

変異原ヌクレオチド分解酵素の反応機構解明

熊本大学大学院医学薬学研究部・教授・山縣ゆり子

古くから膨大な生体内の酵素反応機構の解明研究が行われてきたが、今もって正確に理解されているものは皆無に近い。多くの研究が、酵素-反応しない基質アナログ複合体、もしくは反応しない酵素-基質複合体の X 線結晶構造解析を基礎にしており、実際に反応する状態を見ているわけではないので、反応機構の解明はあくまで推定しているに過ぎない。時分割蛋白質結晶学は酵素反応を可視化できる手法として期待されてきた。特に低温トラップ法は、通常の蛋白質結晶構造解析法とほぼ同じルーチンの実験技術を使って反応過程を追跡できる方法として酵素反応の機構解明に一定の成果を挙げてきた。低温トラップ法では、反応しない条件で酵素-基質複合体結晶ができること、結晶中で反応を開始できること、反応が実験操作(たとえば結晶を急速凍結する時間)に比べて速すぎないこと、反応過程で結晶が壊れないことなどの条件が揃う必要がある。しかしながらそれら条件が揃い反応が起こる直前までは追跡できて、結晶内といえども反応後の変化は早いことや反応の同期性の時間依存的くずれ、反応後の結晶性の劣化等様々な理由で、反応過程全体を追跡できた報告はほとんどないと思われる。

我々は、 Mg^{2+} (Mn^{2+}) 存在下 8-oxo-dGTP を 8-oxo-dGMP に加水分解することによって通常生命活動で細胞内に生じる活性酸素の酸化でもっとも重大な DNA 塩基損傷の一つ 8-オキシグアニンの DNA への取り込みを防御している大腸菌 MutT(分子量 15000 : 8-oxo-dGTPase)の加水分解反応の各段階のスナップショットを、低温トラップ X 線結晶構造解析法を用いて明らかにしてきた。しかしながら、上述したように本酵素の反応開始後結晶内反応が早い、さらに反応開始までに反応の同期性が崩れているなどが原因で反応開始直前と思われるスナップショット以降の経過は全く不明のままである。また、これまで得られている X 線解析での構造には水素の情報がないため、加水分解反応で最も重要な求核攻撃する水のプロトンの移動に関しては推定に過ぎない。低温トラップ法と言えども反応の進行は結晶ごとに異なるので、正確なプロトンの位置を求めるためには、同一結晶で中性子、X 線のデータを収集し、差画像を得ることが必須である。

本講演では、これまでの大腸菌 MutT の 8-oxo-dGTPase 機構解明の現状と問題点、今後のこの字型小委員会への期待を述べてみたい。