



## 販売中止のお知らせ

お客様各位

いつも小社製品をご愛顧頂きありがとうございます。

2020 年 2 月 1 日より下記製品は販売中止となりますため、

本冊子に記載の製品に関してご注意頂きますようよろしくお願い申し上げます。

### 販売中止品目

| 製品コード | 製品名                                                   | 容量         |
|-------|-------------------------------------------------------|------------|
| M323  | MGD                                                   | 500 mg     |
| N388  | NOR 1                                                 | 10 mg      |
| N391  | NOR 4                                                 | 10 mg      |
| SB07  | -SulfoBiotics- H2S donor 5a                           | 10 mg      |
| SB08  | -SulfoBiotics- H2S donor 8l                           | 10 mg      |
| SB09  | -SulfoBiotics- H2S donor 8o                           | 10 mg      |
| SB14  | -SulfoBiotics- Protein S-Nitrosylation Monitoring Kit | 20 samples |
| M323  | MGD                                                   | 500 mg     |
| N388  | NOR 1                                                 | 10 mg      |

ご不明点等がございましたら、小社カスタマーサポートまでお問い合わせ下さ

い。フリーダイヤル 0120-489548



# 生体内硫化水素の バイオロジー

## - 目次 -

|                                                   |    |
|---------------------------------------------------|----|
| 1. 硫化水素の生合成                                       | 1  |
| 1-1. Cystathionine- $\beta$ -synthase (CBS)       |    |
| 1-2. Cystathionine- $\gamma$ -lyase (CSE)         |    |
| 1-3. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST) |    |
| 1-4. ピリドキサル酵素 CBS, CSE の反応機構                      |    |
| 2. 硫化水素のバイオロジー                                    | 5  |
| 2-1. 血管弛緩作用                                       |    |
| 2-2. 細胞保護機能                                       |    |
| 2-3. 神経伝達 (記憶、疼痛)                                 |    |
| 2-4. アポトーシス誘導                                     |    |
| 2-5. エネルギー産生                                      |    |
| 2-6. カロリー制限と硫黄代謝                                  |    |
| 3. 硫化水素放出試薬                                       | 10 |
| 4. 硫化水素の検出方法                                      | 11 |
| 5. 硫化水素と S- スルフヒドリル化                              | 13 |
| 6. 硫化水素と NO のクロストーク                               | 16 |
| 7. 今後の展望                                          | 17 |

## はじめに

近年、毒ガスとして知られている硫化水素 ( $\text{H}_2\text{S}$ ) が、血管拡張や細胞保護、インスリン分泌や神経伝達調節など様々な生理活性を示すことが明らかにされ、一酸化窒素 (NO) や一酸化炭素 (CO) に続く第3のガス状シグナル分子として注目されている<sup>1)-4)</sup> (図1)。

生体内に存在する硫化水素は、主に L-cysteine を基質として cystathionine- $\beta$ -synthase (CBS) や cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE)、3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST) と呼ばれる酵素類によって産生され、生理活性を示すと共に、タンパク質などのシステイン SH 基に付加した結合型硫黄として生体内に貯蔵されると考えられている。硫化水素は、NO や CO と同様にガス状分子であるが、その pKa は約7であり、生理的 pH では約80%が硫化水素イオン ( $\text{HS}^-$ ) の状態で存在する (図1)。また、硫化水素イオンは生体内で様々な結合形態や構造をとるため、その作用機序の詳細は未だ不明であり、硫化水素を中心とした硫黄の生体内機能の解明が待ち望まれている。本説ではこれまでの硫化水素研究の概要と最近の展開について簡単にご紹介したい。

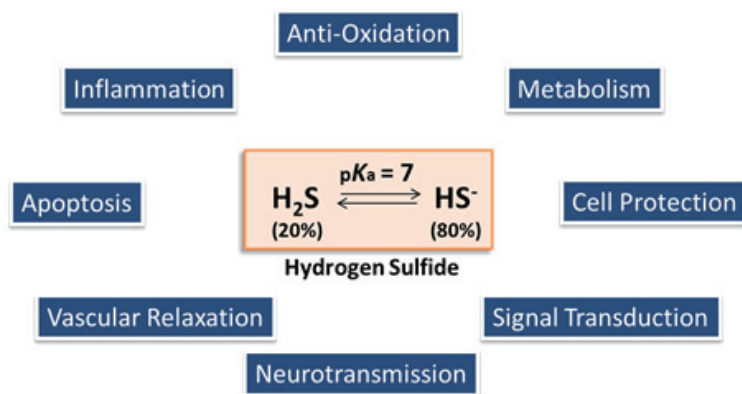


図1 生体内における硫化水素とその働き

## 1. 硫化水素の生合成

生体内における硫化水素は、L-cysteine や L-homocysteine を基質として代謝酵素 CBS、CSE あるいは 3-MST によってカタボリックに産生される。各酵素は組織あるいは細胞によって発現量が異なっている他、その発現量や機能は多くの生理活性物質によって制御されているため、生体内における役割は多岐にわたっている。本項では、各酵素の活性化や機能について概説する。

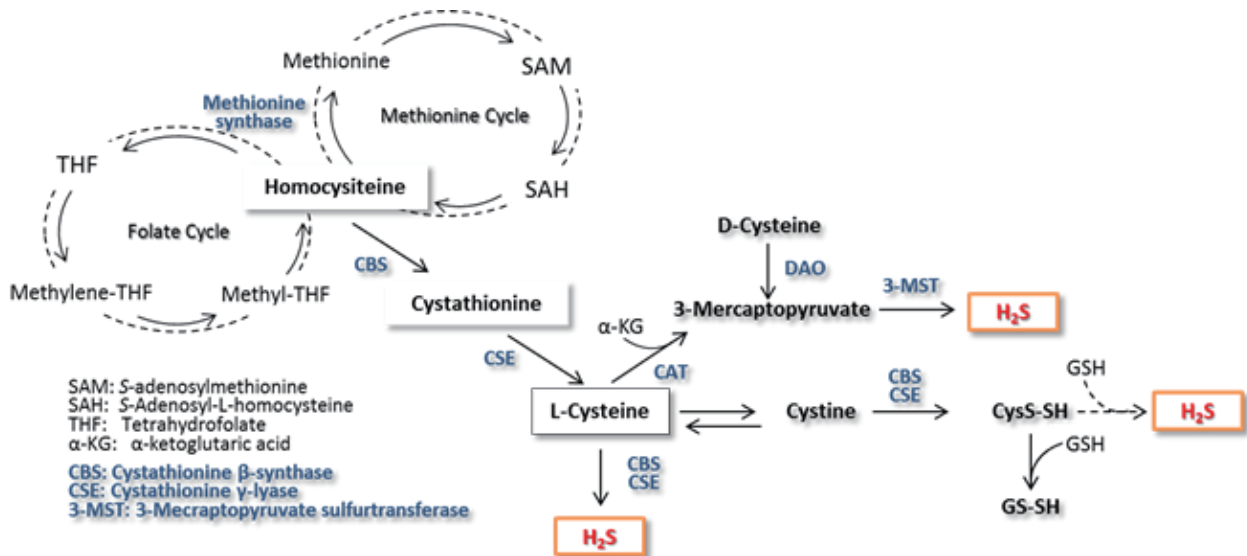


図1-1 硫化水素の主な生合成



## 1-1. Cystathionine-β-synthase (CBS)

この酵素は 63 kDa のサブユニット 2 個から形成される 2 量体タンパク質であり、N 末端にはヘムドメイン、続いて補酵素である PLP (pyridoxal phosphate) の結合ドメイン、そして C 末端には調節ドメインが存在し、この調節ドメインに SAM (S-adenosyl methionine) が結合することによって活性化することがわかっている。また、N 末端ヘムに第 2 のシグナルガス分子である CO が結合することによって活性が阻害されることから、この酵素の活性は高次に制御されているものと考えられる<sup>5)</sup>。CBS は、L-serine と L-homocysteine から L-cystathionine を合成する酵素として知られているが、L-cysteine と L-homocysteine を基質とした場合には、L-cystathionine を生成すると同時に硫化水素を生成する。また、マイナーな反応として L-cysteine のみを基質とした場合、L-serine や L-lanthionine が生成し、同時に硫化水素が発生する<sup>6)-8)</sup>。

CBS は、多くの組織で発現が確認されているが、特に肝臓や腎臓<sup>9)</sup>そして脳に多く発現<sup>10)</sup>していることが確認されている。

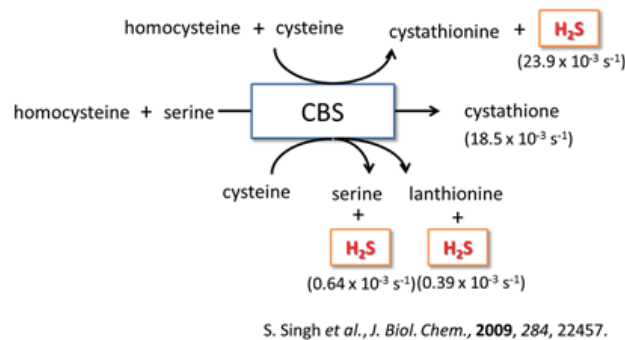


図 1-2 CBS による硫化水素の産生

## 1-2. Cystathionine-γ-lyase (CSE)

この酵素は、約 45 kDa のサブユニット 4 個から形成される 4 量体タンパク質である。CBS と同様に PLP 依存性酵素であるが、ヘムドメインや SAM 結合ドメインは存在しない<sup>5)</sup>。この酵素は、cystathionine から L-cysteine を合成する酵素であるが、L-cysteine や L-homocysteine を基質とした場合には、硫化水素を生成する。主な硫化水素の生成ルートは、L-cysteine を基質として pyruvate を生成するルートであるが、これらの反応は L-homocysteine の濃度に依存しており、L-homocysteine 濃度が高い場合には、それを基質として α-KB (α-ketobutyrate) を生成する反応や L-homolanthionine を生成する反応が優先的に進行する<sup>8,11)</sup>。

CSE は、肝臓、腎臓、大動脈および膵臓など多くの組織に発現が認められている<sup>9, 12, 13)</sup>。しかし、興味深いことにその発現制御は CBS と異なっている。CBS は恒常的に発現しているのに対し、CSE は外部刺激に応じて発現がコントロールされており、例えば、膵 β 細胞においては高血糖刺激に応答して CSE 発現が誘導される<sup>14)</sup>。

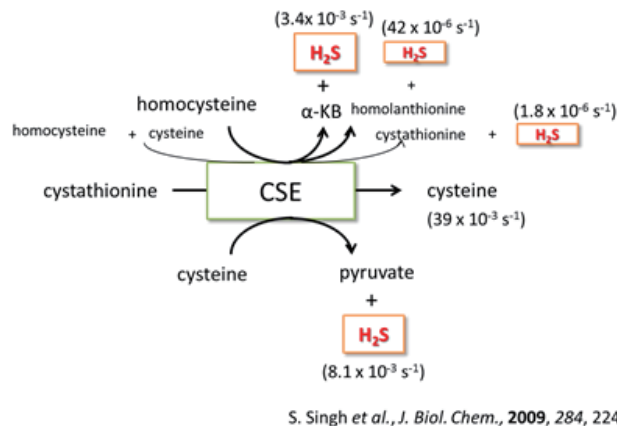


図 1-3 CSE による硫化水素の産生

### 1-3. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST)

この酵素は 34 kDa の単量体タンパク質であり、3-mercaptopyruvate (3-MP) を pyruvate に変換する。硫化水素生成反応において 3-MST は cysteine aminotransferase (CAT) と連動して働き、L-cysteine から 3-MP を介して硫化水素を産生する。この経路での硫化水素生成機構は、CBS や CSE とは異なっており 3-MST の活性中心に存在するシステイン残基が 3-MP との反応によってスルフヒドリル化された後、チオレドキシンのような還元物質によって還元されて硫化水素を放出する<sup>15, 16)</sup>。

3-MST は、脳（ニューロン）、肝臓、腎臓、心臓、血管内皮、平滑筋、網膜に存在する<sup>17,18)</sup>。細胞内においては CBS や CSE が細胞質に局在しているのに対し、3-MST はミトコンドリアにも局在していることから、特異的な機能があると考えられている<sup>16)</sup>。

