

博士論文

オオムギ由来 Nudix hydrolase 遺伝子の発現と
機能に関する研究

平成 27 年 3 月

田中 小百合

岡山大学大学院

環境生命科学研究科

博士論文 目次

略語	1
第 1 章 緒論	3
第 2 章 オオムギ由来 Nudix hydrolase 遺伝子の同定と分類	
第 1 節 目的	10
第 2 節 材料と方法	
2-1 オオムギ由来 Nudix hydrolase family 遺伝子の相同性解析	10
2-2 オオムギ由来 Nudix hydrolase family 遺伝子のクローニング	11
第 3 節 結果	
3-1 オオムギ由来 Nudix hydrolase family 遺伝子の同定	12
3-2 オオムギ由来 Nudix hydrolase family の系統樹解析	13
3-3 ミナトカモジグサ由来 Nudix hydrolase family 遺伝子の相同性検索 と系統樹解析	13
第 4 節 考察	14
第 3 章 オオムギ由来 Nudix hydrolase 遺伝子のストレス応答解析	
第 1 節 目的	22
第 2 節 材料と方法	
2-1 ストレス処理	22
2-2 RNA の抽出	23
2-3 RT-PCR	23
2-4 リアルタイム PCR	24
第 3 節 結果	
3-1 非生物学的ストレスによるオオムギ由来 Nudix hydrolase 遺伝子の 発現	24

3-2 紫外線ストレス下によるオオムギ由来 Nudix hydrolase 遺伝子の 発現.....	25
第 4 節 考察.....	25
第 4 章 UV-C で誘導されるオオムギ由来 Nudix hydrolase 遺伝子の クローニングと機能解析	
第 1 節 目的.....	35
第 2 節 材料と方法	
2-1 オオムギ由来 Nudix hydrolase 遺伝子のクローニングと発現 タンパクの精製.....	35
2-2 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	37
2-3 タンパク質測定.....	37
2-2 酵素活性測定.....	37
2-3 <i>mutT</i> 欠損大腸菌における転写エラー相補性測定.....	38
第 3 節 結果	
3-1 HvNUDX の発現と基質特異性.....	39
3-2 HvNUDX12 の至適 pH	40
3-3 HvNUDX12 の反応速度論解析.....	40
3-4 HvNUDX12 転写エラー抑制作用.....	41
第 4 節 考察.....	41
第 5 章 HvNUDX12 の基質特異性発現に関与するドメイン	
第 1 節 目的.....	49
第 2 節 材料と方法	
2-1 部位特異的変異導入 HvNUDX12 の作製.....	49
2-2 AtNUDX26 遺伝子のクローニングと HvNUDX12 キメラ酵素の 作製.....	50

2-3 AtNUDX26、変異 HvNUDX12、HvNUDX12 キメラ遺伝子の発現 とタンパク質精製	51
2-4 SDS-PAGE	52
2-5 タンパク質測定	52
2-6 酵素活性測定	52
第 3 節 結果	
3-1 部位特異的変異導入変異 HvNUDX12 の加水分解活性	52
3-2 HvNUDX12 キメラ酵素の加水分解活性	53
第 4 節 考察	55
まとめ	64
謝辞	69
参考文献	70

略語

ADP-ribose	adenosine 5'-diphosphoribose
AMP	adenosine monophosphate
AP ₄ A	diadenosine tetraphosphate
AP _n A	diadenosine polyphosphate
AtNUDX	<i>Arabidopsis thaliana</i> Nudix hydrolase
CoA	Coenzyme A
CPD	cyclobutane pyrimidine dimer
FAD	flavin adenine dinucleotide
FMN	flavin mononucleotide
HvNUDX	<i>Hordeum vulgare</i> Nudix hydrolase
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide
NDP	nucleoside diphosphate
NMP	nucleoside monophosphate
NUDX	nucleoside diphosphates linked to some moiety X
8-oxo-dGTP	8-oxo-deoxyguanosine 5'-triphosphate
8-oxo-dGDP	8-oxo-deoxyguanosine 5'-diphosphate
8-oxo-dGMP	8-oxo-deoxyguanosine 5'-monophosphate
PCD	programmed cell death
pGp	guanosine 3',5'-bisphosphate
ppGpp	guanosine 3',5'-tetraphosphate
PR	pathogenesis-related protein
P-X	phosphate-X
ROS	reactive oxygen species

TCA	trichloroacetic acid
UDP-gal	uridine diphosphate galactose
UMP	uridine monophosphate
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

第 1 章 緒論

低温、高濃度塩類、紫外線、乾燥をはじめとする環境ストレスは、植物の生育や作物の生産に有害な影響を与える。植物の環境ストレス下における細胞あるいは分子レベルの応答はこれまでに多く研究された。土壌中の塩濃度の上昇で生じる塩ストレスは生育阻害、作物収量の減少などの影響を及ぼす(Epstein et al, 1980, Boyer, 1982)。日照り、無降水状態が続く気象条件で生じる乾燥ストレスは生育速度、茎の伸長、葉の拡大の減少と気孔の閉鎖をもたらす(Hisao et al, 1973)。近年、諸産業や交通の急激な発展により各種の汚染物質が排出され、大気汚染によるオゾン層の破壊が問題となっている。大気中のオゾンは成層圏(10-50km 上空)に存在し、このオゾンの高濃度領域をオゾン層という。オゾンは太陽からの紫外線を吸収し、生態系を保護する役割がある。このうち紫外線は波長により UV-A (320-400nm)、UV-B (280-320nm)、UV-C (100-280nm)に区分され、UV-A と UV-B はオゾン層を通過する。地上に到達する紫外線の 90%以上は UV-A であるが、環境悪化によるオゾン層の破壊が今後続けば UV-B や UV-C の影響が無視できなくなる。最近では、クロロフルオロカーボンやその他の微量ガスの排出によってオゾン層が減少し、その結果、地球上への UV-B の放射量は増加している(Blumthaler et al., 1990)。1982 年頃からオゾンホールが出現するようになり、その規模は年々拡大してきた(Fig. 1)。UV-C は成層圏オゾン層ですべて吸収されるが、このようなオゾン層破壊に伴って UV-C の放射量が増加すれば、生物や植物に対して細胞障害や生育障害等といった悪影響を

及ぼすことが考えられる。これらのストレス応答に適応する植物の電子伝達や防御機構を明らかにすることは極めて重要である。

植物の紫外線応答については、これまで UV-B は生理学的レベルあるいは DNA レベルで植物の生育過程に障害を及ぼすことが報告されてきた。高等植物において、UV-B の照射を受けた DNA は隣接する核酸塩基のピリミジン(チミン、シトシン)の間にシクロブタン型ピリミジン二量体(cyclobutane pyrimidine dimer; CPD)が形成される。このような障害は生物へ致死や変異を引き起こし、さらに DNA の複製や転写が阻害される。高等植物では UV-B によって生じたこれらのダメージを修復する酵素として光回復酵素(photolyase)がよく知られている。Photolyase は 300nm から 600nm にわたる紫外線の波長によって二量体を単量体へ活性化することで光修復を行う(Hidema et al., 2001)。これまでにシロイヌナズナでは UV-C 照射によって、細胞核のアポトーシスの出現、オリゴヌクレオソーム DNA の断片化、カスパーゼ様プロテアーゼの活性化によるプログラム細胞死(programmed cell death; PCD)が誘導されることが報告されてきた。しかし、これらの UV-C 照射による細胞内障害の防御メカニズムについての報告は少ない。

環境ストレス下では植物は reactive oxygen species (ROS) を生成し、ROS による標的分子の酸化分解がこれらのストレス傷害の原因となることが示されてきた。ROS の産生が増大することで、非特異的な酸化反応を引き起こし、酸化ヌクレオチドの生成、酵素の不活性化、脂質の過酸化、クロロフィルの崩壊、TCA サイクルやアミノ酸代謝の阻害、DNA 螺旋構造の崩壊といった傷害を生じる。DNA と巨大分子を保護するために、ROS を除去することが、

ストレス応答に関与する最も重要な分子メカニズムであると考えられる。

このような酸化ストレスによって生じた酸化ヌクレオチドを修復する酵素として Nudix hydrolase (NUDX) が知られている。NUDX はヌクレオシド-2 リン酸類縁体(**n**ucleoside **d**iphosphate linked to a moiety **X**)を加水分解して nucleoside monophosphate (NMP)や P-X(phosphate-X)を生成する pyrophosphohydrolase である (Bessman et al., 1996)。



NUDX は Nudix motif と呼ばれるアミノ酸配列 (GX₅EX₇REUXEEXGU, U: Ile, Leu, Val) を保有し、ウイルスからヒトまで広く分布している。NUDX は、基質特異性によって、酸化ヌクレオチド、ジヌクレオシドポリリン酸、糖ヌクレオチド (ADP-ribose、ADP-sugar)、ジアドノシン四リン酸あるいはポリリン酸 (AP₄A、AP_nA (n>4))、コエンザイム A (CoA)、NAD(P)H、FAD、キャップ化 mRNA などをも基質とするサブファミリーに分類される。したがって、NUDX は細胞内における様々なシグナル分子や、細胞内に対して毒性を有するヌクレオシド二リン酸化合物を加水分解することで、これらの濃度を調節する役割を担っているハウスキーピング酵素であると考えられる (Bessman et al, 1996、Xu et al, 2006、McLennan et al, 2006、Kraszewska, 2008)。これまでに種々の生物で NUDX の生理機能が明らかにされている。*Escherichia coli* 由来 mutT は、8-oxo-deoxyguanosine 5'-triphosphate (8-oxo-dGTP)、8-oxo-deoxyguanosine 5'-diphosphate (8-oxo-dGDP)、8-oxo-guanosine 5'-triphosphate (8-oxo-GTP)、

8-oxo-guanosine 5'-diphosphate (8-oxo-GDP)を加水分解する。*E.coli* の *mutT* 欠損株では一方向性の A:T→C:G の DNA トランスバージョン変異頻度が上昇することから、突然変異や転写エラーの抑制に関与すると考えられている (Akiyama et al, 1989、Tajiri et al, 1995)。ヒトにおいては *mutT* のホモログである MTH1 は 8-oxo-dGTP を加水分解するが 8-oxo-dGDP に対する活性は示さない。一方 NUDT5 が 8-oxo-dGDP を加水分解することで、癌や加齢性の障害を引き起こす原因となる酸化ヌクレオチドプールの衛生化に寄与する (Mo et al, 1992、Ishibashi et al, 2003、Takagi et al, 2012, Ames et al, 1993)。

高等植物の NUDX ファミリーについては、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) では 28 種類 (*AtNUDX1-27*、*AtDCP2*)、キク (*Chrysanthemum*) では 8 種類 (*CINUDX1-8*) の NUDX 相同性遺伝子が同定されている。これまでに *AtNUDX* の細胞内局在性や基質特性は明らかになっており、細胞質型 (*AtNUDX1-11*、*AtDCP2*)、ミトコンドリア型 (*AtNUDX12-18*)、葉緑体型 (*AtNUDX19-27*) に分類される (Fig. 1.)。このうち *AtNUDX1* は 8-oxo-dGTP 加水分解活性、4 個の *AtNUDX* (*AtNUDX13*、25、26、27) は AP_4A/AP_nA 加水分解活性、3 個の *AtNUDX* (*AtNUDX6*、7、19) は NAD(P)H 加水分解活性、5 個の *AtNUDX* (*AtNUDX2*、6、7、10、14) は ADP-ribose 加水分解活性、3 個の *AtNUDX* (*AtNUDX11*、15、26) は CoA 加水分解活性を有する (Ogawa et al, 2005、Ogawa et al, 2008)。キクでは、*CINUDX3*、*CINUDX8* が AP_nA pyrophosphohydrolase サブファミリー分類される。*AtNUDX1* は、DNA および RNA 突然変異を抑制することが報告されている

(Ogawa et al, 2005、Yoshimura et al, 2007)。ADP-ribose pyrophosphohydrolase サブファミリーに属するシロイヌナズナとキクの *NUDX* (*AtNUDX2*、*AtNUDX7*、*CINUDX2*) は非生物ストレスによって発現増加する。*AtNUDX2*、*AtNUDX7* の過剰発現シロイヌナズナは ADP-ribose の代謝を介して酸化ストレス耐性能が向上する。ADP-ribose は ADP リボシル化 (PAR) 反応の分解過程で生成される。ADP-ribose 加水分解活性を有する *NUDX* は毒性レベルの遊離型 ADP-ribose を減少させ、枯渇した ATP の再供給や nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) の維持に寄与する (Ishikawa et al, 2009、Rosshi et al, 2002、Ogawa et al, 2005、Ogawa et al, 2009)。一方、 AP_4A pyrophosphohydrolase サブファミリーに属する *AtNUDX26*、*CINUDX6* のうち、*AtNUDX26* は乾燥ストレスでは発現増加するが、*CINUDX6* は発現応答性を示さない。さらに *AtNUDX26* はバクテリアの緊縮応答に関わる guanosine-3, 5-tetraphosphate (ppGpp) に対する加水分解活性が他の *AtNUDX* と比べて最も高いことから、*AtNUDX26* は非生物学的ストレス下で ppGpp レベルの制御に機能していることが示唆された (Ogawa et al, 2009、Ishikawa et al, 2009、Ito et al, 2012)。これらの結果は、植物種の違いによって *NUDX* アイソザイムの数と遺伝子発現制御が異なることを示唆する。しかし、*NUDX* の多様性や環境ストレス下における *NUDX* 発現に関する研究の大部分は高等植物ではシロイヌナズナとキクに限定され、単子葉植物由来の *NUDX* ファミリーの遺伝子についての報告はほとんど知られておらず、その生理機能については未だ明らかではない。

本研究では、植物の *NUDX* ファミリー遺伝子の多様性、環境ス

ストレス応答、機能を明らかにするために、オオムギから NUDX ファミリー遺伝子を探索し、ストレスによる遺伝子発現や分子機能について解析した。

Cytosolic; AtNUDX1 - 11, AtDCP 2
 It has the hydrolase activities specifically, such as oxidative nucleotides (AtNUDX1), ADP-ribose and NADH (AtNUDX2,6,7,10), CoA (AtNUDX11).

Mitochondrial; AtNUDX12 - 18
 It acts on the substrates specifically, such as AP_nA (AtNUDX13), ADP-ribose (AtNUDX14), CoA and a variety of CoA derivatives (AtNUDX15).

Chloroplastic; AtNUDX19 - 27
 It acts on the substrates specifically, such as NADPH (AtNUDX19), FAD (AtNUDX23), AP_nA (AtNUDX25,26,27).

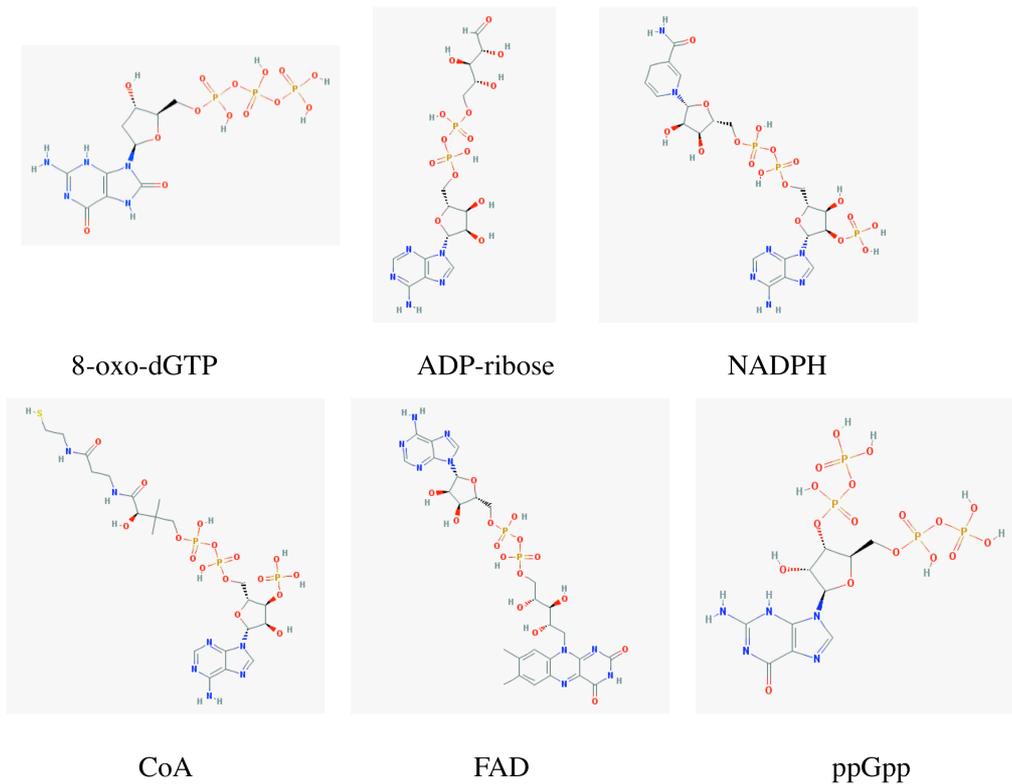


Fig. 1. Localization and function of Nudix hydrolase family in *Arabidopsis*.

