

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}

Atsuhiro 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)

(¹Dept. Biol., Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.,²RIKEN SPring-8 Center, Harima Inst.)

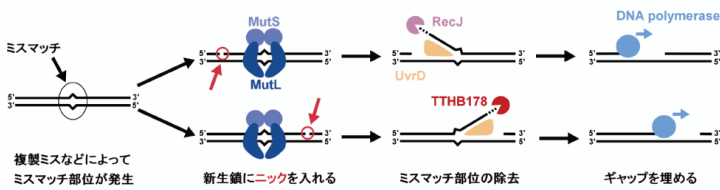
e-mail: a_shima@bio.sci.osaka-u.ac.jp

一本鎖 DNA 特異的エキソヌクレアーゼ (ssExo) は、(1) DNA ミスマッチ修復や (2) 二重鎖切断修復、(3) 脱アミノ傷害修復など、様々な DNA 修復システムに関わっている重要な酵素であり、一本鎖 DNA を 3' 側から分解するもの (3'-ssExo) と、5' 側から分解するもの (5'-ssExo) が存在する (図 1)。こうした ssExo の分解活性の方向性によって、それぞれの ssExo が関与する DNA 修復システムが異なることが示唆されてきたが、いまだ明確な証明は成されていない。その理由として、これまで研究されてきた大腸菌などのモデル生物は、活性の重複する複数の ssExo を持っており (表 1)、破壊株を用いた解析が容易ではなかったことが挙げられる。モデル生物である高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 は、5'-ssExo として RecJ のみと 3'-ssExo として TTHB178 のみしか持っていないため、各々の ssExo の関わる DNA 修復システムを明らかにすることに適していると考えられた。

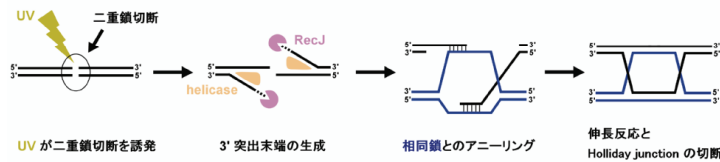
表 1. 生物の持つ ssExo の数

生物種	活性の方向		
	5' → 3'	3' → 5'	5' ← 3'
<i>T. thermophilus</i>	1	1 ?	0
<i>Escherichia coli</i>	1	3	1
<i>Homo sapiens</i>	2	5	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	3	0

(1) ミスマッチ修復



(2) 二重鎖切断修復



(3) 鎖除去修復

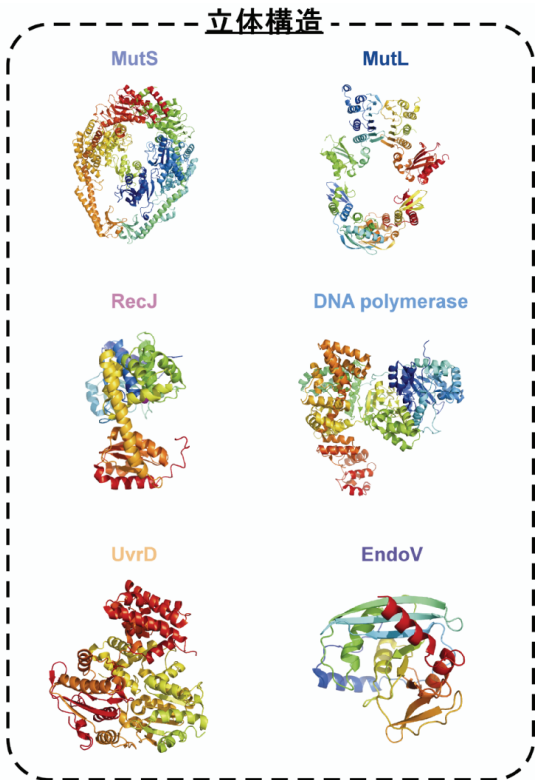
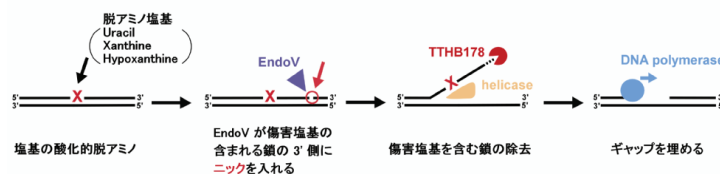


