

博士論文審査要旨

論文審査担当者

主査	明星大学	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	明星大学	教授	富宿 賢一

申請者氏名 土屋 怜平

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

(論文審査の結果の内容)

申請者は、RNA を利用した DNA 二重鎖切断修復におけるヒト RAD52 タンパク質の機能を生化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、4 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、DNA 二重鎖切断を修復する機構としてこれまで明らかにされている RNA を利用した修復機構に関する知見がまとめられている。第 2 章では、本研究で使用したタンパク質と核酸基質の調製方法、並びに RAD52 の機能を明らかにするために用いた実験手法を詳細に記述している。第 3 章では、RAD52 の機能ドメインを用いて行った種々の生化学的解析について述べている。第 4 章では、第 3 章で述べた研究成果をもとに、RAD52 が触媒する RNA・DNA 鎖交換反応のメカニズムを提案している。以下にその概要を述べる。

生体内において DNA は、活性酸素、化学物質、放射線などにより、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。このような損傷を正確に修復する機構の一つに、無傷で相同な塩基配列を有する DNA を鋳型にして、損傷部位の DNA を復元する相同組換えがある。真核生物では、RAD51 タンパク質が相同組換え修復において重要な役割を担っている。RAD51 は DNA 鎖交換反応を触媒し、損傷した DNA の一本鎖領域と、鋳型 DNA の相同な二重鎖領域の間で、塩基対形成を促進する。この DNA 鎖交換は正確な修復に欠かせない反応である。一方、損傷部位の

復元に RNA が鋳型として用いられる修復機構の存在も明らかにされている。この DNA 修復経路は、出芽酵母やヒトの神経細胞で確認されており、RAD51 ではなく、RAD52 タンパク質に依存的したメカニズムであることが示唆されている。しかし、RAD52 がどのような分子機構によって RNA を利用した二重鎖切断の修復を促進しているのかは不明であった。

申請者は、この課題を解決するために、RAD52 の RNA 結合活性、RNA・DNA 鎖交換活性、および液滴形成に焦点をあて、それらを生化学的に解析した。ヒト RAD52 が RNA 結合活性や RNA・DNA 鎖交換活性を有することは既に報告されている。そこで申請者は、RAD52 の機能ドメイン（N 末端側と C 末端側）や点変異体の活性を解析し、より詳細な分子機構の解明を目指した。

第 3 章では、まず RAD52 の RNA 結合活性について述べている。ゲルシフト法を用いた解析により、RAD52 の N 末端側と C 末端側ドメインは、どちらも単鎖 RNA 結合活性を有することが分かった。先行研究では、RAD52 の N 末端側ドメインに単鎖 DNA との相互作用に重要なアミノ酸残基が存在することが明らかにされている。申請者は、単鎖 DNA 結合に重要なアミノ酸残基をアラニンに置換した点変異体を調製し、それらの単鎖 RNA 結合活性を解析した。しかし、変異による顕著な結合活性の低下は見られなかったことから、単鎖 RNA の結合部位は単鎖 DNA のそれとは異なることが考えられた。RAD52 の C 末端側ドメインが単鎖 RNA 結合活性を有することと、N 末端側ドメインの単鎖 RNA 結合部位が単鎖 DNA のそれと異なることは、新しい知見であり、評価できる。

次に、申請者は RAD52 機能ドメインの *inverse* RNA・DNA 鎖交換活性について述べている。RAD52 の N 末端側ドメインは、全長 RAD52 の半分程度の鎖交換活性しかないことを明らかにしている。一方、C 末端側ドメインは、鎖交換活性をほとんど示さなかったことから、RAD52 は N 末端側ドメインにおいて鎖交換反応を触媒していることが考えられた。興味深いことに、N 末端側ドメインが触媒する鎖交換反応に C 末端側ドメインを加えると、全長 RAD52 と同程度の鎖交換活性が見られた。この結果は、C 末端側ドメインが N 末端側ドメインの鎖交換活性を補助する機能があることを示唆している。さらに、RAD52 の N 末端側ドメインは *forward* の RNA・DNA 鎖交換反応や、DNA 間の鎖交換反応を触媒したにも関わらず、これらの反応において C 末端側ドメインによる反応効率の上昇は見られなかった。このことから、RAD52 の C 末端側ドメインは、*inverse* RNA・DNA 鎖交換反応において特異的に機能することが考えられた。

第 4 章では、第 3 章で述べられている研究成果を統合し、RAD52 C 末端側領域の *inverse* RNA・DNA 鎖交換反応における役割を提唱している。RAD52 の C 末端側領域は *inverse* RNA・DNA 鎖交換反応において、単鎖 RNA と結合し、二重鎖 DNA と結合した RAD52 の N 末端側領域に単鎖 RNA を誘導するモデルである。本研究では、

RAD52 の C 末端側領域は、これまで考えられていた RPA や RAD51 など他のタンパク質との相互作用部位としての機能だけでなく、核酸と結合して DNA 修復反応に関与する機能も有することを初めて示した。これまでヒト RAD52 の C 末端側領域の機能は明らかにされておらず、その一端を明らかにしたことは、高く評価できる。

本論文の成果は、RNA を利用した DNA 二重鎖切断修復における RAD52 タンパク質の機能を理解するための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 DNA 修復の構造生物学を専門とする香川亘教授、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、および応用微生物学を専門とし、酵素による触媒反応機構に造詣の深い、冨宿賢一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。令和 5 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 20 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令和 4 年 12 月 1 日に開催された第 45 回日本分子生物学会年会にて、主査の参加のもと、申請論文の研究成果に関するポスター発表（題名：Functional implications for RAD52 in RNA-dependent DNA repair）を外国人研究者に対して英語で行った。申請者は、ポスターの内容を英語で 10 分程度説明した。その後、参加者から発表内容について英語で質疑がなされた。申請者は、質問に対し英語で丁寧な説明を行い、研究内容に関するディスカッションを英語で行う能力を有すると判定された。また、本学位論文の内容が 1 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に加え、そ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。