

好熱好酸性アーキア *Sulfolobus tokodaii* 由来 シスタチオニン γ -シンターゼの精製及び性質検討

篠崎 舞・柳谷 昌彦・兼田 翔一郎・工藤 大蔵
遠藤 祐一・田村 隆・倉光 成紀^{a)}・稲垣 賢二

(農芸化学コース)

Purification and Characterization of Cystathionine γ -Synthase from Thermoacidophilic Archaea *Sulfolobus tokodaii*

Mai Shinozaki, Masahiko Yanagitani, Shouichirou Kaneda, Daizou Kudou,
Yuuichi Endou, Takashi Tamura, Seiki Kuramitsu^{a)} and Kenji Inagaki

(Course of Agrochemical Bioscience)

The gene encoding a cystathionine γ -synthase from *Sulfolobus tokodaii* was cloned and expressed in *Escherichia coli* Rosetta-gami (DE3). Cystathionine γ -synthase [EC 2. 5. 1. 48] from *Sulfolobus tokodaii* (stCGS) was purified by heat treatment, DEAE-Toyopearl 650M and Sephacryl S-300 column chromatographies from *E. coli* transformants. stCGS shows optimum activity at pH 7.0, and is stable between pH5.0 and pH9.0. The optimum temperature of stCGS is above 100°C, and the enzyme showed the remaining activity of almost 100% up to 70°C. The K_m and V_{max} with *O*-phospho-L-homoserine as a substrate are 0.82 mM and 2.42 U/mg. To analyze the role of Phe 97 in the active site of stCGS, we constructed F97Y, R99C, and F97Y-R99C mutant enzymes. Although native stCGS has no activity toward L-methionine, F97Y mutant enzyme gained the elimination activity toward L-methionine.

Key words : cystathionine γ -synthase, pyridoxal 5'-phosphate, thermoacidophilic archaea, *Sulfolobus tokodaii*

緒 言

Sulfolobus tokodaii strain7 は大分県別府温泉で採取された超好熱好酸性のアーキア（古細菌）であり、単独で硫化水素を分解する特徴を有している。*Aeropyrum pernix* や *Pyrococcus horikoshii* と比較すると生育限界温度は87°Cとやや低いが、硫化水素を分解する性質や酸性を(pH 2~3)を好む性質からすでに工場の排気ガス対策で産業利用されていることで知られている。生産されるタンパク質や酵素は非常に高い耐熱性を有しており、化学、食品、医薬品など様々な産業分野への応用や代謝経路の解明を行うことによる環境分野への盛んな利用が期待されている。

本菌のゲノム DNA は 1 対の染色体からなっており、その長さは2,694,756 bp, GC 含量は32.8%で、2,826の ORF が確認された¹⁾。今回その中からシスタチオニン γ -シンターゼ (CGS) [EC 2.5.1.48] 遺伝子と思われる ORF が同定された。

含硫アミノ酸代謝は多くの生物に普遍的に存在し、多くの重要な生物反応に必須である。近年、含硫アミノ酸代謝が動脈硬化、アルツハイマーの病理に関与し中間代謝物質である硫化水素がガスメディエーターとして神経

や血管の機能制御に大きな役割を果たすことが明らかにされている。

硫黄代謝経路は細菌や植物では1-メチオニンを合成する硫黄転移経路、哺乳類やカビ類では逆硫黄転移経路が存在し、基質となる1-ホモセリン誘導体は細菌では *O*-アセチル-1-ホモセリン、もしくは *O*-サクシニル-1-ホモセリン、植物では *O*-ホスホ-1-ホモセリンを生理的基質とすることが知られている^{2,3)}。これらメチオニン代謝経路に存在する酵素の多くは CGS と同じくピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) を補酵素とし、その構造や機能が非常に類似していることがこれまでの研究で分かっている。

