

令和 2 年 8 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14396

研究課題名(和文) 生物合成系を模倣したペプチド化学合成法の開発と応用

研究課題名(英文) Development and applications of biomimetic peptide synthesis

研究代表者

倉永 健史 (Kuranaga, Takefumi)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：70625201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では生合成を模倣したペプチド化学合成法の開発研究を行なった。また生合成模倣化学合成法の有用性を実証する応用研究として、本手法を用いるペプチド系天然物の生合成研究を行なった。本手法を駆使して得られた化学合成基質と大腸菌において異種発現させた生合成酵素とのin vitro反応による生合成メカニズム解明研究を種々行い、新規酵素の同定や機能解明に成功するなどの成果をあげた。さらに、本研究に用いる化学合成を駆使した新規ペプチド系天然物チオアミコラミド類の完全構造決定にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は学术界・産業界いずれでも当然のように文字通り「不自然」な向きにペプチド鎖が伸長されている現在の化学合成を一新しうる重大な意義を持つ研究である。また現代における未知の生合成酵素メカニズム解明は、遺伝子操作や配列相同性検索などから芋づる式に未知の天然物の発見を導く。そのため本研究は化学合成を足がかりとした生合成メカニズム解明研究から、新規有用生物活性化合物(新規創薬リード)探索研究としての展開・社会への貢献が期待される研究でもある。

研究成果の概要(英文)：In this project, the development of a new methodology for the biomimetic peptide synthesis and its applications to the biosynthetic studies on the structurally unique peptidic natural products were achieved. The new methodology has been efficiently utilized in the biosynthetic studies on the peptidic natural products, namely, cyclic peptides surugamides A-E, a linear peptide surugamide F, and a hybrid peptide-polyketide natural product kasumigamide. In addition to this, the complete structural determination of the new peptidic natural products, thioamycalamides A-E, were also accomplished by the chemical syntheses program in this project.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ペプチド 生合成 有機合成

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

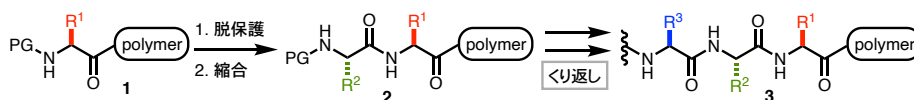
### 1. 研究開始当初の背景

ペプチドはカルボン酸とアミンの脱水縮合の繰り返しにより合成される「単純なもの」である。単純に混合しただけでは脱水縮合を起こさないカルボン酸とアミンに対し、ペプチド化学合成では各種縮合剤がアミド化に広く用いられるが、異性化ペプチドの生成など種々の問題が潜在する。これらの副反応は高性能な縮合剤の使用や、生合成とは逆向きの「ペプチドC末端→N末端」の順でアミノ酸を連結していくことである程度は回避できるものの、その完全制御は困難であった。また高収率でのペプチド化学合成の実現には、通常アミンに対しカルボン酸・縮合剤を過剰量用いることで反応を促進させ、異性化を抑制する必要がある。さらに過剰に用いたカルボン酸は異性化しており再利用できないため、非常に無駄の多い手法となっていた。「単純な反応」でありながら多くの改善点を残していた。

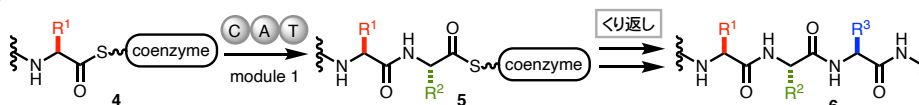
### 2. 研究の目的

長い歴史のなかで化学合成時の問題回避のために生合成とは逆向きの「ペプチドC末端→N末端」の順でアミノ酸を連結することが当然のこととなっているペプチド合成に対し、本研究は従来法とは大きく異なるアプローチで生合成模倣ペプチド化学合成法を開発し、ペプチド化学合成時の問題点を克服することを目的とする(図1)。また、生物合成系を模倣した化学合成法においては各化学合成中間体がそれぞれの生合成中間体と類似の構造を有するため、効率的な生合成中間体の化学合成供給が可能となる。本手法をペプチド系天然物の全合成や生合成メカニズム解明研究に効率的に用いることによる、その有用性の実証実験も行う。

