

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 篠倉 潔

篠倉 潔は、酵素系あるいは生細胞で硫化水素 (H_2S) をリアルタイムに検出できる蛍光プローブの開発、及びそれを用いた H_2S 産生酵素阻害剤の開発を行った。

硫化水素 (H_2S) は腐卵臭を有する毒性の高い気体であるが、近年 H_2S 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_2S 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 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_2S をリアルタイムに検出することは難しく、 H_2S のダイナミックな生理機能を解析することは出来なかった。篠倉は、このような H_2S に着目して、酵素系あるいは生細胞での H_2S 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_2S 産生酵素阻害剤の開発に取り組んだ。

篠倉は、まず初めに H_2S 選択的蛍光プローブ (HSip-1) の開発を行った。細胞内で H_2S を検出する際の最大の課題は、 H_2S 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, 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_2S に対してのみ反応する高い選択性を有する必要があった。また、細胞内の H_2S 濃度は明確には決定されていないが、10 μM -1 mM の H_2S 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_2S を検出できる感度が必要であると考察した。そこで、10 mM GSH には応答せず、10 μM H_2S のみに素早く応答する蛍光プローブの開発を目標として、プローブ設計を行った。

蛍光プローブの分子設計として、 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。環状ポリアミン構造は 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、 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 H_2S が Cu^{2+} と強く結合することが知られている。これらの知見から篠倉は、 H_2S が Cu^{2+} と結合することによって 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 Cu^{2+} が外れず蛍光強度の上昇が起こらないと考えた。

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 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、 H_2S および GSH への応答性を評価した結果、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 μM H_2S を添加した場合には、迅速な蛍光強度上昇を示した。これら結果は、 H_2S と GSH の $\text{p}K_a$ や分子自体の高さ、安定度定数に起因すると考察した。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、H₂S 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うため、HSip-1 を細胞膜透過性とするためジアセチル体である HSip-1 DA を合成し HeLa 細胞に負荷し、その後、H₂S 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 H₂S 濃度依存的に蛍光強度の上昇を示した。つまり、HSip-1 を用いて細胞内においても H₂S を選択的に捉えることに成功した。

さらに篠倉は、H₂S 産生酵素 3MST の選択的阻害剤の開発を行った。哺乳類の生体内での H₂S 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。そこで篠倉は、HSip-1 の持つ H₂S 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) を行った。具体的には、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 H₂S の *in vitro* での検出系の構築を行った。さらに、本系を用いて大規模 HTS (約 17 万化合物) を行った結果、10 μM 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。これら化合物は Ar-COCH₂S-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察された。

さらに、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 H₂S 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 H₂S 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、H₂S 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 H₂S 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 H₂S 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結果、3MST 選択的な阻害剤となる化合物を見出すことに成功している。

本研究は、新たな H₂S 選択的蛍光プローブ HSip-1 の開発、さらに、それを用いた世界初の 3MST 選択的阻害剤の創製研究であり、本蛍光プローブが生細胞イメージングのみならず HTS アッセイ系へも応用可能であったのは、HSip-1 の優れた感度と選択性に起因している。開発した蛍光プローブ及び阻害剤は、今後の H₂S の生理機能の解明に貢献するものと考えられ、これら篠倉の成果は、博士 (薬学) の学位の取得に値する優れた研究と認めた。