第 2 章 オオムギ由来 **Nudix hydrolase** 遺伝子の同定と分類

第 1 節 目的

高等植物の NUDX ファミリーについては、シロイヌナズナとキクからそれぞれ 28、8 種類の遺伝子が同定されているが、単子葉植物由来 NUDX ファミリーについての報告は少ない。そこで、本研究ではオオムギ及びミナトカモジグサ由来 NUDX ファミリー遺伝子の探索を行い、植物間の多様性と分類について解析した。ミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon*) はイネ科の単子葉植物で 2010 年にゲノム塩基配列が解読され、ゲノムサイズが小さく (272Mb)、草丈が 30cm で実験室内での栽培が可能な点からモデル植物として適しているため、本研究で用いた。

第 2 節 材料と方法

2-1 オオムギ由来 **Nudix hydrolase family** 遺伝子の相同性解析

DNA Data Bank of Japan (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/intro-j.html>) から NUDX の配列情報を検索したところ、28 種類シロイヌナズナ由来 NUDX ファミリー (AGI code: At1g68760、At5g47650、At1g79690、At1g18300、At2g04430、At2g04450、At4g12720、At5g47240、At3g46200、At4g25434、At5g45940、At1g12880、At3g26690、At4g11980、At1g28960、At3g12600、At2g01670、At1g14860、At5g20070、At5g19460、At1g73540、At2g33980、At2g42070、At5g19470、At1g30110、At3g10620、At5g06340、At5g13570)、14 種類のオオムギ由来 NUDX ファミリー (Accession number: AK367316、AK354651、AK357936、AK375942、

AK35885、AK368722、AK366965、AK354180、AK372158、AK36156、AK367792、Z99996、AK359921、AK376461)と、19種類のミナトカモジグサ由来 NUDX ファミリー (Accession number: Bradi1g35490.1、Bradi3g53887.1、Bradi1g44170.1、Bradi2g37517.1、Bradi2g32550.1、Bradi5g08460.1、Bradi1g49810.1、Bradi3g56830.1、Bradi1g51060.1、Bradi4g28030.2、Bradi4g37360.1、Bradi5g26560.2、Bradi3g35160.1、Bradi5g17500.1、Bradi3g44460.1、Bradi3g35150.1、Bradi1g54020.1、Bradi3g56830.1、Bradi3g54700.1) が検出できた。これらの NUDX の塩基配列をアミノ酸配列に置換し、相同性検索、アミノ酸配列アライメントおよび系統樹解析をそれぞれ、BLAST (Altschul et al, 1990、Karlin and Altschul, 1990)、CLUSTAL W (Tompson et al, 1994)、MEGA 5.05 (Tamura et al, 2007)、NJ 法 (Saitou and Nei, 1987)を用いて行った。

2-2 オオムギ由来 Nudix hydrolase family 遺伝子の

クローニング

オオムギ「はるな二条」種子を浸水後、20℃、暗条件下で3日間培養して発芽した芽 150mg から RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen)を用いて Total RNA を抽出した。Total RNA 50µg から oligo (dT)プライマーと PrimeScript RT Master Mix (Takara)により 1st strand cDNA を合成した。

NUDX ファミリー遺伝子と同定された *HvNUDX1-14* の配列からプライマーを設計し (Table 1)、PCR 反応液は 5U/µl Ex Taq HS (Takara) 0.5µl、10×Ex Taq Buffer 5µl、2.5mM dNTP Mixture 4µl、10µM 正方向プライマー、10µM 逆方向プライマー 1µl、cDNA 1µl、

DW 37.5 μ l を混合し 50 μ l に調製した。反応は [94 $^{\circ}$ C 15 秒、60 $^{\circ}$ C 15 秒、68 $^{\circ}$ C 1 分] を 35 サイクル行った。得られた PCR 産物を pGEM-T vector (Promega) にライゲーションし、*E. coli* DH5 α (Takara) へ形質転換後 LB 寒天培地 (50 μ g / ml ampicillin、0.1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)、40 μ g / ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal)) に植菌し、37 $^{\circ}$ C で 16 時間培養した。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用いプラスミドを抽出し ABI 3100 Avant DNA sequencer により塩基配列を決定した。

第 3 節 結果

3-1 オオムギ由来 Nudix hydrolase family 遺伝子の同定

28 種類シロイヌナズナ由来 NUDX ファミリーのアミノ酸配列 (AtNUDX1-27、AtDCP2) と相同性を示すアミノ酸配列をコードするオオムギ由来遺伝子を BLAST 検索し、14 個の推定 NUDX を得た。DNA データベースから推定されるオープンリーディングフレームを PCR により増幅したところ推定塩基長のフラグメントを得た。また、フラグメントの塩基配列を解析して推定したアミノ酸配列はデータベースと一致することを確認した (Fig. 2)。HvNUDX1-14 の推定アミノ酸配列は AtNUDX と 40-67% の相同性を示した (Table 1)。しかし、オオムギでは AtNUDX1 と AtDCP2 のホモログをコードする遺伝子は検出できなかった。HvNUDX1-14 のアミノ酸配列には、HvNUDX4 の挿入アミノ酸 22 残基を除き、23 残基のアミノ酸で構成される Nudix motif が保存されていた (Fig. 3)。

3-2 オオムギ由来 Nudix hydrolase family の系統樹解析

シロイヌナズナとオオムギの NUDX の系統樹解析を Fig. 4 に示した。HvNUDX1 は ADP-ribose pyrophosphohydrolase、HvNUDX3、6、8 は AP_nA pyrophosphohydrolase、HvNUDX5 と 14 は CoA pyrophosphohydrolase、HvNUDX7 は ADP-sugar pyrophosphohydrolase、HvNUDX9 は NAD(P)H pyrophosphohydrolase、HvNUDX11 は FAD pyrophosphohydrolase、HvNUDX12 と 13 は AP₄A pyrophosphohydrolase のサブファミリーに属した。一方、HvNUDX2、4、10 は既知のサブファミリーに属さず、それぞれ AtNUDX3、AtNUDX9、AtNUDX20 と AtNUDX24 と基質特異未知のサブファミリーを形成した。

3-3 ミナトカモジグサ由来 Nudix hydrolase family 遺伝子の相同性検索と系統樹解析

AtNUDX と HvNUDX アミノ酸配列と相同性 Nudix motif を示すアミノ酸配列をコードするミナトカモジグサ由来 NUDX を BLAST 検索し、19 種類の推定 NUDX を得た。BraNUDX1-19 の推定アミノ酸配列は HvNUDX や AtNUDX と 39-92% の相同性を示した (Table 2)。BraHvNUDX1-13 は HvNUDX と 75% 以上高い相同性を示し、BraNUDX14-19 は AtNUDX のみに 50% 程度の相同性を示した。しかし AtNUDX1 のホモログをコードする遺伝子は存在しなかった。ミナトカモジグサ、シロイヌナズナ、オオムギの NUDX 系統樹解析から、BraNUDX1、14 は ADP-ribose pyrophosphohydrolase、BraNUDX3、6、8、15、17、18 は AP_nA pyrophosphohydrolase、BraNUDX5、13、16 は CoA pyrophosphohydrolase、

BraNUDX7 は ADP-sugar pyrophosphohydrolase、BraNUDX9 は NAD(P)H pyrophosphohydrolase、BraNUDX11 は FAD pyrophosphohydrolase、BraNUDX19 は mRNA cap のサブファミリーに属した。一方 BraNUDX2、4、10 はそれぞれ HvNUDX2、HvNUDX4、HvNUDX10 と基質特異性未知のサブファミリーを形成した(Fig. 5)。

第 4 節 考察

Nudix hydrolase は pyrophosphatase の多様なスーパーファミリーであり、古細菌、細菌、真核生物等から同定されている(Sheikh et al, 1998、Xu et al , 2002)。高等植物では 28 種類のシロイヌナズナ由来 NUDX (AtNUDX)が存在しており、組み換えタンパク質を用いた解析により、13 種類の AtNUDX の基質特異性や生理機能等が明らかになっている (Ogawa et al, 2005, Ogawa et al, 2008)。しかしながら、植物の NUDX の報告は少なく、その多様性や機能においても不明な点が多い。そこで単子葉植物であるオオムギとミナトカモジグサから NUDX 相同性遺伝子を探索した。オオムギでは 14 種類、ミナトカモジグサでは 19 種類の相同性遺伝子が存在した。いずれも 7 つの既知サブファミリーと基質特異性未知の 3 つのサブファミリーに分類された。HvNUDX では mRNA cap 除去に関わる AtDCP2 (Gunawardana et al, 2008)と相同性を示さなかったが、BraNUDX19 は AtDCP2 と 58%の相同性を示した。HvNUDX1-14 と BraNUDX1-13 は高い相同性を示すが、BraNUDX14-19 は AtNUDX のみと相同性を示す。また NUDX と相同性を示したり Nudix motif を有するホモログをコードする遺伝

子がイネとトマトにそれぞれ 23、11 個ある (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>、<http://www.pgb.kazusa.or.jp/kaftom/>)。以上のことから、植物の種によって *NUDX* の多様性は異なることが明らかとなった。オオムギとミナトカモジグサには 8-oxo-dGTP pyrophosphohydrolase ファミリーである AtNUDX1 に相同性を示すホモログ遺伝子が検出できなかった。AtNUDX1 は 8-oxo-dGTP や 8-oxo-dGDP を加水分解し突然変異の抑制を行うため、非常に重要な酵素である (Yoshimura et al, 2007)。Fig. 5 で示した A_p_nA pyrophosphohydrolase サブファミリーに属する AtNUDX26 は ppGpp pyrophosphohydrolase 活性をもつことが最近報告されたことから (Ito et al, 2012)、分類された *NUDX* サブファミリー以外の新たなヌクレオシドやヌクレオチドに対しても活性示したり、AtNUDX1 のように他に分類された *NUDX* サブファミリーが酸化ヌクレオチド加水分解活性に関与することが考えられる。よって、オオムギやミナトカモジグサ等の単子葉植物にはシロイヌナズナとは異なる *NUDX* が 8-oxo-dGTP や 8-oxo-dGDP 等といった酸化ヌクレオチドを加水分解する機能を有する可能性が示唆された。

>HvNUDX1
MSAS1YSTRVDSAMTKNGDVEPLPFVYDKHGGVIEIMTSLMDPQAFSASLKSLLSKWREOGIRGVWIKLPIISLANLIQSAAVEEGFWYHHAETTYLMLAYWLPNT
PHTLPIINATHRVGVGAFVMDKREVLVQKESGLVGLGIWKFPTGVVEPGEDINIGVVREVKEETGVDAEFVVEVAFRQSHKAYFEKSDLFFVCILRPLSVDITKQ
ESEIEDAQWMPVEEFAQPFVQKHELKVKYILEVGLAKVDKEYAGFSPIISKSAFSEKQSLFYMNRRDLEKASGSIISTQKDS

>HvNUDX2
MAAQAPPEERLDVLTAAAGDKTVSKPRSEVHRDGDYHRAVHVWYICESTGELLQRRAKDCSWPQWQDISSAGHVSAGDSSLSARRELQEEELGIKLPVDAFELIFV
FLQECVINNGTYTNNENYVLTTLTPIPLEAFTLQSEVSAVRYMHRDEYKSCLAAESGEYVFPYDVGNGYQGLFSIIEERYKDNTESRSLTLQKQISRYAPIHLE
PELTTLSEGDREALGYILKASMVIDEIFYEQVWNSNTMLRDWLKAHADSSLDTLKWAYYSINKSPWSCLDENKAFSTADSAAVLLTDATKPIISGWKLEYRAAFP
LDKPRGANFYPADMKMEFDLWKSGLTDKEQKDATGFFTVIRKPDALLTTSVAQSDGNQNTNSDDLFIYPYSKEYKTSLEKAAELLKASDCSDCPSKLNLLKTKA
NAFLSNDYYESDIAMMELSDNIDITIGPYETIEDGLFSYKATFEAFVGVREDEVATSVQKLFQDQLEDELEKNPLDNIYKSDNVSAAPIRVMNLLYNSGDVKGQPTIA
FNLNDRIVNERGTSVMVLMKNVSEAKFKHILKPIANACIRREEQKEYVDPEPYIYTHIVCHECCGHIIPHSITLPGGKSTVRMELQECHSALEEAADIVGLWALNF
LINKGLLPKLSKSMYVSLAGCFRSIRFGLAEAHKGQALQFNWLYDKGAFILHSDGKFSIDFTKVEEAVESLGREIMTIQAKGDKPAAQSLQSRATLTQPLRVA
LEKIEHMQVFPVDIAPFCTASKLLANN

>HvNUDX3
MAAMMVAARQRELQRYASATGGRIIVGCIPIYRARGDGGEEVVLVICSRRKASAGVLPFKGGWELDESMDEAARREALEEAGVRGETGPSLGRWCYSRRYDATYE
GYMFLRVTVDELEKWPMSGRGRTWTVQDAMDRCPHLWMREALQRFADRAAAAAAL

>HvNUDX4
MAAAAAASTAAGTYKLLSCPEGLPRSRVSRVDFPDRTPHPDASLEEMCEIWNQRLQNPFLYNGTKFRYGGHALHHSDESSQYCVSLHGLTDRYTFVGTN
MSPLWEKFLVSEDDSVCCOHMSNPLNGAIVETSDEKIIILLQRSNVVGESPHYVFPGGHSEPOEAGILAHQNDKDVAGLIDRISDEMFDGIIREVVEETGVPAS
SLTEPILIGVQRETNVRPAAFFYMRNCINDSGAITELYARAQDGYESTKLCVAVSLKELREMSQRLPGCHLGGFALYQLMRNAWKSS

>HvNUDX5
MRPLLSRLFTPSYIAMAAPSPSPSRLLALTRHLLASSSSSSELSSVVGAPAAASASSPVVGAASKGFAAVLVCIFEDNRGDPVLLTKRSTLSSHSEVSLPGGKV
DQGDVVKATALREAEIEIGLDRALVIVTVLEPFLSKNGLDVTVPVIGILSDKALFKPVLNKAEEVDFDAPLEMLKDDNRTRQRNWMGKTIIPVQFDYEAEGEK
YVIWGLTAHILTRAASVVLQKPKSFVLELNRPTNISITSKK

>HvNUDX6
MASEKLVARKGRRLRQRYDNEYRLVAGCVYRVDKHKQLEVLVMTANRDLVFPFKGGWEDDEDVYEAACREALEEAGVRGNINRNPLGLWFMFRKSRRESLQSSSDCP
RGACKGHVFALEVTEELKQWPEQETHRRWLSPADAYGLCRYDWMREALTALLDRCSIASPTIPVAAAAVSTAAPLNEHAGMCIISMLMKPAGPGDRAVALC

>HvNUDX7
MASTDAPQLGATVDVPGAAGPVRVVAAGLPEADFRKALDSALFRRLGSLRAEKGLLASGKGLRQILIQGVDMFGQVGFVKFKADIVDDETRAKIPGIVFARGP
AVAVLILLESKGTQYAVLTEQARVIGKFIILEPAGMLDDENGDFVGTAVREVEETGIKLNLEDVMDLTALLDPATGCKMLPSPGCGDEEIGLFLYGRHVDDETR
ALQKGETGLRDHGLIKLRVVPYDQLWRSTADSKALSIALYEMAKKEGVLPPSSGSSNL

>HvNUDX8
MAVLVARQRELQRYASATGGRIIVGCIPIYRAREGEGELEVLISSQKHGMFPFKGGWELDESMDDAARREALEEAGVSGDMGKVLGCWHYQSRRYQTYEGIM
YPLRVTHELQQWPEMASRNRWATVQVMEGQCQHMREALEELVSRHAKPSAL

>HvNUDX9
MSIHLRAHAFAANPLRGLAGTRSPSAVSPSAAAALRALLDGADAAAAGNHLRVLFRFRGRPLARSPPDPAPSSPAPPAPWRLAWLPPSRVPGVSDVFLVGLSHG
GEGDGEAAAYWAVDVSELEGAGFAGAGEEQSAFVDRLTMVAADWRDAMDGELAAGHARALLEWHNTAKFCGACGAKAVPVEAGTRKQCGNESCKKRIYPRVDP
VVIIMLVIDKENDRALLSRQSRFPVPMWSCLAGFIEPGESELEAVRRETWEETGIEVGVQVYVHSSQPPVPGPNTMPCQLMVGFFAYAKSLDIHVDKKELEDAQWHSRE
DVKKALTFAEYEKAQRSSALKVQNQICGAERGPSTSSDLSVESEEPAPMFPVGPYAI AHHLISSWALEGAPKLPSSFSNL

>HvNUDX10
MVAVATSFSAAAAVAARRSPAPLQLAARRLSFCTAASSSAPAAAAGFGWADALRVASELVGDESLSGYFRKVDICNRGMGNKGEFVEFTVEDQVVGVIHK
GFTEHLRDFHVDVTIVSNGNKNNSVHVTLHSSLRTPEDRTIAGDVIKGLGELIPGIRNELYPVTSYSGMPVYVSLERAAAAPYFGIKAYGIHMNGYIEKHGEKSLW
IGKRSVQKTYPGMLDHLVAGGLPYGISCKENVIKECEEEAGIPRSMSTNATSVGAVSYMINGFRYKRDVLFYDLRLPADVFPNNEDGVEDSFRLLIPVPHVANI
RRTDFLKPNCNLVIIDFLFRHYINPDCNGYLKMTSLRSGDCS

>HvNUDX11
MLLLRSHHLLPFAARLLARRAAAAPLPTAAAARLPLRMAASNHSGAGASSPSPAPPAPMPSRIPFCACGSPTKLAVPDGDEKMRVAVCSGCRVHYENPK
MUVGCLVEHDNKVLLCRKRIEPAYGLWTLPAAGYLEVGESEAAAAGASRETLEACADVEIVSPPAQLDIPLIGQVSEK

>HvNUDX12
MDSPEGYRTNVGICLADPSLTKIFASRIDIPTAWQMPQGGIDPGEPRAAAIRELREETCVRSAEIVAEAPNWLTYDFPADVKDKLNARWGTNWKQAQKWFLLR
LTGGDDEINLMGDGSEKPEFSEAWMTPKQVIEKAVDFKPKVVEETLKHFAFYLPQSDPAASS

>HvNUDX13
MTVAAARCLILTPTISSSSAAAALVRLPRVARRRPLSCASPLAVFASMDSPPEGYRTNVGICLADPSLTKIFASRIDIPTAWQMPQGGIDPGEPRAAAIREL
EETGVRSAEIVAEAPNWLTYDFPADVKDKLNARWGTNWKQAQKWFLLRLTGGDDEINLMGDGSEKPEFSEAWMTPKQVIEKAVDFKPKVVEETLKHFAFYLPQSDP
AASS

>HvNUDX14
MEGKEPATMEALIQRLRHRPPSPYAGDPSTAATPNAGELFKPRRAAVLICLFRGSAGELRVILTKRSSSLSTHSGEVALPGGKVDGEDDAATAALREAKEEIG
MDPCLVTVVTSLEHFLSKHLLVVVPIVGLISDIEGFKVVPNIHEVDDIFDVPLEMFLKVSFVVFVSHAKVGYTA

Fig. 2. Deduced amino acid sequences from open reading frames of HvNUDX genes.

Table 1. Identity of deduced amino acid sequences of HvNUDX genes with those of AtNUDX genes.

Gene	Accession no.	Identity (%)	Gene	Accession no.	Identity (%)
<i>HvNUDX1</i>	AK367316	AtNUDX2: 55	<i>HvNUDX8</i>	AK354180	AtNUDX17: 51
		AtNUDX10: 49			AtNUDX18: 51
		AtNUDX7: 44			AtNUDX4: 46
		AtNUDX8: 44			AtNUDX12: 45
		AtNUDX6: 43			AtNUDX13: 45
					AtNUDX16: 44
					AtNUDX21: 44
<i>HvNUDX2</i>	AK354651	AtNUDX3: 67			
<i>HvNUDX3</i>	AK357936	AtNUDX21: 48	<i>HvNUDX9</i>	AK372158	AtNUDX19: 59
		AtNUDX4: 46			
		AtNUDX18: 44	<i>HvNUDX10</i>	AK361569	AtNUDX20: 53
		AtNUDX17: 42		AtNUDX24: 53	
		AtNUDX12: 41			
		AtNUDX13: 41	<i>HvNUDX11</i>	AK367792	AtNUDX23: 45
<i>HvNUDX4</i>	AK375942	AtNUDX9: 60	<i>HvNUDX12</i>	AK369000	AtNUDX26: 66
					AtNUDX27: 64
<i>HvNUDX5</i>	AK358853	AtNUDX11: 49			AtNUDX25: 53
		AtNUDX15: 45			
		AtNUDX22: 45	<i>HvNUDX13</i>	AK359921	AtNUDX26: 56
					AtNUDX25: 51
					AtNUDX27: 50
<i>HvNUDX6</i>	AK368722	AtNUDX13: 48			
		AtNUDX12: 46			
		AtNUDX16: 43	<i>HvNUDX14</i>	AK376461	AtNUDX15: 55
		AtNUDX18: 42		AtNUDX22: 50	
		AtNUDX17: 40		AtNUDX11: 44	
<i>HvNUDX7</i>	AK366965	AtNUDX14: 64			

```

HvNUDX1      123  -----AFVMDKREVLVQEKSGVLK--GLGIWKFP--GVVERGV-----DINIGVREVKEEGVDAEFVEVAFRQSHKAYFEKSDLFFVCL--- 204
HvNUDX2      43  -----IYCESTGELLQRADCKDS--WPQMDISSAGHVSAGD-----SSLSARREEEEGLIKLPVDAFELIFVFLQECVINNGTYTNNEY--- 124
HvNUDX3      33  -----RAR-GDG-GEVEVLICSRKKG--ASAGVLFV-KGWELDI-----SMDEAARREALEEEAGVRGETG-PSLGRWCYQSRRYDAYTEGYMFPL--- 113
HvNUDX4     137  -----ATVETSDKTIILLQRSNVVG-ESPGHYVFP-GGHSEPEAGLLAHQNDKDVAGLIDRISDFMFDGITREVEEGVPASSLTEPILIGVSQRETNRPAAFYMR--- 240
HvNUDX5      75  -----FEDNRGDPRVLLTKRASTLSSHSGEVSIP-GGXVDGDGV-----DVKATALEAEEEEGLDRALVSTVTVLEPFLSKNGLIDVTPVIGTL--- 157
HvNUDX6      26  -----GCVPIRVKHQLEVLWVSTAN-----RDDLVFP-KGWEDDE-----DVEAAREALEEEEGVRGINRNPLGLIMFRSKSRESLSQSSDCPRGA 110
HvNUDX7     113  -----ILLESKGTAYVLTEQARVP-IGKFILELP-AGLDDENG-----DFVGTAVREVEEEEEGTIKLINEDMDWDLTALLDPATGCKMLPSPGGC--- 195
HvNUDX8      30  -----YRVEGEGELEVLVSSQK-----GHGMFEP-KGWELDI-----SMDDAARREALEEEAGVSDMG-KVLGGWHYQSRRYQTYEGIMFPL--- 110
HvNUDX9      216  -----VIMLVIDKENDRALLSRQSR--FVPRMSCL-AGFEPGE-----SLEEAVRETWEEEEGTIEVGVVYHSSQWPVGPNTMPCOLWGF--- 297
HvNUDX10     205  -----TEKHGKSLWTKGRSDYKQTYQMLDHLVAGLPYGI-----SCKENVKECEEEAGTPRSMTMATSVGAVSYMDINGFRYKRDVL--- 286
HvNUDX11     102  -----HYENPKWVGGCLVEHDNKVLLGRKIEP-----AYGLWTLP-AGVLEGE-----SAAGASRETLEEAGADVETVSPEAOLDTLIGQVSEK----- 183
HvNUDX12      12  -----VGTCLADPSLTKIFSASRID-----IPTAWQMP-GGIGLDPG-----EPRAAALREIREEEEGVRSAEIVAEAPNWLTYDFP-ADVKDKLNARW--- 92
HvNUDX13      60  -----NVGICLADPSLTKIFSASRID-----IPTAWQMP-GGIGLDPG-----EPRAAALREIREEEEGVRSAEIVAEAPNWLTYDFP-ADVKDKLNARW--- 141
HvNUDX14      55  -----FRGSAGELRVLLTKRSSSLTHSGEVALP-GGXVDEGDA-----DDAATALREAKEEEEEEGVRSAEIVAEAPNWLTYDFP-ADVKDKLNARW--- 197
Nudix motif      GXXXXX
XXXXXXXXREUXEEXGX

```

Fig. 3. Alignment of the amino acid sequences of putative barley NUDX.

