

論文審査の結果の要旨

氏名 香川 亘

Rad52 は、真核生物の相同組換えによる DNA 修復機構において中心的な役割を果たすタンパク質である。相同 DNA 組換え反応において、切断を受けた DNA と同じ塩基配列を持った DNA を無傷の染色体の中から見つけ出す「相同的対合反応」が中心的な反応であり、Rad52 はこの反応に関与することが示唆されている。本論文では、ヒト Rad52 の生化学的解析および X 線結晶構造解析を行い、Rad52 の相同的対合反応における分子機構の研究を行っている。

第 2 章では Rad52 の相同的対合活性の生化学的解析について述べている。ヒトの Rad52 遺伝子からは、418 アミノ酸からなる全長型および C 末端半分の領域が欠失したスプライシングバリエーションである短縮型 (226 アミノ酸) の 2 種が転写されている。まず、全長型をリコンビナントタンパク質として大量精製を行っている。そして、試験管内組換え反応系 (D-loop formation assay) を用いて、全長型 Rad52 は、単独で相同的対合反応を触媒することを明らかにしている。次に、その触媒ドメインを同定するために、全長型のプロテアーゼによる限定分解を行っている。そして、短縮型に対応する N 末端側の 237 アミノ酸領域がプロテアーゼに耐性であることを見いだしている。このフラグメントを全長型と同様に大量精製を行い、相同的対合活性を調べた結果、全長型と同レベルの活性を有することが明らかになった。これらの結果は、短縮型は Rad52 の相同的対合反応の触媒ドメインであり、そしてプロテアーゼに耐性な高次構造を形成することを示している。

第 3 章では、Rad52 の立体構造について述べている。論文提出者は、Rad52 の相同的対合ドメインの立体構造を決定するために、Rad52 の 1 番目から 212

番目のアミノ酸領域からなるフラグメントをデザインし、優れた単結晶を作成している。そして、セレノメチオニン置換体を用いた多波長異常分散法により、Rad52₁₋₂₁₂ の立体構造を決定している。その結果、Rad52₁₋₂₁₂ は、11 量体のリング構造であった。次に、Rad52₁₋₂₁₂ の DNA 結合領域を同定するために、リングの表面電荷の計算を行っている。そして、DNA 結合領域はリングの外周に存在する溝であることが推測された。実際、単鎖および二重鎖 DNA 結合に直接関与するアミノ酸残基をアラニンスキャニング変異導入法により同定を行っている。作成した 12 種の変異体のうち、5 種は DNA 結合活性が著しく低下していることが明らかになった。そして、これらの残基は、いずれも DNA 結合に関与すると予想された溝の中に側鎖をつきだしていた。これらの知見から、論文提出者は、Rad52 は溝においてリングの外周に巻き付ける形で DNA と結合して相対的対合反応を触媒するメカニズムを提案している。

さらに、論文提出者は、電子顕微鏡解析および分子量を精密に測定できる沈降平衡法により全長型 Rad52 は 7 量体リング構造であることを示している。このように、同一遺伝子から作られる 2 つのタンパク質が 7 量体と 11 量体という異なった会合体を形成する例は初めてである。そこで、Rad52₁₋₂₁₂ の単量体の立体構造を使って、全長型の 7 量体構造のモデルを構築している。そしてこのモデル構造においても、Rad52₁₋₂₁₂ と同様に DNA 結合に重要な溝がリングの外周に存在し、全長型と短縮型の間で同程度の相対的対合活性を有する生化学的解析結果と一致している。またこの 7 量体のモデル構造では、モノマー間におけるβシートの間隔が 10 Å 開き、実際の 7 量体リング構造では、C 末端側の領域がモノマー・モノマーインターフェースの形成に関与することを考察している。

なお、本論文は、東京大学大学院理学部の横山茂之教授、濡木理助教授、石谷隆一郎君、深井周也君、および理化学研究所の胡桃坂仁志研究員、柴田武彦主任研究員、井川肅子研究員との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

従って、博士（理学）の学位を授与できると認める。