

博士学位論文

立体構造に基づく *Sphingobium* sp. SYK-6 由来
MTHFR の機能解析

物質構造科学専攻

于 宏洋

Yu Hongyang

学籍番号 20161351

Index

| | |
|---|-----------|
| 1. 序論 | 3 |
| 1-1. 脱メチル化反応..... | 4 |
| 1-2. 1C 代謝 (one carbon metabolism) | 5 |
| 1-3. 脱メチル化酵素に依存した 1C 代謝..... | 10 |
| 1-4. 脱メチル化酵素に依存する <i>Sphingobium</i> sp. SYK-6 の 1C 代謝..... | 12 |
| 1-5. 研究目的..... | 15 |
| 2. S6MTHFR 発現精製と WT の活性測定 | 17 |
| 2.1 S6MTHFR の発現 | 18 |
| 2.2 SEC-MALS による分子量の同定 | 25 |
| 2.3 嫌気滴定実験による精製サンプルの活性確認 | 27 |
| 2.4 S6MTHFR の NADH に対する比活性..... | 32 |
| 2.5 S6MTHFR の CH ₃ -THF に対する活性..... | 34 |
| 3. S6MTHFR の結晶構造解析と構造評価 | 40 |
| 3.1 結晶化、最適化と凍結条件の検討..... | 41 |
| 3.2 基質非結合型 S6MTHFR と THF 結合型 S6MTHFR の構造決定 | 44 |
| 3.3 結晶学的精密化..... | 47 |
| 3.4 基質非結合型 S6MTHFR の立体構造 | 50 |
| 3.5 S6MTHFR 及び S6MTHFR-CH ₃ -THF 複合体の立体構造比較..... | 51 |
| 3.6 S6MTHFR-CH ₃ -THF と EcMTHFR-CH ₃ -THF の構造比較 | 52 |
| 3.7 S6MTHFR と EcMTHFR-NADH complex との構造比較..... | 56 |
| 4. 構造情報に基づいた変異体の活性測定 | 61 |
| 4.1 CH ₃ -THF 反応に対する変異体の活性測定 | 62 |
| 4.2 NADH 反応に対する変異体の活性測定..... | 66 |
| 5. S6MTHFR の電子受容体について | 72 |
| 5.1 NAD ⁺ は S6MTHFR の電子受容体ではない..... | 73 |
| 5.2 S6MTHFR 電子受容体の検討 | 76 |
| 6. MTHFR ファミリーのアミノ酸配列解析 | 81 |
| 6.1 S6MTHFR ホモログの配列解析..... | 82 |
| 6.2 MTHFR の系統解析..... | 91 |

| | |
|-------------|-----|
| 7.まとめ..... | 98 |
| 参考文献: | 101 |
| 謝辞..... | 113 |
| 実績関連..... | 114 |
| 実験手法..... | 115 |

1. 序論

1-1. 脱メチル化反応

炭素は、核酸、アミノ酸、脂質、糖など生体物質の構成に必須な元素である。生物はこれらの化合物を合成するために、生育環境に応じて様々な炭素源を利用している。植物に代表される独立栄養性生物は光エネルギーや H_2 を利用し、 CO_2 から炭素を固定する (Weiss MC, *et al.*, 2016)。これに対して、ヒトを代表する従属栄養性生物は植物など独立栄養性生物が合成した澱粉などの化合物を摂取し、解糖系などの代謝経路を使って炭素源を獲得していることはよく知られた事実である。しかし、従属栄養性生物に属しながら、上記の解糖系でなく、脱メチル化反応を利用して炭素を獲得する生物も存在する (Bugg T, *et al.*, 2011)。

脱メチル化は名前通り、1C unit であるメチル基を化合物から除去する反応である。ヒトなどの生物にとって、脱メチル化は主に DNA, RNA, ヒストンを対象とし、脱メチル化反応によってメチル基を除去することで、遺伝子の修復、合成、転写、発現を制御していることが知られている (Chen Z and Riggs A, 2011)。特に有名なのは 2004 年に、これまで不可逆と言われたヒストン Lys メチル修飾を脱メチル化する酵素 Lysine specific demethylase (LSD)が発見され (Shi Y, *et al.*, 2004)、その後にガンなど様々な疾病に関与することが報告されたことである (Sainathan S, *et al.*, 2015)。これまで主に FAD、heme (Cytochrome P450) (Wang FY, *et al.*, 2015)、非 heme 鉄 (Tsukada Y, *et al.*, 2005)、Rieske 型 Fe-S クラスター (Dumitru R, *et al.*, 2009)を有する脱メチル酵素が報告されてきた。これらの酵素は脱メチル化反応を行いながら、1C unit であるメチル基をホルムアルデヒド (以後、HCHO)に変換することが知られている。しかし、上記の脱メチル化酵素と異なり、生物が外部から獲得した化合物を炭素源として利用する最初のステップとして、

H₄folate (以後、THF)を利用する脱メチル酵素も存在する。これら THF に依存した脱メチル酵素は炭素源となる基質から獲得したメチル基を THF に結合させることで、N⁵-メチル-THF(以後、CH₃-THF)を合成することが知られている (Abe T, *et al.*, 2005; Vannelli T, *et al.*, 1999)。THF に転移されたメチル基は、1C 代謝によってアミノ酸や核酸の合成に使われる。1C 代謝(one carbon metabolism)というのは、生物に必須の代謝系で、アミノ酸や核酸の合成のために THF に転移された炭素を利用する代謝系である(Patrick J. Stover, 2009)。

1-2. 1C 代謝 (one carbon metabolism)

1C 代謝は生命にとって極めて重要な代謝で、1950 年代頃から研究されてきた (Welch AD and Nichol CA, 1952)。1C 代謝では、炭素源となる化合物から獲得した 1C unit を THF (図 1-2-1)に結合させることで 1C-THF を生成する。その後、1C-THF に結合した 1C unit は様々な酵素の働きによりプリン、メチオニン、チミジル酸の合成に使われる (Locasale Jason W, 2013)。これまで知られている重要な 1C-THF としては、N⁵,N¹⁰-メチレンテトラヒドロ葉酸 (以後、CH₂-THF)、N¹⁰-ホルミルテトラヒドロ葉酸 (以後、CHO-THF)と CH₃-THF がある(Ducker GS and Rabinowitz, 2016)。

CH₂-THF は 1C-THF の中で最も不安定な葉酸誘導体で、自発的かつ可逆的に THF と HCHO に分解されるが、1C-THF の中で通常は最初に合成される。その後、一部の CH₂-THF はチミジル酸シンターゼ (TYMS) によってチミジル酸の合成に使われる。また、一部の CH₂-THF はメチレンテトラヒドロ葉酸脱水素酵素 (MTHFD) によって CHO-

THF に変換され(Shin M, *et al.*, 2017)、プリン合成に使われる (Denis V, *et al.*, 1998)。チミジル酸や CHO-THF の合成に利用される部分を除き、残りの CH₂-THF はすべてメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR)によって、最も安定な葉酸誘導体である CH₃-THF に変換される (Hiraoka M, *et al.*, 2017)。その後、CH₃-THF はホモシステインにメチル基を提供することでメチオニンの合成に使われる。これによって、生体内のホモシステイン濃度が調節され、細胞内の酸化ストレスが制御されることが報告されている (Vitvitsky V, *et al.*, 2006)。また、メチオニンは細胞内のメチル化反応に必要なメチル源である *S*-アデノシルメチオニン (SAM)の合成に使われることで、細胞の分化と修復に関与することが知られている (Shiraki N, *et al.*, 2014) (図 1-2-2)。

すでに述べたように、CH₂-THF は 1C-THF の中で最初に合成される。これはヒトや大腸菌などほとんどの生物では、セリンあるいはグリシンを主な炭素源として 1C 代謝を行うためである。これらの通常の生物では、グルコースが解糖系によって 3-ホスホグリセリン酸 (3-PG)に変換された後、*de novo* serine synthesis 代謝経路によってセリンが合成される (Mullarky E, *et al.*, 2016)。セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ(以後、SHMT)によってセリンから 1 C unit を転移された TFH は CH₂-THF となり、1C unit を失ったセリンはグリシンに変換される。グリシンはグリシン開裂系 (GCV) の GcvP によって CO₂が除去されて -CH₂-NH₂に変換された後、GcvT の働きにより THF と結合し CH₂-THF と NH₃を生成する (図 1-2-3) (Kikuchi, *et al.*, 2008) 。そのため、1C 代謝を行う最初のステップとして、CH₂-THF が SHMT/GCV によってセリンおよびグリシンから合成される。その後、MTHFR が CH₂-THF を CH₃-THF に還元することで、THF 代謝経路とメチオニン代謝経路が結びつくことが知られている。

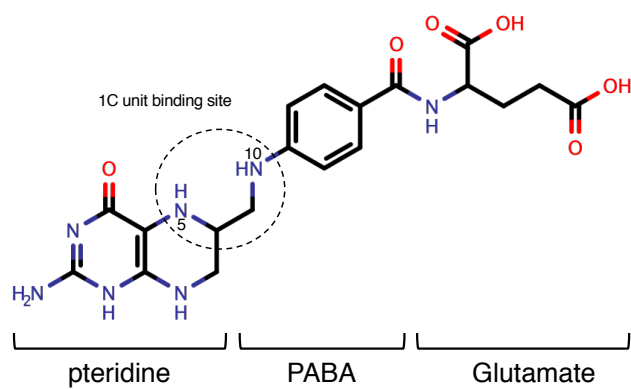


図 1-2-1. H₄folate (THF)の構造式

1C unit は N⁵ か N¹⁰、もしくは N⁵ と N¹⁰ を架橋するように結合する。

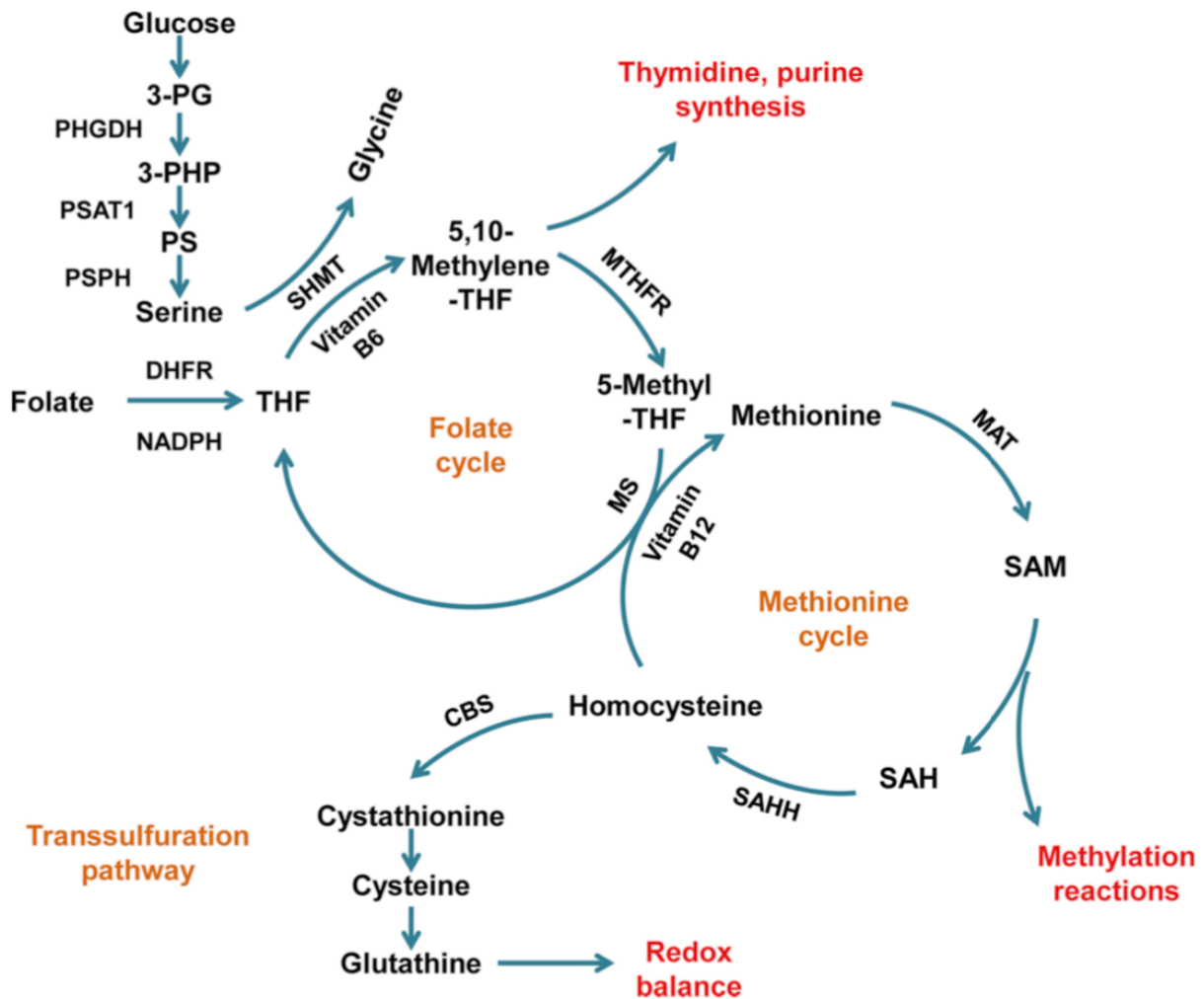


図 1-2-1. 1C 代謝 (Zeng J, et al, Pharmacological Research, 149, 2019)

3-PG, 3-phosphoglycerate; 3- PHP, 3-phosphohydroxypyruvate; PS, phosphoserine; PHGDH, 3-phosphoglycerate dehydrogenase; PSAT1, phosphoserine aminotransferase1; PSPH, phosphoserine phosphatase; THF, tetrahydrofolate; DHFR, dihydrofolate reductase; SHMT, serine hydroxymethyltransferase; MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; MS, methionine synthase; MAT, methionine adenytransferase; SAM, S-adenosyl-methionine; SAH, S-adenosylhomocysteine; SAHH, S-adenosylhomocysteine hydrolase; CBS, cystathionine β synthase.

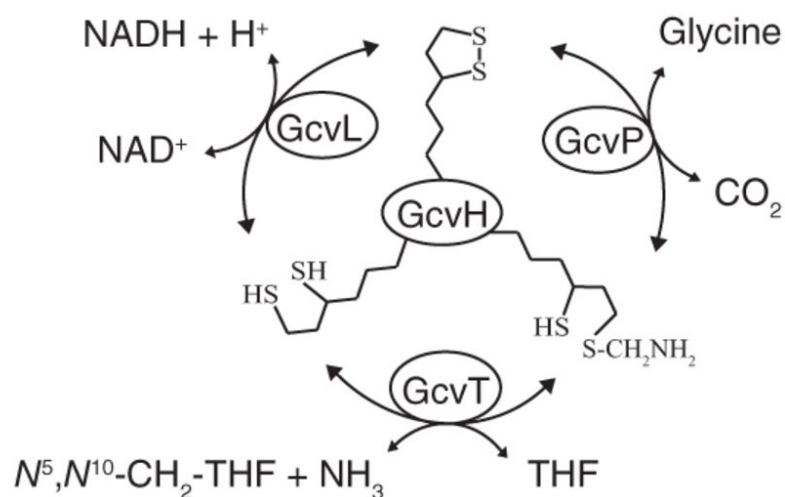


図 1-2-3. グリシン開裂系 (Tezuka T, *et al.*, 2014 より)

GcvP, GcvT, GcvH, and GcvL are the components of the GCS system. THF, tetrahydrofolate. An aminomethyl moiety bound to the lipoic acid of GcvH represents an intermediate that is degraded to methylene-THF and ammonia by the action of GcvT.

1-3. 脱メチル化酵素に依存した 1C 代謝

上で述べた経路とは異なり、脱メチル化酵素が 1C 代謝と繋がっているバクテリアも存在する。これらのバクテリアはグルコースを利用しない時、カフェイン (Gummadi SN, *et al.*, 2009)、クロロメタン (以後, CH_3Cl) (Nadalig T, *et al.*, 2011)、バニリン酸 (以後, VA) (Mallinson SJB, *et al.*, 2018; Abe T, *et al.*, 2005)、シリンガ酸 (以後, SA) (Masai E, *et al.*, 2004)、ジカンバ (以後, DA) (Dumitru R, *et al.*, 2009; Yao L, *et al.*, 2016) など自然界に存在するメチル基含有化合物を唯一の炭素源として生育できる。第 1 節で述べたが、1C 代謝との観点から見るとこれら脱メチル化酵素は、THF を直接利用するかしないかの 2 種類に分類される。THF を直接使わない酵素は、heme (Cytochrome P450) (Mallinson SJB, *et al.*, 2018) や Rieske 型 Fe-S クラスター (Dumitru R, *et al.*, 2009) を利用し、脱メチル化反応を行う。これによって、1C は HCHO に変換された後、複数の触媒反応を経て間接的に $\text{CH}_2\text{-THF}$ の合成に利用されることが知られている (Burgos-Barragan G, *et al.*, 2017; Morellato AE, *et al.*, 2020) (図 1-3-1)。

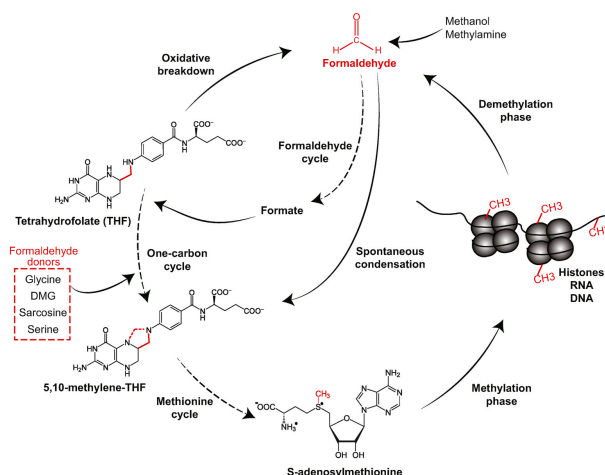


図 1-3-1. HCHO と 1C 代謝 (Burgos-Barragan G, *et al.*, 2017 より)

$\text{CH}_2\text{-THF}$ は HCHO によって合成された後、通常 1C 代謝と同様に MTHFR によって $\text{CH}_3\text{-THF}$ に変換される。

しかし上記と異なり、THF を利用し直接 CH₃-THF を合成する THF 依存脱メチル化酵素も存在する。第 2 節で述べた SHMT/GCV を用いて Ser/Gly から CH₂-THF を合成した後、MTHFR が CH₂-THF を CH₃-THF に還元することで 1C 代謝を行う生物と違い、THF 依存脱メチル化酵素を有する生物は先に CH₃-THF を生成し、その後に MTHFR が CH₃-THF を CH₂-THF に酸化することで 1C 代謝を行うと考えられている (Yao S, *et al.*, 2019)。このような CH₃-THF を最初の 1C-THF として 1C 代謝を行う生物においては、これまでに 3 種類の THF 依存脱メチル化酵素が報告されている。CH₃Cl や methanol で生育できる *Methylobacterium* sp. strain CM4 由来コリノイド (以後、Co) 含有酵素 CmuAB (Studer A, *et al.*, 1999)、DA で生育できる *Rhizorhabdus dicambivorans* Ndbn-20 由来 Dmt (Yao L, *et al.*, 2016)、そして低分子型リグニン VA および SA で生育できる *Sphingobium* sp. SYK-6 由来 LigM/DesA である (Abe T, *et al.*, 2005)。

この中で THF 依存脱メチル酵素を有する生物の 1C 代謝がどのように、CH₂-THF でなく、CH₃-THF を最初の 1C-THF として代謝を行うのかに関する知見を得るために、我々はリグニン代謝のモデル生物である *Sphingobium* sp. SYK-6 の 1C 代謝に注目した。

1-4. 脱メチル化酵素に依存する *Sphingobium* sp. SYK-6 の 1C 代謝

Sphingobium sp. SYK-6 (以後, SYK-6) は 1987 年に Katayama グループによってパルプ工場の廃液処理槽から単離されたグラム陰性好気菌である (Katayama Y, *et al.*, 1987)。リグニンは、地球上で 2 番目に豊富な天然高分子であるにも関わらず、難分解性により熱源としてしか使われていない。このリグニンを有効利用するために、低分子型リグニンを代謝できる *Sphingobium* sp. SYK-6 は共同研究先である長岡技術科学大学の政井研究室で長年にわたり研究されてきた (Katayama, *et al.*, 1988; Masai, *et al.*, 1989; Masai, *et al.*, 1991)。その結果、SYK-6 は β -アリールエーテル、ビフェニル、ジアリールプロパン、フェルラ酸などリグニン由来化合物を、一旦共通の中間代謝物である VA あるいは SA まで分解する。その後、THF 依存型脱メチル化酵素である LigM や DesA は VA や SA からメチル基を獲得し CH_3 -THF を合成した後、脱メチル化によって生じたプロトカテク酸 (PCA) や没食子酸 (GA) は芳香環開裂反応によりピルビン酸とオキサロ酢酸まで分解され、TCA 回路で利用されると推定されている (Kamimura N, *et al.*, 2017) (図 1-4-1)。

グルコースなど炭素源が豊富な環境下で育つ一般的な生物種と違い、SYK-6 はリグニン由来芳香族化合物しかないと思われる環境下で生育する。その上、これまでの研究から、SYK-6 は一般生物のように解糖系を利用しグルコースを炭素源として生育できない上に (Varman AM, *et al.*, 2016)、グリシンを基質に CH_2 -THF を作り、1C 代謝を行う GCV 系遺伝子も持っていない。その代わりに、SYK-6 が VA を唯一の炭素源として生育する際に、LigM によって生成された CH_3 -THF は MTHFR (以後、S6MTHFR) によって CH_2 -THF に変換され 1C 代謝を行うことが推定された (Masai, *et al.*, 2007)。

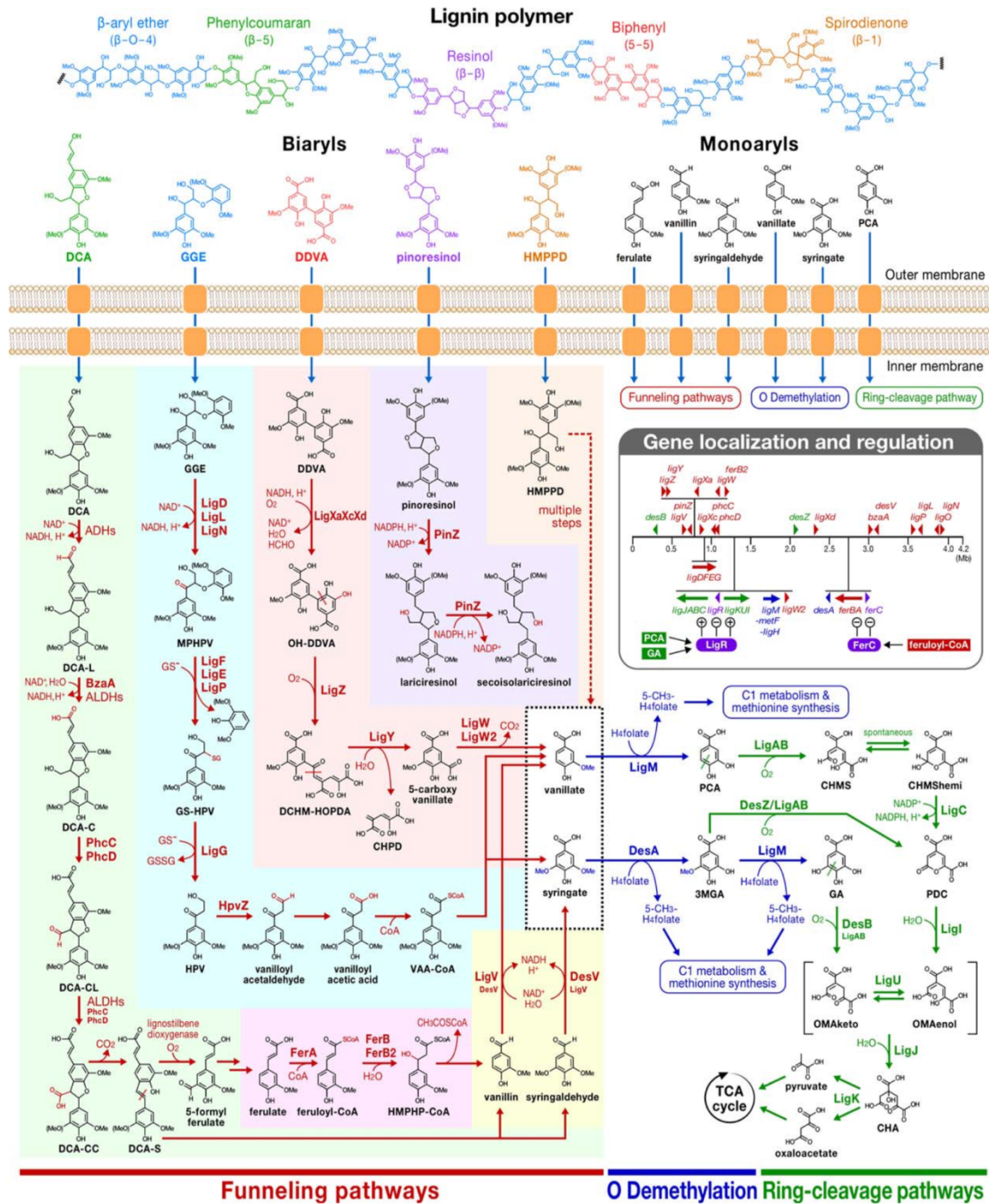


図 1-4-1 *Spingobium* sp. SYK-6 のリグニン依存代謝経路

(Kamimura N, *et al.*, 2017 より)

第2節で述べたように、MTHFRはSHMT/GCVによって生成されたCH₂-THFをCH₃-THFに還元することで1C代謝において重要な役割を果たしている。しかし、SYK6の1C代謝におけるS6MTHFRの役割についてはまだわかっていない。2002年のSonokiらの研究では、*s6mthfr*の欠損破壊株はVAで生育できない上、細胞の抽出液から大量のCH₃-THFの蓄積が見られたことから、S6MTHFRはSYK-6の代謝に重要不可欠であることが示唆された(Sonoki T, *et al.*, 2002)。2017年に筆者が属するグループは初めてTHF依存脱メチル化酵素であるLigMの結晶構造と酵素学的性質を明らかにする同時に、LigMがCH₃-THFを合成する証拠を示した(Harada A, *et al.*, 2017)。さらに、VAからはLigMにより先ずCH₃-THFが合成されるため、S6MTHFRが一般のMTHFRの反応方向と逆に、CH₃-THFをCH₂-THFに酸化する可能性が考えられた。しかし、これに関しては実験的な証明もなく、CH₃-THFをCH₂-THFに酸化するメカニズムも不明である。

1-5. 研究目的

一般的な生物の 1C 代謝においてはグルコースを炭素源とし、SHMT/GCV を用いて Ser/Gly から CH₂-THF を生成した後、MTHFR が CH₂-THF を CH₃-THF に変換する(図 1-5, B)。しかし、VA を炭素源として生育する SYK-6 では、THF 依存脱メチル化酵素 LigM を利用し CH₃-THF を生成した後、SYK-6 の MTHFR である S6MTHFR が CH₃-THF を CH₂-THF に酸化することで 1C 代謝を行うと考えられ、S6MTHFR は通常の生物の MTHFR とは逆の反応を行う必要がある (図 1-5, A)。そこで、我々は S6MTHFR の酵素学的な性質を調べその性質を明らかにするとともに、その触媒反応のメカニズムを原子のレベルで解明することにした。この酵素と LigM が VA と 1C 代謝を繋ぐメカニズムを明らかにできれば、THF 依存脱メチル化酵素を利用するバクテリアの代謝系の進化の一端に迫ることができると考えた。

本論文は以下のように構成される。本章に続き、第 2 章では S6MTHFR サンプルの準備と活性測定による S6MTHFR の酵素学性質解明、第 3 章では S6MTHFR の構造決定と構造評価、第 4 章では構造情報に基づいた活性測定、第 5 章では電子受容体、第 6 章では配列解析、第 7 章では本論文のまとめの順にそれぞれの結果と考察を述べる。また、最後に実験手法の詳細を記した。

2. S6MTHFR 発現精製と WT の活性測定

これまでに解明されていない S6MTHFR の酵素学的性質を明らかにするため、S6MTHFR のサンプル調製と野生型 S6MTHFR の活性測定を行なった。

2.1 S6MTHFR の発現

活性測定用の S6MTHFR タンパク質を準備するために、以下の図 2.1 で示したように His-tag と GST-tag を用いた S6MTHFR の発現ベクターを作製した。その上で、ユーロフィン株式会社に DNA シークエンスを委託し、GenBank に登録されている *s6mthfr* の配列 (BAK65950.1) と一致することを確認した。

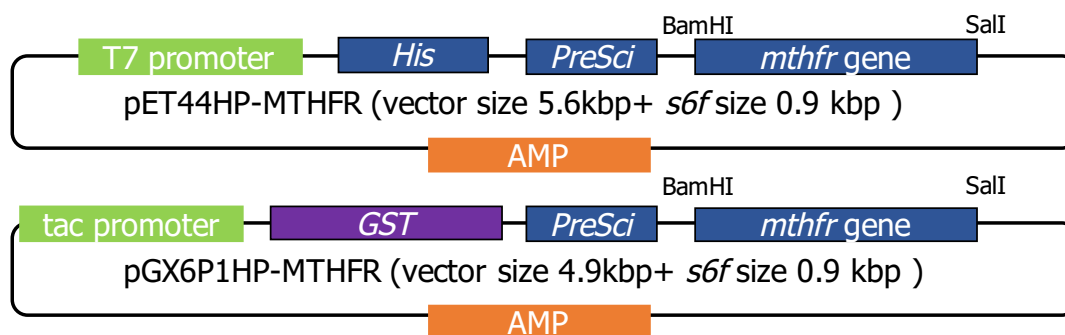


図 2.1 S6MTHFR の発現ベクター

発現条件を検討するため、まず 20 ml LB 培地で実験することにした。上記の pGX6P1HP-MTHFR もしくは pET44HP-MTHFR の発現ベクターで形質転換した大腸菌 BL21 (DE3)を用いて、0.5 mM IPTG で誘導をかけた後、37 °C, 3 時間または 16 °C, overnight の 2 条件に分けて培養収菌し、超音波破碎を行った。回収した可溶性の上清に Ni sepharose /GS4B を加え、破碎後の全画分、上清画分 resin をそのまま SDS-PAGE で分析した。その結果、分子量が 59 kDa である S6MTHFR-GST タグ融合タンパク質と、分子量が 32 kDa である S6MTHFR-His タグ融合タンパク質のバンドが確認でき、目的タンパク質が発現したことがわかった (図 2.2)。GST-tag の上

清画分である lane2,6 と、His-tag の上清画分である lane4,8 から 4 L 大量培養で十分な量の可溶性 S6MTHFR を回収できると判断した。また、16 °C overnight 条件と比べて 37 °C 3 h で培養した方が効率的に見えたため、以後の発現条件は 37 °C, 3h に決定した。

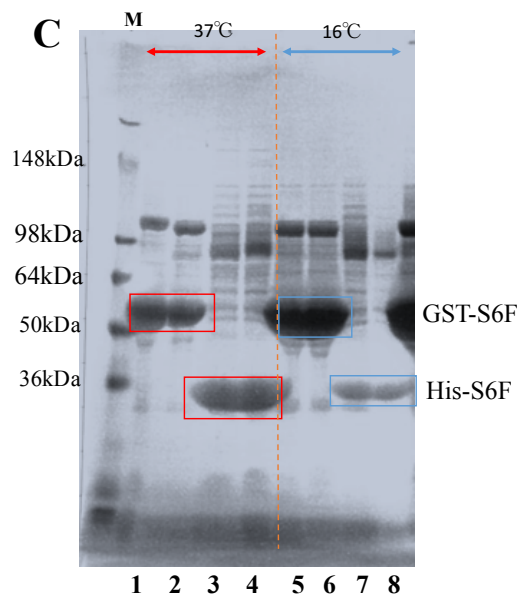


図 2.2 SDS-page における S6MTHFR の発現確認

M: 分子量マーカー、GST-S6MTHFR を GST-S6F、His-S6MTHFR を His-S6F で表記した

lane 1 (total fraction), lane 2 (soluble fraction): 37°C, GST-S6MTHFR タグ条件の resin fraction;

lane3(total fraction), lane 4(soluble fraction): 37°C, His-S6MTHFR タグ条件 resin fraction、

lane 5(total fraction), lane 6(soluble fraction): 16°C, GST-S6MTHFR タグ条件の resin fraction、

lane7(total fraction), lane 8(soluble fraction): 16°C, His-S6MTHFR タグ条件 resin fraction。

S6MTHFR 分子量約 31 kDa、His-tag 分子量約 1 kDa、GST-tag 分子量約 28 kDa。

4 L LB 培地を用いて His-S6MTHFR もしくは GST-S6MTHFR で形質転換した大腸菌を 37 °C, 3h でそれぞれ培養した後、超音波で細胞を破碎し遠心した。50 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.3 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 mM imidazole の buffer 条件で、それぞれの上清を Ni sepharose /GS4B に結合させ、open column で洗浄した後、そのまま prescission protease で tag を切断し溶出した。SDS-PAGE の結果では、GST-S6MTHFR (lane 1)と His-S6MTHFR (lane6) の total fraction のバンドが非常に濃いことを確認でき、S6MTHFR が大量発現していたことがわかった。また、それぞれの隣にある上清 fraction (lane 2,7) も濃いバンドを示し、十分な可溶性を有することが考えられる。さらに、open column からの flow through fraction (lane3,8)と wash fraction のバンド (lane 4,9) から洗浄条件は十分であることが示された。その上、GST-S6MTHFR (lane 5)の elution fraction のバンド位置が 36 kDa 以下であり、His-S6MTHFR の elution fraction のバンド位置 lane7 より低いことから、GST-tag と His-tag が切断されていると考えられた (図 2.3.1)。

S6MTHFR は FAD を cofactor とする酵素であるため、FAD が結合している時にしか活性を持たない。室内環境下において FAD は酸化型の状態を示すため、波長が 450 nm 付近に吸収ピークがある。450nm における FAD の吸光係数は $14.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ であることに従い(Igari S, *et al.*, 2011)、nanodrop を用いて 450 nm における最終産物の吸光度を測定し計算を行った結果 (S6MTHFR Mw: 31367 Da)、合計 4 L の培養液から約 0.28 g の S6MTHFR (FAD)を回収できたと考えられた。また、glutathione-resin より Ni-resinの方が再利用しやすいので、以後は His-tag 条件で精製することにした。

