

## 効率的な環状ペプチドの化学-酵素ハイブリッド合成法を開発

～環境調和性の高い環状ペプチド製造法の発展に期待～

### ポイント

- ・ペプチド化学合成と酵素による環化反応をシームレスに行う環状ペプチド合成法を開発。
- ・野生型酵素の探索と論理的な酵素改変により、合成できる環状ペプチドの多様性を拡張。
- ・非リボソームペプチド環化酵素を生体触媒として応用する開発研究の加速に期待。

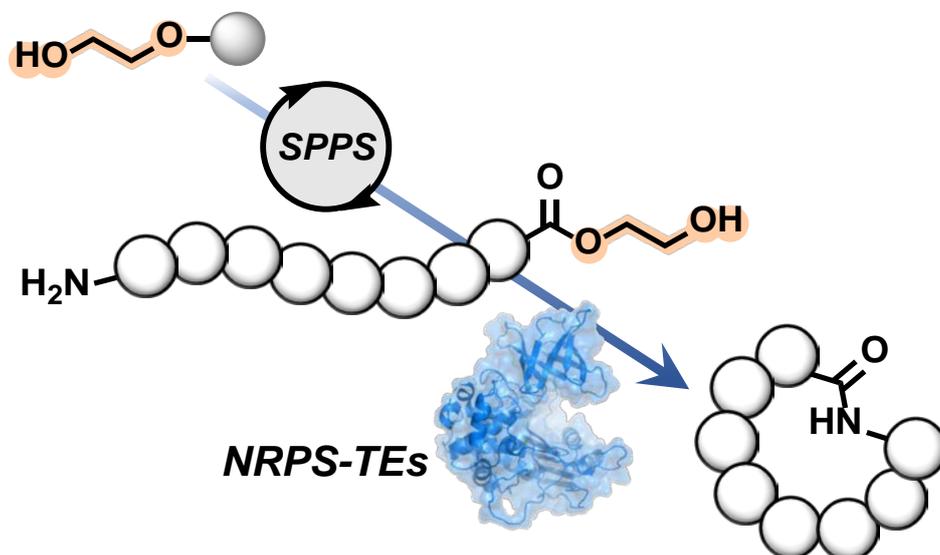
### 概要

北海道大学大学院薬学研究院の脇本敏幸教授及び松田研一講師の研究グループは、非リボソームペプチド<sup>\*1</sup>環化酵素を用いて環状ペプチドを効率的に合成する化学-酵素法を開発しました。

ペプチドの環化反応は多量体化反応と競合する難度の高い反応であり、なかでも組織移行性に優れる10残基程度以下の短いペプチドの環化は、有機合成的にも酵素的にも困難です。一方、これまで研究グループは新しいタンパク質ファミリーの非リボソームペプチド環化酵素を世界に先駆けて発見し、その詳細な機能解析を行ってきました。本研究では、これまでボトルネックとなっていた煩雑な基質合成法を改良し、ペプチド固相合成と酵素による環化反応をシームレスに実施できる環状ペプチドの化学-酵素合成法を確立しました。さらに、野生型酵素の探索や論理的な酵素触媒の改変により、合成できる環状ペプチドの多様性を拡張しました。

今回開発した方法は、環境調和性の高い環状ペプチド製造に向けた技術基盤を提供します。また多数の基質を簡便に調製可能となったことから、今後、非リボソームペプチド環化酵素を生体触媒として応用する開発研究が一層加速することが期待されます。

なお、本研究成果は、2023年1月13日（金）公開の Journal of the American Chemical Society 誌にオンライン掲載されました。



ペプチド固相合成と酵素環化反応をシームレスに繋ぐ環状ペプチド合成法

## 【背景】

環状ペプチドは鎖状ペプチドに比べて標的特異性や生体膜透過性、分解酵素に対する耐性が優れる場合が多く、実際に、生物活性をもつペプチド性天然物や、ペプチド医薬品の多くが環状の骨格を有します。ところがペプチドの環化反応は多量体化反応と競合するため難度の高い反応であり、特に組織移行性に優れる 10 残基程度以下の短いペプチドの環化は、有機合成的にも酵素的にも困難です。

一方で、免疫抑制剤シクロスポリンや、ダプトマイシンやポリミキシンなどの抗菌リポペプチドに代表される非リボソームペプチドは 4~15 残基程度の、比較的サイズの小さな環状骨格を有しています。このため、これら環状ペプチドの生合成過程において環化を担う「非リボソームペプチド環化酵素」は短鎖ペプチドの環化に適した触媒と考えられます。しかし、これら環化酵素は基質の C 末端に非ペプチド性の脱離基を要求するために基質合成が煩雑であり、このことが酵素の詳細な機能解析や実用化の妨げとなっていました。このような背景のもと、研究グループは放線菌<sup>2</sup> から新しいペプチド環化酵素ファミリー PBP-type TE<sup>3</sup> を独自に発見し、その寛容な基質選択性を明らかにしてきました（【関連するプレスリリース】参照）。

