

本稿は 1998 年 5 月 29 日、東京のヤクルトホールで開催された日本環境変異原学会主催の第 9 回公開シンポジウム「モデル DNA 損傷と変異機構」(企画: 根岸和雄, 早津彦哉) で発表された (座長: 望月正隆)。

## 酸化チミン損傷を含む DNA の調製と DNA 修復酵素による認識

井出 博

広島大学理学部遺伝子科学専攻 〒739-8526 東広島市鏡山 1-3-1

---

### Preparation of DNA substrates containing unique thymine oxidation lesions and their recognition by DNA repair enzymes

Hiroshi Ide

Graduate Department of Gene Science, Faculty of Science  
1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-8526, Japan

#### Summary

Reactive oxygen species generate structurally diverse thymine lesions that exert differential cytotoxic and genotoxic effects. They are also processed by different DNA repair enzymes depending on their structure. Thymine glycol, urea residues and 5-formyluracil represent three major classes of oxidative thymine damage formed by C5,C6 hydroxylation, ring fragmentation and oxidation of the methyl group, respectively. Chemical and biochemical methods to introduce these lesions into natural DNA and oligonucleotides have been developed and the introduced damage can be characterized and confirmed by specific base excision repair enzymes, mostly cloned from *Escherichia coli*. These DNA substrates have also proved to be powerful tools to uncover catalytic mechanisms and to screen the activity of mammalian DNA repair enzymes.

(This paper, chaired by Masataka Mochizuki, was presented to the 9th JEMS Annual Symposium, "Synthetic Models for DNA Damage and Mutagenesis", organized by Kazuo Negishi and Hikoya Hayatsu, sponsored by the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at Yakult Hall, Tokyo, May, 29, 1998.)

**Keywords** : DNA damage, DNA repair, damage introduction, oligonucleotide, reactive oxygen species

---

#### 結 言

生物の遺伝情報を担う DNA には、内的あるいは外的要因によりさまざまな損傷が発生する。未修復の損傷は DNA 複製阻害や複製エラーを誘発し、細胞毒性や突然変異性を示す (Friedberg et al., 1995)。細胞の正常な代

謝活動の副産物として生成する活性酸素は、典型的な内的損傷因子であり、主として反応性の高いヒドロキシルラジカルが DNA と反応し酸化損傷を生成する。また、これらの酸化損傷は、外的損傷因子である X 線やガンマ線の照射によって生成する生成物とオーバーラップしているものが多い。活性酸素は紫外線やアルキル化剤とは異なり、構造的にきわめて多様な DNA 損傷を与えるのが特徴で、塩基部位および糖部位を含めると、これまでに 100 近い損傷がすでに同定されている (von Sonntag, 1987; Breen and Murphy, 1995)。したがって、活性酸

---

受付: 1998 年 7 月 21 日

受理: 1998 年 7 月 29 日

©日本環境変異原学会

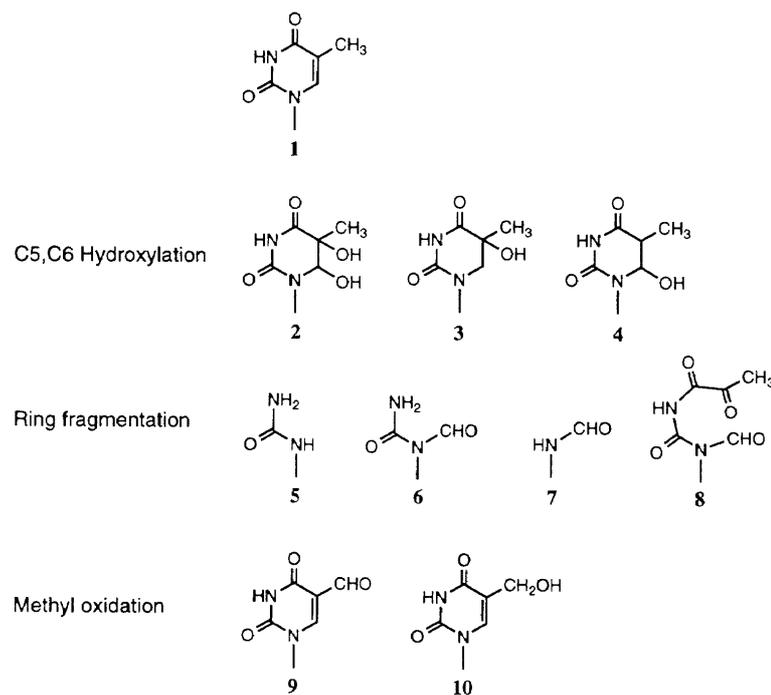


Fig. 1 Structures of major oxidative thymine damage. 1, thymine ; 2, thymine glycol (5,6-dihydro-5,6-dihydroxythymine) ; 3, 5,6-dihydro-5-hydroxythymine (thymine C5-hydrate) ; 4, 5,6-dihydro-6-hydroxythymine (thymine C6-hydrate) ; 5, urea ; 6, *N*-formylurea ; 7, formamide ; 8, *N*<sup>1</sup>-formyl-*N*<sup>2</sup>-pyruvylurea ; 9, 5-formyluracil ; 10, 5-hydroxymethyluracil.

