

大腸菌 MutT による 8-oxo-dGTP 加水分解反応の時分割 X 線結晶構造解析 Time-resolved X-ray crystallography of 8-oxo-dGTP hydrolysis by *E. coli* MutT

中村照也^{1,2*}, 山縣ゆり子^{1,3}

¹ 熊本大学大学院生命科学研究部 (薬学系), 〒862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1

² 熊本大学大学院先端機構, 〒862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1

³ 尚綱大学・尚綱大学短期大学部, 〒862-8678 熊本市中央区九品寺 2-6-78

Teruya NAKAMURA^{1,2*} and Yuriko YAMAGATA^{1,3}

¹ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University,
5-1 Oehonmachi, Chuo-ku, Kumamoto, 862-0973, Japan

² Priority Organization for Innovation and Excellence, Kumamoto University,
5-1 Oehonmachi, Chuo-ku, Kumamoto, 862-0973, Japan

³ Shokei University and Shokei University Junior College,
2-6-78, Kuhonji, Chuo-ku, Kumamoto, 862-8678, Japan

1 はじめに

8-オキソグアニン (8-oxoG) は、活性酸素種により生じるグアニンの酸化体であり、シトシンと塩基対を形成するだけでなく、アデニンともミス塩基対を形成するため、突然変異の原因となる。8-oxoG は、1) DNA 中のグアニン塩基の直接酸化と、2) dGTP の酸化体である 8-oxo-dGTP が DNA 中に取り込まれることによって生じる。大腸菌 MutT は、8-oxo-dGTP を高い親和性で認識して加水分解することで突然変異を抑制する酵素である [1, 2]。MutT は Mn²⁺ もしくは Mg²⁺ イオン存在下、8-oxo-dGTP を 8-oxo-dGMP へと加水分解する [3]。これまでに我々は、Mn²⁺ イオンを用いた時分割 X 線結晶構造解析により、MutT の 8-oxo-dGTP 加水分解反応過程を可視化した。その結果、MutT 活性部位への 3 つの Mn²⁺ イオンの結合とともに、水分子が移動して求核攻撃するという反応機構を提案することができたので、もう一つの 2 価金属イオンである Mg²⁺ イオンによる反応機構を理解するため、Mg²⁺ イオンを用いた時分割 X 線結晶構造解析を行った [4]。

2 実験

大腸菌 MutT は、大腸菌発現系を用いて発現させ、陰イオン交換カラムとゲルろ過カラムを用いて精製した。MutT-8-oxo-dGTP (基質) 複合体の結晶は、0.2 M potassium sodium tartrate, 0.1 M sodium citrate (pH 5.8), 2 M ammonium sulfate の結晶化溶液を用いることで調製した。結晶内の 8-oxo-dGTP 加水分解反応は、0.2 M potassium sodium tartrate, 0.1 M Tris HCl (pH 6.8), 2 M ammonium sulfate, MgCl₂ の反応溶液を用いることで開始した。30 分と 2.5 時間反応させた結晶を液体窒素で凍結させることで反応を停止した。X 線回折実験は BL-1A と BL-17A で行った。構造の精密化はプログラム PHENIX と COOT を用いて行い、MutT-8-oxo-dGTP-3Mg²⁺ の構造 (反応 30 分) と MutT-8-oxo-dGMP-Mg²⁺ の構造 (反応 2.5 時間) を

それぞれ決定した。MutT-8-oxo-dGTP-3Mg²⁺ の活性部位には、3 つの Mg²⁺ が結合し、基質 8-oxo-dGTP の占有度を 0.7、生成物 8-oxo-dGMP の占有度を 0.3 として構造を精密化した (1.70 Å resolution, $R_{\text{work}}/R_{\text{free}} = 0.160/0.204$)。MutT-8-oxo-dGMP-Mg²⁺ の活性部位には、生成物 8-oxo-dGMP が結合していた (1.58 Å resolution, $R_{\text{work}}/R_{\text{free}} = 0.167/0.189$)。

