

T. thermophilus HB8 由来 3'-5' exonuclease TTHB178 の分子機能解析Molecular functional analysis of TTHB178 from *T. thermophilus* HB8島田敦広¹, 中川紀子^{1,2}, 増井良治^{1,2}, 倉光成紀^{1,2}Atsuhiko Shimada¹, Noriko Nakagawa^{1,2}, Ryoji Masui^{1,2}, and Seiki Kuramitsu^{1,2}¹ 阪大・院理・生物科学, ² 理研・播磨研¹(Dept. Biol., Grad. Sch. Sci., Osaka Univ., ²RIKEN SPring-8 Center, Harima Inst.)e-mail: a_shima@bio.sci.osaka-u.ac.jp

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 は遺伝子数が約 2000 個と少ないため、生命現象の解析に適したモデル生物である。我々は *T. thermophilus* HB8 について、DNA 傷害修復系酵素群の解析を進めている。一般に DNA 二重鎖切断の修復などには一本鎖 DNA (ssDNA) に特異的な exonuclease が必要とされる。*T. thermophilus* HB8 では ssDNA 特異的な 5'-3' exonuclease は複数同定されているが、3'-5' exonuclease (3'-5' Exo) は未だに発見されていない。しかし、そのような特異性をもつ exonuclease は相同組換えの抑制や SOS 応答の制御にも関与している可能性がある。DnaQ superfamily に属する原核生物の 3'-5' Exo は、N 末端側に Exonuc_X-T モチーフ、C 末端側に Exonuc_X-T_C モチーフを持つ。*T. thermophilus* HB8 ゲノム配列を検索した結果 Exonuc_X-T モチーフを有する TTHB178 が 3'-5' Exo ではないかと推定した。しかし、TTHB178 には Exonuc_X-T_C モチーフはなく、既知の 3'-5' Exo とは異なる活性を示す可能性が考えられた。そこで、本研究では TTHB178 の機能解析を行った。

pET システムを用いて TTHB178 を大量発現させ、精製した。TTHB178 は 60°Cまで安定であり、ゲル濾過の結果から ExoI などとは異なり、溶液中では二量体で存在することが分かった。次に、ssDNA、二本鎖 DNA、ssRNA に対する活性測定を行ったところ、ssDNA に対してのみ 3'-5' Exo 活性を示し、その活性発現には Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ のような二価金属イオンが必要であった。またその活性は基質 DNA が長いほど高くなった。次に種々の傷害塩基を含む基質 DNA に対する活性測定から、uracil や hypoxanthine といった脱アミノ傷害塩基、O⁶-methylguanine などのメチル化傷害塩基を含むヌクレオチドは分解できるが、8-oxoguanine や脱塩基部位を含むヌクレオチドは分解できないことが示された。さらに、TTHB178 の破壊株は野生型に比べて過酸化水素に対する感受性を示し、自然突然変異率の上昇も確認された。これらの結果から、TTHB178 は複数の DNA 傷害修復経路に関与していることが示唆された。

表 1. ssDNA 特異的な exonuclease



図 1. TTHB178 と ExoI の配列比較

	exonucleases	5' → 3'	3' → 5'
<i>T. thermophilus</i>	TTHB178	×?	○?
	RecJ	○	×
<i>E. coli</i>	ExoI	×	○
	ExoVII	○	○
	ExoX	×	○
	RecJ	○	×