

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670060

研究課題名(和文) Pin1酵素阻害剤の迅速スクリーニング用プローブの開発

研究課題名(英文) Molecular design of Pin1-binding fluorescence probes for efficient drug screening

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Pin1阻害能の迅速評価が可能な蛍光性Pin1結合プローブを開発することを目標として検討を行った。具体的には、プローブ分子内蛍光性官能基が、タンパク質結合時の疎水性相互作用によって、蛍光性が変化し蛍光性が上昇する性質を目指して開発を行った。既存の阻害剤の疎水性相互作用部位に環境応答性蛍光団を導入したところ、低極性有機溶媒中での蛍光上昇が観察された。またPin1タンパク質との結合によってわずかな蛍光上昇がみられた。一方非特異的結合による蛍光上昇も観測されることが判明した。より結合活性の高い構造を探索すべく既存化合物に変わる阻害剤探索から検討したところ、脂肪族環を有する高活性阻害剤を見いだした。

研究成果の概要(英文)：Design and exploration of fluorescence probe compounds for the Pin1 binding pocket were performed, in which the molecules were expected to increase the fluorescence when binding to Pin1 proteins. By replacement of heteroaromatic moiety of a known Pin1 inhibitor with the fluorescent moiety which is responding to the environmental polarity. One of the inhibitory compound bearing fluorescence molecular showed good environmental response in low-polarity organic solvents and slight increase of the fluorescence in the presence of Pin1 proteins. However, the compound was assumed to have a significant amount of non-specific binding to Pin1 other than the substrate binding pocket. Other potent Pin1 inhibitors were also explored for future development of the probe, and the compound bearing azocanyl moiety for the proline pocket was found to have potent Pin1 inhibiting activity.

研究分野：創薬化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：ケミカルバイオロジー 酵素阻害剤

1. 研究開始当初の背景

(1) Pin1 について

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 (*Nat.Rev.Cancer* 2007, 7,381-388)、また、前立腺がんでは 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 (*Cancer Res.* 2003, 63, 6244-6251)。これらのことから、Pin1 とがんの関連が注目されている。また CDK、MAPK、GSK3 などのキナーゼシグナル経路に参与することも報告されている (*Science* 1997, 278,1957-1960)。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 (*Nat.Chem.Biol.* 2007, 3, 619-629)。

(2) Pin1 阻害剤とスクリーニング手法

Pin1 は、上述のように、細胞増殖や分化と関連があると考えられ、活性の阻害は抗がん作用に繋がる可能性がある。近年いくつかの Pin1 阻害剤が報告されているが、十分なリード探索や構造活性相関研究が行われているとはいいがたい。これは、既存の測定手法が多検体スクリーニングに適用しにくい方法であることが原因の 1 つと考えられる。

現在の標準的な Pin1 阻害活性評価は、trans-アミド特異的ペプチダーゼ (トリプシン等) を異性化反応後の後処理に用いて微少な吸光度時間変化を測定し反応速度の差を求めるもので、時間を要する一方で精度は低い。基質代謝反応に基づく阻害評価法は本質的に同様の困難さを内包するため、異なる方法論が必要であると考えられる。そこで、基質代謝反応の反応阻害過程を評価すること方法から離れ、競合的阻害活性評価に特化し、活性ポケットに基質競合的に結合する発蛍光性プローブを開発すれば、蛍光プローブの結合・非結合を判定することで、迅速な結合能評価が可能となる。この目的のためには、Pin1 活性中心ポケット近傍の疎水性表面に着目し、この部位との芳香族官能基との相互作用により蛍光特性を変化するような適切な蛍光性官能基とその結合位置を検討する必要がある。

2. 研究の目的

本研究は、阻害能の迅速評価が可能な発蛍光性 Pin1 結合プローブを開発することを目指した。具体的には、基質結合部位に競合的に結合し、結合時の疎水性相互作用によって、蛍光性官能基の蛍光性が変化し発蛍光あるいは蛍光性が上昇するプローブ化合物を開発することを目指した。

