

## 論文内容の要旨

論文題目 Functional Analyses of the Human DNA Repair Proteins  
Rad51B and the BCDX2 Complex  
(ヒト DNA 修復タンパク質 Rad51B と BCDX2 複合体の機能解析)

氏名 横山 浩

遺伝情報の正確な複製と子孫への伝達は、全ての生物において最も基本的な特性である。しかし、細胞の染色体は、様々な外的・内的要因によって常に損傷を受けている。これらの DNA 損傷の中で染色体の二重鎖切断は、細胞にとって最も致命的であり、正確に修復されなければゲノム不安定化が引き起こされる。染色体の二重鎖切断は、放射線、DNA 架橋変異原物質、通常の細胞内代謝によって生じる活性酸素などによって生成される。更に、DNA 鎖に損傷があると複製フォークの進行が阻害され、染色体の二重鎖切断が生じることが知られている。相同組換え修復は、染色体の二重鎖切断を切断されていない相同染色体を鋳型として正確に修復する機構である (図 1)。従って、相同組換え修復は、染色体の安定維持に大変重要な役割を果たしている。ゲノム不安定化は細胞の癌化への原因の一つであるから、染色体の安定維持機構の解明は非常に注目されている。

相同組換え修復の基本的メカニズムは、原核生物から高等真核生物に至るまで高度に保存されている。二重鎖切断された染色体末端は、エキソヌクレアーゼによって 5'末端から 3'末端方向に分解され、3'末端が突出した 1 kb 程度の一本鎖 DNA (ssDNA) が生成する。その ssDNA は切断されていない相同染色体の相同領域に侵入して、3'末端から DNA ポリメラーゼによって伸張される。その後、切断された染色体と鋳型染色体由来の 4 本の DNA 鎖から成るホリデイジャンクション (HJ) と呼ばれる中間体が形成される。HJ が移動して解離することによって、相同組換え修復は完了する。相同組換え修復において、HJ が生成するまでの

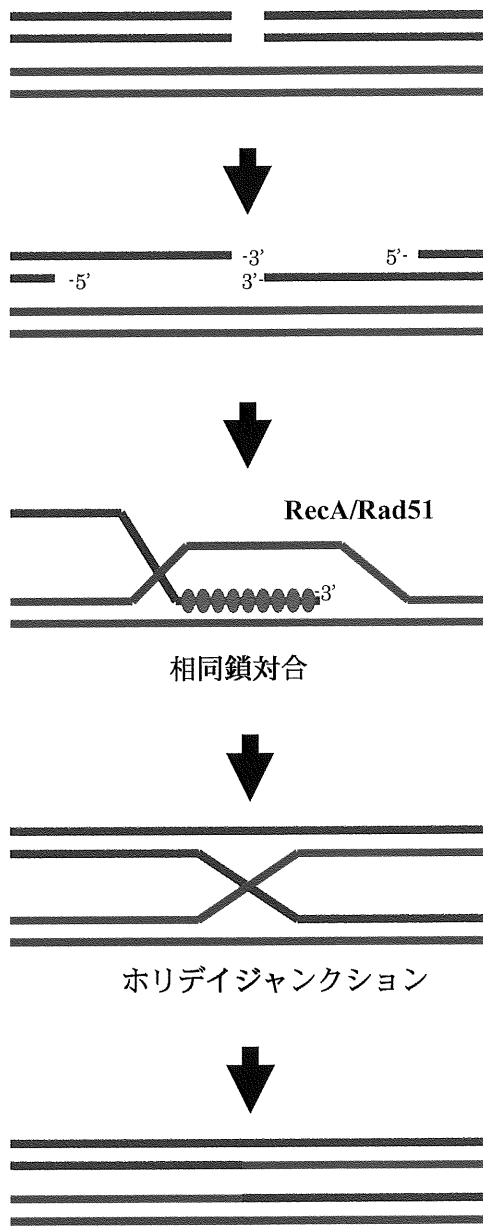


図1 相同組換え修復

過程を初期過程、それ以降の過程を後期過程と呼ばれている。

大腸菌の RecA タンパク質は、相同組換え修復の初期過程において中心的役割を担っている。RecA は 3' 末端突出 ssDNA 上に規則正しく結合して、ヌクレオプロテインフィラメントと呼ばれる構造体を形成する。このヌクレオプロテインフィラメントを形成することにより RecA は、相同鎖検索と対合を行う。RecA のホモログである真核生物の Rad51 タンパク質は、RecA と似た組換え活性を持っており相同組換え修復の初期過程において重要なタンパク質である。二重鎖切断を誘導する試薬で細胞を処理した後に蛍光顕微鏡で Rad51 の細胞内局在を観察すると、nuclear foci と呼ばれる核内にドット状の形体が見られる。この Rad51 nuclear foci は、Rad51 によって形成されたヌクレオプロテインフィラメントであると考えられている。脊椎動物では、Rad51 の他に RecA と相同性を持つ 5 つのタンパク質 (Rad51B, Rad51C, Rad51D, Xrcc2, Xrcc3) の存在が近年になって明らかにされ、Rad51 パラログと呼ばれている。これは、原核生物と比較して真核生物のゲノムサイズが非常に長く、その安定維持のためにより複雑な修復機構を必要とするので Rad51 パラロ

