

活性硫黄分子産生酵素に対する新規阻害剤の開発

越膳 ほなみ, 花岡 健二郎

1. はじめに

硫化水素 (H_2S) は一酸化炭素 (CO) や一酸化窒素 (NO) に次ぐ, 第三のガス状シグナル伝達物質として注目され, 血管拡張や炎症などに関与する含硫黄小分子として注目されてきた¹⁾. さらに近年, 酸化数0の硫黄原子であるスルファン硫黄 (sulfane sulfur: S^0) を含む小分子の生理機能に注目が集まっている (図1A). S^0 は他の硫黄原子に可逆的に結合しポリスルフィド (polysulfide: $-\text{S}-\text{S}_n-\text{S}-$) やハイドロパースルフィド (persulfide: $-\text{S}-\text{SH}$) といった形で存在し, 活性酸素と反応することで抗酸化作用を示すと報告されている²⁾. 一方, H_2S や S^0 などの活性硫黄分子の産生酵素として, 3-メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素 (3-mercaptopyruvate sulfurtransferase: 3MST) およびシスタチオニン γ リアーゼ (cystathionine γ -lyase: CSE), シスタチオニン β 合成酵素 (cystathionine β -synthase: CBS), システイニル tRNA 合成酵素 (cysteinyll-tRNA synthetases: CARSs) の四つが報告されている^{1, 3-5)}. いずれも, アミノ酸を基質として働く酵素であり, 3MSTはチオレドキシン (thioredoxin) やジヒドロリポ酸 (dihydrolipoic acid) などのジチオールが存在下で3-メルカプトピルビン酸 (3-mercaptopyruvate: 3MP) を基質として H_2S や H_2S_2 , H_2S_3 を産生すると報告されている⁴⁾ (図1B). 一方でCSEは主にシステインを基質として, CBSはシステインとホモシステインの縮合反応でシスタチオニンとともに H_2S を産生する. また, S^0 の産生の際には, CSEとCBSはシスチンを基質とし, CARSsはシステインを基質とすると報告されている⁵⁾.

2. 活性硫黄分子産生酵素の既存の阻害剤

酵素の機能を解明するためのツールの一つとして, その酵素に対する選択的阻害剤がある. 活性硫黄分子産生酵素に対しても, これまでに使用されてきた阻害剤が存在するため, 以下にそれぞれの酵素に対する既存の阻害剤について紹介する. まず, CSEの阻害剤としてはD,L-プロパルギルグリシン (D,L-propargylglycine: PAG) と β -シアノ-L-アラニン (β -cyano-L-alanine: BCA) が, CBSの阻害剤としてはアミノオキシ酢酸 (aminooxyacetic acid: AOAA) が主に汎用されている (図1C)⁶⁾. しかしながら, これらの阻害剤は, 選択性や生細胞における活性に問題を抱えており, 新規阻害剤の開発が求められている. 近年, CBS, CSEに対する新規阻害剤の開発が報告されているため, 以下にいくつかを紹介する. 2016年にはシステインと構造がよく似たD-ペニシラミン (D-penicillamine: D-pen) がCBSよりもCSEに対して強い阻害作用を示し (IC_{50} はそれぞれ8.5mM, 0.27mM), この構造がCSEに対する新規阻害剤の骨格として有用であると報告されている (図1C)⁷⁾. また, 同じく2016年にフラグメントの組合わせに基づいた新規CSE阻害剤の開発に関する論文が発表され, 既存の阻害剤であるPAGの, CSEとの結合形成部位であるプロパルギル基と, CSEの基質であるシステインの誘導体を組み合わせた化合物が, 選択性が高く, かつPAGよりも強い阻害作用を示すことを報告している (図1C)⁸⁾. また, CBSの新規阻害剤の開発において, 2013年には H_2S を検出する蛍光プローブ (AzMC) の開発 (図2A) と, AzMCを利用したCBS阻害剤の開発が報告されている⁹⁾. 一方, CARSsの活性硫黄分子の産生機能は近年報告されたばかりであり, その阻害剤はいまだ開発されていない¹⁰⁾.

