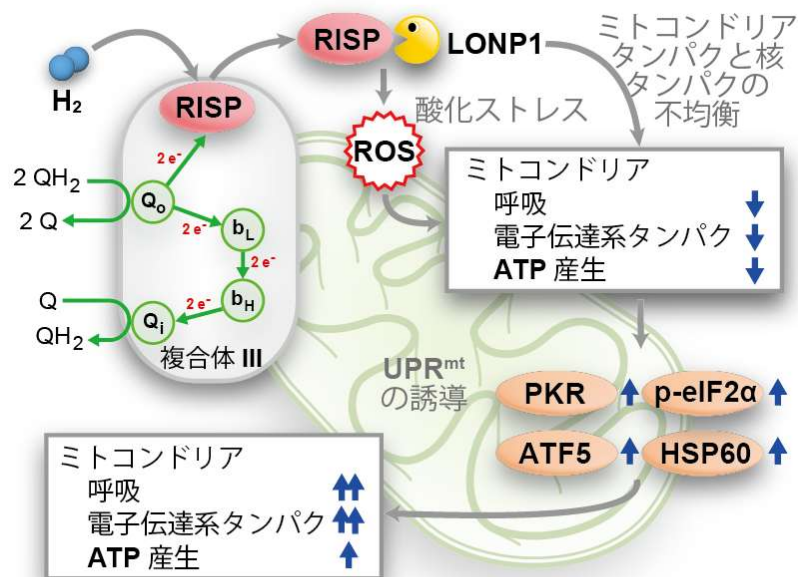


分子状水素はリスケ鉄硫黄タンパク質を標的にする —分子状水素の分子作用機構を説明—

【本研究のポイント】

- ・分子状水素(H_2)は、ミトコンドリア電子伝達系(ETC)(^{*1})複合体 III のリスケ鉄硫黄タンパク質(RISP)(^{*2})を一次的な標的とする。
- ・ H_2 の結合により RISP は、ミトコンドリアのタンパク分解酵素 LONP1 による分解を受ける。
- ・RISP の喪失はミトコンドリアタンパク質と核タンパク質の不均衡を生じ、ミトコンドリア小胞体ストレス応答(UPR^{mt})(^{*3})を誘導する。
- ・結果として生じるミトホルミシス(^{*4})(軽度のミトコンドリアストレスに対する有益な適応応答)が、 H_2 の治療効果である。
- ・このメカニズムは、様々な酸化還元マーカーや炎症マーカーに対する H_2 の広範かつ時に矛盾した効果の説明を可能にする。



【研究概要】

名古屋大学大学院医学系研究科分子遺伝学(旧 神経遺伝情報学)の根岸修人 学部生(現 血液・腫瘍内科学大学院生)、伊藤美佳子 講師、大野欽司 名誉教授(現 名古屋学芸大学教授)らの研究グループは、分子状水素(H_2)はリスケ鉄硫黄タンパク質(RISP)を特異的に減少させることにより、細胞ストレス応答経路であるミトコンドリア小胞体ストレス応答(UPR^{mt})を誘導し、ミトコンドリアを活性化することを見出した。

これまでに、多様な病態に対する H_2 の効果がモデル動物とヒトで報告されてきた。しかし、その分子作用機構は十分に理解されておらず、初期から H_2 による作用機序は活性酸素種(ROS)^(*)5)の水酸化ラジカル($\cdot OH$)選択的還元が提唱されていた。研究チームはこのパラダイムに挑戦し、 H_2 が特定の分子標的を持つ活性シグナル分子であることを示した。

