



## ホモシステイン血症再考

### 1. はじめに

ホモシステイン  $[\text{HOOC-CH}(\text{NH}_2)\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-SH}]$  は、構造がシステインに似ることから命名された生体内に普通に存在するアミノ酸であり、メチオニンからシステインが合成される際の必須中間体である。血中ホモシステイン濃度の上昇が心血管病発症の独立のリスクファクターとして見いだされ、また妊婦における高ホモシステイン血症と新生児の先天異常(二分脊椎や水頭症などの神経管閉鎖障害)の発症リスクの相関が示唆されて久しいが、それらの病態の発症分子機構については諸説あるもののいまだ不明である。血中ホモシステイン濃度を下げたため1998年よりパンやパスタなどの主要穀物への葉酸添加を義務化した米国では、それ以降脳卒中による死亡率が下がり、神経管閉鎖障害発症数が2割減少したことが報告されている。本稿では、ホモシステイン代謝に必須の二酵素[シスタチオンβ-シクターゼ(CBS)とシスタチオンγ-リアーゼ(CTH, 通称CSE)]の遺伝子欠損マウスの解析により得られた知見をもとに、ホモシステイン血症について考える。

### 2. ホモシステインの産生と代謝

タンパク質を構成する20種の標準アミノ酸のうち含硫アミノ酸は2種のみであり、必須アミノ酸のメチオニンから合成されるシステインは非必須アミノ酸と呼ばれる。その経路はメチオニンサイクルとトランススルフェーションから成る(図1)<sup>1)</sup>。メチオニンはATP由来のアデノシンを硫黄原子に付加されS-アデノシルメチオニン(SAM)となり、SAMはほとんどのメチル化酵素の共通基質として各種メチル化反応に用いられS-アデノシルホモシステイン(SAH)となり、そしてホモシステインに加水分解さ

れる。ホモシステインは再メチル化されてメチオニンに戻るか(メチオニンサイクル)、あるいはトランススルフェーションを介してシステインに変換される。通常の成人男子では生成したホモシステインの約4割が前者に回り、残りの6割が回る後者では、まずCBSによりセリンが付加されてシスタチオンが生成し、次にそれがCTHにより加水分解されてシステインとなる<sup>1)</sup>。合成されたシステインの一部はグルタチオンやタウリンに変換され、またCBSはホモシステインとシステイン、CTHはシステインあるいはシスチン、メルカプトピルビン酸スルファートランスフェラーゼ(MPST)はシステイン脱アミノ産物の3-メルカプトピルビン酸をそれぞれの基質として、硫化水素( $\text{H}_2\text{S}$ )を産生する。CBSとCTHのマウスにおける臓器発現は肝・腎・膵・大腸などに局在が見られるが<sup>2)</sup>、MPSTはほぼ全ての臓器に発現する。このようにホモシステインの産生と代謝は、メチル化反応の共通基質SAMの供給による生体内メチル基含有化合物(DNA, RNA, タンパク質、リン脂質、クレアチニン、エピネフリン、カルニチンなど)の合成、主要な抗酸化物質であるグルタチオンやタウリンの産生、多彩な生理作用を有する $\text{H}_2\text{S}$ の産生(本誌85巻2号の木村英雄氏総説参照)などの重要な生体反応と深く関連する(図1)。

### 3. ホモシステインの蓄積と毒性

ホモシステインは血中において約75%がアルブミンなどのタンパク質にジスルフィド結合し、遊離形はわずか1~2%に過ぎず、残りはホモシスチンあるいはホモシステイン-システインなどのジアミノ酸として存在する<sup>3)</sup>。血中濃度は通常、ジスルフィド結合を還元切断して遊離する全てのホモシステイン(総ホモシステイン)の濃度を指す。遺伝病ホモシスチン尿症(高ホモシステイン血症)の原因として幾つかの遺伝子の異常があるが、そのうち最も頻度が高くかつ症状が重いのがCBS遺伝子欠損によるI型で、他にメチルコバラミン合成障害(II型)あるいはメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子異常(III型)によるメチオニンシクターゼ活性阻害が知られる。約20万人に1人の頻度のホモシスチン尿症I型患者は、わが国では生後すぐに新生児マススクリーニングにより発見され早期に治療が施されるが、未治療の場合は脳卒中や心筋梗塞などにより20代で亡くなることが報告されている。仮に早期治療で延命できたとしても精神発達遅滞などの障害が残ることが多く、また血栓予防のため長期にわたるアスピリンなどの服用が必要となる。さらに重要であるのは、通常10