3MSTに対する非選択的阻害剤としてピルビン酸, メナジオン, 3-メルカプトプロピオン酸, 3-クロロピルビン酸が報告されていたが (図1C)¹⁰⁾, 選択的な阻害剤は報告されていなかった. そこで近年, 我々は3MSTに対する阻害剤の開発に取り組み, 世界初の選択的阻害剤の開発に成功した¹¹⁾. 本稿においては, その研究内容を中心に紹介する.

東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室 (〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1)

Development of a novel inhibitor for reactive sulfur species-producing enzymes

Honami Echizen and Kenjiro Hanaoka (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033 Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載.

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900388

© 2018 公益社団法人日本生化学会

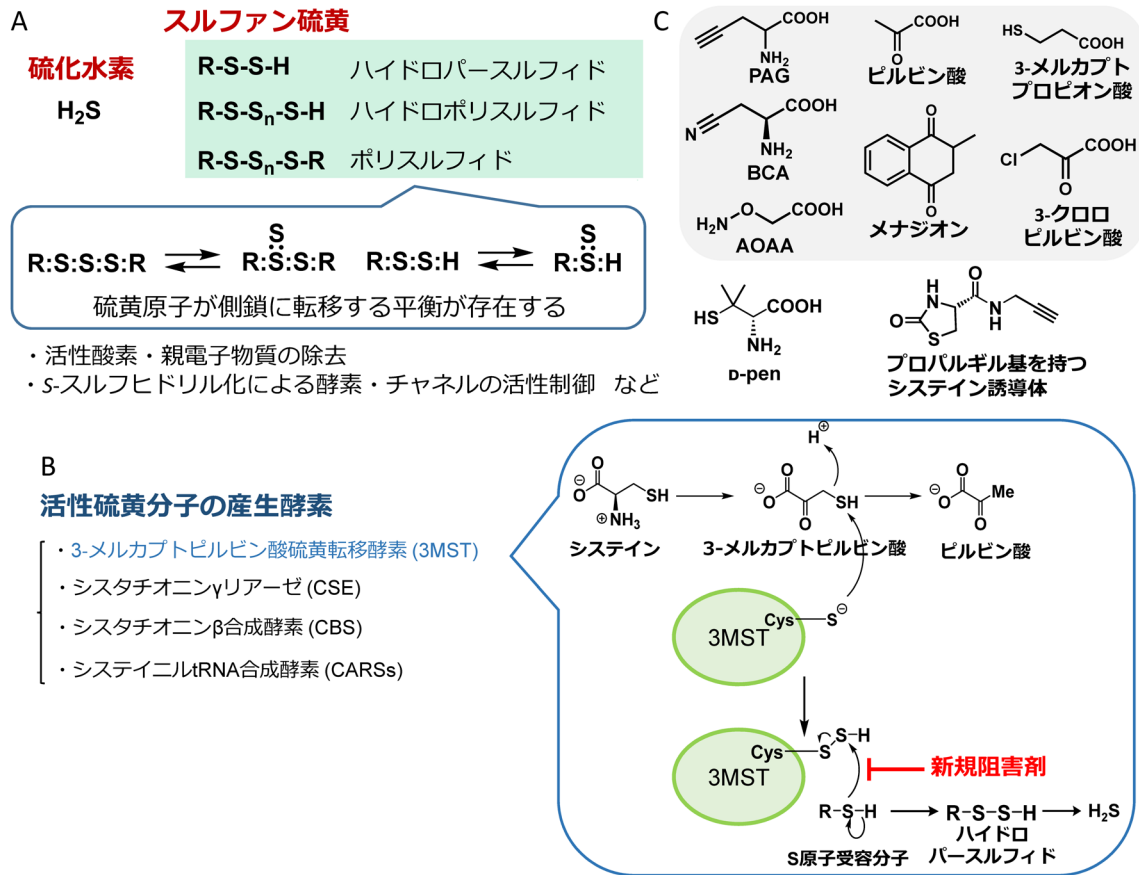


図1 生体内の活性硫黄分子種とそれらの産生酵素
 (A)生体内の活性硫黄分子とその化学的特性および生理活性. (B)活性硫黄分子の産生酵素. (C)活性硫黄分子種の産生酵素の阻害剤.