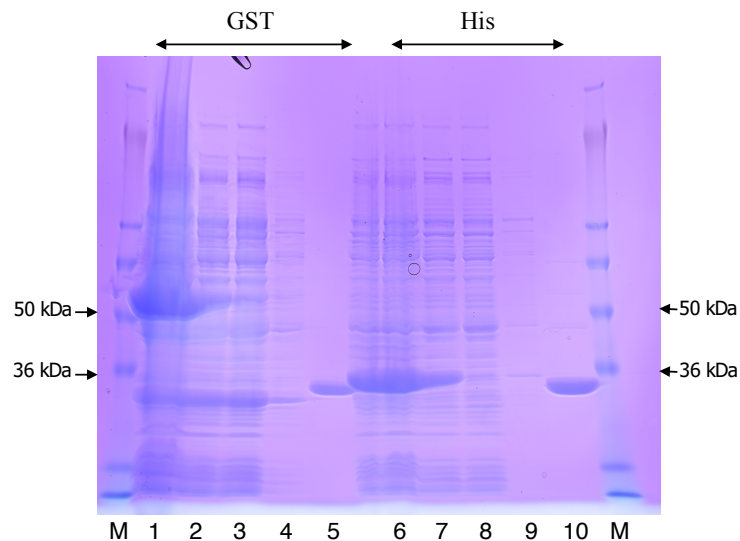


図 2.3.1 SDS における発現精製確認

M: 分子量マーカー, 1: GST-S6MTHFR total fraction, 2: GST-S6MTHFR supernatant fraction, 3: GST-S6MTHFR flow through fraction, 4: GST-S6MTHFR wash fraction, 5: GST-S6MTHFR elution fraction, 6: His-S6MTHFR total fraction, 7: His-S6MTHFR supernatant fraction, 8: His-S6MTHFR flow through fraction, 9: His-S6MTHFR wash fraction, 10: His-S6MTHFR elution fraction

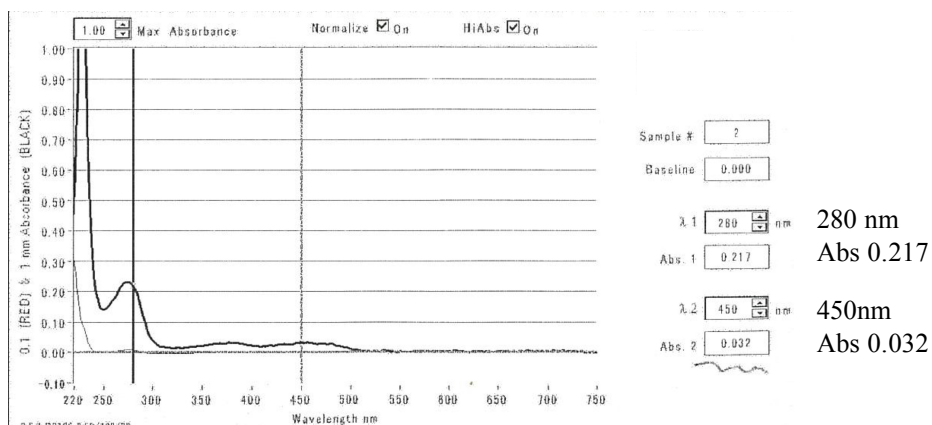


図 2.3.2 nanodrop における S6MTHFR の吸光スペクトル

nanodrop の場合、セル（光路）の長さは 1 cm ではなく 1 mm のため、測定値の 10 倍で濃度を計算した。

Ni-resin で精製したサンプルを、さらに陰イオン交換カラム(MonoQ)により精製した。50 mM Tris-HCl (pH8.0), 25 mM NaCl, 1 mM DTT で平衡化したカラムにサンプルを添加し、bed volume の 10 倍をかけて塩濃度を 0.5 M まで上げて S6MTHFR を溶出した。その結果、fraction 14, 15, 16 から 280 nm のピークと S6MTHFR の cofactor である酸化型 FAD に由来する 450 nm のピークが同時に検出された (図 2.4.1) 。さらに、回収した fraction の一部を SDS-PAGE で確認した所、S6MTHFR (Mw: 約 31 kDa) に対応すると思われるバンドを観察できた (図 2.4.2) 。しかし、fraction 14, 15 の lane には目的の S6MTHFR バンド上方の 64 kDa 付近に不純物のバンドもあることが示された。これ結晶化に使うのは不適切と考え、さらなる精製を行うことにした。

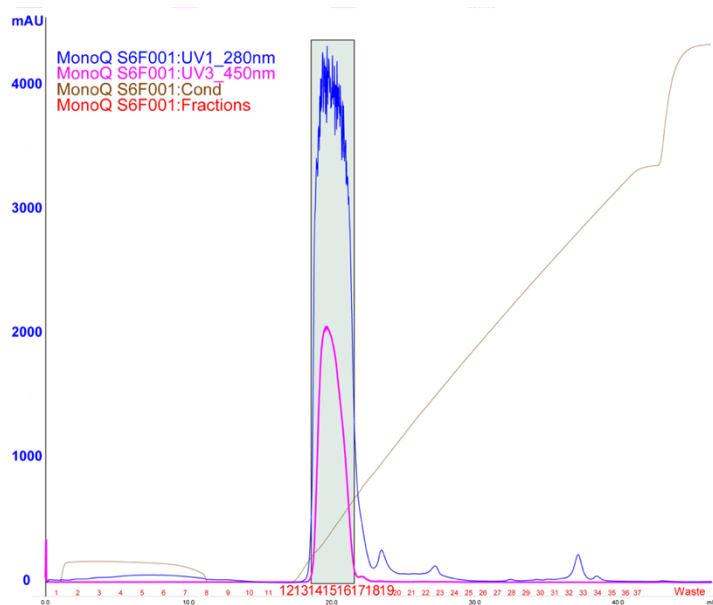


図 2.4.1 MonoQ における S6MTHFR の精製結果

*X 軸 : fraction volume, Y 軸 : 吸光度

Buffer A: 50 mM Tris-HCl (pH8.0), 25 mM NaCl, 1 mM DTT

Buffer B: 50 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 M NaCl, 1 mM DTT

Mono Q 5/50 GL

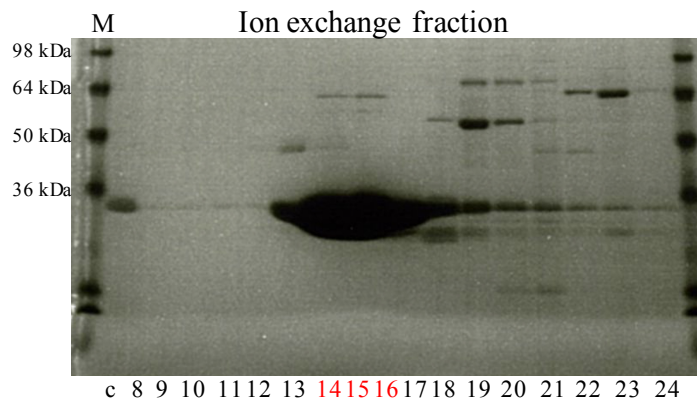


図 2.4.2 MonoQ 精製 fraction の SDS-page 確認結果

*Lane c: affinity purification 段階の elution fraction, lane 8~24: 図 2.4.1 の fraction volume

MonoQ からの溶出された fraction14, 15, 16 を回収した後、10mM HEPES-NaOH (pH7.5), 100 mM NaCl の buffer 条件でゲル濾過 (Superdex200) 精製を行なった。溶出のチャートから fraction15, 16, 17, 18, 19 から 280 nm のピークと 450 nm のピークを検出した (図 2.5.1)。回収した fraction を SDS-PAGE で確認した結果、S6MTHFR (Mw: 約 31 kDa) の非常に濃いバンドを観察できた (図 2.5.2)。ちなみに、S6MTHFR バンド(fraction15, 16, 17, 18, 19)の下方にもバンドが存在するが、恐らく分解物のバンドでバンドの位置から分子量が 30 kDa 以下であり、分子量カット 30 kDa の限外濾過器で濃縮することで除去できた。SDS-PAGE 上におけるバンドの面積から純度を計算した結果、純度 95% の S6MTHFR が得られた。濃縮した後に nanodrop で濃度を測定し、最終的に約 11.34 mg/L の高純度 S6MTHFR を取得できた。

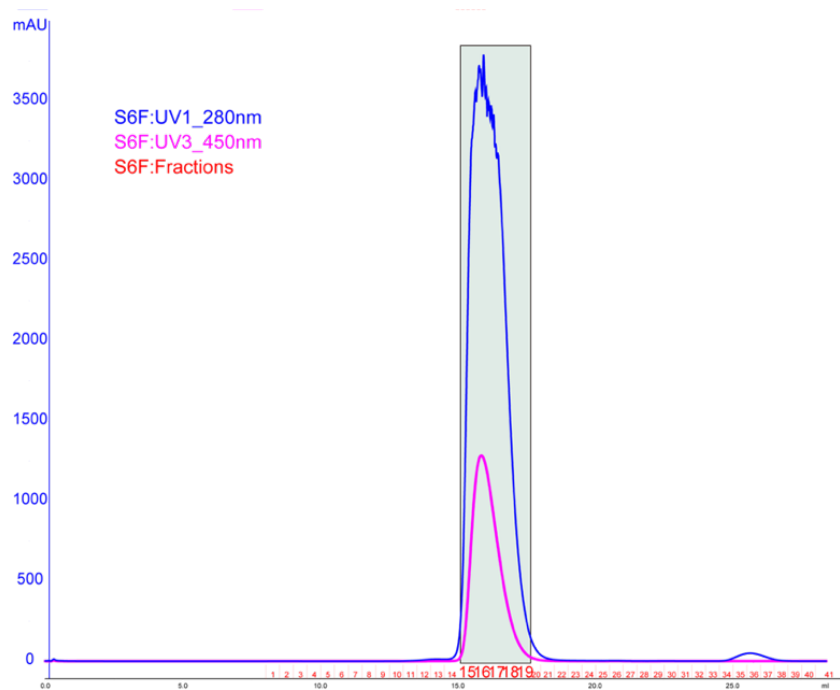


図 2.5.1 Superdex200 における S6MTHFR の精製結果

*X 軸 : fraction volume, Y 軸 : 吸光度

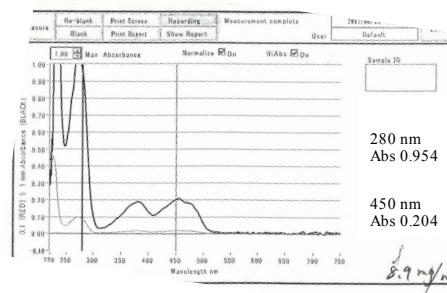
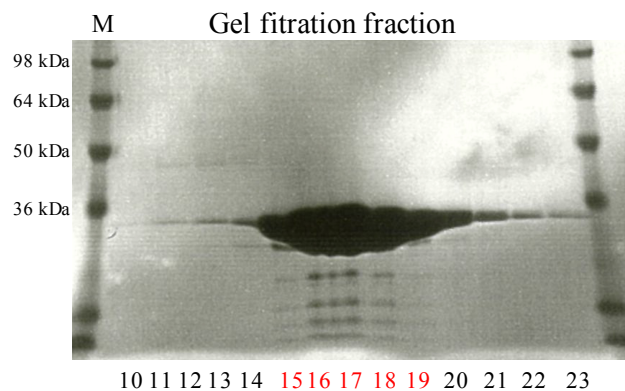


図 2.5.2 SDS-page における S6MTHFR のゲル濾過結果 (左)、ゲル濾過後の S6MTHFR の吸光スペクトル (右)

*Lane 10~23: 図 2.5.1 の fraction volume

2.2 SEC-MALS による分子量の決定

これまでの $\text{CH}_2\text{-THF}$ から反応する典型的な MTHFR はいずれも多量体を形成することが報告されてきた (Sheppard C, *et al.*, 1999; Matthews R, *et al.*, 1986)。溶液中における S6MTHFR の会合状態を明らかにするため、SEC-MALS を用いて S6MTHFR の分子量を測定した。10 mM HEPES-NaOH (pH7.5), 100 mM NaCl の buffer 条件で S6MTHFR の溶液中における分子量を調べた結果を図 2.6.1 及び図 2.6.2 に示す。S6MTHFR が 32 min (16ml) 付近にシングルピークを示した。アミノ酸配列から計算された S6MTHFR の分子量の理論値は 31.37 kDa であることに對し、実験の結果では数平均分子量 M_n 、重量平均分子量 M_w 及び M_w/M_n がそれぞれ $29.61 \text{ k} \pm 0.512\% \text{ Da}$ 、 $29.61 \text{ k} \pm 0.502\% \text{ Da}$ 及び $1.000 \text{ k} \pm 0.717\%$ であることが示された。この結果から、S6MTHFR は溶液中では単一な粒子として分布し、単量体として存在することがわかった。

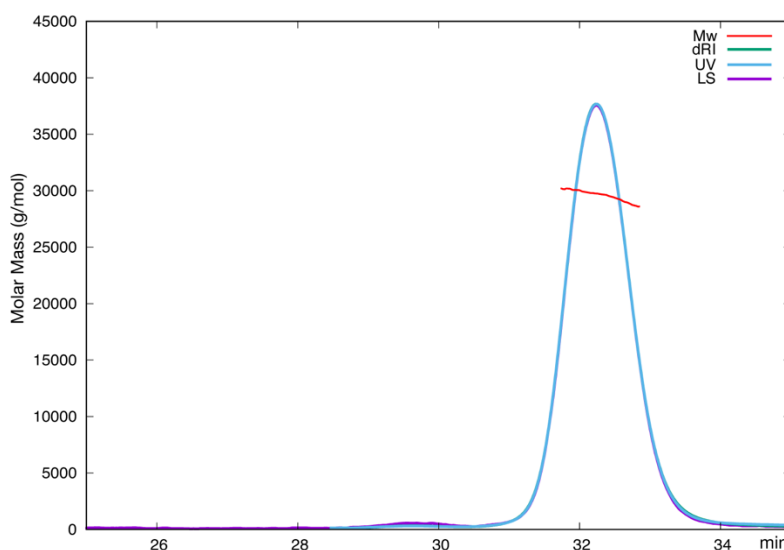


図 2.6.1 SEC-MALS における溶出チャット

| | Peak 1 |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| Masses | |
| Injected Mass (μg) | 800.00 |
| Calculated Mass (μg) | 267.13 |
| Mass Recovery (%) | 33.4 |
| Mass Fraction (%) | 100.0 |
| Molar mass moments (g/mol) | |
| Mn | 2.961×10^4 (±0.512%) |
| Mp | 2.975×10^4 (±0.142%) |
| Mv | n/a |
| Mw | 2.961×10^4 (±0.502%) |
| Mz | 2.962×10^4 (±1.112%) |
| Polydispersity | |
| Mw/Mn | 1.000 (±0.717%) |
| Mz/Mn | 1.000 (±1.224%) |

図 2.6.2 溶液中の分子量

Mn: 数平均分子量; Mp: ピークトップ分子量; Mv: 粘度平均分子量; Mw: 重量平均分子量; Mz: Z 平均分子量

2.3 嫌気滴定実験による精製サンプルの活性確認

MTHFR (EC.1.5.1.20)はFADを補因子として Ping-Pong Bi-Bi 反応を触媒する酸化還元酵素である。MTHFR の全反応は、2 電子が NADH からヒドリドの形で CH₂-THF に渡された後に CH₃-THF が生成され、 ΔG^0 が-21.6 kJ/mol になる発エルゴン反応である (Wohlfarth G, *et al.*, 1991)。この触媒反応は 2 つのステップ: 1) **NADH 半反応**: NADH を利用して補因子 FAD⁺を還元する反応(reductive half-reaction)、2) **THF 半反応**: 還元された FADH₂により CH₂-THF を還元し CH₃-THF を生成する反応(oxidative half-reaction)に分けられる (Trimmer E, *et al.*, 2001) (図 2-3-1)。また、*In vitro* では MTHFR による CH₃-THF の酸化という、上記の反応の逆反応も起こるが、NADH による MTHFR の還元反応の k_{cat}/K_m は CH₃-THF による MTHFR の還元反応の約 45 倍であり (Zuo C, *et al.*, 2018)、かつ SHMT/GCV は CH₂-THF を作ることや細胞内における NADH の濃度が CH₃-THF より高い状況下において、MTHFR は CH₂-THF から CH₃-THF にしか反応しないと考えられてきた。

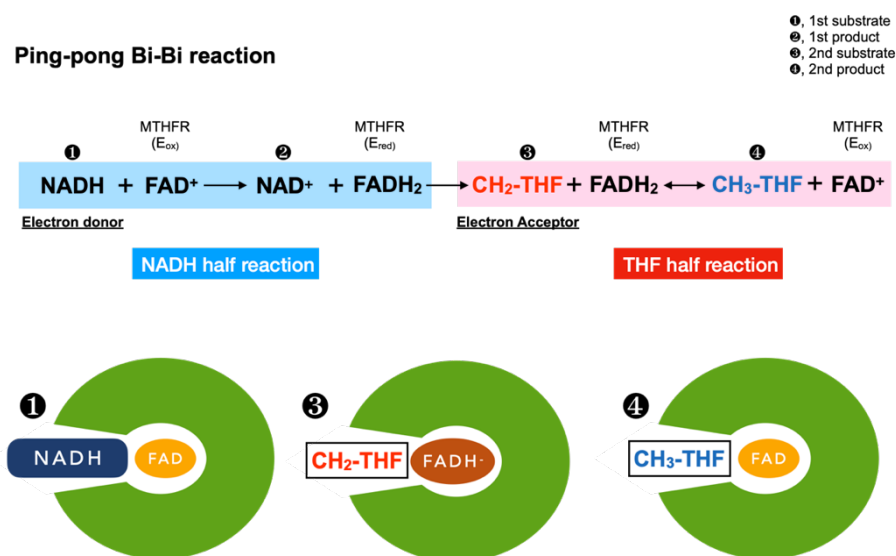


図 2-3-1. MTHFR の Ping-Pong Bi-Bi 反応

しかし、S6MTHFR は THF 依存脱メチル化酵素 LigM が CH₃-THF を生成する影響を受け、逆方向から反応すると推定された。S6MTHFR とほかの MTHFR との間には約~29% のアミノ酸配列相同性を有すること。さらに、S6MTHFR、大腸菌 MTHFR (以後、EcMTHFR) 及びもう一つ基質非結合型構造が決定されている好熱菌である *Thermus thermophilus* HB8 由来 MTHFR 間とのシーケンス比較では、NADH との触媒反応に重要と考えられている触媒残基 Glu21 (EcMTHFR Glu28) と Asp107 (EcMTHFR Asp120) が S6MTHFR にも保存されている (図 2-3-2)。そのため、嫌気条件で S6MTHFR の CH₃-THF と NADH に対するそれぞれの素反応を比較した (図 2-3-3)。

| | | | | | |
|--------------------|--------------------|------------------|-----------------|--------------|------------------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| <i>S. SYK-6</i> | MATATLD---- | KAA LSRLF--TDYSL | EI-----TPKDVEAL | ENAAHMIPP--G | TLISVTFLLP-G |
| <i>E. coli</i> | MSFFHASQRDALNQS | LAEVQGQINVSF | EFFPPRTSEMEQL | WNSIDRLSSLKP | KFVSITYGANS |
| <i>Thermus HB8</i> | MKI-----RDLLKAR | RGPL-----FSF | EFFPPKDPEGEEAL | FRTLEELKAFRP | AFVSITYGAMG |
| | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
| <i>S. SYK-6</i> | AEYEDRARA | KRIQEL-GFRP | VPHLSARRLI | DEADLRITYLD | MLKGVIDLKH |
| <i>E. coli</i> | GERDRTHSII | KGIKDRGLEA | APHLTICID-A | TPDELRTIAR | DYWNN-GIRH |
| <i>Thermus HB8</i> | STRERSVAWA | QRIQSL-GLNP | LAHLTVAG-Q | SRKEVAEVLH | RFVES-GVEN |
| | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 |
| <i>S. SYK-6</i> | LGIYE----- | DALA LIDSGILKEY | GIEHCGISGY | PEGHPDITD-E | KLAKAMHDKV |
| <i>E. coli</i> | SG-----KPE-- | MYASD LVTLLKEVAD | --FDISVAAY | PEVHPEAKSAQ | ADLLNLKRKV |
| <i>Thermus HB8</i> | ERVFRPHPEGFRY | AAE LVALIRERYG | DRVSVGGAAAY | PEGHPESESLE | ADLRHFKAKV |
| | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 |
| <i>S. SYK-6</i> | GIDY SIMTQFGF | DA EPVLEWLKQI | RSEGIDGPVR | IGLAGPASIK | TLLRFAARCG |
| <i>E. coli</i> | GANR -AITQFFFDV | ESYLRFDRDC | VSAGIDVEII | PGILPVSNEK | QAKKFADMTN |
| <i>Thermus HB8</i> | GLDF -AITQLFFNN | AHYFGFLERA | RRAGIGIPIL | PGIMPVTSYR | QLRRFTEVC |
| | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 |
| <i>S. SYK-6</i> | KK Y----- | GLSITSLIG | SAGPDPVIED | LTPVLGPEHG | QVHLHFYPPG |
| <i>E. coli</i> | QM FDGLDDDAETRKL | VG ANIAMDMVKI | LS-----REG | VKDFHFYTLN | RAEMSYAICHTL |
| <i>Thermus HB8</i> | AK LERHQDDPKAVLEIG | VEHAVRQVAE | LL-----EAG | VEGVHFYTLN | KSPATRMVLERLGLRP |

図 2-3-2. SYK-6、*E. coli* と *T. thermophilus* HB8 間の MTHFR のシーケレット比較

青は共通のアミノ酸残基、赤は触媒反応に重要な活性残基を示す。

Sequence alignment は NCBI の COBALT (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi?LINK_LOC=Blast

HomeLink)を使用した。

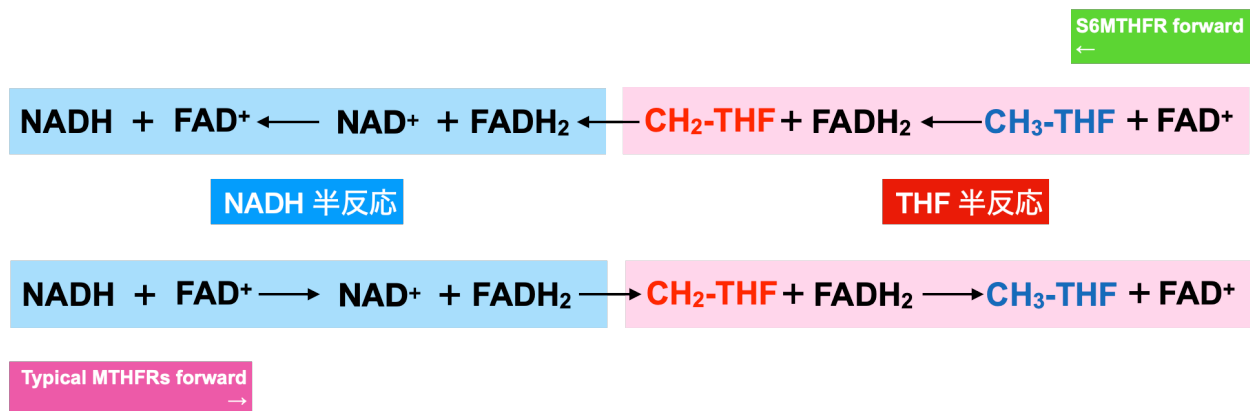


図 2-3-3. MTHFR 酵素反応概略

上は S6MTHFR の反応方向、下は一般的な MTHFR の反応方向を示す

・結果

まず、精製した S6MTHFR が CH₃-THF と反応できるかどうかを調べるために、S6MTHFR の FAD の CH₃-THF による還元反応を嫌気条件下で測定した。具体的には、吸光セルに脱気した 100 mM potassium phosphate buffer (pH7.2) (以後、KPB), 0.1 M EDTA 溶液と 19 μM S6MTHFR (19 nmol)を入れて 1 ml の反応液を作り、0 nmol から 50 nmol まです 2 分間おきに 8 or 10 mM CH₃-THF を 0.5 μl ずつ加えて、450nm の吸収を嫌気チャンバ一内で測定した。その結果 (反応式 1,2)、450 nm における S6MTHFR の FAD の吸収は CH₃-THF の添加と共に減っていくことがわかり、S6MTHFR は CH₃-THF により還元されることが示された (図 2-3-4)。

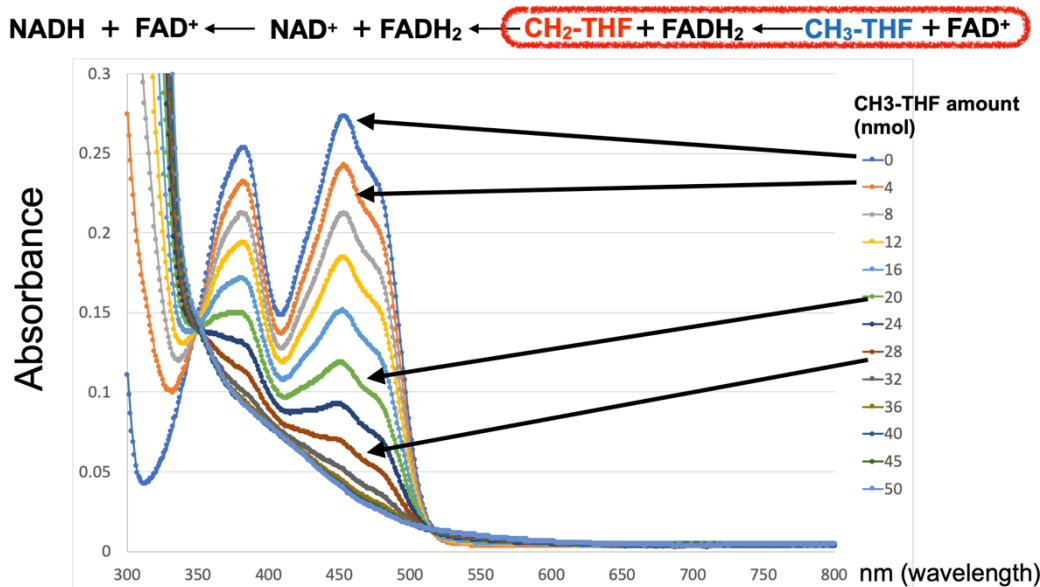
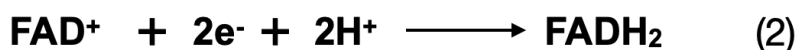
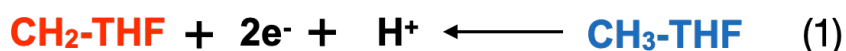


図 2-3-4. CH₃-THF による S6MTHFR の嫌気滴定 (THF の半反応)

続いて、S6MTHFRがNADHにより還元されるかどうかを調べるために、CH₃-THFの代わりにNADHを添加し、同じ方法でFADの還元を測定した(反応式4, 2)。その結果、S6MTHFRは他のMTHFRのように、NADHと反応できることが分かった。しかし、S6MTHFRは2分間内で添加したCH₃-THFと全部反応しきったことに比べ、NADHとの反応は約30分が経過したところで反応しきったことから、S6MTHFRはNADHに対して低い反応性を有する可能性が示唆された。その上、340 nmにおける吸収の増加からNADHが徐々に蓄積されていたことがわかった(図2-3-5)。

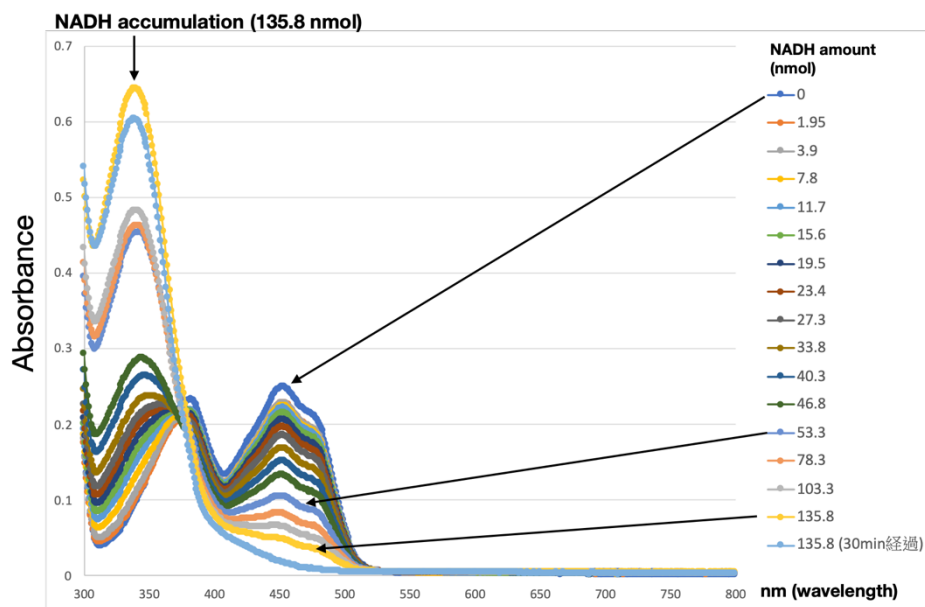
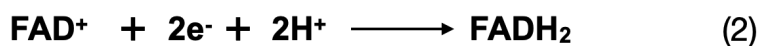


図2-3-5. NADHによるS6MTHFRの嫌気滴定(NADHの半反応)

NADHは340 nmに極大吸収があり、NADH添加量の増加と共に340 nmにおける吸収が上昇した。

2.4 S6MTHFR の NADH に対する比活性

S6MTHFR と NADH と反応性を定量的に評価するために、これまで報告された大腸菌 EcMTHFR の研究を参考して比活性を求めた (Sheppard CA, *et al.*, 1999)。酵素 S6MTHFR を turnover させ、かつ EcMTHFR や他の MTHFR と比較するために、1980 年代から MTHFR family 酵素のアッセイですっと使われてきた電子受容体 menadione を使用した (図 2-4-1)。

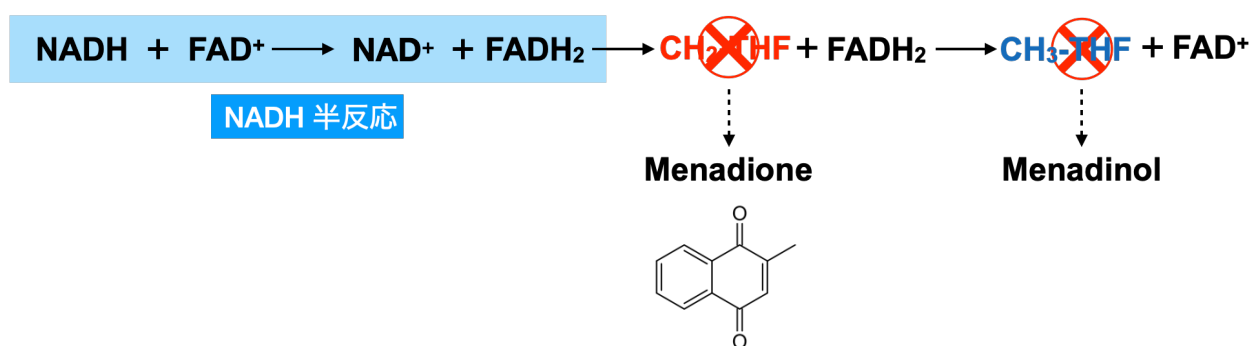


図 2-4-1 menadione を利用した NADH との全反応

・結果

酵素濃度を 10 nM から 50 μ M まで検討したが、最終的に 5 μ M S6MTHFR で測定を行った (図 2-4-2)。その結果、酵素なしの条件 (blank, 青) と比べ、NADH の吸光度が 10 分内に均一な速度で減少した (オレンジ点)。このデータから、S6MTHFR の NADH に対する比活性は 0.04 (μ mol/min/mg, 以後 unit/mg)であることがわかった。

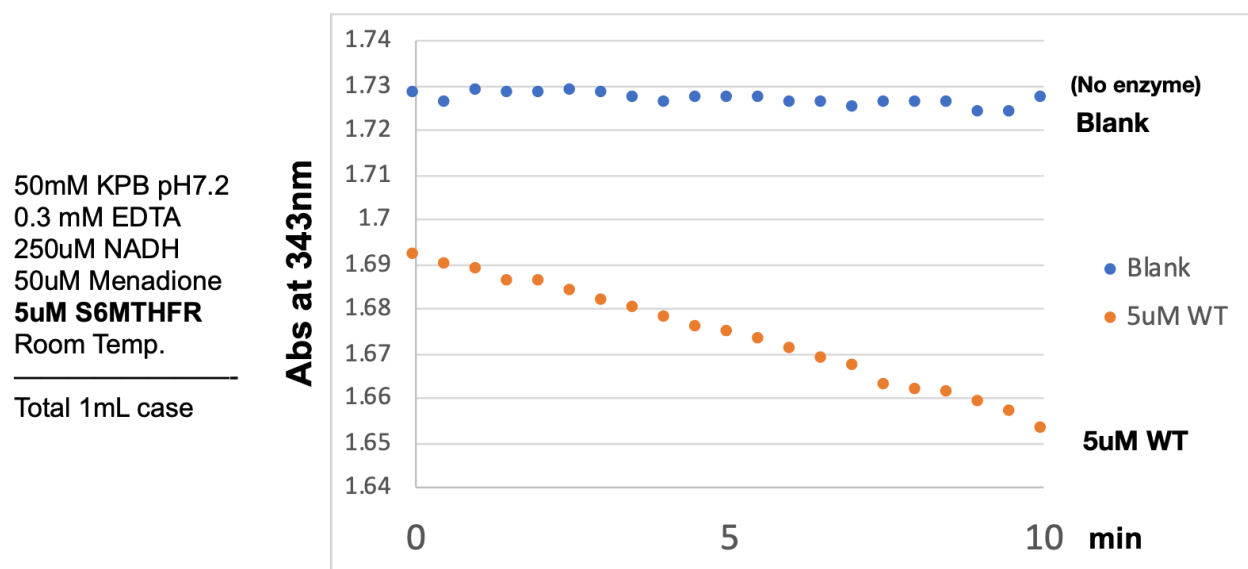


図 2-4-2. NADH 対する活性測定

343 nm における NADH の減少量は吸光係数が $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ で計算した (Igari S, *et al.*, 2011)

2.5 S6MTHFR の CH₃-THF に対する活性

S6MTHFR は LigM によって生成された CH₃-THF を CH₂-THF に酸化すると推定されたが (Masai E, *et al.*, 2007)、CH₂-THF が生成される証拠はない。その上、S6MTHFR の CH₃-THF に対する酵素学性質も研究されていない。そのため、定常状態の反応速度論と比活性を用いて評価を行なった。

CH₃-THF は UV-vis 領域に目立った吸収を持たないため吸光法で定量するのは難しい。そこで、共同研究先である長岡技術科学大学 政井研究室の協力をいただき、LC-MS を用いて CH₃-THF の定量を行なった。電子受容体は上節で述べたように、これまでの MTHFR の研究でよく使われてきた menadione を使用した (図 2-5-1)。

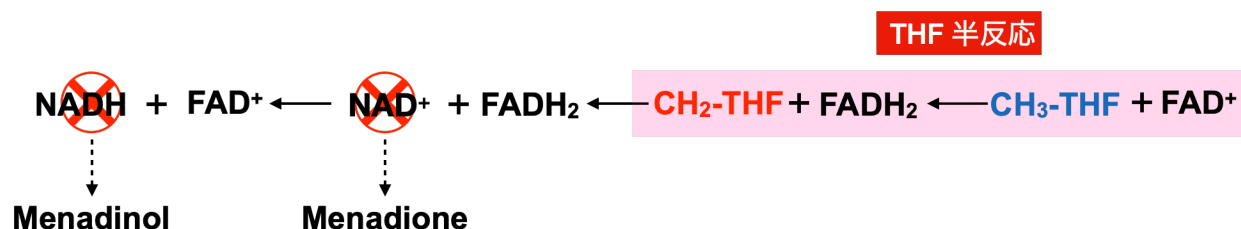


図 2-5-1. Menadione を利用した CH₃-THF アッセイ系

・結果

まず、LC-MS を用いて基質の CH₃-THF と生成物の CH₂-THF それぞれの市販品を用い、両者の溶出ピークが重なっていないことを確認した。その上で、-2 価イオン化された両者(CH₃-THF Mw: 458 g/mol, CH₂-THF Mw: 456 g/mol)を MS で検出した (図 2-5-2, D, E, F, G)。そして、20 nM MTHFR が存在する条件下で CH₃-THF の減少に伴い CH₂-THF の増加が確認されたことから、S6MTHFR によって CH₃-THF から CH₂-THF が生成されることがわかった (図 2-5-2, A, B, C, D)。しかし、試薬の公式取扱書にも書かれているように、CH₂-THF は CH₃-THF より不安定なので、以後 CH₃-THF の減少で定量することにした。

