トピックス

ラジカルSAM酵素における反応中間体捕捉と
反応機構解析

堀谷正樹 佐賀大学農学部生命機能科学科

1. ラジカル SAM 酵素スーパーファミリー

ラジカル SAM (S-アデノシルメチオニン) 酵素スーパーファミリーはヒトを含む高等生物からバクテリアまで全生物が保有していることが知られており、現在ではその数が 113,000 種を超える自然界最大の酵素スーパーファミリーである。すべてのラジカル SAM 酵素は活性中心に特異な [4Fe-4S] クラスターを持ち、3つの鉄イオンは-CX3CX2C-モチーフで保存されているシステイン残基と結合しているが、残りのひとつの鉄イオンは酵素と共有結合をしておらず、“空の”結合サイトを持っている。Hoffman らは電子・核二重共鳴 (ENDOR) 法を用いてラジカル SAM 酵素スーパーファミリーであるリジン 2,3-アミノ ミューターゼ (LAM) とピルビン酸ギ酸リアーゼ活性化酵素 (PFL-AE) を調べ、それらの反応休止状態で SAM のメチオニン部分と特異な鉄イオンがキレート結合を持っていることを報告した (図 1 左上)¹⁾。現在いくつかのラジカル SAM 酵素において SAM 結合型の結晶構造が報告されており、X線結晶構造解析からもこのキレート構造が追認されている²⁾。

2. 5'-デオキシアデノシルラジカル

ラジカル SAM 酵素の酵素反応では、反応第一段階として還元型 [4Fe-4S]⁺ クラスターから 1 電子が SAM に受け渡され、SAM の S-C5' 結合の還元的開裂により 5'-デオキシアデノシル (5'-dAdo•) ラジカルとメチオニンが生じると考えられている (図 1 上)。反応第二段階ではすべてのラジカル SAM 酵素がこのラジカルを利用して様々な基質から水素原子の引き抜きを行い、基質ラジカルと 5'-デオキシアデノシンが生じる。その後、産出した基質ラジカルはそれぞれの酵素に依存した多種多様な酵素反応に利用される。このように「単一種のラジカル中間体」を利用して多様な酵素反応を触媒する点は非常にユニークである。また SAM には 3つの S-C 結合が存在するが、ラジカル SAM 酵

図 1

ラジカル SAM 酵素とビタミン B₁₂ 補酵素における 5'-dAdo• ラジカル中間体の産出。

素による SAM の開裂反応は S-C5' 結合でしか起こらない。一体どのようにして酵素が SAM の S-C5' 結合を選択的に認識・開裂しているのか、そのメカニズムは現在のところ不明である。

一方、動物にしか存在しておらず、その数も 12 種類しかないビタミン B₁₂ 補酵素は活性中心にアデノシルコバラミンを持つ (図 1 下)。ビタミン B₁₂ の酵素反応では Co-C5' 結合の開裂により生じる 5'-dAdo• ラジカルを利用して、基質より水素原子引き抜き反応を行う³⁾。ラジカル SAM 酵素とビタミン B₁₂ 補酵素では同じラジカル中間体を利用することで酵素反応を行っているが、双方ともにこのラジカル中間体が直接観測・捕捉された例はない。

Trapping of the Reaction Intermediates and Analysis of Enzymatic Catalytic Reaction on Radical SAM Enzymes

Masaki HORITANI

Department of Applied Biochemistry and Food Science, Faculty of Agriculture, Saga University

3. | ピルビン酸ギ酸リアーゼの酵素反応中間体の捕捉・同定

PFL-AE は比較的研究が進んだラジカル SAM 酵素のひとつである²⁾。この酵素は 5'-dAdo• ラジカルにより別の酵素であるピルビン酸ギ酸リアーゼ (PFL) の 734 番目グリシンから水素原子を引き抜くことで PFL を活性化 (グリシルラジカル化) する反応を触媒している。この反応系において、短寿命反応中間体を捕捉するために、高速混合凍結法 (RFQ) を用いた。まず PFL-AE の還元型を作成するのに嫌気下での光還元法を用いた。この手法のメリットは光照射を止めると同時に還元が止まることである。つまり、還元型 PFL-AE が一度 SAM へ電子を渡し、5'-dAdo• ラジカルを生じさせると、酸化型 $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ クラスターになり、再度光照射しない限り再還元されない。このようにしてシングルターンオーバーの酵素反応条件を達成した。光還元した PFL-AE 溶液に対し 1 当量の PFL と 10 当量の SAM 混合溶液を RFQ ミキサー中で混合し、あらかじめ液体窒素で冷やした高速回転中の銅製ローラーに噴霧することで反応を止めた (図 2)。この際、流速やミキサーとローラー間の距離を変えることで反応開始からの経過時間を任意に変えた中間体捕捉が出来る。PFL-AE と PFL/SAM 溶液を混合し、25 ms ~ 1 s の時間帯で反応を止め電子スピン共鳴 (EPR) 装置による観測を行ったところ、新規の EPR 信号が 12 K で観測 (Ω 中間体と名付ける) された (図 2 黄色吹き出し)⁴⁾。この Ω 中間体の信号強度は 500 ms で最大になり、その後減少していく。500 ms で反応をクエンチした Ω 中間体について、温度アニーリング法により、試料の温度を 220 K まで段階的に上げ、反応をゆっくり進めると Ω 中間体の信号強度の減少とともに生成物であるグリシルラジカルの生成が確認された。これは Ω 中間体

