



SAM自由基酶研究进展: 新反应与新机制

支宁, 朱宏吉, 乔建军, 董敏*

天津大学化工学院, 系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300072

* 联系人, E-mail: mindong@tju.edu.cn

2021-10-14 收稿, 2021-11-29 修回, 2021-12-14 接受, 2021-12-16 网络版发表

国家自然科学基金(21977079)资助

摘要 S-腺苷-L-蛋氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAM)自由基酶是当今酶学领域的研究热点. 该类酶通过结合的辅因子SAM和[4Fe-4S]簇催化生物体中一系列重要的自由基反应, 自2001年被正式命名以来, 成员不断壮大, 目前已成为最大的酶家族之一. 近年来, SAM自由基酶领域有大量新反应和新催化机制被报道. 本文对近5年部分代表性成果进行酶催化机制的介绍, 内容涉及核糖体肽翻译后修饰、核苷类化合物以及多种小分子生物合成. 通过底物分类, 让读者更容易理解SAM自由基酶催化反应的广泛性与多样性. 同时对该领域新发现的新颖的有机金属催化自由基反应机制进行了介绍, 并对SAM自由基酶领域的未来发展方向进行展望.

关键词 SAM自由基酶, 铁硫簇, 生物合成, 催化机制, 自由基反应

S-腺苷-L-甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionine, Ado-Met或SAM)是一种由腺苷和甲硫氨酸杂合而成的硫化物. SAM是除三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)之外的人体第二大辅助因子, 它的代谢与平衡关乎生命体生长、健康、衰老等各个方面. SAM具有一个硫正结构, 因此它具有3个不稳定的C-S键. SAM最为人熟知的功能是作为SAM依赖型甲基转移酶(MTase)的甲基供体, 甲基化各类底物, 如DNA、RNA、蛋白质、碳水化合物和小分子代谢物^[1]. 近年来, 人们逐渐发现, 有一系列SAM依赖型的酶可以催化一些生命体中非常重要而从化学角度又很困难的反应, 比如维生素和辅因子的合成, 以及一些有良好活性的天然药物的生物合成. 而这一系列酶都是通过自由基机制催化反应, 因此得名SAM自由基酶.

SAM自由基酶是目前发现最大的蛋白家族之一, 都含有活性必需的SAM和[4Fe-4S]. SAM自由基酶一般都具有3个半胱氨酸组成的保守结构域CxxxCxxC

(其中x表示任何氨基酸残基), 用来结合[4Fe-4S]簇中的3个铁原子. 第4个铁原子结合SAM的甲硫氨酸结构中氨基和羧基部分^[2]. 这样的结合方式使还原状态的[4Fe-4S]¹⁺更容易传递电子给SAM, 使SAM的C_{5'}-脱氧腺苷-S键断裂, 产生5'-脱氧腺苷自由基(5'-dA·或5'-dAdo·), 从而产生底物自由基, 催化种类丰富的自由基反应^[3], 如环丙烷化^[4]、自由基环化^[5]、硫醚交联^[6]、甲硫醇化^[7,8]反应等. 除此之外, 5'-dA·还可以与底物双键进行加成反应, 最终生成腺苷化的产物^[9]. 而我们的研究发现, 有一类非经典的SAM自由基酶-白喉酰胺生物合成酶, 却可以选择切断SAM的C_{甲硫氨酸}-S键, 形成3-氨基-3-羧基丙基自由基, 进而修饰蛋白质翻译延伸因子EF2的组氨酸残基, 最终在EF2上形成白喉酰胺修饰^[10~12](图1).

由此可见, SAM自由基酶家族已经在酶学领域得到了广泛研究. 同时, 也已有多篇综述文章^[2,3,13~15], 特别是2014年Broderick等人^[16]发表的综述对该领域作了

引用格式: 支宁, 朱宏吉, 乔建军, 等. SAM自由基酶研究进展: 新反应与新机制. 科学通报, 2022, 67: 1806-1820

Zhi N, Zhu H J, Qiao J J, et al. Recent progress in radical SAM enzymes: New reactions and mechanisms (in Chinese). Chin Sci Bull, 2022, 67: 1806-1820, doi: 10.1360/TB-2021-1067

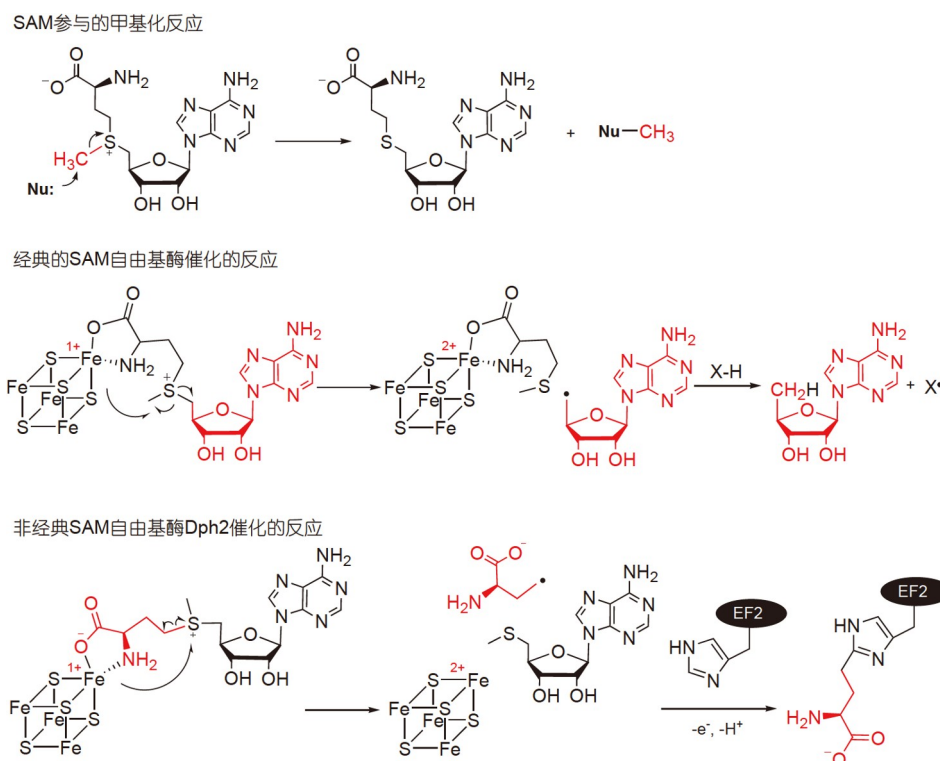


图1 (网络版彩色)SAM的三类C-S键断裂反应

Figure 1 (Color online) Three categories of C-S bond cleavage reactions of SAM

详尽的介绍,实为初入该领域研究者的必读文献.近年来,国内外研究者在SAM自由基酶领域从新酶发现到机制解析又有许多出色的成果.表1为自2015年后新发现和表征的SAM自由基酶及其催化反应类型.本文主要按照酶的底物分类,着重介绍酶的催化反应类型和机制.

1 核糖体肽翻译后修饰中涉及的SAM自由基酶

核糖体合成的翻译后修饰肽(Ripps)是近年被不断发现的一类天然产物,它们结构多样,并有着出色的生物活性^[45]. Ripps最初都是一段由结构基因编码、核糖体合成的前体肽,其主要包含N端的前导肽区域和C端的核心肽区域^[6]. 前导肽通常对于进行翻译后修饰的酶识别是必要的,修饰发生后将被蛋白酶水解去除.而核心肽是翻译后修饰发生的位点,经修饰酶或肽酶进行剪切修饰后,最终形成成熟的产物^[17]. 最近发现, SAM自由基酶在Ripps中引入了多种翻译后修饰,其主要通过还原性的 $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{1+}$ 裂解SAM生成5'-dA. 该自由基从底物肽中攫取H原子产生底物自由基,催化多种

后续反应. 目前发现的Ripps翻译后修饰包括C-O和C-C键的生成^[46]、脱羧反应、硫醚键形成^[47]、C-甲基化^[48]等. 对Ripps形成过程中SAM自由基酶的研究扩展了其催化反应的范围,扩大了基于肽的SAM自由基化学库.