#### a) 一般的なペプチド化学合成法例(固相合成)



#### b) ペプチド生合成の例(非リボソームペプチド)



#### c) 本研究

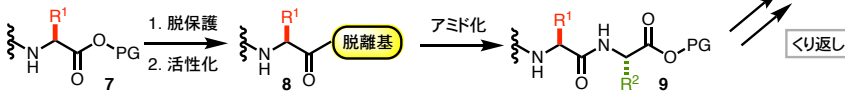


図1. 研究概要

### 3. 研究の方法

本研究では、まずペプチドC末端アミノ酸C $\alpha$ 位の異性化を生じない実用的アミド化の開発を行う。さらに開発したアミド化を駆使し、C末端化学選択的活性化、アミド化、C末端保護基の除去...の繰り返しによりペプチド鎖をN末端→C末端へと伸長する。従来のペプチド化学合成とは逆向きの、生物合成系を模倣したペプチド化学合成法の開発と応用を行う。

巨大酵素複合体により多様な構造変換を経て得られる非リボソームペプチド系天然物は、通常その多段階合成の最終産物のみが生物より抽出される。そのため生合成経路内で特殊構造の合成を担う未知の酵素単独の詳細解明は困難である。本研究で開発する生物合成系を模倣したペプチド化学合成法においては各ペプチド鎖伸長反応の化学合成中間体がそれぞれの生合成中間体と類似の構造を有するため、効率的に1段階ごとの生合成中間体の化学合成供給を行うことが可能となる。この点に着目し、機能未解明の生合成酵素に対しまずその周囲のゲノム解析から予想される通常得られない生合成中間体を化学合成により供給する。続いて、化学合成した想定生合成中間体と、異種発現により得る生合成酵素との *in vitro* 反応を行うことで酵素単独の詳細解明研究が可能となる。

具体的には、脇本ら(北海道大学、研究代表者の前属研究室)が生合成遺伝子の取得に成功し、生合成酵素の異種発現系の確立を行っていたペプチド系天然物スルガミド類(10および11, 図2)やカスミガミド(20, 次頁, 図4)を研究対象とし、その生合成模倣全合成、続けて生合成機構解明研究を行う。

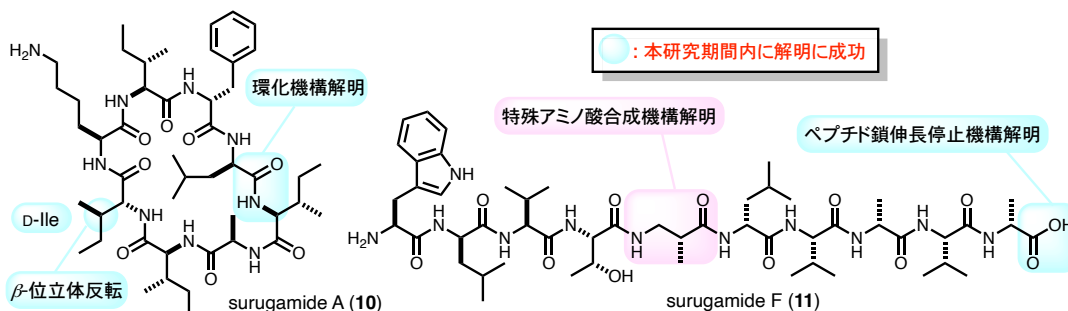
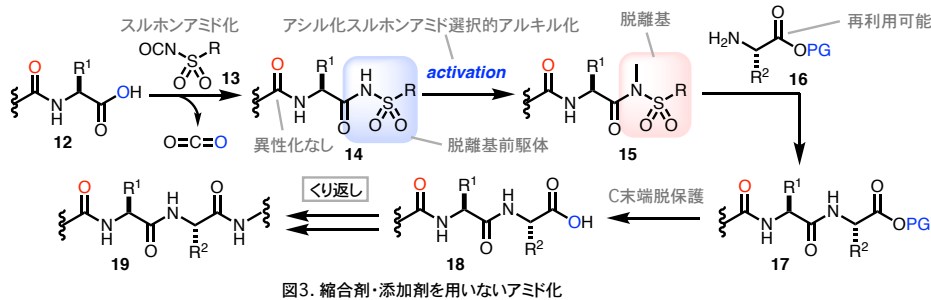


