

# 哺乳類の酸化損傷塩基修復酵素 NTH1 と OGG1 の 基質特異性と作用機序

井出 博\*

広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻  
〒739-8526 東広島市鏡山 1-3-1

## Substrate specificities and reaction mechanisms of mammalian base excision repair enzymes NTH1 and OGG1

Hiroshi Ide

Department of Mathematical and Life Sciences, Graduate School of Science, Hiroshima University,  
Higashi-Hiroshima 739-8526, Japan

### Summary

Reactive oxygen species generate structurally diverse base lesions in DNA. In *E. coli* cells, oxidative pyrimidine lesions are removed by Endo III and Endo VIII, whereas oxidative purine lesions by Fpg. In the present study, substrate specificities and reaction mechanisms of NTH1, a mammalian homologue of Endo III, and OGG1, a mammalian functional homologue of Fpg, were characterized using defined oligonucleotide substrates and the obtained results were compared to those of Endo III and Fpg. Mouse NTH1 (mNTH1) recognized not only urea (UR), thymine glycol (TG), 5,6-dihydrothymine (DHT), and 5-hydroxyuracil (HOU) derived from pyrimidine bases but also formamidopyrimidine (FAPY) derived from guanine. With both mNTH1 and human NTH1, the activity for FAPY was comparable to TG. Unlike Endo III, the activities of mNTH1 for these lesions were essentially independent of paired bases. Human OGG1 (hOGG1) recognized 7, 8-dihydro-8-oxoguanine (OG) and FAPY. hOGG1 excised OG in a paired base-dependent manner but paired base effects were not evident for FAPY. The difference in the activity for the most preferred OG : C and the least preferred OG : A was 20-fold, while that for the most preferred FAPY : C and the least preferred FAPY : A was only 2.3-fold. These results indicate that FAPY : C is a good substrate for both NTH1 and OGG1, suggesting participation of the two enzymes in repair of this lesion in mammalian cells. In contrast, Endo III and Endo VIII recognized FAPY : C very poorly relative to TG. Determination of enzymatic parameters revealed that catalytic rate constants ( $k_{cat}$ ) of mNTH1 and hOGG1 were much lower than those of Endo III and Fpg. It seems that distinctive rate determining steps for the enzymatic reaction are responsible for the differential paired base effects observed for Endo III and mNTH1. For Endo III with high  $k_{cat}$ , the rate determining step is flip out of a damaged base, thereby making the activity sensitive to paired bases. In contrast, for mNTH1 with low  $k_{cat}$ , the rate determining step is subsequent *N*-glycosylase and/or AP lyase, thereby making the activity insensitive to paired bases.

**Keywords** : oxidative base damage, NTH1, OGG1, substrate specificity, paired base effects

### 緒 言

好氣的代謝や放射線により生成する活性酸素はDNAに損傷を誘発し、これが適切に修復されないと、突然変異や細胞死が起こる。活性酸素により塩基部位に生じる

\* ideh@hiroshima-u.ac.jp

受付：2001年9月27日 受理：2001年9月27日

©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第12回公開シンポジウム「活性酸素の分子病態学」で発表された。

This paper was presented at the 12th JEMS Annual Symposium at the Nagai Memorial Hall, Tokyo, May 26th, 2001. The symposium entitled "Molecular Pathogenesis for Oxidative Stress", was organized by Tatsuo Nunoshiba and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.

**Table 1** Base excision repair enzymes for oxidative base damage

Damage	Repair enzymes		
	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Mammal
Pyrimidine	Endo III Endo VIII	Ntg1, Ntg2	NTH1
Purine	Fpg	yOgg1	OGG1

酸化損傷は構造的に極めて多様性に富むことが明らかにされているが、これらは主に *N*-glycosylase/AP lyase 活性を持つ塩基除去修復酵素により DNA から除去される。大腸菌では、酸化損傷塩基の修復に関わる修復酵素として、ピリミジン酸化損傷を認識する endonuclease (Endo) III と Endo VIII, プリン酸化損傷を認識する formamidopyrimidine glycosylase (Fpg) が同定され、詳細な生化学的ならびに遺伝学的解析に基づき遺伝情報維持における役割が明らかにされている (Table 1) (Wallace, 1997). Endo III 欠損株 (*nth*) および Endo VIII 欠損株 (*nei*) は明確な表現型を示さないが、両者の欠損株 (*nth nei*) は過酸化水素や放射線に感受性であり自然突然変異率も上昇する (Jiang et al., 1997; Saito et al., 1997). したがって、Endo III と Endo VIII は細胞内において機能的なバックアップ関係にあると考えられる。Fpg 欠損株 (*fpg/mutM*) は過酸化水素や放射線に感受性を示さないが、自然突然変異率が上昇し GC → TA トランバージョンを誘発する (Michaels et al., 1991). Fpg 欠損株では、G の酸化により生じる突然変異性の高い損傷 7,8-dihydro-8-oxoguanine (OG) を修復できないため、DNA 複製の際、新生鎖に A が取り込まれ突然変異を誘発する。近年、Endo III および Fpg の哺乳類ホモログとして、それぞれ NTH1 および OGG1 がクローニングされた (Table 1). マウスおよびヒト NTH1 のアミノ酸配列は、Endo III に比べ N 末端側が約 90 残基長く、この部分に核移行シグナル (NLS) とミトコンドリア移行シグナル (MTS) が含まれている (Sarker et al., 1998; Takao et al., 1998). ホモロジーのある部分では、活性部位の Helix-hairpin-Helix モチーフと C 末端の 4Fe-4S クラスターが保存されており、DNA への結合とタンパクのフォールディングに関与している。一方、OGG1 (酵母, マウス, ヒト) と Fpg はアミノ酸配列レベルでの相同性は全くないが、OG などのプリン酸化損傷を認識するという点で機能的なホモログである。OGG1 には、4Fe-4S クラスターはないが Helix-hairpin-Helix モチーフがあり、構造的に Endo III のスーパーファミリーに属する (Bruner et al., 2000). OGG1 には複数の splicing isoform が存在し、C 末端側のアミノ酸配列の違いにより核移行型とミトコンドリア移行型が生じる (Aburatani et al., 1997; Takao et al., 1998; Nishioka et al., 1999). 最近、NTH1 (岡野と安井, 2001) および OGG1 (Klungland et al., 1999b; Minowa et al., 2000) の機能解析を目的に

ノックアウトマウスが作製された。OGG1 ノックアウトマウスではゲノム中に OG が蓄積するが、現在報告されている限り両マウスは正常に生まれ、発癌率の上昇等の明瞭な表現型は現れていない。したがって、NTH1 や OGG1 の遺伝情報維持における役割についてはさらに検討が必要である。本研究では、NTH1・OGG1 の遺伝情報維持における役割を生化学的な視点から検討するために、両酵素の基質特異性と作用機序を調べ、その結果を大腸菌ホモログ (Endo III, Fpg) と比較した。

