

光回復酵素とクリプトクローム

藤堂 剛[✉], 藤原 (石川) 智子

大阪大学大学院医学系研究科 ゲノム生物学講座・放射線基礎医学教室

要旨

光回復酵素とクリプトクロームは共通の祖先に由来する兄弟タンパク質であり、一次構造のみならず高次構造まで両者の類似性は高い。一方機能的には、光回復酵素は太陽紫外線によるDNA損傷を効率よく修復する酵素であり、クリプトクロームは光形態形成あるいは生物時計の必須因子として機能しており、両者は極めて異なる生命現象に関与している。しかしながら、一見全く異なる生命現象に見える「DNA修復」と「生物時計」は、いずれも太陽紫外線の脅威に対抗する為に生物が作り出した地球環境変化への適応手段であり、光回復酵素とクリプトクロームの多様な機能分化は、太陽紫外線に対抗する生命の巧みな戦略を示すものであると考えられる。一方、多様な機能分化において両者の共通性が果たす役割についてはそれ程理解が進んでいない。本稿では、補酵素や高次構造といった共通性から、クリプトクローム・光回復酵素の反応メカニズムを概観したい。

はじめに

太陽光に含まれる紫外線は生命にとり恒常的な脅威であり、誘発されるDNA損傷の修復は生存の為に必須である。「DNA光回復」は、紫外線損傷特異的なDNA修復機構である。DNA光回復酵素 (DNA photolyase) と呼ばれる酵素が単一で働く事により効率よくDNA修復反応を行なう極めてシンプルな系であり[1]、生物が最初に獲得したDNA修復機構であると考えられている。一方クリプトクロームは、DNA光回復酵素と一次構造が類似した一群のタンパク質の総称であり、関与する生理機能は生物種により異なる[2]。植物及び昆虫においては、それぞれ光形態形成あるいは概日リズム制御の光受容体として機能している。一方、多くの脊椎動物では

転写抑制因子として概日リズム形成に重要な役割を果たしている。また、渡り鳥や一部の昆虫において磁場センサーとしての機能が提唱されている[3]。光回復酵素とクリプトクロームは、一次構造のみならず高次構造の類似性も高く、共通の祖先に由来するタンパク質であると考えられ、クリプトクローム・光回復酵素ファミリー (Cryptochrome Photolyase Family: CPF) と呼ばれている。本ファミリーの特徴はFlavin Adenine Dinucleotide (FAD) を補酵素として持つ事である。FADの機能的役割は光回復酵素においてその詳細が明らかにされている。しかしながら、クリプトクロームの多様な機能におけるFADの役割については未だ不明な点が多い。多様な機能の根底に共通したメカニズムが存在するのか、あるいはFADといったミステリアスな分子の多面性を各々のクリプトクロームが使い分けしているのか、興味深い点である。本項では、このような視点から本ファミリーの分子機構について現在までの知見を紹介したい。

1. DNA光回復酵素遺伝子

太陽光に含まれる紫外線によりゲノムDNAに損傷が生じる。シクロブタン型ピリミジンダイマー (Cyclobutane Pyrimidine Dimer: CPD) と6-4光産物 (6-4pyrimidine Pyrimidone Dimer: 6-4PP) が主生成産物である (図1)。光回復酵素は、これら紫外線誘発DNA損傷に特異的に作用し、青色光のエネルギーを利用してそれらを修復するDNA修復酵素である。CPDを基質とする酵素 (CPD光回復酵素) と6-4PPを基質とする酵素 (6-4光回復酵素) の2種類が知られている[1, 4] (図1)。また、CPD光回復酵素はその一次構造から、原核生物に存在するClass I CPD光回復酵素と真核生物に存在するClass II CPD光回復酵素の2種に分けうる。

