

ペプチドを分子内架橋する新規ラジカルSAM酵素

中井 忠志, 谷澤 克行, 岡島 俊英

1. はじめに

一般的に生体内でのラジカルの生成は有害であり, 生物はその生成をできるだけ避けるだけでなく, 積極的にラジカルを消去する系を有することはよく知られている. その一方で, ラジカルの高い反応性を“安全に”活用する酵素が存在することも知られている. このようなラジカル酵素として最初に発見されたのは, アデノシルコバラミン (adenosylcobalamin: AdoCbl) 依存性の分子内転移酵素であったが, 別種の酵素として, 1970年にS-アデノシルメチオニン (S-adenosylmethionine: SAM) を補助基質とするリシンアミノムターゼ (lysine 2,3-aminomutase: LAM, 図1A) が報告された¹⁾. SAMは生体内のメチル化反応におけるメチル基供与体として作用することが古くから知られていたが, LAMはAdoCblの代わりにSAMを使って5'-デオキシアデノシルラジカル (5'-deoxyadenosyl radical: dAdo \cdot) を発生させるラジカル酵素であると推定された. その後の30年間にSAM依存性のラジカル酵素は5種類しか見つからず, ラジカル酵素としてはマイナーな存在とみなされていた. しかし, 2001年にSofiaらはゲノムデータを用いたバイオインフォマティクス解析により, これら5種類の酵素と共通のCxxxCxxCモチーフを持つ大きなタンパク質ファミリーがあることを発見した²⁾. それらはラジカルSAMスーパーファミリーと命名され, 現在ではすべての生物種から11万種以上もの同族酵素が見つかった. ラジカルSAM酵素は, ビオチンやリポ酸をはじめとする補酵素の生合成, DNAの生合成と修復, RNAの修飾, 翻訳後修飾, 抗ウイルス応答と多岐にわたる反応を触媒しており³⁾(図1A), 生物の主要なラジカル駆動酵素であることが明確となった. ヒトにおいても, これまでに8種類のラジカルSAM酵素が見つかった. そのうち2種については機能未知であり, 残りは前述した機能性のいずれ

かを有する. これらヒト酵素をコードするいずれの遺伝子の欠損も, 心臓疾患など先天性の疾病を引き起こすか, あるいはウイルス感染に対する感受性が増大するなどの何らかの表現型を示すことが報告されており, 高等生物におけるラジカルSAM酵素の重要性を裏づけている (最近の総説⁴⁾に詳しい).

最近, ラジカルSAM酵素の中にタンパク質やペプチドの翻訳後修飾に関わる一群の酵素の存在が明らかになり⁵⁾, SPASMサブファミリー⁶⁾と命名された (図2A). この名称は, サブファミリーを構成することが最初に判明した4種類の酵素の頭文字から名づけられたものである. 筆者らも同時期に新規ラジカルSAM酵素であるペプチド分子内チオエーテル架橋形成酵素QhpDの機能解析に成功し, QhpDもこのサブファミリーに属することを明らかにした⁷⁾. 本稿では, ラジカルSAM酵素の特徴について概説するとともに, QhpDに関する最近の研究成果を紹介する.

2. ラジカルSAM酵素と鉄硫黄クラスター

ラジカルSAM酵素はラジカル供与体としてSAMを用いる鉄硫黄クラスター含有タンパク質である. 前述の共通モチーフCxxxCxxCの3個のCys残基は, [4Fe-4S]クラスター (RSクラスター) の3個のFe原子に配位しており (図1B), Cysに配位しないFe原子にはSAMのアミノ基とカルボキシル基が配位することで, ラジカルSAM酵素に共通の [4Fe-4S]/SAM複合体が活性部位に形成される (図1B). 反応時には, まず, フラボドキシンなどの電子供与体から電子を受け取り, [4Fe-4S]²⁺が [4Fe-4S]⁺に還元される. [4Fe-4S]⁺からSAMに1電子がわたり, SAMのC-S結合がホモリシスすることによって, MetとdAdo \cdot が生じる. dAdo \cdot が基質のC-Hの水素原子を引き抜き, 基質ラジカル (S \cdot) が生成し, その後は各酵素の特異性により独自の反応が進行する.

