

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05841

研究課題名(和文) 抗菌環状ペプチドhypeptinの三次元構造および標的分子認識機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of 3D structure and target molecule-recognition mechanism of hypeptin, an antimicrobial cyclic peptide.

研究代表者

増田 裕一 (MASUDA, Yuichi)

三重大学・生物資源学研究所・准教授

研究者番号：90617755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： 抗菌環状ペプチドhypeptinの作用機序解明に用いる化合物供給を目的として、hypeptinの全合成研究を行った。

hypeptinのペプチド鎖伸長と環化反応の条件を検討するため、ヒドロキシ基を含まないアミノ酸で構成される構造単純化類似体を合成した。次に、hypeptinの全合成に用いるヒドロキシアミノ酸を立体選択的に合成した。合成したヒドロキシアミノ酸を含む8つのアミノ酸を固相法により伸長し、得られた鎖状ペプチドを液相で環化させた後に、側鎖保護基の除去を試みたが、ヒドロキシ基の保護に用いたベンジル基の除去が困難であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

hypeptinは、ペプチドグリカン前駆体を認識して結合し、細菌の細胞壁合成を阻害することから、耐性菌がでにくい。その作用機序の解明には、hypeptinの量的供給および誘導体化が不可欠であることから、その合成法の確立が急務の課題となっている。

本研究では、hypeptinの単純化類似体の合成を行うことにより、ペプチド鎖伸長および環化反応の最適条件を確立した。ヒドロキシアミノ酸は様々な天然由来生物活性物質に含まれていることから、本研究で確立した合成法が役立てられることが期待できる。

研究成果の概要(英文)： Synthetic study of hypeptin, an antimicrobial cyclic peptide, was conducted toward the elucidation of its action mechanism.

To investigate the conditions for peptide chain elongation and cyclization of hypeptin, we synthesized a structurally simplified analogue composed of amino acids without β -hydroxy groups. Next, we synthesized the β -hydroxy amino acids for the total synthesis of hypeptin. The eight amino acids including the synthesized β -hydroxy amino acids were elongated by a solid-phase peptide synthesis. After its cyclization in the solution-phase, the resultant macrocycle was subjected to removal of the protecting groups in the side chains. However, removal of the benzyl group, used for the protection for the β -hydroxy groups, was found to be difficult.

研究分野：農芸化学、生物有機化学、ペプチド化学、核磁気共鳴

キーワード：環状ペプチド 抗菌活性 全合成 ヒドロキシアミノ酸 ペプチド合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物活性環状ペプチドは、環状骨格により三次元的に配置されたアミノ酸残基を用いて、標的分子を特異的に認識することから、創薬資源として注目されている。しかしながら、環状ペプチドの三次元構造は、柔軟な環状骨格と様々な相互作用のバランスにより維持されているため、その合理的設計は困難である。従って、環状ペプチドの三次元構造ならびに分子認識に関する知見を蓄積し、これらの制御技術を確立することが望まれている。

天然由来の環状ペプチドには、特殊な化学構造により複雑な三次元構造を形成し、標的分子を特異的に認識するものがあり、緑膿菌 PB-6269 株が生産する hypeptin (図 1) はその好例である。hypeptin は、4 残基の環状デプシペプチドの N 末端に 4 残基の直鎖ペプチドが連結した構造であり、β ヒドロキシアミノ酸を 4 つ含むことを特徴としている¹。hypeptin は、ペプチドグリカン前駆体を認識して結合し、細菌の細胞壁合成を阻害することにより、グラム陽性菌に強い抗菌力を示すことが報告されている²。hypeptin に特有の環状構造およびアミノ酸残基が、三次元構造の形成および標的分子の認識においてどのような役割を果たしているかを解明することは、hypeptin のみならず環状ペプチドの薬剤設計に重要な知見を与える。

