【解説】

【2007年 農芸化学研究企画賞】

プロリン異性化酵素 Pin1 阻害剤の探索

森 正, 内田隆史

Pin1 は、リン酸化セリン（トレオニン）-プロリンのペプチド結合の *cis/trans* 構造の変化に関わるプロリン異性化酵素である。Pin1 ノックアウトマウスの解析から、Pin1 と多様な疾患との関連が解明された。たとえば、Pin1 が高発現している癌患者は予後が悪いので、Pin1 の阻害剤は抗癌剤として期待される。Pin1 の阻害剤探索のハイスループット化に成功したことにより、天然物資源からの癌やその他の疾患の創薬の可能性に期待が高まっている。

Pin1 はリン酸化 Ser/Thr-Pro 部位の *cis/trans* 異性化反応を特異的に促進し、タンパク質のフォールディングに関与するペプチジルプロリル *cis/trans* 異性化酵素 (peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase, 以下 PPIase) である。PPIase には、Pin1 の属するパルブリン (parvulin) ファミリーを含め、3つのファミリーがある。残りの2つのファミリーであるシクロフィリン、FKBP (FK-506 結合タンパク質) に関しては、その阻害剤である免疫抑制剤のシクロスポリン、FK-506 のほうがむしろ有名であろう。

筆者らは、Pin1 に関して以前から研究を続けてきており、Pin1 の機能を解析する評価系、ツールを取得して

きている。また、Pin1 ノックアウトマウスを作製、解析し、Pin1 が癌やアルツハイマー病の発症に関係していることを明らかにした。これらの発見は、Pin1 の活性を制御することができれば、癌やアルツハイマー病の予防・治療が可能になることを示唆している。その他 Pin1 の機能に関する報告は年々増加しており、感染症なども含めた様々な分野で治療薬としての役割が期待されている。ここでは、天然物ライブラリーを使用しての Pin1 調節剤探索に向けた天然物探索の戦略と、その過程でブレイクスルーとなったスクリーニング系の構築に焦点を当てて紹介する。

Pin1 調節剤探索への期待

天然物からの創薬を考える上で重要な要素として、標的分子とそのスクリーニング方法の選択が挙げられる。天然物は、時に人知を超える多彩な構造を強い活性を伴って与えてくれる。歴史的に見ても、現在の化学合成品による創薬が始まる以前の、主な薬の起源であった漢方薬や伝承薬は天然物に他ならない。その理由は、天然物を産生する生物が、長い生存競争の中で、生物学的に何らかの意味のある化合物を最適化して生産できるようになり、生き残ってきたという事実を考えれば理解でき

Screening for PPIase Pin1 Inhibitors
Tadashi MORI, Takafumi UCHIDA, 東北大学大学院農学研究科

る。したがって、創薬標的となるタンパク質を天然物が利用しているのであれば、非常に有益なスクリーニング資源になると考えられる。1981年から2008年までに市販された1,024の医薬品のうち、特に感染症治療薬（抗生物質、抗菌剤、抗ウイルス剤）では68.3%が、また抗癌剤では79.8%が天然物もしくは天然物の情報を利用したものであるとの報告がある⁽¹⁾。さらに、売上高の高い天然物の適応疾患を見ると、高脂血症薬スタチン系は別格として、残りは感染症治療薬、抗癌剤、免疫抑制薬となり⁽²⁾、Pin1の調節している機能と重なる部分が多いことがわかる。

