

74. 蛍光プローブの開発を基盤とした酵素阻害剤の探索研究

花岡 健二郎

慶應義塾大学 薬学部／大学院薬学研究科 創薬分析化学講座

Key words : 蛍光プローブ, 活性硫黄分子種, 阻害剤, ハイスループットスクリーニング, 酵素

緒言

活性硫黄分子種とは、生体内に存在する反応性の高い含硫黄分子である [1]。腐卵臭を持つガスである硫化水素 (H_2S) は代表的な活性イオン分子として、血管拡張や炎症、血管新生、抗酸化作用等に関するガス状シグナル伝達物質として着目されてきた [2]。さらに近年では、0 価の硫黄原子である sulfane sulfur が、シグナル伝達やレドックス制御において重要な生理機能に関与することが報告されている [3]。Sulfane sulfur は生体内で polysulfide ($-S_n-S-$) 構造や persulfide ($-S-SH$) 構造で存在し、他の硫黄原子に可逆的に結合する [4]。これらの活性硫黄分子種は、生体内で酵素依存的に産生される。現在までに cystathionine γ -lyase (CSE)、cystathionine β -synthase (CBS)、3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST)、cysteiny t-RNA synthetases (CARSs) が産生酵素として報告されている [3, 5]。活性硫黄分子種の産生において各酵素は関わり合っており、それぞれの酵素が活性硫黄分子産生においてどのような役割を担っているか十分に明らかにされていない。

CSE は pyridoxal 5'-phosphate (PLP) 依存性酵素であり、cysteine を代謝する過程での H_2S の産生や、cystine を基質にした sulfane sulfur の産生が報告されている。PLP に依存し cysteine を基質とした CSE の H_2S の産生機構を図 1 に示す。CSE の基質ポケットの Lys 残基と結合している PLP に、基質である cysteine が結合すると Lys とのシッフ塩基の代わりに cysteine とシッフ塩基を形成し、そこから酵素反応は進み、一連の代謝反応が終わると PLP は再び Lys と結合して酵素内に留まると考えられている。

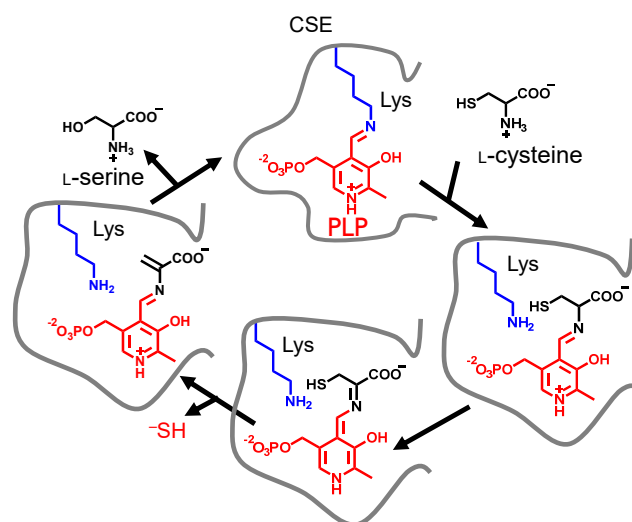


図 1. CSE の cysteine を基質とした H_2S の産生機構
CSE は PLP 依存性酵素であり、L-cysteine を基質として、 H_2S を生成しながら L-serine を生成する。

活性硫黄分子の機能解明において阻害剤は重要なケミカルツールであり、CSE の阻害剤として D,L-propargylglycine (PAG) が汎用されてきた (図 2)。しかし、PAG は他の PLP 依存性酵素である L-alanine transaminase (ALT) や methionine γ -lyase (MGL) を阻害するという報告があり、CSE 選択的ではない [6, 7]。そこで本研究において、CSE の新たな選択的な阻害剤の開発を行った。

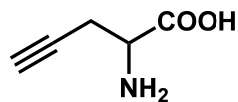


図 2. 既存の CSE 阻害剤である D,L-propargylglycine (PAG) の構造式を示す。

方法および結果

1. CSE 阻害剤の探索

CSE 阻害剤のハイスループットスクリーニング (HTS) には、独自に我々が開発した H_2S 選択的蛍光プローブ (HSip-1) を用いた [8]。HSip-1 は H_2S 選択的に応答して蛍光が上昇する蛍光プローブである (図 3)。つまり、化合物が CSE の酵素活性を阻害することによって H_2S 産生が低下した場合、HSip-1 の蛍光強度上昇が抑制されるアッセイ系を構築した。本アッセイ系を用いて、東京大学創薬機構が所有する約 16 万化合物に対して、スクリーニングを行った結果、CSE の活性を阻害する化合物として、oxamic hydrazide を得ることに成功した (図 4)。得られた化合物は、CBS や 3MST といった他の活性硫黄分子を産生する酵素には阻害活性を示さず、CSE に高い選択性を示した。さらに、PAG の off target である PLP 依存性酵素の methionine γ -lyase [7] に対しても阻害活性を示さなかった。また、得られた化合物を生細胞へと応用したところ、生細胞における H_2S 産生に対しても阻害活性を示すことが分かった。