[✉]todo@radbio.med.osaka-u.ac.jp

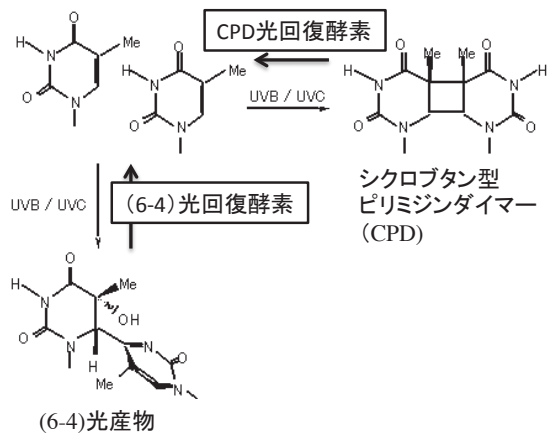


図1. 紫外線によって生じるDNA損傷と光回復酵素による修復。短波長紫外線(UVC:波長200-280nm)及び中波長紫外線(UVB:波長208-315nm)により、ピリミジンが並んでいる配列に生じるDNA損傷を示している。

Class I CPD光回復酵素は古くから知られたDNA修復酵素であり、その遺伝子はAziz Sancarにより1978年に大腸菌からクローニングされ[5]、リコンビナントタンパクを用い詳細な反応メカニズムが明らかにされてきた。Aziz Sancar は2015年度ノーベル化学賞を受賞したが、光回復酵素の反応機構解明

は多くの業績の中でも重要なものとして高く評価されている。一方、高等動物のCPD光回復酵素遺伝子は1992年にクローニングされ[6]、Class II CPD光回復酵素と分類された。6-4光回復酵素は、1993年にショウジョウバエにおいて酵素活性が同定され[7]、1996年にその遺伝子がクローニングされた[8]。同定された6-4光回復酵素の一次構造はClass I CPD光回復酵素と部分的に高いホモロジーを示すものの、全体としてのホモロジーはそれ程高くなく、系統樹においては別のCladeに分類される(図2A)。また、6-4光回復酵素遺伝子はほとんどの高等植物・動物に存在する。

2. クリプトクローム遺伝子

植物の芽生えは光に応答して伸長を止め、葉緑体合成等の光形態形成を開始する。クリプトクロームは、青色光による芽生え伸長阻害を示さなくなったシロイヌナズナ変異体(hy4)の原因遺伝子として、Cashmoreのグループにより1993年にクローニングされた[9]。その一次構造が、青色光を受容するClass I CPD光回復酵素とそっくりであった為、芽生え伸長阻害を誘導する青色光受容体として機能し

