

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570123

研究課題名（和文） ヒト・メチレン葉酸還元酵素のリン酸化と性質に関する研究

研究課題名（英文） Studies on properties of human methylenetetrahydrofolate reductase; factors for phosphorylation

研究代表者

山田 和弘 (YAMADA KAZUHIRO)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・特任准教授

研究者番号：90431973

研究成果の概要：メチレン葉酸還元酵素(MTHFR)の制御に異常をきたすと、心疾患の独立した危険因子である血液中のホモシステイン量増加が観察される。最近、ヒトMTHFRはリン酸化によっても活性制御されることが明らかとなったが、この分子機構は不明である。本研究の結果、リン酸化されていないMTHFRは、アデノシルメチオニンが結合することによって独特の構造変化を惹起し、この構造変化によりリン酸化酵素によって認識され、リン酸化されると考えられた。また、ヒト培養細胞中からMTHFRと相互作用する（タンパク質）因子を検出する方法を開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：酵素化学、栄養化学、メチオニンと葉酸代謝

1. 研究開始当初の背景

水溶性ビタミンの一種である葉酸は、核酸の生合成やアミノ酸の代謝に必要である。一方、必須アミノ酸であるメチオニンはタンパク質の構成アミノ酸として、また、活性化してアデノシルメチオニンとなり生体内の様々なメチル化反応のメチル基供与体として重要である。近年、メチオニンの代謝物であるホモシステインの血中濃度の上昇が心疾患の独立した危険因子として広く認識されている。また、葉酸の摂取により新生児の神経管欠損

のリスクが低くなることも知られている。このメチオニン代謝と葉酸代謝は密接に調節されている。メチレン葉酸還元酵素(MTHFR)はメチオニン・葉酸代謝の接点に位置する酵素で、この酵素の活性制御は代謝調節に非常に重要な働きをしている。MTHFR遺伝子の変異は上記以外にも様々な疾病の原因となることが示唆されているが、生化学的な疾病発症の機構は明らかではない。さらに、多くの腫瘍細胞の特徴としてメチオニン依存性がよく知られている。したがって、メチオニン・葉酸代謝関

連酵素の生化学的研究は、日本人の主な死因である悪性腫瘍や心疾患の病因を理解する上で重要である。これまでにヒトMTHFRはリン酸化などの翻訳後修飾によって代謝調節に重要なアロステリック調節機能を得ることを発見した。興味深いことに、このMTHFRの翻訳後修飾は、細胞内のメチオニン量により調節されている事が示唆されている。しかし、メチオニン依存的な翻訳後修飾機構、特にリン酸化酵素のメチオニン依存的な活性制御は他に知られていない。

2. 研究の目的

ヒト MTHFR をリン酸化する酵素 (群) やアデノシルメチオニンによる翻訳後修飾の制御機構は全く不明である。また、リン酸化が MTHFR の性質に及ぼす影響についても検討の余地がある。さらに、ヒト MTHFR の立体構造は未だに明らかではない。これは立体構造解析に必要なヒト MTHFR のタンパク質結晶が得られないためである。これらの問題や未解明な点を明らかにする目的で、精製した様々なヒト MTHFR の野生型および変異体酵素を用いた生化学的な手法、また培養細胞を用いた細胞生物学的な手法を用いて研究を行った。

3. 研究の方法

組み換え体ヒト MTHFR の発現と精製：野生型および変異体ヒト MTHFR は N 末端にヒスチジンを付加したタンパク質として、昆虫細胞とバキュロウイルスを用いる方法で発現した。精製はイオン交換クロマトグラフィーと Ni アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。

ヒト培養細胞でのヒト MTHFR の高発現：ヒト培養細胞には HeLa 細胞を使用した。Lipofectamin を用いる遺伝子導入方法でヒト MTHFR 遺伝子を細胞に導入し、野生型および変異体 MTHFR を発現させた。

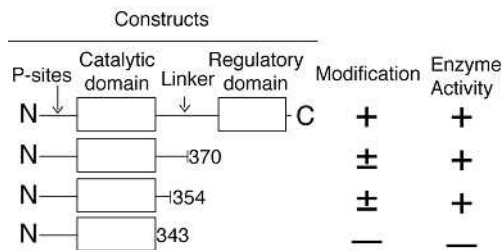


図 1 MTHFR のリン酸化に及ぼすリンカーの影響

リン酸化部位 (P-site) は N 末端であるが、MTHFR のリンカー (Linker) の 343-354 アミノ酸配列がリン酸化 (Modification) と酵素活性 (Enzyme Activity) に必要である