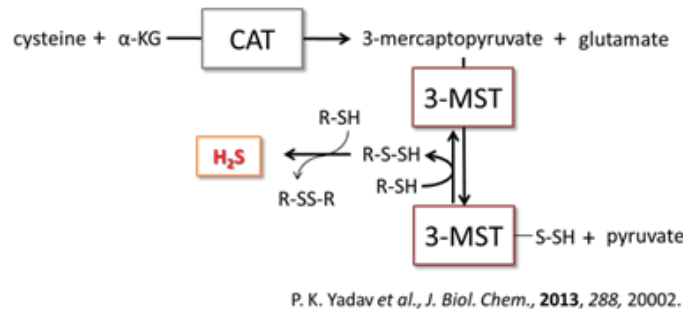


図 1-4 CAT/3-MST による硫化水素の産生

### 1-4. ピリドキサル酵素 CBS, CSE の反応機構

CBS と CSE は基質も多様かつ類似しており、区別して理解しにくい部分もあるが、共通の反応中間体を想定するとこれらの酵素反応が理解しやすくなる。まず、L-cysteine(L-Cys) を基質として CBS あるいは CSE によって H<sub>2</sub>S が発生するまでを考える。この部分は CBS, CSE とともに中間体 I を生成する共通の反応機構であると考えられる（図 1-5）。L-Cys のアミノ基が補酵素ピリドキサルとシッフ塩基を形成し、カルボキシル基の隣の α-プロトンが酸性化することでチオール基の脱離が起こりやすくなる。H<sub>2</sub>S の脱離によって中間体 I が生成すると考えられ、これ以降は CBS と CSE とで異なった反応経路をとる。

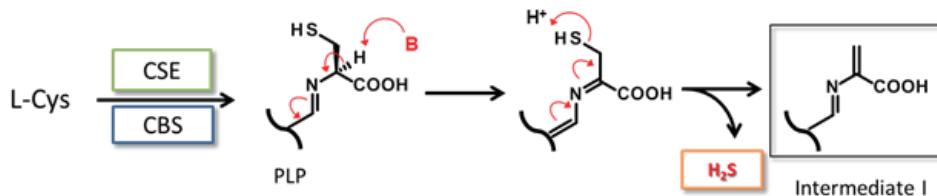


図 1-5 L-Cys を基質した場合の CBS, CSE による硫化水素生成機構

CBS の場合は、共基質である L-homocysteine (L-Hcy) のチオール基が中間体 I のオレフィン部分に共役付加し、最終的に cystathionine を与える（図 1-6, path A）。また同様の反応で、L-Hcy の代わりに L-Cys が共役付加すると lanthionine、水が付加すると L-serine (L-Ser) を与える。一方、CSE の場合は中間体 I が加水分解されピルビン酸とアンモニアが生成する（図 1-6, path B）。

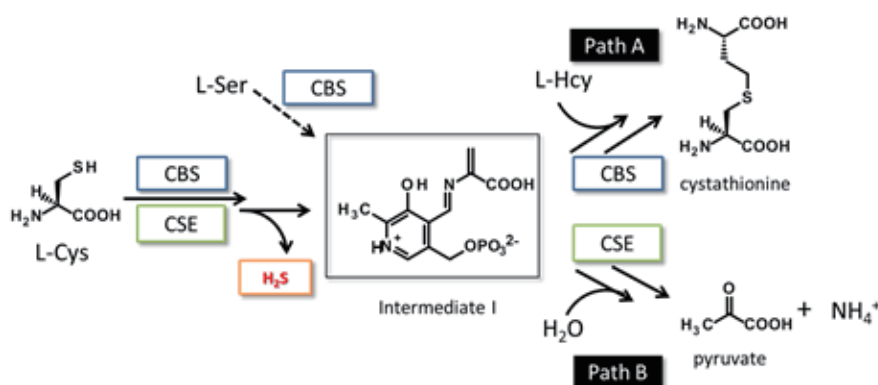


図 1-6 L-Cys を基質した場合の CBS, CSE の反応機構

また、CSE は L-Hcy が高濃度のとき、L-Hcy を基質として  $\text{H}_2\text{S}$  を生成する（図 1-7）。ここでは  $\alpha$ -プロトンに続いて  $\beta$ -プロトンも引き抜かれ、さらに  $\text{H}_2\text{S}$  が脱離することで中間体 II が生成すると考えられる。

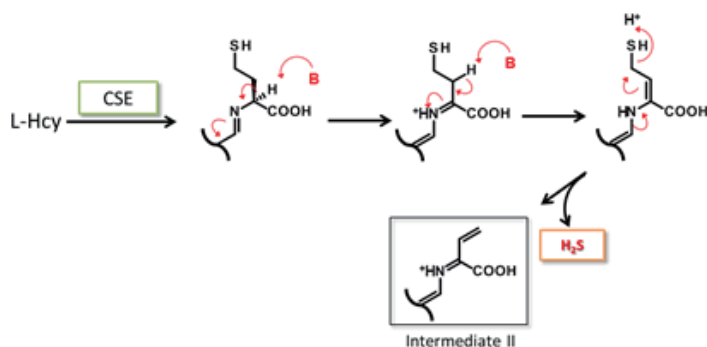


図 1-7 L-Hcy を基質した場合の CSE による硫化水素生成機構

中間体 II 以降は L-Cys の場合（図 1-6）と同様、L-Hcy が共役付加すれば homolanthionine、加水分解が優先すると  $\alpha$ -ketobutyrate ( $\alpha$ -KB) が生成する（図 1-8）。

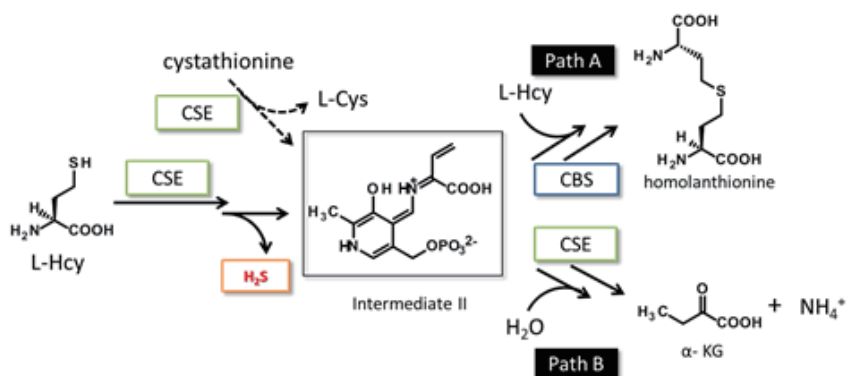


図 1-8 L-Hcy を基質した場合の CBS, CSE の反応機構

生体中では、L-Cys は L-Hcy から cystathionine を経て生合成される（図 1-1）。最初の L-Cys から cystathionine までの反応は CBS が触媒し、中間体 I を経由する path A（図 1-6）であり、次の cystathionine から L-Cys までの反応は、CSE が触媒し、中間体 II を経由する path B（図 1-8）であると考えられる。この場合、CSE は cystathionine を基質とし、L-Cys 及び、 $\alpha$ -KB、アンモニアを生成する。



## 2. 硫化水素のバイオロジー

硫化水素の生体内機能は多岐に渡っており、組織や細胞によっても異なっている。また、硫化水素の合成ルートや標的タンパク質、反応機構など、詳細なメカニズムは不明な点が多く、今後も活発に研究が行われていくものと思われる。

現在、考えられている硫化水素の主な生理活性を以下に示す。その作用機序の詳細は不明であるが、主にタンパク質のチオール基に作用して機能を果たしており、その中でもタンパク質システインのチオール基に硫黄が付加する S- スルフヒドリル化反応 (S-sulfhydration) が最も重要な作用機構と考えられている<sup>19)</sup>。しかし、硫化水素が直接システインチオール基と反応するとは考えにくく、S- スルフヒドリル化反応の詳細なメカニズムについては、現在も研究が行われている。S- スルフヒドリル化反応に関しては、後述を参照して頂きたい。

### - 硫化水素の主な生理機能 -

- ・ 血管弛緩
- ・ 細胞保護 (抗酸化、抗老化、抗アポトーシス、細胞修復、タンパク質分解)
- ・ 神経伝達 (記憶、疼痛)
- ・ アポトーシス
- ・ 糖代謝
- ・ インスリン分泌

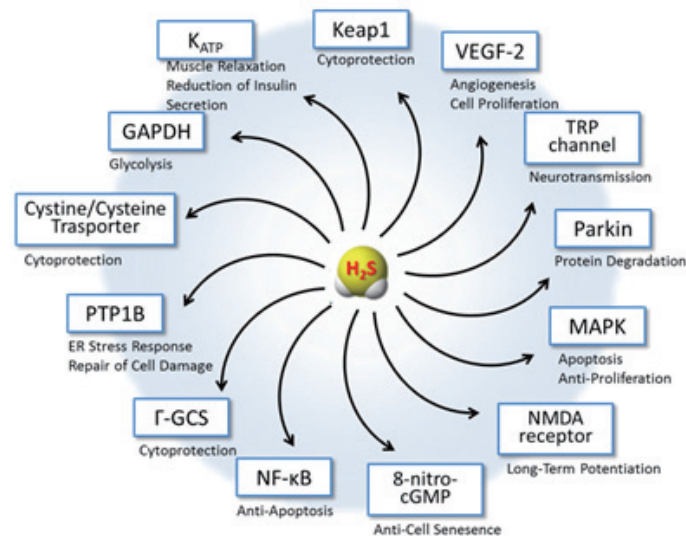


図 2-1 硫化水素の主な生理活性

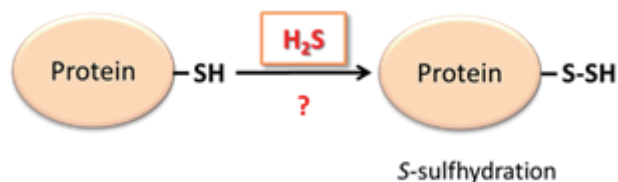


図 2-2 タンパク質の S- スルフヒドリル化



## 2-1. 血管弛緩作用

硫化水素は NO と同様に血管弛緩作用を示すことが確認されている。しかし、NO とは異なり、硫化水素は平滑筋細胞膜の ATP 依存性カリウムイオンチャネルを活性化し、過分極を引き起こすことが知られている<sup>20)</sup>。硫化水素の産生は血管内皮細胞および平滑筋細胞のいずれにおいても確認されており、平滑筋細胞では CSE が主な産生酵素と考えられている。一方、血管内皮細胞では主な硫化水素合成酵素が CSE なのか 3-MST なのかは議論が分かれている<sup>21-23)</sup>。

## 2-2. 細胞保護機能

硫化水素は cytochrome c を阻害して細胞死を引き起こすことが知られているが、低濃度では細胞を保護する働きをすることが確認されている。硫化水素による細胞保護機能には、以下に示すような機構が関与すると考えられている。

### 1) cysteine/cystine の細胞内取り込み促進

cysteine/cystine は、細胞内の主要な抗酸化物質である glutathione (GSH) の原料として使用されるアミノ酸である。硫化水素は、L-Cys あるいは cystine のトランスポーターを活性化することで、これらの細胞内への取り込みを促進し、GSH 合成を助けている<sup>23)</sup>。

### 2) GSH 合成酵素 (γ-GCS) 活性化

GSH の合成には、L-glutamate と L-cystine から γ-Glu-Cys を合成する γ-glutamylcysteine synthetase (γ-GCS) と γ-Glu-Cys から GSH を合成する glutathione synthetase (GS) が関与している。硫化水素は GS ではなく γ-GCS を活性化することが確認されている<sup>23)</sup>。

