

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K12164

研究課題名（和文）放射光円二色性分光を用いたDNA損傷修復過程におけるクロマチン構造変化過程の解明

研究課題名（英文）Analyses of secondary structural changes of chromatin during DNA damage repair using synchrotron circular dichroism spectroscopy

研究代表者

泉 雄大（Izumi, Yudai）

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学研究所・主任研究員

研究者番号：20595772

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：細胞を加熱することによって生じるヒストンタンパク質H2A-H2Bの二次構造変化を放射光円二色性（CD）分光により調べた。45あるいは60℃で加熱した細胞から抽出したH2A-H2BのCDスペクトルは、非加熱細胞由来のH2A-H2Bあるいはそれを直接加熱した場合のCDスペクトルとは異なった。これは、細胞内で通常の熱変性とは異なる構造変化がH2A-H2Bに生じたことを示す。コメットアッセイにより細胞加熱によるDNA損傷量を調べたところ、変化した構造の持続時間と相関が見られた。このことから、H2A-H2Bの構造変化はDNA損傷に応答する何らかの細胞機能によって生じている可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、被加熱細胞由来のヒストンH2A-H2Bの構造が通常のH2A-H2Bおよび試験管内で熱変性させたそれとは異なっていることを初めて示した。これは、細胞内タンパク質の熱ストレスに対する振る舞いは、試験管内の実験のみでは明らかにできないことを示唆する。この知見は、タンパク質研究の発展に寄与するところが大きいと考えられる。また、本研究で扱った温度領域は、がん治療法の一つである温熱療法で用いられるものと同等であり、本研究で確立した測定手法や得られた知見は、温熱療法の作用機序の理解、治療効果の向上に資するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Secondary structure contents of histone H2A-H2B proteins extracted from heated cells were analyzed using synchrotron radiation circular dichroism (CD) spectroscopy to confirm the effects of cell heating on the histone structures. The CD spectra of histone H2A-H2B extracted from the cells heated at 45 and 60 °C differed from those of H2A-H2B both native and denatured in vitro. It indicates that the structural changes of H2A-H2B, which differed from the ordinary thermal denaturation, were induced. The duration of the altered structures seemed to correlate with that of the heat-induced DNA lesions. The structural alterations of H2A-H2B might be induced by cellular functions to resist heat-induced DNA lesions, such as DNA damage repair pathways.

研究分野：生物物理学

キーワード：DNA損傷応答 クロマチン ヒストン 円二色性 放射光

1. 研究開始当初の背景

代表者らはこれまでに X 線を照射した細胞から抽出したヒストンタンパク質が非照射細胞由来のそれとは異なる構造を取っていることを明らかにしてきた[1-3]。タンパク質の構造はその反応を左右する重要な要因であり、また、ヒストンタンパク質は様々な細胞機能に関わっていることから、放射線を照射した細胞由来のヒストンタンパク質で見られた構造変化は、細胞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、この構造変化が X 線照射によって生じる特有の反応であるのか、外部ストレスに対する普遍的な反応であるのかは明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

放射線以外の外部ストレスによってもヒストンタンパク質の構造変化が生じるのかどうかを確かめるために、加熱した細胞からヒストン H2A-H2B タンパク質を抽出し、放射光円二色性 (CD) 分光を用いてその二次構造を調べ、非加熱細胞由来の H2A-H2B と比較を行った。

3. 研究の方法

ヒト子宮頸がん細胞 (HeLa.S.-FUCCI 細胞) を培養し、45 あるいは 60 で 3 時間加熱した。加熱終了直後あるいは加熱後通常の培養環境に 2 時間おいた後にそれぞれの細胞から H2A-H2B を抽出した。H2A-H2B の抽出は市販のキットを用い、既報[1, 2]に従って行った。抽出した H2A-H2B は 250 mM の NaF を添加した 10 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.5) に溶解した。残存する DNA 断片などは遠心ろ過によって取り除いた。10 kDa 以上の画分を回収し、CD 分光測定用の試料とした。SDS-PAGE により H2A-H2B 以外のタンパク質の混入が無視できることを確認した。最終的な H2A-H2B の濃度は吸光度測定により 100-150 μM と決定された。

放射光 CD 分光は、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]。測定には光路長 50 μm の CaF_2 セルを用いた[5]。測定は室温 (25) で行った。H2A-H2B の通常の熱変性による CD スペクトル変化を確かめるために、45 あるいは 60 でも測定を行った。得られた CD スペクトルは BeStSel プログラム[6, 7]を用いて解析し、二次構造成分割合を決定した。