## 【研究手法】

PBP-type TE は基質の脱離基に対しても寛容な選択性を示します。本研究ではこの性質を利用し、これまでボトルネックだった脱離基を付加する合成ステップを回避した、簡便かつ高収率な基質合成法を開発しました。本手法により多数の基質ペプチドを迅速に合成し、代表的な PBP-type TE である SurE の基質選択性を *in vitro*<sup>4</sup> で詳細に解析しました。また、公共のタンパク質データベースから PBP-type TE を網羅的に探索し、相同性ネットワーク解析<sup>5</sup> によって、これらが互いに基質選択性の異なる複数のサブグループに分類できることを見出しました。AlphaFold2<sup>6</sup> を用いて、基質選択性の異なる PBP-type TE の立体構造モデルを作製し、これに基づいて SurE に変異を導入することで、SurE の基質選択性を論理的に改変しました。

## 【研究成果】

従来の基質合成スキームでは、液相で脱離基を縮合する際に分離困難な立体異性体の副産物が生じる問題がありました（図 1 上段）。そこで、酵素反応の脱離基となり得る化合物をあらかじめ担持した樹脂上でペプチド固相合成 (SPPS)<sup>7</sup> を行うことで、液相での縮合反応を回避することにしました。検討の結果、エチレングリコール (EG) を担持した樹脂上でペプチドを合成することで、脱離基の縮合反応を回避しつつ、C 末端に脱離基を有するペプチドを 80% 以上の高収率で簡便に合成できることが分かりました（図 1 下段）。得られるペプチドは純度が高いため、液体クロマトグラフィー (LC) による精製工程を省くことができ、基質合成にかかる手間と精製に必要な有機溶媒廃液を大幅に削減できました。SurE は EG を脱離基として許容し、効率よく環状ペプチドを与えました。以上により、ペプチド固相合成と酵素による環化反応をシームレスに実施できる環状ペプチドの化学-酵素合成法を確立しました。

確立した方法により多数の基質ペプチドを合成し、SurE の基質選択性を網羅的に検証しました。その結果、SurE は基質 C 末端にグリシンや電荷をもつ残基を受け入れない一方で、基質のそれ以外の部分に対しては非常に寛容な選択性を示すことが判明しました。特に、内部に様々なサイズのポリエチレングリコールを含む非ペプチド性の基質をも効率よく環化しました。このことから SurE は非ペプチド性中分子の環化反応にも広く適用できる可能性があることが示唆されました。

SurE は基質 C 末端残基に対して一定の選択性を示したことから、確立した環状ペプチドの化学-酵素

合成の適用範囲は限定的でした。そこで、SurE の選択性を相補しうるホモログ酵素を公共のタンパク質配列データベースから網羅的に探索しました。その結果見いだされた 600 種類以上の PBP-type TE は、選択性に依りて多数のグループに分類できました。中でも WolJ は SurE とは明確に異なる選択性を有し、SurE が受け入れなかった C 末端にグリシンや塩基性アミノ酸を有するペプチドを効率的に環化しました。また、タンパク質立体構造モデルの解析から選択性の要因となる残基を同定し、たった一残基の変異により、野生型 SurE が全く環化できなかった基質を効率よく環化できる改変酵素の作製にも成功しました。選択性の異なるホモログ酵素の探索と、論理的な酵素改変という 2 つの戦略により、開発した化学-酵素合成法の適用範囲を大きく拡張しました。実際、本法を用いて複数種類の抗菌ペプチドやその類縁体を効率よく合成可能なことを実証しました。

### 【今後への期待】

本研究で開発した化学-酵素合成法は、環境調和性の高い環状ペプチド製造法の確立に向けた大きな足掛かりになると考えられます。基質ペプチドを、LC 精製を介さずに高純度に得られるため、合成スケールの大規模化も比較的容易であると考えられます。また、本手法によって多数の基質の調製が簡便に行えるため、今後、非リボソームペプチド環化酵素を生体触媒として応用する開発研究が一層加速することが期待されます。

### 【謝辞】

本研究は、文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「生合成リデザイン」、学術変革領域研究「予知生合成科学」、基盤 B (16H06448、18H02581、21H02635)、若手研究 (19K16390、22K15302)、特別研究員奨励費 (22J13818) 国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 「革新的中分子創薬技術の開発」、国立研究開発法人科学技術振興機構 (JST)、A-STEP、ACT-X 「生命と化学」、北海道大学国際連携研究教育局バイオサーフェス創薬グローバルステーション、旭硝子財団、内藤記念科学振興財団、上原記念生命科学財団、住友財団、第一三共生命科学研究振興財団の支援を受けて行われました。

