

第1章 NMRによるCPD photolyaseのDNA認識メカニズムの解明

CPDを含むssDNAのphotolyase結合部位の決定

CPDを含むDNAとphotolyaseとの相互作用部位を調べるために、CPDを含むd7merと、そのphotolyaseと結合状態の ^{31}P NMRスペクトルを測定した (Fig. 2 (a), (b))。photolyase非結合状態のシグナルの帰属はDQF-COSY、TOCSY、ROESY、 ^1H - ^{31}P HSQC測定により行った。photolyase結合状態のシグナルの帰属は、photolyaseに対して過剰量のDNAを添加した状態で ^{31}P - ^{31}P EXSYを測定することによって可能となった。photolyase結合状態のスペクトルを非結合状態と比較した結果、 P_{-1} 、 P_0 、 P_1 、 P_2 に由来するシグナルが極端な広幅化と化学シフト変化を示した。このことからphotolyaseとの結合にはCPDを含む上記の4ヌクレオチドが特に関与していることが明らかとなった。

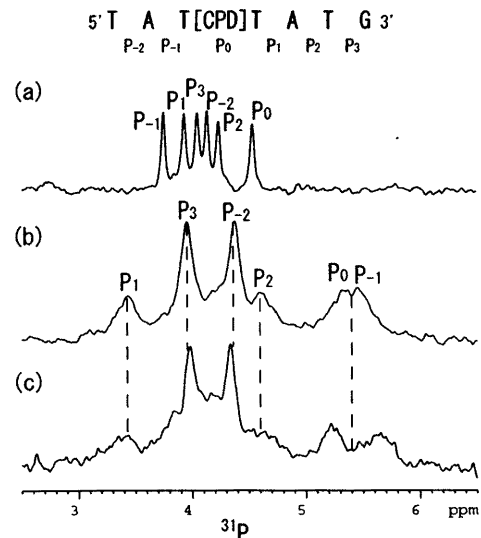


Fig. 2: d7merの ^{31}P NMRスペクトル

- (a) - photolyase
- (b) + photolyase (野生株)
- (c) + photolyase (R200A)

表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いた速度論的解析

これらのヌクレオチドがどのような相互作用によって結合に関与しているのかを検討するため、SPR法を用いてCPDを含むd8merとphotolyaseとの結合定数の塩濃度依存性を調べた。その結果、結合定数は塩濃度が高くなるほど低下した。このことから両者の結合にはDNAのリン酸基に由来する負電荷とphotolyaseの塩基性アミノ酸残基に由来する正電荷の静電相互作用が寄与していることが明らかとなった。次に塩基性アミノ酸残基の内、結合に関与する残基を同定するために、Arg、Lys残基をAlaに残基置換した変異体の結合定数を求めた。この結果、R140、R200、K239、R310、R365、R375がCPDを含むDNAとの結合に関与することが明らかとなった。

複合体におけるDNAの配向決定

次にこれらの結合に関与するアミノ酸残基とヌクレオチドの相対配置を決定するために、変異体と結合した状態のd7merの ^{31}P スペクトルを測定した。Arg200をAlaに置換した変異体(R200A)との結合状態のスペクトル (Fig. 2 (c)) を野生株結合状態のスペクトル (Fig. 2 (b)) と比較すると P_{-1} 、 P_0 のみに化学シフト差が観測された。このことからArg200はCPDとその5'側のリン酸基近傍に存在していることが判明した。同様の実験を