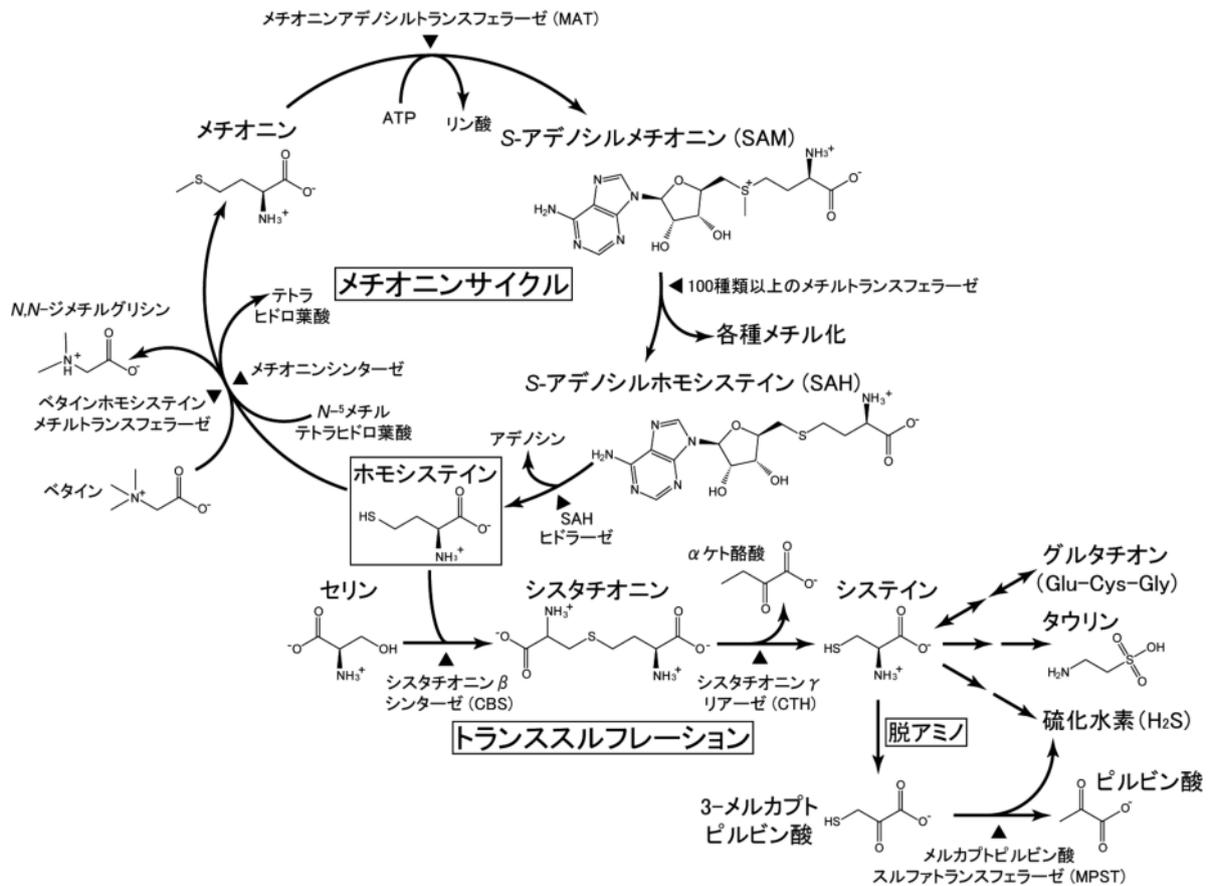


図1 ホモシステインの産生と代謝

ホモシステインはメチオニンからシステインが生合成される過程の必須の中間体。ホモシステインの蓄積はメチオニンサイクルとトランススルフェーションのバランスの変化で起こり、各種メチル化反応、システイン/抗酸化物質/硫化水素の生合成、セリン代謝に影響を与える。

