほぼ同サイズであり、さらにこの切断型 CBS は活性を有すると報告されている (Skovby *et al.*, 1984)。しかし、以下の理由から、本研究で検出されたおよそ 50 kDa のタンパク質は、その切断型の CBS ではなく、主にニューロンに発現する、CBS とは無関係のタンパク質と見なした。まず、このタンパク質の発現は胎児脊髄から作製した混合培養系、ニューロン培養系の両方で認められたが、H₂S 産生活性は高分子 (63 kDa) CBS の発現量のみに関連し、低分子 (およそ 50 kDa) タンパク質

は H_2S 産生活性をもたなかった。また、この低分子タンパク質発現量は培養アストロサイトでは極めてわずかだったが、ニューロンを含む培養系では PGP 9.5 の発現量に相関して増減を示した。

ニューロンによるアストロサイト CBS 発現の誘導

これまで中枢神経系ではアストロサイトに CBS が局在すると報告されていたが、脊髄培養アストロサイトの CBS 活性は極めて低いものであった。本研究では以下の結果から、アストロサイトの CBS 発現はニューロンにより維持されており、アストロサイト単独培養により CBS 発現が減少すると結論付けた。まず新生ラット (P0-3) 脊髄では細胞培養の過程で CBS 発現量が顕著に減少したが、培養下でもニューロンが生存可能な胎児ラット (E16) 脊髄を用いると、培養により CBS 発現量が増加した。胎児ラット脊髄そのものでは CBS 発現量が低かったが、これは E16 ではグリア細胞の分化が進んでいないためと推測される (Qian *et al.*, 2000)。培養細胞で CBS 発現量が増加したのはニューロンの存在下で分化アストロサイトの数が増加したためであろう。

また新生ラット培養アストロサイトの減少した CBS は、胎児 (E16) ラット脊髄細胞との共培養で回復した。この共培養系では胎児ラットアストロサイトの増殖を AraC で抑制していたため、先に播種したアストロサイトの CBS 発現が、胎児脊髄細胞に含まれていたニューロンにより誘導されたと考えられる。有意な CBS 誘導は胎児の脊髄細胞混合培養では培養 7 日目に初めて認められたのに対し、新生ラットアストロサイトと胎児ニューロンから成る共培養系では 3 日目から認められた。GFAP の発現レベルからも明らかにされたように、培養初期には前者 (混合培養系) は分化したアストロサイトをほとんど含まないが、後者 (共培養系) はすでに多くのアストロサイトを含んでいたため、培養後すぐに発現誘導が生じたと考えられる。

CBS は海馬や側頭葉から分離したアストロサイトの単独培養系でも発現していると

報告されている (Enokido *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2009; Garg *et al.*, 2011)。しかしこれら先行研究では培養アストロサイトの CBS 発現量を組織での CBS 発現量と比較していない。本研究において、脊髄から分離した培養アストロサイトでも CBS 発現は検出されたが、その発現量は脊髄組織と比べて極めて低かったことから、報告された CBS の培養脳アストロサイトにおける発現量も、生体内でのそれよりはるかに低い可能性がある。

CBS 発現を調節する神経性ファクターの候補物質

本実験結果から、アストロサイト CBS 発現の誘導にニューロン由来のメディエーターが関与している可能性が示唆される。Enokido ら (2005) は様々な化合物による培養脳アストロサイトの CBS 発現への効果を調べ、膜透過性 cAMP 類似体が最も効率的に CBS 発現量を増加させることを示した。本研究では dbcAMP による脊髄アストロサイトの CBS 発現量、H₂S 産生活性および形態への効果を検討し、cAMP がニューロンによるアストロサイト CBS 調節の細胞内シグナル分子である可能性を提示した。dbcAMP はアストロサイトの生理的な成長や分化を模倣するために広く用いられている (Lange *et al.*, 2012)。細胞内 cAMP は Gs タンパク質を介したアデニル酸シクラーゼの活性化により増加し、実際アストロサイトには β アドレナリン受容体、セロトニン受容体、ドパミン受容体など多くの Gs タンパク質共役型受容体が機能的に発現している (Hirst *et al.*, 1997; Zanassi *et al.*, 1997; Laureys *et al.*, 2010)。ゆえにアストロサイトの cAMP 濃度を上昇させる物質、例えば Gs タンパク質共役型受容体のリガンドは、アストロサイトの CBS 発現維持に関わる神経性ファクターの候補となる。

CBS と同様、アストロサイトに発現するグルタミン酸トランスポーターGLT-1 の発現はニューロンにより維持され、さらに dbcAMP がその作用を模倣する (Swanson *et al.*, 1997; Schlag *et al.*, 1998)。またアストロサイトに発現し、細胞間ギャップジャンクションを構成するコネキシンタンパクの発現もニューロンにより維持されていると報告さ

