



SAM自由基酶研究新进展

王皓欣^{1†}, 陈晨^{1†}, 董敏^{1,2*}

1. 天津大学化工学院, 天津 300072

2. 合成生物技术全国重点实验室, 天津大学合成生物与生物制造学院, 天津 300072

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: mindong@tju.edu.cn

收稿日期: 2025-06-30; 接受日期: 2025-09-05; 网络版发表日期: 2025-09-26

国家自然科学基金(批准号: 22277088)资助

摘要 S-腺苷甲硫氨酸(*S*-adenosylmethionine, SAM)自由基酶是一类依赖SAM作为辅因子, 通过自由基机制催化一系列生物化学反应的酶家族. 此类酶在自然界中广泛存在, 参与多种重要代谢途径, 包括核酸修饰、辅酶合成、抗生素生物合成等. 其主要核心特征在于利用SAM的还原裂解生成5'-脱氧腺苷自由基(5'-dA•), 进而引发底物的自由基反应. 本文对近年来发表的部分SAM自由基酶所催化的新反应与新机制进行了介绍, 涉及碳-碳键生成、硫醚交联、缩环反应和甲基化等多种反应类型, 展现了SAM自由基酶的强大功能与SAM自由基反应的多样性.

关键词 SAM自由基酶, [4Fe-4S]簇, 自由基反应, 催化机制, 生物合成

S-腺苷甲硫氨酸(SAM)是人体内的一种重要的甲基供体, 在DNA、RNA、蛋白质和多种小分子的甲基化中起关键作用^[1]. Barker等人^[2]在1970年发现, SAM辅助催化赖氨酸2,3-氨基变位酶(LAM)进行赖氨酸的重排反应, 这是首次发现SAM具有甲基化之外的功能. Marcia等人^[3]研究证明, 在LAM催化过程中, SAM产生的5'-脱氧腺苷自由基(5'-dA•)参与了底物的氢原子转移, 证明SAM在自由基重排过程中发挥着和腺苷钴胺素(AdoCbl, 最早发现的参与生物自由基反应的辅因子)相似的作用. 随后在1980~1990年间, 越来越多的研究发现SAM的腺苷部分在多种自由基酶催化过程中起到重要作用, 包括丙酮酸甲酸裂解酶激活酶(PFL-AE)^[4]、核苷三磷酸还原酶^[5]和生物素合酶^[6]等. SAM自由基(rSAM)酶目前已经成为世界上最大的酶超家

族, 至今已有超过100种不同类型rSAM反应被表征^[7].

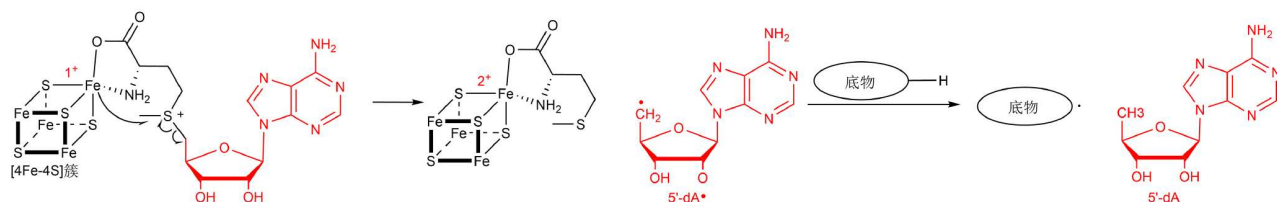
rSAM酶的辅因子[4Fe-4S]簇通常结合在含有三个连续的半胱氨酸基序CX₃CX₂C处, 铁硫簇的三个Fe原子和三个半胱氨酸结合, 另一个Fe与SAM的氨基和羧基配位, 这种配位结构还促进了SAM的S⁺与自由Fe发生轨道重叠. 底物结合在靠近SAM和[4Fe-4S]簇的活性口袋中, 提取的H原子通常位于SAM的5'C周围3~5 Å的范围内^[8,9].

经典的rSAM酶催化循环起始于[4Fe-4S]的还原(图1). rSAM酶通过接受外部电子供体(铁氧还原蛋白、黄素氧还原蛋白或人工添加的还原剂等)的电子, 将[4Fe-4S]²⁺还原为[4Fe-4S]¹⁺; [4Fe-4S]¹⁺再将电子传递给SAM, 使SAM发生还原均裂, 产生甲硫氨酸和5'-dA•, [4Fe-4S]¹⁺失去电子变为[4Fe-4S]²⁺; 5'-dA•通过

引用格式: 王皓欣, 陈晨, 董敏. SAM自由基酶研究新进展. 中国科学: 生命科学

Wang H X, Chen C, Dong M. New advances in radical SAM enzymes (in Chinese). Sci Sin Vitae, doi: 10.1360/SSV-2025-0201

经典SAM自由基酶反应



非经典SAM自由基酶反应

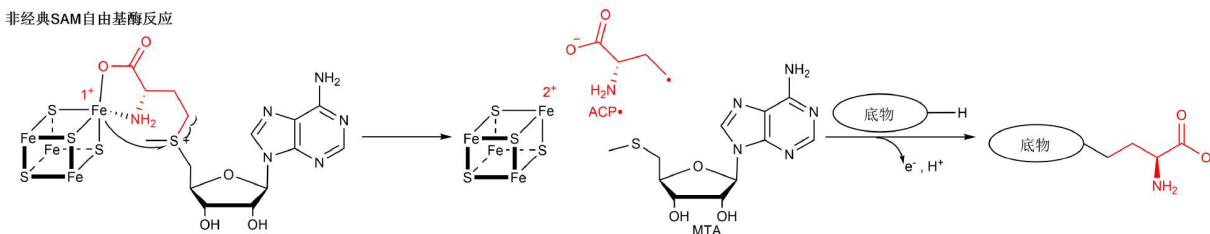


图 1 SAM自由基酶催化的反应

Figure 1 Reactions catalyzed by radical SAM enzymes

从底物位置攫取一个氢原子,生成5'-dAH和底物自由基;随后通过底物自由基引发甲基化、异构化或环化等多种化学转化^[10];反应结束后5'-dAH从活性中心解离,体内可被水解代谢,甲硫氨酸通过甲硫氨酸腺苷转移酶(MAT)重新合成SAM,完成代谢循环。

此外,还有一类非经典的rSAM酶可以催化 $C_{Met}-S$ 键均裂(图1),生成3-氨基-3-羧丙基(3-amino-3-carboxypropyl, ACP)自由基和甲硫腺苷(5'-deoxy-5'-(methylthio)adenosine, MTA)。目前,有两种酶拥有催化这种特殊的切割SAM活性:(i) Dph2在蛋白质翻译延长因子EF2的His残基上进行ACP修饰,[4Fe-4S]簇与蛋白不同结构域中的3个Cys结合,而不是通过常见的 CX_3CX_2C 基序^[11];(ii) ArsL在亚砷酸底物上进行ACP修饰,相较于Dph2, ArsL与大多数rSAM酶一样,通过 CX_3CX_2C 基序结合[4Fe-4S]簇。

近年来,研究者发现了许多新的rSAM酶催化的反应,许多酶的机制也得到了充分的解析。本文按照反应类型介绍近五年来报道的部分rSAM酶催化的新反应和新的催化机理。

1 rSAM酶催化C-C键的形成

C-C键的构建是自然界中最具挑战性的反应之一,这是因为其需要克服高活化能垒,而且天然产物结构复杂,需要精准的控制成键位置和立体构型,很难在

温和的生理条件下通过极性机制进行。rSAM酶通过形成5'-dA•,从底物分子上攫取氢原子,从而形成活性极高的底物自由基(S•)。S•可以跨越反应能垒,通过多种途径构建新的C-C键,包括:S•和不饱和键的直接加成,形成新的C-C键和新的自由基中心;S•引发底物分子的重排(如环化、缩环、碳骨架迁移等),过程中形成新的C-C键;S•和另一个碳中心自由基偶联形成C-C键等^[8]。这些机理在近年来发现的rSAM酶中不断得到验证和补充,从赖氨酸变位中的基团迁移,到吲哚合成中的碳骨架彻底重组,再到环丙烷的构建,都印证了自由基机制在实现热力学挑战性的C-C键构筑中的强大能力^[8,12,13]。

1.1 Gms催化植烷链之间的C-C交联

古细菌(Archaea)是一类广泛分布于极端环境中的微生物,其细胞膜由独特的跨膜脂质构成,这些脂质在适应高温、高压、酸性或厌氧等极端条件中发挥关键作用^[14]。甘油单烷基甘油四醚(monoalkyl glycerol dialkyl glycerol tetraethers, mGDGTs)是古细菌膜脂的主要成分之一,由于其在两条植烷链之间形成额外的C-C键而具有更高的刚性和稳定性。Nguyen等人^[15]鉴定了一种rSAM酶,该酶催化甘油二烷基甘油四醚(glycerol dialkyl glycerol tetraethers, GDGTs)的两条植烷链之间形成 $C(sp^3)-C(sp^3)$ 键,将其命名为mGDGTs合成酶(Gms)。

Gms(表1)的活性在体内与体外实验中均得到验证. 作者将gms导入工程产甲烷菌*Methanococcus maripaludis*体内进行异源表达, 通过UPLC-MS/MS分析发现产物分子量减少2 D, 且二级质谱显示GDGTs植烷链间的断裂碎片消失, 证实了C-C键的形成. 此外, 作者将来自*Methanococcus okinawensis*的重组Gms在*Escherichia coli* BL21(DE3)中异源表达纯化, 在反应体系中加入SAM和还原剂连二亚硫酸钠, 成功催化底物GDGTs转化为mGDGTs.

通过AlphaFold2预测Gms的结构, 发现其含有四个结构域: N-端结构域、rSAM结构域、桥接区域和C-端SPASM结构域. Gms利用rSAM机制激活GDGT末端甲基, [4Fe-4S]¹⁺还原SAM生成高活性5'-dA•, 攫取底物氢形成底物碳自由基, 最终实现跨链C(sp³)-C(sp³)交联这种最具挑战性的反应. 结合EPR波谱, 作者发现Gms中含有三个铁-硫簇, 其中rSAM结构域中的[4Fe-4S]簇负责SAM的还原裂解生成5'-dA•; 此外, 区别于仅含单一rSAM铁硫簇的环化酶GrsA, Gms的两个辅助[4Fe-4S]簇(AuxI和AuxII)通过与底物形成C-S键的方式, 稳定底物自由基中间体, 避免副反应的发生, 为复杂碳链的修饰提供了新的范例.

1.2 TigE催化RiPPs底物的环丙烷化

近年来, 许多研究发现rSAM酶家族中RS-SPASM亚族的酶与核糖体合成翻译后修饰肽(RiPPs)的成熟过程密切相关. Lien等人^[17]通过生物信息学分析确定了大量以前未注释或未探索的潜在新RiPPs类别. 作者挑选了其中一个生物合成基因簇, 该基因簇编码具有重复TIGSVS序列和单个RS-SPASM酶的前体肽TigB(表1).

