

# 分裂酵母のDNA塩基除去修復経路の初期過程に作用する酵素の役割

金光 恭一郎・池田 正五\*

岡山理科大学大学院理学研究科博士課程材質理学専攻

\*岡山理科大学理学部生物化学科

(2009年9月28日受付、2009年11月5日受理)

## 1. はじめに

DNAは様々な外的および内的要因によって絶えず損傷を受けている (Lindahl, 1993; Barners et al., 2004; Friedberg et al., 2006)。DNAの損傷が複製や転写を阻害すると、細胞は死に至る。また、塩基の損傷は突然変異を誘発し、がん化、老化および遺伝性疾患などの原因となる。したがって、DNA損傷を効率良く修復する機構は生命にとって必須である。修復機構の一つに塩基除去修復機構 (base excision repair、以下BERと略記) がある (池田と関, 2001; Hegde et al., 2008)。BERは、塩基の脱アミノ化やアルキル化、酸化による損傷、ミスペア、塩基欠落部位 (apurinic/aprimidinic sites; APサイトと略称)、一本鎖切断などのような小さな損傷の修復に関与している。一般的なBER経路は、損傷塩基を認識・切除するDNAグリコシラーゼやAPサイトを切断するAPエンドヌクレアーゼの作用により開始される。これらの反応産物として生じる異常な3'末端や5'末端は、それぞれをクリーンアップする酵素や仕組みにより、3'-OH末端と5'-リン酸末端に変換される。つづいてDNAポリメラーゼによりギャップが埋められ、DNAリガーゼにより鎖が連結され、修復が完了する。

分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) は単細胞真核生物で、様々な生命現象の解析のモデルとして広く用いられている。分裂酵母の遺伝子数は4,828個で、これまで全塩基配列が決定された真核生物のうち最も少ない (Wood et al., 2002)。分裂酵母は半数体で栄養増殖することや、遺伝子破壊が容易であるなど、分子遺伝学的な手法で遺伝子の機能や反応経路を解析するのに適した生物である。分裂酵母のBERを研究するグループは少なく、大腸菌や出芽酵母、哺乳類におけるBERの研究と比べて遅れている。私たちの研究室では、分裂酵母のBERの分子機構を分子遺伝学的な手法による解明を行ってきた。本論文では、分裂酵母のBERの初期過程で作用する酵素の役割について、他の生物のものと比較しながら、これまでに得られている知見をまとめた。さらに、この生物におけるBERの分子機

構について考察した。

## 2. DNAグリコシラーゼ

DNAグリコシラーゼは損傷塩基 (およびミスペア) を認識し、*N*-グリコシド結合を加水分解する (池田と関, 2001; Hegde et al., 2008)。表1に、大腸菌、出芽酵母、分裂酵母およびヒトで見いだされた酵素を、それらの基質特異性や構造上の特徴から分類した。分裂酵母には6種類のDNAグリコシラーゼがゲノム配列から見いだされ、すべてについてその機能が実証されている。DNAグリコシラーゼには、DNAグリコシラーゼ活性のみをもつ単機能グリコシラーゼ (monofunctional DNA glycosylase) と、DNAグリコシラーゼ活性とAPリナーゼ活性をあわせもつ二機能グリコシラーゼ (bifunctional DNA glycosylase) の2つのタイプがある。分裂酵母の二機能酵素は*nth1*のみであり、他の生物と比べて特徴的である。単機能酵素の場合、反応生成物としてAPサイトができる。hNTH1やhOGG1のような二機能酵素が作用すると、損傷塩基が取り除かれ、次いでAPリナーゼ活性のβ脱離反応によりDNA鎖が切断される。その結果、3'-α, β不飽和アルデヒド (3'-UA) 末端と5'-リン酸末端が生じる。大腸菌FpgやhNEIL1、hNEIL2などの酵素はβ脱離を行うので、3'-リン酸末端が残る。3'-UA末端や3'-リン酸末端にはDNAポリメラーゼが作用できないので、総称して3'ブロックと呼んでいる。この3'ブロックは修復DNA合成の開始可能な3'-OH末端に変換される必要がある。

### 2-1 ウラシルに作用するグリコシラーゼ

DNA中のシトシンは、pHや温度に依存した脱アミノ反応で、自発的にウラシルに変換される (Friedberg et al., 2006)。この損傷が修復されることなく複製が起こると、U:G→T:Aのトランジション変異が誘発される。ヒト細胞では、シトシンの脱アミノ反応は、1日1ゲノム当たり100~500残基と見積もられている (Kunkel, 1999)。ウラシルは、dUMPがdTMPの代わりにDNAポリメラーゼによってDNA中に取り込まれることによっても

表1 DNAグリコシラーゼの分類

大腸菌	出芽酵母	分裂酵母	ヒト
Ung	Ung1p	Ung1p	hUNG
Mug		Thp1p	hTDG hSMUG1 hMBD4
AlkA	Mag1p	Mag1p Mag2p	
TagA			hMPG
MutY		Myh1p	hMYH
Nth1	Ntg1p Ntg2p	Nth1p	hNTH1
	Ogg1p		hOGG1
Fpg			
Nei			hNEIL1 hNEIL2 hNEIL3

生じる。

ウラシル残基は、単機能酵素であるウラシルDNAグリコシラーゼ (UDG) により取り除かれる。ヒトのUDGは次の4種類のファミリーに分類される (Yonekura et al., 2009)。①UNGファミリー：細胞の主要なUDG活性。②MUG/TDG (mismatch-specific uracil DNA glycosylase/thymine DNA glycosylase) ファミリー。③SMUG (single strand-specific monofunctional uracil DNA glycosylase) ファミリー。④MBD4 (methyl-binding domain 4) ファミリー。MBD4以外のUDGは共通の $\alpha/\beta$ 折りたたみ構造をもつ単一のタンパク質スーパーファミリーに属し、共通の祖先から進化したと考えられている (Aravind and Koonin, 2000)。

分裂酵母では、*ung1* (SPCC1183.06) がUDGをコードしている。Ung1pのアミノ酸配列はヒトのUNGと51%の同一性を持ち、主に核に局在している (Elder et al., 2003)。*ung1*破壊株 (以後、遺伝子破壊株は遺伝子名の後に $\Delta$ をつけて表す) では、自然突然変異率が上昇する (池田, 2008)。*ung1*を過剰発現させると、DNAのチェックポイントに依存した細胞周期の遅れが誘導され、細胞が死滅する (Elder et al., 2003)。