研究は、 H_2 存在下の培養細胞および H_2 投与マウスの肝臓の両方で、 H_2 は UPR^{mt} を誘導するという観察から始まった。 H_2 はマウス肝臓すりつぶし組織において、わずか 2 分間以内にミトコンドリア電子伝達系(ETC)複合体 III の活性を正常の 78.5% にまで迅速に抑制した。細菌・古細菌・一部の真核生物が持つヒドロゲナーゼ酵素とミトコンドリアタンパク質の進化的な関連性から、研究者らは鉄硫黄クラスターを持つ RISP が標的であるとの仮説を立て実証した。 H_2 はミトコンドリアのプロテアーゼである Lon ペプチダーゼ 1($LONP1$)^(*)6)を活性化することにより、1 時間以内に培養細胞の RISP の分解を促進することが示された。この RISP の一時的な喪失とそれに続く UPR^{mt} の誘導は、今までの研究で観察されてきた H_2 の広範で時に矛盾した効果を理解するための包括的な枠組みを提供する。

本研究成果は、「*Redox Biology*」(2025 年 12 月 2 日付電子版)に掲載されました。

1. 背景

歴史的に、分子状水素(H_2)は生物学的に不活性であると考えられてきた。その小さく非極性の性質と、ヒト細胞にヒドロゲナーゼ酵素が存在しないことがこの見解を支持し、深海潜水用の混合ガスとして安全な選択肢とされてきた。しかし、 H_2 を健康改善や一部のモデルでの寿命延長と関連付ける研究が増え始め、この長年の仮定に疑問が投げかけられ始めた。

1975 年と 2007 年の画期的な研究で、 H_2 が腫瘍や虚血性脳損傷に対して治療可能性を持つことが示唆され、大きなパラダイムシフトが始まった。これらの効果は当初、 H_2 が選択的抗酸化物質として作用し、特に有害なヒドロキシルラジカル($\cdot OH$)を除去することに起因すると考えられた。この理論は支持を得たものの、重大な課題に直面した。 H_2 とラジカルとの反応速度は比較的遅く、生体内で達成される H_2 の濃度は低いため、直接的な除去作用だけで観察された深刻かつ持続的な生物学的効果を説明することは考えにくかった。

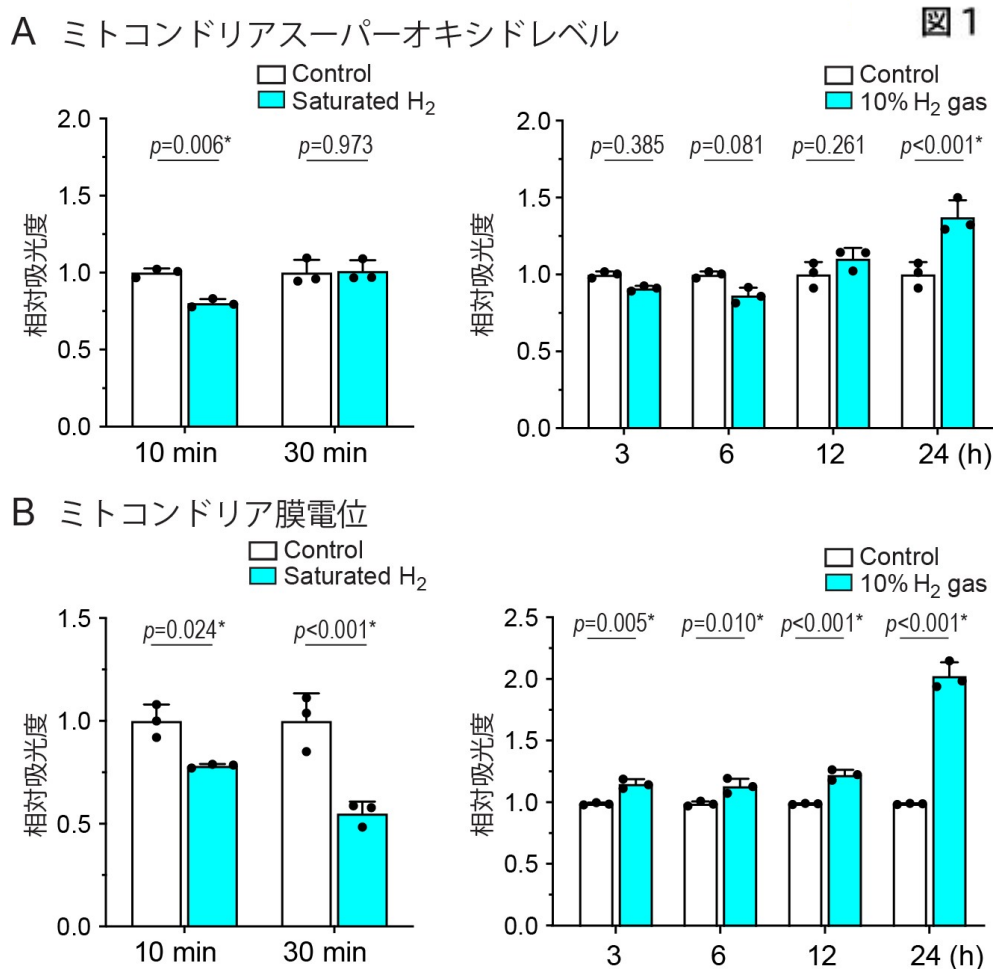
最近の研究では、 H_2 が鉄ポルフィリンのような他の生体分子と相互作用することが示されているが、これらの相互作用は広範な保護効果を説明するには反応量が足りない

