

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15103

研究課題名（和文）データベース及び実験的手法を用いた光回復酵素/クリプトクロムファミリーの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of the photolyase/cryptochrome family using databases and experimental methods

研究代表者

山田 大智（Yamada, Daichi）

兵庫県立大学・生命理学研究科・助教

研究者番号：90793191

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、情報生物学と機能測定実験を組み合わせることで、同じ共通祖先由来にもかかわらず異なる機能をもったタンパク質群である光回復酵素/クリプトクロムファミリーの分子進化から機能発現機構の解明を目指した。その結果、祖先型に近い機能を持つ蛋白質の特定とDNA修復に重要な機能メカニズムの一端を明らかにした。また、これらの技術を利用して、他のタンパク質への応用も行い、ロドプシン類の進化において新たな知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、情報生物学と機能測定実験を組み合わせること、計算と実験を統合した新しい学問分野を切り開く研究になった。また、これまで行われてきた研究とは異なるアプローチで、対象とする光回復酵素/クリプトクロムファミリーの機能発現機構の一端の解明に貢献し、更なる発展の可能性を示せた。また、他のタンパク質への応用することができることも示し、今後多くのタンパク質の研究に用いることができ、社会的にも意義のあるものと言える。

研究成果の概要（英文）：In this study, by combining information biology and functional measurement experiments, we aimed to elucidate the mechanism of function expression from the molecular evolution of the photolyase/cryptochrome family, which are proteins that have different functions despite having the same common ancestor. As a result, we clarified the identification of proteins with ancestral-type functions, and one of the important functional mechanisms for DNA repair. Moreover, utilizing these techniques, we were applied to other proteins, and new knowledge could be obtained in the evolution of rhodopsins.

研究分野：生物物理学

キーワード：バイオインフォマティクス 赤外分光法 祖先配列 構造機能相関 光回復酵素 クリプトクロム

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

私はこれまで、世界最高精度の光誘起赤外分光計測を駆使して光回復酵素の構造機能相関を研究してきた。光回復酵素は、紫外線によって損傷した DNA を光のエネルギーを使って修復する酵素である。損傷 DNA には CPD と(6-4)光産物の 2 種類が存在し、それぞれの基質に対する光回復酵素が知られている。DNA 光回復酵素の研究は、2015 年のノーベル化学賞の対象に含まれるなど注目されているが、そのメカニズムはほとんどわかっていない。私は低温赤外測定や部位特異的変異導入法を駆使することで、反応中間体の測定や光回復酵素間の機能転換に成功し、光回復酵素の構造機能相関の一端を明らかにしてきた。ただ、これまでの研究は個々のタンパク質における実験だけの研究のため、一般性をもたせるのは難しかった。そこで私は、これまで培ってきた経験を生かし、さらに発展させるために、計算生物学という新しい分野でデータベースを用いた統合的な研究と実験を組み合わせることで、タンパク質の機能発現機構を明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

私がこれまで研究対象としてきた光回復酵素は、光回復酵素/クリプトクロムファミリーというタンパク質群に属している。クリプトクロムとは、光・磁気センサーや概日リズムに関与するタンパク質で、DNA 修復能をもたない (Cashmore et al., *Science* 284, 760-765 (1999))。しかし、光回復酵素とクリプトクロムがアミノ酸配列や立体構造において高い類似性をもつにもかかわらず、まったく異なる機能をもつ機構については不明であり、またどの機能が先に生まれたのかも分かっていない。これらを議論するには『分子進化』を検証する必要があるが、個々のタンパク質における実験だけの研究では検証はできない。現在、計算により祖先配列を再現し、実際にタンパク質として発現する方法が検討されている (Yamagishi et al., *J. Geography* 112, 197-207 (2003))。『分子進化』を検証するには、データベースも用いた統合的な研究を行い、計算により導き出された進化の跡を、実験により検証する必要がある。そこで本研究では、データベースと機能測定実験を組み合わせることで、光回復酵素/クリプトクロムファミリーの分子進化から機能発現機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

データベースから光回復酵素/クリプトクロムファミリーの遺伝子情報を集め、系統樹を作成することで、共通祖先配列を推定した。そして、光回復酵素/クリプトクロムファミリーは現在さまざまな機能を担っているが、推定された祖先配列のタンパク質を復元し、その機能を測定することで、共通祖先がどのような機能をもっていたのか実験的に検証することができる。さらに、系統樹上で機能が分岐する点における異なるタンパク質同士を比較することで、それぞれの機能に重要な部位のアミノ酸を抽出した。

具体的には、各異なる機能をもつ配列群の代表をそれぞれ 2-3 配列選び、類似配列を検索できる BLAST を用いてデータベースから現在見つかっている全ての光回復酵素/クリプトクロムファミリーのアミノ酸配列を取得した。その後、タンパク質立体構造情報をもとにアライメントを行う ALAdeGAP 法を用いて光回復酵素/クリプトクロムファミリーのアライメントを行い、近隣結合法やベイズ法を用いて系統樹を作製。その後、研究協力者である由良敬教授の研究室で独自に開発した全ての分岐点の配列を推定するプログラムを実行することで、祖先配列を推定した。

タンパク質の復元及び DNA 修復活性の機能測定は、まず、推定した祖先配列を企業に合成してもらい、発現用の遺伝子を作製し、大腸菌を用いて発現条件の検討を行った。一般的に、祖先型のアミノ酸配列は細胞の構造などが単純な生物に由来するアミノ酸配列に近づいていくことが期待されるので、大腸菌系での発現が可能であると考えられる。または、タンパク質が構造を形成しないなどの問題に対しては、祖先配列の推定へのフィードバックを行い、アミノ酸配列の改変を検討した。

さらに、機能が異なる配列群または同じ機能をもつ配列群と各機能の分岐点の配列と比較し、保存性の高い配列または異なる配列から、それぞれの機能に重要な配列情報を抽出した。また、ALAdeGAP 法を用いることでより正確なホモロジーモデリングを行うことができるので、この構造情報上に得られた配列情報をマッピングすることで機能に必要なアミノ酸部位を見出した。そのアミノ酸部位が本当に機能に重要なのかは、その機能をもつ配列ともたない配列それぞれに変異導入し、機能測定することで確認を行なった。

4. 研究成果

本研究では、データベースと機能測定実験を組み合わせることで、遺伝子修復、光線センサーや概日リズムの一部を担う機能をもち、同じ共通祖先由来にもかかわらず異なる機能をもつタンパク質群である光回復酵素/クリプトクロムファミリーの分子進化から機能発現機構を明らかにする。また、これらの技術を利用して、他のタンパク質への応用も行った。本研究成果を以下に記述する。

1. 光回復酵素/クリプトクロムファミリーの祖先配列の推定を行った。その結果、共通祖先は CPD を修復する CPD 光回復酵素に近いことが示唆された。次に、推定した祖先配列を遺伝子合成し、大腸菌による共通祖先配列の発現を試みたが、多くの祖先配列で発現は確認できたものの構造を保った状態で回収することができなかった。この原因として、推定された祖先配列の長さやアミノ酸の存在比率が、既存のものとは大きく異なっていることが考えられた。また、古環境に適応したタンパク質である祖先配列は、嫌気下や現在の環境とは異なる環境に適応している可能性があり、通常の培養・精製方法では、目的タンパク質を回収できなかったのではないかと考えている。そのため、現在発見されている光回復酵素/クリプトクロムファミリーの遺伝子だけでは、正しい構造を形成できる祖先配列を推定し、網羅的に機能解析を行うことは難しいことがわかった。

2. 光回復酵素の機能が何故生み出されるのか明確な答えは出ていない。そこで、(6-4)光回復酵素について、機能に重要な配列情報を抽出し、活性サイト近傍にある Lys 残基が重要であることを提唱した。これを検証するため、変異体を用いたフーリエ変換赤外分光測定を行った。その結果、Lys の Ala と His 変異体において DNA 修復が見られず、初めて完全に DNA 修復能が無くなる変異体を見出した。また、Arg と Gln に置換した変異体では修復能は下がったが、機能は保持する結果を得た。さらに、理論計算から、活性部位の水素結合環境は、DNA 修復能がある変異体と無い変異体で大きく異なることが示された。これらの結果から、活性部位にある Lys は DNA 修復を実現するために必要な水素結合環境を安定化している事が明らかになった。

さらに、この知見から (6-4)光回復能をもたない CPD 光回復酵素に (6-4)光回復能を生む可能性があり、Lys 残基を含む周辺ドメインを入れ替えたキメラタンパク質の作製を複数種類試みた。しかし、作製したキメラタンパク質は、フラビンを保持しない構造が崩れたものがほとんどであった。その原因は、光回復酵素/クリプトクロムファミリーの構造を保持するための必要十分条件がわかっていないことが大きな問題であり、この点については、今後も検討していきたいと考えている。