このようなラジカル反応開始に必須なRSクラスター以外にも, 第2, 第3の鉄硫黄クラスター (Auxクラスター) を持つラジカルSAM酵素も存在しており, それがラジカルSAM酵素触媒反応の多様性を生み出す一因となっている. たとえば, BioBでは [2Fe-2S], LipAでは [4Fe-4S] が第2のクラスターとして存在し, それぞれビオチンや

大阪大学産業科学研究所 (〒567-0047 大阪府茨木市美穂ヶ丘8-1)

Novel radical SAM enzyme forming intrapeptidyl crosslinks

Tadashi Nakai, Katsuyuki Tanizawa and Toshihide Okajima
(Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University,
8-1 Mihogaoka, Ibaraki, Osaka 567-0047, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880506

© 2016 公益社団法人日本生化学会

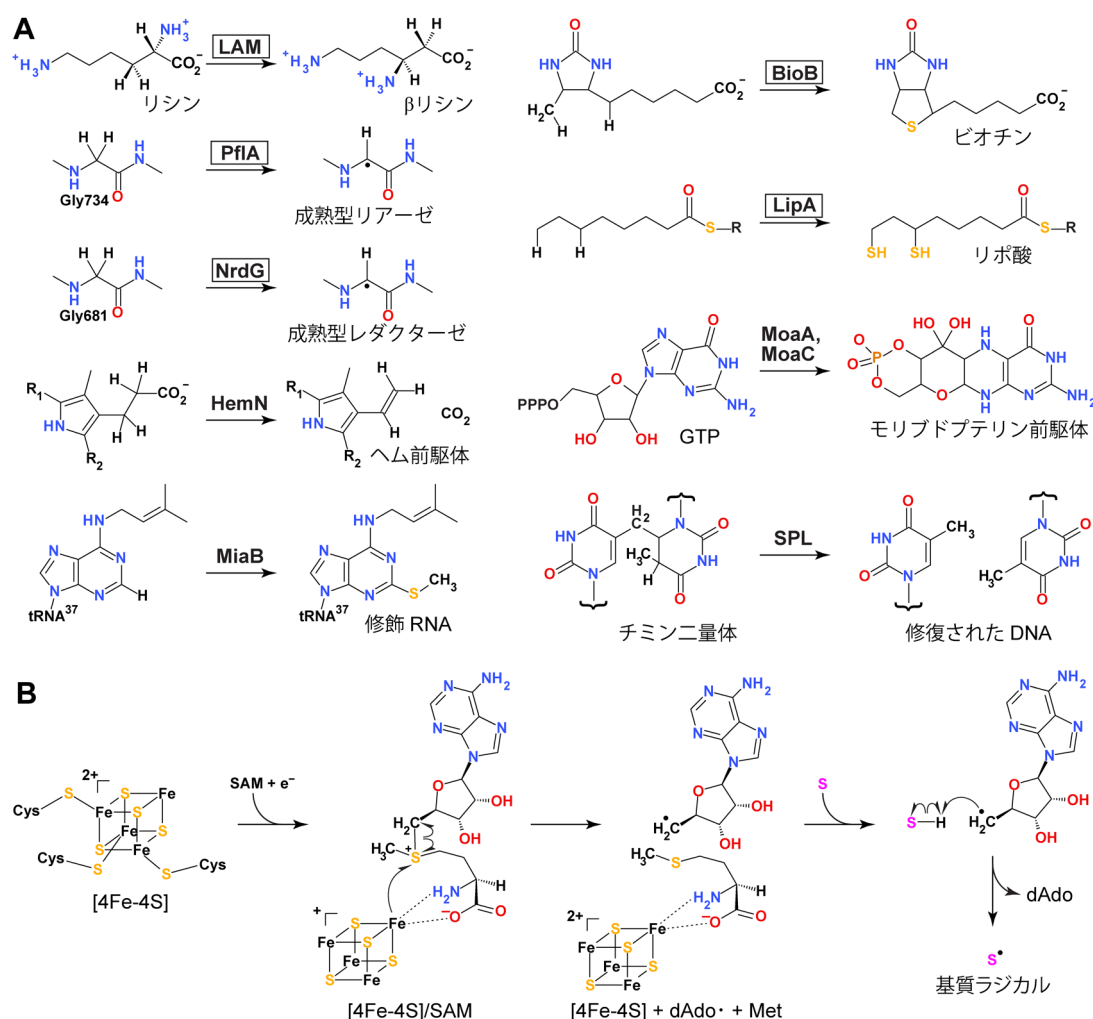


図1 ラジカルSAMスーパーファミリー酵素の反応

(A) ラジカルSAM酵素の反応。最初に見つかった五つの酵素名を四角で囲んで示した。(B) ラジカルSAM酵素の共通するラジカル生成機構。

リポ酸の硫黄原子の供給源としての役割を持つ (図1A)。さらに、SPASMサブファミリーに属する嫌気性スルファターゼ成熟化酵素 (anaerobic sulfatase maturation enzyme: anSME) では、合計2個の [4Fe-4S] 型Auxクラスターを持つことが判明している⁸⁾ (図2B)。