作者从*Paramaledivibacter aminithermotolerans*中克隆该基因簇中的rSAM酶, 在*E. coli*中异源表达纯化, 并命名为TigE. 通过紫外-可见光谱和EPR波谱分析, 确定TigE中含有三个[4Fe-4S]簇, 其中两个可被连二亚硫酸盐(dithionite, DT)还原, 另一个氧化还原电位低于DT. 随后通过固相合成得到了具有三个TIGSVS序列和一个N-端Trp的截短TigB, 催化结果表明在仅含有DT的还原体系中, TigE无法催化肽段修饰; 但加入黄素氧还蛋白(FlaA)和黄素氧还蛋白还原酶(Fpr)与TigE级联, 就可以通过HRMS观测到有-2, -4和-6 D的产物生成, MS/MS, NMR与¹³C标记实验结果证明,

表1 近五年部分rSAM酶研究总结(本文介绍的酶粗体显示)

Table 1 Studies on radical SAM enzymes in recent 5 years (the enzymes discussed in this article are in bold)

反应类型	酶名称	底物
C-C键生成	Gms ^[16]	甘油二烷基甘油四醚
	TigE ^[17]	Ile
	PFL-AE ^[18]	丙酮酸甲酸裂解酶(PFL)
	Coel ^[19]	1,3,8-三羟基蒽醌
	TYW1 ^[20]	tRNA ^{Phe}
	ZmHpnH ^[21,22]	双盖蒽烯(Diploptene)
	WprB ^[23]	Trp与Arg
	GrsA/B ^[24]	甘油二烷基甘油四醚
碳杂键生成	Tes ^[14]	甘油二烷基甘油四醚
	PapB ^[25]	Cys与Asp间硫醚交联
	SbtM ^[26]	Cys或SeCys环化
	MybB ^[27]	4-噻唑烷酮的硫插入
	DynA ^[28]	Dynobactin A
缩环反应	QueE ^[29]	6-羧基-5,6,7,8-四氢蝶呤(CPH ₄)
	AlsA/AlsB ^[30]	2'-dAMP
	MitD ^[31]	3氨基-5-羟基苯甲酸-氨基葡萄糖 AHBA-GlcN
脱水反应	GD-AE ^[32,33]	甘油脱水酶(GD)
	BlcE ^[34]	胞苷葡萄糖醛酸
异构化	PyIB ^[35]	Lys
C-C键断裂	NirJ ^[36]	12,18-双脱羧血红素
B12依赖的甲基化(氟甲基化)	MpcB ^[37]	棒状孢菌素(clavosporins)前体
	QcmT ^[38]	Gln
	CysS ^[38,39]	氨基苯甲酸盐-CysG1硫酯
	GenD1 ^[38]	庆大霉素 A
	Mmp10 ^[39]	13肽底物
	TokK ^[39]	β-内酰胺底物
	Cxm8 ^[40]	创新霉素前体
	ApyD ^[15]	Tyr
非经典SAM反应	Gmm ^[41]	甘油单烷基甘油四醚
	ArsL ^[42]	亚砷酸

分子量的依次减少表示三个TIGSVS序列中分别发生了1, 2和3个Ile残基环丙烷化修饰.

该反应通过硫-碳中间体机制进行(图2): 还原态的[4Fe-4S]¹⁺将电子传递给SAM, 引发5'C-S键均裂, 生成5'-dA•和甲硫氨酸; 5'-dA•攻击异亮氨酸乙基侧链的C_{γ1}-H, 攫取氢原子生成5'-dAH和Ile-C_{γ1}•, Ile-C_{γ1}•攻击辅助[4Fe-4S]簇的硫原子, 形成簇-底物硫醚键共价

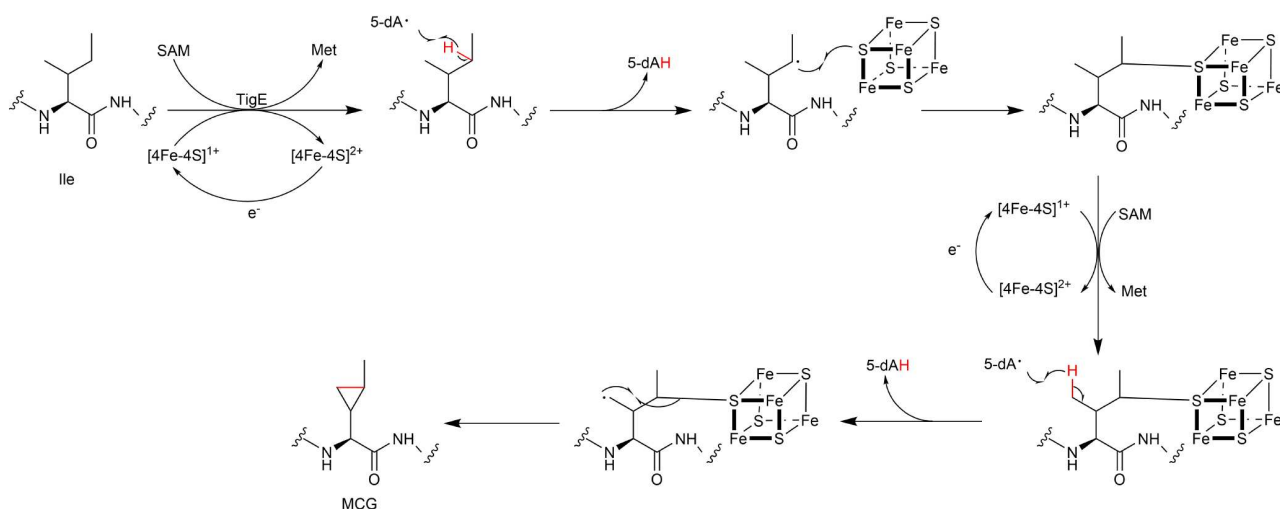


图2 (网络版彩图)TigE催化机制

Figure 2 (Color online) Catalytic mechanism of TigE

中间体; 随后另一分子SAM裂解生成新5'-dA•, 对同一异亮氨酸的烯丙基侧链C_{γ2}-H进行第二次氢原子攫取, 生成Ile-C_{γ2}•; Ile-C_{γ2}•攻击硫-碳键, 引发电子回流至辅助[4Fe-4S]簇, 同时形成C_{γ1}-C_{γ2}键, 释放H₂S并生成环丙烷产物甲基环丙基甘氨酸(2-(methylcyclopropyl)glycine, MCG)。

此前, 所有已知rSAM酶催化环丙烷形成均需耦合C-甲基化反应, TigE的发现首次证明存在独立的环丙烷基合成途径, 仅通过C-C键形成即可将Ile直接转化为MCG, 无需甲基供体。此外, 通过序列相似性网络鉴定出了一个新的环丙烷合成酶亚家族, 其中与辅助[4Fe-4S]簇配位相关的GYW基序在25%~98%同源性的48个同源酶中严格保守, 表明该酶家族可能在微生物中广泛存在且功能专一。

1.3 CoeI催化蒽醌的甲基化

芳香聚酮化合物具有复杂的化学结构和广泛的生物活性, 包括抗菌、抗肿瘤、免疫抑制等药理作用, 其生物合成主要由II型聚酮合酶(PKS-II)介导^[43]。HemN-like酶是rSAM超家族中的一个亚族, 最初被发现参与血红素合成中的氧化脱羧反应, 近年来逐渐被发现还有环丙烷化功能^[44]。

Nie等人^[19]从土壤样本中的总DNA中筛选出编码PKS-II的基因簇COE, 其中包含13个基因, 涉及聚酮骨架合成(*coeA*, *coeB*)、修饰(*coeI*)及转运(*coeM*)等功能。

其编码的修饰蛋白CoeI(表1)属于HemN亚族, 通过基因敲除实验间接证明CoeI负责催化底物1,3,8-三羟基蒽醌的C2-甲基化, 生成产物2-甲基-1,3,8-三羟基蒽醌。此后又将CoeI在*E. coli*中异源表达纯化, 通过体外实验直接监测到了甲基化产物的生成。AlphaFold预测CoeI结构包含N-端rSAM结构域, 可以结合一分子[4Fe-4S]簇和两分子SAM, 还包含一个C-端结构域, 通过Lys16与Thr-427同底物上的羟基形成氢键来结合底物。反应首先通过一分子SAM在[4Fe-4S]¹⁺的帮助下产生5'-dA•(如图3), 5'-dA•攫取另一分子SAM上S-CH₃的氢原子; 新形成的SAM亚甲基自由基与底物进行加成, 重排后形成烯烃产物并释放一分子SAH; 烯烃产物经历还原、质子化与重排过程生成最终的甲基化产物。

2 rSAM酶催化碳杂键的形成

RiPPs是一类具有结构多样性的天然产物。这类多肽经核糖体生物合成后, 通过翻译后修饰机制引入功能与生物学多样性^[45,46]。一般来说, RiPPs生物合成从前体肽的翻译后修饰开始, 前体肽通常由N端前导区与C端核心区两个特征性结构域组成^[45]。核心区(或核心肽)是翻译后修饰发生的地方, 前导肽则为许多翻译后修饰酶提供结合亲和力, 并在生物合成过程中的某个时间点被去除^[47]。十余年来, rSAM酶被证实广泛参与RiPPs天然产物的多种修饰, 可催化许多化学挑战性

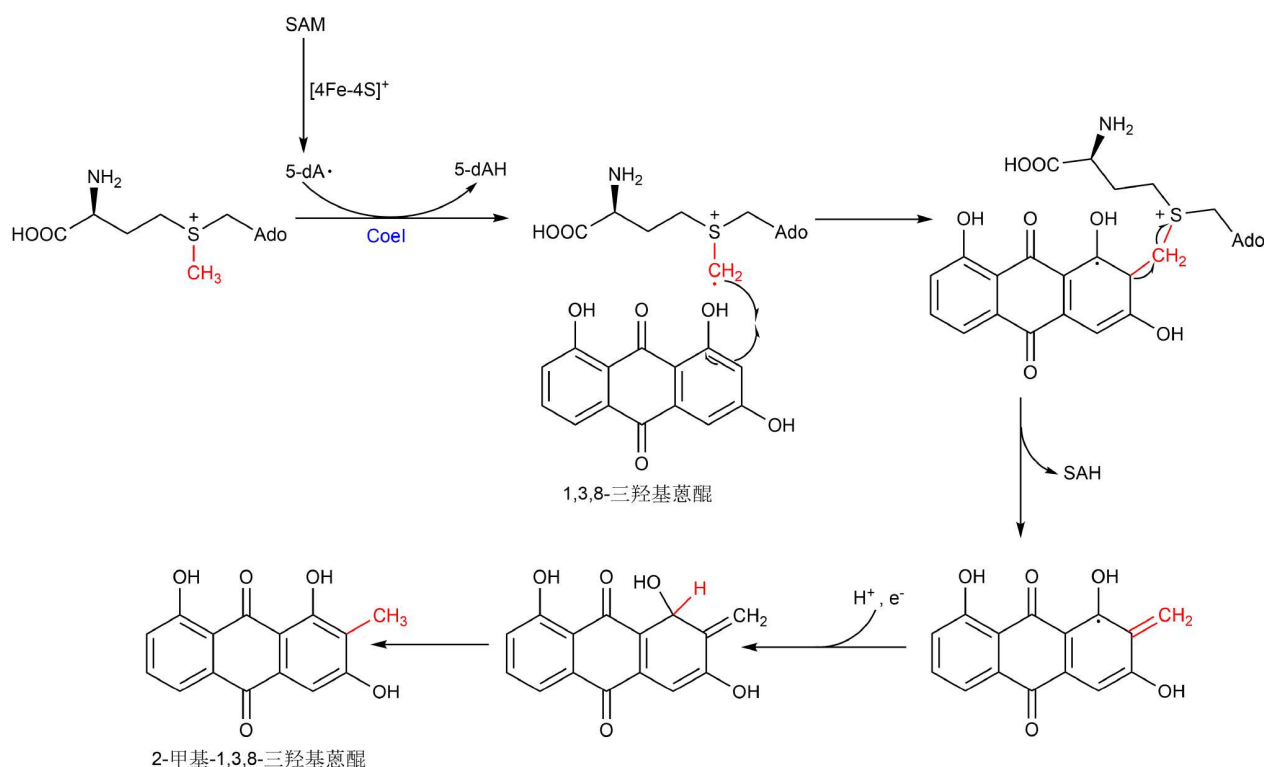


图3 (网络版彩图)CoeI催化机制

Figure 3 (Color online) Catalytic mechanism of CoeI

反应, 包括在非活化碳中心实现C-O^[48,49], C-S^[50-54]等碳杂键的构建. 下面介绍部分在RiPPs天然产物生物合成中催化碳杂键形成的rSAM酶.