素による DNA 損傷の生物学的影響を分子レベルで明らかにするためには、細胞内に存在する DNA 複製系・修復系が構造的に多様性に富む損傷をそれぞれどのようにプロセスするかを知る必要がある。そのために、個々の損傷を DNA に特異的に導入し DNA 複製の鋳型あるいは修復酵素の基質として用いることにより、DNA 損傷の細胞内プロセシングが研究されてきた。

DNA と活性酸素の反応では糖部位の損傷も生成するが、量的には塩基部位の損傷が圧倒的に多い(von Sonntag, 1987 ; Breen and Murphy, 1995)。本論文では、4 種の塩基の中で生成物の構造が最も詳細に研究されている thymine 由来の損傷を中心に、DNA への特異的な導入法と DNA 修復酵素による認識について解説する。

## 1. Thymine 酸化損傷の特異的な導入法

これまでに同定された thymine 由来の損傷はその構造に基づき、C5,C6 位水酸化生成物、環開裂生成物、methyl 基酸化生成物に大別される (Fig. 1)。Thymine glycol (2) は C5, C6 位水酸化生成物の代表的な生成物であり、そのほか 5 位あるいは 6 位だけが水酸化された水和物 (3, 4) も同定されている。電離放射線では 5 位、6 位いずれの水酸化物も生成するのに対し、紫外線で生成する水和物は 6 位の水酸化体 (4) のみである。さらにピリミジン環の酸化・断片化が進むと尿素残基 (5) のような環開裂生成物が生じる。環開裂生成物に関しても、断片

化の程度に応じてさまざまな構造の生成物 (6-8) が同定されている。5 位の methyl 基の酸化生成物には、5-formyluracil (9)、5-hydroxymethyluracil (10) がある。

Thymine glycol の導入には、過マンガン酸カリウム (KMnO<sub>4</sub>) または四酸化オスミウム (OsO<sub>4</sub>) 酸化が用いられる。過マンガン酸カリウムは thymine の 5, 6 位の二重結合を酸化し、アルカリ側 (pH 8.6) では thymine glycol を、酸性側 (pH 4.3) では 5-hydroxy-5-methylbarbituric acid を選択的に生成する (Iida and Hayatsu, 1971)。中性では両者の混合物となる。Thymine の酸化反応で生成する 5-hydroxy-5-methylbarbituric acid は安定であるが、N1 位がデオキシリボースで置換されたヌクレオシド誘導体は加水分解により開環した methyltartronylurea 誘導体に変化しやすい。したがって、過マンガン酸カリウム処理で DNA 中に生じた 5-hydroxy-5-methylbarbituric acid も methyltartronylurea に変化していると考えられる。過マンガン酸カリウムは酸化力が強く他の塩基の酸化など副反応が起こりやすいため、反応条件 (温度、反応時間、濃度) に注意する必要がある。また、thymine を 1 ヶ所だけ含むオリゴヌクレオチドを酸化し、thymine glycol を選択的に導入することも可能である (Kao et al., 1993 ; Sarkar et al., 1998)。Fig. 2 に、thymine を 1 ヶ所だけ含む 19 mer オリゴヌクレオチドを過マンガン酸カリウム (pH 8.6) で処理した直後の生成物および HPLC 分取

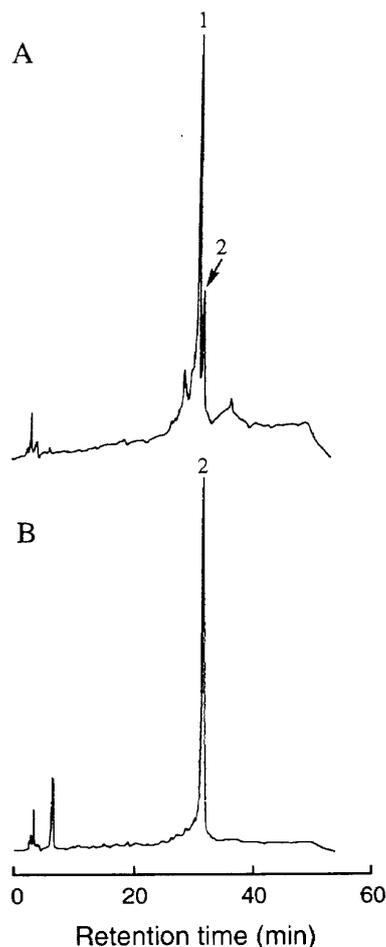


Fig. 2 HPLC elution profiles of oligonucleotides treated with  $\text{KMnO}_4$ . A 19mer oligonucleotide containing a single thymine was treated with  $\text{KMnO}_4$  and products were analyzed before (A) and after (B) HPLC purification. Samples were eluted with a acetonitrile gradient [7% (0.5 min), 7-12% (5.45 min)] in 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA), and monitored by UV absorption at 260 nm. Peak 1, unreacted 19mer; peak 2, 19mer containing thymine glycol.

により精製した生成物の HPLC 分析チャートを示す。この結果からわかるように、オリゴヌクレオチド中の thymine を完全に酸化しようとする、副反応のため、反応後の試料は他の分解生成物との混合物となる。したがって、HPLC あるいはポリアクリルアミド電気泳動による精製が必要となる。四酸化オスミウム ( $\text{OsO}_4$ ) も thymine の 5, 6 位の二重結合を選択的に酸化し、thymine glycol が生成する (Beer et al., 1966; Ide et al., 1985)。Cytosine もわずかに反応するが量的には無視できる。一般的に、安価で水に対する溶解度が高い過マンガン酸カリウムはヌクレオシドやオリゴヌクレオチドの preparative な酸化に用いられるのに対し、高価で溶解度が低い四酸化オスミウムはプラスミドなど天然の DNA の酸化に用いられている。四酸化オスミウムを用いると DNA 中の全 thymine の約数 % を thymine

glycol に変換することが可能であるが、過マンガン酸カリウムの場合と同様、副反応を考慮すると特定の部位を完全に thymine glycol に変換するのは難しい。以上述べた方法のほかに、thymine glycol については、対応するデオキシヌクレオチド三リン酸 (thymidine glycol 5'-triphosphate) を合成し、これを terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) で DNA 中に導入する方法が考案されている (Hatahet et al., 1993)。