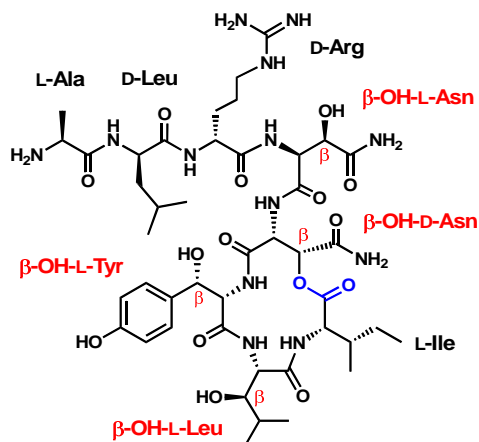


図 1 hypeptin の化学構造

2. 研究の目的

本研究では、hypeptin の特殊な環状構造およびアミノ酸残基が、三次元構造形成および標的分子認識において果たしている機能を、原子レベルで解明することを目的としている。

3. 研究の方法

- (1) 量的供給と類縁体合成を目的として、hypeptin の全合成を行う。
- (2) 合成した hypeptin の三次元構造を NMR により解析し、三次元構造モデルを提示する。
- (3) ペプチドグリカン前駆体と hypeptin との複合体構造を NMR により解析する。
- (4) hypeptin の類縁体を合成し、三次元構造 - 活性相関を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 構造単純化類縁体の合成

hypeptin のペプチド鎖伸長と環化反応の条件を検討するため、β ヒドロキシ基を含まないアミノ酸で構成される構造単純化類縁体を設計・合成した(図 2)。2-クロロトリチルリンカーを有する固相担体を用いて、アミノ酸を Fmoc 法により伸長した。D-Ser のアミノ基と、D-Ser の側鎖ヒドロキシ基に連結した Alloc-L-Ile のエステル結合との間で起こる副反応 (O→N アシル化転位) を避けるため、先に Fmoc-L-Asn(Trt)-OH の縮合 (図 2 の青矢印(3)) をしてから、D-Ser 側鎖ヒドロキシ基への Alloc-L-Ile-OH のエステル化 (図 2 の青矢印(4)) を行った。ペプチド鎖の伸長反応の終了後、環状部の L-Ile の Alloc 基を除去し、続いて弱酸性条件に附することにより、側鎖保護基を残したまま樹脂からの切り出しを行った。得られた直鎖ペプチドの環化反応を液相で行った後、全ての保護基を強酸性条件で除去することにより、構造単純化類縁体の合成を達成した。

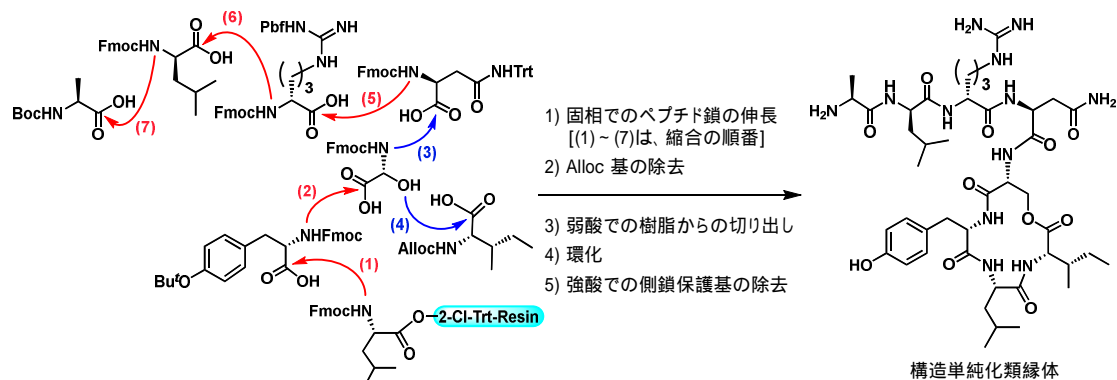


図 2 hypeptin の構造単純化類縁体の合成

(2) β ヒドロキシアスパラギンの合成

hypeptin の固相法を用いた全合成に用いる 2 種類の β ヒドロキシアスパラギン (β-OH-Asn) の立体選択的合成を行った (図 3)。 (±)-*trans*-epoxysuccinic acid を D-Arg とのジアステレオマー塩を形成させることにより光学分割した。得られた (2*R*,3*R*)-*trans*-epoxysuccinic acid に対するアンモニアの求核付加反応とそれに伴うエポキシドの開環によって、(2*S*,3*R*)-β-OH-Asp を合成した後、官能基の変換と保護を行い、(2*S*,3*R*)-β-OH-Asn 誘導体を合成した。一方、*cis*-epoxysuccinic acid に対してアンモニアを求核付加させ、得られた *threo*-β-OH-Asp のラセミ混合物を D-Lys とのジアステレオマー塩を形成させることにより光学分割した。その後、官能基の変換と保護によって、(2*R*,3*R*)-β-OH-Asn 誘導体を合成した。

