

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02095

研究課題名(和文)天然物生合成における特異な変換反応を触媒するラジカルSAM酵素の機能解析

研究課題名(英文)Mechanistic Enzymology of Radical SAM Enzymes in Natural Product Biosynthesis

研究代表者

江口 正 (Eguchi, Tadashi)

東京工業大学・理学院・教授

研究者番号：60201365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ラジカルS-アデノシルメチオニン(ラジカルSAM)酵素の機能および反応機構解析を目的とし、バクテリオホパンの生合成遺伝子クラスターに含まれるラジカルSAM酵素HpnH及び環状ペプチド化合物Q-6402-Aに含まれる非タンパク質性アミノ酸である1-アミノ-2-メチルシクロプロパンカルボン酸の生合成におけるラジカルSAM酵素Orf29を研究対象とした。その結果、バクテリオホパン生合成において、HpnHはジプロプテンを(22R)-アデノシルホパンに変換することを明らかにした。また、Orf29はS-アデノシルメチオニンのメチル化反応を触媒することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では未解明のラジカルSAM酵素の機能および反応機構解析を目的とした。生体内酵素反応は、すべてイオニックな反応メカニズムによって触媒されると考えられてきた。しかし、有機ラジカル中間体が関与する酵素反応の例が明らかになり始め、現在ではラジカル中間体を經由する反応機構が広く受け入れられている。ラジカル機構を利用する酵素は、イオニックなメカニズムによって触媒するのが難しい、あるいは不可能と考えられる反応がラジカル中間体を経て反応を進行させている。本研究で明らかにしたラジカルSAM酵素の反応はラジカルを介して行われる酵素化学の深化および新たな酵素化学の領域を築けたと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, functional analysis of a radical S-adenosyl-L-methionine (SAM) adenosylhopane synthase HpnH and a methylcobalamin-dependent radical SAM methyltransferase Orf29 were performed.

Adenosylhopane is found to be formed by a crosslinking reaction between diploptene and a 5'-deoxyadenosyl radical that is generated by the radical S-adenosyl-L-methionine (SAM) enzyme HpnH. Further, we successfully propose that the thiol of Cys106 stereoselectively reduces the radical intermediate generated at the C22 position by the addition of the 5'-deoxyadenosyl radical to diploptene, to complete the reaction.

By in vitro analysis using Orf29, Orf29 was found to catalyze the C-methylation of the L-methionine moiety of SAM. The resulting methylated derivative of SAM was then converted into 1-amino-2-methylcyclopropanecarboxylic acid by Orf30. Thus, we demonstrate that C-methylation of SAM occurs prior to cyclopropanation in the biosynthesis of a bacterial 1-amino-2-methylcyclopropanecarboxylic acid.

研究分野：天然物化学

キーワード：ラジカルSAM酵素 天然物 生合成 反応機構

1. 研究開始当初の背景

生体内の酵素反応は、ほぼすべてイオニックな反応メカニズムによって触媒されると古くは広く考えられてきた。しかしながら、約40年前頃から有機ラジカル中間体が関与する酵素反応の例が明らかになり始め、現在ではいくつかの生化学反応でラジカル中間体を經由する反応機構が広く受け入れられている。例えば、シトクロム P450、メタン・モノオキシゲナーゼ、リボヌクレオチド還元酵素およびビタミン B₁₂ 酵素などの例がよく知られている。概して、ラジカル機構を利用する酵素は、イオニックなメカニズムによって触媒するのが難しい、あるいは不可能と考えられる活性化されていない C-H 結合の水素原子を引き抜き、ラジカル中間体を生成する。

