

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。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)を有しており、二電子還元型 FAD (FADH^-)は吸収極大が 350 nm 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。

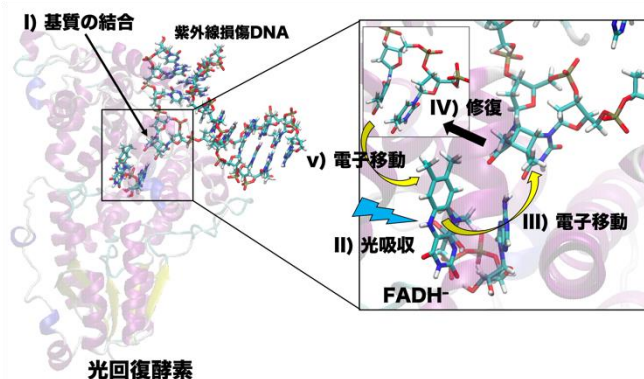


図 1. 光回復酵素の紫外線損傷 DNA の修復機構

光回復酵素はヒトには存在しないタンパク質であり、ヒトは光回復酵素と異なるタンパク質によって紫外線損傷 DNA を修復している。しかし、先天的にこの修復機能が発現しない疾患 (色素性乾皮症, XP)が知られている。XP は遺伝子疾患であることから根治には遺伝子治療が必須である。しかし、人間の遺伝子に操作を加えることは現状では困難が多く存在するため、ヒトにおいて紫外線損傷 DNA を修復す

るための有効な薬の開発が待たれる。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。

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向けて、分子シミュレーションを用いて光回復酵素の紫外線修復機構の解明を試みた。

2. 具体的な利用内容、計算方法

(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。この点を明らかにするために、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フリッピングがどのタイミングで生じるのかを検討した。

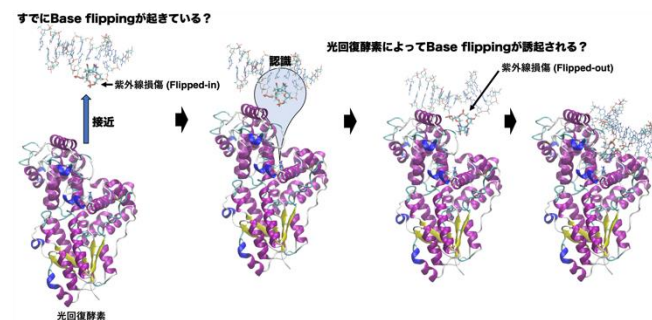


図 2. 光回復酵素の紫外線損傷 DNA の認識・結合機構の仮説

はじめに分子動力学計算を 1000 ns 実施し、光回復酵素と紫外線損傷 DNA の複合体の緩和構造を取得する。その後、光回復酵素から紫外線損傷 DNA が解離した系を生成するために、光回復酵素の重心と紫外線損傷 DNA の重心を反応座標として距離が離れていく pulling simulation を 100 ns 実施する。その後、紫外線損傷部位と隣接する核酸間の二

面角を反応座標としたメタダイナミクス計算を 1000 ns 実施する。一方で、光回復酵素の寄与を明らかにするために、紫外線損傷 DNA 単体に対しても分子動力学計算を 500 ns 実施したのちに、上記の反応座標でメタダイナミクスを 1000 ns 実施する。

3. 結果

光回復酵素-DNA 複合体に対する pulling simulation を実施した結果、100 ns で DNA が光回復酵素から解離する挙動を観測することができた(図 3)。さらに興味深いことに、紫外線損傷 DNA が光回復酵素から離れるにつれて、損傷部位が Flipped-out 状態から Flipped-in 状態に遷移する挙動も観測することができた。このことから、損傷部位のフリッピング状態は光回復酵素によって保持されている可能性が示唆できた。

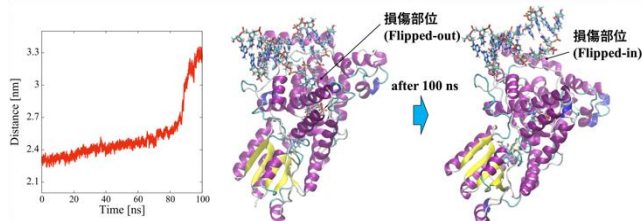


図 3. Pulling simulation における紫外線損傷 DNA の解離の様子

一方で、1000 ns のメタダイナミクス計算の結果では、DNA 単体と光回復酵素-DNA 複合体(重心間距離がおおよそ 35 Å 離れている状態)での Flipped-in 状態から Flipped-out 状態へのエネルギー障壁はほとんど同じであった。また、DNA 単体での 500 ns の分子動力学計算では、損傷部位がフリッピングする挙動が観測されなかった。これらのことから少なくとも DNA 内に紫外線損傷が生じたとしても自発的にフリッピングが起きる可能性は低く、光回復酵素などの外部からの影響によりフリッピング誘起されている可能性を示唆している。しかしながら、光回復酵素の重心と紫外線損傷 DNA の重心間距離が少なくとも 35 Å 離れていると紫外線損傷のフリッピングを誘起することはできない。そこで、本研究では光回復酵素がどの程度接近するとフリッピングが誘起されるのかを分子動力学計算を利用して検証した。本研究では、光回復酵素と紫外線損傷 DNA の重心間距離を 30, 32 および 35 Å 周りで揺らぐように設定した、それぞれで 500 ns の分子動力学計算を 5 回実施した。その結果、30 Å 周りで揺らぐ場合では、5 回中 4 回で Base flip が生じ、flipped-out 状態が 400 ns 以上保持されていた。32 Å 周りで揺らぐ場合では、5 回中 2 回で Base flip が生じ、flipped-out

状態が 400 ns 以上保持されていた。一方で、35 Å 周りで揺らぐ場合では、5 回中一度も Base flip が生じ、flipped-out 状態が保持されなかった。このことから、損傷部位の Base flipping が誘起されるのは光回復酵素が紫外線損傷 DNA に 35 Å よりも近く必要があることを明らかにし、加えて光回復酵素が損傷部位の Base flipping を誘起していることも示唆できた。

4. まとめ

光回復酵素による紫外線損傷 DNA の認識・結合機構に関して分子シミュレーションを用いて調査した結果、光回復酵素が紫外線損傷 DNA に接近することで、損傷部位に Base flip が生じ、損傷部位が溶媒に露出することを明らかとした。そして、露出した損傷部位を光回復酵素が認識し、flipped-out 状態を保持しつつ、活性部位へと誘導することで紫外線損傷 DNA と結合が完了するという機構を提案することに成功した。

5. 今後の計画・展望

今後は本研究成果により、光回復酵素の紫外線損傷 DNA の認識・結合機構の一端を明らかにすることができた。光回復酵素と似た三次構造であ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タンパク質である DASH 型クリプトクロムに対しても同様の解析を実施する。そして、紫外線損傷 DNA の認識・結合の観点から、DASH 型クリプトクロムがなぜ修復機能を発現できないのかを明らかにする予定である。

6. 利用がなかった場合の理由

【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】

特になし

【その他(著書、プレスリリースなど)】

特になし