

博士論文審査要旨

論文審査担当者

主査	明星大学	准教授	香川 亘
副査	明星大学	教授	清水 光弘
副査	明星大学	准教授	須賀 則之
副査	東京大学	教授	胡桃坂 仁志

申請者氏名 五月女 美香

論文題目 DNA 修復タンパク質 RAD52 が触媒する相同 DNA 分子の検索と対合の構造生物学的研究

(論文審査の結果の内容)

申請者は、相同組換え修復においてヒト RAD52 タンパク質が触媒する相同 DNA 分子の検索と対合の分子機構を構造生物学的に明らかにすることを研究目的とした。本申請論文は、5 章から構成されている。第 1 章では、本申請論文の研究背景が述べられており、相同組換え修復の分子機構に関するこれまでの知見がまとめられている。第 2 章では、X 線結晶構造解析に適した RAD52 点変異体の調製について、第 3 章では、RAD52 と単鎖 DNA との複合体の X 線結晶構造解析について、第 4 章では、RAD52 の ssDNA アニール触媒機構の生化学的および物理化学的解析について述べており、各章において、背景、材料と実験方法、結果と考察を記述している。第 5 章では、第 2 章から第 4 章で述べた研究成果をもとに、RAD52 が触媒する相同 DNA 分子の検索と対合の反応モデルを提案している。以下にその概要を述べる。

生体内において DNA は、放射線、化学物質、活性酸素などにより、両方の鎖が切れてしまう二重鎖切断損傷を日常的に受けている。相同組換えは二重鎖切断を修復する反応機構であり、無傷で相同な塩基配列を有する DNA を鋳型にすることにより、損傷を受けた DNA を正確に修復することができる。その際に傷ついた DNA と修復の鋳型となる DNA が相同な領域で対合することが重要であり、この対合の

ステップに関与するタンパク質の一つが RAD52 である。RAD52 は多量体リングを形成し、RAD52 リングを一周する塩基性の溝が存在する。先行研究において、RAD52 リング上の溝の内側と外側に DNA 結合領域が存在することが明らかにされており、どちらの DNA 結合領域も RAD52 の組換え活性に重要であることが示されている。RAD52 が触媒する相同組換え反応の詳細な分子機構を明らかにするためには、それらの DNA 結合領域に DNA が結合した複合体の X 線結晶構造解析が重要と考えられる。

第 2 章では、RAD52 と DNA との複合体の X 線結晶構造解析において問題となる複合体の不均一性に焦点をあてている。RAD52 には DNA 結合領域が 2 箇所存在するため、RAD52 と DNA を混合して複合体を調製する際に、2 種類の複合体が形成されてしまう。この問題を解決するために申請者は、RAD52 の外側に位置する DNA 結合領域にアラニン変異を導入した点変異体を作製した。大量調製した点変異体は野生型より結晶化しやすく、2.4 Å 分解能で立体構造を明らかにできることを見出した。RAD52 と DNA との複合体の X 線結晶構造解析に適した RAD52 点変異体を検討したことは重要な技術的進歩として評価できる。

第 3 章では、RAD52 点変異体と単鎖 DNA との複合体の X 線結晶構造解析と、明らかになった立体構造から考えられる RAD52 の溝の内側に位置する DNA 結合領域の相同組換え反応における機能について述べている。複合体の立体構造は、3.6 Å 分解能で決定され、RAD52 リングの溝の内側に単鎖 DNA が結合した構造が明らかになった。RAD52 と結合した単鎖 DNA は B-form 様構造を有しており、Watson-Crick 塩基対を形成する原子が溶媒側に露出していた。この構造から、RAD52 と結合した単鎖 DNA は相補的な単鎖 DNA と塩基対を形成するのに適していることが考えられた。本研究で明らかになった単鎖 DNA の立体構造は、相同組換え反応を触媒する大腸菌 RecA タンパク質に結合した単鎖 DNA のそれと共通点が多いことがわかった。本成果は、相同組換え反応の基本的な分子機構の理解に貢献し、当該分野に極めて大きい影響を及ぼすことが考えられる。

第 4 章では、RAD52 が触媒する相同組換え反応の分子機構を明らかにするために行った 2 つの DNA 結合領域の生化学的および物理化学的解析について述べている。まず、溝の外側に位置する DNA 結合領域に点変異を導入した RAD52 点変異体は野生型と比べ単鎖 DNA を凝集する活性が著しく損なわれていることを明らかにしている。さらに、等温滴定型カロリメトリーを用い、RAD52 の溝の内側に位置する DNA 結合領域よりも、溝の外側に位置する DNA 結合領域の方が単鎖 DNA に対する親和性が高いことを示している。DNA 結合領域ごとの活性の違いを見出したことは RAD52 が触媒する相同組換え反応の分子機構を解明するために重要であり、高く評価できる。

第 5 章では、第 2 章から第 4 章まで述べられている研究成果を統合し、RAD52 が

触媒する相同組換え反応の詳細な分子機構モデルを提案している。このような詳細な分子機構モデルを構築するためには、RAD52のDNA結合領域の詳細な構造と機能を解明する必要があり、申請者はこの難度の高い研究を成功させたことは、高く評価できる。

本論文の成果は、相同組換え修復の分子機構を理解するために重要な知見を与えており、本申請論文は博士（理学）の学位を授与するに十分価値あるものと認める。

（試験および試問の結果の要旨）

本申請論文の審査は、主査として構造生物学を専門とする香川亘准教授、副査として、分子生物学・生化学を専門とする清水光弘教授、分子細胞生物学を専門とする須賀則之准教授、構造生物学を専門とし、相同組換え修復の分子機構に造詣の深い、東京大学・胡桃坂仁志教授によって行われた。

各審査委員による申請論文の予読後、申請者は各審査委員より論文について質疑とコメントを受け、その内容について十分に検討し、申請論文の改善を行った。平成31年1月31日に、主査および副査に加えて、本学化学専攻教員、化学専攻大学院生など約40名の参加のもと公聴会が行われた。申請者による発表（約40分）は、各審査委員のコメントと議論を取り入れており、発表内容の論旨は明快でプレゼンテーション能力にも優れていた。発表後、副査3名に加えて、化学専攻教員から、研究背景、実験結果の解釈、関連研究分野での本研究成果の位置づけなどについて約50分間質疑がなされたが、いずれの質問に対しても論理的で適切な説明がなされ、専攻学術の知識は十分であると認められた。

外国語（英語）については、その最終試験として平成30年12月17日に、主査、副査（清水教授、須賀准教授）の参加のもと、申請論文に関連する最新の原著論文の紹介を行った。申請者は、2018年12月にMolecular Cell誌に発刊された、「The Histone Chaperone FACT Coordinates H2A.X-Dependent Signaling and Repair of DNA Damage」を選び、その内容についてスライドを用いて約30分説明した後、主査と副査から論文内容について質疑がなされた。その結果、原著論文の内容について深く理解していると判定された。また、本学位論文の内容が2報の原著英語論文として国際学術誌に掲載されていること、それらの原著論文における引用文献の英語論文読解力が十分であることから、課程博士としての英語の能力を合格と判定した。

以上のことを踏まえて、慎重に審査した結果、合格と判定した。