上記の方法でプラスミドあるいはオリゴヌクレオチドに導入した thymine glycol をアルカリ処理 (pH 12, 室温) するとピリミジン環が開裂し、thymine glycol は定量的に尿素残基に変換される (Ide et al., 1985; Sarker et al., 1998)。この処理条件下では鎖切断は起こらない。また、thymine の methyl 基をあらかじめ  $^3\text{H}$  で標識しておく、この反応により脱離する acetol fragment を定量することにより、導入された thymine glycol および尿素残基の量を知ることができる (Hariharan, 1980)。ホスホロアミグイトモノマーを用いた直接的な尿素残基の導入法も報告されている (Guy et al., 1990)。この場合、DNA 合成に用いる A, G のアミノ基の保護基には phenoxyacetyl (PAC) 基、C の保護基には acetyl 基を用いることにより、通常の塩基の脱保護条件 (濃アンモニア水中,  $60^\circ\text{C}$ , 6 時間) に比べより穏和な条件下 (濃アンモニア水中, 室温, 6 時間) で脱保護を行っている。DNA 合成機を用いると比較的大量の試料を合成できるため、二次元 NMR によるオリゴヌクレオチドの溶液構造に関する研究も行われている (Gervais et al., 1998)。

5-Formyluracil の導入には、酵素的な方法とホスホロアミグイトモノマーを用いた方法が報告されている。酵素的な方法では、対応するデオキシヌクレオチド三リン酸 (5-formyl-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate, fdUTP) を合成し、これを DNA ポリメラーゼ反応で DNA 中に導入する (Yoshida et al., 1997)。fdUTP は大腸菌 DNA ポリメラーゼ I およびファージ T7 DNA ポリメラーゼのよい基質であり、DNA 複製反応系にこれを添加すると効率よく dTTP に置換する。一方、DNA 合成機を用いる合成法では、5-formyluracil が通常の脱保護条件下では不安定で分解してしまうため、formyl 基の保護基として ethylenediamine 誘導体を用いる方法、または 5-formyluracil の前駆体となる修飾塩基を導入する方法が用いられている。前者では、アンモニアによる通常の脱保護の後、formyl 基の保護基 [*N,N*-di-(3,5-dichlorophenyl)ethylenediamine] を酸により除去する (Ono et al., 1994)。後者では、5-formyluracil の前駆体として 2 つの水酸基を acetyl 基で保護した 5-(1,2-dihydroxyethyl)uracil をアミグイト法により導入後、アンモニア処理により前駆体の acetyl 基を含めたすべての塩基の保護基を除去する。次いで、オリゴヌクレオチドを過ヨウ素酸 ( $\text{NaIO}_4$ ) 処理し 5-(1,2-

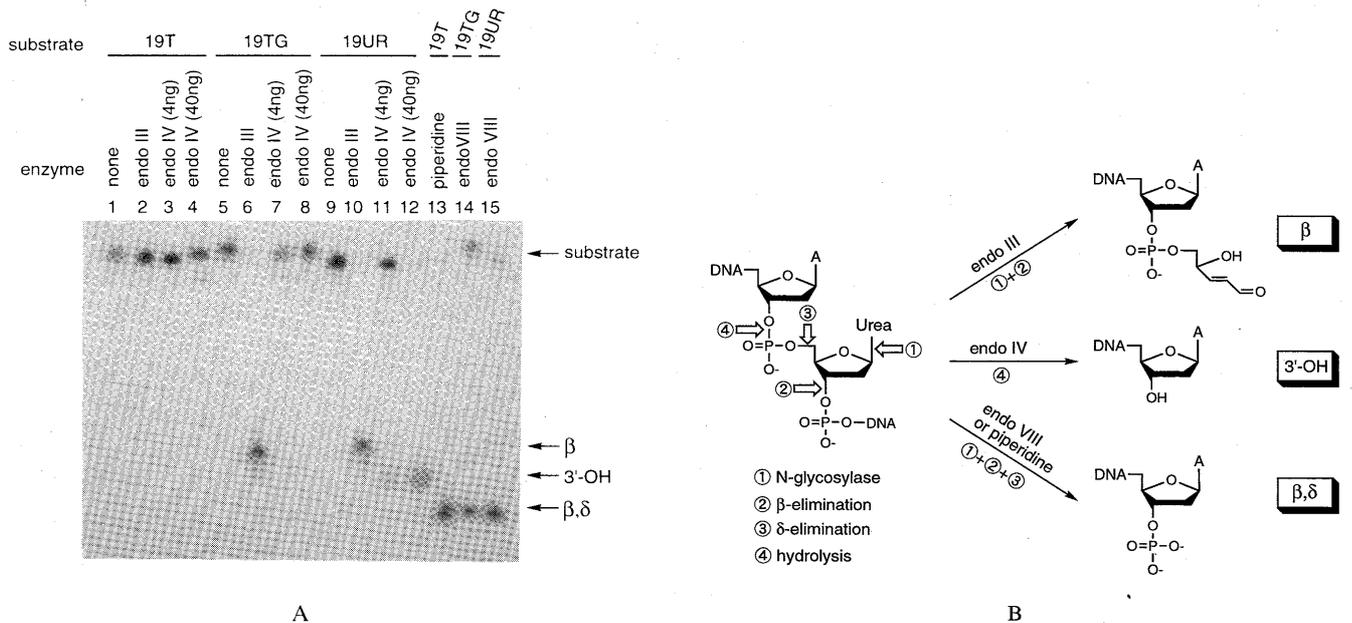


Fig. 3 Recognition of thymine damage by endonucleases III, IV and VIII. A, 5'-<sup>32</sup>P-labeled 19mer oligonucleotides containing a single thymine (19T), thymine glycol (19TG) or urea (19UR) at the same position were annealed to the complementary strand and incubated with endonucleases III, IV, and VIII. Products were analyzed by 16% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. B, cleavage sites (arrows) and products formed by the repair enzymes and piperidine treatment.

