

## マウス APEX ヌクレアーゼ遺伝子の クローニングと構造解析

岡山大学医学部附属分子細胞医学研究施設病態分子生物学部門 (指導: 関 周司教授)

長 尾 一 孝

(平成6年2月28日受稿)

**Key words:** APEX ヌクレアーゼ, AP エンドヌクレアーゼ, DNA 修復酵素,  
Apex 遺伝子 (マウス), CpG island

### 結 言

細胞の遺伝物質 DNA は、内・外からの種々の要因により多様な損傷を受けている<sup>1)</sup>。なかでも多いのがプリンあるいはピリミジン塩基の欠落で、直接的にあるいは損傷塩基が N-グリコシラーゼ作用で除かれた結果として間接的に、1日1細胞 DNA 当たり1万箇所も生じることが知られている<sup>2),3)</sup>。また、イオン化放射線、活性酸素等により損傷された DNA によく見られるヌクレオチド破片が3'端に結合している(3'ブロック端をもつ)一本鎖切断も、1日1細胞当たり数個生じることが知られている<sup>4-7)</sup>。これらの損傷は、一般には細胞が具備している修復酵素系により元通りに修復されて、遺伝的連続性、損傷前と同様の情報発現が保たれる。しかし、時には誤った修復がなされて突然異変をきたし、結果として、遺伝形質の変化ひいては表現形質の変化(がん化、分子遺伝病、素因等)につながる可能性があることが知られている<sup>8)</sup>。

塩基欠落部位(apurinic/aprimidinic sites; APサイト)修復は、一般に AP エンドヌクレアーゼにより AP サイトの5'側に切れ目を入れることにより開始される。3'ブロック端をもつ一本鎖切断の修復開始は、DNA 3'修復ジエステラーゼ作用により3'ブロックを除くことによって修復が開始される<sup>9)</sup>。大腸菌(*Escherichia coli*)では、両作用をもった酵素として、エキソヌクラーゼIIIとエンドヌクラーゼIVが知られており、これら酵素の遺伝子も解明されている<sup>10,11)</sup>。

哺乳類でも、1970年代からこれまで多種類の AP エンドヌクレアーゼの報告がなされてきた。そして、最近まで哺乳類の主要な AP エンドヌクレアーゼは、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性をもたないエンドヌクレアーゼIV型酵素と考えられていた。1991年、3つのグループから独立に、哺乳類の主要な AP エンドヌクレアーゼの cDNA クローニングの報告がなされた<sup>12)</sup>。Robsonら<sup>13,14)</sup>は、ウシおよびヒトの cDNA をクローニングし、酵素を bovine (human) AP endonuclease 1 (BAP1 & HAP1) と命名した。関ら<sup>15,16)</sup>は、マウスおよびヒトの本酵素 cDNA をクローニングした。Dempleら<sup>17)</sup>は、ヒトの cDNA をクローニングし、APE cDNA、酵素を Ape protein と命名した。関ら<sup>15,16)</sup>は、本酵素がエキソヌクレアーゼIIIと同様に、5' AP エンドヌクレアーゼ活性、DNA 3'ホスタファーゼ活性、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性および DNA 3'修復ジエステラーゼ活性をもつ分子量 35kDa の多機能 DNA 修復酵素であることを示した。以上3グループから報告された cDNA は互いに高いホモロジーを示し、同一酵素で、エキソヌクレアーゼ III (*E. coli*) のホモログであることが判明した。関ら<sup>18)</sup>は、エキソヌクレアーゼIII型の主要な AP エンドヌクレアーゼであることから、本酵素を APEX nuclease、遺伝子名は命名のガイドライン<sup>19)</sup>に従い、ヒト遺伝子を APEX、マウス遺伝子を Apex とした。

本酵素の機能に関しては、精製酵素による研究から少なくとも4つの酵素活性を示す多機能

DNA 修復酵素であり、*E. coli* でエキソヌクレアーゼIIIと相補しうることが明らかにされている。しかし、哺乳類細胞内での本酵素の機能と発現調節、特に DNA 修復系、複製系、転写系等のネットワークの中での本酵素の役割や本酵素異常に基づく疾患の有無の検討等、多くの重要な研究課題が考えられる。これら研究を遂行するためには、Apex 遺伝子とそのプロモーター領域の構造を明らかにする必要があると思われる。特に、マウス Apex 遺伝子のクローニングとその構造解明は、本遺伝子破壊（ノックアウト）マウスの作成を可能とし、生体内における本酵素の機能解明に有用と考えられる。

本研究ではマウス Apex 遺伝子のクローニング、当該遺伝子およびプロモーター領域の構造を明らかにすることを試みた。

## 材 料 と 方 法

### 1. 材 料

電気泳動用のアガロースゲル (Low-Mr) は Bio-Rad Lab. より、制限酵素、Klenow ポリメラーゼ、*E. coli* アルカリホスタファラーゼ、Seakem™ GTG アガロース、DNA 回収用フィルター付き遠心チューブ (SUPREC™-01)、ランダムプライマー DNA ラベリングキット、7-デアザシーケンスキット (Ver. 2)、DNA ライゲーションキットおよび Gene Amp™ DNA 増幅試薬キット (Ampli Taq™ を含む) は東洋紡績株式会社または宝酒造株式会社より、マウス白血球由来のゲノム DNA ライブラリーは CLONTECH 社より、DNase I および RNase A は Sigma 社より、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP (3000 Ci/mmol) は ICN 社より入手した。また塩基配列の決定に用いる合成オリゴヌクレオチドプライマー (20 mer) は岡山大学医学部共同実験室設置の DNA 合成機 (Applied Biosystems 社製) で合成、一部サワディー・テクノロジー株式会社に依頼合成した。EMBL-3 SP 6/T 7 フェージの指示菌として *E. coli* NM538 株を、プラスミドの宿主菌として *E. coli* JM109 株 (コンピテントセルは東洋紡績株式会社より購入) を用いた。NZYM 培地<sup>20)</sup>は、水溶液1000ml当り、10g NZ Amine (和光純薬工業株式会社、Type

A)、5g NaCl、5g Bacto-yeast extract (Difco 社) および 2g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  を含むように調製した。指示菌 *E. coli* NM538 株の培養には、NZYM 培地に 0.2% のマルトースを添加した培地を用いた。Luria-Bertani (LB) 培地<sup>20)</sup>は、水溶液1000ml当り 10g Bacto-Tryptone (Difco 社)、5g の bacto-yeast extract (Difco 社) および 10g NaCl を含むように調製した。全ての組換え DNA 実験は文部省のガイドラインに従って行った。

