

# ヒト酸化ヌクレオチド加水分解酵素 MTH1 の時分割 X 線結晶構造解析 Time-resolved X-ray crystallography of human oxidized nucleotide hydrolase MTH1

平田啓介, 後藤大空, 中村照也\*

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

Keisuke HIRATA, Masataka GOTO, and Teruya NAKAMURA\*  
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。MTH1 は加水分解酵素の大きなファミリーである Nudix ファミリーに属している。Nudix ファミリーの酵素学的研究は古くから行われており、2つの金属イオンが関与する「2金属イオン機構」と3つの金属イオンが関与する「3金属イオン機構」の2つのモデルが提案されている。これまでに我々は、MTH1 の大腸菌ホモログである MutT の時分割 X 線結晶構造解析を行い、MutT は3つの  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$  を介して 8-oxo-dGTP を加水分解する反応過程を可視化した[1]。本研究では、MTH1 の 8-oxo-dGTP と 2-oxo-dATP の加水分解反応機構を明らかにするために時分割 X 線結晶構造解析を行った[2]。

## 2 実験

MTH1-8-oxo-dGTP 複合体と MTH1-2-oxo-dATP 複合体の結晶は、0.1 M cacodylate-HCl pH 6.5, 0.75 M sodium citrate, 0.2 M NaCl の結晶化溶液を用いることで調製した。結晶内の 8-oxo-dGTP および 2-oxo-dATP 加水分解反応は、0.1 M cacodylate-HCl pH 6.5, 0.75 M sodium citrate, 0.2 M NaCl, 400 mM  $MnCl_2$  の反応溶液を用いることで開始させた。一定の時間 (30分から3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。これら結晶を用いた X 線回折実験は BL-17A と AR-NE3A 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、8-oxo-dGTP および 2-oxo-dATP の反応中間体構造をそれぞれ3種類決定した。

## 3 結果

8-oxo-dGTP 加水分解反応においては、酵素-基質複合体 (ES) に加え、酵素-基質- $3Mn^{2+}$  複合体 (ES-3M)、酵素-基質/生成物- $3Mn^{2+}$  複合体 (ES/EP-3M)、酵素-生成物- $Mn^{2+}$  複合体 (EP-M) の結晶構造を 1.09~1.57 Å 分解能で決定した。

2-oxo-dATP 加水分解反応においては、酵素-基質複合体 (ES) に加え、酵素-基質- $2Mn^{2+}$  複合体 (ES-2M)、酵素-基質/生成物- $3Mn^{2+}$  複合体 (ES/EP-3M)、酵素-生成物- $Mn^{2+}$  複合体 (EP-M) の結晶構造を 1.18~1.55 Å 分解能で決定した。

## 4 考察

8-oxo-dGTP および 2-oxo-dATP の加水分解反応において、MTH1 の Nudix モチーフに3つの金属イオンが結合することで、2つの金属イオンに架橋するように水分子が移動した後、基質の三リン酸に求核攻撃して基質が生成物へと加水分解される過程を可視化した。本時分割解析と同時期に行った中性子構造解析の結果を合わせることで、Nudix モチーフで完全に保存されている Glu52 が水分子からプロトンを引き抜く一般塩基となることが示唆された。我々は、大腸菌 MutT の時分割構造解析においても3つの  $Mg^{2+}/Mn^{2+}$  イオンが関わる3金属イオン機構を解明している。今回の MTH1 の時分割構造解析により、Nudix ファミリーは3つの金属イオン結合部位が関与して加水分解反応を触媒する機構を強く支持する結果を得た。

## 謝辞

本研究の X 線回折実験にご協力いただきましたチ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] T. Nakamura & Y. Yamagata, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **119**, e2203118119 (2022).
- [2] 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