CGS は1-ホモセリン誘導体と1-システインから1-シスタチオニンの合成を触媒するビタミンB₆酵素である⁴⁾。1-システインの代わりに硫化水素やメタンチオールも基質としてそれぞれ1-ホモシステインや1-メチオニンを生成する。以上のような γ -脱離反応の他にも1-ホモセリン誘導体の γ -脱離反応や γ -脱離反応も触媒す

Received October 1, 2009

a) 大阪大学大学院理学研究科

(Graduate School of Science, Osaka University)

る多機能性酵素である。近年結晶化によるタンパク質の立体構造解析が盛んに行われているが、 γ -ファミリー PLP 酵素群も例外ではなくその構造が次々に明らかになってきており、シスタチオニン γ -リアーゼ (CGL)⁵⁾ や1-メチオニン γ -リアーゼ (MGL)⁶⁾ の構造解析が完了したことによって、 γ -ファミリー酵素群の構造が一通りそろい、様々な知見が得られている。CGS では *Nicotiana tabacum*, *Escherichia coli* 由来 CGS がすでに立体構造解析が完了している^{7,8)}。その構造はサブユニット当たり約400~500アミノ酸からなるホモテトラマー構造を有している。本研究は *S. tokodaii* 由来シスタチオニン γ -シターゼ (stCGS) を大腸菌で大量発現させ、精製及び機能解析を行うことにより、本酵素の基質認識機構、触媒機構及び耐熱機構の解明を行い、 γ -ファミリー PLP 酵素群に新たな知見を提供することを目的としている。

材料と方法

使用菌株、プラスミド

目的タンパク質発現における組換えプラスミドの宿主には *Escherichia coli* Rosetta-gami (DE3) 株 [$\Delta ara-leu7697$, $\Delta lacX74$, $\Delta phoAPvuII$, *phoR*, *araDI39*, *ahpC*, *galE*, *galK*, *rpsL*, F' [*lac*⁺ (*lacI*^q) *pro*], *gor522* :: Tn10(TcR), *trxB* :: kan (DE3)pRARE(Cm^R)] を用いた。プラスミド DNA の精製は組換えプラスミド保有の本菌から行った。プラスミドベクターには pET-11a (Novagen 社) を用いた。

シスタチオニン γ -シターゼ発現プラスミドの構築

大腸菌組換えタンパク質発現用プラスミドベクター pET-11a に stCGS 遺伝子 (Fig. 1) を T7 プロモーター下にあるマルチクロニングサイトに組み込んだ。目的遺伝子断片には、*Bam*H I 及び *Nde* I サイトを付加した。ベクターとインサートをこれらの制限酵素で処理し、ベクター部分の T7-tag を取り除きライゲーションを行った。

形質転換体の培養

E. coli Rosetta-gami (DE3)/pET-stCGS を 3.2L の modified TB 培地に植菌し、37°C, 180 rpm で12時間培養しこれを本培養とした。培養開始より2時間後に IPTG を 1mM となるよう添加し発現誘導を行った。

シスタチオニン γ -シターゼの精製

集菌した菌体ペレットを菌体破碎用緩衝液 (0.1 M トリス塩酸 (pH9.0), 1 mM EDTA, 0.05% 2-メルカプトエタノール, 10 μ M PLP) を湿菌体重の2倍量で懸濁し、150W, 10分間で超音波破碎を行った。この超音波破碎液を無細胞抽出液とした。破碎液を14,000 rpm, 15分間で遠心し菌体碎片を除去した後、70°C, 30分間の熱処理を行い、14,000 rpm, 15分間で遠心分離を行った。沈殿を除去し、得られた上清に対して硫酸アンモニウムを40%

飽和となるように加え、氷上で30分間穏やかに攪拌した。14,000 rpm, 15分間で遠心し、上清と沈殿を分離した。各沈殿を適量の透析用緩衝液 (20 mM トリス塩酸 (pH6.9), 1 mM EDTA, 0.05% 2-メルカプトエタノール, 10 mM PLP) に溶解した。その後、サンプルの100倍量の透析用緩衝液で4°C, 2時間透析を行い、さらに100倍量の同緩衝液で一晩透析を行った。

