

氏名(本籍) 小^こ 林^{ばやし} 孝^{たか} 安^{やす}

学位の種類 医学博士

学位記番号 医博第 1062 号

学位授与年月日 平成 3 年 3 月 28 日

学位授与の条件 学位規則第 5 条第 1 項該当

研究科専攻 東北大学大学院医学研究科
(博士課程) 生理学系専攻

学位論文題目 DNA光回復酵素の構造と機能
1. Molecular characterization of a gene encoding a photolyase from Streptomyces griseus. (放線菌 Streptomyces griseus の DNA 光回復酵素遺伝子のクローニングとその解析)
2. Increased UV sensitivity of Escherichia coli cells after introduction of foreign photolyase genes. (他生物種由来の DNA 光回復酵素が大腸菌の紫外線感受性に与える影響)

(主査)

論文審査委員 教授 及川 淳 教授 小野 哲也

教授 帯刀 益夫

論 文 内 容 要 旨

光回復現象は1949年A. Kelnerによって放線菌に見い出されたが、1960年代になってC. S. Rupertによって特別な酵素が必要であることが発見され、光回復酵素と名付けられた。光回復酵素は紫外線によってDNA中に生じたピリミジン2量体を可視光線(300~500nm)のエネルギーを用いて直接修復する酵素であり、修復に最も適する可視光線の波長から2群に分類されている。第1のグループは380nm付近の光を良く利用するタイプで、大腸菌、パン酵母、アカパンカビの光回復酵素が含まれている。一方、藍藻、放線菌、高度好塩菌の光回復酵素が含まれる第2のグループは相対的に長波長である440nm付近の光を良く利用している。(以後、前者を短波長型光回復酵素、後者を長波長型光回復酵素と呼ぶ。)この2群の作用スペクトルの違いは、それぞれのタイプの光回復酵素に含まれている補酵素の違いに由来している。すなわちFADH₂とプテリン誘導体を補助因子として含むのが、短波長型光回復酵素であるのに対し、長波長型光回復酵素は、FADH₂と8-ヒドロキシ-5-デアザフラビン(8-HDF)を補酵素として持っている。著者は、短波長型、長波長型それぞれ2種、計4種の光回復酵素の1次構造を比較することによって、光回復酵素の構造と機能を解明しようと試みた。すなわちある領域が4種の間で保存されているならば、そこは両タイプに共通な機能である損傷DNAに対する結合能および共通の補助因子FADH₂の結合能を担っていると考えられる。一方、ある領域が各タイプの酵素間でのみ相同性を保持しているならば、そこは各タイプ特異的な補助因子(プテリン誘導体または8-HDF)の結合部位であることが推測される。この仮説を検証するために、第2の長波長型光回復酵素の遺伝子を放線菌*Streptomyces griseus*からクローニングし、その解析を試みた。(この時点までに短波長型酵素の遺伝子が大腸菌とパン酵母から、また長波長型酵素の遺伝子が藍藻から得られていた。)その結果、カルボキシル末端に近い約100個のアミノ酸が4種の光回復酵素の間で非常に良く保存されていることが明らかになった。更に、この領域の中に数多くのDNA結合タンパク質に見られるヘリックス・ターン・ヘリックス構造のコンセンサス配列と合致する配列が見い出された。また各タイプの間でのみ相同的なアミノ酸は、アミノ末端に近い約150アミノ酸からなる領域に多く見い出され、この領域がプテリン誘導体または8-HDFの結合部位である可能性が示唆された。

大腸菌の光回復酵素は、可視光のエネルギーを用いたピリミジン2量体の直接的な修復の他に除去修復系の効率を促進する働きも持っている。このメカニズムを明らかにする上で他生物種由来の光回復酵素も同じように除去修復系を促進するかどうかを知ることが有用だと考え、前述の放線菌を含む4種の生物に由来する光回復酵素遺伝子を大腸菌内で発現させたところ、それらは

興味深いことに大腸菌の除去修復系の働きを阻害することが明らかになった。このことは大腸菌の2つの修復系は長い間共存しているうちに、一方が他方を助けるように進化して来たことを示唆し、また除去修復系促進に関わる領域は、他の光回復酵素とホモロジーのない領域に存在する可能性を示している。

