

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05720

研究課題名（和文）Fungi界由来の両親媒性を有するペプチド環化機構の解明

研究課題名（英文）Cyclization mechanism of fungal amphipathic ribosomal peptides

研究代表者

梅村 舞子（Umemura, Maiko）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：00552259

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、Fungi界に広く分布するペプチド環化因子UstYaホモログ（旧DUF3328）のシクロファン環化構造形成にかかる反応機構解明を目的として研究を進めた。結果、当該因子は糸状菌内で他の2つのペプチド環化に必須な因子とともに液胞に局在し、ペプチド環化も液胞で行われると考えられることを示した。当該因子の大腸菌での異種発現と結晶構造解析、in vitro反応については、明確な成果を得ることはできなかった。しかし、同因子のホモログについて大腸菌異種発現により可溶性成分での発現を確認しており、精製量を増やすことで目的を達成できると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で標的としている環状ペプチド生合成経路はキノコを含むFungi界に広く多様に保存されており、前駆体ペプチドは一株平均5個、コアペプチドの種類は800種類以上存在する。本研究は当該環状ペプチド生合成系の要である環化因子の生合成分子機構解明を目指すもので、これによりFungi界の生命活動に普遍的かつ不可欠に関わる環状ペプチド群の生合成に関する新規知見を得られるだけでなく、コアペプチド配列の改変や修飾酵素のすげ替えにより望む機能を持つ環状ペプチドをデザイン・創製できる系としての展開が可能となる。

研究成果の概要（英文）：In this project, we worked on elucidating the cyclization mechanism of DUF3328 cyclization factor for fungal ribosomal peptides, which catalyzes the formation of cyclophane structure. We identified that the factor localized in vacuole with other two indispensable factors for core peptide cyclization. On the other hand, it was difficult to obtain the purified target protein neither from *E. coli* nor from the filamentous fungus. As we succeeded to observe another homologous cyclization factor in a soluble fraction from *E. coli*, we expect to obtain sufficient amount of the target protein for crystal structure analysis and function analysis.

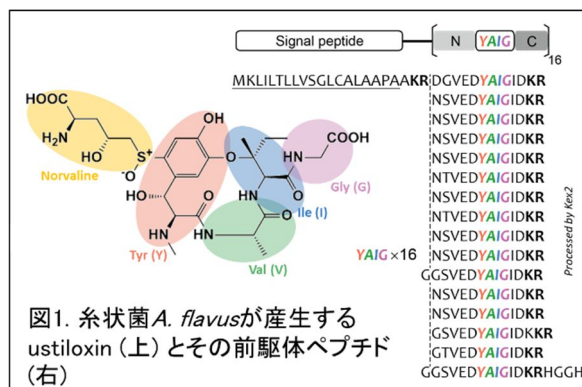
研究分野：応用微生物

キーワード：環状ペプチド シクロファン構造 両親媒性 糸状菌 環化因子

## 1. 研究開始当初の背景

生物オミクス情報の取得が容易になった現在、微生物や植物が作る二次代謝物質および生合成経路の研究は、ゲノム情報から検出した天然化合物の生合成経路を強化・再構築することで活性を持つ化合物を新たに見出す方向が主流となっている。我々はこれまで、ゲノム情報と遺伝子発現情報を有効に組み合わせる二次代謝遺伝子群を迅速・正確に検出するアルゴリズムを開発・適応することで、糸状菌 *Aspergillus flavus* においてリボソームペプチド (RiPP) 生合成経路を見出すことに成功した (図1) (Umemura *et al.*, *Fungal Genet. Biol.*, 68: 23, 2014)。これは Ascomycota (カビ) で初めての RiPPs の例であり、我々は *Aspergillus* 属ゲノムに関して本解析を進めることで、新規環状ペプチド化合物の発見に成功している (Nagano, Umemura *et al.*, *Fungal Genet. Biol.*, 86: 58, 2016)。