ヒトのMUG/TDGは、5-メチルシトシンの脱アミノにより生じるT:Gミスマッチからチミンを取り除く酵素として見いだされた (Cortázar et al., 2007)。この酵素はU:GからUを取り除くこともできる。分裂酵母の*thp1* (SPCC965.05c) はMUG/TDGファミリーに属し、U:G、U:A、I (イノシン) :G、およびI:Tに強いグリコシラーゼ活性を持つ (Hardeland et al., 2003; Cortázar et

al., 2007)。また、5-フルオロウラシル、ウラシルシトシンの脱アミノ/酸化産物である5-ヒドロキシウラシルや、脂質の過酸化により生じる3, N<sup>4</sup>-エテノシトシンに、一本鎖DNA・二本鎖DNAにかかわらず作用する。さらに、グアニンの脱アミノ産物であるキサンチンやオキサニンにも作用する (Dong et al., 2008)。hTDGと違って、Thp1pはT:Gミスマッチからチミンを取り除くことはできない。これは、分裂酵母のDNA中にシトシンのメチル化を検出することができないことに関連しているのかも知れない。*thp1* $\Delta$ では自然突然変異率が上昇し、*ung1/thp1*二重破壊株ではさらに上昇した (池田, 2008)。これらは、Ung1pとThp1pが異なった基質に作用し、ゲノムの自然突然変異の抑制に作用していることを示している。

## 2-2 アルキル化塩基に作用するグリコシラーゼ

メチルメタンスルホン酸 (methyl methanesulfonate; MMS) のようなアルキル化剤は、DNAの塩基に作用して、N7-メチルグアニン (7-mG) やN3-メチルアデニン (3-mA) など、種々のアルキル化塩基を生じる (Lindahl, 1993; Friedberg et al., 2006)。MMSによるアルキル化塩基のうち、7-mGは83%を占めるが、生物的な毒性は低い。一方、3-mAの生成は11%であるが、複製阻害を起こすので致死性である。塩基のアルキル化は、塩化メチルのような環境中の物質でもおこる。塩化メチルは最も大量に存在する環境中の変異原物質 (発がん物質) の一つで、バイオマスの焼却や微生物や海藻により合成される。生体反応に必要なS-アデノシルメチオニンも、非酵素なDNAのメチル化に関与している。ヒト細胞では、7-mGと3-mAがそれぞれ1日1ゲノム当たり4,000残基および600残基生じると見積もられている (Kunkel, 1999)。

大腸菌では、3-mAや7-mGのような主なアルキル化産物は、構造の異なる2種類の単機能DNAグリコシラーゼ AlkAとTagAにより取り除かれる。分裂酵母には、大腸菌*alkA*や出芽酵母*MAG1*と相同性を有する2つのパラログ遺伝子*mag1* (SPAPB24D3.04c) と*mag2* (SPBC23G7.11) が存在する。Mag1pとMag2pのアミノ酸配列間には、44.8%の同一性がある。AlkAファミリーは、ヘリックス-ヘアピン-ヘリックス (helix-hairpin-helix, HhH) モチーフとその近傍に活性に必要なトリプトファン残基を共通の構造として持っている。

Mag1pは228アミノ酸からなるタンパク質で、大腸菌のAlkA/TagA二重欠損株のアルキル化剤感受性を相補する活性に基づいてクローニングされた (Memisoglu and Samson, 1996)。大腸菌で発現させたMag1pの基質特異性は、3-mAや3-mG、7-mGのような主要なアルキル化産物に限られ、脱アミノ産物やエテノ付加物、およ

び酸化産物にはほとんど作用しなかった (Alseth et al., 2005)。Mag1pの7-mGの除去速度は大腸菌のAlkAとほぼ同程度だったが、3-mAと3-mGの除去効率は5~10倍低かった。一方、Mag2pの基質特異性などの生化学的な解析は、未だ行われていない。

*mag1*Δと*mag2*ΔはMMSに対してほとんど感受性を示さない (Memisoglu and Samson, 2000; Alseth et al., 2005; Kanamitsu et al., 2007)。*mag1*Δ/*nth1*Δと*mag1*Δ/*apn2*Δ、*mag1*Δ/*rad2*Δ二重変異株は*nth1*Δ、*apn2*Δ、*rad2*Δの単独変異株と比べてMMSに対する耐性を増した (Alseth et al., 2005; Kanamitsu et al., 2007)。これはMag1pがMMSによって生じる損傷の修復を行うNth1p依存的なショートパッチBER経路と、Rad2p (flap エンドヌクレアーゼ) 依存的なロングパッチBER経路の両者の開始ステップに関わっていることを示している。また、*mag2*Δ/*nth1*Δ二重破壊株も、*nth1*Δに比べてMMSに対する耐性を増すことから、Mag2pもアルキル化損傷の除去に関与していることがわかる (Kanamitsu et al., 2007)。ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair, 以下NERと略記) に関与する*rad16*遺伝子と*mag1*、*mag2*それぞれとの二重破壊株は、それぞれの単独破壊株よりもMMS感受性を増した (Kanamitsu et al., 2007)。さらに*rad16*Δ/*mag1*Δ/*mag2*Δ三重破壊株が、最も高いMMS感受性を示した。三重破壊株に*mag1*と*mag2*を発現ベクターを用いてそれぞれ導入すると、MMSに対する耐性が増加した。これらの結果は、Mag1pおよびMag2pの作用により開始されるBERと、NERが互いに独立にアルキル化損傷塩基を除去することを示している。相同性組換えに関わる*rhp51*Δ/*mag1*Δの二重破壊株は、慢性的なMMS処理で*rhp51*Δ単独破壊株よりも感受性になった (Memisoglu and Samson, 2000)。さらに*mag1*変異株では、自然に起こる染色体内組換え頻度が3倍上昇した (Alseth et al., 2005)。これらの結果は、Mag1pと組換え修復が両方ともアルキル化塩基の修復に関与していることを示している。*nth1*、*rad16*および*rad2*欠損株からそれぞれ*mag1*をさらに欠損させると組換え頻度が低下した (Alseth et al., 2005)。これは、自然に起こる塩基損傷がMag1pによって除去され、生じたAPサイトがショートパッチBER、ロングパッチBER、NER、および相同性組換えの基質になることを示している。

### 2-3 酸化塩基に作用するグリコシラーゼ

G:C塩基対中のグアニン残基の酸化により生じた8-オキソグアニン (8-oxoG) は、次の複製でシトシンのみならずアデニンと塩基対形成ができるため、G:C→T:A変異を誘発する。ヒト細胞では、8-oxoGは1日1ゲノム当たり1,000残基程度生じる (Kunkel, 1999)。シトシンと対合している8-oxoGを切除するDNAグリコシラ

ーゼは、大腸菌ではFpg (MutM)、酵母や哺乳類ではOGG1と呼ばれる二機能酵素である。両者の機能は類似しているが、構造は全く異なっている。分裂酵母は、FpgやOGG1に対応する酵素はコードしていない。チミンの酸化産物であるチミングリコール (Tg) は、ヒト細胞1ゲノム当たり1日に500残基程度生じ、複製や転写を中断させる。これを切除する酵素は、大腸菌ではエンドヌクレアーゼIII (Nth) やエンドヌクレアーゼVIII (Nei) である。分裂酵母にはNthのホモログが見つかるが、Neiに対応する酵素はコードされていない。

