

令和元年5月22日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15263

研究課題名(和文)糸状菌リボソームペプチドの生合成に普遍的な新規環化酵素の機能解明

研究課題名(英文)Studies on the macrocyclization in the biosynthesis of fungal ribosomal peptides

研究代表者

尾崎 太郎(Ozaki, Taro)

北海道大学・理学研究院・助教

研究者番号：40709060

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)：近年、リボソームペプチドの生合成遺伝子が糸状菌ゲノムに数多く見いだされ、生物活性物質の単離源として着目されている。本研究課題では、糸状菌由来のリボソームペプチドの生合成におけるペプチドの環化反応に着目して研究を行った。二環性骨格を有するasperipin-2a (1)の生合成に関与すると考えられた4つの遺伝子をクローニングし、異種宿主である麹菌で発現することで1の異種生産を達成した。これにより、化合物1の環化反応にもustiloxin Bと同様の環化酵素が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糸状菌のゲノムには、リボソームペプチドの生合成遺伝子が数多く見出される。生合成経路の詳細な解析例はustiloxin Bの一例のみであり、利用は進んでいないのが現状である。本研究でasperipin-2a生合成経路の異種宿主内での再構築に成功した。さらに、異種宿主から調製した化合物を使い、本化合物の絶対配置の決定に成功した。これにより環化反応が立体選択的に進行することが示唆された。Ustiloxin Bと比較して環化に関与する遺伝子の数が少ないことから、今後本化合物を材料として解析を進めることで、環化酵素の解析が容易になると期待される。

研究成果の概要(英文)：The biosynthetic genes for fungal ribosomal peptides are widely distributed among fungal genomes and expected to be a rich source of biologically active compounds. However, the genomic information has not been utilized well, possibly due to the lack of information about their biosynthetic pathway. In this study, the biosynthetic pathway of fungal ribosomal peptides, especially focusing on macrocyclization, were analyzed. The biosynthetic genes for asperipin-2a, a bicyclic ribosomal peptide, were cloned and expressed in the heterologous host *Aspergillus oryzae*. As a result, asperipin-2a was successfully produced by the transformant. This result indicated that the macrocyclization in the asperipin-2a biosynthesis proceed in a similar manner to that of ustiloxin B. Because the number of genes involved in macrocyclization of asperipin-2a was smaller than that in the biosynthesis of ustiloxin B, this finding may facilitate the characterization of this intriguing process in detail.

研究分野：生物有機化学

キーワード：生合成

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

1. 研究開始当初の背景

リボソームペプチド (以下 RiPPs: Ribosomally-synthesized and Post-translationally modified Peptides) は、遺伝子の転写と翻訳により合成された前駆体ペプチドが、翻訳後修飾を受けることで生合成されるペプチド系天然有機化合物の総称である。食品添加物として利用されるナイシンをはじめとして顕著な生物活性を示す化合物が多く知られることから、近年注目を集めている化合物群である。RiPPs は微生物にも広く分布し、盛んに研究が行われているが、その大半が原核微生物由来の化合物に関するものであり、真核微生物である糸状菌が生産する RiPPs に関する研究の例は限られていた。これは、担子菌が生産する α -アマニチンなど、真核微生物由来の RiPPs の報告例自体が少ないことに起因すると考えられる。そのような状況のなか 2014 年に梅村らによって ustiloxin B の生合成遺伝子が糸状菌 *Aspergillus flavus* から発見された¹。遺伝子破壊実験によって、本化合物が前駆体蛋白質 UstA の翻訳後修飾によって生合成される RiPPs であることが報告された。これは子囊菌真菌における RiPPs の初めての例であった。この発見を契機として、類似の生合成遺伝子群が糸状菌に広く分布することが見出され²、バクテリアと同様に糸状菌も RiPPs の有用なソースであると考えられるようになった。遺伝子情報をもとに糸状菌の RiPPs の構造を推測すると、多くは中分子とも呼ばれる分子量 500 から 2000 程度の環状ペプチドであると考えられる。中分子は、低分子化合物が示す優れた膜透過性と、抗体などの高分子が持つ標的分子との高い親和性を併せ持つ創薬シーズとして期待される化合物群である。そのため、糸状菌に広く分布する RiPPs 生合成遺伝子群も、生物活性分子の単離源として有望であると期待できる。