考えられている。これらの限界に直面し、研究チームは、 H_2 はヒト細胞内に存在する進化的に保存されたヒドロゲナーゼ様タンパク質と相互作用するという新たな仮説を立てた。RISP は、ヒドロゲナーゼの触媒中心と同様に[2Fe-2S]鉄硫黄クラスターを含んでおり、 H_2 との相互作用の有力な候補となった。事実、研究チームは H_2 の標的はミトコンドリア電子伝達複合体 III のリスキ鉄硫黄タンパク質(RISP)であることを実証した。

2. 研究成果

H_2 のミトコンドリア機能に対する二相性効果

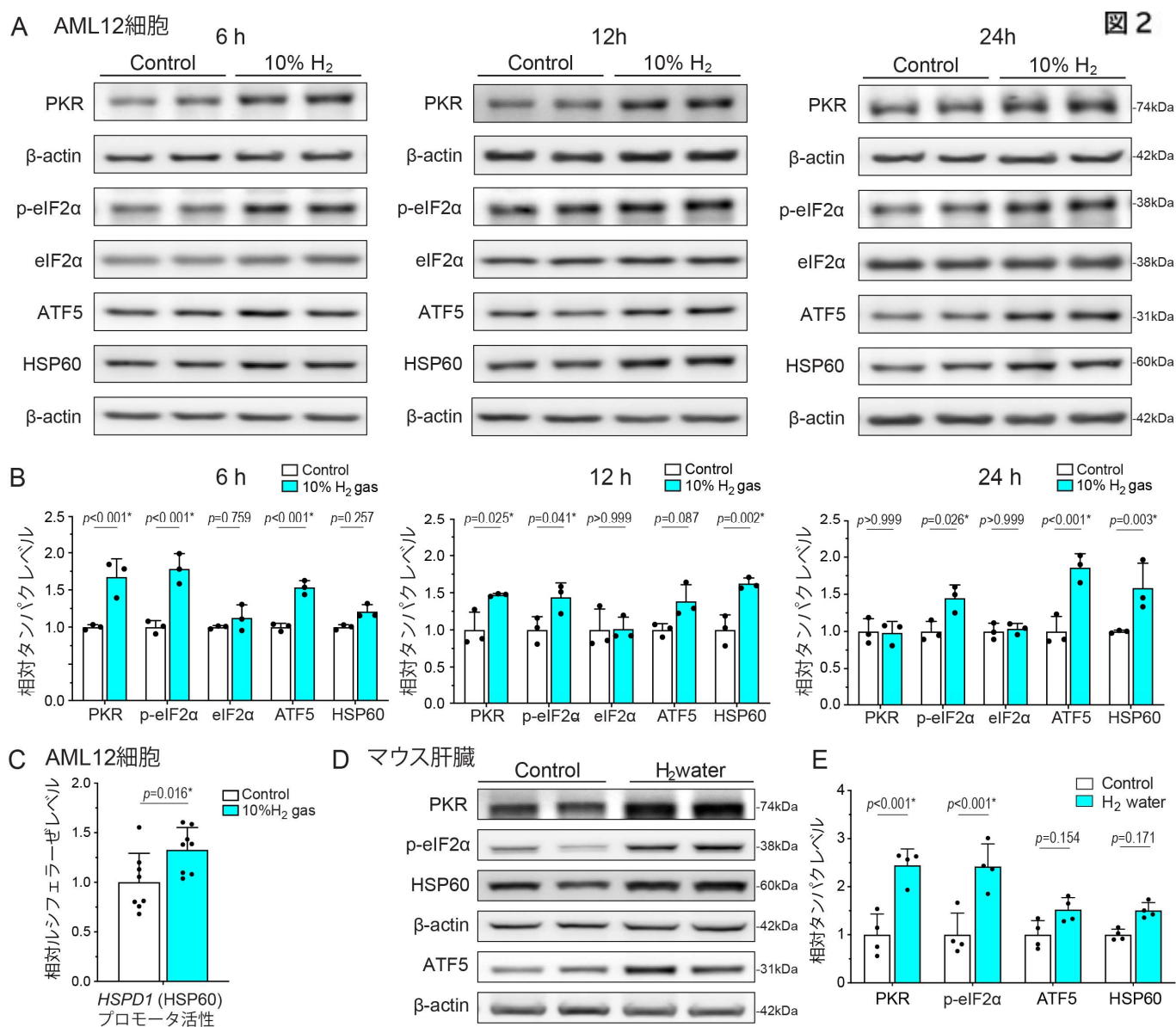
はじめに、 H_2 が哺乳類細胞のミトコンドリア機能に与える影響を経時的な調べた(図1)。マウス肝臓由来の AML12 細胞を 10% H_2 存在下で培養したところ、10~30 分でミトコンドリアのスーパーオキシドレベルとミトコンドリア膜電位が減少した。この初期の抑制は、ミトコンドリア電子伝達系の障害を示唆した。その後、両ミトコンドリアマーカーは増加し、ベースラインレベルを上回った。この初期の減少とその後の増加というパターンは、古典的なホルミシス応答を強く示唆した。ミトコンドリア電子伝達系(ETC)の初期障害が軽度のストレスとして作用し、それが代償的で適応的な応答、すなわちミトホルミシスとして知られるプロセスを引き起こした。



H_2 は培養哺乳類細胞および野生型マウス肝臓において UPR^{mt} を誘導する

ミトホルメシスの関与を明らかにするため、研究チームは H_2 が AML12 細胞および野

生型マウス肝臓において UPR^{mt} を誘導するかどうかを検証した。AML12 細胞を 10% の H_2 ガスに 6 時間以上曝露すると、 UPR^{mt} 関連タンパク質(PKR、p-eIF2 α 、ATF5、HSP60)のレベルが上昇し(図 2AB)、*HSP60* をコードする Hspd1 のプロモーター活性が増加した(図 2C)。同様に、4 週間 H_2 水を自由摂取させた野生型マウスでは、肝臓における UPR^{mt} 関連タンパク質(PKR、p-eIF2 α 、ATF5、HSP60)のレベルが上昇した(図 2DE)。