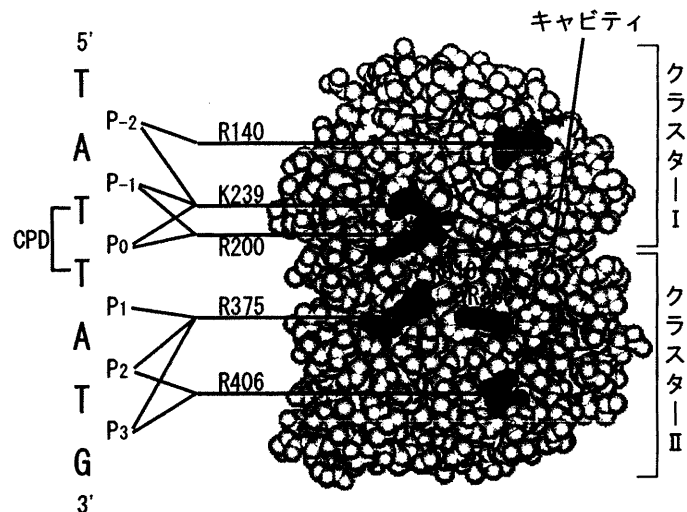


Fig. 3: photolyaseとDNAの相対配置図
変異体と結合した状態のd7merの ^{31}P スペクトルを野生株のスペクトルと比較して、化学シフト差が観測されたシグナルが由来するリンと、その変異体の置換残基をphotolyaseのモデル上にマッピングした。

他の変異体についても行った。その結果、CPD の 5'側のヌクレオチドがクラスター I と結合し、3'側のヌクレオチドがクラスター II と結合しており、CPD はそれらのクラスターで形成されるキャビティによって認識されることが明らかとなった (Fig. 3)。このようにして複合体中の photolyase に対する DNA の配向を決定することができた。

CPD の結合様式の解析

photolyase と結合した状態の CPD の構造をより詳細に解析するためには、CPD のデオキシリボースおよび塩基に由来するシグナルを観測する必要がある。そのためには CPD の安定同位体標識が不可欠である。しかし、CPD はその合成収率の低さから安定同位体標識を施すことは不可能であった。そこで、従来の安定同位体標識法に改良を加え、ヌクレオチド選択的標識を確立することによって、CPD のみに ^{13}C 標識を施した d5mer を調製することに成功した。これ

と ^2H 標識 photolyase との結合状態の ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルを測定した結果、結合状態の CPD に由来するシグナルを観測することが可能となった (Fig. 4)。これらのシグナルの帰属は ^1H - ^{13}C HSQC-NOESY などによって行った。その結果、photolyase の結合に伴い、CPD のデオキシリボース部位に由来するシグナルは顕著な化学シフト変化を示さなかったものの、塩基部位のメチル基および 6 位に由来するシグナルは ^1H 軸方向に大きく高磁場シフトした。特に CPD 塩基の 5'側のメチル基に由来するシグナルの化学シフトは 1.4ppm から -1.3ppm まで変化し、その差は 2.7 ppm にも及んだ。このような顕著な高磁場シフトは CPD の隣接塩基、あるいは photolyase の芳香環による環電流効果のいずれかに起因する。CPD を含む d5mer と CPD の両末端にリン酸基のみを付加した DNA オリゴマーの ^1H NMR スペクトルを比較することによって、このような高磁場シフトが photolyase の芳香環に由来するものであることを示した。上述の変異体の ^{31}P NMR 解析から明らかとなったヌクレオチドと photolyase のアミノ酸残基の相対配置から、環電流効果を及ぼす残基はクラスター I とクラスター II で形成されるキャビティに存在する Trp246、Trp352 あるいは補酵素の FAD に特定できる。さらに Trp246 を Ala に置換した変異体 W246A を添加した状態における d5mer の ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルを測定し、野生株のスペクトルと比較した結果、CPD 塩基部位の 5'側のメチルシグナルのみに顕著な化学シフト差が観測された。以上の結果から CPD の塩基部位がキャビティに埋没するような状態で結合し、CPD の 5'側近傍に Trp246 が位置していることが判明した。現在までに数多くの研究グループによって photolyase と CPD の複合体のモデルが構築されているが、いずれも高次構造情報に基づいたものではない。本研究はこの複合体の決定的な構造証拠を与えたと言える。

dsDNA と photolyase の複合体における CPD のフリップアウトの立証

以上のように photolyase の基質複合体の解析は CPD を含む ssDNA を用いて明らかにしてきたが、photolyase は ssDNA のみならず、dsDNA とも結合することが報告されている。

