

# 環状ペプチドの化学酵素合成法

北海道大学 大学院薬学研究院 講師  
松田 研一

2023年12月8日

# 背景1

創薬資源として有望な中分子ペプチド

## 中分子ペプチドの利点

**大きな表面積：タンパク質間相互作用（PPI）に有利**

**合成が簡便：ペプチド固相合成によって調製可能**

## 中分子ペプチドの難点

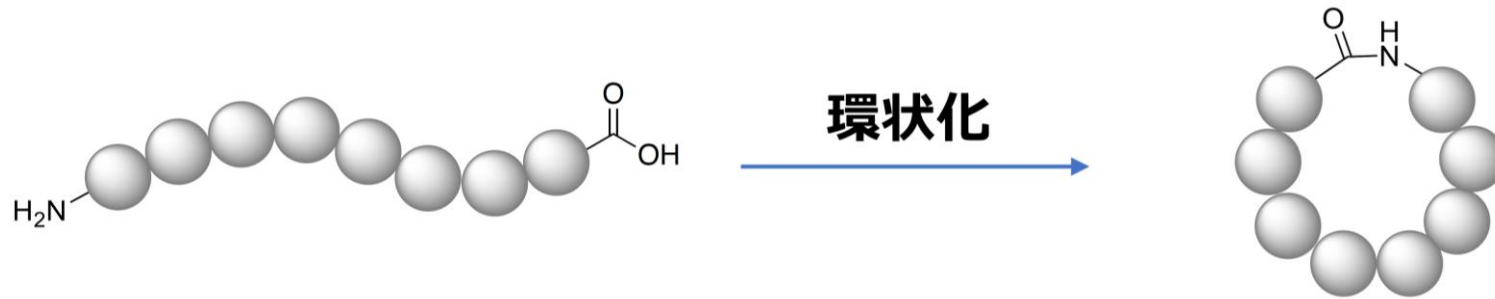
**低い細胞膜透過性：細胞内の標的分子への作用困難**

**代謝安定性：代謝酵素による分解**

# 背景1

創薬資源として有望な中分子ペプチド

**大環状化によって中分子ペプチドの難点を克服**



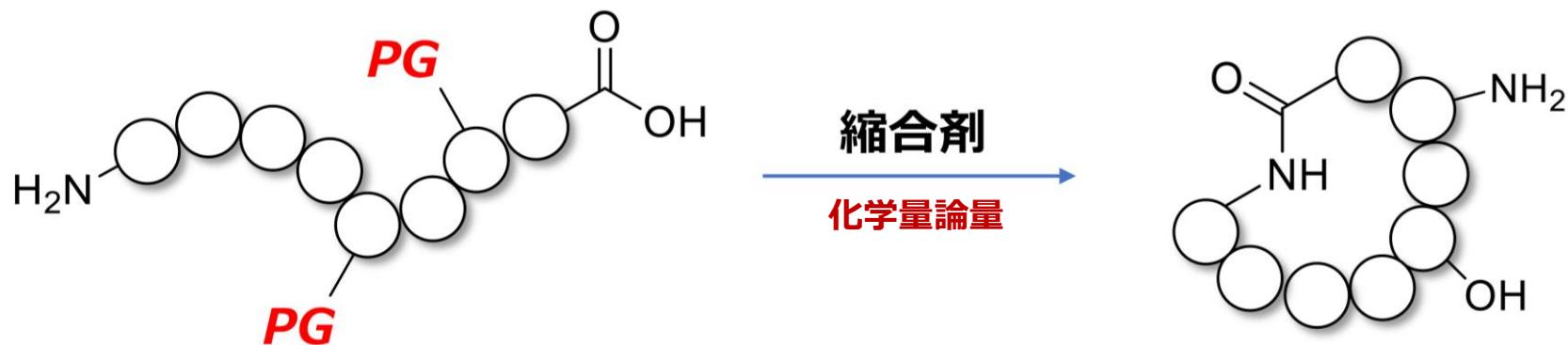
## 環状中分子ペプチドの利点

**細胞膜透過性：細胞内の標的分子への作用可能**

**代謝安定性：代謝酵素への抵抗性**

## ペプチド環化反応の問題点

縮合剤によるペプチド環化反応の課題



**分子内反応と分子間反応の競合：希釈条件が必要**

**C末端残基の異性化：分離困難な副産物の生成**

**環化点の位置選択性：保護基の着脱が必要**

## 酵素によるペプチド環化反応

温和な条件下で効率的なペプチド環化反応を実現



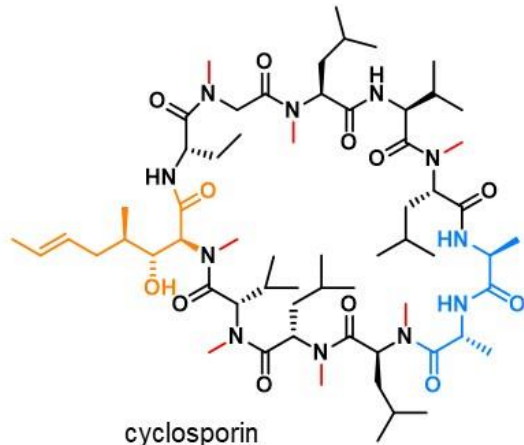
**分子内反応が優先して進行**

**立体異性体等の副生成物が生じない**

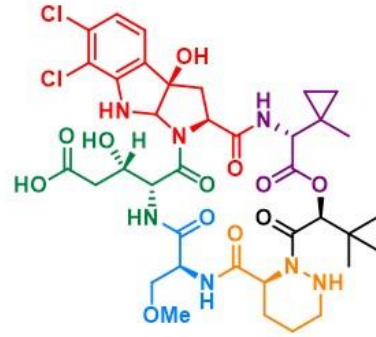
