

Thermus thermophilus HB8 タンパク質の機能発見研究:

DNA 修復系酵素 Endonuclease V の機能解析

Functional identification of protein from *Thermus thermophilus* HB8:

Functional analysis of DNA repair enzyme Endonuclease V

井上真男¹, 中川紀子^{1,2}, 増井良治^{1,2}, 倉光成紀^{1,2}Masao Inoue¹, Noriko Nakagawa^{1,2}, Ryoji Masui^{1,2}, Seiki Kuramitsu^{1,2}(¹ 阪大・院理・生物科学, ² 理研・播磨研)(¹ Dept. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., Osaka Univ., ² RIKEN/Harima Inst.)e-mail: masao@bio.sci.osaka-u.ac.jp

DNA 中において、ヒポキサンチン (Hyp)、キサンチン (Xan)、及びウラシル (Ura) は、それぞれアデニン、グアニン及びシトシンの脱アミノによって生じる傷害塩基である。特に、Hyp と Ura が DNA 中で生じると DNA 複製を経て突然変異が起こる。Endonuclease V (EndoV) はこれらの傷害塩基の 3' 側の 2 番目のホスホジエステル結合を切断し、ニックを入れる酵素である。大腸菌において、EndoV の遺伝子破壊株が野生株に比べて亜硝酸存在下で変異率が上昇したことから、EndoV は DNA の脱アミノ傷害の修復に関わっていると考えられている。EndoV 自身はニックを入れるだけで傷害部位を取り除くことはしないため、それ以降の反応を行う他の DNA 修復系酵素を呼び込む機能も持つのではないかとされているが、その詳細は明らかになっていない。また、EndoV はバクテリア、アーキアからヒトに至るまで広く保存されているが、生物種によって基質特異性が異なることが知られている。そこで我々は *Thermus thermophilus* HB8 由来の EndoV (TtEndoV) を大腸菌内で組換えタンパク質として発現、精製し、これを用いて様々な傷害塩基を含むオリゴ DNA に対する活性測定を行った。

精製した TtEndoV は 80°C まで安定で、溶液中では単量体として存在することが分かった。傷害塩基として Hyp を含むオリゴ DNA に対して活性測定を行った結果、Mg²⁺ 存在下でニックング活性を示した。基質特異性を調べるために、他の様々な傷害を含むオリゴ DNA に対しても活性測定を行ったところ、切断活性は見られなかった (表 1)。このことから、TtEndoV は Hyp に対しての基質特異性が高く、これまでに研究されてきたバクテリアの EndoV とは異なるタイプの酵素であると考えられる。さらに、切断様式を調べるため、TtEndoV で切断した DNA 断片の質量をフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型質量分析計を用いて測定した。切断後の DNA 断片の質量から TtEndoV は 3' 側に水酸基を、5' 側にリン酸基を残すような切断様式を示すことが明らかになった (図 1)。

表 1. TtEndoV の基質特異性

傷害 DNA	TtEndoV	<i>E. coli</i> EndoV
Hyp		
Xan	×	
Ura	×	
ミスマッチ	×	
脱塩基部位	×	
傷害なし	×	×

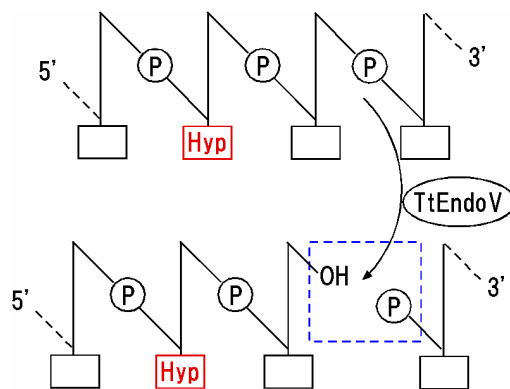


図 1. TtEndoV による切断様式