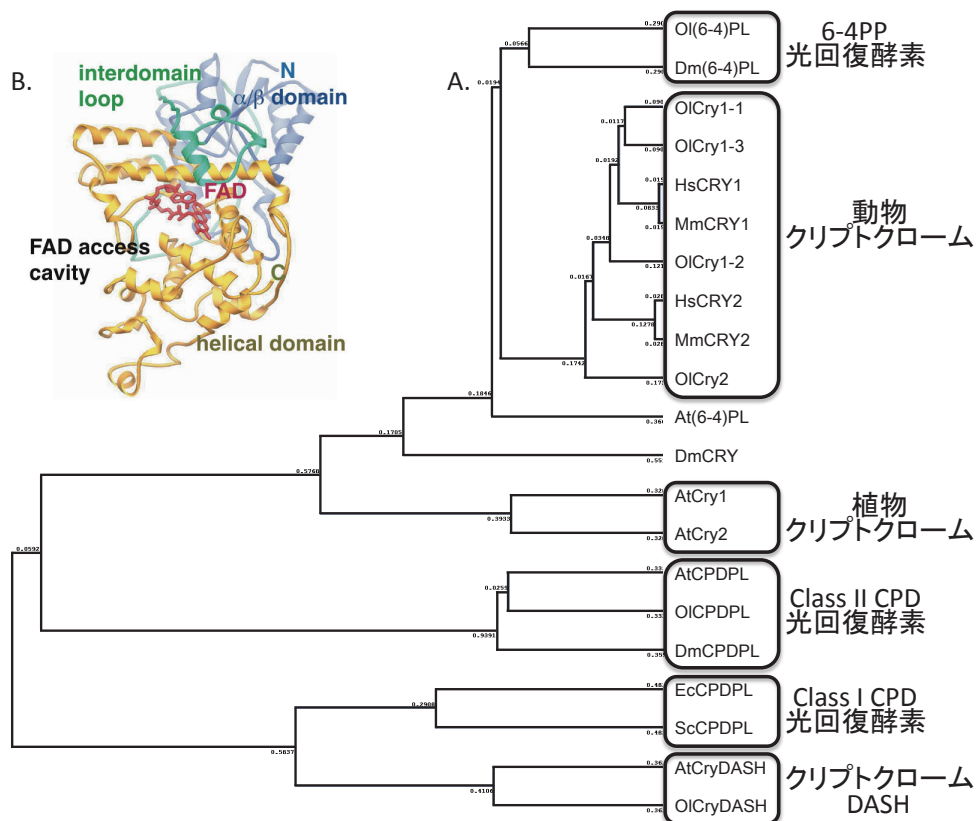


図2. 光回復酵素・クリプトクロームタンパク質ファミリー。(A) 光回復酵素・クリプトクロームタンパク質ファミリーの系統樹。(B) 6-4光回復酵素の結晶構造。全てのCPFタンパク質は同様な構造をしている。

