

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16130

研究課題名(和文) DNA損傷修復過程で生じるヒストンタンパク質立体構造変化の放射光分光による追跡

研究課題名(英文) Structural analysis of histone proteins extracted from DNA damaged cells using circular dichroism spectroscopy

研究代表者

泉 雄大 (Izumi, Yudai)

広島大学・放射光科学研究センター・助教

研究者番号：20595772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：円二色性スペクトル測定により、DNA損傷に伴って、ヒストンH2A-H2Bは $\alpha$ -ヘリックス構造が増加するのに対し、H3-H4では逆に、 $\alpha$ -ヘリックス構造が減少することを明らかにした。H2A-H2B、H3-H4に生じる構造変化が異なることから、それぞれ異なる構造変化機構が関与していることが示唆された。さらに、DNA損傷に伴って生じる「異常な」構造は、少なくとも24時間にわたって保たれ続ける事が明らかとなった。ヒストンの構造変化は、DNA損傷応答、例えば、DNA損傷修復機構、において、何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In an attempt to investigate structural alterations of histone proteins induced by DNA damage responses, we measured circular dichroism spectra of histones extracted from DNA-damaged cells. We revealed that DNA damage response increases  $\alpha$ -helix structure in histone H2A-H2B, but decreases that in histone H3-H4. Since different structural alterations were observed in H2A-H2B and H3-H4, it is suggested that the structural alterations of histones are caused by the several pathways. Interestingly, these altered structures persisted for at least 24 hours. These structural alterations would play an important role in DNA damage responses, such as DNA damage repair pathways.

研究分野：放射線生物学

キーワード：DNA損傷応答 ヒストン 円二色性 翻訳後修飾 放射光

### 1. 研究開始当初の背景

DNA 二重鎖切断損傷の修復過程では、ヒストンタンパク質の化学修飾をきっかけとして、修復タンパク質が損傷個所にアクセスしやすいように DNA 損傷近傍のクロマチン (DNA とタンパク質の複合体) 構造が変化すると考えられている。しかしながら、DNA 損傷に伴う、クロマチンやそれを構成するヒストンの構造変化やその変異した構造の回復過程 (時間変化) などを実験的に観測した例はなかった。

### 2. 研究の目的

DNA 損傷に伴うヒストンの構造変化過程を追跡するために、X 線照射により DNA を損傷させた細胞からヒストンを抽出し、タンパク質の構造を反映する円二色性 (CD) スペクトル測定によりその構造を調査した。

### 3. 研究の方法

ヒトがん細胞を培養し、40 Gy の X 線を照射し DNA 損傷を導入した。X 線照射後、DNA 損傷修復を行わせるために一定時間培養した後、ヒストンタンパク質 H2A-H2B あるいは H3-H4 を抽出した。抽出したヒストンタンパク質の CD スペクトルを測定し、溶液状態におけるヒストンの構造を調査した。比較のために、X 線を照射していない、すなわち、DNA 損傷を与えていない細胞からも同様の方法でヒストンを抽出し、構造調査を行った。また、X 線がヒストン自身に与えるダメージによる構造変化についても併せて調査した。

CD スペクトルの測定は、フランスの放射光施設 SOLEIL の DISCO ビームライン、広島大学の放射光施設 HiSOR の BL12 あるいは物質・材料研究開発機構 (NIMS) 所有の円二色性分散計 (日本分光、J-725) を用いて行った。放射光施設を用いた場合は、波長 175 nm から 260 nm の範囲で測定を行った。円二色性分散計での測定では、光源のフラックスが小さい短波長領域で十分な精度で測定を行うことが困難であることから 195 nm から 260 nm の範囲に限って測定を行った。

