

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26505015

研究課題名(和文)糸状菌におけるリボソームペプチド生合成経路の合理的探索

研究課題名(英文)Rational investigation of fungal ribosomal peptide biosynthetic pathways

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・生物プロセス研究部門・研究グループ付

研究者番号：00552259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は近年、糸状菌で初めてリボソームペプチド生合成経路を見出した。本経路の特徴に基づくゲノム情報探索と代謝物LC-MS分析等により、今回、同種の糸状菌リボソームペプチド生合成(ust-RiPS)経路と化合物のセットを新たに2つ見出した。これら2つの化合物はいずれも、最初の例であるustiloxin同様、前駆体コアペプチド配列を骨格構造とする環状ペプチドだが、その構成アミノ酸と構造は大きく異なる。ゲノム上でust-RiPS経路はfungiに広く保存されている。今回の結果により、本経路が多様な構造の環状ペプチドを生合成する二次代謝経路のクラスであることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, we reported the first ribosomal peptide synthetic pathway in filamentous fungi, which is the ustiloxin one in *Aspergillus flavus*. Here, we further surveyed 14 *Aspergillus* strains for the ustiloxin type ribosomal peptide synthetic (ust-RiPS) pathways and compounds, using genome sequence analyses and LC-MS metabolite analyses. Two novel cyclic peptides synthesised by novel ust-RiPS pathways were identified, which are both composed of the amino acids in the core peptide sequences and cyclised by the ether bonds directly to aromatic rings, in the same manner with ustiloxin. However, the amino acid components and the structures are completely different among the three compounds. The genome information survey indicates that the ust-RiPS pathways are widely conserved in fungi, and there is a wide variety of the core peptide sequences. The results in this study strongly imply that the ust-RiPS pathways are a diverse and abundant resource of biosynthetic genes for cyclic peptides.

研究分野：応用微生物学

キーワード：糸状菌 二次代謝経路 リボソームペプチド

### 1. 研究開始当初の背景

糸状菌は生理活性を有する多くの低分子天然化合物を産生することで知られ、その多くが医薬品として利用されている(ペニシリン、シクロスポリン、メバスタチン等)。これら化合物は二次代謝経路によって生合成されるが、近年我々は、ゲノム情報と発現情報を組み合わせた手法によって、これまで糸状菌では報告のなかった二次代謝経路であるリボソームペプチド生合成経路を糸状菌 *Aspergillus flavus* において見出した (ustiloxin 生合成経路、Umemura et al., *Fungal Genetics and Biology*, 2014, 68, 23-30)。リボソームペプチド生合成経路では、化合物のアミノ酸骨格構造がそのまま前駆体遺伝子に書き込まれており、それがリボソームでアミノ酸に翻訳された後、環状化やメチル化等の修飾を受けて合成される。特に今回見出した ustiloxin 生合成経路では、前駆体ペプチド配列が、小胞体へのシグナルペプチドに加えて、ゴルジ体局在プロテアーゼ Kex2 認識サイトで切断される高度な繰り返し配列を有する点に特徴がある (図1)。

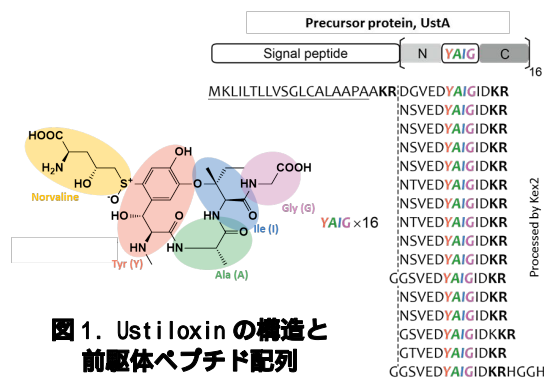


図1. Ustiloxin の構造と前駆体ペプチド配列

### 2. 研究の目的

以上の知見に基づき、本研究では、ゲノム探索と代謝物解析により、同種の経路を糸状菌を対象として広範に探索し、新規糸状菌リボソームペプチド化合物と生合成遺伝子のペアを同定することを目的とする。本経路では化合物骨格構造が遺伝子に配列として書き込まれているため、遺伝子改変による化合物のデザイン・生合成がより容易であると期待される。本研究で得られる新規化合物と生合成遺伝子の成果を元に、将来的には、多様な環状ペプチドの生合成プラットフォーム構築を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、以下の手順に従って、新規当該経路および化合物をできるだけ多く同定する。

