

**【目的】** NAD は生体内での補酵素として広く用いられている。それ以外に、NAD は寿命延伸に関わる Sirtuin や、ゲノム修復に関わる poly ADP-ribose polymerase など重要な生理作用に関わるタンパク質の基質となるなど、多様な生理学的機能を担うことが知られている。筆者は、抗腫瘍アザインダン天然物 *altemicidin* 合成中、NAD が生合成反応の基質となる現象を初めて報告し、その新たな役割を示した (図 a)。本合成系は NAD のニコチンアミド部が PLP 酵素 (SbzP) によって求核攻撃を受け C3、C2 単位間に二回の C-C 結合形成を経て、修飾される。このニコチンアミド部はさらに修飾を受け、リン酸結合が加水分解されることによって、NMN 様構造が形成され、さらに多段階修飾されることで、最終産物が生成される。生体内や化学修飾において、C-C 結合形成による NAD アナログの合成例は存在せず、本合成系は既存の分子とは全く異なる骨格の構造を作り出すことが可能である。そこで、SbzP の構造解析を行い、それを基盤に非天然型基質と組み合わせることで、特異的なニコチンアミド修飾型の NAD 化合物生合成を合成し、生体機構を制御する特異的な生理活性化合物を創出することを目的とした。

**【方法】** SbzP の安定ホモログ PseP を用いて、クライオ電子顕微鏡解析を行った。クライオ電子顕微鏡構造より、SbzP の基質酵素複合体構造を取得し、NAD の結合部位を同定した。そこに変異導入し、反応生成物の同定、SPR 解析、サーマルシフトアッセイを行い、その NAD 結合活性を評価した。SAM を酵素構造にドッキングし、結合部位に変異を加え、SAM から合成される MTA の検出、ストップフロー解析を行うことによって、SAM の結合能を評価した。

**【結果】** SbzP ホモログ PseP の基質認識機構解明のため、クライオ電子顕微鏡解析を進め、NAD 結合構造を 2.6Å の分解能で取得した (図 b)。その結果、NAD のアデニンが monomer B の F457、R466 によって、二リン酸が R466 によって、ニコチンアミドリボシドが monomer A の Y413、Y418 と monomer B の D462 と Loop 6 によって保持されることを明らかにした (図 c)。また、それぞれのアミノ酸残基に変異導入を行ったところ、F413A、Y418A、F457A、R466A、Y699A のいずれも 80% 以上のアザインダンジヌクレオチド生成の減少が見られ、それぞれの基質保持における重要性が示された。その一方で、アデニン、リン酸の保持に関わるアミノ酸変異体 F457A、R466A、Y699A は SAM の  $\gamma$ -脱離によって生成する methylthioadenosine (MTA) の生産量が大きく減少した (>64%)。その一方、F413A、Y418A では 105%、67% とそれぞれ活性上昇、中程度の減少に止まった。このデータより、それぞれ SAM 認識における異なる役割が示唆された。

NAD、SAM を受け入れ新規骨格を合成する生合成酵素のクライオ電子顕微鏡解析