dihydroxyethyl)uracil から 5-formyluracil への変換を行っている (Sugiyama et al., 1996). これらの研究では、合成したオリゴヌクレオチドを用いて UV 融解曲線測定も行い、5-formyluracil の二重鎖安定性に対する影響も検討している。

## 2. 修復酵素を用いた損傷の確認

### 1) オリゴヌクレオチド

導入した損傷の確認には、基質特異性がよく確立されている大腸菌由来の DNA 修復酵素が用いられる。Thymine glycol は N-glycosylase/AP lyase 活性をもつ endonuclease III (Nth) および VIII (Nei) により認識される (Melamede et al., 1994; Wallace, 1994; Dongyan et al., 1997; 井出, 1997). 尿素残基は endonuclease III, VIII のほか、formamidopyrimidine glycosylase (Fpg) および AP endonuclease [endonuclease IV (Nfo), exonuclease III (Xth)] によっても認識される (Melamede et al., 1994; Wallace, 1994; Dongyan et al., 1997; 井出, 1997). したがって、アルカリ処理前後の thymine glycol DNA を endonuclease III (あるいは endonuclease VIII) および endonuclease IV (あるいは exonuclease III) で処理し切断活性を調べることで損傷の変換を確認することができる。Fig. 3 A にその一例を示す。Thymine glycol および尿素残基を含むオリゴヌクレオチドは上記 1. に述べた方法で合成し、T4 ポリヌクレオチドキナーゼと [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP を用いて 5' 末端を <sup>32</sup>P 標識した後、相補鎖とアニールし

た。これを endonuclease III, endonuclease VIII, endonuclease IV で処理し、生成物をポリアクリルアミド電気泳動で分析した。損傷を含まない基質では、いずれの修復酵素でも切断バンドは認められないが、thymine glycol を含む基質 19 TG は endonuclease III (レーン 6) および endonuclease VIII (レーン 14) により認識され切断バンドが現れている。一方、endonuclease IV は thymine glycol を認識しないため、切断バンドは現れていない (レーン 7, 8)。尿素残基を含む基質 19 UR は、用いた 3 種のいずれの修復酵素によっても認識され切断されている (レーン 10-12, 15)。生成物のバンドの移動度は酵素によって異なり、endonuclease VIII > endonuclease IV > endonuclease III の順となっている。これは、各修復酵素の DNA 鎖切断機構が異なるためで、endonuclease VIII では標識された側の生成物の 3' 末端にリン酸が残った形 ( $\beta$ ,  $\delta$ -脱離生成物)、endonuclease IV では 3' 末端が OH 形、endonuclease III では 3' 末端に糖 (4-hydroxypentenal) がついた形 ( $\beta$ -脱離生成物) の生成物が生じているためである (Fig. 3 B)。レーン 13 は、thymine glycol を含む基質を熱ピペリジン処理したもので、 $\beta$ ,  $\delta$ -脱離生成物のマーカーである。endonuclease III, VIII の鎖切断活性は加水分解を伴わない lyase であるのに対し、endonuclease IV の活性は加水分解を伴う hydrolase である (Wallace, 1994; 井出, 1997)。以上の結果からわかるように、特定の損傷を含むオリゴヌクレオチドを基質として用いることにより、修復酵素の基質特異性のほか作用機構についての情報も同時に得ること

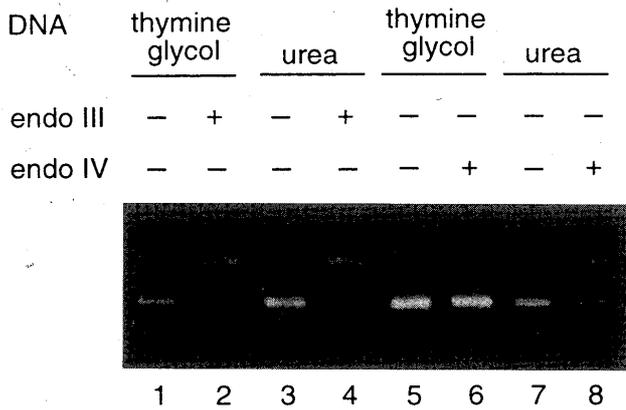


Fig. 4 Agarose gel analysis of plasmid DNA containing thymine glycol and urea residues. pDEL19 plasmid DNA containing thymine glycol (lanes 1, 2, 5, 6) or urea residues (lanes 3, 4, 7, 8) was treated with endonucleases III (lanes 2, 4) or IV (lanes 6, 8). Intact (Form I, lower bands) and nicked (Form II, upper bands) DNA were separated by 0.8% agarose gel electrophoresis.

