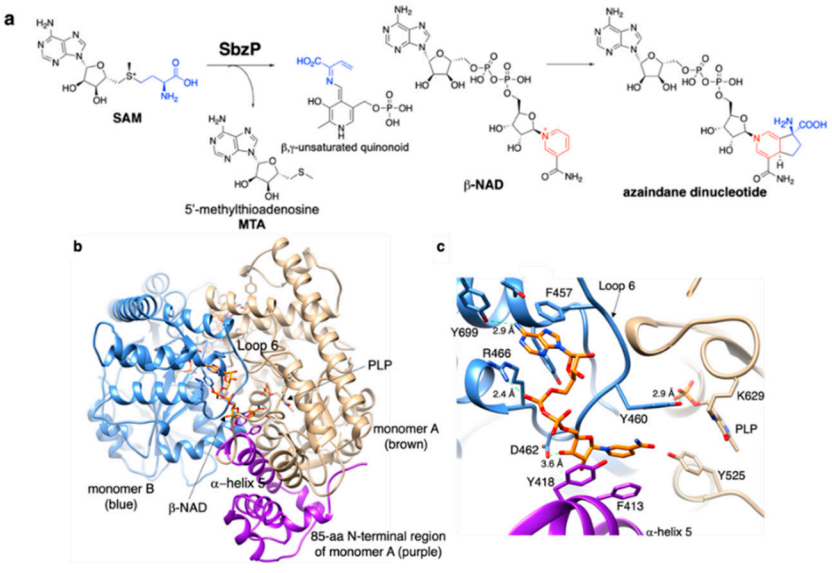
1　新規NAD由来生合成機構の応用による医薬品物質生産	淡川　孝義

【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 生合成中、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）。本生合成系は 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、本生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、ストップト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γ-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



1. 新規 NAD 由来生合成機構の応用による医薬品物質生産

淡川　孝義

理化学研究所 環境資源科学研究センター ケミカルバイオロジー・生合成研究チーム

Key words：補酵素，β-NAD，SAM，酵素，構造解析

緒　言

NAD は生体内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 PARP など重要な生理作用に関わるタンパク質の基質として、あるいは RNA キャップ構造の修飾反応の基質となるなど、多様な生理学的機能を担うことが知られている［1，2］。筆者は、抗腫瘍アザインダン天然物 altemicidin 生合成中、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［3，4］。本生合成系は 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（図 1a）。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、Sirtuin の機能を活性化する 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。生体内における NAD、NMN のニコチンアミド部の修飾反応は前例がない。化学修飾の例は存在するが、C-C 結合形成によるアナログの合成例は存在せず、本生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 酵素のクライオ電子顕微鏡、X 線結晶構造解析により精密機能解析を行い、その機能改変を行うことで、さらに生成物の骨格多様性を拡大し、酵素・化学法により新規活性化合物を取得することを目指した。

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、ストップトフロー解析を行うことによって、SAM の結合能を評価した。また、速度論解析から得られた反応機構を提示し、その矛盾を、東京大学大学院農学生命科学研究科の寺田透教授との共同研究にて、ドッキングシミュレーション、MD シミュレーションによって説明した。カリフォルニア大学 Dean Tantillo 教授との共同研究にて、反応機構の QM 計算を行い、その反応性を精査した。

結果および考察

SbzP は、β-NAD のニコチンアミドを高度に修飾するユニークな酵素であり、その基質認識、触媒機構に興味が持たれたため、その立体構造解析、生物物理学的解析、計算化学解析を行った。条件検討の後、SbzP と同等の反応を触媒するホモログ酵素 PsePQ に注目して、構造解析を行った。SbzP ホモログの中では、PsePQ は比較的安定ではあるが、高濃度まで濃縮することができず、結晶化による構造解析は困難であった。そのため、クライオ電子顕微鏡解析により構造解析を検討したところ、β-NAD 存在下解像度 2.6Åでその立体構造を取得することに成功した（図 1b）。その一方、SAM とそのアナログである SAH、vinylglycine をリガンドとした際には、粒子の均一性が上がらず、2D classification が進行せず、構造解析は不可能であった。また、aminovinylglycine、

sinefungin を基質とした際には、アポ体構造のみが得られ、複合体構造は得られなかった。また、特筆すべき点としては、C 末の PseP（PLP 結合ドメイン）の構造のみが得られ、N 末の PseQ（α-ketoglutarate 依存性酸化酵素）の構造は得られなかった点である。タンパク質の安定性を調べるために、SEC-MALLS 解析を行い、クライオ電子顕微鏡解析に用いたタンパク質は欠損なく、全長のホモダイマー構造を保っていることを明らかにした。N 末の PseQ ドメインを含めた PsePQ 全長の Alphafold2 構造を解析すると、クライオ PseP 構造とよく重なり、解析データの 2D classification で観測された一部の minor 構造コンフォメーションと一致する構造が得られることが判明した。これらのデータより、PseQ 部位は固定されておらず、様々なコンフォメーションを取るために、データ解析の後、一定の構造として現れないことが示唆された。