れている (Rouach *et al.*, 2000; Koulakoff *et al.*, 2008)。しかしながら、これらアストロサイトタンパク質の発現を調節するニューロン性因子は依然同定されていない。細胞内 Ca^{2+} 濃度変化など、アストロサイトの活動はニューロン由来の多くの物質、例えばグルタミン酸や GABA などの神経伝達物質、成長因子、サイトカイン、一酸化窒素、さらに活性酸素種などによりコントロールされている (Fellin and Carmignoto, 2004; Agulhon *et al.*, 2008)。CBS の発現も、Gs タンパク質共役型受容体のリガンド以外のこれらの物質により調節されている可能性があり、その神経性ファクターを同定することが今後の検討課題である。

RT-PCR 解析により、ニューロンと dbcAMP は CBS 発現量を転写レベルで調節することがわかった。Ge ら (2002) は CBS 遺伝子の転写は転写因子 nuclear factor Y (NF-Y) や specificity protein 1 (Sp1) によって共同的に調節されることを報告している。cAMP は NF-Y や Sp-1 を介して matrix metalloproteinase や tryptophan hydroxylase などの酵素を転写誘導するため (Zhong *et al.*, 2000; Côté *et al.*, 2002)、dbcAMP による CBS 調節にもこれらの転写因子が関与しているのかもしれない。

CBS の中枢神経系における H_2S 産生への寄与とその生理・病態生理的役割

CBS は H_2S 合成の過程で L-homocysteine を代謝する。高ホモシステイン血症は脊髄損傷や筋萎縮性側索硬化症などの脊髄疾患患者で認められる症状であり (Lee *et al.*, 2006; Valentino *et al.*, 2010)、アルツハイマー病や認知症、統合失調症においても共通した所見でもある (Regland *et al.*, 1995; Seshadri *et al.*, 2002)。本研究から、ホモシステインレベルの上昇は先行するニューロン・アストロサイト関連不全に起因するとの仮説も立てられる。これまでホモシステイン蓄積が神経に及ぼす影響について多くの研究が行われており、ホモシステインは酸化ストレス誘導や DNA 傷害を惹起するなど、神経毒性を示すことが知られている (Mattson and Shea, 2003)。しかしながらホモシステイン

蓄積が神経疾患の原因であるか結果であるかについては未だ議論が続いている。一方、近年の研究から、 H_2S が酸化ストレスから神経を保護するほか、DNA 修復酵素を誘導するなど、ホモシステインと逆の作用をもつことも明らかになってきた (Kimura and Kimura, 2004; Whiteman *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2014)。さらに、 H_2S 処置がホモシステインに誘発される神経変性や記憶障害を緩和することも報告されている (Tang *et al.*, 2010; Kamat *et al.*, 2013)。したがって、CBS の減少とそれに伴う H_2S 合成の低下は偶発性および遅発性神経疾患の結果ではなく、病態の進行や増悪に関与している可能性がある。

総括

硫化水素 (H_2S) は哺乳動物の組織でも L-cysteine を基質として cystathionine γ -lyase (CSE)、cystathionine β -synthase (CBS)、および cysteine aminotransferase (CAT) と mercaptopyruvate sulfurtransferase (MPST) の共役による 3 種類の酵素反応経路により産生される。本研究では神経系における H_2S 産生機序についてラットを用いて検討した。まず知覚ニューロンの細胞体が存在する脊髄後根神経節 (DRG) および末梢神経モデルの細胞株である PC12 細胞を用い、3 種類の酵素反応経路による末梢神経系の H_2S 産生への寄与を調べた。中枢神経系ではアストロサイトに発現する CBS が主な H_2S 産生源と考えられている。そこで次に、ニューロンとアストロサイトの構成が異なる脊髄細胞培養系を用い、ニューロンによるアストロサイト CBS の発現とその H_2S 産生活性への影響について評価した。

1. CSE と CBS は陽性コントロールであるラット肝臓と脳には発現していた。一方、PC12 細胞と DRG では CSE は発現しておらず、CBS 発現量は脳組織に比べて著しく低かった。
2. PC12 細胞と DRG には細胞質型 CAT、ミトコンドリア型 CAT さらに MPST の全てが発現しており、その発現量は陽性コントロールの脳と同程度であった。
3. PC12 細胞と DRG は、CAT の共基質である α -ketoglutarate 存在下においてのみ L-cysteine から相当量の H_2S を産生し、この H_2S 産生は還元剤 dithiothreitol や dihydrolipoic acid 依存性に増加した。

