光による DNA 損傷と光回復酵素

東北大学抗酸菌病研究所 安井 明

Large amount of information saved in DNA is protected by various DNA repair systems in living cells. Photoreactivating enzyme repairs UV-induced pyrimidine dimers by using the energy of blue light. This enzyme has two different light-absorbing elements, one of which is common in various organisms, a reduced FAD. Extensive homology among amino acid sequences of the enzymes from various organisms indicates the ancient origin of this DNA repair system.

ultra-violet light/DNA repair systems/photoreactivation/photolyase/evolution

生物は紫外線や化学物質により生じる DNA 上の損傷を修復する酵素系をいくつも持っている。図 1 は酵母の野生型と三つの突然変異株の紫外線に対する生存率を示す。この中で最も感受性の *rad 3* 変異株は除去修復と呼ばれる、多くの蛋白質が関与する修復機構が、一つの遺伝子の変異により全く働かなくなっている。

図 1. 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の野生型と三種の DNA 修復欠損株の紫外線に対する感受性

Light-induced DNA damage and photoreactivating enzyme

Akira YASUI

Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University

その次に感受性の *rad 18* はまだ修復機構が全く判っていない修復系に属する遺伝子の変異であり, *rad 50* は DNA の組換えにより修復を行なう系に属する遺伝子の変異である。これらの修復系はそれぞれ損傷の種類により修復の得意, 不得意があり, 例えば紫外線損傷には除去修復が, X 線損傷には組換え修復が最も働く。

さて上に述べた修復系以外でその修復に光のエネルギーを使うのが光回復酵素である。図 2 は *rad 2* という除去修復系の変異株と *rad 2*, *rad 18* の二重変異株 (この株は *rad 2* と *rad 18* を足し合わせた紫外線感受性をもつ) に暗闇で紫外線を照射し, その 5 分後に至

図 2. 二種の酵母 *S. cerevisiae* 株の紫外線照射後のフラッシュによる光回復

図3. 藍藻 (*Anacystis nidulans*) の暗回復効果
(P. G. LANHAM and J. A. HOUGHTON 1988)より改図

近距離から写真用のフラッシュを一発当てた場合の生存率の増加を示したものである。フラッシュの代りに蛍光灯の下に10分程度も置けば生存率は100%近くにまで回復する。この現象を光回復と呼びバクテリアから哺乳動物まで多くの生物が持っている光回復酵素というDNA修復酵素によるものである。この小文では光をエネルギー源として生きるラン藻の光回復酵素について解説し、それを通じて、生物にとってのDNA修復の役割について考えてみる。

光を利用する原核生物には主に、1. 光合成細菌、2. ラン藻、3. 高度好塩菌がありいずれも太陽光をエネルギー源として使う事が出来る。太陽光には紫外線も含まれているからそれによりDNAは損傷を受ける。その損傷はDNA複製を阻害してDNAの崩壊を招き細胞死につながると考えられる。図3は光(500~700nm)を唯一のエネルギー源とするラン藻(*Anacystis nidulans*)に紫外線を与えた後、一日暗闇においた場合と比べて、ただちにエネルギー源である黄色光を与えて細胞を増殖させると細胞の多くは死んでしまうことを示している。暗闇に置かれた細胞は、その間に上に述べた除去修復系等がDNA損傷を修復するので生存率が上昇する。ところが今度は紫外線照射の後

図4. 藍藻 (*Synechocystis*) の光回復効果
(P. A. O'BRIEN and J. A. HOUGHTON 1982)より改図

図5. 光回復のモデル

に青色光(350~500nm)を当てると生存率はそれ以上で、ほとんど100%の生存率になる(図4)。このラン藻は440nmを最適波長とする長波長型の光回復酵素を他の生物に比べて多量に持っており、光のエネルギーを生存の為の光合成と修復の為の光回復にうまく使い分けていることが判る。

光回復酵素は図5のモデルに見られる様に蛋白質と光を吸収する補助因子から成っており、紫外線により

表1. 藍藻の光回復酵素の精製 (Eker et al. 1990)

