

## Mutational analysis of ADP-ribose pyrophosphatase from *Thermus thermophilus* HB8

高度好熱菌由来 ADP-ribose pyrophosphatase の変異体解析

Takushi Ooga<sup>1</sup>, Sachiko Yoshiba<sup>1</sup>, Noriko Nakagawa<sup>1</sup>, Ryoji Masui<sup>1,2</sup>, and Seiki Kuramitsu<sup>1,2</sup>

大賀拓史<sup>1</sup>, 葭葉幸子<sup>1</sup>, 中川紀子<sup>1,2</sup>, 増井良治<sup>1,2</sup>, 倉光成紀<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Dept. Biol., Grad. Sch. Sci., Osaka Univ., <sup>2</sup>RIKEN Harima Inst.)

(<sup>1</sup>阪大院 理 生物学, <sup>2</sup>播磨理研)

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

Nudix タンパク質ファミリーはヌクレオシド 2 リン酸誘導体を主な基質とする加水分解酵素ファミリーである。この酵素はウイルスから哺乳類、植物まで生物界に広く存在しているが、その多くは生理学的機能が未だ分かっていない。これらのうち ADP-ribose pyrophosphatase (ADPRase) は ADP-ribose を AMP と ribose-5'-phosphate に加水分解する反応を触媒することが知られている。また近年、*E. coli*、*M. tuberculosis* 由来 ADPRase の基質-金属複体の結晶構造が決定された。しかし ADPRase の生化学的解析は十分になされておらず、詳細な反応機構は解明されていない。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 には 8 つの nudix 遺伝子の存在が確認されている。それらの遺伝子産物の 1 つである Ndx4 は配列相同性から ADPRase であると予想されている。我々は Nudix タンパク質ファミリーに共通する反応機構を解明するため、Ndx4 について反応速度論的解析および結晶構造解析を行い、さらにこれらの結果に基づいて変異体を作製し、Ndx4 の基質認識と反応触媒機構の解析を行った。

Nudixタンパク質の主な基質に対する比活性を調べた結果、Ndx4はADP-riboseに対して非常に高い特異性を持っていた。またNdx4 の基質複体の結晶構造を決定して既知のADPRaseの複合体構造との比較を行ったところ、活性部位を含む構造類似性が非常に高いことが分かった。そこでこの複合体構造に基づいて基質認識・反応触媒に関わると予想される残基の変異体を作製し、解析を行った。その結果、*E. coli*、*M. tuberculosis*由来ADPRaseの立体構造から予想されていた反応触媒残基の変異体では活性の低下が見られなかったのに対し、Nudixタンパク質ファミリーに強く保存されているモチーフ (nudix motif) に存在するグルタミン酸残基の変異体では $k_{cat}$ の大幅な低下が見られた。このことからNdx4 を含むADPRaseの反応触媒基は、これまでのモデルとは異なり、nudix motifで保存されたグルタミン酸であると考えられる。また基質ADP-riboseと相互作用すると予想される残基の変異体の解析の結果、Ndx4 の基質認識機構に関わる複数の残基を同定することができた。

### 参考文献

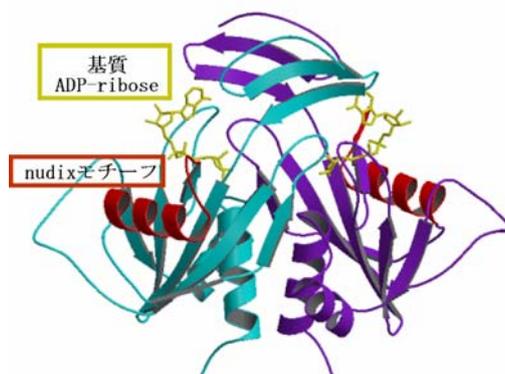
Gabelli, S. B., *et al.* (2002) *Biochemistry* **41**, 9279-9285

Kang, L. W., *et al.* (2003) *Structure* **11**, 1015-1023

Thomas K., *et al.* (2000) *Biochemistry* **39**, 1655-1674

Yoshiba, S., *et al.* (2003) *Acta Cryst.* **D59**, 1840-1842

Iwai, T., *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 21732-21739



Tt ADPRase・基質複体結晶構造