

令和元年6月18日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08332

研究課題名(和文) 脳内リラキシン受容体標的型抗肥満薬の開発～インスリン様ペプチド7アナログの設計

研究課題名(英文) Discovery of INSL7 analogue with agonistic activity for RXFP3 in the brain

研究代表者

北條 恵子 (Hojo, Keiko)

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号：20289028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：リラキシン-3は、視床下部に局在するリラキシン受容体3(RXFP3)の内因性リガンドとして発見された。RXFP3は、肥満、精神疾患の創薬標的となっている。リラキシン-3は、ペプチドA鎖B鎖からなり、インスリンと相同性の高い立体構造をもつ中分子である。RXFP3活性化に必須なリラキシン-3の残基は、B鎖に集中している。そこで、本申請研究では、低分子化したB鎖一本鎖ステープルペプチドを基盤とする強力なRXFP3アゴニストの開発を行った。検討探索の結果、架橋した17残基からなる一本鎖のアゴニストの開発に成功した。このステープルペプチドアナログは、抗肥満薬のリードとして期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リラキシン-3は、インスリンスーパーファミリーに属している神経ペプチドの一つである。このスーパーファミリーに属するペプチドの構造変化はあまり研究がなされてこなかった。その理由は、二本鎖の中分子であるが故に、低分子化、改変分子におけるNativeコンフォメーションの再現に困難が伴うからである。しかし、リラキシン-3をB鎖のみのステープルペプチドとすると、その合成は容易となり改変も可能である。更には、多分子間相互作用を狙った二価性、三価性のアナログ等の創製も可能となる。このような高機能なペプチド性医薬品の投入は、規模を拡大し続けている精神疾患の創薬マーケットにインパクトを持って迎えらえるはずである。

研究成果の概要(英文)：Relaxin-3 is a two-chain neuropeptide that plays a key role in stress responses, arousal and affective behaviors through interaction with RXFP3 that is highly expressed in the brain. From detailed structure-activity relationship studies together with the known tertiary structure of relaxin-3 and molecular modeling of the RXFP3-relaxin-3 complex, the central B-chain-helical region of relaxin-3 is essential for the binding to RXFP3 as it contains several key residues. The C-terminal residues are critical for activation of RXFP3. Although all the critical residues are located within the B-chain, the native relaxin-3 B-chain alone displays only weak agonistic activity at RXFP3 probably due to loss of the native helical binding conformation when separated from the stabilizing A-chain. In this study we applied this stapling system to stabilize the-helix of single B-chain and showed that it mimics the native conformation of B-chain and possesses potent RXFP3 agonist activity.

研究分野：医薬品化学

キーワード：ペプチドアナログ インスリンファミリー GPCR ステープルペプチド ヘリックス 神経ペプチド
ペプチド合成 リラキシン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リラキシン-3は視床下部神経核ニューロンに高発現しており、視床下部に局在するリラキシンファミリーペプチド受容体3(RXFP3)の唯一の内因性リガンドとして2002年に同定されたRXFP3は、摂食、情動、認知行動との関わりが報告されており、うつ、認知障害などの精神疾患、肥満症に対する創薬標的として脚光を浴びている。しかし、その内因性リガンドであるリラキシン-3は、脳内分布域がほぼ重なるRXFP1にも交差親和性を示すため、RXFP3に選択的なアナログの開発が希求されている。リラキシンファミリーペプチド受容体は4種類(RXFP1~4)存在し、いずれもGタンパク質共役型受容体(GPCR)である。しかし、GPCRの型は異なっており、心血管系、脳を含め全身に分布域をもつRXFP1は、Leu-rich repeatsを細胞外ドメインとしてもつType I型GPCRであり、RXFP3は細胞外ドメインを持たない典型的なclass A型GPCRである。Type I型のRXFP1の活性化は、まず細胞外ドメインにリラキシンペプチドA鎖が結合した後、膜貫通ドメインに存在するリガンド結合部位が開放され、B鎖が結合することによって進む。一方、細胞外ドメインを持たないRXFP3の場合、露出しているリガンド結合部位にB鎖が結合することによって、受容体の構造変化が誘導される。つまり、リラキシン-3のA鎖は、RXFP3の活性化に必須ではない。従って、A鎖を有さないB鎖のみのリラキシン-3アナログとすれば、RXFP1に親和性をもたないRXFP3選択的なアナログの開発につながると考え研究に着手した。

2. 研究の目的

これまでのリラキシン-3とRXFP3との構造活性相関研究と受容体のモデリングから、RXFP3活性化に必須なリラキシン-3のアミノ酸残基は、B鎖に集中している。これらの知見からB鎖一本鎖のみでの活性発現が期待されたが、B鎖のみでは、Nativeリラキシン-3の α -helixなバイオアクティブコンフォメーションが失われ、RXFP3との親和性が著しく低下することが明らかとなっている。そこで、リラキシン-3B鎖の α -helix構造を分子内架橋で固定化してNativeなコンフォメーションを再現すれば、B鎖一本鎖でもRXFP3に対する親和性が向上すると考えた。そこで、本申請研究の基本戦略をB鎖の分子内架橋による α -helix形成(ステーブルペプチド)と親和性発揮、親和性向上を目指した α -helix surfaceの機能改変とし、インスリンスーパーファミリーではこれまでに例のない低分子化したB鎖一本鎖ステーブルペプチドを基盤とする強力なRXFP3アゴニスト、バイアスリガンドの開発、新たな肥満治療薬を産み出すことに挑む。

