

光回復酵素による損傷 DNA 修復反応を原子レベルで解明

— 反応中間体立体構造の時系列観察で新たな酵素学の扉を開く —

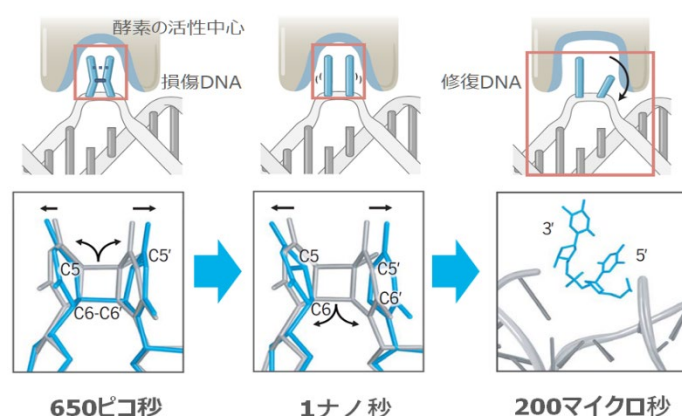
概要

理化学研究所（理研）放射光科学研究センター生命系放射光利用システム開発チームの別所義隆客員研究員（台湾中央研究院・生物化学研究所客座教授（研究当時兼務））、台湾中央研究院・生物化学研究所の蔡明道特聘研究員、台湾大学の Manuel Maestre-Reyna（マヌエル・マエストレ・レイナ） 助理教授、フィリップ大学マールブルクの Lars-Oliver Essen（ラース・オリバー・エッセン） 教授、大阪大学大学院基礎工学研究科物質創成専攻の山元淳平准教授、東北大学多元物質科学研究所の南後恵理子教授、京都大学大学院医学研究科分子細胞情報学の岩田想教授らの国際共同研究グループは、X 線自由電子レーザー（XFEL）^[1] 施設「SACLA^[2]」と「SwissFEL^[3]」を用いた時分割結晶構造解析^[4]によって、紫外線によって損傷した DNA を修復する光回復酵素の動的構造を解明しました。

光回復酵素は青色光が当たると DNA 修復を始めますが、修復の最中の酵素および DNA の立体構造は不明でした。本研究では、酵素の活性中心であるフラビン補酵素 FAD^[5]からの電子移動を引き金とした DNA 修復反応と、修復された DNA が酵素から離脱する様子を、ピコ秒（1 ピコ秒は 1 兆分の 1 秒）からマイクロ秒（1 マイクロ秒は 100 万分の 1 秒）のスケールで明らかにしました。

本研究は、疾患の原因にもなる DNA 損傷の修復過程に関する理解を深め、立体構造に基づくより合理的な人工酵素や薬剤の設計に寄与するものです。

本研究は、科学雑誌『Science』オンライン版（2023 年 11 月 30 日付：日本時間 12 月 1 日）に掲載されました。



本研究で明らかになった光回復酵素の反応の様子

背景

紫外線が DNA に当たると、ピリミジン塩基（シトシンまたはチミン）が連続した箇所ではピリミジン二量体という構造ができることがあります。なかでもシクロブタン型ピリミジン二量体（CPD）は、ピリミジン塩基の C5 および C6 炭素が、隣接するピリミジン塩基の C5' および C6' 炭素に共有結合しており、細胞内で紫外線によって発生する代表的な損傷 DNA です。このような損傷が生じると、DNA 複製や転写の妨げとなり、細胞死や突然変異、がん化など、細胞にさまざまな弊害をもたらします。

DNA 光回復酵素は、紫外線曝露により生じる CPD を修復する酵素です（図 1）。この酵素は、反応に青色の光を必要とします。まず、酵素の反応中心にあるフラビン補酵素（FAD）がフォトン（光子）を捉えると、近傍のアミノ酸残基から電子を受け取って酸化型（FADox）から還元型（FADH⁻）に変化し、酵素による DNA 修復の準備が完了します。この反応は、光還元反応と呼ばれています。DNA は CPD 部位で二重らせん構造が変形しており、DNA 光回復酵素がそれを見つけて CPD を活性中心に収納します。この状態で酵素の FADH⁻ が新たなフォトンをつかえて、電子を CPD に転移することで DNA が修復されます。このような反応経路は明らかになってきたものの、損傷 DNA が修復される最中の DNA およびタンパク質の立体構造は分かっていませんでした。この点を解明するために、反応中間体の原子レベル分解能での立体構造決定を試みました。

