

P-075

Functional analysis of Endonuclease V from *Thermus thermophilus* HB8

Yukie Matsuda, Shigenori Iwai, Isao Kuraoka
Graduate School of Engineering Science, Osaka University

Adenine normally present in DNA is spontaneously deaminated to hypoxanthine in pH- and temperature-dependent reactions in living cells. Hypoxanthine in DNA is potentially mutagenic, since it can form a base pair with cytosine during replication generating A:T to G:C transition type mutations. *E.coli* Endonuclease V (EndoV) protein is a DNA repair enzyme which hydrolyzes the second phosphodiester bond 3' to the hypoxanthine. Otherwise, it has been showed that human Endonuclease V (hEndoV) doesn't incise DNA but incise RNA including inosine.

In this study, EndoV from *Thermus thermophilus* HB8 (tth), which is extreme thermophile, and *E.coli* EndoV is purified, then analyzed and compared these functions. In consequence, tthEndoV showed activity against both DNA including hypoxanthine and RNA including inosine. Moreover, tthEndoV incises substrates at higher temperature than *E.coli* EndoV.

Higher organism has the function that converts adenine to inosine. This function is called RNA editing. It plays a role to increase diversity within an organism. In human, deletion of this function cause cancer or mental ailments. We think that tthEndoV may work for detection of RNA after RNA editing.

P-076 (0-16)

Role of DNA Repair in *Thermus thermophilus* Genomic Integrity ~ Analyzing by a Homologous Recombination Detection System

Kaito Kikuchi¹, Kazune Esaki¹, Hanaka Mera¹, Keiichiro Hiratsu², Tatsuo Nunoshiba¹

¹College of Liberal Arts, International Christian University; ²Department of Applied Chemistry, National Defense Academy

We established a system to detect the frequency of Homologous Recombination (HR) in both *E. coli* and *T. thermophilus* and reported it as the shuttle vector pMO (See figure below). Bacteria transformed by pMO initially show Tetracycline (Tc) sensitivity, whereas the cells will become Tc resistant after HR occurs in the overlapping region (shown in black) and restores the functional *tet* gene. This enables us to quantify HR rates in both *E.coli* and *T.thermophilus*.

We tested if the system detects HR rates as expected in both *E.coli* and *T. thermophilus*. In *E. coli*, HR frequency in wild type and the *recA* mutant was detected to be 2.7×10^{-4} and less than 4.2×10^{-5} , respectively. *T.thermophilus* wild type and *recA* mutants showed HR rates to be 2.3×10^{-4} and 4×10^{-5} , respectively. This shows that the pMO system successfully detects the HR repression in *recA* mutant strains. We are currently examining the HR rates of *T.thermophilus* mutants deficient in Endonuclease III (Base Excision Repair), Endonuclease IV (AP Endonuclease) and Endonuclease V (deoxyinosine 3' endonuclease) to infer the roles in *T. thermophilus* genome stability in face of extremely high temperatures.

高度好熱菌由来のエンドヌクレアーゼ V (Endo V) の機能解析

裕田雪恵、岩井成憲、倉岡功
大阪大学大学院基礎工学研究科

DNA 中のアデニンは、pH や温度に依存して脱アミノ化され、ヒポキサンチンを生じる。DNA の複製過程において、ヒポキサンチンはシトシンと塩基対を形成するため、A:T から G:C への突然変異を引き起こす。大腸菌の Endonuclease V (Endo V) はヒポキサンチンの 3' 側の 2 番目のリン酸ジエステル結合を加水分解する DNA 修復酵素である。一方、我々はヒト由来の Endo V は、ヒポキサンチンを有する DNA には作用せず、イノシンを含む RNA を切断することを報告した。

本研究では、高度好熱菌である *Thermus thermophilus* HB8 由来の Endo V、また大腸菌由来の Endo V を新たに精製し、その機能を解析・比較した。その結果、好熱菌の Endo V は、ヒポキサンチンを含む DNA、イノシンを含む RNA に対し共に活性を示し、更に大腸菌の Endo V に比べより高温域でも基質を切断することが分かった。

高等生物にはアデニンを脱アミノ化し、イノシンに変換する機能 (RNA 編集) がある。この機能は生体内の多様性を生み出すために存在すると考えられており、ヒトにおいてこの機能の欠失は、癌及び神経疾患に関与する。今回単離された好熱菌の Endo V は、この RNA 編集された RNA を検出するために利用できるかもしれない。

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* のゲノム安定化への DNA 修復機構の役割-相同組換え検出系を用いて

菊池魁人¹、江崎和音¹、米良花香¹、平津圭一郎²、布柴達男¹
¹国際基督教大学教養学部、²防衛大学校応用化学群

65-85℃の高温環境に生息する高度好熱菌のゲノム安定性の指標として相同組み換え (HR) に着目し、我々は下図に示す HR 検出系 pMO シャトルベクターを構築し、大腸菌でその検出を確認した (本学会 2011, 2012)。

pMO をもつ菌は *tet* の分断により Tetracycline (Tc) 感受性であるが、*tet* 遺伝子内の重複部分で HR が起こると *tet* が回復して Tc 抵抗性となるため、これを指標に HR 頻度の測定が可能である。pMO を大腸菌に導入して HR 頻度を求めた結果、野生株では 2.7×10^{-4} 、*recA* 変異株では 4.2×10^{-5} と *recA* 変異により HR が抑制されることが確認できた。一方高度好熱菌へ導入した場合も、野生株では 2.3×10^{-4} 、*recA* 変異株では 4×10^{-5} となり pMO で HR が検出できることが確認できた。

現在は高度好熱菌の高温下で生じると考えられる DNA 損傷修復に関係する EndoIII (Base Excision Repair), EndoIV (AP endonuclease), EndoV (deoxyinosine 3' endonuclease) の各欠損株において HR 頻度を測定し、ゲノム安定化への関わりを調べている。

pMO シャトルベクターの概要。
tet 遺伝子の一部領域が重複するように二分し、間にマーカー遺伝子を挿入して機能を欠損させた。HR がこの重複領域で生じると *tet* 遺伝子が回復し、Tc 耐性を示す。

