

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K12825

研究課題名(和文)放射光円二色性分光によるヒストンのDNA損傷誘起「異常構造」形成過程の解明

研究課題名(英文)Structural analyses of "abnormal" structures of histone proteins induced by DNA damage using synchrotron radiation 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：DNA損傷修復過程でヒストンH3タンパク質に施される翻訳後修飾である4あるいは9番目のリジン残基のトリメチル化によりH3の構造が変化することを放射光円二色性分光により初めて明らかにした。また、メチル化により誘起される構造変化は、メチル化された残基近傍だけでなく、分子全体で生じていることが予測された。これらの結果は、DNA損傷に誘起されたヒストンの構造変化が、修復過程における翻訳後修飾によって生じたものであるという作業仮説を支持するものであると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA損傷修復機構を理解する上で重要な要因の一つである修飾されたヒストンタンパク質の構造は未解明の部分が多い。本研究は、メチル化によりヒストンタンパク質H3全体の構造が変化し得ることを初めて示した。修飾によって生じるヒストンの構造変化過程を解明することは、DNA損傷修復機構の全容解明に寄与すると期待され、本研究はその端緒を開いたと考えられる。またこれらの成果は、将来的に、ヒストンの修飾を人工的に制御することで抗がん作用などの薬効を得るエビジェネティック薬の開発にもつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：This work revealed that the global structural changes in histone H3 proteins induced by lysine-4 or -9 mono-, di-, and tri-methylation, which are part of the critical post-translational modifications for DNA damage responses, using synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy. The structural alterations occurred at residues not only close to but also distant from the methylated sites. These alterations would regulate the interactions between modified histones and other molecules and play an important role in DNA damage responses.

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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

代表者らはこれまでに、DNA 損傷を与えた細胞から抽出したヒストンタンパク質が通常とは異なる「異常な」構造をとっていることを明らかにしてきた[1-3]。ヒストンは DNA 損傷修復をはじめとした様々な細胞機能に関わるタンパク質であり、また、タンパク質の構造は反応を左右する重要な要因であることから、ヒストンの構造変化はこれらの機能に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。しかしながら、構造変化が生じる原因は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

「ヒストンの「異常」構造は DNA 損傷修復中に施される翻訳後修飾によって生じる」という作業仮説を検証するために、放射光円二色性分光法を用いて 4 あるいは 9 番目のリジン残基(以下、それぞれ K4、K9 と書く)がトリメチル化されたヒストンタンパク質 H3 の構造解析を行った。また、同残基がモノ、ジメチル化した場合あるいは非修飾の場合の構造と比較を行った。

3. 研究の方法

K4 あるいは K9 残基がモノ、ジ、あるいはトリメチル化された H3 タンパク質(以下、H3K N me X ($N = 4, 9$; $X = 1, 2, 3$)と書く)および非修飾の H3 (以下、単に H3 と書く)を試料として用いた。ヒストンを溶解し、1 mg/mL の試料溶液を得た。溶媒として、250 mM のフッ化ナトリウムを添加した 20 mM リン酸バッファを用いた。

円二色性(CD)スペクトルの測定は、広島大学の放射光施設 HiSOR の真空紫外円二色性ビームライン BL-12 で行った[4]。試料セルとして、光路長 10 μ m の CaF₂ セルを用いた[5]。SELCON3 プログラムを用いて得られたスペクトルを解析し、ヒストンの二次構造成分割合を決定した[6-9]。また、VUVCD-NN 法[10]により、二次構造形成位置の予測を行った。

4. 研究成果

図 1(a)に H3 および H3K4me X ($X = 1, 2, 3$)の CD スペクトルを示す。H3K4me1 のスペクトルは H3 のそれと比較すると、190 nm 付近の正のピークおよび 210 nm 付近の負のピークの強度がどちらも増加しているのが見て取れる。CD スペクトルの強度と形状は、タンパク質の構造を反映するため、この結果は、4 番目のリジン残基のモノメチル化で構造変化が生じることを示す。また、H3K4me2 は H3K4me1 のスペクトルとほぼ一致したので、両者は近い構造をとっていると考えられる。他方、H3K4me3 は H3 および H3K4me1 および H3K4me2 とは異なるスペクトルを示し、トリメチル化によって、モノあるいはジメチル化とは異なる構造変化が生じることが示された。K9 残基のメチル化の場合(図 1(b))にも同様の傾向が見られたが、特にトリメチル化において、正のピークが消失するなど、K4 と K9 残基では異なる変化が見られた。

