



# 創薬展開を見据えたリラキシンの化学合成基盤の創出 ーセレン化学に立脚したリラキシン製剤開発ー

## 1. 研究の目的

妊娠期の女性の黄体および胎盤から分泌される『リラキシン』は、異なる2本のポリペプチド鎖（A鎖・B鎖）が、システイン（Cys）残基間で形成される2組のジスルフィド（S-S）結合によってリンクした構造をもつ（図1）。リラキシンは本来、妊娠女性の産道を拡張するために分泌されるホルモンであるが、近年ではその心不全緩和、抗繊維化、抗炎症などの作用が見いだされ、製剤としての臨床応用が期待されている。一方で、一般試薬として販売されているリラキシンは極めて高額であり、その希少性から基礎研究の遂行すらままならない。また、リラキシンは投与後すぐにプロテアーゼの影響を受けて速やかに分解することから、製剤応用を見据えては血中における分子の長寿命化が課題である。現状のリラキシン製造では、遺伝子組換え技術を利用した生物依存的な合成法が採用されており、人工アミノ酸の導入による機能改変は困難である。本研究では、化学合成に立脚したリラキシンの効率的な製造基盤を確立し、分子デザインの自由度を拡張するとともに、具体的な高機能リラキシンを提案することを本研究の全体の目的とする。

化学合成基盤確立の足掛かりを得るために、初年度は、下記2点を小目的として設定した。

- (1) 新たなリラキシンの化学合成経路を提案するとともに、その有効性を実証する。
- (2) 人工リラキシンとしてセレノリラキシン（図1; SeRlx- $\alpha$ ）の合成を検討し、合成効率の向上と構造・機能特性を理解する。