anSMEは構造解析がなされている数少ないラジカルSAM酵素の一つである。全体構造は二つのドメインから構成され、RSクラスターを結合するRSドメインと、2個のAuxクラスターを持つSPASMドメインからなる。RSドメインは、ラジカルSAM酵素に共通な機能を持つ一方、SPASMドメインは、anSMEの反応に特有な機能 (たとえば、基質ペプチドの結合や反応時の電子の授受) に関わると推定されている⁸⁾。SPASM酵素は共通して [4Fe-4S] を3個もつと考えられてきたが、最近PqqEのメスバウアースペクトルが測定され、[4Fe-4S] が2個、[2Fe-2S] が1個という存在比であることが判明している⁹⁾。

3. タンパク質分子内チオエーテル架橋形成酵素 QhpD

1) QhpDの発現・精製とその性質

筆者らの研究室では、タンパク質を構成するアミノ酸残基の翻訳後修飾により活性化される酵素の生合成機構の研究を行ってきた (本誌の総説¹⁰⁾ を参照されたい)。その過程で、キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素 (QHNDH) の $\alpha\beta\gamma$ 三量体構造の最小 γ サブユニット (QhpC) 内に、CysとTrp残基から形成される補酵素システイントリプトフィルキノン (cysteine tryptophylquinone: CTQ) と、CysとAspまたはGlu残基から形成される3か所の分子内チオエーテル架橋という特徴的な化学構造を有することを見いだした^{11, 12)} (図3A)。3か所のチオエーテル架橋は、Cysが常にAsp/Gluの6~9残基前に存在し、架橋で生じるキラル炭素原子がすべてS型の立体配置をとるといふ共通性を持つことから、これらの架橋が酵素反応によ

