

平成 30 年度 未来研究ラボシステム 研究成果報告書

研究種目：共同研究

研究期間：平成 30 年 10 月～平成 32 年 9 月

研究課題名：時分割 X 線分光学で観る光回復酵素による DNA 修復過程

ラボ長

所属：基礎工学研究科物質創成専攻機能物質化学領域

氏名：山元 淳平

研究成果

本研究は、光依存的 DNA 修復を担う(6-4)光回復酵素の DNA 修復反応機構を原子レベルで明らかにすることを目的に、若手研究者の国際共同研究による Spring-8/SACLA での時分割シリアルフェムト秒結晶構造解析(TR-SFX)および ESRF での時分割溶液 X 線小角散乱測定 (TR-SAXS) を行う。

平成 30 年度は、本未来研究ラボの開始年度であるため、代表者である山元が台湾・中央研究院所属の Manuel Maestre-Reyna 博士および PI の Ming-Daw Tsai 博士を訪問し、今後の共同研究打ち合わせとセミナーを行った (図 1A)。また、その際に当研究室博士課程進学予定者で修士 2 年生の細川雄平氏を派遣し、1 ヶ月間 Maestre-Reyna 博士の指導のもとで TR-SFX にかかるサンプル調製法 (測定用カートリッジの作成技術および蛋白質調製技術) について新たな知見を得た (図 1B)。

本研究課題で対象とする(6-4)光回復酵素の中でも、アフリカツメガエル由来のものは蛋白質単体の結晶構造はおろか、DNA 複合体の構造も解かれていない。そこで、細川氏の台湾派遣中に、アフリカツメガエル由来(6-4)光回復酵素 (XI64) の蛋白質調製条件の確立および結晶化条件の探索を行った。結晶は得られていないが、結晶化に必要な大量の蛋白質を調製する条件を確立したため、今後蛋白質単体および DNA 複合体の結晶を得るための条件探索を行う予定である。



図 1: (A・左) 台湾中央研究院でのセミナー、(B・右) 蛋白質精製を学ぶ細川氏

2018 年後期 (2018B) の SACLA におけるビームタイムに山元・細川両名が参加し (図 2)、2017 年後期から始めているメタン産生好熱菌由来光回復酵素 (MmCPDII) の DNA 修復過程に関する TR-SFX 測定を行った。なお、SACLA で得た MmCPDII の無損傷結晶構造は現在論文投稿中である (Maestre-Reyna et al.)。MmCPDII の DNA 修復 TR-SFX 測定について、これまでに得られた結果を図 3 に示す。408 nm のナノ秒レーザー (100-300 μ J) 照射



図 2: 2018B ビームタイム後の写真

後、一定の遅延時間の後に X 線自由電子レーザー (7 keV) を照射し、得られた回折像から光反応後の電子密度を得た (図 3)。MmCPDII の修復基質であるシクロブタン型ピリミジンダイマー(CPD)に着目してその構造変化を経時的に追跡したところ、光照射 10 ns 後では、元の CPD と大きな構造変化は見られなかったため、補酵素 FADH⁻ から一電子移動が起こった後の状態を捉えていると考えられる。一方、光照射後 25 μs 後では、CPD

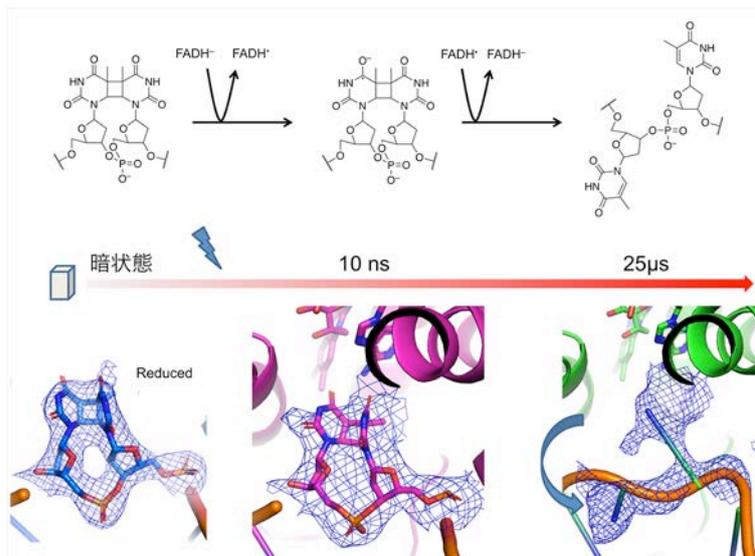


図 3: TR-SFX で明らかにした MmCPDII の DNA 修復過程

近傍で大きな電子密度の変化が観測された。CPD は FAD から電子移動を受けるために、DNA 二本鎖の外側にフリップアウトしているが、修復の完了とともに DNA 二本鎖の内側にフリップバックする。今回、25 μs のデータは、修復された CPD が DNA 二本鎖中へとフリップバックの様子が見られたと考えられる。なお、**2019 年前期 (2019A) の SACLA ビームタイムの獲得が確定しており**、2019A では 10 ns と 25 μs の間で数点の遅延時間データセットを取ることで MmCPDII の DNA 修復 TR-SFX を完了し、本結果を論文投稿する予定である。