(1) *A. flavus* において見出した ustiloxin 生合成経路の前駆体ペプチド配列および経路の特徴に基づき、同種の経路を見出すべく

*Aspergillus* 属を中心に広範にゲノム情報探索を行う。

(2) *Aspergillus* 属を中心に複数の条件下で培養を行い、代謝物の LC-MS 測定およびトランスクリプトーム解析を行う。

(3) 配列・遺伝子発現・代謝物のデータを統合的に判断し、蓋然性の高い前駆体遺伝子を破壊し、対応する化合物の消失を LC-MS 上で確認する。

(4) 当該 MS ピークに対応する化合物を単離精製し、構造決定を行う。

菌株: Ustiloxin 経路を見出した *A. flavus* CA14 株に加えて、13 種類の *Aspergillus* 属菌株を購入または譲受により入手し、ust-RiPS 化合物経路探索を行った。具体的には次の 13 株である: *A. nidulans* FGSC A4, *A. fumigatus* Af293, *A. terreus* NIH 2624, *A. zonatus* NBRC 8817, *A. niger* CBS 513.88, *A. awamori* NBRC 4314, *A. kawachi* NBRC 4308, *A. tubingensis* MYA-78, *A. tubingensis* CBS 134.48, *A. aculeatus* ATCC 16872, *A. clavatus* NRRL 11007, *A. brasiliensis* CBS 101740, *A. carbonarius* ITEM 5010。

培養条件: *A. flavus* では ustiloxin 産生条件を見出すのが難しく、試みた複数の培養条件のうち、産生が確認されたのはコーン固体培養または V8 液体培養のみだった。また 28 度では産生するが 37 度では産生しないという特徴があった。そこで他の *Aspergillus* 株についても、菌体抽出のしやすさを考慮して、代謝物測定用にはコーン固体培地および V8 液体培地、トランスクリプトーム解析には V8 液体培地を用いることとした。培養時間は、固体培養では確実な産生を見るため 2 週間、液体培養では遺伝子発現を見るため 6 日間行い、培養温度は、各株の適性温度に加えて、7 度または 5 度高い温度でも行った。

代謝物解析: コーン固体培養の場合、2.5 g の培地上培養物に対して 10 mL の 80% アセトンを加えて室温で一時間攪拌したのち、アセトンを留去し、残った水層に対して等量の酢酸エチル、*n*-ブタノールで順に抽出し、残存した水層と合わせた計 3 種類について逆相 LC-MS 解析を行った。V8 液体培養の場合、菌体をろ過した培養上清を同様に等量の酢酸エチル、*n*-ブタノールで順に抽出し、残存した水層と合わせた 3 種類について LC-MS 解析を行った。なおこの際にろ過した菌体は、トランスクリプトーム解析用 RNA 抽出に使用した。

トランスクリプトーム解析: V8 液体培地で培養した菌体を回収し、ただちに液体窒素で凍らせたのち乳鉢ですりつぶして RNA を抽出した。その後メーカーのプロトコルに従って Illumina TruSeq ライブラリを作成し、MiSeq で RNA-seq 解析を行った。

### 4. 研究成果

4.1. *Aspergillus* 属における ustiloxin 型リボソ

#### ームペプチド生合成経路のゲノム探索

Ustiloxin 生合成経路における前駆体ペプチド配列の、小胞体への移行シグナルペプチドおよび Kex2 認識サイトで切断される高度な繰り返し配列を有する特徴を元に、*Aspergillus* 属 20 株のゲノム配列を探索したところ、繰り返し配列の扱いによって数は多少変化するものの、全 1400 程度、一株平均約 70 の ustiloxin 型前駆体様遺伝子が見出された。このうち、別途明らかになっている本経路における環状化因子と考えられる UstY ホモログが 10 kb 以内の近傍にあるものが全部で 93 個見出された。これら 93 個の前駆体ペプチド中、コアペプチド配列の多様性をクラスター分析により解析すると、大きく 36 種類に分類されることが分かった。さらに、米国立生物工学情報センター (NCBI) に登録されている生物ゲノム全体で探索すると、UstY ホモログを近傍に有する ustiloxin 型前駆体様遺伝子は fungi に一株平均 10-20 程度と幅広く保存されていることが分かった (未発表データ)。以上の結果から、ustiloxin 生合成経路と同種のリボソームペプチド生合成経路は、カビ・キノコ新規二次代謝経路として一つのクラスをなしていることが強く示唆された。この事実に基づき、UstY ホモログを近傍に伴う ustiloxin 型前駆体ペプチドを有する経路を ust-RiPS 経路と呼ぶこととする。