3 結果および考察

Mg²⁺ イオンを用いた時分割 X 線結晶構造解析により、MutT-8-oxo-dGTP-3Mg²⁺ と MutT-8-oxo-dGMP-Mg²⁺ の 2 つの状態の構造を決定した。これにより、Mg²⁺ イオンも MutT 活性部位に 3 つ結合することにより 8-oxo-dGTP の加水分解反応を触媒することが明らかになった。また、今回決定した MutT-8-oxo-dGTP-3Mg²⁺ を Mn²⁺ イオンを用いた中間体構造 MutT-8-oxo-dGTP-3Mn²⁺ と比較したところ、両者の活性部位の構造は同様であった (図 1)。

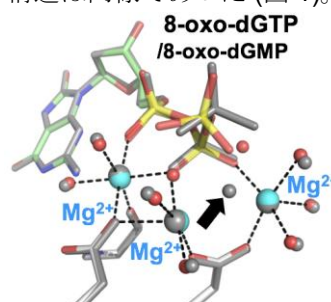


図 1 MutT-8-oxo-dGTP-3Mg²⁺ (色付き) と MutT-8-oxo-dGTP-3Mn²⁺ (灰色) の構造の重ね合わせ。矢印は MutT-8-oxo-dGTP-3Mn²⁺ で見られた求核攻撃を行うと考えられる水分子。

MutT-8-oxo-dGTP-3Mg²⁺ では、MutT-8-oxo-dGTP-3Mn²⁺ で見られた求核攻撃を行うと考えられる水分子 (図 1 の矢印) を高い占有度で観察することはできなかった。しかしその位置に $F_o - F_c$ map のピ

ーク (図 2 の緑のメッシュ) が見られたことから、MutT-8-oxo-dGTP-3Mg²⁺においては、低い占有度で求核攻撃を行う水分子が結合していることが示唆された。

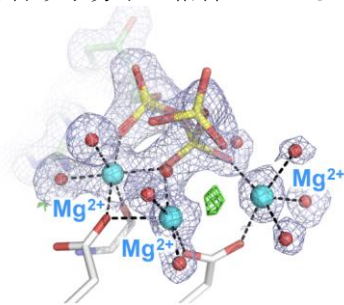


図 2 MutT-8-oxo-dGTP-3Mg²⁺の構造と電子密度。
2F_o-F_c map (薄い紫、1σ)、F_o-F_c map (緑、3σ)。

また、反応後の MutT-8-oxo-dGMP-Mg²⁺の活性部位の構造も MutT-8-oxo-dGMP-Mn²⁺のものと同様であった (図 3)。以上のことから、Mg²⁺イオンは、Mn²⁺イオンと同様の機構で、MutT の 8-oxo-dGTP 加水分解反応を触媒することが示唆された[4]。

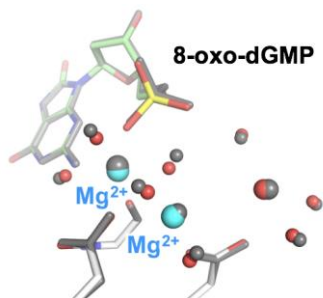


図 3 MutT-8-oxo-dGMP-Mg²⁺ (色付き) と MutT-8-oxo-dGMP-Mn²⁺ (灰色) の構造の重ね合わせ。

謝辞

本研究の X 線回折実験にご協力いただきましたビームラインスタッフの皆様はこの場を借りてお礼申し上げます。

参考文献

- [1] H. Maki & M. Sekiguchi, *Nature* **355**, 273-275 (1992).
- [2] T. Nakamura *et al.*, *J. Biol. Chem.* **285**, 444-452 (2010).
- [3] D.N. Frick *et al.*, *J. Biol. Chem.* **269**, 1794-1803 (1994).
- [4] T. Nakamura & Y. Yamagata, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **119**, e2203118119 (2022).

*tnaka@gpo.kumamoto-u.ac.jp