

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広く知られている。この損傷は隣り合うピリミジン塩基間に共有結合が形成されたものである。生物はこの紫外線損傷したDNAを修復する機能を長い年月をかけて獲得してきた。紫外線によって損傷したDNAを修復する酵素のひとつとして「光回復酵素」が知られている。光回復酵素は補酵素としてフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)を有している。FADは光回復酵素内に存在するとき二電子還元型(FADH⁻)をとっていることが明らかとされており、FADH⁻は吸収極大が350nm付近にあることから紫外光・青色光を吸収する。このことから光回復酵素は青色光受容体蛋白質とも呼ばれる。光回復酵素による紫外線損傷DNAの修復機構は次の通りである。I) 光回復酵素が紫外線損傷DNAを認識・結合、II) FADH⁻が青色光を吸収し、励起状態となる(FADH^{-*})、III) FADH^{-*}から損傷部位への光誘起電子移動反応が生じる、IV) 電子を受け取った損傷部位内で余分な結合の開裂等が進行し、元の二つのピリミジン塩基となる、V) 元に戻ったピリミジン塩基から電子がセミキノン型FADへ移動し、FADH⁻に戻るというサイクルになっている。

光回復酵素は大腸菌から高等植物までの生物種で同定されている一方で、ヒトでは同定されていない。他方、光回復酵素とともに一つのタンパク質ファミリーを形成するクリプトクロムが知られており、クリプトクロムはヒトで同定されている。クリプトクロムは光回復酵素と同様にFADを有しており、FADを利用して様々な機能を発現することが明らかとなっている。しかし、光回復酵素とアミノ酸配列および三次構造が類似しているにもかかわらず、紫外線損傷DNAの修復機能を発現しない。2003年にこれまで同定されていたクリプトクロムよりもさらに光回復酵素様のクリプトクロム(DASH型クリプトクロム)が同定されたが、のちの研究により二本鎖DNAの修復活性を示さないことが報告された。

多くの国内外の研究グループが光回復酵素によるDNA

修復機構の解明に取り組んでいる。その成果により、修復機構の大枠は明らかとされているが、未だに不明瞭な部分も残されている。したがって、DASH型クリプトクロムに対して完全な形でのDNA修復機能の導入は今日においても達成されていない。

他方、人間は先天的にDNA修復機能が発現しない遺伝子疾患として色素性乾皮症が知られている。現在のところ、この疾患に対する有効的な治療法は確立されていない。我々は色素性乾皮症の根治に向けた有効な医薬品開発に、DASH型クリプトクロムが利用できる考えた。本研究では、DASH型クリプトクロムが二本鎖DNAを修復できない理由を分子シミュレーションにより明らかとし、DASH型クリプトクロムにDNA修復機能を導入するための指針を示す。

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、研究を遂行した。(1) DASH型クリプトクロムの光誘起電子移動反応の効率と光回復酵素の光誘起電子移動反応の効率の比較および(2) 紫外線損傷DNAの結合活性の比較。

(1) DASH型クリプトクロムの電子移動反応性の解析

DASH型クリプトクロムが紫外線損傷DNAの修復活性を示さない理由のひとつとしてFADH⁻からの光誘起電子移動反応の効率が悪いことが考えられる。DASH型クリプトクロムと光回復酵素は、アミノ酸配列が類似しているが、図1に示すように活性部位の一部のアミノ酸残基が異なっている。このアミノ酸残基の相違が、活性部位の電子状態に変化を与え、電子移動速度が変化している可能性がある。本研究では、電子移動速度の観点から電子移動反応性(DNAの修復活性)を比較した。電子移動速度は、マーカスの電子移動速度式によると電子因子とフランクコンドン因子の2項の積で見積もることができ、本研究では特に電子因子を計算科学(分子動力学計算と量子化学計算)によって算出した。

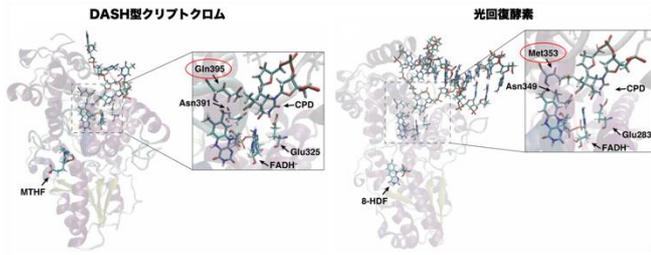


図1. DASH型クリプトクロムと光回復酵素の活性部位のアミノ酸残基の比較. CPDはDNAの紫外線損傷の一種.