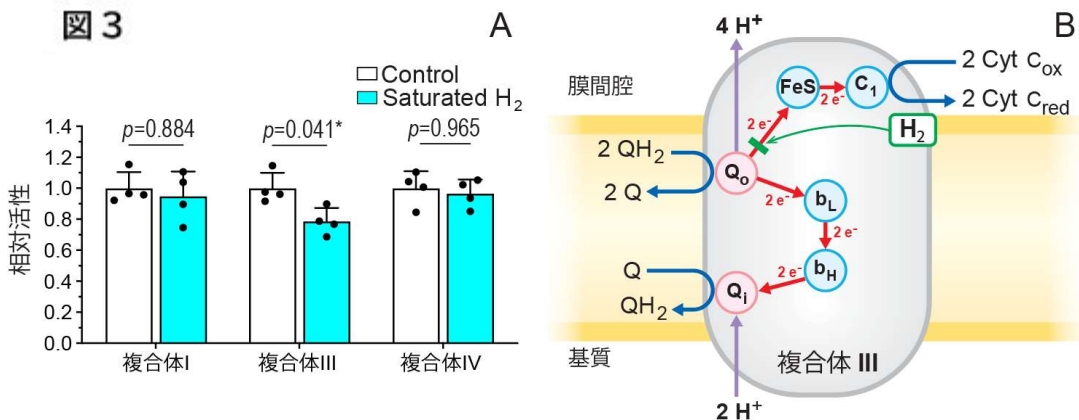


H_2 は電子伝達系(ETC)複合体 III の電子の流れを阻害する

次に、研究者らは阻害の正確な位置を特定するために ETC の主要な酵素複合体(複合体 I、III、IV)に対する H_2 の影響を調べた。野生型マウスの肝臓からミトコンドリアを単離し、 H_2 に曝露したところ、わずか 2 分以内に ETC 複合体 III の酵素活性は正常率の 78.5%に抑制された(図 3A)。一方、複合体 I および IV の活性は影響を受けなかった。

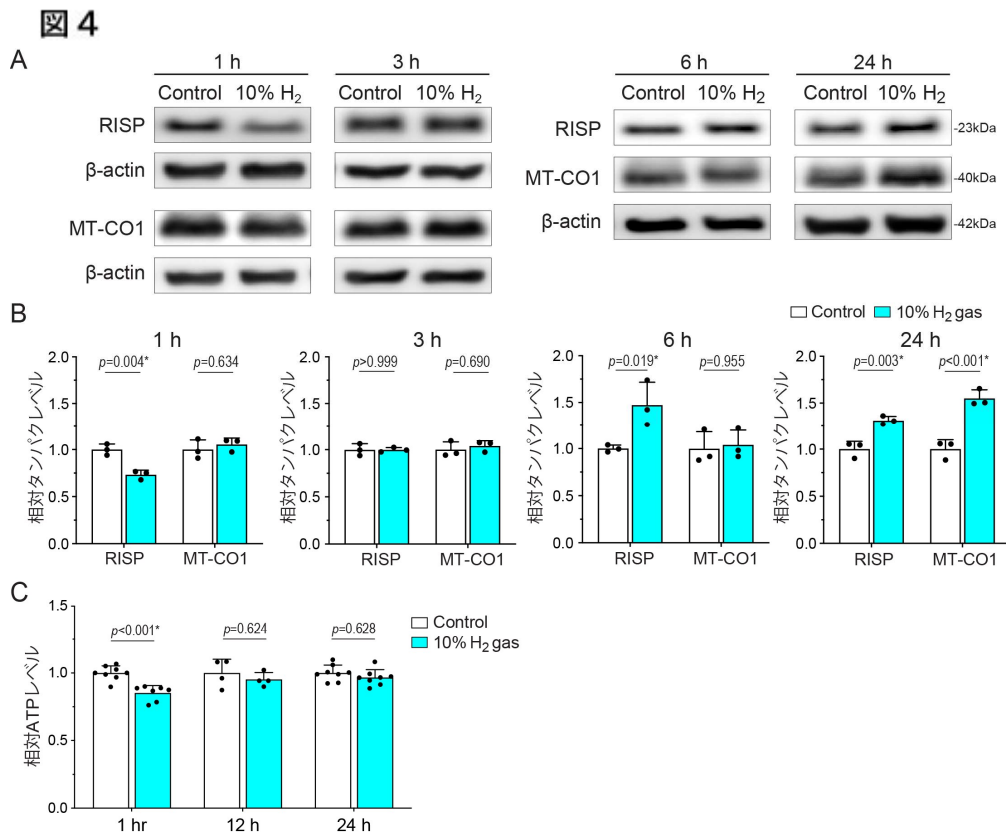
この複合体 III の特異的な阻害は、 H_2 の標的がこの複体内に存在することを強く示唆した。さらなる分析により、FeS-*c1*経路が H_2 の作用部位である可能性が示された(図 3B)。FeS(鉄硫黄クラスター)はリスケ鉄硫黄タンパク質(RISP)の主要な構成要素であ