■ スクリーニング技術の変遷とスクリーニング方法の選択

標的分子が適切であるならば、次に大切になるのは天然物をスクリーニングする方法である。農芸化学分野では鈴木梅太郎博士の見いだした糖成分のオリザニン（ビタミンB）以来、天然物の分離抽出技術、スクリーニング方法などの工夫は日本の得意とする領域であった。しかし、現在のスクリーニング方法の主流であるハイスループットスクリーニング（HTS；high throughput screening）やハイコンテンツスクリーニング（HCS；high-contents screening）は欧米主導で技術開発が進み、日本はそれに追従する形となっている。HTSは、世界的には1990年代半ば、日本では1990年代後半から製薬企業を中心に発展してきた。HTSの進化とともに、候補化合物ライブラリーの質の向上、評価系のミニチュア化、オートメーション化、分注機の高精度化、測定器の高感度化、データ処理システムの整備などが進められた。試験系の微量化、高密度化は急速に進み、当初1プレート当たり96ウェルから始まったHTSは384ウェル、さらには1,536ウェルにまで高密度化され、アッセイの総量は約1/25にまで微量化されている。

また、このような技術基盤のもとに、従来行なわれていたcell-based assayと呼ばれる細胞の機能評価試験を、より多検体を多次元の指標で観察することのできるHCSが登場し、1次スクリーニングのみならず、その後の化合物の最適化の過程で使うことが定着しつつある。

■ Pin1 活性調節物質の探索ストラテジー

1. 標的分子の妥当性

筆者らが標的分子として注目しているPPIaseファミリーは、多種類のシクロフィリンとFKBP、および2種

類のパルプリン（Pin1とhPar14）の3つのサブファミリーからなる。これらの酵素は多様な機能を有しているが、共通しているのは、基質となるタンパク質中のプロリン分子の*cis/trans*構造の異性化を触媒しタンパク質のフォールディングを助けるシャペロンとしての機能である。タンパク質が転写、翻訳されフォールディングするとき、プロリン部分が*cis*-ペプチドにならないとうまくフォールディングできない場合があり、多くの場合プロリンの異性化がタンパク質フォールディングの律速段階となっている。PPIaseはプロリンのペプチド結合を異性化することで、速やかなフォールディングを助けている。分子シャペロンは、その分子としての特徴から、多くのタンパク質と結合することが報告されている。天然物もまた、このシャペロンの機能をうまく利用することを生存競争の中で獲得していったであろうことが想像される。シクロスポリンやFK-506、ラパマイシンを代表とする環状ペプチドの標的分子となっているのは、シクロフィリンでありFKBPであった（図1-A）。

シクロスポリンは真菌の代謝産物であり、11個のアミノ酸からなる疎水性の環状ポリペプチド群として菌の培養液中より見つかった。その中の一つシクロスポリンAに強力な免疫抑制作用があることが判明し、研究が続けられた結果、Tリンパ球を特異的に抑制する作用をもっていることがわかり、当時、免疫の抑制が求められていた臓器移植への応用が進められ、第一選択薬となった⁽³⁾。一方、FK-506は、cell-based assayといわれる細胞を直接顕微鏡で観察する方法で免疫抑制作用を有する天然物を探索する課程で見つけられた⁽⁴⁾。この方法は現在では改良され、HCSの名でスループットの高いcell-based assayとして多くの天然物スクリーニングで利用されている。また、ラパマイシンは土壌由来放線菌が産生する抗菌物質として見いだされた。

これらの分子標的研究は共通点が多い。図2に示すように、それぞれの化合物は最終的な作用点となるタンパク質に直接結合するのではなく、まずFKBP、シクロフィリンなどと結合することによって、その複合体が各々の標的分子の機能を阻害して薬理作用を発現する。ラパマイシンはFK-506と同様の部分構造をもち、FKBPと結合するところまでは同様であるが、その複合体が標的とする分子に違いがある⁽⁵⁾。ラパマイシンが標的にするのは、mRNA翻訳促進による細胞増殖の促進作用があるmTOR（mammalian target of rapamycinから命名された）分子である。FK-506およびシクロスポリンが形成する複合体は、それぞれまったく違う因子で構成されているにもかかわらず、両者とも標的が

図1 ■ PPIase のサブファミリーとそれを分子標的とする天然物医薬品 (A), および分子シャペロンを標的とする天然物の構造 (B)
ゲルダナマイシンとラディシコールは Hsp90, スベルグアリンは Hsp70/Hsc70, ETB は Asp60 をそれぞれ標的とする。

