

令和 2 年 2 月 21 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07226

研究課題名(和文)糸状菌由来リボソーム・ペプチド合成遺伝子のバイオインフォマティクス解析による探索

研究課題名(英文)Bioinformatics analyses to search for ribosomal peptide biosynthetic genes from filamentous fungi

研究代表者

長野 希美(NAGANO, Nozomi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・情報・人間工学領域・主任研究員

研究者番号：70357648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：米国 DOE Joint Genome Institute (JGI) Genome Portalで公開されている Ascomycota/Pezizomycotina (299ゲノム)、Basidiomycota/Agaricomycotina(176)を含む623の菌類ゲノムの解析を行い、リボソーム・ペプチド(RiP)前駆体候補遺伝子、ustYaホモログ遺伝子の予測を行った。また、RiP前駆体候補遺伝子の近傍(2万bp以内)の遺伝子のドメイン予測による機能解析やRiP前駆体遺伝子産物のシグナルペプチドを除くアミノ酸組成の解析も行った。RiP前駆体候補遺伝子等の予測結果の概要のウェブサイトを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者らが見出した新規環状リボソーム・ペプチドも含め二次代謝物の多くは、微量にしか生成されないため、これまで同定されてこなかった可能性が高い。しかしながら、バイオインフォマティクス技術により菌類ゲノム解析を進め、機能未知遺伝子の役割を解析することにより、新しい菌類二次代謝物の網羅的な発見に至ると考えられる。また、我が国では、醤油・味噌等の食品産業により、カビやキノコの培養技術も高く、遺伝子工学により、微量の新規生理活性物質を大量に合成する技術の発展にもつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：623 fungus genome data, including 299 data of Ascomycota/Pezizomycotina, and 176 data of Basidiomycota/Agaricomycotina from Dikarya of fungi, which have been published by JGI Genome Portal of the DOE Joint Genome Institute (JGI), were analyzed to predict precursor gene candidates for ribosomal peptides (RiPs), and ustYa homologous genes. In addition, functional analyses of the nearby genes (within 20,000 bp) of the predicted RiP precursor candidates were performed. Amino acid composition of the gene products of the RiP precursors, whose signal peptides were excluded, was also analyzed. Furthermore, the web site for the results of the analyses was developed.

研究分野：酵素蛋白質のバイオインフォマティクス

キーワード：糸状菌 ゲノム 遺伝子 リボソーム・ペプチド バイオインフォマティクス 酵素 二次代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

国内外の研究動向及び位置づけ：麹菌などのカビ（糸状菌）は、エバーメクチンなどが同定された放線菌などの細菌と共に、多様な二次代謝物を合成することが知られ、醤油など食品業界等では大量培養する技術なども確立されている微生物である。糸状菌・二次代謝物には、アフラトキシンのような毒素から、ペニシリン（抗生物質）、シクロスポリン（免疫抑制剤）のような薬剤に至る多様な生理活性物質がある。それらの生合成は、主に非リボソーム・ペプチド合成酵素（NRPS）、ポリケチド合成酵素（PKS）、テルペン合成酵素などによるが、こうした酵素は、特徴的な配列モチーフを持つドメインが存在するために、SMURF (Khalidi *et al.*, 2010)、AntiSMASH (Medema *et al.*, 2011) 等の検出プログラムにより、遺伝配列情報から容易に同定できる。他方で、糸状菌ゲノムには、機能未知の遺伝子も依然として多く、こうした特徴的な配列モチーフを持たない生合成酵素も多数存在すると考えられる。研究代表者と共同研究者らは、近年、配列モチーフ情報によらない二次代謝遺伝子クラスター検出アルゴリズム（MIDDAS-M法）を用いて、糸状菌 *Aspergillus flavus* から、二次代謝物質として知られる Ustiloxin B の生合成遺伝子クラスターを同定した (Umemura *et al.*, 2013)。

