



# 展 TENBO 望

## 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



**泉 雄大**  
*Izumi Yudai*  
(広島大学放射光科学研究センター)



**山本 悟史**  
*Yamamoto Satoshi*  
(茨城大学大学院理工学研究科)



**藤井 健太郎**  
*Fujii Kentaro*  
(量子科学技術研究開発機構量子ビーム科学研究部門)



**横谷 明德**  
*Yokoya Akinari*

### 1 はじめに

我々の細胞核内に存在する DNA が損傷を受けると、突然変異やがんなどの原因になり得る。こう聞くと、DNA の損傷をなるべく避けて生活したいと誰しも考えるわけであるが、日常生活で生じる DNA 損傷の犯人は太陽光に含まれる紫外線<sup>1)</sup>や呼吸によるエネルギー生成の副産物である活性酸素種<sup>2)</sup>などであり、それから逃れることは難しい。残念ながら、今この瞬間にも我々の DNA は絶えず傷ついている。我々が受ける DNA 損傷の数は、通常の代謝の過程だけで1日、1細胞当たり5万から50万<sup>3)</sup>とも言われており、喫煙や放射線治療などによってさらにその数は増加する<sup>4)</sup>。このような大量の損傷を絶えず受けながらも、我々の多くが健康に暮らすことができているのは、細胞の中に DNA 損傷を直ちに修復するシステムが備わっているからである<sup>5)</sup>。

我々の二重らせん DNA は、大量のコアヒストンと呼ばれるタンパク質複合体にそれぞれ約1.7周ずつ巻き付いた状態<sup>6)</sup>で塊となって細胞核中に存在している(これが、生物の教科書等で見かける染色体である)。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(一部、アミノ酸配列

の異なるバリエーションと呼ばれる異性体に置換されている場合がある)各2分子から成る<sup>6)</sup>。最近の研究で、DNA 損傷修復過程をはじめとした様々な細胞機能において、ヒストンの化学修飾が重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。例えば、重篤な損傷である DNA 二重鎖切断損傷 (DNA double strand break; DSB) の修復過程の初期段階では、DSB を検出した MRN コンプレックスと呼ばれるタンパク質複合体が、リン酸化酵素の一つである ATM を DSB 付近にリクルートし、ATM が DSB 近傍にあるヒストン H2AX (H2A のバリエーション) をリン酸化する。その後、リン酸化された H2AX とリクルートされた MDC1 タンパク質が結合する……といったように、DNA 修復に必要な酵素、タンパク質が DSB 箇所にリクルートされ、その近傍にあるヒストンの化学修飾や、ヒストンとの結合を繰り返しながら修復過程が進行していくことが知られている<sup>5)</sup>。

このような研究成果を受けて、近年、ヒストンの修飾酵素やその修飾残基、また、その役割が精力的に研究されている。しかしながら、筆者らの興味は、少し別の所にある。それは、修復過程の紹介の中で、何の説明もなく現れ、おそらく多くの読者が面食らったであろう、現代生命科学の分野ではごく

当たり前に使用される専門用語の“リクルート”についてである。

“リクルート”は、英単語 recruit をそのままカタカナ表記したもので、“呼んでくる/呼ばれる（リクルートする/される）”といったニュアンスで酵素などの生体分子を擬人化した表現であり、生物学以外の例えば物理学の研究者にとっては、非常に違和感のある言葉である。酵素やタンパク質を擬人化すると、

- ・MRN コンプレックスはどうやって ATM を“呼んだ”のだろうか？
- ・“呼ばれた” ATM は、1組の DNA あたり 100 万分子はあろうかという H2AX の中から、どうやって DSB 近くにあるものだけをピンポイントで選ぶことができるのだろうか？

といった疑問がわいてこないだろうか？

MRN が ATM に繋がったロープを持っていて、それを引っ張って“リクルート”しているならば話は簡単だが、今のところ、そのような報告はない。別のアイデアとして、MRN が DSB 近傍で ATM を呼ぶための“物質”を放出し、それを受け取った ATM が“物質”の来た道をたどりながら DSB 箇所まで移動するというような過程が考えられるかもしれない。ただこの場合、“物質”はおそらく細胞核内でランダムに拡散し、ATM に届く保証はないし、運よく ATM が“物質”を受け取れたとしても、ランダムに拡散した“物質”の経路を逆に辿ることは難しそうである。

このように、DSB 修復過程の研究分野において（あるいは、全ての現代生物学分野においてさえ）何も疑問に思われないで多用されている“リクルート”であるが、じっくり考えてみると、いったい何がどうなっているのか全く説明がなされていないことに気付く。そこで筆者らは、“リクルート”の過程において、酵素などがどのように DSB 周辺のヒストンとそれ以外のヒストンを如何に識別しているのかという点に着目し、以下の仮説のもとに研究を行うことを考えた。

- (1) DSB 修復の初期過程で、細胞が DSB 近傍のヒストンの構造を変化させている。
- (2) その構造変化したヒストンを目印として酵素やタンパク質は“リクルート”され、機能する。前置きが長くなってしまったが、本稿では、筆者