タンパク質量 5 mg 当たり 1 mL の DEAE-トヨパールのイオン交換樹脂 (東ソー) を使用した。20 mM トリス塩酸 (pH7.0), 1 mM EDTA, 0.01% 2-メルカプトエタノール, 10 μ M PLP で平衡化を行い溶出は20mM, 100mM, 200 mM, 500mM の KCl を用いステップワイズで行った。この DEAE 画分を200 mL のセファクリル S-300 樹脂を充填したカラムを用いて20 mM トリス塩酸 (pH7.0), 0.15 M NaCl の緩衝液を用い 1 mL/1 分間の流速でゲル濾過カラムクロマトグラフィーを行った。

酵素活性測定法 (MBTH 法)

酵素活性測定には、置換反応によるシスタチオニンの合成を見るのではなく、CGS の副反応である β 脱離反応で O-ホスホ-L-セリン (OPS) から生成するケト酸 (ピルビン酸) を MBTH 法により定量した。その理由は、基質や生成物となるシスタチオニンやホモセリン誘導体は非常に高価であり、コストがかかる点と生成物の検出

```

1 - GTGCATGGGTGAGAGAAGGCACTAAAGTTACAACGGAGGATGATGAGAGAGCTGGTCTATACTCCAAATATACAGACT - 90
  M H G L R E G T K V T T E G Y D E E T G A I T T P I Y Q T T
91 - TCTTATATTCCTATAGGTGAGAAATATCGGTATAGCCGAGAAGTAAACCTACTGCTACTTAACTGCCGAAAGATCTGCACT - 180
  S Y I Y P I G E K Y R Y S R E V N P T V L K L A E K I S E L
181 - GAAGAGCGAGAGATGGGATAGCTTTTTCATCTGGAATGGGGCTATTTCGCTACTTTCCTACCTAGCTAAGCTGGGAGCAAAATA - 270
  E E A E M G V A F S S G M G A I S S T L L T L A K P G S K I
271 - CTAATACAGAGATATGTTGGAGGACTACAGATTCCTTACGGACTTCATCGGTAATAGGAGTAGAAGTAGATGTTGAAATCCA - 360
  L I H R D M F G R T Y R F F T D F M R N L G V E V D V A N P
361 - GGAGAAATTTAGAAATGTAAGAGGATGAAAGTAAAGATATGTTTATGTTGAACTATATCAAAATCCATTTAAGAGTTATAGATATT - 450
  G E I L E M V K V K K Y D I V Y V E T I S N P L L R V I D I
451 - CCGACTCTTCAAAAATGTAAGAGGATGAAAGCTTACTAATTAAGGAGCTCTTTTCAACCAATCAACGAGAAACCGTATAGTT - 540
  P A L S K I C K E N G S L L I T D A T F S T P I N Q K P L V
541 - CAAGTGCAGATAGTTTTACATAGTGTCTCAAAAATTTATAGCAGGACATAATGATGTTATGCTGGTTAGGTGGGCTGAAAGAA - 630
  Q G A D I V L H S A S K F I A G H N D V I A G L G A G S K E
631 - TTAAGTAAAGTAGATTAATGAGAAGAACTTTGGGCACATCTTAGATCTCATGCGAGATATCTGTGATAAGAGGATAAAAAGT - 720
  L M T K V D L M R R T L G T S L D P H A A Y L V I R G I K T
721 - CTTAAATAGAAATGATGATTAATCAATGACAGAGAAATAGCCGAATTTTCAAGAACATAAAAATCAAAATCAAGTATATAT - 810
  L K I R M D V I N S N A Q K I A E Y L Q E H N K I K S V Y Y
881 - CCTGAACTAAAGTACATCCAGATACGAACTGCTAGAGAACTAAAGGATATGGTGGTGTAGTACATTTGAAATTAAGAGAGT - 900
  P G L K S H P D Y E T A R R I L K G Y G G V V T F E I K G S
901 - ATGAATGATGACTTAATTAACGAGATCAAAAGTATTTTGCCTGACAGACTTATGGTGGAGTACTTCAAAATTCACATCCT - 990
  M N D A L N L I T R F K V I L P A Q T L G G V N S T I S H P
991 - GCAACTGACTATAGAACTTAACTCCCGAAGGAAAGGAAATCATTGGTATTCGGATTCATGTTAAGACTCTCTGTGGAAATAG - 1080
  A T M T H R T L T P E E R K I I G I S D S M L R L S V G I E
1081 - GATGTTAAGATTTAAGAAGATTTAGATAAAGCACTAACTCACTAATAA - 1134
  D V N D L I E D L D K A L T S L N *

