

**X-ray Crystallographic Analysis of Endonuclease V from *Thermus thermophilus* HB8**高度高熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 endonuclease V の結晶化

Hitomi Yamaguchi, Kei Wada, Atsushi Yamagata,

Yasuhiro Takahashi and Keiichi Fukuyama

山口瞳, 和田啓, 山形敦史, 高橋康弘, 福山恵一

(Grad. School of Science, Osaka University)

(阪大院・理)

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

DNA の損傷には DNA の構造変化をもたらすものや、構造変化をほとんど伴わない塩基修飾などが知られている。これらの損傷は、ヌクレオチド除去もしくは塩基除去により修復される。ヌクレオチド除去修復では、DNA 構造変化の有無に関わらず損傷を含む広範囲のヌクレオチド鎖 (12~30 bp) が切り取られる。一方、塩基除去修復は、脱アミノ化、アルキル化などを受けた塩基のみが修復される。近年、損傷 DNA への結合力が強く、二本鎖の片側だけを切断する DNA 修復酵素 endonuclease V (Endo V) が発見され、新規な修復機構の存在が示唆された。この修復機構では、Endo V がアデニンの脱アミノ化体であるヒポキサンチンを含む ssDNA および dsDNA に強く結合し、 $Mg^{2+}$  存在下でヒポキサンチンから 3' 側にある二番目のリン酸結合を切断する。この DNA 切断様式から、Endo V による修復は塩基除去修復やヌクレオチド除去修復とは全く異なった機構が考えられる。しかし、Endo V によるリン酸結合切断後のヒポキサンチンの除去機構や他のタンパク質の関与は現在のところ不明である。そこで本研究では、Endo V の立体構造から損傷 DNA の認識・切断様式を明らかにするために、*Thermus thermophilus* HB8 由来する Endo V の結晶化を試みた。

当初 Endo V 全長の*E. coli*による発現および熱処理を用いた精製を試みたが、発現量が非常に少なく、精製タンパク質を得ることができなかった。そこで、His-tag によるアフィニティー精製を行うために、Endo V の N 末端に His-tag を付加する発現プラスミドを構築した。この発現プラスミドを用いて、*E. coli* C41 (DE3) 株を形質転換し、大量培養を行った。次に Ni-NTA によるアフィニティーおよびゲルろ過クロマトグラフィーにより Endo V を精製した。また、トロンビンによる消化を行い、His-Tag を除去した Endo V も精製した。結晶化条件の検索を行った結果、His-tag Endo V ではポリエチレングリコールを沈殿剤とした条件において結晶を得た (図 1)。得られた結晶について SPring-8 において回折 X 線測定を行った結果、2.8 Å 分解能までの強度データを収集した。この結晶は正方晶系に属し、空間群は  $P4_1$  もしくは  $P4_3$ 、格子定数は  $a = b = 170.6 \text{ \AA}$  および  $c = 55.4 \text{ \AA}$  であった。非対称単位中に Endo V が 5~9 分子存在すると、 $V_m$  は  $1.8 \sim 3.2 \text{ \AA}^3/\text{Da}$  と妥当な値をとる。現在、重原子誘導体結晶の作製を進めている。また基質 (ssDNA および dsDNA) との共結晶化も行っており、dsDNA について  $Mg^{2+}$  存在下において結晶を得ている。



図 1. Endo V の結晶