

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：13903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770151

研究課題名(和文)クリプトクロム/DNA光回復酵素ファミリーの光反応機構の解明

研究課題名(英文)eli

研究代表者

岩田 達也(Tatsuya, Iwata)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20569917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：DNA光回復酵素の反応機構解明のために以下の研究を行った。

(6-4)光回復酵素の光活性化反応の詳細について分光法による解析を行った。CPD光回復酵素の機能発現に伴う構造変化をFTIR分光法により計測し、(6-4)光回復酵素のシグナルと比較した。

その結果、以下の結果を得た。277 Kで「酸化型-中性セミキノン型-還元型」の一連の反応に伴う構造変化の検出に成功した。また、200 Kで光照射することにより、アニオンラジカル型の蓄積を確認することが出来た。CPD光回復酵素がCPD結合の際にヘリックスが構造変化を起こすが、この構造変化の様式が(6-4)光回復酵素逆向きであることがわかった。

研究成果の概要(英文)：I carried out the following research experiments for the elucidation of reaction mechanism of DNA photolyases. (1) I measured the detailed photoreaction of *Xenopus* (6-4) photolyase by UV-vis and FTIR spectroscopy. (2) I measured light induced difference FTIR spectra which accompany the structural changes of photoactivation and photorepair processes of *E. coli* CPD photolyase by FTIR spectroscopy, and compared with those of *Xenopus* (6-4) photolyase.

I obtained the following results. (1) I succeeded in the detection of the structural change accompanying a series of responses of the photoreaction of FAD, "oxidized form - neutral semiquinoid form - reduced form" at 277 K. I was also able to check the accumulation of the anionic radical form illuminated at 200 K. (2) Upon the CPD binding to CPD photolyase, the structural changes of the alpha helices take place. The style of the structural changes was reverse compared to those of (6-4) photolyase.

研究分野：6803

科研費の分科・細目：生物物理学

キーワード：フラビン DNA修復 光回復酵素 シクロブタン型ピリミジン二量体 (6-4)光産物

1. 研究開始当初の背景

クリプトクロムと DNA 光回復酵素は進化的に近縁で共通の構造を形成し同一の色素(フラビンアデニンジヌクレオチド、FAD)を結合しており、タンパク質ファミリーを形成している。しかしながら両者の機能は全く異なり、クリプトクロムは植物の光センサーや動物の概日時計の一部として機能する一方、DNA 光回復酵素は紫外線によって損傷を受けた DNA (ピリミジン二量体、CPD と(6-4)光産物)を近紫外・青色光を用いて修復する酵素である。また、CPD と(6-4)光産物を修復する特異的な DNA 光回復酵素 (CPD 光回復酵素と(6-4)光回復酵素)が存在する。

私はこれまでにシアノバクテリア由来のクリプトクロム-DASH とアフリカツメガエル由来の(6-4)光回復酵素について紫外・可視とフーリエ変換赤外 (FTIR) 分光法による研究を行い、それらの光反応における構造変化と DNA 修復機構の測定系を構築し、反応機構解明への道筋を漬けることに成功した (Iwata, T., et al. (2010) *Biochemistry* 49, 8882-8891, Zhang, Y. et al. (2011) *Biochemistry* 50, 3591-3598, Zhang, Y. et al. (2011) *J. Phys. Chem. Lett.* 2, 2774-2777.)。それらの研究から、FAD は同じ光反応をするにもかかわらず異なる機能を持つ理由を明らかにしたいと考えられるようになった。これまでに、光回復酵素の基質や特異性を変えることに成功したという報告はなく、クリプトクロムを光回復酵素に変換した研究も報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、進化的に近縁であるが機能の全く異なるクリプトクロム/DNA 光回復酵素ファミリーを対象として、DNA 修復活性の発現に必要な要素を明らかにし、反応機構を解明することを目的とする。この目的のために、以下の実験を行った。

- ① (6-4)光回復酵素の光活性化反応の詳細を紫外・可視分光法と FTIR 分光法を用いて解析を行った。
- ② CPD 光回復酵素の機能発現に伴う構造変化を FTIR 分光法により計測し、(6-4)光回復酵素のシグナルと比較した。

3. 研究の方法

本研究では、用いた光回復酵素は大腸菌由来の CPD 光回復酵素とアフリカツメガエル由来の(6-4)光回復酵素である。大腸菌大量発現系を用いて、N 末端側に His₆ タグを融合させた融合タンパク質として調製した。精製は Co-NTA 或いは Ni-NTA レジンを用いた。精製度が不十分な時は、必要に応じて陰イオン交換カラムを用いて、塩化ナトリウム濃度勾配により溶出させ、精製した。