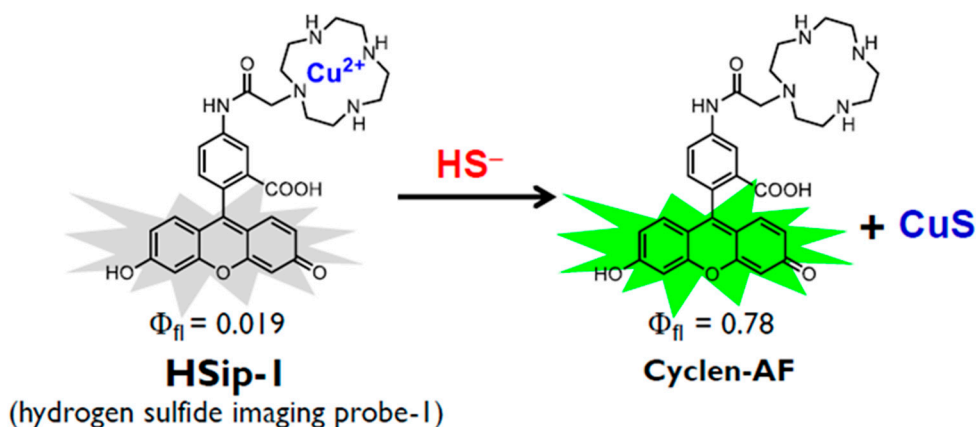


図 3. 我々が開発した H_2S を選択的に検出する蛍光プローブ HSip-1

Cu^{2+} は近傍に存在する蛍光色素の蛍光を消光させる性質があり、 HS^- (H_2S) が Cu^{2+} と反応して CuS を生成することで、蛍光プローブから Cu^{2+} が外れ、発蛍光するメカニズムになっている。