分裂酵母の*nth1* (SPAC30D11.07) は大腸菌*nth*のホモログとしてクローニングされた (Roldan-Arjona et al., 1996)。Nth1pは、355アミノ酸からなる40.2 kDaのタンパク質である。NthファミリーのDNAグリコシラーゼは、DNAグリコシラーゼ活性とAPリナーゼ活性の両方を持つ二機能酵素で、損傷塩基を除去した後、β脱離反応によりDNAの鎖を切断し、3'ブロック (3'-UA) と5'-リン酸末端を残す。その構造は原核生物から真核生物まで高度に保存され、活性中心のリジン残基付近にHhHモチーフを、C末端側に鉄-硫黄クラスター [4Fe-4S] を持っている (図1)。HhHモチーフは、AlkAファミリーやMutYファミリーなどにも保存されている。真核生物の酵素は、さらに核移行シグナル (NLS) を持っている。分裂酵母Nth1pの細胞内局在を、GFPを用いた蛍光観察法で調べたところ、核に強く観察された (Sugimoto et al., 2005)。ほ乳類の酵素や出芽酵母のNtg1pと異なり、分裂酵母のNth1pはミトコンドリアで観察されなかった。

精製したNth1pを使って、基質特異性が調べられている。酸化損傷DNAからNth1pにより遊離する塩基を化学分析したところ、ピリミジンの酸化損傷によって生じる5-ヒドロキシシトシンやTg、5-ヒドロキシ-6-ヒドロチミン、5,6-ジヒドロシトシン、5-ヒドロキシウラシルが検出された (Karahalil et al., 1998)。さらに、5-ホルミルウラシルと5-ヒドロキシメチルウラシルも大腸菌のNth1と同様の効率で除去する (Yonekura et al., 2007)。また、酸化損傷の主な産物である8-oxoGを、8-oxoG/Gと8-oxoG/Aミスペアからも除去する活性

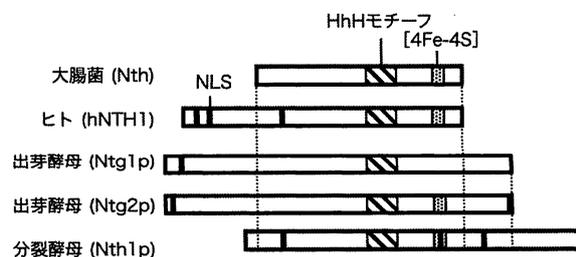


図1 Nthファミリーの構造

を持っている。大腸菌の*nth1/nei*遺伝子破壊株で分裂酵母Nth1pを発現させると、過酸化水素耐性が回復し、自然突然変異率が減少した(Osman et al., 2003)。これはNth1pが8-oxoGを除去するという生化学的データを遺伝学的に裏付ける。Nth1pはmethyl-*N*-nitroso urea (MNU) により生じるメチルホルムアミドピリミジン (me-fapy) のようなアルキル化ピリミジンも除去できるが、3-mAや7-mGは除去できない(Osman et al., 2003)。*nth1*Δの抽出液中のTgとAPサイトに対する切断活性は、ほとんど消失した(Sugimoto et al., 2005)。したがって、Nth1pは分裂酵母細胞内のTgとAPサイトを切断する主要な活性である。

*nth1*Δは酸化剤(過酸化水素、メナジオン)や紫外線、放射線に対して感受性を示さないが、アルキル化剤のMMSに対しては感受性となる(Osman et al., 2003; Alseth et al., 2004; Sugimoto et al., 2005)。これは、*nth1*のAPリアーゼ活性の欠損によるものと考えられる。さらに、*nth1*Δでは有糸分裂における染色体間組換え頻度が、野生株に比べ6倍上昇した(Osman et al., 2003)。*nth1*遺伝子とBER遺伝子(*apn1*, *uvel*, *rad2*)、NER遺伝子(*rad16*, *rad14*, *swi10*, *rad13*)や相同性組換え遺伝子(*rhp55*)とのMMS損傷修復におけるエピスタシス解析が行われた(Osman et al., 2003)。*nth1*Δ/*rad16*Δと*nth1*Δ/*rhp55*Δ、*nth1*Δ/*rad2*Δ、*rad2*Δ/*rad16*Δ二重欠損株はそれぞれの単独欠損株よりもMMS感受性が増加した。したがって、MMS損傷の修復はBER以外の修復経路でも行われている。*nth1*Δに過酸化水素を分解するカタラーゼの遺伝子(*ctt1*)を欠損させると、過酸化水素に対する感受性が著しく増加し、さらに自然突然変異も増加した(Hida and Ikeda, 2008)。カタラーゼが*nth1*Δの過酸化水素耐性に働いていることや、Nth1pが酸化損傷によるDNAの突然変異抑制に貢献していることがわかる。

APエンドヌクレアーゼをコードする*apn2*遺伝子の欠損株はMMSに高い感受性を示すが、これに*nth1*の欠損を導入すると、耐性が回復する(Alseth et al., 2004)。これは、Nth1pがApn2pと同じ経路の上流で働いていることを示している。すなわち、Nth1pにより生じた3'ブロックは、主にApn2pの3'ホスホジエステラーゼ活性によって除去される。Nth1pは、DNAグリコシラーゼとして酸化塩基を除去するだけでなく、単機能DNAグリコシラーゼにより生じたAPサイトを開裂する主要な活性を担っている。このように、Nth1pは分裂酵母のBER経路の初期過程で中心的な役割を果たしている(Sugimoto et al., 2005)。

#### 2-4 ミスマッチに作用するグリコシラーゼ

酸化的損傷でできたDNA中の8-oxoGに対してアデニ

ン残基が過って取り込まれると、8-oxoG:Aミスペアが生じ、G:C→T:A変異が引き起こされる。このミスペアの修復は、アデニン特異的ミスマッチDNAグリコシラーゼ(MutY)がアデニン残基を切除することで開始される。分裂酵母からも*mutY*ホモログがクローニングされ、*myh1*(SPAC26A3.02)と呼ばれている(Lu and Fawcett, 1998)。*Myh1p*はHhHモチーフをもつ461アミノ酸からなるタンパク質で、そのアミノ酸配列は大腸菌MutYと28%の同一性を持つ。*mutY*欠損大腸菌で*Myh1p*を発現させると、自然突然変異速度を低下させることができた。精製した*Myh1p*は、A:GやA:8-oxoGに対する活性の他、G:2-アミノプリンとA:2-アミノプリンに対する活性も持っていた(Lu and Fawcett, 1998)。さらに、G:8-oxoGからグアニンを除去するので、C:G→G:Cトランスポージョン変異の抑制に働いていると考えられる(Doi et al., 2005)。*myh1*Δは、自然突然変異率が野生株に比べて36倍も上昇した(Chang and Lu, 2001)。また、*myh1*Δは過酸化水素感受性を示した。*Myh1p*は細胞内でPCNAと結合し、突然変異誘発の抑制に機能している(Chang and Lu, 2002)。さらに、*Myh1p*はRad9p/Rad1p/Hus1pヘテロ三両体に結合することがわかった(Chang and Lu, 2005; Jansson et al., 2008)。この複合体はPCNAに類似した構造を持ち、ストレス下でのチェックポイントとDNA複製に働く。したがって、*Myh1p*はDNA損傷を見つけ、チェックポイントタンパク質を損傷部位にリクルートする働きをしているのかも知れない。