Gaps, denoted by a dash, were introduced into the sequences to maximize the homology. The nudix motif is shown below the sequence. Identical amino acid residues to those of nudix motif are shown as reversal letters. The sequences are deduced from the following accession numbers: HvNUDX1, AK367316; HvNUDX2, AK354651; HvNUDX3, AK357936; HvNUDX4, AK375942; HvNUDX5, AK358853; HvNUDX6, AK368722; HvNUDX7, AK366965; HvNUDX8, AK354180; HvNUDX9, AK372158; HvNUDX10, AK36156; HvNUDX11, AK367792; HvNUDX12, Z99996; HvNUDX13, AK359921; and HvNUDX14, AK376461.

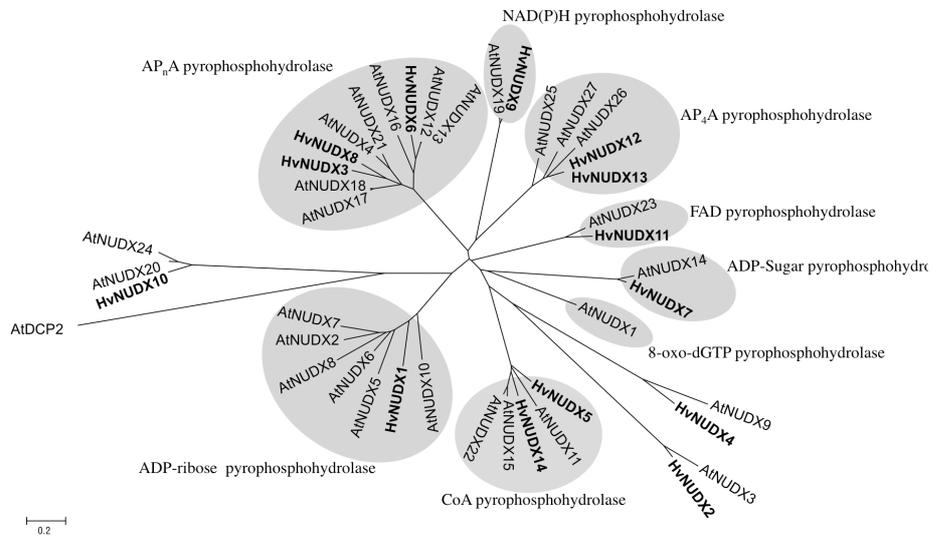


Fig. 4. Phylogenetic tree for barley and Arabidopsis NUDX.

Barley NUDX is shown by bold letters.

Table 2. Identity of deduced amino acid sequences of BraNUDX genes with those of HvNUDX and AtNUDX genes.

Gene	Accession no.	Identity (%)	Gene	Accession no.	Identity (%)
<i>BraNUDX1</i>	Bradi1g35490.1	HvNUDX1: 83	<i>BraNUDX10</i>	Bradi4g28030.2	HvNUDX10: 85
		AtNUDX2: 55			AtNUDX20: 61
		AtNUDX10: 50			AtNUDX24: 58
		AtNUDX7: 45	<i>BraNUDX11</i>	Bradi4g37360.1	HvNUDX11: 81
		AtNUDX6: 42			AtNUDX23: 53
AtNUDX5: 39					
<i>BraNUDX2</i>	Bradi3g53887.1	HvNUDX2: 92	<i>BraNUDX12</i>	Bradi5g26560.2	HvNUDX12: 91
		AtNUDX3: 66			HvNUDX13: 83
					AtNUDX26: 58
<i>BraNUDX3</i>	Bradi1g44170.1	HvNUDX3: 85			AtNUDX25: 49
				AtNUDX27: 47	
<i>BraNUDX4</i>	Bradi2g37517.1	HvNUDX4: 80	<i>BraNUDX13</i>	Bradi3g35160.1	HvNUDX14: 77
		AtNUDX9: 60			AtNUDX22: 55
<i>BraNUDX5</i>	Bradi2g32550.1	HvNUDX5: 86			AtNUDX11: 51
<i>BraNUDX6</i>	Bradi5g08460.1	HvNUDX6: 81	<i>BraNUDX14</i>	Bradi5g17500.1	AtNUDX8: 50
<i>BraNUDX7</i>	Bradi1g49810.1	HvNUDX7: 86	<i>BraNUDX15</i>	Bradi3g44460.1	AtNUDX13: 47
		AtNUDX14: 58			AtNUDX12: 46
<i>BraNUDX8</i>	Bradi3g56830.1	HvNUDX8: 85	<i>BraNUDX16</i>	Bradi3g35150.1	AtNUDX15: 57
		AtNUDX17: 51			
		AtNUDX4: 49	<i>BraNUDX17</i>	Bradi1g54020.1	AtNUDX16: 71
<i>BraNUDX9</i>	Bradi1g51060.1	HvNUDX9: 85	<i>BraNUDX18</i>	Bradi3g56830.1	AtNUDX18: 52
		AtNUDX19: 59			AtNUDX21: 47
			<i>BraNUDX19</i>	Bradi3g54700.1	AtDCP2: 58

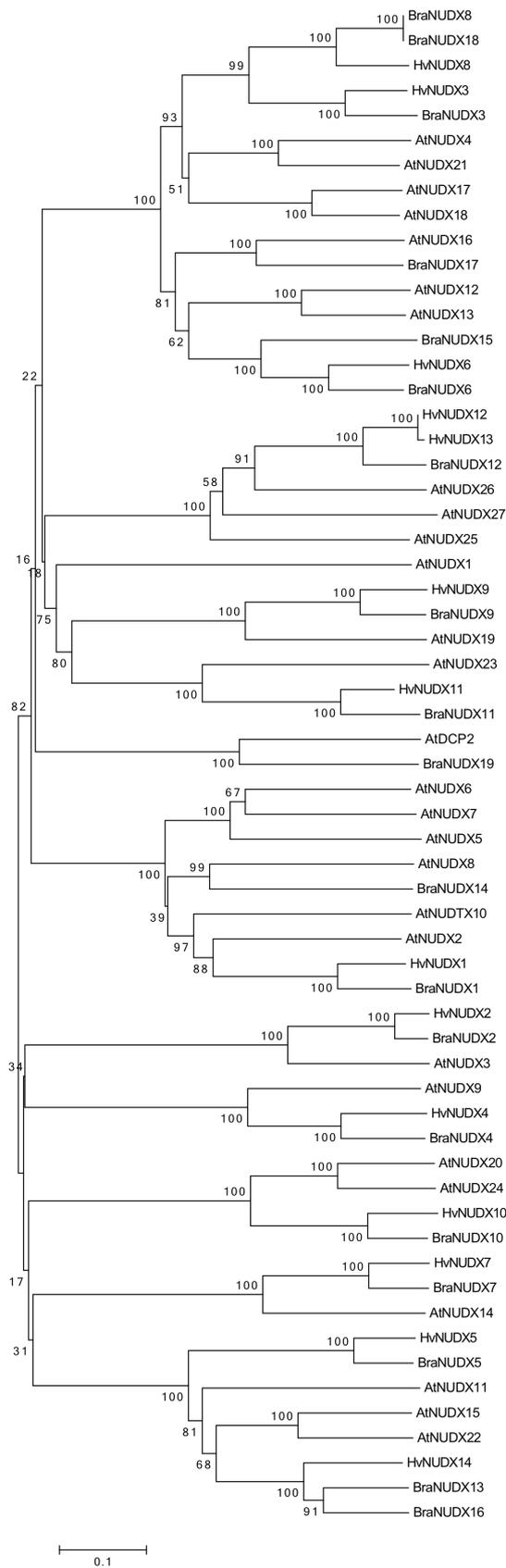


Fig. 5. Phylogenetic tree for barley, Brachypodium and Arabidopsis NUDX.

第 3 章 オオムギ由来 *Nudix hydrolase* 遺伝子のストレス

応答解析

第 1 節 目的

植物は、紫外線、高濃度塩類、乾燥等の環境ストレス下で、TCA サイクルやアミノ酸代謝の阻害、DNA らせん構造の崩壊といった傷害を生じる。また、紫外線は波長により UV-A (320-400nm), UV-B (280-320nm), UV-C (100-280nm) に区分され、環境悪化によるオゾン層の破壊が今後続けば、地上における UV-B や UV-C の影響が無視できなくなる。これまで UV-B は植物の生育過程に傷害を及ぼすことが報告されてきた。しかし、植物における UV-C に対する応答・防御メカニズムは明らかではない。

そこで、紫外線などの環境ストレスに対するオオムギ由来 *NUDX* の応答・防御メカニズムを明らかにすることを目的として、植物の代謝制御や生物的・非生物的ストレスに応答する *NUDX* に着目し、*HvNUDX* の環境ストレス応答について解析した。

第 2 節 材料と方法

2-1 ストレス処理

オオムギの種子を浸水後、20°C に設定した恒温室内の暗条件下で 3 日間培養し、発芽させた。発芽後、水耕栽培培養液 (4 mM KNO_3 、1 mM NaH_2PO_4 、1 mM MgSO_4 、1 mM CaCl_2 、1 mg / ml Fe-citrate, pH5.5)、メタルハライドライト (350 $\mu\text{mol} / \text{m}^2 / \text{s}$) 照射下 で 1 日間生育させた。紫外線については、340nm (UV-A)、312nm (UV-B)、260nm (UV-C) 波長ライトをそれぞれ 186、431、

438 $\mu\text{W} / \text{cm}^2$ の強度で 24 時間照射した。塩処理については、100mM NaCl 水溶液中にオオムギの根を浸水した。乾燥処理については、水耕培養液を取り除き、乾燥させた。メタルハライドライト (350 $\mu\text{mol} / \text{m}^2 / \text{s}$) 照射をコントロールとした。これらの処理をしたオオムギのシュートはそれぞれ 0、2、12、24 時間後に液体窒素で凍結し、 -80°C で保存した。

2-2 RNA の抽出

RNeasy[®] Plant Mini Kit を用い、オオムギ芽 150mg から total RNA の抽出を行った。Poly (A) Purist-MAG (Ambion) を用いて Total RNA 50 μg に oligo (dT) MagBeads(Ambion) 100 μg の磁気ビーズに結合させることで mRNA を精製した。精製した mRNA は oligo (dT) プライマーを用いて PrimeScript RT Master Mix で反応液を調製し、 37°C 15 分反応後 85°C 5 秒により 1st strand cDNA を合成した。

2-3 RT-PCR

RT-PCR 反応液は 5U/ μl Ex Taq HS 0.5 μl 、10 \times Ex Taq Buffer 5 μl 、2.5mM dNTP Mixture 4 μl 、10 μM 正方向プライマー、10 μM 逆方向プライマー 1 μl 、cDNA 1 μl 、DW 37.5 μl を混合し 50 μl に調製した。

HvNUDX、 α -Tubulin、pathogenesis-related protein-3 (PR3) 遺伝子の配列からプライマーを設計し (Table 3)、PCR を 94°C 1 分後に [94°C 15 秒、 60°C 15 秒、 68°C 1 分] を 25-40 サイクル行った。ただし、HvNUDX8 については、 94°C 1 分後に [94°C 15 秒、 60°C 20 秒] を 30 サイクル行った。増幅した DNA は 3% (w/v)

Nusieve3:1Agarose (Takara)アガロースゲルを用いた電気泳動で分離した。検出したバンド強度はLAS4000(GE Healthcare)で測定し定量化した。内部標準に α -Tubulin を用いて、各遺伝子発現量をノーマライズした。

2-4 リアルタイム PCR

反応液は SYBR Premix Ex Taq (Takara) 10 μ l、10 μ M 正方向プライマー 2 μ l、10 μ M 逆方向プライマー 2 μ l、DW 4 μ l、希釈 cDNA 2 μ l を混合し 20 μ l に調製した。リアルタイム PCR システム Light Cycler2.0 (Roche)を用いて 95 $^{\circ}$ C で 10 秒後に [95 $^{\circ}$ C 5 秒、60 $^{\circ}$ C 20 秒] を 40 サイクル行った。内部標準に α -Tubulin を用いて、各遺伝子発現量をノーマライズした。

第 3 節 結果

3-1 非生物的ストレスによるオオムギ由来 Nudix hydrolase

遺伝子の発現

オオムギ幼芽に各種ストレス処理 (UV-C、塩、乾燥) を行い、0、2、12、24 時間後の *HvNUDX* の発現量を半定量的 RT-PCR 法により解析した (Table 4、Fig. 6)。UV-C 処理で 4 種類の *HvNUDX* (*HvNUDX*6、7、12、14) が有意に発現増加した。乾燥処理で 7 種類の *HvNUDX* (*HvNUDX*1、2、6、7、11、12、13) は有意に発現量が増加した。一方、塩処理では *HvNUDX*1、6 の遺伝子が 24 時間後に 1.5 倍以上発現増加したものの、T 検定で有意差は認められなかった。

3-2 紫外線ストレス下によるオオムギ由来 *Nudix hydrolase*

遺伝子の発現

オオムギ幼芽に UV-A (340nm)、UV-B (312nm)、UV-C (260nm) の紫外線を 24 時間照射後に total RNA を抽出してリアルタイム PCR 法により解析した (Fig. 7)。その結果、*HvNUDX4* は UV-A と UV-B でそれぞれ、1.3 倍、1.4 倍、*HvNUDX6* は UV-B と UV-C でそれぞれ 7.8 倍、14.9 倍、*HvNUDX7* は UV-C で 2.6 倍、*HvNUDX12* は UV-C で 1.2 倍、*HvNUDX14* は UV-C で 2.0 倍有意に発現量が増加した。

第 4 節 考察

14 種類のオオムギ由来 *NUDX* を単離し、これらの遺伝子を 7 種類の *NUDX* サブファミリーと 3 種類の未知のサブファミリーに分類した。そこで、*HvNUDX* の環境ストレス応答や防御機構を明らかにするために、非生物学的ストレス条件下での *HvNUDX* 発現量の変化を RT-PCR で解析した。UV-C で 4 種類 (*HvNUDX6*、7、12、14)、乾燥で 7 種類 *HvNUDX* (*HvNUDX1*、2、6、7、11、12、13) の発現量が増加し、このうち 3 種類の遺伝子 (*HvNUDX6*、7、12) が UV-C と乾燥条件で発現量が増加した。*HvNUDX1* と同源性遺伝子である *AtNUDX2*、7 は、塩と乾燥条件下で発現量が増加し (Ogawa et al, 2009, Ishikawa et al, 2009)、いずれも ADP-ribose pyrophosphohydrolase のサブファミリーに分類される。さらに、ADP-ribose pyrophosphohydrolase のサブファミリーに分類されるキクの *CINUDX2* も同様に塩と乾燥条件下で発現量が増加する (Huang et al, 2012)。ADP リボシル化は細胞内のアポトーシス誘

導や細胞障害を引き起こす要因となるため、ADP-ribose の細胞内レベルの維持は重要である (Han et al, 2000, McDonald et al, 1994, Sandra et al, 2001)。よって、オオムギ、シロイヌナズナ、キクで非生物的ストレスにより発現量が増加する ADP-ribose pyrophosphohydrolase サブファミリー遺伝子は、植物において重要な役割を果たすことが示唆される。AP_nA pyrophosphohydrolase に分類される 3 種類の *HvNUDX* のうち *HvNUDX6* は UV-C と乾燥ストレスで 24 時間後にそれぞれ、2.48 倍、9.16 倍発現量が増加した。AP_nA pyrophosphohydrolase に分類される *CINUDX3*、8 も同様に非生物的ストレス (乾燥、塩、熱、低温) で発現量が増加する (Huang et al, 2012)。哺乳類では、細胞外の AP_nA は血圧と神経伝達の調整に関与する (Miras-Portugal et al, 1998)。長鎖 AP_nA の蓄積は、様々なリン酸化酵素を阻害し、細胞傷害の影響を及ぼす (Bone et al, 1986, Shoyah ,1985)。よって、Fig. 4、Fig.7-8 の結果から *HvNUDX6* は酸化ストレス等に蓄積された AP_nA を加水分解することで、細胞内の AP_nA レベルを正確に調節することが予測される。ADP-sugar pyrophosphohydrolase に分類される *HvNUDX7* は UV-C ストレスで 12 時間後に 1.62 倍、乾燥で 24 時間後に 4.33 倍発現量が増加した。FAD pyrophosphohydrolase に分類される *HvNUDX11* は乾燥ストレスで 24 時間後に 1.76 倍発現量が増加した。ADP-sugar と FAD pyrophosphohydrolase に分類される *CINUDX1*、7 は非生物的ストレス (乾燥、塩、熱、低温) で発現量が増加する (Huang et al, 2012)。CoA pyrophosphohydrolase に分類される *HvNUDX14* は UV-C で 24 時間後に 1.40 倍発現量が増加したが、CoA pyrophosphohydrolase に分類される *CINUDX4* は非

生物的ストレス下で応答を示さなかった (Huang et al, 2012)。しかし、ADP-sugar、FAD、CoA pyrophosphohydrolase のサブファミリーに分類される *AtNUDX14*、*23*、*11*、*15*、*22* のストレス応答や環境ストレス下における生理機に関しては不明な点が多い (Ogawa et al, 2005, Ogawa et al, 2008)。AP₄A はアポトーシスやストレス応答において DNA の複製や修復の制御に関与する重要なシグナル分子である (McLennan, 2000)。AP₄A pyrophosphohydrolase に分類される *HvNUDX12*、*13* は乾燥ストレスで 24 時間後にそれぞれ 1.68 倍、1.69 倍発現量が増加し、*AtNUDX26* と同様の結果であった (Ito et al, 2012)。*HvNUDX12* は UV-C ストレスで 24 時間後に 1.25 倍発現量が増加したが、AP₄A pyrophosphohydrolase に分類される *CINUDX6* は非生物的ストレス下で応答を示さなかった (Huang et al, 2012)。基質特異性未知サブファミリーに分類される *HvNUDX2* は乾燥ストレスで 24 時間後に 1.92 倍発現量が増加したが、*HvNUDX4*、*10* は UV-C、乾燥、塩ストレスのいずれに対しても応答を示さなかった。UV-C (260nm) 照射でタバコの葉に蓄積する (Brederode et al, 1991) ことが報告されている PR-3 遺伝子について、UV-C ストレス 24 時間後のオオムギでは *HvPR-3* 遺伝子の発現量が 110 倍有意に増加した。これらの結果から、植物の NUDX はハウスキーピング酵素としてだけでなく、ストレス耐性酵素遺伝子として、代謝や制御において役割を果たすことが示唆された。

環境悪化に伴うオゾン層の破壊により 2065 年までに地球上の 60%以上のオゾン層が破壊されることが予測されている。オゾン層の消失は生物学的に有害な紫外線の増加を引き起こす

(Newman et al, 2009)。そのため、地上に達する有害な紫外線は UV-B だけでなく UV-C の増加も懸念される。そこで *HvNUDX* の紫外線応答について解析した。UV-A では *HvNUDX4*、UV-B では *HvNUDX4*、6、UV-C では、*HvNUDX6*、7、12、14 の発現が誘導され、*HvNUDX7*、12、14 が UV-C で特異的に応答した。よって、*HvNUDX* は紫外線の波長により応答性が異なることが明らかとなり、*HvNUDX6*、7、12、14 が UV-C により受ける障害を回避修復する機能をもつ可能性があると考えられる。

Table 3. Primers for RT-PCR.