```

Fig. 1 DNA sequence and deduced amino acid sequence of cystathionine γ -synthase gene from *S. tokodaii*

及び定量が困難なためである。その点、*O*-ホスホ-L-セリンは、安価であり、反応産物であるケト酸の定量も容易なので、これを使用した。酵素希釈溶液 (0.1M トリス塩酸 (pH9.0), 1mM EDTA, 0.1g/L DTT, 10 μ M PLP) により適切に希釈させた酵素溶液をあらかじめ70 $^{\circ}$ C, 5分間でプレインキュベートしておいた1mLの基質溶液 (0.1M トリス塩酸 (pH9.0), 10mM OPS, 10 μ M PLP) に添加し70 $^{\circ}$ Cで反応を開始した。10分間反応を行い, 100 μ Lの50% TCAを添加することにより反応を停止した。上記の反応溶液0.8mLを1.6mLの1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0), 0.6mLの0.1% MBTHを混合し, 50 $^{\circ}$ C, 40分間反応させた。MBTHとピルビン酸 (酵素反応生成物) のアミノカルボニル反応により生じたアジンの量を320nmの単色光の吸光度を測定することにより決定した。あらかじめ作製した検量線から求めた分子吸光係数の値を用いて酵素反応により生じたピルビン酸の量を測定した。なお1Uは70 $^{\circ}$ Cで1 μ mol/分間のピルビン酸を生じる酵素量と定義した。

アポ酵素の調製

酵素中の補酵素 PLP を取り除くために PLP フリー緩衝液 (0.1M トリス塩酸 (pH9.0), 1mM EDTA, 0.1g/L DTT) で一晚透析を行った。その後, 酵素溶液に対して終濃度10mMとなるように PLP 酵素阻害剤であるヒドロキシルアミン塩酸塩 (石津製薬) を添加し37 $^{\circ}$ C, 2時間インキュベートした。ヒドロキシルアミン処理後, ヒドロキシルアミン及び PLP を取り除くため再度 PLP フリー緩衝液で一晚透析を行ったものをアポ酵素とした。

脱離活性における基質特異性の検討

O-ホスホ-L-ホモセリンは, L-ホモセリンを基質として大腸菌ホモセリンキナーゼにより酵素的に合成した。通常用いている10mM *O*-ホスホ-L-セリンの代わりに各種化合物を10mMとなるように添加した基質溶液を作製し, 適当な濃度に希釈した酵素溶液を添加し, MBTH 法により活性測定を行った。

変異酵素の作成

変異作成は部位特異的変異導入によって行った。反応液50 μ Lに対し PCR 緩衝液を25 μ L, dNTP 5 μ L, プライマー S, AS を各約125ng, 鋳型 DNA と KOD FX DNA ポリメラーゼ1 μ Lを添加し PCR を行った。反応終了後に鋳型 DNA 消化のために制限酵素 *Dpn* I を添加し37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。この反応液を *E. coli* JM109 に形質転換したのち, プラスミド抽出を行った。