#### 3. APエンドヌクレアーゼ

APサイトは、損傷塩基が単機能DNAグリコシラーゼによって除かれて生じる。APサイトは、これよりもさらに高頻度にDNAの*N*-グリコシド結合の非酵素的加水分解で塩基が脱落して生じる(Lindahl, 1993; Barners et al, 2004; Friedberg et al., 2006)。ヒト細胞では、1日1ゲノム当たり9,000残基程度のAPサイトが生じる(Kunkel, 1999)。APエンドヌクレアーゼは、APサイトの5'側のホスホジエステル結合を加水分解し、3'-OH末端と5'-デオキシリボースリン酸(dRp)末端にする(池田と関, 2001; Hegde et al, 2008)。大腸菌では、エキソヌクレアーゼIII(Xth)とエンドヌクレアーゼIV(Nfo)がこの活性をもつ。XthとNfoの構造の違いに基づいて、様々な生物由来のAPエンドヌクレアーゼが分類されている(表2)。哺乳類ではxthのホモログのAPE1が5'-APエンドヌクレアーゼ活性の90%以上を担っている。もう一つのXth型の酵素APE2も見いだされているが、Nfo型は無い。一方、酵母ではNfo型のApn1pとAPE2に類似したApn2pが存在する。出芽酵母では、Apn1pが主要な酵素活性を担っている。

表 2 APエンドヌクレアーゼの分類

大腸菌	出芽酵母	分裂酵母	ヒト
Xth			hAPE1
	Apn2p	Apn2p	hAPE2
Nfo	Apn1p	Apn1p (Uve1p)	

APエンドヌクレアーゼによるAPサイトの切断で5'-dRp末端が生じる。これは5'ブロックと呼ばれ、取り除かれる必要がある。多くのAPエンドヌクレアーゼは、APエンドヌクレアーゼ活性の他に、DNA 3'-ホスホジエステラーゼ活性やDNA 3'-ホスファターゼ活性を持つ。活性酸素やイオン化放射線障害、プレオマイシンによるDNAの一本鎖切断においては、切断部位の3'末端にホスホグリコレートやリン酸が付着している。APエンドヌクレアーゼはこれらの3'ブロックを除き、DNAポリメラーゼによる修復DNA合成を開始させる。Nthファミリーのような二機能DNAグリコシラーゼによって生じた3'ブロック(3'-UA)も、APエンドヌクレアーゼは除くことができる。

### 3-1 Nfo型APエンドヌクレアーゼ

大腸菌 *nfo* と相同な配列の検索により、分裂酵母の *apn1* (SPCC622.17) の cDNA が単離された (Ramotar et al., 1998)。Apn1p のアミノ酸配列は、出芽酵母の Apn1p と 45% の同一性を持っている。出芽酵母の *apn1Δ* は MMS に高感受性であるにもかかわらず、分裂酵母の *apn1* 破壊株は MMS に感受性にならなかった。さらに、*nth1Δ/apn1Δ* 二重破壊株は *nth1Δ* と同じ MMS 感受性を示した (Osman et al., 2003)。しかし、*apn2Δ/apn1Δ* 二重破壊株は *apn2Δ* よりも感受性が上昇した (Ribar et al., 2004)。また、*apn2Δ* で Apn1p を発現させると、部分的に MMS 感受性が緩和された (Tanihigashi et al., 2006)。これらの結果は、分裂酵母では Apn2p が主な MMS 損傷修復に働く AP エンドヌクレアーゼであり、Apn1p の貢献は非常に低いことを示している。Apn1p は、核と細胞質の両方に観察された (Tanihigashi et al., 2006)。

### 3-2 Xth型APエンドヌクレアーゼ

分裂酵母の Xth 型 AP エンドヌクレアーゼの遺伝子 *apn2* (SPBC3D6.10) がゲノム配列中に見いだされ、その cDNA の単離と遺伝子破壊株による解析が行われた (Ribar et al., 2004)。Apn2p は 523 アミノ酸からなる 60.3 kDa のタンパク質で、N 末端側半分には Xth 型酵素によく保存された配列がある (図 2)。295 番目のヒスチジンは活性に必須のアミノ酸である。N 末端にミトコンドリア移行配列 (MTS)、C 末端側に増殖細胞核抗

原 (PCNA) 結合モチーフとトポイソメラーゼ III (TOP3) と相同性のある配列をもつ。Apn2p は主に核に局在していた (Tanihigashi et al., 2006)。

分裂酵母の *apn2Δ* は、MMS とプレオマイシン類似物 (Phleomycin や Zeocin で、DNA 鎖を 3'-ホスホグリコレート末端を生じるように切断する) に対して感受性を示した (Alseth et al., 2004; Ribar et al., 2004; Tanihigashi et al., 2006)。*apn2Δ* の突然変異率は、MMS によって著しく上昇した。*apn2Δ* の抽出液の AP サイト (またはテトラヒドロキシフラン) をもつオリゴヌクレオチドに対する切断活性は、野生株と比較して著しく低下した。これらの結果は、Apn2p が分裂酵母の主な AP エンドヌクレアーゼとして作用していることを示す。*apn2Δ* で Apn2p を発現させると、AP エンドヌクレアーゼ活性は野生株と同様にまで回復したが、Apn1p の発現ではわずかな回復しか見られなかった (Tanihigashi et al., 2006)。Apn1p の AP エンドヌクレアーゼ活性は、構造的に低いのかも知れない。

