◆ 総 説 ◆

ホモシステイン関連酵素（血拴症の関
連から）

山田 和 弘*

Homocysteine metabolism and related enzymes

Kazuhiro YAMADA*

Key words: methionine-folate metabolism, hyperhomocysteinemia,
methylenetetrahydrofolate reductase, methionine synthase

山田和弘

1990 年 東京農業大学卒業
1992 年 東京農業大学大学院博士前期
課程修了
1992~1994 年 東京農業大学副手
1998 年 岡山大学大学院博士後期課程
修了
1999~2006 年 米国ミシガン大学博士研究員
2006 年 東京農工大学大学院共生科学
技術研究院特任助教授
現在に至る

はじめに

ホモシステインはメチオニンの代謝物である。近年、血中ホモシステイン濃度の上昇（高ホモシステイン血症）は心疾患¹⁾や神経管欠損²⁾に対して独立した危険因子であることが明らかになり、この代謝に関わる酵素の性質について再び関心が高まっている。メチオニン・葉酸代謝（図 1）は、核酸の生合成、タンパク質合成、ポリアミンの合成およびトランスメチレーションに関与する重要な代謝であるので、古くからアミノ酸と水溶性ビタミンの機能に関して研究が行われてきた。図 1 に示したように、ホモシステイン代謝に係わる酵素はメチオニン合成酵素（MS）、シスタチオニンβシンターゼ（CBS）、ベタインホモシステインメチルトランスフェラーゼ（BHMT）、アデノシルホモシステイン加水分解酵素（SAHase）、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素（MTHFR）である。この代謝で重要は点はこれらの代謝酵素活性の制御である。今回取り上げるこれらの酵素は全て補因子（補酵素や金属原子）を活性発現に必要としている。従って、メチオニン・葉酸

代謝は栄養素摂取（すなわち、アミノ酸、ビタミンやミネラルの供給）の影響を強く受けることが知られている。一方、ヒト個人間の遺伝子の違い（遺伝子多型）は、タンパク質の性質を変化させ、病気の罹り易さに影響すると考えられる。本総説ではメチオニン・葉酸代謝について概説し、ホモシステイン代謝酵素として特に MTHFR と MS について最近の生化学的知見を紹介する。

メチオニン・葉酸代謝

葉酸は生体内でメチル基（CH₃-）やホルミル基（CHO-）などいわゆる C1 ユニット（一炭素化合物）の運び屋として機能する大切なビタミンである（図 1）。葉酸代謝の重要性は DNA・RNA 前駆体の生合成にある。C1 ユニットはプリン塩基の生合成に使用される。また、チミジル酸合成酵素の作用によってチミジル酸（dTTP）の生合成にも利用される。

一方で葉酸 C1 ユニットはメチオニン合成に用いられる。高等動物においてメチオニンは必須アミノ酸であるが、ホモシステインを再メチ

* 東京農工大学大学院共生科学技術研究院 [〒 184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16]

The Institute of Symbiotic Science and Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology [2-24-16 Nakacho, Koganei, Tokyo 184-8588]

Tel: 042-388-7479 Fax: 042-388-7479 e-mail: yamadak@cc.tuat.ac.jp

図1 メチオニン・葉酸代謝

ル化することで合成することが出来る。メチオニンは体タンパク質の生合成に必要であるばかりではなく、ATPと化合しアデノシルメチオニン (SAM) となる。SAMはポリアミンの基質であるのみならず、多くのメチル化反応の基質となる。メチル基を供与したSAMはアデノシルホモシステイン (SAH) となった後、アデノシンとホモシステインに加水分解される。ホモシステインはMSにより再メチル化されてメチオニンになるか、またはCBSの触媒反応によりセリンと化合しシスタチオニンとなった後、システインへと異化される。このようにメチオニン・葉酸代謝は多くの経路とリンクしており、生体にとって重要な代謝である。

