

志田 敏夫

目的別テーマ：天然繊維の高機能化と応用

研究テーマ

15-2-9：微生物酵素によって合成される繊維状高分子に関する研究

ABSTRACT

AP site recognition mechanisms of AP endonucleases have not yet been determined. Based on our previous study with E. coli exonuclease III (ExoIII), it has been postulated that the ExoIII family AP endonucleases probably recognize the DNA-pocket formed at an AP site. Concurrently, it has been speculated that the indole ring of the conserved tryptophan residue in the vicinity of the catalytic site presumably intercalates into the pocket. To test this hypothesis, we constructed a series of mutants of ExoIII and human APE1. Trp-212 of ExoIII and Trp-280 of APE1 were critical residues to the AP endonuclease activities and binding abilities to DNA containing the AP site. To confirm intercalation of the tryptophan residue to the AP site, we examined the interaction between the oligopeptide containing a tryptophan residue and the oligonucleotide containing AP sites, using spectrofluorimetry and surface plasmon resonance technology. It was elucidated that the tryptophan residue of the oligopeptide specifically intercalates into an AP site of DNA. The results obtained in this study show the possibility that the tryptophan residue in the vicinity of the catalytic site of the ExoIII family AP endonuclease plays a key role in AP site recognition.

To elucidate whether these residues are the recognizers, the ExoIII homologues of Thermoplasma volcanium and Lactobacillus plantarum were characterized. These proteins showed AP endonuclease and 3'-5' exonuclease activities. The heat stability of the T. volcanium enzyme was quite high. In each protein, the mutations of the residues corresponding to Trp-280 of APE1 caused greater influences on the activities and binding abilities to the substrate DNA, than those corresponding to Trp-212 of ExoIII. These results suggest that the tryptophan residues corresponding to Trp-280 of APE1 are the predominant recognizers of an AP site, and those corresponding to Trp-212 of ExoIII are the auxiliary recognizers.

研究目的

本研究の目的は「酵素・基質複合体形成の初期段階、すなわち先駆的な酵素の基質認識のメカニズム」を解明することであった。まず手始めにDNA修復酵素を用いて、ミカエリス複合体形成の前段階での基質認識メカニズムを解明した。DNA修復酵素が長大なDNA中に稀に生じる損傷部位をどのようなメカニズムで的確に見つけ出しているかという「初期認識機構」を解明することから始めた。ここでいう「初期認識機構」とは、誘導適合の過程を経てDNA修復酵素がDNA損傷部位に強固に結合し、まさにリン酸エステル結合やN-グリコシド結合などがまさに切断されようとしているミカエリス複合体中での酵素と基質間の認識メカニズムではない。すでに多くのDNA修復酵素と基質アナログとの複合体の立体構造が単結晶X線構造解析やNMR構造解析により明らかになっている。しかし、それらはミカエリス複合体中でどのように反応が進むかという反応メカニズムについては明確な答えを与えうるが、酵素とDNA損傷部位が最初に出会ったときに、酵素がDNA損傷部位の何を認識し、どのようにして複合体形成が進むかという疑問にはなんら答えを与えるものではなかった。

5年間の研究内容と成果

AP部位 (Apurinic/Apyrimidinic site) 特異的APエンドヌクレアーゼの基質認識メカニズムの解明

本研究では、DNA修復酵素にはAPエンドヌクレアーゼを主に用いた。特にヒトのAPE1タイプのAPエンドヌクレアーゼは原核生物、古細菌、真核生物、ヒトなどのほ乳類に至るまでその保存性は高く、すべての生物が持っていると言っても過言ではない。抗生物質ブレオマイシンやフェナン

トリリン・Cu⁺錯体によって活性化された活性酸素によって引き起こされるDNA損傷部位を調べている過程で核酸塩基がほとんど原型をとどめないデオキシリボフラノシルホルムアミド体を単離・同定した。わずかに核酸塩基の残骸が残るAP部位をAPエンドヌクレアーゼが認識し、切断できるかどうか種々のAP部位のアナログを含むDNAオリゴマーを用いてAPエンドヌクレアーゼの基質特異性を明らかにした。APエンドヌクレアーゼは核酸塩基がなければ、AP部位の糖部がデオキシリボースでなくても、AP部位の相補鎖側の塩基がなんであろうとも、さらには二本鎖でなく一本鎖の中にあるAP部位も認識することが分かった。国外の研究者らによりAPエンドヌクレアーゼによるAP部位認識メカニズムがいろいろ提唱されていたが、いずれの仮説もこの実験結果を説明することはできていなかった。ヒトのAPエンドヌクレアーゼAPE1や同じファミリーに属する大腸菌のAPエンドヌクレアーゼExoIIIとAP部位を含む合成DNAの複合体の立体構造解析 (Mol. C. D. *et al.* (1995) PDB ID: 1AK0) からは、APエンドヌクレアーゼのどのアミノ酸残基がAP部位の特異的認識に働いているかまったく想像がつかなかった。

すべての基質アナログに共通するのは核酸塩基の脱落によって生じる空間であると確信し、この空間の有無を手掛かりにAPエンドヌクレアーゼはAP部位を見つけているのではないかという仮説を立てた。脱落した核酸塩基を補うように酵素の芳香族アミノ酸の側鎖がAP部位に挿入されるのではないかと考え、活性中心近傍に存在する芳香族アミノ酸に着目した。種々の解析手段を駆使して解析した結果、活性中心近傍のトリプトファン残基がAP部位に挿入されることで特異的で先駆的な初期認識が行われることが明らかになった [T. Shida *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **34**, 1552-1563 (2006)]。ヒトAPE1タ

イプのAPエンドヌクレアーゼをあらためてトリプトファン残基の位置で分類すると四つのタイプに分けられた。既に三つのタイプのAPエンドヌクレアーゼに関しては基質認識の初期段階において、活性中心近傍のトリプトファン残基が基質認識の決定的なファクターであることを追認した [T. Shida *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2213-22

21 (2006)]。現在、国内外で精力的にAPエンドヌクレアーゼの研究が行われているが、同じ観点でAPエンドヌクレアーゼを研究している例は皆無である。さらに他の多くの酵素についても複合体と言え、それは暗黙の了解としてミカエリス複合体が連想され、誘導適合の初期過程のしかも一過的な初期複合体の形成に関して研究を行っているのは当研究室だけ (オンリーワン) であり、本研究課題は今後とも重要性和緊急性も併せ持つと考えている。