EcMTHFR の研究では pH7.2 の KPB buffer 条件下で CH₃-THF に対する活性を測定している (Trimmer E, *et al.*, 2001)。そのため、S6MTHFR も同じ buffer 条件で活性測定することにした。しかし、SYK-6 株の最適生育温度は 30°C であるため、S6MTHFR の K_m 及び k_{cat} は pH7.2, 30°C の条件で測定した。また、他の MTHFR 研究では menadione による活性阻害が報告されたことがあったので (Zuo C, *et al.*, 2018)、20 nM の S6MTHFR に対し、menadione の濃度を 400 μ M まで振り、menadione に阻害効果がないことを確認した。その後、menadione 濃度を 400 μ M に固定し、CH₃-THF 濃度を 1.5 mM (最大溶解度) まで振り、ミカエリスメンテン式に従って野生型(WT)の k_{cat} と K_m を計算した。その結果、 k_{cat} は 29.2 ± 0.41 (s⁻¹), K_m は 28.2 ± 1.5 (μ M) であることがわかった (図 2-5-3)。ちなみに、200 μ M CH₃-THF の条件下において S6MTHFR の活性はすでに最大値に達しており、この時の比活性は 49.59 ± 1.11 unit/mg であることが示された。さらに、GTA buffer を用い

で最適 pH を解析し、至適 pH は 7.5 であることがわかった。また、10℃から 70℃の間で至適温度を検討した結果、35℃付近で活性が一番高いことが示された (図 2-5-4)。

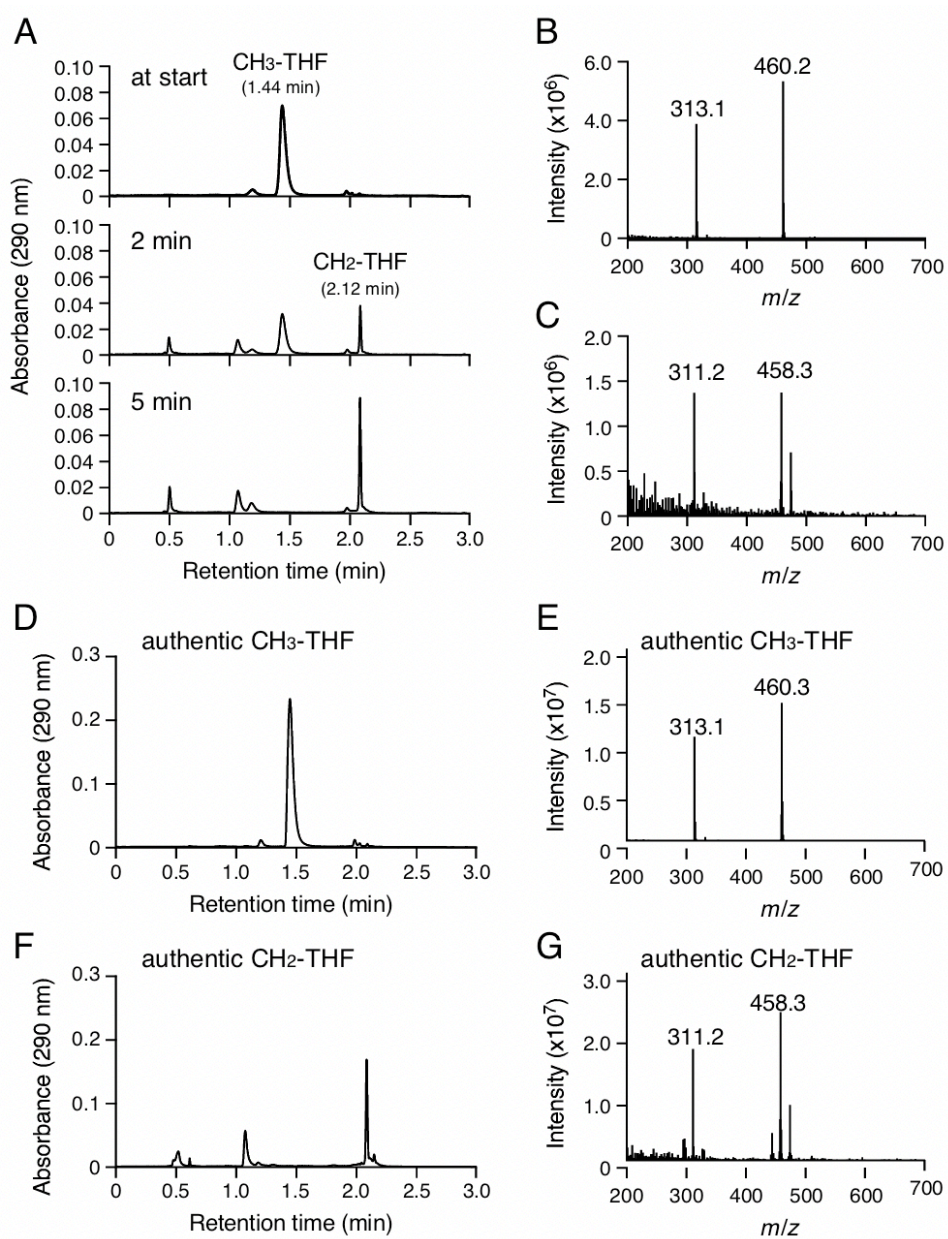
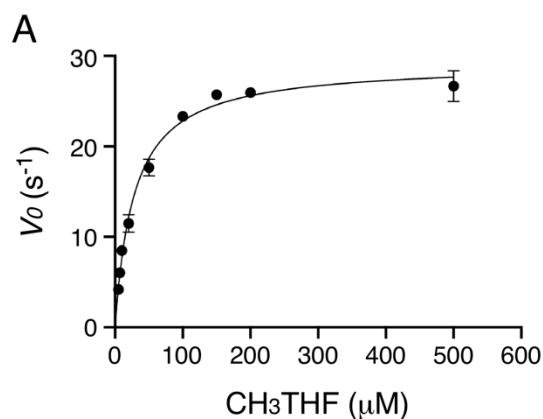


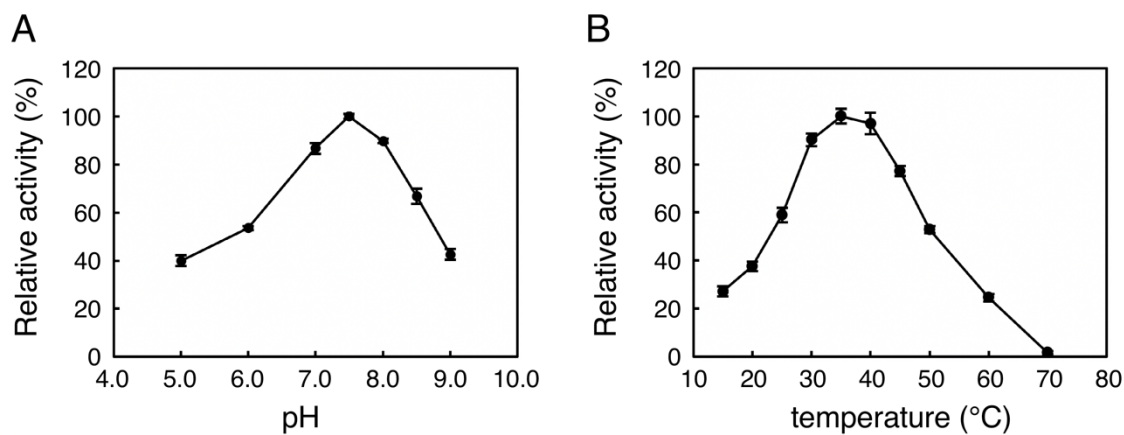
図 2-5-2. Conversion of CH₃-THF by MTHFR.

(A) 20 nM MTHFR was incubated with 200 μ M CH₃-THF in the presence of 400 μ M menadione at 30°C. Portions of the reaction mixtures were collected at the start, after 2 min, and after 5 min of incubation and analyzed by HPLC–MS. (B and C) The ESI–MS spectrum (positive-ion mode) of CH₃-THF (at start) and a conversion product, CH₂-THF (after 5 min of incubation) are shown in (B) and (C), respectively. (D–G) HPLC chromatograms and ESI–MS spectra of authentic compounds. Retention times of CH₃-THF and CH₂-THF were 1.44 and 2.12 min, respectively.



☒ 2-5-3. Kinetic analysis of MTHFR

Conversion activity of MTHFR (A) for various concentrations of CH₃-THF were examined using 50 mM KH₂PO₄-K₂HPO₄ buffer (pH 7.2) in the presence of 400 μ M menadione at 30°C. The data are mean \pm standard deviation of four independent experiments.



☒ 2-5-4. Optimal pH (A) and optimal temperature (B) for MTHFR.

(A) Conversion activity of MTHFR for CH₃-THF were examined using 50 mM GTA buffer (50 mM 3,3-dimethylglutarate, 50 mM Tris, and 50 mM 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol; pH 5.0 to 9.0) in the presence of 200 μ M menadione at 30°C. (B) Conversion activity of MTHFR for CH₃-THF were determined using 50 mM KH₂PO₄-K₂HPO₄ buffer (pH 7.2) in the presence of 200 μ M menadione at 15 to 70°C. The data are mean \pm standard deviation of four independent experiments.

・ 考察

一般的な MTHFR を代表する EcMTHFR の CH₃-THF に対する K_m は 30 μM 、 k_{cat} は 0.47 s^{-1} であり、NADH に対する K_m は 25 μM 、 k_{cat} は 18.2 s^{-1} であることが報告されている (Zuo C, *et al.*, 2018)。これらの値から、EcMTHFR の NADH に対する k_{cat} / K_m は CH₃-THF の 45.5 倍と圧倒的に NADH と反応しやすいことが示されている。これに比べ、S6MTHFR の CH₃-THF に対する K_m は 28 μM 、 k_{cat} は 29 s^{-1} で、 k_{cat} / K_m は 1.0 であることがわかった (この k_{cat} はこれまでに報告された MTHFR の中において最も高い)。また、若干測定条件は異なるが、200 μM CH₃-THF における S6MTHFR の比活性は 49.59 unit/mg であることに對し、250 μM NADH における S6MTHFR の比活性は非常に低く、0.04 unit/mg しかない。以上のことから、S6MTHFR は一般的な MTHFR のように NADH と反応できるものの、CH₃-THF と圧倒的に反応しやすい性質 (6250 倍) を有することがわかった。これは SYK-6 がメチル基含有化合物である VA を炭素源として生育する際に、THF 依存脱メチル化酵素 LigM の CH₃-THF を生成する影響を受け、S6MTHFR の基質特異性が変化し CH₃-THF と反応しやすくなるように進化したと考えられる。しかし、S6MTHFR はどのように CH₃-THF と反応しやすくなり、どのように NADH と反応しにくくなったのか、そのメカニズムが不明である。これを明らかにすることこそ、THF 依存脱メチル化に依存した 1C 代謝の進化を理解する際に最も重要なことであると考え、X 線結晶構造解析を用いて S6MTHFR の結晶構造を決定することにした。

3. S6MTHFR の結晶構造解析と構造評価

第 2 章では、S6MTHFR は一般的な MTHFR のように NADH と反応できるものの、CH₃-THF と圧倒的に反応しやすい性質 (6250 倍) を有することが示された。S6MTHFR は EcMTHFR と同様に、NADH に対する活性残基を有するにも関わらず、通常の MTHFR と真逆な性質を持つ理由が不明である。このような反応性の変化の原因は S6MTHFR の構造によるものと考え、S6MTHFR の結晶構造を決定することにした。

3.1 結晶化、最適化と凍結条件の検討

構造決定に必要な S6MTHFR の結晶を得るために、精製した S6MTHFR を用いて結晶化の初期 screening を行った。Crystal Screen (Hampton Research)(Jancarik & Kim, 1991), PEG/Ion (Hampton Research) (Mcpherson, 2001), Crystal Screen Cryo (Hampton Research), Index (Hampton Research), Wizard (Emerald Biosystems), PEGsII (QIAGEN), ProteinComplex (QIAGEN) の結晶化キットを用いて 20°C の条件でスクリーニングを行なった結果、Index kit No.2 (2 M Ammonium sulfate, 0.1 M Sodium acetate pH 4.5) (図 3-1-1 A)、及び ProteinComplex kit No.26 (20 % (w/v) PEG 4000 , 0.1 M Sodium citrate pH 4.5) (図 3-1-1 B) 2 条件において cluster 状結晶が得られた。

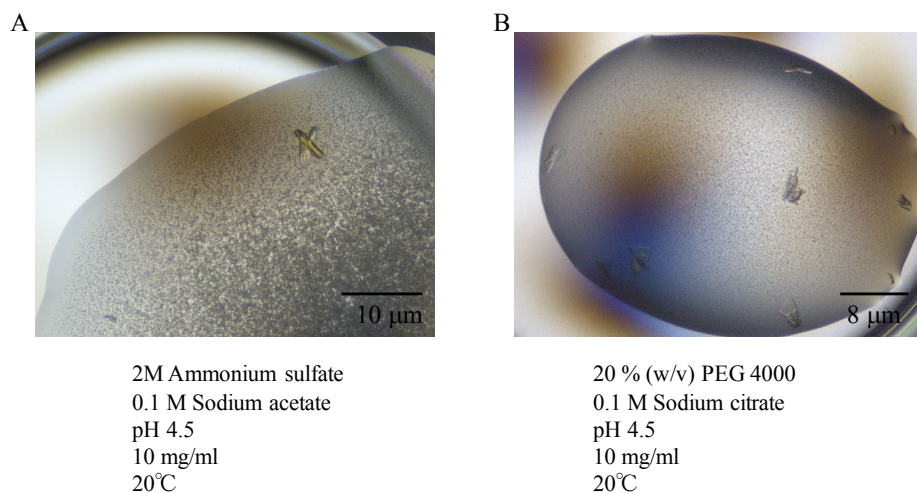


図 3-1-1 初期結晶化スクリーニングの S6MTHFR 結晶写真

Aは Ammonium sulfate 条件下の S6MTHFR 結晶写真、Bは PEG4000 条件での S6MTHFR の結晶写真を示す。S6MTHFR は FAD を有するため、黄色を呈する。

その後、24 well の結晶化プレートを用い hanging drop 法で結晶化条件の最適化を行った。micro-seeding 法で結晶化の再現性がとれた後に両条件の最適化を行なった。しかし、沈澱剤として Ammonium sulfate を用いた条件においては、結晶がクラスター状になってしまい、綺麗な結晶が得られなかった。これに比べ、PEG4000 を沈澱剤として用いた場合は 20% (w/v) PEG4000, 0.1M sodium citrate, pH 4.5, 5 mg/ml, 20°C の条件で図 3-1-2 のような綺麗な結晶が得られた。

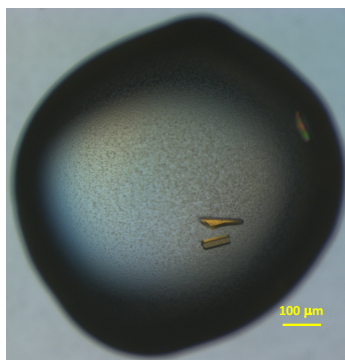


図 3-1-2 microseeding により得られた S6MTHFR の基質非結合型結晶

上記の結晶を用いて CryoPro (Hampton Research) (Boutron, 1988)を利用し cryoprotectant の条件を検討した。各 cryoprotectant 溶液の pH 条件は結晶化溶液と同一にして、S6MTHFR の結晶を様々な cryoprotectant を含む溶液に 5 min ほど浸し、顕微鏡で結晶の様子を観察し、結晶が酷く割れた条件を除いた。最終的に下記の 3 つの条件でサンプルを用意し、snapshot で分解能を確認した結果、30% (w/v) PEG4000 の条件で結晶を凍結することにした (表 1)。また、結晶化溶液に 10 mM CH₃-THF が入った soaking 溶液に、S6MTHFR の基質非結合型結晶を 1 時間漬けた結果、結晶表面に少し亀裂が入ったことが観察できた。その後、基質非結合型と同様に、30% (w/v) PEG4000 の条件で S6MTHFR の THF 結合型結晶を凍結した。

表 1. 抗凍結剤の種類と分解能の関係

| 結晶化条件 | 抗凍結剤濃度 | 抗凍結剤種類 | snapshotの分解能(Å) |
|---------|-----------|---------------------|-----------------|
| PEG4000 | 30% (w/v) | PEG4000 | 1.5 - 2.0 |
| PEG4000 | 30% (w/v) | PEG400 | 1.8 - 2.1 |
| PEG4000 | 23% (w/v) | Trehalose dihydrate | 3.0 - 3.5 |

3.2 基質非結合型 S6MTHFR と THF 結合型 S6MTHFR の構造決定

表 2 の条件で NSRRC BL-13B1 において回折データを収集し、*XDS* (Kabsch, 2010)、*CCP4 POINTLESS* と *AIMLESS* (Evans, *et al.*, 2013)を用いてデータ処理を行なった (表 2)。次に、処理したデータを用いて分子置換法で構造決定を試みた。swiss model (<https://swissmodel.expasy.org>)を用いて分子置換のモデルを構築し(PDB ID: 1v93, chainA, 24% 相同性を元にモデル構築された)、このモデルを利用して分子置換法の計算を行なったが、適切な初期位相が得られなかった。そのため、硫黄原子(S)の異常散乱を利用した native-SAD 法で初期位相の決定を試みた。ヘリウムチャンバーを持つ Photon factory (PF) BL-1A で波長 2.7 Å の X 線を使って回折データを収集し、*XSCALE* で merge した 2.6 Å 分解能の回折データを用いて (表 2) *Crank2* (Ness SR, *et al.*, 2004)で初期位相の決定からモデルの構築まで行なった (図 3-2-1)。その結果、非対称単位内に 2 分子が存在し合計 576 個残基があることがわかり、自動的に 562 個残基 (97.6%)を構築することができた。その座標を用いて、NSRRC BL-13B1 のデータによる分子置換を行ない(表 3-2)、1.5 Å 分解能の S6MTHFR 基質非結合型構造を得た。

その後、S6MTHFR の基質非結合型結晶に 10 mM CH₃-THF を soaking し、SLS (swiss light source) の X06DA で回折データの収集を行なった(表 3-2)。*XDS*、*POINTLESS* と *AIMLESS* で回折データを処理した後、基質非結合型構造をモデルとして *Molrep* により分子置換法で構造を決定し、*Refmac* による精密化後、CH₃-THF と思われる電子密度を確認することができた (図 3-2-2)。

表 2, 測定条件、S6MTHFR 結晶の結晶学的パラメータと回折強度データの統計値

| Sampe | 基質非結合型 (for native-SAD) | 基質非結合型 (for MR) | THF結合型 (CH3-THF complex) |
|-----------------------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Light source | PF BL-1A | NSRRC, BL13B1 | SLS-X06DA |
| Wavelength (Å) | 2.700 | 1.000 | 1.000 |
| Temperature (K) | 95K | 95K | 95K |
| Detector | EIGER 4M | Q315r | PILATUS 2M-F |
| Crystal-detector distance (mm) | 60 | 200 | 180.33 |
| Rotation range/ image (°) | 0.2 | 0.25 | 0.5 |
| Total rotation range (°) | 360*10 | 90 | 720 |
| Exposure time/ image (s) | 0.2 | 2.5 | 0.1 |
| Transmittance (%) | 3.38 | 100 | 100 |
| Space group | $P2_1$ | $P2_1$ | $P2_1$ |
| a, b, c (Å) | 36.57 165.51 45.00 | 37.06 168.12 45.42 | 37.13 170.35 45.15 |
| α, β, γ (°) | 90.00 105.62 90.00 | 90.00 105.55 90.00 | 90.00 104.55 90.00 |
| No. of subunits / asym. unit | 2 | 2 | 2 |
| Resolution (Å) | 43.42-2.60 (2.72-2.60) | 42.35-1.5 (1.53-1.50) | 43.7-1.85 (1.89-1.85) |
| R-merge | 0.074 (0.110) | 0.034 (0.239) | 0.101 (0.853) |
| R-pim | 0.014 (0.022) | 0.031 (0.215) | 0.064 (0.537) |
| $I/\sigma(I)$ | 58.6 (35) | 19.1 (4.4) | 14.3 (2.2) |
| Completeness (%) | 83.4 (70.2) | 99.5 (96.3) | 100 (100) |
| No. of observed reflections | 663496 (64907) | 309475 (12599) | 315500 (19364) |
| No. of unique reflections | 12987 (1303) | 84735 (4091) | 46088 (2827) |
| Multiplicity | 51.1 | 3.7 (3.1) | 6.8 (6.8) |
| Mosaicity | 0.13 | 0.13 | 0.23 |

No. of subunits / asym. unit は CCP4 CELL CONTENT ANALYSIS を用いて計算した。

()内の数値は最外殻の値を示す。

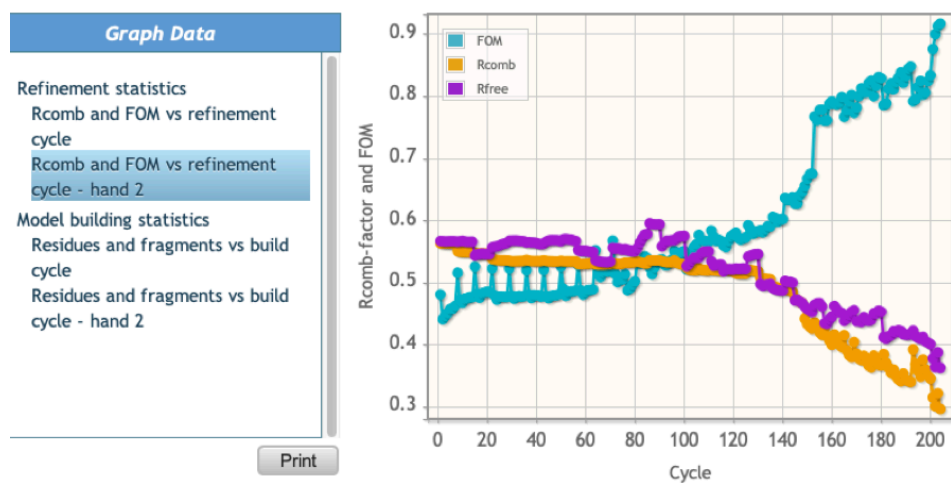


図 3-2-1. *Crank2* の結果

Crank2 pipeline に含まれる ARP/wARP によりモデル構築された結果、 $R_{work/free}$ は 0.2984/0.353 となった。

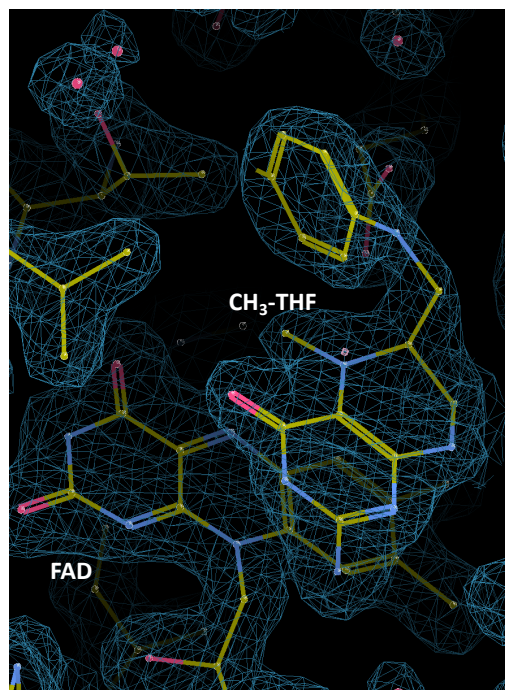


図 3-2. CH₃-THF の 2mFo-DFc map (Contour level は 1.2 σ)

3.3 結晶学的精密化

上記で得られた 1.5 Å の S6MTHFR 基質非結合型及び 1.85 Å の CH₃-THF 基質複合体データを用いて、PHENIX の *phenix.refine* (Afonine PV, *et al.*, 2012)による構造精密化を行った。Coot で 2mFo-DFc を 1.2 σ 、mFo-DFc map を 3.5 σ に設定した上、電子密度がはっきり見えない部分のアミノ酸残基あるいは側鎖を削除した。Alternative conformation の可能性がある場合は、それぞれの占有率を下げて合計 1 になるようにモデルを入れた。また、mFo-DFcmap を 3.5 σ において、電子密度の形が丸いと判断できる大きさのものを水分子の電子密度として判断した。PHENIX の *Molprobity* (Lovell SC, *et al.*, 2003)を使い *geometry* に問題がないことを確認しつつ、精密化を数十回繰り返した。最終的に、S6MTHFR 基質非結合型の $R_{work/free}$ が 0.17/0.21、S6MTHFR THF 結合型の $R_{work/free}$ が 0.18/0.22 となったところで精密化を終了した(図 3-3-1 表 3)。さらに、基質非結合型にある FAD と THF 結合型にある CH₃-THF を Simulated annealing omit map で確認した(図 3-3-2)。

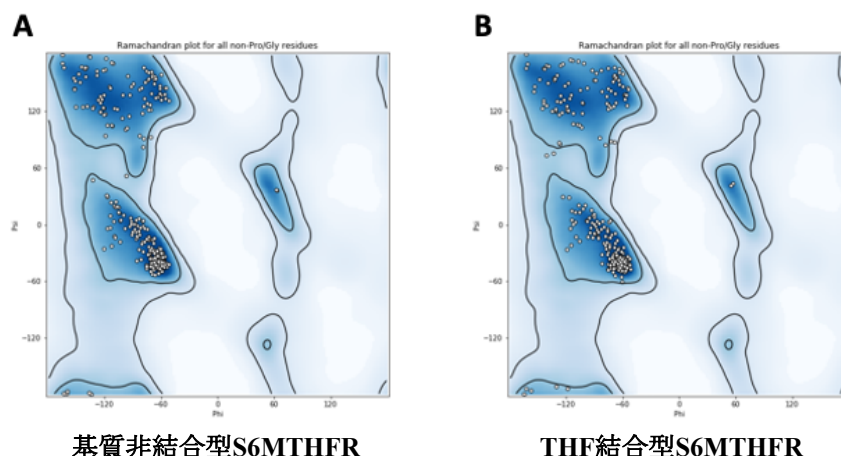


図 3-3-1. phenix.refine による Molprobity による Ramachandran Plot

A. S6MTHFR 基質非結合型、B. S6MTHFR-CH₃-THF 複合体をそれぞれ示す。Outlier に入るアミノ酸がないことを確認した。

表 3. S6MTHFR 基質非結合型/THF 結合型の精密化まとめ

| Sample | S6MTHFR-基質非結合型 | S6MTHFR-THF 結合型 |
|--------------------------|----------------|-----------------|
| Resolution (Å) | 42.04 - 1.5 | 43.70-1.85 |
| <i>R</i> _{work} | 0.1709 | 0.1833 |
| <i>R</i> _{free} | 0.2123 | 0.2189 |
| No. atoms | | |
| Protein | 4251 | 4192 |
| Lignad/Ion | 106/- | 159/- |
| Water | 842 | 387 |
| <i>B</i> -factor (Å) | | |
| Protein | 17.52 | 21.28 |
| Lignad/Ion | 13.89/- | 21.95/- |
| Water | 27.64 | 25.98 |
| Rms deviations | | |
| Bond lengths (Å) | 0.006 | 0.007 |
| Bond angles (deg) | 0.804 | 0.911 |

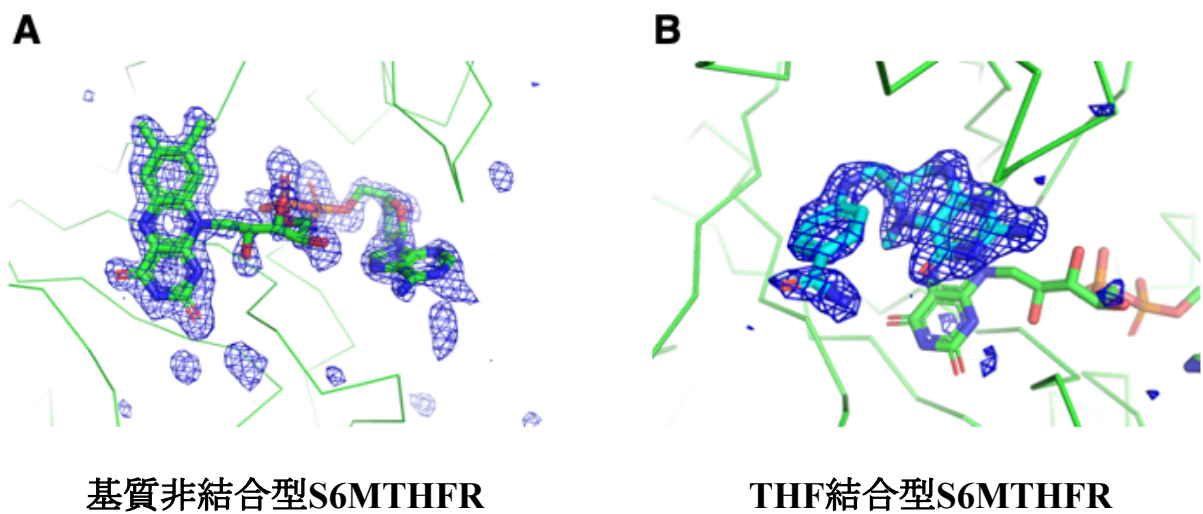


図 3-3-2. SA omit map による cofactor FAD と ligand CH₃-THF の確認

目的分子の周り 10 Å範囲で mFo-DFcmap を 3.5 σ で作成した。A, S6MTHFR 基質非結合型、B, S6MTHFR CH₃-THF 結合体型を示す。

3.4 基質非結合型 S6MTHFR の立体構造

結晶中の非対称単位には 2 分子の S6MTHFR が含まれているが (図 3-4-1, A)、第 2 章で述べたように S6MTHFR は溶液中で単量体として存在している。S6MTHFR の結晶構造は 15 本の α -helix と 10 本の β -sheet で構成されるが、真ん中には β -barrel 構造があり、その周りに α -helix が配置していることから TIM barrel 構造に分類される (図 3-4-1, B)。この TIM 構造は他の MTHFR ホモログの構造でも確認されている。

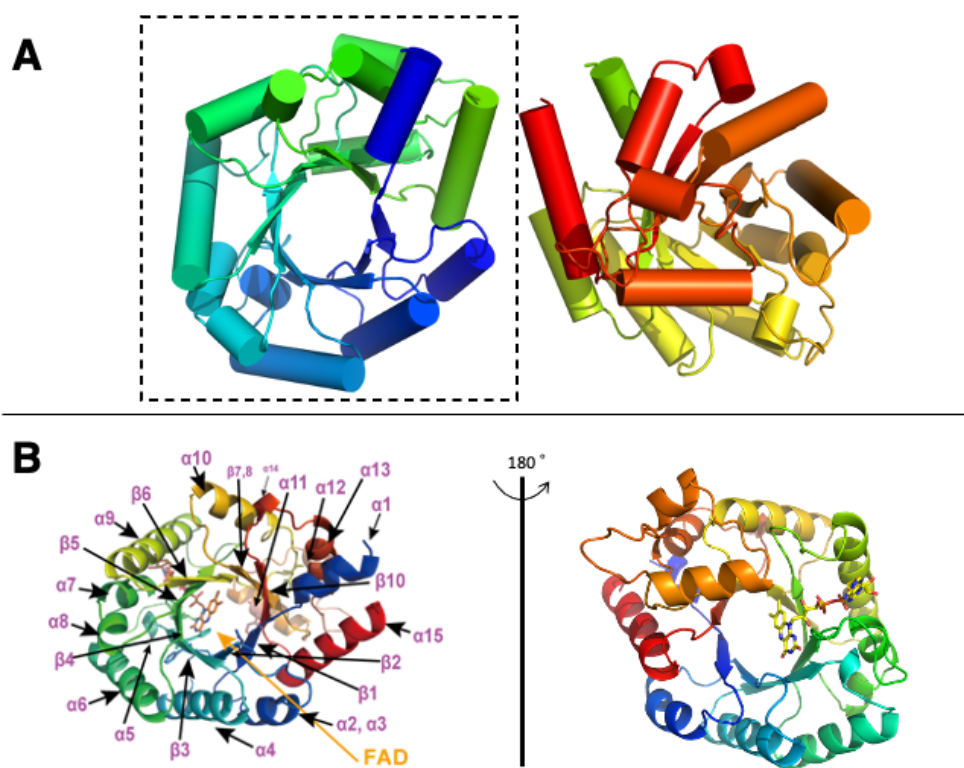


図 3-4-1. S6MTHFR の結晶構造

A, 非対称単位内にある 2 分子の S6MTHFR を示す。 α -helix は棒状、 β -sheet は矢印状で表示した。両者間の rmsd は 0.10\AA であった。

B, 1 分子の S6MTHFR 及び 180 度回転したものを示す。 α -helix は螺旋状、 β -sheet は矢印状で表した。

3.5 S6MTHFR 及び S6MTHFR-CH₃-THF 複合体の立体構造比較

基質非結合型 S6MTHFR (coordinate error: 0.18 Å)と CH₃-THF 複合体型 S6MTHFR (coordinate error: 0.23 Å)を 280 個の C α 原子を用いて最小二乗法を用いて重ね合わせた結果、root-mean-square deviation (rmsd)は 0.33 Åであることから、ligand である CH₃-THF の結合によって全体構造に大きな変化はなかったことがわかった。しかし、活性中心を比較すると、有意な変化があることが示された。具体的には、 α -helix 11 の末端にある Cys219 が CH₃-THF の結合によって、基質側に 1.8 Å移動していた (図 3-5-1)。これによって、Cys219 の-SH 基と CH₃-THF の N¹ 間の距離は 3.4 Åとなり (図 3-5-2)、この距離から考えて Cys219 は CH₃-THF の結合及び触媒に関与する可能性が示唆された。

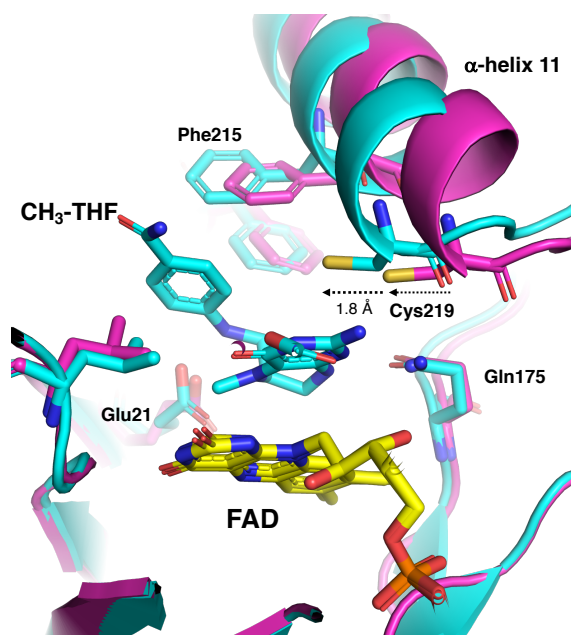


図 3-5-1. CH₃-THF 結合による S6MTHFR の Cys219 の移動

S6MTHFR 基質非結合型は紫、CH₃-THF 複合体型は青、FAD は黄色、CH₃-THF はみ空色に示す。α-helix 11 は CH₃-THF の結合により全体が左側に傾き、末端にある Cys219 は 1.8 Å の距離を移動した。