このようなラジカル機構で生化学反応を触媒する酵素として2001年に、ラジカル S-アデノシルメチオニン (SAM) 酵素群の存在が提唱された。本酵素群に含まれるものとして1970年にリシン-2,3-アミノムターゼの反応機構が初めて解明され、ラジカル中間体が関与してアミノ基転位反応が進行することが明らかとなった。その後、数種の酵素がラジカル機構で反応が進行し、共通に高く保存されたシステインモチーフ CxxxCxxC を有し、これが [4Fe-4S] クラスタを核とする活性部位を有していることが明らかとなり、共通の酵素群であることが認識されて2001年にラジカル SAM 酵素と分類された。現在では、ラジカル SAM 酵素はその相同性から約48,000種も見出されており、DNA 修復、ビタミン、補酵素あるいは抗生物質の生合成に関与すると考えられている。しかしながら、詳細にその酵素機能が解明されたされたものは、リシン-2,3-アミノムターゼ、ピオチン合成酵素など数10種に留まっている。その原因としてラジカル SAM 酵素が酸素に対して非常に不安定で酵素精製等が非常に困難であり、また、活性部位である [4Fe-4S] クラスタの調製が難しいこともあり、本酵素の取り扱いが出来る研究室は世界でも限られている。

ラジカル SAM 酵素の共通した反応機構は、活性型の [4Fe-4S]⁺ クラスタが、SAM を還元的に開裂し、5'-デオキシアデノシルラジカルを発生させ、種々のラジカル反応を開始することである (図1)。

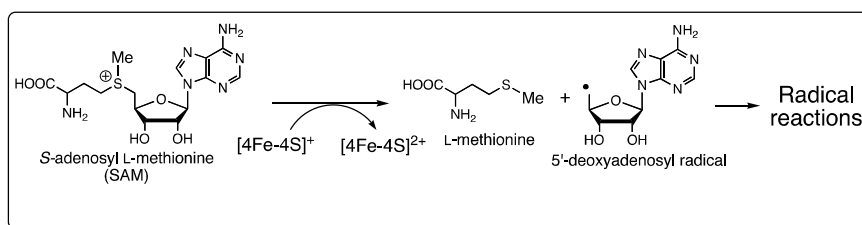


図1. ラジカル SAM 酵素による SAM の還元の開裂による 5'-デオキシアデノシルラジカル生成機構

先にも述べたように本酵素群に属する酵素には、機能未確定の酵素が数多く存在しており、それらの中にはこれまでに無い興味深い反応機構で未知の酵素反応を触媒すると考えられ、ラジカル SAM 酵素の機能解析は世界各国で活発に行われてきている。

我々は、このようなラジカル SAM 酵素の機能解析に興味を持ち、アミノグリコシド抗生物質ブチロシンとネオマイシンの生合成におけるラジカル SAM 脱水素酵素 BtrN およびラジカル SAM エピメリ化酵素 NeoN の機能を既に明らかにした。これらはラジカル SAM 酵素が水酸基の酸化あるいは不斉炭素のエピメリ化を行うことをいずれも世界で初めて明らかにした例である。2つの酵素はアミノグリコシド抗生物質の生合成クラスターにコードされた酵素であるが、他の天然物の生合成遺伝子にもラジカル SAM 酵素遺伝子が存在している。このような背景のもと、本研究では未解明のラジカル SAM 酵素の機能および反応機構解析を目的とし、種々の天然物生合成遺伝子クラスターにコードされているラジカル SAM 酵素を研究対象とした。

2. 研究の目的

本研究は、機能未解明のラジカル SAM 酵素の機能解明および反応機構解析を目的とする。ラジカル SAM 酵素は、一般に共通したシステインモチーフ CxxxCxxC を持ち、これが活性部位である [4Fe-4S]⁺ クラスタを保持して、S-アデノシルメチオニン (SAM) を還元的に開裂し、5'-デオキシアデノシルラジカルを発生させ、それを契機に特異な酵素反応を触媒する。ラジカル SAM 酵素はその相同性から約48,000種も見出されているが、その酵素機能が解明されたものは、わずか数10種に留まっている。本研究では、本酵素群のなかでも特に種々の天然物生合成系に含まれるラジカル SAM 酵素の反応機構解明を目的とする。すなわち、バクテリオホバンの生合成遺伝子クラスターに含まれるラジカル SAM 酵素 HpnH 及び環状ペプチド化合物 Q-6402-A に含まれる非タンパク質性アミノ酸である 1-アミノ-2-メチルシクロプロパンカルボン酸の生合成におけるラジカル SAM 酵素 Orf29 を研究対象とした。これらの酵素の機能は、化学構造と類似の天然物の生合成経路等から推定できるものの、詳細な反応機構は、何が基質であるかを含めて未解明であり、非常に興味深い。