変異導入の確認は DNA シーケンスによって確認した。この変異導入プラスミドで *E. coli* Rosetta-gami (DE3) を形質転換し発現させ, 検討に用いた。

結果と考察

酵素の精製

stCGS 発現用プラスミド pET-stCGS を有する大腸菌

形質転換体の可溶性画分に有効な CGS 活性が確認された。この大腸菌を大量培養, 破碎後, 本酵素の精製を行うことができた。好熱菌由来のタンパク質は高い熱安定性を有しており, それを利用した70 $^{\circ}$ Cという高温での熱処理によって簡便に不純タンパク質を大幅に除くことができた。その後, DEAE-トヨパールイオン交換カラムとセファクリル S-300 ゲル濾過カラムクロマトのステップを踏むことにより精製酵素が得られた。精製酵素12 μ gを用いて, SDS-PAGE を行ったところ, ほぼ単一にまで精製することができた (Fig. 2)。

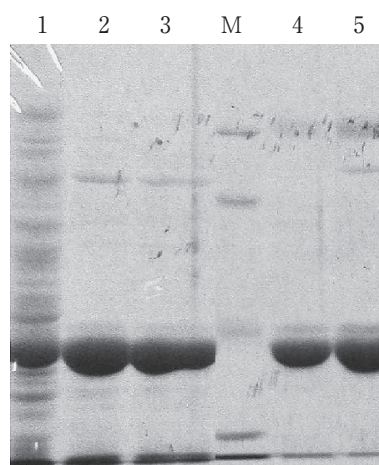


Fig. 2 SDS-PAGE of the cystathionine γ -synthase from *S. tokodaii*.

Lane M, molecular mass marker : phosphorylase b (97.0 kDa), albumin (66.0 kDa), ovalbumin (43.0 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), α -lactalbumin (14.4 kDa); Lane 1, cell free extract; Lane 2, heat treatment (70 $^{\circ}$ C, 30 min); Lane 3, ammonium sulfate fractionation; Lane 4, DEAE-Toyoparl column chromatography; Lane 5, Sephacryl S-300 column chromatography.

stCGS 精製酵素の性質検討

stCGS の最適温度を明らかにするため30~100 $^{\circ}$ Cに設定したヒートブロック中で酵素反応を行った。熱安定性の検討は酵素溶液を30~100 $^{\circ}$ Cで60分間処理し, 酵素活性を測定した。熱安定性は70 $^{\circ}$ Cまでほぼ100%の残存活性を示した。一方, 最適温度においては100 $^{\circ}$ Cで70 $^{\circ}$ Cの約4倍の活性が検出された (Fig. 3 (A) (B))。 *Sulfolobus tokodaii* strain7 は高度好熱菌であることから, その保有する酵素も生育環境を反映した高い熱安定性を持つと考えられる。

最適 pH についてはリン酸カリウム緩衝液やブリン-ロビンソン広域緩衝液の場合は pH7.0の時が最も活性が高く, トリス塩酸緩衝液では pH9.0が最適となり使用する緩衝液によって最適 pH が異なるという結果になった (Fig. 4 A)。大腸菌由来, コリネ菌由来 CGS におい

