



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | アストロサイトにおける硫化水素の細胞内Ca <sup>2+</sup> シグナルとエネルギー代謝への作用に関する研究                                      |
| Author(s)           | 新居, 剛                                                                                           |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                           |
| Degree Name         | 博士(獣医学)                                                                                         |
| Dissertation Number | 甲第14546号                                                                                        |
| Issue Date          | 2021-03-25                                                                                      |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k14546">https://doi.org/10.14943/doctoral.k14546</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/81962">https://hdl.handle.net/2115/81962</a>               |
| Type                | doctoral thesis                                                                                 |
| File Information    | Takeshi_Nii.pdf                                                                                 |



アストロサイトにおける硫化水素の  
細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルとエネルギー代謝への  
作用に関する研究

(The effect of hydrogen sulfide on  $\text{Ca}^{2+}$  signal  
and energy metabolism in astrocytes)

新居 剛

## 目次

|     |                                                                             |    |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| I   | 緒言                                                                          | 1  |
| II  | 方法                                                                          | 4  |
| A   | 実験動物                                                                        | 4  |
| B   | 脊髄アストロサイトの分離培養法                                                             | 4  |
| C   | Ca <sup>2+</sup> イメージング法                                                    | 4  |
| D   | 細胞毒性測定法                                                                     | 5  |
| E   | 細胞増殖測定法                                                                     | 5  |
| F   | 細胞外及び細胞内 ATP 測定法                                                            | 5  |
| G   | 細胞内 cAMP 測定法                                                                | 6  |
| H   | 細胞外乳酸測定法                                                                    | 6  |
| I   | 使用溶液                                                                        | 7  |
| J   | 試薬                                                                          | 7  |
| K   | 統計処理                                                                        | 8  |
| III | 結果                                                                          | 9  |
| A   | H <sub>2</sub> S の脊髄アストロサイト内 Ca <sup>2+</sup> シグナリングに対する効果                  | 9  |
| 1   | H <sub>2</sub> S による細胞内 Ca <sup>2+</sup> 濃度上昇作用                             | 9  |
| 2   | H <sub>2</sub> S の脊髄アストロサイトに対する毒性の検討                                        | 9  |
| B   | H <sub>2</sub> S による細胞内 Ca <sup>2+</sup> 濃度上昇機構                             | 9  |
| 1   | H <sub>2</sub> S 誘発性 Ca <sup>2+</sup> 濃度上昇における細胞外からの Ca <sup>2+</sup> 流入の関与 | 9  |
| 2   | H <sub>2</sub> S 誘発性 Ca <sup>2+</sup> 濃度上昇における小胞体からの Ca <sup>2+</sup> 遊離の関与 | 12 |
| a   | Sarco/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase (SERCA)阻害薬の効果          | 12 |
| b   | 小胞体膜上の Ca <sup>2+</sup> チャネルの関与                                             | 12 |
| 3   | Ca <sup>2+</sup> シグナルにおける H <sub>2</sub> S と ATP の相互作用                      | 16 |
| a   | 脊髄アストロサイトにおける ATP による細胞内 Ca <sup>2+</sup> 上昇                                | 16 |
| b   | ATP 誘発性 Ca <sup>2+</sup> 濃度上昇に対する H <sub>2</sub> S の抑制作用                    | 16 |
| c   | H <sub>2</sub> S による ATP 放出作用の検討                                            | 19 |
| C   | H <sub>2</sub> S 誘発性 Ca <sup>2+</sup> 濃度上昇へのスルフヒドリル化と cAMP の関与の検討           | 19 |
| 1   | スルフヒドリル化の関与                                                                 | 19 |
| 2   | 細胞内 cAMP の関与                                                                | 23 |
| D   | H <sub>2</sub> S による Ca <sup>2+</sup> シグナリングと代謝変化                           | 23 |
| 1   | H <sub>2</sub> S によるグルコース代謝変化の関与                                            | 23 |
| 2   | H <sub>2</sub> S 誘発性 Ca <sup>2+</sup> 濃度上昇における ROS の関与                      | 26 |
| 3   | H <sub>2</sub> S による電子伝達鎖抑制の関与                                              | 26 |

|    |                                                        |    |
|----|--------------------------------------------------------|----|
| 4  | H <sub>2</sub> S の乳酸合成及び細胞内 ATP 量への作用                  | 26 |
| 5  | H <sub>2</sub> S 誘発性 Ca <sup>2+</sup> 上昇におけるトランスロコンの関与 | 27 |
| 6  | H <sub>2</sub> S 誘発性 Ca <sup>2+</sup> 上昇による乳酸産生の促進作用   | 27 |
| IV | 考察                                                     | 35 |
| V  | 結論                                                     | 40 |
|    | 謝辞                                                     | 42 |
|    | 引用文献                                                   | 43 |
|    | 英文抄録                                                   | 52 |

## 略語表

|                                  |                                                                                      |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 2APB                             | 2-aminoethoxydiphenyl borate                                                         |
| ACSF                             | artificial cerebrospinal fluid                                                       |
| AGC                              | aspartate-glutamate carrier                                                          |
| AITC                             | allyl isothiocyanate                                                                 |
| AMPK                             | AMP-activated protein kinase                                                         |
| AOAA                             | (aminooxy)acetic acid hemihydrochloride                                              |
| ATP                              | adenosine triphosphate                                                               |
| [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> | intracellular Ca <sup>2+</sup> concentration (細胞内 Ca <sup>2+</sup> 濃度)               |
| DTT                              | dithiothreitol                                                                       |
| EGTA                             | <i>O,O'</i> bis(2-aminoethyl)ethylene-glycol- <i>N,N,N',N'</i> tetraacetic acid      |
| FCCP                             | cyanide 4-trifluoromethoxyphenylhydrazone                                            |
| GPT                              | glutamic-pyruvic transaminase                                                        |
| H <sub>2</sub> S                 | hydrogen sulfide (硫化水素)                                                              |
| HBSS                             | Hanks' balanced solution                                                             |
| HC-030031                        | theophylline-7-( <i>N</i> -4-isopropylphenyl) acetamide                              |
| IA                               | iodoacetic acid sodium salt                                                          |
| IP <sub>3</sub>                  | inositol 1,4,5-triphosphate                                                          |
| LDH                              | lactate dehydrogenase                                                                |
| MAS                              | malate-aspartate shuttle                                                             |
| NAD <sup>+</sup>                 | nicotinamide adenine dinucleotide                                                    |
| NADH                             | nicotinamide adenine dinucleotide hydride                                            |
| PLC                              | phospholipase C                                                                      |
| ROS                              | reactive oxygen species                                                              |
| SERCA                            | sarco/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase                                 |
| TRPA1                            | transient receptor potential ankyrin 1                                               |
| U73122                           | 1-[6-[[[(17β)-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione |
| W7                               | <i>N</i> -(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide hydrochloride             |

## I 緒言

硫化水素 ( $\text{H}_2\text{S}$ ) は、水溶性のガス状物質であり (Filipovic *et al.*, 2018)、生理的な条件下では約 20% が気体として存在する (Kimura, 2014)。 $\text{H}_2\text{S}$  は、単純拡散によって細胞膜を介して移動する (Mathai *et al.*, 2009)。また、比較的高濃度の  $\text{H}_2\text{S}$  はミトコンドリアの電子伝達鎖 (図 1) を抑制する (Cooper and Brown, 2008)。

$\text{H}_2\text{S}$  は生体内の組織で合成され、生理活性物質として機能する (Kimura, 2014)。 $\text{H}_2\text{S}$  は、タンパク質のシステイン残基を共有結合的に修飾することによって、その構造と機能を制御することが知られており、この反応はスルフヒドリル化と呼ばれている (Mustafa *et al.*, 2009; Kimura, 2014)。スルフヒドリル化では、 $\text{H}_2\text{S}$  から生じるポリサルフェン ( $\text{H}_2\text{S}_n$ ) が、タンパク質中のシステイン残基と反応する (Liu *et al.*, 2018)。さらに、 $\text{H}_2\text{S}$  は細胞内 cAMP 濃度の制御を介して、細胞機能を調節することも知られている (Cao *et al.*, 2018)。例えば、 $\text{H}_2\text{S}$  による細胞内 cAMP 濃度の増加は、protein kinase A の活性化とそれによる細胞膜のイオンチャネルの開口を引き起こす (Perniss *et al.*, 2017)。

中枢神経系においては、 $\text{H}_2\text{S}$  は主に星状膠細胞 (アストロサイト) によって合成され (Lee *et al.*, 2009)、その濃度は脳内では  $\sim 166 \mu\text{M}$  であると報告されている (Baskar and Bian, 2011)。近年、細胞内では組織全体での濃度よりも高い濃度の  $\text{H}_2\text{S}$  が局所的なシグナルとして働くことも示唆されている (Furne *et al.*, 2008)。海馬アストロサイトにおいて、 $\text{H}_2\text{S}$  は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) を上昇させること、この  $\text{Ca}^{2+}$  反応は主にスルフヒドリル化によって開口した非選択的陽イオンチャネル transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) を介する細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入によって引き起こされることが報告されている (Nagai *et al.*, 2004; Ogawa *et al.*, 2012; Kimura *et al.*, 2013)。また、これらの報告の中では  $\text{H}_2\text{S}$  が細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアから  $\text{Ca}^{2+}$  を遊離させることも示されているが、その機構は不明である。

これまで中枢神経系内の  $\text{H}_2\text{S}$  の役割については、脳での報告が中心であった。これは、脳内  $\text{H}_2\text{S}$  量や  $\text{H}_2\text{S}$  合成酵素発現の変化が、ダウン症、アルツハイマー症と関連することや、 $\text{H}_2\text{S}$  の適用がパーキンソン病を緩和させることが報告されてきたからである (Eto *et al.*, 2002; Ichinohe *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2010)。近年、脊髄内  $\text{H}_2\text{S}$  量が筋萎縮性側索硬化症で上昇することや、 $\text{H}_2\text{S}$  がゼブラフィッシュの前後軸の形成に必要なことが報告された (Davoli *et al.*, 2015; Prabhudesai *et al.*, 2018)。これらのことから、脊髄においても  $\text{H}_2\text{S}$  が重要な役割をもつことが示唆されるが、その作用は未だ明らかではない。

$\text{H}_2\text{S}$  は、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化を変化させるだけでなく、細胞質での代謝の亢進による乳酸の放出も引き起こす (Lee *et al.*, 2017; Panagaki *et al.*, 2019)。解糖は、細胞質でグルコースがピルビン酸まで分解される経路のことであり、ピルビン酸はさらに代謝されて乳酸が生じる。乳酸は、もともと老廃物だと考えられていたが、細胞間乳酸輸送 (シャトル) や細胞に対する様々な作用の発見を契機に、その価値が再評価されてきた (Gladden,

2004)。脳では、取り込んだグルコースの~7%が乳酸となって放出され、この量は神経刺激や病態下で3~4倍に上昇する (Dienel, 2012)。中枢神経系内には、アストロサイトからニューロンへ乳酸の濃度勾配が存在しており (Mächler *et al.*, 2016)、乳酸はアストロサイトからニューロンへエネルギー基質として受け渡される (Alberini *et al.*, 2018)。近年、乳酸は神経伝達において重要なシグナルとなることもわかってきた (Abrantes *et al.*, 2019; Dienel, 2019)。さらに、乳酸が虚血後に神経保護作用を発揮するという報告もある (Berthet *et al.*, 2009)。

ミトコンドリアにおける細胞内呼吸の変化は、ミトコンドリア内膜の膜電位や (Barrientos and Moraes, 1999; Eghbal *et al.*, 2004)、細胞質内の活性酸素種 (ROS; reactive oxygen species) 及び ATP 濃度に影響を与える (Li *et al.*, 2003; Voronina *et al.*, 2010)。ミトコンドリア内膜の脱分極はミトコンドリアからの  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離を引き起こし (Saotome *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2013)、ROS や ATP は小胞体膜上のイオンチャネルの活性を変化させることで  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を変化させる (Walsh *et al.*, 2009; Görlach *et al.*, 2015)。ウシ副腎クロム親和性細胞においては、 $\text{H}_2\text{S}$  がミトコンドリア及び小胞体の両方から  $\text{Ca}^{2+}$  を遊離させることが報告されている (de Pascual *et al.*, 2018)。一方で、 $\text{Ca}^{2+}$  は解糖を制御する重要な因子である。ミトコンドリア内膜を介して NADH などの物質を輸送する様々なキャリアーは、 $\text{Ca}^{2+}$  によって制御される (Gellerich *et al.*, 2010)。これらのキャリアーの中でも aspartate-glutamate carrier は、細胞質における過剰な nicotinamide adenine dinucleotide hydride (NADH) の蓄積を防ぐことで乳酸産生を亢進する (Wang *et al.*, 2016)。加えて、 $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン複合体はグルコース取り込みや解糖を調節する経路の上流に位置している (Herzig and Shaw, 2018)。しかしながら、アストロサイトにおける  $\text{H}_2\text{S}$  による代謝変化と  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の関係は、これまで注目されてこなかった。

本研究では、ラット脊髄由来培養アストロサイトを用いて、 $\text{H}_2\text{S}$  による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇及びこれによるエネルギー代謝の変化を検討した。各種チャネル阻害薬やカルシウムストア枯渇薬を用いた薬理的な解析から、 $\text{H}_2\text{S}$  がミトコンドリア電子伝達鎖の抑制を介して、小胞体およびミトコンドリアからの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離を引き起こすことを明らかにした。また、 $\text{H}_2\text{S}$  がアストロサイトにおいて乳酸の合成を促進することと、これに  $\text{H}_2\text{S}$  による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇が関与することを示した。

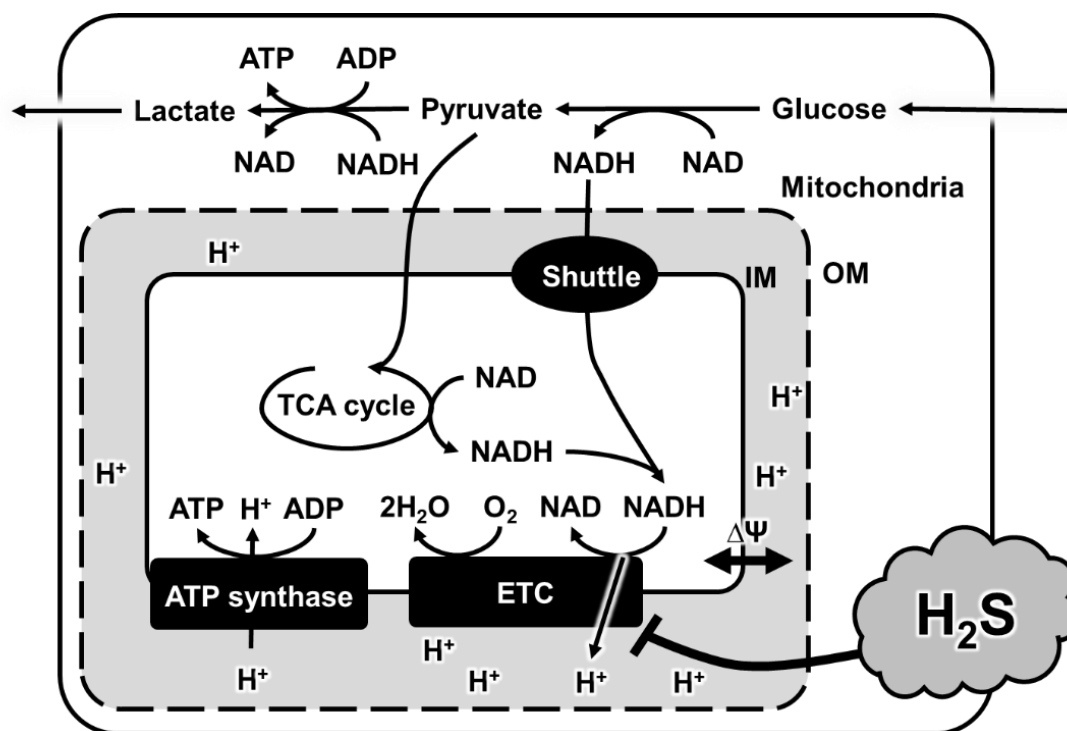


図 1. 電子伝達鎖 (ETC) と H<sub>2</sub>S 作用

細胞質内でグルコース (glucose) がピルビン酸 (pyruvate) に分解される際に、NAD<sup>+</sup>が NADH に還元され、一部の NADH は複数の酵素や輸送体群で構成される NADH shuttle によってミトコンドリア内に輸送される。一部のピルビン酸は、ミトコンドリア内に輸送され、TCA cycle における NAD<sup>+</sup>の還元を促進する。ETC は、NADH を NAD<sup>+</sup>に再酸化し、この時に生じた H<sup>+</sup>は膜間腔に蓄積され、ATP synthase による ATP 合成を駆動させる。細胞質の残りの NADH は、ピルビン酸がさらに乳酸 (lactate) に代謝される際に NAD<sup>+</sup>に再酸化され、これと ATP の合成が共役する。再酸化された NAD<sup>+</sup>は再び、glucose の分解に使われる。また、ETC における H<sup>+</sup>の膜間腔への排出は、ミトコンドリア内膜 (IM) を介する負の膜電位 (ΔΨ) を形成する。この ΔΨ が駆動力となり、マトリックス内へ Ca<sup>2+</sup>が流入する。H<sub>2</sub>S は ETC の構成要素の一つである cytochrome oxidase を阻害する。ETC; electron transport chain、IM; inner membrane、OM: outer membrane、TCA cycle; tricarboxylic acid cycle

## II 方法

### A 実験動物

本研究は北海道大学大学院獣医学研究院・獣医学部において行う実験動物に関するガイドラインに従って行った（動物実験計画書承認番号 14-0111 及び 19-0009）。実験には自家繁殖した Wistar 系新生ラット（雌雄、生後 0 から 3 日齢）を用いた。

### B 脊髄アストロサイトの分離培養法

新生ラットを断頭して安楽死処置し、脊髄を摘出した。二価陽イオンを含まない Hanks' balanced salt solution (HBSS) 中で脊髄から髄膜を除去し、角膜剪刀を用いてミンスした。続いて papain (10 U/ml) 及び DNase (0.1 mg/ml) を含む HBSS 中で室温で 20 分間インキュベートした後、酵素含有液を除去して培養液を加え、シリコン処理したパスツールピペットで攪拌して細胞を分離した。細胞培養液には 10% fetal bovine serum、100 µg/ml streptomycin 及び 100 U/ml penicillin G を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F-12 を用いた。細胞浮遊液を poly-L-lysine 処理した T-75 フラスコに移し、1-2 時間後に培養液を交換した。培養は 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で行い、2-3 日おきに培養液を交換した。細胞が 80-90%コンフルエンスになった後、37°C、250 rpm で 12 時間以上振盪することでアストロサイト以外の細胞をフラスコ底面から剥離した。残ったアストロサイトをトリプシン処置により回収し、poly-L-lysine 処理した T-25 フラスコ、プレート、ディッシュもしくはカバーガラス (Φ15) に播種して培養した。当研究室では本手法で得られたほぼ全ての細胞が、アストロサイトマーカーである glial fibrillary acidic protein を発現していることをすでに確認している (Eguchi *et al.*, 2015)。

### C Ca<sup>2+</sup>イメージング法

細胞をカバーガラスに  $5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、9-17 日間培養した。細胞を人工脳脊髄液 (ACSF; artificial cerebrospinal fluid) で洗浄後、Fura-2 AM (10 µM) を cremophor EL (0.002% (v/v)) を含む ACSF で 60 分間、25°C でローディングした。Fura-2 蛍光の測定は、倒立顕微鏡 (Diaphot 300、Nikon) と蛍光比イメージングシステム (ORCA-ER、Hamamatsu Photonics) を用いて行った。測定は、細胞外を常に ACSF で灌流した状態で行い、340 nm 及び 380 nm で 111 ms 間、2 s 間隔で励起光を照射し、各蛍光シグナル (F<sub>340</sub> 及び F<sub>380</sub>) を 500 nm において検出した。F<sub>340</sub> と F<sub>380</sub> の蛍光比 (R) は、Aquacosmos 2.6 software (Hamamatsu Photonics) を用いてバックグラウンド蛍光を補正した後に解析し

