



展 TENBO 望

クロマチンの凝縮が生み出す放射線耐性



高田 英昭

Takata Hideaki

(大阪大学大学院工学研究科)



前島 一博

Maeshima Kazuhiro

(国立遺伝学研究所
生体高分子研究室)

1 はじめに

私たちの体を構成する1個1個の細胞の中には、全長約2 mにも及ぶDNAが収められている。DNAは直径2 nmの非常に細い糸で、ヒストンと呼ばれるタンパク質に巻きついてヌクレオソームと呼ばれる構造を形成し、それらが数珠状に連なって線維構造(図1)を形成していることが知られている。1976年、イギリスのA. クルーグ(1982年ノーベル化学賞受賞)らは、このヌクレオソーム線維がらせん状に規則正しく折り畳まれて、直径約30 nmのクロマチン線維ができると提唱した。現在広く受け入れられている染色体構造の定説では、染色体はこのクロマチン線維がらせん状に巻かれて100 nmの線維をつくり、次に200~250 nm、更には500~750 nmというように、規則正しいらせん状の階層構造(積み木構造)を形成するとされてきた^{1,2)}。実際、分子生物学の最も有名な教科書である「細胞の分子生物学」では、過去25年以上にわたって、この定説が掲載されて

きた。しかしながら、最近のクライオ電子顕微鏡(高性能な透過型電子顕微鏡に低温(-160℃)のまま観察できる装備を備えたもの)やX線散乱の実験により、生体内の環境に近い状態の染色体の構造を調べると、定説のような規則正しく折り畳まれたクロマチン線維は存在せず、ヌクレオソーム線維が不規則に(かなりいい加減な状態で)細胞内に収められていることが報告されている(図1)^{3,4)}。さらに、分裂期染色体と間期核のクロマチンの構造を比較した結果、両者の構造は類似しており、間期核の中であってもDNAは基本的に不規則に折り畳まれており、凝縮した状態を維持していることが分かってきた⁵⁾。

では、間期核でもDNAを凝縮状態に保つメリットとは何なのだろうか? 本稿では、筆者らが最近見いだしたDNA凝縮の意義を紹介する⁶⁾。地球上の生物は、毎年約2.4 mSvの放射線を自然界から浴びている。放射線はDNAの切断を引き起こすので、これは、生物の生死にかかわる深刻な問題である。DNAが集まって

凝縮している状態が保たれていることは、放射線などの環境ストレスからゲノム情報を守っているのではないかと以前から推測されていた。実際、*in vitro*の実験においてDNAの凝縮が γ 線によるDNAの2本鎖切断を抑制することが報告されている⁷⁻¹⁰。しかしながら、損傷を加えず長いDNAを扱う方法やDNA損傷を高感度かつ定量的に検出する良い方法がなかったことから、これまでは厳密な検証が困難であった。また、ヒドロキシルラジカルがDNAの2本鎖切断の原因となっていることが示唆されてきているものの¹¹⁻¹³、*in vivo*の実験においては、DNA切断の修復機構が存在するため^{14,15}、定量的な解析が困難であった。こうした困難から、クロマチンの構造（凝縮状態）がDNA損傷効率に与える影響はまだはっきりとは分かっていなかった。

2 DNA損傷を定量するシステムの構築

筆者らの研究グループは、クロマチンの凝縮がDNA損傷に与える影響を定量的に解析できるシステムを構築した⁶。DNA損傷を定量的に解析することがこれまで困難だった大きな理由は、ピペッティングなどの実験操作によってDNAに物理的損傷が加わってしまい、放射線の影響のみを厳密に定量することができなかったためである。そこで今回筆者らは、DNAが含まれる核をヒトの培養細胞（HeLa細胞）からそのまま取り出し、薄いガラス（カバーガラス）の上に貼り付けるという方法を採用した（図2）。核を貼り付けたままのカバーガラスをいろいろな反応溶液に浸すことで、実験操作に基づくDNAへの物理的損傷を避けるように工夫した。

