

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870400

研究課題名(和文)青色光受容タンパク質によるDNA修復機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of DNA repair mechanisms of blue light receptor proteins

研究代表者

山元 淳平(YAMAMOTO, Junpei)

大阪大学・基礎工学研究科・助教

研究者番号：90571084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：(6-4)光回復酵素は太陽光中の青色光を用いて、がん化の原因となる紫外線損傷DNAの一つである(6-4)光産物を直接修復することのできるタンパク質である。しかし、(6-4)光回復酵素の機能は完全に解明されていなかった。そこで、本研究課題では、(6-4)光回復酵素の修復反応機構を調べるため、酵素のアミノ酸変異体を用いた分子科学研究を行った。その結果、(6-4)光回復酵素による損傷DNAの認識および修復に関するアミノ酸側鎖を新たに同定した。今後、(6-4)光回復酵素と相同性の高い、概日時計を司るクリプトクロムの研究へと展開されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：(6-4) photolyases are flavoproteins that are able to directly repair the (6-4) photoproducts, one of the UV-induced DNA lesions, in response to blue light in sunlight. Thus far, overall function of the (6-4) photolyase still remains obscure. Here, in order to investigate the DNA repair mechanism of the (6-4) photolyase, molecular scientific studies using mutants of the enzyme were performed. As results, several amino acids residues involved in the repair and recognition of the (6-4) photoproduct have been identified. In future, these information would be applied to the investigations on cryptochromes, which share high homologies with the (6-4) photolyase and are responsible for the regulation of the circadian clocks in human.

研究分野：生物科学

キーワード：DNA修復 DNA損傷 光生物

1. 研究開始当初の背景

光回復酵素はフラビントタンパク質の一種であり、青色光に反応して紫外線損傷 DNA を直接的に修復することのできるタンパク質である。この光回復酵素は修復対象に応じて2つのクラスに分類され、それぞれ CPD 光回復酵素、(6-4)光回復酵素と呼ばれる。CPD 光回復酵素による修復反応機構は盛んに研究がなされており、その修復反応の本質は光励起されたフラビンから損傷 DNA への一電子移動によるものであることが明らかとなっている一方、本課題の研究対象である(6-4)光回復酵素は、概日リズムを担うクリプトクロムとアミノ酸配列や三次元構造の相似性が高く、クリプトクロムの進化由来酵素、つまりモデル酵素であると考えられており、その重要性に注目されている。しかし、(6-4)光回復酵素の機能は完全に解明されておらず、特にその反応機構に関しては研究開始当初においても世界的に意見が分かれている状況であった。

2. 研究の目的

研究代表者は、(6-4)光回復酵素による DNA 修復には 2 光子必要であることを新たに示した(図1)が、以前より修復反応に関与することが示されていたアミノ酸側鎖の分子論的役割が不明瞭であった。そこで、本研究課題では、(6-4)光回復酵素の研究を世界的にリードすべく、『(6-4)光回復酵素による 2 光子修復反応機構のより詳細な分子メカニズムの理解』を目指した。

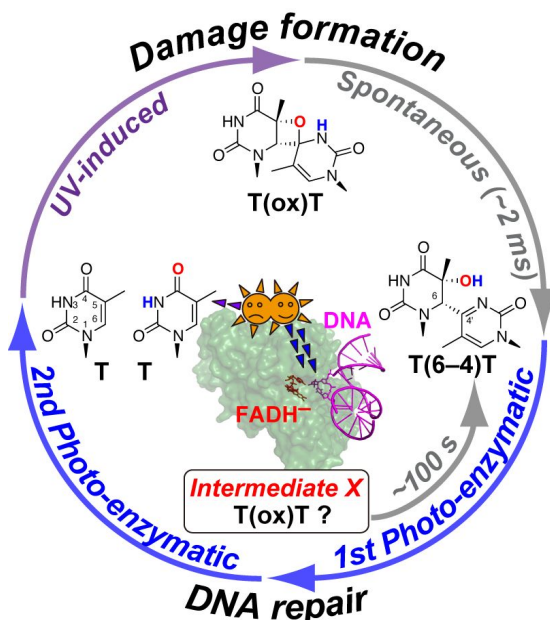


図1：(6-4)光回復酵素による(6-4)光産物の逐次的 2 光子修復反応機構。上半分が DNA 損傷形成反応機構を示し、下半分が研究代表者の研究結果(成果 3)から明らかとなった逐次的反応。(6-4)光回復酵素による修復は、準安定な中間体を經由し、その寿命は 10°C の条件において約 100 秒であることが明らかとなった。

