

RNA を利用した DNA 修復ではたらく RAD52 タンパク質の機能

The function of the RAD52 protein in RNA-transcript-dependent
DNA repair

博士論文
Doctoral Dissertation

2023 年 2 月 博士（理学）申請
明星大学大学院 理工学研究科 化学専攻

submitted for the degree of
Doctor of Philosophy

Department of Chemistry, Graduate School of Science and Engineering,
Meisei University

土屋 怜平
Ryohei Tsuchiya

目次	1
略語一覧	4
第 1 章 序論	
1.1 DNA 二重鎖切断損傷	6
1.2 相同組換え修復	7
1.3 RNA を利用した DNA 二重鎖切断の修復	7
1.4 RAD52 について	9
1.5 本研究の目的	12
第 2 章 実験方法	
2.1 タンパク質の大量調製	13
2.2 RNA および DNA 基質	15
2.3 RAD52 と単鎖 RNA との相互作用解析	16
2.4 RAD52 と単鎖 DNA との相互作用解析	17
2.5 単鎖 DNA 存在下での RAD52 と単鎖 RNA との相互作用解析	18
2.6 単鎖 RNA と単鎖 DNA による競合阻害実験	18
2.7 鎖交換反応に用いる dsDNA の調製	19
2.8 鎖交換アッセイ	20
2.9 単鎖 RNA または単鎖 DNA 存在下における RAD52 の凝集実験	22
2.10 RAD52 を用いた液滴形成と蛍光観察	23

第3章 結果

3.1	RAD52 タンパク質の大量調製	24
3.1.1	RAD52 ¹⁸⁴⁻⁴¹⁸	24
3.1.2	RAD52 点変異体	26
3.1.3	RAD52-GFP	26
3.2	RAD52 の RNA 結合活性	29
3.2.1	単鎖 RNA との相互作用	29
3.2.2	DNA 結合活性との比較	29
3.2.3	RAD52・RNA 複合体の安定性	32
3.2.4	RAD52 ¹⁻²¹² と RAD52 ¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の RNA 結合活性	36
3.2.5	RAD52 点変異体と単鎖 RNA との相互作用解析	38
3.3	RAD52 の inverse RNA-DNA 鎖交換活性	43
3.3.1	全長 RAD52 の活性	43
3.3.2	RAD52 ¹⁻²¹² と RAD52 ¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の活性	45
3.3.3	forward RNA-DNA 鎖交換活性との比較	45
3.3.4	RAD52 点変異体の活性	48
3.3.5	inverse DNA-DNA 鎖交換活性との比較	49
3.4	RAD52 による液滴形成	53
3.4.1	タンパク質の液-液相分離	53
3.4.2	単鎖 RNA に依存した RAD52 の凝集活性	53
3.4.3	RAD52 液滴の観察	57
3.3.4	単鎖 RNA 存在下での RAD52 の液滴形成	59

第 4 章 考察

4.1	RAD52 と RNA との相互作用	60
4.2	RAD52 が触媒する RNA-DNA 間の鎖交換反応	61
4.3	RAD52 の液滴形成	61
4.4	RNA を利用した DNA 修復における RAD52 の役割	62

引用文献	65
------	----

謝辞	73
----	----

研究業績	74
------	----

略語一覽

bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
CBB	Coomassie brilliant blue
Cy3	Cyanine3
Cy5	Cyanine5
DNA	deoxyribonucleic acid
DSB	double-strand break
dsDNA	double-stranded deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
GFP	green fluorescent protein
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethane-1-sulfonic acid
HRR	homologous recombination repair
IPTG	isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside
LDS	lithium dodecyl sulfate
MRN	MRE11-RAD50-NBS1
NHEJ	non-homologous end joining
Ni-NTA	nickel-nitrilotriacetic acid
OD	optical density
RNA	ribonucleic acid
RPA	replication protein A

SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SSA	single-strand annealing
ssDNA	single-stranded deoxyribonucleic acid
ssRNA	single-stranded ribonucleic acid
TBE	Tris-borate-EDTA
TC-HR	transcription-coupled homologous recombination
Tris	Tris hydroxymethyl aminomethane

