

## 論文の内容の要旨

論文題目 硫化水素 (H<sub>2</sub>S) 選択的蛍光プローブの開発とその応用

氏 名 篠 倉 潔

### 【序論】

硫化水素 (H<sub>2</sub>S) は腐卵臭を有する毒性の高い気体である。しかしながら、近年 H<sub>2</sub>S が生体内において血管平滑筋の弛緩等の生理シグナルに関与していることが明らかになりつつあり、一酸化窒素 (NO)、一酸化炭素 (CO) に次ぐ、第三のガス性シグナル情報伝達物質として注目されている。これまでに H<sub>2</sub>S 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、HS<sup>-</sup>選択的電極等が報告されているが、これら方法では生体内の H<sub>2</sub>S をリアルタイムに検出することは困難で、H<sub>2</sub>S のダイナミックな生理機能を解析することは出来ない。本研究において私は、酵素系あるいは生細胞で H<sub>2</sub>S をリアルタイムに検出できる蛍光プローブを開発し、更にはそれを用いて H<sub>2</sub>S 産生酵素阻害剤の開発を行った。

### 【本論】

#### 1. H<sub>2</sub>S 選択的蛍光プローブ (HSip-1) の開発と生細胞イメージング

細胞内で H<sub>2</sub>S を検出する際の最大の課題は、H<sub>2</sub>S に対する選択性と感度である。細胞内には thiol 基を有する生体分子として、glutathione (GSH, 推定生体内存在濃度: 約 1-10 mM) や cysteine (約 100 μM)、タンパク質等が存在し、蛍光プローブはこれらとは反応せず、H<sub>2</sub>S に対してのみ反応する、高い選択性を有する必要がある。また、細胞内の H<sub>2</sub>S 濃度は明確には決定されていないが、10 μM-1 mM の H<sub>2</sub>S の添加により生理作用が引き起こされるという報告から、少なくとも 10 μM の H<sub>2</sub>S を検出できる感度が必要である。そこで、10 mM GSH には応答せず、10 μM H<sub>2</sub>S のみに素早く応答する蛍光プローブの開発を目指した。

蛍光プローブの分子設計として私は、 $\text{Cu}^{2+}$ とそれをキレートする環状ポリアミン構造を有した4つの fluorescein 誘導体を設計・合成した (Figure 1)。環状ポリアミン構造は  $\text{Cu}^{2+}$ とキレート効果により安定な錯体構造を形成すること、また、 $\text{Cu}^{2+}$ は近傍に存在する蛍光団の蛍光を強く消光すること、さらには  $\text{H}_2\text{S}$  が  $\text{Cu}^{2+}$ と強く結合することが知られている。これらの知見から、 $\text{H}_2\text{S}$  が  $\text{Cu}^{2+}$ と結合することによって  $\text{Cu}^{2+}$ が環状ポリアミン構造から外れて蛍光強度が上昇するのに対して、GSH では  $\text{Cu}^{2+}$ が外れず蛍光強度の上昇が起こらないことを期待した。

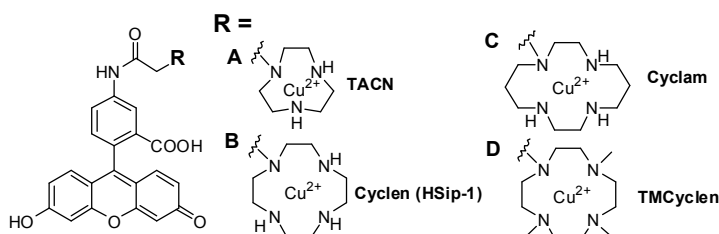


Figure 1. Structures of four macrocyclic fluorescein- $\text{Cu}^{2+}$  conjugates.

はじめに各化合物の吸収・蛍光特性を評価した結果、いずれの化合物も 490 nm 付近に吸収極大波長を、515 nm 付近に蛍光極大波長を示し、かつ  $\text{Cu}^{2+}$ による強い消光のために蛍光量子収率が低く抑えられていた。次に、 $\text{H}_2\text{S}$  および GSH への応答性を評価した結果、TACN を用いた場合には GSH を添加した際にも蛍光強度上昇を示し、十分な選択性が得られなかった。また、Cyclam や TMCyclen を用いた場合でも、GSH に対する  $\text{H}_2\text{S}$  への選択性は示したものの、 $\text{H}_2\text{S}$  を添加した際の蛍光強度上昇は迅速では無かった。一方、Cyclen を用いた HSip-1 では 10 mM GSH では殆ど蛍光上昇を示さず、10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{S}$  を添加した場合には、迅速な蛍光強度上昇を示した (Figure 2)。