着想に至った経緯：Ustiloxin B は、Tyr-Ala-Ile-Gly (YAIG) からなるテトラ・ペプチドが Tyr の芳香環と Ile の側鎖部分でエーテル結合によって環状化された構造を骨格とし、Tyr が非蛋白質原性アミノ酸ノルバリンで修飾されたペプチド化合物である。糸状菌のペプチド系二次代謝物が、従来、NRPS によって合成されているという報告しかなかったことから、この化合物も当初 NRPS によって合成されていると考えられたが、同定された遺伝子クラスターには、NRPS の遺伝子が含まれていなかった。そこで、研究代表者は、蛋白質、酵素のデータベース解析の経験に基づき、Ustiloxin B の生合成遺伝子クラスターを解析した結果、転写因子、トランスポーターやペプチダーゼや P450 のような機能既知の酵素遺伝子の他に、Ustiloxin B の核となる YAIG モチーフを 16 個含む前駆体遺伝子 (ustA; AFLA_094980) が存在する事が判明した (Umemura, Nagano *et al.*, 2014)。この前駆体遺伝子産物の配列は、N 末端のシグナル・ペプチドで始まり、上記 YAIG と Kex2 ペプチダーゼで切断される部位 (KR) を含むペプチドが、繰り返されている (Umemura, Nagano *et al.*, 2014)。前駆体遺伝子 ustA を含む Ustiloxin 生合成遺伝子の多くは機能既知の遺伝子であったが、その中には環状化に直接関与する遺伝子は見つからなかった。他方で、研究代表者は、機能未知の遺伝子 ustYa、ustYb が、Ustiloxin B の Tyr と Ile のエーテル結合を形成する環状化に関与していることを示唆した (Nagano *et al.*, 2016)。ustYa、ustYb は、互いに進化的類縁関係があり (ホモログ)、主に糸状菌やキノコ類などの真菌類に特異的に存在する事が判明した。更に、前駆体遺伝子 ustA のシグナル・ペプチドがあり、繰返配列を持つ特徴や ustYa/Yb 遺伝子の配列情報を基に、20 種類の *Aspergillus* 属の糸状菌ゲノムを解析した結果、ゲノム当り、約 100 個近くのリボソーム・ペプチド (RiP) の前駆体遺伝子候補が見つかり、それらのうち 4~5 個の前駆体遺伝子の近傍には、上記 ustYa/Yb ホモログ遺伝子が存在している事を見出した (Nagano *et al.*, 2016)。配列解析により ustiloxin 以外に 40 種類以上の前駆体配列が存在する事も判明した (Nagano *et al.*, 2016)。ustYa/Yb ホモログ遺伝子と共役している前駆体遺伝子の中から、ustiloxin とは異なる新規の環状 RiP (Asperipin-2a と命名) が合成されることも示し、ustYa/Yb ホモログ遺伝子が環状化酵素遺伝子である事を示した (Nagano *et al.*, 2016)。ustYa/Yb ホモログ遺伝子と共役している前駆体遺伝子は、ustiloxin の前駆体遺伝子と同様に、全般的に芳香族アミノ酸を含むものが多く、Kex2 切断部位を持つものが多い。ustYa/Yb ホモログ遺伝子の 50% 弱は、RiP 前駆体遺伝子の近傍にないため、他の二次代謝系に関与している可能性もある (Nagano *et al.*, 2016)。

2. 研究の目的

カビ（糸状菌）やキノコなどの真菌類は、放線菌などの細菌と同様に多様な二次代謝物を作ることが知られているが、二次代謝を担う遺伝子の多くは依然として機能未知である。研究代表者は近年、糸状菌において、二次代謝物として、リボソーム・ペプチド (RiP) の前駆体遺伝子と真菌類特有の新規修飾酵素遺伝子を発見した。RiP 前駆体候補遺伝子は、各糸状菌ゲノムから約 100 個同定されたが、生合成に関与する修飾酵素遺伝子が不明な場合が多い。そこで、バイオインフォマティクス解析により、RiP 前駆体遺伝子の近傍の機能未知遺伝子などの機能予測を行う。逆に、研究代表者が見出した新規修飾酵素遺伝子が、RiP 前駆体遺伝子の近傍に存在しない場合、それらの遺伝子についても解析することにより、糸状菌二次代謝の生合成系の解明に寄与する。

3. 研究の方法

米国・DOE Joint Genome Institute (JGI) JGI Genome Portal で公開されている Ascomycota/Pezizomycotina (299 ゲノム)、Basidiomycota/Agaricomycotina (176 ゲノム) を含む 623 の菌類ゲノムの解析を行った。主に下記のゲノム解析により遺伝子の解析を行った。

