

## (6-4) 光回復酵素による DNA 修復の赤外分光観測

(名工大院工<sup>1</sup> 阪大院基<sup>2</sup> 米国・スクリプス研<sup>3</sup> 阪大院医<sup>4</sup>)張 宇<sup>1</sup>、岩田達也<sup>1</sup>、山元淳平<sup>2</sup>、人見研一<sup>2,3</sup>、岩井成憲<sup>2</sup>、藤堂 剛<sup>4</sup>、E. D. Getzoff<sup>3</sup>、  
○神取秀樹<sup>1</sup>

【序】 紫外線は DNA に作用してシクロブタン型ピリミジンダイマー (CPD) や(6-4)光産物を生成するが、生物は青色光を用いてこれらを修復する CPD 光回復酵素や(6-4)光回復酵素をもっている[1]。いずれも FAD をクロモフォアとして持ち、還元型からの光誘起電子移動反応を利用して DNA のダイマーを解裂させるが、CPD と違って(6-4)光産物は単純な解裂だけでなく官能基の転移が必要となるため、(6-4)光回復酵素はより複雑

な修復反応を示すと考えられている。しかしながら、CPD 光回復酵素と比較して(6-4)光回復酵素の発見は遅く、反応機構の理解も進んでいない。

光誘起赤外差スペクトル分光法は原子レベルでの構造変化の解析に有力な手法であることを、我々はロドプシンやフォトトロピンの研究において明らかにしてきた[2,3]。そこで今回、*Xenopus* 由来の(6-4)光回復酵素に対して赤外分光法を適用したところ、光活性化 (=還元型の生成) における差スペクトルばかりでなく、(6-4)光産物の修復に伴う赤外差スペクトルを初めて測定することに成功したので報告する。

【実験】 *Xenopus*(6-4)光回復酵素は大腸菌を用いた系で組換え体を発現、精製した[4]。酸化型の酵素は光還元によって DNA 修復能を得るが、これまでの赤外分光に用いられた水和フィルムでは溶液中と同様の光還元が起こらなかった。そこで濃縮溶液に対する光照射により差スペクトルを測定する系を構築した。

実験に用いた 14 塩基対の二本鎖 DNA の配列は以下の通りである[5]。下線は(6-4)光産物を示す。  
5'-CGCGAATTGCGCCC-3'  
3'-GCGCTTAACGCGGG-5'

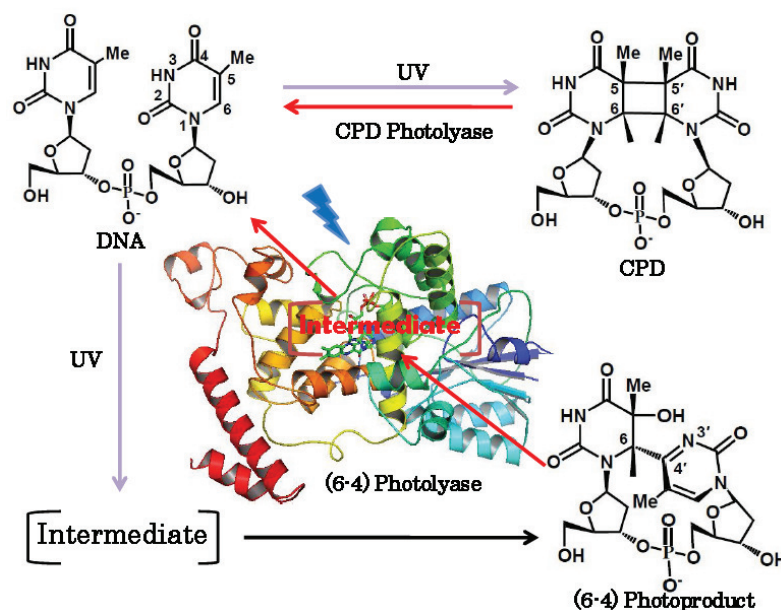


図1 紫外線によるピリミジンダイマーの生成と、光回復酵素を用いた修復 (赤線)。中央に *Xenopus* の(6-4)光回復酵素の構造を示す[6]。

【結果と考察】 濃縮溶液に対する光照射により、*Xenopus* (6-4) 光回復酵素の酸化型から還元型への変化に伴う差スペクトルを得た (図 2 a)。本実験条件では、還元剤の添加は不要であり、セミキノン型の蓄積はみられなかった。活性化に伴うスペクトルは(6-4)光産物の有無に関わらずよく似ており、スペクトル変化が主に酵素の構造変化に由来することを示している。一方、アミド I (1653  $\text{cm}^{-1}$ ) やプロトン化カルボン酸 (1738 (+)/1728 (-)  $\text{cm}^{-1}$ ) の振動数領域に有意なスペクトル変化が観測されたが、これは(6-4)光産物の結合に由来する信号と考えられる。