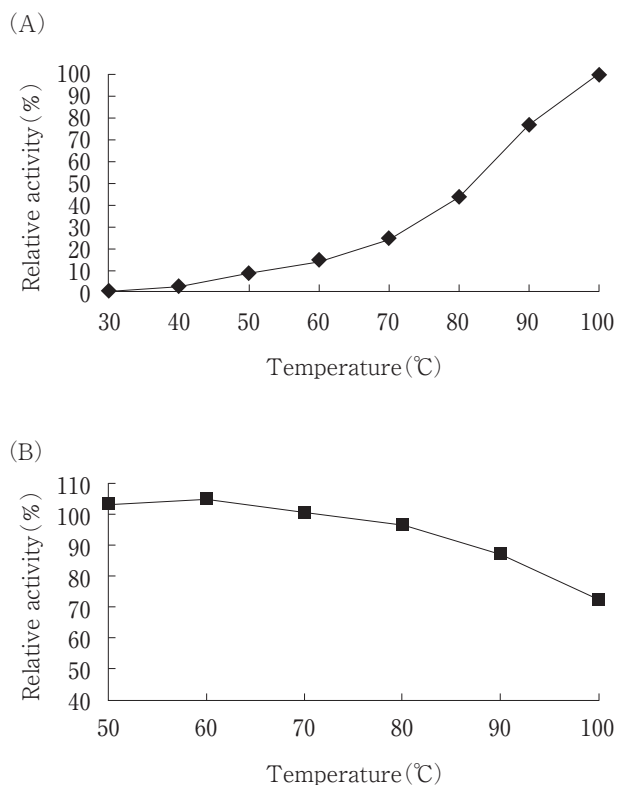


Fig. 3 Effect of temperature on activity and stability of cystathionine γ -synthase from *S. tokodaii*
 (A) Optimum temperature of cystathionine γ -synthase from *S. tokodaii*.
 (B) Thermal stability of cystathionine γ -synthase from *S. tokodaii*.
 —■— The enzyme activity was measured after incubation of the enzyme at various temperatures for 60 min.

でも使用する緩衝液の影響を大きく受けるという報告もある⁹⁾ことから *Sulfolobus tokodaii* 由来 CGS においても同じく影響を受けているものと思われる。pH 安定性は、pH5.0~9.0において残存活性が80%以上と、比較的安定であり、酸性領域で若干の失活が見られる程度であった (Fig. 4 B)。

アポ酵素の PLP 添加によるホロ化実験

ヒドロキシルアミンを用いて調製したアポ酵素にそれぞれ 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M となるよう PLP を添加し酵素活性を測定した。アポ酵素は活性が完全に消失していた。ホロ化実験では、 10^{-6} M PLP 添加時で10.2%, 10^{-5} M PLP 添加時で36.2%の活性回復と PLP を加えていくにつれて活性が回復したことから本酵素が PLP 依存型酵素であることが分かった。

脱離反応における本酵素の基質特異性

本酵素及び γ -ファミリー PLP 酵素のマルチプルアラメントをとって見たところ、他種由来の CGS や MGL の活性中心において高度に保存されている Tyr 残基が本酵素では存在せず、代わりに Phe 残基であること