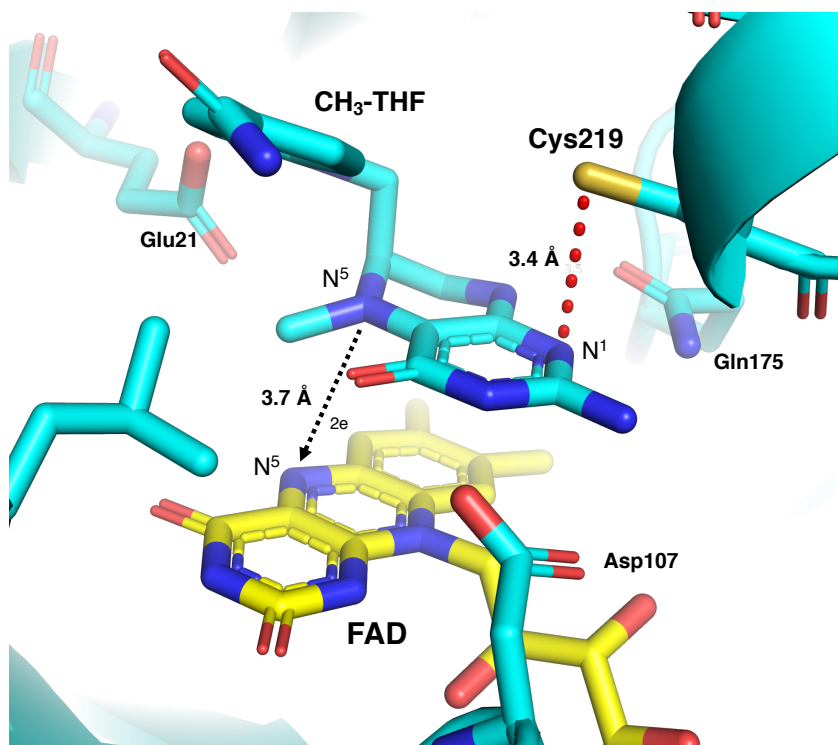


図 3-5-2. S6MTHFR の CH₃-THF 基質複合体の活性中心

Cys219 から CH₃-THF の N¹ 原子までの距離は赤点線で示した。CH₃-THF による FAD の還元は電子が CH₃-THF の N⁵ から FAD の N⁵ まで移動すると予想された (Trimmer E, *et al.*, 2001) ので、その距離を黒い点線で示した。

3.6 S6MTHFR-CH₃-THF と EcMTHFR-CH₃-THF の構造比較

現在 PDB に登録されている 5 つの生物種 (*E. coli* (PDB ID, 1zp3), *Thermus thermophilus* (3apt), *Haemophilus influenzae* Rd KW20 (5ume), *Homo sapiens* (6fcx), *Saccharomyces cerevisiae* (6fnu)) 由来 MTHFR の中で、*E. coli* 由来 MTHFR (EcMTHFR) は最も研究されており、かつ THF 結合型構造が決定されたのは EcMTHFR のみだった。そのため、ここ

では EcMTHFR と S6MTHFR の構造比較から明らかになった 2 つの顕著な違いについて議論する。

1 つ目の違いは、前節で議論した S6MTHFR の Cys219 である。EcMTHFR-CH₃-THF 複合体構造 (1zp4) と S6MTHFR-CH₃-THF 複合体構造を比較したところ、EcMTHFR は対応する位置に Cys219 を持たないことが分かった。EcMTHFR の対応する位置には Thr227 が存在するが、CH₃-THF に N¹ から 5.8 Å 離れており、相互作用するのは難しいと思われる (図 3-6-1, A)。そのため、CH₃-THF の結合による Cys219 の位置変化は S6MTHFR の触媒反応に関わると考えられ、Cys219 を Ala に置換し、次の節で定常状態の酵素速度論定数 (K_m , k_{cat}) を求めることにした。

2 つ目の違いは S6MTHFR の CH₃-THF 認識機構である。これまでの EcMTHFR 研究では、変異体を用いた実験から Glu28, Asp120, Gln183, Phe223 は MTHFR の触媒反応に重要であることが示されていた (Trimmer E, *et al.*, 2001)。Ping-Pong Bi-Bi 機構で反応する EcMTHFR には触媒ポケットは一つしかない。Gln28 (変異体の結晶構造), Asp120, Gln183 は ligand の結合による位置変化はほとんど見られなかった。しかし、CH₃-THF が結合すると Phe223 の側鎖のベンゼン環は CH₃-THF の pteridine 環に垂直になり、CH₃-THF の PABA のベンゼン環に並行に配置する (図 3-6-1. A)。一方、NADH 結合時には (図 3-6-1. B)、Phe223 の側鎖のベンゼン環は NADH のアデニン環に並行になるように配置し、CH₃-THF 結合時と比較して、90 度ほど χ 1 角が変化したことが報告された (図 3-6-1. C)。

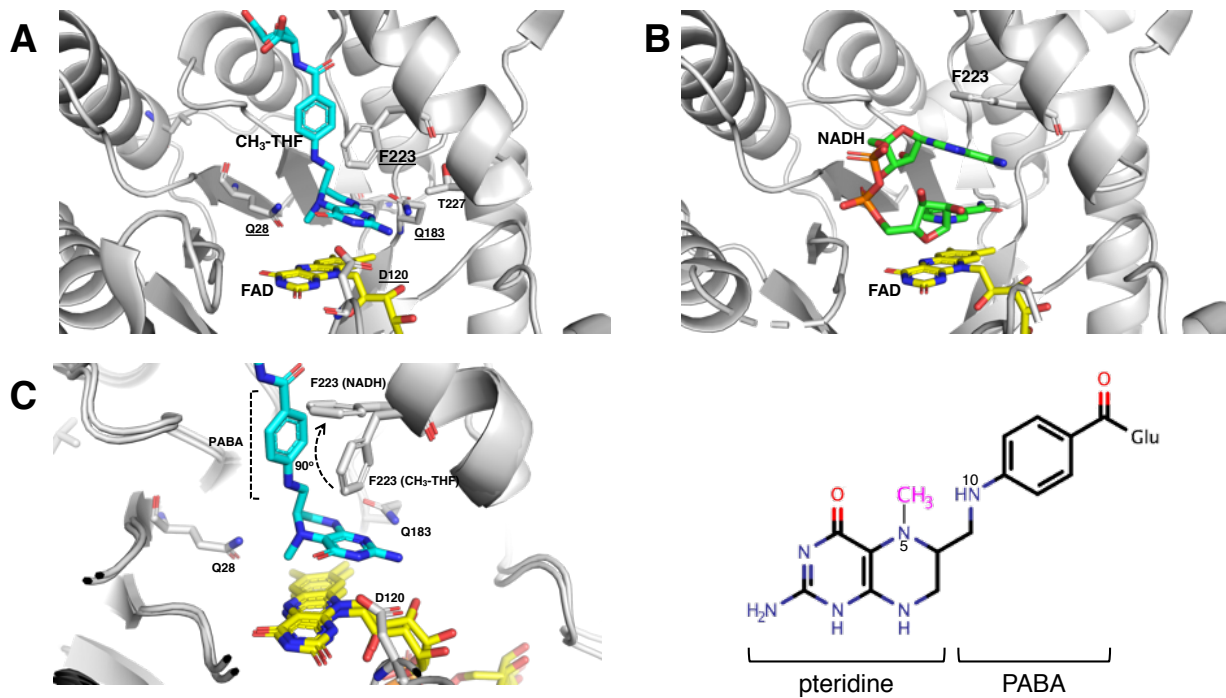


図 3-6-1. EcMTHFR における異なる ligand 結合構造及び Phe223 の位置変化

A. EcMTHFR-CH₃-THF 複合体 (PDB ID: 1zp4), B. EcMTHFR-NADH 複合体 (PDB ID: 1zrq), C. 両者を重ね合わせした構造を示す。FAD は黄色、CH₃-THF はみ空色、NADH は緑色 stick で示した。E28 を Q28 に変異させた結晶構造である。

S6MTHFR は上記の 4 残基に対応する残基 Glu21, Asp107, Gln175, Phe215 を有し、立体位置上でも類似した場所に配置していた。しかし、EcMTHFR と S6MTHFR に対して CH₃-THF は異なる様式で結合することが構造の比較から明らかになった(図 3-6-2. A, B)。EcMTHFR では、CH₃-THF の PABA は pteridine 環に対しほぼ垂直に配置しているのに対し、S6MTHFR 中の CH₃-THF の PABA は pteridine 環に向かって折りたたまれていることが示された(図 3-6-2. C, D)。そして、S6MTHFR では、EcMTHFR の CH₃-THF の PABA に

対応する場所に Phe269 が存在し、 π - π stacking で Phe215 のベンゼン環の向きを固定しながら、Phe215 と共に CH₃-THF の PABA のベンゼン環を固定している。その上、反対側の Leu48 も PABA のベンゼン環に相互作用していることがわかった。そのため、EcMTHFR Phe223 のような構造変化をする結合サイトではなく、S6MTHFR は Leu48, Phe215, Phe269 によって CH₃-THF の専用結合サイトを形成し、より結合しやすくなったと推測した。

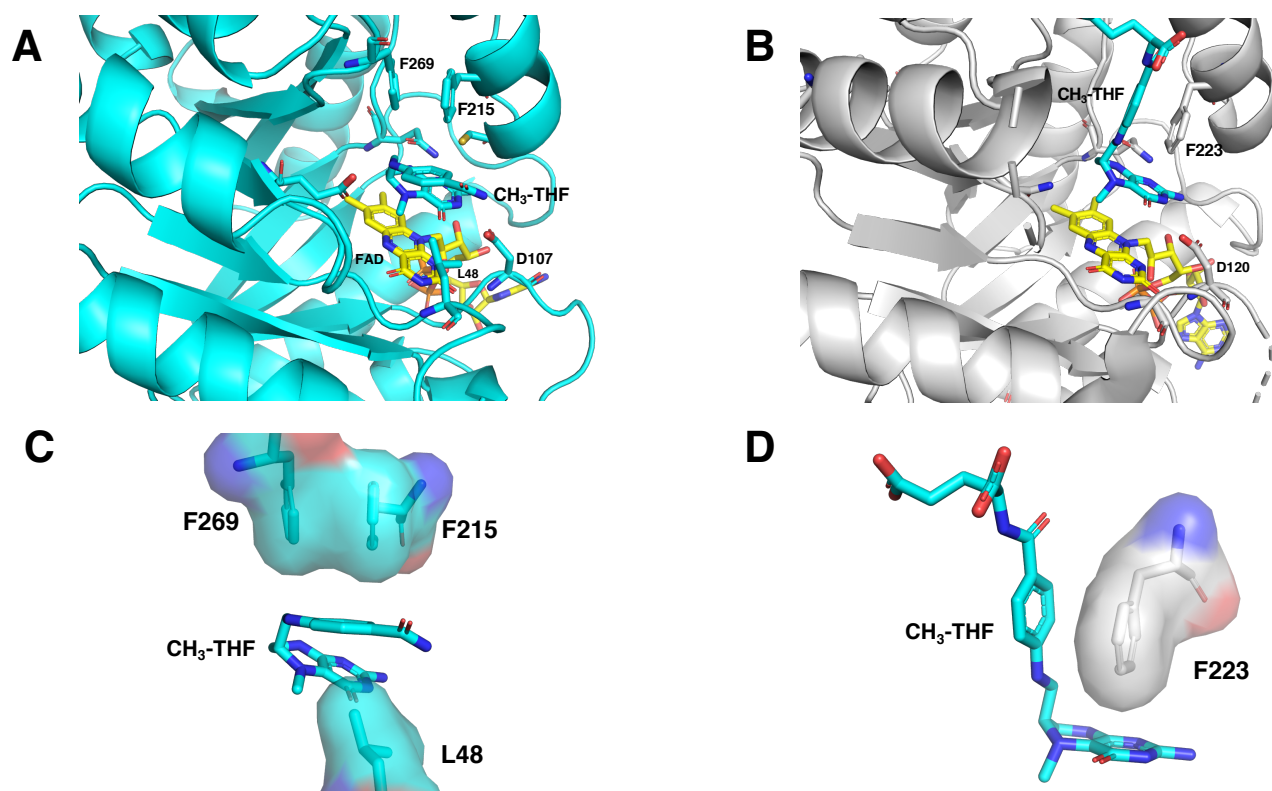


図 3-6-2. CH₃-THF 結合様式の違い

A. S6MTHFR-CH₃-THF 複合体構造, C. S6MTHFR-CH₃-THF 複合体構造中、CH₃-THF の PABA 環に focus した構造部分, B. EcMTHFR-CH₃-THF 複合体構造 (1zp4), D. EcMTHFR-CH₃-THF 複合体構造中、

CH₃-THF の PABA 環に focus した構造部分を示す。C の L48, F269 と F215, D の F223 は surface で示した。

3.7 S6MTHFR と EcMTHFR-NADH complex との構造比較

第 2.3 節で述べたように、MTHFR (EC.1.5.1.20)は Ping-Pong Bi-Bi 反応を触媒するので、SHMT/GCV によって生成された CH₂-THF を還元するためには、まず NADH と反応しないといけない。その上、NADH による MTHFR の還元反応の k_{cat}/K_m は CH₃-THF による MTHFR の還元反応の約 45 倍であるため、一般的な MTHFR は NADH と反応しやすい性質を持っている。しかし、我々の活性測定結果から、S6MTHFR は CH₃-THF と反応しやすく (49.59 unit/mg)、NADH と反応しにくい性質 (0.04 unit/mg)を持っていることが示唆された。S6MTHFR は EcMTHFR の NADH 結合・触媒反応に重要とも言われた活性残基 Glu21(EcMTHFR Glu28)、Asp107 (EcMTHFR Asp120)、Phe215 (EcMTHFR Phe223) も保存している。それにも関わらず、S6MTHFR が NADH と反応しにくい原因は構造変化によるものと推測した。そのため、ここで S6MTHFR と EcMTHFR-NADH complex の構造の比較について述べる。

PDB に登録された MTHFR 中、唯一の NADH 複合体構造を有する EcMTHFR (FAD 還元型、PDB ID: 1zrq)を用いて S6MTHFR の基質非結合型との比較を行なった。Pymol で 194 個の C_αを重ね合わせたところ、rmsd 値は 2.8 Å であった。その上、Gly61 から Phe223 まで、約 13.5 Å の”open”な広い触媒ポケットの入り口を有する EcMTHFR (図 3-7-1) に比べ、S6MTHFR は Leu48 から Phe215 までの間に、最長で 7.3 Å の狭い入り口し

か持っていないことが分かった (図 3-7-2)。上で述べたように、NADH が結合すると EcMTHFR の Phe223(F223)のベンゼン環の向きは今 S6MTHFR の Phe215 (F215)向きから 90 度回転し、NADH のアデニン環に並行し π stacking で NADH の結合に働くことが報告されている (Peichal R, *et al.*, 2005; Lee MN, *et al.*, 2009) (図 3-6-1)。これに対し、S6MTHFR の Phe215 は Phe269 との間の π stacking 相互作用によってしっかり固定されているため、ベンゼン環の向きが変えられない。これによって、Phe215 の側鎖から NADH のアデニン環までの距離は 1.5 Å となった(図 3-6-2)。さらに、S6MTHFR の Leu48 の側鎖は NADH のニコチンアミドの近くにあるリボースとの間に、立体障害を起こし NADH の結合を阻害するように見える (図 3-7-3)。これらによって、S6MTHFR が NADH と結合しにくくなり、反応しづらくなっただのではないかと推測した。

そのため。以後では Leu48, Phe215, Cys219, Phe269 の単体変異体と多重変異体を作成し、CH₃-THF 及び NADH に対する比活性の測定を行なった。

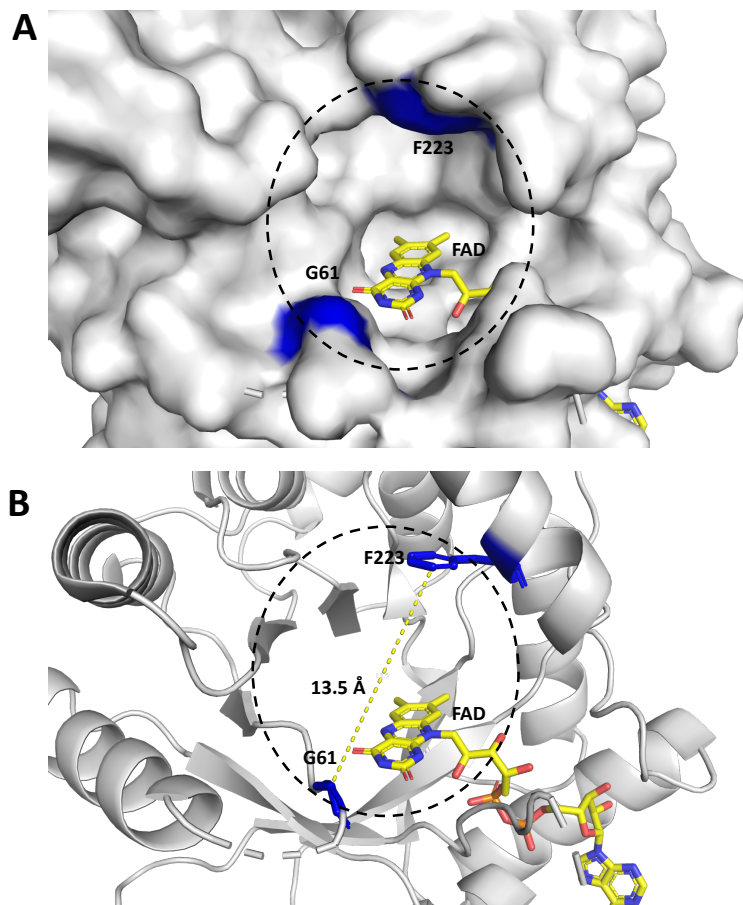


図 3-7-1. EcMTHFR-NADH 複合体の活性ポケット

大腸菌 EcMTHFR の NADH 複合体構造(1zrq)、A は surface representation で、B は surface representation なしに stick のみで示した。” - - -“黒い線で囲まれた部分は触媒ポケットで、FAD は黄色 sticks で示した。F223 から G61 までの距離は 13.5 Å で、黄色の” - - -“線で示した。

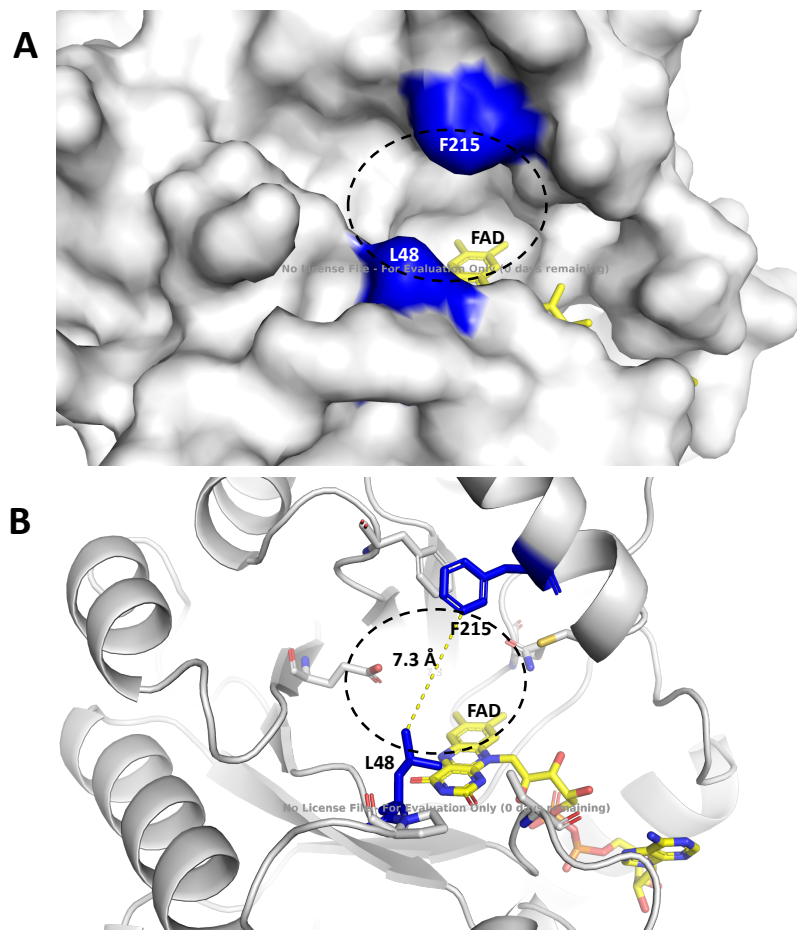


図 3-7-2. S6MTHFR-基質非結合型の活性ポケット

図 3-7-1 と同じ angle から示したものである。A は surface representation で、B は surface representation なしに stick のみで示した。” - - “黒い線で囲まれた部分は触媒ポケットで、FAD は黄色 sticks で示した。F215 から L48 までの距離は 7.3 Å で、黄色の” - - “線で示した。

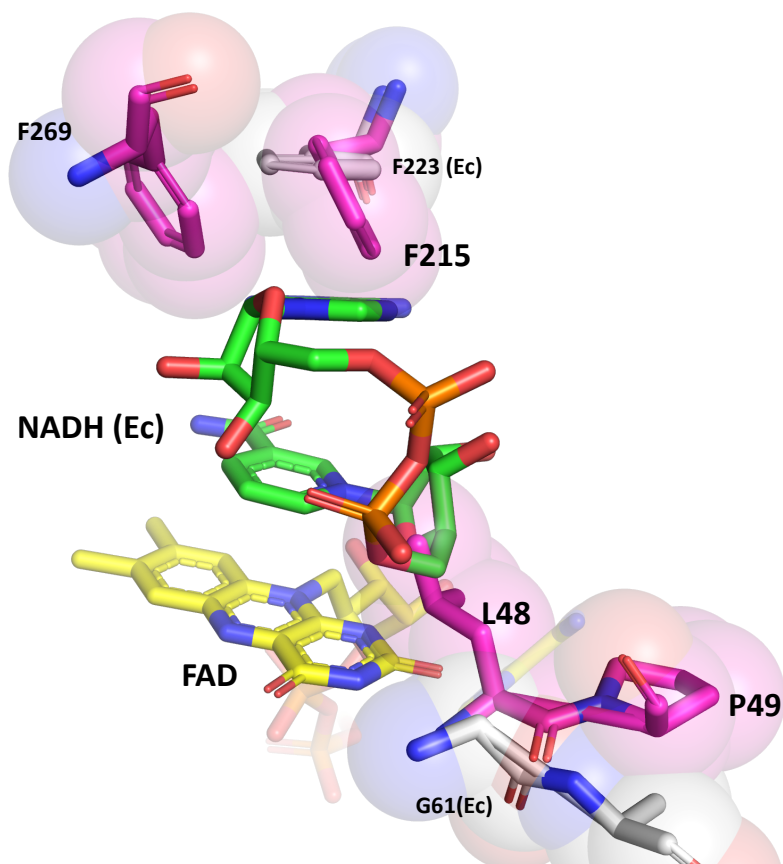


図 3-7-3. S6MTHFR と EcMTHFR-NADH 複合体の活性中心の重ね合わせ

アミノ酸残基は stick で表示した上、spheres で表示した。EcMTHFR の NADH 複合体構造(1zrq)由来アミノ酸残基は灰色とラベルに” (Ec) ”で示した。S6MTHFR 由来残基の炭素原子を紫色で示した。EcMTHFR 由来 NADH は緑色、FAD は黄色で示した。

4. 構造情報に基づいた変異体の活性測定

第3章では、S6MTHFR と S6MTHFR-CH₃-THF complex の構造比較、そして S6MTHFR-CH₃-THF complex と EcMTHFR-CH₃-THF complex の構造比較から、Leu48, Phe215, Cys219, Phe269 は CH₃-THF の結合と触媒反応に関与する可能性が示唆された。また、S6MTHFR と EcMTHFR-NADH complex の構造比較から、Leu48, Phe215, Phe269 は NADH の結合を阻害する可能性が示唆された。そのため、本章では変異体の活性測定を用いてこれら残基の機能について評価する。

4.1 CH₃-THF 反応に対する変異体の活性測定

第3.5節で述べたように、Cys219 は CH₃-THF の結合によって位置が変化し、CH₃-THF の結合及び触媒反応に関与する可能性が示唆された。これを検証するために、Cys219 を Ala に置換した変異体を WT と同様に精製して k_{cat} と K_m を求めた (図 4-1-1)。その結果、立体構造で得られた知見と一致するように、 K_m は 308 ± 33 (μM) で WT より約 10 倍大きくなったことがわかった。興味深いことに、Cys219 は CH₃-THF の触媒反応に関与することを予想していたが、 $k_{cat} = 67.7 \pm 2.3$ (s^{-1}) で WT より約 2.4 倍に上昇したことが示され、Cys219 は S6MTHFR が CH₃-THF を CH₂-THF に酸化する反応に抑制的に関与することがわかった。さらに、Cys219 をリジン (K) に置換したところ、100 μM CH₃-THF における C219K の比活性は WT の 37.5 unit/mg から 4.3 unit/mg まで顕著に低下し、CH₃-THF との反応が阻害されたことが示唆された (図 4-1-2)。

第3.6節で述べたように、S6MTHFR は EcMTHFR と異なる様式で CH₃-THF と結合している (図 3-6-3)。CH₃-THF の pteridine 環に直接相互作用する Cys219 以外、Leu48, Phe215,

Phe269 が CH₃-THF の安息香酸のベンゼン環 (PABA) と作用し、結合に関与すると考えられる。そこで、これらのアミノ酸の活性に対する効果を調べるために L48G/C219A/F269G、F215A/C219A/F269G 2 つの 3 重変異体を発現精製し、100 μM CH₃-THF における比活性の測定を行なった。その結果、WT の 37.5 unit/mg であることに對して、L48G/C219A/F269G は 1.16 unit/mg、F215A/C219A/F269G は 0.73 unit/mg であることが示され、CH₃-THF に対する比活性が大きく低下していることが明らかになった (図 4-1-2)。この変化は CH₃-THF に対する結合能の低下によるものと考えられ、CH₃-THF の濃度を 1000 μM まで上げてもう一回比活性測定を行なった。その結果、各変異体の比活性は濃度の増加と共に上昇したが、単体変異体の比活性は WT とほぼ変わらないものの、多重変異体の比活性は WT の半分以下であるが示された(図 4-1-3)。上記のことから、Leu48, Phe215, Phe269 は S6MTHFR の CH₃-THF の専用結合サイトを形成し、CH₃-THF の結合に重要不可欠であることが強く示唆された。

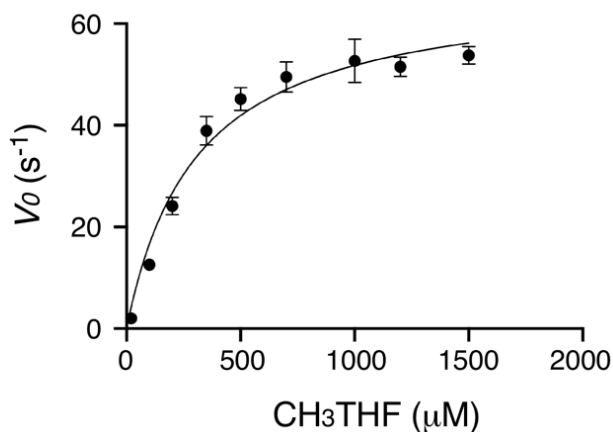


図 4-1-1. Kinetic analysis of MTHFR_{C219A}.

Conversion activity of MTHFR_{C219A} for various concentrations of CH₃-THF were examined using 50 mM KH₂PO₄-K₂HPO₄ buffer (pH 7.2) in the presence of 400 μM menadione at 30°C. The data are mean ± standard deviation of four independent experiments.

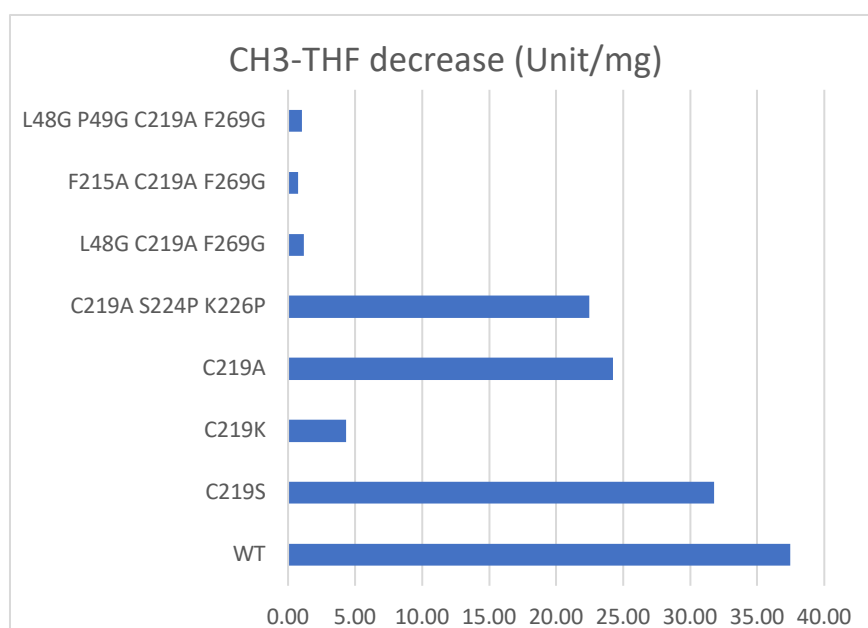


図 4-1-2. 各変異体が 100μM CH₃-THF に対する比活性

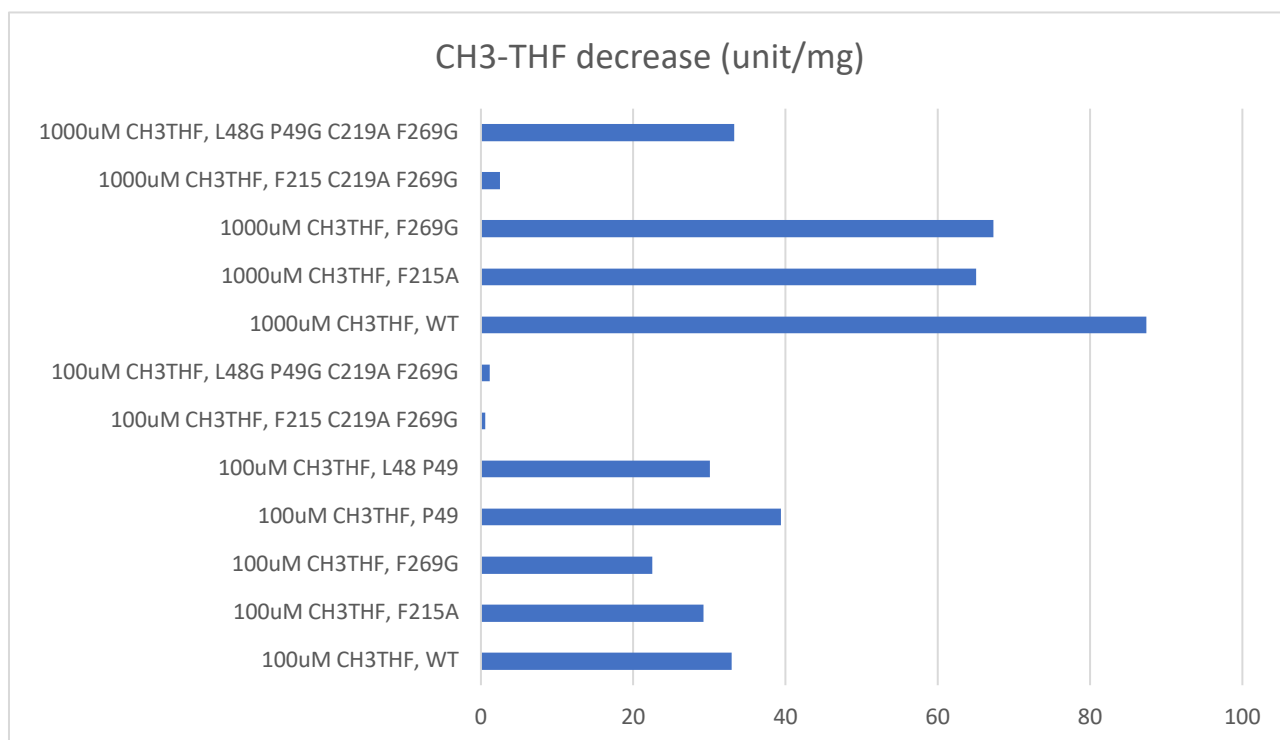


図 4-1-3. CH₃-THF の濃度変化による各変異体の比活性の変化

4.2 NADH 反応に対する変異体の活性測定

S6MTHFR の NADH に対する非活性が低い原因は構造上、NADH の結合が阻害されていることを証明するために変異体を作成し、NADH に対する比活性の変化を測定した。

最初は C219A を用いて測定を行なったが、残念ながら野生型に比べて比活性はほぼ変わらなかった。その後、F215A/C219A/F269G、F215A、F269G、C219A/F269G 変異体の比活性も測定したが、WT とほぼ変わらなかった。前章では、基質非結合型体 S6MTHFR と EcMTHFR-NADH 複合体の重ね合わせから、NADH の結合は Leu48 に阻害されたように見えたので、ポケットの入り口付近にある Leu48 を Gly にした L48G/C219A/F269G 三重変異体を用意した。しかし、L48G/C219A/F269G を用いた活性測定の結果もこれまでの変異体とほぼ変わらなかった。

その後、すでに報告された細胞内で CH₃-THF から反応する 3 つの MTHFR ホモログ (*Rhizorhabdus dicambivorans* Ndbn-20 由来 MTHFR, *Methylobacterium* sp. strain CM4 由来 MTHFR, S6MTHFR) (Yao S, *et al.*, 2019; Studer A, *et al.*, 2002) と S6MTHFR の構造情報を合わせて解析を行なった所、Leu48 のすぐ隣にある Pro49 に着目した。Pro49 は活性中心から離れているが、Leu48 を有する loop の立体位置を固定する役割があると推測し、P49G、L48G/P49G、L48G/P49G/C219A/F269G の変異体を作成し、NADH に対する活性測定を行なった。その結果、P49G 単体変異体や他の変異体に比べ、L48G/P49G 及び L48G/P49G/C219A/F269G の活性は顕著に上昇し(図 4-2-1)、酵素濃度が 1 μM 時の比活性は WT の 10 倍、最大で 1.7 unit/mg に達した (図 4-2-2)。