1.1 TqqB催化的C-O键形成反应

猪链球菌是一种能够传播给人类的地方性猪病原体,会引起人类的化脓性脑炎等疾病, *tqq*基因簇仅存在于猪链球菌中. TQQ的生物合成中涉及3个基因,前体肽TqqA是SAM自由基酶TqqB的底物,还包含一个蛋白酶/转运蛋白TqqC. Clark等人^[17]发现, TqqB包含两个 $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$,一个是活性位点的功能铁硫簇,另一个是Twitch域用来结合“辅助”铁硫簇(auxiliary cluster). TqqB与底物TqqA的反应检测到了TqqA质量少2道尔顿(Da)的产物. 酶降解底物和产物后的质谱与核磁分析显示, TqqB在TqqA核心C端的TQGTK序列中添加了一个修饰,即Thr30的侧链连接到Gln31的C α 上,如图2所示. 验证TqqB的底物特异性时,发现TqqB对 α 位修饰的氨基酸没有强烈偏好,但对残基Thr30的羟基具有特异

表 1 2015年后发现的SAM自由基酶总结^{a)}

Table 1 Summary of radical SAM enzymes characterized since 2015

底物	SAM自由基酶	催化反应类型
核糖体肽	TqqB ^[17]	Thr和Gln间C–O键形成
	MftC ^[18]	氧化脱羧
	StrB ^[19]	Lys和Trp间C–C键形成
	QhpD ^[20]	Cys和Glu、Asp间C–S键形成
	PoyD ^[21]	差向异构化
	ThzC, ThzD ^[6]	Cys与其他氨基酸间C–S键形成
	QmpB ^[22]	Cys和Asn间C–S键形成
	SuiB ^[23]	Lys和Trp间C–C键形成
	RumMC2 ^[24]	Cys和其他氨基酸间C–S键形成
	YydG ^[25]	差向异构化
核苷	ThnB ^[26]	Cys与其他氨基酸间C–S键形成
	NikJ, PolH ^[27]	自由基加成反应
	OxsB ^[28]	缩环反应
	Viperin (来源于褐家鼠) ^[29]	脱水反应
小分子	RaSEA ^[30]	C–N键裂解
	AprD4 ^[31,32]	脱水反应
	C10P ^[33]	环丙烷化反应
	HpnH ^[34]	自由基与双键的加成反应
	ArsS ^[35]	C–As键形成
	BicD ^[36]	氧化反应
	CysS ^[37]	迭代甲基化, C–C键形成
	ThnK ^[38]	甲基化, C–C键形成
	GrsA, GrsB ^[39]	环戊基化
	Bzar ^[40]	复杂重排
蛋白(甘氨酸 自由基酶)	CutD ^[41,42]	与CutC共同催化C–N键裂解
	IseH ^[43]	与IseG共同催化C–S键裂解
	IADAE ^[44]	与IAD共同催化脱羧反应

a) 加粗的SAM自由基酶为本文所涉及

性. 研究者根据以上实验提出如下可能的机制, 即设想通过Thr30羟基的氧原子与辅助[4Fe-4S]簇的游离铁连接来活化Thr30的羟基, 5'-dA·攫取Gln31的H_α, 在Gln31

的C_α产生反应性很强的碳自由基, 其与活化的Thr-OH反应生成产物.

1.2 MftC催化的脱羧反应

在耻垢分枝杆菌中发现了类似于氧化还原辅助因子吡咯并喹啉醌(PQQ)生物合成中pqq簇的mft簇, 该簇包含3个基因mftA、mftB、mftC^[18]. 在PQQ合成途径中, PqqD和SAM自由基酶PqqE共同催化前体肽PqqA向PQQ的转化^[49]. 为确定该簇的生物功能, SAM自由基酶MftC在还原/不还原的情况下催化底物MftA反应, 但并没有发现除5'-dA之外的新产物.

Bruender和Bandarian^[18]经序列比对发现, MftB与PQQ生物合成的辅助蛋白PqqD有显著的序列相似性. 于是将MftB加入反应体系, 检测到了损失CO₂H₂的产物MftA*. 进行HCD高能裂解后, 确定修饰发生在Tyr30上, 并根据MftA的质量损失, 推测反应类型为氧化脱羧. 为验证该猜想, 使用[¹³C₉, ¹⁵N₁]Tyr合成了MftA肽, 并检测到质量减少47.0083 Da的产物, 与Tyr的C末端CO₂H₂损失和MftA的C末端羧基损失是一致的. 据此, 研究者提出了两种可能的反应机理(图S1). 首先5'-dA·攫取了Tyr的C_β中的H, 形成Tyr的C_β自由基. 之后, 一种可能是, C_β的未配对电子从自由基中间体转移至[4Fe-4S]簇, 并伴随脱羧; 另一种可能是, C_α-COOH键均裂, 形成·COOH, 其被淬灭成甲酸酯或CO₂.

1.3 StrB催化的C–C键形成反应

嗜热链球菌是用于乳制品发酵的非致病性链球菌模型菌株. 研究发现, 该菌包含许多链球菌常见的SHP/Rgg群体感应系统^[50], 短疏水肽SHP与独立的转录调节子Rgg结合后会调节基因表达, str基因簇是其上调的位点之一. 该基因簇由编码短前体肽的strA、SAM自由基酶strB和推定的转运蛋白strC组成. 已有研究表明, 含有30个氨基酸的前体肽StrA最终被修饰为成熟的环状9肽, 且残基K2和W6参与了该环化反应^[51]. Schramma

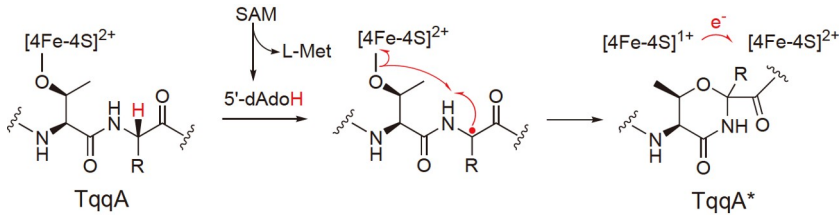


图 2 (网络版彩色)TqqB的催化机制

Figure 2 (Color online) Catalytic mechanism of TqqB

等人^[19]将此结构命名为streptide. 多种核磁数据验证了C-C键连接的Lys-Trp交联环状结构的存在, 而 $\Delta strB$ 突变体中无streptide的产生.

StrB属于SAM自由基酶中的SPASM亚家族^[52], 除经典的SAM活性位点铁硫簇外, 还有一个辅助铁硫簇. Schramma等人^[19]发现, StrB催化StrA的反应产物少了两个质子, 且失去结合辅助铁硫簇的突变体C409A/C415A引起产物的缺失, 说明辅助铁硫簇对StrB催化反应很重要.

将 2H_8 -L-Lys合成的StrA参与反应, 结果验证了SAM还原裂解生成 $5'-dA^\cdot$, 其从Lys中提取出 β -H, 产生了赖氨酰自由基. 该自由基中间体与Trp的吲哚侧链反应, 生成带有Lys-Trp交联键的吲哚基的机制. 且在反应中辅助铁硫簇起到分子内电子传递的作用, 辅助铁硫簇在+2价具有活性, 催化过程中会转化成+1价, 但活性位点铁硫簇相反. 因此在一轮反应中, 分子内电子从辅助铁硫簇转移至活性位点铁硫簇, 使两者都处于活化状态引发反应(图3).

1.4 QhpD催化的C-S键形成反应

在脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)中, 醌血红素脱氢酶(QHNDH)是一种催化各种脂肪族伯胺氧化脱氨的细菌酶, 在细菌利用碳源、氮源方面发挥重要的作用^[53]. QHNDH由3个不同的亚基组成, 其中qhpC编码了分子量为9 kD的最小 γ 亚基, 其内部具有4个硫醚交联结构, 共同承担维持结构作用及生物功能^[20], 其中有3个硫醚键的合成由SAM自由基酶QhpD参与.

在Nakai等人^[20]的研究中, QhpC肽链的N端首先与QhpD结合, 随后QhpC核心功能区结合在QhpD富含正

电荷的蛋白结构凹槽中, 开始了后续的结构重排(图S2). 首先, QhpC的7位Cys基团的硫原子与QhpD的辅助铁硫簇^[54]相结合, QhpC中Glu16通过羧基的盐桥锚定到QhpD的Arg37胍基上, 并伴随着SAM自由基酶与还原性 $[4Fe-4S]$ 簇中特异性铁原子相结合. 类似其他SAM自由基酶, Cys7-Glu16环会逐渐改变构象^[14,55], 使Cys7的硫原子与Glu16亚甲基碳原子形成硫醚键, 并通过辅助簇Aux^[20]完成电子的转移. 由于构象受限, 交联的Cys7-Glu16环从活性位点被释放, 转移至第2个待交联的Cys27-Asp33区域. Cys41-Asp49间的第3个硫醚键也类似地形成.

1.5 PoyD催化的异构化反应

Polytheonamides属于Ripps家族, 其在哺乳动物细胞中具有低皮摩尔细胞毒性^[56]. 在它们的48个翻译后修饰中有35个修饰被预测由3种SAM自由基酶催化: PoyB、PoyC和PoyD. 目前Parent等人^[57]已证明PoyC负责18个 C_β 甲基化, PoyD负责肽基的18个差向异构化^[21], 且推测PoyB负责N端叔丁基的形成.

PoyC是 B_{12} 依赖型甲基转移酶, 前体肽PoyA为其底物, 但由于其溶解度低, 因此以PoyA₁₋₁₅(保留前15个氨基酸, 且在N端加5个赖氨酸残基助溶)作为底物进行测试. 经验证, 甲基化发生在倒数第2个氨基酸L-Val14上. 当以14位为D-Val的肽作为底物时, 却无法再甲基化, 说明差向异构化发生在甲基化之后.