た。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) は、Fura-2 と  $\text{Ca}^{2+}$  の解離定数 ( $K_D$ )、 $\text{Ca}^{2+}$  が飽和した時と 0 である時の  $F_{380}$  の比 ( $\beta$ )、最小 ( $R_{\min}$ ) 及び最大 ( $R_{\max}$ ) の蛍光比 ( $F_{340}/F_{380}$ ) を用いて、以下の式に従って計算した。 $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D \beta \times (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$  (Grynkiewicz *et al.*, 1985)。  $K_D$ 、 $\beta$ 、 $R_{\min}$ 、 $R_{\max}$ 、 $F_{340}/F_{380}$  は、Calcium Calibration Buffer Kit (Invitrogen) を用いて算出した。全ての実験は室温で行った。

静止時  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は、特別な記載がない限り、薬物を処置する直前の値とし、最大  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は、薬物処置時間中の最大値とした。最大  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇値は、最大  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  と静止時  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の差分とした。

#### D 細胞毒性測定法

細胞を 96 ウェルプレートに  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、1% fetal bovine serum を含む培養液中で 2 時間インキュベートした。培養液で 1 回洗浄後、 $\text{Na}_2\text{S}$  ( $1 \mu\text{M} - 1 \text{ mM}$ ) を含む培養液を 6 時間処置した。細胞毒性は細胞から放出される lactate dehydrogenase (LDH) を Cytotoxicity Detection LDH Kit (Roche) を用いて検出することで評価した。付属の説明書に従い、490 nm における吸光度を、参照波長を 700 nm に設定してマイクロプレートリーダー (SH-1000、Corona Electric) で測定した。

#### E 細胞増殖測定法

細胞を 96 ウェルプレートに  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、24 時間インキュベートした。その後、 $\text{Na}_2\text{S}$  ( $150 \mu\text{M}$ ) を 24 時間処置し、その培養液を除去して新しい培養液を 100  $\mu\text{l}$  加えた。細胞増殖は、3-[4,5-dimethylthiazonyl-2]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) を用いた MTT Cell Count Kit (Nacalai Tesque) によって評価した。付属の説明書に従い、570 nm における吸光度を、参照波長を 650 nm に設定してマイクロプレートリーダーで測定した。

#### F 細胞外及び細胞内 ATP 測定法

細胞外 ATP の測定では、細胞を 24 ウェルプレートに  $1.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、3 日間培養した。その後、培養液を除去して ACSF に置換し、37°C で 1 時間インキュベートした。高濃度のストック溶液の添加によって  $\text{Na}_2\text{S}$  (最終濃度  $0.001 - 150 \mu\text{M}$ ) を適用し、5 分後に測定用の試料 50  $\mu\text{l}$  を採取して煮沸した。残った ACSF を除去し、0.1 N NaOH を加えて細胞を剥離し、超音波破碎機で細胞を破壊した後、そのタンパク質量を Quick Start protein assay (Bio-Rad Laboratories) 及びマイクロプレートリーダー (SH-9000Lab、

Corona Electric) を用いて測定した。

細胞内 ATP の測定では、細胞を T-25 フラスコに  $2.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、10-15 日間培養した。その後、トリプシン処置により細胞を回収し、12 ウェルプレートに  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し 24 時間インキュベートした。培養液を除去し、sodium pyruvate (1 mM) および glutamine (2 mM) を添加した ACSF (0.5 mM glucose) に置換して 37°C で 1 時間インキュベートした。その後、各薬物を目的の濃度と時間で処置した。細胞内 ATP 量の測定は、Yang らの方法を用いた (Yang *et al.*, 2002)。実験液を全て除去した後、沸騰蒸留水 (1 ml/ウェル) を加えて、ピペッティングによって細胞を破壊し、これを回収した。この細胞破砕液を  $12,000 \times g$ 、4°C で遠心後、上清 20  $\mu$ l を試料とした。

試料中の ATP は、ATP Determination Kit (Invitrogen) を用いた luciferin/luciferase 法によって、マイクロプレートリーダーで発光を測定することで定量した。既知の濃度の ATP を含む標準溶液を用いて検量線を作製し、試料中の ATP 濃度を算出した。細胞外 ATP 量は、細胞タンパク質量当たりの値 (pmol/mg protein) として表した。

#### G 細胞内 cAMP 測定法

細胞を 60 mm ディッシュに  $5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、10-14 日間培養した。その後、培養液を除去して ACSF に置換し、37°C で 1 時間インキュベートした。室温で 10 分間静置した後、Na<sub>2</sub>S (150  $\mu$ M)、Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> (10  $\mu$ M)、または forskolin (100  $\mu$ M) を処置した。10 分後、ACSF を除去し、0.1 N HCl を適用して室温で 20 分間細胞を溶解した。細胞溶解液を  $1,000 \times g$ 、4°C で 10 分間遠心し、上清を試料とした。試料中の cAMP 濃度は、cAMP Enzyme Immunoassay Kit (Cayman Chemicals) を用いて、付属の説明書に従い、マイクロプレートリーダーで測定した。

#### H 細胞外乳酸測定法

細胞を T-25 フラスコに  $2.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、10-15 日間培養した。その後、トリプシン処置により細胞を回収し、12 ウェルプレートに  $9 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種して 24 時間インキュベートした。培養液を除去し、sodium pyruvate (1 mM) および glutamine (2 mM) を添加した ACSF (0.5 mM glucose) に置換して 37°C で 1 時間インキュベートした。各薬物を目的の濃度と時間で処置し、その後実験液を全量回収し、 $12,000 \times g$ 、4°C で遠心後、上清を試料とした。0.1 N NaOH を加えて細胞を剥離し、超音波破砕機で細胞を破壊した後、そのタンパク質量を Quick Start protein assay 及びマイクロプレートリーダーを用いて測定した。試料中の乳酸濃度の測定は、Schmidt の方法で行った (Schmidt, 2009)。試料 20  $\mu$ l に 160  $\mu$ l の蒸留水と 180  $\mu$ l の反応液 (5.6 mM NAD<sup>+</sup>、19.9 U/ml lactate

dehydrogenase、1.94 U/ml glutamic-pyruvic transaminase、250 mM sodium glutamate、pH 8.9 with NaOH) をマイクロプレートのウェル内で混合し、37°C、湿潤環境で 90 分間インキュベートした。乳酸から生じた NADH の検出は、ウェル内の試料を 340 nm で励起し、460 nm における蛍光をマイクロプレートリーダーで測定することで行った。乳酸量は、細胞タンパク質量当たりの値 (nmol/mg protein) として表した。

## I 使用溶液

本研究で使用した ACSF の組成は以下の通りである：138 mM NaCl、3.5 mM KCl、25 mM HEPES、10 mM glucose、1.25 mM CaCl<sub>2</sub>、1.2 mM MgCl<sub>2</sub>、pH 7.3 with NaOH。グルコース濃度を低下させた ACSF (0.5 mM glucose) の組成は以下の通りである：143 mM NaCl、3.5 mM KCl、25 mM HEPES、0.5 mM glucose、1.25 mM CaCl<sub>2</sub>、1.2 mM MgCl<sub>2</sub>、pH 7.3 with NaOH。Ca<sup>2+</sup>を除去した ACSF (Ca<sup>2+</sup>-free) では、ACSF 中の CaCl<sub>2</sub>を除去し、1 mM EGTA を加えた。

## J 試薬

使用した試薬は以下の通りである。

Dithiothreitol (DTT)、2-aminoethoxydiphenylborate (2APB)、allyl isothiocyanate (AITC)、L(+)-glutamine、emetine dihydrochloride、(aminooxy)acetic acid hemihydrochloride (AOAA) は富士フィルム和光純薬から、ATP disodium salt hydrate、cremophor EL、rotenone、*N*-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide hydrochloride (W7)、glutamic-pyruvic transaminase (GPT) は Sigma-Aldrich から、Na<sub>2</sub>S、Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub>、1-[6-amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]-2-(amino-5-methylphenoxy) ethane-*N,N,N',N'*tetraacetic acid, pentaacetoxymethyl ester (Fura-2 AM)、*O,O'*bis(2-aminoethyl)ethylene-glycol-*N,N,N',N'*tetraacetic acid (EGTA) は同仁堂から、theophylline-7-(*N*-4-isopropylphenyl) acetamide (HC-030031) は Tocris から、thapsigargin と 1-[6-[[[(17β)-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione (U73122) は Cayman Chemicals から、ryanodine は Abcam から、iodoacetic acid sodium salt (IA) と sodium pyruvate は Nacalai tesque から、lactate dehydrogenase (LDH) は TOYOBO から、β-NAD<sup>+</sup> は オリエンタル酵母工業 から、cyanide 4-trifluoromethoxyphenylhydrazine (FCCP) は Fluka から購入した。

## K 統計処理

それぞれの実験は、最低 3 つの異なる動物から得られた培養細胞を用いて行った。データは、平均値  $\pm$  標準誤差、 $n =$  例数で示した。二群間の有意差検定は **paired *t*-test** または **Student's *t*-test**、多重比較は **Dunnett's test** または **Tukey's test** により行った。 $P < 0.05$  を統計学的有意差水準とした。全ての統計解析は、エクセル統計 2008 (Social Survey Research information Co., Ltd.) を用いて行った。

### III 結果

#### A H<sub>2</sub>S の脊髄アストロサイト内 Ca<sup>2+</sup>シグナリングに対する効果

##### 1 H<sub>2</sub>S による細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇作用

最初に、H<sub>2</sub>S ドナーである Na<sub>2</sub>S を用いて、H<sub>2</sub>S が脊髄培養アストロサイトの細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) にどのような作用をもたらすのかを検討した。アストロサイトの静止時の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> は、 $38.3 \pm 1.3$  nM ( $n = 379$ ) であった。Na<sub>2</sub>S (10  $\mu$ M-1 mM) を 10 分間適用すると、100  $\mu$ M 以上の濃度で [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> が有意に上昇した (図 2A, B)。Na<sub>2</sub>S を除去してから 3 分後に [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> は、Na<sub>2</sub>S (100  $\mu$ M) の場合は静止時の濃度まで回復したが、Na<sub>2</sub>S (1 mM) の場合は高いまま維持された ( $\Delta$ [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> at 0  $\mu$ M Na<sub>2</sub>S:  $8.98 \pm 1.24$  nM, 100  $\mu$ M:  $15.40 \pm 2.99$  nM, 1 mM:  $67.61 \pm 7.41$  nM,  $P < 0.01$  vs. 0  $\mu$ M Na<sub>2</sub>S Dunnett's test,  $n = 93-100$ )。

Na<sub>2</sub>S による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇の反復性を確かめるために、Na<sub>2</sub>S (150  $\mu$ M) を 10 分間適用した後、10 分間の間隔を空けて、もう一度 Na<sub>2</sub>S を適用したところ、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> は再び上昇した。また、1 回目の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇 ( $\Delta C_1$ ) に比べて、2 回目の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇 ( $\Delta C_2$ ) の方が大きい傾向が見られた (図 2C, D,  $P = 0.09$ , paired t-test,  $n = 88$ )。

##### 2 H<sub>2</sub>S の脊髄アストロサイトに対する毒性の検討

本研究で用いた濃度の Na<sub>2</sub>S が、脊髄アストロサイトに毒性を示すかを検討するために、Na<sub>2</sub>S (1  $\mu$ M-1 mM) 処置下でアストロサイトを 6 時間培養した時の、細胞外に遊離される lactate dehydrogenase (LDH) の量を検討した。LDH は細胞膜が傷害された場合に、急速に細胞外へ遊離する酵素である。Na<sub>2</sub>S は、いずれの濃度においても、細胞外への LDH の遊離を増加させなかった (図 3A)。さらに、Na<sub>2</sub>S (150  $\mu$ M) の適用は、24 時間後の MTT アッセイにおける細胞増殖を変化させなかった (図 3B)。以上の結果から、150  $\mu$ M 以下の濃度において Na<sub>2</sub>S はアストロサイトに毒性を示さないことが示唆された。よって以下の実験では Na<sub>2</sub>S を 150  $\mu$ M 以下の濃度で使用した。

#### B H<sub>2</sub>S による細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇機構

##### 1 H<sub>2</sub>S 誘発性 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇における細胞外からの Ca<sup>2+</sup>流入の関与

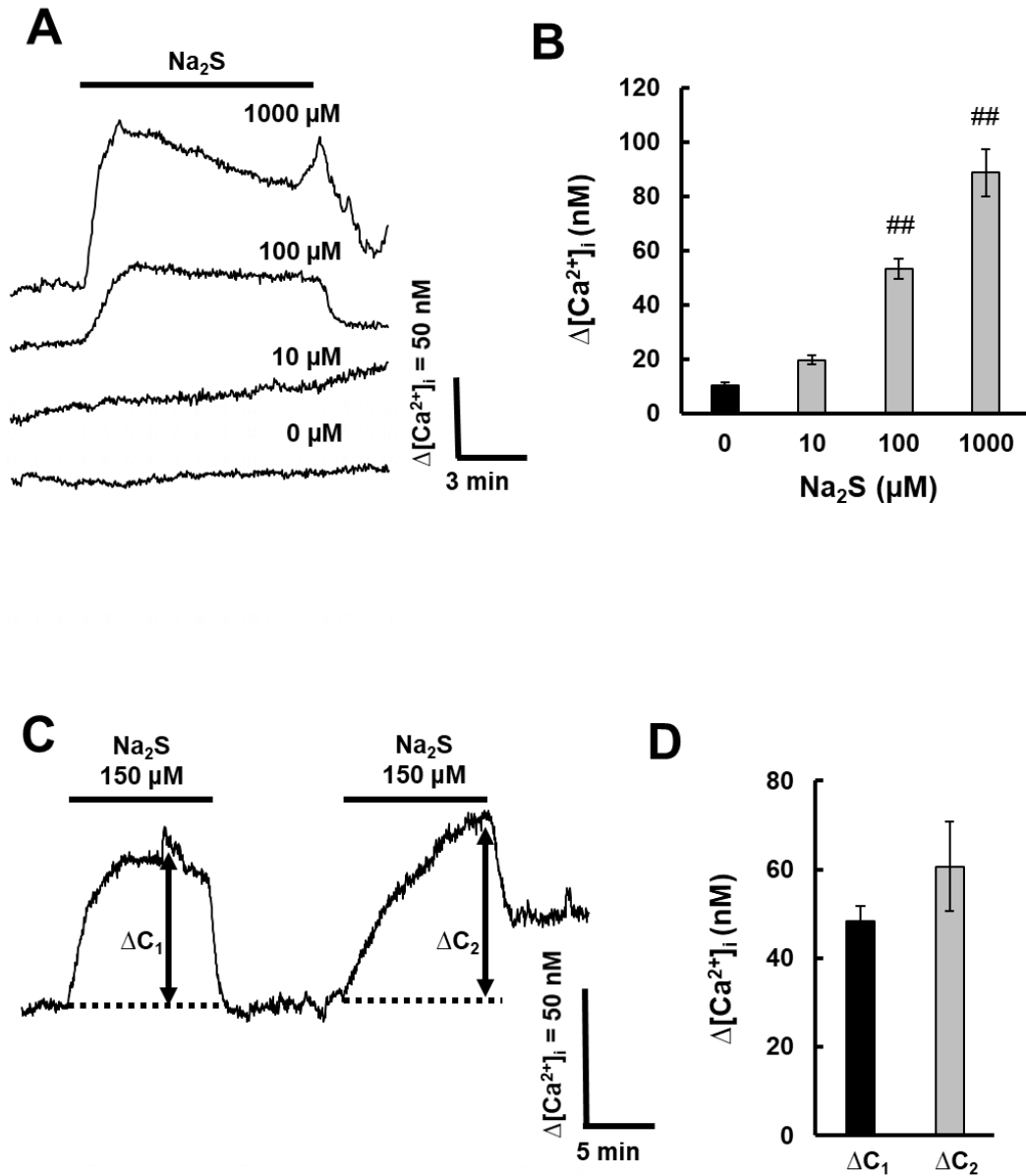


図 2. H<sub>2</sub>S によるラット脊髄培養アストロサイトの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇

(A) Na<sub>2</sub>S (10, 100 μM 及び 1 mM) による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>変化。(B) Na<sub>2</sub>S (10 μM-1 mM、10 分間) 適用による最大[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇値。##*P* < 0.01 vs. 0 μM Na<sub>2</sub>S (Dunnett's test)、*n* = 89-100 (3 動物からの培養) (C) Na<sub>2</sub>S (150 μM、10 分間) の 2 回適用による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>変化。

(D) 1 回目 (ΔC<sub>1</sub>) および 2 回目 (ΔC<sub>2</sub>) の Na<sub>2</sub>S (150 μM、10 分間) 適用による最大[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇値。*n* = 88 (3 動物からの培養) データは平均値 ± 標準誤差で示した。

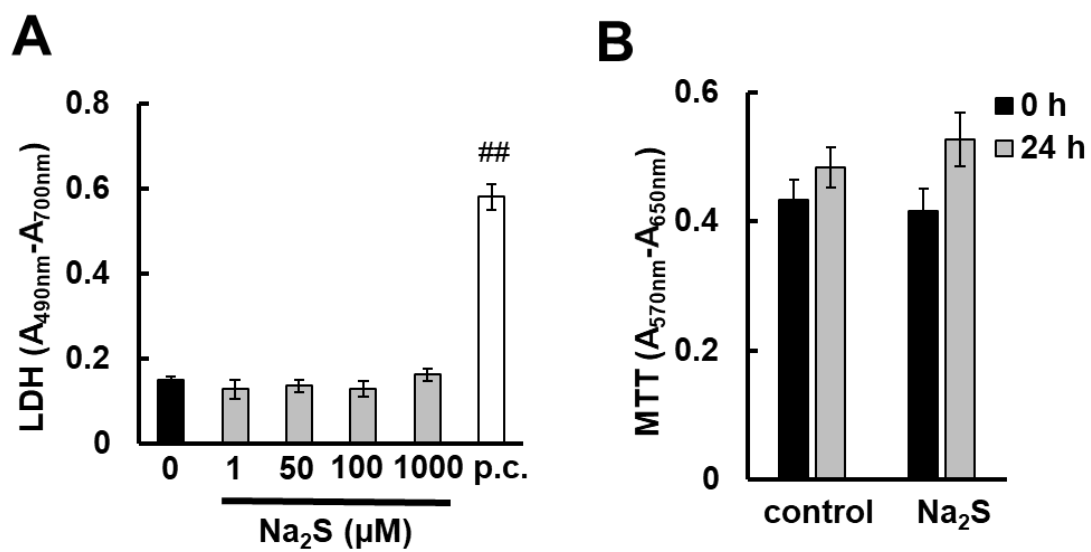


図 3. H<sub>2</sub>S のアストロサイトに対する毒性作用の検討

(A) Na<sub>2</sub>S (0-1 mM、6 時間) の細胞外への LDH 放出に対する効果。陽性コントロール (p.c.) は溶解させた細胞の結果を示す。<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs. 0 μM Na<sub>2</sub>S (Dunnett's test)、 $n = 3$ 。(B) MTT 試験による Na<sub>2</sub>S (150 μM) の細胞増殖への影響。 $n = 5$ 。データは平均値 ± 標準誤差で示した。

海馬アストロサイトにおいて、 $\text{H}_2\text{S}$  は TRPA1 のスルフヒドリル化による活性化と、それによる細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入を引き起こす (Nagai *et al.*, 2004; Kimura *et al.*, 2013)。そこで、脊髄アストロサイトにおける  $\text{H}_2\text{S}$  による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇機構について、TRPA1 の関与を検討した。 $\text{Na}_2\text{S}$  (150  $\mu\text{M}$ ) による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は、TRPA1 チャネル阻害薬である HC-030031 (10  $\mu\text{M}$ ) によって抑制されなかった (図 4A, B)。また、TRPA1 チャネル作動薬である AITC (10  $\mu\text{M}$ ) の適用は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を引き起こさなかった (図 4C)。これらの結果から、脊髄アストロサイトにおける  $\text{H}_2\text{S}$  誘発性  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は、TRPA1 チャネルの活性に依存しないことが示唆された。次に、 $\text{H}_2\text{S}$  による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇に細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入が関与するかを検討した。 $\text{Na}_2\text{S}$  (150  $\mu\text{M}$ ) による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は、細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  を除去しても抑制されなかった (図 4D, E)。