3. 研究の方法

本研究は、二次代謝酵素反応系にコードされている機能未解明のラジカル SAM 酵素の機能および反応機構解析を目的としている。目的達成のため、まず種々の天然物生合成遺伝子クラスターに存在するラジカル SAM 酵素のクローニングを行う。次に酵素合成あるいは化学合成によりラジカル SAM 酵素の考えられる基質の調製を行う。さらに調製した基質を用いての酵素活性の検出、生成物の同定を行い、ラジカル SAM 酵素機能解析を行う。さらに活性の見られた酵素に関して、安定同位体標識した基質を用いての酵素反応等の実験を行い、機能未解明のラジカル SAM 酵素の反応機構解析を目指す。本研究では、ラジカル SAM 酵素のクローニング、異種発現に成功したバクテリオホパン及び環状ペプチド化合物 Q-6402-A の生合成遺伝子クラスターに含まれるラジカル SAM 酵素を研究対象とした。

4. 研究成果

バクテリオホパン生合成におけるラジカルSAMアデノシルホパン合成酵素HpnHの機能解析

アデノシルホパンは、細菌の細胞膜の流動性と透過性を調節すると考えられているC₃₅ホパノイドの重要な前駆体である(図2)。本研究ではこのアデノシルホパン合成酵素であるHpnHの詳細な機能解析を行った。まず、ホパノイド生合成におけるユニークな炭素-炭素結合形成反応を触媒すると推定されたラジカルSAM酵素HpnHの基質を明らかにし、酵素反応を行って、酵素機能および反応機構を明らかにすることを目的とした。