### 4. 研究成果

図 1 に DNA (非) 損傷細胞由来の H2A-H2B の CD スペクトルを示す。また、DNA 非損傷細胞由来の H2A-H2B に X 線を照射した場合の CD スペクトルも併せて示す。前者の測定は SOLEIL DISCO ビームラインで行い、後者の測定は NIMS で行った。DNA 損傷導入後の培養時間は 30 分とした。X 線を照射していない細胞から抽出した H2A-H2B の CD スペクトル (黒) は、波長 190 nm 付近に正、210、220 nm 付近に負のピークを示した。これは、 $\alpha$ -ヘリックス (らせん) 構造を含むタンパク質が示す特徴的な CD ピークである。X 線を照射して DNA 損傷を与えた細胞から抽出した場合 (赤) でも同様のピークが確認されたが、その強度は非損傷の場合に比べて大きくなった。CD ス

ペクトルの形状は、タンパク質の構造を反映するので、この結果は、細胞に X 線を照射することによって、H2A-H2B の構造が変化することを示す。他方、H2A-H2B に直接 X 線を照射した場合に見られたスペクトル変化 (図 1. 黒 橙) は、細胞に X 線を照射した場合 (図 1. 黒 赤) とは異なった。すなわち、細胞への X 線照射によって生じる H2A-H2B の構造変化と、H2A-H2B に直接 X 線を照射し、ダメージを与えた場合に生じる構造変化は異なることがわかった。

以上のことから、細胞に X 線を照射することによって、DNA 損傷に伴う何らかの細胞機能により H2A-H2B の構造変化が生じたと結論した。

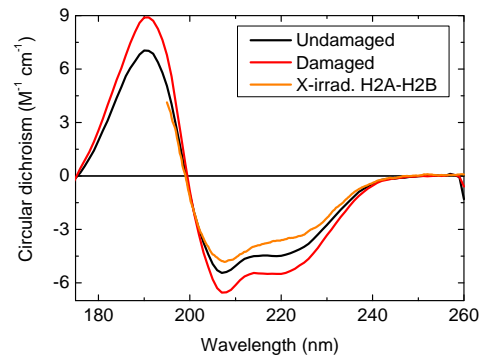


図 1. H2A-H2B の CD スペクトル

図 2 に X 線照射による DNA 損傷導入後の培養時間を 30 分から 24 時間まで変化させた場合の H2A-H2B の CD スペクトルを示す。測定は NIMS で行った。DNA 損傷導入後の培養時間、すなわち、DNA 損傷修復にかけることのできる時間を 30 分から 24 時間まで増やしても、H2A-H2B の CD スペクトルは、非損傷細胞由来の H2A-H2B のそれと重なることはなかった。本測定は、円二色性分散計を用いて実施したため、光源性能の限界で波長 190 nm 付近の正のピークは観測できなかった。DNA 損傷修復の進行に伴って、190 nm のピーク強度を変化させるような構造変化が生じている可能性は捨てきれない。したがって、正確な構造変化を同定するために、放射光を用いた CD 測定を新たに行う必要があり、これは今後の課題である。

構造変化の詳細は明らかになっていないが、DNA 損傷細胞由来の H2A-H2B の CD スペクトルが、非損傷細胞由来のそれと一致しなかったことは、DNA 損傷導入後 24 時間を経過しても、H2A-H2B の構造が通常の状態とは異なる「異常な」状態のままであることを示している。一般に、損傷導入後 24 時間が経過すれば、その損傷の大半は修復が完了すると考えられている。H2A-H2B が修復に必要とされる期間よりも長く「異常な」構造を保つことの必要性、H2A-H2B の構造が通常の状態に戻るにはさらに長い時間がかかるのか、あるいは