核の中のDNAの凝縮状態を変化させるために、二価陽イオンであるマグネシウムイオン

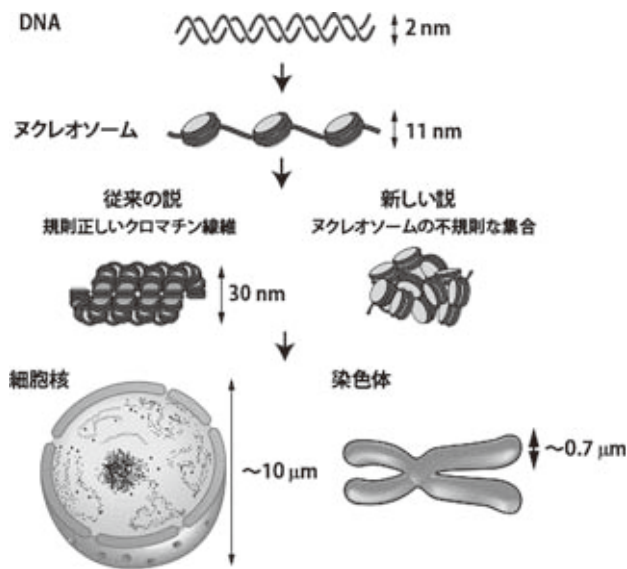


図1 DNAの折り畳みモデル

従来、ヌクレオソームが規則正しくらせん状に折りたたまれて30 nmクロマチン線維を形成していると考えられていたが（左）、最近の研究によりこのようなクロマチン線維は存在せず、ヌクレオソームが不規則に折り畳まれていることが分かってきた（右）

(Mg^{2+})を用いた。DNAの構造単位に含まれるリン酸基は負電荷を帯びているため、リン酸基の負電荷同士には反発し合う力が働き、DNAを凝集しにくくさせている。そこで、 Mg^{2+} を加えることで、DNAに含まれる負電荷を打ち消し、密に凝縮した状態を誘導することができる（図2）。一方、これにEDTAという薬剤を加えると、マグネシウムイオンが取り除かれて陽電荷が打ち消され、DNAの負電荷が元に戻り、DNAは脱凝縮する（図2）。

このように、 Mg^{2+} の濃度の異なる溶液にカバーガラスに貼り付けた核を移すことによって、クロマチンの凝縮状態を変化させた核を用意した（図2）。それに、放射線（ γ 線）照射し、DNA切断がどのくらい起きているかをTUNEL（Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling）アッセイにより検出した。このアッセイでは、DNA切断は蛍光色素のシグナルとして検出されるので、それを高性能CCDカメラで測定することで定量的な解

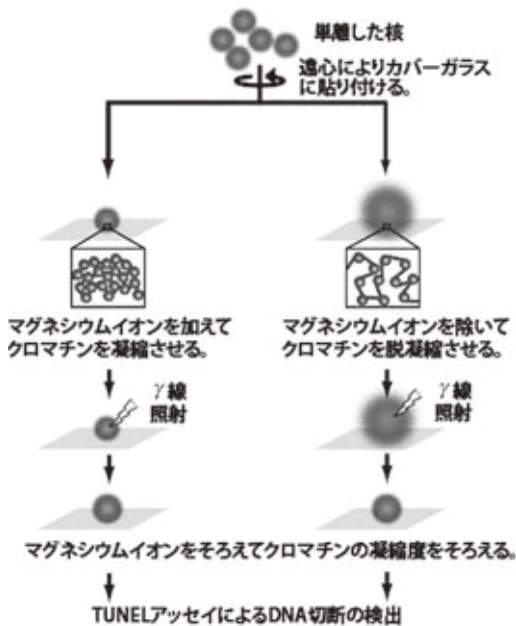


図2 DNA 損傷を定量的に解析するために開発したシステム

ヒト培養細胞から単離した核をカバーガラスに貼り付け、その後の実験操作は全てカバーガラス上で行うことでDNAの物理的な損傷を最小限に抑え、定量的なDNA損傷の解析を可能にした。なお、クロマチンが脱凝縮すると体積が拡大するが、DNA切断を測定する際には、単位体積当たりの切断を測定するため、DNAの凝縮状態を揃える

析が可能となる。実験操作を通じて、核はカバーガラス上に保持されたままなので、作業過程による物理的なDNA損傷を最低限に抑えることができる。

3 クロマチンの凝縮によるDNA損傷の抑制効果

凝縮状態の異なるクロマチンに対して、大阪府立大学の放射線照射施設にてコバルト (^{60}Co) を線源とする高線量の γ 線、国立遺伝学研究所の放射線照射施設にてセシウム (^{137}Cs) を線源とする低線量の γ 線を照射した。これらの放射線照射後、DNA損傷を定量的に解析した結果は、驚くべきものであった。DNA損傷はクロ