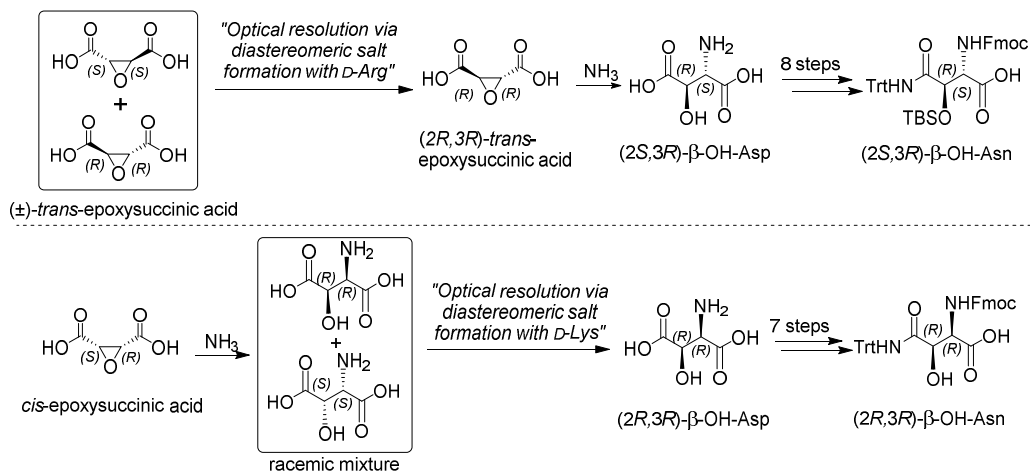


図 3 β ヒドロキシアスパラギン (β-OH-Asn) の合成

(3) hypeptin のペプチド鎖伸長と環化反応

合成した β ヒドロキシアミノ酸を含む 8 つのアミノ酸の固相法により伸長し、得られた鎖状ペプチドを液相で環化させた後に、側鎖保護基の除去を試みた (図 4)。しかし、β ヒドロキシロイシンと β ヒドロキシチロシンのヒドロキシ基の保護に用いたベンジル (Bn) 基の除去が困難であることが判明した。

一方で、β ヒドロキシアスパラギンのヒドロキシ基の保護に用いた *tert*-ブチルジメチルシリル (TBS) 基は容易に除去することができた。そこで、β ヒドロキシロイシンと β ヒドロキシチロシンのヒドロキシ基を TBS 保護したビルディングブロックを用いることにし、これらの合成を完了した。現在、新たに合成したビルディングブロックを用いて、ペプチドの伸長反応を進めている。

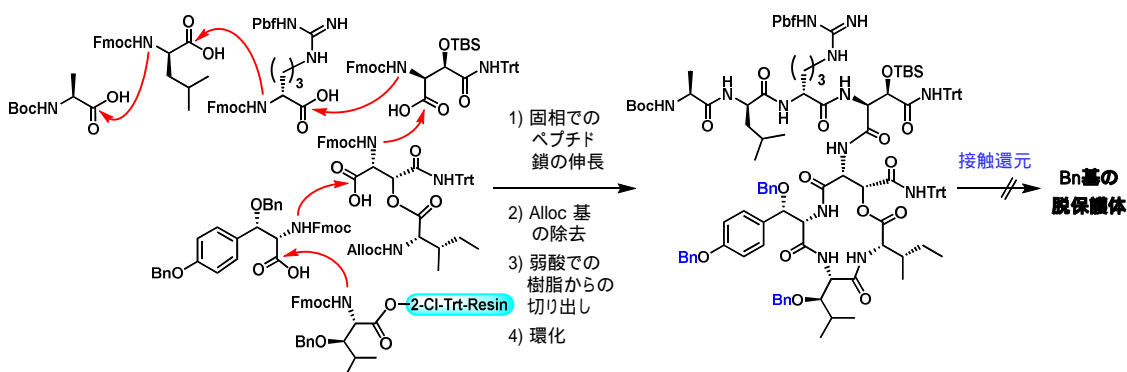


図 4 hypeptin の合成経路

[引用文献]