カルシニューリンであり、免疫抑制作用を示すことは興味深い。Pin1 についても、他の PPIase と同様、これと結合して複合体を形成する未知の天然物が存在するかもしれない。

PPIase 以外の分子シャペロンでも天然物の標的タンパク質になっている例が報告されている。これまでにケミカルバイオロジー研究で明らかになった天然物と分子

シャペロンとの結合の例として、図 1-B に示したゲルダナマイシン (geldanamycin)⁽⁶⁾、ラディシコール (radicicol) が Hsp90⁽⁷⁾、ETB (エポラクタエン誘導体, epolactaene tertiary butyl ester) が Hsp60⁽⁸⁾、スベルグアリン (spergualin) が Hsp70⁽⁹⁾ とそれぞれ結合しているという報告がある。

一方、Pin1 ノックアウトマウスはアポトーシスや細

図2 ■ PPIase を介した天然物の細胞機能の発現と Pin1 調節剤に期待される作用

CypA: シクロフィリン A

胞周期に異常を生じる。その原因は、Pin1 が p53 や p73 などチェックポイント制御に関わる分子の安定化・活性化を制御しているためであるとされている^(10~12)。天然物由来の化合物の作用点解析結果からは、細胞周期に関わる因子に作用する天然物由来阻害剤が知られていない例はきわめて稀であり⁽¹⁾、これらのことを考え合わせると、Pin1 を阻害する天然物が存在することは十分に考えられ、Pin1 は天然物創薬の標的分子として妥当であると考えられた。

2. スクリーニング方法の妥当性

PPIase と結合する天然物を眺めると、シクロスポリン、サングリフェリン、ラパマイシン、FK-506 のいずれも PPIase 活性の阻害作用をもつ⁽¹³⁾。実際、筆者らの行ったシクロフィリンや FKBP の合成ペプチド基質を用いたプロテアーゼカップル PPIase 活性測定系においても、これらの天然物阻害剤は感度良くスクリーニングできることが示されている。なお、Pin1 と結合することが確認されている合成の環状ペプチドは多数報告されている⁽¹⁴⁾。

シクロフィリンを介したシクロスポリンのカルシニューリンとの結合には PPIase 活性は必須ではないことが、シクロスポリンの誘導体の研究を通じて証明されている⁽¹⁵⁾。つまり、天然物を含む化合物が標的タンパク質と結合する際に利用するサイトとして、もともと基質が入る鍵穴となっている酵素の活性中心は絶好の場所であることがわかる。

天然物からの創薬を行なうにあたり、Pin1 タンパク質は分子標的としてふさわしく、PPIase 活性を指標としたスクリーニング系は、単なる Pin1 との結合や細胞の形態変化などを指標にした cell-based の HCS などと比べてより効率的であると考えられる。

Pin1 調節物質探索方法構築に向けての工夫

筆者らの研究室では、以前より、ハイスループットではないが基本的な PPIase の活性測定法を確立していた。その方法の基本的な原理は、プロリン異性化酵素の基質となるペプチドが *trans* 体になったときのみの特異的にプロテアーゼ活性を示すプロテアーゼと、プロリン

図 3 ■ リアルタイム蛍光検出器 FDSS とその特徴

異性化酵素とを組み合わせることで酵素活性を測定しようというものである。プロリン異性化酵素で *trans* 型になった基質は、プロテアーゼにより切断を受けるが、*cis* 型の基質は切断されない。切り出された蛍光もしくは吸光物質の蛍光強度や吸光度を測定することにより酵素活性を測定できる⁽¹⁶⁾。