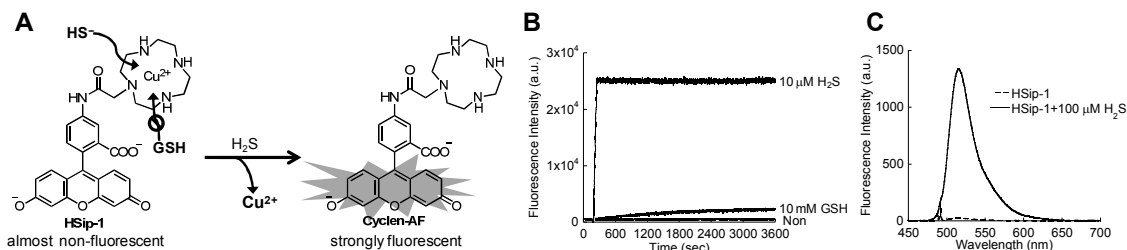
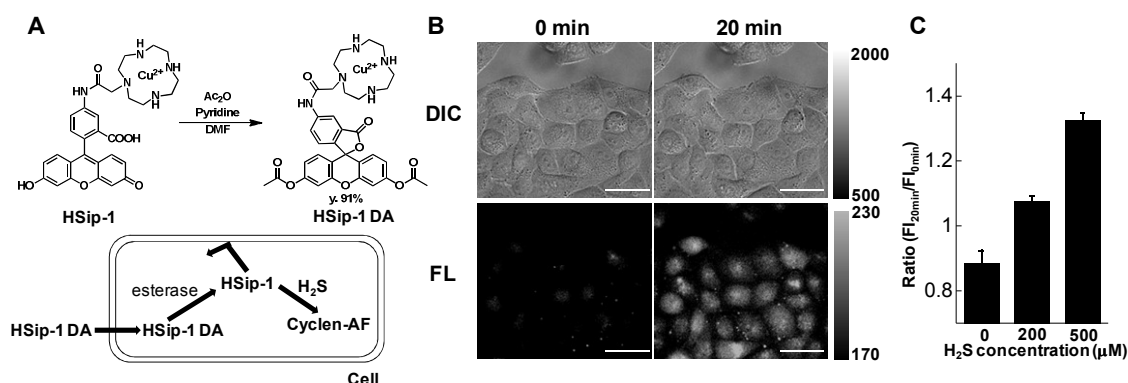


Figure 2. (A) Schematic of the reaction of HSip-1 with  $\text{H}_2\text{S}$ . (B) Time course of the fluorescence intensity change of HSip-1 with no addition (Non), addition of 10 mM GSH, or 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{S}$ . (C) Fluorescence spectra of 1  $\mu\text{M}$  HSip-1 before and after addition of 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{S}$ .

これら結果は、 $\text{H}_2\text{S}$ とGSHの  $\text{pK}_a$ や分子自体の高高さ、 $\text{TACN-Cu}^{2+} < \text{Cyclen-Cu}^{2+} < \text{Cyclam-Cu}^{2+}$ の安定度定数の違いに起因すると考えられる。また、HSip-1は1 mM cysteine や1 mM homocysteine、各種無機含硫化合物や活性酸素種、活性窒素種の添加によっても蛍光強度上昇は示さず、 $\text{H}_2\text{S}$ に対して高い選択性を示した。

さらに、HSip-1の生細胞イメージングへの応用を行った。まずHSip-1に細胞膜透過性を付与するため、ジアセチル体であるHSip-1 DAを合成した (Figure 3A)。合成したHSip-1 DAをHeLa細胞に負荷し、その後、 $\text{H}_2\text{S}$ を細胞外液に添加したところ、HSip-1は細胞質への局在を示し、添加した $\text{H}_2\text{S}$ 濃度依存的に蛍光強度の上昇を示した (Figure 3B,C)。このように、HSip-1を用いて細胞内

においても H<sub>2</sub>S を選択的に捉えることに成功した。

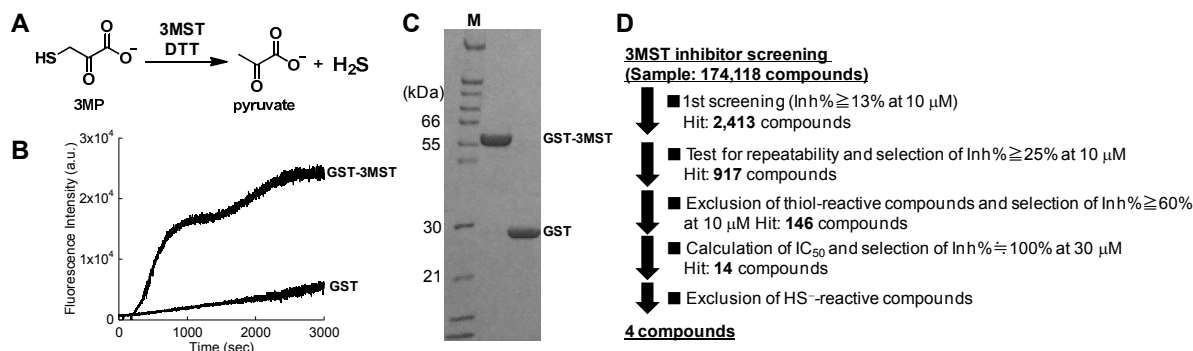


**Figure 3.** Visualization of H<sub>2</sub>S inside live cells using HSip-1 DA. (A) Synthetic scheme of HSip-1 DA and strategy to introduce HSip-1 into the cell. (B) Differential interference contrast (DIC) and fluorescence (FL) images were captured before and after addition of 500 μM H<sub>2</sub>S to the medium outside cells. (C) Average F<sub>20 min</sub>/F<sub>0 min</sub> fluorescence intensity ratios in fluorescence images after addition of 0, 200, or 500 μM H<sub>2</sub>S.