μM 程度の血中ホモシステイン濃度がわずかに5 μM 上昇すると冠動脈疾患の発症リスクが1.6倍となること、早発性冠動脈疾患・末梢血管疾患患者の約4割と透析患者・末期腎不全患者の多くが高ホモシステイン血症を呈することである。また血中ホモシステイン濃度は調査した母集団の約半分で加齢と共に上昇傾向にあること<sup>4)</sup>が報告され、CBS遺伝子が正常でもホモシステイン濃度が上昇しうることも重要である。

なぜホモシステイン蓄積が病態発症につながるのか？

ホモシステインは遊離のSH基を介してタンパク質のジスルフィド結合を切断 (S-homocysteinylatation) し、その高次構造を壊すと考えられるが、その作用は構造の似るシステインも同じはずである。6種の硫黄化合物の水溶液の酸化還元電位を比べると、システインは強力な還元剤としてSDS-PAGEサンプルバッファー中で使用される2-メルカ

プトエタノール、そしてホモシステインに次いで還元力が強く、グルタチオンやメチオニンとは3~4オーダーの開きがある (図2A)。また細胞培養液中に添加すると、システインはホモシステインに準じて細胞死を強く誘導する (図2B)。高い毒性を有する遊離システインは細胞内では安全なグルタチオンの形で貯蔵され、必要に応じてシステインに分解されるのに対し、遊離ホモシステインには安全な保存形態がないと考えられる。

ホモシステインの作用機序としては、(1)過剰なホモシステインが酸素を還元して活性酸素種を発生させ、酸化ストレスを惹起、(2)ホモシステイン蓄積はメチル化反応の亢進を伴い、一酸化窒素 (nitric oxide: NO) 産生酵素の内性阻害剤である asymmetric dimethylarginine (AMDA) の産生により NO 産生を阻害、(3)強力な還元力によりタンパク質のジスルフィド結合を切断し変性させる、(4)メチ

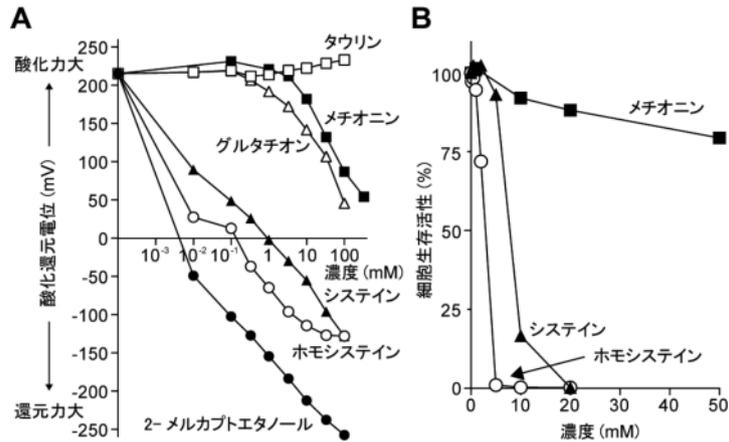


図2 ホモシスチンとシスチンの活性比較

(A) 各種硫黄化合物の水溶液の酸化還元電位。

(B) マウス初代培養肝細胞の培養液中へのホモシスチン，シスチン，メチオニン添加による30時間後の細胞生存活性(細胞内ATPレベル)<sup>11)</sup>。