2.1 PapB催化的硫醚交联反应

Ranthipeptides是一种RiPPs类天然产物, 其生物合成基因簇的典型特征包括富含半胱氨酸的前体肽及能够在半胱氨酸供体残基与受体残基间催化硫醚键形成的rSAM酶^[53]. 尽管其与含有硫- α -碳硫醚键的硫醚肽(sactipeptides)存在表观相似性, 但自由基非 α -碳硫醚肽生物合成相关的rSAM酶能够在受体残基的非 α -碳位点(β -或 γ -碳)引入硫醚修饰^[53,55]. PapB(表1)是一种负责催化RiPPs成熟的rSAM酶, 其功能为催化PapA多肽中六个硫醚交联的构建^[56]. PapB通过从非活化C-H键转移氢原子启动催化反应, 随后形成C-S键生成硫醚交联.

Vahe Bandarian团队^[57]通过使用硒代半胱氨酸(SeCys)取代交联位点的半胱氨酸(Cys), 详细探讨了PapB的催化机制. Cys硫醇盐和未活化的C-H键之间

形成硫醚键需要双电子氧化. 在PapB催化的硫醚交联反应中, PapB对SAM的还原裂解促进了第一个电子的失去, 这一过程产生的5'-dA•开启氢原子转移. PapB具有三个[4Fe-4S]簇^[58], 除了与SAM配位的铁硫簇, 辅助铁硫簇可能在第二步硫醚键形成, 失去第二个电子时发挥作用. 辅助铁硫簇通过Fe原子与Cys残基配位, 并用于接受硫醚键产生时失去的电子. PapB催化非 α -碳位点硫醚交联的机制如图4所示^[57].

同时, 该课题组还利用含单一交联基序的最小底物探究了PapB酶的底物适应性^[58], 并表明该酶不仅具有高度混杂性, 可接受多种Cys-X_n-Asp序列($n=0\sim6$), 还对肽底物的变化具有很高的耐受性^[26]. 值得注意的是, PapB对半胱氨酸或天冬氨酸位点被D-氨基酸取代的肽链仍具有催化活性. 基于上述特性, 研究人员通过Cys-Glu硫醚交联替代原药物中的二硫键, 成功构建了FDA批准药物奥曲肽的硫醚环化类似物. 在Cys硫醇盐和未活化的C-H键之间形成硫醚键是一个具有挑战性的问题, 未活化的C-H键反应性低, 而硫醇盐既可以作为亲核试剂也可以作为还原剂, 因此在化学上比

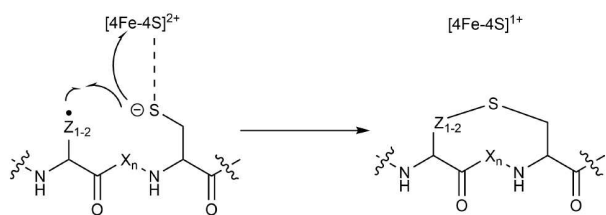


图4 PapB催化机制

Figure 4 Catalytic mechanism of PapB

较难实现,而PapB可以作为一个强有力的酶催化工具实现这类反应,并且具有卓越的底物兼容性,该酶在开发新型肽类药物中有很大的应用前景。

2.2 SbtM催化含噻唑RiPPs天然产物的形成

SAM自由基肽成熟酶基因通常与编码假定肽底物的开放阅读框(ORF)以及编码合成完整天然产物所需的其他修饰蛋白基因共簇存在。Haft和Basu^[59]曾通过调查细菌基因组,鉴定出若干潜在RiPPs基因簇,这些基因簇至少编码一种rSAM酶和一个假定肽底物。Vahe Bandarian团队^[27]表征了*Geobacter lovleyisbtm*基因编码的一种rSAM酶SbtM(表1),并成功实现该酶与Haft和Basu报道的一个含有53个氨基酸肽底物之间的反应,该底物被视为SbtM的最小底物。

SbtM催化最小肽底物中Cys/SeCys残基的环化,在含半胱氨酸的肽中引入硫代噻唑结构单元。由SbtM催化的反应可能是第一个表征的含SeCys的修饰RiPPs

天然产物。肽底物包含首个硒代半胱氨酸(SeCys)位点,且在SeCys之后保留了该家族其他成员中保守的氨基酸序列,但去除了高度可变区。定点诱变研究显示,虽然该位点可耐受SeCys和Cys,但替换为丙氨酸(Ala)或丝氨酸(Ser)则无法被转化。环化是通过从Cys的β-碳中去除两个氢原子、从Cys酰胺氮中去除一个氢原子和从肽的α-碳中去除一个氢原子来完成的。

SbtM的催化机制如图5所示。生化研究表明, SbtM含有至少两个[4Fe-4S]簇,其中一个由保守的rSAM酶半胱氨酸基序协调^[60],通过类比其他包含SPASM结构域的rSAM酶^[61-63],剩余的辅助铁硫簇之一可能在活性位点的底物附近并参与反应,而另一个辅助铁硫簇可能起电子传递作用。反应由5'-dA•攫取第35位Cys/SeCys的β-碳H原子开启,随后底物自由基中间体被辅助铁硫簇氧化,形成硫代甲酰甘氨酸。该硫代甲酰甘氨酸中间体通过羰基氧的参与发生环化反应,同时伴随着5'-dA•攫取酰胺氮的氢原子过程。生成的O,S-缩醛通过一个来自第35位半胱氨酸残基β碳的氢原子转移被氧化为硫酮基团,随后进行第二次氧化。该硫酮中间体通过互变异构化反应最终生成稳定的芳香硫代噻唑。SbtM是首个报道能够催化含硒代半胱氨酸(SeCys)多肽转化的rSAM酶,并为含噻唑环的RiPPs的生物合成提供了新范例。

2.3 DynA催化抗生素Dynobactin A的形成

由于抗生素的大量使用,细菌耐药性已成为人类

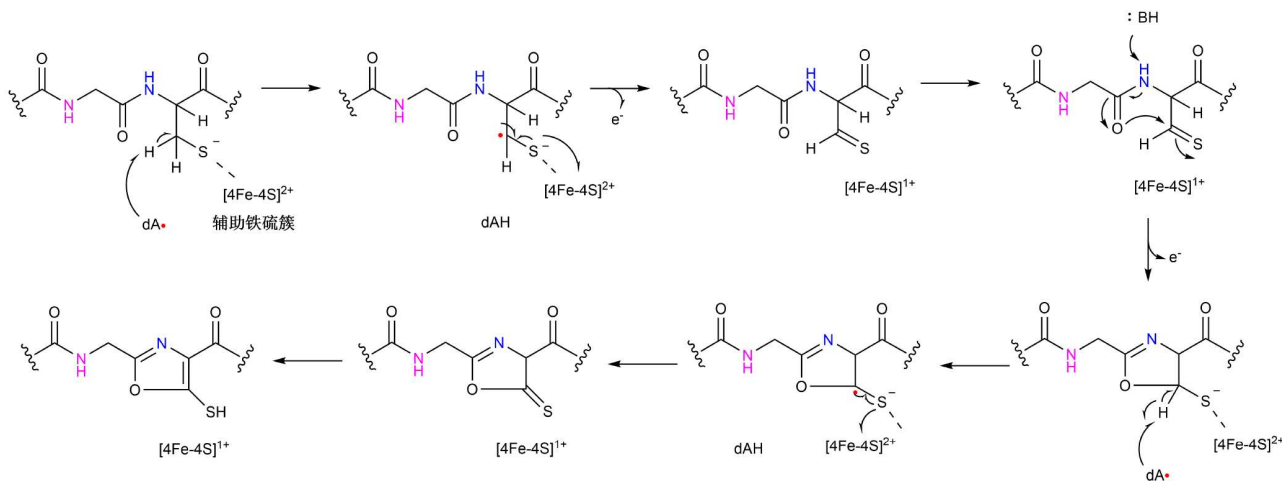


图5 (网络版彩图)SbtM催化机制

Figure 5 (Color online) Catalytic mechanism of SbtM

的健康挑战. RiPPs丰富的结构多样性和生物活性使得该类天然产物在对抗多重耐药病原体的新型药物中的应用引起了广泛关注. 最引人瞩目的RiPPs类天然产物发现之一是Lewis团队^[48]于2019年鉴定的Darobactin. 基于Darobactin的发现, Lewis团队^[64,65]通过筛选与Darobactin生物合成基因簇有亲缘关系的基因, 鉴定了另一种靶向BamA的新型RiPPs抗生素Dynobactin A. Dynobactin A是一种RiPPs抗生素, 对革兰氏阴性菌表现出强效活性.

Dynobactin A的特征在于其双环骨架结构: 色氨酸1(Trp1)与天冬酰胺4(Asn4)之间的碳-碳(C-C)交联, 组氨酸6(His6)与酪氨酸8(Tyr8)之间高度独特的N-C交联. rSAM酶DynA(表1)被推测作用于前体肽DynB, 催化Dynobactin A双环骨架的形成^[64]. 张琪团队^[28]通过结合体内共表达和体外测定证明了rSAM酶DynA催化Dynobactin A双环骨架的形成. DynA催化以逐步方式进行, 其中N-C交联先于C-C交联形成. 高度独特的N-C交联的形成通过源自Tyr8的对醌甲基化物(para-quinone methide, pQM)中间体实现, 这是rSAM酶学领域的一种全新机制. DynA催化机制如图6所示. N-C交联、C-C交联分别是由5'-dA•攫取Tyr8上的氢原子和Asn4上的氢原子, 形成底物自由基开启反应.

通过对前体肽DynB的定点突变分析发现, DynA具有底物特异性, 但在第4位天冬酰胺残基处表现出适度灵活性. 值得注意的是, DynB的H6Y突变体可形成完整的双交联结构, 而H6W突变体则特异性生成C端的色氨酸-酪氨酸(Trp-to-Tyr)交联. 这些发现凸显了rSAM酶超家族的多功能性, 证明了DynA在RiPPs生物合成中催化N-C交联的关键作用.