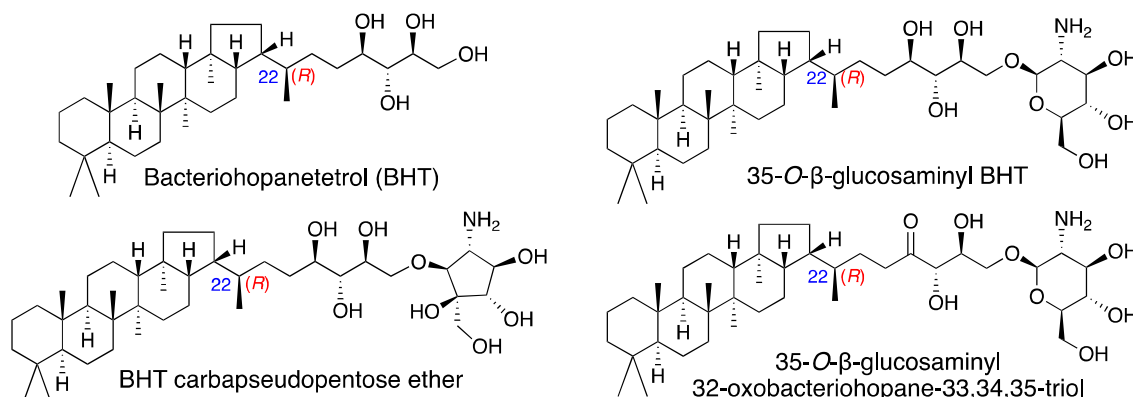


図2. 種々のバクテリオホパンの構造

Methylobacterium 属細菌や *Burkholderia* 属細菌、*Rhodopseudomonas* 属細菌における遺伝子破壊実験の結果から、HpnH はジプロプテンをアデノシルホパンに変換すると推定されていた。HpnHの活性を検出するに際し、推定基質であるジプロプテンの水に対する低い溶解性が問題となった。そこで、スクアレン-ホペン環化酵素と *Streptomyces coelicolor* A3 (2) 由来の HpnH (SchpnH) を共発現させた大腸菌の無細胞抽出液を用いることとし、反応系中にてスクアレンをジプロプテンに変換し、SchpnH と反応させた。その結果、アデノシルホパンが SchpnH の活性によって形成されることが明らかとなった。さらに、生成物を反応系から単離し構造解析を行ったところ、生成物は (22*R*)-アデノシルホパンであることが明らかになった。これは解析に用いた SchpnH が立体選択的な炭素鎖伸長反応を触媒することを示す結果である。

次に、大腸菌にて異種発現させた SchpnH を嫌気条件にて精製し、ジプロプテンを基質として活性を検出することを検討した。ダンマルゴムよりヒドロキシホパンを抽出し、これを誘導することでジプロプテンを得た。酵素反応では、ジプロプテンをスクアレンに溶かし、高濃度の界面活性剤存在下で混合することで SchpnH と反応させた。その結果、アデノシルホパンが検出され、これによって、SchpnH がジプロプテンの C29 位と 5'-デオキシアデノシンの C5' 位の間に新たな炭素-炭素結合を形成する反応を触媒するということが明らかになった。さらに、本反応を重水中で行ったところ、重水素が生成物に取り込まれることが分かった。そこで、重水素が取り込まれる位置を特定すべく、スクアレン-ホペン環化酵素と SchpnH を共発現させた大腸菌の無細胞抽出液を用いた反応を重水中にて行い、生成物を単離して構造解析を行った。その結果、アデノシルホパンの C3 位と C22 位に重水素が取り込まれていることが判明した。スクアレン-ホペン環化酵素によってスクアレンがジプロプテンへと変換される際に、水由来の水素原子が C3 位に取り込まれることがすでに明らかになっていることから、SchpnH による触媒反応によって水由来の水素原子が C22 位に取り込まれることが明らかになった(図3)。

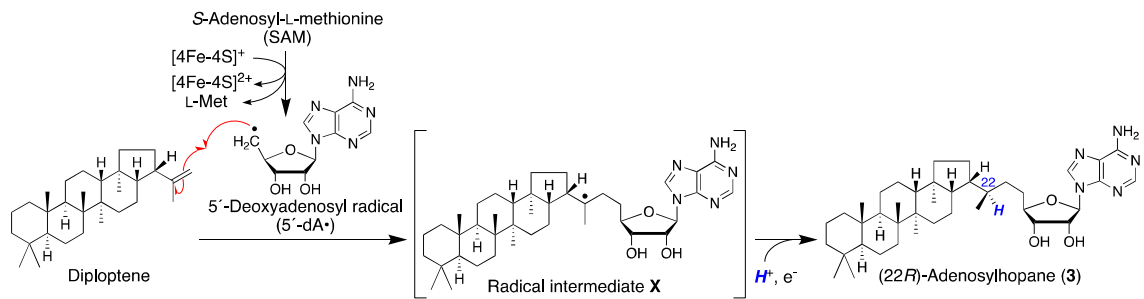


図 3 . ラジカルSAMアデノシルホパン合成酵素HpnHの反応

以上の実験結果をもとに、HpnHが触媒する立体選択的な炭素-炭素結合形成反応の機構を次のように推定した。SAMの還元的開裂によって生じた5'-デオキシアデノシルラジカルがジプロプテンの末端に存在する二重結合にラジカル付加することで、ラジカル中間体が形成される。このラジカル中間体がHpnH活性中心において水とのプロトン交換可能なアミノ酸残基から立体選択的に水素原子を引き抜くことで、(22R)-アデノシルホパンが形成されると考えられる。3級炭素におけるC-H結合の結合解離エネルギーは約400 kJ/molと見積もられていることから、ラジカル停止に関わる残基は8つのシステインまたは3つのチロシン残基であると推測した。