## 2 $\text{H}_2\text{S}$ 誘発性 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇における小胞体からの $\text{Ca}^{2+}$ 遊離の関与

### a) Sarco/endoplasmic reticulum $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) 阻害薬の効果

ここまでの結果から、 $\text{H}_2\text{S}$  による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離によって起こることが考えられた。そこで、小胞体膜に発現する SERCA の阻害剤である thapsigargin (1  $\mu\text{M}$ ) によって小胞体内の  $\text{Ca}^{2+}$  を枯渇させた後で、 $\text{Na}_2\text{S}$  (150  $\mu\text{M}$ ) を適用した。Thapsigargin の適用は  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を上昇させ、その後の  $\text{Na}_2\text{S}$  による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は有意に抑制された (図 5A, B)。以上の結果から、 $\text{H}_2\text{S}$  は脊髄アストロサイトにおいて、主に小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離によって、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を引き起こすことが明らかとなった。

### b) 小胞体膜上の $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの関与

小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離には、 $\text{IP}_3$  受容体や ryanodine 受容体といった小胞体膜上に発現する  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルが関与する。そこで、これらの  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルが  $\text{H}_2\text{S}$  による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇に関与するかどうかを検討した。細胞内での inositol 1,4,5-triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) 合成を抑制するため phospholipase C 阻害剤である U73122 (5  $\mu\text{M}$ ) を 60 分間処置すると、 $\text{Na}_2\text{S}$  (150  $\mu\text{M}$ ) による  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は抑制されず、むしろ増強された (図 6A, D)。

次に、ryanodine 受容体が  $\text{H}_2\text{S}$  による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇に関与するかを検討した。高濃度の ryanodine は、ryanodine 受容体の開口を抑制することが知られている (Willmott *et al.*, 2000)。本研究で用いた培養アストロサイトでも、ryanodine (1  $\mu\text{M}$ ) は  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を引き起こしたが、この反応は ryanodine (100  $\mu\text{M}$ ) を 30 分間事前に処置すると抑制された (図 6B)。また、同様の条件下では  $\text{Na}_2\text{S}$  (150  $\mu\text{M}$ ) による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は抑制されなかった (図 6C, D)。以上の結果から、 $\text{IP}_3$  受容体や ryanodine 受容体は  $\text{H}_2\text{S}$  による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇に関与しないと考えられる。

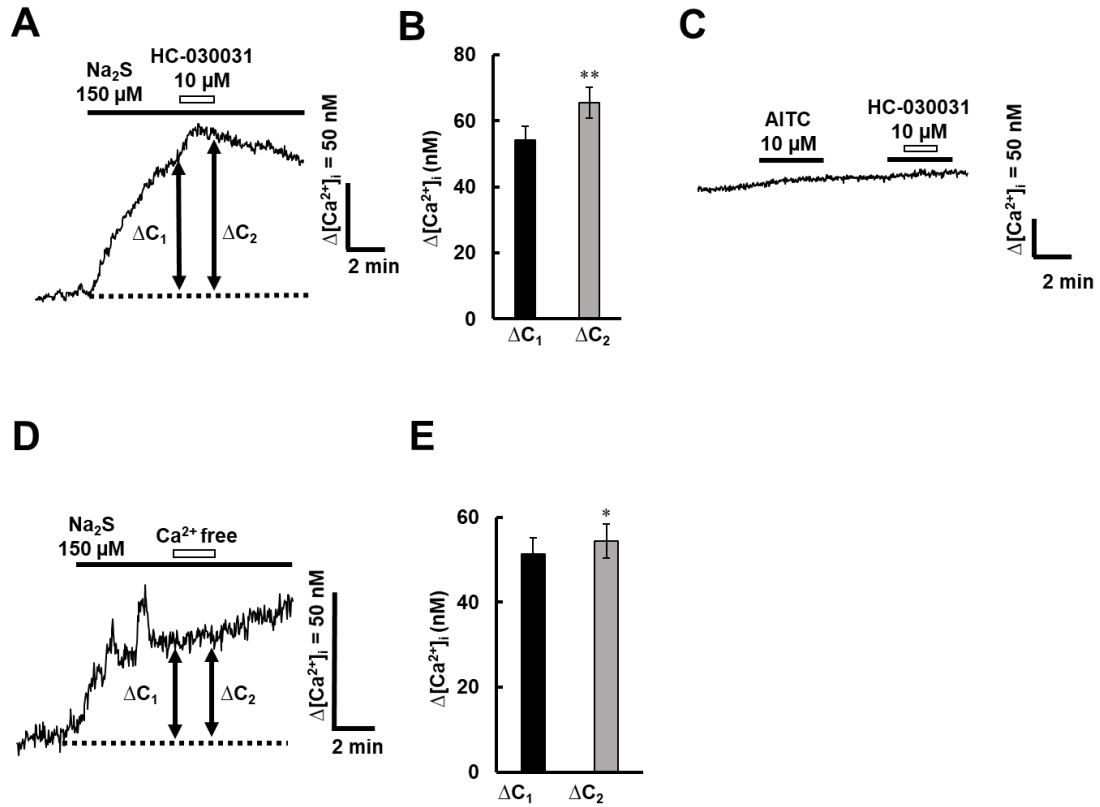


図 4. 脊髄アストロサイトにおける  $Ca^{2+}$  流入に依存しない  $H_2S$  による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇

(A)  $Na_2S$  (150  $\mu M$ ) による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇に対する HC-030031 (10  $\mu M$ 、2 分間) の効果。 $\Delta C_1$ 、 $\Delta C_2$  はそれぞれ HC-030031 の適用前後における  $[Ca^{2+}]_i$  上昇値。(B) (A) における  $\Delta C_1$  および  $\Delta C_2$  値をまとめたもの。 $**P < 0.01$  (paired  $t$ -test)、 $n = 74$  (4 動物からの培養) (C) HC-030031 非存在下及び存在下における AITC (10  $\mu M$ ) の  $[Ca^{2+}]_i$  に対する効果。同様の実験を 4 回実施した (4 動物からの培養)。(D)  $Na_2S$  (150  $\mu M$ ) による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇に対する細胞外  $Ca^{2+}$  除去の効果。 $\Delta C_1$ 、 $\Delta C_2$  はそれぞれ  $Ca^{2+}$  除去前後における  $[Ca^{2+}]_i$  上昇値。(E) (D) における  $\Delta C_1$  および  $\Delta C_2$  値をまとめたもの。 $*P < 0.05$  (paired  $t$ -test)、 $n = 94$  (4 動物からの培養) データは平均値  $\pm$  標準誤差で示した。

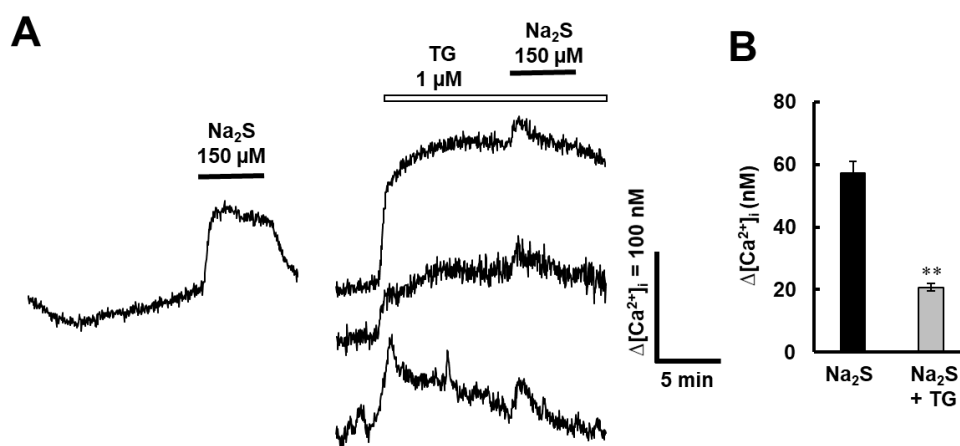


図 5. H<sub>2</sub>S による小胞体からの Ca<sup>2+</sup>遊離

(A) Thapsigargin (TG、1  $\mu$ M) 非存在下 (左) または存在下 (右) における、Na<sub>2</sub>S (150  $\mu$ M) による  $[Ca^{2+}]_i$  反応。(B) (A) における Na<sub>2</sub>S による最大  $[Ca^{2+}]_i$  上昇値。\*\* $P < 0.01$  (Student's  $t$  test)、 $n = 67$  [Na<sub>2</sub>S]、76 [Na<sub>2</sub>S + TG] (3 動物からの培養) データは平均値  $\pm$  標準誤差で示した。

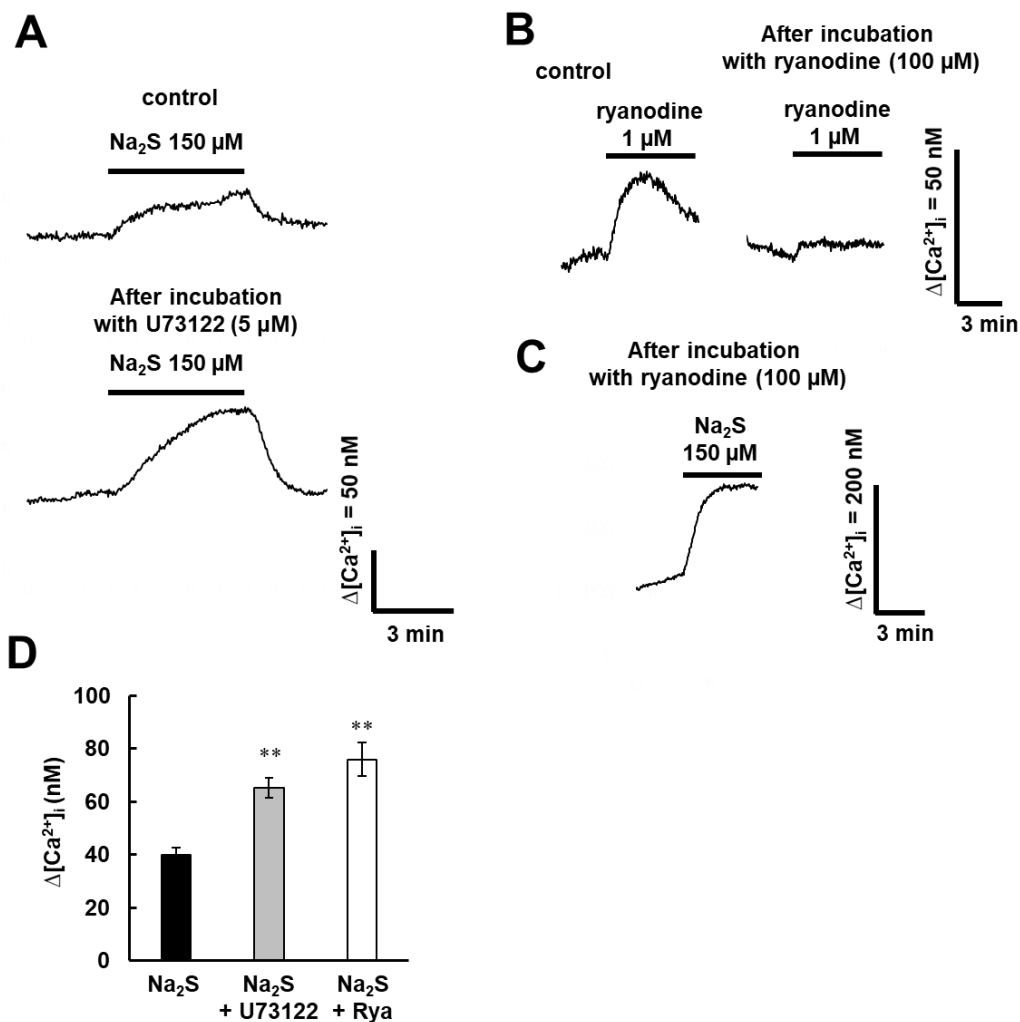


図 6. H<sub>2</sub>S による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇に対する PLC 阻害および ryanodine 受容体阻害の効果

(A) U73122 (5 μM、60 分間) 非存在下 (左) または存在下 (右) における Na<sub>2</sub>S (150 μM、5 分間) による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>反応。(B) Ryanodine (100 μM、30 分) 非処置下 (左) または処置後 (右) における ryanodine (1 μM) による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>反応。(C) Ryanodine (100 μM、30 分) 存在下における Na<sub>2</sub>S (150 μM) による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>反応。(D) (A) 及び (C) における Na<sub>2</sub>S (150 μM) による最大[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇値をまとめたもの。##*P* < 0.01 vs. Na<sub>2</sub>S (Dunnett's test)、n = 87 [Na<sub>2</sub>S]、87 [Na<sub>2</sub>S + U73122]、99 [Na<sub>2</sub>S + Rya] (3 動物からの培養) データは平均値 ± 標準誤差で示した。

### 3 $\text{Ca}^{2+}$ シグナルにおける $\text{H}_2\text{S}$ と ATP の相互作用

#### a) 脊髄アストロサイトにおける ATP による細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇

アストロサイトの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は、隣接するニューロンとの細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を持つ (Scemes and Giaume, 2006; Guerra-Gomes *et al.*, 2018)。このアストロサイトの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は、ATP などの神経伝達物質によって引き起こされる。ATP は G タンパク質共役型受容体である P2 受容体に結合し、phospholipase C の活性化とそれに続く  $\text{IP}_3$ シグナル経路を刺激することで、 $\text{IP}_3$ 受容体を介する小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離を引き起こす (Salter and Hicks, 1994, 1995; Guthrie *et al.*, 1999)。

まず、脊髄アストロサイトにおける ATP による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルへの効果を検討した。ATP (10  $\mu\text{M}$ ) を 30 秒間適用すると、ほとんどすべてのアストロサイトにおいて一過性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が観察され、一部の細胞ではその後に小さなプラトー相も観察された (図 7A)。この $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は、phospholipase C の阻害剤である U73122 (5  $\mu\text{M}$ ) を 60 分間前処置すると、ほぼ完全に抑制された (図 7A, B)。このことから、ATP (10  $\mu\text{M}$ ) は主に  $\text{IP}_3$ シグナリング経路を介した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を引き起こすことが示唆される。1 回目の ATP 適用の 15 分後に、2 回目の ATP 適用を行うと、再び $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は上昇した。このとき、1 回目の ATP 誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇 ( $\Delta\text{ATP}_1$ ) と、2 回目の ATP 誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇 ( $\Delta\text{ATP}_2$ ) の比 ( $\Delta\text{ATP}_2/\Delta\text{ATP}_1$ ) は一定だった。また、 $\text{IP}_3$ 受容体阻害剤である 2-aminoethoxydiphenyl borate (2APB, 100  $\mu\text{M}$ ) の 2 分間の適用は、単独でわずかに $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させ、 $\Delta\text{ATP}_2/\Delta\text{ATP}_1$ を低下させた (図 7C, D)。2APB による ATP 誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の抑制は部分的であり、2APB の処置時間を 10 分間に延長してもさらなる抑制は見られなかった (図 7D)。このことから、2APB に感受性の低いサブタイプの  $\text{IP}_3$ 受容体が脊髄アストロサイトに発現していることが示唆された (Saleem *et al.*, 2014)。したがって、以降の実験で 2APB は使用しなかった。以上の結果から、 $\text{H}_2\text{S}$  と ATP の両方が、主に小胞体から  $\text{Ca}^{2+}$ を遊離させていることが示唆された。

#### b) ATP 誘発性 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇に対する $\text{H}_2\text{S}$ の抑制作用

次に、 $\text{H}_2\text{S}$  の ATP 誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に与える影響を検討した。1 回目の ATP (10  $\mu\text{M}$ 、30 秒間) 適用の後、 $\text{Na}_2\text{S}$  (0.1-150  $\mu\text{M}$ ) を 10 分間処置し、 $\text{Na}_2\text{S}$  存在下で 2 回目の ATP 適用を行った。1 回目の ATP 適用の後、100  $\mu\text{M}$  以上の  $\text{Na}_2\text{S}$  は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させた (図 8A, B)。また、 $\Delta\text{ATP}_2/\Delta\text{ATP}_1$ は 100  $\mu\text{M}$  以上の  $\text{Na}_2\text{S}$  存在下で有意に低下した (図 8C)。以上の結果から、 $\text{H}_2\text{S}$  による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が ATP 誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の抑制に関与していることが示唆された。

次に、ATP による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が、 $\text{H}_2\text{S}$  による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に影響を与えるかを検討した。ATP (10  $\mu\text{M}$ 、30 秒間) を 3 回適用すると (適用間隔は 1-2 回目:4 分、2-3 回目:11 分)、

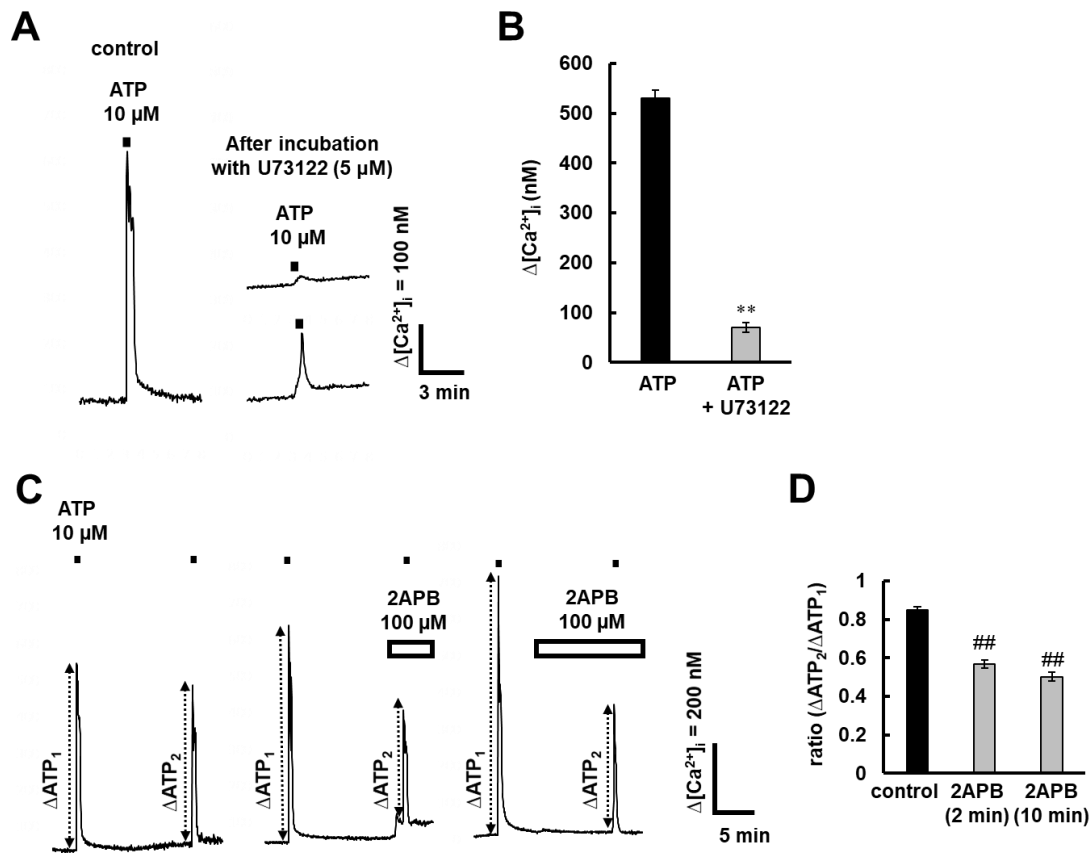


図 7. 脊髄アストロサイトにおける ATP による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇

(A) ATP (10  $\mu$ M、30 秒間) による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  反応 (左)。U73122 (5  $\mu$ M、60 分間) 存在下における ATP による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  反応 (右)。ほとんど反応が消失した場合 (上段) と小さな反応が観察された場合 (下段) のそれぞれの典型例。(B) (A) における ATP による最大  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇値。\*\* $P < 0.01$  (Student's  $t$ -test)、 $n = 81$  [ATP]、89 [ATP + U73122] (3 動物からの培養) (C) 2APB (100  $\mu$ M) 非存在下 (左)、2 分間処置後 (中央)、または 10 分間処置後 (右) における ATP (10  $\mu$ M、30 秒間) による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  反応。 $\Delta\text{ATP}_1$  および  $\Delta\text{ATP}_2$  はそれぞれ、1 回目および 2 回目の ATP 適用による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇値。(D) (C) における  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇値の比 ( $\Delta\text{ATP}_2/\Delta\text{ATP}_1$ ) をまとめたもの。## $P < 0.01$  vs. control (Dunnett's test)、 $n = 80$  [control]、92 [2APB 2 min]、92 [2APB 10 min] (3 動物からの培養) データは平均値  $\pm$  標準誤差で示した。