図 2 還元型 PFL-AE と SAM・PFL 混合溶液による高速混合凍結法による実験模式図と反応開始前、中間体、生成物の EPR 信号。

が PFL-AE 反応における酵素反応中間体であることを示している。さらに、 Ω 中間体の構造解析を行うため、部位特異的同位体ラベル (^{13}C) した SAM や PFL 変異体 (G734A), ^{57}Fe 置換 PFL-AE について Ω 中間体を捕捉し、ENDOR 測定を行った。ENDOR 法は電子スピン周辺の核スピンに関する情報を与えてくれる (NMR on EPR と呼ばれることもあり、超高感度 NMR である)。そのため、ENDOR 信号のスペクトル解析より電子スピンと核スピン間の相互作用 (結合状態や距離) に関する情報が得られるため、金属タンパク質研究における活性中心周辺の溶液 / 結晶構造解析に威力を発揮する手法である。 ^{13}C および ^{57}Fe ENDOR 信号を解析した結果、 Ω 中間体の電子スピンは $[4\text{Fe-4S}]$ クラスターに分布しており、5'-dAdo の C5' と直接共有結合 (^{13}C 結合定数: $A(\text{isotropic}) = 9.4 \text{ MHz}$, $2T(\text{dipole}) \sim 5.3 \text{ MHz}$) していることが明らかになった。また Ω 中間体の特異な EPR 信号 ($g(\text{average}) > g_e = 2.003$) より、 Ω 中間体は高酸化状態 $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$ クラスターに 5'-dAdo が共有結合した有機金属中間体であると考えられる⁴⁾ (図 3)。

4. | ラジカル SAM 酵素におけるラジカル反応機構

Ω 中間体はこれまで予想されていた反応経路にはない反応中間体であった。それではどのようにして Ω 中間体が形成され、酵素反応に利用されているのだろうか。これまで筆者らが行ってきた研究から考え得る反応機構を図 3 に示す。従来 SAM の開裂は 1 電子が鉄硫黄クラスターより SAM に受け渡されることで起こる (図 3 上経路) と考えられており、この電子伝達経路は $\text{Fe} \rightarrow \text{S}$ (SAM) であると予測されていた⁵⁾。これが正しいとすると、電子伝達後 S-C5' 結合の開裂が起こり 5'-dAdo• ラジカルが生じる。ところが 5'-dAdo• ラジカルは高反応性であるため、すぐに鉄硫黄クラスターの鉄イオンと共有結合を作る (Ω 中間体) ことで安定化しているのではないかと予想される。一方で SAM への電子伝達反応なしで Ω 中間体が形成さ

図 3 PFL-AE におけるラジカル反応機構。

れる可能性もある (図 3 下経路). こちらの経路ではまず SAM のアデノシンとメチル基の入れ替えが起こり, C5' が鉄硫黄クラスターに近接する. その後, 鉄イオンの非共有電子対が求核反的にデオキシアデノシンと結合を作る. 両経路での重要な違いは Ω 中間体形成に高反応性ラジカルの産出が必要であるかということである. この問題にはより速い時間での中間体捕捉が必要かも知れない. Ω 中間体はまさしくビタミン B₁₂ 補酵素にみられるアデノシルコパラミン様化合物であり, Ω 中間体形成後は Fe-C5' 結合の開裂により 5'-dAdo• ラジカルが産出し, 基質より水素原子引き抜き反応が起こると考えられる.