同様の方法で培養、加熱した細胞を用いて、コメットアッセイにより加熱によって生じた DNA 損傷量を調べ、比較した。

4. 研究成果

図 1 に非加熱細胞由来の H2A-H2B を直接加熱した場合に生じる CD スペクトル変化を示す。25 における非加熱細胞由来の H2A-H2B (Control) の CD スペクトルは、190 nm 付近に正、208、222 nm 付近に負のピークを示した (図 1 黒)。H2A-H2B を 45 あるいは 60 に加熱すると、ピーク強度の絶対値は小さくなり (それぞれ図 1 赤、青) 60 に加熱した場合にはピークの短波長側へのシフトが顕著に見られた。これは典型的な熱変性によるスペクトル変化である。CD スペクトルを解析して決定された二次構造成分割合を比較すると、加熱により、 α -ヘリックス構造が減少し、 β -ストランド構造や無秩序構造が増加したことが明らかとなった (表 1)。試料を冷却し、45 から 25 に戻すと CD スペクトル (図 1 緑) および二次構造成分割合 (表 1) は加熱前と一致したが、60 から 25 に戻した場合にはスペクトル、二次構造成分割合は完全には元に戻らなかった (図 1 マゼンタ、表 1)。

図 2 に加熱細胞由来の H2A-H2B の CD スペクトルを示す。比較のために Control の CD スペクトルも併せて示す。45 で 3 時間細胞を加熱し、加熱終了直後に抽出を行った H2A-H2B (45-0) の CD スペクトル (図 2(a) 赤) は Control (図 2(a) 黒) よりもピーク強度の絶対値が大きくなった。このスペクトル変化は、図 1 に示した H2A-H2B の熱変性によるスペクトル変化と異なった。他方、45 で細胞を加熱した後、2 時間培養した細胞由来の H2A-H2B (45-2) の CD スペクトル (図 2(a) 緑) は、Control と誤差範囲で一致した。二次構造成分割合を比較すると、45-0 は Control よりも α -ヘリックス構造が増加した一方で、 β -ストランド構造やターン構造の減少が見られた (表 1)。この変化は、

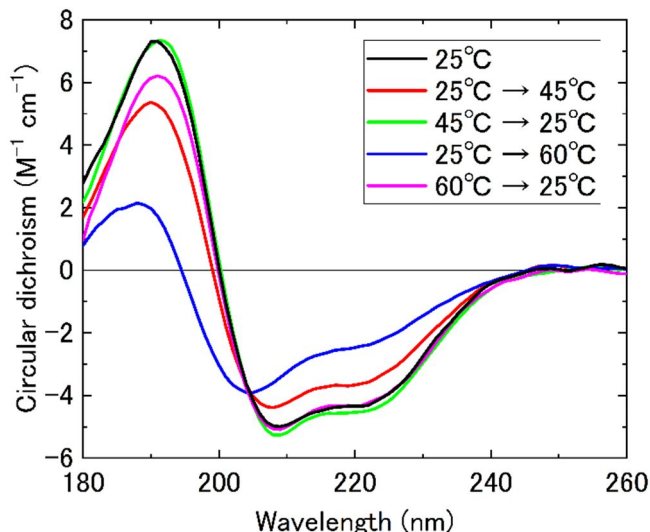


図 1. H2A-H2B 加熱による CD スペクトル変化

-ヘリックス構造が減少し、-ストランド構造、無秩序構造が増加した熱変性試料とは異なる変化である。45-2の二次構造成分割合はControlのそれと誤差範囲で一致した(表1)。これらの結果は、45で加熱された細胞内ではH2A-H2Bの構造に通常の熱変性とは異なる構造変化が生じ、変化した構造は加熱後2時間以内に元に戻ることを示している。

60で細胞を加熱した場合には、加熱後2時間培養してから抽出した試料(60-2; 図2(b)緑)と加熱終了直後に抽出を行った試料(60-0; 図2(b)赤)のCDスペクトルが誤差範囲で一致した。これらのスペクトルはControlおよびControl(図2(b)黒)を60に加熱した場合(図1青)のCDスペクトルとは異なった。60-0および60-2の二次構造成分割合は、45-0と誤差範囲で一致した(表1)ことから、加熱細胞内で生じるH2A-H2Bの構造変化に加熱温度依存性はないが、その持続時間は加熱温度に依存する可能性が示された。

図3にコメットアッセイの結果を示す。45-0のTail momentはControlのそれよりも有意に増加した(有意確率 $p < 0.001$)。45-2では、Controlとの間に有意差はなかった一方で、45-0とは有意に減少した($p < 0.5$)。すなわち、453時間の細胞加熱によりDNA損傷が生じ、加熱後2時間培養環境に置くことでDNA損傷量が減少し、非加熱細胞と同程度になったと考えられる。他方、60で加熱した場合には、60-0、60-2のTail momentはどちらもControlに対して有意な増加が見られた($p < 0.001$)ことから、60の加熱によって生じたDNA損傷の多くは加熱終了後少なくとも2時間にわたって細胞内に残存したと考えられる。このように、細胞加熱によるDNA損傷量は、H2A-H2Bの構造と同様の傾向で変化した。このことは、細胞加熱によって生じるDNA損傷をきっかけとしてH2A-H2Bの構造変化が生じている可能性を示唆する。

細胞加熱によって生じたH2A-H2Bの構造変化、すなわち、-ヘリックス構造の増加および-ストランド構造の減少、はX線を照射した細胞由来のH2A-H2Bに見られたものと同様であった[1, 2]ことから、H2A-H2Bの構造変化は外部ストレスの種類に寄らずDNA損傷をきっかけとして何らかの細胞機能により生じている可能性がある」と結論した。