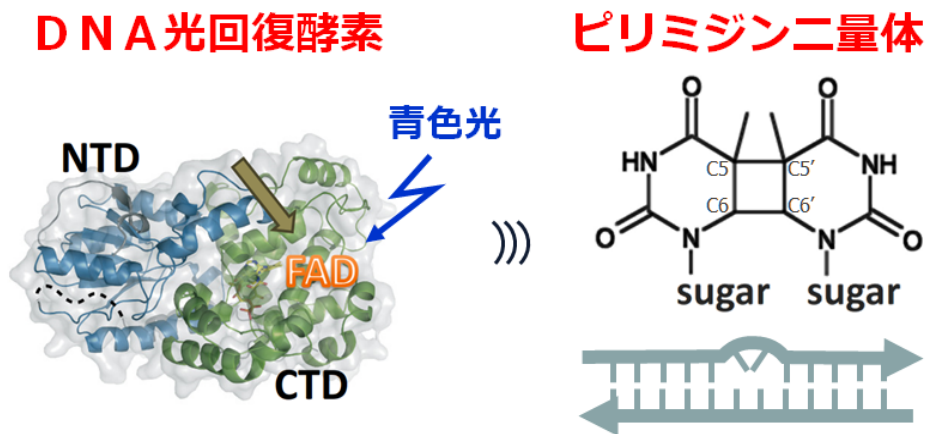


図 1 光回復酵素による紫外線損傷 DNA の修復

- 左) DNA 光回復酵素の立体構造。DNA 光回復酵素に青色光が当たると、反応中心の FAD (矢印) が酸化型 (FADox) から還元型 (FADH⁻) に変化する。NTD、CTD はそれぞれタンパク質の N 端ドメイン、C 端ドメインを示す。
- 右) シクロブタン型ピリミジン二量体 (CPD) の構造式 (上) と DNA 損傷のイメージ (下)。DNA の塩基配列の中に CPD ができると、DNA の塩基対構造がゆがみ、複製や転写が妨げられる。

研究手法と成果

国際共同研究グループは、還元状態の古細菌の DNA 光回復酵素のタンパク質を、CPD を持つ DNA と暗所嫌気下で混ぜて結晶化し、反応直前の酵素-DNA 複合体の結晶を準備しました。この結晶に反応のトリガーとなる青色光を当て、ピコ秒からサブミリ秒（1 万分の 1 秒）の時間差で SACLA または SwissFEL のビームラインから X 線自由電子レーザーを照射し、回折光を検出しました。回折光から得られる数万のイメージデータから、タンパク質と修復 DNA の立体構造を決定し、反応開始後の時間が異なるスナップショットを集めました。

光回復酵素による CPD 修復は、青色光を照射して 100 ピコ秒後から始まっています。FADH から CPD への電子移動により、酵素活性中心にあるアルギニン（R256）側鎖の立体位置が変わり、電子を受け取った CPD を安定化させています。その後、反応開始 650 ピコ秒後に CPD の C5-C5' 結合が開裂し、反応開始 1 ナノ秒後に C6-C6' も同様に開裂することで、2 塩基のピリミジンへと修復される様子を観察できました。反応に使用された電子は、フラビン補酵素に逆転移し、FADH を再生することで次の修復反応に備えます。その後、酵素活性中心が反応前の状態へ戻ると、修復された二つのピリミジン塩基は、順番に回転して酵素活性中心から離れ、DNA の二重らせん構造が回復します。これには反応開始後 200 マイクロ秒と比較的長い時間を要し、連続した酵素反応の律速になっていることが見いだされました（図 2）。このように、DNA 光回復酵素が損傷 DNA を修復する際の全ての原子メカニズムを、リアルタイムで解明しました。