### 2. マウス Apex 遺伝子のクローニング<sup>20)</sup>

すでに報告されているマウス Apex cDNA 断片挿入 pUC18 プラスミド (pExE 2)<sup>15)</sup> から、遺伝子クローニング用プローブを調製した。この pExE 2 プラスミド DNA を制限酵素 EcoRI および Pst I で消化して、ポリ A 領域を含まない Apex cDNA 断片を切り出し、アガロースゲル電気泳動でこの断片を分離、精製した。この DNA 断片をニックトランスレーション法で <sup>32</sup>P 標識し、遺伝子クローニングのプローブとした。使用したマウス白血球由来ゲノム DNA ライブラリーは、EMBL-3 SP 6/T 7 をベクターとして作成されており、インサート DNA の平均長は 15kb で、 $1.6 \times 10^6$  個の独立なフェージクローンを含有している。*E. coli* NM538 株を 25ml の 0.2% マルトース含有 NZYM 培地で、30°C、一晚培養し、遠心分離で集菌、10ml の 10mM  $\text{MgSO}_4$  溶液に懸濁した。フェージの感染時に、指示菌懸濁液をフェージ希釈液 (NaCl 5.8g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.0g, 1 M Tris-HCl 緩衝液, pH 7.5, 5 ml, 2%ゼラチン溶液 5 ml を蒸留水に溶解し 1000ml にしたもの) で、600nm における吸光度が 1.0 になるように希釈して使用した。一次スクリーニングでは、指示菌 200  $\mu\text{l}$  に  $3.6 \times 10^6$  pfu (plaque forming unit) のフェージ溶液を混ぜ、37°C で 20 分間保温して感染させた。50°C に加温した 6 ml の上層寒天培地 (0.7% の Bacto-agar を含む NZYM 培地) とフェージ感染指示菌を均等に混和して、予め用意しておいた 1.5% 寒天培地に重層し、37°C で培養した。全体で  $1.5 \times 10^6$  pfu のフェージを 41 枚の角型シャーレ (9.5 cm  $\times$  13.5 cm) にまいた。十分な大きさのプラークが形成された後、シャーレを 4°C に冷却した。

13cm x 8.5cmのナイロンフィルター (Hybond-N, Amersham 社) を寒天上に1分間置きファージを吸着させた。変性溶液 (1.5 M NaCl を含む0.5 N NaOH 溶液) で1分間, 中和溶液 (1.5 M NaCl を含む0.5 M Tris-HCl 緩衝液, pH 7.5) で2分間, 2xSSC 溶液で5分間処理後, 風乾し更に80°Cで2時間焼付けた。同様な方法でレプリカを作成した。これらのフィルターを2xSSCで5分間処理した後, 0.5%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), 1 mM EDTA を含む5xSSC 溶液中で42°Cで2時間振盪して洗浄した。プラークハイブリダイゼーションは次の条件で行った。フィルターを6xSSC, 5xDenhardt 溶液 [1xDenhardt 溶液は0.02%フィコール (Sigma 社, Type 400), 0.02%牛血清アルブミン (Armour 社, F-V), 0.02%ポリビニルピロリドン (片山化学工業株式会社, K-90) を含む], 0.5% SDS および0.1mg/mlの変性サケ精子 DNA (Sigma 社, Type III) からなるハイブリダイゼーション緩衝液中で, 68°C, 4時間加温後, 液を除き, 新たにニックトランスレーションで<sup>32</sup>P 標識した変性プローブ DNA を含

むハイブリダイゼーション液を加え, 68°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った。フィルターを室温でそれぞれ0.1% SDS を含む2xSSC 溶液で各25分間, 4回洗浄後, 68°Cの0.1% SDS 含有1xSSC 溶液で, 90分間, 2回洗浄した。洗浄したフィルターは, 風乾後サランラップで包み, 増感紙 (du pont 社, Lightning-Plus) を用いてフジ RX 医療用X線フィルム (フジ写真フィルム株式会社) に-80°Cで16~72時間露出し, オートラジオグラフィーを行った。この一次スクリーニングで検出された複数の陽性プラークの確認と単離を行うため, 二次スクリーニングを行った。それぞれのシャーレから陽性を示すファージのプラークを採取し, 単離したファージをφ9 cmのシャーレ当り約300pfuに調整して, 一次スクリーニングと同様の操作を行い陽性のファージを純化した。

3. Apex 遺伝子挿入プラスミドの構築

Apex 遺伝子挿入組換え DNA は図1のように構築した。前述のようにして, 単離, 純化した陽性プラークからファージを爪楊枝で釣り上げ, 指示菌 *E. coli* NM 538株に吸着させた後,

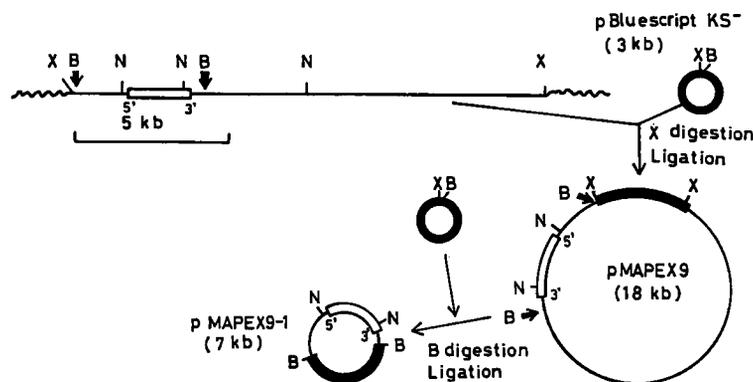


図1 マウス Apex 遺伝子を組み込んだプラスミドの構築

単離した EMBL-3 SP6/T7ファージクローンに挿入されているゲノム DNA 断片 (15kb) を制限酵素 Xho I で切出し, pBluescript KS-プラスミドの Xho I 部位に組込み, 組換えプラスミド pMAPEX9 を作成した。増幅した後, このゲノム DNA を更に BamHI 酵素で消化し, Apex cDNA とハイブリダイズする 4 kb の DNA 断片を, 同種プラスミドの BamHI 部位に組込み, 生じた組換えプラスミドを pMAPEX9-1とした。

実線はゲノム DNA を, 波線は EMBL-3 SP6/T7ファージベクター DNA, 白枠部分はマウス Apex 遺伝子の想定されるアミノ酸コード領域, その黒塗り部分は pBluescript KS-プラスミド DNA 領域を示した。図中の制限酵素切断部位は以下のように略記した。X, Xho I ; B, BamHI ; N, Nar I。

寒天培地で平面培養を行った。この培養プレートから、Plate lysate 法<sup>20)</sup>でファージ DNA を調製した。これらの内から、後述する PCR (Polymerase chain reaction) 法およびサザンハイブリダイゼーションで、Apex 遺伝子の全領域を有するファージクローンのみを選択した。これらより一つのファージクローンを選び (図 1), 挿入ゲノム DNA (15kb) を制限酵素 Xho I で切り出し、アガロースゲル (Seakem™ GTG) 電気泳動で分離し、当該バンドを切り出し、溶出し、ガラスビーズ (BIO 101 社, GLASSMILK™) もしくは DNA 回収用フィルター付き遠心チューブ (SUPREC™-01) をもちいて回収、精製した。同様に制限酵素 Xho I で切断し、脱リン酸化処理をしたプラスミド pBluescript KS<sup>-</sup> (Stratagene 社, 3 kb) に、上記マウス DNA 断片を加え、ライゲーションキットでライゲーションし、pMAPEX 9 を構築した。本プラスミドで、*E. coli* JM109 を形質転換した。IPTG (Sigma 社), X-gal (Sigma 社) およびアンピシリン添加 LB 培地で、生育する無色のコロニーを選択した。この形質転換株よりアルカリ法<sup>20)</sup>でプラスミド DNA を抽出し、各種制限酵素による消化並びにマウス Apex cDNA をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションにより、挿入 DNA の制限酵素地図作成と Apex 遺伝子の存在を調べた。さらに、PCR 法により組換えプラスミドがマウス Apex 遺伝子の全アミノ酸コード領域を有していることを確認した。このようにして作製した pMAPEX 9 (18kb) から、マウス Apex 遺伝子の全領域を含む 4 kb の DNA 断片を、制限酵素 BamH I で切り出し、pBluescript KS<sup>-</sup> の BamH I サイトに組込み、組換えプラスミド (pMAPEX 9-1, 7 kb) を作製した。*E. coli* JM109 を pMAPEX 9-1 で形質転換し、本プラスミドを増幅した。この挿入 DNA 断片を、各種制限酵素で消化し、アガロースゲル電気泳動で分画し、消化 DNA 断片サイズの比較により詳細な制限酵素地図を作製した。

#### 4. PCR 法による DNA 増幅<sup>21)</sup>

DNA 増幅は、DNA 増幅装置 (アステック株式会社, プログラム・テンプコントロール PC-

700) を用いて、以下の条件で行った。あらかじめ作成した反応液 [10xPCR 反応緩衝液 1  $\mu$ l, dNTPs (各 1.25mM) 混合溶液 1.5  $\mu$ l, 各 20  $\mu$ M プライマー溶液 0.5  $\mu$ l, Taq ポリメラーゼ (5unit/ $\mu$ l) 0.05  $\mu$ l を遠心チューブに入れ蒸留水を加え、総量を 9  $\mu$ l にする] にテンプレート DNA を 1  $\mu$ l (約 1 ng) 添加し、その上に水の蒸発を防ぐために 25  $\mu$ l の mineral oil を加えた。90°C で 1 分, 55°C で 1 分, 72°C で 3 分の反応を 30 サイクル繰り返し、最後に 72°C で 3 分間反応後、冷却し保存した。尚、使用したプライマー (20mer) は、マウス Apex cDNA の塩基配列<sup>15)</sup>に基づいて作成した。増幅 DNA の有無は、アガロースゲル電気泳動で確認した。

#### 5. サザンハイブリダイゼーション<sup>20)</sup>

制限酵素消化 DNA を、0.8% アガロースゲル電気泳動で分画、ゲル内 DNA をエチジウムブロマイド溶液 (0.5  $\mu$ g/ml) で染色後、UV トランスイルミネーター上で写真撮影した。ゲルを変性溶液 (1.5M NaCl を含む 0.5M NaOH 溶液) 中で 1 時間振盪し、プロットング溶液 (1.2 M NaCl を含む 0.25M NaOH 溶液) を用い、毛細管法でナイロンフィルター (Hybond-N, Amersham 社) 上に約 16 時間かけて DNA をプロットングした。約 16 時間プロットングを行った後、フィルターを 2 xSSC 溶液で洗浄し、風乾後ブランクハイブリダイゼーションと同様の条件でハイブリダイゼーションを行った。

#### 6. 塩基配列および CpG island の決定

組換えプラスミド (pMAPEX 9-1) 中のマウス Apex 遺伝子の塩基配列は、シーケンナーゼを用い、dideoxy chain termination 法により決めた<sup>20,22)</sup>。尚、シーケンシング反応に用いたオリゴヌクレチドプライマー (20mer) は、前もって決定された塩基配列に基づいて逐次的に合成して用いた。二本鎖の両鎖について塩基配列を決定した。哺乳類 housekeeping 遺伝子の転写調節部位と推定されている CpG island の決定は、Gardiner-Garden と Frommer の方法<sup>23)</sup>に従い、NEC パーソナルコンピュータ PC9801 を用いて図 2 に示したプログラムで計算、図式化した。

```

1000 ' DNA Count program
1010 '
1020 DEFINT I-N
1030 '
1040 INPUT "Input file name";F1$
1050 INPUT "Number of Data";N
1060 INPUT "Size of Cell";M
1070 INPUT "Output file name ( CG/(C+G)";F01$
1080 INPUT "Output file name ( C,G,C+G,CG,GC )";F02$
1090 OPEN F1$ FOR INPUT AS #1
1100 OPEN F01$ FOR OUTPUT AS #2
1110 OPEN F02$ FOR OUTPUT AS #3
1120 OPEN "LPT1:" FOR OUTPUT AS #4
1130 '
1140 DIM SOUCES(N)
1150 '
1160 FOR I=1 TO N
1170   INPUT #1,SOUCES(I)
1180 NEXT I
1190 CS="C" : GS="G" : CGS="CG" : GCS="GC"
1200 '
1210 FOR IC=1 TO N-M
1220   CN=0 : GN=0 : CGN=0 : GCN=0
1230   FOR I=IC TO IC+M-1
1240     IF (SOUCES(I)=CS) THEN CN=CN+1
1250     IF (SOUCES(I)=GS) THEN GN=GN+1
1260     IF (I = IC+M-1) THEN GOTO 1280
1270     IF (SOUCES(I)=CS AND SOUCES(I+1)=GS) THEN CGN=CGN+1
1280     IF (SOUCES(I)=GS AND SOUCES(I+1)=CS) THEN GCN=GCN+1
1290   NEXT I
1300   PRINT #3, CN;GN;CN+GN;CGN;GCN
1310   PRINT #2, CGN/(CN+GN)*M
1320   IF ( IC MOD 4 = 0 ) THEN PRINT #4, USING "   ###: ## ## ## ## ## #.###"
:IC;CN;GN;CN+GN;CGN;GCN;CGN/(CN+GN)*M ELSE PRINT #4, USING "   ###: ## ## ## ##
## #.###";IC;CN;GN;CN+GN;CGN;GCN;CGN/(CN+GN)*M;
1330   PRINT IC
1340 NEXT IC
1350 CLOSE #1 : CLOSE #2 : CLOSE #3 : CLOSE #4
1360 END

