

P-35

チミンの酸化的損傷 5-フォルミルウラシルによる突然変異生成とその修復酵素

○米井脩治、宮部 泉、張秋梅（京大院・理・生物科学）

【目的】活性酸素や放射線は、鎖切断、塩基や糖の損傷など多種多様な損傷を DNA に引き起こす。しかし、それら個々の損傷が細胞致死や突然変異誘発作用にどのような役割を果たすのか、それらはどのような機構で修復されるのかは多くの場合まだ理解されていない。本研究の目的は、チミンのメチル基への OH ラジカルが付加反応によって生じる 5-フォルミルウラシルの生物学的作用と、その修復酵素を解明することにある。

【方法】私たちは東京医科歯科大の杉山教授らと共同で、5-フォルミルウラシルを 1 カ所だけ含むオリゴヌクレオチドの化学合成に成功した。これは、フォルミルウラシルがどのような突然変異を起こすのかを解明するためにも、さらに、その修復酵素の同定、精製にもきわめて有用である。

【結果と考察】5-フォルミルウラシルを含むオリゴヌクレオチドを *in vitro* での DNA 合成の鋳型にし、5' 末端を ^{32}P でラベルしたプライマーの伸張反応でフォルミルウラシルの DNA 合成への影響について検討した。鋳型中のフォルミルウラシルの向かい側には dAMP とともに dCMP が挿入されることを見出した。フォルミルウラシル:C 塩基対の形成は種々の制限酵素による切断パターンからも支持することができた。一方、5-ヒドロキシメチルウラシルは A とのみ塩基対を形成した。さらに、ヒト培養細胞の抽出液中に、フォルミルウラシルを含む DNA を特異的に修復する酵素活性を検出した。

P-36

GC→CG トランスバージョンを抑制する大腸菌 MutY タンパクの機能

○張秋梅、米井脩治（京大院・理・生物科学）

【目的と方法】活性酸素や放射線で誘発される塩基置換突然変異では、GC→TA、GC→CG などのトランスバージョンの頻度が高い。GC→TA は 8-オキシグアニン (8-oxoG) が原因であるが、GC→CG についてはその原因となる DNA の損傷やその抑制機構はまだ明らかにはなっていない。*mutM* 変異株のように特定の塩基置換の自然生成頻度を増大させる mutator の分離は突然変異機構を解明する上できわめて有用である。本研究では、GC→CG 自然突然変異頻度を増大させる大腸菌の変異株を分離して、その性質を解析しようとした。

【結果と考察】大腸菌の CC103 は GC→CG トランスバージョンが起こった場合でのみ Lac⁺ に復帰する。この株に mini Tn10 をランダムに挿入して、P-Gal、X-Gal を含む最小培地上でパピレを多く産生するコロニーを選択した。この mutator の性質を表す locus は大腸菌遺伝子地図上の 67 分に位置した。さらに、この遺伝子のヌクレオチド配列を決定したところ、*mutY* 遺伝子そのものであることが分かった。そこで、GST 融合タンパク精製用のベクターを用いて MutY タンパクを精製した。*in vitro* での実験の結果、MutY タンパクは 8-oxoG:A と同様に 8-oxoG:G にも結合すること、さらに、これまでに分かっていた 8-oxoG:A から A を除去する DNA グリコシラーゼの活性に加えて、8-oxoG:G ミスペアから G を除去する活性を持っていることが本研究から明らかになった。MutY タンパクは、DNA 複製の際に 8-oxoG の向かい側に入った G を除去することによって GC→CG を抑制していると結論できる。