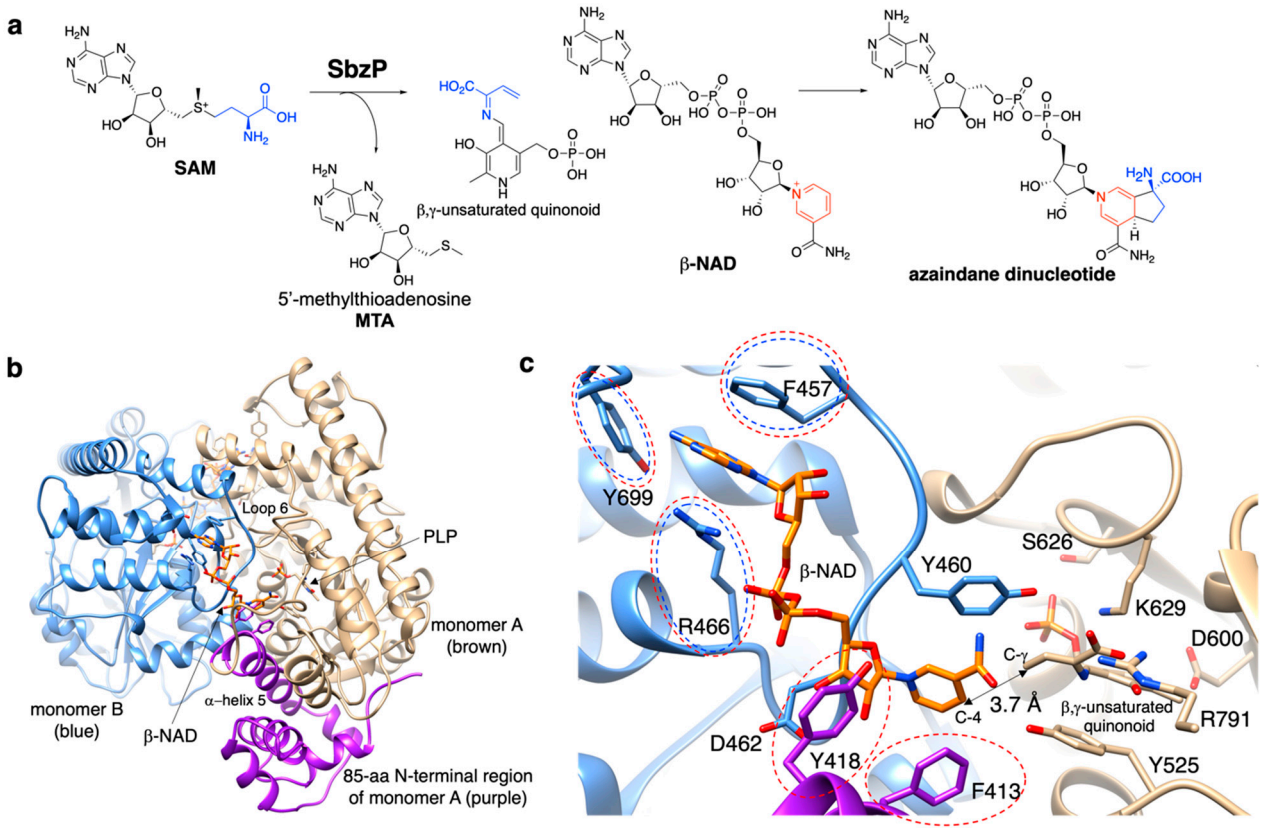


図 1. NAD、SAM を受け入れ新規骨格を合成する生合成酵素のクライオ電子顕微鏡解析

a） SbzP が触媒する β-NAD、SAM 縮合反応。

b） SbzP ホモログ酵素 PseP のクライオ電子顕微鏡構造。

c） PseP の β-NAD、β,γ-unsaturated quinonoid の MD シミュレーションのスナップショット（β-NAD 結合に重要な残基を赤で、SAM 結合に重要な残基を青で示した）。