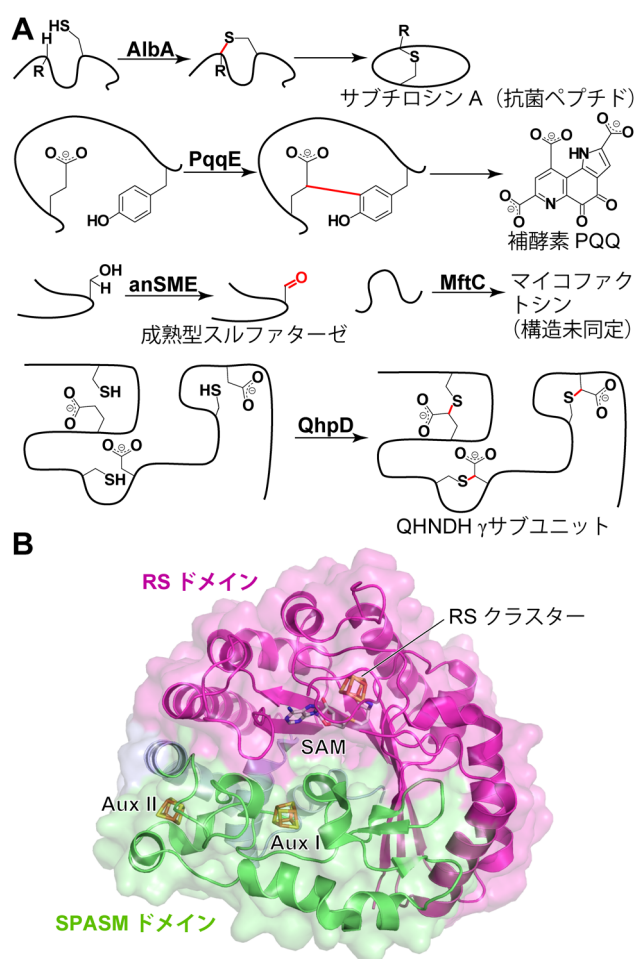


図2 SPASMサブファミリー酵素の反応と構造 (A) SPASM酵素の反応。反応により新しく生成する結合を赤で示した。(B) 嫌気性スルファターゼ成熟化酵素 (anSME) の結晶構造 (PDB ID: 4K36)。

て形成されると推定された。遺伝的解析の結果、QHNDHの構造遺伝子 *qhpABC* に加え、近傍の五つの遺伝子 *qhpDEFGR* がオペロンを形成し、それらがQHNDHの生合成に必須であることがわかった¹³⁾。 *qhpD* がこの架橋反応を担うラジカルSAM酵素をコードすることは比較的初期に明らかにされていたが¹⁴⁾、遺伝子産物QhpDは他のラジカルSAM酵素と同様に酸素存在下において不安定であるとともに、大腸菌内で発現させると、不溶性となるために生化学的解析が遅れていた。さまざまな試行錯誤の末、大腸菌内でQhpDと基質タンパク質QhpCを共発現させたところ、QhpC・QhpD複合体が可溶性成分として大量発現できることが判明し、研究が大きく進展した。翻訳直後のQhpCには成熟過程で除去される28残基のN末端配列（リーダー配列）が存在しており¹⁵⁾、架橋形成に必須であるにも関わらず、その役割が不明であった。さまざまな長さの短縮型QhpCとの相互作用を調べたところ、実はQhpCのリーダー配列がQhpDとの相互作用すなわち複合体形成に必須

であることが判明した。

精製したQhpC・QhpD複合体は、鉄硫黄クラスターに特徴的な茶褐色を呈しており、可視紫外吸収スペクトルでは410nmにピークを持つブロードな吸収帯がみられた。電子スピン共鳴スペクトルでは、液体ヘリウムを用いた15Kの低温と還元剤の存在という条件でのみシグナルが生じた。これらの分光学的性質は、QhpDが[4Fe-4S]型の鉄硫黄クラスターを含有することを示している。さらに、鉄と硫黄の含量を比色定量法により求めたところ、QhpD 1分子中に3個の[4Fe-4S]を持つことが推定された（精製したQhpDは2個の[4Fe-4S]しか含まないが、鉄硫黄クラスターの再構成処理により3個まで[4Fe-4S]が導入される）。これはSPASM酵素の特徴の一つでもある。

2) QhpDの反応

QhpDの触媒するQhpC架橋形成は反応前後の質量差により検出可能ではあるが、反応の前後で1本の架橋あたり質量が2しか減少しないので、観測は容易ではない。そこで、架橋されずに残ったCysのSH基をヨードアセトアミドでアルキル化することで架橋の有無を判別した。反応速度の定量化は、フリーのSH基を蛍光標識試薬N-(9-アクリジニル)マレイミドで修飾することで可能になった。その結果、架橋反応はSAMおよび還元剤の存在下でのみ進行し、ほぼ一次反応（半減期20分）に従って進行することがわかった。変異型QhpCを用いた解析の結果、架橋形成はCysおよびAspまたはGlu残基間のみで起こり、AsnやGlnでは代用できないことがわかった。このことからQhpDの活性中心にはAspまたはGlu残基を認識する塩基性残基が存在すると推測された。本来の基質であるQhpC（全長型と呼ぶ）には架橋部位が3か所含まれるが、全長型QhpCを基質とすると、経時的に3か所まで架橋が形成される。架橋を構成する酸性残基へ変異導入した全長型QhpCを用いて解析したところ、3番目の架橋部位変異体(D49N)では1,2番目の架橋が形成されたのに対し、1番目の架橋部位変異体(E16Q)では3か所とも架橋が形成されなかった。一方、2,3番目の架橋部位変異体(D33N/D49N)では1番目の架橋のみが形成された。これらの結果より、QhpDタンパク質は1分子のQhpCを基質としてそのN末端側から順に3か所の架橋を形成することが証明された。また、3か所の架橋形成反応中に、QhpCはQhpDから解離しないことを強く示唆する結果も得られた。