アデノシルメチオニンと代謝制御

メチオニン・葉酸代謝には重要な分岐点が2カ所ある。一つはホモシステインを再メチル化に利用するか、またはシステインに異化代謝するかの分岐。もう一つは、メチレンテトラヒドロ葉酸のC1ユニットをデオキシウリジル酸 (dUMP) へと渡しdTMP合成の使用するか、またはメチルテトラヒドロ葉酸に還元した後、

メチオニン合成に利用するかの分岐である。

ホモシステインの再メチル化と異化代謝の分岐では、CBS活性の調節が行われる。SAMはCBSの活性化剤であり、高濃度のSAMによりCBSの活性は上昇する³⁾。この調節は細胞内のメチオニン濃度が高い時にメチオニンを異化代謝を促進する応答であると考えることが出来る。

一方、メチレンテトラヒドロ葉酸のC1ユニットを核酸合成かメチオニン合成に使用するかはMTHFR活性を制御することによって行う。SAMはMTHFRの強力なアロステリック阻害剤である⁴⁾。SAHはMTHFRを活性化しないが、SAMとMTHFRの結合を阻害する。すなわちSAM/SAHの比率によってMTHFRの活性は調節されている。

このSAM/SAH比はSAM依存性メチル基転移酵素にとっても重要な比率である⁵⁾。SAHは多くのSAM依存性メチル基転移酵素の競合阻害剤である。従って、細胞内SAH濃度の上昇は、SAM依存性メチル基転移酵素活性を低下させ、メチル化化合物を減少させる⁵⁾。このようにSAMはメチオニン・葉酸代謝に関係する酵素の活性制御に中心的な役割を果たしている。

図2 MTHFRの触媒する反応 (A) およびヒト酵素と大腸菌酵素との比較 (B)

高ホモシステイン血症と MTHFR 遺伝子変異

血中ホモシステイン濃度と動脈硬化のリスクについて1969年にMcCullyが報告している⁶⁾。Rosenblattら⁷⁾およびKangら⁸⁾は高ホモシステイン血症患者とMTHFRの熱耐性について検討、患者の中で高温(46度)で失活しやすい酵素を持つグループを発見した。1995年にRozenらのグループによってヒトMTHFR cDNAの全長がクローニングされ⁹⁾、ヒトMTHFR遺伝子の677C>T遺伝子多型が報告された。この遺伝子変異は222番目のアミノ酸をアラニンからバリンに変化させるもの(Ala222Val)である。(注; MTHFRの遺伝子クローニングの時に翻訳開始点が決められなかったために、このMTHFR変異の核酸の番号とタンパク質のアミノ酸番号にはズレがある。) 677C>T変異はcommon polymorphismであり、ホモ接合性は約10%程度である¹⁰⁾。日本人においても同様の割合であると報告されている¹¹⁾。677C>Tホモ接合体患者のMTHFR活性は低く、血中ホモシステイン濃度高めである¹²⁾。Ala222Val変異体酵素は熱安定性が悪

いことが示され⁹⁾、先に報告された熱感受性MTHFRと遺伝子変異の因果関係が明らかとなった。

メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR)

MTHFRが触媒するのはメチレンテトラヒドロ葉酸を還元しメチルテトラヒドロ葉酸を生成する反応である¹³⁾。MTHFRは酵素反応に必要なフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)と非共有結合している(図2)。ヒトMTHFRはNADPHを基質とし、メチレンテトラヒドロ葉酸を還元し、メチルテトラヒドロ葉酸を生成する。従ってMTHFRは直接ホモシステインを基質とする酵素ではない。しかし、生成物のメチルテトラヒドロ葉酸はメチオニン合成反応の基質であるので、MTHFRは基質の供給という点で間接的に関与し、ホモシステイン量の調節に中心的な役割を果たしている。

