

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 dNTP triphosphohydrolase のドメイン
およびサブユニット解析

Domain and subunit analysis of dNTP triphosphohydrolase from *Thermus thermophilus* HB8

妻鹿 良亮¹, 近藤 直幸², 中川 紀子^{2,3}, 増井 良治^{2,3}, 倉光 成紀^{1,2,3}

Ryosuke Mega¹, Naoyuki Kondo², Noriko Nakagawa^{2,3}, Ryoji Masui^{2,3}, Seiki Kuramitsu^{1,2,3}

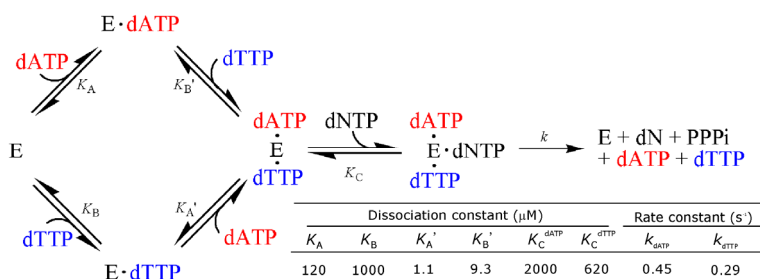
(¹ 阪大・院生命機能, ² 阪大・院理, ³ 理研・播磨研)

(¹Grad. Sch. Frontier Biosci., Osaka Univ., ²Grad. Sch. Sci., Osaka Univ., ³RIKEN Harima Inst.)

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

Thermus thermophilus HB8 由来 1) dNTP 認識機構モデル

来の TT1383 は大腸菌 dGTP triphosphohydrolase との間にくらかのアミノ酸配列相同性があり、dATP と dTTP によって誘導される新規の dNTP triphosphohydrolase (dNTPase) 活性を持つ¹⁾。詳細な定常状態



速度論解析から、TT1383 の触媒活性部位と活性調節部位は別々のドメインに存在するということがわかった。アミノ酸配列解析から、N 末端領域の 200 残基は機能ドメインである「HD ドメイン」を含むが、C 末端領域にはそのような機能ドメインは存在しないことが示唆された。そのような新規の活性機構を解明するため、われわれは TT1383 のドメイン構造と機能特性についての解析を行った。400 残基のアミノ酸からなる TT1383 の非特異的なプロテアーゼによる限定分解を行ったところ、主に 3 つの断片が得られた。これらのアミノ酸配列を解析し、MS による質量分析を行ったところ、1 つは N 末端領域の 180 アミノ酸に対応し、残りの 2 つの断片は C 末端由来のものであった。この結果とアミノ酸配列比較から、N 末端ドメインと C 末端ドメインが存在することが示唆された。限定分解産物の混合物のゲルろ過クロマトグラフィーを行ったところ、その溶出プロファイルは限定分解前の TT1383 と同じであり、6 量体構造を形成していた。そこで、われわれは 2 つのドメインを個別に得るため、大腸菌発現系の構築を試みたが、発現した個々のドメインは単独では不安定なものであった。

また、われわれはゲルろ過、CD、蛍光スペクトルを用いて TT1383 の変性過程を調べることにより、TT1383 のサブユニット解析を行った。その結果、二次構造と三次構造は 4 M までの尿素濃度では維持したままであるが、6 量体構造は 2 M 以上の尿素を含む条件下で 2 量体に解離し始めた。サブユニット間の架橋実験を行ったところ、比較的安定性の高い 2 量体構造が存在することが確認された。尿素濃度の上昇に伴い、dCTPase 活性は減少し、5 M 尿素存在下でその活性はほとんど確認されなくなった。これらの結果から、TT1383 の活性には 6 量体構造が必要であることが示唆された。