具体的には、以下のことを明らかにするため、研究を行った。

- (1) 修復反応に必須であることがわかっている、保存されたヒスチジン側鎖(図2中 H354)の 2 光子反応機構における役割の解明
- (2) 隣接位に存在する保存されたヒスチジンやチロシン側鎖(図2中 H358 および Y412)の 2 光子反応機構における役割の解明
- (3) (6-4)光回復酵素による 2 光子修復反応の基質一般性の検討
- (4) (6-4)光回復酵素による基質認識機構の解明

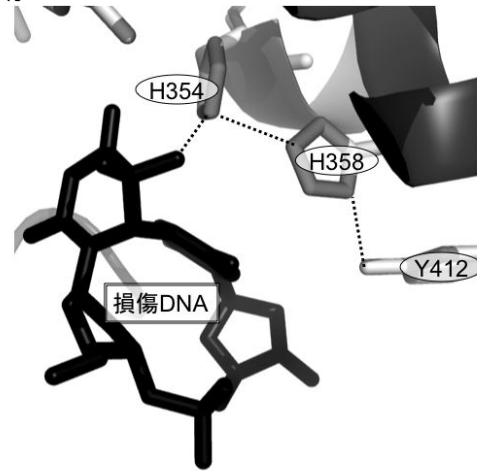


図2：(6-4)光回復酵素活性中心にて、(6-4)光産物修復に関与すると考えられるアミノ酸側鎖

3. 研究の方法

2 光子 DNA 修復反応機構の詳細な分子メカニズムを調べるため、修復に関与することが予想される(6-4)光回復酵素アミノ酸側鎖の変異体を調製し、修復反応量子収率や中間体の寿命測定を行った。これにより、中間体形成および中間体安定化に寄与するアミノ酸側鎖の役割について考察した。また、このアミノ酸側鎖の重要性を調べるため、これらの変異大腸菌株を作成し、紫外線感受性などの表現型を調べた。平行して、損傷 DNA の基質一般性や基質認識機構について明らかにし、本酵素の生体防御メカニズムの全容解明を目指した。

4. 研究成果

(1 および 2) 本課題を行うため、アフリカツメカエル由来(6-4)光回復酵素の点変異体 H354A、H358A、H412F を産生するプラスミドを作成し、大腸菌 SY32 株に形質移入して、大腸菌紫外線照射および白色光照射に伴う生存率を、野生型および変異型で比較した(図3)。その結果、野生型と比較して、上記 H354A、H358A、Y412F は全て(6-4)光回復酵素欠損株と同程度の低い生存率を示した。このことから、従来想定されていたように、H354 の重要性だけでなく、その近傍に存在する H358 や Y412 も修復反応に必須であることが明らかとなった。

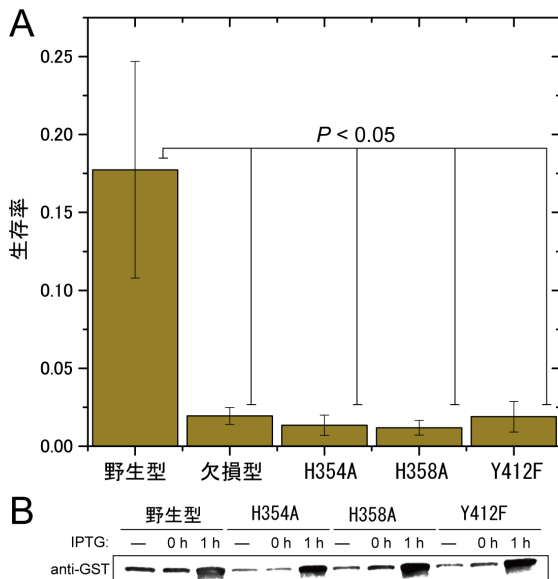


図3：(6-4)光回復酵素野生型および変異型の大腸菌生存実験。(A) 紫外線を 0.6 J/m^2 照射後白色光下に2時間おき、光回復された大腸菌株のコロニーを計数した。(B) ウエスタンブロッティングによるIPTG添加に伴う(6-4)光回復酵素の発現確認。