らの仮説(1)を検証した研究結果<sup>7)</sup>と、その研究で用いた円二色性分光によるタンパク質の構造研究手法を紹介する。

## 2 円二色性分光

円二色性 (Circular Dichroism ; CD) は、アミノ酸や糖などのキラル分子やこれらが繋がったタンパク質や DNA, RNA といった生体高分子が示す性質で、左円偏光に対する吸収強度と、右円偏光に対するそれに差が生じる現象である<sup>8)</sup>。ここで、円偏光とは、光の進行方向に垂直な面内において、光の電場ベクトル（および磁場ベクトル）の先端の軌跡が円を描く光のことである<sup>9)</sup>。電場ベクトルの先端が左（右）回りで円を描きながら観測者に向かってくる光を左（右）円偏光と呼ぶ。波長  $\lambda$  における溶液試料の CD は、波長  $\lambda$  の左円偏光に対するモル吸光係数  $\epsilon_L$  と同じ波長の右円偏光に対するモル吸光係数  $\epsilon_R$  の差

$$CD(\lambda) = \epsilon_L(\lambda) - \epsilon_R(\lambda)$$

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つと断定できない、その他の部分）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。このときに生じる電子軌道の変化を観測し、構造情報を得る手法が本稿で扱う CD スペクトル測定である<sup>8)</sup>。

ほとんどのタンパク質は、全ての二次構造を含んでいるので、実際に観測される CD スペクトルは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ものとなる<sup>8)</sup>。どの二次構造がどういった割合で含まれるかは CD スペクトルを解析しなければわからない。しかし、二次構造成分比の違い  $\equiv$  立体構造の違いは、CD スペクトルの形状の違いとして明瞭に現れる<sup>10)</sup>。したがって、複数のタンパク質の CD スペクトルを測定し、その形状を見比べれば、それらのタンパク質の構造に違いがあるかどうかを直ちに判別することができる。

### 3 ヒストンの DNA 損傷誘起構造変化

先に述べた仮説 (1) “DSB 修復の初期過程で、細胞が DSB 近傍のヒストンの構造を変化させている”を検証するために、DSB を与えた細胞からヒストン H2A-H2B を抽出し、CD 分光によりその構造変化を調査した<sup>7)</sup>。

培養したヒトがん細胞 (HeLa.S-FUCCI) に X 線を照射した (吸収線量 40 Gy)。これにより、1 細胞核あたり 1,600 の DSB が生じたと見積もられる<sup>11)</sup>。照射後、DSB 修復を促すために、30 分間培養したのち、Histone Purification Kit (Active Motif) を用いて H2A-H2B (これらのバリエーションや修飾を受けたものを含む) を抽出した (以下、細胞照射試料と呼ぶ)。比較のために、非照射の細胞からも同様の方法で H2A-H2B の抽出を行った (非照射試料)。また、X 線照射により直接 H2A-H2B が分解される影響を評価するために、非照射細胞から抽出した H2A-H2B の水溶液に X 線を照射した試料 (ヒストン照射試料) も用意した。試料溶液を光路長 1 mm の石英セルに入れ、円二色性分散計 (J-725, 日本分光) を用いて CD スペクトル測定を行った。

測定結果を図 1 に示す。非照射試料の CD スペクトルでは、波長 208, 222 nm 付近に負のピークが確認された。これは、 $\alpha$ -ヘリックス構造が示す特徴的な CD ピーク<sup>10)</sup> であり、H2A-H2B の主要な構造が  $\alpha$ -ヘリックス構造であることを示す。この結果は、結晶構造解析の結果と良く整合している<sup>6)</sup>。細胞照射試料でも同様に、波長 208, 222 nm 付近に負のピークが確認されたが、その強度は非照射試料に比べて負側に増大した。他方、ヒストン照射試料の場合、非照射および細胞照射試料とはスペクトル形状が異なり、その強度も正側に増大した。先に述べた通り、CD スペクトルは、タンパク質の二次構造成分比を反映する。したがって、図 1 の結果から、細胞照射およびヒストン照射試料中の H2A-H2B の構造は、非照射試料のそれとは異なり、変化していることがわかった。

それぞれの試料の二次構造成分比を調査するために、二次構造解析プログラム SELCON3<sup>12,13)</sup> を用いて、CD スペクトルの解析を行った。結果を表 1 に示す。解析により、照射試料では、 $\alpha$ -ヘリックスの成分量が 45.9% から 62.6% に相対的に増加し、そ

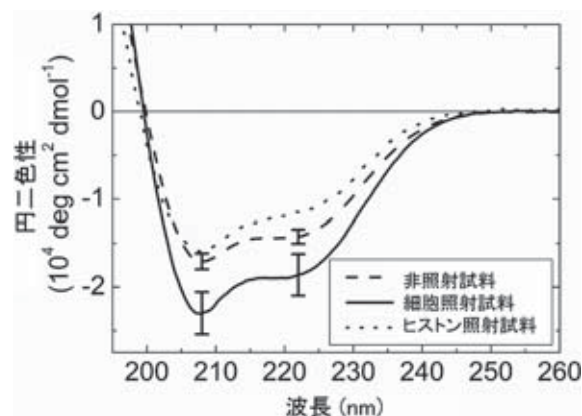


図 1 (破線) 非照射試料, (実線) 細胞照射試料, (点線) ヒストン照射試料の CD スペクトル

表 1 SELCON3 を用いた二次構造成分の解析結果 (単位: %)