3. H₂S 検出方法

1) 従来のH₂S検出方法と蛍光プローブの開発

これまでに、H₂Sの検出方法として、メチレンブルー法やガスクロマトグラフィー法、HS⁻選択的電極等が報告されていたが、依然としてこれらの方法では生体内のH₂Sをリアルタイムに検出することは難しかった。そこで我々は、3MSTに対する阻害剤開発に先立ち、生体サンプル内でH₂Sをリアルタイムに検出できる蛍光プローブの開発を行った¹²⁾。H₂Sを検出する蛍光プローブを開発するにあたり最も考慮すべきは、H₂Sに対して高い感度と選択性を示すことであった。細胞内にはチオール基を有する生体分子としてグルタチオン (GSH, 約1~10mM) やシステイン (約100μM)、タンパク質などが存在し、開発する蛍光プローブはこれらに対し高い選択性を示す必要があった。また、細胞内のH₂S濃度は明確には決定されていなかったが、10μM~1mMのH₂Sの添加により生理作用が引き起こされる報告があるため、少なくとも10μMのH₂Sを検出できる蛍光プローブの開発を目指した。

2) H₂S検出蛍光プローブ HSip-1の開発

H₂S検出蛍光プローブとして、一般的によく使われている蛍光色素であるフルオレセインと、環状ポリアミンにキレートされたCu²⁺を有する分子を分子設計した (図2B)。これは、Cu²⁺が近傍に存在する蛍光団の蛍光を消光すること、環状ポリアミン構造がCu²⁺とキレート効果により安定な錯体構造を形成すること、さらには、Cu²⁺はH₂Sと結合しCuSを生成することを利用した設計である。つまり、H₂Sとの反応前のフルオレセインの蛍光はCu²⁺により消光されているが、H₂SとCu²⁺が結合することでCu²⁺が環状ポリアミン構造から外れ、強い蛍光強度を示すと期待した。

まず、最適な環状ポリアミン構造の検討を行った。異なる環状ポリアミン構造 (トリアザシクロノナン、サイクレン、サイクラム、トリメチルサイクレン) を持つ四つのフルオレセイン誘導体を合成し、評価を行った (図2B)。はじめに、各化合物の吸収・蛍光特性を測定した結果、いずれの化合物も490nm付近に吸収極大波長を、515nm付近に蛍光極大波長を示した。また期待どおりに、Cu²⁺を