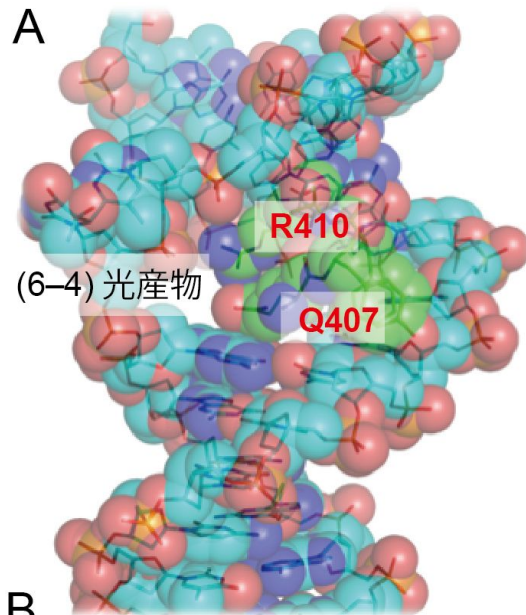
次に、上記3つの変異体プラスミドを用いて変異体を遺伝子組換えタンパク質として得た。これを用いて、まずは光子数を確認した定常光を用いて野生型および変異型における(6-4)光産物修復の反応量子収率を算出したところ、以前の研究と同様に、野生型は5.2%であるのに対し、変異型では修復は全く検出されなかった。興味深いことに、光源の光子密度を大幅にあげると、H354A および H358A 変異体でも修復産物の生成が確認された。光子密度から算出された反応量子収率は、0.01% (H354A) および 0.05% (H358A) であった。これらのことから、ヒスチジン側鎖が欠損している場合でも、光量を大幅にあげれば修復反応が進行することが明らかとなった。

野生型と H354A 変異型での違いを調べるため、反応により過渡的に形成されるフラビンセミキノンラジカル(FADH^\bullet)の寿命を時間分解過渡吸収分光法により調べた。その結果、野生型では FADH^\bullet は非常に長寿命存在しており、その寿命は秒オーダーにも及ぶことがわかった。一方、H354A 変異体では FADH^\bullet は形成するものの速やかに減衰した。この違いと上記実験結果から、ヒスチジン側鎖は反応に直接関与するというよりも、電子移動後の反応中間体である(6-4)光産物アニオンラジカルの安定化に寄与しており、このアニオンラジカルの状態で化学結合の組換えが起こり、中間体が生成する可能性が考えられた。

なお、これらの結果は現在論文作成中であるため、重要な図の使用は控えさせていただく。

(3) (6-4)光回復酵素による(6-4)光産物修復の基質一般性の検討をおこなうために、チミン-シトシン間に形成された(6-4)光産物を化学的に合成し、同様に光子数制御された光源を用いて修復の反応量子収率を算出したところ、チミン-チミン間(6-4)光産物とほぼ同じ5.1%であることがわかった。

(4) (6-4)光回復酵素の結合に伴い、(6-4)光産物が DNA からフリップアウトし、酵素活性中心に近づき修復反応が進行する。報告されている酵素-DNA 共結晶構造において、損傷部位がフリップアウトすることで生成する空隙に、(6-4)光回復酵素のアミノ酸側鎖であるグルタミンおよびアルギニン残基が位置していることが観測された(図4A)。これらのアミノ酸側鎖は種々の(6-4)光回復酵素において高度に保存されており(図4B)、基質認識においてなんらかの役割を担っていることが予見された。そこで、これらアミノ酸側鎖の酵素変異体プラスミドを作成し、Q407A および R410A 変異体を遺伝子組換えタンパク質として得、これらを用いた DNA 修復実験および結合解析を行った。



<i>D. melanogaster</i>	6-4	414	AFFHQYFRVYSPVA
<i>X. laevis</i>	6-4	403	AFFHQFFRVYSPVA
<i>A. thaliana</i>	6-4	432	SFFYQFNRIYSPIS
<i>D. rerio</i>	6-4	403	TFFHQYFRVYSPIA
<i>D. salina</i>	6-4	450	AFFAQYFRVYSPVV
<i>E. coli</i>	CPD	391	TDAAPYFRIFNPPT
<i>A. nidulans</i>	CPD	398	MDPKP-LRIFNPAS