Gene	Forward (5' => 3')	Reverse (5' => 3')	Fragment size* (bp)	Accession No.
HvNUDX1	TGTGCATCCTAAGGCCACTTT	TTGGACGAATGGTTGTGCC	107	AK367316
HvNUDX2	ATGAGCGGATTGTGAATGAGC	TGCAGGCATTGGCAATAGG	102	AK354651
HvNUDX3	TCGGCCGCTGGTGCTACCAG	GCGGCCGGACATCTCGGGCC	110	AK357936
HvNUDX4	GATCGTTGAAACATCCGACGA	TCCAGCTTCTTGTGGCTCAGA	115	AK375942
HvNUDX5	CCGGACAACAAGACAAAGGAA	TGTGCAGTTAAGCCCCAAATG	105	AK358853
HvNUDX6	TCACCGAGGAGCTCAAGCAAT	CGATGCAATCGAACAACGATC	143	AK368722
HvNUDX7	ACGAAGAGATTGGCCTGTTC	TTGATCAGCTCGCCATGGT	106	AK366965
HvNUDX8	CTGGCACTACCAGAGCCGCC	GTTGCCAGGTGCGGTTGCG	120	AK354180
HvNUDX9	TACCATGCCATGCCAGTTGAT	TTAACGTCTTCACGGCTGTGC	114	AK372158
HvNUDX10	TTTGTGGAGTTCACGGTGGA	TGTTGCCCGAGACAATGGT	106	AK361569
HvNUDX11	AGTGCACTACGAGAACCCCAA	AGAGTCCAAAAGGCCATAAGCC	108	AK367792
HvNUDX12	GCGGATGTCAAAGACAAGCTG	ATCCCCATCAGGTTGATCTC	117	AK369000
HvNUDX13	GCCAGGCTCAGAAAGTGGTTTCT	TCCATGCCCACTCGGAAAA	105	AK359921
HvNUDX14	TGTTGTCCCTATGTTGGCA	AACCTTGAGGAACATCTCCAGG	113	AK376461
α -Tubulin	CTCCATGATGGCCAAGTGTGA	AGTGCCTTGGTCTTGATGGT	126	Y08490
HvPR-3	AGTTGGCCTTGACAAGAAGCG	CGCATAACGTCAAGGACGAAG	104	AJ276226

*Expected from barley gene nucleotide sequence.

Table 4. Relative mRNA levels of HvNUDX under abiotic stress by semi-quantitative RT-PCR.

Expression levels were normalized with that of the α -tubulin gene as an internal control. Data show mean values \pm SD for three individual experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Gene	UV-C				NaCl				Drought				
	0 h	2 h	12 h	24 h	0 h	2 h	12 h	24 h	0 h	2 h	12 h	24 h	
	1	0.85 \pm 0.08*	0.82 \pm 0.08	1.06 \pm 0.07	1.08 \pm 0.07	1	1.05 \pm 0.25	1.59 \pm 0.88	2.24 \pm 1.66	1	0.98 \pm 0.06	1.09 \pm 0.12	1.32 \pm 0.07**
HvNUDX1	1	0.85 \pm 0.08*	0.82 \pm 0.08	1.06 \pm 0.07	1.08 \pm 0.07	1	1.05 \pm 0.25	1.59 \pm 0.88	2.24 \pm 1.66	1	0.98 \pm 0.06	1.09 \pm 0.12	1.32 \pm 0.07**
HvNUDX2	1	0.89 \pm 0.05*	1.08 \pm 0.10	1.18 \pm 0.20	1.18 \pm 0.20	1	0.93 \pm 0.26	1.18 \pm 0.11	1.04 \pm 0.35	1	0.85 \pm 0.06**	1.21 \pm 0.19	1.92 \pm 0.50*
HvNUDX3	1	2.11 \pm 0.99	1.45 \pm 1.29	2.19 \pm 1.06	2.19 \pm 1.06	1	0.99 \pm 0.36	1.05 \pm 0.06	1.10 \pm 0.45	1	1.73 \pm 0.53	1.68 \pm 0.84	2.10 \pm 0.86
HvNUDX4	1	1.06 \pm 0.10	1.00 \pm 0.05	1.28 \pm 0.32	1.28 \pm 0.32	1	1.12 \pm 0.33	0.98 \pm 0.18	1.16 \pm 0.43	1	1.18 \pm 0.24	1.17 \pm 0.33	1.30 \pm 0.55
HvNUDX5	1	0.94 \pm 0.01**	0.92 \pm 0.07	0.97 \pm 0.11	0.97 \pm 0.11	1	1.16 \pm 0.10	1.15 \pm 0.24	1.05 \pm 0.33	1	1.00 \pm 0.12	0.86 \pm 0.23	0.74 \pm 0.22
HvNUDX6	1	0.73 \pm 0.10*	1.35 \pm 0.54	2.48 \pm 0.40*	2.48 \pm 0.40*	1	0.50 \pm 0.18*	1.25 \pm 0.24	1.53 \pm 0.26	1	1.63 \pm 0.22	3.16 \pm 1.60	9.16 \pm 1.43**
HvNUDX7	1	1.05 \pm 0.21	1.62 \pm 0.49*	2.88 \pm 2.01	2.88 \pm 2.01	1	0.91 \pm 0.18	1.00 \pm 0.18	1.32 \pm 0.37	1	1.21 \pm 0.01**	3.33 \pm 0.92	4.33 \pm 0.79**
HvNUDX8	1	0.54 \pm 0.33*	0.67 \pm 0.06*	1.02 \pm 0.09	1.02 \pm 0.09	1	0.98 \pm 0.57	1.04 \pm 0.71	0.70 \pm 0.62	1	0.69 \pm 0.09	1.06 \pm 0.22	1.22 \pm 0.23
HvNUDX9	1	1.01 \pm 0.27	1.10 \pm 0.52	1.38 \pm 0.82	1.38 \pm 0.82	1	1.06 \pm 0.08	1.18 \pm 0.16	1.13 \pm 0.12	1	0.79 \pm 0.12	0.66 \pm 0.02**	0.55 \pm 0.09*
HvNUDX10	1	0.93 \pm 0.07	0.85 \pm 0.06	0.80 \pm 0.11	0.80 \pm 0.11	1	0.98 \pm 0.27	1.13 \pm 0.05	1.13 \pm 0.07	1	1.04 \pm 0.23	0.59 \pm 0.36	0.71 \pm 0.51
HvNUDX11	1	0.99 \pm 0.09	0.91 \pm 0.10	0.92 \pm 0.03**	0.92 \pm 0.03**	1	0.83 \pm 0.33	0.97 \pm 0.25	0.87 \pm 0.51	1	0.78 \pm 0.04**	0.75 \pm 0.10	1.76 \pm 0.14**
HvNUDX12	1	0.94 \pm 0.01*	0.99 \pm 0.02	1.25 \pm 0.12*	1.25 \pm 0.12*	1	0.99 \pm 0.12	1.07 \pm 0.04	1.12 \pm 0.12	1	1.31 \pm 0.14	1.39 \pm 0.34	1.68 \pm 0.32*
HvNUDX13	1	1.00 \pm 0.06	0.96 \pm 0.06	1.09 \pm 0.06	1.09 \pm 0.06	1	1.03 \pm 0.19	1.10 \pm 0.11	1.17 \pm 0.33	1	1.31 \pm 0.09	1.35 \pm 0.10	1.69 \pm 0.42*
HvNUDX14	1	1.02 \pm 0.12	1.17 \pm 0.14	1.40 \pm 0.02**	1.40 \pm 0.02**	1	0.89 \pm 0.20	1.02 \pm 0.33	1.01 \pm 0.46	1	0.94 \pm 0.14	1.21 \pm 0.24	1.64 \pm 1.14

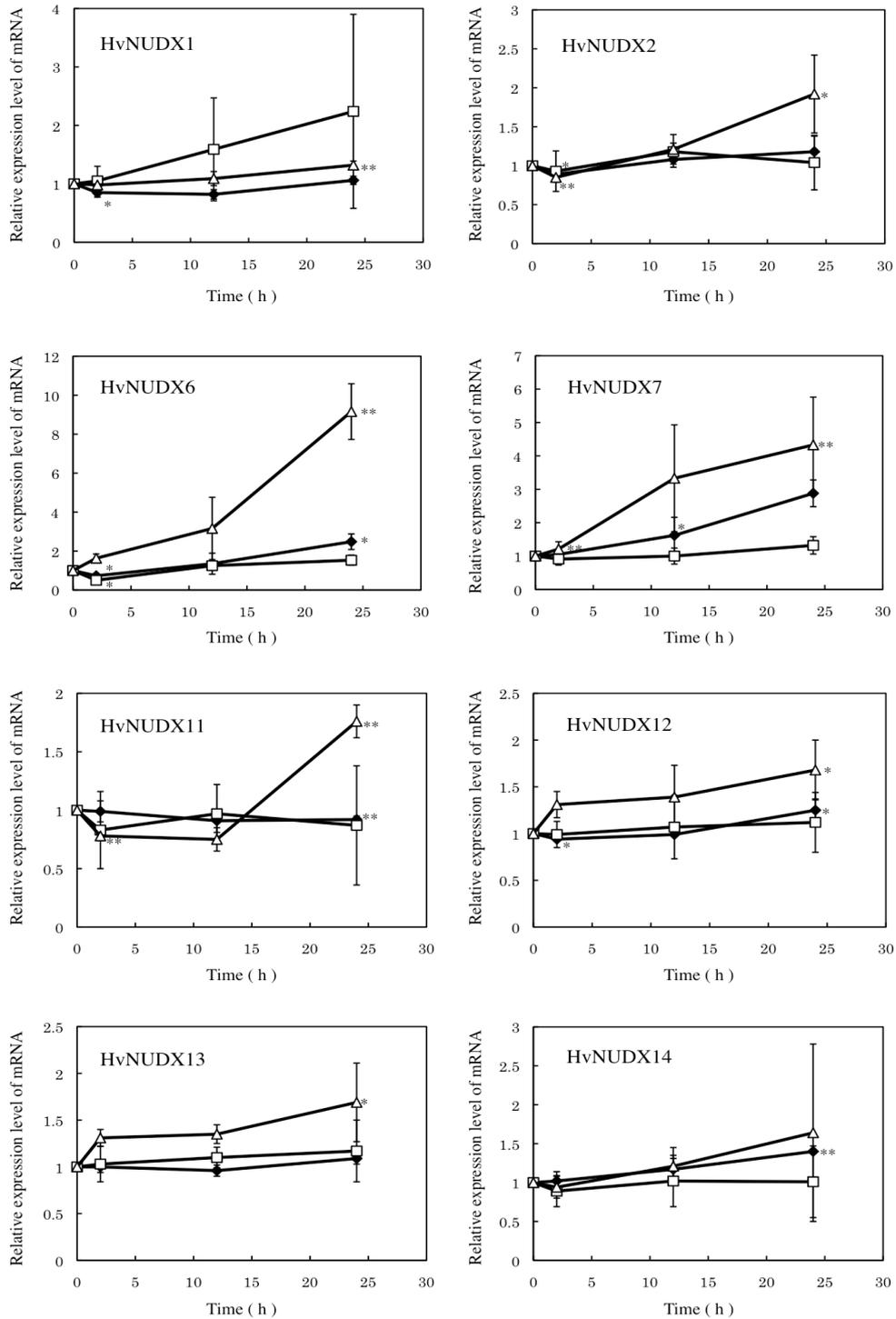
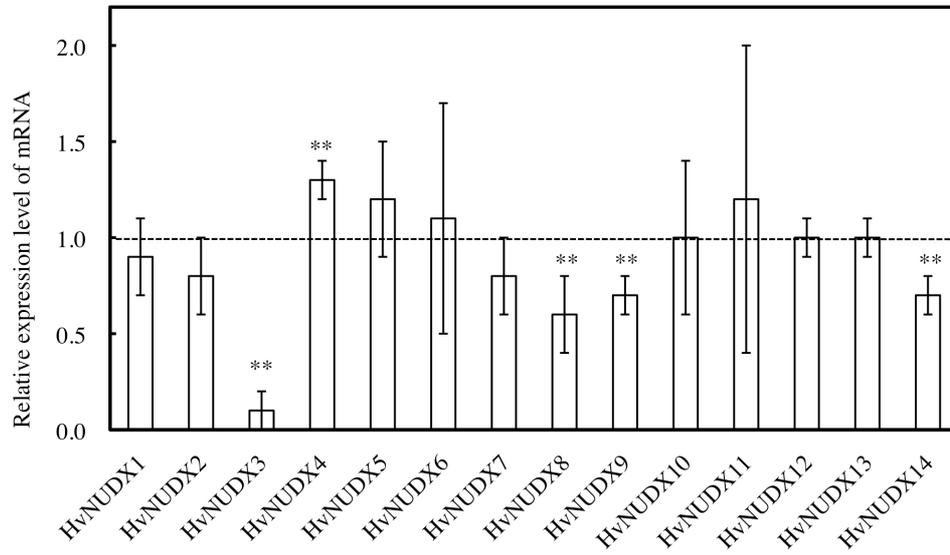


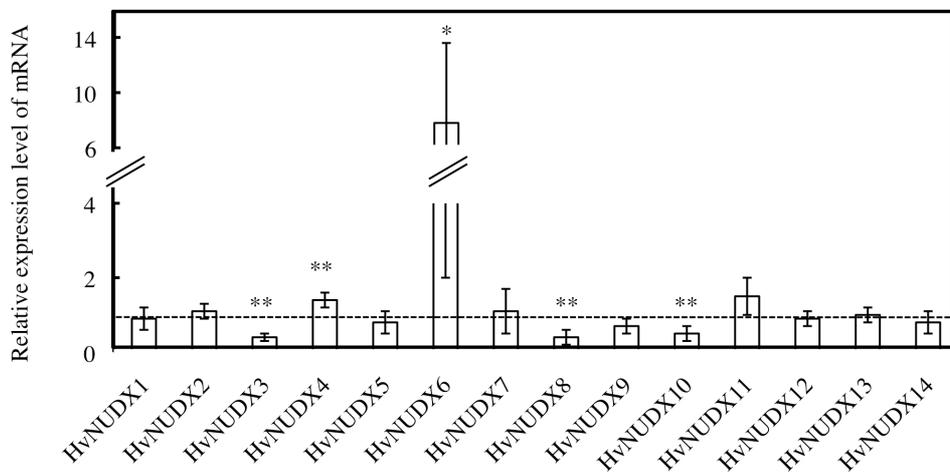
Fig. 6. Expression profiles of HvNUDX genes under abiotic stress.

Total RNAs isolated from shoots of barley under UV-C (◆), salinity (□), and drought (△) conditions were subjected to semi-quantitative RT-PCR. Expression levels were normalized with that of the α -Tubulin gene as an internal control. The error bar represents standard error of the mean for three experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

(A)



(B)



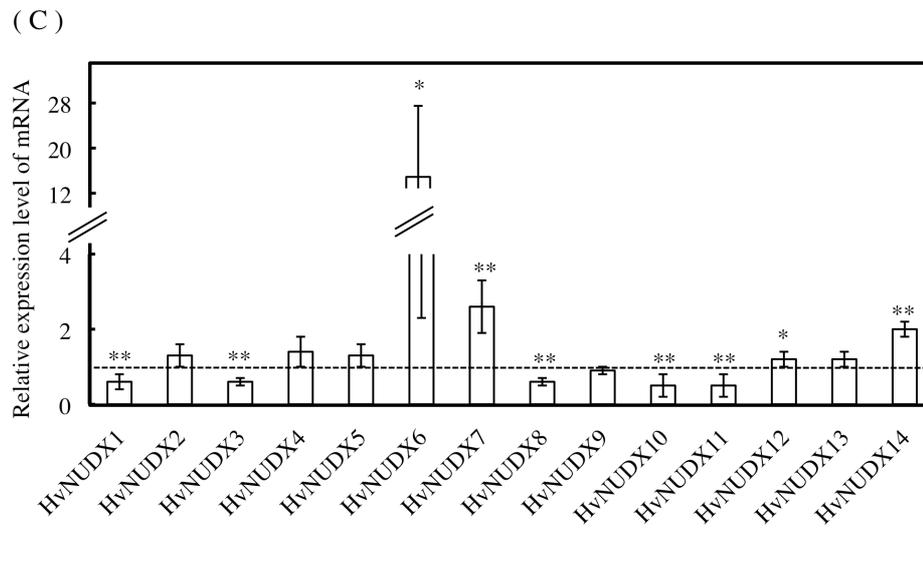


Fig. 7. Expression levels of HvNUDX genes under UV for 24 h by quantitative RT-PCR.

