

低温トラップX線結晶構造解析による
MutT の 8-oxo-dGTP 加水分解反応機構の解明

○中村照也, 山縣ゆり子

熊本大学大学院医学薬学研究部

8-オキソグアニン (8-oxoG) は、通常生命活動において、細胞内の活性酸素により生じる酸化損傷塩基であり、DNA に取り込まれるとアデニンとも塩基対を形成するため、内在性の変異原となる。大腸菌 MutT は Mg^{2+} (Mn^{2+}) 存在下、8-oxo-dGTP を 8-oxo-dGMP へと加水分解し、8-oxo-dGTP の新生 DNA 鎖への取り込みを妨げて、8-oxoG のミスペアに起因する突然変異を抑制している。MutT は、その他の 8-oxoG 修復に関わる酵素群の中でも、8-oxoG に対して非常に顕著な基質特性を有しており、dGTP と比較して K_m にして約 14,000 倍にも及ぶ高い親和性で 8-oxo-dGTP を加水分解する特徴を持つ。我々は、これまでに、MutT 単独、反応生成物 8-oxo-dGMP との複合体、そして基質 8-oxo-dGTP との複合体の構造解析を行い、MutT は、リガンド結合部位周辺のループ領域の大きな構造変化の結果生じた多数の相互作用により、8-oxo-dGTP の特徴である N7 位の水素、O8 位の酸素、有利な *syn* 配座を厳密に認識し、その顕著な基質特異性を発揮していることを明らかにしている。

本研究では、MutT の基質特異性の解明に続き、8-oxo-dGTP 加水分解反応機構の解明を目的として MutT-8-oxo-dGTP (酵素-基質複合体) 結晶への $MnCl_2$ 溶液ソーキングを反応開始とした低温トラップX線結晶構造解析を行い、時分割で 8-oxo-dGTP の加水分解反応を追跡した。MutT-8-oxo-dGTP 結晶に様々な濃度の $MnCl_2$ 溶液 (5 - 20 mM) をソーキングして種々の反応時間毎に 100K 下で反応を停止させ、それぞれの結晶について構造解析を行った。 Mn^{2+} の配位位置は、波長 1.5 Å のX線による異常分散効果を利用して決定した。この様にして得られた様々な反応状態の構造から、複数の Mn^{2+} が 8-oxo-dGTP のリン酸部位と加水分解モチーフのグルタミン酸残基や水に配位していく過程、それに伴って求核攻撃を行う水分子が活性化される過程、さらにその水分子が 8-oxo-dGTP の β リン酸へ求核攻撃する直前の構造を捕らえ、電子密度の変化による一連の 8-oxo-dGTP 加水分解反応機構の可視化に成功した。