オニンと構造の似るホモシスチンのタンパク質への取り込みを防ぐため、メチオニル tRNA シンターゼによる編集(editing)を受けてホモシスチンチオラクトンに変換され、タンパク質のリシン残基に結合(N-homocysteinylation)、そこに新規SH基を導入、(5)遺伝子発現誘導を介して小胞体ストレス応答(UPR: unfolded protein response)や脂質代謝異常を誘導、(6)催奇形性を有する、などの諸説が提唱されている。

#### 4. CBS 欠損マウスと CTH 欠損マウス

米国のグループにより作製されたCBSホモ欠損マウスは、高ホモシスチン血症(野生型の6  $\mu\text{M}$  に対し200  $\mu\text{M}$ )・成長不全・脂質代謝異常(脂肪肝)を呈し、4週齢までにそのほとんどが(おそらく肝機能不全<sup>5)</sup>により)死亡する<sup>6)</sup>。マウスは後にJackson研究所に管理委託され、そこでC57BL/6Jに戻し交配されたCBSヘテロ欠損マウスが世界中の研究者に配付され解析されてきた。わずかなCBSホモ欠損生存個体は成体においても野生型の半分程度の体重に留まり、そのため主にCBSヘテロ欠損マウスか幼若CBSホモ欠損マウスを用いた解析が行われてきた。我々は近年、マウスの遺伝的背景を他の近交系に置換することで、CBSホモ欠損マウスの半致死性と成長の改善に成功した<sup>7)</sup>。我々のC3H/HeJ背景CBSホモ欠損マウスの生存率は30%程度あり、生存個体は野生型に匹敵する成長を示す<sup>7)</sup>。C3H/HeJマウスは同週齢のC57BL/6Jマウスよりも身体が大きく、血中ホモシスチン濃度が野生型に

においてもCBSヘテロ欠損・ホモ欠損においても若干低いことが理由として考えられる。若齢期に発症した脂質代謝異常や脂肪肝は成体ではほぼ寛解していたが、高ホモシスチン血症は維持されたままであり、さらには記憶学習障害や小脳異形成などの中枢神経系異常が確認された<sup>7)</sup>。

そして最近、カナダのWangらと我々のグループにより独立してCTHホモ欠損マウスが作製された。Wangらは血管平滑筋弛緩作用を持つH<sub>2</sub>Sの産生減少によりCTHホモ欠損マウスが7週齢以降に高血圧症を示すと報告したが、我々の同マウスは正常血圧であった<sup>8,9)</sup>。両者に共通するのは、見かけ上正常に発育し生殖可能で、共に高ホモシスチン血症を呈する点である。ただしWangらのCTHホモ欠損マウスは成体雌の血中ホモシスチン濃度が120  $\mu\text{M}$ 程度であるのに対し雄は18  $\mu\text{M}$ 程度で、一方我々の同マウスは雌雄ともに100~150  $\mu\text{M}$ 程度である<sup>8,9)</sup>。その原因としては、遺伝的背景の違いや生育環境(餌など)の違いが考えられる。CTHホモ欠損マウスはシスタチオニン血症(尿症)を示すが、CBSホモ欠損マウスで顕著な高メチオニン血症は呈さない<sup>9)</sup>。そして酸化ストレスに脆弱で<sup>9)</sup>、したがって虚血再灌流障害にも脆弱であり<sup>10)</sup>、また必須アミノ酸としてシスチン(シスチン)の摂取を必要とし、その欠乏餌投与時には急性筋萎縮を起こし<sup>9)</sup>、高メチオニン餌投与によっては急性肝炎を示すこと<sup>11)</sup>が明らかとなっている。