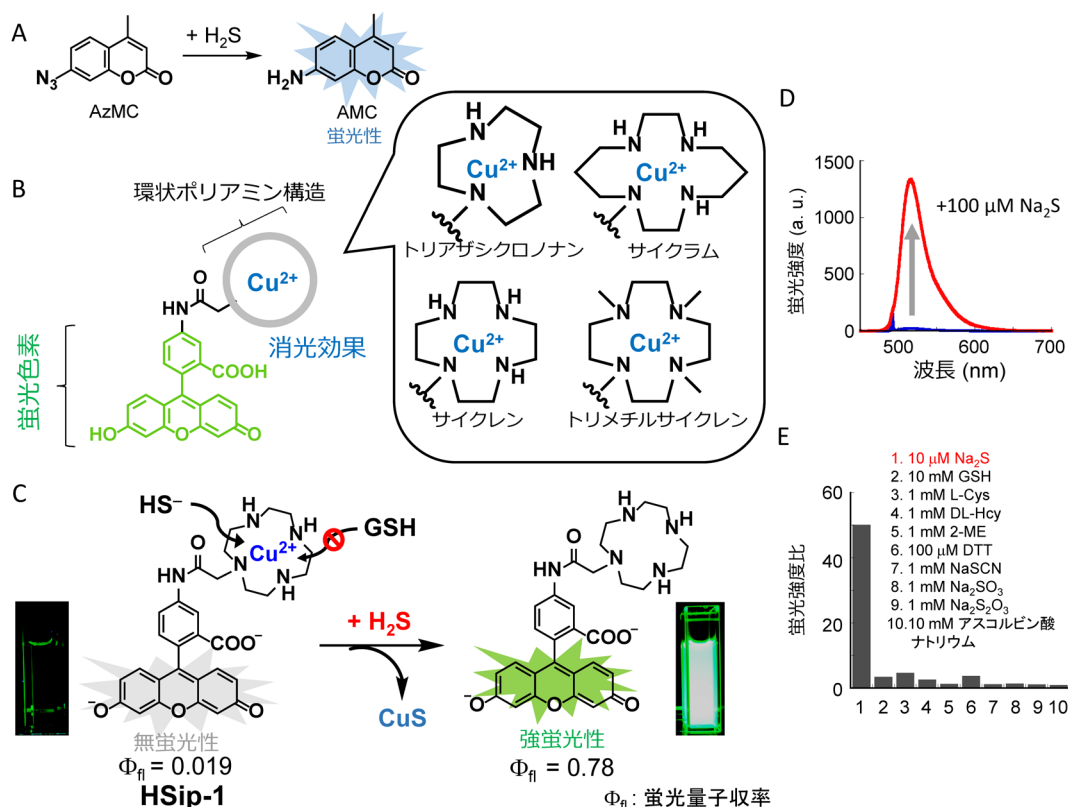


図2 H₂Sを検出する蛍光プローブ

(A) アジド基の還元反応を利用したH₂S検出蛍光プローブ. (B) 新たなH₂S検出蛍光プローブの分子設計戦略. (C) 新たなH₂S検出蛍光プローブHSip-1. Φ_{fl}は蛍光量子収率を表す. (D) H₂SドナーであるNa₂Sを添加した際のHSip-1の蛍光スペクトル変化 (蛍光上昇). (E) HSip-1のH₂Sに対する選択性. (1) 10 μM Na₂S, (2) 10 mM GSH, (3) 1 mM L-Cys, (4) 1 mM DL-Hcy, (5) 1 mM 2-ME, (6) 100 μM DTT, (7) 1 mM NaSCN, (8) 1 mM Na₂SO₃, (9) 1 mM Na₂S₂O₃, (10) 10 mM アスコルビン酸ナトリウム.

キレートさせたものでは、Cu²⁺による強い消光のために蛍光が低く抑えられており、ほとんど蛍光を示さなかった。次に、H₂Sに対する選択性を評価するために、10 μM Na₂S (H₂Sドナー) と10 mM GSHに対する応答性を評価したところ、サイクレンを用いた化合物であるHSip-1は10 mM GSHにはほとんど蛍光の上昇を示さなかったが、一方で、10 μM Na₂Sに対しては迅速な蛍光強度の上昇を示した。合成・検討した他の三つの分子は、GSHに対する選択性が十分でない、あるいはH₂Sに対する応答が迅速でなかった。そのため、選択的なH₂S検出蛍光プローブとしてHSip-1が最適な構造であると考えた (図2C, D)。さらにHSip-1のH₂Sに対する選択性を精査したところ、還元型グルタチオン、システイン、ホモシステイン、各種無機含硫化合物 [2-メルカプトエタノール、ジチオトレイトール (DTT), NaSCN, Na₂SO₃, Na₂S₂O₃]、活性酸素種、活性窒素種の添加によっても、蛍光強度の上昇はみられなかった (図2E) ため、H₂Sに対する高い選択性を示す蛍光プローブの開発に成功した。

4. 3MST阻害剤の開発

1) HSip-1を用いた大規模ハイスループットスクリーニング

次に、開発したH₂S検出蛍光プローブであるHSip-1を用いて、活性硫黄分子産生酵素である3MSTの阻害剤の開発を行った。具体的には、HSip-1が高い感度および高い選択性を示すことに着目し、蛍光プローブを用いた大規模ハイスループットスクリーニング (HTS) を行った。はじめに、マウス3MSTの大量発現・精製方法の確立を行い、基質である3MPとDTTから産生されるH₂Sを*in vitro*において検出する系の構築を行った (図3A)。その系を用いて、174,118化合物を用いた大規模HTSを行った結果、10 μMの化合物濃度においてHSip-1の蛍光強度上昇を80%以上阻害する四つの化合物 (化合物1~3, 5) を得ることに成功した (図3B)。このうち、化合物1~3は共通してピリミドン構造を有しており、この構造が3MSTの阻害に重要であると考えられた。

