

課題名(タイトル): Theoretical Analyses of the Function of Blue Light Photoreceptor

利用者氏名:
○佐藤 竜馬(1)

理研における所属研究室名:
(1) 生命機能科学研究センター 計算分子設計研究チーム

1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

DNA は紫外線を照射することで損傷することが知られている。DNA の紫外線損傷は主に二種類に分類することができ、一つは隣り合うピリミジン塩基の C5-C5 間および C6-C6 間に共有結合が形成されるシクロブタン型ピリミジン二量体(CPD)と C6-C4 間に共有結合が形成される(6-4)光産物((6-4)pp)である(図 1)。

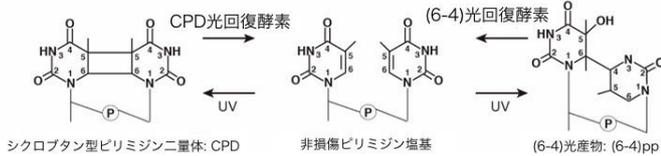


図 1. 紫外線損傷 DNA

これらの損傷が修復されることなく DNA 内に存在し続けると DNA の転写や複製の際に問題を生じる。植物においては成長障害、人間では皮膚がんの原因となる。したがって、生物はこの損傷を修復する機構を備えており、その機能を有する蛋白質を光回復酵素と呼ぶ。光回復酵素はバクテリアから植物までの生物種でみつかっており、補酵素としてフラビンアデニンヌクレオチド(FAD)を有するフラボ蛋白質の一種である。FAD は光回復酵素内では二電子還元型(FADH⁻)となっており、青色光領域(440 nm - 450 nm)に吸収極大波長をもつ。光回復酵素による紫外線損傷 DNA 修復機構は次のようになる: (1) 光回復酵素が紫外線損傷 DNA を認識し結合する。(2) DNA が結合したのち、青色光を FADH⁻が吸収し励起状態となる。(3) 励起した FADH⁻から損傷部位へ電子移動反応が起こる。(4) 電子を受け取った損傷内で結合の開裂反応が進行し二つのピリミジン塩基に分かれる。(5) 修復されたピリミジン塩基から電子が中性ラジカル型 FAD へと戻ることによって修復反応が終了する(図 2)。

これまで多くの国内・海外の理論・実験グループがこの修復メカニズムの解明に取り組んでいる。しかし、この修復メカニズムには未だ不明瞭な部分が残されており、本研究で

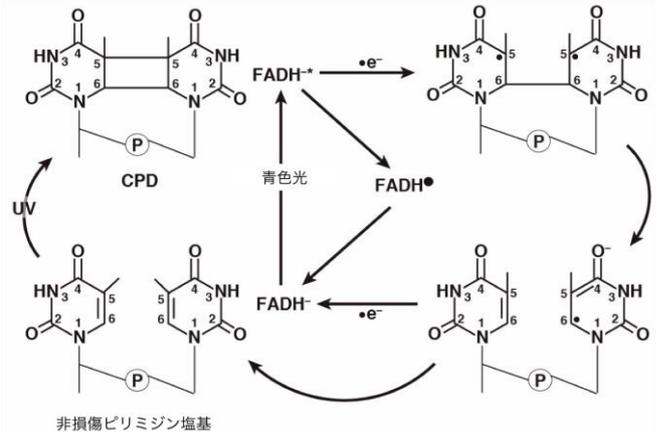


図 2. 紫外線損傷の修復メカニズム

はその点を明らかにすることを目的としている。特に光回復酵素とアミノ酸配列およびその三次構造が似ていて、かつ補酵素に FAD を有する蛋白質であるクリプトクロムが見つかるがクリプトクロムは DNA 修復活性を示さない。その理由の一つは FAD が二電子還元型になれないためであるが、近年新たなクリプトクロムが発見され(DASH 型クリプトクロム)、FAD が二電子還元型をとっていることも明らかにされた。しかし、DASH 型クリプトクロムも DNA 修復活性を示さなかった。現在、その理由は明らかとなっていない。したがって本研究では分子動力学計算と量子化学計算を駆使し、DNA 修復活性をもつ光回復酵素と DNA 修復活性をもたない DASH 型クリプトクロムの挙動を解析することで DNA 修復機能の発現に必須となる条件を明らかにする。

2. 具体的な利用内容、計算方法

本研究は次の二点に着目して研究を進めた。(1)電子移動反応の反応性の比較、(2)紫外線損傷 DNA 結合メカニズムの解明。

(1) 電子移動反応の反応性の比較

光回復酵素と DASH 型クリプトクロムでは電子移動反応の反応性に違いがあるのかを調べるため、はじめに本研究ではそれぞれで分子動力学計算を実行し、構造サンプリング

を行った。ここで光回復酵素と紫外線損傷した二本鎖 DNA の複合体に対する X 線結晶構造 (PDB ID: 1TEZ) が明らかとなっているため、初期構造として用いた。一方、DASH 型クリプトクロムは紫外線損傷した一本鎖 DNA との複合体の X 線結晶構造 (PDB ID: 2VTB) を初期構造に用いた。分子動力学計算より得られた構造に対して量子化学計算を用いて励起状態計算を実行した。量子化学計算を使用して励起状態を計算することで、各励起状態間の遷移双極子モーメントを算出することが可能となる。そして得られた各状態の双極子モーメント (μ_1 , μ_2)、各状態間の遷移双極子モーメント (μ_{12}) および各状態間の励起エネルギー差 (ΔE) から Generalized Mulliken-Hush 法を用いて電子カップリング行列要素 (T_{DA}) を算出した (式 1)。

$$T_{DA} = \frac{m12DE}{\sqrt{(m1 - m2)^2 + 4(m12)^2}} \quad (1)$$

T_{DA} は式 2 に示すように電子移動反応の移動度を算出する際に一般的に用いられるマーカス式に含まれる。

$$k_{ET} = \frac{2\pi}{\hbar} |T_{DA}|^2 \frac{1}{\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} \exp\left[-\frac{(\Delta G + \lambda)^2}{4\lambda k_B T}\right] \quad (2)$$