## 2. H<sub>2</sub>S 産生酵素 3MST の選択的阻害剤の開発

哺乳類の生体内での H<sub>2</sub>S 産生酵素としては、cystathionine β-synthase (CBS) や cystathionine γ-lyase (CSE)、3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST) が報告されている。また、CBS の選択的阻害剤として aminooxyacetic acid (AOAA) が、CSE の選択的阻害剤として propargylglycine (PAG) が報告されている。一方、3MST の選択的阻害剤はこれまで報告されていない。そのため、3MST の選択的阻害剤の開発は、3MST の生理機能の解明に大きく貢献出来ると考えた。そこで私は、HSip-1 の持つ H<sub>2</sub>S に対する感度と選択性、水溶性の高さに着目して、HSip-1 を用いた 3MST 阻害剤のハイスループットスクリーニング (HTS) を行うこととした。

はじめに、マウス 3MST の大量発現・精製方法の確立、および基質である 3-mercaptopyruvate (3MP) と DTT から産生される H<sub>2</sub>S の *in vitro* での検出系の構築を行った (Figure 4A-C)。さらに、本系を用いて大規模 HTS (約 17 万化合物) を行った (Figure 4D)。



**Figure 4.** (A) H<sub>2</sub>S biosynthesis catalyzed by 3MST. (B) Time course of the fluorescence intensity change of HSip-1 with GST-3MST or GST in the presence of 3MP and DTT as substrates. (C) SDS-PAGE analysis of GST-3MST and GST. (D) Flow chart of 3MST inhibitor screening.

その結果、10  $\mu\text{M}$  の化合物濃度で HSip-1 の蛍光強度上昇を 80-100% 阻害する化合物を 4 つ得ることに成功した (Figure 5)。そのうち、化合物 1-3 は Ar-COCH<sub>2</sub>S-pyrimidone の共通骨格を有しており、この構造が 3MST 阻害に重要であると考えられる。

次に、ガスクロマトグラフィーを用いて本アッセイ系における H<sub>2</sub>S 産生量を評価した結果、これらの化合物の添加によって 3MST からの H<sub>2</sub>S 産生が 90-100% 低下しており、HSip-1 を用いた蛍光測定の結果と一致していた。また、マウス 3MST を発現させた HEK293 細胞のセルライゼートを用いて、H<sub>2</sub>S 産生の阻害活性を評価した結果、セルライゼート中においても H<sub>2</sub>S 産生を 85-100% 抑制しており、他の夾雑タンパク質存在下においても 3MST の活性を選択的に阻害できることを明らかにした。さらにオフターゲットとして、他の H<sub>2</sub>S 産生酵素 (CBS や CSE) 、また、3MST と構造類似性 (アミノ酸配列の相同性 57.6%) を有する thiosulfate sulfurtransferase への阻害活性を評価した。その結果、化合物 3 は、3MST 選択的な阻害剤であることが示された。

Compound	Inhibition% <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	Inhibition% <sup>b</sup> at 10 $\mu\text{M}$	Inhibition% <sup>b</sup> (100 $\mu\text{M}$ , lysate)
1	102.8 $\pm$ 0.2	1.7	103.7 $\pm$ 2.7	99.7 $\pm$ 0.6
2	81.7 $\pm$ 2.5	6.3	93.4 $\pm$ 0.8	88.5 $\pm$ 2.2
3	102.0 $\pm$ 2.9	2.7	90.3 $\pm$ 12.0	98.3 $\pm$ 1.4
5	95.5 $\pm$ 3.4	5.7	90.9 $\pm$ 0.9	98.9 $\pm$ 1.2

**Figure 5.** Structures of 3MST inhibitors and assay data. These data were obtained from results of <sup>a</sup>fluorescence measurement and <sup>b</sup>gas chromatography.

### 【結論】

本研究において、H<sub>2</sub>S 選択的蛍光プローブ HSip-1 の開発、さらに、それを用いて世界初の 3MST 選択的阻害剤の開発に成功した。本蛍光プローブの生細胞イメージングのみならず、HTS アッセイ系への応用を可能としたのは、HSip-1 の優れた感度と選択性に起因しており、HSip-1 は非常に有用な蛍光プローブである。今後は HSip-1 と開発した阻害剤を用いて更なる H<sub>2</sub>S の生理機能の解明を行っていきたい。

### 【発表文献】

Kiyoshi Sasakura, Kenjiro Hanaoka, Norihiro Shibuya, Yoshinori Mikami, Yuka Kimura, Toru Komatsu, Tasuku Ueno, Takuya Terai, Hideo Kimura, and Tetsuo Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 18003-18005.