3. 目的タンパク質である光回復酵素/クリプトクロムファミリー以外にも本研究手法が適応できることを示すため、大量の配列を比較計算する技術を駆使して、ロドプシン様タンパク質の解析を行った。ロドプシンは一般的に発色団レチナールを結合するために、タンパク質内部に保存性の高い Lys 残基を持っている。しかし、アミノ酸配列はロドプシンと相同性を示すものの、この Lys 残基を保存していない配列も多く見つかっているが、その詳細は不明であった。今回のこの Lys 残基を持たないロドプシン様タンパク質に、Lys 残基とカウンターイオンになる Asp を導入することで、プロトンポンプ機能を復活させることに成功した。さらに、系統解析の結果、Lys 残基を保存していない配列の分布と他のロドプシン様タンパク質との関係性を示し、進化の面で新たな知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamauchi Yumeka, Konno Masae, Yamada Daichi, Yura Kei, Inoue Keiichi, Beja Oded, Kandori Hideki	4. 巻 95
2. 論文標題 Engineered Functional Recovery of Microbial Rhodopsin Without Retinal Binding Lysine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Photochemistry and Photobiology	6. 最初と最後の頁 1116 ~ 1121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1111/php.13114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Dokainish Hisham M., Yamada Daichi, Iwata Tatsuya, Kandori Hideki, Kitao Akio	4. 巻 7
2. 論文標題 Electron Fate and Mutational Robustness in the Mechanism of (6-4)Photolyase-Mediated DNA Repair	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ACS Catalysis	6. 最初と最後の頁 4835 ~ 4845
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscatal.7b00751	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Watari Masahito, Ikuta Tatsuya, Yamada Daichi, Shihoya Wataru, Yoshida Kazuho, Tsunoda Satoshi P., Nureki Osamu, Kandori Hideki	4. 巻 294
2. 論文標題 Spectroscopic study of the transmembrane domain of a rhodopsin?phosphodiesterase fusion protein from a unicellular eukaryote	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 3432 ~ 3443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.006277	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 4件/うち国際学会 9件）

1. 発表者名 山田 大智, Hisham M. Dokainish, 山元 淳平, 北尾 彰朗, 神取 秀樹
2. 発表標題 (6-4)光回復酵素のDNA修復機構におけるLys残基の役割
3. 学会等名 日本光生物学会協会第20回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daichi Yamada
2. 発表標題 Functional conversion of photolyases/cryptochrome superfamily (PCSf): Toward finding the ancestor of PCSf.
3. 学会等名 The 56th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daichi Yamada
2. 発表標題 Functional conversion study of photolyase/cryptochrome family proteins
3. 学会等名 9th INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daichi Yamada, Hisham M. Dokainish, Junpei Yamamoto, Tatsuya Iwata, Elizabeth D. Getzoff, Akio Kitao, and Hideki Kandori
2. 発表標題 The (6-4) Photolyase Reaction ~Role of the Important Residues in Active Center~
3. 学会等名 Asian Biophysics Association Symposium and Annual Meeting of the Australian Society for Biophysics (ABA/ASB2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daichi Yamada
2. 発表標題 FTIR study of photoactivated cyclase
3. 学会等名 International Symposium on "Optobiotechnology" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田 大智、Hisham M. Dokainish、山元 淳平、北尾 彰朗、神取 秀樹
2. 発表標題 (6-4)光回復酵素のDNA修復におけるLys残基の役割
3. 学会等名 2017年度中部支部講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hisham M. Dokainish、山田大智
2. 発表標題 Elucidation of molecular mechanism of photolyase in DNA repair process
3. 学会等名 新学術領域研究「柔らかな分子系」第六回全体合宿会議（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 D. Yamada, J. Yamamoto, T. Iwata, H. Kandori
2. 発表標題 Low-temperature FTIR study of the repair processes by Xenopus (6-4) photolyase
3. 学会等名 The 55th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 D. Yamada, H. M. Dokainish, T. Iwata, J. Yamamoto, T. Ishikawa, T. Todo, S. Iwai, E. D. Getzoff, K. Yura, A. Kitao, H. Kandori
2. 発表標題 Function conversion between CPD and (6-4) photolyases
3. 学会等名 19th International Union for Pure and Applied Biophysics Congress 11th European Biophysics Congress（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 D. Yamada, H. M. Dokainish, T. Iwata, J. Yamamoto, T. Ishikawa, T. Todo, S. Iwai, E. D. Getzoff, K. Yura, A. Kitao, H. Kandori
2. 発表標題 Functional conversion of CPD and (6-4) photolyases
3. 学会等名 KAKENHI International Symposium on "Studying the Function of Soft Molecular Systems" (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daichi Yamada, Takashi Nomura, Yuna Nakajima, Minoru Kubo
2. 発表標題 Time-resolved spectroscopic study on photoreaction of (6-4) photolyase
3. 学会等名 The 57th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Segaia Convention Center (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田 大智
2. 発表標題 分光法によるDNA光修復酵素の分子メカニズム研究
3. 学会等名 兵庫県立大学・城研セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田 大智
2. 発表標題 分光法による光受容タンパク質の分子メカニズム研究
3. 学会等名 第35回XFEL構造生物ミーティング (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	由良 敬 (Yura Kei)		