Our own N-layered integrated molecular orbital and molecular mechanics (ONIOM) 法による ONIOM(B3LYP/6-31G(d):AMBER94)によって構造最適化を実施し, 得られた構造に対する configuration interaction singles (CIS)法による励起状態計算を実施した. この計算により得られた各種物理量を利用し, generalized Mulliken-Hush(GMH)法によって電子因子が算出された. 加えて, MD計算によって得られた複数のスナップショットに対して CIS法とGMH法を用いて, 電子因子が算出された.

(2) 紫外線損傷した二本鎖DNAの結合活性

DASH型クリプトクロムが二本鎖DNAの修復活性を示さない理由は電子移動反応性ではなく紫外線損傷DNAの結合活性の低さが考えられる. 実際にDASH型クリプトクロムは紫外線損傷DNAとの結合活性が極端に低いことが実験により報告されている. しかし, なぜ結合活性が光回復酵素と比較して低いのかについては未だに明らかとされていない. 本研究では, なぜ結合活性が低くなるのかの原因を明らかにすることを目的とし, DASH型クリプトクロムおよび光回復酵素と紫外線損傷DNAの複合体に対して, それぞれで分子動力学計算を実施した.

3. 結果

本研究では, DASH型クリプトクロムの野生型および変異体(Gln395Met)に対して解析を遂行した. はじめにそれぞれの ONIOM法により最適化された構造に対して, 励起状態計算を実施した結果, アミノ酸残基の相違による大きな変化は観測されなかった. したがって, 電子因子の値に関しても, 野生型が6.5 meV, 変異型が3.1 meVとほとんど差のない結果が得られた. 一方で, 電子移動速度は周囲の環境に敏感であるため, 分子動力学計算により得られた複

数の構造に対して電子因子を見積もった結果, 野生型が $5.3 \text{ meV} \pm 4.6 \text{ meV}$, 変異型が $5.1 \text{ meV} \pm 4.8 \text{ meV}$ であった. したがって, 活性部位の相違は電子因子に影響を与えておらず, さらに光回復酵素の電子因子(4.5 meV)と同程度の値であることから, 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示すことを明らかにした. 実際に, 実験により一本鎖DNAに対して修復活性を示すことを確認した.

先の実験で, 野生型のDASH型クリプトクロムはこれまでの報告と同様に二本鎖DNAに対しては修復活性がないことも確認した. また, 先行研究によって光回復酵素と二本鎖DNAの結合に寄与している考えられるアミノ酸残基が報告されているため, そのアミノ酸残基に変異させたDASH型クリプトクロムに対して結合活性を本研究にて調べたが, 結合活性を示さなかった. そこで分子動力学計算の結果を比較した結果, 図2に示すように光回復酵素では損傷部位と周囲のアミノ酸残基間で塩橋が安定して形成されていたのに対して, DASH型クリプトクロムでは塩橋が安定して形成されていないことを明らかにした.

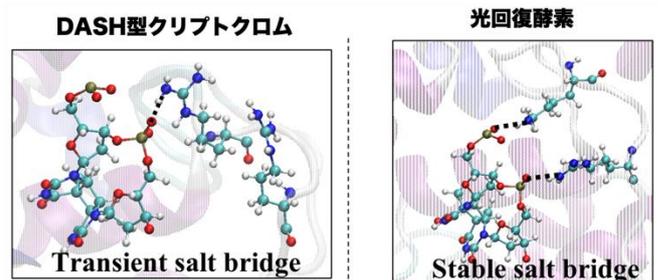


図2. 損傷部位と周辺アミノ酸残基間の塩橋の形成の様子

4. まとめ

DASH型クリプトクロムが紫外線損傷した二本鎖DNAを修復できない原因は, 電子移動反応性が光回復酵素に劣っているためではなく, 二本鎖DNAと安定した結合が形成できないためであることを示唆する結果を得た.

5. 今後の計画・展望

今後は本研究成果により, DASH型クリプトクロムが光回復酵素のように二本鎖DNAと安定した塩橋を形成できるようにするための方法を特定していく予定である.

6. 利用がなかった場合の理由

2020 年度 利用研究成果リスト

【雑誌に受理された論文】

Ryuma Sato, Yoshiharu Mori, Risa Matsui, Noriaki Okimoto, Junpei Yamamoto and Makoto Taiji, “Theoretical insights into the DNA repair function of Arabidopsis thaliana cryptochrome-DASH”, *Biophysics and Physicobiology*. **17**, 113–124, 2020

【口頭発表】

Ryuma Sato, “Analysis of photoinduced reactions in UV-damaged DNA repair of photolyases”, 第 58 回日本生物物理学会年会, 2020 年 9 月, オンライン