ができる。なお、修復機構との関連では、endonuclease III, VIIIの生成物は3'末端が糖やリン酸によりブロックされているため(Fig. 3 B), このままでは引き続くDNAポリメラーゼによる修復合成ができない。実際の細胞内では、endonuclease III, VIIIが作用した後、3'-phosphodiesterase および 3'-phosphatase 活性をもつendonuclease IVまたは exonuclease IIIが3'末端から5'-糖リン酸( $\beta$ -脱離生成物)やリン酸( $\beta$ ,  $\delta$ -脱離生成物)を除去し3'-OH基をもつプライマー末端が形成される。

5-Formyluracilは、3-methyladenine glycosylase II (AlkA)により認識される(Bjelland et al., 1994; 井出, 未発表)。5-Formyluracilを部位特異的に導入したオリゴヌクレオチド基質をAlkAとインキュベートすると、AlkAのN-glycosylase活性によりDNAから5-formyluracilが切除され脱塩基部位(abasic site)が生じる。しかし、このままでは鎖切断が起こらないため、ポリアクリルアミド電気泳動では検出できない。そこで、AlkA処理後にAP endonuclease活性をもつ酵素(たとえばendonuclease IV)とインキュベートすると脱塩基部位で鎖切断が起こり検出可能となる。

## 2) 天然型のDNA

プラスミドに導入したthymine glycolは、endonuclease IIIあるいはVIII処理により鎖切断が生じコンホメーションがForm I (super coil)からForm II (nicked circular)へ変化する(Melamede et al., 1994)。Form IとIIのプラスミドはアガロース電気泳動により簡単に分離できる。Thymine glycol DNAのアルカリ処理により導入した尿素残基は、上記酵素のほか、endonuclease IVおよび exonuclease IIIにより切断される。Fig. 4は、

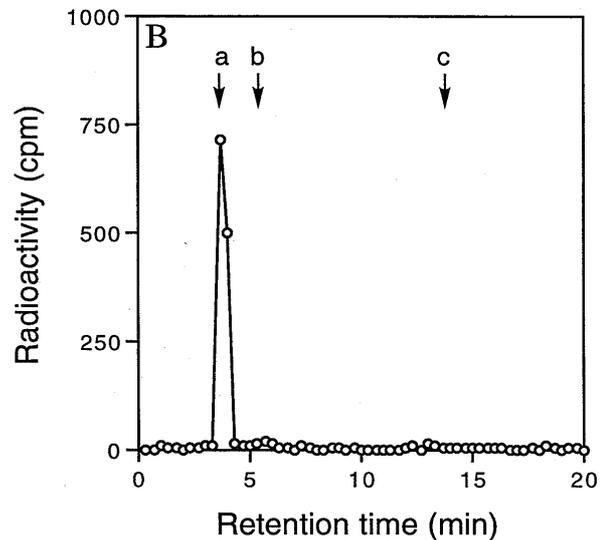
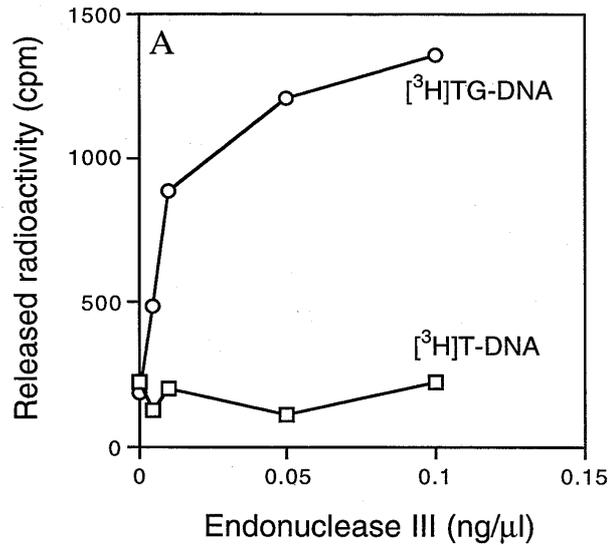


Fig. 5 Analysis of N-glycosylase activity of endonuclease III. A, Duplex M13 DNA containing <sup>3</sup>H-labeled thymine glycol ([<sup>3</sup>H] TG-DNA) or thymine ([<sup>3</sup>H] T-DNA) was incubated with the indicated amounts of endonuclease III. Radioactivity released from DNA was measured after removal of [<sup>3</sup>H] DNA by an anion exchange column. B, HPLC analysis of radioactive materials released from [<sup>3</sup>H] TG-DNA upon endonuclease III treatment. Arrows indicate the elution positions of authentic thymine glycol (a), 5-hydroxymethyluracil (b) and thymine (c).

四酸化オスミウム処理および四酸化オスミウム+アルカリ処理によりthymine glycolおよび尿素残基をそれぞれ導入したpDEL 19プラスミド(4.8 kb)をendonuclease III, endonuclease IVとインキュベート後、アガロース電気泳動により分析した結果である。Thymine glycolを含むプラスミドDNAはendonuclease IIIのみにより認識されForm IIへ変化しているが(レーン2), 尿素残基を含むプラスミドDNAはendonuclease IIIのほかendonuclease IVによってもForm IIへ変化して

いる(レーン4, 8).