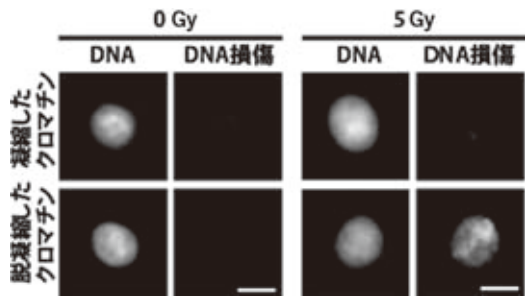


図3 0 Gyと5 Gyの放射線を照射したときのDNA損傷をTUNELアッセイによって検出した結果。5 Gyの放射線を照射すると、クロマチンが凝縮していないときには明るいDNA損傷のシグナルが検出されるが、凝縮しているときにはほとんど検出されない。スケールバーは10 μm を示す

マチンの凝縮状態の違いに非常に敏感であった(図3)。細胞の間期の核における凝縮したクロマチンは、脱凝縮したクロマチンに比べて16倍もの放射線耐性を示した。

凝縮することで放射線に対する耐性を獲得するというクロマチンの性質は、単離した間期の核に限ったことなのだろうか？細胞が分裂するときには、核内のクロマチンは更に凝縮して染色体を形成する(図1)。この時、核を覆っていた核膜は崩壊して存在しないので、単離した分裂期染色体のクロマチンは間期核よりも、より脱凝縮する(広がる)ことができる。したがって、単離染色体のクロマチンの凝縮度は間期核よりも大きく変化する。体積比は50倍にもなった。この染色体を用いた場合、凝縮した状態のクロマチンは、脱凝縮した状態に比べて50倍もの放射線耐性を示した。

では、なぜクロマチンが凝縮していると、DNA損傷を抑えることができるのだろうか？

放射線によるDNA損傷の主な原因は、放射線によって水分子が開裂することにより発生するヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) だと考えられている¹¹⁻¹³。実際に、ラジカルの発生を抑制するラジカルスカベンジャーの存在下では、クロマチンが脱凝縮していても、DNA損傷はほとんど検出されないことが分かった。ヒドロキシ

ルラジカルの寿命は100万分の1秒と非常に短いので、DNAと離れた場所で発生してもDNAに損傷を与えることはできない。もし、クロマチンが凝縮していると、DNAの周りの水分子の数が少なくなるため、放射線を照射したときにDNAの周りで発生するヒドロキシルラジカルの数は少なくなる(図4)。これが、クロマチンが凝縮するほど高い放射線耐性が得られる理由だと考えている。

クロマチンが凝縮することでDNAを保護することができるのはγ線からだけではない。放射線医学総合研究所において、重粒子線がん治療装置(Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba: HIMAC)を用いて間期核のクロマチンに対して重粒子線を照射したところ、クロマチンが凝縮することでDNA損傷を抑制することが分かった。また、抗がん剤として用いられているシスプラチンのDNAへの結合量を誘導結合プラズマ質量分析計(Inductively coupled plasma mass spectrometry: ICP-MS)によって調べたところ、クロマチンが凝縮することでシスプラチンのDNAへの結合量が減少することが分かった。このように、クロマチンが凝縮することでDNA損傷を防ぐという性質は、放射線に限ったものではなく、クロマチンが持つ一般的な性質であることを見いだした。

4 クロマチン凝縮の意義

間期の核内でもクロマチンはある程度凝縮した状態を保っていることがこれまでの研究で示唆されていたが⁵⁾、今回の研究によって、その生物学的意義が明らかになった。生物は、DNAを凝縮させることで、遺伝情報であるDNAが損傷を受けることを防ぐという仕組みを備えていたのである。生物には損傷したDNAを修復する機構も備わっているが、生物進化の初期のDNA修復機構が未発達な段階では、DNAを凝縮させて環境ストレスから守る

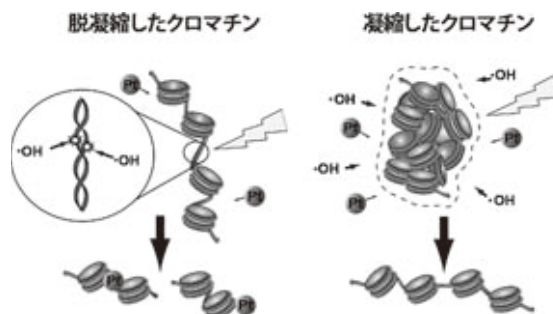


図4 クロマチンの凝縮がDNAを保護するモデル
クロマチンが脱凝縮している時は、DNAは放射線によって発生するヒドロキシルラジカル(活性酸素、 $\cdot\text{OH}$)や抗がん剤(Pt)による損傷を受けやすいが、凝縮している時には、DNAはこれらから保護される