*apn2Δ* に *nth1* 欠損を導入すると、MMS 耐性が回復する (Alseth et al., 2004)。一方、Zeocin に対する *apn2Δ* の感受性は、*apn2Δ/nth1Δ* では回復しなかった (Sugimoto et al., 2005)。これらのことから、分裂酵母内で生じた AP サイトは、主に Nth1p の AP リアーゼ活性により切断され、生じた 3' ブロックが Apn2p の 3' ホスホジエステラーゼ活性によって OH 末端に変換されると考えられる。*apn2Δ* では 3' ブロックが蓄積するので、MMS や Zeocin に対して感受性を示す。一方、*apn2Δ/nth1Δ* では AP サイトが開裂しないので、感受性が弱まるのだろう。*apn2Δ/nth1Δ* で蓄積した AP サイトは、NER などによって修復されると考えられる。*nth1Δ* に Apn2p を発現しても MMS 感受性は回復しなかったが、ヒトの hAPE1 や出芽酵母の Apn1p を発現させると回復した (Sugimoto et al., 2005; Tanihigashi et al., 2006)。すなわち、Apn2p は *in vitro* では AP エンドヌクレアーゼ活性を示すにもかかわらず、細胞内で AP サイトを分解して BER 経路を開始させることができない。

*apn2Δ* の突然変異は過酸化水素により誘導される (Fraser et al., 2003)。この効果は、*uve1* 欠損を追加することで相加的に上昇する。また、*ctt1Δ* との二重欠損により過酸化水素に対する感受性が著しく増加し、さらに自然突然変異も増加した (Hida and Ikeda,

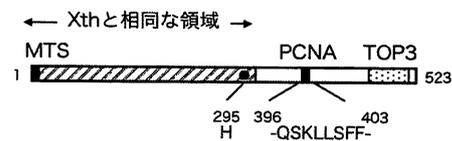


図 2 分裂酵母の Apn2p の構造

2008)。これらは、酸化損傷によるDNAの突然変異抑制に、Apn2pがUve1pとは違った経路で貢献していることを示している。

Apn2pのPCNA結合モチーフとトポイソメラーゼⅢ相同配列の機能を調べた (Ribar et al., 2004; Igawa et al., 2008)。これらの配列の突然変異体や欠失変異体は、野生株と同じようなMMS損傷修復能を示した。すなわち、これらの配列はMMS損傷修復に不要である。今後、PCNAとの結合を確認する必要がある。

#### 4. その他のBER酵素

##### 4-1 UVエンドヌクレアーゼ

紫外線により生じるシクロピリミジン二量体や6,4光産物のような損傷は、多くの生物ではNERにより修復される。分裂酵母では、NERに加え、UV損傷特異的なエンドヌクレアーゼUve1p (SPBC19C7.09c) により修復される (McCready et al., 2000)。Uve1pは損傷部位の5'側を切断し、3'-OH端を生じる。その後、flapエンドヌクレアーゼRad2pを介したロングパッチBER経路により修復が完了する (Yoon et al., 1997; Alleva et al., 2000)。Uve1pは68 kDaのタンパク質で、構造的にはNfo型APエンドヌクレアーゼに分類される (Goosen and Moolenaar, 2008)。Uve1pは核とミトコンドリアに局在している (Tanihigashi et al., 2006)。

精製したUve1pは、UV損傷のみならず、GGプラチナ付加体、ウラシルやジヒドロウラシル、APサイトを認識して切断することができる (Avery et al., 1999)。また、ミスマッチの5'側を切断した (Kaur et al., 1999)。APエンドヌクレアーゼのように、*Neurospora crassa*のUve1pはAPサイトの切断のみならず、3'ブロックを除去することができた。さらに、大腸菌の*xth/nfo*欠損株の酸化剤やアルキル化剤感受性を抑制することができた (Kanno et al., 1999)。

*uve1Δ*はMMS感受性を示さないが、*apn2Δ/uve1Δ*二重破壊株は*apn2Δ*よりも高いMMS感受性を示した (Ribar et al., 2004)。また、*apn2Δ/apn1Δ*の細胞抽出液に残存するAPエンドヌクレアーゼが、Uve1pによる活性であると考えられている。しかし、*nth1Δ/uve1Δ*は*nth1Δ*と同程度のMMS感受性を示す (Osman et al., 2003; Tanihigashi et al., 2006)。したがって、Uve1pは*in vitro*ではAPエンドヌクレアーゼ活性を示すにもかかわらず、細胞内でAPサイトを分解してBER経路を開始させることができない。DNAの酸化損傷による突然変異抑制にも、Uve1pはApn2pとは違った経路で貢献している (Fraser et al., 2003; Hida and Ikeda, 2008)。Uve1pは、広い基質特異性で様々な損傷の5'側を切断することによって、DNAグリコシラーゼによって開始される一般的なBER経路をバックアップしていると考えら

れる。

##### 4-2 エンドヌクレアーゼV

大腸菌のエンドヌクレアーゼV (Nfi)は損傷認識エンドヌクレアーゼで、損傷特異的にその3'側を切断する。Nfiはプリン塩基の脱アミノ産物であるイノシンのみならず、酸化により生じた尿素やDNA鎖の歪みなど幅広い損傷を認識する。分裂酵母でも*nfi*ホモログ (SPAC1F12.06c)が見いだされているが、まだ解析されていない。大腸菌Nfiと分裂酵母Nfipのアミノ酸配列は28.1%が一致し、酵素活性中心付近の配列も保存されている。

##### 4-3 トポイソメラーゼ阻害剤によるDNA損傷に作用する酵素

トポイソメラーゼはDNAの一本鎖または二本鎖を切断し、DNAのらせんをほどいた後、再び連結する酵素である。トポイソメラーゼの反応は活性中心にあるチロシン残基を介して行われ、鎖の切断、チロシンのDNAの3'末端への共有結合、そして鎖の再連結により遂行する。トポイソメラーゼI (Top1)の作用部位の近傍に一本鎖切断や塩基損傷があると、Top1-DNA共有結合複合体はDNAの3'端に放置される。また、この反応中間体はカンプトテシンのようなトポイソメラーゼ阻害剤の存在により安定化する。トポイソメラーゼが結合したDNA損傷は、tyrosy-DNA phosphodiesterase (TDP1)がTop1のチロシン部位とDNAの3'リン酸末端のホスホジエステル結合を切断することにより修復される。ヒトのTDP1の欠損により、脊髄小脳失調症 (SCAN1)を起すことが知られている。酸化損傷で生じる3'ホスホグリコレート末端も、TDP1の基質となる。

分裂酵母にも*tdp1* (SPCP31B10.05)が存在する。*tdp1Δ*はカンプトテシン感受性を示す。Go期で静止状態の細胞は、DNA損傷を蓄積し、Top1pに無関係な細胞死を引き起こす (Ben Hassine and Arcangioli, 2009)。*tdp1Δ*中のDNA修復にはRhp51pの関わる組換え修復が重要であった。Go期で、Tdp1pは酸化損傷によって生じる3'末端の処理に、DNA 3'-ホスファターゼ (Pnk1p)とともに関与していることがわかった。Go期における*tdp1Δ*の細胞死は、呼吸の抑制や抗酸化剤処理で救出できる。