第 1 章 序論

1.1 DNA 二重鎖切断損傷

生物の遺伝情報を担う物質である DNA は細胞内で日々、紫外線や電離放射線などの外的要因や DNA 複製のエラーや代謝時に産生される活性酸素などの内的要因によって様々な損傷を受けている。その中で最も重篤な損傷は、DNA の 2 本の鎖が両方とも切れてしまう二重鎖切断 (double-strand break: DSB) 損傷である。この損傷は、染色体の分断を意味し、修復されないと遺伝情報の損失や、細胞分裂時の染色体分配の異常の原因となり、最終的に細胞のがん化、細胞死、遺伝病に至ってしまう (Krogh and Symington, 2004; Jackson and Bartek, 2009; Moynahan and Jasin, 2010; Mehta and Haber, 2014)。細胞は進化の過程で DSB を修復するための機構を獲得しており、その基本的な仕組みは原核生物から真核生物まで広く保存されている。

DSB が修復される方法として、2 種類の機構が明らかにされている (Ceccaldi et al., 2016)。1 つ目は、非相同末端結合 (non-homologous end joining : NHEJ) と呼ばれる修復である。これは、損傷によって生じた DNA 末端同士を Ku70/80 タンパク質をはじめとする因子によって直接繋ぐ修復機構である (Walker et al., 2001; Lieber, 2010)。この機構は、主に細胞周期の M 期と G₁ 期で機能すると考えられている。また DSB 時に塩基の欠落が生じた場合に修復によって DNA の塩基配列が変化してしまう可能性があるため、NHEJ は正確性を欠いた修復方法であると言える。2 つ目は、相同組換え修復 (homologous recombination repair : HRR) と呼ばれる機構である。相同組換え修復は、姉妹染色分体や相同染色体を鋳型として DSB を修復するため、塩基の欠落が生じた場合でも無傷の DNA を鋳型にして欠落した部分を正確に復元することが可能であるという特徴がある (San Filippo et al., 2008; Heyer et al.,

2010)。

1.2 相同組換え修復

前述した通り，相同組換え修復は姉妹染色分体や相同染色体を鋳型として DNA を修復する機構であることから細胞周期の S 期及び G₂ 期ではたらくと考えられている。しかし，その反応機構は完全に解明されていない。先行研究から，ヒトにおける相同組換えの反応ステップは以下のように考えられている。DSB が起こるとまず損傷部位に MRE11, RAD50, および NBS1 からなる MRN complex が DSB 部位に動員されることで 5'末端が削られ，3'突出末端が形成される（図 1, I）（Zhao et al., 2020）。突出した 3'末端にはまず RPA が結合する（図 1, I）。その後，BRCA2 のメディエーター活性によって RAD51 が一本鎖 DNA 上にフィラメントを形成する（Esashi et al., 2007; Zelensky et al., 2014; Scully et al., 2019）（図 1, II）。次に，RAD51 が無傷の姉妹染色分体の相同な領域を検索し，Displacement loop (D-loop) を形成する（図 1, III）。そして相同な DNA を鋳型にして DNA ポリメラーゼにより損傷領域が合成される（図 1, IV）。次に，D-loop の一本鎖 DNA と損傷領域に侵入していないもう片方の鎖との間で対合し（セカンドエンドキャプチャー），相補鎖が合成されることによって損傷が修復される（Nimonkar and Kowalczykowski, 2009; Nimonkar et al., 2009）（図 1, V）。一方，どの DNA ポリメラーゼが HRR に関与するのかや，DNA 合成からセカンドエンドキャプチャーの反応工程においてどの因子がどのような機構ではたらくのかは未だによくわかっていない。

1.3 RNA を利用した DNA 二重鎖切断の修復

前節では，DSB 周辺と相同な配列を持つ DNA を利用した正確な修復機構について述べたが，近年，3 つ目の修復機構として RNA を利用した DNA 修復が報告されている（Keskin et al.,

