

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-C'6 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)。

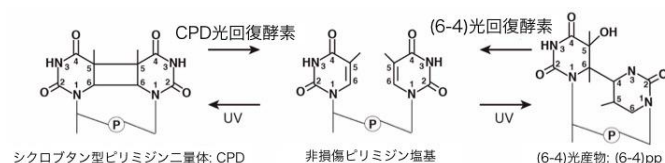


図 1. 紫外線損傷 DNA

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阻害、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のひとつ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同定されており、補酵素としてフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)を有するフラボ蛋白質の一種である。FAD の吸収極大は 500nm 以下にある青色の光を吸収することで励起状態になる。このことから光回復酵素は青色光受容体とも呼ばれる。光回復酵素による紫外線損傷 DNA の修復機構の大枠は明らかにされており、(1)光回復酵素が DNA 内にある損傷部位を認識・結合する。(2)紫外線損傷 DNA を結合したのち、FAD が青色光を吸収し励起状態となる。(3)励起状態になった FAD から損傷部位への光誘起電子移動反応が起こる。(4)電子を受け取った損傷部位内で結合の開裂等が進行し元の二つのピリミジン塩基になる。

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

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同定されてい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。また、修復機構が完全には明らかになっていない(6-4)光産物における修復機構の解明にも取り組む。

2. 具体的な利用内容、計算方法

本研究では次の二点に着目して研究を進めた。(1)光回復酵素による紫外線損傷 DNA の結合・認識メカニズムの解明、(2) (6-4)光産物の修復機構の解明。

(1) 光回復酵素による紫外線損傷 DNA の結合・認識メカニズムの解明

光回復酵素と紫外線損傷 DNA の複合体は X 線結晶構造解析により明らかとなっている。X 線結晶構造を解析すると、DNA に含まれている損傷部位が二重らせんから外側にフリップしている(フリッピング)ことが確認できる。しかし、このフリッピングがどの段階で生じているのかは明らかとされていない。特に DASH 型クリプトクロムは一本鎖 DNA であれば紫外線損傷を修復することが可能であることが明らかにされており、なぜ二本鎖 DNA は修復できないのかは不明である。したがって DASH 型クリプトクロムは二本鎖 DNA 内に存在する損傷部位をフリッピングすることができないのではないかと考えられる。このことを明らかにするために、まずは光回復酵素と DNA 複合体および DNA のみの系に対

する分子動力学計算とメタダイナミクス法を用いてフリッピングのしやすさを検証した。

(2) (6-4)光産物の修復機構の解明

紫外線による DNA 損傷には二種類あることを上述したが、CPDはその修復機構が比較的簡易であり理論と実験により十分に調査が進んでいる。一方、(6-4)光産物はその修復過程が複雑であり、理論と実験により調査が進んでいるが未だ修復機構がはっきりしていない。これまでの(6-4)産物に関する理論的研究は quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) 法を用いた研究に傾倒しており、QM/MM 法ではある程度決まった構造に対する解析しかできず研究従事者の恣意性が多分に含まれる。そこで、本研究では恣意性を排除し自然な振る舞いのなかで起こる反応を観測するために QM/MM-MD を用いた。

3. 結果

(1) 光回復酵素による紫外線損傷DNAの結合・認識メカニズムの解明

メタダイナミクス法を用いて紫外線損傷部位を含む DNA および紫外線損傷部位を含む DNA と光回復酵素の複合体に対して損傷部位のフリッピングが起こる際の自由エネルギー曲面を推測した(図2)。その結果、DNA 単体においてフリッピングが起こるときに比べて近くに光回復酵素が存在しているときのほうがフリッピングするためのエネルギー障壁が低くなる傾向を観測した。