## 1. NTH1 と Endo III

活性アッセイは、マウス由来 NTH1 (mNTH1) を用いて行った (Sarker et al., 1998). 基質としては、ピリミジン損傷 urea (UR), *cis*-thymine glycol (TG, 5*S*,6*R*-および 5*R*,6*S*-異性体), 5,6-dihydrothymine (DHT), 5-hydroxyuracil (HOU) を含むオリゴヌクレオチドを用いた (Fig. 1). 基質を Endo III あるいは mNTH1 とインキュベートし、生成物を PAGE で分析した (Asagoshi et al., 2000a). 両酵素とも  $\beta$  脱離により切断された生成物が認められた。生じた基質の切断率を定量したところ、Endo III の UR, TG, HOU に対する活性は同程度であったが、DHT に対する活性は著しく低かった (Fig. 2). mNTH1 の UR 活性は若干高かったものの、基質間でそれほど大きな違いは認められなかった。この結果から、Endo III と mNTH1 で DHT に対する相対活性に差があることがわかった。DHT に対する活性の差の原因を明らかにするため、TG と DHT に対する酵素パラメーターを求めた (Table 2). Endo III の両基質に対する  $K_m$  を比較すると、DHT に対する値は TG よりも約 27 倍高く、DHT は非常に親和性の低い基質であることがわかった。また、DHT に対する反応速度 ( $k_{cat}$ ) も低く、TG の 1/11 であった。その結果、DHT に対する反応効率 ( $k_{cat}/K_m$ ) は TG の 1/315 となった。mNTH1 の両基質に対する  $K_m$  は低く、Endo III に比べ TG で 6 倍、DHT では 170 倍の親和性を示した。逆に  $k_{cat}$  は Endo III に比べかなり低く、TG で 1/26, DHT では 1/4 であった。しかし、 $K_m$ ,  $k_{cat}$  の値は両基質で大きな差はなく、反応効率 ( $k_{cat}/K_m$ ) はほぼ同じ値となった。つまり、Endo III は DHT に対する親和性、反応速度が TG に比べいずれも低いのに対し、mNTH1 では両者で差がないため、同程度の活性を示すことがわかった。また、mNTH1 の  $k_{cat}$  は Endo III に比べ低かった (特に TG の場合)。この原因として実験に用いた mNTH1 の失活が考えられたので、 $\text{NaBH}_4$  トラップ反応 (後述) を用いて活性な酵素の割合を調べたところ、mNTH1 の 68% および Endo III の 95% が活性であった。したがって、mNTH1 は本質的に  $k_{cat}$  の低い酵素であるといえる。

Endo III は基質 DNA と結合後、Lys120 が損傷部位のデオキシリボース C1' を攻撃し、反応中間体として

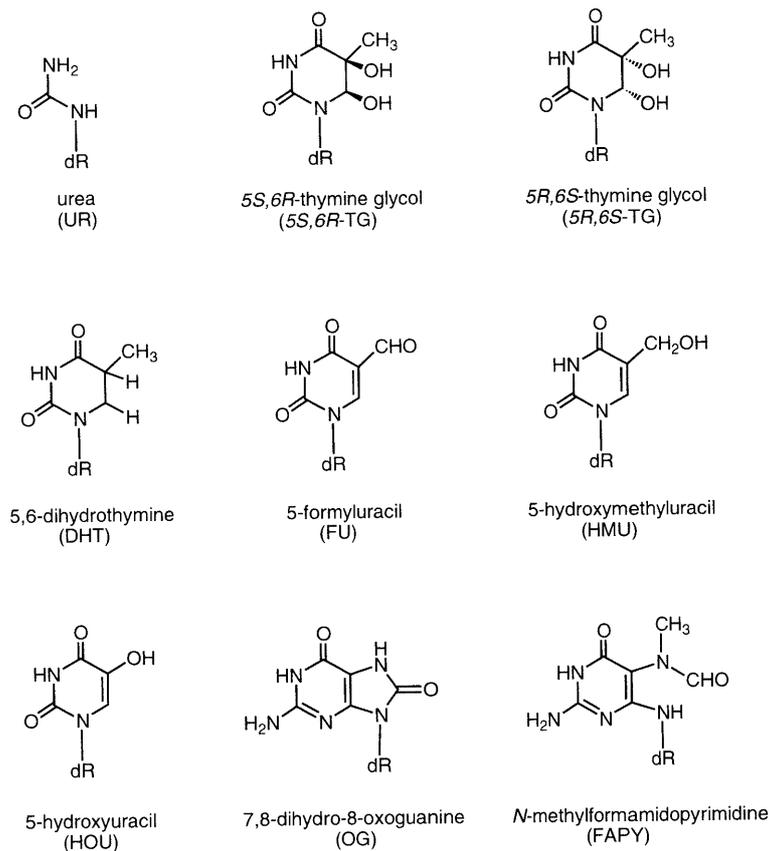


Fig. 1 Structures of base lesions formed by reactive oxygen species and related compounds

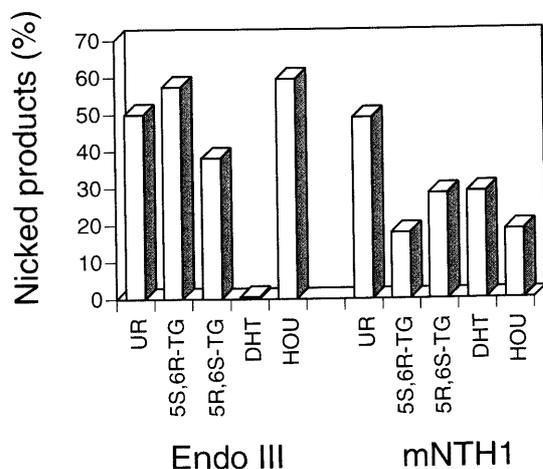


Fig. 2 Activities of Endo III and mNTH1 for different types of pyrimidine damage. UR : urea ; TG : *cis*-thymine glycol ; DHT : 5,6-dihydrothymine ; HOU : 5-hydroxyuracil

Table 2 Parameters of Endo III and mNTH1 for TG and DHT

Enzyme	Substrate	$K_m$ (nM)	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\times 10^4$ )
Endo III	TG : A <sup>a</sup>	19	0.78	410 (315) <sup>b</sup>
	DHT : A	510	0.07	1.3 (1)
mNTH1	TG : A <sup>a</sup>	3	0.03	100 (77)
	DHT : A	3	0.02	66 (51)