**保護基を用いることなく、高い位置選択性を実現**

**温和な条件下、水系溶媒中で反応が進行**

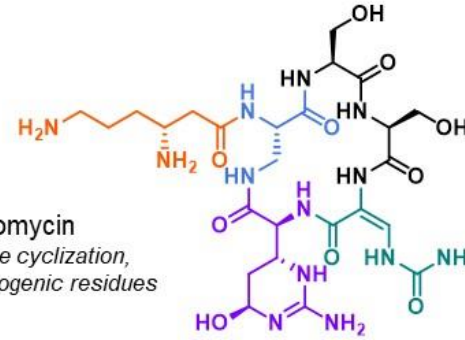
## 非リボソーム環状ペプチド



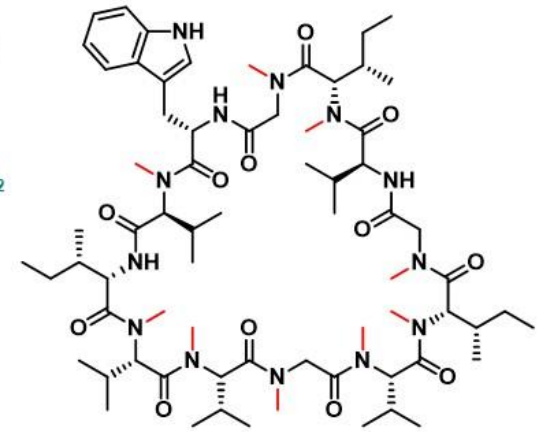
cyclosporin  
backbone cyclization, N-methylation  
nonproteinogenic residue



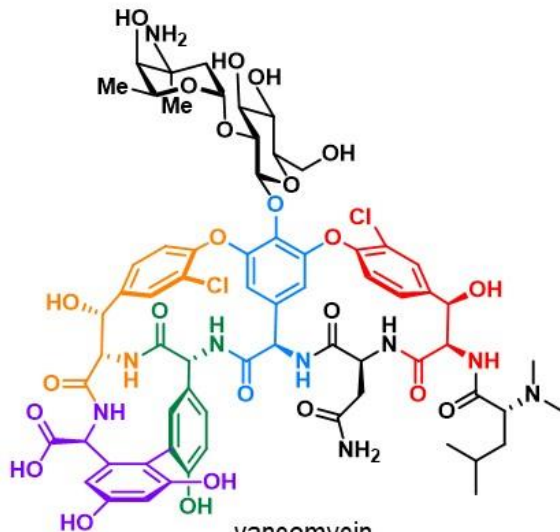
kutzneride  
backbone cyclization,  
nonproteinogenic residues



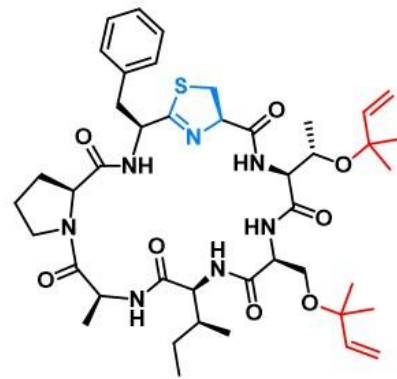
viomycin  
backbone cyclization,  
nonproteinogenic residues



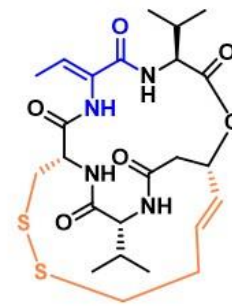
omphalotin A  
backbone cyclization,  
N-methylation



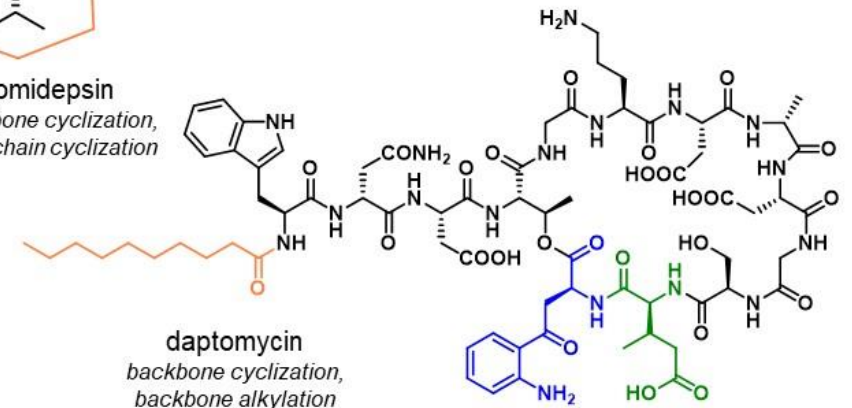
vancomycin  
side-chain cyclization, glycosylation  
nonproteinogenic residues



