

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月8日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570132

研究課題名（和文） 哺乳類のメチオニン合成に關与する酵素の性質に關する研究

研究課題名（英文） Properties of enzymes involved in methionine biosynthesis in mammals

研究代表者

山田 和弘（ YAMADA KAZUHIRO ）

東京農業大学・応用生物科学部・研究員

研究者番号：90431973

研究成果の概要（和文）：

ヒト・メチオニン合成酵素、メチオニン合成酵素還元酵素(MSR)、及びメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(MTHFR)の組み換え体酵素の発現・精製に成功し、解析を行った。MSR 遺伝子で知られる共通遺伝子多型（66A>G）は、タンパク質機能に影響を及ぼさなかった。また、重篤な MTHFR 欠損患者の遺伝子変異による酵素の性質の変化に關して生化学的な根拠を得た。さらに、好熱性細菌である *Thermus thermophilus* HB8 由来 MTHFR をモデルとして使用することで、これらの遺伝子変異の影響について構造生物学的な解釈を付け加えることに成功した。

研究成果の概要（英文）：

Expression and purification of human methionine synthase, methionine synthase reductase (MSR), and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) have been achieved. A common polymorphism in MSR gene, 66A>G, did not influence on protein function. Also, effects of gene mutations found in severe MTHFR-deficient patients were examined, i.e. properties of these mutant proteins were biochemically characterized. In addition, protein structural analysis using *Thermus thermophilus* HB8 MTHFR as model rationally explained how the gene mutations affected protein properties.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

1. 研究開始当初の背景

ホモシステインはメチオニンの代謝物であり、血中ホモシステイン濃度上昇（高ホモシステイン血症）が心疾患の独立した危険因

子であることから、メチオニン代謝に關与する酵素の性質に關して関心が持たれていた。高ホモシステイン血症は、葉酸・メチオニン代謝に關与する酵素の遺伝子変異と栄養素

の摂取不良によって引き起こされると考えられている。しかし、ほとんどの研究は、遺伝子変異と患者の症状を統計的に解析するのみで、生化学的な知見は乏しかった。一般に疫学的な検討だけでは、原因（遺伝子変異）と結果（患者の症状）の間は大きなブラックボックスである。葉酸の投与は血中ホモシステイン濃度の低減に有効であるが、必ずしも心疾患のリスクを軽減しない、という報告もある。現在でも、この高ホモシステイン血症が心疾患の独立した危険因子なのかは、意見の分かれているところである。他方、葉酸投与は神経管欠損の予防に有効であることが知られているが、この効果も生化学的に解明されていない。ヒトの葉酸・メチオニン代謝に関与する遺伝子変異が酵素の性質にどのような性質の変化を与えるのか、酵素化学的な検証が必要である。ホモシステイン代謝に関与する酵素の中でも特にビタミン B₁₂ 関与メチオニン合成酵素（MS）は、直接ホモシステインを基質とすることから重要であると考えられている。MS には、補助酵素としてメチオニン合成酵素還元酵素（MSR）が必要であることが明らかにされているが、MSR はバイオフィーマティクスをもとに遺伝子が先に発見された比較的新しい酵素で、酵素化学的な性質は不明な部分が多い。さらに、MS がホモシステインを基質としてメチオニンを合成するためには、もうひとつの基質であるメチルテトラヒドロ葉酸が必要である。このメチルテトラヒドロ葉酸を生成する反応を触媒するのが、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素（MTHFR）である。MTHFR はホモシステインを直接の基質とはしないが、血中ホモシステイン濃度の調節に必要な酵素であると考えられている。これらの酵素は重要であることは認識されているが、酵素の取り扱いの困難さ等から生化学的な解析があまりされていなかった。

2. 研究の目的

ホモシステイン代謝、特にメチオニン合成に関与する酵素、すなわちビタミン B₁₂ 関与メチオニン合成酵素（MS）とその補助酵素であるメチオニン合成酵素還元酵素（MSR）、さらにメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素（MTHFR）に着目し、その性質を生化学的、構造生物学的に明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

MS、MSR、および MTHFR は、それぞれのヒト cDNA をもちいて組み換え体タンパク質としてバキュロウイルス・昆虫細胞系によって発現したものを用いた。また、*Thermus thermophilus* HB8 由来のホモログ酵素をモデルとして用い、生化学的および構造生物学的な比較検討を行った。

