

## 1 緒言

われわれヒトを含む真核生物の DNA は、タンパク質複合体であるコアヒストンに巻き付いて存在している。コアヒストンは、H2A, H2B, H3, H4 と呼ばれるヒストンタンパク質が 2 分子ずつ集まって構成されている。最近の研究で、DNA 損傷修復をはじめとした様々な細胞機能の制御にヒストンの化学修飾（翻訳後修飾と呼ばれる）が重要な役割を果たしていることが明らかになっている。たとえば、最も重篤な DNA 損傷のひとつである二重鎖切断損傷の修復時には、損傷周辺の H2AX (2%–25% 含まれる H2A の変異体) のリン酸化をきっかけに、DNA 修復タンパク質が損傷部位に集合、結合することで修復過程が進行することが知られている<sup>1)</sup>。しかしながら、修復タンパク質や修飾酵素がどのように損傷部位と非損傷部位を区別しているかは明らかになっていない。筆者らは、細胞が DNA 損傷に応答してヒストンの構造を変化させており、修復タンパク質はそれを目印として損傷部位を識別しているのではないかと考えた。そこで本研究では、X 線照射により DNA を損傷させたヒトがん細胞からヒストンを抽出し、円二色性 (Circular Dichroism; CD) スペクトル測定を用いてその構造を調べた<sup>2,3)</sup>。

## 2 CD 測定によるタンパク質の構造解析

CD はアミノ酸や糖などのキラル分子、あるいは、それらが結合したタンパク質や DNA, RNA といった

生体高分子が示すことが知られている性質であり、左円偏光に対するモル吸光係数と右円偏光に対するその差として定義される。タンパク質中のあるアミノ酸残基がその近傍のアミノ酸残基とともに二次構造、すなわち、 $\alpha$ -ヘリックス、 $\beta$ -ストランド、ターン、無秩序 (先の 3 つの構造と断定できない部分) 構造、を形成すると、これらの残基間の距離が変化したり、残基間で水素結合が形成されるなど、周辺環境が変化する。このような結合形成や、残基間距離が変化したことによる静電的な相互作用の変化に伴い、そのアミノ酸残基近傍では二次構造形成前とは異なる電子軌道が形成される。また、その変化の具合は形成される二次構造によって異なるため、電子軌道の変化も二次構造ごとに異なる<sup>4)</sup>。したがって、電子軌道の状態を反映する電子遷移の変化 (たとえば、吸収強度の変化) を観測できれば、形成された二次構造に関する情報を引き出すことができる。CD スペクトル測定は、円偏光を用いてこの変化を観測し、タンパク質の構造情報を得る手法である。

実際のタンパク質は複数種類の二次構造を個別の割合で含んでいるので、それぞれの二次構造形成に起因する電子状態変化とその成分比を反映した CD スペクトルが観測される。すなわち、タンパク質の構造の違いが CD スペクトルの形状の違いとして観測される。したがって、複数のタンパク質の CD スペクトルを測定し、見比べるだけで、それらのタンパク質の構造の違いがあるのかどうかを直ちに判別することができるという利点がある。

## 3 実験

培養したヒトがん細胞 (HeLa-S.FUCCI 細胞) に 40 Gy の X 線を照射し、DNA に損傷を与えた。DNA 修復過程を進行させるため 30 分間培養したのち、Histone Purification Kit (Active Motif) を用いてヒストン

Secondary structural changes of histone proteins induced by DNA damage

Yudai Izumi\* (Hiroshima Synchrotron Radiation Center, Hiroshima University),

〒739-0046 広島県東広島市鏡山 2-313

TEL: 082-424-6293, FAX: 082-424-6294,

E-mail: izumi-yudai@hiroshima-u.ac.jp

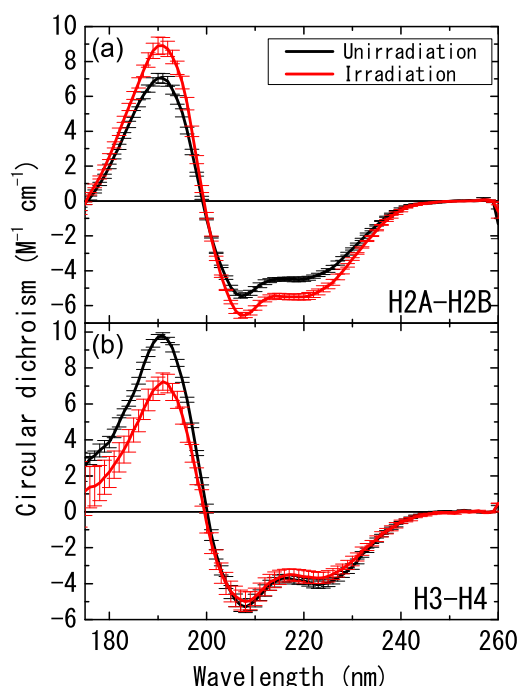


Figure 1. CD spectra of (a) H2A-H2B and (b) H3-H4 extracted from unirradiated (thin line) and irradiated (thick line) cells.