図4：本研究で着目したアルギニン側鎖およびグルタミン側鎖。(A) (6-4)光回復酵素共結晶構造において、R410 および Q407 残基が DNA 中に入り込む様子がわかる。(B) 様々な生物種の(6-4)光回復酵素におけるアルギニンおよびグルタミン残基は、生物種を超えて広く保存されている。

まず、Q407A および R410A 変異体の大腸菌生存実験を同様に行ったところ、Q407A 変異体は野生型とほぼ同様の生存率曲線を描いたが、R410A の場合では生存率の低下が観測された。次に、これらの変異体を遺伝子組換えタンパク質として産生し、上述のように光子数制御された光源を用いて修復反応を行い、これらの反応量子収率を算出した(表1)。その結果、Q407A 変異体は野生型とほぼ同じ 5.5%であったのに対し、R410A 変異体の反応量子収率が野生型の 4 分の 1 に低下していることがわかった。この結果は大腸菌生存実験の結果を支持しており、R410 残基が(6-4)光回復酵素の修復反応において非常に重要であることが明らかとなった。

この量子収率の変化が結合に由来するかどうかを調べるため、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いた結合解析を行った。また、アルギニンからリシンへと変異した R410K 変異体も遺伝子組換えタンパク質として作成し、(6-4)光産物を有するオリゴヌクレオチドへの結合能を比較した(表1)。その結果、R410A 変異体は解離定数が野生型の 2 倍であり、結合能が低下していることが明らかとなった。一方、R410K 変異体では野生型よりも高い結合能であることがわかった。これは、塩基性側鎖であるアルギニンが有する正電荷が重要な役割を果たしていると推察される。

表1 : (6-4)光回復酵素各種変異体の修復反応量子収率と解離定数

酵素	反応量子収率 (%)	解離定数 K_d (nM)
野生型	5.2	39
Q407A	5.5	47
R410A	1.3	84
R410K	N.D.	19

算出された解離定数を用いて反応量子収率実験の濃度領域における複合体形成率を算出したところ、野生型の場合と同じで 99% 以上の酵素が結合していることがわかった。したがって、結合そのものに由来する修復効率の低下ではなく、結合様式に由来する可能性が示唆された。

図4から、これらのアミノ酸側鎖が(6-4)光産物周辺核酸塩基と相互作用する可能性がある。そこで、(6-4)光産物の核酸塩基を 5,6-ジヒドロチミン(DHT)へと変換した基質を化学合成し、その中の一つを通常チミンにしたオリゴヌクレオチド 1~4 を調製した(表2)。これらの基質と野生型酵素を用いて反応量子収率を算出したところ、(6-4)光産物の 3'側隣接位に通常チミンが存在するオリゴヌクレオチド 3 の場合のみ、反応量子収率が通常と同程度まで回復した。興味深いことに、それ以外のオリゴヌクレオチドの反応量子収率は、R410A 変異体の場合と同じように、約 1.3%前後であった。

表2 : DHT を含むオリゴヌクレオチドを用いた反応量子収率解析

配列(5'→3')	反応量子収率(%)
THHHT(6-4)THHHH	1.5
HHHTT(6-4)THHHH	1.3
HHHHT(6-4)TTHHH	5.0
HHHHT(6-4)THHHT	1.6

H: DHT, T(6-4)T: チミン-チミン(6-4)光産物

図4より、着目しているアルギニン側鎖は(6-4)光産物 3'側隣接位の核酸塩基と非常に近い位置に存在している。このことから、アルギニンは(6-4)光産物ではなく、(6-4)光産物隣接位の核酸塩基との相互作用を担っている可能性が示唆された。

本研究結果は現在論文作成中である。

(5) 総括

上記の結果より、(6-4)光回復酵素による損傷 DNA の認識および修復に関する新たな分子科学的知見が得られた。本研究によって(6-4)光回復酵素による反応の全容解明に一步近づいたと考えている。今後、(6-4)光回復酵素と相同性の高い、概日時計を司るクリプトクロムの研究へと展開されることが期待される。

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8件)

1. I M. Mahaputra Wijaya, Yu Zhang, Tatsuya Iwata, Junpei Yamamoto, Kenichi Hitomi, Shigenori Iwai, Elizabeth D. Getzoff, and Hideki Kandori. Detection of distinct α -helical rearrangements of cyclobutane pyrimidine dimer photolyase upon substrate binding by fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*, **2013**, 52, 1019-1027.

