

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670059

研究課題名(和文)チオアミド回転障壁に基づくプロリンペプチド結合異性化酵素Pin1の阻害剤創製

研究課題名(英文)Development of peptidyl prolyl isomerase Pin1 inhibitors based on thioamide isomerization energy

研究代表者

中川 秀彦(Nakagawa, Hidehiko)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80281674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチド中のリン酸化されたセリン-プロリン結合およびトレオニン-プロリン結合を異性化する酵素Pin1の阻害剤を開発することを目指して、チオアミドを含むプロリンペプチド誘導体の開発を行った。チオアミドは、通常のプロリンアミド結合に比べて、異性化のためのアミド結合回転障壁エネルギーが高くなっており、ペプチド異性化反応が進みにくくなる効果が期待できる。Pin1酵素の基質となるペプチド様構造を有する化合物の反応点アミド結合をチオアミド結合に置換した化合物を合成し、阻害能を評価したところ、基質の競合から予想されるよりも大きい阻害能を示し、チオアミド構造が阻害に寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Peptidyl prolyl isomerase, Pin1, is an enzyme that catalyzes isomerization reaction of phospho-serine-proline and phospho-threonine-proline amide bond. I planned to develop inhibitors for Pin1 enzyme based on thioamide-containing peptides. Proline thioamide has larger rotation energy for isomerization in comparison with normal proline amide bonds in peptides. Thioamide derivatives of the substrate for Pin1 are expected to slow the reaction of Pin1. I synthesized thioamide version of Pin1 substrate peptide derivatives and evaluate its inhibitory activity for Pin1 enzyme. The synthesized thioamide showed larger inhibitory activity against Pin1 in comparison with the simple substrate competition at the active site.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：ケミカルバイオロジー 酵素阻害剤 薬学

1. 研究開始当初の背景

1-1. Pin1 の生物学医学的重要性

Pin1 は、Peptidyl Prolyl cis/trans Isomerase (PPIase) の 1 種であり、蛋白質中 phospho-Ser/Thr と Pro の間のペプチド結合 cis/trans 異性を触媒する (Fig.1)。他の PPIase である Cyclophilin や FKBP などと異なるサブファミリーに属し、リン酸化ペプチドのみを基質とする特徴を持つ。近年 Pin1 が、前立腺、直腸、肝臓、食道がんなどで過剰発現しており、前立腺がんで Pin1 過剰発現とがん予後に相関があるとの報告もなされたことから、Pin1 とがんの関連が注目され、また CDK、MAPK、GSK3 などキナーゼシグナル経路に関与することも報告されている。さらにリン酸化されたアミロイド前駆体蛋白質 (APP) の異性化にも関与することからアルツハイマー病への関与も指摘されている。

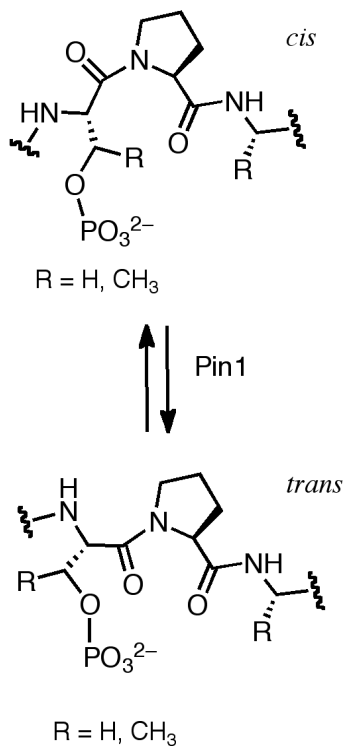


Fig. 1 Phospho-Ser/Thr-Pro の cis/trans 異性化反応

1-2. Pin1 阻害剤開発の現状

Pin1 は細胞増殖や分化と関連があると考えられ、その酵素活性阻害は抗がん作用に繋がる可能性があるため、近年いくつかの Pin1 阻害剤が報告されているが、これらの阻害剤は、特異性の低い Juglone を除けば、Pin1 との結合能に基づいた Structure-based 阻害剤といえる。

2. 研究の目的

Pin1 では酵素反応に基づいた阻害剤はこれまで知られていないが、新たな阻害剤開発の戦略を見いだすことは重要であると考えた。ペプチド結合の cis/trans 異性化のエネルギー障壁は約 30kcal/mole でありこれが増せば阻害効果が期待できることから、エネルギー障壁が通常のアミドより約 23kcal/mole 大きいチオアミド (計約 53 kcal/mole) を導入する着想を得て本計画を立案した。

基質モデルペプチドの反応点をチオアミドとした化合物を合成し、エネルギー障壁の高いチオアミド構造が酵素活性阻害に寄与することを実証する。

阻害剤開発の新たな方向を実証的に示すことで、Pin1 の機能研究が進展し、創薬標的としての認識が高まり、新たな医薬品創製に役立つと期待できる。

3. 研究の方法

Pin1 基質モデルペプチドの一つ、Suc-Ala-Glu-Pro-Phe-pNA は、リン酸化ペプチドではないが Glu と Suc のカルボキシ基がリン酸基のジアニオンを模倣して Pin1 の基質となることが知られている。このモデルペプチドの反応点である Glu-Pro 間のアミド結合をチオアミドに変換し、さらに N 末および C 末を簡略化した阻害剤候補化合物 1 を合成した。また、比較対照化合物としてチオアミドでなく通常のアミド結合を有する化合物 2 も合成した。

阻害剤候補ペプチドの簡略化に際して、PDB (プロテインデータベース) を利用して Pin1 の立体構造を取得し、リガンド-酵素結合シミュレーションを行うソフトウェア Glide を用いて基質結合部位への結合について妥当性を検証した。その結果、化合物 1 は、モデルペプチドと同様に結合能を有する可能性が示唆された。

合成した化合物 1 および 2 について、酵素阻害活性測定を行った。活性測定には、より多くの報告で用いられ、測定の再現性が高いとされている「Protease coupled method」を用いた。基質として C 末に p-ニトロアニリドを有する基質ペプチドを別途合成し、Pin1 酵素反応に引き続くトリプシン反応により遊離した p-ニトロアニリンの吸光度変化を測定することで、基質代謝速度を求めた。

また、酵素の基質代謝反応に依存した阻害活性を実現しているか検証するため、既存の阻害剤のうち Structure-based design で開発された結合阻害型の阻害剤についても、チ

オアミド化することで活性が変化するか、検証した。

既存の阻害剤にはいくつかの種類が存在するが、そのうち、結合様式が解明されており、アミド構造を有する化合物である VER1 (Fig. 3) について、ナフタレン構造を変更して活性化化合物を探索した結果、基質プロリンアミド結合位置近くにアミド結合を有する化合物 g6 を見いだした (Fig. 3)。化合物 g6 は、VER1 に比べ IC₅₀ 値は 2 倍程度の値を示したが、十分高い Pin1 阻害活性を持つことが判明した。そこで、化合物 g6 のモルホリン部に存在するアミド結合をチオアミドに変換した誘導体を合成し、酵素活性を比較した。

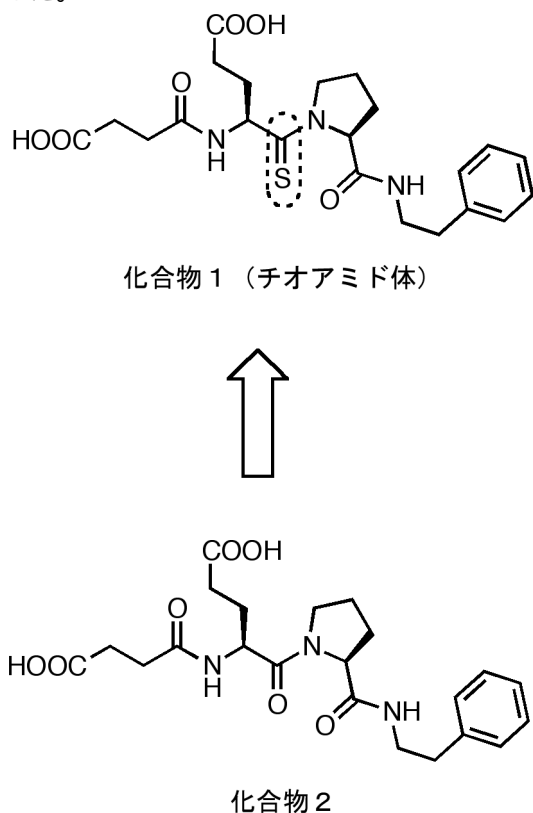
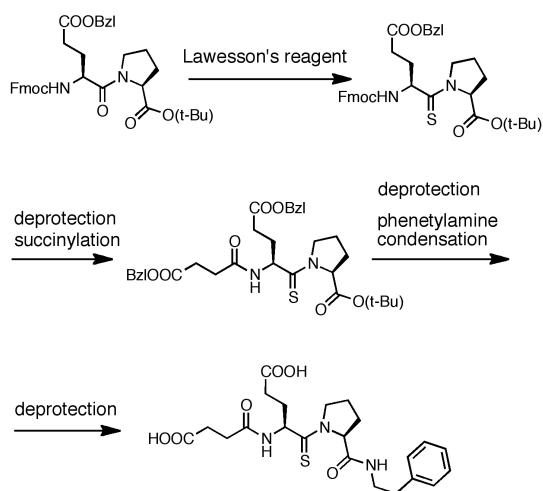


Fig. 2 チオアミド型阻害剤候補化合物

4. 研究成果

活性測定を行った結果、化合物 2 の基質競合作用による Pin1 阻害活性の IC₅₀ 値が 200 μM 以上であったのに対し、化合物 2 のチオアミド誘導体である化合物 1 は、IC₅₀ 値 87 μM を示した。このことから、より高い回転障壁を有するチオアミドへの変換は、酵素機室代謝反応に基づいた有効な阻害剤開発方針の 1 つとなることが示された。

その結果、通常のアミド体である g6 に比較して、およそ 10 倍の IC₅₀ 値を示し、活性が低下していることが明らかとなった。



Scheme 1 チオアミド型阻害剤候補化合物の合成経路

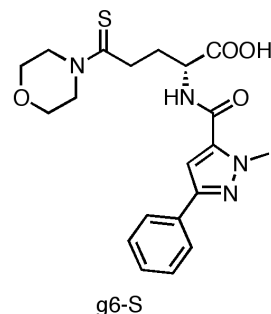
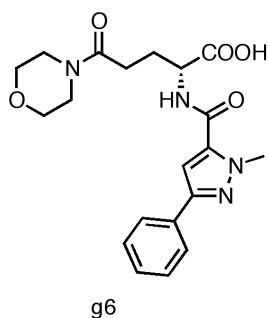
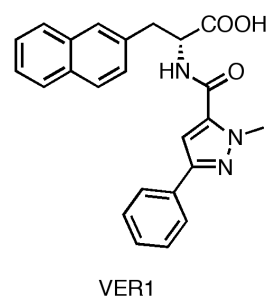


Fig. 3 VER1, g6, and g6-S

Structure-based design によって開発した結合阻害型の阻害剤では、回転障壁が鍵となるチオアミド誘導体の効果は得られなかったと考えられた。

これらの結果は、チオアミド誘導体が基質代謝反応であるアミド結合異性化反応において、エネルギー障壁が高まることによって酵素阻害が生じていることを示唆する結果と考えられ、チオアミド結合の回転障壁を利用することで反応機構に基づいたmechanism-based designの新しい開発方針が有効である可能性を示した。

5. 主な発表論文等
なし（現在執筆中）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 秀彦 (NAKAGAWA HIDEHIKO)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：80281674

(2) 研究分担者

なし（ ）

研究者番号：

(3) 連携研究者

家田 直弥 (IEDA NAOYA)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：00642026