

生物界に広く保存されたヌクレアーゼ EndoV の構造機能解析

## Structural and functional analysis of EndoV: a ubiquitous nuclease family

井上真男<sup>1</sup>, 中川紀子<sup>1,2</sup>, 増井良治<sup>1,2</sup>, 倉光成紀<sup>1,2</sup>

Masao Inoue<sup>1</sup>, Noriko Nakagawa<sup>1,2</sup>, Ryoji Masui<sup>1,2</sup> and Seiki Kuramitsu<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>阪大・院理・生物科学,<sup>2</sup>理研・播磨研)

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

e-mail: [masao@bio.sci.osaka-u.ac.jp](mailto:masao@bio.sci.osaka-u.ac.jp)

ヌクレアーゼは核酸 (DNA や RNA) のホスホジエステル結合を切断する酵素であり, DNA の複製や修復, 組換え, RNA の分解や編集などといった生体内での多様なサブシステムにおいて重要な機能を担っている。特に, DNA の修復システムにおけるヌクレアーゼは傷害 DNA を除去する上で必須の因子である。その中で, EndoV は脱アミノ反応によって DNA 中に生じた傷害の 3' 側の 2 番目のホスホジエステル結合を切断し, ニック (切れ目) を入れるヌクレアーゼである。脱アミノ反応は, DNA を構成する 4 つの塩基 (A, G, C, T) のうち 3 つ (A, G, C) において起こり, 傷害塩基を生じて突然変異を誘発する。特に, ヒトなどにおいては DNA の脱アミノ傷害が免疫・炎症反応によって引き起こされるガンの原因となると考えられている (図 1)。また, 最近になって EndoV 遺伝子のノックアウトマウスでは発ガンのリスクが高まることが明らかになっており, EndoV が DNA の脱アミノ傷害を修復し, 突然変異を抑制する上で重要な働きをしていることが示唆されている [1]。しかし, 面白いことに EndoV はニックを入れるだけで傷害を取り除くことはせず, その後の修復経路や他の DNA 修復系タンパク質との関係においては未解明な点が多い。また, EndoV はバクテリア, アーキアからヒトに至るまで生物界に広く保存されており, その反応機構や修復システムは多くの生物で共通であると考えられる。そこで本研究では, 遺伝子数が少なく最小限の因子でシステムが構築されていると考えられ, タンパク質が熱に安定で生化学的な解析や結晶化に適した好熱菌をモデル生物として EndoV の構造機能解析を行った。

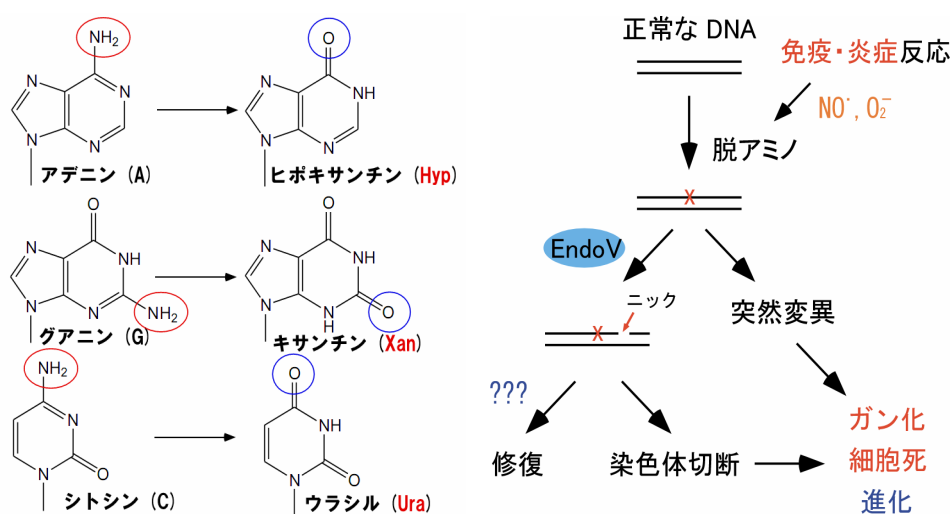


図 1. DNA の脱アミノ反応 (左) と EndoV 修復システムの概要 (右)

まず、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 EndoV (TtEndoV) の分子機能を調べるために、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 に対して活性測定を行った。TtEndoV は  $Mg^{2+}$  存在下でヒポキサンチン特異的なニッキング活性を示し、一本鎖 DNA に対しても二本鎖 DNA に対しても活性の大きさは同じであった。また、 $Mn^{2+}$  存在下においてはヒポキサンチンだけでなくキサンチンや脱塩基部位を含む DNA に対してもニッキング活性を示した。一方で、ウラシルやミスマッチ塩基対、酸化傷害、アルキル化傷害を含む DNA に対してはニッキング活性を示さなかった。さらに、 $Mn^{2+}$  存在下において二本鎖 DNA 末端に対して 5'→3' エキソヌクレアーゼ活性を示すことを見出し、これらの結果から TtEndoV の DNA 修復システムのモデルを考察した。

次に、EndoV の持つヌクレアーゼ活性の反応機構を調べるために、X 線結晶構造解析を行った。TtEndoV を用いて結晶化を行ったところ、幾つかの条件で結晶が得られたものの構造決定に至る良質の結晶は得られなかった。そこで、超好熱菌 *Thermotoga maritima* 由来 EndoV (TmEndoV) について X 線結晶構造解析を行ったところ、1.7 Å の分解能で結晶構造を決定することに成功した(図 2)。得られた立体構造の活性部位には 1 つの  $Ca^{2+}$  が結合しており、既知の立体構造と比較することによって金属イオンの結合様式とヌクレアーゼ活性の制御機構について考察した。



図 2. EndoV の立体構造

#### Reference

- [1] Dalhas B. *et al.* (2009) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 138-143