

4B14

光回復酵素の DNA 修復反応における酵素－基質間相互作用ダイナミクス

(京大院理¹・阪大基礎工²・Scripps 研究所³・阪大医⁴) ○近藤正人¹・山元淳平²・人見研一³・岩井成憲²・藤堂剛⁴・Elizabeth, D. Getzoff³・寺嶋正秀¹

【序】光回復酵素(PHR)は紫外線により損傷を受けた DNA(基質)を修復する酵素である。発色団として Flavin adenine dinucleotide (FAD) を持ち、光誘起により還元型の FAD (FADH[•]) から基質へと電子を移動することで損傷を修復する。このための酵素と基質の結合サイトは発色団付近であることが X 線構造解析によって知られているため、修復反応にはこうした発色団付近での電子の授受といった局所的な相互作用が重要となる。また、こうして酵素から基質へ電子移動をするためには、これらが互いに近づいて結合する必要がある一方、修復後に別の基質を新たに修復するためには、修復された基質は PHR から離れなければならない。そのため酵素と基質間での解離・会合といった形の全体的な相互作用も修復機能に深く関わるはずである。これまでに暗状態における定常的な相互作用は調べられており、PHR が基質と高い親和性を持ち、暗状態では基質と結合し、複合体を形成することが報告されている。しかし、光修復反応過程においてこれらの中で起こる相互作用ダイナミクスに関しては全く捉えられてきていない。本研究では PHR の DNA 修復反応において酵素と基質間で起こる相互作用ダイナミクスを時間分解で捉えることで、修復反応機構を明らかにすることを目指した。この目的のために、本研究では過渡吸収(TA)法および過渡回折格子(TG)法を用い、局所的・全体的な観点から酵素－基質間相互作用を調べた。

【実験】*Xenopus laevis* 由来の(6-4) PHR を酵素として用いた。(6-4) PHR は紫外線による DNA 損傷のうち、(6-4)光産物と呼ばれる損傷体のみを特異的に修復する酵素である。配列に(6-4)光産物を含む 14 塩基対のオリゴヌクレオチドを基質として用いた。また、負のコントロール実験のために同じ配列の損傷を含まない基質も試料として用いた。励起光には YAG レーザーの三倍波(355 nm)のパルス光を用い、還元型 PHR (PHR_{red}) の発色団 FADH[•] を光励起した後に起こる反応を基質がある場合とない場合で調べて比較した。

【結果と考察】①過渡吸収測定

PHR_{red} の光励起後に観測された TA スペクトルを図 1A に示した。500 nm から 700 nm の波長領域には吸収増大信号が見られた。これはラジカル型 FAD (FADH[•]) の吸収帯とよく一致しており、PHR_{red} の光励起後には FADH[•] が電子を失うことで発色団 FADH[•] を持つ PHR[•] が形成されることが分かった。図 1B(a)はこの PHR[•] の吸収波長である 633 nm における TA 時間変化信号である。この信号は二成分の指数関数(時定数: 20 ms, 2.5 s)で再現された。450 nm での測定では PHR_{red} のブリーチ回復信号が同様の時定数で観測されていたため、形成された PHR[•] がこれらの時定数で元の PHR_{red} に戻ることが分かった。ここに基質を加えると (図 1B(b))。約 100

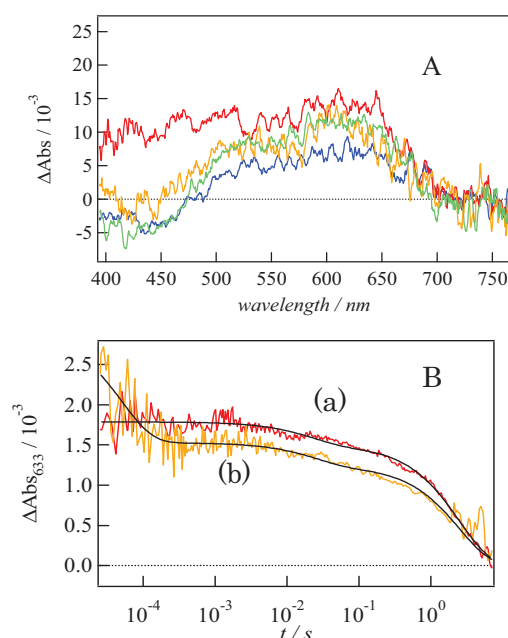


図 1 A. PHR_{red} の TA スペクトル:
50 μs (赤), 200 μs (橙), 1 ms (緑), 20 ms (青)
B. 633 nm における時間変化信号:
(a) PHR_{red} のみ (b) PHR_{red} + 基質