##### 4-4 DNA 3'-ホスファターゼ

$\beta$   $\delta$ 脱離を行う二機能DNAグリコシラーゼの作用や、Top1-DNA共有結合複合体にTdp1が作用すると、3'-リン酸末端が生じる。また、酸化的なDNAの一本鎖切断により、3'-リン酸末端が直接生じる場合もある。このような末端は、DNA 3'-ホスファターゼによりOH基に変換さ

れ、APエンドヌクレアーゼに依存しないBERにより修復される (Wiederhold et al., 2004)。

分裂酵母のDNAホスファターゼは、酸化損傷DNAをDNAポリメラーゼによる修復可能な基質に変換する活性を指標として、精製された (Jilani and Ramotar, 2002)。45 kDaのタンパク質で、大腸菌Fpgによって生じた3'-リン酸末端を除去した。つづいて、本酵素の遺伝子*pnk1* (SPAC23C11.04c) が単離された (Meijer et al., 2002)。Pnk1pは核局在酵素で、ヒトのポリヌクレオチドキナーゼと同じように5'-DNAキナーゼ活性と3'-DNAホスファターゼ活性の両方をもつ。*pnk1Δ*は通常の条件では普通に生育する。 $\gamma$ 線照射やトポイソメラーゼ阻害剤のカンプトテシンに感受性で、アルキル化剤などには耐性であった。これらの結果は、Pnk1pが特異的なDNA損傷の修復に関わっていることを示している。

#### 4-5 flapエンドヌクレアーゼ

flapエンドヌクレアーゼ (ヒトではFEN-1) は、DNAのflap構造を認識して切断する構造特異的なヌクレアーゼである。同じファミリーに属するヌクレアーゼには、NERで損傷の3'側を切断するXPG (分裂酵母ではRad13p; SPBC3E7.08c) や組換えなどに関与するエキソヌクレアーゼ I (分裂酵母ではExo1p; SPBC29A10.05) も含まれる (McCready et al., 2000)。FEN-1はflapエンドヌクレアーゼ活性や5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を持ち、DNA複製のラギング鎖合成で、RNAプライマーの除去に関わっている。BERのロングパッチ経路では、DNA合成が進むにつれ損傷部位を含む数ヌクレオチドがはがされる。そのフラップ構造の付け根の部位をFEN-1がflapエンドヌクレアーゼ活性により切断する。FEN-1は、PCNAに対する結合モチーフをもっている。

分裂酵母のRad2p (SPAC3G6.06c) は380アミノ酸からなり、flapエンドヌクレアーゼとして働いている。紫外線損傷のUve1pによる修復経路に働いていることが、遺伝学および生化学的な再構成系でも証明されている (Alleva et al., 200; Yoon et al., 1999; McCready et al., 2000)。また、*mag1Δ/rad2Δ* や *nth1Δ/rad2Δ* 二重変異株は*rad2Δ*の単独変異株と比べてMMSに対する耐性を増すので、Rad2pがBER経路に関わっていることを示している (Osman et al., 2003; Alseth et al., 2004)。*rad2Δ/rad16Δ*も、それぞれの単独欠損株よりもMMS感受性が増加した (Osman et al., 2003)。したがって、MMS損傷の修復は異なった修復経路で行われている。*rad2Δ*と*rhp55Δ*や*rhp51Δ*の二重欠損株は、合成致死を示す。

#### 4-6 アルキルトランスフェラーゼ様タンパク質 アルキル化剤により生じたO<sup>6</sup>-メチルグアニンはTと

塩基対を作るので、G:C→A:T点突然変異を誘起する。多くの生物は、この損傷塩基のメチル基を直接修復により除去する。すなわち、O<sup>6</sup>-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ (大腸菌ではAda、ヒトではMGMT) は、自身のシステイン残基にメチル基を転移する反応を触媒する。分裂酵母ゲノムには、MGMTホモログであるアルキルトランスフェラーゼ様タンパク質 (*at11*, SPAC1250.04c) がコードされているが、活性に必要なシステイン残基がトリプトファンに置換している (Pearson et al., 2005; Margison et al., 2007)。それにもかかわらず、*at11Δ*は種々のアルキル化剤に感受性を示した。また、O<sup>6</sup>-アルキルグアニンからのアルキル基の転移はできないが、MGMTの修復反応を阻害し、O<sup>6</sup>-アルキルグアニンをもつDNAに結合した。最近、At11pの損傷認識がNERによる損傷修復を誘導することが見いだされた (Tubbs et al., 2009)。At11pはO<sup>6</sup>-メチルグアニン塩基を認識してDNAに結合し、DNAの折り曲げと塩基をらせんの内部から外側にはじき出す。このAt11pによるDNA二重らせんのゆがみがNERタンパク質により認識され、二重鎖が開かれる。損傷の5'側がRad16p/Swi10pにより、3'側がRad13pにより切り出され、NERの修復過程が進行する。*at11Δ*では、誤りがちな損傷乗り越えDNA合成が起きる。

#### 4-7 酸化的脱アルキル化酵素

大腸菌のAlkBは、アルキル化塩基の1-mAや3-mCから酸化的にメチル基を取り去る直接修復に関与している。すなわち、AlkBが $\alpha$ ケトグルタル酸を補助基質としてFe<sup>2+</sup>を補因子としてメチル基をヒドロキシル化し、非酵素的にホルムアルデヒドが遊離して、脱メチル化反応が遂行する。メチル化RNAにも作用するので、RNAの損傷修復に機能する可能性がある。ヒトは8種の分子からなるAlkBホモログ (ABH) ファミリーを持っている。分裂酵母にも一種類のAlkBホモログ遺伝子 *abh1* (SPBC13G1.04c) が存在するが、まだ解析されていない。

#### 4-8 DNAポリメラーゼとDNAリガーゼ

BERでは、上述の酵素群により損傷塩基が除去され、3'-OH末端と5'-リン酸末端が形成されると、DNAポリメラーゼによりギャップが埋められ、DNAリガーゼによりDNA鎖が連結される。

分裂酵母では、ヒトのpol  $\beta$ と同じXファミリーのDNAポリメラーゼとして*pol14* (SPAC2F7.06c) が知られている (Gonzalez-Barrera et al., 2005)。pol  $\beta$ は、APエンドヌクレアーゼによるAPサイトの切断で生じる5'-dRp末端をリガーゼ活性で取り除くことができる。Pol14pもその活性を有しているため、BERで働いている

と考えられる (Bebenek et al., 2005)。プロセスィビティと忠実性は低い。

ヒトのpol $\gamma$ のホモログで、ミトコンドリアで働くDNAポリメラーゼ (*pog1*; SPCC24B10.22) も存在する。*pog1 $\Delta$ ではミトコンドリアDNAが消失し、プチコロニーを形成する (Chu et al., 2007)。*

分裂酵母のDNAリガーゼ I 遺伝子 (*cdc17*; SPAC20G8.01) は生存に必須で、核とミトコンドリアでの複製と修復に関与している (Martin and MacNeill, 2004)。核の中ではPCNAと結合している。