```

図2 “CpG island”領域の計算プログラム

Nはシーケンスにより決定した総塩基数、Mは100とする。

## 結 果

1. マウスのゲノム DNA のサザンハイブリダイゼーションによる解析  
マウスゲノム DNA を、制限酵素で消化し、サザントランスファーした結果を図3に示す。プラスミド pExE 2<sup>15</sup>からマウス APEX ヌクレアーゼの cDNA (Apex cDNA) 断片 (1 kb)

を制限酵素 EcoR I と Pst I で切り出し、精製後、ニックトランスレーションで<sup>32</sup>P標識して検出プローブとした。Apex cDNA に切断サイトをもたない制限酵素 BamH I で消化した場合 4 kb, BglII で消化した場合は15kbの DNA 断片が1個検出された。Apex cDNA 中に一箇所切断部位を持つ制限酵素 Apa I でゲノム DNA を消化すると、5.0kbと2.3kbの2個の DNA 断片

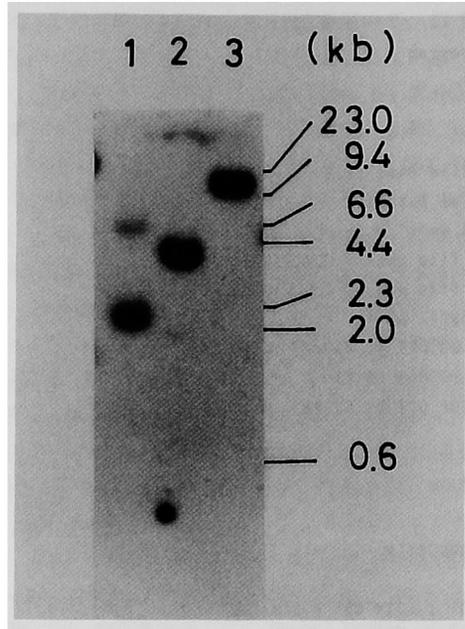


図3 マウスゲノム DNA のサザンハイブリダイゼーション  
マウスゲノム DNA は、制限酵素 Apa I (レーン 1)、BamH I (レーン 2) および Bgl II (レーン 3) で消化した。使用したプローブおよびハイブリダイゼーションの条件は材料と方法の所で記述した。

が検出され、この結果は Apex 遺伝子が単一遺伝子であることを示唆した。

## 2. マウス Apex 遺伝子の単離

マウス白血球由来のゲノム DNA ライブラリーから、マウス Apex cDNA をプローブとして、Apex 遺伝子を有するファージクローンを単離した。一次のブランクハイブリダイゼーションで、 $1.5 \times 10^6$  個のファージクローンから 20 個の陽性クローンが検出された。これらのクローンから、確実な陽性クローンとして 10 クローンを最終的に純化、単離した。これらの単離クローンから PCR 法で、マウスの Apex cDNA 全領域を有する遺伝子クローンを選択した。Apex cDNA 遺伝子の塩基配列を参考にして合成した 5' 端と 3' 端のプライマーを用い、単離したファージクローンの DNA を鋳型として Apex cDNA のアミノ酸コード領域に対応する DNA の増幅を試みた(図 4)。その結果、4 つの陽性クローンで、同一増幅結果が得られた。他の 6 クローンはいずれもこのプライマーで遺伝子増幅が観察されず、いずれも Apex 遺伝子の一部分からなる遺伝子断片が挿入されていると考えられた。

DNA 増幅が認められたクローンで、翻訳領域両端のプライマーを用いた場合、1.9kb の DNA が増幅された。同一プライマーを用いて Apex cDNA を増幅させると 1.1kb の DNA が増幅されることより、このプライマー間に約 0.8kb のイントロンが存在すると推定された。さらに cDNA 内部のプライマーを用いて PCR (反応 1~4) を行った結果、図 4 のプライマー a と b の間に約 0.2kb、プライマー b と c の間に約 0.5kb、プライマー c と d の間に約 0.1kb のイントロンの挿入が予測された。そこで Apex 全領域を有すると推定される 4 種のファージクローンの DNA を単離し、EMBL-3 SP 6 / T 7 ファージベクターの multiple cloning site (MCS) に制限酵素部位がある Xho I で消化した結果、これらのクローンの挿入 DNA はいずれも内部に Xho I 切断部位をもたず、それぞれ 15, 18, 16, 15kb の DNA 断片が挿入されていることが確認された。これらのクローンの挿入 DNA は、各種の制限酵素による DNA の消化パターンがほぼ同一で、これらが類似のクローンであることが示唆された。Apex cDNA の制限酵素部位との比較によ

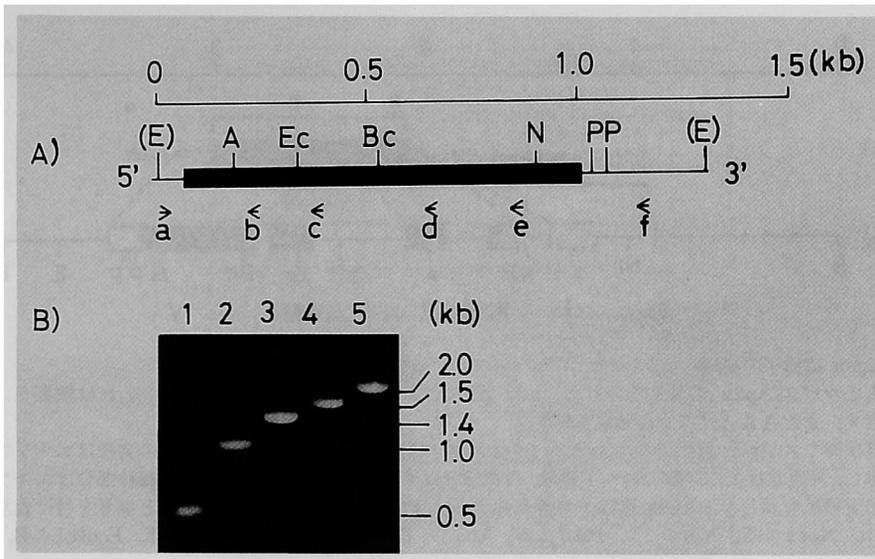


図4 Apex 遺伝子の全アミノ酸コード領域を含むファージクローンの選択

A: pUC18 プラスミドをベクターとして作成された組換えプラスミド pExE2 に挿入されているマウス Apex cDNA. 黒塗の太い部分はアミノ酸コード領域を示した. この遺伝子中の制限酵素部位は以下のように略記した. (E), EcoR I リンカー; A, Apa I; Ec, EcoRV; Bc, Bcl I; N, Nar I; P, Pst I. 横向きの矢印は遺伝子の増幅に使用した合成プライマー (20mer) の作成位置および方向を示し, 各プライマーはアルファベットで表示した. a は 5' 端, f は 3' 端の非翻訳領域のプライマーである.

