

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21603017

研究課題名（和文） 小分子阻害剤によるプロリン異性化酵素の細胞周期進行における役割の解析

研究課題名（英文） Analyses of the role of peptidyl prolyl isomerase on the cell cycle progression through small molecule inhibitors

## 研究代表者

渡邊 信元 (WATANABE NOBUMOTO)

独立行政法人理化学研究所・化合物ライブラリー評価研究チーム・チームヘッド

研究者番号：90221689

## 研究成果の概要（和文）：

蛍光タンパク質融合Pin1の基質リン酸化ペプチドへの結合を測定することで簡便なPin1阻害小分子探索系を構築し、Pin1阻害小分子を探索・単離した。その小分子を用いてPin1の細胞分裂への役割を化学生物学的に解析することを目的とした研究を行った。Pin1の活性は細胞周期の分裂期からの離脱時におけるリン酸化制御に重要であることが明らかになった。

## 研究成果の概要（英文）：

We have established a simple screening system for Pin1 inhibitor through the measurement of the binding of the fluorescence protein tagged Pin1 and phosphorylated target peptides. We have successfully isolated Pin 1 inhibitors and analyzed the role of Pin1 on the cell cycle progression using them. Pin1 was found to be important for the exit of mitosis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

## 研究分野：時限

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

## キーワード：

タンパク質リン酸化、イソメラーゼ、脱リン酸化酵素、細胞周期

## 1. 研究開始当初の背景

リン酸化セリンまたはスレオニンのC端のプロリン特異的に異性化を行う Pin1 は、分裂期リン酸化の多くがC端にプロリンをもつ

セリン・スレオニンで起こることを考えると、分裂期リン酸化によるタンパク質構造変化において中心的な役割を果たすと考えられる。実際、Pin1 ノックアウトマウスでは増殖の遅滞が認められ、siRNA や抗体注入による

Pin1 阻害は M 期開始、進行に影響を与えるという報告もあるが、これらの解析は分裂進行中の細胞に対して行うには難しい技術であり、M 期開始、進行における Pin1 の役割に関しても明確な結論が得られているわけではない。PPIase には、Pin1 の属するパルブリンファミリーの他に、シクロフィリンファミリー、FK506 結合タンパク質(FKBP)ファミリーがある。サイクロスポリン A はシクロフィリンファミリー、FK506, ラパマイシンは FKBP ファミリーの PPIase 特異的阻害物質として、これらの PPIase の役割の解明に大きな役割を果たした。同様に、分裂期進行における Pin1 の役割を明らかにするには Pin1 阻害剤を用いた化学生物学的アプローチが有効であることは疑いない。しかし、これまで報告されてきた Pin1 阻害剤は、必ずしも Pin1 に特異的に働くわけではなく、有効濃度も比較的高い。最近、低濃度で Pin1 阻害効果のあるペプチド性阻害剤も報告されたが、細胞へは浸透できない。

PPIase 酵素活性は、主に、基質ペプチドの異性化状態がキモトリプシンなどのタンパク質分解酵素に対する感受性に影響することを利用して測定されてきた。この測定系は系内に異性化酵素と分解酵素が共存する複雑な系であり、ハイスループットな阻害剤探索には不適當である。他にペプチドの異性化状態を蛍光で測定する系もあるが、異性化による蛍光変化が微弱であるため、決して簡便な探索系とは言えない。従って、Pin1 の特異的阻害剤を見出すには、Pin1 活性を簡便に測定できる系を構築することが必要である。

われわれは 19 年度に開始した基盤研究 C で、リン酸化を介したタンパク質間相互作用のハイスループット阻害小分子探索系を開発し、分裂期リン酸化酵素 Plk1 のポロボックスドメイン (PBD) に依存するリン酸化特異的結合を阻害する薬剤を見出し、PBD 依存結合の細胞分裂期進行における役割を明らかにしている (JBC, 2009)。

Pin1 の N 端にある WW ドメインも他のタンパク質にリン酸化依存に結合し、この結合を失う変異導入は Pin1 活性を阻害する。さらに我々は予備的実験で、PPIase 活性を失う変異を導入した Pin1 は、野生型に比し WW ドメイン依存結合が著しく強くなるという興味深い現象を見出している。これは、異性化酵素活性がリン酸化依存結合を解離させることに働くためと考えられる。すなわち WW ドメイン依存結合を減少させる小分子のみならず上昇させる小分子も Pin1 阻害活性を有

すと考えられる。これらの予備結果を基に、WW ドメイン依存結合を上昇あるいは減少させるタイプの Pin1 阻害小分子を一度にハイスループットに探索する系を構築することを中心に本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

細胞増殖期に活性化するリン酸化酵素 (CDK, MAPK など) は、C 端側にプロリンをもつセリン・スレオニン (Ser-Pro, Thr-Pro) を特異的にリン酸化する。このリン酸化は細胞分裂進行に極めて重要であるが、リン酸化がどのような分子機構で基質タンパク質に影響を与えるのかはほとんど明らかではない。プロリン異性化酵素 (PPIase; peptidyl prolyl cis/trans isomerase) はプロリンを含む結合を cis/trans 異性化してタンパク質の構造変化を引き起こし、タンパク質活性などを大きく変化させる酵素である。PPIase の一種である Pin1 はリン酸化したセリン・スレオニンの C 端側のプロリン (pSer-Pro, pThr-Pro) を特異的に異性化するので、分裂期にリン酸化される基質タンパク質の構造変化を担う異性化酵素と考えられている。しかし、現在までのところ、細胞レベルで Pin1 活性を特異的に阻害できる物質は存在しない。

