

氏 名	ひと み けん いち 人 見 研 一
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2378 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 生 理 系 専 攻
学位論文題目	Role of two histidines in the (6-4) photolyase reaction (6-4) 光回復酵素の基質特異性と作用機序に関する研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 丹 羽 太 貫	教 授 平 岡 眞 寛	教 授 藤 堂 剛
--------	----------------------	-------------	-----------

論 文 内 容 の 要 旨

紫外線による DNA 損傷はさまざまなタイプの DNA 修復酵素により認識・修復される。DNA 修復に関与する蛋白質群の欠損はヒトでは色素性乾皮症やコケイン症候群などの疾患をもたらすことが知られており、修復されずに残った DNA 損傷は発がんや老化の原因となる。紫外線によってできるおもな DNA 損傷としてシクロブタンピリミジンダイマー (CPD) と (6-4) 光産物の二種類がある。これらの損傷のそれぞれに特異的に作用して、光依存的に修復する酵素として 2 つのタイプの光回復酵素が知られている。我々は脊椎動物 (アフリカツメガエル) から初めて (6-4) 光回復酵素の遺伝子をクローニングし、大腸菌内で組み換え体を発現させ、均一な酵素を精製することに成功した。本研究ではこの精製酵素を用い基質特異性とその反応メカニズムを明らかにした。

(6-4) 光回復酵素はその基質特異性の違いにもかかわらずアミノ酸配列で CPD 光回復酵素と高い相同性を示し、CPD 光回復酵素同様に補酵素光受容分子として FAD をもつことを証明した。また還元型の FAD が光を吸収して励起し、電子を供与することでピリミジン環間の共有結合を開裂することを明らかにした。しかし (6-4) 光産物はその生成過程において 3' 側から 5' 側への官能基の転移が起こるため、完全にもとの塩基にまで修復されているか否かが懸念された。そこで、(6-4) 光産物を (6-4) 光回復酵素で処理した後、反応産物を HPLC にて単離・同定した結果、完全にもとの塩基にまで修復されていることを明らかにした。さらに (6-4) 光回復酵素の基質特異性及び作用機序を明らかにするために両光回復酵素で保存されている二つの Trp と (6-4) 光回復酵素だけで保存されている Leu, Gln, 及び二つの His 残基をそれぞれ Ala で置き換えた (6-4) 光回復酵素の点突然変異体を作成し、DNA 結合能さらに修復活性を *in vitro* と *in vivo* で調べた。Gln を Ala で置き換えた変異体ではその影響は全くみられなかったが、Leu を Ala で置き換えることで DNA 結合能が著しく低下した。このことは、(6-4) 光回復酵素が (6-4) 光産物と Leu 残基において疎水性の相互作用をもつことを示唆しており、さらに CPD 光回復酵素ではその部位は Arg が保存されていることから両光回復酵素の基質特異性の違いに重要な役割を果たしていることが明らかとなった。一方、側鎖の大きな Trp 残基変異体が活性を示したのに対して、同様に比較的大きな側鎖をもつ二つの His 残基をそれぞれ Ala で置き換えた変異体は *in vitro* と *in vivo* でほとんど活性を失っていた。このことは変異によって構造が保持できないために活性を示さないのではなく、His 残基が (6-4) 光回復酵素の活性において重要な役割を担っていることを示唆しており、このことは (6-4) 光回復酵素のユニークな pH 依存性からも推し量られた。FAD が電子を供与するにはやや酸性度が高い方が効率が良いにもかかわらず、(6-4) 光回復酵素はアルカリ領域において高い活性を示し、中性付近ではその活性が著しく低下する。His は他のアミノ酸と異なりその側鎖であるイミダゾールの性質から pKa を中性付近にもつことに一致する。

CPD 光回復酵素とのアミノ酸レベルでの高い相同性にもかかわらず (6-4) 光回復酵素が (6-4) 光産物を選択的に認識するには Leu が重要な役割を果たし、完全にもとの塩基に修復するには 2 つの His 残基が必須であることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

紫外線による DNA 損傷としてシクロブタンピリミジンダイマー (CPD) と (6—4) 光産物の二種類が知られている。(6—4) 光産物は CPD に比べ生成量は少ないものの、突然変異原性が強いいため人体影響も大きい。本研究は、この (6—4) 光産物を可視光を利用して特異的に修復する (6—4) 光回復酵素の反応メカニズムを解析したものである。(6—4) 光産物を化学合成し、これを基質とした修復反応産物を単離・同定する事により、この酵素が損傷 DNA を完全に正常な塩基にまで修復している事を明らかにした。この酵素は可視光依存的に DNA 損傷を修復するが、補酵素として持つ FAD が光受容分子であり、しかも還元型の FAD が活性型である事を明らかにした。また、この酵素の遺伝子に点突然変異を導入した変異体を作成する事により酵素活性に重要な役割を果たすアミノ酸残基をスクリーニングし、損傷 DNA を選択的に認識するために重要な役割を果たすロイシン残基と、修復反応に重要な役割を果たす二つのヒスチジン残基を同定した。変異体の解析結果とこの酵素が示すユニークな pH 依存性から、この酵素はヒスチジン残基により、基質である (6—4) 光産物をその生成中間体にまで構造変化させ、修復反応を起こりやすくしているというモデルを提唱した。

以上の研究は、太陽光による発癌における DNA 損傷とその修復機構の役割の解明に貢献し、癌研究の発展に寄与するところが多い。

従って、本論文は、博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成13年2月21日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。