2. 研究の目的

上記のような期待の一方で、糸状菌由来 RiPPs の生合成は、ustiloxin B の生合成経路が詳細に解析されている³のみで、そのほかの化合物の解析は限定的であった。特に、糸状菌由来の RiPPs に共通すると考えられる環状構造の構築機構については、理解が進んでいなかった。これまでの研究によって、ustiloxin B 生合成における環状中間体 desmethylustiloxin F の生合成にチロシナーゼ遺伝子 *ustQ* 及び機能未知遺伝子 *ustYa/ustYb* が関与することが明らかにされている。しかし、各遺伝子を前駆体遺伝子 *ustA* とともに麹菌で異種発現すると desmethylustiloxin F が生産されることが報告されているのみで、各遺伝子産物がどのような反応を触媒するかは明らかにされていない。特に、UstYa と UstYb については機能既知の蛋白質とは相同性を示さないため、解析が進んでいなかった。Ustiloxin B の類縁化合物である phomopsin A の生合成遺伝子群が 2016 年に報告されているが、チロシナーゼ遺伝子 *phomQ* の遺伝子破壊やメチル基転移酵素 PhomM の活性評価が行われているのみで、生合成経路の詳細は明らかにされていない⁴。本化合物の生合成遺伝子クラスターにも UstY のホモログがコードされていることから、ustiloxin と同様の環化機構が示唆される。また、*A. flavus* から見出された RiPPs である asperipin-2a の生合成にも UstY のホモログが関与することが遺伝子破壊実験から示されている²。このように、UstY のホモログは phomopsin A や asperipin-2a の生合成遺伝子クラスターにもコードされているため、関連化合物の生合成において環化を担う重要な酵素だと考えられる。現在は、反応機構など機能の詳細が分からないため、遺伝子情報のみから化合物の構造を推定することが困難であるが、本酵素群の機能を明らかにすることができれば、糸状菌ゲノムに数多く見出される RiPPs 生合成遺伝子を活用し、新規生物活性物質を取得できるようになると期待される。そのため、本研究課題では、糸状菌由来 RiPPs の生合成における鍵酵素 UstY ホモログの機能解析に取り組むこととした。