3 催化缩环反应的rSAM酶

3.1 QueE催化含7-脱氮嘌呤的天然产物生物合成

rSAM酶QueE(表1)催化含7-脱氮嘌呤的天然产物生物合成中一个关键的自由基介导环收缩步骤. 其催化循环始于5'-dA•攫取6-羧基-5,6,7,8-四氢蝶呤(6-carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin, CPH₄)C-6位的氢原子, 随后通过自由基介导的重排反应生成7-羧基-7-脱氮鸟嘌呤(7-carboxy-7-deazaguanine, CDG), 并再生SAM^[66-70], 催化过程如图7所示. 据推测, 该反应最初生成的是一个gem-胺基羧酸盐中间体, 随后该中间体通过立体选择

性去质子化并脱去氨分子, 最终形成产物CDG.

rSAM酶的[4Fe-4S]簇从+2价还原到+1价时, 铁硫簇促进配位的SAM辅因子的裂解, 生成5'-dA•和L-甲硫氨酸, 通常5'-dA•从底物中攫取H原子以开始催化循环^[71]. 在底物缺失及处于还原条件下, rSAM酶会催化SAM无效裂解生成5'-dA•, 且与产物生成呈解偶联关系^[72]. 和其他rSAM酶类似, QueE同样催化SAM的无效裂解, 当使用C-6氘代CPH₄作为底物时, 形成一组未标记的脱氧腺苷证明了这一点^[68]. Vahe Bandarian团队^[29]以rSAM酶QueE为模型, 系统解析了催化条件下脱氧腺苷的生成机制. 实验证据表明, 催化过程中观察到的脱氧腺苷来源于多重支路途径, 其中催化起始阶段用于SAM还原裂解的还原系统可诱导初始底物自由基的还原淬灭, 该过程是脱氧腺苷的形成途径之一. 这些研究发现对rSAM酶超家族具有普适性启示, 在选择rSAM酶催化所需的还原系统时要考虑如何避免因还原系统导致的支路途径, 以免影响催化效率.

3.2 AlsB和AlsA催化天然产物Albucidin的生物合成

rSAM酶可以介导底物的复杂重排, 部分原因是其催化产生的特征自由基中间体不稳定^[73]. 在某些情况下, 这些重排会生成不寻常的化学结构, 例如在巨型芽孢杆菌NK84-0128产生的oxetanocin A(OXT-A)中观察到的四元氧杂环丁烷环^[74]. 钴胺依赖的rSAM酶OxsB与磷酸水解酶OxsA催化2'-脱氧腺苷 5'-磷酸盐(2'-deoxyadenosine 5'-phosphate, 2'-dAMP)呋喃糖环氧化收缩成氧杂环丁烷醛, 最终伴随OXT-A中的氧杂环丁烷环的形成^[75]. 与OXT-A紧密相关的抗病毒及除草天然产物Albucidin, 最初作为OXT-A的合成类似物被制备^[76], 直至后续研究发现其本身即为白色链霉菌亚种NRRL B-24108产生的天然产物^[77].

由于OXT-A和Albucidin的结构相似性, 两者可能通过类似酶学机制合成, 然而Albucidin缺乏C2'羟甲基基团. 因此, 如果OXT-A和Albucidin的生物合成具有相似的起点, 那么后者除了氧杂环丁烷环的形成外, 还必须涉及一碳单元消除这一关键步骤. 刘鸿文团队^[30]在链霉菌中鉴定了Albucidin生物合成基因簇. 非生产菌株的异源表达证明了基因alsA和alsB对于Albucidin生物合成是必要且足够的. 体外催化显示从2'-dAMP起始通过两个步骤构建Albucidin的4'-磷酸盐, 钴胺素依

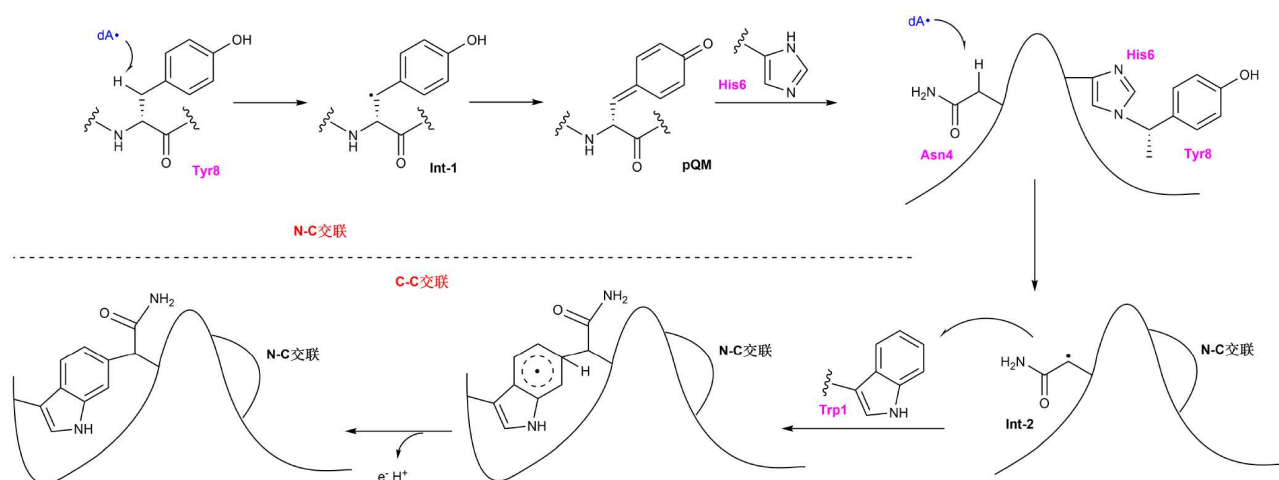


图 6 (网络版彩图)DynA催化机制

Figure 6 (Color online) Catalytic mechanism of DynA

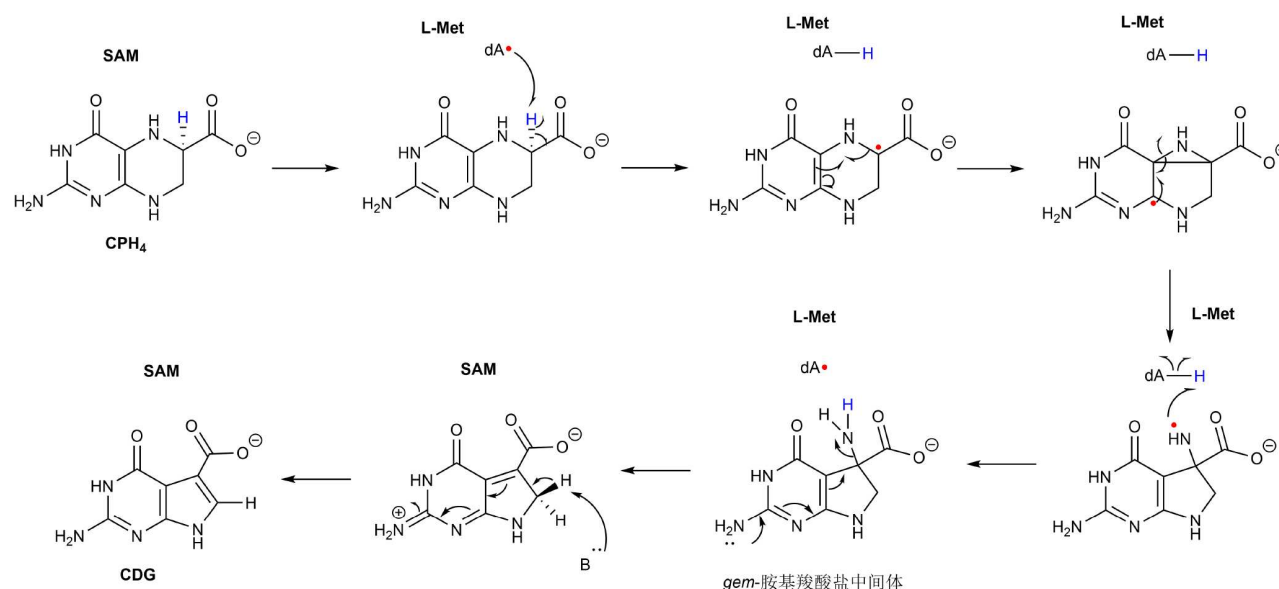


图 7 (网络版彩图)QueE催化的缩环反应

Figure 7 (Color online) Ring contracting reaction catalyzed by QueE

赖的rSAM酶AlsB催化环收缩, rSAM酶AlsA(表1)催化一碳单元的消除。AlsB和AlsA催化的反应如图8所示, AlsB(表1)催化生成的中间体(P-I)有待表征, 推测P-I是一种不稳定的含氧杂环丁烷的化合物。同位素标记研究表明, AlsB的催化同样始于5'-dA•攫取2'-dAMP的C2'-*pro-R*氢原子, 而被消除的一碳单元来源于2'-dAMP的C3'。该研究解释了Albucidin中氧杂环丁烷的形成以及一碳单元的消除过程, 并成功实现AlsB和

AlsA的体外催化反应, 为Albucidin生物合成提供了新见解。

3.3 MitD参与丝裂霉素生物合成的关键酶促步骤

丝裂霉素(Mitomycins)是一类结构相似天然产物, 具有显著的抗肿瘤与抗菌活性^[78]。其分子核心为高度官能团化的致密多环体系, 该结构脆弱且易在低pH及还原条件下被激活, 因此丝裂霉素的抗肿瘤抗菌

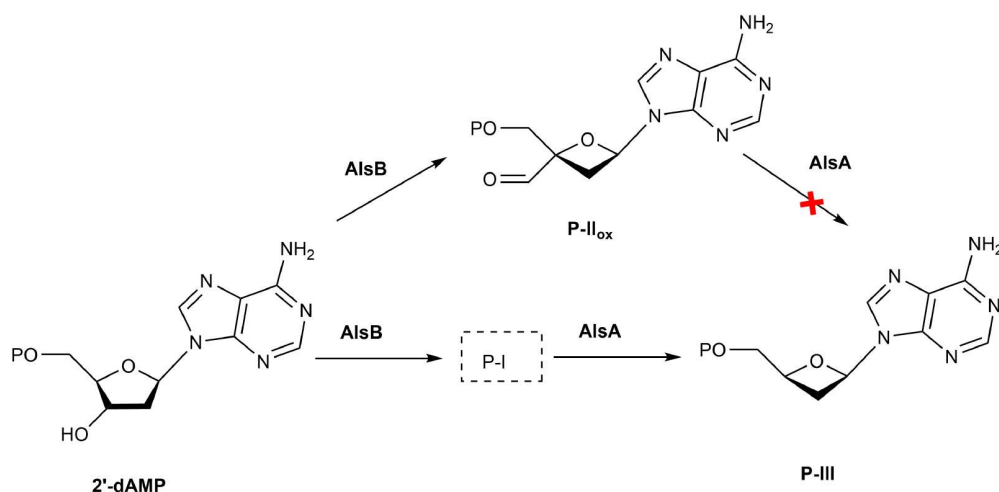


图 8 (网络版彩图)AlsB和AlsA催化的反应
Figure 8 (Color online) Reaction catalyzed by AlsB and AlsA

功能源于其能够作为强效烷基化试剂, 并且在缺氧细胞中引发DNA交联^[79-81]. 在丝裂霉素家族中, 丝裂霉素C因其吡啶并吡咯并氮丙啶骨架所组合成的特征6/5/5/3稠环而具有特殊重要性, 自20世纪70年代起即被用于临床肿瘤化疗^[82].