この一連の研究において明らかにした本生合成系の重要な特徴は、1) 化合物骨格構造となるコアペプチドが前駆体ペプチドにおいて高度に繰り返す、2) 化合物が芳香環から直接エーテル結合によって環を巻くシクロファン構造をとる、3) 環状化に必須な機能未知の Pfam DUF3328 モチーフを有する遺伝子を経路に含む点にある。これら3つの特徴は、バクテリアを含めこれまでに見出された RiPPs 生合成経路のいずれのタイプにも該当しない、新規なカビ特有の RiPPs 生合成経路である。注目すべきは、この経路がキノ



コを含む Fungi 界に広く保存されており、前駆体ペプチドは一株平均 5 個、コアペプチドの種類は 800 種類以上見出される点にある (Umemura, *Fungal Biol. Biotechnol.*, 7: 11, 2020)。すなわち本経路は、Fungi 界の生命活動において普遍的かつ不可欠な機能を有する多様で豊富な新規環状ペプチドの生合成遺伝子シースであるだけでなく、コアペプチド配列の改変や修飾酵素のすげ替えにより、新規機能を付与した人工環状ペプチドをデザイン・創製できる系であると期待される。一方、本系の利用と展開には DUF3328 ペプチド環化因子によるシクロファン環化機構の解明が不可欠だが、これまでコアペプチドの環化に必須であること以外全く機能未知の状態であった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、DUF3328 環化因子の機能を細胞内局在観察とタンパク質発現・精製・結晶構造解析、*in vitro* 反応から明らかにすることを目的とする。その結果に基づき、コアペプチド配列の認識に働くアミノ酸残基の改変等によって、人工的な前駆体ペプチドを環化できる系の構築を目指す。DUF3328 環化因子はチロシンやトリプトファン等の芳香環に直接エーテル結合によって環を巻くシクロファン構造の形成を触媒するが、おそらくこの構造によって、本経路化合物は高い水溶性を示しながら疎水性相互作用も持つというユニークな両親媒性を示すため、疎水性の高いこれまでの低・中分子にはなしえなかった形でのタンパク質との相互作用を実現する可能性が高い。またコアペプチドの多様性を考えると、本 DUF3328 環化因子の機能解明と改変によって得られる機能性環状ペプチドの多様性は非常に高いと期待される。本研究により DUF3328 環化因子の細胞内局在と機能を明らかにすることで、Fungi 界を含む真核生物 RiPPs 研究の更なる進展と、*in vitro* 反応系を含めた人工環状ペプチドのデザイン・生合成系への展開が見込まれる。

## 3. 研究の方法

本研究課題では、以下の内容に基づき研究を進めた。

### 3 - 1. DUF3328 環化因子の細胞内局在観察による反応オルガネラ同定

図1に示した最初の本経路 RiPP である ustiloxin の生合成系を題材に、選択マーカーを4種類有する *Aspergillus oryzae* NSAR1 株を宿主株として、まず UstYa の N/C 末側に緑色蛍光タンパク質を融合させて共焦点顕微鏡観察を行ったところ、C 末側に融合した株は発色が見られなかった。そこで N 末融合株を宿主株として、さらに赤色蛍光タンパク質を融合した7種類のオルガネラマーカーおよび8種類の ustiloxin 生合成タンパク質をそれぞれ共発現させて (表1)、共焦点顕微鏡観察により緑色および赤色蛍光タンパク質融合タンパク質の共同在を解析した。

### 3 - 2. DUF3328 環化因子の大腸菌異種発現・精製と結晶構造解析および機能解析

Ustiloxin の DUF3328 環化因子である UstYa や、別の本経路 RiPP である asperipin-2a の環化因子である AprY について、pET 等の高発現ベクターに組み込んで大腸菌にて異種発現させた。タグ精製後、いくつかのバッファ下で基質である合成ペプチドとともに *in vitro* 反応させて、反応液を LC-MS 測定により解析した。結晶作製に足る純度と状態のタンパク質は得られなかった。