在研究PoyD活性时, 由于其底物PoyA的低溶解度, 底物肽被设计为N端引入一个Trp残基的包含来自前导序列的残基-9~-1和来自核心区域的+1~+10的PoyA衍生物. 在氧化缓冲液中对反应研究, 发现PoyD催化从

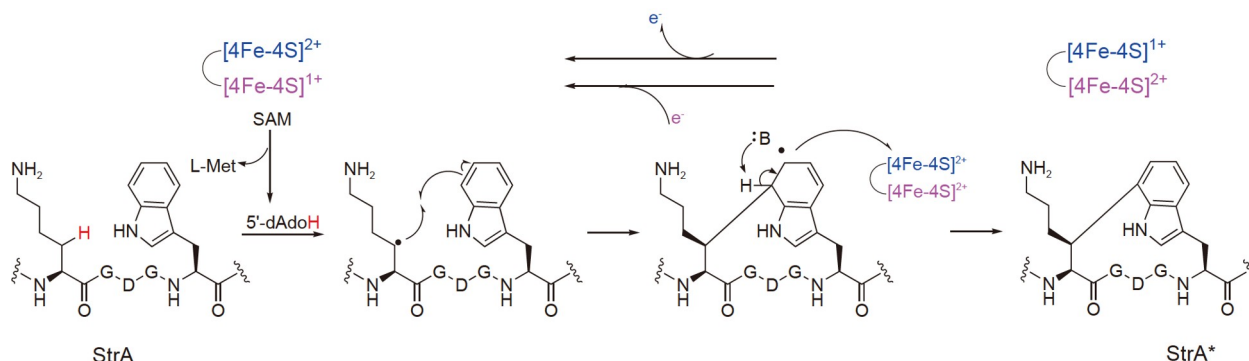


图3 (网络版彩色)StrB的催化机制. 蓝色铁硫簇代表活性位点铁硫簇, 紫色代表辅助铁硫簇

Figure 3 (Color online) Catalytic mechanism of StrB. The clusters in blue and purple correspond to the active site cluster and the auxiliary cluster, respectively

第一/第二个氨基酸开始的核心序列残基的1, 3...间隔差向异构化, 而不催化前导序列残基的差向异构化, 且PoyD从C端到N端进行定向催化. 将C372A突变体进行体内/外反应, 发现其在体内无法催化差向异构化, 但在体外有活性, 产生Val9单差向异构化肽. 以该肽为底物时, 野生型PoyD催化产物仅能形成与Val9交替的肽, 说明第一个差向异构化影响和限制了后续的差向异构化.

PoyD的催化机制见图S3. 5'-dA·攫取底物C_α的H, 形成以碳为中心的自由基, 一个可溶剂交换的H从H原子供体(可能是Cys-372)转移到自由基中间体以产生差向异构化的残基.

2 核苷类化合物相关的SAM自由基酶

核苷类化合物在天然产物以及药物化学领域占有重要地位. 目前为止, 虽然以核苷类化合物为底物的SAM自由基酶被发现种类不多, 但所催化的反应都非常新颖. 对于几乎所有的SAM自由基酶, 5'-dA·从底物中攫取氢原子以产生5'-dA和底物自由基, 从而引发反应. 与夺氢不同, SAM自由基酶很少将5'-dA·加成到其他的基团中. 要介绍的反应包括5'-dA·及产生的底物自由基与双键或其他原子的加成反应, 也包括核苷类的底物自由基发生的重排、消除等反应. 这些反应无疑为结构新颖的核苷类化合物合成提供新策略.

2.1 PolH催化的C-C键形成反应

尼克霉素(nikkomycins)和多氧霉素(polyoxins)是对人与植物病原体具有活性的抗真菌肽基核苷抗生素, 其共同结构是氨基己糖醛酸(aminohehexuronic acid)^[58]. 氨基己糖醛酸是由UMP和磷酸烯醇丙酮酸(PEP)通过烯醇丙酮酸UMP(EP-UMP)与C5'延伸的高碳核苷、辛基酸或其衍生物形成的^[27]. EP-UMP是通过UMP烯醇丙酮酰基转移酶(多氧霉素合成中的PolA)将PEP的烯醇丙酮酰基转移到UMP的3'-OH形成的, 但C5'从EP-UMP延伸到辛基酸的过程仍然未知^[59]. 由于亲核进攻的机理不能解释氨基己糖醛酸C5'-C6'键形成, 因此考虑SAM自由基酶PolH使用5'-dA·氧化EP-UMP的C5'引发反应.

Lilla和Yokoyama^[27]将PolH与EP-UMP反应, PolH消耗SAM生成尿嘧啶辛基酸5'-磷酸酯(U-OAP). 当在D₂O中进行PolH反应时, 在U-OAP的7'位置掺入了氘. 这些结果说明PolH催化涉及一个以C7'为中心的自由基中间体, 该中间体被具有溶剂可交换质子的还原剂

立体定向还原. 由于PolH除了[4Fe-4S]簇外没有其他氧化还原活性辅助因子, 因此C7'自由基还原很可能是由氧化还原活性氨基酸催化的. 对突变体C209A/S的反应进行电子顺磁共振(electron paramagnetic resonance, EPR)检测发现了C7'·的积累, 且发现C209A/S-PolH的产物中有7'-R型U-OAP(epi-U-OAP). 因此提出了以下催化机制, 如图4所示.

PolH使用5'-dA·从EP-UMP提取H5', 底物生成C5'自由基, 该自由基进攻C3''双键形成U-OAP的双环结构. 这一自由基环化反应产生C7'自由基, 其被C209立体定向还原以产生U-OAP. 野生型PolH催化的反应在C209硫自由基(C209·)还原后完成, 该自由基可能是由另一种氧化还原活性氨基酸(如酪氨酸)还原, 然后自由基传递到蛋白质表面并被外源还原剂还原.

2.2 OxsB催化的缩环反应

欧西塔霉素A(oxetanocin-A, OXT-A)是巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)产生的一种具有抗肿瘤、抗病毒特性的核苷类似物^[60]. OXT-A的磷酸化形式可以抑制细胞和病毒的DNA聚合酶活性, 并对乙型肝炎以及单纯疱疹病毒具有抑制作用^[61,62]. Bridwell-Rabb等人^[28]发现, 在OXT-A的合成过程中, 钴胺素(cobalamin, Cbl)依赖的SAM自由基酶OxsB对催化氧杂环丁烷的形成起到了关键作用.

OxsB蛋白由4个结构域组成, 包括N-端结构域(N-terminal domain, I)、Cbl结合域(Cbl binding domain, II)、AdoMet区域(AdoMet radical domain)以及螺旋束域(Helix bundle domain, IV). 其中Cbl与结构域II相结合发挥作用. 在OXT-A的合成过程中, OxsB催化2'-脱氧腺苷-5'-单/二/三磷酸(dAMP/dADP/dATP)形成OXT-A的四元环. 根据氘标记实验可知, 催化可能起始于5'-dA·从dAMP、dADP或dATP的C2'位置攫取了氢原子. 随后形成的底物自由基可以通过烯醇自由基重排形成产物自由基, 最终形成dAMP/dADP/dATP的醛形式(图5). 在此过程中, OxsA所催化的磷酸水解与之偶联, 可以促进平衡向产物方向的移动. Cbl可能通过与自由基的直接或者间接配位, 降低反应步骤的活化能垒; 或是充当潜在电子受体, Cbl-产物自由基配合物为电子转移提供了通道.

2.3 Viperin催化的核苷脱水反应

Viperin是一种干扰素诱导蛋白, 在病毒感染的先

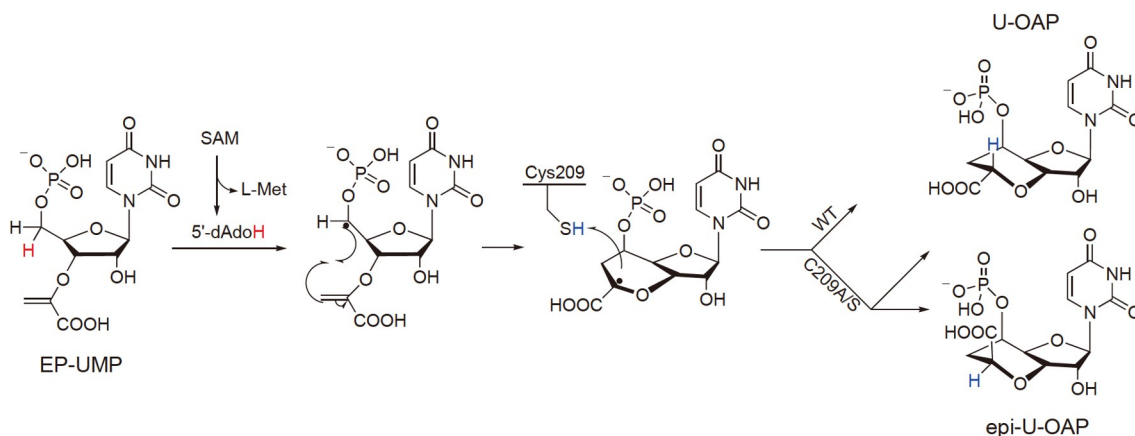


图4 (网络版彩色)PolH的催化机制

Figure 4 (Color online) Catalytic mechanism of PolH

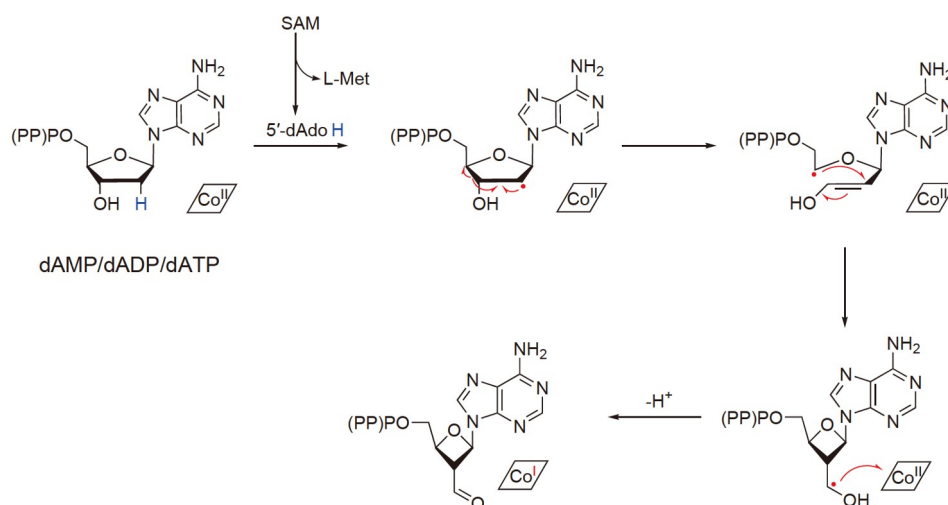


图5 (网络版彩色)OxsB的催化机制

Figure 5 (Color online) Catalytic mechanism of OxsB

天免疫反应中起着重要作用^[63]。其参与抑制DNA病毒、逆转录病毒、正链RNA病毒、负链RNA病毒等多种病毒的复制,包括登革热病毒、西尼罗河病毒^[64]。然而Viperin抑制病毒的机制却一直未知。