4. 研究成果

ヒト MS、MSR、及び MTHFR、すべての組み換え体酵素の発現系の構築は首尾良く行うことができた。この発現系を用いて精製酵素を得、酵素化学的解析を行った。MS の補助タンパク質である MSR の第一の役割は不活性化した MS の再活性化活性である。精製した MSR は確かに MS 再活性化能を有しており、MS、MSR 共に正しいタンパク質を得ることは確認できた。しかし、MSR の MS 再活性化能は一分子のタンパク質あたり一回のみの活性化しか検出できなかった。すなわち、触媒回転を観察することができなかった。様々な因子（主に低分子化合物）を添加し、触媒回転の検出を試みたが、この研究期間中に見出すことはできなかった。したがって、当初の目的であった動物組織中 MSR 活性の測定方法の確立には至らなかった。MSR が触媒回転を持ち得ないとすればこのタンパク質は「酵素」と言うよりはむしろ「因子」であるか、あるいは継続的な触媒回転に何らかの物質が必須であるであると考えられる。MSR の MS 再活性化機構についてはさらなる検討が必要である。さらに、MSR 共通遺伝子多型(66A>G)が知られている変異体も作成したが、野生型、変異型共に同様の性質を示し、今回検討した中では遺伝子変異による酵素タンパク質機能への影響は確認できなかった（未発表）。

MSR のもう一つの機能に MS のホロ酵素生成を補助する機能があるが、哺乳類のアポ MS は非常に不安定で精製することはできない。これまでの研究では粗酵素抽出液を使用してきたが、詳細な解析には精製した酵素が必要である。そこで安定なアポ MS の探索を行った。大腸菌など常温で生息する微生物のアポ MS は不安定であることが知られていたため、好熱性細菌の MS を遺伝子の情報から検索したところ、*Thermus thermophilus* HB8 のゲノム上にヒト MS と類似の遺伝子があることを確認した。他の好熱性細菌でも MS 類似遺伝子は確認できたが、ヒト MS と比較して、ドメイン構造の類似性から *Thermus* MS は良いモデルとなるのではないかと考えられた。そこで *Thermus* MS を大腸菌内で発現させ、精製することに成功した。*Thermus* MS のアポ酵素は 65 度 15 分間の加熱処理にも耐え、常温または 4 度では非常に安定であった。（未発表）この *Thermus* MS を用いることで、B₁₂ の取り込みや、反応機構の詳細、各ドメインの役割と相互作用など、常温生物由来の MS では不可能であった実験が可能となり、今後の研究に活かせるものと考えている。

ヒト MTHFR 遺伝子は多くの病因性変異が報告されているが、677C>T といった共通遺伝子多型以外の変異がどのような性質の変化を引き起こすのかは全く不明であった。そこで重篤な MTHFR 欠損患者で確認された 22 の遺伝子変異をそれぞれ発現ベクターに導入し、

22の変異タンパク質を昆虫細胞内で発現させた(第64回日本栄養食糧学会大会にて発表)。そのうち10の変異体は活性のあるタンパク質として可溶性画分に発現されず、酵素活性も検出することはできなかった。しかし、不溶性の遺伝子産物が確認され、ヒトMTHFRに特有の翻訳後修飾の痕跡が認められた。したがって、これらの変異体は、遺伝子発現されるものの、不安定で不溶性のタンパク質となり不活性化し易いと考えられた。その他の12の変異体は精製することが可能であった。精製酵素を用いて、酵素化学的なパラメータを算出した。さらに、アロステリック調節因子であるアデノシルメチオニンによる不活性化と阻害定数についても算出した。また、タンパク質の安定性についても検討を行った。MTHFRはFAD(フラビンアデニンジヌクレオチド、活性型ビタミンB₂)を補因子として結合している。酵素タンパク質の不活性化、すなわち変性とともこのFADが放出される。そこで、放出されたFADの量を計測することによってMTHFRの安定性を評価した。その結果、遺伝子変異によるMTHFR活性低下の原因は酵素の触媒機能の低下によるものか、タンパク質の不安定化のどちらか、または両方によって引き起こされることが明らかとなり、遺伝子変異による酵素タンパク質の性質の変化をグループ分けすることに成功した。また、日本人でも約10%の割合でホモ接合体として発見される677C>T遺伝子変異によるMTHFRタンパク質の不安定化は、重篤なMTHFR欠乏患者に匹敵するものであった。MTHFR677C>Tに起因する不安定化酵素は、十分な葉酸存在下で安定化されることから、ほかの変異酵素の安定化にも葉酸やビタミンB₂の存在が有効であると考えられる。

ヒトMTHFR変異体を用いて得られた生化学的結果を、構造生物学的に解釈することを試みた。ヒトMTHFRの結晶構造解析は、タンパク質の結晶を得ることができないことから現在でも達成されていない。そこで、モデルとして*Thermus thermophilus* HB8由来のMTHFRを用いた。大腸菌を宿主として*Thermus* MTHFRを発現させ、精製した。まず、野生型酵素の性質と構造を明らかにした(*PLoS One* 2011)。大腸菌を用いて発現し、精製した*Thermus* MTHFRは、FADを結合していないサブユニットとFADを結合したサブユニットの2量体の構造を明らかにした。特に、FADを欠いたアポサブユニットの構造はこの研究で初めて明らかにされた。また、FADの結合によりサブユニットの境界で回転が起こることを示すことができた。次に*Thermus* MTHFRにヒト変異を模した4種類の変異体酵素の発現系を構築し、精製した後、これらの生化学的性質、酵素化学的パラメータ、タンパク質の安定性を対応するヒトMTHFR変異体と比較した