trunkamide  
backbone cyclization,  
heterocyclization,  
side-chain acylation



romidepsin  
backbone cyclization,  
side-chain cyclization

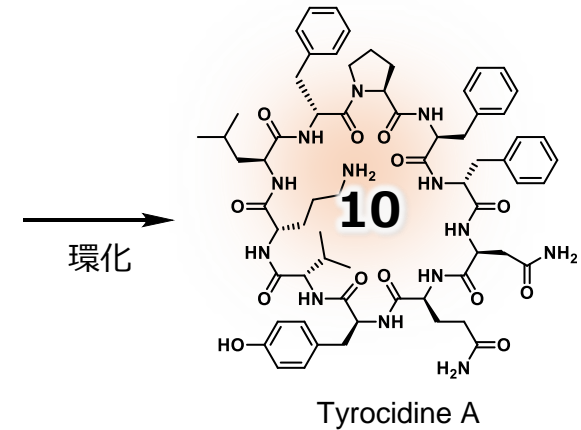
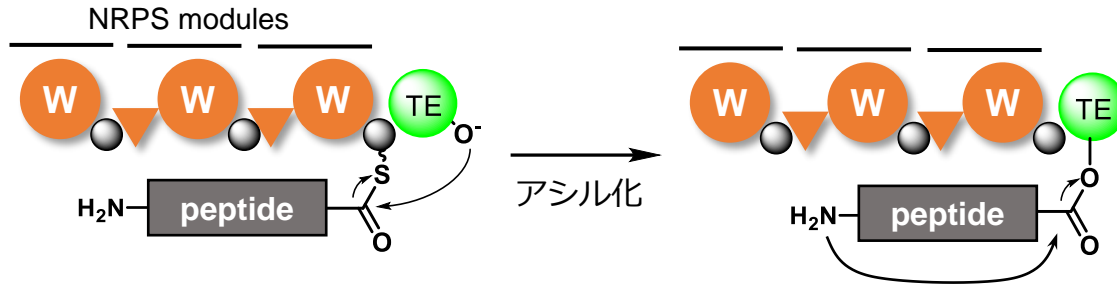


daptomycin  
backbone cyclization,  
backbone alkylation

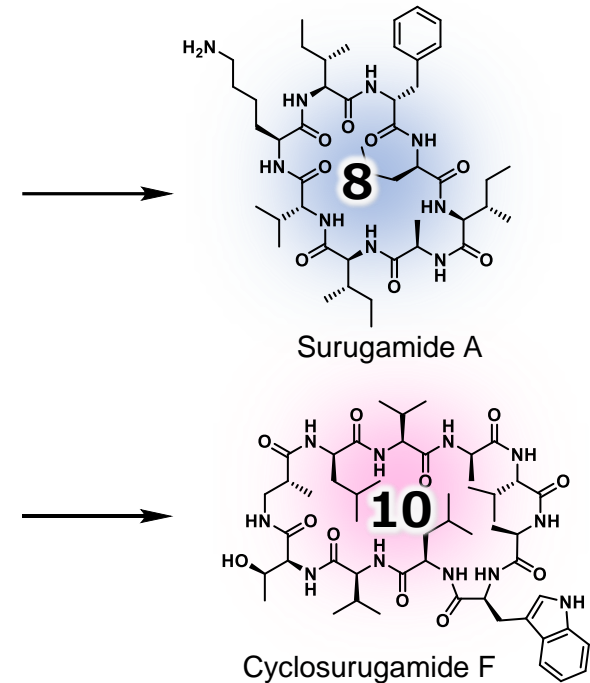
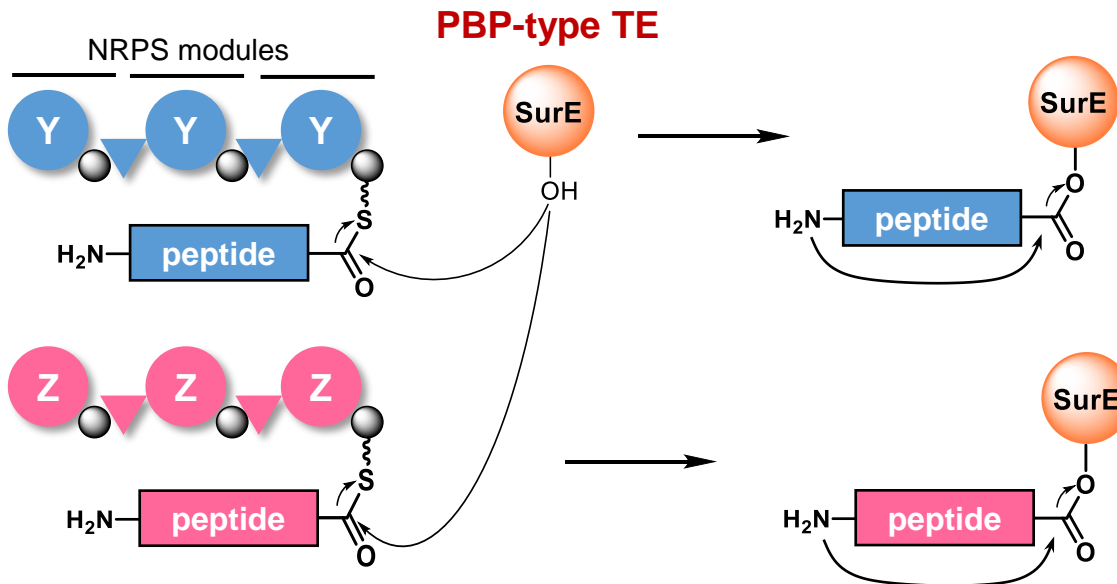
## 背景 3 : 非リボソームペプチド合成における環化反応