本研究は、蛍光タンパク質融合 Pin1 の基質リン酸化ペプチドへの結合測定系による簡便な Pin1 阻害小分子探索系を構築し、Pin1 阻害小分子を探索・単離すること、その小分子を用いて Pin1 の細胞分裂への役割を化学生物学的に解析することを目的とする。

## 3. 研究の方法

①. 蛍光標識 Pin1 融合タンパク質を大腸菌で大量発現した

ヒト Pin1 タンパク質およびその変異体 (アミノ酸点変異体およびドメイン欠失体) の N 端側に蛍光タンパク質を融合させたタンパク質を大腸菌で発現させた。

② Pin1 結合配列リン酸化ペプチドを 96 ウェルプレートの各ウェルに共有結合させる。

Pin1 結合配列リン酸化ペプチドは、スレオニン 239 をリン酸化したヒト Wee1A 由来のペプチド配列 (CQVNINPFpTPDSL; pT はリン酸化スレオニン) を用いた。リン酸化していないスレオニンにしたペプチドも合成し、結合しない

対照として用いた。

③蛍光タンパク質融合 Pin1 発現大腸菌抽出液をリン酸化ペプチドを共有結合した 96 ウェルプレートに入れ、結合しなかったタンパク質を洗浄後、結合したタンパク質を蛍光で定量し、この結合に影響を与える化合物を単離し、Pin1 酵素活性を阻害する化合物が得られた。

④Pin1 酵素活性を阻害する化合物を培養細胞に投与し、細胞周期の進行を解析した。

#### 4. 研究成果

蛍光タンパク質融合Pin1の基質リン酸化ペプチドへの結合を測定することで簡便なPin1阻害小分子探索系を構築し、Pin1阻害小分子を探索・単離し、その小分子を用いてPin1の細胞分裂への役割を化学生物学的に解析することを目的とした研究を行った。Pin1とリン酸化ペプチドへの結合測定系の構築を行いさらに化合物の探索を行い、Pin1酵素活性を阻害する化合物が得られた。

この化合物を用いて、Pin1の細胞周期進行への役割を解析し、Pin1が細胞分裂期からの離脱時に重要な役割を有することを明らかにした。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① Burger, M., Zimmermann, T.J., Kondoh, Y., Stege, P., Watanabe, N., Osada, H., Waldmann, H., and Vetter, IR.

Crystal structure of the predicted phospholipase LYPLAL1 reveals unexpected functional plasticity in spite of close relationship to acyl protein thioesterases.

J Lipid Res. **53**, 43-50 (2012) (査読有)

② Uchida, S., Watanabe, N., Kudo, Y., Yoshioka, K., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Nakagama, H., Poon, R.Y.C., and Yamashita, K.

SCF  $\beta$  TrCP mediates stress-activated MAP kinase-induced Cdc25B

degradation

J. Cell Science, **124**, 2816-2825 (2011) (査読有)

③ Ong, EB., Watanabe, N., Saito, A., Futamura, Y., Abd El Galil, K.H., Koito, A., Najimudin, N., Osada, H.\*

Vipirinin, a coumarin-based HIV-1 VPR inhibitor, interacts with a hydrophobic region of VPR

J Biol. Chem., **286**, 14049-14056 (2011) (査読有)

④ Olsen, BB., Kreutzer, N., Watanabe, N., Holm, T. Guerra, B.

Mapping of the interaction sites between Wee1 kinase and the regulatory b-subunit of protein kinase CK2

Int. J. Oncol., **36**, 1175-1182 (2010) (査読有)

⑤ Tamura, Y., Simizu, S., Muroi, M., Takagi, S., Kawatani, M., Watanabe, N., and Osada, H.

Polo-like kinase 1 phosphorylates and regulates Bcl-x<sub>L</sub> during pironetin-induced apoptosis.

Oncogene, **28**, 107-116 (2009) (査読有)

⑥ Watanabe, N., Sekine, T., Takagi, M., Iwasaki, J., Imamoto, N., Kawasaki, H. and Osada, H.

Deficiency in chromosome congression by the inhibition of PLK1 polo box domain-dependent recognition.

J Biol. Chem., **284**, 2344-2353 (2009) (査読有)

[学会発表] (計 14 件)

①渡邊 信元ら

Role of peptidyl prolyl cis-trans isomerase Pin1 on M-phase progression  
第34回日本分子生物学会年会

2011年12月16日

パンフィコ横浜(横浜市)

②渡邊 信元ら  
プロリン異性化酵素 Pin1 の小分子阻害剤の  
分裂期進行への影響の解析  
第70回日本癌学会学術総会  
2011年10月3日  
名古屋国際会議場(名古屋市)

③渡邊 信元ら  
リン酸化特異的プロリン異性化酵素 Pin1 阻  
害小分子の探索  
第14回日本がん分子標的治療学会学術集会  
2010年7月7日  
東京

[図書] (計2件)

①渡邊 信元  
共立出版  
細胞分裂期を制御する蛋白質分解システム  
2010 58-63 (査読無)

②渡辺信元、長田裕之  
中外医学社  
がん化学療法・分子標的治療update  
第2章 がん化学療法の標的 3. 細胞周期  
(2009) 19-26 (査読無)

[その他]

ホームページ等  
<http://www.riken.jp/r-world/research/lab/asi/cl-vali/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡邊 信元 (WATANABE NOBUMOTO)  
独立行政法人理化学研究所・化合物ライブラ  
リー評価研究チーム・チームヘッド  
研究者番号：90221689

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし