



Title	非リボソームペプチド環化酵素を利用した環状ペプチドの効率的な化学：酵素合成法の開発
Author(s)	小林, 雅和
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第15783号
Issue Date	2024-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15783
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94366
Type	doctoral thesis
File Information	Masakazu_Kobayashi.pdf



博士学位論文

非リボソームペプチド環化酵素を利用した
環状ペプチドの効率的な化学-酵素合成法の開発

小林 雅和

北海道大学大学院生命科学院
生命科学専攻 生命医薬科学コース
天然物化学研究室

2024 年 3 月

略語一覧

本論文では以下の略語を使用した。

Å	angstrom
°C	degrees Celsius
2-CT resin	2-chlorotrityl chloride resin
aa	amino acid
Abs	absorbance
A domain	adenylation domain
ADP	adenosine diphosphate
AEEA	2-[2-[2-(Fmoc-amino)ethoxy]ethoxy]acetic acid
Ala (or A)	alanine
Amp	ampicillin
AMPA	3-amino-2-methylpropionic acid
<i>aq.</i>	aqueous
Arg (or R)	arginine
Asn (or N)	asparagine
Asp (or D)	aspartic acid
ATP	adenosine triphosphate
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
Bu	butyl
Bzl	benzyl
cal	calorie
calcd.	calculated
C domain	condensation domain
CoA	coenzyme A
Cys (or C)	cysteine
d	doublet
Da	dalton
Dab	α,γ -diaminobutyric acid
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undecene

DCC	<i>N, N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide
DCM	dichloromethane
Dde	1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)ethyl
DIC	<i>N, N'</i> -diisopropylcarbodiimide
DIPEA (or DIEA)	diisopropylethylamine
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DMF	<i>N, N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	2'-deoxyribonucleotic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDCI	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
E domain	epimerization domain
EIC	extracted ion chromatogram
eq	equivalent
ESI	electrospray ionization
<i>et al.</i>	et alia
Et ₂ O	diethylether
EtOAc	ethyl acetate
Fmoc	9-fluorenylmethyloxycarbonyl
g	gram (s)
Gln (or Q)	glutamine
Glu (or E)	glutamic acid
Gly (or G)	glycine
h	hour (s)
HATU	1-[bis(dimethylamino)methylene]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate
HBTU	1-[bis(dimethylamino)methylene]-1 <i>H</i> -benzotriazolium 3-oxide hexafluorophosphate
HFIP (or HFP)	1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol
His (or H)	histidine
HOAc	1-hydroxybenzotriazole

HPLC	high-performance liquid chromatography
HRMS	high-resolution mass-spectrum
Hz	hertz
<i>i</i>	iso
Ile (or I)	isoleucine
IPTG	isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside
J	joule
<i>J</i>	coupling constant
k	kilo
Km	kanamycin
L	liter
LC	liquid chromatography
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry
Leu (or L)	leucine
Lys (or K)	lysine
M	molar
m	milli, min, multiplet
μ	micro
<i>m/z</i>	mass-to-charge ratio
Me	methyl
MeCN	acetonitrile
MeI	iodomethane
MeOH	methanol
Met (or M)	methionine
MHC	minimum hemolysis concentration
MIC	minimum inhibition concentration
min	minute (s)
mol	mole (s)
MS	mass spectrometry
Mw	microwave
NCL	native chemical ligation

n.d.	not determined, not detected
Neo	neomycin
NMR	nuclear magnetic resonance
NRP	nonribosomal peptide
NRPS	nonribosomal peptide synthetase
ODS	octadecyl silyl
ORF	open reading frame
Orn (or O)	ornithine
Oxyma	ethyl cyano(hydroxyimino)acetate
P450	cytochrome P450
Pbf	2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBP	penicillin-binding protein
PCP	peptidyl carrier protein
PCR	polymerase chain reaction
PG	protecting (or protective) group
pH	potential hydrogen
Phe (or F)	phenylalanine
PI	isoelectric point
PPI	protein-protein interaction
ppm	parts per million
PPTase	phosphopantetheinyl transferase
Pro (or P)	proline
PyBOP	1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
R domain	reductase domain
r.d.s	rate-determining step
RNA	ribonucleic acid
rpm	rotation per minute
quant.	quantitative
s	singlet
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. albidoflavus</i>	<i>Streptomyces albidoflavus</i>

SAL	salicylaldehyde
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Ser (or S)	serine
sec.	second (s)
SNAC	<i>N</i> -acetylcysteamine
sp	species
SPPS	solid-phase peptide synthesis
SSN	sequence similarity network
std.	standard
STL	serine/threonine ligation
<i>t</i>	tert
t	triplet
T domain	thiolation domain
TEA	triethylamine
TE domain	thioesterase domain
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
Thr (or T)	threonine
TIS	triisopropylsilane
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
Trp (or W)	tryptophan
Trt	trityl
Tyr (or Y)	tyrosine
UV	ultraviolet
Val (or V)	valine
WT	wild type

目次

第一章 序論

第一節 創薬モダリティとしての環状ペプチド	1
第二節 有機合成的手法によるペプチドのマクロラクタム化	4
第三節 酵素を利用したペプチドのマクロラクタム化	10
第四節 非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS)	15
第五節 Surugamide 類の生合成	22
第六節 本研究の目的	25
第七節 本論文の構成	26

第二章 新規非リボソームペプチド環化酵素 SurE の発見

第一節 本章の目的	27
第二節 候補遺伝子の探索と遺伝子破壊実験	28
第三節 Surugamide A-E 生合成におけるペプチド環化機構の解明	33
第四節 Surugamide F 生合成における加水分解機構の解明	36
第五節 小括と考察	40

第三章 SNAC 基質を用いた SurE の基質選択性の解明

第一節 本章の目的	50
第二節 基質両末端残基に対する立体選択性の検証	52
第三節 残基選択性の検証	55
第四節 脱離基に対する選択性の検証	58
第五節 PBP-type TE の系統解析とホモログ酵素の探索	61
第六節 小括と考察	69

第四章 Head-to-tail 型環状ペプチドの効率的な化学一酵素合成法の開発

第一節 本章の目的	75
第二節 ジオール基質の着想と設計	77

第三節 ジオール基質の合成と <i>in vitro</i> 酵素反応	82
第四節 EG 基質を用いた SurE の基質選択性の網羅的解析	85
第五節 SurE の酵素改変による基質 C 末端残基選択性の拡張	89
第六節 EG 基質を用いた head-to-tail 型環状ペプチドの化学－酵素合成	93
第七節 小括と考察	98
第五章 Head-to-side chain 型環状ペプチドの効率的な化学－酵素合成法の開発	
第一節 本章の目的	106
第二節 分岐型 EG 基質の着想と設計	107
第三節 分岐型 EG 基質の合成と <i>in vitro</i> 酵素反応	109
第四節 Head-to-side chain 型環状ペプチドの化学－酵素合成	115
第五節 セリン/スレオニンライゲーションの併用による構造展開	122
第六節 小括	125
第六章 総括と展望	
実験項	131
引用文献	316
謝辞	329

第一章 序論

第一節 創薬モダリティとしての環状ペプチド

昨今、世界中で長寿化が急速に進み、先進国においては 2007 年生まれの 2 人に 1 人が 100 歳を超えて生きる「人生 100 年時代」が到来すると言われている^{1,2}。厚生労働省の発表によれば、本邦の 2022 年における平均寿命は男性が 81.05 歳、女性が 87.09 歳である³。一方で、第二次世界大戦後の 1947 年における平均寿命は男性が 50.06 年、女性が 53.96 年であり、戦後約 70 年で男女ともに 30 年以上も平均寿命が延長していることが理解される。この平均寿命の伸長に大きな影響を及ぼしたものとして、医療の進歩、とりわけ医薬品の寄与・貢献が挙げられる⁴。なかでも戦後著しい進歩を遂げた分野に外科治療が挙げられ、これは輸血に関する技術が進歩したこと、人工呼吸器などの医療機械が開発されたことや抗生物質の開発・使用により手術後の感染の危険性が減少したことが大きく貢献している。内科的療法の面においても、結核、肺炎、胃腸炎など感染症の治療に抗生物質が大きな役割を果たしている。20 世紀初頭に初の抗生物質 *salvarsan* が医療の場で使用されたことを皮切りに、*streptomycin* や *chloramphenicol* と次々に新しい抗生物質が医療に供された⁵。近年では科学技術の発展に伴い抗がん剤の開発が盛んに行われ、化学療法の対象も細菌感染から悪性新生物の治療にまで広がった。

近代の医薬品治療は、低分子化合物や抗体を原薬とするものが主流となっている⁶⁻⁸。低分子医薬品とは、一般に分子量が数百程度の分子が有効成分となる医薬品の総称である (**Figure 1-1a**)。低分子医薬品は分子量が小さいため化学合成による大量供給が可能で製造コストを抑えることができるうえ、細胞膜や血液脳関門を通過できるものが多く経口投与が可能である点や、コンビナトリアル合成により構造展開が容易に行える点が大きな利点である。その一方で、分子サイズが小さいため構造の多様性が制限される点や、標的分子との相互作用面が小さいため、標的選択性が低く副作用が多い点が課題となっている⁹。

抗体を代表とするタンパク質医薬品は、一般に分子量が 15 万以上の分子の医薬品の総称である¹⁰ (**Figure 1-1c**)。抗体医薬品はその構造複雑性や相互作用面の大きさから優れた標的結合能や特異性を有し、さらにはタンパク質間相互作用 (PPI: Protein-protein interaction) の阻害も可能であるため、従来の低分子医薬品では標的とすることが困難であった疾患へのアプローチが可能である¹⁰。しかしながら、抗体医薬品は分子サイズが大きく細胞膜を通過できないため適用範囲が限られるうえ、高額な製造コストや免疫原性による長期使用時の治療効果の低下が課題となっている¹⁰。

このような中で、低分子医薬品と抗体医薬品の利点を兼ね備え、かつ、両者の欠点を克服しうる新たな分子群として、500～3000 Da の分子量を有する中分子、とりわけ環状ペプチドが新たな創薬シーズとして注目されている¹¹⁻¹⁵ (Figure 1-1b)。

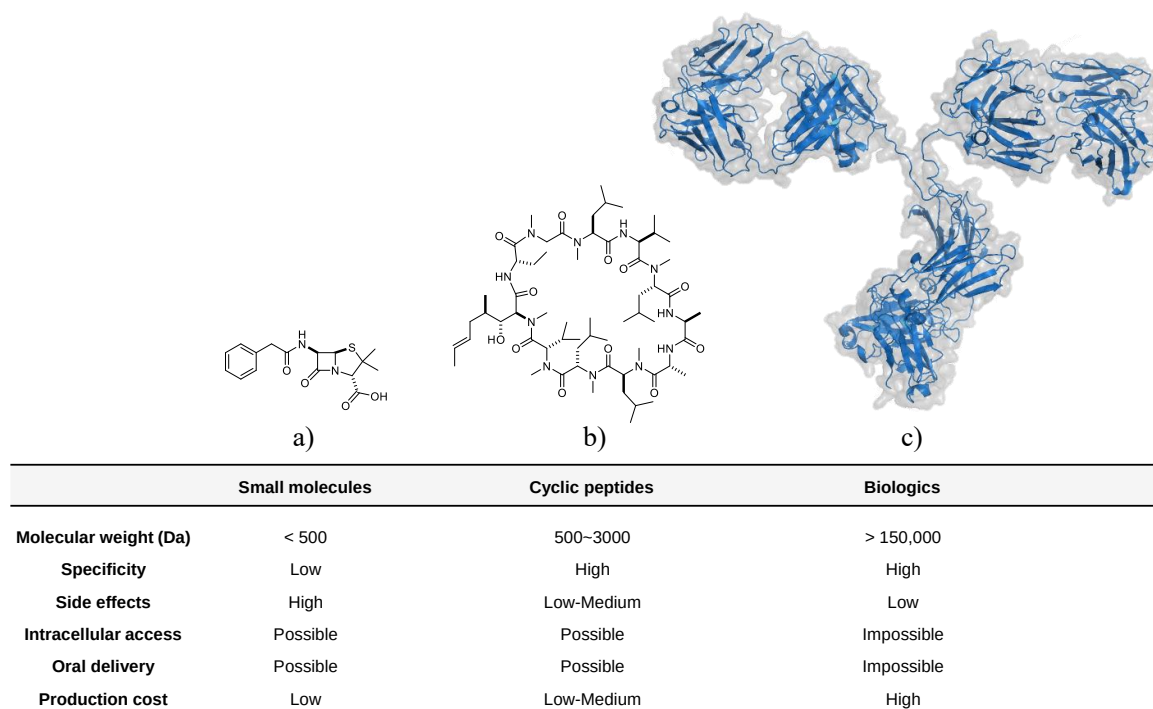


Figure 1-1. 各医薬品分子群の特徴

a) 低分子医薬品の特徴 b) 環状ペプチド医薬品の特徴 c) 抗体医薬品の特徴

環状ペプチドは剛直な化学構造を有することから、生体内の消化酵素による分解を免れ優れた代謝安定性を示すことが期待される。また、低分子医薬品と共通した利点として、活性制御のための構造修飾が容易な点が挙げられる。ペプチド性化合物は合成樹脂を利用することで連続的なアミノ酸縮合が行えるため、狙いの位置に望みの官能基を導入することが可能であり、構造活性相関研究を比較的容易に実施できる。さらに、低分子化合物と比べて標的分子との広い相互作用面 (500～700 Å 以上) を有し、抗体などのタンパク質製剤と同様に高い標的結合能や特異性を有するため副作用の低減が期待できる。また、抗体と比べて小さい分子量を有するため細胞膜透過や経口剤投与も期待でき、低分子医薬品では難しいとされる細胞内 PPI 阻害剤の開発へと応用可能である。2001 年に行われたヒトゲノムの解析結果によると、生体内で働く PPI は合計 30 万パターンにも及ぶとされている¹⁶。¹⁷ PPI に関与するタンパク質間の接触表面積は平均 1500～3000 Å と大きく、PPI の接触界

面の形状は一般に平坦かループ状である。その一方で、従来の低分子医薬品における標的タンパク質との平均的な接触面積は 300~1000 Å 程度である。また、多くの PPI は細胞の細胞質や核に存在し、分子構造が大きい抗体医薬品が到達できない。したがって、環状ペプチドは細胞内移行性と標的特異性を備え持つ有力な治療手段として期待されており、抗がん剤、血管新生阻害剤、感染症など幅広い疾患を対象に創薬研究が進められている¹⁸⁻²⁰。今後、細胞内 PPI を制御する環状ペプチド医薬品の研究開発は益々加速していくことが予想され、これまで有効な治療法が存在しなかった“undruggable”な標的や、現在の治療法が有効でない様々な疾患に対して優れた治療法を提供できることが期待される。

第二節 有機合成的手法によるペプチドのマクロラクタム化

先述した環状ペプチドの生物活性の発現には環状骨格が重要であるが、有機合成的手法によるペプチドのマクロラクタム化は制御の難しい反応であり、有機合成の発展が目覚ましい昨今においてもいくつかの課題を残している。通常、ペプチド合成において DCC や PyBOP に代表される縮合剤を反応に用いる場合、活性エステル中間体の高い反応性によりペプチド鎖 C 末端アミノ酸のエピメリ化が問題となる²¹ (**Figure 1-2**)。まず、縮合剤により活性化された鎖状ペプチドの C 末端アミド酸素が分子内のエステル結合へ求核攻撃し、5 員環アズラクトンを生じる。その後、アズラクトンの脱プロトン化・再プロトン化が起こることで α 位の立体が反転した立体異性体を生じ、続くアミンの求核攻撃が起こることによってエピマーが生成する。

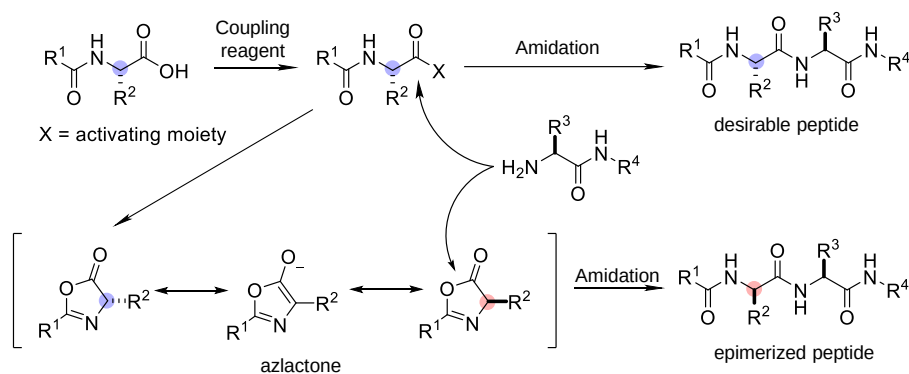


Figure 1-2. ペプチド合成におけるエピメリ化機構

鎖状ペプチドの化学合成においては、Fmoc アミノ酸や Boc アミノ酸に代表されるような N 末端アミンがカルバメートで保護されたアミノ酸をビルディングブロックとして用いることで、5 員環アズラクトンの形成を抑制することができる (**Figure 1-3a**)。そのため、アミノ酸の縮合とカルバメート保護基の除去を繰り返し行い、1 残基ずつペプチドを伸長することで、所望の鎖状ペプチドを高い収率で合成することが可能である。その一方で、環状ペプチドの化学合成における鎖状ペプチドのマクロラクタム化においてはその限りではない。この場合、鎖状ペプチドの C 末端残基はカルバメート構造ではなくアミド構造をとるため、5 員環アズラクトン形成を介したエピメリ化が問題となる (**Figure 1-3b**)。これにより、目的環化体の収率が大幅に低下するとともに、カラムクロマトグラフィーによる *epi*

体の煩雑な分離・精製作業が必須となる。これに加えて、競合する分子間縮合を抑制するために高希釈条件下で反応を行う必要があり、大量の有機溶媒を消費する点も環状ペプチド合成の課題として挙げられる。

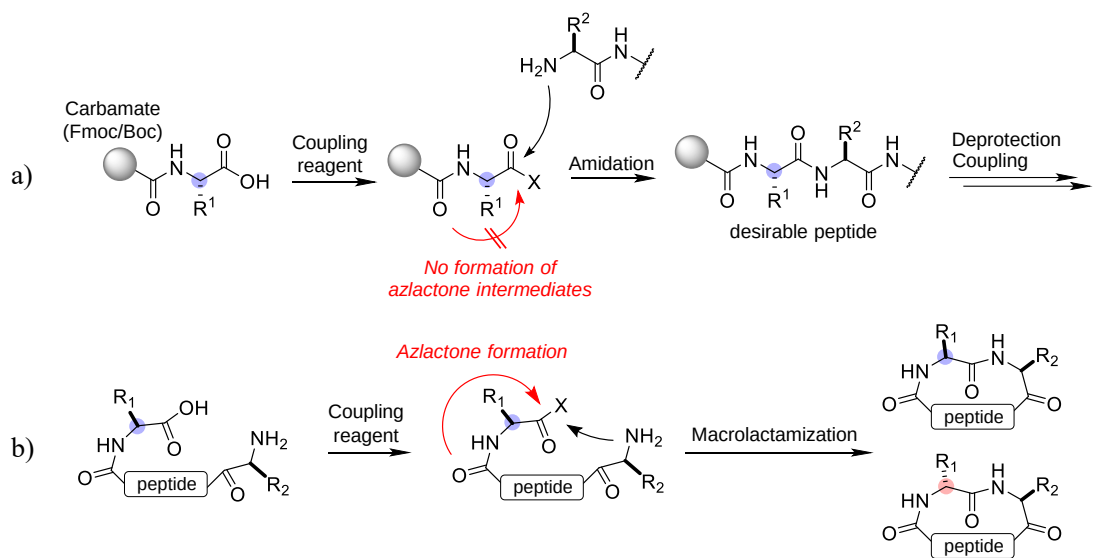


Figure 1-3. 鎖状ペプチドと環状ペプチドの化学合成

- a) Fmoc アミノ酸を用いた鎖状ペプチドの伸長反応
- b) 鎖状ペプチドのマクロラクタム化における C 末端残基のエピメリ化

- ✓ Low yield
- ✓ Difficult to separate
- ✓ High dilution condition

このような環状ペプチド合成の問題を克服するため、近年では C 末端残基のエピメリ化を抑制した鎖状ペプチドのマクロラクタム化手法が多数開発されている。2018 年、ワシントン大学の Chatterjee らの研究グループは、Cys 残基による native chemical ligation (NCL) を利用した高化学選択的なマクロラクタム化手法を報告した²² (**Figure 1-4a**)。本手法では、ブロモ酢酸とトリチル保護された 2-(aminooxy)ethanediol を rink amide 樹脂へ担持し MEGA 樹脂としたのち、Fmoc 固相合成によるペプチドの伸長と TFA による樹脂からの切り出しを行い無保護の鎖状ペプチドを合成する。最後に、鎖状ペプチドを酸性条件下 (pH 4.0-6.0) に付すことで、分子内のチオールの求核攻撃によるチオエステル化と N 末端 Cys 残基での NCL が連続的かつ高化学選択的に進行し、目的の head-to-tail 環化体を生成する。本手法では C 末端残基のエピメリ化を起こすことなくワンポットで無保護の環状ペプチドを合成できる一方で、鎖状基質の化学合成に多段階の反応を要することや合成収率が中程度であることが課題となる。Chatterjee らは本手法をトリプシン阻害活性を有する環状テトラデカペプチド SFT-1 (I10G) の合成へと適用し、本化合物を総収率 30%で得ている (**Figure 1-4b**)。

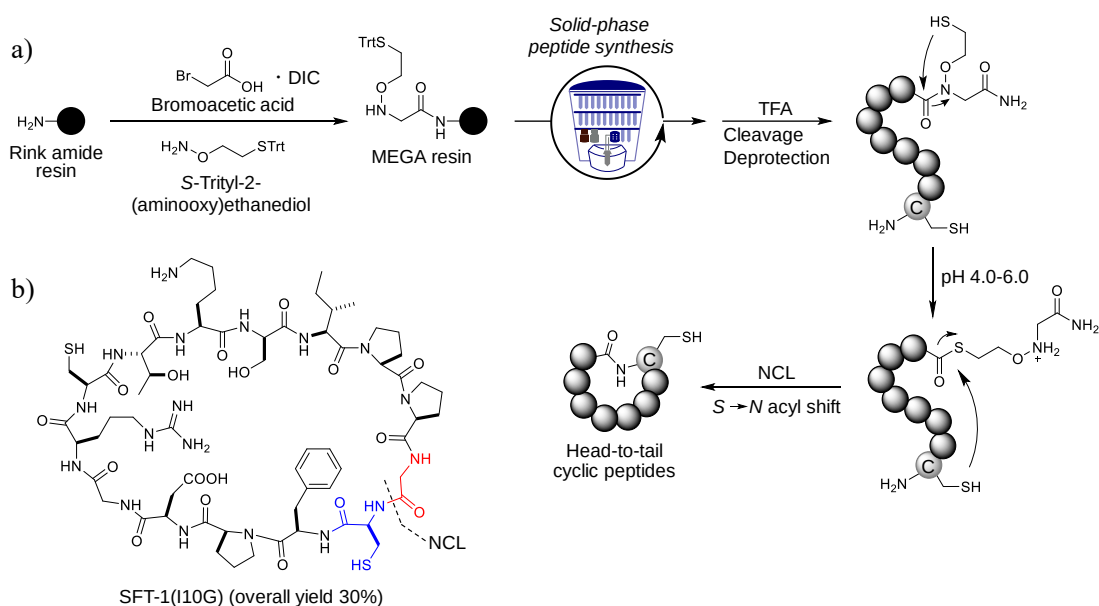


Figure 1-4. Native chemical ligation によるペプチドのマクロラクタム化

a) 本手法の合成スキーム b) SFT-1(I10G) の化学構造

また、同年にコペンハーゲン大学の Olsen らの研究グループは NCL を使用した固相合成樹脂上でのマクロラクタム化手法を報告した²³ (**Figure 1-5a**)。本手法では、rink amide 樹脂に Gly と 3-amino-4-(methylamino)benzoic acid (MeDbz) を担持し、Fmoc 固相合成法によりペプチド鎖を伸長する。その後、得られた固相担持ペプチドに 4-nitrophenyl chloroformate と塩基を作用させ MeDbz 部位のアシル化と活性化を行い、TFA による脱保護と続く NCL

による分子内マクロラクタム化により目的の head-to-tail 環化体を合成する。本手法では、ペプチド鎖を合成樹脂から切り出す必要がないため、上記手法と比べて合成ステップを簡略化できる。また、合成樹脂上での環化反応であるため中程度の純度で目的の環化体を得ることができる。その一方で、ペプチド固相合成に先立ち MeDbz 部位を導入する必要があるため合成工程が煩雑になる点や、目的物の合成収率が低い点が課題となる。Olsen らは本手法を用いて環状オクタペプチド desotamide B や環状デカペプチド tyrocidine A の類縁体など、鎖長の異なる環状ペプチドを複数合成することに成功している (Figure 1-5b)。

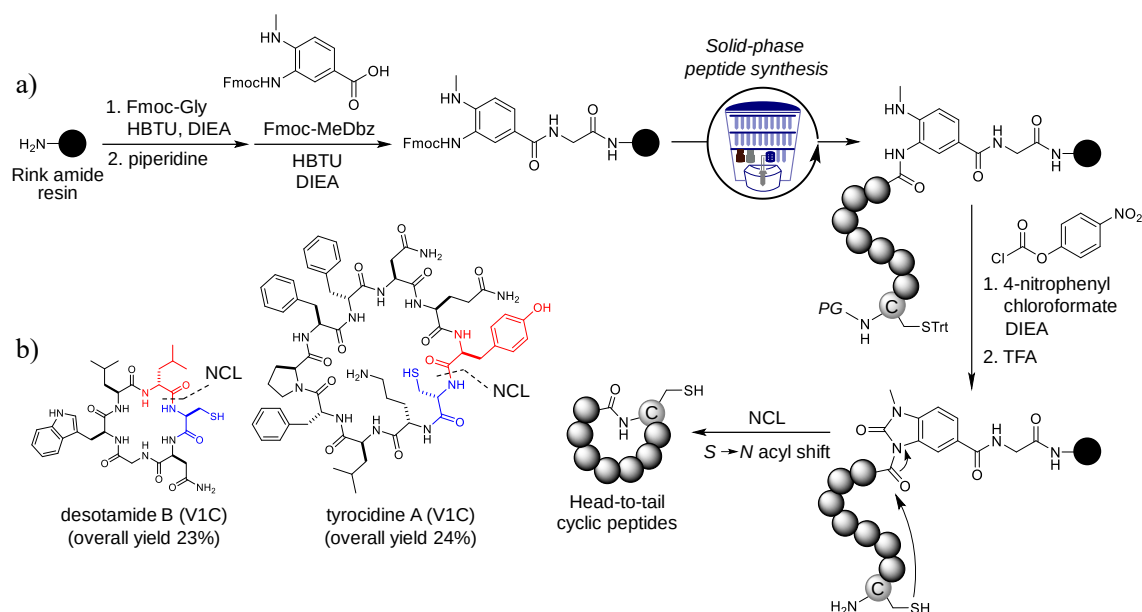


Figure 1-5. 固相合成樹脂上での native chemical ligation によるペプチドのマクロラクタム化
a) 本手法の合成スキーム b) desotamide B (V1C)と tyrocidine A (V1C)の化学構造

上記のような NCL を利用したペプチドのマクロラクタム化は、保護基を用いることなく高い化学選択性で望みの環状ペプチドを与えることから有用な手法となるが、配列内に Cys 残基を必要とするため汎用性の低さが課題であった。より基質適用範囲の広い手法として、2018 年に高雄医学大学の Kao らの研究グループはベンゾトリアゾール環形成を介した鎖状ペプチドのマクロラクタム化手法を開発した²⁴ (Figure 1-6a)。本手法では、rink amide 樹脂に *o*-aminonitrobenzoic acid を担持したのち、SnCl₂ を用いてニトロ基の還元を行うことでジアミンとする。その後、Fmoc 固相合成法にてペプチド鎖を伸長し、isoamyl nitrite によるベンゾトリアゾール環の形成と続く分子内マクロラクタム化を行うことで環状ペプチドの側鎖保護体を合成する。本手法は Cys 残基を利用した NCL に依存しないため、残基選択性の制限なしに目的の環状ペプチドを 90%以上の純度で得ることが可能である。その一方で、ベンゾトリアゾール環の形成に数段階の反応を要し合成工程が煩雑になる点

や、ベンゾトリアゾール環上のアミンが無保護の状態で行うため、副反応により収率が低下する点が課題となる。Kao らは本手法をトリプシン阻害活性を有する環状テトラデカペプチド SFT-1 の合成へと適用し、本化合物を総収率 42%で得ることに成功している (Figure 1-6b)。

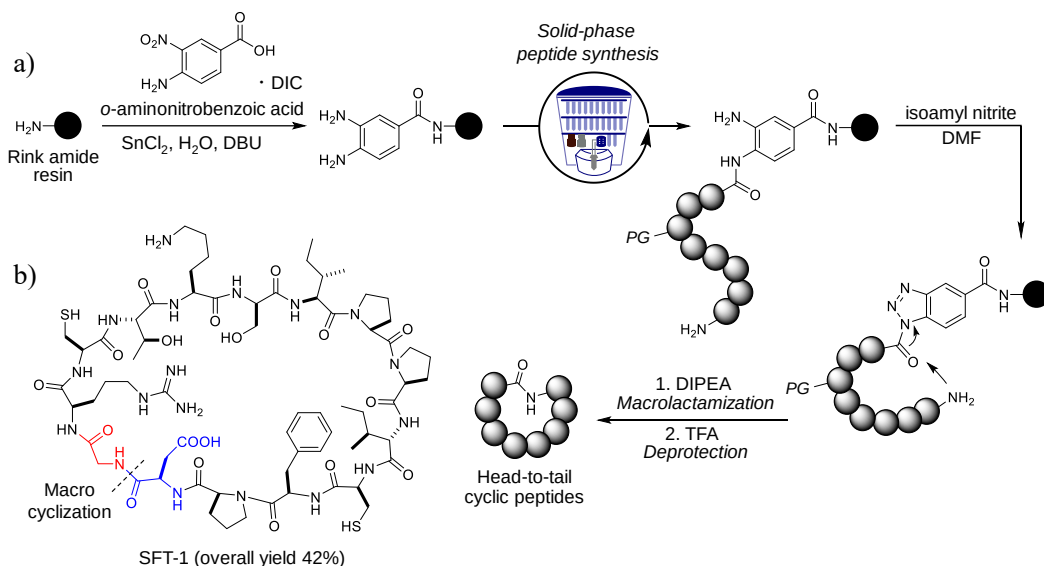


Figure 1-6. 固相合成樹脂上でのペプチドのマクロラクタム化

a) 本手法の合成スキーム b) SFT-1 の化学構造

さらに、2019年にメルボルン大学の Hutton らの研究グループは、チオアミドと Ag^+ イオンによるイソイミド形成を介したペプチドのマクロラクタム化手法を報告した²⁵ (Figure 1-7a)。本手法では、N 末端にチオアミド構造を有する鎖状ペプチドを Fmoc 固相合成法により調製したのち、反応系中に炭酸銀を添加することで、 Ag^+ イオンによるペプチド鎖 C 末端カルボキシ基と N 末端チオアミド間でのイソイミド形成と、続く分子内アシル転移反応が進行し環状ペプチドを生成する。本手法は HATU のような縮合剤を利用した従来型のマクロラクタム化手法と比べて反応効率が十数倍高い利点を有する一方で、基質となる鎖状ペプチドを合成するためにチオアミド構造を有するアミノ酸のビルディングブロックを別途調製する必要があり、基質合成が煩雑になる点が課題となる。Hutton らは本手法を用いることで、gramicidine S、mahafacyclic B や RGD ペプチドなどの生物活性環状ペプチドを収率 20~30%で合成することに成功している (Figure 1-7b)。

以上のように、鎖状ペプチドのマクロラクタム化手法は今日に至るまで精力的に研究・開発されており、従来法が抱える課題の一部は克服されつつある。その一方で、環化反応に用いる残基の制限や基質合成の煩雑さ、合成収率の低さの点においては依然として改善の余地を残しており、より効率的で堅牢性の高いマクロラクタム化手法の開発が望まれる。

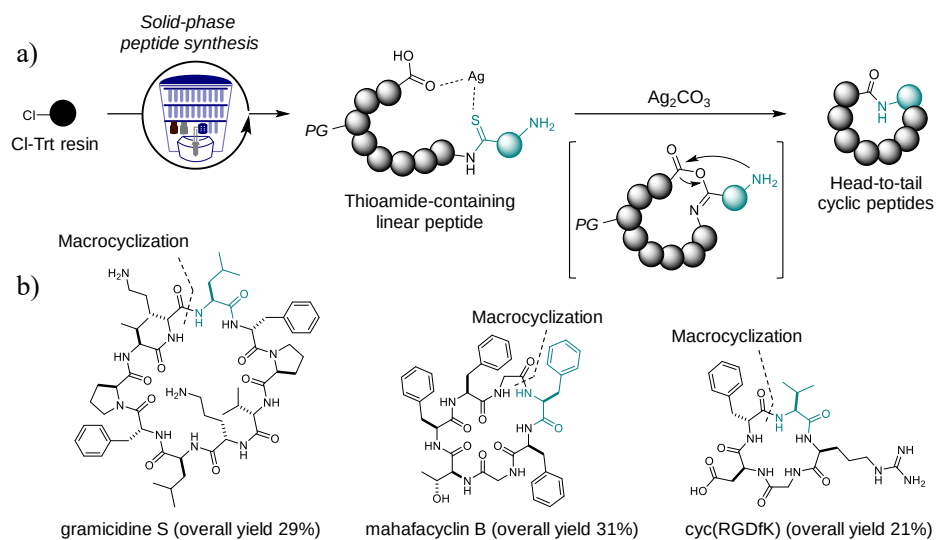


Figure 1-7. チオアミドと Ag^+ イオンを利用したペプチドのマクロラクタム化
a) 本手法の合成スキーム b) 本手法で合成した環状ペプチドの化学構造

第三節 酵素を利用したペプチドのマクロラクタム化

先述した有機合成的手法に加え、近年ではバクテリアや植物が有する酵素を利用したペプチドのマクロラクタム化手法も多数開発されている。ペプチド環化酵素は、温和な条件下、保護基を用いることなく高い官能基選択性・立体選択性・位置選択性で環化反応を触媒する。そのため、酵素を利用したペプチド環化法は既存の有機合成的手法の欠点を相補する効率的で環境調和性に優れた手法として期待されている。現在、生体触媒としての応用が期待される代表的なペプチド環化酵素として sortase A、butelase 1 や omniligase-1 等の peptiligase 改変酵素が挙げられる。

Sortase A は、1999 年にカリフォルニア大学の Olaf Schneewind らの研究グループにより *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) から発見されたペリプラズム局在性のペプチド転移酵素である^{26, 27}。Sortase A は LPXTG モチーフを C 末端に有するタンパク質 (LPXTG タンパク質) を特異的に認識し、それを細胞表面の lipid II へと結合することで表層タンパク質を形成する役割を担う。Sortase A によるペプチド転移反応はアシル化とアミド化の 2 段階の反応から構成される (Figure 1-8)。まず初めに、sortase A の触媒 Cys 残基の求核攻撃により LPXTG モチーフの Thr と Gly 間のペプチド結合が切断されアシル化が進行し、基質-酵素複合体を形成する。その後、lipid II のオリゴグリシンの求核攻撃により脱アシル化が進行し、基質タンパク質と lipid II 間で新たにペプチド結合が形成される。Sortase A の基質となる LPXTG タンパク質は、繊維タンパク質ピリンや付着促進性の表面糖タンパク質、免疫グロブリンなど多岐にわたり、それらが宿主からの免疫応答の回避、宿主との相互作用やコロニー形成の促進に関与することが知られている²⁸。したがって、sortase A をコードする *srtA* 遺伝子を欠損した *S. aureus* 変異体は LPXTG タンパク質を細胞壁に提示する機能を失い、宿主への感染能力が大幅に減弱する。

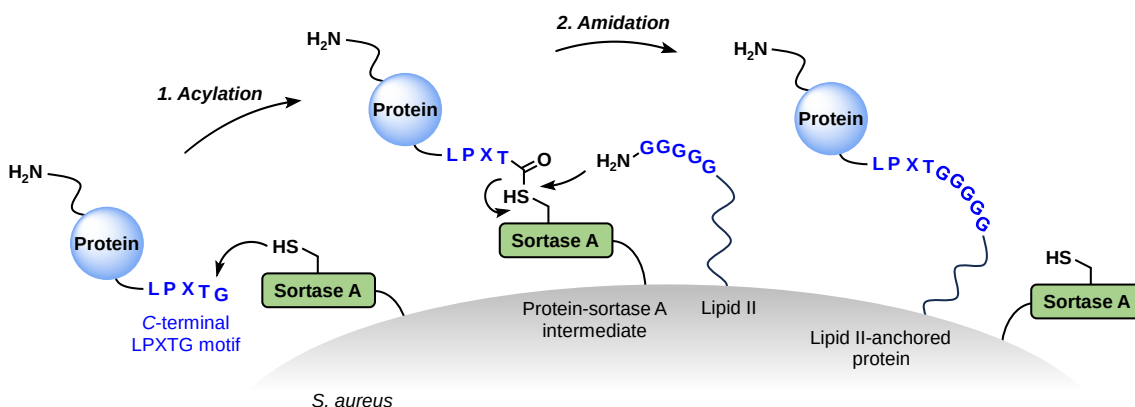
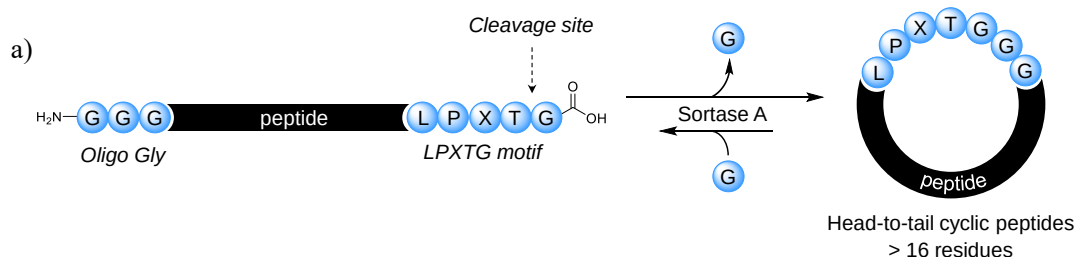


Figure 1-8. Sortase A によるペプチド結合形成反応

Sortase A は多種多様な LPXTG タンパク質のペプチド結合を触媒する寛容な基質選択性を有するため、近年では分子間や分子内でのペプチド結合を触媒する生化学試薬として応用研究が進められている²⁹⁻³²。2011 年、フロリダ大学の Guo らの研究グループは、sortase A の分子内ペプチド結合形成反応を利用した head-to-tail 型環状ペプチドの化学-酵素合成法を報告した³³ (Figure 1-9a)。C 末端に LPXTG モチーフを有し、かつ N 末端にオリゴ Gly 配列を有する鎖状基質を固相合成法により調製したのち sortase A の *in vitro* 酵素反応に供することで、40~60% の中程度の変換効率で目的の環状ペプチドを得ることに成功した。また、2018 年、江南大学の Wu らの研究グループは sortase A を利用した固相合成樹脂上でのペプチド環化法を報告した³⁴ (Figure 1-9b)。本手法では、親水性の PEGA 樹脂を固相合成に採用することで、基質合成後の脱樹脂工程を経ることなく sortase A の酵素反応を直接行うことが可能となった。これにより、より簡略化された合成スキームで、かつ高い純度で目的の head-to-tail 型環状ペプチドを得ることに成功した。

その一方で、sortase A によるペプチド環化反応にはいくつかの課題点が存在する。第一に、合成できる環状ペプチドの環サイズの制限である。Sortase A は一般に、16 残基以上の比較的長鎖の基質に対しては良好な効率で環化反応を触媒する一方で、16 残基以下の短い基質を酵素反応に用いた場合には環化単量体よりもオリゴマー化した環化体を優先的に生成する。そのため、cyclosporin A や pasireotide に代表される 6~10 残基程度の中程度の環サイズを有する環状ペプチドの合成には本酵素は適用できない。第二に、厳密な基質認識条件である。Sortase A は C 末端の LPXTG モチーフと N 末端のオリゴ Gly 間での環化反応を触媒するため、本認識モチーフを有さない環状ペプチドの合成には適用できない。さらに、生成する環状ペプチドの配列内には基質認識モチーフ LPXTG が残存するため、本手法により合成できる環状ペプチドのケミカルスペースは非常に限定的である。上記の課題点に加えて、競合する逆反応により収率が低下する点や、触媒効率が低く 20 時間以上の長い反応時間を要する点も、本酵素の欠点として挙げられる。



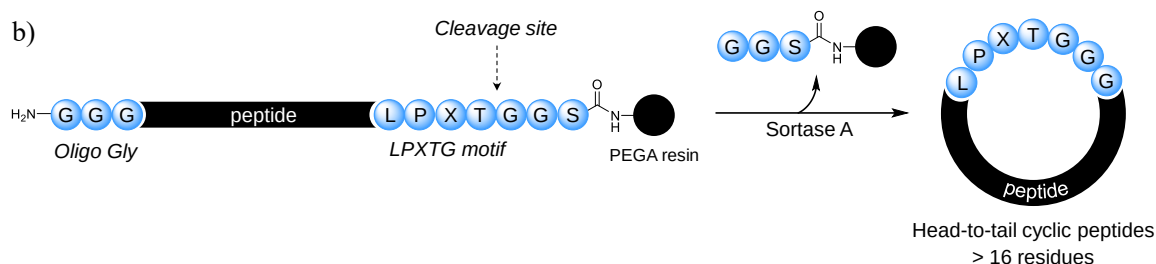


Figure 1-9. Sortase A の環状ペプチド合成への適用

- a) Sortase A による分子内マクロラクタム化
b) Sortase A による固相樹脂上での分子内マクロラクタム化

Butelase 1 は、2014 年に南洋理工大学の Tam らの研究グループにより熱帯植物 *Clitoria ternatea* から発見されたシステイントランスペプチダーゼである^{35, 36}。Butelase 1 は植物由来環状ペプチドである cyclotide ファミリーの生合成において鎖状生合成中間体の head-to-tail 環化反応を触媒する (**Figure 1-10**)。Butelase 1 は sortase A と同様、基質 C 末端に存在する 3 残基からなる基質認識モチーフ Asx-HV (Asx = Asn/Asp) を認識したのち、His と Val 間のペプチド結合の切断とジペプチドの放出を伴って基質-酵素複合体を形成する。その後、N 末端残基の求核攻撃により分子内選択的なマクロラクタム化が進行し、環状ペプチドが生成する。2016 年、同研究グループにより butelase 1 の詳細な機能解析が行われ、本酵素の寛容な基質選択性が明らかになった³⁷。基質 N 末端に対する残基選択性に関しては、N 末端 2 位のアミノ酸残基は疎水性アミノ酸 (I/V/L) や Cys のみに限定されるものの、N 末端 1 位の残基に対しては酸性残基や第 2 級アミンを有する Pro 以外であれば効率よく環化反応を触媒することが可能である。また、タンパク質性アミノ酸だけでなく、D-アミノ酸やアルキル鎖を配列中に含む基質も環化できるため、幅広い環状ペプチドに適用可能である。さらに、butelase 1 は sortase A と比べて約 2 万倍優れた触媒効率 ($k_{cat}/K_m = 1,300,000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) を示し、僅か 0.005 mol 等量の酵素量で定量的な環化反応が実施可能である。

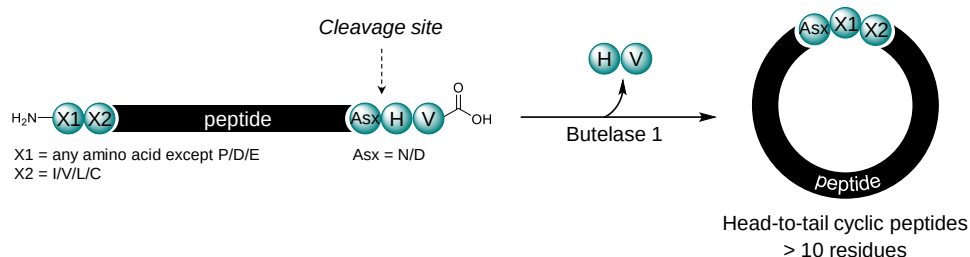


Figure 1-10. Butelase 1 による分子内マクロラクタム化

このように butelase 1 はペプチド環化触媒として優れた性質を示す一方で、sortase A と同様、環化できるペプチド鎖長には限りがあり、10 残基以下の中程度のサイズを有する環状ペプチドの合成には適用できない。また、生成する環状ペプチドの配列内に基質認識モチーフの一部である Asn や Asp が必ず含まれる点や、環化反応の際に His と Val のジペプチドユニットが放出されるため原子効率が悪い点が課題となる。さらに、butelase 1 の大腸菌による組換え酵素の異種生産法は確立されていないため、熱帯植物 *Clitoria ternatea* からの抽出精製が必須であり、酵素の獲得に手間を有することも触媒利用における課題である。2017 年にジョーンズ・ホプキンス大学の Wu らの研究グループが、butelase 1 のホモログ酵素である OaAEPb の大腸菌による組換え酵素の異種発現に成功したものの、その発現量は培養液 1L 当たり 2 mg 以下と十分でなく、触媒活性も butelase 1 と比較して大幅に減弱するものであった³⁸。

Butelase 1 と同様に優れた触媒活性を有するペプチド環化酵素として omniligase-1 が挙げられる。Omniligase-1 は、2017 年に EnzyPep.B.V 社の Nuijens らの研究グループが *Bacillus amyloliquefaciens* 由来のセリンプロテアーゼである subtilisin を改変して創製した組換え酵素である^{39, 40}。Omniligase-1 は、上述の sortase A や butelase 1 とは異なり、C 末端にエステル構造を有する鎖状ペプチドを基質認識する (Figure 1-11)。まず、Omniligase-1 の触媒 Cys 残基が基質 C 末端のエステル結合に求核攻撃し、脱離基 OCam-Leu の放出を伴って基質-酵素複合体を形成する。その後、N 末端残基の求核攻撃が起こることで分子内選択的なマクロラクタム化が進行し、head-to-tail 型環状ペプチドが生成する。本酵素反応において基質認識モチーフに必要な構造は脱離基 OCam-Leu のみであり、sortase A や butelase 1 のように生成する環状ペプチドの配列内に特定のアミノ酸配列を残さないため汎用性に優れている。また、酵素反応に必要な酵素量も基質に対して 0.0003 mmol 等量と高い反応性を示し、組換え酵素も大腸菌にて容易に調製できる利点を有する。

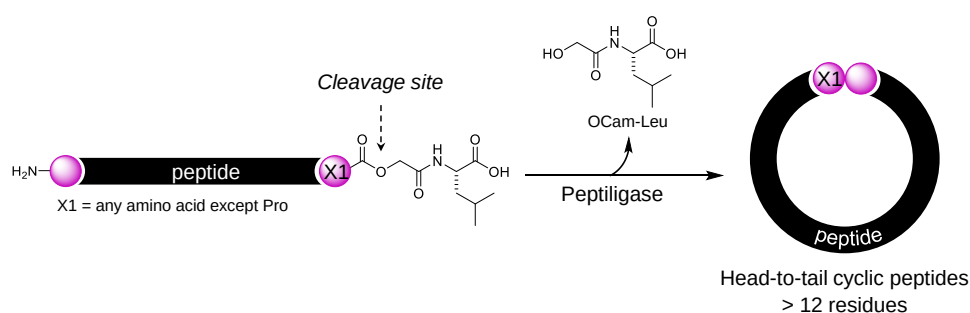


Figure 1-11. Omniligase-1 による分子内マクロラクタム化

その一方で、Fmoc 固相合成で簡便に基質を供給できる sortase A や butelase 1 とは異なり、omniligase-1 は基質 C 末端にエステル構造を要求するため、基質の化学合成が煩雑になる点が課題となる。また、上記の酵素と同様に環化できる基質の鎖長には制限があり、12 残基以下の環状ペプチドの合成には適用することができない。

このように、酵素を用いたマクロラクタム化は高い官能基選択性・立体選択性・位置選択性で所望の環状ペプチドを与えるため合成上有力な手法となるものの、酵素の触媒能や異種発現の可否、基質合成の煩雑さなど様々な側面でその適用が制限されている。特に、医薬品として臨床応用されている cyclosporin や pasireotide に代表されるような、免疫原性が低く“drug-like”な特性を示す中程度の環サイズを有する環状ペプチドの合成には上記酵素は適用できない。したがって、従来酵素では未踏である環サイズを有する環状ペプチドの合成へと適用可能な生体触媒の開発が望まれている⁴¹。

第四節 非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS)

天然から見出される環状ペプチドの多くは、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS: Non-ribosomal peptide synthetase) により生合成される^{42, 43}。NRPS は一般に、3~15 残基から構成されるペプチド性化合物の生合成を担い、これにより生合成される環状ペプチドは D-アミノ酸や N-メチル化アミノ酸などの非タンパク質性アミノ酸を多く含有する。また、その化学構造も直鎖状ペプチドや head-to-tail 型環状ペプチド、head-to-side chain 型環状ペプチドと多岐にわたり、多種多様な生物活性を有することが特徴として挙げられる。

NRPS は全長数百 kDa にもおよぶ巨大酵素であり、各部位ごとにそれぞれ異なる反応を触媒する機能性ドメインを有する。NRPS を構成する基本的な機能性ドメインとして、PCP (Peptidyl carrier protein) ドメイン、A (Adenylation) ドメイン、E (Epimerization) ドメイン、C (Condensation) ドメイン、および TE (Thioesterase) ドメインの 5 つが挙げられる。また、PCP ドメイン、A ドメイン、C ドメイン (場合によっては E ドメイン) が 1 つずつ纏まったアミノ酸 1 分子の伸長に関与する基本単位のことをモジュールという。

PCP ドメインは A ドメインの下流に位置する約 100 残基から構成されるタンパク質であり、伸長された鎖状生合成中間体の足場として機能する。PCP ドメインは *apo* 体として発現し、phosphopantetheinyl transferase (PPTase) により coenzyme A のホスホパンテテイル基が PCP ドメインに保存された Ser 残基に転移する翻訳後修飾を受けることで、活性化状態の *holo* 体へと変換される (Figure 1-12)。

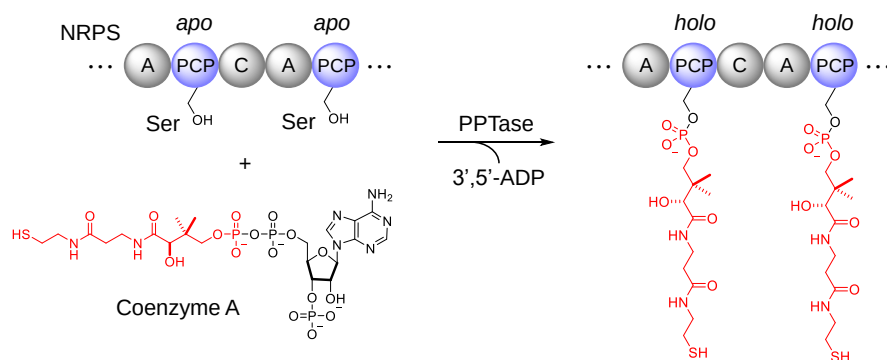


Figure 1-12. PPTase による PCP の *holo* 化

A ドメインは C ドメインの下流に位置する約 550 残基から構成される機能性ドメインであり、ビルディングブロックとなる特定のアミノ酸を認識したのち、ATP を用いてカルボキシ基のアデニル化を行い、そのアミノ酸を *holo* 化された PCP ドメインに縮合する (Figure 1-13a, b)。A ドメインは、基質となるアミノ酸残基を厳密に認識するため、NRPS

生合成におけるゲートキーパーとして機能する。A ドメインのアミノ酸選択性は、その基質ポケットを構成する約 10 残基により決定されることが明らかとなっており、A ドメインの一次配列から基質アミノ酸を予想する web ツール (NRPSpredictor2) が開発されている⁴⁴。

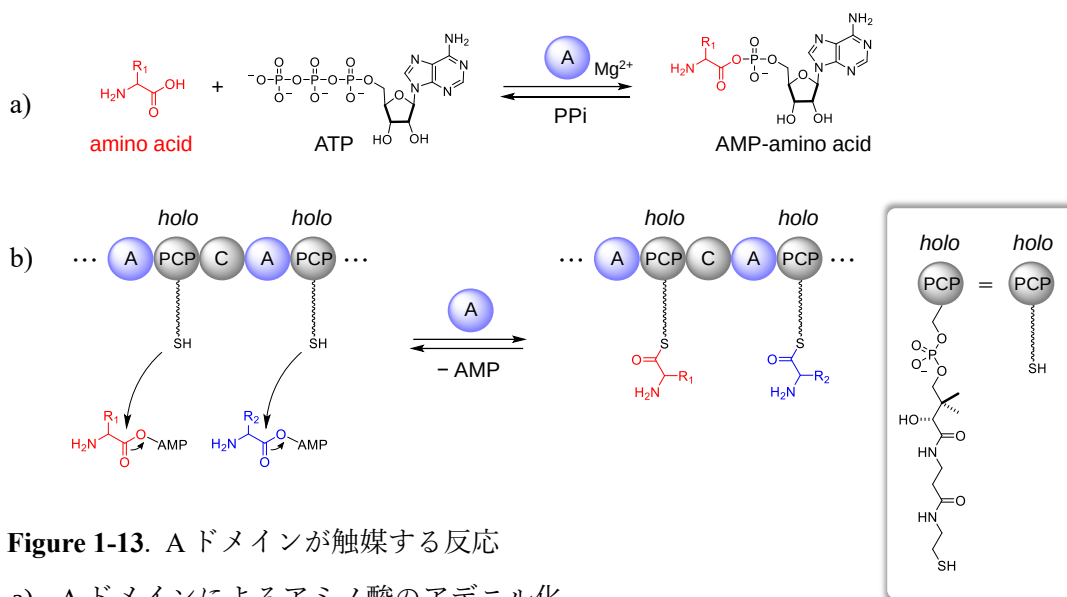


Figure 1-13. A ドメインが触媒する反応

- a) A ドメインによるアミノ酸のアデニル化
- b) A ドメインによるアミノ酸の PCP への縮合

E ドメインは PCP ドメインの下流に位置する約 450 残基から構成される機能性ドメインであり、上流の PCP ドメインに担持されたアミノ酸の C α のエピメリ化を触媒する (**Figure 1-14**)。本ドメインがモジュール内に存在することで D-アミノ酸が最終産物の骨格に取り込まれるため、NRPS により生合成されるペプチド性天然物の化学構造に多様性が創出される。

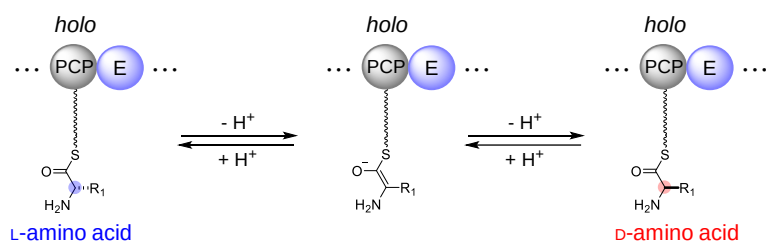


Figure 1-14. E ドメインによるアミノ酸側鎖のエピメリ化

C ドメインは PCP ドメインの下流に位置する約 450 残基から構成される機能性ドメインであり、上流と下流の PCP ドメインに担持されたアミノ酸同士の縮合、もしくはアミノ酸とオリゴペプチドの縮合を触媒し、ペプチド鎖を伸長する (**Figure 1-15**)。C ドメインは V 字形の擬二量体構造を有し、上流の PCP ドメインに担持されたアミノ酸もしくはペプチド鎖を認識するドナー部を N 末端側に、下流の PCP ドメインに担持されたアミノ酸を認識す

るアクセプター部を C 末端側に有する。一般に、N 末端のドナー部は本来の基質に対して厳密な選択性を示す一方で、C 末端のアクセプター部は比較的寛容な基質選択性を有することが明らかとなっている。また、近年では遺伝子工学技術の発展に伴い、天然とは異なる組み合わせのアミノ酸同士の縮合反応を触媒する改変型 C ドメインの創出が可能となった。これにより、NRPS アッセンブリーラインの改変による非天然型ペプチド化合物の生物合成が数例報告されている^{45,46}。

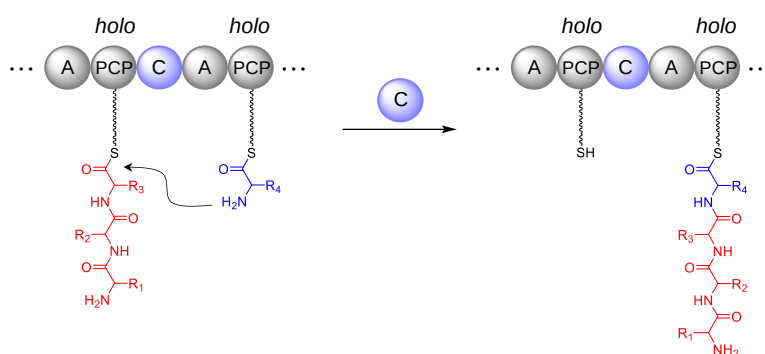


Figure 1-15. C ドメインによる鎖状生合成中間体の伸長反応

各ドメインの働きにより伸長された鎖状生合成中間体は、最終的に NRPS の C 末端に存在する TE ドメインにより、環化反応や加水分解反応が触媒され、最終産物が NRPS から切り出される。TE ドメインにより触媒される反応はアシル化とデアシル化の 2 段階の反応から構成される (**Figure 1-16**)。まず、TE ドメインの触媒 Ser 残基もしくは触媒 Cys 残基が生合成中間体のチオエステル結合へ求核攻撃することで TE ドメインにペプチド鎖が転移し、基質-酵素複合体を形成する。その後、ペプチド鎖の N 末端アミンや配列内部の求核性側鎖の求核攻撃によりデアシル化が進行し、分子内での環化反応が進行する。この際、分子内での求核攻撃が進行しない場合には、TE ドメインの活性ポケット内の水分子の求核攻撃により加水分解反応が進行し、鎖状ペプチドを生成する。この他に、TE ドメイン以外の酵素により PCP ドメインからの最終産物の放出が触媒される場合がある。R (Reductase) ドメインは、NRPS の C 末端に存在し、伸長された生合成中間体の 2 電子または 4 電子還元を触媒する NADPH 依存型デヒドロゲナーゼ/レダクターゼである (**Figure 1-17a**)。これにより放出される産物は鎖状アルデヒドやアルコールであり、その後、分子内環化反応を経て環状ペプチドが生合成される例がいくつか報告されている⁴⁷⁻⁵⁰。C_T (Condensation-like) ドメインは、NRPS の C 末端もしくは C 末端 PCP ドメインの上流に存在し、主に真菌類のペプチド生合成に広くみられる C ドメイン様のペプチド環化酵素である (**Figure 1-17b**)。Cyclosporin などの大環状ペプチドやジケトピペラジン (DKP) 骨格を有する小分子ペプチドが C_T ドメインによる環化を経て生合成されることが報告されている⁵¹⁻⁵³。

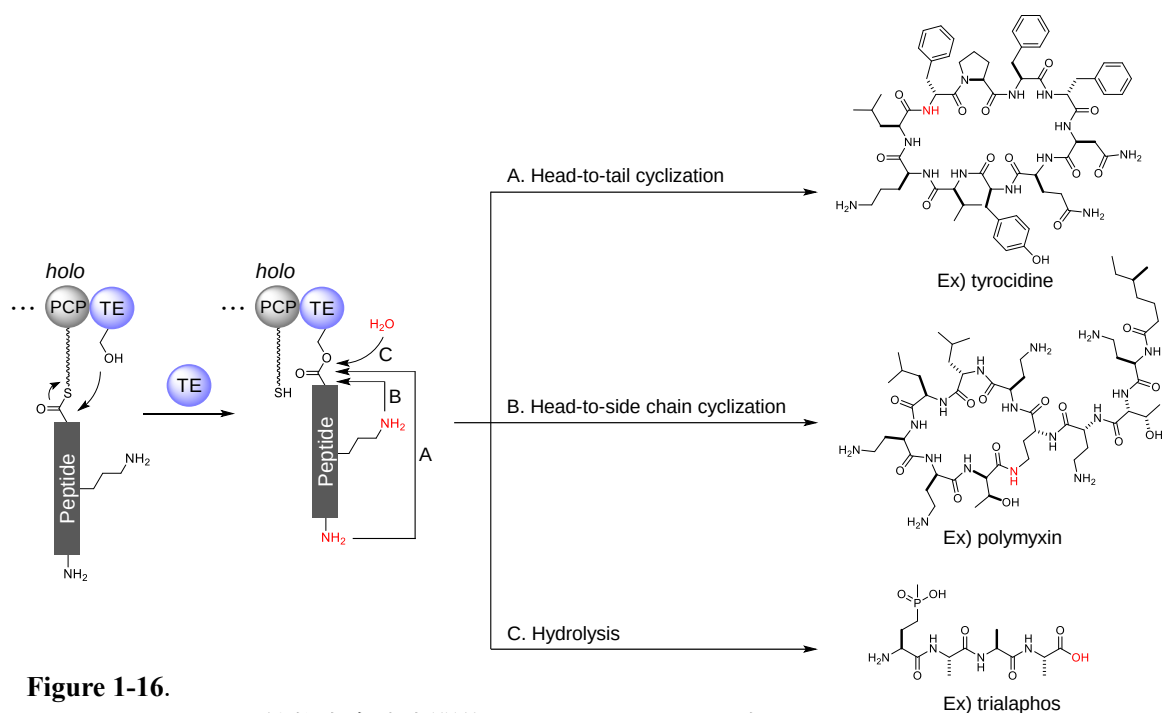


Figure 1-16.

TE ドメインによる鎖状生成中間体の NRPS からの切り出し

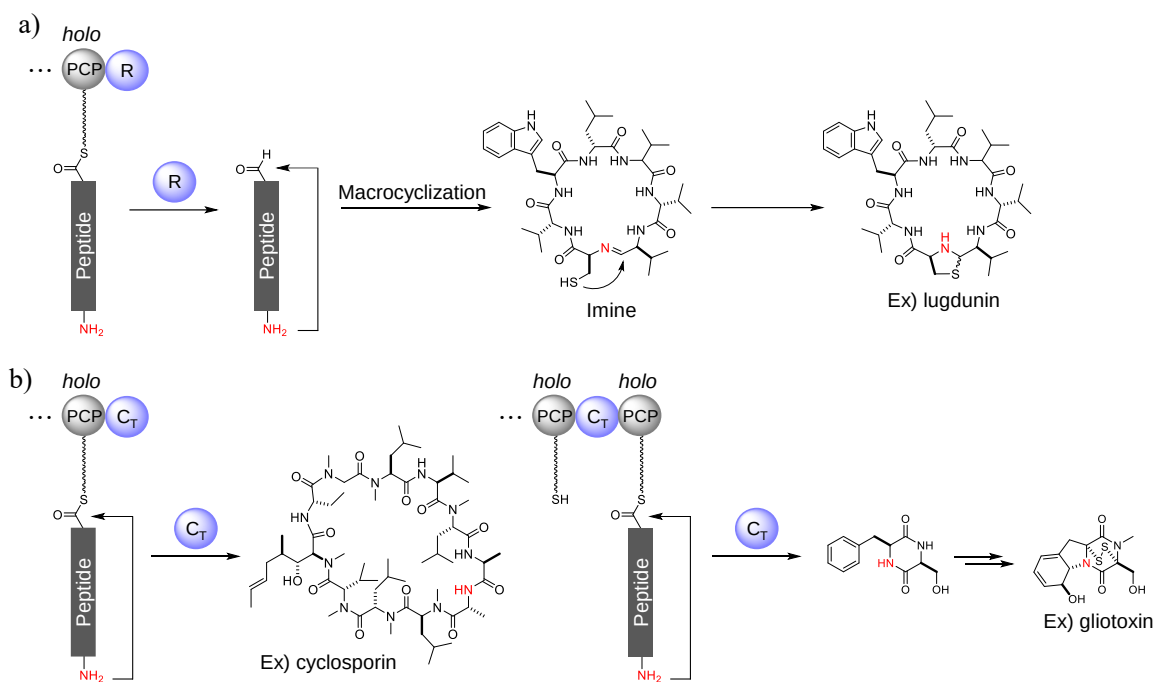


Figure 1-17. TE ドメイン以外の酵素によるペプチドのマクロラクタム化

a) R ドメインによる生成中間体の放出と環化

分子内環化反応によりイミンが生成後、Cyc 残基との反応によりチアゾリジン環が形成

b) C_T ドメインによる生成中間体の放出と環化

TE ドメインの生体内における本来の基質は、NPRS の PCP ドメインにチオエステル結合を介して担持された生合成中間体であるが、本反応は大幅に簡略化した基質を用いて試験管内で再構成することができる。2000 年、ハーバード大学の Walsh らの研究グループは NRPS により生合成される抗菌活性環状デカペプチド tyrocidine A の生合成に着目し、生合成最終段階を担う TE ドメインの機能を *in vitro* にて世界で初めて明らかにした⁵⁴。Walsh らは大腸菌を用いて調製した TE ドメインの組換え酵素 TycC-TE と、ホスホパンテテイル基を部分的に模倣した *N*-acetylcysteamine (SNAC) を C 末端に導入したチオエステル基質 (SNAC 基質) を用いて *in vitro* 酵素反応を行うことで、化学-酵素的に tyrocidine A を合成することに成功した (Figure 1-18a, b)。

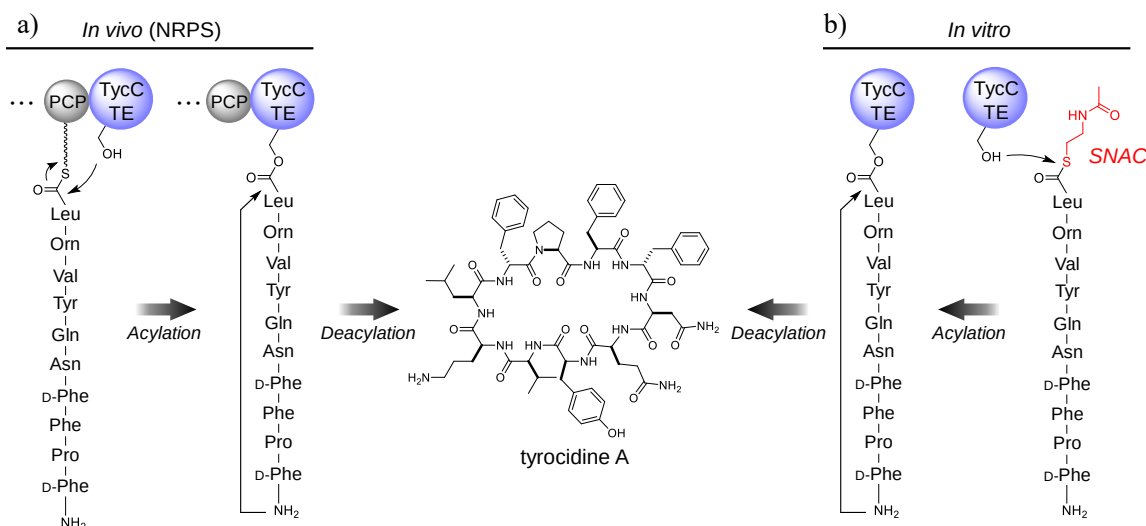


Figure 1-18. TycC-TE による鎖状ペプチドのマクロラクタム化

- a) *In vivo* (NRPS) における TycC-TE の機能
- b) SNAC 基質を用いた *in vitro* における TycC-TE の機能解析

続く 2002 年、同研究グループは TycC-TE を用いた合成樹脂上でのマクロラクタム化による tyrocidine 誘導体のライブラリー合成法を報告した⁵⁵ (Figure 1-19)。本手法ではまず、親水性の固相合成樹脂である PEGA 樹脂を用いて、ホスホパンテテイル基を模倣したリンカー部の合成とペプチド鎖の伸長を行う。次に TFA によるペプチド側鎖の脱保護を行ったのち、反応系中に組換え酵素 TycC-TE を添加することで、TE ドメインによるペプチド鎖の樹脂からの切り出しとマクロラクタム化が進行し環状ペプチドが生成する。彼らは本手法を駆使して tyrocidine A の N 末端 1 位の D-Phe と N 末端 4 位の D-Phe を多様な置換基に変換した 192 種類の類縁体ライブラリーを創出し、抗菌活性試験を行った。これにより、

tyrocidine A と比べてヒト赤血球への溶血活性を抑制し、かつ緑膿菌に対する抗菌活性を向上した類縁体 $\Delta F10$ -tyrocidine A を獲得することに成功した。本手法は、望みの環状ペプチドを高い純度で合成できる利点を有する一方で、リンカー部の合成に多段階の反応を要することや、生じる環状ペプチドが MS にて検出できる程度の少量であることが課題となり、現状、ライブラリー合成などの創薬分野での適用に限られている。

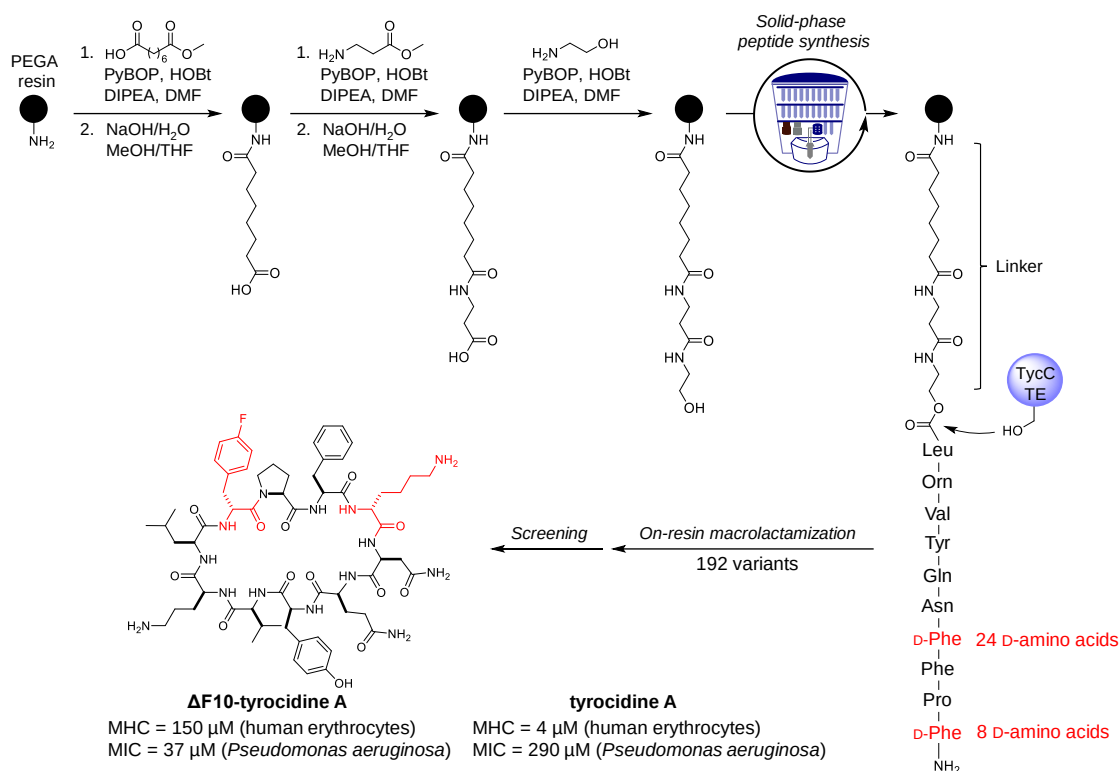


Figure 1-19. TycC-TE を用いた tyrocidine 誘導体ライブラリーの合成

Walsh らの先駆的な研究ののち、今日に至るまで様々な TE ドメインの機能解析が行われ、それら酵素の触媒利用が試みられてきた。NRPS の TE ドメインは、先述したペプチド環化酵素 sortase A、butelase 1 や omniligase-1 とは異なり、その多くが 5~13 残基程度の中程度の環サイズを有する環状ペプチドの生合成に関与するため、既存の生体触媒の欠点を相補する魅力的な酵素ファミリーであると考えられる。しかし、TE ドメインは一般に厳密な基質選択性を有するため、**Figure 1-19** のように一部分のみを置換した類似基質に対しては環化活性を維持するものの、本来の基質とはかけ離れたアミノ酸配列を有する基質に対しては環化活性を示さない。さらに、TE ドメインは細胞内において巨大な NRPS の一部として存在しており、他ドメインとの相互作用により構造安定化や機能制御がなされている⁵⁶。その

ため、TE ドメインのトランケート体を単独酵素として調製する際に正しくフォールディングされず封入体を形成する可能性や、可溶性タンパク質を獲得できたとしても本来の酵素活性を失う可能性があった⁵⁷。このような触媒としての扱いにくさから、TE ドメインを生体触媒として実用化することは困難であると考えられてきた。したがって、従来型のTE ドメインが抱える課題を解決した酵素、すなわち元々単独のタンパク質として存在し、かつ、寛容な基質選択性を有するペプチド環化酵素を新たに見出すことができれば、その生体触媒利用が大いに期待できると考えられる。

第五節 Surugamide 類の生合成

Surugamide A-E (**1-5**) は 2013 年、東京大学農学部の松永先生、高田先生らの研究グループにより海洋放線菌 *Streptomyces* sp. JAMM992 から単離された環状オクタペプチドである⁵⁸ (**Figure 1-20a**)。 *In vitro* による活性試験により、surugamide 類はがんの浸潤や膨潤に重要な役割を担うカテプシン B に対して阻害活性を示すことが明らかとなっている。また、2016 年には同研究グループにより surugamide 生産菌の生合成遺伝子クラスターが解明され、**1-5** とは構成残基や鎖長が異なる新規鎖状デカペプチド surugamide F (**6**) が同クラスターの生合成産物として単離・構造決定された⁵⁹ (**Figure 1-20b**)。 Surugamide 類の生合成遺伝子クラスターは 4 つの *nrps* 遺伝子 (*surA*、*surB*、*surC*、*surD*) から構成されており、これらにコードされた NRPS、SurA と SurD により環状オクタペプチド **1-5**、SurB と SurC により鎖状デカペプチド **6** が生合成される (**Figure 1-20c**)。

Surugamide 類の生合成における興味深い特徴として、本来 NRPS の C 末端に存在し、鎖状生合成中間体の環化反応や加水分解反応を触媒する TE ドメインが欠損していることが挙げられる (**Figure 1-21**)。 **1-5** および **6** の生合成における生合成中間体のペプチド伸長反応は一般的な NRPS と同様の機構で触媒される。その一方で、本アッセンブリーラインには、生合成最終段階を触媒する TE ドメインや C_T ドメイン、R ドメインが存在しないため、これまでに報告例のない未知の機構により生合成中間体の NRPS からの切り出し、および環化反応と加水分解反応が触媒されることが示唆された。

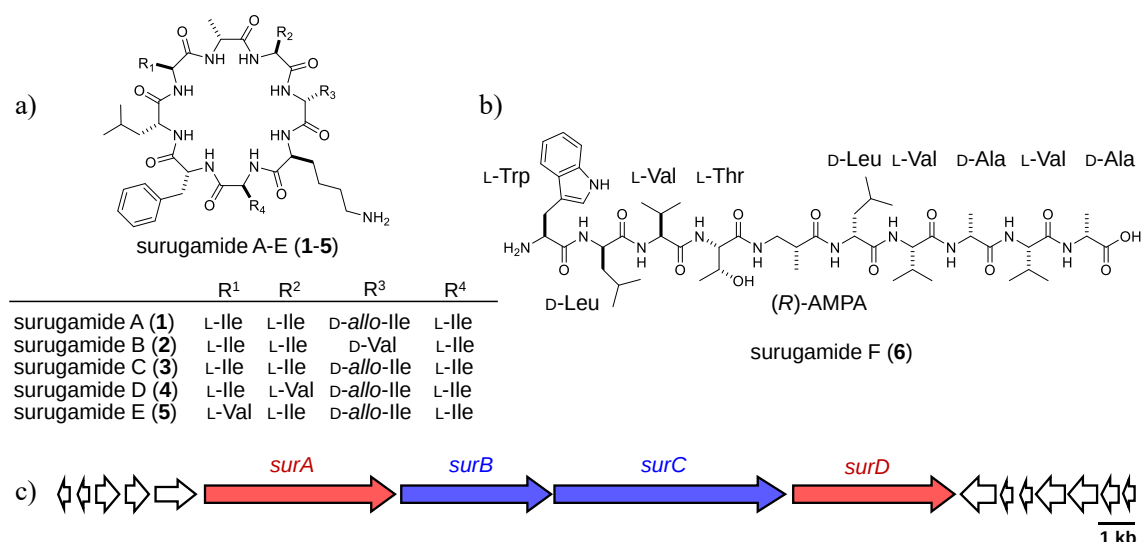


Figure 1-20. Surugamide 類の化学構造

- a) Surugamide A-E (**1-5**) の化学構造 b) Surugamide F (**6**) の化学構造
c) Surugamide 類の生合成遺伝子クラスター

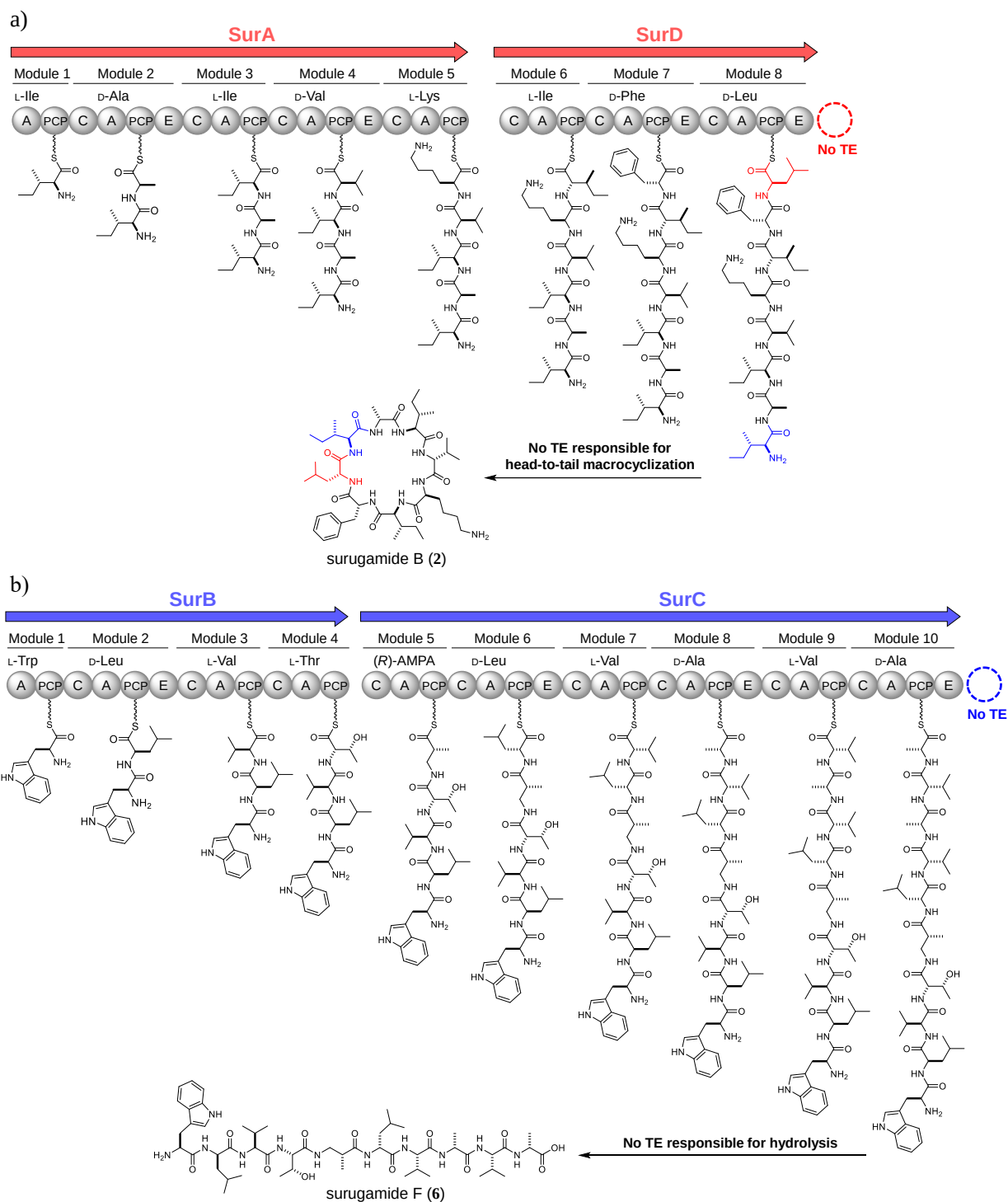


Figure 1-21. TE ドメインが欠損した surugamide 類の生合成アッセンブリーライン

- a) 環状オクタペプチド surugamide A-E (1-5) の生合成
ここでは surugamide B (2) の生合成を例に示した。
- b) 鎖状デカペプチド surugamide F (6) の生合成

当研究室ではこれまで、環状オクタペプチド **1-5** の生合成に着目し、生合成中間体を模倣した SNAC 基質を用いて非酵素的な環化の可能性を検証してきた。当研究室の卒業生である佐野文映 修士は、surugamide B (**2**) の環化前駆体である SNAC 基質 *seco*-surugamide B-SNAC (**7**) を塩基性条件下、縮合剤を加えず水中で 2 日間静置し、得られた反応溶液を HPLC にて分析し環化反応の進行を検証した (Figure 1-22)。その結果、SNAC 基質 **7** の環化反応の進行は確認されたものの、生成した環化体は **2** ではなく、N 末端 5 位の L-Lys 側鎖で環化したイソペプチド **8** であった。この結果から、天然物にみられるようなペプチド鎖 C 末端残基と N 末端残基での head-to-tail 環化反応を選択的に触媒する酵素が surugamide 類の生合成に存在することが強く示唆された。また、鎖状デカペプチド **6** の生合成においても同様に、生合成中間体の加水分解反応は自発的には進行せず、未知の酵素により触媒されることが示唆された。

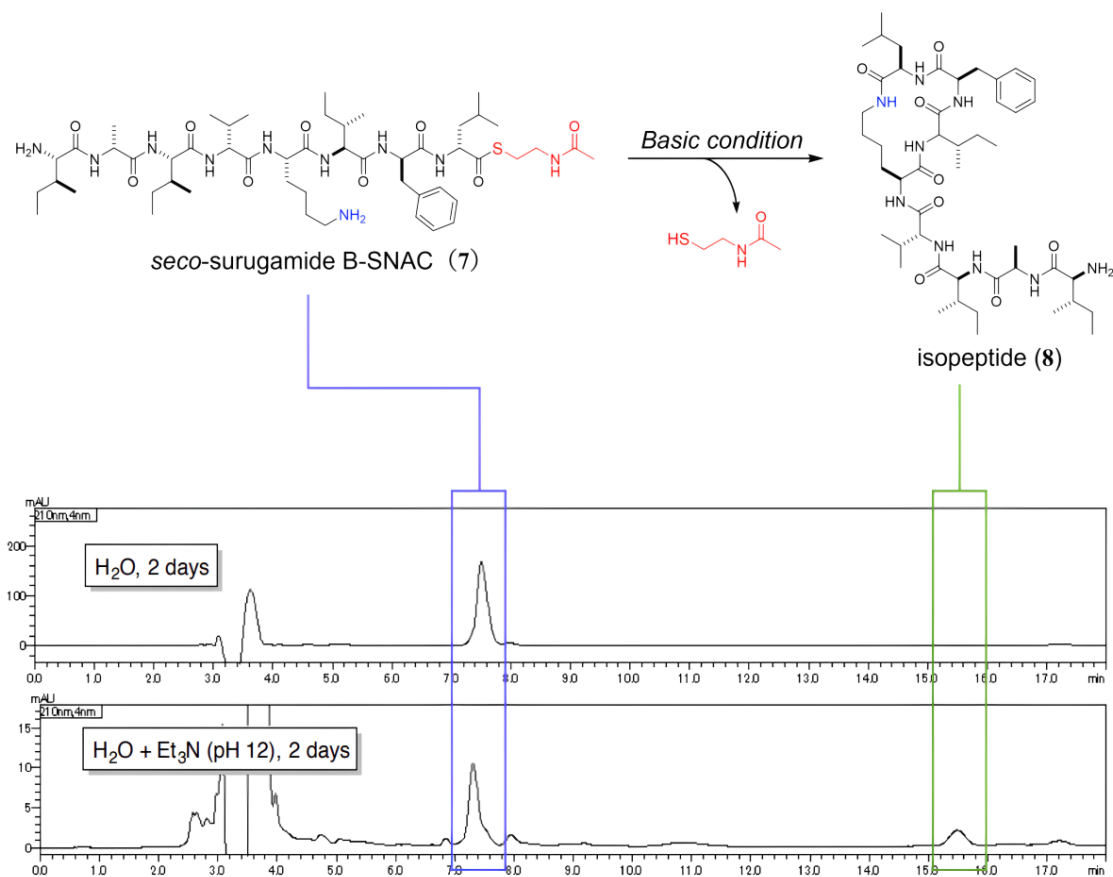


Figure 1-22. 鎖状生合成中間体の非酵素的な環化の検証

H₂O のみの反応液を 2 日間静置した結果を上段のクロマトグラムに示し、塩基 (Et₃N) を加えた反応液を 2 日間静置した結果を下段のクロマトグラムに示した。

第六節 本研究の目的

天然から見出される非リボソームペプチドの生合成においては、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) によって伸長された鎖状生合成中間体が、NRPS の C 末端に存在する TE ドメインにより、環化反応や加水分解反応を経て切り出される。その一方で、海洋放線菌 *Streptomyces* sp. JAMM992 が生産する surugamide 類の生合成遺伝子クラスター中には、生合成最終段階を触媒する TE ドメインが欠損していた。さらに、当研究室で行われた生合成中間体を模倣した SNAC 基質を用いた実験により、surugamide 類の環化反応は自発的に進行しないことが明らかとなった。このことから、surugamide 類の生合成にはこれまでに報告例のない未知のペプチド環化酵素や加水分解酵素が存在することが示唆された。そこで第二章の研究では、環状オクタペプチド surugamide A-E と鎖状デカペプチド surugamide F の新奇な生合成機構に着目し、*in vivo* および *in vitro* による詳細な解析を通じて、それら生合成中間体の環化機構と加水分解機構の解明を目指した。これを達成することで、NRPS 生合成における新規酵素の発見、および NRPS の生合成機構に関する新たな知見の獲得が期待される。

第二章の研究により、NRPS 生合成における新規ペプチド環化酵素 SurE が同定された。SurE は構成残基や鎖長が異なる 2 種類の環状ペプチドの生合成に関与するため、寛容な基質選択性を有するペプチド環化酵素であることが推測された。有機合成的手法によるペプチドの環化反応は、有機合成が発展した現代においても未だ制御の難しい反応であるため、SurE のような寛容な基質選択性を有するペプチド環化酵素を生体触媒として活用することで、効率的で環境調和性の高い環状ペプチド合成法の確立が期待できる。そこで第三章以降の研究では、SurE の生体触媒としての応用を見据え、複数の基質を用いて SurE の機能解析を行い、本酵素の基質適用範囲や基質認識機構に関する知見を得ることを目的とした。また、酵素反応に用いる鎖状基質の効率的合成法の開発、および SurE のホモログ酵素の探索や基質選択性を拡張した変異酵素を創出することで、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確立を目指した。

第七節 本論文の構成

第二章では、海洋放線菌 *Streptomyces* sp. JAMM992 から単離された環状オクタペプチド surugamide A-E と鎖状デカペプチド surugamide F の新奇な生合成に着目し、生合成中間体の環化機構と加水分解機構の解明、および新規非リボソームペプチド環化酵素 SurE の発見について述べる。第三章では、生合成中間体を模倣した SNAC 基質を用いて明らかとした SurE の基質選択性、および基質認識機構について述べる。第四章では、非リボソームペプチド環化酵素の触媒利用を目指す上でボトルネックであった鎖状基質の合成法を改良し、高収率かつ高純度で簡便に基質を供給できる新たな基質合成法の開発について述べる。また、本手法による SurE の基質選択性の網羅的解析と変異導入による SurE の基質選択性の改変について述べる。第五章では、前節にて確立した基質合成法を利用した head-to-side chain 型環状ペプチドの効率的な化学-酵素合成法の開発、およびセリン/スレオニンライゲーシオンの併用による環状ペプチドの構造展開について述べる。第六章では、本研究の総括と今後の展望について述べる。

第二章 新規非リボソームペプチド環化酵素 SurE の発見

第一節 本章の目的

天然から見出される非リボソームペプチドの生合成において、非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）によって伸長された鎖状生合成中間体は、NRPS の C 末端に存在する TE ドメインにより、環化反応や加水分解反応が触媒され切り出される。しかしながら、海洋放線菌 *Streptomyces* sp. JAMM992 が生産する surugamide 類の生合成遺伝子クラスター中には、生合成最終段階を触媒する TE ドメインが欠損していた。さらに、当研究室で行われた生合成中間体を模倣した SNAC 基質を用いた実験により、surugamide 類の環化反応は自発的には進行しないことが明らかとなった。したがって、surugamide 類の生合成にはこれまでに報告例のない新しいタイプのペプチド環化機構や加水分解機構が存在することが示唆された。

そこで本章では、環状オクタペプチド surugamide A-E と鎖状デカペプチド surugamide F の生合成機構に着目し、*in vivo* および *in vitro* による詳細な解析を通じて、それら生合成中間体の環化機構と加水分解機構の解明を目指した（Figure 2-1）。これにより、NRPS 生合成における新規酵素の発見、および NRPS の生合成機構に関する新たな知見が得られることが期待される。

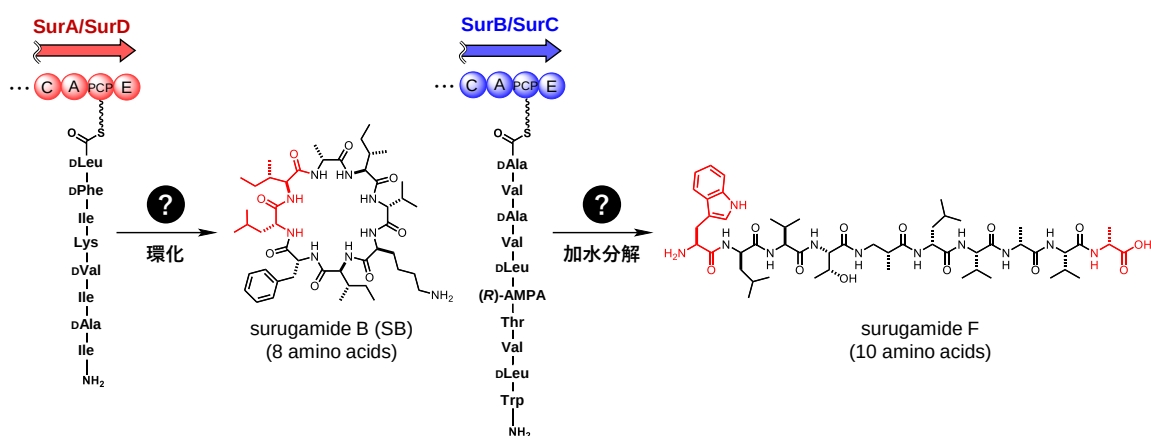


Figure 2-1. Surugamide 類生合成における生合成中間体の環化機構と加水分解機構の解明

第二節 候補遺伝子の探索と遺伝子破壊実験

Surugamide 類の生合成における生合成中間体の環化機構、および加水分解機構の解明を目指し、候補遺伝子を探索した。微生物が作り出す二次代謝産物は複数の生合成酵素により合成されるが、一般にそれらの酵素をコードする遺伝子はゲノムの特定の領域に集積し、生合成遺伝子クラスターを形成する⁶⁰。そのため、surugamide 類の生合成において生合成中間体の環化反応や加水分解反応を触媒する酵素遺伝子も同様に、NRPS 生合成遺伝子 *surA*, *surB*, *surC*, *surD* の近傍に存在することが考えられた。そこで、surugamide 生産菌である海洋放線菌 *Streptomyces* sp. JAMM992 のゲノム情報を再度詳細に解析した結果、生合成遺伝子クラスターの上流にコードされる Orf として *surE* を見出した。BLAST 検索⁶¹の結果、SurE は、ペニシリン結合タンパク質 (PBP: Penicillin-binding protein) と 40%前後の相同性を示すことが明らかとなった (Figure 2-2)。PBP のファミリータンパク質である *Pyrococcus abyssi* 由来の Pab87 (PDB ID: 2QMI) および *Bacillus cereus* 由来の ADP (Alkaline D-Peptidase, PDB ID: 4Y7P) と、SurE を構成するアミノ酸残基のアライメントをそれぞれ比較した結果、SurE のアミノ酸配列は PBP のそれと類似しており、PBP の酵素反応に重要な触媒 4 残基 (Ser、Lys、Asn、His) が SurE においても保存されてることが明らかとなった⁶² (Figure 2-3)。

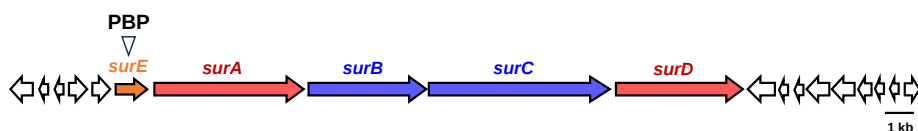


Figure 2-2. Surugamide 類生合成遺伝子クラスターの近傍にコードされた PBP

PBP はペプチドグリカン生合成の最終段階に関与するペリプラズム局在性のタンパク質である。PBP はその生化学的機能からトランスグリコシダーゼ・トランスペプチダーゼ・D-アラニカルボキシペプチダーゼの 3 種類に大別され、中でも、ペプチドグリカン生合成において広く認められるトランスペプチダーゼ活性は、アミノ酸間のペプチド結合形成を触媒することで強固な細胞壁の構築に関わるため、細菌の生存や発育に必須とされる⁶³。PBP によるペプチドグリカンの生合成機構は、アシル化とアミド化の 2 段階の反応により説明される (Figure 2-4)。まず、GlcNAc に結合した pentapeptide [L-Ala-γ-D-Glu-A₂pm (or L-Lys)-D-Ala-D-Ala] を基質として、PBP との間でミカエリス複合体を形成し、PBP の触媒 Ser 残基によるペプチド C 末端 D-Ala-D-Ala 間のカルボニル炭素原子上への求核攻撃により、アシル化が進行する。次に、ペプチドグリカンに存在する Lys 側鎖もしくは Gly による求核

アシル置換により、脱アシル化とアミド化が進行し、架橋構造が構築される。このような PBP のアミド結合形成機構は、生合成中間体の環化反応や加水分解反応を触媒する TE ドメインのそれと類似する。したがって、PBP と相同性を示す SurE が surugamide 類の生合成における環化反応や加水分解反応を触媒する可能性が考えられた。

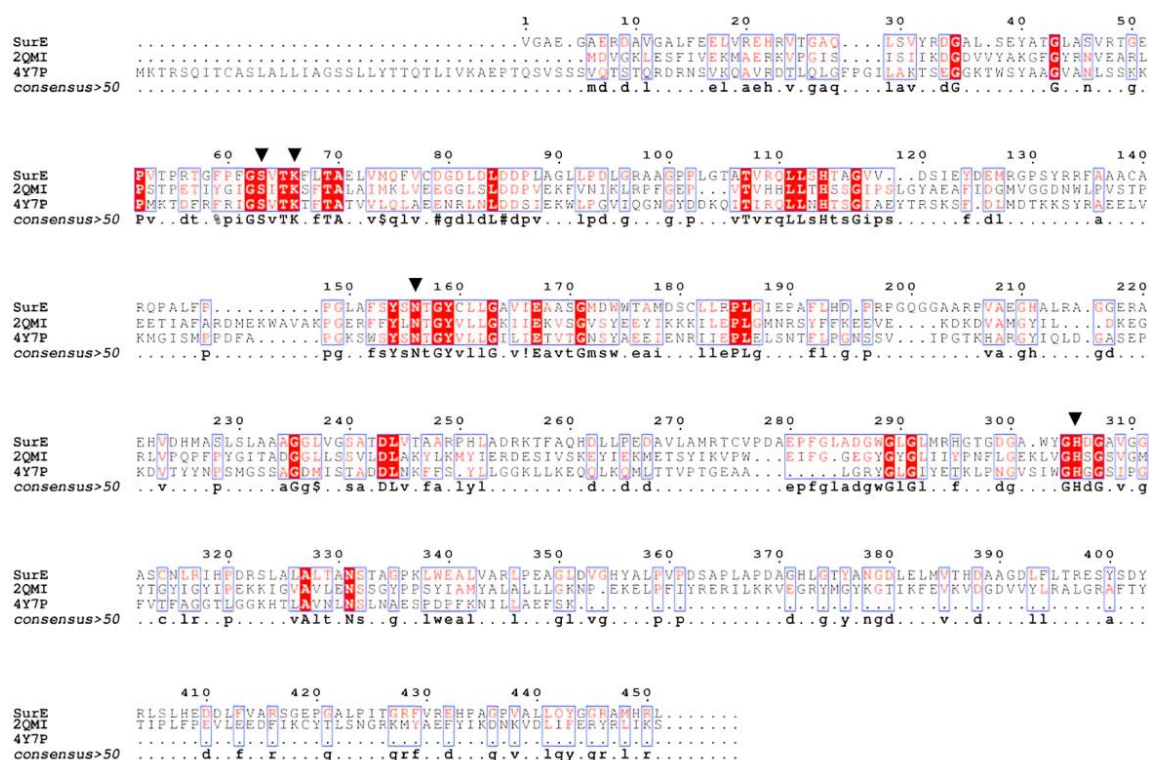


Figure 2-3. SurE と PBP (2QMI, 4Y7P) のアミノ酸アライメントの比較
酵素反応に関わると推測される触媒 4 残基を▼で示した。

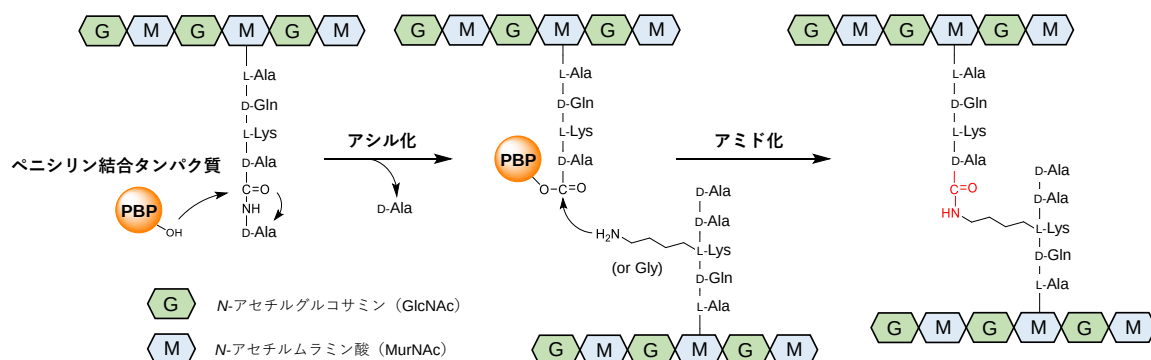


Figure 2-4. PBP によるペプチドグリカンの生合成機構

そこで、surugamide 生合成における SurE の関与を検証するべく、*surE* の遺伝子破壊実験を試みた。これに先立ち、まず初めに surugamide 類の生産量の最適化を目的に放線菌の培養条件の検討を行った。8種類の培地（Cia44 培地、TSB 培地、PC1 培地、ISP2 培地、A1 培地、Q 培地、avenolide 生産培地⁶⁴、K 培地）を用いて surugamide 生産菌 *Streptomyces albidoflavus* (*S. albidoflavus*) NBRC12854 を 30 °C で 5 日間培養し、各培地における surugamide 類の生産量を比較した。それぞれの代謝物を LC-MS にて分析し、環状オクタペプチド surugamide A と surugamide B-E の化合物ピーク強度（＝生産量）を比較した（Figure 2-5）。その結果、Cia44 培地、TSB 培地、PC1 培地、ISP2 培地、A1 培地を用いた場合には、目的物の生産量は微量であった一方で、Q 培地、avenolide 生産培地を用いた場合には目的物の生産量が増加し、K 培地を用いた場合に最大の生産量を与えることが明らかとなった。以上の検証結果から、以降の実験では K 培地を用いて surugamide 類生産菌、および *surE* 遺伝子破壊株を培養することとした。

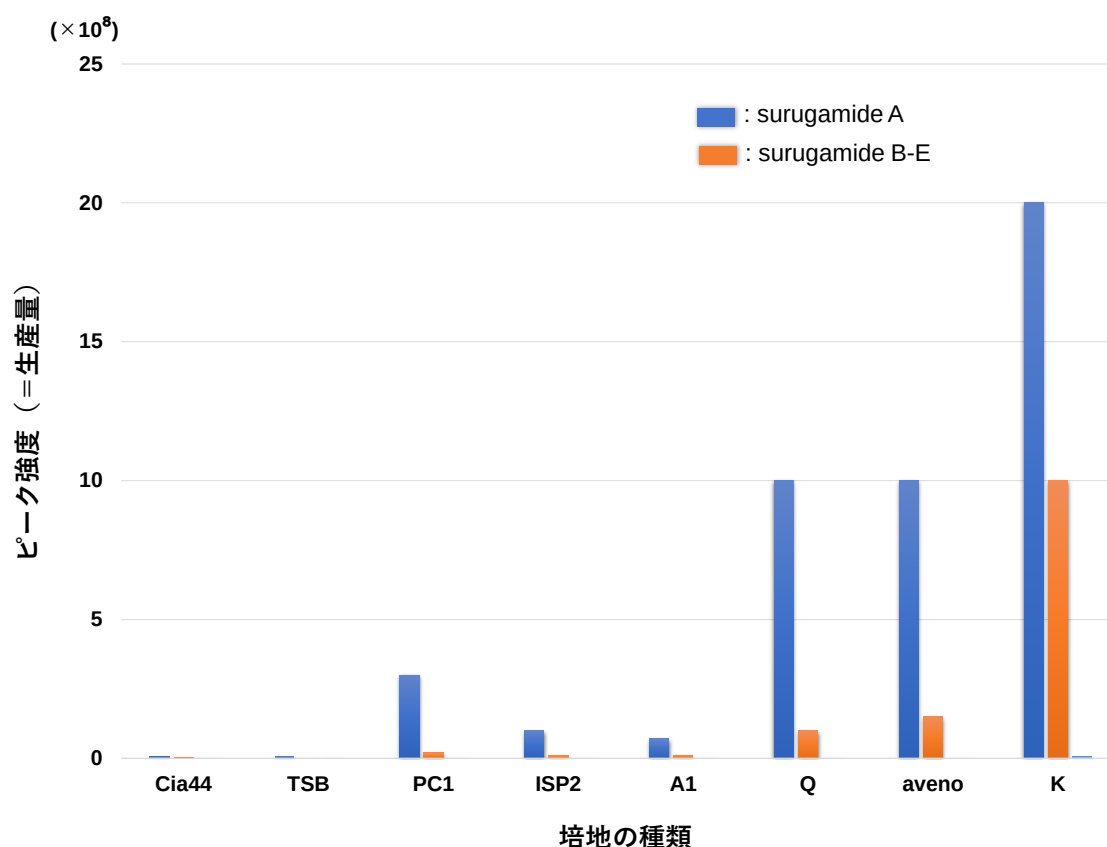
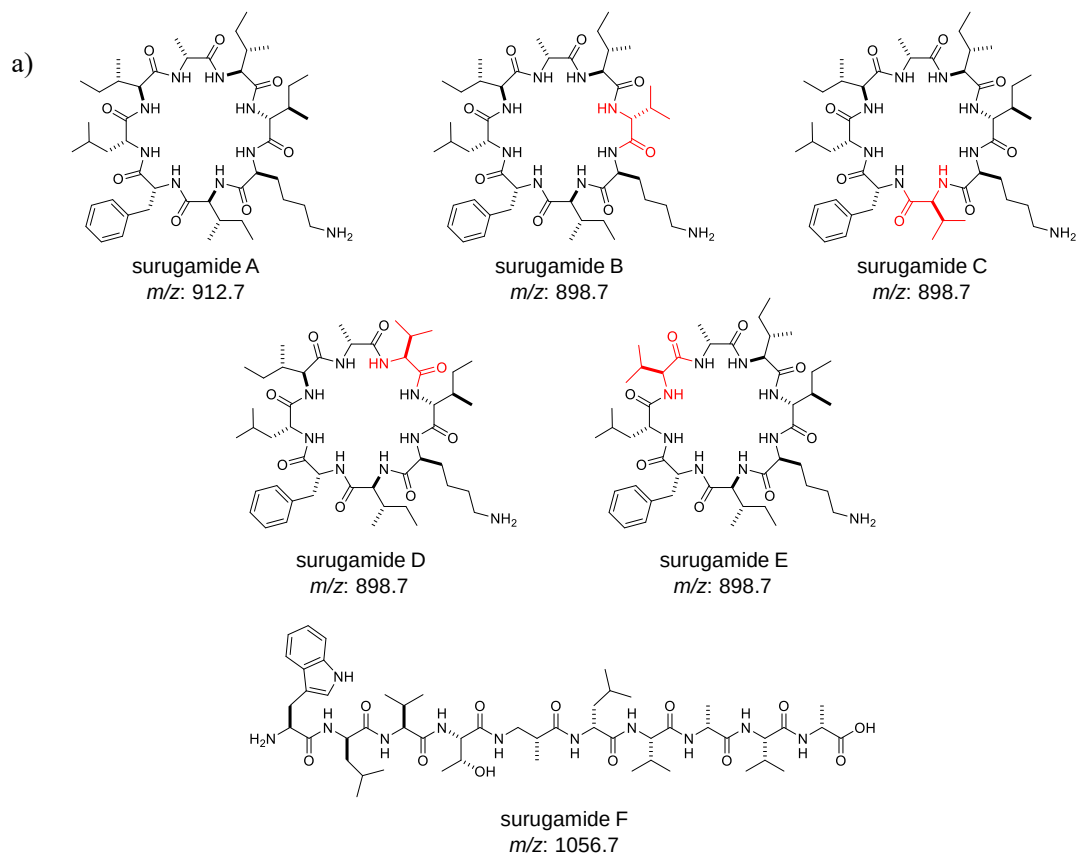


Figure 2-5. 各培地における surugamide 類の生産量の比較

横軸に本実験で用いた培地の種類、縦軸に surugamide A（青）と surugamide B-E（オレンジ）のピーク強度を示した。

培養条件を最適化したのち、*surE* の遺伝子破壊実験を実施した。Surugamide 生産菌である *S. albidoflavus* NBRC12854 の DNA を鋳型として PCR を行い、標的遺伝子である *surE* の上流 1.5 kb および下流 1.5 kb の領域を増幅した。増幅断片と neomycin 耐性遺伝子 *aphII* を gibson assembly 法⁶⁵ により連結し、得られた遺伝子断片を pGM160 へ挿入し遺伝子破壊用プラスミド pGM160- Δ *surE* を構築した。大腸菌 (*E. coli* GM2929 *hsdS*::*Tn10*/pUB307::Tn7⁶⁶) を介した接合伝達により同プラスミドを *S. albidoflavus* NBRC12854 へと導入し、相同組換えを利用した二回交叉法により *surE* の遺伝子破壊株を構築した。

野生型 (wide type) の *S. albidoflavus* NBRC12854 と *surE* 遺伝子破壊株 *S. albidoflavus* NBRC12854 Δ *surE* を K 培地にて 30 °C で 5 日間培養し、両者の代謝物を HPLC および LC-MS にて解析した (Figure 2-6)。その結果、wild type における surugamide A (*m/z* 912.7) と surugamide B-E (*m/z* 898.7) に相当する分子イオンピークが、*surE* 破壊株において完全に消失することが判明した。この結果から、SurE は環状オクタペプチド surugamide A-E の生合成に関与することが明らかとなった。また、鎖状デカペプチド surugamide F (*m/z* 1056.7) に由来する分子イオンピークも *surE* 破壊株では消失していた。このことから、SurE は surugamide A-E のみならず、surugamide F の生合成にも関与する二機能性の酵素であることが強く示唆された。



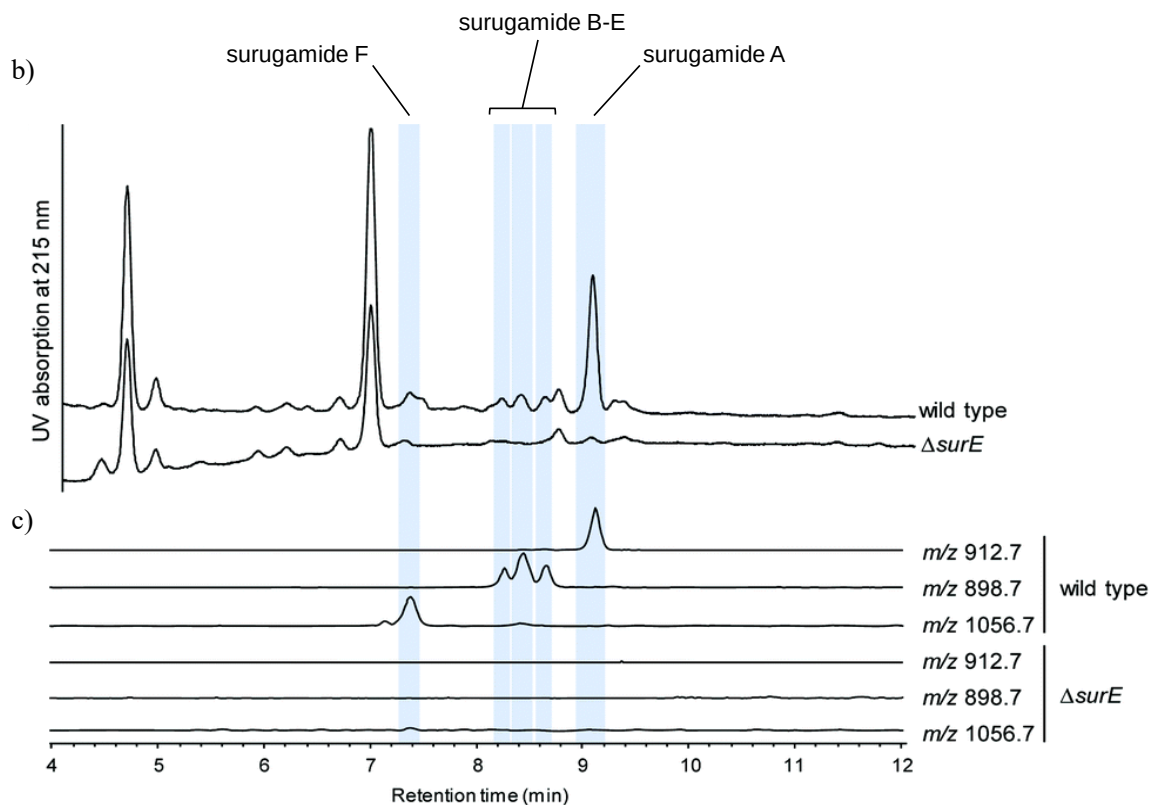


Figure 2-6. *surE* 遺伝子破壊株の代謝物解析

a) Surugamide A-E および surugamide F の化学構造

下にプロトン付加体の m/z を示した。

b) wild type および *surE* 遺伝子破壊株の代謝物を HPLC にて分析したクロマトグラム
215 nm における吸収波長を示した。

c) wild type および *surE* 遺伝子破壊株の代謝物を LC-MS にて分析したクロマトグラム
各化合物のプロトン付加体における抽出イオンクロマトグラム (EIC) を示した。

第三節 Surugamide A-E 生合成におけるペプチド環化機構の解明

前節の実験結果から、SurE が環状オクタペプチド surugamide A-E の生合成に関与することが明らかになった。しかしながら、SurE が本生合成においてどの段階に関与し、どのような反応を触媒しているかの詳細については一切不明である。そこで、surugamide A-E 生合成における SurE の機能をさらに詳細に解明すべく、環化前駆体を模倣した SNAC 基質と組換えタンパク質 SurE を用いた *in vitro* 酵素反応を試みた。本研究では、surugamide A-E のうち、比較的高価なビルディングブロックである D-Ile を構造中に含まない surugamide B (2) をモデル化合物として設定し、その環化前駆体である SNAC 基質を化学合成した (Figure 2-7)。まず、DIPEA を用いて C 末端残基 D-Leu を 2-chlorotriyl 樹脂 (2-CT 樹脂) に担持し、固相担持アミノ酸 **9** を得た。その後、Fmoc 固相合成法により種々アミノ酸を縮合し、固相担持ペプチド **10** とした。30% 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol (HFP)/DCM 溶液によるペプチド鎖の樹脂からの切り出しを行ったのち、SNAC および縮合剤を添加することで C 末端残基のチオエステル化を行った。最後に、本反応により生じた C 末端残基のエピ体、*epi-seco-surugamide B*-SNAC (**11**) を HPLC にて分離・除去することで、目的基質 *seco-surugamide B*-SNAC (**7**) を総収率 30.0% で得た。

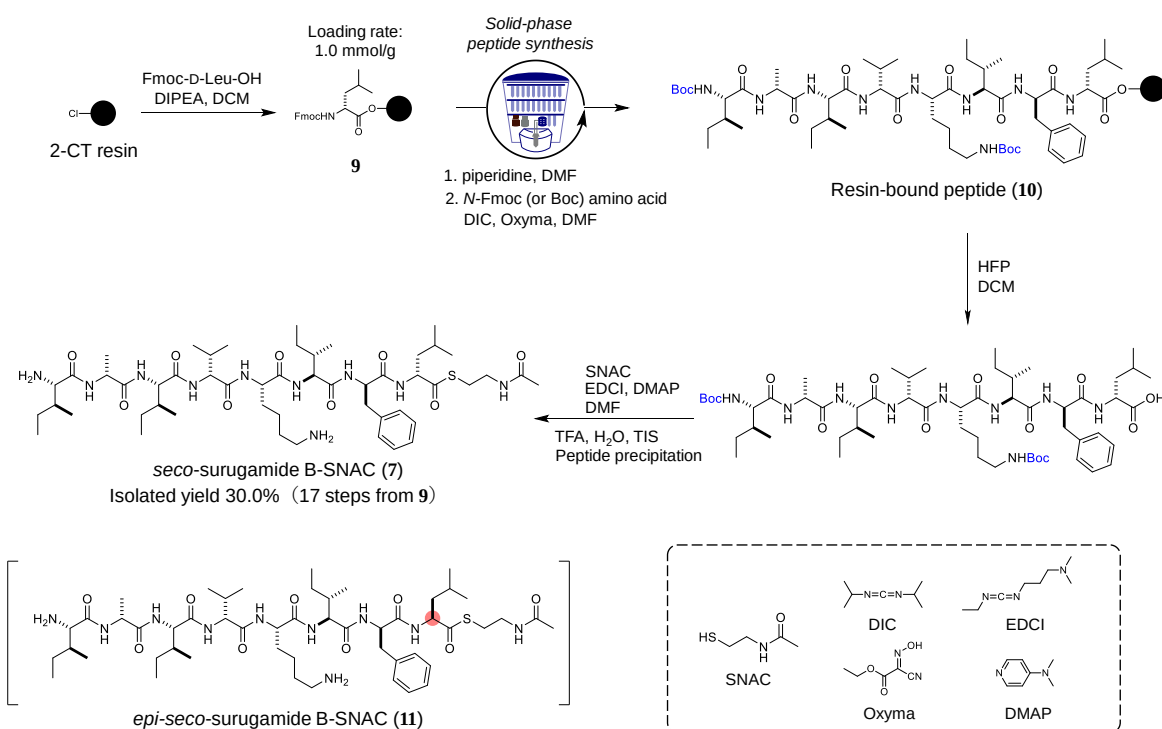


Figure 2-7. *Seco-surugamide B*-SNAC の合成スキーム

所望の SNAC 基質を得たのち、組換えタンパク質 SurE を大腸菌を用いて調製した。N 末端にタンパク質精製のためのヒスチジンタグ *His6* を融合させた組換えタンパク質 SurE (*His6-SurE*) を設計した。組換えタンパク質発現用プラスミド pET28a の T7 プロモーター下流に、PCR により増幅した *surE* 遺伝子断片を挿入し、宿主大腸菌 *E. coli* BL21 (DE3) に同プラスミドを導入した。大腸菌を培養後、IPTG の添加により目的タンパク質を発現させたのち、細胞破碎により得られた粗酵素溶液を Ni アフィニティー樹脂カラムに供し、樹脂に吸着した組換えタンパク質 *His6-SurE* を精製した。精製した画分を 10% SDS-PAGE にて分析したところ、溶出画分に *His6-SurE* に相当するバンド (49.6 kDa) が観察され、実際に組換えタンパク質 *His6-SurE* が得られたことを確認した (**Figure 2-8a**)。

上記で調製した SNAC 基質 *seco-surugamide B*-SNAC (7) と組換え SurE を用いて *in vitro* 酵素反応を行い、SurE の環化活性を評価した。**Figure 2-8b** に示す組成にて酵素反応液を調製したのち、室温条件下、水中で 2 時間インキュベートし、環化反応の進行を HPLC にて分析した (**Figure 2-8c**)。その結果、SurE を加えた反応系では SNAC 基質 7 が完全に消失し、定量的に環化体 *surugamide B* (2) へ変換されることが明らかとなった。またこの際、非酵素条件下で生じていたリシン側鎖で環化したイソペプチド 8 の生成は全く観察されなかった。この結果から、SurE は、環状オクタペプチド *surugamide A-E* の生合成において、生合成中間体の生合成酵素からの切り出し、および head-to-tail での位置選択的な環化反応を触媒する新規ペプチド環化酵素であることが明らかになった。

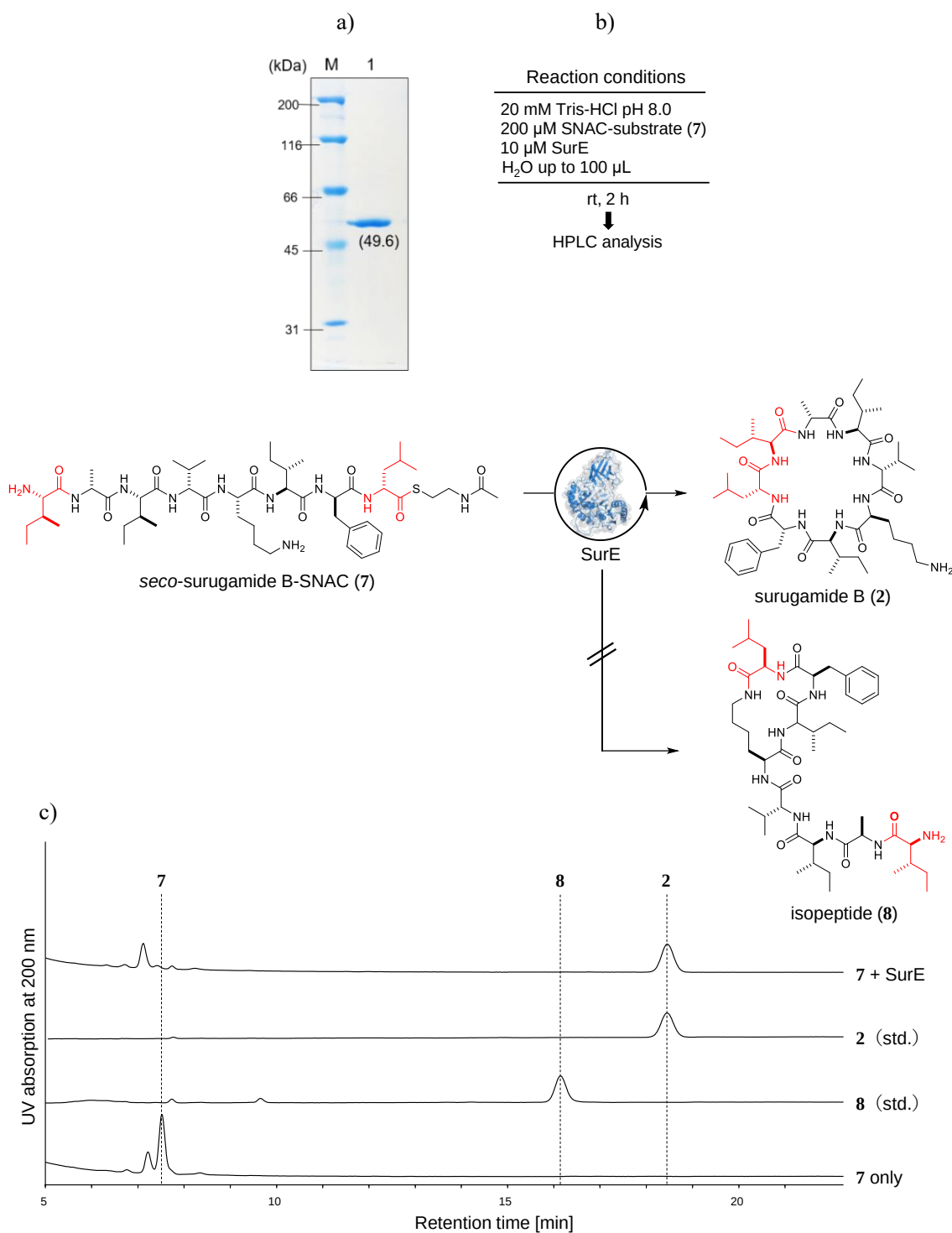


Figure 2-8. *Seco*-surugamide B-SNAC と SurE を用いた *in vitro* 酵素反応

- a) 組換え SurE を含む溶出画分の SDS-PAGE による分析
M. タンパク質マーカー; 1. Ni アフィニティー精製した SurE (49.6 kDa)
- b) *In vitro* 酵素反応の反応条件
- c) SNAC 基質と SurE を用いた *in vitro* 酵素反応の HPLC 分析
UV200 nm における吸収波長を示した。

第四節 Surugamide F 生合成における加水分解機構の解明

前節の実験により、環状オクタペプチド surugamide A-E の生合成におけるペプチド環化機構が明らかになった。その一方で、生合成酵素 SurB/SurC により合成される直鎖状デカペプチド surugamide F (**6**) の生合成におけるペプチド加水分解機構は不明である。**6** の生合成最終段階を担う生合成酵素 SurC の C 末端モジュールも、surugamide A-E の生合成と同様に産物の加水分解を担う TE ドメインを欠いていることから、従来の TE ドメインには依存しない未知の機構により、NRPS 産物の加水分解が進行することが考えられる。一方で、第二節にて実施した *surE* の遺伝子破壊実験の結果 (Figure 2-6) では、*surE* 欠損株において **6** の生産が完全に消失していた。このことから、SurE が生合成中間体の NRPS からの切り出し、および加水分解反応を触媒し、直鎖状ペプチド **6** を生合成する可能性が考えられた。

そこで、本仮説を検証するために **6** の加水分解前駆体である SNAC 基質 *seco*-surugamide F-SNAC (**12**) を化学合成し、組換え SurE を用いた *in vitro* 酵素反応を行った。なお、本実験に用いた SNAC 基質 **12** と組換え酵素の調製は、前節と同様の合成スキーム・手法で行った。化学合成した SNAC 基質 **12** と組換え SurE を Figure 2-9 に示す組成にて混合し、室温条件下、水中で 2 時間反応させ、加水分解反応の進行を LC-MS を用いて分析した (Figure 2-10)。その結果、酵素依存的な SNAC 基質 **12** の消費は確認されたものの、当初予想していた加水分解体である **6** の生成は全く確認されなかった (Figure 2-10a,b)。その一方で、酵素反応液を詳細に解析したところ、基質の SNAC 基が脱離し、さらに分子内で環化した化合物と同等の m/z 値 (m/z 1038.5) を示すイオンピークが酵素依存的に生成することが判明した (Figure 2-10c)。以降では本化合物を“化合物 **X**”と呼称する。

酵素依存的に生成した化合物 **X** (m/z 1038.5) は、**6** (m/z 1056.7) よりも 18 Da 小さい m/z 値を示すことから、**6** が分子内で環化した化合物であると考えられる。しかしながら、**6** の配列中には N 末端 1 位の末端アミン、および N 末端 4 位の L-Thr 側鎖ヒドロキシ基と 2 つの求核基が存在するため、酵素反応により生成した環化体の構造を一意的に決めることはできない。さらに、NMR による構造決定を目的に、HPLC を用いた化合物 **X** の単離を試みたが、いかなる分析条件でも本化合物はブロード状に溶出し、構造解析に十分な量を精製することは困難であった。そのため、次に示す方法により化合物 **X** の化学構造を決定することとした。すなわち、**12** の N 末端 4 位に存在する L-Thr の側鎖ヒドロキシ基をベンジル基で保護した鎖状基質 *O*-benzyl *seco*-surugamide F-SNAC (**13**) を別途調製し、SurE の酵素反応に供することで、環化点の決定を試みた (Figure 2-11)。仮に、本基質においても環化

Reaction conditions
20 mM Tris-HCl pH 8.0
200 μ M SNAC-substrate (12)
10 μ M SurE
H ₂ O up to 100 μ L
rt, 2 h
↓
LC-MS analysis

Figure 2-9. *Seco*-surugamide F-SNAC と SurE の *in vitro* 酵素反応の反応条件

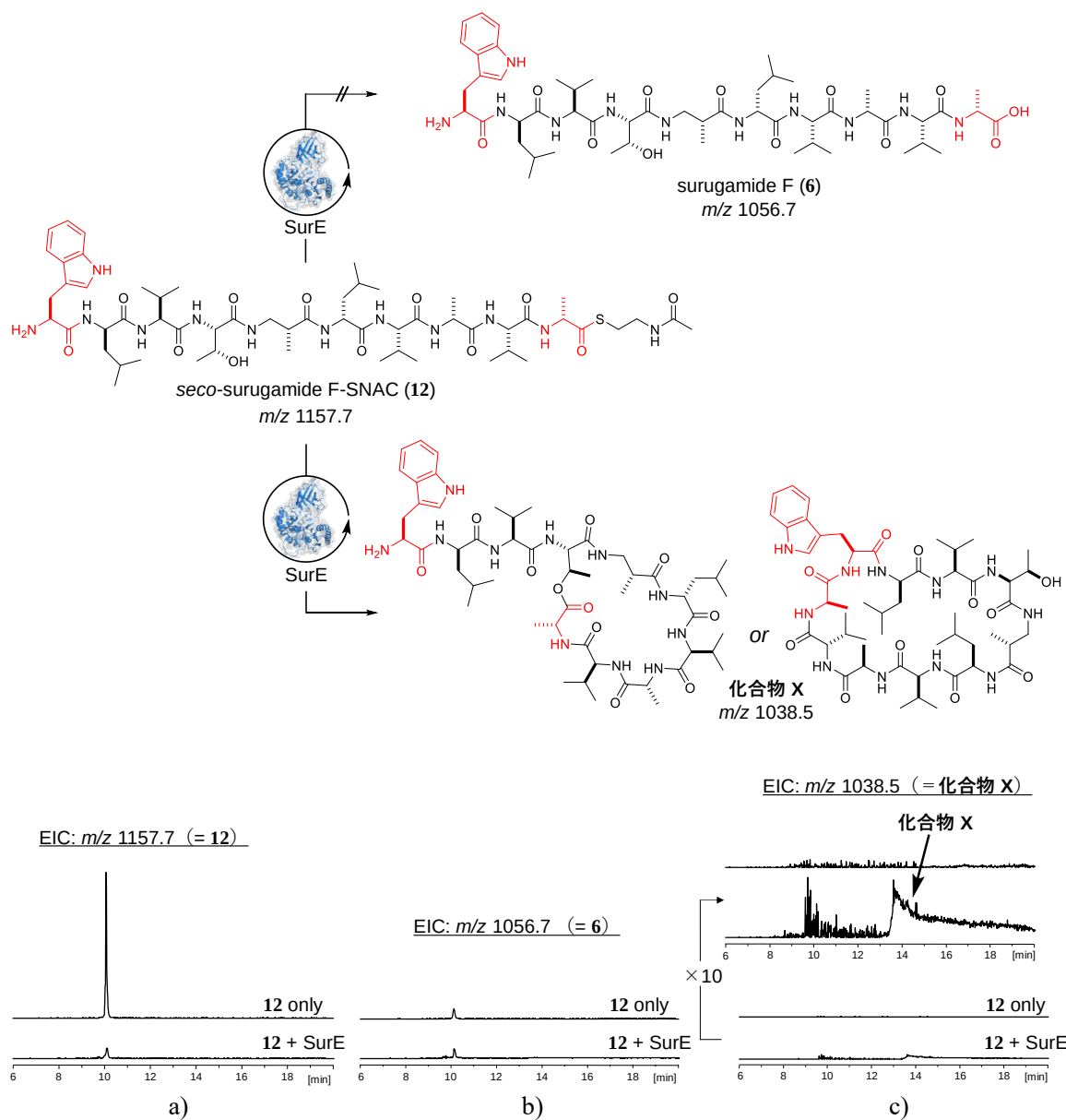


Figure 2-10. *Seco*-surugamide F-SNAC と SurE を用いた *in vitro* 酵素反応

- a) EIC: m/z 1157.7 (= *seco*-surugamide F-SNAC **12**)
- b) EIC: m/z 1056.7 (= surugamide F **6**)
- c) EIC: m/z 1038.5 (= 化合物 **X**)

反応が観測されれば、N 末端 1 位の末端アミンで環化していると予想することができ、また、環化反応が観測されなければ N 末端 4 位の L-Thr 側鎖ヒドロキシ基で環化していると予想することができる。化学合成した SNAC 基質 **13** と組換え SurE を用いて *in vitro* 酵素反応を行った結果、酵素依存的な SNAC 基質 **13** の消失と、SNAC 基が脱離し分子内で環化したことを意味する分子量が 119 Da 減少した化合物 **Y** (m/z 1128.5) の生成が確認された (Figure 2-11)。本基質の環化点は N 末端 1 位の末端アミンのみに限られるため、本酵素反応により生じた化合物 **Y** は、基質 C 末端の D-Ala と N 末端の L-Trp 間で環化した head-to-tail 環化体であると決定した。

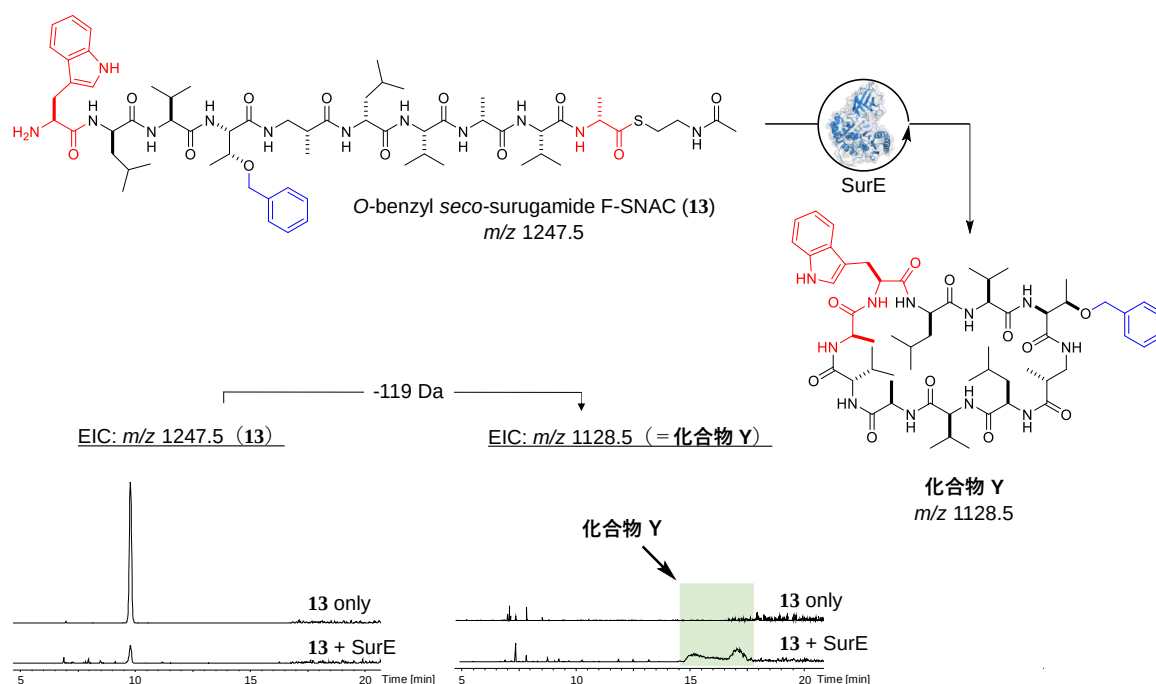


Figure 2-11. *O*-benzyl *seco*-surugamide F-SNAC と SurE を用いた *in vitro* 酵素反応

さらに、化合物 **Y** に対して接触水素化還元を行うことでベンジル基を除去した化合物 **Z** と、*seco*-surugamide F-SNAC (**12**) を酵素反応に用いた際に生じた化合物 **X** のカラム保持時間を比較したところそれらが一致した (Figure 2-12)。このことから、*seco*-surugamide F-SNAC を酵素反応に用いた際に生じた化合物 **X** は、C 末端 D-Ala と N 末端 L-Trp 間で head-to-tail の様式で環化した環化体であることが明らかになった。以降、化合物 **X** を “cyclosurugamide F” と呼称する。上記の結果を踏まえ surugamide 生産菌である海洋放線菌 *S. albidoflavus* NBRC12854 の代謝物を LC-MS により再度詳細に分析したところ、cyclosurugamide F は生産菌の代謝物中にもわずかながら見出された (Figure 2-13)。よって、本化合物は天然物であることが明らかとなった。Surugamide 生産菌の代謝物はこれまで精

力的に解析されてきたが^{58, 59}、本化合物の報告はこれまでにない。本化合物は DMSO 以外の有機溶媒への溶解性が著しく低いというに、一般的な逆相カラムにおいて非常にブロードな溶出挙動を示す。そのため、通常の単離精製工程では、その検出は困難であるため、これまでの化合物探索研究で見過ごされてきた可能性が考えられる。本研究では、生合成酵素の機能解析を通じて、検出や単離精製が困難な天然物を初めて明らかにすることができた。

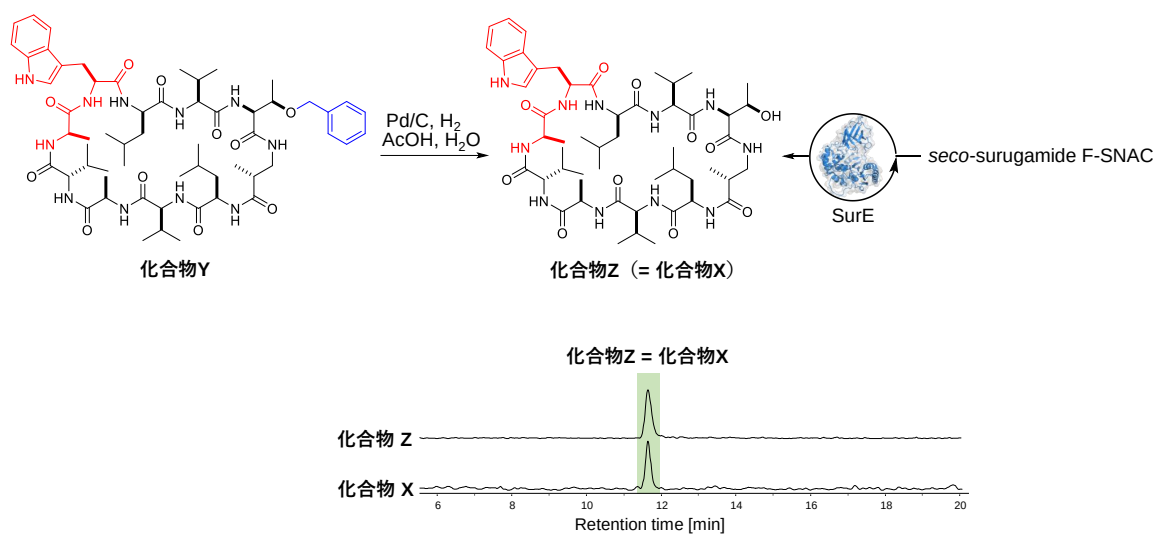


Figure 2-12. 化合物 Z および X のカラム保持時間の比較

EIC: m/z 1038.5 (= 化合物 Z および化合物 X) のクロマトグラムを示した。

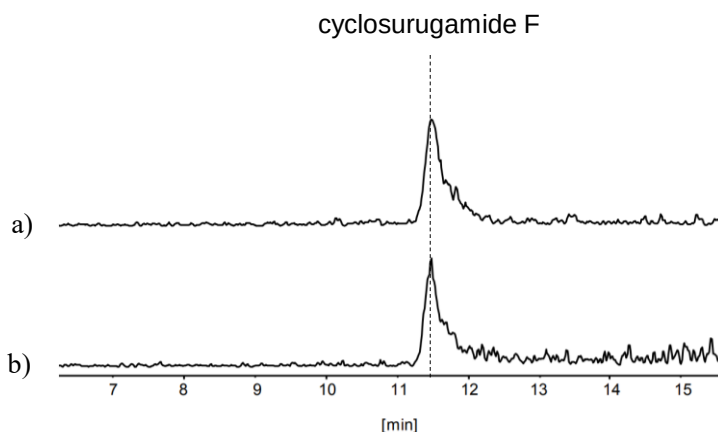


Figure 2-13. 放線菌培養液の LC-MS 解析

- a) 放線菌培養液の分析結果 EIC: m/z 1038.5 におけるクロマトグラムを示した。
- b) 酵素反応により生成した cyclosurugamide F の分析結果
EIC: m/z 1038.5 を示した。

第五節 小括と考察

1. 第二章のまとめ

本章では、環状オクタペプチド surugamide A-E と鎖状デカペプチド surugamide F の新奇的な生合成機構に着目し、*in vivo* および *in vitro* による詳細な解析を通じて、それら生合成中間体の環化機構と加水分解機構の解明を目指した。本章で得られた研究成果によって、surugamide 類生合成遺伝子クラスターの上流に独立にコードされた SurE が、surugamide A-E の生合成だけでなく、surugamide F の生合成にも関与する二機能型酵素として機能し、構成残基や鎖長が全く異なる 2 つの生合成中間体の head-to-tail 環化反応を選択的に触媒することが明らかになった (**Figure 2-14**)。SurE は、従来の NRPS のペプチド環化酵素である TE ドメインや C_T、R ドメインとは相同性を示さない一方で、バクテリアの細胞壁生合成において重要な役割を担う PBP と相同性を示す新しいタイプのペプチド環化酵素である。このため、SurE およびそのホモログ酵素からなる新規非リボソームペプチド環化酵素ファミリーを、以降では「ペニシリン結合タンパク質型チオエステラーゼ (PBP-type TE)」と呼称する。SurE は構成残基や鎖長が異なる surugamide B や surugamide F の前駆体に加え、Thr 側鎖がベンジル化された SNAC 基質に対しても環化反応を効率よく触媒したことから、寛容な基質選択性を有することが推測され、ペプチド環化触媒としての利用が期待される。

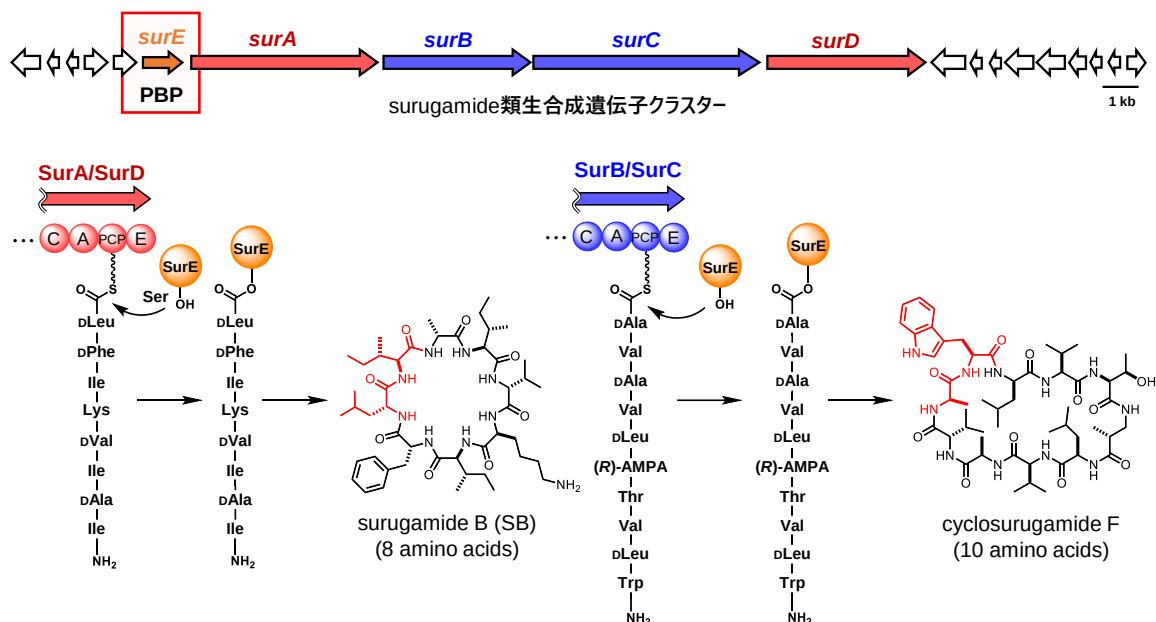


Figure 2-14. SurE による生合成中間体の head-to-tail 環化反応

2. 従来型の TE ドメインと比較した SurE の特徴に関する考察

SurE は分子量約 50 kDa の酵素であり、従来型の TE ドメインの約 2 倍の分子量を有する (**Figure 2-15a**)。SurE は 2 つのドメインから構成され、N 末端側には PBP と相同性を示すドメイン (PBP ドメイン)、C 末端側には lipocalin と相同性を示すドメイン (lipocalin ドメイン) を有する (**Figure 2-15b**)。PBP ドメインは約 37 kDa の大きさを有し、その配列中に PBP の触媒 4 残基 (S63、K66、N156、H305) が高度に保存されている。PBP と同様にこれら残基は SurE の触媒活性の発現に必須であることが考えられる。SurE の C 末端側に存在する lipocalin ドメインの詳細な機能は明らかでないが、疎水性ポケットの形成や基質-酵素複合体における基質のコンフォメーション制御、NRPS との相互作用などに関与していることが考えられる。

SurE はこれまでに同定されてきた NRPS のペプチド環化酵素には見られない特徴を 2 つ有する。1 つ目の特徴は、PBP とアミノ酸配列相同性を示すことである。この構造的特徴により、SurE の基質認識性は PBP のそれと高い相関があることが推測される。実際、surugamide A-E と cyclosurugamide F の環化前駆体における C 末端残基はともに D-アミノ酸 (D-Leu および D-Ala) であるが、これは C 末端に D-アミノ酸を含有する基質 (D-Ala-D-Ala) を選択的に認識する PBP と類似した特徴である。PBP の基質 C 末端 D-アミノ酸選択性は、基質結合部位の周辺に位置する疎水性ポケットに起因するものであることが、PBP のファミリー酵素 ADP (Alkaline D-Peptidase) の結晶構造と計算化学を用いた研究により示唆されている⁶⁷。そのため、SurE も ADP と同様の分子機構により基質 C 末端残基選択性を発現していることが推測される。SurE が従来型の TE ドメインではなく PBP と相同性を示す理由は不明であるが、以下に示す 2 つの理由が考えられる。1 つ目は、PBP の水平伝播である。他のバクテリアから PBP の遺伝子が水平伝播により surugamide 生産菌へと取り込まれたのち、それを NRPS 生合成の環化酵素として利用するようになった可能性である。2 つ目の可能性は、タンパク質の収斂進化である。元来 surugamide 生産菌にコードされていたペプチド環化酵素が、C 末端 D-アミノ酸の基質に対する親和性をより高めるために進化し、結果的に PBP と類似するようになった可能性である。SurE の進化的な起源は明らかでないが、今後、系統解析などの進化論的考察も交えることで本課題の解明に近づくことが期待される。

SurE の従来型の TE ドメインには見られない 2 つ目の特徴として、NRPS から独立して存在する単独酵素であることが挙げられる。一般的な TE ドメインは、巨大な生合成酵素の機能性ドメインとして C 末端に融合する形で存在しており、隣接する PCP ドメインに結合した生合成中間体に対してのみ環化反応を触媒する。その一方で、本研究で見出された SurE

は、生合成酵素から独立して存在する単独酵素であり、SurC と SurD という 2 つの異なる NRPS にそれぞれ分子間で作用する。このような *trans* に作用する環化酵素を利用した生合成システムは、SurC と SurD の C 末端に TE ドメインをそれぞれコードする必要がなくなるため、生体内のアミノ酸資源を節約できるという点で生物学的に理にかなった戦略であると捉えることができる。

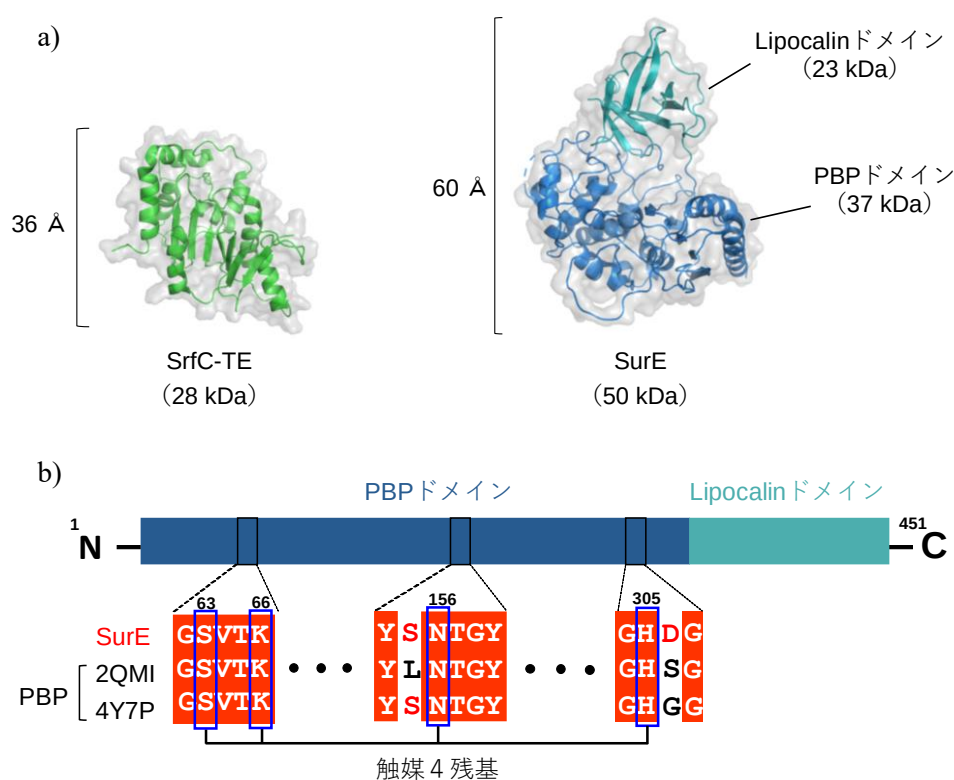


Figure 2-15. SurE の構造的特徴

- a) 従来型の TE と SurE の X 線結晶構造の比較
従来型の TE として surfactin の生合成に関わる SrfC-TE を左に示した (PDB: 1JMK) ⁶⁸。SurE の X 線結晶構造を右に示した (PDB: 6KSU)。
- b) SurE の一次構造

3. SurE と NRPS のタンパク質間相互作用に関する考察

NRPS の生合成では、各生合成酵素や各ドメインはそれぞれ特定のペアとなるタンパク質と特異的に相互作用し、望まない副産物が生合成されないようアッセンブリーラインが厳密に制御されている。このことから、SurE のような複数の NRPS (SurC と SurD) と *trans* に作用する酵素が、生体内でどのように制御され、どのように特定の NRPS を選択的に認識しているのかについては興味もたれる。NRPS のアッセンブリーラインにおいて、複数の NRPS に *trans* に作用する酵素は非常に珍しく、これまで数例のみの報告にとどまる⁶⁹⁻⁷¹。その中で、詳細な機能解析がなされた *trans* に作用する酵素の代表例として、環状デブシペプチド skyllamycin の生合成から見出されたシトクロム P450 モノオキシゲナーゼ Sky32 が挙げられる (Figure 2-16)。Sky32 は、NRPS (Sky30/Sky31) に存在する 3 つの PCP ドメインと特異的に相互作用し、それらにロードされた L-Phe、OMe-L-Tyr、及び D-Leu の β 位水酸化を一挙に触媒する酵素である。

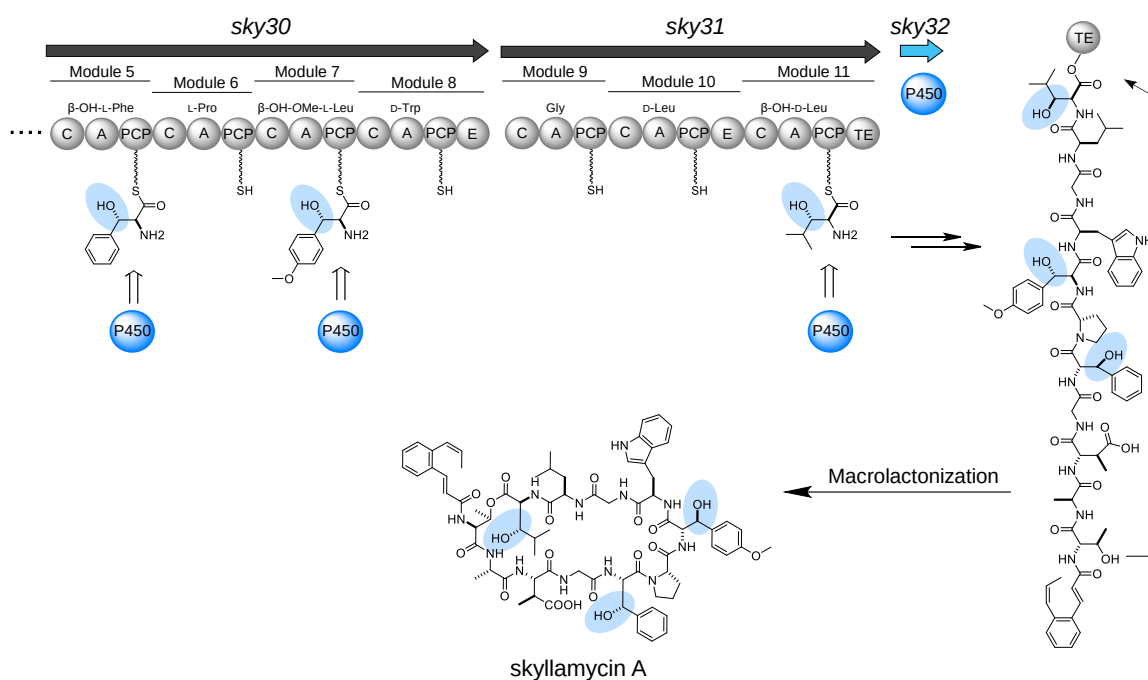
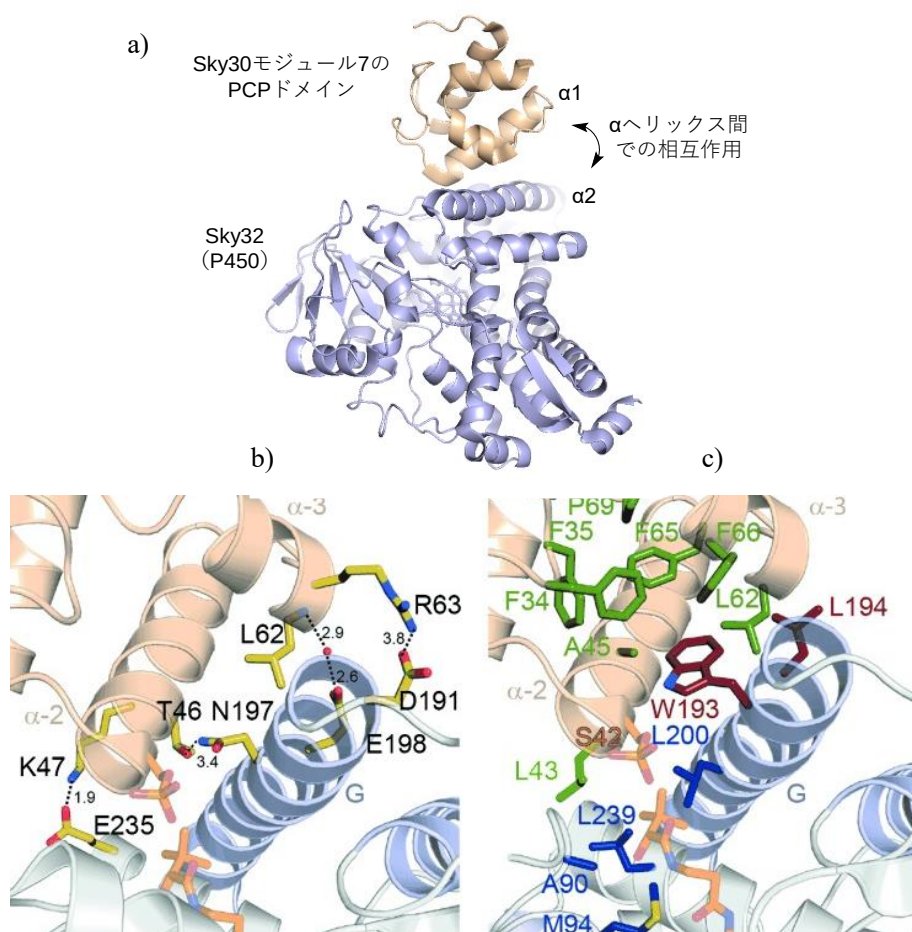


Figure 2-16.

Skyllamycin 生合成において *trans* に作用するシトクロム P450 モノオキシゲナーゼ Sky32

2014 年、モナッシュ大学の Cryle らの研究グループは、Sky32 の PCP ドメイン選択性を解明するため、Sky32 とそのペアタンパク質である Sky30 のモジュール 7 の PCP ドメインの共結晶構造を獲得した⁷² (Figure 2-17a, PDB ID: 4PXH)。これによれば、PCP ドメインの α ヘリックス ($\alpha 1$) と Sky32 の α ヘリックス ($\alpha 2$) が相互作用しており、これが Sky32 の PCP ドメイン選択性に寄与していることが考えられた。この相互作用は 2 つのタンパク質

の分子間相互作用から構成され、PCPドメインのR63、T46、K47とSky32のD191、N197、E235を介した水素結合（**Figure 2-17b**）、およびPCPドメインのL43、F34、F35、F65、F66、L62とSky32のW193、L194、L200、L239で形成される疎水性相互作用によるものであった（**Figure 2-17c**）。実際、反応には関与しないSky31モジュール10のPCPドメインとSky32の共結晶は得られなかったことから、それら α ヘリックス間での特異的なタンパク質間相互作用の重要性がうかがえる。



Kristina, Haslinger. *et al.* The structure of a transient complex of a nonribosomal peptide synthetase a cytochrome P450 monooxygenase. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 8518-8522 (2014)より引用

Figure 2-17. Sky32 と PCP ドメインのタンパク質間相互作用

- Sky32 と PCP ドメインの共結晶構造
PCP ドメインを茶色、Sky32 を紫色で示した。また、相互作用に関わる PCP ドメインの α -helix を $\alpha 1$ 、Sky32 の α -helix を $\alpha 2$ と記した。
- 水素結合による相互作用
PCP ドメインの $\alpha 1$ を茶色、Sky32 の $\alpha 2$ を紫色で示した。また、水素結合を形成するアミノ酸残基を黄色で示し、その結合様式を黒の点線で示した。
- 疎水性残基による相互作用（疎水性相互作用）

上述の先行研究に基づいて surugamide 類の生合成を考察すると、Sky32 と同様に *trans* に作用する SurE においても、上記に類似した α ヘリックスを介した相互作用により NRPS 選択性を発現している可能性が考えられた。そこで、surugamide 類生合成における SurE と NRPS の相互作用様式について知見を得るため、SurE とそのペアモジュールである SurD モジュール 8 の PCP-E ドメイン (**Figure 1-21a**) の複合体モデルを、タンパク質立体構造予想プログラム AlphaFold-Multimer を用いて作成した⁷³ (**Figure 2-18**)。その結果、SurE の構造中の α ヘリックスに存在する Arg/Asp と、E ドメインの構造中の α ヘリックスに存在する Arg/Asp の 6 か所の側鎖間でイオン結合を形成することが示唆された (**Figure 2-18a**)。また、約 18 Å のホスホパントテイル基を介して生合成中間体が担持される PCP ドメインの Ser 残基は、SurE の触媒 Ser 残基の近傍に位置し、PCP ドメインから SurE への生合成中間体の受け渡しが十分可能な距離 (9.7 Å) であった⁷⁴ (**Figure 2-18b**)。また、SurE と PCP ドメインは互いが物理的に近い位置に存在しているものの、両者の残基間で疎水性相互作用や水素結合様/イオン結合様の相互作用は確認されなかった。その一方で、本来のペアモジュールではない SurD モジュール 7 の PCP-E ドメイン (**Figure 1-21a**) と SurE の複合体モデルを AlphaFold-Multimer にて作成し、その相互作用様式を解析したところ、PCP ドメインの Ser 残基は SurE の触媒ポケットとは反対の方向に位置し、PCP ドメインから SurE への生合成中間体の受け渡しが困難な距離 (29.8 Å) であることが示唆された (**Figure 2-19**)。このことから、SurE は α ヘリックス間での相互作用を介して NRPS の C 末端 E ドメインを特異的に認識し、その結果として SurE の活性ポケット近傍に位置した PCP ドメインに担持された生合成中間体に対して環化反応を触媒することが示唆された。

以上のことから、SurE は先行研究の Sky32 と同様、 α ヘリックス間での相互作用を介して特定の NRPS ドメイン構造を認識することが示唆された。一方で、Sky32 の場合とは異なり、SurE が認識するドメインは生合成中間体が担持される PCP ドメインではなく、合成酵素 C 末端に存在する E ドメインであることが示唆された。今後、PCP-E ドメインと SurE の共結晶構造の獲得や変異導入による相互作用に関わる残基の同定を行い両酵素間での相互作用様式を明らかにすることで、surugamide 生合成における SurE と NRPS の選択性の解明が期待できる。また、得られた知見をもとに SurE とより強く相互作用する E ドメインを人工的にデザインすることで、NRPS アッセンブリーラインのハイジャックによる非天然型環状ペプチドの生物合成も可能になると考えられる。

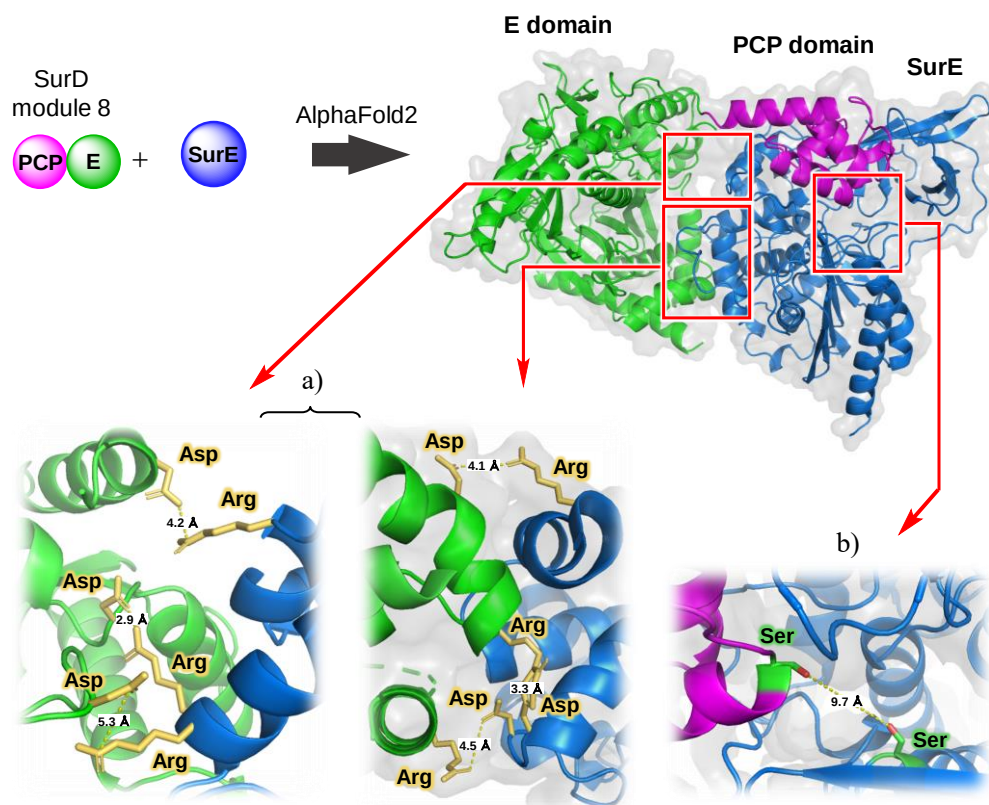


Figure 2-18. SurE と SurD モジュール 8 の PCP-E ドメインの複合体モデル

a) Arg/Asp 間のイオン結合を介した SurE と E ドメインの相互作用様式

b) SurE と PCP ドメインの Ser 残基が隣接している様子

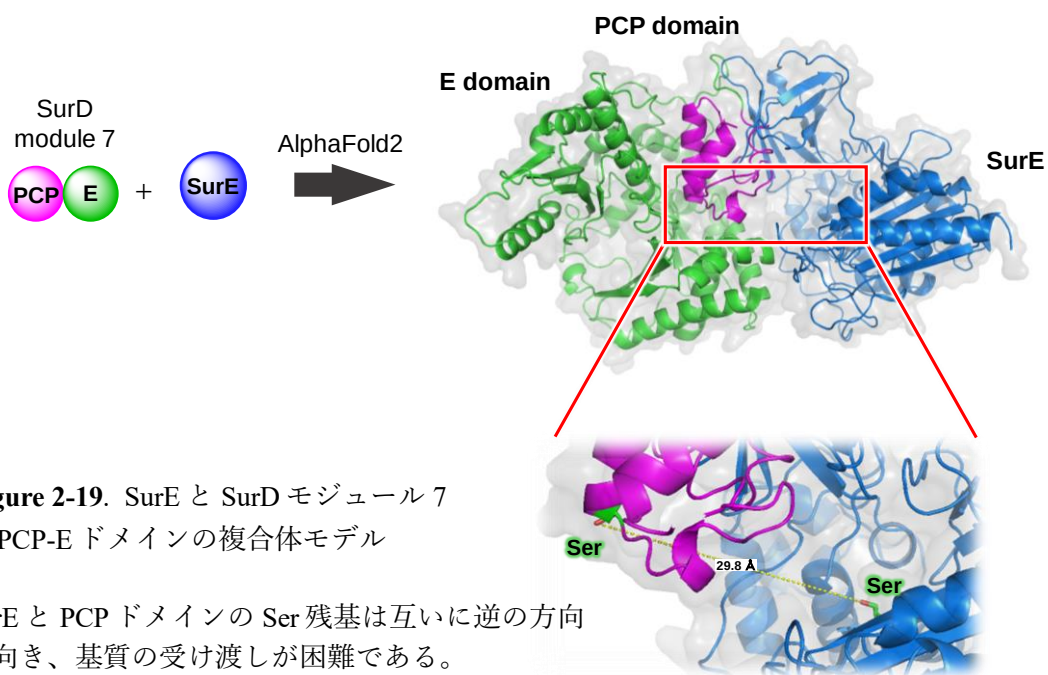


Figure 2-19. SurE と SurD モジュール 7 の PCP-E ドメインの複合体モデル

SurE と PCP ドメインの Ser 残基は互いに逆の方向を向き、基質の受け渡しが困難である。

4. Surugamide F と cyclosurugamide F の生合成経路に関する考察

本章で行った *surE* 遺伝子破壊株の代謝物解析で surugamide F の生産が消失したこと (Figure 2-6)、および放線菌の代謝物解析で cyclosurugamide F の生産が確認されたこと (Figure 2-13) から、これらの天然物に関して以下 2通りの生合成経路を考えることができる (Figure 2-20a, b)。すなわち、生合成酵素 SurB/SurC により生合成中間体が伸長されたのち、a) SurE がペプチド環化反応と加水分解反応の 2つの反応を触媒し、両化合物が同時に生産される生合成経路、および b) SurE による環化反応が触媒され cyclosurugamide F が生成したのち、生体内に存在する未知のペプチダーゼにより位置特異的な加水分解反応が進行し、鎖状の surugamide F へと変換される生合成経路である。

第四節にて行った加水分解前駆体の SNAC 基質を用いた酵素反応 (Figure 2-10) にて鎖状デカペプチド surugamide F が全く生成しなかったことを鑑みると、*in vitro* 系と *in vivo* 系で SurE の反応性に差がないとは断言できないものの、a) の経路で surugamide F が生合成されているとは考え難い。また、a) の経路を経て surugamide F が生合成されていると仮定すると、surugamide F の生産量の増加に伴い cyclosurugamide F の生産量も増加していくはずである。しかし、surugamide 生産菌を 5日間培養し、surugamide F と cyclosurugamide F の蓄積量を経時的に追跡してみると、surugamide F の蓄積量は次第に増加していく一方で、cyclosurugamide F の蓄積量は培養 4 日目を境に頭打ちとなった (Figure 2-21)。これは細胞内の cyclosurugamide F の濃度を一定に保つ未知の機構の存在を示唆している。この結果から、cyclosurugamide F が生体内の未知のペプチダーゼにより surugamide F へと変換される b) の生合成経路を提唱している。Surugamide 類の生合成遺伝子クラスターの解析結果から、本クラスターの上流にコードされた *orf2* が、そのアミノ酸配列から α/β hydrolase にアノテーションされることが明らかとなっている⁵⁹ (Figure 2-22)。そのため、本酵素が cyclosurugamide F から surugamide F への加水分解反応を触媒していることが考えられる。本生合成経路により鎖状の surugamide F が直接生合成されない理由は定かではないが、天然物の生合成にしばしばみられる「プロドラッグ戦略」⁷⁵⁻⁷⁸を採用している可能性が考えられる。すなわち、まず初めに不活性型の環状ペプチド cyclosurugamide F を生合成したのち、本化合物を細胞外へと放出する際に加水分解酵素 Orf2 の働きで活性本体である鎖状の surugamide F へと変換されていることが考えられる。これにより、生産菌自身の身を守りつつ、生体外の標的へと効率的に活性型化合物を放出することが可能である。今後、surugamide F の生物活性や cyclosurugamide F の加水分解反応を触媒するペプチダーゼの同定、および本放線菌における cyclosurugamide F の変換反応の生理的意義を解明することで、surugamide 類生合成の全容解明が期待される。

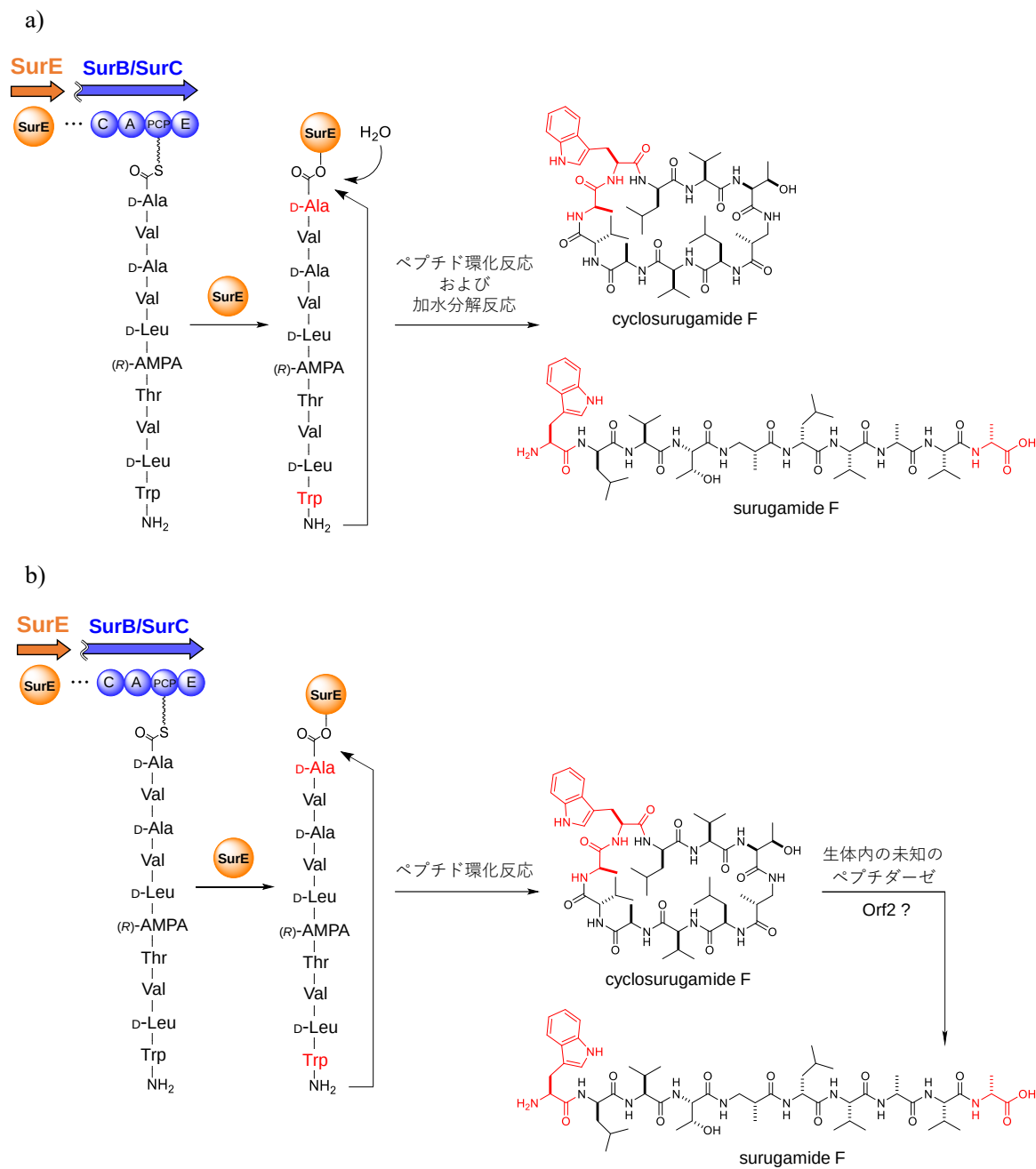


Figure 2-20. Surugamide F と cyclosurugamide F の推定生合成経路

- a) SurE により環化・加水分解が触媒され、両化合物が同時に生合成される経路
- b) SurE により環化が触媒されたのち、ペプチダーゼによる加水分解が起こる経路

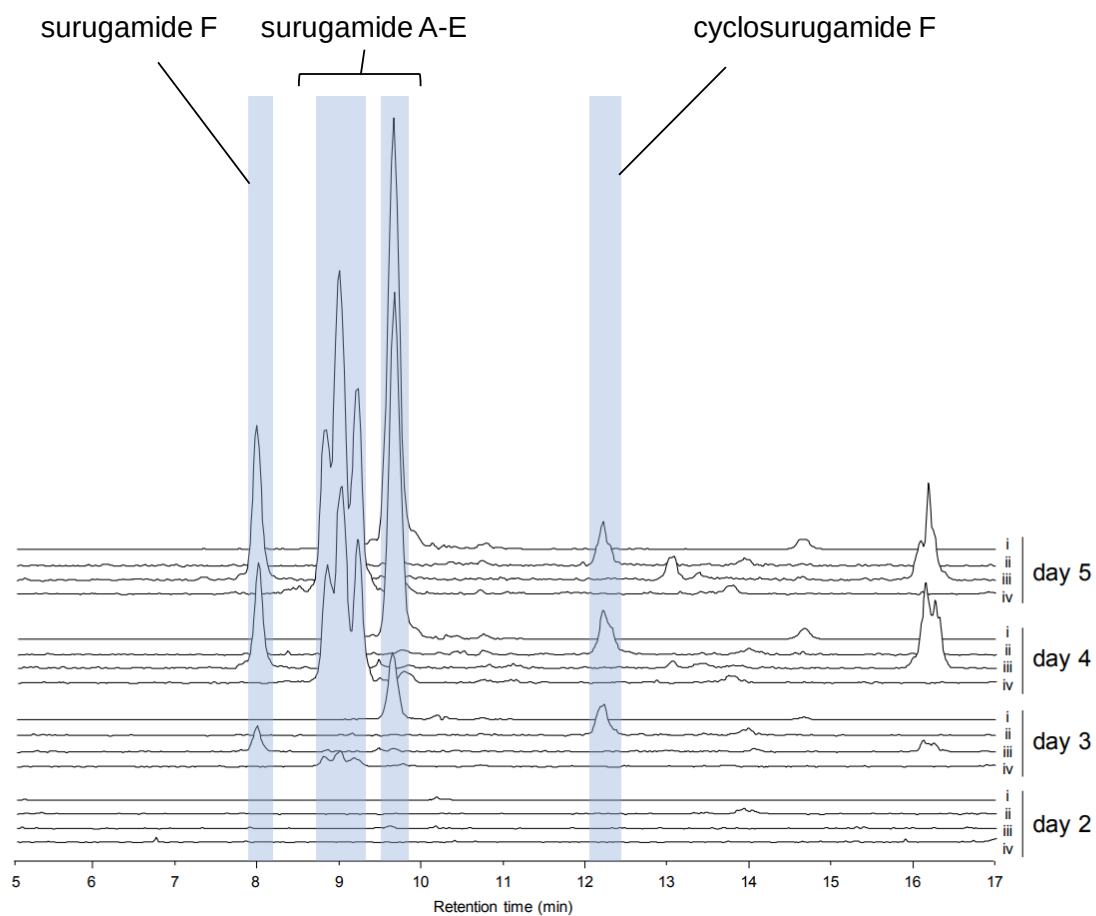


Figure 2-21. Surugamide F と cyclosurugamide F の経時的な蓄積量の変化

培養 2 日目から 5 日目までの各代謝物の蓄積量を LC-MS にて分析した。

- i: Surugamide A の化合物イオンピーク (EIC of m/z 912.8)
- ii: Cyclosurugamide F の化合物イオンピーク (EIC of m/z 1038.8)
- iii: Surugamide F の化合物イオンピーク (EIC of m/z 1056.8)
- iv: Surugamide B-E の化合物イオンピーク (EIC of m/z 898.8)

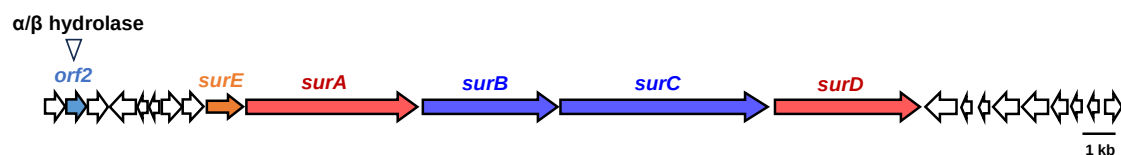


Figure 2-22. Surugamide 類生合成遺伝子クラスターにコードされた加水分解酵素

第三章 SNAC 基質を用いた SurE の基質選択性の解明

第一節 本章の目的

環状ペプチドはその特有の三次元構造から鎖状ペプチドと比べて高い代謝安定性・膜透過性・標的特異性が期待できるため、新たな創薬シーズとしてアカデミア・産業界問わず多方面から注目を集めている^{79, 80}。しかし、有機合成的手法によるペプチドの環化反応は未だ制御の難しい反応であり、有機合成の発展が目覚ましい昨今においてもいくつかの課題点を残している。

2000 年にハーバード大学の Walsh らの研究グループが非リボソームペプチド環化酵素の *in vitro* 再構成に成功して以降、今日で四半世紀の月日が経とうとしている⁵⁴。その間、多くの研究者がペプチド環化酵素を探索し、その機能解析とともに触媒利用の道を模索してきた。しかしながら、その期待に反し、非リボソームペプチド環化酵素を生体触媒として利用できた事例はごく一部のみに限られている⁵⁵。その主たる要因として、TE ドメインの厳密な基質選択性が挙げられる。TE ドメインは構成残基の一部のみを置換した類似基質は環化できても、本来の基質とはかけ離れたアミノ酸配列を有する基質に対しては環化活性を示さない場合が大半であり、その基質適用範囲の狭さが課題であった。また、TE ドメインは通常、細胞内において巨大な合成酵素の一部として存在しており、他ドメインとの相互作用により構造安定化や機能制御がなされている。そのため、TE ドメインのトランケート体を単独酵素として調製する際に、正しくフォールディングされず封入体を形成する可能性や、可溶性タンパク質を獲得できたとしても本来の酵素活性を失っている可能性があった。このような触媒としての扱いにくさから、TE ドメインを生体触媒として実用化することは困難であると考えられてきた。

その一方で、第二章にて同定した新規ペプチド環化酵素 SurE は、環状オクタペプチド surugamide A-E と環状デカペプチド cyclosurugamide F という構造的に大きく異なる 2 つの化合物の生合成に関与するため、寛容な基質選択性を有するペプチド環化酵素であることが推測される。また、SurE は従来の TE ドメインとは異なり、もともと生合成酵素から独立して存在する単独酵素であるため、遺伝子操作や組換えタンパク質の調製が比較的容易である。このように、従来の TE ドメインの欠点を克服した特徴を有する SurE であれば、ペプチド環化触媒としての応用が十分に期待できると考えられる。

そこで本章では、SurE の生体触媒としての応用を見据え、複数の SNAC 基質を用いて SurE の機能解析を行い、本酵素の基質適用範囲や基質認識機構に関する知見を得ることを

目的とした。SurE の基質選択性を解明するにあたり、本章では以下に示すように SNAC 基質を 4 つの部位（基質 C 末端/基質 N 末端/配列内部/脱離基）に分割し、それぞれの部位に対する SurE の選択性を評価した（Figure 3-1）。

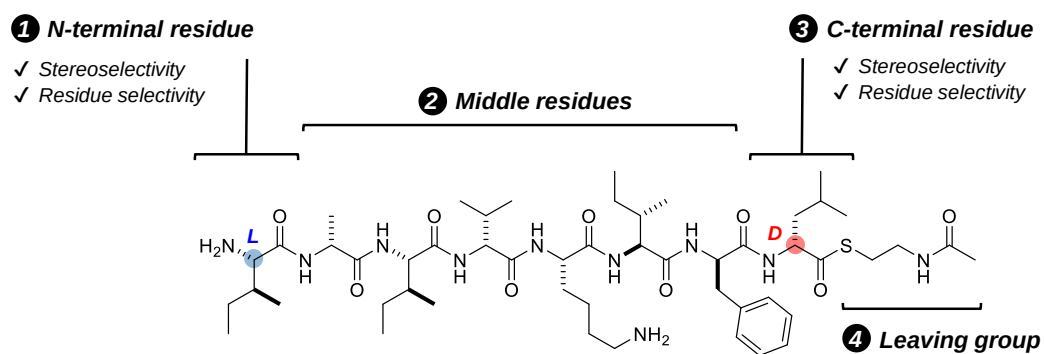


Figure 3-1. SNAC 基質を用いた SurE の基質選択性の解明

第二節 基質両末端残基に対する立体選択性の検証

SurE は PBP と相同性を示し、酵素反応に関わるとされる触媒 4 残基 (Ser、Lys、Arg、His) も高度に保存されていることから、その基質選択性も PBP と相関があることが推測される。実際、PBP は C 末端に D-アミノ酸を含有する基質 (D-Ala-D-Ala) を選択的に認識する一方で、SurE も同様、本来の基質である環状オクタペプチド surugamide A-E と環状デカペプチド cyclosurugamide F の環化前駆体の C 末端残基はどちらも D-アミノ酸 (D-Leu/D-Ala) である。このことから、基質 C 末端に D-アミノ酸を含有することが SurE の基質認識に重要である可能性が考えられた。

そこで本仮説を検証するため、モデル基質である *seco*-surugamide B-SNAC (7) の C 末端 D-Leu を L-Leu に置換した基質を化学合成し、SurE の *in vitro* 酵素反応を行い、その環化活性を評価した (Figure 3-2)。なお、SNAC 基質 7 の C 末端 D-Leu を L-Leu に置換した基質 *seco*-surugamide B (dL8LL)-SNAC を酵素反応に用いた際、N 末端 5 位の L-Lys 側鎖で自発的に環化反応が進行し、SurE の環化活性を定量的に評価することができなかった。そこで本実験では、この自発的な環化を防ぐために N 末端 5 位 L-Lys を L-Ala に置換した基質を別途調製し、SurE の *in vitro* 酵素反応に用いることとした。SNAC 基質 7 の N 末端 5 位 L-Lys と N 末端 8 位 D-Leu をそれぞれ L-Ala および L-Leu へと置換した基質 *seco*-surugamide B (K5A, dL8LL)-SNAC (14) を化学合成したのち、組換え SurE を用いた *in vitro* 酵素反応に供した。室温条件下、水中で 2 時間反応させたのち、酵素反応液を HPLC にて分析した (Figure 3-2)。その結果、C 末端が D-Leu である基質 *seco*-surugamide B (K5A)-SNAC (15) を酵素反応に用いた場合では、SurE 依存的な基質の減少とそれに伴う head-to-tail 環化体 cyc-15 の生成が確認された一方で、C 末端が L-Leu である SNAC 基質 14 を用いた場合では、基質の減少や環化体の生成は全く確認されなかった。この結果から、SurE は C 末端に D-アミノ酸を有する基質を選択的に認識し、環化反応を触媒することが明らかとなった。

次に、SurE の環化反応において C 末端残基との反応点となる N 末端残基に対する立体選択性を検証した。SNAC 基質 7 の N 末端 L-Ile を D-allo-Ile に置換した基質 *seco*-surugamide B (H1dalloI)-SNAC (16) を調製し、組換え SurE による *in vitro* 酵素反応に供し、HPLC による分析を行った (Figure 3-3)。その結果、SurE 依存的な基質の減少は確認されたものの、生成した化合物は head-to-tail 環化体 cyc-16 ではなく、チオエステル結合が切断された加水分解体 hyd-16 であった。これは、SurE が基質を認識し基質-酵素複合体を形成したものの、基質 N 末端残基 D-allo-Ile の求核攻撃が進行せず、系中の水分子による求核攻撃が優先的に起きたために生じたものと考えられる (Figure 3-4)。

以上の立体選択性に関する検証結果から、SurE は、C 末端 D-アミノ酸と N 末端 L-アミノ酸でのヘテロキラルな残基間での head-to-tail 環化反応を選択的に触媒するペプチド環化酵素であることが明らかとなった。

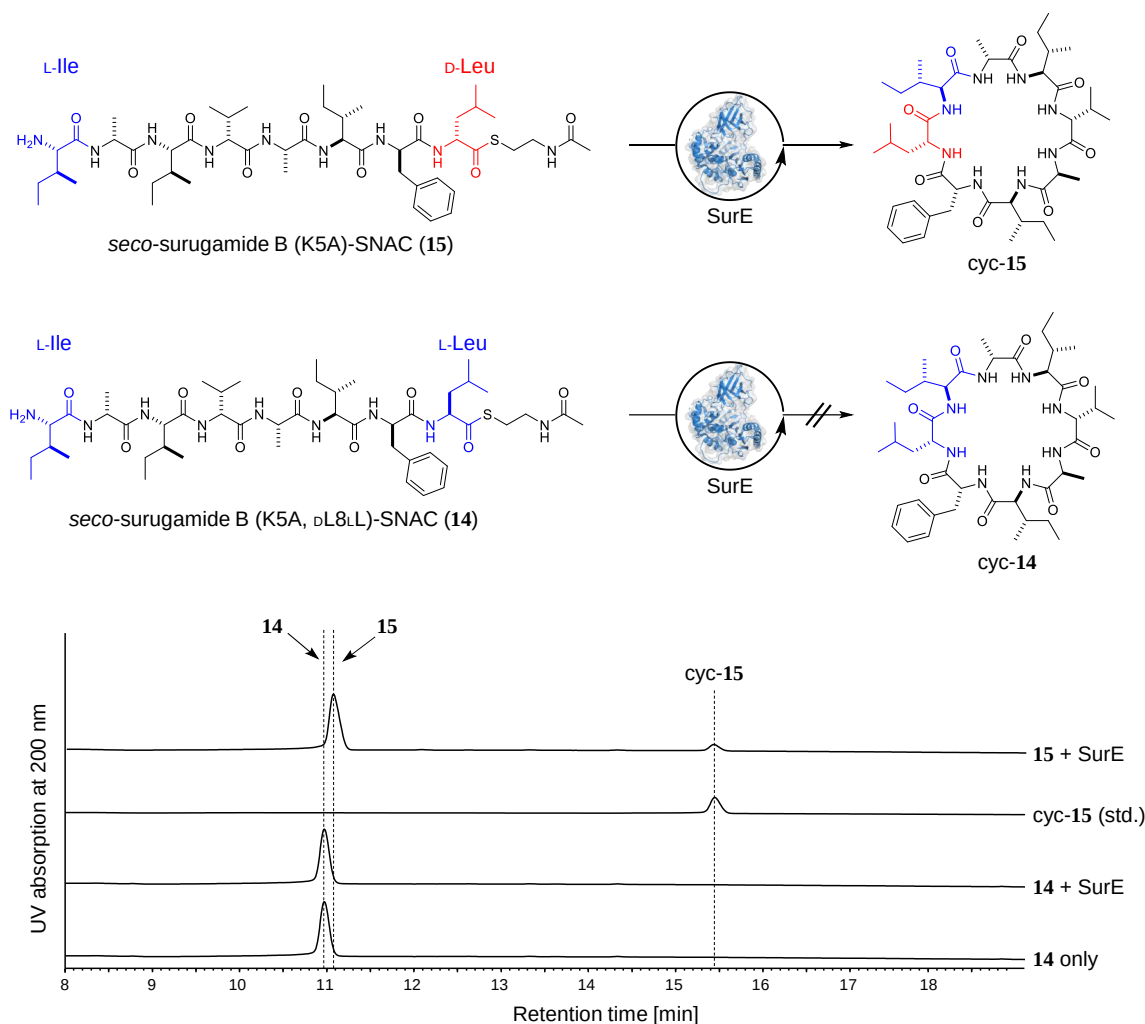


Figure 3-2. 基質 C 末端残基に対する立体選択性の検証

UV200 nm におけるクロマトグラムを示した。また、酵素反応で生成した head-to-tail 環化体を「cyc」と記した。

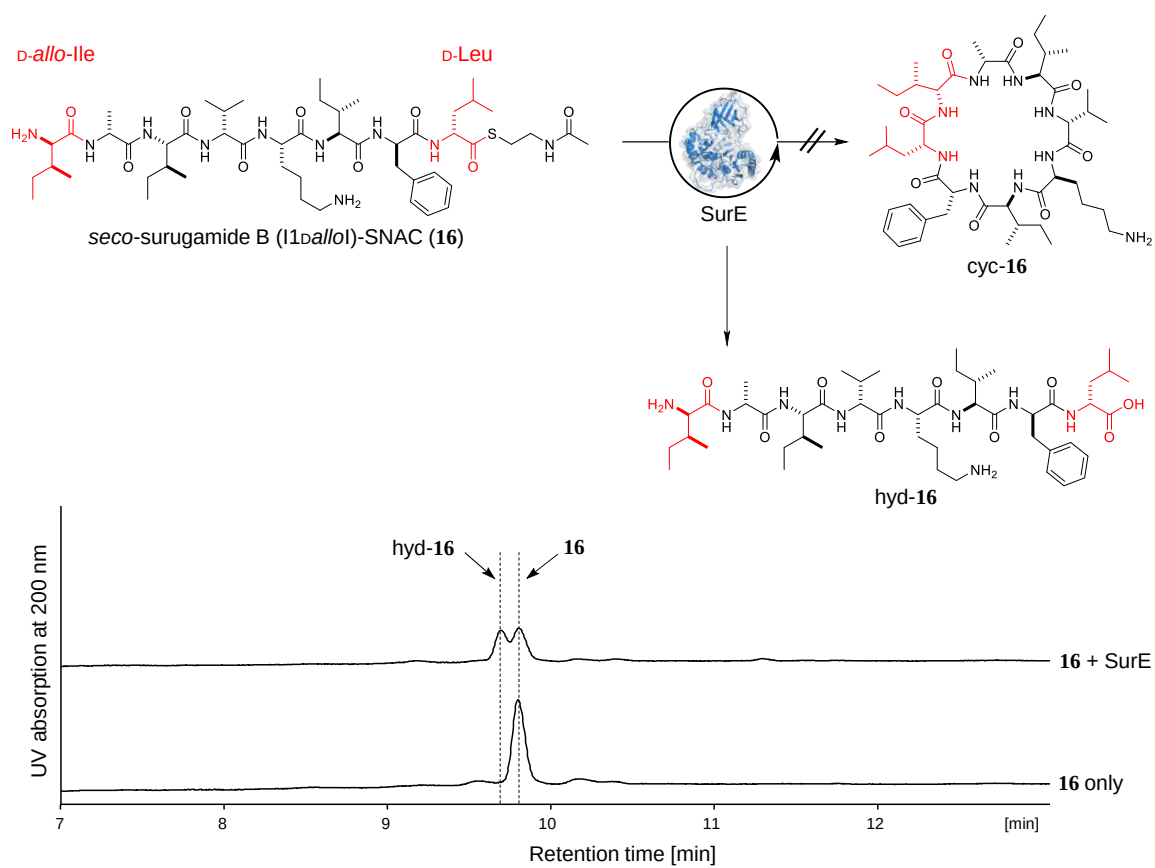


Figure 3-3. 基質 N 末端残基に対する立体選択性の検証

UV200 nm におけるクロマトグラムを示した。また、酵素反応で生成した加水分解体を「hyd」と記した。

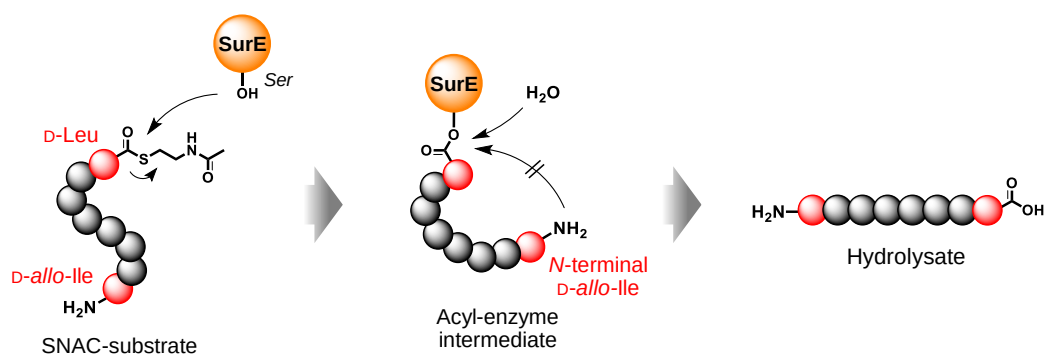


Figure 3-4. SurE による加水分解反応機構

第三節 残基選択性の検証

次に、SurE の基質認識に重要な役割を担うアミノ酸残基を同定するために、SNAC 基質のアラニンスキャニングを実施した。*seco-surugamide B*-SNAC (7) を構成する各アミノ酸残基を C α 位の立体化学を保持したまま L-Ala もしくは D-Ala へ置換した種々の SNAC 基質を化学合成し、組換え SurE を用いた *in vitro* 酵素反応に供した。本実験で用いる基質は、SNAC 基質 7 を構成する残基 L-Ile3、D-Val4、L-Ile6、D-Phe7、および D-Leu8 をそれぞれ Ala に置換した基質 *seco-surugamide B* (I3A)-SNAC (17)、*seco-surugamide B* (dV4dA)-SNAC (18)、*seco-surugamide B* (I6A)-SNAC (19)、*seco-surugamide B* (dF7dA)-SNAC (20)、*seco-surugamide B* (dL8dA)-SNAC (21) である。また、N 末端 5 位の L-Lys に関しては、基質の水溶性を維持するために L-Ala ではなく α -アミノアジピン酸 (α AA) に置換した基質 *seco-surugamide B* (K5 α AA)-SNAC (22) を用いた。上記 6 種類の SNAC 基質 (17-22) を調製したのち、室温条件下、水中で 2 時間酵素反応を行った (Figure 3-5)。酵素反応液を HPLC にて分析した結果、L-Lys5 と D-Leu8 の置換体 22 と 21 では環化効率が低下したものの、それ以外の基質では定量的に head-to-tail 環化体へと変換されることが明らかとなった。この結果から、SurE は基質末端を除き、配列内部に対して寛容な残基選択性を有することが示唆された。

次に、基質 C 末端および基質 N 末端の残基選択性を検証した。本実験にて用いた基質は、*seco-surugamide B*-SNAC (7) の C 末端 D-Leu を親水性アミノ酸 D-Arg/D-Asn/D-Ser へと置換した *seco-surugamide B* (dL8dR)-SNAC (23)、*seco-surugamide B* (dL8dN)-SNAC (24)、*seco-surugamide B* (dL8dS)-SNAC (25)、嵩高い側鎖を有する D-Phe へと置換した *seco-surugamide B* (dL8dF)-SNAC (26)、不斉炭素を有さない Gly へと置換した *seco-surugamide B* (dL8G)-SNAC (27)、および N 末端 L-Ile を嵩高い側鎖を有する L-Trp へと置換した *seco-surugamide B* (I1W)-SNAC (28)、第 2 級アミンを有する L-Pro へと置換した *seco-surugamide B* (I1P)-SNAC (29) の 7 種類である。これらの SNAC 基質を組換え SurE を用いた *in vitro* 酵素反応に供し、環化反応の進行を観察した (Figure 3-6)。種々の酵素反応液を HPLC にて分析した結果、C 末端に比較的嵩が小さい D-Ser を導入した基質 25 では環化体の生成が認められた。その一方で、D-Arg、D-Asn などの嵩高い親水性残基やアキラルな Gly を C 末端に導入した基質 23、24、27 では環化反応は全く進行しなかった。また、N 末端を第 2 級アミンである L-Pro に置換した基質 29 では、基質の減少は確認できたものの、その生成物は環化体ではなく加水分解体であった。基質両末端を Phe や Trp などの嵩高い疎水性アミノ酸に置換した基質 26、28 においては、定量的な基質の消失とそれに伴う環化体の生成が確認され

た。以上の結果から、SurE は C 末端残基に疎水性残基や嵩の小さい親水性残基を含む基質を好む一方で、嵩高い親水性残基を含む基質は環化せず、基質 C 末端に対して一定の残基選択性を示すことが明らかとなった。また、N 末端残基に対しては、Pro のような求核性の弱い第 2 級アミンを含む基質は環化しない一方で、Trp のような嵩高い残基を含む基質を環化することから、比較的寛容な選択性を有することが示唆された。

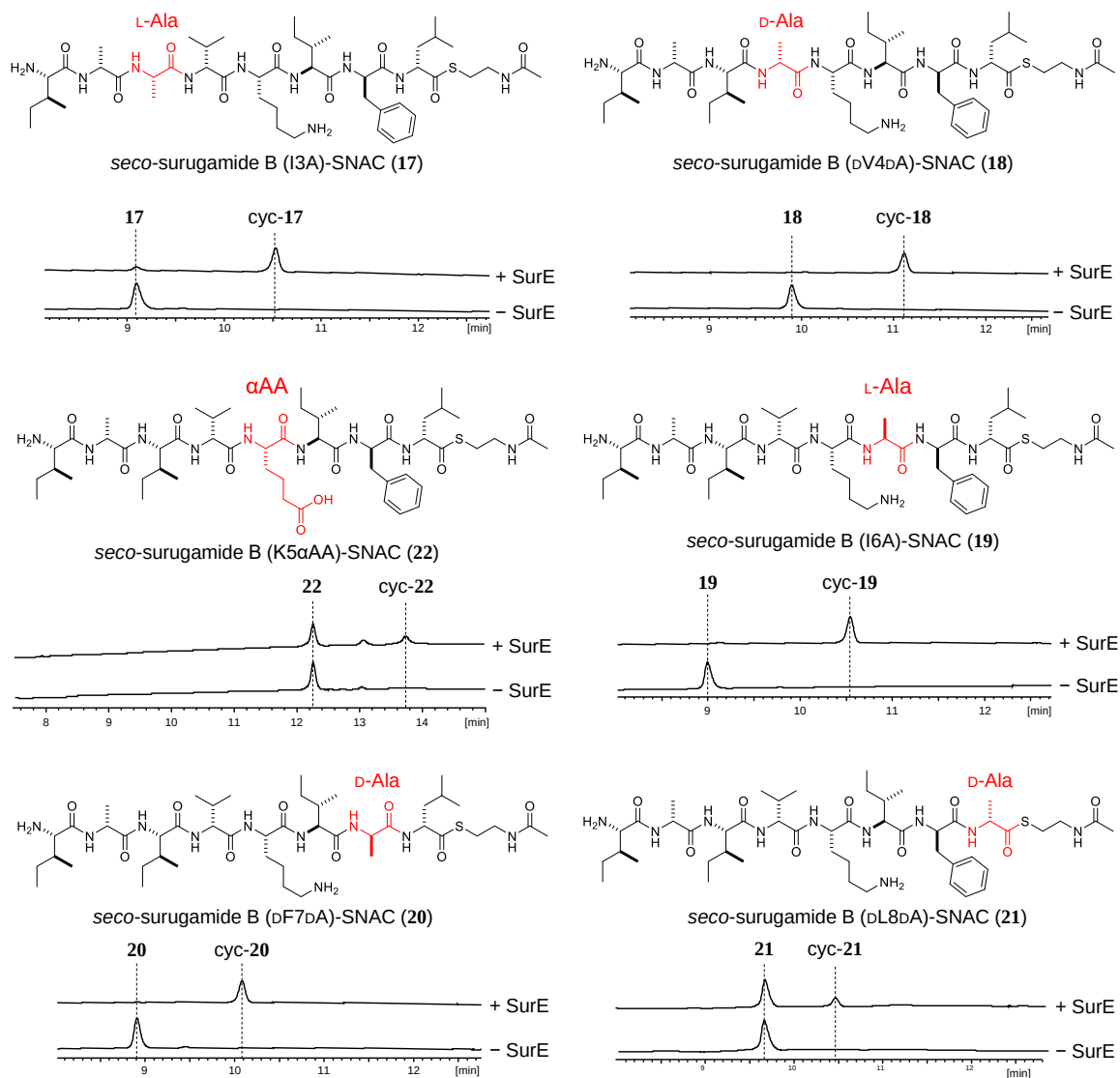
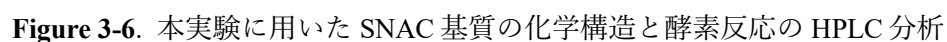
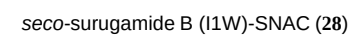
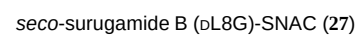
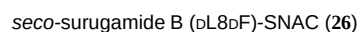
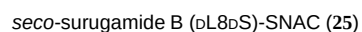
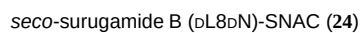
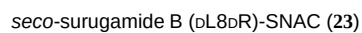


Figure 3-5. 本実験に用いた SNAC 基質の化学構造と酵素反応の HPLC 分析

上段に SurE を添加した系 (+ SurE)、下段に基質のみの系 (- SurE) を示した。UV200 nm におけるクロマトグラムを示した。また、酵素反応で生成した head-to-tail 環化体を「cyc」と記した。



上段に SurE を添加した系 (+ SurE)、下段に基質のみの系 (- SurE) を示した。UV200 nm におけるクロマトグラムを示した。また、酵素反応で生成した head-to-tail 環化体、および加水分解体を「cyc」、および「hyd」と記した。

第四節 脱離基に対する選択性の検証

次に、基質 C 末端の脱離基に対する選択性を検証した。本実験では、これまで用いてきた SNAC 基質よりも合成が簡便で、かつ化学合成の際に C 末端残基のエピメリ化などの副反応が問題とならないメチルエステル体を基質として選択した。*seco*-surugamide B-SNAC (7) をモデル基質として、そのメチルエステル体を以下に示すスキームにより化学合成した (Figure 3-7)。まず、DIPEA を用いて C 末端残基 D-Leu を 2-CT 樹脂に担持し、固相担持アミノ酸 9 を得た。次に、Fmoc 固相合成法により各種アミノ酸の縮合とペプチド鎖の伸長を行い、固相担持ペプチド 10 を得たのち、30% HFP/DCM 溶液によりペプチド鎖を樹脂から切り出し、カルボン酸 30 を得た。30 を DMF に溶解したのち、20 等量の DIPEA と iodomethane を加え、C 末端残基のメチルエステル化を行った。マイクロウェーブを用いて 100 °C で 15 min 反応させたのち、TFA によりアミノ酸側鎖の保護基および N 末端アミンの Boc 基を除去し、メチルエステル体を得た。このメチルエステル体に対してエーテル沈殿を行い、HPLC を用いた精製を行うことで、目的基質 *seco*-surugamide B-methyl ester (31) を総収率 35.0% で得た。なお、本合成法では SNAC 基質の化学合成で問題となった C 末端残基のエピメリ化は確認されず、所望の立体を有する基質のみを単一に与えた。

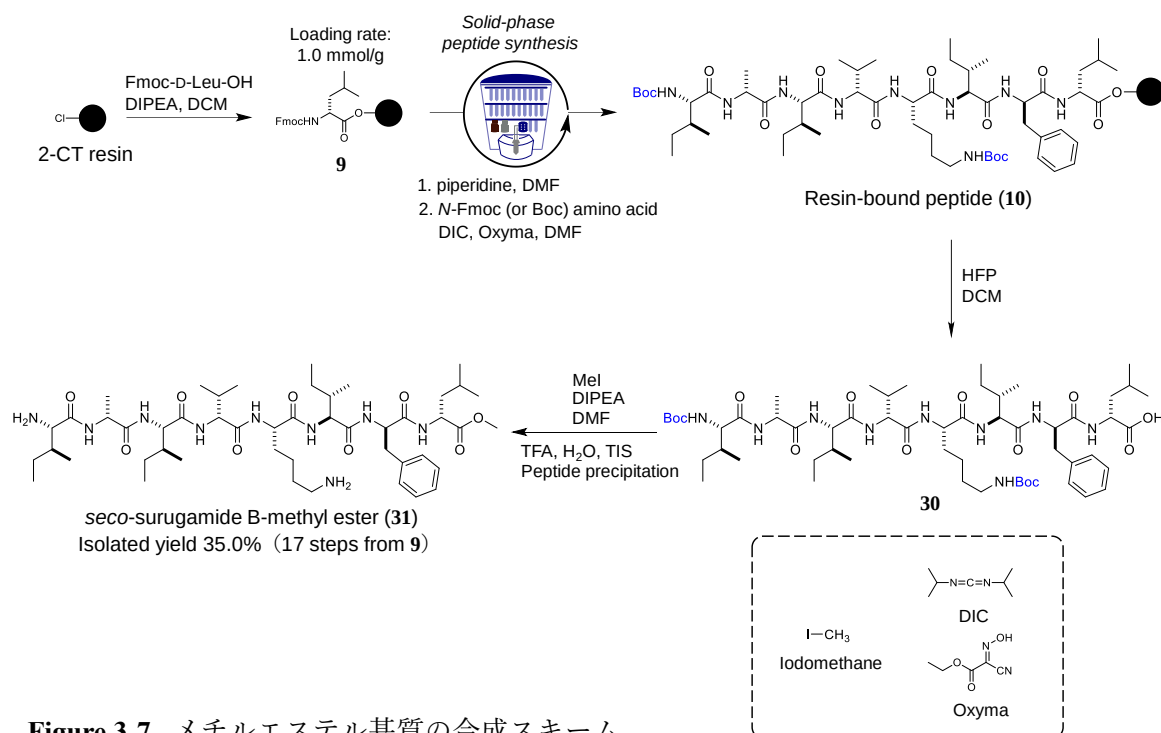


Figure 3-7. メチルエステル基質の合成スキーム

化学合成したメチルエステル基質 **31** と組換え SurE の酵素反応液を **Figure 3-8** に示す組成にて調製し、30 °Cで終夜インキュベートした。酵素反応液を LC-MS にて分析した結果、微量ではあるものの、酵素依存的に環化体 surugamide B (**2**) が生成することが明らかとなった (**Figure 3-9**)。この結果から、SurE は SNAC 体だけでなくメチルエステル体も基質として受け入れ、脱離基に対して寛容な選択性を有することが明らかとなった。

Reaction conditions
20 mM Tris-HCl pH 8.0
200 μ M Methyl ester-substrate (31)
20 μ M SurE
H ₂ O up to 100 μ L
30°C, over night
↓
LC-MS analysis

Figure 3-8. *Seco*-surugamide B-methyl ester と SurE の *in vitro* 酵素反応の反応条件

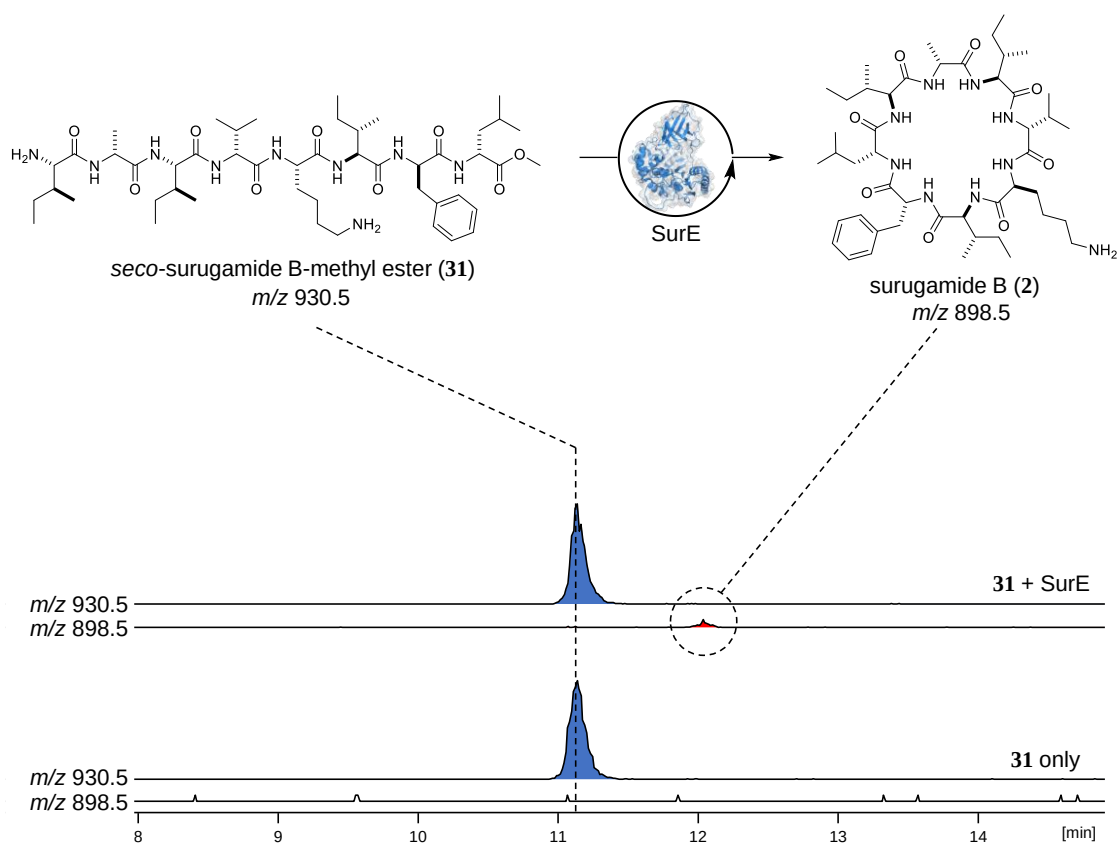


Figure 3-9. *Seco*-surugamide B-methyl ester と SurE の *in vitro* 酵素反応

上段に SurE を添加した系の分析結果、下段に基質のみの系の分析結果を示した。クロマトグラムは基質の分子イオンピークに相当する m/z 930.5 と surugamide B の分子イオンピークに相当する m/z 898.5 の EIC を示した。

SurE は、SNAC 基質だけでなく化学合成が容易なメチルエステル基質に対しても環化活性を示すことが明らかとなったが、その変換効率は非常に低い (**Figure 3-9**)。そこで、メチルエステル基質に対する環化活性の向上を目指すため、精製工程を省いた大腸菌の細胞破碎液を直接酵素反応に用いることとした。**Figure 3-10** に示す組成でメチルエステル基質と SurE 細胞破碎液の酵素反応液を調製したのち、30 °C で終夜インキュベートした。酵素反応液を HPLC にて分析した結果、メチルエステル基質 **31** が完全に消失し、定量的に head-to-tail 環化体 **2** へ変換されることが明らかとなった (**Figure 3-11**)。このことから、SurE の細胞破碎液を酵素反応に用いることで、メチルエステル基質に対する環化活性を向上できることが明らかとなった。

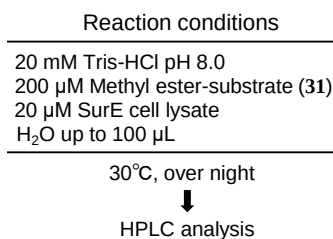


Figure 3-10. *Seco*-surugamide B-methyl ester と細胞破碎液の *in vitro* 酵素反応の反応条件

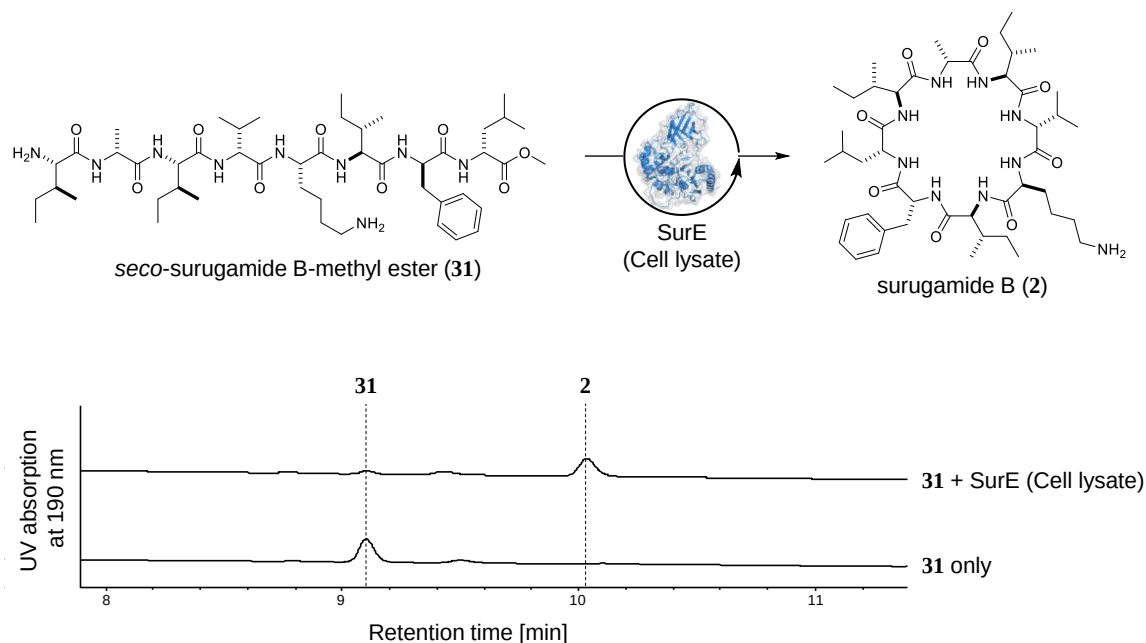


Figure 3-11. *Seco*-surugamide B-methyl ester と細胞破碎液を用いた酵素反応

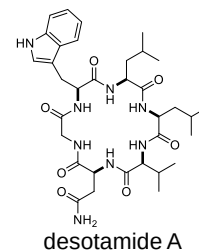
上段に SurE 細胞破碎液を添加した系、下段に基質のみの系を示した。UV190 nm におけるクロマトグラムを示した。

第五節 PBP-type TE の系統解析とホモログ酵素の探索

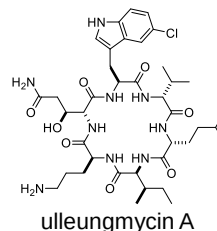
前節の *in vitro* 酵素反応の実験結果から、SurE は基質の配列内部の残基や脱離基に対して寛容な選択性を有することが示唆された。また、基質 N 末端や C 末端の残基に対しても一定の制限はあるものの、寛容な選択性を有することが示唆された。このように生体触媒として優れた特性を有する SurE に加えて、他の SurE ホモログ酵素 (PBP-type TE) の基質選択性についても興味を持たれるところである。特に、SurE と系統的に異なるクレードを形成する PBP-type TE の探索とその機能解析を行うことができれば、新たな触媒能を有した PBP-type TE の同定や PBP-type TE 酵素ファミリーのさらなる知見の獲得が期待される。そこで本節では、SurE のアミノ酸配列を指標に系統解析を行い、新たなホモログ酵素の探索とその基質選択性の検証を行った。

SurE のアミノ酸配列を指標に公共のゲノムデータベース GenBank⁸¹ にてホモログ酵素の探索を行った。その結果、PBP-type TE は各種放線菌に幅広く存在する普遍的な生合成システムであり、現時点で 600 種以上の PBP-type TE が存在することが明らかとなった (**Figure 3-12**)。その中には、すでに単離・構造決定されている天然物である環状ヘキサペプチド desotamide⁸²、ulleungmycin⁸³、mannopeptimycin⁸⁴ や noursamycin⁸⁵ などの生合成において生合成中間体の head-to-tail 環化反応を触媒すると予想される DsaJ、Ulm16、Mppk や Nsm16 に加え、産物が同定されていない生合成遺伝子クラスター中にも、数多くの未知の PBP-type TE がコードされていることが明らかとなった。この結果は、単離報告されていない環状ペプチドが多数存在していることを示唆するものであり、今後、PBP-type TE を指標としたゲノムマイニングを展開することで、新規環状ペプチドの発見が期待される。

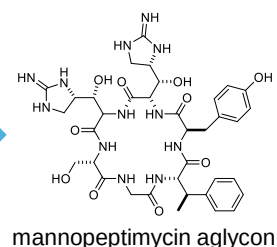
Streptomyces scopuliridis SCSIO ZJ46 – desotamide biosynthetic gene cluster



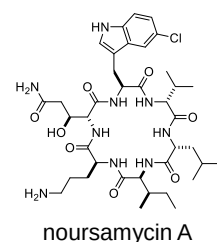
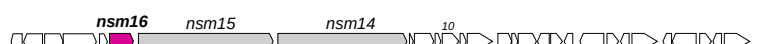
Streptomyces sp. KCB13F003 – ulleungmycin biosynthetic gene cluster



Streptomyces hygroscopicus – mannopeptimycin biosynthetic gene cluster



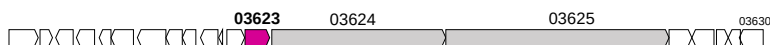
Streptomyces noursei NTR-SR4 – noursamycin biosynthetic gene cluster



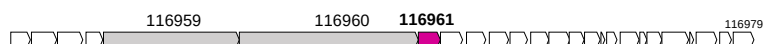
Streptomyces violaceusniger Tu 4113



Streptomyces sp. MJM8645



Streptomyces lydicus 103



Amycolatopsis mediterranei S699



etc.

SurEホモログを含む
生合成産物が未知の
遺伝子クラスター

Figure 3-12. PBP-type TE をコードする生合成遺伝子クラスター

生合成遺伝子クラスターと推測される領域を灰色、PBP-type TE をコードする遺伝子を紫色で示した。

次に、得られた PBP-type TE のアミノ酸配列情報をもとに系統解析を行った (Figure 3-13)。その結果、PBP-type TE はそのドメイン構造から 2 種類のタイプ (Class I PBP-type TE と Class II PBP-type TE) に分類できることが明らかとなった。Class I PBP-type TE は、触媒ドメインである PBP ドメインのほかに C 末端に lipocalin ドメインを有し、NRPS から独立して存在する環化酵素群である。本研究で見出した SurE や Figure 3-12 中の PBP-type TE は全て Class I PBP-type TE に分類される。Class II PBP-type TE は C 末端に lipocalin ドメインを有さず、従来の TE ドメインと同様に NRPS の C 末端に融合した形で存在する酵素群である。Class II PBP-type TE により生合成される化合物でこれまでに単離・構造決定された例はないが、そのいくつかは NRPS-PKS ハイブリッド型の生合成遺伝子クラスターにコードされているため、ペプチドのみならずポリケチドユニットを含有する基質に対しても環化反応を触媒できる可能性が示唆される。

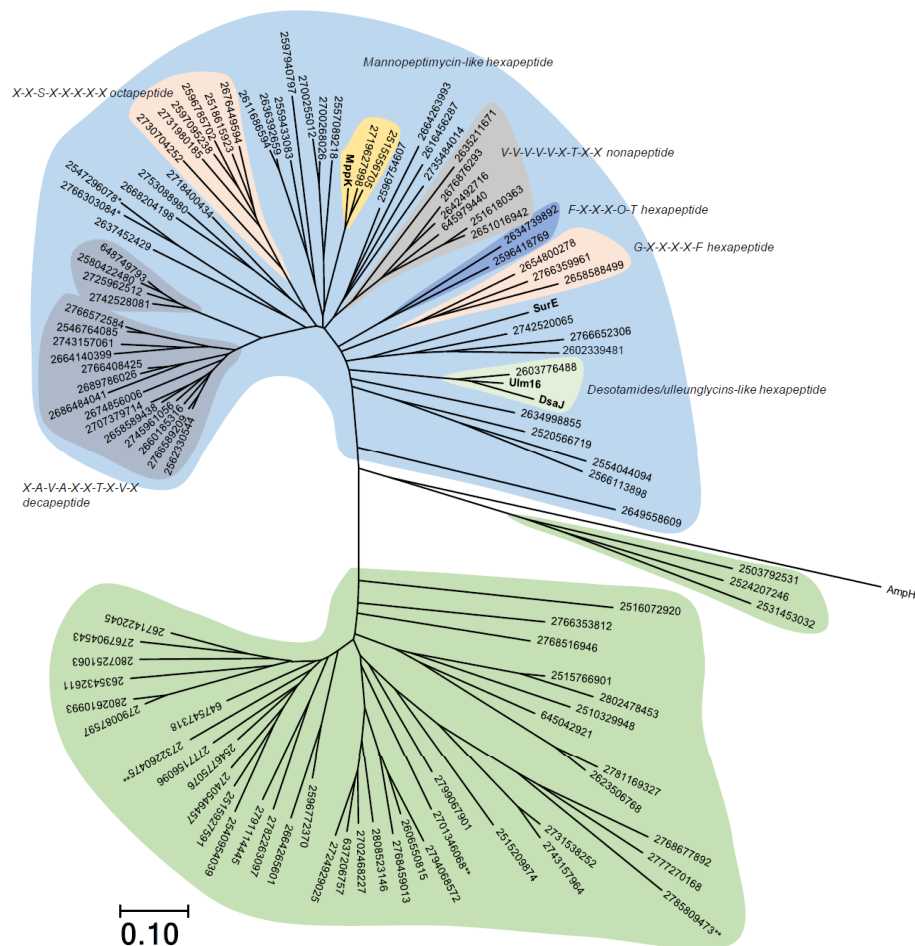


Figure 3-13. PBP-type TE の系統的分類

Class I PBP-type TE を青色、Class II PBP-type TE を緑色で示した。また、Class I PBP-type TE を基質のペプチド鎖長、及び構成アミノ酸で細分類した。

得られた系統樹をもとに基質の残基鎖長と C 末端残基の種類で PBP-type TE を分類した (Figure 3-14)。系統樹の外周に記載した数字は基質の残基数、内周に記載したアルファベットは基質 C 末端のアミノ酸残基を示す。たとえば、SurE の場合、本来の基質が環状オクタペプチド surugamide A-E (8 残基、C 末端 Leu) と環状デカペプチド cyclosurugamide F (10 残基、C 末端 Ala) であるため、「8+10」、「A & L」と記した。その結果、PBP-type TE ファミリーは、基質の残基鎖長や C 末端残基の種類に多様性があることが明らかとなった。残基鎖長は 4~10 残基と幅広く、基質 C 末端残基に関しても Gly、D-Ala、D-Leu などの疎水性残基のみならず、D-Arg や D-Asn などの親水性残基を含有する基質を環化する PBP-type TE が数多く存在することが明らかとなった。SurE は C 末端に D-Arg や D-Asn などの嵩高い親水性アミノ酸を含有する基質を環化することができないが (Figure 3-6)、これと相補的な基質選択性を有する PBP-type TE が複数存在することが示唆された。

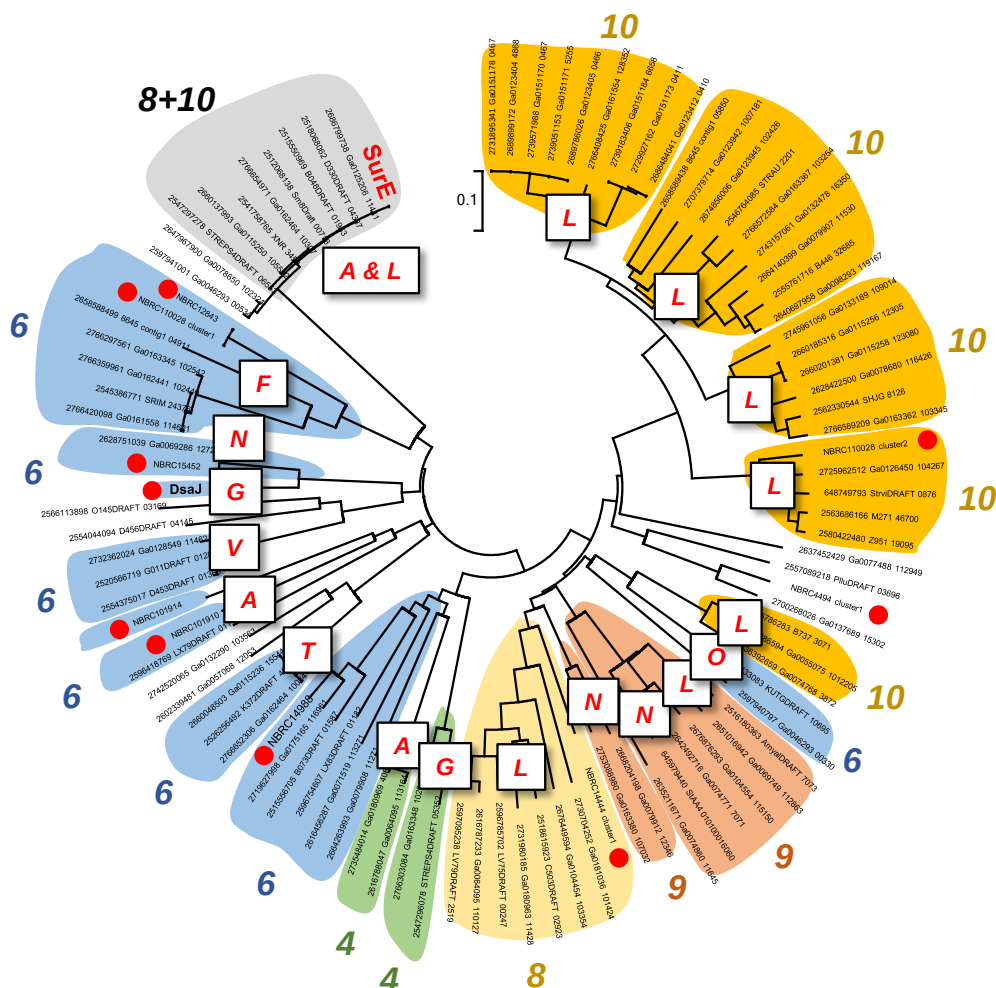


Figure 3-14. 基質の残基鎖長と C 末端残基をもとにした PBP-type TE の系統解析

PBP-type TE の系統解析の結果をもとに、ホモログ酵素の探索と基質選択性の検証を行った。SurE と異なるクレードを形成する 10 種類の PBP-type TE (**Figure 3-14** の●) を選択し、大腸菌を用いた組換えタンパク質の調製を試みた。各種放線菌のゲノムを抽出したのち、PCR により標的領域の増幅とクローニングを行い、組換えタンパク質発現用プラスミドを構築した。大腸菌を用いた標的タンパク質の発現と Ni レジンによるアフィニティー精製を行ったのち、SDS-PAGE によりタンパク質の可溶化を検証した。その結果、10 種類の PBP-type TE のうち、8 種では目的タンパク質が不溶性画分へ移行したものの、残りの 2 種 (NBRC No.15452 と 14988) は可溶性タンパク質として取得することに成功した (**Figure 3-15** および **Figure 3-16**)。以降この 2 種類の PBP-type TE を SurE₁₅₄₅₂、SurE₁₄₉₈₈ と呼称する。

Scientific name	NBRC No.	Recombinant protein
<i>Kitasatospora aureofaciens</i>	NBRC 12943	×
<i>Streptomyces</i> sp.	NBRC 110028 cluster1	×
<i>Streptomyces noursei</i>	NBRC 15452	○
<i>Micromonospora siamensis</i>	NBRC 101914	×
<i>Streptomyces scopuliridis</i>	—	×
<i>Allokutznetia albata</i>	NBRC 101910	×
<i>Goodfellowiella coeruleoviolacea</i>	NBRC 14988	○
<i>Saccharothrix australiensis</i>	NBRC 14444	×
<i>Streptomyces</i> sp.	NBRC 110028 cluster2	×
<i>Kibdelosporangium aridum</i>	NBRC 14493	×

Figure 3-15. 10 種類の PBP-type TE とその可溶性の確認

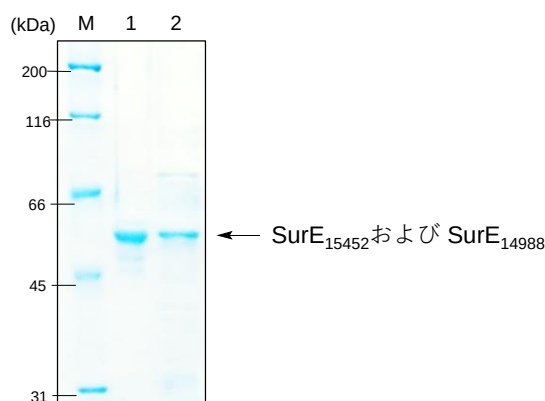
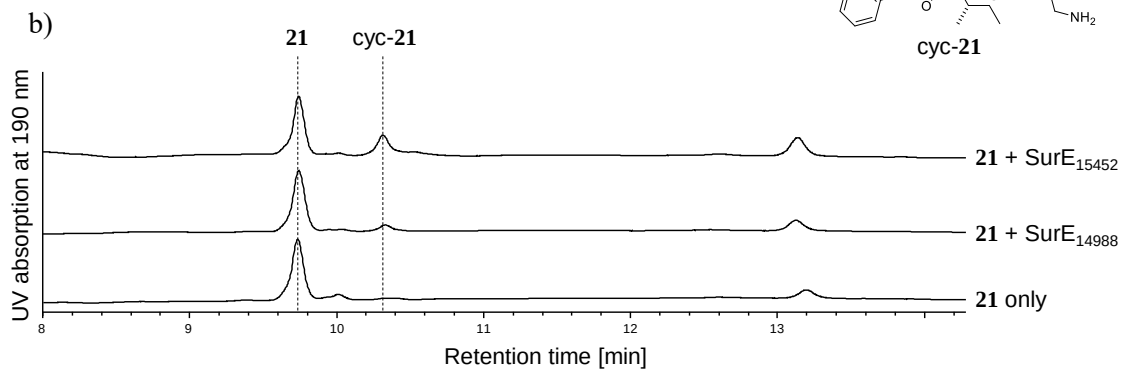
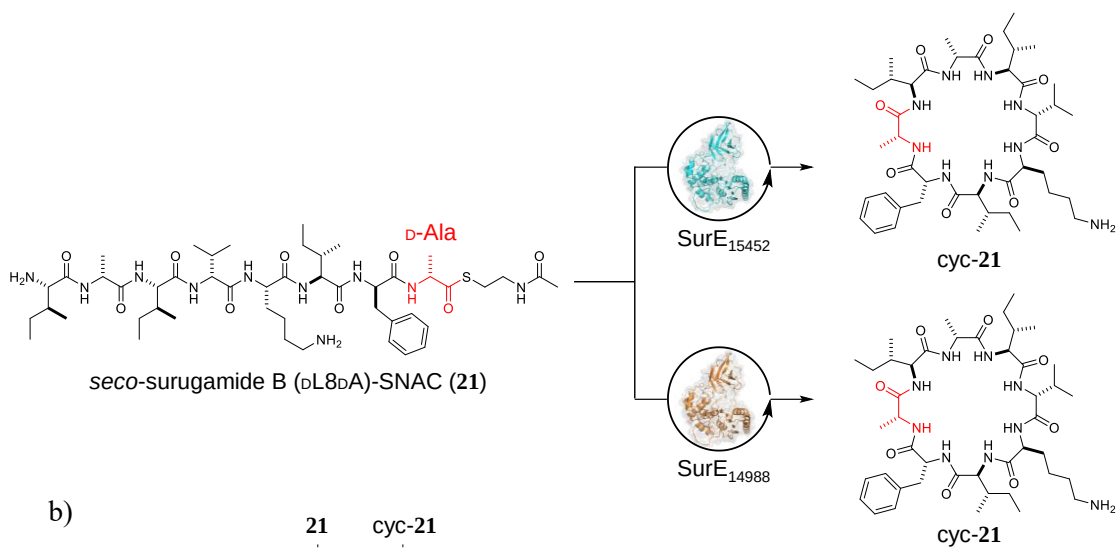
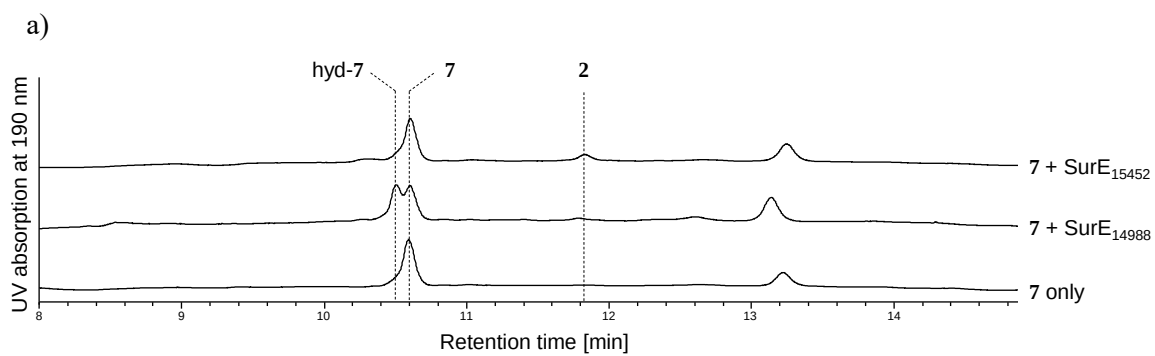
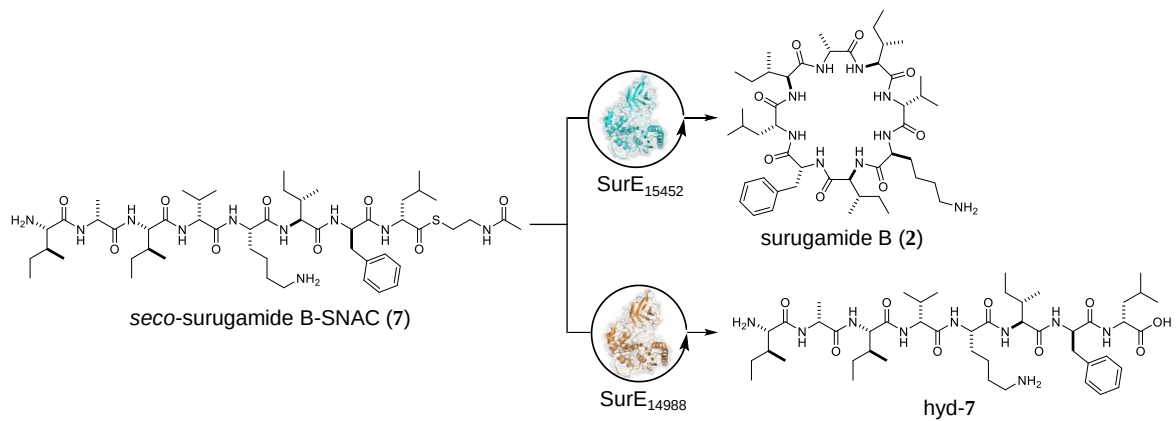


Figure 3-16. SDS-PAGE による組換えタンパク質 SurE₁₅₄₅₂ と SurE₁₄₉₈₈ の可溶性生産の確認
M, タンパク質分子量マーカー; 1, SurE₁₅₄₅₂; 2, SurE₁₄₉₈₈

SurE₁₅₄₅₂ と SurE₁₄₉₈₈ の本来の基質の残基鎖長と C 末端残基はそれぞれ、6 残基/C 末端 D-Arg と 6 残基/C 末端 D-Tyr であることが遺伝子情報から推測されている (**Figure 3-14**)。本研究では、PBP-type TE の寛容な基質選択性を検証することを目的に、SurE₁₅₄₅₂ と SurE₁₄₉₈₈ の本来の基質とは全く異なる surugamide 類の SNAC 基質を *in vitro* 酵素反応に用いることとした。本実験では、*seco*-surugamide B-SNAC (**7**)、*seco*-surugamide B (dL8dA)-SNAC (**21**)、*seco*-surugamide B (dL8dF)-SNAC (**26**) の 3 種類の SNAC 基質を、SurE₁₅₄₅₂ と SurE₁₄₉₈₈ の *in vitro* 酵素反応に供し、環化反応の進行を検証した (**Figure 3-17**)。酵素反応液を HPLC にて分析した結果、SurE₁₅₄₅₂、および SurE₁₄₉₈₈ はいずれの SNAC 基質も基質として受け入れ、環化反応もしくは加水分解反応を触媒することが明らかとなった。SNAC 基質 **7** を用いた場合では、SurE₁₅₄₅₂ は head-to-tail 環化体のみを与えた一方で、SurE₁₄₉₈₈ は加水分解体のみを与える結果となった (**Figure 3-17a**)。SNAC 基質 **21** を用いた場合では、両酵素とも head-to-tail 環化体のみを与える結果となった (**Figure 3-17b**)。SNAC 基質 **26** を用いた場合では、SurE₁₅₄₅₂ は head-to-tail 環化体のみならず head-to-side-chain 環化体であるイソペプチド **32** も与えた一方で、SurE₁₄₉₈₈ は加水分解体のみを与える結果となった (**Figure 3-17c**)。PBP-type TE の種類により反応性や触媒能に差はあるものの、いずれの酵素も本来の基質とは大きく異なるアミノ酸配列を有する SNAC 基質を受け入れた。このことから、SurE に限らず PBP-type TE ファミリー全体が寛容な基質選択性を有する酵素群であることが強く示唆された。



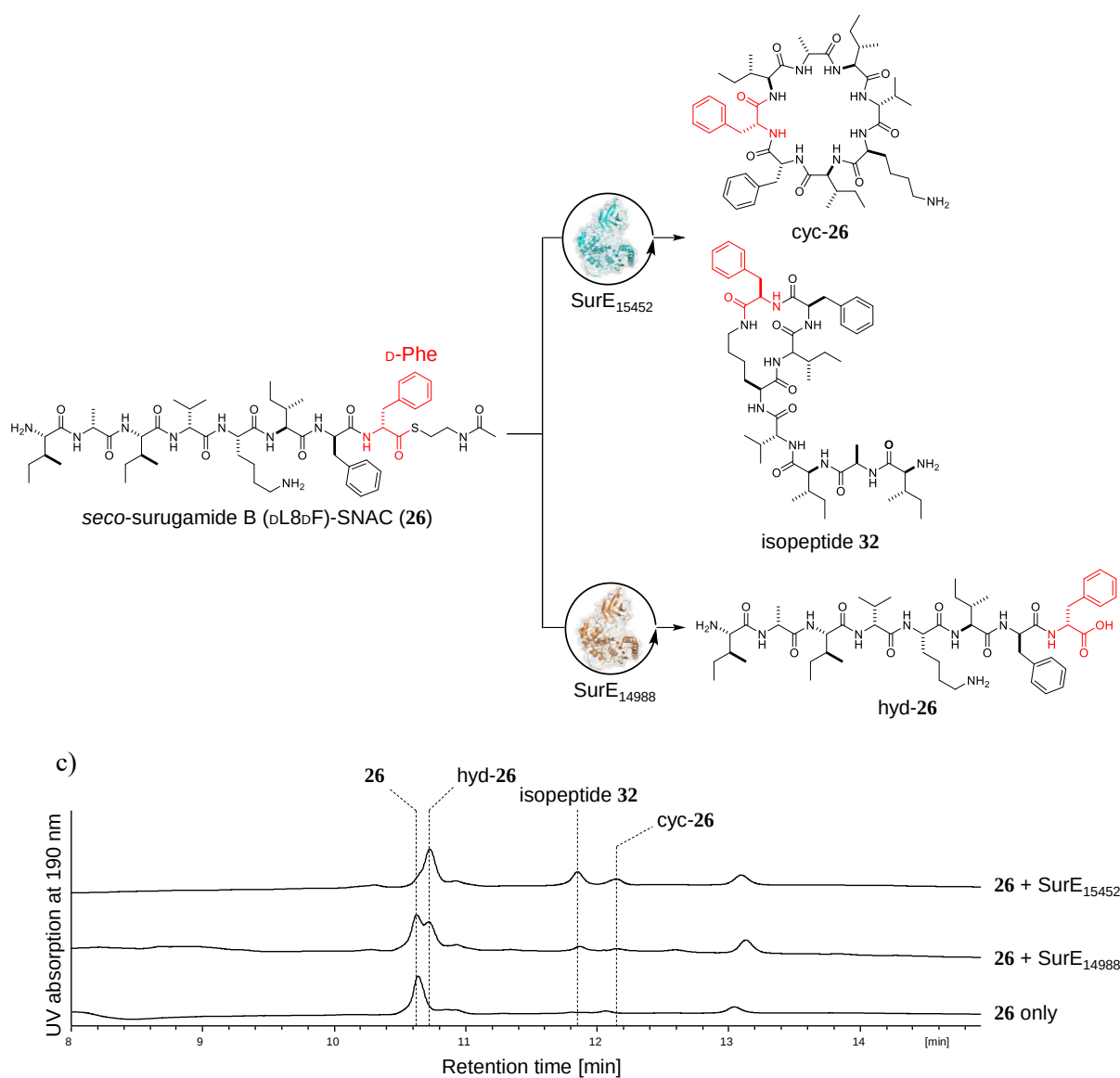


Figure 3-17. SurE₁₅₄₅₂ と SurE₁₄₉₈₈ の基質選択性の検証

- a) Seco-surugamide B-SNAC (7)を用いた *in vitro* 酵素反応
- b) Seco-surugamide B (DL8DA)-SNAC (21)を用いた *in vitro* 酵素反応
- c) Seco-surugamide B (DL8DF)-SNAC (26)を用いた *in vitro* 酵素反応

UV190 nm におけるクロマトグラムを示した。また、酵素反応で生成した head-to-tail 環化体、および加水分解体をそれぞれ「cyc」、および「hyd」と記した。

第六節 小括と考察

1. 第三章のまとめ

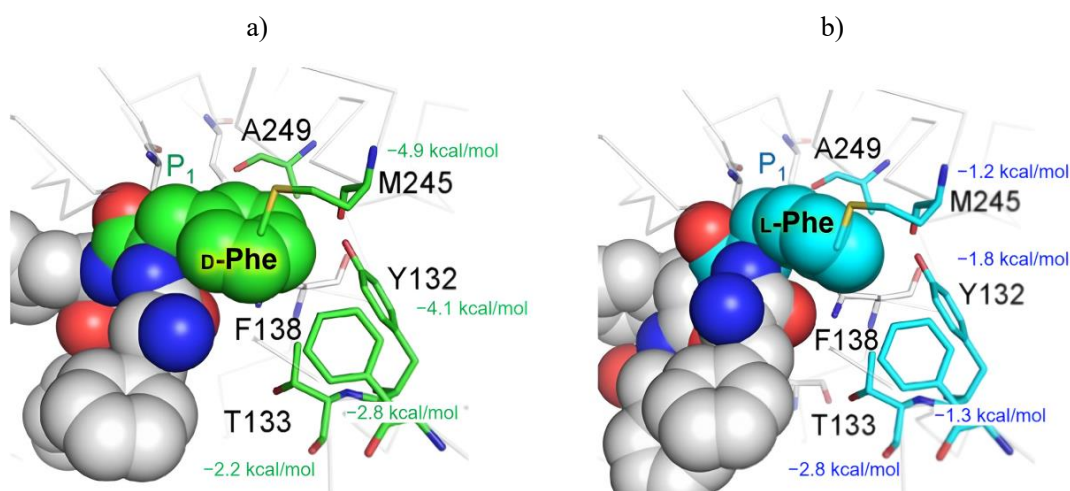
本章では、第二章にて同定した新規ペプチド環化酵素 SurE に焦点を当て、複数の SNAC 基質を用いた *in vitro* 酵素反応を行うことで、本酵素の基質選択性をはじめとした機能解析を行った。基質の両末端残基の立体化学をそれぞれ独立に反転した基質を酵素反応に用いることで、SurE の基質 C 末端 D-アミノ酸選択性と、N 末端 L-アミノ酸選択性を明らかにし、本酵素がヘテロキラルな残基間での head-to-tail 環化反応を選択的に触媒するペプチド環化酵素であることを明らかにした。また、基質のアラニンスキャニングの結果から、SurE は基質配列内部の残基に対して寛容な選択性を示すことが示唆された。また、SurE は嵩高い親水性残基を C 末端に含む基質を環化できないなど、基質 C 末端残基に対して一定の選択性を示す一方で、脱離基に対してはメチルエステルでも許容であり、その基質はチオエステルに限定されないことが明らかとなった。

さらに、上記の SurE の基質選択性の検証に加え SurE のホモログ酵素 (PBP-type TE) の探索とそれら酵素の基質選択性の検証を行った。可溶性タンパク質として得られた 2 種類の PBP-type TE、SurE₁₅₄₅₂ と SurE₁₄₉₈₈ に対して surugamide B の配列をもとに設計した 3 種類の SNAC 基質を用いた酵素反応を行ったところ、どちらの PBP-type TE も本来の基質とは全く異なるアミノ酸配列であるにもかかわらず環化反応や加水分解反応を触媒した。このことから、SurE に限らず PBP-type TE 全体が、寛容な基質選択性を有するペプチド環化酵素ファミリーであることが強く示唆された。本章の研究により、SurE をはじめとした PBP-type TE ファミリーの寛容な基質選択性の一端を明らかにし、本酵素ファミリーの生体触媒としての利用可能性を提示することができた。

2. SurE の基質 C 末端残基選択性に関する考察

本章での実験により、SurE が基質両末端のヘテロキラルな残基間での head-to-tail 環化反応を選択的に触媒するペプチド環化酵素であることが明らかとなった。SurE によるペプチド環化反応が進行するためには、その基質 C 末端に D-アミノ酸を有する必要があるが、これは SurE と相同性を示す PBP が、C 末端に D-アミノ酸を含有する基質 (D-Ala-D-Ala) を選択的に認識することと一致する。PBP の基質 C 末端 D-アミノ酸選択性は、基質結合部位の周辺に位置する複数の残基により構成される疎水性ポケットに起因することが、PBP ファミリーに属する *Bacillus cereus* 由来の類似酵素 ADP (Alkaline D-Peptidase) の結晶構造と計算化学を用いた研究により示唆されている⁶⁷。2015 年、富山県立大学の浅野先生らの研究

グループはPBPの1種であるADPに着目し、X線結晶構造（PBP ID: 4Y7P）とそれに基づくドッキングシミュレーションにより、基質C末端残基のD-アミノ酸選択性を明らかにした。ADPの基質を模倣したテトラペプチド(D-Phe)₄とその*epi*体基質である(L-Phe)₂-(D-Phe)₂をADPの酵素活性ポケットにドッキングし、アシルドナーである基質C末端2位のD-Phe、及びL-Pheと周辺残基との静電的、疎水的相互作用を解析した（Figure 3-18）。その結果、(D-Phe)₄を基質とした場合には、D-Pheが触媒残基近傍に存在する疎水性ポケットに格納され、疎水性相互作用、静電的相互作用、およびファンデルワールス力に起因する π - π スタッキングにより安定化を受けることが示唆された（Figure 3-18a）。その一方で、*epi*体基質(L-Phe)₂-(D-Phe)₂のL-Pheの場合では、それら相互作用によるエネルギーは高い値を取り、より不安定な3次元構造をとることが示唆された（Figure 3-18b）。したがって、PBPに基質が認識されるためには、その基質C末端のD-アミノ酸側鎖がPBPの疎水性ポケットに格納され、安定化を受ける必要があることが示唆された。この結果から、SurEもADPと同様、触媒残基周辺のアミノ酸残基で形成される疎水性ポケットとの相互作用によりC末端D-アミノ酸選択性を発現している可能性が考えられる。



Nakano, S. *et al.* Structural and computational analysis of peptide recognition mechanism of class-C type penicillin binding protein, alkaline D-peptidase from *Bacillus cereus* DF4-B. *Sci. Rep.* 5, 13836 (2015)より引用

Figure 3-18. (D-Phe)₄および(L-Phe)₂-(D-Phe)₂とADPのドッキングシミュレーション

- a) (D-Phe)₄とADPのドッキングシミュレーション
- b) (L-Phe)₂-(D-Phe)₂とADPのドッキングシミュレーション
各残基との相互作用によるポテンシャルエネルギーを示した。

2020 年、東京大学の阿部郁朗先生、森貴裕先生との共同研究により SurE の X 線結晶構造が明らかとなった (**Figure 3-19a**, PDB: 6KSU)。SurE は 2 つのサブドメインから構成され、N 末端側には PBP と相同性を示す PBP ドメイン (残基 1-350)、C 末端側には lipocalin と相同性を示す lipocalin ドメイン (残基 368-451) を有する。また、これら 2 つのサブドメインは、タンパク質中央に存在する 17 残基長のリンカー (残基 351-367) により連結されている。DALI server⁸⁶を用いて構造類似酵素を検索したところ、SurE は、*Klebsiella aerogenes* 由来の AmpC β -lactamase⁸⁷ (PDB: 5F1F, RMSD for C α -atoms: 2.8 Å, AAid: 23%)、*Pseudomonas aeruginosa* 由来の Class C β -lactamase⁸⁸ (PDB: 4GZB, RMSD for C α -atoms: 2.8 Å, AAid: 23%)、および *Bacillus cereus* 由来の alkaline D-peptidase ADP⁶⁷ (PDB: 4Y7P, RMSD for C α -atoms: 3.0 Å, AAid: 27%)と構造類似性を示すことが明らかとなった (**Figure 3-19b**)。また、SurE の酵素反応に関わるとされる触媒 4 残基 (Ser63、Lys66、Asn156、His305) は、上記の PBP の立体構造と同様の位置に高度に保存されていた (**Figure 3-19c**)。

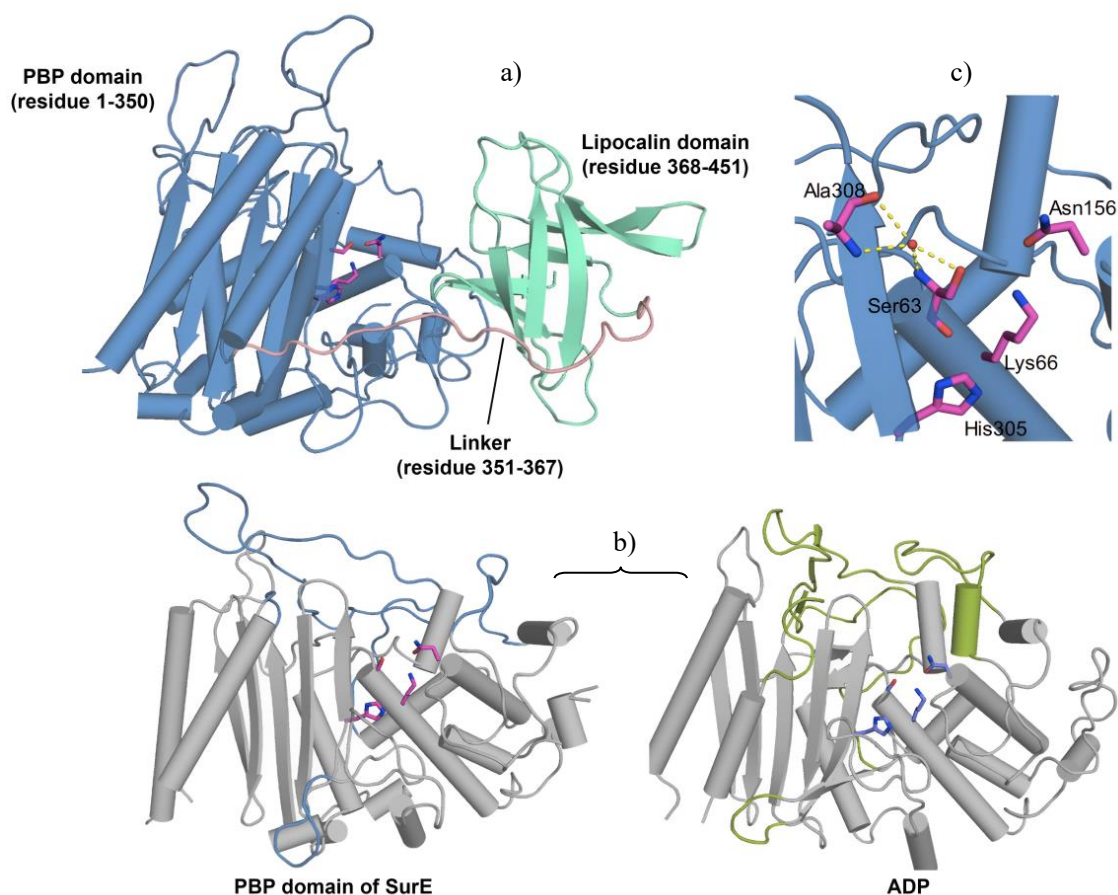


Figure 3-19. SurE の X 線結晶構造解析

a) SurE の立体構造 b) SurE の PBP ドメインと ADP の構造類似性 c) SurE の触媒 4 残基

SurE の基質 C 末端残基に対する D-アミノ酸選択性について知見を得るために、獲得した SurE の *apo* 体の X 線結晶構造を用いてペプチド-酵素複合体モデルを作成し、ペプチド中間体の安定配座計算を行った。本実験では、計算コストを削減するために、SurE の活性残基 Ser63 から 8 Å 以内の残基に絞り、かつ、使用する基質も全長ではなく基質 C 末端のみを模倣した *N*-formyl D-Leu を用いて計算を実施した (**Figure 3-20**)。ペプチド中間体の安定配座計算を行った結果、基質 D-Leu の側鎖は、SurE の触媒残基 Ser63 近傍に位置する Ala227、Leu231、Ala232、Ala234、Gly235、Ala308、Val309 により形成される疎水性ポケット内に格納され、疎水性相互作用により安定化を受けることが示唆された (**Figure 3-20** 中の緑色)。また、基質のホルミル基は、SurE の lipocalin ドメイン中に存在する Arg446 の側鎖 N_ω原子により認識されることが示唆された。

その一方で、*epi* 体である *N*-formyl L-Leu を用いて上記と同様にペプチド中間体の安定配座計算を行ったところ、L-Leu の側鎖は疎水性ポケットとは反対の方向に位置し、本複合体モデルのポテンシャルエネルギーは、*N*-formyl D-Leu を使用した時と比べて 30 kJ/mol 高くなることが明らかとなった (**Figure 3-20** 中のオレンジ色)。このことから、SurE の酵素反応においては、基質 C 末端残基の側鎖を認識する疎水性ポケット、およびカルボニル基を認識する Arg446 の空間的配置が、基質 C 末端の D-アミノ酸選択性に寄与していることが示唆された。

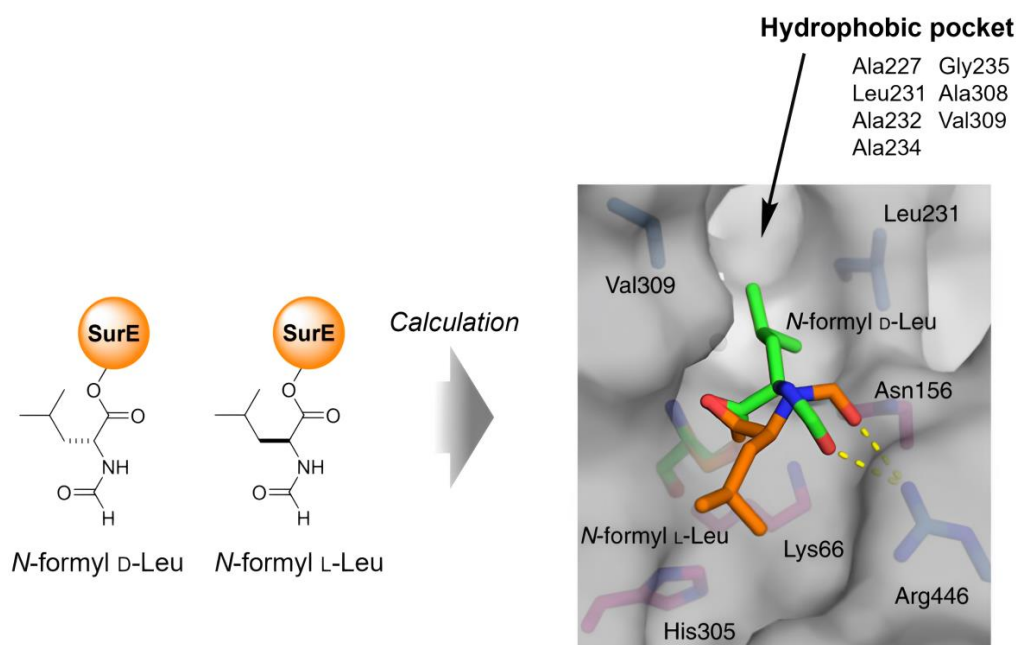


Figure 3-20. *N*-formyl D-Leu および *N*-formyl L-Leu と SurE との複合体モデルの最安定配座 *N*-formyl D-Leu を緑色、*N*-formyl L-Leu をオレンジ色で示した。

この結果をもとに、**Figure 3-6** の実験で明らかになった SurE の基質 C 末端残基選択性を考察する。SurE は D-Leu、D-Phe や D-Ser を C 末端に含有する SNAC 基質に対して環化反応を触媒できるが、これは基質 C 末端残基の側鎖が上記の疎水性ポケットに格納され、基質として認識されるためであると考えられる。一方で、側鎖を有さない C 末端 Gly の基質では、疎水性ポケットによる安定化を受けず基質認識されないため、環化反応が進行しなかったと考えられる。また、比較的嵩が大きく電荷を有する D-Arg や嵩高い親水性残基である D-Asn に関しても、上記と同様、疎水性ポケットに格納されず安定化を受けないために、環化反応が進行しなかったものと考えられる。今後、上記で得られた知見をもとにした合理的な酵素改変を行うことで、基質 C 末端残基の選択性を拡張した SurE 変異体の獲得が期待される。

3. SurE の基質配列内部に対する選択性に関する考察

本章の **Figure 3-5** にて行った SNAC 基質のアラニンスキャニングの実験結果から、SurE は基質配列内部の残基に対して寛容な選択性を有することが示唆された。そこで、SurE の基質配列内部の残基認識について知見を得るべく、ペプチド基質が結合していない状態の *apo* 体の SurE と、ペプチド基質が結合した状態の *holo* 体の SurE (基質-酵素複合体) の X 線結晶構造をそれぞれ比較した (**Figure 3-21**)。なお、*holo* 体の SurE においては、担持されたペプチド鎖の電子密度が不明瞭であったため、結合状態でのコンフォメーションの決定には至っていない。そのため、図中には明瞭な電子密度が観測された C 末端 D-Leu のみを示している。*apo* 体と *holo* 体の SurE の立体構造を比較した結果、SurE の活性ポケット近傍に存在する 23 残基からなるループ構造 (残基 206-228) が、*holo* 体の SurE においては電子密度が定まらず、その構成残基である His225 と Met226 が SurE の活性中心に接近することが明らかとなった。この際、上記のループ構造以外に *apo* 体と *holo* 体で立体構造が大きく変化した部位は見受けられなかった。本ループ構造の基質認識における機能をさらに詳細に調べるため、ループ構造を構成する His225 を Ala へと変換した変異体 SurE (H225A) を作成し、*seco-surugamide* B-SNAC を用いて反応速度論的解析を行った (**Figure 3-22**)。その結果、SurE (H225A) を用いた場合では、 K_m 値が SurE (WT) と同等の値を示した一方で、 k_{cat} 値は SurE (WT) と比べて 3 倍ほど低下することが明らかとなった。このことから、ループ構造 (残基 206-228) は、最初の基質認識の段階に関与するのではなく、基質-酵素複合体を形成したのちの基質のコンフォメーション制御に関与していることが示唆された。したがって、本ループ構造と基質内部配列の相互作用が SurE の環化反応に重要であることが

考えられ、今後、本ループ構造を標的とした変異導入により、環化効率を向上した SurE 変異体の獲得が期待される。

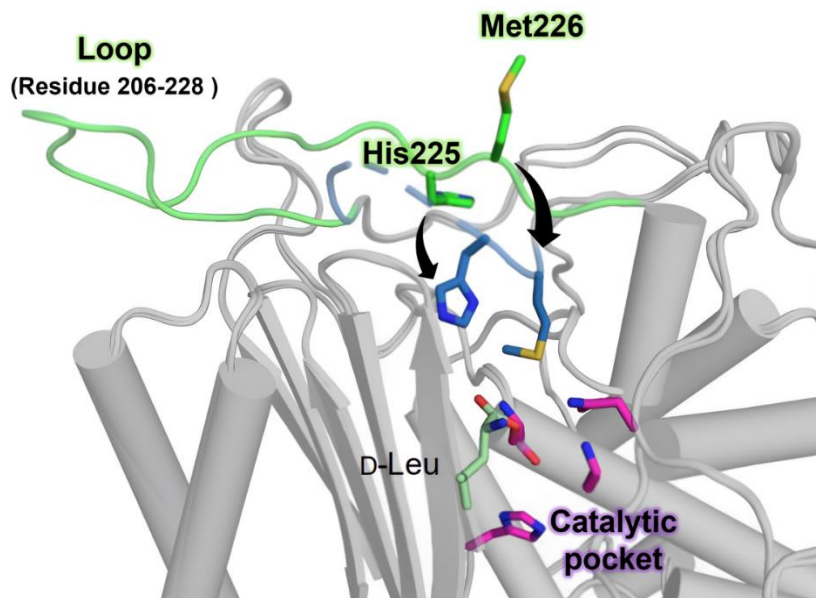


Figure 3-21. *apo* 体 SurE と *holo* 体 SurE の重ね合わせ

apo 体 SurE (PDB ID: 6KSU) の Loop 構造 (残基 206-228) を緑色で示した。
holo 体 SurE (PDB ID: 6KSV) の Loop 構造 (残基 206-228) を青色で示した。

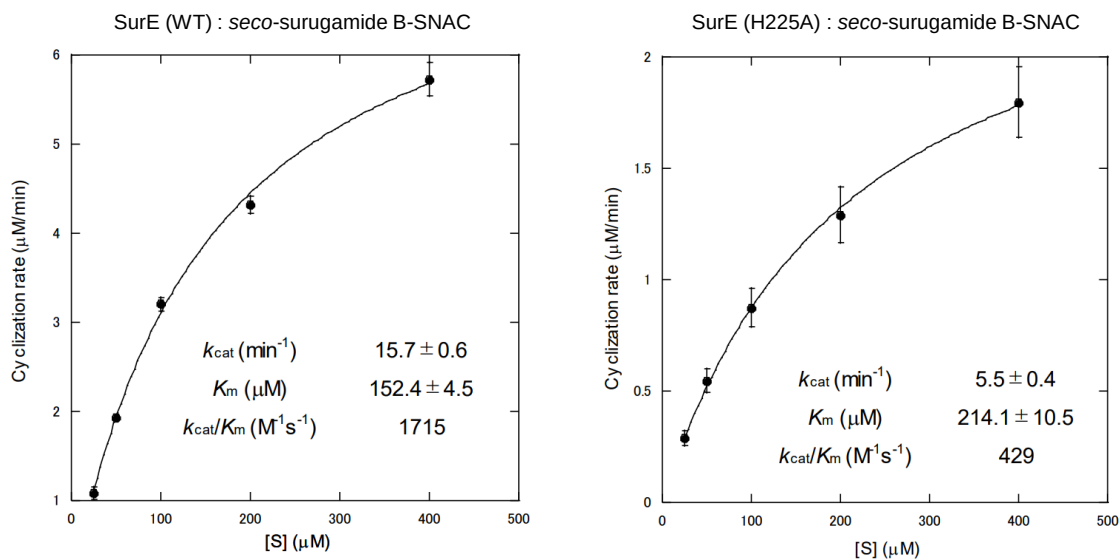


Figure 3-22. SurE (H225A) 変異体の反応速度論的解析

左に SurE (WT) と SNAC 基質、右に SurE (H225A) と SNAC 基質を用いた際の反応速度論的解析の結果を示した。

第四章 Head-to-tail 型環状ペプチドの効率的な化学-酵素合成法の開発

第一節 本章の目的

第三章までの研究にて、NRPS 生合成における新規ペプチド環化酵素 SurE を同定し、SNAC 基質を用いた機能解析により、本酵素の基質選択性の一端を明らかにした。寛容な基質選択性を有すると推測される SurE や、そのホモログ酵素を生体触媒として利用することで、従来の有機合成的手法の欠点を相補する効率的で環境調和性の高い環状ペプチド合成法の確立が期待できる。

一方で、SurE の機能解析を進める中で生体触媒の実用化に向けた課題点がいくつか浮き彫りとなった。第一に、*in vitro* 酵素反応に用いる SNAC 基質の化学合成が煩雑である点が挙げられる (Figure 4-1)。SNAC 基質は通常、固相合成で得たペプチド鎖の C 末端を、縮合剤を用いてチオエステル化することで合成できる。しかしながら、この際に C 末端残基のエピメリ化が進行するため、大幅な収率低下が引き起こされる。さらに、カラム保持時間の近いジアステレオマー混合物を HPLC で分離・精製する必要があるため、HPLC の条件検討に時間を要する。このように、SNAC 基質の化学合成には多大な時間と労力を要するため、これまでに検証された SNAC 基質の種類は非常に限定的であり、SurE の基質選択性の全容解明は困難な状況にあった。さらに、寛容な基質選択性を有する SurE を用いてペプチド環化工程を効率化できたとしても、その前段階である SNAC 基質の化学合成が非効率的では、生体触媒の実用化に向けて課題が残る。

そこで本章の研究では、非リボソームペプチド環化酵素の触媒利用を目指す上で大きなボトルネックであった SNAC 基質の合成法を改良し、高収率かつ高純度で簡便に鎖状基質を調製できる新たな合成法の開発に着手した。(Figure 4-2a)。また、開発した基質合成法を駆使して多数の酵素反応基質を調製し、SurE の基質選択性を網羅的に検証することで、本酵素のペプチド環化触媒としての有用性を検証することを目指した (Figure 4-2b)。上記の目的を達成することで、head-to-tail 型環状ペプチドの効率的な化学-酵素ハイブリッド合成法が実現し、環状ペプチドの大スケール合成だけでなく環状ペプチドライブラリーの創出など、ペプチド創薬の分野にも大きく貢献できるものと考えられる。また、本研究により多数の酵素反応基質を簡便に供給できるようになれば、SurE のみならず様々なペプチド環化酵素の機能解析が一挙に進み、それら酵素を生体触媒として応用する研究が一層加速することが期待される。

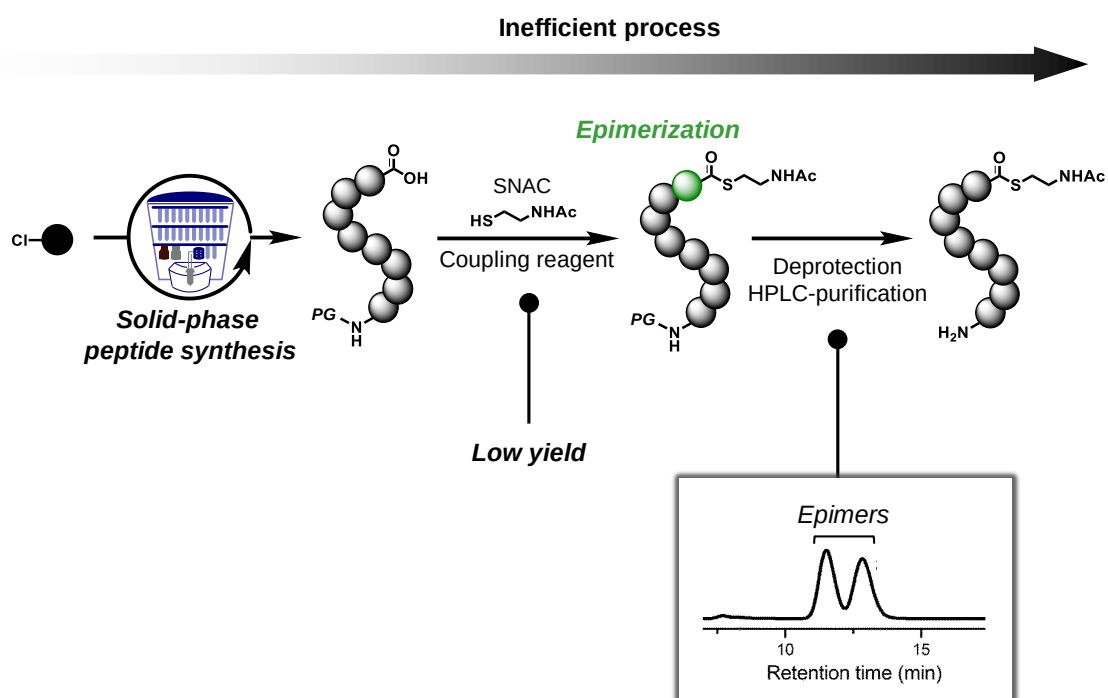


Figure 4-1. SNAC 基質の化学合成における課題点 **Time-consuming purification step**

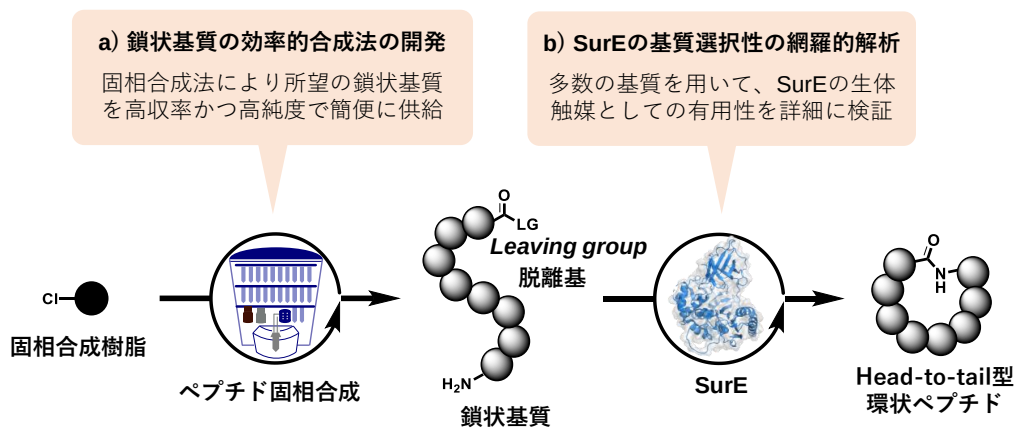


Figure 4-2. 本章の研究目的

第二節 ジオール基質の着想と設計

最初の目的である鎖状基質の効率的合成法の開発 (Figure 4-2a) に着手するにあたり、SNAC 基質の化学合成における問題点について再度考察する。SNAC 基質の化学合成で問題となるペプチド鎖 C 末端残基のエピメリ化は、SNAC の縮合反応を合成の“終盤”に行うことで引き起こされる。このエピメリ化機構は、環状ペプチドの化学合成でしばしば問題となる C 末端残基のエピメリ化と同様の反応機構により説明される (Figure 1-2)。すなわち、縮合剤を用いて鎖状ペプチドを活性エステルとした際に、分子内の酸素原子による求核攻撃により 5 員環アズラクトンが形成され、続くアズラクトンの脱プロトン化・再プロトン化が起こることで、 α 位の立体が反転した立体異性体が生成する。したがって、鎖状基質の効率的合成法を確立するにあたっては、反応途中で生じる 5 員環アズラクトン形成の回避が鍵と言える。

一方で、Fmoc 固相合成法で採用される 1 残基ごとのアミド化反応や、depsipeptide の化学合成で採用される固相上でのエステル化反応の際には、上記のようなエピメリ化は問題とならない^{89, 90} (Figure 4-3)。これは、縮合させる対象がペプチド鎖ではなく、Fmoc アミノ酸であるためである。すなわち、Fmoc アミノ酸のカルバメート保護基の化学的性質により、酸素原子上の電子が非局在化するために、分子内の活性エステルへの求核攻撃が抑制され、5 員環アズラクトンが形成されにくくなるからである。このことから、SNAC の代替となる新たな脱離基を合成の“終盤”ではなく、固相合成の“序盤”にあらかじめ導入しておき、そこを足場として Fmoc 固相合成法によりアミノ酸を 1 残基ずつ伸長することができれば、C 末端残基のエピメリ化を起こすことなく鎖状基質を合成できると考えられる (Figure 4-4)。すなわち、脱離基を固相合成樹脂に担持したのち、C 末端の Fmoc アミノ酸を脱離基を介して樹脂に担持する。その後、Fmoc 固相合成法により種々アミノ酸を伸長し固相担持ペプチドとしたのち、最後に樹脂からの切り出しと側鎖の脱保護を行うことで、鎖状基質を合成できると考えた。

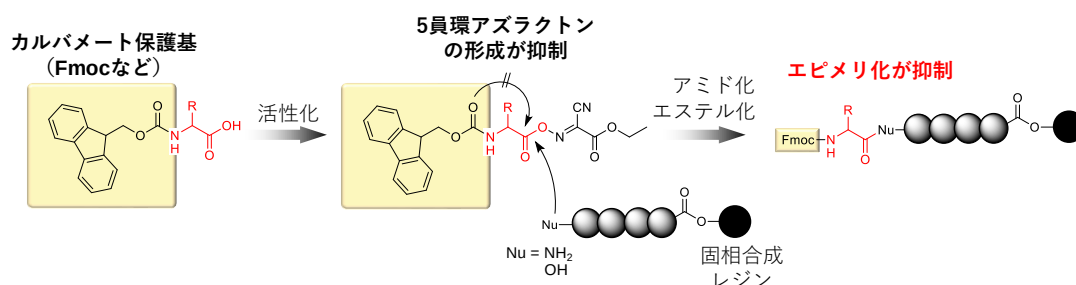


Figure 4-3. エピメリ化を抑制したペプチド伸長反応

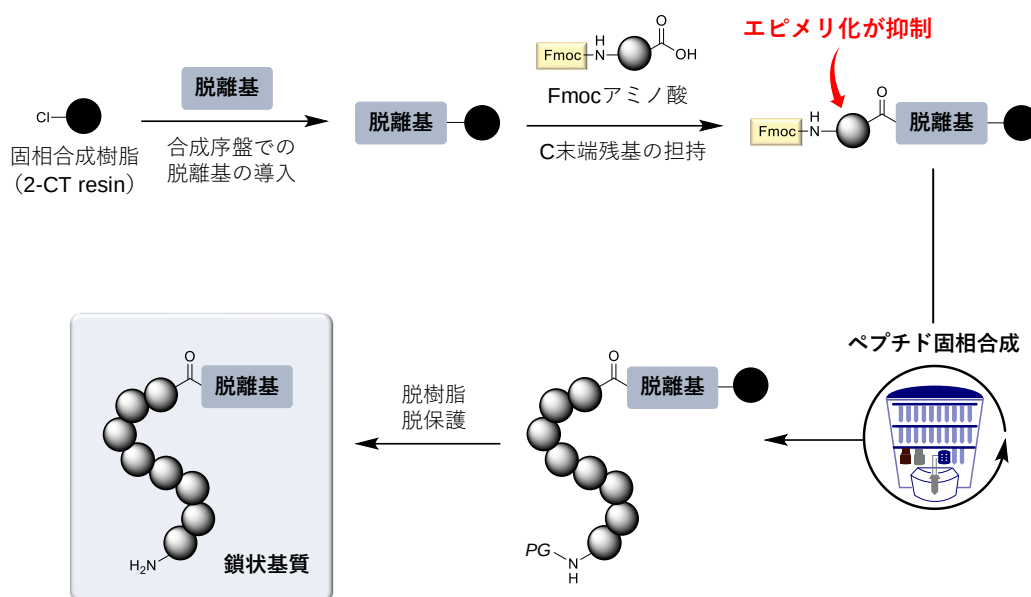


Figure 4-4. 本研究における鎖状基質の合成スキーム

上記の基質合成法にて利用する脱離基は、①2-CT樹脂と共有結合を形成できる反応性官能基を有すること、および②エステル結合、もしくはチオエステル結合の形成によりペプチド鎖を担持できる反応性官能基を有すること、の2点を満たす必要がある。まず①に関して、アミンのような反応性置換基を介して2-CT樹脂と共有結合を形成した場合、合成終盤にペプチド鎖を樹脂から切り出せない可能性が考えられた。そこで、強酸でのペプチドの脱樹脂が可能であると考えられるヒドロキシ基を反応性置換基として選択した。次に②に関して、チオエステル結合を介してペプチド鎖を担持した場合、強塩基条件によるFmoc保護基の除去の際に、チオエステル結合が同時に切断され目的基質の収率低下を招く可能性が考えられた。そのため、チオエステル結合よりも安定なエステル結合を介してペプチド鎖を担持することとした。以上のことを踏まえ、構造中に2つのヒドロキシ基を有する分子を脱離基候補として選択した (Figure 4-5)。

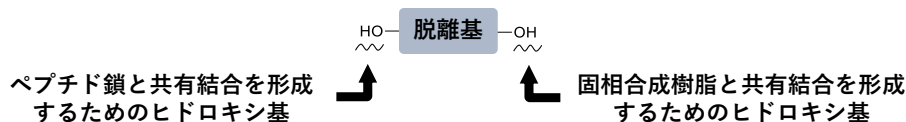
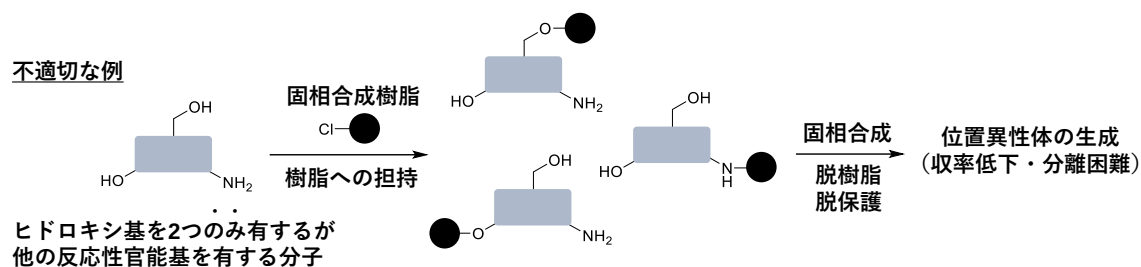


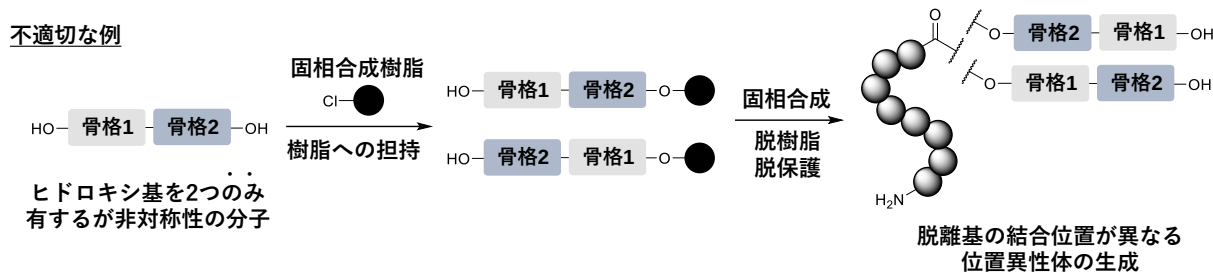
Figure 4-5. 脱離基の候補分子

構造中に 2 つのヒドロキシ基を有する分子は無数に存在する。そこで、SNAC の代替となる新たな脱離基の候補分子を選定するにあたり、以下に示す 4 つの条件を設定した (Figure 4-6)。1 つ目の条件は、「構造中にヒドロキシ基を 2 つのみ有し、かつ他に反応性官能基を有さない分子であること」である。ヒドロキシ基を 3 つ以上、もしくは他の反応性官能基を複数有する分子を用いた場合、位置異性体や望まぬ副反応が生じ目的基質の収率低下や煩雑な精製作業が問題になる可能性が考えられる。2 つ目の条件は、「対称性の分子であること」である。ヒドロキシ基を 2 つのみ有する分子であっても、対称性を有さない場合には上記と同様に位置異性体を生じ、収率低下を招く可能性が考えられる。3 つ目の条件は、「安全性に優れ、かつ安価に入手可能な分子であること」である。生体触媒の実用化に向けてはユーザビリティの観点が重要であり、「誰でも」「どこでも」「簡単に」「再現性良く」利用可能な方法論であることが求められる⁹¹。そのため、安全性に問題がある分子や高価な分子を用いた場合、実用化を目指す上で大きな障壁になる可能性が考えられる。4 つ目の条件は、「SurE に基質認識されうる脱離基であること」である。仮に、上記の条件 1-3 をすべて満たした分子を同定し、酵素反応基質を効率的に合成できたとしても、続く SurE による環化反応がうまく進行しなければ本目的は達成されない。したがって、嵩高い構造を有する分子や極端な化学的性質を示す分子ではなく、本来の脱離基である SNAC の化学構造に可能な限り類似した分子を利用することが望ましい。

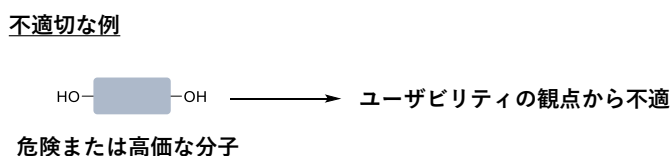
条件その1 「構造中にヒドロキシ基を2つのみ有し、かつ他に反応性官能基を有さない分子」であること



条件その2 「対称性の分子」であること



条件その3 「安全性に優れ、かつ安価に入手可能な分子」であること



条件その4 「SurEに基質認識されうる脱離基分子」であること

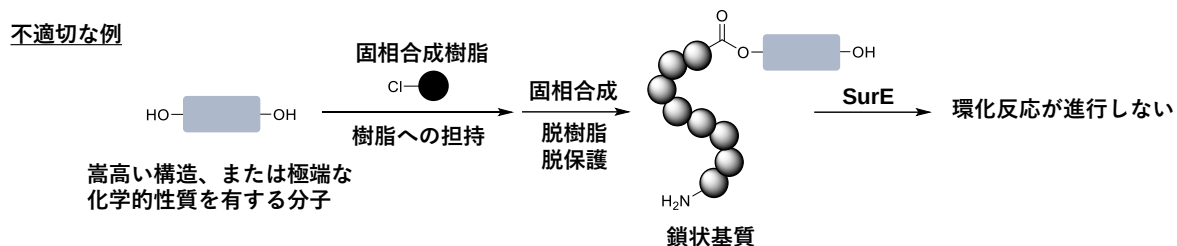


Figure 4-6. 候補分子の選定条件

以上 4 つの条件を踏まえ、以下に示す 4 種類のジオール分子 (ethylene glycol、1,3-propanediol、1,4-butanediol、diethylene glycol) を脱離基候補として選定した (**Figure 4-7**)。これらはいずれも、構造中に 2 つのヒドロキシ基のみを有し、SNAC と類似した単純な構造をとり、かつ試薬メーカーから安価に大量に入手することができる分子である。

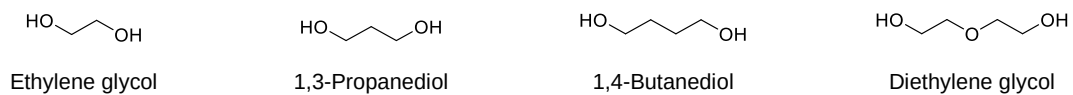


Figure 4-7. 選定した 4 種類のジオール分子

第三節 ジオール基質の合成と *in vitro* 酵素反応

前節の基質合成法、および選定した 4 種類のジオール分子をもとに鎖状基質の効率的合成法の開発に着手した。本研究では、まず初めに SurE 本来の基質である surugamide B の環化前駆体をモデル配列として鎖状基質の合成を試みた。合成スキームを以下に示す (Figure 4-8)。なお、Figure 4-8 では例として ethylene glycol を用いた際の合成スキームのみを示しているが、他の 3 種類のジオール分子においても同様の合成スキームで基質合成を行った。まず、塩基 DIPEA を用いて ethylene glycol を 2-CT 樹脂に担持した。その後、DIC および DMAP を用いて C 末端残基のエステル化を行い、固相担持アミノ酸 **33** を得た。その後、Fmoc 固相合成法により種々アミノ酸を伸長することで、固相担持ペプチド **34** とした。最後に、TFA によるペプチド鎖の樹脂からの切り出しと側鎖の脱保護を行うことで、ペプチド鎖 C 末端に ethylene glycol を縮合した酵素反応基質 *seco*-surugamide B-ethylene glycol (**35**) を得た。

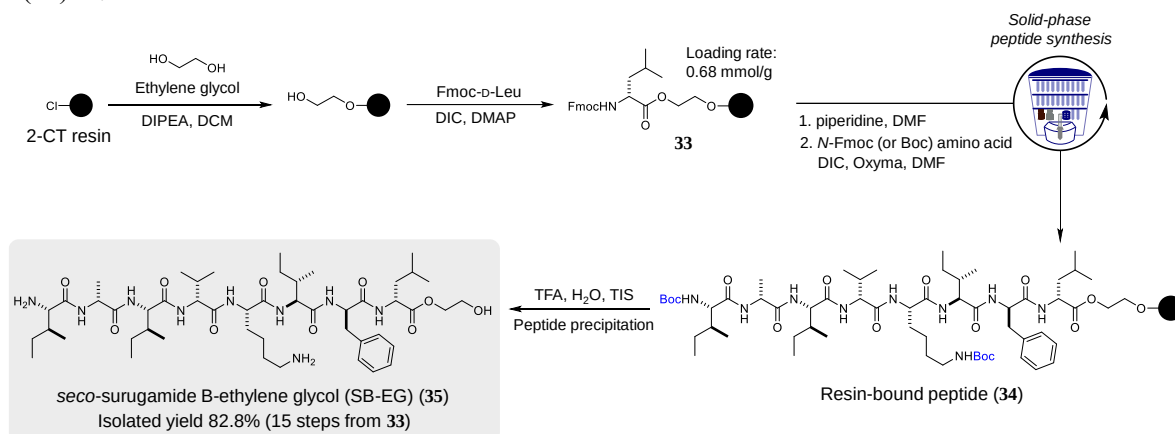


Figure 4-8. ジオール分子を利用した鎖状基質の合成スキーム

エーテル沈殿を行ったのちの粗精製物を LC-MS にて分析した結果、目的基質 **35** が高い純度で得られたことを確認した (Figure 4-9)。その後、HPLC による精製を行うことで、本化合物を総収率 82.8% (15 steps from **33**) で得た。Figure 2-7 で示した液相での縮合反応を利用する SNAC 基質 (*seco*-surugamide B-SNAC) の合成収率が 30.0% であることを鑑みると、本手法では収率が大幅に向上したことに加え、分離困難な立体異性体の夾雑物を与えないため、基質調製にかかる手間が大幅に削減された。

1,3-Propanediol、1,4-butanediol、diethylene glycol が C 末端に縮合した鎖状基質に関しても、ethylene glycol と同様 Figure 4-8 に示す合成スキームで化学合成し、それぞれの合成収率を算出した。その結果、1,3-propanediol、1,4-butanediol、diethylene glycol を C 末端に縮合した

基質の総収率はそれぞれ 39.0%、34.0%、45.8% となり、いずれの場合も ethylene glycol の場合と比較して収率が大幅に低下する結果となった。

以上の結果から、4 種類のジオール分子のうち最も構造が単純な ethylene glycol を固相合成に組み込むことで、酵素反応基質を高い純度かつ高い収率で調製できる基質合成法を確立した。以降では、基質 **35** を SB-EG (*seco-surugamide B-ethylene glycol*) と呼称する。

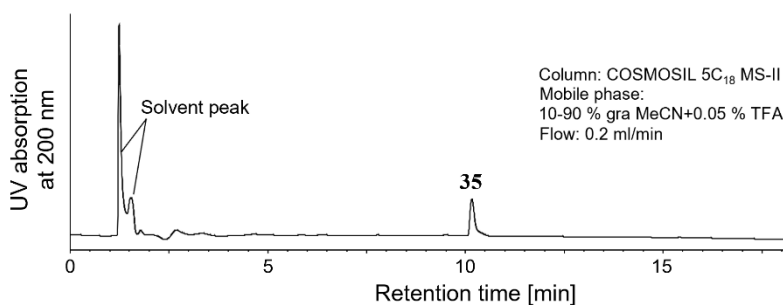


Figure 4-9. 基質 **35** の粗精製物の LC-MS 解析

次に、化学合成した SB-EG と組換え酵素 SurE を用いて *in vitro* 酵素反応を行い、本基質に対する SurE の環化活性を評価した。ここでは、高い純度で基質を調製できる本合成法の利点を活かし、合成樹脂から切り出した SB-EG の粗精製物を HPLC 精製することなく、直接 SurE の *in vitro* 酵素反応に供した。Figure 4-10 に示す組成にて酵素反応液を調製したのち、室温条件下、水中で 2 時間反応させた。その後、酵素反応液に等量の MeOH を加えて反応をクエンチしたのち、得られた混合液を HPLC にて分析した (Figure 4-11)。その結果、SB-EG (**35**) が酵素依存的に消失し、環化体 surugamide B (**2**) へ定量的に変換されることが明らかになった。なお、酵素依存的に生成した環化体 **2** の化学構造は MS/MS によるペプチドフラグメント解析によって決定した (p. 236, Figure S10)。

次に SB-EG に対する SurE の環化活性を詳細に検証するため、反応速度論的解析を行った (Figure 4-12)。その結果、本酵素反応における速度論的パラメーター k_{cat} 、 K_{m} 、および $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ の値は、それぞれ $4.6 \pm 0.2 \text{ min}^{-1}$ 、 $660.2 \pm 41.3 \text{ }\mu\text{M}$ 、 $116 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となった。Figure 3-22 で示した SNAC 基質の反応速度論的解析の結果と比較して各パラメーターの値は数倍低下したものの、SurE は本来と異なる脱離基を有する鎖状ペプチドを基質として認識し、良好な環化活性を示すことが明らかとなった。

以上の結果から、ethylene glycol を用いた基質合成法と SurE の環化反応を組み合わせることで、環状ペプチドを合成序盤から終盤にかけて精製作業を一度も行わずに高収率かつ高純度で合成できる化学-酵素ハイブリッド合成法を確立した。以降、ペプチド鎖 C 末端に ethylene glycol を縮合した鎖状基質を EG (Ethylene glycol) 基質と呼称する。

Reaction conditions
20 mM Tris-HCl pH 8.0
200 μ M SB-EG (35)
10 μ M SurE
H ₂ O up to 100 μ L

rt, 2 h

↓

HPLC analysis

Figure 4-10. SB-EG と SurE の *in vitro* 酵素反応の反応条件

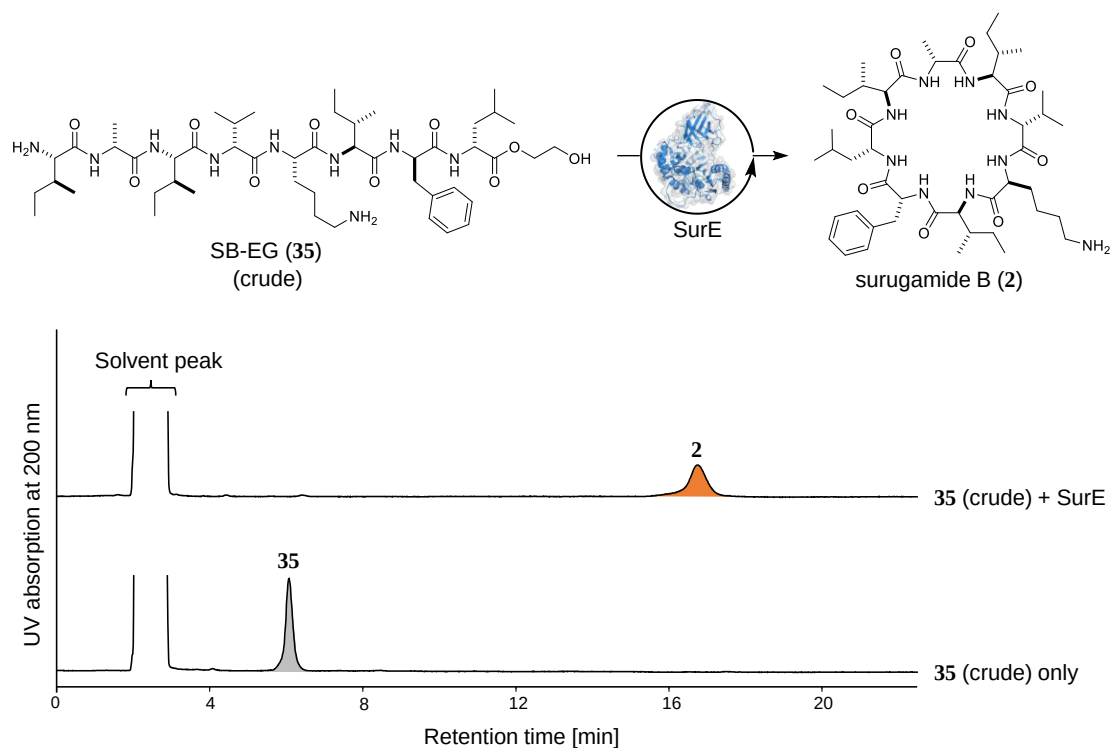


Figure 4-11. *In vitro* 酵素反応の HPLC 分析

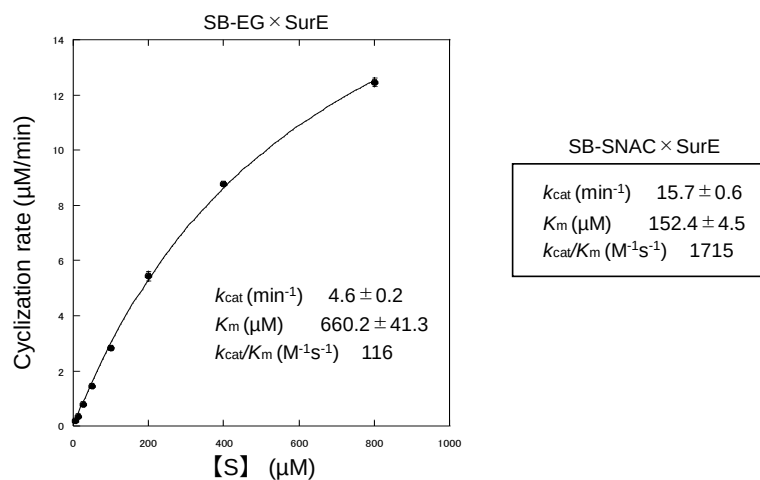


Figure 4-12. SB-EG を用いた酵素反応の反応速度論的解析

第四節 EG 基質を用いた SurE の基質選択性の網羅的解析

第三章の SNAC 基質を用いた *in vitro* 酵素反応の実験により、SurE の基質両末端残基に対する立体選択性と配列内部に対する残基選択性の一端が明らかとなった (**Figure 3-5** および **Figure 3-6**)。しかしながら、いずれの場合も SNAC 基質の化学合成の煩雑さから、調製できる基質の数・種類には限りがあり、SurE の基質選択性の全容解明には至っていない。一方で、本章の第四節では安価に入手可能な ethylene glycol を用いた鎖状基質の効率的合成法を確立した。本手法では、所望の鎖状基質を高収率かつ高純度で調製可能であり、HPLC 精製を行うことなく直接 SurE の酵素反応に供することができる。そこで本節では、開発した合成法を駆使して多数の EG 基質を並列的に合成し、SurE の基質選択性の全容解明を目指した。

まず、SurE の基質 N 末端に対する残基選択性を検証するため、モデル基質である SB-EG の N 末端 L-Ile を 18 種類の L-アミノ酸に置換した EG 基質 **36-53** を化学合成し、粗精製物を SurE の *in vitro* 酵素反応に供した。なお、調製した EG 基質 **36-53** の化学構造は MS/MS によるペプチドフラグメント解析によって決定した (pp. 237-255, **Figure S11-S46**)。また、N 末端が L-Cys である EG 基質に関しては *in vitro* 酵素反応の際に酵素溶液がゲル状に固まり HPLC 分析が困難であったため、本文では酵素反応の結果は省いている。EG 基質 **36-53** と組換え SurE の酵素反応液を **Figure 4-10** に示す組成にて調製し、室温条件下、水中で 2 時間反応させ、得られた酵素反応液を HPLC にて分析した (**Figure 4-13a** および pp. 226-228, **Figure S4**)。横軸に EG 基質の変換率を示し、head-to-tail 環化反応が進行した場合をオレンジ色で、基質 C 末端のエステル部の加水分解反応が進行した場合を青色で示した。酵素反応液を分析した結果、N 末端に L-Arg や L-Glu、第 2 級アミンを有する L-Pro を含む EG 基質 **44**、**50**、**53** を用いた場合には、加水分解反応が優位に進行したものの、その他すべての EG 基質は定量的に head-to-tail 環化体へと変換されることが明らかになった。なお、酵素反応により生じた環化体および加水分解体の化学構造は MS/MS によるペプチドフラグメント解析によって決定した (pp. 237-255, **Figure S12-S47**)。この結果から、SurE は基質 N 末端残基に対して寛容な選択性を有することが明らかとなった。

次に、配列内部に対する残基選択性と鎖状選択性を調べるため、SB-EG の中央 6 残基 (DAla2-LIle3-DVal4-LLys5-LIle6-DPhe7) を、**Figure 4-13b** に示す PEG 残基 2-[2-[2-(Fmoc-amino)ethoxy]ethoxy]acetic acid (AEEA) に置換し、鎖長の異なる 7 種類の EG 基質 **54-60** を調製した。上記と同様の条件にて酵素反応を行い、得られた酵素反応液を HPLC にて分析した (**Figure 4-13c, d** および p. 229, **Figure S5**)。その結果、加水分解や多量体化などの副反

応を起こすことなく、すべての基質で単量体の head-to-tail 環化体を与えることが明らかとなった。また、PEG の鎖長が長くなるに伴い SurE の環化活性が低下したが、酵素反応時間を 2 時間から 12 時間に延長することで、すべての基質が環化体へと定量的に変換された (Figure 4-14)。なお、酵素反応により生じた環化体の化学構造は MS/MS によるペプチドフラグメント解析によって決定した (pp. 256-260, Figure S48-S54)。この結果から、SurE は配列内部の残基に対して寛容な選択性を有し、5~23 残基相当の幅広い長さの基質を環化できることが明らかとなった。

最後に、SurE の基質 C 末端に対する残基選択性を検証するため、SB-EG の C 末端 D-Leu を 17 種類の D-アミノ酸へと置換した EG 基質 61-77 を化学合成し、粗精製物のまま SurE の酵素反応に供した。なお、調製した EG 基質 61-77 の化学構造は MS/MS によるペプチドフラグメント解析によって決定した (pp. 262-276, Figure S56-S83)。また、C 末端が D-Cys および D-Pro である 2 種類の EG 基質においては化学合成が困難であったため、本文では酵素反応の結果は省いている。上記と同様の条件にて酵素反応を行い、得られた酵素反応液を HPLC にて分析した (Figure 4-13e および pp. 230-232, Figure S6)。その結果、疎水性残基 (D-Ala/D-Val/D-alloIle/D-Phe/D-Tyr) や親水性残基 (D-Ser/D-Thr) を C 末端に含む EG 基質は、SurE により定量的に head-to-tail 環化体へ変換された一方で、アキラルな Gly や塩基性残基 (D-His/D-Arg/D-Lys)、酸性残基 (D-Asp/D-Glu) を C 末端に含む EG 基質を用いた場合には環化活性が大幅に低下することが明らかとなった。なお、酵素反応により生じた環化体の化学構造は MS/MS によるペプチドフラグメント解析によって決定した (pp. 262-276, Figure S57-S84)。この結果から、SurE は基質 C 末端残基に対して厳密な選択性を有することが明らかとなった。

前章での SNAC 基質を用いた検証と、本節での EG 基質を用いた検証で明らかになった SurE の基質選択性を以下にまとめる (Figure 4-15)。SurE は N 末端 L-アミノ酸と C 末端 D-アミノ酸でのヘテロキラルな残基間での head-to-tail 環化反応を選択的に触媒するペプチド酵素である。また、N 末端残基、および配列中央の残基に対して寛容な基質選択性を有するためペプチド環化触媒として優れる一方で、基質 C 末端残基に対しては厳密な選択性を有するため、本酵素の生体触媒としての利用範囲は限定的であることが明らかとなった。

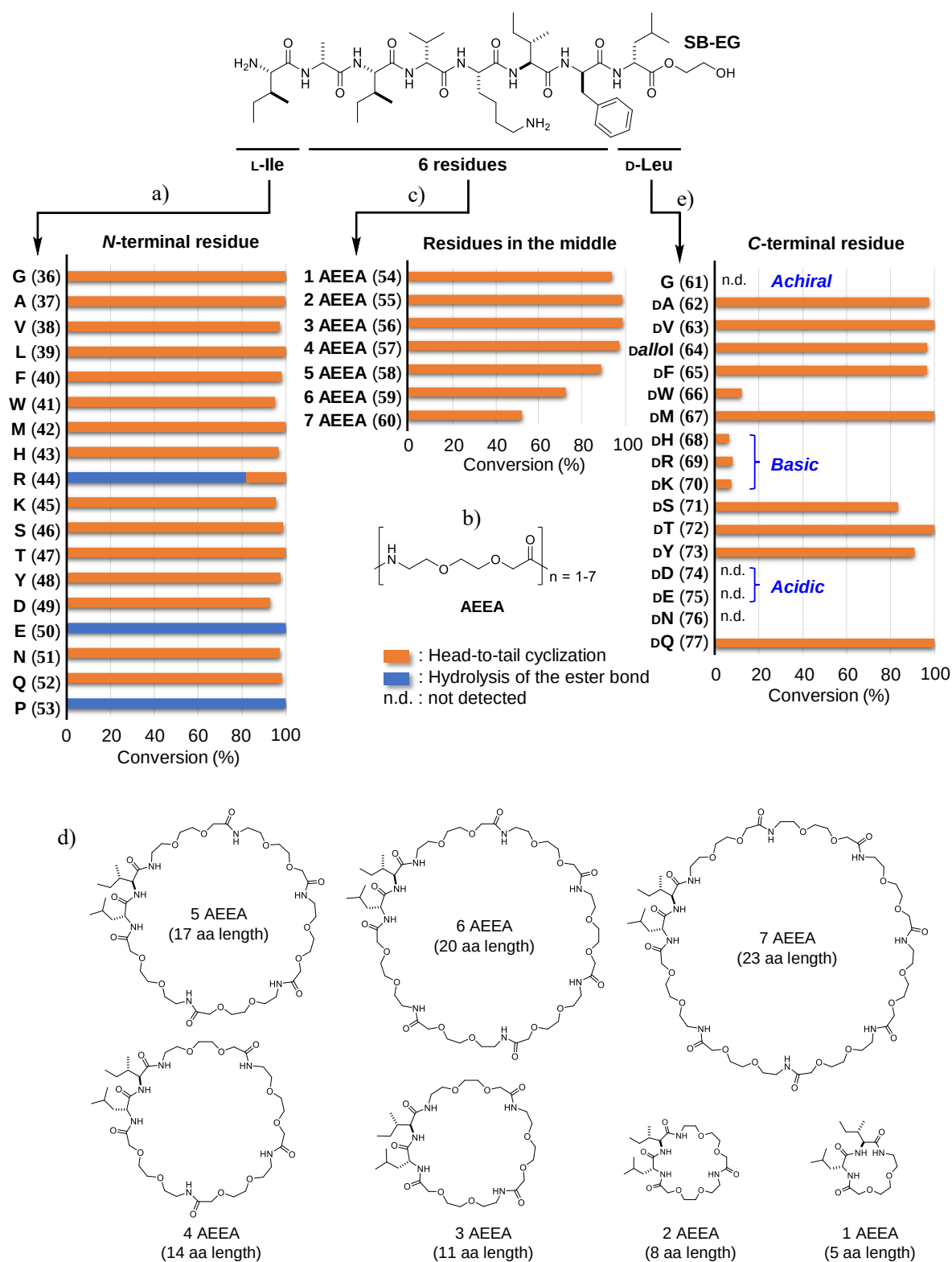


Figure 4-13. SurE の基質選択性の網羅的解析

a) N 末端残基選択性 b) AEEA の構造 c) 配列中央の残基選択性 d) AEEA 環化体の構造
 e) C 末端残基選択性

第五節 SurE の酵素改変による基質 C 末端残基選択性の拡張

前節の実験により、SurE の基質 N 末端残基と配列内部の残基に対する寛容な選択性、および基質 C 末端残基に対する厳密な選択性が明らかとなった。今後、SurE を汎用性の高い生体触媒として開発するためには、本研究で明らかとなった基質 C 末端残基に対する厳密な選択性を克服する必要がある。そこで本節では、ホモログ酵素 (PBP-type TE) のタンパク質構造の比較に基づく論理的な変異導入により、SurE の基質 C 末端残基選択性の改変を試みた。

第三章第五節では PBP-type TE の系統解析を行い、それら酵素の基質鎖長や基質 C 末端残基選択性に多様性があることを見出した (Figure 3-14)。このうちの一つである DsaJ は、環状ヘキサペプチド desotamide 類の大環状化を触媒すると推測されるペプチド環化酵素であり、SurE とは系統的に異なるクレードに分類される⁸²。Desotamide 類の生産を担う生合成遺伝子クラスターのゲノム情報を解析したところ、DsaJ の基質 C 末端残基は Gly であることが推測された (Figure 4-16)。このことから、DsaJ は、C 末端 Gly の基質を環化できない SurE とは異なる基質選択性を有することが推測される。DsaJ の基質 C 末端残基選択性について知見を得るために本酵素の組換え酵素の獲得を試みたが、いかなる条件においても封入体を形成し不溶化したため、組換え DsaJ を調製することはできなかった。そのため、本酵素の基質選択性や生体触媒としての利用可能性の検証には至っていない。

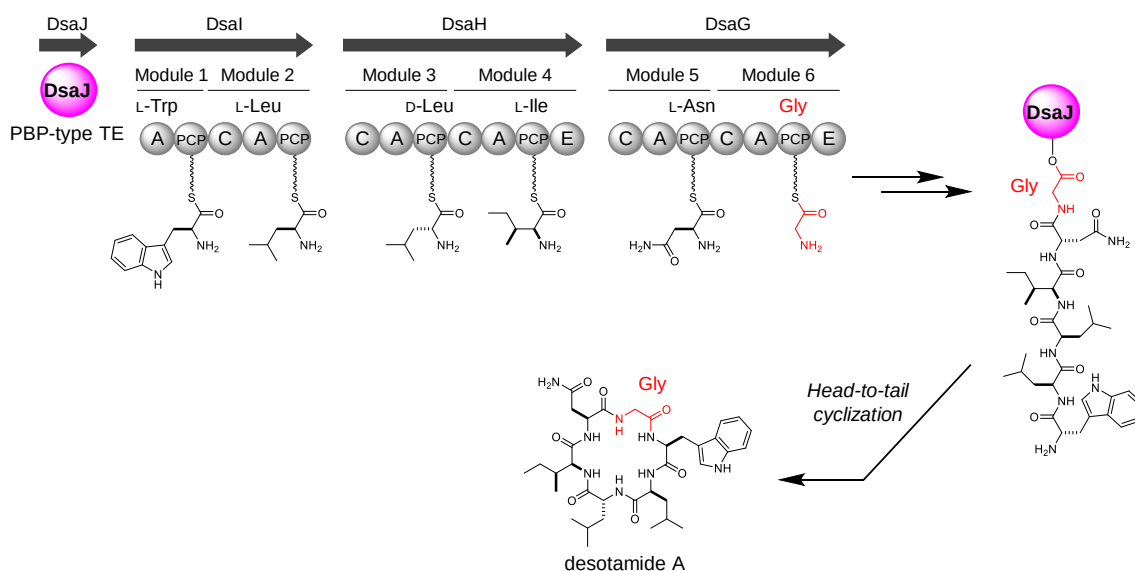


Figure 4-16. DsaJ による生合成中間体の head-to-tail 環化反応

第三章第六節では、SurE の X 線結晶構造をもとに基質-酵素複合体モデルの安定配座計算を行い、基質 C 末端残基の認識に関与すると予想される「疎水性ポケット」を触媒 Ser 残基の近傍に見出した (Figure 3-20)。そこで、SurE とは異なる基質 C 末端選択性を有する DsaJ の疎水性ポケットの特徴について知見を得るため、AlphaFold2⁹²を用いて DsaJ の立体構造モデルを作成し、SurE と DsaJ の疎水性ポケットの構成残基を比較した (Figure 4-17)。その結果、両酵素間において疎水性ポケットの構成残基に大きな相違は見出されなかったものの、一部、SurE の Leu にあたる残基が DsaJ では嵩高い疎水性残基 Phe へと置き換わっており、疎水性ポケットの容積が SurE と比較して減少している様子が観察された。

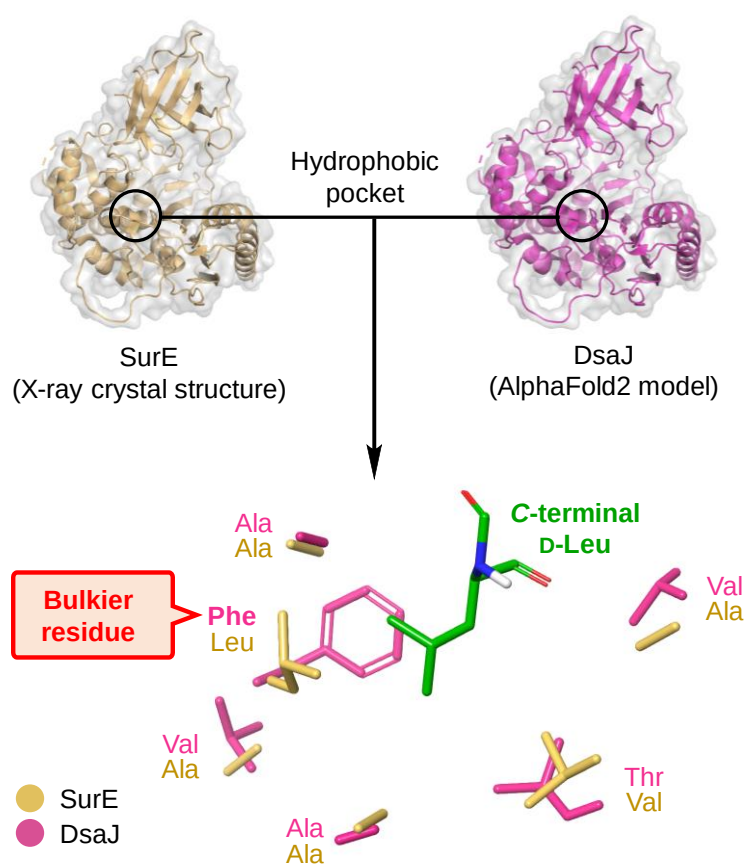


Figure 4-17. SurE と DsaJ の疎水性ポケットの比較

そこで、DsaJ の疎水性ポケットを模倣するため、SurE の疎水性ポケットを構成する Gly235 (Figure 4-18a) を、より嵩高い Ala へと置換しポケットの容積を減少させた変異体 SurE (G235A)を作成した。この変異体と C 末端が Gly である EG 基質 *seco*-surugamide B (DL8G)-ethylene glycol (61) を用いて酵素反応液を調製し、室温条件下、水中で 2 時間反応させた (Figure 4-18b)。酵素反応液を HPLC で分析した結果、野生型 SurE (WT) では環

化反応は全く進行しなかった一方で、SurE (G235A)を用いた場合には、head-to-tail 環化体 cyc-**61** が少量ながら生成することが明らかになった。さらに、変異残基を Ala からより嵩高い Val、Ile にすることで環化効率が次第に向上し、最終的に Leu へと変換することで基質 **61** が環化体へと定量的に変換されることが明らかとなった。なお、酵素反応により生じた環化体 cyc-**61** の化学構造は MS/MS によるペプチドフラグメント解析によって決定した (p. 261, Figure S55)。

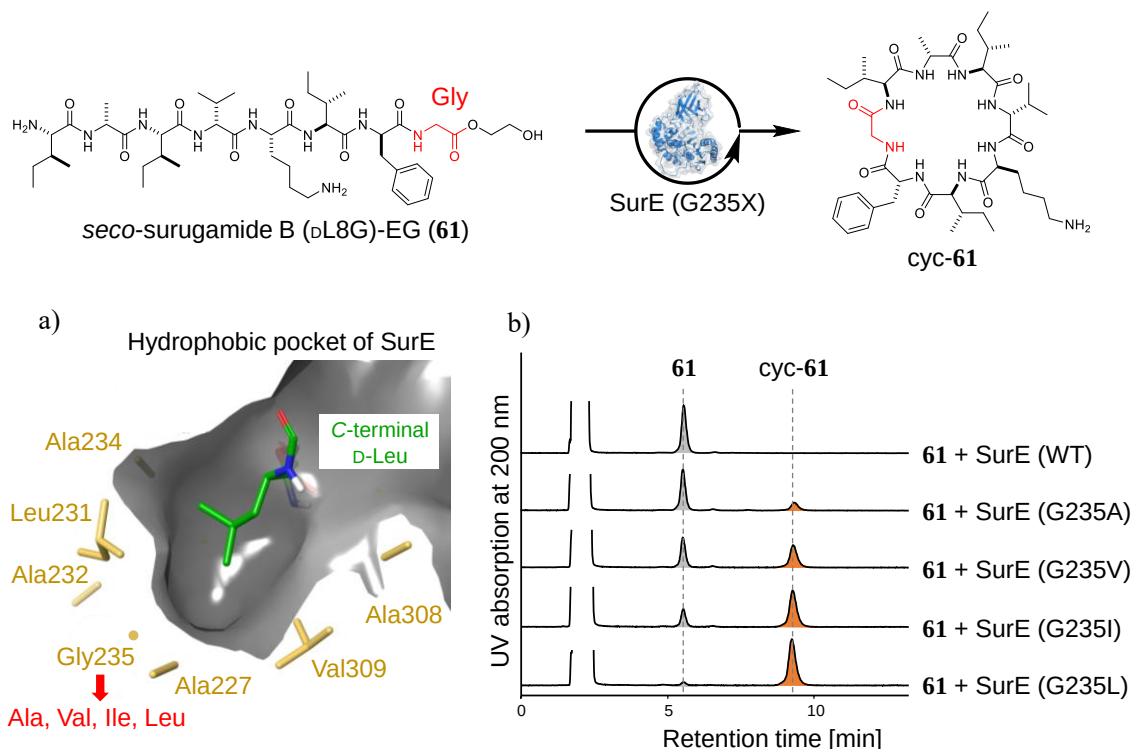


Figure 4-18. SurE の基質 C 末端残基選択性の改変

a) SurE の疎水性ポケット b) SurE 変異体を用いた *in vitro* 酵素反応

本実験で作成した 4 種類の SurE (G235X) 変異体の基質 C 末端残基選択性を検証するため、C 末端が D-Leu である SB-EG (**35**) を用いて *in vitro* 酵素反応を行った (Figure 4-19)。酵素反応液を HPLC にて分析した結果、いずれの変異体においても環化活性が大幅に減弱、または消失することが明らかとなった。これは、SurE の基質 C 末端残基の認識に関わる疎水性ポケットが変異により欠損したために、SB-EG 基質の C 末端 D-Leu を認識できなくなったためであると考えられる。したがって、上記 4 種類の SurE 変異体は、C 末端 Gly の基質のみを選択的に認識し、head-to-tail 環化反応を触媒する酵素であることが示唆される。

以上の結果から、触媒 Ser 残基の近傍に存在する疎水性ポケットが基質 C 末端残基の認識に関与していることを実験的に明らかにし、本ポケットに変異を導入することで SurE の基質 C 末端残基選択性を改変することに成功した。

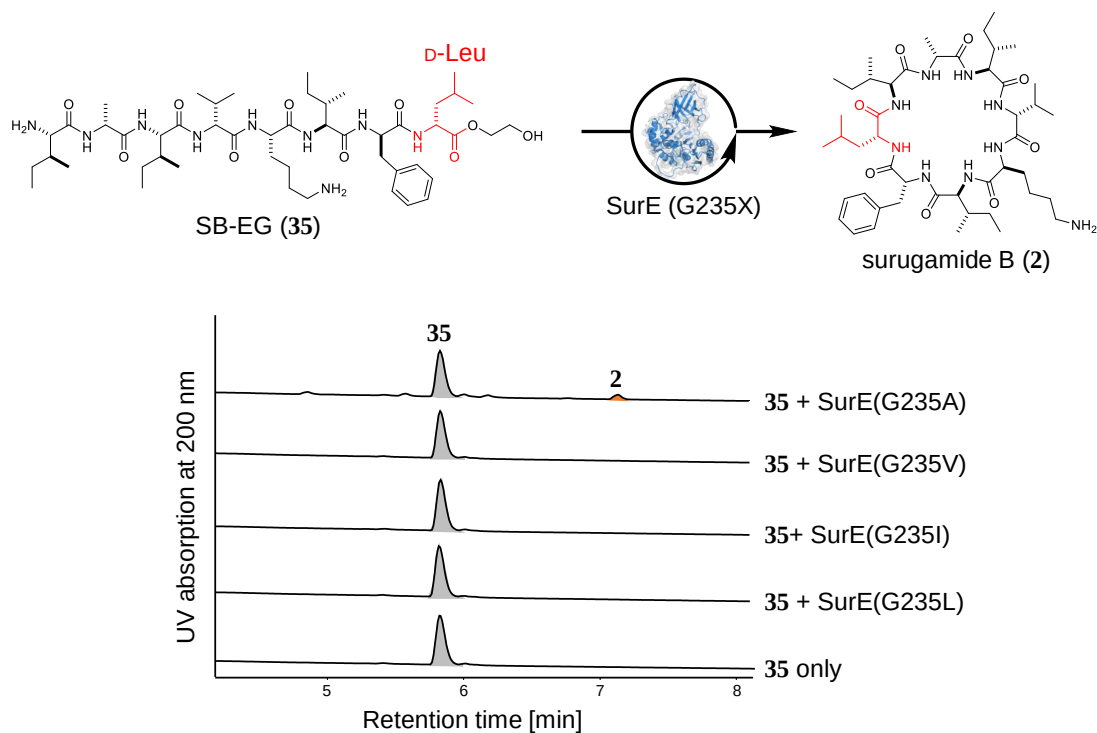


Figure 4-19. SB-EG と SurE (G235X)を用いた *in vitro* 酵素反応

第六節 EG 基質を用いた head-to-tail 型環状ペプチドの化学-酵素合成

前節までの研究にて、安価に入手可能な ethylene glycol を用いた酵素反応基質の効率的合成法を開発した。また、それを利用して多数の基質を合成することで、SurE の基質選択性を網羅的に解析し本酵素のペプチド環化触媒としての有用性を明らかにした。そこで本節では、EG 基質の一般適用性を検証することを目的に、SurE やその他 PBP-type TE、および従来型の非リボソームペプチド環化酵素 (TE ドメイン) を利用して、様々な head-to-tail 型環状ペプチドの化学-酵素合成を試みた。

まず、SurE の寛容な基質選択性を利用し、本来の基質のアミノ酸配列とは異なる 2 種類の環状ペプチド deoxypentaminomycin C (**78**) と desprenylagaramide C (**79**) の化学-酵素合成を試みた⁹³⁻⁹⁵。Fmoc 固相合成法により **78** の環化前駆体 EG 基質 *seco*-deoxypentaminomycin C-EG (**80**) を総収率 77.0% で調製し、SurE を用いた *in vitro* 酵素反応に供した (Figure 4-20)。その結果、96% の環化率で対応する head-to-tail 環化体 **78** へ変換されることが明らかとなった。なお、酵素反応により生じた環化体 **78** の化学構造は MS/MS によるペプチドフラグメント解析によって決定した (p. 277, Figure S85)。

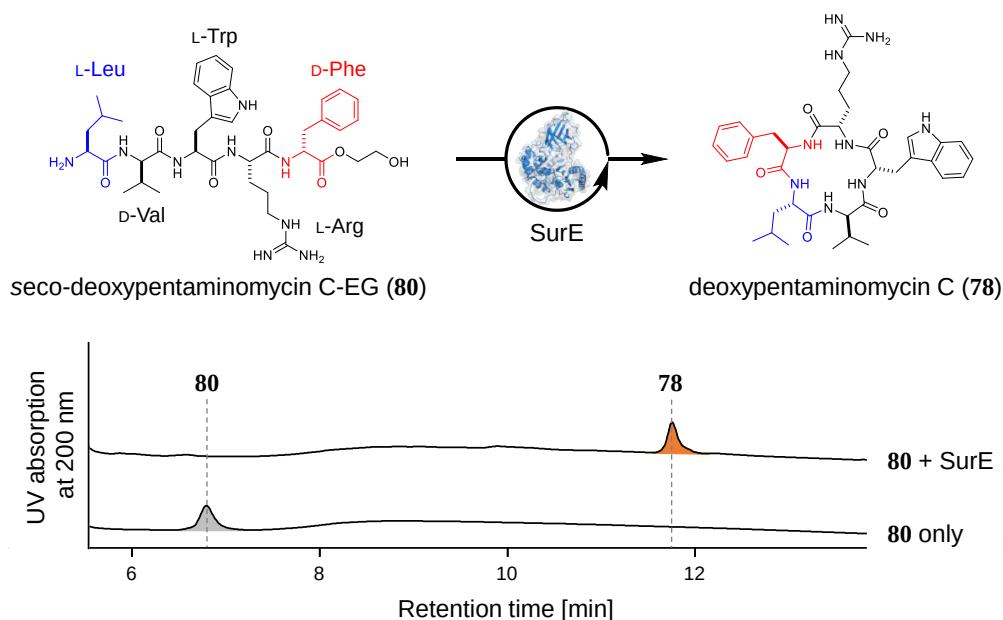


Figure 4-20. EG 基質 **80** と SurE を用いた *in vitro* 酵素反応

同様に、**79** の環化前駆体 EG 基質 *seco*-desprenylagaramide C-EG (**81**) を総収率 80.3% で調製し、C 末端 Gly の基質を環化できる SurE (G235L) を用いて *in vitro* 酵素反応を行った

(Figure 4-21)。その結果、99%の環化率で対応する head-to-tail 環化体 **79** へ変換されることが明らかとなった。なお、酵素反応により生じた環化体 **79** の化学構造は MS/MS によるペプチドフラグメント解析によって決定した (p. 278, Figure S86)。今回の酵素反応に用いた 2 種類の EG 基質は、SurE の本来の基質と鎖長・構成残基ともに異なるうえに、**81** は配列中に 2 つの Pro を含むため、環化の際にペプチド鎖のコンフォメーション制御が困難であると予想される基質である⁹⁶。そのため、上記の実験結果は SurE の寛容な基質選択性と生体触媒としての有用性を強く示唆するとともに、今後、開発した基質合成法と SurE を活用することで多種多様な環状ペプチドを効率よく合成できることが期待される。

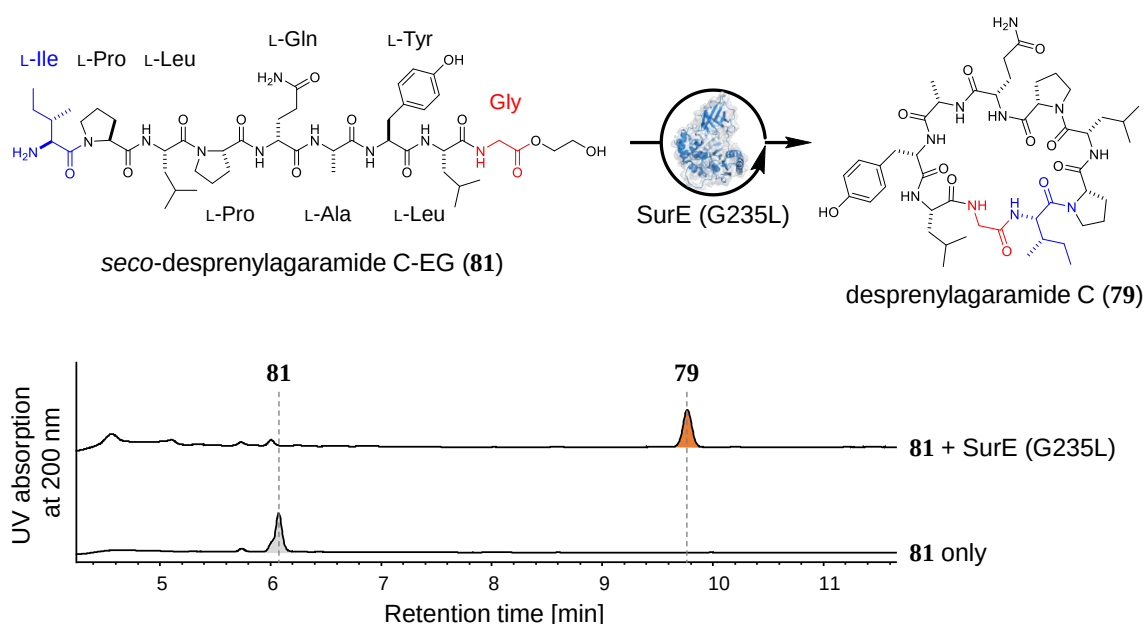


Figure 4-21. EG 基質 **81** と SurE (G235L)を用いた *in vitro* 酵素反応

次に、SurE 以外の PBP-type TE に対する EG 基質の適用を検証した。本研究では、抗菌活性環状ヘキサペプチド desotamide 類と wollamide 類の生合成に関与する PBP-type TE、WolJ に着目した。WolJ は、生合成のアッセンブリーラインが途中で分岐した 2 つの異なる NRPS (WolG1/WolG2) にそれぞれ作用し、SurE が環化できない C 末端 Gly や C 末端塩基性残基の基質に対して head-to-tail 環化反応を触媒することが推測されている⁹⁷ (Figure 4-22)。そこで、環状ヘキサペプチド desotamide B (**82**)、および優れた抗結核菌活性を有する類縁体 wollamide B1^{98, 99} (**83**) に着目し、その環化前駆体 EG 基質 seco-desotamide B-EG (**84**) と seco-wollamide B1-EG (**85**) を化学合成した。大腸菌を用いて WolJ の組換えタンパク質 (49.4 kDa) を調製したのち、EG 基質 **84** と **85** を用いた *in vitro* 酵素反応を行った (Figure

4-23a, b)。その結果、いずれの基質も酵素依存的に消失し、95%以上の環化率で head-to-tail 環化体 **82**、および **83** へ変換された。なお、酵素反応により生じた環化体 **82** と **83** の化学構造は MS/MS によるペプチドフラグメント解析によって決定した (pp. 279-280, **Figure S88-89**)。この結果から、desotamide 類、および wollamide 類の生合成において、WolJ が生合成中間体の大環状化を触媒することが明らかとなった。また、EG 基質は SurE 以外の PBP-type TE に対しても適用可能であることが明らかとなった。今後、SurE とは異なる基質 C 末端残基選択性を有する PBP-type TE を本手法に活用することで、様々な head-to-tail 型環状ペプチドを効率よく合成できることが期待される。

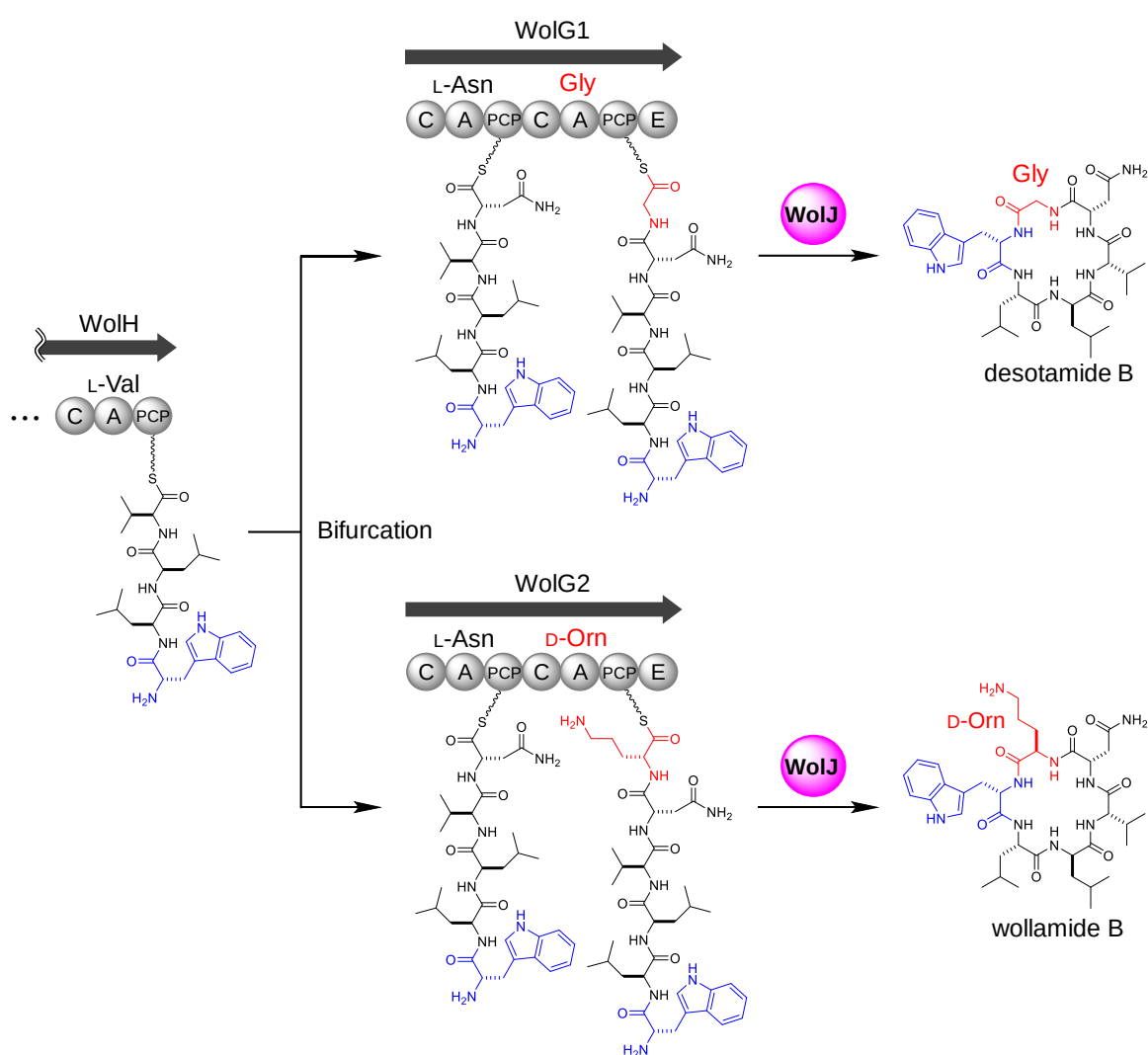


Figure 4-22. WolJ による生合成中間体の head-to-tail 環化反応

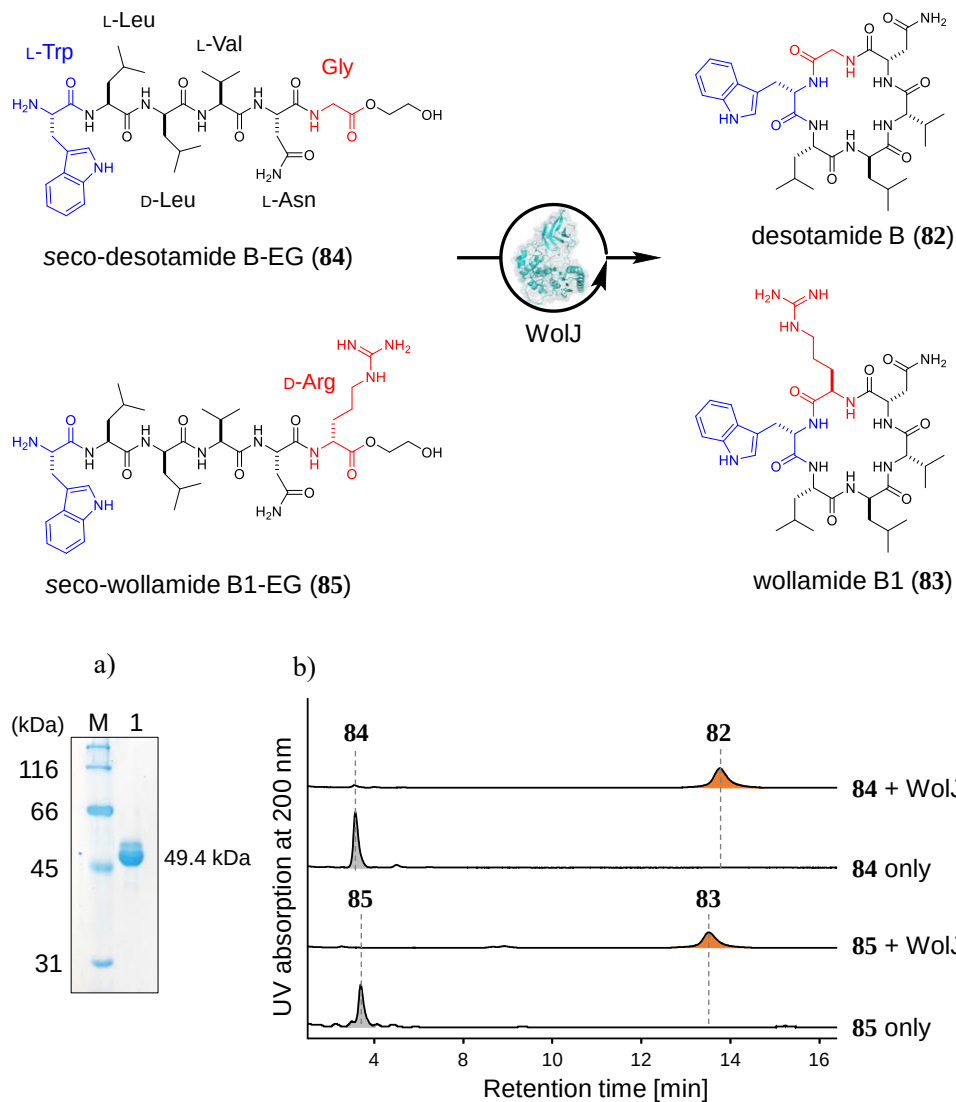


Figure 4-23. EG 基質 **84**、および **85** と WolJ の *in vitro* 酵素反応

- a) 組換え WolJ を含む溶出画分の SDS-PAGE による分析
M. タンパク質マーカー; 1. Ni アフィニティー精製した WolJ (49.4 kDa)
- b) EG 基質と WolJ を用いた *in vitro* 酵素反応の HPLC 分析
UV200 nm における吸収波長を示した。EG 基質 **84** と WolJ の酵素反応の結果を上段 2 つのクロマトグラムに示した。EG 基質 **85** と WolJ の酵素反応の結果を下段 2 つのクロマトグラムに示した。

次に、従来型の TE ドメインへの EG 基質の適用を検証した。本実験では、環状デカペプチド tyrocidine A (**86**) の生合成に関与する TE ドメイン、TycC-TE に着目し、EG 基質に対する環化活性を評価した⁵⁴。大腸菌を用いて TycC-TE の組換えタンパク質 (32.1 kDa) を調製したのち、Fmoc 固相合成法により環化前駆体基質 *seco*-tyrocidine A-EG (**87**) を総収率 71.0% で化学合成した (Figure 4-24a)。その後、EG 基質 **87** を TycC-TE を用いた *in vitro* 酵素反応に供し、得られた酵素反応液を HPLC にて分析した (Figure 4-24b)。その結果、EG 基質 **87** は酵素依存的に消失し、加水分解体 hyd-**87** と環化体 **86** がそれぞれ 30% と 70% の変換率で生成することが明らかとなった。本酵素反応における加水分解体と環化体の生成割合は、2000 年にハーバード大学の Walsh らが行った SNAC 基質を用いた TycC-TE の活性評価の結果と一致する⁵⁴。したがって、EG 基質は酵素反応に使用するペプチド環化酵素の環化収率に影響を与えないことが示唆された。以上の検証から、EG 基質は PBP-type TE のみならず従来型の TE ドメインに対しても適用可能であることが明らかとなった。

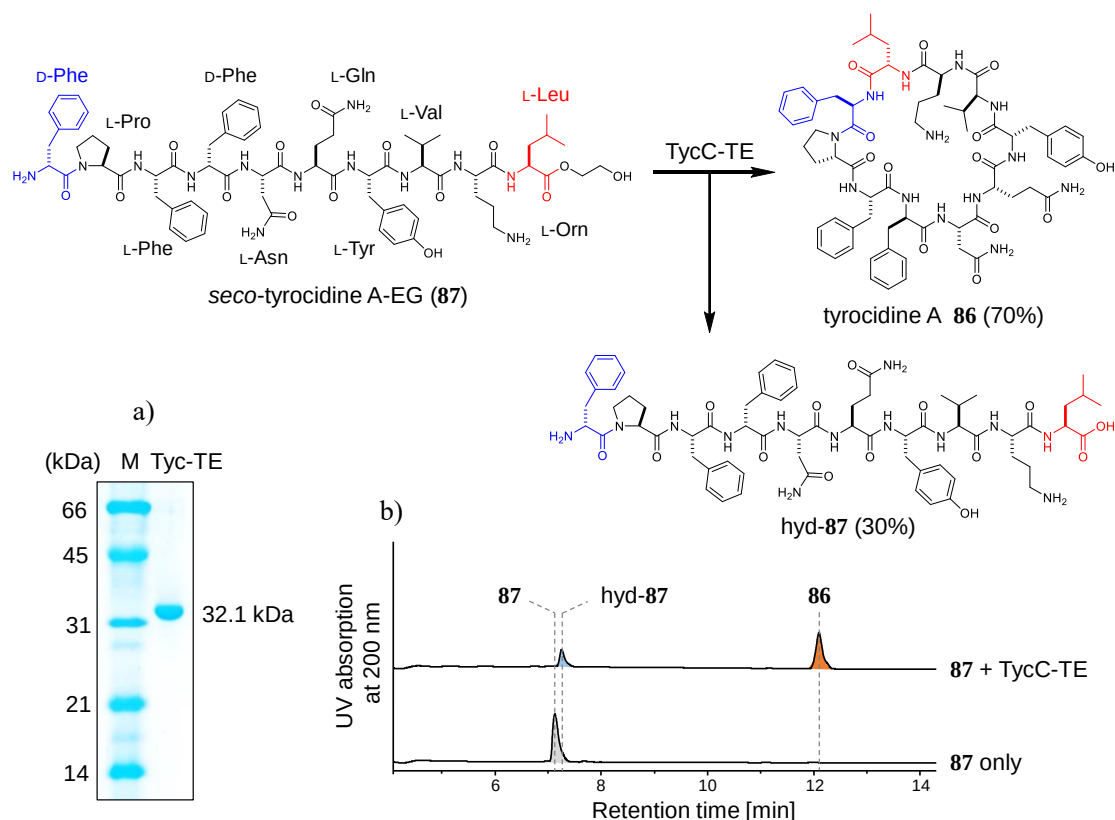


Figure 4-24. EG 基質 **87** と TycC-TE を用いた *in vitro* 酵素反応

- 組換え TycC-TE を含む溶出画分の SDS-PAGE による分析
M. タンパク質マーカー; 1. Ni アフィニティー精製した TycC-TE (32.1 kDa)
- EG 基質 **87** と TycC-TE を用いた *in vitro* 酵素反応の HPLC 分析
UV200 nm における吸収波長を示した。

第七節 小括と考察

1. 第四章のまとめ

第四章では、非リボソームペプチド環化酵素の触媒利用において大きなボトルネックであった基質合成法を改良した。検討の結果、安価に入手可能な小分子である ethylene glycol を固相合成に組み込むことで、ペプチド環化酵素の基質となる鎖状ペプチドを高収率かつ高純度で簡便に調製できる基質合成法を確立した。これにより、SNAC 基質の化学合成における課題であった ① 基質の収率の低さ、② 基質の純度の低さ、③ 煩雑な精製作業の必要性を一挙に解決した。また、開発した合成法を駆使して SurE の基質選択性を網羅的に調べることで、本酵素の基質 N 末端と配列内部の残基に対する寛容な選択性と、基質 C 末端残基に対する厳密な選択性を明らかにした。さらに、SurE の基質 C 末端残基に対する厳密な選択性を拡張することを目的に、ホモログ酵素 DsaJ とのタンパク質構造比較に基づく酵素改変を行った。その結果、野生型 SurE では環化できなかった C 末端 Gly の基質を環化可能な SurE 変異体を複数創出することに成功した。本章で開発した化学-酵素ハイブリッド合成法を駆使することで、アミノ酸のみで構成される単純な環状ペプチドだけでなく、PEG のような非アミノ酸残基を配列に含む環状ペプチドも効率よく合成することに成功した。また、C 末端 Gly の基質を環化できる SurE 変異体を用いることで、タンパク質性アミノ酸のみで構成される環状ペプチドも効率よく合成し、本手法で合成できる環状ペプチドの多様性を拡張することに成功した。本研究で確立した化学-酵素合成法では、環状ペプチドを精製作業を一度も行うことなく高純度かつ高変換効率で合成できる。そのため、本手法は環状ペプチドの大スケール合成だけでなく、環状ペプチドライブラリーの創出など、ペプチド創薬の分野にも大きく貢献できるものと考えられる。また、本手法は、SurE のみならず従来型の TE ドメインに対しても適用可能であるため、今後、様々なペプチド環化酵素の機能解析が一挙に進み、それら酵素を生体触媒として応用する研究が一層加速することが期待される。

2. SNAC 基質と EG 基質の諸性質に関する考察

本研究で開発した EG を脱離基とする合成法の有用性を検証するため、従来、非リボソームペプチド環化酵素の機能解析を行う際に脱離基として汎用的に用いられてきた SNAC と諸性質を比較した。ここでは、以下に示す 4 項目（1. 化学合成の容易さ、2. 基質の安定性、3. 基質の水溶性、4. 基質の酵素反応速度）について検証した。

1. SNAC 基質と EG 基質の化学合成について

まず、SNAC 基質と EG 基質における化学合成の煩雑さと合成収率を比較した。前述の通り、SNAC 基質の化学合成では Fmoc 固相合成法により鎖状ペプチドを調製したのち、液相にて SNAC 脱離基の縮合反応を行う。そのため、基質 C 末端残基のエピメリ化が問題となり、目的基質の収率低下や煩雑な精製作業が必須となる。実際、本合成スキームにより surugamide B の環化前駆体の SNAC 基質を調製した際には合成総収率が 30.0%と低く、HPLC による *epi* 体の分離作業が必要であった (**Figure 2-7**)。

SNAC 基質の合成上の課題を克服するために、C 末端残基のエピメリ化を抑制したチオエステル化手法がいくつか開発されている。2011 年に清華大学の Liu らの研究グループは Fmoc 固相合成法により合成したペプチドヒドラジドを鍵中間体としたチオエステル化法を報告した¹⁰⁰ (**Figure 4-25a**)。本手法ではまず、2-CT 樹脂にヒドラジンを縮合し、Fmoc 固相合成法によりペプチド鎖を伸長する。その後、酸を用いてペプチドヒドラジド **88** を合成樹脂から切り出したのち、ペプチド鎖 C 末端を酸化剤により活性化しチオエステル化を行う。本手法では C 末端残基のエピメリ化を起こすことなく目的のチオエステル体を得ることができるが、過剰量の酸化剤やチオールを反応後に除去する必要があるうえに、合成ステップが多段階に及ぶこと、合成収率が低～中程度であることが課題となるため、生体触媒の基質供給法として優れているとは言い難い。

また、1999 年にイェール大学の Ellman らの研究グループは、固相合成樹脂上でのチオエステル化法を報告した¹⁰¹ (**Figure 4-25b**)。本手法では、市販の 4-sulfamylbutyryl AM 樹脂を出発原料として、スルホンアミド化による C 末端アミノ酸の固相担持と、Fmoc 固相合成によるペプチド鎖の伸長を行い、固相担持ペプチド **89** を合成する。その後、反応溶液中にチオールと塩基を添加し、合成樹脂上でのチオエステル化を行う。本手法では、塩基のみを反応剤として使用するため、目的のチオエステル体を C 末端残基のエピメリ化を起こすことなく中程度の純度で調製することができる。しかしながら、市販の 4-sulfamylbutyryl AM 樹脂が高価であることや、合成樹脂上でのチオエステル化の反応効率が低く長時間 (24 h) 反応させる必要があること、目的基質の総収率が低～中程度であることが課題となるため、本手法も生体触媒の基質供給法として優れているとは言い難い。

その一方で、本研究で開発した基質合成法では、安価に入手可能な ethylene glycol を原料とし、高収率かつ高純度で簡便に目的基質を調製することができる。さらに、C 末端残基のエピメリ化も問題とならないため、煩雑な HPLC 精製を行う必要がなく、粗精製物のまま直接酵素反応に供することが可能である。したがって、従来の SNAC 基質の化学合成の課題点を克服した基質供給法として本手法は有用であると考えられる。

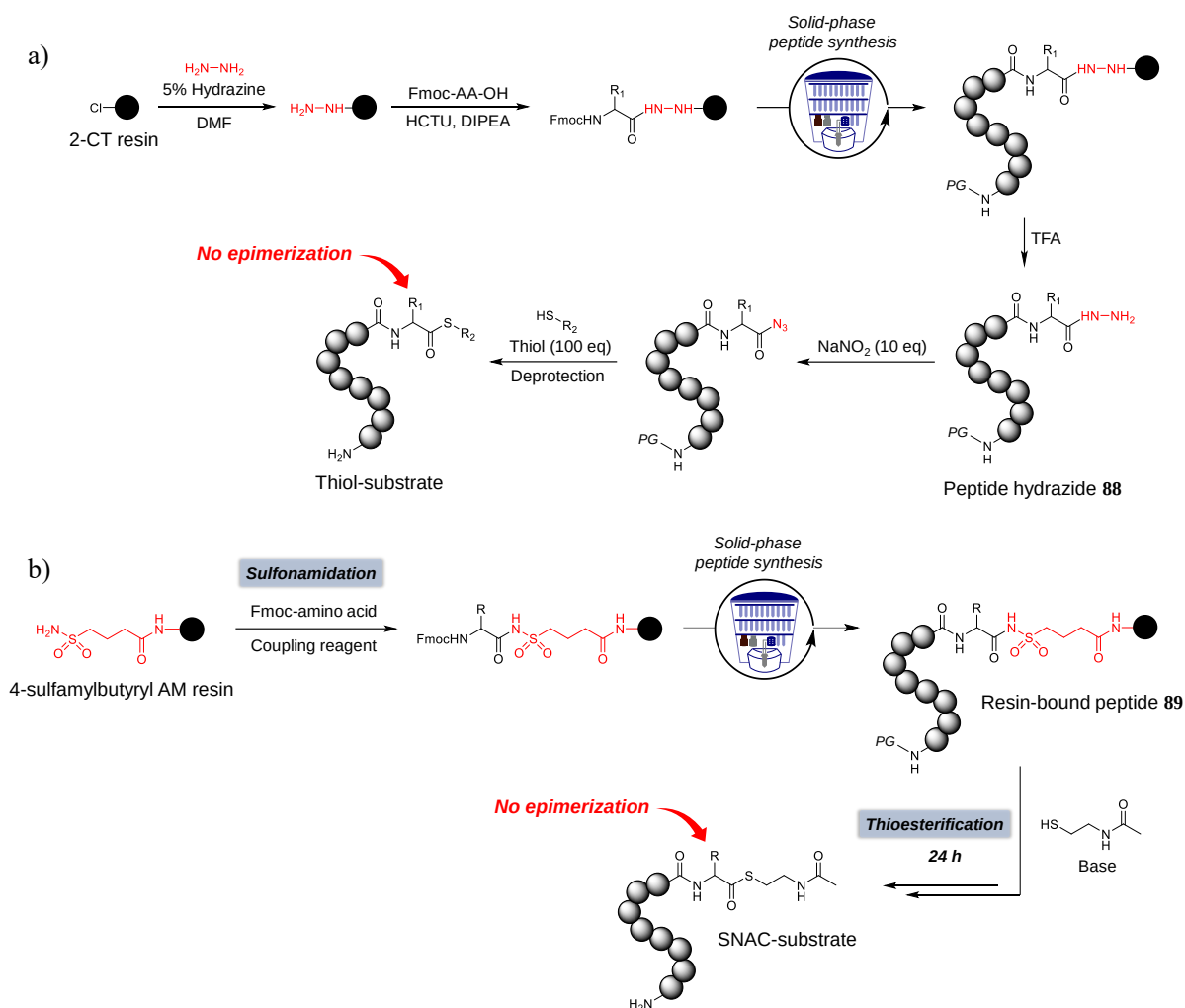


Figure 4-25. エピメリ化を抑制したペプチド鎖 C 末端のチオエステル化

- a) ペプチドヒドラジドを鍵中間体としたチオエステル化
b) 固相合成樹脂上でのチオエステル化

2. SNAC 基質と EG 基質の安定性について

SNAC 基質を酵素反応に用いる際の課題点として、上記で挙げた化学合成の煩雑さの他に、基質が不安定であることが挙げられる。チオエステル結合は、アミド結合やエステル結合と比べて反応性が高いため、系中に存在する求核基の求核攻撃により、容易に切断される。そのため、酵素反応のような高 pH 条件下 (pH 8~pH 10) に SNAC 基質を供すると、自発的な加水分解反応や基質内部の求核側鎖での自発的な環化反応が進行し、酵素の触媒活性を定量的に評価できないことが問題となる (Figure 4-26)。一方で、EG 基質ではチオエステル結合より強固なエステル結合を採用しているため、上記のような自発的な副反応

を抑制できる。結果として、本章の第四節で行った実験のように、酵素の触媒活性を網羅的かつ定量的に評価することに成功している (**Figure 4-13**)。生体触媒の実用化に向けては、副反応を起こすことなく目的物のみを効率的に合成できることが重要課題の一つであるが、この観点から EG 基質は SNAC 基質と比べて優れていると考えられる。

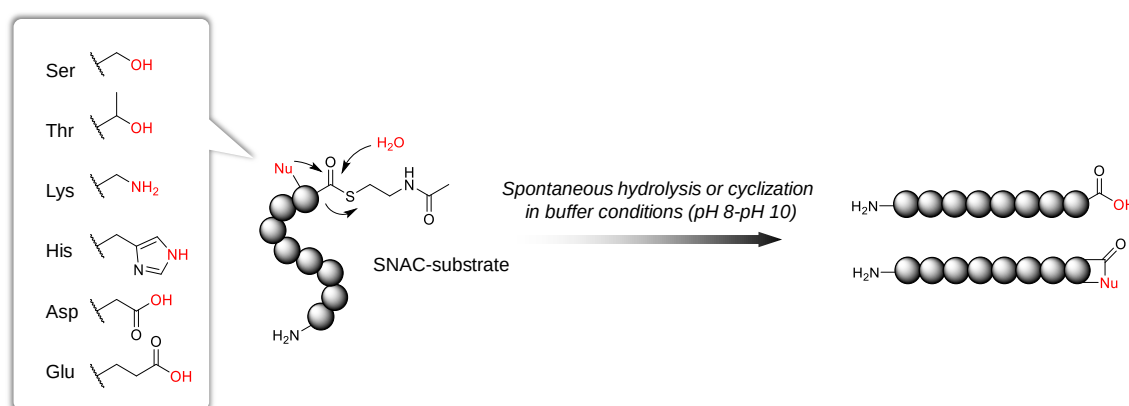


Figure 4-26. 酵素反応条件下での SNAC 基質の自発的な分解

3. SNAC 基質と EG 基質の水溶性について

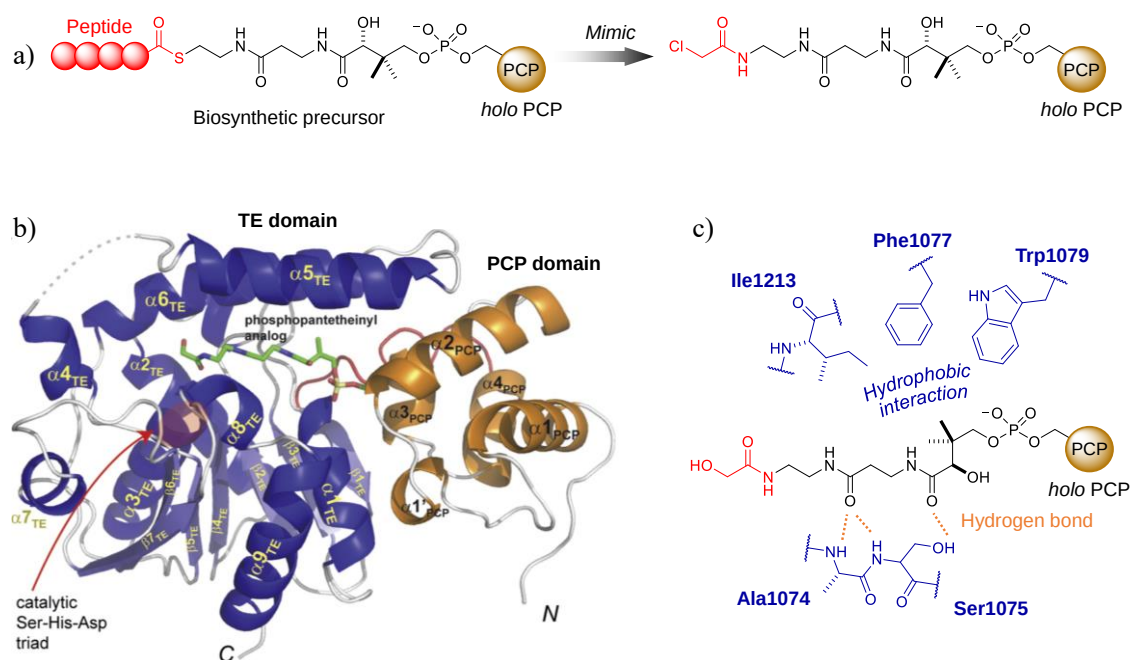
酵素は水に溶解している基質に対してのみ反応を触媒するため、生体触媒の実用化を目指す上では酵素反応基質の水溶性も留意すべき点である。SNAC 基質および EG 基質の 100 μ L の水における溶解度を検証したところ、モデル基質である *seco*-surugamide B-SNAC は、基質濃度 800 μ M を境に不溶化物が確認された一方で、C 末端に EG を縮合した *seco*-surugamide B-EG の場合には、基質濃度 5 mM を超えても不溶化物は確認されなかった（実験データは示していない）。このような EG 基質の優れた水溶性は、おそらく脱離基 ethylene glycol の性質によるもので、高親水性の ethylene glycol が基質の C 末端に付加することで、基質全体の水溶性向上に寄与しているものと考えられる。このことから、EG 基質は大スケール合成へと適用可能な十分な溶解性を示し、SNAC 基質と比べて優れた水溶性を有していると考えられる。

4. SNAC 基質と EG 基質の酵素反応速度について

次に、SNAC 基質と EG 基質に対する SurE の環化活性について考察した。前節にて行った反応速度論的解析により、EG 基質を SurE の酵素反応に用いた場合には SNAC 基質と比べて k_{cat} 値が約 4 倍低下 ($k_{\text{cat}} = 4.6 \pm 0.2 \text{ min}^{-1}$)、 K_{m} 値が約 4 倍上昇 ($K_{\text{m}} = 660.2 \pm 41.3 \text{ }\mu\text{M}$)、 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ が約 16 倍低下 ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} = 116 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) することが明らかとなった (**Figure 4-12**)。EG 基質が SNAC 基質と比べて反応効率が低い理由として、以下 2 点が考えられる。1 点目は、

脱離基部位のアセチル基の重要性である。2011 年、フロリダ大学の Bruner らの研究グループは、NRPS 生合成における TE ドメインと鎖状生合成中間体が連結するホスホパンテテイル基の相互作用解析を行った¹⁰²。環状ペプチド enterobactin の生合成^{103, 104}に着目し、ホスホパンテテイル基の模倣体で *holo* 化した PCP ドメインと TE ドメインの組換えタンパク質を調製し、その共結晶構造を解析した (**Figure 4-27a, b**)。その結果、TE ドメインはホスホパンテテイル基模倣体のアミド酸素と Ala1074 と Ser1075 で水素結合を形成し、さらに Phe1077、Trp1079、Ile1213 で疎水性相互作用することが明らかとなった (**Figure 4-27c**)。この結果から、NRPS のペプチド環化酵素である SurE も上記と同様の分子機構によりホスホパンテテイル基と相互作用する可能性が考えられる。本研究にて用いた EG 基質ではその脱離基は ethylene glycol であり末端にヒドロキシ基を有する一方で、SNAC 基質では TE ドメインとの相互作用に関与するアセチル基を脱離基に有する (**Figure 4-28**)。したがって、このような脱離基の構造的差異が SurE の基質認識に影響を与え、 K_m 値の上昇に寄与している可能性が考えられる。EG 基質が SNAC 基質と比べて反応効率が低い 2 点目の理由として、エステル結合とチオエステル結合の結合強度の違いが挙げられる。一般的に、エステル結合の方がチオエステル結合と比べて強固で安定な結合であるため、SurE の触媒 Ser 残基の求核攻撃によるアシル化が起こりにくくなり、 k_{cat} 値の低下を招いた可能性が考えられる。

以上、4 項目における SNAC 基質と EG 基質の諸性質をまとめる (**Figure 4-29**)。EG 基質は SNAC 基質と比べて、合成の容易さ、安定性、水溶性の点で優れる。その一方で、SurE による基質認識に関しては SNAC 基質の方に優位性があり、EG 基質の反応効率の低さが課題と言える。今後、酵素の指向性進化法¹⁰⁵や機械学習を用いた酵素改変¹⁰⁶を駆使し EG 基質に対する親和性と反応性を向上させた SurE 変異体を創出することで、本課題の解決が期待される。



Liu, Ye. *et al.* Structural basis for phosphopantetheinyl carrier domain interactions in the terminal module of nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **18**, 1482-1488 (2011)より引用

Figure 4-27. TE ドメインとホスホパンテテイル基の相互作用解析

- a) ホスホパンテテイル基の模倣体の化学構造
- b) TE ドメインと *holo* 体 PCP ドメインの共結晶構造
TE ドメインを青色、*holo* 体 PCP ドメインを茶色、ホスホパンテテイル基模倣体を緑色で示した。
- c) TE ドメインとホスホパンテテイル基模倣体の相互作用様式
相互作用に関わる TE ドメインの残基を青色で示した。また、水素結合をオレンジ色で示した。

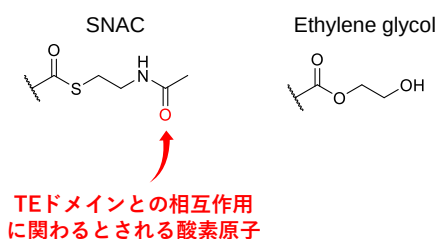


Figure 4-28. SNAC と ethylene glycol の構造的差異

	基質の化学合成 (収率)	基質の安定性	基質の水溶性	環化効率
SNAC基質	煩雑 (低い)	不安定	< 800 μ M	高い
EG基質	簡易 (高い)	安定	> 5 mM	低い

Figure 4-29. SNAC 基質と EG 基質の諸性質のまとめ

3. 基質 C 末端残基の認識を担う「疎水性ポケット」に関する考察

前章、および本章にて行った実験により、SurE の触媒 Ser 残基の近傍に位置する「疎水性ポケット」が、基質 C 末端残基の認識に関与していることが明らかとなった。また、本ポケットに変異を導入することで、C 末端 Gly の基質を環化できる SurE 変異体を創出し、その厳密な基質 C 末端残基選択性の一部を改変した。SurE は D-Arg などの塩基性残基や D-Asn などの中性残基を C 末端に含む基質を環化できないが、天然にはそれら基質を環化すると予想されるホモログ酵素が多数存在することが明らかとなっている (Figure 3-14)。そのため、これら PBP-type TE の「疎水性ポケット」の構成残基や特性を系統的に明らかにすることで、SurE の基質 C 末端残基選択性のさらなる改変へと応用できると考えられる。

PBP-type TE の「疎水性ポケット」に関してさらなる知見を得るため、ゲノムデータベースから見出された 633 種類の PBP-type TE に対して、タンパク質の配列相同性に基づくネットワーク解析を行った。さらに、各 PBP-type TE における「疎水性ポケット」を構成するアミノ酸残基の理論等電点を算出し、上記の結果にマッピングした (Figure 4-30 および p. 203, Table S6 および pp. 223-224, Figure S1-S2)。Figure 4-30 では、丸印がそれぞれの PBP-type TE を表し、丸印の色が赤いほど「疎水性ポケット」の等電点が低く、ポケットが負に帯電していることを示している。解析の結果、633 種類の PBP-type TE は複数のグループに分類され、各グループ内で「疎水性ポケット」の等電点に同様の傾向がみられることが明らかになった。例えば、SurE、PenA や Lon18 のような C 末端に疎水性残基を含む基質を環化する PBP-type TE は、一貫して「疎水性ポケット」の等電点が高い傾向にあった。その一方で、SurE が環化しなかった C 末端に塩基性残基を含む基質を環化する PBP-type TE (図中の MppK など) においては、低い等電点を示す傾向にあった。このことから、MppK のような PBP-type TE は、負に帯電した「疎水性ポケット」および基質 C 末端の塩基性残基でイオン結合様の相互作用を形成し、基質を認識することが推測される。実際、MppK の立体構造モデルを AlphaFold2 で作成し、「疎水性ポケット」の構成残基を調べたところ、SurE の Leu231 にあたる残基が MppK では Glu に置き換わっており、本残基がイオン結合の形成に関わることが考えられた (Figure 4-31)。

上記の解析で明らかになった各種 PBP-type TE の「疎水性ポケット」の構成残基や特性をもとに酵素改変を行うことで、基質 C 末端残基の選択性をさらに拡張した SurE 変異体の創出が期待される。

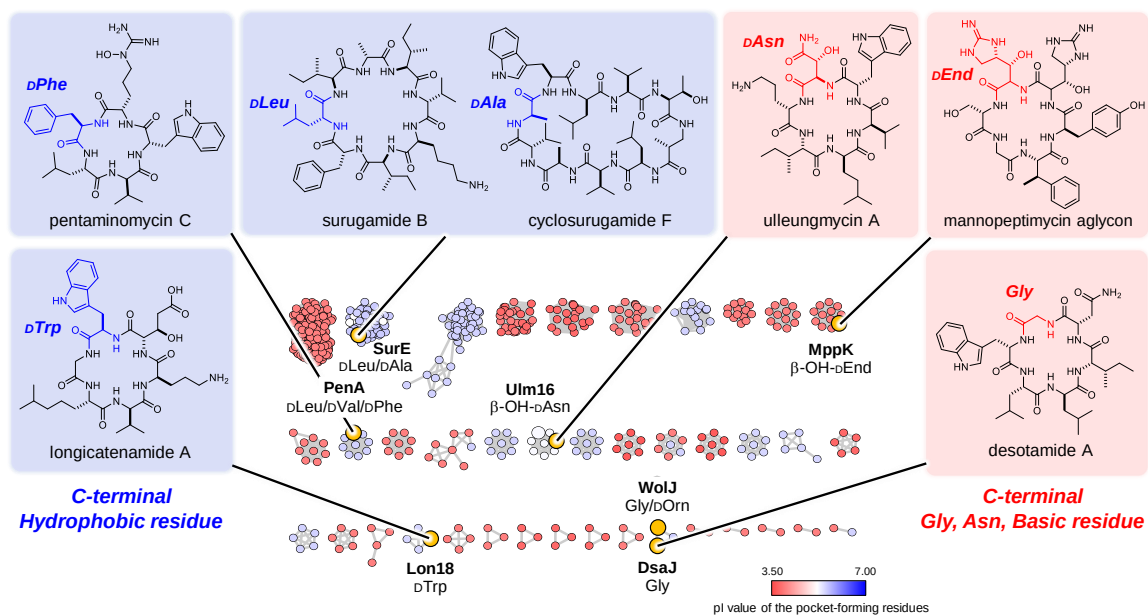


Figure 4-30. PBP-type TE のネットワーク解析

現在同定されている代表的な PBP-type TE とその基質 C 末端残基を記した。また、各 PBP-type TE の「疎水性ポケット」における等電点を赤色から青色の勾配で示した。

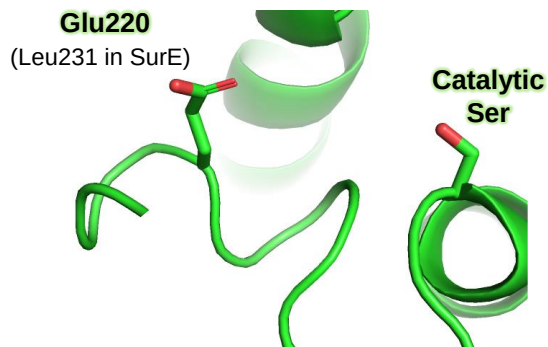


Figure 4-31. MppK の「疎水性ポケット」内に存在する Glu 残基

第五章 Head-to-side chain 型環状ペプチドの効率的な化学-酵素合成法の開発

第一節 本章の目的

前章の研究では、ethylene glycol を用いた鎖状基質の効率的合成法と寛容な基質選択性を有する SurE のペプチド環化反応を組み合わせた、環状ペプチドの効率的な化学-酵素ハイブリッド合成法を確立した。しかし、本手法により合成できる環状ペプチドは SurE の環化様式に制限されるため、一貫してペプチド鎖 C 末端残基と N 末端残基で環化した head-to-tail 型環状ペプチドに限定される。

一方で、天然からは daptomycin、polymyxin B1、bacitracin A や didemnin B に代表されるようなペプチド鎖 C 末端残基と配列内部の側鎖で環化した head-to-side-chain 型環状ペプチドが多数見出されており、抗菌活性や抗腫瘍活性など、それぞれが多様で魅力的な生物活性を有している¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ (Figure 5-1)。そのため、寛容な基質選択性を有する SurE を活用し、これら head-to-side chain 型環状ペプチドを酵素合成できれば、本酵素の生体触媒としての適用範囲をさらに拡張できると考えられる。そこで本章では、ヘテロキラルな残基間での環化反応を触媒する SurE の特性と、後述する分岐型 EG 基質を利用した head-to-side chain 型環状ペプチドの化学-酵素合成法の確立を目指した。

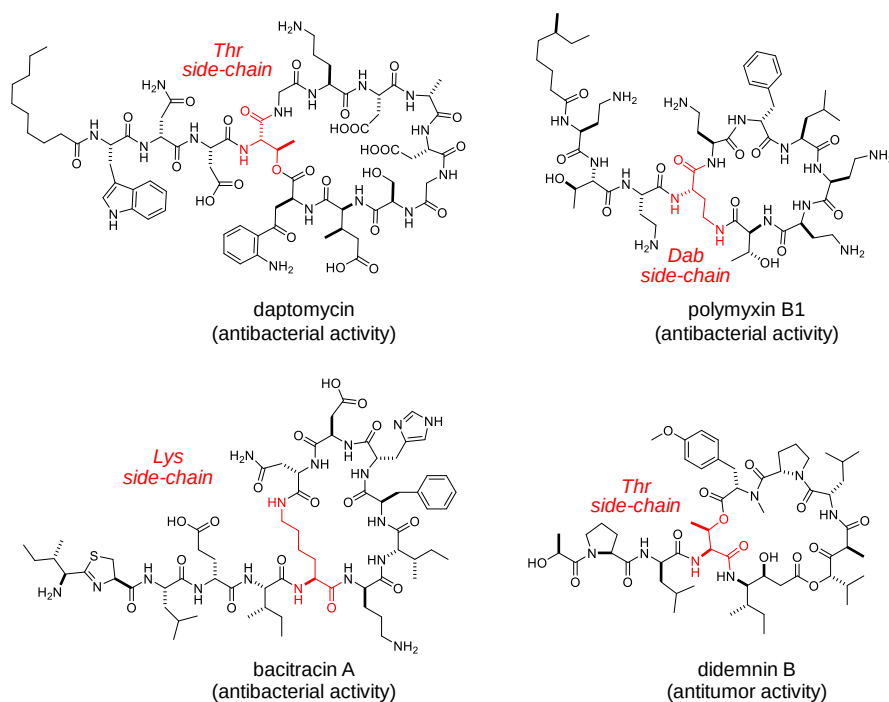


Figure 5-1. 代表的な head-to-side chain 型環状ペプチドの化学構造

第二節 分岐型 EG 基質の着想と設計

SurE は、ペプチド鎖 C 末端 D-アミノ酸と N 末端 L-アミノ酸のヘテロキラルな残基間での head-to-tail 環化反応を選択的に触媒するため、基質内部に存在する Lys や Thr 等の側鎖求核基を介した環化反応を触媒できない。SurE の触媒能を head-to-tail 環化反応から head-to-side chain 環化反応へと改変する手法の一つとして、変異導入による酵素改変が選択肢として挙げられる。しかし、SurE の基質認識機構は C 末端残基選択性を除いては全く明らかでないため、SurE を合理的に改変し、その触媒能を head-to-side chain 型へと改変することは困難であると考えられる。

一方で、有機合成的手法による head-to-side chain 型環状ペプチドの化学合成では、固相合成法にて Y 字型の分岐型ペプチドを調製し、そのものに対して環化反応を行う戦略がしばしばとられている¹¹⁰⁻¹¹³ (Figure 5-2a)。このことから着想を得て、SurE のペプチド環化反応においても上記と同様に分岐型基質を酵素反応に用いることで、側鎖での環化反応が進行する可能性が考えられた。特に、ヘテロキラルな残基間での環化反応を触媒する SurE の特性を活かして、基質 N 末端と C 末端に D-アミノ酸、側鎖に L-アミノ酸を有する分岐型基質を酵素反応に用いることで、所望の head-to-side chain 型環状ペプチドのみを選択的に与えることが予想された (Figure 5-2b)。

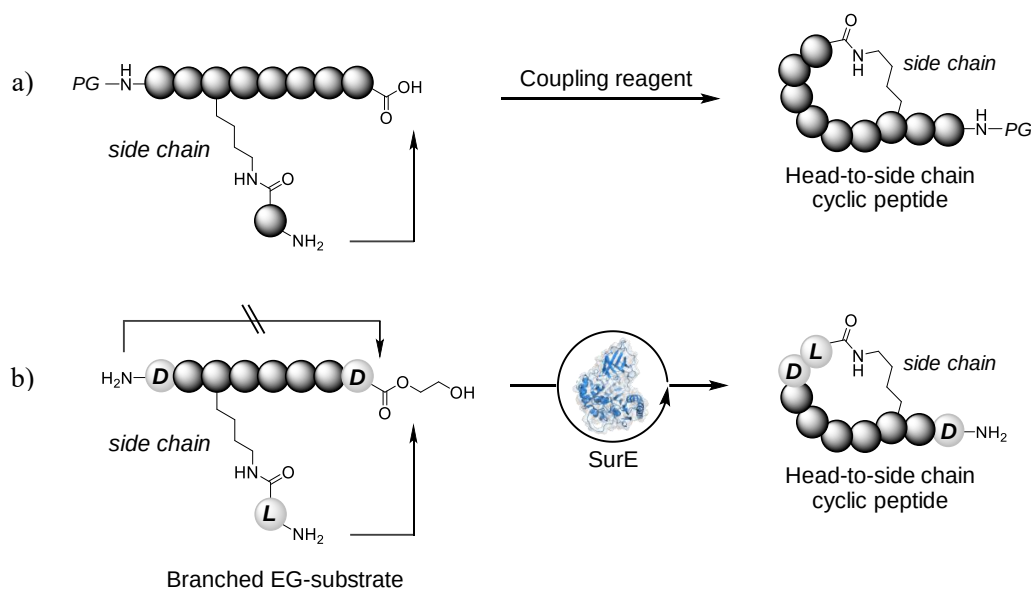


Figure 5-2. 分岐型ペプチドを用いた側鎖での環化反応

a) 有機合成による側鎖の環化反応 b) SurE による側鎖の環化反応

そこで、本仮説を検証するため、SB-EG をモデル基質として以下に示す分岐型 EG 基質 **90** を設計した (**Figure 5-3**)。本基質は、SB-EG の N 末端 3 位の L-Ile が L-Lys へと置換され、かつ、その側鎖に L-Ile を有する。また、主鎖での head-to-tail 環化反応を抑制するために、N 末端 L-Ile を安価に入手可能で構造的に類似した D-Val へと置換した。上記の分岐型 EG 基質 **90** を用いて SurE の酵素反応を行うことで、基質 C 末端 D-Leu と L-Lys 側鎖に導入した L-Ile 間での head-to-side chain 環化反応を試みた。

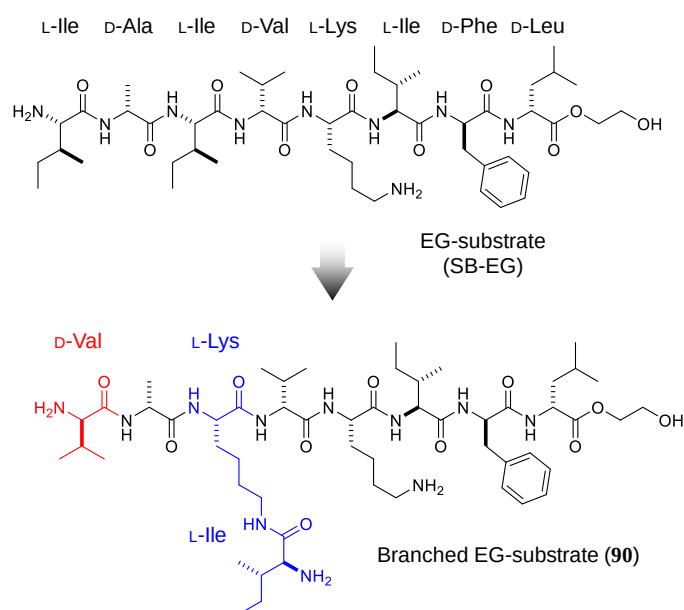


Figure 5-3. 本研究で用いる分岐型 EG 基質の設計

第三節 分岐型 EG 基質の合成と *in vitro* 酵素反応

前節にて設計した分岐型 EG 基質 **90** の化学合成を行った (**Figure 5-4**)。まず、塩基 DIPEA を用いて ethylene glycol を 2-CT 樹脂に担持した。その後、DIC および DMAP を用いて C 末端残基 Fmoc-D-Leu のエステル化を行い、固相担持アミノ酸 **33** を得た。その後、Fmoc 固相合成法により各種アミノ酸を伸長し、固相担持ペプチド **91** とした。ここでは、分岐型基質の合成を行うべく L-Lys 側鎖が 1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)ethyl (Dde) で保護された Fmoc- L-Lys(Dde)-OH をビルディングブロックとして採用した。**91** を得たのち、2% hydrazine/DMF 溶液を用いて L-Lys 側鎖の Dde 保護基を選択的に除去し、その側鎖に Boc-L-Ile-OH を縮合した。最後に、TFA によるペプチド鎖の樹脂からの切り出しと側鎖の脱保護を行うことで、Lys 側鎖に擬似 N 末端を有する分岐型 EG 基質 *seco*-surugamide B (I1dV, I3K(I-NH₂))-EG (**90**) を得た。エーテル沈殿を行ったのちの粗精製物を LC-MS にて分析した結果、目的基質 **90** が高い純度で得られたことを確認した (**Figure 5-5**)。その後、HPLC による精製を行うことで、本化合物を総収率 82.6% (17 steps from **33**) で得た。

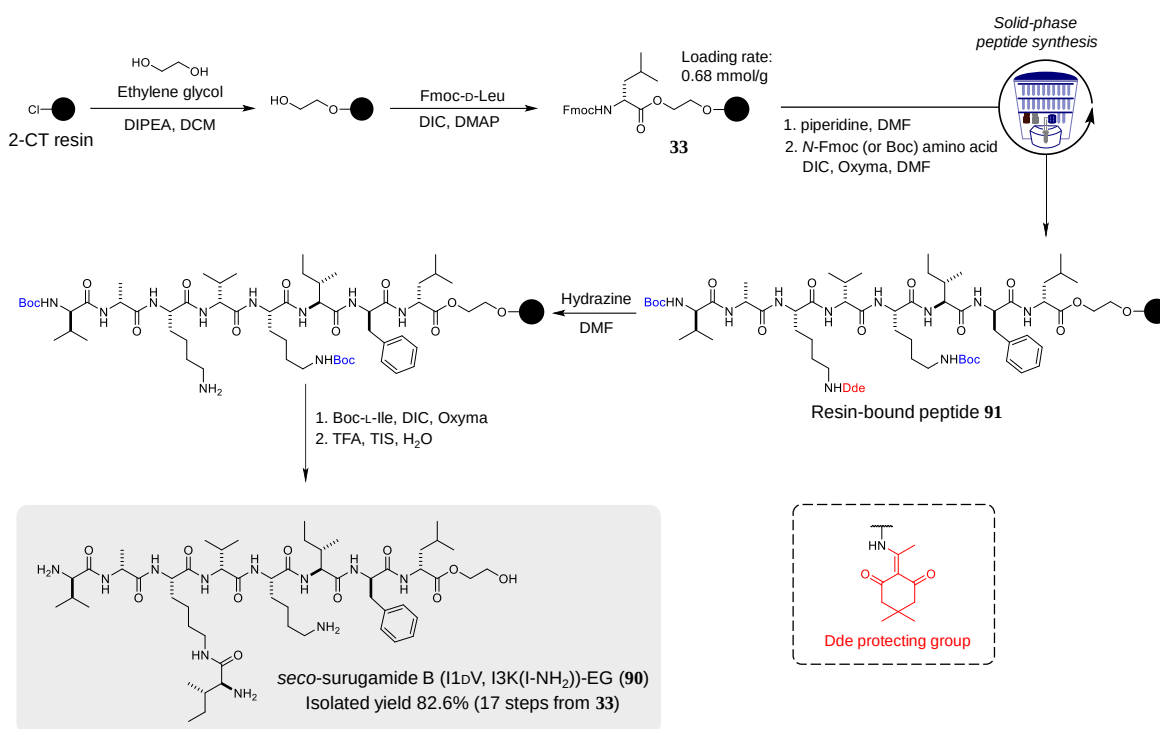


Figure 5-4. 分岐型 EG 基質の合成スキーム

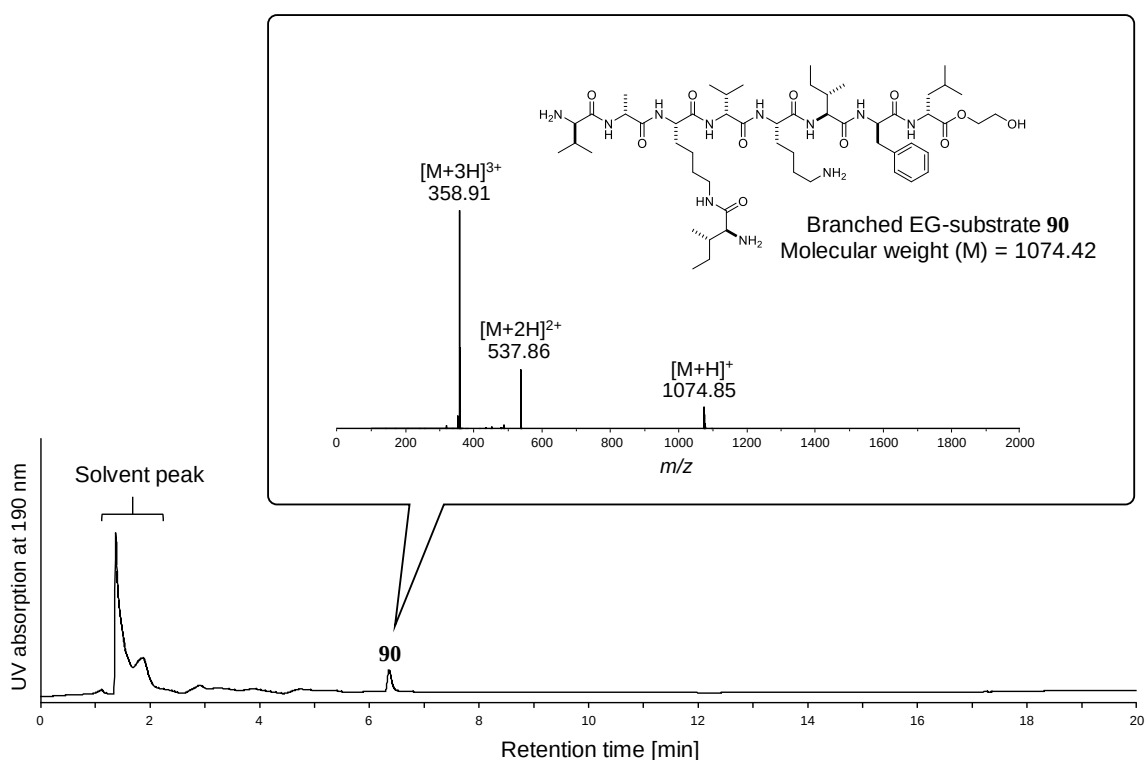


Figure 5-5. 分岐型 EG 基質 **90**（粗精製物）の LC-MS 分析

UV 190 nm におけるクロマトグラムを示した。また、分岐型 EG 基質 **90** の分子量、および 1 価、2 価、3 価におけるプロトン付加体の m/z 値を示した。

次に、化学合成した分岐型 EG 基質 **90** と組換え酵素 SurE を用いて *in vitro* 酵素反応を行い、本基質に対する SurE の環化活性を評価した。高い純度で酵素反応基質を調製できる本手法の利点を活かし、合成樹脂から切り出した分岐型 EG 基質 **90** の粗精製物を HPLC 精製することなく、直接 SurE の酵素反応に供した。**Figure 5-6** に示す組成にて酵素反応液を調製したのち、室温条件下、水中で 2 時間反応させた。その後、酵素反応液に等量の MeOH を加えて反応をクエンチし、得られた混合液を HPLC にて分析した (**Figure 5-7**)。その結果、分岐型 EG 基質 **90** の消失と、環化体と同等の分子量を示す新たな化合物ピークの生成が確認された。今回用いた EG 基質 **90** において、C 末端の D-Leu と環化しうる反応点は N 末端 1 位の D-Val、N 末端 5 位の L-Lys 側鎖アミン、および N 末端 3 位の L-Lys 側鎖 L-Ile であるため、3 種類の環化体 (**92-94**) が想定される (**Figure 5-8a**)。そこで、新たに生じた環化体の化学構造を決定するため、LC-MS/MS によるペプチドフラグメントの解析を行った (**Figure 5-8b**)。その結果、head-to-side chain 環化体 **94** に帰属されるペプチドフラグメントを複数検出した。特に、図中の赤色で示す m/z 487.3、 m/z 615.4、および m/z 714.5 を示す 3 つのペプチドフラグメントは、head-to-tail 環化体 **92** や head-to-side chain 環化体 **93** では検出

し得ない環化体 **94** 特有のペプチドフラグメントである。この結果を踏まえ、環化体 **94** の合成標品を化学合成し、酵素生成物と HPLC のカラム保持時間を比較したところ、それらが一致した (Figure 5-7)。以上のことから、本酵素反応により生じた化合物は head-to-side chain 環化体 **94** であることが明らかとなった。本実験に用いた分岐型 EG 基質 **90** には、C 末端の D-Leu と環化しうる反応点が 3 か所存在するが、SurE の基質選択性をうまく利用することで目的の head-to-side chain 環化体のみを選択的に酵素合成することに成功した。

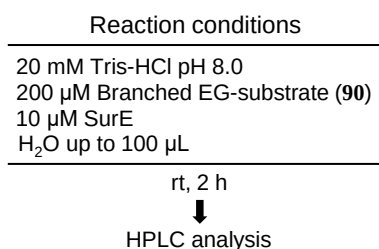


Figure 5-6. 分岐型 EG 基質 **90** と SurE の *in vitro* 酵素反応の反応条件

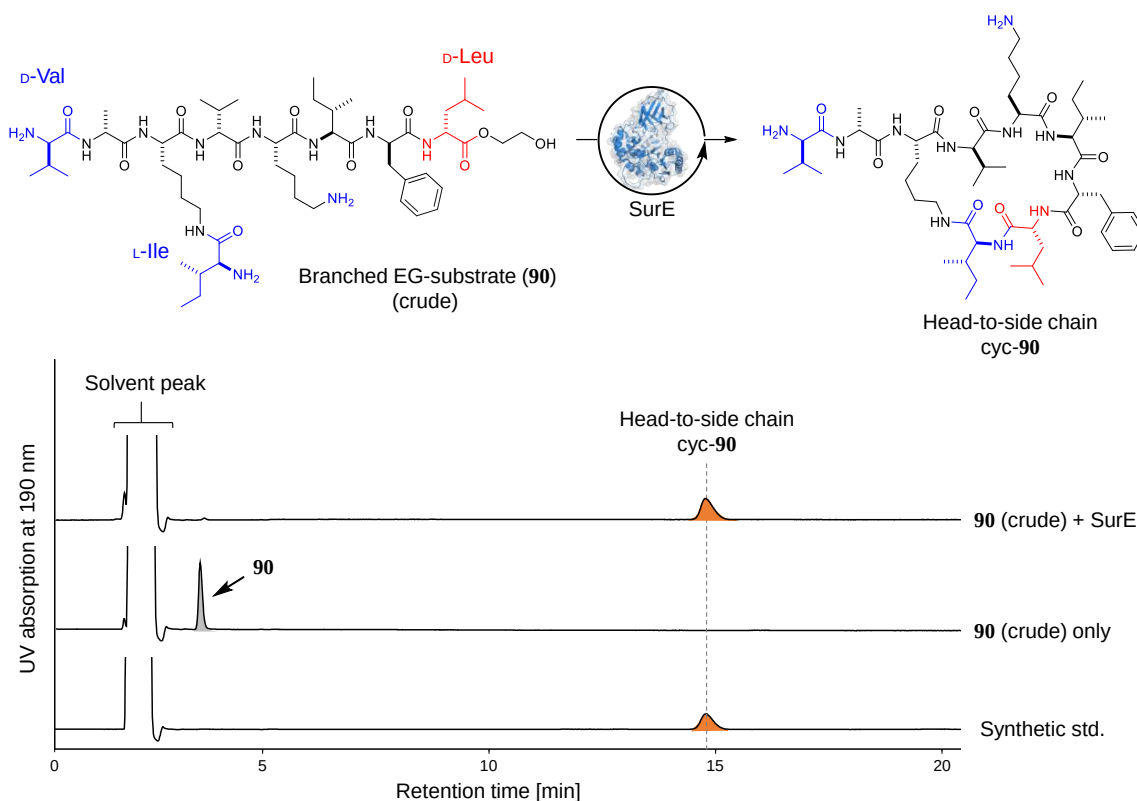


Figure 5-7. 分岐型 EG 基質 **90** と組換え SurE を用いた *in vitro* 酵素反応 UV190 nm におけるクロマトグラムを示した。

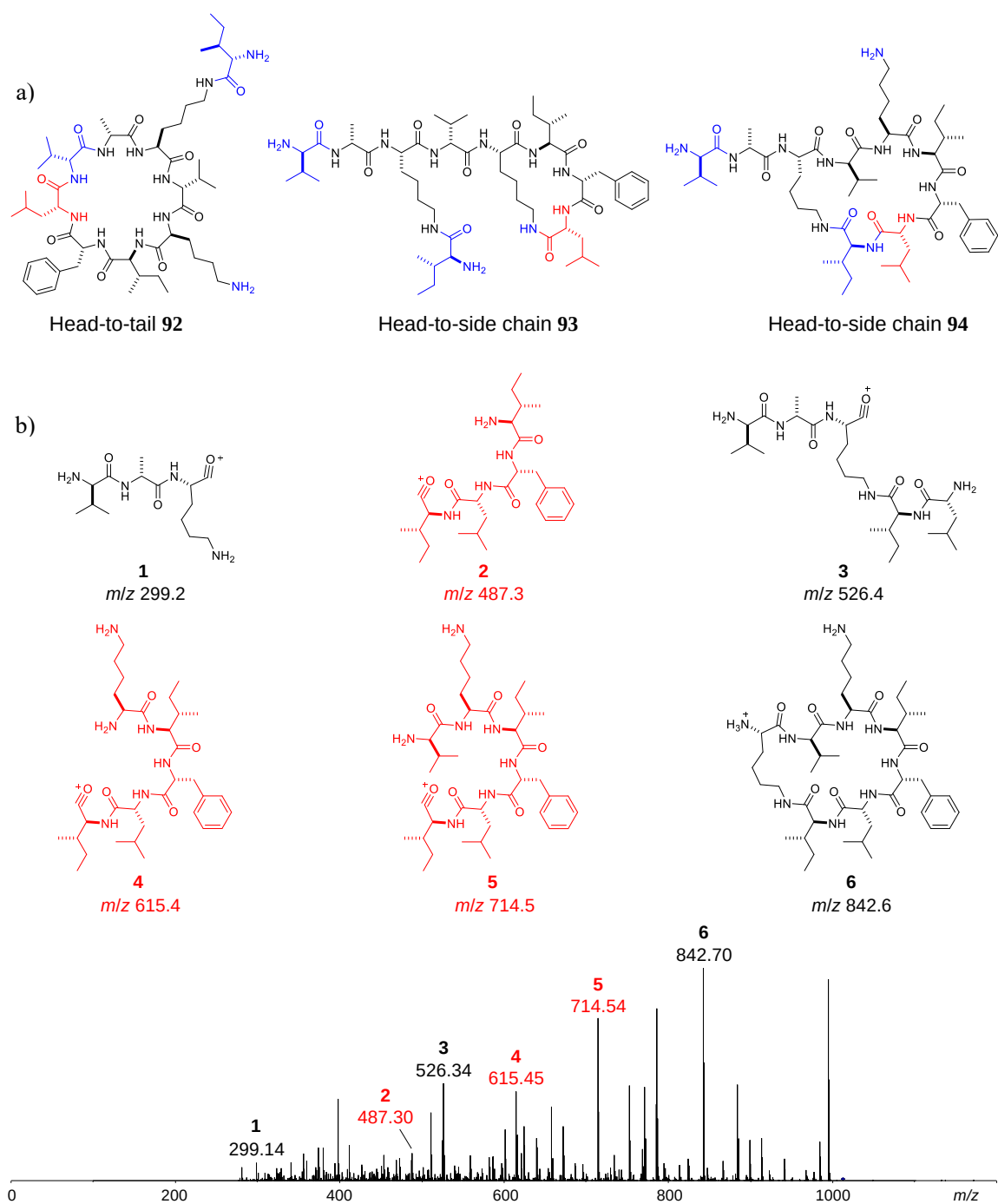


Figure 5-8. 酵素反応生成物の LC-MS/MS によるペプチドフラグメントの解析

a) 酵素反応により生じうる 3 種類の環化体 **92-94** の化学構造

b) 酵素反応生成物の LC-MS/MS 解析

Head-to-side chain **94** 特有のペプチドフラグメントを赤色で示した。

一方で、EG 基質 **90** の主鎖 N 末端残基を L-Ile に置換した分岐型 EG 基質 *seco*-surugamide B (I3K(I-NH₂))-EG (**95**) を SurE の *in vitro* 酵素反応に供した場合、EG 基質は消失するものの、環化体と同等の分子量を示す 2 つの新たな化合物ピーク (**96** および **97**) が生成した (Figure 5-9)。環化体の化学構造を決定するため、それぞれの化合物ピークに対して LC-MS/MS によるペプチドフラグメントの解析を行った (Figure 5-10)。その結果、**96** は基質 C 末端の D-Leu と N 末端の L-Ile で環化した head-to-tail 環化体、**97** は基質 C 末端の D-Leu と L-Lys 側鎖の L-Ile で環化した head-to-side chain 環化体であることが判明し、SurE の酵素反応により位置異性体の混合物が生成することが明らかとなった。したがって、本手法により head-to-side chain 型環状ペプチドを選択的に酵素合成するためには、酵素反応に用いるペプチド環化酵素の立体選択性をはじめとした基質選択性の理解と、それに基づく分岐型 EG 基質の分子設計が重要であると考えられる。

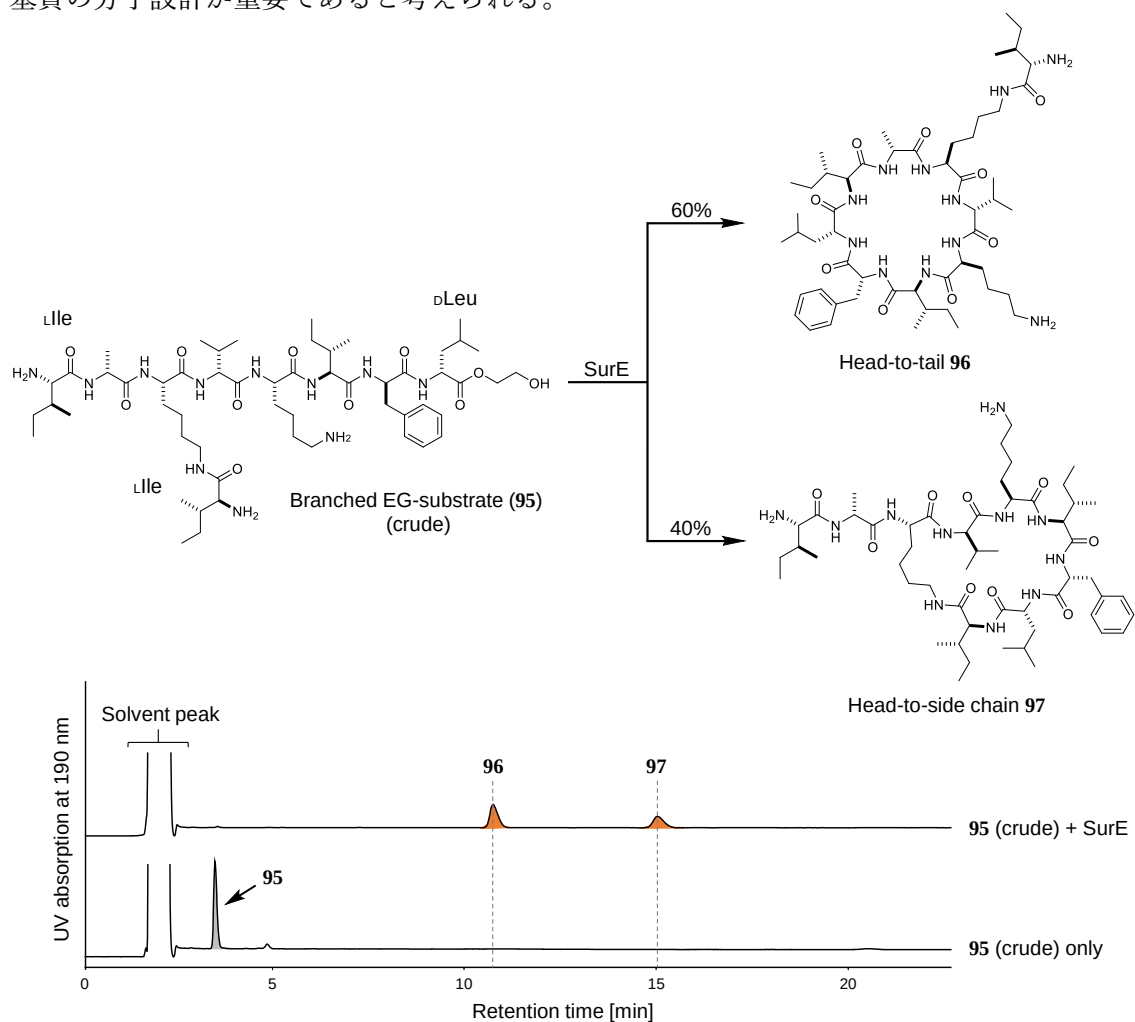


Figure 5-9. 分岐型 EG 基質 **95** と組換え SurE を用いた *in vitro* 酵素反応 UV190 nm におけるクロマトグラムを示した。

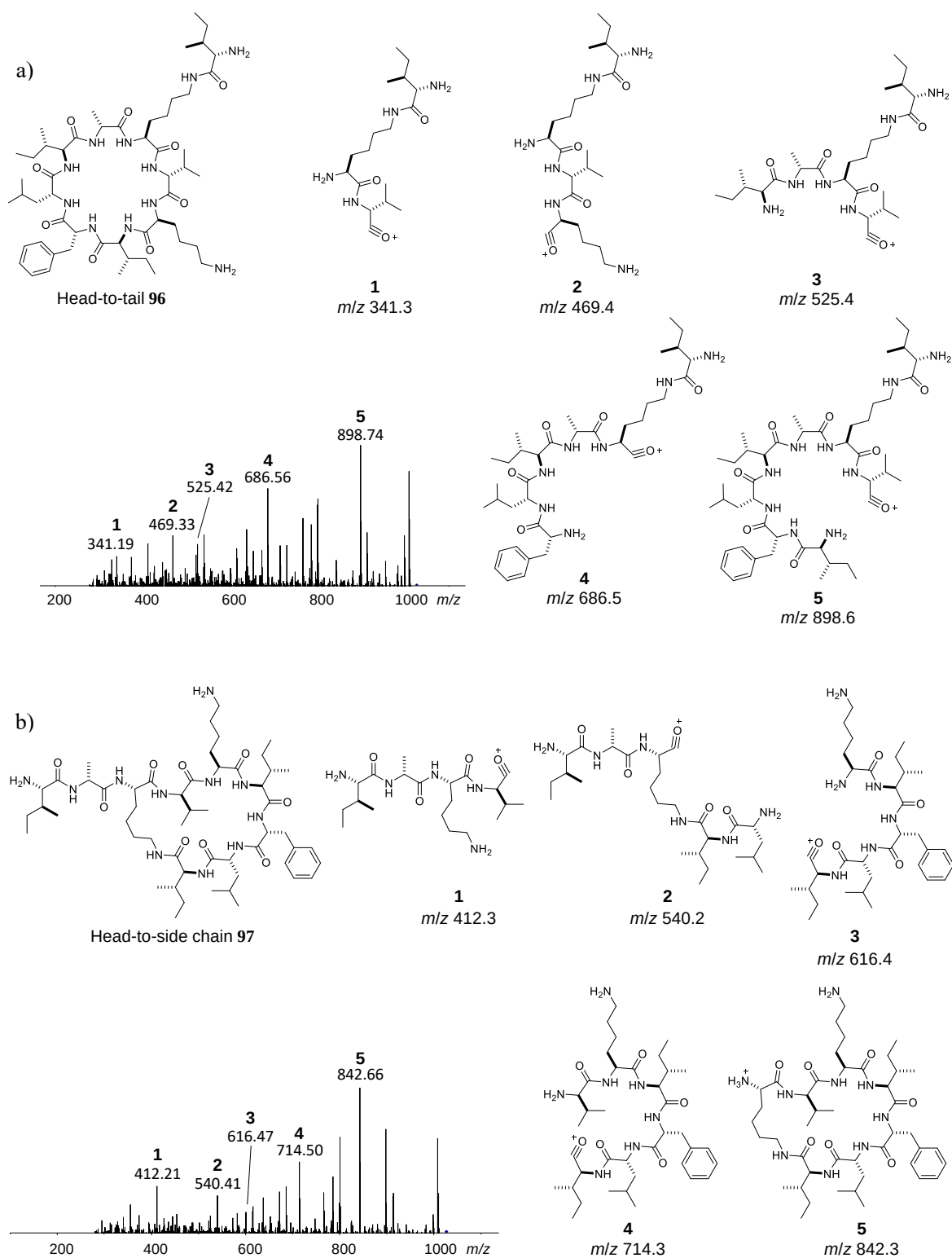


Figure 5-10. 酵素反応生成物の LC-MS/MS によるペプチドフラグメントの解析

a) Head-to-tail 環化体 **96** の化学構造と LC-MS/MS によるペプチドフラグメント解析

b) Head-to-side chain 環化体 **97** の化学構造と LC-MS/MS によるペプチドフラグメント解析

第四節 Head-to-side chain 型環状ペプチドの化学—酵素合成

前節にて、ヘテロキラルな残基間での環化反応を触媒する SurE の特性と擬似 N 末端を有する分岐型 EG 基質を利用することで、head-to-side chain 型環状ペプチドの化学—酵素合成法を確立した。次に、分岐型 EG 基質の一般適用性を検証するべく、複数の分岐型 EG 基質を化学合成し、SurE やそのホモログ酵素、および従来型の TE ドメインを用いて head-to-side chain 型環状ペプチドの化学—酵素合成を試みた。

まず、本手法における SurE の基質適用範囲を検証するべく、SB-EG をモデル基質として以下に示す 6 種類の分岐型 EG 基質を合成した。すなわち、SB-EG を構成する N 末端側の 6 残基を 1 残基ずつ、前節で用いた L-Lys と L-Ile からなるジペプチドユニットで置換した 6 種類の分岐型 EG 基質 **98-103** を合成した (**Figure 5-11a, b**)。なお、SB-EG の N 末端 L-Ile をジペプチドユニットに置換した分岐型 EG 基質 **98** では、N 末端 L-Lys の主鎖で head-to-tail 環化反応を起こす可能性が考えられたため、N 末端アミンをアセチル基で保護した基質を用いた。また、調製した分岐型 EG 基質 **98-103** の化学構造は MS/MS によるペプチドフラグメント解析によって決定した (pp. 283-296, **Figure S93-S106**)。分岐型 EG 基質 (**98-103**) を化学合成したのち、組換え SurE を用いた *in vitro* 酵素反応に供し、環化反応の進行を HPLC にて分析した (**Figure 5-11c, d** および p. 233, **Figure S7**)。 **Figure 5-11c** では head-to-side chain 環化反応が進行した場合をオレンジ色で、エステル部の加水分解反応が進行した場合を青色で示している。解析の結果、分岐型 EG 基質 **98** や **99** のような環サイズが中程度の大きさとなる基質を用いた場合では、擬似 N 末端と C 末端で環化した head-to-side chain 環化体へと定量的に変換されることが明らかとなった。その一方で、**100**、**101**、**102** や **103** のような環サイズが比較的小さくなる基質を用いた場合では環化体の生成は少量であり、エステル部の加水分解反応が優位に進行する結果となった。なお、酵素反応により生じた環化体や加水分解体の化学構造は MS/MS によるペプチドフラグメント解析によって決定した (pp. 284-298, **Figure S94-S108**)。前節、および上記の実験結果から、SurE は 7 残基相当以上の中程度の環サイズを有する head-to-side chain 型環状ペプチドの合成に適用できることが明らかとなった。

環サイズがより小さい head-to-side chain 型環状ペプチドへの適用を目指すため、SurE のホモログ酵素 WolJ を用いて分岐型 EG 基質の *in vitro* 酵素反応を試みた。WolJ は先述の通り、抗結核菌活性を有する環状ヘキサペプチド wollamide 類の生合成に関与する PBP-type TE であり、C 末端塩基性残基と N 末端 L-Trp での head-to-tail 環化反応を選択的に触媒する (Figure 4-22)。そこで、環化前駆体 *seco*-wollamide B1-EG (85) を構成する N 末端側の 5 残基を 1 残基ずつ、L-Lys と L-Trp からなるジペプチドユニットで置換した 5 種類の分岐型 EG 基質 (104-108) を化学合成した (Figure 5-12a, b)。なお、85 の N 末端 L-Trp をジペプチドユニットに置換した分岐型 EG 基質 104 では、N 末端 L-Lys の主鎖で head-to-tail 環化反応を起こす可能性が考えられたため、N 末端アミンをアセチル基で保護した基質を用いた。これら分岐型 EG 基質 104-108 を組換え WolJ を用いた *in vitro* 酵素反応に供し、環化反応の進行を HPLC にて分析した (Figure 5-12c, d および p. 234, Figure S8)。その結果、分子間反応を起こすことなく、108 以外のすべての基質において head-to-side chain 型環状ペプチドの生成が確認された。さらに、加水分解体の生成を抑制することを目的に 50% DMSO 水溶液にて酵素反応を行ったところ、いずれの基質においても環化体の生成率が向上することが明らかとなった。なお、酵素反応に用いた分岐型 EG 基質と酵素反応により生じた環化体や加水分解体の化学構造は、MS/MS によるペプチドフラグメント解析によって決定した (pp. 299-312, Figure S109-S122)。

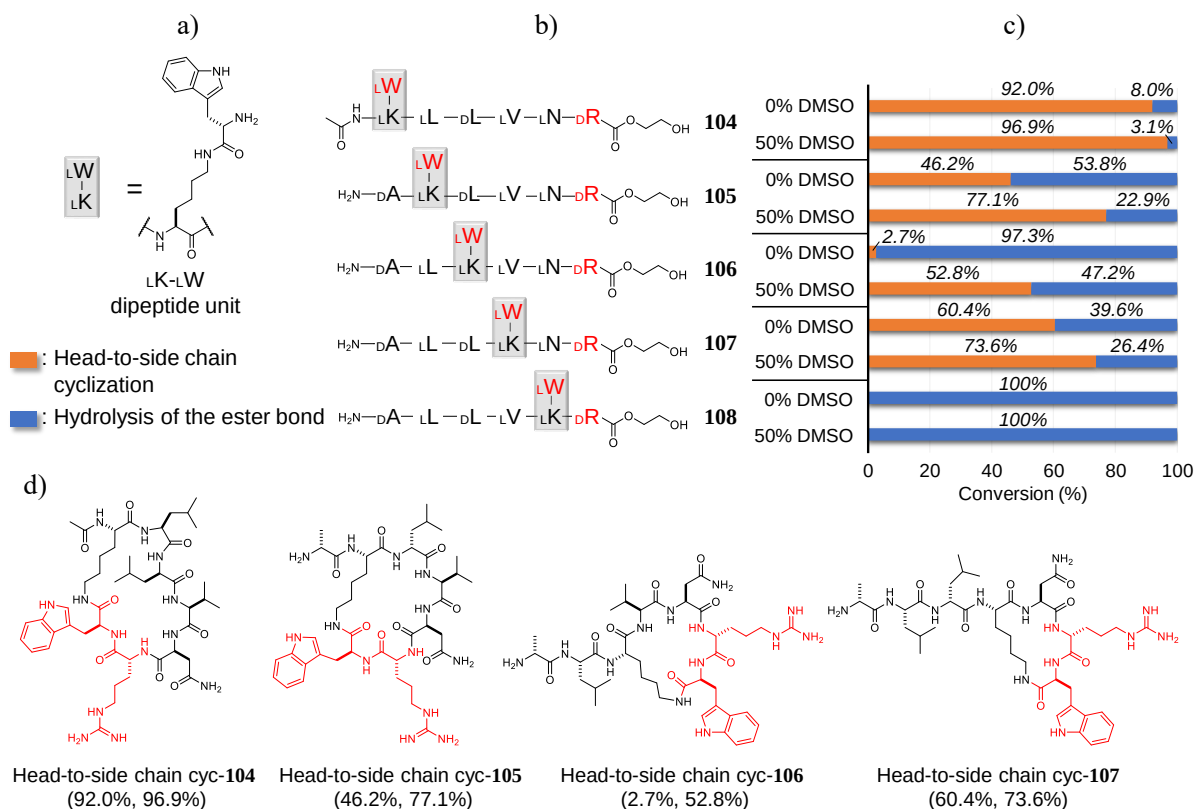


Figure 5-12. 分岐型 EG 基質 **104-108** と組換え WoIJ を用いた *in vitro* 酵素反応

- ジペプチドユニットの化学構造
- In vitro* 酵素反応に用いた分岐型 EG 基質のアミノ酸配列
環化点の残基を赤色で示した。
- In vitro* 酵素反応の HPLC 分析の結果
Head-to-side chain 環化体の生成をオレンジ色、加水分解体の生成を青色で示した。
- In vitro* 酵素反応で生じた head-to-side chain 型環状ペプチドの化学構造
酵素反応で生成した head-to-side chain 環化体を「Head-to-side chain cyc」と記した。
また、カッコ内に WoIJ の環化反応による環化体の生成率を示し、0% DMSO 水溶液を用いた際の生成率を左に、50% DMSO 水溶液を用いた際の生成率を右に示した。
また、環化点の残基を赤色で示した。

次に、従来型の TE ドメインに対する分岐型 EG 基質の適用を検証した。本実験では、環状ペプチド tyrocidine A の生合成に関与する TycC-TE に着目し検証を行った。TycC-TE は **Figure 4-24** で示す通り、C 末端 L-アミノ酸と N 末端 D-アミノ酸でのヘテロキラルな残基間での head-to-tail 環化反応を触媒する。そこで、環化前駆体をもとに以下に示す分岐型 EG 基質 **109** を化学合成し、組換えタンパク質 TycC-TE を用いた *in vitro* 酵素反応を行い、環化反応の進行を HPLC にて分析した (**Figure 5-13**)。その結果、分岐型 EG 基質 **109** は酵素依存的に消失し、91%の環化率で環化体 head-to-side chain cyc-**109** へ変換されることが明らかとなった。なお、酵素反応により生じた環化体の化学構造は合成標品とのカラム保持時間の比較により決定した。

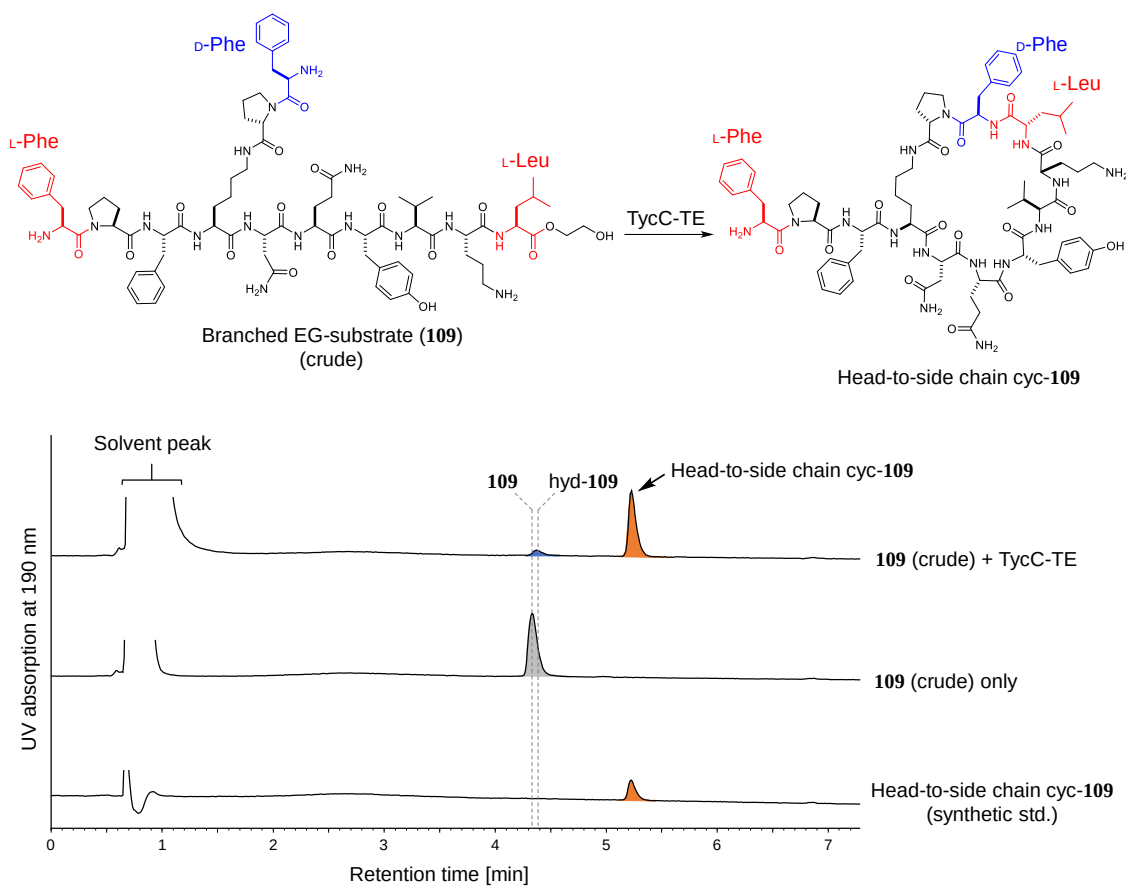


Figure 5-13. 分岐型 EG 基質 **109** と組換え TycC-TE を用いた *in vitro* 酵素反応

UV190 nm におけるクロマトグラムを示した。また、酵素反応で生成した head-to-side-chain 環化体、および加水分解体をそれぞれ「Head-to-side chain cyc」、および「hyd」と記した。

本手法における TycC-TE の基質適用範囲を検証するため、**Figure 4-24** で用いた環化前駆体 EG 基質 **87** を構成する N 末端側の 9 残基を 1 残基ずつ、L-Lys と D-Phe からなるジペプチドユニットで置換した 9 種類の分岐型 EG 基質 (**110-118**) を化学合成した (**Figure 5-14a, b**)。これら分岐型 EG 基質 **110-118** を組換え TycC-TE を用いた *in vitro* 酵素反応に供し、環化反応の進行を HPLC にて分析した (**Figure 5-14c, d** および p. 235, **Figure S9**)。その結果、全ての基質が酵素依存的に消失し、head-to-side chain 環化反応もしくは加水分解反応が進行することが明らかとなった。特に、環サイズの大きい基質 **110**、**111** を用いた際には、**70%** 以上の高い効率で head-to-side chain 型環化体へ変換された。また、本酵素においても上記と同様に 50% DMSO 水溶液中で酵素反応を行うことで、加水分解の抑制と環化体の生成率の向上が確認された。

以上の検証結果から、分岐型 EG 基質は SurE に限らず、様々なペプチド環化酵素に対しても適用可能であることが明らかとなった。本研究で用いた SurE、WolJ、TycC-TE はいずれも、もともと head-to-tail 環化反応に特化したペプチド環化酵素であるが、本研究はそれら酵素を head-to-side chain 型環状ペプチドの合成へと適用できることを示した初の例である。本研究で得られた知見は、ペプチド環化酵素のもつ応用可能性を広げるとともに、今後、より多様で複雑な骨格を有する環状ペプチドの合成へと応用できることが期待される。

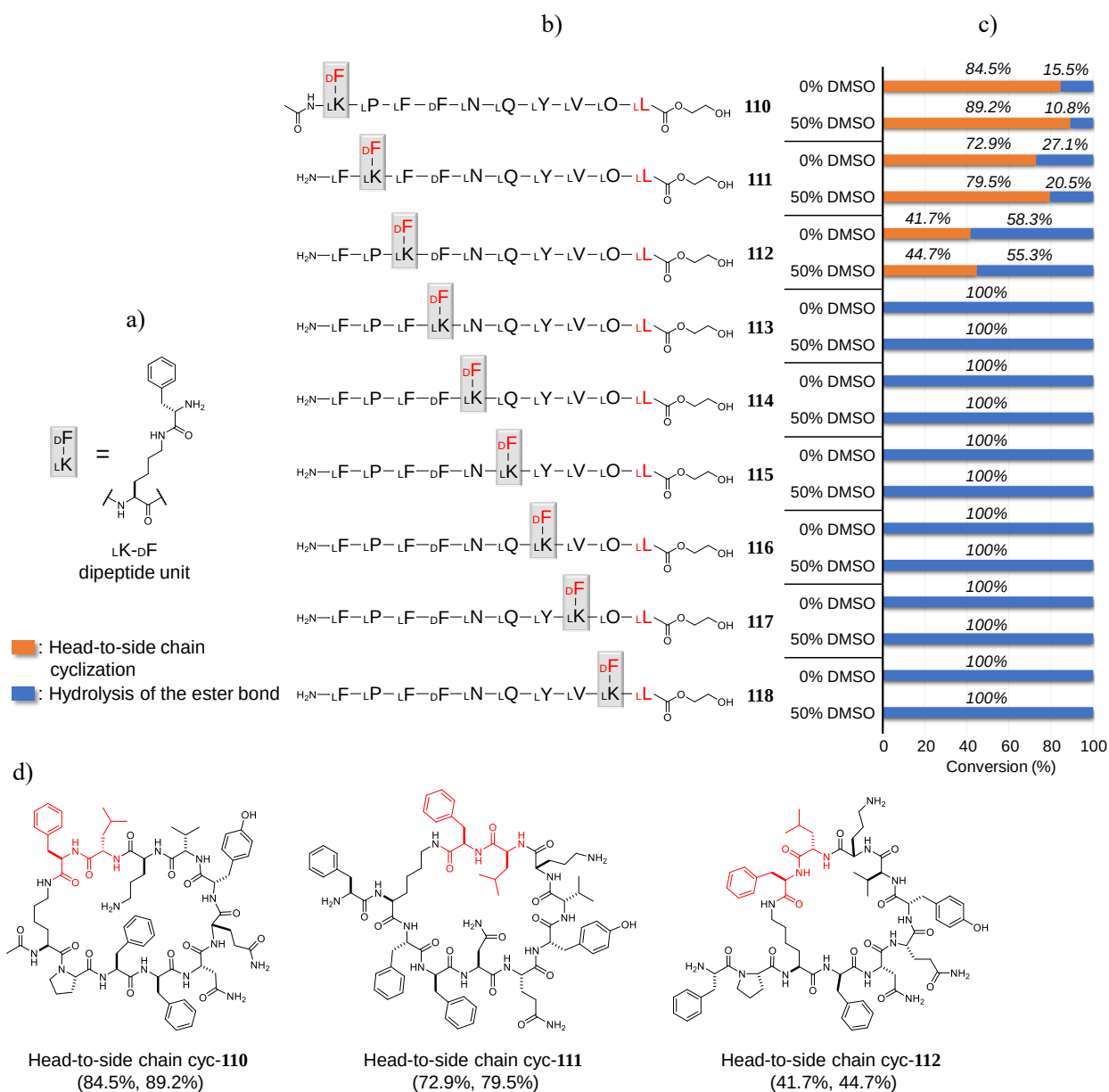


Figure 5-14. 分岐型 EG 基質 110-118 と組換え TycC-TE を用いた *in vitro* 酵素反応

- ジペプチドユニットの化学構造
- In vitro* 酵素反応に用いた分岐型 EG 基質のアミノ酸配列
環化反応に関わる残基を赤色で示した。
- In vitro* 酵素反応の HPLC 分析の結果
Head-to-side chain 環化体の生成をオレンジ色、加水分解体の生成を青色で示した。
- In vitro* 酵素反応で生じた head-to-side chain 型環状ペプチドの化学構造
酵素反応で生成した head-to-side chain 環化体を「Head-to-side chain cyc」と記した。
また、カッコ内に TycC-TE の環化反応による環化体の生成率を示し、0% DMSO 水溶液を用いた際の生成率を左に、50% DMSO 水溶液を用いた際の生成率を右に示した。
また、環化点の残基を赤色で示した。

第五節 セリン/スレオニンライゲーションの併用による構造展開

前節での研究にて head-to-side chain 型環状ペプチドの効率的な化学-酵素ハイブリッド合成法を確立した。本手法では、精製作業を行うことなく高収率かつ高純度で分岐型基質を供給することができ、続く酵素反応においても望みの head-to-side chain 環化体を無保護の状態で得ることができる。そのため、本手法とセリン/スレオニンライゲーションのような化学選択的な変換反応を組み合わせることで、環状ペプチドの合成と後続の誘導体展開を迅速かつ効率的に実施できると考えられる。

セリン/スレオニンライゲーション (STL: Serine/Threonine Ligation) は、2010 年に香港大学の Li らの研究グループが開発した Ser/Thr 残基選択的なアミド化反応である¹¹⁴ (Figure 5-15)。本反応では、ピリジン/酢酸混合溶液中、salicylaldehyde (SAL) ester と Ser や Thr のようなアミノアルコールを混合することで、官能基選択的かつ不可逆的なアシル転移が進行し、オキサゾリジン中間体が生成する。その後、酸による加水分解反応に供することで、SAL の放出を伴ってアミド化体が生成する。STL は、反応系中に複数の反応性官能基が存在する場合でも優れた化学選択性で所望のアミド体を与えるため、タンパク質のフラグメント合成や鎖状ペプチドの大環状化など、多方面で応用がなされている¹¹⁵⁻¹¹⁷。また、最近では北海道大学の市川先生、勝山先生らの研究グループが STL を利用した polymyxin 誘導体の構造展開と *in situ* スクリーニング法を報告した¹¹⁸。本手法では、環状ペプチドのスキヤニングと続く STL による構造展開をシームレスに行うことができるため、天然物よりも高い活性を有する polymyxin 誘導体や緑膿菌に選択的な polymyxin 誘導体を効率的に創出することに成功した。

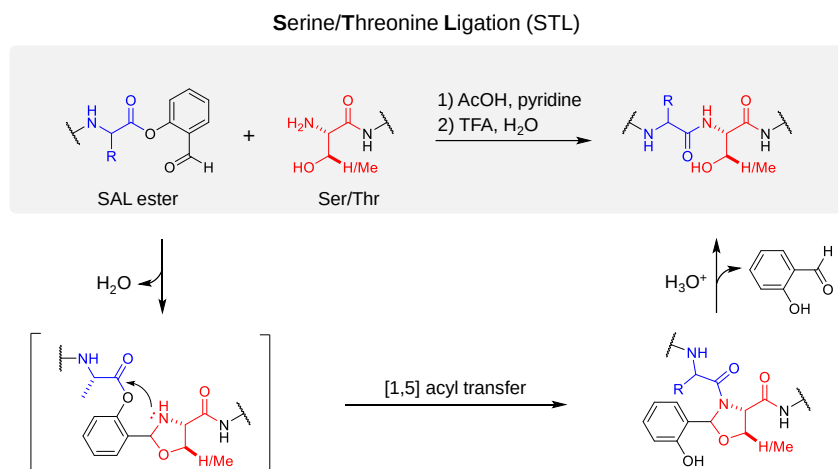


Figure 5-15. セリン/スレオニンライゲーションによるアミド化

本研究で確立した head-to-side chain 型環状ペプチドの化学-酵素合成法への STL の適用可能性を検証するため、**Figure 5-7** での酵素反応で使用した基質 **90** の主鎖 N 末端 D-Val を D-Ser に置換した分岐型 EG 基質 **119** を新たに設計・合成した (**Figure 5-16**)。なお、調製した分岐型 EG 基質 **119** の化学構造は MS/MS によるペプチドフラグメント解析によって決定した (p. 313, **Figure S123**)。基質を合成したのち、精製作業を行わずに 2.5 mM の基質 **119** と 25 μ M の組換え SurE を含む酵素反応液を調製し、常温で終夜インキュベートした。酵素反応液を HPLC にて分析した結果、分岐型 EG 基質 **119** が消失し、定量的に環化体 head-to-side chain cyc-**119** へ変換されることが明らかとなった (**Figure 5-17a**)。次に、得られた酵素反応液の溶媒を凍結乾燥により除去し、ピリジン/酢酸混合溶液を加え懸濁した。その後、得られた混合溶液に biphenyl-SAL ester **120** を加え、30 °C で終夜インキュベートし、反応の進行を HPLC にて分析した (**Figure 5-17b**)。その結果、環化体 head-to-side chain cyc-**119** が消失し、定量的にオキサゾリジン中間体 **121** へ変換された。最後に溶媒を留去し 50% TFA 水溶液による加水分解を行うことで、biphenyl 誘導体 **122** を得ることに成功した (**Figure 5-17c**)。なお、酵素反応で生じた環化体 head-to-side chain cyc-**119**、およびその biphenyl 誘導体 **122** の化学構造は MS/MS によるペプチドフラグメント解析によって決定した (pp. 314-315, **Figure S124-S125**)。

以上の検証から、酵素反応液のような夾雑物が複数共存する粗精製液を用いた場合にも STL は問題なく進行し、目的の N 末端修飾環状ペプチド誘導体を選択的に与えることが明らかとなった。本手法では、合成初期から合成終盤にかけて精製工程を一切行わずに複雑修飾ペプチドの合成とその誘導体展開を行うことができる。そのため、本手法を環状ペプチドのライブラリー合成へと適用することで、迅速かつ効率的なリード化合物の創出へと応用できることが期待される。

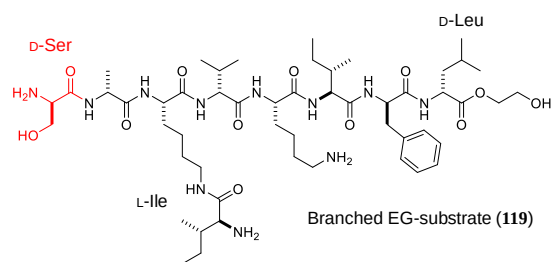


Figure 5-16. 分岐型 EG 基質 **119** の化学構造

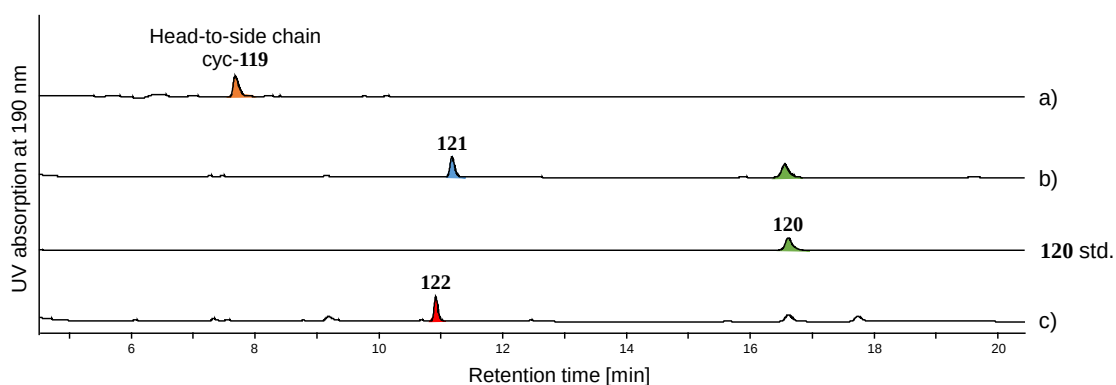
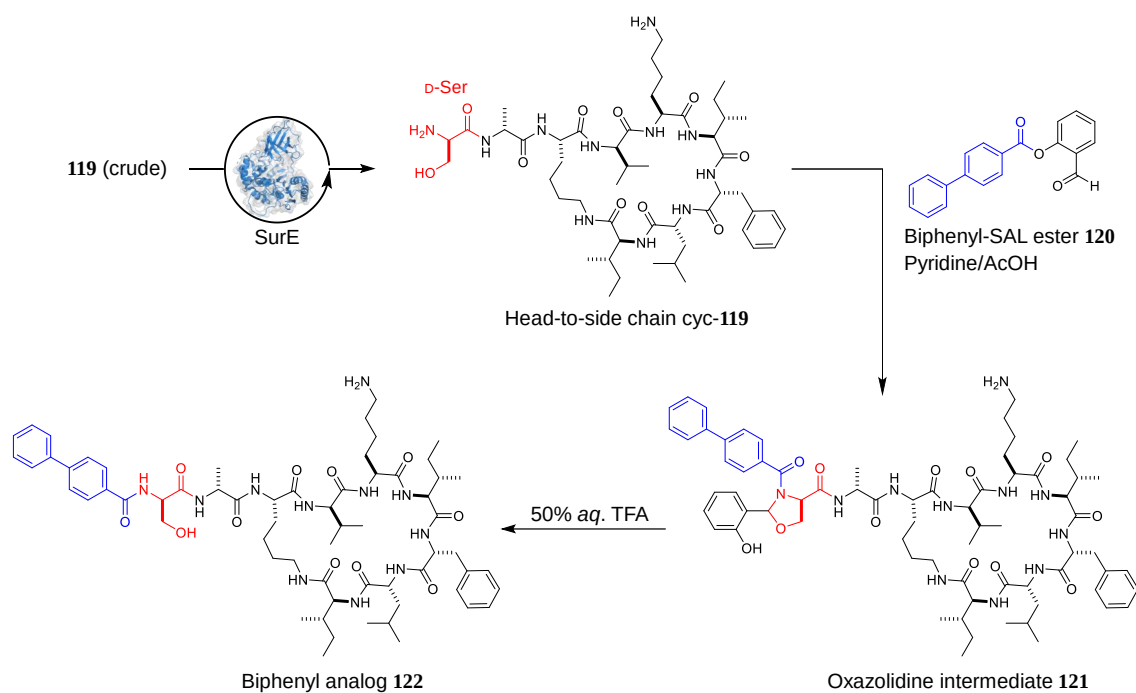


Figure 5-17. STL の併用による環状ペプチドの誘導体化

- a) Head-to-side chain 環化体の生成
- b) オキサゾリジン中間体 **121** の生成
- c) Biphenyl 誘導体 **122** の生成

第六節 小括

1. 第五章のまとめ

第五章では、SurE の生体触媒としての適用範囲の拡張を目指し、head-to-side chain 型環状ペプチドの化学-酵素合成を試みた。第四章にて確立した化学-酵素合成法では、合成できる環状ペプチドは一貫して head-to-tail 型環状ペプチドのみに限定されるため、その環化様式の乏しさが課題であった。そこで、有機合成的手法から着想を得た分岐型基質を SurE の酵素反応に用いることで、head-to-side chain 型環状ペプチドの酵素合成を達成した。本手法は、高収率かつ高純度で分岐型基質を供給することが可能であり、その後の酵素反応においても望みの環化体のみを選択的に与える。また、本手法による head-to-side chain 型環状ペプチドの合成は、SurE のみならず、その他の PBP-type TE や従来型の TE ドメインに対しても適用可能であった。本研究で得られた知見は非リボソームペプチド環化酵素のもつ応用可能性を広げるとともに、将来的にはより多様で複雑な骨格を有する環状ペプチドの創出へと応用できることが期待される。また、PBP-type TE は環化点となるアミノ酸残基の立体化学に対して厳密な選択性を示すため、複数の反応点が共存する場合においても位置選択的な環形成が可能である。そのため、酵素的な環化反応に用いられていなかった反応点を足掛かりとしてさらなる構造展開が可能であり、実際、酵素反応液を精製することなくセリン/スレオニンライゲーションに直接供することで、シームレスに構造展開を行うことができた。今後、様々な非リボソームペプチド環化酵素を本手法へと適用することで、環状ペプチドライブラリーの構築やシード化合物の効率的な創出に貢献できることが期待される。

第六章 総括と展望

アミド結合は、生物に必須なタンパク質をはじめ、天然有機化合物、医薬品やその他人工高分子に至るまで幅広い化合物の基本骨格を形成する普遍的な結合様式である¹¹⁹。そのため、アミド結合形成反応は有機合成上最も重要な反応の 1 つとして位置づけられており、その効率的合成法の開発が重要課題となっている¹¹⁹。20 世紀に入り、生物活性ペプチドが数多く単離報告されるに伴い、それらペプチド化合物の効率的全合成の必要性が増していった。Robert B. Merrifield らによるペプチド固相合成法の開発^{120, 121}を皮切りに、カルボジイミド系試薬や BOP 系試薬などの反応性に優れた縮合剤の開発研究が盛んに行われ、直鎖状ペプチドを高収率かつ簡便に化学合成することが可能となった¹²²⁻¹²⁵。その一方で、環状ペプチドの化学合成においては、ペプチド鎖 C 末端残基のエピメリ化、競合する分子間縮合による収率低下や合成後期にて煩雑な精製作業を必要とする点など、有機合成が発展した現代においても未だ多くの課題を残している。

一方で、天然から見出される環状ペプチドの生合成では、各ペプチドに特化したペプチド環化酵素が温和な条件下、保護基を用いることなく位置特異的なペプチド環化反応を効率よく触媒する。そのため、これら酵素を生体触媒として利用することで、既存の合成法を相補する効率的で環境調和性の高い環状ペプチド合成法の確立が期待できる。本研究では、新規ペプチド環化酵素の同定およびその生体触媒の開発を通じて、上記の課題解決に取り組んだ。

第二章では、NRPS により生合成される surugamide 類の生合成に着目し、その新奇な生合成機構、すなわち鎖状生合成中間体のペプチド環化機構と加水分解機構の解明を目指し研究に着手した。環状オクタペプチド surugamide A-E の生合成遺伝子クラスター中には、一般的な非リボソーム型環状ペプチドの生合成において生合成中間体の環化を触媒する TE ドメインが欠損しており、これまでに報告例のない新たな機構により生合成最終段階が触媒されることが示唆された。Surugamide 生産菌のゲノム情報を詳細に解析した結果、surugamide 類の生合成遺伝子クラスターの上流にコードされる Orf として *surE* を見出し、本酵素がペニシリン結合タンパク質 PBP と相同性を示すことを明らかとした。PBP は細菌の細胞壁生合成においてアミド結合形成を触媒する酵素であることから、SurE も PBP と同様の分子機構により鎖状生合成中間体の環化反応を触媒する可能性が考えられた。そこで、遺伝子破壊による *in vivo* 実験、および組換え酵素 SurE を用いた *in vitro* 実験を行い、surugamide A-E 生合成における SurE の機能を解析した。その結果、*surE* 遺伝子を欠損した株では surugamide A-E の生産が消失すること、また、大腸菌により調製した組換え酵素

SurE が surugamide 環化前駆体の SNAC 基質を効率よく環化することが判明した。以上の結果から、surugamide A-E 生合成における SurE を介した鎖状生合成中間体の環化機構を解明した。SurE は、NRPS 生合成において一般的なペプチド環化酵素である TE ドメインや PCP ドメインからの生合成中間体の切り出しを担う C_T ドメイン、R ドメインとは全く相同性を示さない一方で、PBP と相同性を示す。そのため、これを NRPS 生合成における新規ペプチド環化酵素 “PBP-type TE” と位置付けた。さらに、SNAC 基質を用いた同様の実験により、SurE は環状デカペプチド cyclosurugamide F の生合成にも関与することを明らかにした。これにより、SurE は surugamide A-E と cyclosurugamide F という構成残基や鎖長が全く異なる 2 種類の環状ペプチドの生合成に関与することが明らかとなり、寛容な基質選択性を有するペプチド環化酵素であることが強く示唆された (**Figure 6-1**)。本章の研究により、新規非リボソームペプチド環化酵素 SurE を同定し、NRPS 生合成の環化機構において新たな知見を得たとともに、本酵素の生体触媒としての利用可能性を見出した¹²⁶⁻¹²⁸。

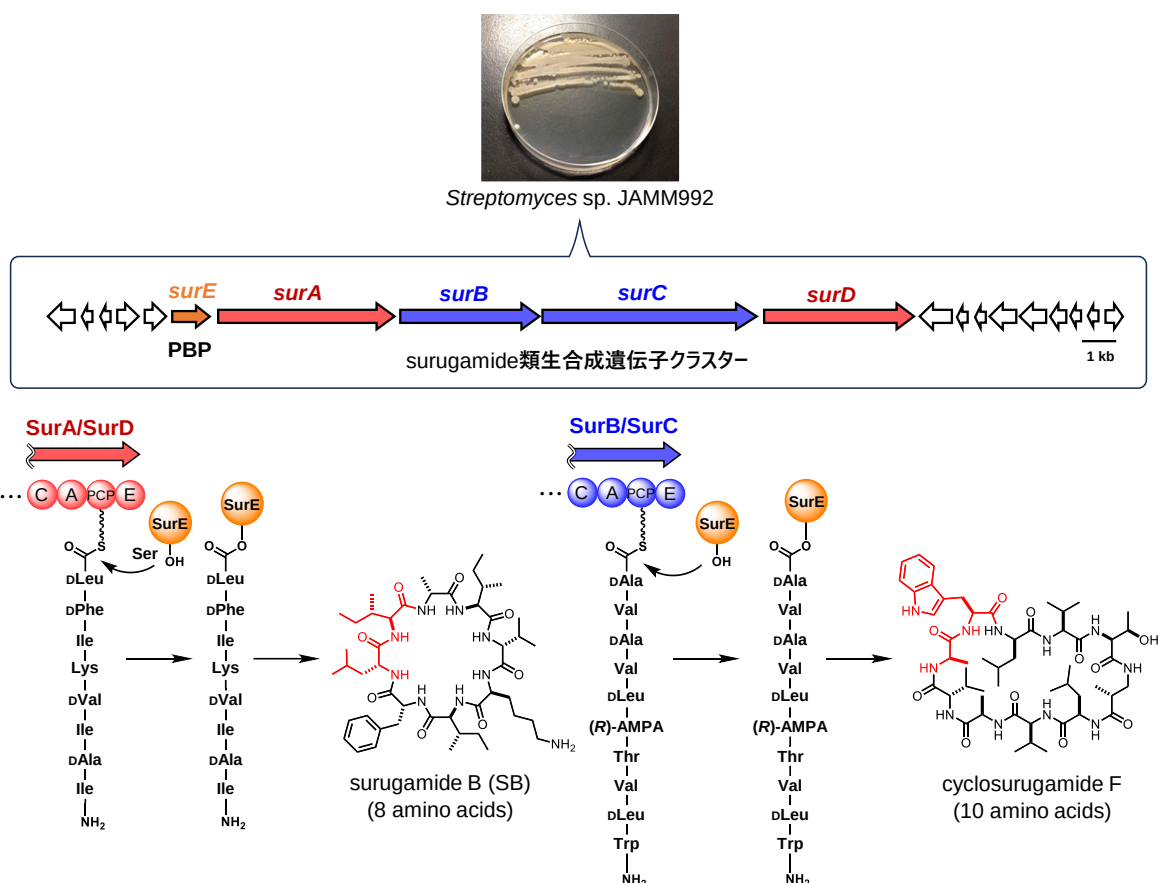


Figure 6-1. 新規非リボソームペプチド環化酵素 SurE によるペプチド環化

第三章では、第二章にて同定した新規ペプチド環化酵素 SurE に対して、基質選択性をはじめとした機能解析を行った。SurE は、第二章の結果から寛容な基質選択性を有することが示唆されたが、その基質適用範囲や基質認識機構は全く明らかでなかった。そこで本章では複数の SNAC 基質を化学合成し SurE の *in vitro* 酵素反応に供することで、本酵素の基質認識性の一端を解明することを目指した。検証の結果、SurE は C 末端に D-アミノ酸、N 末端に L-アミノ酸を有する鎖状基質の head-to-tail 環化反応を選択的に触媒する酵素であることが明らかとなった。また、酵素反応に用いる SNAC 基質のアラニンスキャニングにより、SurE は基質配列内部の残基に対して寛容な選択性を示すことが示唆された。また、上記に付随して SurE のホモログ酵素 (PBP-type TE) の探索と基質選択性の検証を行った。可溶性タンパク質として得られた 2 種類の PBP-type TE、SurE₁₄₉₈₈ と SurE₁₅₄₅₂ に対して、surugamide B の配列をもとに設計した SNAC 基質を用いて *in vitro* 酵素反応を行った。その結果、どちらの酵素も本来の基質とはかけ離れたアミノ酸配列を有する SNAC 基質を受け入れたことから、PBP-type TE ファミリー全体が寛容な基質選択性を有する酵素群であることが強く示唆された。本章の研究により、SurE やその他 PBP-type TE の基質選択性の一端を明らかにし、本酵素ファミリーの生体触媒としての利用可能性を提示した¹²⁹。

第四章では、SurE の触媒利用を目指す上で大きなボトルネックであった基質合成法の改良を行った。検討の結果、安価に入手可能な小分子である ethylene glycol を固相合成に組み込むことで、SurE の基質となる鎖状ペプチドを高収率かつ高純度で簡便に調製できる基質合成法を開発した。これにより、SNAC 基質の化学合成で課題であった ① 基質の収率の低さ・② 基質の純度の低さ・③ 煩雑な精製作業の必要性を一挙に解決した。さらに、開発した合成法を駆使して多数の基質を並列的に合成し、SurE の基質選択性を網羅的に検証した。その結果、SurE は基質 N 末端残基と配列内部の残基に対して寛容な選択性を有する一方で、基質 C 末端残基に対しては厳密な選択性を有することが明らかとなった。SurE の基質 C 末端残基に対する厳密な選択性を改変するため、ホモログ酵素 DsaJ との構造比較に基づく酵素改変を行った。その結果、野生型 SurE では環化できなかった C 末端 Gly の基質を環化可能な SurE 変異体を複数創出することに成功した。本章で開発した化学-酵素ハイブリッド合成法を駆使することで、アミノ酸のみから構成される単純な環状ペプチドだけでなく、PEG のような非アミノ酸残基を配列に含む環状ペプチドも効率よく合成することに成功した。また、作成した C 末端 Gly の基質を環化できる SurE 変異体を用いることで、タンパク質性アミノ酸のみで構成される環状ペプチドも効率よく合成し、本手法で合成できる環状ペプチドの多様性を拡張することに成功した。本研究成果により、精製作業を一度も行うことなく、高純度かつ高変換効率で環状ペプチドを合成できる新たな方法論を提示した¹³⁰ (Figure 6-2)。

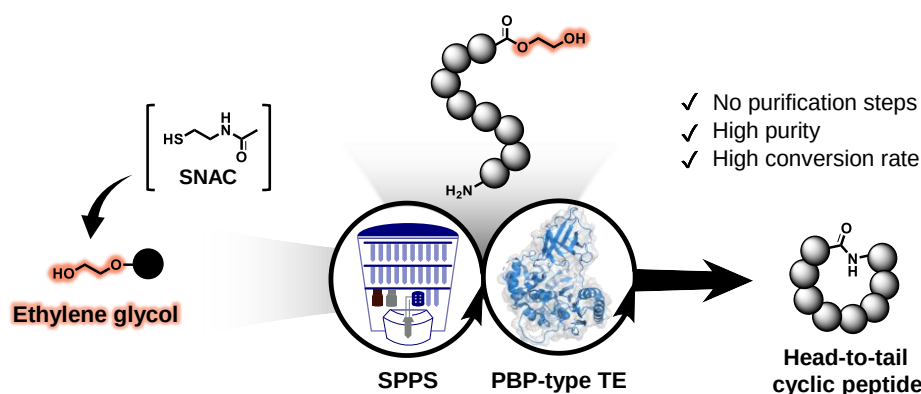


Figure 6-2. 本研究で確立した head-to-tail 型環状ペプチドの化学-酵素合成法

第五章では、SurE の生体触媒としての適用範囲を拡張するため、head-to-side chain 型環状ペプチドの化学-酵素合成を試みた。第四章にて確立した手法で合成できる環状ペプチドは一貫して head-to-tail 型環状ペプチドに限定されていた。そのため、daptomycin や polymyxin に代表される head-to-side chain 型環状ペプチドの合成には本手法は適用できなかった。そこで、有機合成的手法から着想を得た分岐型ペプチドを SurE の酵素反応の基質とすることで、head-to-side chain 型環状ペプチドの酵素合成を達成した (**Figure 6-3**)。本手法は前章と同様、高収率かつ高純度で分岐型基質を供給することができ、続く酵素反応においても位置選択的に望みの環化体を得ることができる。また、開発した分岐型基質は SurE 以外の PBP-type TE や従来型の TE ドメインに対しても適用可能であった。本章の実験で用いた SurE、WolJ、TycC-TE はもともと head-to-tail 環化反応に特化したペプチド環化酵素であるが、本研究はそれら酵素を head-to-side chain 型環状ペプチドの合成へと適用できることを示した初の例である。本研究で得られた知見は、非リボソームペプチド環化酵素の有する応用可能性を引き出すとともに、今後、より多様で複雑な骨格を有する環状ペプチドの創出へと応用できることが期待される。

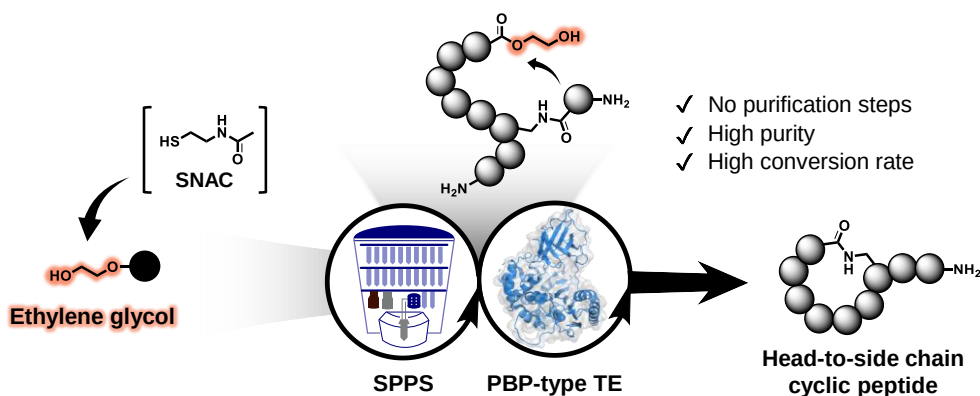


Figure 6-3. 本研究で確立した head-to-side chain 型環状ペプチドの化学-酵素合成法

以上、本研究では NRPS 生合成における新規ペプチド環化酵素 SurE の同定と機能解析、および本酵素の触媒利用を指向した基質合成法の改良を行い、環状ペプチドの効率的な化学-酵素ハイブリッド合成法を確立した。生体触媒の安定性や EG 基質に対する反応性などいくつかの課題を残すものの、今後、指向性進化をはじめとした酵素改変や PBP-type TE の探索研究を進めることで、環状ペプチドのスケール合成へと適用可能な方法論の開発に資することができる。また、本手法では精製作業を一度も行うことなく、環化体を高純度かつ高変換効率で得ることができるため、環状ペプチドライブラリーの創出などペプチド創薬の分野にも大きく貢献できるものと考えられる。

実験項

本研究では、以下の実験機器と試薬を用いた。

実験機器類

超純水装置	Elix®5 UV, Milli-Q Labo (Millipore)
オートクレーブ	LSX-500 (TOMY)
卓上遠心機	ExtraGene, CT15E himac (HITACHI)
冷却遠心機	CR 20F (HIMAC) angle rotor#R10A (volume 200 mL) MX-307 (TOMY) angle rotor# (volume 50 mL) KUBOTA6200, swing rotor#SF-722
天秤	XS204 (METTLER TOLEDO) FX-1200i (AND Company)
凍結乾燥機	FDU-2000 (EYELA)
ブロック恒温機	BSR-M002 INCUBATOR (Bio Medical Science Inc.)
恒温振とう培養機	CLE-303 CULTIVATION CHAMBER (TOMY)+MULTI SHAKER MMS (EYELA) Bio Shaker BR-23FP, BR-180LF-70RT (TAITEC)
クリーンベンチ	Biological Safety Cabinets CLASS II A2 (NuAire) KBB1303L (AIRTECH JAPAN, Ltd.)
アガロース電気泳動槽	MARINE 23ST (FUJIFILM)
アガロース撮影装置	Camera DMC-LX100 (Panasonic)
タンパク質電気泳動	Mini-PROTEIN® Tetra System, myPowerII300 AE-8135 (ATTA) WSE-1025 CompactPAGE Ace Twin
サーマルサイクラー	TP350, PCR Thermal Cycler Dice Touch (Takara Bio Inc.)
超音波破碎機	UD-100 ULTRASONIC DISRUPTOR (TOMY)
分光光度計	UV-1900i UV-VIS Spectrophotometer+TCC+100 (SHIMAZU)
DNA 定量	BioSpec-nano (SHIMAZU BIOTECH)
pH メーター	SevenMulti (METTLER TOLEDO)
HPLC	LC-20AD pump CTO-20A column oven
UPLC	NexeraXR LC-20AD pump SIL-20AC XR autosampler CTO-20AC column oven SPD-M20A diode array detector
LC-MS	amaZon SL-NPC (Bruker)

生化学関連試薬

40% (w/v) Acrylamide/Bis Mixed Solution	(NACALAI TESQUE, INC.)
Agar	(NACALAI TESQUE, INC.)
Agarose S	(NIPPON GENE CO., LTD.)
Ampicillin	(NACALAI TESQUE, INC.)
Ammonium sulfate	(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)
Ammonium peroxodisulfate	(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)
Bacto™ Trypton	(NACALAI TESQUE, INC.)
Bacto Yeast extract	(BD Biosciences)
Bradford reagent	(Bio-Rad)
CBB Stain One	(NACALAI TESQUE, INC.)
DNA polymerase	KOD One ® PCR Master mix -Blue- (TOYOBO)
EcoRI	(Takara Bio Inc.)
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	(Sigma-Aldrich)
λ-HindIII DNA marker	(Takara Bio Inc.)
HindIII	(Takara Bio Inc.)
Imidazole	(NACALAI TESQUE, INC.)
Isopropanol	(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)
IPTG	(NACALAI TESQUE, INC.)
Ligase Solution I	(Takara Bio Inc.)
2-meraptoethanol	(KANTO CHEMICAL CO.,INC.)
NdeI	(Takara Bio Inc.)
OneStep Marker	(NIPPON GENE CO., LTD.)
pET28a	(Novagen)
pUC19	(Takara Bio Inc.)
pColdII	(Takara Bio Inc.)
Protein Maker	(NACALAI TESQUE, INC.)
Sodium acetate	(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)
Sodium Chloride	(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)
Sodium hydroxide	(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	(NACALAI TESQUE, INC.)
TEMED	(NACALAI TESQUE, INC.)

有機合成関連試薬

Acetic acid	(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)
Acetonitrile	(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)
1,4-butanediol	(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)
2-chlorotriptyl chloride resin	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
DCM	(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)
DIPEA	(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)
Diethylene glycol	(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)
DIC	(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)
DMF	(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)
Ethylene glycol	(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)
HOAt	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
HFP	(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)
Methanol	(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)
Oxyma	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Piperidine	(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)
Pyridine	(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)
PyBOP	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
1,3-propanediol	(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)
SNAC	(Sigma-Aldrich)
TEA	(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)
TFA	(NACALAI TESQUE, INC.)
THF	(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)
2,4,6-trimethylpyridine	(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)
Fmoc-Gly-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-Ala-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-D-Ala-OH	(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)
Fmoc-Val-OH	(PEPTIDE INSTITUTE, INC.)
Fmoc-D-Val-OH	(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)
Fmoc-Leu-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-D-Leu-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-Ile-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-D- <i>allo</i> -Ile-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-Phe-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-D-Phe-OH	(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)
Fmoc-Trp(Boc)-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)

Fmoc-D-Trp(Boc)-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-Met-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-D-Met-OH	(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)
Fmoc-Cys(Trt)-OH	(Chem-Impex)
Fmoc-D-Cys(Trt)-OH	(Combi-Blocks)
Fmoc-Thr(tBu)-OH	(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)
Fmoc-D-Thr(tBu)-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-Ser(tBu)-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-D-Ser(tBu)-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-D-Tyr(tBu)-OH	(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)
Fmoc-Lys(Boc)-OH	(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)
Fmoc-Lys(Dde)-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-D-Lys(Boc)-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-His(Trt)-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-D-His(Trt)-OH	(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-D-Asp(OtBu)-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-D-Glu(OtBu)-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-Asn(Trt)-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-D-Asn(Trt)-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-Gln(Trt)-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-D-Gln(Trt)-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-Pro-OH	(PEPTIDE INSTITUTE, INC.)
Fmoc-D-Pro-OH	(PEPTIDE INSTITUTE, INC.)
Fmoc-Orn(Boc)-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-AEEA-OH	(WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)
Fmoc-AMPA-OH	(Sigma-Aldrich)
Boc-Ile-OH	(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)
Boc-D-Phe-OH	(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)
Boc-Trp(Boc)-OH	(Sigma-Aldrich)
Boc-D-Pro-OH	(Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)

本研究で使用した培地の組成を以下に示す。

Cia44 media

Dextrin	40 g
Glycerin	5.0 g
Pharmamedia	20 g
CuSO ₄	0.050 g
MgCl ₂	0.050 g
ZnSO ₄	0.050 g
pH	7.2
	1.0 L

TSB media

Trypton soya broth	30 g
Agar	15 g
	1.0 L

PC1 media

Starch	10 g
Molasses	10 g
Polypeptone	10 g
Meat extract	10 g
pH	7.2
	1.0 L

ISP2 media

Bacto tryptone	5.0 g
Bacto yeast extract	3.0 g
pH	7.0
	1.0 L

A1 media

Starch	40 g
Bacto yeast extract	5.0 g
Polypeptone	20 g
pH	7.0
	1.0 L

Q media

Glycerol	10 g
Molasses	10 g
Casein	10 g
Polypeptone	10 g
CaCO ₃	4.0 g
pH	7.2
	1.0 L

Avenolide-producing media

Glucose	60 g
NaCl	2.0 g
K ₂ HPO ₄	0.50 g
Yeast extract	2.0 g
MgCl ₂	0.050 g
ZnSO ₄	0.050 g
CaCO ₃	5.0 g
FeSO ₄	0.050 g
MgSO ₄	0.10 g
pH	7.2
	1.0 L

K media

Starch	25 g
Soy bean meal	15 g
Dry yeast	2.0 g
CaCO ₃	4.0 g
pH	6.2
	1.0 L

SFM media

Mannitol	20 g
Soya flour	20 g
Agar	20 g
	1.0 L

M4-Mg media

Starch	10 g
NaCl	1.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0 g
CaCO ₃	5.0 g
Trace metal sol.	1.0 mL
MgSO ₄	1.0 g
Agar	15 g
pH	7.2
	1.0 L

LB media (Agar)

Bacto tryptone	10 g
Bacto yeast extract	5.0 g
NaCl	10 g
(Agar)	15 g
	1.0 L

2xYT media (Agar)

Bacto tryptone	16 g
Bacto yeast extract	10 g
NaCl	5.0 g
	1.0 L

組換えタンパク質の精製に用いた試薬の組成を以下に示す。

Buffer A

Tris-HCl (pH 8.0)	20 mM
NaCl	150 mM

Buffer B

Tris-HCl (pH 8.0)	20 mM
NaCl	150 mM
Imidazole (pH 8.0)	20 mM

Buffer C

Tris-HCl (pH 8.0)	20 mM
NaCl	150 mM
Imidazole (pH 8.0)	500 mM

Solution B

Tris-HCl (pH 8.8)	1.5 M
SDS	0.4 %

Solution C

Tris-HCl (pH 6.8)	0.75 M
SDS	0.4 %

Separating gel

40% Acrylamide	4.5 mL
Solution B	3.0 mL
H ₂ O	4.5 mL
10% APS	108 μ L
TEMED	10.8 μ L

Stacking gel

40% Acrylamide	675 μ L
Solution C	750 μ L
H ₂ O	4.225 mL
10% APS	54 μ L
TEMED	9.0 μ L

Running buffer

Tris	3.03 g
Glycine	14.4 g
SDS	1.0 g
H ₂ O	1.0 L

Table of contents

General remarks

Supplementary method: synthesis of substrates mimics and synthetic standard

Table S1: Oligonucleotides used in this study

Table S2: Strains used in this study

Table S3: Plasmids used in this study

Table S4: Amino acid sequence of peptide cyclases used in this study

Table S5: Compounds used in this study

Table S6: 633 PBP-type TEs candidates

Figure S1: Exploration of PBP-type TEs in public database

Figure S2: SSN analysis of PBP-type TEs

Figure S3: *In vitro* reaction of SurE using diol-activated substrates (**S14-S16**)

Figure S4: *In vitro* reaction of SurE using SB-EG(I1X) variants (**36-53**)

Figure S5: *In vitro* reaction of SurE using I-(AEEAs)-DL-EG substrates (**54-60**)

Figure S6: *In vitro* reaction of SurE using SB-EG(DL8DX) variants (**61-77**)

Figure S7: *In vitro* reaction of SurE using branched EG-substrate (**98-103**)

Figure S8: *In vitro* reaction of WolJ using branched EG-substrate (**104-108**)

Figure S9: *In vitro* reaction of TycC-TE using branched EG-substrate (**110-118**)

Figure S10-S125: MS/MS spectra for synthetic EG-substrates and enzymatic products

General remarks

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a JEOL ECZ 500 (500 MHz for ^1H NMR) or a JEOL ECZ 400 (400 MHz for ^1H NMR) spectrometer or Bruker AVANCE Neo (500 MHz for ^1H NMR). Chemical shifts are denoted in δ (ppm) relative to residual solvent peaks as internal standard (DMSO- d_6 , ^1H δ 2.50, ^{13}C δ 39.5). ESI-MS spectra were recorded on a Thermo Scientific Exactive mass spectrometer or a SHIMADZU LCMS-2020 spectrometer. Optical rotations were recorded on a JASCO P-1030 polarimeter. High performance liquid chromatography (HPLC) experiments were performed with a SHIMADZU HPLC system equipped with a LC-20AD intelligent pump. All reagents were used as supplied unless otherwise stated. Oligonucleotides used for genetic manipulation were purchased from Fasmac Co., Ltd. (Kanagawa, Japan). Visualization of protein structure was performed by Maestro (Schrödinger). Protein structure prediction was performed by AlphaFold2⁹² with parameters set at default. Visualization of sequence similarity network was performed by Cytoscape (v3.9.1)¹³¹.

Deletion of *surE* gene

E. coli DH5 α was used as a host for general cloning. The approx. 2 kb upstream and downstream region *surE* gene were amplified by PCR using genomic DNA of *Streptomyces albidoflavus* (*S. albidoflavus*) NBRC12854 as template and cloned into pUC19 vector. A set of primers used to amplify the upstream region are as follow; SurE_del_up_forward: 5'-cgcgaattcaagcttCCTACTCGATCTCGACAG-3' (underlined characters indicate EcoRI site), SurE_del_up_reverse: 5'-tgctctagaCACTGCGTCCCCTGCGCC-3' (underlined characters indicate XbaI site). A set of primers used to amplify the downstream region are as follow; SurE_del_down_forward: 5'-tgctctagaCGTGCGCCATCAGTTTCG-3' (underlined characters indicate XbaI site), SurE_del_down_reverse: 5'-cccaagcttCCAGGAACCAGAGCCGTTC-3' (underlined characters indicate EcoRI site). The cloned fragments were sequenced for validation. The neomycin resistance marker (*aphII*) flanking *loxP* sequences was amplified by PCR with pKU479¹³² as a template using a set of primers, AphII_forward: 5'-tgctctagaCGGCCAGTGAATTCGAGCGACTCGAGT-3' (underlined characters indicate XbaI site), AphII_reverse: 5'-cccaagcttctagaCCGGGTACCGAGCGAACGCGTT-3' (underlined characters indicate XbaI site). These three fragments were integrated to generate a disruption cassette: upstream-*aphII*-downstream. The cassette was inserted into HindIII site of pGM160 Δ *aac1::oriT::pheS(A339G/T278S)::sacB::aph* to yield disruption plasmid, pGM160- Δ *surE*.

pGM160 Δ *aacI*::*oriT*::*pheS*(A339G/T278S)::*sacB*::*aph* is a derivative of pGM160 Δ *aacI*::*oriT*::*sacB*::*aph*¹³³ equipped with *pheS* (A339G/T278S) gene for counterselection by 4-chloro-DL-phenylalanine¹³³. The resultant disruption plasmid pGM160- Δ *surE* was introduced into *E. coli* GM2929 *hsdS*::Tn10/pUB307::Tn7¹³³ by electroporation. A 20-fold dilution of overnight culture of *E. coli* strain containing disruption cassette was mixed with spore suspension of *S. albidoflavus* NBRC12854 and spread onto M4-Mg media (10 g of soluble starch, 1.0 g of K₂HPO₄, 1.0 g of MgSO₄ • 7H₂O, 1.0 g of NaCl, 2.0 g of (NH₄)₂SO₄, 2.0 g of CaCO₃, 1 mL of trace metal sol. (1.0 g of FeSO₄ • 7H₂O, 1.0 g of MnCl₂ • 4H₂O, 1.0 g of ZnSO₄ • 7H₂O in 1 L of deionized water), 15 g of agar in 1 L of deionized water, pH was adjusted to 7.2, then autoclaved at 110 °C for 10 min supplemented with 20 mM MgCl₂. After incubation at 30 °C for 18 hours, 1 mL of sterile water containing 25 µg/ml of neomycin and 2000 µg/ml of aztreonam (TCI chemicals, Tokyo, Japan) were overlaid and further incubated for additional 5 days. Exoconjugants were transferred onto TSB plate containing 25 µg/ml of kanamycin, 12.5 µg/ml of nalidixic acid and 10 mM 4-chloro-DL-phenylalanine (Ark Pharm Inc.). The disruption of *surE* gene was confirmed based on PCR amplification using following primers; SurE_del_check_forward: 5'-GTGGTGCTCGCCCTCGGC-3'; SurE_del_check_reverse: 5'- GACCACCTCCGCCGAGCG-3'. The neomycin-resistance marker *aphII* flanking *loxP* sequences on the deletion region in the genome was removed by the expression of Cre recombinase encoded in pKU471¹³⁴. 20-fold dilution of overnight culture of *E. coli* GM2929 *hsdS*::Tn10/pUB307::Tn7 harboring pKU471 was mixed with spore suspension of the disruption mutant and spread onto M4-Mg media supplemented with 20 mM MgCl₂. After incubation at 30 °C for 18 hours, 1 mL of sterile water containing 25 µg/ml of thiostrepton and 2000 µg/ml of aztreonam were overlaid and further incubated for additional 5 days. Exoconjugants were transferred to TSB plate containing 12.5 µg/ml of nalidixic acid and 2 w/v% of D-xylose (for induction of *cre* gene). The desired Δ *surE* deletion mutants were selected by the neomycin-sensitive phenotypes and removal of resistance marker was confirmed by PCR amplification using the same primers that were used to check the insertion of neomycin resistance marker.

Construction of an expression plasmid of SurE

To facilitate nickel affinity column chromatography, recombinant SurE was expressed with His×6 tag at their *N*-terminus. DNA fragment coding for SurE was amplified by KOD Fx Neo (Toyobo) using a single set of primer SurE_Fw/SurE_Rv (SurE_Fw: CCGGAATTCCATATGGGTGCCGAG

GGGGCG, SurE_Rv: CCCAAAGCTTTCAGAGCCGGTGCATGGC, restriction enzyme was underlined). The genomic DNA of *S. albidoflavus* NBRC12854 was used as template. Amplified fragments were digested by EcoRI and HindIII and inserted into multicloning site of pUC19 (Takara) to afford SurE-pUC19. After sequence confirmation, the fragment was transferred to NdeI/HindIII site in multicloning site of expression vector pET28a (EMD Millipore) to generate SurE-pET28a.

Construction of expression plasmids of SurE₁₅₄₅₂ and SurE₁₄₉₈₈

The DNA fragment coding for PBP-type TE from *Streptomyces noursei* (*S. noursei*) NBRC15452 (Gene ID of SurE₁₅₄₅₂ in JGI database: 2603776488) was amplified from genomic DNA of *S. noursei* NBRC15452 using following primers; forward: 5'- ccggaaattcGTGCACGGGGACTCAGCGGATCC-3' (underlined characters indicate EcoRI site), reverse: 5'-cccaaagcttTTAGTGCGGCCGTGCGCCGTGG-3' (underlined characters indicate HindIII site) and KOD One® PCR Master Mix -Blue-. The fragment was transferred to EcoRI/HindIII sites of pET28a to generate SurE₁₅₄₅₂-pET28a for the expression of N-terminal His-tag fused SurE₁₅₄₅₂. The DNA fragment coding for PBP-type TE from *Goodfellowiella coeruleoviolacea* (*G. coeruleoviolacea*) NBRC14988 (Gene ID of SurE₁₄₉₈₈ in JGI database: 2596754607) was amplified from genomic DNA of *G. coeruleoviolacea* NBRC14988 using following primers; forward: 5'-ccggaaattcGTGCCCAACGAGCAGGATCTCGGG-3' (underlined characters indicate EcoRI site), reverse: 5'-cccaaagcttTCATCCGGTCACCTGCCGCCGC-3' (underlined characters indicate HindIII site) and KOD One® PCR Master Mix -Blue-. The fragment was transferred to EcoRI/HindIII sites of expression vector pET28a (EMD Millipore) to generate SurE₁₄₉₈₈-pET28a for the expression of N-terminal His-tag fused SurE₁₄₉₈₈. Both SurE₁₅₄₅₂ and SurE₁₄₉₈₈ were expressed and purified in the same manner as SurE.

Construction of an expression plasmid of SurE mutant (H225A)

The DNA fragment coding for SurE variant H225A was amplified with a set of primers; forward: 5'-GCCGAGCACGTCGACGCCATGGCCTCGCTCTCG-3', reverse: 5'-CGAGAGCGAGGCCATGGCGTCGACGTGCTCGGC-3' using SurE-pUC19 as a template and KOD One® PCR Master Mix -Blue- (TOYOBO) as polymerase. The amplified fragment was introduced into *E. coli* DH5a and a circular plasmid was extracted from cell. After validating nucleotide sequence, the insert coding for SurE (H225A) was transferred to multi-cloning site of pET28a using a pair of restriction enzymes EcoRI/HindIII, to give an expression vector for N-terminal

His tag-fused SurE (H225A). Procedures for expressing, purifying enzyme, and assay conditions are same as that for wild type enzyme.

Construction of expression plasmids of SurE mutants (G235A, G235V, G235I and G235L)

The DNA fragments coding for SurE mutants were amplified with a set of primers listed in Table S1, SurE (G235A)_Fw/SurE (G235A)_Rv, SurE (G235V)_Fw/SurE (G235V)_Rv, SurE (G235I)_Fw/SurE (G235I)_Rv and SurE (G235L)_Fw/SurE (G235L)_Rv by KOD One® PCR Master Mix -Blue- (TOYOBO), using SurE-pUC19 as a template. The amplified fragments were individually introduced into *E. coli* DH5 α and circular plasmids were extracted from cell. After validating nucleotide sequence, the inserts were transferred to multicloning site of pET28a using a pair of restriction enzyme EcoRI/HindIII, to give expression plasmids for *N*-terminal His tag-fused SurE mutants.

Construction of an expression plasmid of TycC-TE

DNA fragment encoding codon-optimized TycC-TE (UniProtKB/Swiss-Prot: O30409.1) with His6-tag at *C*-terminus was synthesized by Fasmac (Japan). The fragment was transferred to NdeI/HindIII sites of pET28a to give TycC-TE-pET28a, an expression plasmid for TycC-TE with His6-tag fused at its *N*-, and *C*-termini.

Construction of an expression plasmid of WolJ

DNA fragment encoding codon-optimized WolJ (GenBank: UNO41476.1) was synthesized by Twist Bioscience (CA). The fragment was transferred to NdeI/HindIII sites of pColdII (Takara) to give WolJ-pColdII, an expression plasmid for WolJ with His6-tag fused at its *N*-terminus.

Enzyme expression and purification

200 mg/mL ampicillin and 50 mg/mL kanamycin were used for the selection of *E. coli* host harboring pColdII-based plasmids and pET28a-based plasmids, respectively. The expression plasmids were introduced into *E. coli* BL21 (DE3) and a single colony was inoculated into 10 mL of 2 $\times$ YT media (1.6% Bacto tryptone, 1.0% Bact yeast extract, 0.5% NaCl) containing an appropriate antibiotic and was cultured at 37 °C for overnight as seed culture. 2.0 mL of cultural broth was transferred to 200 mL of 2 $\times$ YT media containing an appropriate antibiotic and culture at 37 °C for three hours. The broth was cooled on ice and 0.1 mM of IPTG was added to induce the expression of recombinant

enzymes. *E. coli* was cultured at 16 °C for overnight. Cell was washed with wash buffer (Buffer A: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl), then successively homogenized by sonication. Cell debris were precipitated by centrifugation with $20,630 \times g$ for 20 min at 4 °C, then the supernatant was subjected to Ni-NTA His-Bind® resin (Merck Millipore), which was equilibrated by lysis buffer (Buffer B: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 20 mM imidazole pH 8.0). The column was washed with additional lysis buffer, then eluted with elution buffer (Buffer C: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 500 mM imidazole pH 8.0). Imidazole was removed by an Amicon Ultra 0.5 ml filter (Merck Millipore). The concentrations of proteins were measured using a Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad).

Detection of cyclosurugamide F in culture broth of *Streptomyces albidoflavus* NBRC 12854

Streptomyces albidoflavus NBRC12854 was grown on TSB plate at 30 °C for 2-4 days. A single colony was picked and transferred to 10 mL of TSB liquid media and cultivated at 30 °C for 2 days as pre-culture. The pre-culture was then inoculated to a flask containing 100 mL K media (2.5% soluble starch, 1.5% soybean meal, 0.2% dry yeast, 0.4% CaCO₃ and the pH was adjusted to 6.2) and incubated at 30 °C with shaking at 140 rpm. 5 mL volume of broth were withdrawn, and cells were harvested by centrifugation at 4,000 rpm and extracted with H₂O/acetone (= 1 : 2). The extract was filtered to remove debris and evaporated to remove solvent. The residue was dissolved into DMSO and subjected to LC-MS analysis.

Kinetic analysis

To determine the kinetic parameters of SurE against *seco*-surugamide B-SNAC (**7**) and SB-EG (**35**), and SurE (H225A) against *seco*-surugamide B-SNAC (**7**) respectively, 50 µL of reaction buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 µM enzyme and 6.25-800 µM substrates were incubated at 30 °C for 5 min. The reaction was quenched by adding 50 µL MeOH and centrifuged with $20,630 \times g$ for 10 min at 4 °C. 5 µL of supernatant was subjected to HPLC. The concentrations of peptides were estimated based on the extinction coefficient (190 nm) that were experimentally determined. E (190 nm) values for **7** and **35** were assumed to be equal. The initial velocities were calculated assuming equal ϵ (190 nm) value for substrates and corresponding cyclic products. All reaction was carried out in triplicates. Kinetic parameters were estimated using Michaelis-Menten equation and curve-fitting program Kaleidagraph.

LC-MS and HPLC analysis

The yields of enzymatic reaction were determined by HPLC analysis. The concentration of enzymatic products was estimated based on the extinction coefficient ϵ (210 nm), which was determined experimentally. ϵ (210 nm) values were assumed to be equal for EG esters and corresponding enzymatic products.

LC-MS/MS analysis

Samples were separated with a SHIMADZU HPLC system equipped with a LC-20AD intelligent pump. LC-MS/MS experiments were performed with amaZon SL-NPC (Bruker Daltonics). Fragmentation of precursor ions were also performed with amaZon SL-NPC using helium gas with amplitude value 1.0 V.

General procedure for solid-phase peptide synthesis (SPPS).

Step 1: Fmoc group of the solid supported peptide was removed by using 20% piperidine/DMF (10 min, room temperature) and additional solution containing DMF/DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-ene)/piperidine (93%/2%/5%) solution (5min, room temperature).

Step 2: The resin in the reaction vessel was washed with DMF ($\times 3$) and CH_2Cl_2 ($\times 3$).

Step 3: To the solution of Fmoc-protected building blocks (4 eq) were added DIC (4 eq in DMF) and Oxyma (4 eq in DMF). After 2~3 min of pre-activation, the mixture was injected to the reaction vessel. The resulting mixture was mixed for 30 min at 40 °C.

Step 4: The resin in the reaction vessel was washed with DMF ($\times 3$) and CH_2Cl_2 ($\times 3$). Amino acids were condensed onto the solid support by repeating Step 1-4.

Loading rate: Add 20% piperidine in DMF (1 mL) to the dried Fmoc-aa-2-chlorotriyl resin, and then shake the tube for 1 h. Dilute the supernatant 100-fold with DMF and subject it to UV measurement at 301 nm. The loading efficiency is calculated from the UV absorbance as follows.

$$\text{Loading (mmol g}^{-1}\text{)} = \frac{(A_{301} \times 1000)}{M_{\text{resin}}[\text{mg}] \times 7800 \times \text{dilution rate}}$$

Where A_{301} = UV absorbance at 301 nm, M_{resin} = mass of the resin used for quantification

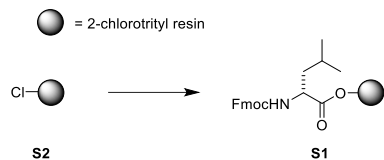
Bioinformatics

Exploration of PBP-type TEs in public database: Candidates of PBP-type TEs were retrieved by blastp search from nr database (downloaded in February 12, 2022) using SurE as a query with the *E*-value was set at 10, which yielded 75,385 sequences. As SurE and other referential PBP-type TEs consist of *N*-terminal PBP domain (1–350 in SurE) and *C*-terminal lipocalin domain (368–451 in SurE), those showing similarities to entire SurE sequence were selected (*qstart* < 50, *qend* > 400). Also, as the length of SurE and other referential PBP-type TEs are approximately 450 (451 for SurE), those with less than 400 aa length or more than 500 aa lengths were excluded. These selections yielded 2,309 candidates. For further selection, the genome neighborhoods of these candidates were investigated. PBP-type TEs genes are co-localized with the genes encoding NRPS assembly-line with epimerization domains (E domains) at their *C*-terminus. This is consistent with the strict requirement of SurE for D-amino acid at substrate *C*-terminus. For simplification, we tentatively refer to the E domains at *C*-terminus of NRPSs as *E_{ter}* domain. Flanking ± 80 kb regions of 2,309 candidates were inspected for the presence of *E_{ter}* domains by the combination of hmmscan with PF005001 (AMP-binding) as a query and blastp with *E_{ter}* of SurD (GenBank: BBZ90018.1) as a query. Parameters were set at default. Among the 2,309 candidates, those co-occurring with *E_{ter}* domains are clustered in a sequence similarity network (SSN) that was generated by all-vs-all blastp with *E*-value set at 1×10^{-90} (Figure S9). 652 sequences in these clusters were selected as candidates of PBP-type TEs. After the removal of redundant sequences, 632 sequences were obtained. Finally, WolJ (GenBank: UNO41476.1), a PBP-type TE encoded in a recently reported BGC of wollamide (*wol*)⁹⁷ was added, then total 633 proteins were subjected to all-vs-all blastp analysis with *e*-value at 1×10^{-175} to generate the network shown in **Figure 4-30** and **Figure S2**. Visualization of sequence similarity network was performed by Cytoscape (v3.9.1)¹³¹.

Substrate-binding pockets of PBP-type TEs: 633 PBP-type TEs were aligned by MUSCLE (v3.8.1551)¹³⁵ with default parameters. The positions of the pocket-forming residues were retrieved by SeqKit (v2.0.0)¹³⁶ subseq function from the alignment. The sequence of the pocket-forming residues was subjected to Compute pI/Mw webtool (Expasy, https://web.expasy.org/compute_pi/)¹³⁷ to calculate pI and molecular weight.

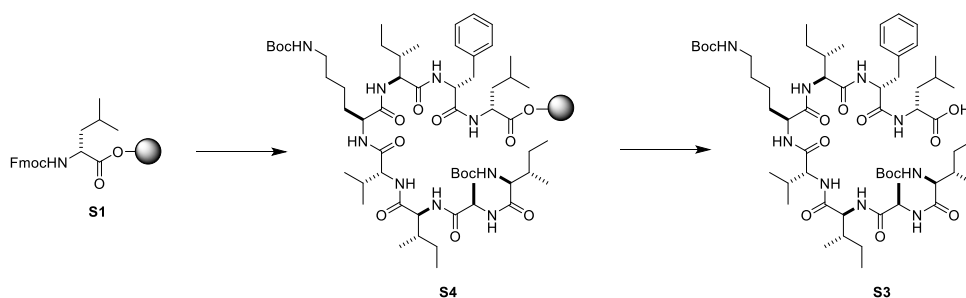
Synthesis of SNAC-activated linear peptides

seco-surugamide B-SNAC (7)

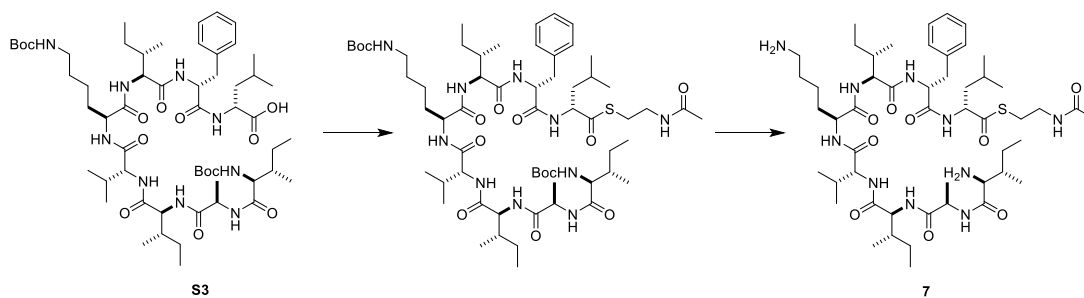


Fmoc-D-Leu-2-chlorotrityl resin (S1): 2-Chlorotrityl resin (**S2**) (100 mg, 0.160 mmol) in Libra tube was swollen with CH_2Cl_2 for 30 min, and then excess solvent was removed by filtration. To the resin was added a solution of Fmoc-D-Leu-OH (113 mg, 0.318

mmol) and DIPEA (168 μL , 0.960 mmol) in CH_2Cl_2 (0.5 mL), and stirred for 1 h at 40 $^\circ\text{C}$. The reaction mixture was filtered, washed with DMF ($\times 3$), CH_2Cl_2 ($\times 3$), methanol, and $\text{Ac}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (= 1:4), then dried under vacuum for 1 h to give Fmoc-D-Leu-2-chlorotrityl resin **S1** (142.3 mg). Dried Fmoc-D-Leu-2-chlorotrityl resin (5.8 mg) was added with 20% piperidine in DMF and stirred for 1 h. The supernatant was diluted with DMF and was subjected to UV measurement at 301 nm. The loading rate was determined to be 1.207 mmol/g.

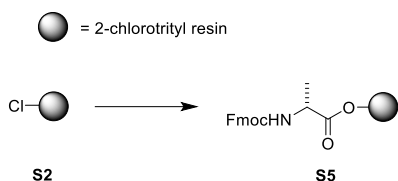


S3: Fmoc-D-Leu-2-chlorotrityl resin **S1** (loading rate: 1.207 mmol/g, 0.0500 mmol, 41.1 mg) in Libra tube was swelled in CH_2Cl_2 for 1 h, which was then subjected to 7 cycles [Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-D-Val-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-D-Ala-OH, Boc-L-Ile-OH] of the SPPS protocol (Steps 1-4) and then SPPS protocol (Steps 1 and 2) to afford resin-bound peptide **S4**. To peptide **S4** was added HFP (= 70:30) (0.5 mL), being stirred for 30 min, and then the reaction mixture was filtered. This procedure was repeated twice. The filtrate was concentrated and azeotroped with toluene ($\times 3$) to afford crude peptide **S3**, which was used in the next reaction without further purification.



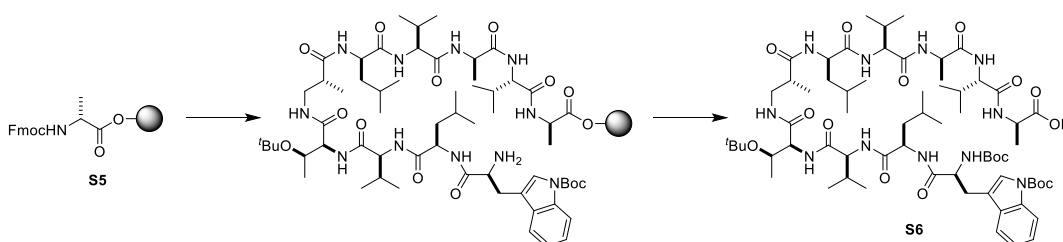
***seco-surugamide B*-SNAC (7):** To the peptide **S3** in DMF (1 mL) were added *N*-acetylcysteamine (12 mg, 0.1 mmol), 2,4,6-collidine (6.6 μ L, 0.05 mmol), HCTU (22.8 mg, 0.055 mmol). After being stirred overnight at room temperature, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NH_4Cl . The resulting solution was extracted with EtOAc ($\times 3$). The organic layer was washed with brine, dried over MgSO_4 , and filtered. The solution was concentrated and azeotroped with toluene ($\times 3$). To the residue was added a cleaving cocktail of TFA/ H_2O /TIS = 95:2.5:2.5 (1.00 mL) to remove the protecting group. After being stirred for 1 h, the reaction mixture was diluted with Et_2O (24 mL), centrifuged at $3500 \times g$ for 5 min at 4 $^\circ\text{C}$, and Et_2O layer was removed by decantation to afford **7**. This procedure was repeated twice. The obtained crude peptide **7** was purified by reversed phase HPLC (COSMOSIL Cholest 10 $\times$ 250 mm, nacalai tesque) with MeCN: H_2O (= 40:60) containing 0.05% TFA to afford peptide **7** (15.3 mg, 30% for 17 steps) as a white solid: $[\alpha]_{\text{D}}^{26}$ -4.3 (*c* 1.00, MeOH); ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.58-8.52 (d, 2H, J = 7.3 Hz), 8.20-8.19 (d, 1H, J = 6.8 Hz), 8.15-7.95 (m, 7H), 7.89-7.70 (m, 2H), 7.31-7.14 (m, 5H), 4.68-4.58 (m, 2H), 4.58-4.43 (m, 2H), 4.31-4.20 (m, 2H), 4.12-4.07 (t, 1H, J = 7.3 Hz), 3.73-3.67 (br, 1H), 3.20-3.16 (dd, 1H, J = 14.0, 3.2 Hz), 3.16-3.10 (q, 2H, J = 6.3 Hz), 2.88-2.83 (t, 2H, J = 7.3 Hz), 2.79-2.65 (m, 3H), 2.11-1.90 (m, 1H), 1.78 (s, 3H), 1.75-1.35 (m, 10H), 1.35-0.95 (m, 9H), 0.95-0.74 (m, 27H), 0.67-0.63 (t, 3H, J = 7.3 Hz), 0.53-0.49 (d, 3H, J = 6.3 Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 201.2, 171.7, 171.4, 171.3, 170.8, 170.7, 169.3, 168.0, 167.2, 137.7, 129.1, 127.9, 126.1, 57.7, 57.6, 57.2, 56.5, 56.3, 53.8, 52.0, 48.1, 40.4, 38.7, 38.1, 37.3, 36.9, 36.4, 36.1, 31.1, 30.7, 27.5, 26.5, 24.0 ($\times 2$), 23.9, 23.8, 22.8, 22.4, 22.2, 21.0, 19.4, 19.1, 17.8, 15.3, 14.8, 14.4, 11.0 ($\times 2$); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{51}\text{H}_{88}\text{N}_{10}\text{O}_9\text{SNa}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1039.6349, found 1039.6367.

seco-surugamide F-SNAC (12)

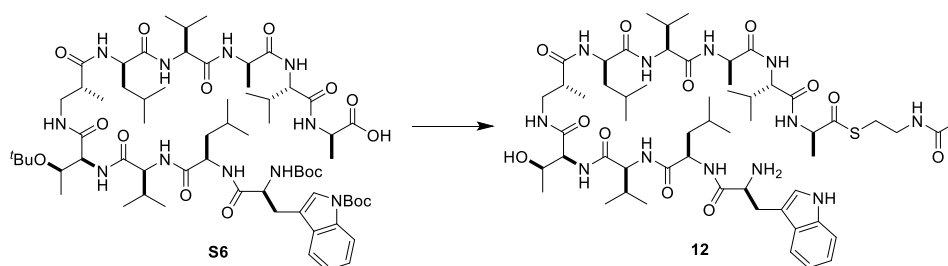


Fmoc-D-Ala-2-chlorotrityl resin (S5):

2-chlorotrityl resin **S2** (37.5 mg, 0.05 mmol), in Libra tube was swollen with CH_2Cl_2 , and excess solvent was removed by filtration. To the resin was added a solution of Fmoc-D-Ala-OH (15.6 mg, 0.05 mmol) and DIPEA (26.1 μL , 0.15 mmol) in CH_2Cl_2 (0.5 mL), and stirred for 1 h. The reaction mixture was filtered, washed with DMF ($\times 3$), CH_2Cl_2 ($\times 3$) to afford **S5**. Dried Fmoc-D-Ala-2-chlorotrityl resin (6.5 mg) was added with 20% piperidine in DMF and stirred for 1 h. The supernatant was diluted with DMF and was subjected to UV measurement at 301 nm. The loading rate was determined to be 1.172 mmol/g.



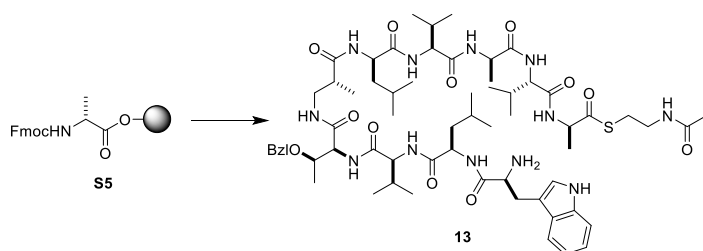
S6: Fmoc-D-Ala-2-chlorotrityl resin **S5** (loading rate: 1.172 mmol/g, 0.0500 mmol, 42.7 mg) in Libra tube was swelled in CH_2Cl_2 for 1 h, which was subjected to 9 cycles [Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-D-Ala-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-D-Leu-OH, Fmoc-DL-AMPA-OH, Fmoc-L-Thr(*t*Bu)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-D-Leu-OH, Boc-L-Trp(Boc)-OH] of the SPPS protocol (step 1-4) to afford the resin-bound peptide. To the peptide was added CH_2Cl_2 /HFP (= 70:30) (0.5 mL), being stirred for 20 min, and then reaction mixture was filtered. This procedure was repeated twice. The filtrate was azeotropically dried with toluene ($\times 3$) to afford crude mixture of peptides **S6**, which was used in the next reaction without further purification.



seco-surugamide F-SNAC (12): To a solution of mixture of peptide **S6** in CH_2Cl_2 /DMF (= 9:1) (12.5 mL) were added *N*-acetylcysteamine (12 mg, 0.1 mmol), 2,4,6-collidine (6.6 μL , 0.05 mmol) and HCTU (22.8 mg, 0.055 mmol). After being stirred overnight, the reaction mixture was concentrated, and the residue was diluted with EtOAc and saturated aqueous NH_4Cl . The resulting mixture was extracted with EtOAc ($\times 3$), washed with brine, dried over MgSO_4 , and concentrated. To the residue

was added a mixture of TFA/H₂O/TIS (= 95:2.5:2.5) (1.0 mL), and the mixture was stirred for 30 min. The reaction mixture was diluted with Et₂O (24 mL), centrifuged at 3,500 × g for 15 min at 4 °C, and Et₂O layer was removed by decantation. This procedure was repeated twice. The crude peptide was separated by reverse-phase HPLC to afford **12** (1.7 mg, 2.9% for 22 steps) as a white solid. The separation was accomplished by COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 10ID × 250 mm (nacalai tesque) eluted with 42% MeCN + 0.05% TFA (flow rate: 3.2 mL/min). **12**: [α]_D²⁵ -1.28 (*c* 0.25 MeOH); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.99 (s, 1H), 8.73 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 8.46 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 8.27 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 8.02-7.95 (m, 7H), 7.84 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz), 7.76 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 7.71-7.69 (m, 2H), 7.33 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.18 (s, 1H), 7.06 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 6.98 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 4.82 (d, 1H, *J* = 4.0 Hz), 4.55 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz), 4.38-4.04 (m, 7H), 3.88 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz), 3.32 (s, 6H), 3.19 (dd, 1H, *J* = 14.0, 5.5 Hz), 3.11-3.08 (m, 4H), 3.00 (dd, 1H, *J* = 14.5, 8.5 Hz), 1.99 (m, 3H), 1.74 (s, 3H), 1.53 (m, 1H), 1.43-1.41 (m, 2H), 1.30 (m, 2H), 1.23 (d, 3H, *J* = 7.5 Hz), 1.20 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz), 0.95 (dd, 6H, *J* = 18, 6.5 Hz), 0.85-0.71 (m, 34H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 201.7, 174.9, 173.0, 172.7, 172.1, 171.6, 171.4, 171.3, 170.6, 169.8, 168.8, 136.8, 127.5, 125.5, 121.7, 119.1, 118.9, 112.0, 107.3, 67.0, 59.0, 58.1, 58.0, 57.8, 55.3, 53.2, 51.5, 49.1, 42.3, 42.0, 41.2, 41.0, 38.7, 31.1, 30.8, 28.2, 24.8, 24.6, 23.5, 23.4, 23.0, 22.2, 22.0, 20.5, 19.8, 19.7, 19.0, 18.5, 18.3, 17.9, 16.0; HRMS (ESI) calcd for C₅₆H₉₃O₁₂N₁₂S [M+H]⁺ 1157.6751, found 1157.6771.

O-benzyl *seco*-surugamide F-SNAC (**13**)

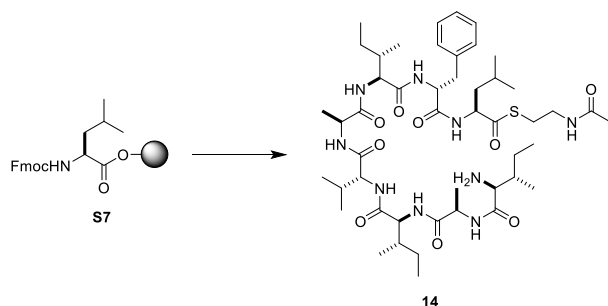


13 was synthesized following the same procedure as for **12** with the substitution of Fmoc-L-Thr(tBu)-OH for Fmoc-L-Thr(Bzl)-OH. The separation was accomplished by

COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 10ID × 250 mm eluted with 46% MeCN + 0.05% TFA (flow rate: 3.2 mL/min) to afford the pure **13** (2.5 mg, 4.0 % for 22 steps) as white solids. **13**: [α]_D²³ +0.39 (*c* 0.16, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.97 (s, 1H), 8.70 (br, 1H), 8.45 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz), 8.22 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 8.02-7.98 (m, 2H), 7.92 (m, 1H), 7.82 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz), 7.75 (m, 1H), 7.70 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz), 7.34-7.22 (m, 6H), 7.17 (s, 1H), 7.06 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 6.98 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz), 4.54 (m, 1H), 4.48 (d, 1H, *J* = 12.0 Hz), 4.41 (d, 1H, *J* = 11.5 Hz), 4.35-4.29 (m, 5H), 4.21-4.13 (m, 2H), 4.06-4.01 (m, 2H), 3.82 (m, 1H), 3.21-2.96 (m, 6H), 2.81 (t, 1H, *J* = 7.0 Hz), 1.99 (m, 3H), 1.74 (s, 3H), 8.27 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 1.53 (m, 1H), 1.42 (m, 1H), 1.30 (m, 2H), 1.23 (d, 3H, *J* = 7.0

Hz), 1.19 (d, 3H, $J = 5.5$ Hz), 1.03 (d, 3H, $J = 5.5$ Hz), 0.92 (d, 3H, $J = 7.0$ Hz), 0.84 (d, 3H, $J = 6.5$ Hz), 0.80-0.78 (m, 33H); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 201.7, 174.8, 173.0, 172.8, 172.0, 171.7, 171.6, 171.4, 170.2, 169.8, 139.1, 136.9, 128.7, 128.1, 127.9, 127.5, 125.5, 121.7, 119.1, 118.9, 112.0, 75.2, 70.8, 58.0, 57.8, 57.4, 55.4, 53.2, 52.0, 51.6, 49.1, 49.0, 42.4, 42.1, 41.3, 41.0, 38.7, 31.1, 30.8, 28.1, 24.8, 24.6, 23.5, 23.3, 23.0, 22.2, 22.0, 19.8, 19.7, 19.0, 18.5, 18.3, 17.9, 16.8, 16.1; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{63}\text{H}_{99}\text{O}_{12}\text{N}_{12}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1247.7221, found 1247.7252.

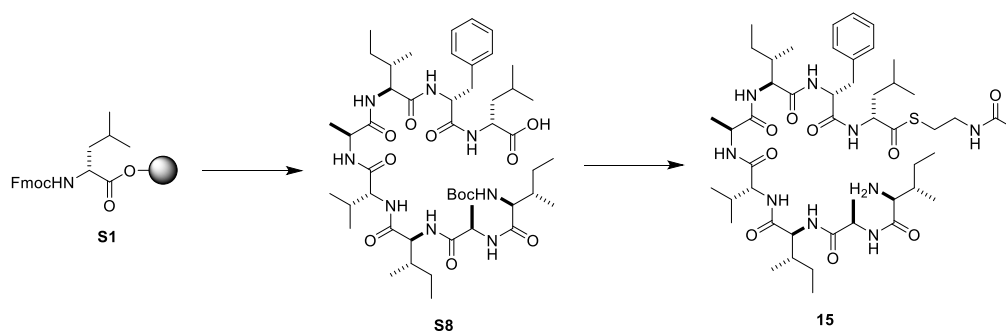
seco-surugamide B (K5A, DL8LL)-SNAC (14)



14 was synthesized following the same procedure as for **7** with the substitution of Fmoc-D-Leu-2-chlorotrityl resin (**S1**) for Fmoc-L-Leu-2-chlorotrityl resin (**S7**). Peptide **14** (1.0 mg, 2.1% for 18 steps): $[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ -24.6 (c 0.10, MeOH); ^1H NMR (500 MHz,

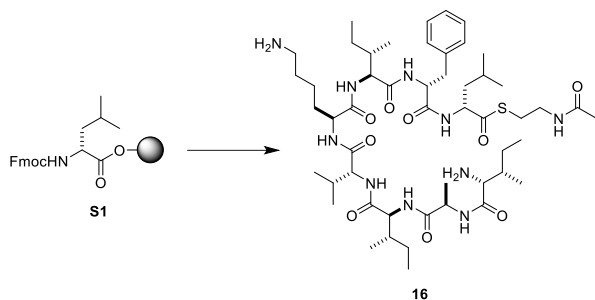
$\text{DMSO}-d_6$) δ 8.62 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 8.59 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 8.22 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 8.16 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 8.15 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 8.10-8.02 (m, 2H), 7.90 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 7.35-7.28 (m, 4H), 7.17 (m, 1H), 4.68-4.58 (m, 2H), 4.72-4.65 (m, 2H), 4.53 (t, 1H, $J = 8.6$ Hz), 4.36 (qui, 1H, $J = 6.9$ Hz), 4.30 (m, 1H), 4.23 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz), 4.16 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz), 3.68 (br, 1H), 3.10 (m, 1H), 2.99 (dd, 1H, $J = 5.2, 13.8$ Hz), 1.93 (m, 1H), 1.78 (s, 3H), 1.74 (m, 1H), 1.59-1.35 (m, 6H), 1.25-1.10 (m, 8H), 0.95-0.74 (m, 27H), 0.67 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz), 0.56 (d, 3H, $J = 6.3$ Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 201.3, 172.0, 171.5, 171.4, 171.0, 170.6, 170.4, 169.3, 167.2, 137.4, 129.1, 128.0, 126.3, 57.6, 57.4, 57.0, 56.3, 56.2, 53.7, 47.8, 47.7, 38.1, 37.3, 36.5, 36.1, 30.7, 27.5, 24.0 ($\times 2$), 23.9, 23.8, 22.9, 22.5, 21.0, 19.7, 19.1, 18.5, 18.0, 15.3, 15.0, 14.5, 11.1, 11.0 ($\times 2$); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{N}_9\text{O}_9\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 960.5951, found 960.5953.

seco-surugamide B (K5A)-SNAC (15)



Fmoc-D-Leu-2-chlorotrityl resin **S1** (loading rate: 1.207 mmol/g, 0.1000 mmol, 82.8 mg) in Libra tube was swelled in CH₂Cl₂ for 1 h, which was subjected to 7 cycles [Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-D-Val-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-D-Ala-OH, Boc-L-Ile-OH] of the SPPS protocol (Steps 1–4), and then the SPPS protocol (Steps 1 and 2). CH₂Cl₂/HFP (= 70:30) (1.0 mL) was added and being stirred for 30 min, and then the reaction mixture was filtered. This procedure was repeated twice. The filtrate was concentrated and azeotroped with toluene (× 3) to afford crude peptide **S8**, which was used in the next reaction without further purification. To a solution of peptide **S8** in CH₂Cl₂/DMF (= 9:1) (25 mL) were added *N*-acetylcysteamine (24 mg, 0.2 mmol), 2,4,6-collidine (13.2 μL, 0.1 mmol) and HCTU (45.6 mg, 0.11 mmol). After being stirred overnight, the reaction mixture was concentrated, and the residue was diluted with EtOAc and saturated aqueous NH₄Cl. The resulting mixture was extracted with EtOAc (× 3), washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated. To the residue was added a mixture of TFA/H₂O/TIS (= 95:2.5:2.5) (2.0 mL), and the mixture was stirred for 30 min. The reaction mixture was diluted with Et₂O (48 mL), centrifuged at 3500 × *g* for 15 min at 4 °C, and Et₂O layer was removed by decantation. This procedure was repeated twice. The crude peptide was purified by reversed-phase HPLC to afford **15** (8.3 mg, 8.6% for 18 steps) as a white solid: $[\alpha]_D^{24} +1.3$ (*c* 0.38, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.62 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 8.33 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 8.31 (m, 1H), 8.12 (m, 1H), 8.05 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 8.00 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.98 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.95 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.77 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 7.29 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz), 7.24 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 7.16 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 4.61 (m, 1H), 4.44 (m, 1H), 4.37 (m, 1H), 4.31 (q, 2H, *J* = 6.9 Hz), 4.14 (dd, 1H, *J* = 6.9, 8.0 Hz), 4.10 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 3.50 (br, 1H), 3.17-3.50 (m, 3H), 2.83 (m, 1H), 2.74 (dd, 1H, *J* = 11.5, 14.3 Hz), 1.96 (m, 1H), 1.77 (s, 3H), 1.76-1.35 (m, 7H), 1.19 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz), 1.12 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz), 1.04 (m, 1H), 0.89 (d, 3H, *J* = 6.3 Hz), 0.87-0.74 (m, 21H), 0.62 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 0.46 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 201.5, 173.0, 172.1, 171.8, 171.0, 170.7, 170.5, 169.2, 137.9, 129.2, 128.0, 126.2, 58.7, 57.8, 57.7, 56.9, 56.8, 53.9, 47.9, 38.1, 37.7, 36.8, 36.6, 30.3, 27.6, 24.0, 23.9, 23.6, 22.9, 22.5, 21.0, 19.2, 19.1, 18.0, 17.9, 15.6, 15.3, 14.9, 11.5, 11.1, 11.0; HRMS (ESI) calcd for C₄₈H₈₂N₉O₉S⁺ [*M*+H]⁺ 960.5951, found 960.5955.

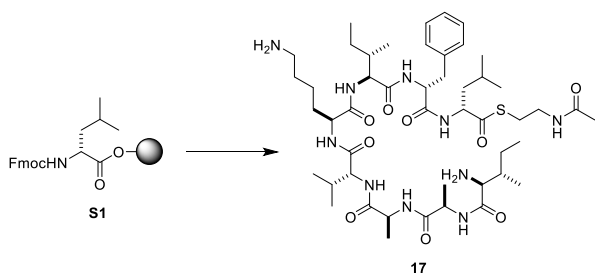
seco-surugamide B (I1dalloI)-SNAC (16)



16 was synthesized following the same procedure as for peptide **7** with the substitution of Boc-L-Ile-OH at the position 1 for Boc-D-*allo*-Ile-OH. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Leu-2-chlorotrityl resin **S1** (loading rate: 1.054 mmol/g, 0.0500

mmol, 47.4 mg). The obtained crude peptide **16** was purified by reversed phase HPLC (COSMOSIL Cholesterol 10 × 250 mm) with MeCN:H₂O (= 40:60) containing 0.05% TFA to afford peptide **16** (16.6 mg, 33% for 17 steps) as a white solid: $[\alpha]_D^{18}$ -7.91 (*c* 0.10, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.60-8.52 (m, 2H), 8.27 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 8.10 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz), 8.05-7.91 (m, 4H), 7.86 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.76-7.68 (m, 3H), 7.27-7.10 (m, 5H), 4.56 (td, 1H, *J* = 12.1, 3.7 Hz), 4.48 (quin, 1H, *J* = 7.3 Hz), 4.38-4.29 (m, 2H), 4.28-4.18 (m, 2H), 4.04 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz), 3.73-3.66 (m, 1H), 3.18-3.04 (m, 3H), 2.83-2.77 (m, 2H), 2.72-2.60 (m, 3H), 1.93-1.28 (m, 17H), 1.27-0.98 (m, 7H), 0.89-0.70 (m, 25H), 0.57 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz), 0.40 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 201.5, 171.8, 171.5, 171.2, 170.9, 170.7, 170.6, 169.3, 167.5, 137.9, 129.1, 128.0, 126.2, 57.7, 57.4, 57.0, 56.7, 56.2, 53.9, 51.9, 48.4, 38.7, 38.1, 37.6, 36.8, 36.5, 36.1 (×2), 30.8, 30.7, 27.5, 26.6, 24.9, 24.0, 23.8 (×2), 22.9, 22.5, 22.1, 21.0, 19.2, 19.1, 17.9, 15.4, 14.8, 13.5, 11.4, 11.2, 11.0; HRMS (ESI) calcd for C₅₁H₈₉N₁₀O₉S⁺ [M+H]⁺ 1017.6552, found 1017.6529.

seco-surugamide B (I3A)-SNAC (17)

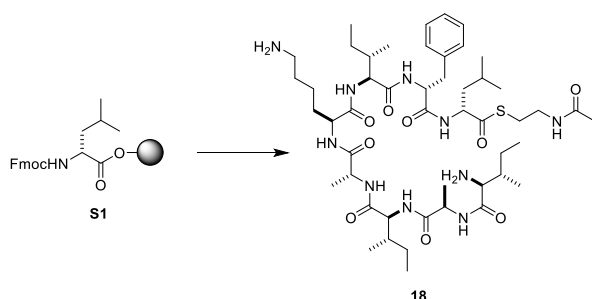


17 was synthesized following the same procedure as for **7** with the substitution of Fmoc-L-Ile-OH at the position 3 for Fmoc-L-Ala-OH. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Leu-2-chlorotrityl resin **S1** (loading rate: 0.808 mmol/g, 0.0500 mmol, 61.9 mg).

The obtained crude peptide **17** was purified by reversed phase HPLC (COSMOSIL Cholesterol 10 × 250 mm) with MeCN:H₂O (= 34:66) containing 0.05% TFA to afford peptide **17** (28.4 mg, 58% for 17 steps) as a white solid. $[\alpha]_D^{16}$ +0.1 (*c* 0.10, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.64-8.58 (m, 2H), 8.26 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 8.15 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 8.10-8.00 (m, 5H), 7.82-7.75 (m, 3H), 7.27-7.09 (m, 5H), 4.58 (ddd, 1H, *J* = 11.5, 8.0, 2.9 Hz), 4.48-4.40 (m, 2H), 4.32 (ddd, 1H, *J* = 10.9, 8.0,

4.5 Hz), 4.26-4.19 (m, 2H), 4.06 (dd, 1H, $J = 8.0, 6.9$ Hz), 3.65 (m, 1H), 3.17-3.09 (m, 1H), 3.07 (q, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.84-2.76 (m, 2H), 2.72-2.63 (m, 3H), 1.94-1.85 (m, 1H), 1.78-1.73 (m, 1H), 1.73 (s, 3H), 1.68-1.35 (m, 9H), 1.28-1.10 (m, 10H), 0.88-0.72 (m, 19H), 0.58 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz), 0.43 (d, 3H, $J = 6.3$ Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 201.6, 172.1, 171.9, 171.4, 170.9, 170.7 ($\times 2$), 169.3, 167.3, 137.9, 129.2, 128.0, 126.2, 57.7, 57.1, 57.0, 56.2, 53.9, 51.9, 48.1, 47.9, 38.7, 38.1, 36.9, 36.7, 36.1 ($\times 2$), 31.3, 31.2, 27.6, 26.6, 24.1, 24.0 ($\times 2$), 22.9, 22.5, 22.3, 21.0, 19.3, 19.2, 19.1, 17.7, 14.9, 14.5, 11.2, 11.0; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{83}\text{N}_{10}\text{O}_9\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 975.6060, found 975.6052.

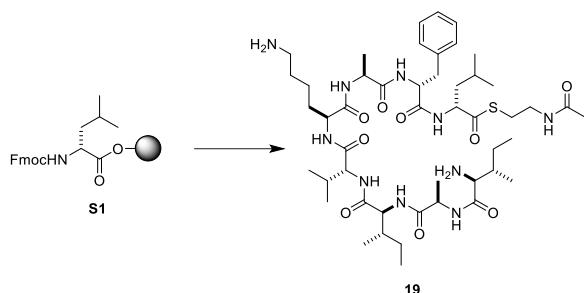
seco-surugamide B (DV4DA)-SNAC (**18**)



18 was synthesized following the same procedure as for **7** with the substitution of Fmoc-D-Val-OH at the position 4 for Fmoc-D-Ala-OH. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Leu-2-chlorotrityl resin **S1** (loading rate: 0.808 mmol/g, 0.0500 mmol, 61.9 mg).

The obtained crude **18** was purified by reversed phase HPLC (COSMOSIL Cholesterol 10×250 mm) with MeCN:H₂O (= 38:62) containing 0.05% TFA to afford peptide **18** (18.1 mg, 37% for 17 steps) as a white solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{19} +11.3$ (c 0.10, MeOH); ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.64 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 8.61 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 8.26-8.14 (m, 3H), 8.07-8.01 (m, 4H), 7.84 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 7.75 (br, 2H), 7.28-7.18 (m, 4H), 7.16-7.11 (m, 1H), 4.61-4.53 (m, 2H), 4.38-4.31 (m, 2H), 4.28-4.21 (m, 2H), 4.07 (dd, 1H, $J = 8.6, 6.9$ Hz), 3.65 (m, 1H), 3.14 (dd, 1H, $J = 14.3, 3.4$ Hz), 3.08 (q, 2H, $J = 6.3$ Hz), 2.85-2.75 (m, 2H), 2.73-2.63 (m, 3H), 1.74 (s, 3H), 1.73-1.28 (m, 12H), 1.27-0.98 (m, 11H), 0.89-0.70 (m, 19H), 0.59 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz), 0.45 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 201.6, 171.9 ($\times 2$), 171.4 ($\times 2$), 170.7, 170.5, 169.3, 167.2, 137.9, 129.2, 128.0, 126.2, 57.7, 57.1, 56.2 ($\times 2$), 53.9, 51.8, 48.0 ($\times 2$), 38.7 ($\times 2$), 38.1, 37.0, 36.9, 36.7, 36.1, 31.5, 27.6, 26.6, 24.2, 24.1, 24.0, 23.9, 22.9, 22.5, 22.3, 21.0, 19.5, 19.3, 15.1, 14.9, 14.5, 11.2, 11.1, 10.8; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{49}\text{H}_{85}\text{N}_{10}\text{O}_9\text{S}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 989.6216, found 989.6218.

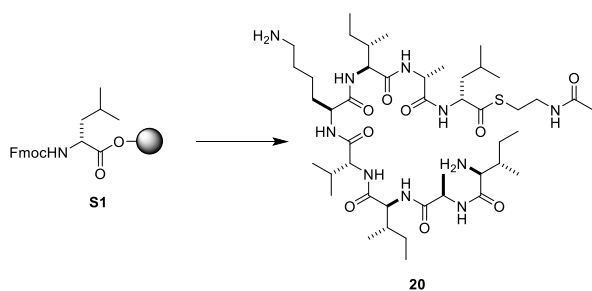
seco-surugamide B (I6A)-SNAC (19)



19 was synthesized following the same procedure as for **7** with the substitution of Fmoc-L-Ile-OH at the position 6 for Fmoc-L-Ala-OH. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Leu-2-chlorotrityl resin **S1** (loading rate: 0.808 mmol/g, 0.0500 mmol, 61.9 mg).

The obtained crude **19** was purified by reversed phase HPLC (COSMOSIL Cholester 10 × 250 mm) with MeCN:H₂O (= 35:65) containing 0.05% TFA to afford peptide **19** (23.1 mg, 47% for 17 steps) as a white solid. $[\alpha]_D^{15} +1.0$ (*c* 0.10, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.69 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 8.61 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 8.17–8.13 (m, 2H), 8.13–7.99 (m, 6H), 7.75 (br, 2H), 7.23–7.19 (m, 4H), 7.17–7.11 (m, 1H), 4.67–4.56 (m, 2H), 4.45 (dd, 1H, *J* = 9.2, 6.3 Hz), 4.33 (m, 1H), 4.25 (dd, 1H, *J* = 8.3, 6.3 Hz), 4.21–4.15 (m, 2H), 3.66 (m, 1H), 3.15 (dd, 1H, *J* = 13.8, 4.0 Hz), 3.09 (q, 2H, *J* = 6.3 Hz), 2.84–2.78 (m, 2H), 2.72–2.63 (m, 3H), 1.92–1.84 (m, 1H), 1.74 (s, 3H), 1.73–1.29 (m, 10H), 1.27–1.18 (m, 2H), 1.17 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz), 1.09–0.99 (m, 2H), 0.89–0.72 (m, 28H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 201.5, 171.9, 171.6, 171.5, 171.1, 170.9, 170.7, 169.3, 167.2, 137.6, 129.3, 127.9, 126.3, 57.8, 57.1, 56.1 (×2), 53.3, 51.8, 48.0, 47.9, 38.7, 38.1, 37.6, 37.4, 36.1 (×2), 31.5, 31.0, 27.6, 26.6, 24.1, 24.0, 23.7, 22.8, 22.5, 22.2, 21.2, 19.7, 19.3, 18.4, 17.8, 15.4, 14.5, 11.0 (×2); HRMS (ESI) calcd for C₄₈H₈₃N₁₀O₉S⁺ [M+H]⁺ 975.6060, found 975.6062.

seco-surugamide B (Df7DA)-SNAC (20)

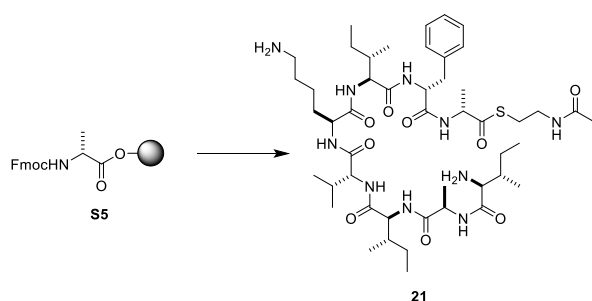


20 was synthesized following the same procedure as for **7** with the substitution of Fmoc-D-Phe-OH at the position 7 for Fmoc-D-Ala-OH. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Leu-2-chlorotrityl resin **S1** (loading rate: 0.808 mmol/g, 0.0500 mmol, 61.9 mg).

The obtained crude peptide **20** was purified by reversed phase HPLC (COSMOSIL Cholester 10 × 250 mm) with MeCN:H₂O (= 30:70) containing 0.05% TFA to afford peptide **20** (25.9 mg, 55% for 17 steps) as a white solid: $[\alpha]_D^{16} +7.7$ (*c* 0.10, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.61 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 8.49 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 8.16–8.01 (m, 7H), 7.97 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 7.78 (br, 2H), 4.63 (quin, 1H, *J* = 7.5 Hz), 4.46 (dd, 1H, *J* = 9.2, 6.9 Hz), 4.37–4.22 (m, 4H), 4.10 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz),

3.69-3.62 (m, 1H), 3.07 (q, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.82-2.75 (m, 2H), 2.72-2.64 (m, 2H), 1.95-1.85 (m, 1H), 1.74 (s, 3H), 1.73-1.24 (m, 12H), 1.22 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz), 1.25-1.18 (m, 2H), 1.17 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz), 1.09-0.97 (m, 3H), 0.86-0.73 (m, S13 31H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 201.6, 172.5, 171.5 ($\times 2$), 170.9, 170.7, 170.5, 169.3, 167.2, 57.6, 57.3, 57.2, 56.2 ($\times 2$), 52.0, 48.0, 47.7, 38.7, 38.1, 37.6, 36.6, 36.1 ($\times 2$), 31.4, 31.0, 27.6, 26.6, 24.5, 24.1, 24.0, 23.7, 22.9, 22.5, 22.2, 21.0, 19.7, 19.2, 17.9, 17.8, 15.4, 15.2, 14.5, 11.2, 11.1, 11.0; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{45}\text{H}_{85}\text{N}_{10}\text{O}_9\text{S}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 941.6216, found 941.6213.

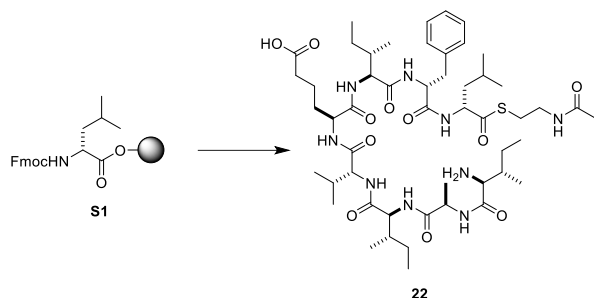
seco-surugamide B (DL8dA)-SNAC (**21**)



21 was synthesized following the same procedure as for **7** with the substitution of Fmoc-D-Leu-2-chlorotrityl resin for Fmoc-D-Ala-2-chlorotrityl resin **S5** (loading rate: 0.9577 mmol/g, 0.0499 mmol, 52.2 mg) as a starting material. The obtained crude peptide

21 was purified by reversed phase HPLC (COSMOSIL Cholesterol 10×250 mm) with MeCN:H₂O (= 33:67) containing 0.05% TFA to afford peptide **21** (10.1 mg, 21% for 17 steps) as a white solid: $[\alpha]_{\text{D}}^{17}$ -8.2 (c 0.10, MeOH); ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.66 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 8.60 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 8.33 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 8.13-8.08 (m, 2H), 8.08-8.00 (m, 4H), 7.73 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 7.72-7.66 (m, 2H), 7.27-7.11 (m, 5H), 4.66-4.56 (m, 2H), 4.45 (dd, 1H, $J = 9.2, 6.3$ Hz), 4.35 (quin, 1H, $J = 7.5$ Hz), 4.26-4.21 (m, 2H), 4.06 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz), 3.68-3.61 (m, 1H), 3.18 (dd, 1H, $J = 13.8, 2.9$ Hz), 3.09 (q, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.81 (dd, 2H, $J = 7.5, 5.3$ Hz), 2.71-2.63 (m, 3H), 1.92-1.83 (m, 1H), 1.77 (s, 3H), 1.76-1.64 (m, 2H), 1.55-1.32 (m, 7H), 1.30 (d, 3H, $J = 7.5$ Hz), 1.25-1.18 (m, 2H), 1.16 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz), 1.09-0.98 (m, 3H), 0.87-0.73 (m, 19H), 0.58 (t, 3H, $J = 6.9$ Hz), 0.40 (d, 3H, $J = 6.3$ S14 Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 201.6, 171.5, 171.4 ($\times 2$), 170.8, 170.7 ($\times 2$), 169.3, 167.2, 137.9, 129.1, 128.0, 126.2, 57.3, 57.1, 56.2, 56.1, 55.0, 53.8, 51.9, 47.9, 38.7, 38.1, 37.6, 36.9, 36.4, 36.1, 31.5, 31.0, 27.5, 26.6, 23.9, 23.7, 22.5, 22.1, 21.0, 19.7, 19.2, 17.8, 17.3, 15.3, 14.8, 14.5, 11.1 ($\times 2$), 10.9; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{83}\text{N}_{10}\text{O}_9\text{S}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 975.6060, found 975.6052.

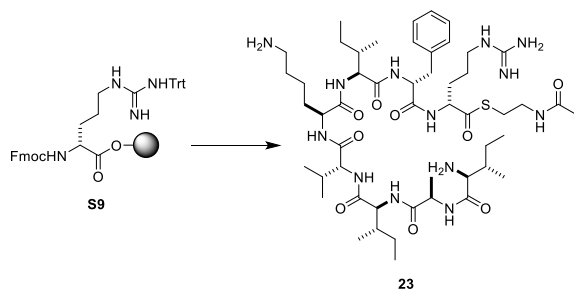
seco-surugamide B (K5 α AA)-SNAC (**22**)



22 was synthesized following the same procedure as for **7** with the substitution of Fmoc-L-Lys(Boc)-OH at the position 5 for Fmoc-L- α -amino adipic acid δ -*tert*-butyl ester. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Leu-2-chlorotrityl resin **S1** (loading rate: 0.554

mmol/g, 0.0500 mmol, 90.3 mg). Then general procedures were used to obtain crude protected peptide. To the residue was added a cleaving cocktail of TFA/H₂O/TIS = 95:2.5:2.5 (1.00 mL) to remove the protecting group. After being stirred for 2 h at room temperature, the reaction mixture was diluted with Et₂O (24 mL), centrifuged at 3500 $\times$ g for 5 min at 4 $^{\circ}$ C, and Et₂O layer was removed by decantation. This procedure was repeated twice. The crude peptide was purified with MeCN:H₂O (= 50:50) containing 0.05% TFA to afford peptide **22** (18.4 mg, 36% for 17 steps) as a white solid. $[\alpha]_D^{18}$ -3.7 (*c* 0.10, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.0 (br, 1H), 8.68 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 8.64 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 8.26 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 8.20-8.00 (m, 6H), 7.91 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz), 7.32-7.14 (m, 5H), 4.71-4.61 (m, 2H), 4.50 (dd, 1H, *J* = 9.2, 6.9 Hz), 4.41-4.35 (m, 1H), 4.33-4.28 (m, 2H), 4.12 (dd, 1H, *J* = 8.6, 7.5 Hz), 3.73-3.66 (m, 1H), 3.20-3.09 (m, 3H), 2.87-2.81 (m, 2H), 2.73 (dd, 1H, *J* = 13.2, 12.0 Hz), 2.19-2.10 (m, 2H), 2.00-1.91 (m, 1H), 1.82-1.34 (m, 15H), 1.20 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz), 1.18-1.00 (m, 3H), 0.93-0.76 (m, 25H), 0.64 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 0.49 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 201.6, 174.2, 171.8, 171.5, 171.4, 170.9, 170.6 ($\times$ 2), 169.3, 167.2, 137.9, 129.2, 128.0, 126.2, 57.7, 57.2, 57.0, 56.2, 56.1, 53.8, 51.8, 47.9, 38.1, 37.6, 37.0, 36.7, 36.1 ($\times$ 2), 33.2, 31.6, 31.0, 27.6, 24.1, 24.0, 23.9, 23.7, 22.9, 22.5, 21.0, 20.8, 19.7, 19.3, 17.7, 15.4, 14.9, 14.5, 11.2, 11.1, 11.0; HRMS (ESI) calcd for C₅₁H₈₆N₉O₁₁S⁺ [M+H]⁺ 1032.6162, found 1032.6158.

seco-surugamide B (DL8DR)-SNAC (**23**)

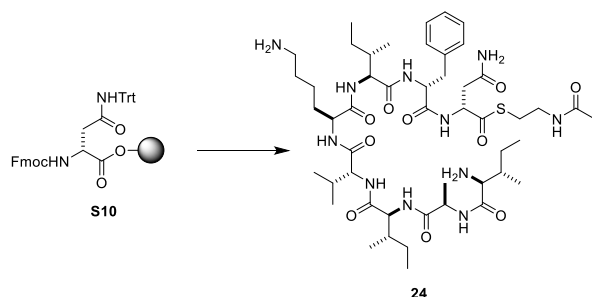


23 was synthesized following the same procedure as for **7** with the substitution of Fmoc-D-Leu-2-chlorotrityl resin for Fmoc-D-Arg(Pbf)-2-chlorotrityl resin **S9** (loading rate: 0.520 mmol/g, 0.0500 mmol, 96.2 mg) as a starting material. The obtained crude peptide **23**

was purified by reversed phase HPLC (COSMOSIL Cholesterol 10 $\times$ 250 mm) with MeCN:H₂O (=

34:66) containing 0.05% TFA to afford peptide **23** (18.0 mg, 34% for 19 steps) as a white solid: $[\alpha]_D^{17}$ -5.7 (*c* 0.10, MeOH); ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.73 (d, 1H, J = 6.9 Hz), 8.60 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 8.25 (d, 1H, J = 8.6 Hz), 8.12-8.02 (m, 7H), 7.81 (d, 1H, J = 8.6 Hz), 7.78-7.71 (m, 4H), 7.59-7.29 (br, 1H), 7.28-7.11 (m, 5H), 4.65-4.57 (m, 2H), 4.45 (dd, 1H, J = 8.6, 6.3 Hz), 4.32-4.19 (m, 3H), 4.08 (dd, 1H, J = 8.6, 6.9 Hz), 3.68-3.62 (m, 1H), 3.20-3.14 (m, 1H), 3.11-3.04 (m, 4H), 2.86-2.77 (m, 2H), 2.73-2.64 (m, 3H), 1.94-1.85 (m, 1H), 1.84-1.66 (m, 6H), 1.66-1.28 (m, 10H), 1.28-1.17 (m, 2H), 1.16 (d, 3H, J = 6.9 Hz), 1.09-0.99 (m, 3H), 0.87-0.71 (m, 19H), 0.58 (t, 3H, J = 6.6 Hz), 0.45 (d, 3H, J = 8.9 Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 201.0, 171.9, 171.5, 171.4, 170.9, 170.7 ($\times 2$), 169.4, 167.2, 156.8, 137.8, 129.1, 128.0, 126.3, 72.3, 59.1, 57.2, 57.0, 56.2 ($\times 2$), 53.8, 52.0, 47.9, 38.7, 38.1, 37.6, 37.0, 36.7, 36.1, 31.3, 31.0, 28.1, 27.6, 26.6, 24.9, 23.9, 23.8, 23.7, 22.5, 22.3, 19.7, 19.2, 17.8, 15.4, 14.9, 14.5, 11.2, 11.1, 11.0; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{51}\text{H}_{90}\text{N}_{13}\text{O}_9\text{S}^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 1060.6700, found 1060.6690.

seco-surugamide B (DL8DN)-SNAC (**24**)

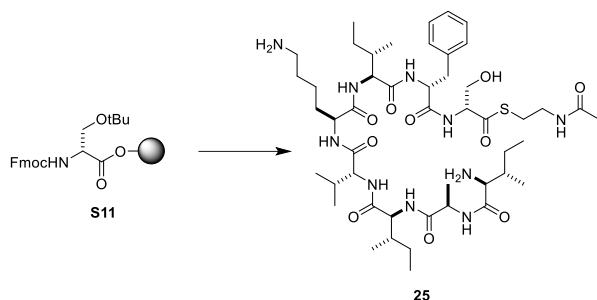


24 was synthesized following the same procedure as for **7** with the substitution of Fmoc-D-Leu-2-chlorotrityl resin for Fmoc-D-Asn(Trt)-2-chlorotrityl resin **S10** (loading rate: 0.563 mmol/g, 0.0500 mmol, 88.8 mg) as a starting material. The obtained crude peptide

24 was purified by reversed phase HPLC (COSMOSIL Cholesterol 10 $\times$ 250 mm) with MeCN:H₂O (= 38:62) containing 0.05% TFA to afford peptide **24** (12.8 mg, 25% for 19 steps) as a white solid: $[\alpha]_D^{17}$ -15.0 (*c* 0.10, MeOH); ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.67 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 8.63 (d, 1H, J = 8.6 Hz), 8.37 (d, 1H, J = 8.6 Hz), 8.17 (d, 1H, J = 8.6 Hz), 8.13-8.00 (m, 5H), 7.85 (d, 1H, J = 8.6 Hz), 7.71-7.65 (m, 2H), 7.55 (br, 1H), 7.29-7.09 (m, 5H), 7.05 (br, 1H), 4.47-4.61 (m, 3H), 4.44 (dd, 1H, J = 9.2, 6.3 Hz), 4.25-4.16 (m, 2H), 4.11 (dd, 1H, J = 8.0, 7.5 Hz), 3.71-3.64 (m, 1H), 3.21-3.14 (m, 1H), 3.13-3.03 (m, 2H), 2.83-2.77 (m, 2H), 2.73-2.63 (m, 4H), 2.63-2.52 (m, 1H), 1.92-1.82 (m, 1H), 1.79-1.66 (m, 5H), 1.59-1.29 (m, 7H), 1.25-1.09 (m, 8H), 0.88-0.73 (m, 19H), 0.58 (t, 3H, J = 6.9 Hz), 0.40 (d, 3H, J = 6.9 Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 200.3, 171.6, 171.5, 171.3, 170.9 ($\times 2$), 170.8, 170.7, 169.4, 167.3, 137.8, 129.2, 128.0, 126.2, 60.2, 57.6, 56.2, 56.0, 53.8, 51.9, 47.9, 38.7, 38.1, 37.5, 37.1, 36.8, 36.4, 36.1, 31.4, 30.8, 27.7, 26.6, 23.9 ($\times 2$), 23.8, 22.5, 22.1, 19.8, 19.2, 18.1,

15.2, 14.8, 14.5, 11.2, 11.1; HRMS (ESI) calcd for $C_{49}H_{84}N_{11}O_{10}S^+$ $[M+H]^+$ 1018.6118, found 1018.6108.

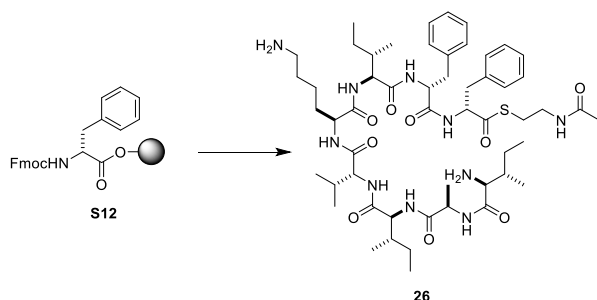
seco-surugamide B (DL8DS)-SNAC (**25**)



25 was synthesized following the same procedure as for **7** with the substitution of Fmoc-D-Leu-2-chlorotrityl resin for Fmoc-D-Ser(tBu)-2-chlorotrityl resin **S11** (loading rate: 0.769 mmol/g, 0.0500 mmol, 65.0 mg) as a starting material. The obtained crude

peptide **25** was purified by reversed phase HPLC (COSMOSIL Cholest 10 × 250 mm) with MeCN:H₂O (= 39:61) containing 0.05% TFA to afford peptide **25** (15.1 mg, 31% for 19 steps) as a white solid: $[\alpha]_D^{17}$ -11.3 (*c* 0.10, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.76 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 8.64 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 8.31 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 8.17-8.01 (m, 6H), 7.80 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz), 7.69 (br, 2H), 7.30-7.26 (m, 2H), 7.22-7.17 (m, 2H), 7.15-7.10 (m, 1H), 5.29 (br, 1H), 4.76 (ddd, 1H, *J* = 12.0, 8.0, 3.4 Hz), 4.68 (quin, 1H, *J* = 7.5 Hz), 4.48-4.38 (m, 2H), 4.25-4.18 (m, 2H), 4.10 (dd, 1H, *J* = 8.6, 6.9 Hz), 3.80-3.75 (m, 1H), 3.69-3.60 (m, 2H), 3.22 (dd, 1H, *J* = 13.8, 2.9 Hz), 3.09 (q, 2H, *J* = 6.9 Hz), 2.85-2.79 (m, 2H), 2.72-2.62 (m, 3H), 1.92-1.82 (m, 1H), 1.79-1.65 (m, 5H), 1.59-1.29 (m, 7H), 1.28-1.18 (m, 2H), 1.15 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz), 1.09-0.98 (m, 3H), 0.88-0.70 (m, 19H), 0.56 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz), 0.41 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 199.8, 172.0, 171.5, 171.4, 170.9, 170.8, 170.6, 169.4, 167.3, 137.9, 129.3, 127.9, 126.2, 61.8, 61.3, 57.5, 56.9, 56.1 (×2), 53.7, 51.9, 47.9, 38.7, 38.1, 37.6, 37.3, 36.5, 36.1, 31.4, 30.8, 27.7, 26.6, 23.9, 23.8, 22.5, 22.2, 21.0, 19.8, 19.2, 18.0, 15.3, 14.9, 14.5, 11.2 (×2), 11.0; HRMS (ESI) calcd for $C_{48}H_{82}N_{10}O_{10}SNa^+$ $[M+Na]^+$ 1013.5828, found 1013.5830.

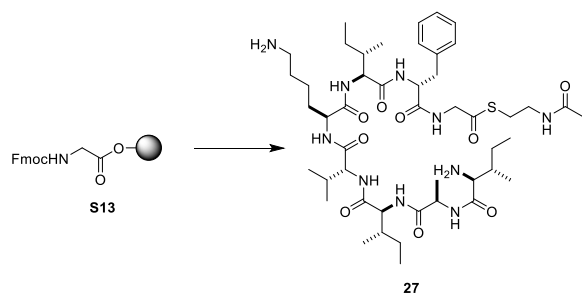
seco-surugamide B (DL8DF)-SNAC (**26**)



26 was synthesized following the same procedure as for peptide **7** with the substitution of Fmoc-D-Leu-2-chlorotrityl resin for Fmoc-D-Phe-2-chlorotrityl resin **S12** (loading rate: 0.9593 mmol/g, 0.0501 mmol, 52.2 mg) as a starting material. The obtained

crude peptide **26** was purified by reversed phase HPLC (COSMOSIL Cholesterol 10 × 250 mm) with MeCN:H₂O (= 36:64) containing 0.05% TFA to afford peptide **26** (13.9 mg, 26% for 17 steps) as a white solid: $[\alpha]_D^{18}$ -6.8 (*c* 0.10, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.82 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 8.64 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 8.23 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 8.17-8.13 (m, 2H), 8.11-8.05 (m, 4H), 7.86 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 7.77-7.72 (m, 2H), 7.28-7.15 (m, 10H), 4.70-4.53 (m, 3H), 4.59-4.53 (m, 1H), 4.31-4.26 (m, 2H), 4.12 (dd, 1H, *J* = 8.6, 6.9 Hz), 3.72-3.66 (m, 1H), 3.15-3.08 (m, 4H), 2.97 (dd, 1H, *J* = 14.3, 9.7 Hz), 2.85 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 2.73-2.63 (m, 3H), 1.98-1.89 (m, 1H), 1.79 (s, 3H), 1.75-1.71 (m, 2H), 1.62-1.32 (m, 7H), 1.32-1.22 (m, 2H), 1.19 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz), 1.13-1.02 (m, 3H), 0.91-0.75 (m, 19H), 0.61 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 0.47 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 200.2, 171.6, 171.5 (×2), 170.9, 170.7, 170.6, 169.4, 167.2, 137.7, 137.0, 129.1 (×2), 128.3, 128.0, 126.5, 126.2, 60.7, 57.2, 57.0, 56.2, 56.1, 53.7, 51.9, 47.9, 38.7, 38.1, 37.6, 37.1, 36.7, 36.6, 36.1, 31.4, 31.0, 27.7, 26.6, 23.9, 23.8, 23.7, 22.5, 22.3, 19.7, 19.2, 17.8, 15.3, 14.9, 14.5, 11.2, 11.1, 11.0; HRMS (ESI) calcd for C₅₄H₈₆N₁₀O₉SNa⁺ [M+Na]⁺ 1073.6192, found 1073.6196.

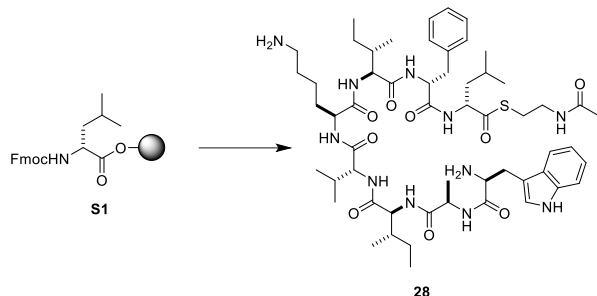
seco-surugamide B (DL8G)-SNAC (**27**)



27 was synthesized following the same procedure as for peptide **7** with the substitution of Fmoc-D-Leu-2-chlorotrityl resin for Fmoc-Gly-2-chlorotrityl resin **S13** (loading rate: 0.860 mmol/g, 0.0500 mmol, 58.1 mg) as a starting material. The obtained crude peptide

27 was purified by reversed phase HPLC (COSMOSIL Cholesterol 10 × 250 mm) with MeCN:H₂O (= 36:64) containing 0.05% TFA to afford peptide **27** (4.4 mg, 9% for 17 steps) as a white solid: $[\alpha]_D^{18}$ -14.3 (*c* 0.10, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.70-8.62 (m, 2H), 8.52-8.46 (m, 1H), 8.24-7.94 (m, 7H), 7.69-7.58 (m, 2H), 7.32-7.13 (m, 5H), 4.76-4.65 (m, 1H), 4.65-4.56 (m, 1H), 4.53-4.45 (m, 1H), 4.32-4.19 (m, 2H), 4.12-3.95 (m, 3H), 3.74-3.66 (m, 1H), 3.21-3.12 (m, 3H), 2.92-2.85 (m, 2H), 2.81-2.61 (m, 3H), 1.95-1.86 (m, 1H), 1.79 (s, 3H), 1.78-1.70 (m, 2H), 1.63-1.31 (m, 7H), 1.30-1.10 (m, 8H), 0.94-0.73 (m, 19H), 0.69-0.61 (m, 3H), 0.48-0.42 (m, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 198.0, 172.0, 171.7, 171.4, 171.0, 170.9, 170.8, 169.4, 167.3, 137.8, 129.1, 128.0, 126.3, 57.6, 57.3, 56.1 (×2), 54.1, 51.8, 49.0, 47.9, 38.1 (×2), 37.5, 37.0, 36.1 (×2), 31.5, 30.7, 27.4, 26.5, 24.1, 23.9, 23.8, 22.5, 22.0, 19.8, 19.2, 18.0, 15.2, 14.8, 14.5, 11.1, 11.0, 10.9; HRMS (ESI) calcd for C₄₇H₈₁N₁₀O₉S⁺ [M+H]⁺ 961.5903, found 961.5906.

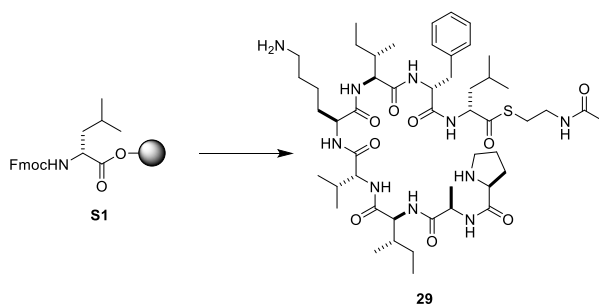
seco-surugamide B (I1W)-SNAC (**28**)



28 was synthesized following the same procedure as for peptide **7** with the substitution of Boc-L-Ile-OH at the position 1 for Boc-L-Trp(Boc)-OH. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Leu-2-chlorotrityl resin **S1** (loading rate: 0.723 mmol/g, 0.0400

mmol, 55.3 mg). The obtained crude peptide **28** was purified by reversed phase HPLC (COSMOSIL Cholesterol 10 × 250 mm) with MeCN:H₂O (= 40:60) containing 0.05% TFA to afford peptide **28** (24.0 mg, 55% for 17 steps) as a white solid: $[\alpha]^{D_{18}} -2.2$ (c 0.10, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.04-11.02 (br, 1H), 8.66 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz), 8.26 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 8.11-8.05 (m, 6H), 7.87 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 7.79 (m, 2H), 7.67 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.35 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.30-7.15 (m, 6H), 7.08 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.00 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 4.65-4.59 (m, 1H), 4.54 (q, 1H, *J* = 7.5 Hz), 4.46 (dd, 1H, *J* = 8.9, 6.6 Hz), 4.39-4.34 (m, 1H), 4.31-4.24 (m, 2H), 4.09 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz), 4.04 (dd, 1H, *J* = 11.5, 5.2 Hz), 3.21-3.05 (m, 5H), 2.86-2.81 (m, 2H), 2.76-2.67 (m, 3H), 1.96-1.89 (m, 1H), 1.77 (s, 3H), 1.75-1.19 (m, 12H), 1.14-1.04 (m, 2H), 1.02 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz), 0.90 (d, 3H, *J* = 6.3 Hz), 0.83-0.74 (m, 16H), 0.61 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz), 0.47 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 201.5, 171.8, 171.5, 171.3, 170.8, 170.6, 170.5, 169.3, 167.8, 137.8, 136.2, 129.1, 127.9, 127.0, 126.1, 124.9, 121.0, 118.5, 118.2, 111.3, 106.8, 57.6, 57.1, 57.0, 56.2, 53.8, 52.5, 51.8, 47.9, 38.6, 38.0, 37.5, 36.9, 36.8, 36.6, 31.3, 31.0, 27.5, 27.3, 26.5, 24.0, 23.9, 23.6, 22.8, 22.4, 22.2, 21.0, 19.1(×2), 17.7, 15.3, 14.8, 11.1, 11.0; HRMS (ESI) calcd for C₅₆H₈₇N₁₁O₉SNa⁺ [M+Na]⁺ 1112.6301, found 1112.6309.

seco-surugamide B (I1P)-SNAC (**29**)

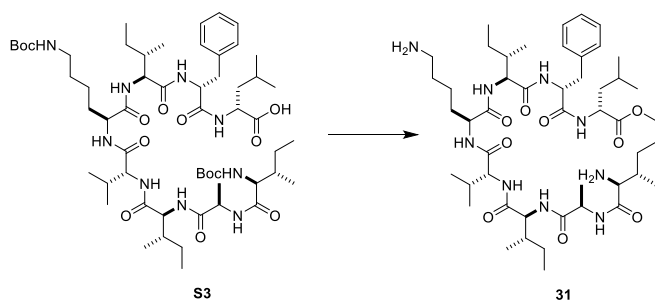


29 was synthesized following the same procedure as for peptide **7** with the substitution of Boc-L-Ile-OH at the position 1 for Boc-L-Pro-OH. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Leu-2-chlorotrityl resin **S1** (loading rate: 1.054 mmol/g, 0.0500

mmol, 47.4 mg). The obtained crude peptide **29** was purified by reversed phase HPLC (COSMOSIL Cholesterol 10 × 250 mm) with MeCN:H₂O (= 33:67) containing 0.05% TFA to afford peptide **29** (32.2

mg, 64% for 17 steps) as a white solid: $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -11.4 (*c* 0.10, MeOH); ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 9.12 (br, 1H), 8.69 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 8.63 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 8.57-8.47 (m, 1H), 8.27 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 8.11-8.03 (m, 3H), 7.84 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 7.67-7.61 (br, 2H), 7.31- 7.16 (m, 5H), 4.61 (ddd, 1H, $J = 12.0, 8.6, 3.4$ Hz), 4.54 (quin, 1H, $J = 7.5$ Hz), 4.46 (dd, S8 1H, $J = 9.2, 6.3$ Hz), 4.40-4.34 (m, 1H), 4.30-4.25 (m, 2H), 4.17-4.07 (m, 2H), 3.24-3.16 (m, 3H), 3.12 (q, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.86-2.81 (m, 2H), 2.76-2.67 (m, 3H), 2.33-2.26 (m, 1H), 1.90-1.78 (m, 4H), 1.77 (s, 3H), 1.75-1.24 (m, 11H), 1.22 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz), 1.16-0.98 (m, 3H), 0.91 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz), 0.85-0.74 (m, 16H), 0.62 (t, 3H, $J = 6.9$ Hz), 0.47 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 201.6, 171.8, 171.5, 171.3, 170.8, 170.7 ($\times 2$), 169.3, 167.5, 137.9, 129.2, 128.0, 126.2, 59.0, 57.7, 57.4, 57.3, 57.1, 56.4, 53.9, 51.9, 45.8, 38.7, 38.1, 37.6, 36.9, 36.6 ($\times 2$), 31.1, 31.0, 29.7, 27.6, 26.6, 24.0, 23.9, 23.7, 23.5, 22.9, 22.5, 22.2, 21.0, 19.2 ($\times 2$), 17.8, 15.4, 14.9, 11.1 ($\times 2$); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{84}\text{N}_{10}\text{O}_9\text{SNa}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1023.6036, found 1023.6055.

seco-surugamide B-methyl ester (**31**)



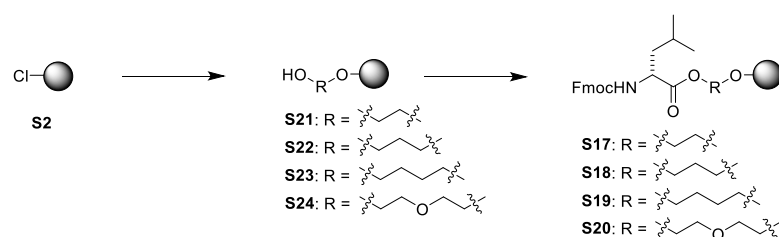
31: To the linear octapeptide **S3** prepared by SPPS approach in DMF (1 mL) were added DIPEA (88 μL , 0.493 mmol) and iodomethane (31 μL , 0.498 mmol). After being stirred for 15 min at 100 $^{\circ}\text{C}$ with microwave, the reaction mixture was

quenched with saturated aqueous NH_4Cl . The resulting solution was extracted with EtOAc ($\times 3$). The organic layer was washed with brine, dried over MgSO_4 , and filtered. The solution was concentrated and azeotroped with toluene ($\times 3$). To the residue was added a cleaving cocktail of $\text{TFA}/\text{H}_2\text{O}/\text{TIS} = 95:2.5:2.5$ (1.00 mL) to remove the protecting group. After being stirred for 1 h, the reaction mixture was filtered, and the reaction mixture was diluted with Et_2O (24 mL), centrifuged at $3500 \times g$ for 5 min at 4 $^{\circ}\text{C}$, and Et_2O layer was removed by decantation. This procedure was repeated twice. The crude was purified by reversed-phase HPLC (COSMOSIL 5C₁₈-AR-II 10 $\times$ 250 mm, nacalai tesque) with $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}$ (= 40:60) containing 0.05% TFA to afford peptides **31** (8.1 mg, 35% for 17 steps) as a white solid: $[\alpha]_{\text{D}}^{26}$ -5.3 (*c* 0.20, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.64 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 8.34 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz), 8.24 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 8.19-8.03 (m, 5H), 7.91 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 7.73 (br, 2H), 7.29-7.13 (m, 5H), 4.67 (quin, 1H, $J = 7.3$ Hz), 4.59 (ddd, 1H, $J = 11.3, 9.1, 4.1$ Hz), 4.50 (dd, 1H, $J = 9.1, 6.3$ Hz), 4.32-4.24 (m, 3H), 4.09 (dd, 1H, $J = 8.2, 7.3$ Hz), 3.69 (m, 1H), 3.61 (s, 3H),

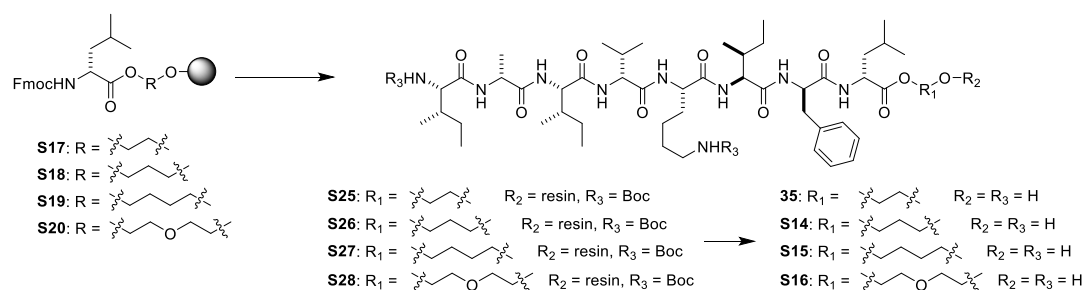
3.07 (dd, 1H, $J = 14.5, 3.6$ Hz), 2.75-2.65 (m, 3H), 1.93 (m, 1H), 1.83-1.32 (m, 12H), 1.31-1.21 (m, 2H), 1.19 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz), 1.16-1.03 (m, 3H), 0.93-0.75 (m, 25H), 0.64 (t, 3H, $J = 7.7$ Hz), 0.48 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{S20 DMSO-}d_6$) δ 172.7, 171.5 ($\times 3$), 170.9, 170.7 ($\times 2$), 167.2, 137.8, 129.2, 128.0, 126.2, 57.4, 57.2, 56.2 ($\times 2$), 53.7, 51.9 ($\times 2$), 50.4, 47.9, 38.7, 37.6, 37.4, 36.5 ($\times 2$), 36.1, 31.3, 30.9, 26.6, 24.2, 24.0, 23.9, 23.7, 22.8, 22.2, 21.3, 19.7, 19.2, 17.9, 15.3, 14.9, 14.5, 11.2, 11.1 ($\times 2$); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{84}\text{N}_9\text{O}_9^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 930.6387, found 930.6383.

Synthesis of diol-activated linear peptides

seco-surugamide B-EG (**S35**), *seco*-surugamide B-PD (**S14**), *seco*-surugamide B-BD (**S15**) and *seco*-surugamide B-DEG (**S16**)



Fmoc-D-Leu-diol-2-chlorotrityl resins (S17-S20**):** 2-chlorotrityl resin **S2** (120 mg, 0.188 mmol) in Libra tube was swelled with CH_2Cl_2 for 10 min, and then excess solvent was removed by filtration. To the resin was added a solution of diols [ethylene glycol (EG), 1,3-propanediol (PD), 1,4-butanediol (BD) and diethylene glycol (DEG)] (0.752 mmol), and DIPEA (163.7 μL , 0.940 mmol) in CH_2Cl_2 (2.0 mL), and shaken for 2 h at 40°C to give diol-2-chlorotrityl resins **S21-S24**. To the resin was added a solution of Fmoc D-Leu-OH (132.9 mg, 0.376 mmol), DIC (117.7 μL , 0.752 mmol) and DMAP (0.00188 mmol, 0.230 mg) in CH_2Cl_2 (2.0 mL) and stirred for 3 h at 40°C to give Fmoc-D-Leu-diol-2-chlorotrityl resins **S17-S20**. Dried **S17-S20** (5.0 mg) was added with 20% piperidine in DMF, and stirred for 1 h. The supernatant was diluted with DMF, and was subjected to UV measurement. Loading rates for **S17-S20** were calculated to be 0.685 mmol/g, 0.792 mmol/g, 0.530 mmol/g and 0.475 mmol/g, respectively, from observed UV absorbance at 301 nm.



Diol-activated peptides (35, S14-S16): The resins **S17**, **S18**, **S19**, and **S20** (0.025 mmol) in Libra tube were swelled in CH₂Cl₂ for 10 min, which was subjected to 7 cycles [Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Lys (Boc)-OH, Fmoc-D-Val-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-D-Ala-OH, Boc-L-Ile-OH] of SPPS protocol described above to afford resin-bound peptides **S25-S28**. To the peptides **S25-S28** were added TFA/H₂O/TIP = 95:2.5:2.5 (1.0 mL), being shaken for 30 min, and then the reaction mixture was filtered. This procedure was repeated twice. The filtrate was diluted with Et₂O (12 mL) and was chilled (−80 °C), then centrifuged with 3,500 × g for 10 min at 4 °C to afford crude peptides. The crude peptides were purified by HPLC with COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 20 mm I.D. × 250 mm, which was eluted by mobile phase MeCN:H₂O (= 40:60) containing 0.05 % TFA with flow rate at 10 ml/min, to afford peptides **35** (15.9 mg, 82.8 % for 15 steps), **S14** (9.5 mg, 39.0 % for 15 steps), **S15** (8.4 mg, 34.0 % for 15 steps), and **S16** (11.5 mg, 45.8 % for 15 steps) as a colorless amorphous solid.

seco-surugamide B-EG (**35**): [α]_D²¹ +4.26 (*c* 0.95, DMSO); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.62 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.32 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.22 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.09 (dd, *J* = 26.5, 9.0 Hz, 5H), 7.88-7.81 (m, 3H), 7.24-7.10 (m, 5H), 4.81 (br, 1H), 4.63 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.55 (t, *J* = 11.0 Hz, 1H), 4.45 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.29-4.22 (m, 3H), 4.06 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.00 (d, *J* = 3.6 Hz, 2H), 3.66 (s, 1H), 3.52 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H), 3.03 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 2.67 (t, *J* = 11.7 Hz, 3H), 2.46 (s, 3H), 1.89 (q, *J* = 6.4 Hz, 1H), 1.70 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.54-1.39 (m, 7H), 1.21 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.16-1.11 (m, 3H), 1.09-1.02 (m, 3H), 0.88-0.73 (m, 25H), 0.59 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.44 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.5, 171.7, 171.6, 171.5, 171.0, 170.8, 170.8, 167.3, 137.9, 129.2 (2×CH), 128.0 (2×CH), 126.2, 66.3, 58.9, 57.4, 57.2, 56.3, 56.2, 53.8, 52.0, 50.5, 48.6, 48.0, 40.4, 38.7, 37.6, 37.4, 36.6, 36.2, 31.4, 31.0, 26.6, 24.2, 24.0, 23.8, 22.9, 22.3, 21.4, 19.8, 19.3, 17.9, 15.4, 14.9, 14.5, 11.3, 11.2, 11.0; HRMS (ESI) calcd for C₄₉H₈₅N₉O₁₀Na⁺ [M+Na]⁺ 982.63116, found 982.62977.

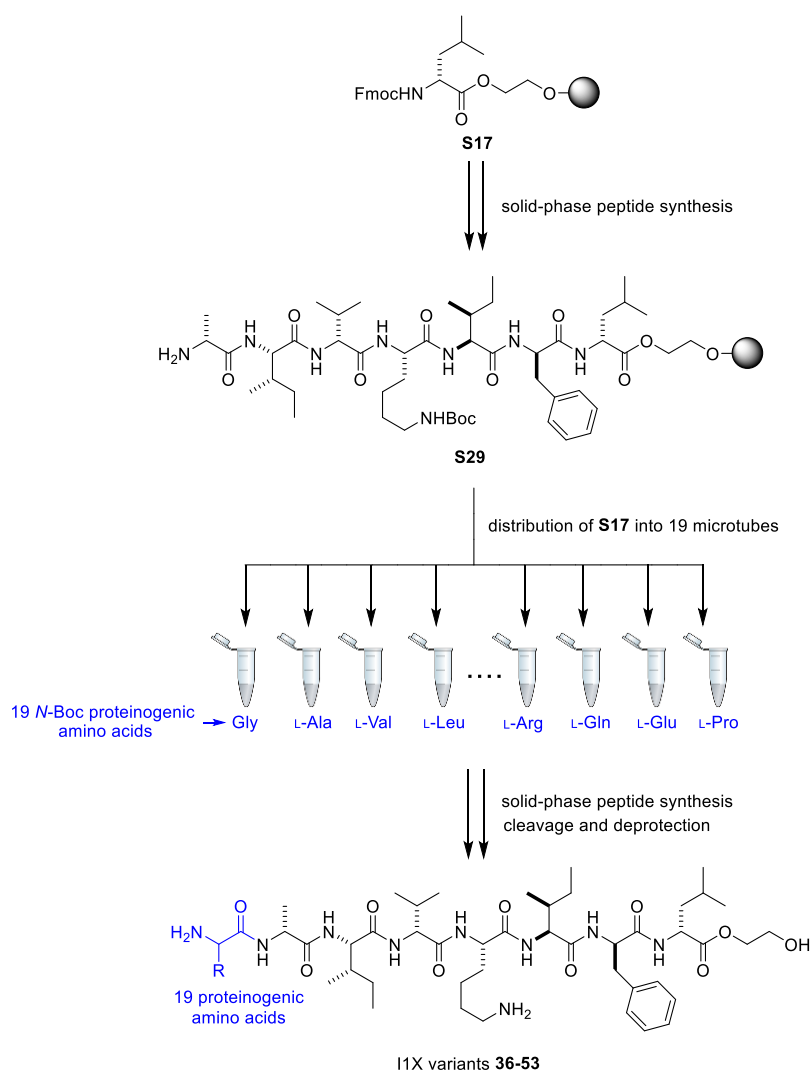
seco-surugamide B-PD (**S14**): [α]_D²¹ +4.83 (*c* 0.68, DMSO); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.61 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.33 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.12 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.07 (s, 3H), 7.85 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.78 (s, 2H), 7.18 (td, *J* = 19.2, 6.4 Hz, 5H), 4.63 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.57 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H), 4.46 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.23 (d, *J* = 4.9 Hz, 3H), 4.06 (t, *J* = 6.3 Hz, 3H), 3.66 (s, 1H), 3.46-3.40 (m, 2H), 3.02 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H), 2.66-2.58 (m, 3H), 2.46 (s, 3H), 1.89 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 1.73-1.63 (m, 4H), 1.55-1.38 (m, 7H), 1.22 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.15 (d, *J* = 5.4 Hz, 3H), 1.07-1.03 (m, 3H), 0.88-0.73 (m, 25H), 0.59 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.44 (d, *J* = 5.4 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.4, 171.7, 171.6, 171.5, 171.0, 170.8, 170.7, 167.3, 137.9, 129.2 (2×CH), 128.0 (2×CH), 126.3, 61.9, 57.4, 57.2, 57.2, 57.1, 56.2, 53.7, 52.0, 50.6, 47.9, 40.4, 38.7,

37.6, 37.4, 36.6, 36.2, 31.6, 31.5, 31.4, 31.0, 26.6, 24.3, 24.0, 23.8, 22.8, 22.3, 21.4, 19.8, 19.3, 17.9, 15.4, 14.9, 14.5, 11.3, 11.2, 11.0; HRMS (ESI) calcd for $C_{50}H_{88}N_9O_{10}^+$ $[M+H]^+$ 974.66487, found 974.66501.

seco-surugamide B-BD (**S15**): $[\alpha]_D^{22} +5.12$ (*c* 0.52, DMSO); 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.61 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.34 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.12 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 8.06 (s, 3H), 7.85 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.76 (s, 2H), 7.24-7.10 (m, 5H), 4.63 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.59-4.54 (m, 1H), 4.48-4.44 (m, 1H), 4.24 (s, 3H), 4.07 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.00 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H), 3.65 (s, 1H), 3.35 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.02 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H), 2.65 (d, *J* = 13.0 Hz, 3H), 2.46 (s, 3H), 1.89 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H), 1.73 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.64-1.39 (m, 11H), 1.23-1.14 (m, 5H), 1.05 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.88-0.73 (m, 25H), 0.58 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H), 0.44 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 172.4, 171.7, 171.5, 171.5, 171.0, 170.7, 170.7, 167.3, 137.9, 129.2 (2 $\times$ CH), 128.0 (2 $\times$ CH), 126.2, 64.5, 60.2, 57.3, 57.1, 56.2, 56.2, 53.7, 52.0, 50.6, 47.9, 40.4, 38.7, 38.7, 37.6, 37.4, 36.7, 36.2, 31.4, 31.1, 28.7, 26.6, 25.0, 24.3, 24.0, 23.7, 22.8, 22.3, 21.4, 19.8, 19.3, 17.9, 15.4, 14.9, 14.5, 11.3, 11.2, 11.0; HRMS (ESI) calcd for $C_{51}H_{90}N_9O_{10}^+$ $[M+H]^+$ 988.68052, found 988.67923.

seco-surugamide B-DEG (**S16**): $[\alpha]_D^{22} +3.93$ (*c* 0.79, DMSO); 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.61 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.35 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.13-8.06 (m, 5H), 7.86-7.76 (m, 3H), 7.24-7.12 (m, 5H), 4.63 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.56 (t, *J* = 11.0 Hz, 1H), 4.46 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.23 (d, *J* = 4.0 Hz, 3H), 4.14 (s, 1H), 4.09-4.05 (m, 2H), 3.65 (s, 1H), 3.55 (s, 2H), 3.42 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H), 3.38 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H), 3.02 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H), 2.63 (t, *J* = 12.6 Hz, 3H), 2.46 (s, 3H), 1.89 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H), 1.71-1.61 (m, 2H), 1.52-1.45 (m, 7H), 1.21 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.15 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.06 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.88-0.73 (m, 25H), 0.58 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.44 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 172.4, 171.7, 171.5, 171.5, 171.0, 170.7, 170.7, 167.3, 137.9, 129.2 (2 $\times$ CH), 128.0 (2 $\times$ CH), 126.2, 72.3, 68.2, 63.9, 60.2, 57.3, 57.1, 56.2, 56.2, 53.7, 52.0, 50.5, 47.9, 40.4, 38.7, 38.7, 37.6, 37.4, 36.6, 36.2, 31.4, 31.0, 26.6, 24.2, 24.0, 23.7, 22.7, 22.3, 21.4, 19.8, 19.3, 17.9, 15.4, 14.9, 14.5, 11.3, 11.2, 11.0; HRMS (ESI) calcd for $C_{51}H_{90}N_9O_{10}^+$ $[M+H]^+$ 1004.67543, found 1004.67404.

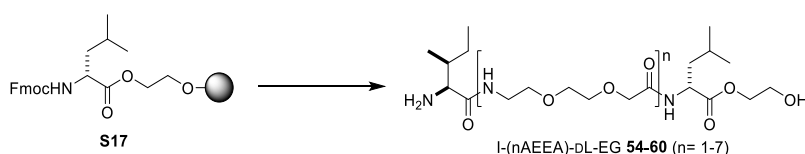
seco-surugamide B (IIX)-EG (36-53)



***seco*-surugamide B (IIX)-EG variants (36-53):** Fmoc-D-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S17** (loading rate: 0.578 mmol/g, 0.0125 mmol, 21.6 mg) in Libra tube was swelled in CH₂Cl₂ for 10 min, which was then subjected to 6 cycles [Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-D-Val-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-D-Ala-OH] of SPPS protocol to afford resin-bound peptide **S29**. Then **S29** was divided into nineteen microtubes each of which contain nineteen *N*-Boc proteinogenic amino acids (i.e. Boc-Gly-OH, Boc-L-Ala-OH, Boc-L-Val-OH, Boc-L-Leu-OH, Boc-L-Phe-OH, Boc-L-Trp(Boc)-OH, Boc-L-Met-OH, Boc-L-His(Trt)-OH, Boc-L-Arg(Pbf)-OH, Boc-L-Lys(Boc)-OH, Boc-L-Ser(tBu)-OH, Boc-L-Thr(tBu)-OH, Boc-L-Tyr(tBu)-OH, Boc-L-Asp(OtBu)-OH, Boc-L-Glu(OtBu)-OH, Boc-L-Asn(Trt)-OH, Boc-L-Gln(Trt)-OH, Boc-L-Pro-OH, Boc-L-Cys(Trt)-OH) except for L-Ile. To the resin was added a solution of DIC (0.0025 mmol) and Oxyma (0.0025 mmol) in DMF (1.0 mL),

and stirred for 40 min at 37 °C. The reaction mixture was removed, and the resin was washed with CH₂Cl₂ (×3). Then Boc deprotection and cleavage of the peptide from the resin was carried out by the solution of TFA/H₂O/TIP = 95:2.5:2.5 (1.0 mL). The reaction mixture was shaken for 30 min, and then were filtered. This procedure was repeated twice. The filtrate was diluted with Et₂O and was chilled (–80 °C), then centrifuged with 3,500 × g for 10 min at 4 °C to give *N*-terminal amino acid-substituted IIX variants **36–53**, which were used for enzyme assays without further purifications. The structures of **36–53** were verified by LC-MS/MS analysis (pp. 237-255, **Figure S11–S46**). Variant with *N*-terminal L-Cys was not amenable for my parallel synthesis.

AEEA-containing EG-substrates (**54–60**)



I-(1AEEA)-dL-EG (54**):** **54** was synthesized following the same procedure as for peptide **35** with the substitution of six Fmoc-amino acids of **35** (Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Lys (Boc)-OH, Fmoc-D-Val-OH, Fmoc-L-Ile-OH, and Fmoc-D-Ala-OH) for one Fmoc-8-amino-3,6-dioxaoctanoic acid (Fmoc-AEEA-OH). The synthesis was initiated from Fmoc-D-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S17** (loading rate: 0.625 mmol/g, 0.020 mmol, 32.0 mg). The crude peptide obtained after Et₂O precipitation was purified by reversed phase HPLC with COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 20 mm I.D. × 250 mm, which was eluted by mobile phase MeCN:H₂O (= 37:63) containing 0.05 % TFA with flow rate at 10 ml/min, to afford peptide **54** (6.7 mg, 77.3 % in 5 steps) as a colorless amorphous solid: $[\alpha]_D^{22} +13.74$ (*c* 0.43, DMSO); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.46 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H), 8.08 (s, 2H), 7.97-7.91 (m, 1H), 4.80 (br, 1H), 4.34 (t, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.01-3.97 (m, 2H), 3.90 (s, 1H), 3.84 (s, 1H), 3.54-3.52 (m, 7H), 3.42 (q, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.37 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 3.18-3.13 (m, 1H), 1.73 (s, 1H), 1.62-1.43 (m, 4H), 1.13-1.01 (m, 1H), 0.85-0.83 (m, 5H), 0.81-0.80 (m, 7H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.5, 169.6, 167.9, 70.1, 69.6, 69.3, 68.8, 66.4, 58.9, 56.5, 49.8, 40.4, 38.7, 36.1, 24.3, 24.1, 22.9, 21.2, 14.5, 11.1; HRMS (ESI) calcd for C₂₀H₄₀N₃O₇⁺ [M+H]⁺ 434.28608, found 434.28521.

I-(2AEEA)-dL-EG (55**):** **55** was synthesized following the same procedure as for peptide **35** with the substitution of six Fmoc-amino acids of **35** (Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Lys (Boc)-OH, Fmoc-D-Val-OH, Fmoc-L-Ile-OH, and Fmoc-D-Ala-OH) for two Fmoc-AEEA-OH. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S17** (loading rate: 0.625 mmol/g, 0.035 mmol, 56.0 mg). The crude peptide obtained after Et₂O precipitation was purified by reversed phase HPLC with

COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 20 mm I.D. × 250 mm, which was eluted by mobile phase MeCN:H₂O (= 37:63) containing 0.05 % TFA with flow rate at 10 ml/min, to afford peptide **55** (16.6 mg, 82.0 % in 7 steps) as a colorless amorphous solid: $[\alpha]_D^{22} +14.22$ (*c* 0.43, DMSO); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.42 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 8.12-8.08 (m, 2H), 7.90 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.65 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 4.78 (br, 1H), 4.34 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.02-4.00 (m, 2H), 3.89 (s, 2H), 3.84 (s, 2H), 3.53 (s, 12H), 3.41 (d, *J* = 5.0 Hz, 4H), 3.24 (q, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.18-3.13 (m, 1H), 1.74 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 1.62-1.50 (m, 2H), 1.11-1.00 (m, 1H), 0.86-0.81 (m, 14H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.4, 169.5, 169.3, 167.8, 70.1, 70.1, 69.9, 69.6, 69.4, 69.3, 68.9, 68.7, 66.3, 58.9, 56.5, 49.8, 40.4, 38.7, 37.9, 36.1, 24.3, 24.1, 22.8, 21.2, 14.4, 11.1; HRMS (ESI) calcd for C₂₆H₅₁N₄O₁₀⁺ [M+H]⁺ 579.35997, found 579.35834.

I-(3AEEA)-dL-EG (56): **56** was synthesized following the same procedure as for peptide **35** with the substitution of six Fmoc-amino acids of **35** (Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Lys (Boc)-OH, Fmoc-D-Val-OH, Fmoc-L-Ile-OH, and Fmoc-D-Ala-OH) for three Fmoc-AEEA-OH. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S17** (loading rate: 0.625 mmol/g, 0.0125 mmol, 20.0 mg). The crude peptide obtained after Et₂O precipitation was purified by reversed phase HPLC with COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 20 mm I.D. × 250 mm, which was eluted by mobile phase MeCN:H₂O (= 37:63) containing 0.05 % TFA with flow rate at 10 ml/min, to afford peptide **56** (7.3 mg, 80.7 % in 9 steps) as a colorless amorphous solid: $[\alpha]_D^{22} +9.36$ (*c* 0.50, DMSO); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.42 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 8.13-8.06 (m, 2H), 7.90 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 4.75 (br, 1H), 4.34 (t, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.02 (td, *J* = 5.0, 1.4 Hz, 2H), 3.89 (s, 2H), 3.84-3.84 (m, 3H), 3.52 (s, 16H), 3.43-3.40 (m, 8H), 3.24 (q, *J* = 5.8 Hz, 4H), 1.74 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 1.62-1.42 (m, 4H), 1.13-1.04 (m, 1H), 0.86-0.81 (m, 12H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.4, 169.5, 169.3, 169.3, 167.8, 70.1 (3×CH₂), 69.9, 69.9, 69.6, 69.3 (3×CH₂), 68.9, 68.9, 68.7, 66.3, 58.9, 56.5, 49.8, 40.4, 38.7, 38.0, 37.9, 36.1, 24.3, 24.1, 22.8, 21.2, 14.4, 11.1; HRMS (ESI) calcd for C₃₂H₆₂N₅O₁₃⁺ [M+H]⁺ 724.43386, found 724.43274.

I-(4AEEA)-dL-EG (57): **57** was synthesized following the same procedure as for peptide **35** with the substitution of six Fmoc-amino acids of **35** (Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Lys (Boc)-OH, Fmoc-D-Val-OH, Fmoc-L-Ile-OH, and Fmoc-D-Ala-OH) for four Fmoc-AEEA-OH. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S17** (loading rate: 0.625 mmol/g, 0.015 mmol, 25.0 mg). The crude peptide obtained after Et₂O precipitation was purified by reversed phase HPLC with COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 20 mm I.D. × 250 mm, which was eluted by mobile phase MeCN:H₂O (= 37:63) containing 0.05 % TFA with flow rate at 10 ml/min, to afford peptide **57** (11.1 mg, 85.2 % in 11 steps) as a colorless amorphous solid: $[\alpha]_D^{23} +9.34$ (*c* 0.76, DMSO); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-

d_6) δ 8.45 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 8.08 (s, 2H), 7.92 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.68-7.61 (m, 3H), 4.78 (br, 1H), 4.38-4.32 (m, 1H), 4.01 (td, J = 5.2, 1.3 Hz, 1H), 3.89 (s, 2H), 3.83 (s, 4H), 3.76 (s, 2H), 3.52 (s, 16H), 3.46-3.44 (m, 3H), 3.41 (t, J = 5.8 Hz, 8H), 3.35 (t, J = 5.6 Hz, 3H), 3.24 (q, J = 6.0 Hz, 4H), 3.17 (d, J = 4.9 Hz, 2H), 1.73 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 1.62-1.41 (m, 5H), 1.19-0.95 (m, 1H), 0.85-0.79 (m, 11H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 172.4, 169.5, 169.3 (3 $\times$ C=O), 167.8, 70.1 (3 $\times$ CH₂), 69.9 (3 $\times$ CH₂), 69.6, 69.4, 69.3 (4 $\times$ CH₂), 68.9 (3 $\times$ CH₂), 68.8, 66.3, 58.9, 56.5, 49.8, 40.4, 38.7, 38.0, 37.9, 37.9, 36.1, 24.3, 24.1, 22.8, 21.2, 14.4, 11.1; HRMS (ESI) calcd for C₃₈H₇₃N₆O₁₆⁺ [M+H]⁺ 869.50776, found 869.50618.

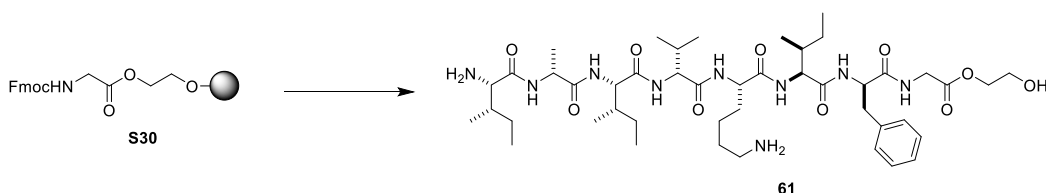
I-(5AEEA)-dL-EG (58): **58** was synthesized following the same procedure as for peptide **35** with the substitution of six Fmoc-amino acids of **35** (Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Lys (Boc)-OH, Fmoc-D-Val-OH, Fmoc-L-Ile-OH, and Fmoc-D-Ala-OH) for five Fmoc-AEEA-OH. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S17** (loading rate: 0.625 mmol/g, 0.020 mmol, 32.0 mg). The crude peptide obtained after Et₂O precipitation was purified by reversed phase HPLC with COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 20 mm I.D. $\times$ 250 mm, which was eluted by mobile phase MeCN:H₂O (= 37:63) containing 0.05 % TFA with flow rate at 10 ml/min, to afford peptide **58** (14.6 mg, 72.0 % in 13 steps) as a colorless amorphous solid: $[\alpha]_D^{22} +7.85$ (c 0.95, DMSO); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.43 (s, 1H), 8.07 (s, 2H), 7.89 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 3.2 Hz, 4H), 4.88 (br, 1H), 4.34 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 4.01 (t, J = 4.3 Hz, 2H), 3.89 (s, 2H), 3.83 (s, 8H), 3.52 (s, 22H), 3.42-3.35 (m, 12H), 3.24 (q, J = 5.6 Hz, 8H), 3.17 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 1.74 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 1.62-1.42 (m, 4H), 1.20-0.95 (m, 1H), 0.86-0.80 (m, 12H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 172.4, 169.5, 169.3 (4 $\times$ C=O), 167.8, 70.1 (5 $\times$ CH₂), 69.9 (5 $\times$ CH₂), 69.6, 69.4, 69.3 (4 $\times$ CH₂), 68.9 (5 $\times$ CH₂), 68.8, 66.3, 58.9, 56.5, 49.8, 40.4, 38.7, 37.9 (2 $\times$ CH₂), 36.1, 24.3, 24.1, 22.8, 21.2, 14.4, 11.1; HRMS (ESI) calcd for C₄₄H₈₄N₇O₁₉⁺ [M+H]⁺ 1014.58165, found 1014.57988.

I-(6AEEA)-dL-EG (59): **59** was synthesized following the same procedure as for peptide **35** with the substitution of six Fmoc-amino acids of **35** (Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Lys (Boc)-OH, Fmoc-D-Val-OH, Fmoc-L-Ile-OH, and Fmoc-D-Ala-OH) for six Fmoc-AEEA-OH. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S17** (loading rate: 0.625 mmol/g, 0.015 mmol, 20.0 mg). The crude peptide obtained after Et₂O precipitation was purified by reversed phase HPLC with COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 20 mm I.D. $\times$ 250 mm, which was eluted by mobile phase MeCN:H₂O (= 37:63) containing 0.05 % TFA with flow rate at 10 ml/min, to afford peptide **59** (13.0 mg, 74.8 % in 15 steps) as a colorless amorphous solid: $[\alpha]_D^{23} +7.15$ (c 0.74, DMSO); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.43 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 8.06 (s, 2H), 7.89 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 4.6 Hz, 5H), 4.79 (br,

1H), 4.34 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H), 4.02 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 3.89 (s, 2H), 3.83 (s, 10H), 3.52 (s, 26H), 3.43-3.35 (m, 16H), 3.24 (q, $J = 5.6$ Hz, 8H), 3.18-3.15 (m, 1H), 1.73 (s, 1H), 1.62-1.42 (m, 4H), 1.20-0.95 (m, 1H), 0.86-0.80 (m, 12H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 172.4, 169.5, 169.3 (5 $\times$ C=O), 167.8, 70.1 (6 $\times$ CH $_2$), 69.9 (6 $\times$ CH $_2$), 69.6, 69.4, 69.3 (5 $\times$ CH $_2$), 68.9 (6 $\times$ CH $_2$), 68.8, 66.3, 58.9, 56.5, 49.8, 40.4, 38.7, 38.0, 37.9 (2 $\times$ CH $_2$), 36.1, 24.3, 24.1, 22.8, 21.2, 14.4, 11.1; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{95}\text{N}_8\text{O}_{22}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 1159.65554, found 1159.65426.

I-(7AEEA)-dL-EG (60): **60** was synthesized following the same procedure as for peptide **35** with the substitution of six Fmoc-amino acids of **35** (Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Lys (Boc)-OH, Fmoc-D-Val-OH, Fmoc-L-Ile-OH, and Fmoc-D-Ala-OH) for seven Fmoc-AEEA-OH. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S17** (loading rate: 0.625 mmol/g, 0.025 mmol, 40.0 mg). The crude peptide obtained after Et $_2$ O precipitation was purified by reversed phase HPLC with COSMOSIL 5C $_{18}$ -MS-II 20 mm I.D. $\times$ 250 mm, which was eluted by mobile phase MeCN:H $_2$ O (= 37:63) containing 0.05 % TFA with flow rate at 10 ml/min, to afford peptide **60** (27.1mg, 83.1 % in 17 steps) as a colorless amorphous solid: $[\alpha]_{\text{D}}^{23} +6.65$ (c 0.97, DMSO); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.43 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H), 8.07 (s, 2H), 7.89 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.66-7.61 (m, 6H), 4.38-4.32 (m, 1H), 4.02 (td, $J = 5.0, 1.4$ Hz, 2H), 3.89 (s, 2H), 3.83 (s, 12H), 3.52 (s, 30H), 3.43-3.35 (m, 18H), 3.24 (q, $J = 5.9$ Hz, 10H), 3.17 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 1.74 (t, $J = 3.2$ Hz, 1H), 1.63-1.42 (m, 4H), 1.19-0.95 (m, 1H), 0.86-0.80 (m, 12H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 172.4, 169.5, 169.3 (6 $\times$ C=O), 167.8, 70.2 (7 $\times$ CH $_2$), 69.9 (7 $\times$ CH $_2$), 69.6, 69.4, 69.3 (6 $\times$ CH $_2$), 68.9 (7 $\times$ CH $_2$), 66.3, 58.9, 56.5, 49.8, 43.7, 40.4, 38.7, 38.0 (3 $\times$ CH $_2$), 36.1, 24.3, 24.1, 22.8, 22.2, 21.2, 14.4, 11.1; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{56}\text{H}_{105}\text{N}_9\text{O}_{25}\text{Na}^+ [\text{M}+\text{Na}]^+$, 1326.71138 found 1326.70924.

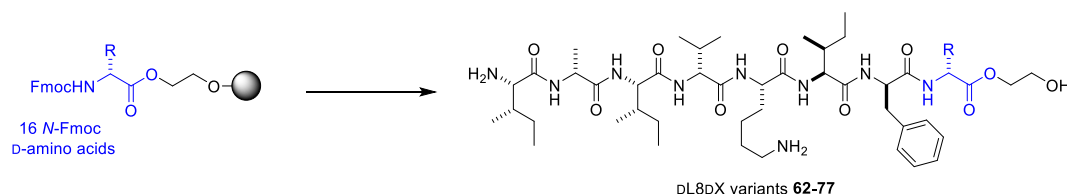
seco-surugamide B (DL8G)-EG (61)



61 was synthesized following the same procedure as for peptide **35** with the substitution of Fmoc-D-Leu-OH for Fmoc-Gly-OH. The synthesis was initiated from Fmoc-Gly-EG-2-chlorotrityl resin **S30** (loading rate: 0.678 mmol/g, 0.025 mmol, 36.9 mg). The crude peptide obtained after Et $_2$ O precipitation was purified by reversed phase HPLC with COSMOSIL 5C $_{18}$ -MS-II 20 mm I.D. $\times$ 250

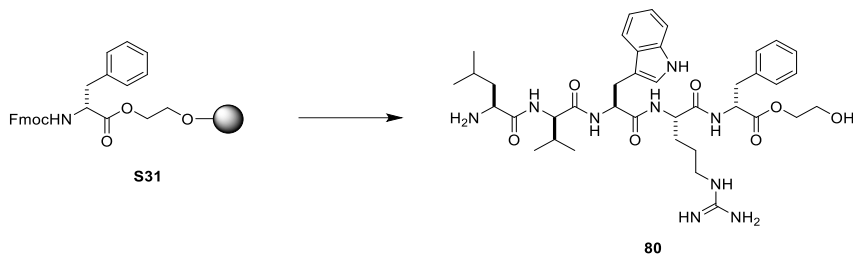
mm, which was eluted by mobile phase MeCN:H₂O (= 37:63) containing 0.05 % TFA with flow rate at 10 ml/min, to afford peptide **61** (19.1 mg, 84.5 % in 15 steps) as a colorless amorphous solid: $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ -0.98 (*c* 0.78, DMSO); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.62 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.41 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.36 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 8.2 Hz, 4H), 7.94 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.76 (s, 2H), 7.24-7.10 (m, 5H), 4.69-4.62 (m, 1H), 4.58-4.52 (m, 1H), 4.44 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.27-4.17 (m, 2H), 4.03 (q, *J* = 4.7 Hz, 3H), 3.92-3.77 (m, 2H), 3.68 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 3.55 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.08 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 2.73-2.66 (m, 3H), 2.46 (s, 3H), 1.89 (td, *J* = 13.3, 6.4 Hz, 1H), 1.76-1.70 (m, 2H), 1.56-1.32 (m, 5H), 1.21 (q, *J* = 7.6 Hz, 1H), 1.15 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.08-0.99 (m, 1H), 0.87-0.74 (m, 19H), 0.62 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 0.42 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.9, 171.8, 171.5, 171.1, 170.9, 170.8, 169.7, 167.3, 138.0, 129.1 (2×CH), 128.0 (2×CH), 126.2, 66.3, 58.9, 57.7, 57.4, 56.2, 54.1, 51.9, 47.9, 40.8, 40.4, 38.7, 37.5, 37.3, 36.1, 35.9, 31.5, 30.7, 26.6, 24.1, 24.0, 23.9, 22.0, 19.7, 19.2, 18.0, 15.2, 14.8, 14.5, 11.1, 11.0, 11.0; HRMS (ESI) calcd for C₄₅H₇₈N₉O₁₀⁺ [M+H]⁺ 904.58662, found 904.58499.

seco-surugamide B (DL8X)-EG (**62-77**)



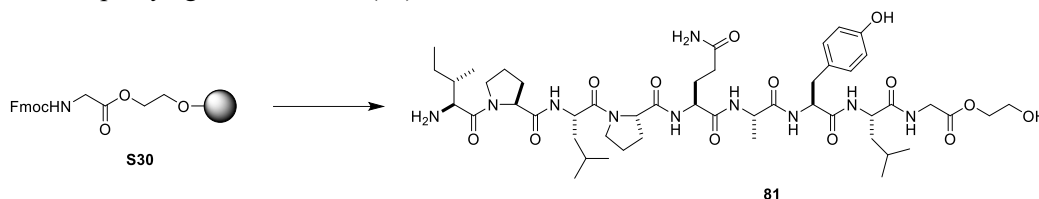
62-77 were synthesized following the same procedure as for peptide **35** with the substitution of Fmoc-D-Leu-OH at the position 1 for sixteen Fmoc-D-amino acid-OH (i.e. Fmoc-D-Ala-OH, Fmoc-D-Val-OH, Fmoc-D-*allo*Ile-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-D-Trp(Boc)-OH, Fmoc-D-Met-OH, Fmoc-D-His(Trt)-OH, Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-D-Lys(Boc)-OH, Fmoc-D-Ser(tBu)-OH, Fmoc-D-Thr(tBu)-OH, Fmoc-D-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-D-Asp(tBu)-OH, Fmoc-D-Glu(tBu)-OH, Fmoc-D-Asn(Trt)-OH, Fmoc-D-Gln(Trt)-OH). **62-77** obtained after Et₂O precipitation were used for enzyme assay without further purification. The structures of **62-77** were verified by LC-MS/MS analysis (pp. 262-276, **Figure S56-S83**). Variants with C-terminal D-Cys and D-Pro were not amenable for my parallel synthesis.

seco-deoxypentaminomycin C-EG (**80**)



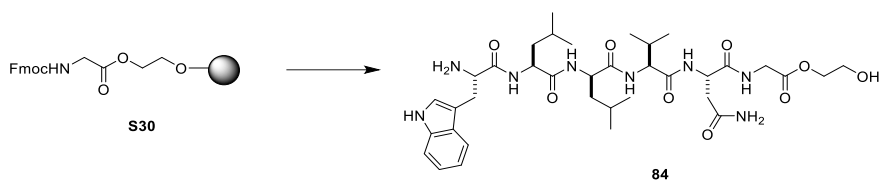
The synthesis of **80** was initiated with Fmoc-D-Phe-EG-2-chlorotrityl resin **S31** (loading rate: 0.500 mmol/g, 0.010 mmol, 20.0 mg) in Libra tube, which was subjected to 4 cycles [Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-D-Val-OH, Boc-L-Leu-OH] of SPPS protocol described above to afford the resin-bound pentapeptide. To the peptide was added TFA/DODT/phenol/TIP=92.5:2.5:2.5:2.5 (2.0 mL), being shaken for 30 min, and then the reaction mixture was filtered. This procedure was repeated twice. The filtrate was diluted with Et₂O (12 mL) and was chilled (−80 °C), then centrifuged with 3,500 × g for 10 min at 4 °C to afford crude peptide **80**. The crude peptide was purified by reversed phase HPLC with COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 20 mm I.D. × 250 mm, which was eluted by mobile phase MeCN:H₂O (= 32.5:67.5) containing 0.05 % TFA with flow rate at 10 ml/min, to afford peptide **80** (5.9 mg, 77% for 9 steps) as a colorless amorphous solid: [α]_D²² −4.68 (*c* 0.80, DMSO); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.74 (s, 1H), 8.54 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.46 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.26 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.05 (s, 3H), 7.72 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.26-7.14 (m, 7H), 7.07 (d, *J* = 13.3 Hz, 2H), 7.01-6.98 (m, 1H), 6.91 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.84 (br, 1H), 4.64-4.59 (m, 1H), 4.51 (td, *J* = 8.8, 5.0 Hz, 1H), 4.31-4.24 (m, 2H), 4.06-4.01 (m, 2H), 3.85 (s, 1H), 3.52 (s, 2H), 3.13-3.06 (m, 2H), 2.96 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.88-2.78 (m, 2H), 1.65-1.53 (m, 2H), 1.47 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.38-1.31 (m, 1H), 1.28-1.17 (m, 2H), 0.83 (t, *J* = 5.7 Hz, 6H), 0.46 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.36 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.6, 171.3 (2×C=O), 170.1, 169.3, 156.9, 137.1, 136.2, 129.2 (2×CH), 128.2 (2×CH), 127.1, 126.6, 124.1, 120.8, 118.6, 118.0, 111.2, 109.8, 66.5, 58.8, 57.3, 53.5, 53.1, 52.0, 50.8, 40.6, 40.4, 36.8, 30.9, 29.3, 28.2, 24.8, 23.7, 22.7, 21.7, 19.0, 17.2; HRMS (ESI) calcd for C₃₉H₅₈N₉O₇⁺ [M+H]⁺ 764.44537, found 764.44353.

seco-desprenylagaramide C-EG (**81**)



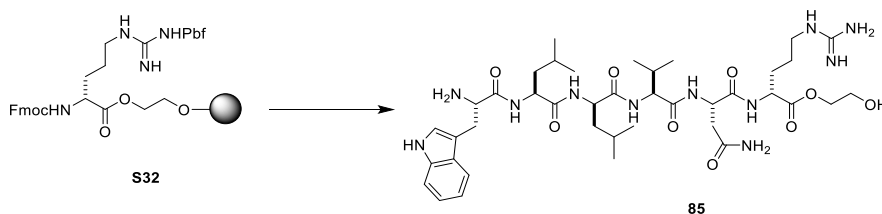
The synthesis of **81** was initiated with Fmoc-Gly-EG-2-chlorotrityl resin **S30** (loading rate: 0.678 mmol/g, 0.025 mmol, 36.9 mg) in Libra tube, which was subjected to 8 cycles [Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Boc-L-Ile-OH] of SPPS protocol described above to afford the resin-bound nonapeptide. To the peptide was added TFA/H₂O/TIP = 95:2.5:2.5 (1.0 mL), being shaken for 30 min, and then the reaction mixture was filtered. This procedure was repeated twice. The filtrate was diluted with Et₂O (12 mL) and was chilled (−80 °C), then centrifuged with 3,500 × *g* for 10 min at 4 °C to afford crude peptide. The crude peptide was purified by reversed phase HPLC with COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 20 mm I.D. × 250 mm, which was eluted by mobile phase MeCN:H₂O (= 35:65) containing 0.05 % TFA with flow rate at 10 ml/min, to afford peptide **81** (20.4 mg, 80.3 % for 17 steps) as a colorless amorphous solid; $[\alpha]_D^{22}$ -27.33 (*c* 0.76, DMSO), ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.13 (br, 1H), 8.12 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H), 8.03 (t, *J* = 5.9 Hz, 3H), 7.90-7.77 (m, 3H), 7.22 (s, 1H), 6.97 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.77 (s, 1H), 6.58 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.50 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 4.43-4.32 (m, 2H), 4.29-4.25 (m, 2H), 4.14 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 4.07 (dd, *J* = 13.7, 7.8 Hz, 1H), 4.01 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.96 (s, 1H), 3.84 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 3.78 (q, *J* = 5.9 Hz, 3H), 3.72 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 3.68 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.53 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H), 3.42 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 2.87 (dd, *J* = 13.3, 4.6 Hz, 1H), 2.66 (dd, *J* = 14.0, 8.9 Hz, 1H), 2.10-2.00 (m, 3H), 1.92-1.68 (m, 9H), 1.60-1.52 (m, 1H), 1.48-1.41 (m, 4H), 1.12 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.93 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.88-0.78 (m, 15H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 174.1, 172.3, 172.0, 171.8, 171.0, 170.9, 170.7, 170.7, 169.7, 166.6, 155.7, 130.1 (2×CH), 127.6, 114.9 (2×CH), 66.2, 59.7, 59.3, 58.9 (2×CH), 54.9, 54.2, 52.6, 50.8, 48.7, 48.4, 47.5, 46.7, 40.9, 40.5, 40.4, 36.4, 36.0, 31.5, 29.1, 28.9, 27.4, 24.7, 24.6, 23.9, 23.9, 23.4, 23.0, 21.6, 21.4, 18.0, 14.3, 11.2; HRMS (ESI) calcd for C₄₉H₇₉N₁₀O₁₃⁺ [M+H]⁺ 1015.58226, found 1015.58350.

seco-desotamide B-EG (84)



The synthesis of **84** was initiated with Fmoc-Gly-EG-2-chlorotrityl resin **S30** (loading rate: 0.57 mmol/g, 0.025 mmol, 43.9 mg) in Libra tube, which was subjected to 5 cycles [Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-D-Leu-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Boc-L-Trp(Boc)-OH] of SPPS protocol described above to afford the resin-bound hexapeptide. To the peptide was added TFA/H₂O/phenol/TIP =92.5:2.5:2.5:2.5 (2.0 mL), being shaken for 30 min, and then the reaction mixture was filtered. This procedure was repeated twice. The filtrate was diluted with Et₂O (12 mL) and was chilled (−80 °C), then centrifuged with 3,500 × *g* for 10 min at 4 °C to afford crude peptide **84**. The structure of **84** was verified by LC-MS/MS analysis (p. 279, **Figure S87**). The sample was subjected to cyclization assay without further purification.

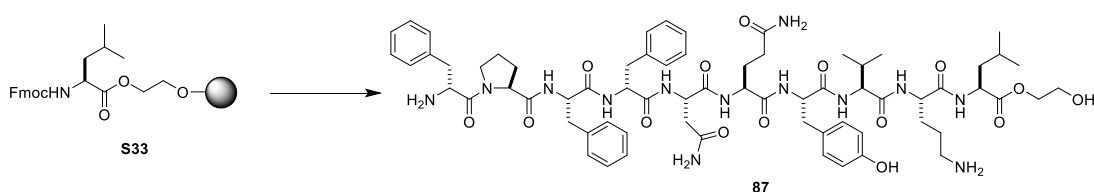
seco-wollamide B1-EG (85)



The synthesis of **85** was initiated with Fmoc-D-Arg(Pbf)-EG-2-chlorotrityl resin **S32** (loading rate: 0.510 mmol/g, 0.01 mmol, 19.6 mg) in Libra tube, which was subjected to 5 cycles [Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-D-Leu-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Boc-L-Trp(Boc)-OH] of SPPS protocol described above to afford the resin-bound hexapeptide. To the peptide was added TFA/H₂O/phenol/TIP =92.5:2.5:2.5:2.5 (2.0 mL), being shaken for 30 min, and then the reaction mixture was filtered. This procedure was repeated twice. The filtrate was diluted with Et₂O (12 mL) and was chilled (−80 °C), then centrifuged with 3,500 × *g* for 10 min at 4 °C to afford crude peptide. The crude peptide was purified by reversed phase HPLC with COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 20 mm I.D. × 250 mm, which was eluted by mobile phase MeCN:H₂O (= 32.5:67.5) containing 0.05 % TFA with flow rate at 10 ml/min, to afford peptide **85** (5.9 mg, 70 % for 11 steps) as a colorless amorphous solid; [α]_D²² −2.80 (*c* 0.75, DMSO); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.92 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.33-8.28 (m, 1H), 8.09 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.95-7.88 (m, 1H), 7.88-7.82 (m, 1H), 7.71 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.61-7.58

(m, 1H), 7.37-7.31 (m, 2H), 7.27-7.22 (m, 2H), 7.17 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.06 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.99-6.96 (m, 1H), 6.85 (s, 1H), 4.78 (br, 1H), 4.56 (q, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.44-4.40 (m, 1H), 4.20-4.18 (m, 2H), 4.03-3.95 (m, 2H), 3.51 (s, 2H), 3.23 (s, 1H), 3.02 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 2.47-2.45 (m, 4H), 2.43-2.40 (m, 2H), 1.98-1.94 (m, 1H), 1.71-1.68 (m, 1H), 1.59-1.51 (m, 3H), 1.48-1.39 (m, 5H), 1.19 (s, 1H), 0.88-0.70 (m, 18H); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 172.1, 171.6, 171.4, 171.3, 171.0, 170.9, 168.5, 156.8, 136.4, 127.0, 125.1, 118.4, 116.6, 116.1, 111.5, 106.9, 66.3, 58.8, 53.7, 52.6, 51.7, 51.2, 50.2, 49.8, 40.3, 40.1, 37.2, 30.8, 28.2, 27.5, 24.7, 24.3, 24.2, 23.1, 23.0, 21.7, 21.3, 19.2, 19.1, 17.8; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{40}\text{H}_{66}\text{N}_{11}\text{O}_9^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 844.50395, found 844.50251.

seco-tyrocidine A-EG (87)



The synthesis of **87** was initiated with Fmoc-L-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S33** (loading rate: 0.589 mmol/g, 0.02 mmol, 34.0 mg) in Libra tube, which was subjected to 9 cycles [Fmoc-L-Orn(Boc)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-D-Phe-OH] of SPPS protocol described above (Step1-4) to afford the resin-bound nonapeptide. To the peptide was added TFA/ H_2O /TIP = 95:2.5:2.5 (1.0 mL), being shaken for 30 min, and then the reaction mixture was filtered. This procedure was repeated twice. The filtrate was diluted with Et_2O (12 mL) and was chilled (-80°C), then centrifuged with $3,500 \times g$ for 10 min at 4°C to afford crude peptide. The crude peptide was purified by reversed phase HPLC with COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 20 mm I.D. $\times$ 250 mm, which was eluted by mobile phase MeCN: H_2O (= 35:65) containing 0.05 % TFA with flow rate at 10 ml/min, to afford peptide **87** (18.8 mg, 70.5 % for 19 steps) as a colorless amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ -27.80 (c 1.39, DMSO); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.55 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.28 (s, 2H), 8.18 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 8.15 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 8.07 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.90 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.85 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.75 (s, 2H), 7.62 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.32-7.08 (m, 13H), 7.00 (t, $J = 7.5$ Hz, 4H), 6.76 (s, 1H), 6.60 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 4.57-1.51 (m, 2H), 4.39-4.23 (m, 4H), 4.17-3.95 (m, 4H), 3.52 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.47-3.44 (m, 1H), 3.07-2.87 (m, 4H), 2.81-2.65 (m, 4H), 2.45-2.47 (m, 6H), 2.41 (s, 2H), 2.01-1.90 (m, 3H), 1.83-1.80 (m, 1H), 1.65-1.19 (m, 11H), 0.84-0.76 (m, 12H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 174.1, 172.4, 171.8, 171.3, 171.2, 171.1, 171.1, 170.9, 170.7, 170.6, 170.5, 167.5, 155.8, 137.9, 137.6, 134.6, 130.1 (2 $\times$ CH), 129.6, 129.5, 129.4 (2 $\times$ CH), 129.0 (2 $\times$ CH), 128.6 (2 $\times$ CH), 128.0 (5 $\times$ CH), 127.5,

126.3, 126.1, 114.9 (2×CH), 66.3, 60.2, 58.9, 57.6, 54.6, 54.1, 53.4, 52.7, 52.6, 51.6, 50.2, 49.7, 48.6, 46.8, 40.4, 38.6, 38.2, 37.2, 36.9, 36.6, 36.2, 31.3, 30.7, 29.0, 27.5, 24.1, 23.6, 23.5, 22.8, 21.2, 19.0, 18.2; HRMS (ESI) calcd for $C_{68}H_{93}N_{13}O_{15}Na^+$ $[M+Na]^+$ 1354.68063, found 1354.67799.

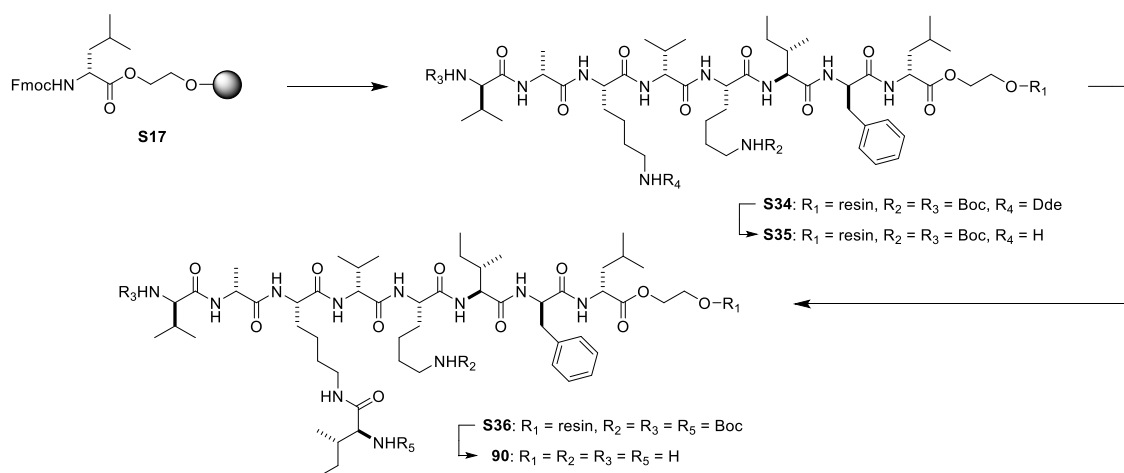
Synthesis of EG-activated branched peptides

seco-surugamide B (I1dV, I3K(I-NH₂))-EG (**90**)

● = 2-chlorotrityl resin



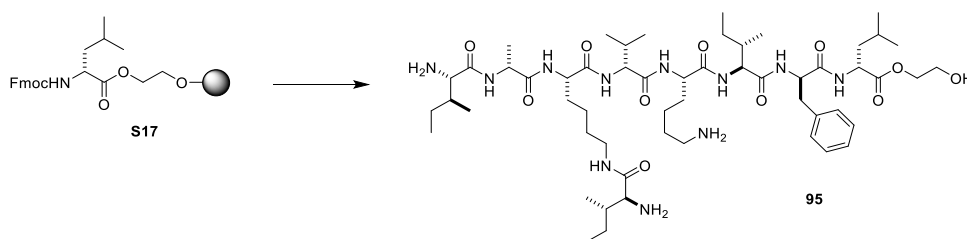
Fmoc-D-Leu-EG-2-chlorotrityl resin (S17): 2-chlorotrityl chloride resin **S2** (159 mg, 0.200 mmol) in Libra tube was swelled with CH_2Cl_2 for 10 min, and then excess solvent was removed by filtration. To the resin was added a solution of ethylene glycol (EG) (24.8 mg, 0.400 mmol), and DIPEA (51.7 mg, 0.400 mmol) in CH_2Cl_2 (2.0 mL) and shaken for 2 h at 40 °C to give EG-2-chlorotrityl resin **S21**. To the resin was added a solution of Fmoc-D-Leu-OH (141 mg, 0.400 mmol), DIC (101 mg, 0.800 mmol) and DMAP (4.89 mg, 0.04 mmol) in CH_2Cl_2 (2.0 mL) and stirred for 3 h at 40 °C to give Fmoc-D-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S17**. Dried **S17** was added with 20% piperidine in DMF and stirred for 1 h. The supernatant was diluted with DMF and was subjected to UV measurement. Loading rate for **S17** was calculated to be 0.470 mmol/g from observed UV absorbance at 301 nm.



***seco*-surugamide B (I1dV, I3K(I-NH₂))-EG (**90**):** The resin **S17** (loading rate: 0.470 mmol/g, 0.0300 mmol, 63.8 mg) in Libra tube was swelled in CH_2Cl_2 for 10 min, which was subjected to 7 cycles [Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-D-Val-OH, Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, Fmoc-D-Ala-OH, Boc-D-Val-OH] of SPPS protocol described above to afford resin-bound peptide **S34**.

Then, to the resin was added a solution of 2% hydrazine in DMF (500 μ L) and shaken for 5 min at 40 $^{\circ}$ C to remove the Dde protecting group of the side chain of L-Lys at the position 3, to give the resin-bound linear peptide **S35**. This procedure was repeated 3 times in total. To the resin was added a solution of Boc-L-Ile-OH (27.8 mg, 0.120 mmol), DIC (15.1 mg, 0.120 mmol) and Oxyma (17.1 mg, 0.120 mmol) in DMF (1.0 mL) and stirred for 30 min at 40 $^{\circ}$ C to give the resin-bound branched peptide **S36**. To the peptide **S36** was added TFA/H₂O/TIP = 95:2.5:2.5 (1.0 mL), being shaken for 30 min, and then the reaction mixture was filtered. The filtrate was diluted with Et₂O (25 mL) and was chilled (-80° C), then centrifuged with $3,500 \times g$ for 10 min at 4 $^{\circ}$ C to afford crude peptide. The crude peptide was purified by reversed phase HPLC with COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 20 mm I.D $\times$ 250 mm, which was eluted by mobile phase MeCN:H₂O (= 30:70) containing 0.05% TFA with flow rate at 10 ml/min to afford the branched EG-substrate, *seco*-surugamide B (I1dV, I3K(I-NH₂))-EG (**90**) (26.6 mg, 82.6% for 17 steps) as a white amorphous solid; $[\alpha]_D^{18}$ -11.06 (c 0.875, DMSO); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.61-8.55 (m, 1H), 8.44-8.36 (m, 1H), 8.31-8.24 (m, 1H), 8.16-8.04 (m, 7H), 7.95-7.71 (m, 4H), 7.24-7.12 (m, 5H), 4.56-4.21 (m, 6H), 4.07-3.98 (m, 3H), 3.60 (s, 1H), 3.53-3.51 (m, 3H), 3.33 (s, 4H), 3.16-3.10 (m, 1H), 3.05-3.03 (m, 1H), 2.96-2.91 (m, 1H), 2.75-2.61 (m, 3H), 2.04-1.98 (m, 1H), 1.89 (td, *J* = 13.2, 6.6 Hz, 1H), 1.79-1.72 (m, 1H), 1.66-1.51 (m, 4H), 1.50-1.45 (m, 6H), 1.37 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.21 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H), 1.10-1.02 (m, 1H), 0.89-0.74 (m, 24H), 0.58 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 0.42 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172.2, 171.4, 171.3, 171.2, 171.1, 170.7, 170.6, 167.3, 167.2, 137.8, 129.0 (2 $\times$ CH₂), 127.8 (2 $\times$ CH₂), 126.0, 66.0, 58.7, 57.1, 56.9, 56.4, 56.4, 53.7, 52.2, 51.8, 50.3, 48.2, 38.5, 38.5, 37.1, 36.3, 35.9, 32.2, 30.9, 30.5, 29.6, 28.2, 26.4, 24.0, 23.7, 22.7, 22.5, 22.0, 21.2, 19.1, 18.5, 18.2, 17.7, 17.5, 14.7, 14.7, 14.4, 14.3, 10.9, 10.9; HRMS (ESI) calcd for C₅₄H₉₅N₁₁O₁₁Na⁺ [M+Na]⁺ 1096.71047, found 1096.70882.

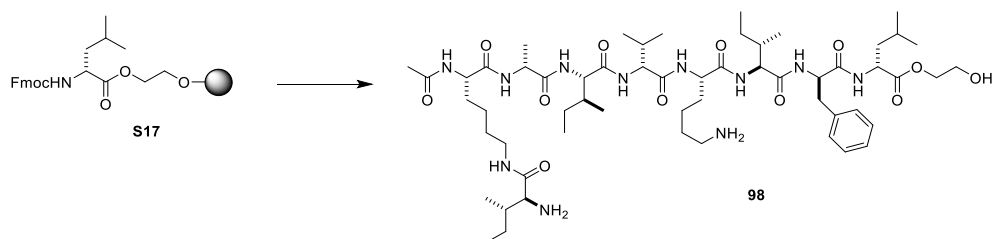
seco-surugamide B (I3K(I-NH₂))-EG (**95**)



The branched EG-substrate **95** was synthesized following the same procedure as for **90** with the substitution of Boc-D-Val-OH at the position 1 for Boc-L-Ile-OH. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S17** (loading rate: 0.47 mmol/g, 0.0300 mmol, 63.8 mg). The obtained crude peptide was purified by reversed phase HPLC with COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 20 mm

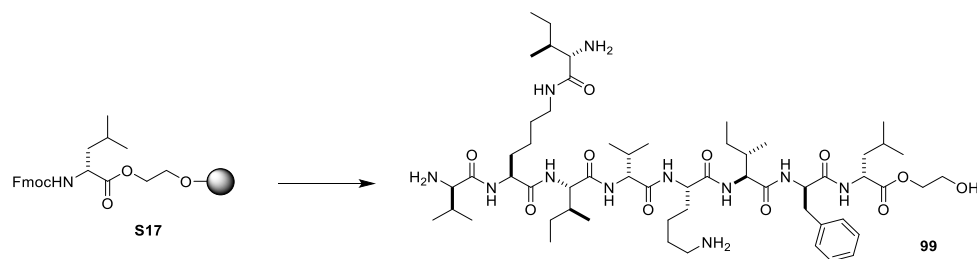
I.D $\times$ 250 mm, which was eluted by mobile phase MeCN:H₂O (= 30:70) containing 0.05% TFA with flow rate at 10 ml/min to afford the branched EG-substrate **95** as a white amorphous solid. The structure of **95** was verified by LC-MS/MS analysis (p. 282, **Figure S92**). The sample was subjected to cyclization assay without further purification.

N-acetyl *seco*-surugamide B (I1K(I-NH₂))-EG (**98**)



The branched EG-substrate **98** was synthesized following the same procedure as for **90** with the addition of acetic acid at its *N*-terminus, and the substitution of Boc-D-Val-OH at the position 1 and Fmoc-L-Lys(Dde)-OH at the position 3 for Fmoc-L-Lys(Dde)-OH and Fmoc-L-Ile-OH, respectively. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S17** (loading rate: 0.47 mmol/g, 0.0300 mmol, 63.8 mg). The obtained crude peptide was purified by reversed phase HPLC with COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 20 mm I.D $\times$ 250 mm, which was eluted by mobile phase MeCN:H₂O (= 30:70) containing 0.05% TFA with flow rate at 10 ml/min to afford the branched EG-substrate **98** (27.0 mg, 79.6% for 19 steps) as a white amorphous solid. The structure of **98** was verified by LC-MS/MS analysis (p. 283, **Figure S93**).

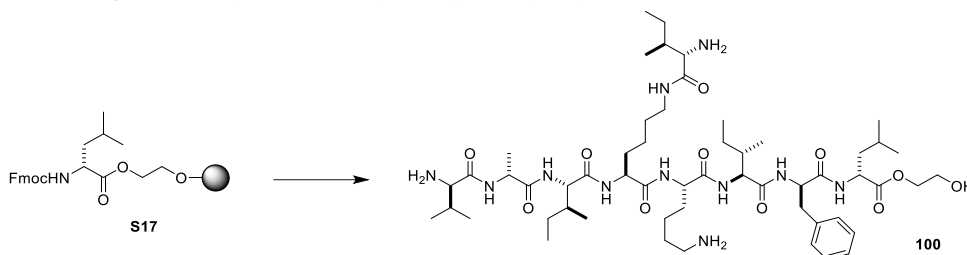
seco-surugamide B (I1dV, dA2K(I-NH₂))-EG (**99**)



The branched EG-substrate **99** was synthesized following the same procedure as for **90** with the substitution of Fmoc-D-Ala-OH at the position 2 and Fmoc-L-Lys(Dde)-OH at the position 3 for Fmoc-L-Lys(Dde)-OH and Fmoc-L-Ile-OH, respectively. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S17** (loading rate: 0.47 mmol/g, 0.0300 mmol, 63.8 mg). The obtained crude peptide was purified by reversed phase HPLC with COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 20 mm I.D $\times$ 250 mm,

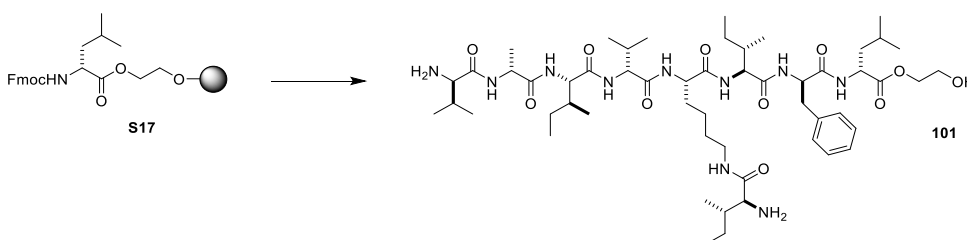
which was eluted by mobile phase MeCN:H₂O (= 30:70) containing 0.05% TFA with flow rate at 10 ml/min to afford the branched EG-substrate **99** (30.1 mg, 89.8% for 17 steps) as a white amorphous solid. The structure of **99** was verified by LC-MS/MS analysis (p. 285, **Figure S95**).

seco-surugamide B (I1DV, DV4K(I-NH₂))-EG (**100**)



The branched EG-substrate **100** was synthesized following the same procedure as for **90** with the substitution of Fmoc-L-Lys(Dde)-OH at the position 3 and Fmoc-D-Val-OH at the position 4 for Fmoc-L-Ile-OH and Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, respectively. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S17** (loading rate: 0.47 mmol/g, 0.0300 mmol, 63.8 mg). The obtained crude peptide was purified by reversed phase HPLC with COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 20 mm I.D × 250 mm, which was eluted by mobile phase MeCN:H₂O (= 30:70) containing 0.05% TFA with flow rate at 10 ml/min to afford the branched EG-substrate **100** (28.9 mg, 88.5% for 17 steps) as a white amorphous solid. The structure of **100** was verified by LC-MS/MS analysis (p. 287, **Figure S97**).

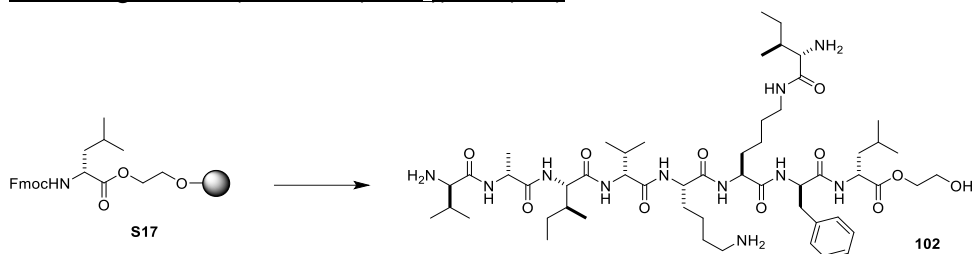
seco-surugamide B (K5K(I-NH₂))-EG (**101**)



The branched EG-substrate **101** was synthesized following the same procedure as for **90** with the substitution of Fmoc-L-Lys(Dde)-OH at the position 3 and Fmoc-L-Lys(Boc)-OH at the position 5 for Fmoc-L-Ile-OH and Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, respectively. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S17** (loading rate: 0.47 mmol/g, 0.0300 mmol, 63.8 mg). The obtained crude peptide was purified by reversed phase HPLC with COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 20 mm I.D × 250 mm, which was eluted by mobile phase MeCN:H₂O (= 40:60) containing 0.05% TFA with flow rate

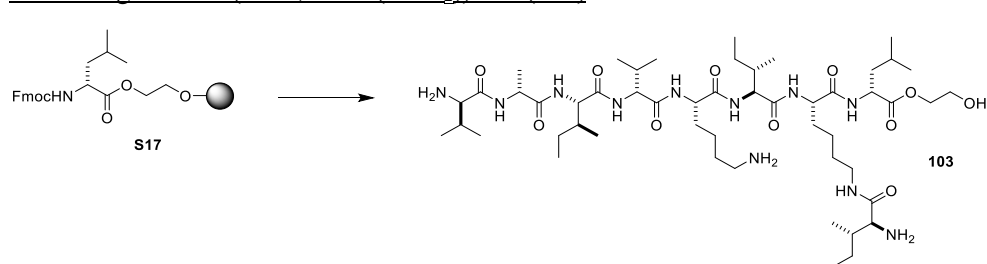
at 10 ml/min to afford the branched EG-substrate **101** (23.3 mg, 72.3% for 17 steps) as a white amorphous solid. The structure of **101** was verified by LC-MS/MS analysis (p. 290, **Figure S100**).

seco-surugamide B (I1DV, I6K(I-NH₂))-EG (**102**)



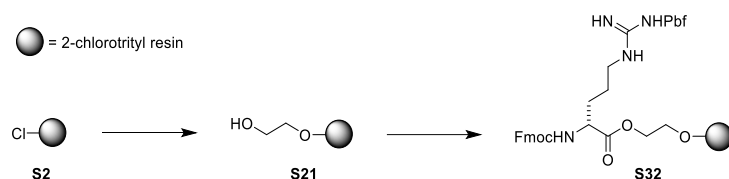
The branched EG-substrate **102** was synthesized following the same procedure as for **90** with the substitution of Fmoc-L-Lys(Dde)-OH at the position 3 and Fmoc-L-Ile-OH at the position 6 for Fmoc-L-Ile-OH and Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, respectively. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S17** (loading rate: 0.47 mmol/g, 0.0300 mmol, 63.8 mg). The obtained crude peptide was purified by reversed phase HPLC with COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 20 mm I.D × 250 mm, which was eluted by mobile phase MeCN:H₂O (= 30:70) containing 0.05% TFA with flow rate at 10 ml/min to afford the branched EG-substrate **102** (27.6 mg, 85.6% for 17 steps) as a white amorphous solid. The structure of **102** was verified by LC-MS/MS analysis (p. 293, **Figure S103**).

seco-surugamide B (I1DV, DF7K(I-NH₂))-EG (**103**)

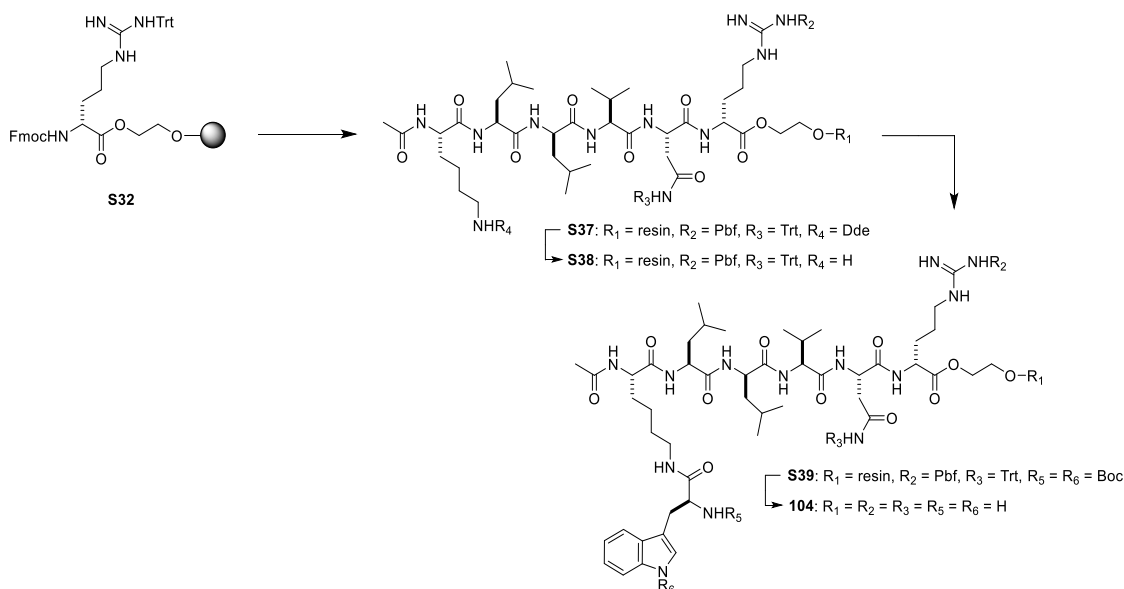


The branched EG-substrate **103** was synthesized following the same procedure as for **90** with the substitution of Fmoc-L-Lys(Dde)-OH at the position 3 and Fmoc-D-Phe-OH at the position 7 for Fmoc-L-Ile-OH and Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, respectively. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S17** (loading rate: 0.47 mmol/g, 0.0300 mmol, 63.8 mg). The obtained crude peptide was purified by reversed phase HPLC with COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 20 mm I.D × 250 mm, which was eluted by mobile phase MeCN:H₂O (= 30:70) containing 0.05% TFA with flow rate at 10 ml/min to afford the branched EG-substrate **103** (24.4 mg, 78.2% for 17 steps) as a white amorphous solid. The structure of **103** was verified by LC-MS/MS analysis (p. 296, **Figure S106**).

N-acetyl seco-wollamide B1 (W1K(W-NH₂))-EG (104)



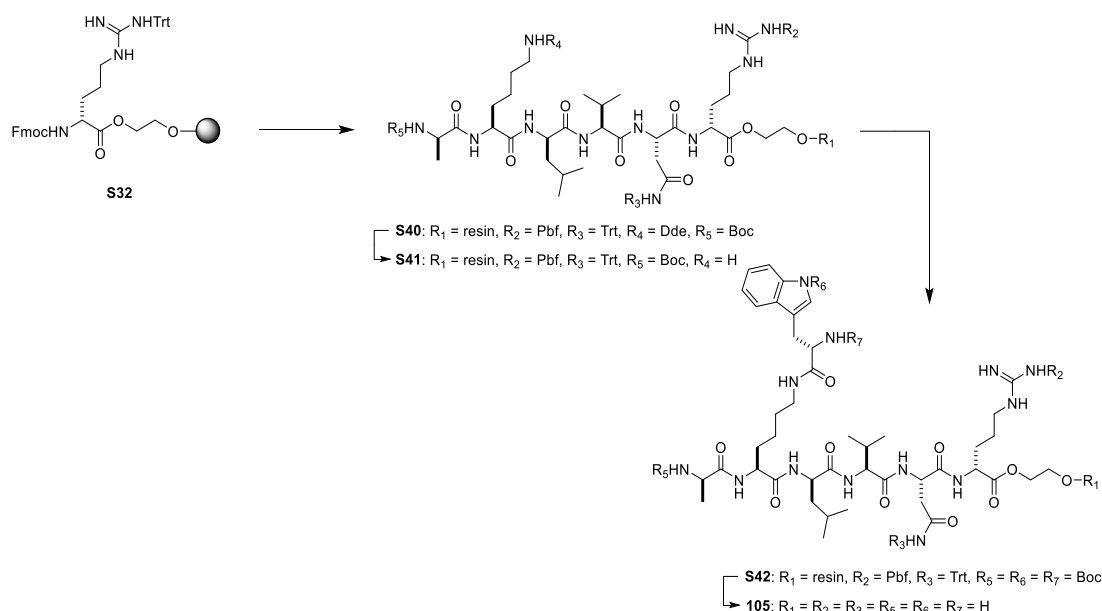
Fmoc-D-Arg(Pbf)-EG-2-chlorotrityl resin (S32): 2-chlorotrityl chloride resin **S2** (159 mg, 0.200 mmol) in Libra tube was swelled with CH₂Cl₂ for 10 min, and then excess solvent was removed by filtration. To the resin was added a solution of ethylene glycol (EG) (24.8 mg, 0.400 mmol), and DIPEA (51.7 mg, 0.400 mmol) in CH₂Cl₂ (2.0 mL) and shaken for 2 h at 40 °C to give EG-2-chlorotrityl resin **S21**. To the resin was added a solution of Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH (300 mg, 0.400 mmol), DIC (101 mg, 0.800 mmol) and DMAP (4.89 mg, 0.04 mmol) in CH₂Cl₂ (2.0 mL) and stirred for 3 h at 40 °C to give Fmoc-D-Arg(Pbf)-EG-2-chlorotrityl resin **S32**. Dried **S32** was added with 20% piperidine in DMF and stirred for 1 h. The supernatant was diluted with DMF and was subjected to UV measurement. Loading rate for **S32** was calculated to be 0.449 mmol/g from observed UV absorbance at 301 nm.



***N*-acetyl seco-wollamide B1 (W1K(W-NH₂))-EG (104):** The synthesis of **104** was initiated with Fmoc-D-Arg(Pbf)-EG-2-chlorotriptyl resin **S32** (loading rate: 0.449 mmol/g, 0.01 mmol, 22.3 mg) in Libra tube, which was subjected to 6 cycles [Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-D-Leu-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, acetic acid] of SPPS protocol described above to afford resin-bound peptide **S37**. Then, to the resin was added a solution of 2% hydrazine in DMF (500 μ L)

and shaken for 5 min at 40 °C to remove the Dde protecting group of the side chain of L-Lys at the position 1, to give the resin-bound linear peptide **S38**. This procedure was repeated 3 times in total. To the resin was added a solution of Boc-L-Trp(Boc)-OH (21.1 mg, 0.04 mmol), DIC (4.05 mg, 0.04 mmol) and Oxyma (5.68 mg, 0.04 mmol) in DMF (1.0 mL) and stirred for 30 min at 40 °C to give the resin-bound branched peptide **S39**. To the peptide **S37** was added TFA/H₂O/TIP = 95:2.5:2.5 (1.0 mL), being shaken for 30 min, and then the reaction mixture was filtered. The filtrate was diluted with Et₂O (25 mL) and was chilled (−80°C), then centrifuged with 3,500 × *g* for 10 min at 4 °C to afford the branched EG-substrate **104**. The structure of **104** was verified by LC-MS/MS analysis (p. 299, **Figure S109**). The sample was subjected to cyclization assay without further purification.

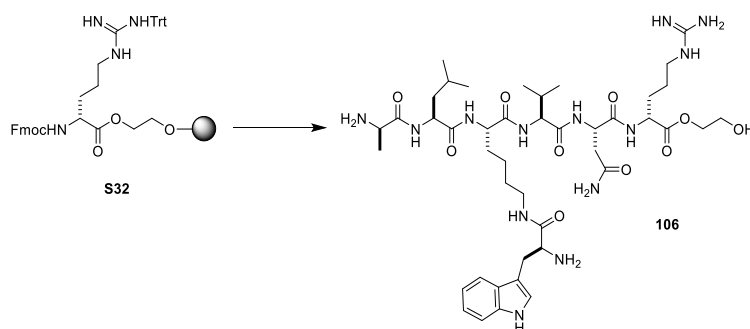
seco-wollamide B1 (W1DA, L2K(W-NH₂))-EG (**105**)



The synthesis of **105** was initiated with Fmoc-D-Arg(Pbf)-EG-2-chlorotrityl resin **S32** (loading rate: 0.449 mmol/g, 0.01 mmol, 22.3 mg) in Libra tube, which was subjected to 6 cycles [Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-D-Leu-OH, Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, Boc-D-Ala-OH] of SPPS protocol described above to afford the resin-bound peptide **S40**. Then, to the resin was added a solution of 2% hydrazine in DMF (500 μ L) and shaken for 5 min at 40 °C to remove the Dde protecting group of the side chain of L-Lys at the position 2, to give the resin-bound linear peptide **S41**. This procedure was repeated 3 times in total. To the resin was added a solution of Boc-L-Trp(Boc)-OH (21.1 mg, 0.04 mmol), DIC (4.05 mg, 0.04 mmol) and Oxyma (5.68 mg, 0.04 mmol) in DMF (1.0 mL) and stirred for 30 min at 40 °C to give the resin-bound branched peptide **S42**. To the peptide was added TFA/H₂O/TIP = 95:2.5:2.5 (1.0 mL), being shaken for 30 min, and then the reaction mixture was

filtered. The filtrate was diluted with Et₂O (25 mL) and was chilled (−80°C), then centrifuged with 3,500 × g for 10 min at 4 °C to afford the branched EG-substrate **105**. The structure of **105** was verified by LC-MS/MS analysis (p. 302, **Figure S112**). The sample was subjected to cyclization assay without further purification.

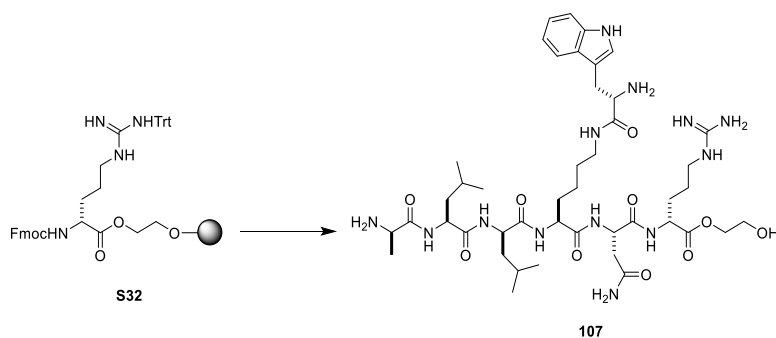
seco-wollamide B1 (W1DA, dL3K(W-NH₂))-EG (**106**)



The branched EG-substrate **105** was synthesized following the same procedure as for **105** with the substitution of Fmoc-L-Lys(Dde)-OH at the position 2 and Fmoc-D-Leu-OH at the position 3 for Fmoc-L-Leu-OH

and Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, respectively. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Arg(Pbf)-EG-2-chlorotrityl resin **S32** (loading rate: 0.449 mmol/g, 0.03 mmol, 66.8 mg). The structure of **106** was verified by LC-MS/MS analysis (p. 305, **Figure S115**). The sample was subjected to cyclization assay without further purification.

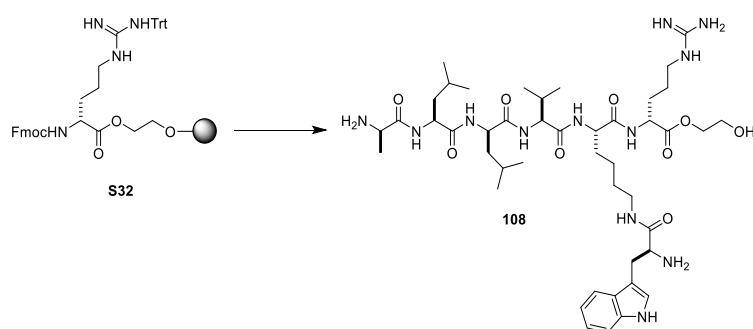
seco-wollamide B1 (W1DA, V4K(W-NH₂))-EG (**107**)



The branched EG-substrate **107** was synthesized following the same procedure as for **105** with the substitution of Fmoc-L-Lys(Dde)-OH at the position 2 and Fmoc-L-Leu-OH at the position 4 for Fmoc-L-Leu-OH

and Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, respectively. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Arg(Pbf)-EG-2-chlorotrityl resin **S32** (loading rate: 0.449 mmol/g, 0.03 mmol, 66.8 mg). The structure of **107** was verified by LC-MS/MS analysis (p. 308, **Figure S118**). The sample was subjected to cyclization assay without further purification.

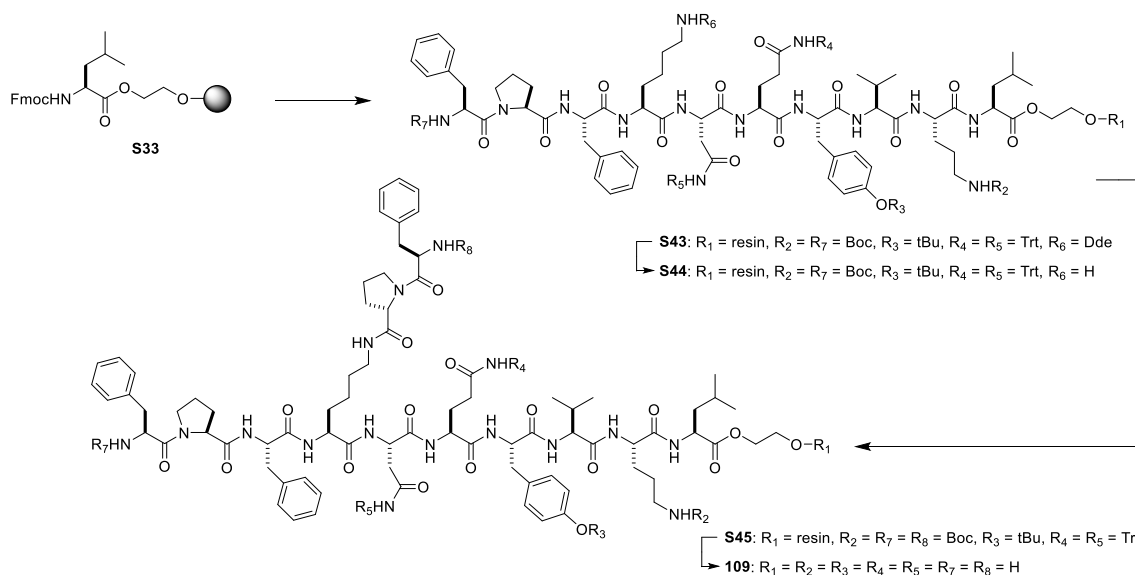
seco-wollamide B1 (W1dA, N5K(W-NH₂))-EG (**108**)



The branched EG-substrate **108** was synthesized following the same procedure as for **105** with the substitution of Fmoc-L-Lys(Dde)-OH at the position 2 and Fmoc-L-Asn(Trt)-OH at the position 5 for Fmoc-L-Leu-OH

and Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, respectively. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Arg(Pbf)-EG-2-chlorotrityl resin **S32** (loading rate: 0.449 mmol/g, 0.03 mmol, 66.8 mg). The structure of **108** was verified by LC-MS/MS analysis (p. 311, **Figure S121**). The sample was subjected to cyclization assay without further purification.

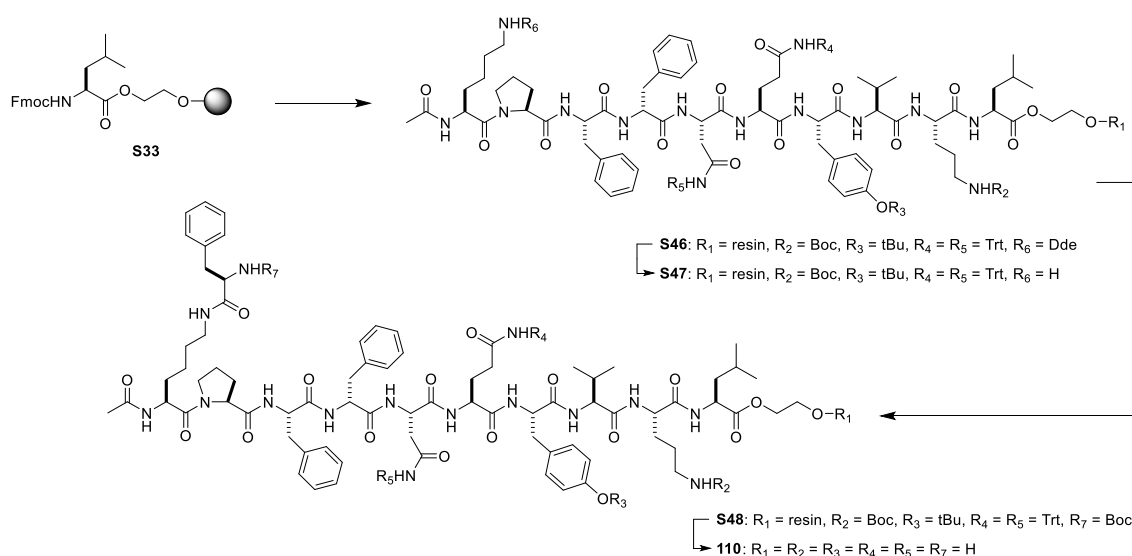
seco-tyrocidine A (DF1F, DF4K(P-DF-NH₂))-EG (**109**)



The resin **S33** (loading rate: 0.502 mmol/g, 0.01 mmol, 19.9 mg) in Libra tube was swelled in CH₂Cl₂ for 10 min, which was subjected to 9 cycles [Fmoc-L-Orn(Boc)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Boc-L-Phe-OH] of SPPS protocol described above to afford the resin-bound peptide **S43**. Then, to the resin was added a solution of 2% hydrazine in DMF (500 μ L) and shaken for 5 min at 40 °C to remove the Dde protecting group of the side chain of L-Lys at the position 4, to give the resin-bound linear peptide **S44**. This procedure was repeated 3 times in total. The resin **S44** was

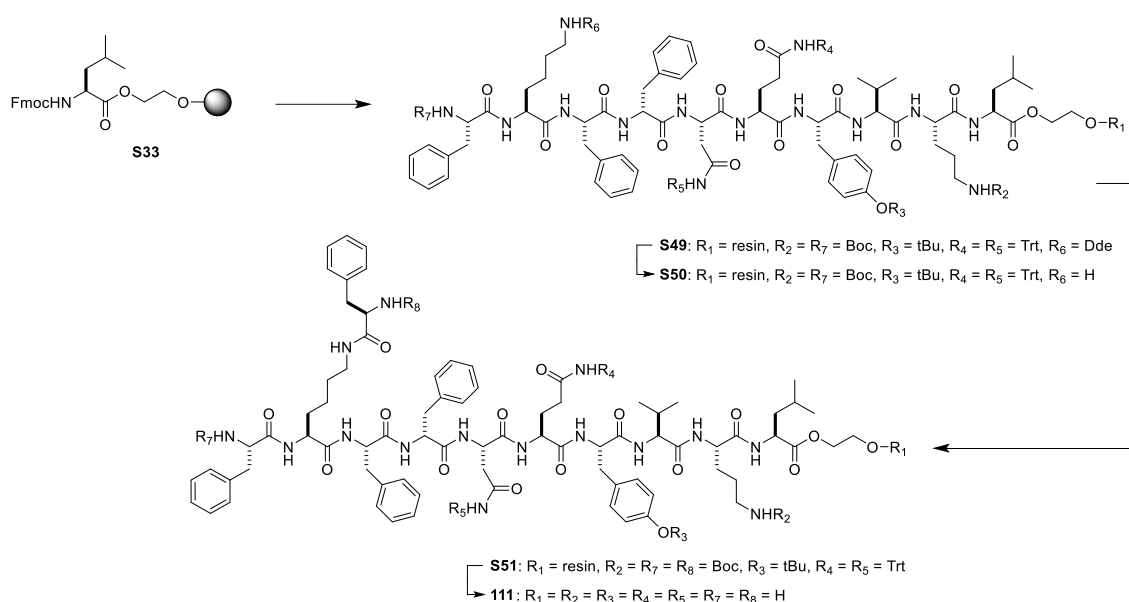
subjected to 2 cycles [Fmoc-L-Pro-OH, Boc-D-Phe-OH] of SPPS protocol described above to afford the resin-bound branched peptides **S45**. To the peptide **S45** was added TFA/H₂O/TIP = 95:2.5:2.5 (1.0 mL), being shaken for 30 min, and then the reaction mixture was filtered. The filtrate was diluted with Et₂O (25 mL) and was chilled (−80 °C), then centrifuged with 3,500 × g for 10 min at 4 °C to afford the crude peptide. The crude peptide was purified by reversed phase HPLC with COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 20 mm I.D × 250 mm, which was eluted by mobile phase MeCN:H₂O (= 33:67) containing 0.05% TFA with flow rate at 10 ml/min to afford the branched EG-substrate, *seco*-tyrocidine A (dF1F, dF4K(P-dF-NH₂))-EG (**109**) (13.7 mg, 88.0% for 23 steps) as a white amorphous solid; [α]_D²⁰ -50.26 (c 0.717, MeOH); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.40-7.73 (m, 16H), 7.46 (d, *J* = 16.8 Hz, 1H), 7.28-7.08 (m, 15H), 6.99 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 6.80 (s, 1H), 6.59 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 4.53-4.46 (m, 2H), 4.37 (s, 2H), 4.27 (d, *J* = 5.4 Hz, 4H), 4.16-3.99 (m, 6H), 3.52-3.30 (m, 6H), 3.17-2.62 (m, 10H), 2.46 (s, 5H), 2.00-1.92 (m, 3H), 1.79-1.47 (m, 17H), 1.31-1.18 (m, 5H), 0.84-0.77 (m, 12H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 174.8, 174.7, 172.9, 172.5, 172.1, 171.8, 171.6, 171.6, 171.4, 171.3, 171.2, 171.1, 170.9, 167.3, 156.3, 138.3, 135.2, 135.1, 130.6 (2×CH₂), 130.4 (2×CH₂), 130.0 (2×CH₂), 129.8 (2×CH₂), 129.5 (2×CH₂), 129.1 (2×CH₂), 128.6 (2×CH₂), 128.5, 127.9, 127.7, 126.7, 115.4 (2×CH₂), 66.8, 60.6, 60.0, 59.4, 58.2, 55.0, 54.3, 53.3, 53.0, 52.7, 52.6, 52.2, 50.7, 50.3, 47.3, 47.1, 40.9, 39.0, 38.9, 37.9, 37.9, 37.3, 37.1, 36.6, 32.2, 32.0, 31.1, 31.1, 29.9, 29.5, 29.4, 28.3, 24.9, 24.6, 24.1, 24.0, 23.3, 23.1, 21.7, 19.6, 18.6; HRMS (ESI) calcd for C₇₉H₁₁₄N₁₆O₁₇⁺ [M+2H]²⁺ 779.42684, found 779.42573.

N-acetyl *seco*-tyrocidine A (dF1K(dF-NH₂))-EG (**110**)



The resin **S33** (loading rate: 0.502 mmol/g, 0.02 mmol, 39.8 mg) in Libra tube was swelled in CH₂Cl₂ for 10 min, which was subjected to 10 cycles [Fmoc-L-Orn(Boc)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, acetic acid] of SPPS protocol described above to afford the resin-bound peptide **S46**. Then, to the resin was added a solution of 2% hydrazine in DMF (500 μ L) and shaken for 5 min at 40 °C to remove the Dde protecting group of the side chain of L-Lys at the position 2, to give the resin-bound linear peptide **S47**. This procedure was repeated 3 times in total. The resin **S47** was subjected to 1 cycle [Boc-D-Phe-OH] of SPPS protocol described above to afford the resin-bound branched peptides **S48**. To the peptide **S48** was added TFA/H₂O/TIP = 95:2.5:2.5 (1.0 mL), being shaken for 30 min, and then the reaction mixture was filtered. The filtrate was diluted with Et₂O (25 mL) and was chilled (–80 °C), then centrifuged with 3,500 $\times$ g for 10 min at 4 °C to afford the branched peptide, *N*-acetyl *seco*-tyrocidine A (dF1K(dF-NH₂))-EG (**110**). The sample was subjected to cyclization assay without further purification.

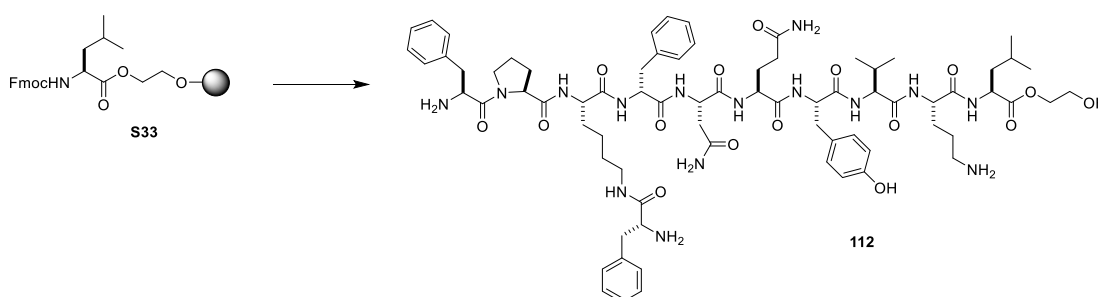
seco-tyrocidine A (dF1F, P2K(dF-NH₂))-EG (**111**)



The resin **S33** (loading rate: 0.502 mmol/g, 0.02 mmol, 39.8 mg) in Libra tube was swelled in CH₂Cl₂ for 10 min, which was subjected to 9 cycles [Fmoc-L-Orn(Boc)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, Boc-L-Phe-OH] of SPPS protocol described above to afford the resin-bound peptide **S49**. Then, to the resin was added a solution of 2% hydrazine in DMF (500 μ L) and shaken for 5 min at 40 °C to remove the Dde protecting group of the side chain of L-Lys at the position 2, to

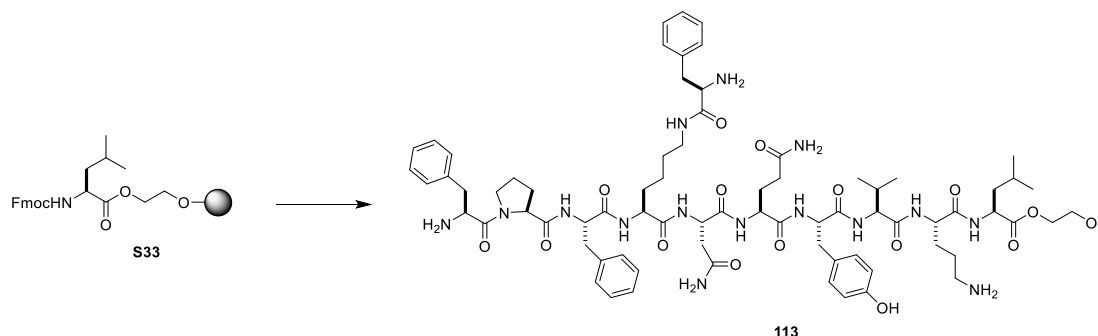
give the resin-bound linear peptide **S50**. This procedure was repeated 3 times in total. The resin **S50** was subjected to 1 cycle [Boc-D-Phe-OH] of SPPS protocol described above to afford the resin-bound branched peptides **S51**. To the peptide **S51** was added TFA/H₂O/TIP = 95:2.5:2.5 (1.0 mL), being shaken for 30 min, and then the reaction mixture was filtered. The filtrate was diluted with Et₂O (25 mL) and was chilled (−80 °C), then centrifuged with 3,500 × g for 10 min at 4 °C to afford the branched peptide, *seco*-tyrocidine A (DF1F, P2K(DF-NH₂))-EG (**111**). The sample was subjected to cyclization assay without further purification.

seco-tyrocidine A (DF1F, F3K(DF-NH₂))-EG (**112**)



The branched EG-substrate **112** was synthesized following the same procedure as for **111** with the substitution of Fmoc-L-Lys(Dde)-OH at the position 2 and Fmoc-L-Phe-OH at the position 3 for Fmoc-L-Pro-OH and Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, respectively. The synthesis was initiated from Fmoc-L-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S33** (loading rate: 0.502 mmol/g, 0.02 mmol, 39.8 mg). The sample was subjected to cyclization assay without further purification.

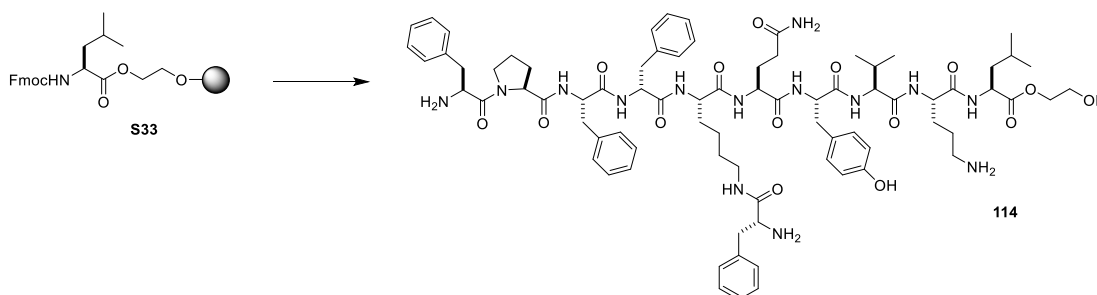
seco-tyrocidine A (DF1F, DF4K(DF-NH₂))-EG (**113**)



The branched EG-substrate **113** was synthesized following the same procedure as for **111** with the substitution of Fmoc-L-Lys(Dde)-OH at the position 2 and Fmoc-D-Phe-OH at the position 4 for Fmoc-L-Pro-OH and Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, respectively. The synthesis was initiated from Fmoc-L-Leu-EG-

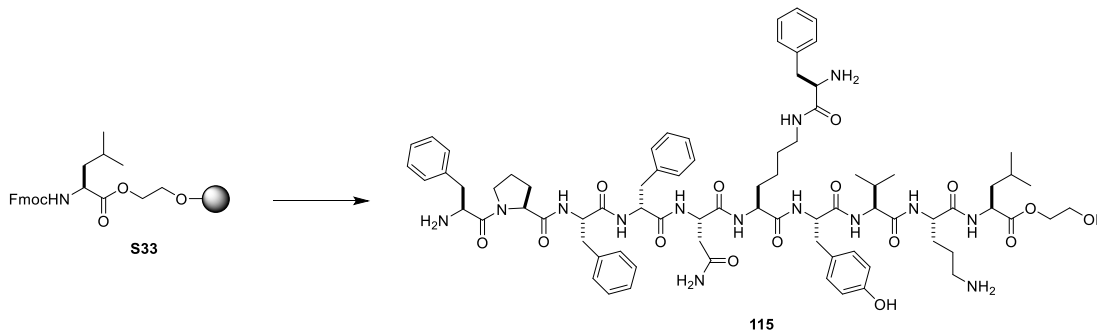
2-chlorotrityl resin **S33** (loading rate: 0.502 mmol/g, 0.02 mmol, 39.8 mg). The sample was subjected to cyclization assay without further purification.

seco-tyrocidine A (DF1F, N5K(DF-NH₂))-EG (**114**)



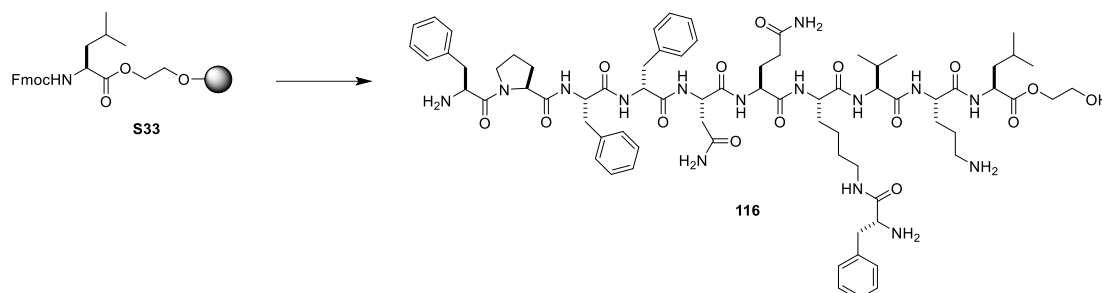
The branched EG-substrate **114** was synthesized following the same procedure as for **111** with the substitution of Fmoc-L-Lys(Dde)-OH at the position 2 and Fmoc-L-Asn(Trt)-OH at the position 5 for Fmoc-L-Pro-OH and Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, respectively. The synthesis was initiated from Fmoc-L-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S33** (loading rate: 0.502 mmol/g, 0.02 mmol, 39.8 mg). The sample was subjected to cyclization assay without further purification.

seco-tyrocidine A (DF1F, Q6K(DF-NH₂))-EG (**115**)



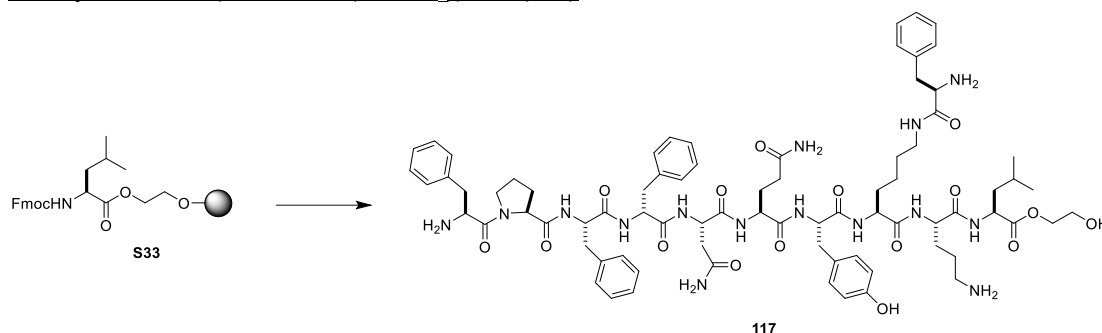
The branched EG-substrate **115** was synthesized following the same procedure as for **111** with the substitution of Fmoc-L-Lys(Dde)-OH at the position 2 and Fmoc-L-Gln(Trt)-OH at the position 6 for Fmoc-L-Pro-OH and Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, respectively. The synthesis was initiated from Fmoc-L-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S33** (loading rate: 0.502 mmol/g, 0.02 mmol, 39.8 mg). The sample was subjected to cyclization assay without further purification.

seco-tyrocidine A (DF1F, Y7K(DF-NH₂))-EG (**116**)



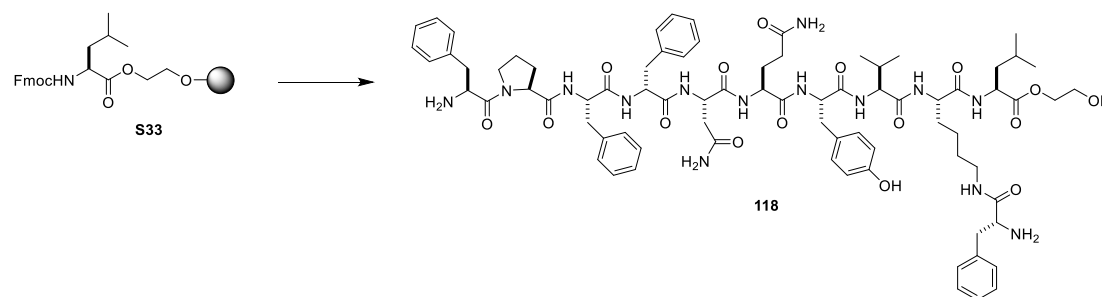
The branched EG-substrate **116** was synthesized following the same procedure as for **111** with the substitution of Fmoc-L-Lys(Dde)-OH at the position 2 and Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH at the position 7 for Fmoc-L-Pro-OH and Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, respectively. The synthesis was initiated from Fmoc-L-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S33** (loading rate: 0.502 mmol/g, 0.02 mmol, 39.8 mg). The sample was subjected to cyclization assay without further purification.

seco-tyrocidine A (DF1F, V8K(DF-NH₂))-EG (**117**)



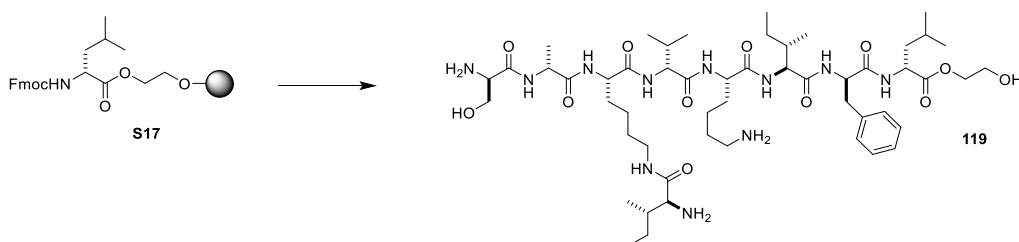
The branched EG-substrate **117** was synthesized following the same procedure as for **111** with the substitution of Fmoc-L-Lys(Dde)-OH at the position 2 and Fmoc-L-Val-OH at the position 8 for Fmoc-L-Pro-OH and Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, respectively. The synthesis was initiated from Fmoc-L-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S33** (loading rate: 0.502 mmol/g, 0.02 mmol, 39.8 mg). The sample was subjected to cyclization assay without further purification.

seco-tyrocidine A (DF1F, O9K(DF-NH₂))-EG (**118**)



The branched EG-substrate **118** was synthesized following the same procedure as for **111** with the substitution of Fmoc-L-Lys(Dde)-OH at the position 2 and Fmoc-L-Orn(Boc)-OH at the position 9 for Fmoc-L-Pro-OH and Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, respectively. The synthesis was initiated from Fmoc-L-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S33** (loading rate: 0.502 mmol/g, 0.02 mmol, 39.8 mg). The sample was subjected to cyclization assay without further purification.

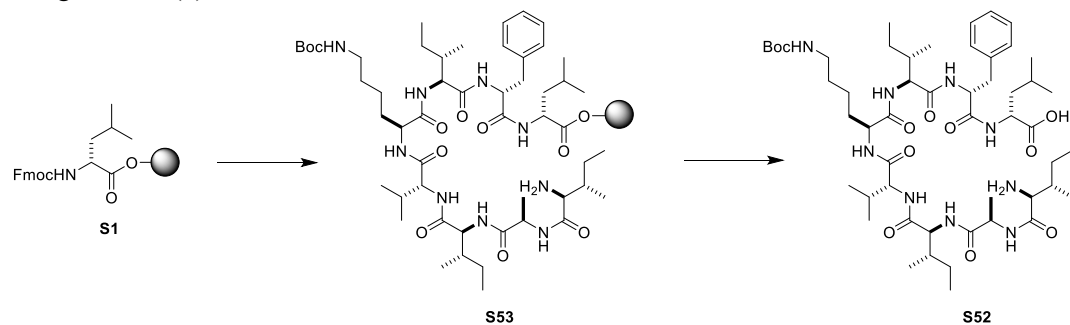
seco-surugamide B (I1dS, I3K(I-NH₂))-EG (**119**)



The branched EG-substrate **119** was synthesized following the same procedure as for **90** with the substitution of Boc-D-Val-OH at the position 1 for Boc-D-Ser(tBu)-OH. The synthesis was initiated from Fmoc-D-Leu-EG-2-chlorotrityl resin **S17** (loading rate: 0.47 mmol/g, 0.0300 mmol, 63.8 mg). The structure of **119** was verified by LC-MS/MS analysis (p. 313, **Figure S123**). The sample was subjected to cyclization assay without further purification.

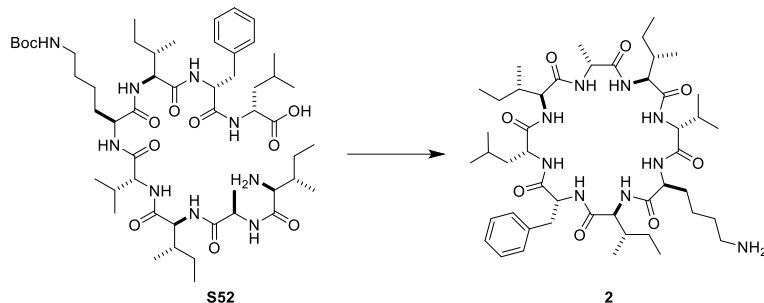
Synthesis of cyclic peptides (Synthetic standards)

surugamide B (**2**)



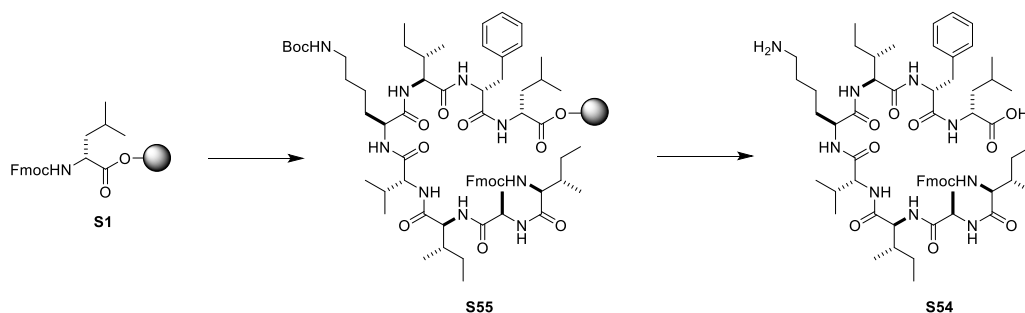
S52: Fmoc-D-Leu-2-chlorotrityl resin **S1** (loading rate: 1.207 mmol/g, 0.0500 mmol, 41.4 mg) in Libra tube was swelled in CH₂Cl₂ for 1 h, which was subjected to 7 cycles [Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-D-Val-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-D-Ala-OH, Fmoc-L-Ile-OH] of the SPPS protocol (Steps 1–4), and then the SPPS protocol (Steps 1 and 2) to afford the resin-bound peptide **S53**. To peptide **S53** was added CH₂Cl₂/HFP (= 70:30) (0.5 mL), being stirred for 30 min, and then the reaction mixture was filtered. This procedure was repeated twice. The filtrate was

concentrated and azeotroped with toluene ($\times 3$) to afford crude peptide **S52**, which was used in the next reaction without further purification.



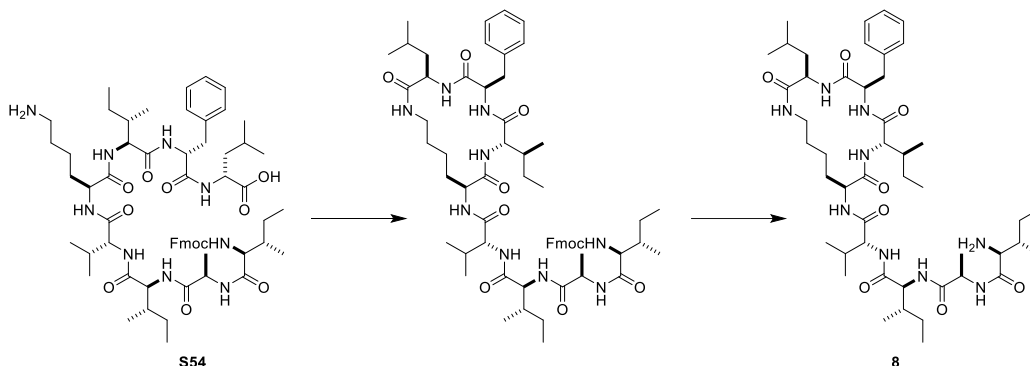
2: To a solution of peptide **S52** in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ ($= 9:1$) (25 mL) were added 2,4,6-collidine (27 μL , 0.204 mmol), HOAt (13.5 mg, 0.100 mmol), and PyBOP (52.3 mg, 0.100 mmol). After being stirred overnight, the reaction mixture was concentrated, and the residue was diluted with EtOAc and saturated aqueous NH_4Cl . The resulting mixture was extracted with EtOAc ($\times 3$), washed with brine, dried over MgSO_4 , and concentrated. To the residue was added a mixture of TFA/ H_2O /TIP ($= 95:2.5:2.5$) (1.0 mL), and the mixture was stirred for 1 h. The reaction mixture was diluted with Et_2O (24 mL), centrifuged at $3500 \times g$ for 5 min at 4°C , and Et_2O layer was removed by decantation. This procedure was repeated twice. The crude peptide was purified by reversed-phase HPLC to afford **2** (15.3 mg, 34% for 18 steps) as a white solid.

isopeptide **8**



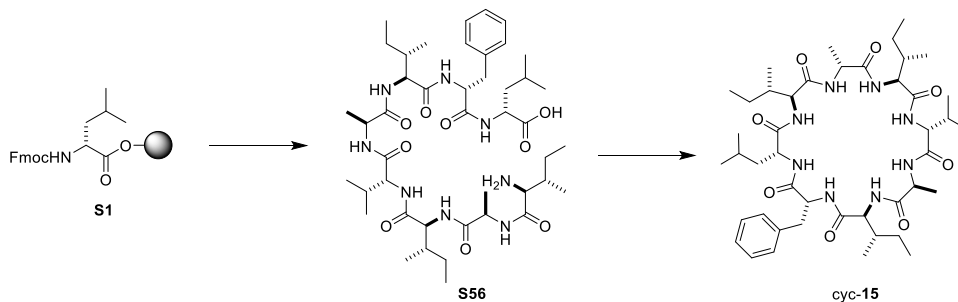
S54: Fmoc-D-Leu-2-chlorotriyl resin **S1** (loading rate: 1.027 mmol/g, 0.0500 mmol, 48.7 mg) in Libra tube was swelled in CH_2Cl_2 for 1 h, which was subjected to 7 cycles [Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-D-Val-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-D-Ala-OH, Fmoc-L-Ile-OH] of the SPPS protocol (Steps 1–4), and then the SPPS protocol (Steps 1 and 2) to afford the resin-bound peptide **S55**. To peptide **S55** was added TFA/ H_2O /TIP = 95:2.5:2.5 (1.0 mL), being stirred for 30 min, and then the reaction mixture was filtered. This procedure was repeated twice. The filtrate was

concentrated and azeotroped with toluene ($\times 3$) to afford the crude peptide **S54**, which was used in the next reaction without further purification.



isopeptide 8: To a solution of **S54** in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ ($= 9/1$) (25 mL) were added 2,4,6-collidine (27 μL , 0.204 mmol), HOAt (13.5 mg, 0.100 mmol), and PyBOP (52.3 mg, 0.100 mmol). After being stirred 2 weeks, the reaction mixture was concentrated, and the residue was diluted with EtOAc and saturated aqueous NH_4Cl . The resulting mixture was extracted with EtOAc ($\times 3$), washed with brine, dried over MgSO_4 , and concentrated. To the residue was added 20% piperidine in DMF (1.5 mL). After 10 min, the mixture was diluted with Et_2O (24 mL), centrifuged at $3500 \times g$ for 5 min at 4°C , and Et_2O layer was removed by decantation.

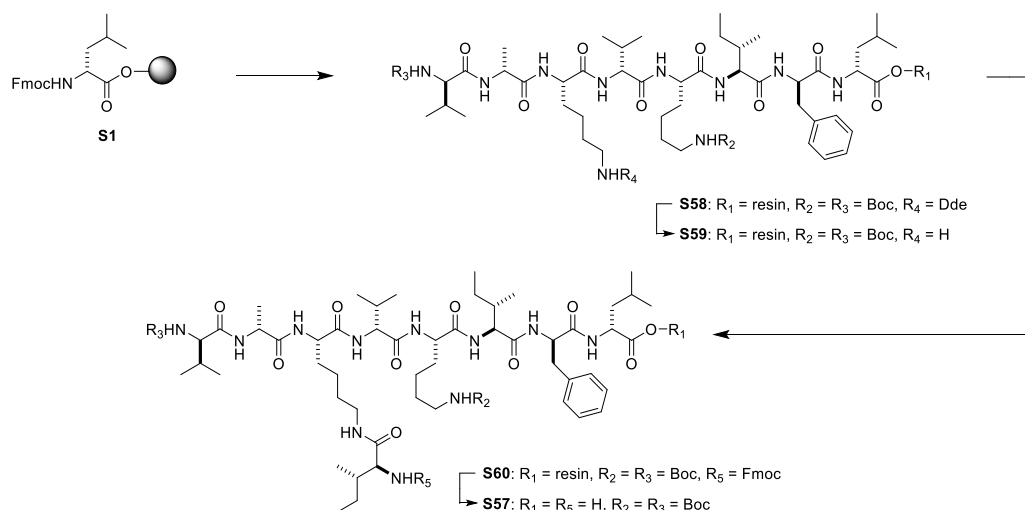
surugamide B (K5A) (= cyc-15)



Fmoc-D-Leu-2-chlorotrityl resin **S1** (loading rate: 1.207 mmol/g, 0.0500 mmol, 41.4 mg) in Libra tube was swelled in CH_2Cl_2 for 1 h, which was subjected to 7 cycles [Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-D-Val-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-D-Ala-OH, Fmoc-L-Ile-OH,] of the SPPS protocol (Steps 1–4), and then the SPPS protocol (Steps 1 and 2) to afford the resin-bound peptide. To the peptide was added $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{HFP}$ ($= 70:30$) (0.5 mL), being stirred for 30 min, and then the reaction mixture was filtered. This procedure was repeated twice. The filtrate was concentrated and azeotroped with toluene ($\times 3$) to afford crude peptide **S56**. To a solution of peptide **S56** in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ ($= 9:1$) (25 mL) were added 2,4,6-collidine (27 μL , 0.204 mmol), HOAt (13.5 mg, 0.100 mmol), and PyBOP

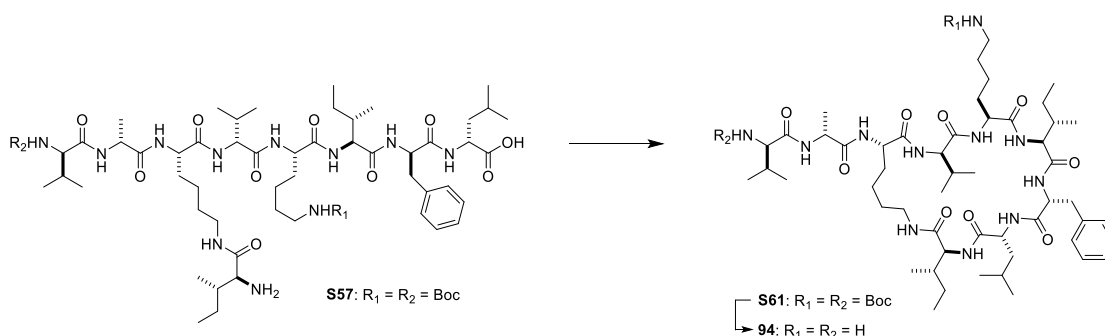
(52.3 mg, 0.100 mmol). After being stirred overnight, the reaction mixture was concentrated, and the residue was diluted with EtOAc and saturated aqueous NH_4Cl . The resulting mixture was extracted with EtOAc ($\times 3$), washed with brine, dried over MgSO_4 , and concentrated. The crude peptide was purified by reversed-phase HPLC to afford surugamid B (K5A) (= cyc-**15**) (5.0 mg, 12% for 17 steps) as a white solid: $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ -1.24 (c 0.25, MeOH); ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.40 (d, 1H, J = 8.6 Hz), 8.20 (d, 1H, J = 8.6 Hz), 8.12 (d, 1H, J = 6.3 Hz), 8.02 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.93 (d, 1H, J = 7.5 Hz), 7.70 (d, 1H, J = 7.5 Hz), 7.66 (d, 1H, J = 6.3 Hz), 7.44 (br, 1H), 7.25-7.15 (m, 5H), 4.42 (m, 1H), 4.36-4.25 (m, 3H), 4.21 (t, 1H, J = 8.6 Hz), 4.16 (t, 1H, J = 7.5 Hz), 4.03 (t, 1H, J = 7.5 Hz), 3.89 (t, 1H, J = 6.9 Hz), 3.20 (m, 1H), 2.68 (dd, 1H, J = 11.5, 13.8 Hz), 1.93 (m, 1H), 1.85 (d, 3H, J = 7.9 Hz), 1.14-1.05 (m, 4H), 0.95-0.74 (m, 26H), 0.67 (t, 3H, J = 6.9 Hz), 0.47 (d, 3H, J = 6.9 Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 172.6, 172.2 ($\times 2$), 171.3, 170.8 ($\times 2$), 170.5, 170.2, 138.0, 128.9, 128.0, 126.1, 58.7, 57.6, 57.0, 54.2, 51.7, 48.1, 48.0, 36.5, 36.2, 35.8, 35.4, 30.3, 24.3, 24.2, 24.1 ($\times 2$), 23.0, 21.5, 19.3, 18.5, 18.3, 18.0, 15.4, 15.1, 14.7, 11.0 ($\times 2$), 10.7; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{72}\text{N}_8\text{O}_8\text{Na}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 863.5365, found 863.5364.

Head-to-side chain cyc-**90** (= **94**)



Cyclic precursor S57: 2-chlorotrityl chloride resin **S1** (loading rate: 0.770 mmol/g, 0.02 mmol, 30.0 mg) in Libra tube was swelled with CH_2Cl_2 for 10 min, which was subjected to 7 cycles [Fmoc-D-Phe-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-D-Val-OH, Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, Fmoc-D-Ala-OH, Boc-D-Val-OH] of the SPPS protocol (Step 1-4) to afford the resin-bound peptide **S58**. Then, to the resin was added a solution of 2% hydrazine in DMF (500 μL) and shaken for 5 min at 40 $^\circ\text{C}$ to remove the Dde protecting group of the side chain of L-Lys at the position 3, to give the resin-bound

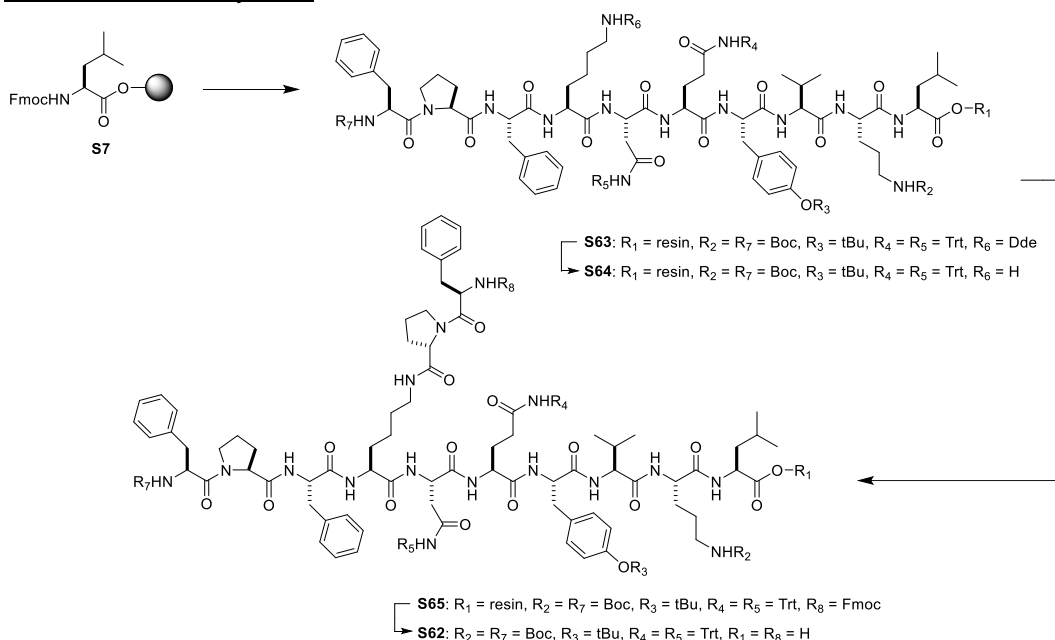
linear peptide **S59**. This procedure was repeated 3 times in total. To the resin was added a solution of Fmoc-L-Ile-OH (28.3 mg, 0.08 mmol), DIC (8.10 mg, 0.08 mmol) and Oxyma (11.4 mg, 0.08 mmol) in DMF (1.0 mL) and stirred for 30 min at 40 °C to give the resin-bound branched peptide **S60**. Following Fmoc removal of the side chain of L-Ile, the resin-bound peptide was cleaved from the resin by a mixture of CH₂Cl₂/HFP (=70:30) (5 mL), being stirred for 10 min, and the reaction mixture was filtered. This procedure was repeated twice. The filtrate was concentrated to afford the cyclic precursor **S57**.



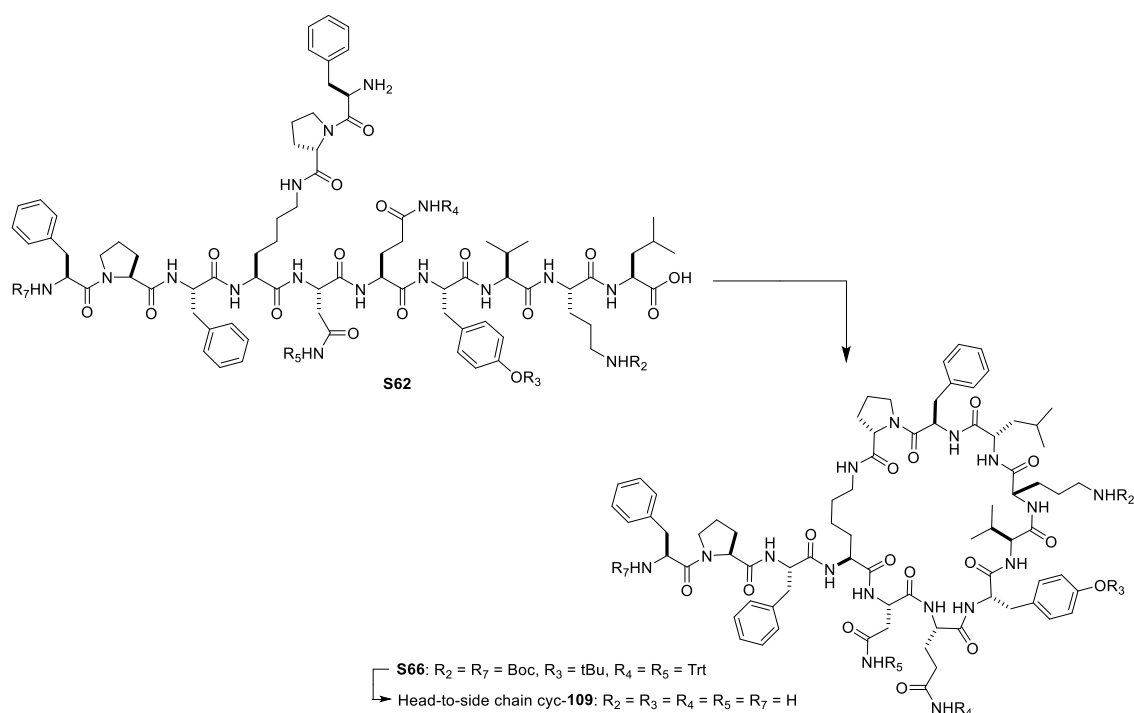
Head-to-side chain cyc-90 (= 94): To a solution of peptide **S57** in CH₂Cl₂/DMF (= 9:1) (20 mL) were added 2,4,6-collidine (9.70 mg, 0.08 mmol), HOAt (5.44 mg, 0.04 mmol), and PyBOP (20.8 mg, 0.04 mmol) to afford cyclic peptide **S61**. After being stirred overnight at 40 °C, the reaction mixture was concentrated, and the residue was diluted with EtOAc and saturated aqueous NH₄Cl. The resulting mixture was extracted with EtOAc ($\times$ 3), washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated. To the residue was added a mixture of TFA/H₂O/TIP (=95:2.5:2.5) (1.0 mL), and the mixture was stirred for 1 h. The reaction mixture was diluted with Et₂O (24 mL), centrifuged at 3500 $\times$ g for 10 min at 4 °C, and Et₂O layer was removed by decantation. The crude peptide was purified by reversed phase HPLC with COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 20 mm I.D $\times$ 250 mm, which was eluted by mobile phase MeCN:H₂O (= 35:65) containing 0.05% TFA with flow rate at 10 ml/min to afford the head-to-side chain cyc-90 (= **94**) (6.6 mg, 32.6% for 19 steps) as a white amorphous solid; $[\alpha]_D^{18}$ -43.16 (c 0.492, DMSO); ¹H NMR(500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.60 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 8.23-8.02 (m, 7H), 7.73 (s, 2H), 7.60-7.56 (m, 1H), 7.46 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.23-7.09 (m, 5H), 4.37 (dd, *J* = 14.2, 7.4 Hz, 2H), 4.26-4.17 (m, 2H), 4.08-3.99 (m, 2H), 3.88 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.81 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.57 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 3.03-2.92 (m, 2H), 2.79-2.56 (m, 4H), 2.02-1.87 (m, 3H), 1.74-1.09 (m, 22H), 1.00-0.56 (m, 30H), 0.44-0.39 (m, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 173.0, 172.9, 172.6, 172.1, 171.9, 171.7, 171.2, 171.1, 168.0, 138.0, 129.7(2 $\times$ CH₂), 128.7(2 $\times$ CH₂), 126.8, 59.8, 59.0, 58.0, 57.8, 55.4, 54.6, 54.1, 52.6, 49.2, 39.1, 38.6, 38.0, 36.3, 35.7, 31.6, 31.3, 30.3, 30.0, 28.4, 28.3, 27.1, 25.0,

24.7, 24.6, 23.1, 22.9, 22.8, 22.6, 19.6, 19.3, 19.0, 18.8, 18.3, 16.3, 15.6, 11.8, 11.5; HRMS (ESI) calcd for $C_{52}H_{89}N_{11}O_9Na^+$ $[M+Na]^+$ 1034.67369, found 1034.67354.

Head-to-side chain cyc-109



Cyclic precursor (S62): 2-chlorotrityl chloride resin **S7** (loading rate: 0.917 mmol/g, 0.05 mmol, 54.5 mg) in Libra tube was swelled with CH_2Cl_2 for 10 min, which was subjected to 9 cycles [Fmoc-L-Orn(Boc)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Boc-L-Phe-OH] of SPPS protocol described above to afford the resin-bound peptides **S63**. Then, to the resin was added a solution of 2% hydrazine in DMF (500 μL) and shaken for 5 min at 40 $^\circ\text{C}$ to remove the Dde protecting group of the side chain of L-Lys at the position 4, to give the resin-bound linear peptide **S64**. This procedure was repeated 3 times in total. The resin-bound linear peptide **S64** was subjected to 2 cycles [Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-D-Phe-OH] of SPPS protocol described above to afford the resin-bound branched peptides **S65**. Following Fmoc removal of the side chain of L-Phe, the resin-bound branched peptide was cleaved from the resin by a mixture of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{HFP}$ (=70:30) (5 mL), being stirred for 10 min, and the reaction mixture was filtrated. This procedure was repeated twice. The filtrate was concentrated to afford the cyclic precursor **S62**.



Head-to-side chain cyc-109: To a solution of peptide **S62** in $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ (=9:1) (20 mL) were added 2,4,6-collidine (24.2 mg, 0.20 mmol), HOAt (27.2 mg, 0.20 mmol), and PyBOP (104 mg, 0.20 mmol) to afford the cyclic peptide **S66**. After being stirred overnight at 40 °C, the reaction mixture was concentrated, and the residue was diluted with EtOAc and saturated aqueous NH_4Cl . The resulting mixture was extracted with EtOAc ($\times 3$), washed with brine, dried over MgSO_4 , and concentrated. To the residue was added a mixture of TFA/ H_2O /TIP (=95:2.5:2.5) (1.0 mL), and the mixture was stirred for 1 h. The reaction mixture was diluted with Et_2O (24 mL), centrifuged at $3500 \times g$ for 10 min at 4 °C, and Et_2O layer was removed by decantation. The crude peptide was purified by reversed phase HPLC with COSMOSIL 5C₁₈-MS-II 20 mm I.D $\times$ 250 mm, which was eluted by mobile phase MeCN: H_2O (= 35:65) containing 0.05% TFA with flow rate at 10 ml/min to afford the head-to-side chain cyc-**109** (27.4 mg, 36.6 % for 25 steps) as a white amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -44.48 (c 1.317, MeOH); ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.70 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 8.45-7.60 (m, 13H), 7.45-6.91 (m, 21H), 6.60 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 4.54-3.99 (m, 11H), 3.66-3.36 (m, 3H), 3.22-2.93 (m, 9H), 2.90-2.74 (m, 8H), 2.15-1.99 (m, 4H), 1.88-1.47 (m, 14H), 1.30-1.18 (m, 7H), 0.81-0.66 (m, 12H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 174.2, 172.2, 171.9, 171.8, 171.5, 171.3, 170.9, 170.8, 170.7, 170.6, 170.4, 170.1, 169.9, 166.8, 155.8, 137.6, 137.2, 134.7, 129.9, 129.9, 129.4, 129.3, 129.0 ($2\times\text{CH}_2$), 128.7 ($2\times\text{CH}_2$), 128.5 ($2\times\text{CH}_2$), 128.4 ($2\times\text{CH}_2$), 128.2, 128.1, 128.1, 127.2, 126.5, 126.2, 115.0 ($2\times\text{CH}_2$), 59.8, 59.6, 55.8, 53.3, 52.5, 52.2, 51.8, 50.6, 49.7, 46.8, 46.6, 45.9, 45.9, 44.8, 44.8, 41.6, 40.4, 38.5, 37.5, 36.9, 36.1, 32.1, 31.4, 31.3, 30.5, 29.1, 29.1, 28.9, 26.0, 25.9, 24.4, 24.0, 23.7, 23.4, 22.8, 22.4, 22.0, 19.3, 18.2; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{77}\text{H}_{108}\text{N}_{16}\text{O}_{15}^+$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 748.40845, found 748.40770.

Table S1: Oligonucleotides used in this study

oligonucleotide	sequence	description
SurE_del_up_forward	cg <u>gaattc</u> aagcttCCTACTCGATCTCGACAG	For deletion of <i>surE</i> gene. EcoRI site is underlined.
SurE_del_up_reverse	tgct <u>ctaga</u> CACTGCGTCCCCTGCGCC	For deletion of <i>surE</i> gene. EcoRI site is underlined.
SurE_del_down_forward	tgct <u>ctaga</u> CGTGCGCCATCAGTTTCG	For deletion of <i>surE</i> gene. XbaI site is underlined.
SurE_del_down_reverse	ccc <u>aagctt</u> CCAGGAACCAGAGCCGTTC	For deletion of <i>surE</i> gene. HindIII site is underlined.
AphII_forward	tgct <u>ctaga</u> CGGCCAGTGAATTCGAGCGACTCGAGT	Cloning of <i>aphII</i> gene. XbaI site is underlined.
AphII_forward	cccaagctt <u>ctaga</u> CCGGGTACCGAGCGAACGCGTT	Cloning of <i>aphII</i> gene. XbaI site is underlined.
SurE_del_check_forward	GTGGTGCTCGCCCTCGGC	Confirmation of deletion of <i>surE</i> gene
SurE_del_check_reverse	GACCACCTCCGCCGAGCG	Confirmation of deletion of <i>surE</i> gene
SurE_Fw	CCG <u>GAATTC</u> CAATATGGGTGCCGAGGGGGCG	Cloning of <i>surE</i> gene. EcoRI-NdeI sites are underlined.
SurE_Rv	CCC <u>AAGCTT</u> TCAGAGCCGGTGTCATGGC	Cloning of <i>surE</i> gene. HindIII sites are underlined.
SurE_H225A_Fw	GCCGAGCACGTCGACGCCATGGCCTCGCTCTCG	Construction of SurE(H225A)
SurE_H225A_Rv	CGAGAGCGAGGCCATGGCGTCGACGTGCTCGGC	Construction of SurE(H225A)
SurE ₁₅₄₅₂ _Fw	ccgga <u>aattc</u> GTGCACGGGGACTCAGCGGATCC	Cloning of SurE ₁₅₄₅₂ gene. EcoRI sites is underlined.
SurE ₁₅₄₅₂ _Rv	ccc <u>aagctt</u> TTAGTGCGGCCGTGCGCCGTGG	Cloning of SurE ₁₅₄₅₂ gene. HindIII sites is underlined.
SurE ₁₄₉₈₈ _Fw	ccgga <u>aattc</u> GTGCCCAACGAGCAGGATCTCGGG	Cloning of SurE ₁₄₉₈₈ gene. EcoRI sites is underlined.
SurE ₁₄₉₈₈ _Rv	ccc <u>aagctt</u> TCATCCGGTCACTGCGGCCGC	Cloning of SurE ₁₄₉₈₈ gene. HindIII sites is underlined.
SurE_G235A_Fw	TCGCTGGCCGCCGCCGCGGGCTGGTCGGCAG	Construction of SurE(G235A)
SurE_G235A_Rv	CTGCCGACCAGCCCCGCGCGGCGGCCAGCGA	Construction of SurE(G235A)
SurE_G235V_Fw	GGCCGCCGCCGTGGGGCTG	Construction of SurE(G235V)
SurE_G235V_Rv	CAGCCCCACGGCGGCGGCC	Construction of SurE(G235V)
SurE_G235I_Fw	TCGCTGGCCGCCGCCATTGGGCTGGTCGGCAG	Construction of SurE(G235I)
SurE_G235I_Rv	CTGCCGACCAGCCCAATGGCGGCGGCCAGCGA	Construction of SurE(G235I)
SurE_G235L_Fw	TCGCTGGCCGCCGCCCTGGGGCTGGTCGGCAG	Construction of SurE(G235L)
SurE_G235L_Rv	CTGCCGACCAGCCCCAGGGCGGCGGCCAGCGA	Construction of SurE(G235L)

Table S2: Strains used in this study

strain	description
<i>Streptomyces albidoflavus</i> NBRC12854	Metabolite analysis, DNA fragment of <i>surE</i> gene
<i>E. coli</i> GM2929 <i>hsdS</i> ::Tn10/pUB307::Tn7	Deletion of <i>surE</i> gene
<i>E. coli</i> DH5 α	General host for gene cloning
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	General host for gene cloning
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)::SurE-pET28a	General host for SurE
<i>Streptomyces noursei</i> NBRC15452	DNA fragment of SurE ₁₅₄₅₂ gene
<i>Goodfellowiella coeruleoviolacea</i> NBRC14988	DNA fragment of SurE ₁₄₉₈₈ gene
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)::SurE ₁₅₄₅₂ -pET28a	General host for SurE ₁₅₄₅₂
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)::SurE ₁₄₉₈₈ -pET28a	General host for SurE ₁₄₉₈₈
<i>E. coli</i> BL21 (DE3):: SurE(H225A)-pET28a	General host for SurE(H225A)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)::SurE(G235A)-pET28a	General host for SurE(G235A)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)::SurE(G235V)-pET28a	General host for SurE(G235V)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)::SurE(G235I)-pET28a	General host for SurE(G235I)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)::SurE(G235L)-pET28a	General host for SurE(G235L)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)::WolJ-pColdII	General host for WolJ
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)::TycC-TE-pET28a	General host for TycC-TE

Table S3: Plasmids used in this study

plasmid	description
pGM160- Δ <i>surE</i>	Deletion of <i>surE</i> gene
SurE-pUC19	Cloning plasmid harboring <i>surE</i> gene
SurE-pET28a	Expression plasmid of SurE
SurE ₁₅₄₅₂ -pET28a	Expression plasmid of SurE ₁₅₄₅₂
SurE ₁₄₉₈₈ -pET28a	Expression plasmid of SurE ₁₄₉₈₈
SurE(H225A)-pET28a	Expression plasmid of SurE(H225A)
SurE(G235A)-pET28a	Expression plasmid of SurE(G235A)
SurE(G235V)-pET28a	Expression plasmid of SurE(G235V)

SurE(G235I)-pET28a	Expression plasmid of SurE(G235I)
SurE(G235L)-pET28a	Expression plasmid of SurE(G235L)
WolJ-pColdII	Expression plasmid of WolJ
TycC-TE-pET28a	Expression plasmid of TycC-TE

Table S4. Amino acid sequence of peptide cyclases used in this study

protein	ID and description	amino acid sequence
<i>N</i> -His6 tagged SurE	Amino acid sequence is derived from SurE (GenBank: BBZ90014.1). Sequence from the expression vector pET28a is underlined.	<u>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH</u> MGAEGERDAVGALFEELVREH RVTGAQLSVYRDGALSEYATGLASVRTGEPVTPRTGFPFGSVT KFLTAE LVMQFVCDGDLDDPLAGLLPDLGRAAGPPLGTATV RQLLSHTAGVVDSIEYDEMGRGPSYRRFAAACARQPALFPPGLA FSYSNTGYCLLGAVIEAASGMDWWTAMDSCLLRPLGIEPAFLH DPRPGQGAARPVAEGHALRAGGERAEHVDHMASLSLAAAG GLVGSATDLVTAARPHLADRKTFAQHDLDPEDAVLAMRTCVP DAEPFGLADGWGLGLMRHGTGDGAWYGHGAVGGASCNLRI HPDRSLALALTANSTAGPKLWEALVARLPEAGLDVGHYALPVP DSAPLAPDAGHLGTYANGDLELMVTHDAAGDLFLTRESYSDY RLSLHEDDLFVARSGEPGALPITGRFVREHPAGPVALLQYGGRA MHRL
<i>N</i> -His6 tagged SurE ₁₅₄₅₂	Amino acid sequence is derived from SurE ₁₅₄₅₂ (JGI database: 2603776488). Sequence from the expression vector pET28a is underlined.	<u>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH</u> MASMTGGQQMGRGSEFVHGDS ADPAGYAGDGSPDLDDLRLARDCDVAGGQLAVHHHGVL TWEFGEEEPGAGRPVHSATAFPYGSTTKVCTATSVLQLVGDGD LDLDRPVREWLPEAGTVPEARRDHPALAATLRQLLSHTAGLPS DHDDADASSLRRWLTGFLAAPADARPAPGTFSYSNVGYGIAGR VVESVTGLPWYEA VRDYLLRPLGTAITLPAEPGSLPAGGLAGS AADLVRLGLLHIAEPGRPDADPAALGEATRPTAGADPFGLAD GWGPGLGHFGPAEDRWLGHDGTLTGATCHLRIHPRRGTVIALT TNSPTGQALWDAVVGALRDAGIDVG VYRPAPPPSLAQGGAPA GAAAFADCTGTyrNGDLAVTVGLDGPHLVLELPGGARELAEP LARRTFAARGAGAFGRFAVDARTGAVHALQYSGRTLLRDTG RAHGARCH
<i>N</i> -His6 tagged SurE ₁₄₉₈₈	Amino acid sequence is derived from SurE (JGI database: 2596754607). Sequence from the expression vector pET28a is underlined.	<u>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH</u> MASMTGGQQMGRGSEFVPNEQ DLGSLARLAERHRVPGAQLSVCHDSASVTVTGRERHGAATP VTARSAFPLGSLTKPFTAALAMVLVADGDLDELDPVAGYHPGV TLRRLLSHTAGLESNVDEQAAAGVPRRRWVTRYPARLAPEHPP GTVFSYSNVGYLLAGHLVEEVTGLDWAEAVESVLLRPLGITPA FVVGAAAGSRGVVCGHVLTDRLVLPVAEQVMPEVEAPNGALAL SSADLLAFAALFSANSPAPDVLDPATAALMCQDQLADVRVGPY GMADGWGLGWARYRGAGADWFGHDGTGDTSCHLRFDPER GTAVALTTNGSTGAALWRELCAELAEHVLPEWGREPGEATP VAGPPDGAGHYANGPAEFVVTRQDDDLALVLDGAQAVPLTC LPDLRFQLRLGTTVLSGRFLRDPDTGGIDHIQVTGRLARRRQVT G

N-His6 (H225A)	tagged	SurE	Amino acid sequence is derived from SurE (GenBank: BBZ90014.1). Sequence from the expression vector pET28a is underlined.	<u>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMGAEGAERDAVGALFEELVREH</u> RVTGAQLSVYRDGALSEYATGLASVRTGEPVTPRTGFPFGSVT KFLTAELVMQFVCDGDLDDPLAGLLPDLGRAAGPPLGTATV RQLLSHTAGVVDSEIYDEMGRGPSYRRFAAACARQPALFPPGLA FSYSNTGYCLLGAVIEAASGMDWWTAMDSCLLRPLGIEPAFLH DPRPGQGGAARPVAEGHALRAGGERAEHVDAMASLSLAAAG GLVGSATDLVTAARPHLADRKTFAQHDLDPEDAVLAMRTCV DAEPFGLADGWGLGLMRHGTGDGAWYGHGAVGGASCNLRI HPDRSLALALTANSTAGPKLWEALVARLPEAGLDVGHYALPVP DSAPLAPDAGHLGTYANGDLELMVTHDAAGDLFLTRESYSDY RLSLHEDDLFVARSGEPGALPITGRFVREHPAGPVALLQYGGRA MHRL
N-His6 (G235X)	tagged	SurE	G235X mutants of SurE. X = A/V/I/L. Sequence from the expression vector pET28a is underlined.	<u>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMGAEGAERDAVGALFEELVREH</u> RVTGAQLSVYRDGALSEYATGLASVRTGEPVTPRTGFPFGSVT KFLTAELVMQFVCDGDLDDPLAGLLPDLGRAAGPPLGTATV RQLLSHTAGVVDSEIYDEMGRGPSYRRFAAACARQPALFPPGLA FSYSNTGYCLLGAVIEAASGMDWWTAMDSCLLRPLGIEPAFLH DPRPGQGGAARPVAEGHALRAGGERAEHVDHMASLSLAAAX GLVGSATDLVTAARPHLADRKTFAQHDLDPEDAVLAMRTCV DAEPFGLADGWGLGLMRHGTGDGAWYGHGAVGGASCNLRI HPDRSLALALTANSTAGPKLWEALVARLPEAGLDVGHYALPVP DSAPLAPDAGHLGTYANGDLELMVTHDAAGDLFLTRESYSDY RLSLHEDDLFVARSGEPGALPITGRFVREHPAGPVALLQYGGRA MHRL
N-His6 tagged WolJ			Amino acid sequence is derived from WolJ (GenBank: UNO41476.1). Sequence from the expression vector pColdII is underlined.	<u>MNHKVHHHHHHMSAEAKGRGTTISLPLDRLAKEHSVVGQQLA</u> VHHQGTTHTWAFGEEHDSGRPVSVGTAFALGSTTKALTATSV LQLVSDGDLDLDSPVKTWIEERGAAADHPALNATLRQLLSHTA GLPSDFHDEEAPSLRRWLAGFLTSGDERARASWPTPGSFSYSNI GYAVAGRAVEAATGLPWWQAVRDYLLTPLGTGIGLLPGAPQD GRPLTAAPGHTAHTTPDGRTVVHVQSTTDAGSAPSGGLAGSA ADLVRFARLHLEPGDLDRSAVADPSVLEMAQPVGTGAEPFGL ADGWGLGLGHFGPAGRHWLGHGDTLDGSTCHLRIEPRQGTVV ALTTNTSSGLALWDSVVEELRECGLDIGLHAPQPPLAAPATFA ECTGTYRNGDLAVTVGIEDQHIVLGLPNGQRDSVAPHTGLFFSG RPGNASLFLGRFVKDVATGEIRALQYSGRTLREALTARN
N,C-His6 tagged TycC-TE			Amino acid sequence attached to the TE domain of the native TycC (UniProtKB/Swiss-Prot: O30409.1) are underlined.	<u>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMGGSHKRFE</u> SRYGTAILLNQETA RNVFCFTPIGAQSVYYQKLAAEIQGVSLYSFDFIQDDNRMEQYI AAITAIDPSGPYTLMGYSSGGLNAFEVAKLEERGYGVTDIILFD SYWKDKAIERTVAETENDIAQLFAEIGENTEMFNMTQEDFQLY AANEFVKQSFVRKTVSYVMFHNNLVNTGMTTAAIHLLIQSELEA DEEAPVAAKWNESAWANATQRLITYSGHGIHSRMLAGDYASQ NASILQNILQELFILKGRSHHHHHH

Table S5: Compounds used in this study

no.	compound	description	enzyme for cyclization
1	surugamide A	A cyclic peptide biosynthesized by SurE	—
2	surugamide B	A cyclic peptide biosynthesized by SurE	—
3	surugamide C	A cyclic peptide biosynthesized by SurE	—
4	surugamide D	A cyclic peptide biosynthesized by SurE	—

5	surugamide E	A cyclic peptide biosynthesized by SurE	—
6	surugamide F	A linear peptide biosynthesized by SurE	—
7	<i>seco</i> -surugamide B-SNAC	A substrate with SNAC at C-terminus	SurE, SurE ₁₅₄₅₂ , SurE ₁₄₉₈₈
8	isopeptide	A head-to-side chain cyclic peptide	—
9	Figure 2-7	—	—
10	Figure 2-7	—	—
11	Figure 2-7	—	—
12	<i>seco</i> -surugamide F-SNAC	A substrate with SNAC at C-terminus	SurE
13	<i>O</i> -benzyl <i>seco</i> -surugamide F-SNAC	A substrate with SNAC at C-terminus	SurE
14	<i>seco</i> -surugamide B (K5A, D ₈ L)-SNAC	A substrate with SNAC at C-terminus	SurE
15	<i>seco</i> -surugamide B (K5A)-SNAC	A substrate with SNAC at C-terminus	SurE
16	<i>seco</i> -surugamide B (I ₁₀ alloI)-SNAC	A substrate with SNAC at C-terminus	SurE
17	<i>seco</i> -surugamide B (I3A)-SNAC	A substrate with SNAC at C-terminus	SurE
18	<i>seco</i> -surugamide B (D ₄ V)-SNAC	A substrate with SNAC at C-terminus	SurE
19	<i>seco</i> -surugamide B (I6A)-SNAC	A substrate with SNAC at C-terminus	SurE
20	<i>seco</i> -surugamide B (D ₇ F)-SNAC	A substrate with SNAC at C-terminus	SurE
21	<i>seco</i> -surugamide B (D ₈ A)-SNAC	A substrate with SNAC at C-terminus	SurE, SurE ₁₅₄₅₂ , SurE ₁₄₉₈₈
22	<i>seco</i> -surugamide B (K5αAA)-SNAC	A substrate with SNAC at C-terminus	SurE
23	<i>seco</i> -surugamide B (D ₈ R)-SNAC	A substrate with SNAC at C-terminus	SurE
24	<i>seco</i> -surugamide B (D ₈ N)-SNAC	A substrate with SNAC at C-terminus	SurE
25	<i>seco</i> -surugamide B (D ₈ S)-SNAC	A substrate with SNAC at C-terminus	SurE
26	<i>seco</i> -surugamide B (D ₈ F)-SNAC	A substrate with SNAC at C-terminus	SurE, SurE ₁₅₄₅₂ , SurE ₁₄₉₈₈
27	<i>seco</i> -surugamide B (D ₈ G)-SNAC	A substrate with SNAC at C-terminus	SurE
28	<i>seco</i> -surugamide B (I1W)-SNAC	A substrate with SNAC at C-terminus	SurE
29	<i>seco</i> -surugamide B (I1P)-SNAC	A substrate with SNAC at C-terminus	SurE
30	Figure 3-7	—	—
31	<i>seco</i> -surugamide B-methyl ester	A substrate with methyl ester at C-terminus	SurE
32	isopeptide	A head-to-side chain cyclic peptide of 26	—
33	Figure 4-8	—	—
34	Figure 4-8	—	—
35	<i>seco</i> -surugamide B-EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE, SurE(G235X)
36	<i>seco</i> -surugamide B (I1G)-EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE

37	<i>seco-surugamide B (I1A)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
38	<i>seco-surugamide B (I1V)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
39	<i>seco-surugamide B (I1L)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
40	<i>seco-surugamide B (I1F)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
41	<i>seco-surugamide B (I1W)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
42	<i>seco-surugamide B (I1M)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
43	<i>seco-surugamide B (I1H)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
44	<i>seco-surugamide B (I1R)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
45	<i>seco-surugamide B (I1K)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
46	<i>seco-surugamide B (I1S)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
47	<i>seco-surugamide B (I1T)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
48	<i>seco-surugamide B (I1Y)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
49	<i>seco-surugamide B (I1D)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
50	<i>seco-surugamide B (I1E)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
51	<i>seco-surugamide B (I1N)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
52	<i>seco-surugamide B (I1Q)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
53	<i>seco-surugamide B (I1P)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
54	<i>seco-surugamide B (1AEAA)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
55	<i>seco-surugamide B (2AEAA)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
56	<i>seco-surugamide B (3AEAA)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
57	<i>seco-surugamide B (4AEAA)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
58	<i>seco-surugamide B (5AEAA)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
59	<i>seco-surugamide B (6AEAA)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
60	<i>seco-surugamide B (7AEAA)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
61	<i>seco-surugamide B (oL8G)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE, SurE(G235X)
62	<i>seco-surugamide B (oL8oA)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
63	<i>seco-surugamide B (oL8oV)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
64	<i>seco-surugamide B (oL8oalloI)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
65	<i>seco-surugamide B (oL8oF)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
66	<i>seco-surugamide B (oL8oW)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
67	<i>seco-surugamide B (oL8oM)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
68	<i>seco-surugamide B (oL8oH)</i> -EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE

69	<i>seco</i> -surugamide B (D8bR)-EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
70	<i>seco</i> -surugamide B (D8bK)-EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
71	<i>seco</i> -surugamide B (D8bS)-EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
72	<i>seco</i> -surugamide B (D8bT)-EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
73	<i>seco</i> -surugamide B (D8bY)-EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
74	<i>seco</i> -surugamide B (D8bD)-EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
75	<i>seco</i> -surugamide B (D8bE)-EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
76	<i>seco</i> -surugamide B (D8bN)-EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
77	<i>seco</i> -surugamide B (D8bQ)-EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
78	deoxypentaminomycin C	A cyclic peptide biosynthesized by PenA	SurE
79	desprenylagaramide C	A cyclic peptide biosynthesized by PagG	—
80	<i>seco</i> -deoxypentaminomycin C-EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
81	<i>seco</i> -desprenylagaramide C-EG	A substrate with EG at C-terminus	SurE
82	desotamide B	A cyclic peptide biosynthesized by WolJ	—
83	wollamide B1	wollamide B analog	—
84	<i>seco</i> -desotamide B-EG	A substrate with EG at C-terminus	WolJ
85	<i>seco</i> -wollamide B1-EG	A substrate with EG at C-terminus	WolJ
86	tyrocidine A	A cyclic peptide biosynthesized by TycC-TE	—
87	<i>seco</i> -tyrocidine A-EG	A substrate with EG at C-terminus	TycC-TE
88	Figure 4-25a	—	—
89	Figure 4-25b	—	—
90	<i>seco</i> -surugamide B (I1bV, I3K(I-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	SurE
91	Figure 5-4	—	—
92	Head-to-tail cyclic peptide	Head-to-tail cyclic peptide of 90	—
93	Head-to-side chain cyclic peptide	Head-to-side chain cyclic peptide of 90	—
94	Head-to-side chain cyclic peptide	Head-to-side chain cyclic peptide of 90	—
95	<i>seco</i> -surugamide B (I3K(I-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	SurE
96	Head-to-tail cyclic peptide	Head-to-tail cyclic peptide of 95	—
97	Head-to-side chain cyclic peptide	Head-to-side chain cyclic peptide of 95	—
98	<i>N</i> -acetyl <i>seco</i> -surugamide B (I1K(I-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	SurE
99	<i>seco</i> -surugamide B (I1bV, D2K(I-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	SurE
100	<i>seco</i> -surugamide B (I1bV, DV4K(I-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	SurE

101	<i>seco</i> -surugamide B (I1D V, K5K(I-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	SurE
102	<i>seco</i> -surugamide B (I1D V, I6K(I-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	SurE
103	<i>seco</i> -surugamide B (I1D V, D F7K(I-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	SurE
104	<i>N</i> -acetyl <i>seco</i> -wollamide B1 (W1K(W-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	WolJ
105	<i>seco</i> -wollamide B1 (W1D A, L2K(W-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	WolJ
106	<i>seco</i> -wollamide B1 (W1D A, D L3K(W-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	WolJ
107	<i>seco</i> -wollamide B1 (W1D A, V4K(W-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	WolJ
108	<i>seco</i> -wollamide B1 (W1D A, N5K(W-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	WolJ
109	<i>seco</i> -tyrocidine A (D F1F, D F4K(P-D F-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	TycC-TE
110	<i>N</i> -acetyl <i>seco</i> -tyrocidine A (D F1K(D F-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	TycC-TE
111	<i>seco</i> -tyrocidine A (D F1F, P2K(D F-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	TycC-TE
112	<i>seco</i> -tyrocidine A (D F1F, F3K(D F-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	TycC-TE
113	<i>seco</i> -tyrocidine A (D F1F, D F4K(D F-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	TycC-TE
114	<i>seco</i> -tyrocidine A (D F1F, N5K(D F-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	TycC-TE
115	<i>seco</i> -tyrocidine A (D F1F, Q6K(D F-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	TycC-TE
116	<i>seco</i> -tyrocidine A (D F1F, Y7K(D F-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	TycC-TE
117	<i>seco</i> -tyrocidine A (D F1F, V8K(D F-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	TycC-TE
118	<i>seco</i> -tyrocidine A (D F1F, O9K(D F-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	TycC-TE
119	<i>seco</i> -surugamide B (I1D S, I3K(I-NH ₂))-EG	A branched substrate with EG at C-terminus	SurE
120	biphenyl-SAL ester	—	—
121	Oxazolidine intermediate	—	—
122	Biphenyl analog	—	—

Table S6. 633 PBP-type TEs candidates. These were subjected to SSN analysis shown in **Figure 4-30** and **Figure S2**. Table contains NCBI_accession_identifiers, pocket-forming residues, group numbers, molecular weights of the pocket-forming residues, pI values of the pocket-forming residues. Group numbers are indicated in **Figure S2**. The pocket-forming residues show residues corresponding to 227th, 231st, 232nd, 234th, 235th, 236th, 307th, 308th, and 309th residues in SurE.

NCBI_accession_id	pocket-forming residues	group	mw	pi	description
WP_176165477	LEAAGAGNA	1	772.81	4	
WP_202487052	LEAAGGGNA	1	758.79	4	
WP_026247773	LEAAGGGNA	1	758.79	4	
WP_196950376	LEAAGAGNA	1	772.81	4	
WP_117485980	LEAAGAGNA	1	772.81	4	
WP_159697701	LEAAGAGNA	1	772.81	4	
WP_074002751	LEAAGAGNA	1	772.81	4	
WP_145488693	LEAAGAGNA	1	772.81	4	
WP_148023456	LEAAGAGNA	1	772.81	4	
WP_111582917	LEAAGAGNA	1	772.81	4	
WP_153815522	LEAAGAGNA	1	772.81	4	
WP_182453053	LEAAGAGNA	1	772.81	4	
WP_100576563	LEAAGAGNA	1	772.81	4	
WP_063350448	LEAAGAGNA	1	772.81	4	
WP_046427892	LEAAGAGNA	1	772.81	4	
WP_146464606	LEAAGAGNA	1	772.81	4	
WP_167161359	LEAAGAGNA	1	772.81	4	
WP_190025813	LEAAGAGNA	1	772.81	4	
WP_154823969	LEAAGAGNA	1	772.81	4	
WP_182786086	LEAAGAGNA	1	772.81	4	
WP_037656772	LEAAGAGNA	1	772.81	4	
WP_162131791	LEAAGAGNA	1	772.81	4	
WP_161250041	LEAAGAGNA	1	772.81	4	
WP_189762602	LEAAGAGNA	1	772.81	4	
WP_067046215	LEAAGAGNA	1	772.81	4	

WP_125211387	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_182774528	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_136099462	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_161257993	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_042368091	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_093680224	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_145911725	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_199375925	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_199572382	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_128788168	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_085563630	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_161216955	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_086808018	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_121785559	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_180328077	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_167741530	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_093769106	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_189911280	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_201837785	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_194892233	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_030607522	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_189755526	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_181796425	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_137304717	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_201814503	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_136239947	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_212006929	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_189988938	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_198501476	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_062770071	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_149516160	LEAAGGGNA	1	758.79	4
WP_184967118	LEAAGAGNA	1	772.81	4

WP_030779990	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_076688145	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_161334278	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_067241607	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_189984362	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_099053570	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_103816447	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_034091314	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_030739793	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_125516453	LEAVGAGNA	1	800.87	4
WP_031027530	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_053211063	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_176151658	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_030986884	LEAAGAGNA	1	772.81	4
MYU26828	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_190203699	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_086703662	LEAAGAGNA	1	772.81	4
GHE91753	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_055528952	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_143637217	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_132785697	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_031098401	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_108999240	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_208886068	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_182443499	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_190015158	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_196945894	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_106411086	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_030785550	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_059262529	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_205036648	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_137304253	LEAAGAGNA	1	772.81	4

WP_189887401	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_078969416	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_168374802	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_189299301	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_058083199	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_014676674	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_110672029	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_190139019	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_030639482	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_189816733	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_171150457	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_202278035	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_210885418	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_030344680	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_053709337	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_107014573	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_112467241	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_208035938	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_086741946	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_189767906	LEAAGAGNA	1	772.81	4
OSZ55491	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_043505853	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_133918601	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_020943750	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_115912803	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_189292687	LQAAGAGNA	1	771.83	5.52
WP_055694410	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_189220447	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_111006009	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_109378144	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_073946309	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_121408422	LEAAGAGNA	1	772.81	4

WP_042166992	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_062191302	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_159537039	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_055571692	LEAAGAGNA	1	772.81	4
OBQ53184	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_055690308	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_055605326	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_155072826	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_150515129	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_061926041	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_172381754	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_138965619	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_030677330	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_125262816	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_087887274	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_030361310	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_164327708	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_058846935	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_189174673	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_157165355	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_189731883	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_030567699	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_037658623	LEAAGAGNA	1	772.81	4
EPH44643	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_187065124	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_144323065	LEAAGAGNA	1	772.81	4
GES29931	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_129292552	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_093640673	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_086717861	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_088796133	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_159478083	LEAAGAGNA	1	772.81	4

WP_189095430	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_040901218	LEAAGGGNA	1	758.79	4
WP_093481651	LEAAGGGNA	1	758.79	4
WP_030077974	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_030989075	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_096214918	LEAAGGGNA	1	758.79	4
WP_030797887	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_030410858	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_147245669	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_201801195	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_129251341	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_129279733	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_199830974	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_201879529	LEAAGAGNA	1	772.81	4
RNF87452	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_039936528	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_176186510	LEAAGAGNA	1	772.81	4
GDY50629	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_191063067	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_210945144	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_202543249	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_100809535	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_174882524	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_208972866	LEAAGAGNA	1	772.81	4
SCG07820	LEAAGAGNA	1	772.81	4
PNG94987	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_069872337	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_046089013	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_079260291	LEAAGAGNA	1	772.81	4
NIY62998	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_093703607	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_102935391	LEAAGAGNA	1	772.81	4

WP_079115496	LEAAGGGNA	1	758.79	4
WP_051885704	LEAAGGGNA	1	758.79	4
WP_066026740	LEAAGGGNA	1	758.79	4
WP_064458662	LEAAGGGNA	1	758.79	4
WP_067081751	LEAAGGGNA	1	758.79	4
WP_060951563	LEAAGGGNA	1	758.79	4
WP_099012482	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_062009451	LEAAGGGNA	1	758.79	4
WP_199335741	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_037954011	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_210608939	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_211834642	LEAAGAGNA	1	772.81	4
MBA6440195	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_138912842	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_166482925	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_201851966	LEAAGAGNA	1	772.81	4
NEW69358	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_020874183	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_044582433	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_121826718	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_125755191	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_059148351	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_211127532	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_216341400	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_086708205	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_137963993	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_161562721	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_208516952	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_078638540	LEAAGAGNA	1	772.81	4
AEM84728	LEAAGAGNA	1	772.81	4
WP_055718197	ITAAGAGAV	2	729.83	5.52
WP_030892059	ITAAGAGAV	2	729.83	5.52

WP_051846197	ITAAGAGAV	2	729.83	5.52
WP_159788023	ITAAGAGAV	2	729.83	5.52
WP_051857202	ITAAGAGAV	2	729.83	5.52
GEB52742	ITAAGAGAV	2	729.83	5.52
WP_124438013	ITAAGAGAV	2	729.83	5.52
WP_073781503	TLAAGGGAV	2	715.8	5.19
WP_129771561	TLAAGGGAV	2	715.8	5.19
RYJ22828	TLAAGGGAV	2	715.8	5.19
WP_106979213	TLAAGGGAV	2	715.8	5.19
PVE07574	TLAAGGGAV	2	715.8	5.19
NEE25910	TLAAGGGAV	2	715.8	5.19
WP_193453605	TLAAGGGAV	2	715.8	5.19
WP_100458026	TLAAGGGAV	2	715.8	5.19
NEC11588	TLAAGGGAV	2	715.8	5.19
WP_203604912	TLAAGGGAV	2	715.8	5.19
WP_207206225	TLAAGGGAV	2	715.8	5.19
WP_115068786	TLAAGGGAV	2	715.8	5.19
WP_202547660	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57
WP_202536544	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57
WP_202550664	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57
WP_202475110	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57
WP_047141266	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57
WP_203626923	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57
WP_206321406	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57
WP_030698899	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57
WP_164181231	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57
WP_175457484	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57
WP_033950794	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57
WP_215221533	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57
QPA00690	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57
WP_023418717	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57
WP_128462326	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57

WP_047471014	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_087774397	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_095712112	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_129828646	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_093844874	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_030309668	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_129819500	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_129811293	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_129814629	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_003948921	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_129290490	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_033240238	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_049978775	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_129804661	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_129810539	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_129817354	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_159312458	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_031178726	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_129839453	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_175508517	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_129862910	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_146581662	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_008405009	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_201399153	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
WP_037844738	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	
6KSU_A	ALAAGGGAV	2	685.78	5.57	SurE
WP_078095273	LWAAAGGTV	3	844.97	5.52	
WP_084902062	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52	
WP_128430376	LWAASAGTV	3	874.99	5.52	
WP_066929463	LWAASGGTV	3	860.97	5.52	
WP_215146602	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52	
WP_030765796	LWTAGGGTV	3	860.97	5.52	

WP_214977681	LWTAGGGTV	3	860.97	5.52
GHF24644	LWAASGGTV	3	860.97	5.52
WP_184944585	LWAASGGTV	3	860.97	5.52
WP_031069049	LWAASGGTA	3	832.91	5.52
WP_153812920	VWAASGGTA	3	818.88	5.49
RAJ65872	VWAASGGTA	3	818.88	5.49
WP_159705792	VWAASGGTA	3	818.88	5.49
WP_111580874	VWAASGGTA	3	818.88	5.49
WP_031183424	VWAASGGTA	3	818.88	5.49
WP_102908528	VWAASGGTA	3	818.88	5.49
NNJ08210	LWAAGGGTA	3	802.89	5.52
WP_052868032	LWAASGGTV	3	860.97	5.52
WP_138052280	LWAASGGTV	3	860.97	5.52
WP_176396005	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_186782422	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_121841935	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_200706609	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_033239015	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_129844809	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_026235217	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_129817651	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_085478904	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_103487666	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_129813637	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_159313271	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_117348902	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_129816142	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_018894784	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_093558772	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_049977186	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_061404072	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_015506966	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52

WP_127453804	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_129861986	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_164299050	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_037842774	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_129289501	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_146580586	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_031177581	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_030307166	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
WP_075986130	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
ALM37933	LWAAGGGTV	3	830.94	5.52
OAP24341	LLDAGAGTA	4	787.87	3.8
SFP59909	LLDAGAGTA	4	787.87	3.8
EFL07475	LLDAGAGTA	4	787.87	3.8
WP_167754242	LLDAGAGTA	4	787.87	3.8
WP_182891604	LLDAGAGTA	4	787.87	3.8
WP_205669846	LLDAGAGTA	4	787.87	3.8
WP_209666765	LLEAGAGTA	4	814.89	4
WP_208720015	LLDAGAGTA	4	787.87	3.8
WP_086675822	LLDAGAGTA	4	787.87	3.8
WP_084743111	LLDAGAGTA	4	787.87	3.8
WP_155544060	LLDAGAGTA	4	787.87	3.8
WP_051735724	LLEAGAGTA	4	801.89	4
WP_125314244	LLEAGAGTA	4	801.89	4
WP_086859917	LLDAGAGTA	4	787.87	3.8
WP_125736247	LLEAGAGTA	4	801.89	4
RSN15258	LLEAGAGTA	4	801.89	4
WP_143267750	LLEAGAGTA	4	801.89	4
WP_093934130	LLEAGAGTA	4	801.89	4
WP_081975860	LLEAGAGTA	4	801.89	4
WP_125693091	LLEAGAGTA	4	801.89	4
WP_051552944	LLEAGAGTA	4	801.89	4
OXM48869	LLEAGAGTA	4	801.89	4

WP_091596577	LLEAGAGTA	4	801.89	4
KFU81853	LLEAGAGTA	4	801.89	4
WP_076167640	LLEAGAGTA	4	801.89	4
SEB32436	LLEAGAGTA	4	801.89	4
WP_184906454	LLEAGAGTA	4	801.89	4
MBB5857513	LLEAGAGTA	4	801.89	4
WP_101613130	LLEAGAGTA	4	801.89	4
AUI58293	LLEAGAGTA	4	801.89	4
WP_204840550	LDAAGAGTA	5	745.79	3.8
WP_184668372	LDAAGAGTA	5	745.79	3.8
WP_063641807	LDAAGAGTA	5	745.79	3.8
WP_209619785	LDAAGAGNG	5	744.76	3.8
WP_189227133	LDAAGAGNG	5	744.76	3.8
WP_184687918	LDAAGAGTA	5	745.79	3.8
WP_121007528	LDAAGAGTA	5	745.79	3.8
WP_121219093	LDAAGAGTA	5	745.79	3.8
WP_063741392	LDAAGAGTA	5	745.79	3.8
WP_106615477	LEAAGAGTA	5	759.81	4
WP_073893781	LEAAGAGNA	5	772.81	4
WP_141983016	LEAAGAGTA	5	759.81	4
WP_051773061	LDAAGAGTA	5	745.79	3.8
WP_201440123	LDAAGAGTA	5	745.79	3.8
WP_123742148	LDAAGAGTA	5	745.79	3.8
WP_184921576	LDAAGAGTA	5	745.79	3.8
WP_053721194	IDAAGAGTA	5	745.79	3.8
WP_158839341	LDAAGAGTA	5	745.79	3.8
WP_077009082	LDAAGAGTA	5	745.79	3.8
QEO73950	LDAAGAGTA	5	745.79	3.8
WP_087773914	LEAAGAGTS	6	775.81	4
QDD59568	LEAAGAGTS	6	775.81	4
WP_047139363	LEAAGAGTS	6	775.81	4
WP_051727099	LEAAGAGTS	6	775.81	4

MBL0778592	LEAAGAGTS	6	775.81	4
WP_095730692	LEAAGAGTS	6	775.81	4
WP_023418525	LEAAGAGTS	6	775.81	4
WP_052192884	LEAAGAGTS	6	775.81	4
NEE55271	LEAAGAGTS	6	775.81	4
WP_124272325	LEAAGAGTS	6	775.81	4
WP_023422390	LEAAGAGTS	6	775.81	4
WP_077972802	LEAAGAGTA	6	759.81	4
WP_196191396	LEAAGAGTS	6	775.81	4
WP_100455273	LEAAGAGTS	6	775.81	4
QHF94981	LESAGAGTS	6	791.81	4
WP_159401481	LESAGAGTS	6	791.81	4
WP_158933453	LESAGAGTS	6	791.81	4
WP_158102265	LESAGAGTS	6	791.81	4
WP_050502569	LEAAGAGTA	6	759.81	4
GFE11018	LEAAGAGTA	6	759.81	4
SIO91352	ILAAGGGTL	7	771.91	5.52
WP_087104001	ILAAGGGTL	7	771.91	5.52
WP_067608174	ILAAGGGTL	7	771.91	5.52
WP_047868003	ILAAGGGTL	7	771.91	5.52
WP_212642483	ILAAGGGTL	7	771.91	5.52
PDP87896	ILAAGGGTL	7	771.91	5.52
WP_210745484	ILAAGGGTL	7	771.91	5.52
WP_013155304	ILAAGGGTL	7	771.91	5.52
WP_071622893	ILAAGGGTL	7	771.91	5.52
WP_019607754	ILAAGGGTL	7	771.91	5.52
WP_174548035	ILAAGGGTL	7	771.91	5.52
WP_130395436	ILAAGGGTL	7	771.91	5.52
WP_150253989	ILAAGGGTL	7	771.91	5.52
WP_210751078	ILAAGGGTL	7	771.91	5.52
NKY96311	ILAAGGGTL	7	771.91	5.52
WP_158813034	VAEAAAAAG	8	729.79	4

WP_158940779	VAEAAAAAG	8	729.79	4
WP_157850235	VAEAAAAAG	8	729.79	4
WP_158706382	VAEAAAAAG	8	729.79	4
WP_129820893	VAEAAAAAG	8	729.79	4
WP_158716964	VAEAAAAAG	8	729.79	4
WP_159393380	VAEAAAAAG	8	729.79	4
WP_159004948	VAEAAAAAG	8	729.79	4
WP_125521788	VAEAAAAAG	8	729.79	4
WP_125531556	VAEAAAAAG	8	729.79	4
WP_158710809	VAEAAAASG	8	745.79	4
WP_167538542	VVEAAAAAG	8	757.84	4
KAA6213465	VVEAAAAAG	8	757.84	4
WP_143264404	LEAAGAGTA	9	759.81	4
WP_206795718	LEAAGAGTA	9	759.81	4
WP_091309251	LEAAGAGTA	9	759.81	4
WP_020645391	LEAAGAGTA	9	759.81	4
WP_051767832	LEAAGAGTA	9	759.81	4
WP_103352221	LEAAGAGTA	9	759.81	4
WP_093952004	LEAAGAGTA	9	759.81	4
WP_013224967	LEAAGAGTA	9	759.81	4
WP_191314712	LEAAGAGTA	9	759.81	4
WP_176176527	LEAAGAGTA	9	759.81	4
WP_103337857	LEAAGAGTA	9	759.81	4
MBE8520860	LEAAGAGTA	9	759.81	4
WP_206507333	LEMNGSGTG	10	864.93	4
WP_018539965	LELNCGGTG	10	816.87	4
WP_125044559	LEMNGSGTG	10	864.93	4
WP_125053638	LEMNGSGTG	10	864.93	4
WP_100601994	LELNCGGTG	10	816.87	4
WP_033270602	LEMNGAGTG	10	848.93	4
WP_158541815	LEMNGAGTG	10	848.93	4
WP_069574363	LEMNGAGTG	10	848.93	4

PIF96557	LEMNGAGTG	10	848.93	4	
WP_190122588	LEMNGAGTG	10	848.93	4	
WP_128509649	LEMNGAGTG	10	848.93	4	
AAU34204	LEMNGAGTG	10	848.93	4	MppK
WP_090096878	LEAAGGGTA	11	745.79	4	
WP_106618041	LEAAGAGMA	11	789.9	4	
WP_063798687	LEAAGGGTA	11	745.79	4	
WP_177221557	LEAAGGGTA	11	745.79	4	
WP_065918818	LEAAGGGTA	11	745.79	4	
WP_189155113	LEAAGGGTA	11	745.79	4	
WP_202971193	LEAAGGGTA	11	745.79	4	
WP_170191981	LEAAGAGTA	11	759.81	4	
QFZ21409	LEAAGAGTA	11	759.81	4	
WP_214928265	LLVAGAGNT	12	814.94	5.52	
WP_124721056	LLVAGAGNT	12	814.94	5.52	
WP_187767545	LLVAGAGNT	12	814.94	5.52	
WP_051847195	LLVAGAGNT	12	814.94	5.52	
WP_051857136	LLVAGAGNT	12	814.94	5.52	
WP_158102277	LLVAGAGNT	12	814.94	5.52	
QQY97180	LLVAGAGNT	12	814.94	5.52	PenA
QHF93414	LLVAGAGNT	12	814.94	5.52	
GEB53797	LLVAGAGNT	12	814.94	5.52	
WP_042194617	IEAAGAGTG	13	745.79	4	
SMD26147	IEAAGAGTG	13	745.79	4	
WP_084434061	IEAAGAGTG	13	745.79	4	
RSM80437	IEAAGAGTG	13	745.79	4	
WP_083752742	IEAAGAGTG	13	745.79	4	
WP_054296557	IEAAGAGTG	13	745.79	4	
WP_209647935	IEAAGAGTG	13	745.79	4	
MBP2319887	IEAAGAGTG	13	745.79	4	
PZS38365	LEAAGAGNA	14	772.81	4	
PZS21586	LEAAGAGNA	14	772.81	4	

PZS22342	LEAAGAGNA	14	772.81	4	
WP_189129478	LEATGAGNA	14	802.84	4	
OLB76504	LEAAGAGNA	14	772.81	4	
WP_167929085	LYAAGAGNI	14	848.95	5.52	
WP_203981639	QEAAGAGNA	14	787.78	4	
NJC68035	QEAAGAGNA	14	787.78	4	
WP_017585753	IMAAGGGTL	15	789.95	5.52	
WP_184637101	VLAAGGGTL	15	757.89	5.49	
WP_077692691	VLTAGGGTL	15	787.91	5.49	
OOC56252	VLTAGGGTL	15	787.91	5.49	
WP_026127205	VLTAGGGTL	15	787.91	5.49	
WP_152442634	VLTAGGGTL	15	787.91	5.49	
WP_193518669	VLTAGGGTL	15	787.91	5.49	
GHD36674	VLTAGGGTL	15	787.91	5.49	
ATU31793	_SLAGGGTL	16	674.75	5.24	Ulm16
PNE39726	_SLAGGGTL	16	674.75	5.24	
WP_107080307	_SLAGGGTL	16	674.75	5.24	
SHN26647	_SLAGGGTL	16	674.75	5.24	
WP_205366966	_SLAGGGTL	16	674.75	5.24	
WP_146051240	_SLAGGGTL	16	674.75	5.24	
WP_189864002	_SLAGGGTL	16	674.75	5.24	
ANZ15841	_SLAGGGTL	16	674.75	5.24	Nsm16
WP_145934032	LLAVGGGTA	17	757.89	5.52	
MBB2940064	LLAVGGGTA	17	757.89	5.52	
SFJ14700	LLAVGGGTA	17	757.89	5.52	
WP_125797423	LLAVGGGTA	17	757.89	5.52	
WP_143104993	LLAVGGGTA	17	757.89	5.52	
KZB86600	LLAVGGGTA	17	757.89	5.52	
WP_052674854	LLAVGGGTA	17	757.89	5.52	
ANN21834	LLAVGGGTA	17	757.89	5.52	
WP_117349431	GEAAGDGTG	18	733.69	3.67	
WP_129848618	GEAAGDGTG	18	733.69	3.67	

WP_101278653	GEAAGDGTG	18	733.69	3.67
WP_201399105	GEAAGDGTG	18	733.69	3.67
WP_129814227	GEAAGDGTG	18	733.69	3.67
WP_079165356	GEAAGDGTG	18	733.69	3.67
WP_049978124	GEAAGDGTG	18	733.69	3.67
WP_091369429	LEAAGAGTG	19	745.79	4
WP_204455606	LEAAGAGTG	19	745.79	4
WP_092782688	LEAAGAGTG	19	745.79	4
WP_121390334	LEAAGAGTG	19	745.79	4
WP_026423719	IEAAGAGTG	19	745.79	4
WP_104481147	LQSAGAGTG	19	760.8	5.52
WP_018682966	IQAAGAGTG	19	744.8	5.52
WP_051731696	VEDAAGGTG	20	775.77	3.67
WP_185094652	VEDAAGGTG	20	775.77	3.67
WP_190159084	VEDAAGGTG	20	775.77	3.67
WP_177181620	VEDAAGGTG	20	775.77	3.67
WP_030687178	VEDAAGGTG	20	775.77	3.67
WP_188307762	VEDAAGGTG	20	775.77	3.67
MBD0693808	VEDAAGGTG	20	775.77	3.67
WP_185993069	VSMAGGGAL	21	761.89	5.49
TRV71681	VSMAGGGAL	21	761.89	5.49
KUM69046	VSMAGGGAL	21	761.89	5.49
WP_215162624	VSMAGGGAL	21	761.89	5.49
WP_063801640	VSMAGGGAL	21	761.89	5.49
WP_037888807	VSMAGGGAL	21	761.89	5.49
ELS53338	VSMAGGGAL	21	761.89	5.49
WP_114397097	VLAAGGGTL	22	757.89	5.49
WP_182313477	VLVAGGGTL	22	785.94	5.49
WP_031128381	CLAAGGGTL	22	761.89	5.52
WP_023586033	CLAAGGGTL	22	761.89	5.52
NKY12726	CLAAGGGTL	22	761.89	5.52
WP_079314323	VEEVAGGTG	23	817.85	3.79

WP_204046946	VEEVAGGTG	23	817.85	3.79	
WP_193209069	VEEVAGGTG	23	817.85	3.79	
WP_138697565	VEEVAGGTG	23	817.85	3.79	
WP_043619516	VEEVAGGTG	23	817.85	3.79	
WP_197022479	LWGAGGGTL	24	830.94	5.52	
WP_167305412	LWGAGGGTL	24	830.94	5.52	
WP_176218334	LWGAGGGTL	24	830.94	5.52	
TLW90599	LWGAGGGTL	24	830.94	5.52	
OQO89828	LWGAGGGTL	24	830.94	5.52	
WP_116179684	LEAAGAGTA	25	759.81	4	
REH36224	LEAAGAGTA	25	759.81	4	
WP_211769225	LEAAGAGTA	25	759.81	4	
WP_184870016	LEAAGAGTA	25	759.81	4	
EWM19537	LEAAGAGTA	25	759.81	4	
WP_202963989	LEAAGAGNA	26	772.81	4	
WP_212986928	LEAAGAGNA	26	772.81	4	
WP_203723873	LEAAGAGNA	26	772.81	4	
WP_043531424	LEAAGAGNA	26	772.81	4	
WP_046385743	VMAAAAAMA	27	806.01	5.49	
WP_150475953	VMAAAAAMA	27	806.01	5.49	
WP_055557517	VLAAAAAMG	27	773.95	5.49	
QUJ09165	VLAAAAAMG	27	773.95	5.49	Lon18
WP_156757155	LEAAGAGTG	28	745.79	4	
PWW67054	LEAAGAGTG	28	745.79	4	
WP_084175291	LEAAGAGTG	28	745.79	4	
EWC63813	LEAAGAGTG	28	745.79	4	
WP_208802339	IEAAGAGNA	29	772.81	4	
WP_182886987	IEAAGAGNA	29	772.81	4	
WP_182880434	IEAAGAGNA	29	772.81	4	
WP_146353444	LDAAGSGTG	30	747.76	3.8	
WP_112264137	LDAAGAGTG	30	731.76	3.8	
WP_030475095	LDAAGAGTG	30	731.76	3.8	

WP_177215812	VEEVAAGTG	31	831.88	3.79	
WP_170224483	VEEVAAGTG	31	831.88	3.79	
RLK57990	VEEVAAGTG	31	831.88	3.79	
QEO73614	EEAAGGGTG	32	747.72	3.8	
QEO73590	ADAAGGGTA	32	689.68	3.8	
QEO73557	ADAAGGGTA	32	689.68	3.8	
WP_042222279	LEAAGAGTS	33	775.81	4	
MBA8930783	LEAAGAGTS	33	775.81	4	
AHH97299	LEAAGAGTS	33	775.81	4	
WP_193563985	AFTAGGGTL	34	793.87	5.57	
AJW76712	AFTAGGGTL	34	793.87	5.57	DsaJ
WP_242583930	TSASGGGTL	34	749.78	5.19	WolJ
WP_167971749	LEATGAGMG	35	805.9	4	
WP_146349125	LEATGAGTA	35	789.84	4	
WP_146349226	MEACGAGNA	36	822.91	4	
WP_112267760	MEACGAGNS	36	838.91	4	
WP_185003023	LEAAGAGNA	37	772.81	4	
WP_086780652	LEAAGAGNA	37	772.81	4	
WP_133900805	LEAAGAGNG	38	758.79	4	
WP_075126824	LEAVGAGNG	38	786.84	4	
WP_063348713	LEAAGAGTG	39	745.79	4	
ARF75452	LQAAGAGTG	39	744.8	5.52	
WP_086820610	LDAAGAGTG	40	731.76	3.8	
WP_052407525	LDAAGAGTA	40	745.79	3.8	
WP_185445851	LEEAGGGNA	41	816.82	3.79	
QNE17015	LEEAGGGNA	41	816.82	3.79	
WP_188316821	MLAAGAGTA	42	761.89	5.28	
KAA2257274	MLAAGAGTA	42	761.89	5.28	
WP_212823168	LETAGGGNA	43	788.81	4	
GHJ43207	LETAGGGNA	43	788.81	4	
WP_026066508	LASAGGGTV	44	731.8	5.52	
AUS79785	LASAGGGTV	44	731.8	5.52	

WP_051713456	VSAEGGGAA	45	717.73	4
AUS77178	VSAEGGGAA	45	717.73	4
WP_215545183	LEETGAGNA	singleton	860.88	3.79
WP_209666634	LWEAGGGTL	singleton	903	4
WP_206807387	VVVAGAGNT	singleton	786.88	5.49
WP_199443203	LLAAGGGTA	singleton	729.83	5.52
WP_199442870	LEATGAGTG	singleton	775.81	4
WP_196231464	LEETGSGTG	singleton	849.85	3.79
WP_189648461	EEADGAGTG	singleton	805.75	3.57
WP_189214163	LEAAGAGTG	singleton	745.79	4
WP_173130728	LEAAGAGMA	singleton	789.9	4
WP_173068873	LESTGAGNG	singleton	804.81	4
WP_172803813	LEEAGAGTG	singleton	803.82	3.79
WP_159401462	VLAAAAAMG	singleton	773.95	5.49
WP_158892651	LLAAGAGMA	singleton	773.95	5.52
WP_158885994	LWAAGGGTL	singleton	844.97	5.52
WP_156038604	YGAYGGGMD	singleton	889.93	3.8
WP_141926201	VMVAGGGTL	singleton	803.97	5.49
WP_132123186	MEAAGGGNT	singleton	806.85	4
WP_091671709	LWLAGGGNL	singleton	900.04	5.52
WP_088969906	LWAAGGGTL	singleton	844.97	5.52
WP_084424924	LWEAGGGTL	singleton	903	4
WP_077006613	LEEAGGGTA	singleton	803.82	3.79
WP_076991617	LEAIGAGSG	singleton	773.84	4
WP_068377429	LEEAGGGNS	singleton	832.82	3.79
SDM57720	LWAAGGGTL	singleton	844.97	5.52
QEO74907	GESAGGGTG	singleton	691.65	4
QEO73981	LEAAGAGTA	singleton	759.81	4
OZM73276	LWEAGGGTL	singleton	903	4
MBB4918972	LEANGAGTG	singleton	788.81	4
CAA9282805	LDVAGGGNG	singleton	758.79	3.8
AUS79763	LAAAGSGTA	singleton	717.78	5.52

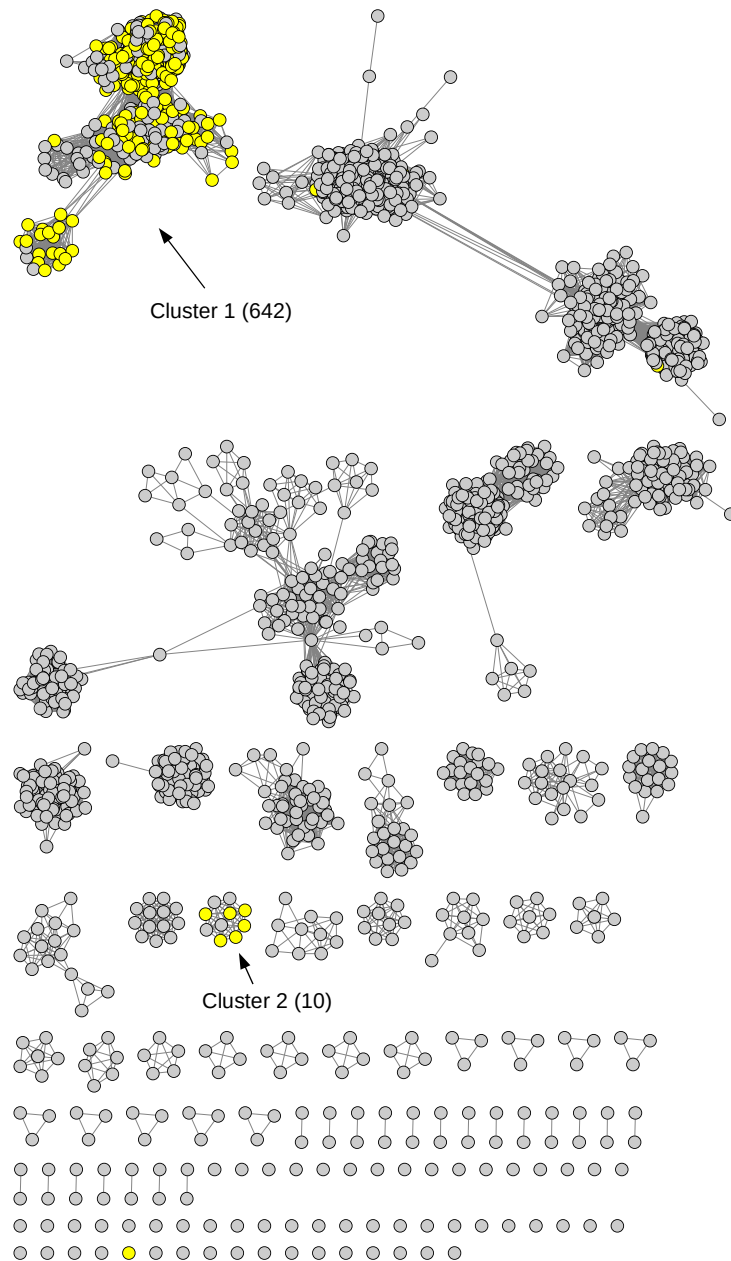


Figure S1. Exploration of PBP-type TEs in public database. The network was generated by all-vs-all blastp with E -value set at 1×10^{-90} . Those with E_{ter} domain encoded within the ± 80 kb genome neighborhoods are colored in yellow. Cluster 1 and 2 highlighted by arrows contain 642 and 10 nodes, respectively. After the removal of highly similar sequences, in total, nonredundant 632 proteins in cluster 1 and 2 were selected as candidates of PBP-type TEs.

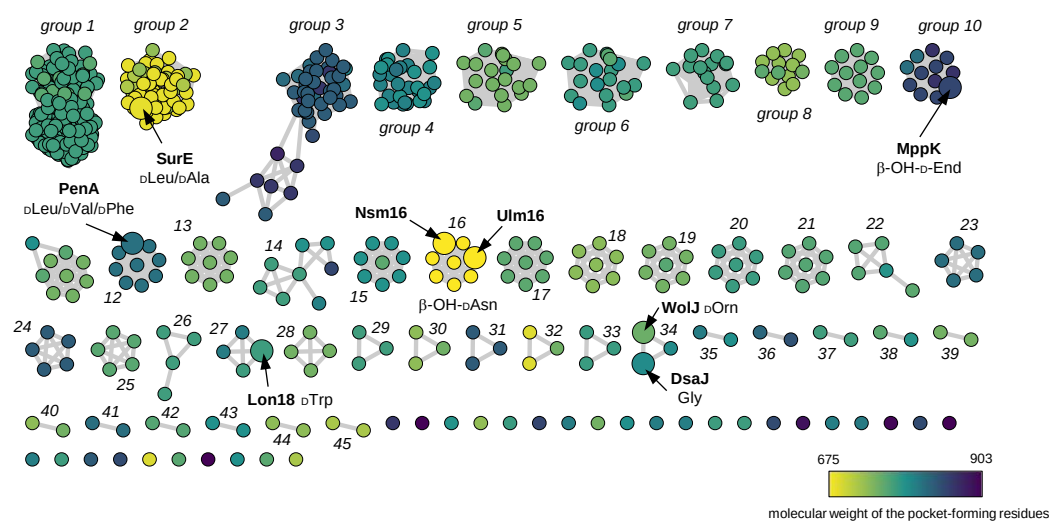
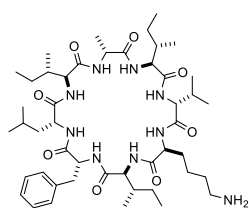
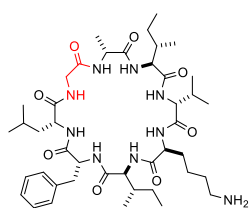


Figure S2. SSN analysis of PBP-type TEs. Network was generated by all-vs-all blastp with *E*-value set at 1×10^{-175} . Networks are identical to **Figure 4-30**, except for the color scheme. Groups with more than one node are indicated by numbering. Nodes were colored according to the molecular weights of pocket-forming residues (**Table S6**). Molecular weights were calculated by Expasy webtool Compute pI/Mw (https://web.expasy.org/compute_pi/)¹⁰².

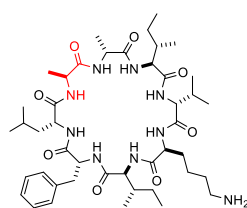
a)



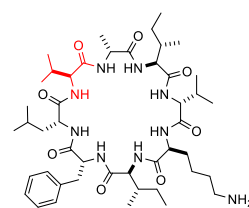
surugamide B
2



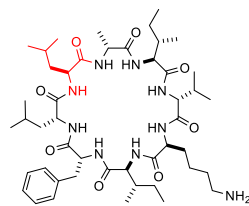
surugamide B (11G)
cyc-36



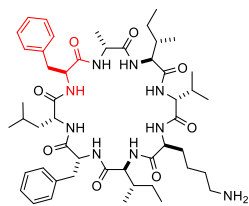
surugamide B (11A)
cyc-37



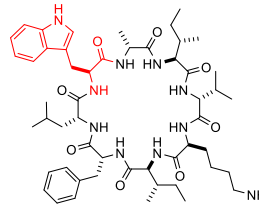
surugamide B (11V)
cyc-38



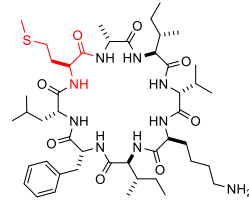
surugamide B (11L)
cyc-39



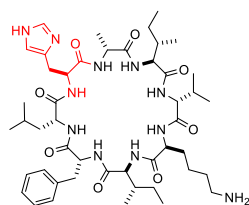
surugamide B (11F)
cyc-40



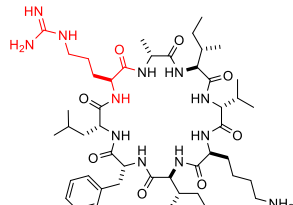
surugamide B (11W)
cyc-41



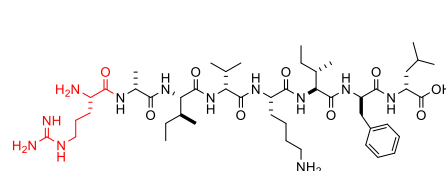
surugamide B (11M)
cyc-42



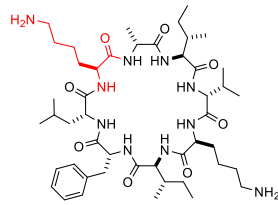
surugamide B (11H)
cyc-43



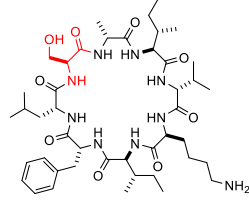
surugamide B (11R)
cyc-44



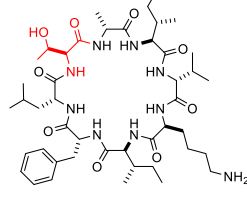
surugamide B (11R)-COOH
hyd-44



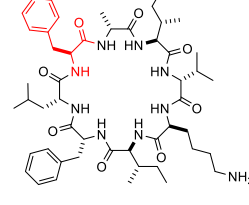
surugamide B (11K)
cyc-45



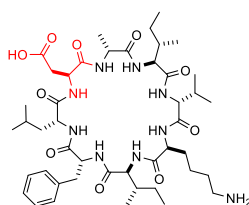
surugamide B (11S)
cyc-46



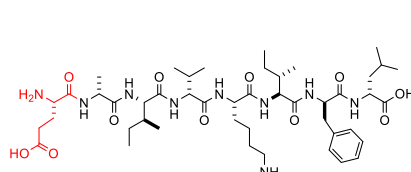
surugamide B (11T)
cyc-47



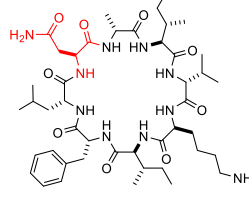
surugamide B (11Y)
cyc-48



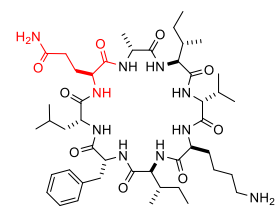
surugamide B (11D)
cyc-49



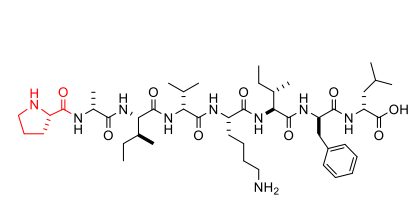
surugamide B (11E)-COOH
hyd-50



surugamide B (11N)
cyc-51



surugamide B (11Q)
cyc-52



surugamide B (11P)-COOH
hyd-53

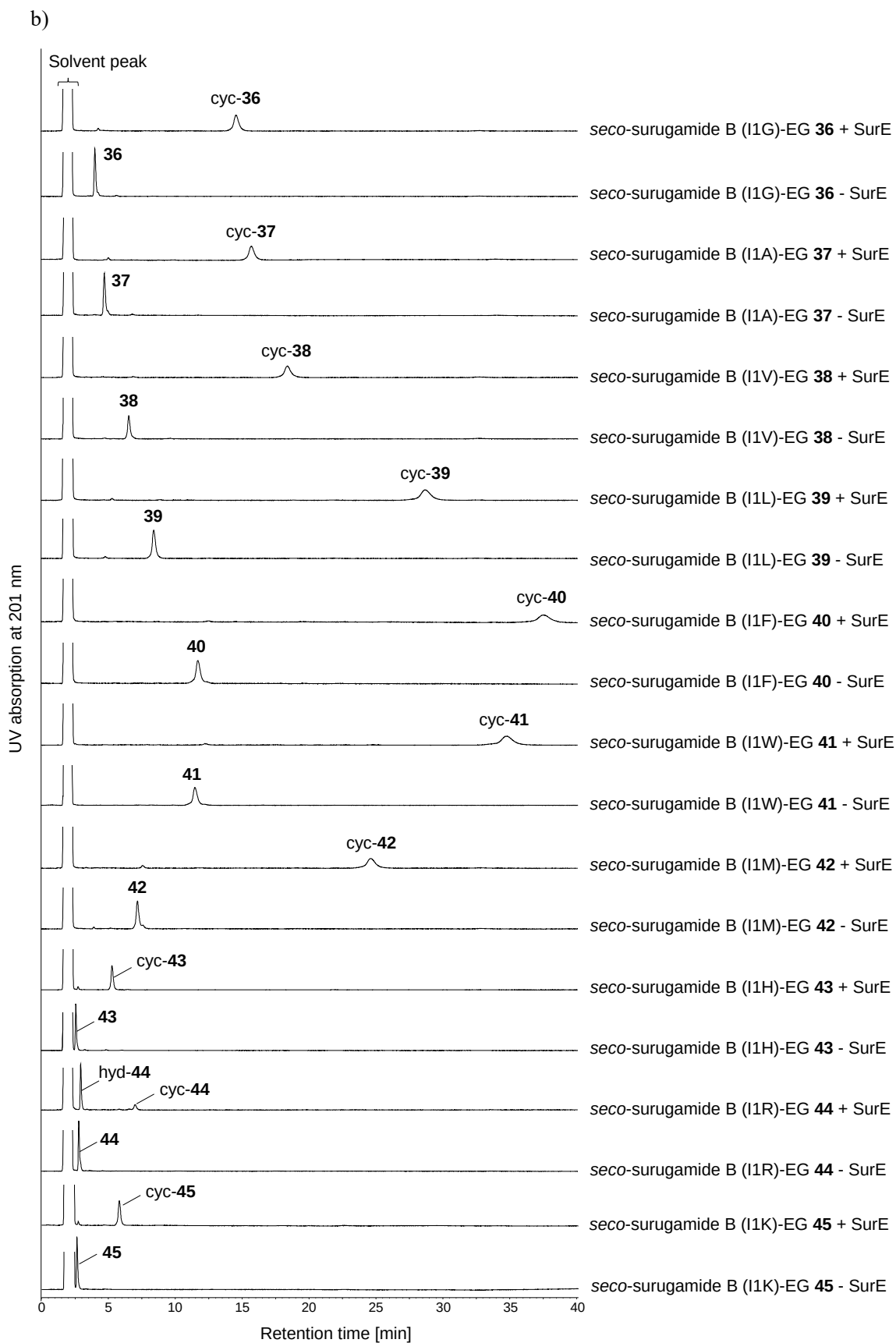


Figure continues the next page.

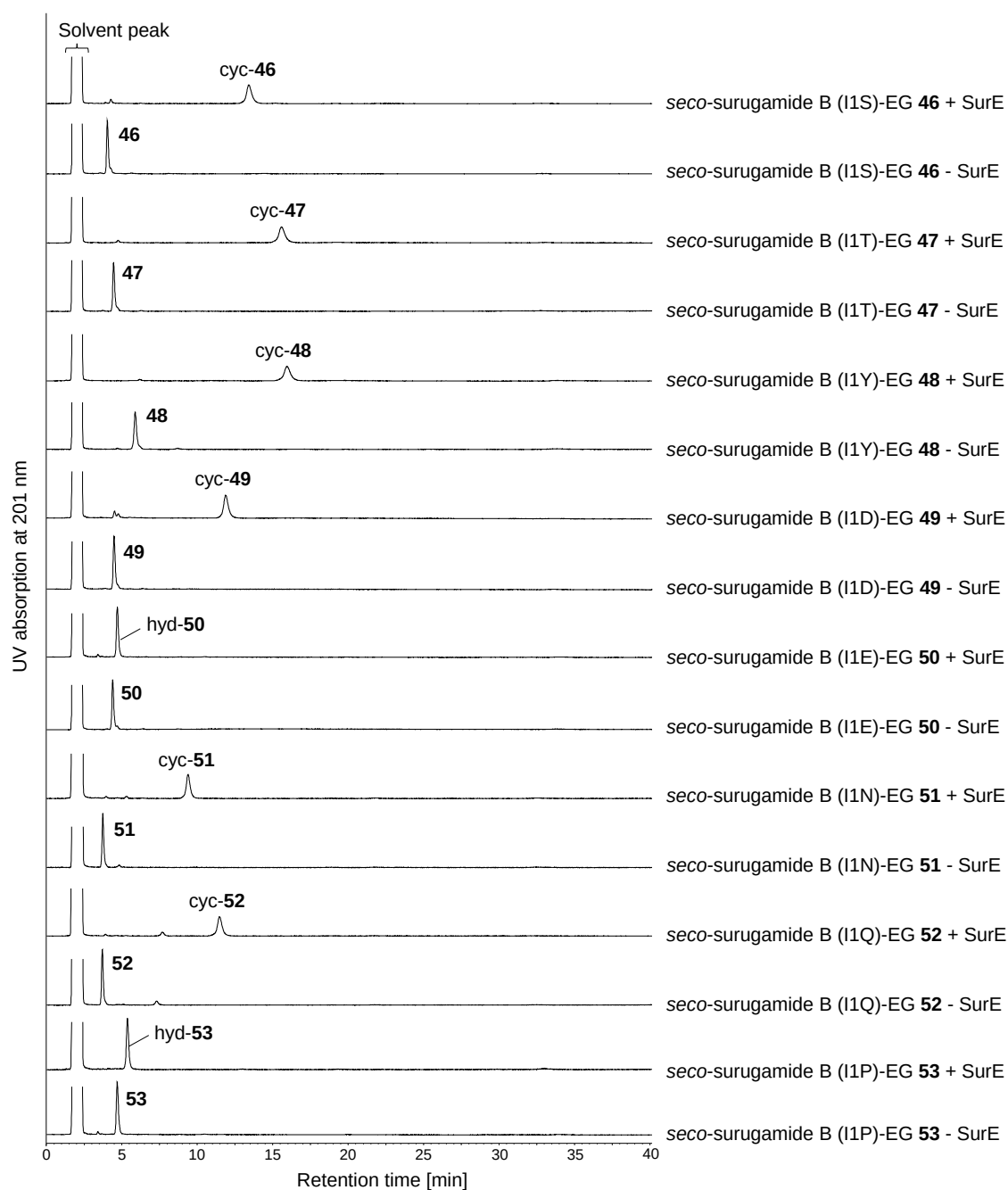


Figure S4. *In vitro* reaction of SurE using I1X variants **36-53**. “cyc” and “hyd” are nomenclatures for head-to-tail cyclic compounds and hydrolyzed linear compounds, respectively. a) Enzymatic products of SurE reactions using I1X variants **36-53**, whose structures were validated based on MS/MS analysis (pp. 237-255, **Figure S12-S47**). Residues differ from surugamide B are colored in red. b) SurE-mediated cyclization of I1X variants. The solvent peaks are partially omitted for simplicity.

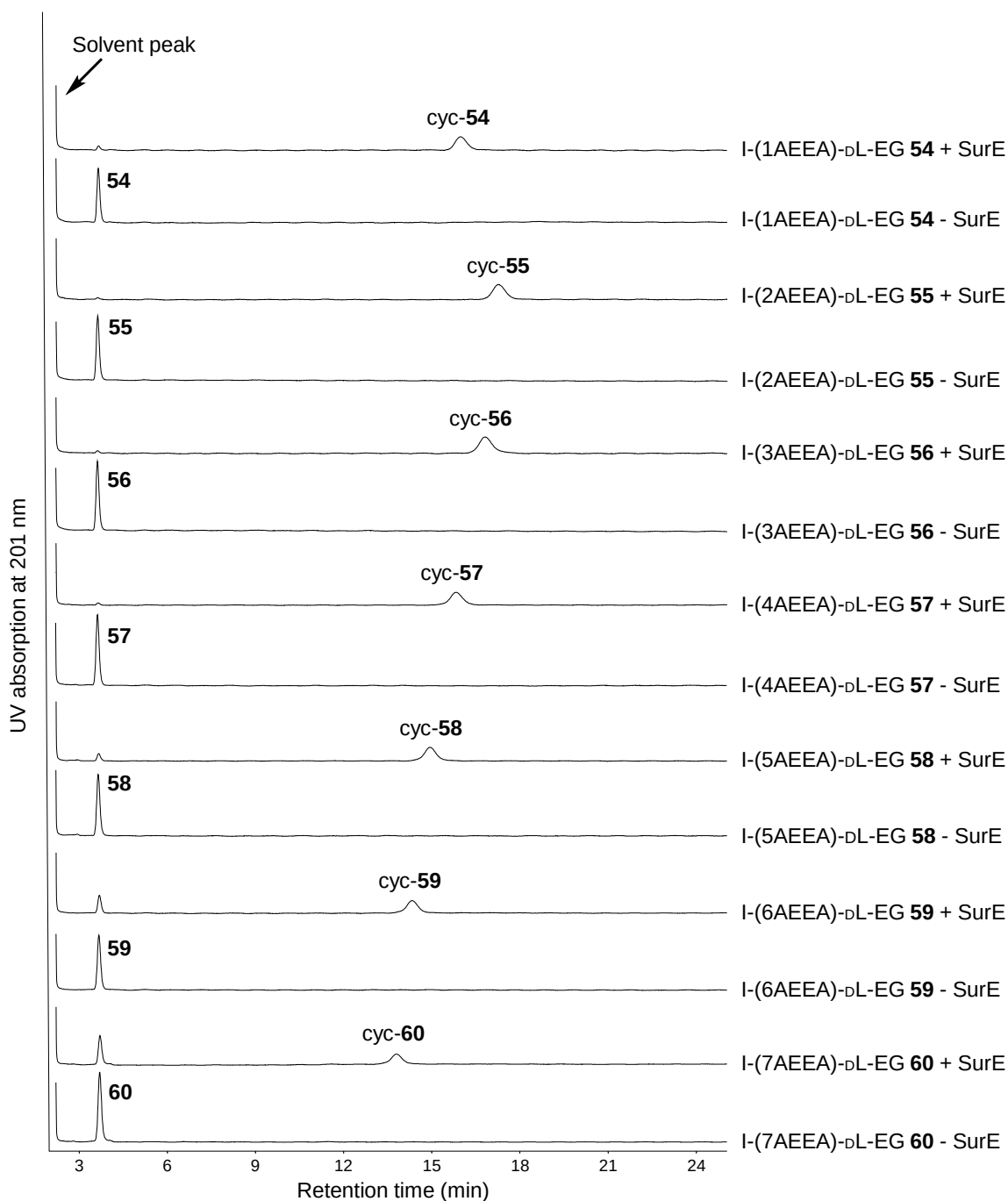
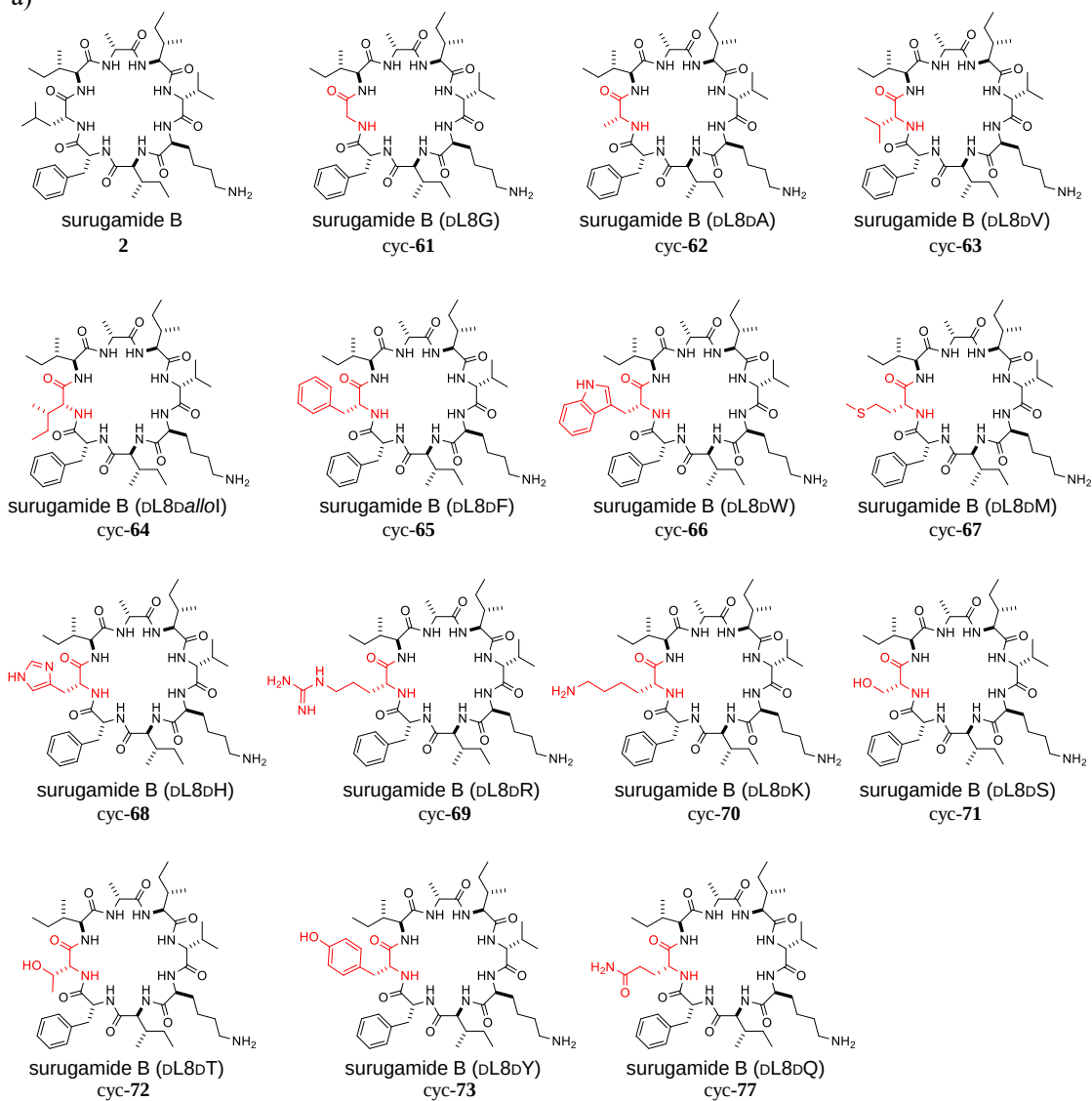


Figure S5. *In vitro* reaction of SurE using I-(AEEAs)-DL-EG (**54-60**). “cyc” is nomenclature for the head-to-tail cyclic compound. The solvent peaks are partially omitted for simplicity. Enzymatic products of SurE reactions using EG-substrates **54-60** were validated based on MS/MS analysis (pp. 256-260, **Figure S48-S54**).

a)



b)

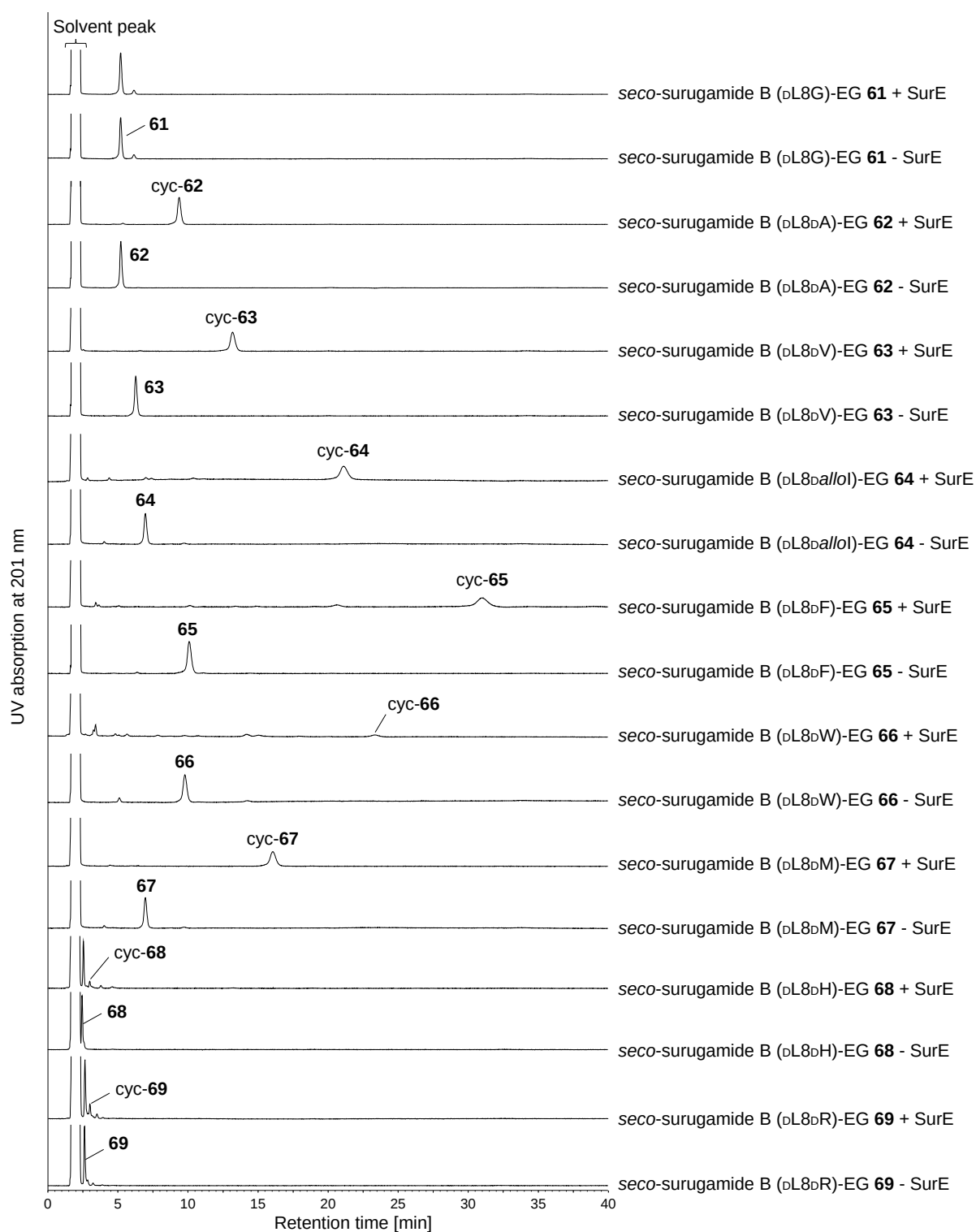


Figure continues the next page.

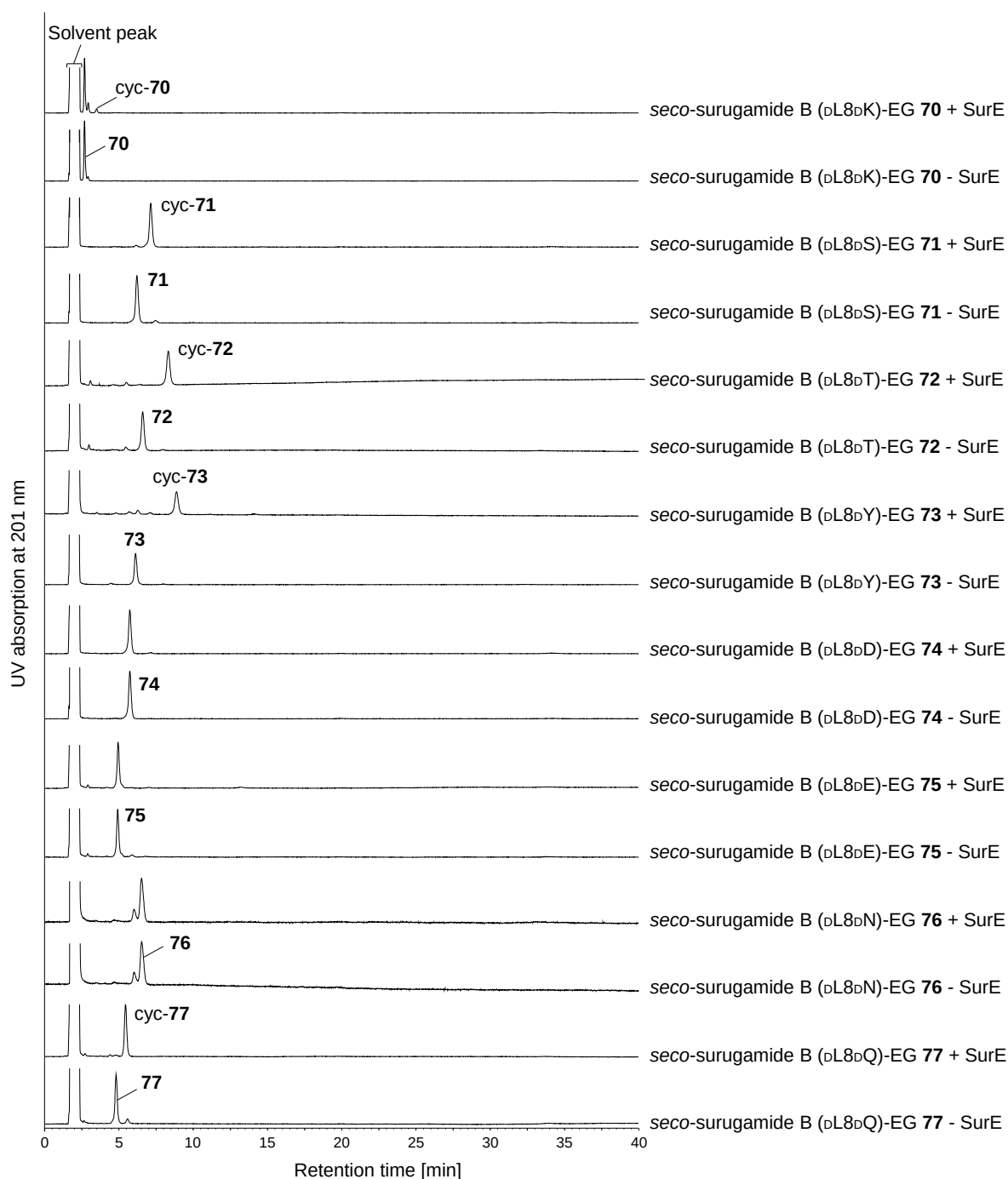


Figure S6. *In vitro* reaction of SurE using DL8DX variants **61-77**. “cyc” and “hyd” are nomenclatures for head-to-tail cyclic compounds and hydrolyzed linear compounds, respectively. a) Enzymatic products of SurE reactions using DL8DX variants **61-77**, whose structures were validated based on MS/MS analysis (pp. 262-276, **Figure S57-S84**). Residues differ from surugamide B are colored in red. b) SurE-mediated cyclization of DL8DX variants. The solvent peaks are partially omitted for simplicity.

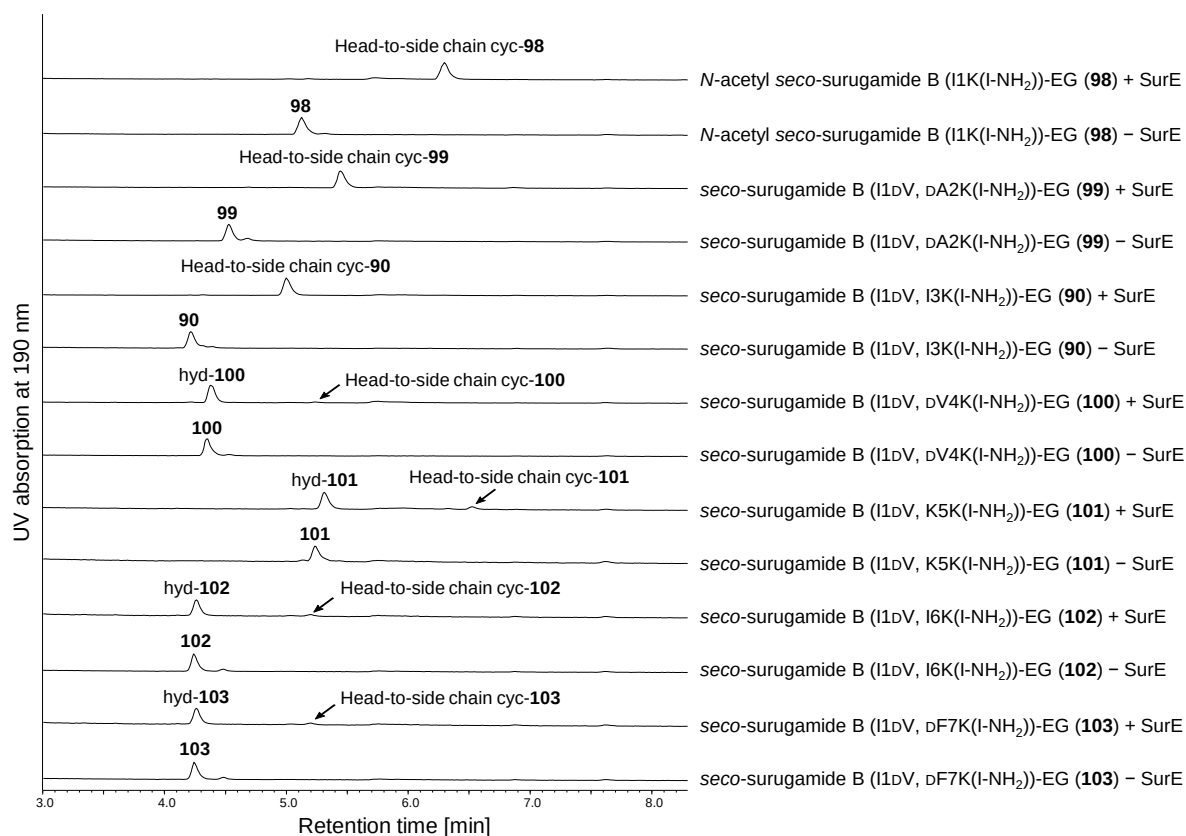


Figure S7. *In vitro* reaction of SurE using branched EG-substrates **98-103**. “Head-to-side chain cyc” and “hyd” are nomenclatures for head-to-side chain cyclic compounds and hydrolyzed linear compounds, respectively. Enzymatic products of SurE reactions using branched EG-substrates **98-103** were validated based on MS/MS analysis (pp. 284-298, **Figure S94-S108**). The solvent peaks are omitted for simplicity.

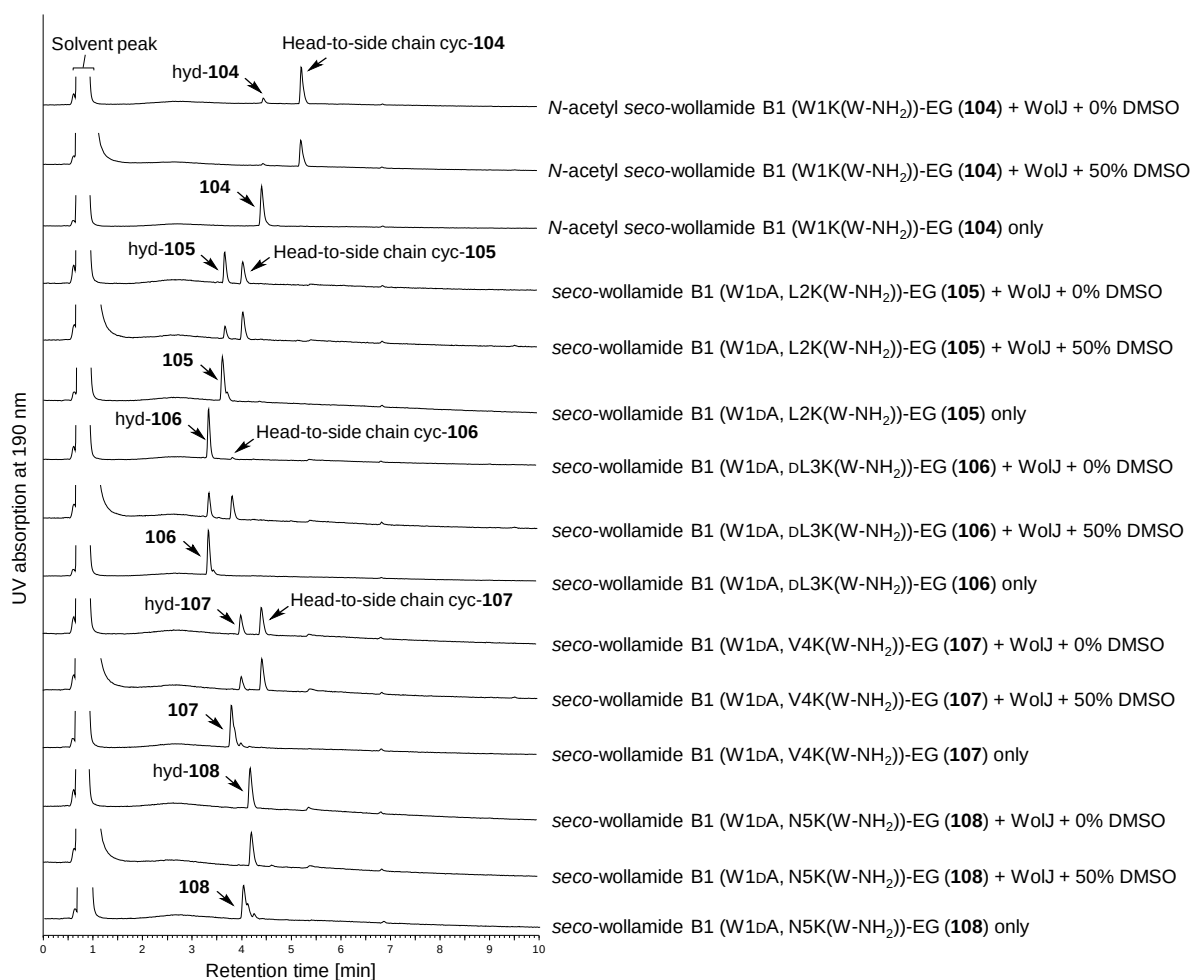


Figure S8. *In vitro* reaction of WolJ using branched EG-substrates **104-108**. “Head-to-side chain cyc” and “hyd” are nomenclatures for head-to-side chain cyclic compounds and hydrolyzed linear compounds, respectively. Enzymatic products of WolJ reactions using branched EG-substrates **104-108** were validated based on MS/MS analysis (pp. 300-312, **Figure S110-S122**). The solvent peaks are partially omitted for simplicity.

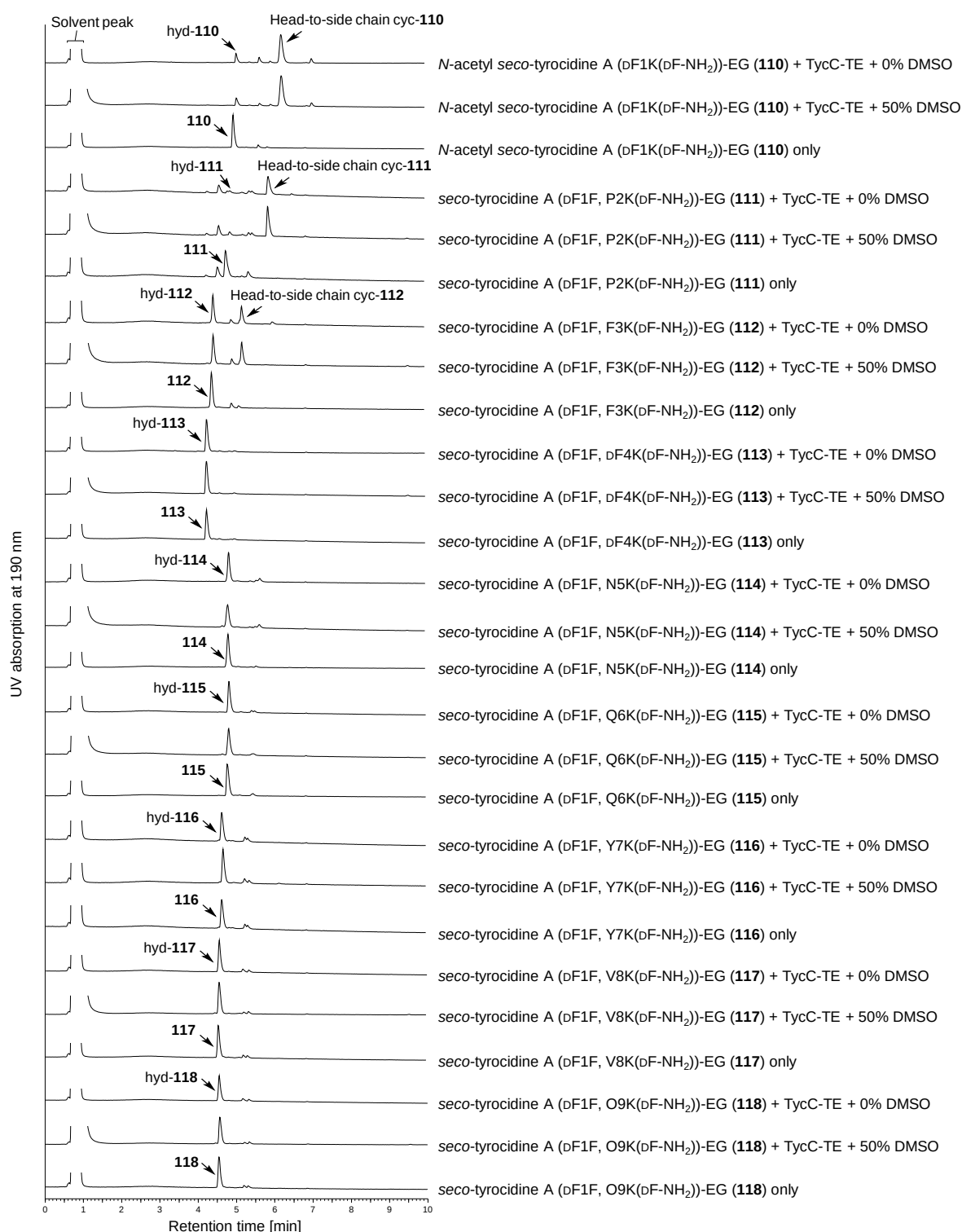


Figure S9. *In vitro* reaction of TycC-TE using branched EG-substrates **110-118**. “Head-to-side chain cyc” and “hyd” are nomenclatures for head-to-side chain cyclic compounds and hydrolyzed linear compounds, respectively. The solvent peaks are partially omitted for simplicity.

Figure S10. MS/MS spectrum for the enzymatic product, surugamide B (**2**)

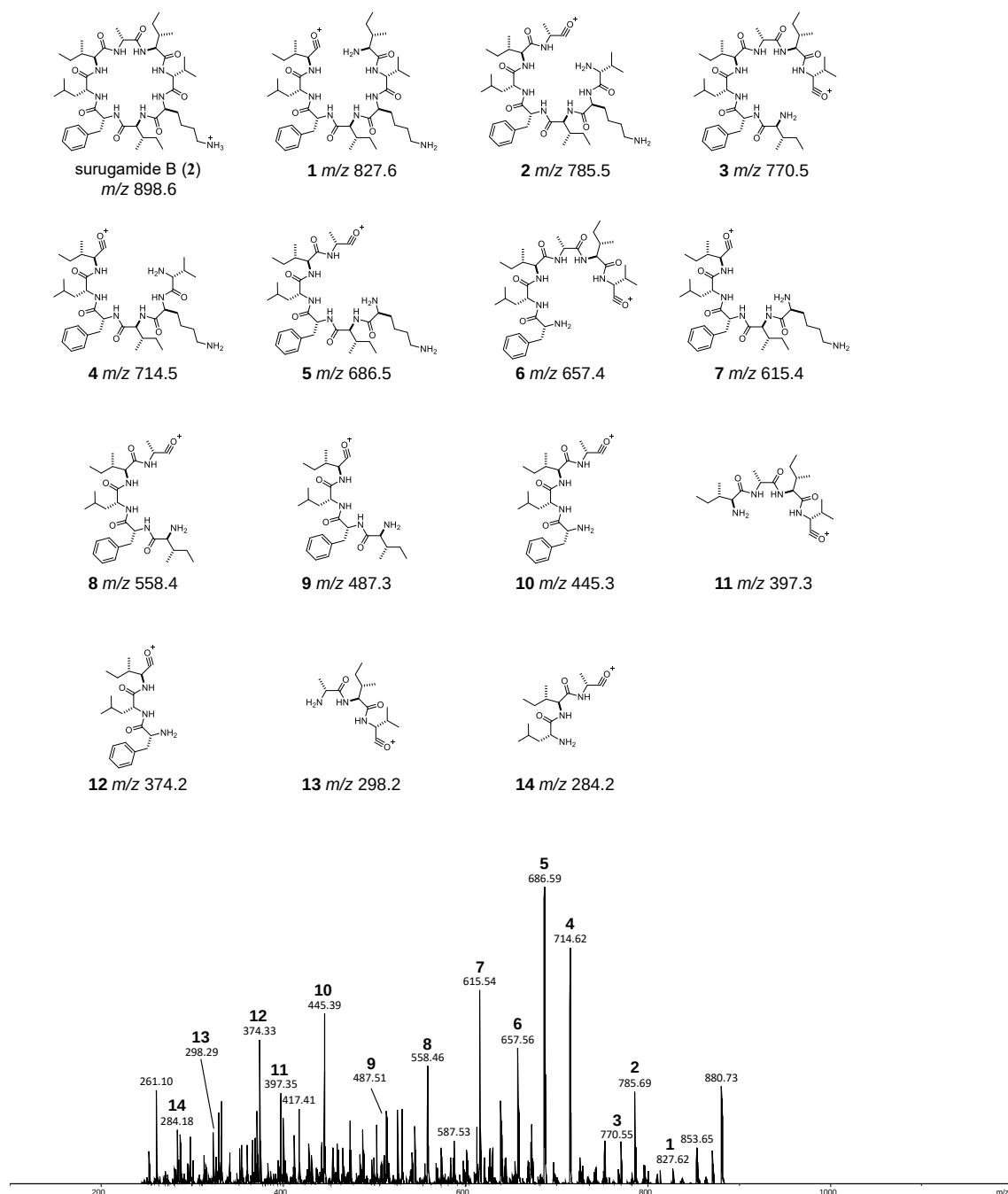


Figure S11. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (11G)-EG (**36**)

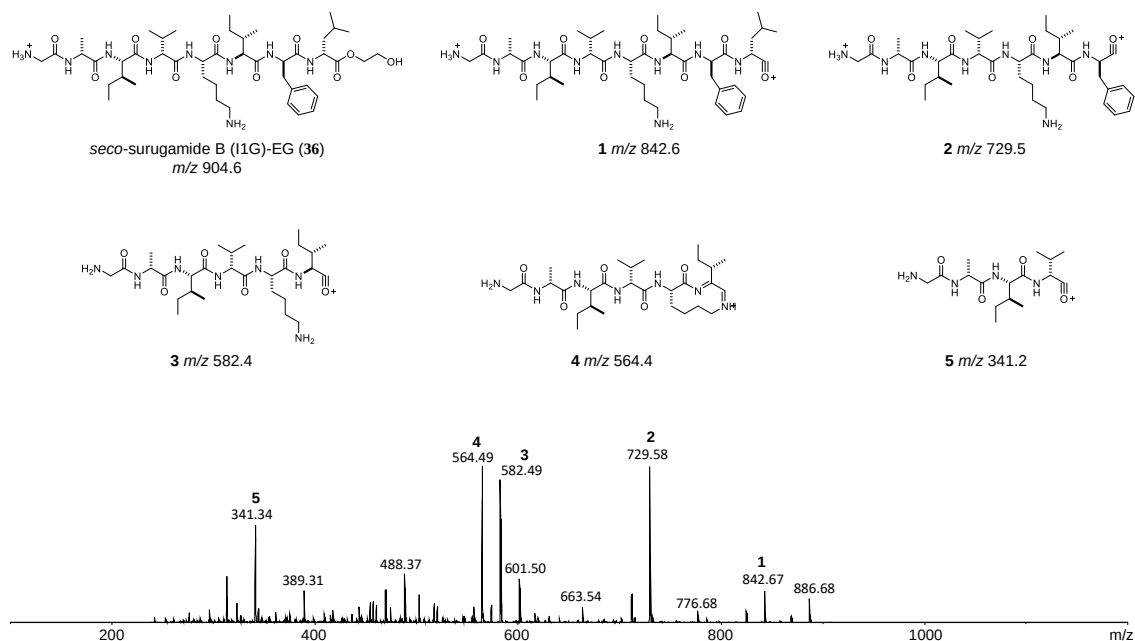


Figure S12. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-**36**

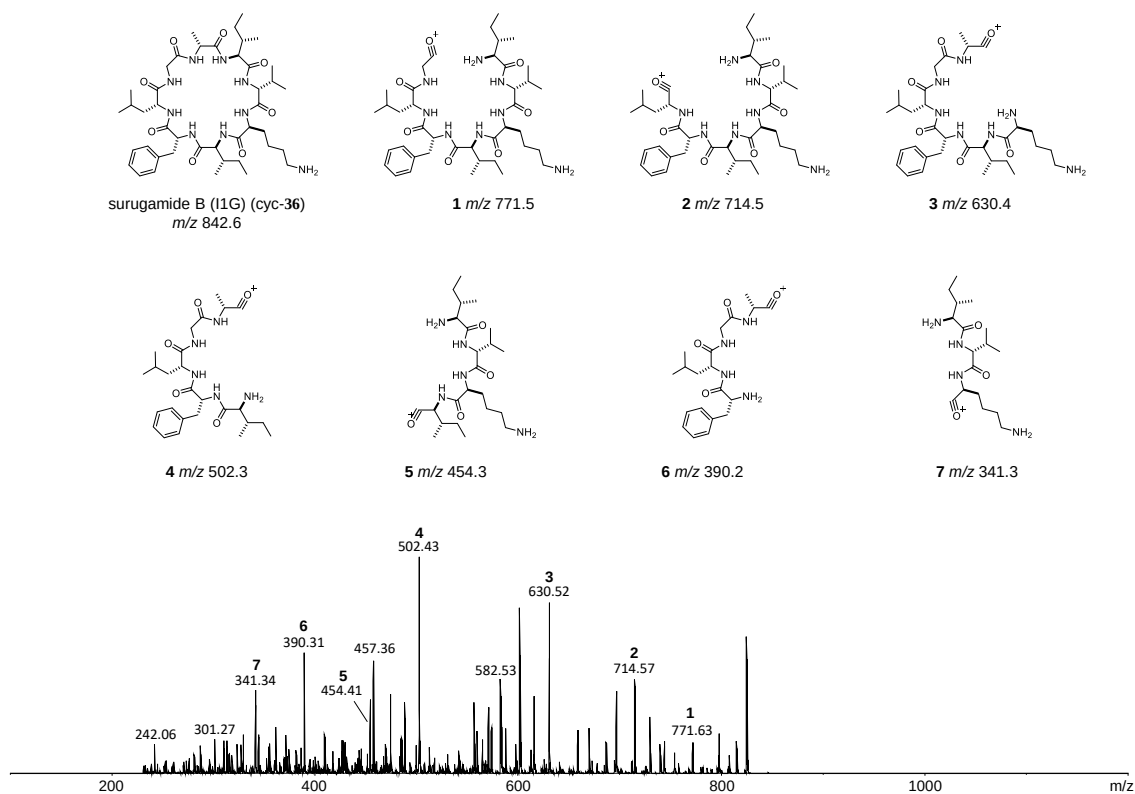


Figure S13. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (I1A)-EG (37)

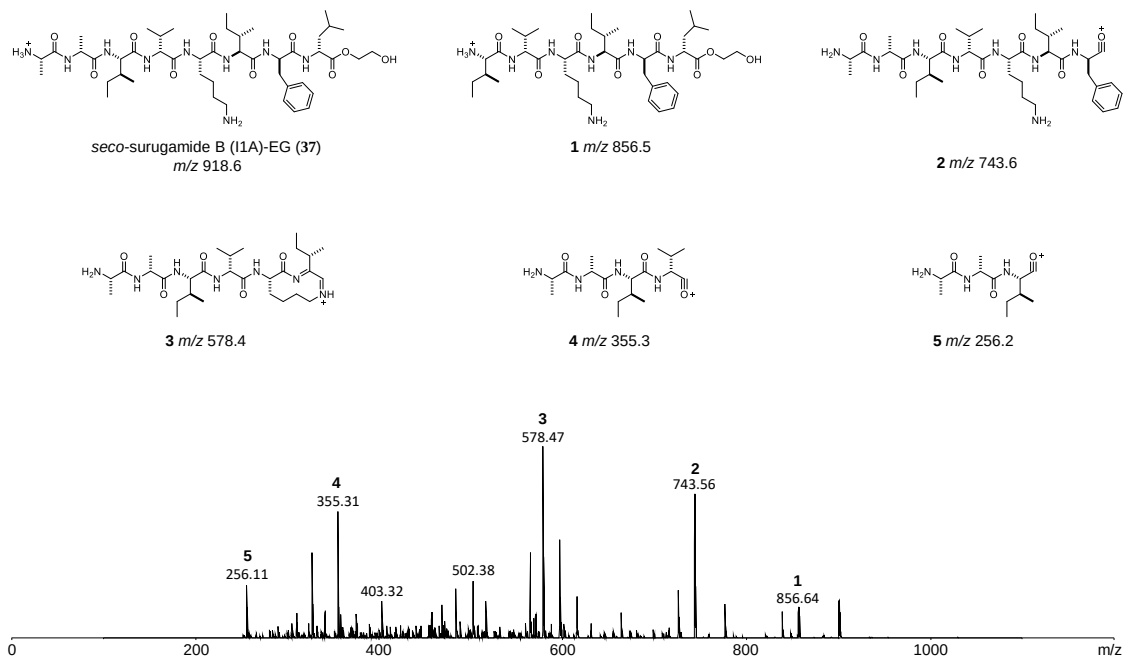


Figure S14. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-37

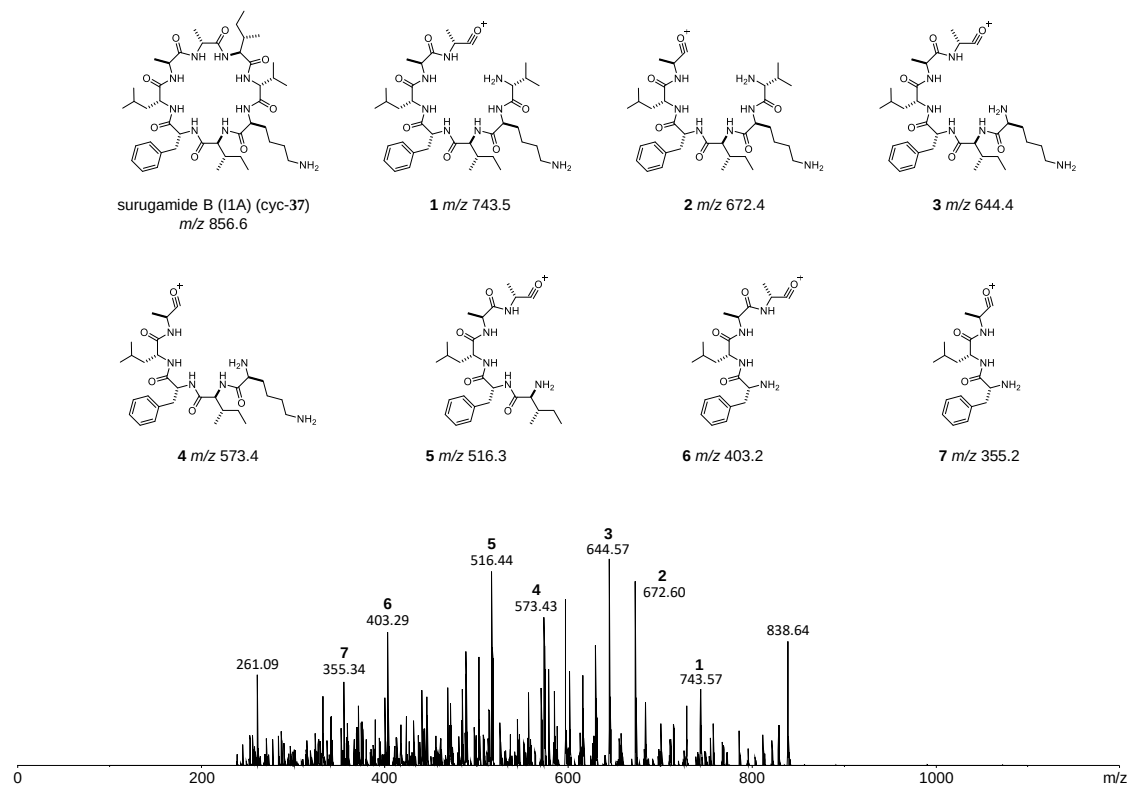


Figure S15. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (I1V)-EG (**38**)

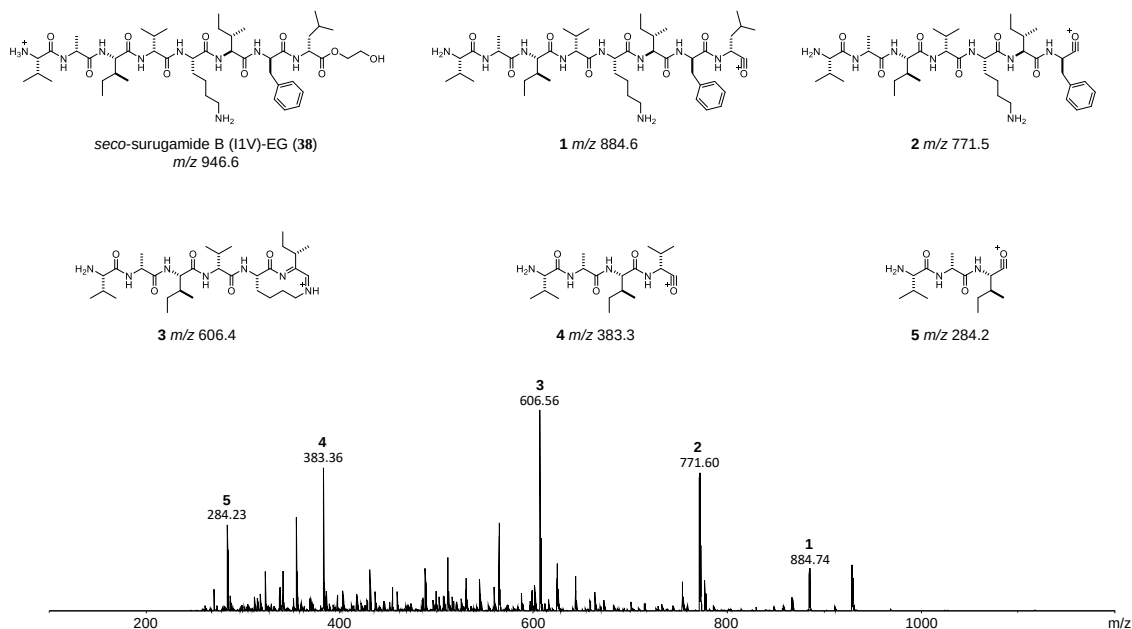


Figure S16. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-**38**

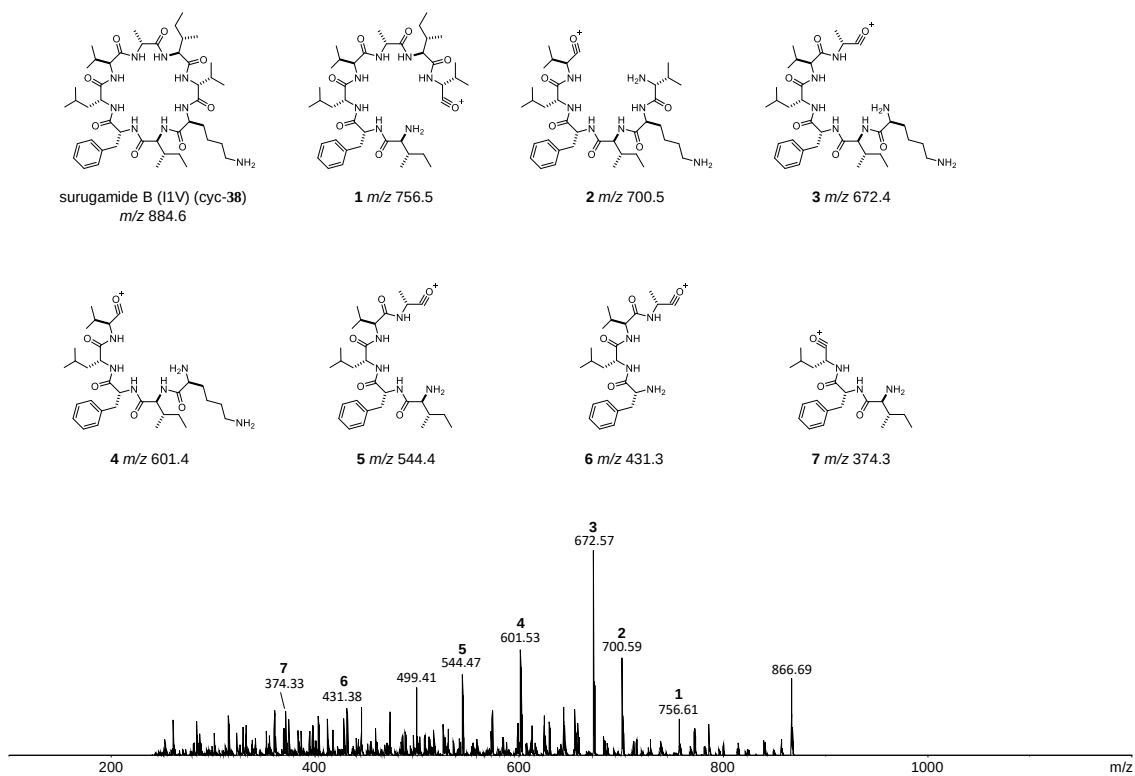


Figure S17. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (11L)-EG (39)

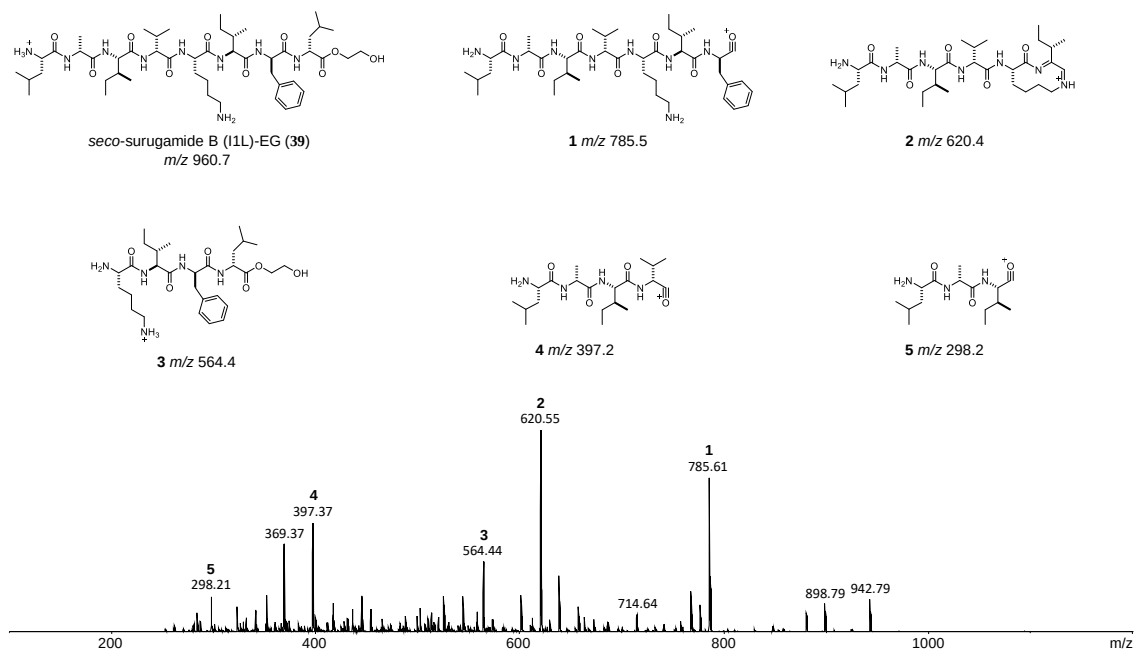


Figure S18. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-39

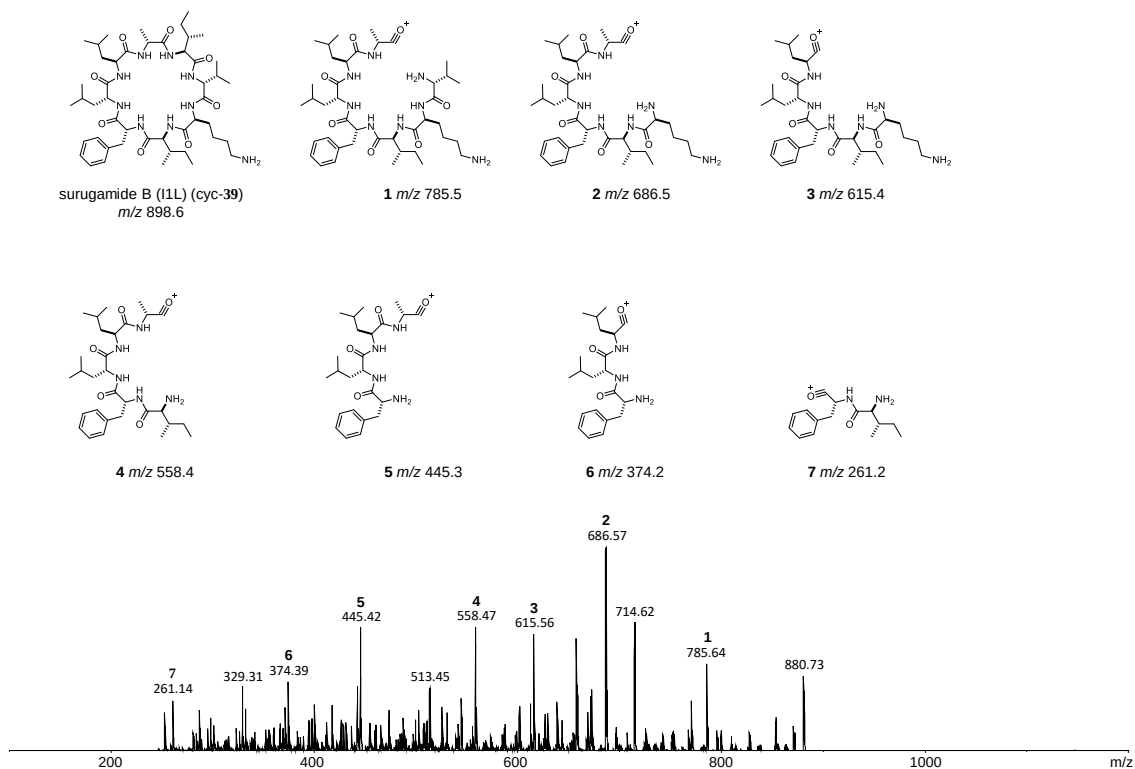


Figure S19. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (11F)-EG (**40**)

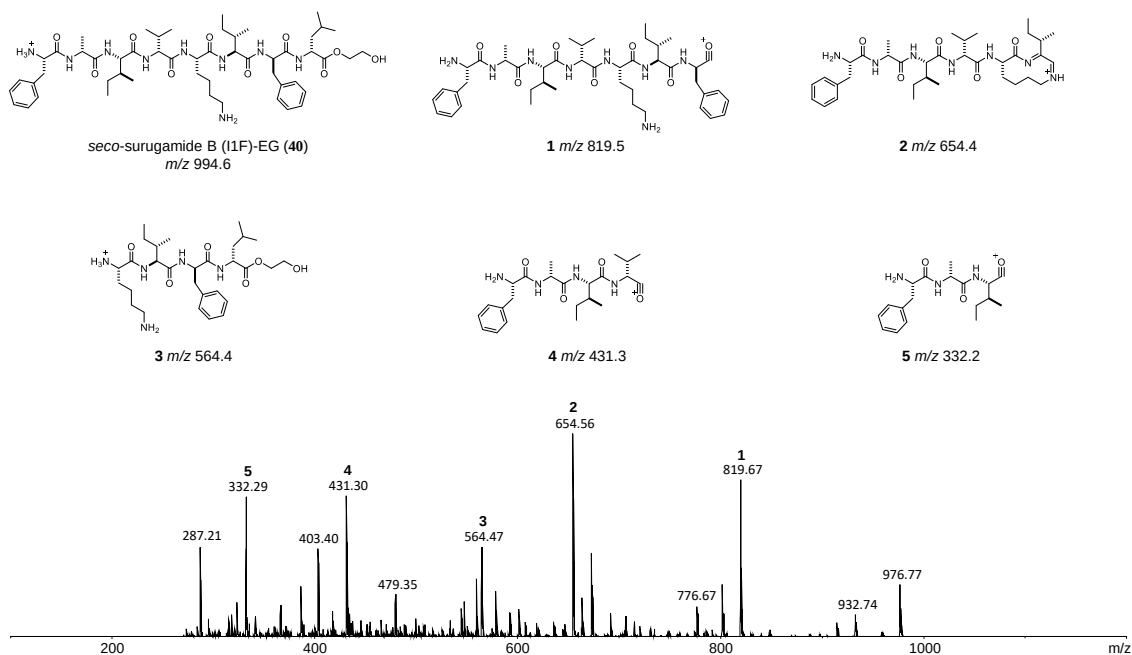


Figure S20. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-**40**

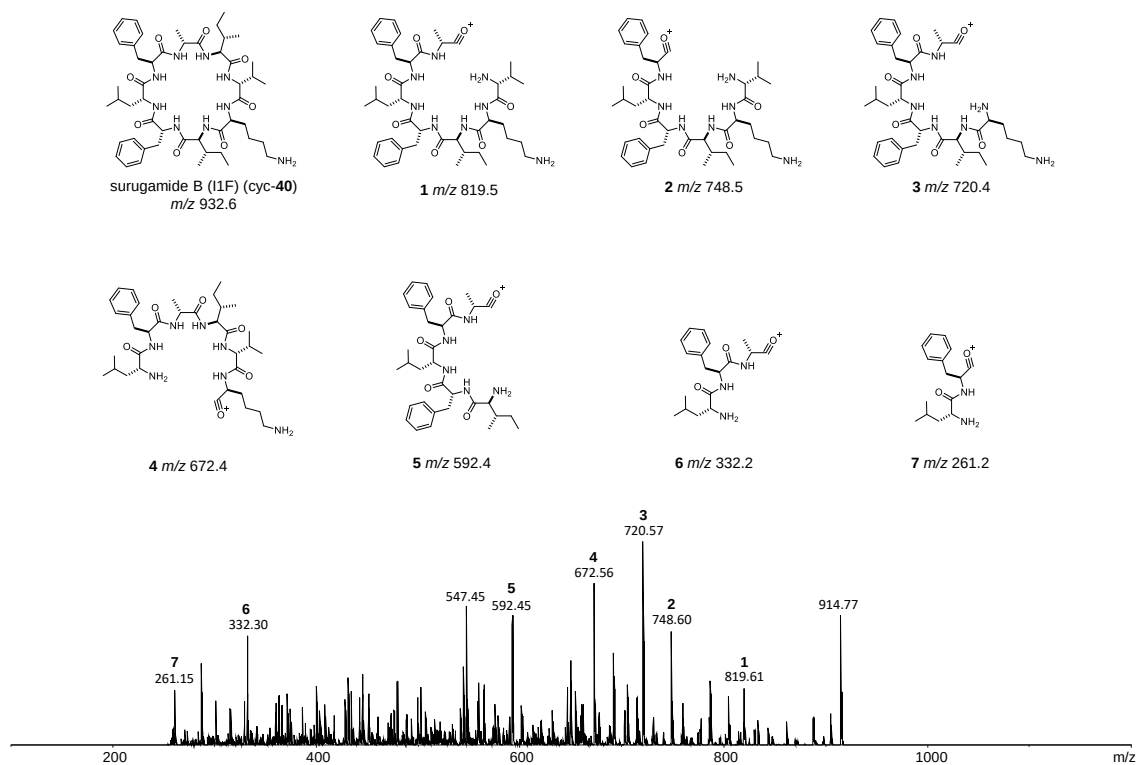


Figure S21. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (11W)-EG (**41**)

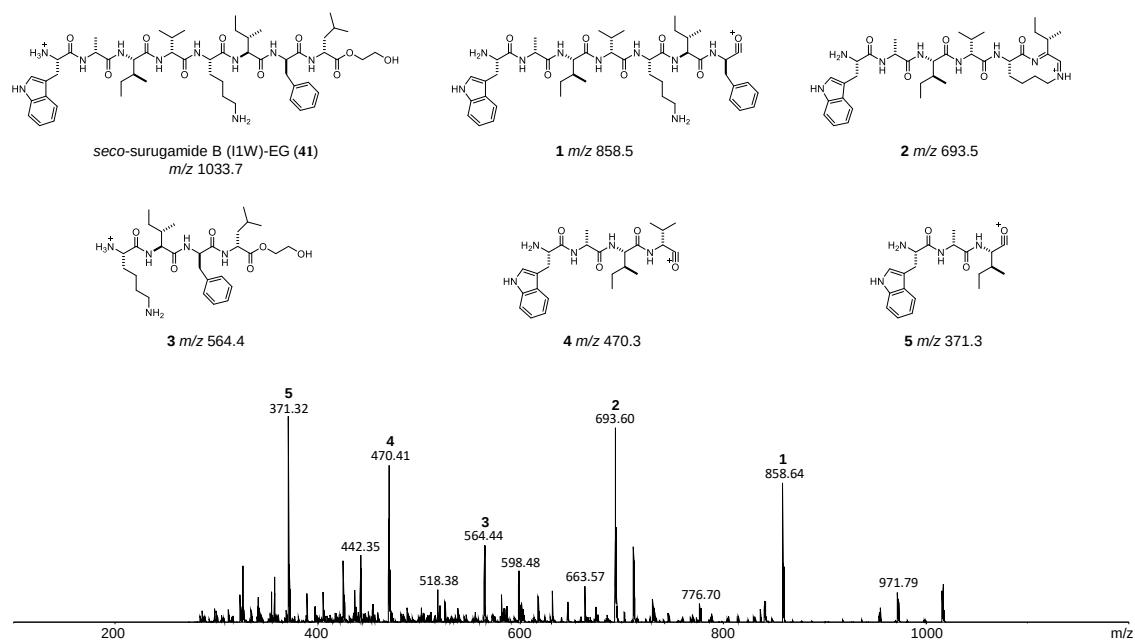


Figure S22. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-**41**

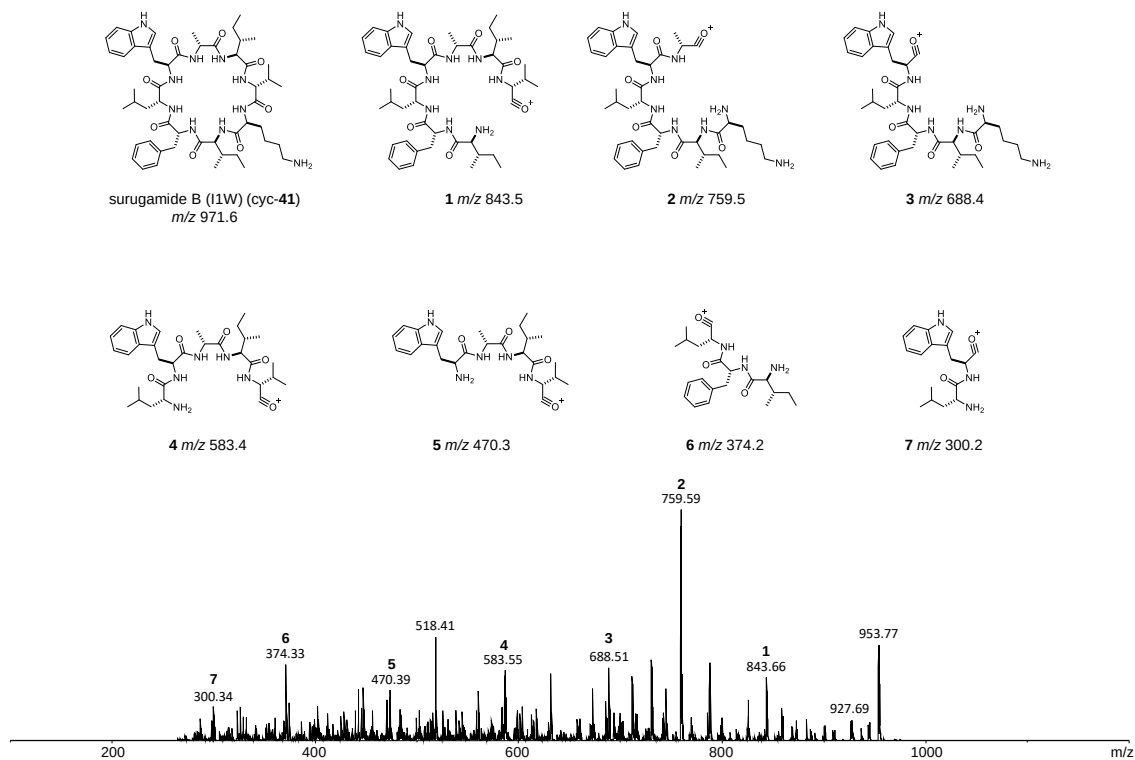


Figure S23. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (I1M)-EG (42)

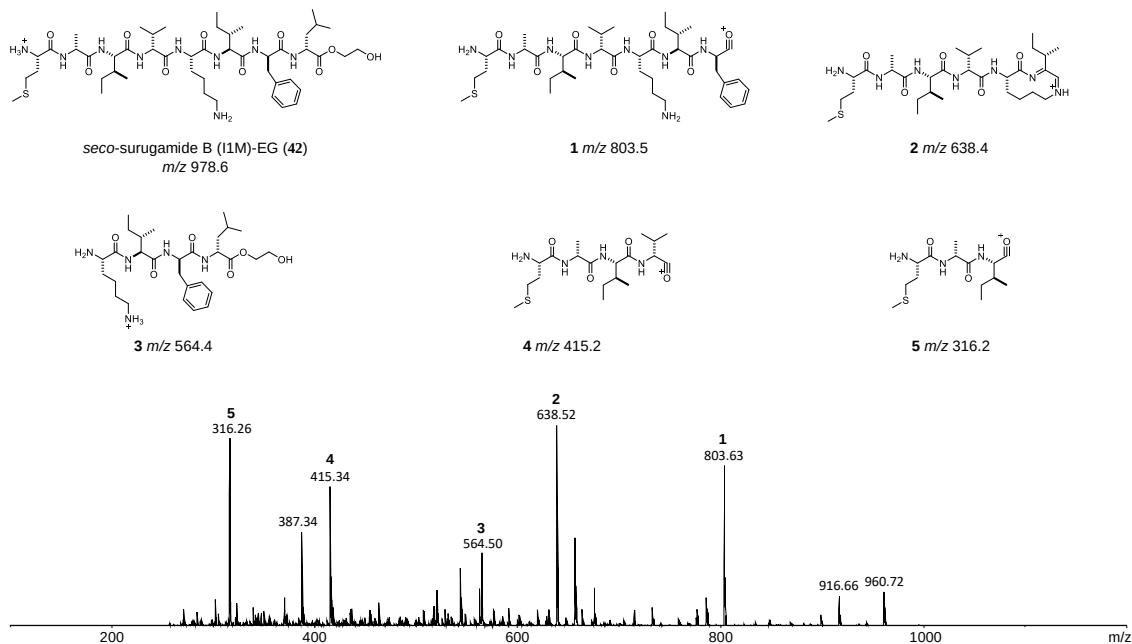


Figure S24. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-42

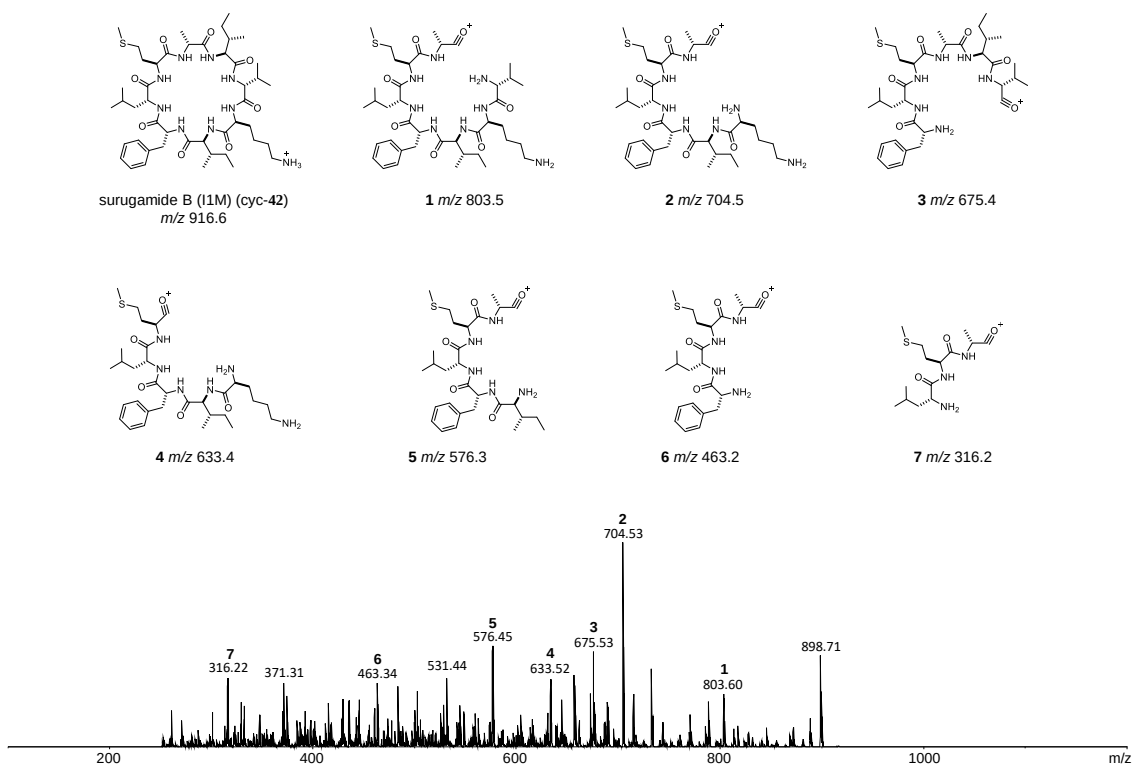


Figure S25. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (11H)-EG (43)

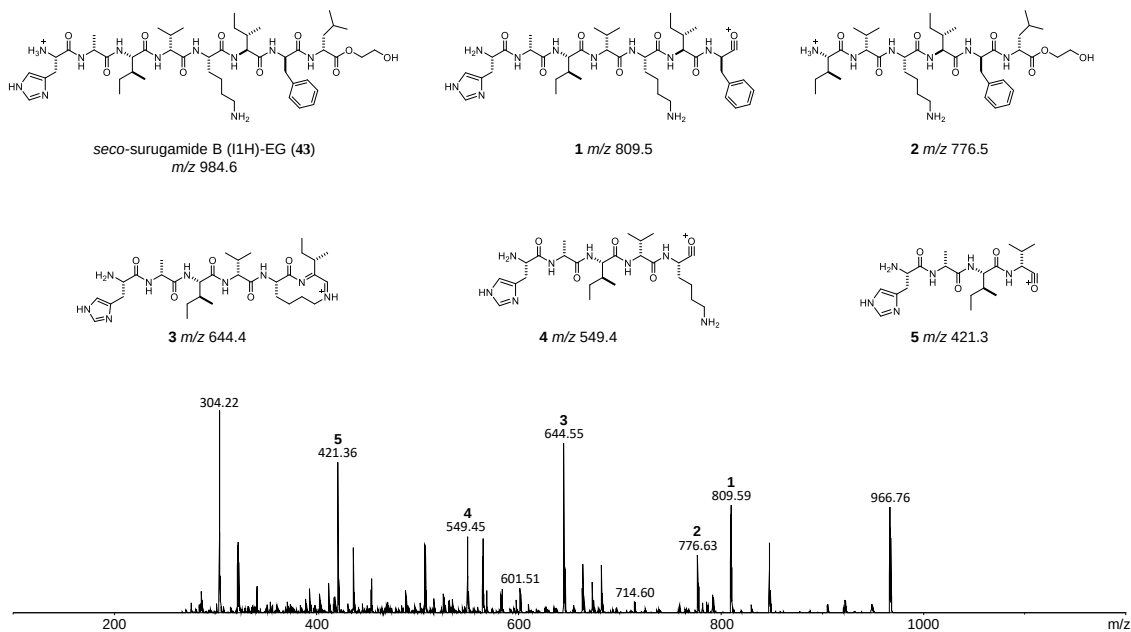


Figure S26. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-43

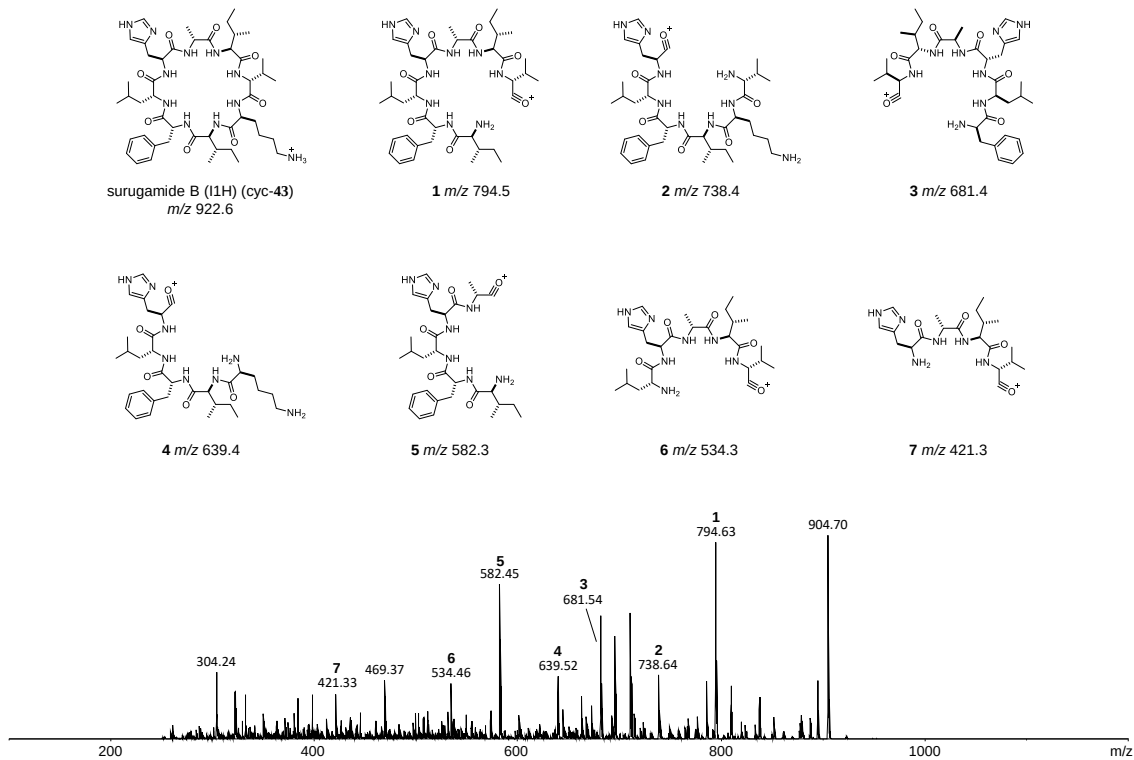


Figure S27. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (11R)-EG (44)

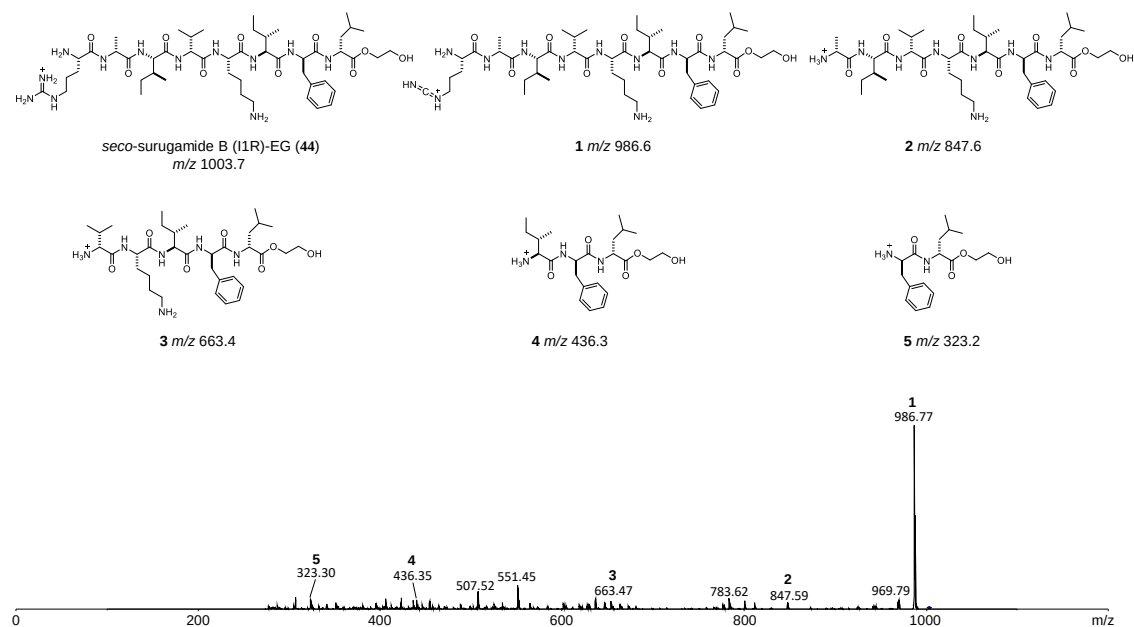


Figure S28. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-44

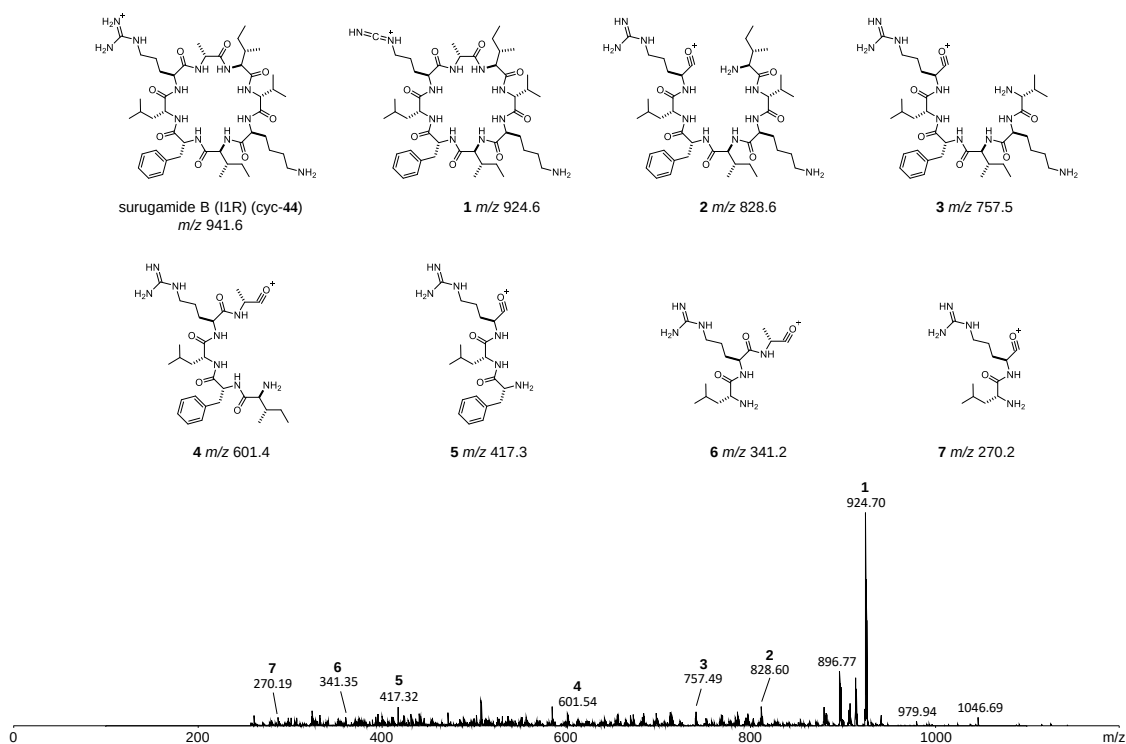


Figure S29. MS/MS spectrum for the enzymatic product hyd-44

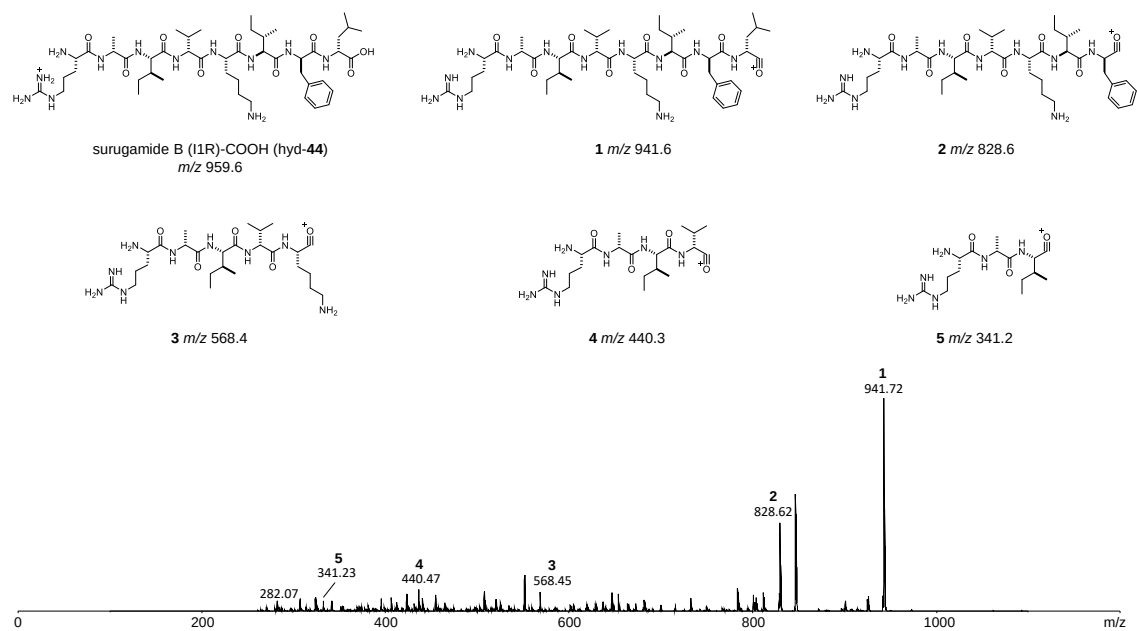


Figure S30. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (11K)-EG (45)

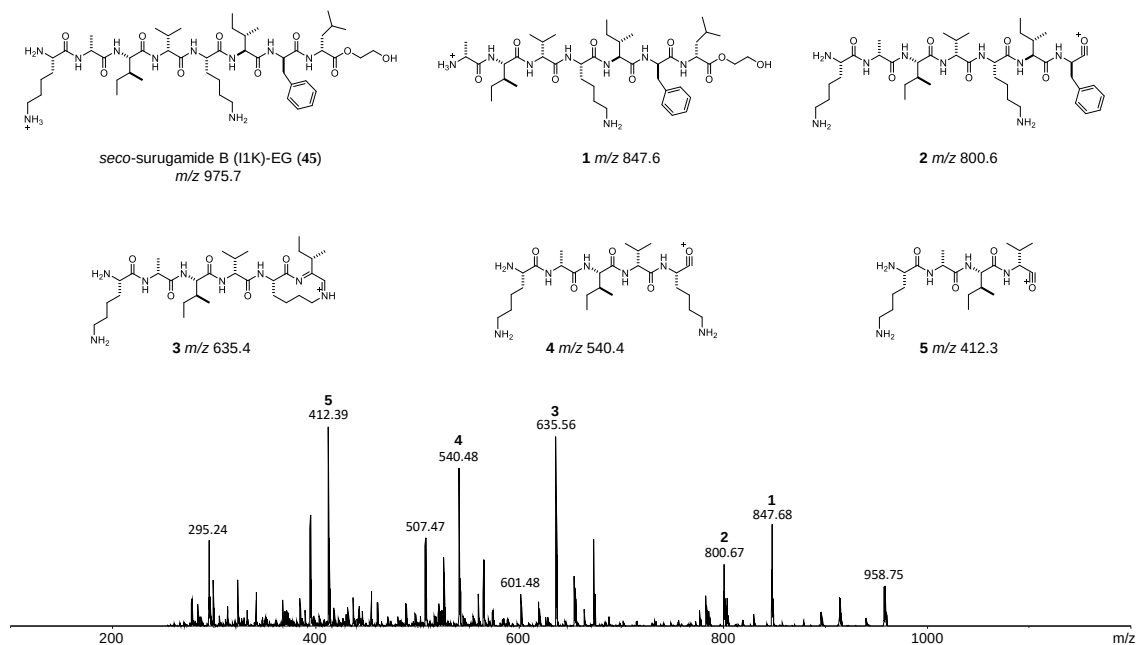


Figure S31. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-45

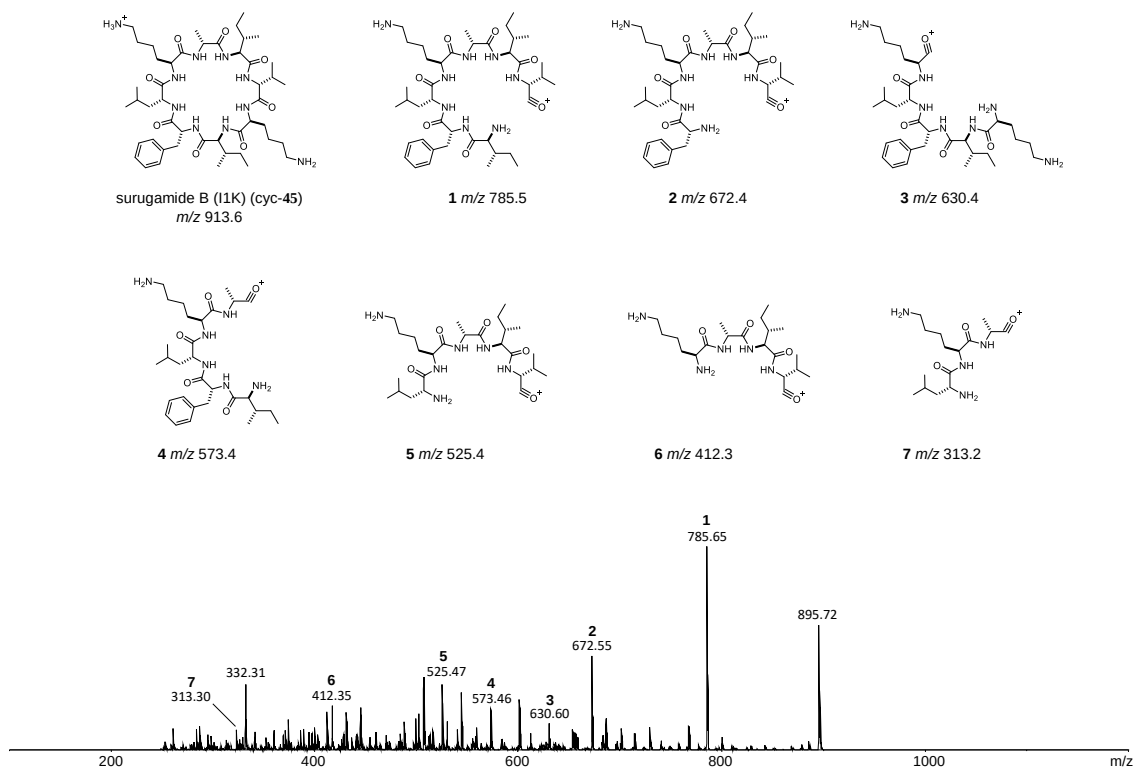


Figure S32. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (11S)-EG (46)

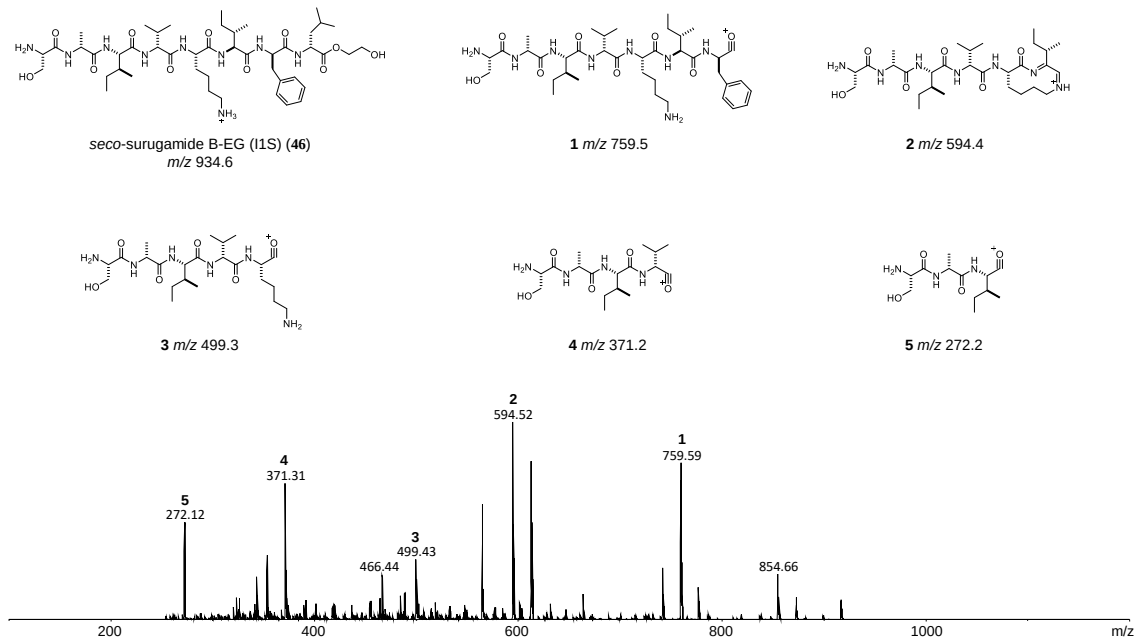


Figure S33. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-46

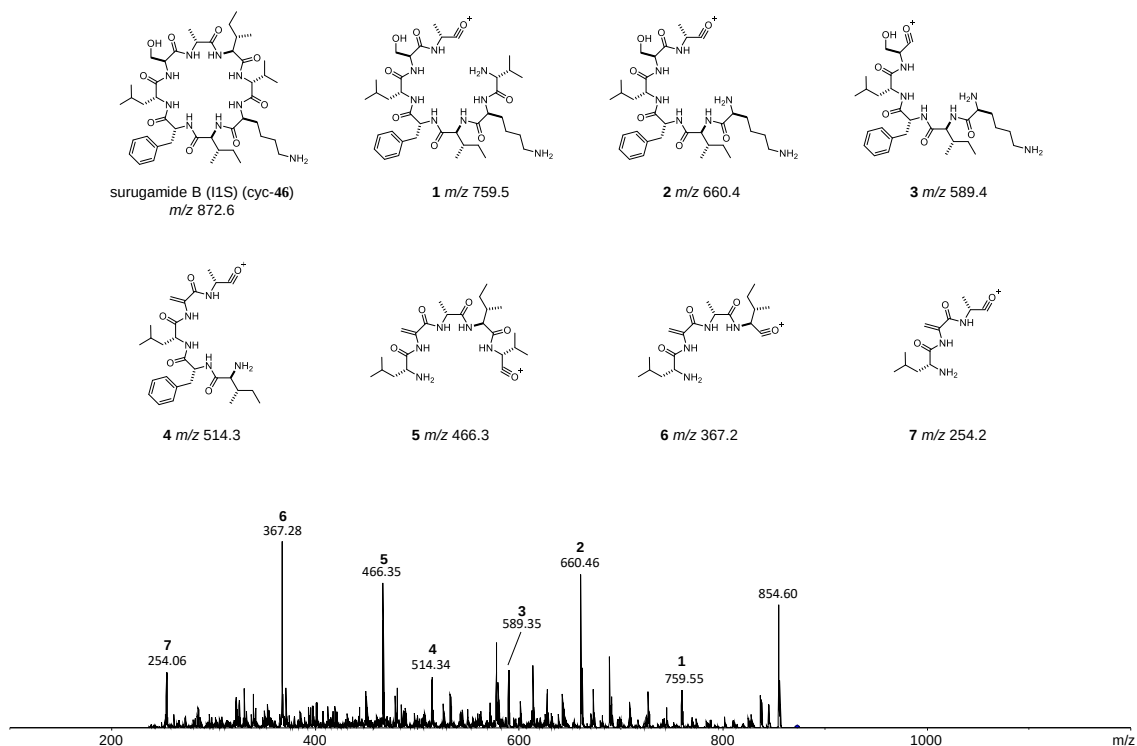


Figure S34. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (11T)-EG (47)

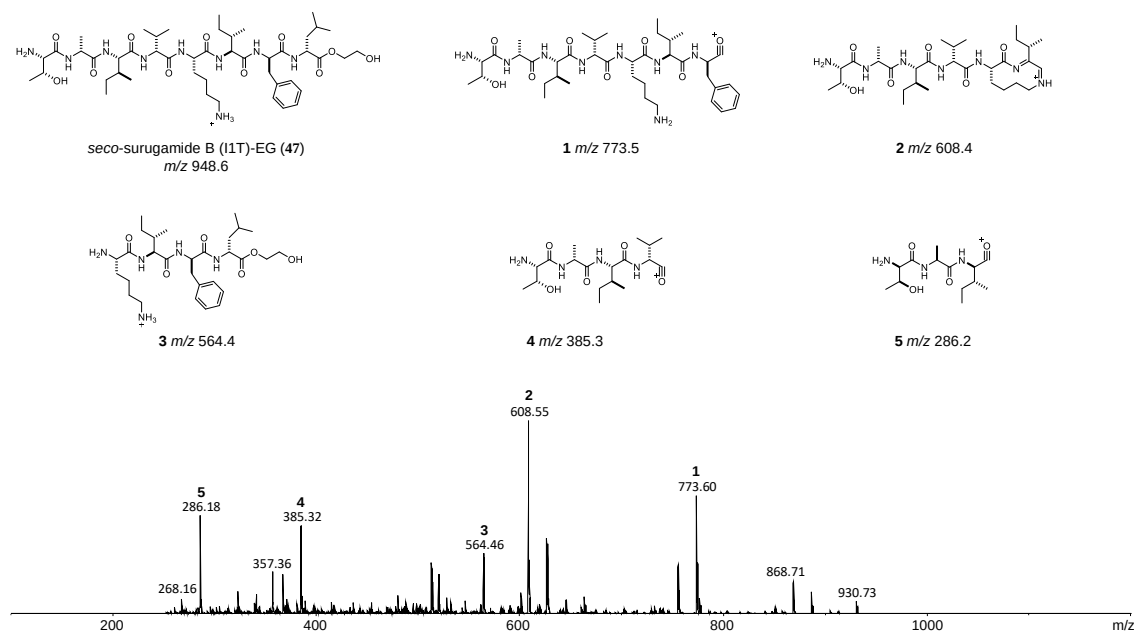


Figure S35. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-47

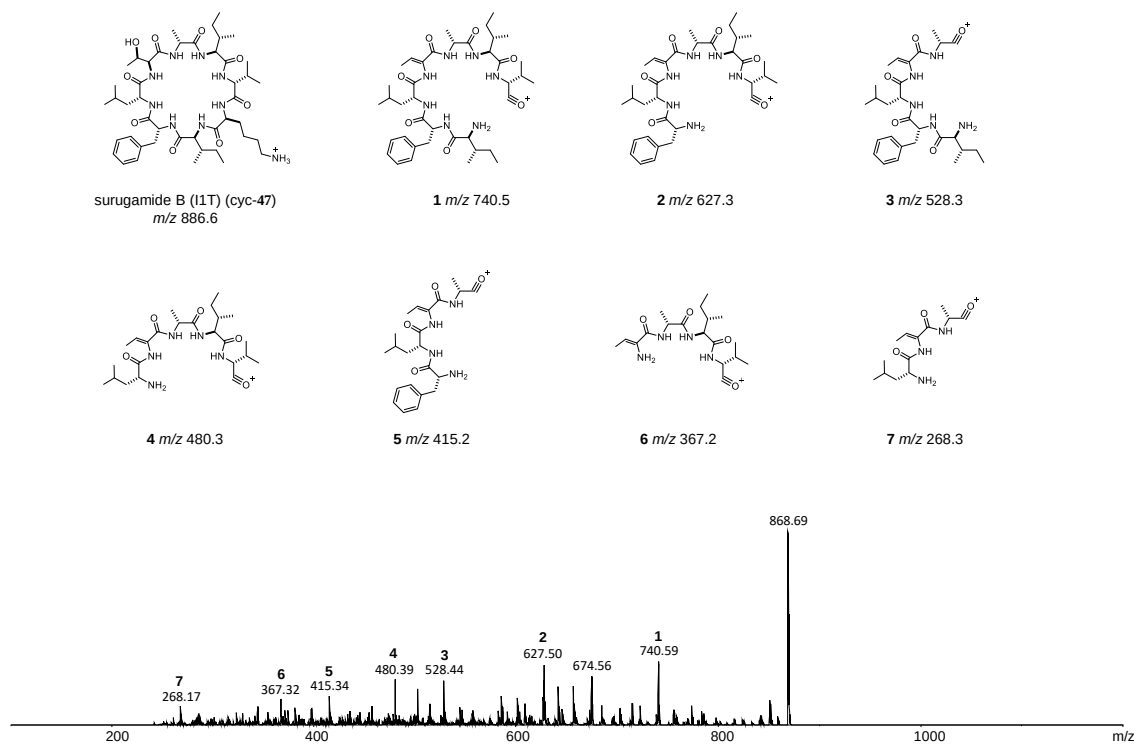


Figure S36. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (11Y)-EG (48)

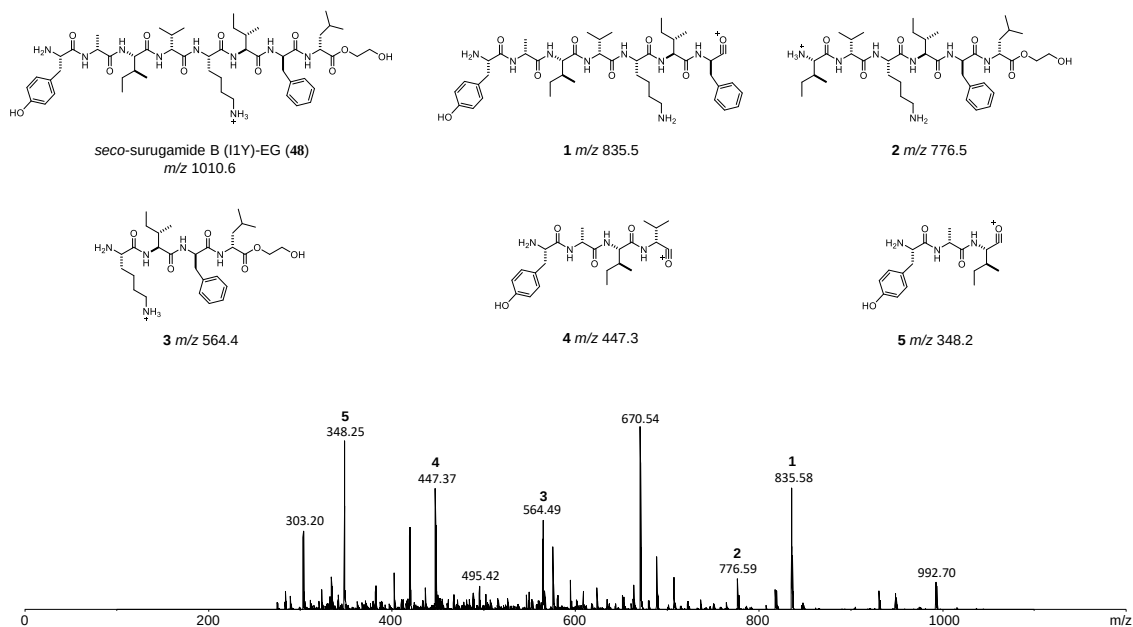


Figure S37. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-48

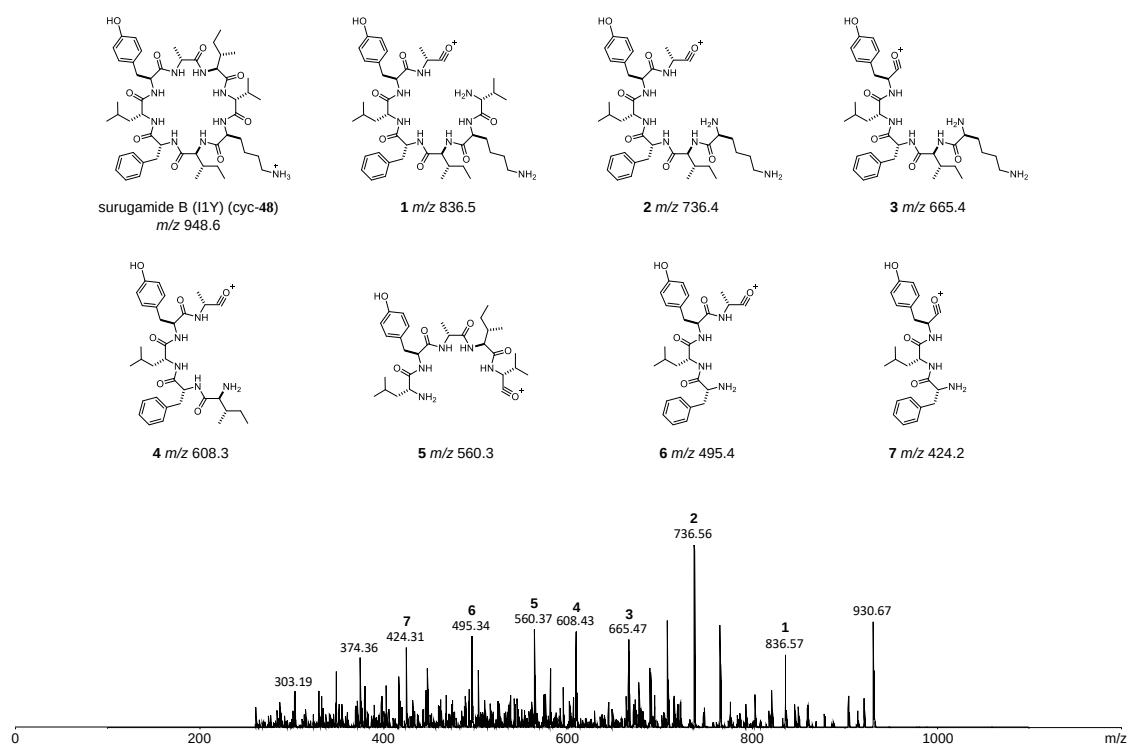


Figure S38. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (I1D)-EG (49)

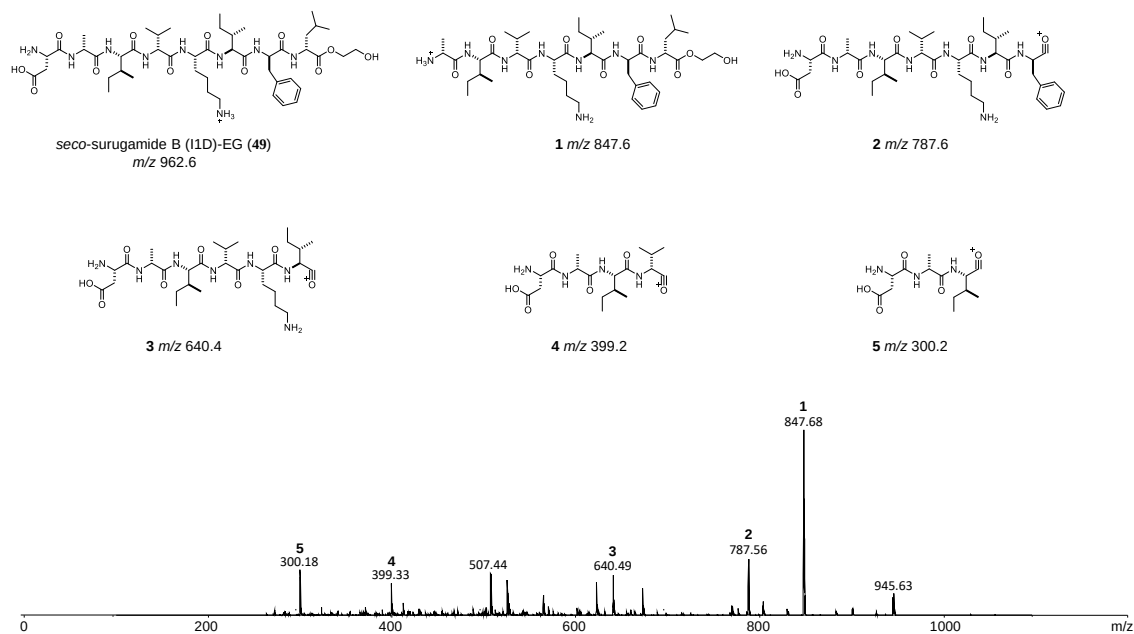


Figure S39. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-49

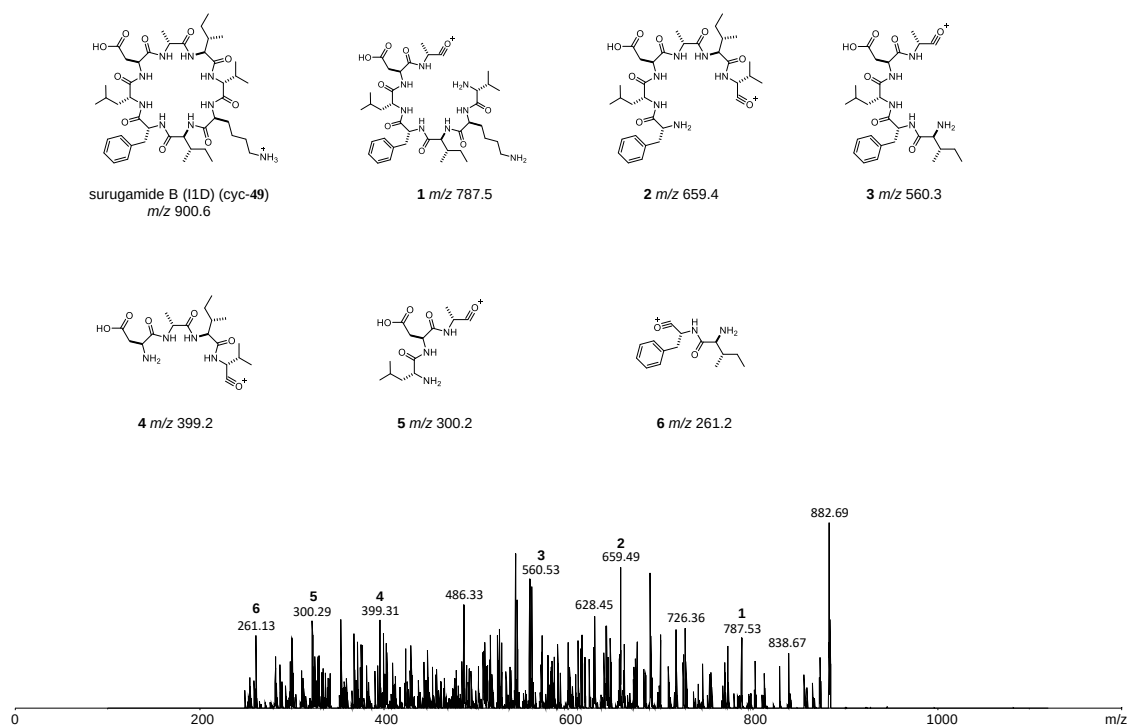


Figure S40. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (11E)-EG (**50**)

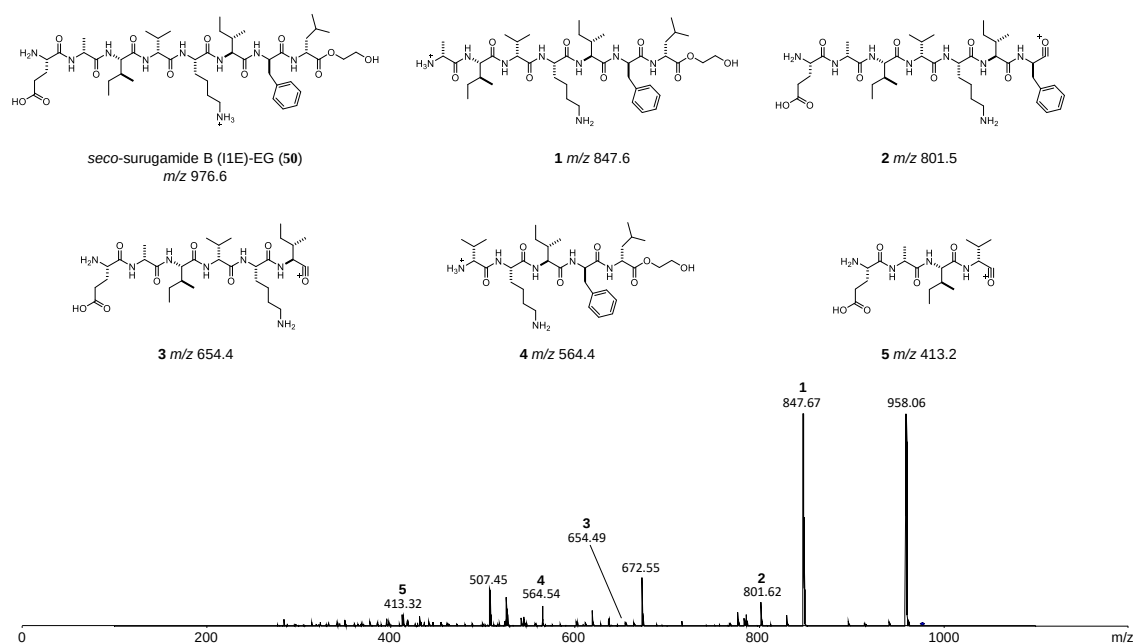


Figure S41. MS/MS spectrum for the enzymatic product hyd-**50**

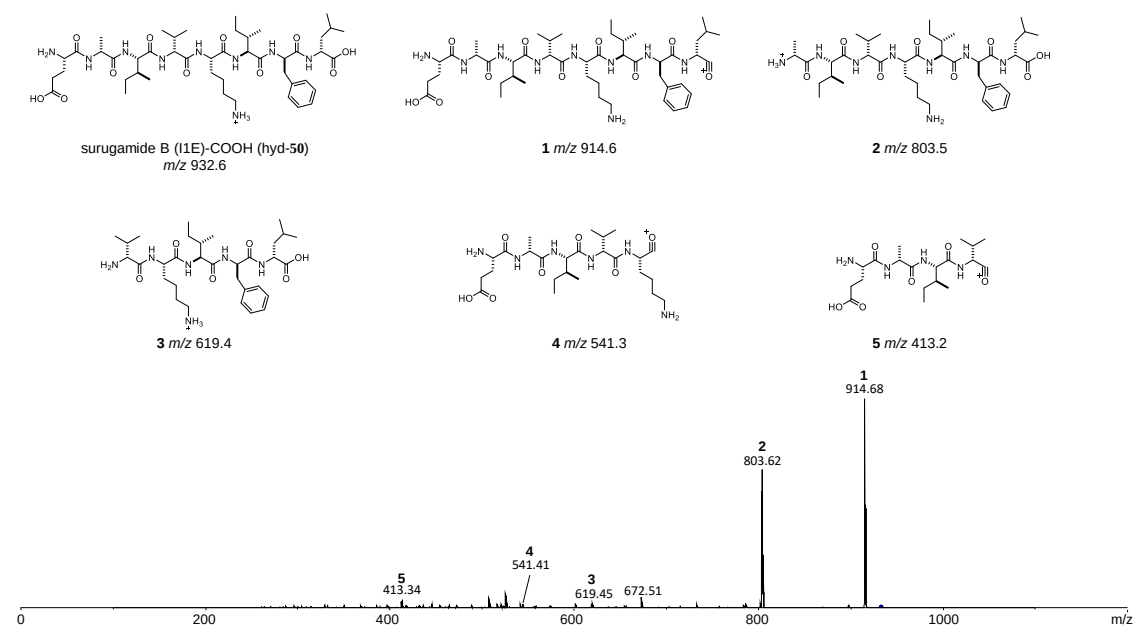


Figure S42. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (11N)-EG (**51**)

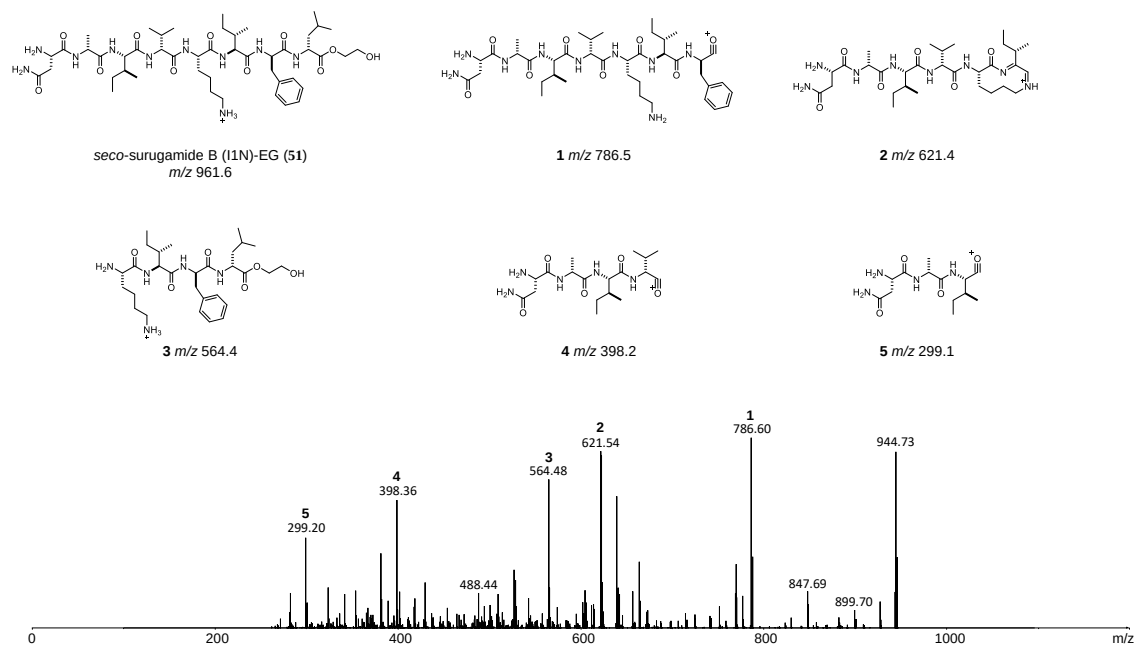


Figure S43. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-**51**

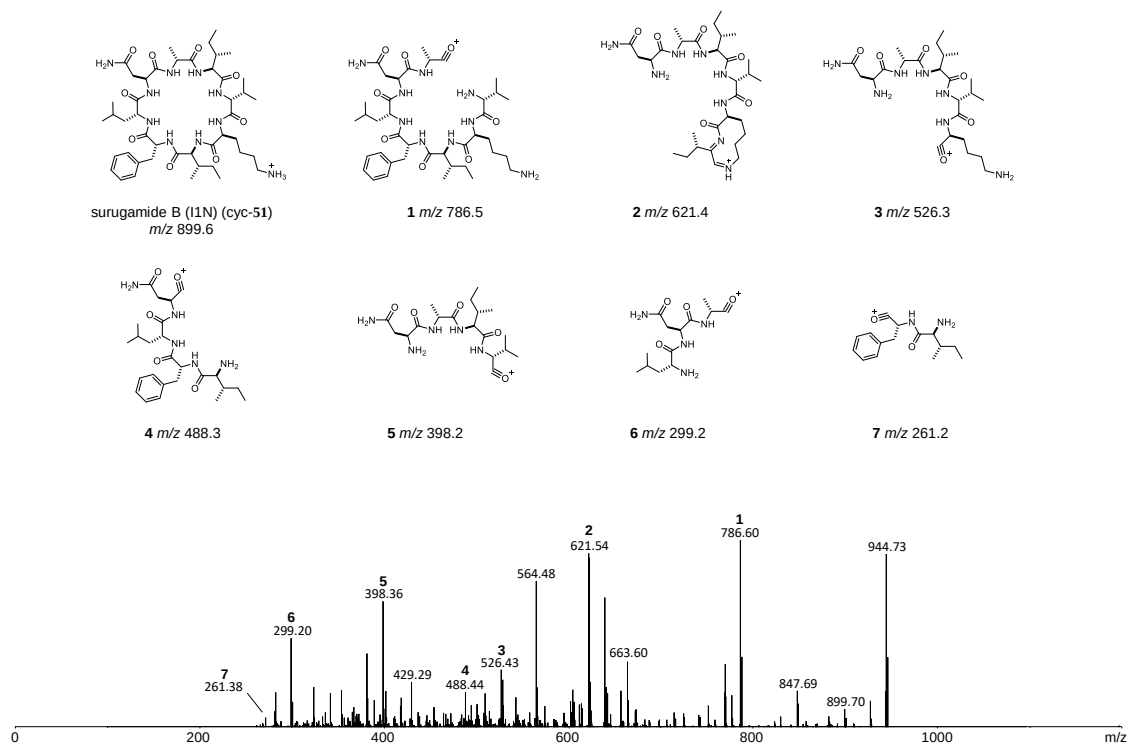


Figure S44. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (I1Q)-EG (**52**)

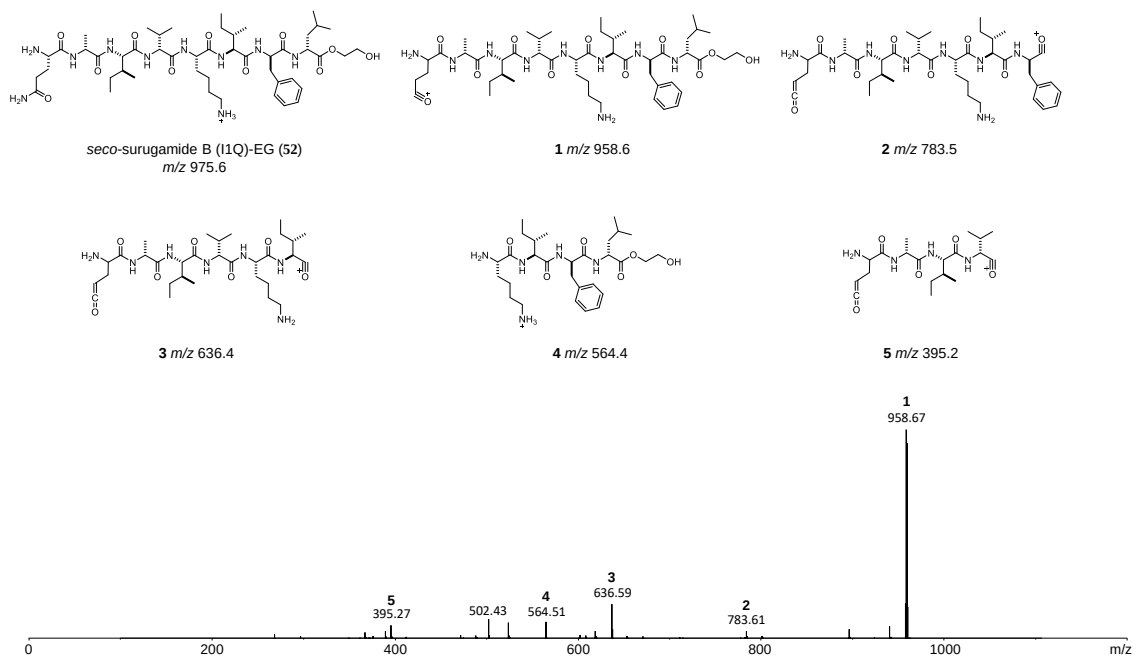


Figure S45. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-**52**

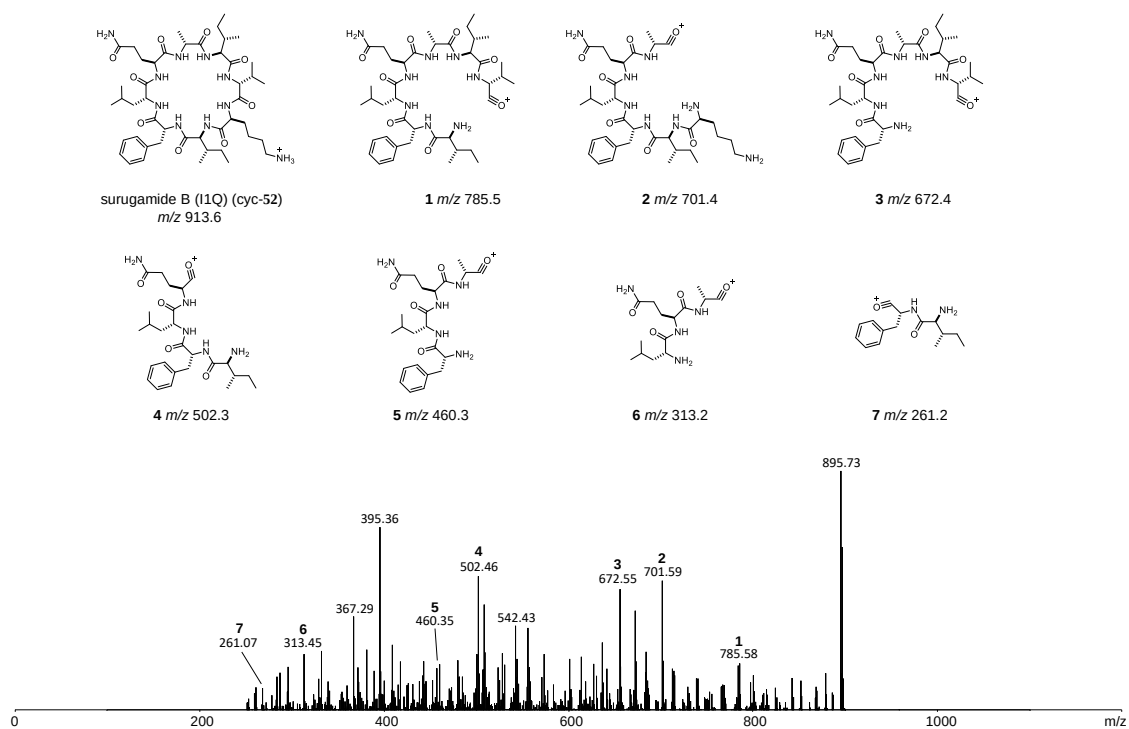


Figure S46. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (I1P)-EG (**53**)

