課題番号　０５Ｂ－３１

研究題目　Bi-functional クリプトクロムの動的な構造と機能制御

研究組織

研究代表者：久保　稔（兵庫県立大学 大学院理学研究科）

共同研究者：齋尾　智英（徳島大学 先端酵素学研究所）

研究分担者：佐藤　航（兵庫県立大学 大学院理学研究科）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

近年、クラミドモナスにおいて、二つの機能を有し、それを使い分ける新奇なクリプトクロム（CRY）が発見された。CraCRY と名付けられたそのタンパク質は、動物型の CRY に分類される 66.4 kDa の水溶性タンパク質である。フラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）を用いて青色光依存的に働く CraCRY の二つの機能は、(1) 概日時計に関連する遺伝子発現の光制御と (2) 紫外線損傷した DNA の光修復である。二つ目の機能は分子進化を考えると面白い。実は CRY と DNA 光修復酵素（photolyase）は近縁関係にあり、両者を含めた分子系統樹を作成することができる。CraCRY は CRY と photolyase の分子進化・機能分化の狭間で、両者の機能を獲得・保持した稀有なタンパク質である。

CraCRY について得られている構造的知見は、以下の 2 つである（図 1）。

(1) CraCRY の構造は、photolyase と相同性の高い領域（Photolyase Homology Region、以下 PHR）（496 残基）と C 末端領域（C-Terminal Extension、以下 CTE）（99 残基）からなる。FAD は PHR に結合している。CTE は天然変性領域である。

(2) PHR 中の FAD は、酸化型（in vitro において安定な暗状態）、それが光還元されたセミキノン型（in vivo での暗状態）、さらにそれが光還元された還元型（in vivo での明状態）の 3 種類の電子状態をとる。（但し、酸化型が in vivo での暗状態と考えている研究グループもある。）photolyase 機能は還元型が青色光を吸収したときに発現する。

以上、いまだ極めて断片的な知見であるが、CraCRY の特異な二機能性制御の仕組みを解く鍵は、FAD の光還元に依存した CTE のダイナミクスにあることは間違いない。そこで本研究では、明状態および暗状態の CraCRY における CTE の構造形成や PHR－CTE 間の相互作用を、NMR を用いてアミノ酸レベルで明らかにする。

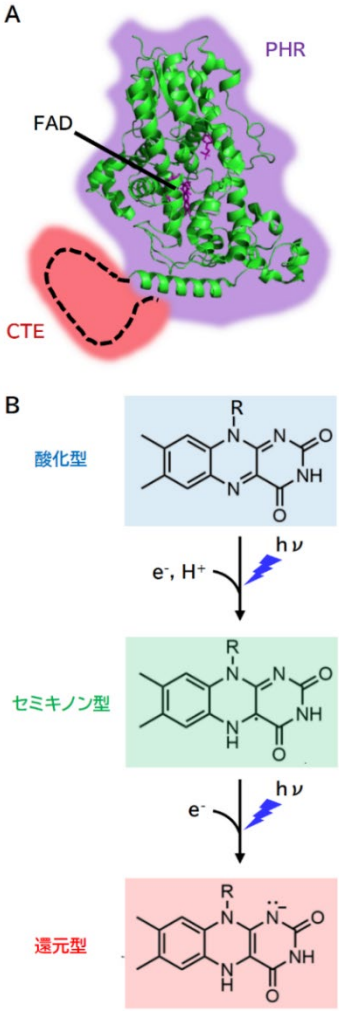

図 1．CraCRY．(A) 全体構造．PHR は結晶構造を表示（PDB: 6FN3）．(B) FAD の電子状態．

[1-2]研究の方法・経過

主鎖アミドシグナルと側鎖メチル基シグナル（Ile, Leu, Val, Ala, Met）をプローブに、NMRを用いて明状態および暗状態CraCRYのCTEの構造を解析した。セミキノン型 CraCRY は、in vitro での安定な調製方法が確立されていないので、暗状態のモデルとしてまずは酸化型を用い、明状態のモデルには還元型を用いた。CTEの信号は、全長試料と CTE 欠損変異体のスペクトルを比較することで帰属した。測定には大阪大学蛋白質研究所の 950 MHz NMR 装置を用い、^{1}H-^{15}N HSQC 測定により主鎖アミドシグナルを、^{1}H-^{13}C HMQC 測定により側鎖メチル基シグナルを観測した。^{13}C メチルラベル化試料は、徳島大学先端酵素学研究所 齋尾研究室にて調製した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

上記の測定により、以下の 4 点を明らかにしている：

(1) CTE を構成する 99 残基の内、約 40 残基分のアミドシグナルは、明状態・暗状態ともに観測されなかった。これは CTE において運動性が低く、二次構造を形成もしくは PHR と相互作用している領域があることを示唆している。
(2) 観測されたCTEのアミドシグナルの内、8残基において、明暗で化学シフト値が変化した。即ち、CTE は明暗で構造（もしくは構造分布）を変化させる。この 8 残基の帰属はまだ出来ていないが、少なくともVal566-568側鎖、Gln580側鎖、Ile583側鎖、Leu587 側鎖の周辺では無い。
(3) 観測されたCTEのメチルシグナルの内、2残基において、明暗で化学シフト値が変化した。加えて、暗状態でのみ観測されるシグナルも 2 残基あった。それらは帰属できなかった Val451 もしくは 30 残基ある Ala のいずれかに由来するシグナルである。(2)で述べた 8 残基の内の 2 残基は Val451 もしくは Ala である可能性が考えられる。
(4) PHR の Val 残基（Val-X）周辺に、暗状態でのみ CTE と相互作用する部位が存在する。即ち、明暗に依存して PHR－CTE 間の相互作用が変化する。

シグナルの帰属が進んでおらず、得られている情報は断片的であるが、FAD の光還元に応じて CTE がダイナミックに動く姿がアミノ酸レベルで見えてきた所である。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

CraCRY のユニークな点は、活性中心の電子状態が天然変性領域の構造転移とリンクしている所であり、このミクロとマクロが連関するメカニズムは生物物理学に新しい視点を与えるものといえる。また、CraCRY には哺乳類 CRY のモデル研究としての位置づけも期待される。哺乳類 CRY も PHR と CTE からなる構造をもち、CTE 天然変性領域が他の時計タンパク質（PER や CLOCK）との相互作用に関与していることが示唆されている。しかし、哺乳類 CRY の CTE 天然変性領域の構造学的研究は進んでいない。CraCRY をモデルとして扱う本研究は、哺乳類 CRY の構造生物学、さらには概日リズム異常の構造ベース創薬の研究手段確立に繋がる発展性を有している。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

なし

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

次年度以降は、さまざまな変異体を作製し、観測されているアミドシグナルやメチルシグナルの帰属を進める計画である。また、暗状態では CTE が PHR から切断され易い傾向があった。バッファー組成や測定温度といった条件検討も必要である。これらの課題を解決し、引き続き CraCRY 天然変性領域のダイナミクスの全貌を明らかにしていく。