#### 4.2. *Aspergillus* 属 14 株における新規 ust-RiPS 経路 化合物の探索

適正温度および 5-7 度高温で培養した 14 種類の *Aspergillus* 属菌株の培養抽出物について、逆相 LC-MS 分析を行った。2 種類の温度下での LC-MS ピークパターンを比較し、差のある MS ピークについて電圧を変えて疑似的に MS/MS 解析を行い、アミノ酸を構成要素としているか否かをフラグメント化したスペクトル分布から見積もった。またトランスクリプトーム解析結果から、配列特徴より ust-RiPS 前駆体候補と考えられる遺伝子の温度依存的発現量変化を確認した。代謝物プロファイルおよび遺伝子発現量変化を見比べた結果、*A. flavus* で 3 つ、*A. fumigatus* で 2 つ、*A. nidulans* で 1 つ、*A. awamori* で 1 つ、化合物を作っている可能性のある ust-RiPS 前駆体様遺伝子と UstY ホモログのペアの候補を挙げることができた。

#### 4.3. 新規 ust-RiPS 経路 化合物ペアの同定

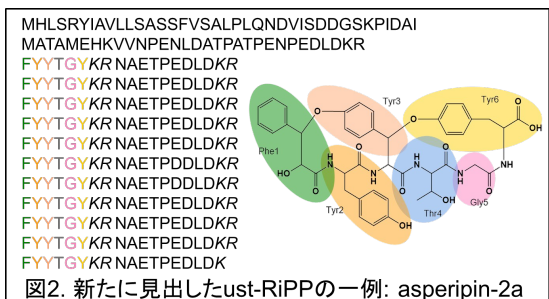
ゲノム探索、代謝物解析、遺伝子発現解析から予測した各株の ust-RiPS 前駆体様遺伝子および UstY ホモログのペア 7 つについて、前駆体様遺伝子および UstY ホモログ遺伝子それぞれを独立に破壊した株をそれぞれ作製した。その後、親株にマーカーのみを復帰させて栄養要求性を合わせた株をコントロールとしてコーン固体培地で培養し、代謝物を抽出・LC-MS 分析した。コントロール株に対して 2 種類の破壊株で共通して消失する

MS 化合物ピークを探したところ、*A. fumigatus* における 2 ペア、*A. nidulans* および *A. awamori* におけるそれぞれ 1 ペアでは、対応する MS ピークを見つけることができなかった。培地や栄養素、温度等を変化させて培養条件を振ったり、MS 測定・検出条件の変更を試みたが、やはり対応する化合物を見つけることは困難であった。しかし、*A. flavus* で破壊株を作成した候補 3 ペアのうち 2 ペアについて、前駆体様および UstY ホモログ遺伝子の双方で特異的に消失する極微量の MS ピークを見出した。

これら MS ピークに対応する化合物の構造を決定するために、培養物からの該当化合物の精製・単離を試みた。Ustiloxin との MS ピーク強度の差から、これら化合物の産生量は 10-50 µg/L 以下と非常に低く、このままでは単離精製が非常に困難であると考えられた。そこで、化合物産生量を増やすべく各前駆体遺伝子のプロモーターすげ替えによる強発現化を行ったが、化合物産生量には影響がなかった。結果として、コーンを 3L 以上使用して産生株を大量に培養し、産総研・新家博士のグループの多大なる協力を得てひたすら抽出を行い、2 つの候補ピークについて、化合物の構造決定を完全にまたはおよそ行うに足る量の当該化合物を得ることができた。

#### 4.3. *A. flavus* における新規 ust-RiPS 経路 化合物の同定

見出した新規 ust-RiPS 化合物候補 2 つのうち 1 つについて、精製した化合物の NMR 測定等により構造を明らかにした (図 2)。本化合物は、ustiloxin 同様、前駆体に含まれる繰り返し配列の一部 (FYITGY) を骨格構造とし、芳香環から直接エーテル結合により環状構造を形成する特徴がある。このような結合様式は他に類を見ないものであるため、UstY ホモログは新規な環状化反応に関わる因子である可能性が高く、現在その構造決定を進めている。



もう一つの新規経路 化合物候補については、化合物の完全な構造同定には至っていないが、アミノ酸組成分析および NMR 解析から、やはり前駆体コアペプチド配列からなり、芳香環を含む環状構造を持つペプチド化合物であることが明らかになっている (デー