### 3) N-グリコシラーゼ活性

Endonuclease III, VIIIは上述の endonuclease 活性のほかに、塩基とデオキシリボースを繋ぐ N-グリコシド結合を切断する活性(N-glycosylase 活性)を有している(Fig. 3 B) (Wallace, 1994; 井出, 1997). したがって、損傷塩基の適当な部位が<sup>3</sup>Hあるいは<sup>14</sup>Cで標識されていれば、N-glycosylase 活性による損傷の確認が可能である。Fig. 5は、DNAポリメラーゼを用いて一重鎖M13 DNAを [<sup>3</sup>H-methyl] dTTP存在下で複製し、これを四酸化オスmium処理後、endonuclease IIIとインキュベートした結果である。N-glycosylase 活性により切除された [<sup>3</sup>H-methyl] thymine glycolをアニオン交換カラムによりDNAから分離し、遊離された放射活性を測定した。Thymine glycolを導入したDNAでは、遊離された放射活性がインキュベートしたendonuclease IIIの量とともに増加しているが、対照の [<sup>3</sup>H-methyl] thymine DNAでは増加は認められていない(Fig. 5 A). さらに遊離された放射活性の由来を確かめるために、アニオン交換カラムの溶出液を逆相HPLCで分析した(Fig. 5 B). 溶出液の放射活性ピークが標品の thymine glycolピークと一致したことから、endonuclease IIIのN-glycosylase 活性により thymine glycolがDNAから除去されていることが確認された。

## 3. DNA修復酵素研究への応用

### 1) 修復酵素の作用機構

これまでに精製された塩基除去修復酵素は、N-glycosylase 活性のみを有する単純なグリコシラーゼとN-glycosylaseのほかにAP lyase 活性を合わせもつものに分類される。部位特異的アミノ酸置換やX線結晶構造解析の結果から、これらの酵素の触媒機構が推定されている(David and Williams, 1998). 単純なグリコシラーゼでは、デオキシリボースのC1'近傍に存在する水分子が酵素により活性化され( $H_2O + B-Enz \rightarrow OH^- + H^+B-Enz$ ),  $OH^-$ がC1'に対し求核反応することにより塩基が脱離すると考えられている。後者の酵素では、酵素のアミノ基が活性化されC1'に直接求核反応し、塩基の脱離と同時に基質-酵素間にSchiff塩基が形成される。さらに、Schiff塩基中間体から3'側のリン酸のβ脱離(および5'側のリン酸のδ脱離)が進行すると考えられている(David and Williams, 1998). Schiff塩基中間体は、水素化ホウ素ナトリウム( $NaBH_4$ )により還元され、酵素-基質間に安定なクロスリンクが形成される。Fig. 6は、水素化ホウ素ナトリウム存在下、thymine glycolあるいは尿素残基を含む5'-<sup>32</sup>P標識オリゴヌクレオチド基質(19TG, 19UR)とendonuclease IIIをインキュベートし、これをSDS-PAGEで分析した結果で

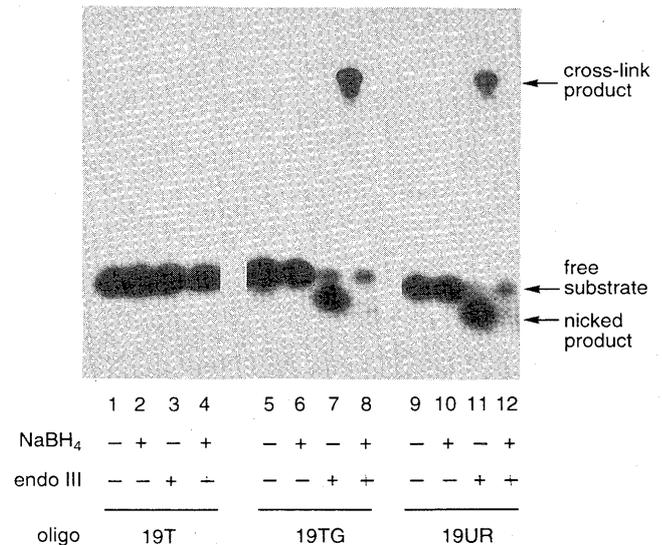
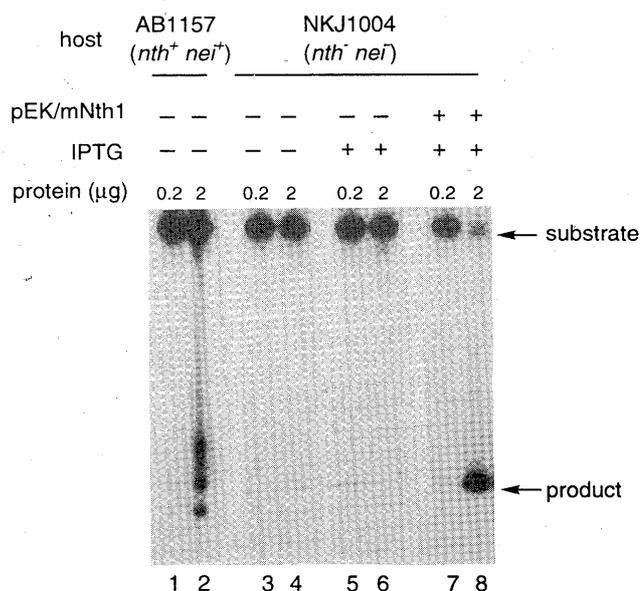


Fig. 6  $NaBH_4$  trap of the Schiff base intermediate formed between oligonucleotide substrates and endonuclease III. Endonuclease III was incubated with 19mer oligonucleotide substrates (<sup>32</sup>P 5'-labeled) containing thymine (19T), thymine glycol (19TG) or urea (19UR) in the absence and presence of  $NaBH_4$ . After incubation, samples were analyzed by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

ある。水素化ホウ素ナトリウムで処理しない場合は、thymine glycolおよび尿素残基のいずれの基質でも、低分子量の切断バンドが生成した(レーン7, 11). 水素化ホウ素ナトリウムで処理した場合は、切断生成物がなくなり、endonuclease III(分子量23.4 kDa)と基質(19mer)がクロスリンクされた高分子量のバンドが認められた(レーン8, 12). また、これらのバンドは、基質だけの水素化ホウ素ナトリウム処理(レーン6, 10)あるいは損傷を含まない基質19Tとendonuclease IIIの処理(レーン4)では生じなかった。Endonuclease IIIの部位特異的アミノ酸置換やX線結晶構造解析の結果から、反応には120-Lysが関わっていることが示唆されていることから、クロスリンクは120-Lysと損傷部位のデオキシリボースのC1'の間に形成されているものと考えられる。