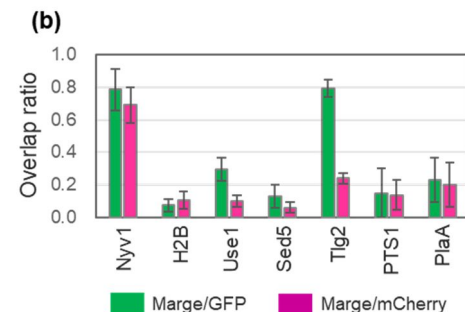
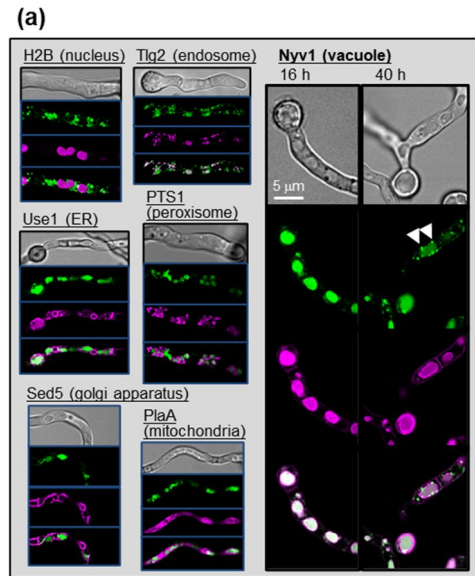
**Table 1. Proteins fused and expressed with mCherry**

Protein/peptide	mCherry position	Function
Organelle markers		
H2B	C	Nucleus localization marker
Use1	N	ER localization marker
Sed5	N	Golgi apparatus localization marker
Nyv1	N	Vacuole localization marker
Tlg2	N	Endosome localization marker
PTS1	N	Peroxisome localization signal
PlaA	C	Mitochondrion localization marker
Ustiloxin biosynthetic proteins		
UstYb	N	Cyclization factor (homologous to UstYa)
UstQ	N	Tyrosinase (indispensable for cyclization)
UstT	N	Major facilitator transporter
UstM	N	Methyltransferases
UstC	N	Cytochrome P450
UstF1	N	Flavin-containing monooxygenase
UstF2	N	Flavin-containing monooxygenase
UstD	N	Cysteine desulfurase

## 4. 研究成果

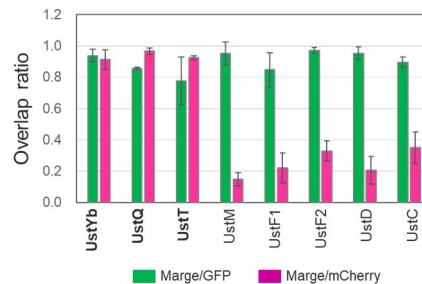
### 4 - 1 . DUF3328 環化因子の細胞内局在観察による反応オルガネラ同定

最初に UstYa とオルガネラマーカの共局在を観察したところ、液胞マーカ (Nyv1) とのきれいな共局在が観察された (図 2)。一方、エンドソームマーカ (Tlg2) と一部共局在しており、5 μm/s 程度の速度ですばやく液胞へ取り込まれるベシクルも観察されたことから、UstYa はエンドソームを介して液胞へ局在することが示唆された。次に他の ustiloxin 生合成タンパク質との共局在を同様に観察したところ、UstYa とともに環化に必須な UstYb と UstQ、および ustiloxin のチロシン残基へのノルバリン修飾に必須な輸送体 UstT は、いずれもきれいに UstYa と共局在を示した (図 3)。合成不良のタンパク質として分解されるために液胞へ局在しているのではないことを示すために、*Aspergillus flavus* 株においてエンドソームから液胞への輸送を補助する *vb1*

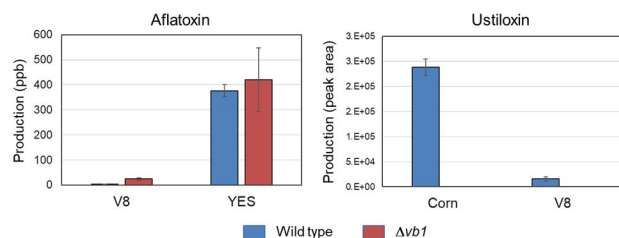


**Figure 2. Colocalization of UstYa and organelle markers.** (a) Confocal observation of GFP-fused UstYa and mCherry-fused organelle marker proteins. (b) Overlap percentage of GFP and mCherry in the pictures.