μs の早い時間領域に特徴的な減衰信号が見られたほか、遅い時間領域では信号強度にも違いが見られた。こうした TA 信号の変化は基質を加えることにより、PHR \cdot の形成量や発色団付近の構造に変化が起きたことを明確に示している。この信号は三成分の指数関数(時定数: 50 μs , 20 ms, 2.5 s)で再現された。注目すべきことに、数 100 μs 以降の時間領域では基質を加える前と信号形状にほとんど変化が見られなかった。時定数も一致していたが、基質を加えることで信号強度が僅かに(約 14 %)減少した。興味深いことに、この減少は修復反応の量子収率(11 %)とほぼ一致した。基質の存在下では、PHR \cdot は酵素から基質への電子移動によって形成される。しかし、この PHR \cdot は修復された基質からの逆電子移動により元の還元型に戻される。信号の減少は PHR \cdot の減少と捉えることができるため、この遅い時間での信号の減少は PHR による光修復反応が早い時間スケールで起きたことを反映したものと考えられる。一方、早い時間領域では 50 μs の減衰成分が観測された。

②過渡回折格子測定

PHR $_{\text{red}}$ の光励起後に観測された TG 信号を図 2A(a)に示した。ここに基質を加えると信号は劇的な変化を示した(図 2B)。際立った変化は遅い時間に立ち上がり減衰からなる非常に大きな山型信号が観測されたことである。この変化は損傷を含まない基質を加えた時には観測されなかったため(2A(b))、修復反応を反映したものである。格子波数(q^2)依存性から図 2A、B で遅い時間に見られた減衰、山型信号はともに分子拡散信号であることが分かった。減衰型の拡散信号は PHR $_{\text{red}}$ 自身の光反応では拡散係数の変化がないことを示している。一方で、基質を加えると山型の拡散信号が見られたという事実から、光修復反応においては拡散係数変化が起きることが分かった。PHR $_{\text{red}}$ の減衰信号の解析から、PHR $_{\text{red}}$ の拡散係数が $4.3 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ と決められた。次に、基質を加えた試料での信号解析から、生成物と反応物の拡散係数値がそれぞれ $D_R = 4.3 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ 、 $D_P = 1.0 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ と決定された。前者は PHR $_{\text{red}}$ 溶液の信号で得た D と同じ値であり、PHR $_{\text{red}}$ のものと同定した。一方で D_P の値は PHR $_{\text{red}}$ の拡散係数の約 2.3 倍という大きな値であった。Stokes-Einstein 式によれば拡散係数は分子量の三乗根に逆比例する。これによると、今回用いた基質(8 kDa)と PHR(60 kDa)の拡散係数比は約 2 倍程度となり、観測結果とよい一致を示した。このことは、この速い拡散成分が基質のものであることを示唆している。しかし、基質自身は光反応を起こさないため、基質の拡散は見られないはずである。この拡散信号が観測された事実は、光修復反応で酵素と基質の間に相互作用が起きたことを明確に表している。そこで、暗状態で PHR と複合体を形成していた基質が光修復によって親和性を失い、PHR から解離する反応が起こることで修復された基質が溶液中に放出されたと考えた。このスキームに基づき、拡散信号の q^2 依存性を解析した結果、この解離反応の時定数が約 50 μs であると決められた。興味深いことに、この時定数は TA 測定で観測された早い減衰信号とほぼ一致した。このことから、50 μs の吸収変化反応は修復された基質の放出をトリガーするような、PHR の発色団付近、すなわち結合サイト付近の構造変化過程であると考えている。講演では、こうした PHR の修復反応に伴う酵素-基質間相互作用を時間分解で捉えた結果を報告し、これに基づいた PHR の DNA 修復反応機構を議論する。

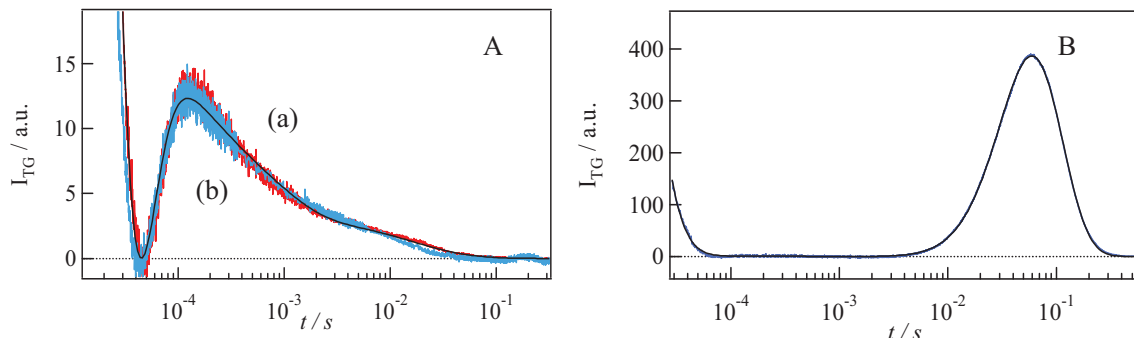


図 2 A. (a) PHR $_{\text{red}}$ (赤線) および (b) ここに損傷のない基質を加えた時(青線)の TG 信号
 B. PHR $_{\text{red}}$ に損傷を含む基質を加えた時の TG 信号 ($q^2 = 3.20 \times 10^{11} \text{ m}^{-2}$)