ることから、RISP が H_2 の標的候補分子として浮上した。



RISP の直接的な標的化と一過性の減少

次に RISP が一次的な標的であるという仮説を検証した。RISP は複合体 III 内で鉄硫黄クラスターを含む唯一のタンパク質であり、鉄硫黄クラスターはヒドロゲナーゼ酵素において H_2 と反応する。研究チームは、 H_2 ガス曝露後の AML12 細胞における RISP のレベルを調べたところ、 H_2 曝露 1 時間後、細胞内の RISP タンパク質レベルは減少した(図 4AB)。RISP レベルは 3 時間時点でベースラインに戻り、その後 6 時間および 24 時間でさらに増加し代償応答を示した。同様に、 H_2 は ATP レベルを 1 時間で下げたが代償応答は示さなかった(図 4C)。対照的に、別のミトコンドリアタンパク質である MT-CO1(複合体 IV のサブユニット)のレベルは 6 時間まで変化しなかったが、24 時間で増加した。この遅延した増加は、UPR^{mt} によって引き起こされる広範なミトコンドリア生合成応答と一致する。RISP の一時的な減少は「ミトコンドリアタンパク質と核タンパク質の不均衡」を生み出し UPR^{mt} を誘導した。

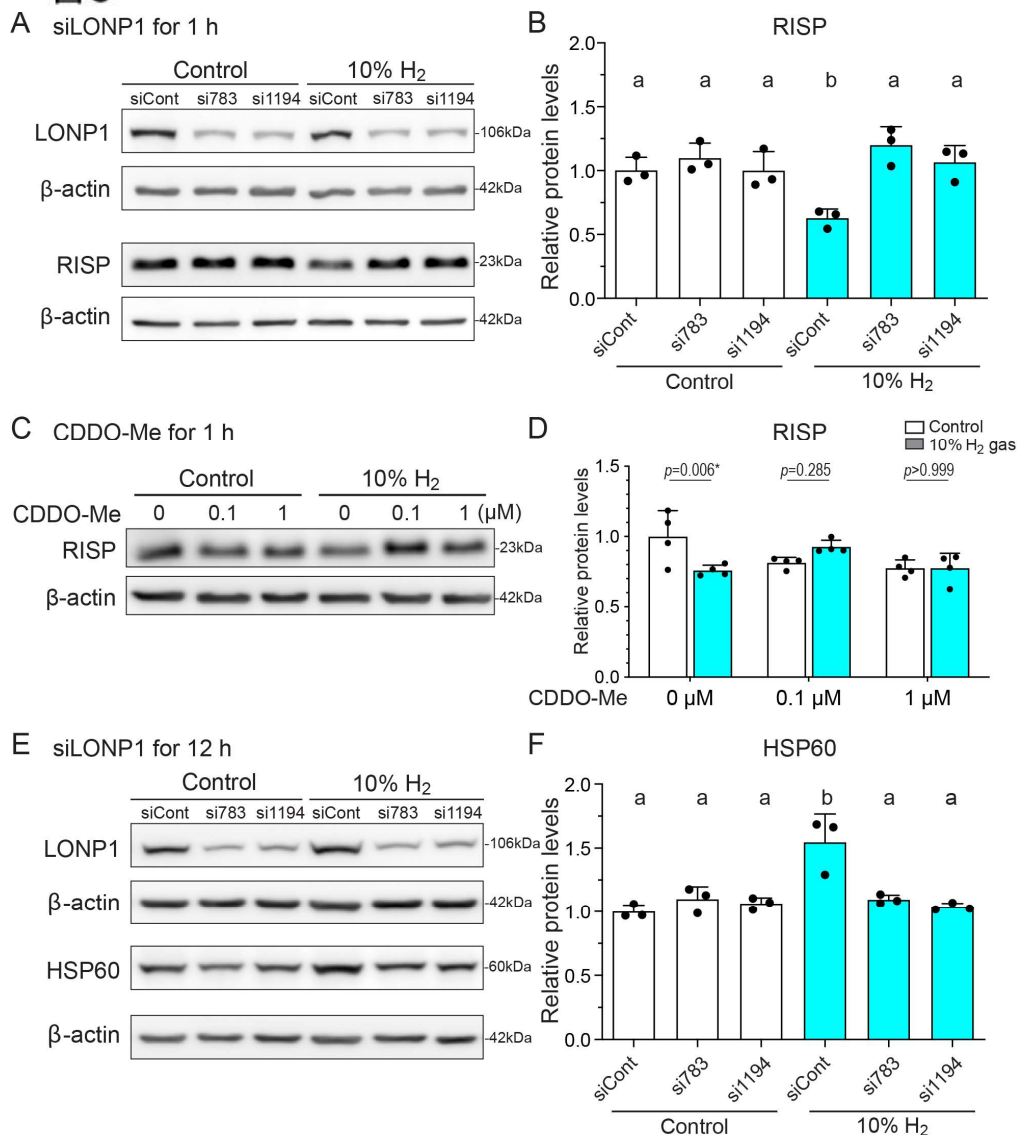


ミトコンドリアのタンパク分解酵素 LONP1 が H₂ による RISP の分解を惹き起こす

パズルの最後のピースは、H₂がどのようにしてRISPレベルを減少させるかであった。研究者らは、損傷したまたは誤って折りたたまれたタンパク質を分解する主要なミトコンドリアプロテアーゼであり UPR^{mt} の主要な役割を果たす LONP1 の関与を調べた。LONP1 遺伝子のノックダウンにより H₂ による RISP の減少が抑制された(図 5A)。同様に、細胞を LONP1 の既知の阻害剤である CDDO-Me で処理しても、H₂ による RISP の減少が抑制された(図 5B)。