以上、脂質代謝異常が寛解したC3H/HeJ背景CBSホモ欠損マウスで高ホモシスチン血症が維持されていたこ

と、そして高ホモシステイン血症も示す CTH 欠損マウスが見かけ上正常であったことから、マウスではホモシステイン過剰蓄積のみでは病態にならないことが示された。

### 5. タンパク質システイン残基の SH 基化学修飾に関する最近の知見

2009年、米国の Snyder らにより H<sub>2</sub>S が肝臓主要タンパク質のシステイン SH 基を S-SH 化修飾 (S-sulfhydration) すること、その修飾が CTH 欠損マウスでは見られないことが報告された<sup>12)</sup>。これは CTH 欠損により内在性 H<sub>2</sub>S が減少したとも、過剰蓄積ホモシステインによる S-homocysteinylation により S-sulfhydration が阻害されるとも受け取れる結果である。さらに最近彼らは、CTH 由来 H<sub>2</sub>S が K<sub>ATP</sub> チャネルの<sup>13</sup>Cys の S-sulfhydration による活性化を介して腸間膜動脈弛緩に働くことを報告した<sup>13)</sup>。一方熊本大医 (現東北大医) の赤池らは、活性酸素種と NO により GTP がニトロ化されて 8-nitro-GTP が生成され、さらにグアニル酸シクラーゼにより環状化変換された 8-nitro-cGMP がタンパク質のシステイン SH 基に結合する S-guanylation

修飾の存在を見だしていたが<sup>14)</sup> (本誌 84 巻 2 号の藤井重元・赤池孝章氏ミニレビュー参照)、最近 H<sub>2</sub>S の生理条件下での主要形態である HS<sup>-</sup>アニオンが 8-nitro-cGMP を sulfhydration 修飾すること、そしておそらくそれが H-Ras タンパク質の S-guanylation を抑えることで心筋梗塞後の心筋細胞保護に働くことを報告している<sup>15)</sup>。

これら 2 種の修飾に加え、NO が付加する S-nitrosylation, グルタチオンが付加する S-glutathionylation, 各種親電子物質が付加する S-alkylation など、過剰蓄積ホモシステインによる S-homocysteinylation が競合しうるタンパク質システインの SH 基修飾形は複数にのぼる (図 3A)。新規に N-homocysteinylation により導入されるタンパク質リシンの SH 基もこれら修飾の標的となるかもしれない (図 3B)。さらには、S が連なる Polysulfur 低分子による SH 基修飾の存在も明らかにされつつある。これらの化学修飾の定性的定量的な高感度検出手法の確立が急務である。

### 6. おわりに

本稿では、メチオニン代謝/システイン生合成系におけるホモシステイン蓄積の位置付けと、タンパク質システイン SH 基の各種化学修飾における S-及び N-homocysteinylation 修飾の意義付けを行った。ホモシステイン血症の病態の真の理解には、これらの化学修飾の正確な検出と生理的意義の解明が必須と考える。

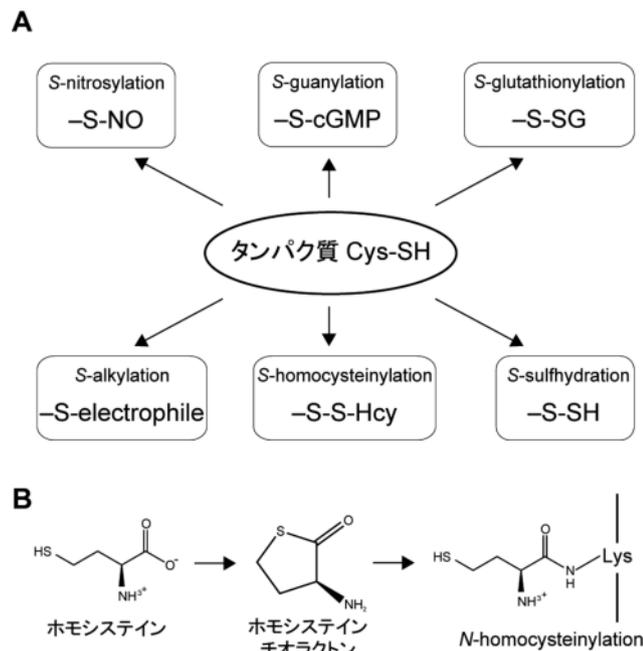


図 3 タンパク質 SH 基の各種化学修飾

- (A) タンパク質システイン SH 基の各種化学修飾。それぞれの修飾は競合しうる。
- (B) N-homocysteinylation によるタンパク質リシン残基への SH 基導入。ホモシステインはメチオニル tRNA シンテターゼによりホモシステインチオラクトンに変換され、タンパク質リシン残基に結合する。