TR-SAXS の測定に先駆けて、シンクロトロン放射光を用いた X164 酵素単体の通常の SAXS 測定を SPring-8 にて行った。阪大で精製した X164 と台湾グループが精製した MmCPDII を SAXS 測定に供したところ、X164 の方は精製度がより高く、沈殿物のないクリアな溶液であったことから、TR-SAXS 測定に最適であることがわかった (図 4)。しかし、当初予定していた ESRF の BioSAXS ビームラインが 2019 年途中から改修のため使用ができない旨通知があった。TR-SAXS 測定のためには別のビームラインを申請する必要があるため、次年度は TR-SFX 測定に注力する。

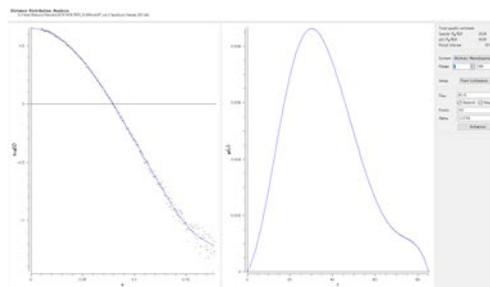


図 4: X164 の SAXS 結果

キーワード : DNA 修復、光回復酵素、時分割 SFX、時分割 SAXS

研究経費 (H30 年度) の内訳

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
0 円	142, 175 円	340, 200 円	0 円	17, 625 円	500, 000 円

共同研究者等

(1) 共同研究者（氏名・所属）

Manuel Maestre-Reyna・中央研究院生物化学研究所（台湾）

Sophie Franz・フィリップ大学マールブルグ（ドイツ）

(2) 研究協力者（氏名・所属・学年（学生の場合））

細川雄平・大阪大学大学院基礎工学研究科物質創成専攻機能物質化学領域・M2

岡田進太郎・大阪大学基礎工学部化学応用科学科・合成化学コース・B4

発表論文等（平成 31 年 3 月 31 日現在）

研究代表者（一重線）および主な共同研究者（二重線）の研究業績のうち、本研究課題に関連するもののみを、現在から順に発表年次を過去に遡って記入してください。

〔雑誌論文〕

(1) Maestre-Reyna, M., Yamamoto, J., Huang, W.-C., Tsai, M.-D., Essen, L.-O., and Bessho, Y. Twist and turn: a revised structural view on the unpaired bubble of class II CPD-photolyase in complex with damaged DNA. *IUCrJ*, **2018**, 5, 608-618.

(2) Franz, S., Ignatz, E., Wenzel, S., Zielosko, H., Gusti Ngurah Putu, E.P., Maestre-Reyna, M., Tsai, M.-D., Yamamoto, J., Mittag, M., and Essen, L.-O. Structure of the bifunctional cryptochrome aCRY from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic Acids Res.*, **2018**, 46, 8010-8022.

(3) Terai, Y., Sato, R., Yumiba, T., Harada, R., Shimizu, K., Toga, T., Ishikawa-Fujiwara, T., Todo, T., Iwai, S., Shigeta, Y., and Yamamoto, J. Coulomb and CH- π interactions in (6-4) photolyase-DNA complex dominate DNA binding and repair abilities. *Nucleic Acids Res.*, **2018**, 46, 6761-6772.

〔著書〕

該当なし

〔学会発表〕

(1) Manuel Maestre-Reyna, The undistorted photolyase: photoreduction stages revealed via serial femtosecond crystallography、第 56 回日本生物物理学会年会シンポジウム-光回復酵素/クリプトクロムスーパーファミリーの光依存的機能と多様性の最先端（オーガナイザー：山元淳平、山田大智）、2018 年 9 月 17 日、岡山大学

〔その他〕

該当なし

外部資金獲得状況・申請状況（本研究課題に関連して、科研費、JST 等の競争的資金、受託研究、奨学寄付金を受給された場合、また、申請された場合はその状況を記入ください）

現在、2019 年度-2021 年度の科学研究費・基盤 B を研究代表者として申請中である。本課題と直接の関係はないが、SACLA プロジェクトと背中合わせで進める研究であるため、その旨報告する。