

2F12

低温赤外分光法による(6-4)光回復酵素のDNA修復中間体の測定

(お茶大・生命情報¹、阪大院・基礎工²、名工大院・工³、米国・スク
リップス研⁴) ○山田大智¹、山元淳平²、張宇³、岩田達也³、
E. D. Getzoff⁴、岩井成憲²、神取秀樹³

The intermediates in (6-4) photolyase repair process by Low-temperature FTIR spectroscopy.

(Cent. Info. Biol., Ochanimizu Univ. Japan¹, Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.
Japan², Nagoya Inst. Tech. Japan³, The Scripps Res. Inst., USA⁴)
○Daichi Yamada¹, Junpei Yamamoto², Yu Zhang³, Tatsuya Iwata³,
Elizabeth D. Getzoff⁴, Shigenori Iwai², Hideki Kandori³

【序】我々生物がもつ DNA に紫外光が当たると細胞死やガンの原因となる DNA 損傷 (主に、シクロブタン型ピリミジンダイマー (CPD) と(6-4)光産物 (Figure 1、左上)) がある。光回復酵素とは、この DNA 損傷を同じ紫外光 (あるいは青色光) を使って修復することができる酵素である。これまでの研究により光回復酵素は以下のような特徴をもつことが知られている。光吸収を担うのは酵素内部に結合した発色団フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) であり、酸化型 (FAD^{ox}) から 2 回の光照射によりセミキノン型 (FADH[•]) を経て触媒活性をもった完全還元型 (FADH⁻) を生成する。FADH⁻ が基質存在下で光を吸収すると、基質への電子移動が起こって修復が実現する。光回復酵素には、CPD を修復する CPD 光回復酵素と(6-4)光産物を修復する(6-4)光回復酵素 (Figure 1、下) がある。(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るが、修復における反応中間体の構造解析は未だ皆無である[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^{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[2-6]。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(6-4)光回復酵素と ¹⁵N 標識(6-4)光産物、¹⁸O 標識(6-4)光産物をそれぞれ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。

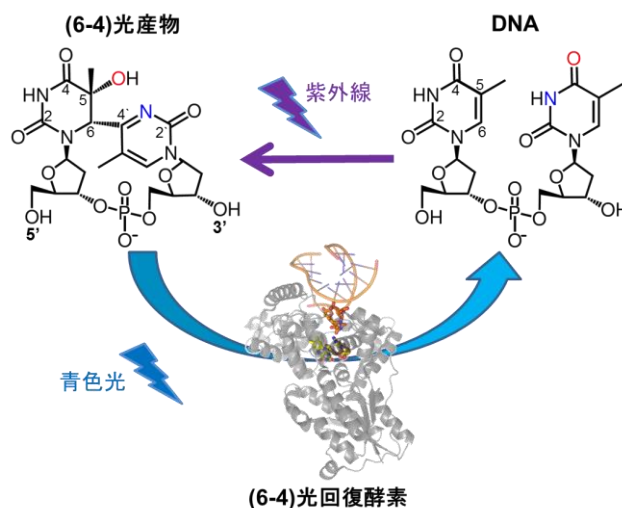


Figure 1 (6-4)光産物形成と
(6-4)光回復酵素による修復

【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]。¹³C 標識(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) を用いて培養し精製した[6]。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[7]。

5'-CGCGAATTTGCGCCC-3' (TT:(6-4) 光産物)
3'-GCGCTTAACGCGGG-5'

また、 ^{15}N 標識(6-4)光産物と ^{18}O 標識(6-4)光産物は、Figure 1 に示す青の N と赤の O の原子を標識している。

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だけの 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 (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 (+) 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。また、光照射に伴い FADH^- から(6-4)光産物に電子が供給され、FAD は一電子酸化された FADH^\cdot を形成する。しかし、今回得られた低温のスペクトルには、 FADH^- に特徴的な 1535 cm^{-1} のバンドが見られなかった。得られた低温スペクトルは、構造変化を誘起していることから電子移動反応は起きているが、電子は FAD に戻った後の構造状態を捉えていると考えられる。次に、同じ測定を ^{13}C 標識(6-4)光回復酵素についても行い、標識と非標識、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、 ^{15}N 標識(6-4)光産物と ^{18}O 標識(6-4)光産物でそれぞれ測定した結果も合わせて、各温度における中間状態の構造モデルを提案する。

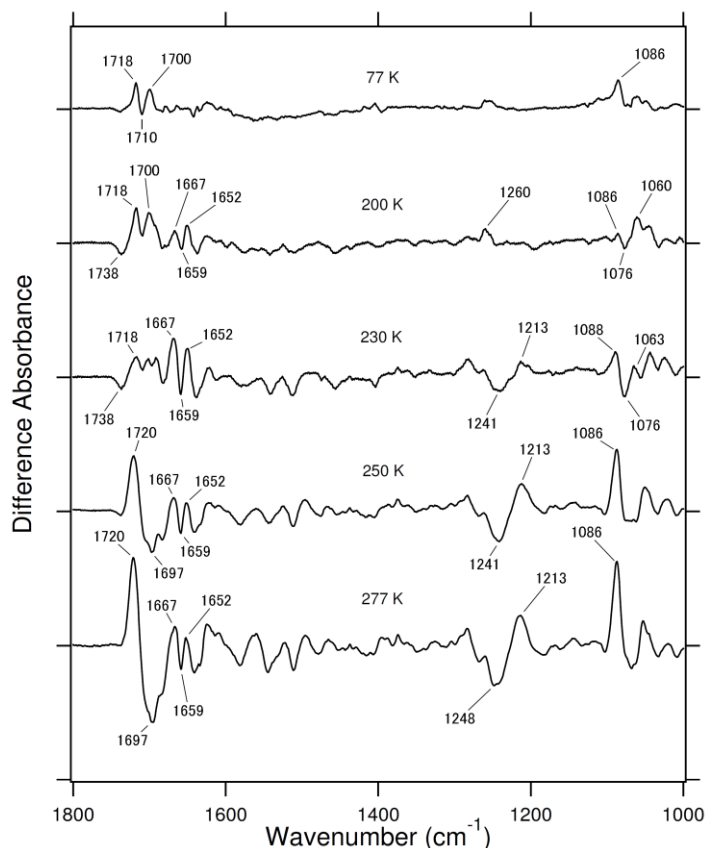


Figure 2 低温FTIR分光法を用いた(6-4)光産物の修復中間体の測定結果

[1] Sancar, A. *Angew.Chem.Int. Ed.*, **2016**, 55, 8502–8527.

[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] Yamada, D., Iwata, T., Yamamoto, J., Hitomi, K., Todo, T., Iwai, S., Getzoff, E. D., Kandori H., *Biophys. Physicobiol.*, **2015**, 12, 139–144.

[6] Yamada, D., Yamamoto, J., Zhang, Y., Iwata, T., Hitomi, K., Getzoff, E. D., Iwai, S., Kandori H., *Biochemistry*, **2016**, 55, 715–723.

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