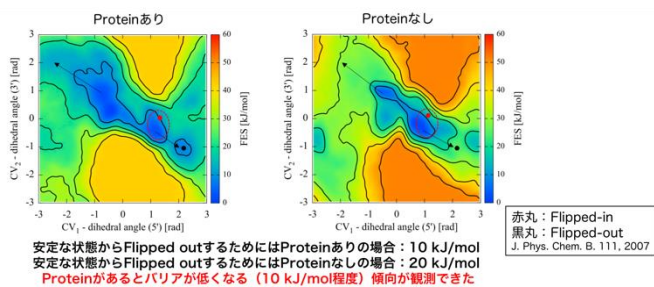


図 2. メタダイナミクス法による自由エネルギー曲面の予測

この結果は、二本鎖 DNA から紫外線損傷部位をフリップさせるためには外部からの影響が必要であり、光回復酵素はフリッピングさせることができるだけの力を DNA に及ぼすことができることが示唆された。

(2) 紫外線損傷 DNA の修復機構の解明

DNA の紫外線損傷である CPD と(6-4)光産物に対して QM/MM-MD を実行した。CPD はその修復過程が実験的に予測されており、本研究でははじめにその修復過程を QM/MM-MD でトレースできるかを試み、CPD に対して

QM/MM-MD を実行した結果、実験で予測されている修復反応を完全にトレースすることに成功した(図 3)。したがって、QM/MM-MD が(6-4)光産物の修復過程の解析に十分に利用できること考えられるため、次に(6-4)光産物に適用した結果、実験で予測されていた初期過程を観測することに成功した。

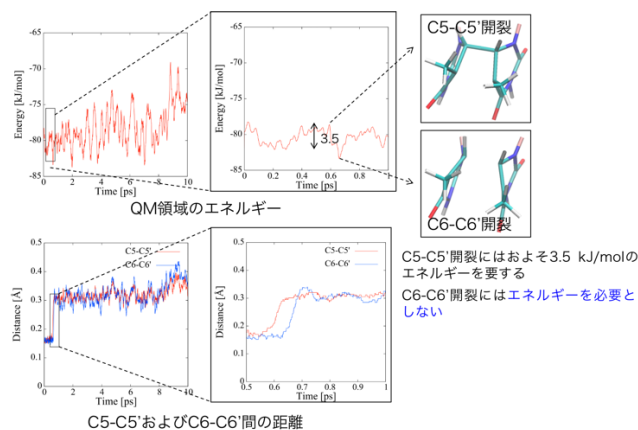


図 3. QM/MM-MD による CPD の修復過程

4. まとめ

光回復酵素は二本鎖 DNA に含まれている紫外線損傷部位を認識し外側に引き出す能力を有しているが示唆できた。一方で、DNA 単体においてもフリッピングに至るまでのエネルギー障壁はそこまで高いものではないため、DNA 単体においてもフリッピングが起こっている可能性も十分あるが、周囲に損傷部位を結合するタンパク質が存在しなければ、再び二重らせん構造に戻ってしまうことも示唆できた。

また、DNA の紫外線損傷に対する QM/MM-MD 計算の結果、CPD においては実験で予測されている修復機構を完全に再現することに成功したため、(6-4)光産物の修復機構の解明に十分利用できることがわかった。そして、(6-4)光産物に適用した結果、まずは実験で予測されている初期過程を観測することに成功した。

5. 今後の計画・展望

光回復酵素は二本鎖 DNA 内にある紫外線損傷部位を引き出し、結合する能力を有していることが確認できたため、今後は DASH 型クリプトクロムがなぜ二本鎖 DNA を修復できないのかを明らかにするため同様の計算を実行し、光回復酵素と比較・検討する予定である。さらに本年度(6-4)光産物に対して QM/MM-MD 計算を実行し、初期過程を観測することができたため引き続き QM/MM-MD を実行し、完全に修復されるまでのダイナミクスを観測する予定である。

2019 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、森 義治、沖本憲明、泰地真弘人、“Computational insights into DNA binding affinity and its repair activity for blue-light photoreceptors”、日本生物物理学会第 57 回年会、2019 年 9 月、宮崎

Ryuma Sato, Yoshiharu Mori, Makoto Taiji “Theoretical Study on DNA Binding Mechanism for Blue-Light Photoreceptors”、12th EBSA, 10th ICBP-IUPAP Biophysics Congress、2019 年 7 月、マドリード

【その他(著書、プレスリリースなど)】

特になし