

平成30年6月5日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03834

研究課題名(和文) ラジカル反応を契機とする特異な変換反応を触媒するラジカルSAM酵素の反応機構解析

研究課題名(英文) Mechanistic Enzymology of Radical SAM Enzymes

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、微生物二次代謝酵素反応系にコードされているラジカルSAM酵素の機能および反応機構解析を目的とし、アミノグリコシド抗生物質アプラマイシン、トブラマイシン及び抗生物質ホスマイシンの生合成遺伝子クラスターに含まれるラジカルSAM酵素を研究対象とした。その結果、アプラマイシン、トブラマイシン生合成において、AprD3、D4の2種類の酵素により、パロマミンがデオキシ化されリビダミンへと変換されることを明らかにし、さらにラジカルSAM酵素AprD4の基質特異性を明らかにした。また、ホスホマイシン生合成において、ラジカルSAMメチル化酵素Fom3 C-メチル化機構を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, functional analysis of a radical S-adenosyl-L-methionine (SAM) dehydratase AprD4 and a methylcobalamin-dependent radical SAM methyltransferase Fom3 were performed.

A radical SAM dehydratase AprD4 and an NADPH-dependent reductase AprD3 are responsible for the C3'-deoxygenation of pseudodisaccharide paromamine in the biosynthesis of apramycin/tobramycin. AprD4 catalyzes the C3'-dehydration of paromamine via a radical-mediated reaction mechanism to give 4'-oxolividamine, which is then reduced by AprD3 with NADPH to afford lividamine. Further, the substrate specificity of this unique combination of enzymes has been investigated.

A methylcobalamin-dependent radical SAM methyltransferase Fom3 was found to catalyze the C-methylation of cytidylyl-2-hydroxyethylphosphonate to give cytidylyl-2-hydroxypropylphosphonate in the biosynthesis of a unique C-P bond containing antibiotic fosfomicin in Streptomyces.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：ラジカルSAM酵素 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、ほぼすべてイオ的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 B<sub>12</sub> 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、イオ的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。

この様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]<sup>+</sup> 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)。

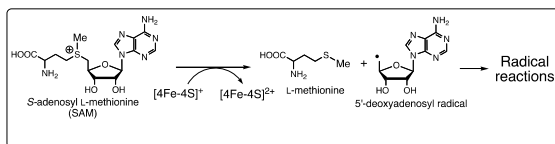


図1. ラジカル SAM 酵素による SAM の還元の開裂による 5'-デオキシアデノシルラジカル生成機構

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は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、この様なラジカル 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 プ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、他の抗生物質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。この様な背景のもと、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、種々の抗生物質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]<sup>+</sup> 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抗生物質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、アミノグリコシド抗生物質 アプラマシン、トブラマイシン及び抗生物質 ホスマイシンの生合成遺伝子クラスターに含まれるラジカル SAM 酵素である。これらの酵素の機能は、化学構造と類似の抗生物質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、まず種々の抗生物質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 酵素機能解明を行う。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

したアミノグリコシド抗生物質アプラマイシン/トブラマイシン及び抗生物質ホスマイシンの生合成遺伝子クラスターに含まれるラジカル SAM 酵素を研究対象とした。

#### 4. 研究成果

(1) アミノグリコシド抗生物質アプラマイシン/トブラマイシンの生合成遺伝子クラスター内に含まれるラジカル SAM 酵素

アミノグリコシド抗生物質は、様々なバクテリアに対して幅広い抗菌活性を有しており、ネオマイシンやカナマイシンなどが古くから臨床薬として用いられてきた。アプラマイシン、トブラマイシンは 2-デオキシストレプトアミン(DOS)を中心アグリコンとして有するアミノグリコシド抗生物質であり、放線菌 *Streptomyces tenebrarius* から単離された(図2)。アプラマイシン及びトブラマイシンは、C-3'位に水酸基を有していないことが構造上の特徴の一つである。カナマイシンなどに見られる C-3'位水酸基は抗生物質耐性酵素によるリン酸化標的部位であり、この部位がデオキシ化された抗生物質は耐性菌にも有効である。従って、アプラマイシン/トブラマイシン生合成における C-3'位デオキシ化反応は、耐性菌にも有効な抗生物質を、生合成工学により創製する上で有用であるが、その生合成機構は明らかとなっていない。