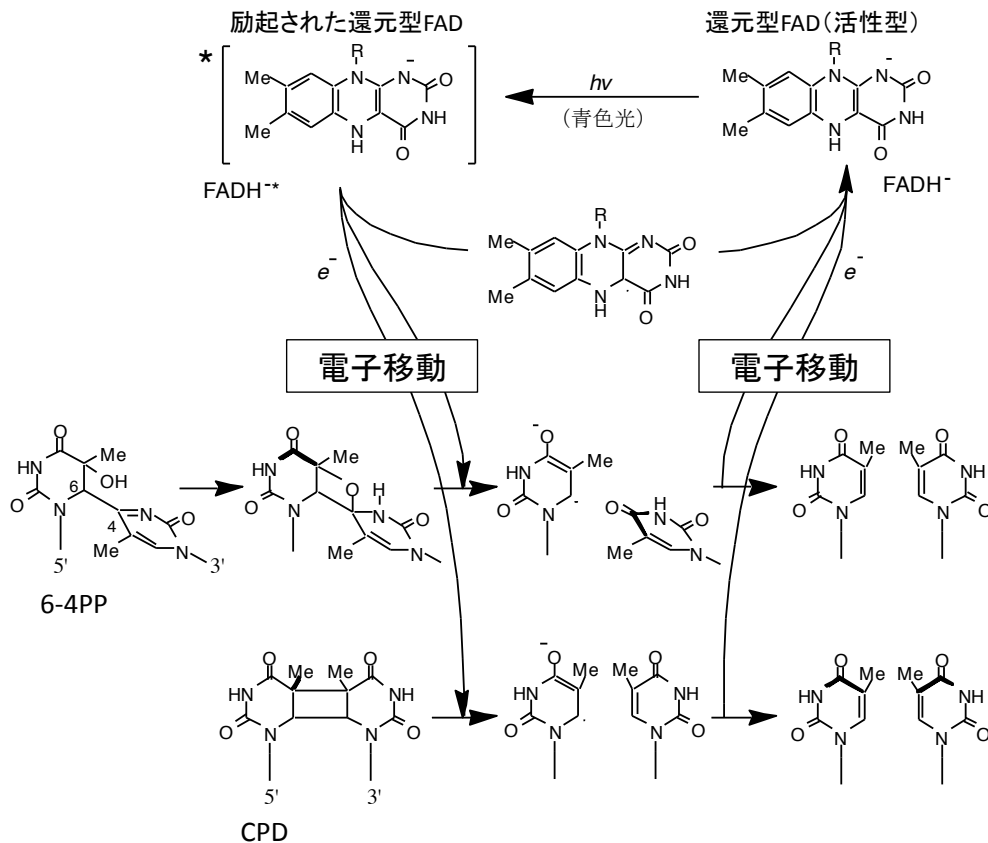


図3. 光回復酵素による修復反応。

ていると類推されクリプトクロームと名付けられた。

動物のクリプトクローム遺伝子は6-4光回復酵素のホモログとして同定された[8]。ヒトESTデータベースの検索から、ショウジョウバエ6-4光回復酵素ホモログ遺伝子がヒトゲノムに2つ存在する事が分かった。ヒトでは光回復酵素活性は検出できない事が定説となっていた為、この発見は驚きであった。実際、この遺伝子産物にはDNA修復活性は検出されなかった[10]。更に、ショウジョウバエcDNAのスクリーニングにより、6-4光回復酵素遺伝子以外にヒトホモログのオーソログと考えられるもう一つのハエホモログが同定された[11]。その後ショウジョウバエでは、概日リズムの光応答がおかしくなった変異体の原因遺伝子がHallのグループによりクローニングされ、ヒト6-4光回復酵素ホモログのハエオーソログである事が明らかとなり、昆虫クリプトクロームと呼ばれるようになった[12]。一方、ヒト6-4光回復酵素ホモログについては、機能解析の為に2つの遺伝子のノックアウトマウスが作成された。3グループからノックアウトマウスがえられたが、いずれのマウスも行動の概日リズムを

失っており、動物クリプトクロームは概日リズム形成に重要な役割を果たしている事が明らかになった[13, 14]。その後動物クリプトクロームは転写抑制因子として働く生物時計本体である事、しかもこの転写抑制活性自体は光に依存しない事がReppertのグループにより明らかにされた[15]。

3. 光回復酵素の光反応

ClassI, ClassII CPD光回復酵素及び6-4光回復酵素の3種類の光回復酵素は、いずれも極めて類似した高次構造をとっている事が結晶構造解析から明らかにされている(図2B)。また、CPD光回復酵素、6-4光回復酵素は異なる基質に作用するものの、その反応様式や修復の基本原理は同じであると考えられている[1]。光回復酵素は、損傷を認識し損傷塩基に強固に結合する。この状態で青色光を受容し、そのエネルギーを利用してDNA損傷を修復する。太陽光に含まれる紫外線によって生じる損傷を、同じく太陽光に含まれる青色光を利用し修復するという極めて合理的な酵素である。光回復酵素の修復反応を図3に示す。光回復酵素は補酵素として持つFADを介し光受容を行っている。還元型FAD

(FADH⁻)が修復反応においては活性型であり、青色光を吸収する事により励起される。この励起エネルギーが電子移動の形でDNA損傷に付与される事により、損傷が自動的に修復される。光回復酵素には、酵素の真ん中にcavityが存在しており、そのcavityの底にFADが存在している(図2B)。通常DNAは二重らせん構造を取っており、塩基は二重らせんの内側に存在している。ところが、損傷を持つDNAに光回復酵素が接触する事により、損傷が生じた塩基はこの二重らせんから外側にフリップアウトし、光回復酵素の穴に入り込む。その結果、損傷塩基は酵素内部の、光受容体であるFADに近接して存在するようになり、上記電子授与反応を効率よく起こせるようになる。

以上の修復反応に加え、光回復酵素内でFADが青色光により還元される事が知られている(図4A)。FADは、酸化型(FAD_{ox})、ラジカル型

(FADH^{*}, FAD^{*-})、還元型(FADH⁻)の3つの酸化還元状態をとる事が可能であり、吸収スペクトルによりそれぞれを判別する事が可能である(図4B)。精製された光回復酵素のFADは暗所では酸化型をとるが、青色光照射によりラジカル型を形成し、このラジカル型は更に光を吸収する事により還元型となる。また、暗所に戻す事により、このラジカル型も還元型も熱的に再び酸化型へと回帰する。この現象は光還元反応(Photo-Reduction)と呼ばれており[16]、光励起されたFADが近接するアポタンパク中のトリプトファンから電子を引き抜く事により開始される。アポタンパク中に3つのトリプトファンが、電子を伝達できるよう配位されており(Trp-Triad)、最終的に外側に位置するトリプトファンが溶媒から電子を受け取る(図4C)。光回復酵素に限らずクリプトクロームにおいてもこの3個のトリプトファンが保存されており、FADは光