<sup>a</sup> TG = 5R,6S-TG

<sup>b</sup> Numbers in parentheses are relative values

Schiff baseを形成する (Fig. 3). この場合、反応系に還元剤 ( $\text{NaBH}_4$ ) が共存すると基質-酵素間のイミン結合 ( $\text{C}=\text{N}$ ) が還元され、不可逆的な基質-酵素クロスリンクが形成される。そこで、mNTH1がEndo IIIと同様にSchiff base中間体を形成し反応しているかどうか検討した。  $\text{NaBH}_4$  存在下、酵素とTG, UR, DHTをインキュベートし、生成物をSDS-PAGEで分析した。Endo IIIだけでなくmNTH1においても基質と酵素がクロスリンクされた生成物のバンドが確認された。これより、mNTH1でもSchiff baseが反応中間体として形成されることがわかった。Endo IIIのLys120に対応するmNTH1のアミノ酸はLys208であることから、これが基質とのSchiff base形成に関与しているものと予想される。また、Endo IIIの場合、DHTではクロスリンクされたSchiff baseの量は他の基質に比べて少なかったが、mNTH1の場合はすべての基質でクロスリンクされた生成物の量は同じだった。これらの結果は、前に述べた切断活性アッセイの結果とよく一致している。

DNA中の塩基がダメージを受けると、隣接した塩基との水素結合・スタッキング相互作用が変わる。Endo IIIがこの部位に結合すると、不安定化した損傷塩基がヘリックス内から酵素の活性部位にフリップアウトしDNAから除去されると考えられている (Thayer et al., 1995). TGは相補鎖のAと水素結合を形成していると考え

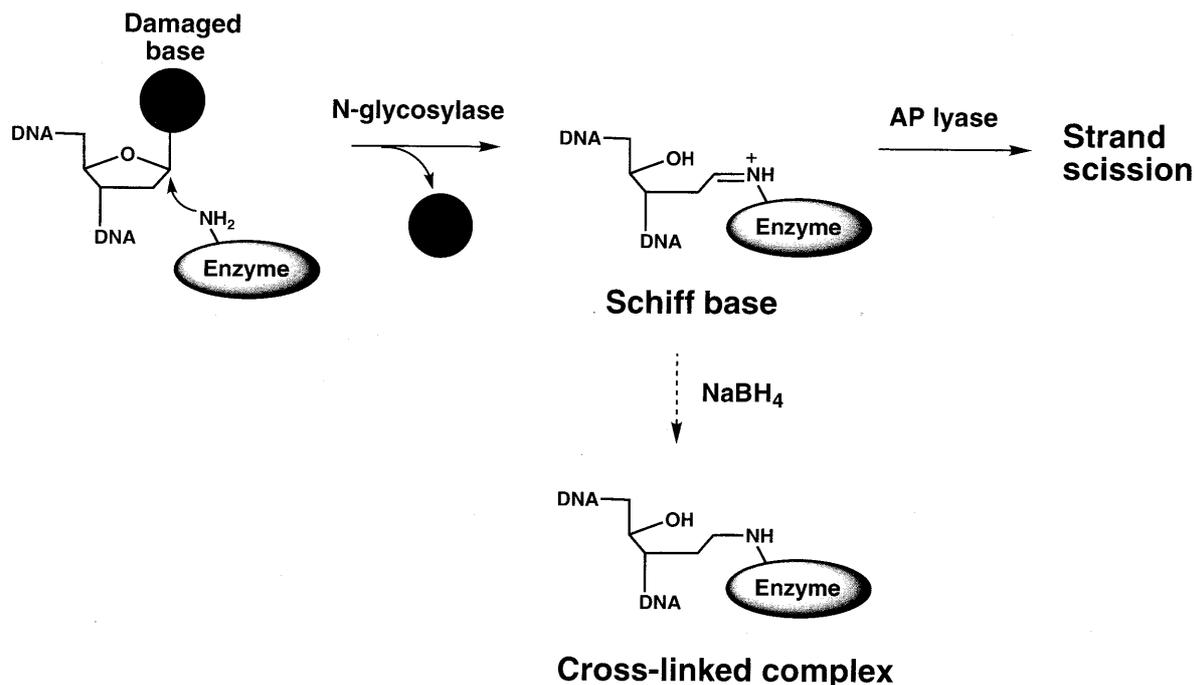


Fig. 3 Formation of a Schiff base intermediate during the action of base excision repair enzymes

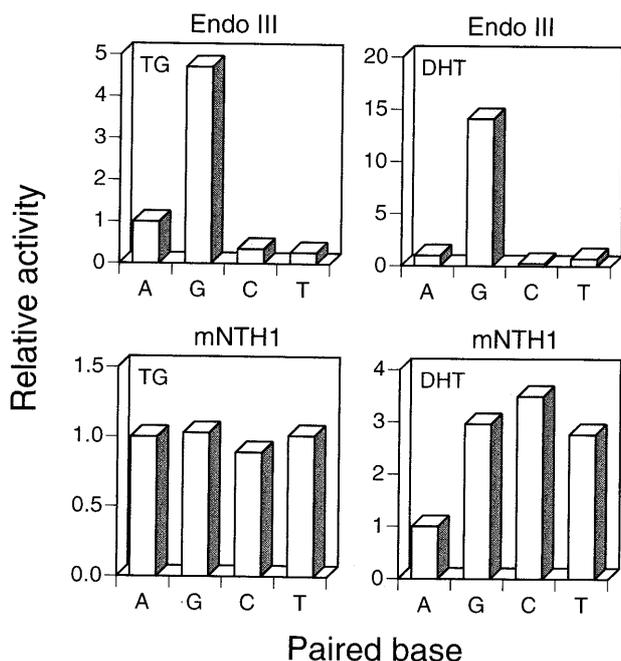
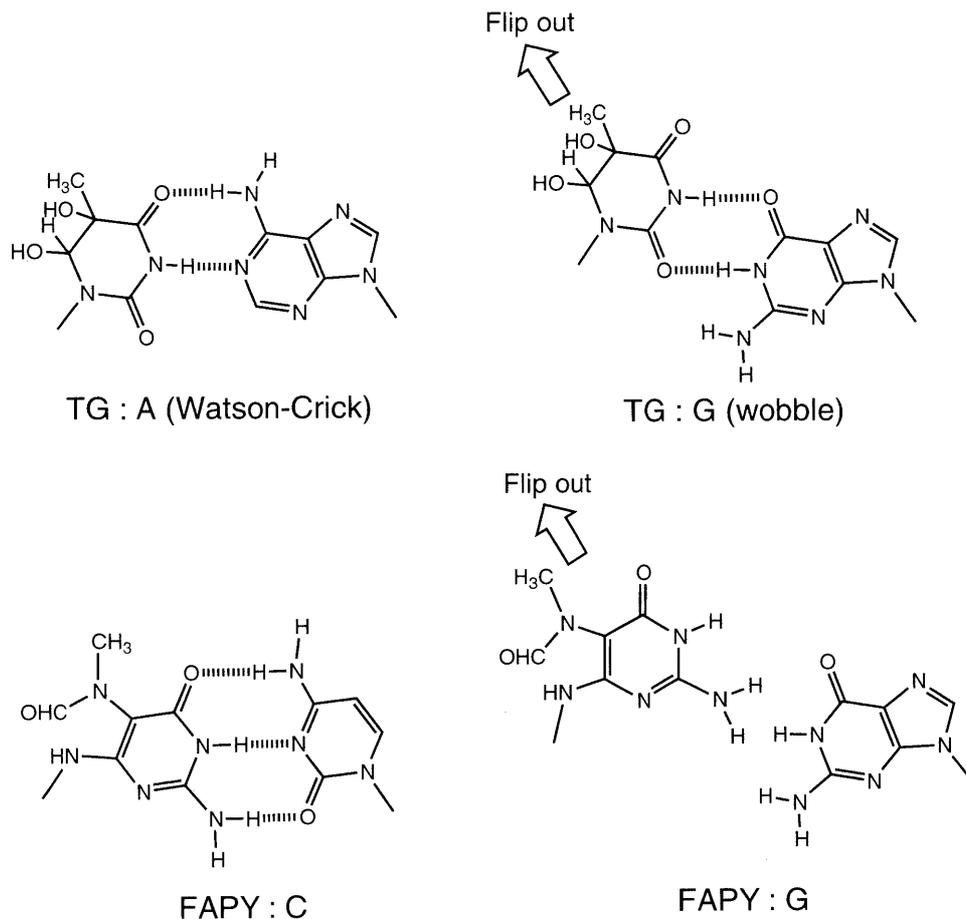


