

酸化傷害 DNA 修復酵素 MutM の反応機構の解析

Analysis of reaction mechanisms of oxidatively-damaged DNA repair enzyme MutM

富山理恵¹, 中川紀子^{1,2}, 増井良治^{1,2}, 倉光成紀^{1,2}Rie tomiyama¹, Noriko Nakagawa^{1,2}, Ryouji Masui^{1,2}, Seiki Kuramitsu^{1,2}(¹大阪大学理学研究科生物学専攻, ²理研播磨)(¹Dpt.Biol.Sci.,Grad.Sch.Sci.,Osaka Univ., ²Riken Harima Inst.,)

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

DNA において最も酸化傷害を受けやすいのはグアニン

(G) であり、G が酸化されると 8-オキシグアニン (OG) が生じる。OG は A と対合することができ、この状態で複製が起きると、G:C→T:A のトランスポージョンが起きる。この変異を防ぐために、OG:C から OG を除去する酵素が MutM である。MutM は (1) OG:C を含む塩基対を認識し、(2) OG 塩基を DNA 二本鎖の中から外側へ反転させて MutM の活性部位に入れ (フリップアウト)、(3) OG 塩基を取り除き (グリコシラーゼ活性)、(4) 残った脱塩基部位の 5'側、3'側のリン酸ジエステル結合を切断 (AP リアーゼ活性) する。我々は高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 の MutM を用いて、その詳細な反応機構を明らかにするため、いくつかの残基について変異体を作成し、その活性測定を行った。

まず MutM-DNA 複合体の立体構造で、OG 部位のリン酸基と相互作用しうる位置にある Arg253 と Lys52 に注目した。これらをそれぞれ Met と Ala に置換した変異型酵素 R253M、K52A は、いずれも活性が大きく低下していた。さらに 2-アミノプリンを含む蛍光 DNA などを用いて各反応段階の活性を測定したところ、Arg253 は DNA 結合に、Lys52 は DNA 結合とフリップアウト、AP lyase 活性に重要な働きをすることが示唆された。

次に、OG のフリップアウトによって生じた DNA 二本鎖の間隙に挿入されている Met70、Arg99、Phe101 の働きを解明するため、それぞれを Ala に置換した変異体を作製し、同様の実験を行った。その結果、Met70 は DNA の構造変化、Arg99 は DNA 結合とフリップアウト、Phe101 はフリップアウトにそれぞれ必須であることが示唆された。