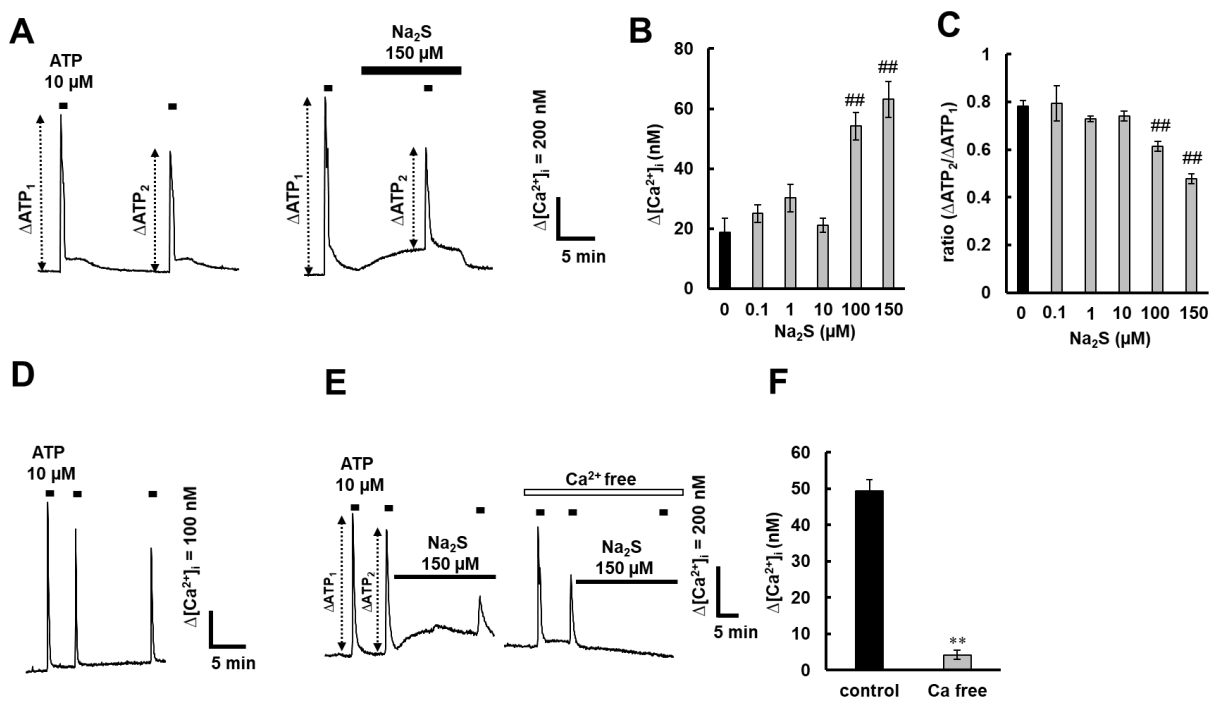


図 8. 脊髄アストロサイトにおける ATP 誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する  $H_2S$  の作用

(A)  $Na_2S$  ( $150 \mu M$ ) 非存在下 (左) または存在下 (右) における ATP ( $10 \mu M$ ) による $[Ca^{2+}]_i$ 反応。 $\Delta ATP_1$ および $\Delta ATP_2$ はそれぞれ、1回目および2回目の ATP 適用による最大 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇値。(B) 1回目の ATP 適用後における、 $Na_2S$  ( $0.1$ - $150 \mu M$ 、10 分間) による最大 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇値。<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs.  $0 \mu M$   $Na_2S$  (Dunnett's test)、 $n = 97$ - $136$ 、3-4 動物からの培養。(C)  $Na_2S$  ( $0.1$ - $150 \mu M$ 、10 分) 適用時の ATP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇値の比 ( $\Delta ATP_2/\Delta ATP_1$ ) をまとめたもの。<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs.  $0 \mu M$   $Na_2S$  (Dunnett's test)、 $n = 97$ - $136$  (3-4 動物からの培養) (D) 3 回の ATP ( $10 \mu M$ ) 適用による $[Ca^{2+}]_i$ 反応。(E) 細胞外  $Ca^{2+}$ 非除去下 (左) または除去下 (右) での 2 回目の ATP 適用後における  $Na_2S$  ( $150 \mu M$ ) による $[Ca^{2+}]_i$ 反応。(F) (E) における  $Na_2S$  による最大 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇値。<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  (Student's  $t$ -test)、 $n = 87$  [control]、76 [ $Ca^{2+}$  free] (3 動物からの培養) データは平均値  $\pm$  標準誤差で示した。

全ての適用で  $[Ca^{2+}]_i$  が上昇した (図 8D)。このことは、ATP による  $Ca^{2+}$ 遊離後、小胞体に  $Ca^{2+}$ が取り込まれ、小胞体内の  $Ca^{2+}$ 濃度が一定に保たれているためと考えられる。次に小胞体の  $Ca^{2+}$ 再充填を抑制するため、細胞外  $Ca^{2+}$ 除去下で実験を行った。細胞外  $Ca^{2+}$ 除去下では、2 回目の ATP 適用による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は有意に減少した ( $\Delta ATP_2/\Delta ATP_1$ , control:  $0.79 \pm 0.02$ ,  $n = 87$ , vs.  $Ca^{2+}$  free:  $0.46 \pm 0.03$ ,  $n = 76$ ,  $P < 0.01$ , Student's t-test)。このことから、細胞外  $Ca^{2+}$ 除去下では 2 回の ATP 適用によって小胞体内  $Ca^{2+}$ 量が維持できなくなっていると考えられる。このとき、2 回目の ATP 適用による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇の後では、 $Na_2S$  による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇がほとんど見られなかった (図 8E, F)。また、細胞外  $Ca^{2+}$ 除去下で  $Na_2S$  適用後に 3 回目の ATP 適用を行うと、 $[Ca^{2+}]_i$  上昇 ( $\Delta ATP_3$ ) はほとんど見られなかった (図 8E, F、 $\Delta ATP_3$ , control:  $108.4 \pm 10.8$ ,  $n = 87$ , vs.  $Ca^{2+}$  free:  $19.0 \pm 5.4$ ,  $n = 76$ ,  $P < 0.01$ , Student's t-test)。これらの結果から、ATP と  $H_2S$  は共通の小胞体から  $Ca^{2+}$ を遊離させると考えられる。

#### c) $H_2S$ による ATP 放出作用の検討

アストロサイトにおいて、 $[Ca^{2+}]_i$  上昇がエクソサイトーシスによる ATP 放出を引き起こすことが報告されており (Pryazhnikov and Khiroug, 2008)、 $H_2S$  による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が脊髄アストロサイトから ATP を放出させ、これが  $[Ca^{2+}]_i$  上昇に関与する可能性が考えられた。そこで、 $Na_2S$  ( $0.001$ - $150 \mu M$ 、5 分間) 適用後の細胞外 ATP 量を測定したところ、いずれの濃度においても ATP 量に変化は見られなかった (図 9)。

### C $H_2S$ 誘発性 $Ca^{2+}$ 濃度上昇へのスルフヒドリル化と cAMP の関与の検討

#### 1 スルフヒドリル化の関与

$H_2S$  による小胞体を介した  $[Ca^{2+}]_i$  上昇のメカニズムを明らかにするために、まずタンパク質のスルフヒドリル化が関与するかを検討した。共有結合修飾の一種であるスルフヒドリル化は、還元剤である dithiothreitol (DTT) によって可逆的に阻害できることが知られている (Cooper and Brown, 2008)。そこで、 $Na_2S$  ( $150 \mu M$ ) による  $[Ca^{2+}]_i$  上昇中に DTT ( $1 mM$ ) を適用したところ、 $[Ca^{2+}]_i$  上昇は抑制されなかった (図 10A)。また、DTT は ATP 誘発性  $[Ca^{2+}]_i$  上昇の  $H_2S$  による抑制作用にも影響しなかった (図 10B, C)。 $H_2S_n$  は  $H_2S$  よりも低い濃度でスルフヒドリル化を引き起こす (Kimura *et al.*, 2013)。そのため、 $H_2S_n$  ドナーである  $Na_2S_3$  が、 $Na_2S$  と同様に ATP 誘発性  $[Ca^{2+}]_i$  上昇を抑制するかを検討した。1 回目の ATP 適用後に、 $Na_2S_3$  ( $0.1$ - $10 \mu M$ ) を適用すると、 $Na_2S_3$  ( $10 \mu M$ ) はわずかに  $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させた。一方、ATP 誘発性  $[Ca^{2+}]_i$  上昇に対して、 $Na_2S_3$  ( $0.1 \mu M$ ) で有意な減少が見られたが、 $Na_2S_3$  ( $1$  及び  $10 \mu M$ ) は影響を与えなかった (図 10D-F)。以上の結果から、

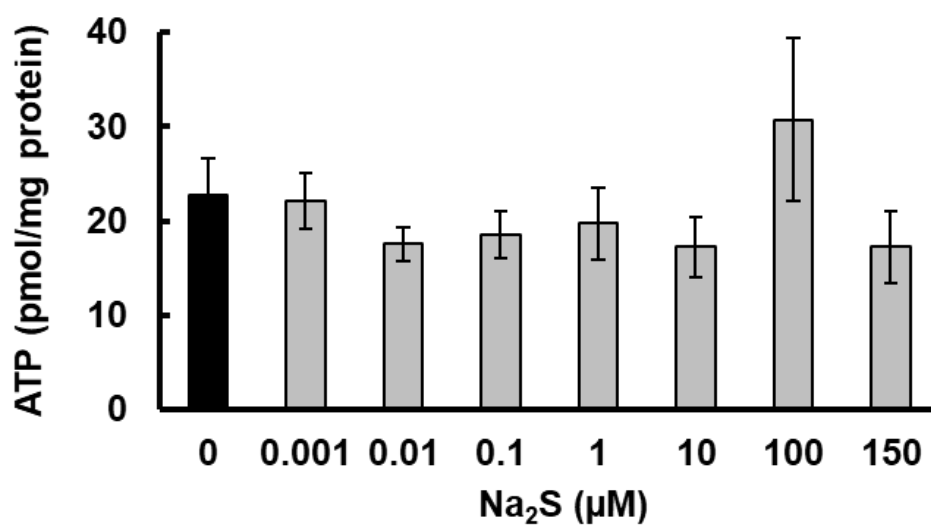


図 9. 脊髄アストロサイトにおける H<sub>2</sub>S の ATP 放出に対する効果

Na<sub>2</sub>S (0.001-150 μM、5 分間) 適用後の細胞外 ATP 量。n = 4。データは平均値 ± 標準誤差で示した。

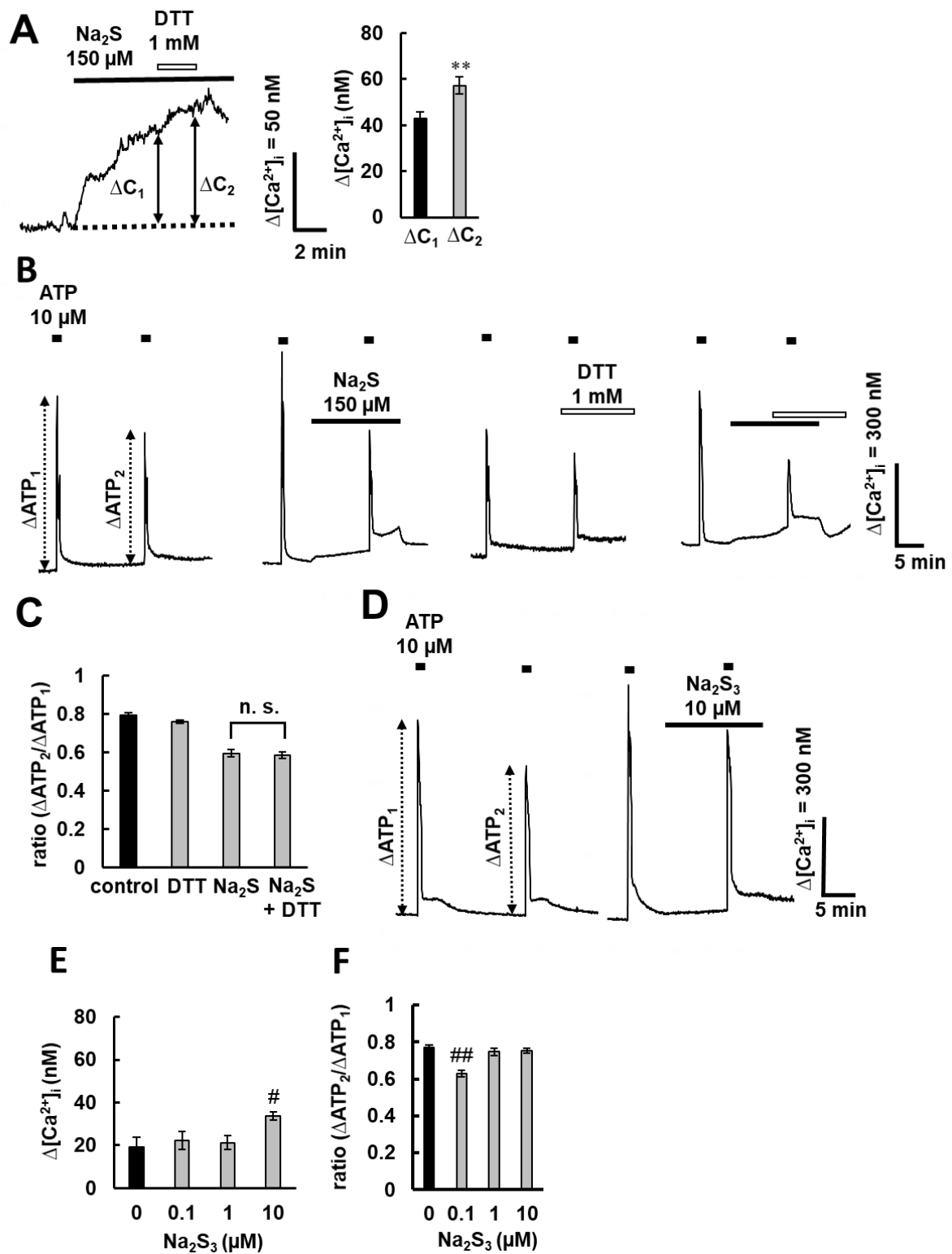


図 10. スルフヒドリル化に依存しない  $\text{H}_2\text{S}$  による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇

(A)  $\text{Na}_2\text{S}$  ( $150\ \mu\text{M}$ ) による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇に対する DTT ( $1\ \text{mM}$ ) の効果 (左)。 $\Delta\text{C}_1$ 、 $\Delta\text{C}_2$  はそれぞれ DTT 適用前後における  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇値。右は  $\Delta\text{C}_1$  および  $\Delta\text{C}_2$  値をまとめたもの。  
\*\* $P < 0.01$  (paired t-test)、 $n = 88$  (3 動物からの培養) (B) 左から  $\text{Na}_2\text{S}$  ( $150\ \mu\text{M}$ ) 及び DTT ( $1\ \text{mM}$ ) の非存在下、存在下、または共処置下における ATP ( $10\ \mu\text{M}$ ) による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  反応。(C)  $\text{Na}_2\text{S}$  ( $150\ \mu\text{M}$ 、10 分間) 及び DTT ( $1\ \text{mM}$ ) 適用時の ATP による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇値の比 ( $\Delta\text{ATP}_2/\Delta\text{ATP}_1$ ) をまとめたもの。n.s., not significant ( $P = 0.42$ , Student's *t*-test)  $n = 126$  [control]、131 [DTT]、126 [ $\text{Na}_2\text{S}$ ]、123 [DTT +  $\text{Na}_2\text{S}$ ] (4 動物からの培養) (D)  $\text{Na}_2\text{S}_3$  ( $10\ \mu\text{M}$ ) 非存在下 (左) または存在下 (右) における ATP ( $10\ \mu\text{M}$ 、30 秒間) による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  反応。(E) 1 回目の ATP 適用後における  $\text{Na}_2\text{S}_3$  ( $0.1$ - $10\ \mu\text{M}$ 、10 分間) による最大  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇値をまとめたもの。 $\#P < 0.05$  vs.  $0\ \mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{S}_3$  (Dunnett's test)、 $n = 116$ -134 (4 動物からの培養) (F)  $\text{Na}_2\text{S}_3$  ( $0.1$ - $10\ \mu\text{M}$ 、10 分間) 適用時の ATP による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇値の比 ( $\Delta\text{ATP}_2/\Delta\text{ATP}_1$ ) をまとめたもの。 $\#\#P < 0.01$  vs.  $0\ \mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{S}_3$  (Dunnett's test)、 $n = 116$ -134 (4 動物からの培養) データは平均値  $\pm$  標準誤差で示した。

H<sub>2</sub>S による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇にスルフヒドリル化はほとんど関与していないと考えられる。

## 2 細胞内 cAMP の関与

H<sub>2</sub>S は、細胞内 cAMP 濃度を変化させることで、細胞機能に影響を与えることが知られている (Cao *et al.*, 2018)。一般に、細胞内 cAMP 濃度の上昇は protein kinase A を活性化させ、これは小胞体膜上に発現する多くの Ca<sup>2+</sup>チャネルの活性を制御する (Desouza *et al.*, 2002; Zalk *et al.*, 2007)。本研究で用いた培養アストロサイトに、Na<sub>2</sub>S (150 μM) または Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> (10 μM) を 10 分間適用すると、細胞内 cAMP 量は変化しなかった (図 11)。一方、adenylate cyclase 活性化薬である forskolin (100 μM) は、細胞内 cAMP 量を上昇させた。これらの結果から、H<sub>2</sub>S による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇に細胞内 cAMP 量の変化は関与しないことが示唆された。

## D H<sub>2</sub>S による Ca<sup>2+</sup>シグナリングと代謝変化

ここまでの結果から、H<sub>2</sub>S がタンパク質のスルフヒドリル化や細胞内 cAMP 量の変化といった既知のシグナル経路を介して小胞体から Ca<sup>2+</sup>を遊離させる可能性は低いことが示された。また、H<sub>2</sub>S による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇に Ca<sup>2+</sup>流入は関与していなかったが (図 4)、小胞体内の Ca<sup>2+</sup>を枯渇させても、H<sub>2</sub>S による Ca<sup>2+</sup>反応が完全には抑制されなかった (図 5)。小胞体以外の主要な Ca<sup>2+</sup>ストアには、ミトコンドリアが第一に挙げられる。H<sub>2</sub>S はミトコンドリア電子伝達鎖を抑制するため、H<sub>2</sub>S が細胞内のエネルギー代謝に対しても何らかの変化を及ぼすことが予想される。そこで、以降の実験では、H<sub>2</sub>S によるアストロサイトのエネルギー代謝の変化と [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇の関係を検討した。