Fig. 4 Paired base effects on the activity of Endo III and mNTH1 for thymine glycol (TG) and 5,6-dihydrothymine (DHT)

えられるが、5,6位にかさだかく極性のあるヒドロキシル基が置換されているため、スタッキング相互作用が弱くなるとともに極性の高いヘリックス外へフラップアウトしやすくなる。それに対して、DHTでは5,6位に小さな水素原子がついているだけであり、水素結合やスタッキング相互作用はTGほど大きな影響を受けない。したがって、DHTはヘリックス内に収まり、フラップアウ

トが起こりにくいため、Endo IIIにより除去されにくいものと考えられる。もしこのようなフラップアウト機構で反応が起こっているとすれば、損傷に対合する塩基を変えることにより酵素の反応性が変化する可能性がある。そこで、TGおよびDHTの対合塩基を変えて酵素活性を調べた (Asagoshi et al., 2000a)。Endo IIIの場合、TG : Gペアに対する活性はTG : Aペアに比べ約5倍上昇したが、ピリミジンと対合した場合は活性の上昇は認められなかった (Fig. 4)。同様に、DHTでもGと対合した場合はAに比べ約15倍活性が上昇した。Endo VIIIでも類似した対合塩基依存性が認められた (Ide, 2001)。TGやDHTがGと対合すると、G : Tミスマッチと同じようにwobble型のbase pair配置をとっていると予想される (Fig. 5)。Aと対合したWatson-Crick型の配置に比べ、Gと対合したwobble型の配置では、TGはヘリックス内からmajor groove側に移動しているためフラップアウトしやすくなっていると考えられ、その結果、TG : Gに対する活性が上昇したと考えられる。一方、mNTH1では、TGおよびDHTいずれの場合もEndo IIIのようなはっきりした対合塩基依存性は認められなかった (Fig. 4)。Endo IIIでは $k_{cat}$ が大きいため、基質酵素複合体が形成された後のフラップアウトが律速段階となり対合塩基の影響がはっきり見られたと考えられる。一方、mNTH1ではEndo IIIに比べて $k_{cat}$ が20倍以上遅いことから、塩基のフラップアウトよりもその後の反応 (*N*-グリコシド結合の切断あるいは $\beta$ 脱離による鎖切断) が律速となりフラップアウトの起こりやすさの違いが活性の差として現れにくかったものと考えられる。



**Fig. 5** Possible base pairing schemes for thymine glycol (TG) and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-*N*-methylformamidopyrimidine (FAPY)

活性酸素種とピリミジン塩基の反応は主にC5-C6二重結合に起こるが、Tの場合5位のメチル基の酸化により5-formyluracil (FU)と5-hydroxymethyluracil (HMU)が生成する (Fig. 1). TやHMUと異なり、電子吸引性のホルミル基を持つFUでは、 $pK_a$ が低下し塩基のイオン化が生理条件でも無視できなくなる。イオン化型のFUは、DNA複製の際、Gと誤対合し突然変異性を示す (Yoshida et al., 1997; Masaoka et al., 2001). 当研究室では、T:Aペアの酸化により生じるFU:AとdGTPのミスインコーポレーションにより生じるFU:Gが、それぞれ大腸菌の3-methyladenine glycosylase II (AlkA)およびミスマッチ修復タンパク MutSにより認識されることを明らかにした (Masaoka et al., 1999; Terato et al., 1999). ヒト培養細胞にもDNAからFUをリリースする活性があることから (Bjelland et al., 1995), AlkAのヒト機能ホモログ methylpurine glycosylase (hMPG)のFUに対する活性を調べたが、活性は認められなかった。最近、Endo III, Endo VIII, FpgおよびhNTH1がFU修復活性を持つことが報告された (Zhang et al., 2000; Zhang, 2001). 報告された実験では、大過剰の酵素を用いて活性アッセイを行っていたので、定量的な検

討を行い、活性をTGと比較した。これらの酵素のFU活性 ( $k_{cat}/K_m$ )はTGに比べ極めて低く、TGの1/50から1/400であった (Masaoka et al., to be published). したがって、Endo III, Endo VIII, FpgおよびhNTH1が実際の細胞内でFU修復に関与しているとは考えにくく、また、哺乳類ではFUを認識する新規な酵素が存在するものと思われる。

## 2. OGG1とFpg

OGG1には、スプライシング様式の違いから多種のisoformが存在する (Aburatani et al., 1997; Nishioka et al., 1999). 酵素活性アッセイにはヒト由来OGG1の核移行型isoform 1a (hOGG1)を用いた。基質としては、7,8-dihydro-8-oxoguanine (OG)およびG由来のN-methyl型formamidopyrimidine (2,6-diamino-4-hydroxy-5-*N*-methylformamidopyrimidine, FAPY)を含むオリゴヌクレオチドを用いた (Fig. 1). OGまたはFAPYを含む基質をFpg, hOGG1とインキュベートし、生成物をPAGEで分析した (Asagoshi et al., 2000c). Fpgでは、OG・FAPYともに損傷部位で $\delta$ 脱離により切断された生成物が認められたが、hOGG1では $\beta$ 脱離により切断

**Table 3** Parameters of Fpg and hOGG1 for OG and FAPY

Enzyme/Substrate	$K_m$ (nM)	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ ( $\times 10^3$ )
Fpg			
OG	13 $\pm$ 4	1.8	140 (82) <sup>a</sup>
FAPY	38 $\pm$ 9	5.1	130 (76)
hOGG1			
OG	23 $\pm$ 8	0.034	1.5 (0.9)
FAPY	15 $\pm$ 4	0.025	1.7 (1)