筆者らは以前に、この測定方法を応用して、ハイスループットではないがおよそ 3,000 の化合物についてスクリーニングを実施し、低分子の阻害剤を取得した実績がある⁽¹⁷⁾。この経験から、適切な HTS 系が構築できれば、阻害剤の取得は可能であると考えていた。HTS 系の構築に当たっては、キュベットを用いて 1 サンプルずつ測定を行なう従来の方法から、96 または 384 ウェルプレート単位で測定を行なえるように、浜松ホトニクス社の FDSS (図 3、名称の由来は Functional Drug Screening System) を利用することを考えた。本装置は様々な蛍光プローブに対応した、細胞を利用する cell-based assay システムとして開発され、蛍光色素を使用して主に細胞内のカルシウム動態を測定する装置として G タンパク質共役型受容体 (GPCR) やイオンチャンネルの測定に使用されている。筆者らは、本装置の備える機能が

PPIase のスクリーニング系にも応用できると考え、検討を開始した。

PPIase 非存在下でも *cis/trans* の異性化は平衡反応として非常に速く進むため、これまではこのような酵素に依存しない反応に伴うバックグラウンド値を低くするために低温下で反応を行なうことが酵素活性の測定には必須の条件であった。HTS の場合、アッセイをすべて低温で行なうには機器ごと低温室に設置する必要があるが、そのような条件での使用を保障する機器は少なく現実的でない。このような状況を打破するために、室温条件でも測定が可能な試験系を構築する必要がある。そのためには、sub-second 単位で変化する反応速度の正確な測定ができる機器が必要であった。これを実現するには、高感度で時間分解能の高い測定機器であること、処理効率が高く試験系の精度も高い機器であることなどの条件をクリアしなければならない。このような条件を満たす機器ということで候補に上がったのが FDSS であった。

FDSS は高感度な CCD カメラを搭載し、プレート内の全ウェルの測定を最小で 0.1 秒毎に実施することができる。また、測定庫内に分注機を備えており、測定中に基質を添加することができるため、酵素反応開始直後の

図4 ■ SPR とドッキング・スタディの組合せによる特異的阻害剤 TME-001 の取得に向けた取り組み

非常に速い蛍光値の変化を精度良く観察できる。実際、FDSSを使用してみると、室温で連続的なプロリン異性化酵素の活性測定が可能になった。また、FDSSは測定機内に備え付けられた CCD カメラによりプレート内の全ウェルの蛍光強度を一度に測定できるため、一般に行なわれている酵素活性の阻害剤探索と同じように、これまで困難と思われていたプロリン異性化酵素の活性阻害剤の探索が可能になった⁽¹⁸⁾。こうして、日本の測定器メーカーの機械を使い、通常の使用用途とは違うユニー

クで独創的な試験系を構築することができた。実際に、この試験系を使って低分子化合物の HTS を行なった結果、ヒット化合物の中から、Pin1 のみならずシクロフィリンにも阻害作用を示す新規の二重阻害剤 TME-001 が得られており、試験系の妥当性が確かめられたと同時に、今後、低分子からの創薬にも期待がかかる⁽¹⁹⁾。

本方法は、最終結果のみを対象とするいわゆるエンドポイントアッセイと異なり、酵素活性の経時的な変化も記録している。これが天然資源をライブラリーにしたと

図5 ■ Pin1 阻害活性をもつ海洋生物

出典：三重大学生物資源学部藻類学研究室 HP 掲載写真

きにしばしば問題となる，蛍光による擬陽性ヒット化合物を除くことにも大きく貢献した．本方法により，今まで実現できなかった迅速で経時的な測定が可能となり，ほぼ初速度に近い初期の反応速度から反応終了までが測定できるようになった．この方法で探索された化合物は，さらにカラムにて色素などの成分を除去した後，酵素に対する阻害の程度などについて精密な解析を行ない，競争阻害することがわかった⁽²⁰⁾．