众所周知, 丝裂霉素的生产依赖于链霉菌菌株发酵条件的控制^[83], 然而丝裂霉素具体的生物合成过程研究较少. 早期对丝裂霉素生物合成的研究利用同位素标记实验阐明丝裂霉素生物合成的前体^[84,85], 分别是3-氨基-5-羟基苯甲酸(3-amino-5-hydroxybenzoic acid, AHBA)、D-氨基葡萄糖(D-glucosamine, GlcN)、瓜氨酸和SAM. 自丝裂霉素的生物合成基因簇被报道以来^[86], 三个甲基转移酶MitM, MitN和MmcR被表征^[87-89], AHBA和GlcN的辅酶形式UDP-GlcNAc在酰基载体蛋白上的偶联被证明^[90], 但丝裂霉素稠环构建的酶学机制未被详细报道.

刘文团队^[31]通过开发一种用于追踪共价结合于酰基载体蛋白MmcB上的丝裂霉素中间体的方法, 系统解析了AHBA与GlcN复合物形成及加工的机制: NADPH依赖的还原酶MitF负责载体蛋白底物的AHBA-GlcN单元还原为线性氨基糖, rSAM酶MitD(表1)利用其均裂SAM产生的5'-dA•攫取底物H原子, 启动自由基介导的氧化还原中性脱水过程, 最后通过单电子还原淬灭环氧化物中间体得到末端含有环氧乙基的线性氨基糖产物, 催化过程如图9所示. 该研究阐明了丝裂霉素生物合成途径中形成和加工N-糖苷AHBA-

GlcN的关键酶促步骤, 为合成生物学领域具有临床应用潜力的稠环体系的设计与开发提供了关键理论支撑.

4 B12依赖的rSAM酶催化的甲基化反应

除了以上介绍主要依赖SAM和铁硫簇的酶, 另一类重要的rSAM酶还涉及另一辅因子维生素B12(cobalamin). B12的核心结构是一个含Co的咕啉环, 其上下两侧各有一个配体与Co配位, 上配体为可变基团, 直接影响B12的化学和生物学特性, 可为氰基、甲基、羟基或腺苷; 下配体是一个含氮碱基——5,6-二甲基苯并咪唑(5,6-dimethylbenzimidazole, DMB), 该碱基通过核苷酸侧链与咕啉环相连^[91]. B12依赖的SAM自由基甲基转移酶(B12-RSMT)结合了B12, SAM和铁-硫簇的催化能力, 可以高效进行复杂的化学转化, 包括形成C-C, C-S, C-P键, 并导致后续的分子内重排、硫醚键形成以及自由基和非自由基介导的甲基化^[91].

TsrM^[92], TokK^[93]和Mmp10^[75]三种B12-RSMT的结构被鉴定出来, 它们均含有一个结合B-12的N-末端Rossmann折叠结构域、一个SAM和铁-硫簇结合的rSAM结构域和一个灵活的C-末端结构域. 在反应过程中, B-12会用活性位点附近的His来替换下方的DMB配体, 形成base-off和His-on构象来稳定Me-Cob(III)alamin; 在甲基转移完成后, Cob(III)被还原为Co(I), 并形成base-off和His-off构象^[14]. 不同的B12-RSMT之间,

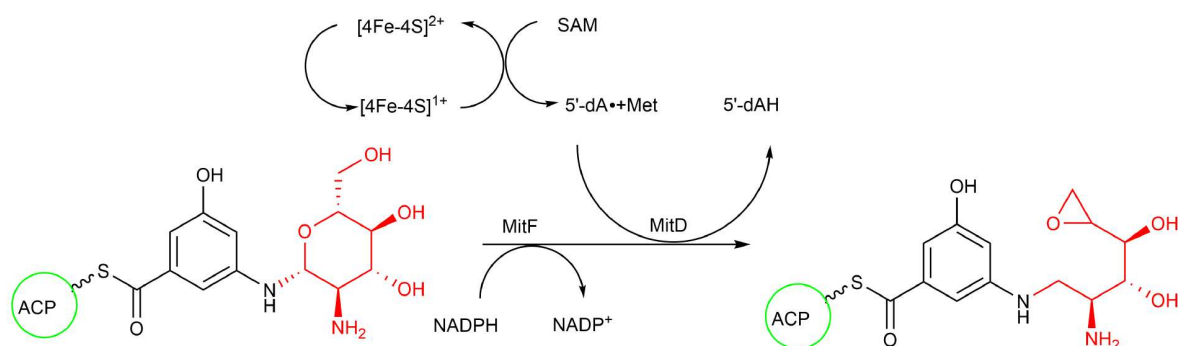


图9 (网络版彩图)AHBA-GlcN合成途径

Figure 9 (Color online) Synthesis pathway of AHBA-GlcN

活性口袋内SAM、Fe-S簇、B12和底物的方向存在显著差异, 这些构象变化累积起来, 使得酶拥有了特异的催化活性。

4.1 Cxm8/Cxm9复合物催化的甲基化反应

创新霉素(chuangxinmycin, CXM)是从放线菌*Actinoplanes tsinanensis*中分离得到的一种吡啶类生物碱类抗生素。最近, 有研究证明CXM及其3-去甲基前体(dmCXM)对多种耐药的结核分枝杆菌临床分离株具有活性^[94]。

来自*A. tsinanensis*的蛋白Cxm8(表1)可以通过B12依赖的SAM自由基机制, 以区域和立体选择性的方式催化dmCXM中间体的惰性C3-甲基化^[40]。特殊的是, Cxm8不能单独完成催化, 需要结合一个必需的双结构域伴侣蛋白Cxm9(表1)。Cxm9不仅可以增加Cxm8的溶解性和稳定性, 还可以利用其N-端结构域对Cxm8的结构进行补充, 形成完整的SAM结构域来完成催化。

Cxm8/Cxm9复合物是所有已知的B12-RSMT中首个依赖伴侣蛋白的实例, 打破了以往对于rSAM酶“单组分自足”的认知。不同于常见的CX₃CX₂C形式, Cxm8还有着特殊的[4Fe-4S]簇结合基序CX₇CX₂C, 其C端结构域类似于RiPPs识别元件PqqD, 表明其可能起源于肽类修饰系统, 有识别更广泛底物的潜力。

与已知的B12-RSMT类似, Cxm8/Cxm9复合物可以利用还原态的[4Fe-4S]¹⁺提供电子进行还原性SAM裂解, 在活性位点产生5'-dA•。该自由基从dmCXM骨架中攫取一个氢原子, 形成C3-自由基, 然后与甲基供体MeCbl反应, 立体选择性地生成具有R构型的C3-甲基, 生成CXM。同时, [4Fe-4S]²⁺和Cob(II)alamin通过

还原剂进行还原反应循环(如图10)。当直接用C3-甲基化之后的CXM做为底物, Cxm8/Cxm9还可以继续催化生成C3-二甲基化的产物。

4.2 ApyD催化酪氨酸β-甲基化

RiPPs是一个庞大的天然产物家族, 具有多种分子支架。核糖体前体肽通常含有一个N-末端前导区, 用于集合修饰酶, 而C-末端核心区接受翻译后修饰。

Nguyen等人^[15]利用RiPPs前体识别元件(RRE)作为生物标志物, 从*Burkholderia thailandensis* E264的基因组中筛选出了一个独特的生物合成基因簇(命名为*apy*)。该基因簇编码前体肽AypA以及四种修饰蛋白: 多核非血红素铁的氧化酶ApyHI, B12-RSMT酶ApyD(表1), 细胞色素P450酶AypO和甲基转移酶AypS。

作者分别在*E. coli*和*Burkholderia* sp. FERM BP-3421中异源表达目标基因, 解析了各酶的功能: ApyD催化前体肽中酪氨酸的β-碳甲基化, 生成(2S,3R)-β-甲基酪氨酸; ApyO催化Tyr-Leu-Tyr序列中两个酪氨酸残基的苯环发生C-C双芳基交联; ApyHI将C-端天冬氨酸氧化为氨基丙酮酸; ApyS催化氨基丙酮酸的β-甲基化, 生成(S)-3-氨基-2-氧代丁酸。此外, 还发现ApyD的甲基化与AypO的双芳基交联可独立进行, 但ApyHI的氧化必须在双芳基交联完成后进行, 且在宿主*Burkholderia*中, 各酶活性都显著高于*E. coli*, 推测该修饰途径可能还受其他蛋白影响。

ApyD是首个靶向芳香族侧链β-碳的B12-RSMT, 拥有高度的立体专一性, 仅生成2S, 3R构型产物, 其与AypO的协同也提供了不同金属酶修饰同一肽链的新的实例, 为复杂天然产物合成路线的设计提供了新的参考。

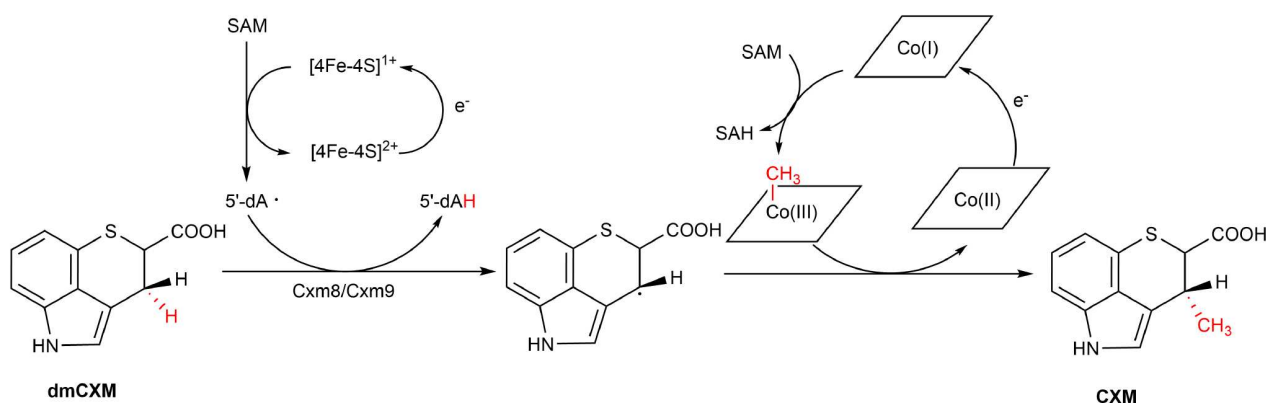


图 10 (网络版彩图)Cxm8/Cxm9催化机制

Figure 10 (Color online) Catalytic mechanism of Cxm8/Cxm9

4.3 QCMT, CysS, GenD1催化的氟甲基化反应

除了天然的甲基化反应, 研究人员还利用此类酶来开发非天然反应. 含氟官能团的引入可以有效提高原有化合物的活性和生物利用度, 在药物和农药中起着重要的作用. 目前, 20%的药物和30%~40%的农药都是含氟的化合物^[95]. 来自嗜热产甲烷菌(*Methanoculleus thermophilus*)中的谷氨酰胺C-甲基转移酶QCMT(表1)是一种B12-RSMT, 负责催化甲基辅酶M还原酶(MCR)中谷氨酰胺残基的C_α-甲基化^[96]. 同时, 数项研究已经证明rSAM酶可以耐受SAM类似物, 例如, 赖氨酸2,3-氨基变位酶(LAM)可以接受Se-腺苷-L-硒代甲硫氨酸(AdoSeMet); QCMT和HydG接受S-腺苷-L-乙硫氨酸(SAE); NosN接受异丙基-SAM(allyl-SAM)等.

