

2C16

(6-4)光回復酵素の低温赤外分光法における DNA 修復中間体の測定

(名工大院・工¹、阪大院・基礎工²、米国・スクリプス研³)

○山田大智¹、山元淳平²、張宇¹、岩田達也¹、人見研一³、
E. D. Getzoff³、岩井成憲²、神取秀樹¹

Low-temperature FTIR study of the intermediates in xenopus (6-4) photolyase repair process.

(Nagoya Inst. Tech. Japan¹, Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ. Japan²,
The Scripps Res. Inst., USA³)

○Daichi Yamada¹, Junpei Yamamoto², Yu Zhang¹, Tatsuya Iwata¹, Kenichi
Hitomi³, Shigenori Iwai², Elizabeth D. Getzoff³ and Hideki Kandori¹

【序】生物は太陽光のエネルギーを巧みに利用するが、光エネルギーを特異な酵素反応に利用するのが DNA 光回復酵素である。興味深いことにこの酵素は、紫外線によって生じた DNA 損傷を、近紫外光あるいは青色光を使って修復することができる。光吸収を担うのは酵素内部に結合した FAD であり、酸化型 (FAD^{ox}) から光照射によりセミキノン型 (FADH^{*}) を経て酵素活性をもった完全還元型 (FADH⁻) を生成する。光回復酵素には、シクロブタン型ピリミジンダイマー(CPD) (Figure 1. 右) を修復する CPD 光回復酵素と(6-4)光産物 (Figure 1. 左) を修復する(6-4)光回復酵素があるが、いずれも FADH⁻が基質存在下で光を吸収することで修復が実現する。(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。しかし、複雑な構造をもった(6-4)光産物を修復できる(6-4)光回復酵素の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]。

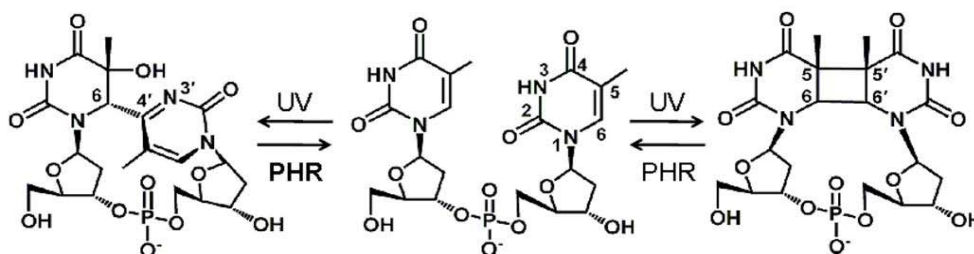


Figure1. (6-4)光産物 (左)、DNA (中央)、CPD (右) [2]

我々はフーリエ変換赤外(FTIR)分光法を用いた構造解析を試み、これまで FAD^{ox} から FADH⁻への光反応及び(6-4)光産物の修復における FTIR 差スペクトルを得ることに成功し、反応機構解明に向けた端緒を開くことが出来た[2-4]。今回我々は、*Xenopus* (6-4)光回復酵素に対して低温 FTIR 分光法を用いた構造解析を試みたところ、(6-4)光産物の修復中間体に由来する信号を含んでいると考えられる赤外差スペクトルを温度依存的に捉えることに成功した。さらに、¹³C 標識した(6-4)光回復酵素の測定を行うことで、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[4]。¹³C 標識した(6-4)光回復酵素は M9 培地 (0.5 g/ 1L culture ¹⁴NH₄Cl, 4 g/ 1 L culture ¹³C-Glucose を含む) を用いて培養し調製した。二本鎖 DNA は 14 塩基対からなり、配列中に合成した(6-4)光産物を含む。塩基配列を以下に示す[5]。