さらに、LONP1 のノックダウンは、12 時間時点での H₂ による HSP60 の増加を防ぎ、LONP1 を介した RISP 分解が UPR^{mt} カスケードを開始するための必要な第一歩であることを確認した(図 5C)。これらの結果は、H₂ が RISP を直接破壊するのではなく、LONP1 プロテアーゼによる標的分解を誘導することを示している。

図 5



3. 今後の展開

研究チームは、分子状水素(H₂)はミトコンドリア電子伝達系(ETC)複合体 III のリスキ鉄硫黄タンパク質(RISP)を標的とする生物学的に活性な分子であることを実証した。H₂ は培養細胞において、ミトコンドリアペプチダーゼ(LONP1)の活性化を介して RISP

の分解を促進し、ETC 複合体 III の活性を一時的に低下させる。RISP の低下は、ミトコンドリアタンパク質と核タンパク質の不均衡を生み、強力なミトコンドリア小胞体ストレス応答(UPR^{mt})が誘導される。このストレス誘導と適応的回復はミトホルメシスと呼ばれ、H₂ が様々な酸化還元マーカーや炎症マーカーに及ぼす時間的に多様で一見逆説的な効果の説明を可能にする。

このメカニズムの解明は、H₂ の治療的潜在能力を最適化することを目的とした臨床試験プロトコルの設計と解釈を導く上で重要な知見を提供することが期待される。

4. 支援・謝辞

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金(JP23H02794, JP23K18273, JP21H02476, JP22K19269, and JP23K06412)、厚生労働科学研究費補助金(23FC1014)、日本医療研究開発機構研究開発助成金(JP23ek0109678)、国立精神神経医療研究センター精神・神経疾患研究開発費(5-6)の支援を受けて実施されました。

【用語説明】

*1)ミトコンドリア電子伝達系(ETC)

ミトコンドリア ETC は、呼吸鎖としても知られ、ミトコンドリア内膜に埋め込まれた一連のタンパク質複合体であり電子伝達を行う。その主な目的は、酸化リン酸化(OXPHOS)と呼ばれるプロセスで、細胞のエネルギーの大部分をアデノシン三リン酸(ATP)の形で生成することである。