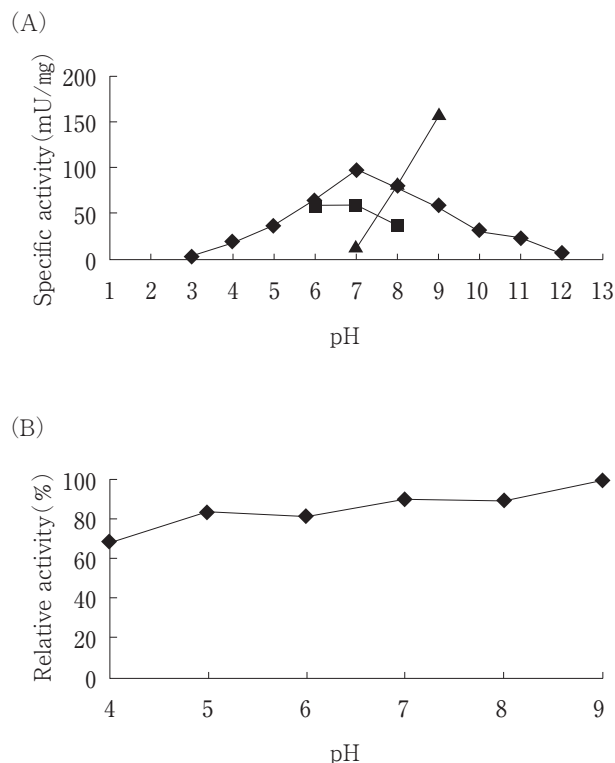


Fig. 4 Effect of pH on activity and stability of cystathionine γ -synthase from *S. tokodaii*
 (A) Optimum pH of cystathionine γ -synthase from *S. tokodaii*
 Enzyme activity was measured in the following buffer. —◆—, Britton-Robinson buffer; —■—, potassium phosphate buffer; —▲—, Tris-HCl buffer.
 (B) pH stability of cystathionine γ -synthase from *S. tokodaii*

が分かった。この Tyr 残基は CGS や MGL の脱離反応に重要な機能を持つとされている⁶⁾。そこで変異酵素 F97Y を作成し、基質特異性の比較検討を行った (Table 1)。野生型 CGS は、O-サクシニル-L-ホモセリンより O-ホスホ-L-ホモセリンを基質とした時に高い γ 脱離活性が確認でき、細菌型でなく植物型の基質特異性を示した。 β -脱離基質は O-ホスホ-L-セリン, L-システイン, L-ホモシステイン, β -クロロ-L-アラニンなどが反応した。L-システインの反応溶液からは硫化水素と思われる腐卵臭が確認された。その他にも γ -脱離反応の反応中間体と思われる L-ビニルグリシンも予想通り高い反応効率を示した。変異酵素 F97Y では、基質に対する厳格性が低下し、野生型 CGS では全く反応しない L-メチオニンなどに対して幅広い γ -脱離活性を示した。変異型に新たに L-メチオニンの γ -脱離活性が見られたことは大変興味深い。F97Y の基質特異性の厳格化が低下したことから、本酵素の97番目のアミノ酸は基質の認識機構に関わっていることが示唆された。また、CGS と MGL は構造と触媒する反応が非常によく似ている。活性部位に関

Table 1 Substrate specificity of cystathionine γ -synthase and F97Y mutant enzyme from *S. tokodaii*

Substrate	Wild Type Enzyme		F97Y mutant enzyme		
	Specific activity (mU/mg)	Relative activity (%)	Specific activity (mU/mg)	Relative activity (%)	
<i>O</i> -phospho-l-homoserine	2305	100	186	100	} γ -elimination
<i>O</i> -succinyl-l-homoserine	807	35	280	150.6	
l-homoserine	0	0	38	20.2	
l-methionine	0	0	68	36.4	
l-ethionine	0	0	12	6.2	
l-methionine sulfone	125	5.4	130	70.1	
l-methionine sulfoxide	4	0.2	11	5.7	
dl-homocysteine	12	0.5	368	198.1	
l-vinylglycine	15562	675	691	372.1	
<i>O</i> -phospho-l-serine	282	12.3	152	81.9	
<i>O</i> -acetyl-serine	0	0	0	0	
l-serine	0	0	12	6.2	
l-cysteine	208	9	133	71.8	
S-methyl-l-cysteine	37	1.6	20	10.7	
S-ethyl-l-cysteine	66	2.9	30	16.4	
β -chloro-l-alanine	2009	87.1	1238	666.7	

して、本酵素のF97Yの変異に加えて、99番目の Arg を Cys に、活性部位の構造を MGL 型に変換した変異酵素を作成した。その結果 F97Y-R99C 変異酵素で l-メチオニンに対して更なる活性上昇が見られた点が興味深い。活性部位である97番目の Phe と99番目 Arg のアミノ酸を含む領域が本酵素で基質特異性に深く関わっていると考えられる。

今後これらの変異酵素の機能解析、基質特異性の詳細な比較、X線結晶構造解析による構造決定を行うことにより CGS だけではなく γ -ファミリー PLP 酵素の分子進化の道筋や基質認識機構の解明に役立てたいと考えている。

