

博士論文の内容の要旨

論文題目 RNA を利用した DNA 修復ではたらく RAD52 タンパク質の機能

氏名 土屋 怜平

第1章では、本研究の背景について述べている。DNA二重鎖切断（DSB）損傷とRAD52に関する先行研究により得られている知見を要約している。DSB損傷は、切断によって生じた末端同士を直接つなぐ非相同末端結合か、姉妹染色分体や相同染色体を鋳型にした相同組換えによって修復されると考えられている。しかし近年、酵母やヒトの非分裂細胞においてRNAを鋳型にしたDSBの修復が行われることが報告された。神経細胞などの非分裂細胞では、ほとんどDNA複製が起こらないことからRNA依存的DSB修復は非分裂細胞において相同組換え修復に替わる重要な修復経路であることが考えられる。先行研究により、RNAを利用したDSB修復経路ではRAD52タンパク質が重要であることが示唆されているが、その詳細な分子機構は不明である。そこで本研究では、RAD52のRNA上での機能を生化学的に解析することで、RNAに依存したDSB修復反応の分子メカニズムを解明することを目的とした。

第2章では、本研究で行った実験に使用したタンパク質の大量調製法および種々の生化学的解析の方法について記述している。RNAを利用したDSB修復におけるRAD52の機能を明らかにするためにRAD52のC末端側半分の断片、全長RAD52の点変異体、および全長RAD52のC末端にGFPを融合したリコンビナントタンパク質（RAD52-GFP）の大量調製法を新たに確立した。RAD52の単鎖RNAに対する親和性を解析するために、ゲルシフト法を用いた。試験管内で、RAD52と40-merの単鎖RNAを混合し、形成された複合体を2%のアガロースゲル電気泳動で分離した。分離した複合体は単鎖RNAに予め標識した蛍光分子をイメージアナライザー（Typhoon）によって検出することにより可視化した。RAD52が触媒する単鎖RNA・二重鎖DNA間の鎖交換反応の詳細を明らかにするために既に確立されている試験管内反応系（Mazina et al., 2017）を改変した実験系を構築した。71-merのDNAとCy3蛍光分子で末端標識した40-merの単鎖DNAのアニーリングにより調製した3'末端が突出した二重鎖DNAとRAD52を混合した後、40-merの単鎖DNAと相補的な配列を有するCy5蛍光分子で末端標識した40-merの単鎖RNAと反応させた。得られたRNA・DNA hybridを12%のポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。RNA・DNA hybridはRNAとDNAにそれぞれ予め標識したCy3およびCy5蛍光分子をTyphoonにて検出するこ

とで可視化した。RAD52 による液滴形成を解析するために、蛍光顕微鏡にて液滴を観察する実験系を構築した。試験管内で RAD52-GFP と凝集剤である dextran を混合した溶液を蛍光顕微鏡にて観察した。液滴は、RAD52 の C 末端に融合した GFP タンパク質の蛍光により可視化した。

第 3 章では、本研究で行った実験の結果について述べている。RAD52 の単鎖 RNA 結合活性をゲルシフト法により調べた結果、RAD52 の単鎖 RNA に対する親和性は単鎖 DNA のそれと同程度であることがわかった。また、RAD52・単鎖 RNA 複合体は、RAD52・単鎖 DNA 複合体より安定であることが明らかになった。さらに、RAD52 の N 末端側半分または C 末端側半분을欠失した変異体の単鎖 RNA 結合活性を解析したところ、N 末端側領域と C 末端側領域のそれぞれに、RNA と結合する部位が存在することが考えられた。次に、RAD52 が触媒する RNA・DNA 鎖交換反応を試験管内で再現し、RAD52 の N 末端側半分または C 末端側半분을欠失した変異体の鎖交換活性を調べた。その結果、RAD52 は N 末端側の領域で単鎖 RNA と二重鎖 DNA 間の鎖交換反応を触媒することがわかった。一方、C 末端側領域は鎖交換反応を単独では触媒しないが、N 末端側領域の鎖交換活性を補助することを明らかにした。この効果は、単鎖 RNA を先に RAD52 と混合した後に二重鎖 DNA と反応させる forward の鎖交換反応や、単鎖 RNA の代わりに単鎖 DNA を用いた DNA・DNA 鎖交換反応では見られず、inverse の RNA・DNA 鎖交換反応で特異的に見られることがわかった。RNA を利用した DSB 修復における RAD52 C 末端側領域の他の役割として、液-液相分離にも着目した。RAD52 の C 末端側領域は天然変性領域であり、本研究で RNA と相互作用することを明らかにしている。これらの構造的性質と機能を有するタンパク質は、これまでの研究により液-液相分離を起こす傾向にあることが示されている。これに加え、酵母 Rad52 が液滴を形成することが報告されていることから (McDevitt et al., 2018)、ヒト RAD52 も C 末端側領域を介して液滴を形成する可能性が考えられた。蛍光顕微鏡を用いた解析を行った結果、ヒト RAD52 は液滴を形成することを明らかにした。また、単鎖 RNA 存在下で RAD52 の液滴形成が促進されることがわかった。

第 4 章では、第 3 章で述べた主要な知見を総括し、ヒト RAD52 が RNA を利用した DSB 修復においてどのような役割を果たすのかを考察している。RAD52 の N 末端側半분을欠失した変異体を用いた解析から、RAD52 の C 末端側領域は RNA と相互作用することを初めて明らかにした。また、RAD52 欠失変異体の RNA・DNA 鎖交換活性を調べた結果、RAD52 の C 末端側領域は鎖交換反応を直接触媒はしないものの、N 末端側領域が有する鎖交換活性を補助することを明らかにした。これらの結果は、RNA を利用した DSB 修復において RAD52 の C 末端側半分の領域が重要な役割を担うことを示唆している。RNA・DNA 鎖交換反応において RAD52 の C 末端側半分の領域は損傷部位から既に転写された RNA と結合

し、その RNA を N 末端側領域に結合している損傷 DNA に近づけるモデルが作業仮説として考えられる。また、RAD52 の C 末端側領域はそのアミノ酸配列から天然変性領域であることが予想されている。天然変性領域と RNA 結合活性を有するタンパク質に見られる特徴として液-液相分離がある。本研究ではヒト RAD52 が液滴を形成し、液滴形成が RNA によって促進されることを明らかにした。従って RAD52 の C 末端側領域のもう一つの機能として、RAD52 の液-液相分離による DNA 修復反応場の形成が考えられる。本研究で得られた知見は、分子機構が不明である RNA を利用した DSB 修復を明らかにする上で重要と考える。RNA を利用した DSB 修復は、神経細胞や心筋細胞などの非分裂細胞で重要な修復機構であることが示唆されており、その解明は神経細胞での難病の治療法確立に役立つことが期待される。