### 3) Keap1/Nrf2 活性化による抗酸化タンパク質の発現誘導

Nrf2 は、GSH 合成酵素や thioredoxin、hemeoxygenase-1 (HO-1) などの抗酸化タンパク質の発現を制御する転写因子であり、Keap1 は Nrf2 の核内移行を制御する酸化ストレス応答性タンパク質である。Calvert らは硫化水素による心筋細胞保護は、Keap1/Nrf2 を介した抗酸化タンパク質発現が関与していることを明らかにしている<sup>24)</sup>。また Koike らはこのような硫化水素による Keap1/Nrf2 の活性化は硫化水素自身ではなく、硫化水素が酸化されることによって生成されるポリスルフィドが実質的な作用物質であるとしている<sup>25)</sup>。Keap1 は通常 Nrf2 と複合体を形成し、Nrf2 の核内移行を阻害しているが、Keap1 のシステインチオール基がスルフヒドリル化されると Nrf2 が Keap1 から解離し、核内に移行すると考えられている<sup>26)</sup>。

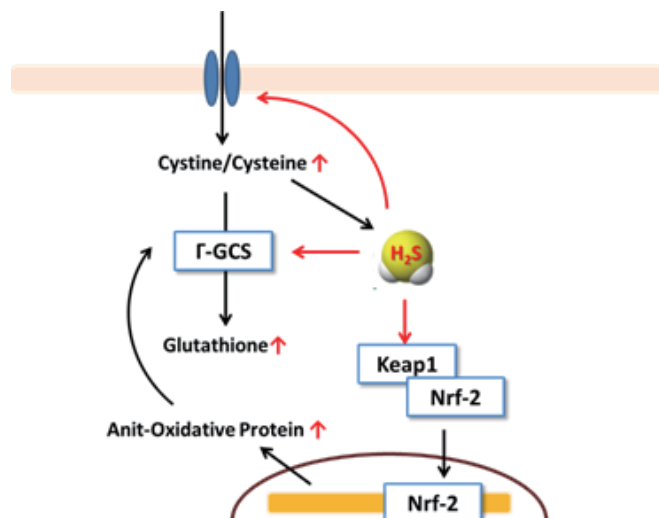


図 2-3 硫化水素による細胞保護機能

#### 4) NF- $\kappa$ B 活性化を介した抗アポトーシスタンパク質発現誘導

NF- $\kappa$ B は、ストレスやサイトカインなどの刺激によって活性化される転写因子であり、炎症や細胞増殖、アポトーシスに関与している。Sen らはこの転写因子が硫化水素によって活性化され、抗アポトーシス活性を発揮することを明らかにしている<sup>27)</sup>。Sen らは TNF- $\alpha$  のような刺激によって硫化水素合成酵素である CSE が発現して硫化水素を産生し、NF- $\kappa$ B をスルフヒドリル化することによって活性化している。

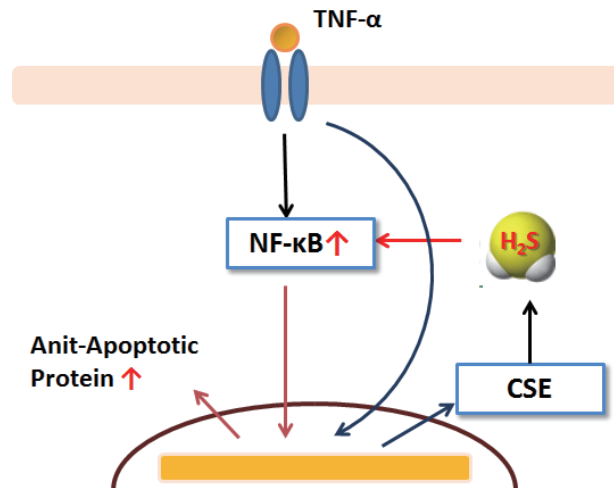


図 2-4 硫化水素による抗アポトーシス作用

#### 5) tyrosine phosphatase 活性化による ER ストレス応答

tyrosine phosphatase は、リン酸化されたチロシン残基を脱リン酸化する酵素であり、キナーゼカスケードを制御する重要な酵素である。PTP1B はインスリンやレプチンシグナルに関与する重要な脱リン酸化酵素の一つとして知られているが、最近では小胞体 (ER) ストレス応答に関与していることが示唆され注目されている。ER ストレスは細胞が酸化ストレスや遺伝子変異などにより産生された異常なタンパク質が ER に蓄積し、細胞機能に障害をきたす現象である。PERK はタンパク質合成を調節するキナーゼであり、ER ストレスによってこの酵素が活性化し、タンパク質合成の抑制および修復のプロセスに導く。PTP1B は、この PERK を脱リン酸化することで酵素活性を抑制する働きを持つ。Krishnan らは硫化水素が PTP1B の活性システインを S-スルフヒドリル化することでこの酵素を不活性化し、PERK の活性化を促進することで ER ストレスに応答すると報告している<sup>28)</sup>。

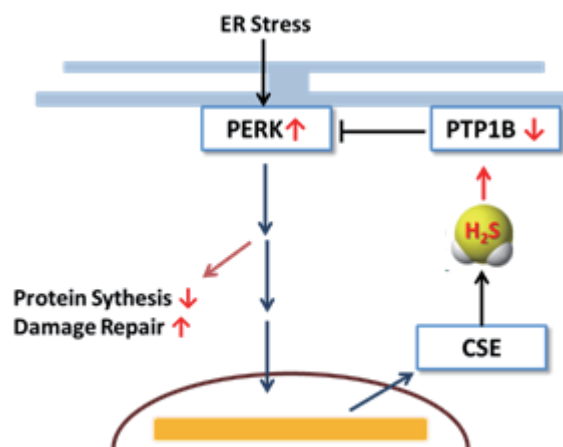


図 2-5 硫化水素による ER ストレス応答制御

#### 6) H-Ras タンパク質の抗 S- グアニル化による心筋細胞の保護

H-Ras タンパク質は低分子 GTP 結合タンパク質であり、がん遺伝子の一つとして知られている。Nishida らはこの H-Ras タンパク質が心筋細胞の老化を引き起こすことを明らかにし、さらに硫化水素が H-Ras タンパク質の活性化を抑制することを報告している<sup>29)</sup>。H-Ras タンパク質は 8-nitro-cGMP のような親電子物質のシステインチオール基への結合を引き金として活性化する。硫化水素はこのような親電子物質と即座に反応することで親電子物質の H-Ras タンパク質への結合を低下させ、細胞老化を抑制すると考えられている。

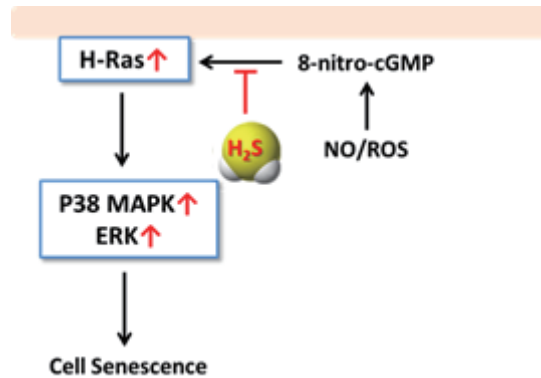


図 2-6 硫化水素による心筋細胞保護

#### 7) Parkin 活性化によるタンパク質分解

Parkin は E3 ubiquitin ligase であり、ユビキチン - プロテアソーム系を介したタンパク質分解に関わる重要な酵素である。そのため、Parkin の機能不全は不要なタンパク質の蓄積を促し、細胞障害を引き起こすため、パーキンソン病の原因の一つと考えられている。これまでの研究からタンパク質内に存在するシステインチオールが酵素活性に重要であり、S- ニトロシル化されると不活性化することが確認されている<sup>30, 31)</sup>。また一方で、Vandiver らはこれらのシステインチオールが S- スルフヒドリル化されることで活性化することを明らかにしている<sup>32)</sup>。

#### 8) 膵 β 細胞のインスリン分泌抑制と細胞保護

Niki らは膵 β 細胞が高血糖状態にさらされた場合、CSE を発現させ硫化水素によってインスリン分泌を抑制することを見出している<sup>33)</sup>。これは、膵 β 細胞が自らの細胞活動を低下させ、慢性的な高血糖というストレス状態から細胞を守るための保護機能であると考えられている。

#### 9) 活性酸素消去作用

硫化水素はそれ自体が還元物質であるため、直接活性酸素を消去することが可能である。Mitsuhashi らはスーパーオキシドに対して<sup>34)</sup>、Whiteman らはパーオキシナイトライトや次亜塩素酸に対して<sup>35)</sup>、Geng らは過酸化水素に対して<sup>36)</sup>、硫化水素が消去活性を示すことを明らかにしている。しかしながら、硫化水素の還元能は GSH や cysteine よりも低く<sup>37)</sup>、生体内における存在量から考えても、GSH やその他の抗酸化タンパク質よりもその寄与は小さいと考えられている。



### 2-3. 神経伝達（記憶、疼痛）

硫化水素は神経伝達系に対しても多くの機能を果たしている。主に硫化水素は陽イオンチャネルの制御に関わっており、神経細胞では NMDA 受容体、アストロサイトでは TRP チャネルが活性化される。NMDA 受容体はグルタミン酸刺激によって活性化される陽イオンチャネルであり、カルシウムなどの陽イオンを細胞内に流入させることで神経伝達を行っている。特にこの受容体は海馬の長期増強（LTP）において重要な役割を果たしており、硫化水素はこの受容体を還元、さらにスルフヒドリル化することによりグルタミン酸の感受性を高めると考えられている<sup>38, 39)</sup>。ちなみに神経細胞における硫化水素産生は、主に CAT/3-MST の経路が関わっている<sup>40)</sup>。

一方、TRP チャネルは環境応答性の陽イオンチャネルであり、温度や酸化ストレス、痛みなどの刺激に応答してチャネルを開閉し、細胞内カルシウム濃度を制御している。硫化水素は、このチャネルをスルフヒドリル化することによって直接活性化することが示唆されている<sup>41, 42)</sup>。アストロサイトの硫化水素は主に CBS によって産生され、アストロサイト自身を活性化すると共に神経細胞に作用し、神経伝達に寄与しているものと考えられる<sup>43)</sup>。

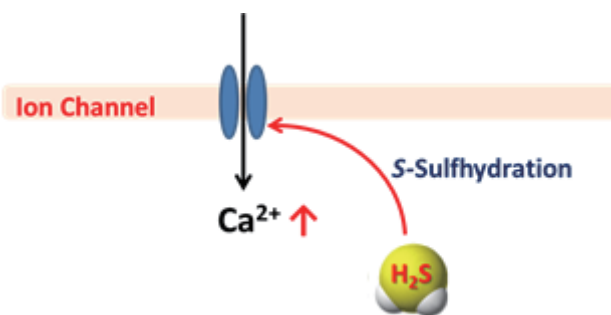


図 2-7 硫化水素による陽イオンチャネル制御

### 2-4. アポトーシス誘導

硫化水素は細胞保護機能を有すると共にアポトーシスを誘導することが知られている。その詳細なメカニズムは不明であるが、Yang らはヒト aorta smooth muscle cell において MAPKs および caspase の活性化を介したアポトーシス<sup>44, 45)</sup>を、また Adahikari らは pancreatic acinar cell において JNK および p38 MAP kinase を介した硫化水素誘導性のアポトーシス<sup>46, 47)</sup>を確認している。さらに、Deng らは硫化水素ドナーである GYY4137 がガン細胞特異的にアポトーシス誘導を引き起こすことを示している<sup>48)</sup>。

### 2-5. エネルギー産生

Mustafa らの報告によれば、糖代謝に関与する glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) は S-スルフヒドリル化されることで活性化し、S-ニトロシル化されることで不活性化することが明らかとなっている<sup>49)</sup>。また、Fu らは vascular smooth-muscle cells において低酸素刺激によって CSE がミトコンドリアに移行し、硫化水素によってミトコンドリア内の ATP 産生が増加することを明らかにしている<sup>50)</sup>。

Szabo らは大腸癌細胞において CBS が過剰発現していることを示しており、硫化水素によって ATP 産生、細胞増殖および血管新生が促進されるとしている<sup>51)</sup>。これは、ミトコンドリアが硫化水素を電子ドナーとして取り込み、電子伝達系に関与することでプロトンポンプを活性化しているためだと考えられている<sup>52, 53)</sup>。