Trauger, J. W. et al., *Nature* (2000)

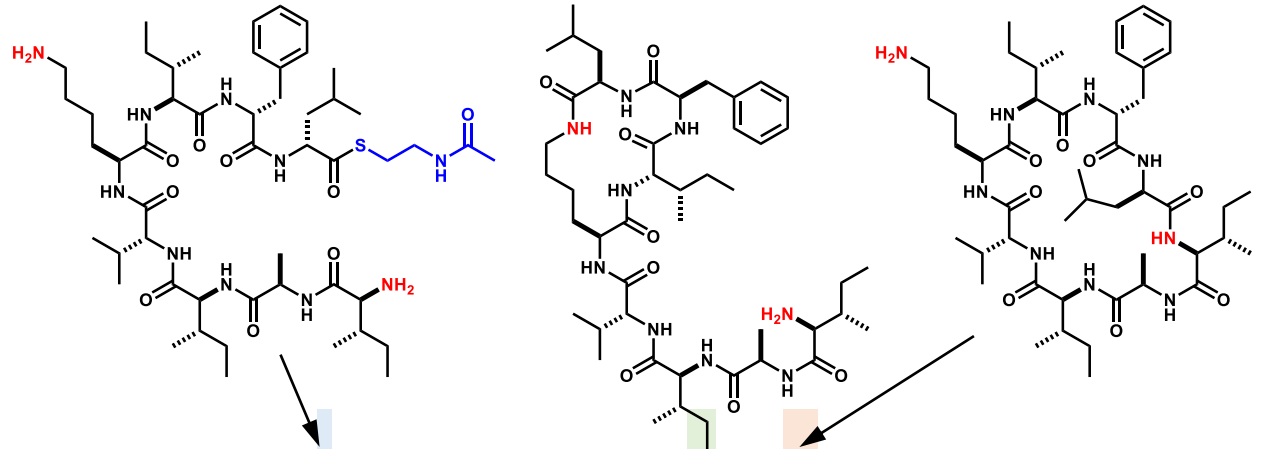
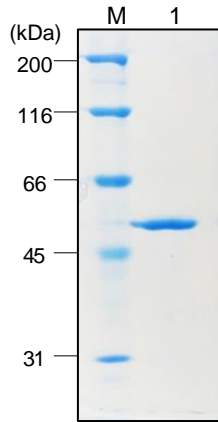
従来型の環化酵素 : 巨大タンパク質に融合. **狭い基質特異性が課題**