DOI: 10.1021/bi3016179

2. Norihito Arichi, Junpei Yamamoto, Chiaki Takahata, Emi Sano, Yuji Masuda, Isao Kuraoka, and Shigenori Iwai. Strand breakage of a (6-4) photoproduct-containing DNA at neutral pH and its repair by the ERCC1-XPF protein complex. *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, 11, 3526-3534.

DOI: 10.1039/C3OB00012E

3. Junpei Yamamoto, Ryan Martin, Shigenori Iwai, Pascal Plaza, and Klaus Brettel. Repair of the (6-4) photoproduct by DNA photolyase requires two photons. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 7432-7436.

DOI: 10.1002/anie.201301567

4. Junpei Yamamoto, Tomoko Oyama, Tomohiro Kunishi, Chikahide Masutani, Fumio Hanaoka, and Shigenori Iwai. A cyclobutane

thymine- N^4 -methylcytosine dimer is resistant to hydrolysis but strongly blocks DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.*, **2014**, *42*, 2075–2084.
DOI: 10.1093/nar/gkt1039

5. Junya Chiba, Shun Aoki, Junpei Yamamoto, Shigenori Iwai, and Masahiko Inouye. Deformable nature of various damaged DNA duplexes estimated by an electrochemical analysis on electrodes. *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 11126–11128.
DOI: 10.1039/c4cc04513k

6. I M. Mahaputra Wijaya, Tatsuya Iwata, Junpei Yamamoto, Kenichi Hitomi, Shigenori Iwai, Elizabeth D. Getzoff, John, T. M. Kennis, Tilo Mathes, and Hideki Kandori. Flavin adenine dinucleotide chromophore charge controls the conformation of cyclobutane pyrimidine dimer photolyase α -helices. *Biochemistry*, **2014**, *53*, 5864–5875.
DOI: 10.1021/bi500638b

7. Masashi Fujita, Shun Watanabe, Mariko Yoshizawa, Junpei Yamamoto, and Shigenori Iwai. Analysis of structural flexibility of damaged DNA using thiol-tethered oligonucleotide duplexes. *PLoS ONE*, **2015**, *10*, e0117798.
DOI: 10.1371/journal.pone.0117798

8. I M. Mahaputra Wijaya, Tatsuya Iwata, Junpei Yamamoto, Kenichi Hitomi, Shigenori Iwai, Elizabeth D. Getzoff, and Hideki Kandori. FTIR study of CPD photolyase with substrate in single strand DNA. *Biophysics*, **2015**, *11*, 39–45.
DOI: 10.2142/biophysics.11.39

〔学会発表〕(計6件)

1. Junpei Yamamoto, Ryan Martin, Shigenori Iwai, Pascal Plaza, Klaus Brettel. A two photon DNA repair mechanism of the (6–4) photolyase. 第51回日本生物物理学会年会、2013年10月28–30日、国立京都国際会館(京都府京都市)

2. Junpei Yamamoto, Tomoko Oyama, Tomohiro Kunishi, and Shigenori Iwai. Biochemical and thermodynamic properties of a cyclobutane thymine- N^4 -methylcytosine dimer. The 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry、2013年11月13–15日、神奈川大学(神奈川県横浜市)

3. 山元淳平、紫外線損傷 DNA の化学合成及びその修復反応・変異機構解析、変異機構研究会 第27回夏の学校(招待講演)、2014年6月21–22日、愛知県小牧勤労センター(愛知県小牧市)

4. Junpei Yamamoto, Kohei Shimizu, Tomoko

Fujiwara, Takeshi Todo, Pascal Plaza, Klaus Brettel, and Shigenori Iwai. Molecular mechanism of the two photon DNA repair by the (6–4) photolyase、第52回日本生物物理学会年会(招待講演)、2014年9月25–27日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

5. 山元淳平・岩井成憲、抗ウイルス剤を末端に含むオリゴヌクレオチドの化学合成とそれをを用いた生化学解析、第8回バイオ関連化学シンポジウム、2014年9月11–13日、岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)

6. Junpei Yamamoto and Shigenori Iwai. Synthesis of oligonucleotides containing chain-terminating antiviral drugs and their use in biochemical analysis、The 41th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry、2014年11月5–7日、北九州国際会議場(福岡県北九州市)

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

研究代表者

山元 淳平(YAMAMOTO, Junpei)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教

研究者番号：90571084