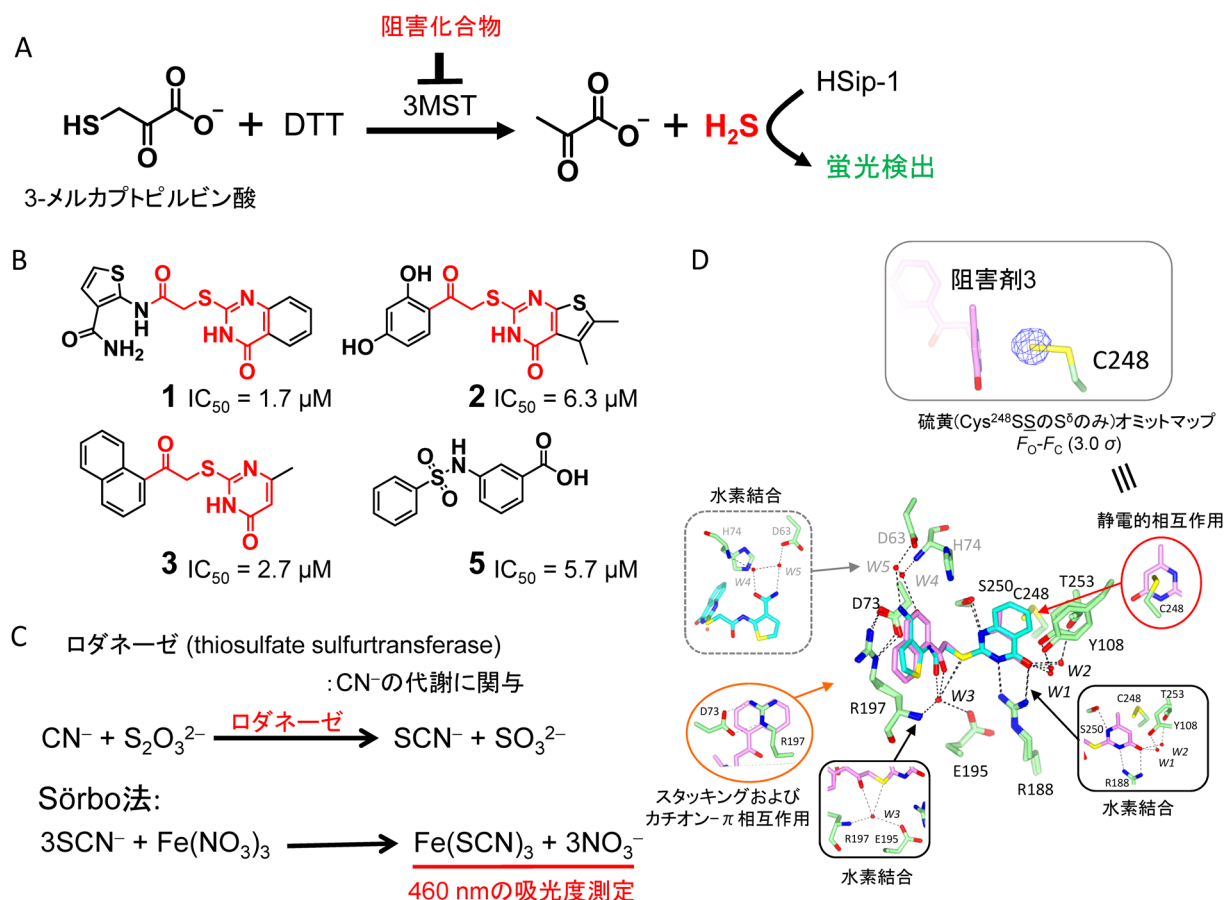


図3 新たな3MST選択的阻害剤

(A)3MSTの酵素活性の蛍光検出システム。(B)スクリーニングで得られたヒット化合物。赤い部分は化合物**1**, **2**, **3**に共通するピリミドン構造。(C)ロダナーゼの酵素活性検出システム。(D)3MSTと阻害剤**3**とのX線結晶解析。

2) 3MSTに対する選択性に関する評価

ヒット化合物が3MSTに対して選択性を示すか調べるために、我々は二つの実験を行った。まず、他のH₂S産生酵素であるCSEおよびCBSに対して四つのヒット化合物の阻害活性をガスクロマトグラフィー法により測定し、これらの化合物が3MSTに対して選択性を示すか調べた。その結果、化合物**3**はCSEおよびCBSに対してはほとんど阻害活性を示さないことがわかった。

