

Substrate specificity of the nudix hydrolase Ndx7 from *Thermus thermophilus* HB8

高度好熱菌由来 Ndx 7 の機能解析

Daisuke Yamagishi¹, Ryoji Masui^{1,2} and Seiki Kuramitsu^{1,2}

山岸大輔¹、増井良治^{1,2}、倉光成紀^{1,2}

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

(¹阪大・院理・生物科学、²理研・播磨研)

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

Nudixタンパク質はNudixモチーフと呼ばれるアミノ酸配列(GX₃EX₇REUXEEXGU:UはI、VまたはL)を有する加水分解酵素であり、ウィルスからヒトまで広く分布している。Nudixタンパク質の基質はヌクレオシド二リン酸化合物(**nu**cleoside **d**iphosphate linked to another moiety **X**)であり、これらには細胞内における様々なシグナル分子や、細胞に対して毒性を持つ物質が含まれる。Nudixタンパク質は細胞内においてこれらの物質を除去、またはこれらの濃度を調節する役割を担っていると考えられている。

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 からは8種類の Nudix タンパク質をコードする遺伝子が発見されている。これらのアミノ酸配列は Nudix モチーフ内においてのみ高度に保存されており、モチーフ以外の配列相同性はほとんどみられない。その中でも、Ndx7 は触媒活性に大きく寄与すると考えられる Nudix モチーフ内の Glu を 2 残基も欠失しており、機能が分かっている他の生物種由来の Nudix タンパク質との配列相同性もほとんどみられない。本研究では生化学的手法を用いて、この機能未知タンパク質 Ndx7 の機能解析を試みた。

まず初めに、Ndx7 の遺伝子を挿入した発現ベクターを用いて大腸菌 BL21(DE3) 株を形質転換し、IPTG 誘導により Ndx7 を大量に発現させた。菌体破砕液を熱処理後、陰イオン交換、疎水、ゲルろ過の 3 種類のカラムクロマトグラフィーによって均一な精製標品を得た。この精製標品をトリプシンで断片化し、MALDI-TOF MS を用いて分析することにより、Ndx7 であることを同定した。CD スペクトル測定により構造安定性を調べたところ、Ndx7 の二次構造は pH 2~13、約 90°C までは安定であった。会合状態の検討を行ったところ、ゲルろ過クロマトグラフィーでは二量体に相当する位置に単独のピークがみられ、二量体を形成していることが示された。また、SDS-PAGE においても β-メルカプトエタノール非存在下では二量体に相当するサイズのバンドが観察されたことから、C 末端付近に存在する 2 つの Cys 残基が二量体形成に関与している可能性が示唆された。次に、ApnA、NTP、NDP、dNTP、dNDP および、ヌクレオシド二リン酸を有する補酵素など、Nudix タンパク質の基質として知られている化合物を用いて活性測定を行った。陰イオン交換クロマトグラフィーおよび逆相イオンペアクロマトグラフィーを用いて反応産物を調べた結果、ADPR、ADP、ATP などに対して弱い分解活性を示した。このことから、Ndx7 はアデニンと 2 つ以上のリン酸基を有する化合物を基質とすると考えられる。

今後はさらに多くの化合物に対する活性スクリーニングを行いつつ、X 線結晶構造解析を

進めていく予定である。