Purification step	Volume ml	Protein mg	Total activity megaunits	Specific activity kunits/mg	Purification x fold	Yield %
Crude extract	10,520	240,700	152	0.6	1	100
Porous silica chromatography	10,512	144,633	142	3.7	6	93
UV-DNA-cellulose chromatography	1,587	530	76	143.5	144	50
Heparin-Sepharose chromatography	68	25.4	68	2,700	4,280	45
DEAE-cellulose chromatography	24	7.4	58	7,800	12,400	38
DEAE-Sepharose chromatography	10	4.7	63	13,400	21,200	41

図6. 種々の生物の細胞エキストラクト中の光回復酵素活性スペクトル

生じる主なDNA損傷であるピリミジン二量体を認識して結合し、その際に入射する光(350~500nm)を捕えてそのエネルギーで二量体を単量体に転換し修復する。この光の最適波長は生物種により異なり、図6に示す様に大きく分けて長波長型(440nm)と短波長型(380nm)に分類できる。この波長型の違いは一体どこから由来しているのだろうか? 筆者らは短波長型の光回復酵素をもつ酵母の遺伝子をクローニングして解析し¹⁾、同じ短波長型の大腸菌の遺伝子との間に広範な相同性を発見した²⁾。波長型の違いを知るために

図7. 藍藻の光回復酵素とデアザフラビン+FADの吸収スペクトルの比較 (Eker et al. 1990)

はもうひとつの長波長型酵素の解析が必要であるので、長波長型の光回復酵素の同定を試みた³⁾。

表1に従ってラン藻の光回復酵素の精製を行なった。酵素活性の測定は、紫外線照射することにより不活性化した抗生物質抵抗性遺伝子を含むDNAに、各フラクションの精製物を加えて光回復光を当て紫外線によるDNA損傷を修復させる。その後、このDNAを抗生物質感受性株に導入して抵抗性に形質転換させる割合をそのフラクション中の酵素活性とした。このようにして精製した酵素の光吸収を詳細に調べることにより補助因子が何であるかを同定すると共に、光エネルギーの移行を調べることができる。ラン藻の酵素は438nmに吸収極大を持つが、100℃で変性させると補助因子が遊離して、吸収スペクトルの変化が生じる(図7)。その際の吸収は補助因子のみの吸収を示し、それはこの図に示す様に、8-HDF(8-hydroxy-5-deazaflavin)とFADを同じ分子数入れた溶液の吸収と一致する。酵素中ではFADは還元されたFADH₂として働くが、暗闇で徐々に不活性型のFADラジカルに変化する。このFADラジカルは長波長の光を吸収して活性のあるFADH₂に戻る。アメリカのグループは、短波長型である大腸菌の酵素の補助因子が、プテリンの誘導体とFADH₂から成っていることを示した⁴⁾。すなわち図8に示す様に、還元されたFADを共通に

図8. 光回復酵素の補助因子と作用スペクトル・吸収スペクトルの関係

持ち、もう一つの補助因子が異なることにより、短、長波長型の違いが生じることが明らかとなった。レーザーフラッシュをもちいて解析された大腸菌の光回復酵素でも明らかにされたが⁵⁾、第二の補助因子は光を吸収してそのエネルギーをFADラジカルの活性化に使う場合とFADH₂へエネルギーを渡して二量体を修復する二つの役割をしている。