FTIR 分光に供与するため、CPD 光回復酵素は濃縮させた状態 (濃縮溶液、濃度 2 mM) にした。また、(6-4)光回復酵素は濃

縮溶液を FTIR 窓板の上で穏やかに乾燥させ、そこに緩衝液あるいは(6-4)光産物溶液を用いて溶解させた試料 (再溶解試料) を用いた。

FTIR 分光法は、温度コントロール可能なクライオスタットが設置された FTIR 分光光度計にて測定を行った。温度を 277 K 或いは 200 K にセットし、光照射前後の差スペクトルを計測した。128 スキャンで 1 スペクトルを計測し、6-8 本の差スペクトルを積算してシグナル・ノイズ比を上げた。

4. 研究成果

① DNA 光回復酵素が活性型になるためには、酸化型 FAD (FAD^{ox}) が二電子還元を受けた完全還元型 (FADH⁻) になる必要がある。活性化過程の詳細な解析を行うため、一電子ずつ還元される反応条件を検討し、その条件で FTIR 分光法による解析を行った。

FAD 酸化型の PHR を 277 K にセットし、450 nm の単色光を照射すると 550 nm 以上に吸収を持つ中間体が蓄積した。これは一電子還元されプロトンが結合した中性セミキノン型 (FADH[•]) に特徴的な吸収である。次に、FADH[•] が吸収する領域の 550 nm 以上の光を照射したところ、FADH⁻ への反応が起きた (図 1、上のスキーム)。

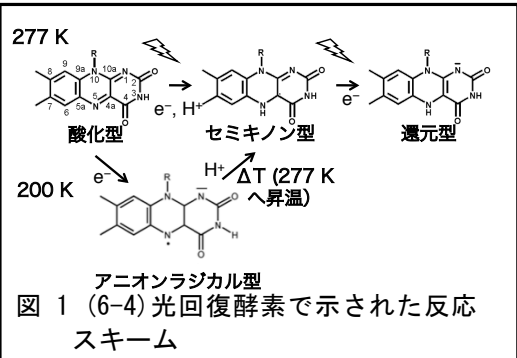


図 1 (6-4)光回復酵素で示された反応スキーム

また、試料を 200 K にセットして光を照射したところ、アニオンラジカル型 (FAD^{•-}) の生成を確認した。これは電子移動反応のみが起こり、プロトン移動反応は起きていないことを示している。また、この状態で 277 K に昇温すると FADH[•] が生成した (図 2、下のスキーム)。すなわち、200 K ではプロトン移動反応は起こらないことがわかった。これらの条件で FTIR 測定を行い、それぞれの酸化還元状態に特異的に現れる FTIR バンドを確認した。また、タンパク質二次構造を反映するアミド I 領域のシグナルから、FAD^{•-} では β シートの構造変化が、FADH[•] では α ヘリックスの構造変化がそれぞれ起こることがわかった。また、これらの変化は FADH⁻ では元に戻る (FAD^{ox} に近い構造になる) ことが示された。

② CDP 光回復酵素は(6-4)光回復酵素よりよく研究されているが、反応の分子機構が解明されたとは言い難い。CPD 光回復酵素を対象

として、その DNA 修復過程と基質特異性の解明を目指して、FTIR 分光法による解析を試みた。そして、既に得られている(6-4)光回復酵素の FTIR スペクトル (図 2 上) と比較することにより両者の共通性と特異性を調べた。

大腸菌由来の CPD 光回復酵素を大腸菌の大量発現系を用いて調製したところ、FADH \cdot の PHR として調製された。これを酸化剤や空気酸化により FAD ox 型に反応させたところ、CPD 光回復酵素は(6-4) 光回復酵素とは異なり、光還元反応が殆ど進まなかった。従って、CPD-光回復酵素の光反応は FADH \cdot から FADH $^-$ への反応について FTIR 測定を行った。(6-4) 光回復酵素の時と同様に、化学合成された CPD を含む DNA 基質を結合させ、光反応と DNA の修復の反応の FTIR 測定を行った (図 2 中)。

基質 DNA の結合に伴う構造変化の観測を行ったところ、CPD-PHR が CPD を結合する際に α ヘルックスが構造変化を起こすことがわかったが、この構造変化の様式が(6-4) PHR が(6-4)光産物を結合する際に起こす構造変化と逆向きであることがわかった (図 2 下)。この研究で、DNA の結合から解離までの複雑な酵素反応を FTIR 分光法により捉えることが出来た。