基質結合部位の精査の結果、PseP ホモダイマーのモノマー間に、β-NAD が保持され、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 1c）。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 γ 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。また、1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid 合成酵素において、SAM のγ-脱離反応に関わる Y152 に相当する Y525 に変異を加えると、アザインダンジヌクレオチド、MTA の双方の合成活性が消失することが明らかとなり、Y525 のγ脱離への関与が示唆された。これらの変異体の NAD 結合能を Biacore で評価すると、野生型はβ-NAD と K_d＝127.7±30.8μM、変異型酵素は K_d＞900μM となり、野生型では SAM 非存在下で結合可能であること、変異型酵素全てで結合能が下がることが示唆された。また、thermal shift assay においても、野生型酵素についてのみβ-NAD が酵素に結合可能であることが示された。SAM の結合を評価するために stopped flow 解析を行い野生型酵素、Y413A、Y418A については SAM と酵素混合後 520 nm の吸収が 5 秒間増加し、その後減衰が見られたことから、SAM が受け入れられ、β,γ-unsaturated quinonoid が生成したことが示唆された。その一方、F457A、R466A、Y699A では 520 nm の吸収は検出されず、これらが SAM 結合に関与していることが示唆された。

500μM、800μM、1,000μM でのβ-NAD 濃度、400μM、700μM、1,000μM での SAM 濃度で固定した場合、それぞれ SAM、β-NAD の消費速度を Lineweaver–Burk plot にて計測したところ、プロット直線は y 軸平行に移動し、これより、PseP は Ping-Pong Bi-Bi mechanism にて反応が進行することをこれまで示していた［3］。その一方で、クライオ電子顕微鏡解析では、SAM の非存在下でβ-NAD が酵素に結合しており、この構造が触媒反応中の酵素構造かそれともアーティファクトなのか、議論の余地があった。そのため、東京大学大学院農学生命科学研究科寺田透先生との共同研究により、β,γ-unsaturated quinonoid の構造モデルを PseP/β-NAD クライオ電子顕微鏡構造にドッキングし、β-NAD C-4 位とβ,γ-unsaturated quinonoid の C-γ位の距離の MD シミュレーションを行った。その結果、計算時間中 62%で 5.0Å以下の距離となり、クライオ電子顕微鏡構造は実際の反応中の酵素構造を反映している可能性が高いことが示された（図 1c）。

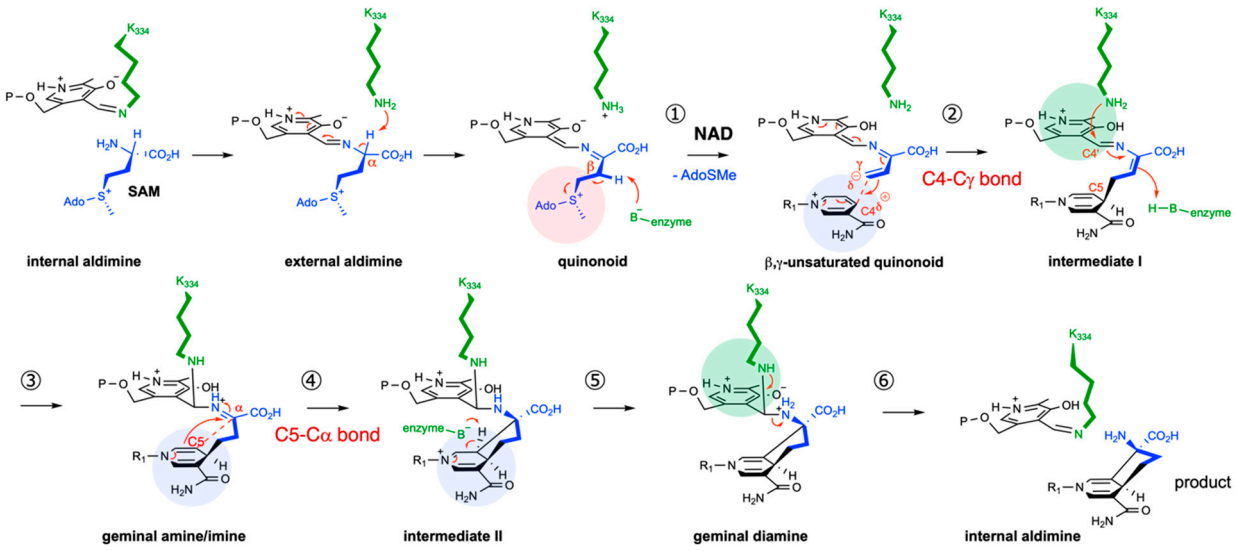


図 2. SbzP/PseP の推定反応機構

① SAM-PLP 複合体からのγ-脱離によるβ,γ-unsaturated quinonoid の形成。
② NAD C4 位と quinonoid 中間体γ位間の 1 回目の C-C 結合形成。
③ 活性中心リジンの攻撃によるイミン／エナミン異性化反応。
④ C5 位からα炭素への攻撃による 2 回目の C-C 結合形成。
⑤ 脱プロトンによる 1,4-ジヒドロピリジン形成。
⑥ 生成物の PLP からの放出。