### 2) 高等動物のDNA修復酵素

最近、ヒトおよびマウスから大腸菌endonuclease IIIホモログがクローニングされた(Hibert et al., 1997; Aspinwall et al., 1997; Sarker et al., 1998). クローニングされたホモログは、endonuclease IIIに比べN-末端側に約80-100残基の余分なアミノ酸配列を含み、この部分を除くアミノ酸配列のホモロジーは26%程度であった。しかし、endonuclease IIIの触媒活性に不可欠なhairpin-helix-hairpin(HhH)モチーフとC末端側の4 Fe-4 Sクラスターが保存されており、endonuclease IIIと同様な酵素活性をもつと予想された。クローニングし



**Fig. 7** Repair activity for thymine glycol in the cell free extracts from *E. coli* AB1157 and NKJ1004 harboring pEK/mNth1. Cell free extracts (0.2 or 2 μg as protein) from *E. coli* AB1157 (*nth<sup>+</sup> nei<sup>+</sup>*) (lanes 1, 2), NKJ1004 (*nth<sup>-</sup> nei<sup>-</sup>*) (lanes 3, 4), IPTG-treated NKJ1004 (lanes 5, 6), and IPTG-treated NKJ1004 harboring pEK/mNth1 (lanes 7, 8) were tested for the 19mer oligonucleotide substrate containing thymine glycol. Products were analyzed by 16% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis.

たマウス遺伝子(mNth 1)を大腸菌で発現させ、細胞粗抽出液中に存在する修復酵素活性を測定した(Fig. 7)。遺伝子の発現は、thymine glycolを認識する2種の酵素 endonuclease III(Nth)およびVIII(Nei)を欠損した大腸菌株(*nth<sup>-</sup> nei<sup>-</sup>*)で行い、活性測定には thymine glycolを含むオリゴヌクレオチドを基質として用いた。切断生成物の生成量からわかるように、大腸菌 NKJ 1004(*nth<sup>-</sup> nei<sup>-</sup>*)では酵素活性が認められないのに対し(レーン3, 4)、野生株の AB 1157(*nth<sup>+</sup> nei<sup>+</sup>*)では endonuclease IIIおよびVIIIに由来するわずかな活性が認められた(レーン2)。マウス endonuclease IIIホモログの発現ベクター(pEK/mNth 1)を導入したNKJ 1004では、IPTG誘導後に明確な切断活性が認められた(レーン8)。以上の結果は、mNth 1遺伝子産物が大腸菌の endonuclease IIIと同様な thymine glycol修復活性をもつことを示している。

#### 4. DNA 損傷の一般的な導入法

本論文では、チミン酸化損傷のDNAへの特異的な導入法とDNA修復酵素による認識について述べた。このほかさまざまな酸化的損傷およびモデル化合物のDNA・オリゴヌクレオチドへの導入法1)–3)が開発されている。

- 1) 選択的な反応性を示す試薬・処理
- 2) ホスホロアミダイトユニットを用いた合成法
- 3) 酵素的な導入法

現在のところ、すべての酸化損傷に適用できる導入法はなく、損傷および研究目的に応じてこれらの方法が使い分けられている。誌面の関係で紹介できなかった20種の損傷および導入法1)–3)の長所・短所については、最近の総説を参考にしていただきたい(井出, 1997)。また、方法2)については、損傷が一般的に塩基に対して不安定なためアンモニア処理による脱保護が最大の障害となっている。これを克服する方法として、塩基の保護基に allyloxy 基を用い Pd<sup>0</sup>により除去する方法(Hayakawa et al., 1990)、塩基無保護のH-ホスホネートモノマーを用いる方法がある(Wada et al., 1997)。実際、allyloxy 保護基を用いた方法が5-hydroxy-5, 6-dihydrothymine (thymine C 5-hydrate)を含むオリゴヌクレオチドの合成に応用されており(Matray and Greenberg, 1994; 1997)、今後これら二つの方法が損傷を含むオリゴヌクレオチド合成に応用されることが期待される。

#### 謝 辞

本論文で用いた実験データを提供していただいた広島大学理学部遺伝子化学研究室の大学院生, Ezat Asgarani さん, 中野浩伸君, 城元竜也君, ならびに内容に関して貴重なコメントをいただいた同研究室の寺東宏明先生に感謝いたします。

#### 参考文献

- Aspinwall, R., D. G. Rothwell, T. Roldan-Arjona, C. Anselmino, C. J. Ward, J. P. Cheadle, J. R. Sampson, T. Lindahl, P. C. Harris and I. D. Hickson (1997) Cloning and characterization of a functional human homolog of *Escherichia coli* endonuclease III, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 94, 109-114.
- Beer, M., S. Stern, D. Carmalt and K. H. Mohlenrich (1966) Determination of base sequence in nucleic acids with electron microscope. V. The thymine-specific reactions of osmium tetroxide with deoxyribonucleic acid and its components, Biochemistry, 5, 2283-2288.
- Bjelland, S., N.-K. Birkeland, T. Benneche, G. Volden and E. Seeberg (1994) DNA glycosylase activities for thymine residues oxidized in the methyl group are functions of the AlkA enzyme in *Escherichia coli*, J. Biol. Chem., 269, 30489-30495.
- Breen, A. P. and J. A. Murphy (1995) Reactions of oxy radicals with DNA, Free Radic. Biol. Med., 18, 1033-1077.
- David, S. S. and S. D. Williams (1998) Chemistry of glycosylases and endonucleases involved in base-excision repair, Chem. Rev., 98, 1221-1261.
- Dongyan, J., Z. Hatahet, R. J. Melamede, Y. W. Kow and S. S. Wallace (1997) Characterization of *Escherichia coli* endonuclease VIII, J. Biol. Chem., 272, 32230-32239.
- Friedberg, E. C., G. C. Walker and W. Siede (Eds) (1995) DNA Repair and Mutagenesis, ASM, Washington D.C.