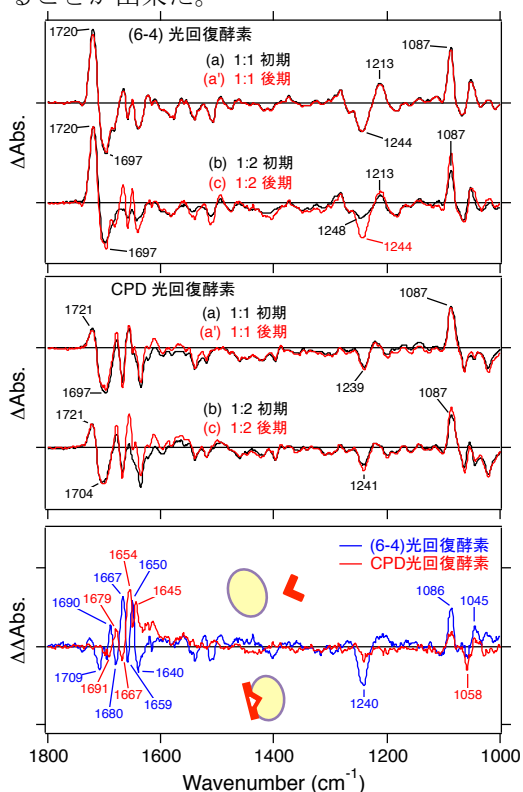


図 2 光回復酵素の損傷 DNA 修復の FTIR 差スペクトル(a-d)。と、還元型の光回復酵素と基質の結合に伴う差スペクトル(e)。文献①より改変して引用。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① I. M. Mahaputra Wijaya, Yu Zhang, Tatsuya Iwata, Junpei Yamamoto, Kenichi Hitomi, Shigenori Iwai, Elizabeth D. Getzoff, Hideki Kandori (2013) “Detection of Distinct α -Helical Rearrangements of CPD Photolyase upon Substrate Binding by FTIR Spectroscopy”, *Biochemistry* **52**, 1019–1027. DOI: 10.1021/bi3016179.
- ② Louisa Reissig, Tatsuya Iwata, Takashi Kikukawa, Makoto Demura, Naoki Kamo, Hideki Kandori, Yuki Sudo (2012) “Influence of Halide Binding on the Hydrogen Bonding Network in the Active Site of *Salinibacter* Sensory Rhodopsin I”, *Biochemistry* **51**, 1019–8813. DOI: 10.1021/bi3009592.
- ③ Daichi Yamada, Yu Zhang, Tatsuya Iwata, Kenichi Hitomi, Elizabeth D. Getzoff, Hideki Kandori (2012) “Fourier-Transform Infrared Study of the Photoactivation Process of *Xenopus* (6–4) Photolyase” *Biochemistry* **51**, 5774–5783. DOI: 10.1021/bi300530x

[学会発表] (計 3 3 件)

1. ○山田大智、岩田達也、神取秀樹「(6-4) 光回復酵素における光活性化の分子メカニズム」日本生物物理学会中部支部講演会、2014年3月6日、岡崎
2. 岩田達也「フラビンを発色団とする光センサータンパク質の多様性」名古屋工業大学オプトバイオテクノロジー研究センター設立シンポジウム (招待講演) 2013年12月26日~12月27日、名古屋
3. ○三國克紘、山田大智、鈴木智大、I. M. M. Wijaya、岩田達也、人見研一、Elizabeth D. Getzoff、神取秀樹「クリプトクロム・光回復酵素の構造機能相関の解明」、新学術領域研究「柔らかな分子系」2013年12月5日~12月7日、長浜
4. ○I. M. M. Wijaya, T. Iwata, T. Mathes, J. Yamamoto, K. Hitomi, E. D. Getzoff, S. Iwai, J. T. Kennis, H. Kandori, “FTIR study of CPD-Photolyase FAD activation and DNA repair by isotope-labeled enzyme” 新学術領域研究「柔らかな分子系」2013年12月5日~12月7日、長浜
5. ○鈴木智大、岩田達也、I. M. M. Wijaya、山元淳平、石川智子、山田大智、E. D. Getzoff、岩井成憲、藤堂 剛、神取秀樹「クリプトクロムから光回復酵素への機能転換」、新学術領域研究「柔らかな分子系」2013年12月5日~12月7日、長浜
6. ○Daichi Yamada, Junpei Yamamoto, Yu Zhang, Tatsuya Iwata, Kenichi Hitomi, Elizabeth D. Getzoff, Shigenori Iwai, Hideki Kandori, “Molecular mechanism of photoactivation of *Xenopus* (6-4) photolyase”, The 6th Asia & Oceania