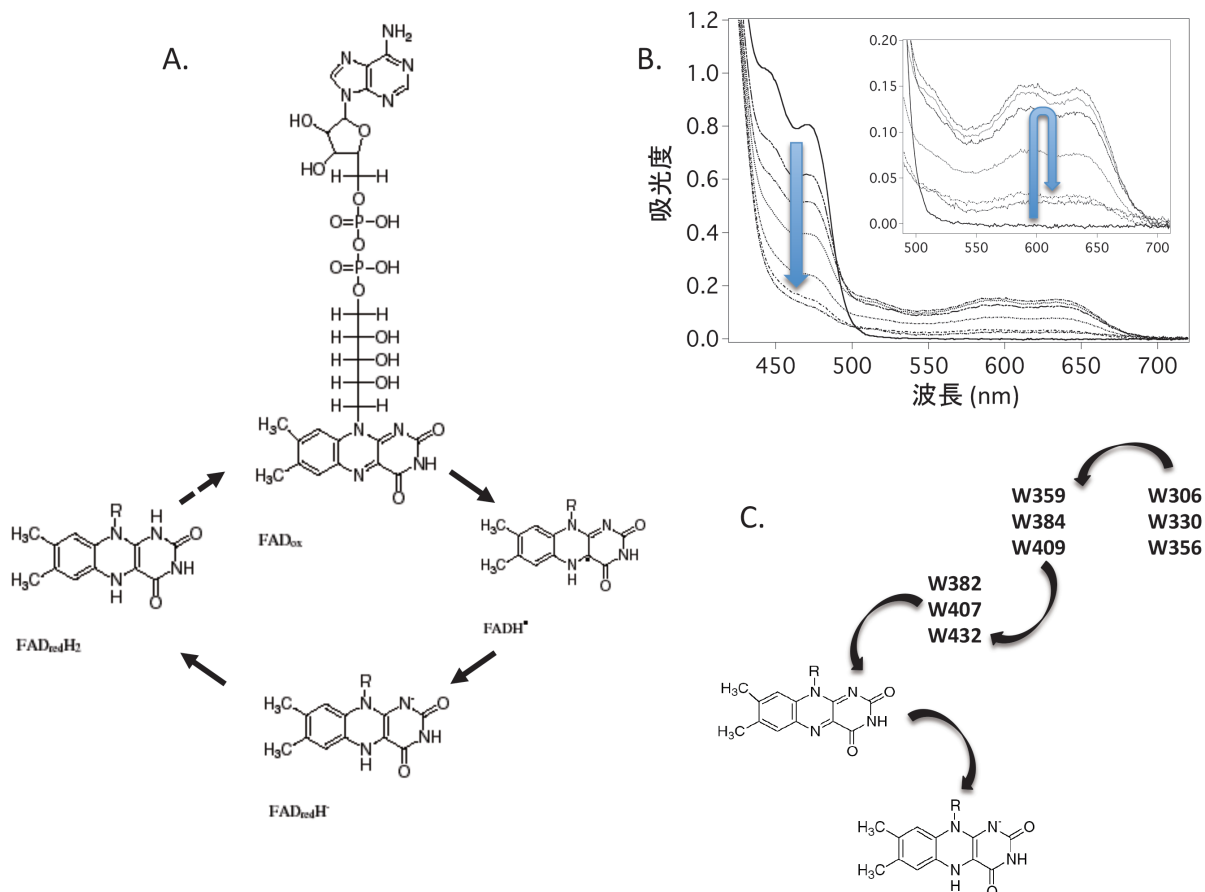


図4. FADの光還元反応。(A) FADのイソアロキシザンリングの変化を示す。(B) 光還元反応に伴うスペクトラム変化。酸化型FADは450-480nm付近に、ラジカル型FADは500nmより長波長に吸光を示すが、還元型FADではこれらは消失する。図では、青色光照射により酸化型FADの450-480nm吸収が消失するとともに、ラジカル型FADの500-700nm吸収が増加していき、更に照射を続けることにより還元型FADに遷移し、この500-700nm吸収が消失する反応を示す。差し込み図は、500-700nm領域の拡大図を示す。(C) Triad-Trp。各々のトリプトファン(W)は、上から大腸菌のCPD光回復酵素、ショウジョウバエの6-4光回復酵素、シロイヌナズナCry3の場所を示す。

