

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05792

研究課題名(和文) セレノシステインの触媒機能の開拓

研究課題名(英文) Exploring catalytic functions of selenocysteine

研究代表者

岩岡 道夫 (Iwaoka, Michio)

東海大学・理学部・教授

研究者番号：30221097

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)：本研究は、セレノシステインの有機触媒としての機能開拓を行うことを目的とし、様々なセレノシステイン誘導体の化学合成を行った。検討の結果、天然アミノ酸のセリンを出発原料としたセレノシステイン誘導体の簡便かつ効率的な製造法を確立した。また、得られたセレノシステイン誘導体を用いて、新規な有機触媒反応の開拓、セレン酵素の活性中心モデル分子の創製、セレノグルタチオンの簡便化学合成法の確立、インスリンのセレンアナログの合成、分子内ネイティブケミカルライゲーション法を応用した環状セレノペプチド合成法の開発などの研究成果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セレノシステインは遺伝子情報によってタンパク質に直接組み込まれる第21番目のアミノ酸である。セレノシステインを活性中心に含むセレン酵素は多数知られているが、これまでその反応メカニズムの詳細が酵素に近いアミノ酸モデルを用いて研究されたことはほとんどなかった。本研究では、セレノシステイン誘導体を用いた研究によって、その一端を明らかにすることができた。研究成果は創薬への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research project was to explore the catalytic functions of selenocysteine. In this project, the following outcomes were obtained. An easy and efficient method to produce selenocysteine derivatives from natural amino acid serine was established. Using the obtained selenocysteine derivatives, novel catalytic organic transformation reactions were found, mimics of selenoenzymes were developed, a convenient synthetic method was established for selenogluthathione, a selenoinsulin analog was synthesized, and the synthesis of cyclic selenopeptides was achieved by application of intramolecular native chemical ligation.

研究分野：生体関連化学

キーワード：セレン セレノシステイン 酵素モデル ペプチド合成 セレノインスリン セレノグルタチオン 環状ペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

セレノシステイン(Sec)は、様々な酵素の活性中心に存在し、生化学的に重要なアミノ酸である。ヒトゲノム解析から、ヒトには 25 種類の Sec 含有タンパク質が存在することが明らかになった。しかし、これらのタンパク質の酵素としての機能については不明なものが多い。一方、有機化学分野においては、レドックス活性が高いセレンはセレン求電子剤やセレン求核剤、セレンラジカル剤として古くから有機反応に応用されてきた。また、1990 年代にセレン試薬を用いた触媒反応が開拓され、以降、不斉触媒反応への応用も精力的に進められている。これまでに様々な不斉セレン触媒が開発されている。しかし、これらの多くは安定な Se-C 結合をもつ芳香族セレン化合物であり、やや不安定な Se-C 結合をもつ脂肪族セレン化合物を触媒として応用した研究は稀である。特に、Sec を触媒として用いた例は、Santi によるアルケンの触媒的不斉ジヒドロキシ化を除くと皆無に近い。即ち、Sec は酵素の活性中心や生体触媒として優れた機能を有する一方、有機化学分野における機能開拓の点では研究が進んでいないのが現状である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、これまで独自に開発してきた Sec 合成法を利用して、様々な Sec 誘導体を合成し、Sec の触媒としての潜在能力を掘り起こし、生体適合性触媒としての新しい機能を開拓することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、4 つの研究項目を設定し多角的に研究を進めることを計画した。まず、基本となるセレノシステイン(Sec)誘導体の合成を行い、多様な誘導体をできるだけ大量に合成した。次に、合成した Sec 誘導体を用いて、以下の方法で研究を推進した。

(1) メチルセレノシステイン(MeSec)を用いた不斉触媒反応 メチル-L-セリンを原料とし、セレン化剤としてウーリンズ試薬(W.R.)を用いて、多様な MeSec 誘導体を合成し、これを用いて触媒的不斉合成反応を行うことを計画した。

(2) Sec 金属錯体の合成と応用 まず、金属錯体の配位子となる L-Sec 誘導体を、独自に開発した合成法を用いて合成した。原料として L-シスチンあるいは L-セリンを用いて、それぞれのカルボキシ基とアミノ基を保護したのちに、種々のセレン化剤を用いて Sec 誘導体に変換した。次に、保護基の脱保護を行った。このようにして得られた保護あり、保護なしの Sec 誘導体を用いて、水銀、亜鉛、パラジウムなどの重金属イオンの塩との錯形成について検討を行った。得られた錯体は、質量分析と Se-NMR によって構造解析し、さらに単結晶が得られれば X 線構造解析によって分子構造を決定することを計画した。

(3) セレノペプチド(Se-Pept)触媒の分子設計 合成した Sec 誘導体を用いて、Sec 含有タンパク質のアミノ酸配列を模倣した様々な Sec 含有ペプチド(セレノペプチド)を、固相合成法および液相合成法によって合成した。本研究では、代表的なセレン酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)やチオレドキシソレダクターゼ(TrxR)の活性中心をモデル化した Se-Pept やその環状ペプチドを合成することを計画した。