独自の環化酵素 : 巨大タンパク質から独立. **寛容な基質特異性が特徴**



# SurE組換えタンパク質を用いたペプチド環化反応



## Reaction mixture

20 mM Tris-HCl pH8.0

1.0 mM SB-SNAC

9.0 μg Recombinant SurE

total 100 μl

↓ 30°C, 2 h

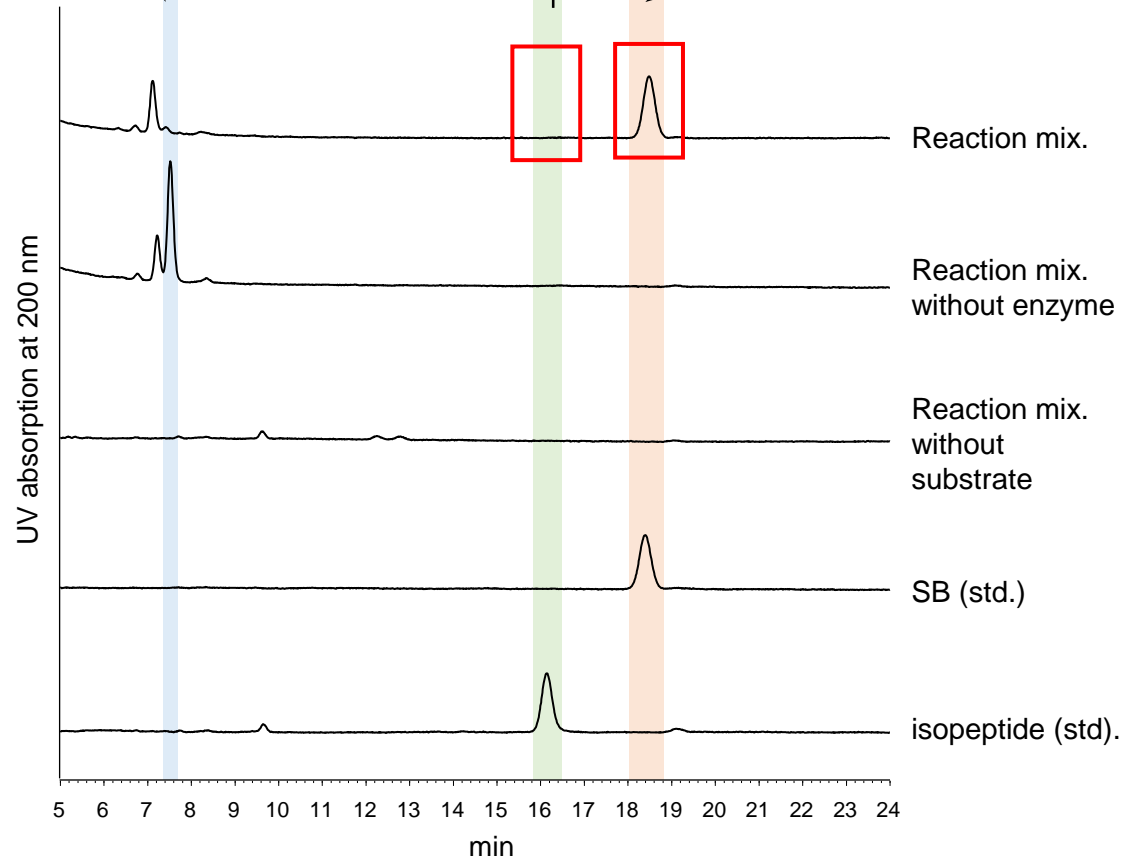
↓ add 100 μl of 0.1% TFA

HPLC analysis

Column: COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-MS-II

Mobile phase: 41% MeCN + 0.05% TFA

Flow: 0.8 ml/min



**位置選択的な環化が定量的に進行！**

[本内容は2022.12.2.の説明会でも紹介](#)