還元される。ただし、このトリプトファンに変異を導入しても大腸菌CPD光回復酵素の*in vivo* DNA修復活性には影響が顕われず、光回復酵素活性における役割は不明である[17]。

4. クリプトクロームの機能

光回復酵素とクリプトクロームは、タンパクの大部分を占めるN端側ドメイン (PHRドメイン) とC末Extension (Cryptochrome C-Terminal Extension Domain: CCT) から構成されている。前者は両者に共通したホモロジーの高いドメインであるが、後者は各メンバーにより長さが異なり、また配列にも高い類似性は見られない。基本的にはキッチリとした高次構造を取っていないと考えられている。CCTドメインは各クリプトクロームにおける多様な機能に重要な役割をはたしている。PHRドメインには光受容体であるFADが結合しており、光受容によるPHRドメインの構造変化、それにより誘発されるCCTドメインとの相互作用の変化がシグナル伝達には重要となる。

シロイヌナズナには2つのクリプトクローム遺伝子(*AtCry1*, *AtCry2*)が存在しているが、いずれもそれぞれでホモダイマーを形成する事が知られている[18, 19]。COP1はユビキチン化酵素活性を持つ核タンパク質で、光形態形成を正に制御する転写因子の分解を促進するが、光活性化されたクリプトクロームはCCTを通じてCOP1の活性を抑制する事により光形態形成を進める。*AtCry*のCCTは、GUS (β -glucuronidase) との融合タンパクとして高発現させると恒常的活性型の表現型を示す[21, 21]。暗条件ではPHRドメインがCCTの活性を抑制しているが、光によりPHRドメインの構造変化が誘発されCCTがactive formに変換されると考えられている。実際、青色光により構造変化が誘発される事が、transient grating spectroscopyにより示されている[22]。この構造変化がどのようにして引き起こされているのかは興味深い点である。上に述べたように光還元反応は全てのCPFに共通にみられる反応であり、この経路のクリプトクローム機能への関与は魅力的な仮説である。精製されたりコンビナントAtCRY2中のFADは酸化型であり、青色光によりラジカル型FADが産生される。ラジカル型FADは緑色光領域に吸収を持つ為 (図4B)、この光によりラジカル型FAD量は減少する。緑色光照射によりAtCRY2のdegradationや芽生え伸長阻害等の青色光の効果が減弱する事が報告され[23]、青色光受

容の初期反応はFADの還元であり、ラジカル型FADが活性型であると提唱された。しかしながら、この緑色光効果は、他のグループでは再現されていない[24]。また、光還元に必要なトリプトファンを全て潰し、*in vitro*での光還元が起きなくなったAtCRY2は*in vivo*で正常な青色光に対する応答を示す[25]。*in vitro*でみられるTriad-Trpを介した光還元は、*in vivo*でのCRYの光受容過程に直接関与しているわけではないようである。

一般的に、生物時計における光の作用はタンパク質のdegradationであると考えられている。ショウジョウバエの概日時計においては、光により転写抑制因子TIMの急速なdegradationが誘発される。D-CRYは光照射に依存してTIMと結合し[26, 27]、TIMのdegradationを促進するが、自らもゆっくりとdegradationされる。各々のdegradationには、Jetlag [28]及びBRWD3 [29] E3-Ubiquitin Ligase複合体が関与している。D-CRYのC末をdeleteすると恒常的にTIMと結合するようになり、TIMのdegradationがおこる[30, 31]。D-CRYのC末は暗条件ではTIMとの相互作用を阻害しているが、光により構造変化が誘発され、D-CRYがTIMに結合するようになり[32]、その後D-CRYを目印にJetlagがTIMに結合すると考えられている。

精製リコンビナントD-CRYのFADは酸化されており、光照射によりアニオンセミキノン型に還元される[33]。培養細胞内で高発現させたCRYでも還元反応が起こりうる[34]。また、Chemical reductionしたD-CRYでも構造変化が起こり活性化される事が示されている[35]。しかしながら、AtCRY同様、Trp-Triadへの変異により*in vitro*での光還元反応ができなくなった変異型D-CRYでも*in vivo*での光に依存したTIM及びCRYのdegradationは起こる[36]。