本课题组^[38]发现, QCMT可以耐受含氟的SAM类似物(F-SAM), 切割F-SAM产生5'-dA•. 由于F-SAM非常不稳定, 半衰期小于1 h, 因此采用Ac/HMT催化SAH和CH₂FI生产F-SAM, 并与QCMT级联, 使用源自MCR α 亚基的肽PS24(ptmmedhfggsqr-agviaaasgls)作为底物, 通过添加还原剂柠檬酸铁或连二亚硫酸钠来引发反应, 成功监测到+32 D的产物产生; 并通过HR-MS检测到胰蛋白酶消化后的产物, 确认氟甲基被修饰在谷氨酰胺残基的 α -C上.

该反应机理如图11所示^[38], QCMT还原裂解F-SAM产生5'-dA•, 该自由基攫取底物肽的H原子, 产生底物自由基. 此外, Cob(III)alamin被还原为Cob(I)alamin, 然后进攻CH₂FI形成CH₂FCbI, CH₂FCbI与底物自

由基发生自由基取代, 生成氟甲基产物和Cob(II)alamin. 然后Cob(II)alamin再次被还原为Cob(I)alamin, 继续进行下一个催化循环.

此外, 该氟甲基化策略被成功应用于其他B12-RSMT^[38]: (i) Ac/HMT级联CysS催化底物氨基苯甲酸盐-CysG1硫酯生成(R)-S-泛亚醇-4-氨基-3-氟乙氧基苯并硫代酸酯; (ii) Ac/HMT级联GenD1催化庆大霉素A的C4''-氟甲基化生成氟代庆大霉素X₂.

传统化学方法进行惰性碳中心的氟甲基化需要强氧化剂与高温等严苛条件, 而此前发现的酶促氟甲基修饰仅限于氧、氮或硫等亲核位点, 以上研究首次实现酶促惰性碳的氟甲基化. F-SAM的应用证明B12-RSMT有接受氟代SAM类似物的能力; 同时CH₂FCbI作为首个酶促生成的氟代钴胺素, 也为设计其他烷基钴胺素类似物提供了新的思路.

5 肿丝菌素生物合成关键酶ArsL催化的非经典反应

砷是自然界中广泛分布的有毒类金属, 主要以无机砷的形式存在, 例如亚砷酸盐(III)和砷酸盐(V), 它们是环境中的有毒污染物^[97]. 虽然具有毒性, 但无机砷已成功用于治疗人类各种疾病^[98,99]. 细菌将无机砷转化为有机化合物甲基砷、二甲砷^[100]、三甲砷和砷糖^[101]及其衍生物^[102], 以此来解毒. 研究人员发现并鉴定了一种由水稻根际细菌产生的新型有机砷抗生素肿丝菌素(arsinothricin, AST)^[103]. AST作为抗生素可

以抑制分枝杆菌生长,此外,AST对碳青霉烯类耐药阴沟肠杆菌的生长也具有显著抑制作用,AST能同时有效抑制这两种细菌,说明其可作为开发抗耐药病原体新型抗菌药物的先导化合物^[104]。因此,AST生物合成的进一步研究以及高效制备是很有必要的。

胍丝菌素生物合成涉及两个步骤,第一步是将ACP基团以自由基形式从SAM转移到亚砷酸,实现C-As键构筑生成AST-OH(III)。第二步是SAM依赖的甲基转移酶ArsM对AST-OH(III)进行甲基化以生成AST(III),AST(III)很容易被空气氧化形成AST,胍丝菌素生物合成途径如图12所示。本课题组^[42]成功在体外重现AST的生物合成,并表征了rSAM酶ArsL(表1)。ArsL包含CX₃CX₂C基序,因此被归于rSAM酶超家族,该家族成员裂解SAM并产生5'-dA•,但本课题组发现

ArsL切割SAM的C_{Met}-S键并产生类似于Dph2切割SAM生成的ACP自由基。Dph2是一种参与白喉酰胺生物合成的非经典rSAM酶。由于Dph2不包含CX₃CX₂C基序,因此ArsL是一种非常独特的rSAM酶。ArsL在C端序列中具有保守的RCCLKC基序,属于含有RCCLKC尾部的SAM自由基蛋白亚家族。通过截短和诱变实验,发现该基序在与底物亚砷酸的结合中起重要作用,并且对蛋白活性非常重要。后续张琪团队^[105]以农业常用除草剂甲基砷酸盐为起始原料,通过一锅化学酶联法合成AST,还发现尽管ArsL酶C端区域的单点突变使其对天然底物无机亚砷酸盐的活性完全丧失,但该突变使酶对甲基砷酸盐的催化活性提升超过50倍,使得在无细胞系统中可以实现亚克级AST合成。这些结果表明,rSAM酶ArsL是目前该酶家族中较为特

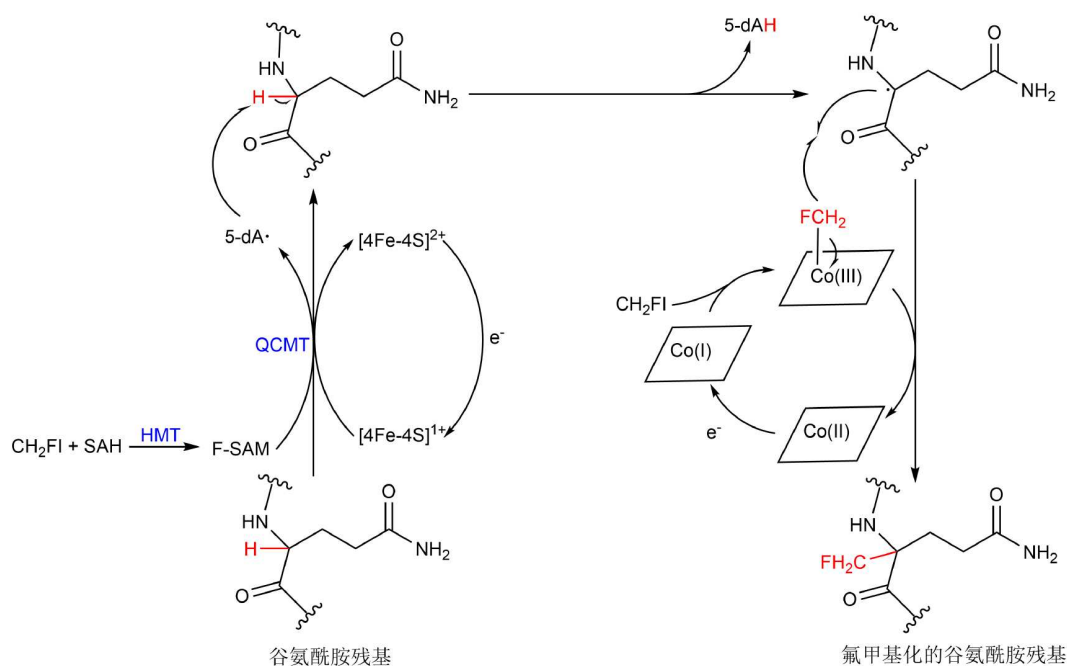


图 11 (网络版彩图)QCMT催化氟甲基反应机制

Figure 11 (Color online) Mechanism of fluoromethylation reaction catalyzed by QCMT

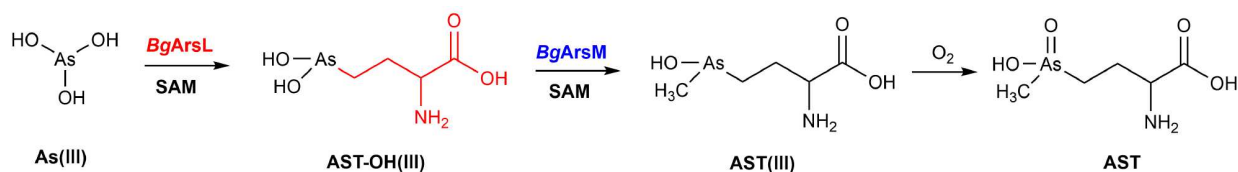


图 12 胍丝菌素生物合成途径

Figure 12 Biosynthesis pathway of arsinothricin

殊的成员, 因此对其进一步的探究尤为重要. 或许在该家族中还存在类似的特殊成员, 未来对这些酶的研究一定会发掘更多生物催化工具.

6 总结与展望

综上, 近年来关于rSAM酶超家族的研究取得了令人瞩目的进展. 研究人员不仅发现rSAM酶催化的诸多新反应类型, 也成功解析了该超家族成员催化的众多复杂新颖的反应机理. rSAM酶产生的自由基中间体具有较高的反应活性, 使其能够高效完成极具挑战性的转化, 在生命体中构筑C-C, C-S, C-N等关键化学键, 催化缩环等结构重塑反应, 构建和修饰复杂碳骨架. 这些研究进展极大拓宽了已知生物体内自由基化学的多样性, 展示了生命体为满足催化复杂反应进化出的超强能力. 展望未来, rSAM酶研究领域仍然具有

巨大潜力和机遇. 首先, 随着更多新的rSAM酶的挖掘, 会有更丰富的催化元件出现. 更为重要的是, 随着对酶及催化机制的认知, 可以利用rSAM酶设计开发全新非天然反应, 获得自然界不存在的催化工具, 例如, 本课题组通过多个B12依赖的甲基转移酶实现了非天然自由基氟甲基反应^[38], 从而获得多肽、天然产物的含氟类似物. 不久前Squire Booker课题组^[39]通过几乎相同的策略, 也实现了B12依赖的甲基转移酶催化的氟甲基反应. 虽然鉴于rSAM酶自身活性和非天然辅因子的引入, 目前此类反应活性较低, 但是通过系统的定向进化改造, 有望获得更高效的催化体系, 同时可以进一步拓展至更多的官能团转移反应. 其次, ArsL酶的研究成果^[42,105], 为rSAM酶家族的探索提供了新的思路. 在按照CX₃CX₂C基序预测的700000个成员中, 会有更多类似的非经典SAM自由基反应等待挖掘, 对rSAM酶家族的进一步研究有望揭示新的催化策略.