### 2-6. カロリー制限と硫黄代謝

カロリー制限による寿命延長が、酵母、線虫、ショウジョウバエ、マウスで報告されているが、その詳細な分子機構は不明であった。Hine らの報告によれば、カロリー制限下におかれたマウスでは CSE の発現が亢進し、硫化水素の産生が増加していることが示されている<sup>54)</sup>。カロリー制限による寿命延長やストレス耐性の分子機構として硫黄代謝の亢進が明らかにされ、その機構は種を超えて保存されている。



### 3. 硫化水素放出試薬

硫化水素の多岐に渡る生理作用が明らかになるに従い、硫化水素を治療に応用する動きが活発になってきている。特に硫化水素を放出する薬（硫化水素ドナー）は、大学や創薬ベンチャーをはじめ多くの研究機関で開発が進められている<sup>55)</sup>。

一般的に、硫化水素研究に使用されるドナーは、硫化水素ナトリウム（NaHS）や硫化ナトリウム（Na<sub>2</sub>S）などの無機塩である。これらの無機塩は水に溶解するとすぐに分解して硫化水素（硫化物イオン、硫化水素イオン、硫化水素ガス）を放出する。前述したように、水溶液中での硫化水素の状態はpKaに依存しており、中性条件下では約80%が硫化水素イオン（HS<sup>-</sup>）、約20%は硫化水素ガス（H<sub>2</sub>S）となる。これまで多く硫化水素研究は、このような無機塩を細胞や組織などの生体試料に添加し、その応答や変化を追跡することで硫化水素の生理作用を調べている。しかしこのような無機塩を用いた場合、一過性の刺激を与えることはできるが、持続的な硫化水素の作用を調査することはできない。

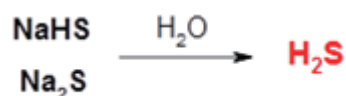


図 3-1 一般的な硫化水素ドナー

そこで開発されたのが、徐放型の硫化水素ドナー類である。GY4137 や ADT-OH 誘導体は、加水分解によって徐々に硫化水素を放出する化合物であり、その生理活性は NaHS などの無機塩とは異なっている。例えば、マクロファージにおける LPS 誘導性炎症作用において、GY4137 は抗炎症能を発揮するのに対し、NaHS は炎症作用を活性化する<sup>56)</sup>。また GY4137 は、NaHS には見られない特異的な抗がん活性を示すことも明らかとなっている<sup>57)</sup>。このような生理活性の違いは、硫化水素の放出速度に依存すると考えられており、硫化水素の生体内機能を解明する上で重要なファクターと言える。また最近、還元物質に応答して硫化水素を放出する新しいタイプのドナー類が開発されている<sup>58, 59)</sup>。これまでのドナー類は加水分解によって自動的に硫化水素が放出されるのに対し、還元物質応答型のドナーは加水分解を受けず、生体内の GSH や cysteine などの還元物質に応答して硫化水素が放出される。これは、生体内の硫化水素の生成機構を模倣したもので、このような硫化水素ドナーが心筋の虚血再灌流障害の保護作用や抗炎症作用を示すことが明らかとなっている。

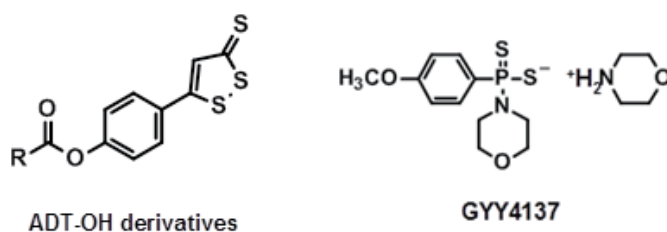


図 3-2 加水分解型硫化水素ドナー

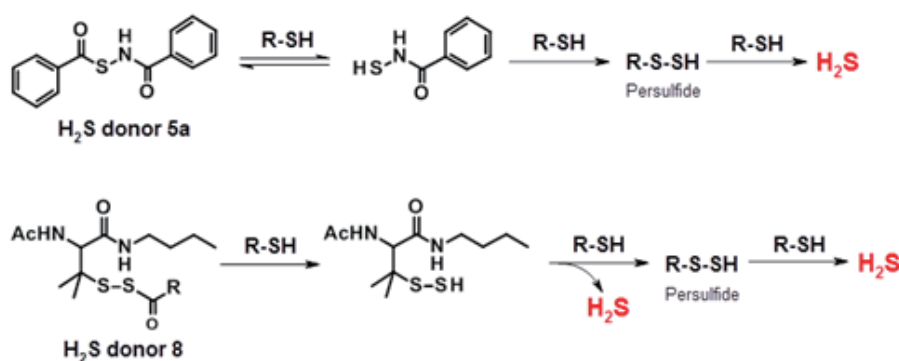


図 3-3 還元物質応答型硫化水素ドナー

## 4. 硫化水素の検出方法

硫化水素研究が活発になってきているにも拘わらず、生体内に存在する硫化水素の量や濃度は文献によって大きく異なっている。その原因の一つとして、確立された硫化水素の検出方法がないことにある<sup>60)</sup>。最も簡便な硫化水素検出法は、メチレンブルー法である。本手法は、酸性条件、塩化鉄(III)存在下でN,N-dimethyl-p-phenylenediammonium (DPDA) と硫化水素が反応してメチレンブルーを生成する機構に基づいており、生成したメチレンブルー由来の 650 nm 付近の吸光度から硫化水素を定量することが可能である<sup>61)</sup>。しかし、本手法は酸性条件下で反応を行うため、生体試料中に含まれる酸に不安定な結合型硫黄由来の硫化水素の反応への関与が示唆されており、実際の生体内硫化水素の絶対定量には適していないと考えられている<sup>62-65)</sup>。また、吸光度を利用するため感度が低いことも大きな課題の一つである。

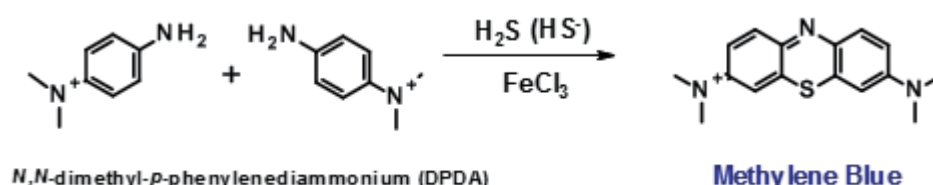


図 4-1 メチレンブルー法を用いた硫化水素検出

最も高感度で有用な検出法の一つとして、monobromobimane を用いた HPLC 分析法が汎用されている。monobromobimane はチオール特異的蛍光ラベル化剤であり、硫化水素 1 分子に対し、bimane 2 分子が特異的に標識した化合物 (sulfide-dibimane) を生成する。そのため、GSH や cysteine などの他のチオール基を有する物質との分離が可能であり、また生成した化合物が蛍光を有するため、蛍光検出による高感度分析ができる<sup>65-67)</sup>。また、最近では質量分析装置と併用することでさらに高感度化と高選択性を達成した方法が報告され、硫化水素だけではなく、SH 基を有する種々の生体試料の詳細な解析法として確立されつつある<sup>63, 69)</sup>。

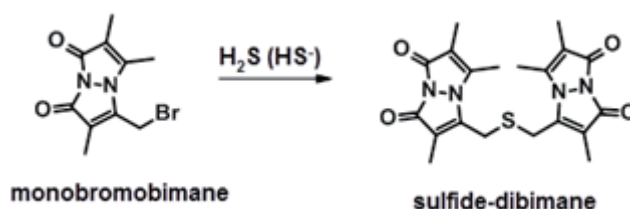


図 4-2 monobromobimane ラベル化法を用いた硫化水素検出

上記のように多くの硫化水素検出法が開発され、硫化水素研究はさらに活発化している。しかし、これらの手法はいずれも細胞や組織を破碎する必要がある、実際の硫化水素の量を反映しているのかは疑問が残っている。そこで有用な研究ツールとなるのが蛍光プローブである。最近、生体内の硫化水素を可視化するための蛍光プローブが数多く報告され、研究に利用されてきている。

硫化水素検出用の蛍光プローブは、その反応機構によって大きく 3 つに分類することができ、いずれも硫化水素との反応によって蛍光を発する。しかし、生体内に mM オーダーで存在する GSH の影響、硫化水素との反応性や選択性の低さなどの課題が残されており、生体内の硫化水素を可視化できる実用的な蛍光プローブは未だ存在していない。また、最近生体内でその存在が確認されているパースルフィドやポリスルフィドなどの影響についても検討する必要があると考えられる。報告されている一部の蛍光プローブはすでに市販されているが、上記の点を考慮して使用することが重要となる。

### 1) 硫化水素によるアジド基あるいはニトロ基の還元<sup>70-72)</sup>

このタイプは硫化水素の還元能を利用した蛍光プローブである。消光性のアジド基(ニトロ基の場合もある)の場合には無蛍光であるが、硫化水素によってアミノ基に還元されると蛍光が復活する。

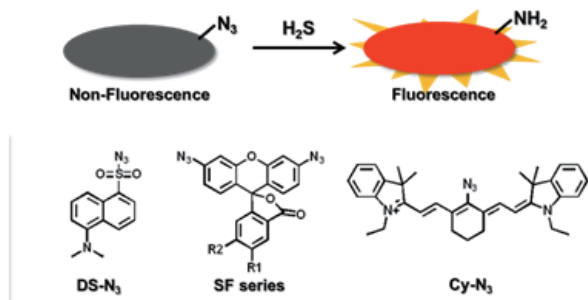


図 4-3 硫化水素の還元能を利用した蛍光プローブ

### 2) 硫化水素の求核付加反応<sup>73-75)</sup>

このタイプは硫化水素の求核性を利用した蛍光プローブである。その構造の中に電子欠損した不飽和結合を有しており、この状態では蛍光を発しない。しかし硫化水素が存在する場合には、不飽和結合部位に硫化水素がマイケル付加し、電子状態の変化あるいは連続して生じる反応によって蛍光を発する。

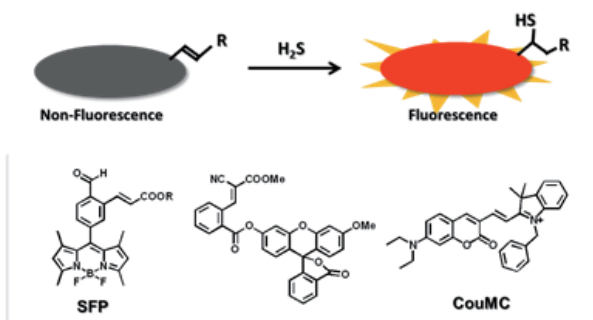


図 4-4 硫化水素による求核付加反応を利用した蛍光プローブ

### 3) 硫化水素による金属イオンの遊離<sup>76-78)</sup>

このタイプは硫化水素の金属配位を利用した蛍光プローブである。蛍光プローブは消光能を有する金属(主に  $\text{Cu}^{2+}$ ) との錯体であり、この状態では無蛍光である。しかし硫化水素が金属に配位し、蛍光プローブから金属が遊離すると蛍光が復活する。

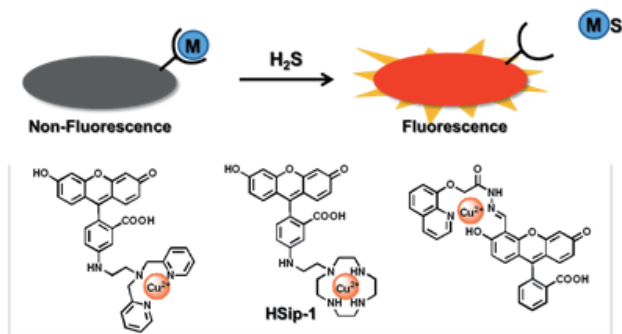


図 4-5 硫化水素の金属配位を利用した蛍光プローブ



## 5. 硫化水素と S- スルフヒドリル化

硫化水素は細胞内機能に様々な形で関与しているが、主な作用機構としてタンパク質の S- スルフヒドリル化が考えられている。タンパク質のシステインチオールは、活性酸素 (ROS) や NO などによって修飾を受け、その機能を制御している<sup>79, 80)</sup>。近年、硫化水素も同様にシステインチオール基への S- スルフヒドリル化という反応によってタンパク質機能に大きく関わっていることが示されている<sup>81)</sup>。しかしながら、硫化水素が直接チオール基と反応することは考えにくく、その作用機序は未だ不明である。