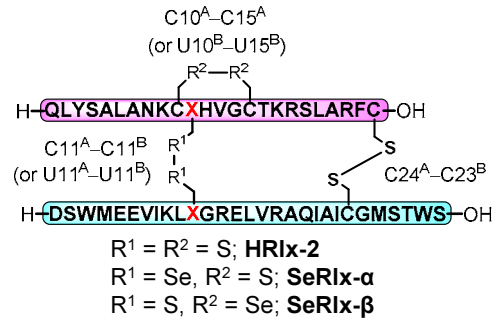


図1: ヒトリラキシン2の一次配列ならびにジスルフィド結合トポロジー。

## 2. 研究の計画

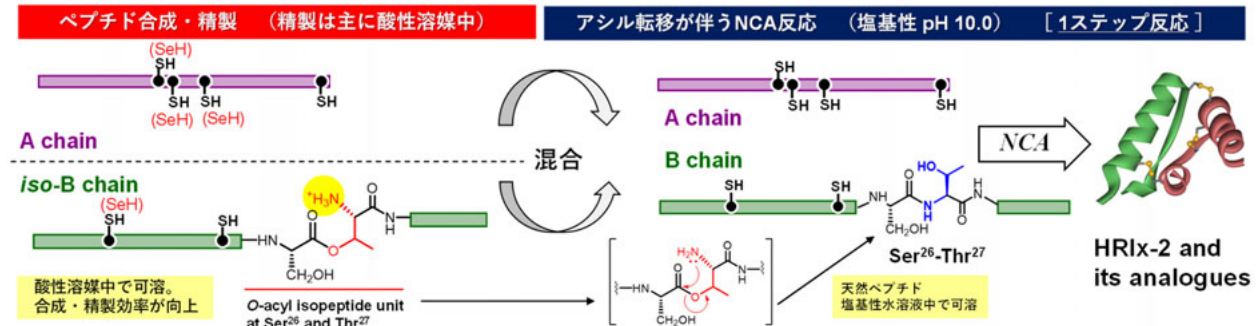


図2: O-アシルイソペプチド（AIP）法を利用したリラキシンアナログの合成戦略。

リラキシンは、A鎖とB鎖がS-S結合で架橋されたヘテロダイマー型の構造を有し、分離した各構成ペプチド鎖から適切な鎖間カップリングを介して高次構造を形成させることは難しい。加えて、B鎖は中性以下の水溶液中では難溶であり、ペプチド合成において必須である酸性水溶液中でのペプチド精製工程を極めて困難なものとする。我々は以前に、リラキシンと同様の構造を有するペプチドホルモン、「インスリン」について、構成ペプチド鎖（A・B鎖）を1:1のモル比で混合するだけで、目的の高次構造体を得ることができる手法を確立した。この天然鎖アセンブリ法（Native chain assembly; NCA）を新規化学合成技術の創出基盤とする。さらに、酸性水溶液中での溶解性を克服するため、B鎖の配列上にO-アシルイソペプチド（O-AIP）ユニットを組み込む戦略を考案した。当該ユニットは、構造上、酸性溶液中でイオン化したアミノ基が遊離した形で存在するため、ペプチド鎖の溶解性の向上が期待できる（図2）。NCA反応は、塩基性条件下で行われるため、O-AIPユニットはアシル転移によって天然ペプチド結合へと迅速に変化し、最終的には目的のヒトリラキシン2（HRlx-2）が得られるはずである（図2）。この戦略は、SerまたはThrとそのN末端側の隣接アミノ酸部分にのみ適応できるため、この研究ではSer26-

Thr27 を *O*-AIP 部位として選定した。初年度は、下記 3 点を具体的な実施項目として設けた。

- (1) 固相ペプチド合成法による *O*-AIP ユニットの組み込んだリラキシン B 鎖 (*iso*-HR1x-2B) の化学合成。
- (2) 構成ペプチド鎖を用いた NCA 法による高次構造形成。
- (3) 人工リラキシンであるセレノリラキシン合成への応用。

これらの遂行により、本戦略の妥当性とリラキシンアナログへの汎用性について明らかにする。

### 3. 研究の成果

#### (1) *iso*-HR1x-2B の化学合成

本研究は、荒井（代表者）と片山（分担者）が主導して実験に取り組んだ。*O*-AIP ユニットの既報 (*Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 1720) に従い容易に得ることができ、固相ペプチド合成 (SPPS) 法によって *O*-AIP ユニットの組み込んだリラキシン B 鎖 (*iso*-HR1x-2B) を合成した。樹脂上で伸長させたターゲットペプチドは、トリフルオロ酢酸 (TFA) を主成分とする脱樹脂剤と反応させ、樹脂からペプチド鎖を切り出す必要がある。一般的な TFA 系脱樹脂剤を用いて B 鎖の脱樹脂を行ったが、メチオニン側鎖のスルフィドがスルホキドに酸化された副生成物が大量に得られた。そこで、脱樹脂における反応条件を検討し、少量の還元剤を添加した混合試薬を脱樹脂剤として用いたところ、目的の *iso*-HR1x-2B が主生成物として得られた。重要なことに、脱樹脂後に得られた粗ペプチドは酸性水溶液 (pH 4.0) に溶解することができ、逆相 HPLC による精製工程が格段に効率化された。精製後の *iso*-HR1x-2B は、酸性緩衝溶液だけでなく塩基性緩衝溶液 (pH 10.0) にも容易に溶け、さらに塩基性条件下では直ちに *O*-AIP ユニットの分子内アシル転移反応が進行し、目的の天然ペプチド鎖に変換されることが明らかとなった (図 3a)。

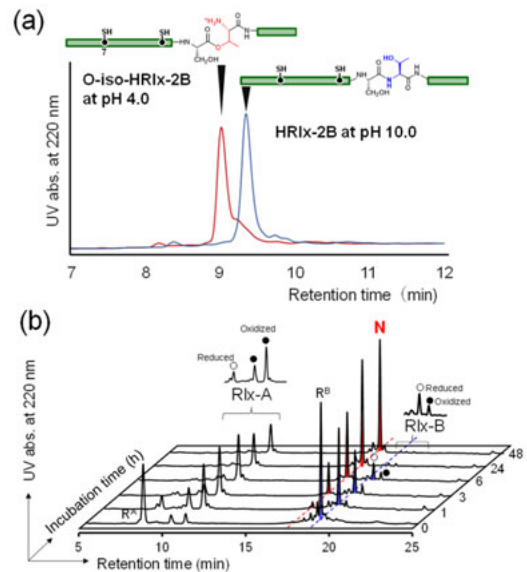


図 3. *iso*-HR1x-2B の合成とそれを用いた A 鎖とのカップリング (NCA) 反応。(a) *iso*-HR1x-2B の天然ペプチド B 鎖への変換。(b) リラキシンの NCA 実験から得られた HPLC 分析結果。

