# 補酵素 NAD を基質とする新規生合成酵素の機能解明と応用

# Functional elucidation and application of a novel biosynthetic enzyme using coenzyme NAD as a substrate

(日本薬学会推薦)

代表研究者 理化学研究所 淡川 孝義 Riken Takayoshi Awakawa

NAD is widely used as a coenzyme in vivo. In addition, NAD is known to play a variety of physiological functions, such as being a substrate for proteins involved in important physiological functions, such as Sirtuin, which is involved in life span extension, and poly ADP-ribose polymerase PARP, which is involved in genome repair, or a substrate for modification reactions of RNA cap structures. The author first reported the phenomenon in which NAD serves as a substrate for biosynthetic reactions during biosynthesis of the antitumor asaindan natural product altemicidin, demonstrating its novel role. In this biosynthetic system, the nicotinamide moiety of NAD undergoes nucleophilic attack by the PLP enzyme (SbzP) and is modified through two C-C bond formations between C3 and C2 units. The nicotinamide moiety undergoes further modification and hydrolysis of the phosphate bond to form an NMN-like structure that activates the function of Sirtuin, which is further modified in multiple steps to produce the final product. The modification reaction of the nicotinamide moiety of NAD and NMN in vivo is unprecedented. Although there are examples of chemical modification, there are no examples of synthesis of analogs by C-C bond formation, and this biosynthetic system can create a completely different skeletal structure from existing molecules. Therefore, we performed precise functional analysis of the SbzP enzyme by cryo-EM and X-ray crystallography, and further expanded the skeletal diversity of the product by modifying its function, aiming to obtain new active compounds by enzymatic and chemical methods.

#### 研究目的

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 (Molecules 24, 4187, 2019, Nat. Commun. 6, Article number 8332. 2015)。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(Nature 2021)。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、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。

# 研究経過

SbzP の安定ホモログ PseP を用いて、クライオ電

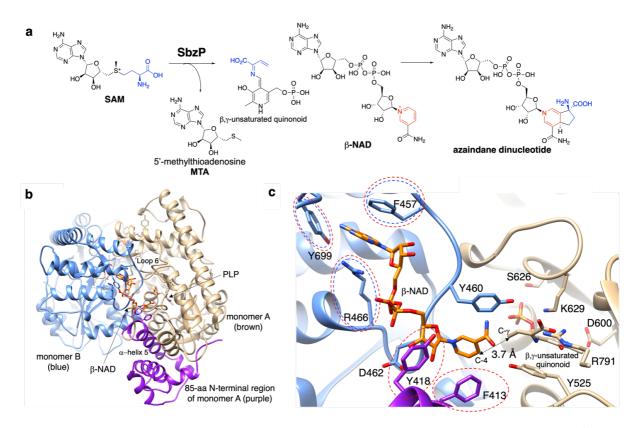


図 1 a SbzP が触媒する b-NAD、SAM 縮合反応、b SbzP ホモログ酵素 PseP のクライオ電子顕微鏡構造、c PseP のβ-NAD、β,γ-unsaturated quinonoid の MD シミュレーションのスナップショット(β-NAD 結合に重要な残基を赤で、SAM 結合に重要な残基を青で示した)

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。 SbzP は、b-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所、β-NAD 存在下解像度 2.6 Åでその立体構造を取得することに成功した(図1 b)。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 PsePO 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。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 Ø Y413、Y418 ≥ monomer B Ø D462 ≥ 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 所、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y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 $\beta$ -NAD と  $K_d$  = 127.7 ± 30.8 mM、変異型 酵素は $K_d > 900 \,\mathrm{mM}$  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。

500 mM、800 mM、1000 mM での $\beta$ -NAD 濃度、400 mM、700 mM、1000 mM での SAM 濃度で固定した場合、それぞれ SAM、 $\beta$ -NAD の消費速度を Lineweaver–Burk plot にて計測した所、プロット直線

#### 考察

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 $\gamma$ -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、 $\beta$ -NAD と $\beta$ , $\gamma$ -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 $^4$ 。

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

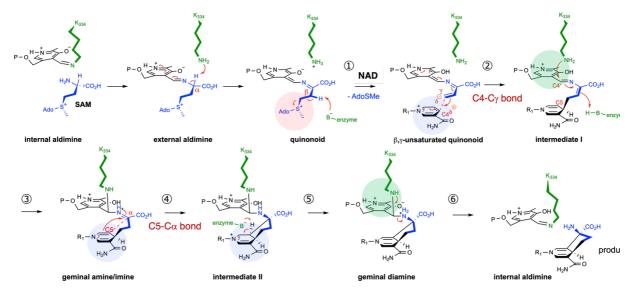


図2 SbzP/PsePの推定反応機構

①SAM-PLP 複合体からの $\gamma$ -脱離による $\beta$ , $\gamma$ -unsaturated quinonoid の形成、②NAD C4 位と quinonoid 中間体  $\gamma$  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、④C5 位 から $\alpha$ 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

(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ず、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。

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。

# 研究の発表

# 口頭発表

 Takayoshi Awakawa, Takahiro Mori, Lena Barra, Kohei Shirai, Ikuro Abe "Structure functional analysis of PLP enzyme catalyzing (3+2)-annulation reaction between β-NAD and SAM" 4<sup>th</sup> International

- Conference on Natural Product Discovery and Development, San Diego USA 2023/01/09
- 2. 淡川孝義「酵素機能発掘と合成生物学による次世代型物質生産系の構築」予知生合成科学第一回公開シンポジウム、東京 2023/01/28
- 3. 淡川孝義「補酵素 NAD を基質とする天然医薬品 化合物生合成機構の解明」日本農芸化学会シン ポジウム、オンライン、2023/03/15
- 4. 淡川孝義 「補酵素 NAD 由来天然物生合成経路の利用による新規活性分子の創出」薬学会若手東北部会、仙台、2023/09/02
- 5. 淡川孝義「補酵素 NAD を基質とする天然医薬品 化合物生合成機構の解明」第 69 回日本生薬学会 年会、仙台、2023/09/09
- Takayoshi Awakawa "β-NAD as a building block in natural product biosynthesis" ASOMPS, Indonesia, 2023/10/06
- 7. 淡川孝義「補酵素 NAD を基質とする天然医薬品 化合物生合成機構の解明」天然薬物の開発と応 用シンポジウム、広島、2023/10/15

# 誌上発表

Barra L, Awakawa T, Shirai K, Hu Z, Bashiri G, Abe I. β-NAD as a building block in natural product biosynthesis. *Nature*. 2021 Dec;600(7890):754-758.

- doi: 10.1038/s41586-021-04214-7. Epub 2021 Dec 8. PMID: 34880494.
- Barra L, Awakawa T, Abe I. Noncanonical Functions of Enzyme Cofactors as Building Blocks in Natural Product Biosynthesis. JACS Au. 2022 Aug
- 17;2(9):1950-1963. doi: 10.1021/jacsau.2c00391. PMID: 36186570
- 3. Awakawa, T. et al. 2024, Nat. Catalysis in revision.