

# Persulfide shield as a newly identified endogenous electrophile detoxification mechanism in biological system

著者	HISYAM BIN ABDUL HAMID
号	88
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第3911号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00126377">http://hdl.handle.net/10097/00126377</a>

氏名	ヒシャーム ビン アブドゥール ハーミッド HISYAM BIN ABDUL HAMID
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	平成31年3月27日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程)医科学 専攻
学位論文題目	Persulfide shield as a newly identified endogenous electrophile detoxification mechanism in biological system (親電子物質の解毒メカニズムを介するパースルフィドの新規生体保護作用)
論文審査委員	主査 教授 赤池 孝章 教授 山本 雅之 教授 中澤 徹

## 論文内容要旨

The efforts in identifying biological function of reactive sulfur species (RSS) are currently gaining momentum and attention from scientists worldwide. Previously, remarkable amount of polysulfides derivatives were found to be generated endogenously and ubiquitously in both prokaryotic and eukaryotic organisms. Nonetheless, the polysulfides are far from fully understood, especially due to their reactivity and intricate redox-active properties. In the beginning of this study, as representatives of RSS, glutathione polysulfide (GS-SS-SG) was used to test RSS stability and degradation kinetics. The GS-SS-SG showed severe degradation following the environment alkalinity suggesting that heterolytic scission triggered by hydroxyl anion (OH<sup>-</sup>) underlying its mechanism. Consequently, polysulfides cleavage produces thiolates and sulfenic acids, which thereby accelerated by alkylating reagents (e.g., IAM) and dimedone. However, a hydroxyphenyl containing derivative,  $\beta$ -(4-hydroxyphenyl)ethyl iodoacetamide (HPE-IAM), has shown potent stabilizing effect on polysulfides. In fact, tyrosine, an amino acid that shares similar group with the HPE-IAM exhibited more potent polysulfides stabilizing properties and prevented the polysulfides degradation occurring in alkaline pH. Thus, the polysulfides degradation-protective effect is likely caused by inhibitory action of hydroxyphenyl residues against alkaline hydrolysis. Hence, using HPE-IAM based LC-MS/MS analysis, the endogenous RSS level is expected can be quantified with better precision. Recombinant cysteinyl tRNA-synthetase (CARS); mouse cytosolic CARS (CARS1) and human mitochondrial CARS (CARS2) showed PLP-dependent cysteine persulfide synthase (CPERS) activity. Evidently, knocking out the CARS2 significantly reduces the endogenous RSS as compared to the CARS1 in HEK293T cell line. Moreover, the heterozygous CARS2 mutant (Cars2<sup>+/-</sup>) mice also exhibited marked reduction of intracellular RSS level indicating that CARS2 plays major role in CPERS activity. The homozygous CARS2 KO in vivo model however was unable to obtain potentially due to embryonic lethality. Another in vitro model, *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) with deficient sulfide quinone:oxidoreductase (SQR) function was developed. The impairment of SQR function leads to the accumulation of sulfide. Hence, knocking out either CARS2 or SQR simulates the reduction and accumulation of intracellular RSS level respectively. Indeed, the CARS2 KO HEK293T cell was found to be more susceptible towards methylmercury (MeHg) compared to the wild type which is believed due to the lack of chelation agent provided by

RSS. Knocking out the SQR increases *S. pombe* susceptibility towards cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>) which is in line with previous reports but the model exhibited significant resistance towards MeHg. As a conclusion, different electrophiles may exhibit different polysulfides degradation properties. HPE-IAM is currently the best option to be used as a probe for LC-MS/MS-based polysulfides detection. CARS2 greatly involves in governing CPERS activity. The intracellular level of RSS which is primarily modulated by CPERS can influence cellular susceptibility towards electrophiles such as MeHg. The presence of endogenous RSS potentially acts as a shield against electrophiles.

## 審査結果の要旨

博士論文題目 Persulfide shield as a newly identified endogenous electrophiles detoxification mechanism in biological system

所属専攻・分野名 医科学専攻 ・ 環境医学分野

学籍番号 B5MD5102 氏名 Hisyam bin Abdul Hamid

グルタチオンポリスルフィド (GS-S<sub>n</sub>-SG) をはじめとしたパースルフィドは生体内で抗酸化活性や親電子シグナル制御機能を発揮している。しかしながら、パースルフィドは複雑なレドックス活性を有しているため、その化学的特性および生理機能については不明な点が多い。

申請者はまず、様々な条件下における GS-S<sub>n</sub>-SG の化学安定性を検討した。その結果、GS-S<sub>n</sub>-SG は中性～塩基性条件で分解（アルカリ加水分解）することが示された。また、この分解は iodoacetamide (IAM) などの親電子性アルキル化剤により、促進されることもわかった。一方、ヒドロキシフェニル基を有するβ-(4-hydroxyphenyl)ethyl IAM (HPE-IAM) は、GS-S<sub>n</sub>-SG の分解を抑制することが判明した。さらに、HPE と同様のヒドロキシフェニル基を有するアミノ酸であるチロシンが GS-S<sub>n</sub>-SG の分解を抑制した。よって、HPE-IAM はパースルフィドの定量分析に有効なツールであること、および、チロシンのパースルフィド安定化作用が示された。

また、申請者は生体内パースルフィド産生系である cysteinyl tRNA-synthetase 2 (CARS2) の遺伝子破壊を試み、HEK293T のホモ破壊株（CARS2 ホモ破壊細胞）および、マウス個体のヘテロ破壊株（CARS2 ヘテロ破壊マウス）の構築に成功した。各種パースルフィドレベルを HPE-IAM を用いて測定したところ、破壊株において各種パースルフィドの有意な低下が認められた。これらの結果から、CARS2 ホモ破壊細胞およびヘテロ破壊マウスは、パースルフィドの生理的意義を解明するための優れたモデルとなることが示された。さらに、申請者は CARS2 破壊株が野生株より環境中親電子物質であるメチル水銀に感受性が高いことを見だし、パースルフィドがメチル水銀に対する解毒代謝系であることを証明した。

本研究で申請者は (1) HPE-IAM やチロシンがパースルフィドを安定化すること、(2) パースルフィド研究のモデル系を構築し、パースルフィドが環境親電子物質の解毒代謝系であることを発見した。これらの研究成果は、環境化学物質の解毒メカニズムとパースルフィドの生理機能を解明するための大きな礎となることが期待される。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。