

細胞内浄化酵素ヒト NUDT5 の 多様な基質認識および反応機構の解明

分子機能薬学専攻 機能分子構造解析学分野 有森 貴夫

DNA の構成塩基の中でもグアニンは最も酸化的損傷を受けやすく、その 8 位が酸化されて生じた 8-オキソグアニン (以下, 8-oxoG) は、シトシンだけでなく、アデニンとも塩基対を形成する。8-oxoG を含むヌクレオチドである 8-oxo-dGDP は、細胞内でリン酸化され 8-oxo-dGTP となった後、DNA ポリメラーゼの基質となるため、生体にとっては重要な変異原である。本研究の対象であるヒト NUDT5 は、8-oxo-dGDP を DNA 合成に関与しない 8-oxo-dGMP へと加水分解することで、8-oxoG による DNA の突然変異を抑制すると考えられている。また、NUDT5 は極めて幅広い基質特異性を有しており、8-oxo-dADP, 2-oxo-dADP といった様々な酸化損傷ヌクレオシド二リン酸、および ADP-ribose, ADP-mannose といった ADP-sugar に対しても加水分解活性を示すことが報告されている。これらの基質は、いずれもヌクレオシド二リン酸を骨格とした類似した化学構造を有している。2006 年には、Zha らによって NUDT5-ADP-ribose 複合体の結晶構造が報告され、NUDT5 による ADP-ribose の認識機構が明らかになった。しかしながら、酸化損傷ヌクレオチドの認識および加水分解反応機構に関する構造学的知見は未だ得られておらず、NUDT5 が様々な基質を認識できる機構は不明である。そこで本研究では、NUDT5 の幅広い基質特異性獲得機構および加水分解反応機構を解明することを目的とし、NUDT5 と酸化損傷ヌクレオチドとの複合体の X 線結晶構造解析を行った。

結晶構造解析に用いる酸化損傷ヌクレオチドとして、変異誘発性の高さから最も重要な基質といえる 8-oxo-dGDP、およびその反応生成物である 8-oxo-dGMP、さらに 8-oxo-dGDP と同等の k_{cat}/K_m 値を示す 8-oxo-dADP を選択し、それぞれ 2.1, 2.3, および 2.05 Å 分解能で NUDT5 との複合体構造を決定することに成功した。8-oxo-dGDP 複合体の構造解析では、基質のピロリン酸部位が NUDT5 の活性部位に固定されないことが判

明したため、NUDT5 の触媒活性に必須であり、ピロリン酸部位の固定に寄与すると考えられる 2 価の金属イオン存在下での共結晶化を試みた。結晶化過程で基質の加水分解反応が進行しないことを HPLC 解析により確認しながら結晶化条件を検討することで、ピロリン酸部位が固定された状態での結晶構造を得ることに成功した。また、得られた結晶構造を ADP-ribose 複合体と比較したところ、基質の結合様式が、酸化損傷ヌクレオチド (8-oxo-dGDP および 8-oxo-dADP) と、ADP-ribose では大きく異なっていることが明らかになった。特に、加水分解反応時に切断を受ける部位である基質のピロリン酸は、完全に逆向きに結合しており、その結果、酸化損傷ヌクレオチドのβ位のリン原子と ADP-ribose のα位のリン原子が NUDT5 に対して同じ位置に結合していた。これまでの研究で、ADP-ribose の加水分解反応時には、そのα位のリン原子が求核水により攻撃を受けると考えられている。したがって、結晶構造で見られた酸化損傷ヌクレオチドの結合様式で加水分解されるなら、これらの基質は切断部位の化学構造が同じであるにもかかわらず、加水分解反応時の求核攻撃部位が異なっていることを意味する。

そこで、この仮説を立証するため、8-oxo-dGDP および ADP-ribose について、同位体ラベル化法を用い、加水分解反応時の求核攻撃部位の特定を行った。これらの基質の ^{18}O ラベル化水存在下で行った加水分解反応溶液の ^{31}P NMR スペクトルを測定した結果、結晶構造から推測された通り、8-oxo-dGDP はβ位、ADP-ribose はα位のリンが求核攻撃を受けるとを特定することに成功した。この結果は、我々が得た結晶構造が、溶液中での反応過程を捕らえたものであることを示す。

以上のように、本研究では X 線結晶構造解析および同位体ラベル化法により、NUDT5 によるこれまでに例のない多様な基質認識および加水分解反応機構を解明することに成功した。また、これらの結果は、“類似した化学構造を持つ複数の化合物が一つの酵素によって触媒される際、酵素への結合様式や触媒反応機構も類似している” という酵素に対する一般的な考え方を覆すものであり、酵素学において極めて重要な知見であるといえる。