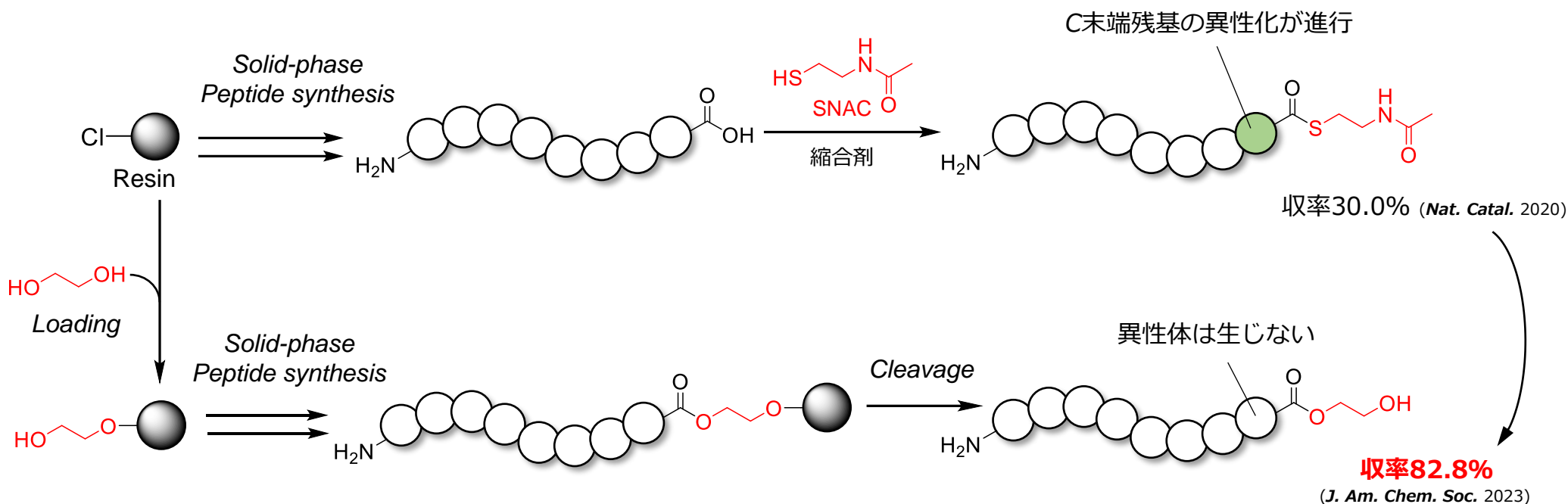


# 環状ペプチドの効率的な化学 – 酵素ハイブリッド合成法の開発

従来の基質合成経路



- 脱離基 (SNAC) を付与する液相反応において、異性化が進行する。
- エピマー (副生成物) の除去に多大な労力を要する。
- 多検体合成は非常に困難。

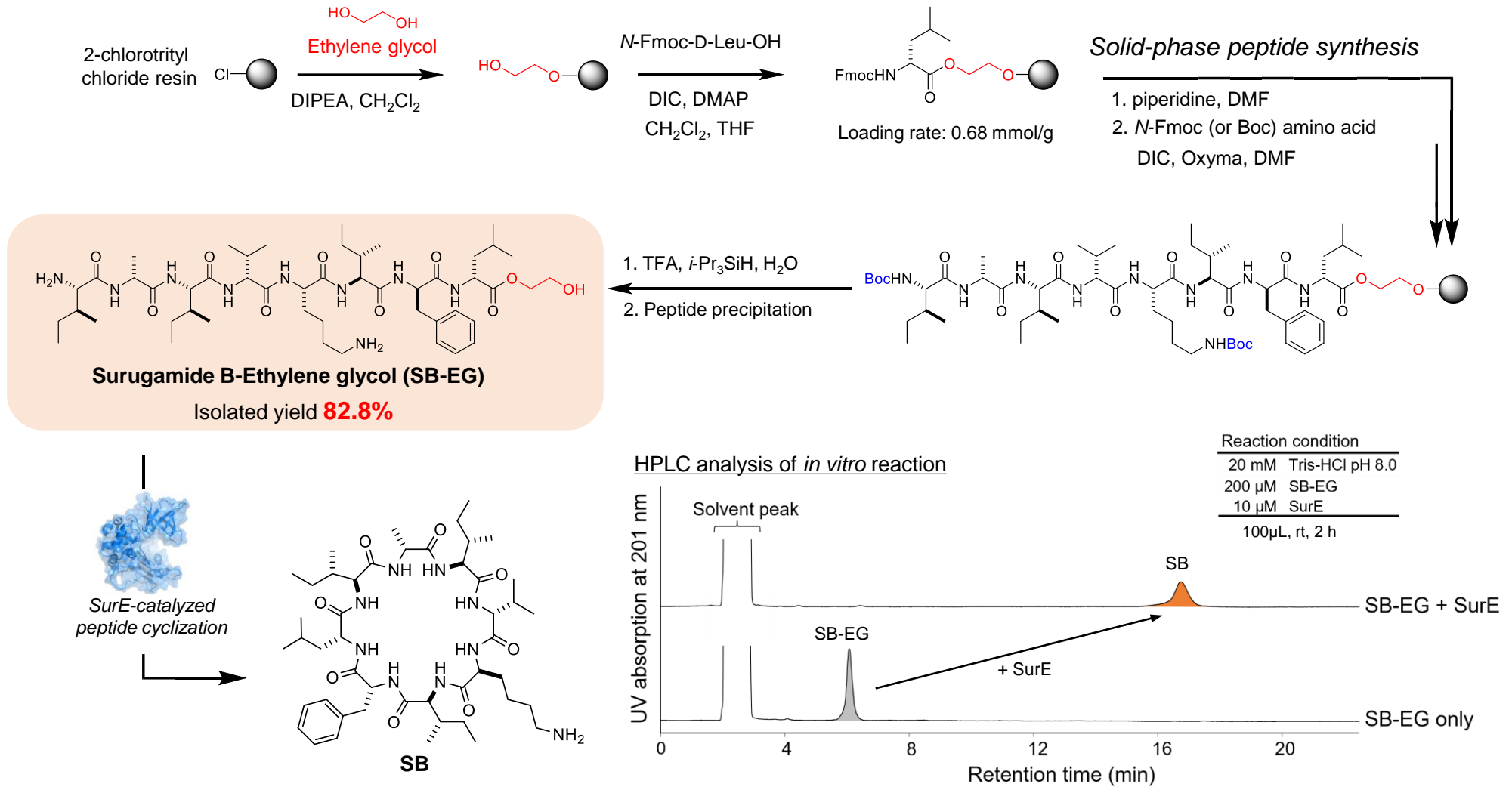


新たに確立した合成経路



- 副生成物が生じうる液相での縮合反応を回避。
- 合成産物は高純度で得られるため、途中精製を介さずに酵素反応を実施できる。
- 合成の手間を削減し、収率を大幅に向上した。

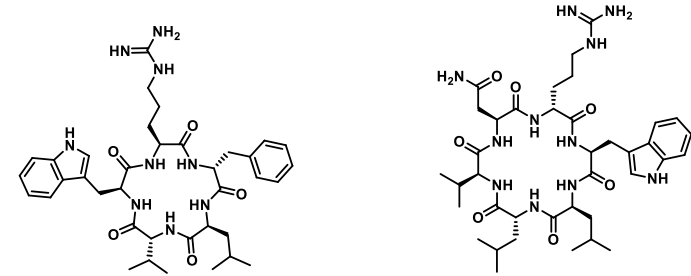
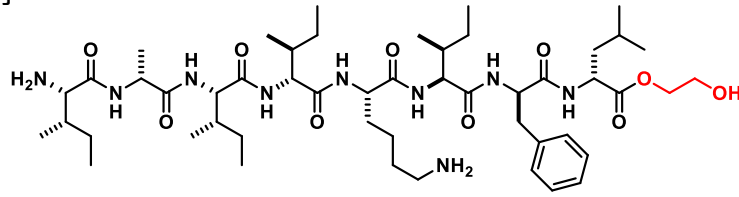
# 環状ペプチドの効率的な化学 – 酵素ハイブリッド合成法の開発