L48G/P49G と L48G/P49G/C219A/F269G の間の活性はほとんど変わらず、かつ Cys219 (データ未呈示)と Phe269 の単体変異体は活性にほとんど有意義な影響がなかった。そのため、Leu48Pro49 は NADH の結合をブロックするのに一番重要であると考えられた。その結論を元に、他の MTHFR の構造と比較した。これまでには細胞内において NADH から反応する MTHFR であり、これら MTHFR のポケット構造はいずれも広く、NADH が入りやすい形になっているがわかった(図 4-2-3/4/5)。これに対して、S6MTHFR の触媒ポケットの入り口には Leu48Pro49 があることで狭くなり、NADH の結合をブロックし結合親和性を低下させた。その結果、NADH より $\text{CH}_3\text{-THF}$ に対する基質特異性が高く、 $\text{CH}_3\text{-THF}$ と反応しやすくなった一方、NADH に対する反応性が低下したと考えられる。その具体的な影響を評価するために今 k_{cat} , K_m の測定を行なっている所である。

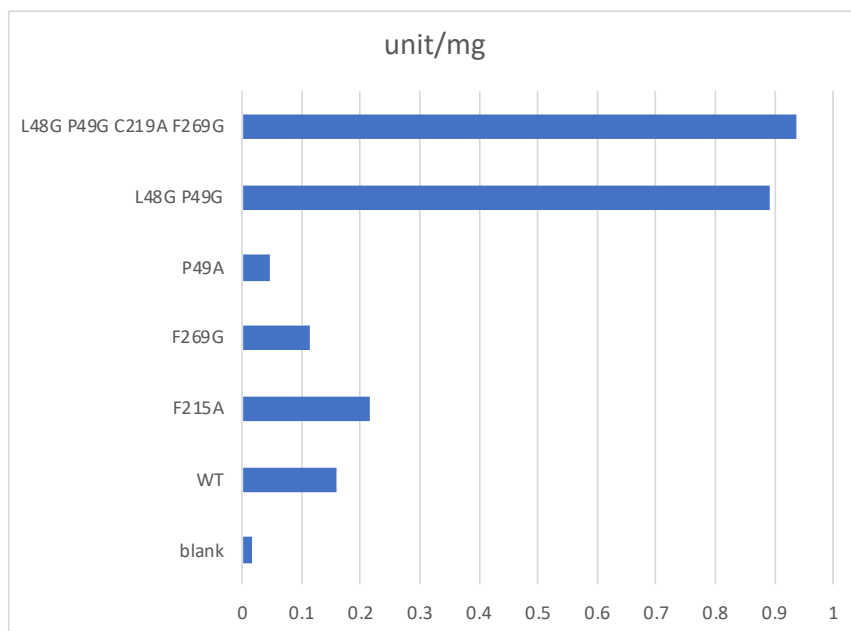


図 4-2-1. 各変異体が NADH に対する比活性の測定

2 mM NADH, 400 μ M menadione, 0.3 mM EDTA, 50 mM KPB pH7.2, 1 μ M 酵素で合計 1 ml の測定系で室温下 16 分間反応させ、NADH が 343 nm における吸光度の減少から $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ で減少量を計算した結果を示した。

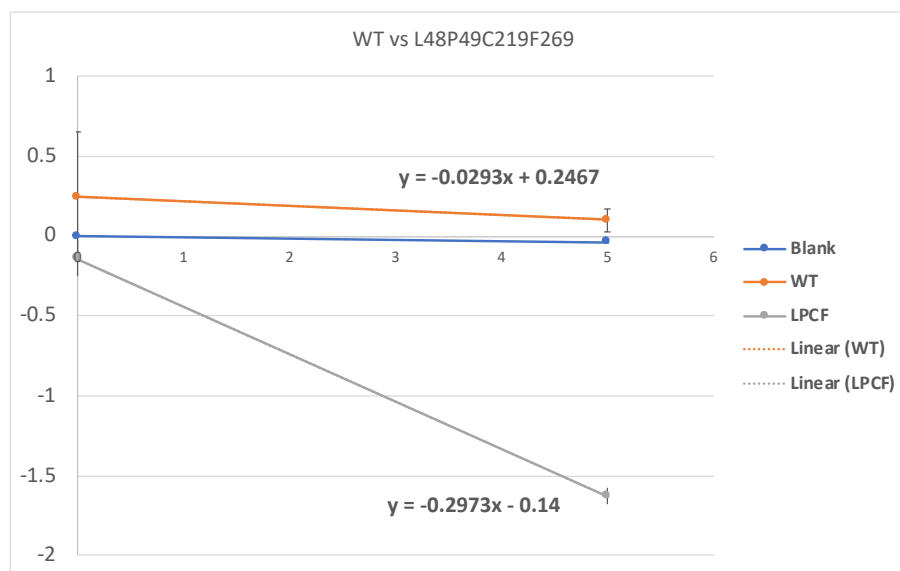


図 4-2-2. L48G/P49G/C219A/F269G と WT の NADH 活性測定

2 mM NADH, 400 μ M menadione, 0.3 mM EDTA, 50 mM KPB pH7.2, 1 μ M 酵素で合計 1 ml の測定系で、5 分間に室温で 3 連測定した。

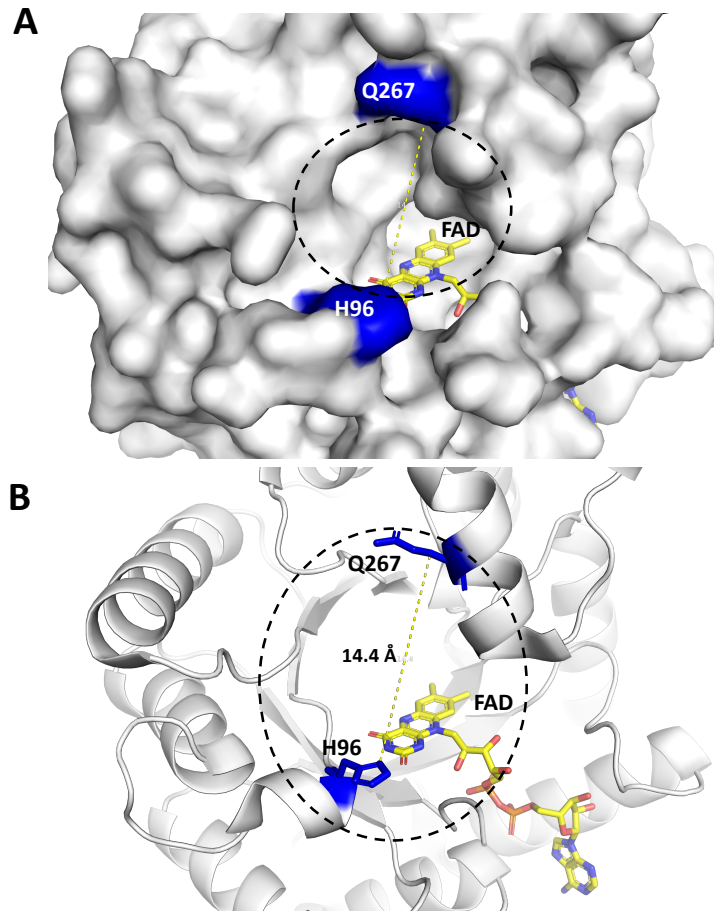


図 4-2-3. PDB にある他の MTHFR の触媒ポケット付近-ヒト由来 MTHFR

Human MTHFR の結晶構造(6fcx)、A は surface representation で、B は surface representation なしに stick のみで示した。” - - “黒い線で囲まれた部分は触媒ポケットで、FAD は黄色で示した。Q267 から H96 までの距離は 14.4 Å で、黄色の” --- “線で示した。

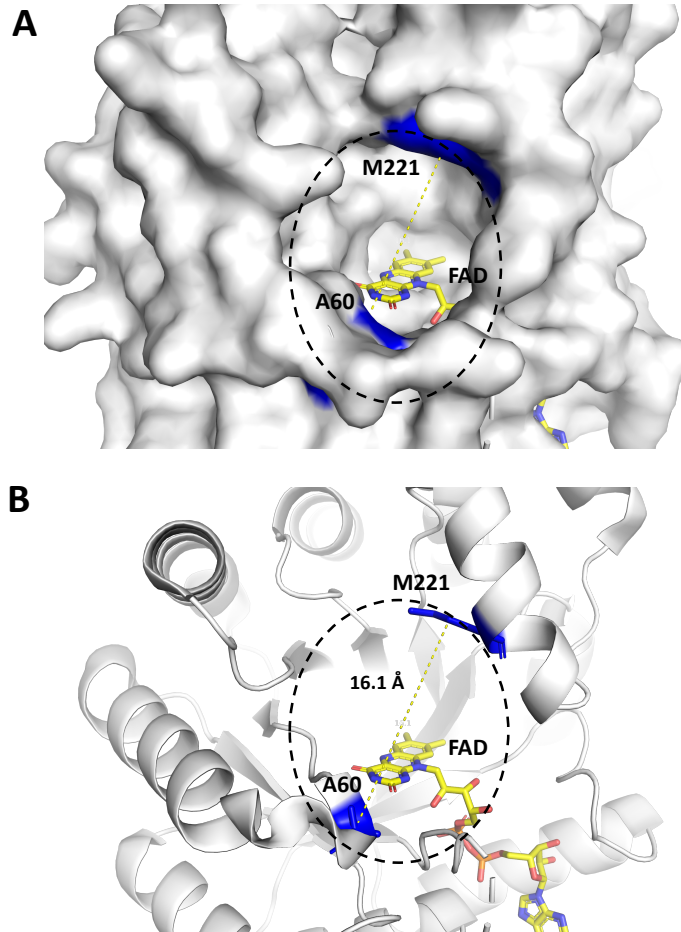


図 4-2-4. PDB にある他の MTHFR の触媒ポケット付近- *Haemophilus influenzae* Rd KW20

由来 MTHFR

Haemophilus influenzae Rd KW20 由来 MTHFR の結晶構造(5ume)、A は surface representation で、B は surface representation なしに stick のみで示した。” - - -“黒い線で囲まれた部分は触媒ポケットで、FAD は黄色で示した。M221 から A60 までの距離は 16.1 Å で、黄色の” - - -“線で示した。

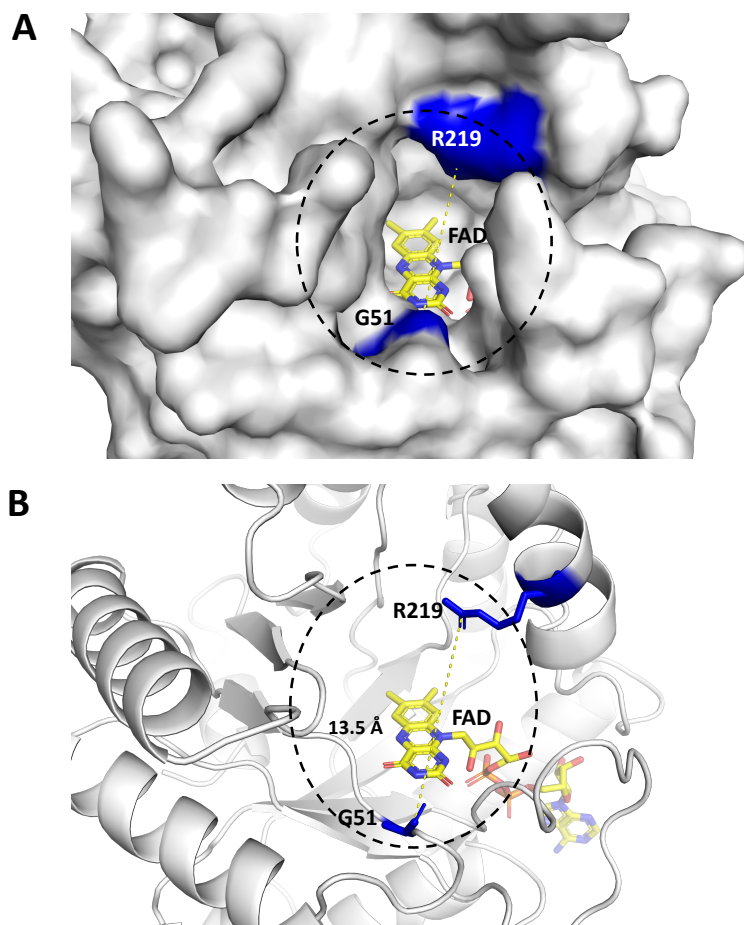


図 4-2-5. PDB にある他の MTHFR の触媒ポケット付近 *Thermus thermophilus* HB8 由来

MTHFR

Thermus thermophilus HB8 由来 MTHFR の結晶構造(3apt)、A は surface representation で、B は surface representation なしに stick のみで示した。” - - “黒い線で囲まれた部分は触媒ポケットで、FAD は黄色で示した。R219 から G51 までの距離は 13.5 Å で、黄色の” - - “線で示した。

5. S6MTHFR の電子受容体について

5.1 NAD^+ は S6MTHFR の電子受容体ではない

通常、MTHFR は細胞内において NAD(P)H を還元剤として $\text{CH}_2\text{-THF}$ を $\text{CH}_3\text{-THF}$ に変換する酵素である。酵素は基本的に可逆反応を行うと思われるため、細胞内で逆方向の反応、つまり $\text{CH}_3\text{-THF}$ から反応する S6MTHFR は NAD^+ を利用し NADH を合成することがこれまでに想定された。しかし、我々の立体構造情報と生化学的実験から、S6MTHFR は NADH と結合しにくいことが分かった。細胞内環境における $\text{CH}_3\text{-THF}$ から NAD^+ まで全反応系のギブスエネルギー ΔG を考慮する以前に、 NAD^+ は構造上 NADH とほぼ違いがないので、 NAD^+ は S6MTHFR と結合しにくく、結果的に反応できないことが考えられる。

これを検証するために、第 2 章で述べた嫌気滴定方法を用いて NAD^+ による還元型 S6MTHFR の滴定実験を行なった (図 5-1-1)。その結果、嫌気条件における 10 nmol の還元型 S6MTHFR に対して 2700 nmol の NAD^+ を加えたが、還元型 S6MTHFR は全く酸化されなかった。また、真核生物由来 MTHFR の一部は NADPH を利用することを考慮し、menadione の代わりに、異なる濃度の $\text{NADP}^+/\text{NAD}^+$ を電子受容体として添加することで、S6MTHFR の $\text{CH}_3\text{-THF}$ に対する変換能 (減少量) の変化を測定した。しかし、10 mM まで $\text{NADP}^+/\text{NAD}^+$ を添加しても変換能が上昇しなかった (図 5-1-2)。従って、 $\text{NADP}^+/\text{NAD}^+$ は S6MTHFR の電子受容体として適切ではないと強く示唆された。

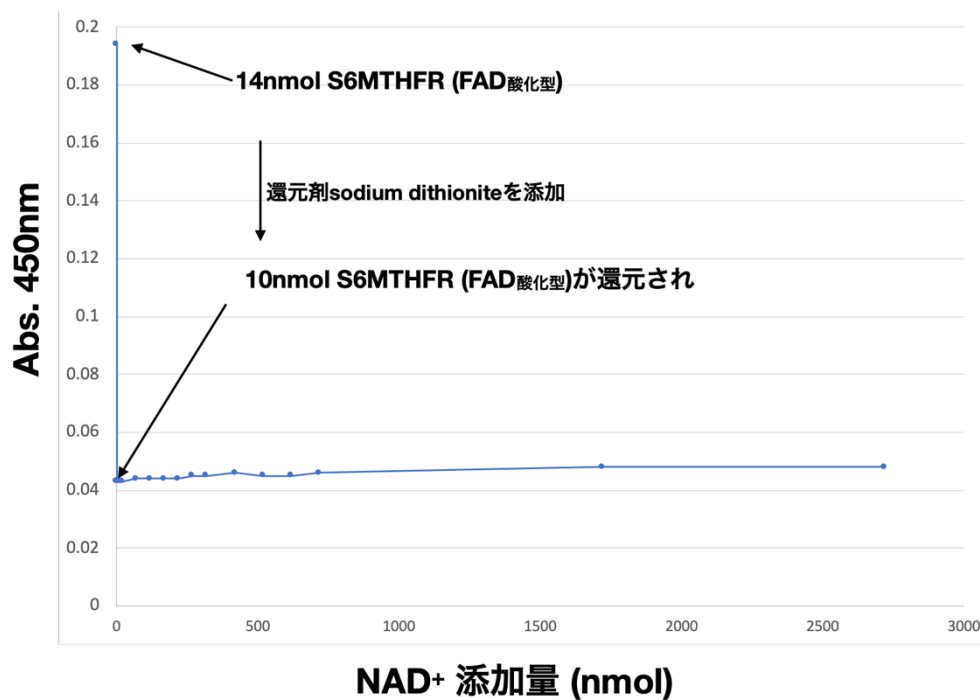


図 5-1-1. NAD⁺による還元型 S6MTHFR の嫌気滴定

S6MTHFR に付いている酸化型 FAD が 450 nm に極大吸収があることを利用し、嫌気状態で sodium dithionite で S6MTHFR の一部、10 nmol を還元した上、NAD⁺を徐々に加えて 450 nm における吸収の変化を記録した。縦軸: 450 nm における吸収強度、横軸: NAD の添加量 (nmol)。

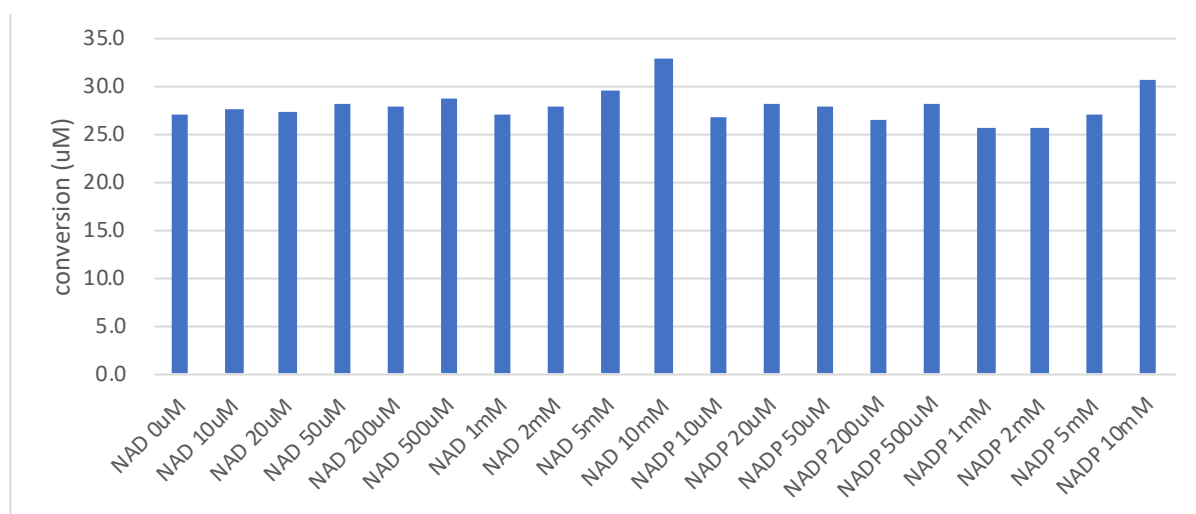


図 5-1-2. 異なる濃度の NADP⁺/NAD⁺の添加による CH₃-THF 減少量の変化

好気環境、100 μM CH₃-THF, 5 μM S6MTHFR, 30 度, 30 min 反応時間の条件で、NADP⁺/NAD⁺電子受容体として添加し、CH₃-THF 減少量から活性変化を評価した。

5.2 S6MTHFR 電子受容体の検討

NAD⁺は細胞内で電子受容体として反応しない以上、CH₃-THF によって還元された S6MTHFR は何か別の分子によって酸化され、turnover する必要がある。これまでに FAD を利用し酸化還元反応を行う酵素は GSSG oxidoreductase (Kamerbeek NM, *et al.*, 2007)、TCA 回路に属する fumarate/succinate oxidoreductase (Iverson TM, *et al.*, 1999)と malate/oxaloacetate oxidoreductase (Phizacherley PJR, 1969) など例があげられる。細胞内 FAD を利用し代謝する反応を網羅的に解析する前に、まず上記それぞれの酵素の基質である GSSG (Glutathione disulfide)と研究室で保有している oxaloacetate など TCA 回路系の試薬で試すことにした。そして FAD は呼吸系で働く ubiquinone と反応しやすいことが報告されたこともあるため(Watmough NJ and Frerman FE, 2010)、ubiquinone (Coenzyme Q10、以後 CoQ10)とそのヘッドグループである Coenzyme Q0 (以後 CoQ0) で試すことにした。また、第 2 章で述べたように、MTHFR を介した CH₂-THF から CH₃-THF への変換反応は発熱反応で、中間標準酸化還元電位 ΔE° は 200 mV 付近と過去に報告されている(Wohlfarth G, *et al.*, 1991)。そのため、理論上は CH₃-THF から CH₂-THF へ触媒する反応は吸熱反応であり、反応が自発的に起こるには高い酸化力を持つ電子受容体で系の ΔG をマイナスにする必要がある。そのため、研究室にある高い酸化力を持つ Fe³⁺, NO³⁻, NO²⁻の塩が電子受容体として機能できるかを試すことにした (Thauer RK, *et al.*, 1977)。

反応開始直後と 3 min の間における CH₃-THF の減少量で定量する方法で、上記の低分子化合物を試した。その結果、Coenzyme Q0, Q10, FeCl₃, NaNO₂ は S6MTHFR がなくでも CH₃-THF と反応できるがわかった。また、上記以外の試薬の結果は酸素が電子受容体 (0.12 unit/mg)として働いた時と比べてほぼ変わらなかった (図 5-2-1, A)。

低分子化合物でなく、ferredoxin (以後、Fd) (Senda M, *et al.*, 2007)、cytochrome C (Lambeth DO and Palmer G, 1973)、hemoglobin などタンパク質も電子受容体として働くことが他の研究で報告されていた。そのため、研究室にあるほうれん草由来 Fd と cytochrome C で電子伝達が始まるかを確認した。その結果、cytochrome C は S6MTHFR がなくても CH₃-THF と反応した。これに対して、Fd は S6MTHFR がないと CH₃-THF とほぼ反応しなかったことを確認できた。その上、Fd の濃度の増加と共に比活性が上昇し、最大で酸素の 3 倍 (0.33 unit/mg) となったことがわかった (図 5-2-1, B)。使用した Fd が古かったこともあって、再現性を取るために新しい Fd を購入し再実験を行なった。その結果、S6MTHFR の比活性は Fd の添加量の増加と共に上昇し、20 µg/ml Fd を加えた時に S6MTHFR の比活性は 0.34 unit/mg であった (図 5-2-2)。

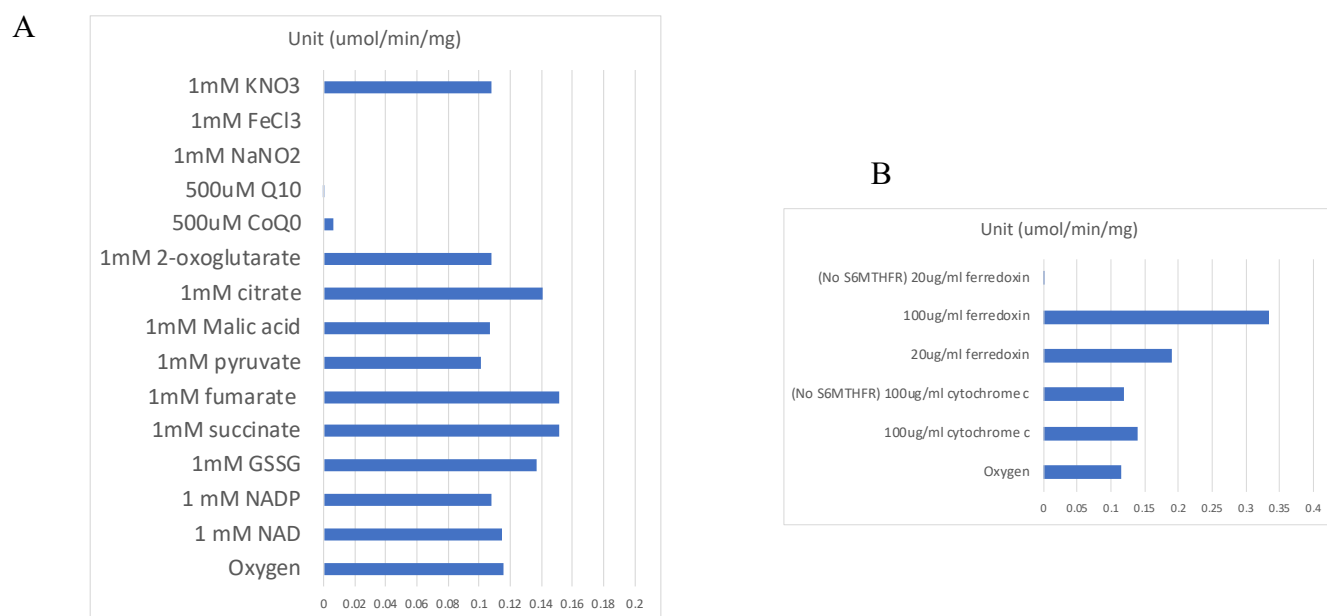


図 5-2-1. 低分子(A)とタンパク質 (B)を用いた電子受容体の検討

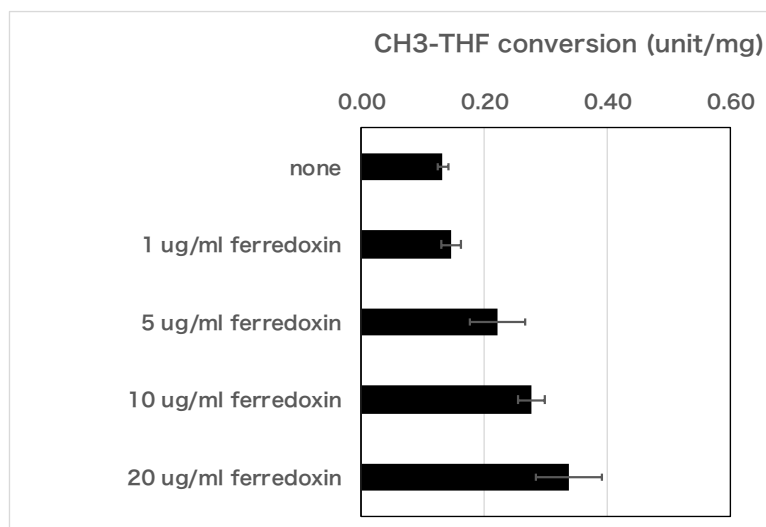


図 5-2-2. 新たなほうれん草由来 ferredoxin による再現実験

None, CH₃-THF が S6MTHFR と反応し、酸素が電子受容体に働くこと。

考察

まず、酸素は CH₃-THF によって還元された S6MTHFR の FAD を再酸化できることが示された。しかし、酸素が電子受容体として働いた時の比活性は 0.12 unit/mg (turnover rate が 0.06 s⁻¹)しかなく、menadione の 30.8 unit/mg と比べて活性が非常に弱いことがわかった。電子受容体が不明のままである Cytokinin dehydrogenase の研究では、最初は酸素が電子受容体として機能するのではないかと予想されたが、turnover rate が 0.6 s⁻¹ という低い活性のことから、oxidase として働く蓋然性は低いと述べられた (Frebortova J, *et al.*, 2004)。また、flavo-oxidase として酸素が還元されると H₂O₂ が発生する (Romero E, *et al.*, 2018)。SYK-6 は VA を炭素源として生育する際に、LigM による脱メチル化代謝反応の下流代謝経路に H₂O₂ の要求性についてこれまで報告されていない。その上、H₂O₂ は reactive oxygen species (ROS) として細胞に毒性を与えることもよく知られた事実である。以上のことから、酸素は S6MTHFR と反応できたが、電子受容体として働くのが難しいと考えられる。

興味深いことに、S6MTHFR はほうれん草 Fd へ電子を伝達できたことから、SYK-6 由来 Fd にも反応できる可能性が示唆された。独立栄養性生物に属し、嫌気条件で H₂ と CO₂ から合成したギ酸を炭素源として生育できるバクテリアとして *Clostridium formicoaceticum*, *Moorella thermoacetica*, *Acetobacterium woodii* が存在する。これらバクテリア由来の MTHFR はゲノム上、*methfr* のすぐ隣にある Fe-S 含有タンパク質にコードする遺伝子 *metV* (あるいは *metV*+NADH dehydrogenase) と転写 unit を組み、その上細胞内で MTHFR-MetV あるいは MTHFR-MetV-NADH dehydrogenase というヘテロ複合体を形成し機能することが推定された (Clark JE, *et al.*, 1984) (Mock J, *et al.*, 2014) (Bertsch J, *et al.*,

2015) (図 5-3)。具体的に言うと、このタイプの MTHFR は CH₂-THF と CH₃-THF 間の触媒反応を行うが、単体としては NADH/NAD⁺ や methyl viologen (ox/red) と反応できないためほとんど機能しない。電子の受け渡しの役割を持つ MetV と複合体を形成することで、活性は 70 倍上がり (50 unit/mg) 初めて機能する。場合によっては MetV だけでは不足、同じ転写ユニット中にある NADH dehydrogenase 役割を持つ HdrABC+MvhD あるいは RnfC2 と複合体を形成し機能することも報告された (Mock J, *et al.*, 2014)。

Blast で検索した所、MetV (約 20 kDa) のようなタンパク質は SYK-6 株のゲノム中には存在しなかった。しかし、S6MTHFR はほうれん草 Fd と反応できたことから、MetV の代わりに SYK-6 由来の Fd が S6MTHFR と反応し電子受容体として働く可能性が示唆された。

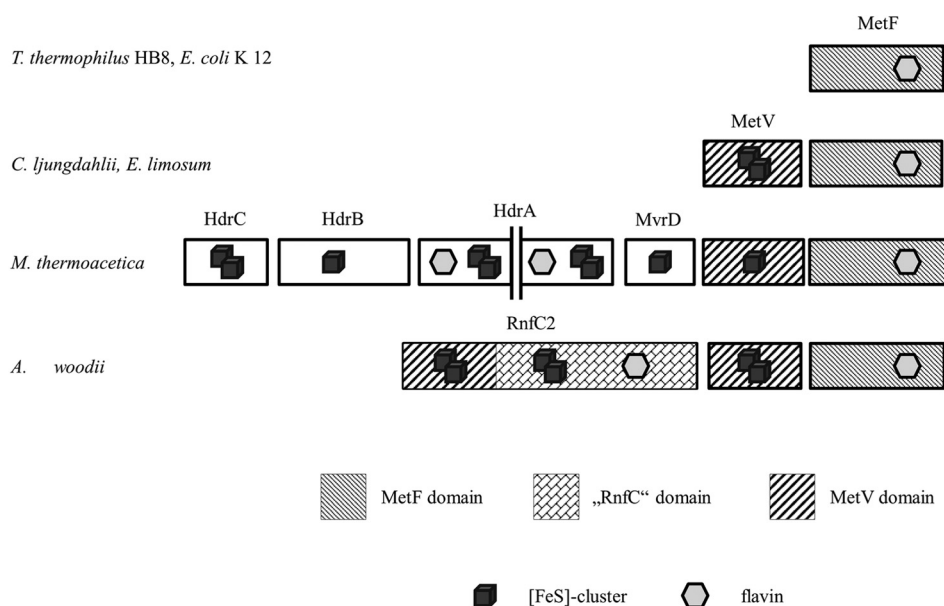


図 5-3. MetV とヘテロ多量体を形成する MTHFR

(Bertsch J, *et al.*, 2015 より)

6. MTHFR ファミリーのアミノ酸配列解析

6.1 S6MTHFR ホモログの配列解析

第2章で述べたように、細胞内ではMTHFRはNADHを利用して非可逆的にCH₂-THFをCH₃-THFに還元すると思われてきた。これに対して、S6MTHFRの通常と逆方向から反応する原因はTHF依存脱メチル化酵素LigMが先にCH₃-THFを生成することに適応するためと考えられるが、そのメカニズムは不明である。これまでのデータから、その原因はS6MTHFRの立体構造変化によって基質特異性が変化したと考えられる。具体的には、触媒ポケット入り口付近にLeu48Pro49があることでNADHの結合がブロックされることと、PABAを固定しCH₃-THFの専用結合サイトを形成する残基Leu48, Phe215, Phe269と、CH₃-THFのpteridineと相互作用することでCH₃-THFの認識結合と触媒反応に重要な残基Cys219に原因あると考えられる。その結果、NADHに対する反応性が0.17 unit/mgとなったことに対して、CH₃-THFに対する反応性が50 unit/mgとなり、S6MTHFRはCH₃-THFから反応せざるを得ない状況となったと考えられる。

このようなS6MTHFRの性質は、他のTHF依存脱メチル化に依存した1C代謝中にあるMTHFRにも適応できるかどうかを明らかにするため、MTHFRホモログの配列解析を行なった。第1章でも述べたように、S6MTHFRのような進化はCH₃-THFを生成するTHF脱メチル化酵素に依存する。このようなTHF依存脱メチル化酵素はSYK-6の持つLigM/DesA (Harada A, *et al.*, 2017)のほか、CH₃Clやmethanolで生育できる*Methylobacterium chloromethanicum* sp. strain CM4由来corrinoid含有酵素CmuAB (Studer A, *et al.*, 1999)、dicambaで生育できる*R. Ndbn-20* (*Sphingomonas* sp. Ndbn-20)由来Dmt (Yao L, *et al.*, 2016)が報告されている。また、ゲノム上ではこれらTHF依存脱メチル化酵素の遺伝子はすぐ隣にある*methfr*とオペロンを組んでいると推定された。そのため、

Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を利用し、上記の LigM/DesA/Dmt/CmuAB それぞれのアミノ酸配列を鋳型とし、40~50%以上の相同性があるホモログを有するバクテリア (60 株) に絞った。その上、既に報告された *M. sp. strain* CM4 由来 MTHFR (以後、C4MTHFR) (Studer A, *et al.*, 2002)、*R. Ndbn-20* 由来 MTHFR (以後、N20MTHFR) (Yao S, *et al.*, 2019) と S6MTHFR のアミノ酸配列を鋳型とし、選択したバクテリアが有する MTHFR ホモログのアミノ酸情報を集めた (表 6-1)。さらに、CH₂-THF から反応する MTHFR と比較するために、これまでに報告された CH₂-THF から反応する MTHFR と、EcMTHFR とヒト MTHFR のアミノ酸情報を鋳型に blast のモデル生物 database で集めた 40 個 MTHFR の配列情報を用いて (表 6-2, 6-3)、上記と合わせて 100 個 MTHFR の配列解析を COBALT で行なった。

結果

まず、既に報告された C4MTHFR, N20MTHFR は S6MTHFR で発見した NADH の結合をブロックする Leu48Pro49 を完全に保存している。その上、CH₃-THF の認識結合・反応の制御に関わる Cys219 も完全に保存されている。また、C4MTHFR では S6MTHFR の Phe215 に対応する残基は His、Phe269 に対応する残基は Leu になっていることがわかった。次に、LigM/DesA/Dmt/CmuAB のホモログを有する 60 個バクテリアで S6/C4/N20MTHFR のホモログ配列を解析したところ、Leu48Pro49, Cys219 は完全に保存され、Phe215 と Phe269 は 80%以上保存されていることがわかった。上記の特徴を有するホモログは基本的に S6 MTHFR, C4 MTHFR, N20MTHFR のそれぞれに対して 40 %以上の相同性を有し、ゲノム上では *ligM* などホモログ遺伝子のすぐ隣に配置されている。

