

論文審査結果の要旨

氏名 皿井 直敬

Rad54B は、相同組換えによる DNA 修復機構において重要な役割を果たすタンパク質である。ヒトを含む高等真核生物では Rad51 タンパク質及び Dmc1 タンパク質が相同組換えの要の反応である鎖交換反応を触媒し、相同組換えにおいて中心的な役割を担っていると考えられている。一方で、Rad51 及び Dmc1 が生体内で機能するうえでは、活性化因子との相互作用が必要不可欠であり、Rad54B はそのような因子の一つであると示唆されている。本論文では、ヒト Rad54B の生化学的解析を行い、Rad54B の相同組換えにおける分子機構の研究を行っている。

“Result One” 及び “Result Two” では Rad54B の生化学的解析について述べている。Rad54B をリコンビナントタンパク質として昆虫細胞を用いた系で大量精製を行っている。そして、Rad54B が Rad51 及び Dmc1 と直接結合することを明らかにしている。また、電子顕微鏡を用いた解析により、Dmc1 が単鎖 DNA と nucleoprotein filament と呼ばれる複合体を形成している際には、Rad54B はその複合体の末端に結合していることを示している。次に、試験管内組換え反応系 (strand exchange assay) を用いて、Rad54B は、Dmc1 の鎖交換反応を活性化することを明らかにしている。さらに、様々な条件下で strand exchange assay を行うことで、Rad54B は、Dmc1 と DNA からなる複合体を安定化することで Dmc1 の鎖交換反応を活性化している可能性を見いだしている。論文提出者は、DNA から解離する Dmc1 の量を検討することによって、実際に

Rad54B が Dmc1 と DNA からなる複合体を安定化するということを明らかにしている。また、Rad54B が Holliday junction を動かす branch migration 活性を有していることを見いだしている。

また、“Result Three” においては Rad54B の 26 番目から 225 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 (Rad54B₂₆₋₂₂₅)、その生化学的解析について述べている。Rad54B₂₆₋₂₂₅ を、大腸菌を用いた系で大量精製を行い、Rad54B₂₆₋₂₂₅ が Rad51 及び Dmc1 と結合することを明らかにしており、Rad54B の N 末端領域が Rad51 及び Dmc1 との結合領域であるということを示している。次に、Dmc1 の Rad54B との結合領域を同定するために、Dmc1 を 10 個のアミノ酸領域に分割し、それらと Rad54B₂₆₋₂₂₅ との結合活性に有無を調べている。その結果、Dmc1 は 8 量体の環状構造をしたタンパク質であるが、Rad54B は、Dmc1 の環状構造の外周部分と相互作用していることを明らかにしている。また、Rad54B₂₆₋₂₂₅ が単鎖 DNA 及び二重鎖 DNA と結合することも見いだしている。

Dmc1 は 8 量体の環状構造をしたタンパク質であり、ATP 非存在下ではその環の中心を通る形で単鎖 DNA が結合する。その一方で、ATP 存在下では単鎖 DNA と螺旋状の nucleoprotein filament を形成して、相対的対合反応を触媒することが知られている。今回の結果から、論文提出者は“Discussion” において、Rad54B は Dmc1 と単鎖 DNA からなる複合体のコンフォメーションの変化を促進しており、このことが Dmc1 と単鎖 DNA からなる複合体の安定化及び Dmc1 の鎖交換反応の活性化に寄与していると考察している。

なお、本論文は、東京大学大学院理学系研究科の横山茂之教授、医学系研究科の宮川清教授、早稲田大学の胡桃坂仁志准教授、東北大学の田中耕三准教授、及び理化学研究所の柴田武彦上席研究員、香川亘研究員、杵渕隆研究員、井川