図2. スルガミドA (10)およびF (11)の構造

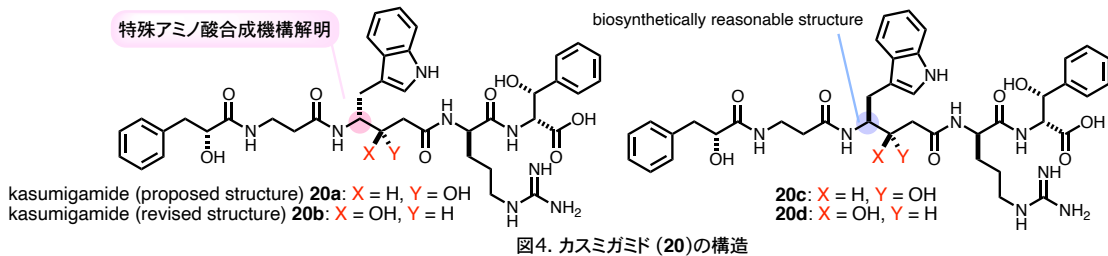
#### 4. 研究成果

平成 30 年度は、まず従来の縮合剤を用いるカルボン酸の活性化(脱水)に対し、イソシアネートの脱炭酸を伴うスルホンアミド化(12→14, 図 3)、アシル化スルホンアミド選択的活性化(14→15)、アミンとの反応(15→17)の一連の構造変換により、ペプチド C 末端アミノ酸 C $\alpha$  位の異性化を生じることなくアミド化する手法を開発した。研究期間内において基質適用範囲の確認、NMR 実験による異性化を生じないメカニズム解析を行い、ペプチド合成に実用化可能である知見を得た。



開発したアミド化のペプチド合成への応用として、研究対象とした天然物群のなかでも環状ペプチド天然物スルガミド A-E および鎖状ペプチド天然物スルガミド F について、その化学合成を駆使した生合成メカニズム解明研究を行った。化学合成基質と大腸菌において異種発現させた生合成酵素との *in vitro* 反応によるペプチド鎖伸長の停止メカニズム解明研究を行った結果、通常のリボソームペプチド合成酵素(NRPS)のペプチド鎖伸長の停止を担う酵素(TE)とは大きく異なる部位に存在する酵素 SurE により環状ペプチド天然物スルガミド A-E が得られることを明らかとし、これまで未解明であった環化機構の解明に成功した。また環状ペプチド天然物スルガミド A は、その遺伝子情報解析から新規の特殊アミノ酸(D-Ile)生合成メカニズムを有すると示唆されていたが、我々の全合成により提唱構造中の D-Ile は正しくは D-allo-Ile であることが判明した。当初の計画とは異なるものの、特殊アミノ酸の生合成に着目し研究を行なったことによりその訂正構造を報告する結果となった。

令和元年度は鎖状ペプチド系天然物カスミガミド (20, 図 4) について、その化学合成を駆使した生合成メカニズム解明研究を行った。20 は遺伝子情報解析からは通常のアミノ酸異性化酵素の存在が確認されず、L-Trp 由来の 20c または 20d として生合成されることが推測されるにも関わらず 20a が提唱構造として報告されており、未知の特殊アミノ酸生合成メカニズムの存在が示唆される化合物であった。



自然界からは得られない 20 の生合成中間体を化学合成供給し、異種発現により得る生合成酵素との *in vitro* 反応による特殊アミノ酸生合成メカニズム解明を計画していたが、その化学合成の過程においてターゲットとしていた特殊アミノ酸部位の天然物の構造決定に誤りがあることが判明した。生合成メカニズム解明を行うにあたり、そもそも生物が合成している生成物の構造の正解がわからないという想定外の問題に直面したが、我々は 20a-d の化学合成(世界初の全合成)と天然物標品との比較(図 5)によりその構造が提唱構造 20a や L-Trp 由来の 20c や 20d でもなく 20b であることを正確に明らかにした。本成果は、これまで示唆にとどまっていた新規の特殊アミノ酸生合成メカニズムの存在を実証するものでもあった。