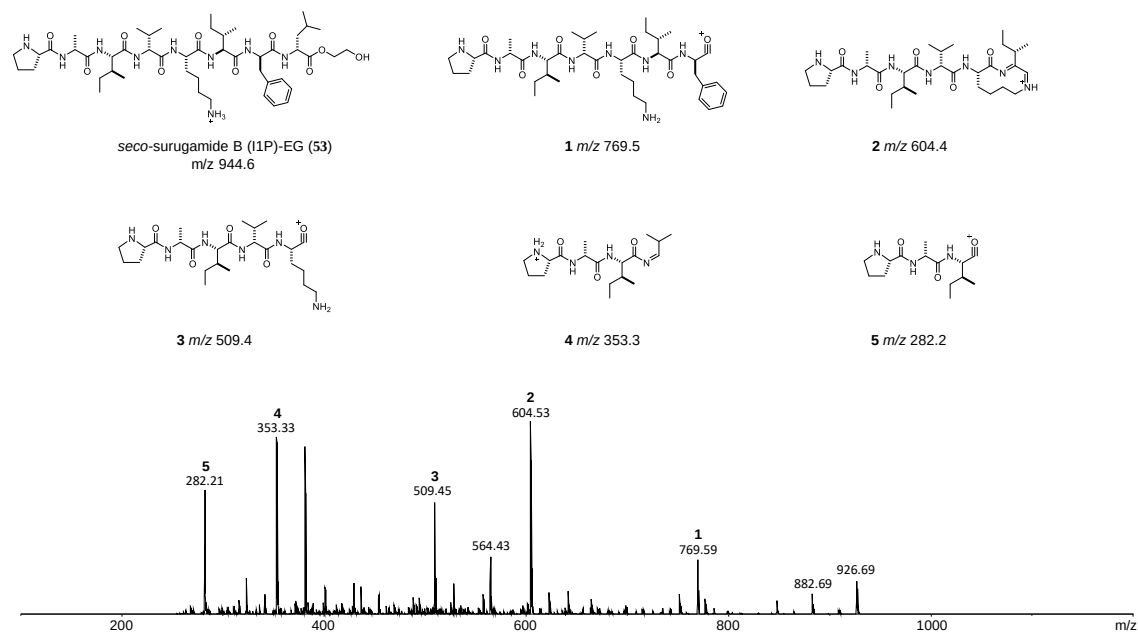


Figure S47. MS/MS spectrum for the enzymatic product hyd-**53**

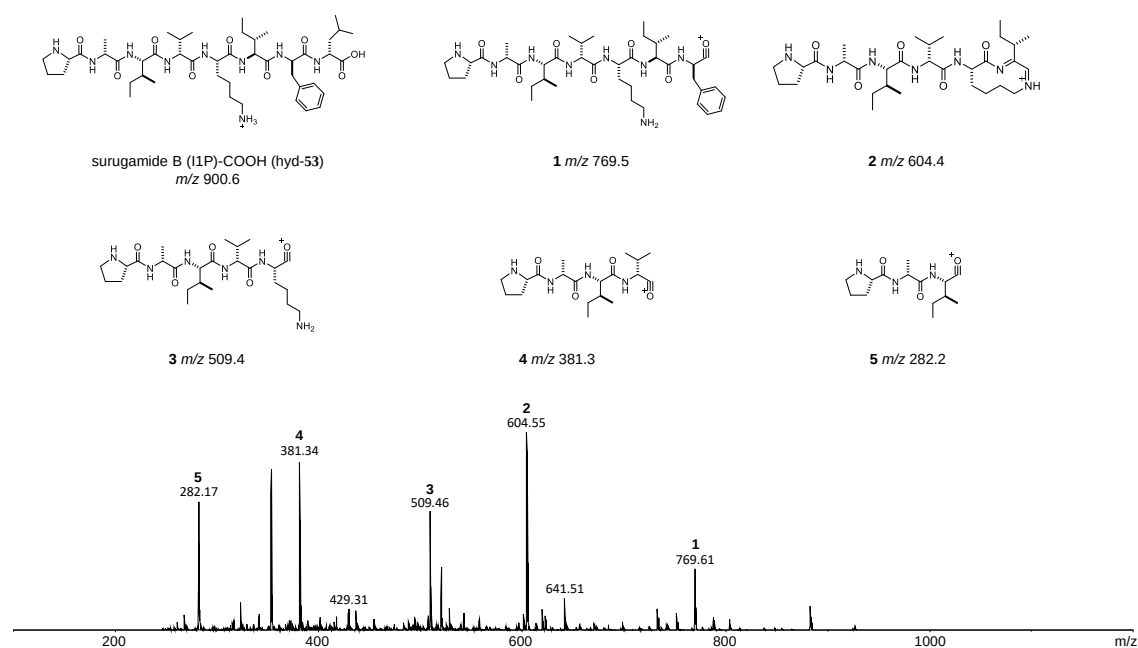


Figure S48. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-54

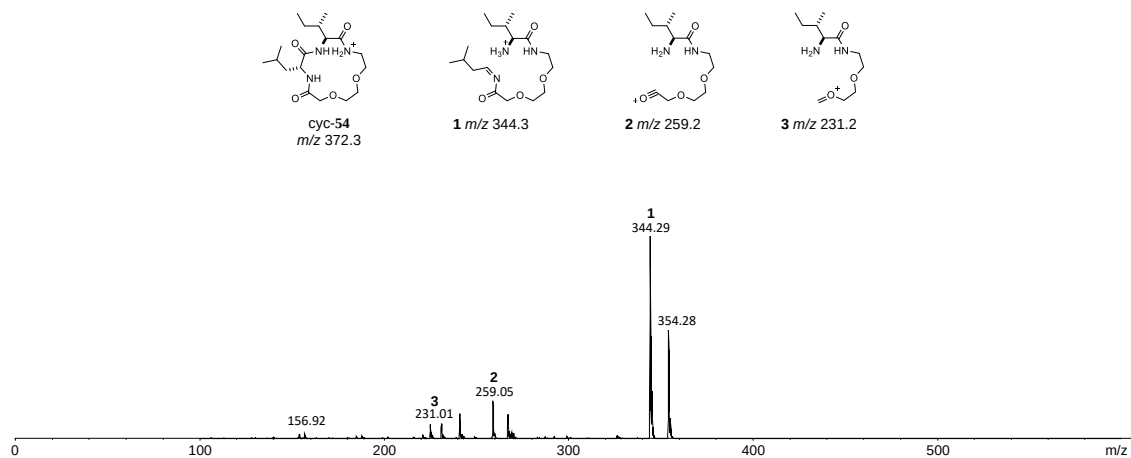


Figure S49. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-55

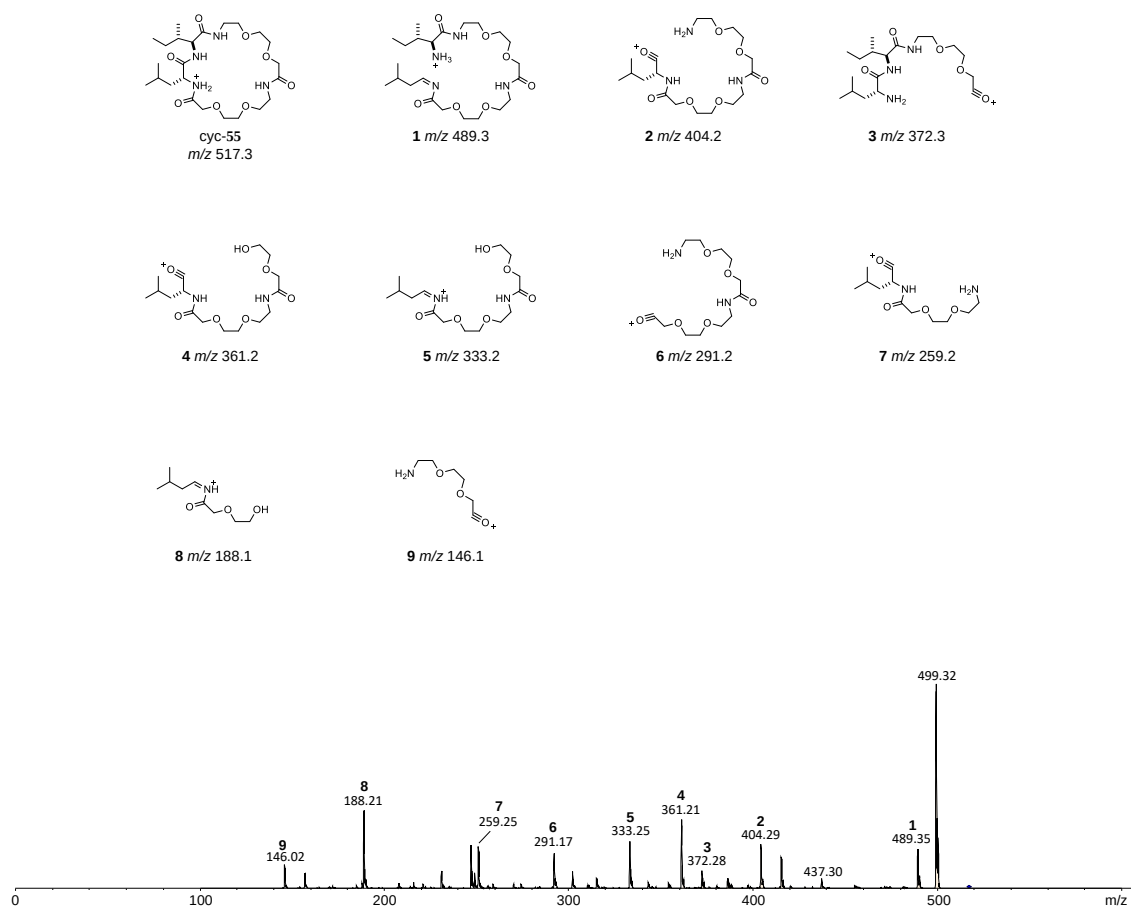


Figure S50. MS/MS spectrum for the enzymatic product **cyc-56**

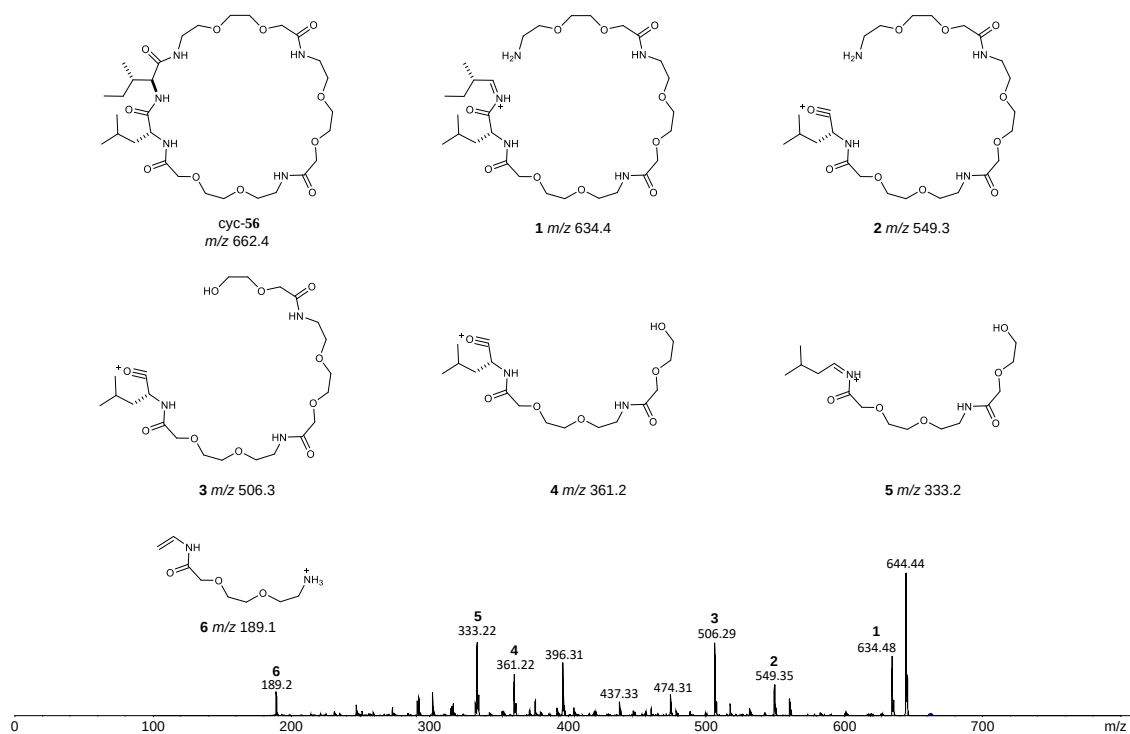


Figure S51. MS/MS spectrum for the enzymatic product **cyc-57**

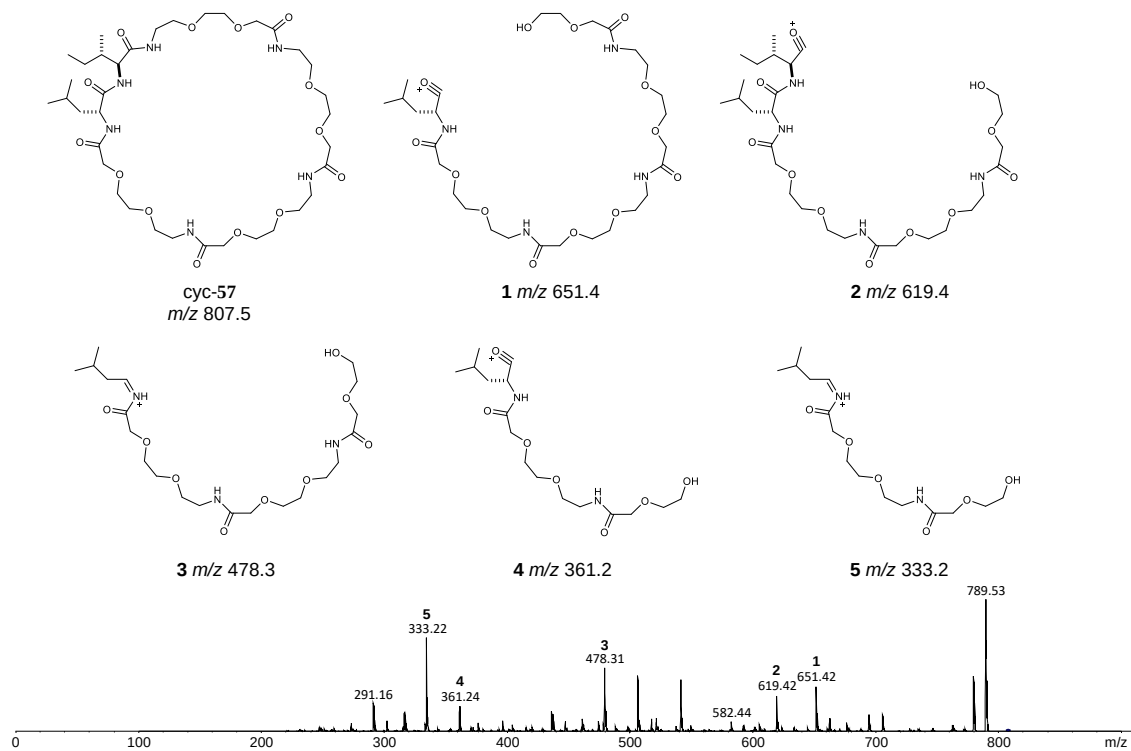


Figure S52. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-58

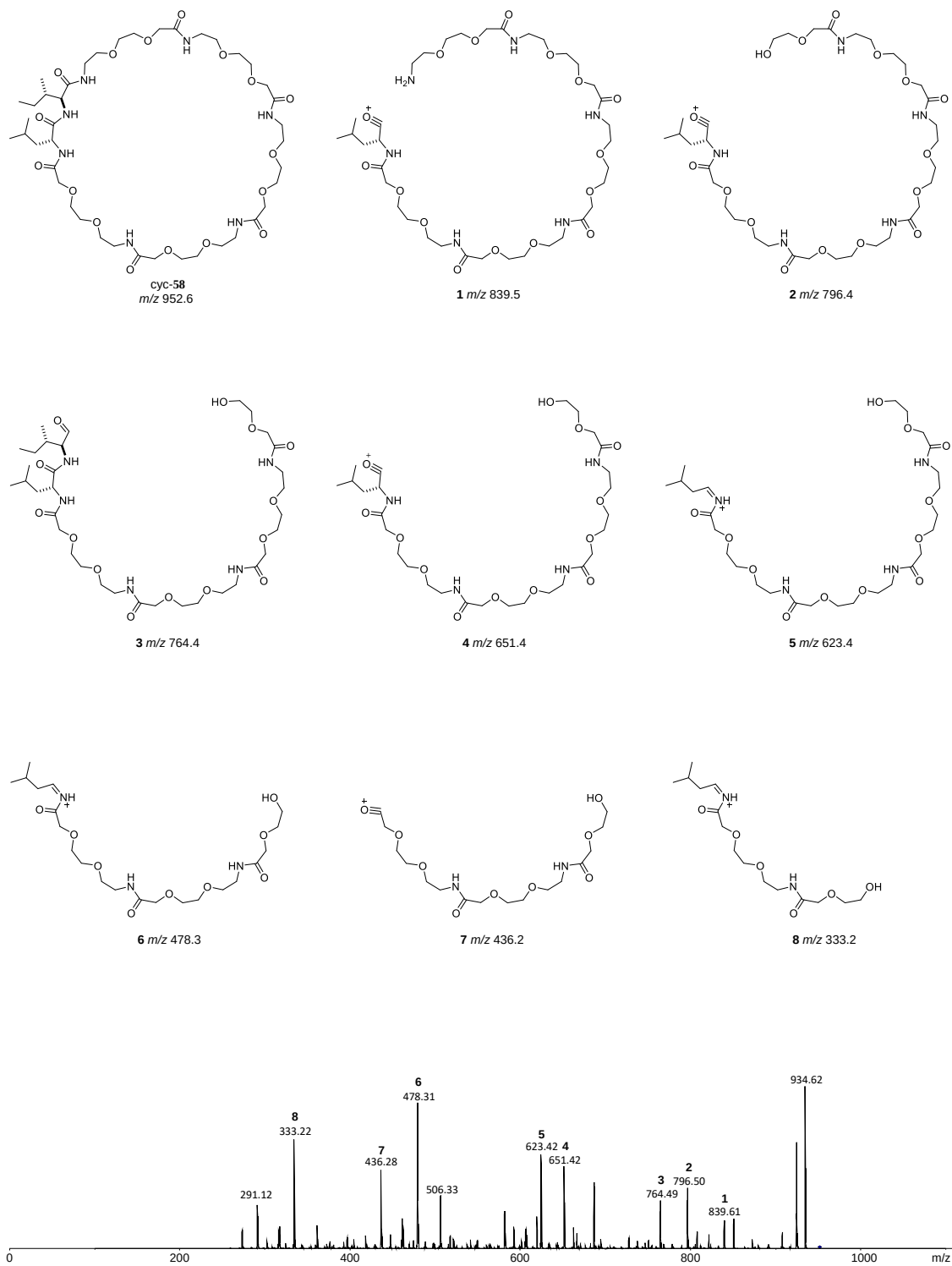


Figure S53. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-**59**

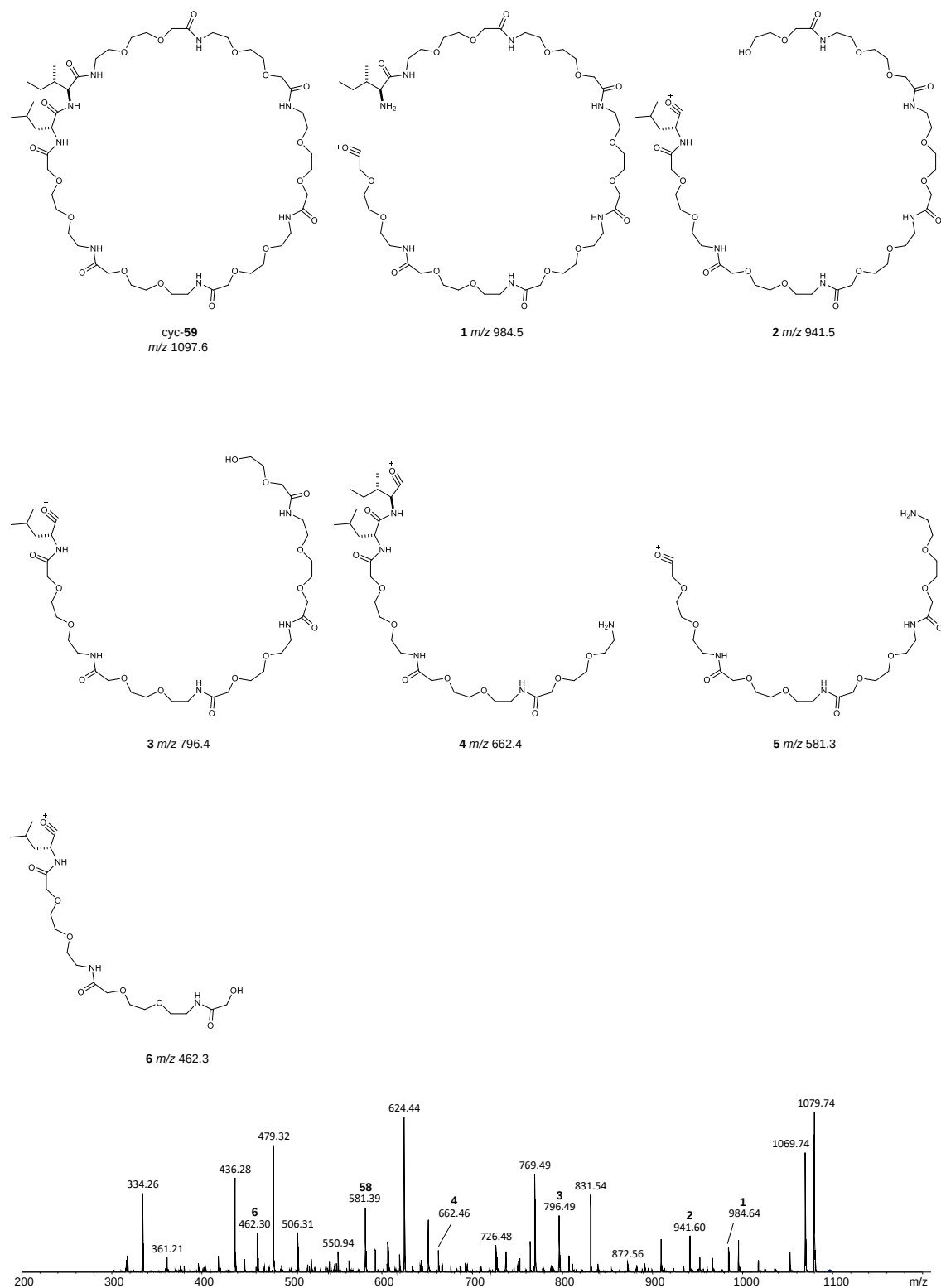


Figure S54. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-60

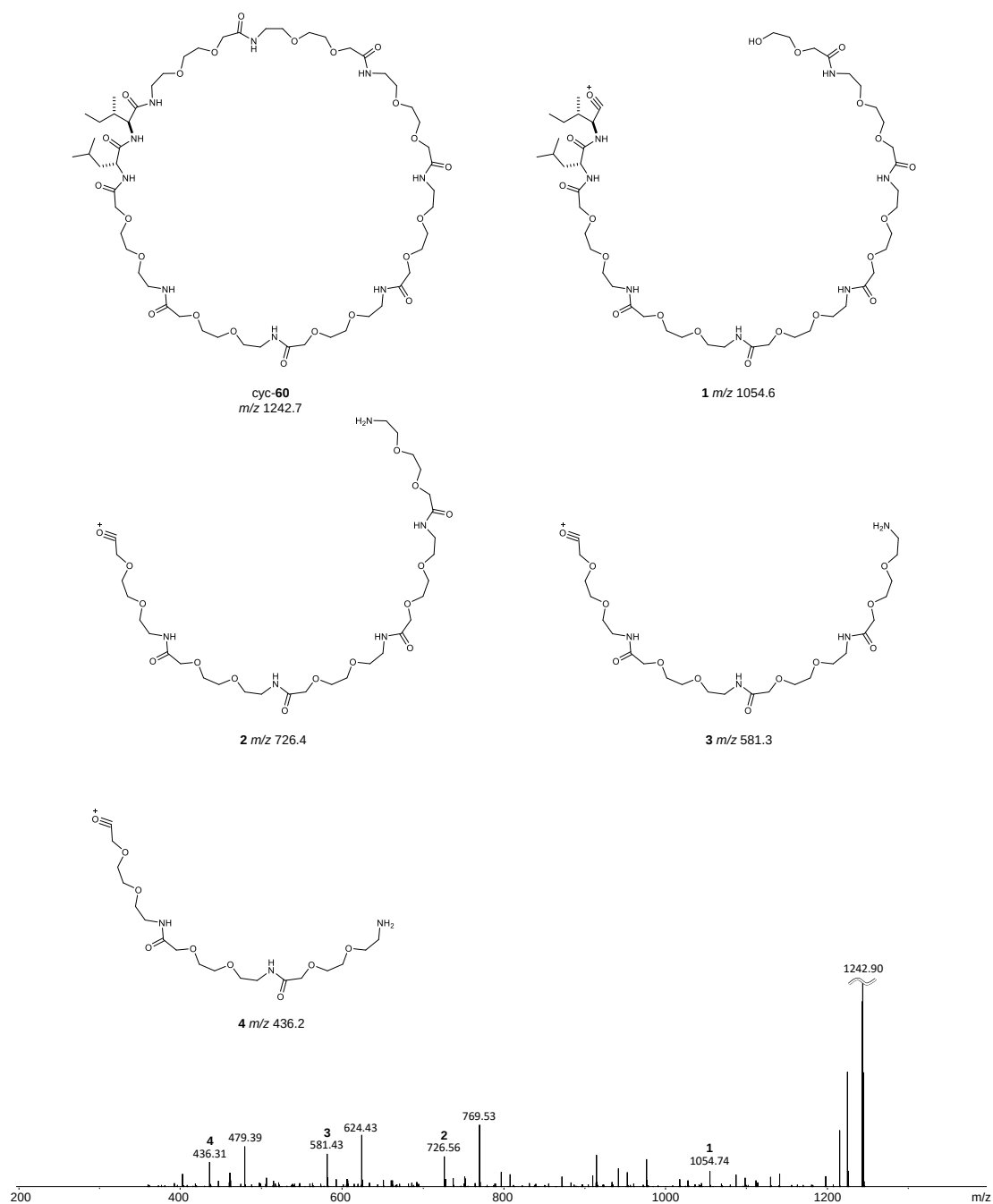


Figure S55. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-61

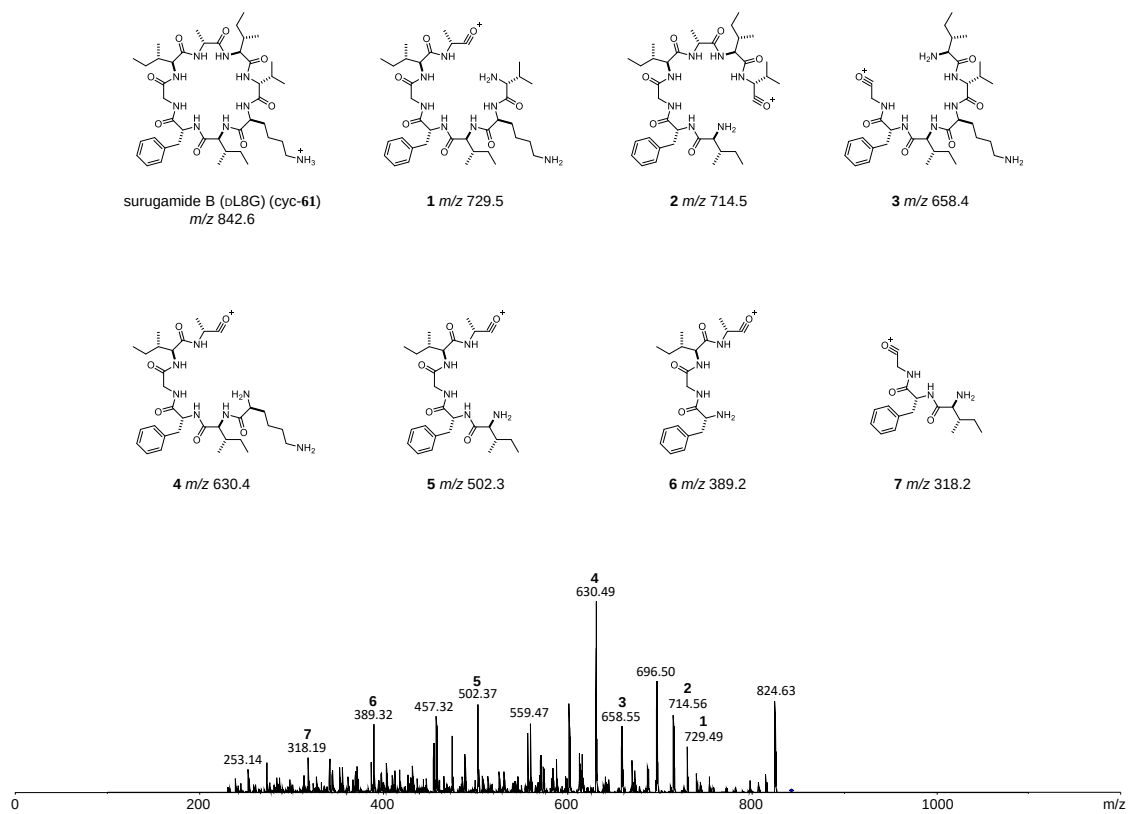


Figure S56. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (D_L8D_A)-EG (**62**)

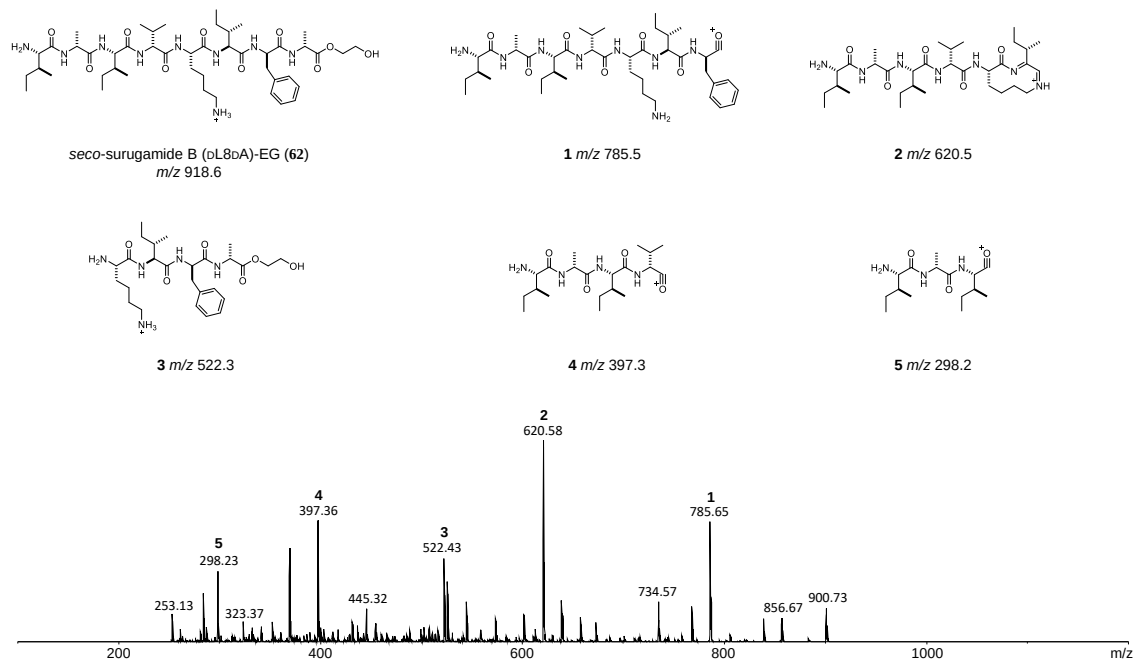


Figure S57. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-62

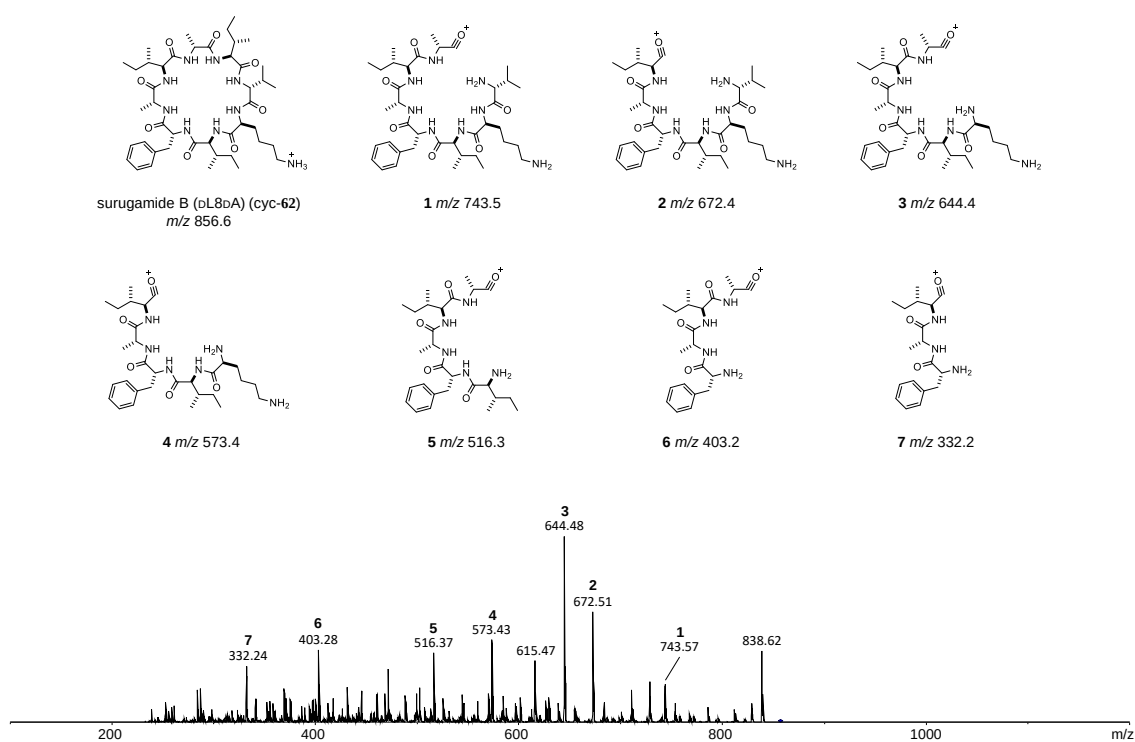


Figure S58. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (dL8dV)-EG (**63**)

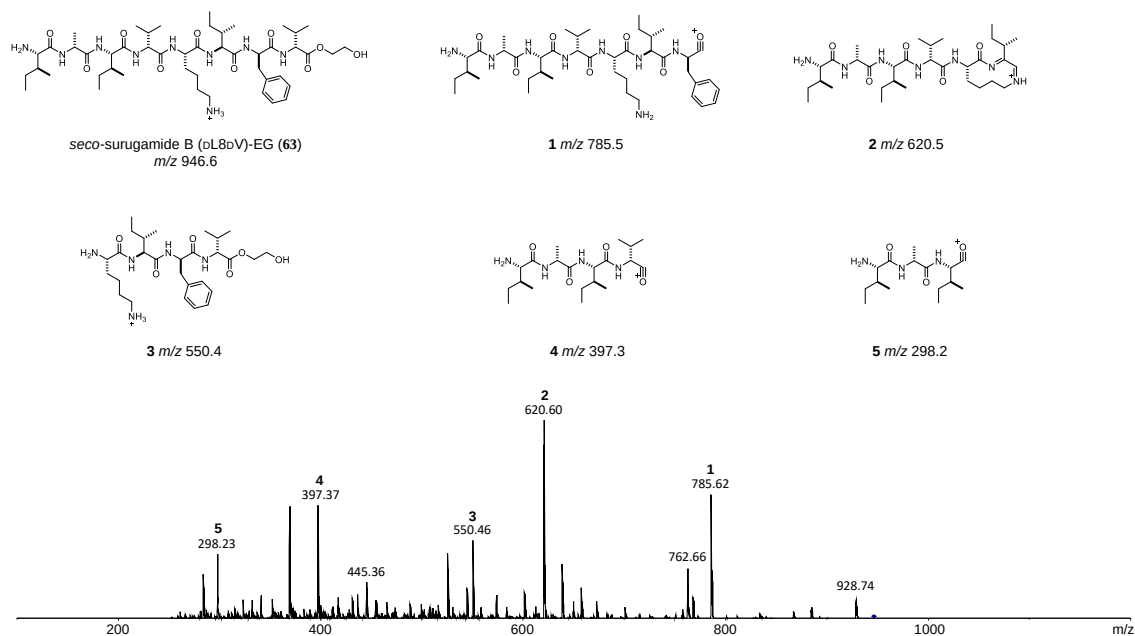


Figure S59. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-**63**

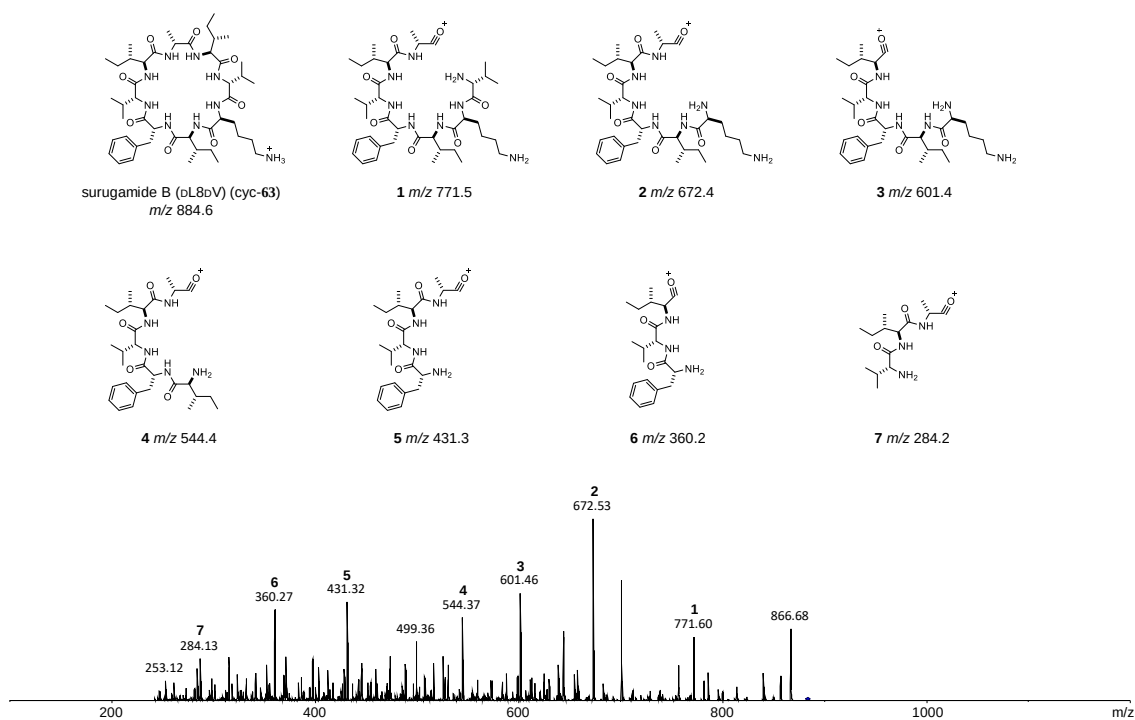


Figure S60. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (pL8dalloI)-EG (**64**)

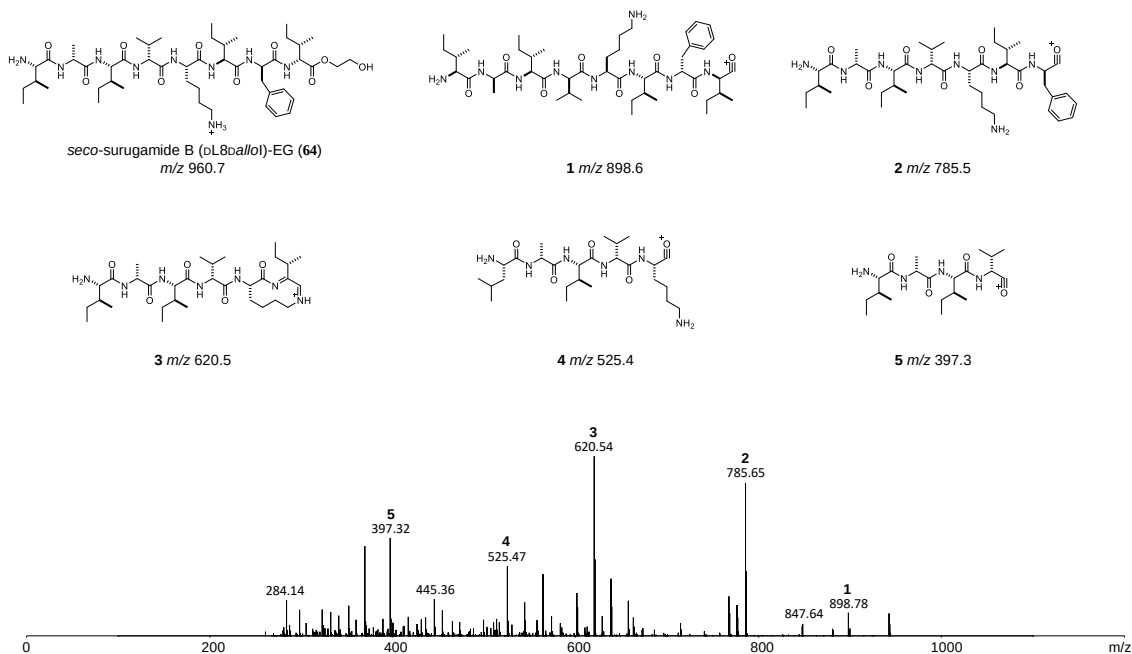


Figure S61. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-**64**

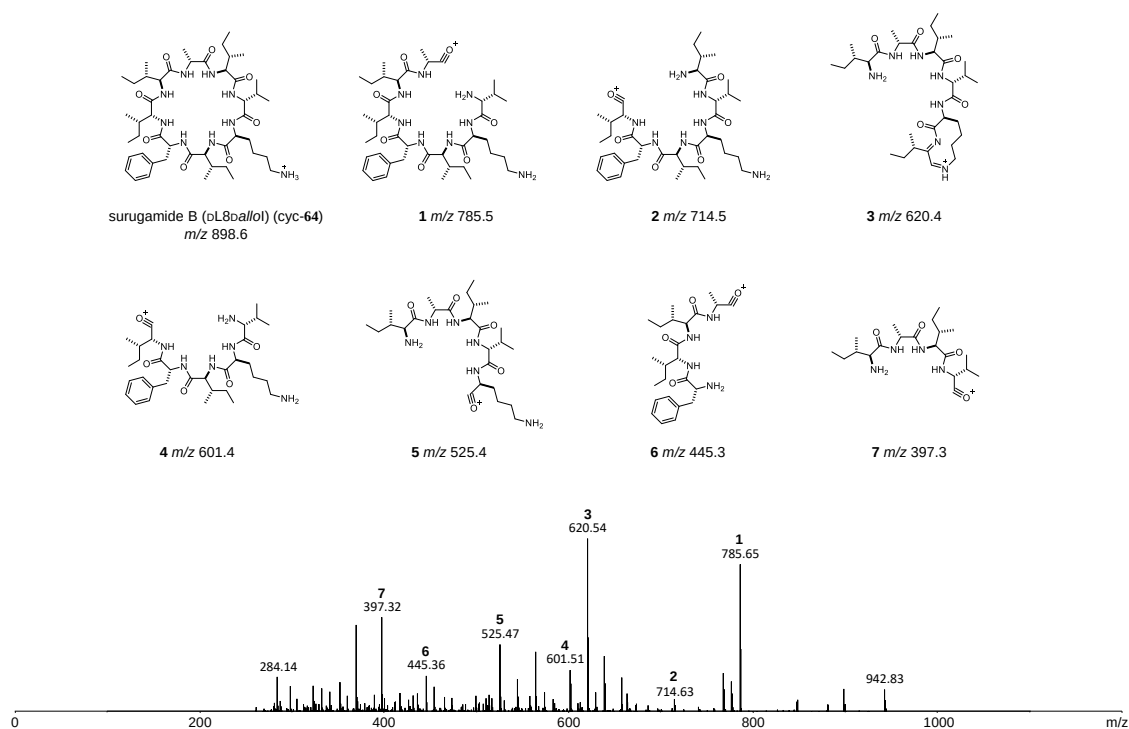


Figure S62. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (dL8dF)-EG (**65**)

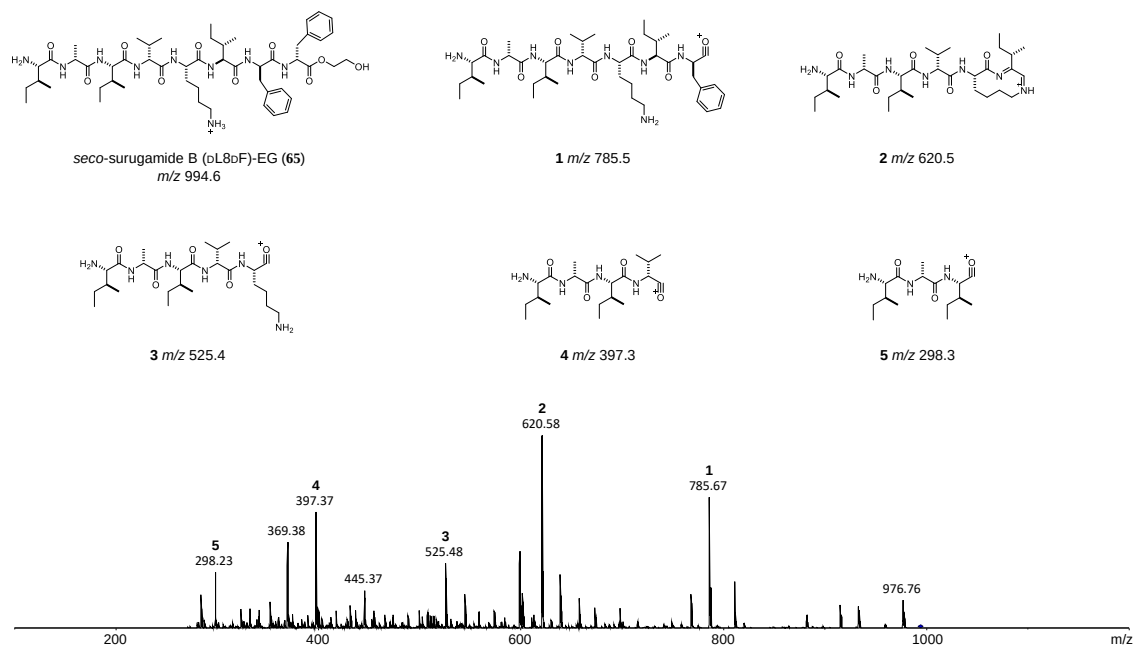


Figure S63. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-**65**

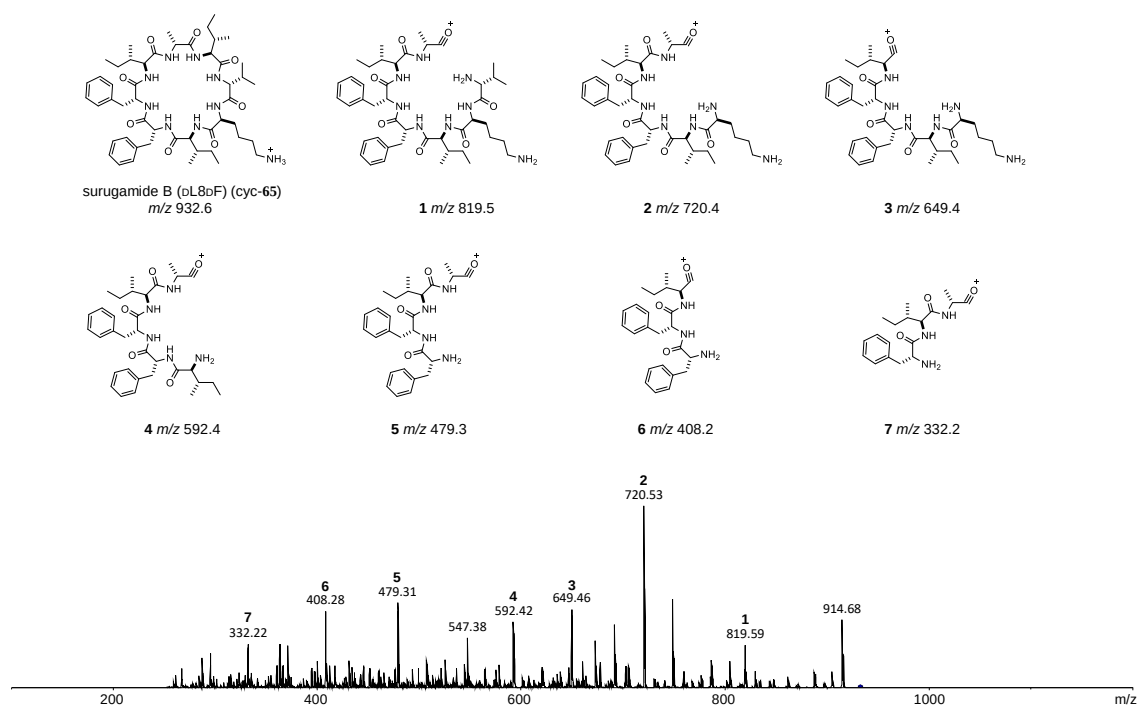


Figure S64. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (D_L8D_W)-EG (**66**)

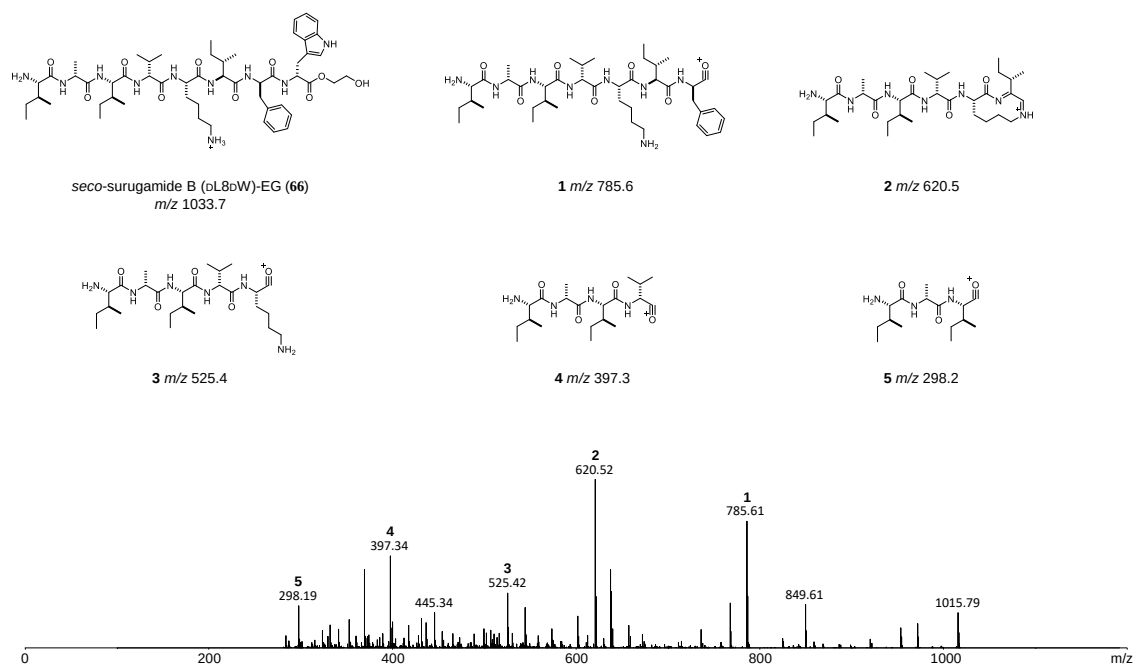


Figure S65. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-**66**

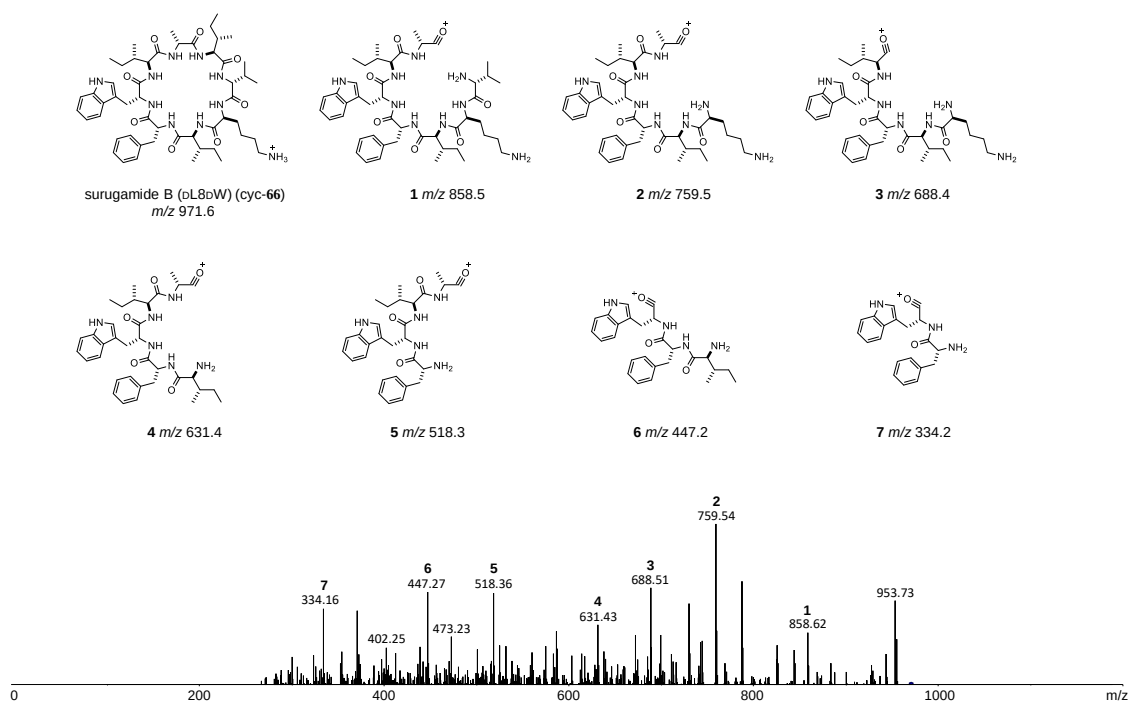


Figure S66. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (dL8dM)-EG (**67**)

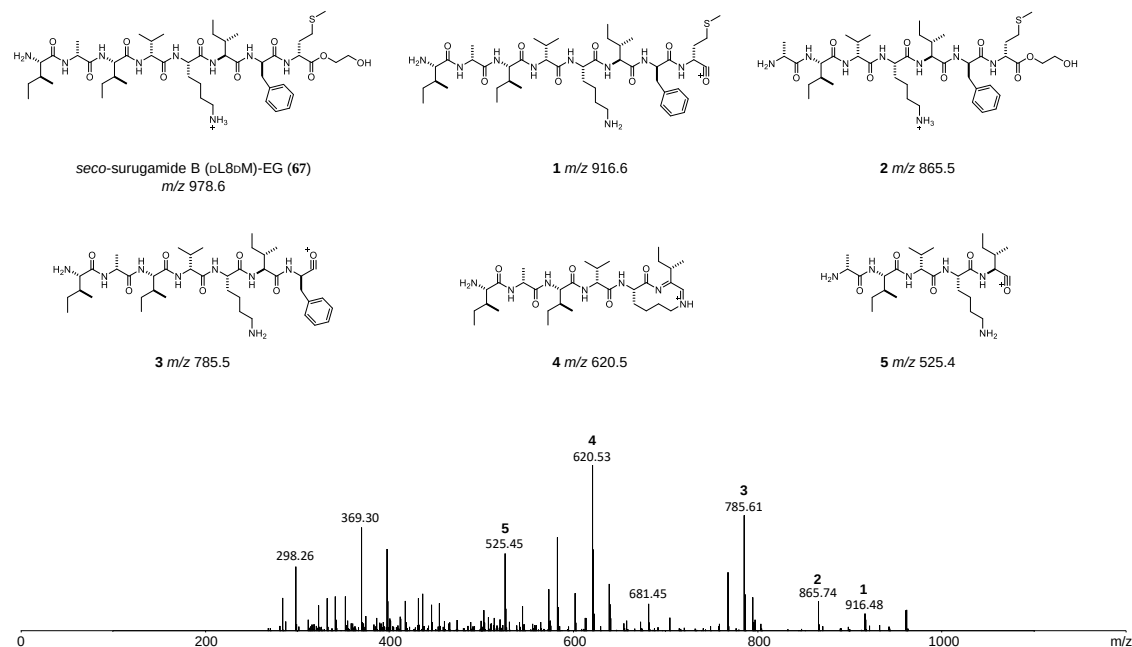


Figure S67. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-**67**

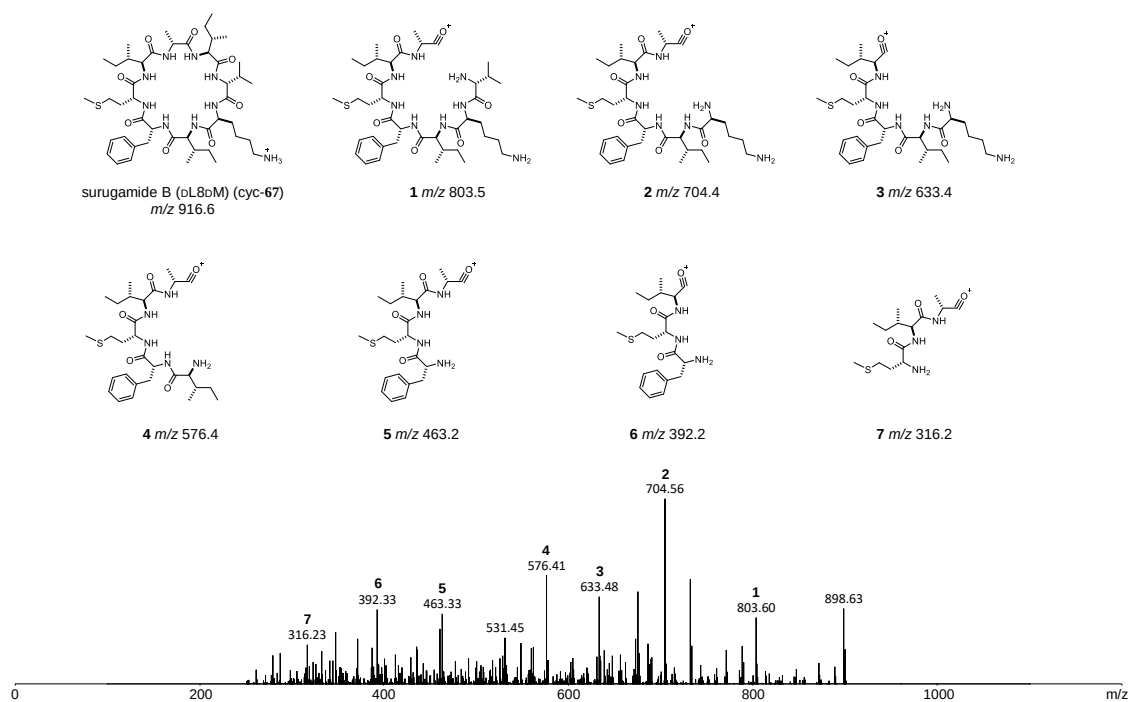


Figure S68. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (DL8DH)-EG (**68**)

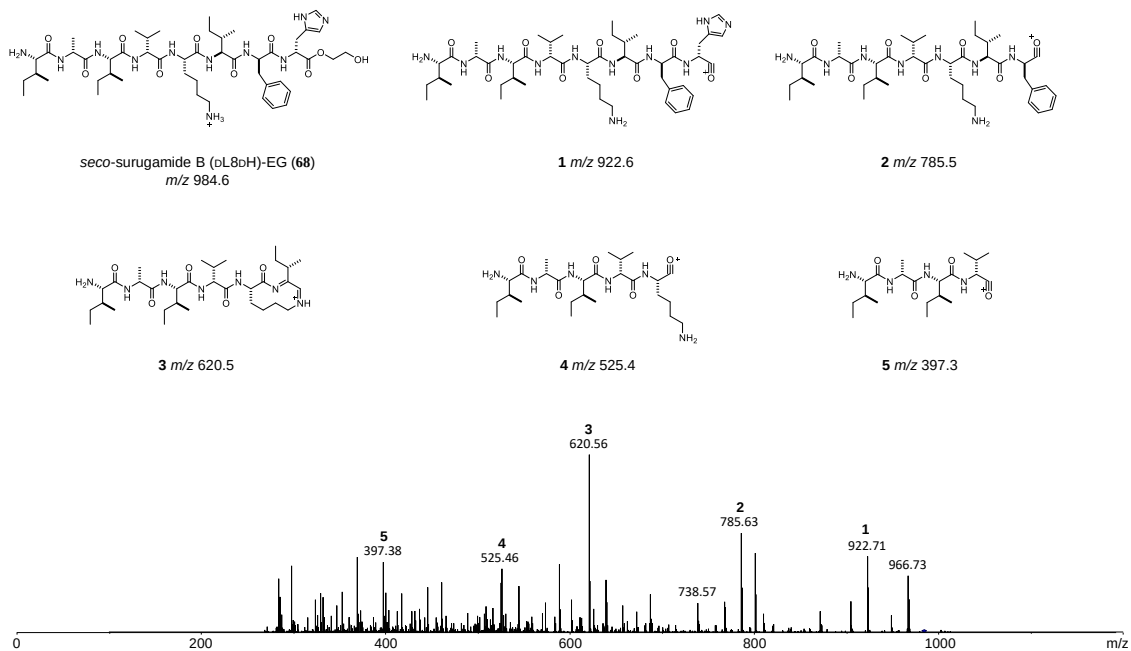


Figure S69. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-**68**

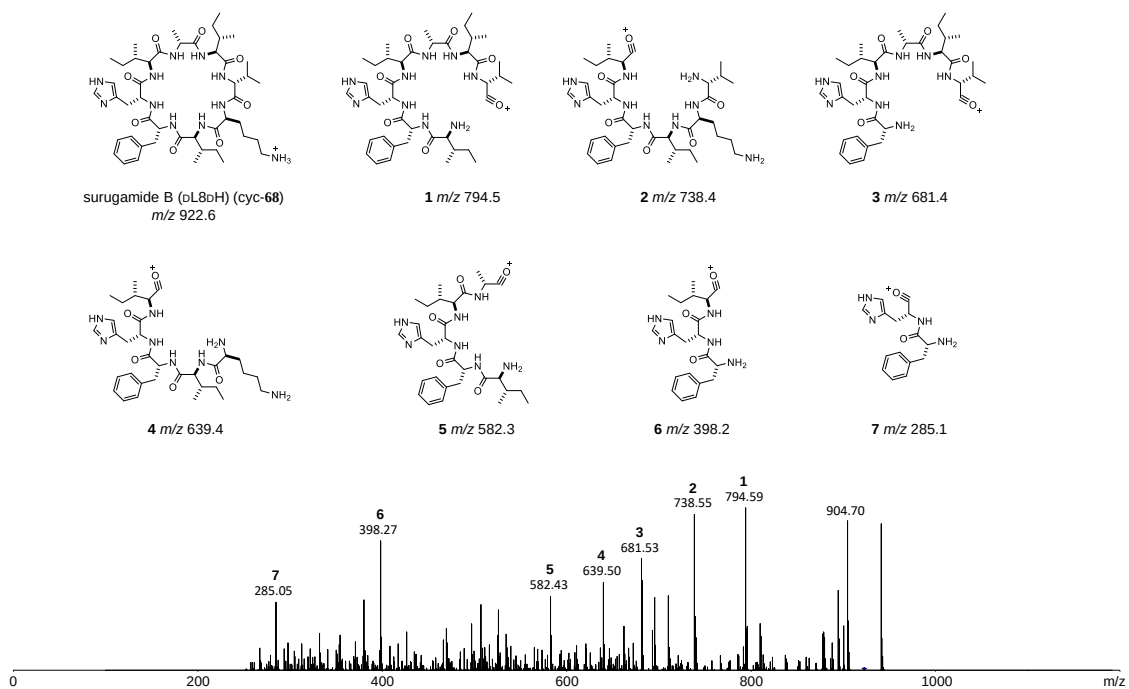


Figure S70. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (D_L8D_R)-EG (**69**)

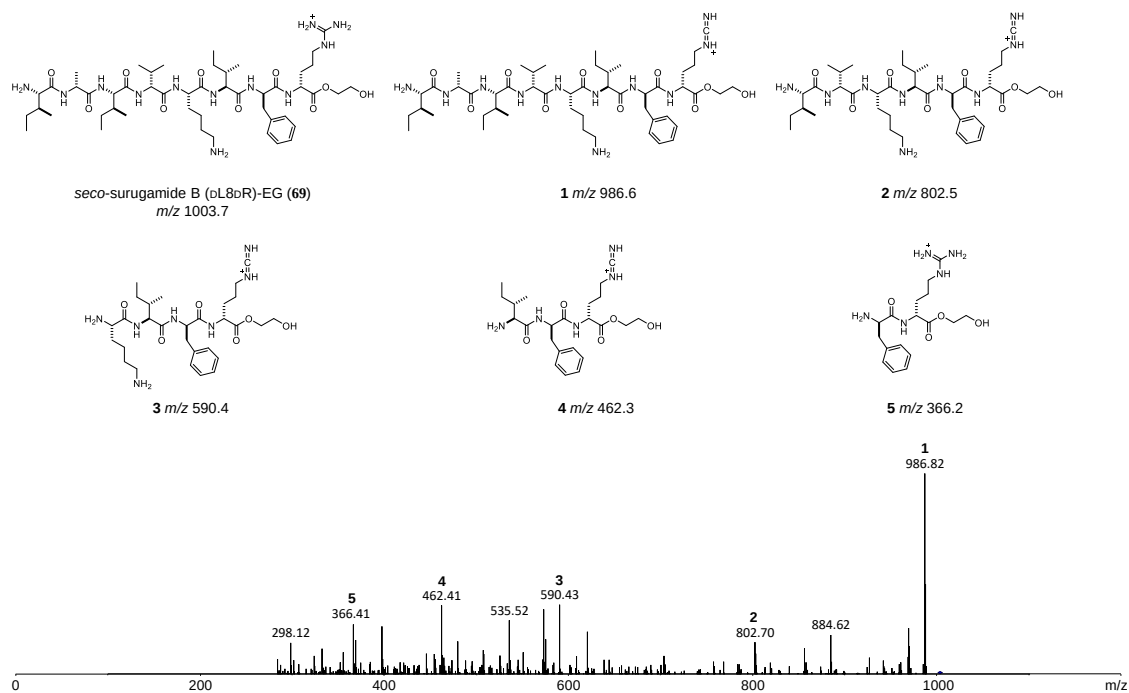


Figure S71. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-**69**

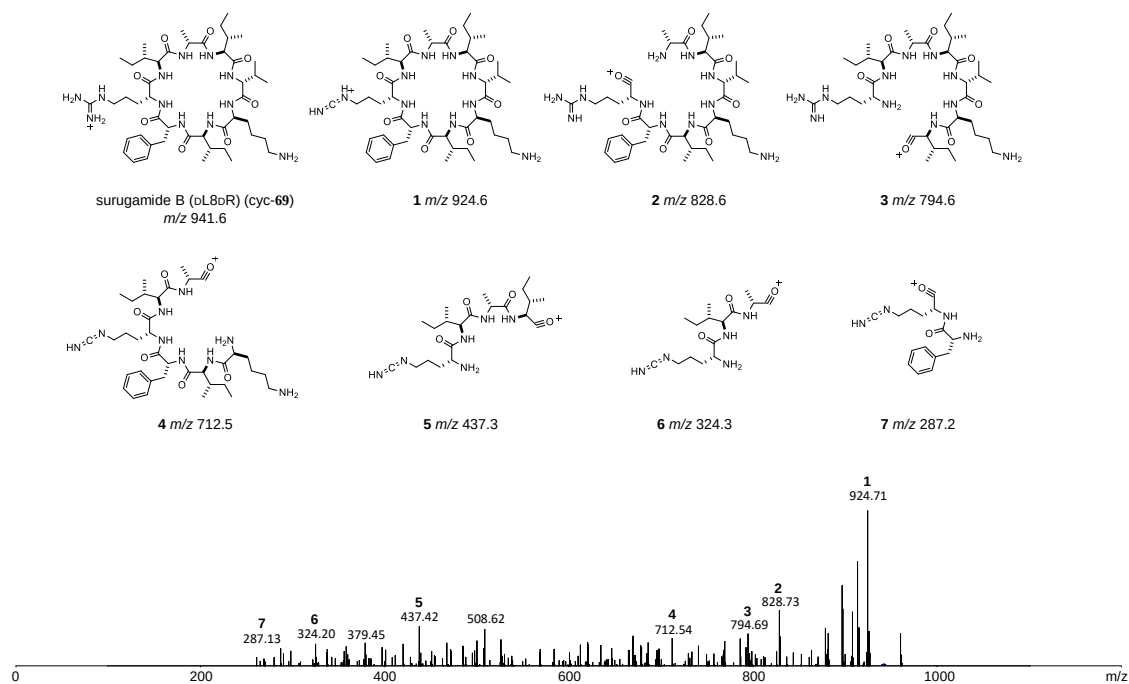


Figure S72. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (D_L8D_K)-EG (70)

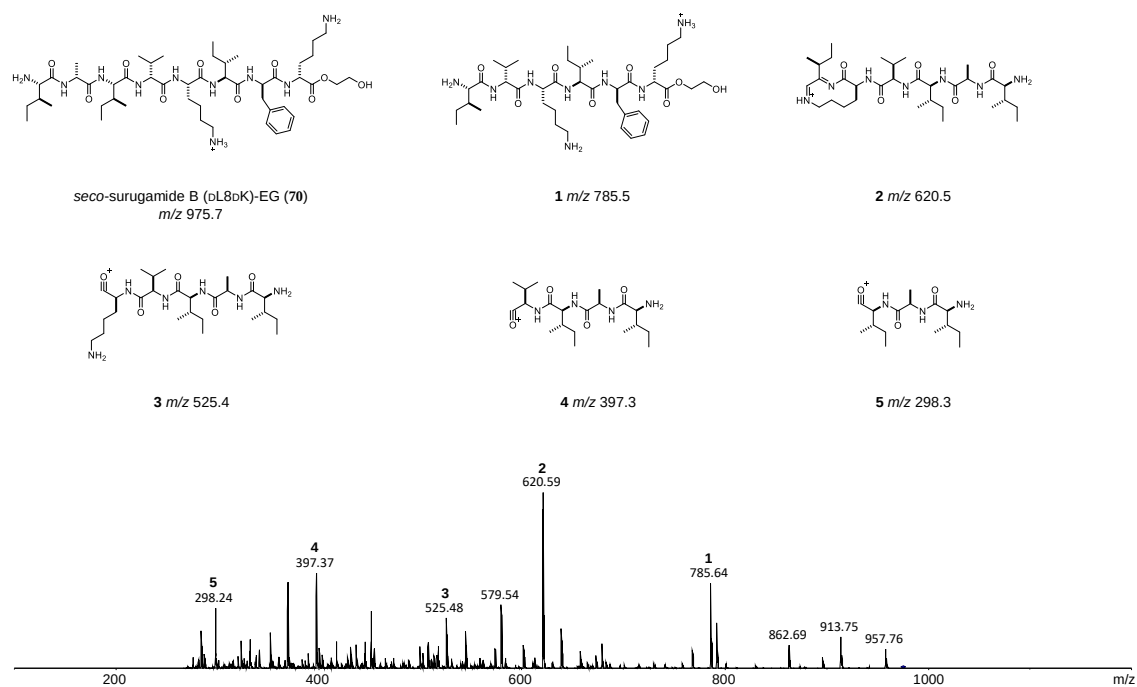


Figure S73. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-70

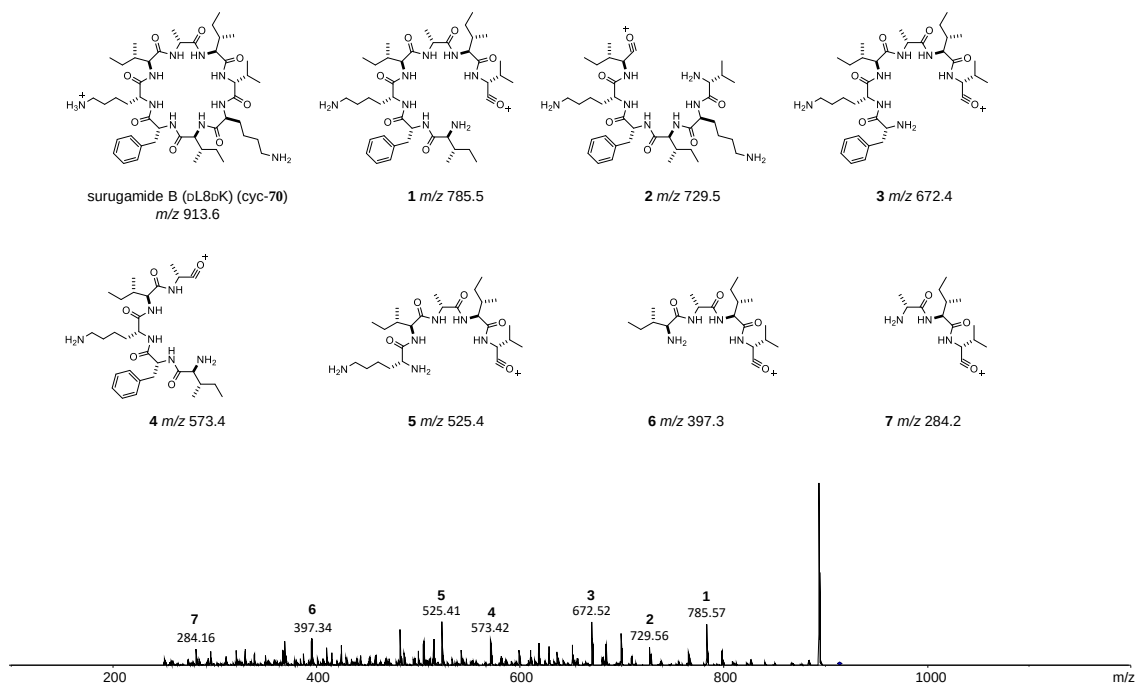


Figure S74. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (dL8dS)-EG (71)

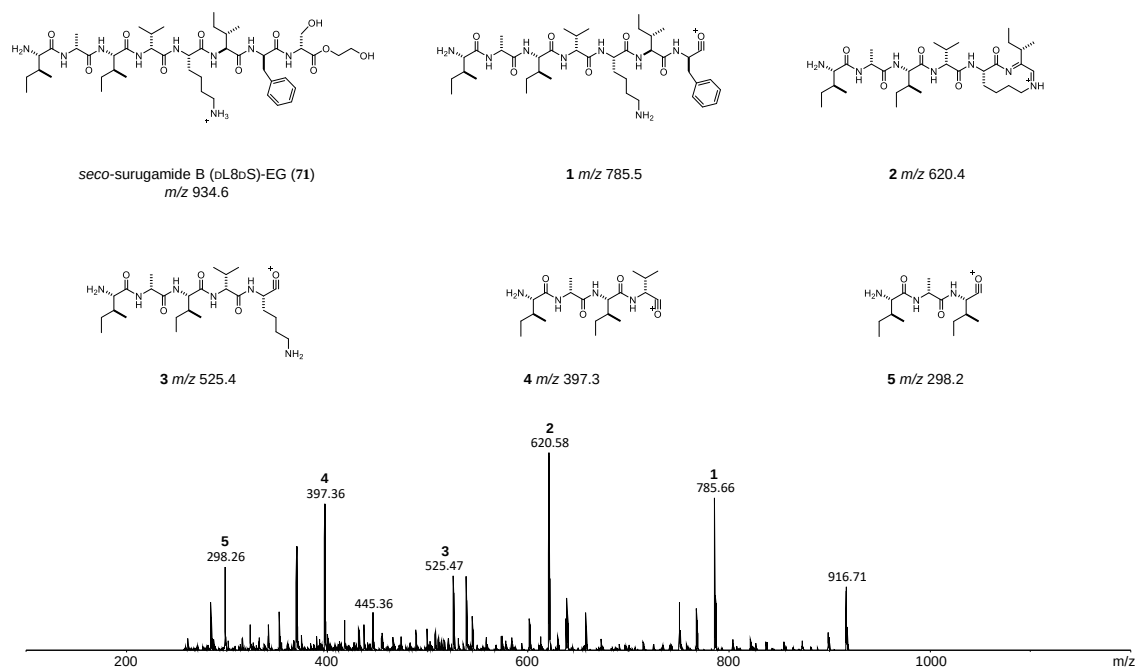


Figure S75. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-71

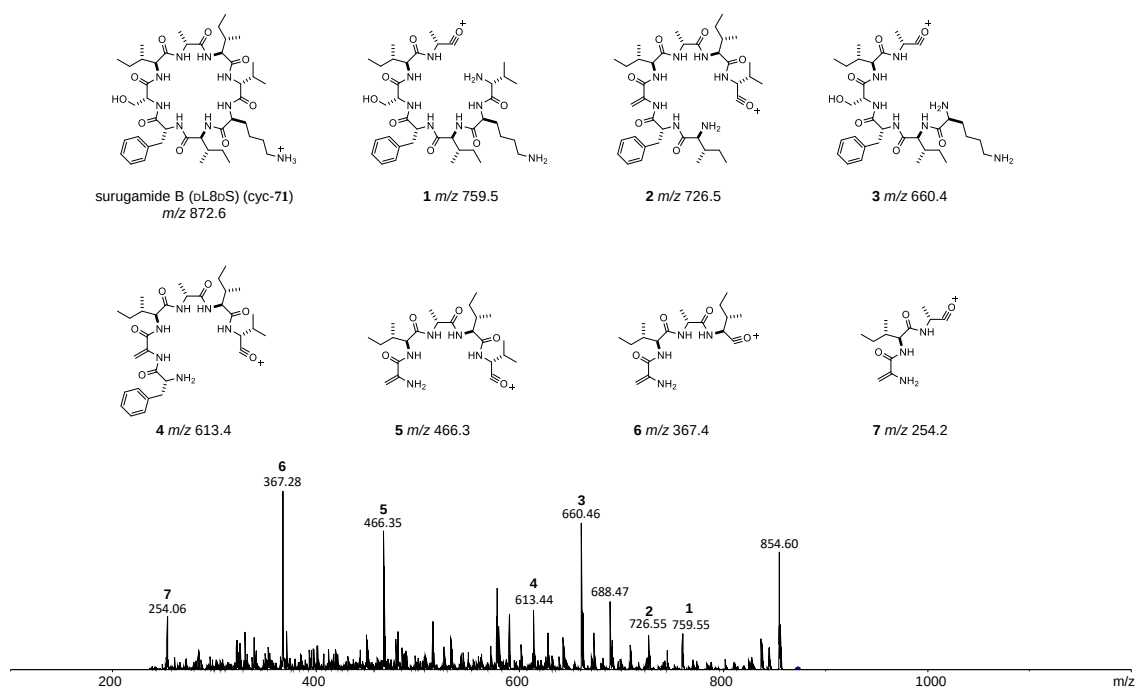


Figure S76. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (dL8dT)-EG (72)

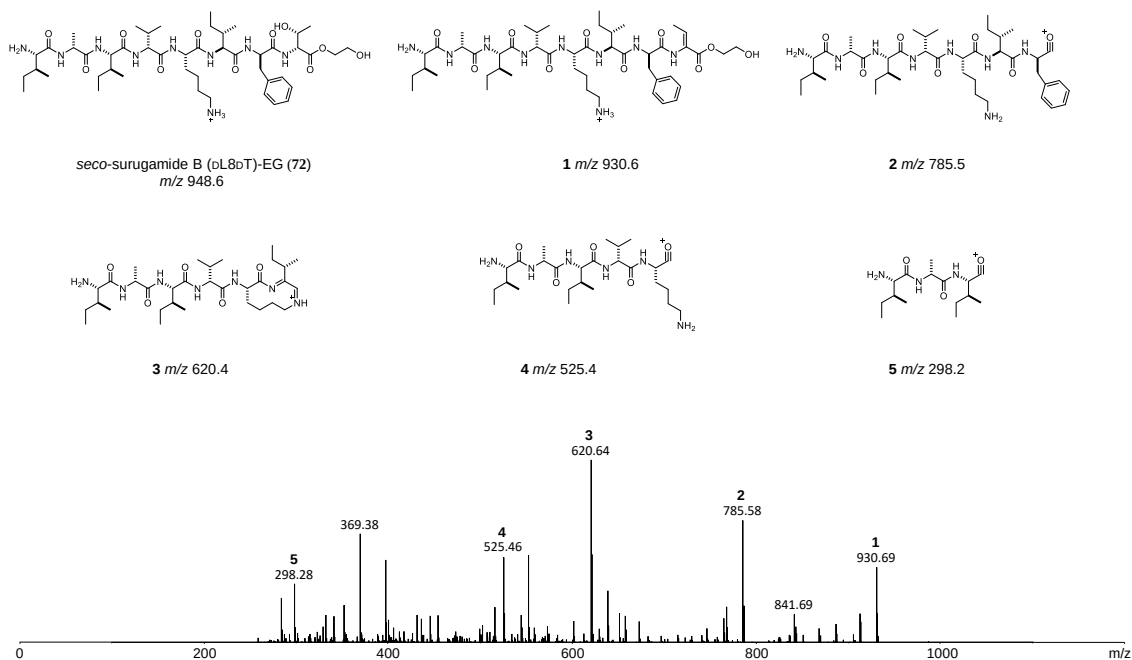


Figure S77. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-72

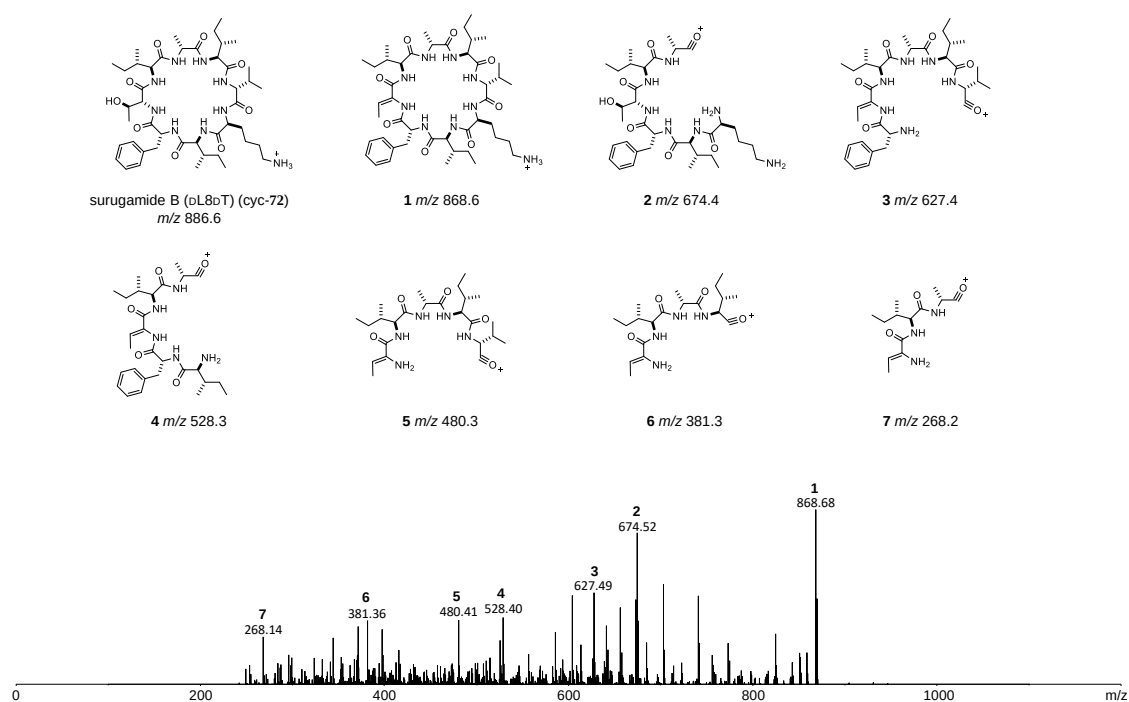


Figure S78. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (dL8dY)-EG (73)

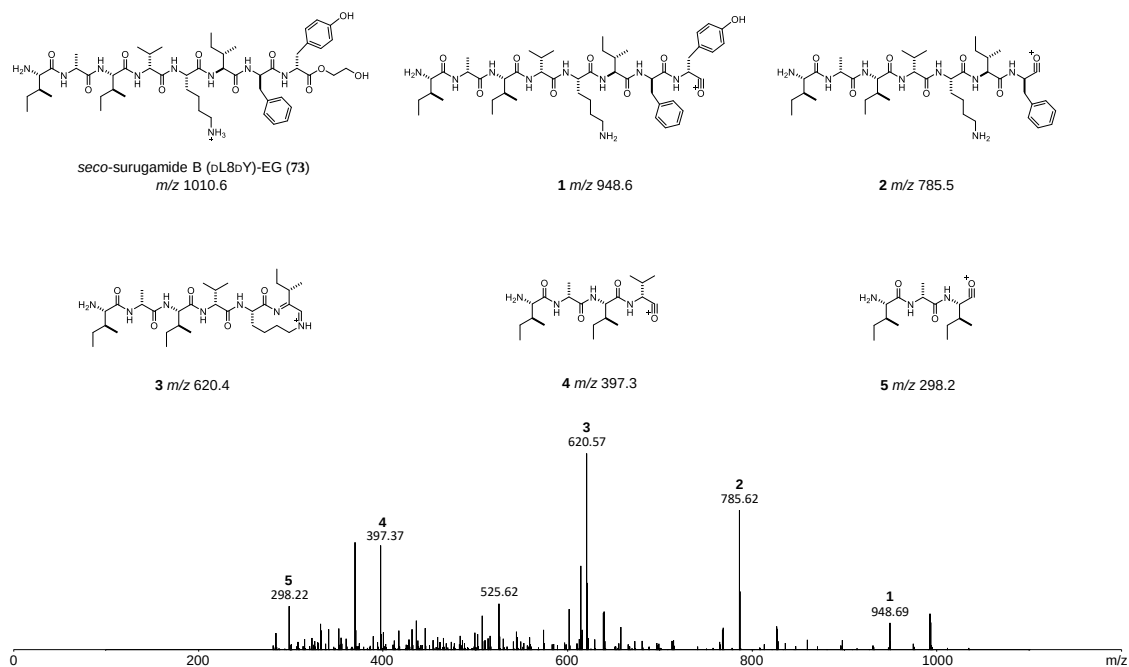


Figure S79. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-73

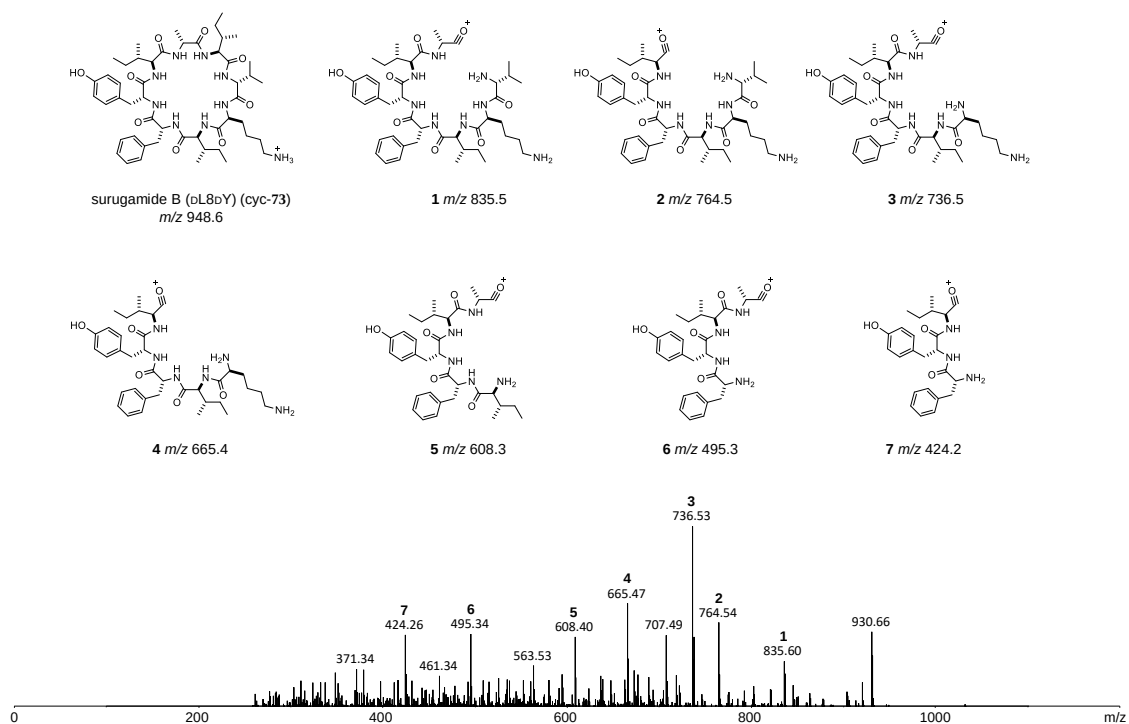


Figure S80. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (D_L8_DD)-EG (74)

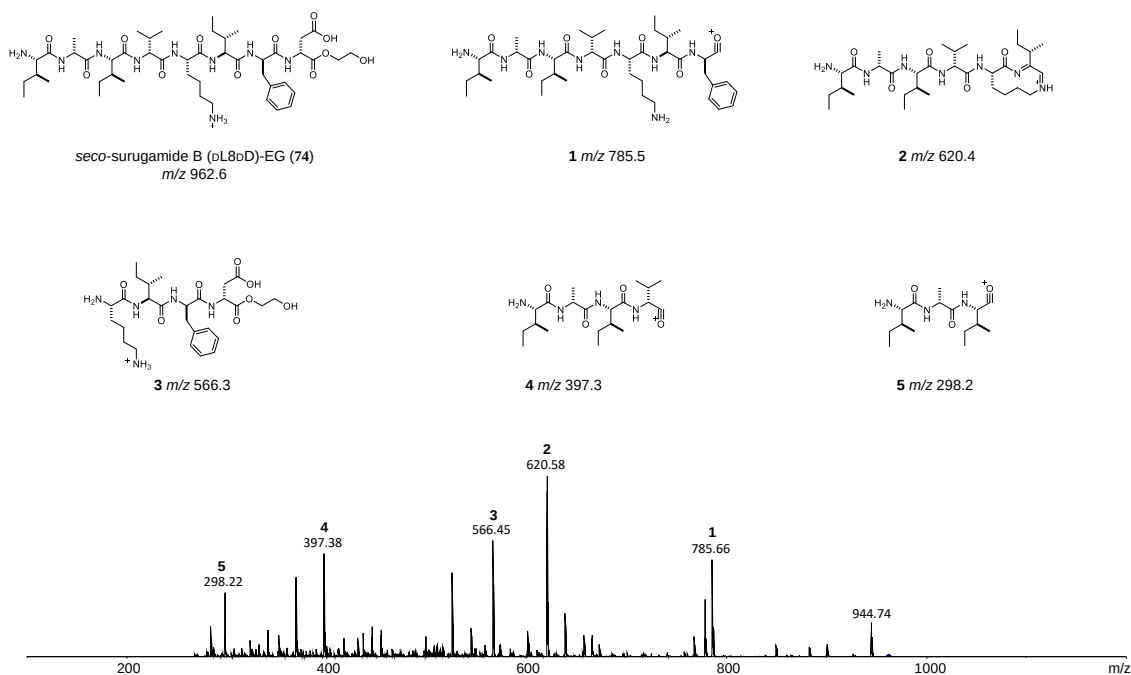


Figure S81. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (D_L8_DE)-EG (75)

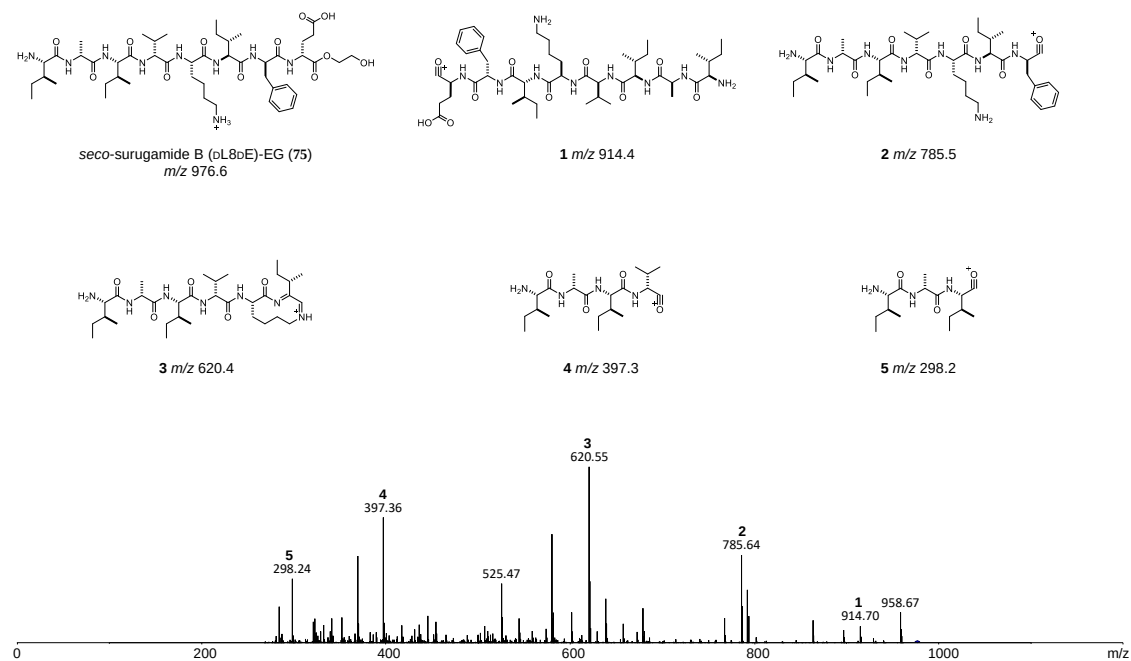


Figure S82. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (dL8dN)-EG (**76**)

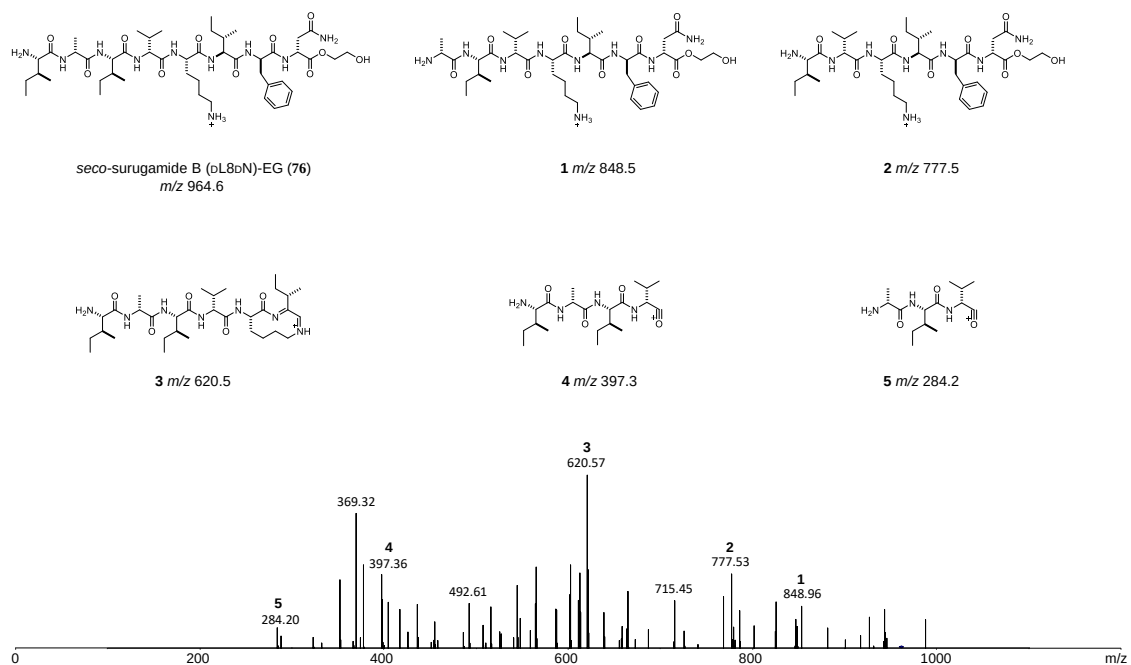


Figure S83. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (DL8DQ)-EG (77)

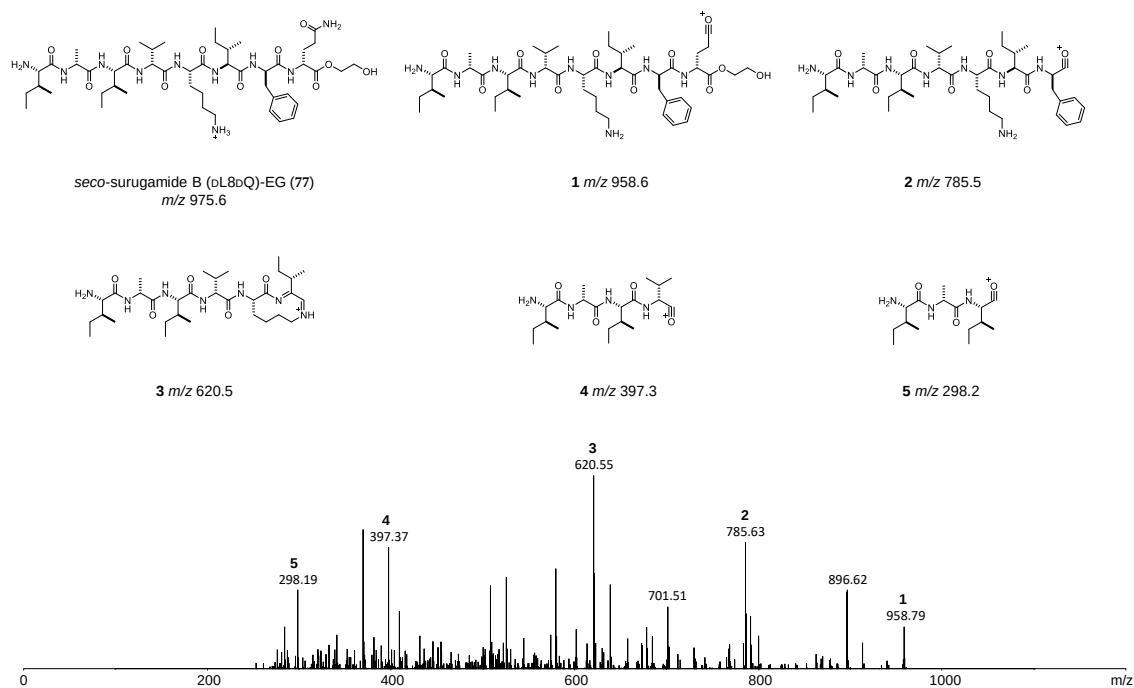


Figure S84. MS/MS spectrum for the enzymatic product cyc-77

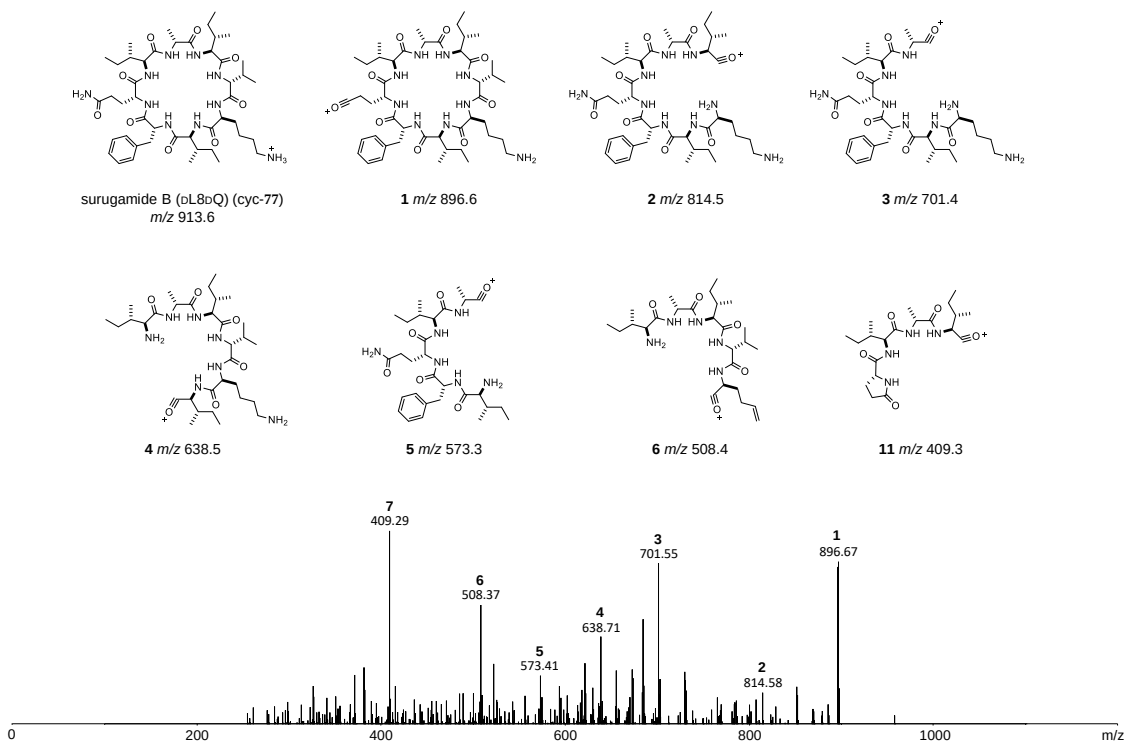


Figure S85. MS/MS spectrum for the enzymatic product, deoxypentaminomycin C (**78**)

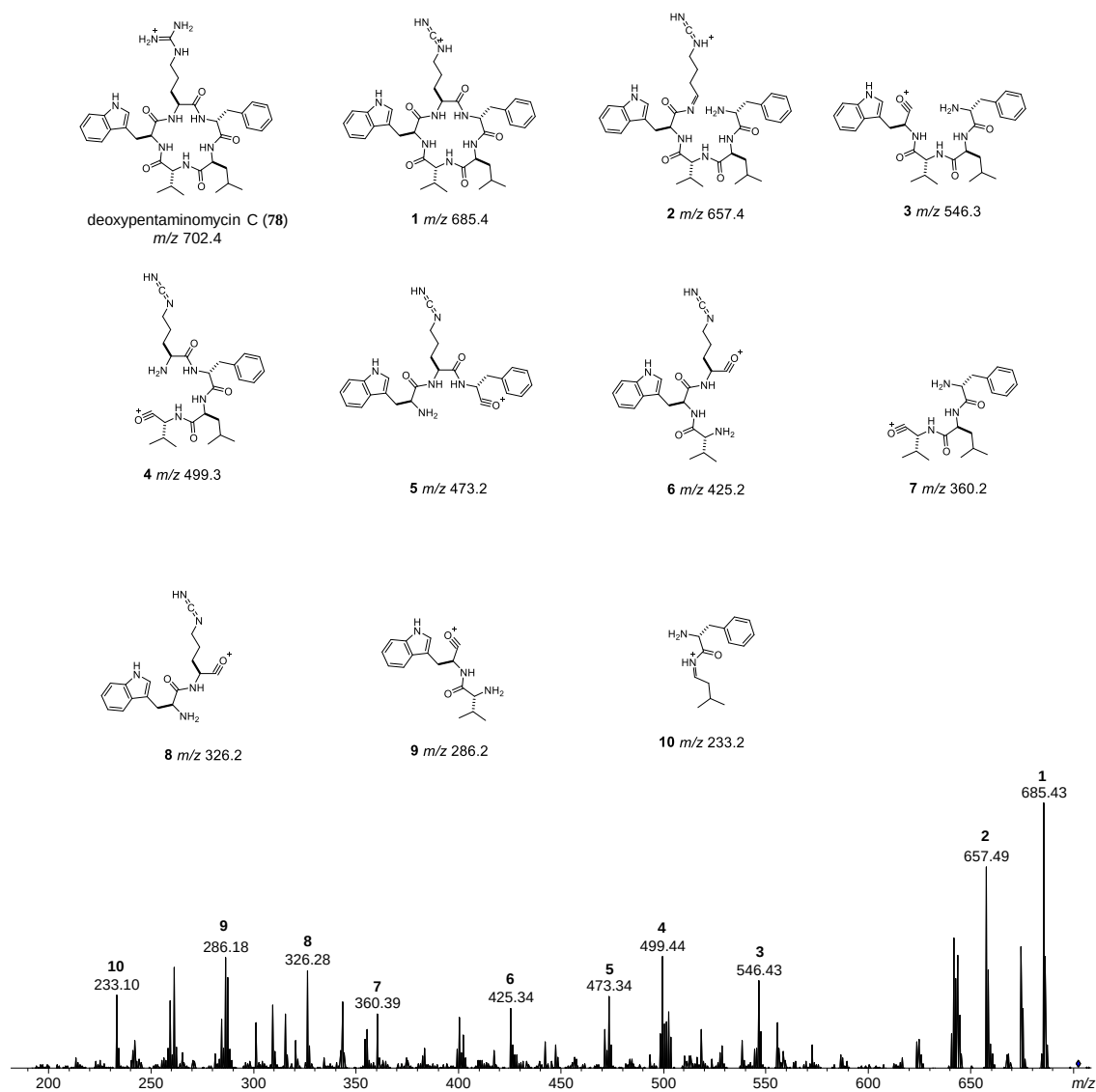


Figure S86. MS/MS spectrum for the enzymatic product, desprenylagaramide C (**79**)

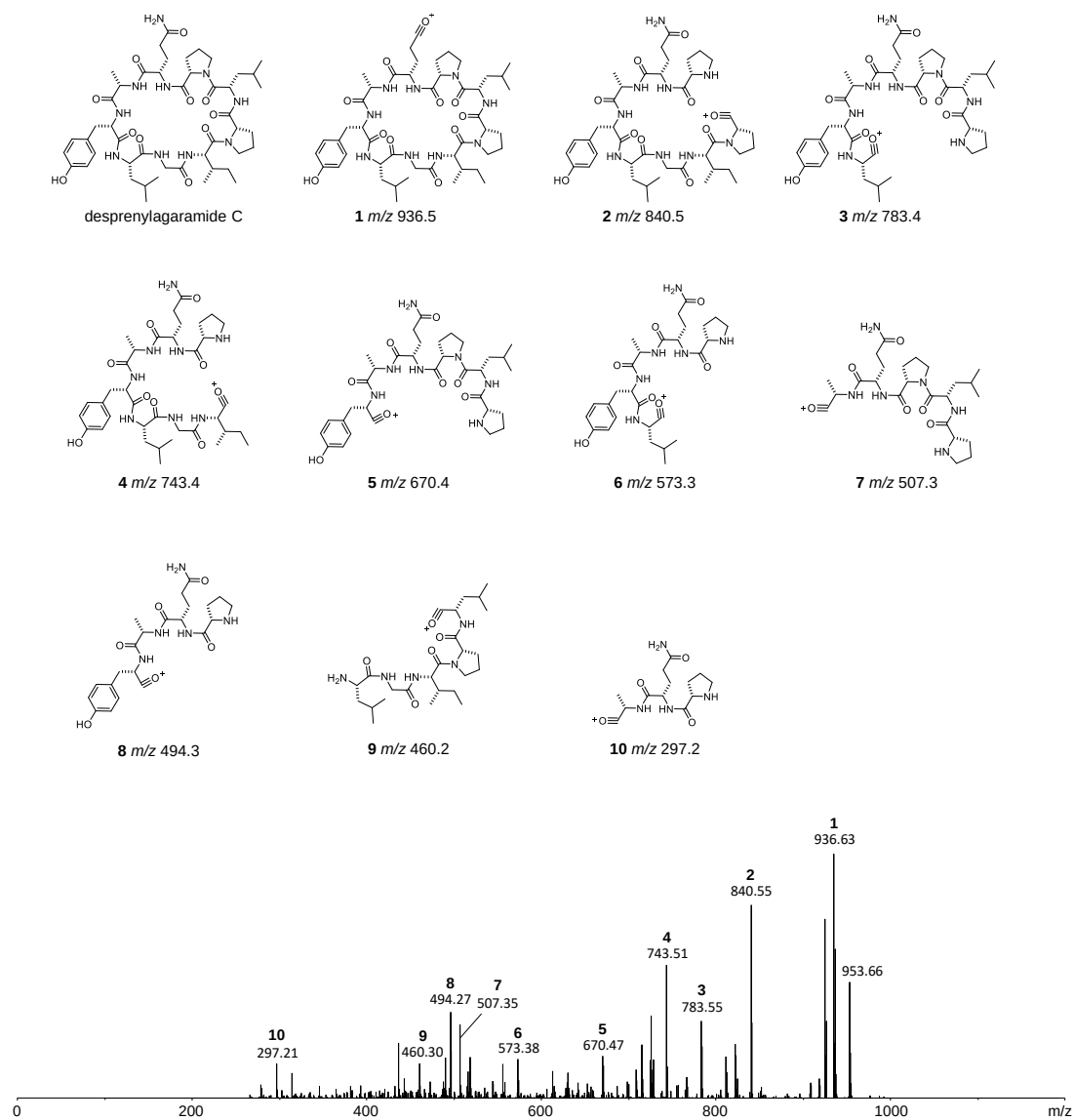


Figure S87. MS/MS spectrum for *seco*-desotamide B-EG (**84**)

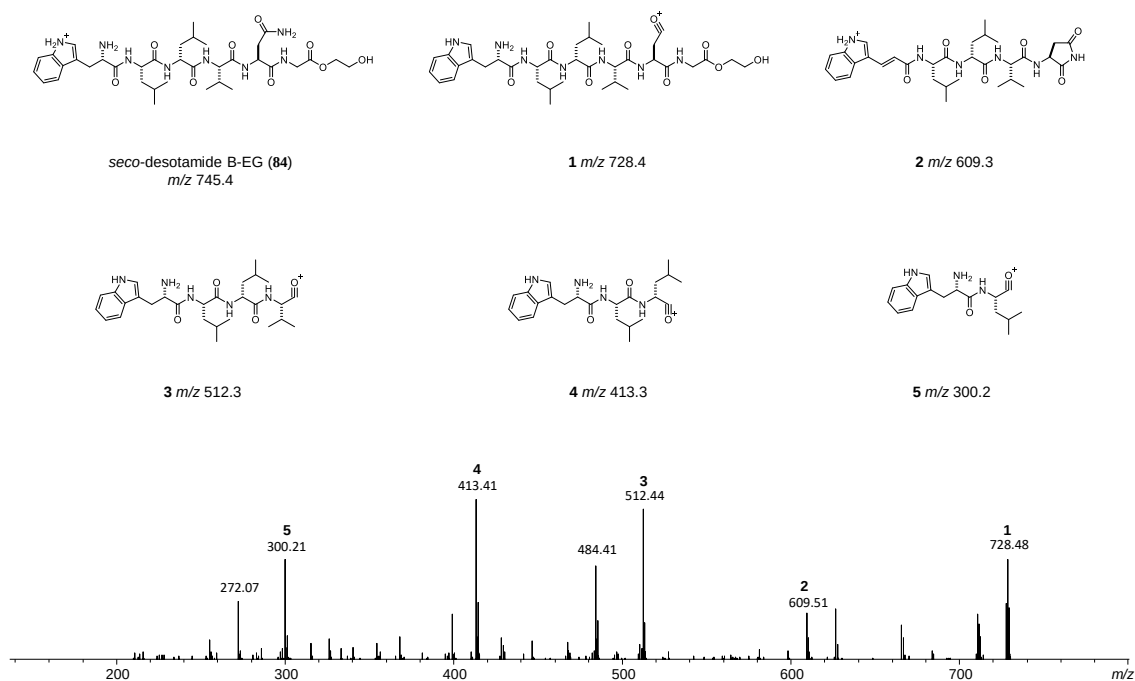


Figure S88. MS/MS spectrum for the enzymatic product, desotamide B (**82**)

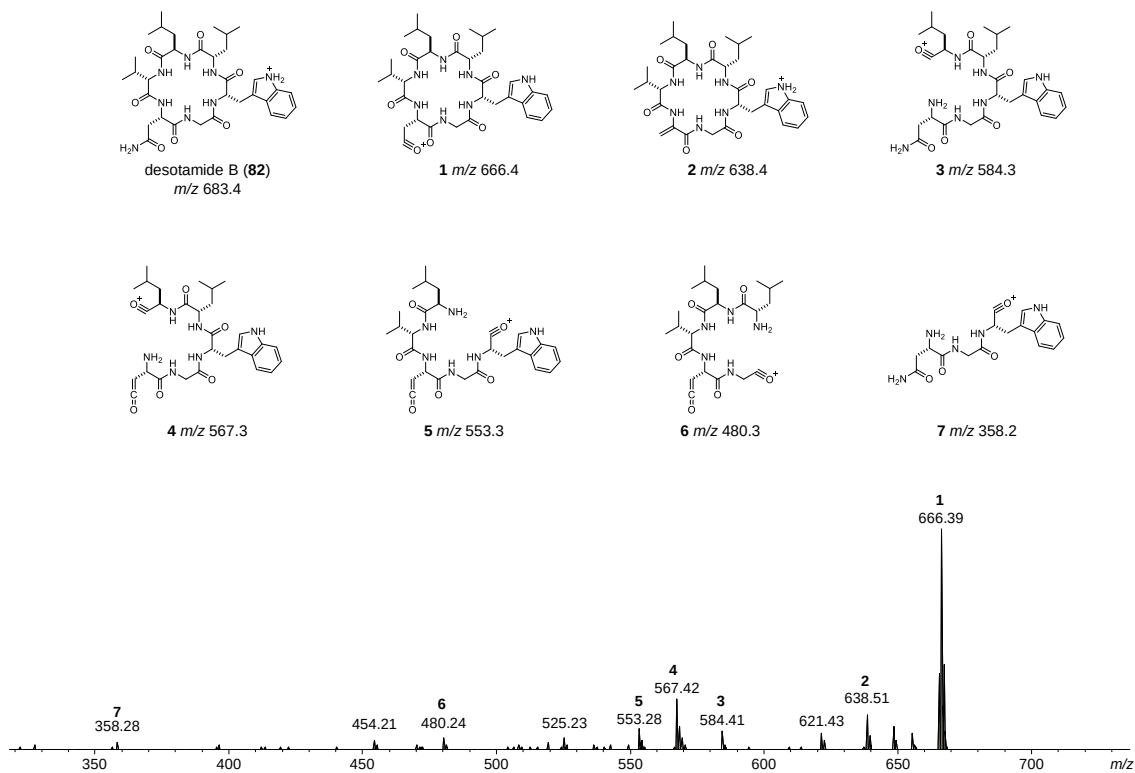


Figure S89. MS/MS spectrum for the enzymatic product, wollamide B1 (**83**)

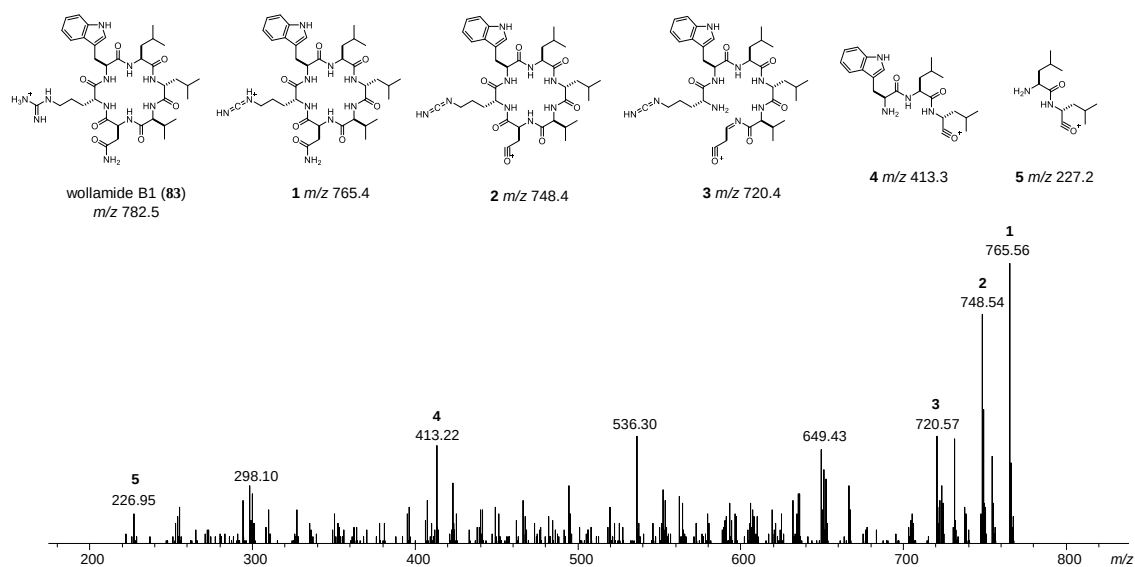


Figure S90. MS/MS spectrum for the enzymatic product, tyrocidine A-COOH (hyd-**87**)

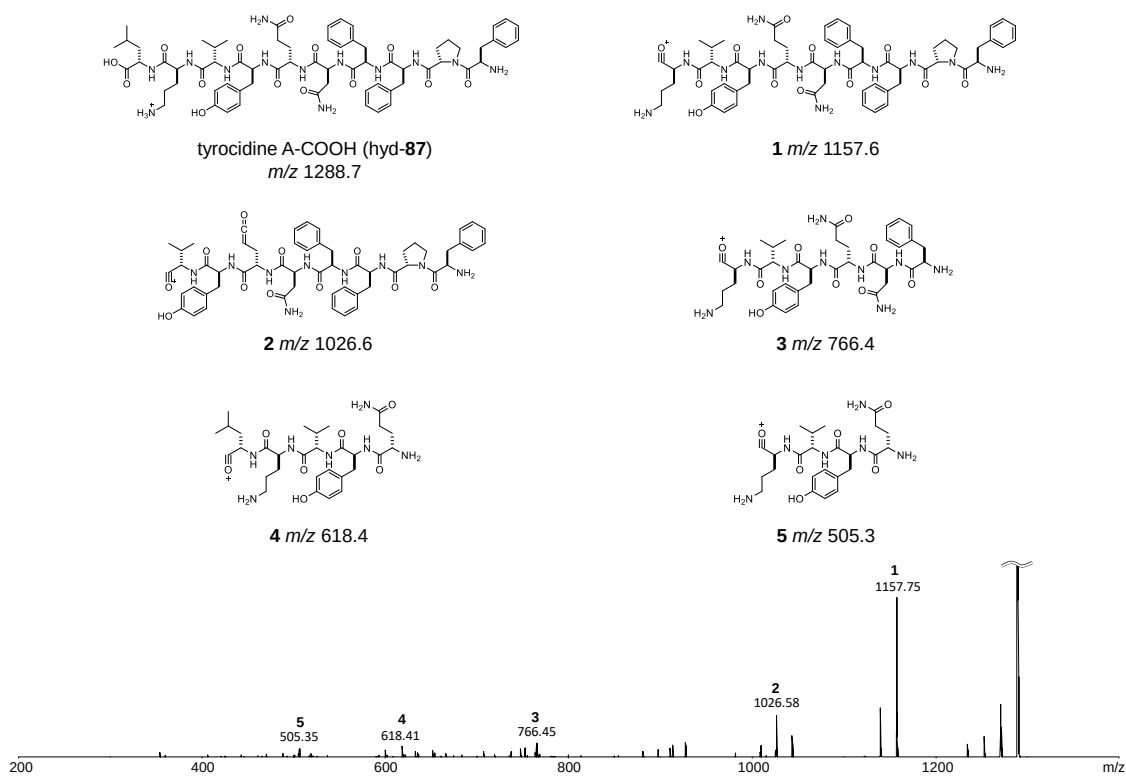


Figure S91. MS/MS spectrum for the enzymatic product, tyrocidine A (**86**)

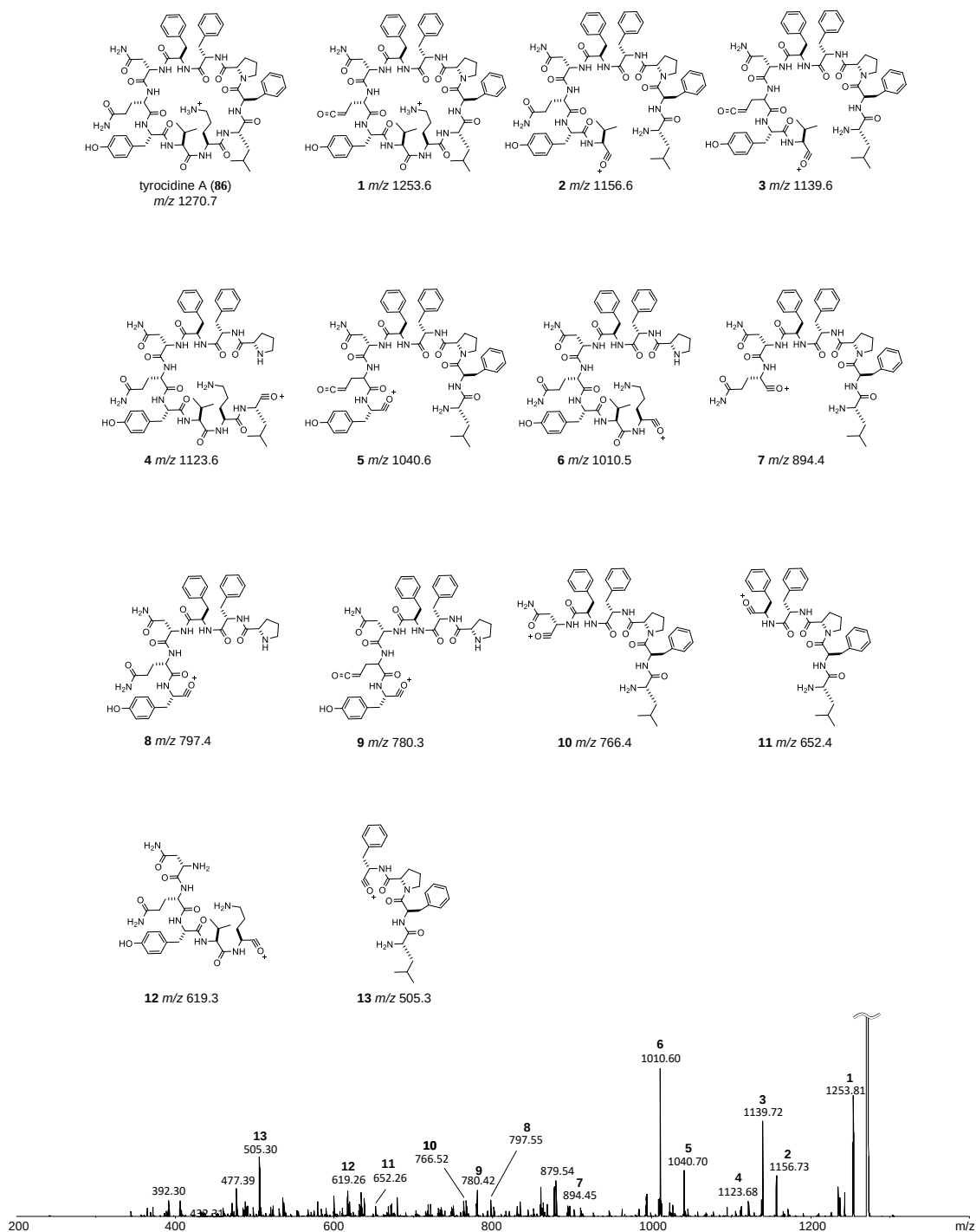


Figure S92. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (I3K(I-NH₂))-EG (**95**)

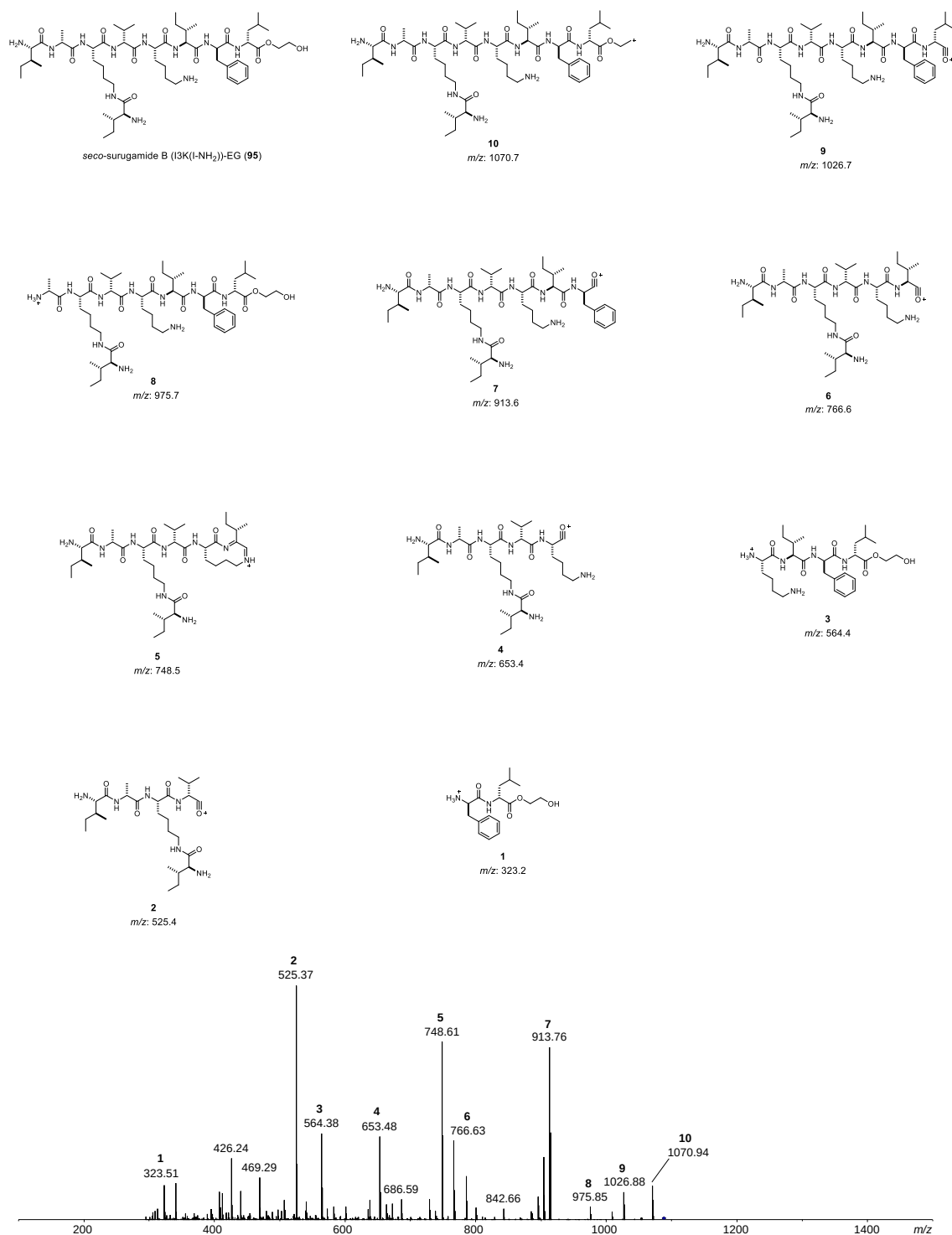


Figure S93. MS/MS spectrum for *N*-acetyl *seco*-surugamide B (I1K(I-NH₂))-EG (**98**)

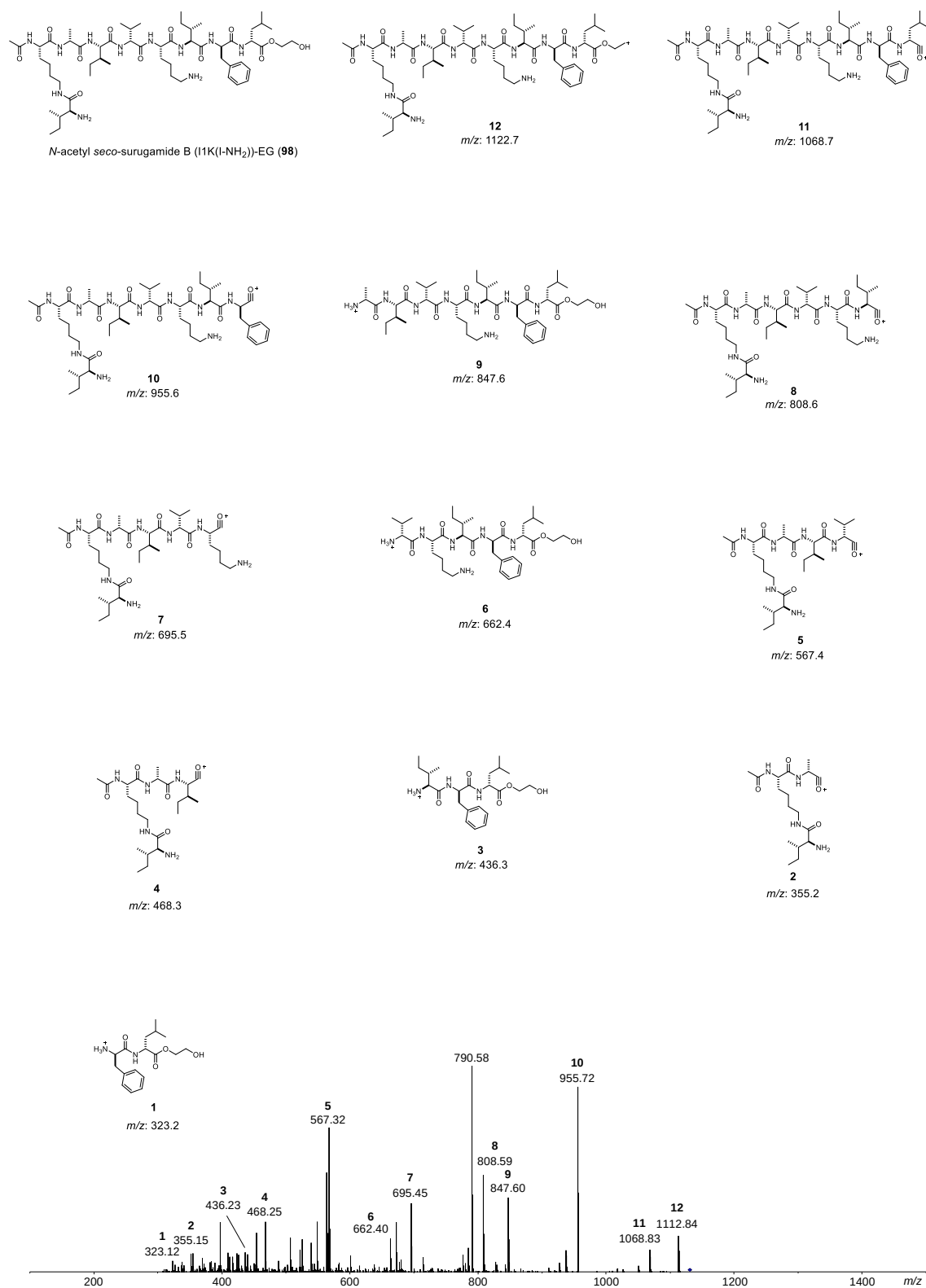


Figure S94. MS/MS spectrum for the enzymatic product, head-to-side chain cyc-98

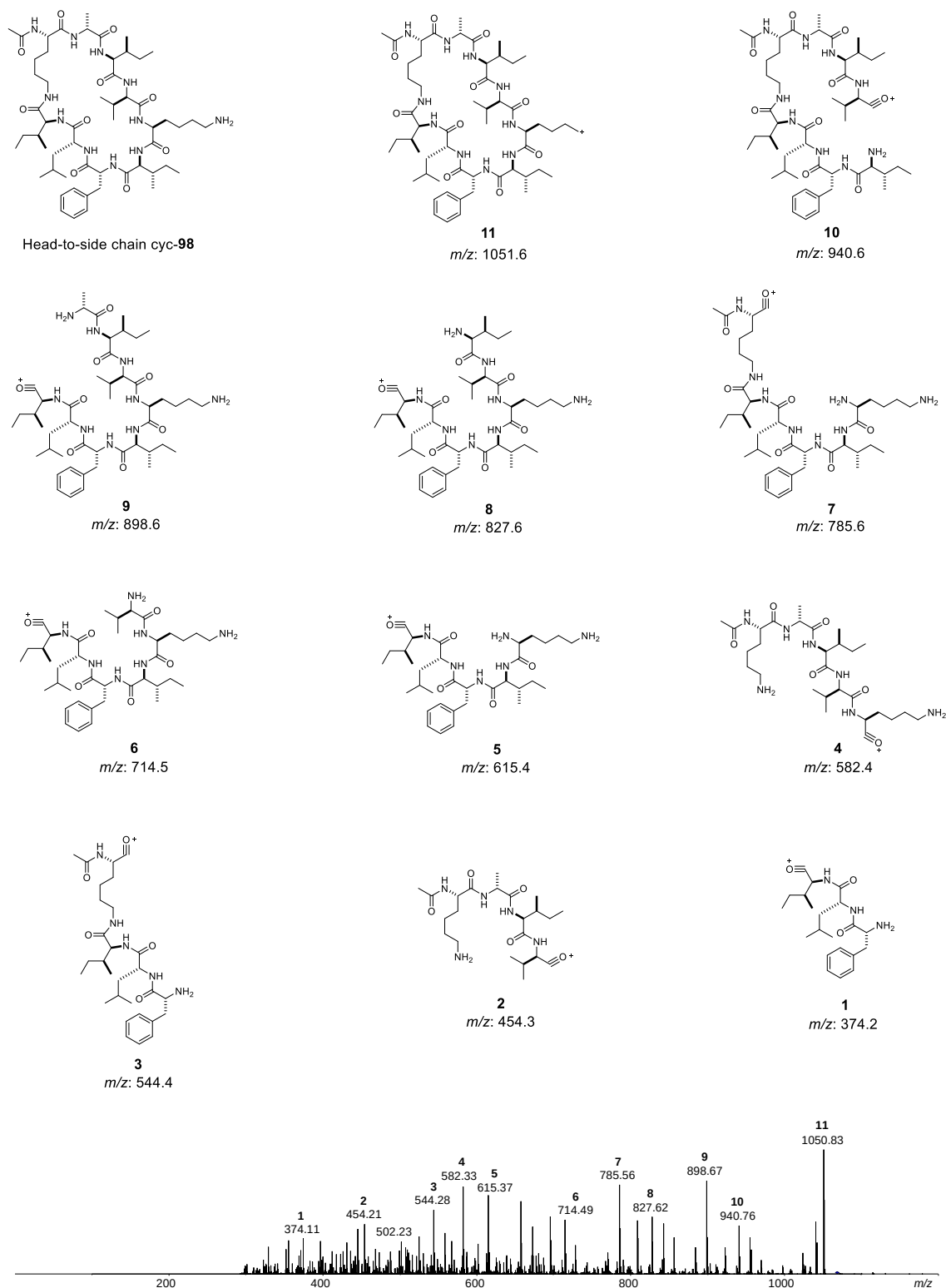


Figure S95. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (I1D_V, D_A2K(I-NH₂))-EG (**99**)

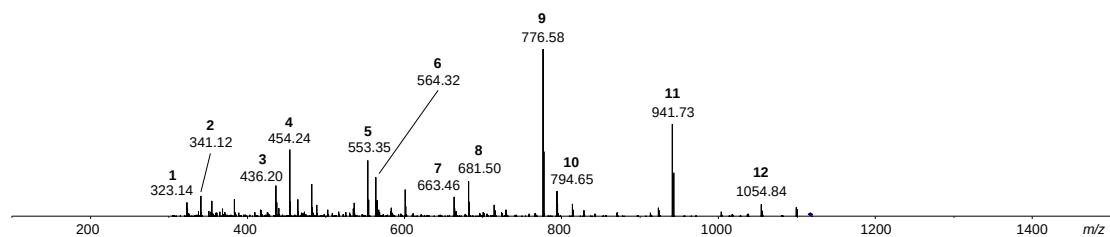
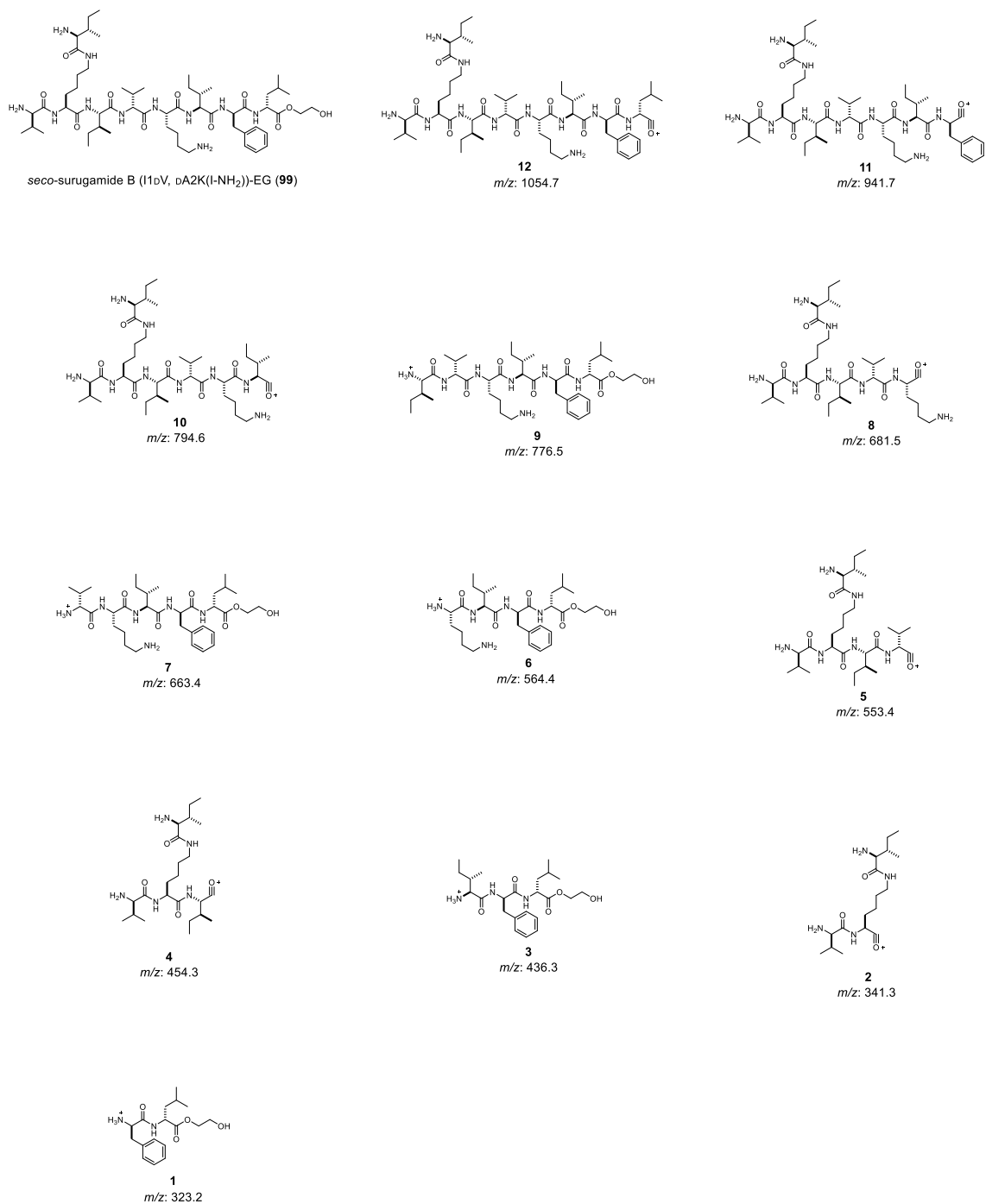


Figure S96. MS/MS spectrum for the enzymatic product, head-to-side chain cyc-99

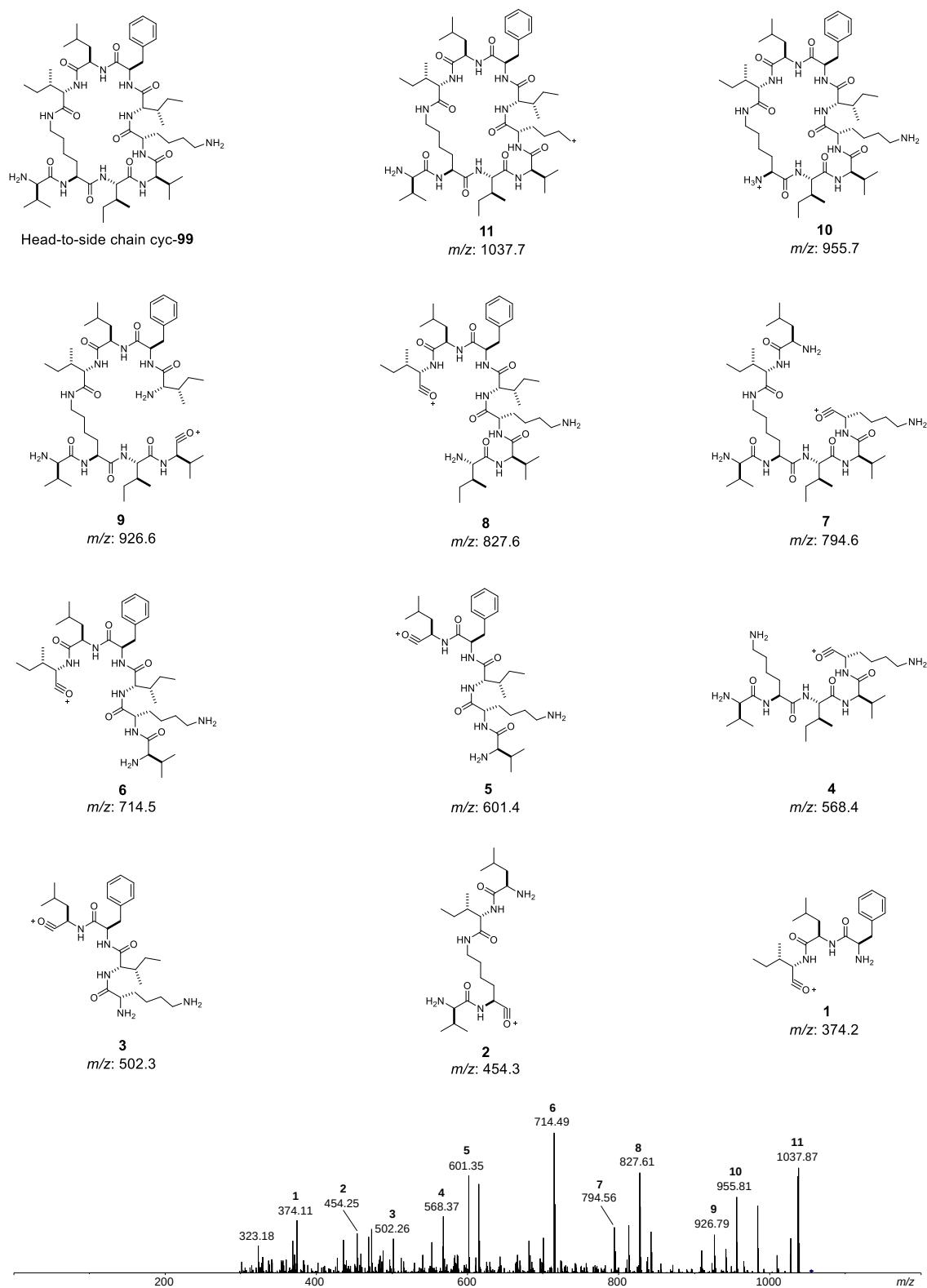


Figure S97. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (I1DV, DV4K(I-NH₂))-EG (**100**)

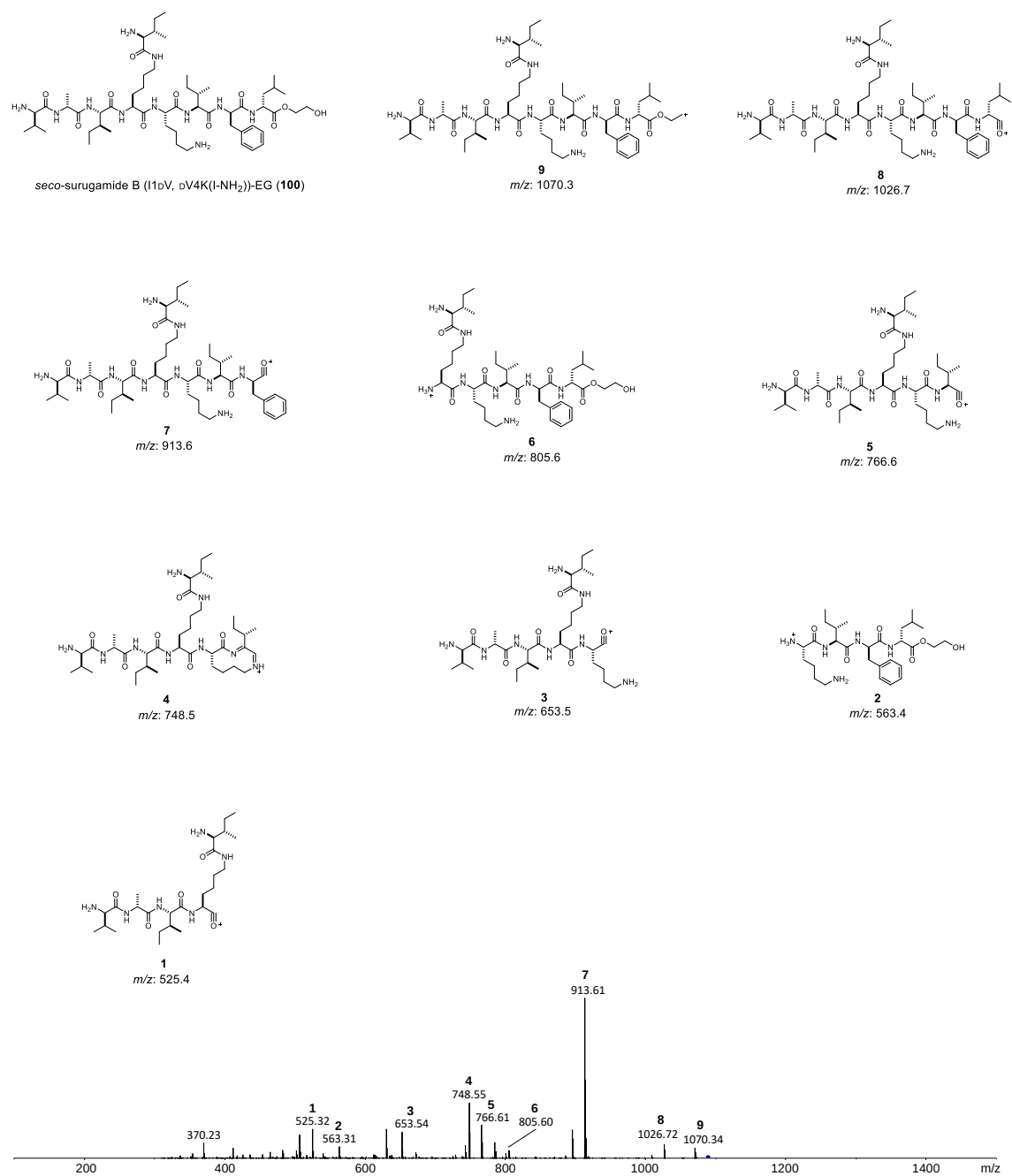


Figure S98. MS/MS spectrum for the enzymatic product, hyd-100

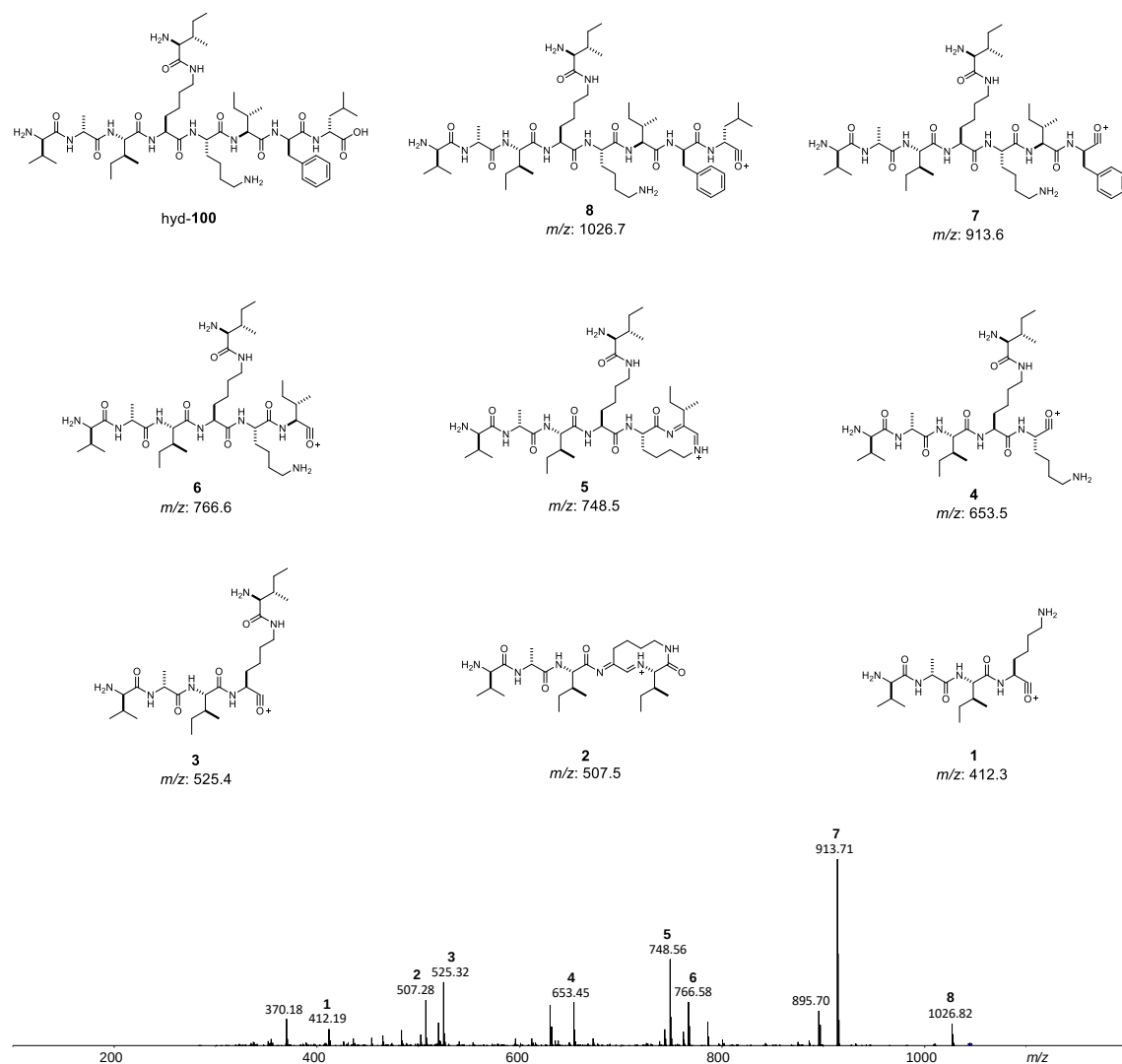


Figure S99. MS/MS spectrum for the enzymatic product, head-to-side chain cyc-100

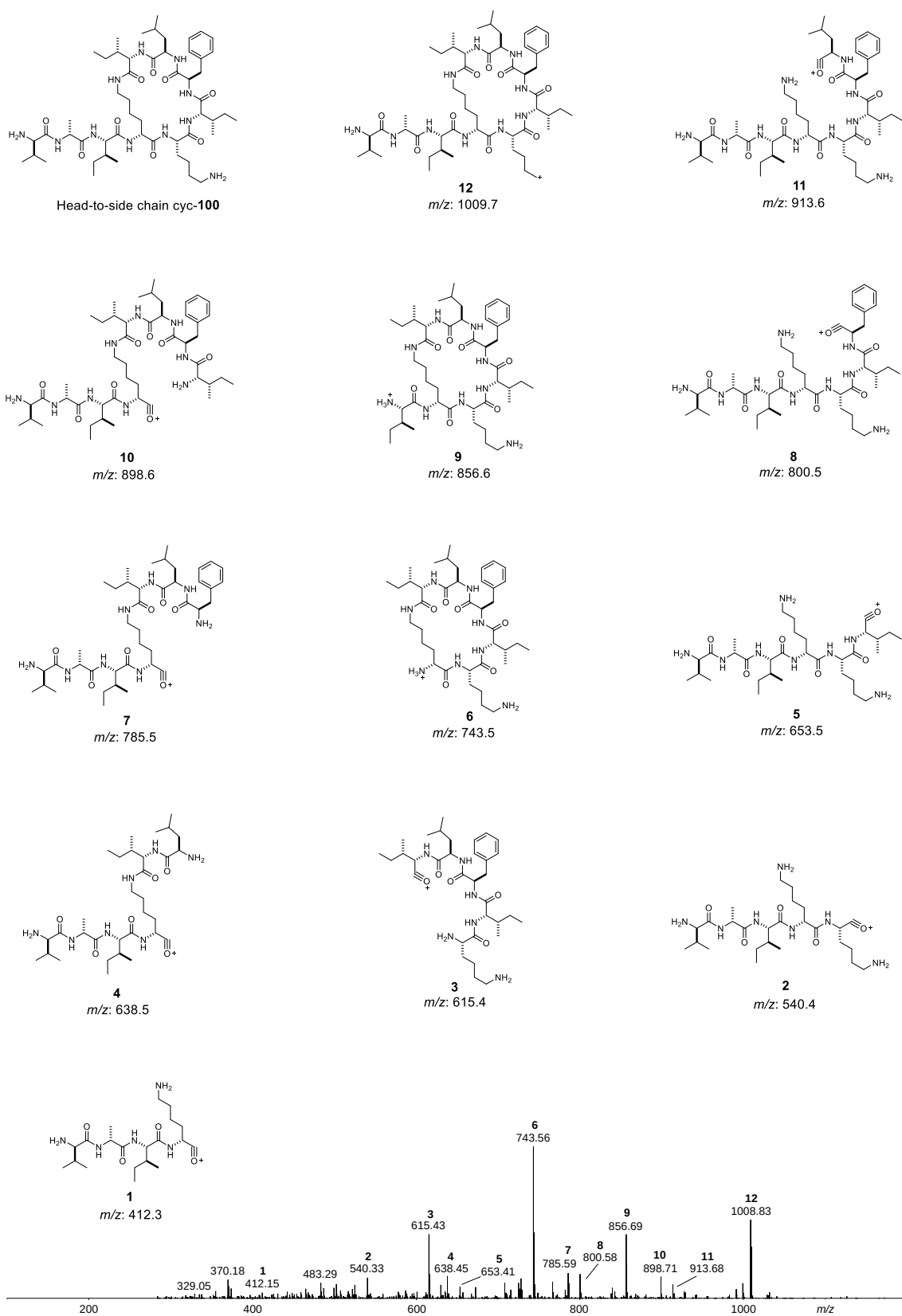


Figure S100. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (I1D_V, K5K(I-NH₂))-EG (**101**)

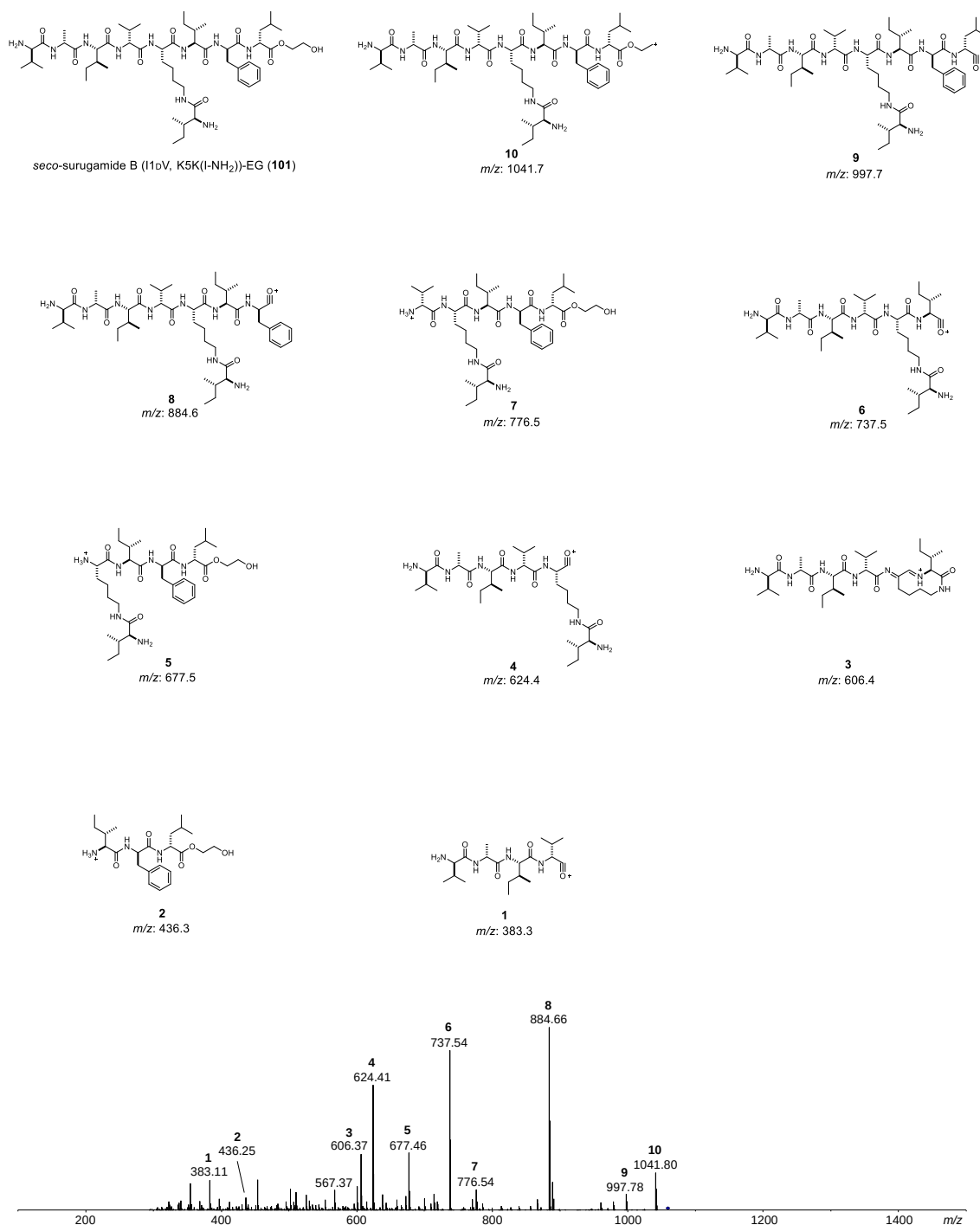


Figure S101. MS/MS spectrum for the enzymatic product, hyd-101

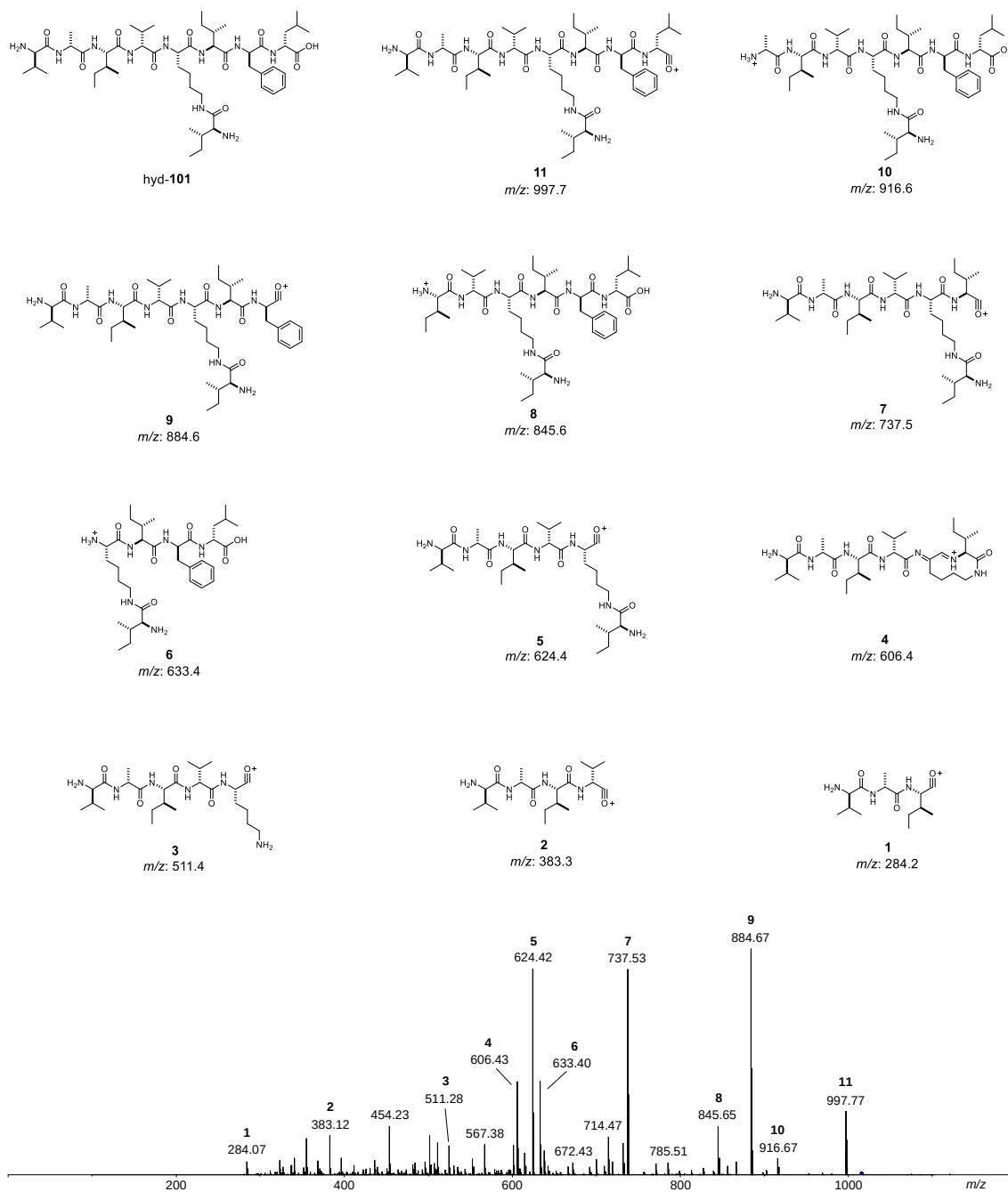


Figure S102. MS/MS spectrum for the enzymatic product, head-to-side chain cyc-101

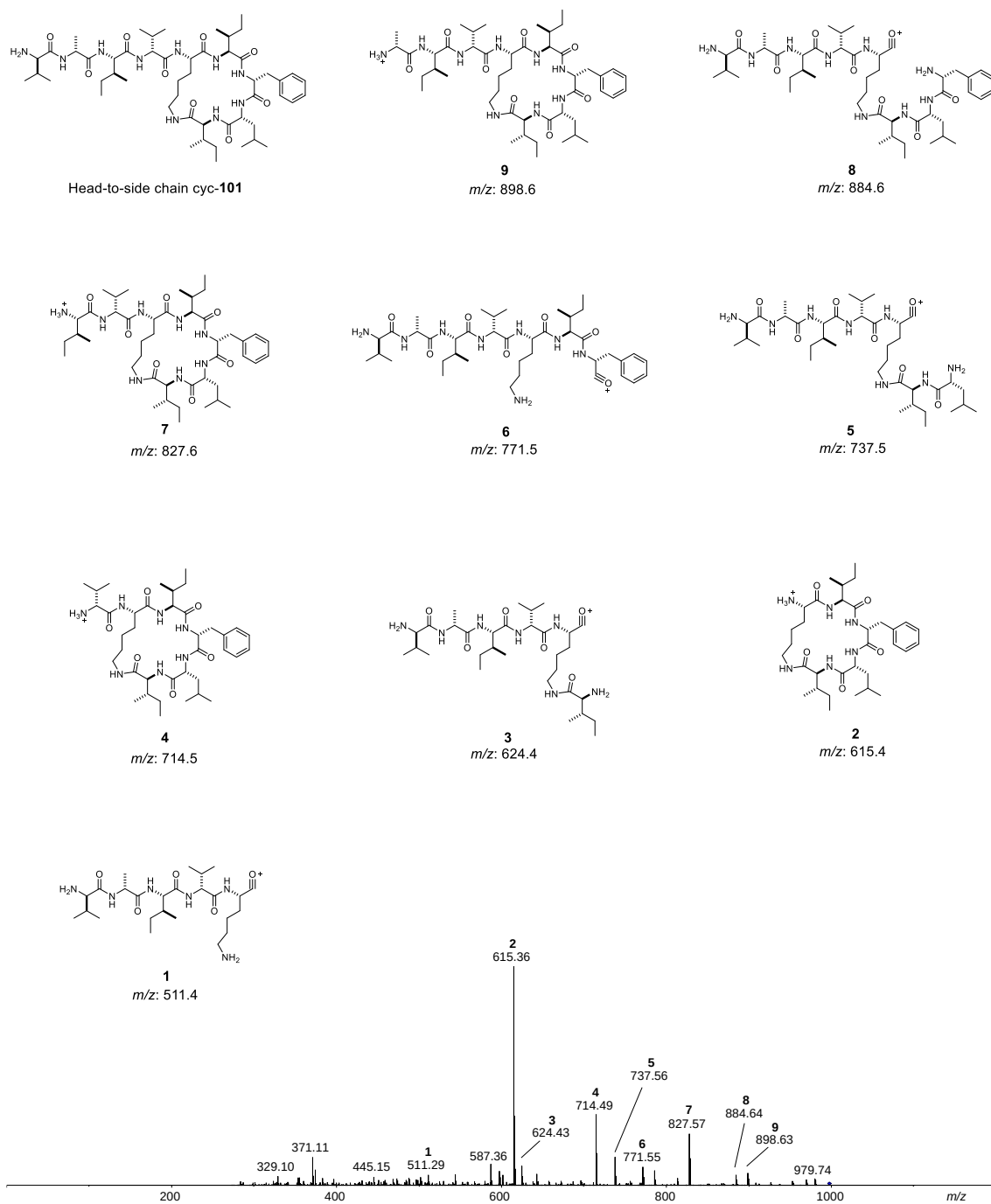


Figure S103. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (I1D_V, I6K(I-NH₂))-EG (**102**)

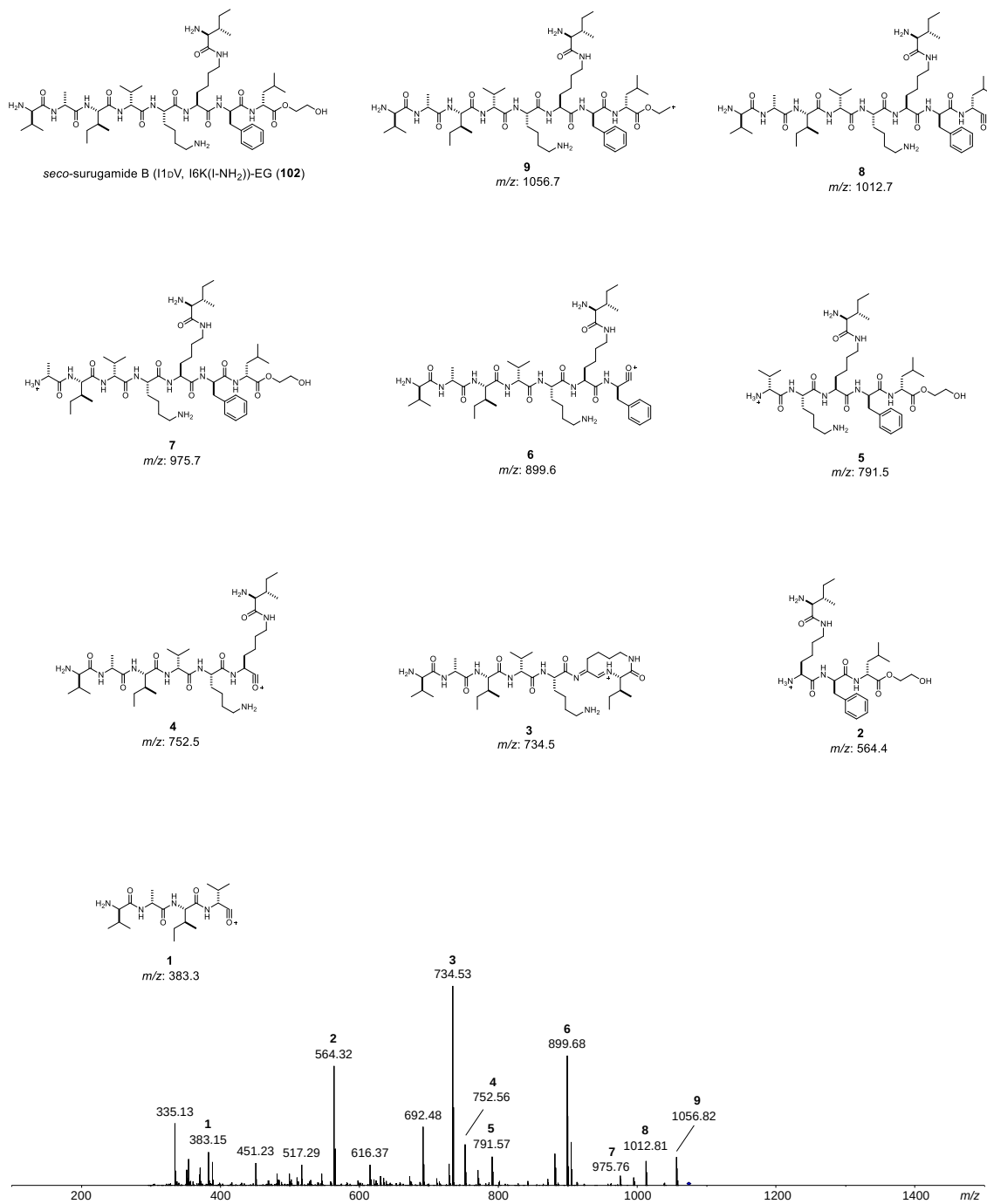


Figure S104. MS/MS spectrum for the enzymatic product, hyd-102

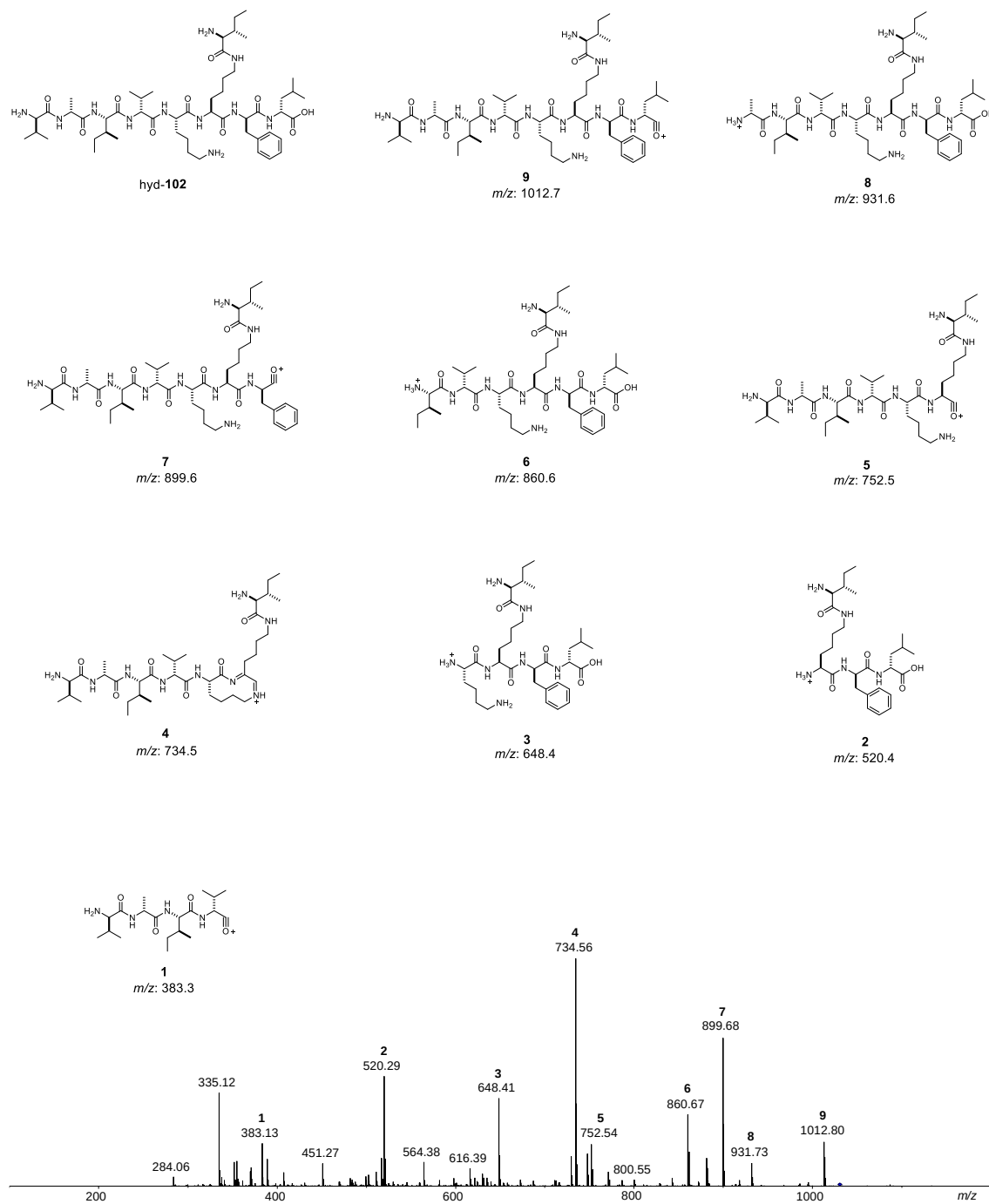


Figure S105. MS/MS spectrum for the enzymatic product, head-to-side chain cyc-102

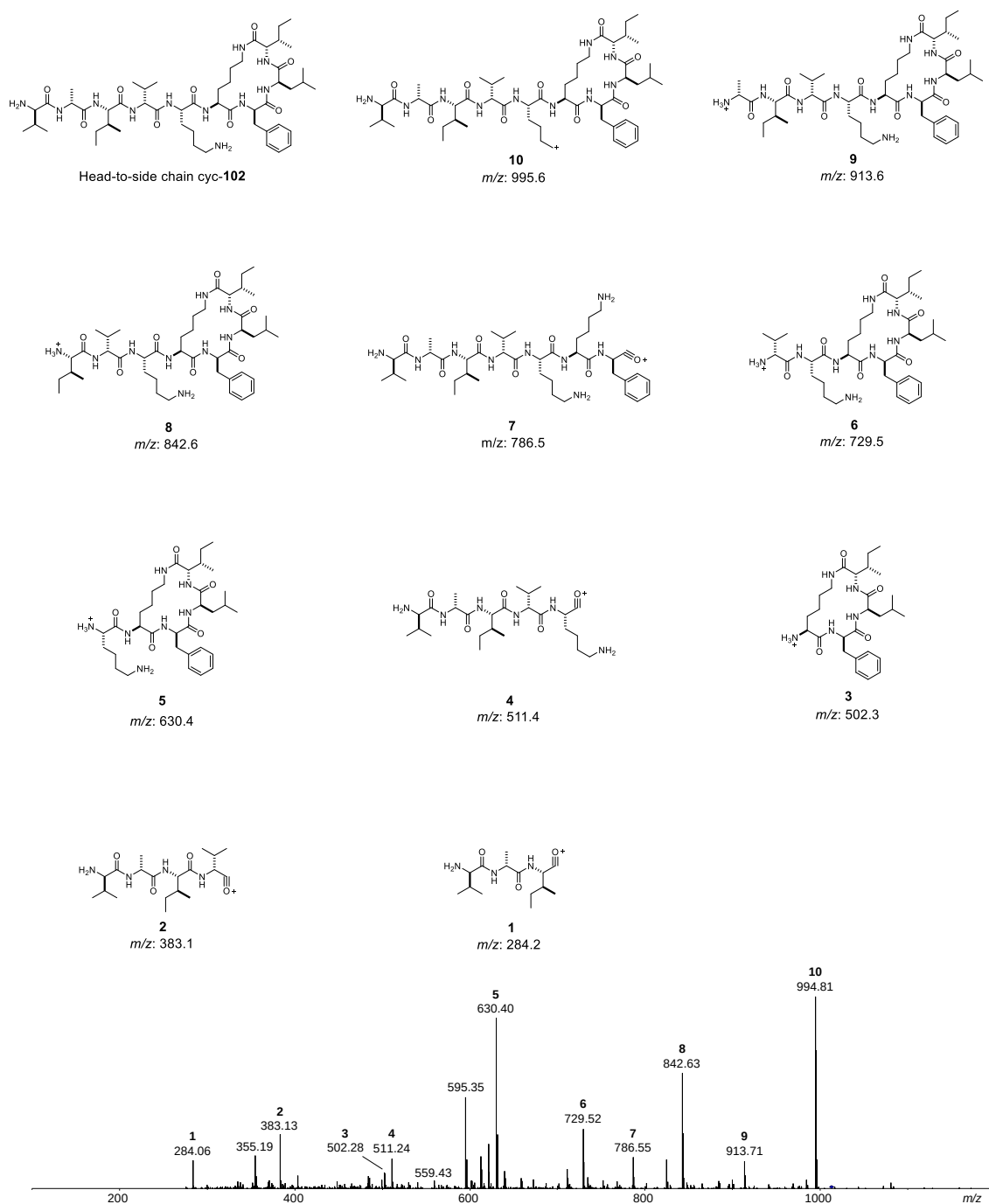


Figure S106. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (11D V, D F7K(I-NH₂))-EG (**103**)

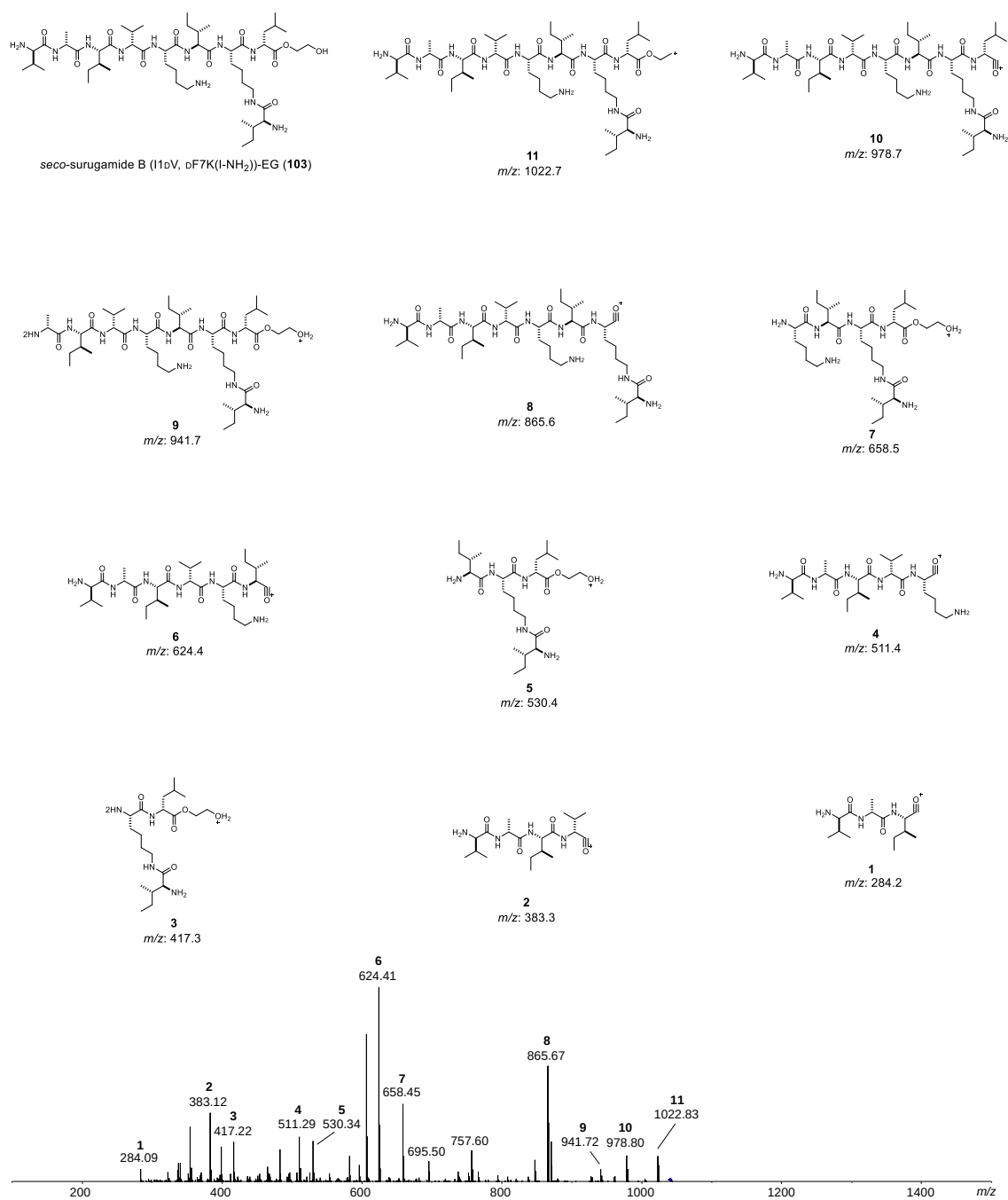


Figure S107. MS/MS spectrum for the enzymatic product, hyd-103

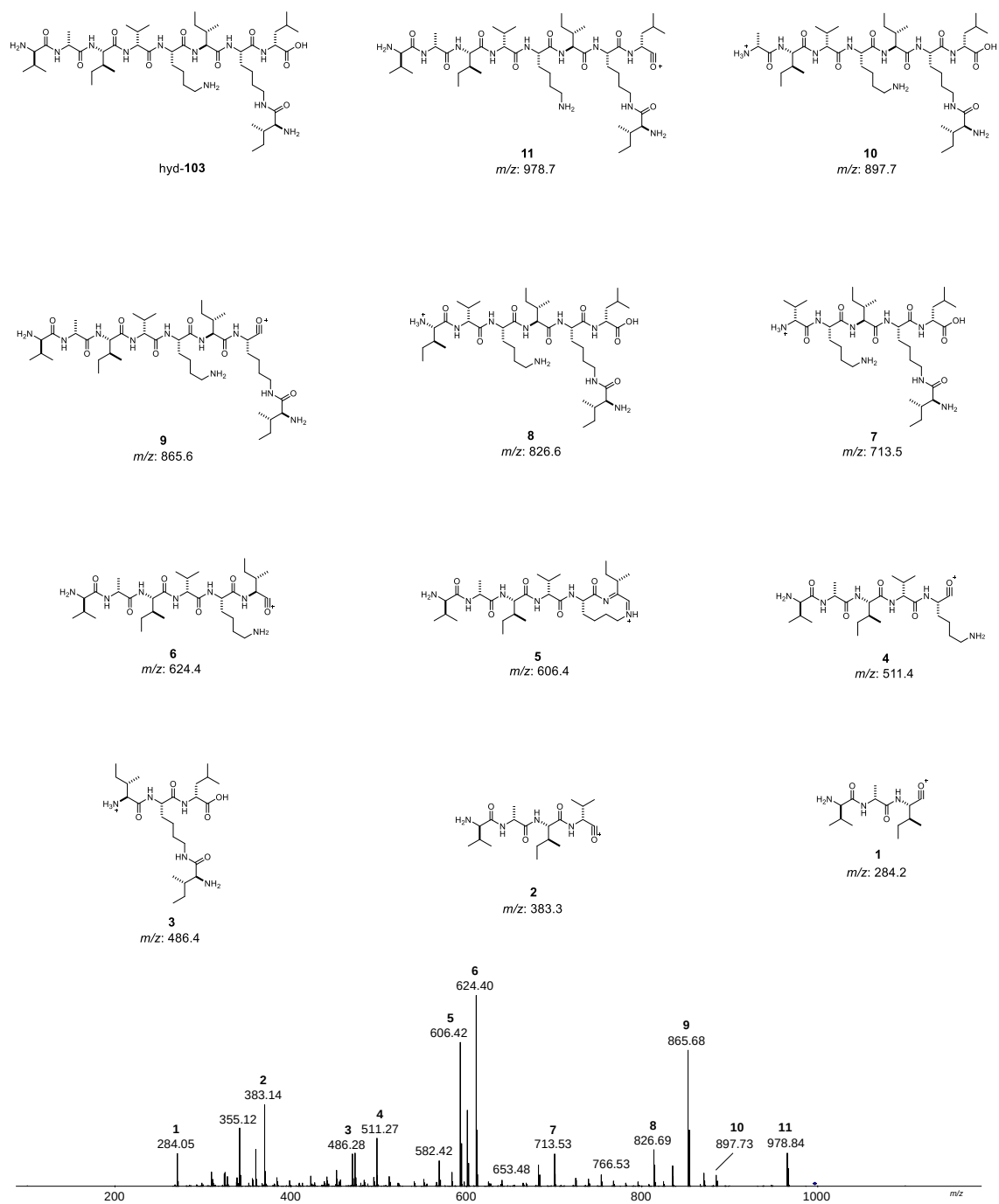


Figure S108. MS/MS spectrum for the enzymatic product, head-to-side chain cyc-103

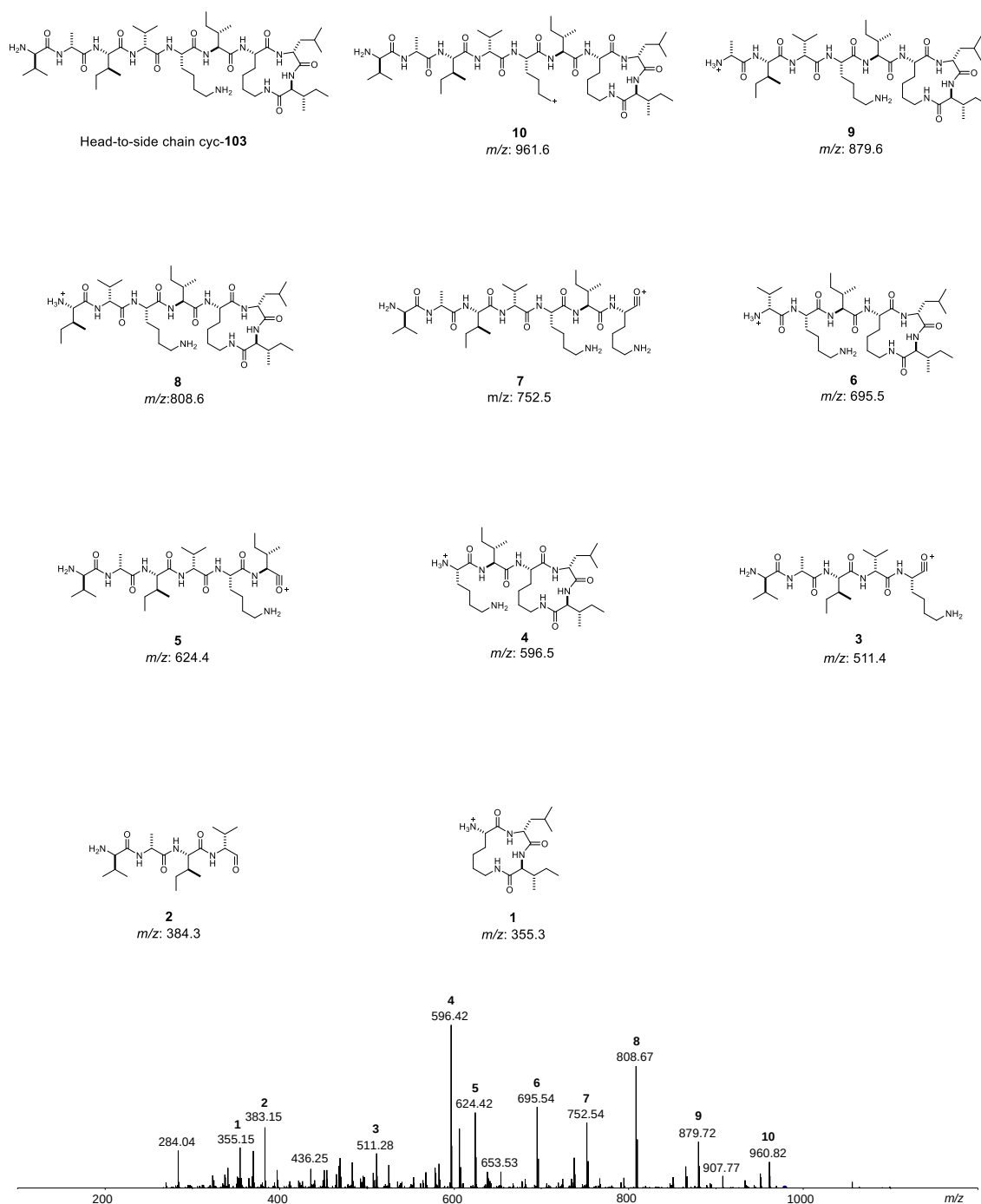


Figure S109. MS/MS spectrum for *N*-acetyl *seco*-wollamide B1 (W1K(W-NH₂))-EG (**104**)

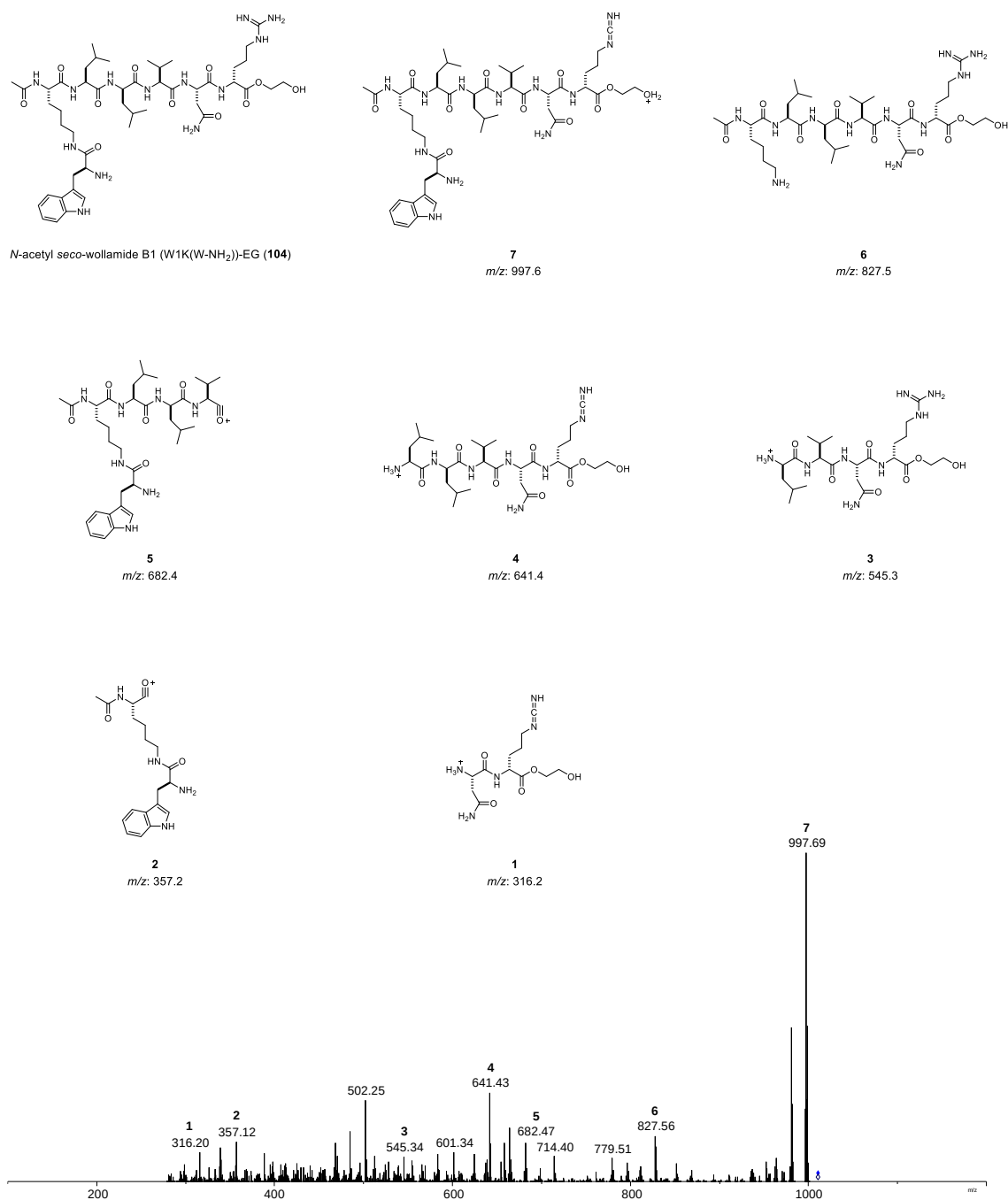


Figure S110. MS/MS spectrum for the enzymatic product, hyd-104

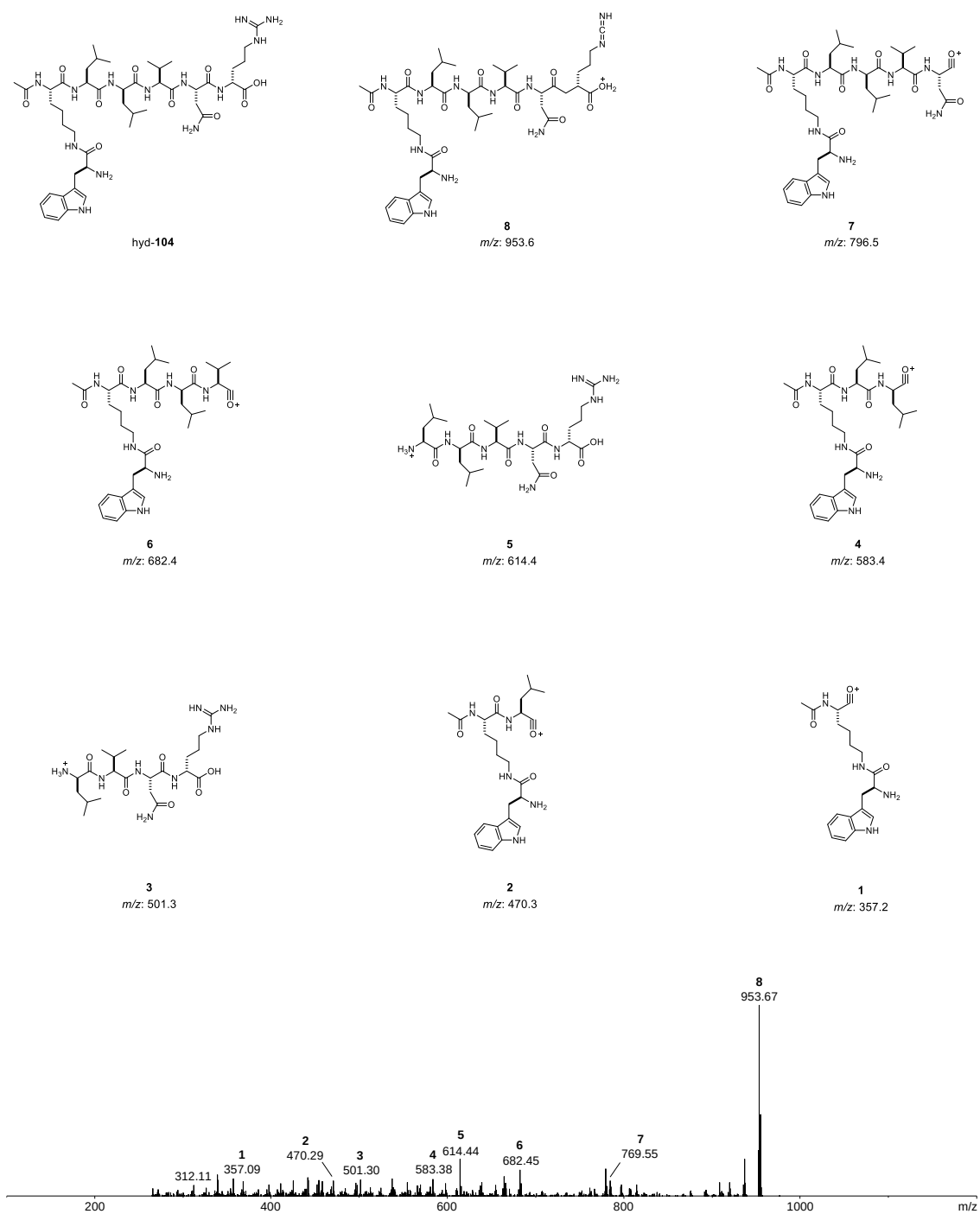


Figure S111. MS/MS spectrum for the enzymatic product, head-to-side chain cyc-104

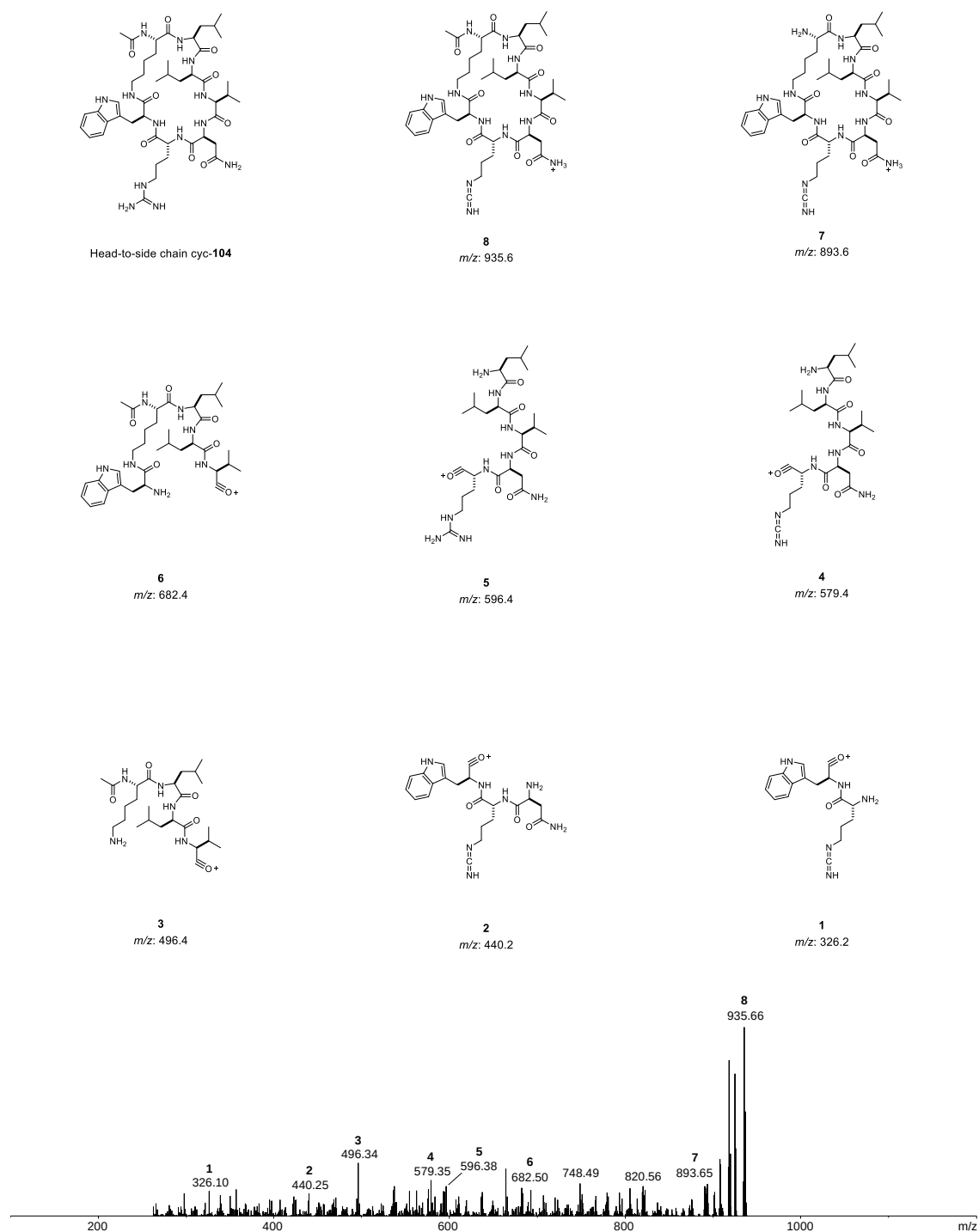


Figure S112. MS/MS spectrum for *seco*-wollamide B1 (W1dA, L2K(W-NH₂))-EG (**105**)

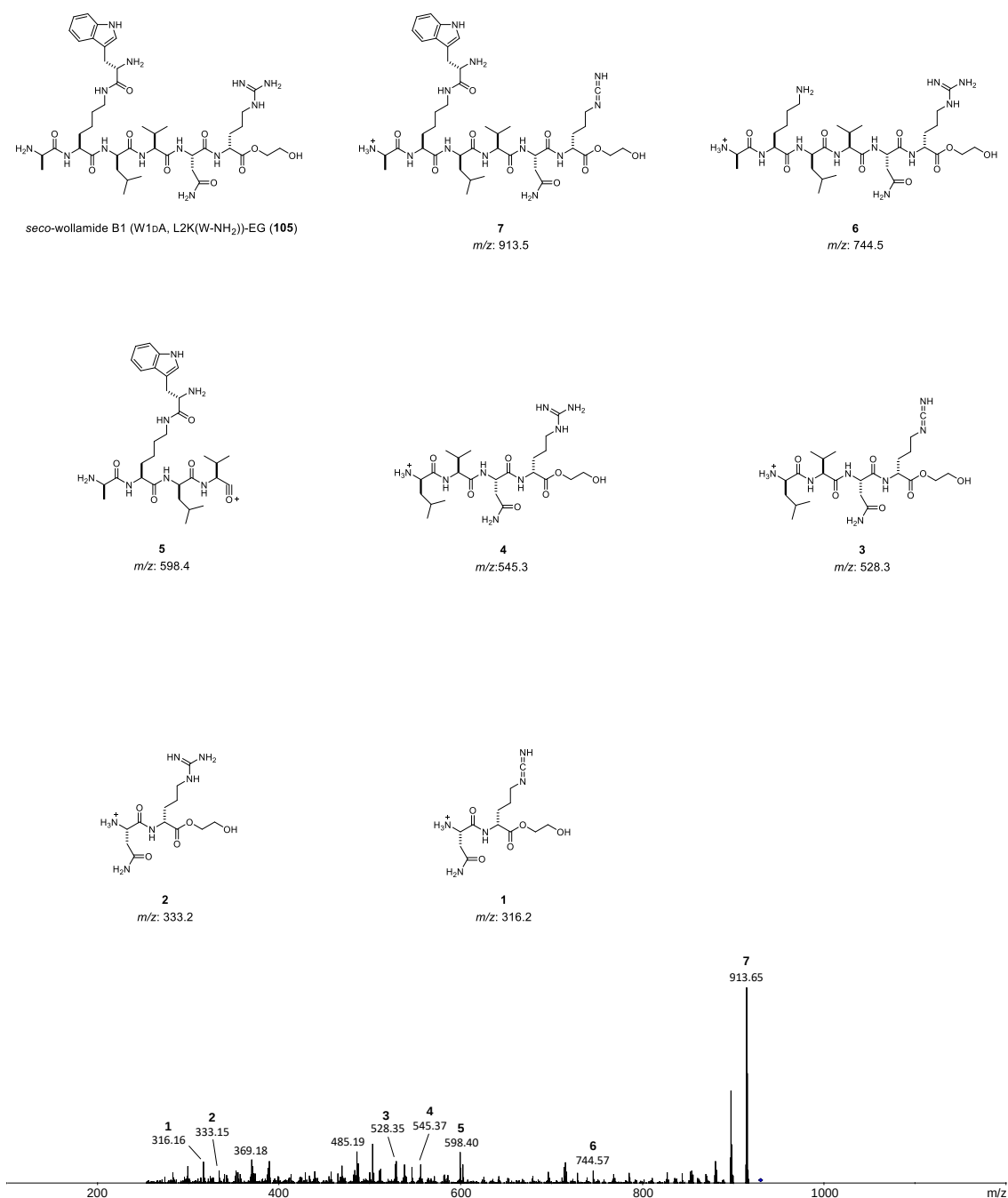


Figure S113. MS/MS spectrum for the enzymatic product, hyd-105

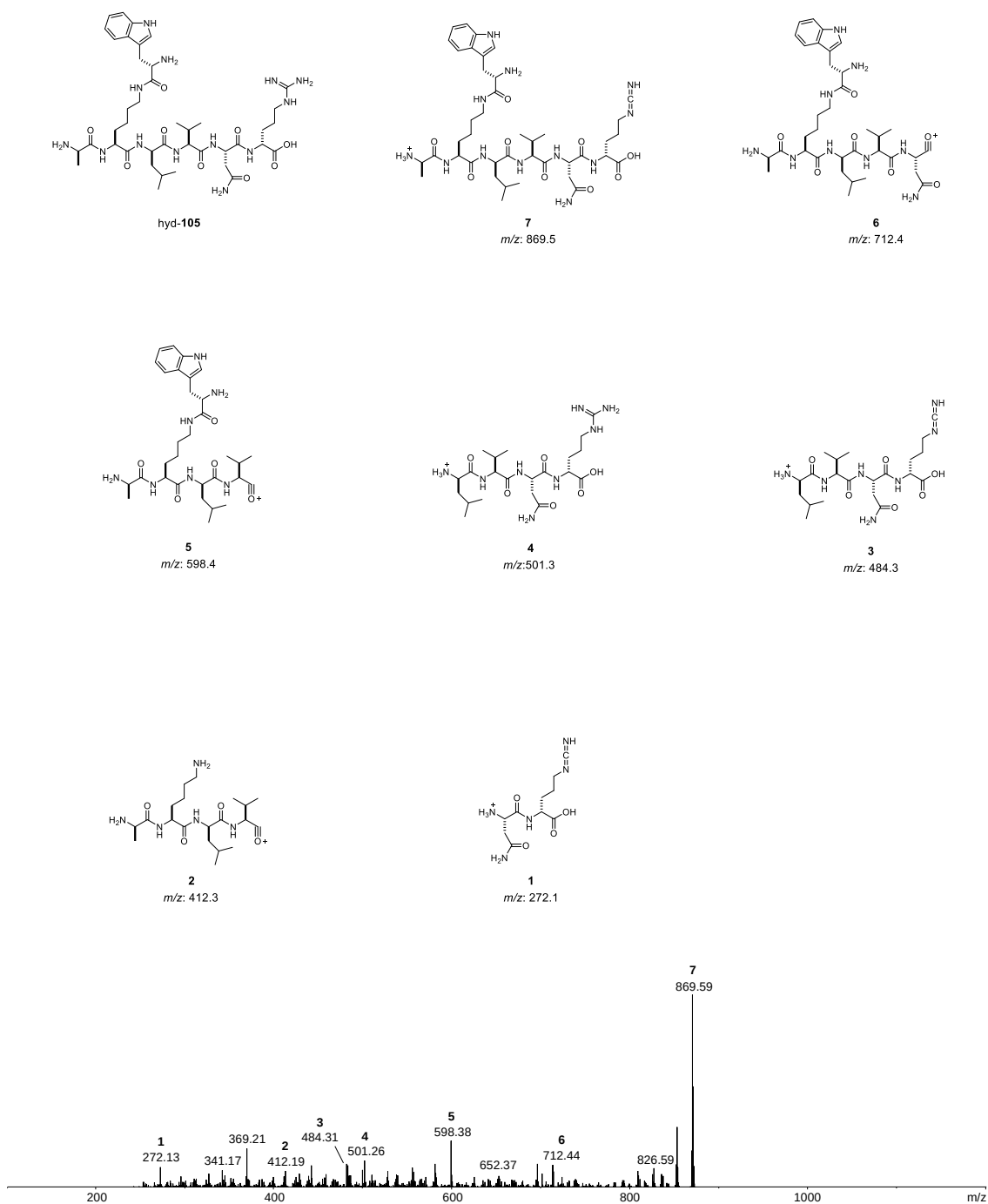


Figure S114. MS/MS spectrum for the enzymatic product, head-to-side chain cyc-105

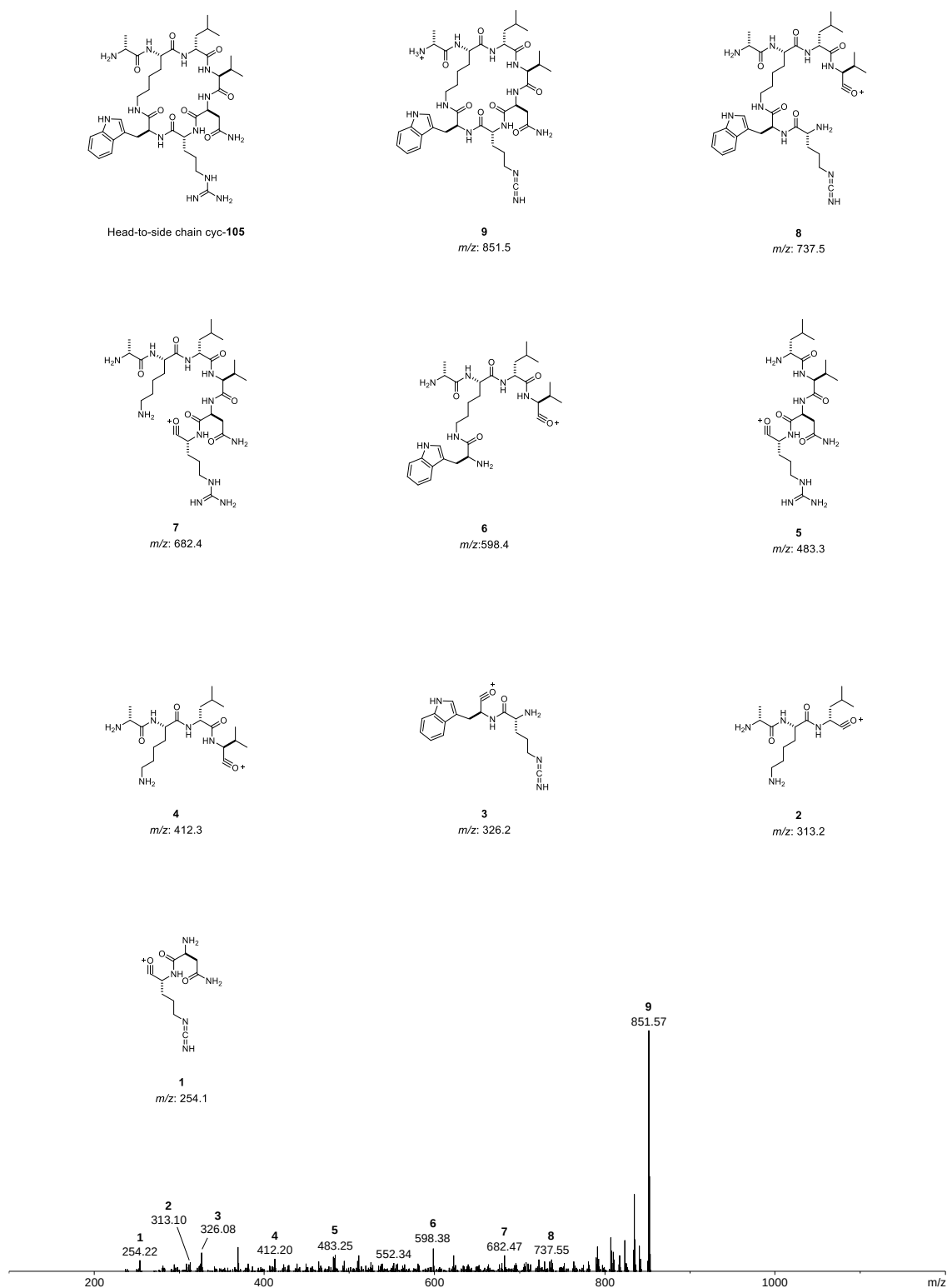


Figure S115. MS/MS spectrum for *seco*-wollamide B1 (W1dA, dL3K(W-NH₂))-EG (**106**)

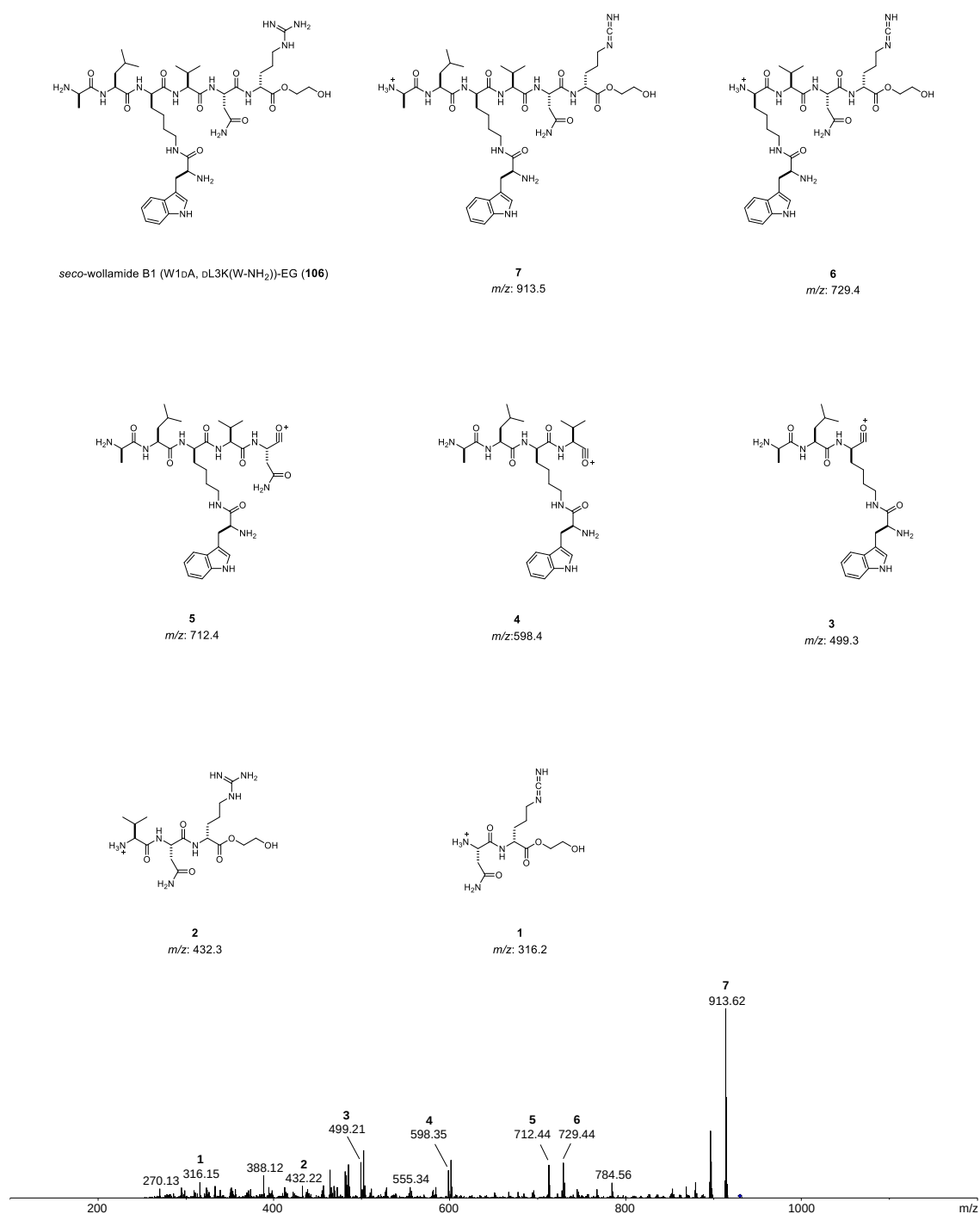


Figure S116. MS/MS spectrum for the enzymatic product, hyd-106

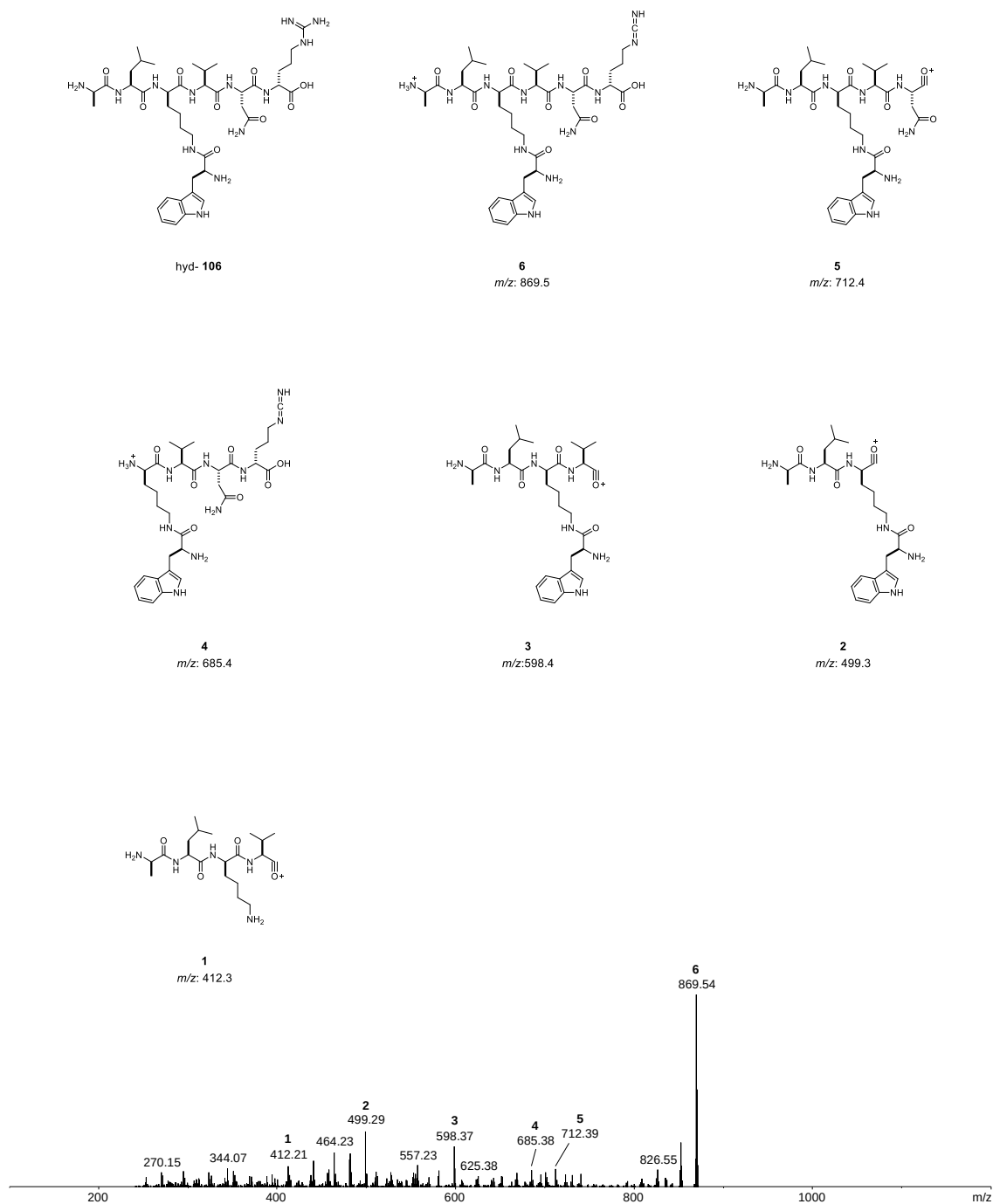


Figure S117. MS/MS spectrum for the enzymatic product, head-to-side chain cyc-106

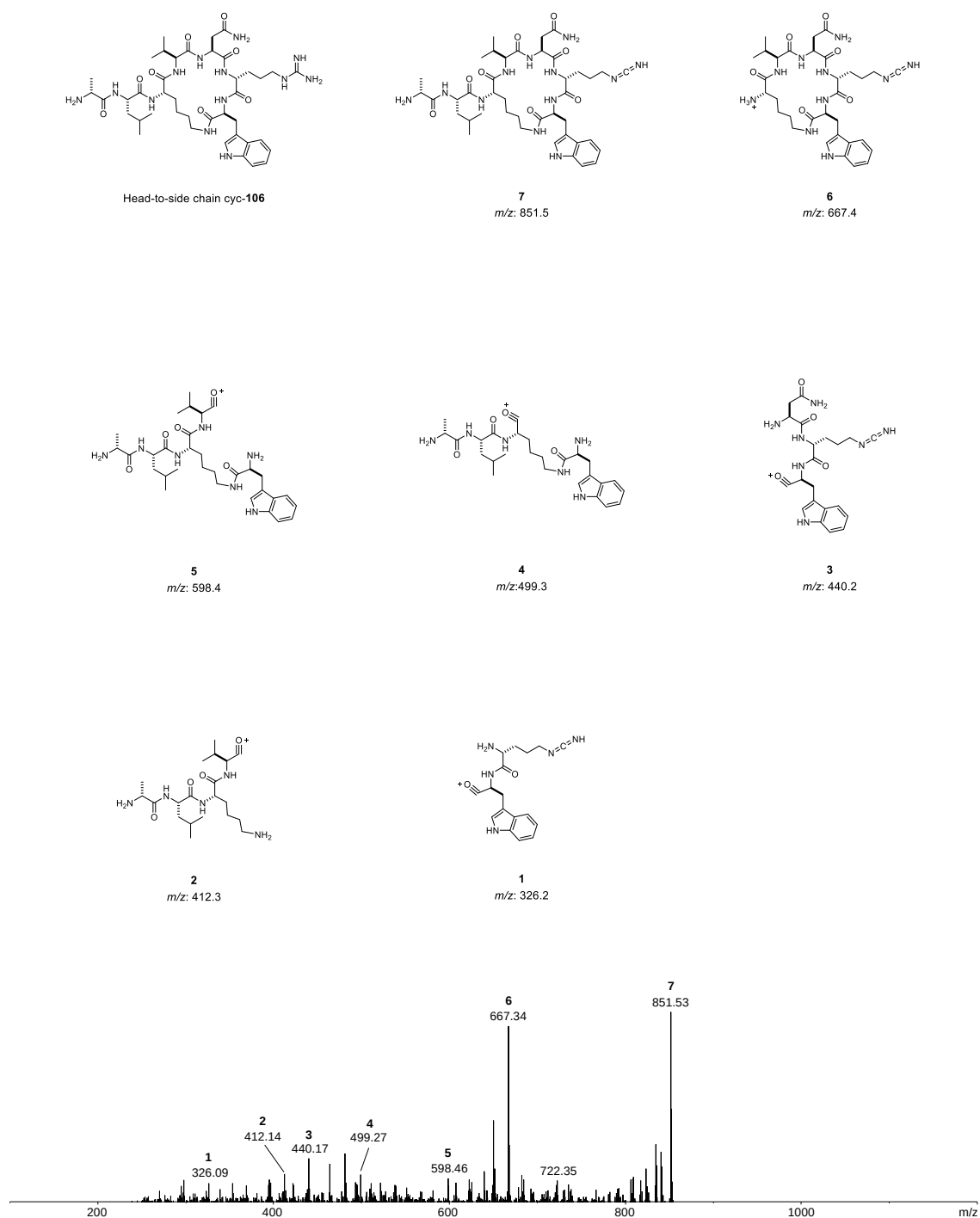


Figure S118. MS/MS spectrum for *seco*-wollamide B1 (W1DA, V4K(W-NH₂))-EG (**107**)

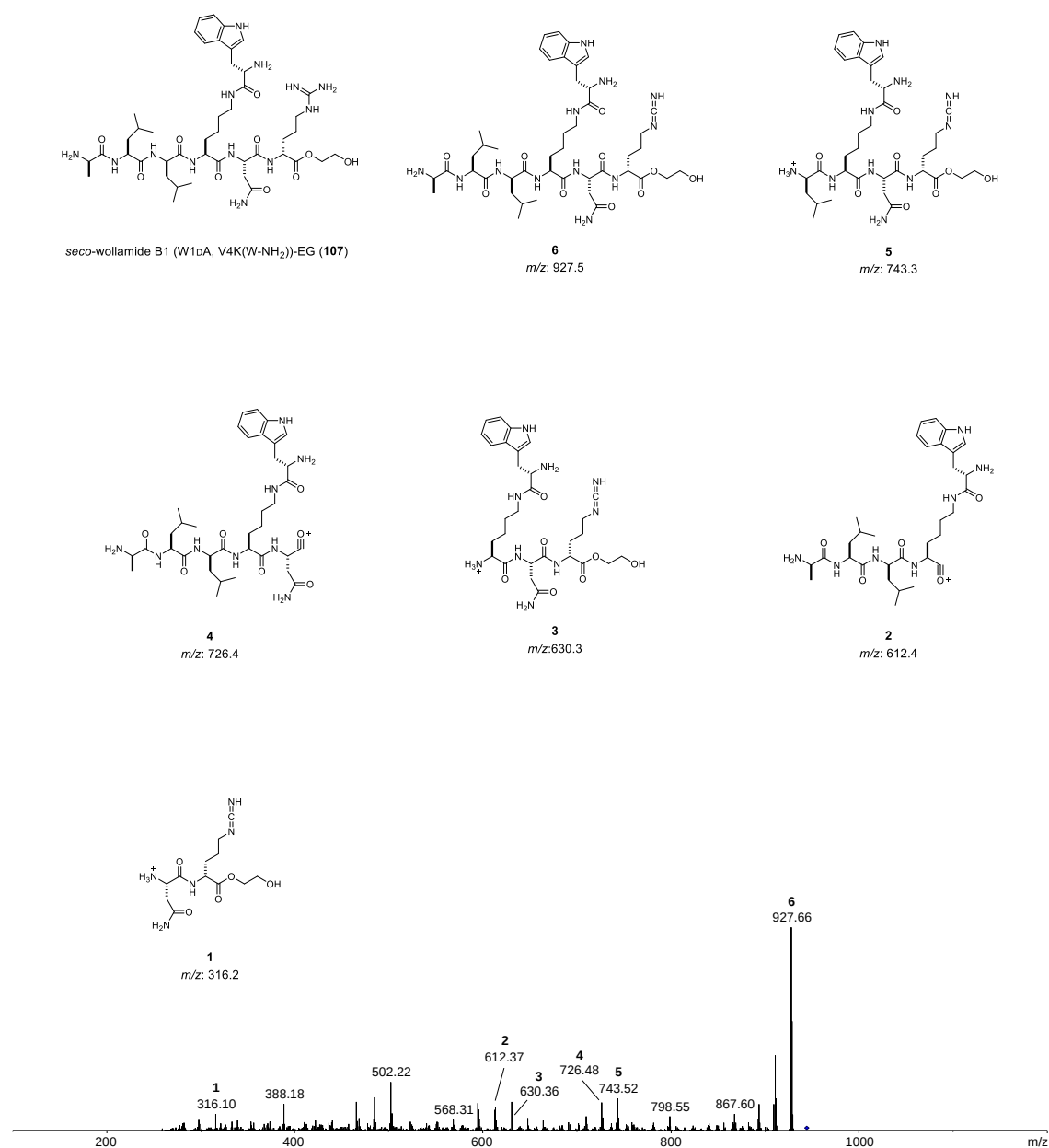


Figure S119. MS/MS spectrum for the enzymatic product, hyd-107

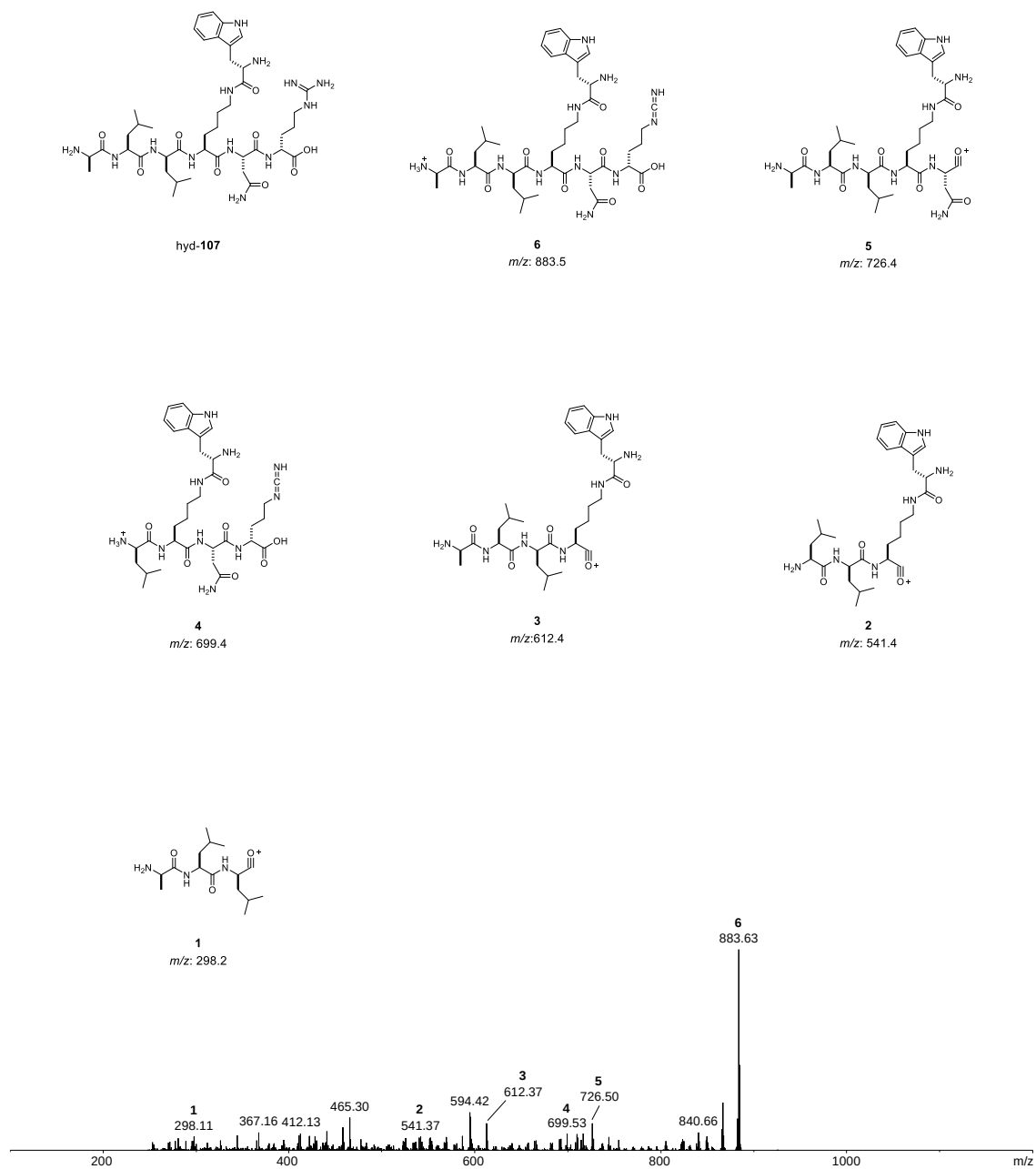


Figure S120. MS/MS spectrum for the enzymatic product, head-to-side chain cyc-107

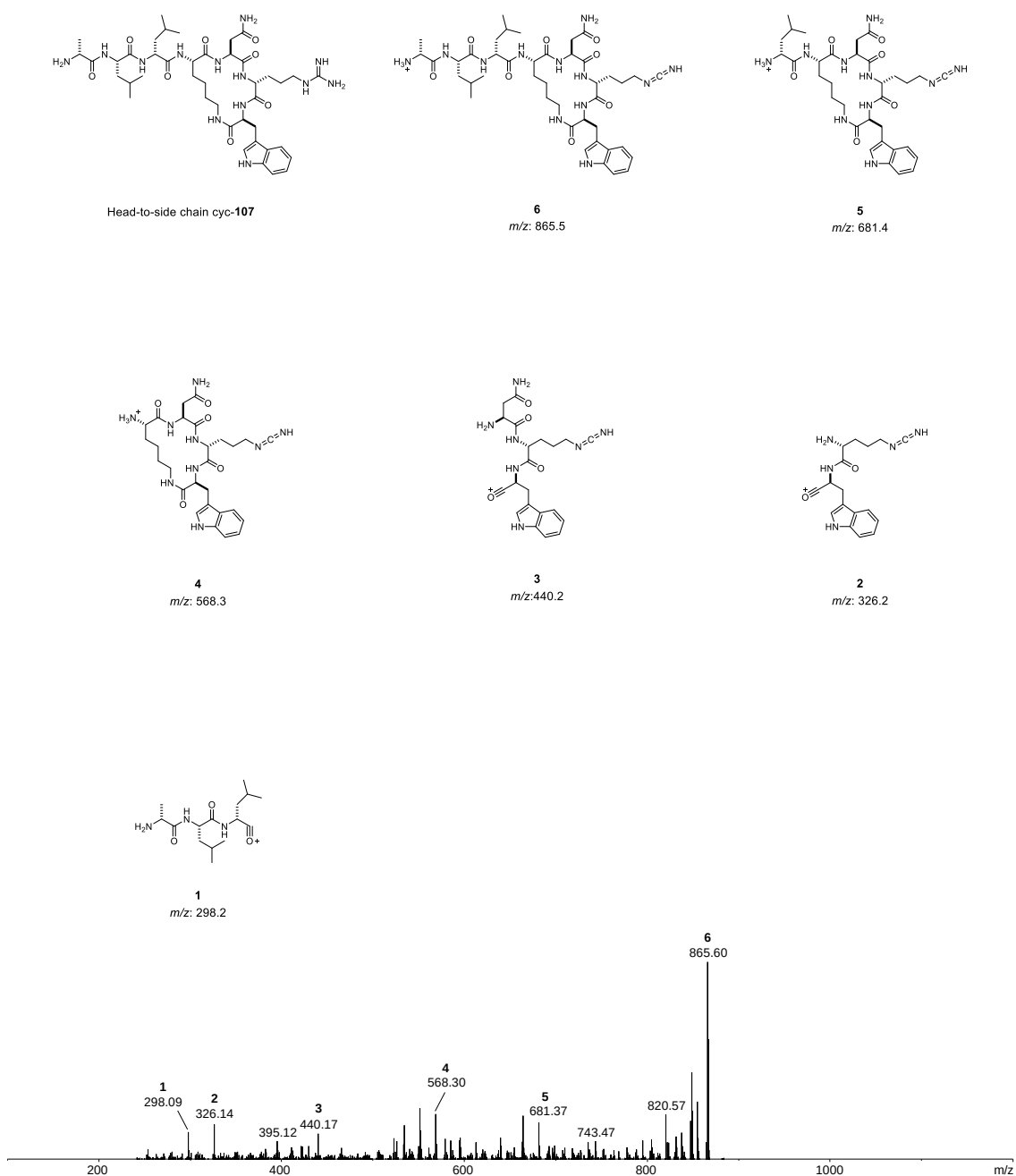


Figure S121. MS/MS spectrum for *seco*-wollamide B1 (W1dA, N5K(W-NH₂))-EG (**108**)

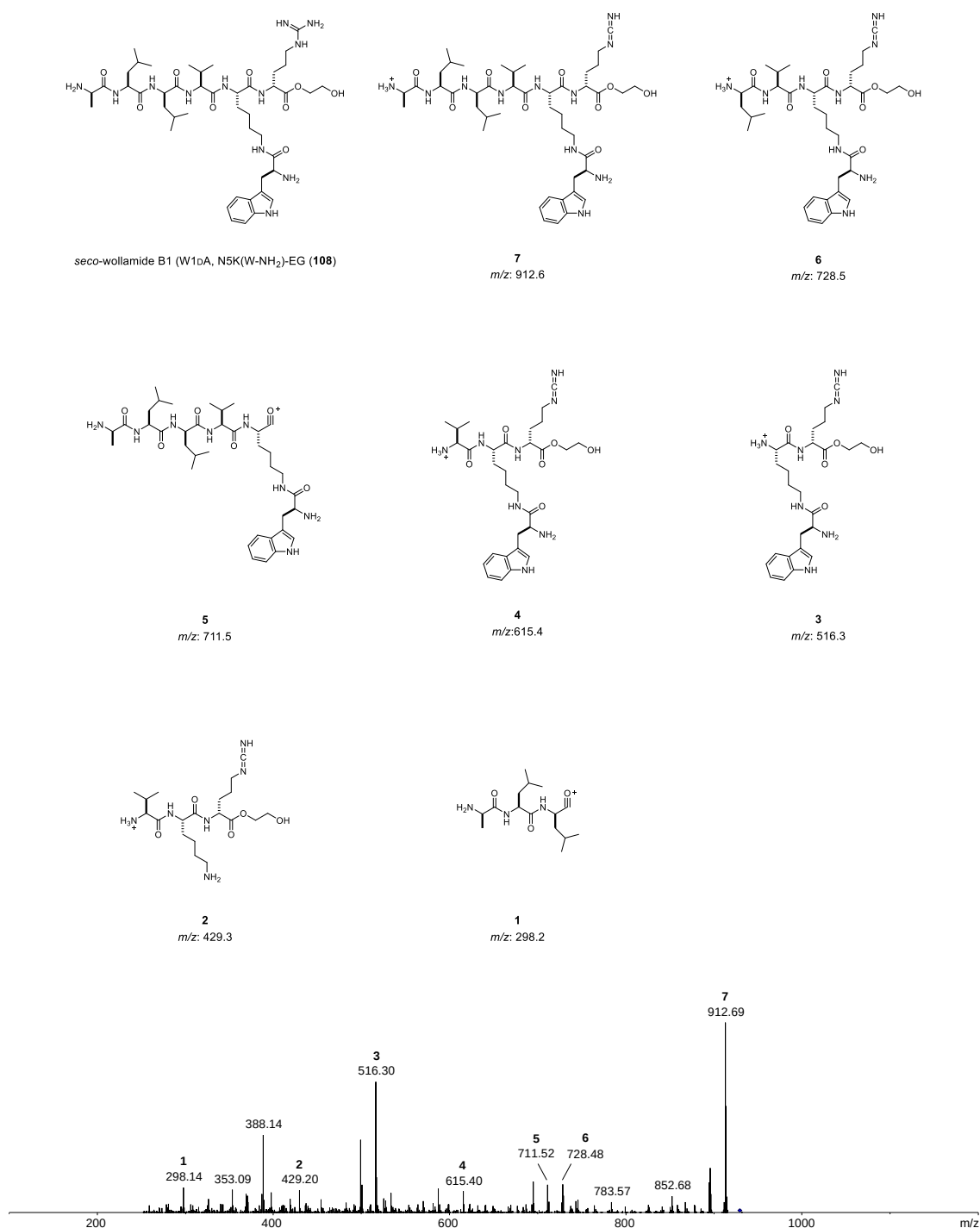


Figure S122. MS/MS spectrum for the enzymatic product, hyd-108

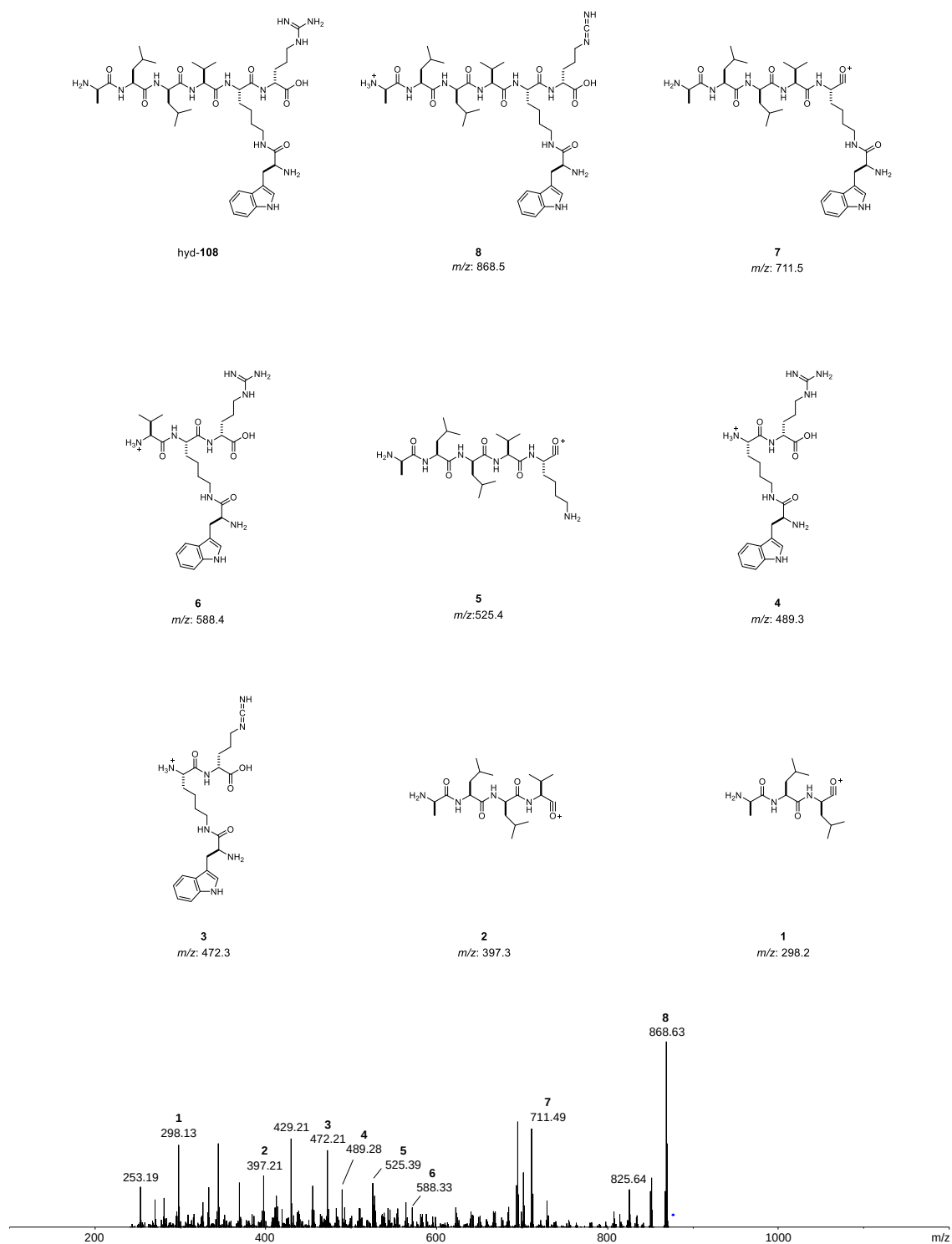


Figure S123. MS/MS spectrum for *seco*-surugamide B (11_DS, 13K(I-NH₂))-EG (**119**)

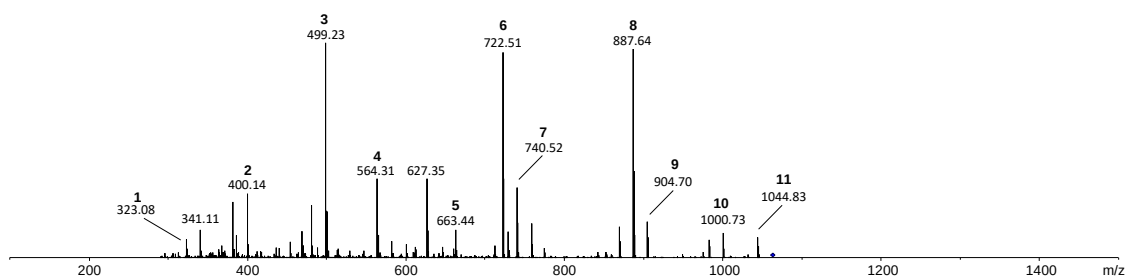
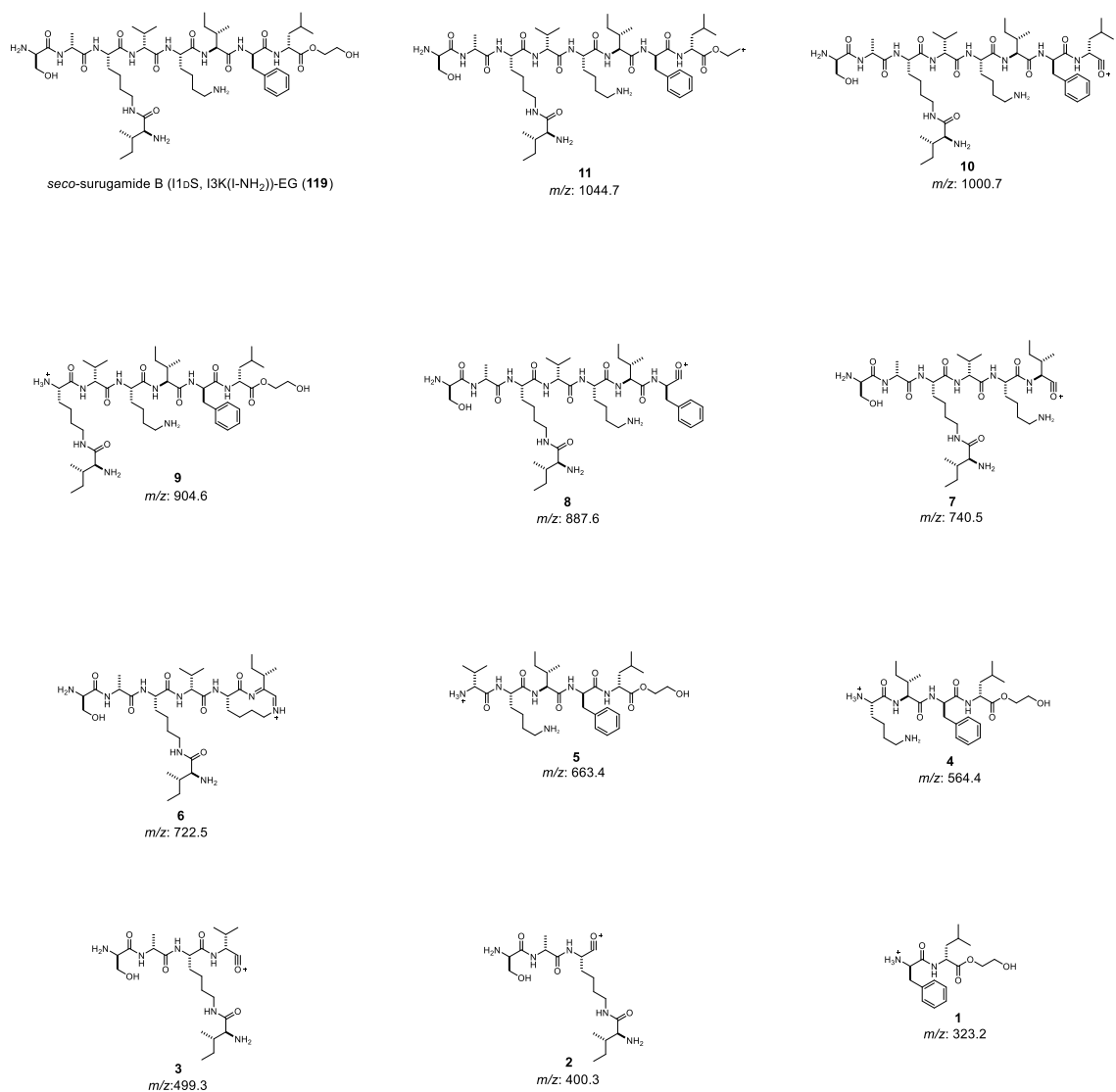


Figure S124. MS/MS spectrum for the enzymatic product, head-to-side chain cyc-119

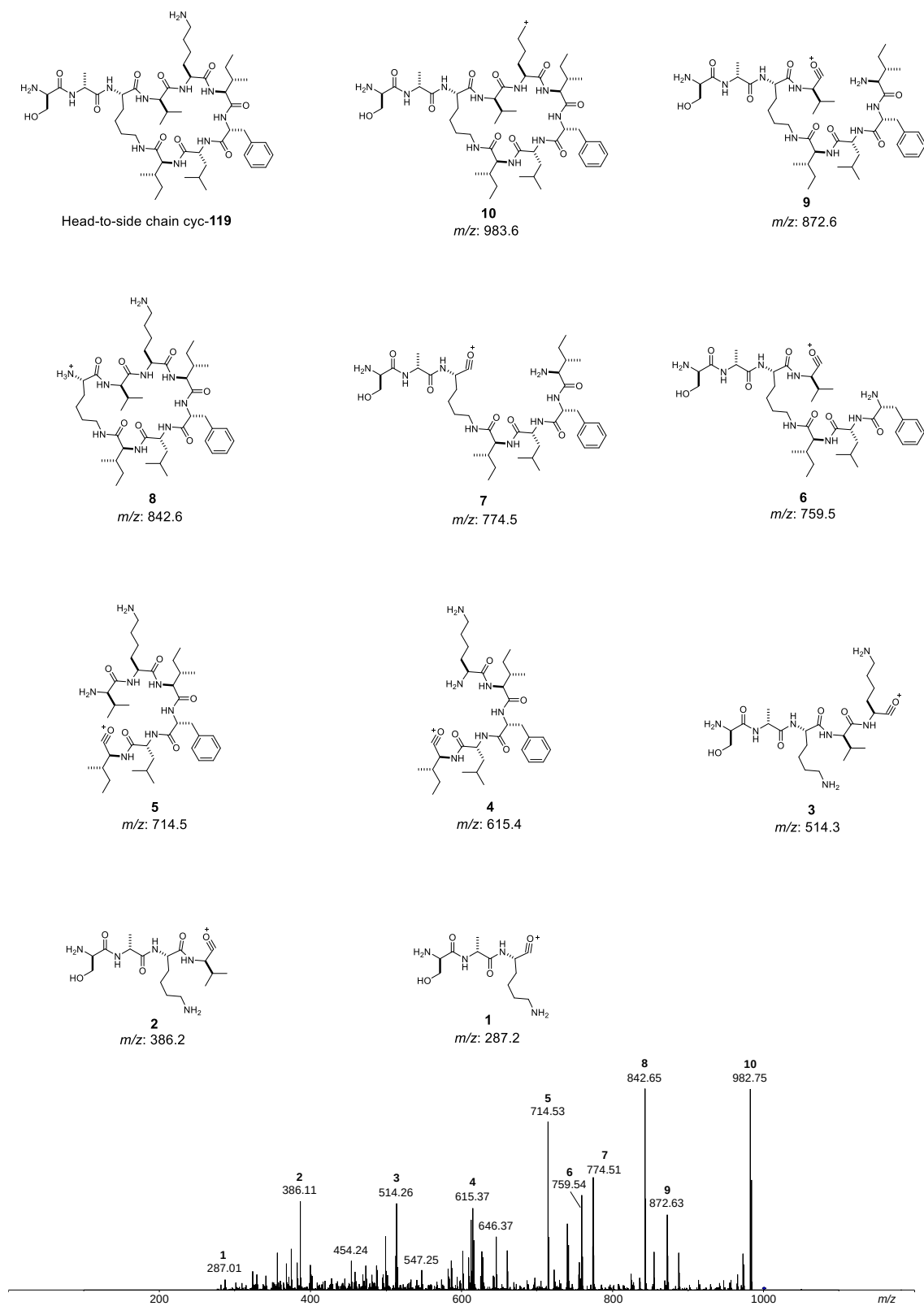
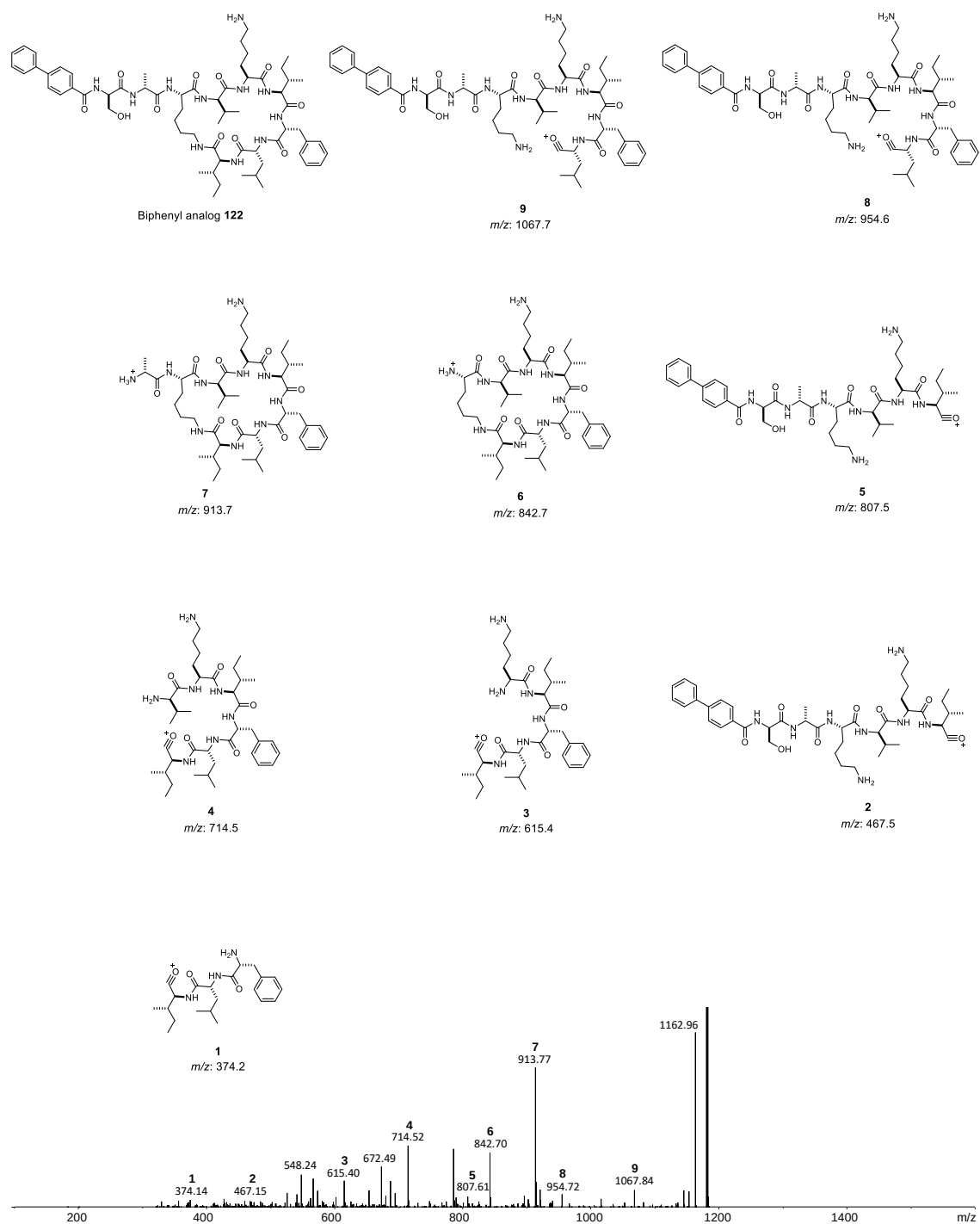


Figure S125. MS/MS spectrum for biphenyl analog **122**



引用文献

1. Lynda Gratton, Andrew Scott. THE 100-YEAR LIFE (2016).
2. Inaba M, Mori K. Extension of healthy life span of dialysis patients in the era of a 100-year life. *Nutrients* **2021**, *8*, 2693.
3. 厚生労働省ホームページ
<https://www.mhlw.go.jp/stf/wp/hakusyo/kousei/19/backdata/01-01-02-01.html>.
4. 日本製薬工業協会ホームページ
https://www.jpma.or.jp/information/industrial_policy/research_map/01.html.
5. Beck H, Härter M, Haß B, Schmeck C, Baerfacker L. Small molecules and their impact in drug discovery: A perspective on the occasion of the 125th anniversary of the Bayer Chemical Research Laboratory. *Drug Discov. Today* **2022**, *6*, 1560-1574.
6. Eder J, Sedrani R, Wiesmann C. The discovery of first-in-class drugs: origins and evolution. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *8*, 577-587.
7. Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2019. *MAbs.* **2019**, *2*, 219-238.
8. Albericio F, Kruger HG. Therapeutic peptides. *Future Med. Chem.* **2012**, *12*, 1527-31.
9. Wang L, Wang N, Zhang W, Cheng X, Yan Z, Shao G, Wang X, Wang R, Fu C. Therapeutic peptides: current applications and future directions. *Signal Transduct. Target Ther.* **2022**, *1*, 48.
10. Chiu ML, Goulet DR, Teplyakov A, Gilliland GL. Antibody structure and function: The basis for engineering therapeutics. *Antibodies* **2019**, *4*, 55.
11. Muttenthaler M, King GF, Adams DJ, Alewood PF. Trends in peptide drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *4*, 309-325.
12. Vinogradov AA, Yin Y, Suga H. Macrocyclic peptides as drug candidates: recent progress and remaining challenges. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *10*, 4167-4181.
13. Tanada M, Tamiya M, Matsuo A, Chiyoda A, Takano K, Ito T, Irie M, Kotake T, Takeyama R, Kawada H, Hayashi R, Ishikawa S, Nomura K, Furuichi N, Morita Y, Kage M, Hashimoto S, Nii K, Sase H, Ohara K, Ohta A, Kuramoto S, Nishimura Y, Iikura H, Shiraishi T. Development of orally bioavailable peptides targeting an intracellular protein: From a hit to a clinical KRAS inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *30*, 16610-16620.
14. Ohta A, Tanada M, Shinohara S, Morita Y, Nakano K, Yamagishi Y, Takano R, Kariyuki S, Iida T, Matsuo A, Ozeki K, Emura T, Sakurai Y, Takano K, Higashida A, Kojima M, Muraoka T, Takeyama R, Kato T, Kimura K, Ogawa K, Ohara K, Tanaka S, Kikuchi Y, Hisada N, Hayashi R,

- Nishimura Y, Nomura K, Tachibana T, Irie M, Kawada H, Torizawa T, Murao N, Kotake T, Tanaka M, Ishikawa S, Miyake T, Tamiya M, Arai M, Chiyoda A, Akai S, Sase H, Kuramoto S, Ito T, Shiraishi T, Kojima T, Iikura H. Validation of a new methodology to create oral drugs beyond the rule of 5 for intracellular tough targets. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *44*, 24035-24051.
15. Merz ML, Habeshian S, Li B, David JGL, Nielsen AL, Ji X, Il Khwildy K, Duany Benitez MM, Phothirath P, Heinis C. De novo development of small cyclic peptides that are orally bioavailable. *Nat. Chem. Biol.* **2023**. <https://doi.org/10.1038/s41589-023-01496-y>.
 16. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann Y, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blöcker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D,

- Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowki J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrino A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ, Szustakowki J; International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **2001**, 6822, 860-921.
17. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferreira S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigó R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L,

- Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Deslattes Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. The sequence of the human genome. *Science* **2001**, 5507, 1304-51.
18. Abdalla MA, McGaw LJ. Natural cyclic peptide as an attractive modality for therapeutics: A mini review. *Molecules* **2018**, 23, 2080.
 19. Tsomaia N. Peptide therapeutics: Targeting the undruggable space. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 94, 459-470.
 20. Tapeinou A, Matsoukas MT, Simal C, Tselios T. Review cyclic peptides on a merry-go-round; towards drug design. *Biopolymers* **2015**, 104, 453-461.
 21. Goodman, M.; Levine, L. Peptide synthesis via active ester. IV racemization and ring-opening reactions of optically active oxazolones. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 2918-2922.
 22. Shelton PM, Weller CE, Chatterjee C. A facile *N*-mercaptoethoxyglycinamide (MEGA) Linker approach to peptide thioesterification and cyclization. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 11, 3946-3949.
 23. Gless BH, Olsen CA. Direct peptide cyclization and one-pot modification using the MeDbz Linker. *J. Org. Chem.* **2018**, 17, 10525-10534.
 24. Selvaraj A, Chen HT, Ya-Ting Huang A, Kao CL. Expedient on-resin modification of a peptide C-terminus through a benzotriazole linker. *Chem. Sci.* **2017**, 2, 345-349.
 25. Thombare VJ, Hutton CA. Rapid, Traceless, Ag^I-promoted macrocyclization of peptides possessing an *N*-terminal thioamide. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 15, 4998-5002.
 26. Mazmanian SK, Ton-That H, Schneewind O. Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **2001**, 5, 1049-1057.
 27. Mazmanian SK, Liu G, Ton-That H, Schneewind O. *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science* **1999**, 5428, 760-763.
 28. Cossart P, Jonquière R. Sortase, a universal target for therapeutic agents against gram-positive bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, 10, 5013-5015.
 29. Kumari P, Bowmik S, Paul SK, Biswas B, Banerjee SK, Murty US, Ravichandiran V, Mohan U. Sortase A: A chemoenzymatic approach for the labeling of cell surfaces. *Biotechnol. Bioeng.* **2021**,

- 12, 4577-4589.
30. Morgan HE, Turnbull WB, Webb ME. Challenges in the use of sortase and other peptide ligases for site-specific protein modification. *Chem. Soc. Rev.* **2022**, 10, 4121-4145.
 31. Podracky CJ, An C, DeSousa A, Dorr BM, Walsh DM, Liu DR. Laboratory evolution of a sortase enzyme that modifies amyloid- β protein. *Nat. Chem. Biol.* **2021**, 3, 317-325.
 32. Morgan HE, Arnott ZLP, Kamiński TP, Turnbull WB, Webb ME. Combined application of orthogonal sortases and depsipeptide substrates for dual protein labeling. *Bioconjug. Chem.* **2022**, 12, 2341-2347.
 33. Wu Z, Guo X, Guo Z. Sortase A-catalyzed peptide cyclization for the synthesis of macrocyclic peptides and glycopeptides. *Chem. Commun.* **2011**, 32, 9218-9220.
 34. Cheng X, Hong H, Zhou Z, Wu Z. Enzymatic on-resin peptide cleavage and *in situ* cyclization one-pot strategy for the synthesis of cyclopeptide and cyclotide. *J. Org. Chem.* **2018**, 22, 14078-14083.
 35. Nguyen GK, Wang S, Qiu Y, Hemu X, Lian Y, Tam JP. Butelase 1 is an Asx-specific ligase enabling peptide macrocyclization and synthesis. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 9, 732-738.
 36. Nguyen GK, Kam A, Loo S, Jansson AE, Pan LX, Tam JP. Butelase 1: A versatile ligase for peptide and protein macrocyclization. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 49, 15398-15401.
 37. Nguyen GK, Hemu X, Quek JP, Tam JP. Butelase-mediated macrocyclization of D-amino-acid-containing peptides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 41, 12802-12806.
 38. Yang R, Wong YH, Nguyen GKT, Tam JP, Lescar J, Wu B. Engineering a catalytically efficient recombinant protein ligase. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 15, 5351-5358.
 39. Weeks AM, Wells JA. Subtiligase-catalyzed peptide ligation. *Chem. Rev.* **2020**, 6, 3127-3160.
 40. Marcel Schmidt, Ana Toplak, Peter J. L. M. Quaedflieg, Hans Ippel, Gaston J. J. Richelle, Tilman M. Hackeng, Jan H. van Maarseveen, Timo Nuijens. Omniligase-1: A powerful tool for peptide head-to-tail cyclization. *Adv. Synth. Catal.* **2017**, 12, 2050-2055.
 41. Schmidt M, Toplak A, Quaedflieg PJLM, van Maarseveen JH, Nuijens T. Enzyme-catalyzed peptide cyclization. *Drug Discov. Today Technol.* **2017**, 26, 11-16.
 42. Süssmuth RD, Mainz A. Nonribosomal peptide synthesis-principles and prospects. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 14, 3770-3821.
 43. Strieker M, Tanović A, Marahiel MA. Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, 2, 234-240.
 44. Röttig M, Medema MH, Blin K, Weber T, Rausch C, Kohlbacher O. NRPSpredictor2-a web server

- for predicting NRPS adenylation domain specificity. *Nucleic. Acids Res.* **2011**, *39*, W362-W367.
45. Bozhüyük KAJ, Fleischhacker F, Linck A, Wesche F, Tietze A, Niesert CP, Bode HB. *De novo* design and engineering of non-ribosomal peptide synthetases. *Nat. Chem.* **2018**, *3*, 275-281.
 46. Bozhüyük KAJ, Linck A, Tietze A, Kranz J, Wesche F, Nowak S, Fleischhacker F, Shi YN, Grün P, Bode HB. Modification and *de novo* design of non-ribosomal peptide synthetases using specific assembly points within condensation domains. *Nat. Chem.* **2019**, *7*, 653-661.
 47. Read JA, Walsh CT. The lyngbyatoxin biosynthetic assembly line: chain release by four-electron reduction of a dipeptidyl thioester to the corresponding alcohol. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *51*, 15762-15763.
 48. Hu Y, Phelan V, Ntai I, Farnet CM, Zazopoulos E, Bachmann BO. Benzodiazepine biosynthesis in *Streptomyces refuineus*. *Chem. Biol.* **2007**, *6*, 691-701.
 49. Chhabra A, Haque AS, Pal RK, Goyal A, Rai R, Joshi S, Panjikar S, Pasha S, Sankaranarayanan R, Gokhale RS. Nonprocessive [2+2]^e- off-loading reductase domains from mycobacterial nonribosomal peptide synthetases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2012**, *15*, 5681-5686.
 50. Zipperer A, Konnerth MC, Laux C, Berscheid A, Janek D, Weidenmaier C, Burian M, Schilling NA, Slavetinsky C, Marschal M, Willmann M, Kalbacher H, Schitteck B, Brötz-Oesterheld H, Grond S, Peschel A, Krismer B. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature* **2016**, *7613*, 511-516.
 51. Gao X, Haynes SW, Ames BD, Wang P, Vien LP, Walsh CT, Tang Y. Cyclization of fungal nonribosomal peptides by a terminal condensation-like domain. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *10*, 823-830.
 52. Yang X, Feng P, Yin Y, Bushley K, Spatafora JW, Wang C. Cyclosporine biosynthesis in *Tolypocladium inflatum* benefits fungal adaptation to the environment. *mBio.* **2018**, *5*, e01211-e01218.
 53. Baccile JA, Le HH, Pfannenstiel BT, Bok JW, Gomez C, Brandenburger E, Hoffmeister D, Keller NP, Schroeder FC. Diketopiperazine formation in fungi requires dedicated cyclization and thiolation domains. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *41*, 14589-14593.
 54. Trauger JW, Kohli RM, Mootz HD, Marahiel MA, Walsh CT. Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. *Nature* **2000**, *6801*, 215-218.
 55. Kohli RM, Walsh CT, Burkart MD. Biomimetic synthesis and optimization of cyclic peptide antibiotics. *Nature* **2002**, *6898*, 658-661.
 56. Miller BR, Gulick AM. Structural biology of nonribosomal peptide synthetases. *Methods Mol.*

Biol. **2016**, *1401*, 3-29.

57. Izoré T, Cryle MJ. The many faces and important roles of protein-protein interactions during non-ribosomal peptide synthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2018**, *11*, 1120-1139.
58. Takada K, Ninomiya A, Naruse M, Sun Y, Miyazaki M, Nogi Y, Okada S, Matsunaga S. Surugamides A-E, cyclic octapeptides with four D-amino acid residues, from a marine *Streptomyces* sp.: LC-MS-aided inspection of partial hydrolysates for the distinction of D- and L-amino acid residues in the sequence. *J. Org. Chem.* **2013**, *13*, 6746-6750.
59. Ninomiya A, Katsuyama Y, Kuranaga T, Miyazaki M, Nogi Y, Okada S, Wakimoto T, Ohnishi Y, Matsunaga S, Takada K. Biosynthetic gene cluster for surugamide A encompasses an unrelated decapeptide, surugamide F. *Chembiochem.* **2016**, *18*, 1709-1712.
60. Flatt PM, Mahmud T. Biosynthesis of aminocyclitol-aminoglycoside antibiotics and related compounds. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *2*, 358-392.
61. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *3*, 403-10.
62. Yu D, Guo D, Zheng Y, Yang Y. A review of penicillin binding protein and group A *Streptococcus* with reduced- β -lactam susceptibility. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2023**, *13*, 1117160.
63. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *2*, 234-258.
64. Kitani S, Miyamoto KT, Takamatsu S, Herawati E, Iguchi H, Nishitomi K, Uchida M, Nagamitsu T, Omura S, Ikeda H, Nihira T. Avenolide, a *Streptomyces* hormone controlling antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *39*, 16410-1645.
65. Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA 3rd, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* **2009**, *5*, 343-345.
66. Jiang J, Tetzlaff CN, Takamatsu S, Iwatsuki M, Komatsu M, Ikeda H, Cane DE. Genome mining in *Streptomyces avermitilis*: A biochemical Baeyer-Villiger reaction and discovery of a new branch of the pentalenolactone family tree. *Biochemistry* **2009**, *27*, 6431-6440.
67. Nakano S, Okazaki S, Ishitsubo E, Kawahara N, Komeda H, Tokiwa H, Asano Y. Structural and computational analysis of peptide recognition mechanism of class-C type penicillin binding protein, alkaline D-peptidase from *Bacillus cereus* DF4-B. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 13836.
68. Tseng CC, Bruner SD, Kohli RM, Marahiel MA, Walsh CT, Sieber SA. Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase.

Biochemistry **2002**, *45*, 13350-13359.

69. Pohle S, Appelt C, Roux M, Fiedler HP, Süssmuth RD. Biosynthetic gene cluster of the non-ribosomally synthesized cyclodepsipeptide skylamycin: deciphering unprecedented ways of unusual hydroxylation reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *16*, 6194-61205.
70. Fortinez CM, Bloudoff K, Harrigan C, Sharon I, Strauss M, Schmeing TM. Structures and function of a tailoring oxidase in complex with a nonribosomal peptide synthetase module. *Nat. Commun.* **2022**, *1*, 548.
71. Wirtz DA, Schneberger N, Klöppel S, Richarz R, Geyer M, König GM, Hagelueken G, Crüsemann M. Adenylation Domain-guided recruitment of *trans*-acting nonheme monooxygenases in nonribosomal peptide biosynthesis. *ACS. Chem. Biol.* **2023**, *8*, 1748-1759.
72. Haslinger K, Brieke C, Uhlmann S, Sieverling L, Süssmuth RD, Cryle MJ. The structure of a transient complex of a nonribosomal peptide synthetase and a cytochrome P450 monooxygenase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *32*, 8518-8522.
73. Liu J, Guo Z, Wu T, Roy RS, Quadir F, Chen C, Cheng J. Enhancing AlphaFold-Multimer-based protein complex structure prediction with MULTICOM in CASP15. *Commun. Biol.* **2023**, *6*, 1140.
74. Johnson MN, Londergan CH, Charkoudian LK. Probing the phosphopantetheine arm conformations of acyl carrier proteins using vibrational spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *32*, 11240-11243.
75. Thoms C, Schupp PJ. Activated chemical defense in marine sponges-a case study on *Aplysinnella rhax*. *J. Chem. Ecol.* **2008**, *9*, 1242-1252.
76. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **2020**, *3*, 770-803.
77. Tang JW, Liu X, Ye W, Li ZR, Qian PY. Biosynthesis and bioactivities of microbial genotoxin colibactins. *Nat. Prod. Rep.* **2022**, *5*, 991-1014.
78. Jomori T, Matsuda K, Egami Y, Abe I, Takai A, Wakimoto T. Insights into phosphatase-activated chemical defense in a marine sponge holobiont. *RSC. Chem. Biol.* **2021**, *6*, 1600-1607.
79. Zhang H, Chen S. Cyclic peptide drugs approved in the last two decades (2001-2021). *RSC. Chem. Biol.* **2021**, *1*, 18-31.
80. Ji X, Nielsen AL, Heinis C. Cyclic peptides for drug development. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, e202308251.
81. Sayers EW, Cavanaugh M, Clark K, Pruitt KD, Sherry ST, Yankie L, Karsch-Mizrachi I. GenBank 2023 update. *Nucleic. Acids Res.* **2023**, *1*, 141-144.

82. Song Y, Li Q, Liu X, Chen Y, Zhang Y, Sun A, Zhang W, Zhang J, Ju J. Cyclic hexapeptides from the deep south china sea-derived *Streptomyces scopuliridis* SCSIO ZJ46 active against Pathogenic gram-positive bacteria. *J. Nat. Prod.* **2014**, 8, 1937-1941.
83. Son S, Hong YS, Jang M, Heo KT, Lee B, Jang JP, Kim JW, Ryoo IJ, Kim WG, Ko SK, Kim BY, Jang JH, Ahn JS. Genomics-driven discovery of chlorinated cyclic hexapeptides ulleungmycin A and B from a *Streptomyces* species. *J. Nat. Prod.* **2017**, 11, 3025-3031.
84. Singh MP, Petersen PJ, Weiss WJ, Janso JE, Luckman SW, Lenoy EB, Bradford PA, Testa RT, Greenstein M. Mannopeptimycins, new cyclic glycopeptide antibiotics produced by *Streptomyces hygroscopicus* LL-AC98: antibacterial and mechanistic activities. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 1, 62-69.
85. Mudalungu CM, von Törne WJ, Voigt K, Rückert C, Schmitz S, Sekurova ON, Zotchev SB, Süßmuth RD. Noursamycins, chlorinated cyclohexapeptides identified from molecular networking of *Streptomyces noursei* NTR-SR4. *J. Nat. Prod.* **2019**, 6, 1478-1486.
86. Holm L. Dali server: structural unification of protein families. *Nucleic. Acids Res.* **2022**, 1, 210-215.
87. Kim MK, An YJ, Na JH, Seol JH, Ryu JY, Lee JW, Kang LW, Chung KM, Lee JH, Moon JH, Lee JS, Cha SS. Structural and mechanistic insights into the inhibition of class C β -lactamases through the adenylation of the nucleophilic serine. *J. Antimicrob. Chemother.* **2017**, 3, 735-743.
88. Lahiri SD, Mangani S, Durand-Reville T, Benvenuti M, De Luca F, Sanyal G, Docquier JD. Structural insight into potent broad-spectrum inhibition with reversible recyclization mechanism: avibactam in complex with CTX-M-15 and *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, 6, 2496-505.
89. Behrendt R, White P, Offer J. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *J. Pept. Sci.* **2016**, 1, 4-27.
90. Palpal-Latoc D, Brimble MA, Harris PWR, Horsfall AJ. Factors influencing on-resin depsipeptide bond formation: case studies on daptomycin- and brevicidine-derived sequences. *Org. Biomol. Chem.* **2023**, 19, 4052-4060.
91. Elizabeth L. Bell, William Finnigan, Scott P. France, Anthony P. Green, Martin A. Hayes, Lorna J. Hepworth, Sarah L. Lovelock, Haruka Niikura, Sílvia Osuna, Elvira Romero, Katherine S. Ryan, Nicholas J. Turner, Sabine L. Flitsch. Biocatalysis. *Nat. Rev. Methods Primers* **2021**. 1, 46.
92. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Židek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-

- Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, 7873, 583-589.
93. Kaweewan I, Hemmi H, Komaki H, Kodani S. Isolation and structure determination of a new antibacterial peptide pentaminomycin C from *Streptomyces cacaoi* subsp. *cacaoi*. *J. Antibiot.* **2020**, 4, 224-229.
 94. Hwang S, Le LTHL, Jo SI, Shin J, Lee MJ, Oh DC. Pentaminomycins C-E: Cyclic Pentapeptides as Autophagy Inducers from a Mealworm Beetle Gut Bacterium. *Microorganisms* **2020**, 9, 1390.
 95. Sarkar S, Gu W, Schmidt EW. Expanding the chemical space of synthetic cyclic peptides using a promiscuous macrocyclase from prenylagaramide biosynthesis. *ACS. Catal.* **2020**, 13, 7146-7153.
 96. Bechtler C, Lamers C. Macrocyclization strategies for cyclic peptides and peptidomimetics. *RSC. Med. Chem.* **2021**, 8, 1325-1351.
 97. Booth TJ, Bozhüyük KAJ, Liston JD, Batey SFD, Lacey E, Wilkinson B. Bifurcation drives the evolution of assembly-line biosynthesis. *Nat. Commun.* **2022**, 1, 3498.
 98. Khalil ZG, Hill TA, De Leon Rodriguez LM, Lohman RJ, Hoang HN, Reiling N, Hillemann D, Brimble MA, Fairlie DP, Blumenthal A, Capon RJ. Structure-activity relationships of wollamide cyclic hexapeptides with activity against drug-resistant and intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, 3, e01773-18.
 99. Rollo RF, Mori G, Hill TA, Hillemann D, Niemann S, Homolka S, Fairlie DP, Blumenthal A. Wollamide cyclic hexapeptides synergize with established and new Tuberculosis antibiotics in targeting *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol. Spectr.* **2023**, 4, e0046523.
 100. Y.-C. Huang, C.-C. Chen, S.-J. Li, S. Gao, J. Shi, Y.-M. Li. Facile synthesis of C-terminal peptide hydrazine and thioester of NY-ESO-1 (A39-A68) from a Fmoc-hydrazine 2-chlorotrityl chloride resin. *Tetrahedron* **2014**, 70, 2951-2955.
 101. Backes, B. J.; Ellman, J. A. An alkanesulfonamide “safety-catch” linker for solid-phase synthesis. *J. Org. Chem.* **1999**, 7, 2322-2330.
 102. Liu Y, Zheng T, Bruner SD. Structural basis for phosphopantetheinyl carrier domain interactions in the terminal module of nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **2011**, 11, 1482-1488.
 103. Rusnak F, Sakaitani M, Drueckhammer D, Reichert J, Walsh CT. Biosynthesis of the *Escherichia coli* siderophore enterobactin: sequence of the entF gene, expression and purification of EntF, and analysis of covalent phosphopantetheine. *Biochemistry* **1991**, 11, 2916-2927.

104. Gehring AM, Bradley KA, Walsh CT. Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. *Biochemistry* **1997**, 28, 8495-8503.
105. Wang Y, Xue P, Cao M, Yu T, Lane ST, Zhao H. Directed evolution: methodologies and applications. *Chem. Rev.* **2021**, 20, 12384-12444.
106. Siedhoff NE, Schwaneberg U, Davari MD. Machine learning-assisted enzyme engineering. *Methods Enzymol.* **2020**, 643, 281-315.
107. Chow HY, Po KHL, Jin K, Qiao G, Sun Z, Ma W, Ye X, Zhou N, Chen S, Li X. Establishing the structure-activity relationship of daptomycin. *ACS. Med. Chem. Lett.* **2020**, 7, 1442-1449.
108. Slingerland CJ, Kotsogianni I, Wesseling CMJ, Martin NI. Polymyxin stereochemistry and its role in antibacterial activity and outer membrane disruption. *ACS. Infect. Dis.* **2022**, 12, 2396-2404.
109. Sakai R, Rinehart KL, Kishore V, Kundu B, Faircloth G, Gloer JB, Carney JR, Namikoshi M, Sun F, Hughes RG Jr, García Grávalos D, de Quesada TG, Wilson GR, Heid RM. Structure-activity relationships of the didemnins. *J. Med. Chem.* **1996**, 14, 2819-2834.
110. Moreira R, Wolfe J, Taylor SD. A high-yielding solid-phase total synthesis of daptomycin using a Fmoc SPPS stable kynurenine synthon. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, 14, 3144-3153.
111. Murai M, Kaji T, Kuranaga T, Hamamoto H, Sekimizu K, Inoue M. Total synthesis and biological evaluation of the antibiotic lysocin E and its enantiomeric, epimeric, and *N*-demethylated analogues. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 5, 1556-1560.
112. Kuranaga T, Enomoto A, Tan H, Fujita K, Wakimoto T. Total synthesis of theonella peptide Id. *Org. Lett.* **2017**, 6, 1366-1369.
113. Palpal-Latoc D, Brimble MA, Harris PWR, Horsfall AJ. Factors influencing on-resin depsipeptide bond formation: case studies on daptomycin- and brevicidine-derived sequences. *Org. Biomol. Chem.* **2023**, 19, 4052-4060.
114. Li X, Lam HY, Zhang Y, Chan CK. Salicylaldehyde ester-induced chemoselective peptide ligations: enabling generation of natural peptidic linkages at the serine/threonine sites. *Org. Lett.* **2010**, 8, 1724-1727.
115. Liu H, Li X. Serine/threonine ligation: origin, mechanistic aspects, and applications. *Acc. Chem. Res.* **2018**, 7, 1643-1655.
116. Zhang Y, Xu C, Lam HY, Lee CL, Li X. Protein chemical synthesis by serine and threonine

- ligation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *17*, 6657-6662.
117. Wang J, Li X. Complex cyclic peptide synthesis *via* serine/threonine ligation chemistry. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, *54*, 128430.
 118. Kaguchi R, Katsuyama A, Sato T, Takahashi S, Horiuchi M, Yokota SI, Ichikawa S. Discovery of biologically optimized polymyxin derivatives facilitated by peptide scanning and *in situ* screening chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *6*, 3665-3681.
 119. Pitzer J, Steiner K. Amides in nature and biocatalysis. *J. Biotechnol.* **2016**, *235*, 32-46.
 120. Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
 121. Chang CD, Meienhofer J. Solid-phase peptide synthesis using mild base cleavage of N alpha-fluorenylmethyloxycarbonylamino acids, exemplified by a synthesis of dihydrosomatostatin. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *3*, 246-249.
 122. E. Massolo , M. Pirola and M. Benaglia. Amide bond formation strategies: Latest advances on a dateless transformation, *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, 4641-4651.
 123. Subirós-Funosas R, Prohens R, Barbas R, El-Faham A, Albericio F. Oxyma: an efficient additive for peptide synthesis to replace the benzotriazole-based HOBt and HOAt with a lower risk of explosion. *Chemistry* **2009**, *37*, 9394-9403.
 124. El-Faham A, Subirós Funosas R, Prohens R, Albericio F. COMU: A safer and more effective replacement for benzotriazole-based uronium coupling reagents. *Chemistry* **2009**, *37*, 9404-9416.
 125. J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro. PyBOP®: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208.
 126. Kuranaga T, Matsuda K, Sano A, Kobayashi M, Ninomiya A, Takada K, Matsunaga S, Wakimoto T. Total synthesis of the nonribosomal peptide surugamideB and identification of a new offloading cyclase family. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *30*, 9447-9451.
 127. Matsuda K, Kobayashi M, Kuranaga T, Takada K, Ikeda H, Matsunaga S, Wakimoto T. SurE is a *trans*-acting thioesterase cyclizing two distinct non-ribosomal peptides. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *5*, 1058-1061.
 128. Kobayashi M, Fujita K, Matsuda K, Wakimoto T. Chemo-enzymatic synthesis of non-ribosomal macrolactams by a penicillin-binding protein-type thioesterase. *Methods Mol. Biol.* **2022**, *2670*, 127-144.
 129. Matsuda K, Zhai R, Mori T, Kobayashi M, Sano I, Abe I, Wakimoto T. Heterochiral coupling in non-ribosomal peptide macrolactamization. *Nat. Catal.* **2020**, *3*, 507-515.

130. Kobayashi M, Fujita K, Matsuda K, Wakimoto T. Streamlined chemoenzymatic synthesis of cyclic peptides by non-ribosomal peptide cyclases. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *6*, 3270-3275.
131. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2498-2504.
132. Kim JH, Komatsu M, Shin-Ya K, Omura S, Ikeda H. Distribution and functional analysis of the phosphopantetheinyl transferase superfamily in *Actinomycetales* microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *26*, 6828-6833.
133. Sota M, Sakoda A, Ikeda H. Efficient transposition of Tn4556 by alterations in inverted repeats using a delivery vector carrying a counter-selectable marker for *Streptomyces*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *3-4*, 477-482.
134. Komatsu M, Uchiyama T, Omura S, Cane DE, Ikeda H. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *6*, 2646-2651.
135. Edgar RC. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC. Bioinformatics* **2004**, *5*, 113.
136. Shen W, Le S, Li Y, Hu F. SeqKit: A cross-platform and ultrafast toolkit for FASTA/Q file manipulation. *PloS One* **2016**, *10*, e0163962.
137. Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol. Biol.* **1999**, *112*, 531-552.

謝辞

本研究を行うにあたり、指導教員として研究・論文の執筆で多大なご指導、ならびにご助言を下さいました北海道大学大学院薬学研究院天然物化学研究室の脇本 敏幸 教授に深く御礼申し上げます。研究面のみならず、今後の進路などのプライベート面でも多くのご助言や励ましのお言葉をいただきました。また、国内外を含む学会発表や論文の執筆など多くの貴重な経験をいただきました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

本論文を執筆するにあたり、ご多忙の中、副査として貴重なご助言、ならびにご討論を賜りました北海道大学大学院薬学研究院創薬科学教育センター有機合成医薬学部門の市川 聡 教授、ならびに薬師寺 文華 准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、終始丁寧なご指導、ならびにご討論を賜りました北海道大学大学院薬学研究院天然物化学研究室内の松田 研一 講師に深く御礼申し上げます。研究室配属当初の右も左もわからない状態の私に生物実験を基礎から丁寧に教えていただくとともに、論文の執筆や学会発表の準備に際し多くのご助言を賜りました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

SurE の遺伝子破壊実験を行うにあたり、遺伝子破壊用プラスミドをご提供いただきました北里大学大学院感染制御科学府の池田 治生 名誉教授に厚く御礼申し上げます。

SurE の X 線結晶構造解析を実施するにあたり、多大なるご協力を賜りました東京大学大学院薬学系研究科天然物化学研究室内の阿部 郁朗 教授、森 貴裕 准教授、ならびに Zhai Rui 博士に厚く御礼申し上げます。

STL を利用した環状ペプチドの構造多様化の実施に際し、SAL エステル基質をご提供いただきました北海道大学大学院薬学研究院創薬科学教育センター有機合成医薬学部門の勝山 彬 助教、ならびに家口 凜太郎 博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、終始丁寧なご指導を賜りました京都大学大学院薬学研究科システムケモセラピー・制御分子学分野の倉永 健史 特任講師に厚く御礼申し上げます。本研究で基盤となる固相合成法をはじめ、有機化学の知識や技術を事細かくご教授いただきました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、丁寧なご指導ならびにご討論を賜りました北海道大学大学院薬学研究院天然物化学研究室内の吉村 彩 助教に深く感謝いたします。セミナーの際には建設的かつ鋭いご助言を沢山賜りました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

大学院での生活を送るにあたり、公私にわたり多大なご協力、ご指導を賜りつつ楽しく過ごさせてくださいました、北海道大学大学院薬学研究院天然物化学研究室内の先輩、同輩

と後輩の皆様に厚く御礼申し上げます。

日々の研究活動に際し、研究費や経済面でのご支援を賜りました、北海道大学 DX 博士人材フェローシップの関係者の皆様、ならびに特別研究員採用後に多大なご支援を賜りました日本学術振興会の関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、今日まで精神的・経済的に支えていただきました家族、友人に心より感謝いたします。

皆さま、どうもありがとうございました。

令和6年3月

小林 雅和