a: 5'TTGGGAGGCAGCGCAGTAAA3', b: 5'GCAGATTTGCCACTGGGTGA3',  
c: 5'CTTGCAGTTCAGCCGGAGT3', d: 5'AGTCCTTTAGAACTTTCGG3',  
e: 5'GGGCATTCATCATGTAAGTC3', f: 5'TCTCTTGATTGTCTAAAGG3'

B: 全アミノ酸領域を含むファージクローンの PCR 法による検出例. 鋳型 DNA は, 単離した Apex 遺伝子ファージクローンを使用した. 写真は, 下記反応 1-4 で増幅された DNA の電気泳動像を示した. 反応 1: レーン 1 (プライマーセット, a と b), 反応 2: レーン 2 (プライマーセット, a と c), 反応 3: レーン 3 (プライマーセット, a と d), 反応 4: レーン 4 (プライマーセット, a と e), および反応 5: レーン 5 (プライマーセット, a と f)

り, 4 種のクローンは Apex 遺伝子全体が挿入された組換え DNA と推定された. そこでこれらのクローンより一つ (15kb の挿入 DNA 断片をもつもの) を選択し, 以下の実験に用いた. このファージクローンの挿入 DNA 断片を制限酵素 Xho I で切り出し, それを pBluescript KS<sup>-</sup> プラスミドの MCS の Xho I 部位に組み込み, 組換えプラスミド pMAPEX 9 を得た (図 1). さらにその BamH I 消化 DNA 断片を, pBlue-script の BamH I 部位にサブクローニングして, 組換えプラスミド pMAPEX 9-1 を作製した. Apex cDNA と BamH I 消化で生じる 4 kb の DNA 断片の制限酵素地図や PCR 増幅実験の結果等から, この 4 kb の DNA 断片は, マウス Apex 遺伝子のアミノ酸コード領域より上流 (5'

側) 1.5kb と, 下流 (3' 側) 0.5kb を含んでいることが確認された (図 4 および図 5). またこの結果は, アミノ酸コード領域の半分より N 末端側に, 少なくとも 3 つのイントロン (総計 0.8kb) が存在し, この 3' 側から二番目のイントロン中に制限酵素 Xba I および Pst I 切断部位が存在することも示唆された (図 5).

### 3. マウス Apex 遺伝子の塩基配列の決定

クローニングしたゲノム DNA 断片 (4 kb) のシーケンシングは dideoxy 法で行った. 図 1 に示した pMAPEX 9-1 プラスミド DNA を用い, pBluescript KS<sup>-</sup> の T7 および T3 プライマー (17mer) を使用して挿入断片の 5' 端および 3' 端より sequencing を始め, 必要なプライマーは合成して逐次的に両鎖の塩基配列を決

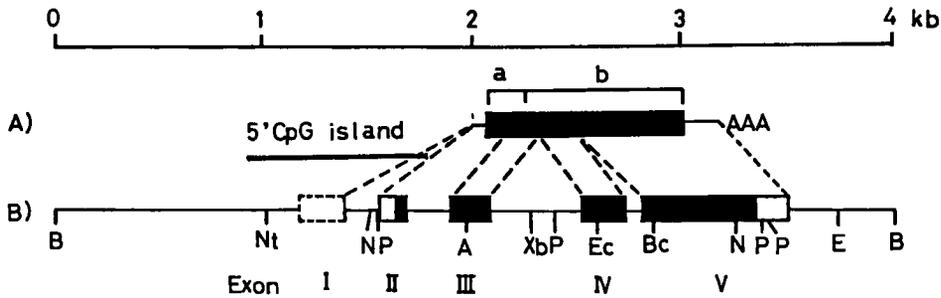


図5 Apex 遺伝子の構造

Aはマウス Apex cDNA を示した。a は APEX ヌクレアーゼの核移行ドメイン、b は触媒ドメインを表す。また AAA はポリ A 領域を示す。

B はマウス Apex 遺伝子のエクソン、イントロン構造を示した。太い白及び黒の実線はエクソン構造を示し、黒塗りはアミノ酸のコード領域、白枠部分はアミノ酸非コード領域を、点線枠部分はエクソン I の推定領域を示した。Apex 遺伝子の各エクソンは 5'側から I, II, III, IV, V と番号を付け表示した。Nt, Not I ; N, Nar I ; P, Pst I ; A, Apa I ; Ec, EcoRV ; Bc, Bcl I ; E, EcoRI ; B, BamHI

定した。塩基配列より、上記の3つのイントロンの上流に更に1つのイントロンの存在が示された。

#### 4. マウス Apex 遺伝子の遺伝子構造

マウス Apex 遺伝子の塩基配列と既に報告されているマウス Apex cDNA の塩基配列<sup>15)</sup>を比較することにより、マウス Apex 遺伝子のイントロン/エクソン接合部位の構造を決定した。アミノ酸の開始コドン (ATG) より上流に存在するエクソンの開始部位は決定していないが、最近報告されたヒト APEX 遺伝子の構造から類推すると、本遺伝子はヒトの場合と同様に5つのエクソン、4つのイントロンにより構成されていると推定される。また、マウス APEX ヌクレアーゼをコードしているエクソン部位の塩基配列は、既に報告されているマウス Apex cDNA の塩基配列<sup>15)</sup>と完全に一致した。実験的に決めた制限酵素部位と塩基配列から推定される制限酵素部位も一致した(図5)。図6は、本実験で明らかにしたエクソン I~V の位置を、既に報告されているマウス Apex cDNA 上に区画して示している。マウス Apex 遺伝子の構造を図5に、各エクソンとイントロンのサイズおよび各イントロン/エクソン接合部位周辺の塩基配列を表1に示す。

マウス Apex 遺伝子においても、エクソンと

イントロンの境界は全て GT-AG 則<sup>24)</sup>に従っていた。エクソン I は、5'側のアミノ酸非コード領域にあり、翻訳開始コドン ATG はエクソン II に、終止コドン TGA はエクソン V に存在した。図6に示す様に成熟酵素では N 末端のメチオニンは除かれるが<sup>15)</sup>、このアミノ酸を含めて各エクソンに含まれるアミノ酸のコード領域の塩基の全アミノ酸コード領域に対する割合はエクソン II, III, IV および V で、それぞれ 5.9%, 19.7% 20.4% および 54.1% であり、この酵素を構成するアミノ酸の約半分はエクソン V にコードされている。*E. coli* エクソヌクレアーゼ III, *Streptococcus pneumoniae* の Exo A タンパク質等<sup>10,25,26)</sup>と一次構造で相同性を示すマウス APEX ヌクレアーゼタンパク質の 29kDa C 末触媒ドメイン<sup>15)</sup>は単一のエクソンに含まれるのではなく、エクソン III, IV そして V に分散していた。