さて補助因子と複合体を作る蛋白質はどのようなものであろうか？長波長型の酵素遺伝子を単離する為に、精製したラン藻のアミノ末端のアミノ酸配列を決め、それに対する合成DNAを作りそれを用いてラン藻光回復酵素遺伝子を単離、同定した⁶⁾。この酵素は大腸菌や酵母のものと広範な相同性をアミノ酸配列にもち、この結果、長、短両波長型の酵素は進化の起源を同じくすることが判明した。このラン藻の遺伝子をあしがかりにして、その後放線菌⁷⁾、高度好塩菌⁸⁾の光回復酵素遺伝子を単離、同定した。図9はこれまでに筆者らが決めた、今まで知られている全ての光回復酵素の一次構造である。よく保存されている部位は、DNA及び共通の補助因子FADH₂との結合域であり、長波長型と短波長型のそれぞれにのみ保存されている配列は第二の補助因子の結合部位に必須のアミノ酸であろう。カルボキシ末端に近いよく保存された領域の三箇所に突然変異を導入した蛋白質はいずれも損傷DNAに結合しなくなった(Kobayashi and Yasui 未発表)。Sancarらはその領域にある一つのトリプトファンにより光回復酵素とDNAが結合しているというモデル

を提唱しているが⁹⁾、酵素が如何にDNA上の損傷を見つけDNAと複合体を作り二つの補助因子はどういう位置関係にあってエネルギーの移行を行なっているかという研究が始ったばかりである。酵素の結晶化や突然変異を導入した蛋白質の解析により、これらが解明されるであろう。

図10は長波長型(ラン藻)と短波長型(酵母)の光回復酵素の吸収スペクトルを太陽光のスペクトルと比較した。明らかにラン藻の方が太陽光のエネルギーをうまく用いている。しかしながら、大腸菌の光回復酵素は光回復のみを行なっているのではないことが最近判ってきた¹⁰⁾。大腸菌の光回復酵素遺伝子を大腸菌で高発現させると、光回復させなくとも紫外線に抵抗性になる。この現象は光回復酵素が除去修復酵素を助けているからであることが*in vitro*の実験からも明らかになった¹¹⁾。図11はこの様子をモデルで示した。これに対して、他の四種の生物由来の光回復酵素遺伝子を大腸菌で発現させると活性のある光回復酵素は作るものの、光を当てないとベクターのみを入れた大腸菌より感受性となる¹²⁾。このことは、それぞれの生物種の光回復酵素と除去修復酵素が進化の間に精密な相互の適応をしてきたことを示唆する。ヒトの細胞においても光回復酵素が除去修復を助ける役割をしているのではないかという仮説が昨年に出されているがまだ結論はでていない。