4. PC12細胞とDRGの顕著なH₂S産生は、非特異的H₂S産生酵素阻害薬(aminooxyacetic acid)、CAT競合基質(L-aspartateとoxaloacetate)およびMPSTのRNA干渉により抑制された。
5. 免疫蛍光解析により、MPSTがPC12細胞とDRGニューロンでは細胞質とミトコンドリアに発現していることがわかった。また細胞分画を用いたウエスタンブロット解析により、PC12細胞とDRGでは、MPSTは細胞質よりミトコンドリアに多く発現することが示された。
6. PC12細胞のCATとMPSTを介したH₂S産生は至適pH 9.0のbell-shape状のpH依存性を示し、ミトコンドリアpHとされるpH 8.0付近では肝臓のCSEや脳のCBSと同程度のH₂S産生活性を示した。
7. 中枢神経系組織である新生ラット脊髄ではCBSによる顕著なH₂S産生が認められたが、この組織から分離した培養アストロサイトではH₂S産生量はごくわずかであった。
8. 新生ラット脊髄からアストロサイトを分離培養する過程で、GFAP（アストロサイトマーカー）の発現量は増加したが、PGP 9.5（ニューロンマーカー）の発現量は低下し、これと並行してCBSの発現量が顕著に減少した。
9. 新生ラットの脊髄切片を用いた免疫蛍光解析により、CBSはニューロンではなくアストロサイトに発現することが示された。

10. 胎児ラットから分離培養した脊髄細胞では PGP 9.5 の発現は維持されており、培養日数増加に従い CBS の発現量と H₂S 産生活性が増加した。
11. 新生ラット培養脊髄アストロサイトの CBS 発現は胎児ラット脊髄細胞との共培養により回復した。
12. 新生ラットの培養脊髄アストロサイトに膜透過性 cAMP 類似体 dibutyl cAMP (dbcAMP) を処置すると、CBS 発現量と H₂S 産生活性は脊髄組織と同程度まで回復した。
13. 新生ラット脊髄組織と比較すると、新生ラット培養脊髄アストロサイトの CBS mRNA 量は極めて低かった。一方、dbcAMP 処置アストロサイトおよび胎児から分離培養した脊髄細胞の CBS mRNA 量は新生ラット脊髄組織の mRNA 量と同程度であった。

以上の結果から、末梢神経系では CSE や CBS ではなく主に CAT と MPST を介して H₂S が生じること、またその H₂S 産生がミトコンドリア内の環境変化により調節されることが示された。さらに中枢神経系では、アストロサイトの CBS が重要な H₂S 産生酵素であり、その発現が神経によって調節されることが明らかとなった。アストロサイトの cAMP 上昇を起こす神経性因子が CBS の発現調節に寄与していることが示唆される。本研究は神経系の内因性 H₂S 産生が、内的または外的因子に影響されることを示した。H₂S は高濃度では細胞毒性を示すが、低濃度では抗酸化作用、抗炎症作用を示すことが報告されている。H₂S 産生効率の変化が、末梢または中枢神経系の神経疾患の病因に関わっている可能性がある。

謝辞

稿の終わりに臨み、終始、御指導と御高配を賜り、本論文を御校閲頂きました北海道大学大学院獣医学研究科比較形態機能学講座薬理学教室、伊藤茂男特任教授に深く感謝申し上げます。

本論文を御校閲頂きます北海道大学大学院獣医学研究科比較形態機能学講座生化学教室、木村和弘教授、同生理学教室、葉原芳昭教授に厚く御礼申し上げます。

北海道大学大学院獣医学研究科比較機能形態学講座薬理学教室、乙黒兼一准教授には日頃より丁寧に御指導頂き、深く感謝しております。

最後に、薬理学教室の教室員のみなさまに、日々の研究生生活を支えて下さったこと、感謝いたします。

参考文献

1. Abad MF, Di Benedetto G, Magalhães PJ, Filippin L, Pozzan T (2004). Mitochondrial pH monitored by a new engineered green fluorescent protein mutant. *J Biol Chem* 279: 11521–11529.
2. Abe K, Kimura H (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci* 16: 1066–1071.
3. Abeles RH, Walsh CT (1973). Acetylenic enzyme inactivators. Inactivation of γ -cystathionase, in vitro and in vivo, by propargylglycine. *J Am Chem Soc* 95: 6124–6125.
4. Agulhon C, Petravic J, McMullen AB, Sweger EJ, Minton SK, Taves SR, Casper KB, Fiacco TA, McCarthy KD (2008). What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron* 59: 932–946.
5. Akagi R (1982). Purification and characterization of cysteine aminotransferase from rat liver cytosol. *Acta Med Okayama* 36: 187–197.
6. Andersson DA, Gentry C, Bevan S (2012). TRPA1 has a key role in the somatic pro-nociceptive actions of hydrogen sulfide. *PLoS One* 7: e46917
7. Asimakopoulou A, Panopoulos P, Chasapis CT, Coletta C, Zhou Z, Cirino G, Giannis A, Szabo C, Spyroulias GA, Papapetropoulos A (2013). Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathionine β synthase (CBS) and cystathionine γ lyase (CSE). *Br J Pharmacol* 169: 922–932.
8. Barr LA, Calvert JW (2014). Discoveries of hydrogen sulfide as a novel cardiovascular therapeutic. *Circ J* 78: 2111–2118.
9. Beard RS Jr, Bearden SE (2011). Vascular complications of cystathionine β -synthase deficiency: future directions for homocysteine-to-hydrogen sulfide research. *Am J Physiol*