#### (2) NCA 反応によるリラキシン (HR1x-2 [図 1 R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=S]) の調製

続けて、NCA 反応に必要なリラキシンの A 鎖も同様の固相ペプチド合成法によって調製した。A 鎖は従来の方法によって滞りなく合成できた。得られた A 鎖および B 鎖 (*iso*-HR1x-2B) を用いて、各鎖を直接的にカップリングさせることで、目的の HR1x-2 を合成した。反応条件は、インスリンの化学合成にて我々が以前に確立した NCA 反応条件のそれと同様のものを適用し、A 鎖および B 鎖をグルタチオン (GSH/GSSG) 存在下、一定の pH・温度条件下で反応を行った。時間の経過に伴って、A 鎖と B 鎖の間で徐々にカップリングが進行し、天然のフォールド構造を有する HR1x-2 (N) が、HPLC 収率にして 48% で得られた (図 3b)。

#### (3) セレノリラキシン (SeR1x- $\alpha$ [図 1 R<sup>1</sup>=Se, R<sup>2</sup>=S]) の合成

HR1x-2 の合成に関して、想定よりも短い期間で合成方法が確立された。当初、SeR1x- $\alpha$  の合成は、2023 年度より実施する予定であったが、HR1x-2 の合成ノウハウを応用して SeR1x- $\alpha$  の合成に着手した。ジセレニド (Se-Se) 結合は、S-S 結合よりも熱力学的に安定である。故に、Se-Se 結合への置換が分子全体の安定性、生理活性ならびに薬物動態へどのような効果を与えるか興味深い。SeR1x- $\alpha$  の合成に必要なセレノシステイン誘導体 (Sec) の化学合成は、岩岡 (分担者) が主導して行った。*iso*-HR1x-2B と同様の手法によって、B 鎖の 11 番目の Cys 残基を Sec 残基に置換したペプチド鎖 (*iso*-SeR1x- $\alpha$ B) を SPPS 法によって合成した。同様に SeR1x- $\alpha$  の構成ペプチドとして、A 鎖の 11 番目の Cys 残基を Sec 残基に置換したペプチド鎖 (SeR1x- $\alpha$ A) の合成にも成功した。フォールド構造を有する SeR1x- $\alpha$  を調製するために、構成ペプチド鎖の直

接的なカップリング反応を試みた。SeR1x- $\alpha$ A と *iso*-SeR1x- $\alpha$ B を適切な濃度条件下で、グルタチオン酸化還元溶液中で混合し、至適 pH・温度条件下で反応を行った。反応溶液の一部を HPLC で分析したところ、フォールドした SeR1x- $\alpha$  に相当するピークが観測された (HPLC 収率: 73%)。精製後の SeR1x- $\alpha$  の純度は、市販の HR1x-2 と同等であることが HPLC 分析から明らかになった (図 4a)。また、HPLC 保持時間が野生型とほぼ同じであり、SeR1x- $\alpha$  の立体構造が HR1x-2 のそれと類似していることを示唆した。さらに ELISA によって、SeR1x- $\alpha$  が HR1x-2 と同程度のリラキシン受容体会合能を有することがわかった (図 4b)。このことは、SeR1x- $\alpha$  がリラキシン受容体と会合し得る HR1x-2 様の構造を有していること、さらに SeR1x- $\alpha$  が野生型のそれと同様の生理活性を発揮し得ることを示唆している。また、SeR1x- $\alpha$  のトリプシンによる酵素分解実験から、適切な架橋位置に Se-Se および S-S 結合を有する目的物が得られたものと考えられる。現在、吉野 (分担者) らが子宮内膜症に対する SeR1x- $\alpha$  の薬理効果に関する検討を行っている。