図 1. ssExo の関わる DNA 修復システムのモデル

そこで、まず RecJ、TTHB178 それぞれの遺伝子破壊株と二重遺伝子破壊株を作製し、様々な DNA 損傷ストレスに対する表現型を比較した。*recJ* 破壊株 ($\Delta recJ$) と二重遺伝子破壊株は、DNA 二重鎖切断を誘発する短波長紫外線に対して、野生株と *tthb178* 破壊株 ($\Delta tthb178$) よりも高い感受性を示した。一方で、塩基の酸化や脱アミノを誘発する過酸化水素に対しては、 $\Delta tthb178$ と二重遺伝子破壊株が野生株と $\Delta recJ$ よりも高い感受性を示した。さらに、DNA ミスマッチに起因する自然突然変異を、ストレプトマイシン耐性株の出現頻度によって調べたところ、野生株と $\Delta tthb178$ 、 $\Delta recJ$ の間には大きな差は観察されなかったが、二重遺伝子破壊株は野生株に比べて高い出現頻度を示した。これらの結果から、ssExo の分解活性の方向性によって関与する DNA 修復経路が異なることが示唆された。次に、精製した TTHB178 を用いて種々の傷害塩基 (図 2) を含む一本鎖 DNA に対して活性測定を行ったところ、uracil や hypoxanthine、xanthine といった脱アミノ傷害塩基、*O*⁶-methylguanine、*O*⁴-methylthymine といったメチル化傷害塩基を含むヌクレオチドは分解できたが、8-oxoguanine や脱塩基部位 (AP site) を含むヌクレオチドはほとんど分解できなかった。以上の結果から、RecJ と TTHB178 のそれぞれが関わる DNA 修復システムのモデルを考察した (図 1)。

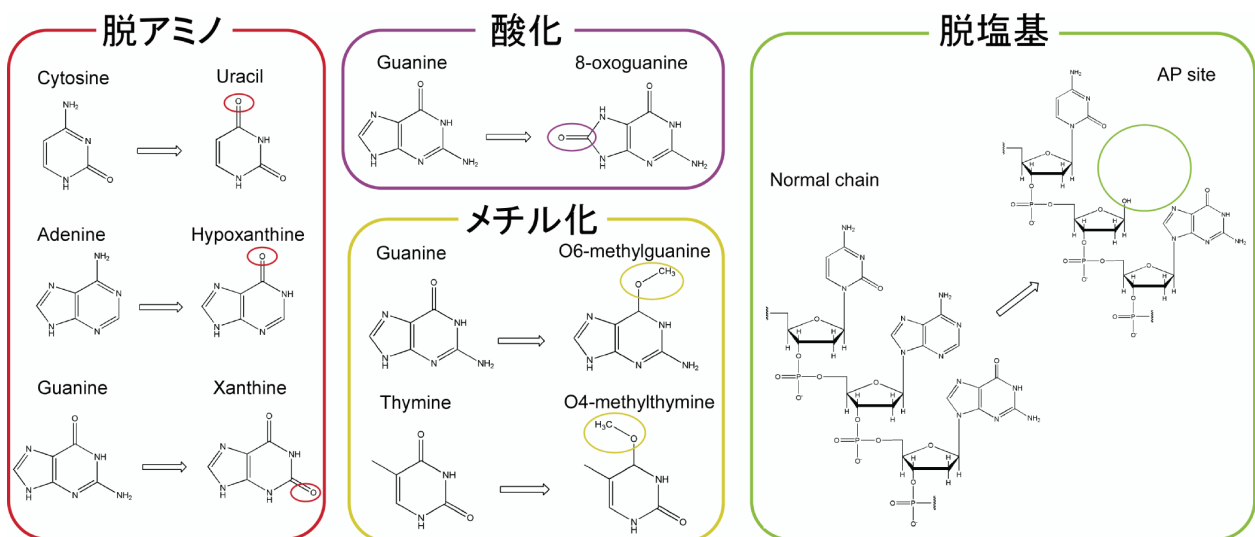


図 2. 種々の DNA 傷害塩基の構造式