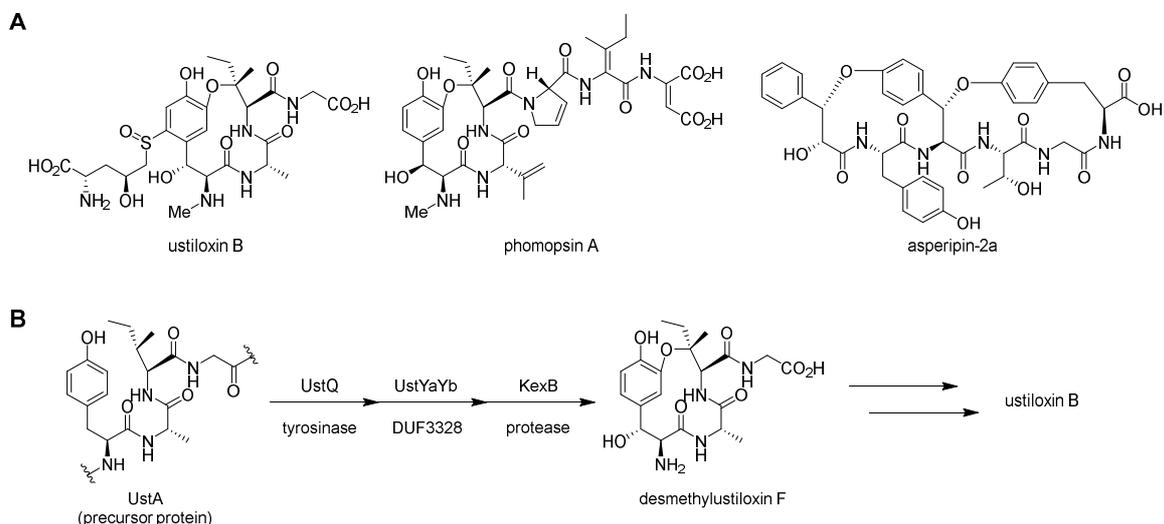


図 1 糸状菌由来 RiPPs とその生合成経路の概略。A. 糸状菌由来 RiPPs の化学構造。B. Ustiloxin B の生合成経路の概略

3. 研究の方法

麹菌異種発現系を用いた糸状菌 RiPPs 生合成経路の再構築

糸状菌のゲノム上に見いだされる RiPPs の前駆体遺伝子の近傍には、UstY のホモログが高い頻度で存在する。そのため、UstY のホモログによるペプチドの環状化反応は、糸状菌に由来する RiPPs の生合成に広く保存されていると考えられる。しかし、実験的に機能が確認されたのは ustiloxin B 生合成に關する UstYa/UstYb のみであり、他の生合成経路の相同酵素についても機能解析を行う必要がある。これまでに phomopsin A 及び asperipin-2a の生合成遺伝子群が報告されており、両化合物の生合成遺伝子クラスターにも UstY ホモログが存在することから、これらの酵素が生合成に關与することが示唆される。そこで、これらの化合物の生合成遺伝子をクローニングし、異種宿主である麹菌に導入することで生合成経路を宿主内で再構築することとした。得られる各形質転換体の代謝産物を分析することで、各 UstY ホモログの機能を実験的に明らかにする。

Asperipin-2a は、ustiloxin B とは異なり、2 残基間で結ばれたエーテル架橋を 2 つ有する二環式骨格を有している。その生合成には前駆体遺伝子 AFLA_041400 (以降 *aprA*)、UstY ホモログである AFLC_041390 (*aprY*)、還元酵素遺伝子 AFLA_041370 (*aprR*)、トランスポーター遺伝子 AFLA_041380 (*aprT*) が關与することが提唱されている。初めに、*aprA* と *aprY* を PCR により増幅し、それぞれ麹菌異種発現用プラスミド pUSA2 及び pUARA2 を用いてクローニングした。また、同様に *aprR* と *aprT* も増幅し、異種発現プラスミド pAdeA2 へクローニングした。構築した各プラスミドを用いて麹菌を形質転換し、生合成遺伝子が導入された形質転換体を得た。形質転換体を培養し、代謝産物を LC-MS を用いて分析した。

形質転換体において asperipin-2a の生産を確認した後、培養抽出物からカラムクロマトグラフィーを用いて本化合物を精製し、NMR 及び質量分析による構造解析に供した。文献値との比較から平面構造を決定した後、水素添加及び加水分解反応に供した。得られた加水分解物を改良マーフィー法に供し、各アミノ酸残基の絶対配置を決定した。また、その際に生じる分解生成物をキラル HPLC により分析し、絶対配置既知の標品との比較から、3-フェニル乳酸残基の絶対配置も決定した。

組換え蛋白質を用いた試験管内反応

UstY のホモログが触媒する反応を明らかにするために、組換え蛋白質を調製し、試験管内反応を検討した。2 種の酵素 UstYa と UstYb が環化に關する Ustiloxin B と比較して、*AprY* のみで環化反応が進行する asperipin-2a の方がより解析が容易であると期待し、こちらを対象に解析を進めることとした。組換え蛋白質は大腸菌を宿主として発現し、マルトース結合タンパク質と融合した形で調製した。基質として用いるペプチドは化学合成により調製した。その際、ペプチドの配列は KexB による消化で生成すると推測される FYYTGYKR を基質の候補として選定した。

