

## 近赤外分光法を用いたペプチド合成反応モニタリング手法の開発

**【代表者】** 石垣 美歌 島根大学戦略的研究推進センター 助教

**【共同研究者】** 山本 達之 島根大学 生物資源科学部 教授  
青木 薫 米子工業高等専門学校 総合工学科 教授

### 【研究の目的と内容】

特殊ペプチド（天然以外のアミノ酸を含む環状のペプチド）医薬品が、抗体医薬品に代わる新たな薬剤として近年注目を集めている。特殊ペプチド医薬品は、分子量が抗体医薬品と比べて小さいため合成が容易であり、抗原特異性と標的特異性に優れている。さらに環状構造を保持させることで難分解性を保持することも可能であり、開発コストの面からも特殊ペプチド医薬品の優位性に注目が集まっている。実際、ペプチドリーム（株）は、非標準ペプチドを合成するベンチャー企業として一定の知名度を得ている。その一方で、特殊ペプチドは立体障害が大きく、従来の化学合成法（バッチ法）ではその合成が難しいという問題点も抱えている。そこで、特殊ペプチドの新たな合成手法としてフロー合成法が注目されている。フロー合成法とは、細い管状の反応器に反応試薬を流しながら、連続的に目的物を合成する手法である。

フロー合成法を用いた特殊ペプチド医薬品合成の実用化のためには、フロー合成反応をリアルタイムにモニタリングする手法の開発が必須となる。研究代表者は過去2年間の研究において、分光学的手法を用いたペプチド合成反応のモニタリング手法を開発するため、本事業の支援により「フロー法により合成されるペプチド鎖長のモニタリングに必要な近赤外バンド帰属の確立（2019年度）」、「ラマン分光法を用いた有機溶媒中アミノ酸濃度の定量分析手法の開発（2020年度）」の研究課題を断続的に推進してきた。過去2年間の研究により、分光学的手法を用いたアミノ酸やペプチドの基礎的な実験データの分析から、ペプチド鎖長伸長に伴うアミド結合数の変化を高精度に定量評価できる結果が示された。そこで本研究ではそれらの結果に基づき、実際のペプチド合成反応を想定した系で合成反応過程をモニタリングできるか検証することを目指した。

研究内容として、まず2種のアミノ酸からなるジペプチド、トリペプチドにおいて、アミノ酸配列の違いによる近赤外スペクトルパターンの違いを把握し、アミノ酸配列依存的に近赤外スペクトルを識別できるか検証した。次に、ペプチド合成反応を模した系で原料、生成物の濃度を定量的に評価し、アミノ酸配列依存的にペプチド合成反応をモニタリングできるか検証した。

## 【研究の成果（本研究によって得られた知見、成果、論文、学会発表、外部資金への応募見込み等）】

本研究では、ペプチド合成反応においてペプチド鎖長が伸長する過程を模した系で、アミド結合数をアミノ酸配列依存的に高精度で定量評価できるか検証した。具体的な実験内容を以下に示す。

1.保護基 (Boc 基) の付いたアミノ酸 [グリシン(G), プロリン(P)], 及びジペプチド [GG, GP, PG], トリペプチド [GGG, GGP, GPG, PGG, GPP, PGP, PPG], 及び保護基を持たないアミノ酸 [G, P]を DMSO に溶解させ、それぞれの近赤外スペクトルデータセットを構築した。図1にアミノ酸配列の異なるトリペプチドの近赤外2次微分スペクトル(5000-4500  $\text{cm}^{-1}$ )を示す。同種アミノ酸から成るトリペプチドにおいて、アミノ酸配列が異なるとアミド結合由来の近赤外吸収バンドが異なるスペクトルパターンを示すことが明らかとなった。この結果は、近赤外スペクトルパターンの違いにより、アミノ酸配列の異なるペプチド種を識別できることが示された。

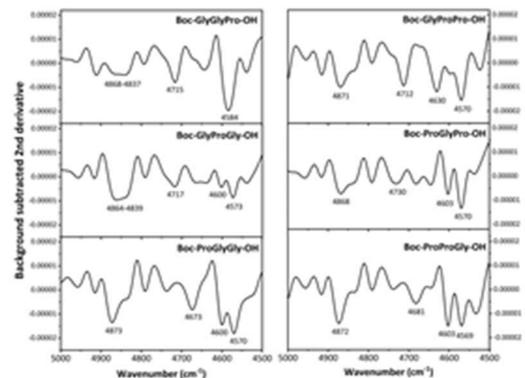


図1:[G, P]から成るトリペプチドの近赤外2次微分スペクトル。

2.原料, 生成物となるアミノ酸やペプチドの DMSO 溶液の濃度を合成反応における原料, 及び生成物の濃度変化を再現するように混ぜ合わせて調製し, 近赤外スペクトルデータセットを構築した。ペプチド合成反応は, 以下のような反応を想定して網羅的にデータを取得した (反応式は省略形で表記する)。

### ジペプチド合成系

- $\text{Boc-G-OH} + \text{H-P-OH} \rightarrow \text{Boc-GP-OH} + \text{H}_2\text{O}$
- $\text{Boc-P-OH} + \text{H-G-OH} \rightarrow \text{Boc-PG-OH} + \text{H}_2\text{O}$

### トリペプチド合成系

- $\text{Boc-GP-OH} + \text{H-G-OH} \rightarrow \text{Boc-GPG-OH} + \text{H}_2\text{O}$
- $\text{Boc-GP-OH} + \text{H-P-OH} \rightarrow \text{Boc-GPP-OH} + \text{H}_2\text{O}$

\*原料に他のジペプチドを用いた場合の合成系についても, 上記同様全組み合わせについても網羅的に実験した。

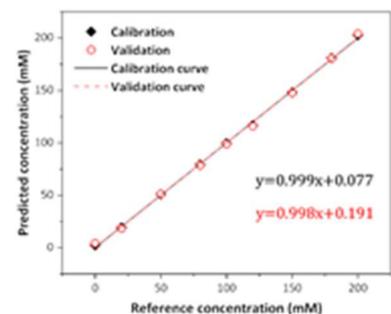


図2: Boc-GP-OH 合成モデル系における Boc-G-OH 濃度の検量線モデル。

3.部分的最小二乗法 (PLSR) を用いて, 上記合成反応系における原料, 生成物の濃度を定量的に評価し, 検量線モデルを作成した。その結果, 全ての合成系において決定決定数 (R2) が 0.99 以上の非常に高い検量精度を得た (図2)。