3. 研究の方法

脳内リラキシン受容体(RXFP3)を標的に、B鎖一本鎖ステーブルペプチドを基盤とするリラキシン-3アナログの開発を目指し、まず、 $i, i+4$ 架橋のリラキシン-3B鎖full lengthのステーブル分子の設計を行い、RXFP3に親和性をもつステーブルペプチドアナログの探索を行う。低分子化を企図し、 $i, i+4$ 架橋のリラキシン-3B鎖のshort lengthステーブルペプチドの分子設計を行う。続いて、機能改変を目指しステーブルヘリックス構造をもつ低分子ペプチドライブラリーを構築し、リラキシン-3の低分子アナログを探索した。また、それぞれのアナログについて受容体親和性を調べ、高活性のものについてその立体構造をCD、NMRによって解析した。

4. 研究成果

(1) リラキシン-3B鎖ステーブルペプチドアナログの設計と合成

リラキシン-3B鎖一本鎖の状態でのNativeのヘリックス構造を再現する方法として、ペプチド鎖内の分子内架橋によって二次構造を形成させたステーブルペプチドの手法を用いることとした。しかし、リラキシン3B鎖の一本鎖はランダムな構造であるため、単純な分子内架橋形成だけでは安定したヘリックス構造を形成させるのは難しいと考えられた。 α -メチルアラニン(Aib)をモチーフとした非天然型アミノ酸をアミノ酸配列の任意の位置に導入してメタセシス環化反応でオレフィン架橋を形成させる方法に着目した。これまでのリラキシン-3とRXFP3との構造活性相関研究から、活性発現に必須な残基(B鎖Arg16、Phe20が結合に、B鎖Arg26、Trp27が活性に必須)は確定している。これらを分子内架橋によって、如何に親和性を示すのに最適な三次元的配置にするかが重要である。アミノ酸配列内のどの位置で架橋を形成すべきか、古典的なヘリックスホイールと、NMR解析から得られた二次構造の情報から検討した。これらの解析からArg16、Phe20周囲の α -ヘリックス構造再現を焦点として、Glu13、Ala17にAibをモチーフとした5-ペンテニルアラニンを導入してオレフィン架橋を形成させたpeptide 1を設計した。また、これまでの構造活性相関の研究からB鎖のN末端領域がRXFP3が活性化に不要であることが明らかとなっていたので、N末端を逐次短くしたより分子サイズの小さいアナログ(peptide 2-6)も設計した。また、5-ペンテニルアラニンで形成する炭化水素分子内架橋は疎水性が高いので、疎水性面に分子内架橋が配置されるようにIle15とその*i+4*の位置にあるIle19を5-ペンテニルアラニンに置換したアナログ(peptide 7、8)と、架橋位置をC末端側にずらしたアナログ(peptide 9)を設計した。また、架橋位置をGlu13とその*i+4*の位置にあるAla17

として、ジスルフィド架橋、ラクタム架橋、塩橋をかけたアナログ (peptide 10-12) を設計した。ペプチドアナログの合成は、すべて Fmoc 法によるペプチド固相合成によって行い、オレフィン架橋は固相上で Grubs^{1st} 試薬を用いたメタセシス環化反応によって、また、ラクタム架橋、ジスルフィド架橋も固相上で従来法によって形成させてアナログ群を得た。

(2) ステープルペプチドアナログ群の RXFP3 に対するアゴニスト活性

Glu13、Ala17 に Aib をモチーフとした 5-ペンテニルアラニンを経介してオレフィン架橋を形成させたアナログ群 (peptide1-6) は、RXFP3 に高い親和性と cAMP 活性を示す RXFP3 のアゴニストであった。また、いずれの一本鎖アナログも A 鎖を持たないので RXFP1 に親和性を示さなかった。疎水性面側で同様 5-ペンテニルアラニンを経介してオレフィン架橋を形成させたアナログ (peptide 7) は、RXFP3 に親和性を有していたが、予想外にも cAMP 活性は示さずアンタゴニストであった。また、Glu13、Ala17 の位置でジスルフィド架橋、ラクタム架橋等を形成させたアナログ群 (peptide10-12) は RXFP3 に対する親和性を有していなかった。最も短鎖で活性の高かった peptide 5 は、Native リラキシン-3 と同等のフルアゴニスト活性を示した。Peptide 5 では生物活性を維持したまま、Native リラキシン-3 のアミノ酸残基数 50 以上から分子量約 5500 からアミノ酸残基数 17、分子量 1700 とその分子サイズを大きく減少させることに成功した。