- SignalP-4.1 によるシグナル・ペプチドの有無の解析
- TMHMM-2.0c による膜貫通領域予測
- ドメイン予測；蛋白質ファミリーデータベース・Pfam Ver.30 の Pfam-A ドメインを対象に、HMMer v3.1b2 の hmmsearch を用いて、ドメイン検索を行った。
- 繰り返し配列解析

- Kex2 プロテアーゼによる切断部位予測

繰り返し配列解析については、従来の手法の改良を行った。上記の解析結果を基に、RiP 前駆体候補遺伝子、ustYa/Yb ホモログ遺伝子の予測を行った。RiP 前駆体候補遺伝子は、シグナル・ペプチドを持ち、繰り返し配列のスコアが 0.1 以上となる配列を候補遺伝子とした。また、Kex2 切断部位が全くない遺伝子は ustYa 共役 RiP 候補遺伝子から外した。当初、ドメイン予測により、Pfam で機能未知となる遺伝子を RiP 前駆体候補遺伝子として絞り込むべきか検討したが、協力研究者の梅村博士と議論した結果、Pfam で機能が同定される場合も候補遺伝子として挙げることにした。ustYa/Yb ホモログ遺伝子は、ドメイン予測により、Pfam の PF11807 (DUF3328) ドメインを含む遺伝子を同定した。

また、RiP 前駆体候補遺伝子の近傍 (2 万 bp 以内) の遺伝子のドメイン予測による機能解析も行った。RiP 前駆体候補遺伝子の遺伝子産物のシグナル・ペプチドを除くアミノ酸組成の解析も行った。

4. 研究成果

菌類ゲノムの分子系統分類に基づく解析:

表 1 に、解析を行った 623 菌類ゲノムの分子系統分類に基づく概要を示す。

RiP 前駆体候補遺伝子は、Dikarya (二核菌亜界)、それ以外の菌類に広範囲に見付かったが、RiP を環状化させると考えられる ustYa/Yb ホモログ遺伝子は、Dikarya (二核菌亜界) のうちの Ascomycota (子囊菌門) / Pezizomycotina (チャワントケ亜門) Basidiomycota (担子菌門) / Agaricomycotina (ハラタケ亜門) 及び Ascomycota (子囊菌門) / Saccharomycotina (サッカロミケス亜門) の *Yarrowia lipolytica* (strain CLIB122) の 1 ゲノムにのみ、同定された。また、ustYa/Yb ホモログ遺伝子は、Ascomycota (子囊菌門) / Pezizomycotina (チャワントケ亜門) 内では広く全ての Class (綱) で同定されたが、Basidiomycota/Agaricomycotina 内では、Agaricomycetes (ハラタケ綱) Dacrymycetes (アカキクラゲ綱) のみで同定された。

ustYa/Yb ホモログ遺伝子の近傍にある RiP 前駆体候補遺伝子の数は、Ascomycota/Pezizomycotina では、ゲノム当たり平均 4.6 遺伝子が同定されたのに対し、Basidiomycota/Agaricomycotina では、平均 1.3 遺伝子のみが同定された (表 1)。

表 1: 623 菌類ゲノムの分子系統分類に基づく概要

分子系統分類における Division (門) / Subdivision (亜門)	解析した ゲノム数	平均 遺伝子数	ustYa の 平均数	RiP 候補遺 伝子の平均 数	RiP 候補遺伝 子近傍の ustYa 平均数	ustYa 近傍 の RiP 候補 遺伝子の平 均数
Ascomycota/Pezizomycotina	299	12528.9	16.7	49.9	6.8	4.6
Ascomycota/Saccharomycotina	44	5835.1	0.0	23.5	0.0	0.0
Ascomycota/Taphrinomycotina	9	5540.9	0.0	12.0	0.0	0.0
Basidiomycota/Agaricomycotina	176	15349.4	10.4	39.6	2.2	1.3
Basidiomycota/Ustilaginomycotina	16	6766.5	0.0	21.4	0.0	0.0
Basidiomycota/Pucciniomycotina	34	11197.3	0.0	40.9	0.0	0.0
Mucoromycota	21	13971.9	0.0	35.6	0.0	0.0
Zoopagomycota	7	10001.0	0.0	122.9	0.0	0.0
Blastocladiomycota	2	16817.0	0.0	40.0	0.0	0.0
Chytridiomycota	4	13490.3	0.0	79.8	0.0	0.0
Neocallimastigomycota	2	16792.0	0.0	206.0	0.0	0.0
Cryptomycota	1	6350.0	0.0	22.0	0.0	0.0
Microsporidia	8	2308.3	0.0	7.1	0.0	0.0