## 4. 研究の反省・考察

### (1) *iso*-HR1x-2B の化学合成に関する反省と考察

Ser26-Thr27 を対応する *o*-AIP ユニットに置換した B 鎖アナログ (*iso*-HR1x-2B) の化学合成に成功した。酸性溶媒における溶解性の向上も見られ、塩基性条件下における分子内アシル転移による天然型ペプチド鎖への迅速な変換反応も確認できた。合成戦略が良好に機能し、B 鎖の合成効率の向上が図れた。一方で、B 鎖単離収率は 3% であり、改善の余地を残した。粗ペプチドの HPLC チャートは、目的ペプチド鎖を主生成物として得られたことを示唆したものの、多くの不純物が含まれていることも確認された。特に脱樹脂工程の反応スケールをあげることで、副反応の進行が著しく、脱樹脂剤の組成をはじめ温度・時間などの精緻な検討を行う必要がある。

### (2) NCA 反応による HR1x-2 の調製に関する反省と考察

合成した *iso*-HR1x-2B は、SPPS 法によって合成した HR1x-2A と適切にカップリングし、フォールド構造を有した HR1x-2 が妥当な収率で得られた (48%)。 *iso*-HR1x- $\alpha$ B は NCA に適した塩基性条件下 (pH 10.0) にて天然型ペプチド結合を生成する特性があることから (図 3a)、得られた HR1x-2 は野生型と同様のペプチド主鎖骨格を有しているものと考えられる。細かな条件検討は行っていないため収率の更なる向上を見据えては、至適 pH/温度の検証ならびに添加剤を検討する余地を残している。

### (3) セレノリラキシン (SeR1x- $\alpha$ [図 1 R<sup>1</sup>=Se, R<sup>2</sup>=S]) の合成に関する反省と考察

HR1x-2 の合成ノウハウを応用することで、SeR1x- $\alpha$  を合成することができた。 *iso*-SeR1x- $\alpha$ B および SeR1x-2A の各ペプチド鎖の合成収率には検討の余地があるが、NCA 反応によるカップリング反応は 70% を上回った。これは、生体内のプロリラキシンのフォールディングに匹敵し、ペプチド鎖間 Se-Se 結合の速度論的、熱力学的優位性がこの高収率に至った理由であると考えられる。SeR1x- $\alpha$  は分子表面に Se-Se 結合を有するが、分子内部に Se-Se 結合 (U10<sup>A</sup>-U15<sup>A</sup>) を有するセレノリラキシンアナログ (SeR1x- $\beta$  [図 1, R<sup>1</sup>=S, R<sup>2</sup>=Se]) がどのようなフォールディング挙動を示すか興味深い。さらに、得られたセレノリラキシン各種の構造、物性、反応性に関する研究を進めるとともにその生理活性に関する知見を収集する。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ① **Kenta Arai\***, Haruka Toba, Nozomi Yamamoto, Mao Ito, Rumi Mikami, Modeling

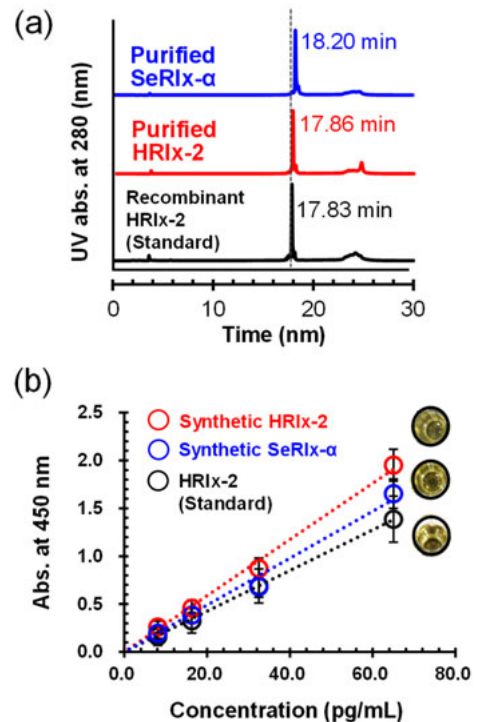


図 4: HR1x-2 と SeR1x- $\alpha$  の HPLC 保持時間の比較と ELISA による抗体会合特性評価。

Type-1 Iodothyronine Deiodinase with Peptide-Based Aliphatic Diselenides: Potential Role of Highly Conserved His and Cys Residues as a General Acid Catalyst. *Chem. Eur. J.*, **2023**, 29, e202202387 (DOI: [10.1002/chem.202202387](https://doi.org/10.1002/chem.202202387)) (Selected as Hot Paper) IF = 5.020