遺伝子を破壊して ustiloxin 生産性を LC-MS 測定により解析したところ、エンドソームでの生合成が知られる aflatoxin は生産性が増大した一方、ustiloxin の生産は全く見られなくなった (図 4)。以上より、ustiloxin は液胞で UstYaYbQ の 3 因子によって生合成されると考えられる。



**Figure 3. Overlap percentage of GFP-fused UstYa and mCherry-fused other ustiloxin biosynthetic proteins.**



**Figure 4. Aflatoxin and ustiloxin production by *Aspergillus flavus* wild type strain and  $\Delta vb1$ .**

#### 4 - 2 . DUF3328 環化因子の大腸菌異種発現・精製と結晶構造解析および機能解析

Ustiloxin の環化に必須な UstYa, UstYb, UstQ のうち、まず UstYa について大腸菌での異種発現を試みた。UstYa には膜貫通領域が存在するため、全長のものに加えて膜貫通領域の異なる位置でトリムした 3 種類を試験した。様々な大腸菌宿主と発現系を検討したところ、本タンパク質を大腸菌で発現させることはできるが、大部分が凝集して不溶化成分に行ってしまうことが分かった。そこで不溶化成分からのリフォールディング条件を検討したところ、ある程度単量体ないし二量体程度に分散する条件を見つけることができた。ただし凝集体は残っており、結晶形成は困難な純度だったため、精製したタンパク質を長さの異なる 4 種類の合成した前駆体ペプチドとともに 5 種類のバッファーで 30 度一晩 *in vitro* 反応を行った。しかし LC-MS 測定では、環化したペプチドに相当するピークは残念ながら見出されなかった。UstYa とともにペプチド環化に機能するとみられる UstYb、UstQ を別途大腸菌で異種発現させて、UstYa と合わせて同様に *in vitro* 反応を行ってみたが、やはり環化したペプチドに相当するピークは見られなかった。

糸状菌からの UstYa 精製も試みた。まず大腸菌と同様に、膜貫通領域を異なる位置でトリムして N 末に His タグをつけた UstYa 変異株を作製し化合物生産性を LC-MS 測定により解析したところ、膜貫通領域をトリムしていないものだけが化合物生産性を維持していた。このことから、糸状菌内での UstYa 機能発現に膜貫通領域は必須であることが分かった。次に、膜貫通領域のついた His タグ融合 UstYa を糸状菌菌体から精製しようと試みたが、いずれのイミダゾール濃度の溶出画分にも相当するタンパク質のピークはウエスタンブロットティングによって観察されなかった。

Ustiloxin の環化には UstYaYbQ という 3 つの酵素が必要となるが、asperipin-2a では 1 つの UstYa ホモログでコアペプチドの 2 か所での環化が行われる。そこで現在、asperipin-2a の DUF3328 環化因子である AprY について、UstYa で得られた知見に基づき発現と精製を行っている。可溶化成分での発現は確認できているため、今後は結晶構造解析および *in vitro* 反応に必要な量を確保することに注力する予定である。期間内に UstYa の結晶構造解析および機能解析を達成することはできなかったが、可溶化成分でのタンパク質発現を可能にするバッファー条件や環化因子の細胞内動態に関する知見は蓄積することができた。これらの知見は、今後の本生成系を利用した環状ペプチドのデザイン・合成・生産系の実現につながると考えている。

