

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

**【目的】** 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。腐卵臭を持つガスである硫化水素 ( $H_2S$ ) は代表的な活性硫黄分子種として、血管拡張や炎症、血管新生、抗酸化作用等に関与するガス状シグナル伝達物質として着目されてきた。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。Sulfane sulfur は生体内で polysulfide ( $-S-S_n-S-$ ) 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。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  $\gamma$ -lyase (CSE)、cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS)、3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST)、cysteinyl t-RNA synthetases (CARSS) が産生酵素として報告されている。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。そこで本研究において、ケミカルツールの一つとして、CSE の選択的な阻害剤の開発を行った。

**【方法】** CSE 阻害剤のハイスループットスクリーニング (HTS) のために、独自に我々が開発した  $H_2S$  選択的蛍光プローブ (HSip-1) を用いて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。さらに得られたヒット化合物について、CSE 選択性の評価や X 線結晶構造解析、SPR 測定、誘導体合成を通して、得られた CSE 阻害剤の機能評価や阻害機構について考察を行った。

**【結果】** 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。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。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。さらに、X 線結晶構造解析の結果、oxamic hydrazide のヒドラジノ基は、PLP とシッフ塩基を形成していることが分かった。誘導体の中で、oxamic hydrazide が最も高い CSE 選択性を示したことについて、X 線結晶構造解析のデータをもとに、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。また、oxamic hydrazide の阻害形式の精査のために SPR 測定を行ったところ、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。本研究で開発された CSE 阻害剤は、今後、レドックスバイオロジーの分野で活用されていくことが期待される。

$H_2S$  を検出する蛍光プローブを用いた CSE 阻害剤のハイスループットスクリーニング