Total RNAs isolated from shoots of barley under UV-A (A), UV-B (B) and UV-C (C) for 0 and 24 h were subjected to quantitative RT-PCR. The levels were normalized with that of the α -tubulin gene as an internal control and relative expression levels of the genes in shoots under for 24 h were determined. The error bar represents standard error of the mean for three experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

第 4 章 UV-C で誘導されるオオムギ由来 Nudix hydrolase 遺伝子のクローニングと機能解析

第 1 節 目的

14 種類の *HvNUDX* を単離し、これらの遺伝子がストレスの種類によって応答性が異なることと、UV-C 照射によって *HvNUDX*6、7、12、14 の遺伝子が発現増加することを明らかにした。本研究ではこれら 4 種類の *HvNUDX* のクローニングを行い、大腸菌で発現させ、酵素科学的諸性質を明らかにし、*HvNUDX* と相同性を示すシロイヌナズナ由来 *AtNUDX* の諸性質と比較することを目的とした。

第 2 節 材料と方法

2-1 オオムギ由来 Nudix hydrolase 遺伝子のクローニングと 発現タンパクの精製

*HvNUDX*6、7、12、14 の ORF を、コントロールのオオムギ幼芽 1st strand cDNA として Table 5 に示すプライマーを用いて増幅した。得られた PCR 産物を pGEM-T vector (Promega) にライゲーションし、*E. coli* DH5 α (Takara) へ形質転換後 LB 寒天培地 (50 μ g / ml ampicillin、0.1 mM IPTG、40 μ g / ml X-gal) に植菌し、37°C で 16 時間培養した。その後、QIA prep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用いプラスミドを抽出した。各プラスミドを制限酵素処理して単離したフラグメントを、*HvNUDX*6 は pET20b (+) ベクター (Novagen) に挿入し、*HvNUDX*7、12、14 は pCold I ベクター (Takara) に挿入し、*E. coli* BL 21 (Takara) へ形質転換

した。

プラスミド pET20b (+) / HvNUDX6 あるいは pCold I / HvNUDX7、12、14 を保持する *E.coli* を LB 液体培地 (50 μ g/ml ampicillin) を用い、 37 $^{\circ}$ C で OD₆₀₀ が 0.5 に達するまで培養し、最終濃度 0.5mM になるように IPTG を添加し pET20b (+) / HvNUDX6 形質転換体は 37 $^{\circ}$ C で 8 時間、 pCold I / HvNUDX7、12、14 形質転換体は 15 $^{\circ}$ C で 20 時間培養した。10,000 rpm で 20 分間集菌後、-80 $^{\circ}$ C に最低 30 分間保存した菌体に BagBusterTM HT protein extraction reagent (Novagen) を加え 100 rpm で 30 分間振とうし、細胞を溶解した。これを 13,000 rpm で 10 分間 4 $^{\circ}$ C で遠心分離し、上清を可溶性画分、沈殿を不溶性画分として回収した。

Ni-NTA カラム (Qiagen) を 0.5 M NaCl、5 mM imidazole を含む 20 mM Tris- HCl buffer (pH 8.0) で平衡化した。可溶性画分をロードし 60 mM imidazole を含む平衡化 buffer でカラムを洗浄し、1 M imidazole を含む平衡化 buffer で吸着タンパク質を溶出した。不溶性画分に移行した HvNUDX6、14 はそれぞれの buffer に 6M guanidine HCl を加え、可溶化した後にカラムへロードし、200 mM imidazole を含む平衡化 buffer で吸着タンパク質を溶出した。溶出した HvNUDX7、12、14 を 1 mM dithiothreitol (DTT)、100 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で透析し、HvNUDX6 は 0.5 % n-dodecyl- β -D-maltoside と 10 % ethylene glycol を加え、透析 buffer で透析した。4 $^{\circ}$ C で一晩透析した後にタンパク質液を Ultracent-30 (Tosho) で濃縮した。

2-2 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

0.1 % (w/v)SDS を含む 12 % (w/v)アクリルアミド濃度のスラブゲルより電気泳動を行い、泳動後のゲルは Coomassie brilliant blue R-250 により染色した。試料の添加と同時にマーカートンパク質を泳動し、これを用いてタンパク質の分子量を算出した。分子量マーカーはプレシジョン Plus スタンダード (Bio-Rad)を用いた。

2-3 タンパク質測定

タンパク質量の測定は Bradford 法により定量した (Bradford et al, 1976)。Bovine serum albumin (Fraction V) (Sigma-Aldrich)を標準物質として、分光光度計により 595nm における吸光度を測定した。

2-4 酵素活性測定

HvNUDX の加水分解活性は小川らの方法に基づいて測定した (Ogawa et al, 2005)。精製したタンパク質、100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5mM MgCl₂、10mM DTT、100-1000 μM 基質を含む総容量 100 μl を 37°C、10-30 分間インキュベーションした。100mM EDTA を 17 μl 加え反応を終結した。反応液 20μl を Cosmosil C₁₈ カラム (4.6×250mm、Nacalai Tesque) を使用して逆相 HPLC にて分析した。dGTP、dATP、dTTP、dCTP、NADH、AP₄A、AP₅A、UDP-gal、CoA、FAD を基質とした反応液は 73mM リン酸バッファー (pH 6.0)、20%メタノール、5mM TEAB を、8-oxo-dGTP と 8-oxo-dGDP を基質とした反応液は 100mM リン酸バッファー (pH 6.0)、5%メ

タノールを溶媒として用いて流速 0.6 ml/min で分析した。ADP-ribose を基質とした反応液は 0.05% TFA 含有水から、0.02% TFA 含有アセトニトリルが流速 0.5 ml/min で 20 分間で 8%となるように勾配して分析した。8-oxo-dGTP と 8-oxo-dGDP は 293 nm、dGTP は 252 nm、dCTP は 271 nm、dTTP は 264 nm、ADP-ribose、NADH、CoA、AP₄A、AP₅A、UDP gal は 260nm、ppGpp は 252nm の吸光度で反応生成物を測定した。8-oxo-dGTP、ADP-ribose の至適 pH は、Tris-HCl buffer (pH7-9)と Glycine-NaOH buffer (pH8.5-11)を用いて測定した。8-oxo-dGTP、ADP-ribose の反応速度は、それぞれ 2.5-25 μ M、20-400 μ M における K_m 値及び V_{max} を算出した。

2-5 *mutT* 欠損大腸菌における転写エラー相補性測定

HvNUDX12 の ORF を、オオムギ幼芽 1st strand cDNA と下記のプライマーを用いて増幅した。

HvNUDX12-*EcoRI*-F

5'-TCGAATTCATGGACTCGCCGCCCGAGGG-3'、

HvNUDX12-*XbaI*-R 5'-CATCTAGATTATGACGAAGCTGCTGGAT-3'

(イタリック体は制限酵素配列)。得られた PCR 産物を pGEM-T vector にライゲーションし、*E. coli* DH5 α へ形質転換後 LB 寒天培地 (50 μ g / ml ampicillin、0.1 mM IPTG 、 40 μ g / ml X-gal) に植菌し、37 $^{\circ}$ C で 16 時間培養した。その後、QIA prep Spin Miniprep Kit を用いプラスミドを抽出した。プラスミドを制限酵素処理して、単離したフラグメントを pTrc100 vector へ挿入してプラスミド pTrc100 / HvNUDX12 を作製した。pTrc100 と pTrc100 /

HvNUDX12 を *E. coli* CC101 株野生型と 8-oxo-dGTP 加水分解能が欠如した *mutT* 欠損 CC101T 株へ形質転換した。形質転換後、LB 寒天培地 (50 µg / ml ampicillin、1 mM IPTG、0.5 mg / ml X-gal) で 37°C 16 時間培養した後 25°C で 2 日間静置させた。

β-ガラクトシダーゼ活性は Miller の方法により測定した (Miller, 1972)。pTrc100 あるいは pTrc100 / HvNUDX12 を保持する CC101 および CC101T 株を 50 µg / ml ampicillin 含む LB 液体培地に 1mM になるように IPTG を添加し、OD₆₀₀ が 1.0 になるまで 37°C で生育させた後、25°C で 2 日間静置させた。その後、細胞を超音波破碎装置で破碎し遠心分離を行い、上清を無細胞抽出液として得た。無細胞抽出液を *o*-nitrophenyl-β-D-galactoside とインキュベーションし、遊離した *o*-nitrophenol を分光光度計にて A_{420nm} の吸光度を測定した。

第 3 節 結果

3-1 HvNUDX の発現と基質特異性

局在部予測プログラム (PSORT) により HvNUDX6、7、12、14 はそれぞれクロロプラスト、プラストチド、サイトゾル、クロロプラストに局在すると予測されたが、シグナルペプチド予測プログラム (SignalP) によりいずれもトランジットペプチドの切断部位が予測できないことから、ORF 配列を大腸菌で発現させた。これらの組換え体 HvNUDX を Ni-NTA カラムで精製し、SDS-PAGE で確認した (Fig. 8)。組換え体 HvNUDX6、7、12、14 の SDS-PAGE での分子量はそれぞれ 23.4、30.5、18.8、20.2 kDa であり、アミノ酸配列から推定される分子量 23.5、29.4、19.0、19.4 kDa とほ

ば一致した。組換え体 HvNUDX の各基質に対する加水分解活性を測定した (Table 6)。ADP-sugar を特異的に加水分解する AtNUDX14 と 64% の相同性を示す組換え体 HvNUDX7 では 8-oxo-dGTP、8-oxo-dGDP、dTTP、NADH、ADP-ribose に対してそれぞれ、0.53、0.35、6.77、0.05、0.39 nmol/min/mg の加水分解活性を示した。AP₅A に対し最も高い加水分解活性を示す AtNUDX26 と 66% の相同性を示す組換え体 HvNUDX12 では 8-oxo-dGTP、8-oxo-dGDP、dGTP、dATP、dTTP、dCTP、NADH、ADP-ribose、AP₄A、AP₅A、CoA、に対して 18.3、17.3、19.7、16.0、21.7、30.2、0.96、1.97、1,071、676、10.4 nmol/min/mg の加水分解活性を示した。組換え体 HvNUDX6、14 は活性を示さなかった。

3-2 HvNUDX12 の至適 pH

組換え体 HvNUDX12 の 8-oxo-dGTP と ADP-ribose 加水分解活性に及ぼす pH の影響を検討した (Fig. 9)。8-oxo-dGTP 加水分解活性の至適 pH は 8.5 で、ADP-ribose の加水分解活性の至適 pH は 9.5 であった。

3-3 HvNUDX12 の反応速度論解析

組換え体 HvNUDX12 の反応速度論解析を行った。8-oxo-dGTP 加水分解活性の K_m と V_{max} 、 V_{max}/K_m はそれぞれ 698 μM 、714 nmol/min/mg、1.0 nmol/min/mg/ μM となった。ADP-ribose 加水分解活性の K_m と V_{max} 、 V_{max}/K_m はそれぞれ 759 μM 、103 nmol/min/mg、0.1 nmol/min/mg/ μM となった。

3-4 HvNUDX12 の転写エラー抑制作用

lacZ 遺伝子上の 461 コドンがアンバー変異し β -ガラクトシダーゼ活性を示さない大腸菌 CC101 株(野生型)に 8-oxo-dGTP 加水分解活性が欠損し、蓄積された 8-oxo-G が mRNA の転写に誤取り込みされることで、トランスバージョンの変異が生じ、 β -ガラクトシダーゼ活性を示す CC101T 株を pTrc100 / HvNUDX12 で形質転換し、X-gal 含有プレートで培養した。pTrc100 ベクター導入 CC101T は青色コロニーを形成したが、Trc100 / HvNUDX12 導入 CC101T は青色コロニー形成が抑制された。CC101T 株の β -ガラクトシダーゼ活性は、HvNUDX12 遺伝子の導入により約 73%有意に抑制された (Fig. 10)。

第 4 節 考察

ROS によって生じる DNA 内ヌクレオチドあるいはヌクレオチド前駆物質の酸化は突然変異、癌、老化などを引き起こす要因であると考えられている。このうち 8-oxo-dGTP は DNA 複製や転写の際にトランスバージョンの変異を引き起こす。哺乳類 NUDX である MTH1 は 8-oxo-dGTP を加水分解するため、酸化ヌクレオチドによる変異誘発を防ぐ機能を有することが示唆されている (Egashira et al, 2002)。植物では、シロイヌナズナ由来 AtNUDX1 が 8-oxo-dGTP に対して加水分解活性を示すことが見出されている (Yoshimura et al, 2007)。しかし、同定した 14 種類のオオムギ由来 NUDX には AtNUDX1 のホモログは存在しない。UV 照射は ROS を産生することで高分子の酸化傷害や細胞のアポトーシスを導く。(Kovacs et al, 2009, McMillan et al, 2008, Paz et al, 2008,

Wlaschek et al, 2001, Valacchi et al, 2012)。このうち UV-C は最もエネルギーが高く、変異原性や毒性を示し、生物学的にあらゆる生命体に障害を与える可能性がある (Hussein, 2005, Afaq et al, 2001)。特に DNA は塩基部分が酸化され損傷を受けるが、グアニンが最も酸化を受けやすい。そこで DNA ダメージの高い UV-C で発現が誘導される NUDX にストレス除去機能があることを期待して組換え体 HvNUDX6、7、12、14 の 8-oxo-dGTP 加水分解活性を検討した。その結果、ADP-sugar pyrophosphohydrolase と AP₄A pyrophosphohydrolase に属する組換え体 HvNUDX7、12 は酸化ヌクレオチドである 8-oxo-dGTP、8-oxo-dGDP や糖ヌクレオチドである ADP-ribose に対しても加水分解活性を示した。活性を示さなかった組換え体 HvNUDX6、14 は Fig.9 より、沈殿画分に移行し、グアニジン塩酸塩で変性し可溶化操作を行った際に酵素が失活した可能性がある。これらに関しては、グルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質精製システム等を利用した、別の手法による精製を検討する必要があると考えられる。組換え体 HvNUDX12 の 8-oxo-dGTP の加水分解活性は組換え体 HvNUDX7 と比べ約 35 倍高い活性を示したことから、組換え体 HvNUDX12 は酸化ヌクレオチド除去で中心的な役割を果たすことが考えられる。さらに、組換え体 HvNUDX12 の 8-oxo-dGTP および ADP-ribose の加水分解活性の酵素学的な解析を行ったところ、それぞれの至適 pH は 8.5 と 9.5 であり、8-oxo-dGTP の V_{max} は ADP-ribose に比べ約 7 倍高い値を示した。基質により異なる至適 pH を示すことは細胞内の様々なストレス条件下で生じるヌクレオチドの種類によって選択的な代謝や制御を行うことが示唆される。これまでに

哺乳類の卵巣細胞から単離した 30 kDa タンパク質とヒト由来線維芽細胞から単離した 18kDa タンパク質の 8-oxo-dGTPase 活性の至適 pH は 8.5 であることが報告されている (Bialkowski et al, 1998)。よって、本研究の結果と一致した。HvNUDX12 のホモログである AtNUDX26 は葉緑体に局在する (AGI code: Atg10620)が、PSORT では、HvNUDX12 はサイトゾルに局在することが予測された。よって NUDX は植物の種によって局在が異なることを示唆した。以上の結果から HvNUDX12 は酸化ストレスによって生じたサイトゾル中の 8-oxo-dGTP を加水分解する機能が考えられる。また HvNUDX12 は A:T から CG へのトランスバージョンの変異を低下させたことから HvNUDX12 は UV-C などのストレスで生じる酸化ヌクレオチドを加水分解し、変異の発生を抑制する機能を有することが示唆された。

Table 5. Primers for expression of HvNUDX genes.

Gene	Forward* (5' => 3')	Reverse* (5' => 3')	Created restriction site
HvNUDX6	<i>CCCATGGCATCGGAGAAGCTCGTCGCCA</i>	<i>CTGTCGACGCACAGCGCCACCGCTCGAT</i>	<i>NcoI / SalI</i>
HvNUDX7	<i>TGCATATGGCCTCGACGGACGCGCCACA</i>	<i>TCTCTAGAGATAACGAACTATGGCCCGT</i>	<i>NdeI / XbaI</i>
HvNUDX12	<i>TCCTCGAGATGGACTCGCCGCCGAGGG</i>	<i>CATCTAGATTATGACGAAGCTGCTGGAT</i>	<i>XhoI / XbaI</i>
HvNUDX14	<i>TTCATATGGAAGGGAAGGAGCCTGCCAC</i>	<i>AATCTAGACTAAGCTGTGTACCCTACTT</i>	<i>NdeI / XbaI</i>

*Created restriction site was shown by italic letters.

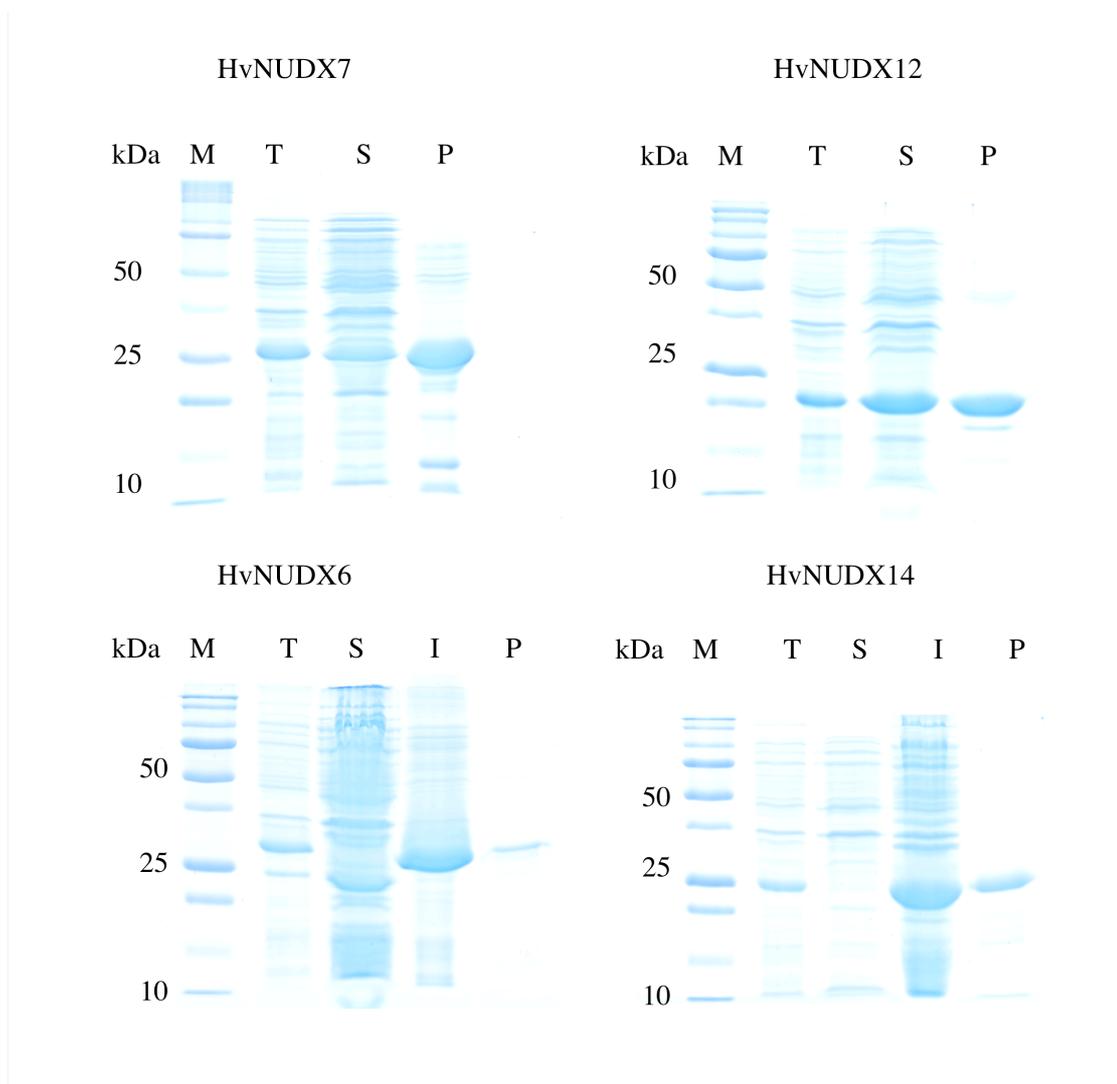


Fig. 8. Analysis of the expression of barley HvNUDX in *E. coli* cells by SDS-PAGE.

