

 <b>MLF Experimental Report</b>	提出日(Date of Report) 2019年3月26日
課題番号(Project No.) 2017PX0020 実験課題名(Title of experiment) 抗がん薬標的酸化ヌクレオチド分解酵素の活性部位プロトン化状態の解明 実験責任者名(Name of principal investigator) 山縣ゆり子 所属(Affiliation) 熊本大学	装置責任者(Name of responsible person) 日下勝弘 装置名(Name of Instrument : BL No.) iBIX 実施日(Date of Experiment) テスト測定: 2017.12.21~12.22 本測定: 2018.1.15~1.30 の 13 日間

実験目的、試料、実験方法、利用の結果得られた主なデータ、考察、及び結論を記述して下さい。

実験結果などの内容をわかりやすくするため、適宜図表添付して下さい。

Please report experimental aim, samples, experimental method, results, discussion and conclusions. Please add figures and tables for better explanation.

<p>1. 実験目的(Objectives of experiment)</p> <p>本研究で対象としているヒト MTH1 は、分子量 18000 の小さなタンパク質であるが、酸化ストレスで生じ、強力な変異原である酸化ヌクレオチドを分解することによって、DNA の突然変異を抑えている働きに加え、がん細胞で強く発現していることやさらに最近その阻害剤ががん細胞の増殖を抑えていることが示され、新しいがん治療薬の標的タンパク質としても注目されている(Nature, 2014, 508, 215 &amp; 222)。その基質認識部位に多くの疎水性残基とともに存在する2つの Asp 残基のプロトン化状態を決めることが幅広い基質特異性の発現機構の解明と抗がん剤の設計を効率的に行う上で必須である。我々は変異型の結晶構造と活性との相関や 1Å 近くの分解能での 2 つの基質複合体の X 線結晶構造解析で結合距離・角度の制限を外して精密化を行い、C-O の結合距離からプロトン化部位を決定し、2つの Asp 残基は、基質によってプロトン化部位を交換することで幅広い基質特異性を獲得しているという報告例のない全く新規の仕組みを示した(JBC, 2017, 292, 2785-2794、添付資料1)。しかし、低分子の X 線結晶構造解析のように D-合成図から水素の位置をきっちりと決定できてはいないので、中性子構造解析により実証したい。</p> <p>これまでに、MTH1 フリーについては 2016 年度に iBIX を用いて、また、MTH1-8-oxoGTP 複合体については、FRM-II で中性子データを測定し、解析を行っている。本課題ではさらに、新しい認識機構の検証に必須の 2-oxoA をもつ基質として、in vitro で最も効率的な基質と報告され、ATP の酸化体である 2-oxo-rATP と MTH1 複合体の中性子データ収集と後に PF で測定した X 線データを用いた NX 結晶構造解析を目的とした。</p>
<p>2. 試料及び実験方法</p> <p>Sample(s), chemical compositions and experimental procedure</p>

## 2.1 試料 (sample(s))

2-oxo-rATP と MTH1 複合体結晶

## 2.2 実験方法(Experimental procedure)

本複合体の中性子用大型結晶は、マクロシーディング法により、容量 70 $\mu$ L の軽水結晶化溶液中から、得られた。得られた大きさ、0.7~2.5 mm<sup>3</sup>のものについて重水素化試薬(一部は軽水素化合物を使用)を用いた結晶化溶液に 1~3 日間浸漬し、ひび割れ等見られなかった数個を中性子回折データ収集用として凍結した。これらについて 2017 年 12 月 21 日から 1 日間、テスト測定を行い、回折像がきれいでもっとも高い分解能(1.7Å)をえられた結晶(3 日間の重水素置換したもの)を用いて 2018 年 1 月 15 日から 30 日の 13 日間の測定を行った。なお、本研究は日下グループ並びに玉田グループとの共同研究である。

## 3. 実験結果及び考察 (実験がうまくいかなかった場合、その理由を記述してください。)

Experimental results and discussion. If you failed to conduct experiment as planned, please describe reasons.

日下グループにデータ処理を行っていただき、その生データを用いて、いくつかのパラメータを変え、統計処理した。さらに、同結晶化条件で得られた結晶について、PF において X 線回折データを収集、パラメータを変えたいくつかの中性子データセットを用いて、分解能をいろいろ変えて NX 精密化を行った。これらの中で最も核密度がよく見えている NX データの統計値、並びに、電子密度と核密度図をそれぞれ、添付資料 2 と 3 に示す。

本結晶には非対称単位中に 2 分子の MTH1 が存在するが、添付資料 3 の核密度図から、より核密度図がはっきりして分子(a)において、Asp120 と 2-oxoA の N1 にプロトンが観察され、FRM-II で測定した 8-oxo-dGTP 複合体の核密度図(添付資料の 4 と 5、本複合体については、共同研究者である熊本大学中村照也准教授により現在も精密化を進めており、よりきれいな核密度図が得られつつあるとの報告を受けている。)を合わせて判断すると、2017 年に発表した「ヒト MTH1 の 2 つの Asp 残基は、基質によってプロトン化部位を交換することで幅広い基質特異性を獲得しているという報告例のない全く新規の仕組み」を中性子結晶構造解析によってほぼ実証できたと考えている。

しかしながら、本結晶型は非常に分解能が高く、大きな結晶になりやすいという利点はあるが、特に大型結晶になると種々の基質をはじめとするリガンドの占有度が落ちるという問題点が分かっていた。2-oxo-rATP については基質の濃度を出来る限り高くしたり、基質を途中で加えたりしたが、結晶が壊れる問題もあり、放射光による種々の条件下での大型結晶の解析からは今回の占有度以上は難しいと考えて、中性子データ測定を行ったが、もう少し明確なプロトンに相当するピークが得られることが望ましい。

## 4. 結論(Conclusions)

今回の実験で、2017 年に発表した「ヒト MTH1 の 2 つの Asp 残基は、基質によってプロトン化部位を交換することで幅広い基質特異性を獲得しているという報告例のない全く新規の仕組み」を概ね実証できたと考えている。この結果は、新しい幅広い基質特異性発現機構の解明に加えて、MTH1 により親和性の高いリガンドの特に *in silico* 解析には、多様な Asp119 と 120 のプロトン化状態を考慮する必要があることを示している。

2-oxoA をもつ基質複合体として、放射光実験から、より基質の占有度が高いと期待できる 2-oxo-dATP-MTH1 複合体については、これまでに大型結晶化がうまくいっていなかったが、先に挙げた中村らは、別会社の合成試料を用いることで、大型結晶の調製に成功し、本年(2018)度の茨城県プロで中性子回折実験が実施されているので、その結果に期待している。