メチル化による構造変化をより詳細に調べるために、二次構造解析を行った結果を表 1 に示す。モノメチル化、ジメチル化の結果は、誤差範囲で一致したのでまとめて示した。K4、K9 どちらの場合も、モノおよびジメチル化によって、 α -ヘリックス構造が増加し、 β -ストランド構造が減少した。他方、トリメチル化では逆に α -ヘリックス構造が減少し、 β -ストランド構造が増加した。K4 と K9 メチル化の結果を比較すると、K9 の方がより大きな構造変化が起きたことがわかった。これらのことから、修飾位置や修飾基の数で異なる構造変化が生じることが明らかとなった。これらの結果は、DNA 損傷に誘起されたヒストンの構造変化が、修復過程における翻訳後修飾によって生じたものであるという作業仮説を支持するものであると考えられる。

続いて、上記の結果をもとに、二次構造形成位置予測を行った(図 2)。興味深いことに、K4、K9 どちらのメチル化の場合も、メチル化された残基近傍だけでなく、遠く離れた残基で構造変化が生じていることが予測された。この変化は、メチル化により静電的な相互作用や立体障害などが変化し、メチル化されたテール部分と中央付近の残基が相互作用し非修飾時とは異なる構造をとることで安定化

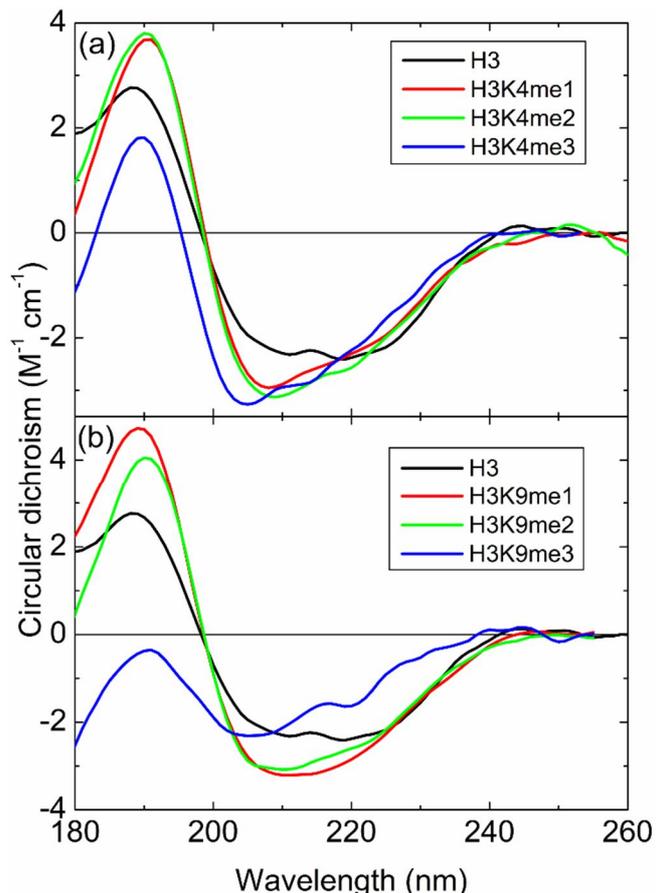


図 1. H3 およびメチル化 H3 の CD スペクトル

を図った結果生じたのではないかと予想している。X線結晶構造解析などによるメチル化 H3 の立体構造決定とシミュレーションなどによる構造変化過程の同定が待たれる。

本研究では遊離の（メチル化）H3 タンパク質を用いた。しかしながら、実際の細胞中では H3 は他のヒストンタンパク質（H2A、H2B、H4）とコアヒストンを形成し、さらに DNA と共にヌクレオソームやクロマチンを形成していることから、H3 の構造変化がコアヒストンやクロマチンの構造にも影響を与える可能性が考えられる。また、当然のことながら、アセチル化やリン酸化といった他の修飾や他のヒストンが修飾された場合も同様のことが起こり得ると考えられる。したがって、DNA 損傷細胞由来のヒストンで観測された「異常構造」は、非常に複雑な修飾状態によって生じている可能性が高い。今後は、質量分析などにより「異常構造」をとるヒストンで顕著に見られる修飾状態を同定し、それを模した系で「異常構造」が確認されるかどうかを確かめるなどして、構造変化過程の同定を行っていくことが重要であると考えられる。