- ✓ C末端にジオールを付加したペプチドは酵素によって定量的に環状化
- ✓ 基質の途中精製を行うことなく環状ペプチドを迅速・簡便に合成

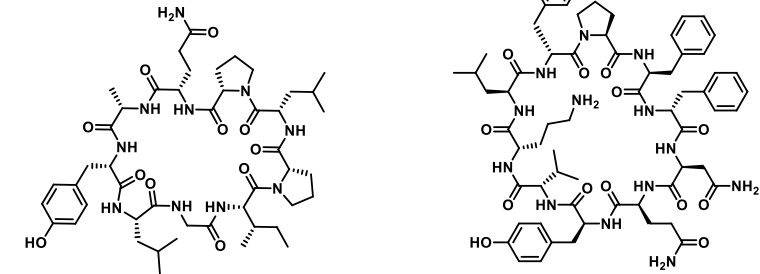
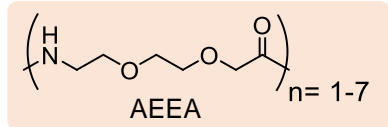
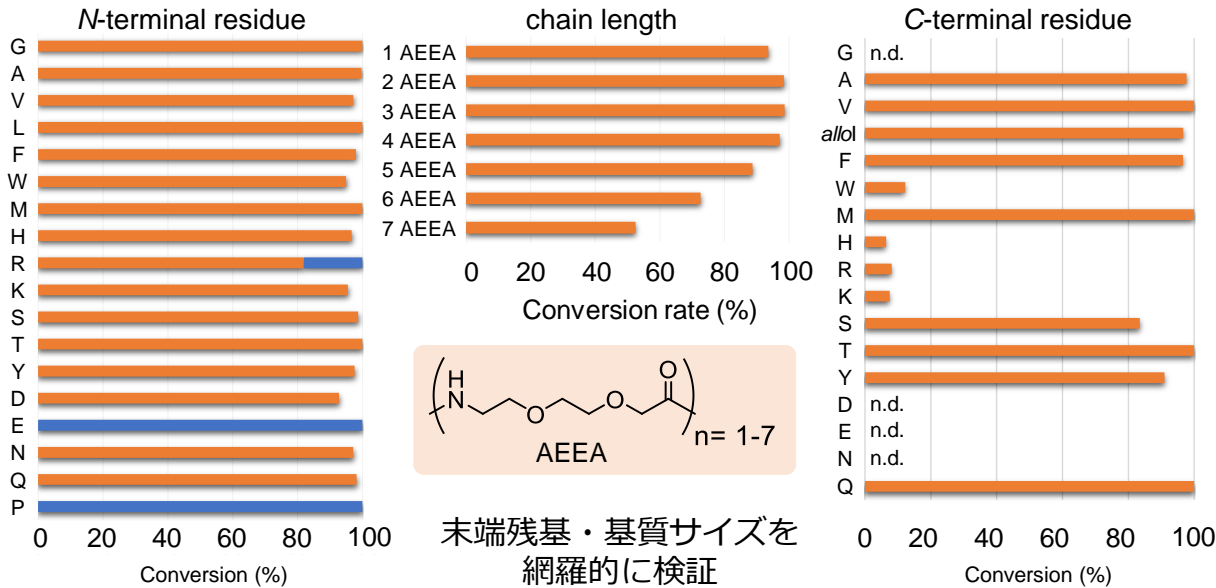
# 環化酵素の基質特異性の検証

モデル配列



deoxypentaminomycin  
*antimicrobial*  
環化反応収率96%

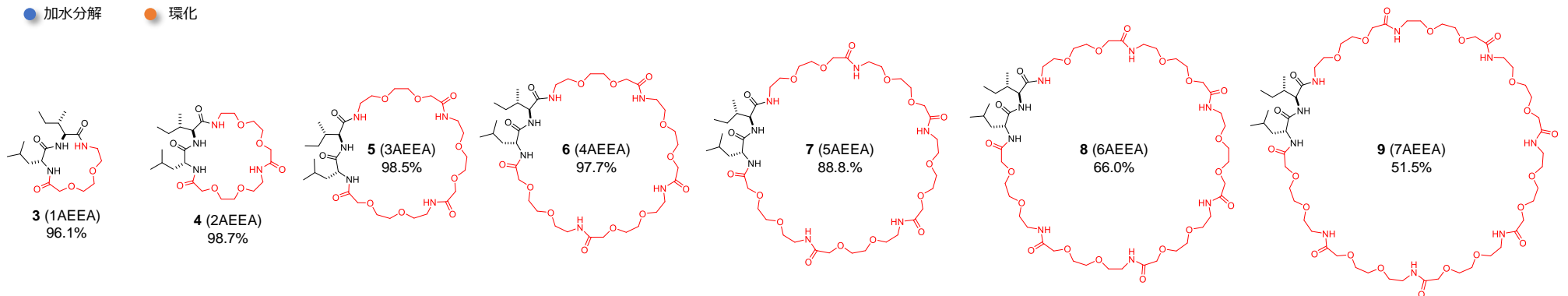
wollamide B1  
*antimycobacterial*  
環化反応収率98%