(図1.ビタミン学会第62回大会にて発表)。これらは非常に類似していることを確認した。続いて、これらの変異体酵素すべてを結晶化し、構造解析を行った。この構造解析によって、タンパク質の不安定性に関連するアミノ酸残基の役割や、FADを結合性に関連する因子などを構造生物学的に解釈することに成功した。

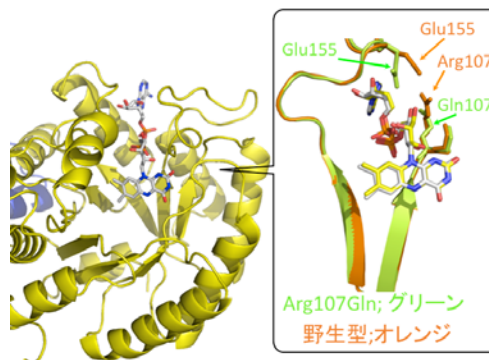


図1 *Thermus* MTHFRの野生型と変異体の立体構造比較の例

Thermus MTHFRの野生型(オレンジ)と変異体(Arg107Gln、グリーン。ヒトMTHFRではArg157Glnに対応)の立体構造を比較した。ヒトMTHFR及び*Thermus*酵素共に、変異体酵素はFAD(図中ではスティックモデルで表示)を結合し、活性も確認できるが、FADを失い易かった。*Thermus*野生型酵素ではFADを強固に結合するため、ベルトの様にGlu155とArg107の間に塩橋が形成されていた。ArgがGlnに変異した変異体酵素ではFADの結合はできるものの、ベルトが形成されないことがタンパク質の立体構造から示された。したがって、この変異を持つ患者でMTHFR活性が低下していたのは、変異に起因するFADの失い易さが原因であることが推察された。

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5件)

猪狩早雅(筆頭著者)、山田和弘(責任著者)(他6名) Properties and crystal structure of methylenetetrahydrofolate reductase from *Thermus thermophilus* HB8, *PLoS One*, 査読有、Vol.6, 2011, e23716, DOI 10.1371/journal.pone.0023716

山田和弘、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(MTHFR)の共通遺伝子多型 677C>T が Ala222Val である理由、ビタミン、査読有、85 巻、2011、499-500

山田和弘、葉酸の大量投与がマウス胎児に及ぼす影響、ビタミン、査読有、85 巻、2011、138-140

山田和弘、フラビン依存性チミジル酸合成酵素の反応機構、ビタミン、査読有、84 巻、2010、265-267

山田和弘、細胞内 B₁₂ 輸送タンパク質 MMACHC の性質について、ビタミン、査読有、83 巻、2009、294-296

〔学会発表〕(計 6 件)

山田和弘、*Thermus thermophilus* HB8 由来メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(MTHFR)の構造と性質、2010 年度 酵素・補酵素研究会、2010 年 9 月 10 日、北九州市・西日本総合展示場

山田和弘、ヒトメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(MTHFR)疾患型変異を導入した *Thermus thermophilus* MTHFR の性質、ビタミン学会第 62 回大会、2010 年 6 月 12 日、いわて県民情報交流センター

山田和弘、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(MTHFR)遺伝子の病因性変異が酵素機能に与える影響、第 64 回日本栄養食糧学会大会大会、2010 年 5 月 23 日、徳島市・アステイとくしま

山田和弘、(招待講演)葉酸・メチオニン代謝の制御と関与するタンパク質群、ビタミン B 研究委員会シンポジウム、2010 年 2 月 5 日、千里ライフサイエンスセンター(大阪)

山田和弘、メチオニンと葉酸代謝～エビジェネティクスを支える代謝～、第 8 回国際バイオオーラム、2009 年 7 月 3 日、東京ビックサイト(東京)

山田和弘、ヒト MTHFR の構造変化に及ぼすアデノシルメチオニン、pH、及びリン酸化の影響、ビタミン学会第 61 回大会、2009 年 5 月 30 日、京都学園大学(京都)

〔図書〕(計 1 件)

日本ビタミン学会編集、朝倉出版、ビタミン総合事典、2010、総ページ 608、第 6 章「葉酸」章担当責任者、6.2 節「生化学的特性」pp292-297、6.7 節「相互作用」pp309-312、第

7 章「ビタミン B₁₂」7.5 節「欠乏症と臨床」pp339-343

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山田 和弘 (YAMADA KAZUHIRO)
東京農業大学・応用生物科学部・研究員
研究者番号：90431973

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：