#### 5. マウス Apex 遺伝子の 5'および 3'非コード領域の構造

転写開始部位を決定していないので、プロモーター領域を塩基配列上から検討するのは難しいが、最近報告されたヒト APEX 遺伝子のプロモーター領域の構造<sup>27)</sup>と比較しても、特徴的な TATA ボックスや CAAT ボックスは認められなかった。これに引き換え、本遺伝子の上流領

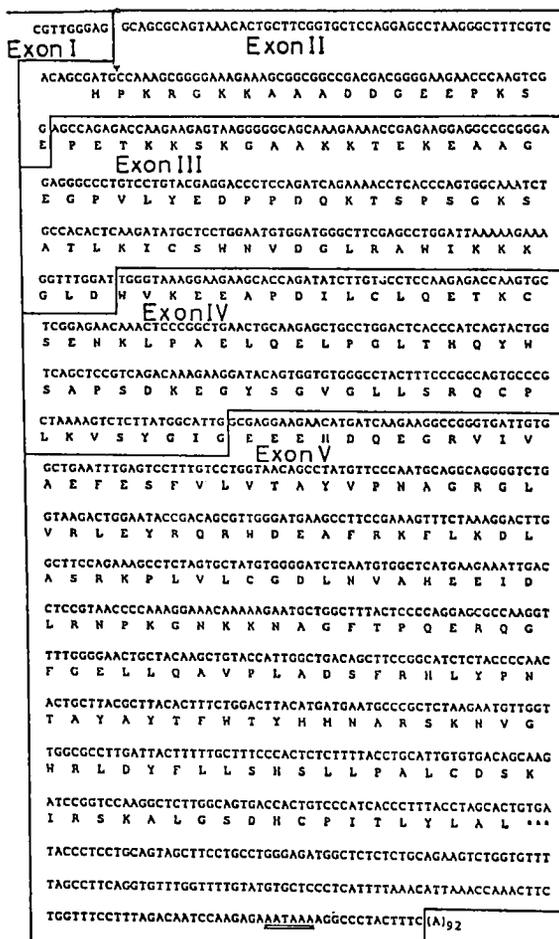


図6 マウス Apex cDNA の塩基配列とエクソン構造  
各エクソンを実線で囲み、図5のエクソンの番号を表示した。▼は成熟 APEX ヌクレアーゼのN末端を示す。

表1 マウス Apex 遺伝子のイントロン/エクソン接合部位の塩基配列

Intron (Splice acceptor)	Exon	Intron (Splice donor)
ttatctgcag GCAGCG	I ( ca 200)	TGGGAG gtcaggtac I ( 183 )
cattttatag AGCCAG	II ( 112 )	AGTCGG gtaaggtgg II ( 217 )
ttcattcag TGGGTA	III ( 188 )	TTGGAT gtgagtaca III ( 460 )
attttatag GCGAGG	IV ( 193 )	GCATTG gtgagacct IV ( 103 )
	V ( 683 )	polyA tail

イントロン、エクソン部分の塩基配列はそれぞれ小文字と大文字で区別して表示した。  
( ) 内はそれぞれの塩基数 (bp) を表す。

域には、G+C含量が高く CpG ジヌクレオチドが高頻度に出現する領域が認められた。そこで、housekeeping 遺伝子に於て遺伝子の発現調節に関与することが示唆されている CpG islands を、Gardiner-Garden と Frommer の式<sup>23)</sup>に当てはめて検索した。検索には図 2 のように、% (G+C) と CpG 出現頻度計算式をコンピュータープログラム化して算出した。マウス Apex 遺伝子について、% (G+C) と CpG 出現頻度を計算した結果を図 7 に示す。Gardiner-Garden と Frommer の式と基準によると、イントロン II から上流約 0.8kb の間が CpG island の基準に当てはまる。この中に G/C ボックス (GGGCGG) の存在も確認された。APEX ヌクレアーゼは、マウス、ラット、ヒト等で調べた全ての細胞において発現しており<sup>15,16)</sup>、機能上からも細胞にとって必須の酵素と考えられる。従って、本遺伝子は housekeeping 遺伝子に属し、この 5' CpG island が本酵素転写調節に重要な役割を演じていることが示唆される。3'側では、翻訳停止コードン TGA の 146bp 下流にポリアデニル化シグナル (AATAAA) が存在する。3' CpG island は認められなかった。

## 考 察

本研究では、哺乳類細胞の主要な AP エンドヌクレアーゼである APEX ヌクレアーゼのマウス遺伝子のクローニングとその遺伝子構造について報告した。本酵素は、*E. coli* のエキソヌクレアーゼ III と同様に、5' AP エンドヌクレアーゼ活性、DNA 3' 修復ジエステラーゼ活性等を示す多機能 DNA 修復酵素で、本酵素の一次構造もエキソヌクレアーゼ III のそれと有意のホモロジーを示し、エキソヌクレアーゼ III の哺乳類ホモログであることが明らかにされている<sup>15)</sup>。また、エキソヌクレアーゼ III を欠く *E. coli* 株で本遺伝子を発現させると、AP サイトを生じるとような DNA 損傷剤や 3' ブロッカー本鎖切断を生じるとような DNA 損傷剤に対する抵抗性を増し、生細胞内でもエキソヌクレアーゼ III に相補しうることが示されている<sup>15)</sup>。関ら<sup>28)</sup>が活性プロテティング法で検討した結果によると、APEX ヌクレアーゼは、哺乳類細胞の全 5' AP エンドヌクレアーゼ活性の 90% 以上を占めていると推定されている。本酵素は、酵素機能からすると細胞にとって極めて重要な DNA 修復酵素と推定されるが、本酵素の哺乳類細胞内での役割は

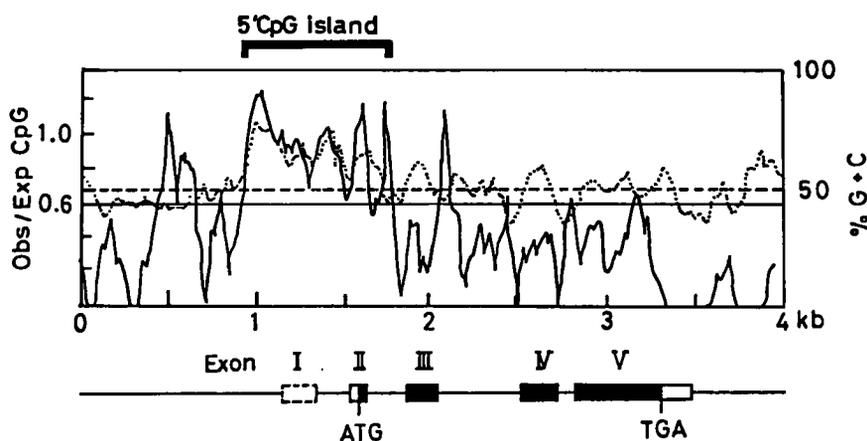


図 7 マウス Apex 遺伝子と 5' 上流領域の CpG island 領域

図は Gardiner-Garden と Frommer の方法に従って計算し、図式化した。実線は Obs/Exp CpG 値、点線は %G+C 値。実線と点線の水平直線は、それぞれの CpG island 境界値 (0.6 および 50%) を示す。図の下部に Apex 遺伝子のイントロン/エクソン構造と図の上部に CpG island を表示した (表示法は図 5 と同様)。