以上

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Umemura Maiko, Kuriwa Kaoru, Viet Dao Linh	4. 巻 160
2. 論文標題 Tandem repeats in precursor protein stabilize transcript levels and production levels of the fungal ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide ustiloxin B	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fungal Genetics and Biology	6. 最初と最後の頁 103691 ~ 103691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fgb.2022.103691	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Hiroki, Umemura Maiko, Ninomiya Akihiro, Kusuya Yoko, Shimizu Masaaki, Urayama Syun-ichi, Watanabe Akira, Kamei Katsuhiko, Yaguchi Takashi, Hagiwara Daisuke	4. 巻 2
2. 論文標題 Interspecies Genomic Variation and Transcriptional Activeness of Secondary Metabolism-Related Genes in <i>Aspergillus Section Fumigati</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Fungal Biology	6. 最初と最後の頁 656751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/ffunb.2021.656751	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Umemura Maiko	4. 巻 7
2. 論文標題 Peptides derived from Kex2-processed repeat proteins are widely distributed and highly diverse in the Fungi kingdom	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fungal Biology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40694-020-00100-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Umemura Maiko, Kuriwa Kaoru, Tamano Koichi, Kawarabayasi Yutaka	4. 巻 143
2. 論文標題 Ustiloxin biosynthetic machinery is not compatible between <i>Aspergillus flavus</i> and <i>Ustilagoidea virens</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fungal Genetics and Biology	6. 最初と最後の頁 103434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fgb.2020.103434	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Umemura Maiko, Tamano Koichi	4. 巻 3
2. 論文標題 How to improve the production of peptidyl compounds in filamentous fungi	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Fungal Biology	6. 最初と最後の頁 1085624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/ffunb.2022.1085624	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Shigenari, Fujioka Tomonori, Yoshimi Akira, Kumagai Toshitaka, Umemura Maiko, Abe Keietsu, Machida Masayuki, Kawai Kiyoshi	4. 巻 3
2. 論文標題 Discovery of a gene cluster for the biosynthesis of novel cyclic peptide compound, KK-1, in <i>Curvularia clavata</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Fungal Biology	6. 最初と最後の頁 1081179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/ffunb.2022.1081179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 UMEMURA Maiko	4. 巻 60
2. 論文標題 Cyclic Ribosomal Peptides from Eukaryotes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 KAGAKU TO SEIBUTSU	6. 最初と最後の頁 295 ~ 303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1271/kagakutoseibutsu.60.295	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件(うち招待講演 1件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 梅村舞子, 栗岩薫, 萩原大祐, 豊留孝仁, 榎尾俊介, 高谷直樹, 矢口貴志, 渡辺哲, 亀井克彦
2. 発表標題 子囊殻形成におけるKex2切断反復タンパク質の役割
3. 学会等名 第20回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Maiko Umemura, Nozomi Nagano, Ying Ye, Taro Ozaki, Atsushi Minami, Hideaki Oikawa, Kazuo Shin-ya, Masayuki Machida
2. 発表標題 Fungal RiPPs with unique cyclic structure are widely distributed in the Fungi kingdom
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅村 舞子、栗岩 薫、加藤 薫、町田 雅之、五味 勝也
2. 発表標題 糸状菌リボソームペプチド生合成因子の細胞内局在
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Maiko Umemura, Kaoru Kuriwa, Kaoru Katoh
2. 発表標題 Localization and motion of ribosomal peptide biosynthetic proteins in fungal hyphae
3. 学会等名 Dynamic Cell IV (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅村 舞子、栗岩 薫、玉野 孝一、河原林 裕
2. 発表標題 糸状菌リボソームペプチド前駆体ペプチドにおける繰り返し構造の役割
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Maiko Umemura, Daisuke Hagiwara, Takahito Toyotome, Takashi Yaguchi, Akira Watanabe, and Katsuhiko Kamei
2. 発表標題 Variation of Kex2-processed repeat proteins (KEPs) and asci/sclerotia formation in eight fungal strains at the MMRC fungal resources
3. 学会等名 The 9th Global Network Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	渡邊 秀樹 (Watanabe Hideki)  (90422089)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長  (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------