Heart Circ Physiol 300: H13–H26.

10. Blachier F, Davila AM, Mimoun S, Benetti PH, Atanasiu C, Andriamihaja M, Benamouzig R, Bouillaud F, Tomé D (2010). Luminal sulfide and large intestine mucosa: friend or foe? *Amino Acids* 39: 335–347.
11. Caliendo G, Cirino G, Santagada V, Wallace JL (2010). Synthesis and biological effects of hydrogen sulfide (H₂S): development of H₂S-releasing drugs as pharmaceuticals. *J Med Chem* 53: 6275–6286.
12. Campolo M, Esposito E, Ahmad A, Di Paola R, Wallace JL, Cuzzocrea S (2013). A hydrogen sulfide-releasing cyclooxygenase inhibitor markedly accelerates recovery from experimental spinal cord injury. *FASEB J* 27: 4489–4499.
13. Casey JR, Grinstein S, Orlowski J (2010). Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 50–61.
14. Chen X, Jhee KH, Kruger WD (2004). Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine β -synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. *J Biol Chem* 279: 52082–52086.
15. Côté F, Schussler N, Boularand S, Peirottes A, Thévenot E, Mallet J, Vojdani G (2002). Involvement of NF-Y and Sp1 in basal and cAMP-stimulated transcriptional activation of the tryptophan hydroxylase (TPH) gene in the pineal gland. *J Neurochem* 81: 673–685.
16. Donoghue JP, Wenthold RJ, Altschuler RA (1985). Localization of glutaminase-like and aspartate aminotransferase-like immunoreactivity in neurons of cerebral neocortex. *J Neurosci* 5: 2597–2608.
17. Enokido Y, Suzuki E, Iwasawa K, Namekata K, Okazawa H, Kimura H (2005). Cystathionine β -synthase, a key enzyme for homocysteine metabolism, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage of developing mouse CNS. *FASEB J* 19: 1854

–1856.

18. Fellin T, Carmignoto G (2004). Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J Physiol* 559: 3–15.
19. Flannigan KL, Ferraz JG, Wang R, Wallace JL (2013). Enhanced synthesis and diminished degradation of hydrogen sulfide in experimental colitis: a site-specific, pro-resolution mechanism. *PLoS One* 8: e71962
20. Fu M, Zhang W, Wu L, Yang G, Li H, Wang R (2012). Hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 2943–2948.
21. Garg SK, Vitvitsky V, Albin R, Banerjee R (2011). Astrocytic redox remodeling by amyloid beta peptide. *Antioxid Redox Signal* 14: 2385–2397.
22. Ge Y, Jensen TL, Matherly LH, Taub JW (2002). Synergistic regulation of human cystathionine-beta-synthase-1b promoter by transcription factors NF-YA isoforms and Sp1. *Biochim Biophys Acta* 1579: 73–80.
23. Giambanco I, Bianchi R, Ceccarelli P, Pula G, Sorci G, Antonioli S, Bocchini V, Donato R (1991). 'Neuron-specific' protein gene product 9.5 (PGP 9.5) is also expressed in glioma cell lines and its expression depends on cellular growth state. *FEBS Lett* 290: 131–134.
24. Haddad PR, Heckenberg AL (1988). Trace determination of sulfide by reversed-phase ion-interaction chromatography using pre-column derivatization. *J Chromatogr* 447: 415–420.
25. Hanson GT, Aggeler R, Oglesbee D, Cannon M, Capaldi RA, Tsien RY, Remington SJ (2004). Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem* 279: 13044–13053.
26. Hatten ME (1985). Neuronal regulation of astroglial morphology and proliferation in vitro.

J Cell Biol 100: 384–396.