以上、本研究の成果をまとめると、DNA 損傷修復過程でヒストン H3 タンパク質に施される翻訳後修飾 K4、K9 のトリメチル化により構造変化することを初めて明らかにした。また、同残基のモノ、ジメチル化によっても構造変化が生じることが明らかとなり、修飾位置やメチル基の数の違いで異なる構造をとることが示された。加えて、メチル化により誘起される構造変化は、メチル化された残基近傍だけでなく、分子全体で生じていることが予測された。これらの結果は、DNA 損傷に誘起されたヒストンの構造変化が、修復過程における翻訳後修飾によって生じたものであるという作業仮説を支持するものであると考えられる。

表 1. H3 およびメチル化 H3 の二次構造成分（単位：%）

	H3	H3K4me1 H3K4me2	H3K4me3	H3K9me1 H3K9me2	H3K9me3
-ヘリックス	25.0±1.2	30.7±1.3	21.8±0.8	36.5±1.7	13.1±0.8
-ストランド	21.3±1.5	18.9±2.0	25.1±2.0	13.6±2.6	29.6±1.9
ターン	21.1±1.0	23.5±1.2	21.4±0.7	23.1±1.0	22.7±1.2
無秩序	32.7±1.7	27.0±1.8	31.7±1.6	27.8±1.8	36.3±2.4



図 2. H3 およびメチル化 H3 の二次構造形成位置予測

References

- [1] Y. Izumi *et al.*, *Radiation Research* **184**, 554 (2015).
- [2] Y. Izumi *et al.*, *Biophysics Journal* **111**, 69 (2016).