動物クリプトクロームは、PERとヘテロダイマーを形成し転写抑制因子として概日時計のネガティブフィードバックループの重要因子として機能している。転写抑制活性自体は光に依存しないので、光還元は起こりえず、転写抑制活性におけるFADの役割はそれ程重視されていなかった。しかしながら、FADのダイナミックな挙動を示唆する結果がいくつか報告され、FADのクリプトクローム安定性への関与が明らかになってきた。ネガティブフィードバックループによる24時間周期の遺伝子発現制御には、時計構成因子の安定性制御が重要である。マウスCRY(mCRY1, mCRY2)の安定性はSkip1-Cull1-F-boxタンパク質であるFBXL3及びFBXL21の2種

類のE3-Ubiquitin Ligase により制御されている[37-41]。前者は核内において、後者は細胞質内においてCRYのユビキチン化を行う。興味深い事に、FBXL3はmCRY2のFAD結合ポケットにFADに置き換わって結合している事が報告されている[42]。一方、CRYの活性を修飾する低分子化合物のスクリーニングが行われ、KL001が同定された[43, 44]。KL001はCRYのFAD結合ポケットに入り込み、FBXL3と競合する事によりCRYの分解を阻害している事が示された。CPD光回復酵素では、FADを除去すると、DNA修復活性はもとよりDNA結合活性まで失われる事から、FADはDNA修復活性に必須のコンポーネントであるだけでなく、タンパク高次構造を保持するのにも重要な役割を果たしており、CPFのcavity内に安定に保持されているとこれまで信じられていた。しかしながら、以上の報告は、FADは他の分子と置き換え可能でありダイナミックな挙動をしている事を示唆している。多くのCPFは、FADに加えもう1つ第2の発色団(2ndクロモフォア)を持っている。実際、クリプトクロームの1種であるCRY-Dashにおいて、その精製リコンビナントタンパク質はFADを除去しても2ndクロモフォアが残っていれば、DNA結合活性が保持できる(未発表データ)。この様なFADのダイナミックな動きは、FADのCRY degradationやCRY活性に対するこれまでに知られていない役割を示唆していると考えられる。

おわりに

CPFタンパク質の特徴は、FADを補酵素として持ち、そのFADはタンパク質深部に埋もれ存在しているにもかかわらず溶媒から容易にアクセスできる特殊な高次構造をとっている事である。光回復酵素においては、これまでの研究から、FADが青色光に依存した電子移動の媒体としてDNA修復にエッセンシャルな役割を果たしており、しかも特徴的な高次構造はその反応の効率化に適した形態をしている事が示されている。一方、クリプトクロームにおいては、この共通特性の意義は充分には解明されていない。光受容過程においては、光受容により何らかの構造変化が光受容体に誘発されなければならないが、その実体は不明である。光回復酵素で明らかにされているFADの光還元反応は、光によりFADに起こりうる唯一の反応であり、光受容体の構造変化誘発の要因になっていると考えられている。しかしながら、本稿で紹介したように、光受容

体として機能するクリプトクロームにおいては、Triad-Trpのトリプトファン経路の阻害は*in vivo*での活性に影響を与えない。今後、*in vitro*と*in vivo*の違い、Triad-Trp経路の意義について明らかにされなければならない。また、生物種によりneutral型、アニオン型のFADラジカルが観察されている。両者はどの様に使い分けされているのかが今後の問題点である。一方、転写抑制活性においては、何故CPFでなければならなかったのか?といった疑問に対する解答がこれまでは不明であった。FADのダイナミックな挙動により、FADの意義と構造上の特徴が説明できる事が示唆されており、今後の研究の進展が期待される。