ヒト MTHFR の特異的検出：ヒト培養細胞抽出物中のヒト MTHFR は特異的抗体を用いた Western Blot 法により行った。

4. 研究成果

リン酸化酵素による MTHFR の認識部位の推定：MTHFR のリン酸化は N 末端のアミノ酸残基でおきるが、リン酸化には N 末端のみではなく、約 300 アミノ酸残基離れた配列が必要であることを発見した (図 1)。すなわち、リン酸化酵素は立体的に MTHFR を基質として認識し、N 末端をリン酸化するものと考えられた。

分子間相互作用を利用したリン酸化酵素の同定の試み：ラベルトランスファー法 (図 2) を用いて、MTHFR と相互作用する因子の検索を行った。すなわち、相互作用部位であると考えられる MTHFR の部分配列 (343-354 ア

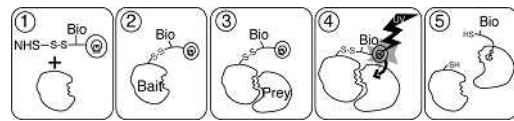


図 2 ラベルトランスファー法の概略

合成したペプチドをビオチン (Bio) ラベル化し (①)、MTHFR と結合する (Bait ②)。細胞抽出液を Bait を混和し、複合体を形成させ (③)、照射により複合体を固定化 (④)。S-S 結合を開裂し、Bio ラベルされたタンパク質を検出する (⑤)

ミノ酸配列) を明らかにした後、ペプチドを合成し、ラベル化した。これをヒト細胞抽出液と混合し、相互作用する因子 (タンパク質) の検出・精製を試みた。しかし、この方法では相互作用する因子のシグナルを得ることは可能であったが、スケールアップが困難で、目的タンパク質の同定方法としては不向きな方法と判断した。

クロスリンカーを用いた *in vivo* クロスリンキング：そこで、スケールアップを見据えて、*in vivo* で MTHFR と相互作用するタンパク質をラベル化する方法の開発を行った。はじめにホルムアルデヒドを架橋剤として用いた。ヒト培養細胞や昆虫細胞中の MTHFR と相互作用する因子を、再現性よくラベル化することが出来た。ホルムアルデヒドを架橋剤として用い、細胞内 (*in vivo*) で MTHFR と相互作用するタンパク質をラベル化する方法により MTHFR と相互作用する因子を、再現性よくラベル化した。しかし、ホルムアルデヒドを架橋剤として用いると MTHFR・相互作用因子複合体の精製が困難であった。そこで、クロスリンカーとして PIERCE 社製の DSS および DSG を用いて相互作用する因子のラベル化の条件検討を行い、最適化した。MTHFR・

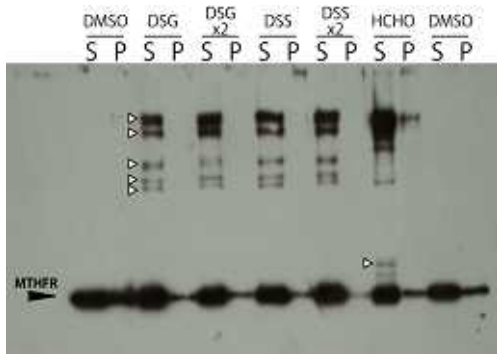


図3 *in vivo* クロスリンク
MTHFR を Hela 細胞で発現し、DSG、DSS、およびホルムアルデヒド(HCHO)で複合体をクロスリンクした。検出は MTHFR を特異的に認識する抗体を用いた。分子量の一番大きな複合体の精製には成功し、質量分析計で解析したが、MTHFR 以外のタンパク質のシグナルは検出できなかった。

相互作用因子複合体を昆虫細胞内から精製し、未知因子の同定を行ったが、リン酸化酵素は発見されなかった。ヒト細胞抽出液中では昆虫細胞で観察されない MTHFR・相互作用因子複合体のシグナルを得ることが出来ているので、この複合体の精製を試みたが、細胞内含量が極端に微量であり、精製することは出来なかった。

アデノシルメチオンが MTHFR の構造に与える影響：リン酸化されている野生型 MTHFR とリン酸化されていない Thr34Ala 変異体を持ち、アロステリック因子(アデノシルメチオン)によるタンパク質の構造変化をトリプシン限定消化により観察した。図4に示すように、Thr34Ala 変異体ではアロステリック因子であるアデノシルメチオンの結合に反応するタンパク質の限定消化の断片化パターンが野生型やアデノシルメチオン無添加の Thr34Ala 変異体のもとは異なっている。これは構造変化の違いによるものと考えられ、この構造の違いがリン酸化酵素による分子認識に利用されるものと推察された。