表 2 に、Ascomycota (子囊菌門) / Pezizomycotina (チャワントケ亜門) Basidiomycota (担子菌門) / Agaricomycotina (ハラタケ亜門) における ustYa/Yb ホモログ遺伝子と共役している RiP 遺伝子等の概要を示す。

解析を行った 299 Pezizomycotina ゲノムのうち 265 ゲノム (89%) で、ustYa/Yb ホモログ 遺伝子と共役している RiP 遺伝子が 1,382 個、同定された (表 2)。176 Agaricomycotina ゲノ ムのうち 89 ゲノム (51%) で、ustYa/Yb ホモログ遺伝子と共役している RiP 遺伝子が 235 個、

同定された (表 2)。これら RiP 遺伝子の近傍に同定された ustYa/Yb ホモログ遺伝子は、Peizizomycotina ゲノムでは、2,028 個同定され、RiP 遺伝子当り 1.5 個存在し、Agaricomycotina ゲノムでは、391 個同定され、RiP 遺伝子当り 1.7 個存在している事が判明した。Ustiloxin 遺伝子クラスターでは、2 個の ustYa/Yb 遺伝子が存在していることから、複数の ustYa/Yb ホモログ遺伝子が存在するケースも多々あると考えられる。

表 2 : Peizizomycotina、Agaricomycotina における ustYa/Yb ホモログ遺伝子共役 RiP 遺伝子

分子系統分類における Division (門) / Subdivision (亜門)	解析した ゲノム数	ustYa 共役 RiP 遺伝子の あるゲノム数	RiP 候補 遺伝子の 合計数	ustYa 共役 RiP 遺伝子の 合計数	ustYa の合 計数	ustYa 近傍 の RiP 遺伝 子合計数
Ascomycota/Peizizomycotina	299	265	14,931	1,382	4,984	2,028
Basidiomycota/Agaricomycotina	176	89	6,971	235	1,838	391

RiP 遺伝子近傍の遺伝子解析 :

RiP 前駆体候補遺伝子の近傍 (2 万 bp 以内) の遺伝子のドメイン予測による機能解析を行った結果、ustYa/Yb ホモログ遺伝子共役 RiP 遺伝子の近傍には、23,479 遺伝子が同定され、そのうち 15,372 遺伝子は、Pfam データベースに対応するファミリーに分類された。残りの 8,107 遺伝子 (ustYa/Yb ホモログ遺伝子共役 RiP 遺伝子当り、5.0 遺伝子) は、Pfam データベースでは分類されないため、将来的に更なる解析が必要であると考えられる。それに対し、ustYa/Yb ホモログ遺伝子の近傍にない RiP 遺伝子 (25,656 個) の近傍には、364,480 遺伝子が同定され、そのうち 224,034 遺伝子が Pfam データベースに対応するファミリーに分類された。残りの 140,446 遺伝子 (RiP 遺伝子当り、5.5 遺伝子) は、Pfam データベースでは分類されないため、将来的に更なる解析が必要であると考えられる。

ustYa/Yb ホモログ遺伝子が圧倒的に多く、距離も平均 3,623 bp と非常に近くにあることが分かった。それ以外の遺伝子では、トランスポーター、転写因子、キナーゼ、P450、メチル転移酵素等の酵素が多く観られ、RiP 合成の際に修飾に関与している事が示唆された。

トランスポーター、転写因子、酵素以外の遺伝子では、Heterokaryon incompatibility protein (HET)、ankyrin-repeat (ANK) といった機能の遺伝子が頻繁に観られた。また、Peizizomycotina、Agaricomycotina では、高頻度で出現する遺伝子の種類に差があり、Agaricomycotina では、転写因子が上位に現れなかった。