- 1) Stipanuk, M.H. (2004) *Annu. Rev. Nutr.*, 24, 539–577.
- 2) Ishii, I., Akahoshi, N., Yu, X.N., Kobayashi, Y., Namekata, K., Komaki, G., & Kimura, H. (2004) *Biochem. J.*, 381, 113–123.
- 3) Mudd, S.H., Finkelstein, J.D., Refsum, H., Ueland, P.M., Malinow, M.R., Lentz, S.R., Jacobsen, D.W., Brattstrom, L., Wilcken, B., Wilcken, D.E., Blom, H.J., Stabler, S.P., Allen, R.H., Selhub, J., & Rosenberg, I.H. (2000) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20, 1704–1706.
- 4) Herrmann, W. & Knapp, J.P. (2002) *Clin. Lab.*, 48, 471–481.
- 5) Namekata, K., Enokido, Y., Ishii, I., Nagai, Y., Harada, T., & Kimura, H. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 52961–52969.
- 6) Watanabe, M., Osada, J., Aratani, Y., Kluckman, K., Reddick, R., Malinow, M.R., & Maeda, N. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1585–1589.
- 7) Akahoshi, N., Kobayashi, C., Ishizaki, Y., Izumi, T., Himi, T., Suematsu, M., & Ishii, I. (2008) *Hum. Mol. Genet.*, 17, 1994–2005.
- 8) Yang, G., Wu, L., Jiang, B., Yang, W., Qi, J., Cao, K., Meng, Q., Mustafa, A.K., Mu, W., Zhang, S., Snyder, S.H., & Wang, R. (2008) *Science*, 322, 587–590.
- 9) Ishii, I., Akahoshi, N., Yamada, H., Nakano, S., Izumi, T., & Suematsu, M. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 26358–26368.
- 10) Bos, E.M., Wang, R., Snijder, P.M., Boersema, M., Damman,

- J., Fu, M., Moser, J., Hillebrands, J.L., Ploeg, R.J., Yang, G., Leuvenink, H.G., & van Goor, H. (2013) *J. Am. Soc. Nephrol.*, 24, 759-770.
- 11) Yamada, H., Akahoshi, N., Kamata, S., Hagiya, Y., Hishiki, T., Nagahata, Y., Matsuura, T., Takano, N., Mori, M., Ishizaki, Y., Izumi, T., Kumagai, Y., Kasahara, T., Suematsu, M., & Ishii, I. (2012) *Free Radic. Biol. Med.*, 52, 1716-1726.
- 12) Mustafa, A.K., Gadalla, M.M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S.K., Barrow, R.K., Yang, G., Wang, R., & Snyder, S.H. (2009) *Sci. Signal.*, 2, ra72.
- 13) Mustafa, A.K., Sikka, G., Gazi, S.K., Steppan, J., Jung, S.M., Bhunia, A.K., Barodka, V.M., Gazi, F.K., Barrow, R.K., Wang, R., Amzel, L.M., Berkowitz, D.E., & Snyder, S.H. (2011) *Circ. Res.*, 109, 1259-1268.
- 14) Sawa, T., Zaki, M. H., Okamoto, T., Akuta, T., Tokutomi, Y., Kim-Mitsuyama, S., Ihara, H., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Fujii, S., Arimoto, H., & Akaike, T. (2007) *Nat. Chem. Biol.*, 3, 727-735.
- 15) Nishida, M., Sawa, T., Kitajima, N., Ono, K., Inoue, H., Ihara, H., Motohashi, H., Yamamoto, M., Suematsu, M., Kurose, H., van der Vliet, A., Freeman, B.A., Shibata, T., Uchida, K., Kumagai, Y., & Akaike, T. (2012) *Nat. Chem. Biol.*, 8, 714-724.

