

審査の結果の要旨

氏名 鳥澤拓也

紫外線の照射によって生じる DNA 損傷は、細胞死、突然変異を引き起こす。その代表的な紫外線損傷 DNA としては、隣接するピリミジン部位で形成される cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) および(6-4)photoproduct が挙げられる。しかし、生物にはこれらの損傷 DNA を修復する酵素群が備わっている。CPD photolyase は光を利用して CPD を修復する酵素である。現在までに大腸菌由来の CPD photolyase を中心として、その修復メカニズムの分子生物学的研究がなされているが、その基質認識機構は全く解明されていない。また、これらの紫外線損傷 DNA を認識する一連のマウスモノクローナル抗体が樹立されており、損傷 DNA の検出および定量に幅広く用いられている。これらの抗体の抗原認識メカニズムを高次構造の観点から明らかにすることができれば抗体工学の導入により、さらに有用な検出試薬を得ることが可能となる。以上のように紫外線損傷 DNA のタンパクによる認識を高次構造の観点から解明することへの期待が高まっている。そこで申請者は CPD photolyase の DNA 認識メカニズム、および紫外線損傷 DNA 認識抗体の抗原認識メカニズムを NMR 法によって解明している。

初めに、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 ssDNA と、その photolyase と結合状態の ^{31}P NMR スペクトルを測定した。photolyase 結合状態のスペクトルを非結合状態と比較解析した結果から、photolyase との結合には CPD を含む 4 ヌクレオチドが特に関与していることを明らかとした。さらに、SPR 法を用いて CPD を含む DNA と photolyase との結合定数の塩濃度依存性を調べた結果、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を作製し、その結合定数を求めた。この結果から、photolyase の DNA 結合領域を明らかとした。また、これら変異体と結合した状態の CPD を含む ssDNA の ^{31}P スペクトルから、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を明らかとした。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。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、申請者は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 ssDNA 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の化学シフトから 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ていることが明らかとなった。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。申請者の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。また 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。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。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の損傷部位（1塩基フリップアウト）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。そこで申請者は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 との複合体の構造解析を行った。複合体に由来する ^1H - ^{15}N HSQC シグナルの観測結果から、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 ssDNA 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。これらのことから photolyase と CPD を含む dsDNA との結合状態において CPD がフリップアウトしていることを構造生物学的手法を用いて初めて証明した。このような 2塩基のフリップアウトという現象は以前に報告例がなく、フリップアウトという DNA の構造変化が DNA の認識過程において広く採用されているメカニズムであるということが示された。さらに申請者は現在までに得られている DNA 単独の状態の構造情報、および photolyase の構造情報を統合することによって、photolyase が DNA から CPD を探し出し、フリップアウトした CPD を認識するに至るメカニズムの興味深い仮説を打ち出した。以上のように申請者は高次構造の観点から CPD photolyase の DNA 認識メカニズムに迫った。

さらに申請者は CPD を認識する抗体 TDM-2 による抗原認識の NMR 解析を行った。その結果、エピトープ、パラトープの決定することができた。また、TDM-2 のみならず(6-4) photoproduct を認識する抗体 64M5 の NMR 解析をも行った。64M5 のエピトープ、パラトープの決定に加え、この抗体の超可変ループが柔軟性を有していることを示した。その柔軟性の起源を従来、静的描写として捉えられていた抗体のループのカノニカル構造から考察した点が非常に斬新である。また、このような柔軟性が化学構造やコンフォメーションの異なる(6-4) photoproduct に適合するために重要であることを考察した。これらのデータは今後、紫外線損傷 DNA 認識抗体を抗体工学に適用する際に極めて有用な構造情報となると考えられる。

以上のように申請者は生体分子の相互作用メカニズムに原子レベルの解答を与え、本研究から得られた構造知見は解析対象とした生体分子を用いた創薬を考える上で非常に重要な情報であると思われる。このように本研究は薬学の発展における貢献度が高く、博士（薬学）の学位に値するものと認めた。