

ヒト MTH1 の幅広い基質認識における pH 依存性 pH-dependence in broad substrate recognition of human MTH1

中村照也^{1,2*}, 小川由香里^{1,3}, 山縣ゆり子^{1,4}

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日本医療科学大学, 〒350-0435 埼玉県入間郡毛呂山町下川原 1276

⁴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*}, Yukari KOGA-OGAWA^{1,3}, and Yuriko YAMAGATA^{1,4}

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

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

³Faculty of Health Sciences, Nihon Institute of Medical Science, 1276 Shimogawara,
Moroyamamachi, Iruma-gun, Saitama, 350-0435, Japan

⁴Shokei University and Shokei University Junior College,
2-6-78, Kuhonji, Chuo-ku, Kumamoto, 862-8678, Japan

1 はじめに

遺伝情報を担う DNA およびその前駆体であるデオキシリボヌクレオチド (dNTP) は、活性酸素種により恒常的に酸化損傷を受ける。dGTP の酸化体である 8-oxo-dGTP が DNA ポリメラーゼによって複製中の DNA に取り込まれるとトランスバージョン変異の原因となる。本研究対象のヒト MutT homolog 1 (MTH1) は、大腸菌 MutT のホモログとして同定された酵素である[1]。MutT と MTH1 は 8-oxo-dGTP を 8-oxo-dGMP へと加水分解することで、突然変異を抑制する。さらに MTH1 は、MutT とは異なり、8-oxo-dGTP のみならず dATP の酸化体である 2-oxo-dATP に対する加水分解活性も有しており、幅広い基質特異性で酸化ヌクレオチドを分解する。また一方で、がん細胞で高発現している MTH1 の働きが細胞死を抑制することが報告されていることから、MTH1 は新規抗がん剤のターゲットとしても注目されている[2, 3]。

これまでに我々は、MTH1 の活性部位のプロトン化状態を議論するため、中性 pH での MTH1 の結晶化条件を確立し[4, 5]、8-oxo-dGTP および 2-oxo-dATP 複合体の高分解能 X 線結晶構造解析と反応測度論解析を行った。その結果、「MTH1 は活性部位の Asp119 と Asp120 のプロトン化状態を変えることで、8-oxo-dGTP と 2-oxo-dATP という異なった基質を同程度の親和性で認識する」という MTH1 の幅広い基質特異性の発現機構を提案した [6, 7]。

これらの成果に続いて、基質認識における Asp119 と Asp120 のプロトン化状態を議論するために、pH 7.7 から 9.1 での MTH1 の 8-oxo-dGTP 複合体の構造解析を行った。その結果、pH の上昇とともに MTH1

の活性部位における 8-oxo-dGTP の電子密度が観察されなくなった。この結果から、8-oxo-dGTP 認識の際には、Asp119 が pH 8.0 から 9.1 で脱プロトン化することが示されたため、次にもう一つの基質である 2-oxo-dATP 認識の pH 依存性を X 線結晶構造解析により調べた [8]。

2 実験

MTH1 と 2-oxo-dATP 複合体の結晶を pH 7.7, 8.0, 8.6, 9.1, 9.7 の条件で調製した。X 線回折実験は BL-17A、AR-NE3A、AR-NW12A 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、1.05 から 1.20 Å 分解能で構造を決定した。Asp120 のプロトン化状態をさらに議論するため、野生型 MTH1 と同等の 2-oxo-dATP 加水分解活性を持つ MTH1(D120N) 変異体についても pH 7.7 と pH 9.7 の条件で結晶を調製し、1.20 Å と 1.08 Å 分解能でそれぞれの構造を決定した。

3 結果および考察

本結晶系の非対称単位には MTH1 が 2 分子存在する (MolA と MolB と呼ぶ)。MolA では、pH 7.7 において基質結合部位に明瞭な 2-oxo-dATP の電子密度が観察されたが、pH の上昇とともに 2-oxo-dATP 由来の電子密度は減弱し、pH 9.7 では結晶化試薬に含まれるグリセロールと Na⁺に置き換わっていた (図 1)。これは、pH 7.7 ではプロトン化している Asp120 が 2-oxo-dATP の O2 原子と水素結合を形成するが、pH の上昇に伴って、Asp120 の脱プロトン化が起こり、pH 9.7 では 2-oxo-dATP と水素結合を形成できなくなったことを示している (図 2)。MolB においても同様