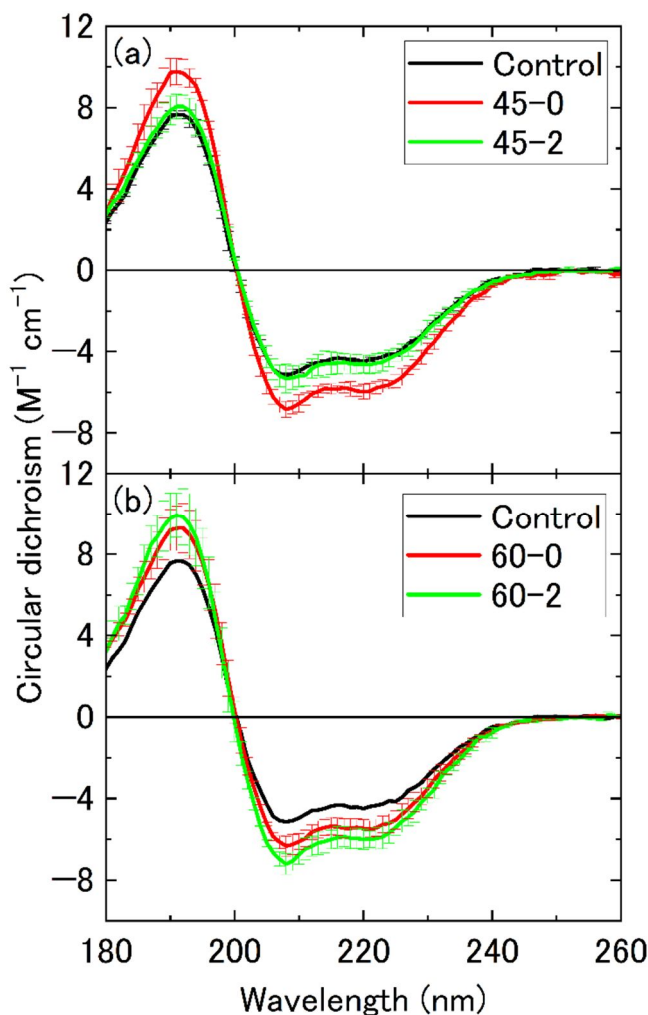


図3. コメットアッセイ結果の箱ひげ図

文献

- [1] Y. Izumi *et al.*, *Radiat. Res.* **184**, 554 (2015)
- [2] Y. Izumi *et al.*, *Biophys. J.* **111**, 69 (2016)
- [3] Y. Izumi *et al.*, *J. Radiat. Res.* **58**, 59 (2017)
- [4] K. Matsuo and K. Gekko, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **86**, 675 (2013)
- [5] K. Matsuo *et al.*, *Anal. Sci.* **19**, 129 (2003)
- [6] A. Micsonai *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, E3095 (2015)
- [7] A. Micsonai *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **46**, W315 (2018)

表 1. H2A-H2B の二次構造成分割合 (%)

	-ヘリックス	-ストランド	ターン	無秩序
Control (25)	39.9±1.9	10.3±1.8	13.3±0.1	36.6±1.0
Control 25 45	28.8	20.8	12.6	37.8
Control 45 25	39.5	9.5	14.3	36.7
Control 25 60	17.2	24.5	14.0	44.2
Control 60 25	32.4	18.8	11.8	37.0
45-0 (25)	52.0±1.4	1.1(+1.5/-1.1)	9.2±0.4	37.6±0.6
45-2 (25)	44.3±3.0	5.3±0.4	13.7±2.0	36.7±0.6
60-0 (25)	49.9±3.9	1.9±1.6	11.7±1.0	36.6±1.3
60-2 (25)	50.8±5.7	1.9(+2.6/-1.9)	8.8±0.6	38.6±2.4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Izumi Yudai, Matsuo Koichi, Yokoya Akinari	4. 巻 35
2. 論文標題 Secondary structural analyses of histone H2A H2B proteins extracted from heated cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chirality	6. 最初と最後の頁 165 ~ 171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/chir.23529	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 泉 雄大
2. 発表標題 加熱ヒトがん細胞由来ヒストンH2A-H2Bの円二色性構造解析
3. 学会等名 第26回HiSOR研究会～生体分子の構造機能研究におけるキララ分光の新しい可能性～（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 泉 雄大、松尾 光一、横谷 明德
2. 発表標題 細胞加熱によって生じるヒストンH2A-H2Bの熱変性とは異なる構造変化
3. 学会等名 量子生命科学会第2回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 泉 雄大、松尾 光一、横谷 明德
2. 発表標題 温熱処理した細胞から抽出したヒストンの円二色性測定
3. 学会等名 第34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 2021年

1. 発表者名 Yudai Izumi, Koichi Matsuo, and Akinari Yokoya
2. 発表標題 Secondary structural analysis of histone H2A-H2B proteins extracted from heated cells
3. 学会等名 19th International Conference on Chiroptical Spectroscopy (CD2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 泉 雄大、松尾 光一、横谷 明德
2. 発表標題 加熱細胞由来ヒストンH2A-H2Bの円二色性測定
3. 学会等名 第37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 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関