

環状リポペプチドの化学-酵素ハイブリッド合成

～有用生物活性環状ペプチドの迅速な同定に期待～

ポイント

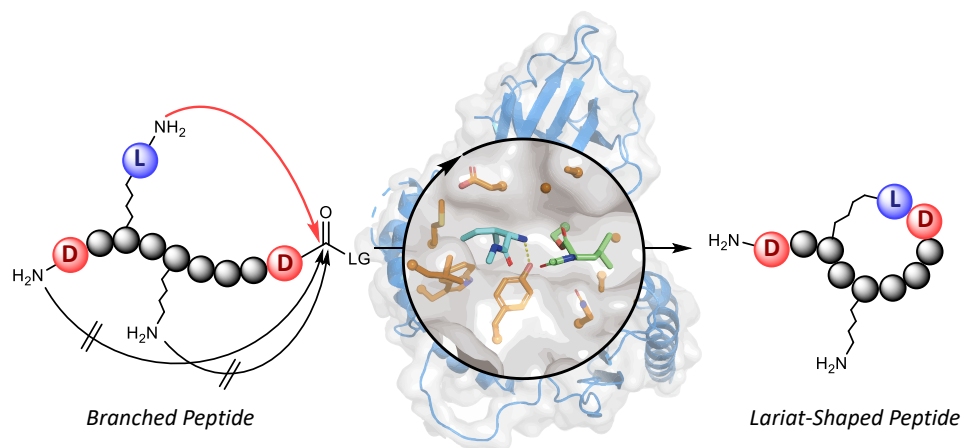
- ・ペプチド主鎖末端に対して選択的な非リボソームペプチド環化酵素をラリアット環構築に転用。
- ・選択的アシル化反応と組み合わせにより環状リポペプチドのモジュラー型合成戦略を確立。
- ・複数の合成産物が非結核性抗酸菌の生育を抑制。

概要

北海道大学大学院薬学研究院の脇本敏幸教授、松田研一准教授らの研究グループは、同大学大学院薬学研究院の市川 聡教授、勝山 彬講師、国立感染症研究所の星野仁彦博士、深野華子博士、平林亜希博士、鈴木仁人博士らとの共同研究により、非リボソームペプチド環化酵素を利用した環状リポペプチド^{*1}の効率的な化学-酵素的合成法を開発しました。

大環状骨格と脂肪側鎖を併せもつ環状リポペプチドは重要な抗菌化合物群ですが、化学構造が複雑なため構造多様性に富むライブラリー構築は困難です。本研究では、ペプチド主鎖両末端を結合する head-to-tail 型^{*2}の非リボソームペプチド環化酵素が、基質設計の工夫により head-to-side chain 型^{*3}のラリアット型環状ペプチド合成に転用可能であること示しました。さらに酵素反応と位置選択的アシル化反応を連続的に実施することで、様々な配列や環サイズの環状リポペプチドの迅速な合成・評価が可能になりました。本手法により合成した複数の新規環状リポペプチドが非結核性抗酸菌 (*Mycobacterium intracellulare*) に対して 8-16 $\mu\text{g/mL}$ で増殖を 50%阻害しました。天然物生合成酵素は、進化の過程で自然が生み出した洗練された物質変換の仕組みであり、これを有機合成化学にうまく組み込むアプローチは、将来の有用物質創成に大きく貢献すると期待されます。

なお、本研究成果は、2025 年 11 月 4 日（火）公開の Nature Chemistry 誌にオンライン掲載されました。



非リボソームペプチド環化酵素によるラリアット環の選択的な構築

【背景】

ダプトマイシンやコリスチンに代表される環状リポペプチドは、環状ペプチド部位と脂肪酸鎖を併せもつ複雑な中分子化合物であり、細胞表層の様々な分子標的と相互作用することで強力な抗菌活性を示します。抗菌薬として非常に重要な化合物群ですが、その化学構造は複雑であり、化学合成するためには直交性のある複数の保護基を用いて大環状化と脂肪酸鎖導入を正確に行う必要があります。このため多様な環状リポペプチドを効率よくライブラリー化することは困難でした。

自然界における環状ペプチドの生合成過程では、ペプチド環化酵素が環化反応を触媒します。ペプチド環化酵素は、①保護基を用いることなく、②重合反応やエピメリ化等の副反応を伴わずに、③室温条件下、水系溶媒中で大環状骨格を正確に構築します。このため酵素反応はペプチドを環化するための有効な手法として注目されています。

非リボソームペプチド生合成経路^{*4}は環状ペプチドを供給する主要な代謝経路であり、ラリアット型の環状骨格を構築する環化酵素がいくつも知られています。しかしこれらの酵素はいずれも本来の基質やそれに非常によく似た基質に対してのみ作用する厳密な選択性を示すことから、これらを利用して多様性に富むラリアット型環状ペプチドを合成することはできませんでした。