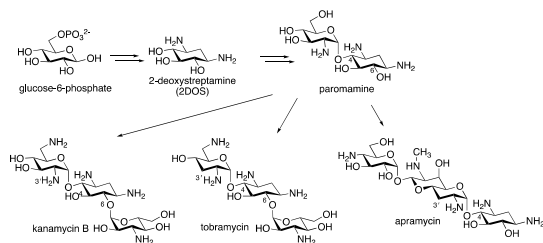


図2. アプラマイシン、トブラマイシンと類似アミノグリコシドの生合成経路

類似アミノグリコシドの化学構造と、それら生合成酵素をコードしている遺伝子クラスターの解析から、アプラマイシン生合成遺伝子クラスター中の AprD3 と AprD4 の 2 つの酵素が、このデオキシ化反応に関与すると推定された。そこで本研究では、これら二つの酵素の組換えタンパク質を調製して酵素反応解析を行い、アプラマイシン/トブラマイシン生合成における C-3'位デオキシ化機構の解明を試みた。

AprD3 は NAD(P)<sup>+</sup> 依存型酸化還元酵素と推定されたため、特徴的な極大吸収を有する還元型の NADH, NADPH との結合能を調べた。その結果、NADPH のみ酵素と結合した状態で得られたため、これを補酵素として用いることとした。AprD4 は、ラジカル SAM 酵素に特徴的な 4Fe-4S クラスター結合モチーフ

を有していた。ラジカル SAM 酵素は一般に、活性型の [4Fe-4S]<sup>+</sup> クラスターが還元的に SAM を開裂させ、生じた 5'-デオキシアデノシルラジカル(5'-dA<sup>•</sup>)が様々なラジカル反応を触媒する。[4Fe-4S]クラスターは空気酸化されやすいことが知られており、異種発現大腸菌の細胞破碎、精製、鉄-硫黄クラスターの再構成など、酵素の取扱いは全てグローブボックス内で嫌気的に行った

AprD4 の [4Fe-4S] クラスターは、ジチオナイトによる還元の前後での可視紫外吸収スペクトルの変化で確認した。EPR スペクトルでも、還元後に本クラスターに特徴的な軸対称型のシグナルが得られ、[4Fe-4S]<sup>+</sup> クラスターの存在が確認された。本デオキシ化の反応機構では、AprD4 により C-4'位水素を引き抜き抜いてラジカル中間体を生じさせ、C-3'位水酸基の脱離を経て C-4'-ケト体を与えると推定した(図3)。その後、C-4'-ケト体が AprD3 により還元されることで C-3'位デオキシ化体が生成すると仮定し、酵素機能解析を行った。

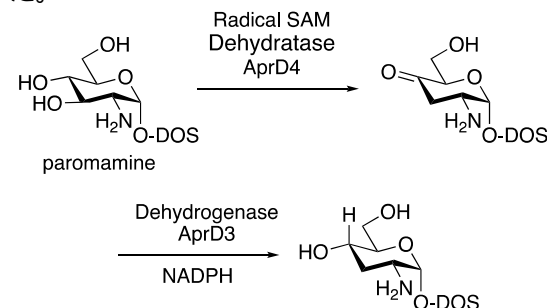


図3. AprD3 と AprD4 の予想反応経路

疑似二糖アミノグリコシドであるパロマミンをデオキシ化反応の候補基質として検討した結果、デオキシ化物と考えられる生成物が観測された。まず、パロマミンから AprD3, D4 反応により生じた化合物をイオン交換クロマトグラフィーにより精製し、各種 NMR 解析した結果、パロマミンの C3'位がデオキシ化されたりビダミンが生成物であることが分かった。

次に、AprD4 の反応だけで C-4'-ケト体が生成するか検証することにした。AprD4 反応生成物を直接単離することができなかったため、AprD3 による還元反応時に重水素化した NADPH を用いることで間接的に証明することにした。その結果、(4S)-[4-<sup>2</sup>H]NADPH を用いたときに、リビダミンの C-4'位に重水素が取り込まれた。つまり、AprD4 の反応生成物は C-4'ケト体であり、それが AprD3 により立体選択的に還元されることで C-3'位デオキシ化が完了すると示唆された。さらに、ラジカル SAM 酵素 AprD4 による脱水機構に興味を持たれたため、本酵素反応を詳細に解析することにした。AprD3, D4 反応を重水中で行うと、重水素が 2'-エカトリアル位に導入されていることが分かった。