次に、3MSTと57.6%という高い構造類似性を有する酵素(ロダナーゼ)に対する阻害活性を測定した。ロダナーゼはシアン化物イオンへの硫黄転移に関与し、シアン化物イオンの解毒に関係している酵素である。シアン化物イオンとチオ硫酸塩から産生されるチオシアン酸塩に対して、その定量法であるSörbo法を用いて阻害活性を評価したところ(図3C)、100 μMの化合物濃度において、化合物**1**が18.2±3.6%、化合物**2**が10.9±5.5%、化合物**3**が1.7±6.7%、化合物**5**が9.7±4.5%の阻害率であり、化合物**1**が若干の阻害活性を示すものの、四つのヒット化合物はいずれもほとんど阻害活性を示さなかった。上記二つの選

択性に関する実験の結果、化合物**3**が3MSTに対する優れた選択的阻害剤であることがわかった。

3) ヒット化合物の阻害形式

ヒット化合物の3MSTに対する阻害形式を調べるためにX線結晶構造解析を行い、化合物**1**および**3**と3MSTの共結晶を得た(図3D)。その結果、活性部位にあるCys²⁴⁸残基がジスルフィド化している(Cys-SH→Cys-S-SH)ことが明らかになり、さらにこのCys²⁴⁸残基と、化合物**1**および**3**のピリミドン構造が相互作用を形成していると考えられた。そこで、開発した阻害剤は、248番のCys残基がジスルフィド化した3MSTとのみ相互作用を形成するのかが検討するため等温滴定型熱量測定(ITC)を行った。ジスルフィド化した3MSTとジスルフィド化していない3MSTを用いて、化合物**1**および**3**との相互作用をそれぞれ測定したところ、ジスルフィド化した3MSTを用いたときのみ相互作用を示すことがわかった。

3MSTのH₂Sの産生反応においては、まず3MSTの活性部位のシステイン残基が、基質の3MPによりジスルフィ

ド化されることから始まる。その後、他のチオール分子により硫黄原子が引き抜かれることでハイドロパースルフィドが形成し、 H_2S が産生される。今回開発した阻害剤は、 H_2S 産生機構の第一段階により生じる中間体であるジスルフィド化した3MSTに対して結合を形成し、阻害作用を示していると考えられる (図1B)。

5. おわりに

近年硫黄原子を含む生体内小分子が注目されている中、我々は H_2S を高い感度で選択的に検出可能な蛍光プローブを開発し、それを用いて H_2S 産生酵素の一つである3MSTに対して選択的な阻害剤の開発に成功した。今回開発した3MSTに対する選択的阻害剤が、活性硫黄分子産生酵素である3MSTの生理機能の解明に貢献することを期待している。また、今回の阻害剤開発において、 H_2S の検出方法として H_2S 検出蛍光プローブを用いたが、さらに近年、我々は S^0 を可逆的に検出可能な蛍光プローブ (SSip-1) の開発にも成功している¹³⁾。HSip-1やSSip-1が、今後の活性硫黄分子の阻害剤開発のためのツールとして利用され、本分野がさらに進展することを期待する。

謝辞

本研究は、東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室で行われたものであり、本研究に関わる多くの大学院生、スタッフならびに外部の共同研究者に謝意を表します。特にX線結晶解析においては、東京大学大学院薬学系研究科・清水敏明教授、藤間祥子助教、諏訪内悠介博士に、阻害剤スクリーニングにおいては、東京大学創薬機構・長野哲雄客員教授、岡部隆義特任教授、小島宏建特任教授に、計算化学においては、東京大学大学院薬学系研究科・内山真伸教授、王超助教に、3MSTのプラスミドの提供については、国立精神・神経医療研究センター・木村英雄博士に深く感謝いたします。