ヒトMTHFRはホモ2量体で、N末端の触媒領域とC末端の調節領域に分けることが出来る(図2)。高等動物MTHFRの立体構造は

図3 メチオニン合成酵素 (MS) が触媒する反応とメチオニン合成酵素還元酵素による再活性化

未だに明らかになっていない。大腸菌 MTHFR は調節領域を持たないので SAM による活性調節を受けないが、ヒト MTHFR の触媒領域は大腸菌 MTHFR と高い相同性 (33% の同一性) を示すことから、立体構造は類似していると考えられる。1999 年に Ludwig らのグループにより、大腸菌 MTHFR の結晶構造解析が報告された¹⁴⁾。大腸菌酵素は $\alpha 8\beta 8$ バレル構造のサブユニットの 4 量体であり、活性中心に FAD が結合している。ヒト MTHFR・Ala222 は大腸菌酵素 Ala177 に相当するが、大腸菌 MTHFR のタンパク質立体構造ではこのアラニン残基は触媒中心から離れたところに位置していた。すなわち Ala222Val 変異は酵素活性に直接影響しないことが示唆された。大腸菌 MTHFR^{Ala177Val} 変異体を用いて、このアミノ酸置換が酵素機能に与える影響が調べられた¹⁴⁾。変異体大腸菌酵素の酵素活性は野生型と変わらないことが観察されたが、変異体酵素を希釈すると野生型よりも約 10 倍速く補酵素 FAD を失うことが観察された。変異体酵素では立体構造が不安定であるために補酵素を失い、失活すると推測された。最近明らかにされた大腸菌 MTHFR^{Ala177Val} 変異体の立体構造はこの仮説を支持している¹⁵⁾。しか

し、ヒト MTHFR サブユニットが約 70kDa の 2 量体であり、大腸菌酵素とは異なっている。著者らは組み換え体ヒト MTHFR の性質を調べた¹⁶⁾。その結果、野生型と変異体では酵素活性など酵素機能に差は観察されなかったが、変異体酵素は FAD を野生型よりも約 3 倍速く失うことを観察した。また、葉酸が MTHFR の活性失活を防ぐという実験的根拠を示した。葉酸の投与が血中ホモシステイン濃度低下に有効である理由の一つであると考えている。

最近、著者らはヒト MTHFR がリン酸化により制御されていることを明らかにした。このリン酸化は酵素活性の調節、特に SAM によるアロステリック調節に重要である¹⁷⁾。

メチオニン合成酵素 (MS) とメチオニン合成酵素還元酵素 (MSR)

MS はメチルテトラヒドロ葉酸のメチル基をホモシステインへわたし、テトラヒドロ葉酸とメチオニンを生成する反応を触媒する (図 3)。MS は亜鉛とビタミン B₁₂ (コバラミン, Cbl (図 3)) を補因子として結合している。コバラミンはメチル基転移反応において中心的な役

割を果たす。高等動物 MS のホモシステインに対する親和性は非常に高く、 K_m 値は約 $2 \mu\text{M}$ である¹⁸⁾ ので、MS は生理量のホモシステイン (血中濃度約 $10 \mu\text{M}$) を効率よく代謝することができると思われる。

コバラミンは酵素反応途中で酸化され易く、MS は 1,000~2,000 回の触媒に 1 回の割合で不活性化する¹⁹⁾。高等動物の場合、不活性化 MS を再活性化する酵素がメチオニン合成酵素還元酵素 (MSR) である。コバラミンは、MSR と NADPH により還元され、SAM からメチル基を受け取ることで再活性化される。MSR は補酵素として FMN と FAD を結合する、P450 還元酵素ファミリーに属する酵素である。MSR は遺伝学的な研究から存在が示唆されていたが、最近まで生化学的な性格が不明なタンパク質であった。1998 年に Gravel らのグループがヒト MSRcDNA クローニングに成功し²⁰⁾、Banerjee らのグループにより初めて MSR 依存的 MS 酵素活性が報告されている²¹⁾。