参考文献

- 1 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
- 2 Chirpich T P, Zappia V, Costilow R N, et al. Lysine 2,3-aminomutase. *J Biol Chem*, 1970, 245: 1778–1789
- 3 Moss M, Frey P A. The role of S-adenosylmethionine in the lysine 2,3-aminomutase reaction. *J Biol Chem*, 1987, 262: 14859–14862
- 4 Frey M, Rothe M, Wagner A F, et al. Adenosylmethionine-dependent synthesis of the glycyl radical in pyruvate formate-lyase by abstraction of the glycine C-2 pro-S hydrogen atom. Studies of [2H]glycine-substituted enzyme and peptides homologous to the glycine 734 site. *J Biol Chem*, 1994, 269: 12432–12437
- 5 Mulliez E, Fontecave M, Gaillard J, et al. An iron-sulfur center and a free radical in the active anaerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1993, 268: 2296–2299
- 6 Escalettes F, Florentin D, Tse Sum Bui B, et al. Biotin synthase mechanism: evidence for hydrogen transfer from the substrate into deoxyadenosine. *J Am Chem Soc*, 1999, 121: 3571–3578
- 7 Oberg N, Precord T W, Mitchell D A, et al. RadicalSAM.org: a resource to interpret sequence-function space and discover new radical SAM enzyme chemistry. *ACS Bio Med Chem Au*, 2022, 2: 22–35
- 8 Broderick J B, Duffus B R, Duschene K S, et al. Radical S-adenosylmethionine enzymes. *Chem Rev*, 2014, 114: 4229–4317
- 9 Broderick J B, Broderick W E, Hoffman B M. Radical SAM enzymes: Nature's choice for radical reactions. *FEBS Lett*, 2023, 597: 92–101
- 10 Frey P A, Hegeman A D, Ruzicka F J. The radical SAM superfamily. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2008, 43: 63–88
- 11 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
- 12 Nicolet Y. Structure-function relationships of radical SAM enzymes. *Nat Catal*, 2020, 3: 337–350
- 13 Zhang Q, Li Y, Chen D, et al. Radical-mediated enzymatic carbon chain fragmentation-recombination. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 154–160
- 14 Zeng Z, Chen H, Yang H, et al. Identification of a protein responsible for the synthesis of archaeal membrane-spanning GDGT lipids. *Nat Commun*, 2022, 13: 1545
- 15 Nguyen D T, Zhu L, Gray D L, et al. Biosynthesis of macrocyclic peptides with C-terminal β-amino-α-keto acid groups by three different metalloenzymes. *ACS Cent Sci*, 2024, 10: 1022–1032

- 16 Li Y, Yu T, Feng X, et al. Biosynthesis of GMGT lipids by a radical SAM enzyme associated with anaerobic archaea and oxygen-deficient environments. *Nat Commun*, 2024, 15: 5256
- 17 Lien Y, Lachowicz J C, Mendauletova A, et al. Structural, biochemical, and bioinformatic basis for identifying radical SAM cyclopropyl synthases. *ACS Chem Biol*, 2024, 19: 370–379
- 18 Lundahl M N, Yang H, Broderick W E, et al. Pyruvate formate-lyase activating enzyme: the catalytically active 5'-deoxyadenosyl radical caught in the act of H-atom abstraction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2023, 120: e2314696120
- 19 Nie L, Wei T, Cao M, et al. Biosynthesis of coelulatin for the methylation of anthraquinone featuring HemN-like radical S-adenosyl-L-methionine enzyme. *Front Microbiol*, 2022, 13: 1040900
- 20 Young A P, Bandarian V. Insertion of 4-demethylwyosine in tRNA^{Phe} catalyzed by the radical S-adenosyl-L-methionine enzyme TYW1 entails oxidative cleavage of pyruvate to form CO₂. *Biochemistry*, 2022, 61: 2643–2647
- 21 Sato S, Kudo F, Rohmer M, et al. Biochemical and mutational analysis of radical S-adenosyl-L-methionine adenosylhopane synthase HpnH from *Zymomonas mobilis* reveals that the conserved residue cysteine-106 reduces a radical intermediate and determines the stereochemistry. *Biochemistry*, 2021, 60: 2865–2874
- 22 Young A P, Bandarian V. Eukaryotic TYW1 is a radical SAM flavoenzyme. *Biochemistry*, 2021, 60: 2179–2185
- 23 Khan A H, Haedar J R, Kiselov V, et al. Radical SAM enzyme WprB catalyzes uniform cross-link topology between Trp-C5 and Arg-C γ on the precursor peptide. *ACS Chem Biol*, 2025, 20: 259–265
- 24 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
- 25 Eastman K A S, Mifflin M C, Oblad P F, et al. A promiscuous rSAM enzyme enables diverse peptide cross-linking. *ACS Bio Med Chem Au*, 2023, 3: 480–493
- 26 Lewis J K, Jochimsen A S, Lefave S J, et al. New role for radical SAM enzymes in the biosynthesis of thio(seleno)oxazole RiPP natural products. *Biochemistry*, 2021, 60: 3347–3361
- 27 Zhao H, Bu J, Liu H. Radical S-adenosylmethionine sulfurtransferase MybB catalyzed formation of the 4-thiazolidinone core in mycobacinin represents an intersection between primary and secondary metabolism. *J Am Chem Soc*, 2025, 147: 4180–4187
- 28 Han Y, Li H, Li X, et al. Radical-mediated N–C crosslinking in the biosynthesis of dynobactin A, a ribosomally-derived peptide targeting gram-negative bacteria. *CCS Chem*, 2025, 7: 59–67
- 29 Nayak S, Jochimsen A S, Bandarian V. Not all 5'-deoxyadenosines are created equal: tracing the provenance of 5'-deoxyadenosine formed by the radical S-adenosyl-L-methionine enzyme 7-carboxy-7-deazaguanine synthase. *J Biol Chem*, 2025, 301: 108347
- 30 Fan P H, Geng Y, Romo A J, et al. Two radical SAM enzymes are necessary and sufficient for the *in vitro* production of the oxetane nucleoside antiviral agent albucidin. *Angew Chem Int Ed*, 2022, 61: e202210362
- 31 Wang S, Cheng Y, Wang X, et al. Tracing of acyl carrier protein-channeled mitomycin intermediates in *Streptomyces caespitosus* facilitates characterization of the biosynthetic steps for AHBA-GlcN formation and processing. *J Am Chem Soc*, 2022, 144: 14945–14956
- 32 Li Y, Yao Y, Yu L, et al. Mechanistic investigation of B12-independent glycerol dehydratase and its activating enzyme GD-AE. *Chem Commun*, 2022, 58: 2738–2741
- 33 Walls W G, Moody J D, McDaniel E C, et al. The B12-independent glycerol dehydratase activating enzyme from *Clostridium butyricum* cleaves SAM to produce 5'-deoxyadenosine and not 5'-deoxy-5'-(methylthio)adenosine. *J InOrg Biochem*, 2022, 227: 111662
- 34 Lee Y H, Hou X, Chen R, et al. Radical S-adenosyl methionine enzyme BlsE catalyzes a radical-mediated 1,2-diol dehydration during the biosynthesis of blasticidin S. *J Am Chem Soc*, 2022, 144: 4478–4486
- 35 Soualmia F, Cherrier M V, Chauviré T, et al. Radical S-adenosyl-L-methionine enzyme PylB: a C-centered radical to convert L-lysine into (3R)-3-methyl-D-ornithine. *J Am Chem Soc*, 2024, 146: 6493–6505
- 36 Meyer H, Hooek M H, Zwara K, et al. The radical SAM enzyme NirJ cleaves off two propionate side chains with the release of acrylate during heme d₁ biosynthesis. *FEBS J*, 2025, v87: 257–298
- 37 Zhang C, Li Y, Overton E N, et al. Peptide surfactants with post-translational C-methylations that promote bacterial development. *Nat Chem Biol*, 2025, 21: 1069–1075
- 38 Kong L, Zhang J, Wang H, et al. B12-dependent radical SAM enzymes catalyze C-fluoromethylation via a CH₂F-cobalamin intermediate. *Angew Chem Int Ed*, 2025, 64: e202419815

