

BL-5A, AR-NE3A/2021G031, 2017G167

X線と中性子を用いた  
ヒト酸化ヌクレオチド加水分解酵素 MTH1 の構造解析  
Joint X-ray/neutron structural analysis  
of human oxidized nucleotide hydrolase MTH1

藤宮佳菜<sup>1</sup>, 平野優<sup>2,3</sup>, 玉田太郎<sup>2,3</sup>, 中村照也<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>熊本大学薬学部, 〒862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1

<sup>2</sup>量子科学技術研究開発機構量子生命科学研究所, 〒263-8555 千葉市稲毛区穴川  
4-9-1

<sup>3</sup>千葉大学量子生命構造創薬センター, 〒263-8522 千葉市稲毛区弥生町 1-33

<sup>4</sup>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

Kana FUJIMIYA<sup>1</sup>, Yu HIRANO<sup>2,3</sup>, Taro TAMADA<sup>2,3</sup>, and Teruya NAKAMURA<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Kumamoto University,

5-1 Oehonmachi, Chuo-ku, Kumamoto, 862-0973, Japan

<sup>2</sup>Institute for Quantum Life Science, National Institutes for Quantum Science and  
Technology, 4-9-1 Anagawa, Inage-ku, Chiba, 263-8555, Japan

<sup>3</sup>Center of Quantum Life Science for Structural Therapeutics, Chiba University, 1-33  
Yayoichou, Inage-ku, Chiba, 263-8522, Japan

<sup>4</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University,  
5-1 Oehonmachi, Chuo-ku, Kumamoto, 862-0973, Japan

## 1 はじめに

生体内で生じる活性酸素種は、遺伝情報物質の DNA およびその前駆体のヌクレオチドを酸化する。8-oxo-dGTP は、dGTP の酸化体であり、DNA ポリメラーゼによって DNA 中に取り込まれるとがんや老化の原因となる。本研究対象のヒト MutT homolog 1 (MTH1) は、8-oxo-dGTP に加え、dATP の酸化体である 2-oxo-dATP などに対する加水分解活性を有しており、幅広い基質特異性で細胞内の酸化ヌクレオチドを分解する。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。

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、MTH1 の高分解能 X 線構造解析に加え、基質結合の pH 依存性を調べた[1-3]。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。本研究では、MTH1 のプロトン化を介した基質認識機構を実験的に実証するため、X 線と中性子を用いた MTH1 の構造解析を行った[4]。

## 2 実験

X 線と中性子を用いた構造解析には大型結晶の調製が必要不可欠となる。MTH1-8-oxo-dGTP 複合体および MTH1-2-oxo-dATP 複合体の大型結晶はこれまでの結晶化条件を基にしたマクロシーディング法で行い、最終的に両結晶とも 1.7 x 1.0 x 0.5 mm<sup>3</sup> 程度の大きさまで成長させることに成功した。本結晶を 1 ヶ月ほど重水素置換した後、中性子回折実験を行った。ドイツ FRM II の BIODIFF にて 1.70 Å 分解能で中性子回折データを収集した 8-oxo-dGTP 複合体結晶を用いて AR-NE3A で X 線回折実験を行い、1.40 Å 分解能の X 線回折データを収集した。また、J-PARC MLF の iBIX にて 2.10 Å 分解能で中性子回折データを収集した 2-oxo-dATP 複合体結晶を用いて BL-5A で X 線回折実験を行い、1.40 Å 分解能の X 線回折データを収集した (表 1)。

表 1 X線回折データ収集の統計値

	8-oxo-dGTP複合体	2-oxo-dATP複合体
<b>Data collection</b>		
Wavelength (Å)	1.0	1.0
Space group	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Unit-cell lengths (Å)	$a = 45.9, b = 48.2, c =$ 124.1	$a = 46.4, b = 47.4, c =$ 123.9
Resolution range (Å)	32.08-1.40 (1.44-1.40)	37.66-1.50 (1.59-1.50)
No. of observed reflections	353,258	289,676
No. of unique reflections	53,822	44,748
Completeness (%)	97.8 (96.1)	99.8 (99.5)
$R_{\text{merge}}$ (%)	4.2 (20.3)	3.5 (7.5)
$\langle I / \sigma \rangle$	26.7 (8.5)	36.4 (18.8)

Highest resolution shell is shown in parenthesis.

### 3 結果および考察

今回収集した X 線回折データと収集済みの中性子回折データを合わせて、プログラム PHENIX と COOT を用いて構造の精密化を行った。その結果、MTH1 の基質結合部位周辺の全原子構造を決定し、「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基質や阻害剤と幅広い特異性で結合する」という MTH1 の基質認識・阻害剤結合機構を実験的に初めて実証した。

#### 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に感謝申し上げます。

#### 参考文献

- [1] S. Waz#, T. Nakamura# (#co-first author) *et al.*, *J. Biol. Chem.* **292**, 2785 (2017)
- [2] T. Nakamura *et al.*, *Int. J. Microgravity Sci. Appl.* **36**, 360103 (2019)
- [3] T. Nakamura#, Y. Koga-Ogawa# *et al.*, *FEBS Lett.* **597**, 1770 (2023)
- [4] K. Hirata#, K. Fujimiya# (#co-first author) *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **122**, e2510085122 (2025).

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