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[2]。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(修復前後の差スペクトル)とは異なるものであった (Figure 2.)。77 K では、1800-1700 cm^{-1} の C=O 伸縮振動が見られているが、200 K 以上で見られる Amide I の領域 (1700-1600 cm^{-1}) に変化が見られなかった。そのため、77 K は他の温度での測定と異なる状態を示していると言える。また、230 K では、200 K では見られないリン酸 PO_2^- の非対称伸縮振動領域 (~1230 cm^{-1}) に変化が見られていることから、200 K と 230 K では異なった状態を示していると考えられる。250 K を見ると 277 K と類似したバンドが見られた。1720 (+) cm^{-1} のバンドは修復され新たに生じたチミンの $\text{C}_4=\text{O}$ (Figure 1. 中央) に由来すると考えられているバンドである。そのため、250 K でも修復反応が起きていると考えられるが、230 K 以下ではスペクトルの形が 277 K のものとは異なるため、これらの温度では完全には修復がなされておらず、修復中間体だと考えられる。以上の事から、低温で得られたスペクトル (77, 200, 230 K) は少なくとも 3 つの修復中間体を捉えられていると考えられる。

さらに、同じ測定を ^{13}C 標識(6-4)光回復酵素についてもを行い、両者のスペクトルを比較することで、1800-1700 cm^{-1} のバンドが(6-4)光産物の C=O 伸縮振動、1700-1600 cm^{-1} のバンドが(6-4)光回復酵素の Amide I、低波数領域のバンドが DNA のリン酸骨格であると同定した。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。

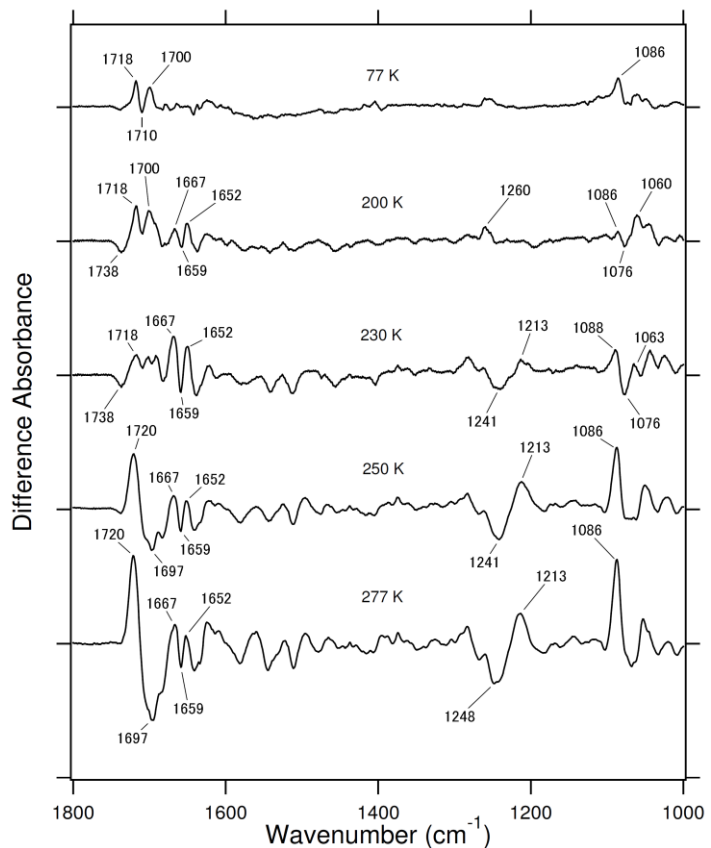


Figure 2. 低温FTIR分光法を用いた77-277 Kの温度範囲での(6-4)光産物の修復中間体の測定結果。

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

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

[3] Zhang, Y., Yamamoto, J., Yamada, D., Iwata, T., Hitomi, K., Iwai, S., Todo, T., Getzoff, E. D., Kandori, H. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 2774-2777.

[4] Yamada, D., Zhang, Y., Iwata, T., Hitomi, K., Getzoff, E. D. and Kandori H. *Biochemistry* **2012**, *51*, 5774-5783.

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