また，筆者らは表面プラズモン共鳴 (SPR) などの分子間相互作用測定装置を用いて基質ペプチドと酵素の結合を特異的に阻害する薬剤を探索する方法も確立している．さらに，天然物と Pin1 との結合様式を明らかにするために，ドッキング・スタディ^{*1} や X 線結晶構造解析なども実施し，Pin1 阻害剤の結合様式について詳細に検討を進めていくことを予定している (図 4-A, B)．これらの生化学的，生物物理的な薬剤探索法で発見した化合物は，次に，その効果を細胞レベルで明らかにしていく．化合物の細胞レベルでの評価は Pin1 の細胞周期の制御作用を利用して，細胞に天然物を作用させた後に細胞周期を FACS (細胞自動解析分離装置) で定量的に解析し，S 期にある細胞がどの程度減少しているかを調べることで検討する予定である．個体レベルでの評価には，筆者らが作製した Pin1 ノックアウトマウスやその

*1 薬剤が立体構造的に酵素活性中心にぴったりとはまり，それが熱力学的にも安定である状態をシミュレーションする手法．

細胞をコントロールとして利用できると考えている．

天然物ライブラリーからのスクリーニングの進捗

天然物創薬を成功させる上で忘れてはならない重要な要素が，スクリーニングを実施するライブラリーの中身である．スクリーニングの対象化合物としては，一般的に化学合成ライブラリーと天然物ライブラリーが用いられる．化学合成ライブラリーから見いだされるリード化合物は一般的に低活性である場合が多いが，化学構造がシンプルで，その後の構造の最適化が比較的容易に実現できる可能性が高い．しかし，大学や公的研究機関の研究室の場合，リード化合物が見つかったとしても，そこからの網羅的な構造展開を実施するのは困難である．

一方で，天然物ライブラリーから見いだされるリード化合物は複雑な化学構造を有するものが多いが，スクリーニングで得られた化合物そのものがすでに最適化された化合物であることも少なくない．これは冒頭でも述べた通り，天然物の生産菌が長い歴史の中で生き延びるために最適化を重ねてきたからに他ならない．このような理由から，筆者らは多くの共同研究先から入手した多様な天然物ライブラリーを用いて，これまでスクリーニングを実施してきた．現在は，共同研究先の京都大学大学院農学研究科海洋生物機能学分野 豊原治彦博士の収集した海洋資源の抽出物からなる“マリンエクス”ライ

ブラリー、北里大学研究所の天然資源ライブラリー（一部は精製されて構造がわかっている）および、玉川大学学術研究所菌学応用研究施設 奥田 徹博士の収集しているライブラリーからの薬剤スクリーニングを行なっている。天然物のスクリーニングは、活性物質の単離までの道のりが長く、それを辛抱強く探索していくことは容易なことではない。しかし、筆者らは天然資源からの抽出物に Pin1 阻害活性を見いだしており、その単離精製も着実に進んでいる。

マリンエキスからは Pin1 活性を強く抑制する天然物抽出物が多く見つかり、抽出物の分画処理後の各分画の Pin1 阻害活性を指標として活性画分からの単離精製を行なっている。現在は図 5 に示すような海洋生物の抽出液を単離精製し、構造決定作業に入っている。その一つは、サガラメやクロメなどに多く含まれるポリフェノールであることがわかった（東北大学農学研究科生体物理化学分野 山下博士ら、未発表データ）。他にも構造未知の新規な化合物が含まれており、今後の構造解明が期待される。

おわりに

Fisher ら⁽²¹⁾ や高橋ら⁽²²⁾ によって、シクロスポリンの標的因子がシクロフィリンであることが解明された。また、FK-506 の標的タンパク質を解明したハーバード大学の Schreiber 教授らが最初に提唱した Chemical Genetics（化学遺伝学）という概念は、新しい学問領域であるケミカルバイオロジー（化学生物学）研究の基本となっている⁽²³⁾。天然物はケミカルバイオロジーの発展に大きく寄与してきたと言える。

また、Pin1 の機能を調節する天然物は、Pin1 を介した未知の因子との間で起こる新たな作用の発見につながるかもしれない。最近のプロテオミクス技術の進歩により、もしもこのような天然物が取れば、複合体を形成する役者を見つけることはそう難しくはないであろう。今後、Pin1 の機能から予想される調節剤機能を超えて、新たな分子の調節機能をもつ天然物を発見し、ケミカルバイオロジーに新たな進展をもたらすことができればと期待している。