PFL-AE の結晶構造に Ω 中間体構造をモデル化すると, Fe-C5' 結合開裂後アデニンとリボース環の C-N 結合がツイストするだけで基質の水素原子引き抜き反応が起こり得ることが分かってきた. つまり, ラジカル産出後は非常に制限された動きで酵素反応が達成できる構造基盤を PFL-AE は持っていることを示唆している. さらに以前筆者らは SAM アナログを合成することで 5'-dAdo• ラジカルアナログ中間体の捕捉に成功している. この詳細な解析では 5'-dAdo• ラジカルが基質より水素原子を引き抜く際, 引き抜きターゲットではなく, 近接した基質炭素原子とファンデルワールス結合していることが明らかになった⁶⁾. この弱い結合力もまた高反応性ラジカルの自由度を制限していると考えられる (図 3 右). つまり PFL-AE では, 高反応性 5'-dAdo• フリーラジカルは① Ω 中間を形成すること, ②ラジカルの動きを制限していること, ③基質とのファンデルワールス力により捕捉されていること, を利用して副反応を起こさないようにラジカルを上手く使う仕組みを持っていると言える.

PFL-AE の酵素反応では有機金属化合物である Ω 中間体を経て酵素反応を触媒していることが明らかになった. 有機金属錯体 (金属イオンと炭素間に結合, 但し一酸化炭素やシアンイオンは除く) は一般的に水溶液中では不安定であるため, 自然界には存在しないと考えられていた. ところが, ビタミン B₁₂ 補酵素が有機金属錯体であるコパラミンを活性中心に持つことが明らかになり⁷⁾, さらに窒素還元酵素の変異体における酵素反応でも活性中心の FeMo コファクターの鉄イオンと基質 (アルコール) とで有機金属化合物の形成が観測され⁸⁾, また水素還元酵素などでも有機金属化合物が利用されている. もし Ω 中間体がすべてのラジカル SAM 酵素に共通の中間体であれば, 自然界は積極的に有機金属化合物を利用していると言えるだろう. さらなる実験・検証が必要である.

5. おわりに

世界的にみても現在多種のラジカル SAM 酵素の機能解析が進められており, 新規のラジカル SAM 酵素 / 鉄硫黄クラスターの反応性・機能性が続々と報告されている. 筆者らも特異なラジカル SAM 酵素であるジフタミド合成酵素において, Ω 中間とは別種の有機金属中間体を報告した⁹⁾. また最近, ラジカルが鉄硫黄クラスターの硫黄原子と結合する可能性や, 酵素による SAM 開裂選択機構についても報告した¹⁰⁾. 最近の鉄硫黄クラスター酵素における潮流を眺めるとまだまだ未知の機能があるに違いない.

謝 辞

本稿における実験は Northwestern Univ の Brian M. Hoffman 教授のもとで行った研究であり, 試料の提供は Montana State Univ の Joan B. Broderick 教授によるものである. ここに謝意を表します.

文 献

- 1) Walsby, C. J. *et al.* (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 11270-11271. DOI: 10.1021/ja027078v.
- 2) Broderick, J. B. *et al.* (2014) *Chem. Rev.* **114**, 4229-4317. DOI: 10.1021/cr4004709.
- 3) Warnke, K., Utada, A. S. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 8564-8572. DOI: 10.1021/ja003658l.
- 4) Horitani, M. *et al.* (2016) *Science* **352**, 822-825. DOI: 10.1126/science.aaf5327.
- 5) Kampmeier, J. A. (2010) *Biochemistry* **49**, 10770-10772. DOI: 10.1021/bi101509u.
- 6) Horitani, M. *et al.* (2015) *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 7111-7121. DOI: 10.1021/jacs.5b00498.
- 7) Banerjee, R., ed. (1999) *Chemistry and Biochemistry of B12*, John Wiley & Sons, New York.
- 8) Lee, H. -I. *et al.* (2004) *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9563-9569. DOI: 10.1021/ja048714n.
- 9) Dong, M. *et al.* (2016) *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 9755-9758. DOI: 10.1021/jacs.6b04155.
- 10) Dong, M. *et al.* (2017) *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 5680-5683. DOI: 10.1021/jacs.7b01712.

堀谷正樹

堀谷正樹 (ほりたに まさき)

佐賀大学農学部生命機能科学科助教
2008 年大阪大学大学院基礎工学研究科博士後期課程修了, 博士 (理学), 理化学研究所特別研究員, Northwestern Univ., ポスドクを経て 16 年より現職.

研究内容: 先端磁気共鳴法による生物無機化学研究
連絡先: 〒 840-8502 佐賀市本庄町 1
E-mail: horitani@cc.saga-u.ac.jp
URL: <http://www.ag.saga-u.ac.jp/japanese/mollifesci/mollifesci.html>