(4) セレノグルタチオン(GSeSeG)の機能開発 研究代表者は以前に固相合成法によって GSeSeG の合成に成功したが、その収率は 9%程度と低いものであった。その後、改良を加えた結果、90%以上の高い通算収率で GSeSeG を合成できるようになった。これによって GSeSeG の様々な誘導体を大量に合成し、その構造解析を行うことが可能になった。本研究では、GSeSeG の側鎖に様々な官能基を導入した GSeSeG 誘導体を合成し、主に質量分析と Se-NMR によって、その構造解析を行うことを計画した。

4. 研究成果

(1) 新規化合物として数種類の メチルセレノシステイン誘導体の合成に成功し、これらを触媒として用いる不飽和カルボン酸の触媒的不斉環化反応を実際に行ってみた。しかし、得られた不飽和ラクトン生成物の不斉収率は約 20%e.e.と低いものであった。そこで、位ではなく位にメチル基をもつセレノスレオニン誘導体の合成についても検討し、新規化合物を合成することができた。合成したセレノスレオニンを用いた不斉触媒反応を行い、セレノシステイン誘導体の不斉触媒としての可能性を検討した。その結果、達成された不斉収率は高くはなかったものの、セレン触媒存在下で進行する新規な合成反応をいくつか見出すことができた。

(2) 目的とするセレノシステイン誘導体をグラムスケールで再現性良く合成する手法を確立することができた。合成したセレノシステイン誘導体を用いて様々な金属錯体の合成を検討し、その構造解析を試みたが、単一の結晶を得ることはできなかった。今後、引き続き反応条件や結晶化の条件を検討し、生体金属とセレノシステインとの相互作用を明らかにしていく予定である。

(3) GPx の活性中心の構造をモデル化したのセレノペプチドを合成し活性評価を行ったが、有効な抗酸化触媒活性を観測することはできなかった。そこで、鎖状ではなく環状のセレノペプチドを分子設計し、合成を検討した。得られた環状セレノペプチドの GPx 様触媒活性を評価した結果、GPx の活性中心に存在すると提案されている触媒テトラッドの重要性を初めて実験的に証明することに成功した。一方、TrxR の活性中心をモデル化したセレノペプチドとして、Sec-Cys のジペプチドを合成し、その酵素様活性を評価した。その結果、TrxR 活性発現において隣接官能基との NH...Se 水素結合が重要な役割を果たしていることが示唆された。この新しい仮説を実証するために、さらに様々なセレノペプチドを合成して、研究を進めている。