他方で、ustYa/Yb ホモログ遺伝子非共役 RiP 遺伝子の近傍遺伝子のデータは詳細を示さないが、トランスポーター、転写因子、酵素が上位に観られるものの、ankyrin-repeat、WD40 repeat、F-box-like といった蛋白質相互作用、フォールディングに関与する遺伝子がより多く観られ、RiP 遺伝子産物の繰り返し配列を安定化する働きがあるのではないかと推定している。

RiP 前駆体候補のアミノ酸組成の解析 :

RiP 前駆体候補の N 末のシグナル・ペプチドを除くアミノ酸組成の解析も行った。研究代表者等が、*Aspergillus flavus* で見出した Ustiloxin B の前駆体 (ustA) と新規 RiP の Asperipin-2a の前駆体も対照として、アミノ酸組成を調べた。

芳香族アミノ酸 (Phe、His、Trp、Tyr) は、平均 9.2% となり、ustiloxin 前駆体 ustA の 8.2% と同程度、Asperipin-2a 前駆体の 17.5% より少ない数値となったが、ustYa ホモログ遺伝子が作用するのが芳香族アミノ酸と観られるので、妥当な含有量があると考えられる。塩基性アミノ酸 (Lys、Arg) は、13.1% で、ustA (16.1%)、Asperipin-2a 前駆体 (18.2%) より少ない数値であるが、Kex2 切断部位を含む筈なので、妥当な含有量であると考えられる。酸性アミノ酸 (Asp、Glu) は、17.7% で、ustA (22.4%)、Asperipin-2a 前駆体 (21.3%) より少ないものの、塩基性アミノ酸の含有量よりも多かった。酸性アミノ酸は、Kex2 切断部位の塩基性アミノ酸を中和する働きがある可能性がある。更に顕著な傾向は、硫黄原子を含むアミノ酸・Cys と Met の含有量がそれぞれ 0.6%、0.8% と低かった。ustA (Cys:0.0%、Met:0.0%)、Asperipin-2a 前駆体 (Cys:0.0%、Met:0.8%) 共に、硫黄原子を含むアミノ酸の含有量が低い。

こうしたアミノ酸組成の傾向は、Peizizomycotina 由来の前駆体遺伝子と Agaricomycotina 前駆体由来遺伝子と比較しても、大きな差は見られなかった。また、ustYa ホモログ遺伝子近傍にない RiP 前駆体候補遺伝子と比較すると、芳香族アミノ酸、塩基性アミノ酸、酸性アミノ酸の含有量が多く、Cys が少ないことも判明した。脂肪族アミノ酸 (Ala、Ile、Leu、Val) に関しては、いずれの RiP 前駆体遺伝子も 25% 前後と大きな差は観られなかった。

また、こうした各ゲノムの統計データや各 ustYa 共役型 RiP 候補遺伝子に関する情報をまとめたウェブサイトを構築し、公開準備を行った。

< 引用文献 >

Khaldi, N. *et al.*, SMURF: genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters.

Fungal Genet. Biol. **47**, 2010, 736-741.

Medema, M.H. *et al.*, AntiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res.* **39**, 2011, W339-W346.

Umemura, M., Nagano, N. *et al.*, Characterization of the biosynthetic gene cluster for the ribosomally synthesized cyclic peptide ustiloxin B in *Aspergillus flavus*. *Fungal Genet. Biol.* **68**, 2014, 23-30.

Nagano, N. *et al.*, Class of cyclic ribosomal peptide synthetic genes in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol.* **86**, 2016, 58-70.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Myco Umemura, Nozomi Nagano, Akira Yoshimi, Ying Ye, Keietsu Abe, Kazuo Shin-ya, Hideaki Oikawa, Masayuki Machida, Ribosomal peptide biosynthetic pathways widely conserved in filamentous fungi, *Proceedings of SIMB 2016*, 査読有, 2016, S49.

〔学会発表〕(計 1件)

Myco Umemura, Nozomi Nagano, Akira Yoshimi, Ying Ye, Keietsu Abe, Kazuo Shin-ya, Hideaki Oikawa, Masayuki Machida, Ribosomal peptide biosynthetic pathways widely conserved in filamentous fungi, 2016 SIMB Annual Meeting and Exhibition (招待講演) (国際学会), 2016年7月25日、Sheraton New Orleans, New Orleans (米国)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：梅村 舞子

ローマ字氏名：UMEMURA, Myco

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。