その他のホモシステイン代謝酵素

CBS はビタミン B₆ 依存性酵素であり、ホモシステインとセリンからシスタチオニンを生成する反応を触媒する酵素である。CBS のホモシステインに対する基質親和性は低い。しかし高等動物において CBS はホモシステインからシステインを生成する反応を触媒する唯一の酵素であるので、CBS 遺伝子の欠損は極度の高ホモシステイン血症を引き起こす²²⁾。最近、SAM は CBS タンパク質を安定化することが明らかになった²³⁾。すなわち、大量にメチオニンを摂取した場合、CBS は SAM により安定化され、さらに活性化されると考えられる。

SAHase は SAH を加水分解し、アデノシンとホモシステインを生成する反応を触媒する。この反応は可逆反応である²⁴⁾。アデノシンやホモシステインが高濃度に存在すると、平衡は SAH を合成する方向に偏る。すなわち、

細胞内のホモシステインやアデノシン濃度は SAM/SAH 比を調節する因子の一つであると考えられる。

BHMT はベタイン (トリメチルグリシン) のメチル基をホモシステインへと渡し、メチオニンを合成する反応を触媒する酵素である。特に肝臓で酵素活性が高く検出されるが、他の臓器中の本酵素活性は非常に低い²⁵⁾。また、ベタインのメチル基は SAM に由来するので、正味のメチオニン合成 (ホモシステイン代謝) が行われるわけではない。しかし、*Mthfr* 遺伝子欠損マウス²⁶⁾ やヒト²⁷⁾ にベタインを投与することでホモシステイン代謝が改善されることが報告されている。

おわりに

今回、ホモシステイン代謝に関与する酵素について生化学的な性質を紹介した。ホモシステイン代謝に関連する報告は多くあるが、「なぜ高ホモシステイン血症が心疾患の危険因子なのか」という疑問に今のところ答えはない。血栓症の発症機序としては、血管内皮細胞の障害、血小板の活性化、凝固機能の亢進などが考えられている。しかしこれらに対してホモシステインが直接毒性を発揮するのか、または血中ホモシステインは単なるマーカーであり直接の毒素ではないのかということも明らかにはなっていない。

高ホモシステイン血症患者への葉酸投与は血中のホモシステイン濃度低下に有効である。1996 年にアメリカでは FDA (食品医薬局) が高栄養価穀物食品に葉酸を強化することを求め²⁸⁾、1998 年から義務づけている。日本では食生活の違いから葉酸が欠乏することは少ないとされているが、今後、食生活の欧米化により葉酸の摂取が減少し、高ホモシステイン血症患者が増加する可能性も考えられる。