### 1 H<sub>2</sub>S によるグルコース代謝変化の関与

中枢神経系の実質内におけるグルコース濃度は 0.5-2 mM の範囲であり (McNay and Gold, 1999; De Vries *et al.*, 2003)、本実験でも使用している典型的な組成の ACSF に含まれる濃度よりも低い (An *et al.*, 2008)。細胞外グルコース濃度の変化に応じて、筋芽細胞やアストロサイトでは電子伝達系の活性が変化することが報告されている (Williams *et al.*, 2015; Staricha *et al.*, 2020)。低グルコース条件では、アストロサイトにおいて電子伝達鎖の抑制による NADH 上昇が明瞭に観察できるという報告もある (Wilhelm and Hirrlinger, 2011)。

細胞外グルコース濃度が 0.5 mM の条件では 10 mM の条件に比べて、Na<sub>2</sub>S (150 μM) による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇が有意に高かった (図 12A, B)。これより、H<sub>2</sub>S による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇には、グルコース代謝が関与することが示唆された。また、以降は特に記述がない限り、細胞外

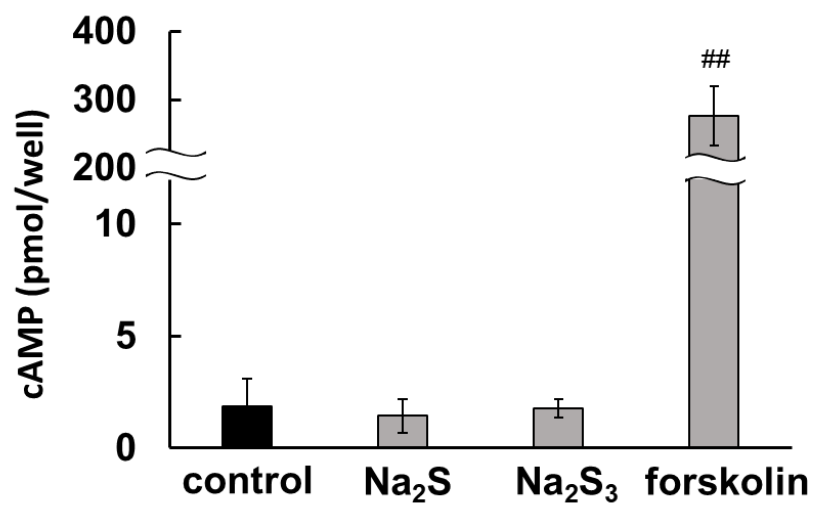


図 11. 細胞内 cAMP 量に対する H<sub>2</sub>S 及び H<sub>2</sub>S<sub>n</sub> の効果

Na<sub>2</sub>S (150 μM)、Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> (10 μM)、forskolin (100 μM) を 10 分間処置した時の 1 ウェル当たりの細胞内 cAMP 量。##P < 0.01 vs. control (Dunnett's test)、n = 3。データは平均値 ± 標準誤差で示した。

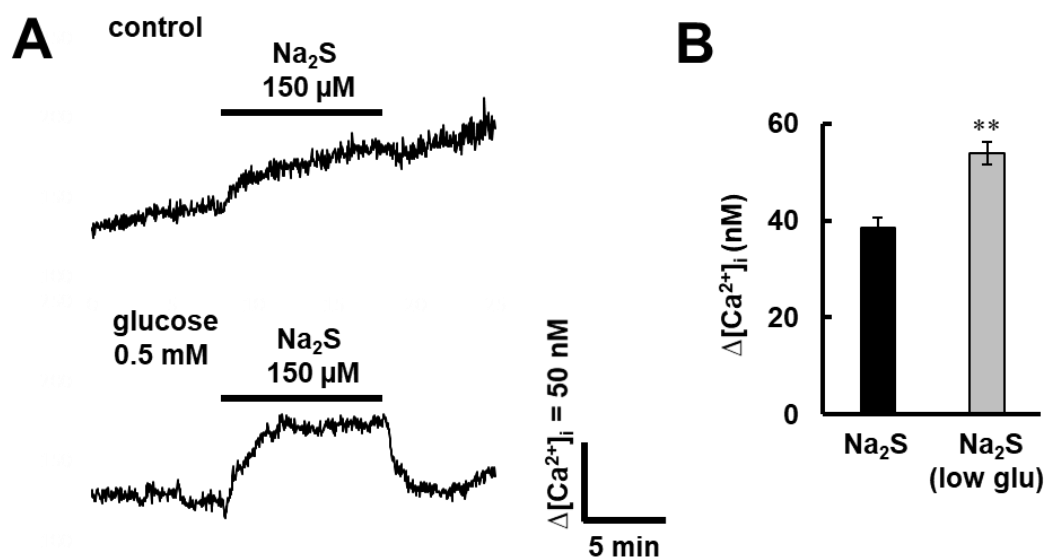


図 12.  $H_2S$  による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇へのグルコース代謝の関与

(A) 細胞外 glucose 濃度が 10 mM (control) または 0.5 mM であるときの、 $Na_2S$  (150  $\mu M$ 、10 分間) による $[Ca^{2+}]_i$ 反応。(B) (A) における  $Na_2S$  による最大 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇値。 $**P < 0.01$  (Student's  $t$ -test)、 $n = 79$  [ $Na_2S$ ]、75 [ $Na_2S$  (low glu)] (3 動物からの培養) データは平均値  $\pm$  標準誤差で示した。

グルコース濃度が 0.5 mM の条件で実験を行った。

## 2 H<sub>2</sub>S 誘発性 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇における ROS の関与

H<sub>2</sub>S が電子伝達鎖を抑制すると、細胞内の活性酸素種 (reactive oxygen species、ROS) 量が上昇することが報告されている (Eghbal *et al.*, 2004)。ROS は、小胞体膜上の Ca<sup>2+</sup>チャネルや Ca<sup>2+</sup>ポンプの活性を変える事例が多数報告されている (Görlach *et al.*, 2015)。そのため、H<sub>2</sub>S によって増加した ROS が小胞体から Ca<sup>2+</sup>を遊離させる可能性が考えられた。H<sub>2</sub>S による ROS 産生は、ROS スカベンジャーの 1 種であるピルビン酸によって抑制できる (Eghbal *et al.*, 2004)。しかし、細胞外グルコース濃度が 10 mM の条件下で、Na<sub>2</sub>S (150 μM) による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は pyruvate (1 mM) 存在下で抑制されなかった (図 13A, B)。このことから、H<sub>2</sub>S による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇には、ROS は関与しないことが示唆された。

## 3 H<sub>2</sub>S による電子伝達鎖抑制の関与

電子伝達鎖の抑制は、ミトコンドリア内膜を脱分極させ (Barrientos and Moraes, 1999; Eghbal *et al.*, 2004)、ミトコンドリアからの Ca<sup>2+</sup>遊離を引き起こす (Saotome *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2013)。そこで、電子伝達鎖の阻害がアストロサイトの [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> を変化させるかを検討した。Na<sub>2</sub>S (150 μM) と同様に、電子伝達鎖阻害剤である rotenone (10 μM) は (Wilhelm and Hirrlinger, 2011)、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> を上昇させた。さらに、Na<sub>2</sub>S による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は、rotenone を処置した後では抑制された (図 14A, B)。これらの結果から、H<sub>2</sub>S は電子伝達鎖の抑制を介して [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> を上昇させていることが示唆された。

次に、H<sub>2</sub>S がミトコンドリアから Ca<sup>2+</sup>を遊離させているかを検討した。ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化の脱共役剤である FCCP は、ミトコンドリア内から Ca<sup>2+</sup>を遊離させる (Saotome *et al.*, 2005)。FCCP (5 μM) は、アストロサイトにおいて [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> を上昇させ、この反応は Na<sub>2</sub>S (150 μM) を 5 分間前処置しておくで抑制された (図 14C, D)。Na<sub>2</sub>S による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇の最大値は、FCCP 処置で変化しなかったが (図 14E, F)、Na<sub>2</sub>S 適用 1-10 分後までの [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> は FCCP 存在下で有意に減少した (図 14G)。これらの結果から、H<sub>2</sub>S による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇の一部は、ミトコンドリアからの Ca<sup>2+</sup>遊離によって引き起こされていることが示唆された。

## 4 H<sub>2</sub>S の乳酸放出及び細胞内 ATP 量への作用

電子伝達鎖の抑制は、代償的なグルコース代謝の亢進を引き起こすことが報告されており (Hou *et al.*, 2018)、これは細胞からの乳酸放出を増加させる。そこで、H<sub>2</sub>S の培養アストロサイトにおけるグルコース代謝への効果を、細胞外乳酸の蓄積を指標にして検討

した。Na<sub>2</sub>S (1.5-150  $\mu$ M) を 30 分間適用すると、Na<sub>2</sub>S (150  $\mu$ M) で細胞外乳酸量が増加した (図 15A)。このことから、H<sub>2</sub>S によるアストロサイトの乳酸産生の亢進が示唆された。また、Na<sub>2</sub>S (150  $\mu$ M) による細胞外乳酸量の有意な増加は、適用 30 分後では見られたが、10 分や 60 分後には見られなかった (図 15B)。

次に、H<sub>2</sub>S が ATP 合成に及ぼす効果を検討した。Na<sub>2</sub>S (150  $\mu$ M、10 分間) の適用は、細胞内 ATP 量を変化させなかった。解糖阻害剤である iodoacetic acid (IA, 1 mM) (Schmidt, 2009) も、細胞内 ATP 量に有意な変化をもたらさなかった。一方で、Na<sub>2</sub>S と IA の共処置は、細胞内 ATP 量を大きく減少させた (図 15C)。これらの結果から、H<sub>2</sub>S は酸化的リン酸化による ATP 合成を抑制するが、細胞内 ATP 総量は少なくとも 10 分間は代償的に亢進したグルコース代謝によって維持されることが考えられる。

さらに、H<sub>2</sub>S による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇が解糖の亢進によるものであるかを検討した。10 分間の IA (1 mM) 処置はそれ自身で [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> を上昇させ、それに続く Na<sub>2</sub>S (150  $\mu$ M) 処置による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇を抑制しなかった (図 15D, E)。この結果から、H<sub>2</sub>S による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は、亢進した解糖によって引き起こされているわけではないことが示唆された。

## 5 H<sub>2</sub>S 誘発性 Ca<sup>2+</sup>上昇におけるトランスロコンの関与

ここまでの結果から、H<sub>2</sub>S はミトコンドリアの電位伝達鎖を抑制し、その結果ミトコンドリア及び小胞体の両方から Ca<sup>2+</sup>を遊離させていると考えられる。しかしながら、電子伝達鎖の抑制がどのようなメカニズムで小胞体からの Ca<sup>2+</sup>遊離を引き起こすのかは依然として不明である。そこで、H<sub>2</sub>S による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇機構に関わる因子として、ミトコンドリアによる ATP 合成に注目した。酸化的リン酸化の阻害は、小胞体内の ATP 量を減少させる (Yong *et al.*, 2019)。小胞体内では、ATP は新生タンパク質を小胞体内に取り込むトランスロコンの活性を制御している (Hamman *et al.*, 1998)。さらにトランスロコンは、小胞体内の ATP 量が減少すると Ca<sup>2+</sup>リークチャネルとして機能することが知られている (Klein *et al.*, 2018)。そこで、トランスロコンの阻害剤である emetine (40  $\mu$ M) を 1 時間前処置したところ、Na<sub>2</sub>S (150  $\mu$ M) による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇が抑制された (図 16A-C)。この結果から、H<sub>2</sub>S は小胞体からトランスロコンを介して Ca<sup>2+</sup>を遊離させることが示唆された。

また、emetine が ATP による小胞体からの Ca<sup>2+</sup>遊離にも影響するかを検討した。ATP (10  $\mu$ M) による [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は、emetine (40  $\mu$ M) を 1 時間前処置するとわずかながら有意に減少した (図 16D, E)。

## 6 H<sub>2</sub>S 誘発性 Ca<sup>2+</sup>上昇による乳酸産生の促進作用

トランスロコンを介する小胞体からの Ca<sup>2+</sup>遊離は、解糖を亢進することが報告されて

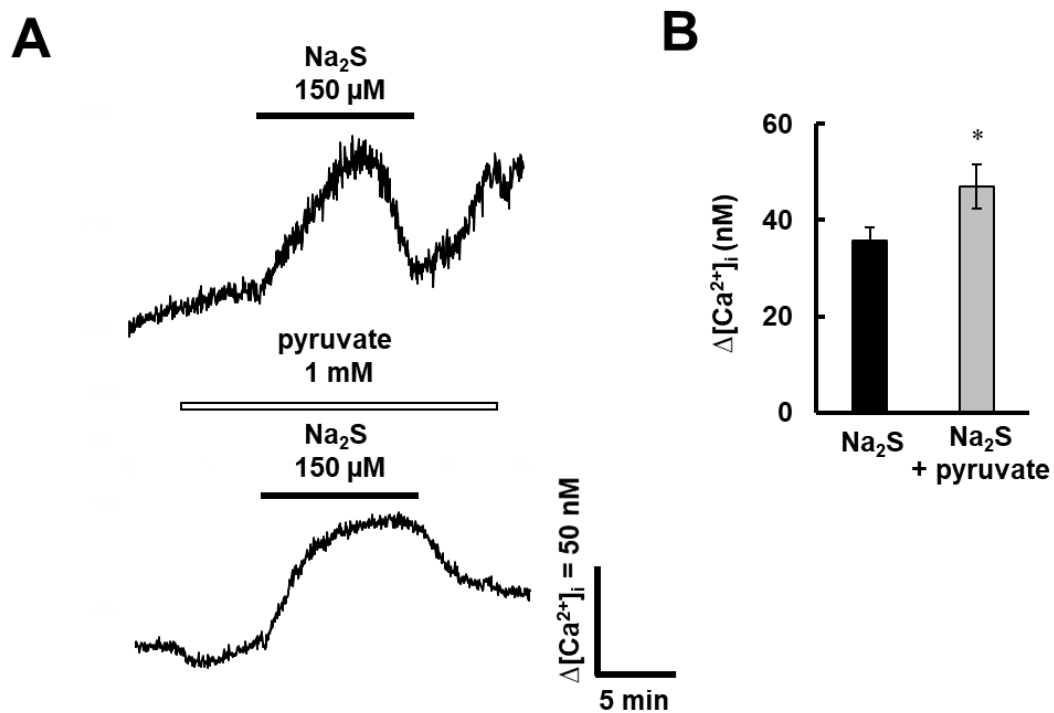


図 13. H<sub>2</sub>S による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇への ROS の関与

(A) Pyruvate (1 mM) 非存在下または存在下における Na<sub>2</sub>S (150 μM) による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 反応。(B) (A) における Na<sub>2</sub>S による最大[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇値。\**P* < 0.05 (Student's *t*-test)、*n* = 86 [Na<sub>2</sub>S]、75 [Na<sub>2</sub>S + pyruvate] (3 動物からの培養) データは平均値 ± 標準誤差で示した。

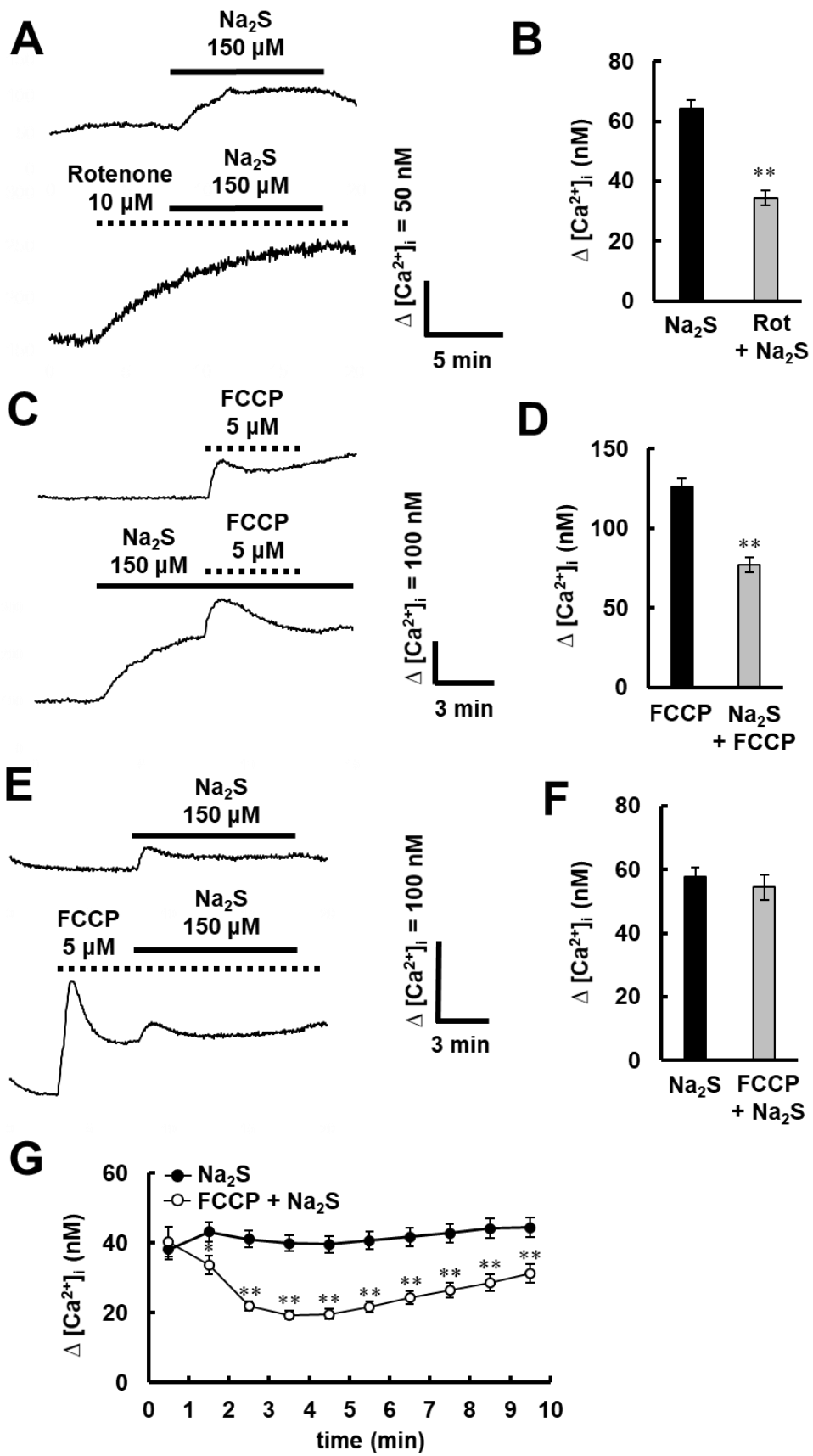


図 14.  $\text{H}_2\text{S}$  による $[\text{Ca}^{2+}]_i$  反応へのミトコンドリア電子伝達系抑制の関与

(A) Rotenone (Rot, 10  $\mu\text{M}$ ) 非存在下または存在下における  $\text{Na}_2\text{S}$  (150  $\mu\text{M}$ ) による $[\text{Ca}^{2+}]_i$  反応。(B) (A) における  $\text{Na}_2\text{S}$  による最大 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇値。  $**P < 0.01$  (Student's  $t$ -test)、 $n = 73$  [ $\text{Na}_2\text{S}$ ]、80 [ $\text{Na}_2\text{S} + \text{rotenone}$ ] (3 動物からの培養) (C)  $\text{Na}_2\text{S}$  (150  $\mu\text{M}$ ) 非存在下または存在下における FCCP (5  $\mu\text{M}$ ) による $[\text{Ca}^{2+}]_i$  反応。(D) (C) における FCCP による最大 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇値。  $**P < 0.01$  (Student's  $t$ -test)、 $n = 105$  [FCCP]、101 [FCCP +  $\text{Na}_2\text{S}$ ] (3 動物からの培養) (E) FCCP (5  $\mu\text{M}$ ) 非存在下または存在下における  $\text{Na}_2\text{S}$  (150  $\mu\text{M}$ ) による $[\text{Ca}^{2+}]_i$  反応。(F) (E) における  $\text{Na}_2\text{S}$  による最大 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇値。 $n = 90$  [ $\text{Na}_2\text{S}$ ]、103 [ $\text{Na}_2\text{S} + \text{FCCP}$ ] (3 動物からの培養) (G) (E) における  $\text{Na}_2\text{S}$  適用後の 1 分ごとの最大 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇値。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$  vs. 各時間の  $\text{Na}_2\text{S}$  (Student's  $t$ -test)、 $n = 90$  [ $\text{Na}_2\text{S}$ ]、103 [ $\text{Na}_2\text{S} + \text{FCCP}$ ] (3 動物からの培養) データは平均値  $\pm$  標準誤差で示した。