Gizzi等人^[29]对基因组研究发现,Viperin总是与注释为胞苷酸单磷酸激酶2(CMPK2)的基因紧邻,且在*Lacinutrix mariniflava*中两个基因融合表达,因此Viperin可能具有修饰核苷酸的功能。用褐家鼠Viperin(rVIP)对核苷酸类底物进行筛选后发现,底物CTP存在时的5'-dA产量是只有rVIP反应的130倍,且检测到新产物3'-脱氧-3',4'-二脱氢-CTP(ddhCTP,是CTP脱去一分子水的产物)。另外,使用4'-氘标记的

CTP与rVIP, SAM反应后的5'-dA显示被氧化,说明从该位置攫取H。因此rVIP可能采取以下机制催化反应(图S4), 5'-dA·攫取CTP的C4'位H,随后在酸辅助下失去3'-OH得到自由基阳离子,该自由基阳离子被一个电子还原并进一步发生电子重排后生成产物ddhCTP。

ddhCTP能够作为黄病毒属多个成员的RNA依赖型RNA聚合酶的链终止子,在体内直接抑制病毒的复制。Viperin同样存在于人体,是目前唯一已知可以直接产生抑制病毒复制的小分子的人类蛋白^[29]。Viperin的产物ddhCTP,无疑为进一步开发具有抗病毒活性的核苷类药物提供了新的思路。

3 其他小分子生物合成中的SAM自由基酶

3.1 安普霉素生物合成酶AprD4催化的脱水反应

安普霉素(apramycin)是一种氨基糖苷类抗生素(AGA),它含有一个独特的双环八糖结构,并且这种八糖在C3'位置被脱氧.氨基糖苷类的C3'位置脱氧会使其不易被氨基糖苷磷酸转移酶(APH(3'))修饰,对磷酸化的敏感性降低,这是某些细菌的已知耐药机制^[65].但是安普霉素的生物合成仍未知(比如C3'脱氧).在 $\Delta aprD3$ 和 $\Delta aprD4$ 突变体中发现了伪二糖paromamine的积累,且并未有安普霉素的生成,初步确认这两个基因负责C3'的脱氧,且paromamine很可能是C3'脱氧反应的底物.复旦大学张琪课题组^[31]和德克萨斯大学奥斯汀分校Kim等人^[32]均对来自*S. tenebrarius*的AprD3和AprD4进行了研究.

研究发现, AprD4是新型的SAM自由基酶,其使用非规范的CX₃CX₃C基序结合[4Fe-4S]簇,作为脱水酶发挥作用. AprD4从C4'位置攫取氢原子来启动paromamine脱水形成4'-oxolividamine. AprD3为其还原酶,通过辅因子NADPH还原羰基获得lividamine.

通过Liu等人^[66]基于晶体结构的体外表征和理论计算, 2021年Yeh等人^[67]设计合成几种底物类似物并将其与AprD4孵育后观察产物分析其催化过程,验证了AprD4的催化机制.如图6所示,首先5'-dA·攫取C4'位的H后生成底物自由基,其进行去质子化以形成羰基自由基,随后经历3'-OH基团的 β -消除以产生烯醇自由基,该自由基进行中间体的单电子还原和质子化,生成脱水产物.

3.2 C10P和C10Q催化的环丙烷化反应

CC-1065属于螺环丙基环己二烯酮(spirocyclopropylcyclohexadienone)家族.这一类天然产物是超强的抗肿瘤抗生素^[68],它们细胞毒活性源自其共有的环丙烷部分,通过腺嘌呤N3小沟中双链DNA的序列选择性烷

基化起作用^[69].

由于CC-1065与谷田霉素(yatakemycin, YTM)结构类似,其生物合成蛋白可能是谷田霉素环丙烷化必需酶YtkT的同源蛋白^[70].唐功利课题组^[4,71]发现, $\Delta C10Q$ (SAM依赖型甲基转移酶)和 $\Delta C10P$ (SAM自由基酶)突变体不再产生CC-1065,并出现一个新产物,为环丙烷化的前体(1,图7),因此两个基因编码蛋白可能共同作用形成环丙烷结构.由于C10P难以纯化,唐功利课题组^[4]使用功能相同的同源蛋白Swoo_2002(后称C10P*)进行代替,这类蛋白属于类似HemN的粪卟啉原III氧化酶,该类酶晶体结构中结合两个SAM分子.在C10P*、C10Q、化合物1的酶级联反应中,检测到了CC-1065的产生,且5'-dA和SAH以1:1生成,可能一个SAM作为自由基引发剂,另一个SAM作为甲基供体.反应中检测到了一个反应中间体(2),同位素标记实验显示,其为亚甲基SAM加合到化合物1的C11位得到. C10Q的H138A突变使反应产生了中间体2后续的旁路产物,因此His138残基可能作为关键的催化碱,负责中间体2的C6酚羟基去质子化.基于以上研究提出了环丙烷化的催化机制. C10P裂解SAM₁产生的5'-dA·攫取SAM₂活化甲基中的H以产生SAM亚甲基自由基,其加成到化合物1的C11上产生新自由基中间体(3). 3攫取可溶剂交换的质子生成中间体2,后触发分子内S_N2环丙烷化生成产物CC-1065.

3.3 HpnH催化的C-C键形成反应

藿烷(hopanoids)是由不同细菌群合成的五环三萜类脂质,是构成原核细胞膜的成分之一^[72]. Hopanoids可以增强细菌膜的稳定性和不渗透性,增强对多种压力条件的抵抗力,比如pH、温度以及接触洗涤剂和抗生素^[73].由于其极高的化学稳定性,藿烷可以作为细胞生物学过程标记^[74].

在hopanoids的生物合成中HpnD、HpnC和HpnE催化两个法呢基二磷酸(farnesyl diphosphate)合成角鲨烯

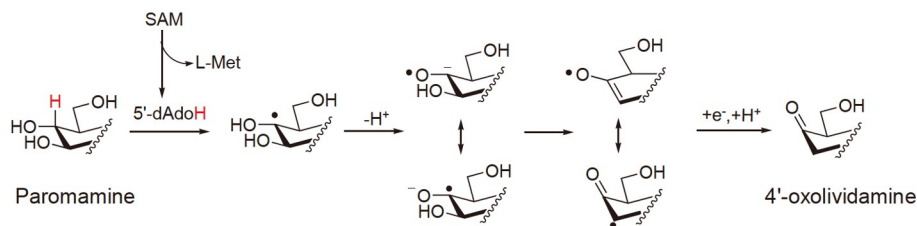


图6 (网络版彩色)AprD4的催化机制

Figure 6 (Color online) Catalytic mechanism of AprD4

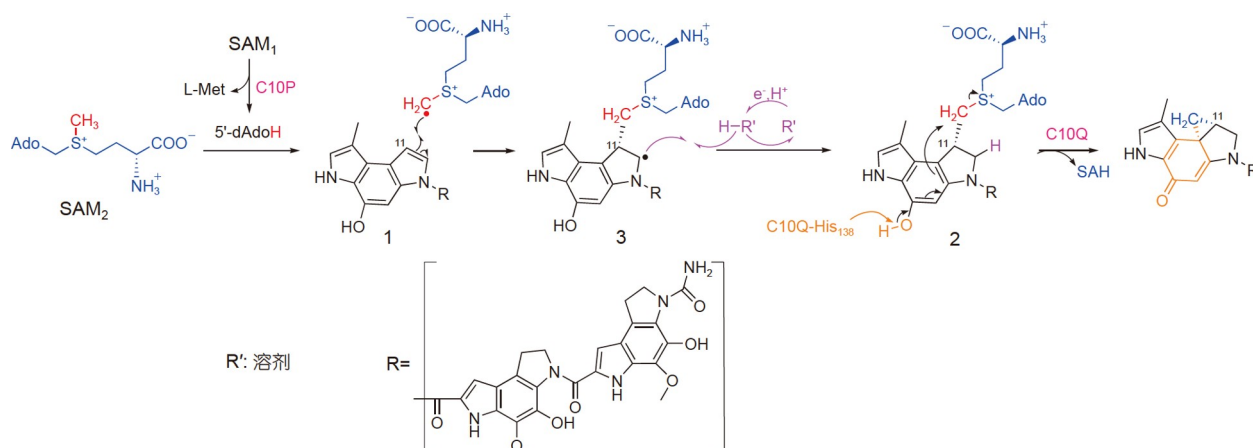


图7 (网络版彩色)C10P和C10Q的催化机制

Figure 7 (Color online) Catalytic mechanism of C10P and C10Q

(squalene), 接着被角鲨烯-藁烯环化酶(squalene-hopene cyclase, SHC)HpnF环化为绵马三萜(diploptene)^[75]。经研究, 绵马三萜和d-核糖衍生物被认为用来生成C35细菌藁烷多元醇(C35 bacteriohopanepolyols)的中间体腺苷藁烷(adenosylhopane), 且HpnH负责这一过程, 同时ΔHpnG突变体积累了腺苷藁烷。