- 1) Shoji, J. *et al. J. Antibiot. (Tokyo)* **1989**, *42*, 1460.
- 2) 巻 秀樹 等, 日本化学療法学会雑誌 **2001**, *49 (S-A)*, 118.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Honda Masaya, Inagaki Minoru, Masuda Yuichi	4. 巻 81
2. 論文標題 Total synthesis of the cyclic pentapeptides PF1171B, D, E, and avellanins A, B, C with inhibitory activity against apolipoprotein B production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 153340 ~ 153340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2021.153340	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 Yoshida Yuka, Inagaki Minoru, Masuda Yuichi	4. 巻 e3308
2. 論文標題 Solid phase synthesis and bioactivity evaluation of cherimolacyclopeptide E	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Peptide Science	6. 最初と最後の頁 e3308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/psc.3308	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 Masuda Yuichi	4. 巻 85
2. 論文標題 Bioactive 3D structures of naturally occurring peptides and their application in drug design	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 24 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbaa008	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 Tanaka Fumiya, Shibata Kana, Monobe Yoko, Akagi Ken-ichi, Masuda Yuichi	4. 巻 28
2. 論文標題 Design and synthesis of β -strand-fixed peptides inhibiting aggregation of amyloid β -protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 115676 ~ 115676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2020.115676	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 Ohsawa Kosuke, Sugai Masato, Zhang Linnan, Masuda Yuichi, Yoshida Masahito, Doi Takayuki	4. 巻 84
2. 論文標題 Total Synthesis and Structural Revision of Cyclotetrapeptide Asperterrestide A	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 6765 ~ 6779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.9b00526	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19件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 ○片山 雄登, 稲垣 穰, 増田 裕一
2. 発表標題 抗菌環状ペプチドnicrophorusamide AとBの全合成と三次元構造解析.
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○橋詰 和記, 稲垣 穰, 増田 裕一
2. 発表標題 抗菌活性環状デプシペプチドhypeptinに含まれる -ヒドロキシアミノ酸の合成.
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ○Kazuki Hashizume, Tsubasa Itoh, Takahiro Aimi, Minoru Inagaki, Yuichi Masuda
2. 発表標題 Synthesis of -hydroxy amino acids constituting hypeptin, an antimicrobial cyclodepsipeptide.
3. 学会等名 第58回ペプチド討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○Yuto Katayama, Minoru Inagaki, Yuichi Masuda
2. 発表標題 Total synthesis of microphorusamide A and B, antibacterial cyclic peptides.
3. 学会等名 第58回ペプチド討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○片山 雄登, 稲垣 穰, 増田 裕一
2. 発表標題 抗菌環状ペプチドmicrophorusamide AとBの全合成.
3. 学会等名 日本農芸化学会 中部支部 第190回 例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○橋詰 和記, 伊藤 翼, 會見 貴宏, 稲垣 穰, 増田 裕一
2. 発表標題 抗菌活性環状ペプチドhypeptin に含まれる α -ヒドロキシアミノ酸類の合成.
3. 学会等名 日本農芸化学会 中部支部 第190回 例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○増田 裕一
2. 発表標題 天然由来ペプチドの活性発現に係わる三次元構造の解明と応用.
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○増田 裕一
2. 発表標題 天然由来ペプチドの活性発現に係わる三次元構造の解明と応用.
3. 学会等名 日本農芸化学会 中部支部 第188回 例会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ○Yuichi Masuda, Moeka Sano, Masaya Honda, Ken-ichi Akagi
2. 発表標題 NMR analysis of hydrogen bonds in PF1171F, a cyclic hexapeptide with insecticidal activity, under pseudo body 's internal environment.
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 ○Yuichi Masuda
2. 発表標題 Elucidation of important 3D structures for bioactivity of naturally occurring peptides.
3. 学会等名 23rd Korean Peptide and Protein Society Symposium (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 増田裕一, 土井隆行	4. 発行年 2020年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 193
3. 書名 CSJ Current Review 36 : 生体分子反応を制御する (共著. 13章を担当)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

創薬化学研究室の紹介ページ
<https://www.cc.mie-u.ac.jp/~masuda/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------