

酸化塩基損傷に作用する新しいDNA修復酵素に関する研究

Isolation and characterization of a novel DNA repair enzyme for oxidative base damage

研究代表者 京都大学大学院理学研究科 助手

張 秋梅

Assistant Professor, Graduate School of Science, Kyoto Univ.

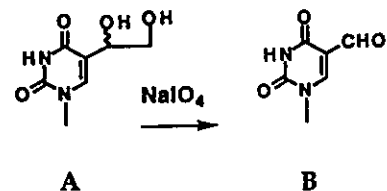
Qiu-Mei ZHANG

5-Formyluracil (5-foU) is a major lesion of thymine produced in DNA by ionizing radiation and various chemical oxidants. In this study, oligonucleotides containing an internal 5-foU at defined sites were synthesized and used as substrates to identify proteins with repair activity for 5-foU in *E. coli* extracts. The NaBH₄ trapping assays revealed that there are three kinds of proteins to form complex with the 5-foU-containing oligonucleotides. Extracts from mutant strains defective in the *mutM*, *nei* and *nth* genes did not contain one of these proteins. Purified MutM, Nei and Nth proteins were trapped to the 5-foU-containing oligonucleotides to form the complex in the presence of NaBH₄. Furthermore, DNA nicking assays demonstrated that the MutM, Nth and Nei proteins efficiently incised the 5-foU-containing oligonucleotides. The frequency of the mutation was significantly enhanced in *E. coli mutMnei nth*-defective mutant. From these results it is concluded that MutM, Nei, Nth proteins are involved in the repair of 5-foU in *E. coli*. Furthermore, it was also found that the *S. cerevisiae* OGG1 and human OGG1 proteins recognized and removed 5-foU from DNA.

1. 研究目的

活性酸素や放射線は、鎖切断、塩基や糖の損傷など多種多様な損傷をDNAに引き起こす。しかし、それら個々の損傷が細胞致死や突然変異誘発作用にどのような役割を果たすのか、それらはどのような機構で修復されるのかは多くの場合まだ理解されていない。本研究の目的は、チミンのメチル基へのOHラジカルの付加反応によって生じる5-フォルミルウラシルの生物学的作用と、その修復酵素を解明することにある。さらに、私たちが発見した5-フォルミルウラシル-DNAグリコシラーゼの遺伝子を同定するとともに、その遺伝子をノックアウトした細胞やマウスを用いて5-フォルミルウラシルの生物学的意義について新しい知見を得ることである。活性酸素や放射線が

生成する多種多様なDNA損傷の個々の生物作用を知るためには、その損傷だけを含むオリゴヌクレオチドの合成が成功への大きな決め手になる。申請者らはすでに5-フォルミルウラシルを1カ所だけ含むオリゴヌクレオチドの化学合成に成功した。まずAの前駆体を任意の部位に含むオリゴヌクレオチドを合成し、これを穏やかに酸化させて5-フォルミルウラシル(B)に転換させた。



このようにして合成したオリゴヌクレオチ

ドは、5-フォルミルウラシルの生物学的効果、とくにどのような突然変異を起こすのかを解明するためにも、さらに、その修復酵素の研究にもきわめて有用である。そこで、本研究では、合成したオリゴヌクレオチドを基質にして、5-フォルミルウラシルの修復酵素の同定と、5-フォルミルウラシルに由来する突然変異の生成におけるこれらの酵素の抑制機能について検討した。

2. 研究経過

2. 1. 方法

AP リアーゼ活性を持つ DNA グリコシラーゼは、8-オキソグアニンなどの損傷塩基を修復する際に、シッフ塩基中間体を形成するが、このとき NaBH_4 で還元すると、DNA とグリコシラーゼが共有結合するようになる。この反応をトラッピングと呼ぶ。SDS-ポリアクリルアミドで電気泳動すると、ラベルしたオリゴヌクレオチドとトラッピングしたタンパクを容易に検出することができる。私たちは、5-フォルミルウラシルの修復酵素を、還元剤存在下でトラッピングを起こすことを利用して同定した。さらに、5-フォルミルウラシルを含む二重鎖オリゴヌクレオチドに対する得意的切断反応を調べた。

5-フォルミルウラシル突然変異は、この損傷を制限酵素 (*SaI*、*HincII*) の認識配列内に含むプラスミドを大腸菌で複製させ、それらの制限酵素に抵抗性になったプラスミドを選択し、そのヌクレオチド配列を決定した。

2. 2. 結果および考察

5-フォルミルウラシルの修復酵素の同定と精製

大腸菌野生株の抽出液 (extract) と5-フォルミルウラシルを含む二重鎖オリゴヌクレオチドを NaBH_4 存在下で反応させると、3種類の異なるタンパクが関与する複合体が形成した。



Trapping assay. From left; extracts from wild-type, *nth*, *nei*, *mutM*, *mutMnei*, *mutMnth*, *nthnei*, *nthneimutM*.

これらのタンパクを同定するために、まず、種々の DNA 修復酵素の欠損株から抽出液を調整し、上と同様のトラッピング反応を行った。その結果、大腸菌 *mutM*、*nth* および *nei* 変異株の抽出液中には3種類のタンパクのうちの1つが検出できなかった。これらの修復遺伝子をすべて欠損した *mutMnthnei* 三重変異株では5-フォルミルウラシルを含むオリゴヌクレオチドにトラップされるタンパクは完全に無くなった。さらに、正常な *mutM*、*nth*、*nei* 遺伝子をプラスミドにクローニングし、それぞれを三重変異株に導入すると、それぞれの変異株で欠失した複合体がゲル上で回復した。これらの結果は、*MutM*、*Nth* (endonuclease III)、*Nei* (endonuclease VIII) は DNA に生じた5-フォルミルウラシルを認識して、その損傷を除去する DNA グリコシラーゼと AP リアーゼ活性をもっていることを示唆している。

そこで、これらの修復酵素を精製して、この結論が妥当であることを証明しようとした。*glutathione-S-transferase* (GST)-*Nth* を発現するプラスミドは以下のように作成した。*nth* 遺伝子を全長もつプラスミド

pACYC 177-*nth*+ を、*nth* 遺伝子を増幅させる PCR の鋳型として用いた。開始コドン付近に *Bam*HI 部位を持つプライマー (5'-TAGGGATCCCGTCTGATGAATAAAGCAA-3') と、終止コドン付近に *Eco*RI 部位をもつプライマー (5'-CCCGCGAATTCACCATGTCAAC-3') を使って PCR を行った。増幅された 662 bp のフラグメントを、制限酵素 *Bam*HI および *Eco*RI で切断し、その *nth* 遺伝子の全長を、同じく *Bam*HI および *Eco*RI で切断したベクター pGEX-4T-1 につなげた。このプラスミドを pGEX-4T-1-Nth と呼ぶ。大腸菌 BL21 株をカルシウム法によって pGEX-4T-1-Nth で形質転換した。

BL21/pGEX-4T-1-Nth を培養し、IPTG を加えて GST-Nth タンパクを高発現させた。GST-Sephadex 4B column に抽出液をアプライし、5 mM glutathione / 50 mM Tris-HCl (pH 9.6) で GST-Nth fusion protein を溶出させて回収した。GST-Nth タンパクを thrombin で切断した Nth タンパクを精製サンプルとした。

Nei, *MutM* タンパクについても FPLC を用いて精製した。

精製したこれらのタンパクをそれぞれ、5-フォルミルウラシルを含むオリゴヌクレオチドと反応させた。その結果、これらのタンパクは NaBH_4 存在下でこのオリゴヌクレオチドと複合体を形成することが分かった。さらに、これらのタンパクはいずれも、5-フォルミルウラシルの部位でオリゴヌクレオチドを切断することも明らかにすることができた。これらの結果は、大腸菌では、*MutM*, *Nth*, *Nei* タンパクは 5-フォルミルウラシルを修復する DNA-グリコシラーゼ活性をもっていることを強く示している。

5-フォルミルウラシルを持つプラスミドの突然変異とその抑制

次に、5-フォルミルウラシルを持つプラスミド pSVK3 を構築した。5-フォルミルウラシルは前述したように 2 種類の制限酵素の認識配列に導入した。細胞内での複製の際に、この損傷がアデニンだけでなく他の塩基をその相手側に取り込むことがあれば、制限酵素での切断が起こらなくなると予想した。