Sato等人^[34]和张琪课题组^[76]同时发现HpnH为SAM自由基酶, 且其催化绵马三萜和5'-dA·加成生成腺苷藁烷。在研究过程中, 由于绵马三萜溶解度很低, 因此采用HpnH与SHC的“一锅法”反应来验证活性, 在酶级联反应中检测到了产物腺苷藁烷, 而在不含HpnH的反应中只检测到绵马三萜。且经MS分析并对手性C22进行立体化学检测, 确认产物为(22R)-腺苷藁烷。当“一锅法”反应在含氧缓冲液中进行时, 显示产物的C3_β和C22位掺入了氧原子, 且SHC负责掺入C3_β位, HpnH负责掺入C22位。据此提出了HpnH的反应机制(图S5), SAM裂解后的5'-dA·与绵马三萜的双键发生加成反应生产绵马三萜C22位的自由基, 该自由基从可以与水进行质子交换的氨基酸中攫取H, 生成(22R)-腺苷藁烷。

3.4 ArsS催化的C-As键形成反应

砷是环境中普遍存在的有毒元素, 砷糖(砷核糖苷, arsenosugar)是含砷的核糖, 在砷生物地球化学循环中起重要作用。已知20多种砷糖主要存在于海洋生物中, 它们是海洋生物的天然成分, 对海洋植物或动物无毒。因此, 砷糖的合成代表了一种砷的解毒机制^[77]。二甲基化砷糖由二甲基砷酰部分组成, 其中五价砷与一个氧、两个甲基和一个5'-脱氧核糖苷结合。有研究指出,

海洋环境中砷转化的推测途径表明SAM是砷糖的甲基和5'-脱氧核糖基团的来源^[78]。

研究发现, ΔarsS(SAM自由基酶)和ΔarsM(SAM依赖型甲基转移酶)突变体均无法生成砷糖。将arsM和arsS基因在大肠杆菌中异源表达, 表达arsM的细胞可以合成二甲基砷酸(DMV(V))但不能合成砷糖, 而表达这两种基因的细胞可以产生二甲基砷核糖苷衍生物。据此提出了砷糖的生物合成途径, 第一步是通过ArsM将甲基从SAM添加到As(III), 第二步是通过ArsS添加脱氧核糖部分^[77]。

朱永官课题组^[79]对ArsM的研究证明其与As(III)或单甲基砷酸(MMV(V))一起孵育会产生甲基化产物DMV(V)和砷糖, 而将ΔarsM和DMV(V)共同孵育时仍检测到砷糖, 说明ArsM是甲基化必需, 但不是合成砷糖必需的蛋白, 且DMV(V)是砷糖的前体。

张琪课题组^[35]研究发现, 5'-dA加合到底物DMAs(III)中, 生成产物5'-脱氧-5'-二甲基砷酰腺苷(DDMAA)。基于此, 他们提出了一种催化机制(图S6), SAM裂解产生的5'-dA·攻击DMAs(III)的As中心, 产生以As为中心的自由基, 而DDMAA是通过随后去质子化耦合的单电子氧化过程产生的, 但该氧化过程电子的受体还不清楚^[35]。他们推测, 电子又回到[4Fe-4S]²⁺簇并将其转化为活性[4Fe-4S]⁺用于下一步SAM切割。为验证该假设, 将与还原剂连二亚硫酸钠孵育过夜的ArsS反应交换到不含连二亚硫酸钠的缓冲液中, 随后加入底物DMAs(III)产生了大量的DDMAA。因此, 反应过程中以As为中心的自由基中间体的电子可以直接或间接回到氧化的[4Fe-4S]²⁺簇, 并将其转化为活性状态来进行

下一次SAM裂解. 这一研究揭示了自然界利用SAM自由基酶解除砷毒性的机制, 同时也丰富了SAM自由基酶产生的5'-dA自由基催化的反应类型.

4 甘氨酸自由基酶

甘氨酸自由基酶(GREs)利用甘氨酸自由基中间体来催化各类反应, 如C-C键形成(苄基琥珀酸合酶(BSS)), C-C键裂解(丙酮酸甲酸裂解酶(PFL))和脱水(不依赖B₁₂的甘油脱水酶(GDH))等^[80], 酶功能所需的以甘氨酸为中心的自由基是由激活蛋白产生的, 这类激活蛋白为SAM自由基酶.

在人体中, 胆碱向三甲胺(TMA)的转化与人类风险较高的心血管疾病相关^[81]. 近期发现, 属于甘氨酸自由基酶的胆碱三甲胺裂解酶(CutC)与属于SAM自由基酶的CutC激活蛋白(CutD)在这一生理过程中起到重要作用^[42].

Craciun等人^[42]进行了CutC和CutD的酶级联反应, 在77 K下的EPR检测中看到了典型的甘氨酸自由基的信号, 当在D₂O中进行反应时, EPR显示没有甘氨酸自由基的超精细分裂, 说明甘氨酸自由基上剩余的氢原子可以与溶剂进行质子交换. 对CutC的同源蛋白GDH进行建模发现, Glu491和胆碱C1羟基之间存在氢键, 因此CutC可能将Glu491作为碱性氨基酸去质子化. CutC突变体C489A可以被CutD激活, 且在重水反应中仍然保留有超精细分裂, 说明质子交换过程为该残基参与. 在酶级联反应中加入胆碱后, 其被完全转化为TMA和乙醛, 证实了CutC和CutD的生化功能. 根据上述结果且经过计算, 提出了CutC和CutD的催化机制. 如图8所示, 活化的CutC的甘氨酸自由基与Cys489反应形成硫自由基, 该自由基从胆碱的C1中提取氢原子生成底物自由基, 随后TMA消去, 产生一个自由基, 其从Cys489中提取氢原子且电子重排后生成乙醛.

5 全新酶机制的发现

近年来, SAM自由基酶领域除上述新酶的发现外, 更为颠覆性的成果是新机制的发现. 通过快速冷冻淬灭技术, 结合EPR与电子-核双共振谱(electron-nucleus double resonance spectroscopy, ENDOR), Horitani等人^[82]在SAM自由基酶PFL-AE催化过程中发现了5'-dA·与铁硫簇形成的有机金属中间体. 有机金属中间体的形成, 可能是SAM被还原裂解生成5'-dA·, 5'-dA·与[4Fe-4S]²⁺簇重组通过Fe-C键形成中间体Ω, 也可能通过结合SAM的铁原子对C5'的亲核进攻形成Ω. 随后Fe-C键的均裂产生5'-dA·, 从而催化后续反应(图9(a)). 也就是说, 有机金属中间体作为稳定的自由基催化反应. 后续研究发现多个SAM自由基酶如HydG、PoyD、LAM等反应都有同样的有机金属中间体产生^[83].

同时, 我们在研究非经典SAM自由基酶Dph2的过程中, 通过使用含有双键的SAM类似物, 检测到了铁硫簇与烯丙基化合物形成的有机金属复合物, 这也是SAM自由基酶中铁硫簇首次被检测到形成有机金属复合物^[84], 揭示了铁硫簇的亲核性. 由此, 我们推测天然底物SAM参与的反应中, 很可能也是通过有机金属化合物来稳定自由基, 从而催化反应. 后续研究发现Dph2通过铁硫簇与SAM特殊的结合方式, 实现选择性切断SAM另一个C-S键. 通过快速冷冻淬灭技术, 捕获到3-氨基-3-羧基丙基与铁硫簇的铁原子形成的有机金属化合物中间体. Fe-C键的均裂产生3-氨基-3-羧基丙基自由基. 该自由基通过对底物EF2的自由基加成反应, 产生EF2的组氨酸自由基(图9(b))^[85]. 该中间体进而失去一个电子和质子, 完成反应.

