

硫化水素の生理機能についての研究は近年精力的になされている。硫化水素産生経路の一つに、Cys から 3-メルカプトピルビン酸(3MP)を経て硫化水素を産生する経路があり、3MP からの硫化水素の生成には 3-メルカプトピルビン酸硫黄転移酵素(3MST) (EC 2.8.1.2)が関与している。3MST は 3MP の硫黄をシアニドやチオールに転移させる酵素であり、チオールに転移させる場合、生成したペルスルフィドが他のチオールと非酵素的に反応して硫化水素が産生される。

3MST の機能解析には選択特異的な阻害剤の開発がのぞまれているが、これまで 3MP 類似阻害剤(α -ケトグルタル酸(AKG)、2-メルカプトプロピオン酸(2MPA)と知られている化合物は阻害効果も弱く、選択性も低い。近年、東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室によって、東京大学創薬オープンイノベーションセンターによる化合物の中から、3MST に選択的阻害作用を持つ物質 A、B (阻害剤 A、B)が見出された。阻害剤 A、B はともに、芳香環-カルボニル-硫黄-4-ピリミドンの共通骨格を持つ。

本論文では、既存の 3MP 類似阻害剤と新規 3MST 阻害剤それぞれの 3MST との複合体の結晶構造を明らかにし、それぞれの阻害剤の阻害機構を解明することを目的とした。マウス 3MST(m3MST)全長を大腸菌で発現させ高純度のサンプルを得、単体および化合物との複合体の結晶を得た。さらにシンクロトロン放射光 X 線を用いて回折強度データを収集し構造を決定した。

まず 3MP 類似阻害剤と m3MST との複合体について述べる。AKG、2MPA はともに m3MST の活性部位に結合していた。AKG は 1 位のカルボキシル基が Tyr108 や Thr253 の側鎖と、2 位のカルボニル基が Gly249 主鎖と、5 位のカルボキシル基が Arg188 や Ser250 の側鎖と直接水素結合していた。また 2MPA はカルボキシル基が Arg188 側鎖と直接水素結合していた。AKG や 2MPA は、h3MST-ピルビン酸(Pyr)複合体(PDB ID: 4JGT)中での Pyr の結合位置とほぼ同じ場所に結合していた。

次に新規 3MST 阻害剤の m3MST への結合定数を等温滴定カロリーメトリー(ITC)によって求めた。3MST の触媒残基である Cys は 3MST が触媒する反応において途中 S-スルフヒドリル化される。そこで 3MST が S-スルフヒドリル化された状態とされていない状態のタンパク質を調製して結合定数を求めることにした。触媒残基の Cys248 が S-スルフヒドリル化された m3MST

では新規 3MST 阻害剤の結合が観察され解離定数が阻害剤 A、B それぞれ 0.5 μM 、3 μM であった。一方、S-スルフヒドリル化されていない m3MST では新規 3MST 阻害剤の結合が観察されなかった。

ITC の知見をもとに新規 3MST 阻害剤と S-スルフヒドリル化された m3MST と結晶構造を決定した。阻害剤 A、B は m3MST にほぼ共通の結合様式で結合しており、3MP 類似阻害剤の認識に関わる残基だけではなく、活性部位周辺領域に存在する Pro39、Asp73、His74、Arg197、Val277 とも相互作用していた。

触媒残基の Cys248 にはどちらの複合体でも硫黄が結合していた。4-ピリミドン骨格を持つ芳香環は Cys278 の近位側に結合し、S_γ-S_δ 間のジスルフィド結合は芳香環にほぼ垂直に位置し阻害剤の 4-ピリミドン骨格を持つ芳香環と相互作用(硫黄- π 相互作用)していた。さらに 4-ピリミドン骨格は Tyr108、Arg188、Ser250、Thr253 と直接または水分子を介した水素結合を形成していた。Cys278 とは遠位に位置する芳香環は、Arg197 側鎖とカチオン- π 相互作用を形成し、Arg197 側鎖と Asp73 側鎖によって形成された水素結合ネットワークとスタッキング相互作用していた。その他、阻害剤は結合部位のアミノ酸残基と直接または水を介した水素結合を形成していた。

3MP 類似阻害剤は反応生成物である Pyr の結合部位に結合していたこと、また S-スルフヒドリル化されていない 3MST に結合していたことから、3MST が担う 1 段階目の反応、つまり 3MP から触媒残基への硫黄転移反応から阻害すると考えられる。一方、新規 3MST 阻害剤は Cys248 が S-スルフヒドリル化されていない m3MST に対しては結合を示さず、Cys248 が S-スルフヒドリル化された m3MST に対しては強い結合を示すことから、新規 3MST 阻害剤は 3MST が担う 2 段階目の反応、すなわち 3MST の反応中間体からチオールへの硫黄転移反応を阻害すると考えられる。さらに本研究では、新規 3MST 阻害剤が実際に S-スルフヒドリル化された Cys278 によって認識され、硫黄- π 、カチオン- π 、スタッキングなどの特徴的な相互作用を通して特異的に認識されていることを原子レベルで明らかにした。

新規 3MST 阻害剤が S-スルフヒドリル化された 3MST に結合することは新規知見であることや、S-スルフヒドリル化された 3MST を原子レベルで明らかにしたことは高く評価できる。さらにここで得られた構造情報はさらに親和性の高い特異的な 3MST 阻害剤の設計に貢献できると考えられる。よって本論文は博士(薬科学)の学位請求論文として合格と認められる。