

令和2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～令和2年9月

研究課題名：時分割X線分光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

【目的】

遺伝情報を担うDNAは太陽光中に含まれる高エネルギー成分である紫外線に曝露することで化学構造の変化が誘起され、がん化の原因となる紫外線損傷DNAが形成される。生物はこれを正しい構造へと修復する機構を有し、これをDNA修復と呼ぶ。ヒトの場合では、ヌクレオチド除去修復機構がこれを担うが、原核生物からヒト・鳥類を除く高等生物まで広範に保存されている光回復酵素は、より低エネルギー成分である青色光を用いて単一の酵素により紫外線損傷DNAを修復することができるユニークな酵素である。紫外線損傷DNAのなかでも(6-4)光産物の修復を担う(6-4)光回復酵素によるDNA修復は、酵素の発見から25年が経過した現在でもその修復機構は依然として明らかとなっていない点があり、いまだに活発に議論がなされている。

本申請課題では、**光回復酵素による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、X線分光光学を主体として種々のタンパク質の機能を研究している台湾・中央研究院のManuel Maestre-Reyna博士、および構造生物学を専門とするドイツ・フィリップ大学マールブルグのSophie Franz博士とともに、若手研究者による学際的かつ国際的な共同研究グループを構築した(図1)。この共同研究グループで、DNA-タンパク質複合体の(1)SPring-8/SACLA(播磨・日本)における時分割シリアルフェムト秒X線結晶構造解析(time-resolved serial femtosecond X-ray crystallography, TR-SFX)、および(2)ESRF(グルノーブル・フランス)における時分割溶液X線小角散乱測定(time-resolved small angle X-ray scattering, TR-SAXS)を行う予定で計画書を提出し、研究を行なった。

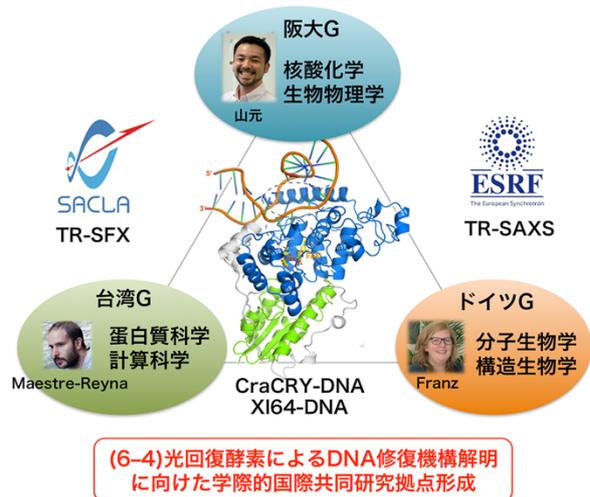


図1：共同研究の枠組み

【結果】

ESRFにおけるTR-SAXSについては、ビームラインの閉鎖のため期間内の実験を行うことができなかった。一方で、SACLAならびにSwissFELにおけるTR-SFX実験において一定の成果が得られたため、以下報告する。

・クラス II 光回復酵素の光活性化過程

光回復酵素による DNA 修復反応には、活性型補酵素である FADH⁻の形成が必要であり、光回復酵素は光依存的に FAD を還元する機構を有する。この光活性化過程については、光回復酵素ファミリーに高度に保存されたトリプトファン側鎖を介した一方向の電子移動反応が鍵である一方で、活性化の過程で生まれる電荷分離状態がどのように安定化されるか、不明であった。

本研究では、古細菌 *Methanosarcina mazei* 由来クラス II 光回復酵素 (*MmCPDII*) の光活性化過程を TR-SFX にて捉えたところ、FAD 近傍に存在し光回復酵素ファミリーに高度に保存されたアルギニン側鎖およびアスパラギン酸側鎖による塩橋が、FAD の電子状態に合わせて過渡的に相互作用することで、FAD の光依存的還元反応が効率よく進行することを見出した (図 2)。本研究結果は Nature Chemistry に投稿し、現在査読改訂中である。

