

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)	要約
Type(English)	Outline

# 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

東京工業大学理学院化学系化学コース 佐藤 秀亮

指導教員: 江口 正、工藤 史貴

## 論文要約

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を嫌氣的に精製し、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1当量ずつ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部分が重要であることが分かった。さらに、キラルHPLC解析の結果から、形成されたHPP-CMPのC2位の立体化学をS配置と決定した。また、(S)- または (R)-[2-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]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<sup>1</sup>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を嫌氣的に精製し、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、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シ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。