

論文要旨

酸化によるゲノム損傷を防御する 大腸菌 MutT およびヒト MTH1 の構造生物学的研究

中村 照也

生体内の活性酸素により生じる 8-オキシグアニン (8-oxoG) は、シトシンのみならずアデニンとも塩基対を形成するため、内在性の変異原となる。DNA 中の 8-oxoG は、グアニン塩基の直接酸化のみならず、dGTP の酸化体である 8-oxo-dGTP の DNA への取り込みにより生じる。本研究の対象である大腸菌 MutT とそのヒトホモログ hMTH1 は、8-oxo-dGTP を 8-oxo-dGMP へと加水分解することで、変異原 8-oxoG の DNA への取り込みを防御し、突然変異を抑制している。MutT と hMTH1 は、加水分解酵素のファミリーである Nudix ファミリーに属するが、両者の基質特異性は大きく異なる。MutT は、8-oxoG に極めて高い基質特異性を持ち、8-oxo-dGTP や 8-oxo-dGDP を効率良く加水分解する。一方、hMTH1 は、8-oxo-dGTP、2-oxo-dATP や 8-oxo-dATP など、様々な酸化損傷塩基を持つヌクレオシド三リン酸を加水分解するという塩基に対する幅広い基質特異性を有する。これまでに MutT と hMTH1 の立体構造が NMR により決定されているが、それぞれの基質認識機構は明らかにされていない。本研究では、MutT と hMTH1 の基質特異性発現機構を解明するため、それぞれの単独やリガンド結合型の X 線結晶構造解析を行った。また、加水分解酵素の反応の可視化については、これまで数多くの研究が行われながら、未だ明確に示された例がない。そこで、動的蛋白質結晶学の手法を用い、MutT-8-oxo-dGTP 結晶内での加水分解反応過程の可視化を行った。

初めに、大腸菌 MutT のアポ体、ホロ体、反応生成物である 8-oxo-dGMP 複合体、そして 8-oxo-dGMP-金属イオン複合体の X 線結晶構造解析を行った。アポ体では Open 型であった基質結合部位周辺のループ領域が、8-oxo-dGMP 複合体では、8-oxo-dGMP を取り囲むように Closed 型へと構造変化しており、MutT は、リガンド結合による大きな構造変化を介して、8-oxoG ヌクレオチドの特徴である N7 位の水素、O8、有利な *syn*

コンフォメーションを認識し、その高い基質特異性を獲得していることが明らかになった。

次に、hMTH1 の幅広い基質特異性発現機構の解明を目的に、hMTH1 と複数のリガンド (8-oxo-dGTP, 2-oxo-dATP, 8-oxo-dATP, 8-oxo-dGMP) との複合体構造を決定した。いずれの酸化損傷ヌクレオチドも基質結合ポケットに結合していたが、hMTH1 によるそれぞれの認識様式は予想外のものであった。8-oxo-dGT(M)P と 2-oxo-dATP は、両塩基の水素結合の供与部位と受容部位が全く異なる位置にあるにもかかわらず、よく似た位置によく似たコンフォメーションで結合していた。これは、hMTH1 が、隣り合った Asp119, Asp120 のプロトネーション状態を交換することにより、8-oxoG, 2-oxoA とそれぞれ適切な水素結合を形成して、変異原として重要な 2 つの酸化損傷塩基を認識することを示し、酵素における全く新しい幅広い基質特異性発現機構である。さらに、8-oxo-dATP 複合体では、水を介して 8-oxoA と 2 つの Asp 残基が相互作用しており、hMTH1 の 8-oxo-dATP の認識においても、これら Asp 残基のプロトネーション状態の変化が反映されていると考えられる。

最後に、低温トラップ法を用いた動的蛋白質結晶学により、MutT の 8-oxo-dGTP の加水分解反応を時間分割で追跡した。著者らは、MutT-8-oxo-dGTP (酵素-基質複合体) 結晶を調製し、MnCl₂ 溶液を用いた反応開始、100 K 下での反応停止、そしてその過程において結晶が崩壊しないという結晶内反応が追跡可能な結晶場を見出した。MnCl₂ 溶液の濃度や反応時間を系統的に変えることにより、時間分割での反応中間体の構造を決定し、それらの電子密度の変化から、Mn²⁺ の配位に伴い、求核攻撃を行う水分子が活性化され、8-oxo-dGTP の P β 原子へ求核攻撃する段階を捕らえ、8-oxo-dGTP 加水分解反応過程の可視化に成功した。

以上、本研究では、MutT と hMTH1 による酸化損傷ヌクレオチド浄化機構を原子レベルで解明した。酸化損傷ヌクレオチド浄化機構の研究は、1992 年の Maki らによる MutT の機能発見に始まり、*in vitro* から個体を用いた *in vivo* レベルまで解明された研究領域である。本研究により、その研究領域を原子レベルに展開することに貢献したといえる。