在以上SAM自由基酶催化的两类C-S键断裂反应中都检测到有机金属中间体的存在, 使得人们对SAM自由基酶的反应机制有了全新的认识, 同时解答了长

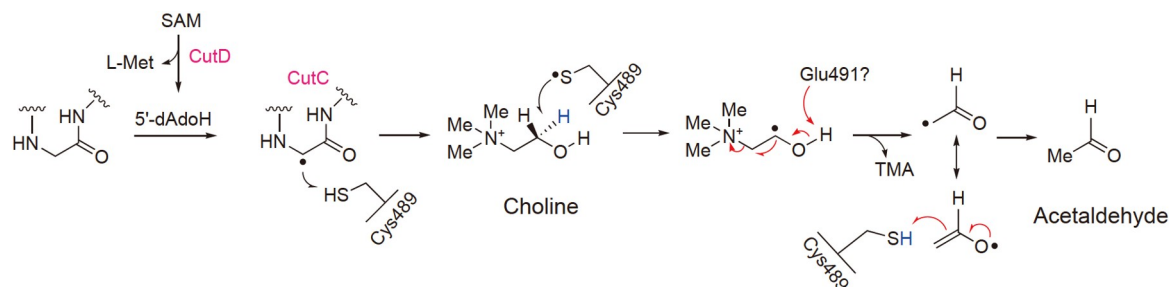


图8 (网络版彩色)CutC、CutD催化的反应

Figure 8 (Color online) Reaction catalyzed by CutC and CutD

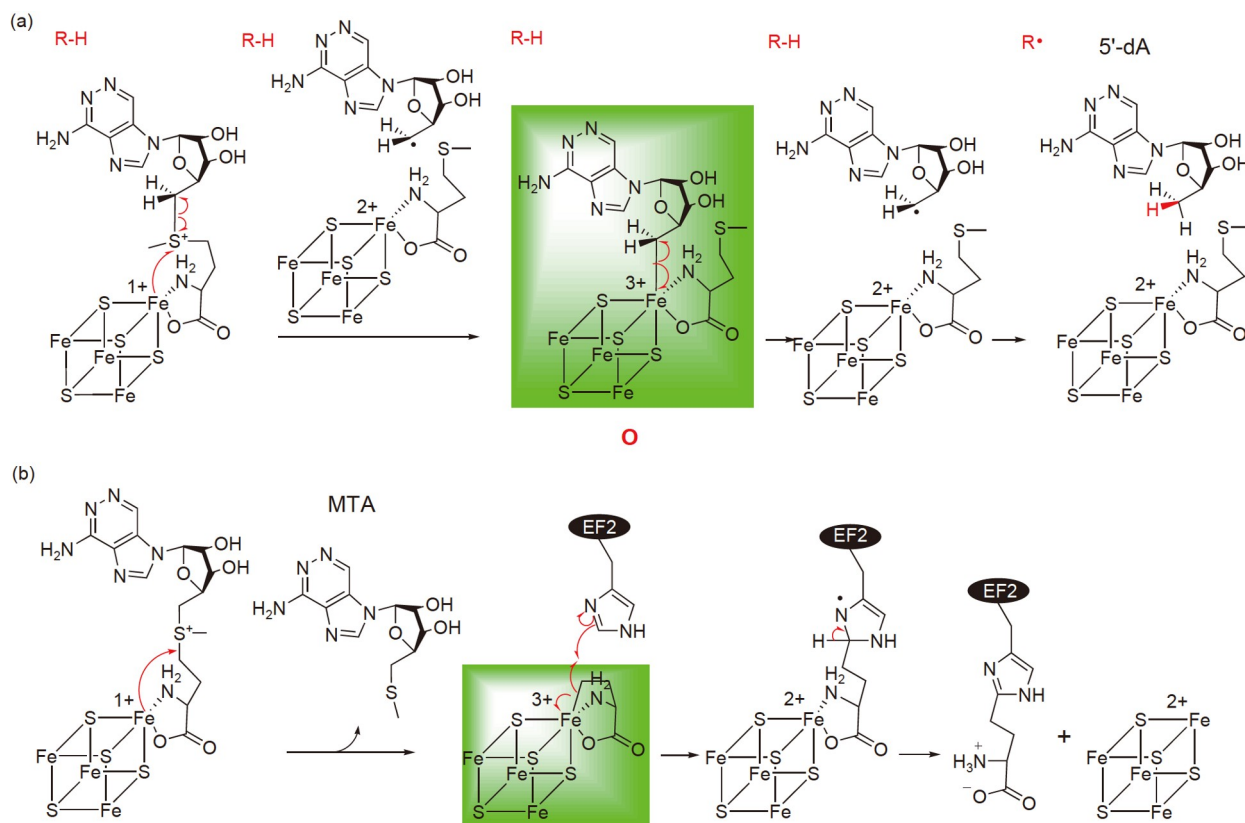


图9 (网络版彩色)SAM自由基酶有机金属中间体催化机制。(a) 经典SAM自由基酶;(b) 非经典SAM自由基酶Dph2

Figure 9 (Color online) Organometallic mechanism of radical SAM enzymes. (a) Conventional radical SAM enzymes; (b) unconventional radical SAM enzyme Dph2

久以来关于酶是如何控制活泼的有机自由基中间体这一困惑。而Fe-C键形成的有机金属化合物,如同一个稳态的自由基,在底物存在需要发生反应时释放自由基,催化后续反应。相关研究也揭示了SAM自由基酶与腺苷钴胺依赖的自由基酶类似的机制,丰富了有机金属化合物参与的酶催化反应类型^[86]。

6 结论与展望

综上,近年来SAM自由基酶领域无论在新反应发现和新机制解析都有大量的重要进展。通过以上实例可以看出,SAM自由基酶通过自由基机制,在生物体内实现了种类多样的反应,其中包括大量C-H键活化、C-C键构筑等在化学合成领域具有挑战的反应。自由基的高活性也使得SAM自由基酶实现了极性机制很难实现的各类反应。同时,SAM自由基酶底物多样,涉及多肽、蛋白、核苷酸、糖类、萜类等。由此可见,SAM自由基酶在生物系统中有着重要作用,对SAM自由基酶的研究也有重要的意义。而这些发现在研究相

关酶的功能、拓展酶学反应理论的同时,无疑也为生物催化和合成生物学提供了许多工具与启示。

首先,自由基由于具有高活性,反应的区域选择性和立体选择性都较难控制。而SAM自由基酶通过使用SAM和铁硫簇产生烷基自由基,精准控制活泼的自由基在温和生理条件下实现大量高区域选择性、高立体选择性的反应。铁硫簇与自由基形成的Fe-C金属有机化合物对拓展自由基化学,实现更多新颖化学反应提供了理论基础。同时,SAM自由基酶参与许多具有抗菌、抗肿瘤活性分子的生物合成,通过底物类似物的引入,结合对酶的工程改造,可以将SAM自由基化学应用于天然产物类似物或者全新活性药物分子的绿色制造。

其次,绝大多数SAM自由基酶通过裂解SAM的C_{5'}-脱氧腺苷-S键,产生5'-dA自由基。该自由基既能发生攫取氢原子,产生底物自由基的反应,又能发生其他如C-C双键的加成反应。在SAM的3个碳硫键中,除了活泼的甲基容易发生亲核取代反应外,另外两个C-S键

有相似的化学性质。然而,目前仅有白喉酰胺合成酶 dph2能产生ACP自由基,与底物EF2组氨酸发生加成反应。那么,是否会有更多的酶利用SAM的ACP自由基?产生的ACP自由基除了发生加成反应,是否也能攫取底物氢原子,产生底物自由基而催化自由基反应?相信有更多类似Dph2的酶等待我们去发现。

最后,随着测序技术和生物信息学的发展,会有更多SAM自由基酶被发掘;结合动态表征等各种手段,也

会有更多新颖的酶催化机制被解析。然而,目前发现的SAM自由基酶普遍催化活性较低,一般只能催化几个到几十个催化循环。在SAM自由基酶催化过程中,铁硫簇的还原步骤至关重要。开发更高效的铁硫簇还原体系,有望提高反应效率。同时,SAM自由基酶活性极易被氧气破坏。结合酶的定向进化和工程改造,提高SAM自由基酶的稳定性,也将有望使SAM自由基酶这一强大的酶家族得到更广泛的应用。

参考文献

- Bauerle M R, Schwalm E L, Booker S J. Mechanistic diversity of radical *S*-adenosylmethionine (SAM)-dependent methylation. *J Biol Chem*, 2015, 290: 3995–4002
- Frey P A, Hegeman A D, Ruzicka F J. The radical SAM superfamily. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2008, 43: 63–88
- Benjdia A, Balty C, Berteau O. Radical SAM enzymes in the biosynthesis of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs). *Front Chem*, 2017, 5: 87
- Jin W B, Wu S, Jian X H, et al. A radical *S*-adenosyl-*L*-methionine enzyme and a methyltransferase catalyze cyclopropane formation in natural product biosynthesis. *Nat Commun*, 2018, 9: 2771
- Hover B M, Tonthat N K, Schumacher M A, et al. Mechanism of pyranopterin ring formation in molybdenum cofactor biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 6347–6352
- Mo T, Ji X, Yuan W, et al. Thuricin Z: A narrow-spectrum sactibiotic that targets the cell membrane. *Angew Chem Int Edit*, 2019, 58: 18793–18797
- Kaminska K H, Baraniak U, Boniecki M, et al. Structural bioinformatics analysis of enzymes involved in the biosynthesis pathway of the hypermodified nucleoside ms²io⁶A37 in tRNA. *Proteins*, 2008, 70: 1–18
- Lee K H, Saleh L, Anton B P, et al. Characterization of RimO, a new member of the methylthiotransferase subclass of the radical SAM superfamily. *Biochemistry*, 2009, 48: 10162–10174
- Ding W, Ji X, Zhong Y, et al. Adenylation reactions catalyzed by the radical *S*-adenosylmethionine superfamily enzymes. *Curr Opin Chem Biol*, 2020, 55: 86–95
- Zhang Y, Zhu X, Torelli A T, et al. Diphthamide biosynthesis requires an organic radical generated by an iron-sulphur enzyme. *Nature*, 2010, 465: 891–896
- Dong M, Su X, Dzikovski B, et al. Dph3 is an electron donor for Dph1-Dph2 in the first step of eukaryotic diphthamide biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 1754–1757
- Dong M, Zhang Y, Lin H. Methods for studying the radical SAM enzymes in diphthamide biosynthesis. *Methods Enzymol*, 2018, 606: 421–438
- Yokoyama K, Lilla E A. C–C bond forming radical SAM enzymes involved in the construction of carbon skeletons of cofactors and natural products. *Nat Prod Rep*, 2018, 35: 660–694
- Wang J, Woldring R P, Román-Meléndez G D, et al. Recent advances in radical SAM enzymology: New structures and mechanisms. *ACS Chem Biol*, 2014, 9: 1929–1938
- Jin W B, Wu S, Xu Y F, et al. Recent advances in HemN-like radical *S*-adenosyl-*L*-methionine enzyme-catalyzed reactions. *Nat Prod Rep*, 2020, 37: 17–28
- Broderick J B, Duffus B R, Duschene K S, et al. Radical *S*-adenosylmethionine enzymes. *Chem Rev*, 2014, 114: 4229–4317
- Clark K A, Bushin L B, Seyedsayamdost M R. Aliphatic ether bond formation expands the scope of radical SAM enzymes in natural product biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 10610–10615
- Bruender N A, Bandarian V. The radical *S*-adenosyl-*L*-methionine enzyme MftC catalyzes an oxidative decarboxylation of the C-terminus of the MftA peptide. *Biochemistry*, 2016, 55: 2813–2816
- Schramma K R, Bushin L B, Seyedsayamdost M R. Structure and biosynthesis of a macrocyclic peptide containing an unprecedented lysine-to-tryptophan crosslink. *Nat Chem*, 2015, 7: 431–437
- Nakai T, Ito H, Kobayashi K, et al. The radical *S*-adenosyl-*L*-methionine enzyme QhpD catalyzes sequential formation of intra-protein sulfur-to-methylene carbon thioether bonds. *J Biol Chem*, 2015, 290: 11144–11166