- ② **Kenta Arai\***, Rumi Mikami, Redox Chemistry of Selenols and Diselenides as Potential Manipulators for Structural Maturation of Peptides and Proteins, *Metallomics Res.*, **2022**, 2, rev1-17. (Invited, Open Access)
- ③ Kazuyuki Kato, Yasutake Mukawa, Shoichi Uemura, Masataka Okayama, Zentaro Kadota, Chika Hosozawa, Sayaka Kumamoto, Shun Furuta, **Michio Iwaoka**, Tomohiro Araki, Hiroshi Yamaguchi. A protein identification method for proteomics using amino acid composition analysis with IoT-based remote control. *Anal. Biochem.*, **2022**, 657, 114904. (DOI: [10.1016/j.ab.2022.114904](https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114904)). (Open Access) IF = 3.191
- ④ **Hidekazu Katayama\***, Kenji Toyota, Haruna Tanaka, Tsuyoshi Ohira. Chemical synthesis and functional evaluation of the crayfish insulin-like androgenic gland factor. *Bioorg. Chem.*, **2022**, 122, 105738 (DOI: [10.1016/j.bioorg.2022.105738](https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.105738)) IF = 5.307
- ⑤ **Hidekazu Katayama**, Masatoshi Mita\*. The C-terminally amidated relaxin-like gonad-stimulating peptide in the starfish *Astropecten scoparius*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **2023**, 334, 114226 (DOI: [10.1016/j.ygcen.2023.114226](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2023.114226)) IF = 3.255
- ⑥ Yosuke Ono, Kyoko Furumura, **Osamu Yoshino\***, Hajime Ota, Yasushi Sasaki, Takao Hidaka, Yoshiyuki Fukushi, Shuji Hirata, Hideto Yamada, Shinichiro Wada, Influence of laparoscopic surgery for endometriosis and its recurrence on perinatal outcomes. *Reprod. Med. Biol.* **2022**, 21, e12456.

## (2) 口頭発表

- ① **Kenta Arai**, Structural Control of Proteins by Utilizing Selenium Chemistry, Group 16 elements in Chemical Biology, **May 2022** (On the internet), *Invited lecture*.
- ② **Michio Iwaoka**, Design and Synthesis of Selenopeptide, *The 10th Workshop of SeS Redox and Catalysis (WSeS-10)*, Nov. 2022 (Niteroi, Brazil) *Invited lecture*.
- ③ **Kenta Arai**, Aliphatic Diselenides as a Potential Manipulator for Proteostasis, *15th International Conference on the Chemistry of Selenium and Tellurium (ICCST-15)*, **Dec. 2022** (Florianópolis, Brazil) *Invited lecture*.
- ④ 佐藤有里, **片山秀和**, **岩岡道夫**, **荒井堅太**, 化学合成法によるヒトリラキシンの開発, 2023年3月22日, 第22回日本再生医療学会 (京都国際会館)。
- ⑤ **Michio Iwaoka**, Selenium Analogs of Nucleosides and Proteins, Jan. 2023 (Tokyo, Japan) *Keynote lecture*.

## (3) 出版物

- ① Small Organoselenium Catalysts as a Potential Manipulator for Redox Homeostasis and Proteostasis. **Kenta Arai\***, in *Chalcogen Chemistry: Fundamentals and Applications*, edited by V. Lippolis, C. Santi, Eder J. L. and A. L. Braga. The Royal Society of Chemistry, **2023**, Chapter 25, pp. 648-665.
- ② Chalcogen-Containing Protein and Nucleic Acid Derivatives - Synthesis and Application. **Michio Iwaoka\***, in *Chalcogen Chemistry: Fundamentals and Applications*, edited by V. Lippolis, C. Santi, Eder J. L. and A. L. Braga. The Royal Society of Chemistry, **2023**, Chapter 24, pp. 625-647.
- ③ **Michio Iwaoka\***, Shingo Shimodaira. Synthesis and catalytic functions of selenopeptides, in *Organochalcogen Compounds: Synthesis, Catalysis, and New Protocols with Greener Perspectives*, edited by E. J. Lenardao, C. Santi, G. Perin, D. Alves, Elsevier, 2022, Chapter 6, pp. 195-218.