SbzP/PseP の反応機構については、以上のように段階的反応機構を提唱した（図 2)。これ以外に、ペリ環状反応が進行する機構の可能性も存在する。そこで、カリフォルニア大学 Dean Tantillo 教授との共同研究にて、反応機構の QM 計算を行い、その反応性を精査した。その結果、それぞれの反応遷移状態間のエネルギー障壁は低く、酵素のアシストなしに、①以降から⑥までの反応が進行することが示唆された。以上より、SbzP は SAM のγ-脱離以降のアザインダンジヌクレオチド形成反応は自発的に進行すると考えられる。その一方、β-NAD とβ,γ-unsaturated quinonoid はペリ環状反応での遷移状態構造は計算では導かれず、この機構での反応は可能性が低いことが示された［5]。

NAD と SAM を受け入れる生合成酵素 SbzP の発見は新たな補酵素天然物ファミリーの発見につながる生合成研究として新規性の高い発見であった。それだけでなく、本発見は SAM を受け入れる PLP 酵素の反応多様性を拡充し、その構造解析により、SAM を受け入れるタンパク質の構造基盤についての知見を拡大した。SAM 結合に加えて、本酵素の NAD 結合部位は Pfam などでは検出されない、新規性の高い領域であり、今後、新たな結合モチーフを指標に新規 NAD 生合成酵素の発見、エンジニアリングによる新規 NAD 化合物の創出が見込まれる。実際に、我々はヒトの微量補酵素である NGD（nicotine guanine dinucleotide)、NHD（nicotine hypoxanthine dinucleotide）を基質としたアザインダンジヌクレオチドの生産に成功しており、その基盤を築きつつある（unpublished data)。また、糸状菌の二次代謝経路中では、Enzyme similarity tool（EFI）を用いて、糸状菌ゲノムより SAM を受け入れる PLP 酵素が見出された例が存在し［6]、近年のゲノムマイニング技術の高度化によるさらなる特異な補酵素代謝酵素発掘の可能性が示されている。今後、NAD、SAM をはじめとする、さらなる新規補酵素代謝酵素発掘、機能解明が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教室の阿部郁朗教授、森貴裕准教授、東京大学大学院農学生命科学研究科生物情報工学研究室の寺田透教授、カリフォルニア大学化学科の Dean Tantillo 教授をはじめとした研究員、学生の皆様である。この場をお借りして、厚く御礼申し上げます。

文　献

1） Depaix, A., Kowalska, J. NAD analogs in aid of chemical biology and medicinal chemistry. ***Molecules*** 24, 4187-4221 (2019). doi: 10.3390/molecules24224187.

2） Obata, F., Miura, M. Enhancing S-adenosyl-methionine catabolism extends Drosophilalifespan. ***Nat Commun*** 6, 8332 (2015). doi: 10.1038/ncomms9332.

3） Barra L, Awakawa T, Shirai K, Hu Z, Bashiri G, Abe I. ß-NAD as a building block in natural product biosynthesis. ***Nature*** 600, 754-758 (2021). doi: 10.1038/s41586-021-04214-7.

4） Hu, Z., Awakawa, T., Ma, Z., Abe, I. Aminoacyl sulfonamide assembly in SB-203208 biosynthesis. ***Nat. Commun.*** 10, 184 (2019). doi: 10.1038/s41467-018-08093-x.

5） Awakawa, T., Mori, T., Barra, L., Ahmed, Y., Ushimaru, R., Gao, Y., Adachi, N., Senda, T., Terada, T., Tantillo, D. J., Abe., I. The structural basis of pyridoxal 5'-phosphate dependent β-NAD alkylating enzymes. ***Nat. Catalysis*** (2024) (in press)

6） Abad AND, Seshadri K, Ohashi M, Delgadillo DA, de Moraes LS, Nagasawa KK, Liu M, Johnson S, Nelson HM, Tang Y.　Discovery and Characterization of Pyridoxal 5'-Phosphate-Dependent Cycloleucine Synthases. ***J. Am. Chem. Soc.*** 146, 14672-14684 (2024) doi: 10.1021/jacs.4c02142.