文 献

- Paul, B.D. & Snyder, S.H. (2012) H_2S signalling through protein sulphydration and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 499–507.
- Mishanina, T.V., Libiad, M., & Banerjee, R. (2015) Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways. *Nat. Chem. Biol.*, **11**, 457–464.
- Ida, T., Sawa, T., Ihara, H., Tsuchiya, Y., Watanabe, Y., Kumagai, Y., Suematsu, M., Motohashi, H., Fujii, S., Matsunaga, T., et al. (2014) Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 7606–7611.
- Kimura, Y., Toyofuku, Y., Koike, S., Shibuya, N., Nagahara, N., Lefer, D., Ogasawara, Y., & Kimura, H. (2015) Identification of H_2S_3 and H_2S produced by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the brain. *Sci. Rep.*, **5**, 14774.
- Akaike, T., Ida, T., Wei, F.Y., Nishida, M., Kumagai, Y., Alam, M.M., Ihara, H., Sawa, T., Matsunaga, T., Kasamatsu, S., et al. (2017) Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat. Commun.*, **8**, 1177.
- Papapetropoulos, A., Whiteman, M., & Cirino, G. (2015) Pharmacological tools or hydrogen sulphide research: a brief, introductory guide for beginners. *Br. J. Pharmacol.*, **172**, 1633–1637.
- Brancaleone, V., Esposito, I., Gargiulo, A., Vellecco, V., Asimakopoulou, A., Citi, V., Calderone, V., Govvetti, T., Perretti, M., Papapetropoulos, A., et al. (2016) D-Penicillamine modulates hydrogen sulfide (H_2S) pathway through selective inhibition of cystathionine- γ -lyase. *Br. J. Pharmacol.*, **173**, 1556–1565.
- Corvino, A., Severino, B., Fiorino, F., Frecentese, F., Magli, E., Perissutti, E., Santagada, V., Vucci, M., Crino, G., Kelly, G., et al. (2016) Fragment-based de novo design of a cystathionine γ -lyase selective inhibitor blocking hydrogen sulfide production. *Sci. Rep.*, **6**, 34398.
- Thorson, M.K., Majtan, T., Kraus, J.P., & Barrios, A.M. (2013) Identification of cystathionine β -synthase inhibitors using a hydrogen sulfide selective probe. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 4641–4644.
- Whiteman, M., Le Trionnaire, S., Chopra, M., Fox, B., & Whatmore, J. (2011) Emerging role of hydrogen sulfide in health and disease: critical appraisal of biomarkers and pharmacological tools. *Clin. Sci. (Lond.)*, **121**, 459–488.
- Hanaoka, K., Sasakura, K., Suwanai, Y., Toma-Fukai, S., Shimamoto, K., Takano, Y., Shibuya, N., Terai, T., Komatsu, T., Ueno, T., et al. (2017) Discovery and mechanistic characterization of selective inhibitors of H_2S -producing enzyme: 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST) targeting active-site cysteine persulfide. *Sci. Rep.*, **7**, 40227.
- Sasakura, K., Hanaoka, K., Sgubya, N., Mikami, Y., Kimura, Y., Komatsu, T., Ueno, T., Terai, T., Kimura, H., & Nagano, T. (2011) Development of a highly selective fluorescence probe for hydrogen sulfide. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 18003–18005.
- Takano, Y., Hanaoka, K., Shimamoto, K., Miyamoto, R., Komatsu, T., Ueno, T., Terai, T., Kimura, H., Nagano, T., & Urano, Y. (2017) Development of a reversible fluorescent probe for reactive sulfur species, sulfane sulfur, and its biological application. *Chem. Commun. (Camb.)*, **53**, 1064–1067.

著者寸描

●越膳 ほなみ (えちぜん ほなみ)

東京大学大学院薬学系研究科薬科学専攻修士課程2年.

■略歴 2017年東京大学薬学部薬科学科卒業. 同年4月より東京大学大学院修士課程薬学系研究科薬科学専攻に在籍.

■研究テーマと抱負 活性イオウ分子に関する研究テーマに取り組んでいる.

●花岡 健二郎 (はなおか けんじろう)

東京大学大学院薬学系研究科准教授. 博士 (薬学).

■略歴 2000年東京大学薬学部薬学科卒業. 05年同大学院修了 [博士 (薬学)]. 同年より米国テキサス大学サウスウェスタンメディカルセンターにて博士研究員. 07年東京大学大学院薬学系研究科・助教, 10年より同講師, 11年より同准教授 (現職).

■研究テーマと抱負 生体内可視化プローブ及び生体制御ケミカルツールの開発とその応用による生命現象の解明に従事している.

■ウェブサイト <http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~taisha/>