3) QhpDの構造モデルに基づく推定反応機構

それでは一体どのような分子機構で架橋反応が進行するのであろうか？ 詳細はQhpDの結晶構造解析を待たねばならないが、QhpC・QhpD複合体のホモロジーモデル（図3B）により合理的な説明が可能である。QhpDの構造は前

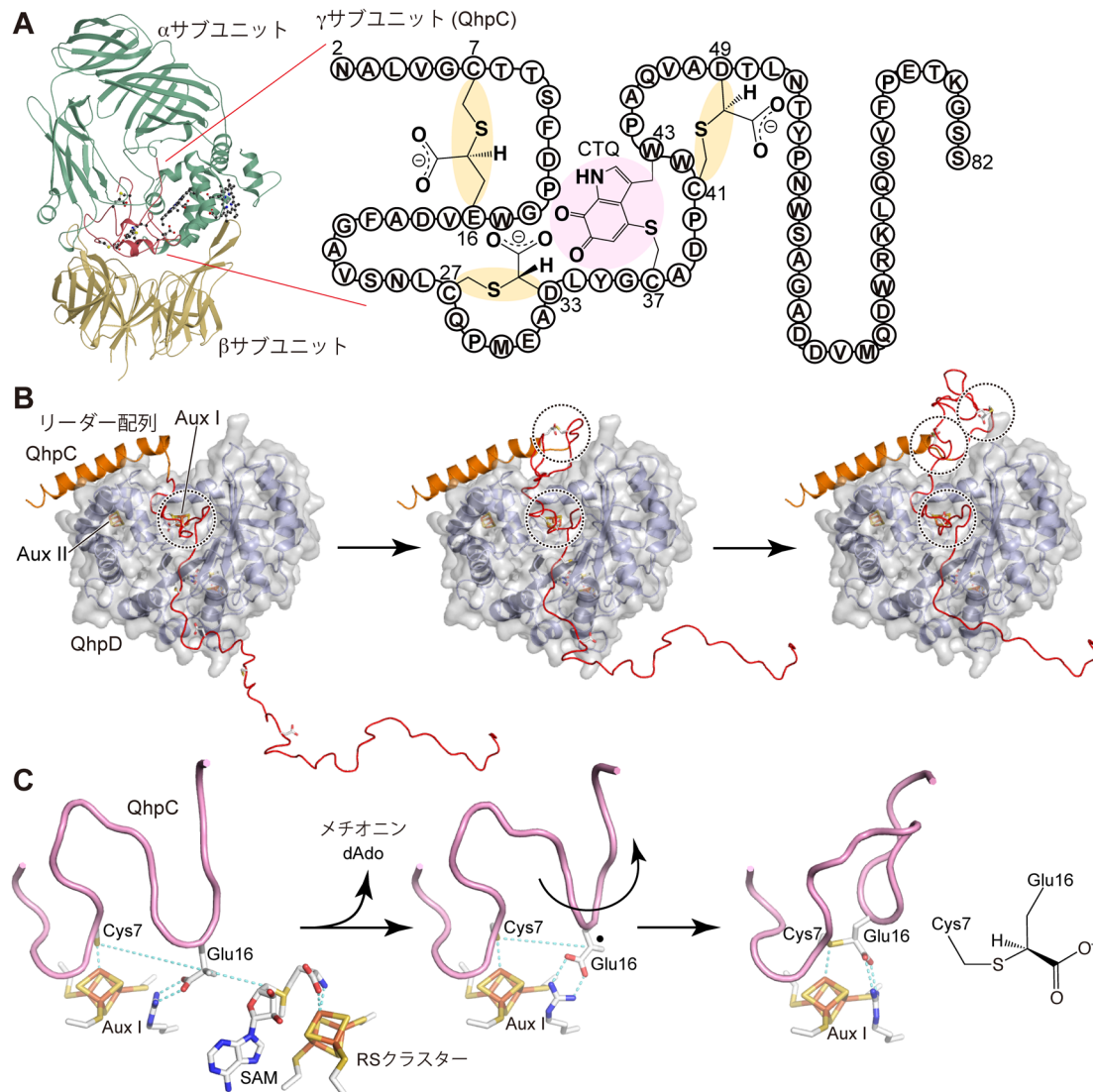


図3 QHNDHの構造とQhpC・QhpD複合体のホモロジーモデル

(A)QHNDHの翻訳後修飾による2種類の特徴的な化学構造. QhpC内の3か所のチオエーテル架橋をオレンジ, 補酵素CTQをピンクの背景で示した. (B)QhpDによるチオエーテル架橋の連続的形成機構. 架橋形成された部位を点線の丸で示した. (C)QhpDの活性部位の構造モデルと推定反応機構. 反応により架橋が形成されるとともにSAMがメチオニンとdAdoに分解される. 一部のラジカルSAM酵素 (LAM, SPLなど) では反応の終わりにSAMがメチオニンとdAdoから再生され補酵素として機能するが, QhpDを含む多くのラジカルSAM酵素ではSAMは基質として消費される³⁾.

述のanSMEの構造に類似した2ドメイン構造をとり, それぞれにRSクラスター, Aux I/IIのクラスターを含有すると推定される. Aux IIの配位子であるCys412の変異体がQhpCとの複合体形成能を失うという実験結果と荷電残基の保存性から, リーダー配列 (二次構造予測により α ヘリックスと推測) がAux II近傍に結合すると推定される. リーダー配列をAux II近傍に配置すると, 1番目の架橋部位が活性部位を通るために都合のよい位置に配置されることがわかる. 活性部位に1番目の架橋部位が結合したようすを図3Cに示す. そこでは, 架橋残基であるCys7はAux Iに配位し, もう一方の架橋残基であるGlu16が, 想定ど