また、AprD4 と AprD3 によるデオキシ化反応では、5'-デオシアデノシン (5'dA) が等量生成していた。したがって、この反応では SAM が触媒的に使われるわけではないことが分かった。以上の結果より、AprD3 と AprD4 の反応は、図4のように進行すると考えられた。

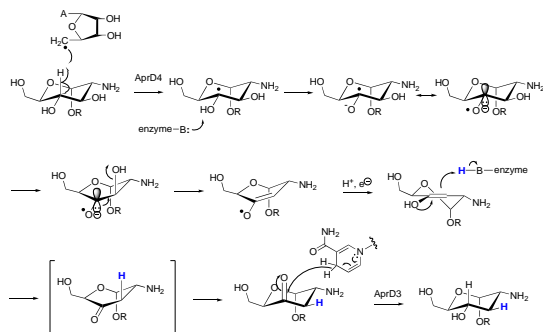


図4. AprD3 と AprD4 の反応機構

さらに、ラジカル SAM 酵素 AprD4 の基質特異性を検討した。その結果、疑似二糖であるパロマミンのグルコサミン部分の C-6'位が水酸基であること、C-2'位のアミノ基と2-デオキシストレプタミン部の C-5 位の水酸基が修飾されていないことが重要であることが分かった。

以上、本研究ではアブラマイシン生合成において、AprD3, D4 の2種類の酵素により、パロマミンがデオキシ化されリビダミンへと変換されることを明らかにした。

## (2) 抗生物質ホスホマイシ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

ホスホマイシンは *Streptomyces* 属や *Pseudomonas* 属によって生産される抗生物質であり、その幅広い抗菌活性から臨床医学において広く利用されている(図5)。ホスホマイシンは天然物の中でも比較的小さな分子でありながら、オキシラン環にホスホン酸ユニットが直接結合しているというユニークな構造を持つことから、その構築機構に興味を持たれ、古くから生合成研究が精力的に行われてきた。

*Streptomyces* 属において、ホスホマイシン生合成はホスホエノールピルビン酸から始まる(図5)。まず、リン酸基転位酵素 Fom1 によって炭素-リン結合が形成され、続く Fom2 による脱炭酸反応、FomC による還元反応を経て、2-ヒドロキシエチルホスホン酸 (HEP) へと変換される。次に、コバラミン依存ラジカル SAM 酵素 Fom3 が HEP の C2 位のメチル化を触媒し、(S)-2-ヒドロキシプロピルホスホン酸 ((S)-HPP) を形成すると推定されている。しかし、報告されている Fom3 の活性は非常に低いものであり、生成物の構造に関する詳細な情報は得られていない。最後に、酸化酵素 Fom4 によってエポキシドが形成され、ホ

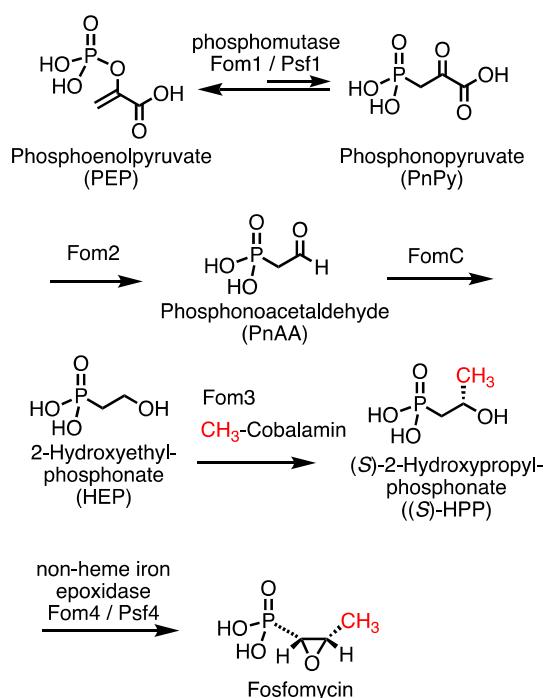


図5. *Streptomyces* 属のホスホマイシンのこれまでの推定生合成経路

スホマイシンが生合成される。従って、HEP と (S)-HPP の間を繋げる生合成メカニズムの解明が残された課題であった。

最近、Fom1 の N 末端側に存在するシチジリル基転移酵素ドメインが HEP をシチジリル化すること、fom1 遺伝子破壊株に対して HEP を投与してもホスホマイシンの生産が回復しなかったことが共同研究により明らかにした。この事実を踏まえると、HEP へのシチジリル基転移反応はホスホマイシン生合成において必須であり、シチジリル化された HEP (HEP-CMP) が Fom3 の真の基質である可能性が考えられた(図6. Path B)。そこで、本研究では、ホスホマイシン生合成における C-メチル化の全容を明らかにすべく、検討を行った。

