

ヒト NUDT5 の 予期せぬ基質認識と触媒反応機構 Unexpected substrate recognition and catalytic reaction mechanisms

有森貴夫^{1,2}, 山縣ゆり子^{1*}

¹ 熊本大学大学院薬学教育部、〒862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1

² 日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部門 〒319-1195 東海村白方白根 2-4

1 はじめに

ヒト NUDT5 は、変異原性ヌクレオチドとして重要な 8-oxo-dGDP をはじめとする様々な酸化損傷ヌクレオシド二リン酸を加水分解し、DNA の突然変異の抑制に寄与している一方で、タンパク質の翻訳後修飾に関与する ADP-ribose などの ADP-sugar に対しても加水分解活性を示し、幅広く細胞内の浄化に貢献していると考えられている。NUDT5 の基質はいずれもヌクレオシド二リン酸を基本骨格としており、触媒反応により二つのリン酸基の間の結合が切断されるが、このピロリン酸部以外の化学構造には多様性があり、NUDT5 が如何にして様々な基質を認識し、加水分解するのかわからなかった。そこで我々は、X 線結晶構造解析と同位体ラベル化法による求核攻撃部位の特定を行い、NUDT5 の幅広い基質特異性獲得機構と加水分解反応機構を原子レベルで解明することに成功した[1]。

2 実験

共結晶化法により NUDT5 と 8-oxo-dGDP (基質), 8-oxo-dGMP (生成物), 8-oxo-dADP (基質) の複合体結晶の取得に成功し、それぞれ 2.1, 2.3, 2.05 Å 分解能で結晶構造を決定した。なお、回折データは PF と Spring-8 で収集した。また、¹⁸O ラベル化水存在下で NUDT5 による 8-oxo-dGDP および ADP-ribose の加水分解反応を行い、その反応溶液の ³¹P NMR スペクトルを測定することで、両基質が NUDT5 により加水分解される過程で水分子による求核攻撃を受けるリン原子を特定した (同位体ラベル化法)。

3 結果および考察

NUDT5/8-oxo-dGDP 複合体と、過去に報告された NUDT5/ADP-ribose 複合体[2]の結晶構造中に観測された基質の認識機構を比較したところ、両基質の構造が異なり、8-oxo-dGDP は Z 型、ADP-ribose は馬蹄型をとり、塩基部位の結合様式にも相違が見られただけでなく、さらに触媒反応を受けるピロリン酸部の α 位と β 位のリン酸基の結合位置が全く逆転していた (図 1)。この結果から、NUDT5 によるこれらの基質の加水分解反応においては、基質および反応生成物の化学構造が類似しているにもかかわらず、求核攻撃を受けるリン原子が異なることが示唆された。そこで、同位体ラベル化法により触媒反応時の求核攻撃部位の特定を行い、8-oxo-dGDP と

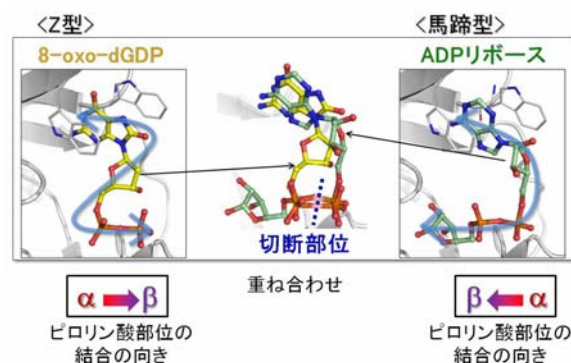


図 1 8-oxo-dGDP と ADP-ribose の結合の比較

ADP-ribose では攻撃部位が異なる (8-oxo-dGDP は β 位、ADP-ribose は α 位のリンが攻撃を受ける) ことを証明した (図 2)。これらの結果から、NUDT5 の幅広い基質特異性は、化学構造が異なる塩基部位のみならず、化学構造が同じで触媒反応を受けるピロリン酸部位まで結合様式を変化させることで獲得しているという我々が知る限り酵素で初めての知見が得られた。

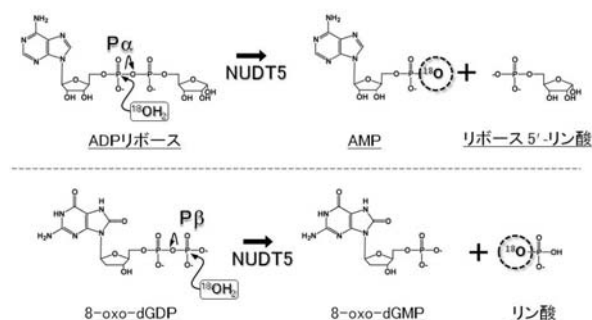


図 2 求核攻撃を受けるリン原子の比較

謝辞

X 線回折実験を行うにあたり、ご協力頂きました PF ならびに Spring-8 のスタッフの方々に感謝申し上げます。

参考文献

- [1] T. Arimori *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 39 (2011) 8972.
[2] M. Zha *et al.*, *J. Mol. Biol.* 379 (2008) 568

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