硫化水素によって S- スルフヒドリル化が起こる可能性の一つとして、修飾を受けたシステインチオールに対して硫化水素が直接反応する系が考えられている。システインチオールは、酸化ストレスや NO などの刺激によって、ジスルフィド (S-S)、スルフェン酸 (SOH)、S- ニトロシル (S-NO) のような様々な構造を有することが確認されている。このように酸化されたチオール基は電子が欠損するため、直接硫化水素イオンによる求核攻撃を受けることが考えられる<sup>87-90)</sup>。

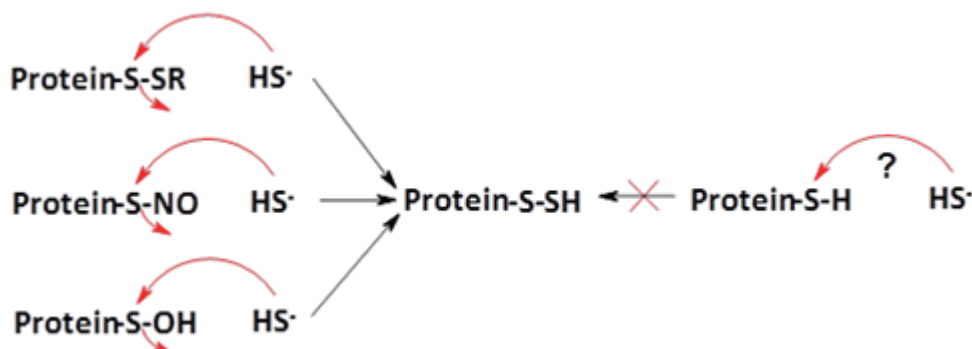


図 5-1 硫化水素によるタンパク質 S- スルフヒドリル化

また、その他の可能性として、最近サルフェン硫黄の存在が注目されている<sup>82)</sup>。サルフェン硫黄とは、硫黄原子にのみ共有結合した硫黄原子のことであり、ゼロ価の硫黄 (zero valent sulfur) を有するためフリーのシステインチオール基に転位し、スルフヒドリル化反応を起こすことが示されている<sup>83, 84)</sup>。サルフェン硫黄は、硫化水素が酸化されることによって生成される polysulfide ( $\text{HSSnH}$ )、GSH やタンパク質などに結合した結合型硫黄 (Bound Sulfur) など、生体内に多く存在することが示唆されている<sup>85, 86)</sup>。

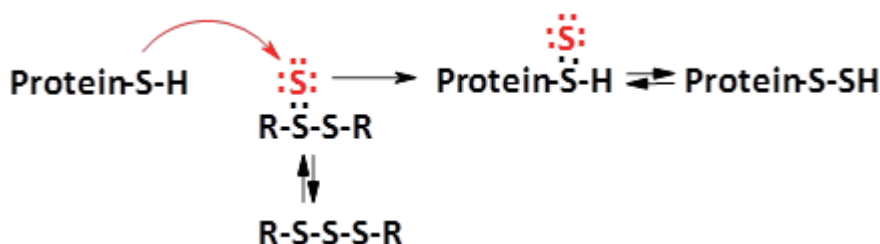


図 5-1 サルフェン硫黄を介したタンパク質 S- スルフヒドリル化

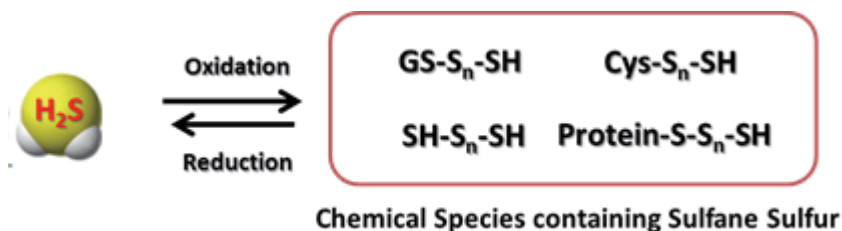


図 5-2 硫化水素とサルフェン硫黄を含む生体分子



最近、Ida らは硫化水素の合成酵素と考えられている CBS や CSE から cystine を基質として硫化水素ではなくサルフェン硫黄を含む cysteine persulfide が効率的に生成されることを明らかにしている。Ida らの報告によれば、この cysteine persulfide (CysS-SH) 内のサルフェン硫黄が、生体内に多く存在する GSH に転位し、glutathione persulfide (GS-SH) として生理活性を発揮するとしている。GS-SH は生体内に数十～数百  $\mu\text{M}$  存在しており、硫化水素（イオン）よりもはるかに高い反応性と抗酸化能を有することを示している<sup>91)</sup>。

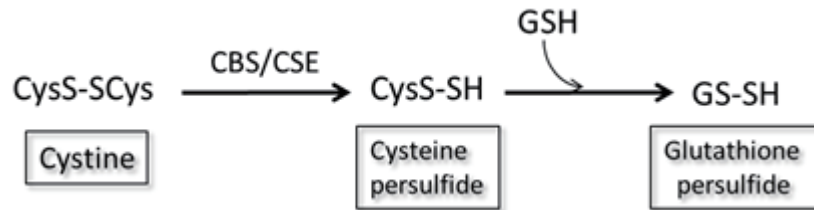


図 5-3 システインパースルフィドの生合成

一方で Kimura らはサルフェン硫黄を有するポリスルフィドが脳内に存在し、脳内の神経伝達を増強することを明らかにしている。その活性は硫化水素の約 300 倍であり、硫化水素の実質的な生理活性はサルフェン硫黄である可能性を示唆している<sup>92)</sup>。同様に Koike らは、polysulfide が Keap1/Nrf2 シグナルを介して神経細胞の保護作用を発揮することを示している<sup>93)</sup>。

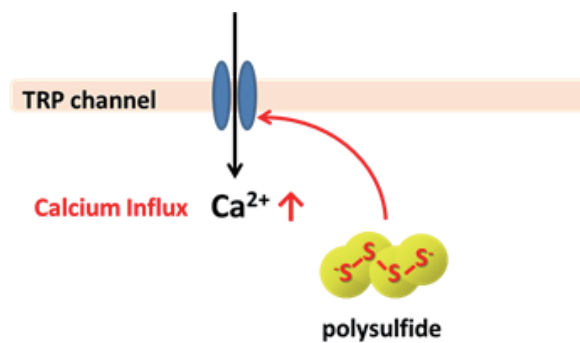


図 5-4 ポリスルフィドによる TRP チャンネル活性化

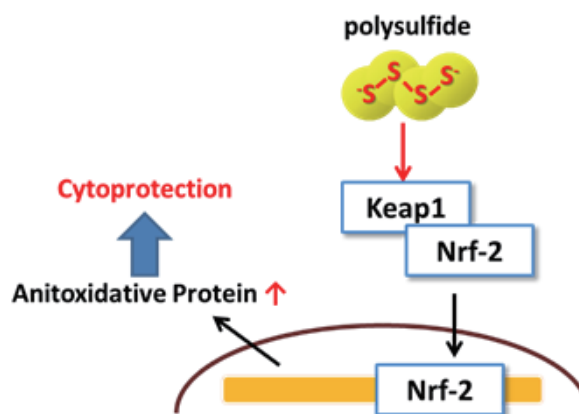


図 5-5 ポリスルフィドによる Keap1/Nrf2 活性化

上記のようにサルフェン硫黄の機能が少しずつ明らかにされる中、サルフェン硫黄研究用の新しい試薬も開発されてきている。

2013 年 Chen らは、サルフェン硫黄を検出するための蛍光プローブを世界で初めて報告している<sup>94)</sup>。このプローブはサルフェン硫黄の転位反応を利用したものであり、プローブ内のチオール基にサルフェン硫黄が転位すると、エステル分解によって保護基が脱離し、蛍光を発するというものである。Ida らはこれらプローブの一つである SSP2 を用いて CSE 過剰発現細胞内にサルフェン硫黄が多く生成されることを明らかにしている<sup>91)</sup>。

また、Zhang らは S-スルフヒドリル化タンパク質の新しい解析法について報告している<sup>95)</sup>。本手法では、はじめに S-スルフヒドリル化されたチオール基を含むすべての反応性チオール基を methylsulfonyl benzothiazole (MSBT) と反応させる。その後、シアノ基を有するビオチンを用いてタンパク質を処理すると S-スルフヒドリル化されたチオール基だけが反応してビオチン化される。本手法を用いることで、タンパク質の S-スルフヒドリル化には硫化水素合成酵素である CSE, CBS, 3-MST が関与していることが明らかとなっている<sup>91, 95)</sup>。

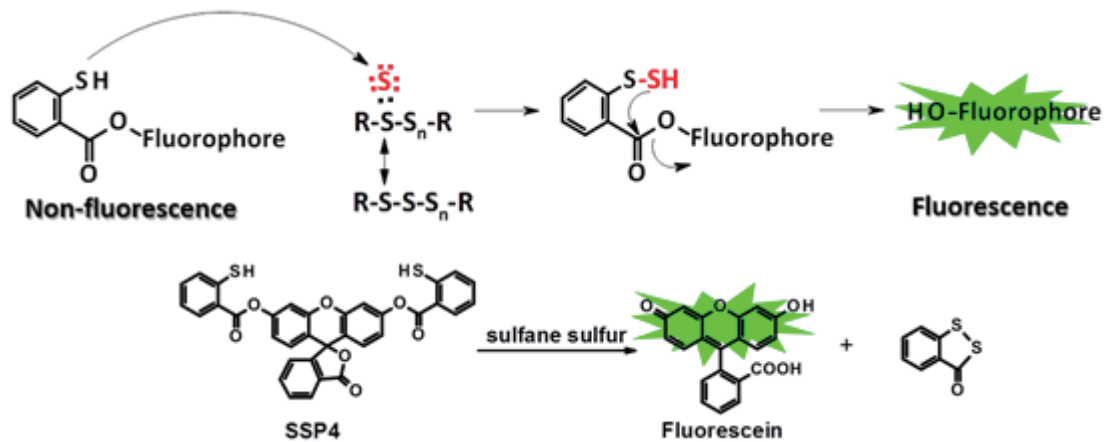


図 5-6 サルフェン硫黄検出用蛍光プローブ SSP4

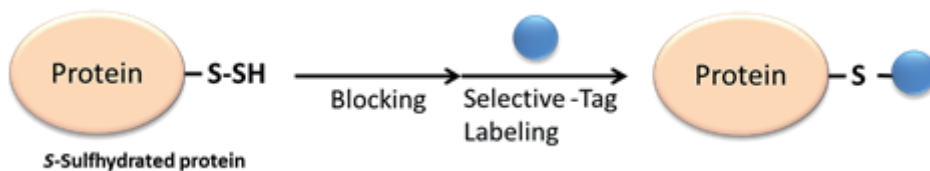


図 5-7 S-スルフヒドリル化タンパク質解析法

## 6. 硫化水素と NO のクロストーク

生体内における硫化水素の働きには、NO が深く関与していることがわかってきている<sup>96)</sup>。血管内皮細胞などに存在する NO 合成酵素 (eNOS; endothelial NO synthase) は、NO を産生することによって血管拡張を促進することが知られているが、硫化水素はこの eNOS を介した NO シグナル伝達系を高度に制御していることが明らかとなっている<sup>97, 98)</sup>。eNOS には二量体形成をコントロールするシステイン残基が存在する。NO はこのシステイン残基をニトロシル化することによって二量化を阻害し、不活性化する(ネガティブフィードバック)。しかし、硫化水素はこのシステイン残基を S-スルフヒドリル化することによって二量化を促し、活性化することが明らかとなっている。さらに、硫化水素は phosphoinositide 3-kinase (PI3K) /Akt を活性化することによって eNOS のリン酸化を促進し、eNOS を活性化する。また、下流の soluble guanylate cyclase (sGC) によって生成される cGMP の分解酵素 phosphodiesterase (PDE) を硫化水素は阻害する。つまり、硫化水素は eNOS の活性だけではなく、その下流にも作用して NO シグナル伝達系を増強しているのである。