は、このまま戻らないのか、また、戻らないとすれば、どのような影響が生じるのかは、分子生物学的な手法も併せて用いながら、引き続き調査する必要がある。

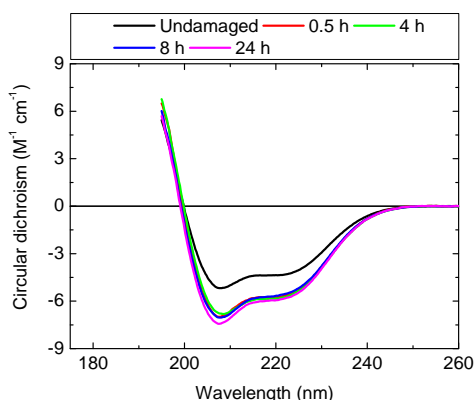


図 2. DNA 損傷導入後の培養時間を変化させたときの H2A-H2B の CD スペクトル

図 3 に DNA (非) 損傷細胞由来の H3-H4 の CD スペクトルを示す。測定は HiSOR BL12 で行った。DNA 損傷導入後の培養時間は 30 分とした。H3-H4 でも、H2A-H2B 同様、190 nm に正、210、220 nm 付近に負のピークが観測された。しかしながら、DNA 損傷細胞由来の H3-H4 の CD スペクトルでは、非損傷由来の場合に比べて、正のピーク強度が減少した。負のピークでは目立った変化は見られなかった。このことから、H3-H4 では H2A-H2B とは異なる構造変化が生じていることがわかった。

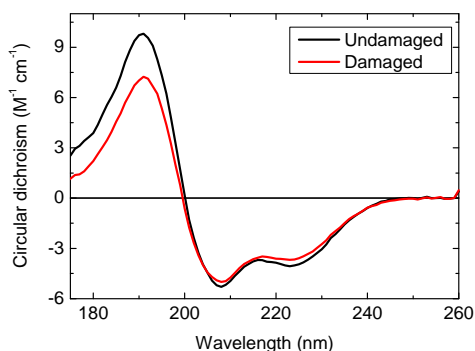


図 3. H3-H4 の CD スペクトル

CD スペクトルを解析し、H2A-H2B および H3-H4 の二次構造成分割合を求めると、H2A-H2B では、DNA 損傷に伴って  $\alpha$ -ヘリックス構造が増加したのに対して、H3-H4 では、逆に、 $\alpha$ -ヘリックス構造が減少していることが明らかとなった。H2A-H2B と H3-H4 は細胞核内で共にコアヒストンと呼ばれる八量体を形成し、さらにその周りを DNA が取り巻いたヌクレオソーム構造を取っている。近接

した環境下でありながら、異なる構造変化が生じたことは、それぞれ異なる機構で構造が変化していることを示唆している。これらの構造変化が果たす役割に関しては、引き続き調査する必要がある。

以上、本研究の成果をまとめると、DNA 損傷に伴って、何らかの細胞機能により細胞内でヒストンの構造が変化することを初めて明らかにした。また、H2A-H2B と H3-H4 に生じる構造変化が異なることがわかった。このことは、異なる機構によって構造変化が生じていることを示唆している。さらに、DNA 損傷に伴って生じる「異常な」構造は、少なくとも 24 時間にわたって保たれ続ける事が明らかとなった。これらは、本研究により新たに発見された DNA 損傷応答である。

本研究の成果は、DNA 損傷応答、特に、DNA 損傷修復機構の全容を解明するための重要な手掛かりになると期待される。

#### <謝辞>

放射光を用いた CD 測定は、SOLEIL (課題番号: 20130831, 20140518) および HiSOR (13-B-18, 14-A-16, 15-A-48) の共同利用において行われました。また、円二色性分散計を用いた CD 測定は、文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム事業 (NIMS 分子・物質合成プラットフォーム) の支援を受けて、物質・材料研究機構において実施されました。各施設のスタッフの皆様には感謝いたします。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Y. Izumi, K. Fujii, S. Yamamoto, K. Matsuo, H. Namatame, M. Taniguchi, and A. Yokoya, "DNA damage response induces structural alterations of histone H3-H4", *Journal of Radiation Research* **58**, 59-65 (2017). 査読有. DOI: 10.1093/jrr/rrw086
2. 泉 雄大, "DNA 損傷により誘起されるヒストンタンパク質の二次構造変化", *放射線化学*, **103**, 35-37 (2017). (依頼解説記事) 査読有.
3. Y. Izumi, K. Fujii, F. Wien, C. Houée-Lévin, S. Lacombe, D. Salado-Leza, E. Porcel, R. Masoud, S. Yamamoto, M. Réfrégiers, M. -A. Hervé du Penhoat, and A. Yokoya, "Structure change from  $\alpha$ -strand and turn to  $\alpha$ -helix in histone H2A-H2B induced by DNA damage response", *Biophysical Journal*, **111**, 69-78 (2016). 査読有. DOI: 10.1016/j.bpj.2016.06.002
4. 泉 雄大, 山本悟史, 藤井健太郎, 横谷明德, "放射線 DNA 損傷の修復応答を開始させる染色体タンパク質ヒストンの構