27. Hems DA, Brosnan JT (1971). Effects of metabolic acidosis and starvation on the content of intermediary metabolites in rat kidney. *Biochem J* 123: 391–397.
28. Hertz L, Peng L, Lai JC (1998). Functional studies in cultured astrocytes. *Methods* 16: 293–310.
29. Higashi T, Tateishi N, Naruse A, Sakamoto Y (1976). Decrease of glutathione and induction of γ -glutamyltransferase by dibutyryl-3', 5'-cyclic AMP in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 68: 1280–1286.
30. Hirst WD, Price GW, Rattray M, Wilkin GP (1997). Identification of 5-hydroxytryptamine receptors positively coupled to adenylyl cyclase in rat cultured astrocytes. *Br J Pharmacol* 120: 509–515.
31. Hu S, Xu W, Miao X, Gao Y, Zhu L, Zhou Y, Xiao Y, Xu GY (2013). Sensitization of sodium channels by cystathionine β -synthetase activation in colon sensory neurons in adult rats with neonatal maternal deprivation. *Exp Neurol* 248: 275–285.
32. Huang S, Chua JH, Yew WS, Sivaraman J, Moore PK, Tan CH, Deng LW (2010). Site-directed mutagenesis on human cystathionine- γ -lyase reveals insights into the modulation of H₂S production. *J Mol Biol* 396: 708–718.
33. Ishii I, Akahoshi N, Yu XN, Kobayashi Y, Namekata K, Komaki G, Kimura H (2004). Murine cystathionine γ -lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. *Biochem J* 381: 113–123.
34. Jalil MA, Begum L, Contreras L, Pardo B, Iijima M, Li MX, Ramos M, Marmol P, Horiuchi M, Shimotsu K, Nakagawa S, Okubo A, Sameshima M, Isashiki Y, Del Arco A, Kobayashi K, Satrústegui J, Saheki T (2005). Reduced N-acetylaspartate levels in mice lacking aralar, a brain- and muscle-type mitochondrial aspartate-glutamate carrier. *J Biol*

Chem 280: 31333–31339.

35. John RA, Charteris A (1978). The reaction of amino-oxyacetate with pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochem J* 171: 771–779.
36. Kabil O, Vitvitsky V, Xie P, Banerjee R (2011). The quantitative significance of the transsulfuration enzymes for H₂S production in murine tissues. *Antioxid Redox Signal* 15: 363–372.
37. Kamat PK, Kalani A, Givvimani S, Sathnur PB, Tyagi SC, Tyagi N (2013). Hydrogen sulfide attenuates neurodegeneration and neurovascular dysfunction induced by intracerebral-administered homocysteine in mice. *Neuroscience* 252: 302–319.
38. Kida K, Yamada M, Tokuda K, Marutani E, Kakinohana M, Kaneki M, Ichinose F (2011). Inhaled hydrogen sulfide prevents neurodegeneration and movement disorder in a mouse model of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* 15: 343–352.
39. Kimura H (2014). The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. *Nitric Oxide* 41: 4–10.
40. Kimura Y, Kimura H (2004). Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J* 18: 1165–1167.
41. Kimura Y, Goto Y, Kimura H (2010). Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxid Redox Signal* 12: 1–13.
42. Kimura Y, Mikami Y, Osumi K, Tsugane M, Oka J, Kimura H (2013). Polysulfides are possible H₂S-derived signaling molecules in rat brain. *FASEB J* 27: 2451–2457.
43. Koulakoff A, Ezan P, Giaume C (2008). Neurons control the expression of connexin 30 and connexin 43 in mouse cortical astrocytes. *Glia* 56: 1299–1311.
44. Lange SC, Bak LK, Waagepetersen HS, Schousboe A, Norenberg MD (2012). Primary cultures of astrocytes: their value in understanding astrocytes in health and disease.

Neurochem Res 37: 2569–2588.

45. Laureys G, Clinckers R, Gerlo S, Spooren A, Wilczak N, Kooijman R, Smolders I, Michotte Y, De Keyser J (2010). Astrocytic β_2 -adrenergic receptors: from physiology to pathology. *Prog Neurobiol* 91: 189–199.
46. Lee M, Schwab C, Yu S, McGeer E, McGeer PL (2009). Astrocytes produce the antiinflammatory and neuroprotective agent hydrogen sulfide. *Neurobiol Aging* 30: 1523–1534.
47. Lee MY, Myers J, Abella J, Froelicher VF, Perkash I, Kiratli BJ (2006). Homocysteine and hypertension in persons with spinal cord injury. *Spinal Cord* 44: 474–479.
48. Liu B, Chen H, Johns TG, Neufeld AH (2006). Epidermal growth factor receptor activation: an upstream signal for transition of quiescent astrocytes into reactive astrocytes after neural injury. *J Neurosci* 26: 7532–7540.
49. Llopis J, McCaffery JM, Miyawaki A, Farquhar MG, Tsien RY (1998). Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6803–6808.
50. Mathai JC, Missner A, Kügler P, Saparov SM, Zeidel ML, Lee JK, Pohl P (2009). No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 16633–16638.
51. Matsuyama S, Llopis J, Deveraux QL, Tsien RY, Reed JC (2000). Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nat Cell Biol* 2: 318–325.
52. Mattson MP (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 120–129.
53. Mattson MP, Shea TB (2003). Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and

- neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 26: 137–146.
54. McCarthy KD, de Vellis J (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85: 890–902.
55. McKenna MC, Waagepetersen HS, Schousboe A, Sonnewald U (2006). Neuronal and astrocytic shuttle mechanisms for cytosolic-mitochondrial transfer of reducing equivalents: current evidence and pharmacological tools. *Biochem Pharmacol* 71: 399–407.
56. Mikami Y, Shibuya N, Kimura Y, Nagahara N, Ogasawara Y, Kimura H (2011). Thioredoxin and dihydrolipoic acid are required for 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase to produce hydrogen sulfide. *Biochem J* 439: 479–485.
57. Miyamoto R, Otsuguro K, Ito S (2011). Time- and concentration-dependent activation of TRPA1 by hydrogen sulfide in rat DRG neurons. *Neurosci Lett* 499: 137–142.
58. Miyamoto R, Otsuguro K, Yamaguchi S, Ito S (2014). Contribution of cysteine aminotransferase and mercaptopyruvate sulfurtransferase to hydrogen sulfide production in peripheral neurons. *J Neurochem* 130: 29–40.
59. Mudd SH, Finkelstein JD, Irreverre F, Laster L (1964). Homocystinuria: an enzymatic defect. *Science* 143: 1443–1445.
60. Módis K, Coletta C, Erdélyi K, Papapetropoulos A, Szabo C (2013). Intramitochondrial hydrogen sulfide production by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase maintains mitochondrial electron flow and supports cellular bioenergetics. *FASEB J* 27: 601–611.
61. Nagahara N, Ito T, Kitamura H, Nishino T (1998). Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat: confocal laser fluorescence and immunoelectron microscopic studies combined with biochemical analysis. *Histochem Cell Biol* 110: 243–250.
62. Nagahara N, Nagano M, Ito T, Shimamura K, Akimoto T, Suzuki H (2013). Antioxidant

- enzyme, 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase-knockout mice exhibit increased anxiety-like behaviors: a model for human mercaptolactate-cysteine disulfiduria. *Sci Rep* 3: 1986
63. Ogawa H, Takahashi K, Miura S, Imagawa T, Saito S, Tominaga M, Ohta T (2012). H₂S functions as a nociceptive messenger through transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) activation. *Neuroscience* 218: 335–343.
 64. Okubo K, Takahashi T, Sekiguchi F, Kanaoka D, Matsunami M, Ohkubo T, Yamazaki J, Fukushima N, Yoshida S, Kawabata A (2011). Inhibition of T-type calcium channels and hydrogen sulfide-forming enzyme reverses paclitaxel-evoked neuropathic hyperalgesia in rats. *Neuroscience* 188: 148–156.
 65. Oyinbo CA (2011). Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp* 71: 281–299.
 66. Paul BD, Snyder SH (2012). H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 499–507.
 67. Qian X, Shen Q, Goderie SK, He W, Capela A, Davis AA, Temple S (2000). Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28: 69–80.
 68. Regland B, Johansson BV, Grenfeldt B, Hjelmgren LT, Medhus M (1995). Homocysteinemia is a common feature of schizophrenia. *J Neural Transm* 100: 165–169.
 69. Robel S, Berninger B, Götz M (2011). The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat Rev Neurosci* 12: 88–104.
 70. Rouach N, Glowinski J, Giaume C (2000). Activity-dependent neuronal control of gap-junctional communication in astrocytes. *J Cell Biol* 149: 1513–1526.
 71. Santo-Domingo J, Giacomello M, Poburko D, Scorrano L, Demareux N (2013). OPA1

promotes pH flashes that spread between contiguous mitochondria without matrix protein exchange. *EMBO J* 32: 1927–1940.