(4) 合成したセレノグルタチオンを用いて、過酸化水素や各種チオールとの反応を行い、GSeSeG から生成した活性種の同定を NMR や質量分析によって行った。その結果、セレノグルタチオンの酸化還元反応の全容を明らかにすることができた。また、セレノグルタチオンの生理機能として、ミスフォールドタンパク質を正常型へと巻き戻す作用があることが明らかになった。一方、新規なインスリンアナログとしてセレノインスリンを合成することにも成功し、この研究をさらに展開することで、ヒトインスリンの効率的な化学合成にも成功した。セレノインスリンには高い持効性が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Arai Kenta, Takei Toshiki, Shinozaki Reina, Noguchi Masato, Fujisawa Shouta, Katayama Hidekazu, Moroder Luis, Ando Setsuko, Okumura Masaki, Inaba Kenji, Hojo Hironobu, Iwaoka Michio	4. 巻 1
2. 論文標題 Characterization and optimization of two-chain folding pathways of insulin via native chain assembly	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42004-018-0024-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shimodaira Shingo, Takei Toshiki, Hojo Hironobu, Iwaoka Michio	4. 巻 54
2. 論文標題 Synthesis of selenocysteine-containing cyclic peptides via tandem N-to-S acyl migration and intramolecular selenocysteine-mediated native chemical ligation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 11737 ~ 11740
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8CC06805D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 荒井堅太, 岩岡道夫	4. 巻 54
2. 論文標題 インスリンの高次構造形成過程の解明 - インスリン製剤の簡便な化学合成への展開	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 1135-1139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 荒井堅太, 岩岡道夫	4. 巻 73
2. 論文標題 インスリンの簡便な化学合成法の開発 - 未来の糖尿病治療への期待	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 化学	6. 最初と最後の頁 29-33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arai Kenta, Tashiro Ayako, Osaka Yuui, Iwaoka Michio	4. 巻 22
2. 論文標題 Glutathione Peroxidase-Like Activity of Amino-Substituted Water-Soluble Cyclic Selenides: A Shift of the Major Catalytic Cycle in Methanol	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 354 ~ 354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules22030354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Arai Kenta, Takei Toshiki, Okumura Masaki, Watanabe Satoshi, Amagai Yuta, Asahina Yuya, Moroder Luis, Hojo Hironobu, Inaba Kenji, Iwaoka Michio	4. 巻 56
2. 論文標題 Preparation of Selenoinsulin as a Long-Lasting Insulin Analogue	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Angew. Chem., Int. Ed.	6. 最初と最後の頁 5522 ~ 5526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201701654	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Reina Shinozaki, Michio Iwaoka	4. 巻 18
2. 論文標題 Effects of Metal Ions, Temperature, and a Denaturant on the Oxidative Folding Pathways of Bovine α -Lactalbumin	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int. J.Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 1996 ~ 1996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18091996	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimodaira Shingo, Asano Yuki, Arai Kenta, Iwaoka Michio	4. 巻 56
2. 論文標題 Selenogluthathione Diselenide: Unique Redox Reactions in the GPx-Like Catalytic Cycle and Repairing of Disulfide Bonds in Scrambled Protein	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 5644 ~ 5653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.7b00751	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arai Kenta, Ueno Haruhito, Asano Yuki, Chakrabarty Gaurango, Shimodaira Shingo, Mugesh Govindasamy, Iwaoka Michio	4. 巻 19
2. 論文標題 Protein Folding in the Presence of Water-Soluble Cyclic Diselenides with Novel Oxidoreductase and Isomerase Activities	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 207 ~ 211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201700624	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Iwaoka Michio, Suzuki Toshiki, Shoji Yuya, Dedachi Kenichi, Shimosato Taku, Minezaki Toshiya, Hojo Hironobu, Onuki Hiroyuki, Hirota Hiroshi	4. 巻 31
2. 論文標題 Development of SAAP3D force field and the application to replica-exchange Monte Carlo simulation for chignolin and C-peptide	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Comput. Aided Mol. Design	6. 最初と最後の頁 1039 ~ 1052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10822-017-0084-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 K. Yoshida, T. Shimosato, M. Iwaoka
2. 発表標題 Molecular simulation of short peptides using the SAAP force field: Effects of a distance-dependent dielectric constant.
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三辻匠海, 篠崎玲奈, 岩岡道夫
2. 発表標題 水溶性セレン酸化剤を用いたウシ α -ラクトグロブリンの酸化的フォールディング経路の解析
3. 学会等名 第45回有機典型元素化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Iwaoka
2. 発表標題 Chemical synthesis of selenopeptides with modified functions
3. 学会等名 The 7th International Selenium Conference (Se2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Iwaoka
2. 発表標題 Chemical synthesis of insulin via native chemical assembly
3. 学会等名 VII Encontro sobre Enxofre, Selenio e Telurio and 7th Workshop of SeS Redox and Catalysis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S. Shimodaira, K. Katsumata, D. G. Churchill, M. Iwaoka
2. 発表標題 . Synthesis and evaluation of thioredoxin reductase model cyclic dipeptides
3. 学会等名 28th International Symposium on the Organic Chemistry of Sulfur (ISOCS-28) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Iwaoka
2. 発表標題 Characterization of oxidative folding pathways of disulfide-containing proteins using a water-soluble selenoxide reagent
3. 学会等名 28th International Symposium on the Organic Chemistry of Sulfur (ISOCS-28) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩岡道夫
2. 発表標題 セレノペプチドの設計と合成
3. 学会等名 第4回日本セレン研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荒井堅太, 岩岡道夫
2. 発表標題 インスリンおよびセレノインスリンの化学合成と生物活性
3. 学会等名 第45回有機典型元素化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩岡道夫, 荒井堅太
2. 発表標題 セレノペプチド創薬 セレノインスリンの化学合成
3. 学会等名 イノベーションジャパン2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 M. Iwaoka
2. 発表標題 Redox chemistry of selenocysteine-containing peptides
3. 学会等名 The 6th Workshop of SeS Redox and Catalysis (WSeS-6) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩岡道夫
2. 発表標題 セレン含有ペプチド、タンパク質の合成
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 M. Iwaoka
2. 発表標題 Selenopeptide chemistry toward antioxidant drug discovery
3. 学会等名 DAE-BRNS Symposium on Selenium Chemistry & Biology (SSCB-2017) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 勝間田憲志、下平伸吾、岩岡道夫
2. 発表標題 チオレドキシソレダクターゼ活性中心のモデルペプチド合成の検討
3. 学会等名 第44回有機典型元素化学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大野拓也、下平伸吾、岩岡道夫
2. 発表標題 L-セレンスレオニンを用いた不斉合成反応の検討
3. 学会等名 第44回有機典型元素化学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 下平伸吾、武居俊樹、北條裕信、岩岡道夫
2. 発表標題 環状セレンペプチドによるグルタチオンペルオキシダーゼ活性中心のモデル化
3. 学会等名 第44回有機典型元素化学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 下平伸吾、勝間田憲志、岩岡道夫
2. 発表標題 チオレドキシニンレダクターゼの活性中心を模倣したジペプチドの合成
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 M. Iwaoka, K. Arai	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Royal Society of Chemistry	5. 総ページ数 457
3. 書名 Compounds in Biology and Medicine	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Press Release: 新規人工インスリン「セレノインスリン」の化学合成と機能解明に成功 http://www.protein.osaka-u.ac.jp/achievement/press-release 新規人工インスリン「セレノインスリン」の化学合成と機能解明に成功 https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2017/04/press20170411-01.html セレン原子が切り開く、インスリン化学合成と機能の向上を目指した新しい道筋 https://academist-cf.com/journal/?p=4501</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----