

## 4P065

### (6-4)光回復酵素の低温における DNA 修復中間体の赤外分光測定

(名工大院・工<sup>1</sup>、阪大院・基礎工<sup>2</sup>、米国・スクリプス研<sup>3</sup>)

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

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

(Nagoya Inst. Tech. Japan<sup>1</sup>, Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ. Japan<sup>2</sup>,  
The Scripps Res. Inst., USA<sup>3</sup>)

○Daichi Yamada<sup>1</sup>, Junpei Yamamoto<sup>2</sup>, Yu Zhang<sup>1</sup>, Tatsuya Iwata<sup>1</sup>,  
Kenichi Hitomi<sup>3</sup>, Shigenori Iwai<sup>2</sup>, Elizabeth D. Getzoff<sup>3</sup>, Hideki Kandori<sup>1</sup>

【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<sup>ox</sup>)から光照射によりセミキノン型(FADH<sup>•</sup>)を経て酵素活性をもった完全還元型(FADH<sup>-</sup>)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)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 (Figure 1、下)があるが、いずれも FADH<sup>-</sup>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 (Figure 1、中央)などが提案されてきた。しかし、修復における反応中間体の構造解析は皆無である[1]。

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<sup>ox</sup> から FADH<sup>-</sup>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、<sup>13</sup>C 標識(6-4)光回復酵素と <sup>18</sup>O 標識(6-4)光産物を用いた測定を行うことで、FTIR シグナルの帰属と中間体の構造モデルを提案する。

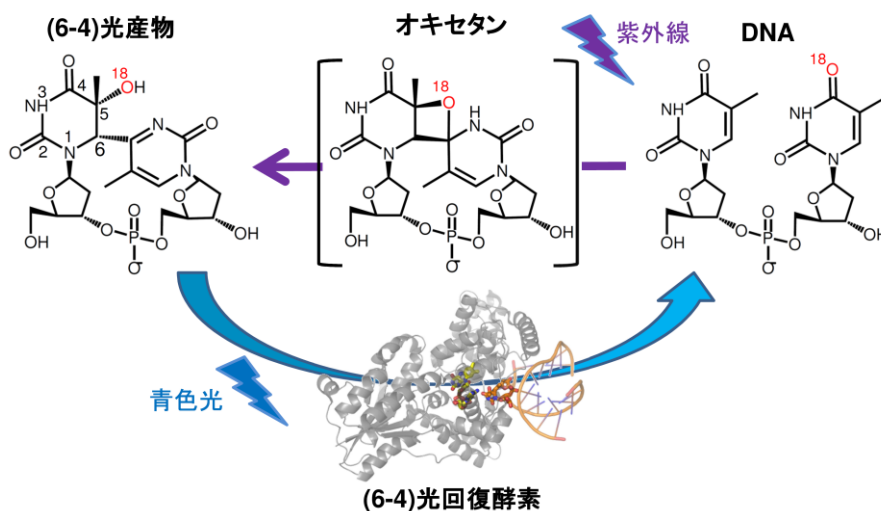


Figure 1 (6-4)光産物形成と(6-4)光回復酵素による修復

【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]。 $^{13}\text{C}$  標識(6-4)光回復酵素は、M9 培地 (0.5 g/ 1L culture  $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ , 4 g/ 1 L culture  $^{13}\text{C}$ -Glucose を含む) を用いて培養し精製した。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]。



また、 $^{18}\text{O}$  標識(6-4)光産物は Figure 1 に示す通り標識した。

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  $>450\text{ nm}$  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  $>390\text{ nm}$  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、 $1800\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  の C=O 伸縮振動は変化したものの Amide I の領域 ( $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ) に変化が見られなかった。200 K 以上で Amide I 領域に変化が現れ、230 K では、さらにリン酸 ( $\text{PO}_2^-$ ) の非対称伸縮振動領域 ( $\sim 1230\text{ cm}^{-1}$ ) に変化が見られた。250 K を見ると 277 K と類似したバンドが見られた。1720 (+)  $\text{cm}^{-1}$  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、右) に由来すると考えられているバンドである[2]。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。

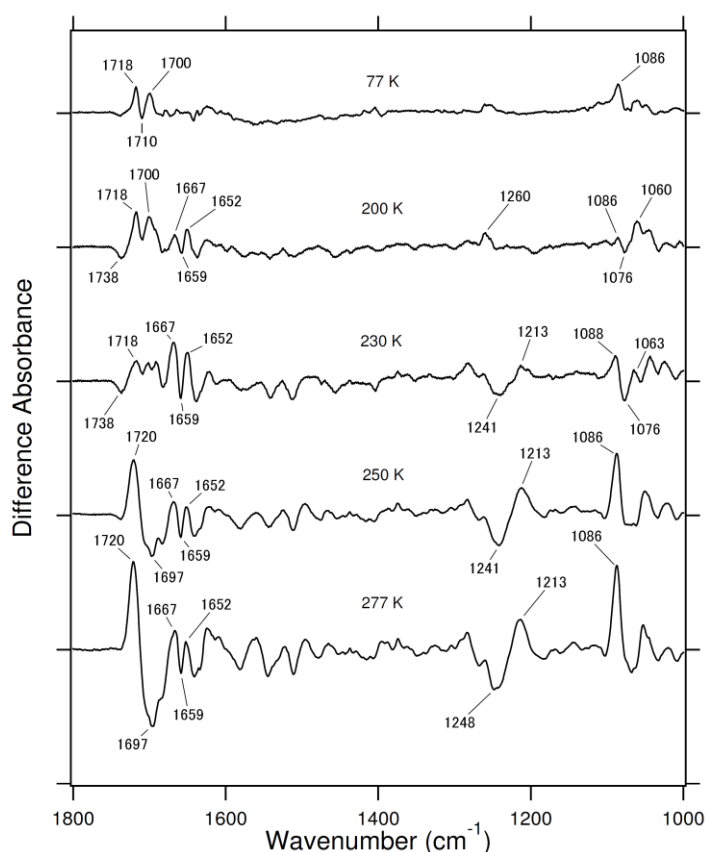


Figure 2 低温FTIR分光法を用いた(6-4)光産物の修復中間体の測定結果

また、同じ測定を  $^{13}\text{C}$  標識(6-4)光回復酵素についても行い、両者のスペクトルを比較することで、 $1800\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$  のバンドが(6-4)光産物の C=O 伸縮振動、 $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$  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。さらに、 $^{18}\text{O}$  標識(6-4)光産物の結果も合わせて、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] 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.