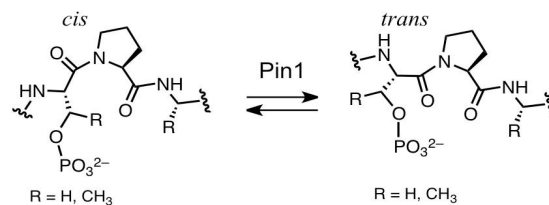


Fig.1 Phospho-Ser/Thr-Proのcis/trans異性化反応

Pin1 酵素反応の特徴から、基質代謝を基にした開発は困難であるため、酵素活性ポケットへの競合的結合を念頭に置き、化合物の構造設計を行った。本研究で得られるプローブは、迅速な化合物スクリーニングを可能とし、ユニークな標的に対する新奇な抗がん剤開発に資すると思われる。

3. 研究の方法

(1) 阻害剤 VER1 誘導体の設計

既存の評価法で見いだされた競合的 Pin1 阻害剤である VER 1 (Potter, AJ et al. *BMCL*, 2010, 20, 586-590) (Fig. 2) は、Pin1 との共結晶解析から、酵素活性ポケットに存在する疎水性領域と相互作用することが分かっている。この化合物について、次の方法で結

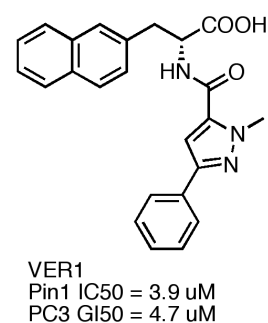


Fig.2 既存 Pin1 阻害剤 VER1 の構造

合プローブのための分子設計を行った。まず、VER1 の構造のうち、疎水性領域と結合する芳香族部分を、環境応答性蛍光性官能基と置換した化合物を設計した。この設計では、化合物が酵素に結合することで環境応答性蛍光性官能基が疎水性領域と相互作用し蛍光性を示すことを期待した。蛍光性官能基として、疎水性部位と相互作用しやすい構造を考慮した化合物について設計・合成を行った。また、VER1 の構造に含まれるナフタレン環部は疎水性相互作用を発揮すると考えられ、基質プロリンが結合するいわゆるプロリンポケットに疎水性相互作用で結合することが結晶構造解析から明らかになっている。そこで、VER1 の疎水性相互作用部位 (複素環部) ではなく、ナフタレン環部を蛍光性官能基に置換した化合物も設計合成した。これらの誘導体の構造を Fig. 3 に示した。

(2) 脂肪族環を有する阻害剤の探索

別のアプローチとして、まず VER1 と部分的に異なる構造を有する優れた阻害化合物を独自に探索し、阻害活性の強い独自阻害剤を基に蛍光性官能基を導入する方法も試みた。この方法では、プロリンポケットに結合する構造として VER1 にみられる芳香族ではなく、基質 (プロリン残基) と構造的に類似した脂肪族環状構造を導入することを意図した。

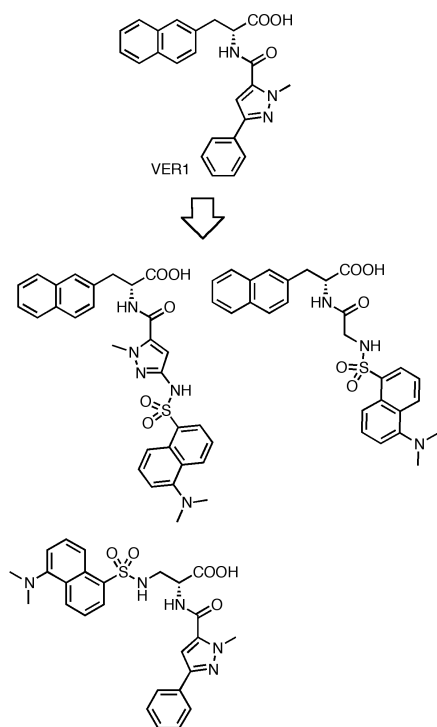


Fig.3 蛍光性官能基を導入した Pin1 阻害剤誘導体

VER1 の開発過程でナフタレン環が当初疎水性相互作用部位として導入された経緯から、疎水性相互作用部位を 1 つに限定できる分子構造として、化合物の結合様式が限定されることを期待した。

(3) 計算化学シミュレーションによる評価
上記の方法で設計した分子について、化学計算的手法により、Pin1 への結合能を予測した。計算化学ソフトウェア Glide によるシミュレーションに加え、別の計算化学ソフトウェアである CLC Drug Discovery Workbench による結合能評価も行った。

