

シスタチオニンβシンターゼのヘム近傍構造

○小崎 紳一 土井 正史 稲田 篤 行村 剛

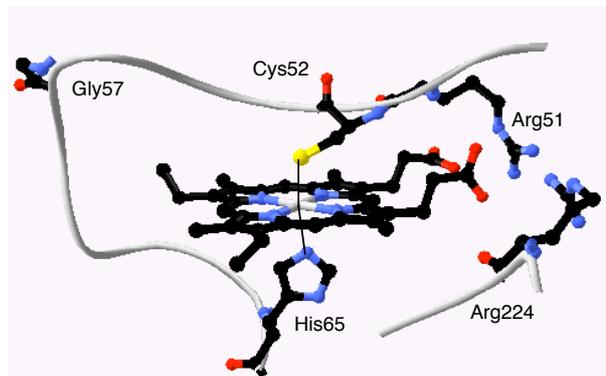
山口大学 農学部 生物機能科学科

ozakis@yamaguchi-u.ac.jp

シスタチオニンβシンターゼ (CBS) は、セリンとホモシステインからシスタチオニンを合成するビタミン B6 (pyridoxal phosphate: PLP) 含有酵素でヒト、ラット、蚊、蠅、酵母などに存在する。ほ乳類の代謝系において、ホモシステインはメチオニン生成ルートとシステイン生成ルートの分岐点に存在し、CBS は含硫化合物の代謝調節に重要な役割を持つと考えられている。実際、生まれつき CBS 遺伝子に欠損がある場合、高ホモシステイン血症と呼ばれる遺伝病を引き起こすことが知られている。興味深いことに、ヒトならびにラットの CBS では、PLP に加えてヘムが N 末端に結合していることが確認されており、アミノ酸配列の比較から蚊や蠅においても Cys と His がヘム鉄の配位子として機能しているのではないかと予想されている。一方、酵母由来の CBS にはヘムが存在せず、類似する反応を触媒するバクテリア由来の PLP 含有酵素、O-アセチルセリンスルフヒドリラーゼ (O-アセチルセリンとスルフィドからシステインを生成する酵素) もヘムを含まない酵素である。触媒機能に直接影響を及ぼさないとされるヘムが、ヒトやラット由来の CBS に何故含まれるのかを考察するために実施した実験の結果を報告する。

本実験では、ヒト由来の野生型 CBS、野生型から C 末端 140 残基 (CBS ドメインと呼ばれる $\beta - \alpha - \beta - \beta - \alpha$ 構造を含む部位) を削除した truncated CBS、ならびに、これらの変異体を実験材料として用いた。

[ヘム近傍の変異が活性に及ぼす影響] 現時点で明らかな truncated CBS の結晶構造によると、活性中心にある PLP とヘムとは約 20Å 離れている。活性中心から離れているにもかかわらず、ヘムが本酵素において何らかの役割を持つとするならば、ヘム近傍の変異 (ヘム近傍の構造変化) が活性に対して影響を及ぼすことがあり得るのではないかと考え、Arg51 → Ala, Arg224 → Ala, Gly57 → Pro の 3 種類の変異を導入し、それら変異体の活性を測定した。Arg51 は、軸配位子の一つであ



る Cys52 の隣に位置し、ヘムのプロピオン酸鎖と水素結合している。Arg224 も Arg51 と同様、ヘムのプロピオン酸鎖と水素結合可能な位置に存在する。Gly57 はヘム鉄の軸配位子 (Cys-52 と His-65) を含むループの付け根に位置する残基である。

精製した変異体 R51A, R224A, G57P の変異体の吸収スペクトルはいずれも野生型と大きな違いはなく、ヘム由来の吸収 (Soret band) が 428nm に観察され、変異の導入がヘム鉄の配位状態を変化させることはなかった。一方、活性は野生型と比較して、35~60%ほど減少した。変異によってヘム鉄の配位構造に変化は見られなかったものの、活性には緩やかな変化が見られたことから、ヘム近傍の構造変化が約 20Å 離れた活性中心に影響を与えると推察された。

[ヘムの配位構造と活性との相関] 前述の結果を踏まえて、ヘムの配位構造の変化によって酵素活性を変動できるかどうかを検討した。

ヘム鉄が3価の時、CBS は Cys52 と His65 を配位子として持つ。今のところ、鉄3価の状態では配位構造を変化させられる化合物は見出せなかったが、ヘム鉄を2価に還元すると最大吸収が 428 nm から 450 nm へと移動し、更に一酸化炭素 (CO) を吹き込むと Soret band は 419 nm へとシフトした。CO 体において、P450 の CO 体のように最大吸収が 450 nm ではなく 419 nm であったことから、His-Fe-CO の構造を持っていると考えられる。還元体の活性は、酸化体 (ヘム鉄が3価の時) の約半分、CO 体も活性が低下した。

配位構造を変化させる要因を探る過程で、pH の変化に伴うヘム由来の吸収の変化を観察した。pH を 8 から酸性側にシフトすると Soret band は 428nm から 370 nm (酸性型) へとシフトする。一方、pH をアルカリ側にシフトさせると最大吸収の位置がわずかに変化し 422nm へと移動した (アルカリ型)。酸性型ならびにアルカリ型の酵素を再び pH 8 に戻しても 428nm に吸収を持つ native の状態には戻らず、422nm に吸収を持つ状態であった。この 422nm の状態の活性を pH 8 で測定し、native の状態 (最大吸収 428nm) と比較したところ、約 20%程度にまで低下していた。ESR などの実験結果とあわせて、現時点では、422nm 種も N-Fe-S の配位状態ではないかと考えているが、詳細は調査中である。

CBS においてヘム近傍の構造変化が活性に影響を与えるという結果が得られたが、生理的にヘムが活性制御に積極的に関わっているのか、あるいは、タンパク質 (酵素) の構造維持が主な役割なのか、を明らかにするためにはさらなる検討が必要である。