ヒト MTHFR のタンパク質結晶化の試み：これまでの数多くの試みにもかかわらずヒト MTHFR の結晶化は成功していない。翻訳後修飾が結晶化を妨げていると考え、新たに N 末端を 36 残基欠損した変異体タンパク質を作成・精製した。一般に結晶化が困難なタンパク質の場合でも、N 末端や C 末端を欠損させる事で結晶化が成功することが報告されている。この MTHFR 変異体タンパク質は翻訳後

修飾を全く受けていないことを質量分析計で確認した。翻訳後修飾とアロステリック制御以外の性質は野生型と同様の性質であることを確認した。タンパク質結晶作成の条件検討を行った。様々な条件下で結晶化を試みたところ、PEG4000 を用いた緩衝溶液中で MTHFR の黄色い結晶が観察された。さらに追試を行ったが、結晶は観察されなかった。再現性のある実験条件設定に向けて更なる検討が必要と思われた。しかし、この研究により観察された高等動物 MTHFR の結晶は世界初であり、今後の構造生物学的な研究の発展に大きく希望がもてる成果であると考えている。

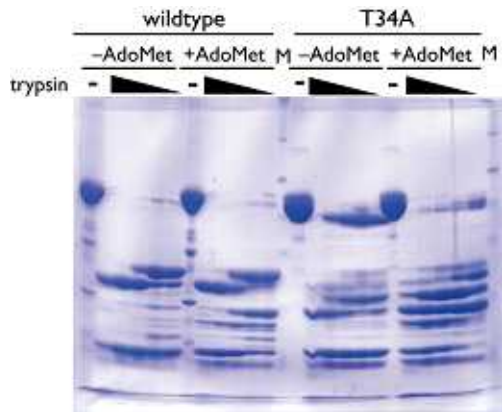


図4 トリプシンによる MTHFR の限定消化

野生型 (wildtype) および Thr34Ala 変異体 (T34A) をアデノシルメチオン (AdoMet) の存在下、非存在下でトリプシン (trypsin) により消化し、電気泳動で消化断片を分離した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

著者名：山田 和弘

論文標題：葉酸投与によって安定化し機能を回復するのはメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素677C>T変異体以外にもあるだろうか

雑誌名：ビタミン

査読の有無：有

巻：82巻(10)

発行年：2008年

ページ：562-563

著者名：山田 和弘、河田哲典、前川昭夫

論文標題：ビタミンB₁₂と精子形成(総説)

雑誌名：ビタミン

査読の有無：有

巻：82巻(1)
発行年：2008年
ページ：11-17

著者名：山田 和弘
論文標題：ホモシステイン関連酵素（血栓症の関連から）(総説)
雑誌名：日本血栓止血学会誌
査読の有無：無
巻：18巻(2)
発行年：2007年
ページ：160-165

[学会発表](計 5 件)

発表者名：山田 和弘
発表標題：ヒト MTHFR の構造変化に及ぼすアデノシルメチオニン、pH、およびリン酸化の影響
学会名：日本ビタミン学会第 61 回大会
発表年月日：2009 年 5 月 30 日
発表場所：亀岡、京都

発表者名：山田 和弘
発表標題：アミノ酸栄養と葉酸・ビタミン B₁₂ に関する最近の知見
学会名：日本畜産学会若手企画シンポジウム
発表年月日：2009 年 3 月 28 日
発表場所：藤沢・神奈川

発表者名：Kazuhiro Yamada
発表標題：Factors for Regulation of Phosphorylation of Human Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR)
学会名：16th International Symposium on Flavins and Flavoproteins
発表年月日：2008 年 6 月 8-13 日
発表場所：Jaca, Spain

発表者(代表)名：山田 和弘、他 2 名
発表標題：ヒト・メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素のリン酸化に関する研究
学会名：酵素・補酵素を楽しむ会
発表年月日：2007 年 11 月 9 日
発表場所：倉敷・岡山

発表者(代表)名：山田 和弘、他 4 人
発表標題：ヒト・メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素のリン酸化に関する因子の検索
学会名：日本ビタミン学会第 59 回大会
発表年月日：2007 年 5 月 24 日
発表場所：ハウステンボス・長崎

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 和弘 (YAMADA KAZUHIRO)
東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・特任准教授
研究者番号：90431973

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し