

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、(a) 概日時計に関連する遺伝子発現の光制御と (b) 紫外線損傷した DNA の光修復である。二つ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。

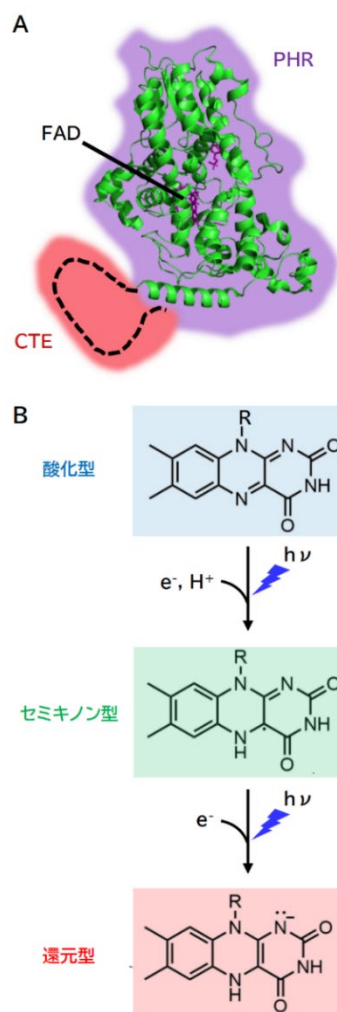


図 1. CraCRY. (A) 全体構造. PHR は結晶構造を表示 (PDB: 6FN3). (B) FAD の電子状態.

[1-2] 研究の方法・経過

本年度は、CTE が PHR から切断されない測定条件を検討したうえで、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル体 CraCRY を調製し、昨年度までに取得した $[\text{H}-^{15}\text{N}]$ HSQC スペクトル上の主鎖アミドシグナルの帰属を目指した。具体的には、 C_α 及び C_β を観測対象とした HNCACB / CBCA(CO)NH 測定を行い、アミノ酸連鎖帰属を試みた。NMR 測定には、大阪大学蛋白質研究所の 950 MHz NMR 装置を用いた。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

還元剤の添加や最適な測定温度などを検討した結果、72 時間以上安定に全長状態を維持できる試料調製条件を見出した。さらに目標とした三次元 NMR 測定を全て完了した。現在、連鎖帰属を進めている。

これまでに、 $[\text{H}-^{15}\text{N}]$ HSQC 上の CTE 由来主鎖アミドシグナルの一部を特定のアミノ酸残基に帰属することに成功している (Thr522/Thr553, Ala546, Lys561-Ala562/Val541-Ala542)。それらはいずれも、明暗の状態変化に応じて化学シフト値が変化するアミノ酸残基ではなかった。

なお、明暗の状態変化に応じて、①PHR-CTE 間の相互作用が変化すること、②CTE 中の Val566-568 側鎖及び Gln580 側鎖は、化学シフト値が変化しないことを、昨年明らかにしている。これらの知見を統合すると、CTE は N 末端側で構造変化を起こしている可能性が高い。

[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関連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

- 1) Sato, W., Kaide, Y., Inui, S., Nagao, S., Kawagoe, S., Yanagisawa, S., Saio, T., Kubo, M. Light-dependent dynamics of intrinsically disordered region of bifunctional cryptochrome. The 5th UOH-FZU-OMU Joint International Symposium on Photocatalysis, Photofunctional Materials, Photon-Science, Nano-Science & Technology, Himeji, November 27, 2024. (招待講演)

[3-3] 成果資料等

なし

【4】今後の課題等

現在、引き続き、 $[\text{H}-^{15}\text{N}]$ HSQC スペクトルのシグナルの帰属を進めている所である。次年度以降は、変異体の作製も加えて、これまでに取得した NMR シグナルの帰属をさらに進める計画である。