	非照射	細胞照射	ヒストン照射
$\alpha$ -ヘリックス	45.9	62.6	38.4
$\beta$ -ストランド	10.4	4.5	14.7
ターン	17.0	13.5	18.4
無秩序	27.7	22.1	29.5

の結果、それ以外の成分が減少していることがわかった。他方、ヒストン照射試料では、逆に、 $\alpha$ -ヘリックスの成分量が 45.9% から 38.4% に相対的に減少し、そのほかの成分量が相対的に増加した。

ヒストン照射試料で見られたスペクトル変化の傾向は、タンパク質の分解 (ペプチド結合の切断) に起因するスペクトル変化<sup>14)</sup> と一致することから、ヒストン照射試料中では X 線のダメージによる H2A-H2B の分解 (ペプチド結合の切断) が起こったと考えられる。また、細胞に X 線を照射した場合に H2A-H2B に生じる構造変化 (細胞照射試料) と H2A-H2B 水溶液に X 線を照射した場合に生じる構造変化 (ヒストン照射試料) は異なること、すなわち細胞照射試料で観測された構造変化は、X 線による H2A-H2B の分解によるものではないことが示された。これらの結果から、細胞照射試料中の 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誘発されたと結論した。

以上のように、筆者らが立てた仮説の通り、“DSB 修復の初期過程で、細胞が DSB 近傍のヒストンの構造を変化させている”ことが CD スペクトル測定から示された。しかしながら、現時点では、



仮説(2) “その構造変化したヒストンを目印として酵素やタンパク質は“リクルート”され、機能する”に関する検証はまだ成されていない。また、どのような過程でヒストンの構造が変化しているのかに関しても明らかになっていない。これらの検証には、分子生物学的な研究手法も併用して研究を進めることが肝要である。本研究をきっかけとして、DNA損傷応答に関する研究の新たな展開を期待したい。

## 4 おわりに

DNA 損傷応答、特に修復機構に関しては、これまでに数多くの研究が成され非常に多く知見が得られている。しかしながら、1 節で述べたように、これまで注目されてこなかったが、酵素(タンパク質)の“リクルート”のメカニズムは全く不明である。放射線による DNA 損傷とその修復は、生命を維持する上で非常に重大なプロセスであり、それゆえ損傷修復機構の全容解明は、福島の問題を抱える私たち日本人だけではなく、地球上の生命に共通する重要な研究課題であると考えられる。これが解明されることにより、例えば薬剤で DNA 修復を促進させることができるようになるかもしれない。このような技術が開発されることにより、放射線がん治療において、がん細胞周辺の正常組織の放射線障害を抑制・防止したり、被ばく事故時の放射線障害を低減化に繋がることを期待される。

DNA 損傷修復過程の研究は、生物学に限らず、他の様々な分野の研究者がそれぞれの知見を持って取り組むべき重要、かつ、興味深い研究課題である。本稿が、Isotope News で繋がる様々な分野の研究者がこれらの研究に参画していくきっかけとなれば幸いである。

## 【謝辞】

本稿で紹介した研究は、日本原子力研究開発機構黎明研究「Initial Processes of Radiation Effects on Genomic Stability (代表: M. -A. Hervé du Penhoat (フランス ピエール・マリーキュリー大学))」及び科研費若手(B)(15k16130)の助成を受けて行われました。また、CD スペクトル測定は、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行われました。

## 参考文献

- 1) J. Cadet *et al.*, *Mutat. Res.* **571**, 3-17 (2005)
- 2) R.D. Bont and N. van Larebeke, *Mutagenesis* **19**, 169-185 (2004)
- 3) L. Zannini, D. Delia, and G. Buscemi, *J. Mol. Cell Biol.* **6**, 442-457 (2014)
- 4) A. Ciccica and S.J. Elledge, *Mol. Cell* **40**, 179-204 (2010)
- 5) H. van Attikum and S.M. Gasser, *Trends Cell Biol.* **19**, 207-217 (2009)
- 6) C.A. Davey *et al.*, *J. Mol. Biol.* **319**, 1097-1113 (2002)
- 7) Y. Izumi *et al.*, *Radiat. Res.* **184**, 554-558 (2015)
- 8) 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(1971)
- 9) 物理学辞典編集委員会 編, 物理学辞典, pp.220 円偏光, 培風館(1992)
- 10) N. Greenfield and G.D. Fasman, *Biochem.* **8**, 4108-4116 (1969)
- 11) C. von Sonntag, “Free-radical-induced DNA damage and its repair”, Springer-Verlag (2006)
- 12) N. Sreerama *et al.*, *Protein Sci.* **8**, 370-380 (1999)
- 13) N. Sreerama and R.W. Woody, *Anal. Biochem.* **287**, 252-260 (2000)
- 14) F. Wien *et al.*, *J. Synchrotron Rad.* **12**, 517-523 (2005)