謝辞：本研究の遂行に当たり、農芸化学研究企画賞を通じて研究推進を援助していただいた関係各位に深く感謝いたします。本研究をともに進めてきた、東北大学大学院農学研究科分子酵素学分野の林 宜瑾さん、吉澤いぶきさんおよび日高将文博士に感謝いたします。天然物の分離精製および構造決定を実施していただいた、東北大学大学院農学研究科生体物理化学分野 山下まり博士に深謝します。また、天然物ライブラリーを提供していただいた、玉川大学学術研究所菌学応用研究施設 奥田 徹博士、京都大学大学院農学研究科海洋生物機能学分野 豊原治彦博士、長瀬産業 伊藤久富博士に深くお礼申し上げます。

文献

- 1) G. M. Cragg, P. G. Grothaus & D. J. Newman : *Chem. Rev.*, **109**, 3012 (2009).
- 2) 上田博嗣 : 日薬理誌, **129**, 191 (2009).
- 3) Neoral HP : http://neoral.jp/medical/medical_01.html.
- 4) 後藤俊男 : 今日の移植, **17**, 282 (2004).
- 5) J. Choi, J. Chen, S. L. Schreiber & J. Clardy : *Science*, **273**, 239 (1996).
- 6) L. Whitesell, E. G. Mimnaugh, B. De Costa, C. E. Myers & L. M. Neckers : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 8324 (1994).
- 7) T. W. Schulte, S. Akinaga, S. Soga, W. Sullivan, B. Stensgard, D. Toft & L. M. Neckers : *Cell Stress Chaperones*, **3**, 100 (1998).
- 8) Y. Nagumo, H. Kakeya, M. Shoji, Y. Hayashi, N. Dohmae & H. Osada : *Biochem. J.*, **387**, 835 (2005).
- 9) S. G. Nadler, M. A. Tepper, B. Schacter & C. E. Mazurco : *Science*, **258**, 484 (1992).
- 10) 内田隆史, J. Fanghaenel, 内田千代子, L. Ostroff : 蛋白質 核酸 酵素, **50**, 1413 (2005).
- 11) P. Zacchi, M. Gostissa, T. Uchida, C. Salvagno, F. Avolio, S. Volinia, Z. Ronai, G. Blandino, C. Schneider & G. Del Sal : *Nature*, **419**, 853 (2002).
- 12) H. Zheng, H. You, X. Z. Zhou, S. A. Murray, T. Uchida, G. Wulf, L. Gu, X. Tang, K. P. Lu & Z. X. Xiao : *Nature*, **419**, 849 (2002).
- 13) T. Mori & T. Uchida : *Curr. Enzyme Inhib.*, **6**, 46 (2010).
- 14) Y. Zhang *et al.* : *ACS Chem. Biol.*, **2**, 320 (2007).
- 15) M. Nakagawa *et al.* : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **313**, 42 (2004).
- 16) G. Fisher, B. Holger, B. Edith & S. Alfred : *Biochim. Biophys. Acta*, **791**, 87 (1984).
- 17) T. Uchida *et al.* : *Chem. Biol.*, **10**, 15 (2003).
- 18) T. Mori, S. Itami, T. Yanagi, Y. Tatara, M. Takamiya & T. Uchida : *J. Biomol. Screen.*, **14**, 419 (2009).
- 19) T. Mori *et al.* : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **406**, 439 (2011).
- 20) J. Fanghänel, H. Akiyama, C. Uchida & T. Uchida : *FEBS Lett.*, **580**, 3237 (2006).
- 21) G. Fischer, B. Wittmann-Liebold, K. Lang, T. Kiefhaber & F. X. Schmid : *Nature*, **337**, 476 (1989).
- 22) N. Takahashi, T. Hayano & M. Suzuki : *Nature*, **337**, 473 (1989).
- 23) S. L. Schreiber : *Bioorg. Med. Chem.*, **6**, 1127 (1998).