## 5. 分裂酵母のBER経路

BERの初期過程で働く酵素の解析により、分裂酵母のBER経路がかなり明らかになってきた (図3)。ウランシルはUng1pやThp1pで、アルキル化塩基はMag1pやMag2pで除去され、APサイトを生じる。多くの生物では、このAPサイトはAPエンドヌクレアーゼで処理されるのが主要な経路である。しかし、分裂酵母では、ほとんどのAPサイトは二機能DNAグリコシラーゼのNth1pがもつAPリナーゼ活性により切断され、3' ブロック (3'-UA) が生じる。3' ブロックは、主にApn2pの3' ホスホジエステラーゼ活性によって除去される。Tgのような酸化損傷塩基にNth1pが直接作用しても、同じことが起きる。ついでDNAポリメラーゼによりギャップが埋められ、DNAリガーゼによりDNA鎖が連結される。これが分裂酵

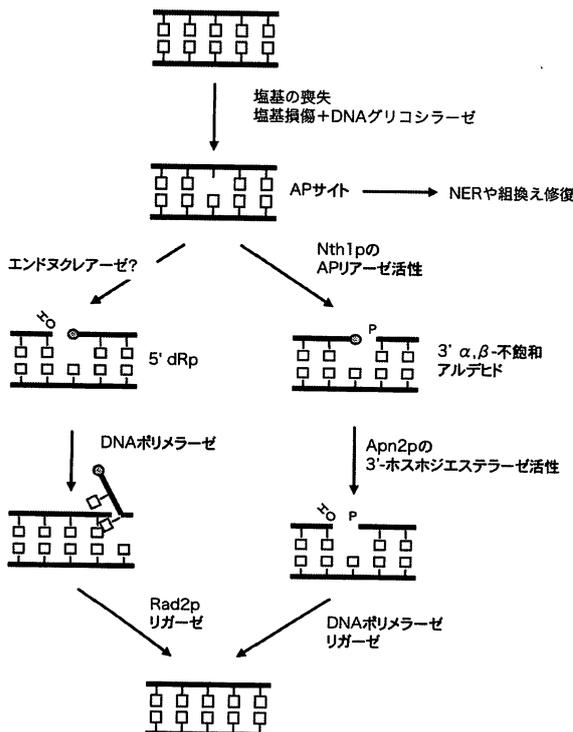


図3 分裂酵母のAPサイトのBER経路

母の主なBER経路と考えられ、Nth1p依存経路とか、ショートパッチ経路と呼ばれる (図3の右側の経路)。

*nth1 $\Delta$ にApn2pを過剰発現してもMMS感受性は回復しないが、ヒトのhAPE1や出芽酵母のApn1pを発現させると回復する。したがって、Apn2pは細胞内でAPサイトを分解してBER経路を開始させることができない。*rad2 $\Delta$ はMMS感受性だが、*mag1 $\Delta$ /*rad2 $\Delta$ 二重破壊株は耐性が高まるので、flapエンドヌクレアーゼRad2pの関与するロングパッチBER経路の存在が考えられる。すなわち、何れかのエンドヌクレアーゼが損傷の5'側にニックを入れる。その3'-OH端から修復DNA合成が起き、損傷を含む一本鎖が相補鎖からはねのけられる。この鎖がRad2pにより切断され、DNAリガーゼにより連結される (図3の右側の経路)。APサイトのエンドヌクレアーゼによる切断で、5'-dRp末端が生じる。この5'-ブロックが、Pol1pのもつリナーゼ活性で取り除かれる経路も考えられる。****

広い基質特異性をもつUve1pは、様々な損傷の5'側を切断し、Rad2pを介したロングパッチBER経路で修復している。このような反応は出芽酵母Apn1pやヒトのAPE1でもみられ、nucleotide incision repair (NIR)とも呼ばれている (Gros et al., 2004)。

分裂酵母のNERや相同性組換えに関わる遺伝子の欠損株は、アルキル化剤に対して高い感受性を示す。アルキル化損傷をBER経路とこれらの経路が協調して修復していると考えられるが、詳細は不明である。NERがアルキル化塩基を直接認識できるのか、またBERの反応中間体 (APサイトや3'ブロック)の修復にNERや相同性組換えが関わっているのかどうか、調べる必要がある。

## 謝辞

本研究の一部は、文部科学省私立大学学術研究高度化推進事業 (社会連携研究推進事業)「地域社会とのコラボレーションによるQOL向上の一体的アプローチ」(平成18年度~平成22年度)の助成により実施した。

## 参考文献

- Alleva, J. L., Zuo, S., Hurwitz, J., and Doetsch, P. W. (2000) *Biochemistry* **39**, 2659-2666
- Alseth, I., Korvald, H., Osman, F., Seeberg, E., and Bjoras, M. (2004) *Nucleic acids research* **32**, 5119-5125
- Alseth, I., Osman, F., Korvald, H., Tsaneva, I., Whitby, M. C., Seeberg, E., and Bjoras, M. (2005) *Nucleic acids research* **33**, 1123-1131
- Aravind, L., and Koonin, E. V. (2000) *Genome Biol* **1**, RESEARCH0007
- Avery, A. M., Kaur, B., Taylor, J. S., Mello, J. A.,