タ非公開)。こちらについても構造決定を急ぎ、新規 ust-RiPS 経路 化合物のリストに加えるべく実験を進めている。

以上より、糸状菌ゲノム配列探索と化合物同定により、骨格構造の全く異なる新規 ustiloxin 型 RiPS 経路および化合物のペアを、ustiloxin に加えて2つ見出すことができた。これにより、ust-RiPS 経路が多様な環状ペプチドを生合成する、1 つの大きな糸状菌二次代謝経路のクラスであることが示唆された。Fungi ゲノム上には、*Aspergillus* 属だけでも 40 種類以上、他の糸状菌やキノコを含めると膨大な数の ust-RiPS 経路シーズがまだ同定されずに眠っている。今後はこれらシーズを異種発現等によって各種類ごとに同定し、望みの環状ペプチド化合物を思うようにデザインできる系へ発展させていきたいと考えている。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計4件)

N. Nagano, M. Umemura (CA), M. Izumikawa, J. Kawano, T. Ishii, M. Kikuchi, K. Tomii, T. Kumagai, A. Yoshimi, M. Machida, K. Abe, K. Shin-ya, and K. Asai, “Class of cyclic ribosomal peptide synthetic genes in filamentous fungi”, *Fungal Genetics and Biology*, 査読有、86 巻、2016、58-70  
doi: 10.1016/j.fgb.2015.12.010

T. Tsukui, N. Nagano, M. Umemura (co-CA), T. Kumagai, G. Terai, M. Machida, and K. Asai, “Ustiloxins, fungal cyclic peptides, are ribosomally synthesized in *Ustilagoidea virens*”, *Bioinformatics*, 査読有、31 巻、2016、981-985  
doi: 10.1093/bioinformatics/btu753

Y. Ye, A. Minami, Y. Igarashi, M. Izumikawa, M. Umemura, N. Nagano, M. Machida, T. Kawahara, K. Shin-ya, K. Gomi, and H. Oikawa, “Unveiling the biosynthetic pathway of the ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide ustiloxin B in filamentous fungi”, *Angewandte Chemie International Edition*, 査読有、55 巻、2016、8072-8075  
doi: 10.1002/anie.201602611

T. Kumagai, T. Ishii, G. Terai, M. Umemura (CA), M. Machida, and K. Asai, “Genome sequence of *Ustilagoidea virens* IPU010, a rice pathogenic fungus causing false smut”, *Genome Announcements*, 査読有、4 巻、2016、

e00306-16

doi: 10.1128/genomeA.00306-16

##### [学会発表](計4件)

M. Umemura, N. Nagano, H. Koike, K. Tamano, K. Abe, K. Shin-ya, K. Asai, and M. Machida, “Discovery of fungal secondary metabolic pathways from large-scale genomic and transcriptomic information”, 28th Fungal Genetics Conference, 国際・口頭発表・登壇・招待講演、2015年03月18日、Asilomar Conference Grounds, Asilomar, USA

梅村舞子、長野希美、「カビの新規リボソームペプチド生合成経路に対応した化合物 MS ピークの検出」、第41回BMSコンファレンス、国内・ポスター発表・登壇、2014年07月08日、能登ロイヤルホテル・石川県能登町

M. Umemura, N. Nagano, A. Yoshimi, Y. Ye, A. Minami, K. Abe, K. Shin-ya, H. Oikawa, and M. Machida, “Ribosomal peptide biosynthetic pathways widely conserved in filamentous fungi”, 2016 SIMB Annual Meeting and Exhibition, 国際・口頭発表・登壇・招待講演、2016年07月26日、Sheraton Hotel, New Orleans, US

##### [図書](計0件)

##### [産業財産権]

##### ○出願状況(計1件)

名称：真菌由来のリボソームペプチドを製造する方法

発明者：長野希美、梅村舞子、小池英明、熊谷俊高、町田雅之

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2015/56667

出願年月日：2015/03/06

国内外の別：外国

名称：真菌由来の新規リボソームペプチド  
発明者：梅村舞子、長野希美、新家一男、泉川美穂

権利者：同上

種類：特許

番号：2015-215256

出願年月日：2015/10/30

国内外の別：国内

##### ○取得状況(計0件)

##### [その他]

ホームページ等

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

梅村 舞子 ( Maiko (Myco) Umemura )  
産業技術総合研究所・生物プロセス研究部  
門・研究グループ付  
研究者番号：00552259

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )