

令和元年6月26日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07321

研究課題名(和文)クリプトクロム・光回復酵素ファミリーの青色光応答素反応解析

研究課題名(英文)Analyses of blue light response of photolyase/ cryptochrome superfamily

研究代表者

山元 淳平 (Junpei, Yamamoto)

大阪大学・基礎工学研究科・講師

研究者番号：90571084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本申請課題では、クリプトクロム・光回復酵素ファミリー(CPF)の青色光応答反応を理解するために、(6-4)光回復酵素によるDNA認識・修復反応機構に関する研究、および補酵素の光還元反応解析を行った。その結果、損傷DNAである(6-4)光産物の認識において、光回復酵素に特異的な1つのアミノ酸側鎖に由来する相互作用がDNA修復活性を司ることを明らかにした。また、補酵素フラビンアデニンジヌクレオチドの光還元反応において、タンパク質内電子移動に関するトリプトファン側鎖およびその周辺環境が果たす役割について新たな知見を得た。これらの発見は、CPF機能進化を考える上で非常に重要な知見を与えると言える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クリプトクロム・光回復酵素ファミリーは大腸菌から高等生物まで広範に保存された青色光受容タンパク質である。光回復酵素とクリプトクロムは各々全く異なる生体機能を発現する一方で、類似した骨格から異なる機能が発現する分子論は未だに明らかになっていない。本研究では、光回復酵素とクリプトクロムの生体機能が分子レベルでどのように変遷したのかを世界に先駆けて報告したため、分子進化における新たな知見を提供した。また、タンパク質内電子移動は光合成のように光-化学エネルギー変換において重要な役割を果たすため、本研究で得られた知見は今後のエネルギー変換の新規材料の設計に大きな影響を与える可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In order to understand the blue-light response reaction of cryptochrome/photolyase family, I have investigated on DNA recognition and repair mechanisms of the (6-4) photolyase and photoreduction of the cofactor flavin adenine dinucleotide (FAD). As a result, I found that an amino acid side chain specifically-conserved among photolyases plays a key role in the DNA repair activity, and that the interactions between the amino acid and DNA governs formation of the repair-active complex. Also, regarding the tryptophan side chain involved in the intraprotein electron transfer in the FAD photoreduction, new insights of the tryptophan side chain and its environments in the (6-4) photolyase were obtained. These findings provide very important insights into the functional evolution of cryptochrome/photolyase family.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：分子進化 DNA修復 DNA認識 光応答 蛋白質内電子移動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

クリプトクロム・光回復酵素ファミリー(Cryptochrome/Photolyase Family, CPF)はフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)を有するフラビタンパク質のひとつであり、太陽光中の青色光に応答して概日リズム形成や DNA 修復を行う酵素である。生物時計タンパク質として知られているクリプトクロム(CRY)は、概日リズム形成のほか、高等生物では時間依存的な DNA 損傷チェックポイントの活性化や RNA エピジェネティクスに、植物では概日リズムに同調した光依存的開花制御、昆虫では地球磁場の受容といった、幅広い生体機能に参与する酵素であり、現在でも研究が隆盛である。一方、光回復酵素(PL)は、紫外線により化学構造が変化した損傷 DNA を光依存的に修復することのできる最もシンプルな DNA 修復経路を担う酵素であり、バクテリアからヒトを除く高等生物に保存されている。PL はその修復対象によって CPD 光回復酵素(CPD PL)および(6-4)光回復酵素((6-4)PL)に分類される。両者に共通して、その反応の本質は励起状態の FAD から損傷 DNA への電子移動反応であり、これにより損傷 DNA の化学結合が組み戻り、正常な DNA が形成される。

CRY と PL はアミノ酸配列および三次元構造の相同性が高いにもかかわらず、上述のようにその生体機能が異なるため、CPF 機能分化の起源に注目が集まっている。また、CRY の中でも生物種に応じてその光応答挙動は異なり、昆虫型 CRY では概日リズム形成の光入力系として関与していることが示唆されているが、植物型 CRY ではシグナル伝達に利用され、動物型では概日リズム形成における光応答能が欠落していることが知られている。一方、青色光に応答して引き起こされる CPF 共通の反応も存在する。それは、光活性化と呼ばれる FAD の光還元反応である。この反応により、PL においては修復活性を有する二電子還元型フラビン(FADH<sup>-</sup>)が、CRY においてはシグナル伝達および磁場受容に必要と考えられる一電子還元型フラビン(FAD<sup>•-</sup>または FADH<sup>•-</sup>)が光依存的に形成される。これらのことから、光活性化反応が CPF 機能起源の鍵であることが考えられる。

### 2. 研究の目的

本申請研究課題では、(6-4)PL による DNA 修復機構の詳細を、また、CRY については昆虫でありながら動物型 CRY を有するミツバチ(*Apis mellifera*)およびヒト由来の CRY における光活性化過程について明らかにすることで、CPF の青色光応答反応を統合的に理解し、CPF 機能分化の起源に迫る。

### 3. 研究の方法

(6-4)PL による DNA 修復機構について、アフリカツメガエル由来(6-4)PL (X164)を用いて、DNA 修復反応にて過渡的に生成する FADH<sup>•-</sup>の吸収を追跡することで、その反応機構の詳細を得る。CRY については、ミツバチ全体およびヒト HeLa 細胞の mRNA から CRY 遺伝子をクローニングし、遺伝子組換えタンパク質として CRY を得る。得た CRY を用いて、FAD 光還元反応の詳細を調べる。

### 4. 研究成果

#### (1) (6-4)PL による DNA 修復反応について

X164 による DNA 修復反応における FADH<sup>•-</sup>の過渡吸収を測定したところ、FADH<sup>•-</sup>の寿命は CPD-PL のそれとは異なり、非常に長寿命であり、約 40 μs であることがわかった。また、シングルターンオーバーレーザーの単発照射で得られたデータと繰り返し照射で得られたデータの差分を取ることで、2光子目の FADH<sup>•-</sup>の寿命を算出したところ、約 180 ns であることがわかった(図1)。この結果は、1光子目の反応の量子収率が低く、化学結合の組み替わりが必要な反応であることを示唆した過去の申請者の報告と一致する。本研究成果は学会にて発表し(学会10)概要を総説に記した(論文7)。現在、結果について原著論文にまとめているところである。

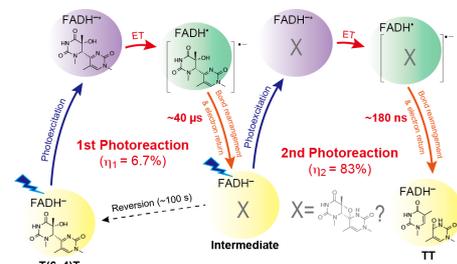


図1 : (6-4)PL 修復過程

#### (2) (6-4)PL による DNA 結合について

X164 による DNA 修復反応に用いた基質 DNA は、紫外部に吸収を極力持たない特殊な基質を用いてきたが、配列によって DNA 修復反応量子収率が異なることがわかってきたため、損傷 DNA 認識機構に関する研究を行った。その結果、(6-4)PL において高度に保存されたアルギニン側鎖が DNA との結合において重要な役割を果たし、(6-4)光産物のリン酸骨格との間で静電相互作用が、また(6-4)光産物の 3'側隣接核酸塩基との間で CH-π 相互作用が形成されることで、DNA 修復活性を有する DNA-酵素複合体が形成されることを見出した(図2)。本研究成果は、学会にて発表し(学会1、2、3、7、8)原著論文にて発表した(論文4)。

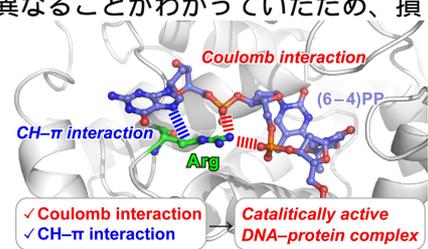


図2 : (6-4)PL の DNA 認識

本研究において、注目するアルギニン側鎖は、動物由来 CRY ではヒスチジンに置換されていることがわかった。そこで、X164 のアルギニン側鎖をヒスチジンに置換した変異体を作成したところ、DNA 結合能が著しく低下することがわかった。このことから、CRY と PL における DNA 修復能機能差異は、このアミノ酸側鎖によって記述される可能性があることがわかった（論文 4）。また、クラミドモナス由来 CRY (CraCRY) は CRY としての機能の他、(6-4)光産物の修復能を有することが知られている。CraCRY と(6-4)光産物を有する DNA の複合体結晶構造を共同研究にて解いたところ、上記の二つの相互作用が完全に保存されていることがわかった（論文 3）。このことから、上記相互作用の有無がクリプトクロム・光回復酵素ファミリーにおける(6-4)光産物修復能の有無を統御することが明らかとなった。これは、分子進化の観点から非常に重要な知見である。

### (3) CRY のクローニングとタンパク質調製について

動物由来 CRY の遺伝子をクローニングするため、HeLa 細胞および大阪大学構内にて採取したミツバチから mRNA を回収し、CRY 遺伝子をクローニングしたところ、ヒト由来 CRY はすでに知られている DNA 配列と一致し、ミツバチ由来 CRY は新規の DNA 配列であった。アミノ酸配列の保存度は(6-4)PL と 50-70% 程度の相同性を、動物由来 CRY とは 80% 程度であることがわかった。この結果は学会にて発表した（学会 9）。しかし、遺伝子組換えタンパク質調製を試みたところ、不溶画分に取り込まれたために大腸菌での調製を期間内で行うことはできなかった。今後さらなる条件検討が必要である。

### (4) (6-4)PL の FAD 光還元反応について

CRY の調製が困難であったため、CRY と相同性の高い(6-4)PL の光還元反応に関する研究を行った。申請者は過去に、(6-4)PL の FAD 光還元には 4 つの保存されたトリプトファンが必要であることを報告しており、(3)で得られたヒト由来およびミツバチ由来 CRY でも、4 つのトリプトファン側鎖を保有している。4 つのトリプトワンのうち、最もタンパク質表面に存在するトリプトファンを還元反応不活性なフェニルアラニンに置換した X164 の W370F 変異体は、DNA 修復活性を有する FADH<sup>-</sup>の形成が非常に遅いものの、一度 FADH<sup>-</sup>が形成されると野生型と同程度の修復能を有することがわかった。また、W370F を発現する大腸菌株は DNA 修復能を持たないことがわかった（図 3）。本研究成果は、学会にて発表し（学会 11）原著論文にて発表した（論文 5）。また、共同研究において、X164 の野生型および W370F 変異体の超高速時間分解分光実験を行ったところ、正孔はトリプトファン側鎖中において非局在化する可能性を示唆した（論文 6）。

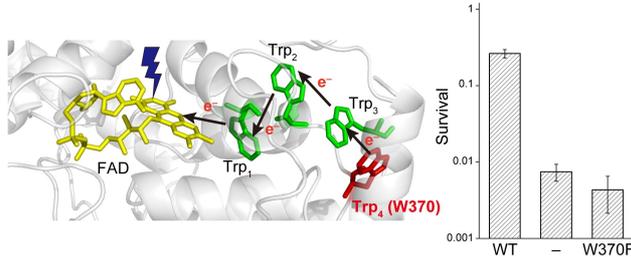


図 3 : X164 の FAD 光還元能

一方で、同じ(6-4)PL でも植物のモデル生物であるシロイヌナズナ由来(6-4)PL (At64) は FAD 光還元反応に 3 つのトリプトファン側鎖を用いており、X164 において 4 つ目のトリプトファン (W370) が存在する箇所にはフェニルアラニンを有する。このことは、X164 の W370F と野生型 At64 は同じ FAD 光還元経路を有することを意味し、X164-W370F の FAD 光還元が著しく遅いという観測結果と矛盾する。そこで、At64 の結晶構造を精査したところ、3 つ目のトリプトファン側鎖の近傍に水分子が存在していた。分子動力学シミュレーションの結果、この水分子は 200 ns のシミュレーション時間の間安定に存在しており、近傍に存在するセリン側鎖 (S412) がその結合に関与していることがわかった。そこで、At64 の S412 をアラニンへと置換した変異体を作成し、FAD 光還元能を検討したところ、FADH<sup>-</sup>の生成は野生型よりも有意に遅く、大腸菌中での DNA 修復能も低減することが判明した。これらのことから、FAD 光還元反応においてトリプトファン側鎖そのものだけでなく、その周辺側鎖による機能調整が重要な役割を果たすことが明らかとなった（図 4）。本研究成果は学会にて発表し（学会 4）、原著論文にて発表した（論文 1）。

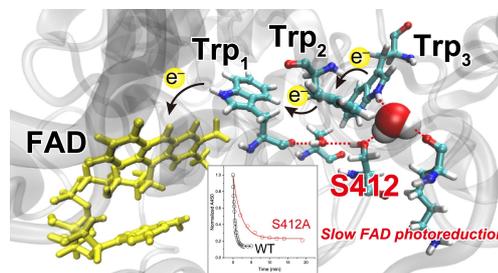


図 4 : At64 の FAD 光還元能

上記の捕捉された水分子は(6-4)PL だけでなく、CRY の結晶構造中にも広範に見られるため、クリプトクロム・光回復酵素ファミリーの光応答反応において重要な役割を担う可能性がある。この点に注目し今後研究を進めることで、分子進化の起源に迫ることができると考えている。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件、全て査読あり)

1. Hosokawa, Y., Sato, R., Iwai, S., and Yamamoto, J. Implications of a water molecule for photoactivation of plant (6-4) photolyase. *J. Phys. Chem. B.*, in press (2019). DOI:

- 10.1021/acs.jpcc.9b03030
2. Maestre-Reyna, M., Yamamoto, J., Huang, W.-C., Tsai, M.-D., Essen, L.-O., and Bessho, Y. Twist and turn: a revised structural view on the unpaired bubble of class II CPD photolyase in complex with damaged DNA. *IUCrJ* 5, 608–618 (2018). DOI: 10.1107/S205225251800996X
  3. Franz, S., Ignatz, E., Wenzel, S., Zielosko, H., Gusti Ngurah Putu, E.P., Maestre-Reyna, M., Tsai, M.-D., Yamamoto, J., Mittag, M., and Essen, L.-O. Structure of the bifunctional cryptochrome aCRY from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic Acids Res.* 46, 8010-8022 (2018). DOI: 10.1093/nar/gky621
  4. Terai, Y., Sato, R., Yumiba, T., Harada, R., Shimizu, K., Toga, T., Ishikawa-Fujiwara, T., Todo, T., Iwai, S., Shigeta, Y., and Yamamoto, J. Coulomb and CH- $\pi$  interactions in (6-4) photolyase-DNA complex dominate DNA binding and repair abilities. *Nucleic Acids Res.* 46, 6771-6772 (2018). DOI: 10.1093/nar/gky364
  5. Yamamoto, J., Shimizu, K., Kanda, T., Hosokawa, Y., Iwai, S., Plaza, P., and Müller, P. Loss of fourth electron-transferring tryptophan in animal (6-4) photolyase impairs DNA repair activity in bacterial cells. *Biochemistry* 56, 5356–5364 (2017). DOI: 10.1021/acs.biochem.7b00366
  6. Matin, R., Lacombat, F., Espagne, A., Dozova, N., Plaza, P., Yamamoto, J., Müller, P., Brettel, K., and de la Lande, A. Ultrafast flavin photoreduction in an oxidized animal (6-4) photolyase through an unconventional tryptophan tetrad. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19, 24493-24504 (2017). DOI: 10.1039/c7cp04555g
  7. Yamamoto, J., Plaza, P., and Brettel, K. Repair of (6-4) lesions in DNA by (6-4) photolyase: 20 years of quest for the photoreaction mechanism. *Photochem. Photobiol.* 93, 51-66 (2017). DOI: 10.1111/php.12696
  8. Yamada, D., Dokainish, H.M., Iwata, T., Yamamoto, J., Ishikawa, T., Todo, T., Iwai, S., Getzoff, E.D., Kitao, A., and Kandori, H. Functional conversion of CPD and (6-4) photolyase by mutation. *Biochemistry* 55, 4173-4183 (2016). DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00361

[学会発表](計12件)

1. 山元淳平、(6-4)光回復酵素の DNA 分子認識・修復機構、日本放射線影響学会第 61 回大会、長崎、2018 年 11 月 (招待講演)
2. Terai, Y., Sato, R., Yumiba, T., Harada, T., Iwai, S., Shigeta, Y., and Yamamoto, J. Coulomb and CH- $\pi$  interactions in (6-4) photolyase-DNA complex dominate DNA binding and repair abilities. The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Kyoto, November 2018.
3. Yamamoto, J. DNA binding and light-dependent repair abilities of photolyases. 第 56 回日本生物物理学会年会、岡山、2018 年 9 月 (招待講演)
4. Hosokawa, Y., Sato, R., Iwai, S., and Yamamoto, J. Mutational analysis of amino acids residues surrounding the electron-transferring terminal Trp of plant (6-4) photolyase. 第 56 回日本生物物理学会年会、岡山、2018 年 9 月
5. Morimoto, A., Kumar, R., Hosokawa, Y., Terai, Y., Iwai, S., and Yamamoto, J. Analysis of binding of light-harvesting secondary chromophore to animal and plant (6-4) photolyase. 第 56 回日本生物物理学会年会、岡山、2018 年 9 月
6. 寺井悠馬・松村梨沙・山元淳平・岩井成憲、修飾核酸を用いたタンパク質の部位特異的ラベル化反応による核酸-タンパク質結合様式の評価法開発、第 12 回バイオ関連化学シンポジウム、大阪、2018 年 9 月
7. 寺井悠馬・佐藤竜馬・弓場貴広・原田隆平・岩井成憲・重田育照・山元淳平、DNA-光回復酵素間の静電相互作用と CH- $\pi$  相互作用が DNA 結合能と修復能を支配する、第 12 回バイオ関連化学シンポジウム、大阪、2018 年 9 月
8. Yamamoto, J., Terai, Y., Sato, R., Harada, R., Shigeta, Y., and Iwai, S. An arginine side chain in the (6-4) photolyase governs formation of a robust repair-active complex with UV-damaged DNA. 第 55 回日本生物物理学会年会、熊本、2017 年 9 月
9. Hosokawa, Y., Iwai, S., and Yamamoto, J. Cloning of cryptochrome 2 gene from honey bee. 第 55 回日本生物物理学会年会、熊本、2017 年 9 月
10. Yamamoto, J., Shimizu, K., Iwai, S., Brettel, K. Monitoring of the back electron transfer in the successive two-photon DNA repair by the (6-4) photolyase. 第 54 回日本生物物理学会年会、つくば、2016 年 11 月
11. Kanda, T., Yamamoto, J., and Iwai, S. Analysis of the fourth electron-transferring tryptophan in *Xenopus laevis* (6-4) photolyase. 第 54 回日本生物物理学会年会、つくば、2016 年 11 月
12. Terai, Y., Yumiba, T., Ishikawa, T., Todo, T., Yamamoto, J., and Iwai, S. Substrate recognition of the (6-4) photolyase. 第 54 回日本生物物理学会年会、つくば、2016 年 11 月

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://researchmap.jp/yamamotojunpei/>

## 6．研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：細川 雄平、寺井 悠馬

ローマ字氏名：Yuhei Hosokawa, Yuma Terai

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。