Total cell lysate (lane T), soluble protein (lane S), insoluble protein (lane I), following Ni-NTA column chromatography (lane P). Gels were obtained using 12% SDS-PAGE with molecular mass marker series (lane M) for calibration, with detection by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining.

Table 6. Substrate specificities of HvNUDX proteins.

Substrate	HvNUDX6	HvNUDX7	HvNUDX12	HvNUDX14
8-oxo-dGTP	N.D.	0.53	18.3	N.D.
8-oxo-dGDP	N.D.	0.35	17.3	N.D.
dGTP	N.D.	N.D.	19.7	N.D.
dATP	N.D.	N.D.	16.0	N.D.
dTTP	N.D.	6.77	21.7	N.D.
dCTP	N.D.	N.D.	30.2	N.D.
NADH	N.D.	0.05	0.96	N.D.
ADP-ribose	N.D.	0.39	1.97	N.D.
AP ₄ A	N.D.	N.D.	1,071	N.D.
AP ₅ A	N.D.	N.D.	676	N.D.
UDP-Gal	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
CoA	N.D.	N.D.	10.4	N.D.
FAD	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

activity; nmo l/ min / mg

N.D. ; not detected.

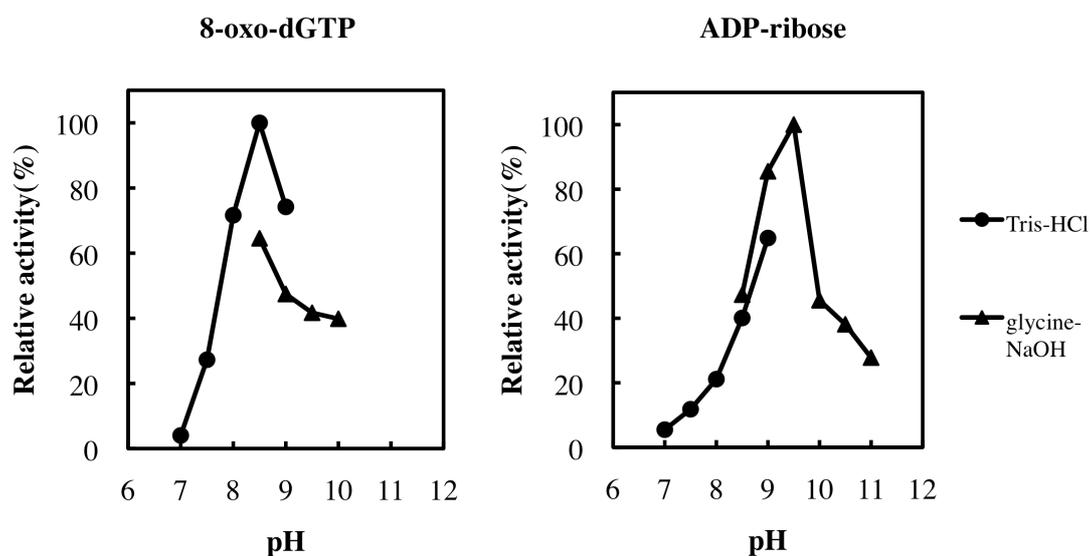


Fig. 9. Effect of pH on 8-oxo-dGTP and ADP-ribose pyrophosphohydrolase activity of HvNUDX12.

Hydrolysis of 8-oxo-dGTP and ADP-ribose. The reaction mixtures (100 μ l) contained 20 μ g of HvNUDX12 protein and 100 μ M 8-oxo-dGTP or ADP-ribose and the mixture was incubated at 37°C for 30 min in 100mM Tris buffer (pH 7-9), filled circle, or in 100mM glycine buffer (pH 8.5-10 or 11), filled triangle.

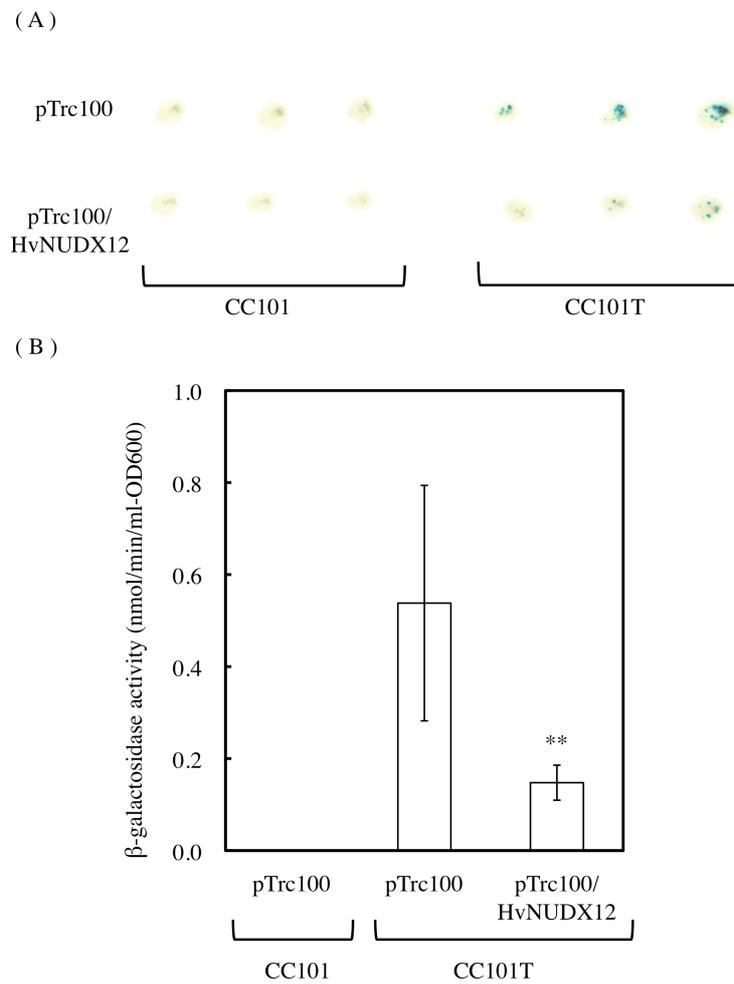


Fig. 10. Suppression of transcriptional errors by expression of HvNUDX12.

(A) *E.coli* cells CC101 and CC101T harboring pTrc100 and pTrc100/HvNUDX12 were grown on LB medium plate containing X-gal. (B) β -galactosidase activity in the cell-free extracts of *E.coli* cells CC101 and CC101T harboring pTrc100 and pTrc100/HvNUDX12. The error bar represents the standard error of the mean for six independent colonies. ** $p < 0.01$.

第 5 章 HvNUDX12 の基質特異性発現に関与するドメイン

第 1 節 目的

HvNUDX12 は酸化ヌクレオチドと ADP-ribose 加水分解を示し転写エラーを抑制する。しかし、HvNUDX12 と 66%の相同性を示す AtNUDX26 は酸化ヌクレオチドに加水分解活性を示すが ADP-ribose に対する活性や転写エラー抑制を示さないことから、Fig.13 に示した ADP-ribose pyrophosphatase サブファミリーで保存されている Nudix motif 下流のプロリン残基をアラニンに変異した HvNUDX12-P81A を作製した。さらに HvNUDX12 と AtNUDX26 のタンパク質の二次構造を予測したところ C 末領域の構造が異なることが示唆された (Fig. 14-15)。このことから、HvNUDX12 と AtNUDX26 の N 末端と C 末端を置換したキメラ酵素 (HvNUDX12-N/AtNUDX26-C、AtNUDX26-N/HvNUDX12-C) を作製し、HvNUDX12 の構造と機能を明らかにする目的で、これらのドメイン構造が酵素反応に与える影響を検討した。

第 2 節 材料と方法

2-1 部位特異的変異導入 HvNUDX12 の作製

HvNUDX12 の 81 番目プロリン残基 (Fig. 13) をアラニンに変異させるために、プラスミド pGEM-T/HvNUDX12 を鋳型に、5'-TGATTTCGCCGCGGATGTCAAAGACAA-3' と 5'-TCCGCGGCGAAATCATATGTCAACCAA-3' (下線は変異塩基) をプライマーに、PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (Takara) を用いて変異導入した。反応液はプラスミド 100 pg、10 μ M 正方向プライマー、10 μ M

逆方向プライマー 1 μl 、2×PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (Takara) 25 μl 、DW で全量 50 μl とした。反応は [98°C 10 秒、55°C 15 秒、72°C 20 秒] を 30 サイクル行った。得られた PCR 産物を単離して制限酵素処理により単離した ORF 領域を pCold I ベクターに挿入し、部位特異的変異 HvNUDX12 遺伝子 (*HvNUDX12-P81A*) を構築した。ABI 3100 Avant DNA sequencer により *HvNUDX12-P81A* の塩基配列を確認した。

2-2 AtNUDX26 遺伝子のクローニングと HvNUDX12 キメラ

酵素の作製

A. thaliana Columbia 種子を MS 培地で 2 週間栽培した葉から RNeasy® Plant Mini Kit を用いて Total RNA を抽出した。Total RNA から oligo (dT) プライマーと Prime Script RT Master Mix により合成した 1st strand cDNA と下記のプライマーを用いて PCR を行った。

AtNUDX26-*Nde*I-F

5'-CTCATATGGAATCTCCTCCGAAGGAT-3'、

AtNUDX26-*Xba*I-R

5'-AAACAGAGAGTCTAGATTTTCGATTTAT-3' (イタリック体は制限酵素配列)。得られた PCR 産物を pGEM-T vector にライゲーションし、*E. coli* DH5 α へ形質転換後 LB 寒天培地 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin、0.1 mM IPTG、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Xgal) に植菌し、37°C で 16 時間培養した。その後、QIA prep Spin Miniprep Kit を用いプラスミドを抽出した。プラスミドを制限酵素処理して単離したフラグメントを、pCold I ベクターに挿入し、*E. coli* BL 21 (DE3) pLysS

(STRATAGENE)へ形質転換した。

キメラ酵素の作製は、はるな二条のオオムギ幼芽と *A. thaliana* Columbia の葉の 1st strand cDNA を鋳型として Table 7 に示すプライマーを用いて増幅した。得られた PCR 産物を pGEM-T vector にライゲーションし、*E. coli* DH5 α へ形質転換後 LB 寒天培地 (50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ ampicillin、0.1 mM IPTG、40 $\mu\text{g} / \text{ml}$ X-gal)に植菌し、37°C で 16 時間培養した。その後、QIA prep Spin Miniprep Kit を用いプラスミドを抽出した。ABI 3100 Avant DNA sequencer により *AtNUDX26-N*、*AtNUDX26-C* の塩基配列を確認した。各プラスミドを制限酵素処理して単離したフラグメントを、pCold I ベクターに挿入し、HvNUDX12 キメラ遺伝子 HvNUDX12-N / *AtNUDX26-C*、*AtNUDX26-N* / HvNUDX12-C を構築した (Fig. 11)。

2-3 *AtNUDX26*、変異 HvNUDX12、HvNUDX12 キメラ遺伝

子の発現とタンパク質精製

pCold I / HvNUDX12-P81A、pCold I / HvNUDX12-N / *AtNUDX26-C* で形質転換した *E. coli* BL21 と pCold I / *AtNUDX26*、pCold I / *AtNUDX26-N* / HvNUDX12-C で形質転換した *E. coli* BL21 (DE3) pLysS は第 4 章 2-1 と同様の方法で培養し、10,000 rpm で 20 分間集菌後、-80°C に最低 30 分間保存した菌体に BagBuster™ HT protein extraction reagent を加え 100 rpm で 30 分間振とうし、細胞を溶解した。これを 13,000 rpm で 10 分間 4°C で遠心分離し、上清を可溶性画分として回収した。

Ni-NTA カラムを 0.5 M NaCl、5 mM imidazole を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で平衡化した。可溶性画分をロードした後に

60 mM imidazole を含む平衡化 buffer でカラムを洗浄し、1 M imidazole を含む平衡化 buffer で吸着タンパク質を溶出した。溶出した AtNUDX26、HvNUDX12-P81A、HvNUDX12-N / AtNUDX26-C、AtNUDX26-N / HvNUDX12-C を 1 mM dithiothreitol (DTT)、100 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で透析した。4°C で一晩透析した後にタンパク質液を Ultracent-30 で濃縮した。

2-4 SDS-PAGE

第 4 章 2-1 と同様の方法で泳動し、染色した。

2-5 タンパク質測定

第 4 章 2-3 と同様の方法でタンパク質量を測定した。

2-6 酵素活性測定

第 4 章 2-4 と同様の方法で測定した。Guanosine-3',5'-tetraphosphate (ppGpp) を基質とした反応液は 73mM リン酸バッファー (pH 6.0)、21%メタノール、5mM TEAB を溶媒として用いて流速 0.6 ml/min で分析した。ppGpp は 252nm の吸光度で反応生成物を測定した。

第 3 節 結果

3-1 部位特異的変異導入変異 HvNUDX12 の加水分解活性

大腸菌で発現させた HvNUDX12-P81A を Ni-NTA カラムで精製し、SDS-PAGE で確認した (Fig.12)。SDS-PAGE で測定した分子量は

19.1 kDa であり、アミノ酸配列から推定される分子量 19.0 kDa とほぼ一致した。HvNUDX12-P81A の加水分解活性を HPLC で測定したところ、HvNUDX12 で加水分解活性を示した dCTP、NADH、CoA については活性を示さなかった。8-oxo-dGTP、8-oxo-dGDP、dGTP、dATP、dTTP、ADP-ribose、AP₄A、AP₅A、FAD、ppGpp に対して 20.7、22.2、9.52、9.98、7.39、1.82、552、121、7.50、153 nmol/min/mg の加水分解活性を示した。ADP-ribose の加水分解活性は HvNUDX12 と比較して同等であり、ppGpp の加水分解活性は HvNUDX12 に比べ半分に減少した。dGTP、dATP、dTTP に関しては HvNUDX12 と比べそれぞれ 52%、38%、66%加水分解活性が低下した (Table 8)。

3-2 HvNUDX12 キメラ酵素の加水分解活性

8-oxo-dGTP 加水分解活性を示す *E.coli* MutT の立体構造解析より、2 つのグリシン残基 (G38、G59)、4 つのグルタミン酸残基 (E44、E53、E56、E57)、1 つのアルギニン残基 (R52) が活性に重要なアミノ酸残基であることが示されている (Nakamura et al, 2010)。AP₄A pyrophosphatase の活性モチーフは Nudix motif 下流のチロシン残基であることが報告されている (Dunn et al, 1999)。HvNUDX12 と AtNUDX26 はいずれもこれらの残基を保存している (Fig. 13)。そこで HvNUDX12 と AtNUDX26 の二次構造を予測したところ (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)、HvNUDX12 には 4 個の β -ストランド (S1-4) と 5 個の α -ヘリックス (H1-5) が存在し、AtNUDX26 は 4 個の β -ストランド (S1-4) と 5 個の α -ヘリックス (H1-5) が存在する他に 1 個の β -ストランド (S5) が H3 に隣接し

て存在した (Fig. 14)。また、Chou-Fasman 法 (Chou and Fasman, 1974)による二次構造予測でも AtNUDX26には S5に相当する領域が確認できた (Fig. 15)。そこで C 末領域の二次構造の違いが HvNUDX12 と AtNUDX26 の基質特異性や酵素活性に関与していることを確認するために、HvNUDX12 の C 末領域を AtNUDX26 の C 末領域に置換した HvNUDX12-N / AtNUDX26-C と HvNUDX12 の C 末領域を AtNUDX26 の C 末領域に置換した AtNUDX26-N / HvNUDX12-C を作製した。大腸菌で発現させた AtNUDX26、HvNUDX12-N / AtNUDX26-C および AtNUDX26-N / HvNUDX12-C を Ni-NTA カラムで精製し、SDS-PAGE で確認した。AtNUDX26、HvNUDX12-N / AtNUDX26-C および AtNUDX26-N / HvNUDX12-C の SDS-PAGE で測定した分子量はそれぞれ 17.8、21.5、18.9 kDa であり、アミノ酸からの推定分子量 18.7、19.4、19.1 kDa とほぼ一致した (Fig. 12)。これらの加水分解活性を HPLC で測定したところ、AtNUDX26 は NADH、ADP-ribose、UDP-galactose、FAD に対して活性を示さなかったが、8-oxo-dGTP、8-oxo-dGDP、dGTP、dATP、dTTP、dCTP、AP₄A、AP₅A、CoA、ppGpp に対して 29.7、28.5、15.7、14.4、19.3、47.3、659、303、38.4、213 nmol/min/mg の加水分解活性を示した。C 末端領域を AtNUDX26 と置換した HvNUDX12-N / AtNUDX26-C は、dGTP、dATP、dTTP、dCTP、UDP-gal、FAD に対して活性を示さなかったが、8-oxo-dGTP、8-oxo-dGDP、NADH、ADP-ribose、AP₄A、AP₅A、CoA、ppGpp に対して 6.83、20.7、0.07、0.39、167、37.6、16.5、108 nmol/min/mg の加水分解活性を示した。N 末端領域を AtNUDX26 と置換した AtNUDX26-N / HvNUDX12-C は、dCTP、NADH、ADP-ribose、UDP-galactose、

FAD に対して活性を示さなかったが、8-oxo-dGTP、8-oxo-dGDP、dGTP、dATP、dTTP、AP₄A、AP₅A、CoA、ppGpp に対して 15.3、16.7、11.6、6.43、11.5、588、342、22.1、183 nmol/min/mg の加水分解活性を示した。HvNUDX12-N / AtNUDX26-C の 8-oxo-dGTP に対する活性は HvNUDX12 より 63%低下するが、8-oxo-dGDP 加水分解活性は HvNUDX12 と同等であった。また、HvNUDX12-N / AtNUDX26-C は dGTP、dATP、dTTP に対する活性は消失したが AtNUDX26-N / HvNUDX12-C は活性を示し、AP₄A、AP₅A、ppGpp に対する活性が AtNUDX26 と同等であった (Table 8)。

第 4 節 考察

シロイヌナズナには 28 種類の AtNUDX が存在し、それぞれの基質特異性や機能は異なっている。そのうち HvNUDX12 と 66% 相同性を示し HvNUDX12 と同様に AP₄A pyrophosphohydrolase のサブファミリーに分類される AtNUDX26 は、葉緑体に局在し、AP₄A だけでなく酸化ヌクレオチド、CoA、ppGpp に対しても加水分解活性を示すが、ADP-ribose に対する活性や転写エラー抑制作用を示さない。(Ogawa et al, 2008)。一方、HvNUDX12 は酸化ヌクレオチドと ADP-ribose 加水分解活性を示し、転写エラーを抑制する。このことから、HvNUDX12 の構造と機能との関係を明らかにするために ADP-ribose pyrophosphatase サブファミリーで保存される ADP-ribose 加水分解活性の活性中心のアミノ酸である 81 番目プロリン残基をアラニン残基へ変異した HvNUDX12-P81A と、HvNUDX12 と AtNUDX26 のタンパク質の二次構造の C 末領域が異なることから、N 末端から Nudix motif までの N 末領域と Nudix

motif から C 末端までの C 末領域をそれぞれ置換したキメラ酵素を作製して、基質特異性の変化を検討した。その結果、HvNUDX12-P81A の ADP-ribose への加水分解活性は組換え体 HvNUDX12 と同等であったが、ppGpp に対する活性は組換え体 HvNUDX12 に比べ半分に減少した (Table 8)。これまでに ADP-ribose pyrophosphatase サブファミリーに分類される NUDX は Nudix motif 下流のプロリン残基であることが報告されているが (Dunn et al, 1999)、今回の結果から、HvNUDX12 の ADP-riboses 加水分解活性には ADP-ribose pyrophosphatase サブファミリーとは異なりプロリン残基は重要でないが ppGpp 加水分解活性に関与していることが明らかとなった。HvNUDX12-N / AtNUDX26-C は 8-oxo-dGTP 加水分解活性が組換え体 HvNUDX12 の 33% に低下したが、AtNUDX26-N / HvNUDX12-C では大きな変化は無かった。また、AtNUDX26-N / HvNUDX12-C は HvNUDX12-N / AtNUDX26-C と比較して AP₄A、AP₅A、ppGpp 加水分解活性はそれぞれ、3.5 倍、9.1 倍、1.7 倍高い活性を示した (Table 8)。これらの結果から、HvNUDX12 の C 末領域は 8-oxo-dGTP、AP₄A、ppGpp 加水分解活性に重要であり、AtNUDX26 とは異なる構造が活性に関与していることを明らかにした。

Table 7. Primers for expression of HvNUDX12 and AtNUDX26 genes.