ことは特に大きな利点を持っていたと想像できる。また、真核生物では次世代に伝える重要な遺伝子情報を安全に維持するために、この仕組みを役立てていると思われる。例えば、私たちヒトの卵母細胞は約40年もの間、減数分裂の途中で停止しており、DNAを染色体の状態に高度に凝縮した状態に保っている¹⁶⁾。

今回の成果から、新たながん治療法を確立するためのヒントも得られた。クロマチンの凝縮をゆるめることで、がん治療に用いられている重粒子線や抗がん剤であるシスプラチンに対するDNAの感受性が増加することが示された。このことを利用して、クロマチンの凝縮をゆるめる働きがあるTSAなどのヒストン脱アセチル化酵素阻害剤などを用いてがん細胞のクロマチンの凝縮をゆるめることで、従来行なわれてきた放射線、重粒子線や抗がん剤を用いたがん治療の効率を飛躍的に向上させることが期待できる。

【謝辞】

本研究を進めるに当たり協力いただいた国立遺伝学研究所の花房朋研究員、大阪府立大学の森利明准教授、国立国際医療研究センターの志村まり室長、東レリサーチセンターの飯田豊部長、放射線医学総合研究所の石川顕一研究員、

同志社大学の吉川研一教授，立命館大学の吉川祐子客員教授に感謝いたします。

参考文献

- 1) Maeshima, K., Hihara, S., and Eltsov, M., Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist in vivo? *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **22**, 291–297 (2010)
- 2) Maeshima, K., Hihara, S., and Takata, H., New insight into the mitotic chromosome structure: irregular folding of nucleosome fibers without 30-nm chromatin structure, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **75**, 439–444 (2010)
- 3) Eltsov, M., Maclellan, K.M., Maeshima, K., Frangakis, A.S., and Dubochet, J., Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 19732–19737 (2008)
- 4) Nishino, Y., Eltsov, M., Joti, Y., Ito, K., Takata, H., *et al.*, Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure, *EMBO J.*, **31**, 1644–1653 (2012)
- 5) Joti, Y., Hikima, T., Nishino, Y., Kamada, F., Hihara, S., *et al.*, Chromosomes without a 30-nm chromatin fiber, *Nucleus*, **3**, 404–410 (2012)
- 6) Takata, H., Hanafusa, T., Mori, T., Shimura, M., Iida, Y., *et al.*, Chromatin compaction protects genomic DNA from radiation damage, *PLoS One*, **8**, e75622 (2013)
- 7) Yoshikawa, Y., Mori, T., Magome, N., Hibino, K., and Yoshikawa, K., DNA compaction plays a key role in radioprotection against double-strand breaks as revealed by single-molecule observation, *Chem. Phys. Lett.*, **456**, 80–83 (2008)
- 8) Spothem-Maurizot, M., Ruiz, S., Sabattier, R., and Charlier, M., Radioprotection of DNA by polyamines, *Int. J. Radiat. Biol.* **68**, 571–577 (1995)
- 9) Warters, R.L., Newton, G.L., Olive, P.L., and Fahey, R.C., Radioprotection of human cell nuclear DNA by polyamines: radiosensitivity of chromatin is influenced by tightly bound spermine, *Radiat. Res.*, **151**, 354–362 (1999)
- 10) Douki, T., Bretonniere, Y., and Cadet, J., Protection against radiation-induced degradation of DNA bases by polyamines, *Radiat. Res.*, **153**, 29–35 (2000)
- 11) Nygren, J., Ljungman, M., and Ahnstrom, G., Chromatin structure and radiation-induced DNA strand breaks in human cells: soluble scavengers and DNA-bound proteins offer a better protection against single-than double-strand breaks, *Int. J. Radiat. Biol.*, **68**, 11–18 (1995)
- 12) Krisch, R.E., Flick, M.B., and Trumbore, C.N., Radiation chemical mechanisms of single- and double-strand break formation in irradiated SV40 DNA, *Radiat. Res.*, **126**, 251–259 (1991)
- 13) Milligan, J.R., Aguilera, J.A., and Ward, J.F., Variation of single-strand break yield with scavenger concentration for plasmid DNA irradiated in aqueous solution, *Radiat. Res.*, **133**, 151–157 (1993)
- 14) Chapman, J.R., Taylor, M.R., and Boulton, S.J., Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice, *Mol. Cell.*, **47**, 497–510 (2012)
- 15) Polo, S.E., and Jackson, S.P., Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications, *Genes Dev.*, **25**, 409–433 (2011)
- 16) Sadler, T., Langman’s Medical Embryology 11th edition, Lippincott Williams & Wilkins (2010)