石井 功

(慶應義塾大学薬学部生化学講座)

#### Reconsideration of homocysteinemia

Isao Ishii (Department of Biochemistry, Keio University Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Shibakoen 1-5-30, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan)

### 抑制型レセプター LMIR3/CD300f は脂質セラミドを認識する

#### 1. はじめに

免疫を制御するレセプター（受容体）の中にはペア型免疫レセプターと呼ばれる一群がある。その特徴は、細胞外領域の相同性が極めて高い活性化型と抑制型レセプターが対を形成することである。一般に、活性化型レセプターは細胞内領域にシグナル伝達配列をもたないが、ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activating motif) を細胞内領域にもつアダプター分子 (Fc $\gamma$  や DAP12 など) と会合して、ITAM のリン酸化を介して活性化シグナルを伝える。一方、抑制型レセプターは細胞内領域に ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) をもち、ITIM のリン酸化を介して抑制シグナルを伝える。leukocyte mono-

immunoglobulin-like receptor (LMIR, 別名 CD300/CLM/MAIR) は、細胞外領域に1個の免疫グロブリン様領域をもつペア型免疫レセプターファミリーであり、主にミエロイド系細胞に発現する。マウスの LMIR は少なくとも8種類存在して、11番染色体に連座する。LMIR1/CD300a と LMIR3/CD300f は抑制型レセプターであり、他の LMIR/CD300 のメンバーは活性化型レセプターである<sup>1-6</sup>。今回、われわれは LMIR3/CD300f のリガンドとして細胞外脂質のセラミドを同定し、生体内における役割を明らかにした<sup>7</sup>。その内容を研究の経過とともに概説する。

#### 2. LMIR/CD300 ファミリーのリガンドについて

LMIR/CD300 ファミリーのリガンドは不明であったが、われわれはレトロウイルスを利用した発現クローニング法によりマウス LMIR5/CD300b のリガンドとして TIM1 (T cell immunoglobulin mucin 1) を同定した<sup>8</sup>。最近、マウスの LMIR1/CD300a は PS (phosphatidylserine) に結合すること、ヒトの CD300a と CD300c は PS や PE (phosphatidylethanolamine) に結合することが示された<sup>9-11</sup>。マウスおよびヒトの CD300a は脂質への結合を介してアポトーシス細胞を認識するが、その際マウスのマスト細胞は腹膜炎における炎症を抑制すること<sup>9</sup>、ヒトのマクロファージはアポトーシス細胞の貪食を抑制すること<sup>10</sup>が示された。現在、LMIR/CD300 ファミリーの主なリガンドは脂質である可能性が示唆されている<sup>7,9-12</sup>。

#### 3. LMIR3/CD300f の構造・発現・機能について

マウスの LMIR3/CD300f は細胞外領域に1個の免疫グロブリン様構造をもち、細胞内領域に2個の ITIM と1個の ITSM (immunoreceptor tyrosine-based switch motif, ITIM と同様の機能を有する) をもち抑制型レセプターである。LMIR3 の発現はミエロイド系細胞全般 (マスト細胞・好中球・マクロファージ・樹状細胞など) に認められる。われわれは、LMIR3 の発現レベルが高いマウス骨髄由来マスト細胞 (BMMC: bone marrow-derived mast cell) に注目して、その機能解析を始めた。培養プレートに固定した特異的な抗体により高親和性 IgE レセプター (Fc $\epsilon$ RI) と LMIR3 を共架橋する系を利用した。さまざまな LMIR3 の変異体を作製して解析した結果、LMIR3 シグナルは BMMC の Fc $\epsilon$ RI シグナルを抑制すること、その際、2個の ITIM と1個の ITSM のリン酸化を介してチロシンホスファターゼの SHP1 と SHP2 を動員することが示された<sup>13</sup>。以上より、LMIR3 はそのリガンドとの結合を介してマス