以上のように、光回復酵素が持ついくつかの機能部位が推定されたが、これらを直接的に検証するために、*In vitro mutagenesis*法による大腸菌光回復酵素の解析を試みた。解析法として大腸菌内での光回復能の測定に加え、ゲルシフト法を用いた。その結果、21種類のミュータントのうち、328番目のアスパラギン酸をアラニンに変えたものが、光回復活性および損傷DNAに対する結合能を失っていることが明らかになった。これをヘパリン・セファロースカラムで精製したのち光学的解析を行ったところ、このミュータントの持つ補助因子は正常型光回復酵素のそれとまったく同一であることが明らかになった。このことは、この変異が補助因子の結合に影響を与えずにDNA結合能だけを失わせていることを示しており、このアスパラギン酸が、損傷DNAに対する認識あるいは結合に関わっていることを示唆している。また、このアスパラギン酸は、前に述べたヘリックス・ターン・ヘリックス構造のうちC末側の α -ヘリックスのちょうど真ん中に位置していることから、328番目のアスパラギン酸が、このヘリックスの構造維持に重要な働きをしているか、あるいはDNAと直接相互作用していることが考えられる。

審査結果の要旨

紫外線は核酸塩基に損傷を与え、生物にとって極めて有害である。紫外線によってDNA中に生じる生成物のうち、ピリミジン二量体は特に生成量が多く細胞致死と突然変異誘発に対する寄与が大きい。多くの生物は、このピリミジン二量体を取除く手段として、可視光のエネルギーを用いて直接修復を行なう光回復酵素を持っている。この酵素は生物種に共通の補助因子としてFADH₂、および生物種により異なる第二の補助因子としてプテリン誘導體または8-HDF（ヒドロキシデアザフラビン）を持っており、その結果生ずる作用スペクトルの違いから短波長型と長波長型の2群に分類されている。

本研究では、光回復酵素の蛋白質としての一次構造と機能の間の関係を明らかにすることを目的として、1) 放線菌 *Streptomyces griseus* の長波長型光回復酵素遺伝子を単離し、それから導かれるアミノ酸配列を既知の2種の短波長型、1種の長波長型光回復酵素のアミノ酸配列と比較することにより機能部位を推定し、2) この推定に基づいて、部位特異的突然変異導入法で大腸菌光回復酵素のアミノ酸配列を改変し活性部位の解析を行なっている。また同時に光回復酵素と他のDNA修復系との関連を明らかにするために、3) 他生物種由来の光回復酵素が大腸菌の除去修復系に与える影響を調べている。

本研究によって次の事が明らかになった。1) 光回復酵素のアミノ酸配列の後半部は非常に良く保存されており、その中に多くのDNA結合性蛋白質に見出されているヘリックス・ターン・ヘリックス (H-T-H) 構造に見られるコンセンサス配列が存在する。2) 短波長型、長波長型酵素夫々の中でのみ相同であるアミノ酸残基はアミノ端側の約150アミノ酸の領域に多く見出され、この領域がプテリン誘導體、8-HDFの結合部位であることが示唆された。3) 部位特異的突然変異導入法で作成した大腸菌光回復酵素の変異蛋白質のうち、328番目のアスパラギン酸をアラニンに変えた変異は補助因子の結合に影響を与えることなく、損傷DNAに対する結合能だけを失わせる。このことはこのアスパラギン酸がH-T-HのC端側のヘリックスの中央にあることを考慮すると、損傷DNAとの結合に関わる構造の維持に関与していることを強く示唆している。4) 大腸菌の光回復酵素は大腸菌の除去修復を促進するが、他の生物種の光回復酵素は大腸菌の除去修復をむしろ阻害した。

光回復酵素の構造と機能に関する本研究は、この蛋白質が損傷DNAを認識するために要求される蛋白質一次構造上の必要条件を明らかにする第一歩となっただけでなく、この蛋白質が除去修復など、他のより普遍的なDNA修復機構における役割についての展望をも大きく拡大したものであり、学位授与に値するものである。