次に還元型に光を照射したところ、酵素のみでは全くスペクトル変化がみられなかった一方、(6-4)光産物の存在下では特徴的なスペクトルが得られた (図 2 b)。モデル化合物の実験から、チミンダイマーは 1077  $\text{cm}^{-1}$ 、損傷のない DNA は 1086, 1052  $\text{cm}^{-1}$  にピークをもつため、1086 (+)/1069 (-)/1052 (+)  $\text{cm}^{-1}$  のバンドが DNA 修復過程を示していると解釈した。これらは 1248 (-)/1213 (+)  $\text{cm}^{-1}$  のバンドとともにリン酸の振動に帰属できるため、DNA 修復はリン酸骨格の構造変化を伴うことが結論された。(6-4)光産物において H/D 置換される部位は限られているが、重水シフトを示した 1720 (+)/1697 (-)/1641 (-)  $\text{cm}^{-1}$  のバンドはこれらの部位に由来する可能性がある。

図 2 b のデータは、酵素と(6-4)光産物を 1:2 のモル比で行ったスペクトル (の総和) であるが、照射時間依存性を詳細に検討したところ、修復の最初の段階と最後の段階でわずかなスペクトルの違いがあることがわかった。1:1 の比で行った実験ではこの違いがみられないことから、これは結合の過程に由来する変化を捉えているものと考えられる。配列や長さの異なる DNA を用いた実験が進行中であり、今後、中間体を捉えるための低温実験などをあわせて DNA 修復のメカニズムに迫りたい。

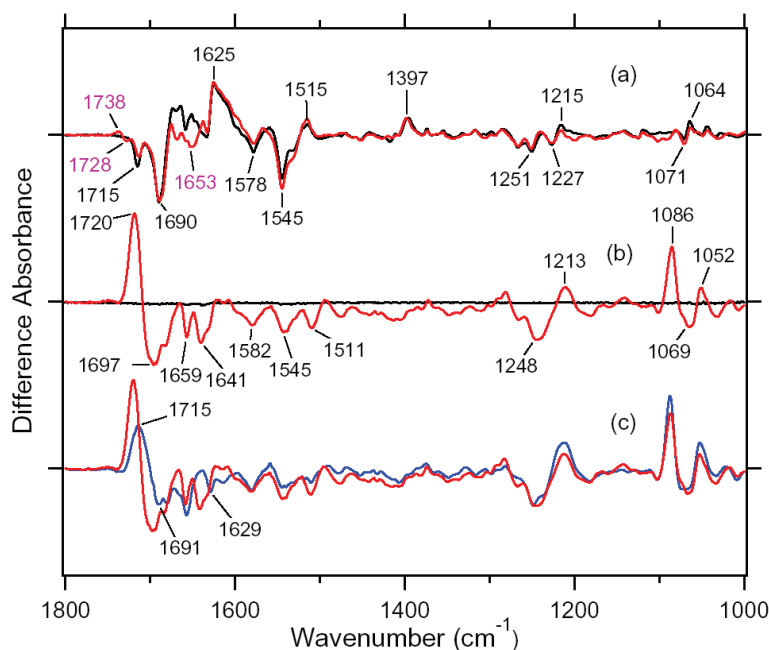


図 2 (a) (6-4)光産物存在下 (赤線) と非存在下 (黒線) における(6-4)光回復酵素の光活性化過程の差スペクトル。負の信号が酸化型、正の信号が還元型に由来する。(b) 還元型の生成後、白色光照射に伴うスペクトル変化。(6-4)光産物非存在下 (黒線) では変化がないのに対して、(6-4)光産物存在下 (赤線) ではスペクトル変化が観測された。(c) 赤線は (b) のスペクトル、青線は重水中でのスペクトル。

[1] Sancar, A. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2203-2237.

[2] Kandori, H. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1460*, 177-191.

[3] Iwata, T.; Tokutomi, S.; Kandori, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11840-11841.

[4] Hitomi, K.; Kim, S. T.; Iwai, S.; Harima, N.; Otoshi, E.; Ikenaga, M.; Todo, T. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32591-32598.

[5] Iwai, S.; Shimizu, M.; Kamiya, H.; Ohtsuka, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7642-7643.

[6] Hitomi, K.; DiTacchio, L.; Arvai, A. S.; Yamamoto, J.; Kim, S. T.; Todo, T.; Tainer, J. A.; Iwai, S.; Panda, S.; Getzoff, E. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 6962-6967.