グが存在すると推測されている。Rad51 パラログ遺伝子の欠損した細胞は、自発的なゲノム不安定化を示し、DNA 損傷薬剤に対して高感受性である。更にその欠損細胞は、Rad51 nuclear foci の形成機能が著しく低下しており、相同組換え修復に異常が見られる。また、Rad51 パラログ遺伝子ノックアウトマウスは、胎生致死である。従って、Rad51 パラログは相同組換え修復に関与し、染色体の安定維持に重要な機能を担っている。

5 つの Rad51 パラログは、2 種類のタンパク複合体を形成できることが報告されている。Rad51B, Rad51C, Rad51D, Xrcc2 から成る BCDX2 複合体と、Rad51C と Xrcc3 から成る Rad51C/Xrcc3 複合体である。また、BCDX2 複合体の一部である Rad51D/Xrcc2 複合体も組換

タンパク質として精製されている。Rad51C/Xrcc3 複合体と Rad51D/Xrcc2 複合体が、RecA と似た相同鎖対合活性を持つことが生化学的実験により示されており、Rad51 パラログが相同組換え修復の初期過程に関与する可能性が示唆されている。Rad51B タンパク質も相同組換え修復の初期過程に関与すると考えられているが、その役割は不明である。そこで本研究は、Rad51B と Rad51B が含まれている BCDX2 複合体の相同組換え修復における機能を生化学的に明らかにすることを目的として、実験を行った。

ヒト Rad51B タンパク質を大腸菌で発現させ、3 種類のカラムを用いて単一のタンパク質として高純度に精製する系を確立した。そのタンパク質を用いて、DNA 結合活性を測定した。その結果、Rad51B は、ATP と  $Mg^{2+}$  または  $Mn^{2+}$  依存的に ssDNA と二本鎖 DNA (dsDNA) の両方に結合することが分かった。さらに、Rad51B は DNA 依存的に ATP アーゼ活性を示した。次に、相同組換え修復の初期過程の反応である相同鎖対合活性を測定したところ、その活性は検出されなかった。この結果は、Rad51B は Rad51 や他の Rad51 パラログとは異なる特異な役割を持つことが示唆された。そこで、相同組換え後期過程で作用する可能性を検討するために、HJ を基質とした DNA 結合活性を測定した。その結果、Rad51B は HJ に高い結合親和性を示した。次に、HJ、Y 型 DNA、dsDNA を基質とした競合的 DNA 結合実験を行った。その結果、Rad51B は、HJ に優先的に結合した (図 2)。