おりに活性中心ポケットの底に存在する保存性Arg残基によって固定される. Glu16の近傍にはSAMが結合部位に存在し, dAdo \cdot が形成されればラジカルによってGlu16のメチレン基水素が引き抜かれ, Glu16を含むループが構造変化し, Cys7との間でチオエーテル架橋を形成する. 架橋を形成した酸性残基のメチレン炭素の立体配置はすべてS型であるが, モデルのように反応が進行すると仮定すれば, 反応の立体特異性をうまく説明できる. 活性部位で架橋反応が起きると, Aux Iに配位していたCysのSH基が外れて活性部位内での親和性が下がり, 架橋形成部位が活性部位の外へ放出される. その動きと連動するように次の架

橋形成部位がスライドし活性部位に入り、3か所の架橋ができるまで反応が繰り返される。このようにして、QhpDに結合したQhpCがN末端からC末端へスライドしながら連続的に架橋を形成していくことが構造モデルにより説明できる。

4. おわりに

本稿ではラジカルSAMスーパーファミリー、中でも特にSPASMサブファミリーに属するQhpDの構造と機能について、筆者らの研究を中心に述べてきた。今後の課題としては、有機ラジカル形成の制御機構を明らかにする必要がある。生体にとって有害な有機ラジカルをいかに封じ込め、副反応を押さえながら反応の駆動開始にのみ用いているのかを本質的に理解することが、ラジカルSAM酵素の反応機構を解明する上で重要な研究目標である。一方、ラジカルSAM酵素は多種多様な難化学反応を触媒するため、その機能を応用すれば穏やかな条件で通常では難しい反応を引き起こすことができると考えられる。QhpDでは、反応によりQhpC内に複数の環状構造が導入されるが、QhpD結合領域を融合した任意のペプチドを基質に用いることでその内部に環状構造を導入できる可能性がある。ペプチドは環状化により安定性が向上するだけでなく、構造の固定化によりさまざまな生理機能（抗菌作用、酵素阻害作用、標的分子への特異的結合能）が付与されることが知られている。そのため、QhpDは新規の機能性環状ペプチドを創出するための有用なツールになる可能性がある。現在までに生化学的な機能解析まで行われたラジカルSAM酵素は十数個程度にすぎず、有用な難化学反応を触媒する酵素がまだまだ多く存在すると推測される。今後、他のラジカルSAM酵素についてもその構造と機能の詳細が調べられ、難化学反応を触媒する生体触媒として、その利用が