また、最近の研究では硫化水素と NO の直接的な反応によって新しい活性分子種 nitroxyl (HNO) が生成して生理作用を示すことが示唆されており、大変興味深い<sup>99)</sup>。

硫化水素と NO の詳細な反応機構や HNO の作用機序は未だ不明であるが、硫化水素の生理活性には NO が密接に関わっていることは間違いないであろう。さらに注目すべきは、硫化水素と NO が反応した場合、HNO が生成すると同時にサルフェン硫黄を含む persulfide や polysulfide が生成することである<sup>100)</sup>。硫化水素、NO、HNO、サルフェン硫黄、さらには一酸化炭素も相互に関わってきており、硫化水素を中心とした研究分野は大きな広がりを見せてきている。

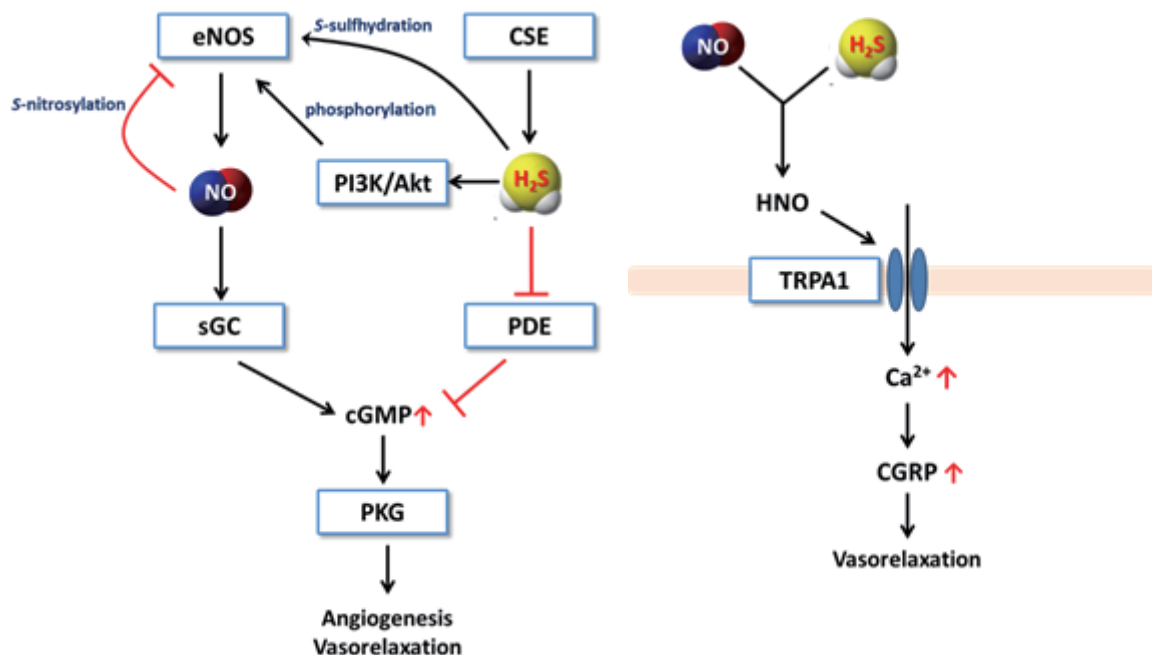


図 7-1 硫化水素と NO によるシグナル伝達



## 7. 今後の展望

硫化水素が様々な生理活性を示すことが報告され、今後も硫化水素研究は発展していくことが予想される。さらに、最近の研究結果からその作用物質は硫化水素（イオン）そのものではなく、サルフェン硫黄である可能性が示唆され、研究は新たな局面を迎えている。サルフェン硫黄の存在自体は決して新しいものではなく結合型硫黄として生体内に多く存在していることが古くから示されている。サルフェン硫黄の役割や詳細な作用機構は未だ不明であるが、サルフェン硫黄を有する polysulfide (persulfide) の驚くべき性質や機能が少しずつ明らかにされてきており、硫化水素研究を進めていく中でサルフェン硫黄の存在は無視できない。

このような硫化水素研究に寄与するため、同仁化学研究所では硫化水素研究用試薬として硫化水素ドナー類、サルフェン硫黄研究用としてサルフェン硫黄ドナーである多硫化ナトリウム類、およびサルフェン硫黄検出用蛍光プローブの製品化を進めている。

また最近の報告では、硫化水素と NO の密接な関係が示唆されており、硫化水素研究は大きな広がりを見せつつある。当社では、今後も硫化水素を中心とした硫黄研究に注目し、必要な試薬を提供していきたいと考えている。

## 参考文献

- 1) H. Kimura (Ed.), "Hydrogen Sulfide and its Therapeutic Applications", Springer-Verlag, Wien, **2013**.
- 2) R. Wang, "Physiological Implications of Hydrogen Sulfide: A Whiff Exploration that Blossomed", *Physiol. Rev.*, **2012**, 92, 791.
- 3) B. L. Predmore, D. J. Lefer and G. Gojon, "Hydrogen Sulfide in Biochemistry and Medicine", *Antioxid. Redox Signal.*, **2012**, 17, 119.
- 4) H. Kimura, "Production and Physiological Effects of Hydrogen Sulfide", *Antioxid. Redox Signal.*, **2014**, 20, 783.
- 5) B. Renga, "Hydrogen Sulfide Generation in Mammals: The Molecular Biology of Cystathione- $\beta$ -Synthase (CBS) and Cystathione- $\gamma$ -Lyase (CSE)", *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, **2011**, 10, 85.
- 6) X. Chen, K-H Jhee and W. D. Kruger, "Production of the Neuromodulator H<sub>2</sub>S by Cystathionine  $\beta$ -Synthase via the Condensation of Cysteine and Homocysteine", *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 52082.
- 7) P. K. Yadav and R. Banerjee, "Detection of Reaction Intermediates during Human Cystathionine- $\beta$ -Synthase-monitored Turnover and H<sub>2</sub>S Production", *J. Biol. Chem.*, **2012**, 287, 43464.
- 8) S. Singh, D. Padovani, R. A. Leslie, T. Chiku and R. Banerjee, "Relative Contributions of Cystathione  $\beta$ -Synthase and  $\gamma$ -Cystathionase to H<sub>2</sub>S Biogenesis via Alternative Trans-sulfuration Reactions", *J. Biol. Chem.*, **2009**, 284, 22457.
- 9) M. H. Stipanuk and P. W. Beck, "Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat", *Biochem. J.*, **1982**, 206, 267.
- 10) K. Abe and H. Kimura, "The Possible Role of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Neuromodulator", *J. Neurosci.*, **1996**, 16, 1066.
- 11) T. Chiku, D. Padovani, W. Zhu, S. Singh, V. Vitvitsky and R. Banerjee, "H<sub>2</sub>S Biogenesis by Human Cystathionine  $\gamma$ -Lyase Leads to the Novel Sulfur Metabolites Lanthionine and Homolanthionine and Is Responsive to the Grade of Hyperhomocysteinemia", *J. Biol. Chem.*, **2009**, 284, 11601.
- 12) W. Zhao, J. Zhang, Y. Lu and R. Wang, "The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener", *EMBO. J.*, **2001**, 20, 6008.
- 13) Y. Kaneko, Y. Kimura, H. Kimura and I. Niki, "L-Cysteine Inhibits Insulin Release From the Pancreatic  $\beta$ -Cell", *Diabetes*, **2006**, 55, 1391.
- 14) Y. Kaneko, T. Kimura, S. Taniguchi, M. Souma, Y. Kojima, Y. Kimura, H. Kimura and I. Niki, "Glucose-induced production of hydrogen sulfide may protect the pancreatic beta-cells from apoptotic cell death by high glucose", *FEBS Lett.*, **2009**, 583, 377.
- 15) P. K. Yadav, K. Yamada, T. Chiku, M. Koutmos and R. Banerjee, "Structure and kinetic analysis of H<sub>2</sub>S production by human mercaptopyruvate sulfurtransferase", *J. Biol. Chem.*, **2013**, 288, 20002.
- 16) Y. Mikami, N. Shibuya, Y. Kimura, N. Nagahara, Y. Ogasawara and H. Kimura, "Thioredoxin and dihydrolipoic acid are required for 3-mercaptopyrivate sulfurtransferase to produce hydrogen sulfide", *Biochem. J.*, **2011**, 439, 479.
- 17) N. Nagahara, T. Ito, H. Kitamura and T. Nishino, "Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat: confocal laser fluorescence and immunoelectron microscopic studies combined with biochemical analysis", *Histochem. Cell. Biol.*, **1998**, 110, 243.
- 18) N. Shibuya, Y. Mikami, Y. Kimura, N. Nagahara and H. Kimura, "Vascular endothelium express 3-mercaptopyrivate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide", *J. Biochem.*, **2009**, 146, 623.
- 19) A. K. Mustafa, M. M. Gadalla, N. Sen, S. Kim, W. Mu, S. K. Gazi, R. K. Barrow, G. Yang, R. Wang and S. H. Snyder, "H<sub>2</sub>S Signals Through Protein S-Sulfhydration", *Sci. Signal.*, **2009**, 2, ra72.
- 20) R. Hosoki, N. Matsuki and H. Kimura, "The Possible Role of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Smooth Muscle Relaxant in Synergy with Nitric Oxide", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, 237, 527.
- 21) G. Yang, L. Wu, B. Jiang, J. Qi, K. Cao, Q. Meng, A. K. Mustafa, W. Mu, S. Zhang, S. H. Snyder and R. Wang, "H<sub>2</sub>S as a Physiologic Vasorelaxant: Hypertension in Mice with Deletion of Cystathionine  $\gamma$ -Lyase", *Science*, **2008**, 322, 587.
- 22) N. Shibuya, Y. Mikami, Y. Kimura, N. Nagahara and H. Kimura, "Vascular endothelium express 3-mercaptopyrivate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide", *J. Biochem.*, **2009**, 146, 623.
- 23) P. K. Yadav, K. Yamada, T. Chiku, M. Koutmos and R. Banerjee, "Structure and kinetic analysis of H<sub>2</sub>S production by human mercaptopyruvate sulfurtransferase", *J. Biol. Chem.*, **2013**, 288, 20002.
- 24) J. W. Calvert, S. Jha, S. Gundewar, J. W. Elrod, A. Ramachandran, C. B. Pattillo, C. G. Kevil and D. J. Lefer, "Hydrogen Sulfide Mediates Cardioprotection Through Nrf2 Signaling", *Circ. Res.*, **2009**, 105, 365.
- 25) S. Koike, Y. Ogasawara, N. Shibuya, H. Kimura and K. Ishii, "Polysulfide exerts a protective effect against cytotoxicity caused by t-butylhydroperoxide through Nrf2 signaling in neuroblastoma cells", *FEBS Letters*, **2013**, 587, 3548.
- 26) G. Yang, K. Zhao, Y. Ju, S. Mani, Q. Cao, S. Puulika, N. Khaper, L. Wu and R. Wang, "Hydrogen Sulfide Protects Against Cellular Senescence via S-Sulfhydration of Keap1 and Activation of Nrf2", *Antioxid. Redox Signal.*, **2013**, 18, 1906.
- 27) N. Sen, B. D. Pau, M. M. Gadalla, A. K. Mustafa, T. Sen, R. Xu, S. Kim and S. H. Snyder, "Hydrogen Sulfide-Linked Sulfhydration of NF- $\kappa$ B Mediates Its Antiapoptotic Actions", *Mol. Cell*, **2012**, 45, 13.
- 28) N. Krishnan, C. Fu, D. J. Pappin and N. K. Tonks, "H<sub>2</sub>S-induced Sulfhydration of the Phosphatase PTP1B and Its Role in the Endoplasmic Reticulum Stress Response", *Sci. Signal.*, **2011**, 4, ra86.
- 29) M. Nishida, T. Sawa, N. Kitajima, K. Ono, H. Inoue, H. Ihara, H. Motohashi, M. Yamamoto, M. Suematsu, H. Kurose, A. van der Vliet, B. A. Freeman, T. Shibata, K. Uchida, Y. Kumagai and T. Akaike, "Hydrogen Sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration", *Nat. Chem. Biol.*, **2012**, 8, 714.
- 30) D. Yao, Z. Gu, T. Nakamura, Z-Q. Shi, Y. Ma, B. Gaston, L. A. Palmer, E. M. Rockenstein, Z. Zhang, E. Masliah, T. Uehara and S. A. Lipton, "Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease: S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2004**, 101, 10810.