### 【関連するプレスリリース】

- ①北海道大学・東京大学共同プレスリリース「非リボソームペプチドの環化機構を解明～ペプチド環化生体触媒の開発に期待～」  
発表日：2020 年 5 月 5 日  
URL：[https://www.hokudai.ac.jp/news/pdf/200507\\_pr.pdf](https://www.hokudai.ac.jp/news/pdf/200507_pr.pdf)
- ②北海道大学プレスリリース「ペニシリン結合タンパク質によるペプチド環化～D-アミノ酸含有環状ペプチドの効率的合成に期待～」  
発表日：2018 年 6 月 18 日  
URL：[https://www.hokudai.ac.jp/news/180618\\_pr.pdf](https://www.hokudai.ac.jp/news/180618_pr.pdf)

## 論文情報

論文名 Streamlined Chemoenzymatic Synthesis of Cyclic Peptides by Non-ribosomal Peptide Cyclase (非リボソームペプチドによる環状ペプチドの効率的な化学-酵素合成)  
著者名 小林雅和<sup>1</sup>、藤田 慧<sup>1</sup>、松田研一<sup>2,3\*</sup>、脇本敏幸<sup>2,3\*</sup> ( <sup>1</sup>北海道大学大学院生命科学院、<sup>2</sup>北海道大学大学院薬学研究院、<sup>3</sup>北海道大学国際連携研究教育局バイオサーフェス創薬グローバルステーション) (\*共同責任著者)  
雑誌名 Journal of the American Chemical Society (化学全般の専門誌)  
DOI 10.1021/jacs.2c11082  
公表日 2023年1月13日(金)(オンライン公開)

## お問い合わせ先

北海道大学大学院薬学研究院 教授 脇本敏幸(わきもととしゆき)

TEL 011-706-3239 FAX 011-706-3922 メール wakimoto@pharm.hokudai.ac.jp

URL <https://www.pharm.hokudai.ac.jp/tennen/>

北海道大学大学院薬学研究院 講師 松田研一(まつだけんいち)

TEL 011-706-3241 FAX 011-706-3922 メール kematsuda@pharm.hokudai.ac.jp

## 配信元

北海道大学社会共創部広報課(〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目)

TEL 011-706-2610 FAX 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

## 【参考図】

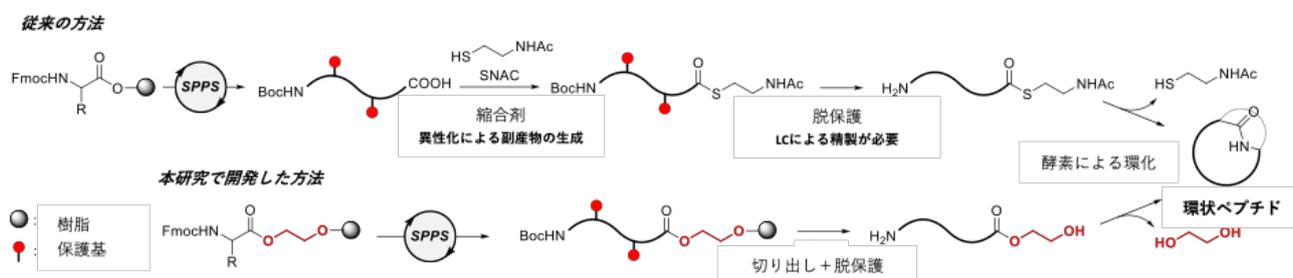


図1. 従来の基質合成法(上段)と本研究で開発した合成法(下段)の比較

## 【用語解説】

- \* 1 非リボソームペプチド … リボソーム以外の仕組みによって合成されるペプチドの総称。
- \* 2 放線菌 … 様々な環境に生息するグラム陽性細菌の一種。生物活性物質を産生する能力が高く、これまで数多くの有用天然物が放線菌から発見されてきた。
- \* 3 PBP-type TE … 当研究グループが独自に発見し、2018年に報告した新しいタイプのペプチド環化酵素。ペニシリン結合タンパク質(PBP)にアミノ酸配列相同性を示す。
- \* 4 *in vitro* … 試験管内で組換え酵素と基質及び必要な補酵素類を混ぜ合わせることで酵素反応を検証する実験方法。系中の化合物を種々変更することで酵素機能を詳細に解析できる。
- \* 5 相同性ネットワーク解析 … 複数のタンパク質のアミノ酸配列を総当たりで比較し、閾値よりも高い相同性を有するタンパク質同士をネットワーク化して表示する解析方法。閾値を適切に設定することで、性質ごとにタンパク質を分類できる。

- \* 6 AlphaFold2 … タンパク質の一次配列から立体構造を予想する構造計算プログラム。
- \* 7 ペプチド固相合成 (SPPS) … カルボキシル基を介して不溶性の樹脂に結合したアミノ酸に、側鎖を保護した Fmoc 保護アミノ酸の縮合と Fmoc 基の脱保護を順次繰り返すことで、樹脂上でペプチドを合成する手法。