要 約

好熱好酸性アーキア *Sulfolobus tokodaii* 由来シスタチオン γ -シンターゼ (stCGS) 遺伝子を pET-11a に組み込み pET-stCGS を構築した。このベクターで *E. coli* Rosetta-gami (DE3) を形質転換し、本遺伝子を発現させ、精製及び性質検討を行った。大腸菌で発現したシスタチオン γ -シンターゼの活性が無細胞抽出液で確認できた。*S. tokodaii* シスタチオン γ -シンターゼを70℃熱処理 DEAE-トヨパールイオン交換カラム等により単一精製した。精製酵素の最適温度は100℃以上であり、熱安定性は60分間処理で70℃までほぼ100%の残存活性を示した。また、最適pHについてはリン酸緩衝液やブリティン-ロビンソン広域緩衝液の場合は pH7.0の時に最も活性が高く、トリス塩酸緩衝液の場合は pH9.0が最適であった。pH 安定性については pH5.0~9.0において安定であった。*O*-ホスホ-l-ホモセリンに対する K_m ,

V_{max} は、それぞれ0.82mM, 2.42U/mg であった。アポ酵素のホロ化実験により、本酵素活性が PLP に依存していることが明らかとなった。更に本酵素の脱離反応での基質特異性の検討を行った。変異酵素を用いた実験により、stCGS の基質特異性には、活性中心に存在する Phe97 を含む領域が深く関わっていることが示唆された。

参 考 文 献

- 1) Kawarabayashi Y., Y. Hino, H. Horikawa, and H. Kikuchi: Complete genome sequence of an aerobic thermophilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain7. *DNA Res.*, **8**, 123-40 (2001)
- 2) Holbrook E. L., R. C. Greene, and J. H. Krueger: Purification and properties of cystathionine γ -synthase from overproducing strains of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **29**, 435-442 (1990)
- 3) Ravel S., B. Gakiere, D. Job, and R. Douce: Cystathionine γ -synthase from *Arabidopsis thaliana*: purification and biochemical characterization of the recombinant enzyme overexpressed in *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **331**, 639-648 (1998)
- 4) Ravel S., M. Droux, and R. Douce: Methionine biosynthesis in higher plants. Purification and characterization of cystathionine γ -synthase from spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.*, **316**, 572-84 (1995)
- 5) Messerschmidt A., M. Worbs, C. Steegborn, M. C. Wahl, R. Huber, B. Laber, and T. Clausen: Determinants of enzymatic specificity in the Cys-Met-metabolism PLP-dependent enzymes family: crystal structure of cystathionine γ -lyase from yeast and intrafamilial structure comparison. *Biol. Chem.*, **384**, 373-386 (2003)
- 6) Kudou D., S. Misaki, M. Yamashita, T. Tamura, T. Takamura, T. Yoshioka, S. Yagi, M. R. Hoffman, A. Takimoto, and K. Inagaki: Structure of the Antitumour

- Enzyme l-Methionine γ -Lyase from *Pseudomonas putida* at 1.8 Å Resolution. *J. Biochem.*, **141**, 535-544 (2007)
- 7) Steegborn C., A. Messerschmidt, B. Laber, W. Streber, R. Huber, and T. Clausen : The crystal structure of cystathionine γ -synthase from *Nicotiana tabacum* reveals its substrate and reaction specificity. *J. Mol. Biol.*, **290**, 983-996 (1999)
- 8) Clausen T., R. Huber, L. Prade, M. C. Wahl, and A. Messerschmidt : Crystal structure of *Escherichia coli* cystathionine γ -synthase at 1.5 Å resolution. *EMBO J.*, **17**, 6827-6838 (1998)
- 9) Ryuichi M. and S. Isamu : Regulation of Aspartate Family Amino Acid Biosynthesis in *Brevibacterium flavum* V. Properties of Homoserine Kinase. *J. Biochem.*, **71**, 219-226 (1972)