- Gervais, V., J. A. H. Cognet, A. Guy, J. Cadet, R. Teoule and G. V. Fazakerley (1998) Solution structure of *N*-(2-deoxy-*D*-erythro-pentofuranosyl)urea frameshifts, one intrahelical and the other extrahelical, by nuclear magnetic resonance and molecular dynamics, *Biochemistry*, 37, 1083-1093.
- Guy, A. and R. Teoule (1990) Insertion of the fragile 2'-deoxyribosylurea residue into oligodeoxynucleotides, *Tetrahedron Lett.*, 31, 5745-5748.
- Hariharan, P. V. (1980) Determination of thymine ring saturation products of the 5, 6-dihydroxydihydrothymine type by the alkali degradation assay, *Radiat. Res.*, 81, 496-498.
- Hatahet, Z., A. A. Purmal and S. S. Wallace (1993) A novel method for site specific introduction of single model oxidative DNA lesions into oligodeoxyribonucleotides, *Nucleic Acids Res.*, 21, 1563-1568.
- Hayakawa, Y., S. Wakabayashi, H. Kato and R. Noyori (1990) The allylic protection method in solid phase oligonucleotide synthesis. An efficient preparation of solid-anchored DNA oligomers, *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 1691-1969.
- Hibert, T. P., W. Chaung, R. J. Boorstein, R. P. Cunningham and G. W. Teebor (1997) Cloning and expression of the cDNA encoding the human homologue of the DNA repair enzyme, *Escherichia coli* endonuclease III, *J. Biol. Chem.*, 272, 6733-6740.
- Ide, H., Y. W. Kow and S. S. Wallace (1985) Thymine glycols and urea residues in M13 DNA constitute replication blocks *in vitro*, *Nucleic Acids Res.*, 13, 8035-8052.
- 井出 博 (1997) 酸化的損傷を特異的に含む DNA 基質と生化学研究への応用, *放射線生物研究*, 32, 307-325.
- Iida, S. and H. Hayatsu (1971) The permanganate oxidation of thymidine and thymidylic acid, *Biochim. Biophys. Acta*, 228, 1-8.
- Kao, J. Y., I. Goljer, T. A. Phan and P. H. Bolton (1993) Characterization of the effects of a thymine glycol residue on the structure, dynamics, and stability of duplex DNA by NMR, *J. Biol. Chem.*, 268, 17787-17793.
- Matray T. J. and M. M. Greenberg (1994) Site-specific incorporation of the alkaline labile, oxidative stress product (5*R*)-5, 6-dihydro-5-hydroxythymidine in an oligonucleotide, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 6931-6932.
- Matray T. J. and M. M. Greenberg (1997) Inhibition of Klenow fragment (exo<sup>-</sup>) catalyzed DNA polymerization by (5*R*)-5, 6-dihydro-5-hydroxythymidine and structural analogue 5, 6-dihydro-5-methylthymidine, *Biochemistry*, 36, 14071-14079.
- Melamede, R. J., Z. Hatahet, Y. W. Kow, H. Ide and S. S. Wallace (1994) Isolation and characterization of endonuclease VIII from *Escherichia coli*, *Biochemistry*, 33, 1255-1264.
- Ono, A., T. Okamoto, M. Inada, H. Nara, and A. Matsuda (1994) Nucleosides and Nucleotides 131. Synthesis and properties of oligonucleotides containing 5-formyl-2'-deoxyuridine, *Chem. Pharm. Bull.*, 42, 2231-2237.
- Sarker, A. H., S. Ikeda, H. Nakano, H. Terato, H. Ide, K. Imai, K. Akiyama, K. Tsutsui, Z. Bo, K. Kubo, K. Yamamoto, A. Yasui, M. C. Yoshida and S. Seki (1998) Cloning and characterization of a mouse homologue (mNth1) of *Escherichia coli* endonuclease III, *J. Mol. Biol.*, 282, 761-774.
- Sugiyama, H., S. Matsuda, K. Kino, Q.-M. Zhang, S. Yonei and I. Saito (1996) New synthetic method of 5-formyluracil-containing oligonucleotides and their melting behavior, *Tetrahedron Lett.*, 37, 9067-9070.
- von Sonntag, C. (Ed) (1987) *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor & Francis, New York.
- Wada, T., Y. Sato, F. Honda, S. Kawahara and M. Sekine (1997) Chemical synthesis of oligonucleotides using *N*-unprotected *H*-phosphonate monomers and carbonium and phosphonium condensing reagents: *O*-selective phosphorylation and condensation, *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 12710-12721.
- Wallace S. S. (1994) DNA damages processed by base excision repair: biological consequences, *Int. J. Radiat. Biol.*, 66, 579-589.
- Yoshida, M., K. Makino, H. Morita, H. Terato, Y. Ohyama and H. Ide (1997) Substrate and mispairing properties of 5-formyl-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate assessed by *in vitro* DNA polymerase reactions, *Nucleic Acids Res.*, 25, 1570-1577.