- 39 Neti S S, Wang B, Cui J, et al. Radical fluoromethylation enabled by cobalamin-dependent radical SAM enzymes. *ACS Bio Med Chem Au*, 2025, 5: 464–474
- 40 Wang S, Huang J, Du Y, et al. Cobalamin-dependent radical *S*-adenosyl-L-methionine protein functions with a partner to successively methylate tricyclic indole alkaloid for chuangxinmycin maturation and derivatization. *Sci China Chem*, 2025, 68: 308–316
- 41 Garcia A A, Chadwick G L, Liu X L, et al. Identification of two archaeal GDGT lipid-modifying proteins reveals diverse microbes capable of GMGT biosynthesis and modification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2024, 121: e2318761121
- 42 Yao Y, He J, Chen F, et al. Arsinothricin biosynthesis involving a radical SAM enzyme for noncanonical SAM cleavage and C–As bond formation. *J Am Chem Soc*, 2024, 146: 21214–21219
- 43 King R W, Bauer J D, Brady S F. An environmental DNA-derived TypeII polyketide biosynthetic pathway encodes the biosynthesis of the pentacyclic polyketide erdacin. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 6257–6261
- 44 Fujimori D G. Radical SAM-mediated methylation reactions. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, 17: 597–604
- 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 Montalbán-López M, Scott T A, Ramesh S, et al. New developments in RiPP discovery, enzymology and engineering. *Nat Prod Rep*, 2021, 38: 130–239
- 47 Yang X, van der Donk W A. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: new insights into the role of leader and core peptides during biosynthesis. *Chem Eur J*, 2013, 19: 7662–7677
- 48 Imai Y, Meyer K J, Iinishi A, et al. A new antibiotic selectively kills Gram-negative pathogens. *Nature*, 2019, 576: 459–464
- 49 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
- 50 Flühe L, Burghaus O, Wieckowski B M, et al. Two [4Fe-4S] clusters containing radical SAM enzyme SkfB catalyze thioether bond formation during the maturation of the sporulation killing factor. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 959–962
- 51 Balty C, Guillot A, Fradale L, et al. Ruminococcin C, an anti-clostridial sactipeptide produced by a prominent member of the human microbiota *Ruminococcus gnavus*. *J Biol Chem*, 2019, 294: 14512–14525
- 52 Caruso A, Bushin L B, Clark K A, et al. Radical approach to enzymatic β -thioether bond formation. *J Am Chem Soc*, 2018, 141: 990–997
- 53 Hudson G A, Burkhardt B J, DiCaprio A J, et al. Bioinformatic mapping of radical *S*-adenosylmethionine-dependent ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides identifies new C α , C β , and C γ -linked thioether-containing peptides. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 8228–8238
- 54 Bruender N A, Wilcoxon J, Britt R D, et al. Biochemical and spectroscopic characterization of a radical *S*-adenosyl-L-methionine enzyme involved in the formation of a peptide thioether cross-link. *Biochemistry*, 2016, 55: 2122–2134
- 55 Flühe L, Marahiel M A. Radical *S*-adenosylmethionine enzyme catalyzed thioether bond formation in sactipeptide biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, 17: 605–612
- 56 Precord T W, Mahanta N, Mitchell D A. Reconstitution and substrate specificity of the thioether-forming radical *S*-adenosylmethionine enzyme in freyrasin biosynthesis. *ACS Chem Biol*, 2019, 14: 1981–1989
- 57 Rush K W, Eastman K A S, Kincannon W M, et al. Peptide selenocysteine substitutions reveal direct substrate-enzyme interactions at auxiliary clusters in radical *S*-adenosyl-L-methionine maturases. *J Am Chem Soc*, 2023, 145: 10167–10177
- 58 Eastman K A S, Kincannon W M, Bandarian V. Leveraging substrate promiscuity of a radical *S*-adenosyl-L-methionine RiPP maturase toward intramolecular peptide cross-linking applications. *ACS Cent Sci*, 2022, 8: 1209–1217
- 59 Haft D H, Basu M K. Biological systems discovery *in silico*: radical *S*-adenosylmethionine protein families and their target peptides for posttranslational modification. *J Bacteriol*, 2011, 193: 2745–2755
- 60 Sofia H J. Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29: 1097–1106
- 61 Kincannon W M, Bruender N A, Bandarian V. A radical clock probe uncouples H atom abstraction from thioether cross-link formation by the radical *S*-adenosyl-L-methionine enzyme SkfB. *Biochemistry*, 2018, 57: 4816–4823
- 62 Shisler K A, Broderick J B. Emerging themes in radical SAM chemistry. *Curr Opin Struct Biol*, 2012, 22: 701–710
- 63 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
- 64 Miller R D, Iinishi A, Modaresi S M, et al. Computational identification of a systemic antibiotic for Gram-negative bacteria. *Nat Microbiol*, 2022, 7: 1661–1672
- 65 Muñoz K A, Hergenrother P J. Computational discovery of dynobactin antibiotics. *Nat Microbiol*, 2022, 7: 1512–1513
- 66 Grell T A J, Bell B N, Nguyen C, et al. Crystal structure of AdoMet radical enzyme 7-carboxy-7-deazaguanine synthase from *Escherichia coli* suggests how modifications near [4Fe-4S] cluster engender flavodoxin specificity. *Protein Sci*, 2019, 28: 202–215
- 67 Bruender N A, Young A P, Bandarian V. Chemical and biological reduction of the radical SAM enzyme CPH₄ synthase. *Biochemistry*, 2015, 54: 2903–2910
- 68 McCarty R M, Krebs C, Bandarian V. Spectroscopic, steady-state kinetic, and mechanistic characterization of the radical SAM enzyme QueE, which catalyzes a complex cyclization reaction in the biosynthesis of 7-deazapurines. *Biochemistry*, 2013, 52: 188–198
- 69 Bruender N A, Grell T A J, Dowling D P, et al. 7-carboxy-7-deazaguanine synthase: a radical S-adenosyl-L-methionine Enzyme with polar tendencies. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 1912–1920
- 70 Dowling D P, Bruender N A, Young A P, et al. Radical SAM enzyme QueE defines a new minimal core fold and metal-dependent mechanism. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 106–112
- 71 Yang H, Ho M B, Lundahl M N, et al. ENDOR spectroscopy reveals the “Free” 5'-deoxyadenosyl radical in a radical SAM enzyme active site actually is chaperoned by close interaction with the methionine-bound [4Fe-4S]²⁺ cluster. *J Am Chem Soc*, 2024, 146: 3710–3720
- 72 Wiig J A, Hu Y, Lee C C, et al. Radical SAM-dependent carbon insertion into the nitrogenase M-cluster. *Science*, 2012, 337: 1672–1675
- 73 Dowling D P, Vey J L, Croft A K, et al. Structural diversity in the AdoMet radical enzyme superfamily. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1824: 1178–1195
- 74 Shimada N, Hasegawa S, Harada T, et al. Oxetanocin, a novel nucleoside from bacteria. *J Antibiot*, 1986, 39: 1623–1625
- 75 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
- 76 Kitagawa M, Hasegawa S, Saito S, et al. Synthesis and antiviral activity of oxetanocin derivatives. *Tetrahedron Lett*, 1991, 32: 3531–3534
- 77 Hahn D R, Graupner P R, Chapin E, et al. Albucidin: a novel bleaching herbicide from *Streptomyces albus* subsp. *chlorinus* NRRL B-24108. *J Antibiot*, 2009, 62: 191–194
- 78 Bass P D, Gubler D A, Judd T C, et al. Mitomycinoid alkaloids: mechanism of action, biosynthesis, total syntheses, and synthetic approaches. *Chem Rev*, 2013, 113: 6816–6863
- 79 Siegel D, Gibson N W, Preusch P C, et al. Metabolism of diaziquone by NAD(P)H: (quinone acceptor) oxidoreductase (DT-diaphorase): role in diaziquone-induced DNA damage and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Cancer Res*, 1990, 50: 7293–7300
- 80 Tomasz M, Chawla A K, Lipman R. Mechanism of monofunctional and bifunctional alkylation of DNA by mitomycin C. *Biochemistry*, 1988, 27: 3182–3187
- 81 Suresh Kumar G, Lipman R, Cummings J, et al. Mitomycin C-DNA adducts generated by DT-diaphorase. Revised mechanism of the enzymatic reductive activation of mitomycin C. *Biochemistry*, 1997, 36: 14128–14136
- 82 Crooke S T, Bradner W T. Mitomycin C: a review. *Cancer Treat Rev*, 1976, 3: 121–139
- 83 Abou-Zeid A A, Yousef A A. Fermentative production of mitomycins by *Streptomyces caespitosus*. *J Appl Chem*, 1972, 22: 933–940
- 84 Hornemann U, Kehrer J P, Nunez C S, et al. D-glucosamine and L-citrulline, precursors in mitomycin biosynthesis by *Streptomyces verticillatus*. *J Am Chem Soc*, 1974, 96: 320–322
- 85 Hornemann U, Eggert J H. Utilization of the intact carbamoyl group of L-(NH₂CO-¹³C,¹⁵N) citrulline in mitomycin biosynthesis by *Streptomyces verticillatus*. *J Antibiot*, 1975, 28: 841–843
- 86 Mao Y, Varoglu M, Sherman D H. Molecular characterization and analysis of the biosynthetic gene cluster for the antitumor antibiotic mitomycin C from *Streptomyces lavendulae* NRRL 2564. *Chem Biol*, 1999, 6: 251–263
- 87 Varoglu M, Mao Y, Sherman D H. Mapping the mitomycin biosynthetic pathway by functional analysis of the mitm aziridine N-methyltransferase. *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 6712–6713
- 88 Sitachitta N, Lopanik N B, Mao Y, et al. Analysis of a parallel branch in the mitomycin biosynthetic pathway involving the mitN-encoded aziridine N-methyltransferase. *J Biol Chem*, 2007, 282: 20941–20947
- 89 Grischow S, Chang L C, Mao Y, et al. Hydroxyquinone O-methylation in mitomycin biosynthesis. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 6470–6476

- 90 Nguyen H P, Yokoyama K. Characterization of acyl carrier protein-dependent glycosyltransferase in mitomycin C biosynthesis. *Biochemistry*, 2019, 58: 2804–2808
- 91 Mathur Y, Hazra A B. Methylations in vitamin B12 biosynthesis and catalysis. *Curr Opin Struct Biol*, 2022, 77: 102490
- 92 Bryant D A, Hunter C N, Warren M J. Biosynthesis of the modified tetrapyrroles—the pigments of life. *J Biol Chem*, 2020, 295: 6888–6925
- 93 Fyfe C D, Bernardo-García N, Fradale L, et al. Crystallographic snapshots of a B12-dependent radical SAM methyltransferase. *Nature*, 2022, 602: 336–342
- 94 Hu X, Shi Y, Jiang B, et al. Iterative methylation leads to 3-methylchuangxinmycin production in *Actinoplanes tsinanensis* CPCC 200056. *J Nat Prod*, 2023, 86: 1–7
- 95 Inoue M, Sumii Y, Shibata N. Contribution of organofluorine compounds to pharmaceuticals. *ACS Omega*, 2020, 5: 10633–10640
- 96 Gagsteiger J, Jahn S, Heidinger L, et al. A cobalamin-dependent radical SAM enzyme catalyzes the unique C_α-methylation of glutamine in methyl-coenzyme M reductase. *Angew Chem Int Ed*, 2022, 61: e202204198
- 97 Hughes M F, Beck B D, Chen Y, et al. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicol Sci*, 2011, 123: 305–332
- 98 Cholujova D, Bujnakova Z, Dutkova E, et al. Realgar nanoparticles *versus* ATO arsenic compounds induce *in vitro* and *in vivo* activity against multiple myeloma. *Br J Haematol*, 2017, 179: 756–771
- 99 Chen Z, Chen S J. Poisoning the devil. *Cell*, 2017, 168: 556–560
- 100 Stýblo M, Venkatratnam A, Fry R C, et al. Origins, fate, and actions of methylated trivalent metabolites of inorganic arsenic: progress and prospects. *Arch Toxicol*, 2021, 95: 1547–1572
- 101 Andrewes P, DeMarini D M, Funasaka K, et al. Do arsenosugars pose a risk to human health? The comparative toxicities of a trivalent and pentavalent arsenosugar. *Environ Sci Technol*, 2004, 38: 4140–4148
- 102 García-Salgado S, Raber G, Raml R, et al. Arsenosugar phospholipids and arsenic hydrocarbons in two species of brown macroalgae. *Environ Chem*, 2012, 9: 63
- 103 Kuramata M, Sakakibara F, Kataoka R, et al. Arsinothricin, a novel organoarsenic species produced by a rice rhizosphere bacterium. *Environ Chem*, 2016, 13: 723
- 104 Nadar V S, Chen J, Dheeman D S, et al. Arsinothricin, an arsenic-containing non-proteinogenic amino acid analog of glutamate, is a broad-spectrum antibiotic. *Commun Biol*, 2019, 2: 131
- 105 Li H, Chen F, Ding W, et al. One-pot chemoenzymatic synthesis of arsinothricin and the mechanistic insights into the noncanonical radical SAM enzyme ArsL. *ACS Catal*, 2024, 15: 494–501

New advances in radical SAM enzymes

WANG HaoXin^{1†}, CHEN Chen^{1†} & DONG Min^{1,2*}

¹ School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

² State Key Laboratory of Synthetic Biology, School of Synthetic Biology and Biomanufacturing, Tianjin University, Tianjin 300072, China

† Contributed equally to this work

* Corresponding author, E-mail: mindong@tju.edu.cn

Radical *S*-adenosylmethionine (SAM) enzymes are a family of enzymes that utilize SAM as a cofactor to catalyze a series of biochemical reactions through a radical mechanism. These enzymes are widely found in nature and participate in various important metabolic pathways, including nucleic acid modification, coenzyme synthesis, and antibiotic biosynthesis. Radical SAM enzymes reductively cleave SAM to generate a 5'-deoxyadenosine radical (5'-dA•), which in turn initiates the radical reaction of the substrate. In this review, we introduce the new reactions and mechanisms catalyzed by radical SAM enzymes that have been published in the past several years, including various reaction types such as carbon-carbon bond formation, thioether cross-linking, condensation reaction and methylation. This article highlights the powerful capabilities of radical SAM enzymes and the diversity of radical SAM reactions.

radical SAM enzymes, [4Fe-4S] cluster, radical reaction, catalytic mechanism, biosynthesis

doi: [10.1360/SSV-2025-0201](https://doi.org/10.1360/SSV-2025-0201)