<sup>a</sup> Numbers in parentheses are relative values

されたバンドが生じた。この結果は、*N*-glycosylase 後に作用する AP lyase の鎖切断モードが OGG1 と Fpg で異なることを示している。次に酵素パラメーターを求めた (Table 3)。Fpg の OG に対する  $K_m$  は FAPY に対する値よりも低く、OG の方が親和性の高い基質であるといえる。しかし、 $k_{cat}$  は FAPY に対する値の方が高く、反応効率 ( $k_{cat}/K_m$ ) は両基質に対してほぼ等しい値となった。hOGG1 では両基質に対する  $K_m$ 、 $k_{cat}$  に大きな差異は見られず、反応効率は Fpg と同様に両基質に対してほぼ等しい値が得られた。この結果から、hOGG1 が OG および FAPY を同程度の反応効率で DNA から除去することが明らかとなった。また、hOGG1 の  $k_{cat}$  は Fpg に比べ著しく低かった。マウス OGG1 では、鎖切断を行う AP lyase 活性が先行する *N*-glycosylase 活性とカップルしないとの報告があり (後述)、本研究で活性測定に用いたニッキングアッセイでは  $k_{cat}$  が多少低く見積もられている可能性がある。しかし、これを考慮しても hOGG1 と Fpg の結果は mNTH1 と Endo III の結果と類似しており (Tables 2, 3)、哺乳類塩基除去酵素の  $k_{cat}$  は大腸菌に比べ本質的に低いといえる。一般に、発生期を除き哺乳類細胞の増殖速度は大腸菌に比べ遅い。したがって、DNA 損傷の修復には時間的余裕があり、 $k_{cat}$  が低くても細胞周期内に十分に修復を行えるのかもしれない。この点に関しては、原核生物と真核生物のゲノム中の DNA 損傷の量と細胞あたりの修復酵素の数を考慮してさらに検討する必要がある。また、酸化損傷塩基の修復と転写の共役が示唆されており、XPG・TFIIH・CSB 等と OGG1 あるいは NTH1 の相互作用によりこれらの酵素の細胞内における修復効率が上昇する可能性もある (Klungland et al., 1999a; Le Page et al., 2000)。

両酵素の反応機構を検討するために、NaBH<sub>4</sub> 存在下で酵素と基質をインキュベートし、クロスリンク生成物 (還元された Schiff base 中間体) が生じるかどうかを SDS-PAGE で分析した。Fpg では、OG・FAPY ともにクロスリンク形成によりシフトしたバンドが見られた。同様に、hOGG1 でも両基質とクロスリンクしたバンドが認められた。これに対し、損傷の代わりに G を含むコントロールでは、クロスリンク生成物は認められなかった。この結果から、Fpg と hOGG1 が、Schiff base 中間

体を経た反応により OG・FAPY を除去することが示された (Fig. 3)。Fpg の Schiff base 形成には N 末端付近の Pro が関与するとされているが (Zharkov et al., 1997)、Endo III のスーパーファミリーに属する hOGG1 では、Helix-hairpin-Helix モチーフに近い Lys249 (Endo III の Lys120 に対応) が Schiff base 形成に関与しているものと思われる。酵素濃度を変化させた場合、同濃度の Fpg に対しては FAPY に比べ OG の方がクロスリンク生成物が多く、Fpg が FAPY より OG に対して高い親和性を持つことが示された。hOGG1 では、基質間でクロスリンクの生成率にほとんど差が認められなかった。これらの結果は、前に述べた Fpg および hOGG1 の両基質に対する  $K_m$  の比較結果とも一致した。最近、OGG1 (マウス) の反応機構に関して、*N*-glycosylase 活性と AP lyase 活性がカップルしていないという興味深い結果が Grollman らのグループにより報告された (Zharkov et al., 2000)。塩基除去修復酵素は従来、*N*-glycosylase 活性のみを持つ monofunctional glycosylase (たとえば uracil glycosylase や 3-methylpurine glycosylase) と *N*-glycosylase 活性と AP lyase 活性の両方を持つ bifunctional glycosylase (たとえば Endo III や Fpg) に分類されてきた。前者では、反応生成物として脱塩基部位が生じるのに対し、後者では、2つの活性が協奏的に作用し、損傷塩基が DNA から除去されると同時に脱塩基部位の  $\beta$  脱離 (あるいは  $\delta$  脱離) が起こり鎖切断が生じる。hOGG1 の作用は、2つのタイプの glycosylase の中間に位置し、損傷塩基が除去された後一時的に脱塩基部位が蓄積し、その後時間をおいて鎖切断が生じる。したがって、hOGG1 の AP lyase 活性が生理的に意味があるかどうかについてはさらに検討が必要である。実際の細胞では、大量に存在する AP endonuclease である APE (APEX, HAP) がこのステップを行っているかもしれない。

Fpg および hOGG1 の OG 除去効率は、対合塩基の種類によって著しく変化する。これは、error free な修復 (OG : C ペアからの OG の除去) を行うと同時に、error prone な修復 (OG : A ペアからの OG の除去) を防ぐために重要である (Michaels et al., 1991)。OG : A ペアは、DNA 複製の際、dATP のミスインコーポレーションにより生じ、OG 除去後の修復合成により突然変異が固定される。しかし、FAPY については、対合塩基の影響はこれまでに検討されていなかった。そこで、本研究では FAPY 修復に対する対合塩基の影響を検討した (Asagoshi et al., 2000c)。同一配列中に OG および FAPY を導入し、対合塩基として A, G, C, T のいずれかを含む基質を調製した。これを Fpg あるいは hOGG1 とインキュベートし生成物を PAGE で分析した。Fpg の場合、OG が G, C, T と対合した場合、強い切断バンドが生じたが、A と対合した場合は、非常に弱い切断バンドしか生じなかった。FAPY では G, C, T だけでなく、A と対

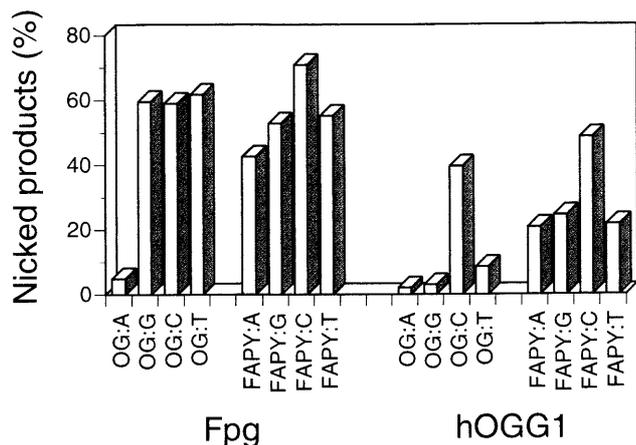


Fig. 6 Paired base effects on the activity of Fpg and hOGG1 for 7,8-dihydro-8-oxoguanine (OG) and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-*N*-methylformamidopyrimidine (FAPY)