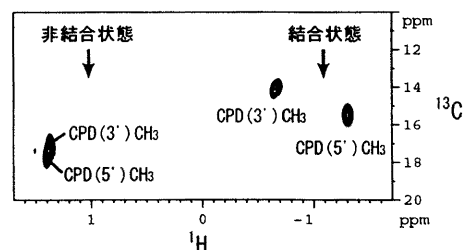


Fig. 4: CPDのみを ^{13}C 標識したd5merにphotolyaseを添加した状態の ^1H - ^{13}C HSQCスペクトル
スペクトル中にはphotolyaseとの結合状態と非結合状態の両方に由来するシグナルが観測されている。

このことから dsDNA がアンワインディングして ssDNA の状態で CPD が認識される可能性が考えられる。また、現在までに、他の DNA 修復酵素であるウラシル DNA グリコシラーゼとその基質 dsDNA の複合体において、DNA らせんの外部に飛び出した状態 (1 塩基フリップアウト) の損傷部位を酵素が認識している例が報告されている。このことから、同様に CPD2 塩基がフリップアウトしている可能性も提唱されてきた。そこでこれらの可能性を検証するために、CPD を含むストランドの相補鎖を ^{15}N 標識した dsDNA を用いて photolyase との複合体の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを測定した (Fig. 5)。複合体に由来するシグナルは、塩基の種類に特有な ^{15}N の化学シフトを指標とし、更に NOE 差スペクトルを測定することによって帰属された。その結果、CPD の少なくとも両末端のいずれか、あるいは両方に由来するチミンのイミノシグナルが観測された。このことから結合状態において DNA は CPD の両端近傍まで二本鎖構造を有していることが明らかとなった。また、 ^1H NMR スペクトルを測定した結果、CPD を含む ss5mer の複合体のスペクトル中で観測された CPD 5'側のメチルシグナルと同様の化学シフトを有するシグナルが観測された。このことから、dsDNA 中に存在する CPD は ssDNA の場合と同様に塩基部位をキャビティに埋没させた状態で結合していることが明らかとなった。以上のことから photolyase と CPD を含む dsDNA との結合状態においては、CPD がフリップアウトしていると結論した。このようなフリップアウトはエネルギー的に、より効率良く CPD そのものを認識し、修復するために必要な構造変化であったと考えられる。

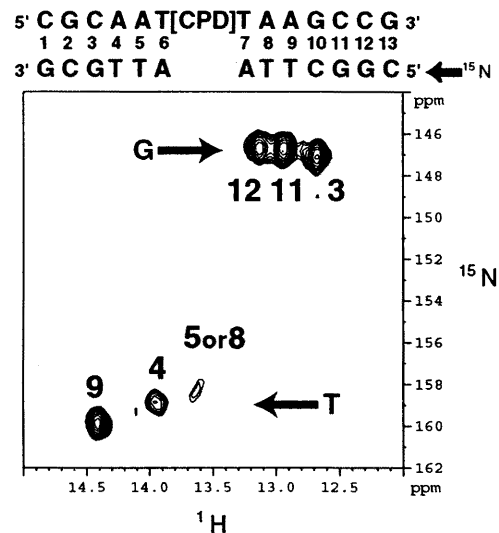


Fig. 5: photolyase との結合状態における CPD を含む dsDNA の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル

CPD を含むストランドの相補鎖が ^{15}N 標識されている。

第2章 NMR による紫外線損傷 DNA 認識抗体の抗原認識メカニズムの解明

以下、参考文献の和訳を記載した。

(6-4) photoproduct を含むオリゴデオキシヌクレオチドと (6-4) photoproduct を認識する抗体の Fab フラグメントとの相互作用の ^{31}P NMR 解析 [1]

(6-4) photoproduct を含むオリゴヌクレオチドと (6-4) photoproduct を認識する抗体 (64M5, 64M3) の Fab フラグメントとの相互作用の ^{31}P NMR 解析について報告する。(6-4) photoproduct のリン酸骨格のコンフォメーションはそれに隣接するヌクレオチドの存在によって変化し、上記の抗体の抗原結合部位はこれらの異なるリン酸骨格のコンフォメーションを有する (6-4) photoproduct に適合して結合することができるということが ^{31}P シグナルの化学シフトから明らかとなった。また、これらの抗体のエピトープは (6-4) photoproduct のみならずそれに隣接する 5'側、3'側の 2 あるいは 3 ヌクレオチドを含むことも判明した。