プラスミド中に 1 個の 5-フォルミルウラシルが含まれていても形質転換の効率にはほとんど影響はなかった。5-フォルミルウラシルは *in vivo* の複製の際、効率的にバイパスされていることが示唆された。このことは *in vitro* での実験の結果と一致していた (Zhang et al., *Nucleic Acids Res.* **25**, 3969-3973, 1997)。次に、突然変異の頻度を求めた。結果をまとめると、

Table 1. Mutation frequencies of plasmids containing 5-foU in wild-type *E. coli*

Sequence	Mutation frequency (%)	
	Experiment 1	Experiment 2
GTCGAC	0.02	<0.009
GFCGAC	0.05	0.06
CTTAAG	0.002	0.005
CTFAAC	0.011	0.02

このように、5-フォルミルウラシルは正常なチミンを含むプラスミドの場合に比べて、その頻度は低いですが、有意に突然変異を起こすことが分かる。チミンの場合に比べて、約 5~8 倍の突然変異頻度を示した。

一方、5-フォルミルウラシルプラスミドを大腸菌の *mutMnthnei* 三重変異株 (さらに、*alkA* 変異を導入した) の中で複製させたところ、その突然変異頻度野生株に比べてさらに約 10 倍増大した。この結果は、

これらの酵素は細胞内でも 5-フォルミルウラシルの修復に関与していることを示している。

酵母およびヒト細胞での 5-フォルミルウラシル修復酵素の同定

さらに、ヒトの Nth ホモログである hNTH タンパク（精製した酵素）が 5-フォルミルウラシルを修復できること、同様の酵素は酵母、*C. elegans* の抽出液の中にも存在することを見つけている。

3. 研究成果

大腸菌の MutM、Nth、Nei タンパクは細胞内でも 5-フォルミルウラシルの修復に関与していることを明らかにした。ヒトの Nth ホモログである hNTH タンパク（精製した酵素）が同様の活性を持っていることも示すことができた。一方で、5-フォルミルウラシルが突然変異を生成することができることにも確かな証拠を与えることに成功した。

4. 今後の課題と発展

1) トラッピング実験の結果は、酵母およびヒト細胞（HeLa 細胞）の抽出液にまだ同定されていない 5-フォルミルウラシル修復酵素が存在することを示唆している。これらの酵素を同定するとともに、*C. elegans* の同様の酵素の同定を進めたい。

2) 5-フォルミルウラシル-DNA グリコシラーゼとしての MutM などのタンパクの反応機構を 8-オキシグアニン-、チミングリコール-DNA グリコシラーゼのそれと比較させ、基質認識の生化学的解析を進めたい。

5. 発表論文リスト

1. Replication in vitro and cleavage by restriction endonuclease of 5-formyluracil- and 5-hydroxymethyluracil-containing oligonucleotides. Zhang, Q.-M., H. Sugiyama, I. Miyabe, S., Matsuda, K. Kino, I. Saito and S. Yonei. *Int. J. Radiat. Biol.*, **1999**, *75*, 59-65.
2. Differential subcellular localization of human MutY homolog (hMYH) and the functional activity of adenine: 8-oxoguanine DNA glycosylase. Takao, M., Q.-M. Zhang, S. Yonei and A. Yasui, *Nucleic Acids Res.*, **1999**, *15*, 3638-3644.
3. Some features of base excision repair and its role in prevention of spontaneous and radiation-induced mutations. Zhang, Q.-M., I. Miyabe, K. Hashiguchi and S. Yonei. in: *Free Radicals in Chemistry, Biology and Medicine 2000* (Edited by T. Yoshikawa, J. Yamamoto, Y. Naito and S. Toyokuni), Elsevier, Amsterdam, **2000**, in press.
4. Identification of proteins of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* that specifically bind to C/C mismatches in DNA. Nakahara, T., Q.-M. Zhang, K. Hashiguchi and S. Yonei. *Nucleic Acids Res.*, **2000**, in press.
5. Mutagenic effects of 5-formyluracil on a plasmid vector during replication in *Escherichia coli*. Miyabe, I., Q.-M. Zhang, H. Sugiyama, K. Kino and S. Yonei. **2000**, submitted.
6. Identification of repair enzymes for 5-formyluracil in DNA: Endonuclease III, endonuclease VIII and MutM proteins of *Escherichia coli*. Zhang, Q.-M., I. Miyabe, Y. Matsumoto, H. Sugiyama, K. Kino and S. Yonei. **2000**, submitted.