しかしながら、*Streptomyces coelicolor* A3 (2) 由来のHpnH (ScHpnH) は発現量も少なく、これ以上の検討は困難と考え、酵素の発現量の優れていたエタノール生産菌*Zymomonas mobilis*のHpnH (ZmHpnH) を用いて、生化学実験および変異体の分析を行った。まず、ZmHpnHはScHpnHと同様に(22R)-アデノシルホパンを生成することを確認した。そこで、ラジカル中間体へと水素原子供与すると考えられたシステインおよびチロシン残基をそれぞれアラニンに変異させ、酵素反応を検討した。その結果 ZmHpnHのCys106Ala変異体は、野生型酵素の40分の1の活性を持ち、かつ(22R)-および(22S)-アデノシルホパンの両方を生産した。さらに、ラジカルトラッピング実験により、22位のラジカル中間体が生成していることを確認できた。これらの実験により、アデノシルホパン合成酵素の反応では、Cys106のチオールが22位に生成したラジカル中間体に水素原子を供与し反応を完了させることを明らかにした(図4)。

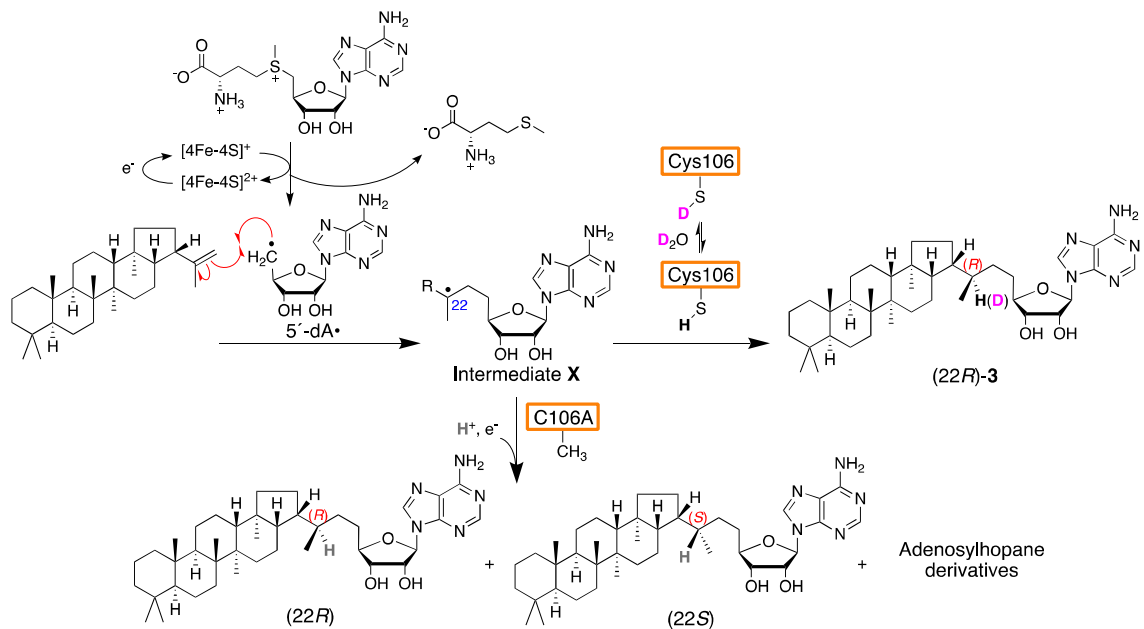


図 4 . ラジカル SAM アデノシルホパン合成酵素 HpnH の反応の反応機構

コバラミン依存ラジカル SAM メチル化酵素 Orf2399 の機能解析

新たなラジカル S-アデノシルメチオニン (SAM) 酵素として、環状ペプチド化合物 Q-6402-A に含まれる非タンパク質性アミノ酸である 1-アミノ-2-メチルシクロプロパンカルボン酸の骨格形成を行うラジカル SAM 酵素、コバラミン依存ラジカル SAM メチル化酵素 Orf2399 について機能解析を進めた(図5)。

