

学 位 論 文 題 名

紫外線損傷 DNA 修復酵素 T 4 エンドヌクレアーゼ V の
基質認識に関する研究

学位論文内容の要旨

序 論

T 4 エンドヌクレアーゼ V は、紫外線損傷 DNA 修復酵素である。本酵素は紫外線による DNA 損傷の中でも *cis-syn* シクロブタン型ピリミジンフォトダイマーに高い特異性を示し、その除去修復初期段階において機能して、以下に示す 4 種の一連の特異的活性を有する。

- (1) 塩濃度依存性の、二本鎖 DNA 上の直線移動
- (2) ピリミジンフォトダイマー部位への特異的結合活性
- (3) ピリミジンフォトダイマーの 5' グリコシル結合に特異的な DNA グリコシラーゼ活性
- (4) アピリミジニックサイト 3' フォスフォジエステル結合を切断するアピリミジニック／アブリニック（AP）エンドヌクレアーゼ活性

T 4 エンドヌクレアーゼ V は DNA 修復酵素の中で X 線結晶解析がなされた数少ない例であり、蛋白工学的手法を用いてその構造活性相関が探索されつつある。しかし、DNA と酵素の相互作用については直接的な知見は得られていない。さらに、各活性に必要なアミノ酸残基も特定されていない。そこで筆者は光親和性標識及びメチル化保護法を用いて T 4 エンドヌクレアーゼ V の結合部位を検索し、酵素の変異体を用いてグリコシラーゼ活性及び AP エンドヌクレアーゼ活性について関与していると考えられるアミノ酸残基を見いだした。

本 論

第一章 光親和性試薬を用いた基質結合部位の検索

ジアジリン光活性基は吸収波長（ λ_{max} 355nm）を照射することによって光分解を起こす。その結果カルベンを生じ、近傍にある分子と共有結合を作るため、光活性基質と酵素を結合させ、光分解を行なうと基質の近傍にあるアミノ酸を標識すると考えられる。

筆者は、d (CGAAGGTTGGAAGC) の配列をもち、二つのチミンの間のリン酸基がアミノエチルホスホネートであるオリゴデオキシリボヌクレオチドを合成し、それより、チミンフォトダイマー間に存在するリン酸部分にジアジリン光活性基を含む誘導体を合成した。

^{32}P で 5' 末端ラベルをした二本鎖光活性基質に T 4 エンドヌクレアーゼ V を加え、UV 照射により酵素と基質の間に共有結合を生じさせた。標識後、未反応酵素を除去し、光標識された酵素をリジルエンドペプチダーゼによって消化した。未標識酵素の消化ペプチド名をアミノ末端側から LEP-1 ~ LEP-11 としてペプチドマッピングを行ない、逆相 HPLC で溶出した場合の各ペプチドの保持時間を同定した。光標識された酵素の消化ペプチドを、逆相 HPLC で光標識ペプチドのオリゴデオキシリボヌクレオチドが吸着して溶出しない系を用いて分析した。つまり、量的に減少が見られるペプチドが光標識されたものと考えられる。チミンダイマーを含む基質を光反応させた場合の溶出パターンは未反応の場合と比べて LEP-8, LEP-9, LEP-10 の減少が観察された。それに対してチミンダイマーを含まない基質を光反応させた場合では LEP-8 の減少が観察された。

逆相 HPLC のカラムと溶出系をオリゴデオキシリボヌクレオチドが溶出するものに換え、チミンダイマーのある基質を用いた場合の光標識ペプチドを単離した、エドマン分析によって反応ペプチド (LEP-8, LEP-9, LEP-10) 及び反応部位 (T-89, Y-129, G-133) を特定した。

そして、チミンダイマーを含まない場合は LEP-8 であったことから、LEP-8 (T-89 を含む) が二本鎖 DNA への非特異的結合に関与していることが示唆された。一方、Y-129, G-133 は T 4 エンドヌクレアーゼ V の特徴的な配列 WYKYY 芳香族クラスターを含むグループの中にあり、基質結合に関わっていることを明らかにした。

第二章 メチル化保護法による DNA への結合部位の検索

マクサム・ギルバート法の条件でジメチル硫酸によってメチル化を行うと 7-メチルグアニンと 3-メチルアデニンが生ずる。グアニンの 7 位はメジャーグループ、アデニンの 3 位はマイナーグループ側に位置することから、蛋白を結合させることによってメチル化が阻止される部分を調べるとその結合部位を知ることができる。筆者は、化学合成された鎖長 18 のチミンダイマーを一分子に一個含む二本鎖オリゴヌクレオチドに対して、上述のメチル化保護実験を行った。その結果、チミンダイマーに相補する二個のアデニンのメチル化が阻止された。このことから T 4 エンドヌクレアーゼ V がマイナーグループ側から結合していることが示唆された。さらに鎖長 30 の二

本鎖オリゴヌクレオチドを用いて同様の実験を行い、チミンダイマーの相補部位にアデニンを配したものとグアニンを配したものを比較した。その結果グアニンのメチル化は阻止されず、相補部位がアデニンの場合にメチル化が阻止されるということが分かった。これらのことから T 4 エンドヌクレアーゼ V は基質 DNA のチミンフォートダイマー部位にマイナーグループ側から結合していることが明らかとなった。