desprenylagaramide C  
*D-aa free*  
環化反応収率99%

tyrocidine A  
*antibacterial*  
環化反応収率70%

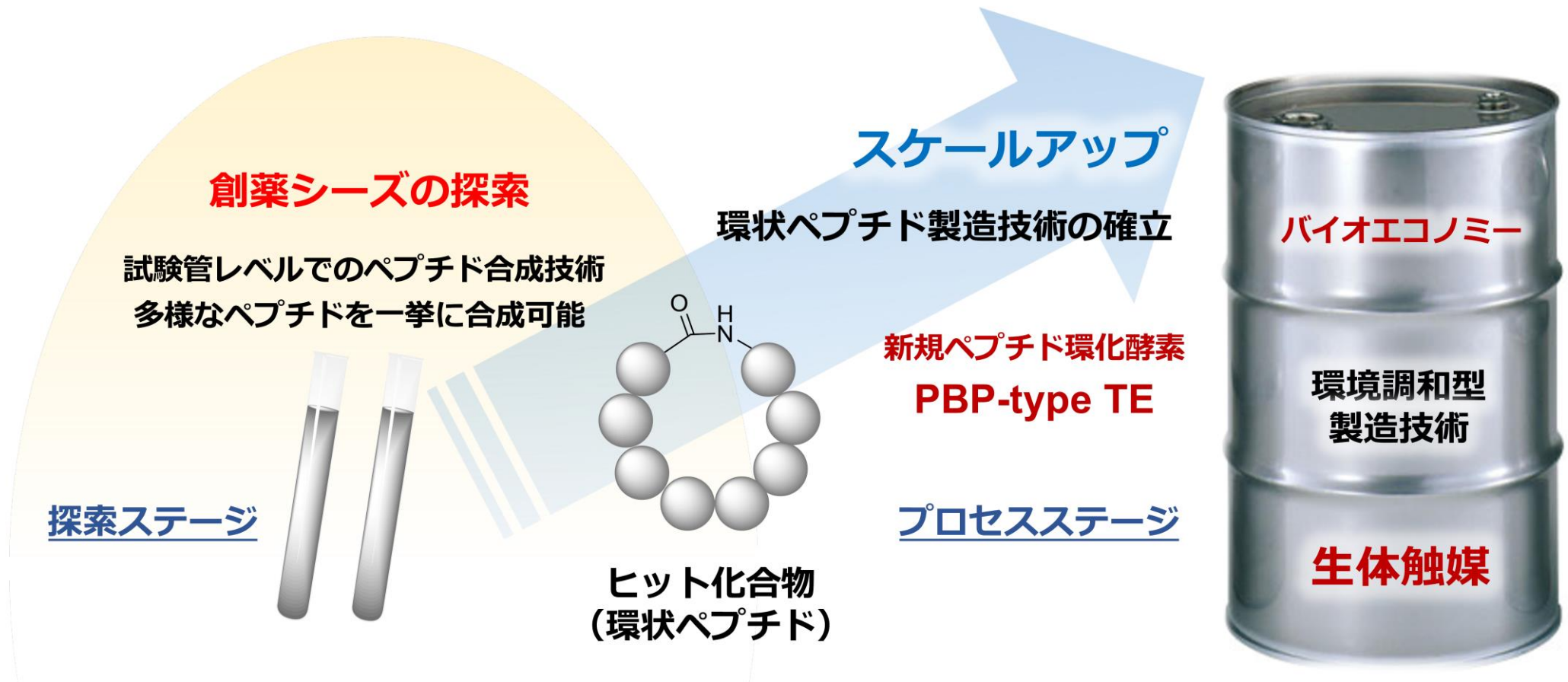
化学-酵素合成法により、  
生物活性環状ペプチド配列を高い反応収率で環化



- ✓ 5 ~ 23 アミノ酸残基に相当する幅広いサイズの基質を環化可能
- ✓ 環化点がアミノ酸残基であれば、配列内部が非ペプチド性ポリマーであっても環化反応が進行

# 想定される用途

- ✓ 化学-酵素合成法により、多様な環状ペプチドを迅速・簡便に調製可能（シーズ探索ステージ）
- ✓ スケールアップにもシームレスに展開可能（ヒット検証・プロセスステージ）。



## 実用化に向けた課題

- ✓ 基質選択性の制限を補完できる複数のホモログや機能改変酵素をすでに開発済み。両末端アミノ酸残基への特異性は克服しつつある。
- ✓ 現在のところ大スケールでの反応条件の最適化が未達である。今後、スケールアップに関する実験データを取得し、プロセスレベルに適用していく場合の条件設定を行っていく。

## 企業への期待

- ✓ 未解決の大スケールでの環化反応の検証については、酵素反応の技術を有する企業との共同研究により克服できると考えている。
- ✓ 酵素反応による製造技術をもつ企業との共同研究を希望
- ✓ 具体的な合成対象となる環状ペプチドをもつ企業、医薬分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

## 本技術に関する知的財産権

発明の名称：ペプチド類の大環状化酵素  
出願番号：特願2020-518267  
出願人：北海道大学  
発明者：脇本敏幸、倉永健史、松田研一

発明の名称：ペプチド類の大環状化酵素  
出願番号：PCT/JP2019/017707  
出願人：北海道大学  
発明者：脇本敏幸、倉永健史、松田研一

発明の名称：環状ペプチドの効率的な化学－酵素合成方法  
出願番号：特願2022-24966  
出願人：北海道大学  
発明者：脇本敏幸、松田研一、小林雅和

発明の名称：環状ペプチドの効率的な化学－酵素合成方法  
出願番号：PCT/JP2022/038513  
出願人：北海道大学  
発明者：脇本敏幸、松田研一、小林雅和

## 産学連携の経歴

2018年 プレスリリース

[https://www.hokudai.ac.jp/news/180618\\_pr.pdf](https://www.hokudai.ac.jp/news/180618_pr.pdf)

***Angew. Chem. Int. Ed.* 57, 9447-9451 (2018)**

2020年 プレスリリース

[https://www.hokudai.ac.jp/news/pdf/200507\\_pr.pdf](https://www.hokudai.ac.jp/news/pdf/200507_pr.pdf)

***Nature Catalysis* 3, 507-515 (2020)**

2020年ー2022年 JST A-STEP 育成型に採択  
「環状ペプチドの効率的合成方法の開発」

2020年ー2022年 JST ACT-Xに採択  
「短鎖環状ペプチドの酵素・生物合成」

2023年 プレスリリース

[https://www.hokudai.ac.jp/news/pdf/230120\\_pr2.pdf](https://www.hokudai.ac.jp/news/pdf/230120_pr2.pdf)

***J. Am. Chem. Soc.* 145, 3270-3275 (2023)**



## お問い合わせ先

**国立大学法人 北海道大学**

**産学・地域協働推進機構**

**TEL 011-706-9532**

**FAX 011-706-9550**

**[techtf@mcip.hokudai.ac.jp](mailto:techtf@mcip.hokudai.ac.jp)**