T2R2 東京工業大学リサーチリポジトリ
Tokyo Tech Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	炭素-炭素結合形成反応を触媒するラジカルS-アデノシル-L-メチオニン酵素の機能解析
Title(English)	
著者(和文)	佐藤秀亮
Author(English)	Shusuke Sato
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11882号, 授与年月日:2021年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:江口 正,岩澤 伸治,後藤 敬,豊田 真司,工藤 史貴
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11882号, Conferred date:2021/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

Powered by T2R2 (Tokyo Institute Research Repository)

（博士課程）
Doctoral Program

論 文 要 旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	化学 化学	系 コース	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	（ 理学 ）
学生氏名： Student's Name	佐藤 秀亮		指導教員（主）： Academic Supervisor(main)		江口 正
			指導教員（副）： Academic Supervisor(sub)		工藤 史貴

要旨（和文 2000 字程度）
Thesis Summary（approx.2000 Japanese Characters ）

ラジカル*S*-アデノシル-L-メチオニン (SAM) 酵素は、4Fe-4Sクラスターを補因子としてSAMを還元的に開裂させることで5'-デオキシアデノシルラジカル (5'-dA•) を発生させ、これをラジカル開始剤として様々なラジカル反応を触媒する酵素である。本研究では、ラジカルSAM酵素によるラジカル反応が天然有機化合物の生合成において炭素骨格の構築に利用されていることに着目し、炭素-炭素結合形成反応を触媒するラジカルSAM酵素の機能解明を目指した。

まず、臨床にて抗菌薬として使用されているホスホマイシンの生合成において、*C*-メチル化反応を触媒すると推定されていたコバラミン依存ラジカルSAM酵素Fom3の機能解析に取り組んだ。大腸菌にて異種発現させたFom3を嫌気的に精製し、シチジリル化された2-ヒドロキシエチルホスホン酸 (HEP-CMP) を基質として反応させた結果、シチジリル-2-ヒドロキシプロピルホスホン酸 (HPP-CMP)、5'-デオキシアデノシン (5'-dA)、*S*-アデノシル-L-ホモシステインが等量生成していることが分かった。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'-dAを検出できなかったことから、Fom3の基質認識においてCMP部分が重要であると分かった。さらに、形成されたHPP-CMPのC2位の立体化学をキラルHPLC解析によって*S*配置と決定した。また、(*S*)- または (*R*)-[2-$^{2}H_{1}$]HEP-CMPをそれぞれ合成し、それらを基質として反応解析を行い、5′-dA• が基質のC2位の*pro-R*の水素原子を選択的に引き抜くことを明らかにした。これらの結果から、Fom3が触媒する*C*-メチル化反応はC2位の立体化学の反転を伴って進行すると考えられる。本研究によって、Fom3による*C*-メチル化機構を解明し、ホスホマイシンの生合成経路の全貌を明らかにすることができた。

次に、細菌の膜脂質成分の一つであるバクテリオホパンポリオールの生合成に関与すると推定されていたラジカルSAM酵素HpnHの機能解析に取り組んだ。HpnHの*in vitro*解析では、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 (SHC) とHpnHを共発現させた大腸菌の無細胞抽出液を用いて、反応系中にてスクアレンをジプロプテンに変換し、HpnHと反応させた。その結果、(22*R*)-アデノシルホパンがHpnHの活性によって形成されることが明らかになった。また、HpnHを嫌気的に精製し、ジプロプテンを基質として高濃度の界面活性剤存在下で反応させたところ、(22*R*)-アデノシルホパンが形成された。これによって、HpnHがジプロプテンのC29位と5'-dA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ことが明らかになった。次に、重水中で反応を行ったところ、生成物のC22位に重水素が取り込まれたことが分かった。この結果からC=C結合への5′-dA• の付加によって形成されるラジカル中間体の還元に、水とのプロトン交換が可能な残基が関与すると考えられた。そこで、HpnHホモログ間に保存されるCysあるいはTyr残基を変異させたHpnH変異体を調製し、反応解析を行なった。その結果、Cys106を変異させた場合に活性が著しく低下したこと、および、Cys106変異体によって (22*R*)-アデノシルホパンと (22*S*)-アデノシルホパンの両方が形成されていたことから、Cys106がラジカル中間体を還元する残基であり、生成物のC22位の立体化学を決定していることが明らかになった。以上の実験結果からHpnHの反応機構について、SAMから生じた5′-dA• がジプロプテンのエキソメチレンに対して付加することで、炭素-炭素結合が構築され、C22位に生じたラジカルがCys106のチオールから水素原子を立体選択的に引き抜くことで、(22*R*)-アデノシルホパンが形成されると考えられる。