ここで、 \hbar はディラック定数、 k_B はボルツマン定数、 T は温度、 ΔG は状態間の自由エネルギー差、 λ は再配置エネルギーである。このようにして算出された T_{DA} の値を光回復酵素と DASH 型クリプトクロムで比較し、電子移動反応の反応性に違いがあるかを調査した。

(2) 紫外線損傷 DNA 結合メカニズムの解明

DASH 型クリプトクロムが DNA 修復活性を示さない原因がどこにあるか明らかになっていないため、本研究では (1) と並行して (2) の解析も進めた。ここでは、紫外線損傷した DNA との複合体に対して分子動力学計算および拡張アンサンブル法を用いた解析を進めた。

3. 結果

(1) 電子移動反応の反応性の比較において、光回復酵素および DASH 型クリプトクロムの活性部位における励起状態計算を実行した。光回復酵素と DASH 型クリプトクロム

の活性部位のアミノ酸残基はほとんど同じであるが光回復酵素ではメチオニン (Met353) である部位が DASH 型クリプトクロムではグルタミン (Gln395) に置換されている。しかし、本研究の結果ではこのアミノ酸の違いは励起状態にほとんど影響を与えないことがわかった。さらに T_{DA} を解析した結果、光回復酵素では 35 cm^{-1} であり、DASH 型クリプトクロムでは 43 cm^{-1} であった。このことから、光回復酵素と DASH 型クリプトクロムの電子移動反応の反応性に大きな違いがない、つまり DASH 型クリプトクロムは光回復酵素と同様の反応を起こすことができる可能性を示唆している。しかし、実際には DASH 型クリプトクロムは DNA 修復活性を示さないため、電子移動反応以外に光回復酵素がもっていて、DASH 型クリプトクロムがもたない反応機構があると考えられる。

(2) 紫外線損傷 DNA 結合メカニズムの解明においては、光回復酵素に対する拡張アンサンブル法を用いた解析を実行した。DNA の結合状態から解離状態までの挙動を観測した結果、蛋白質のループ部分が DNA と相互作用していることを明らかにした (図 3)。

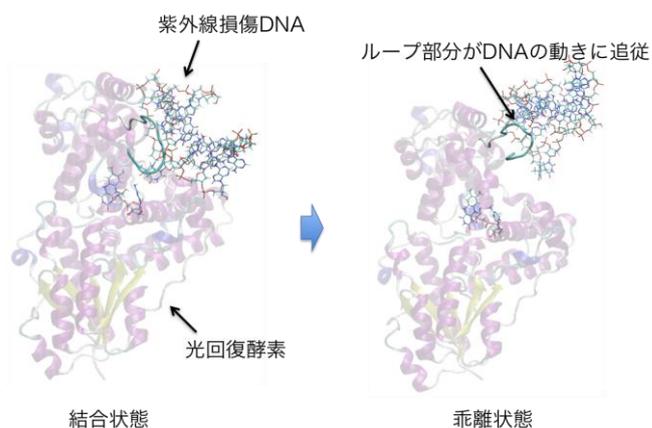


図 3. 光回復酵素における DNA の結合状態と乖離状態の構造

このことから光回復酵素は紫外線損傷 DNA を認識する際にループ部分を使って DNA を捕捉している可能性が示唆できた。

4. まとめ

光回復酵素と DASH 型クリプトクロムに対する電子カップリング行列要素の観点から電子移動反応の反応性を比較した結果、DASH 型クリプトクロムは光回復酵素と同程度の反応性を有している可能性が示唆できた。さらに、これまで光回復酵素がどのように紫外線損傷 DNA を認識し結合して

いるか明らかではなかったが、本研究により紫外線損傷 DNA との結合メカニズムにおいてループ部分が重要な働きを担っている可能性が示唆できた。

5. 今後の計画・展望

DASH 型クリプトクロムは光回復酵素と同程度の電子移動反応性を有している可能性が示唆できたことから、その他の反応において光回復酵素に劣る部分があると考えられる。今年度の研究により光回復酵素における紫外線損傷 DNA との結合において重要と考えられる部位が特定できたため、今後は DASH 型クリプトクロムにおいて同様の解析を行い、光回復酵素と同様の挙動が観測されるのかどうかを明らかにする。さらに次年度は CPD に着目して解析を進めたが、もう一つの(6-4)pp に対する修復メカニズムは CPD 以上に不明瞭である。したがって、今後は(6-4)pp の修復メカニズムの解明に向けてもアプローチしていく。

平成 30 年度 利用研究成果リスト

【雑誌に受理された論文】

特になし

【会議の予稿集】

特になし

【口頭発表】

特になし

【ポスター発表】

佐藤竜馬、泰地真弘人、“Theoretical Analysis of Electron Transfer Reaction for Cryptochrome-DASH”、日本生物物理学会第 56 回年会、2018 年 9 月、岡山

佐藤竜馬、泰地真弘人、“Theoretical Study of Electron Transfer Reactivity for Cryptochrome-DASH”、63RD Annual Meeting of the Biophysical Society、2019 年 3 月、ボルチモア

【その他(著書、プレスリリースなど)】

特になし