その上、EcMTHFR など他の CH₂-THF から反応する MTHFR と比べて、上記残基の周りでは以下のような特定なパターンの motif : T₄₆-F₄₇(Y/R 17%)-L₄₈P₄₉ (以後、TFLP)(図 6-1-1)、F₂₁₅AAR-C₂₁₉GVGxS₂₂₄ (図 6-1-2)、PF₂₆₉GG (図 6-1-5)になっていることがわかった。しかし、実際特定した 60 個バクテリアの中、80 %のバクテリアは 2 つ以上の MTHFR を持っていることがわかった。上記の motif を有する MTHFR と違い、もう一つの MTHFR は S6 MTHFR, C4 MTHFR, N20MTHFR のそれぞれに対して 20 %の相同性しかないし、上記の motif も保存されていない。その上、CH₂-THF から反応する EcMTHFR と 50 %以上の相同性を持っていることが示された。

考察

まず、NADH の結合をブロックする Leu48Pro49 は、ゲノム上 *ligM* などホモログにすぐ隣接する *methfr* に完全に保存されていることから、Leu48Pro49 は NADH との反応を阻害し、MTHFR を CH₃-THF から反応させる最も重要な残基と考えられる。また、Leu48Pro49 を含む TFLP motif に対し、EcMTHFR を代表する CH₂-THF から反応する MTHFR は TYGA motif、酵母、線虫、稲など 75%の真核生物由来 MTHFR は TWGA motif となっている。ヒトとその近縁種である *Macaca fascicularis* (猿), *Mus musculus* (マウス), *Bos Taurus* (牛)由来 MTHFR だけ、TWHF motif を持っているように見えたが、ヒト由来 MTHFR の立体構造との比較から、Pro49 (S6MTHFR)に対応するのは Pro97 (ヒト)でなく TWHF motif 中の His96 (ヒト)であることが分かった(図 6-1-1)。

次に、Cys219 は CH₃-THF の pteridine の N¹ に作用し、Cys を Ala に置換すると K_m が 10 倍ほど上昇したことから、CH₃-THF の結合に関与していることが示唆された。この

Cys219 は上記の TFLP motif を持つ S6MTHFR ホモログで全て保存されているが、CH₂-THF から反応する MTHFR の中でも約 20 %保存されている。しかし、Cys219 の周りを見ていくと、S6MTHFR のホモログだけ Cys219 から 6 残基にわたり、CGVGAS という motif が高度に保存されていることが分かった (CGxGxS motif)。構造上では Cys219 に続く GxGxS は loop の部分にあたり、CH₃-THF の結合による Cys219 の移動と共に loop の長さが 0.8 Å 伸びた(図 6-1-3, A)。このような CH₃-THF 有無による loop の位置変化は EcMTHFR で観察されなかった(図 6-1-3, B)。さらにこの部分のアミノ酸保存性を細かく見ていくと、S6MTHFR ホモログの CGxGxS motif の Ser224 に対応する残基は、他の全ての MTHFR において Pro になっていることがわかった。Ser224 を Pro に置換し CH₃-THF に対する活性を測定した結果では、野生型より比活性が最大 40%低下したことがわかった (図 6-1-4)。これらの結果から、Cys219 と CH₃-THF の pteridine 間の相互作用が重要であること上、Ser224 を含む loop 位置変化と比活性の結果から、C₂₁₉GxGxS₂₂₄ motif は CH₃-THF の結合と触媒反応に関与することが示唆された。

Leu48, Phe215, Phe269 3 つの残基が CH₃-THF の PABA と同時に相互作用し、CH₃-THF の結合に重要であることは第 4 章で述べた。Phe215 は S6MTHFR ホモログの中で 80%ぐらい保存されているが、EcMTHFR ホモログなど全部の MTHFR 中では 50%の保存性しかない (Phe の代わりに、H/Y/M/L/R/I)。さらに、EcMTHFR の研究から Phe215 は NADH と CH₂/CH₃-THF の結合に重要ではあるが、保存性が低いことや、Phe を Leu に置換しても活性に影響はなかったことが報告された (Lee MN, *et al.*, 2009)。Phe215 の代用性が高いため、単体としての重要性は比較的低いと判断した。また、Phe269 も TFLP motif を持つ S6MTHFR ホモログの中で 80%ぐらい保存されているが、その周りをさらに解析す

ると H₂₆₅F₂₆₆Y₂₆₇-PF₂₆₉GG motif が S6MTHFR ホモログのみで保存されているが示された (図 6-1-5)。His₂₆₅ はすべての MTHFR でも完全に保存されており、H₂₆₅F₂₆₆Y₂₆₇ は FAD から少し離れているが、現存の全ての MTHFR の構造中でほぼ同じ位置にあることが示された。しかし、その後の loop について、TFLP motif を有する S6MTHFR ホモログ以外の MTHFR は TLNx になっていることに対し、S6MTHFR ホモログは loop の初めに Pro₂₆₈ が入ることで (PF₂₆₉GG motif)、loop の方向が大きく変わり、Phe₂₁₅ に寄せて他の loop と逆な方向になっていることが分かった (図 6-1-6)。これによって Phe₂₆₉ は Phe₂₁₅ の側鎖の手前に存在し、Phe₂₁₅ 側鎖の向きを固定しながら、CH₃-THF の PABA のベンゼン環と相互作用すると考えられる。その同時に、Pro₂₆₈ によって Phe₂₁₅ 方向に寄せられた Phe₂₆₉ の位置は EcMTHFR の CH₃-THF の PABA に相当する (図 3-6-2)。これによって、S6MTHFR の CH₃-THF が折りたたまれて、PABA は Leu₄₈ と反応できるようになったと考えられる。

上記のことをまとめると、CH₃-THF から反応する MTHFR はゲノム上 THF 依存脱メチル化酵素に隣接し、NADH の結合を阻害する TFLP motif (F は 82.5% 保存) を有することが最も大きな特徴である。その上、S6MTHFR のように CH₃-THF と結合・触媒しやすくするために ($k_{cat}/K_m=1.0$, EcMTHFR は 0.016)、CGxGxS motif と PFGG motif (F は 80% 保存) を有することがもう一つの特徴である。これらの条件を満たす MTHFR を S6 型 MTHFR として定義することにした。

| | | | TFL ₄₈ P ₄₉ motif | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|-----|
| S6MTHFR/ N20MTHFR/ C4MTHFR/ homologies (Type 4) | SYK-6 | V | T | F | L | P | G A |
| | Sphingomonas sp. Ndbn-20 | V | T | Y | L | P | - - |
| | Sphingobium sp. YR768 | V | T | F | L | P | - - |
| | Sphingobium czechense | V | T | F | L | P | - - |
| | Sphingobium sp. Ba1 | V | T | F | L | P | - - |
| | Sphingobium chlorophenolicum L-1 | V | T | Y | L | P | - - |
| | Novosphingobium aromaticivorans DSM 12444 | V | T | F | L | P | - - |
| | Novosphingobium sp. PP1Y | L | T | F | L | P | - - |
| | Novosphingobium sp. CCH12-A3 | V | T | F | L | P | - - |
| | Methylobacterium extorquens CM4 | I | T | R | L | P | - - |
| | Leifsonia xyli | I | T | R | L | P | T G |
| Prokaryotic MTHFR (Type 2) | Escherichia coli K-12 | V | T | Y | G | A | N S |
| | Thermus thermophilus | I | T | Y | G | A | M G |
| | Haemophilus influenzae Rd KW20 | V | T | Y | G | A | N S |
| Eukaryotic MTHFR (Type 1) | Zea mays | I | T | W | G | A | G G |
| | Saccharomyces cerevisiae | V | T | W | G | A | G G |
| | Caenorhabditis elegans | M | T | W | H | M | G S |
| | Homo sapiens | V | T | W | H | P | A G |
| | Mus musculus | V | T | W | H | P | A G |
| MetV+MTHFR (Type 3) | Clostridium formicaceticum | V | T | D | F | Q | S A |
| | Acetobacterium woodii | V | T | D | N | Q | S S |

図 6-1-1. TFLP motif

100 個 MTHFR を解析した一部 (22 個) を例としてここに示す。全共通残基はピンクで、S6MTHFR ホモログの共通残基は赤で示した。Type 4 は THF 依存脱メチル酵素遺伝子に隣接する *methfr* で、CH₃-THF から反応する S6MTHFR/C4MTHFR/N20MTHFR を含めるホモログである。CH₂-THF から反応し、EcMTHFR を代表する一般的原核生物由来 MTHFR を type 2 で表示した。Type 1 は CH₂-THF から反応し、ヒト MTHFR を代表する一般的真核生物由来 MTHFR である。Type 3 は CH₂-THF から反応し、MetV とヘテロ多量体を形成する MTHFR ホモログである。なお、Type 1, 2, 3, 4 は次の 6.2 節で定義した。図 6-1-2 と図 6-1-5 も同様。

| F ₂₁₅ AAR - C ₂₁₉ GVGX ₂₂₄ motif | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S6MTHFR/ N20MTHFR/ C4MTHFR/ homologies (Type 4) | SYK-6 | R | F | A | A | R | C | - | G | V | G | T | S |
| | Sphingomonas sp. Ndbn-20 | R | F | A | A | R | C | - | G | V | G | A | S |
| | Sphingobium sp. YR768 | R | F | A | A | R | C | - | G | V | G | A | S |
| | Sphingobium czechense | R | F | A | A | R | C | - | G | V | G | A | S |
| | Sphingobium sp. Ba1 | R | F | A | A | R | C | - | G | V | G | A | S |
| | Sphingobium chlorophenolicum L-1 | R | F | A | A | R | C | - | G | V | G | A | S |
| | Novosphingobium aromaticivorans DSM 12444 | A | F | A | A | R | C | - | G | V | G | A | S |
| | Novosphingobium sp. PP1Y | R | F | A | A | R | C | - | G | V | G | A | S |
| | Novosphingobium sp. CCH12-A3 | A | F | A | A | R | C | - | G | V | G | A | S |
| | Methylorubrum extorquens CM4 | K | H | A | V | A | C | - | G | V | G | A | S |
| | Leifsonia xyli | K | H | A | L | A | C | - | G | V | G | A | S |
| Prokaryotic MTHFR (Type 2) | Escherichia coli K-12 | K | F | A | D | M | T | - | N | V | R | I | P |
| | Thermus thermophilus | R | F | T | E | V | C | - | G | A | S | I | P |
| | Haemophilus influenzae Rd KW20 | K | M | A | S | F | T | - | N | V | K | I | P |
| Eukaryotic MTHFR (Type 1) | Zea mays | R | M | T | G | F | C | - | K | T | K | I | P |
| | Saccharomyces cerevisiae | R | A | A | K | L | S | - | H | A | S | I | P |
| | Caenorhabditis elegans | R | I | A | K | L | S | - | Q | L | E | I | P |
| | Homo sapiens | Q | L | V | K | L | S | - | K | L | E | V | P |
| | Mus musculus | Q | L | V | K | L | S | - | K | L | E | V | P |
| MetV+MTHFR (Type 3) | Clostridium formicaceticum | F | M | N | N | N | V | P | G | I | Y | V | P |
| | Acetobacterium woodii | Y | M | N | A | N | V | A | G | V | H | V | P |

図 6-1-2. F₂₁₅AAR-C₂₁₉GVGxS₂₂₄ motif の比較

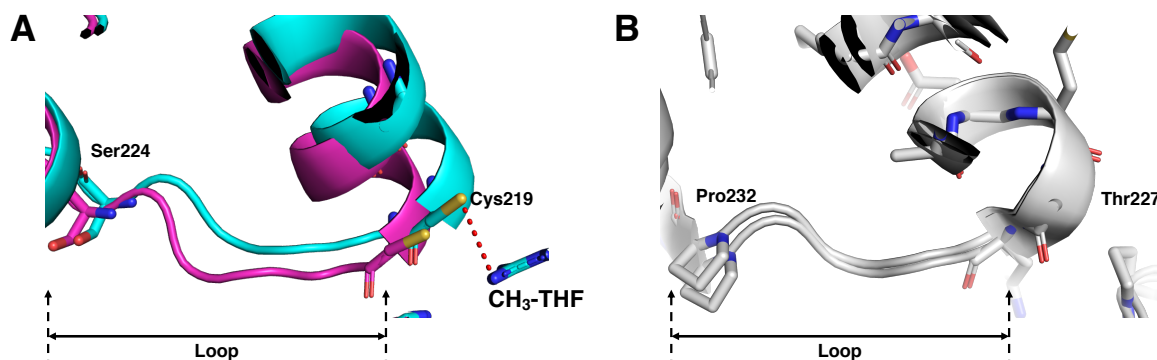


図 6-1-3. C₂₁₉GxGxS₂₂₄ motif の構造比較

A, S6MTHFR の Cys219 と loop 部分である GxGxS₂₂₄ を示す。青は CH₃-THF 複合体、紫は基質非結合型体構造を示す。 B, C₂₁₉GxGxS₂₂₄ motif に対応する EcMTHFR の CH₃-THF 有無の構造を示す。

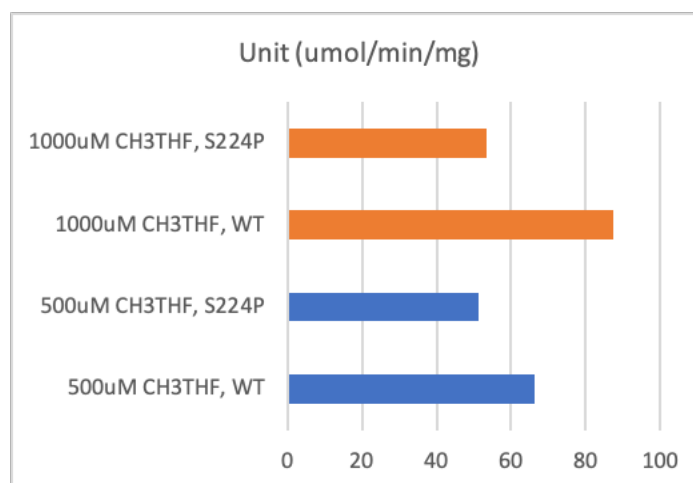


図 6-1-4. Ser224 を Pro に置換した変異体活性

| | | HFY - P ₂₆₈ F ₂₆₉ GG motif | | | | | | | |
|---|---|--|---|---|---|---|---|---|---|
| S6MTHFR/ N20MTHFR/ C4MTHFR/ homologies (Type 4) | SYK-6 | H | F | Y | P | F | G | G | L |
| | Sphingomonas sp. Ndbn-20 | H | F | Y | P | F | G | A | L |
| | Sphingobium sp. YR768 | H | F | Y | P | F | G | G | L |
| | Sphingobium czechense | H | F | Y | P | F | G | G | L |
| | Sphingobium sp. Ba1 | H | F | Y | P | F | G | G | L |
| | Sphingobium chlorophenolicum L-1 | H | F | Y | P | F | G | A | F |
| | Novosphingobium aromaticivorans DSM 12444 | H | F | Y | P | F | G | G | L |
| | Novosphingobium sp. PP1Y | H | F | Y | P | F | G | G | L |
| | Novosphingobium sp. CCH12-A3 | H | F | Y | P | F | G | G | L |
| | Methylobacterium extorquens CM4 | H | V | F | P | L | G | G | F |
| | Leifsonia xyli | H | F | F | P | L | G | G | F |
| Prokaryotic MTHFR (Type 2) | Escherichia coli K-12 | H | F | Y | T | L | N | R | A |
| | Thermus thermophilus | H | F | Y | T | L | N | K | S |
| | Haemophilus influenzae Rd KW20 | H | F | Y | T | L | N | R | S |
| Eukaryotic MTHFR (Type 1) | Zea mays | H | L | Y | T | L | N | M | D |
| | Saccharomyces cerevisiae | H | F | Y | T | L | N | L | E |
| | Caenorhabditis elegans | H | L | Y | T | M | N | R | E |
| | Homo sapiens | H | F | Y | T | L | N | R | E |
| | Mus musculus | H | F | Y | T | L | N | R | E |
| MetV+MTHFR (Type 3) | Clostridium formicaceticum | H | I | M | A | I | G | A | E |
| | Acetobacterium woodii | H | I | M | S | L | G | W | E |

図 6-1-5. Type CH3, PF(L)GG motif の比較

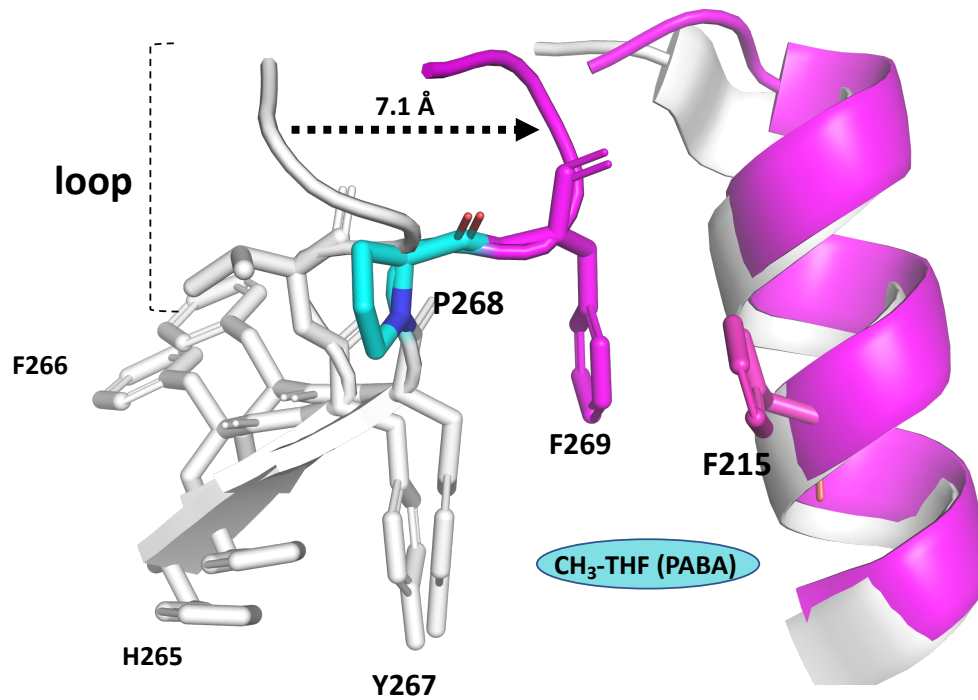


図 6-1-6. EcMTHFR (1zp3)HFY-TLN motif と S6MTHFR HFY-PF₂₆₉GG motif 間の比較

EcMTHFR は灰色で、S6MTHFR は青色(Pro269)と紫色で示した。

6.2 MTHFR の系統解析

MTHFR に関する研究は 1950 年代の遺伝子同定とその後の 1960 年代初頭のタンパク質分子の機能解析まで遡れる (Donaldson K, *et al.*, 1962)。これまでの研究から、MTHFR は $\text{CH}_3\text{-THF}$ と $\text{CH}_2\text{-THF}$ の変換を行い、1C 代謝中の葉酸を利用した経路とメチオニン代謝経路を繋ぐ役割を果たしている。

第 1 章で述べたように、グルコースを炭素源として利用し、SHMT/GCV を用いて Ser/Gly から $\text{CH}_2\text{-THF}$ を生成した後、MTHFR は $\text{CH}_2\text{-THF}$ を $\text{CH}_3\text{-THF}$ に変換することでメチオニン代謝経路にメチル基を提供することが一般的な生物の 1C 代謝である。従属栄養性生物に属するこの type の MTHFR は基本的にホモ多量体を形成し、大腸菌 MTHFR を代表する N 末端触媒ドメイン (約 300aa)のみを有する原核生物と、ヒト MTHFR を代表する N 末端触媒ドメイン (約 300aa)+C 末端制御ドメイン (約 250aa)を有する真核生物に分類できる (Kasap M, *et al.*, 2007)。本論文では、制御ドメインを有する真核生物 MTHFR を type 1 として定義することに対し、触媒ドメインしかない原核生物を type 2 として定義する。

上記の炭素源の獲得方法と異なるが、 H_2 を利用し CO_2 から炭素を固定する独立栄養性生物も存在する。前章で述べたように、この type の MTHFR は単体として機能せず、MetV という Fe-S タンパク質 (あるいは MTHFR+MetV+NADH dehydrogenase) とヘテロ多量体を形成し機能する (ゲノム上ではオペロンを組んでいる)。本論文では、このような MetV とヘテロ複合体形成する MTHFR を type 3 として定義する (Clark JE, *et al.*, 1984) (Mock J, *et al.*, 2014) (Bertsch J, *et al.*, 2015)。

しかし、自然界に存在する豊かなメチル基含有化合物を炭素源として、THF 依存脱メチル化酵素を利用し $\text{CH}_3\text{-THF}$ を最初に生成し、その後 MTHFR が $\text{CH}_3\text{-THF}$ を $\text{CH}_2\text{-THF}$ に酸化することで 1C 代謝を行う生物も存在する。このような逆方向から反応する MTHFR を持つ生物は $\text{CH}_3\text{-THF}$ を生成する THF 脱メチル化酵素に依存し、その後に生物が 1C 代謝を行うために進化させたと考えられる。前節では、このような逆方向から反応する MTHFR を S6 型 MTHFR として定義した。この S6 型 MTHFR と上記 type1,2,3 との関係性を調べるために、系統樹を用いて解析を行なった。

結果

その結果、 $\text{CH}_3\text{-THF}$ から反応すると考えられる S6 型 MTHFR は、これまで報告された $\text{CH}_2\text{-THF}$ から反応する type 1, 2, 3 MTHFR と異なり、新たなクラスターに分類されることが示された(図 6-2)。また、図には示していないが、前節で議論した 2 つ MTHFR を同時に有するバクテリアについてだが、S6 型 MTHFR クラスターと EcMTHFR を代表する type 2 MTHFR クラスターにそれぞれ分類され、綺麗に分かれた。そのため、ここで S6 型 MTHFR を type 4 MTHFR として定義する。

考察

上記のことから、2 つ MTHFR を同時に有するバクテリアの存在は、type 4 MTHFR が type 2 から進化してきた証拠であると考えた。Type1,2 MTHFR のような解糖系を依存した従属栄養性生物は現在地球上広く存在するが、進化的観点から見ると、type 3

MTHFR のような独立栄養性生物は古くから存在していたと考えられる。第 1 章では、 H_2 を用いて CO_2 から炭素を固定する独立栄養性生物が存在すると述べたが、この炭素固定法は Wood-Ljungdahl pathway というアセチル CoA の合成経路として知られており、最終共通祖先に保存されていると推定された (Weiss M, *et al.*, 2016)。 H_2 と CO_2 から生成されたギ酸から 1C unit を獲得し CH_2 -THF が生成されたのちに、MTHFR が CH_2 -THF を CH_3 -THF に還元し、アセチル CoA の合成にメチル基を提供する代謝は Wood-Ljungdahl pathway として以前から知られている (Braakman R, *et al.*, 2012)。MetV と複合体を形成する Type 3 MTHFR はこの Wood-Ljungdahl pathway に属するために、進化的に最も古いものの一つと考えられる。その後、グルコースなど炭素源が豊かになるに伴い、生物が進化し解糖系に依存した代謝を行うようになった。その結果、SHMT/GCV がセリンやグリシンを利用して CH_2 -THF を作り出した後、type1,2 のような MTHFR が直接 NADH と反応できるようになり、 CH_2 -THF を CH_3 -THF に変換するようになった。その後、type 2 の一部のバクテリアでは炭素源が限られているため、バニリン酸やシリング酸などのメチル基含有化合物を利用して生存できるように、解糖系から生成されたグリシンを代謝するグリシン開裂系のほかに THF 依存脱メチル化に依存した代謝経路も持つようになったと考えられた。その結果、type 1,2 MTHFR のほか、 CH_3 -THF から反応する type 4 MTHFR も有するように進化したと考えられる。最終的に、グリシン開裂系遺伝子が淘汰され、完全に THF 脱メチル化代謝経路を依存するようになった結果、type 4 MTHFR である S6MTHFR しか持たない SYK-6 のような生物が現れたと考えられる。

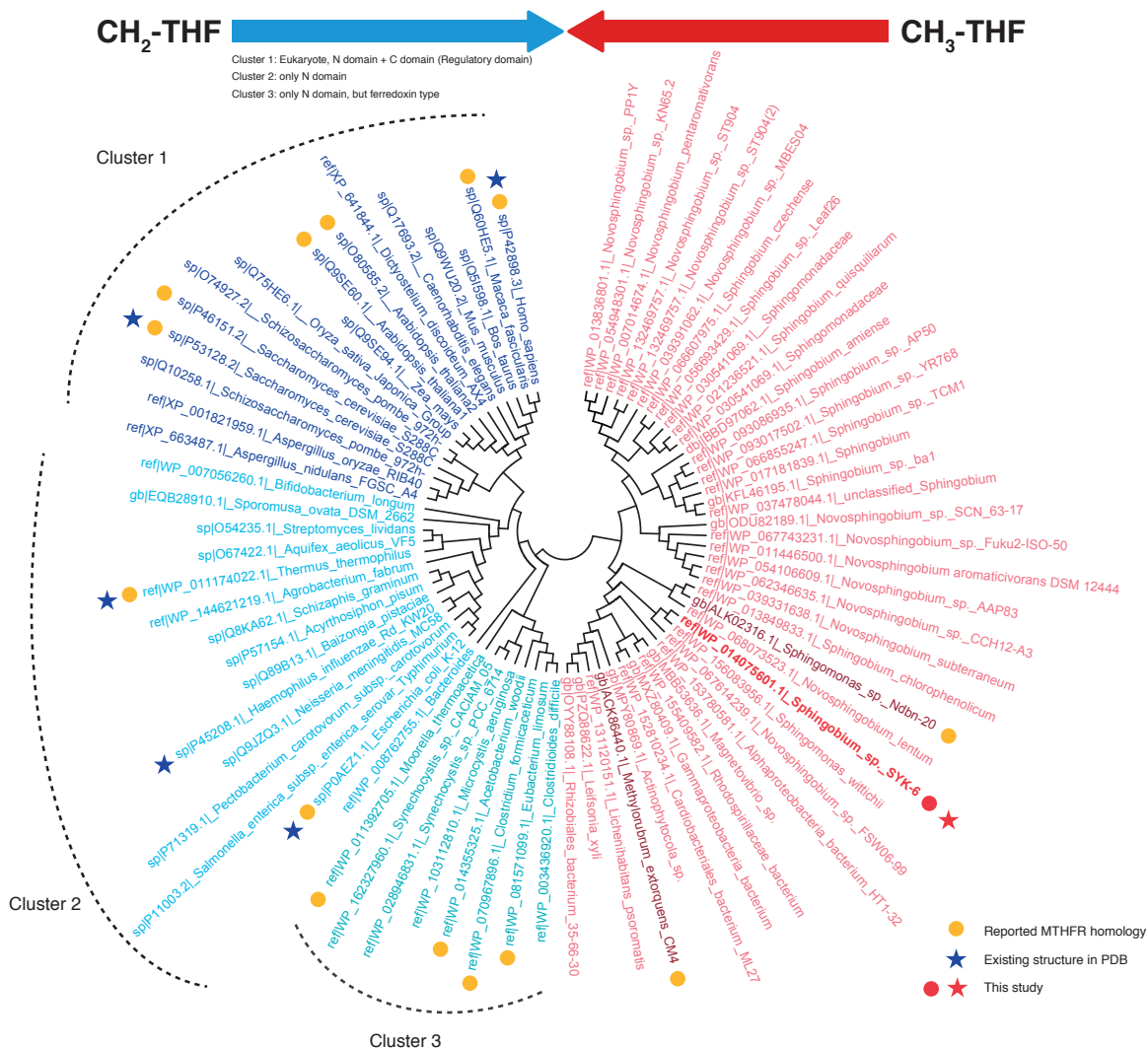


図 6-2. MTHFR family 系統樹

CH₂-THF から反応する type 1, 2, 3 MTHFR (40 個)と CH₃-THF から反応する type 4 MTHFR (40 個)、合計 80 個を用いて Maximum likelihood 法により、MEGA7 で作成した (Kumar S, *et al.*, 2016)。Cluster1 は C 末端ドメインを持つ真核生物由来 type 1 の MTHFR にあたり、Cluster2 は大腸菌を代表する C 末端なしの原核生物由来 type 2 MTHFR に当たる。Cluster3 は MetV とベテロ複合体を形成する type 3 の MTHFR に当たる。それ以外に赤色で表示したのは type 4 になる。

表 6-1

| Type 4 | Max Score | Max Score | Max Score | Max Score | Max Score | Accession |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------------|
| <u>Sphingobium sp. SYK-6</u> | 585 | 585 | 100% | 0 | 100.00% | WP_014075601.1 |
| Sphingobium sp. AP50 | 282 | 282 | 93% | 4.00E-96 | 51.12% | WP_093086935.1 |
| Sphingobium sp. YR768 | 287 | 287 | 93% | 4.00E-98 | 51.49% | WP_093017502.1 |
| Sphingobium czechense | 281 | 281 | 92% | 7.00E-96 | 51.32% | WP_066607975.1 |
| Sphingobium amiense | 288 | 288 | 94% | 2.00E-98 | 51.28% | BBD97062.1 |
| <u>Sphingobium sp. ba1</u> | 287 | 287 | 93% | 6.00E-98 | 52.04% | KFL46195.1 |
| Sphingobium chlorophenolicum L-1 | 313 | 313 | 94% | 2.00E-108 | 56.25% | WP_013849833.1 |
| <u>Sphingobium quisquiliarum</u> | 284 | 284 | 96% | 7.00E-97 | 50.36% | WP_021236521.1 |
| <u>Sphingobium sp. DC-2</u> | 284 | 284 | 96% | 5.00E-97 | 50.36% | WP_030541069.1 |
| Sphingobium xenophagum | 282 | 282 | 92% | 1.00E-95 | 51.32% | WP_017181839.1 |
| Sphingobium sp. TCM1 | 287 | 287 | 93% | 3.00E-98 | 51.30% | WP_066855247.1 |
| Sphingobium sp. Leaf26 | 282 | 282 | 96% | 4.00E-96 | 50.72% | WP_056693429.1 |
| Sphingobium sp. RAC03 | 287 | 287 | 93% | 3.00E-98 | 52.04% | WP_037478044.1 |
| Sphingomonas sp. Ndbn-20 | | | | | | ALK02316.1 |
| Sphingomonas wittichii | 338 | 338 | 98% | 9.00E-118 | 55.79% | WP_156083956.1 |
| Sphingomonas paucimobilis | 284 | 284 | 96% | 2.00E-96 | 50.36% | WP_030541069.1 |
| Novosphingobium aromaticivorans DSM 12444 | 279 | 279 | 94% | 7.00E-95 | 50.92% | WP_011446500.1 |
| Novosphingobium sp. PP1Y | 288 | 288 | 93% | 1.00E-98 | 52.79% | WP_013836801.1 |
| Novosphingobium sp. CCH12-A3 | 278 | 278 | 94% | 1.00E-94 | 50.55% | WP_062346635.1 |
| Novosphingobium subterraneum | 278 | 278 | 94% | 2.00E-94 | 50.55% | WP_039331638.1 |
| Novosphingobium sp. ST904 | 290 | 290 | 93% | 6.00E-99 | 53.16% | WP_132469757.1 |
| Novosphingobium sp. KN65.2 | 288 | 288 | 93% | 1.00E-98 | 52.79% | WP_054948301.1 |
| Novosphingobium lentum | 298 | 298 | 96% | 1.00E-102 | 56.23% | WP_068073523.1 |
| Novosphingobium sp. AAP83 | 278 | 278 | 94% | 1.00E-94 | 50.55% | WP_054106609.1 |
| Novosphingobium sp. Fuku2-ISO-50 | 277 | 277 | 93% | 4.00E-94 | 50.37% | WP_067743231.1 |
| Novosphingobium sp. FSW06-99 | 327 | 327 | 93% | 8.00E-114 | 59.78% | WP_067614239.1 |
| Novosphingobium sp. MBES04 | 286 | 286 | 92% | 2.00E-97 | 51.70% | WP_039391062.1 |
| Novosphingobium sp. ST904 | 290 | 290 | 93% | 6.00E-99 | 53.16% | WP_132469757.1 |
| Novosphingobium pentaromativorans | 277 | 277 | 93% | 1.00E-93 | 53.53% | WP_007014674.1 |
| Novosphingobium sp. SCN 63-17 | 264 | 264 | 92% | 5.00E-89 | 50.00% | ODU82189.1 |

| | | | | | | |
|--------------------------------------|--|--|--|--|--|----------------|
| Methylobacterium extorquens CM4 | | | | | | ACK86440.1 |
| Leifsonia xyli | | | | | | PZQ88622.1 |
| Lichenihabitans psoromatis | | | | | | WP_131120151.1 |
| Rhizobiales bacterium 35-66-30 | | | | | | OYY88108.1 |
| Magnetovibrio sp. | | | | | | MBB53636.1 |
| Alphaproteobacteria bacterium HT1-32 | | | | | | WP_153780581.1 |
| Rhodospirillaceae bacterium | | | | | | WP_155409582.1 |
| Gammaproteobacteria bacterium | | | | | | MXZ80409.1 |
| Actinophytocola sp. | | | | | | MPY80869.1 |
| Cardiobacteriales bacterium ML27 | | | | | | WP_152810234.1 |

表 6-2

| Type1,2 | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|-----------|------------|----------------|
| Escherichia coli K-12 | 617 | 617 | 100% | 0 | 100.00% | P0AEZ1.1 |
| Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium str. LT2 | 596 | 596 | 100% | 0 | 95.95% | P11003.2 |
| Agrobacterium fabrum | 238 | 238 | 91% | 3.00E-78 | 42.81% | WP_144621219.1 |
| Bacteroides | 114 | 114 | 85% | 3.00E-30 | 27.21% | WP_008762755.1 |
| Bifidobacterium longum | 141 | 141 | 85% | 2.00E-41 | 33.46% | WP_007056260.1 |
| Thermus thermophilus | 189 | 189 | 90% | 1.00E-59 | 37.18% | WP_011174022.1 |
| Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum | 541 | 541 | 99% | 0 | 85.71% | P71319.1 |
| Neisseria meningitidis MC58 | 460 | 460 | 97% | 3.00E-164 | 73.79% | Q9JZQ3.1 |
| Haemophilus influenzae Rd KW20 | 457 | 457 | 97% | 4.00E-163 | 73.10% | P45208.1 |
| Buchnera aphidicola str. APS (Acyrthosiphon pisum) | 381 | 381 | 98% | 5.00E-133 | 58.90% | P57154.1 |
| Buchnera aphidicola str. Sg (Schizaphis graminum) | 368 | 368 | 98% | 7.00E-128 | 59.59% | Q8KA62.1 |
| Buchnera aphidicola str. Bp (Baizongia pistaciae) | 362 | 362 | 97% | 3.00E-125 | 54.64% | Q89B13.1 |
| Aquifex aeolicus VF5 | 231 | 231 | 90% | 6.00E-74 | 44.20% | O67422.1 |
| Streptomyces lividans | 194 | 194 | 98% | 4.00E-59 | 36.75% | O54235.1 |
| Arabidopsis thaliana | 181 | 181 | 92% | 2.00E-51 | 35.52% | Q9SE60.1 |
| Arabidopsis thaliana | 174 | 174 | 94% | 7.00E-49 | 33.45% | O80585.2 |
| Oryza sativa | 172 | 172 | 93% | 4.00E-48 | 33.67% | Q75HE6.1 |
| Zea mays | 171 | 171 | 91% | 6.00E-48 | 33.22% | Q9SE94.1 |
| Saccharomyces cerevisiae S288C | 156 | 156 | 93% | 2.00E-42 | 32.30% | P53128.2 |
| Schizosaccharomyces pombe 972h- | 152 | 152 | 91% | 1.00E-40 | 32.26% | Q10258.1 |
| Caenorhabditis elegans | 144 | 144 | 90% | 7.00E-38 | 32.97% | Q17693.2 |
| Saccharomyces cerevisiae S288C | 140 | 140 | 91% | 3.00E-36 | 32.09% | P46151.2 |
| Schizosaccharomyces pombe 972h- | 108 | 108 | 87% | 3.00E-25 | 33.45% | O74927.2 |
| Dictyostelium discoideum AX4 | 173 | 173 | 85% | 2.00E-48 | 36.15% | XP_641844.1 |
| Aspergillus nidulans FGSC A4 | 172 | 172 | 93% | 2.00E-49 | 33.57% | XP_663487.1 |
| Aspergillus oryzae | 170 | 170 | 98% | 2.00E-48 | 32.67% | XP_001821959.1 |
| Macaca fascicularis | 152 | 152 | 97% | 1.00E-40 | 33.33% | Q60HE5.1 |
| Homo sapiens | 153 | 153 | 97% | 4.00E-41 | 33.33% | P42898.3 |
| Mus musculus | 153 | 153 | 90% | 6.00E-41 | 34.17% | Q9WU20.2 |
| Bos taurus | 152 | 152 | 90% | 8.00E-41 | 33.69% | Q5I598.1 |