進展することを期待したい。

文 献

- 1) Chirpich, T.P., Zappia, V., Costilow, R.N., & Barker, H.A. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 1778–1789.
- 2) Sofia, H.J., Chen, G., Hetzler, B.G., Reyes-Spindola, J.F., & Miller, N.E. (2001) *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1097–1106.
- 3) Broderick, J.B., Duffus, B.R., Duschene, K.S., & Shepard, E.M. (2014) *Chem. Rev.*, **114**, 4229–4317.
- 4) Landgraf, B.J., McCarthy, E.L., & Booker, S.J. (2016) *Annu. Rev. Biochem.*, **85**, 485–514.
- 5) Haft, D.H. (2011) *BMC Genomics*, **12**, 21.
- 6) Grell, T.A.J., Goldman, P.J., & Drennan, C.L. (2015) *J. Biol. Chem.*, **290**, 3964–3971.
- 7) Nakai, T., Ito, H., Kobayashi, K., Takahashi, Y., Hori, H., Tsubaki, M., Tanizawa, K., & Okajima, T. (2015) *J. Biol. Chem.*, **290**, 11144–11166.
- 8) Goldman, P.J., Grove, T.L., Sites, L.A., McLaughlin, M.I., Booker, S.J., & Drennan, C.L. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 8519–8524.
- 9) Saichana, N., Tanizawa, K., Pechoušek, J., Novák, P., Yakushi, T., Toyama, H., & Frébortová, J. (2015) *J. Biochem.*, **159**, 87–99.
- 10) 岡島俊英, 中井忠志, 谷澤克行 (2011) 生化学, **83**, 691–703.
- 11) Datta, S., Mori, Y., Takagi, K., Kawaguchi, K., Chen, Z.W., Okajima, T., Kuroda, S., Ikeda, T., Kano, K., Tanizawa, K., & Mathews, F.S. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 14268–14273.
- 12) Satoh, A., Kim, J.-K., Miyahara, I., Devreese, B., Vandenberghe, I., Hacısalihoglu, A., Okajima, T., Kuroda, S., Adachi, O., Duine, J.A., Van Beeumen, J., Tanizawa, K., & Hirotsu, K. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 2830–2834.
- 13) Nakai, T., Deguchi, T., Frébort, I., Tanizawa, K., & Okajima, T. (2014) *Biochemistry*, **53**, 895–907.
- 14) Ono, K., Okajima, T., Tani, M., Kuroda, S., Sun, D., Davidson, V.L., & Tanizawa, K. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 13672–13684.
- 15) Nakai, T., Ono, K., Kuroda, S., Tanizawa, K., & Okajima, T. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 6530–6538.

著者寸描

●中井 忠志 (なかい ただし)



大阪大学産業科学研究所助教。博士（理学）。

■略歴 2000年大阪市立大学大学院理学研究科化学専攻博士課程修了。同年理化学研究所基礎科学特別研究員。03年日本学術振興会特別研究員。05年理化学研究所研究員。07年日本学術振興会海外特別研究員を経て09年より現職。

■研究テーマと抱負 複数の酵素により構成される生体システムの生化学・構造生物学的研究。生物がもつ巧妙な「しかけ」を発見し、その仕組みを分子や原子のレベルで理解するとともに有用な機能性物質の創出につなげたい。

■ウェブサイト <http://researchmap.jp/nakaix/>

■趣味 旅行、サイクリング。

●岡島 俊英 (おかじま としひで)

大阪大学産業科学研究所准教授。博士（理学）。

■略歴 1992年大阪大学大学院理学研究科生物化学専攻博士後期課程修了。同年近畿大学農学部助手。95年講師。2000年大阪大学産業科学研究所助手。02年助教授を経て07年より准教授。現在に至る。

■研究テーマと抱負 アミノ酸残基に由来するビルトイン型キノン補酵素の形成機構。鉄硫黄クラスターや銅などの金属含有酵素の触媒機構。反応中間体の結晶構造解析に基づいて、何が活性中心で起きているのか原子レベルで解明したい。

■ウェブサイト <http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/smb/>

■趣味 旅行。