*2)リスケ鉄硫黄タンパク質(RISP)

RISP は、ミトコンドリア電子伝達系(ETC)の複合体 III(チトクロム *bc1* 複合体としても知られる)の重要な構成要素である。その主な機能は、電子の伝達を促進し、ATP 合成に必要なプロトン勾配の生成に寄与することである。

*3)ミトコンドリア小胞体ストレス応答(UPR^{mt})

UPR^{mt} は、ミトコンドリアがストレスや機能不全を経験したときに活性化される進化的に保存された適応シグナル伝達経路である。その主な役割は、ミトコンドリア内のタンパク質恒常性(プロテオスタシス)を回復し、ひいては細胞全体の健康を維持するための品質管理システムとして機能することである。

*4)ミトホルメシス

ミトホルメシスは、軽度で致命的でないミトコンドリアストレスの誘導が、協調的な適応応答を引き起こし、最終的に細胞や生物の健康、ストレス耐性、生存能力の向上につながる生物学的現象である。この用語は、「ミトコンドリア」を指す「ミト」と、「少量のストレスは有益だが、大量は有害である」という用量反応の概念である「ホルメシス」を組み合わせたものである。本質的には、「ミトコンドリアを殺さないものはミトコンドリアを強くする」という考え方である。UPR^{mt} は、細胞内でミトホルメシスを達成される主要かつ最も重要な分子メカニズムの一つである。

*5)活性酸素種(ROS)

ROS は、酸素代謝の自然な副産物として形成される酸素を含む高反応性分子のグル

ープである。ROS は非常に不安定で、細胞内の他の分子と容易に反応する。このグループには、フリーラジカル(ヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)やスーパーオキシドアニオン($\text{O}_2^{\cdot-}$)のような少なくとも 1 つの不对電子を持つ分子)と非ラジカル種(過酸化水素(H_2O_2)のような)の両者が含まれる。

*6)Lon ペプチダーゼ 1(LONP1)

LONP1 は、ミトコンドリアマトリックスに位置する高度に保存された ATP 依存性セリンプロテアーゼである。LONP1 はミトコンドリアのタンパク質恒常性(プロテオスタシス)を維持する。その主な機能は以下の通りである。

1. タンパク質分解活性: 損傷した、誤って折りたたまれた、または凝集したタンパク質を選択的に分解し、それらの蓄積を防ぎミトコンドリア機能を維持する。
2. シャペロン活性: 新しく合成され、輸入されたミトコンドリアタンパク質の適切な折りたたみと組み立てを助ける。
3. UPR^{mt} メディエーター: UPR^{mt} の主要な構成要素として、その活性化は、ストレスで損傷したタンパク質を除去し、それによって細胞の適応と生存(ミトホルミシス)を促進するために不可欠である。

【論文情報】

雑誌名: *Redox Biology*

論文タイトル: The Rieske iron-sulfur protein is a primary target of molecular hydrogen

著者: Shuto Negishi^{a,†}, Mikako Ito^{a,†}, Tomoya Hasegawa^a, Hikaru Otake^a, Bisei Ohkawara^a, Akio Masuda^a, Hiroyuki Mino^b, Tyler W. LeBaron^{c,d,*}, Kinji Ohno^{a,e,*}

^aDivision of Neurogenetics, Center for Neurological Diseases and Cancer, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya 466-8550, Japan

^bDivision of Material Science (Physics), Nagoya University Graduate School of Science, Nagoya 464-8601, Japan

^cDepartment of Kinesiology and Outdoor Recreation, Southern Utah University, Cedar City, UT 84720, USA

^dMolecular Hydrogen Institute, Enoch, UT 84721, USA

^eGraduate School of Nutritional Sciences, Nagoya University of Arts and Sciences, Nisshin 470-0196, Japan

[†]These authors contributed equally to this work.

DOI: [10.1016/j.redox.2025.103952](https://doi.org/10.1016/j.redox.2025.103952)

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Red_251219en.pdf