表 6-3

| Type 3 | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|-----------------------------|-----------|-------------|-------------|----------|------------|----------------|
| Moorella thermoacetica | 630 | 630 | 100% | 0 | 100.00% | WP_011392705.1 |
| Sporomusa ovata DSM 2662 | 50.1 | 50.1 | 64% | 6.00E-08 | 26.73% | EQB28910.1 |
| Synechocystis sp. PCC 6714 | 218 | 218 | 98% | 1.00E-68 | 40.20% | WP_028946831.1 |
| Clostridium formicaceticum | | | | | | WP_070967896.1 |
| Acetobacterium woodii | 264 | 264 | 97% | 7.00E-89 | 49.13% | WP_014355325.1 |
| Clostridioides difficile | 277 | 277 | 97% | 1.00E-91 | 49.15% | WP_003436920.1 |
| Microcystis aeruginosa | 219 | 219 | 98% | 7.00E-69 | 40.74% | WP_103112810.1 |
| Synechocystis sp. CACIAM 05 | 210 | 210 | 98% | 1.00E-65 | 40.07% | WP_162327960.1 |
| Eubacterium limosum | 256 | 256 | 97% | 5.00E-85 | 45.05% | WP_081571099.1 |

7.まとめ

生物は様々な生育環境に応じて進化してきた。アミノ酸と核酸を合成するために、ほとんどの生物はグルコースを炭素源として利用し、SHMT/GCV を用いて Ser/Gly から CH₂-THF を生成した後、MTHFR が CH₂-THF を CH₃-THF に変換することで 1C 代謝を行う。しかし、SYK-6 を代表する一部のバクテリアはグルコースを利用できない代わりに、THF 依存脱メチル化反応を利用し 1C 代謝を行う。このようなバクテリアの 1C 代謝は一般的な 1C 代謝と違い、最初の 1C-THF は CH₂-THF でなく、THF 依存脱メチル酵素によって生成された CH₃-THF である。そのため、生物は 1C 代謝を行うために下流にある MTHFR を進化させ、CH₃-THF を CH₂-THF に酸化するようになったと考えられる。通常の生物では、先に生成された CH₂-THF を還元するために NAD(P)H を利用する。*In vitro* では MTHFR による CH₃-THF の酸化という上記の反応の逆反応も起こるが、NAD(P)H による MTHFR の還元反応の k_{cat}/K_m は CH₃-THF による MTHFR の還元反応の約 45 倍であるため、通常 MTHFR は NAD(P)H により還元される。しかし、CH₃-THF が生成される 1C 代謝を有する生物の MTHFR は逆方向から反応できている。そこで、我々は THF 依存脱メチル化酵素を利用するバクテリアの代謝系の進化を理解する一貫として、生化学解析、結晶構造解析と配列解析を用いて S6MTHFR の酵素学的な性質を原子のレベルで明らかにした。

酵素活性測定の結果から、S6MTHFR は NADH と反応できるものの、CH₃-THF (50 unit/mg) と 100 倍以上に反応しやすいことがわかった。S6MTHFR と CH₃-THF complex 結晶構造を決定した後、構造情報に基づいた変異体解析から、Leu48Pro49 は NADH の活性部位へのアクセスをブロックしていることがわかった。その上、Leu48, Phe215, Cys219, Phe269 の 4 残基が CH₃-THF の結合に重要であるがわかった。これまでに NAD⁺

が電子受容体として働くと思われてきたが、我々のデータから NAD^+ は電子受容体として適切ではないと示唆された。その上、ほうれん草由来 ferredoxin (Fd) と反応できたことから、SYK-6 由来 Fd が電子受容体として働く可能性が示唆された。

これまでの研究から、 $\text{CH}_3\text{-THF}$ から反応する MTHFR は THF 依存脱メチル化酵素に依存すると考えられる。そのため、ゲノム上 THF 依存脱メチル化酵素に隣接する MTHFR を集め、EcMTHFR などホモログと共に配列解析を行なった。その結果、THF 依存脱メチル化酵素に隣接する MTHFR は全て上記重要残基を含む 3 つの motif: TFL₄₈P₄₉, C₂₁₉GxGxS と PF₂₆₉GG を有することがわかった (Phe₂₁₅ は 80% 以上保存)。これらの特徴は通常の MTHFR には見られないものであり、 $\text{CH}_3\text{-THF}$ から反応する MTHFR の特徴であると考えられた。さらに、系統樹解析の結果では S6MTHFR およびその類縁酵素は、 NAD(P)H を利用して $\text{CH}_2\text{-THF}$ を $\text{CH}_3\text{-THF}$ に還元する通常の MTHFR とは異なるクラスターに分類された。興味深いことに、S6MTHFR 型と通常の型の MTHFR の 2 つを有するバクテリアも存在していた。通常の生物の 1C 代謝ではグルコースなど炭素源が豊かになるに伴い、解糖系に由来するグリシンからグリシン開裂系を利用して炭素を利用するように MTHFR が進化した。一部のバクテリアでは炭素源が限られているため、バニリン酸などのメチル基含有化合物を利用して生存できるように、グリシン開裂系のほかに THF 依存脱メチル化の代謝経路も持つようになったと考えられた。その後、SYK-6 のようにグリシン開裂系遺伝子を欠失して完全に脱メチル化代謝経路に依存するようになり、S6MTHFR 型の MTHFR が $\text{CH}_3\text{-THF}$ を $\text{CH}_2\text{-THF}$ に変換することで 1C 代謝に利用するような仕組みに進化したと考えられる。

参考文献:

Mallinson, S.J.B., Machovina, M.M., Silveira, R.L. *et al.* A promiscuous cytochrome P450 aromatic *O*-demethylase for lignin bioconversion. *Nat Commun* 9, 2487 (2018). [https://doi.org/10.1038/s41467-018-04878-](https://doi.org/10.1038/s41467-018-04878-2)

2

Dumitru R, Jiang WZ, Weeks DP, Wilson MA. Crystal structure of dicamba monooxygenase: a Rieske nonheme oxygenase that catalyzes oxidative demethylation. *J Mol Biol.* 2009 Sep 18;392(2):498-510. doi: 10.1016/j.jmb.2009.07.021. Epub 2009 Jul 15. PMID: 19616011; PMCID: PMC3109874.

Yao L, Yu LL, Zhang JJ, Xie XT, Tao Q, Yan X, Hong Q, Qiu JG, He J, Ding DR. A Tetrahydrofolate-Dependent Methyltransferase Catalyzing the Demethylation of Dicamba in *Sphingomonas* sp. Strain Ndbn-20. *Appl Environ Microbiol.* 2016 Aug 30;82(18):5621-30. doi: 10.1128/AEM.01201-16. PMID: 27422839; PMCID: PMC5007784.

Kamerbeek NM, van Zwieten R, de Boer M, Morren G, Vuil H, Bannink N, Lincke C, Dolman KM, Becker K, Schirmer RH, Gromer S, Roos D. Molecular basis of glutathione reductase deficiency in human blood cells. *Blood.* 2007 Apr 15;109(8):3560-6. doi: 10.1182/blood-2006-08-042531. Epub 2006 Dec 21. PMID: 17185460.

Iverson TM, Luna-Chavez C, Cecchini G, Rees DC. Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex. *Science.* 1999 Jun 18;284(5422):1961-6. doi: 10.1126/science.284.5422.1961. PMID: 10373108.

Imai T. FAD-dependent malate dehydrogenase, a phospholipid-requiring enzyme from *Mycobacterium* sp. strain Takeo. Purification and some properties. *Biochim Biophys Acta.* 1978 Mar 14;523(1):37-46. doi: 10.1016/0005-2744(78)90006-2. PMID: 629992.

Watmough NJ, Frerman FE. The electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Dec;1797(12):1910-6. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.10.007. Epub 2010 Oct 16. PMID: 20937244.

Thauer RK, Jungermann K, Decker K. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev*. 1977 Mar;41(1):100-80. PMID: 860983; PMCID: PMC413997.

Weiss, M., Sousa, F., Mrnjavac, N. *et al*. The physiology and habitat of the last universal common ancestor. *Nat Microbiol* 1, 16116 (2016). <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.116>

Kremp F, Poehlein A, Daniel R, Müller V. Methanol metabolism in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *Environ Microbiol*. 2018 Dec;20(12):4369-4384. doi: 10.1111/1462-2920.14356. Epub 2018 Oct 24. PMID: 30003650.

Zheng Y, Ramsamooj S, Li Q, Johnson JL, Yaron TM, Sharra K, Cantley LC. Regulation of folate and methionine metabolism by multisite phosphorylation of human methylenetetrahydrofolate reductase. *Sci Rep*. 2019 Mar 12;9(1):4190. doi: 10.1038/s41598-019-40950-7. PMID: 30862944; PMCID: PMC6414673.

Sainathan, S., Paul, S., Ramalingam, S. *et al*. Histone Demethylases in Cancer. *Curr Pharmacol Rep* 1, 234–244 (2015). <https://doi.org/10.1007/s40495-015-0025-y>

Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstone JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*. 2004 Dec 29;119(7):941-53. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.012. PMID: 15620353.

Barry SM, Challis GL. Mechanism and Catalytic Diversity of Rieske Non-Heme Iron-Dependent Oxygenases. *ACS Catal*. 2013 Oct 4;3(10):10.1021/cs400087p. doi: 10.1021/cs400087p. PMID: 24244885; PMCID: PMC3827946.

Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, Zhang Y. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*. 2006 Feb 16;439(7078):811-6. doi: 10.1038/nature04433. Epub 2005 Dec 18. PMID: 16362057.

Dumitru R, Jiang WZ, Weeks DP, Wilson MA. Crystal structure of dicamba monooxygenase: a Rieske nonheme oxygenase that catalyzes oxidative demethylation. *J Mol Biol*. 2009 Sep 18;392(2):498-510. doi: 10.1016/j.jmb.2009.07.021. Epub 2009 Jul 15. PMID: 19616011; PMCID: PMC3109874.

Wang F, Zhou J, Li Z, Dong W, Hou Y, Huang Y, Cui Z. Involvement of the cytochrome P450 system EthBAD in the N-deethoxymethylation of acetochlor by *Rhodococcus* sp. strain T3-1. *Appl Environ Microbiol*. 2015 Mar;81(6):2182-8. doi: 10.1128/AEM.03764-14. Epub 2015 Jan 16. PMID: 25595756; PMCID: PMC4345396.

Yao S, Chen L, Yang Z, Yao L, Zhu J, Qiu J, Wang G, He J. The Properties of 5-Methyltetrahydrofolate Dehydrogenase (MetF1) and Its Role in the Tetrahydrofolate-Dependent Dicamba Demethylation System in *Rhizorhabdus dicambivorans* Ndbn-20. *J Bacteriol*. 2019 Aug 8;201(17):e00096-19. doi: 10.1128/JB.00096-19. PMID: 31209079; PMCID: PMC6689297.

Abe T, Masai E, Miyauchi K, Katayama Y, Fukuda M. A tetrahydrofolate-dependent O-demethylase, LigM, is crucial for catabolism of vanillate and syringate in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *J Bacteriol*. 2005 Mar;187(6):2030-7. doi: 10.1128/JB.187.6.2030-2037.2005. PMID: 15743951; PMCID: PM1C064056.

Yao L, Yu LL, Zhang JJ, Xie XT, Tao Q, Yan X, Hong Q, Qiu JG, He J, Ding DR. A Tetrahydrofolate-Dependent Methyltransferase Catalyzing the Demethylation of Dicamba in *Sphingomonas* sp. Strain Ndbn-20. *Appl Environ Microbiol*. 2016 Aug 30;82(18):5621-30. doi: 10.1128/AEM.01201-16. PMID: 27422839; PMCID: PMC5007784.

Studer A, Vuilleumier S, Leisinger T. Properties of the methylcobalamin:H₄folate methyltransferase involved in chloromethane utilization by *Methylobacterium* sp. strain CM4. *Eur J Biochem*. 1999 Aug;264(1):242-9. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00629.x. PMID: 10447694.

Studer A, McAnulla C, Büchele R, Leisinger T, Vuilleumier S. Chloromethane-induced genes define a third 1C utilization pathway in *Methylobacterium chloromethanicum* CM4. *J Bacteriol*. 2002 Jul;184(13):3476-84. doi: 10.1128/jb.184.13.3476-3484.2002. PMID: 12057941; PMCID: PMC135114.

Nadalig T, Farhan Ul Haque M, Roselli S, Schaller H, Bringel F, Vuilleumier S. Detection and isolation of chloromethane-degrading bacteria from the *Arabidopsis thaliana* phyllosphere, and characterization of chloromethane utilization genes. *FEMS Microbiol Ecol*. 2011 Aug;77(2):438-48. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01125.x. Epub 2011 Jun 8. PMID: 21545604.

Lee MN, Takawira D, Nikolova AP, Ballou DP, Furtado VC, Phung NL, Still BR, Thorstad MK, Tanner JJ, Trimmer EE. Functional role for the conformationally mobile phenylalanine 223 in the reaction of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 2009 Aug 18;48(32):7673-85. doi: 10.1021/bi9007325. PMID: 19610625; PMCID: PMC2805098.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*. 2016 Jul;33(7):1870-4. doi: 10.1093/molbev/msw054. Epub 2016 Mar 22. PMID: 27004904.

Clark JE, Ljungdahl LG. Purification and properties of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, an iron-sulfur flavoprotein from *Clostridium formicoaceticum*. *J Biol Chem*. 1984 Sep 10;259(17):10845-9. PMID: 6381490.

Mock J, Wang S, Huang H, Kahnt J, Thauer RK. Evidence for a hexaheteromeric methylenetetrahydrofolate reductase in *Moorella thermoacetica*. *J Bacteriol*. 2014 Sep;196(18):3303-14. doi: 10.1128/JB.01839-14. Epub 2014 Jul 7. PMID: 25002540; PMCID: PMC4135698.

Bertsch J, Öppinger C, Hess V, Langer JD, Müller V. Heterotrimeric NADH-oxidizing methylenetetrahydrofolate reductase from the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *J Bacteriol*. 2015 May;197(9):1681-9. doi: 10.1128/JB.00048-15. Epub 2015 Mar 2. PMID: 25733614; PMCID: PMC4403655.

Whitfield CD, Steers EJ Jr, Weissbach H. Purification and properties of 5-methyltetrahydropteroyltrimethylglutamate-homocysteine transmethylese. *J Biol Chem*. 1970 Jan 25;245(2):390-401. PMID: 4904482.

Yoshikata T, Suzuki K, Kamimura N, Namiki M, Hishiyama S, Araki T, Kasai D, Otsuka Y, Nakamura M, Fukuda M, Katayama Y, Masai E. Three-Component O-Demethylase System Essential for Catabolism of a Lignin-Derived Biphenyl Compound in *Sphingobium* sp. Strain SYK-6. *Appl Environ Microbiol*. 2014 Dec;80(23):7142-53. doi: 10.1128/AEM.02236-14. Epub 2014 Sep 12. PMID: 25217011; PMCID: PMC4249175.

Chen K, Jung YS, Bonagura CA, Tilley GJ, Prasad GS, Sridhar V, Armstrong FA, Stout CD, Burgess BK. *Azotobacter vinelandii* ferredoxin I: a sequence and structure comparison approach to alteration of [4Fe-4S]₂^{+/+} reduction potential. *J Biol Chem*. 2002 Feb 15;277(7):5603-10. doi: 10.1074/jbc.M108916200. Epub 2001 Nov 9. PMID: 11704670.

Lu Y. Assembly and Transfer of Iron-Sulfur Clusters in the Plastid. *Front Plant Sci*. 2018 Mar 14;9:336. doi: 10.3389/fpls.2018.00336. PMID: 29662496; PMCID: PMC5890173.

Isas JM, Yannone SM, Burgess BK. Azotobacter vinelandii NADPH:ferredoxin reductase cloning, sequencing, and overexpression. J Biol Chem. 1995 Sep 8;270(36):21258-63. doi: 10.1074/jbc.270.36.21258. PMID: 7673160.

Jaganaman S, Pinto A, Tarasev M, Ballou DP. High levels of expression of the iron-sulfur proteins phthalate dioxygenase and phthalate dioxygenase reductase in Escherichia coli. Protein Expr Purif. 2007 Apr;52(2):273-9. doi: 10.1016/j.pep.2006.09.004. Epub 2006 Sep 15. PMID: 17049880; PMCID: PMC2080846.

Jouanneau Y, Duport C, Meyer C, Gaillard J. Expression in Escherichia coli and characterization of a recombinant 7Fe ferredoxin of Rhodobacter capsulatus. Biochem J. 1992 Aug 15;286 (Pt 1)(Pt 1):269-73. doi: 10.1042/bj2860269. PMID: 1325780; PMCID: PM1C133050.

Darimont B, Sterner R. Sequence, assembly and evolution of a primordial ferredoxin from Thermotoga maritima. EMBO J. 1994 Apr 15;13(8):1772-81. PMID: 8168477; PMCID: PMC395016.

Daubner SC, Matthews RG. Purification and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from pig liver. J Biol Chem. 1982 Jan 10;257(1):140-5. PMID: 6975779.

Boutron, P. 1988. Non-Equilibrium Formation of Ice in Aqueous Solutions: Efficiency of Polyalcohol Solutions for Vitrification. In The Biophysics of Organ Cryopreservation, D.E. Pegg, and A.M. Karow, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 201–236.

Evans, P.R., and Murshudov, G.N. 2013. How good are my data and what is the resolution? Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 69, 1204–1214.

Kabsch, W. 2010. XDS. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 66, 125–132.

Sheldrick GM. Experimental phasing with SHELXC/D/E: combining chain tracing with density modification. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010 Apr;66(Pt 4):479-85. doi: 10.1107/S0907444909038360. Epub 2010 Mar 24. PMID: 20383001; PMCID: PMC2852312.

Ness SR, de Graaff RA, Abrahams JP, Pannu NS. CRANK: new methods for automated macromolecular crystal structure solution. *Structure*. 2004 Oct;12(10):1753-61. doi: 10.1016/j.str.2004.07.018. PMID: 15458625.

Afonine PV, Grosse-Kunstleve RW, Echols N, Headd JJ, Moriarty NW, Mustyakimov M, Terwilliger TC, Urzhumtsev A, Zwart PH, Adams PD. Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2012 Apr;68(Pt 4):352-67. doi: 10.1107/S0907444912001308. Epub 2012 Mar 16. PMID: 22505256; PMCID: PMC3322595.

Lovell SC, Davis IW, Arendall WB 3rd, de Bakker PI, Word JM, Prisant MG, Richardson JS, Richardson DC. Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins*. 2003 Feb 15;50(3):437-50. doi: 10.1002/prot.10286. PMID: 12557186.

Sheppard CA, Trimmer EE, Matthews RG. Purification and properties of NADH-dependent 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MetF) from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1999 Feb;181(3):718-25. doi: 10.1128/JB.181.3.718-725.1999. PMID: 9922232; PMCID: PMC93435.

Fox JL. Sodium dithionite reduction of flavin. *FEBS Lett*. 1974 Feb 1;39(1):53-5. doi: 10.1016/0014-5793(74)80015-3. PMID: 4854313.

Vanoni MA, Ballou DP, Matthews RG. Methylenetetrahydrofolate reductase. Steady state and rapid reaction studies on the NADPH-methylenetetrahydrofolate, NADPH-menadione, and methyltetrahydrofolate-menadione oxidoreductase activities of the enzyme. *J Biol Chem*. 1983 Oct 10;258(19):11510-4. PMID: 6352699.

Igari S, Ohtaki A, Yamanaka Y, Sato Y, Yohda M, Odaka M, Noguchi K, Yamada K. Properties and crystal structure of methylenetetrahydrofolate reductase from *Thermus thermophilus* HB8. *PLoS One*. 2011;6(8):e23716. doi: 10.1371/journal.pone.0023716. Epub 2011 Aug 15. PMID: 21858212; PMCID: PMC3156243.

Halsted CH, Ling EH, Luthi-Carter R, Villanueva JA, Gardner JM, Coyle JT. Folylpoly-gamma-glutamate carboxypeptidase from pig jejunum. Molecular characterization and relation to glutamate carboxypeptidase II. *J Biol Chem*. 1998 Aug 7;273(32):20417-24. doi: 10.1074/jbc.273.32.20417. Erratum in: *J Biol Chem* 2000 Sep 29;275(39):30746. PMID: 9685395.

Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, Sandoval C, Zhao R, Akabas MH, Goldman ID. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell*. 2006 Dec 1;127(5):917-28. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.041. PMID: 17129779.

Klon AE, Héroux A, Ross LJ, Pathak V, Johnson CA, Piper JR, Borhani DW. Atomic structures of human dihydrofolate reductase complexed with NADPH and two lipophilic antifolates at 1.09 Å and 1.05 Å resolution. *J Mol Biol*. 2002 Jul 12;320(3):677-93. doi: 10.1016/s0022-2836(02)00469-2. PMID: 12096917.

Mullarky E, Lairson LL, Cantley LC, Lyssiotis CA. A novel small-molecule inhibitor of 3-phosphoglycerate dehydrogenase. *Mol Cell Oncol*. 2016 Mar 30;3(4):e1164280. doi: 10.1080/23723556.2016.1164280. PMID: 27652319; PMCID: PMC4972100.

Kikuchi G, Motokawa Y, Yoshida T, Hiraga K. 2008. Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.* 84, 246–263.

Shin, M., Momb, J. & Appling, D.R. Human mitochondrial MTHFD2 is a dual redox cofactor-specific methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase. *Cancer Metab* 5, 11 (2017). <https://doi.org/10.1186/s40170-017-0173-0>

Tezuka T, Ohnishi Y. Two glycine riboswitches activate the glycine cleavage system essential for glycine detoxification in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol.* 2014 Apr;196(7):1369-76. doi: 10.1128/JB.01480-13. Epub 2014 Jan 17. PMID: 24443533; PMCID: PMC3993345.

Denis, V., Daignan-Fornier, B. Synthesis of glutamine, glycine and 10-formyl tetrahydrofolate is coregulated with purine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 259, 246–255 (1998). <https://doi.org/10.1007/s004380050810>

Vitvitsky V, Thomas M, Ghorpade A, Gendelman HE, Banerjee R. A functional transsulfuration pathway in the brain links to glutathione homeostasis. *J Biol Chem.* 2006 Nov 24;281(47):35785-93. doi: 10.1074/jbc.M602799200. Epub 2006 Sep 27. PMID: 17005561.

Hiraoka M, Kagawa Y. Genetic polymorphisms and folate status. *Congenit Anom (Kyoto).* 2017 Sep;57(5):142-149. doi: 10.1111/cga.12232. Epub 2017 Jul 20. PMID: 28598562; PMCID: PMC5601299.

Kenneth O. Donaldson and John C. Keresztesy. 1962. Naturally occurring forms of folic acid. *Biological Chemistry* 237, No 4.

Bertsch J, Öppinger C, Hess V, Langer JD, Müller V. Heterotrimeric NADH-oxidizing methylenetetrahydrofolate reductase from the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *J Bacteriol.* 2015 May;197(9):1681-9. doi: 10.1128/JB.00048-15. Epub 2015 Mar 2. PMID: 25733614; PMCID: PMC4403655.

Kasap M, Sazci A, Ergul E, Akpinar G. Molecular phylogenetic analysis of methylenetetrahydrofolate reductase family of proteins. *Mol Phylogenet Evol.* 2007 Mar;42(3):838-46. doi: 10.1016/j.ympev.2006.09.020. Epub 2006 Oct 7. PMID: 17098450.

Froese DS, Kopec J, Rembeza E, Bezerra GA, Oberholzer AE, Suormala T, Lutz S, Chalk R, Borkowska O, Baumgartner MR, Yue WW. Structural basis for the regulation of human 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase by phosphorylation and S-adenosylmethionine inhibition. *Nat Commun*. 2018 Jun 11;9(1):2261. doi: 10.1038/s41467-018-04735-2. PMID: 29891918; PMCID: PMC5995969.

Yamada K, Strahler JR, Andrews PC, Matthews RG. Regulation of human methylenetetrahydrofolate reductase by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jul 26;102(30):10454-9. doi: 10.1073/pnas.0504786102. Epub 2005 Jul 15. PMID: 16024724; PMCID: PMC180802.

Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA. Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene*. 2014 Jan 1;533(1):11-20. doi: 10.1016/j.gene.2013.09.063. Epub 2013 Oct 1. PMID: 24091066.

Matthews RG. Methylenetetrahydrofolate reductase from pig liver. *Methods Enzymol*. 1986;122:372-81. doi: 10.1016/0076-6879(86)22196-5. PMID: 3702701.

Trimmer EE, Ballou DP, Ludwig ML, Matthews RG. Folate activation and catalysis in methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli*: roles for aspartate 120 and glutamate 28. *Biochemistry*. 2001 May 29;40(21):6216-26. doi: 10.1021/bi002790v. PMID: 11371182.

Pejchal R, Sargeant R, Ludwig ML. Structures of NADH and CH₃-H₄folate complexes of *Escherichia coli* methylenetetrahydrofolate reductase reveal a spartan strategy for a ping-pong reaction. *Biochemistry*. 2005 Aug 30;44(34):11447-57. doi: 10.1021/bi050533q. PMID: 16114881.

Trimmer EE, Ballou DP, Matthews RG. Methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli*: elucidation of the kinetic mechanism by steady-state and rapid-reaction studies. *Biochemistry*. 2001 May 29;40(21):6205-15. doi: 10.1021/bi002789w. PMID: 11371181.

Schlesinger, W.H. (1977) Carbon balance in terrestrial detritus. *Annu Rev Ecol Syst* 8: 51–81.

Asgher M., H. N. Bhatti, M. Ashraf, and R. L. Legge. 2008. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation* 19:771-783.

Higuchi T. Formation and biological degradation of lignins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1971;34:207-83. doi: 10.1002/9780470122792.ch5. PMID: 4947343.

Katayama Y, Nishikawa S, Murayama A, Yamasaki M, Morohoshi N, Haraguchi T. The metabolism of biphenyl structures in lignin by the soil bacterium (*Pseudomonas paucimobilis* SYK-6). *FEBS Lett.* 1988 Jun ;233(1):129-133.

Masai E, Katayama Y, Nishikawa S, Yamasaki M, Morohoshi N, Haraguchi T. Detection and localization of a new enzyme catalyzing the beta-aryl ether cleavage in the soil bacterium (*Pseudomonas paucimobilis* SYK-6). *FEBS Lett.* 1989 Jun 5;249(2):348-52.

Masai E, Katayama Y, Kawai S, Nishikawa S, Yamasaki M, Morohoshi N. Cloning and sequencing of the gene for a *Pseudomonas paucimobilis* enzyme that cleaves beta-aryl ether. *J Bacteriol.* 1991 Dec;173(24):7950-5

Masai E, Katayama Y, Fukuda M. Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007 Jan;71(1):1-15. doi: 10.1271/bbb.60437. Epub 2007 Jan 7. PMID: 17213657.

Kamimura N, Takahashi K, Mori K, Araki T, Fujita M, Higuchi Y, Masai E. Bacterial catabolism of lignin-derived aromatics: New findings in a recent decade: Update on bacterial lignin catabolism. *Environ Microbiol Rep.* 2017 Dec;9(6):679-705. doi: 10.1111/1758-2229.12597. PMID: 29052962.

Sonoki, T., Otsuka, Y., Ikeda, S. et al. Tetrahydrofolate-dependent vanillate and syringate O-demethylation links tightly to one-carbon metabolic pathway associated with amino acid synthesis and DNA methylation in the lignin metabolism of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *J Wood Sci* 48, 434–439 (2002). <https://doi.org/10.1007/BF00770706>

Harada A, Kamimura N, Takeuchi K, Yu HY, Masai E, Senda T. The crystal structure of a new O-demethylase from *Sphingobium* sp. strain SYK-6. *FEBS J.* 2017 Jun;284(12):1855-1867. doi: 10.1111/febs.14085. Epub 2017 May 11. PMID: 28429420.

Wohlfarth, G., Diekert, G. Thermodynamics of methylenetetrahydrofolate reduction to methyltetrahydrofolate and its implications for the energy metabolism of homoacetogenic bacteria. *Arch. Microbiol.* 155, 378–381 (1991). <https://doi.org/10.1007/BF00243458>

Canelas AB, van Gulik WM, Heijnen JJ. Determination of the cytosolic free NAD/NADH ratio in *Saccharomyces cerevisiae* under steady-state and highly dynamic conditions. *Biotechnol Bioeng.* 2008 Jul 1;100(4):734-43. doi: 10.1002/bit.21813. PMID: 18383140.

Varman AM, He L, Follenfant R, Wu W, Wemmer S, Wrobel SA, Tang YJ, Singh S. Decoding how a soil bacterium extracts building blocks and metabolic energy from ligninolysis provides road map for lignin valorization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Oct 4;113(40):E5802-E5811. doi: 10.1073/pnas.1606043113. Epub 2016 Sep 15. PMID: 27634497; PMCID: PMC5056086.

Zuo C, Jolly AL, Nikolova AP, Satzer DI, Cao S, Sanchez JS, Ballou DP, Trimmer EE. A role for glutamine 183 in the folate oxidative half-reaction of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys.* 2018 Mar 15;642:63-74. doi: 10.1016/j.abb.2018.01.014. Epub 2018 Feb 3. PMID: 29407039.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導、御教示を賜りました高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 構造生物学研究センター センター長 兼 総合研究大学院大学 高エネルギー加速器科学研究科 物質構造科学専攻 千田俊哉教授に御礼申し上げます。

高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所の足立伸一教授、構造生物学研究センター 清水伸隆教授、加藤龍一准教授、川崎政人准教授、長岡技術科学大学の政井英司教授には、本学位論文の審査を引き受けていただいたことに深く感謝を申し上げます。

最後に、研究遂行にあたり、適切な御助言を与えて頂きました桑原直之研究員ならびに同研究センターの皆様、共同先である長岡技術科学大学 政井研究室の皆様に深く御礼申し上げます。

実績関連

論文:

1.

Harada A, Kamimura N, Takeuchi K, Yu H, Masai E and Senda T, The crystal structure of a new O-demethylase from *Sphingobium* sp. SYK-6, The FEBS Journal, doi: 10.1111/febs.14085, 2017.

2.

Naffouje R, Grover P, Yu H, Sendilnathan A, Wolfe K, Majd N, Smith E.P, Takeuchi K, Senda T, Kofuji S, Sasaki AT, Anti-Tumor Potential of IMP Dehydrogenase Inhibitors: A Century-Long Story. *Cancers* 2019, *11*, 1346.

3.

Fujita M, Sakumoto T, Tanatani K, Yu H, Mori K, Kamimura N, Masai E, Iron acquisition system of *Sphingobium* sp. strain SYK-6, a degrader of lignin-derived aromatic compounds. *Sci Rep* 10, 12177 (2020).