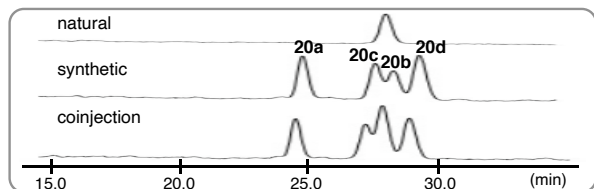


図5. 化学合成と標品の比較によるカスミガミド (20) の構造改訂

前年度までの環状ペプチド天然物スルガミドに関する研究の中で独自に同定し、報告していた新規ペプチド環化酵素 SurE (T. Kuranaga et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018, 57, 9447.) についても、引き続きその機能解明研究を行った。SurE は生産生物もアミノ酸配列も全く異なる鎖状ペプチド天然物カスミガミド(20)誘導体の環化能も有することが示され、ペプチド環化触媒として幅広く応用可能であることが確認された。

また研究期間内において掛谷ら(京都大学)により新規ペプチド系天然物チオアミコラミド A-E (**21-25**, 図 6)が発見された。チオアミコラミド類はその生合成遺伝子未同定ながらもその構造的特徴から非リボソームペプチド合成酵素(NRPS)により生合成されると想定されるものの、その生合成にはペプチド C 末端部位の構造など通常の NRPS による構造変換に加え、イレギュラーな追加修飾が必要な平面構造を有していた。一方、その立体化学構造については NMR や質量分析などの通常の分光学的手法だけでは構造決定不可能な部位を有しており、論文発表できていなかった。

本研究の対象とするべき特異なメカニズムにより生合成されると推定される化合物であり、また本研究で行う生合成模倣化学合成に必要なビルディングブロックが **21-25** の立体化学構造の解明研究にも利用可能であったため、研究期間内においてその化学合成を駆使した構造決定研究にも取り組んだ。現在までにその完全構造決定に成功し、掛谷らとともに論文発表を行なっている(*Org. Lett.* **2020**, *22*, 3014-3017.)。

現在は構造決定に用いたビルディングブロックを利用した **21-25** の生合成模倣全合成および化学合成を駆使した生合成メカニズム解明研究に取り組んでおり、今後それらの成果発表も予定している。