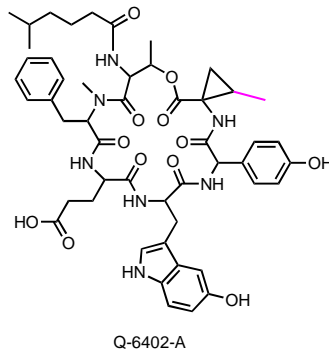


図 5 . 環状ペプチド化合物 Q-6402-A

1-アミノ-2-メチルシクロプロパンカルボン酸は、コバラミン依存ラジカル SAM メチル化酵素 Orf29 と環化する酵素 Orf30 によって生合成されるものと考えられていた。しかし、SAM のシクロプロパン化への環化が先に起きるのか、SAM へのメチル化が起きるのかは、不明であった。そこで、両酵素を大腸菌にて発現を行い、*in vitro* での酵素反応を試みた。両酵素存在のもと、嫌気条件下で SAM、メチルコバラミンを反応させると、1-アミノ-2-メチルシクロプロパンカルボン酸が生成していることが明らかになった。これにより、Q-6402-A に含まれる非タンパク質性アミノ酸である 1-アミノ-2-メチルシクロプロパンカルボン酸は、Orf29 と Orf30 の作用によって生合成されることが明らかになった。次に反応の順番を決めるためにラジカル SAM メチル化酵素 Orf29 を SAM、メチルコバラミン存在下あるいはアミノシクロプロパンカルボン酸、メチルコバラミン存在下、嫌気条件下で酵素反応を行った。その結果、SAM からはメチル化が進行した化合物の生成が観測された。従って、まず SAM が Orf29 によってメチル化され、その後 Orf30 によって、シクロプロパン化が進行することが明らかになった (図 6)。