(6-4) photoproduct を認識するモノクローナル抗体の抗原結合部位の構造多型 [2]

(6-4)photoproduct を含む DNA に対して高い親和性を示すモノクローナル抗体 64M5 の抗原結合部位を安定同位体標識 NMR 法によって解析した。主鎖アミド基を選択的に ^{13}C 、 ^{15}N 標識した一連の 64M5 Fab アナログを調製し、64M5 の可変領域に由来するアミドシグナルの帰属を、重鎖と軽鎖との再構成法を併用し、2D-HN(CO)測定を用いることによって行った。d(T[6-4]T)および d(GTAT[6-4]TATG)の結合に伴うアミドシグナルの化学シフト変化を指標に 64M5 における(6-4) photoproduct の結合サイトと、それに隣接するヌクレオチドの結合サイトを同定した。(6-4) photoproduct との結合に関与する L1 と L3 セグメントは抗原非存在下において構造多型を示し、d(T[6-4]T)および d(GTAT[6-4]TATG)との結合状態間で異なるコンフォメーションを有している。64M5 の V_L ドメインとアミノ酸配列の相同性の高い他の Fab フラグメントのスペクトルとの比較から、本研究において観察される構造多型は L1 と L3 のカノニカル構造の組み合わせ、および L3 のカノニカル構造におけるキー残基の残基置換によって生じており、それが抗原結合に対して有利な影響を与えていると結論した。

CPD を認識するモノクローナル抗体の Fab フラグメントの DNA 結合様式 [3]

CPD を認識するモノクローナル抗体は DNA の光損傷の検出および定量に幅広く用いられている。しかし抗 CPD 抗体の抗原結合メカニズムはほとんど明らかとなっていない。そこで本研究では cis-syn シクロブタンチミンダイマー、d(T[c,s]T)を認識するマウスモノクローナル抗体、TDM-2 による抗原認識の NMR 解析を報告する。 ^{31}P NMR と表面プラズモン共鳴法によって得られたデータから TDM-2 によって認識されるエピトープが CPD を中心とする 6 ヌクレオチドから構成されることが明らかとなった。TDM-2 Fab の d(T[c,s]T)および d(TAT[c,s]TAT)に伴う化学シフト変化から、これらの抗原アナログの結合サイトを同定した。d(T[c,s]T)は抗原結合部位の中心に結合し、一方 CPD に隣接するヌクレオチドは V_H ドメインの正電荷が分布した領域に静電相互作用を介して結合することが明らかとなった。スピンラベル化 DNA アナログを利用した新規 NMR 手法を用いることによって抗原結合部位における DNA の配向を決定した。その結果、CPD を含むオリゴヌクレオチドは湾曲した状態で TDM-2 と結合し、3'側のヌクレオチドは H1 と H3 セグメント上に位置しており、5'側のヌクレオチドは H2 と L3 セグメント上に位置していることが明らかとなった。これらのデータは TDM-2 を抗体工学に応用する際に有用な情報となる。

参考文献

- [1] Torizawa, T., Kato, K., Kimura, Y., Asada, T., Kobayashi, H., Komatsu, Y., Morioka, H., Nikaido, O., Ohtsuka, E. and Shimada, I. FEBS Letters 429, 157-161, 1998.
- [2] Torizawa, T., Kato, K., Kato, J., Kobayashi, H., Komatsu, Y., Morioka, H., Nikaido, O., Ohtsuka, E. and Shimada, I. J. Mol. Biol. 290, 731-740, 1999.
- [3] Torizawa, T., Yamamoto, N., Suzuki, T., Nobuoka, K., Komatsu, Y., Morioka, H., Nikaido, O., Ohtsuka, E., Kato, K. and Shimada, I. Nucleic Acids Res. 28, 944-951, 2000.