合した場合も強い切断バンドが生じた。hOGG1の場合、OGではCと対合したときのみ強い切断バンドが生じた。FAPYでは、CだけでなくA, G, Tと対合した場合も強い切断バンドが生じた。PAGEによる生成物分析の結果に基づき、各基質の切断率を定量した (Fig. 6)。OGでは、既に報告されているFpgおよびhOGG1の対合塩基依存性とよく一致した。一方、FAPYでは、Cと対合した場合、除去効率は高い傾向にあるものの、他の3種の対合塩基の効率も高く、塩基間でOGほど大きな差は認められなかった。したがって、OGでは、FpgおよびhOGG1に固有の対合塩基依存性があるが、いずれの場合もOG:CペアからのOGの除去効率は高く、OG:Aペアからの効率は著しく低い。しかし、FAPYではOGのような明確な対合塩基依存性は存在せず、どの塩基対も比較的高い効率で除去されることがわかった。当研究室でFAPY (G由来) を含む鋳型を用いDNA複製を調べたところ、FAPYはDNA合成を強く阻害するが、translesion synthesisが起こる場合はFAPYの向かいにCが選択的に取り込まれることが明らかとなった (Asagoshi et al., to be published)。この結果は、FAPY (G由来) が実際の生体内でFAPY:Cペアとしてのみ存在しており、他の塩基対は生じないことを示している。したがって、2種の塩基対 (OG:CとOG:A) が生じるOGのケースとは異なり、修復酵素はFAPYの対合塩基を特別識別する必要がないと思われる。A由来のFAPYについては実験を行っていないが、構造から考えてA由来のFAPYについても同様な議論ができるものと推測される。

最近、OGを含むオリゴヌクレオチド基質-hOGG1複合体の三次元構造がVerdineらのグループにより報告された (Bruner et al., 2000)。これによると、hOGG1は損傷結合ポケットと対合塩基を特異的に認識する結合部位を持つ。ヘリックスからフリップアウトしたOGとヘ

リックス内に収まっている対合塩基Cは、特異的な水素結合と芳香族アミノ酸残基のスタッキング相互作用により認識されている。OGの対合塩基がAの場合は、Cの結合部位に収まらず酵素は活性化状態に移れない。この結果は、hOGG1のOG:CとOG:Aに対する認識の差をうまく説明しているが、なぜ構造の異なるFAPYが同じ効率で認識され、さらに対合塩基の影響もOGの様に顕著に現れないのか等の問題は依然残されたままである。たとえば、GとOGを区別する水素結合は1本のみで、OGのN7位のNHとGly42の主鎖COの間に形成される。しかし、N7-methyl型のFAPYは、このような水素結合が形成できないにもかかわらず、hOGG1のよい基質である。報告された複合体で認められた特異的相互作用はOG:Cに対するinduced fitの結果であり、実際の2つの結合部位における相互作用はもう少しフレキシブルであると考えられる。

### 3. NTH1 と OGG1 の認識基質オーバーラップ

OGやFAPYなどプリン酸化損傷は、大腸菌ではFpg、真核生物ではOGG1により修復される。一方、TGなどピリミジン酸化損傷は、大腸菌ではEndo III、酵母ではNtg1, Ntg2 (*S. cerevisiae*) およびNth-spo (*S. pombe*)、哺乳類ではNTH1によって修復される (Table 1)。最近、酵母Ntg1とNtg2がFAPY修復活性を持つことが示された (Senturker et al., 1998; Alseth et al., 1999)。Endo IIIおよびNTH1はNtg1・Ntg2とアミノ酸配列の相同性があることから、これらの酵素がFAPY修復活性を持つ可能性がある。そこで、Endo IIIおよびmNTH1のFAPYに対する活性を検討した (Asagoshi et al., 2000b)。

アッセイでは、FAPYを含むオリゴヌクレオチドと、対合塩基としてA, G, C, T, いずれかを含む相補鎖とアニールし、これを修復酵素とインキュベートし、生成物をPAGEで分析した。活性は生じた切断バンドにより定量した。Endo IIIでは、FAPY:Cペアに対する活性が最も低く、TGに対する活性に比べると1/22であった (Fig. 7)。プリン塩基A, Gと対合した場合の活性は上昇し、TGの活性の1/2となった。Endo IIIと類似した基質特異性を持つ大腸菌Endo VIIIについても同様な結果が得られた。mNTH1では、FAPY:Cペアに対する活性はTGとほぼ同じであり、A, G, C, Tの間で対合塩基依存性は認められなかった。ヒト由来NTH1 (hNTH1) についても同様な検討を行ったところmNTH1と同じ結果が得られた。これらの結果は、Endo IIIおよびNTH1 (マウス・ヒト) に潜在的なFAPY修復活性があること、さらにEndo IIIとNTH1では活性の対合塩基依存性が異なることを示している。この結果をさらに確認するため、NaBH<sub>4</sub>トラップ反応を用いて反応中間体の形成を調べた。Endo IIIの場合、酵素-基質クロスリンク生成物の量を対合塩基で比較すると、A, G, Tに比べCが著し

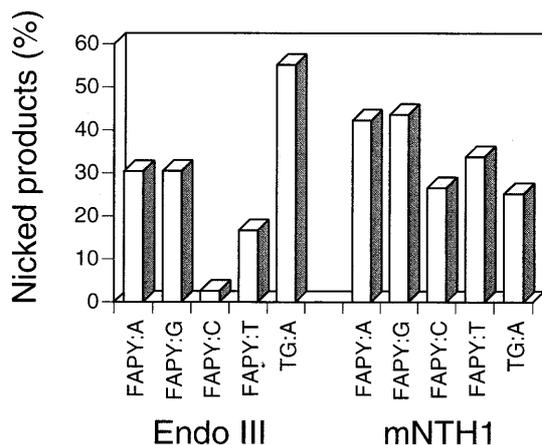


Fig. 7 Paired base effects on the activity of Endo III and mNTH1 for 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine (FAPY)

く少なかった。mNTH1では、A, G, C, Tいずれの塩基と対合した場合も、クロスリンク生成物の量は同じであった。これらの結果は、基質のニッキングアッセイの結果と一致した。最近、SeebergらのグループもhNTH1がpoly (dG-dC) からFAPYをリリースすることを報告している (Luna et al., 2000)。

以上の結果から、Endo IIIによるFAPYの修復には対合塩基依存性があり、FAPYがプリンと対合したときに効率よくDNAから除去されることがわかった。Endo IIIはフリップアウト機構により損傷を認識する (1. NTH1とEndo III参照)。FAPYがCと対合した場合は、塩基間で水素結合が形成され安定化するため、損傷塩基であるFAPYが活性部位にフリップアウトしにくい (Fig. 5)。これは、DNA複製の際、FAPYの向かいにCが選択的に取り込まれることから支持される。一方、FAPYがGやAと対合した場合は、そのかさ高さのために立体障害が生じ、不安定化されたFAPYは活性部位にフリップアウトしやすくなる。その結果、対合塩基によって活性に差が生じたものと考えられる。mNTH1のFAPY修復活性は、4種の対合塩基で差が認められなかった。既に述べたように、本酵素はEndo IIIに比べ反応速度 ( $k_{cat}$ ) の低い酵素であり、反応の律速段階がフリップアウトではなく、これに続くN-グリコシド結合の切断あるいは鎖切断にあるためだと考えられる。