受賞 :

American Crystallographic Association (ACA)

2020 Herman R. Branson Pauling Poster Prize Winner:

PS1-8 HongYang Yu, Structural Biology Research Center, Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization (KEK), The graduate University for Advanced Studies, “Structural insights into enzymatic mechanism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) from *Sphingobium* sp. SYK-6”

実験手法

・ S6MTHFR の発現用ベクター作製

➤ 必要器具、試薬

- ・ MyiQ Single-Color Real Time PCR Detection System (BIO-RAD)
- ・ マイクロチューブ、PCR チューブ
- ・ アガロースゲル電気泳動装置
- ・ 遠心機 (Hitachi)
- ・ 振盪培養機
- ・ QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN)
- ・ QIAquick[®] PCR Purification kit (QIAGEN)
- ・ QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN)
- ・ TOYOBO[®] KOD Plus PCR set (TOYOBO)
- ・ *E. coli* DH5 α (Competent cells)
- ・ 100 mg/ml Ampicillin (Nacalai)
- ・ LB 培地 (BD)
- ・ 100 g/ml Amp, LB 寒天培地 (Nacalai)
- ・ Takara[®] BamHI, SalI, 10*T buffer (Takara bio)
- ・ Takara[®] 10*loading buffer (Takara bio)
- ・ Nacalai[®] 1Kb Ladder (Nacalai)
- ・ pGX6p1, pET44HP ベクター
- ・ *s6mthfr* gene (Obtained from The Masai Lab)

➤ 実験方法

1. PCR による目的遺伝子 *S6MTHFR* の増幅

図 2.1 のように、*S6MTHFR* 全長の PCR 用 primer SYK-metF-5, SYKmetF-3 を設計し（表 1）、ユーロフィンジェノミクス株式会社に依頼し合成した。



図 2.1 *S6MTHFR* の primer 設計イメージ

↓ PCR チューブに以下の成分が含まれる反応液を作製した。

| Solution | Volume |
|-----------------------------|--------------|
| milliQ | 35.2 μ l |
| 10* PCR buffer for KOD plus | 5 μ l |
| 2mM dNTPs | 5 μ l |
| 25mM MgSO ₄ | 2 μ l |
| 50 uM Primer Fw | 0.4 μ l |
| 50 uM Primer Rv | 0.4 μ l |

| | |
|------------------------|-------------------|
| Template DNA (S6MTHFR) | 1 μ l (100ng) |
| KOD pkus | 1 μ l |
| | Total 50 μ l |

↓MyiQ Single-Color Real Time PCR Detection System (BIO-RAD) ON

↓PCR 条件は以下のように設定した

| | |
|--------------------------|-------------|
| 94°C 15sec (denature) | } 25 cycles |
| 55°C 30sec (annealing) | |
| 68°C 1min/kb (extention) | |
| 4°C store | |

↓PCR チューブを取り出し、反応液 に 10x Loading buffer 5 μ l を加えた

↓あらかじめ用意した 0.8% (w/v) Agarose Gel に全量を入れた

↓5 μ l 1kb Ladder を Agarose Gel に加えた

↓100V, 30 min

↓電気泳動終了後、Agarose Gel を取り出し、10,000 倍希釈した GelRed 溶液に入れた

↓10 min 間放置した

↓UV で確認した

↓LED ランプで照らしながら PCR 産物を切り出して、1.5 ml チューブに移した

↓重さを測っておおよその量を見積もった

2. QIAquick® Gel Extraction Kit を用いたゲルからの DNA 抽出

↓回収した DNA が含まれるゲルの 3 倍量の Buffer QG を加えた

↓混和転倒で簡単に懸濁した

↓ヒートブロックで 50°C, 10min

↓ゲルが完全に溶けたことを確認した

↓ゲル容量と等量の 2-propanol を加えて、懸濁した

↓紫色のカラムに全量入れた

↓15krpm, 1min, RT

↓素通り画分を decantation で捨てた

↓キムワイプの上にチューブを逆さにして立てて、上清をなるべく除いた

↓500 μ l の buffer QG をカラムに加えた

↓15krpm, 1min, RT

↓素通り画分を decantation で捨てた

↓750 μ l の buffer PE を加えた

↓15krpm, 1min, RT

↓素通り画分を decantation で捨てた

↓15krpm, 2min, RT (もう一度遠心をしてカラムのレジンから buffer PE を完全に除く)

↓紫色のカラムを 1.5 ml チューブに移した

↓50 μ l の buffer EB(elution buffer)を加えた

↓15krpm, 1min, RT

↓紫色のカラムを捨てて、ラベルを書いた

↓nanodrop で DNA 濃度を測定した

3. BamHI と SalI による制限酵素消化

↓回収した *s6mthfr* gene 50 μ l 及び事前に用意した pGX,pET ベクター溶液 50 μ l それぞれを以下の試薬を加え、計 100 μ l の反応液を調製した。

| Solution | Volume |
|---------------|-------------------|
| MilliQ | 31 μ l |
| DNA/plasmid | 50 μ l |
| Buffer (1.5T) | 15 μ l |
| BamH1 | 2 μ l |
| Sal1 | 2 μ l |
| | Total 100 μ l |

↓37 °C, 2 h

↓回収した

4. QIAquick® PCR Purification kit (250)による制限酵素消化済みサンプルの精製

↓PCR 産物の 5 倍量 buffer PB を入れた

↓全量をカラムに

↓15 Krpm, 1 min 液体を捨てた

↓750 μ l buffer PE, 15 krpm, 1 min

↓完全除去するため、もう一回 centrifuge

↓カラムを 1.5 ml tube に

↓50 μ l buffer EB を加え, kept 1min

↓15 krpm 1min

5. Ligation による発現ベクター作製

BamHI、SalI により消化された *s6mthfr* gene 及び pGX, pET ベクターを用いて、ligation による発現ベクターの作製を行った、その反応液の組成は以下に示す。

| Solution | Volume |
|---------------------|------------------|
| Vector: Insert =1:3 | 7.5 μ l |
| Ligation high ver2 | 7.5 μ l |
| | Total 15 μ l |

↓16 °C, 30 min

↓回収した

*buffer の組成は Toyobo の説明書に参考した。

*反応は 30min 以上にしないこと。

6. *E. coli* DH5 α に transformation

↓-80 °Cから *E. coli* DH5 α を取り出し、on ice で溶かした

↓無菌環境下で 15 μ l の ligation 産物を *E. coli* DH5 α に加えた

↓タッピングで溶液を懸濁した

↓かるく遠心した

↓on ice 30 min

↓42°C, 45sec

↓LB 800 μ l を添加した

↓37 °C、30 min

↓遠心 60 k*g 10min

↓上清 800 μ l を除いた

↓vortex で懸濁した

↓LB plate (100 ug/ml Amp)にまいた

↓37 °C, 12~24 h 以内で回収した

↓clean bench でコロニーを 100 ug/ml Amp、10 ml LB が入ったチューブに植菌した

- ↓37 °C, 12 h、振盪培養、
- ↓回収し、6 k*g, 10 min で遠心した
- ↓ペーパータオル、もしくはキムワイブの上にチューブを逆さにして立てて、上清を除いた

7. QIAprep® Spin Miniprep Kit (250)を用いたプラスミドの回収

- ↓上記で回収した菌体に
- ↓Buffer P1(resuspension buffer)を 230 µl 加えた
- ↓50 ml チューブの蓋をして、vortex で懸濁した
- ↓懸濁液を 250 µl とって、1.5 ml チューブに移した
- ↓250 µl の Buffer P2 (Lysis buffer)を加えて、混和転倒、4-5 回
- ↓350 µl の Buffer N3 (Neutralization buffer)を加えて、混和転倒、4-5 回
- ↓遠心 15krpm 15min RT (13krpm 10min 以上)
- ↓上清を青色のカラムに decantation で入れた
(白い沈殿がカラムに入らないように注意する)
- ↓遠心、15 krpm 1min
- ↓素通り画分を decantation で捨て、上清を除いた
- ↓500 µl の buffer PB をカラムに入れた
- ↓遠心、15 krpm 1min
- ↓素通り画分を decantation で捨て、上清を除いた
- ↓750 µl の buffer PE をカラムに入れた
- ↓遠心、15 krpm 1min
- ↓素通り画分を decantation で捨てた
- ↓遠心、15 krpm 1min
(もう一度遠心をしてカラムのレジンから buffer PE を完全に除く)
- ↓青いカラムを 1.5 ml チューブに移した
- ↓80 µl の buffer EB(elution buffer)を加えた
- ↓遠心、15 krpm 1min
- ↓回収した pGXS6MTHFR, peTS6MTHFR を使って、nanodrop で DNA 濃度測定した
- ↓BamHI, SalI による制限酵素消化確認を行った
- ↓さらに DNA シークエンスの確認を行った (ユーロフィン株式会社へ委託)
- ↓残りの pGXS6MTHFR, pETS6MTHFR は-20 °Cで保存した

・発現確認と培養条件検討

➤ 必要器具、試薬

- ・遠心機、振盪培養機
- ・分光光度計 (Beckman)
- ・SDS-page 泳動装置
- ・pGXS6MTHFR, pETS6MTHFR 発現ベクター
- ・*E. coli* BL21 (DE3) competent cells
- ・LB 培地 (BD)
- ・100ug/ml Amp, LB 寒天培地 (nacalai)
- ・1 M IPTG (sigma)
- ・100 mg/ml Ampicillin (nacalai)
- ・See Blue Plus2 Prestained Protein Marker (Invitrogen)
- ・CBB 染色液 (nacalai)
- ・NuPAGE 4 to 12%, Bis-Tris (Invitrogen)
- ・NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen)
- ・1 M pH8.0 Tris-HCl (nacalai)
- ・5 M NaCl (nacalai)
- ・1 M DTT (nacalai)
- ・5 M imidazole (nacalai)
- ・Glutathione Sepharose 4B (GE)
- ・Ni Sepharose (6 fast flow) (GE)

➤ 実験方法

8. *E. coli* BL21 (DE3) へ形質転換

- ↓-80 °Cから *E. coli* BL21 (DE3) を取り出し、on ice で溶かした
- ↓無菌環境下で 5 □l の pGXS6MTHFR, pETS6MTHFR を *E. coli* BL21 (DE3)に加えた
- ↓タッピングで溶液を懸濁した
- ↓かるく遠心した
- ↓on ice 30 min
- ↓42°C, 45 sec
- ↓LB 800 µl を添加した
- ↓37°C、30 min
- ↓遠心 6 k*g 10 min
- ↓上清 800 µl を除いた
- ↓vortex で懸濁した
- ↓LB plate (100 ug/ml Amp)にまいた
- ↓37 °C, 12 h で plate を回収した

9. 20 ml ケースにおける S6MTHFR の発現誘導条件検討

- ↓上記で回収した plate からシングルコロニー (2 種類) を取り、20 ml LB 培地・100 ug/ml Amp に植菌した
- ↓37°Cで振盪培養
- ↓2~2.5 h で OD₆₆₀ を測定し、0.5-0.8 あたりで以下の 2 条件で培養した (37°C 20 ml から 10 ml を取り、16°Cに培養機に移した)
- ↓37°C, 0.5 mM IPTG、3 h 条件はそのまま 1 M IPTG を 5 µl 加えて、そのまま培養した

↓16°C, 0.5 mM IPTG、overnight 条件は on ice で 5 min くらい冷やしたあと 1M IPTG を 5 µl 加えて、16°C overnight 振盪培養した
 ↓培養液回収し、6 k*g, 4°C, 10 min 遠心した
 ↓培養上清を捨てた後、キムタオルの上にチューブを逆さにして培地を除いた
 ↓そのまま -80°C に保存した

10. 発現チェック

↓事前に以下の組成で Lysis buffer を作製した

| |
|------------------------|
| Final concentration |
| 50 mM Tris-HCl pH8.0 |
| 0.3 M NaCl |
| 1 mM DTT |
| 10mM imidazole-HCl pH8 |
| Total 50ml |

↓回収した菌体に Lysis buffer を 1 ml 加え、vortex で懸濁した
 ↓1.5 ml チューブに移した
 ↓ハンディソーニケーターで sonication, 10 sec x 3 times
 ↓sample 回収用に 30 µl を別の 1.5 ml チューブに移し、30 µl を total 画分 として 1.5 ml チューブに分注し、SDS-PAGE sample buffer を加えて懸濁した
 ↓15 krpm, 4 °C, 15 min
 ↓sample 回収用のチューブから sup.画分 と ppt.画分 を回収、SDS-PAGE sample buffer に溶かした
 ↓GS4B resin もしくは Ni-NTA resin を加えた (bead vol. で 30 µl)
 ↓4°C, rotation, 1h in cold room
 ↓遠心 5 k*g, 10min
 ↓上清は捨てた
 ↓Lysis buffer に終濃度 20 mM Imidazole になるように imidazole を加えた
 ↓20 mM imidazole 1 ml をチューブに入れて、混和転倒
 ↓cent 5 k*g, 10 min
 ↓上清を捨てた
 ↓もう一度 20 mM imidazole 1 ml をチューブに入れて、混和転倒
 ↓遠心 5 k*g, 10 min
 ↓上清を捨てた
 ↓resin と捨て切れなかった上清合わせて、volume を 50-100 µl 程度にした
 ↓4x SDS-PAGE sample buffer を 20-25 µl 加えて、vortex (resin 画分)
 ↓SDS-PAGE2.3 大量培養、アフィニティー精製

10. 4 L ケースにおける S6MTHFR の大量発現

➤ 必要器具、試薬

上記方法 2.2 にある必要もの以外

- PBS (phosphate-buffered saline) buffer (Wako)
- Glutathione Sepharose 4B (GE)
- Ni Sepharose (6 fast flow) (GE)
- open column
- 5 L 三角フラスコ
- 大型振盪培養器

- ・大型遠心器 (Hitachi)
- ・超音波破碎器 (TAITEC)

➤ 実験方法

—上記の実験方法 8 と全く同じ、pGXS6MTHFR, pETS6MTHFR 2 種類の発現ベクターの形質転換を行った。

その後、LB plate に生えた大腸菌を回収した

↓5 ml LB 培地を plate に加えた

↓コンラージ棒もしくはピペッティングでコロニーを懸濁した

↓50 ml tube に回収した (4 ml 程度回収できるはず)

↓そのままと OD が高過ぎるので、LB 培地で 10 倍希釈して OD を測定した

↓10 ml LB + 100 ug/ml Amp に OD=0.05 になるように回収した大腸菌懸濁液を加えた

↓37 °C で振盪培養した

↓2-3 時間程度で

↓20 ml culture/2000 ml LB medium, 100 ug/ml Amp (1 種類ベクター合計 4 L)

↓2-3 時間程度で OD=0.5-0.8 に

↓37 °C, 0.5 mM IPTG (1 M IPTG を 1 ml/2000 ml)加えて、37°C 3 h 振盪培養

↓大型遠心器で集菌した、6 k*g 4dC 10 min

↓培養上清を捨てた後、ペーパータオルの上にチューブを逆さにして、培地を除いた

↓80 ml PBS に溶かす、10~16°C で懸濁した

↓50 ml tube に移し、6 k*g, 10 min で遠心し、PBS を除去した

↓そのまま -80°C に保存した

・アフィニティ精製

事前に以下の buffer を調整した。

| Final conc. | Solution | Volume |
|---------------------------|---------------|----------|
| Lysis buffer (500ml) | | |
| 50 mM Tris-HCl (pH8.0) | 1 M Tris | 25 ml |
| 0.3 M NaCl | 5 M NaCl | 30 ml |
| 1 mM DTT | 1 M DTT | 0.5 ml |
| 10 mM imidazole-HCl (pH8) | 5 M imidazole | 1 ml |
| | milli Q | 443.5 ml |
| | total | 500 ml |

| Final conc. | Solution | Volume |
|---------------------------|---------------|---------|
| Wash1 buffer (100 ml) | | |
| 50 mM Tris-HCl (pH8.0) | 1 M Tris | 5 ml |
| 0.3 M NaCl | 5 M NaCl | 6 ml |
| 1 mM DTT | 1 M DTT | 0.1 ml |
| 20 mM imidazole-HCl (pH8) | 5 M imidazole | 0.4 ml |
| | milli Q | 88.5 ml |
| | total | 100 ml |

| | | |
|---------------------------|---------------|---------|
| Elution buffer (50 ml) | | |
| 50 mM Tris-HCl (pH8.0) | 1 M Tris | 2.5 ml |
| 25 mM NaCl | 5 M NaCl | 0.25 ml |
| 1 mM DTT | 1 M DTT | 0.05 ml |
| 20 mM imidazole-HCl (pH8) | 5 M imidazole | 0.2 ml |
| | milli Q | 47 ml |
| | total | 50 ml |

↓4 L 大量培養後の菌体を-80℃から取り(以下なるべく on ice)

↓lysis buffer で懸濁、ビーカーに最終 80 ml まで

↓菌体液入りのビーカーをアミルホイルで蓋し箱に入れ、周りは氷で固定後水を少量入れた

↓蓋を外し、超音波破碎器にセット(チップ先端がビーカーの bottom に触れず、液面以下に)

↓output MAX, duty 30, time 5 min

↓5 min, 2 回 (計 10 min, 一回目終了後 5 min 休憩してから 2 回目)

↓粉砕された菌体液から 30 μ l を別の 1.5 ml tube に保存した(total fraction)

↓もう一回菌体液から 30 μ l を取り 1.5 ml tube に入れて遠心し、

それを sup. fraction と ppt. fraction として SDS sample buffer を 150 μ l まで加えた

↓残りの菌体を専用 tube に入れ、大型遠心器で 18 krpm ,30 min

Sapharos の平衡化

↓遠心の間に、Ni Sepharose と Glutathione Sepharose 4B をよく混ぜ、

50 ml tube に 5 ml ずつ分注*2(菌体は 2 tube に分注したから)

↓50 ml tube にある 5 ml Sepharose を 40 ml までミリ Q で調整した

↓2 k*g, 5 min, 4°C centrifuge (ethanal を除くため)
↓しばらく放置した後(5 min onice)、supernatant を除いた
↓lysis buffer で 40 ml まで(茶色になるはず)、
↓2 k*g, 5 min centrifuge
↓しばらく放置した後(5 min onice)、supernatant を除いた
遠心終わり
↓菌体液の supernatant を sepharose が入った 50 ml tube に入れた
↓4°C, 1 h rotator
↓30 µl を取り flow through. fraction として 1.5 ml tube に
↓セットした open column に全量入れ、全部流し終わるまで待ち
↓wash buffer (20 mM imidazole)を 2 回満タンまで入れ、洗い流した
(wash buffer は大体 resin 量の 10~20 倍)
↓-80°Cにある 1.5 ml tube に分注された 200 µl の prescission protease をカラム中に入れ (2 回目洗浄後、
ある程度の wash buffer が残っている状態で入れる)
↓カラムを蓋し、overnight で反応させ
↓翌日 elution buffer を 15~20 ml 入れて溶出させ、サンプルを回収した
↓回収したサンプル液から 30 µl を取り
(elution fraction として SDS sample buffer を 150 µl まで加えた)
↓これまで回収した fraction を SDS-page に流した
↓残りのサンプル nanodrop で濃度を測定した
(S6MTHFR は FAD を有するため、450 nm の吸光度を基準にし、 $A_{450}=12,100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ で濃度を計算した)
*酵素活性に使われた変異体も同じ条件で発現精製を行なったが、本編に結果を省略した

・イオン交換クロマトグラフィー

➤ 必要器具、試薬

- ・ AKTA (GE)
- ・ Mono Q 5/50 GL (GE)
- ・ Buffer A: 50 mM Tris-HCl (pH8.0), 25 mM NaCl, 1 mM DTT
- ・ Buffer B: 50 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 M NaCl, 1 mM DTT
- ・ See Blue Plus2 Prestained Protein Marker (Invitrogen)
- ・ NuPAGE® 4-12% Bis-tris Gel (Invitrogen)
- ・ NuPAGE® LDS Sample Buffer (Invitrogen)
- ・ Amicon® Ultra tube (Merck)
- ・ シリンジ

➤ 実験方法

→AKTA の流路を以下の設定で置換を行った

100% B 5-10 ml/min, 15 ml,

0%B 5-10 ml/min, 15 ml,

monoQ 5/50 (cv=1 ml) を 0.5 ml/min (pressure limit, 4MPa)で溶液を流しながらセット

1 ml/min, pressure limit 4MPa, end time 10ml

→method を以下の条件で設定した

anion exchange, MonoQ 5/50, position 1

波長 450, 280, 260 nm 測定

equilibration start 0, volume 0, off (平衡化 volume は通常 column の 5 倍)

manual, empty loop 2 ml (毎回 sample 入れる量以上を設定)

tube size, wash out (yes), fracc-950 (器械), fraction volume 5 ml, start at first tube

elution fractionation: fixed volume, fraction volume 1 ml,

next tube

selution: linear gradient, target conc 50%B, length (gradient speed) 10(6~15 ok), clean afterelution

↓Amicon® tube を用いて、アフィニティー精製から得られた S6MTHFR 溶液を濃縮した

↓濃縮した S6MTHFR 溶液をフィルターに通し、沈殿を除いた

↓シリンジを利用し、S6MTHFR 溶液を AKTA に注入し

↓一番ピークが高い所とその付近の fraction を回収した

↓SDS-page 確認

↓nanodrop で濃度を測定した

・ サイズ排除クロマトグラフィー

➤ 必要器具、試薬

- ・ AKTA (GE)
- ・ Superdex 200 increase 10/300 GL (GE)
- ・ Buffer A: 10 mM HEPES-NaOH(pH7.5), 100 mM NaCl
- ・ See Blue Plus2 Prestained Protein Marker (Invitrogen)
- ・ NuPAGE 4 to 12%, Bis-Tris (Invitrogen)
- ・ NuPAGE® LDS Sample Buffer (Invitrogen)
- ・ Amicon® Ultra tube (Merck)
- ・ シリンジ

➤ 実験方法

- ↓ion exchange 後、Amicon で濃縮した
- ↓濃縮の間に、AKTA 流路を以下の設定で置換した
- ↓column が繋がっていない状態で 5~12 ml/min の流速で、20 ml 以上を流した
- ↓流速を 0.5 ml/min にし、流れている状態で superdex200 を接続した
- ↓column 平衡化で、2 column volume buffer, 0.5 min/ml, 3.5MPa で行った
- ↓program の作成: 3.3 Mpa, 1ml elution fraction, 1.2 cv length of the elution
- ↓wash and equilibrate with 1.2 cv buffer
- ↓S6MTHFR を 1 ml ずつ入れ, run program
- ↓一番ピークが高い所とその付近の fraction を回収した
- ↓回収した fraction から 30 µl を取り、SDS sample buffer を加え、泳動確認した
- ↓残りの S6MTHFR 溶液を Amicon で濃縮した

・ SEC-MALS による分子量の同定

➤ 必要器具、試薬

Hitachi HPLC (L-2400 UV detector)

DAWN HELEOS II 18 angle detector (Wyatt Technology)

RI-101 detector (Shodex)

Wyatt SEC column for MALS (WTC-030S5)

ASTRA 6

Running buffer: 10 mM HEPES-NaOH(pH7.5), 100 mM NaCl, 脱気済み

洗浄用 milliQ (脱気済み)

3mg/ml S6MTHFR, 100 μ l (0.1 μ m フィルター濾過済み)

➤ 実験方法

カラムの洗浄

↓ Hitachi HPCL の立ち上げ

↓ MilliQ による洗浄: 0.5 m/min で 2 CV 以上

↓ Buffer による洗浄および平衡化: 0.5 m/min で 2 CV

↓ シリンジでループ洗浄

RI detector (Shodex) と LS detector (HELEOS II) の立ち上げ

ASTRA 6 の立ち上げ

サンプルインジェクション

↓ レバーが Load 側(上側)の位置になっていることを確認

↓ ASTRA 6 の validate button をクリック後、run experiment を押した。サンプルを打ちこむ準備完了というメッセージが表示された

↓ サンプルを 100 μ l アプライし、黒いレバーを Load から Inject に回してデータ測定を開始した

データ解析

↓ SEC による A_{280} のピークを確認した

↓ Procedures の "Baseline" を選択し、全ての Baseline を確認・調整し、OK で変更を保存した

↓ Procedures の "Peaks" を選択し、Peak を選択した

↓ Procedures の "Molar Mass & Radius from LS" を選択し、Rg 半径の計算に必要な LS data を確認しながら、18 レーザ間の R^2 data 相関性を編集した

↓ Result の "Report summary" を選択し、Mw, Mn などを確認した

・嫌気滴定

➤ 必要器具、試薬

1M potassium phosphate buffer (KPB), pH7.2 (nacalai)

0.1M EDTA (nacalai)

Milli Q

嫌気チャンバー

S6MTHFR

分光光度計 DU730 (Beckman)

Eppendorf semi micro vis cuvettes (Cat no.: 0030079353)

100mM NADH (481913-1GMCN)

100mM CH₃-THF (sigma)

➤ 実験方法

S6MTHFR の補因子である FAD は、酸化の状態では 450 nm に極大吸収があり、還元されると 450 nm における吸収が減少するので、この性質を利用し反応を追跡する。しかし、buffer に酸素が混入したら、還元された FAD は酸素によって直ちに酸化されてしまうので、全ての試薬から酸素を除去する必要がある。そこで、実験の 2 日前から実験サンプル及び利用する溶液を嫌気チャンバーに入れ、脱酸素を行なった。100 mM KPB buffer, 1 mM EDTA の buffer 条件で、450 nm における吸光が 0.25 付近になるように S6MTHFR (約 18 nmol)を入れて、反応液が最終的に 1 ml なるようにした。飽和まで 6 点以上を取るように、1 ml の反応液に毎回 0.5 μ l, 4~10 mM のリガンド (CH₃-THF/NADH)を入れた。その後、ピペットで 30 sec 間攪拌し、300~800 nm 間の波長スキャンを行なった。リガンドを入れてから波長スキャンまでの間が 2 分間になるように統一した。

・ NADH に対する比活性の測定

➤ 必要器具、試薬

1 M potassium phosphate buffer (KPB), pH7.2 (nacalai)

0.1 M EDTA (nacalai)

Milli Q

S6MTHFR と各変異体

分光光度計 DU730 (Beckman)

Nanodrop 1000 (Thermo)

Eppendorf semi micro vis cuvettes (Cat no.: 0030079353)

100 mM NADH (481913-1GMCN)

1 mM menadione (sigma)

➤ 実験方法

測定方法は腸菌 MTHFR の論文を参考した (Sheppard CA, *et al.*, 1999)。10 mg の menadione (過剰量) を 400 μ l の 100% methanol に溶かした後、methanol の終濃度が 20% (v/v) になるよう milli Q を加え、アルミホイルで遮光した条件で 10 分間攪拌した。その後、0.2 μ m フィルターで不溶な部分を取り除き、nanodrop で 340 nm における吸収を測定し、menadione の吸光係数が 3100 M⁻¹ cm⁻¹ の条件で濃度を計算した (Vanoni MA, *et al.*, 1983)。50 mM KPB pH7.2, 0.3 mM EDTA, 室温の条件で各濃度の NADH と menadione が入った 1 ml の反応液を用意し、酵素 S6MTHFR を入れて反応を開始させた。NADH は 340 nm に極大吸収があることを利用して定量するが、menadione も 340 nm に吸収がある。そのため、menadione が 343 nm に isosbestic 点 (等吸収点) がある性質を利用し、30 sec ごとに 343 nm における吸光度の減少で NADH の減少量 (吸光係数 6220 M⁻¹ cm⁻¹) を定量した (Igari S, *et al.*, 2011)。

・ CH₃-THF に対する活性の測定

S6MTHFR およびその変異酵素の酵素活性は基本的に以下の条件及び方法で測定した。20 nM 精製酵素と 100-1,000 mM CH₃-THF (Schircks Laboratories) を 400 mM menadione (sigma) 存在下で 50 mM KPO₄ buffer (pH 7.2) 中で 30°C で 3 min 反応させ、反応液に対して 20% (v/v) formic acid を 10% (v/v) 添加、混合することで反応を停止した。19,000 × g (4°C) で遠心分離したのちに上清をボアサイズ 0.2 mm の PTFE で濾過し分析前処理を行った。濾液の CH₃-THF 濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定し、CH₃-THF の減少量を基に酵素活性を評価した。CH₃-THF の変換産物の同定には、CH₂-THF (Schircks Laboratories) が低 pH において不安定であったため反応停止のための formic acid を添加せずに HPLC-マススペクトル (LC-MS) 解析を行った。至適 pH は、buffer に pH 5.0-9.0 の 50 mM GTA buffer (50 mM 3,3-dimethylglutaric acid, 50 mM Tris, 50 mM 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol) を用い、反応温度は 30°C で行った。至適温度は、反応温度を 15-70°C の範囲に設定し、buffer は 50 mM KPO₄ buffer (pH 7.2) を用いて行った。S6MTHFR 及び S6MTHFR_{C219A} の動力学的性質の解析は、それぞれ 5-500 mM および 20-1,500 mM の CH₃-THF の濃度範囲で酵素活性を測定した。この時、野生型は CH₃-THF の濃度が 5-50 mM、100-500 mM CH₃-THF の範囲で 5 nM 及び 20 nM の精製酵素を、S6MTHFR_{C219A} は 20-500 mM、700-1,500 mM の CH₃-THF においてそれぞれ 5 nM および 20 nM の精製酵素を用いた。

・電子受容体の検討について

NaNO₃, FeCl₃, NaNO₂, oxoglutarate, citrate, malate, pyruvate, fumarate, succinate, GSSG は nacalai から購入した。Coenzyme Q₁₀, Coenzyme Q₀, NADP⁺, NAD⁺, ferredoxin, cytochrome C は sigma から購入した。1 μM 精製酵素と 100 mM CH₃-THF を NAD⁺等の様々な化合物の存在下、50 mM KPO₄ buffer (pH 7.2) 中で 30°C で 3 min 反応させて酵素活性を測定した。

・HPCL 及び LC-MS 分析

HPLC 分析はカラムに BEH C18 逆相カラム (2.1 × 100 mm, 1.7 mm particle size; Waters)を用いた。HPLC システムは ACQUITY ultraperformance liquid chromatography (UPLC) system (Waters) 及び ACQUITY UPLC I-Class system (Waters)を用いた。移動相には分離液 A (0.1% formic acid を含む acetonitrile)と分離液 B (0.1% formic acid 水溶液)を用い、流速は 0.5 ml/min として以下のグラジエントコンディションで分離を行った: 0-1.2 min, 6% A; 1.2-2.0 min, 6%から 35%に A を増加; 2.0-3.0 min, 35% A; 3.0-3.1 min, 35%から 6%に A を減少; 3.1-4.0 min, 6% A。HPLC 分析の検出波長は 270 nm で行った。LC-MS 分析は、ACQUITY UPLC system と接続した ACQUITY TQ detector (Waters)を用いて electrospray ionization (ESI)法により行った。ESI-MS の検出は positive-ion mode で以下の条件で行った: capillary voltage, 3.0 kV; cone voltage, 10-40 V; source temperature, 120°C; desolvation temperature, 350°C; desolvation gas flow rate, 650 liters/h; cone gas flow rate, 50 liters/h。

・S6MTHFR の結晶化と最適化

結晶化の初期 screening は構造生物学研究センターのタンパク質結晶化システム (PXS) を利用した。ゲル濾過で得られた 10 mg/ml の S6MTHFR を用いて、Crystal Screen (Hampton Research)(Jancarik & Kim, 1991), PEG/Ion (Hampton Research) (McPherson, 2001), Crystal Screen Cryo (Hampton Research), Wizard (Emerald Biosystems), PEGsII(QIAGEN), ProteinComplex(QIAGEN)の結晶化条件で、170 μl の結晶化溶液と 170 μl のタンパク質溶液 (10 mg/ml)を混合して 20 度/4 度で sitting-drop 蒸気拡散法を用いて screening を行なった。

結晶化条件の最適化は micro-seeding 法を用いて行なった。VCX-130 sonication machine (Sonics & Materials Inc.; output 20%, 5 sec × 6 times at 10 sec interval)を用いて、上記の(20 % w/v) PEG 4000, 0.1 M sodium citrate pH 4.5 条件で得た結晶を破碎し、seed 溶液 ((22 % w/v) PEG 4000, 0.1 M sodium citrate pH 4.5)を用意した。その後、1 μl タンパク質溶液, 1 μl 結晶化溶液, 0.2 μl seed 溶液を混合して hanging-drop 蒸気拡散法を利用し、5 ~15 mg/ml のタンパク質濃度, pH 4~5, 各 PEG4000 濃度, 各 seed 濃度, 20 度/4 度で結晶化条件を検討した。

・S6MTHFR の CH₃-THF 基質複合体結晶の作製

22 % (w/v) PEG 4000, 0.1 M sodium citrate pH 4.5 の buffer に 8 ~20 mM CH₃-THF を加えて soaking 溶液を作製した。その後、S6MTHFR の結晶を soaking 溶液に移し、4 度で 1 時間~overnight の条件で検討を行なった。最終的に、顕微鏡で酷く割れていなかった結晶を回収し凍結した。

・ S6MTHFR の抗凍結剤の検討

標準母液は 22 % (w/v) PEG 4000, 0.1 M sodium citrate pH 4.5 で作製した。抗凍結剤の検討は CryoPro (Hampton Research) (Boutron, 1988)を用いて、全 48 種類の中から 25 % (v/v) Glycerol, 25 % (v/v) Ethylene glycol, 25 % (v/v) Diethylene glycol, 30 % (v/v) PEG200, 30 % (v/v) PEG400, 32 % (v/v) xylitol, 32 % (v/v) D-sucrose, 32 % (v/v) D-glucose, 23 % (v/v) trehalose, 25 % (v/v) methyl-pentanediol を選択し、標準母液に添加した。また、30 % (w/v) PEG4000 が入った抗凍結溶液も用意した。クライオループを使って、これらの抗凍結溶液に結晶を 5 min ほど浸した後、顕微鏡で結晶が割れているかどうかを判別した。その上、酷く割れていない結晶を液体窒素で凍結し、X 線の照射による回折データに基づいて評価を行い、抗凍結剤の条件を決めた。

・ S6MTHFR の初期位相の決定

S6MTHFR の基質非結合型結晶構造の初期位相はタンパク質中に存在する硫黄原子の異常分散を利用する Native-SAD 法により決定した。Photon factory (PF) BL-1A で 2.7 Å の波長を用いて一つの結晶の 4 か所に照射し、0.2° ずつ回転させながら、露光時間 0.2 秒、透過率 3.38 で、0 ~360° 分の計 10 セットの回折データを収集した。XDS で処理した後、XSCALE (Kabsch, 2010)を用いてデータをマージした。

フリーデルの法則に適用しない異常散乱の SigAno ($|F(+)-F(-)|/\sigma$)が 1.2 以上になるように CCP4 program suite (Winn *et al.*, 2011)の AIMLESS (Evans *et al.*, 2013)でデータを処理した後、Crank2 (Ness SR, *et al.*, 2004)を用いて初期位相決定及びモデルの自動構築を行なった。その後、NSRRC の BL13B1 で 1 Å の波長で測定した分解能が 1.5 Å の回折データを用いて、Molrep で分子置換を行なった。

S6MTHFR-CH₃-THF 基質複合体結晶の回折強度データは XDS (Kabsch, 2010)、CCP4 program suite (Winn *et al.*, 2011)の AIMLESS (Evans *et al.*, 2013)を用いて最外殻の I/σ が 2 以上になるように処理した。その後、S6MTHFR の基質非結合型結晶構造を鋳型とし、CCP4 program suite の Molrep で分子置換を行なった。

・ 構造精密化

構造精密化には PHENIX の *phenix.refine* (Afonine *et al.*, 2012)を用いて、S6MTHFR-基質非結合型結晶と S6MTHFR-CH₃-THF 基質複合体結晶から得られた回折強度データの中で最も高い分解能を示したデータセットについて精密化を行った。精密化により得られた電子密度マップは、2Fo-Fc map を 1.2σ、Fo-Fc map を 3.5σ で表示し、以下の基準によりモデルの修正を行った。1. 電子密度がはっきりしないまたは見えない部分にアミノ酸残基を入れない。2. 電子密度の形により alternative 構造がある場合には、占有率 50% ずつにして構造を入れる。3. Fo-Fc map の表示基準である 3.5σ において、電子密度の形が丸いと判断できる大きさのものを水分子の電子密度であると判断する。精密化した全ての S6MTHFR の結晶構造における幾何学的状態(ジオメトリー)は、PHENIX の MolProbability (Lovell *et al.*, 2003)にて確認を行った。

また、S6MTHFR-CH₃-THF 複合体結晶構造において、ligand が結合しているかどうかを確認するために、*phenix.refine* を用いて omit map を作成した上、simulated annealing を使用し精密化を行なった。

・アミノ酸配列解析と系統樹解析

各 *methfr* のアミノ酸配列は Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて集めた (表 8-1,2)。これまでに報告された CH₂-THF から反応する一般的 MTHFR のアミノ酸配列情報を集めた上、大腸菌 MTHFR あるいはヒト MTHFR を鋳型とし Protein BLAST のモデル生物データベースから合計 40 種類の MTHFR のアミノ酸配列情報を収集した。

CH₃-THF から反応する MTHFR は脱メチル化酵素の影響に適応し進化したと推測した。そのため、これまでに報告された THF を利用し CH₃-THF を生成する脱メチル化酵素 LigM, DesA, DMT, CmuB を鋳型とし、これらのホモログを持つバクテリアを集めた。その上、これまでに報告された 3 つの CH₃-THF から反応する *Sphingobium* sp. SYK-6 由来 MTHFR, *Sphingomonas* sp. Ndbn-20 由来 MTHFR, *Methylobacterium chloromethanicum* CM4 由来 MTHFR (Nadalig T, *et al.*, 2011) それぞれを鋳型とし、合計 60 個の MTHFR アミノ酸配列を収集した。

sequence alignment は NCBI の COBALT (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi?LINK_LOC=BlastHomeLink) を用いて 100 個の MTHFR で行なった。系統樹解析は MEGA7 を用いて (Kumar S, *et al.*, 2016)、Maximum likelihood 法により、CH₂-THF から反応する 40 個 MTHFR と CH₃-THF から反応する 40 個の MTHFR、合計 80 個 MTHFR で解析を行なった。