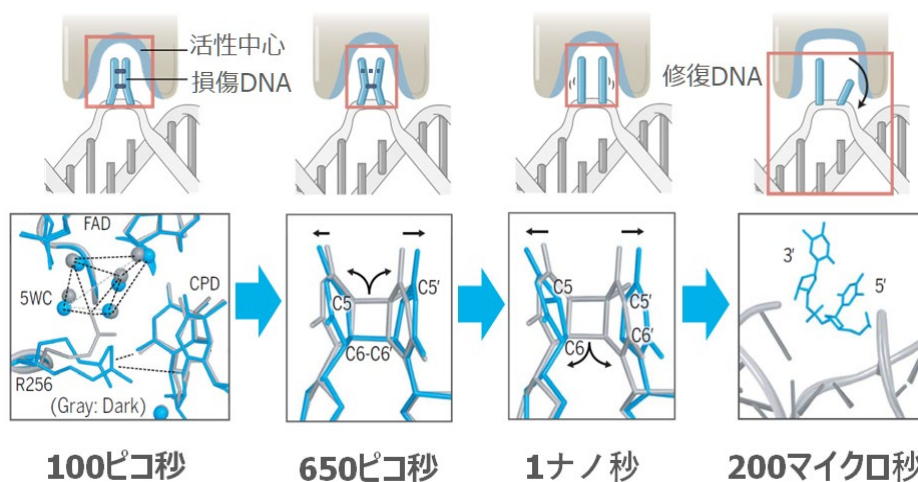


図 2 XFEL 時分解構造解析により明らかになった光回復酵素の DNA 修復反応

上段が反応の模式図、下段が模式図の赤枠内を分子の立体構造で示したもの。時間は反応開始後の時間を示す。

今後の期待

光回復酵素は原核生物から真核生物まで幅広い種で保有されている基本的な DNA 修復酵素です。本研究は、この酵素の反応における中間体の性質や構造を経時的に詳細に解析することで、基礎化学の理解に大きく貢献するものです。

ピリミジン二量体は、皮膚がんの一種メラノーマの原因となる可能性が示唆されています。今回の研究は光回復酵素による損傷 DNA の修復過程を完全に説明しました。これにより、DNA 修復活性がより高い人工酵素の作成など応用研究への道も開けました。

また、原子レベルで酵素反応の全過程を直接調べることが可能となり、新たな酵素学への扉を開きました。今後、酵素の真の活性状態である反応中間体の構造に基づいて、合理的に触媒や薬剤を設計するための第一歩となるものです。

論文情報

<タイトル>

Visualizing the DNA repair process by a photolyase at atomic resolution

<著者名>

Manuel Maestre-Reyna*, Po-Hsun Wang, Eriko Nango, Yuhei Hosokawa, Martin Saft, Antonia Furrer, Cheng-Han Yang, Eka Putra Gusti Ngurah Putu, Wen-Jin Wu, Hans-Joachim Emmerich, Nicolas Caramello, Sophie Franz-Badur, Chao Yang, Sylvain Engilberge, Maximilian Wranik, Hannah Louise Glover, Tobias Weinert, Hsiang-Yi Wu, Cheng-Chung Lee, Wei-Cheng Huang, Kai-Fa Huang, Yao-Kai Chang, Jiahn-Haur Liao, Jui-Hung Weng, Wael Gad, Chiung-Wen Chang, Allan H. Pang, Kai-Chun Yang, Wei-Ting Lin, Yu-Chen Chang, Dardan Gashi, Emma Beale, Dmitry Ozerov, Karol Nass, Gregor Knopp, Philip J. M. Johnson, Claudio Cirelli, Chris Milne, Camila Bacellar, Michihiro Sugahara, Shigeki Owada, Yasumasa Joti, Ayumi Yamashita, Rie Tanaka, Tomoyuki Tanaka, Fangjia Luo, Kensuke Tono, Wiktoria Zarzycka, Pavel Müller, Maisa Alkheder Alahmad, Philipp Bezold, Valerie Fuchs, Petra Gnau, Stephan Kiontke, Lukas Korf, Viktoria Reithofer, Christian Joshua Rosner, Elisa Marie Seiler, Mohamed Watad, Laura Werel, Roberta Spadaccini, Junpei Yamamoto, So Iwata, Dongping Zhong, Joerg Standfuss, Antoine Royant, Yoshitaka Bessho*, Lars-Oliver Essen*, Ming-Daw Tsai*

<雑誌>

Science

<DOI>

10.1126/science.add7795

補足説明

[1] X線自由電子レーザー (XFEL)

近年の加速器技術の発展によって実現した X 線領域のパルスレーザー。従来の半導体や気体を発振媒体とするレーザーとは異なり、真空中を高速で移動する電子ビーム

を媒体とするため、原理的な波長の制限はない。SPring-8 などの従来の放射光源と比較して、10 億倍も高い輝度の X 線がフェムト秒（1,000 兆分の 1 秒）スケールの時間幅を持つパルス光として出射される。この高い輝度を生かしてマイクロメートルサイズの小さな結晶を用いたタンパク質の原子分解能の構造解析や X 線領域の非線形光学現象の解明などの用途に用いられている。