第三章 核酸の CD スペクトル変化から見た基質結合活性の解析

T 4 エンドヌクレアーゼ V の変異体のうち、グリコシラーゼ活性を検出できなかったものは 23 番目のグルタミン酸変異体と 3 番目のアルギニン変異体であった。核酸の CD スペクトルを用いてそれらの変異体の結合活性を調べたところ、E 23 Q は結合活性を保持しているが、R 3 Q の場合は二本鎖 DNA に対する結合活性を失っているとの結果を得た。以上のことから、23 番目のグルタミン酸はグリコシラーゼ活性に非常に重要な役割を担っていること、3 番目のアルギニンは基質との結合活性に関与していることが分かった。

第四章 AP エンドヌクレアーゼ活性部位の検索

AP エンドヌクレアーゼ活のみを測定するために、アベシック部位を一分子に一個含む鎖長 14 のデオキシオリゴヌクレオチドを化学合成し、野生型及び変異型酵素による切断実験を行った。その中で、E 23 Q には活性がなく、E 23 D には活性が保持されていた。幾つかの変異体についてキネティックパラメーターを求めたところ、E 23 D は k_{cat} が低下し、 K_m には大きな変化は見られなかった。R 3 Q、R 3 K については k_{cat} が低下し、 K_m は大きくなり、R 26 K、R 22 Q については野生型と大きな差は見られなかった。これらのことから 23 番目のグルタミン酸が AP エンドヌクレアーゼ活性に重要な役割を果たし、3 番目のアルギニンは基質結合に役割を担っていることが分かった。

さらに活性部位を検索するため、アミノ酸変異体を用いて AP エンドヌクレアーゼ活性の pH 依存性を調べた。その結果、E 23 D の至適 pH は、pH 5.0 と野生型の至適 pH が pH 5.5 に比べて酸性側に移動していることが分かった。アスパラギン酸の pKa はグルタミン酸の pKa よりも酸性側にあると考えられることから、この結果は、23 番目のグルタミン酸のカルボキシル基が AP エンドヌクレアーゼ活性に重要な役割を果たしていることを示している。

結 論

- 1) T4 エンドヌクレアーゼVの芳香族クラスターを含むループ部分が基質の近傍にあることを見出した。
- 2) T4 エンドヌクレアーゼVが基質 DNA のチミンフォトダイマー部位に対してマイナーグループ側から結合していることを明らかにした。
- 3) 23番目のグルタミン酸がグリコシラーゼ活性に重要な役割を果たしていること、及び3番目のアルギニンが基質結合に関与していることを示した。
- 4) 23番目のグルタミン酸がAP-エンドヌクレアーゼ活性に関与しているという知見を得た。

学位論文審査の要旨

主査	教授	大塚	栄子
副査	教授	横沢	英良
副査	教授	松田	彰
副査	助教授	井上	英夫

申請者は紫外線損傷 DNA を修復する酵素の一種である T4 ファージのエンドヌクレアーゼ V の基質認識に関する研究を行ってきたが、今回以下のような新たな知見を得た。

T4 エンドヌクレアーゼVは DNA 修復酵素の中で X 線結晶解析がなされた数少ない例であり、蛋白工学的手法を用いてその構造活性相関が探索されつつある。しかし、DNA と酵素の相互作用については直接的な知見は得られていなかった。申請者は光親和性標識及びメチル化保護法を用いて T4 エンドヌクレアーゼVの結合部位を検索し、酵素の変異体を用いてこの酵素のもつグリコシラーゼ活性及び AP エンドヌクレアーゼ活性について関与していると考えられるアミノ酸残基を見いだした。

メチル化保護法による DNA への結合部位の検索にはマクサム・ギルバート法の条件でジメチル硫酸によってメチル化を行う方法を用いた。グアニンの7位はメジャーグループ、アデニンの3位はマイナーグループ側に位置することから、蛋白を結合させることによってメチル化が阻止される部分を調べるとその結合部位を知ることができる。メチル化保護実験の結果、チミンダイマーに相補する二個のアデニンのメチル化が阻止された。このことから T4 エンドヌクレアーゼVがマイナーグループ側から結合していることが示唆された。さらに鎖長30の二本鎖オリゴヌ

クレオチドを用いて同様の実験を行い、T 4 エンドヌクレアーゼ V は基質の DNA のチミンフォトダイマー部位にマイナーグループ側から結合していることを明らかにした。

次に、核酸の CD スペクトル変化から見た基質結合活性の解析を行った。T 4 エンドヌクレアーゼ V の変異体のうち、グリコシラーゼ活性を検出できなかったものは23番目のグルタミン酸変異体と3番目のアルギニン変異体であった。核酸の CD スペクトルを用いてそれらの変異体の結合活性を調べたところ、E 23 Q は結合活性を保持しているが、R 3 Q の場合は二本鎖 DNA に対する結合活性を失っているとの結果を得た。以上のことから、23番目のグルタミン酸はグリコシラーゼ活性に非常に重要な役割を担っていること、3番目のアルギニンは基質との結合活性に関与していることを見出した。

また、AP エンドヌクレアーゼ活性のみを測定するために、アペイシック部位を一分子に一個含む鎖長14デオキシオリゴヌクレオチドを化学合成し、野生型及び変異型酵素による切断実験を行った。

さらに活性部位を検索するため、アミノ酸変異体を用いて AP エンドヌクレアーゼ活性の pH 依存性を調べた。その結果、23番目のグルタミン酸のカルボキシル基が AP エンドヌクレアーゼ活性に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

以上の業績は博士（薬学）を授与するに値するものと認めた。