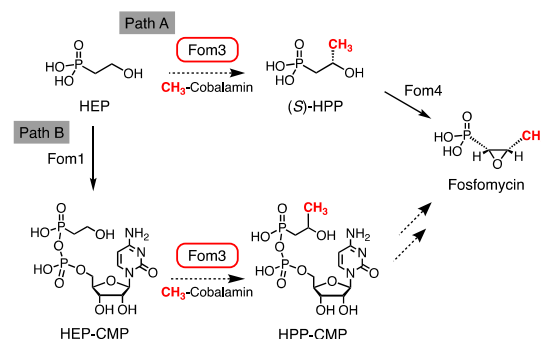


図6. *Streptomyces* 属のホスホマイシン生合成経路におけるメチル化. Path A; 従来考えられてきたメチル化経路、Path B; 新たな経路

コバラミン依存ラジカル SAM 酵素では、鉄硫黄クラスターを補因子として SAM を還元的

に開裂させ、その際に生じる 5'-デオキシアデノシルラジカル (5'-dA $\cdot$ ) が基質から水素を引き抜くことによってラジカル反応を開始させる。この基質ラジカルにメチルコバラミン上のメチル基がラジカル的に転移することによってC-メチル化が完了すると推定されている。

fom3 遺伝子と鉄硫黄クラスター生合成マシナリーを大腸菌にて共発現させ、金属アフィニティークロマトグラフィーによりほぼ純粋な組換え酵素を得た。嫌気条件にて、精製 Fom3 の鉄硫黄クラスターを再構成した後、メチルコバラミン、ジチオトレイトール (DTT)、NADH、メチルピオロゲン存在下にて SAM と HEP-CMP を混合したところ、メチル化生成物が確認できた。また、同時にもう一つの生成物である 5'-デオキシアデノシン、S-アデノシルメチオニンも確認できた。さらにシチジリル化されていない HEP を HEP-CMP の代わりに反応させた時には 5'-デオキシアデノシンは生成しなかったことから、HEP-CMP が Fom3 の真の基質であることが明らかとなった。

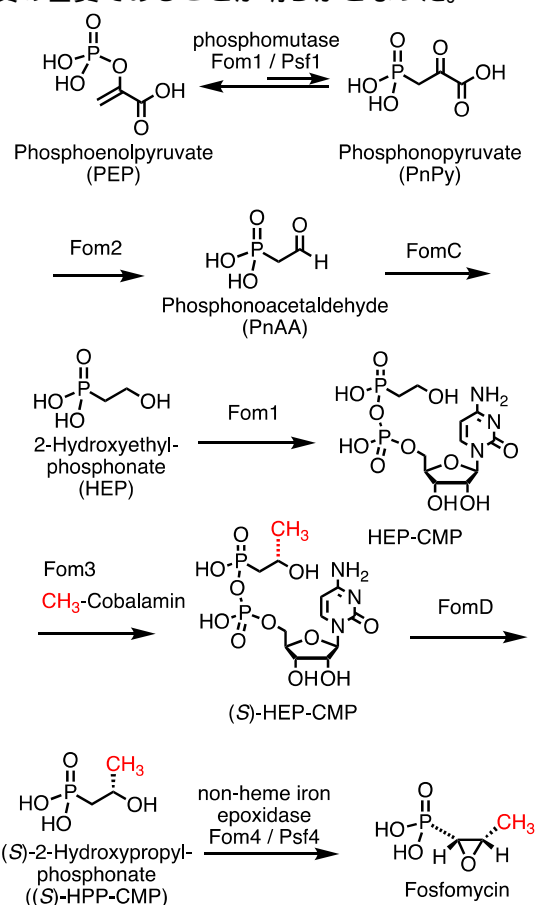


図 7. *Streptomyces* 属におけるホスホマイシンの生合成経路

さらに Fom3 反応によって生じた HPP-CMP は加水分解により HPP に変換される必要がある。相同解析から、この脱シチジリル化過程は生合成遺伝子クラスター中にコードされている機能未知酵素 FomD によって触媒されると予想し、fomD 遺伝子が大腸菌にて異種発現、精製し、機能解析を行った。その結果、FomD

