

dNTP triphosphohydrolase の機能解析

Functional Analysis of dNTP triphosphohydrolase

近藤直幸¹, 中川紀子^{1,2}, 増井良治^{1,2}, 倉光成紀^{1,2}Naoyuki Kondo¹, Noriko Nakagawa^{1,2}, Ryoji Masui^{1,2}, Seiki Kuramitsu^{1,2}¹大阪大学, ²理研、播磨研¹Osaka Univ., ²Harima Inst. RIKEN)

e-mail: kondon@bio.sci.osaka-u.ac.jp

ヌクレオチド加水分解酵素は全ての生物で幅広く分布している。*Thermus thermophilus* HB8 (TTHB8) においても、ゲノム解析の結果、ヌクレオチド加水分解モチーフを有するタンパク質が多く同定された。これらのタンパク質の機能として、配列相同性の解析から、幅広く用いられるヌクレオチドの加水分解による代謝経路の維持や、有害なヌクレオチドの加水分解による解毒作用等が主であると考えられているが、それら多くの正確な機能は未だ明らかになっていない。

そのような機能が明らかでないタンパク質の一つとして TTHA0412 タンパク質がある。TTHA0412 は、DNA 合成の原料である正常な deoxyguanosine triphosphate (dGTP) を dG と PPPi に分解する大腸菌由来 dGTP triphosphohydrolase (dGTPase) と 20 % 程度の配列相同性を有するタンパク質である。dNTP 新規合成系は原核生物からヒトまで幅広く保存されている経路である (右図) が、その分解系の報告例はなく、未だ解明されていない新規の経路に関わる可能性が考えられる。本研究では TTHA0412 の希有な活性の同定とその生化学的、構造生物学的解析を行い、分子機能の面から未知の機能に迫った。

TTHA0412 を発現・精製し、その活性を調べたところ、Mg²⁺ 存在下では、dGTP を含む 1 種類の dNTP に対する活性はみられなかったが、dATP もしくは dTTP を含む 2 種類以上の dNTP が共存する場合にのみ、全ての dNTP に対する活性がみられた。定常状態の速度論的解析を含む、更なる分析の結果、dATP と dTTP が活性化因子でもあり、分解される基質でもあることが示唆された。最終的に、複数の dNTP が結合し、1 つの部位で分解が起こるとする反応機構モデルを提案した。次に、dATP と dTTP 存在下での様々な dNTP に対する活性を調べたところ、天然型の dNTP にも障害塩基を持つ dNTP にも分解活性を示した。最も分解される基質は dCTP であったが、他の dNTP に対しても良く似た速度論的パラメーターを示した。このことから、TTHA0412 は、塩基部分の特異性が広いことが明らかになった。Se-Met 化タンパク質を用いて結晶化を行い、SAD 法を用いた立体構造解析を行ったところ、活性部位として予測された部位が、リン酸ジエステル加水分解酵素の配列モチーフである HD domain を持つタンパク質の構造と似ていることが明らかになった。この部位と dNTP が結合しているモデルを製作し、活性測定の結果と比較検討したところ、これらの結果は良い相関を示した。

Reference

[1] Kondo, N. Kuramitsu, S. and Masui, R. (2004) *J. Biochem.* **136**, 221-231