- 31) K. K. K. Chung, B. Thomas, X. Li, O. Pletnikova, J. C. Troncoso, L. Marsh, V. L. Dawson and T. M. Dawson, "S-Nitrosylation of Parkin Regulates Ubiquitination and Compromises Parkin's Protective Function", *Science*, **2004**, 304, 1328.
- 32) M. S. Vandiver, B. D. Paul, R. Xu, S. Karuppagounder, F. Rao, A. M. Snowman, H. S. Ko, Y. Il Lee, V. L. Dawson, T. M. Dawson, N. Sen and S. H. Snyder, "Sulfhydration mediates neuroprotective actions of parkin", *Nat. Commun.*, **2013**, 4, 1626
- 33) Y. Kaneko, T. Kimura, S. Taniguchi, M. Souma, Y. Kojima, Y. Kimura, H. Kimura and I. Niki, "Glucose-induced production of hydrogen sulfide may protect the pancreatic beta-cells from apoptotic cell death by high glucose", *FEBS Lett.*, **2009**, 583, 377.
- 34) H. Mitsuhashi, S. Yamashita, H. Ikeuchi, T. Kuroiwa, Y. Kaneko, K. Kiromura, K. Ueki and Y. Nojima, "Oxidative Stress-Dependent Conversion of Hydrogen Sulfide to Sulfite by Activated Neutrophils", *Shock*, **2006**, 24, 529.
- 35) M. Whiteman, J. S. Armstrong, S. H. Chu, S. Jia-Ling, B-S. Wong, N. S. Cheung, B. Halliwell and P. K. Moore, "The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'?", *J Neurochem.*, **2004**, 90, 765.
- 36) B. Geng, L. Chang, C. Pan, Y. Qi, J. Zhao, Y. Pang, J. Du and C. Tang, "Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2004**, 318, 756.
- 37) O. Kabil and R. Banerjee, "Redox Biochemistry of Hydrogen Sulfide", *J. Biol. Chem.*, 2010, 285, 21903.
- 38) K. Abe and H. Kimura, "The Possible Role of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Neuromodulator", *J. Neurosci.*, 1996, 16, 1066.
- 39) M. M. Gadalla and S. H. Snyder, "Hydrogen sulfide as a gasotransmitter", *J. Neurochem.*, **2010**, 113, 14.
- 40) N. Shibuya, M. Tanaka, M. Yoshida, Y. Ogasawara, T. Togawa, K. Ishii and H. Kimura, "3-Mercaptopropionate Sulfurtransferase Produces Hydrogen Sulfide and Bound Sulfane Sulfur in the Brain", *Antioxid. Redox Signal.*, **2009**, 11, 703.
- 41) Y. Nagai, M. Tsugane, J-I. Oka and H. Kimura, "Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes", *FASEB. J.*, **2004**, 18, 557.
- 42) Y. Kimura, Y. Mikami, K. Osumi, M. Tsugane, J-I. Oka and H. Kimura, "Polysulfides are possible H<sub>2</sub>S-derived signaling molecules in rat brain", *FASEB. J.*, **2013**, 27, 2451.
- 43) H. Kimura, "Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system", *Neurochem. Int.*, **2013**, 63, 492.
- 44) G. Yang, X. Sun and R. Wang, "Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen activated protein kinases and caspase-3", *FASEB. J.*, **2004**, 18, 1782.
- 45) G. Yang, L. Wu and R. Wang, "Pro-apoptotic effect of endogenous H<sub>2</sub>S on human aorta smooth muscle cells", *FASEB. J.*, **2005**, 20, 553.
- 46) Y. Cao, S. Adhikari, A. D. Ang, P. K. Moore and M. Bhatia, "Mechanism of induction of pancreatic acinar cell apoptosis by hydrogen sulfide", *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **2006**, 291, C503.
- 47) S. Adhikari and M. Bhatia, "H<sub>2</sub>S-induced pancreatic acinar cell apoptosis is mediated via JNK and p38 MAP kinase", *J. Cell Mol. Med.*, **2008**, 12, 1374.
- 48) Z. W. Lee, J. Zhou, C-S Chen, Y. Zhao, C-H. Tan, L Li, P. K. Moore and L-W. Deng, "The Slow-Releasing Hydrogen Sulfide Donor, GYY4137, Exhibits Novel Anti-Cancer Effects In Vitro and In Vivo", *PLoS One.*, **2011**, 6, e21077.
- 49) A. K. Mustafa, M. M. Gadalla, N. Sen, S. Kim, W. Mu, S. K. Gazi, R. K. Barrow, G. Yang, R. Wang and S. H. Snyder, "H<sub>2</sub>S Signals Through Protein S-Sulfhydration", *Sci. Signal.*, **2009**, 2, ra72.
- 50) M. Fu, W. Zhang, Lingyun Wu, G. Yang, H. Li and R. Wang, "Hydrogen Sulfide (H<sub>2</sub>S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2012**, 109, 2943.
- 51) C. Szabo, C. Coletta, C. Chao, K. Modis, B. Szczesny, A. Papapetropoulos and M. R. Hellmich, "Tumor-derived hydrogen sulfide, produced by cystathione-β-synthase, stimulates bioenergetics, cell proliferation, and angiogenesis in colon cancer", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2013**, 110, 12474.
- 52) M. Gubern, M. Andriamihaja, T. Nubel, F. Blachier and F. Bouillaud, "Sulfide, the first inorganic substrate for human cells", *FASEB. J.*, **2007**, 21, 1699.
- 53) K. Modis, C. Coletta, K. Erdelyi, A. Papapetropoulos and C. Szabo, "Intramitochondrial hydrogen sulfide production by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase maintains mitochondrial electron flow and supports cellular bioenergetics", *FASEB. J.*, **2013**, 27, 601.
- 54) C. Hine, E. Harputlugil, Y. Zhang, C. Ruckstuhl, B. C. Lee, L. Brace, A. Longchamp, J. H. Trevino-Villarreal, P. Mejia, C. K. Ozaki, R. Wang, V. N. Gladyshev, F. Madeo, W. B. Mair and J. R. Mitchell, "Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits", *Cell*, **2014**, 160, 1.
- 55) G. Caliendo, G. Cirino, V. Santagada and J. L. Wallace, "Synthesis and Biological Effects of Hydrogen Sulfide (H<sub>2</sub>S): Development of H<sub>2</sub>S-Releasing Drugs as Pharmaceuticals", *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, 6275.
- 56) M. Whiteman, L. Li, P. Rose, C-H. Tan, D. B. Parkinson and P. K. Moore, "The Effect of Hydrogen Sulfide Donors on Lipopolysaccharide-Induced Formation of Inflammatory Mediators in Macrophage", *Antioxid. Redox Signal.*, **2010**, 12, 1147.
- 57) Z. W. Lee, J. Zhou, C-S Chen, Y. Zhao, C-H. Tan, L Li, P. K. Moore and L-W. Deng, "The Slow-Releasing Hydrogen Sulfide Donor, GYY4137, Exhibits Novel Anti-Cancer Effects In Vitro and In Vivo", *PLoS One.*, **2011**, 6, e21077.
- 58) Y. Zhao, H. Wang and M. Xian, "Cysteine-Activated Hydrogen Sulfide (H<sub>2</sub>S) Donors", *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **133**, 15.
- 59) Y. Zhao, S. Bhushan, C. Yang, H. Otsuka, J. D. Stein, A. Pacheco, B. Peng, N. O. Devarie-Baez, H. C. Aguilar, D. J. Lefer and M. Xian, "Controllable Hydrogen Sulfide Donors and Their Activity against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury", *ACS Chem. Biol.*, **2013**, 8, 1283.
- 60) G. K. Kolluru, X. Shen, S. C. Bir, C. G. Kevil, "Hydrogen sulfide chemical biology: pathophysiological roles and detection", *Nitric Oxide*, **2013**, 35, 5.
- 61) N. S. Lawrence, J. Davis and R. G. Compton, "Analytical strategies for the detection of sulfide: a review.", *Talanta*, **2000**, 52, 771.



- 62) Y. Kaneko, Y. Kimura, H. Kimura and I. Niki, "L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic beta-cell: possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter", *Diabetes*, **2006**, 55, 1391.
- 63) T. Morikawa, M. Kijimura, T. Nakamura, T. Hishiki, T. Nakanishi, Y. Yukutake, Y. Nagahata, M. Isikawa, K. Hattori, T. Takenouchi, T. Takahashi, I. Ishii, K. Matsubara, Y. Kabe, S. Uchiyama, E. Nagata, M. M. Gadalla, S. H. Snyder and M. Suematsu, "Hypoxic regulation of the cerebral microcirculation is mediated by a carbon monoxide-sensitive hydrogen sulfide pathway", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, 109, 1293.
- 64) M. Fu, W. Zhang, L. Wu, G. Yang, H. Li and R. Wang, "Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, 109, 2943.
- 65) A. D. Ang, A. Konigstorfer, G. I. Giles and M. Bhatia, "Measuring free tissue sulfide", *Adv. Biol. Chem.*, **2012**, 2, 360.
- 66) G. L. Newton, R. Dorian and R. C. Fahey, "Analysis of biological thiols: Derivatization with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography", *Anal. Biochem.*, **1981**, 114, 383.
- 67) E. A. Wintner, T. L. Deckwerth, W. Langston, A. Bengtsson, D. Leviten, P. Hill, M. A. Insko, R. Dumpit, E. VandenEkar, C. F. Toombs and C. Szabo, "A monobromobimane-based assay to measure the pharmacokinetic profile of reactive sulphide species in blood", *Br. J. Pharmacology*, **2010**, 160, 941.
- 68) X. Shen, C. B. Pattillo, S. Pardue, S. C. Bir, R. Wang and C. G. Kevil, "Measurement of plasma hydrogen sulfide in vivo and in vitro", *Free Radic. Biol. Med.*, **2011**, 50, 1021.
- 69) M. Nishida, T. Sawa, N. Kitajima, K. Ono, H. Inoue, H. Ihara, H. Motohashi, M. Yamamoto, M. Suematsu, H. Kurose, Albert van der Vliet, B. A. Freeman, T. Shibata, K. Uchida, Y. Kumagai and T. Akaike, *Nat. Chem. Biol.*, **2012**, 8, 714.
- 70) H. Peng, Y. Cheng, C. Dai, A. L. King, B. L. Predmore, D. J. Lefer, and B. Wang, "A Fluorescent Probe for Fast and Quatitative Detection of Hydrogen Sulfide in Blood", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50, 9672.
- 71) A. R. Lippert, E. J. New, and C. J. Chang, "Reaction-Based Fluorescent Probes for Selective Imaging of Hydrogen Sulfide in Living Cells", *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 10078.
- 72) F. Yu, P. Li, P. Song, B. Wang, J. Zhao, and K. Han, "An ICT-based strategy to a colorimetric and ratiometric fluorescence probe for hydrogen sulfide in living cells", *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 2852.
- 73) Y. Qian, J. Karpus, O. Kabil, S-Y Zhang, H-L Zhu, R. Banerjee, J. Zhao, and C. He, "Selective fluorescent probes for living-cell monitoring of sulphide", *Nat. Commun.*, **2011**, 2, 495.
- 74) C. Liu, B. Peng, S. Li, C-M Park, A. R. Whorton, and M. Xian, "Reaction Based Fluorescent Probes for Hydrogen Sulfide", *Org. Lett.*, **2012**, 14, 2184.
- 75) Y. Chen, C. Zhu, Z. Yang, J. Chen, Y. He, Y. Jiao, W. He, L. Qiu, J. Cen, and Z. Guo, "A Ratiometric Fluorescent Probe for Rapid Detection of Hydrogen Sulfide in Mitochondria", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 125, 1732.
- 76) M. G. Choi, S. Cha, H. Lee, H. L. Jeona, and S. Chang, "Sulfide-selective chemosignaling by a Cu<sup>2+</sup> complex of dipicolylamine appended fluorescein", *Chem. Commun.*, **2009**, 7390.
- 77) K. Sasakura, K. Hanaoka, N. Shibuya, Y. Mikami, Y. Kimura, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, H. Kimura, and T. Nagano, "Development of a highly selective fluorescence probe for hydrogen sulfide", *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 18003.
- 78) F. Hou, L. Huang, P. Xi, J. Cheng, X. Zhao, G. Xie, Y. Shi, F. Cheng, X. Yao, D. Bai, and Z. Zeng, "A Retrievable and Highly Selective Fluorescent Probe for Monitoring Sulfide and Imaging in Living Cells", *Inorg. Chem.*, **2012**, 51, 2454.
- 79) H. J. Forman, J. M. Fukuto and M. Torres, "Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers", *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **2004**, 287, C246.
- 80) C. E. Paulsen and K. S. Carroll, "Cysteine-Mediated Redox Signaling: Chemistry, Biology, and Tools for Discovery", *Chem. Rev.*, **2013**, 113, 4633.
- 81) B. D. Paul and S. H. Snyder, "H<sub>2</sub>S Signalling through protein sulfhydration and beyond", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2012**, 13, 499.
- 82) J. I. Toohey, "Sulphane sulfur in biological systems: a possible regulatory role", *Biochem. J.*, **1989**, 264, 625.
- 83) J. I. Toohey, "Sulfur signaling: Is the agent sulfide or sulfane?", *Anal. Biochem.*, **2011**, 413, 1.
- 84) R. Greiner, Z. Palinkas, K. Basell, D. Becher, H. Antelmann, P. Nagy and T. P. Dick, "Polysulfide Link H<sub>2</sub>S to Protein Thiol Oxidation", *Antioxid. Redox Signal.*, **2013**, 19, 1749.
- 85) Y. Ogasawara, S. Isoda and S. Tanabe, "Tissue and Subcellular Distribution of Bound and Acid-Labile Sulfur, and the Enzymic Capacity for Sulfide Production in the Rat", *Biol. Pharm. Bull.*, **1994**, 17, 1535.
- 86) C. Lu, A. Kavalier, E. Lukyanov and S. S. Gross, "S-sulfhydration/desulfhydration and S-nitrosylation/denitrosylation: A common paradigm for gasotransmitter signaling by H<sub>2</sub>S and NO", *Methods*, **2013**, 62, 177.
- 87) P. S-Y. Wong, J. Hyun, J. M. Fukuto, F. N. Shirota, E. G. DeMaster, D. W. Shoeman and H. T. Nagasawa, "Reaction between S-Nitrosothiols and Thiols: Generation of Nitroxyl (HNO) and Subsequent Chemistry", *Biochemistry*, **1998**, 37, 5362.
- 88) N. E. Francoleon, S. J. Carrington and J. M. Fukuto, "The reaction of H<sub>2</sub>S with oxidized thiols: Generation of persulfides and implications to H<sub>2</sub>S biology", *Arch. Biochem. Biophys.*, **2011**, 516, 146.
- 89) M. R. Filipovic, J. Lj. Miljkovic, T. Nauser, M. Royzen, K. Klos, T. Shubina, W. H. Koppenol, S. J. Lippard and I. Ivanovic-Burmazovic, "Chemical Characterization of the Smallest S-Nitrosothiol, HNSO; Cellular Cross-talk of H<sub>2</sub>S and S-Nitrosothiols", *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 12016.
- 90) D. Zhang, I. Macinokovic, N. O. Devarie-Baez, J. Pan, C-M. Park, K.S. Carroll, M. R. Filipovic and M. Xian, "Detection of Protein S-Sulfhydration by a Tag-Switch Technique", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 1.
- 91) T. Ida, T. Sawa, H. Ihara, Y. Tsuchiya, Y. Watanabe, Y. Kumagai, M. Suematsu, H. Motohashi, S. Fujii, T. Matsunaga, M. Yamamoto, K. Ono, N. O. Devarie-Baez, M. Xian, J. M. Fukuto, and T. Akaike, "Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **2014**, 111, 7606.