4. 研究成果

麹菌異種発現系を用いた糸状菌 RiPPs 生合成経路の再構築

麹菌に 4 種の遺伝子を導入した形質転換体 (AO-*aprAYRT*) を培養したところ、asperipin-2a の生産が確認された。生産された化合物の平面構造は、化合物を単離した後 1 次元、2 次元の NMR 及び質量分析を行い決定し、asperipin-2a であることを確認した。宿主として用いた麹菌 NSAR1 株では本化合物の生産が確認できなかったことから、導入した 4 種の遺伝子が asperipin-2a の生合成に關与することが確かめられた。4 種の遺伝子のうち、*aprR* や *aprT* を除いた 3 種のみを導入した形質転換体も同様に作製し (AO-*aprAYT* 及び AO-*aprAYR*)、代謝産物を分析した。これらの形質転換体でも asperipin-2a がわずかに検出されたものの、その生産量は大きく減少していた。以上の結果から、*aprR* 及び *aprT* も asperipin-2a の生合成に關与していることが示唆された。わずかに asperipin-2a の生産が見られたことから、宿主細胞内に存在する他の蛋白質がこれらの遺伝子産物の機能を相補したのだと考えられる。また、*AprA* のアミノ酸配列中で asperipin-2a に変換される部分 (FYYTGY) のうち、環状構造の形成に關わる Tyr3 及び Tyr6 をフェニルアラニンに置換した前駆体ペプチドを設計し、対応する *aprA* 変異体 (*aprA/Y3F* 及び *aprA/Y6F*) を異種発現に用いたが、いずれの変異体を用いた際にも環状ペプチドや関連化合物の生産は確認できなかった。このことから、これら二つの残基が環化反応に重要であることが示唆された。また、単環式の化合物なども確認できなかったことから、環化反応は連続的に進行すると推測している。*AprA* の配列をクエリとして BLAST 行ったところ、*AprA* のホモログが複数見出された。いずれのホモログ遺伝子も *aprY*、*aprR*、*aprT* のホモログとクラスターを形成していることから、asperipin-2a の類縁体の生合成に關与すると考えられる。各前駆体のアミノ酸配列を比較すると、asperipin-2a の 1 番目のフェニルアラニン、3 番目と 6 番目のチロシンに相当する残基は保存されており、これらが環化に重要であることが示唆された。一方、その他の残基はフェニルアラニンやヒスチジン、アスパラギンで置換されている場合があり、これらの部位は環化に影響しないことが示唆された。これらの部位に変異を導入することで asperipin-2a 類縁体の創製が可能だと期待される。

次に、形質転換体から得た asperipin-2a を分解反応に供した。得られた分解産物を改良マーフィー法に供した。L-FDLA で誘導体化した分解産物を、アミノ酸標品の誘導體と比較分析をし

た結果、チロシン及びスレオニンがL体であることが明らかになった。また、グリシンの誘導体も検出することができた。以上の結果から、アミノ酸部分の絶対配置を決定した。また、asperipin-2aの構造中に存在する3-フェニル乳酸残基の絶対配置については、分解産物を誘導体化せずに直接キラルHPLCで分析することで決定した。市販の標品と比較分析を行った結果、R体と保持時間が一致することが確かめられた。以上のように決定した各残基の絶対配置と、1次元及び2次元のNMRから得られた相対配置の情報を組み合わせることで、asperipin-2aの絶対配置を図1に示すように決定した。

以上の結果から、asperipin-2aの生合成経路を以下のように推定している。本化合物の生合成は、前駆体遺伝子 *aprA* の転写と翻訳により、前駆体ペプチド AprA が合成されることで開始する。AprA 配列中には、最終的に asperipin-2a へと変換される 8 残基のコア配列 FYYTGY が八回繰り返して存在している。各繰り返し配列は、2つの塩基性残基 KR と隣接しているが、この部位はゴルジ体に局在するプロテアーゼ KexB の認識配列であり、その作用により AprA は消化されると考えられる。また、AprA は AprY や AprR により翻訳後修飾を受けて asperipin-2a へと変換されると考えられる。現時点では、これらの酵素による消化や修飾の順序については情報が得られていない。Ustiloxin B 生合成との比較から、asperipin-2a の構造中に存在する2つのエーテル架橋の形成は単一の酵素 AprY が触媒していると考えている。これは、2つのエーテル架橋がどちらも同じ立体化学を示すこと、AprY のサイズが比較的小さく一つの活性中心しか有していないと推測できることから支持される。Ustiloxin B の生合成では、チロシンの水酸化と続く環化によってエーテル架橋を介した環状構造が形成される。この際にチロシン残基のβ位も同時に水酸化される。これと同様に、asperipin-2a の環化反応においてもα位の水酸化と脱水を伴ってイミン **1** を形成するのではないかと現在推測している。**1** は直ちにケトン **2** へと加水分解されると考えられ、AprR はこのケトンの還元に関与することを想定している。トランスポーターと相同性を示す AprT は生合成酵素ではなく、生成物の排出に関与すると考えられる。

以上のように決定した各残基の絶対配置と、1次元及び2次元のNMRから得られた相対配置の情報を組み合わせることで、asperipin-2aの絶対配置を図1に示すように決定した。

