

29S-am09

DNA polymerase η によるヌクレオチド転移反応の可視化

○中村 照也¹, Ye ZHAO^{2,3}, 山縣 ゆり子¹, Yue-jin HUA³, Wei YANG²(¹熊本大院
薬, ²NIDDK, NIH, ³INAS, Zhejiang Univ.)

【目的】DNAポリメラーゼを含む酵素の反応機構のほとんどは、これまで基質アナログや反応生成物との複合体の結晶構造を基盤として推測されてきた。しかし、酵素反応は本来、準安定状態の反応中間体構造を経て進行するため、酵素反応を真に理解するには、反応の現場を時間軸にそって”直接観察すること”が望まれる。本研究では、紫外線により生じるチミン二量体を乗り越えて複製することのできるヒトDNAポリメラーゼ η (Pol η) に注目し、Pol η の反応速度が比較的遅く、反応中の構造変化が小さいという特徴を利用して、時分割X線結晶構造解析により、ヌクレオチド転移反応をリアルタイムかつ原子レベルで観察した。

【方法】まず、真の基質dATPと反応を阻害するCa²⁺を用いることで反応開始構造であるPol η -DNA-dATP-Ca²⁺構造(酵素-基質複合体)を1.5 Å分解能で決定した。この結晶をpH 6.8もしくは7.0の1 mM Mg²⁺溶液に移して、結晶内反応を引き起こし、40秒から300秒まで約40秒間隔で結晶を凍らせて反応を停止した。それぞれの反応中間体構造は、1.50-1.95 Å分解能で精密化した。

【結果および考察】得られた反応中間体の電子密度変化から、2つのMg²⁺が活性部位に結合することでプライマー鎖末端の3'-OHが反応開始位置にきた後、糖がC2'-endoからC3'-endoに構造を変えながら3'-OHとdATPの α リンの間に共有結合が形成される過程が明らかになった。さらに、3'-OHの脱プロトン化に関わる一過性の水分子や、3つ目の金属イオンが反応中間体構造を安定化することなど、これまでのDNAポリメラーゼと基質アナログや生成物などとの複合体の結晶構造からは全く予想されなかった反応中間体を見出し、時分割X線結晶構造解析による酵素反応機構研究の有用性を示すことができた (Nakamura T. *et al.*, *Nature*, 2012).