文 献

- 1) Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Ueland PM, Palma-Reis RJ, Boers GH, Sheahan RG, Israelsson B, Uiterwaal CS, Meleady R, McMaster D, Verhoef P, Witteman J, Rubba P, Bellet H, Wautrecht JC, de Valk HW, Sales Luis AC, Parrot-Rouland FM, Tan KS, Higgins I, Garcon D, Andria G, et al: Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. *J Am Med Assoc* **277** : 1775-1781, 1997.
- 2) van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP, Mariman EC, den Heyer M, Rozen R, Blom HJ: Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* **346** : 1070-1071, 1995.
- 3) Finkelstein JD, Kyle WE, Martin JL, Pick AM: Activation of cystathionine synthase by adenosylmethionine and adenosylethionine. *Biochem Biophys Res Commun* **66** : 81-87, 1975.
- 4) Kutzbach C, Stokstad EL: Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochim Biophys Acta* **250** : 459-477, 1971.
- 5) Hoffman DR, Cornatzner WE, Duerre JA: Relationship between tissue levels of S-adenosylmethionine, S-adenylhomocysteine, and transmethylation reactions. *Can J Biochem* **57** : 56-65, 1979.
- 6) McCully KS: Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* **56** : 111-128, 1969.
- 7) Rosenblatt DS, Erbe RW: Methylenetetrahydrofolate reductase in cultured human cells. II. Genetic and biochemical studies of methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Pediatr Res* **11** : 1141-1143, 1977.
- 8) Kang SS, Passen EL, Ruggie N, Wong PW, Sora H: Thermolabile defect of methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. *Circulation* **88** : 1463-1469, 1993.
- 9) Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, et al: A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* **10** : 111-113, 1995.
- 10) Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R: A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* **64** : 169-172, 1998.
- 11) Nishio H, Lee MJ, Fujii M, Kario K, Kayaba K, Shimada K, Matsuo M, Sumino K: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene among the Japanese population. *Jpn J Hum Genet* **41** : 247-251, 1996.
- 12) Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE: Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* **22** : 195-201, 2001.
- 13) Matthews RG: Methylenetetrahydrofolate reductase from pig liver. *Methods Enzymol* **122** : 372-381, 1986.
- 14) Guenther BD, Sheppard CA, Tran P, Rozen R, Matthews RG, Ludwig ML: The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat Struct Biol* **6** : 359-365, 1999.
- 15) Pejchal R, Campbell E, Guenther BD, Lennon BW, Matthews RG, Ludwig ML: Structural perturbations in the Ala → Val polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase: how binding of folates may protect against inactivation. *Biochemistry* **45** : 4808-4818, 2006.
- 16) Yamada K, Chen Z, Rozen R, Matthews RG: Effect of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** : 14853-14858, 2001.
- 17) Yamada K, Strahler JR, Andrews PC, Matthews RG: Regulation of human methylenetetrahydrofolate reductase by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** : 10454-10459, 2005.
- 18) Yamada K, Tobimatsu T, Kawata T, Wada M, Maekawa A, Toraya T: Purification and some properties of cobalamin-dependent methionine synthase from rat liver. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **43** : 177-186, 1997.
- 19) Yamada K, Yamada S, Tobimatsu T, Toraya T: Heterologous high level expression, purification, and enzymological properties of recombinant rat cobalamin-dependent methionine synthase. *J Biol Chem* **274** : 35571-35576, 1999.
- 20) Leclerc D, Wilson A, Dumas R, Gafuik C, Song D, Watkins D, Heng HH, Rommens JM, Scherer SW, Rosenblatt DS, Gravel RA: Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** : 3059-3064, 1998.
- 21) Olteanu H, Banerjee R: Human methionine synthase reductase, a soluble P-450 reductase-like dual flavoprotein, is sufficient for NADPH-dependent methionine synthase activation. *J Biol Chem* **276** : 35558-35563, 2001.
- 22) Watanabe M, Osada J, Aratani Y, Kluckman K, Reddick R, Malinow MR, Maeda N: Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e) inemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** : 1585-1589, 1995.
- 23) Prudova A, Bauman Z, Braun A, Vitvitsky V, Lu SC, Banerjee R: S-adenosylmethionine stabilizes cystathionine beta-synthase and modulates redox capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** : 6489-6494, 2006.
- 24) G. de la Haba, G. L. Cantoni: The Enzymatic Synthesis of S-Adenosyl-l-homocysteine from Adenosine and Homocysteine. *J. Biol. Chem* **234** : 603-608, 1959.
- 25) Sunden SL, Renduchintala MS, Park EI, Miklasz SD, Garrow TA: Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. *Arch Biochem Biophys* **345** : 171-174, 1997.
- 26) Schwahn BC, Laryea MD, Chen Z, Melnyk S, Pogribny I, Garrow T, James SJ, Rozen R: Betaine rescue of an animal model with methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Biochem J* **382** (Pt 3) : 831-840, 2004.
- 27) Kishi T, Kawamura I, Harada Y, Eguchi T, Sakura N, Ueda K, Narisawa K, Rosenblatt DS: Effect of betaine on S-adenosylmethionine levels in the cerebrospinal fluid in a patient with methylenetetrahydrofolate reductase deficiency and peripheral neuropathy. *J Inher Metab Dis* **17** : 560-565, 1994.
- 28) Food and Drug Administration (FDA). Food Standards: Amendment of Standards of Identity for Enriched Grain Products to Require Addition of Folic Acid; Final Rule (21 CFR Parts 136, 137, and 139). *Federal Register* **61** : 8781-8797, 1996.