の結果が得られたため、2-oxo-dATP の認識においては、Asp120はpH 8.6から9.7で脱プロトン化することが示された(図2)。

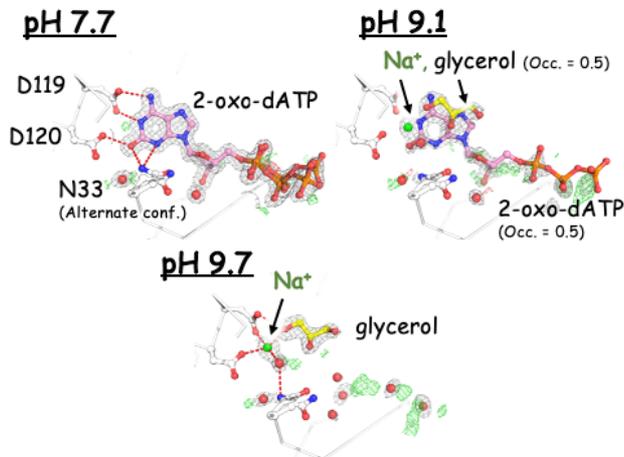


図1 pHによる基質結合部位の電子密度の変化

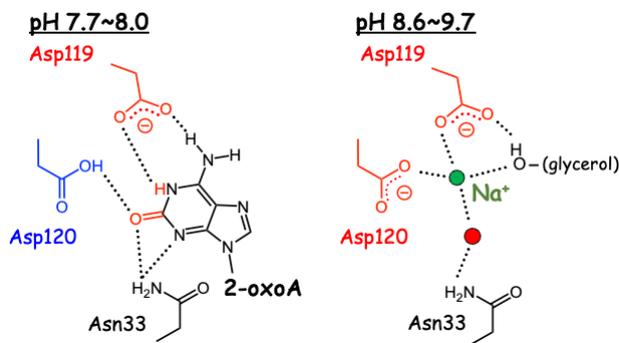


図2 pHによる基質認識様式の変化

また、D120N変異体においては、Asp120のプロトン化したO δ -Hの代わりに、Asn120のN δ -Hにより、2-oxo-dATPのO2と水素結合を形成しており、pH 7.7と9.7の両条件において、2-oxo-dATPの明瞭な電子密度が観察された(図3)。この結果から、野生型で見られたpHの上昇に伴う基質結合能の減弱は(図1)、ヌクレオチド自体のプロトン化状態の変化ではなく、Asp120のプロトン化状態の変化(図2)によって引き起こされたと考えられる。

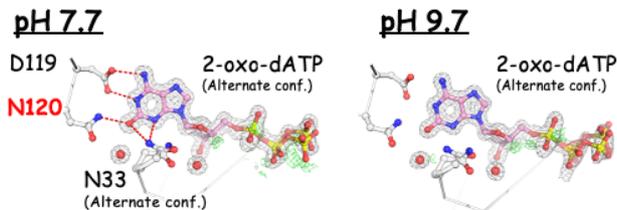


図3 D120N変異体の基質結合部位の電子密度

本実験により、MTH1は高いpK_aを示すAsp119とAsp120のプロトン化状態を変えることで、8-oxo-dGTPと2-oxo-dATPを同程度の親和性で認識することを明らかにした[8]。

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がこの場を借りてお礼申し上げます。

参考文献

- [1] JY. Mo *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11021 (1992).
- [2] H. Gad *et al.*, *Nature* **508**, 215 (2014)
- [3] KVM. Huber *et al.*, *Nature* **508**, 222 (2014)
- [4] Y. Koga *et al.*, *Acta Cryst.* **F69**, 45 (2013)
- [5] T. Nakamura *et al.*, *Acta Cryst.* **F62**, 1283 (2006)
- [6] S. Waz, T. Nakamura# (#co-first author) *et al.*, *J. Biol. Chem.* **292**, 2785 (2017)
- [7] T. Nakamura *et al.*, *Int. J. Microgravity Sci. Appl.* **36**, 360103 (2019)
- [8] T. Nakamura#, Y. Koga-Ogawa# *et al.*, *FEBS Lett.* **597**, 1770 (2023)

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