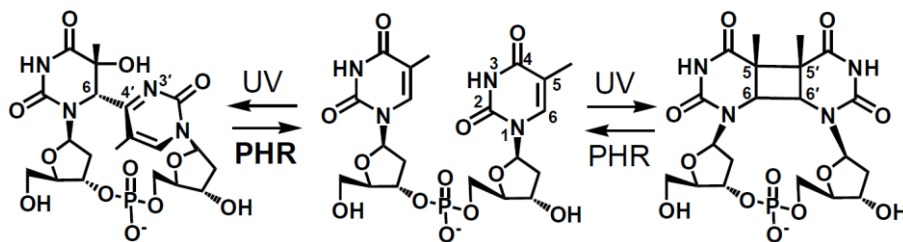


<sup>15</sup>N ラベルした(6-4)光産物修復の赤外分光観測

(1 名工大院工、2 阪大院理、3 スクリプス研、4 阪大院医) ○張宇<sup>1</sup>、山田大智<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】DNA が紫外線を吸収すると、励起状態からの緩和の過程でしばしば異なった化学構造を取る場合がある。代表的な光産物



図、1 チミン(中央)、CPD(右)、(6-4)光産物(左)の構造。

として、隣り合ったチミン同士が共有結合を形成した CPD(図 1、右)または(6-4)光産物(図 1、左)を挙げることができる。これらの DNA 損傷は細胞のガン化など生命に危険な状態をもたらすため、損傷を修復する種々の酵素を生物は有している。このうち、光回復酵素は青色光を用いて DNA の修復を行う酵素であり、いずれも FAD を発色団としている。植物の光センサーや動物の概日時計の構成要素として働くクリプトクロムとの構造の類似性が報告されている光回復酵素であるが、(6-4)光回復酵素は CPD 光回復酵素よりも発見が遅く、反応機構の理解も遅れている。CPD より複雑な構造を有する(6-4)光産物の修復においては酸素の転位が必須であり、修復過程におけるオキセタン中間体などが提案されてきた。最近、(6-4)光回復酵素の結晶構造が報告され、構造をもとにした新しい研究の時代に入ったが、反応中間体の捕捉を含めた詳細な構造解析は皆無である[1]。

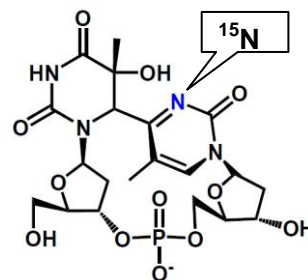
これまでに我々は、*Xenopus* 由来の(6-4)光回復酵素[2]に対してフーリエ変換赤外 (FTIR)分光法を用いて光修復過程における構造変化の解析を試みた。再溶解試料での測定条件の構築を行い、(6-4)光回復酵素の光誘起差スペクトルを測定することに成功した。さらに光照射波長を最適化することで(6-4)光産物の光修復に伴う光誘起差スペクトルも得ることができた[3]。本発表では、77-277 K の温度範囲で光産物修復の中間体の検出と <sup>15</sup>N 標識した(6-4)光産物の測定を行い、FTIR シグナルの帰属と中間体の構造モデルを提案する。

【実験】*Xenopus* 由来の(6-4)光回復酵素の調製は以前に報告した方法を用いた[3]。二本鎖 DNA は 14 塩基対からなり、配列中に一箇所の(6-4)光産物を含む。塩基配列を以下に示す[4]。また、(6-4)光産物は N3' が <sup>15</sup>N 標識された試料を用いた。

5'-CGCGAATTGCGCCC-3' (TT:(6-4) 光産物)

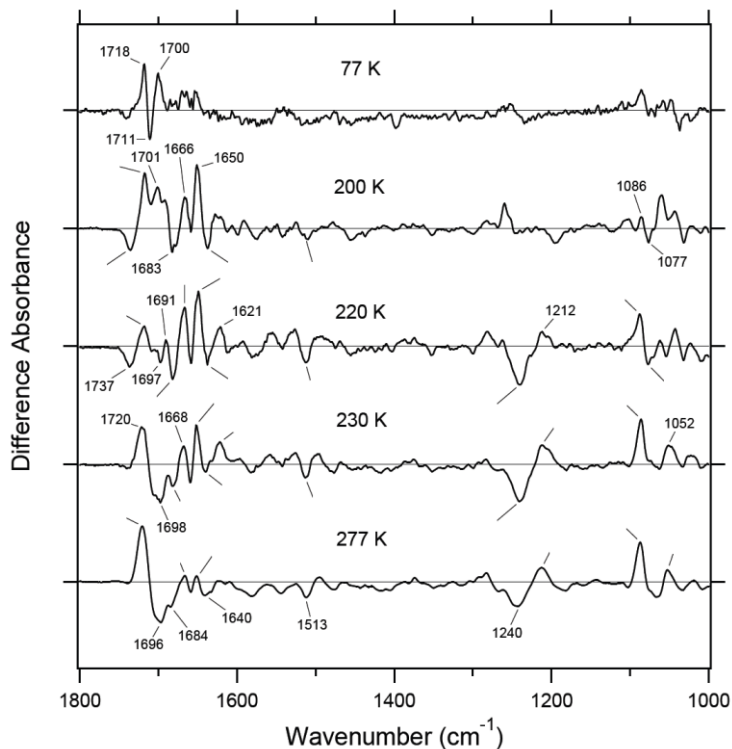
3'-GCGCTTAACGCGGG-5'

FTIR 測定は、(6-4)光産物存在下で、*Xenopus* (6-4) 光回復酵素の再溶解試料を作製し、277 K で >450 nm の光照射により還元型を蓄積させた[3]。その後 77-277 K で目的の温度にセットし、温度が安定するのを待って >390 nm 以上の光を照射し、光照射前後の差スペクトルを得た。



### 【結果と考察】

低温で測定した光照射前後の差スペクトルは、277 K (DNA の完全な修復の差スペクトル)とは異なるものであった(図 2)。230 K と 277 K はスペクトルの形がよく似ているが 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$  領域で違いが観測される。230 K では DNA は修復されているがタンパク質から解離していない状態だと考えられ、1666  $\text{cm}^{-1}$ 、1650  $\text{cm}^{-1}$  のバンドは摂動を受けたタンパク質骨格(アミド I)に由来するかもしれない。また、1086  $\text{cm}^{-1}$ 、1052  $\text{cm}^{-1}$  のバンドは DNA のリン酸基に由来すると考えられる。



図、2 *Xenopus* (6-4) 光回復酵素の光活性化後に、各温度得られたスペクトルである。

220 K 以下ではスペクトルの形が 277 K のものとは異なることから、これらの温度では完全には修復がなされておらず、中間状態だと考えられる。同じ測定を  $^{15}\text{N}$  (6-4) 光産物についても行い、両者のスペクトルを比較することで、 $\text{C4}'=\text{N3}'$ 伸縮振動、 $\text{C2}'-\text{N3}'$ 伸縮振動を同定した。これらの結果から、各温度における中間状態の構造モデルを提案する。

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

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

[3] Zhang, Y.; Iwata, T.; Yamamoto, J.; Hitomi, K.; Iwai, S.; Todo, T.; Getzoff, ED.; Kandori, H. *Biochemistry.* **2011**, *50*, 3591-3598.

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