以上の結果から、Endo III (およびEndo VIII) はFAPYに対する潜在的な活性を持つものの、FAPY:Cペアに対する活性は本来の基質であるTGと比較し著しく低いことが示された。したがって、大腸菌細胞内では、これまで知られているようにFpgがFAPY修復を行い、Endo IIIはFAPYの修復に関与していないと予想される。これを確認するため、大腸菌の野性株およびEndo III欠損株 (*nth*) の細胞粗抽出物を調製しFAPY活性を調べた。FAPY:Cペアを基質とした場合、野生株・*nth*株

いずれの場合もEndo IIIによる $\beta$ 脱離生成物は認められず、Fpgによる $\delta$ 脱離生成物が認められた。FAPY:Cペアを基質とした場合、野生株ではEndo IIIによる明瞭な $\beta$ 脱離生成物が認められたが、*nth*株ではこの生成物はなくなった。これらの結果は、artificialな基質であるFAPY:Cペアを用いると粗抽出物中のEndo III活性は検出されるが、実際の細胞内に生成するFAPY:Cペアに対する活性は検出されないこと、つまり大腸菌ではEndo IIIがFAPY:Cペアの修復に関与していないことを示す。また、Endo VIII欠損株 (*nei*) およびEndo III・Endo VIII二重欠損株 (*nth nei*) 欠損を用いた検討結果から、Endo VIIIもFAPY:Cペアの修復に関与していないことが確認された。一方、精製したmNTH1はFAPY:Cペアに対してTGと同程度の活性を示した (Fig. 7)。哺乳類ではこれまでに、FAPYの修復酵素としてOGG1が知られていることから、本研究の結果をあわせて考慮すると、哺乳類ではOGG1とNTH1の両者がFAPY修復に関わっていると考えられる。実際、OGG1ノックアウトマウスでは、OG活性は完全に消失したが、FAPYに対しては野生型の1/3程度の残留活性があると報告されている (Klungland et al., 1999b)。我々も、野生型のマウス臓器から核粗抽出物を調製し、FAPY活性を調べた。FAPY活性は、ネガティブコントロールのTを含むオリゴヌクレオチド基質では阻害されなかったが、TGを含む基質では競争的に阻害された。同様にFAPY活性は、OGを含む基質でも阻害された。ノックアウトマウスの結果およびTG阻害実験の結果は、FAPYの細胞内修復に対するNTH1・OGG1両酵素の関与を強く支持するものである。

NTH1・OGG1両酵素により認識される他の酸化損傷については、まだほとんど研究は行われていないが、当研究グループではhOGG1がURを認識することを見出している (Ide, 2001)。mNTH1のURに対する活性は対合塩基依存性がないが (Asagoshi et al., 2000a)、hOGG1ではUR:Cペアに対する活性が最も高かった。Endo III、hNTH1およびEndo VIIIにOG修復活性があるとの報告がある (Matsumoto et al., 2001; Hazra et al., 2000)。当研究室で過剰量の酵素を用いてOG:N (N = A, G, C, T) ペアに対する活性を調べてみたが、数パーセントの基質が切断されただけであり、活性の酵素濃度依存性も認められなかった。化学合成したOGを含むオリゴヌクレオチドの脱保護を通常条件で行うとOGが分解するため、脱保護はメルカプトエタノール存在下で行う必要がある。たとえば、何らかの原因でOGの一部が分解しFAPYタイプの生成物に変わった場合、既に述べたようにEndo IIIホモログやEndo VIIIに認識され、さらに対合塩基依存的に活性が変化するはずである。特にGと対合した場合活性は高いと予想される。Endo III、hNTH1、Endo VIIIのOGに対する活性は、オリゴヌク

レオチドに導入されたOGの純度を十分にチェックして再度調べる必要があると思われる。

今後、さらに多くの酸化損傷に対してNTH1とOGG1の活性オーバーラップを調べるとともに、これらを相補する新規な活性について検討し、修復酵素間の機能相補による酸化損傷修復ネットワークを明らかにしてゆく必要がある。

## 謝 辞

本研究は、万有製薬(株)つくば研究所・西村暹博士(hOGG1)、中国短期女子大学・関周司博士(mNTH1)、岡山理科大学・池田正五博士(hNTH1)、東北大学大学院・山本和生博士(大腸菌*nth*および*nei*変異株)との共同研究であり、ご協力に心より感謝申し上げます。また、本研究に精力的に取り組んでくれた遺伝子化学研究室の学生諸君ならびに本原稿に対し有意義なコメントをいただいた広島大学大学院・寺東宏明博士、大山義彦博士にお礼申し上げます。