- 造変化”, *Isotope News*, **746**, 2-5 (2016). (依頼解説記事) 査読有.
5. 泉 雄大, 山本悟史, 藤井健太郎, 横谷明德, “紫外円二色性スペクトルを用いたタンパク質構造研究”, *放射線生物研究*, **51**, 91-106 (2016). 査読有.
  6. Y. Izumi, S. Yamamoto, K. Fujii, and A. Yokoya, “Secondary structure alterations of histone H2A and H2B in X-irradiated human cancer cells: Altered histones persist in cells for at least 24 hours”, *Radiation Research*, **184**, 554-558 (2015). 査読有. DOI: 10.1667/RR14071.1

[学会発表](計 8 件)

1. 泉 雄大, “放射光円二色性分光を用いたヒストンのDNA損傷誘起二次構造変化の観測”, 第1回量子生命科学研究会, 2017年4月12日(東京大学、文京区、東京都). (招待講演)
2. Y. Izumi, “Structural changes of histone induced by DNA damage response”, Hiroshima International Workshop on Circular Dichroism Spectroscopy 2017 ~Application to Imaging Microscopy and Radiation Biology~, 2017年2月28日(広島大学、東広島市、広島県).
3. 泉 雄大, 山本悟史, 藤井健太郎, 松尾光一, 横谷明德, “放射光円二色性分光によるDNA損傷誘起ヒストン二次構造変化の観測”, 第30回日本放射光学会年会 放射光科学合同シンポジウム, 2017年1月7-9日.(神戸芸術センター、神戸、兵庫県)
4. 泉 雄大, 山本悟史, 藤井健太郎, 松尾光一, 横谷明德, “DNA損傷応答により生じるヒストンの二次構造変化”, 日本放射線影響学会第59回大会, 2016年10月26-28日.(JMSアステールプラザ、広島市、広島県)
5. 泉 雄大, 山本悟史, 藤井健太郎, 松尾光一, 横谷明德, “DNA損傷により誘起されるヒストンタンパク質の二次構造変化”, 第59回放射線化学討論会, 2016年9月20-22日.(QST高崎量子応用研究所、高崎市、群馬県)
6. Y. Izumi, S. Yamamoto, K. Fujii, and A. Yokoya, “Secondary structural alteration of histone H2A-H2B induced by DNA damage responses”, 14th International Workshop on Radiation Damage to DNA, 2016年3月20-24日.(Victorian treasury theatre、メルボルン、オーストラリア)
7. Y. Izumi, “VUV-CD measurements of histone H2A-H2B proteins: Secondary structural alterations induced by DNA damage responses”, The 20th

Hiroshima International Symposium on Synchrotron Radiation, 2016年3月10-11日.(招待講演)(広島大学、東広島市、広島県)

8. Y. Izumi, K. Fujii, S. Yamamoto, K. Matsuo, and A. Yokoya, “VUV-CD measurements of proteins relating to DNA repair”, The 20th Hiroshima International Symposium on Synchrotron Radiation, 2016年3月10-11日.(広島大学、東広島市、広島県)

[その他]

2015年11月5日プレスリリース

<http://www.jaea.go.jp/02/press2015/p15110501/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

泉 雄大 (YUDAI IZUMI)

広島大学・放射光科学研究センター・助教  
研究者番号: 20595772