酵素活性と *E. coli* のエキソヌクレアーゼ III を相補しうることから推察されているに過ぎない。

*E. coli* では、AP エンドヌクレアーゼとして、エキソヌクレアーゼ III の他にエンドヌクレアーゼ IV やエンドヌクレアーゼ III 等<sup>1,29)</sup>が知られている。哺乳類細胞でも、酵素レベルでは、多種類あると報告されているが<sup>3)</sup>、cDNA がクローニングされているのは、緒言の項で述べたように、3つのグループから独立に報告された本酵素のみである。本酵素の遺伝子名は、報告者によって HAP 1<sup>30,31)</sup>、APEX<sup>15,16,27)</sup>、APE<sup>17,32)</sup>、Ref 1<sup>33)</sup>等まちまちな名称が使用されているが、最近の Science 誌<sup>34)</sup>によると、本報告の様にマウスの遺伝子を Apex、ヒトの遺伝子を APEX として報告されている。

本酵素ヒト遺伝子はすでに、Zhao ら (HAP 1)<sup>26)</sup>、Robson ら (HAP 1)<sup>27)</sup>、Harrison ら (APE)<sup>32)</sup>、秋山ら (APEX)<sup>27)</sup>によって報告されており、5つのエクソンから構成され、染色体14q11.2-12に局在していることが示されている。秋山ら<sup>27)</sup>はさらにプロモーター領域の解析も行っている。にも拘らず、著者がマウスの遺伝子のクローニングを行ったのは、生細胞における遺伝子機能を明らかにする上で、ジーンターゲット法により、遺伝子破壊マウスや変異遺伝子導入マウスを作成して遺伝子機能を調べる方法が可能になると考えたからである。数種の AP エンドヌクレアーゼの相互関係、他の修復系、複製系、転写系等との相互関係等を明らかにするには、この様な *in vivo* 系が是非必要と思われる。

マウスの Apex 遺伝子もヒト APEX 遺伝子同様、比較的 compact な遺伝子で、5つのエクソンから構成されており、5'上流領域に CpG island が認められた。基本的には、ヒト遺伝子と同様な構造であったが、特にイントロンの塩基配列やイントロン III サイズ(マウスが106bp短い)に顕著な違いが認められた。CpG island は、他の housekeeping 遺伝子の場合と同様に、転写調節に関与していると推定された。最近、秋山ら<sup>27)</sup>はヒト APEX 遺伝子で5' CpG island の比較的短い領域にプロモーター活性があることを証明している。また数種の転写調節因子認識

塩基配列の存在を指摘している。マウス Apex 遺伝子については、転写開始点の決定が出来ていないが、Apex mRNA が約1.5kbであり<sup>15)</sup>、エクソン II 以下の大きさが約12kb+polyA であることから、エクソン I の大きさは約0.2kbと推定された。

マウス Apex 遺伝子に関する本研究は、生細胞における本酵素の機能を明らかにする上で、また本酵素異常に基づく病態についての研究に役立つことが期待される。

## 結 論

1. AP エンドヌクレアーゼ、DNA 3'修復ジエステラーゼ、3'→5'エキソヌクレアーゼ、DNA 3'ホスファターゼ等の活性を示す多機能 DNA 修復酵素(APEX ヌクレアーゼ)の遺伝子(Apex)を、マウス白血球由来ゲノム DNA ライブラリーより、マウス Apex cDNA をプローブとしてクローニングし、制限酵素地図を作成した。

2. Apex 遺伝子を含む約 4 kb の塩基配列を決め、遺伝子構造を検討した。Apex 遺伝子は、比較的 compact な約2.6kbの遺伝子で、Apex cDNA の塩基配列との比較から、5つのエクソンで構成されていると推定された。エクソン-イントロン接合部位は GT/AG 規則に従っていた。翻訳開始コドン ATG はエクソン II に、終止コドン TGA はエクソン V に局在した。

3. イントロン II から上流0.8kbの範囲は、G+C 含量が高く CpG ジヌクレオチドが高頻度に出現する領域で、housekeeping 遺伝子にしばしば認められる“CpG island”と考えられた。この領域に、プロモーター領域、転写開始点等が局在することが示唆された。