- Essigmann, J. M., and Doetsch, P. W. (1999) *Nucleic acids research* **27**, 2256-2264
- Barnes, D. E., and Lindahl, T. (2004) *Annu Rev Genet* **38**, 445-476
- Bebenek, K., Garcia-Diaz, M., Patishall, S. R., and Kunkel, T. A. (2005) *J Biol Chem* **280**, 20051-20058
- Ben Hassine, S., and Arcangioli, B. (2009) *Embo J* **28**, 632-640
- Chang, D. Y., Gu, Y., and Lu, A. L. (2001) *Mol Genet Genomics* **266**, 336-342
- Chang, D. Y., and Lu, A. L. (2002) *J Biol Chem* **277**, 11853-11858
- Chang, D. Y., and Lu, A. L. (2005) *J Biol Chem* **280**, 408-417
- Chu, Z., Li, J., Eshaghi, M., Karuturi, R. K., Lin, K., and Liu, J. (2007) *BMC Genomics* **8**, 323
- Cortázar, D., Kunz, C., Saito, Y., Steinacher, R., and Schär, P. (2007) *DNA repair* **6**, 489-504
- Doi, T., Yonekura, S., Tano, K., Yasuhira, S., Yonei, S., and Zhang, Q. M. (2005) *J Radiat Res (Tokyo)* **46**, 205-214
- Dong, L., Mi, R., Glass, R. A., Barry, J. N., and Cao, W. (2008) *DNA repair* **7**, 1962-1972
- Elder, R. T., Zhu, X., Priet, S., Chen, M., Yu, M., Navarro, J. M., Sire, J., and Zhao, Y. (2003) *Biochem Biophys Res Commun* **306**, 693-700
- Fraser, J. L., Neill, E., and Davey, S. (2003) *DNA repair* **2**, 1253-1267
- Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A., and Ellenberger, T. (2006) *DNA Repair and Mutagenesis*, 2nd ed., ASM Press, Washington, D.C.
- Gonzalez-Barrera, S., Sanchez, A., Ruiz, J. F., Juarez, R. et al. (2005) *Nucleic acids research* **33**, 4762-4774
- Goosen, N., and Moolenaar, G. F. (2008) *DNA repair* **7**, 353-379
- Gros, L., Ishchenko, A. A., Ide, H., Elder, R. H., and Saparbaev, M. K. (2004) *Nucleic acids research* **32**, 73-81
- Hardeland, U., Bentele, M., Jiricny, J., and Schar, P. (2003) *Nucleic acids research* **31**, 2261-2271
- Hegde, M. L., Hazra, T. K., and Mitra, S. (2008) *Cell Res* **18**, 27-47
- Hida, Y., and Ikeda, S. (2008) *Genes Environ* **30**, 86-91
- Igawa, E., Tanihigashi, H., Yamada, A., and Ikeda, S. (2008) *Current Topics in Biochemical Research* **10**, 101-105
- Jansson, K., Warringer, J., Farewell, A., Park, H. O., Hoe, K. L., Kim, D. U., Hayles, J., and Sunnerhagen, P. (2008) *Mutat Res* **644**, 48-55
- Jilani, A., and Ramotar, D. (2002) *Biochemistry* **41**, 7688-7694
- Kanamitsu, K., Tanihigashi, H., Tanita, Y., Inatani, S., and Ikeda, S. (2007) *Genes Genet Syst* **82**, 489-494
- Kanno, S., Iwai, S., Takao, M., and Yasui, A. (1999) *Nucleic acids research* **27**, 3096-3103
- Karahalil, B., Roldan-Arjona, T., and Dizdaroglu, M. (1998) *Biochemistry* **37**, 590-595
- Kaur, B., Fraser, J. L., Freyer, G. A., Davey, S., and Doetsch, P. W. (1999) *Mol Cell Biol* **19**, 4703-4710
- Kunkel, T. A. (1999) *Trends Genet* **15**, 93-94
- Lindahl, T. (1993) *Nature* **362**, 709-715
- Lu, A. L., and Fawcett, W. P. (1998) *J Biol Chem* **273**, 25098-25105
- Margison, G. P., Butt, A., Pearson, S. J., Wharton, S. et al. (2007) *DNA repair* **6**, 1222-1228
- Martin, I. V., and MacNeill, S. A. (2004) *Nucleic acids research* **32**, 632-642
- McCready, S. J., Osman, F., and Yasui, A. (2000) *Mutat Res* **451**, 197-210
- Meijer, M., Karimi-Busheri, F., Huang, T. Y., Weinfeld, M., and Young, D. (2002) *J Biol Chem* **277**, 4050-4055
- Memisoglu, A., and Samson, L. (1996) *Gene* **177**, 229-235
- Memisoglu, A., and Samson, L. (2000) *Journal of bacteriology* **182**, 2104-2112
- Osman, F., Bjoras, M., Alseth, I., Morland, I., McCready, S., Seeberg, E., and Tsaneva, I. (2003) *Molecular microbiology* **48**, 465-480
- Pearson, S. J., Wharton, S., Watson, A. J., Begum, G. et al. (2006) *Nucleic acids research* **34**, 2347-2354
- Ramotar, D., Vadnais, J., Masson, J. Y., and Tremblay, S. (1998) *Biochimica et biophysica acta* **1396**, 15-20
- Ribar, B., Izumi, T., and Mitra, S. (2004) *Nucleic acids research* **32**, 115-126
- Roldan-Arjona, T., Anselmino, C., and Lindahl, T. (1996) *Nucleic acids research* **24**, 3307-3312
- Sugimoto, T., Igawa, E., Tanihigashi, H., Matsubara, M., Ide, H., and Ikeda, S. (2005) *DNA repair* **4**, 1270-1280
- Tanihigashi, H., Yamada, A., Igawa, E., and Ikeda, S. (2006) *Biochem Biophys Res Commun* **347**, 889-894
- Tubbs, J. L., Latypov, V., Kanugula, S. et al. (2009) *Nature* **459**, 808-813
- Wiederhold, L., Leppard, J. B., Kedar, P. et al. (2004) *Molecular cell* **15**, 209-220
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A. et al. (2002) *Nature* **415**, 871-880
- Yonekura, S., Nakamura, N., Doi, T., Sugiyama, H., Yamamoto, K., Yonei, S., and Zhang, Q. M. (2007) *J Radiat Res (Tokyo)* **48**, 417-424
- Yonekura, S., Nakamura, N., Yonei, S., and Zhang-Akiyama, Q. M. (2009) *J Radiat Res (Tokyo)* **50**, 19-26
- Yoon, J. H., Swiderski, P. M., Kaplan, B. E., Takao, M., Yasui, A., Shen, B., and Pfeifer, G. P. (1999) *Biochemistry* **38**, 4809-4817
- 池田正五、関周司 (2001) 蛋白質 核酸 酵素, **46**, 916-923
- 池田昌聡 (平成19年度) 岡山理科大学大学院理学研究科修士論文

# The roles of enzymes functioning in early steps of the DNA base excision repair pathway in fission yeast

Kyoichiro KANAMITSU and Shogo IKEDA\*

*Graduate School of Science,*

*\*Department of Biochemistry, Faculty of Science,*

*Okayama University of Science,*

*1-1 Ridai-cho Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan*

(Received September 28, 2009; accepted November 5, 2009)

DNA base excision repair (BER) is an evolutionarily conserved process for maintaining genomic integrity by removing damaged or inappropriate bases that are generated endogenously or induced by genotoxic agents. In this review we described the roles of enzymes in the early steps of BER in a fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. AP sites formed by monofunctional DNA glycosylase are incised by Nth1p, the sole bifunctional DNA glycosylase in the yeast, to leave 3'  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehyde termin. The major AP endonuclease Apn2p predominantly functions in the removal of the 3'-blocked ends to generate 3'-OH termini. Finally, a DNA polymerase fills the gap, and a DNA ligase seals the nick (Nth1p-dependent or short patch BER). In long patch BER pathway, an endonuclease incises the AP sites to leave 5'-dRp ends, which will be removed by flap endonuclease (Rad2p) after DNA synthesis. Nucleotide excision repair and homologous recombination are probably involved in repair of alkylating DNA and intermediates of BER such as AP site and 3'-block ends.

**Keywords:** fission yeast; base excision repair; DNA damage; DNA glycosylase ; AP endonuclease.