は Mn<sup>2+</sup> または Co<sup>2+</sup> 存在下で (S)-HPP-CMP を加水分解することが分かった。基質選択性を検討したところ、(S)-HPP-CMP, (R)-HPP-CMP, HEP-CMP について加水分解が進行し、中でも (S)-HPP-CMP に対する活性が最も大きかった。一方、Fom1 のシチジリル基転移活性は HEP に対して最大だった。これらの結果から、ホスホマイシン生合成において、メチル化されていない HEP に対してシチジリル化が進行し、メチル化された HPP-CMP に対して脱シチジリル化が優先して進行すると示唆された。

以上、本研究によって、ホスホマイシン生合成における C-メチル化機構を明らかにすることができた。すなわち、ラジカル SAM メチル化酵素 Fom3 の基質認識において CMP 部分が重要な役割を果たしており、HEP が Fom1 によってシチジリル化されることで C-メチル化が進行する。その後、FomD によって CMP 部分が取り除かれて、ホスホマイシンへと変換されると考えられる (図 7)。

## 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)

Fumitaka Kudo, Tadashi Eguchi, Aminoglycoside Antibiotics: New Insights into the Biosynthetic Machinery of Old Drugs, *Chem. Rec.*, **16** [1], 4-18 (2016). 査読有り, doi: 10.1002/tcr.201500210

Fumitaka Kudo, Takahiro Tokumitsu, Tadashi Eguchi, Substrate Specificity of Radical S-Adenosyl-L-methionine Dehydratase AprD4 and Its Partner Reductase AprD3 in the C3'-Deoxygenation of Aminoglycoside Antibiotics, *J. Antibiot.*, **70** [4], 423-428 (2017). 査読有り, doi: 10.1038/ja.2016.110

Shusuke Sato, Fumitaka Kudo, Seung-Young Kim, Tomohisa Kuzuyama, Tadashi Eguchi, Methylcobalamin-Dependent Radical SAM C-Methyltransferase Fom3 Recognizes Cytidylyl-2-hydroxyethylphosphonate and Catalyzes the Nonstereoselective C-Methylation in Fosfomycin Biosynthesis, *Biochemistry*, **56** [28], 3519-3522 (2017). 査読有り, doi: 10.1021/acs.biochem.7b00472

Su-Hee Cho, Seung-Young Kim, Takeo Tomita, Taro Shiraiishi, Jin-Soo Park, Shusuke Sato, Fumitaka Kudo, Tadashi Eguchi, Nobutaka Funa, Makoto Nishiyama, Tomohisa Kuzuyama, Fosfomycin Biosynthesis via Transient Cytidylylation of 2-Hydroxyethylphosphonate by the Bifunctional Fom1 Enzyme, *ACS Chem. Biol.*, **12** [8], 2209-2215 (2017). 査読有り, doi: 10.1021/acschembio.7b00419

(学会発表)(計 4 件)

(1) Tadashi Eguchi, Biosynthesis of Aminoglycoside Antibiotics, PACIFICHEM

2015, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Dec 18, 2015, Honolulu, Hawaii, USA

(2) 佐藤秀亮、工藤史貴、江口正、葛山智久、ホスホマイシン生合成におけるラジカル S-アデノシル-L-メチオニン C-メチル化酵素の機能解析、日本化学会第 97 春季年会、2017 年 3 月 16 日、慶應義塾大学日吉キャンパス（横浜）

(3) Tadashi Eguchi, Radical SAM Enzymes involved in Natural Product Biosynthesis, 9th US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products, Jun 3, 2017, UCLA Lake Arrowhead Conference Center, Lake Arrowhead, CA 92352, USA

(4) 佐藤 秀亮、Kim Seung-Young、葛山 智久、工藤 史貴、江口 正、ホスホマイシン生合成における C-メチル化機構、第 59 回天然有機化合物討論会、2017 年 9 月 21 日、わくわくホリデーホール（札幌）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chemistry.titech.ac.jp/~eguchi/>

## 6. 研究組織

### (1) 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