- 92) Y. Kimura, Y. Mikami, K. Osumi, M. Tsugane, J-I. Oka and H. Kimura, "Polysulfides are possible H<sub>2</sub>S-derived signaling molecules in rat brain", *FASEB. J.*, **2013**, 27, 2451.
- 93) S. Koike, Y. Ogasawara, N. Shibuya, H. Kimura, and K. Ishii, "Polysulfide exerts a protective effect against cytotoxicity caused by t-butylhydroperoxide through Nrf2 signaling in neuroblastoma cells", *FEBS Lett.*, **2013**, 3548.
- 94) W. Chen, C. Liu, B. Peng, Y. Zhao, A. Pacheco and M. Xian, "New fluorescent probes for sultrane sulfurs and the application in bioimaging", *Chem. Sci.*, **2013**, 4, 2892.
- 95) D. Zhang, I. Macinkovic, N. O. Devarie-Baez, J. Pan, C-M. Park, K. S. Carroll, M. R. Filipovic, and M. Xian, "Detection of Protein S-Sulfhydration by a Tag-Switch Technique." *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 575.
- 96) G. K. Kolluru, X. Shen, and C. G. Kevil, "A tale of two gases: NO and H<sub>2</sub>S, foe or friends for life?" , *Redox Biology*, **2013**, 313
- 97) Z. Altaany, Y. Ju, G. Yang, and R. Wang, "The coordination of S-sulfhydration, S-nitrosylation, and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide", *Sci. Signal.*, **2014**, 7, 342, ra87.
- 98) C. Coletta, A. Papapetropoulos, K. Erdelyi, G. Olah, K. Modis, P. Panopoulos, A. Asimakopoulou, D. Gero, I. Sharina, E. Martin, and C. Szabo, "Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **2012**, 109, 9161.
- 99) M. Eberhardt et al., "H<sub>2</sub>S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signaling pathway", *Nat Commun.*, **2014**, 5, 4381.
- 100) M. R. Filipovic, J. Lj. Miljkovic, T. Nauser, M. Royzen, K. Klos, T. Shubina, W. H. Koppenol, S. J. Lippard, and I. Ivanovic-Burmazovic, "Chemical Characterization of the Smallest S-Nitrosothiol, HSNO; Cellular Cross-talk of H<sub>2</sub>S and S-Nitrosothiols", *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 12016.

< 生体硫黄研究関連 >

| 製品名                                                           | 容量         | 品コード | 備考                                |
|---------------------------------------------------------------|------------|------|-----------------------------------|
| -SulfoBiocitcs- Sodium sulfide                                | 100 mg x 5 | SB01 | サルフェン硫黄発生剤                        |
| -SulfoBiocitcs- Sodium disulfide                              | 100 mg x 5 | SB02 | サルフェン硫黄発生剤                        |
| -SulfoBiocitcs- Sodium trisulfide                             | 100 mg x 5 | SB03 | サルフェン硫黄発生剤                        |
| -SulfoBiocitcs- Sodium tetrasulfide                           | 100 mg x 5 | SB04 | サルフェン硫黄発生剤                        |
| -SulfoBiocitcs- Stable isotope Na <sub>2</sub> S(34) solution | 0.5 ml     | SB05 | サルフェン硫黄発生剤                        |
| -SulfoBiocitcs- GYY4137                                       | 10 mg      | SB06 | H <sub>2</sub> S 発生剤 (徐放性)        |
| -SulfoBiocitcs- H <sub>2</sub> S donor 5a                     | 10 mg      | SB07 | H <sub>2</sub> S 発生剤 (還元物質応答性)    |
| -SulfoBiocitcs- H <sub>2</sub> S donor 8l                     | 10 mg      | SB08 | H <sub>2</sub> S 発生剤 (還元物質応答性)    |
| -SulfoBiocitcs- H <sub>2</sub> S donor 8o                     | 10 mg      | SB09 | H <sub>2</sub> S 発生剤 (還元物質応答性)    |
| -SulfoBiocitcs- SSP4                                          | 1 mg       | SB10 | サルフェン硫黄検出用蛍光プローブ                  |
| -SulfoBiocitcs- Protein Redox State Monitoring Kit            | 5 samples  | SB11 | タンパク質チオール基解析用キット (精製タンパク質用)       |
| -SulfoBiocitcs- Protein Redox State Monitoring Kit - Plus     | 5 samples  | SB12 | タンパク質チオール基解析用キット (細胞内タンパク質用)      |
| -SulfoBiocitcs- Protein S-Nitrosylation Monitoring Kit        | 20 samples | SB14 | タンパク質 S- ニトロシル基解析用キット (細胞内タンパク質用) |
| GSSG/GSH Quantification Kit                                   | 200 tests  | G257 | 酸化型 / 還元型グルタチオン分別定量キット            |
| Total Glutathione Quantification Kit                          | 100 tests  | T419 | 全グルタチオン測定キット                      |
| DTNB                                                          | 1 g        | D029 | チオール基比色定量用試薬                      |

< 一酸化窒素関連 >

| 製品名                                                                                         | 容量           | 品コード | 備考                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|------|------------------------------------------------|
| 2,3-Diaminonaphthalene (for NO detection)                                                   | 10 mg        | D418 | 蛍光での NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> 検出試薬         |
| Carboxy-PTIO                                                                                | 10 mg        | C348 | NO 消去剤                                         |
| DTCS Na                                                                                     | 10 mg        | D465 | NO スピントラップ剤                                    |
| MGD                                                                                         | 500 mg       | M323 | NO スピントラップ剤                                    |
| NOR1                                                                                        | 10 mg        | N388 | NO 発生剤 (酸性側で安定)                                |
| NOR3                                                                                        | 10 mg        | N390 | NO 発生剤 (酸性側で安定)、FK409 と呼ばれる                    |
| NOR4                                                                                        | 10 mg        | N391 | NO 発生剤 (酸性側で安定)                                |
| NOR5                                                                                        | 10 mg        | N448 | NO 発生剤 (酸性側で安定)                                |
| NOC5                                                                                        | 10 mg, 50 mg | N380 | NO 発生剤 (アルカリ側で安定)                              |
| NOC7                                                                                        | 10 mg, 50 mg | N377 | NO 発生剤 (アルカリ側で安定)                              |
| NOC12                                                                                       | 10 mg, 50 mg | N378 | NO 発生剤 (アルカリ側で安定)                              |
| NOC18                                                                                       | 10 mg, 50 mg | N379 | NO 発生剤 (アルカリ側で安定)                              |
| Peroxynitrite 溶液                                                                            | 1 ml x 5     | P332 | 45 mmol/l 以上の Peroxynitrite 溶液                 |
| SIN-1                                                                                       | 25 mg        | S264 | Peroxynitrite 発生剤                              |
| APDC                                                                                        | 1 g          | A389 | NOS 阻害剤                                        |
| L-NAME                                                                                      | 1 g          | N412 | NOS 阻害剤                                        |
| L-NMMA                                                                                      | 25 mg        | N411 | NOS 阻害剤                                        |
| NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub> Assay Kit-C(Colorimetric) ~ Griess Reagent Kit ~           | 100 回用       | NK05 | 吸光度測定による NO 測定キット<br>10 ~ 100μmol/l の濃度域に適している |
| NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub> Assay Kit-FX (Fluorometric) ~ 2,3-Diaminonaphthalene Kit ~ | 200 tests    | NK08 | 蛍光強度測定による NO 測定キット<br>1 ~ 10 μmol/l の濃度域に適している |

- 1) 製品・製品容量は、このパンフレット編集時のものです。予告無しに変更する場合がございますのでご注意ください。  
2) 上記製品は、試薬、研究用のみに使用するものです。医療用その他目的には使用できません。

株式会社 同仁化学研究所

熊本県上益城郡益城町田原 2025-5 熊本テクノ・リサーチパーク 〒861-2202  
Tel.096-286-1515 (代表) Fax.096-286-1525

URL: http://www.dojindo.co.jp Free dial:0120-489548  
E-mail: info@dojindo.co.jp Free fax :0120-021557

ドージン・イースト (東京)

東京都港区芝大門 2-1-17 朝川ビル 7F 〒105-0012  
Tel.03-3578-9651 (代表) Fax.03-3578-9650

許可なくコピーを禁ず  
2016/03/17 改訂