光回復酵素が太古の昔から存在にしないに違いないDNA修復系であることは種々の生物の光回復酵素を

Pt	<i>S.cerevisiae</i>	MKRTVISSSNAYAKSRRLDIEHDFEQYHSLNKKYPRPITRTGANQFNNSRAKPMIEVEKLQKKQKTSFE
HDF	<i>H.halobium</i>	QLFWHRRRLTTRGIAAAAPGVTAVDGGHDQGPVAAVFCFDEVL---AHAAPPVAFVMDADAAERERYRDLGS
HDF	<i>S.griseus</i>	SVAVVLFTS---DLRLHDPVLRRAA-----LRDADEVVPLFVRDDAVHRRAGFDAPNRLAFADCDAAALDAGLRHRGG
HDF	<i>A.nidulans</i>	AAPILFWHRRDLRLSDNIGLAAA-----RAQSAQLIGLFCLDPQILOQADMAPARVAYLQGCLOELQORVQQAGS
Pt	<i>E.coli</i>	TTHLVWFRQDLRLHDKLALAAAC-----RNSSARVLALYIATPRQWATHNMSPRQAEILINAGINCTQIALAEKGI
Pt	<i>S.cerevisiae</i>	NVSTVMHAFRNLDRLYDNVGLYKSVAFQOLRQKNNAKALYAVYVINEDDWRHMDSGWKLMTFIMGALKNLQOSLAELHI
HDF	<i>H.h</i>	DLIVRHGDPA-----VLPVAVNDLDATRVVWNHDYSGLATDRD---AGVRDALDAAGVAHAQPHAV---HHRFG-EIRT
HDF	<i>S.g</i>	RILVRRGEAAT-----EVRRVAETGAARVHIAAGVSRVAAARRE---QRIREALADSGRELHV-HAVVTALAEGRVVPT
HDF	<i>A.n</i>	RLLLQGDPOH-----LIPQLAQQLQAEAVYWNQDIEPYGRDRD---GQVAAALKTAGIRAVQLWQOL---LHSPD-QILS
Pt	<i>E.c</i>	PLLFREVDDFV---ASVEIVKQVCAENSVTHLFYNYQYEVN-ERARD---VEVERALRNVVCEGFDPSV---ILPFG-AVMT
Pt	<i>S.c</i>	PLLWFEFHTPKSTLSNSKFFVEFFKECMNVSSSGTGITITANIFYQTDLYRDIRLLENEHRLQLKYHSC---IVAEQ-LITT
HDF	<i>H.h</i>	NAGDPYSVITYFWRKWQ-DREKN-PPAPEPEPADLAAD-----TALAD---TSFPPSVQELGFAEPAEPAVDAGTANARSLLDAF
HDF	<i>S.g</i>	GGKDHFAVTFPYFRWEAEGVRGTQAPRTVRVP-----DGVASDELPRDRCVENLSPGLAR---GGEEAGRLKLVTSW
HDF	<i>A.n</i>	GSGNPYSVYGPFWKNWQ-AQPKPTPVATPTLVLSPEQL-----TAIAPLLSELPTLKLQGFWDGGFPVEPGETAAIARLOEF
Pt	<i>E.c</i>	GNHEMYKVFPTF-KN---AWLKRLREGMPECVAAPKVRSS---GSIPEPSITITNYPRQ-SFD-TAHFPVE---EKAAIAQLRQF
Pt	<i>S.c</i>	DRGTNYSVTFPWYKKWV-LYVNNYKKSTSEICHLHIIEPLKYNETFELPKPFQYSIDDEFLOQYIPKSKWCLPDVSEBALSRLKDF
HDF	<i>H.h</i>	RESGDIYREEDRRDYPHPEETSLSPHLKFTIGIRTVYEAARAAKSDADT---DDERENVAAFIGOLAWREFYVAQVLYFNQNVV
HDF	<i>S.g</i>	LN-GPMADYEDGDDLAGDATSLSLPHLHFTVSAELVHRAR-----EKGLGGEAFVROLAWRDFHHQVLADRPD-A
HDF	<i>A.n</i>	CD-RAIADYDQRFNFFPAEAGTSLSPALKFPAIGIRQAWQAASAHAALSRS---DEARNSIRVWQELAWREFYOHALYHFPPLA
Pt	<i>E.c</i>	CQ-NGAGEYEQQRDFPAVEGTSLSLASLATGLSPROCLHRLAE---QPQALDGGAGSVWLNELIWRREFYRHLYTHYHPSLC
Pt	<i>S.c</i>	LG-TKSSKYNNEKMDLYLGTSLSLVYITLIRISTRLIVNQAFQSCNGQIMSKALKQNFQNLKEVWDEYVRHRCMCNWPYTS
HDF	<i>H.h</i>	SE-NFKAYEHPIDRRDPAALQAKDGETGMEIVDANRQIRAEAYMNRNRMIVNAPLIDLVWRAQYDWREKIDNHTAN
HDF	<i>S.g</i>	SWSDYRPRHDR---MRSDADEMHAKSGLTGMEIVDANRQIRAEAYMNRNRMIVNAPLIDLVWRAQYDWREKIDNHTAN
HDF	<i>A.n</i>	DG-PYRSLWQOFFENREALTAMTQAGTGMIVDANRQIRAEAYMNRNRMIVNAPLIDLVWRAQYDWREKIDNHTAN
Pt	<i>E.c</i>	KHRFFIAWTDREVQMSNPAHLQAKDEGKTGMIVDANRQIRAEAYMNRNRMIVNAPLIDLVWRAQYDWREKIDNHTAN
Pt	<i>S.c</i>	MGMFYRLDTLDIKMNPVAFKMTCTGNIGMEIVDANRQIRAEAYMNRNRMIVNAPLIDLVWRAQYDWREKIDNHTAN
HDF	<i>H.h</i>	DNGGMQWAASTGDAAPYFRVFNPMTOGERVCPDADYITEFVPELRDVPADAIHSHWELSLSERRRHAPVDPPIVHOSORREDA
HDF	<i>S.g</i>	NQLNMQWVAGTGDITRE-NRLNPNVIGKRFDARGDYVRRWVPELAEVEGSAIH---EPWKLGQLDRAGLDYDPVMDLAEARAR
HDF	<i>A.n</i>	NNGGMQWSASSGDPKPE-LRIFNPAACAKKFDATATYIKRWLPELRHVHPKDL---ISGEITPIERRGYPAPVNVNHLRQKF
Pt	<i>E.c</i>	NNGGMQWAASTGDAAPYFRVFNPMTOGERVCPDADYITEFVPELRDVPADAIHSHWELSLSERRRHAPVDPPIVHOSORREDA
Pt	<i>S.c</i>	NVGGMGFCSSSTGDAAPYFRVFNPMTOGERVCPDADYITEFVPELRDVPADAIHSHWELSLSERRRHAPVDPPIVHOSORREDA
HDF	<i>H.h</i>	IAMFERARGDE
HDF	<i>S.g</i>	---FERARGLD
HDF	<i>A.n</i>	KALYNQLKAAIAEPEAEPOS
Pt	<i>E.c</i>	LAAYEAARKGK
Pt	<i>S.c</i>	LKYVKDAM