## 参考文献

- Aburatani, H., Y. Hippo, T. Ishida, R. Takashima, C. Matsuba, T. Kodama, M. Takao, A. Yasui, K. Yamamoto, M. Asano, K. Fukasawa, T. Yoshinari, H. Inoue, E. Ohtsuka and S. Nishimura (1997) Cloning and characterization of mammalian 8-hydroxyguanine-specific DNA glycosylase/apurinic, apyrimidinic lyase, a functional mutM homologue, *Cancer Res.*, 57, 2151-2156.
- Alseth, I., L. Eide, M. Pirovano, T. Rognes, E. Seeberg and M. Bjoras (1999) The *Saccharomyces cerevisiae* homologues of endonuclease III from *Escherichia coli*, Ntg1 and Ntg2, are both required for efficient repair of spontaneous and induced oxidative DNA damage in yeast, *Mol. Cell Biol.*, 19, 3779-3787.
- Asagoshi, K., H. Odawara, H. Nakano, T. Miyano, H. Terato, Y. Ohyama, S. Seki and H. Ide (2000a) Comparison of substrate specificities of *Escherichia coli* endonuclease III and its mouse homologue (mNTH1) using defined oligonucleotide substrates, *Biochemistry*, 39, 11389-11398.
- Asagoshi, K., T. Yamada, Y. Okada, H. Terato, Y. Ohyama, S. Seki and H. Ide (2000b) Recognition of formamidopyrimidine by *Escherichia coli* and mammalian thymine glycol glycosylases. Distinctive paired base effects and biological and mechanistic implications, *J. Biol. Chem.*, 275, 24781-24786.
- Asagoshi, K., T. Yamada, H. Terato, Y. Ohyama, Y. Monden, T. Arai, S. Nishimura, H. Aburatani, T. Lindahl and H. Ide (2000c) Distinct repair activities of human 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase and formamidopyrimidine DNA glycosylase for formamidopyrimidine and 7,8-dihydro-8-oxoguanine, *J. Biol. Chem.*, 275, 4956-4964.
- Bjelland, S., L. Eide, R.W. Time, R. Stote, I. Eftedal, G. Volden and E. Seeberg (1995) Oxidation of thymine to 5-formyluracil in DNA: mechanisms of formation, structural implications, and base excision by human cell free extracts, *Biochemistry*, 34, 14758-14764.
- Bruner, S.D., D.P. Norman and G.L. Verdine (2000) Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA, *Nature*, 403, 859-866.
- Hazra, T.K., T. Izumi, R. Venkataraman, Y.W. Kow, M. Dizdaroglu and S. Mitra (2000) Characterization of a novel 8-oxoguanine-DNA glycosylase activity in *Escherichia coli* and identification of the enzyme as endonuclease VIII, *J. Biol. Chem.*, 275, 27762-27767.
- Ide, H. (2001) DNA substrates containing defined oxidative base lesions and their application to study substrate specificities of base excision repair enzymes, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 68, 207-221
- Jiang, D., Z. Hatahet, J.O. Blaisdell, R.J. Melamed and S.S. Wallace (1997) *Escherichia coli* endonuclease VIII: cloning, sequencing, and overexpression of the *nei* structural gene and characterization of *nei* and *nei nth* mutants, *J. Bacteriol.*, 179, 3773-3782.
- Klungland, A., M. Hoss, D. Gunz, A. Constantinou, S.G. Clarkson, P. W. Doetsch, P.H. Bolton, R.D. Wood and T. Lindahl (1999a) Base excision repair of oxidative DNA damage activated by XPG protein, *Mol. Cell*, 3, 33-42.
- Klungland, A., I. Rosewell, S. Hollenbach, E. Larsen, G. Daly, B. Epe, E. Seeberg, T. Lindahl and D.E. Barnes (1999b) Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96, 13300-13305.
- Le Page, F., E.E. Kwok, A. Avrutskaya, A. Gentil, S.A. Leadon, A. Sarasin and P.K. Cooper (2000) Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome, *Cell*, 101, 159-171.
- Luna, L., M. Bjoras, E. Hoff, T. Rognes and E. Seeberg (2000) Cell-cycle regulation, intracellular sorting and induced overexpression of the human NTH1 DNA glycosylase involved in removal of formamidopyrimidine residues from DNA, *Mutat. Res.*, 460, 95-104.
- Masaoka, A., H. Terato, M. Kobayashi, A. Honsho, Y. Ohyama and H. Ide (1999) Enzymatic repair of 5-formyluracil. I. Excision of 5-formyluracil site-specifically incorporated into oligonucleotide substrates by AlkA protein (*Escherichia coli* 3-methyladenine DNA glycosylase II), *J. Biol. Chem.*, 274, 25136-25143.
- Masaoka, A., H. Terato, M. Kobayashi, Y. Ohyama and H. Ide (2001) Oxidation of thymine to 5-formyluracil in DNA promotes misincorporation of dGMP and subsequent elongation of a mismatched primer terminus by DNA polymerase, *J. Biol. Chem.*, 276, 16501-16510.
- Matsumoto, Y., Q.M. Zhang, M. Takao, A. Yasui and S. Yonei (2001) *Escherichia coli* Nth and human hNTH1 DNA glycosylases are involved in removal of 8-oxoguanine from 8-oxoguanine/guanine mispairs in DNA, *Nucleic Acids Res.*, 29, 1975-1981.
- Michaels, M.L., L. Pham, C. Cruz and J.H. Miller (1991) MutM, a protein that prevents G.C.T.A transversions, is formamidopyrimidine-DNA glycosylase, *Nucleic Acids Res.*, 19, 3629-3632.
- Minowa, O., T. Arai, M. Hirano, Y. Monden, S. Nakai, M. Fukuda, M. Itoh, H. Takano, Y. Hippo, H. Aburatani, K. Masumura, T. Nohmi, S. Nishimura and T. Noda (2000) Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 4156-4161.
- Nishioka, K., T. Ohtsubo, H. Oda, T. Fujiwara, D. Kang, K. Sugimachi and Y. Nakabeppu (1999) Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs, *Mol. Biol. Cell.*, 10, 1637-1652.
- 岡野 聡, 安井 明 (2001) 塩基損傷と単鎖切断の修復ネットワーク, 蛋白質核酸酵素, 46, 959-967.
- Saito Y, F. Uraki, S. Nakajima, A. Asaeda, K. Ono, K. Kubo and K. Yamamoto (1997) Characterization of endonuclease III (*nth*) and endonuclease VIII (*nei*) mutants of *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.*, 179, 3783-3785.
- 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.
- Senturker, S., P. Auffret van der Kemp, H.J. You, P.W. Doetsch, M. Dizdaroglu and S. Boiteux (1998) Substrate specificities of the ntg1 and ntg2 proteins of *Saccharomyces cerevisiae* for oxidized DNA bases are not identical, *Nucleic Acids Res.*, 26, 5270-5276.
- Takao, M., H. Aburatani, K. Kobayashi and A. Yasui (1998) Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage, *Nucleic Acids Res.*, 26, 2917-2922.
- Terato, H., A. Masaoka, M. Kobayashi, S. Fukushima, Y. Ohyama, M. Yoshida and H. Ide (1999) Enzymatic repair of 5-formyluracil. II. Mismatch formation between 5-formyluracil and guanine during dna replication and its recognition by two proteins involved in base excision repair (AlkA) and mismatch repair (MutS) , *J. Biol. Chem.*, 274, 25144-25150.
- Thayer, M.M., H. Ahern, D. King, R.P. Cunningham and J.A. Tainer (1995) Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure, *EMBO J.*, 14, 4108-4120.
- Wallace, S.S. (1997) Oxidative damage to DNA and its repair, In : J.G. Scandalios (Ed), *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 49-90.
- 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.
- Zhang, Q.M. (2001) Role of the *Escherichia coli* and human DNA glycosylases that remove 5-formyluracil from DNA in the prevention of mutations, *J. Radiat. Res.*, 42, 11-19.
- Zhang, Q.M., I. Miyabe, Y. Matsumoto, K. Kino, H. Sugiyama and S. Yonei (2000) Identification of repair enzymes for 5-formyluracil in DNA. Nth, Nei, and MutM proteins of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, 275, 35471-35477.
- Zharkov, D.O., R.A. Rieger, C.R. Iden and A.P. Grollman (1997) NH<sub>2</sub>-terminal proline acts as a nucleophile in the glycosylase/AP-lyase reaction catalyzed by *Escherichia coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) protein, *J. Biol. Chem.*, 272, 5335-5341.
- Zharkov, D.O., T.A. Rosenquist, S.E. Gerchman and A.P. Grollman (2000) Substrate specificity and reaction mechanism of murine 8-oxoguanine-DNA glycosylase, *J. Biol. Chem.*, 275, 28607-28617.