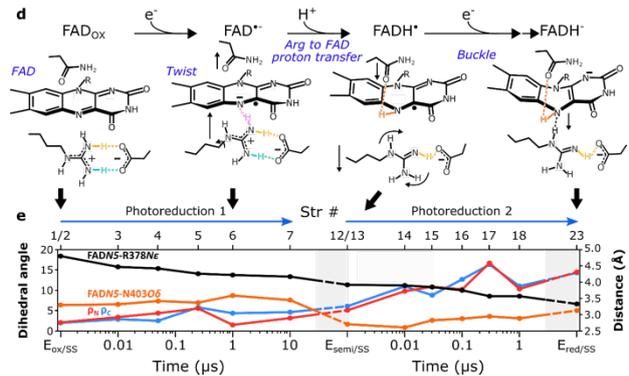


図 2 : *MmCPDII* の光活性化過程の TR-SFX 結果

・クラス II 光回復酵素による DNA 修復

Methanosarcina mazei 由来光回復酵素による光依存的 DNA 修復反応を SACLA および SwissFEL での TR-SFX 測定により捉えた。その結果、光照射から 25 μs 後には損傷 DNA が修復され、3'側塩基から DNA の中へとフリップバックしていく過程が観測された (図 3)。本研究結果は現在論文作成中である。

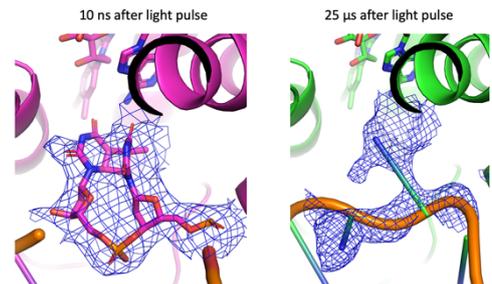


図 3 : DNA 修復の TR-SFX 結果

・藻類由来(6-4)光回復酵素の光活性化過程

藻類 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来動物様クリプトクロム (*CraCRY*) はシグナル伝達を担うクリプトクロムの機能と(6-4)光産物の修復を担う光回復酵素の機能を有する多機能酵素である。*CraCRY* のクリプトクロムとしての機能発現は光依存的に進行することが知られているため、*CraCRY* の光活性化過程について 10 ns~100 ms の広い遅延時間領域にて TR-SFX 測定を行なった。その結果、FAD の電子状態の変化に伴い、近傍のアミノ酸側鎖が上述と同様に動き、さらに C 末端領域に存在する 22 番目の αヘリックスが

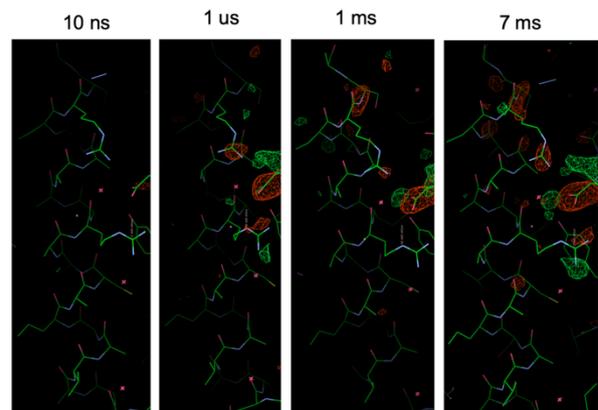


図 4 : *CraCRY* の光活性化過程の TR-SFX 結果

光依存的に動く様子が観測された (図 4)。この結果は、本共同研究先であるドイツ G にて行われた水素-重水素交換質量分析の動的解析の結果と一致しており、今後さらに遅延時間を細かく刻む

ことで、光活性化過程と機能発現の機構を紐づけることが可能になることが多いと期待される。

・(6-4)光回復酵素による DNA 修復過程

(6-4)光回復酵素による DNA 修復過程を捉えるためには、(6-4)光回復酵素と DNA の複合体結晶を得る必要がある。これまでに、CraCRY-DNA 複合体を報告したが、再現性に乏しく TR-SFX 測定に向かない可能性があった。そこで、DNA 配列のスクリーニングを行なったところ、再現性良く微結晶を得ることができた。この結晶についてシンクロトン放射光による構造解析を行なったところ、1.8 Å の分解能で構造を解くことができた (図 5)。この結晶を用いて SACLA による常温無損傷構造解析に供したところ、2.0 Å の分解能で構造を解くことに成功した。今後、この結晶を用いて TR-SFX 測定を行うことで、(6-4)光回復酵素による DNA 修復過程を捉えることができるかと期待される。