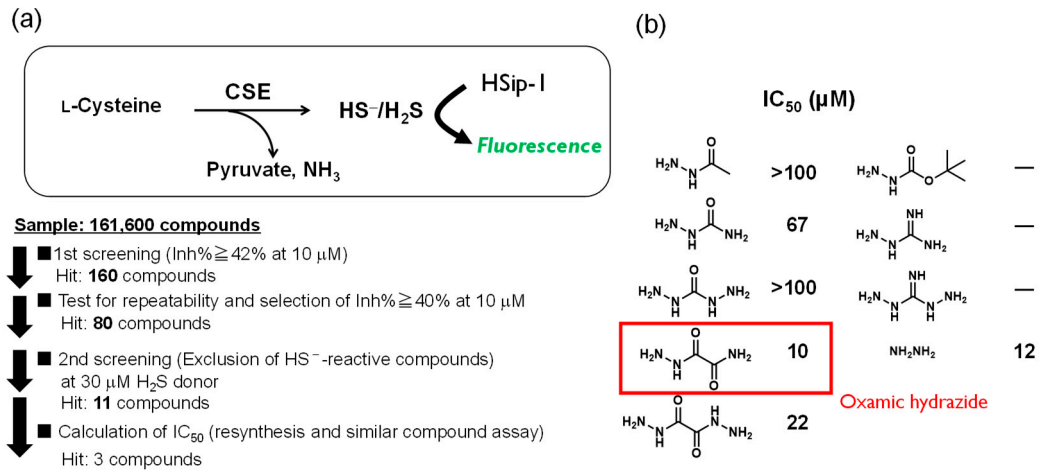


図 4. CSE 阻害剤のハイスループットスクリーニングとヒット化合物

a) 約 16 万化合物のハイスループットスクリーニング。

b) ヒット化合物として見出した oxamic hydrazide。

2. X線結晶構造解析および誘導体の合成・評価

上記のように、ハイスループットスクリーニングによって、CSE を選択的に阻害する化合物として oxamic hydrazide (IC₅₀ = 11 μM) を見出すことに成功した。そこで、阻害機構の解析とそれに基づいた誘導体の合成に取り組んだ。X線結晶構造解析の結果、oxamic hydrazide のヒドラジノ基は、PLP と Schiff 塩基を形成していることが分かった (図 5)。次に、CSE の表面に存在し、かつ側鎖との相互作用が比較的小さいと考えられる末端のアミノ基を修飾した化合物 (2~4) の合成・評価を行った (図 6)。阻害活性の評価は、H₂S 検出蛍光プローブ HSip-1 を用いて、各化合物を添加時の H₂S 産生量を測定することで行った。その結果、化合物 2 が最も強い阻害活性を示し (IC₅₀ = 0.41 μM)、化合物 3、4 に関しては強い阻害活性を示さなかった。さらに、oxamic hydrazide および 2 に関して選択性に関する検討を行い、既存の阻害剤である D,L-propargylglycine (PAG) と比較した結果、2 や PAG が他の PLP 依存性酵素である

methionine γ-lyase (MGL) に対しても阻害作用を示したのに対し、oxamic hydrazide は高い CSE 選択性を示すことが明らかとなった。Oxamic hydrazide が最も高い CSE 選択性を示したことについて、X線結晶構造解析の結果をもとに、分子動力学 (MD) シミュレーションを行ったところ、これら化合物におけるジケトン部位のシス-トランス互変異性による立体反発が重要であると予想された。

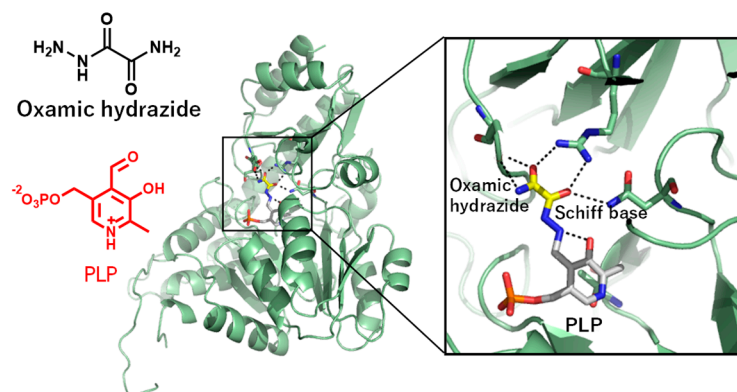


図 5. CSE 阻害剤と CSE 蛋白質との共結晶構造

Oxamic hydrazide は補酵素である PLP と Schiff 塩基を形成していた。

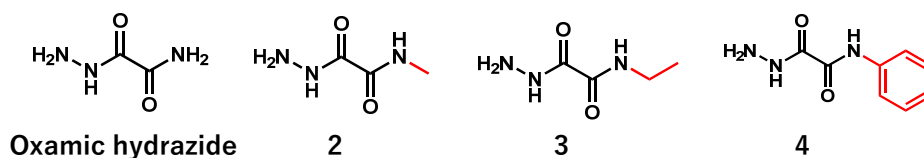


図 6. 末端のアミノ基を修飾した oxamic hydrazide の誘導体
合成および阻害活性の評価を行った oxamic hydrazide の誘導体を示す。

3. 表面プラズモン共鳴 (SPR) による阻害形式の解析

さらに oxamic hydrazide の阻害形式に関して精査を行った。SPR 測定により oxamic hydrazide は不可逆的に CSE と共有結合を形成していることが明らかとなった (図 7)。以上の実験より、oxamic hydrazide は CSE との親和性によって CSE の活性中心で結合し、近接効果により PLP と共有結合を形成することで、PLP 依存性酵素の中でも CSE 選択的に阻害作用を示していると推測された。

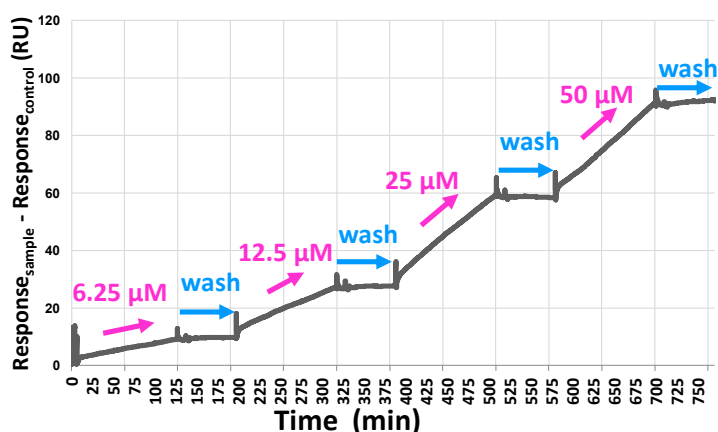


図 7. SPR による oxamic hydrazide と CSE 蛋白質との結合測定

- 1) チップに CSE を固定。
- 2) チップ上を oxamic hydrazide 水溶液の濃度を上げながら、buffer と交互に流す。
- 3) 質量変化を測定。