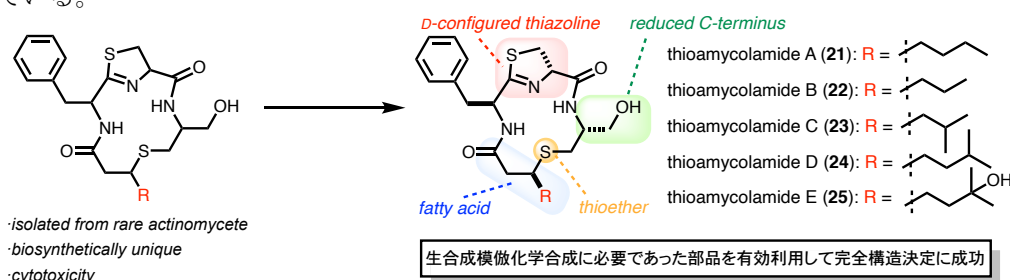


図6. チオアミコラミドA-F (**21-25**)の構造

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Chengqian Pan, Takefumi Kuranaga, Chao Liu, Shan Lu, Naoya Shinzato, Hideaki Kakeya                                   | 4. 巻<br>22              |
| 2. 論文標題<br>Thioamycolamides A-E, Sulfur-Containing Cyclolipopeptides Produced by the Rare Actinomycete <i>Amycolatopsis</i> sp. | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Org. Lett.  | 6. 最初と最後の頁<br>3014-3017 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1021/acs.orglett.0c00776  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Kenichi Matsuda, Takefumi Kuranaga, Toshiyuki Wakimoto  | 4. 巻<br>77              |
| 2. 論文標題<br>A new cyclase family catalyzing head-to-tail macrolactamization of non-ribosomal peptides                            | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>J. Synth. Org. Chem. Jpn.   | 6. 最初と最後の頁<br>1106-1115 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.5059/yukigoseikyokaisi.77.1106  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>松田研一、倉永健史、脇本敏幸  | 4. 巻<br>55              |
| 2. 論文標題<br>ペニシリン結合タンパク質によるペプチド環化  | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>ファルマシア  | 6. 最初と最後の頁<br>650-654   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.14894/faruawpsj.55.7_650  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Takahiro Jomori, Shuji Shiroyama, Yuji Ise, Hisanori Kohtsuka, Kenichi Matsuda, Takefumi Kuranaga, Toshiyuki Wakimoto | 4. 巻<br>73              |
| 2. 論文標題<br>Scrobiculosides A and B from the Deep-Sea Sponge <i>Pachastrella scrobiculosa</i>                                    | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>J. Nat. Med.  | 6. 最初と最後の頁<br>814-819   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/s11418-019-01315-6   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Kenichi Matsuda, Takefumi Kuranaga,* Ayae Sano, Akihiro Ninomiya, Kentaro Takada, Toshiyuki Wakimoto | 4. 巻<br>67            |
| 2. 論文標題<br>The Revised Structure of the Cyclic Octapeptide Surugamide A  | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Chem. Pharm. Bull.   | 6. 最初と最後の頁<br>476-480 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1248/cpb.c19-00002  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Anna L. Vagstad, Takefumi Kuranaga, Salome Puentener, Vijay Pattabiraman, Jeffrey W. Bode, Joern Piel             | 4. 巻<br>58              |
| 2. 論文標題<br>Introduction of D-Amino Acids in Minimalistic Peptide Substrates by an S-Adenosyl-L-Methionine Radical Epimerase | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Angew. Chem. Int. Ed.   | 6. 最初と最後の頁<br>2246-2250 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/anie.201809508  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Kenichi Matsuda, Masakazu Kobayashi, Takefumi Kuranaga, Kentaro Takada, Shigeki Matsunaga, Haruo Ikeda, Toshiyuki Wakimoto | 4. 巻<br>17              |
| 2. 論文標題<br>SurE is a trans-acting thioesterase cyclizing two distinct non-ribosomal peptides   | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Org. Biomol. Chem.   | 6. 最初と最後の頁<br>1058-1061 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1039/C8OB02867B   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Kuranaga Takefumi, Matsuda Kenichi, Sano Ayae, Kobayashi Masakazu, Ninomiya Akihiro, Takada Kentaro, Matsunaga Shigeki, Wakimoto Toshiyuki | 4. 巻<br>57                |
| 2. 論文標題<br>Total Synthesis of the Nonribosomal Peptide Surugamide?B and Identification of a New Offloading Cyclase Family                            | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Angewandte Chemie International Edition  | 6. 最初と最後の頁<br>9447 ~ 9451 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/anie.201805541   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Matsuda Kenichi, Kobayashi Masakazu, Kuranaga Takefumi, Takada Kentaro, Ikeda Haruo, Matsunaga Shigeki, Wakimoto Toshiyuki | 4. 巻<br>17                |
| 2. 論文標題<br>SurE is a trans-acting thioesterase cyclizing two distinct non-ribosomal peptides   | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Organic & Biomolecular Chemistry   | 6. 最初と最後の頁<br>1058 ~ 1061 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1039/C8OB02867B   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

|                                   |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>森本涼太, 倉永健史, 脇本敏幸, 掛谷秀昭 |
| 2. 発表標題<br>実用的inverseペプチド合成法の開発   |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第140年会            |
| 4. 発表年<br>2020年                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>スルガミド環化酵素SurEによる環状カスミガミドの合成  |
| 2. 発表標題<br>田地川千里 <sup>1</sup> , 松田研一 <sup>2</sup> , 倉永健史 <sup>3</sup> , 脇本敏幸 <sup>2</sup> |
| 3. 学会等名<br>第8回食品薬学シンポジウム  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Takefumi Kuranaga  |
| 2. 発表標題<br>Chemical Synthesis and Biosynthesis of Peptidic Natural Products |
| 3. 学会等名<br>日本化学会第100春季年会「若い世代の特別講演」(招待講演)                                   |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>倉永健史                       |
| 2. 発表標題<br>ものとり指向型化学合成                |
| 3. 学会等名<br>第54回天然物化学談話会 (受賞講演) (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2019年                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Takefumi Kuranaga  |
| 2. 発表標題<br>Chemical Synthesis and Biosynthesis of Scarce Natural Products                             |
| 3. 学会等名<br>International Congress on Pure & Applied Chemistry Langkawi (ICPAC Langkawi) (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2018年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

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