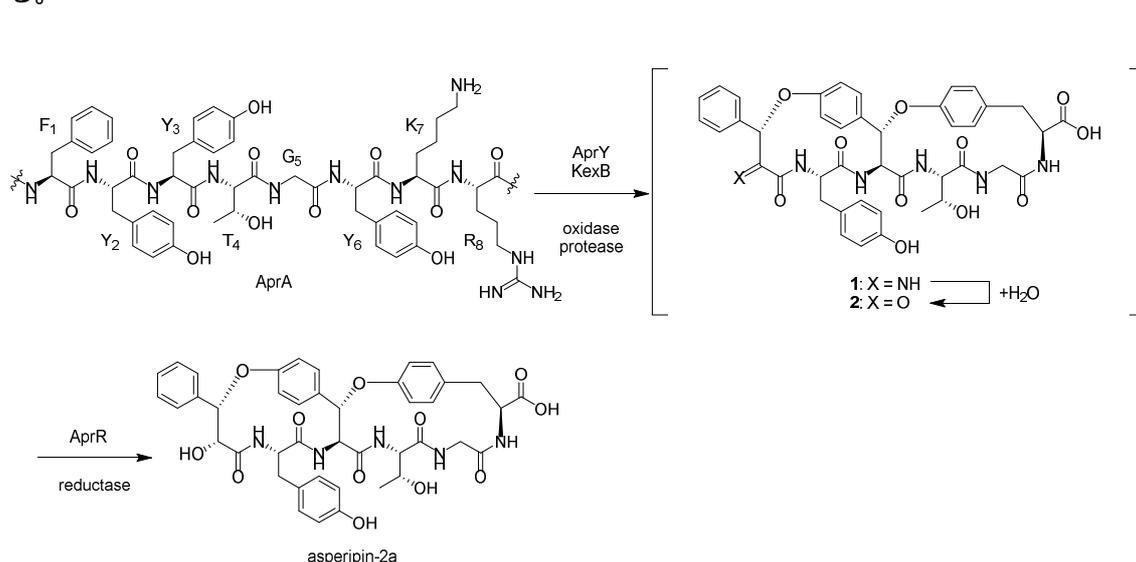


図 3 asperipin-2a の推定生合成経路

組換え蛋白質を用いた試験管内反応

アミロースカラムを用いて精製した組換え蛋白質と、基質ペプチドを反応に供した。反応終了後、反応溶液をLC-MSを用いて分析したが asperipin-2a や関連化合物の生成は確認できなかった。このことから、基質がペプチドではなく消化を受ける前の AprA である可能性や、活性型の蛋白質が得られていない可能性が考えられる。今後、異なる基質や発現宿主を用いることで活性を検証していく必要がある。

総括

以上の研究によって、UstY のホモログが asperipin-2a の生合成にも関与し、本化合物の 2 環性骨格形成に関わることを示した。過去の ustiloxin B における知見と合わせ、UstY ホモログによる環状エーテル形成は、糸状菌由来 RiPPs に共通の戦略だと考えられる。チロシナーゼや二種の UstY (UstYa 及び UstYb) が環化に関わる ustiloxin B と比較すると、AprY と AprR のみが反応に関わる本生合成系はよりシンプルで解析が容易な対象であると期待される。今後、本生合成系を対象に研究を進めることで、UstY ホモログの機能が明らかになると期待される。

<引用文献>

1. M. Umemura, N. Nagano, H. Koike, J. Kawano, T. Ishii, Y. Miyamura, M. Kikuchi, K. Tamano, J. Yu, K. Shin-ya and M. Machida, *Fungal Genet. Biol.*, **2014**, 68, 23–30
2. N. Nagano, M. Umemura, M. Izumikawa, J. Kawano, T. Ishii, M. Kikuchi, K. Tomii, T. Kumagai, A. Yoshimi, M. Machida, K. Abe, K. Shin-Ya and K. Asai, *Fungal Genet. Biol.*, **2016**, 86, 58–70
3. Y. Ye, A. Minami, Y. Igarashi, M. Izumikawa, M. Umemura, N. Nagano, M. Machida, T. Kawahara, K. Shin-Ya, K. Gomi and H. Oikawa, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2016**, 55, 8072–8075
4. W. Ding, W. Q. Liu, Y. Jia, Y. Li, W. A. van der Donk and Q. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2016**, 113, 3521–3526

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- (1) Y. Ye, *T. Ozaki, M. Umemura, C. Liu, A. Minami, and *H. Oikawa, Heterologous production of asperipin-2a: proposal for sequential oxidative macrocyclization by a fungi-specific DUF3328 oxidase. *Org. Biomol. Chem.*, 査読有, Vol. 17, 2019, 39–43.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

なし

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。