研究グループはこれまで、ペプチドの両端をつなげて環化する新しいタイプの非リボソームペプチド環化酵素「ペニシリン結合型チオエステラーゼ (PBP-type TE)^{*5}」を発見し、これが様々な構造の環状ペプチドの環化を触媒することを明らかにしてきました（【関連するプレスリリース】①）。また最近では酵素反応基質の簡便な合成法を開発し、これを酵素的環化反応と連続して実施することで、合成中間体の精製工程を要さず、簡便かつ効率的な環状ペプチド化学—酵素合成法を開発しました（【関連するプレスリリース】②）（図 1a 上段）。本手法により様々な配列や環サイズの環状ペプチドの合成が可能になった一方、合成産物の環化様式はペプチドの両端が結合したいわゆる head-to-tail 型に限定的であり、head-to-side chain 型の環化様式をもつラリアット型環状ペプチドを合成することはできませんでした。

【研究成果】

本研究では、上述の化学—酵素合成法（【関連するプレスリリース】②）を拡張し、head-to-side chain 型の環化様式をもつラリアット型環状ペプチドの効率的な化学—酵素合成法を開発しました（図 1a 下段）。PBP-type TE は直鎖状の基質ペプチド主鎖の N 末端を特異的に認識し、これを求核基とする head-to-tail 型の環化反応を触媒します（図 1a 上段）。そこで、配列内部に擬似的な N 末端（偽 N 末端）としてジペプチドユニットを導入した分岐型の基質ペプチドを設計・合成し酵素反応を行いました。その結果、主鎖 N 末端と C 末端で結合した head-to-tail 型の環状ペプチドに加え、偽 N 末端と C 末端が結合したラリアット型環状ペプチドが同程度得られました。このことから PBP-type TE は主鎖 N 末端だけでなく偽 N 末端も求核基として認識し環化反応を触媒できることが分かりました。

さらに PBP-type TE が L-アミノ酸のみを求核基として選択的に受け入れる性質を逆にとり（【関連するプレスリリース】③）、基質の主鎖 N 末端に酵素が受け付けない D-アミノ酸を導入しました。その結果、偽 N 末端を求核基とする環化反応が選択的に進行し、ラリアット型環状ペプチドのみが得られました。酵素反応に用いた基質に含まれる三つの求核基（主鎖 N 末端、偽 N 末端、リジン側鎖ε-アミノ基）はいずれも無保護であり、縮合剤等による化学的な環化反応では3通りの環化パターンが考えられますが、モデル基質を用いた酵素反応ではラリアット型環状ペプチドのみが単一の産物として定量的に得られました。

本手法の一般性を検証するため、基質選択性の異なる 2 種類の PBP-type TE (SurE, WolJ) と I 型チオエステラーゼ (TycC-TE)*⁶ に対して同様の変換を検討した結果、いずれの酵素も非常に寛容な選択性を示し、様々な配列及び環サイズをもったラリアット型環状ペプチドを高い環化反応収率で合成可能でした。反応収率は構築する環サイズに依存し、SurE の場合は 25 員環より大きい環状骨格を効率よく構築した一方、それ以下では反応収率は著しく低下しました。WolJ はサイズの比較的小さい環形成に向いており、16 員環よりも大きな環構築を効率よく触媒しました。興味深いことに、PBP-type TE が求核基に L-アミノ酸を用いることとは対照的に、TycC-TE は D-アミノ酸を求核基とするラリアット環形成を選択的に触媒しました。このため酵素触媒を適切に選択することで、L-/D-アミノ酸いずれを求核基とする場合にもラリアット骨格の構築が可能になりました。

酵素反応は高い産物選択性で進行するため、得られた産物は単離、精製を要さず、直接さらなる構造修飾反応に供することができます。そこで、環化反応に関与せずにとり残されている無保護の主鎖 N 末端にアシル基を選択的に導入することで、環状リポペプチドの合成を検討しました。具体的には、酵素反応の基質となる分岐型ペプチドの主鎖 N 末端に D-セリンを導入してラリアット骨格を構築した後、酵素反応液に直接セリン/スレオニンライゲーションを実施し、主鎖 N 末端 D-セリンをアシル化しました。これにより分岐型ペプチド基質から「酵素的環化反応」と「位置選択的アシル基導入」をワンポットで実施する環状リポペプチドのモジュラー合成が可能になりました (図 1b)。同手法で 3 種類のペプチド基質と 17 種類のアシル基を組み合わせ、51 種類の環状リポペプチドのサンプルを調製し、反応産物を単離することなく、*Mycobacterium intracellulare*、*Mycobacterium abscessus*、*Staphylococcus aureus*、*Escherichia coli* に対する抗菌活性を指標にスクリーニングしたところ、複数のサンプルにおいて非結核性抗酸菌 *M. intracellulare* に対する増殖抑制効果がみられました。これらを再合成し評価したところ、8 種類の化合物が 8-16 mg/ml の濃度で *M. Intracellulare* の生育を 50% 阻害しました。

【今後への期待】

本研究では偽 N 末端を鍵とする基質設計の工夫により、head-to-tail 型の非リボソームペプチド環化酵素をラリアット型環状ペプチド合成に転用しました。天然物生合成酵素のもつユニークな反応性や選択性を理解し活用することで、天然物と同等の複雑さをもつ中分子を迅速に合成・評価し、ヒット化合物を複数得られたことは、有用物質の創成における天然物生合成酵素の類稀なポテンシャルを端的に表しています。天然物生合成酵素は、進化の過程で自然が生み出した洗練された物質変換の仕組みであり、これを有機合成化学にうまく組み込むアプローチは、将来の有用物質創成に大きく貢献すると期待されます。

【謝辞】

本研究は、文部科学省科学研究費補助金 学術変革領域研究 (A) 「予知生合成科学」、基盤 A (JP25H00907)、基盤 B (JP21H02635、JP24K01659)、挑戦的研究 (開拓) (JP23K17410)、若手研究 (JP22K15302)、特別研究員奨励費 (JP22KJ0097)、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) (CREST: JP25gm1610007、BINDS: JP25ama121039、JP25ak0101256)、国立研究開発法人科学技術振興機構 (JST)、A-STEP (MJTR24U6)、ACT-X「生命と化学」(MJAX201F)、創発的研究 (MJFR233U)、SPRING (MJSP2119)、北海道大学国際連携研究教育局バイオサーフェス創薬グローバルステーション、公益財団法人日本応用酵素協会、公益財団法人テルモ生命科学振興財団の支援を受けて行われました。

【関連するプレスリリース】

①北海道大学プレスリリース「ペニシリン結合タンパク質によるペプチド環化～D-アミノ酸含有環状ペプチドの効率的合成に期待～」

公表日：2018年6月18日（月）

U R L： https://www.hokudai.ac.jp/news/180618_pr.pdf

②北海道大学プレスリリース「効率的な環状ペプチドの化学-酵素ハイブリッド合成法を開発～環境調和性の高い環状ペプチド製造法の発展に期待～」

公表日：2023年1月20日（金）

U R L： https://www.hokudai.ac.jp/news/pdf/230120_pr2.pdf

③北海道大学・東京大学共同プレスリリース「非リボソームペプチドの環化機構を解明～ペプチド環化生体触媒の開発に期待～」

公表日：2020年5月5日（火）

U R L： https://www.hokudai.ac.jp/news/pdf/200507_pr.pdf

論文情報

論文名	Non-Ribosomal Peptide Cyclases-Directed Chemoenzymatic Synthesis of Lariat Lipopeptides（非リボソームペプチドによるラリアットリポペプチドの化学-酵素合成）
著者名	小林雅和 ^{1#} 、松田研一 ^{1#*} 、山田惟人 ¹ 、市原凜太郎 ¹ 、小野澤菜帆 ¹ 、深野華子 ² 、星野仁彦 ² 、平林亜希 ³ 、鈴木仁人 ³ 、勝山 彬 ¹ 、市川 聡 ¹ 、脇本敏幸 ^{1*} （ ¹ 北海道大学大学院薬学研究院、 ² 国立感染症研究所ハンセン病研究センター、 ³ 国立感染症研究所薬剤耐性研究センター）（#筆頭著者、*共同責任著者）
雑誌名	Nature Chemistry（化学全般の専門誌）
D O I	10.1038/s41557-025-01979-6
公表日	2025年11月4日（火）（オンライン公開）

お問い合わせ先

北海道大学大学院薬学研究院 教授 脇本敏幸（わきもととしゆき）

T E L 011-706-3239 F A X 011-706-3922 メール wakimoto@pharm.hokudai.ac.jp

U R L <https://www.pharm.hokudai.ac.jp/tennen/>

北海道大学大学院薬学研究院 准教授 松田研一（まつだけんいち）

T E L 011-706-3241 F A X 011-706-3922 メール kematsuda@pharm.hokudai.ac.jp

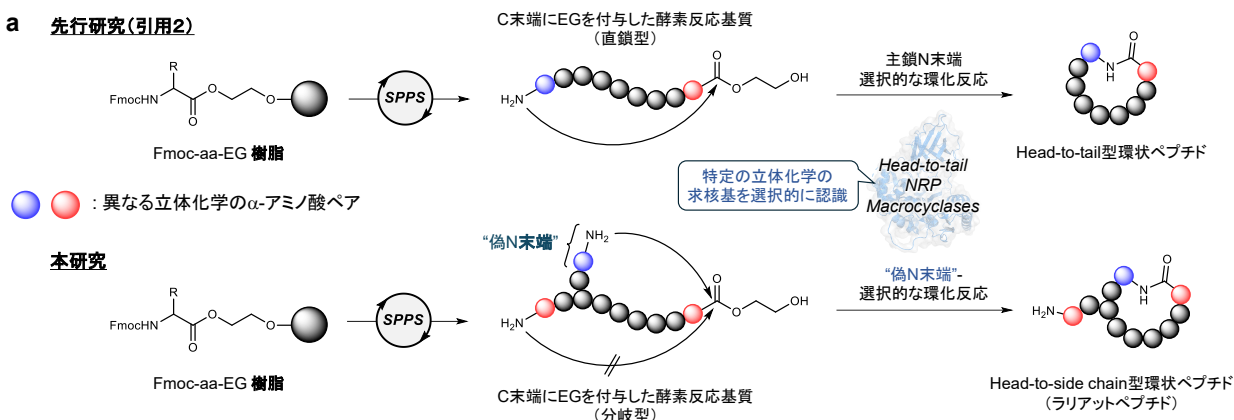
配信元

北海道大学社会共創部広報課（〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目）

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

a 先行研究(引用2)



本研究

b

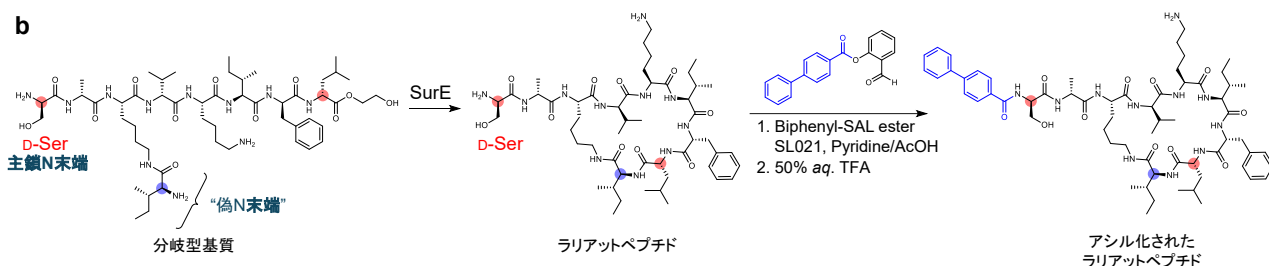


図 1. 非リボソームペプチド環化酵素を用いた環状リポペプチドの合成方法

【用語解説】

- *1 環状リポペプチド … ペプチド配列内部のリシンやセリン残基等の側鎖がC末端と結合した大環状骨格にくわえて主鎖N末端に脂肪側鎖が結合した修飾ペプチドの総称。
- *2 head-to-tail 型 … ペプチド配列主鎖C末端（head）と主鎖N末端（tail）が結合する環化様式。
- *3 head-to-side chain 型 … ペプチド配列主鎖C末端（head）と内部配列の側鎖可能基（side chain）が結合する環化様式。
- *4 非リボソームペプチド生合成経路 … mRNAに依存しない巨大酵素である非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）を介したペプチド生合成経路。ラリアットリポペプチドだけでなく、b-ラクタム（ペニシリン等）やグリコペプチド（バンコマイシン等）といった抗菌薬、免疫抑制剤シクロスポリン等、临床上重要な化合物が本代謝経路によって生合成される。
- *5 ペニシリン結合型チオエステラーゼ（PBP-type TE） … 当研究グループが独自に発見し、2018年に報告した新しいタイプのペプチド環化酵素（【関連するプレスリリース】①）。ペニシリン結合タンパク質（PBP）にアミノ酸配列相同性を示す。従来の非リボソームペプチド環化酵素（I型チオエステラーゼ^{*6}）は巨大なNRPSのC末端に融合したタンパク質ドメインとして存在するのに対し、PBP-type TEは350アミノ酸残基程度の単独酵素として、NRPSから独立して存在する。
- *6 I型チオエステラーゼ（TycC-TE） … NRPSのC末端に融合して存在する従来型の環化酵素の総称。TycC-TEは*Brevibacillus brevis*が産生する抗菌性環状ペプチド tyrocidineの生合成を担うNRPSに融合した環化ドメイン。