参考文献

- 1) Sancar A: Chem Rev 103:2203-2237 (2003)
- 2) Lin C, Todo T: Genome Biol 6:220 (2005)
- 3) Gegear RJ, Casselman A, Waddell S, Reppert SM: Nature 454:1014-1018 (2008)
- 4) Todo T: Mutat Res 434:89-97 (1999)
- 5) Sancar A, Rupert CS: Gene 4:295-308 (1978)
- 6) Yasuhira S, Yasui A: J Biol Chem 267:25644-25647 (1992)
- 7) Todo T, *et al.*: Nature 361:371-374 (1993)
- 8) Todo T, *et al.*: Science 272:109-112 (1996)
- 9) Ahmad M, Cashmore AR: Nature 366:162-166 (1993)
- 10) Todo T, *et al.*: Mutat Res 384:195-204 (1997)
- 11) Ishikawa T, *et al.*: Genes Cells 4:57-65 (1999)
- 12) Stanewsky R, *et al.*: Cell 95:681-692 (1998)
- 13) van der Horst GT, *et al.*: Nature 398:627-630 (1999)
- 14) Vitaterna MH, *et al.*: Proc Natl Acad Sci U S A 96:12114-12119 (1999)
- 15) Kume K, *et al.*: Cell 98:193-205 (1999)
- 16) Kao YT, *et al.*: J Am Chem Soc 130:7695-7701 (2008)
- 17) Li YF, Heelis PF, Sancar A: Biochemistry 30:6322-6329 (1991)
- 18) Sang Y, *et al.*: Plant Cell 17:1569-1584 (2005)
- 19) Yu X, *et al.*: Proc Natl Acad Sci U S A 104:7289-7294 (2007)
- 20) Partch CL, Clarkson MW, Ozgur S, Lee AL, Sancar A: Biochemistry 44:3795-3805 (2005)
- 21) Partch CL, Sancar A: Photochem Photobiol

- 81:1291-1304 (2005)
- 22) Kondoh M, *et al.*: J Mol Biol 413:128-137 (2011)
 - 23) Bouly JP, *et al.*: J Biol Chem 282:9383-9391 (2007)
 - 24) Li X, *et al.*: Proc Natl Acad Sci U S A 108:20844-20849 (2011)
 - 25) Gao J, *et al.*: Proc Natl Acad Sci U S A 112:9135-9140 (2015)
 - 26) Ceriani MF, *et al.*: Science 285:553-556 (1999)
 - 27) Rosato E, *et al.*: Curr Biol 11:909-917 (2001)
 - 28) Koh K, Zheng X, Sehgal A: Science 312:1809-1812 (2006)
 - 29) Ozturk N, VanVickle-Chavez SJ, Akileswaran L, Van Gelder RN, Sancar A: Proc Natl Acad Sci U S A 110:4980-4985 (2013)
 - 30) Busza A, Emery-Le M, Rosbash M, Emery P: Science (New York, N.Y.) 304:1503-1506 (2004)
 - 31) Peschel N, Veleri S, Stanewsky R: Proc Natl Acad Sci U S A 103:17313-17318 (2006)
 - 32) Ozturk N, Selby CP, Annayev Y, Zhong D, Sancar A: Proc Natl Acad Sci U S A 108:516-521 (2011)
 - 33) Ozturk N, Song SH, Selby CP, Sancar A: J Biol Chem 283:3256-3263 (2008)
 - 34) Hoang N, *et al.*: PLoS Biol 6:e160 (2008)
 - 35) Vaidya AT, *et al.*: Proc Natl Acad Sci U S A 110:20455-20460 (2013)
 - 36) Ozturk N, Selby CP, Zhong D, Sancar A: J Biol Chem 289:4634-4642 (2014)
 - 37) Busino L, *et al.*: Science 316:900-904 (2007)
 - 38) Godinho SI, *et al.*: Science 316:897-900 (2007)
 - 39) Siepka SM, *et al.*: Cell 129:1011-1023 (2007)
 - 40) Yoo SH, *et al.*: Cell 152:1091-1105 (2013)
 - 41) Hirano A, *et al.*: Cell 152:1106-1118 (2013)
 - 42) Xing W, *et al.*: Nature 496:64-68 (2013)
 - 43) St John PC, Hirota T, Kay SA, Doyle FJ, 3rd: Proc Natl Acad Sci U S A 111:2040-2045 (2014)
 - 44) Hirota T, *et al.*: Science 337:1094-1097 (2012)