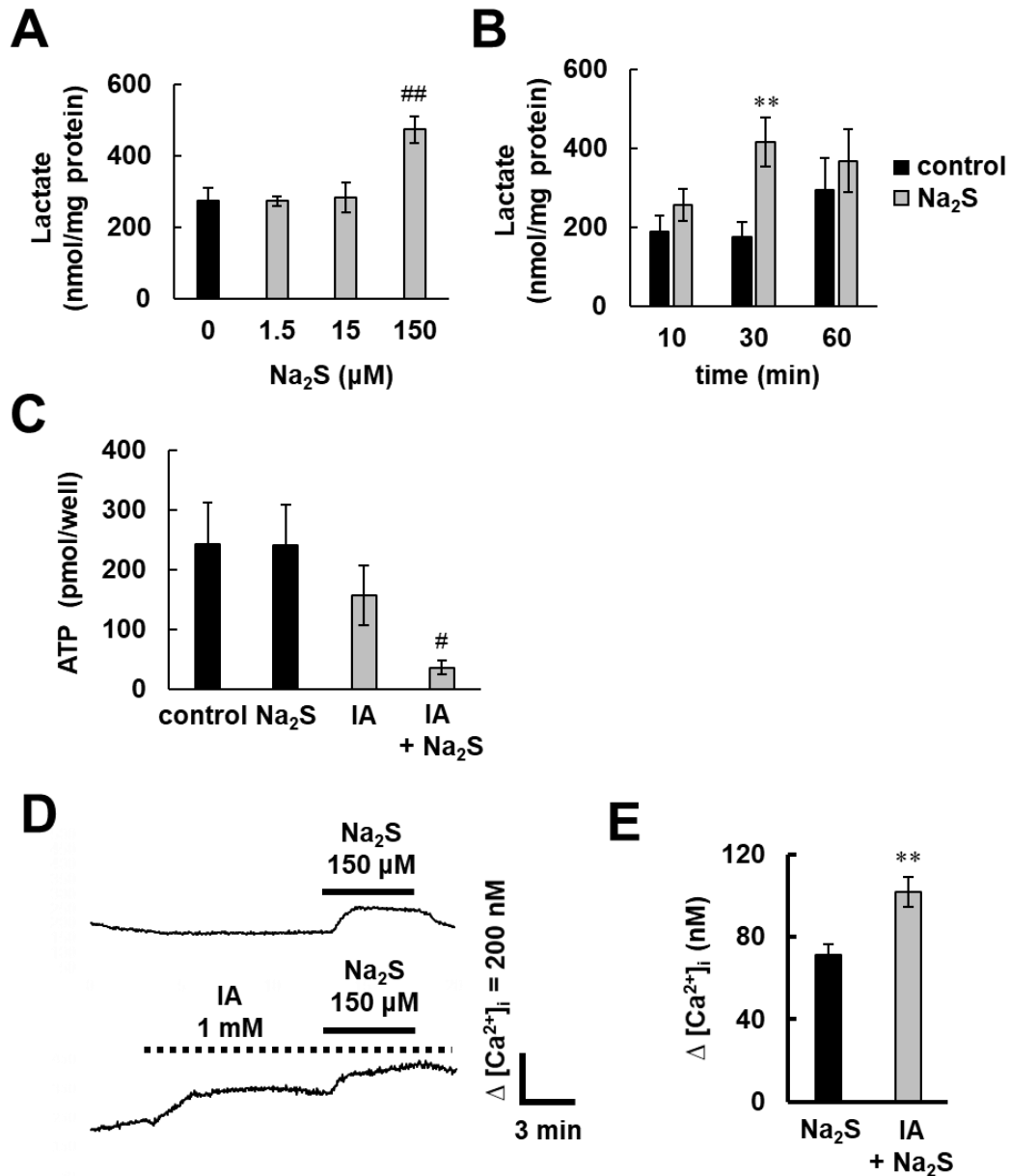


図 15. H<sub>2</sub>S による脊髄アストロサイトにおける解糖の亢進

(A) Na<sub>2</sub>S (0-150 μM、30 分間) 適用後の細胞外液中の乳酸量。<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs. 0 μM Na<sub>2</sub>S (Dunnett's test)、 $n = 5$ 。(B) Na<sub>2</sub>S (150 μM、0-60 分間) 非存在下または存在下における細胞外液中の乳酸量。<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs. control (Student's  $t$ -test)、 $n = 6$ 。(C) Na<sub>2</sub>S (150 μM) 及び IA (1 mM) の非存在下、存在下または共処置下 (10 分間) における細胞内 ATP 量。<sup>#</sup> $P < 0.05$  vs. control (Dunnett's test)、 $n = 4$ 。(D) IA (1 mM) 非存在下または存在下における、Na<sub>2</sub>S (150 μM) による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>反応。(E) (D) における Na<sub>2</sub>S による最大[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇値。<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  (Student's  $t$ -test)、 $n = 95$  [Na<sub>2</sub>S]、103 [IA + Na<sub>2</sub>S] (3 動物からの培養) データは平均値 ± 標準誤差で示した。

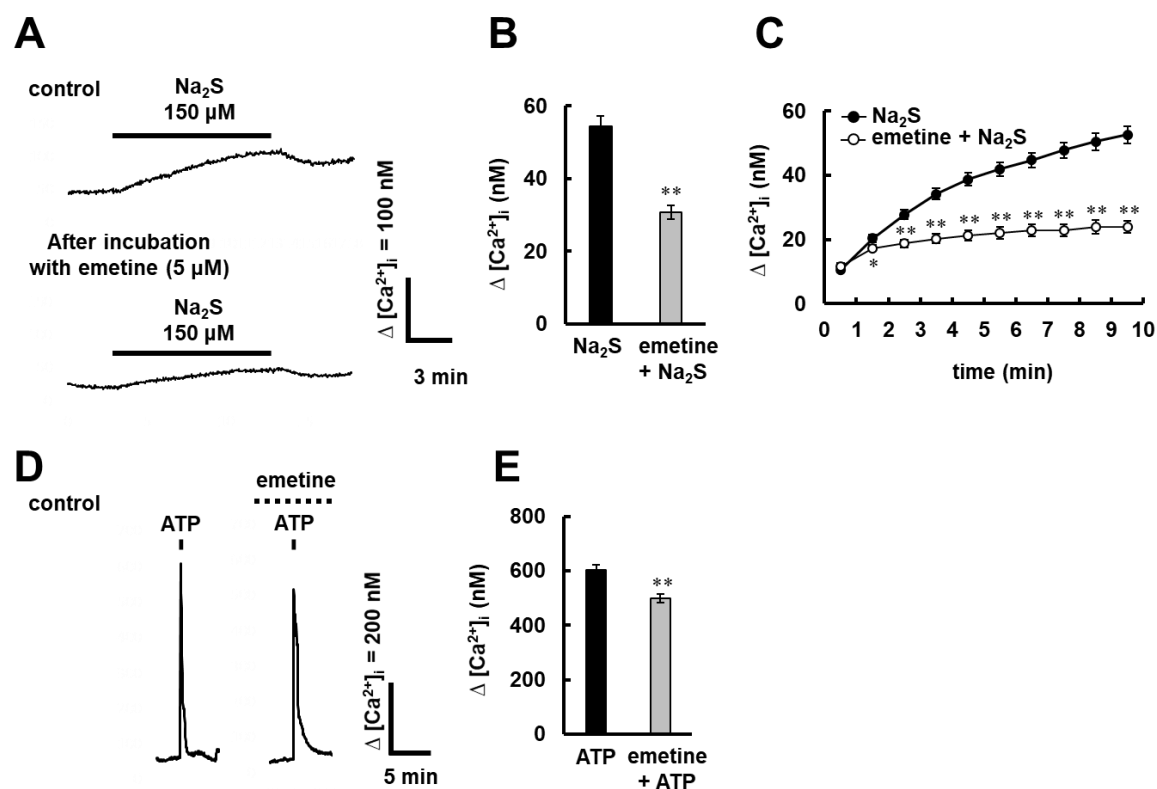


図 16.  $\text{H}_2\text{S}$  による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇におけるトランスロコンの関与

(A) Emetine (40  $\mu\text{M}$ 、60 分間) 非処置または処置後における  $\text{Na}_2\text{S}$  (150  $\mu\text{M}$ ) による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  反応。(B) (A) における  $\text{Na}_2\text{S}$  による最大 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇値。 $**P < 0.01$  (Student's  $t$ -test)、 $n = 95$  [ $\text{Na}_2\text{S}$ ]、103 [emetine +  $\text{Na}_2\text{S}$ ] (3 動物からの培養) (C) (A) における  $\text{Na}_2\text{S}$  適用後の 1 分ごとの最大 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇値。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$  vs. 各時間の  $\text{Na}_2\text{S}$  (Student's  $t$ -test)、 $n = 93$  [ $\text{Na}_2\text{S}$ ]、93 [emetine +  $\text{Na}_2\text{S}$ ] (3 動物からの培養) (D) Emetine (40  $\mu\text{M}$ 、60 分間) 非処置または処置後における ATP (10  $\mu\text{M}$ ) による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 反応。(E) (D) における ATP による最大 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇値。 $**P < 0.01$  (Student's  $t$ -test)、 $n = 103$  [ATP]、92 [emetine + ATP] (3 動物からの培養) データは平均値  $\pm$  標準誤差で示した。

いる (Klein *et al.*, 2018)。そこで、 $\text{H}_2\text{S}$  による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇が乳酸産生の亢進に関与しているのかを検討するために、emetine 存在下で  $\text{H}_2\text{S}$  による細胞外乳酸の蓄積を測定した。アストロサイトに emetine (40  $\mu\text{M}$ ) を 1 時間処置しても、細胞外乳酸量に変化は見られなかった (図 17A)。一方、emetine 存在下では、 $\text{Na}_2\text{S}$  (150  $\mu\text{M}$ ) の 30 分間処置による乳酸量の有意な増加は見られなかった。これらのことから、 $\text{H}_2\text{S}$  によるトランスロコンを介する  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は、乳酸産生の亢進に寄与すると考えられる。

次に、 $\text{H}_2\text{S}$  による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇が、どのような機構で乳酸産生を亢進しているのかを検討した。解糖亢進時に ATP 合成を維持するためには、細胞質における過剰な NADH の増加を防ぐ機構が必要だと言われている (Wang *et al.*, 2016)。リンゴ酸—アスパラギン酸シャトル (malate-aspartate shuttle, MAS) は、ミトコンドリア内膜を介する NADH 輸送を担う機構であり、アストロサイトにおいてはミトコンドリア外の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に活性を制御されている (McKenna *et al.*, 2006)。そこで、MAS が  $\text{H}_2\text{S}$  による乳酸産生の亢進に関与するかを検討した。MAS 阻害剤である AOAA (5 mM) 単独の 20 分間処置は、細胞外乳酸量に影響を与えなかった。一方、 $\text{Na}_2\text{S}$  (150  $\mu\text{M}$ , 30 分間) 処置開始の 10 分後に AOAA を処置すると、 $\text{Na}_2\text{S}$  による乳酸量の増加は抑制された (図 17B)。これらの結果から、MAS は静止状態の乳酸産生には関与しないが、 $\text{H}_2\text{S}$  による乳酸産生の亢進に寄与することが示唆される。

トランスロコンを介した  $\text{Ca}^{2+}$  遊離は、AMP-activated protein kinase (AMPK) をリン酸化することが報告されている (Klein *et al.*, 2018)。AMPK の活性化は、グルコース取り込みの促進や解糖酵素のリン酸化を介して解糖を促進する (Herzig and Shaw, 2018)。また、AMPK のリン酸化は  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存性経路によっても引き起こされることが知られている (Racioppi and Means, 2012)。そこで、カルモジュリンが  $\text{H}_2\text{S}$  による乳酸産生亢進に関与するかを検討した。カルモジュリン阻害剤である W7 (50  $\mu\text{M}$ ) を単独で 30 分間処置すると細胞外乳酸量が増加する傾向が見られ (図 17C)、W7 処置下では  $\text{Na}_2\text{S}$  (150  $\mu\text{M}$ ) の 30 分間処置による乳酸量の有意な増加は見られなかった。Emetine (図 17A) や AOAA (図 17B) は単独で細胞外乳酸量を変化させなかったことから、静止状態の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は乳酸産生の活性に大きく影響しないことが示唆されていた。一方、W7 は単独で細胞外乳酸を増加させたことから、 $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存性経路が静止状態において想定とは異なる働きをもつことが示唆された。また、W7 処置下では  $\text{Na}_2\text{S}$  による細胞外乳酸量の増加が見られなかったが、 $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存性経路による乳酸産生の促進が  $\text{H}_2\text{S}$  の作用を覆い隠してしまっている可能性を考慮し、本研究ではこの経路の関与はこれ以上検討しなかった。

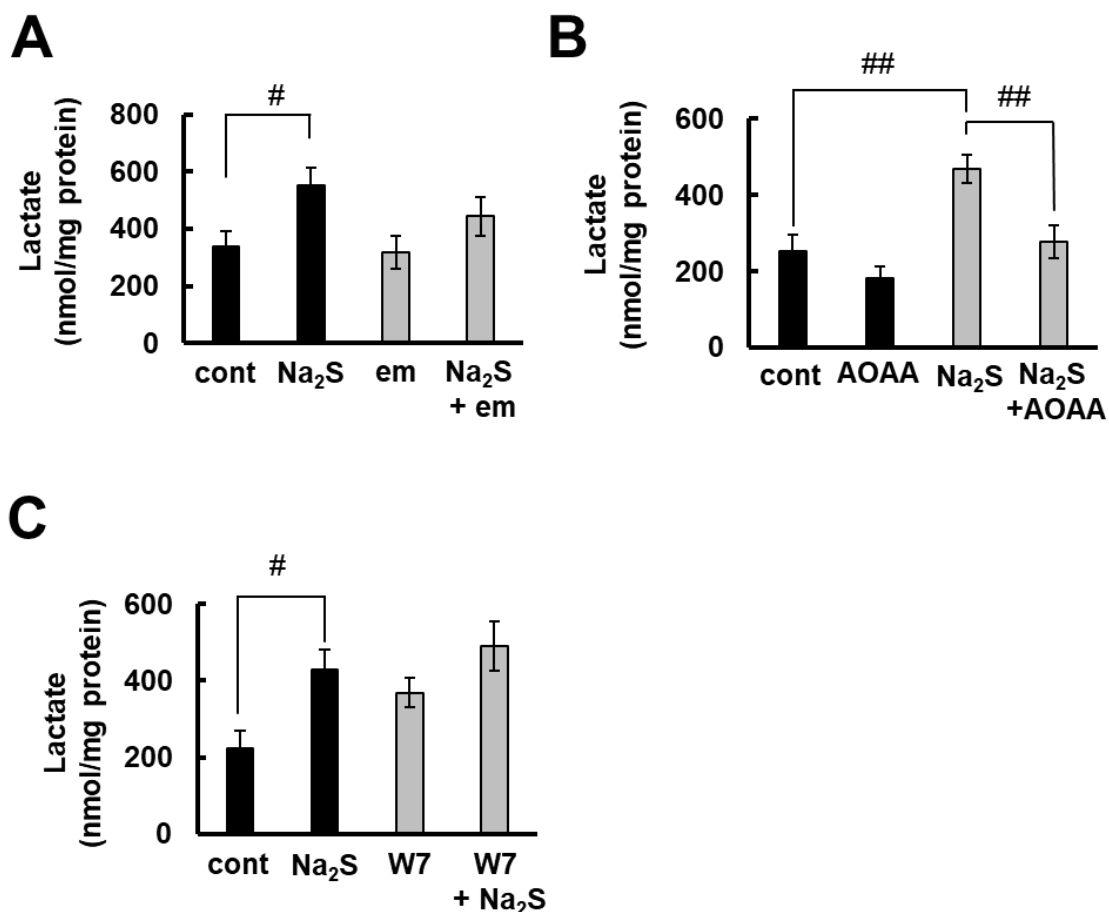


図 17. H<sub>2</sub>S による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇の乳酸産生亢進への関与

(A) Na<sub>2</sub>S (150  $\mu$ M) 及び emetine (em, 40  $\mu$ M) の非存在下、存在下または共処置下 (30 分間) における細胞外乳酸量。Emetine は Na<sub>2</sub>S 適用 60 分前に適用した。<sup>#</sup> $P < 0.05$  vs. control (Tukey's test)、 $n = 6$ 。(B) Na<sub>2</sub>S (150  $\mu$ M) 及び AOAA (1 mM) の非存在下、存在下または共処置下 (20 分間) における細胞外乳酸量。Na<sub>2</sub>S は AOAA 適用 10 分前に適用した。<sup>##</sup> $P < 0.01$  (Tukey's test)、 $n = 5$ 。(C) Na<sub>2</sub>S (150  $\mu$ M) 及び W7 (50  $\mu$ M) の非存在下、存在下または共処置下 (30 分間) における細胞外乳酸量。W7 は Na<sub>2</sub>S 適用 30 分前に適用した。<sup>#</sup> $P < 0.05$  (Tukey's test)、 $n = 5$ 。データは平均値  $\pm$  標準誤差で示した。

#### IV 考察

H<sub>2</sub>S は、アストロサイトにおいて[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇を引き起こすことが示されていたが、その詳細な機構及び細胞機能に及ぼす影響は不明であった。本研究では、脊髄培養アストロサイトにおいて、H<sub>2</sub>S が小胞体及びミトコンドリアからの Ca<sup>2+</sup>遊離によって[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> を上昇させることを明らかにした (図 18)。また、この[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は H<sub>2</sub>S による電子伝達系の抑制によって引き起こされ、小胞体からの Ca<sup>2+</sup>遊離にはトランスロコンが関与することを示した。さらに、H<sub>2</sub>S による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇が、アストロサイトにおける代償性の乳酸産生の亢進に寄与することも明らかにした。

#### 脊髄培養アストロサイトにおける H<sub>2</sub>S による細胞内 Ca<sup>2+</sup>ストアからの Ca<sup>2+</sup>動員

海馬アストロサイトにおいて、H<sub>2</sub>S は TRPA1 のスルフヒドリル化による活性化と、それによる細胞外からの Ca<sup>2+</sup>流入を引き起こす (Nagai *et al.*, 2004; Kimura *et al.*, 2013)。この反応は、Na<sub>2</sub>S<sub>3</sub> などのポリサルフェンのドナーではより低濃度 (EC<sub>50</sub> 91 nM) で引き起こされ、DTT によって阻害することができる (Kimura *et al.*, 2013; Ujike *et al.*, 2015)。しかしながら、本研究では、H<sub>2</sub>S による脊髄アストロサイトの[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は TRPA1 阻害剤や、DTT、細胞外 Ca<sup>2+</sup>の除去では抑制されなかった。さらに、TRPA1 作動薬である AITC は、アストロサイトの Ca<sup>2+</sup>反応を引き起こさなかった。これらの結果から、TRPA1 は脊髄アストロサイトにおいて H<sub>2</sub>S による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇には関与しないと考えられる。海馬アストロサイトを用いた先行研究では、胎子ラット由来のアストロサイトを用いている (Nagai *et al.*, 2004)。また、海馬アストロサイトを成長因子を用いて活性化させると TRPA1 が関与する Ca<sup>2+</sup>上昇が減少することも報告されている (Kimura *et al.*, 2013)。本研究では、出生後のラットの脊髄からアストロサイトを分離・培養した。そのため、本研究で TRPA1 の関与がなかった点については、部位差に加えて、アストロサイトの発達や培養条件の違いも関係しているかもしれない。