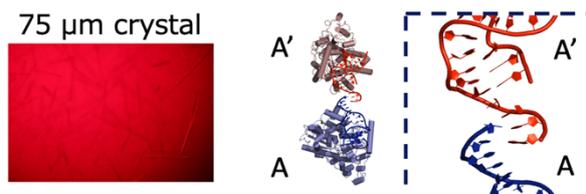


図 5 : CraCRY-DNA 複合体結晶構造

キーワード : DNA 修復、光回復酵素、時分割 SFX

研究経費 (R2 年度) の内訳

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
0 円	137500 円	0 円	0 円	71500 円	209000 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・D2

発表論文等 (令和 3 年 3 月 31 日現在)

[雑誌論文]

1. Terai, Y., Sato, R., Matsumura, R., Iwai, S., and Yamamoto, J. Enhanced DNA repair by DNA photolyase bearing an artificial light-harvesting chromophore. *Nucleic Acids Res.*, **2020**, 48, 10076-10086.

[著書]

なし

[学会発表]

1. 寺井悠馬・川上由夏・佐藤竜馬・岩井成憲・山元淳平、人工集光アンテナ分子修飾による光回復酵素の DNA 修復能の向上、第 14 回バイオ関連化学シンポジウム、2020 年 9 月、オンライン開催
2. 細川雄平・佐藤竜馬・Martin Saft・Pavel Müller・Klaus Brettel・Lars-Oliver Essen・岩井成憲・山元淳平、A newly identified hydrogen-bonding network modulates photoreduction of the flavin cofactor in plant (6-4) photolyase、第 58 回日本生物物理学会年会、2020 年 9 月、オンライン開催
3. 山元淳平、(6-4)光回復酵素による DNA 修復反応の分子動画撮影、新学術領域・高速分子動画第 2 回シンポジウム、2020 年 10 月、兵庫県淡路市
4. 寺井悠馬・佐藤竜馬・松村梨沙・岩井成憲・山元淳平、人工光捕集分子修飾による光回復酵素の DNA 修復能の向上、第 10 回 CSJ 化学フェスタ 2020、2020 年 10 月、オンライン開催
5. 川上由夏・寺井悠馬・岩井成憲・山元淳平、システイン選択的修飾反応による CPD 光回復酵素の DNA 修復活性の向上、第 10 回 CSJ 化学フェスタ 2020、2020 年 10 月、オンライン開催
6. 山元淳平、ゲノム恒常性維持における量子性：青色光受容タンパク質による逐次 2 光子 DNA 修復、量子生命科学会第 2 回大会、2020 年 12 月、オンライン開催

[その他]

1. 細川雄平、第 5 回日本生物物理学会学生発表賞、第 58 回日本生物物理学会年会、2020 年 9 月
2. 寺井悠馬、優秀ポスター発表賞、第 10 回 CSJ 化学フェスタ 2020、2020 年 10 月
3. 川上由夏、優秀ポスター発表賞、第 10 回 CSJ 化学フェスタ 2020、2020 年 10 月

外部資金獲得状況・申請状況

[受給中]

・新学術領域研究（研究領域提案型）「高速分子動画」、公募研究、(6-4)光回復酵素による DNA 修復反応の分子動画撮影（代表者：山元淳平）、令和 2 年度～令和 3 年度

[採択決定済み]

・JST 創発的研究支援事業、DNA 修復反応の動的構造解析基盤の創出（代表者：山元淳平）、令和 3 年度～令和 5 年度

[申請中]

・科学研究費 基盤研究(B)、時間分解計測を用いた青色光受容タンパク質による DNA 修復反応機構の一般化（代表者：山元淳平）、令和 3 年度～令和 5 年度

参考となるHP等

<https://researchmap.jp/yamamotojunpei>