(3) ステープルペプチドアナログの立体構造

一本鎖ステープルアナログの peptide 5、架橋位置の異なる peptide 7 また Glu13、Ala17 の位置でジスルフィド架橋、ラクタム架橋等を形成させたアナログ群 (peptide 10、11)、架橋をかけていないライナーのペプチドアナログ (peptide 13) について CD を測定した。Peptide 5 は明確なヘリックス構造を示したが、その他のアナログはヘリックス構造の比率が低い (peptide 7) あるいはほとんど特徴的な二次構造を示さないことがわかった。この知見は生物活性の結果と比例しており、架橋位置が Glu13、Ala17 で最適なこと、また Aib モチーフを導入した効果が高いことを示している。Peptide 5 の立体構造を Native リラキシン-3 の NMR 構造と重ね合わせると、ヘリックス構造は完全に重なっており、また、RXFP3 の活性発現に必須な残基 (B 鎖 Arg16、Phe20 が結合に、B 鎖 Arg26、Trp27 が活性に必須) の三次元的配置がほぼ期待通りの位置を示した。このステープルアナログは、インスリン・リラキシンスーパーファミリーのペプチド群で数少ない一本鎖アナログの成功例である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Keiko Hojo, Tatsuya Hashimoto, Koushi Hidaka, Yuko Tsuda. Aqueous microwave-assisted solid phase peptide synthesis without hydroxyl side chain protection. Peptide Science, 査読有, 2018.

Keiko Hojo, Mika Izutsu, Ross A. D. Bathgate, K Johan Rosengren, Koushi Hidaka, Yuko Tsuda, Mohammad Akhter Hossain, John D. Wade. Design and synthesis of hydrocarbon stapling peptide antagonist for relaxin family peptide receptor 3 (RXFP3). Peptide Science, 査読有, 2017: 148-149.

Keiko Hojo, Hossain A. Hossain, K. Johan Rosengren, Sheri Ma, Andrew L. Gundlach, Yuko Tsuda, Koushi Hidaka, R. A. D. Bathgate, John D. Wade. Design, synthesis and biological activity of hydrocarbon stapled single-chain relaxin-3 analogue. Peptides 2017: 148-149.

Keiko Hojo, Ross A. D. Bathgate, K. Johan Rosengren, Andrew L. Gundlach, Koushi Hidaka, Yuko Tsuda, Mohammad A. Hossain, John D. Wade. Development of a single chain peptide agonist of relaxin-3 receptor: optimization of stapling strategies. Peptide Science, 査読有, 2016:65-66.

Keiko Hojo, Mohammed A. Hossain, Julien Tailhades, Fazel Shabanpoor, Lilian L.L. Wong, Emma E.K. Ong-Palsson, Hanna E. Kastman, Sherie Ma, Andrew L. Gundlach, K. Johan Rosengren, John D. Wade, Ross A. D. Bathgate. Development of a single-chain peptide agonist of the relaxin-3 receptor using hydrocarbon stapling. J. Med. Chem., 査読有, 59 巻, 2016: 7445-7456.

北條恵子, 脱有機溶媒を志向する環境調和型のペプチド合成, 特集/ペプチド科学の最前線(I), 化学工業, 67 巻, 2016: 753-759.

〔学会発表〕(計45件)

北條恵子: 2019年3月23日、日本薬学会139年会、千葉、「Relaxin-2 B鎖のステープルアナログの設計と合成」

Keiko Hojo: December 7, 2018, The 10th International Peptide Symposium/The 55th Japanese Peptide Symposium, Kyoto, Aqueous microwave-assisted solid phase peptide synthesis without hydroxyl side chain protection

Keiko Hojo: November 22, 2017, The 54th Japanese Peptide Symposium, Osaka, Design and synthesis of hydrocarbon stapling peptide antagonist for relaxin family peptide receptor 3 (RXFP3).

北條恵子: 2017年3月25日、日本薬学会137年会、仙台、リラキシン受容体(RXFP3)アンタゴニスト活性を有するリラキシン3アナログの設計と合成

Keiko Hojo: October 28, 2016, The 53rd Japanese Peptide Symposium, Kyoto, Development of a single chain peptide agonist of relaxin-3 receptor: optimization of stapling strategies

〔図書〕(計2件)

北條恵子, マイクロ波を用いる水中ペプチド合成法, 中分子創薬に資するペプチド・核酸・糖鎖の合成技術 第5章, 千葉一裕監修, シーエムシー出版.

北條恵子, 脳内リラキシン受容体標的型抗肥満薬の開発~インスリン様ペプチド7アナログの設計, ペプチド創薬の最前線 第23章, 木曾良明監修, シーエムシー出版.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 津田裕子

ローマ字氏名: Yuko Tsuda

所属研究機関名: 神戸学院大学

部局名: 薬学部

職名: 教授

研究者番号: 10098478

研究分担者氏名: 日高興士

ローマ字氏名: Koushi Hidaka

所属研究機関名: 神戸学院大学

部局名: 薬学部

職名: 講師

研究者番号: 30445960

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。