H<sub>2</sub>S による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は、SERCA 阻害剤である thapsigargin や、細胞外 Ca<sup>2+</sup>除去下での細胞外 ATP 刺激による小胞体内の Ca<sup>2+</sup>枯渇によって抑制された。さらに、H<sub>2</sub>S は細胞外 ATP による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇を抑制した。これらの結果は、H<sub>2</sub>S と細胞外 ATP が共通の小胞体から Ca<sup>2+</sup>を遊離させることを示唆している。H<sub>2</sub>S が小胞体から Ca<sup>2+</sup>を遊離させることは、ヒト血管内皮細胞や、SH-SY5Y 細胞、ウシ副腎クロム親和性細胞において報告されている (Bauer *et al.*, 2010; Yong *et al.*, 2010; de Pascual *et al.*, 2018)。これらの先行研究では、SERCA 阻害剤等による小胞体内 Ca<sup>2+</sup>枯渇が H<sub>2</sub>S による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇を抑制することが示されている。ヒト血管内皮細胞においては、細胞外 Ca<sup>2+</sup>除去下において、細胞外 ATP による[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇が H<sub>2</sub>S によって抑制されるという報告がある (Bauer *et al.*, 2010)。また、SH-SY5Y 細胞では、H<sub>2</sub>S は小胞体からの Ca<sup>2+</sup>遊離と protein kinase A の活性に依存する Ca<sup>2+</sup>

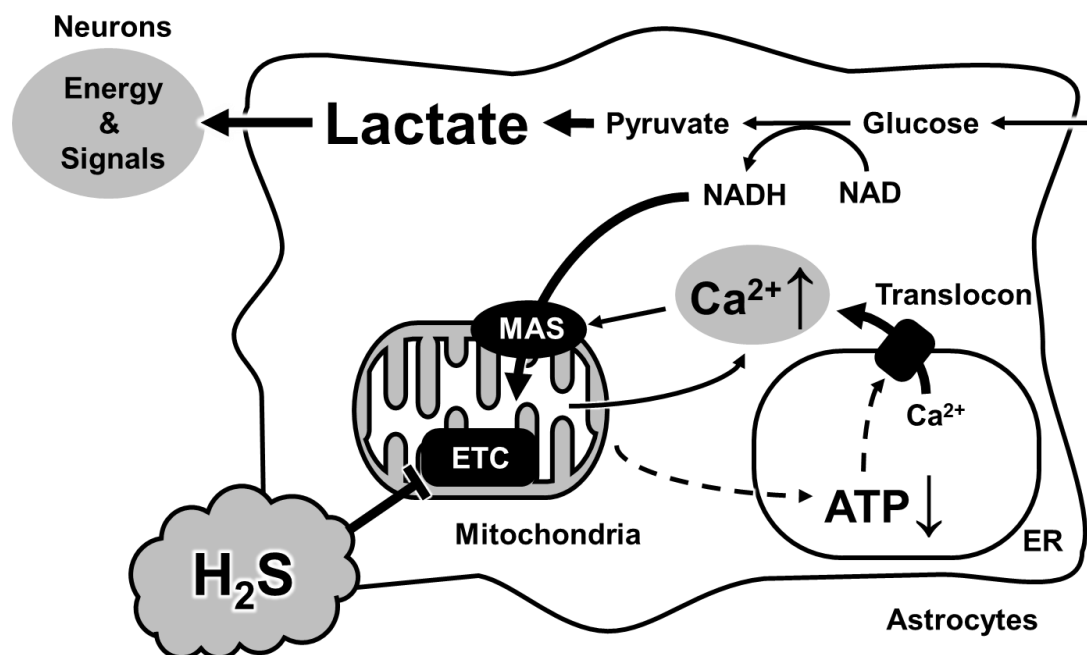


図 18. アストロサイトにおける H<sub>2</sub>S の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 及びエネルギー代謝への効果

H<sub>2</sub>S はまず、電子伝達鎖 (ETC) を抑制する。これにより、ミトコンドリア内から Ca<sup>2+</sup> が遊離し、ミトコンドリアにおける ATP 合成は抑制される。このミトコンドリアに由来する ATP の減少が、トランスロコンを介する小胞体からの Ca<sup>2+</sup> 遊離を引き起こす。細胞質における [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の上昇は、ミトコンドリア内膜の MAS による NADH 輸送を活性化する。これが細胞質の NADH の蓄積を防ぐことで、lactate の合成及び放出が促進される。代償的な乳酸産生の亢進によって、細胞内 ATP 総量は維持される。ETC; electron transport chain、ER; endoplasmic reticulum、MAS; malate-aspartate shuttle

流入の両方によって $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させる (Yong *et al.*, 2010)。本研究では、先述の通り、 $H_2S$ は $Ca^{2+}$ 流入や細胞内 cAMP 濃度の増加を引き起こさなかった。 $H_2S$ の細胞内 cAMP 濃度への影響は、細胞の種類や状態によって大きく異なり、これは細胞に発現する adenylate cyclase や phosphodiesterase のアイソフォームの違いによると考えられている (Cao *et al.*, 2018)。本研究で用いた脊髄アストロサイトは、 $H_2S$ に感受性のある adenylate cyclase や phosphodiesterase のアイソフォームを発現していないのかもしれない。アストロサイトは様々な刺激によって活性化し、遺伝子の発現が変化する (Escartin *et al.*, 2019)。今後の研究では、様々な状態のアストロサイトを用いて、 $H_2S$ の細胞内 cAMP 濃度への影響を検討する必要がある。

細胞外 ATP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、100  $\mu M$  以上の  $Na_2S$  を処置することによって抑制された。このとき、 $H_2S$ は $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させた。本研究で、 $H_2S$ が主に小胞体から $Ca^{2+}$ を遊離させることが示されたため、 $H_2S$ による小胞体内の $Ca^{2+}$ 量の減少が、以降の細胞外 ATP による $Ca^{2+}$ 遊離を抑制すると考えられる。中枢神経系内ではアストロサイトが $H_2S$ の主要な産生源であり、アストロサイトは自身が生成する $H_2S$ だけでなく周囲のアストロサイトから拡散してきた $H_2S$ にもさらされていると考えられている (Lee *et al.*, 2009)。本研究は、 $H_2S$ がアストロサイトとその周囲の細胞との $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を介する情報伝達を制御していることを示唆している。

$H_2S$ は、20  $\mu M$  以上の濃度で電子伝達鎖を阻害する (Cooper and Brown, 2008)。 $H_2S$ の pKa は 6.98 (25°C) であるため (Filipovic *et al.*, 2018)、pH7.3 の ACSF 中で 150  $\mu M$  の  $Na_2S$  が溶液中で加水分解されると約 40  $\mu M$  の  $H_2S$  が放出される。したがって、 $Na_2S$  による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が見られたときには、電子伝達鎖が阻害されていると考えられる。また、本研究において $H_2S$ による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、脱共役剤である FCCP を用いてミトコンドリア内の $Ca^{2+}$ 量を事前に減らしておくことで抑制された。FCCP はミトコンドリア内膜を脱分極させることで、ミトコンドリアから $Ca^{2+}$ を遊離させる (Saotome *et al.*, 2005)。ミトコンドリア内膜の脱分極は、電子伝達鎖の阻害によっても引き起こされるため (Barrientos and Moraes, 1999)、 $H_2S$ は先述した小胞体に加えて、ミトコンドリアからも $Ca^{2+}$ を遊離させると考えられる。

### $H_2S$ による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の分子機構

$H_2S$  から生じる  $H_2S_n$  は、タンパク質のシステイン残基を修飾し、その機能を制御する (Kimura, 2014)。このスルフヒドリル化は酸化反応であり (Lau and Pluth, 2019)、 $H_2S$  の最も重要な生物学的作用の一つである。本研究において還元剤である DTT は、 $H_2S$  による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制しなかった。このことから、 $H_2S$  の  $Ca^{2+}$  反応にスルフヒドリル化は関与していないと考えられる。

本研究において電子伝達鎖の複合体 I 阻害剤 rotenone は (Hou *et al.*, 2018)、単独でア

astrocyteの $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させただけでなく、その前処置は  $H_2S$  による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制した。また本研究は、トランスロコンの阻害剤である emetine が (Amer *et al.*, 2009)、 $H_2S$  による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制することを示した。トランスロコンは、小胞体内の ATP 量が減少すると、 $Ca^{2+}$ リークチャネルとして機能する (Klein *et al.*, 2018)。近年の研究において、小胞体内 ATP はミトコンドリアに由来すると報告されている (Yong *et al.*, 2019)。以上のことから、 $H_2S$  がミトコンドリアの電子伝達鎖を抑制し、ミトコンドリアで合成される ATP が減少した結果、小胞体への ATP 供給が減少し、トランスロコンを介して小胞体から  $Ca^{2+}$ が遊離するのではないかと考えられる。また、 $H_2S$  の電子伝達鎖抑制作用は、 $H_2S$  が電子伝達鎖複合体IVである cytochrome c oxidase の銅中心に配位結合することで起こると考えられている (Filipovic *et al.*, 2018)。このことは、 $H_2S$  による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が還元剤である DTT で抑制されなかったこととも矛盾しない。

## $H_2S$ のアストロサイトにおけるエネルギー代謝への効果

$H_2S$  は、アストロサイトにおいて細胞外乳酸量を増加させた一方で、細胞内 ATP 総量は変化させなかった。また、 $H_2S$  は IA によって解糖を阻害した条件下では細胞内 ATP 量を減少させた。これらの結果は、 $H_2S$  がミトコンドリアにおける ATP 合成を抑制するが、亢進した乳酸産生が細胞内 ATP 総量を維持することを示唆する。加えてこの結果も、 $H_2S$  が電子伝達系の抑制によって $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させるという仮説を支持するものである。

$H_2S$  による細胞外乳酸量の増加は、emetine および MAS 阻害剤である AOAA によって抑制された。ミトコンドリア外側の  $Ca^{2+}$ は、NADH 輸送に必要な MAS の構成要素である aspartate-glutamate carrier (AGC) の活性を制御することで、細胞内呼吸を調節する。AGC を活性化する  $Ca^{2+}$ の  $S_{0.5}$  値は、350 nM である (Contreras *et al.*, 2007)。本研究では、静止時のアストロサイトの $[Ca^{2+}]_i$ は約 40 nM であり、 $Na_2S$  (150  $\mu M$ ) から放出された  $H_2S$  は 細胞質全体の平均として $[Ca^{2+}]_i$ を約 60 nM 上昇させた。そのため、単純に考えると AGC を活性化させるには、あと 250 nM 程度の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が必要だと考えられる。ミトコンドリアと小胞体の近接部位では、小胞体から  $Ca^{2+}$ が遊離する際に、非常に  $Ca^{2+}$ 濃度が高い微小領域が形成されると言われている (Csordás *et al.*, 2018)。そのため、本研究において  $H_2S$  が小胞体から  $Ca^{2+}$ を遊離させた際に、ミトコンドリア近傍における局所的な  $Ca^{2+}$ 濃度は実測された $[Ca^{2+}]_i$ 値よりも高いと考えられる。MAS の活性化は、細胞質における NADH の過剰な蓄積を防ぐことで解糖を促進することが報告されている (Wang *et al.*, 2016)。以上のことから、 $H_2S$  によるトランスロコンを介した小胞体からの  $Ca^{2+}$ 遊離は、MAS の活性化とそれに続く乳酸産生の亢進に貢献している可能性がある。また、アストロサイトではミトコンドリア内膜における通常の NADH 輸送は、主にグリセロール 3 リン酸によって担われていると考えられており、これも  $Ca^{2+}$ 感受性をもつ (McKenna *et al.*, 2006)。今後、 $H_2S$

による小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離が、グリセロール 3 リン酸の活性に影響を与えているのかについても検討が必要である。

トランスロコンを介する  $\text{Ca}^{2+}$ リークは、AMPK を活性化することが示されている (Klein *et al.*, 2018)。また AMPK は、カルモジュリン依存性シグナル経路を介してグルコース利用を促進する (Racioppi and Means, 2012; Herzig and Shaw, 2018)。しかしながら、本研究においては  $\text{H}_2\text{S}$  によるアストロサイトの代謝変化におけるカルモジュリンの役割を明らかにすることはできなかった。カルモジュリン阻害剤である W7 は単独で細胞外乳酸量を増加させる傾向を示し、W7 存在下では  $\text{H}_2\text{S}$  による有意な乳酸量の増加は見られなかった。 $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存性 protein kinase II の阻害は、皮質アストロサイトにおいてミトコンドリア内膜の膜電位を脱分極させることが報告されている (Ashpole *et al.*, 2013)。それゆえ、カルモジュリンの阻害はミトコンドリアにおける酸化的リン酸化の阻害と、代償的な乳酸産生の亢進を引き起こすことが考えられる。 $\text{H}_2\text{S}$  による乳酸産生の亢進にカルモジュリンが関与するかどうかについては、今後もさらなる検討が必要である。

以上をまとめると、 $\text{H}_2\text{S}$  は脊髄アストロサイトにおいて、ミトコンドリア電子伝達系の抑制を介し、小胞体およびミトコンドリアから  $\text{Ca}^{2+}$ を遊離させることが明らかになった。また、小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離は、代償的な乳酸産生の亢進を引き起こすことがわかった。グルコース代謝の最終産物の 1 つである乳酸は、アストロサイトからニューロンへエネルギー基質やシグナルとして輸送される (Alberini *et al.*, 2018)。また、好氣的条件下での解糖は出生後の幼弱動物で中枢神経系内のエネルギー代謝において特に重要である (Goyal *et al.*, 2014; Maffezzini *et al.*, 2020)。アストロサイトにおける主要な  $\text{H}_2\text{S}$  合成酵素である Cystathionine- $\beta$ -synthase の発現も出生後に一過性に高くなり、このことは中枢神経系の発達に貢献すると考えられている (Enokido *et al.*, 2005)。 $\text{H}_2\text{S}$  は、アストロサイトのエネルギー代謝の制御を介して、中枢神経系の発達や機能維持に重要な役割を果たすのかもしれない。

## V 結論

硫化水素 ( $\text{H}_2\text{S}$ ) は、ミトコンドリア電子伝達系を阻害する性質をもち、火山地帯などにおいて事故の原因となる有毒性のガスとして知られているが、中枢神経系内でも主にアストロサイトによって合成される。本研究では、ラット脊髄培養アストロサイトの細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態に対する  $\text{H}_2\text{S}$  の作用を検討した。また近年では、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナリングとエネルギー代謝の密接な関連が多数報告されている。そこで、 $\text{H}_2\text{S}$  による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  変化がアストロサイトのエネルギー代謝にどのような効果をもたらすかを検討するために、細胞外乳酸の蓄積を指標にグルコース代謝への  $\text{H}_2\text{S}$  の作用を解析した。

1. ラット脊髄培養アストロサイトの細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) に対する  $\text{H}_2\text{S}$  の作用を  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬 Fura-2 を用いた  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  測定法で検討した。 $\text{H}_2\text{S}$  ドナーである  $\text{Na}_2\text{S}$  (100  $\mu\text{M}$  及び 1 mM) の適用は、アストロサイトに  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を引き起こした。また、 $\text{Na}_2\text{S}$  (< 150  $\mu\text{M}$ ) の適用は、アストロサイトに毒性を示さなかった。
2. 海馬アストロサイトの報告とは異なり、非選択的陽イオンチャネル TRPA1 の阻害薬 HC-030031 や細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の除去は、脊髄アストロサイトにおける  $\text{Na}_2\text{S}$  による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を抑制しなかった。
3. SERCA 阻害薬 thapsigargin による小胞体内  $\text{Ca}^{2+}$  の枯渇は、 $\text{Na}_2\text{S}$  による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を抑制した。
4. 細胞外 ATP は  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を引き起こし、これは phospholipase C 阻害剤 U-73122 によってほぼ完全に抑制された。ATP 誘発性  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は、ATP 適用前に  $\text{Na}_2\text{S}$  によって  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を上昇させると抑制された。また、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  除去下では、 $\text{Na}_2\text{S}$  誘発性  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は、 $\text{Na}_2\text{S}$  適用前に細胞外 ATP によって  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  を上昇させると抑制された。
5.  $\text{Na}_2\text{S}$  による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は、phospholipase C 阻害剤 U73122 や高濃度 ryanodine の前処置による ryanodine 受容体阻害によって抑制されなかった。
6.  $\text{Na}_2\text{S}$  による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇および ATP 誘発性  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇の抑制は、還元剤 DTT によって抑制されなかった。また、 $\text{H}_2\text{S}_n$  のドナーである  $\text{Na}_2\text{S}_3$  (0.1-1  $\mu\text{M}$ ) は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を引き起こさず、また ATP 誘発性  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を抑制しなかった。
7.  $\text{Na}_2\text{S}$  (150  $\mu\text{M}$ ) の適用は、アストロサイト内の cAMP 量を変化させなかった。

8.  $\text{Na}_2\text{S}$  による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は、細胞外グルコース濃度を 10 mM から 0.5 mM へ減少させると増強された。また、ROS スカベンジャーの pyruvate は、 $\text{Na}_2\text{S}$  による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を抑制しなかった。
9. 電子伝達鎖阻害剤である rotenone は、アストロサイトにおいて  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を引き起こした。また、rotenone 処置は、 $\text{Na}_2\text{S}$  による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を抑制した。脱共役剤 FCCP によるミトコンドリアからの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離は、 $\text{Na}_2\text{S}$  で抑制された。また、 $\text{Na}_2\text{S}$  による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇は、FCCP によって抑制された。
10.  $\text{Na}_2\text{S}$  (150  $\mu\text{M}$ ) は、アストロサイトの細胞外乳酸量を増加させた。また、 $\text{Na}_2\text{S}$  および解糖阻害剤 IA はそれぞれ単独では細胞内 ATP 量を変化させなかったが、IA と  $\text{Na}_2\text{S}$  の共処置は細胞内 ATP 量を減少させた。
11. トランスロコン阻害剤 emetine は、 $\text{Na}_2\text{S}$  による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を抑制した。Emetine 存在下では、 $\text{Na}_2\text{S}$  による細胞外乳酸量の有意な増加が見られなかった。また、 $\text{Ca}^{2+}$  感受性 NADH シャトルの阻害薬 AOAA は、 $\text{Na}_2\text{S}$  による細胞外乳酸量の増加を抑制した。
12. カルモジュリン阻害剤 W7 は、単独で細胞外乳酸量を増加させる傾向を示した。また、W7 存在下では、 $\text{Na}_2\text{S}$  による細胞外乳酸量の有意な増加が見られなかった。

以上の結果から、ラット脊髄培養アストロサイトにおいて、 $\text{H}_2\text{S}$  がミトコンドリア電子伝達系の抑制を介し、小胞体及びミトコンドリアから  $\text{Ca}^{2+}$  を遊離させることが明らかになった。また、小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離は乳酸の産生に貢献することが示唆された。乳酸は、アストロサイトからニューロンへ輸送されてエネルギー基質やシグナルとして働く。 $\text{H}_2\text{S}$  は、アストロサイトのエネルギー代謝の制御を介して、中枢神経系の機能維持に貢献するかもしれない。

## 謝辞

稿の終わりに臨み、本研究の推進にあたり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院基礎獣医科学分野薬理学教室、乙黒兼一教授に深く感謝申し上げます。

本論文を御校閲頂きました主査の北海道大学大学院獣医学研究院基礎獣医科学分野生化学教室、木村和弘教授に厚く御礼申し上げます。

また、副査を務めていただきました同解剖学教室、市居修准教授、同生理学教室、山口聡一郎准教授にも厚く御礼申し上げます。

本研究のために尊い命を提供してくれた数多の実験動物の御霊に心より感謝の念を捧げ、安らかな眠りにつくことを願って慰霊の言葉とさせていただきます。

最後に、本論文の作成、そして日々の研究において終始御協力を頂きました江口遼太助教をはじめとする薬理学教室の皆様に深く感謝致します。

## 引用文献

Alberini CM, Cruz E, Descalzi G, Bessi res B, Gao V (2018). Astrocyte glycogen and lactate: New insights into learning and memory mechanisms. *Glia* **66**: 1244–1262.