72. Schlag BD, Vondrasek JR, Munir M, Kalandadze A, Zeleniaia OA, Rothstein JD, Robinson MB (1998). Regulation of the glial Na⁺-dependent glutamate transporters by cyclic AMP analogs and neurons. *Mol Pharmacol* 53: 355–369.
73. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA (2002). Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 346: 476–483.
74. Shibuya N, Tanaka M, Yoshida M, Ogasawara Y, Togawa T, Ishii K, Kimura H (2009). 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxid Redox Signal* 11: 703–714.
75. Siegal LM (1965). A direct microdetermination for sulfide. *Anal Biochem* 11: 126–132.
76. Siess EA, Kientsch-Engel RI, Wieland OH (1984). Concentration of free oxaloacetate in the mitochondrial compartment of isolated liver cells. *Biochem J* 218: 171–176.
77. Skovby F, Kraus JP, Rosenberg LE (1984). Biosynthesis and proteolytic activation of cystathionine beta-synthase in rat liver. *J Biol Chem* 259: 588–593.
78. Stipanuk MH, Beck PW (1982). Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J* 206: 267–277.
79. Swanson RA, Liu J, Miller JW, Rothstein JD, Farrell K, Stein BA, Longuemare MC (1997). Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J Neurosci* 17: 932–40.
80. Szabó C (2007). Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 6: 917–935.
81. Takahashi T, Aoki Y, Okubo K, Maeda Y, Sekiguchi F, Mitani K, Nishikawa H, Kawabata

- A (2010). Upregulation of $\text{Ca}_v3.2$ T-type calcium channels targeted by endogenous hydrogen sulfide contributes to maintenance of neuropathic pain. *Pain* 150: 183–191.
82. Tanase S, Morino Y (1976). Irreversible inactivation of aspartate aminotransferases during transamination with L-propargylglycine. *Biochem Biophys Res Commun* 68: 1301–1308.
 83. Tang XQ, Shen XT, Huang YE, Ren YK, Chen RQ, Hu B, He JQ, Yin WL, Xu JH, Jiang ZS (2010). Hydrogen sulfide antagonizes homocysteine-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Neurosci Res* 68: 241–249.
 84. Tang XQ, Fan LL, Li YJ, Shen XT, Zhuan YY, He JQ, Xu JH, Hu B, Li YJ (2011). Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to 1-methy-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity. *Neurotox Res* 19: 403–411.
 85. Tardy M, Fages C, Rioul H, LePrince G, Rataboul P, Charriere-Bertrand C, Nunez J (1989). Developmental expression of the glial fibrillary acidic protein mRNA in the central nervous system and in cultured astrocytes. *J Neurochem* 52: 162–167.
 86. Ubuka T, Umemura S, Yuasa S, Kinuta M, Watanabe K (1978). Purification and characterization of mitochondrial cysteine aminotransferase from rat liver. *Physiol Chem Phys* 10: 483–500.
 87. Valentino F, Bivona G, Butera D, Paladino P, Fazzari M, Piccoli T, Ciaccio M, La Bella V (2010). Elevated cerebrospinal fluid and plasma homocysteine levels in ALS. *Eur J Neurol* 17: 84–89.
 88. Wang Y, Qu R, Hu S, Xiao Y, Jiang X, Xu GY (2012). Upregulation of cystathionine β -synthetase expression contributes to visceral hyperalgesia induced by heterotypic intermittent stress in rats. *PLoS One* 7: e53165.
 89. Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, Jia-Ling S, Wong BS, Cheung NS, Halliwell B, Moore PK (2004). The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous

- peroxynitrite 'scavenger'? *J Neurochem* 90: 765–768.
90. Whiteman M, Cheung NS, Zhu YZ, Chu SH, Siau JL, Wong BS, Armstrong JS, Moore PK (2005). Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain? *Biochem Biophys Res Commun* 326: 794–798.
 91. Williamson DH, Lopes-Vieira O, Walker B (1967). Concentrations of free glucogenic amino acids in livers of rats subjected to various metabolic stresses. *Biochem J* 104: 497–502.
 92. Xuan A, Long D, Li J, Ji W, Zhang M, Hong L, Liu J (2012). Hydrogen sulfide attenuates spatial memory impairment and hippocampal neuroinflammation in β -amyloid rat model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 9: 202.
 93. Yadav PK, Yamada K, Chiku T, Koutmos M, Banerjee R (2013). Structure and kinetic analysis of H₂S production by human mercaptopyruvate sulfurtransferase. *J Biol Chem* 288: 20002–20013.
 94. Yao WB, Zhao YQ, Abe T, Ohta J, Ubuka T (1994). Effect of N-acetylcysteine administration on cysteine and glutathione contents in liver and kidney and in perfused liver of intact and diethyl maleate-treated rats. *Amino Acids* 7: 255–266.
 95. Zanassi P, Paolillo M, Montecucco A, Avvedimento EV, Schinelli S (1999). Pharmacological and molecular evidence for dopamine D₁ receptor expression by striatal astrocytes in culture. *J Neurosci Res* 58: 544–552.
 96. Zhao K, Ju Y, Li S, Altaany Z, Wang R, Yang G (2014). S-sulfhydration of MEK1 leads to PARP-1 activation and DNA damage repair. *EMBO Rep* 15: 792–800.
 97. Zhong ZD, Hammani K, Bae WS, DeClerck YA (2000). NF-Y and Sp1 cooperate for the transcriptional activation and cAMP response of human tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J Biol Chem* 275: 18602–18610.