- [3] Y. Izumi *et al.*, *Journal of Radiation Research* **58**, 59 (2017).
- [4] M. Sawada *et al.*, *Journal of Physics: Conference Series* **425**, 162010 (2013).
- [5] K. Matsuo *et al.*, *Analytical Science* **19**, 129 (2003).
- [6] N. Sreerama *et al.*, *Protein Science* **8**, 370 (1999).
- [7] N. Sreerama and R. W. Woody, *Analytical Biochemistry* **287**, 252 (2000).
- [8] K. Matsuo *et al.*, *Journal of Biochemistry* **135**, 405 (2004).
- [9] K. Matsuo *et al.*, *Journal of Biochemistry* **138**, 79 (2005).
- [10] K. Matsuo *et al.*, *Proteins* **73**, 104 (2008).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Izumi Yudai, Matsuo Koichi	4. 巻 23
2. 論文標題 Sample Volume Reduction Using the Schwarzschild Objective for a Circular Dichroism Spectrophotometer and an Application to the Structural Analysis of Lysine-36 Trimethylated Histone H3 Protein	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2865 ~ 2865
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules23112865	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Izumi Yudai, Matsuo Koichi, Fujii Kentaro, Yokoya Akinari, Taniguchi Masaki, Namatame Hirofumi	4. 巻 59
2. 論文標題 Circular dichroism spectroscopic study on structural alterations of histones induced by post-translational modifications in DNA damage responses: lysine-9 methylation of H3	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 108 ~ 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rrx068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Izumi Yudai, Matsuo Koichi, Namatame Hirofumi	4. 巻 30
2. 論文標題 Structural analysis of lysine-4 methylated histone H3 proteins using synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chirality	6. 最初と最後の頁 536 ~ 540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chir.22849	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 -
1. 著者名 Izumi Yudai	4. 巻 3
2. 論文標題 Structural Alterations of Histone Proteins in DNA-Damaged Cells Revealed by Synchrotron Radiation Circular Dichroism Spectroscopy: A New Piece of the DNA-Damage-Response Puzzle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Quantum Beam Science	6. 最初と最後の頁 23 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/qubs3040023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Yudai Izumi
2. 発表標題 Structural changes of histone protein in DNA-damaged cells revealed by synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy
3. 学会等名 The 2019 Korean-Japanese Student Workshop Pusan National University & Hiroshima University (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 泉 雄大
2. 発表標題 円偏光放射光を利用した量子生命科学研究
3. 学会等名 量子生命科学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yudai Izumi and Koichi Matsuo
2. 発表標題 Secondary structure analysis of histone H2A-H2B proteins extracted from heated cells using circular dichroism spectroscopy
3. 学会等名 3rd QST International Symposium "Quantum Life Science" (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 泉 雄大
2. 発表標題 エビジェネティクス研究への放射光・量子ビームの利用
3. 学会等名 第25回HiSOR研究会 小型放射光リングによる多彩な量子ビームの発生と応用
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 泉 雄大、松尾 光一
2. 発表標題 ヒストンタンパク質のエピジェネティクス構造変化
3. 学会等名 第23回HiSOR研究会 分子キラリティの計測・理論技術の革新から迫る生命機能研究の新展開
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 泉 雄大、松尾 光一
2. 発表標題 放射光円二色性分光によるK4/K9メチル化ヒストンH3の構造解析
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 泉 雄大、松尾 光一
2. 発表標題 放射光円二色性分光によるK4メチル化ヒストンH3の構造解析
3. 学会等名 第33回日本放射光学会年会 放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yudai Izumi
2. 発表標題 Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy for structural characterization of chiral materials
3. 学会等名 MIRAI Materials Science Workshop 2018 Spring (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 泉 雄大
2. 発表標題 DNA損傷に誘起されるヒストン構造変化の円二色性分光による解析
3. 学会等名 研究会「光・物質・生命・宇宙におけるキラリティ」（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 泉 雄大、松尾 光一
2. 発表標題 円二色性分光によるメチル化ヒストンH3の構造解析
3. 学会等名 量子生命科学研究会第2回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 泉 雄大、松尾 光一
2. 発表標題 放射光円二色性分光を用いたK4メチル化ヒストンH3の構造解析
3. 学会等名 第61回放射線化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 泉 雄大
2. 発表標題 放射光円二色性分光によるメチル化ヒストンH3の構造解析
3. 学会等名 第60回放射線化学討論会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 泉 雄大
2. 発表標題 放射線生物学・量子生命科学研究における放射光円二色性分光の展開と可能性 ヒストン構造変化の観測を事例として
3. 学会等名 日本放射線影響学会第60回大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Y. Izumi and K. Matsuo
2. 発表標題 Structural analysis of lysine-4 methylated histone H3 proteins using synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy
3. 学会等名 Chirality 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Y. Izumi and K. Matsuo
2. 発表標題 Methylation-induced structural alteration of histone H3 characterized by synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy
3. 学会等名 1st QST International Symposium “Quantum Life Science”（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Y. Izumi and K. Matsuo
2. 発表標題 Structural Analysis of Lysine-4 Methylated Histone H3 Using VUV-CD Spectroscopy
3. 学会等名 The 22nd Hiroshima International Symposium on Synchrotron Radiation（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 泉 雄大、松尾 光一、藤井 健太郎、横谷 明德
2. 発表標題 放射光円二色性分光による メチル化ヒストンH3の構造解析
3. 学会等名 第31回日本放射光学会年会 放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 泉 雄大、松尾 光一
2. 発表標題 円二色性分光によるメチル化ヒストンH3の構造解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第61回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yudai Izumi	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 16
3. 書名 Secondary structures of histone H3 proteins with unmethylated and methylated lysine-4 and -9 residues: Characterization using circular dichroism spectroscopy, In S. Jurga and J. Barciszewski (Eds.), The DNA, RNA, and Histone Methylomes	

〔産業財産権〕

〔その他〕

メチル化によるヒストンタンパク質構造変化の初観測 http://www.hsro.hiroshima-u.ac.jp/research/result/42.html

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
--	---------------------------	-----------------------	----