Amer MS, Li J, O’regan DJ, Steele DS, Porter KE, Sivaprasadarao A, Beech DJ (2009). Translocon closure to Ca<sup>2+</sup> leak in proliferating vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Hear Circ Physiol* **296**: 910–916.

An JH, Su Y, Radman T, Bikson M (2008). Effects of glucose and glutamine concentration in the formulation of the artificial cerebrospinal fluid (ACSF). *Brain Res* **1218**: 77–86.

Ashpole NM, Chawla AR, Martin MP, Brustovetsky T, Brustovetsky N, Hudmon A (2013). Loss of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in cortical astrocytes decreases glutamate uptake and induces neurotoxic release of ATP. *J Biol Chem* **288**: 14599–14611.

Barrientos A, Moraes CT (1999). Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology. *J Biol Chem* **274**: 16188–16197.

Baskar R, Bian J (2011). Hydrogen sulfide gas has cell growth regulatory role. *Eur J Pharmacol* **656**: 5–9.

Bauer CC, Boyle JP, Porter KE, Peers C (2010). Modulation of Ca<sup>2+</sup> signalling in human vascular endothelial cells by hydrogen sulfide. *Atherosclerosis* **209**: 374–380.

Berthet C, Lei H, Thevenet J, Gruetter R, Magistretti PJ (2009). Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **29**: 1780–1789.

Cao X, Wu Z, Xiong S, Cao L, Sethi G, Bian JS (2018). The role of hydrogen sulfide in cyclic nucleotide signaling. *Biochem Pharmacol* **149**: 20–28.

Contreras L, Gomez-Puertas P, Iijima M, Kobayashi K, Saheki T, Satr stegui J (2007). Ca<sup>2+</sup> activation kinetics of the two aspartate-glutamate mitochondrial carriers, aralar and citrin. *J Biol Chem* **282**: 7098–7106.

Cooper CE, Brown GC (2008). The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: Chemical mechanism and physiological significance. *J Bioenerg Biomembr* **40**: 533–539.

Csordás G, Weaver D, Hajnóczky G (2018). Endoplasmic reticulum–mitochondrial contactology: structure and signaling functions. *Trends Cell Biol* **28**: 523–540.

Davoli A, Greco V, Spalloni A, Guatteo E, Neri C, Rizzo GR, Cordella A, Cardaioli G, Calabresi P, Mercuri NB, Urbani A, Longone P (2015). Evidence of hydrogen sulfide involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* **77**: 697–709.

de Castro AH, Briquet M, Schmuziger C, Restivo L, Puyal J, Rosenberg N, Rocher A, Offermanns S, Chatton J (2019). The lactate receptor HCAR1 modulates neuronal network activity through the activation of G $\alpha$  and G $\beta\gamma$  subunits. *J Neurosci* **39**: 4422–4433.

de Pascual R, Baraibar AM, Méndez-López I, Pérez-Ciria M, Polo-Vaquero I, Gandía L, Ohia SE, García AG, de Diego AMG (2018). Hydrogen sulphide facilitates exocytosis by regulating the handling of intracellular calcium by chromaffin cells. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **470**: 1255–1270.

de Vries MG, Arseneau LM, Lawson ME, Beverly JL (2003). Extracellular glucose in rat ventromedial hypothalamus during acute and recurrent hypoglycemia. *Diabetes* **52**: 2767–2773.

Desouza N, Reiken S, Ondrias K, Yang YM, Matkovich S, Marks AR (2002). Protein kinase A and two phosphatases are components of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor macromolecular signaling complex. *J Biol Chem* **277**: 39397–39400.

Dienel GA (2012). Brain lactate metabolism: the discoveries and the controversies. *J Cereb Blood Flow Metab* **32**: 1107–1138.

Dienel GA (2019). Does shuttling of glycogen-derived lactate from astrocytes to neurons take place during neurotransmission and memory consolidation? *J Neurosci Res* **97**: 863–

882.

Eghbal MA, Pennefather PS, O'Brien PJ (2004). H<sub>2</sub>S cytotoxicity mechanism involves reactive oxygen species formation and mitochondrial depolarisation. *Toxicology* **203**: 69–76.

Eguchi R, Akao S, Otsuguro K, Yamaguchi S, Ito S (2015). Different mechanisms of extracellular adenosine accumulation by reduction of the external Ca<sup>2+</sup> concentration and inhibition of adenosine metabolism in spinal astrocytes. *J Pharmacol Sci* **128**: 47–53.

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.

Escartin C, Guillemaud O, Carrillo-de Sauvage MA (2019). Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia* **67**: 2221–2247.

Eto K, Asada T, Arima K, Makifuchi T, Kimura H (2002). Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* **293**: 1485–1488.

Filipovic MR, Zivanovic J, Alvarez B, Banerjee R (2018). Chemical biology of H<sub>2</sub>S signaling through persulfidation. *Chem Rev* **118**: 1253–1337.

Furne J, Saeed A, Levitt MD (2008). Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**: 1479–1485.

Gellerich FN, Gizatullina Z, Trumbeckaite S, Nguyen HP, Pallas T, Arandarcikaite O, Vielhaber S, Seppet E, Striggow F (2010). The regulation of OXPHOS by extramitochondrial calcium. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* **1797**: 1018–1027.

Gladden LB (2004). Lactate metabolism: A new paradigm for the third millennium. *J*

*Physiol* **558**: 5–30.

Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O (2015). Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol* **6**: 260–271.

Goyal MS, Hawrylycz M, Miller JA, Snyder AZ, Raichle ME (2014). Aerobic glycolysis in the human brain is associated with development and neotenus gene expression. *Cell Metab* **19**: 49–57.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985). A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**: 3440–3450.

Guerra-Gomes S, Sousa N, Pinto L, Oliveira JF (2018). Functional roles of astrocyte calcium elevations: From synapses to behavior. *Front Cell Neurosci* **11**: 1–7.

Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MVL, Charles AC, Kater SB (1999). ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* **19**: 520–528.

Hamman BD, Hendershot LM, Johnson AE (1998). BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* **92**: 747–758.

Herzig S, Shaw RJ (2018). AMPK: Guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**: 121–135.

Hou WL, Yin J, Alimujiang M, Yu XY, Ai LG, Bao YQ, Liu F, Jia W (2018). Inhibition of mitochondrial complex I improves glucose metabolism independently of AMPK activation. *J Cell Mol Med* **22**: 1316–1328.

Hu LF, Lu M, Tiong CX, Dawe GS, Hu G, Bian JS (2010). Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on Parkinson's disease rat models. *Aging Cell* **9**: 135–146.

Ichinohe A, Kanaumi T, Takashima S, Enokido Y, Nagai Y, Kimura H (2005). Cystathionine  $\beta$ -synthase is enriched in the brains of Down's patients. *Biochem Biophys Res Commun* **338**: 1547–1550.

Kimura H (2014). Hydrogen sulfide and polysulfides as biological mediators. *Molecules* **19**: 16146–16157.

Kimura Y, Mikami Y, Osumi K, Tsugane M, Oka J, Kimura H (2013). Polysulfides are possible H<sub>2</sub>S - derived signaling molecules in rat brain. *FASEB J* **27**: 2451–2457.

Klein MC, Zimmermann K, Schorr S, Landini M, Klemens PAW, Altensell J, Jung M, Krause E, Nguyen D, Helms V, Rettig J, Fecher-Trost C, Cavalié A, Hoth M, Bogeski I, Neuhaus HE, Zimmermann R, Lang S, Haferkamp I (2018). AXER is an ATP/ADP exchanger in the membrane of the endoplasmic reticulum. *Nat Commun* **9**: 3489.

Lau N, Pluth MD (2019). Reactive sulfur species (RSS): Persulfides, polysulfides, potential, and problems. *Curr Opin Chem Biol* **49**: 1–8.

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.

Lee ZW, Teo XY, Song ZJ, Nin DS, Novera W, Choo BA, Dymock BW, Moore PK, Huang RY, Deng L (2017). Intracellular hyper-acidification potentiated by hydrogen sulfide mediates invasive and therapy resistant cancer cell death. *Front Pharmacol* **8**: 1–10.

Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP (2003). Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem* **278**: 8516–8525.

Liu H, Radford MN, Yang CT, Chen W, Xian M (2018). Inorganic hydrogen polysulfides: chemistry, chemical biology and detection. *Br J Pharmacol* **176**: 616–627.

Mächler P, Wyss MT, Elsayed M, Stobart J, Gutierrez R, Faber-Castell A, von Faber-Castell A, Kaelin V, Zuend M, Martin AS, Romero-Gomez I, Baeza-lehnert F, Iengacher S, Schneider BL, Aebischer P, Magistretti PJ, Barros LF, Weber B (2016). In vivo evidence for a lactate gradient from astrocytes to neurons. *Cell Metab* **23**: 94–102.

Maffezzini C, Calvo-Garrido J, Wredenberg A, Freyer C (2020). Metabolic regulation of neurodifferentiation in the adult brain. *Cell Mol Life Sci* **77**: 2483–2496.

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.

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.

McNay EC, Gold PE (1999). Extracellular glucose concentrations in the rat hippocampus measured by zero-net-flux: Effects of microdialysis flow rate, strain, and age. *J Neurochem* **72**: 785–790.

Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi SK, Barrow RK, Yang G, Wang R, Snyder SH (2009). H<sub>2</sub>S signals through protein S-sulfhydration. *Sci Signal* **2**: ra72.

Nagai Y, Tsugane M, Oka J, Kimura H (2004). Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *FASEB J* **18**: 557–559.

Ogawa H, Takahashi K, Miura S, Imagawa T, Saito S, Tominaga M, Ohta T (2012). H<sub>2</sub>S functions as a nociceptive messenger through transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) activation. *Neuroscience* **218**: 335–343.

Panagaki T, Randi EB, Augsburger F, Szabo C (2019). Overproduction of H<sub>2</sub>S, generated by CBS, inhibits mitochondrial complex IV and suppresses oxidative phosphorylation in down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* **116**: 18769–18771.

Perniss A, Preiss K, Nier M, Althaus M (2017). Hydrogen sulfide stimulates CFTR in *Xenopus* oocytes by activation of the cAMP/PKA signalling axis. *Sci Rep* **7**: 1–12.

Prabhudesai S, Koceja C, Dey A, Eisa-Beygi S, Leigh NR, Bhattacharya R, Mukherjee P, Ramchandran R (2018). Cystathionine β-synthase is necessary for axis development in

Vivo. *Front Cell Dev Biol* **6**: 1–11.

Pryazhnikov E, Khiroug L (2008). Sub-micromolar increase in  $[Ca^{2+}]_i$  triggers delayed exocytosis of ATP in cultured astrocytes. *Glia* **56**: 38–49.

Racioppi L, Means AR (2012). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2: Roles in signaling and pathophysiology. *J Biol Chem* **287**: 31658–31665.

Saleem H, Tovey SC, Molinski TF, Taylor CW (2014). Interactions of antagonists with subtypes of inositol 1,4,5-trisphosphate ( $IP_3$ ) receptor. *Br J Pharmacol* **171**: 3298–3312.

Salter MW, Hicks JL (1994). ATP-evoked increases in intracellular calcium in neurons and glia from the dorsal spinal cord. *J Neurosci* **14**: 1563–575.

Salter MW, Hicks JL (1995). ATP causes release of intracellular  $Ca^{2+}$  via the phospholipase  $C_6/IP_3$  pathway in astrocytes from the dorsal spinal cord. *J Neurosci* **15**: 2961–2971.

Saotome M, Katoh H, Satoh H, Nagasaka S, Yoshihara S, Terada H, Hayashi H (2005). Mitochondrial membrane potential modulates regulation of mitochondrial  $Ca^{2+}$  in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol Circ Physiol* **288**: H1820–H1828.

Scemes E, Giaume C (2006). Astrocyte calcium waves. *Glia* **54**: 716–725.

Schmidt MM (2009). Differential effects of iodoacetamide and iodoacetate on glycolysis and glutathione metabolism of cultured astrocytes. *Front Neuroenergetics* **1**:1.

Staricha K, Meyers N, Garvin J, Liu Q, Rarick K, Harder D, Cohen S (2020). Effect of high glucose condition on glucose metabolism in primary astrocytes. *Brain Res* **1732**: 146702.

Ujike, A, Otsuguro K, Miyamoto R, Yamaguchi S, Ito S (2015). Bidirectional effects of hydrogen sulfide via ATP-sensitive  $K^+$  channels and transient receptor potential A1 channels in RIN14B cells. *Eur J Pharmacol* **764**: 463–470.

Voronina SG, Barrow SL, Simpson AWM, Gerasimenko OV, da Silva Xavier G, Rutter GA, Peterson OH, Tepikin AV (2010). Dynamic changes in cytosolic and mitochondrial ATP levels in pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* **138**: 1976–1987.e5.

Walsh C, Barrow S, Voronina S, Chvanov M, Petersen OH, Tepikin A (2009). Modulation of calcium signalling by mitochondria. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* **1787**: 1374–1382.

Wang C, Chen H, Zhang M, Zhang J, Wei X, Ying W (2016). Malate-aspartate shuttle inhibitor aminooxyacetic acid leads to decreased intracellular ATP levels and altered cell cycle of C6 glioma cells by inhibiting glycolysis. *Cancer Lett* **378**: 1–7.

Wilhelm F, Hirrlinger J (2011). The NAD<sup>+</sup>/NADH redox state in astrocytes: Independent control of the NAD<sup>+</sup> and NADH content. *J Neurosci Res* **89**: 1956–1964.

Williams ED, Rogers SC, Zhang X, Azhar G, Wei JY (2015). Elevated oxygen consumption rate in response to acute low-glucose stress: Metformin restores rate to normal level. *Exp Gerontol* **70**: 157–162.

Willmott NJ, Wong K, Strong AJ (2000). A fundamental role for the nitric oxide-G-kinase signaling pathway in mediating intercellular Ca<sup>2+</sup> waves in glia. *J Neurosci* **20**: 1767–1779.

Yang NC, Ho WM, Chen YH, Hu ML (2002). A convenient one-step extraction of cellular ATP using boiling water for the luciferin–luciferase assay of ATP. *Anal Biochem* **306**: 323–327.

Yong J, Bischof H, Burgstaller S, Siirin M, Murphy A, Malli R, Kaufman RJ (2019). Mitochondria supply ATP to the ER through a mechanism antagonized by cytosolic Ca<sup>2+</sup>. *elife* **8**:e49682.

Yong QC, Choo CH, Tan BH, Low CM, Bian JS (2010). Effect of hydrogen sulfide on intracellular calcium homeostasis in neuronal cells. *Neurochem Int* **56**: 508–515.

Zalk R, Lehnart SE, Marks AR (2007). Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Annu Rev Biochem* **76**: 367–385.

Zhao Z, Gordan R, Wen H, Fefelova N, Zang WJ, Xie LH (2013). Modulation of intracellular calcium waves and triggered activities by mitochondrial Ca flux in mouse cardiomyocytes. *PLoS One* **8**: e80574.

The effect of hydrogen sulfide on  $\text{Ca}^{2+}$  signals and energy metabolism in astrocytes

Takeshi Nii

Laboratory of Pharmacology, Department of Basic Veterinary Sciences,  
Graduate school of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060-0818, Japan

Hydrogen sulfide ( $\text{H}_2\text{S}$ ) inhibits the electron transport chain (ETC) in mitochondria. Despite this toxicity,  $\text{H}_2\text{S}$  is endogenously produced mainly by astrocytes. In hippocampal astrocytes,  $\text{H}_2\text{S}$  increases intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) mainly by activating transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) on the cell membrane through the post-translational modification of protein. It was also shown that  $\text{Ca}^{2+}$  release from the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores was involved in  $\text{H}_2\text{S}$ -induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase. However, the precise mechanism and functional role of this  $\text{Ca}^{2+}$  response are still unknown.  $\text{H}_2\text{S}$  induces not only metabolic changes in mitochondria but also promotes glycolysis. Lactate, a glycolytic product, had been considered a waste product, but it is reevaluated as an energy substrate and signals. Recently, a lot of studies have reported that intracellular metabolic changes mediate  $\text{Ca}^{2+}$  signals by influencing concentrations of bioactive substances including ATP and reactive oxygen species (ROS). On the other hand,  $\text{Ca}^{2+}$  is a key regulator of energy metabolism. Here, we examined the relationship between  $\text{H}_2\text{S}$ -induced metabolic changes and  $\text{Ca}^{2+}$  response.

$[\text{Ca}^{2+}]_i$  in cultured rat spinal cord astrocytes was measured using fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  indicator Fura-2. The extracellular lactate and intracellular ATP levels were measured by the enzymatic reaction using lactate dehydrogenase and luciferase, respectively.

$\text{Na}_2\text{S}$  (150  $\mu\text{M}$ ), an  $\text{H}_2\text{S}$  donor, induced a nontoxic increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in cultured rat spinal cord astrocytes. This  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase by  $\text{Na}_2\text{S}$  was not inhibited by HC-030031, a TRPA1 inhibitor, and removal of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ .  $\text{Ca}^{2+}$  depletion in the endoplasmic reticulum (ER) after application of thapsigargin, a sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase inhibitor, inhibited  $\text{Na}_2\text{S}$ -induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase. The  $\text{Na}_2\text{S}$ -induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase was not suppressed by U73122, a phospholipase C inhibitor, and high concentration of ryanodine, which inhibits ryanodine receptors.

ATP also increased  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in spinal cord astrocytes. The ATP-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase was inhibited by U-73122.  $\text{Na}_2\text{S}$  inhibited subsequent ATP-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase when  $\text{Na}_2\text{S}$  clearly increased  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . In the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}_2\text{S}$ -induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$

increase was suppressed after application of ATP.

The  $\text{Na}_2\text{S}$ -induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase and inhibitory effect of  $\text{Na}_2\text{S}$  on ATP-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase was not inhibited by DTT, a reducing agent. In addition,  $\text{Na}_2\text{S}$  had no effect on intracellular cAMP level.

The  $\text{Na}_2\text{S}$ -induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase was enhanced at a lower concentration of extracellular glucose (0.5 mM).  $\text{Na}_2\text{S}$ -induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase was suppressed by rotenone, an ETC inhibitor, but not by pyruvate, an ROS scavenger. Rotenone itself increased  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .  $\text{Ca}^{2+}$  release from mitochondria by FCCP, an uncoupler of oxidative phosphorylation, was inhibited by  $\text{Na}_2\text{S}$ , while the  $\text{Na}_2\text{S}$ -induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase was also inhibited by FCCP.

$\text{Na}_2\text{S}$  increased the accumulation of extracellular lactate.  $\text{Na}_2\text{S}$  alone did not change intracellular ATP content, but decreased it when glycolysis was inhibited by IA, a glycolytic enzyme inhibitor.  $\text{Na}_2\text{S}$ -induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase and accumulation of extracellular lactate were inhibited by emetine, a translocon complex inhibitor, which mediates  $\text{Ca}^{2+}$  leak from the ER. AOAA, a  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive NADH shuttle inhibitor, also decreased  $\text{Na}_2\text{S}$ -mediated accumulation of lactate. W7, a calmodulin inhibitor, alone tended to increase the accumulation of extracellular lactate. In the presence of W7,  $\text{Na}_2\text{S}$  did not increase accumulation of lactate.

In conclusion, inhibition of the ETC by  $\text{H}_2\text{S}$  induces  $\text{Ca}^{2+}$  release from mitochondria and the ER, which increases lactate production in spinal cord astrocytes. It is suggested that reduction of mitochondria-derived ATP by  $\text{H}_2\text{S}$  induces  $\text{Ca}^{2+}$  release from the ER through the translocon complex. Lactate is shuttled from astrocytes to neurons as an energy source. In addition, glycolysis is especially important for newborn animals. Therefore, astrocytic metabolic changes by  $\text{H}_2\text{S}$  may contribute to the development and/or maintenance of central nervous system function.