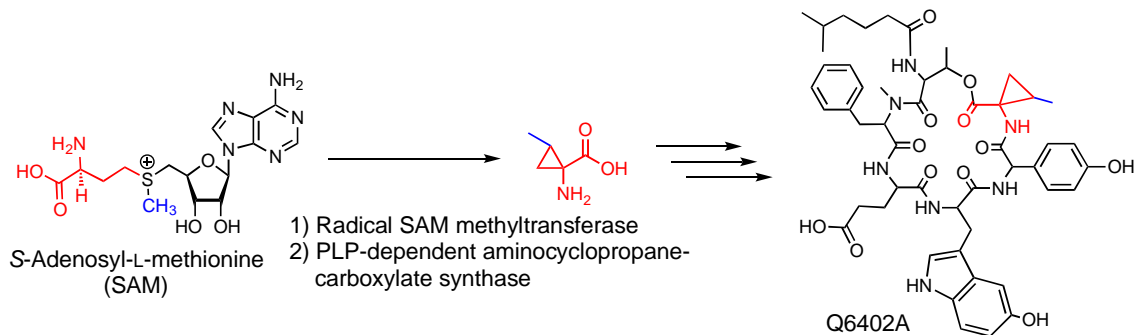


図 6 . 1-アミノ-2-メチルシクロプロパンカルボン酸の生成機構

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 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato Shusuke, Kudo Fumitaka, Rohmer Michel, Eguchi Tadashi	4. 巻 59
2. 論文標題 Characterization of Radical SAM Adenosylhopane Synthase, HpnH, which Catalyzes the 5 - Deoxyadenosyl Radical Addition to Diploptene in the Biosynthesis of C35 Bacteriohopanepolyols	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 237 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201911584	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 該当する
1. 著者名 佐藤秀亮, 工藤史貴, 江口正	4. 巻 77
2. 論文標題 抗生物質ホスホマイシン生合成の全貌解明	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 378 ~ 379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Sato Shusuke, Kudo Fumitaka, Kuzuyama Tomohisa, Hammerschmidt Friedrich, Eguchi Tadashi	4. 巻 57
2. 論文標題 C-Methylation Catalyzed by Fom3, a Cobalamin-Dependent Radical S-adenosyl-L-methionine Enzyme in Fosfomycin Biosynthesis, Proceeds with Inversion of Configuration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 4963 ~ 4966
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.8b00614	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 該当する
1. 著者名 Sato Shusuke, Miyanaga Akimasa, Kim Seung-Young, Kuzuyama Tomohisa, Kudo Fumitaka, Eguchi Tadashi	4. 巻 57
2. 論文標題 Biochemical and Structural Analysis of FomD That Catalyzes the Hydrolysis of Cytidylyl (S)-2-Hydroxypropylphosphonate in Fosfomycin Biosynthesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 4858 ~ 4866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.8b00690	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 Maruyama Chitose, Chinone Yukiko, Sato Shusuke, Kudo Fumitaka, Ohsawa Kosuke, Kubota Junya, Hashimoto Junko, Kozone Ikuko, Doi Takayuki, Shin-ya Kazuo, Eguchi Tadashi, Hamano Yoshimitsu	4. 巻 10
2. 論文標題 C-Methylation of S-adenosyl-L-Methionine Occurs Prior to Cyclopropanation in the Biosynthesis of 1-Amino-2-Methylcyclopropanecarboxylic Acid (Norcoronamic Acid) in a Bacterium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 775 ~ 775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10050775	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 Sato Shusuke, Kudo Fumitaka, Rohmer Michel, Eguchi Tadashi	4. 巻 60
2. 論文標題 Biochemical and Mutational Analysis of Radical S-Adenosyl-L-Methionine Adenosylhopane Synthase HpnH from Zymomonas mobilis Reveals that the Conserved Residue Cysteine-106 Reduces a Radical Intermediate and Determines the Stereochemistry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2865 ~ 2874
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.1c00536	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 Shusuke Sato, Fumitaka Kudo, Tadashi Eguchi	4. 巻 669
2. 論文標題 Characterization of the Cobalamin-Dependent Radical SAM C-Methyltransferase Fom3 in Fosfomycin Biosynthesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in Enzymology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.mie.2021.11.025	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Shusuke Sato, Fumitaka Kudo, Tomohisa Kuzuyama, Tadashi Eguchi
2. 発表標題 Radical SAM C-Methylation in Fosfomycin Biosynthesis
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤秀亮, 宮永顕正, 工藤史貴, 葛山智久, 江口 正
2. 発表標題 ホスホマイシン生合成における新規加水分解酵素 FomD の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度(平成31年度)大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 秀亮, 工藤 史貴, Michel Rohmer, 江口 正
2. 発表標題 バクテリオホパンポリオール生合成において炭素-炭素結合形成反応を触媒するラジカルSAM酵素HpnHの機能解析
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 秀亮, 工藤 史貴, Michel Rohmer, 江口 正
2. 発表標題 バクテリオホパンポリオール生合成において炭素-炭素結合形成反応を触媒 するラジカル SAM 酵素 HpnH の機能解析
3. 学会等名 第63回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 湊 敦志, 佐藤 秀亮, 丸山 千登勢, 濱野 吉十, 工藤 史貴, 江口 正
2. 発表標題 1-アミノ-2-メチルシクロプロパンカルボン 酸生合成におけるメチル基転移酵素の機能解析
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京工業大学 理学院 化学系 江口・工藤研究室
<http://www.chemistry.titech.ac.jp/~eguchi/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------