(4) 設計化合物の合成と、既存の評価法による Pin1 阻害能の検証

分子設計およびシミュレーションによる評価で、Pin1 酵素ポケットに適切に相互作用することが予想された化合物について、実際に合成を行い、化合物を得た。これらの合成した化合物について、既存の評価法により Pin1 阻害能を検証した。

(5) Pin1 結合による蛍光強度変化の測定
Pin1 活性阻害能の評価と平行して、合成化合物の蛍光性変化について、溶媒による蛍光変化、および Pin1 存在下での蛍光変化、をそれぞれ観測した。

4. 研究成果

(1) VER1 と同様のプロリンポケット結合部を有する蛍光性官能基結合 VER1 誘導体
VER1 の複素環部 (疎水性相互作用部) を、

蛍光性官能基で、溶媒の極性によって環境応答性を示すことが報告されている Dancyl 基を導入した化合物 3 種を合成した (Fig. 3)。3 種の化合物は、水溶液中およびトルエン中で異なる蛍光性を示し、純粋中ではほとんど蛍光性を示さなかったのに対し、クロロホルム中およびトルエン中では 15~30 倍程度蛍光強度が上昇した。これは、Dancyl 基が溶媒極性に応じて発光特性を変化させたからと考えられた。

次に 3 種の化合物の Pin1 活性阻害能を既存の阻害能評価法で計測した。その結果、ピラゾリン環を介して Dancyl 基を結合した化合物では、IC₅₀ 値 8.6 μM を示し、VER1 (IC₅₀ 値 4.8 μM) と同程度の阻害活性を有することが示された。一方、ピラゾリン環を介さず直接 Dancyl 基を結合した化合物、およびナフタレン環部の代わりに Dancyl 基を導入した化合物では、いずれも IC₅₀ 値が 45 μM 程度となり、阻害活性が著しく低下したことが示された。IC₅₀ 値が低値を示した化合物は Pin1 に有効に結合できなくなっている可能性が考えられた。

Dancyl 基を有し有効な Pin1 阻害活性を示した化合物について、Pin1 存在下と非存在下における蛍光強度の比較を行った。その結果、Pin1 存在下では、非存在下に比べ蛍光強度の上昇が見られたものの、その差は僅かであり、VER1 (既存の阻害剤) 添加によって蛍光上昇は抑制されなかった。このことから、合成化合物は、Pin1 タンパク質の基質結合部以外の疎水性表面にも結合していることが示唆され、このため VER1 を加えても競合せず蛍光上昇が抑制されなかったと考えられた。

(2) 脂肪族環を有する阻害剤

VER1 とは異なる特徴を有する阻害剤を探索し、蛍光性プローブの基本骨格の候補とするため、VER1 のナフタレン環部を脂肪族環に変更した化合物を種々設計した。脂肪族環として、環状第 2 級アミンおよびシクロアルキルアミンを選択し、これをアミド結合を介して、D-グルタミン酸構造および D-アスパラギン酸 (VER1 と同じ立体を有するアミノ酸) の側鎖カルボキシ基と結合させた。同アミノ酸のアミノ基には、VER1 と同様の複素環構造あるいは、類似の複素環構造を導入した。合成した化合物について、既存の評価法により Pin1 阻害活性測定を行った。その結果、脂肪族環として、柔軟な折り畳み構造を取りうる八員環第 2 級アミン構造 (アゾカン構造) を有する化合物が、VER1 と同等かそれ以上の阻害活性を有することが示された (Fig. 4 および 5. 主な発表論文 を参照)。

今後この構造を基に、蛍光性官能基を導入することで、蛍光性プローブの開発に有用な知見が得られると考えられる。

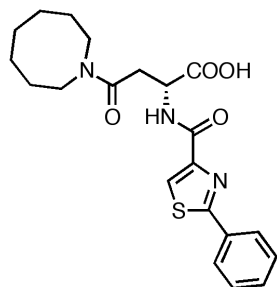


Fig. 4 開発した脂肪族環構造を有する Pin1 阻害剤

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Hidehiko Nakagawa, Suguru Seike, Masatoshi Sugimoto, Naoya Ieda, Mitsuyasu Kawaguchi, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, Peptidyl prolyl isomerase Pin1-inhibitory activity of D-glutamic and D aspartic acid derivatives bearing a cyclic aliphatic amine moiety, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 25, 5619-5624 (2015) 査読あり DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.10.033

〔その他〕

<http://www.nagoya-cu.ac.jp/phar/grad/soyaku/iya/ku/yakka.html>

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

(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