- Conference on Photobiology, November 10–13, 2013, Sydney, Australia.
7. ○T. Suzuki, T. Iwata, I. M. M. Wijaya, J. Yamamoto, T. Ishikawa, D. Yamada, E. D. Getzoff, S. Iwai, T. Todo, H. Kandori, “Cyanobacterial Cryptochrome-DASH mutants that repair CPD in double stranded DNA”, 日本生物物理学会、2013年10月28日–10月30日、京都
 8. ○D. Yamada, J. Yamamoto, Y. Zhang, T. Iwata, K. Hitomi, E. D. Getzoff, S. Iwai, H. Kandori, “Molecular mechanism of photoactivation and photorepair of *Xenopus* (6-4) photolyase”, 日本生物物理学会、2013年10月28日–10月30日、京都
 9. ○I. M. M. Wijaya, T. Iwata, T. Mathes, J. Yamamoto, K. Hitomi, E. D. Getzoff, S. Iwai, J. T. Kennis, Kandori, “FTIR study of isotope-labeled CPD Photolyase” 日本生物物理学会、2013年10月28日–10月30日、京都
 10. ○鈴木智大、岩田達也、I. M. M. Wijaya、山元淳平、石川智子、山田大智、E. D. Getzoff、岩井成憲、藤堂剛、神取秀樹「シアノバクテリア由来のCRY-DASHのCPD光回復酵素への機能転換」錯体化学若手の会、2013年9月21日、岡崎
 11. ○山田大智、岩田達也、神取秀樹「(6-4)光回復酵素における光活性化のメカニズム」第53回生物物理若手の会夏の学校、2013年9月6日~9月9日、伊豆
 12. ○鈴木智大、岩田達也、I. M. M. Wijaya、山元淳平、石川智子、山田大智、E. D. Getzoff、藤堂剛、岩井成憲、神取秀樹「DNA光回復酵素への機能転換を試みたCRY-DASHの赤外分光法による構造解析」第53回生物物理若手の会夏の学校、2013年9月6日~9月9日、伊豆
 13. ○H. Kandori, I. M. M. Wijaya, D. Yamada, T. Iwata, “Light-induced difference FTIR study of CPD and (6-4) photolyase” Seventh International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS7), Aug. 26-Aug. 27, 2013, Kobe, Japan
 14. ○I. M. M. Wijaya, T. Iwata, T. Mathes, J. Yamamoto, K. Hitomi, E. D. Getzoff, S. Iwai, J. T. Kennis, H. Kandori, “Isotope Labeled CPD-Photolyase Revealed FAD Redox States Affects the DNA Substrate C=O Vibration”, 1st Awaji International Workshop on "Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Applications", Jun. 26–Jun. 27, Awaji, Japan.
 15. ○T. Suzuki, I. M. M. Wijaya, J. Yamamoto, T. Ishikawa, D. Yamada, T. Iwata, T. Todo, S. Iwai, H. Kandori, “Conversion of cyanobacterial Cryptochrome-DASH into CPD Photolyase by site-directed mutagenesis”, 1st Awaji International Workshop on "Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Applications", Jun. 26–Jun. 27, Awaji, Japan.
 16. ○Daichi Yamada, Yu Zhang, Tatsuya Iwata, Junpei Yamamoto, Kenichi Hitomi, Shigenori Iwai, Elizabeth D. Getzoff, Hideki Kandori, “The intermediates in *Xenopus* (6-4) photolyase repair process by low-temperature FTIR spectroscopy”, 1st Awaji International Workshop on "Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Applications", Jun. 26–Jun. 27, Awaji, Japan.
 17. ○Daichi Yamada, Yu Zhang, Tatsuya Iwata, Junpei Yamamoto, Kenichi Hitomi, Shigenori Iwai, Elizabeth D. Getzoff, Hideki Kandori, “FTIR study of the photorepair intermediates of *Xenopus* (6-4) photolyase”, 8th Asia Biophysics Association (ABA) Symposium, May 26–May 29, 2013, Jeju-do, Korea
 18. 岩田達也「タンパク質の赤外分光計測で何がわかるか？」神戸大学先端融合科学シンポジウム「タンパク質の低振動ダイナミクス:水と熱活性」(招待講演)、2013年03月28日、神戸
 19. 岩田達也「フラビントタンパク質とは?-その歴史から新規機能性タンパク質の開発まで」日本植物生理学会シンポジウム「フラビン酵素の植物生理学」(招待講演) 2013年03月21日~2013年03月23日、岡山
 20. ○I. M. M. Wijaya、張宇、岩田達也、山元淳平、人見研一、岩井成憲、E. D. Getzoff、神取秀樹、”CPD- and (6-4) Photolyase's Distinct α -helices Rearrangement upon DNA Binding by FTIR Spectroscopy”、日本生物物理学会中部支部講演会、2013年2月19日、名古屋
 21. ○S. Ito, H. Kato, T. Iwata, O. Nureki and H. Knadori, “Protein bound water molecules of channelrhodopsin”, Nagoya Symposium-Frontiers in Structural Physiology, Jan. 22-Jan. 24, 2013, Nagoya, Japan.
 22. ○I. M. M. Wijaya、張宇、岩田達也、山元淳平、人見研一、岩井成憲、E. D. Getzoff、神取秀樹「Enzyme and DNA Substrate Assignment of *E. coli* CPD Photolyase by FTIR Spectroscopy」第43回中部化学関係学協会支部連合秋季大会、2012年11月10日~11月11日、名古屋
 23. ○山田大智、岩田達也、神取秀樹「(6-4)光回復酵素の低温におけるDNA修復中間体の測定」第43回中部化学関係学協会支部連合秋季大会、2012年11月10日~11月11日、名古屋