本研究では、Fom3の機能解析を通じて、天然物の生合成に広く存在するコバラミン依存ラジカルSAM酵素による*C*-メチル化反応の機構を明らかにした。また、HpnHの機能解析によって、多くの細菌の細胞膜に含まれるバクテリオホパンポリオールの構築において鍵となる疎水性ユニットと親水性ユニットを炭素-炭素結合で結ぶ機構を明らかにした。本研究によって得られた成果は天然物の炭素骨格の構築機構を理解する上で重要な知見となる。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。
Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).
注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

（博士課程）
Doctoral Program

論 文 要 旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	化学 化学	系 コース	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	（ 理学 ）
学生氏名： Student's Name	佐藤 秀亮		指導教員（主）： Academic Supervisor(main)		江口 正
			指導教員（副）： Academic Supervisor(sub)		工藤 史貴

要旨（英文 300 語程度）
Thesis Summary（approx.300 English Words ）

Radical *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) enzyme, which is the enzyme superfamily that catalyze a various radical reaction in living cells, has a 4Fe-4S cluster at the active site. The carbon-sulfur bond of SAM coordinating to the 4Fe-4S cluster is cleaved reductively to generate 5'-deaoxyadenosyl radical (5'-dA•), which is a radical initiator in radical SAM reactions. In this thesis, I focused on the radical SAM enzymes catalyzing a carbon-carbon bond forming reaction involved in construction of the carbon skeleton of natural products.

First, I show the functional analysis of cobalamin-dependent radical SAM enzyme Fom3 involved in the biosynthesis of fosfomycin, which is a clinically used antibiotic isolated from *Streptomyces* and *Pseudomonas*. The enzyme reaction was conducted with recombinant Fom3 and cytidylylated 2-hydroxyethylphosphonate (HEP-CMP) as a substrate. As a result, HEP-CMP was converted to cytidylyl 2-hydroxypropylphosphonate (HPP-CMP). The production of 5'-deoxyadenosine (5'-dA) was also observed. In the presence of HEP instead of HEP-CMP, the production of 5'-dA was not detected, indicating that the CMP moiety of HEP-CMP is critical for substrate recognition by Fom3. The chiral HPLC analysis showed that the stereochemistry at the C2 position of HPP-CMP formed by Fom3 is (*S*)-configuration. In addition, Fom3 reaction was performed with (*S*)- and (*R*)-[2-$^{2}H_{1}$]HEP-CMP, elucidating that 5'-dA• stereoselectively abstracts the *pro-R* hydrogen atom at the C2 position of HEP-CMP. Consequently, it was clarified that the *C*-methylation catalyzed by Fom3 proceeds with inversion of configuration.

Second, I show the functional analysis of radical SAM enzyme HpnH involved in the biosynthesis of bacteriohopanepolyols, which is one of the components of bacterial cell membrane. Recombinant HpnH converted diploptene into adenosylhopane. NMR spectra of the enzymatic reaction product were identical to those of synthetic (22*R*)-adenosylhopane, indicating that HpnH catalyzes stereoselective C–C bond formation between C29 of diploptene and C5' of 5'-dA. Further, the HpnH reaction in D_2O-containing buffer revealed that a deuterium atom was incorporated at the C22 position of adenosylhopane. Mutational analysis clarified that the Cys residue conserved among HpnH homologues stereoselectively reduces the radical intermediate formed by the addition of 5'-dA• to diploptene.

This study elucidated the substrates and products of Fom3 and HpnH, and also the mechanisms of carbon-carbon bond forming reaction catalyzed by Fom3 and HpnH.

備考 ： 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。
Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).
注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).