H2A と H2B (H2A-H2B) あるいは H3 と H4 (H3-H4) を抽出した。比較のため、非照射細胞からも同様の方法でヒストンを抽出した。抽出したヒストンを 250 mM NaF を添加した 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) に溶解し、試料とした。

CD スペクトル測定は、H2A-H2B についてはフランスの放射光施設 SOLEIL の DISCO ビームライン<sup>5)</sup>を、H3-H4 に関しては広島大学の放射光施設 HiSOR BL-12<sup>6)</sup>を利用して行った。タンパク質の二次構造解析プログラム SELCON3<sup>7-10)</sup>を用いて CD スペクトル

から H2A-H2B および H3-H4 の二次構造成分を決定した。

#### 4 結果と考察

Figure 1 に H2A-H2B および H3-H4 の CD スペクトルを示す。全てのスペクトルで、190 nm 付近に正のピーク、208 nm、222 nm 付近に負のピークが確認された。これは、 $\alpha$ -ヘリックス構造特有のピークであり、H2A-H2B、H3-H4 が  $\alpha$ -ヘリックス構造を多く含んでいることを示す。これは、ヌクレオソーム (コアヒストンと 146-147 塩基対の DNA との複合体) の結晶構造解析の傾向と一致する<sup>11)</sup>。照射細胞から抽出した H2A-H2B のピーク強度は、非照射細胞の場合に比べて増大していることが見て取れる (Fig. 1(a))。他方、照射細胞由来の H3-H4 では、非照射細胞由来と比べて、負のピークは誤差範囲で一致し、正のピークのみ減少するのが見られた (Fig. 1(b))。CD スペクトルはタンパク質の二次構造の割合を反映する。したがって、この結果は、細胞への X 線照射によって細胞内でヒストンの構造が変化したことを示す。また、H2A-H2B と H3-H4 で異なるスペクトル変化が見られたことから、細胞内で H2A-H2B と H3-H4 にそれぞれ異なる構造変化が生じていることが明らかとなった。これらの変化は、ヒストンに直接 X 線を照射したときに観測される、ヒストンの分解に起因すると思われる CD スペクトル変化<sup>12)</sup>とは異なる。したがって、本研究で観測された CD スペクトル変化は、X 線によるヒストンのダメージによるものではなく、細胞が DNA 損傷にตอบสนองして、何らかの機能によりヒストンの構造を変化させたために生じたと結論した。

構造変化の詳細を明らかにするために、CD スペクトルから各試料の二次構造成分を決定した。結果を Table 1 に示す。H2A-H2B の細胞照射試料では、非照射試料に比べて  $\alpha$ -ヘリックス構造の割合が相対的に増加 (47.7%→63.5%) した。他方、H3-H4 の場合には、

Table 1. Contents of secondary structures as obtained using the SELCON3 program. (U) and (I) indicate the samples extracted from unirradiated and irradiated cells, respectively.

Structure Content (%)	H2A-H2B (U)	H2A-H2B (I)	H3-H4 (U)	H3-H4 (I)
$\alpha$ -Helix	47.7	63.5	61.6	48.3
$\beta$ -Strand	10.7	3.3	1.9	8.0
Turn	14.8	19.6	18.2	19.1
Unordered	22.7	14.8	17.8	26.0

H2A-H2B とは逆に、細胞への X 線照射により、 $\alpha$ -ヘリックス構造の割合が相対的に減少 (61.6%→48.3%) するのが確認された。H2A-H2B および H3-H4 で見られた構造変化が一様でなかったことから、細胞内では DNA 損傷に反応して、通常は球形に近い構造をしているコアヒストンに異方性が生じていると考えられる。DNA 修復の完了まで、DNA の転写、複製などの機能が一時的に停止することが知られているが、コアヒストンの異方性がその機能停止に寄与している可能性が考えられる。

## 5 結言と今後の展望

CD 分光を用いて、DNA 損傷に反応して誘起されるヒストンの二次構造変化を明らかにした。ヒストンの構造変化は、DNA 損傷の修復過程を開始させる積極的な役割を担っていると考えられる。ヒストンの構造変化過程を明らかにするために、個々のヒストンを分離したうえでの CD 測定や、修飾状態の変化などの調査が重要であると考えられる。

### 〈謝 辞〉

共同研究者の横谷明徳博士、藤井健太郎博士 (量研機構)、山本悟史氏 (茨城大 M2)、松尾光一准教授 (広島大)、Drs. Frank Wien, Matthieu Réfrégiers (Synchrotron SOLEIL), Profs. Chantal Houée-Lévin, Sandrine Lacombe, Dr. Erika Porcel, Mses. Daniela Salado-Leza,

Rawand Masoud (パリ南大), Prof. Marie-Anne Hervé du Penhoat (ピエール・マリーキュリー大) に深く感謝いたします。本研究は、日本原子力研究開発機構黎明研究「Initial Processes of Radiation Effects on Genome Stability (代表: M.-A. Hervé du Penhoat)」および科研費若手 B (JP15K16130) の助成を受けて行われました。また、CD スペクトル測定は、SOLEIL (課題番号: 20130831, 20140518) および HiSOR (課題番号: 13-B-18, 14-A-16, 15-A-48) で行われました。

### 〈参 考 文 献〉

- 1) C. R. Hunt *et al.*, *Radiat. Res.*, 179 (2013) 383.
- 2) Y. Izumi *et al.*, *Biophys. J.*, 111 (2016) 69.
- 3) Y. Izumi *et al.*, *J. Radiat. Res.*, 58 (2017) 59.
- 4) 浜口浩三, 武貞啓子, 蛋白質の旋光性< ORD と CD >, 学会出版センター, 東京, 1971.
- 5) M. Réfrégiers *et al.*, *J. Synchrotron Rad.*, 19 (2012) 831.
- 6) M. Sawada *et al.*, *J. Phys.: Conf. Ser.*, 425 (2013) 162010.
- 7) N. Sreerama *et al.*, *Protein Sci.*, 8 (1999) 370.
- 8) N. Sreerama, R. W. Woody, *Anal. Biochem.*, 287 (2000) 252.
- 9) K. Matsuo *et al.*, *J. Biochem.*, 135 (2004) 405.
- 10) K. Matsuo *et al.*, *J. Biochem.*, 138 (2005) 79.
- 11) C. A. Davey *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 319 (2002) 1097.
- 12) Y. Izumi *et al.*, *Radiat. Res.*, 184 (2015) 554.