本研究の遂行および論文の作成にあたり始終、御指導と御校閲を賜りました恩師、関 周司教授に深く感謝致します。また貴重なプラスミド pBlue-script KS<sup>-</sup> を贈与下さいました同研究室の筒井 研助教授に深謝いたしますと共に、CpG island の計算プログラム作成に御協力くださいました岡山理科大学情報センターの尾高好政助教授ならびに実験遂行、論文作成にあたり始終快く御協力頂きました秋山公祐助手および教室の皆様にご心からお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Friedberg EC : DNA repair. W. H. Freeman and Company, New York (1985).
- 2) Lindahl T : DNA repair enzymes. *Annu Rev Biochem* (1982) **51**, 61—87.
- 3) Lindahl T : Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* (1993) **362**, 709—715.
- 4) Teoule R : Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int J Radiat Biol* (1987) **51**, 573—589.
- 5) Gilon L, Takeshita M, Johnson F, Iden C and Grollman AP : Bleomycin-induced strand-scission of DNA, mechanism of deoxyribose cleavage. *J Biol Chem* (1981) **256**, 8608—8615.
- 6) Muragesan N, Xu C, Ehrenfeld GM, Sugiyama H, Kilkuskie RE, Rodriguez LO, Chang L-H and Hecht SM : Analysis of products formed during Bleomycin-mediated DNA degradation. *Biochemistry* (1985) **24**, 5735—5744.
- 7) Burger RM, Projan SJ, Horwitz SB and Peisach J : The DNA cleavage mechanism of Iron-Bleomycin, kinetic resolution of strand scission from base propanal release. *J Biol Chem* (1986) **261**, 15955—15959.
- 8) Loeb LA and Preston BD : Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. *Annu Rev Genet* (1986) **20**, 201—230.
- 9) Weiss B and Grossman L : Phosphodiesterases involved in DNA repair. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* (1987) **60**, 1—34.
- 10) Saporito SM, Smith-white BJ and Cunningham RP : Nucleotide sequence of *xth* gene of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* (1988) **170**, 4542—4547.
- 11) Saporito SM and Cunningham RP : Nucleotide sequence of the *nfo* gene of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* (1988) **170**, 5141—5145.
- 12) 関 周司, 秋山公祐 : クローニングされた哺乳類の遺伝子修復酵素—AP エンドヌクレアーゼを中心に—, *生化学* (1993) **65**, 1165—1170.
- 13) Robson CN, Milne AM, Pappin DJC and Hickson ID : Isolation of cDNA clones encoding an enzyme from bovine cells that repairs oxidative DNA damage *in vitro* : homology with bacterial repair enzymes. *Nucleic Acids Res* (1991) **19**, 1087—1092.
- 14) Robson CN and Hickson ID : Isolation of cDNA clones encoding a human apurinic/apyrimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in *E. coli xth* (exonuclease III) mutants. *Nucleic Acids Res* (1991) **19**, 5519—5523.
- 15) Seki S, Akiyama K, Watanabe S, Hatsushika M, Ikeda S and Tsutsui K : cDNA and deduced amino acid sequence of a mouse DNA repair enzyme (APEX nuclease) with significant homology to *Escherichia coli* exonuclease III. *J Biol Chem* (1991) **266**, 20797—20802.
- 16) Seki S, Hatsushika M, Watanabe S, Akiyama K, Nagao K and Tsutsui K : cDNA cloning, sequencing, expression and possible domain structure of human APEX nuclease homologous to *Escherichia coli* exonuclease III. *Biochim Biophys Acta* (1992) **1131**, 287—299.
- 17) Demple B, Herman T and Chen DS : Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease : Definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* (1991) **88**, 11450—11454.
- 18) Seki S, Ikeda S, Watanabe S, Hatsushika M, Tsutsui K, Akiyama K and Zhang B : A mouse DNA repair enzyme (APEX nuclease) having exonuclease and apurinic/apyrimidinic endonuclease activities : purification and characterization. *Biochim Biophys Acta* (1991) **1079**, 57—64.

- 19) Shows TB, McAlopine PJ, Boucheix C, Collins FS, Conneally PM, Frezal J, Gershowitz H, Goodfellow PN, Hall JG, Issitt P, Jones CA, Knowies BB, Lewis M, Mckusick VA, Meisler M, Morton NE, Rubinstein P, Schanfield MS, Schmickel RD, Skolnick MH, Spence MA, Sutherland GR, Traver M, Van Cong N and Willard HF : Guidelines for human gene nomenclature. *Cytogenet Cell Genet* (1987) **46**, 11—28.
- 20) Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T : *Molecular cloning, a laboratory manual* (2nd edition) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989).
- 21) Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ : *PCR protocols, A guide to method and applications*. White TJ ed, Academic Press Inc, San Diego, California (1990).
- 22) 中村崇規, 水之江義充, 安川洋生, 前川宣彦 : 修飾 T7 DNA ポリメラーゼ (シーケネース) による DNA塩基配列決定法. *細胞工学* (1988) **7**, 712—722.
- 23) Gardiner-Garden M and Frommer M : CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* (1987) **196**, 261—282.
- 24) Mount SM : A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acid Res* (1982) **10**, 459—472.
- 25) Puyet A, Greengerg B and Lacks SA : The *expA* gene of *Streptococcus pneumoniae* and its product, a DNA exonuclease with apurinic endonuclease activity. *J Bacteriol* (1989) **171**, 2278—2286.
- 26) Clement JE, Rogers SG and Weiss B : A DNase for apurinic/apyrimidinic sites associated with exonuclease III of *Haemophilus influenzae*. *J Biol Chem* (1978) **253**, 2990—2999.
- 27) Akiyama K, Seki S, Oshida T and Yoshida MC : Structure, promoter analysis and chromosomal assignment of the human APEX gene. *Biochim Biophys Acta* (1994) in press.
- 28) Ikeda S, Seki S, Watanabe S, Hatsushika M and Tsutsui K : Detection of possible DNA repair enzymes on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels by protein blotting to damaged DNA-fixed membranes. *Anal Biochem* (1991) **192**, 96—103.
- 29) Kornberg A and Baker TA : *DNA replication*, 2nd Ed, W. H. Freeman and Company, New York (1992) pp403—437.
- 30) Zhao B, Grandy DK, Hagerup JM, Magenis RE, Smith L, Chuhan BC and Henner WD : The human gene for apurinic/apyrimidinic endonuclease (HAP1) : sequence and localization to chromosome 14 band q12. *Nucleic Acids Res* (1992) **20**, 4097—4098.
- 31) Robson CN, Hochhauser D, Craig R, Rack K, Buckle VJ and Hickson ID : Structure of the human DNA repair gene HAP1 and its localisation to chromosome 14q 11. 2—12. *Nucleic Acids Res* (1992) **20**, 4417—4421.
- 32) Harrison L, Ascione G, Menninger JC, Ward DC and Demple B : Human apurinic endonuclease gene (APE) : structure and genomic mapping (chromosome 14q 11. 2—12). *Human Mol Genet* (1992) **1**, 677—680.
- 33) Xanthoudakis S, Miao G, Wang F, Pan Y-CE and Curran T : Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J* (1992) **11**, 3323—3335.
- 34) Copeland NG, Jenkins NA, Gilbert DJ, Eppig JT, Maltais EL, Miller JC, Dietrich WF, Weaver DA, Lincoln SE, Steen RG, Stein LD, Nadeau JH and Lander ES : A genetic linkage map of the mouse : current applications and future prospects. *Science* (1993) **262**, 57—66.

**Cloning and structural analysis of mouse Apex gene encoding  
the major apurinic/aprimidinic endonuclease**

**Kazutaka NAGAO**

**Department of Molecular Biology,  
Institute of Cellular and Molecular Biology,  
Okayama University Medical School,  
Okayama 700, Japan  
(Director : Prof. S. Seki)**

The APEX nuclease is a mammalian multifunctional repair enzyme having 5' apurinic/aprimidinic (AP) endonuclease, DNA 3' repair diesterase, 3'-5' exonuclease and DNA 3' phosphatase activities. The mouse Apex gene for the enzyme, was isolated from a mouse leukocyte genomic library by plaque hybridization with the mouse Apex cDNA as a probe. The nucleotide sequence of the Apex gene and its 5'-and 3'-flanking regions were determined. With reference to the published Apex cDNA sequence, the mouse Apex gene can be divided into five exons and four introns with a total length of about 2.6 kb. The boundaries between exon and intron follow the GT/AG rule. The translation initiation and termination sites are located in exons II and V, respectively. A part of the 5' flanking region belongs to a CpG island, which extends to intron II. The CpG island is thought to be a putative transcription regulatory region of the Apex gene, a housekeeping gene.