

審査結果の要旨

氏名 上田 卓見

本論文は、代表的な紫外線損傷 DNA であるシクロブタンピリジンダイマー (CPD) を、光を利用して修復する酵素である、CPD photolyase の修復メカニズムを解明した研究成果を述べたものである。本論文は、序文の第一章、実験項の第二章、総括の第五章、展望の第六章に加えて、本論である、「高度好熱菌由来 CPD photolyase の第二補酵素の同定および機能解明」と題された第三章、および「CPD photolyase-DNA 複合体における、FAD-CPD 間の距離決定」と題された第四章から構成されている。

本論文第三章では、CPD photolyase の光吸収メカニズムを明らかにした研究成果が述べられている。光を効率よく吸収するために、大腸菌およびラン藻由来 CPD photolyase は、光アンテナとして機能する第二補酵素 (それぞれ MTHF, 8-HDF) を持つことがすでに示されている。一方、高度好熱菌由来 CPD photolyase では、第二補酵素は確認されていなかった。本研究では、熱処理や高塩濃度のバッファーを使わない、穏和な精製方法を確立し、第二補酵素を保持した状態で、高度好熱菌由来 CPD photolyase を精製している。続いて、得られた CPD photolyase の補酵素を解析し、高度好熱菌由来 CPD photolyase が第二補酵素として FMN を持つことを明らかにしている。さらに、本研究では、修復反応における FMN の機能の解明を行っている。まず、FMN を等量持つ CPD photolyase (FMN(+))、および FMN を持たない CPD photolyase (FMN(-)) の調製方法を確立している。次に、FMN(+) と FMN(-) の修復活性を比較することにより、FMN が CPD photolyase の光吸収効率を増大させることにより、修復反応全体の効率を増大させることを示している。加えて、FMN(+) と FMN(-) の NMR スペクトルを比較することにより、FMN が第二補酵素結合部位と相同な位置に存在するポケットに結合することを見出している。以上の結果から、FMN は吸収した光エネルギーを FAD に受け渡す、光アンテナとして機能すると結論している。近年、リポソームに封入した CPD photolyase の皮膚への投与や、生体への CPD photolyase 遺伝子を導入により、生体の CPD 修復能を高める研究が行われている。他の生物種由来 CPD photolyase の第二補酵素と比較して、FMN は太陽光を効率よく吸収することが可能であり、生物界に広く存在するという特徴を持つ。したがって、FMN を CPD photolyase の第二補酵素として同定した本研究は、上記のような研究の発展に大きく貢献すると考えられる。

本論文第四章では、CPD photolyase の光電子移動反応のメカニズムを明らかにした研究成果が述べられている。光励起した FAD から CPD への光電子移動反応の効率には、FAD-CPD 間の距離が重要である。しかし、CPD を含む DNA と CPD photolyase の複合体の立体構造は未だ解明されていない。そこで、本論文では、FAD ラジカルにより引き起こされる、緩和速度増大効果 (PRE) を利用して、CPD photolyase-DNA 複合体中における、FAD-CPD 間の距離の決定を行っている。最初に、トリプトファン残基を選択的に ^{15}N 標識した CPD photolyase の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルを還元型およびラジカル型に均一化した状態で測定し、観測されたトリプトファン

残基のシグナルを帰属している。その結果から、ラジカル型のスペクトルでは FAD 近傍に存在する原子に由来するシグナルが強度減少しており、その強度減少率は結晶構造中における観測原子-FAD 間の距離と良く相関することを示している。加えて、強度減少率と FAD からの距離の実測値にフィッティングをかけることにより、強度減少率と FAD からの距離を直接結びつける式を得ることに成功している。次に、 ^{13}C 標識した CPD を含む DNA と CPD photolyase の複合体の ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルを還元型およびラジカル型で測定することにより、損傷塩基のメチル基および 6 位、ならびにデオキシリボースの 1' に由来するシグナルに生じた、FAD ラジカルによる強度減少を観測している。以上の結果に基づいて、CPD photolyase-DNA 複合体において、FAD と CPD が 16 Å 離れていることを明らかとしている。さらに、得られた FAD-CPD 間の距離に基づいて、CPD photolyase-CPD 複合体モデルを作製し、電子移動メカニズムに関する考察を行い、Trp-247, Trp-353 が FAD-CPD 間のスペーサーとなることで逆電子移動を抑制すること、および Arg-201, Lys-240 が静電相互作用により CPD アニオン中間体を安定化することを提唱している。加えて、これらの残基の変異体の CPD 修復活性が野生型と比較して減少することを示し、これらの残基が実際に反応において重要な役割を担うことを解明している。

以上のように、本論文の成果は、皮膚癌の予防や色素性乾皮症の治療をめざした創薬にあたって重要な手がかりを与えるだけでなく、構造生物学、光生物学、光化学をはじめとした幅広い科学領域の発展に貢献するものである。したがって、本研究は博士（薬学）の学位に値すると判断した。