24. ○伊藤奨太、岩田達也、神取秀樹「BLUF domainにおける活性中心の水素結合環境変化」第43回中部化学関係学協会支部連合秋季大会、2012年11月10日～11月11日、名古屋
25. ○T. Iwata, S. Ito, M. Iseki, M. Watanabe and H. Kandori, "Structural changes of hydrogen-bonding environment upon the photoreaction of the BLUF domains", The 50th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Nagoya, Japan.
26. ○D. Yamada, Y. Zhang, T. Iwata, J. Yamamoto, K. Hitomi, S. Iwai, T. Todo, E. D. Getzoff and H. Kandori, "Repair of damaged DNA by the anion radical form of (6-4) photolyase", The 50th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Nagoya, Japan.
27. 岩田達也、伊藤奨太、伊関峰生、渡辺正勝、○神取秀樹「BLUFドメインの光活性化に伴う水素結合構造の赤外分光解析」第6回分子科学討論会、2012年09月18日-9月22日、東京
28. ○山田大智、岩田達也、神取秀樹「アニオンラジカル型FADを安定にもつ(6-4)光回復酵素変異体によるDNA修復」第52回生物物理若手の会夏の学校、2012年8月31日-2012年9月3日、北海道
29. ○伊藤奨太、岩田達也、神取秀樹「BLUFドメインの光活性化に伴う水素結合構造の赤外分光解析」第52回生物物理若手の会夏の学校、2012年8月31日-2012年9月3日、北海道
30. ○D. Yamada, Y. Zhang, T. Iwata, K. Hitomi, E. D. Getzoff and H. Kandori, "FTIR study of the photoactivation process of Xenopus (6-4) photolyase", The 244th American Chemical Society (ACS) National Meeting "Photochemistry in Biology", Aug. 19-Aug. 23, 2012, Philadelphia, USA.
31. ○岩田達也、伊藤奨太、伊関峰生、渡辺正勝、神取秀樹「BLUFドメインの光誘起反応における水素結合環境変化」第17回日本光生物学協会年会2012年8月17日～8月18日、大阪
32. ○伊藤奨太、岩田達也、伊関峰生、渡辺正勝、神取秀樹「BLUFドメインにおける活性中心の水素結合変化」分子科学シンポジウム「生体分子と水素結合」2012年6月9日、東京
33. ○伊藤奨太、岩田達也、伊関峰生、渡辺正勝、神取秀樹「BLUFドメインの光誘起反応における水素結合環境変化」第39回生体分子科学討論会、2012年6月8日～6月9日、仙台

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

〔その他〕

国立大学法人 名古屋工業大学 研究者データベースシステム

http://researcher.nitech.ac.jp/html/100000171_ja.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 達也 (IWATA, Tatsuya)

研究者番号 : 20569917