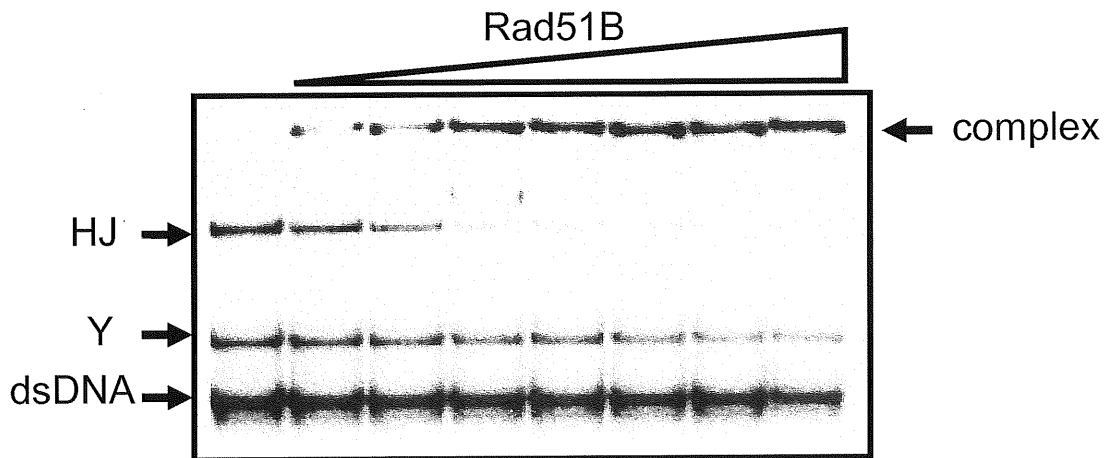


図 2 Rad51B の競合的 DNA 結合実験

次に、BCDX2 複合体の生化学的解析を行った。BCDX2 複合体は、BCDX2 複合体の一部である Rad51B/Rad51C 複合体と Rad51D/Xrcc2 複合体から再構成した。Rad51B/Rad51C 複合体と Rad51D/Xrcc2 複合体を別々に大腸菌で発現させ、両方の大腸菌を混合して破碎した。その可溶性画分を 2 種類のカラムで共精製を行い、BCDX2 複合体を調整することができた。BCDX2 複合体の複合体形成を免疫沈降法で確認したところ、安定な複合体が形成されていることが分かった。この結果から、Rad51B は BCDX2 複合体として細胞内で存在して、相同組換えに関与する可能性が示唆された。BCDX2 複合体の会合状態を、ゲル濾過で解析した。その結果、BCDX2 複合体はポイド付近に溶質され、BCDX2 複合体は 600 kDa 以上の巨大な複合

体であり、リングやフィラメント構造を形成している可能性が推測された。また、BCDX2 複合体は ssDNA と dsDNA の両方に結合し、ATP アーゼ活性を示した。次に、BCDX2 複合体の 7 種類の DNA 基質 (ssDNA, dsDNA, 5'-tailed dsDNA, 3'-tailed dsDNA, nicked duplex, Y 型 DNA, HJ) に対する競合的 DNA 結合実験を行った。その結果、BCDX2 複合体は、枝分かれ構造を持つ DNA (Y 型 DNA と HJ) に対して優先的に結合する活性を持つことが分かった。次に、プラスミドサイズの DNA 基質を使ってアニーリング活性を測定したところ、BCDX2 複合体はその活性を持つことが分かった (図 3)。また、BCDX2 複合体の遺伝子を HeLa 細胞に導入して Rad51B の細胞内局在を、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、Rad51B は DNA 損傷薬剤処理の後、nuclear foci を形成することが分かった。この Rad51B-nuclear foci は、Rad51B のみを細胞に遺伝子導入した場合は観察されなかったので、Rad51B は BCDX2 複合体として nuclear foci を形成している可能性が推測された。

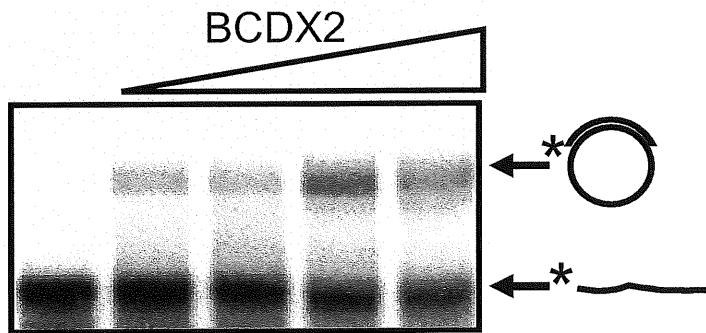


図 3 BCDX2 複合体のアニーリング実験

以上の結果から、Rad51B は細胞内で BCDX2 複合体を形成して、様々な機能を果たす可能性が推測される。BCDX2 複合体は、枝分かれ構造を持つ DNA (Y 型 DNA と HJ) に優先的に結合する活性を持っている。この活性から、BCDX2 複合体は HJ に結合して、

そのプロセッシングに参与する可能性が示唆される。従来、Rad51 パラログは、相同組換え修復の初期過程でのみ機能すると考えられてきた。この結果は、Rad51 パラログが相同組換え修復の後期過程で機能する可能性を初めて示唆しているので、大変興味深い。また、近年になって様々な経路の相同組換え修復が存在することが分かってきた。その中で、HJ を経由しない synthesis-dependent strand-annealing (SDSA) 経路が知られている。SDSA 経路では Y 型 DNA が中間体として形成され、その Y 型 DNA の分岐点があニーリング反応で移動することが考えられている。BCDX2 複合体は SDSA 経路において、その Y 型 DNA に結合して移動させる可能性が推測される。また、DNA 損傷によって複製フォークの進行が阻害された場合、HJ を経由して修復されることが提唱されている。この停止した複製フォークの修復にもアニーリング反応が重要であることが知られている。従って、BCDX2 複合体はこの停止した複製フォークの修復にも関与する可能性が示唆される。