Mechanisms of hydrogen sulfide production in the nervous systems

Ryo Miyamoto

Laboratory of Pharmacology, Department of Biomedical Sciences,

Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University,

Sapporo, 060-0818, Japan

In mammals, hydrogen sulfide (H_2S) is produced from L-cysteine through three enzymatic reactions mediated by cystathionine γ -lyase (CSE), cystathionine β -synthase (CBS), and mercaptopyruvate sulfurtransferase (MPST) coupled with cysteine aminotransferase (CAT). In this study, the mechanisms of H_2S production in the rat nervous systems were investigated. Contribution of three enzymatic pathways to H_2S production in the peripheral nervous system (PNS) was first examined, employing dorsal root ganglion (DRG), where cell bodies of sensory neurons are located, and PC12 cells, which are model cells of peripheral neuron. In the central nervous system (CNS), CBS is expressed in astrocytes, and is an important source of H_2S . The influence of neurons on CBS expression and its H_2S -producing activity in astrocytes were next evaluated, employing multiple culture systems with different compositions of neurons and astrocytes.

1. CSE and CBS were expressed in the rat liver (positive control for CSE) and the brain (positive control for CBS), respectively. In PC12 cells and the DRG, CSE was not detected, and expression levels of CBS were lower than that in the brain.

2. Cytosolic CAT, mitochondrial CAT, and MPST were all expressed in PC12 cells and the DRG, and the expression levels were similar to those in the brain.
3. PC12 cells and the DRG produced a substantial amount of H₂S from L-cysteine only in the presence of a CAT co-substrate α -ketoglutarate, and the production of H₂S was increased by reducing substances, dithiothreitol or dihydrolipoic acid.
4. The production of H₂S in PC12 cells was inhibited by a non-selective H₂S-producing enzyme inhibitor (aminooxyacetic acid), CAT competitive substrates (L-aspartate and oxaloacetate) and RNA interference against MPST.
5. Immunofluorescence analysis revealed that MPST was expressed in both the mitochondria and cytosol of PC12 cells and DRG neurons. Western blot analysis of subcellular fraction showed that MPST was mostly expressed in the mitochondrial fraction.
6. In PC12 cells, H₂S production by CAT/MPST showed bell-shaped pH-dependence with an optimal pH of 9.0. At pH 8.0, or an estimated physiological mitochondrial matrix pH, the amount of H₂S produced by CAT/MPST was comparable to that produced by liver CSE and brain CBS.
7. H₂S production by CBS was considerably high in neonatal rat spinal cord, but was very low in cultured astrocytes isolated from it.

8. During culture of astrocytes isolated from neonatal rat spinal cord, expression level of glial fibrillary acidic protein (GFAP, astrocyte marker) was increased, while that of protein gene product 9.5 (PGP 9.5, neuronal marker) was markedly reduced, accompanied by the decrease of CBS expression level.
9. Immunofluorescence analysis of neonatal rat spinal cord slices showed astrocytic, but not neuronal, localization of CBS.
10. In cultured spinal cells isolated from fetal rats, PGP 9.5 was stably expressed, and CBS expression and its H₂S-producing activity were increased as the culture period increased.
11. Impaired CBS expression in neonatal rat astrocytes was restored by co-culture with fetal rat neurons.
12. Treatment with a membrane permeable cAMP analogue dibutyryl cAMP (dbcAMP) restored CBS expression and its H₂S-producing activity to the similar level of that in intact spinal cord.
13. Compared with neonatal rat spinal cord, mRNA level of cultured astrocytes was very low, while that of cultured astrocytes treated with dbcAMP or cultured spinal cells isolated from fetal rats was comparably high.

These results indicate that, in the PNS, H₂S is produced through CAT/MPST, but not through CSE or CBS, and that the CAT/MPST-mediated production of H₂S could be regulated by

alteration of mitochondrial conditions. In the CNS, it is demonstrated that astrocytic CBS is an important enzyme for H₂S synthesis, and its expression is controlled by neurons. Neural factors triggering the increase in astrocytic cAMP are suggested to mediate the regulation of CBS expression. This study shows that endogenous H₂S production in the nervous system could be regulated by internal or external factors. H₂S is cytotoxic at high concentration, while, at low concentration, it has also been reported to exhibit antioxidant and anti-inflammatory activities. Changes in production rate of H₂S may be involved in the pathogenesis of neuronal disorders in the PNS and CNS.