

酸化損傷ヌクレオチド分解酵素 MTH1 による pH 依存的基質認識に関する構造生物学的研究

分子機能薬学専攻 分子機能薬学講座 機能分子構造解析学分野 古賀 由香里

通常の生命活動によって生じる活性酸素は、DNA 前駆体であるヌクレオチドを酸化し、これら酸化損傷ヌクレオチドが DNA に取り込まれると、突然変異を引き起こす。ヒトでは human MutT homolog-1 (hMTH1) が種々の酸化損傷ヌクレオシド三リン酸を一リン酸へと加水分解することで、突然変異の防御系として機能している。

これまでに、我々は hMTH1 と酸化損傷ヌクレオシド三リン酸である 8-oxo-dGTP および 2-oxo-dATP との複合体 (以下それぞれ hMTH1-8-oxo-dGTP, hMTH1-2-oxo-dATP とする) の結晶構造を決定し、「hMTH1 は基質の塩基部位と水素結合を形成する 2 つの隣り合うアスパラギン酸残基 (Asp119, Asp120) のプロトネーション部位を変えることで、異なる基質を同程度に認識する」という酵素による新規の幅広い基質認識機構を提唱した。しかし、これらの結晶は pH 4.0 という生理的条件よりもかなり低い pH で得られたものであるため、hMTH1 の基質認識機構について正確な議論を行うには中性付近で得られる結晶の構造を明らかにするという重要な課題が残っていた。

本研究では、まず、中性領域で得られた hMTH1-8-oxo-dGTP と hMTH1-2-oxo-dATP 結晶の構造解析を行った。本研究室でこれまで用いられてきた野生型 hMTH1 では中性領域で結晶は得られておらず、また、大腸菌から調製した野生型 hMTH1 は、N 末残基が不均一であることを見出したので、変異を導入した N 末変異型 hMTH1 (G2K) を用いることで、N 末残基が均一となる結晶化試料を得た。この N 末変異型について結晶化条件のスクリーニングを行い、Seeding 法を用いることにより、中性領域で hMTH1-8-oxo-dGTP および hMTH1-2-oxo-dATP の高分解能の結晶を得ることに成功した。これらの X 線結晶構造解析の結果、中性付近でも pH 4.0 での結晶化条件で観測されたよう

に、8-oxo-dGTP を認識するときは Asp119 がプロトネーションし、2-oxo-dATP を認識するときは Asp120 がプロトネーションしていることが明らかになり、生理的条件においても、これまでの我々の新しい幅広い基質認識機構の提案を支持する結果を得た。

次に、hMTH1 の基質認識と pH の関係性を明らかにするため、pH 5.6~pH 10.1 で結晶化した hMTH1-8-oxo-dGTP および hMTH1-2-oxo-dATP の構造を 17 種類決定し、hMTH1 の基質結合領域における pH 依存的な電子密度の変化を調べた。hMTH1-8-oxo-dGTP および hMTH1-2-oxo-dATP 結晶の非対称単位中に hMTH1 分子は 2 分子存在するが (分子 A, B と呼ぶ)、hMTH1-8-oxo-dGTP の分子 A では pH 8.2 までは、基質の電子密度は明瞭であり、上述した基質認識様式で基質の結合が見られたが、pH 8.8 以上では、基質の電子密度が見られず、Asp119 との結合距離にナトリウムイオンと水分子が確認された。また、分子 B については、pH 7.0 までは上述した基質認識様式で基質の結合が見られたが、pH 8.2 では基質が反転、移動し、Asp119 と反転した 8-oxoG 塩基の N1-H およびナトリウムイオンとの間に相互作用が確認された。両分子とも pH の上昇に伴って、hMTH1 の Asp119 側鎖が脱プロトネーションを起こした結果、このような基質認識に変化が見られたと考えられる。また、塩とその濃度の異なる結晶化条件での結晶構造から、イオン強度も Asp119 の脱プロトネーションに影響することが示唆された。一方、hMTH1-2-oxo-dATP では、pH 8.2 までは上述した基質認識様式で基質の結合が見られたが、分子 A では pH 8.8 以上で pH の上昇に伴い、基質の電子密度の割合が減少し、Asp120 との水素結合距離に水分子の電子密度の割合が増加する様子が確認でき、分子 B では pH 9.3 以上で、Asp120 との水素結合距離に水分子が確認されたため、2-oxo-dATP 認識の際、Asp120 は pH 8.2~9.3 付近で脱プロトネーションを受けることが明らかになった。

以上の結果から、生理的条件下、hMTH1 は、通常と比べて非常に高い pK_a をもつ 2 つの隣り合うアスパラギン酸残基のプロトネーション部位を交換することで、2 つの異なる基質を認識するという新規の幅広い基質特異性発現機構の存在が示された。