Gene	Forward* (5' => 3')	Reverse* (5' => 3')	Created restriction site
HvNUDX12	TCCTCGAGATGGACTCGCCGCCGAGGG	CATCTAGATTATGACGAAGCTGCTGGAT	<i>XhoI / XbaI</i>
AtNUDX26-N	GGAGCTCATGGAATCTCCTCCTGAAGGA	GACAGCTGCTCTGGATCTTCACCTTCG	<i>SacI / PvuII</i>
AtNUDX26-C	AGCAGCTGTCATGAGAGAGCTTAAAGA	AAACAGAGAGTCTAGATTTCGATTAT	<i>PvuII / XbaI</i>

*Created restriction site was shown by italic letters.

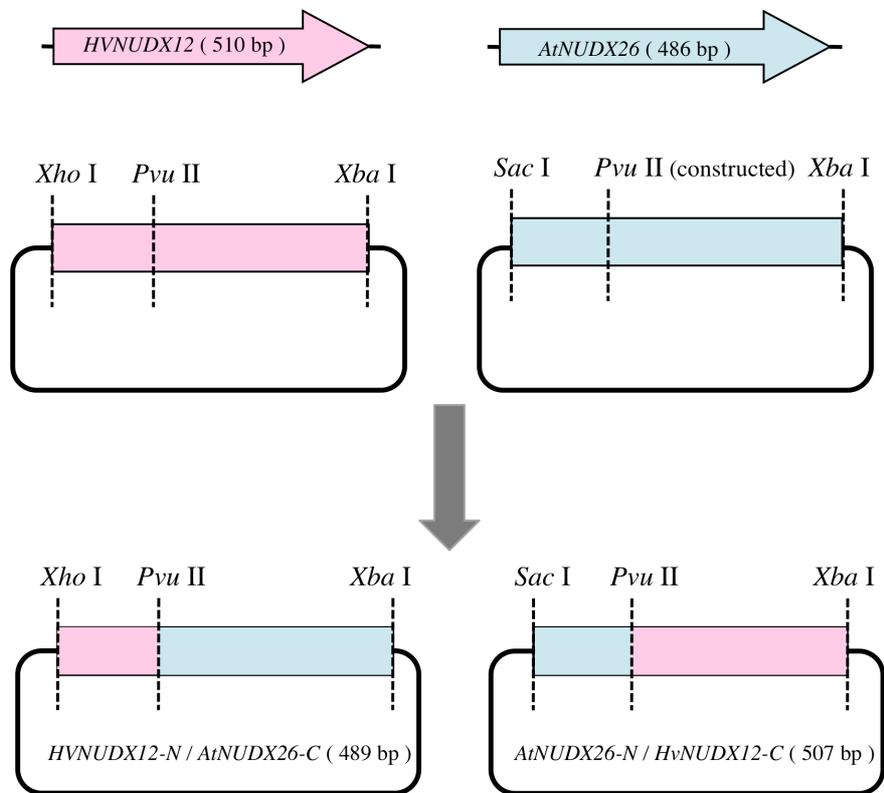


Fig. 11. Construction of *HvNUDX12-N / AtNUDX26-C* and *AtNUDX26-N / HvNUDX12-C*.

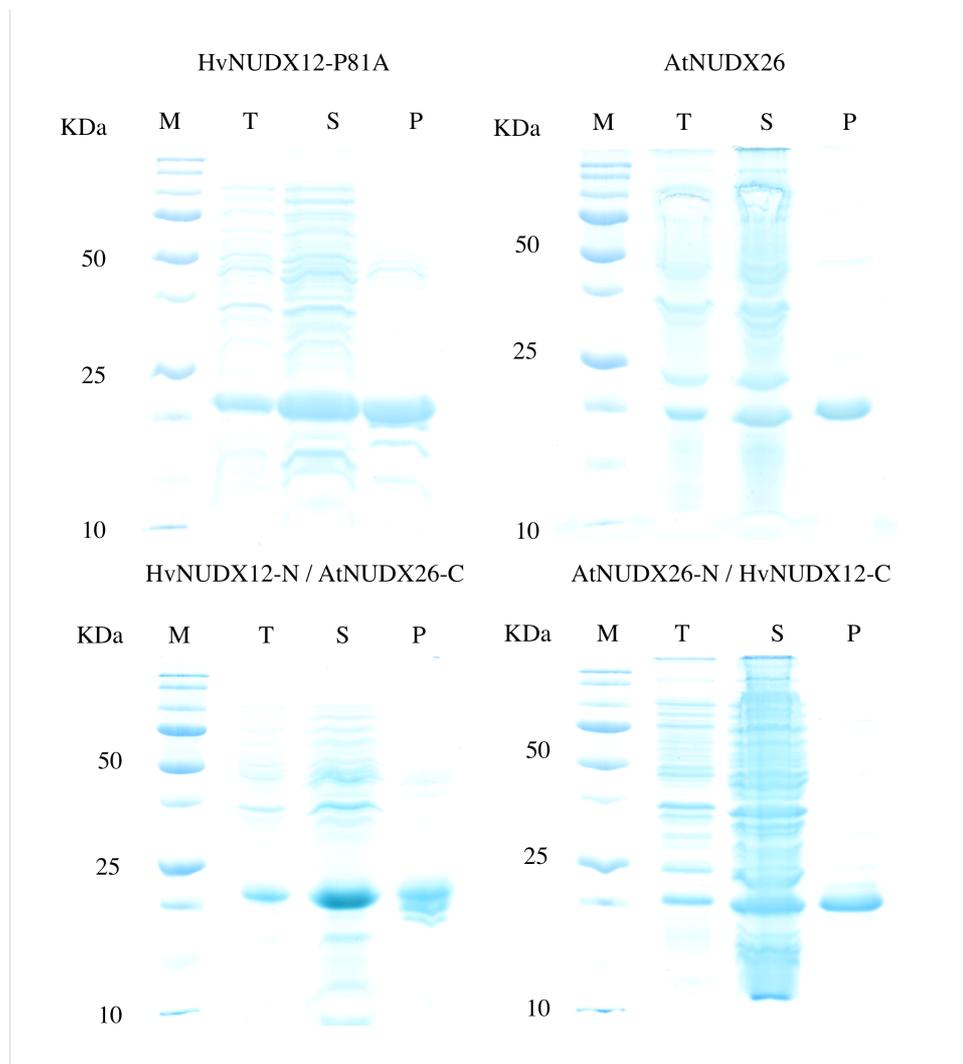


Fig. 12. Analysis of the expression of mutant or chimeric HvNUDX12 and AtNUDX26 in *E. coli* cells by SDS-PAGE.

Total cell lysate (lane T), soluble protein (lane S), purified protein (lane P), following Ni-NTA column chromatography. Gels were obtained using 12% SDS-PAGE with molecular mass marker series (lane M) for calibration, with detection by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining.

Table 8. Substrate specificities of AtNUDX26 , mutant or chemic HvNUDX12 proteins.

Substrate	AtNUDX26	HvNUDX12	HvNUDX12- P81A	HvNUDX12-N / AtNUDX26-C	AtNUDX26-N / HvNUDX12-C
8-oxo-dGTP	29.7	18.3	20.7	6.83	15.3
8-oxo-dGDP	28.5	17.3	22.2	20.7	16.7
dGTP	15.7	19.7	9.52	N.D.	11.6
dATP	14.4	16.0	9.98	N.D.	6.43
dTTP	19.3	21.7	7.39	N.D.	11.5
dCTP	47.3	30.2	N.D.	N.D.	N.D.
NADH	N.D.	0.96	N.D.	0.07	N.D.
ADP-ribose	N.D.	1.97	1.82	0.39	N.D.
AP ₄ A	659	1,071	552	167	588
AP ₃ A	303	676	121	37.6	342
UDP-Gal	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
CoA	38.4	10.4	N.D.	16.5	22.1
FAD	N.D.	N.D.	7.50	N.D.	N.D.
ppGpp	213	324	153	108	183

activity; nmol / min / mg
N.D. ; not detected.

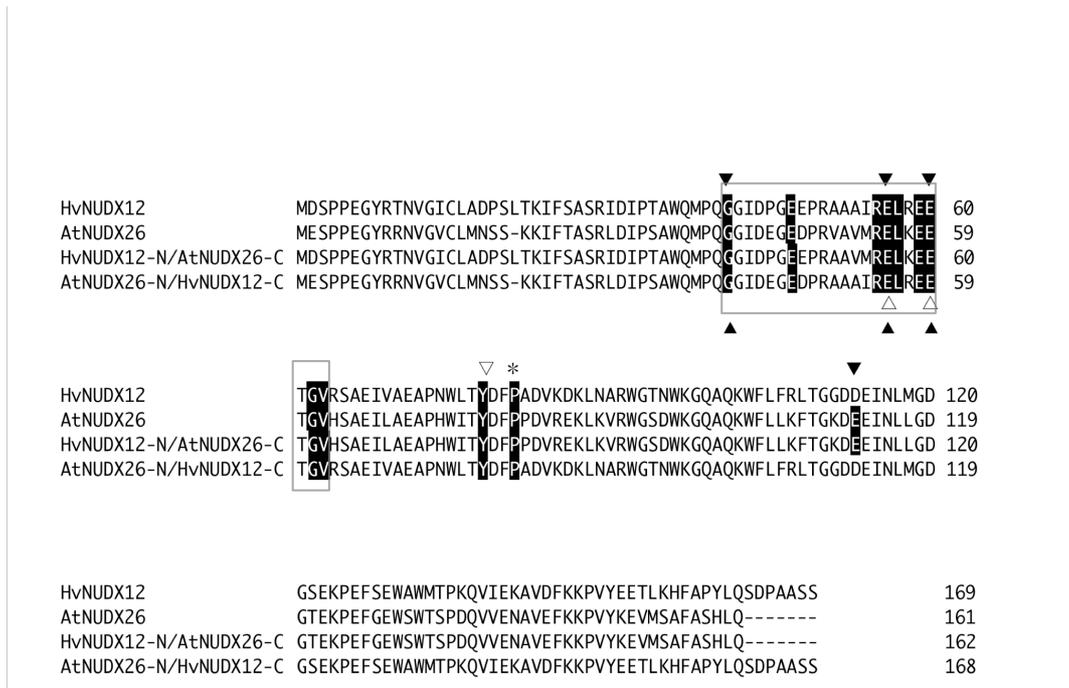


Fig. 13. Alignment of amino acid sequences among HvNUDX12, AtNUDX26, HvNUDX12-N / AtNUDX26-C, AtNUDX26-N / HvNUDX12-C.

The gray box indicates the Nudix motif. The black down-pointing triangles denote the motif of human ADP-ribose pyrophosphatase (ADPRase) subfamily (Zha et al, 2008). The black triangles denote the motif of *E.coli* 8-oxo-dGTPase subfamily (Shimokawa et al, 2000). The white down-pointing triangles denote the motif of human 8-oxo-dGDPase subfamily (Arimori et al, 2011). The white triangles denote the motif AP₄A subfamily (Dunn et al, 1999). The asterisk denotes the motif of ADPRase subfamily (Dunn et al, 1999).



Fig. 14. Prediction of 2nd-structure.

The position of secondary structure elements: β -strands (yellow arrows), α -helices (pink cylinders) were shown on HvNUDX12, AtNUDX26, HvNUDX12-N / AtNUDX26-C and AtNUDX26-N / AtNUDX26-C sequences. The green asterisks indicate the amino acids of Nudix motif.

```

HvNUDX12
MDSPPGEGYRTNVGICLADPSLTKIFASASRIDIPTAWQMPQCGIDPGDEPRAAAIRELREET
helix
strand <-----> <-----> <-----> <----->
turns T T T EEEEEEE EEEE EEEEEEEEEEE T TT T T T
TCVRSAEIVAEAPNWLTYDFPADVKDKLNARWGTNWKGOAQKWFRLTGGDDEINLMGD
helix
strand <-----> <-----> <-----> <----->
turns T EEEEE T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T
GSEKPEFSEWAWMTPKQVIEKAVDFKPKVYEEETLKHFAFAPYLQSDPAASS
helix
strand <-----> <----->
turns T EEEEEEEEEEE EEEEEEEEEEEEEEE TT

AtNUDX26
MESPPGEGYRRNVGCLMNSSKKIFTASRLDIPSAWQMPQCGIDEGEDPRVAVMRELREET
helix
strand <-----> <-----> <-----> <----->
turns T T T EEEEE EE EEEEEEEEEEE T T T T T T T T EEEEE T
GVHSAEILAEAPHWITYDFPPDVREKLVKRWGSDWKGOAQKWFLLKFTGKDEEINLLGD
helix
strand <-----> <-----> <-----> <----->
turns T EEEEE T T EEEE EEEEEEEEEEEEE EEE T T T T T T T T T
TEKPEFGESWTSPPDQVVENAVEFKPKVYKEVMSAFASHLQ
helix
strand <-----> <----->
turns TT TTT T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T

HvNUDX12-N/AtNUDX26-C
MDSPPGEGYRTNVGICLADPSLTKIFASASRIDIPTAWQMPQCGIDPGDEPRAAVMRELREET
helix
strand <-----> <-----> <-----> <----->
turns T T T EEEEE EEEE EEEEEEEEEEE T TT T T T T T T T T T
TCVHSAEILAEAPHWITYDFPPDVREKLVKRWGSDWKGOAQKWFLLKFTGKDEEINLLGD
helix
strand <-----> <-----> <-----> <----->
turns T EEEEE T T EEEE EEEEEEEEEEEEE EEE T T T T T T T T T T T
GTEKPEFGESWTSPPDQVVENAVEFKPKVYKEVMSAFASHLQ
helix
strand <-----> <----->
turns TT TTT T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T

AtNUDX26-N/HvNUDX12-C
MESPPGEGYRRNVGCLMNSSKKIFTASRLDIPSAWQMPQCGIDEGEDPRAAAIRELREET
helix
strand <-----> <-----> <-----> <----->
turns T T T EEEEE EE EEEEEEEEEEE T T T T T T T T T T T
GVRSAEIVAEAPNWLTYDFPADVKDKLNARWGTNWKGOAQKWFRLTGGDDEINLMGD
helix
strand <-----> <-----> <-----> <----->
turns T EEEEE EEEEEEEEEEEEEEE EEE

```

Fig. 15. Prediction of 2nd-structure by Chou-Fasman method.

The position of secondary structure elements were shown on HvNUDX12, AtNUDX26, HvNUDX12-N / AtNUDX26-C and AtNUDX26-N / HvNUDX12-C sequence showing S5 (shown in Fig.15) β -strands (yellow). The Nudix motif is shown by black boxes.

まとめ

活性酸素によって生じた DNA 損傷のうち、酸化型のグアニン塩基である 8-oxo-G はシトシンやアデニンとミス塩基対を形成してしまうため、DNA トランスバージョンの変異を起こす原因となる (Shibutani et al, 1991、Tkeshelashvili et al, 1991)。8-oxo-G を含むヌクレオチドを分解する酵素として初めに発見された *E. coli* mutT タンパク質と mutT のヒトホモログである MTH1 のはそれぞれ、8-oxo-dGTP と 8-oxo-GTP、8-oxo-dGTP と 2-OH-dATP を特異的に加水分解することで、DNA あるいは RNA への誤取り込みによって生じるミス塩基対の形成、変異、細胞死を回避することができる。*E. coli* mutT は 23 基アミノ酸残基からなる Nudix motif を有する Nudix hydrolase ファミリーとして特徴付けられた (Dos Vultos et al, 2006、Maki et al, 1992、Sakumi et al, 1993、Oka et al, 2008、Ichikawa et al, 2008)。高等植物では、シロイヌナズナ、キクからそれぞれ、28 種類、8 種類の *NUDX* が同定されてきたが、単子葉植物から *NUDX* についての報告は少ない。オオムギは主要な穀類の一つであり、コムギやイネよりも乾燥や塩ストレス耐性を備えている。よってオオムギの酸化ストレス耐性能に Nudix hydrolase が関与する可能性が推測される。本研究では Nudix hydrolase ファミリーに着目し、オオムギ由来 Nudix hydrolase ファミリー遺伝子の探索とストレス応答について解析した。

シロイヌナズナに存在する 28 種類の *NUDX* ファミリータンパク質 (AtNUDX1-17、AtDCP2) のアミノ酸配列と相同性を示すアミノ酸をコードするオオムギ由来遺伝子を BLAST 検索したところ、

14 種類の遺伝子 (*HvNUDX1-14*) が約 40-67% の相同性を示していることが明らかとなった。さらに、*Nudix motif* と呼ばれるアミノ酸配列がオオムギの *NUDX* ファミリーにおいても保存されていることが分かった。また、ミナトカモジグサについては *NUDX* 相同性遺伝子が 19 種類 (*BraNUDX1-19*) 存在した。*HvNUDX* と *BraNUDX* では *AtNUDX* の相同性が異なることから、単子葉植物間においても *NUDX* の数や生理機能が異なることを示唆した。

各ストレス (*UV-C*、塩、乾燥) 条件下におけるオオムギ幼芽の *HvNUDX* の発現を解析した結果、ストレスの種類によって応答性が異なり、乾燥で誘導された *HvNUDX* の発現量が最も高く、*UV-C* で発現増加した *HvNUDX6*、*7*、*12*、*14* は乾燥でも発現量が増加し、発現パターンが類似する結果となった。さらに 3 つの波長の紫外線 (*UV-A*、*-B*、*-C*) を照射したオオムギ幼芽の *HvNUDX* の発現を解析した。*UV-A* では *HvNUDX4*、*UV-B* では *HvNUDX4*、*6*、*UV-C* では、*HvNUDX6*、*7*、*12*、*14* の遺伝子の発現が増加し、このうち *HvNUDX7*、*12*、*14* の遺伝子が *UV-C* 特異的に応答した。よって、*HvNUDX* は紫外線の種類によって応答性が異なることが明らかとなり、*UV-C* で発現量が増加した 4 種類の生化学的な *HvNUDX* について機能解析を試みた。

組換え体 *HvNUDX6*、*7*、*12*、*14* それぞれを大腸菌に発現させて、タンパク質を精製し、活性測定を行った。組換え体 *HvNUDX7*、*12* は 8-oxo-dGTP、8-oxo-dGDP、ADP-ribose に対して活性を示し、さらに組換え体 *HvNUDX12* は dGTP、dATP、dTTP、dCTP、AP₄A、AP₅A に対しても活性を示し、幅広い基質特異性を有することが明らかとなった。しかし、組換え体 *HvNUDX6*、*14* は活性を示さな