- 21 Parent A, Benjdia A, Guillot A, et al. Mechanistic investigations of PoyD, a radical *S*-adenosyl-*L*-methionine enzyme catalyzing iterative and directional epimerizations in polytheonamide A biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 2469–2477
- 22 Caruso A, Seyedsayamdost M R. Radical SAM enzyme QmpB installs two 9-membered ring sactonine macrocycles during biogenesis of a ribosomal peptide natural product. *J Org Chem*, 2021, 86: 11284–11289
- 23 Schramma K R, Seyedsayamdost M R. Lysine-tryptophan-crosslinked peptides produced by radical SAM enzymes in pathogenic *Streptococci*. *ACS Chem Biol*, 2017, 12: 922–927
- 24 Balty C, Guillot A, Fradale L, et al. Biosynthesis of the sactipeptide ruminococcin C by the human microbiome: Mechanistic insights into thioether bond formation by radical SAM enzymes. *J Biol Chem*, 2020, 295: 16665–16677
- 25 Benjdia A, Guillot A, Ruffié P, et al. Post-translational modification of ribosomally synthesized peptides by a radical SAM epimerase in *Bacillus subtilis*. *Nat Chem*, 2017, 9: 698–707
- 26 Wieckowski B M, Hegemann J D, Mielcarek A, et al. The PqqD homologous domain of the radical SAM enzyme ThnB is required for thioether bond formation during thurincin H maturation. *FEBS Lett*, 2015, 589: 1802–1806
- 27 Lilla E A, Yokoyama K. Carbon extension in peptidynucleoside biosynthesis by radical SAM enzymes. *Nat Chem Biol*, 2016, 12: 905–907
- 28 Bridwell-Rabb J, Zhong A, Sun H G, et al. A B₁₂-dependent radical SAM enzyme involved in oxetanocin A biosynthesis. *Nature*, 2017, 544: 322–326
- 29 Gizzi A S, Grove T L, Arnold J J, et al. A naturally occurring antiviral ribonucleotide encoded by the human genome. *Nature*, 2018, 558: 610–614
- 30 Yokogawa T, Nomura Y, Yasuda A, et al. Identification of a radical SAM enzyme involved in the synthesis of archaeosine. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 1148–1155
- 31 Lü M, Ji X, Zhao J, et al. Characterization of a C3 deoxygenation pathway reveals a key branch point in aminoglycoside biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 6427–6435
- 32 Kim H J, LeVieux J, Yeh Y C, et al. C3'-deoxygenation of paromamine catalyzed by a radical *S*-adenosylmethionine enzyme: Characterization of the enzyme AprD4 and its reductase partner AprD3. *Angew Chem Int Edit*, 2016, 55: 3724–3728
- 33 Ji W, Ji X, Zhang Q, et al. Sulfonium-based homolytic substitution observed for the radical SAM enzyme HemN. *Angew Chem Int Edit*, 2020, 59: 8880–8884
- 34 Sato S, Kudo F, Rohmer M, et al. Characterization of radical SAM adenosylhopane synthase, HpnH, which catalyzes the 5'-deoxyadenosyl radical addition to diploptene in the biosynthesis of C₃₅ bacteriohopanepolyols. *Angew Chem Int Edit*, 2020, 59: 237–241
- 35 Cheng J, Ji W, Ma S, et al. Characterization and mechanistic study of the radical SAM enzyme ArsS involved in arsenosugar biosynthesis. *Angew Chem Int Edit*, 2021, 60: 7570–7575
- 36 Thweatt J L, Ferlez B H, Golbeck J H, et al. BciD is a radical *S*-adenosyl-*L*-methionine (SAM) enzyme that completes bacteriochlorophyllide e biosynthesis by oxidizing a methyl group into a formyl group at C-7. *J Biol Chem*, 2017, 292: 1361–1373
- 37 Wang Y, Schnell B, Baumann S, et al. Biosynthesis of branched alkoxy groups: Iterative methyl group alkylation by a cobalamin-dependent radical SAM enzyme. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 1742–1745
- 38 Sinner E K, Lichstrahl M S, Li R, et al. Methylations in complex carbapenem biosynthesis are catalyzed by a single cobalamin-dependent radical *S*-adenosylmethionine enzyme. *Chem Commun*, 2019, 55: 14934–14937
- 39 Zeng Z, Liu X L, Farley K R, et al. GDGT cyclization proteins identify the dominant archaeal sources of tetraether lipids in the ocean. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 22505–22511
- 40 Gagnon D M, Stich T A, Mehta A P, et al. An aminoimidazole radical intermediate in the anaerobic biosynthesis of the 5,6-dimethylbenzimidazole ligand to Vitamin B12. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 12798–12807
- 41 Bodea S, Balskus E P. Purification and characterization of the choline trimethylamine-lyase (CutC)-activating protein CutD. *Methods Enzymol*, 2018, 606: 73–94
- 42 Craciun S, Marks J A, Balskus E P. Characterization of choline trimethylamine-lyase expands the chemistry of glycyl radical enzymes. *ACS Chem Biol*, 2014, 9: 1408–1413
- 43 Xing M, Wei Y, Zhou Y, et al. Radical-mediated C–S bond cleavage in C2 sulfonate degradation by anaerobic bacteria. *Nat Commun*, 2019, 10: 1609
- 44 Liu D, Wei Y, Liu X, et al. Indoleacetate decarboxylase is a glycyl radical enzyme catalysing the formation of malodorous skatole. *Nat Commun*, 2018, 9: 4224
- 45 Arnison P G, Bibb M J, Bierbaum G, et al. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: Overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat Prod Rep*, 2013, 30: 108–160
- 46 Barr I, Latham J A, Iavarone A T, et al. Demonstration that the radical *S*-adenosylmethionine (SAM) enzyme PqqE catalyzes *de novo* carbon-carbon cross-linking within a peptide substrate PqqA in the presence of the peptide chaperone PqqD. *J Biol Chem*, 2016, 291: 8877–8884
- 47 Caruso A, Bushin L B, Clark K A, et al. Radical approach to enzymatic β -thioether bond formation. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 990–997

