

学 位 論 文 題 名

Structural study on a methyltransferase that
participates in the biosynthetic pathway of
2-Methylisoborneol (2-MIB) in *Streptomyces lasaliensis*

(*Streptomyces lasaliensis* における 2-Methylisoborneol (2-MIB) の
生合成に関わるメチルトランスフェラーゼの構造研究)

学位論文内容の要旨

2-methylisoborneol (2-MIB) is a special terpenoid that differs from other GPP (geranyl diphosphate)-derived monoterpenes in biosynthetic pathway. All cyclic monoterpenes are found to undergo ring forming reaction catalyzed by single enzyme before being subjected to other modifications, whereas 2-MIB needs an extra methylation step before the common cyclization reaction. This unique reaction is catalyzed by a methyltransferase enzyme named GPP-methyltransferase (GPPMT) with the universal methyl donor, S-adenosyl methionine (SAM). GPPMT is a SAM-dependent methyltransferase (SAM-MTase) of which substrate is a prenyl diphosphate intermediate in the branch chain of terpenoid biosynthetic pathway. No other enzymes except the prenyltransferases, including terpene synthases, have been reported to be able to catalyze these prenyl diphosphate substrates. GPPMT is the first enzymes that has been reported to possess this special characteristic, and might be the representative of various uncharacterized proteins encoded by genes found in the genome of actinomycetes bacteria.

The aim of this study is to analyze the structure and catalytic mechanism of GPPMT. Recombinant GPPMT from the genome of *Streptomyces lasaliensis* was overproduced, purified, and crystallized with and without cofactor, cofactor analog and substrate. Three crystal forms of GPPMT were obtained from the experiment: the apo form, the binary complex form with the cofactor SAM, and the tertiary complex form with the substrate GPP and SAM analog sinefungin (SFG).

The overall structure of GPPMT consists of the core domain that resembles the highly conserved structural core fold of class I SAM-MTases with additional helices in several regions. Despite being the modification found commonly in most small-molecule SAM-MTases, the

additional N-terminal helices as well as the following long loop are found to contain several important residues essential for the function of the enzyme. GPPMT recognizes its substrate by forming extensive hydrogen bond between the residues in this N-terminal region and the functional group of GPP, the diphosphate moiety. Although these residues do not directly participate in the methylation mechanism, they are indispensable for the catalytic activity of the enzyme since mutation of the residues results in loss of substrate conversion ability as confirmed by GC-MS. The diphosphate-recognizing residues of GPPMT mentioned above are not conserved among SAM-MTases or the prenyltransferases, which use specific motif to recognize the substrate diphosphate groups. The results suggest a novel mode of a prenyl diphosphate substrate recognition that is limited to GPPMT.

The mechanism of enzyme catalysis was postulated. Upon GPP binding, the side chain of the histidine residue located in the active site is moved away in order to facilitate the optimum orientation of SAM and GPP that favors methylation, while the diphosphate group of GPP is stabilized by the residues from the N-terminal region. Methylation is characterized by the S_N2 nucleophilic attack of GPP C2 atom to the methyl group of SAM. Based on the structure and the enzymatic activity results, two residues: Tyr59 and Glu181, are postulated to be responsible for activation of C2 atom to a reactive nucleophile. Glu181 is conserved among C-methylation SAM-MTases, suggesting the major role of this residue to serve as the general base in C-methylation catalysis of SAM-MTases.

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	田 中	勲
副 査	教 授	門 出	健 次
副 査	准教授	姚	関
副 査	准教授	尾 瀬	農 之

学 位 論 文 題 名

Structural study on a methyltransferase that participates in the biosynthetic pathway of 2-Methylisoborneol (2-MIB) in *Streptomyces lasaliensis*

(*Streptomyces lasaliensis* における 2-Methylisoborneol (2-MIB) の
生合成に関わるメチルトランスフェラーゼの構造研究)

2-methylisoborneol(2-MIB)は、geranyl diphosphate (GPP)や farnesyl diphosphate (FPP)から誘導される他のモノテルペンと異なる生合成経路を持つ特殊なテルペノイドである。すべての環状モノテルペンは、他の修飾が行われる前に、環化反応を受けることが知られているが、2-MIB は閉環反応の前にメチル化される。このユニークな反応は、普遍的なメチル基供与体である S-アデノシルメチオニン(SAM)を使って、GPP-メチルトランスフェラーゼ(GPPMT)によって触媒される。GPPMT の基質は prenyl diphosphate であるが、prenyl diphosphate を基質としたメチル化反応を触媒する酵素はこれまで報告されていない。GPPMT は、この特別な性質を持つことが報告されたはじめての酵素であり、この酵素で得られた知見を基にして、放射菌バクテリアをはじめとしたゲノムの中に次々と prenyl diphosphate メチル化酵素が発見されることが期待される。

本研究の目的は、GPPMT の構造と触媒機構を解明することである。 *Streptomyces lasaliensis* のゲノムにコードされた GPPMT から、組換え GPPMT を大量発現し、精製、結晶化を行った。実験から GPPMT の 3 つの結晶形を得た。Apo 体、補助因子 SAM と酵素との二元複合体、および基質である GPP と SAM アナログの sinefungin (SFG) と酵素の三元複合体である。

GPPMT の全体的な構造は、クラス I SAM-MTases において非常によく保存されたコアフォールドに類似したコアドメインと、その周りのアルファらせん領域からなる。たいていの小分子 SAM-MTases で一般的に見られるような構造修飾の他に、N末端らせんとそれに続く長いループの部分を持ち、この部分に酵素活性に重要な残基があると推定された。GPPMT は、この N 末端の領域の残基と GPP の官能基との間で水素結合を形成することによって基質を認識している。これらの残基は、直接メチル化には関与しないが、残基を変異すると酵素活性が消失することが GC-MS によって確認され、酵素の触媒作用にとって不可欠であることが示された。前述したように、GPPMT のピロリン酸塩を認識する残基は、SAM-MTases や prenyltransferases では、保存されていない。prenyltransferases は、基質である prenyl diphosphate を認識するのに特定のモチーフを使用している。構造解析の結果、GPPMT は prenyl diphosphate 基質認識のための新様式を持つことが示された。

構造に基づいて酵素触媒反応のメカニズムを考察した。GPP が結合すると、活性部位に位置するヒスチジン残基の側鎖は、SAM と GPP の最適なオリエンテーションを容易にするように、またメチル化ができるように動く。この際、GPP の prenyl diphosphate は、N 末端領域の残基によって安定化される。メチル化は GPP の C2 原子が、SAM のメチル基へ S_N2 求核攻撃を行うことで進む。構造解析と酵素活性測定の結果、2 つの残基 Tyr59 と Glu181 が、メチル化後の C2 原子よりプロトンを受け取る残基として推定された。その内、Glu181 は炭素原子をメチル化する SAM-MTases としては、**methoxymycolic acid** 合成酵素に保存されている。また cyclopropane mycolic acid 合成酵素では、溶液中の重炭酸が塩基の働きをしていることが報告されており、この重炭酸の位置と GPPMT の Glu181 の位置は同じであった。ゆえに、この残基が、SAM-MTases による炭素原子メチル化触媒作用に対して一般塩基として働くことを示唆している。

以上、本研究では、X 線結晶構造解析により、2-methylisoborneol(2-MIB)の合成に関与する新しいメチル基転移酵素の構造を決定し、その反応機構を明らかにした。本研究が生命科学に及ぼす貢献には多大なものがあり、よって審査員一同は、申請者が北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認めた。