かった。組換え体 HvNUDX12 の 8-oxo-dGTP、ADP-ribose 加水分解活性の至適 pH は pH8.5 と pH9.5 で、反応速度論解析を行い 8-oxo-dGTP の V_{max} 値は、ADP-ribose に比べ約 10 倍高いことが示された。よって、HvNUDX12 は主として 8-oxo-dGTP を加水分解する機能を持つことが推定された。さらに HvNUDX12 の転写エラー抑制機能を検討するために、mutT 遺伝子が欠損し突然変異により β -ガラクトシダーゼ活性が上昇した CC101T 株に HvNUDX12 遺伝子を導入すると β -ガラクトシダーゼ活性は約 73%有意に減少した。今回の研究において、HvNUDX12 は紫外線等の酸化ストレスによって生じた酸化ヌクレオチドを加水分解し、DNA トランスバージョン変異を修復する機能を有すること示唆した報告は、単子葉植物では本研究が初めてである。

HvNUDX12 は AP_4A pyrophosphohydrolase サブファミリーに分類されるが 8-oxo-dGTP や ADP-ribose に対して加水分解活性に対して加水分解活性と転写エラー抑制作用を有する。一方、 AP_4A pyrophosphohydrolase サブファミリー分類され、HvNUDX12 と 66% の相同性を示す AtNUDX26 は ADP-ribose 加水分解活性と転写エラー抑制作用を有しない (Ogawa et al, 2008)。そこで、HvNUDX12 の構造と機能との関係を明らかにする目的で HvNUDX12 の ADP-ribose pyrophosphatase で保存される 81 番目プロリン残基をアラニン残基に置換した変異酵素遺伝子を作製し、大腸菌に発現させた。これらのタンパク質を精製し、活性測定を行ったところ、HvNUDX12P81-A の ADP-ribose 活性は組換え体 HvNUDX12 と同等であったが、ppGpp に対する活性は組換え体 HvNUDX12 に比べ半分減少した。この結果から HvNUDX12 の 81 番目プロリン残基

は ADP-ribose 加水分解に重要ではないが ppGpp 加水分解活性に関与していることが明らかとなった。HvNUDX12 と AtNUDX26 の二次構造を予測したところ、HvNUDX12 には 4 個の β -ストランド(S1-4)と 5 個の α -ヘリックス(H1-5)が存在し、AtNUDX26 には 4 個の β -ストランド(S1-4)と 5 個の α -ヘリックス(H1-5)が存在する他に 1 個の β -ストランド(S5)が H3 に隣接して存在した。そこで C 末領域の二次構造の違いが HvNUDX12 と AtNUDX26 の基質特異性や酵素活性に関与していることを確認するために、HvNUDX12 の C 末領域を AtNUDX26 の C 末領域に置換した HvNUDX12-N / AtNUDX26-C と HvNUDX12 の C 末領域を AtNUDX26 の C 末領域に置換した AtNUDX26-N / HvNUDX12-C を作製して酵素活性を検討した。HvNUDX12-N / AtNUDX26-C は 8-oxo-dGTP 加水分解活性が組換え体 HvNUDX12 の 33% に低下したが、AtNUDX26-N / HvNUDX12-C では大きな変化は無かった。AtNUDX26-N / HvNUDX12-C は HvNUDX12-N / AtNUDX26-C と比較して AP₄A、AP₅A、ppGpp 加水分解活性はそれぞれ、3.5 倍、9.1 倍、1.7 倍高い活性を示した。これらの結果から、HvNUDX12 の C 末領域は 8-oxo-dGTP、AP₄A、AP₅A、ppGpp 加水分解活性に重要であり、AtNUDX26 とは異なる構造が活性に関与していることを明らかにした。

これまで様々な生物で NUDX ファミリーが代謝系や分子シグナル応答へ関与することが明らかにされ、生物の有する NUDX の種類が環境ストレス下における代謝や適応に関与すると考えられていた(Abdelraheim et al, 2001)。さらに、植物では photolyase が UV-B 照射によって生じた CPD を単量体へ修復するが、本研究で

は、紫外線だけでなく乾燥ストレスに対しても応答する HvNUDX12 が転写エラー抑制能を有する結果を見出したことは非常に新規性があり、今後の環境悪化による穀物の栽培への応用に期待できる。また、AtNUDX1 は 8-oxo-dGTP を加水分解するが、酸化ストレスに応答性を示さないことや、AtNUDX26 は 8-oxo-dGTP を加水分解するが、乾燥ストレスのみに応答する (Ogawa et al, 2009、Ito et al., 2012)。しかし、HvNUDX12 は UV-C と乾燥ストレス条件下で応答し、8-oxo-dGTP 加水分解活性や AtNUDX1、26 とは異なる基質に対して加水分解活性を示したことは、HvNUDX は他の植物の NUDX とは異なる生理機能を有することが考えられる。これまで他の植物種で、NUDX の酸化ストレス耐性機構に関する報告が少ないことから、UV-C だけでなく、乾燥、UV-A、UV-B ストレス条件下で応答したその他の HvNUDX についても生理機能について明らかにする必要があると考えられる。また、イネやオオムギなどの穀物の生産向上に貢献できる可能性があるため、単子葉植物でこれらの NUDX の生理機能を明らかにすることは非常に重要である。本研究により、植物には多様な NUDX が存在し、環境ストレスに対する発現応答が異なること、同じサブファミリーに分類される NUDX であっても植物種の違いにより基質特異性や構造が異なること、植物が有する NUDX は環境ストレス耐性に関与する可能性について示唆することができた。今後は、形質転換植物で HvNUDX の局在性や、酸化ストレス抵抗性などの特性評価を行い更なる機能性について明らかにしていく。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、直接ご指導、多くのご助言を賜りました、岡山大学資源植物科学研究所 ゲノム制御グループ准教授 杉本学博士に心より厚く感謝いたします。はるな二条の種子をご提供頂きました、(株)サッポロビール バイオ研究開発部 木原誠様に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、研究テーマに付随したご助言、ご激励を賜りました、岡山大学資源植物科学研究所 環境応答機能研究グループ 教授 平山隆志博士に心から感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、研究テーマに付随したご助言、ご激励を賜り、シロイヌナズナへの形質転換体の作出につきましては、岡山大学資源植物科学研究所 光環境適応研究グループ 教授 坂本亘博士に心から感謝の意を表します。

最後になりましたが、ご協力ご激励頂きましたゲノム制御グループの皆様、ならびに岡山大学資源植物科学研究所の皆様心より感謝の意を表します。

参考文献

Abdelrahemin S. R., Cartwright J. L., Gasmi L., McLennan A. G., 2001. Arch. Biochem. Biophys. 388. 18-24.

Afaq F., Mukhtar H., 2001. Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways. J. Photochem. Photobiol. B. 63. 61-9.

Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J., 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215. 403-410.

Akiyama M., Maki H., Sekiguchi M., Horiuchi T., 1989. A specific role of MutT protein: to prevent dG·dA mispairing in DNA replication. Proc. Natl. Acad. Sci. 86. 3949-3952.

Ames B. N., Shigenaga M. K., Hagen T. M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. 90. 7915-7922.

Arimori T., Tamaoki H., Nkamura T., Kamiya H., Ikemizu S., Takagi Y., Ishibashi T., Harashima H., Sekiguchi M., Yamagata Y., 2011. Diverse substrate recognition and hydrolysis mechanisms of human NUDT5. Nucleic. Acids. Res. 39. 8972-8983.

Bessman M. J., Frick D. N., O'Handly S. F., 1996. The MutT proteins

or “Nudix” hydrolases, a family of versatile, widely distributed, “Housecleaning” enzymes. *J. Biol. Chem.* 271. 25059-25062.

Bialkowski K., Kasprzak K. S., A novel assay of 8-oxo-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate pyrophosphohydrolase (8-oxo-dGTPase) activity in cultured cells and its use for evaluation of cadmium(II) inhibition of this activity. *Nucl. Acid. Res.* 26. 3194-3201.

Blumthaler M., Ambach W., 1990. Indication of increasing solar ultraviolet-B radiation flux in alpine regions. *Science.* 248. 206–208.

Bone R., Cheng Y. C., Wolfenden R., 1986. Inhibition of adenosine and thymidylate kinase by bisubstrate analogs. *J. Biol. Chem.* 261. 16410-16413.

Boyer J. S., 1982. Plant productivity and environment. *Science.* 218. 443-448.

Bradford M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72. 248-254.

Brederode F. T., Huub J. M. L., Bol J. F., 1991. Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus

infection, ethephon treatment, UV light and wounding. *Plant. Mol. Biol.* 17. 1117-1125.

Brevet A., Plateau P., Best-Belpomme M., Blanquet S., 1985. Variantion of AP4A and other dinucleoside polyphosphates in stressed *Drosophila* cells. *J. Biol. Chem.* 260. 15566-15570.

Chou P.Y., Fasman G.D., 1974. Prediction of protein conformation. *Biochem.* 13. 222-245.

Danon A., Gallois P., 1998. UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS. Lett.* 437. 131-136.

Danon A., Rotari V. I., Gordon A., Mailhac N., Gallois P., 2004. Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in *Arabidopsis*, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and Defender against apoptotic Death. *J. Biol. Chem.* 279. 779-787.

Dos V. T., Blazquez J., Rauzier J., Matic I., Gicquel B., 2006. Identification of Nudix hydrolase family members with an antimutator role in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* 188. 3159-3161.

Dunn C. A., O'Handley S. F., Frick D. N., Bessman M. J., 1999.

Studies on the ADP-ribose pyrophosphatase subfamily of the Nudix hydrolases and tentative identification of *trgB*, a gene associated with tellurite resistance. *J. Biol. Chem.* 274. 32318-32324.

Egashira A., Yamauchi K., Yoshiyama K., Kawate H., Katsuki M., Sekiguchi M., Sugimachi K., Maki H., Tsuzuki T. 2002. Mutational specificity of mice defective in the *MTH1* and/or the *MSH2* genes. 2002. *DNA Repair.* 1. 881-893.

Epstein E., Norlyn J. D., Rush D. W., Kingsbury R. W., Kelley D. B., Cunningham G. A., Wroma A. F., 1980. Saline culture of crop: a genetic approach. *Science.* 210. 399-404.

Han M. K., Cho Y. S., Kim Y. S., Yim C. Y., Kim U. H., 2000. Interaction of two classes of ADP-ribose transfer reactions in immune signaling. *J. Biol. Chem.* 275. 20799-20805.

Gabelli S. B., Bianchet M. A., Bessman M. J., Amzel L. M., 2001. The structure of ADP-ribose pyrophosphatase reveals the structural basis for the versatility of the Nudix family. *Nature. Struct. Biol.* 8. 467-472.

Gao C., Xing D., Li L., Zhang L., 2008. Implication of reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction in the early stages of plant programmed cell death induced by ultraviolet-C overexposure. *Planta.* 277. 755-767.

Gunawardana D., Cheng H. C., Gayler K. R., Identification of functional domains in *Arabidopsis thaliana* mRNA decapping enzyme (AtDcp2). *Nucl. Acid. Res.* 36. 203-216.

Hidema J., Song I. K., Sato T., Kumagai T., 2001. Relationship between ultraviolet-B sensitivity and cyclobutane pyrimidine dimer photorepair in rice. *J. Radiat. Res.* 42. 295-303.

Hisao T. C., 1973. Plant responses to water stress. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 24. 519-570.

Huang H., Cao H., Niu Y., Dai S., 2012. Expression analysis of Nudix hydrolase genes in *Chrysanthemum lavandulifolium*. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 30. 973-982.

Hussein M.R., 2005. Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *J. Cutan. Pathol.* 32. 191–205.

Ishibashi T., Hayakawa H., Sekiguchi M., 2003. A novel mechanism for preventing mutations caused by oxidation of guanine nucleotides. *EMBO reports.* 4. 479-483.

Ichikawa J., Tsuchimoto D., Oka S., Ohno M., Furuichi M., Sakumi K., Nakabeppu Y., 2008. Oxidation of mitochondrial deoxynucleotide pools by exposure to sodium nitroprusside induces cell death. 2008.

DNA Repair. 7. 418-430.

Ishikawa K., Ogawa T., Hirose E., Nakayama Y., Harada K., Fukusaki E., Yoshimura K., Shigeoka S., 2009. Modulation of the poly(ADP-ribosylation) reaction via the Arabidopsis ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolase, AtNUDX7, is involved in the response to oxidative stress. *Plant. Physiol.* 151. 741-754.

Ito D., Kato T., Maruta T., Tamoi M., Yoshimura K., Shigeoka S., 2012. Enzymatic and molecular characterization of Arabidopsis ppGpp pyrophosphohydrolase, AtNUDX26. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76. 2236-2241.

Katlin S., Altschul S. F., 1990. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87. 2264-2268.

Kovacs D., Raffa S., Flori E., Aspö N., Briganti S., Cardinali G., Torrisi M. R., Picardo M., 2009. Keratinocyte growth factor down-regulates intracellular ROS production induced by UVB. *J. Dermatol. Sci.* 54. 106-113.

Kraszewska E., 2008. The plant Nudix hydrolase family. *Acta. Biochem. Pol.* 55. 663-671.

Maki H., Sekiguchi M., 1992. MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature*. 355. 273-275.

McDonald L. J., Moss J., 1994. Enzymatic and nonenzymatic ADP-ribosylation of cysteine. *Mol. Cell. Biochem.* 138. 221-226.

McLennan A. G., 2000. Dinucleotide polyphosphates—friend or foe? *Pharmacol. Ther.* 87. 73-89.

McLennan A. G., 2006. The Nudix hydrolase superfamily. *Cell. Mol. Life. Sci.* 63. 123-143.

McMillan T. J, Leatherman E., Ridley A., Shorrocks J., Tobi S. E., Whiteside J. R., 2008. Cellular effects of long wavelength UV light (UVA) in mammalian cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 60. 969–976.

Miller JH., 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 352-355.

Miras-Portugal MT., Gualix J., Pintor J., 1998. The neurotransmitter role of diadenosine polyphosphates. *FEBS. Lett.* 430. 78-82.

Mo J. Y., Maki H., Sekiguchi M., 1992. Hydrolytic elimination of a mutagenic nucleotide, 8-oxodGTP, by human 18-kilodalton protein: Sanitization of nucleotide pool. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89.

11021-11025.

Nakamura S., Meshitauka S., Kitagawa S., Abe N., Yamada J., Ishino T., Nakano H., Tsuzuki T., Doi T., Kobayashi Y., Fujii S., Sekiguchi M., Yamagata Y., 2010. Structural and dynamic features of the MutT protein in the recognition of nucleotides with the mutagenic 8-oxoguanine base. *J. Biol. Chem.* 285. 444-452.

Newman P. A., Oman L. D., Duglass A. R., Fleming E. L., Frith S. M., Hurwitz M. M., Kawa S. R., Jackman C. H., Krotkov N. A., Nash E. R., Nielsen J. E., Pawson S., Stolarski R. S., Velders G. J. M., 2009. What would have happened to the ozone layer if chlorofluorocarbons (CFCs) had not been regulated? *Atmos. Chem. Phys.* 9. 2113-2128.

Ogawa T., Ishikawa K., Harada K., Fukusaki E., Yoshimura K., Shigeoka S., 2009. Overexpression of an ADP-ribose pyrophosphatase, AtNUDX2, confers enhanced tolerance to oxidative stress in Arabidopsis plants. *Plant. J.* 57. 289-301.

Ogawa T., Yoshimura K., Miyake H., Ishikawa K., Ito D., Tanabe N., Shigeoka S., 2008. Molecular characterization of organelle-type Nudix hydrolase in Arabidopsis. *Plant. Physiol.* 148. 1412-1424.

Ogawa T., Ueda Y., Yoshimura K., Shigeoka S., 2005. Comprehensive analysis of cytosolic Nudix hydrolases in Arabidopsis thaliana. *J. Biol. Chem.* 280. 25277-25283.

Oka S., Ohno M., Tsuchimoto D., Sakumi K., Furuichi M., Nakabeppu Y., 2008. Two distinct pathways of cell death triggered by oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNAs. *EMBO J.* 27, 421-432.

Paz M.L., Gonzalez Maglio D. H., Weill F. S., Bustamante J., Leoni J., 2008. Mitochondrial dysfunction and cellular stress progression after ultraviolet B irradiation in human keratinocytes. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 24. 115–122.

Rossi R., Montecucco A., Donzelli M., Denegri M., Biamonti G., Scovassi AI., 2002. DNA ligase I is dephosphorylated during the execution step of etoposide-induced apoptosis. *Cell. Death. Differ.* 9. 89-90.

Sakumi K., Furuichi M., Tsuzuki T., Kakuma T., Kawabata S., Maki H., Sekiguchi M., 1993. Cloning and Expression of cDNA for a human enzyme that hydrolyzes 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* 268. 23524-23530.

Sheikh S., O'Handly S. F., Dunn C. A., Bessman M. J., 1998. Identification and characterization of the Nudix hydrolase from the Archaeon, *Methanococcus jannaschii*, as a highly specific ADP-ribose pyrophosphatase. *J. Biol. Chem.* 273. 20924-20928.

Saitou N., Nei M., 1987. The neighbor-joining method: a new method

for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4. 406-425.

Shibutani S., Takeshita M., Grollman AP., 1991. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation damaged base 8-oxodG. *Nature*. 349. 431-434.

Shimokawa H., Fujii Y., Furuichi M., Sekiguchi M., Nakabeppu Y., 2000. Functional significance of conserved residues in the phosphohydrolase module of *Escherichia coli* MutT protein. *Nucleic. Acids. Res.* 28. 3240-3249.

Shoyab M., 1985. Inhibition of protein kinase activity of phorboid and ingenoid receptor by di(adenosine-5')-oligophosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 236. 441-444.

Tajiri T., Maki H., Sekiguchi M., 1995. Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 336. 257-267.

Takagi Y., Setoyama D., Ito R., Kamiya H., Yamagata Y., Sekiguchi M., 2012. Human MTH3(NUDT18) protein hydrolyzes oxidized forms of guanosine and deoxyguanosine diphosphates. *J. Biol. Chem.* 287. 21541-21549.

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24. 1596-1599.

Tkeshelashvili L. K., McBride T., Spence K., Loeb L. A., 1991. Mutation spectrum of copper-induced DNA damage. *J. Biol. Chem.* 266. 6401-6406.

Tompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J., 1994. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acid. Res.* 22. 4673-4680.

Valacchi G., Sticozzi C., Pecorelli A., Cervellati F., Cervellati C., Maioli E., 2012. Cutaneous responses to environmental stressors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1271. 75–81.

Wlaschek M., Tantcheva-Poor I., Naderi L., Ma W., Schneider L.A., Razi-Wolf Z., Schuller J., Scharffetter-Kochanek K., 2001. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J. Photochem. Photobiol. B.* 63. 41–51.

Xu W., Dunn C. A., O'Handly S. F., Smith D. L., Bessman M. J., 2006. Three new Nudix hydrolases from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 281. 22794-22798.

Xu W., Gauss P., Shen J. Y., Dunn C. A., Bessman M. J., 2002. The gene e.1 (nud E.1) of T4 Bacteriophage designates a new member of the Nudix hydrolase superfamily active on flavin adenine dinucleotide, adenosine 5'-triphospho-5'-adenosine, and ADP-ribose. *J. Biol. Chem.* 277. 23181-23185.

Zha M., Guo Q., Zhang Y., Yu B., Ou Y., Zhong C., Ding J., 2008. Molecular mechanism of ADP-ribose hydrolysis by human NUDT5 from structural and kinetic studies. *J. Mol. Biol.* 379. 568-578.