図9. 光回復酵素の amino 酸配列の相合体

HDF と Pt はそれぞれデアザフラビン及びプテリン型と意味する。amino 酸配列の上下の▼及び▽はそれぞれデアザフラビン型及びプテリン型の酵素にのみ存在する保存されたamino 酸を示す。

図10. 太陽光スペクトルと藍藻及び酵母の光回復酵素の吸収スペクトルの比較

図11. DNA 修復系の相互作用

比較して明らかになった。それと比べて除去修復系は比較的、新しい修復系と考えられる。修復過程のなかでは、DNA 上の損傷が修復酵素の一つによって如何に認識されてその後の修復につながっていくかをまず知らねばならない。光回復酵素はその理解のためのよいモデルを提供している。紫外線や有害な化学物質の増加しつつある現在、高等動物でこれらの修復酵素の働き方の一層の理解が必要とされている。

文 献

- 1) Yasui, A., Chevallier, M. R. (1983) *Curr. Genet.*, **7**, 191-194.
- 2) Yasui, A., Langeveld, S. A. (1985) *Gene*, **36**, 349-355.
- 3) Eker, A. P. M., Kooiman, P., Hessels, J. K. C., Yasui, A., (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 8009-8015.
- 4) Johnson, J. L., Hamm-Aivarez, S., Payne, G., Sancar, G. B., Rajagopalan, K. V., Sancar, A., (1988) *Pro. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 2046-2050.
- 5) Heelis, P. F., Okamura, T., Sancar, A., (1990) *Biochemistry*, **29**, 5694-5698.
- 6) Yasui, A., Takao, M., Oikawa, A., Kiener, A., Walsh, C. T., Eker, A. P. M., (1988) *Nucleic Acids Res.*, **16**, 4447-4463.
- 7) Kobayashi, T., Takao, M., Oikawa, A., Yasui, A., (1989) *Nucleic Acids Res.*, **17**, 4731-4744.
- 8) Takao, M., Kobayashi, T., Oikawa, A., Yasui, A., (1989) *J. Bacteriol.* **171**, 6323-6329.
- 9) Li, Y. F., Sancar, A., (1990) *Biochemistry*, **29**, 5698-5706.
- 10) Yamamoto, K., Satake, M., Shinagawa, H., Fujiwara, Y., (1983) *Mol. Gen. Genet.*, **190**, 511-515.
- 11) Sancar, A., Franklin, K. A., Sancar, G. B., (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**, 7397-7401.
- 12) Kobayashi, T., Takao, M., Oikawa, A., Yasui, A., (1990) *Mut. Res.* **236**, 27-34.