考 察

開発した CSE 阻害剤は、CSE の活性中心内で PLP と近接効果により結合し、阻害剤として作用するという独特の阻害機構をとると考えられた。さらに、本研究で行ったスクリーニング法は、生体内で重要な役割を果たす他の PLP 依存性酵素の阻害剤探索へと応用でき、2017 年にその活性硫黄分子産生機能が報告された CARSs に対しても阻害剤の開発へと応用できると期待される。さらに、今回開発した CSE 阻害剤は今後、活性硫黄分子種の機能解明のためのケミカルツールの一つとして、レドックスバイオロジーの研究分野に貢献することが期待される。

共同研究者・謝辞

これら研究成果をまとめて学術論文に発表を行うことができました [9]。本研究は、主として東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室で行ったものであり、当研究室の浦野泰照教授および大学院生らに深く感謝申し

上げます。また、X線結晶構造解析についてお世話になりました東京大学大学院薬学系研究科蛋白構造生物学教室の清水敏之教授および藤間祥子助教、日々亮太氏に深く感謝申し上げます。化合物スクリーニングについてお世話になりました東京大学創薬機構の岡部隆義特任教授および小島宏建特任教授に深く感謝申し上げます。表面プラズモン共鳴測定においてお世話になりました東京大学大学院工学系研究科の津本浩平教授および長門石暁特任教授に深く感謝申し上げます。MD計算においてお世話になりました北陸大学薬学部の齋藤大明准教授に深く感謝申し上げます。最後に、慶應義塾大学薬学部創薬分析化学講座のスタッフおよび学生に深く感謝を申し上げます。

文 献

- 1) Lau N, Pluth M D. Reactive sulfur species (RSS): persulfides, polysulfides, potential, and problems. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2019 49:1-8. DOI: 10.1016/j.cbpa.2018.08.012
- 2) Wallace J L, Wang R. Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2015 14:329-345. DOI: 10.1038/nrd4433
- 3) Akaike T, Ida T, Wei F-Y, Nishida M, Kumagai Y, Alam M M, Ihara H, Sawa T, Matsunaga T, Kasamatsu S, Nishimura A, Morita M, Tomizawa K, Nishimura A, Watanabe S, Inaba K, Shima H, Tanuma N, Jung M, Fujita S, Watanabe Y, Ohmuraya M, Nagy P, Feelisch M, Fukuto J M, Motohashi H. Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat. Commun.* 2017 8:1177. DOI: 10.1038/s41467-017-01311-y
- 4) Mishanina T V, Libiad M, Banerjee R. Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways. *Nat. Chem. Biol.* 2015 11:457-464. DOI: 10.1038/nchembio.1834
- 5) Paul B D, Snyder S H. H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012 13:499-507. DOI: 10.1038/nrm3391
- 6) Burnett G, Marcotte P, Walsh C. Mechanism-based inactivation of pig heart L-alanine transaminase by L-propargylglycine. *J. Biol. Chem.* 1980 255(8):3487-3491. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)85725-3
- 7) Sun Q, Collins R, Huang S, Holmberg-Schiavone L, Anand G S, Tan C-H, van-den-Berg S, Deng L-W, Moore P K, Karlberg T, Sivaraman J. Structural basis for the inhibition mechanism of human cystathionine γ -lyase, an enzyme responsible for the production of H₂S. *J. Biol. Chem.* 2009 284(5):3076-3085. DOI: 10.1074/jbc.M805459200
- 8) Sasakura K, Hanaoka K, Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Komatsu T, Ueno T, Terai T, Kimura H, Nagano T. Development of a Highly Selective Fluorescence Probe for Hydrogen Sulfide. *J Am. Chem. Soc.* 2011 133: 18003-18005. DOI: 10.1021/ja207851s
- 9) Echizen H, Hanaoka K, Shimamoto K, Hibi R, Toma-Fukai S, Ohno H, Sasaki E, Komatsu T, Ueno T, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Otsuka T, Saito H, Nagatoishi S, Tsumoto K, Kojima H, Okabe T, Shimizu T, Urano Y. Discovery of a cystathionine γ -lyase (CSE) selective inhibitor targeting active-site pyridoxal 5'-phosphate (PLP) via Schiff base formation. *Sci. Rep.* 2023 13:16456. DOI: 10.1038/s41598-023-43536-6