- 48 Mahanta N, Zhang Z, Hudson G A, et al. Reconstitution and substrate specificity of the radical *S*-adenosyl-methionine thiazole *C*-methyltransferase in thiomuracin biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 4310–4313
- 49 Weckler S R, Stoll S, Iavarone A T, et al. Interaction of PqqE and PqqD in the pyrroloquinoline quinone (PQQ) biosynthetic pathway links PqqD to the radical SAM superfamily. *Chem Commun*, 2010, 46: 7031–7033
- 50 Rued B E, Covington B C, Bushin L B, et al. Quorum sensing in *Streptococcus* mutans regulates production of tryglysin, a novel RaS-RiPP antimicrobial compound. *mBio*, 2021, 12: e02688
- 51 Ibrahim M, Guillot A, Wessner F, et al. Control of the transcription of a short gene encoding a cyclic peptide in *Streptococcus thermophilus*: A new quorum-sensing system? *J Bacteriol*, 2007, 189: 8844–8854
- 52 Grell T A J, Goldman P J, Drennan C L. SPASM and twitch domains in *S*-adenosylmethionine (SAM) radical enzymes. *J Biol Chem*, 2015, 290: 3964–3971
- 53 Takagi K, Yamamoto K, Kano K, et al. New pathway of amine oxidation respiratory chain of *Paracoccus denitrificans* IFO 12442. *Eur J Biochem*, 2001, 268: 470–476
- 54 Goldman P J, Grove T L, Sites L A, et al. X-ray structure of an AdoMet radical activase reveals an anaerobic solution for formylglycine posttranslational modification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 8519–8524
- 55 Roach P L. Radicals from *S*-adenosylmethionine and their application to biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol*, 2011, 15: 267–275
- 56 Freeman M F, Vagstad A L, Piel J. Polytheonamide biosynthesis showcasing the metabolic potential of sponge-associated uncultivated ‘*Entotheonella*’ bacteria. *Curr Opin Chem Biol*, 2016, 31: 8–14
- 57 Parent A, Guillot A, Benjdia A, et al. The B₁₂-radical SAM enzyme PoyC catalyzes valine C_β-methylation during polytheonamide biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 15515–15518
- 58 Zhang D, Miller M J. Polyoxins and nikkomycins: Progress in synthetic and biological studies. *Curr Pharm Des*, 1999, 5: 73–99
- 59 Chen W, Huang T, He X, et al. Characterization of the polyoxin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces cacaoi* and engineered production of polyoxin H. *J Biol Chem*, 2009, 284: 10627–10638
- 60 Shimada N, Hasegawa S, Harada T, et al. Oxetanocin, a novel nucleoside from bacteria. *J Antibiot*, 1986, 39: 1623–1625
- 61 Izuta S, Shimada N, Kitagawa M, et al. Inhibitory effects of triphosphate derivatives of oxetanocin G and related compounds on eukaryotic and viral DNA polymerases and human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Biochem*, 1992, 112: 81–87
- 62 Ueda K, Tsurimoto T, Nagahata T, et al. An *in vitro* system for screening anti-hepatitis B virus drugs. *Virology*, 1989, 169: 213–216
- 63 Ebrahimi K H. A unifying view of the broad-spectrum antiviral activity of RSAD2 (viperin) based on its radical-SAM chemistry. *Metallomics*, 2018, 10: 539–552
- 64 Ghosh S, Marsh E N G. Viperin: An ancient radical SAM enzyme finds its place in modern cellular metabolism and innate immunity. *J Biol Chem*, 2020, 295: 11513–11528
- 65 Magnet S, Blanchard J S. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev*, 2005, 105: 477–498
- 66 Liu W Q, Amara P, Mouesca J M, et al. 1,2-Diol dehydration by the radical SAM enzyme AprD4: A matter of proton circulation and substrate flexibility. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 1365–1371
- 67 Yeh Y C, Kim H J, Liu H W. Mechanistic investigation of 1,2-diol dehydration of paromamine catalyzed by the radical *S*-adenosyl-*L*-methionine enzyme AprD4. *J Am Chem Soc*, 2021, 143: 5038–5043
- 68 Boger D L, Johnson D S. CC-1065 and the duocarmycins: Unraveling the keys to a new class of naturally derived DNA alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 3642–3649
- 69 Ghosh N, Sheldrake H M, Searcey M, et al. Chemical and biological explorations of the family of CC-1065 and the duocarmycin natural products. *Curr Top Med Chem*, 2009, 9: 1494–1524
- 70 Huang W, Xu H, Li Y, et al. Characterization of yatakemycin gene cluster revealing a radical *S*-adenosylmethionine dependent methyltransferase and highlighting spirocyclopropane biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 8831–8840
- 71 Wu S, Jian X H, Yuan H, et al. Unified biosynthetic origin of the benzodipyrrole subunits in CC-1065. *ACS Chem Biol*, 2017, 12: 1603–1610
- 72 Welander P V, Doughty D M, Wu C H, et al. Identification and characterization of *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1 hopanoid biosynthesis mutants. *Geobiology*, 2012, 10: 163–177
- 73 Schmerk C L, Welander P V, Hamad M A, et al. Elucidation of the *Burkholderia cenocepacia* hopanoid biosynthesis pathway uncovers functions for conserved proteins in hopanoid-producing bacteria. *Environ Microbiol*, 2015, 17: 735–750
- 74 Damsté J S S, Rijpstra W I C, Dedysh S N, et al. Pheno- and genotyping of hopanoid production in acidobacteria. *Front Microbiol*, 2017, 8: 968
- 75 Hoshino T, Sato T. Squalene-hopene cyclase: Catalytic mechanism and substrate recognition. *Chem Commun*, 2002, (4): 291–301
- 76 Zhong Y, Ji X, Zhang Q. Radical SAM-dependent adenosylation involved in bacteriohopanepolyol biosynthesis. *Chin J Chem*, 2020, 38: 39–42
- 77 Xue X M, Ye J, Raber G, et al. Identification of steps in the pathway of arsenosugar biosynthesis. *Environ Sci Technol*, 2019, 53: 634–641
- 78 Edmonds J S, Francesconi K A. Transformations of arsenic in the marine environment. *Experientia*, 1987, 43: 553–557

- 79 Xue X M, Ye J, Raber G, et al. Arsenic methyltransferase is involved in arsenosugar biosynthesis by providing DMA. *Environ Sci Technol*, 2017, 51: 1224–1230
- 80 Selmer T, Pierik A J, Heider J. New glycyl radical enzymes catalysing key metabolic steps in anaerobic bacteria. *Biol Chem*, 2005, 386: 981–988
- 81 Herring T I, Harris T N, Chowdhury C, et al. A bacterial microcompartment is used for choline fermentation by *Escherichia coli* 536. *J Bacteriol*, 2018, 200: e00764–17
- 82 Horitani M, Shisler K, Broderick W E, et al. Radical SAM catalysis via an organometallic intermediate with an Fe–[5'-C]-deoxyadenosyl bond. *Science*, 2016, 352: 822–825
- 83 Byer A S, Yang H, McDaniel E C, et al. Paradigm shift for radical *S*-adenosyl-*L*-methionine reactions: The organometallic intermediate Ω is central to catalysis. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 8634–8638
- 84 Dong M, Horitani M, Dzikovski B, et al. Organometallic complex formed by an unconventional radical *S*-adenosylmethionine enzyme. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 9755–9758
- 85 Dong M, Kathiresan V, Fenwick M K, et al. Organometallic and radical intermediates reveal mechanism of diphthamide biosynthesis. *Science*, 2018, 359: 1247–1250
- 86 Dong M, Zhang Y, Lin H. Noncanonical radical SAM enzyme chemistry learned from diphthamide biosynthesis. *Biochemistry*, 2018, 57: 3454–3459

Summary for “SAM自由基酶研究进展: 新反应与新机制”

Recent progress in radical SAM enzymes: New reactions and mechanisms

Ning Zhi, Hongji Zhu, Jianjun Qiao & Min Dong*

*Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China** Corresponding author, E-mail: mindong@tju.edu.cn

S-adenosyl-L-methionine (SAM) is the second largest cofactor in the human body, and its metabolism is closely related to various physiological activities. In addition to a methyl donor, SAM is also used by radical SAM enzymes with a [4Fe-4S] cluster to catalyze a series of radical reactions. Since the discovery of this enzyme family, it has been found to play important physiological functions in all kingdoms of life. According to bioinformatics prediction, over 220000 radical SAM enzymes are involved in more than 85 biochemical transformations. Almost all radical SAM enzymes have a conserved CxxxCxxC motif, which coordinates the [4Fe-4S] cluster. The reduced [4Fe-4S] cluster provides an electron to SAM to cleave the C_{5'}adenosine-S bond of SAM and generates a 5'-deoxyadenosine radical (5'-dA·). This radical then grabs a hydrogen atom from the substrate to generate the substrate radical and initiates many different types of reactions. These include thioether crosslinking reactions, radical addition reactions that generate C-C bonds, aliphatic etherification that generates C-O bonds, oxidation reactions, complex rearrangement reactions, methylation, methylthiolation, cyclopropanation reactions and so on. The nonclassical radical SAM enzyme Dph2 cleaves the C_{γ, Met}-S bond of SAM to generate a 3-amino-3-carboxylpropyl radical (ACP radical), which is added to a histidine residue of the substrate protein elongation factor EF2 for dipthamide biosynthesis.

Radical SAM enzymes have a very rich substrate scope, including ribosomally synthesized and posttranslationally modified peptides (RiPPs), proteins, nucleosides and all kinds of small molecules. Classifying by the type of substrate, this review summarizes some of the newly discovered radical SAM enzymes since 2015 and introduces the catalytic mechanism. In addition to new enzymes and reactions, strides have been made in mechanistic studies of radical SAM enzymes in the past several years. Using rapid freeze-quench (RFQ) combined with electron spin resonance spectroscopy (EPR) and electron-nucleus double resonance spectroscopy (ENDOR), researchers have captured and characterized two types of novel intermediates in radical SAM enzymes. These two intermediates are organometallic species with Fe-C bonds formed by the iron-sulfur cluster with the 5'-dA radical and ACP radical, respectively. These findings answer the long-standing question of how enzymes control active organic radical species in radical SAM enzymes and the regioselectivity of SAM cleavage.

Finally, we look forward to the future directions of radical SAM enzymes. As discussed above, radical SAM enzymes catalyze numerous difficult reactions, such as C-H activation and C-C bond formation. New enzymatic reactions with unnatural substrates could be developed with protein engineering. Therefore, natural product analogs could be easily made for drug development. Furthermore, in the radical SAM chemistry, only Dph2 can cleave SAM unconventionally to generate the ACP radical, other than the 5'-dA radical from all the other radical SAM enzymes. Whether there are more enzymes using this mechanism to catalyze the reaction remains unexplored. We expect that more Dph2-like enzymes that can generate ACP radicals will be discovered in the future. Finally, the drawback for almost all the reported radical SAM enzymes thus far is their low efficiency. Protein engineering or other strategies that could increase the stability and efficiency of radical SAM enzymes are in high demand. Only by this means would we expect more widespread use of radical SAM enzymes as biocatalysts in synthetic biology.

radical SAM enzyme, iron sulfur cluster, biosynthesis, catalytic mechanism, radical reactiondoi: [10.1360/TB-2021-1067](https://doi.org/10.1360/TB-2021-1067)