[2] SACLA

理研と高輝度光科学研究センターが共同で建設した日本で初めての XFEL 施設。高い空間コヒーレンス、短いパルス幅、高いピーク輝度を備えた X 線領域のレーザーを発生させる。2011 年 3 月に施設が完成し、SPring-8 Angstrom Compact free electron LAser の頭文字を取って SACLA（サクラ）と命名された。2011 年 6 月に最初の X 線レーザーを発振、2012 年 3 月から共用運転が開始され、利用実験が始まった。大きさが諸外国の同様の施設と比べて数分の 1 とコンパクトであるにもかかわらず、0.1nm 以下という世界最短クラスの波長のレーザー生成能力を持つ。

[3] SwissFEL

スイス北部のパウル・シェラー研究所（Paul Scherrer Institute: PSI）に設置された比較的新しい XFEL 施設。2019 年より運用が開始された。日本の SACLA は、LCLS（米国）、European-XFEL（欧州）、SwissFEL（スイス）、PAL-XFEL（韓国）、上海 XFEL（中国）とともに 6 極連携を進め、国際的な研究協力体制を強化している。

[4] 時分割結晶構造解析

結晶中の分子の微細な動きを高い時間分解能で観察する手法。本研究では、室温で微結晶を連続的に X 線自由電子レーザーの X 線照射ポイントまで流し、これに酵素の構造変化を引き起こす青色レーザー光を照射する装置を組み合わせることで、光回復酵素と損傷 DNA の構造変化を観察した。Time-resolved serial femtosecond crystallography（TR-SFX）法の訳語。

[5] FAD

フラビンアデニンジヌクレオチド（Flavin Adenine Dinucleotide）の略称。ビタミン B2（リボフラビン）にオルトリン酸 2 分子とアデノシン 1 分子が結合した化合物で、多くの酸化還元酵素の補酵素として重要である。アデノシンが結合しないフラビンモノヌクレオチド（FMN）とともに、フラビン補酵素と呼ばれる。両者は、微生物から高等動物まで広く生命基本原材料として細胞内反応に使われている。酸化型と還元型があり、それぞれ FADox、FADH⁻と示した。

国際共同研究グループ

理化学研究所 放射光科学研究センター 生命系放射光利用システム開発チーム

客員研究員 別所義隆（ベッショ・ヨシタカ）

（台湾中央研究院・生物化学研究所 客座教授（研究当時兼務））

台湾中央研究院・生物化学研究所

特聘研究員 蔡 明道（Ming-Daw Tsai）

台湾大学

助理教授 Manuel Maestre-Reyna（マヌエル・マエストレ・レイナ）

フィリップ大学マールブルク（ドイツ）

教授 Lars-Oliver Essen （ラーズ・オリバー・エッセン）

大阪大学 大学院基礎工学研究科 物質創成専攻

准教授 山元淳平 （ヤマモト・ジュンペイ）

東北大学 多元物質科学研究所

教授 南後恵理子（ナンゴ・エリコ）

（理化学研究所 放射光科学研究センター 分子動画研究チーム
チームリーダー）

京都大学 大学院医学研究科 分子細胞情報学

教授 岩田 想 （イワタ・ソウ）

（理化学研究所 放射光科学研究センター SACLA 利用技術開拓グループ
グループディレクター）

上記機関のほか、パウル・シェラー研究所（スイス）、欧州シンクロトロン放射光研究所（フランス）、ハンブルク大学（ドイツ）、オハイオ州立大学（米国）、高輝度光科学研究センター、グルノーブル・アルプ大学（フランス）、パリ＝サクレ大学（フランス）、サンニオ大学（イタリア）の研究者らが参加。

研究支援

本研究は、主に日本学術振興会（JSPS）科学研究費助成事業新学術領域研究（研究領域提案型）「高速分子動画法によるタンパク質非平衡状態構造解析と分子制御への応用（領域代表者：岩田想）」、同公募研究「(6-4)光回復酵素による DNA 修復過程の分子動画撮影（研究代表者：山元淳平）」、同基盤研究（C）「非天然官能基ポスト標識技術による微小マイクロ結晶構造解析法の開発と応用（研究代表者：別所義隆）」、日本医療研究開発機構（AMED）の生命科学・創薬研究支援基盤事業（BINDS）、科学技術振興機構（JST）創発的研究支援事業（FOREST）「DNA 修復反応の動的構造解析基盤の創出（研究代表者：山元淳平）」による助成を受けて行われました。