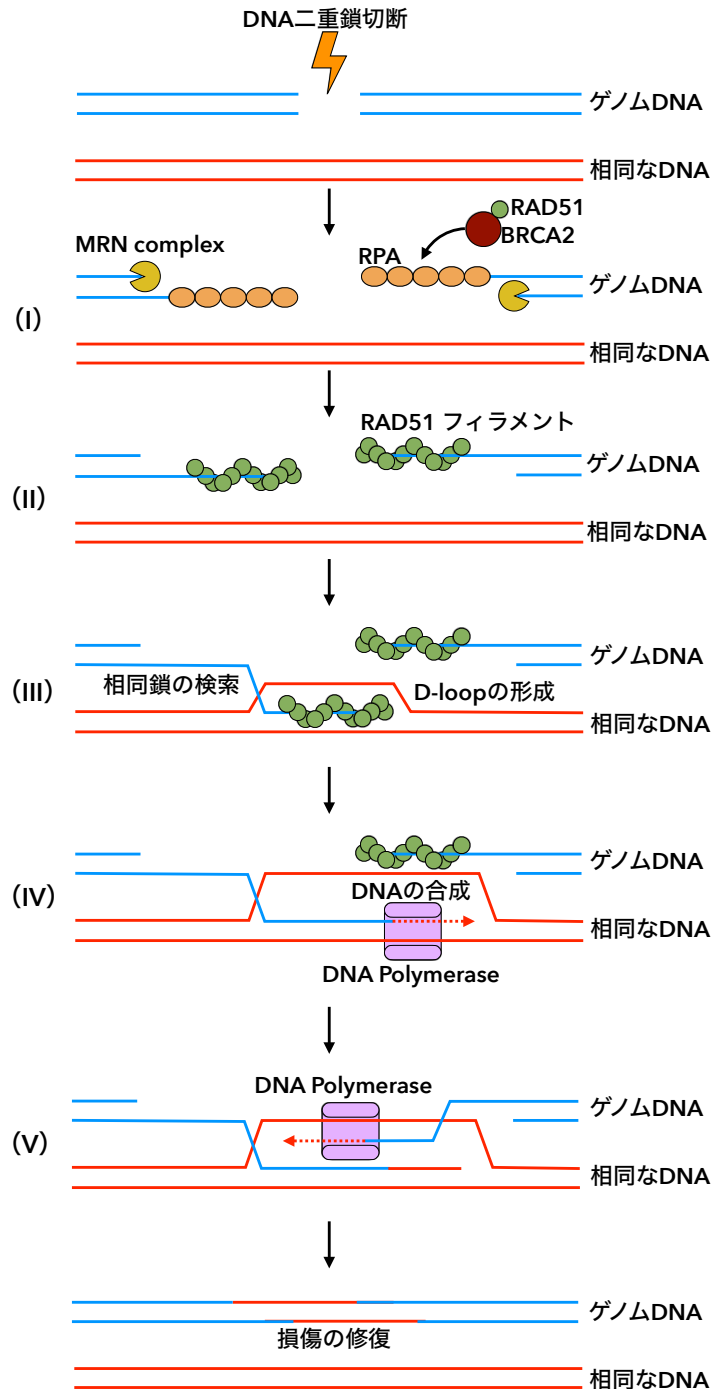


図1 HRRによるDSB修復

DSB が起こると、MRN complex によって 3'突出末端が形成され RPA が結合する。次に、BRCA2 のメデイエーター活性によって RPA が RAD51 に置き換わり、RAD51 フィラメントが形成される。次に、形成された 3'突出末端が相同な二重鎖 DNA との間で D-loop 構造を形成し、相同鎖の検索と対合が起こる。次に、無傷で相同な DNA を鋳型にして DNA ポリメラーゼにより損傷部位の合成が行われる。次に、D-loop を形成していないもう片方の 3'突出末端が相同な配列で対合し(セカンドエンドチャプチャー), DNA 合成されることで損傷が修復する。

2014)。転写と翻訳はすべての細胞周期で頻繁に行われており、細胞核内には非常に大量の RNA が存在している。そのため RNA が関与する DNA 修復はすべての細胞周期において可能であると言える。また、心筋細胞や神経細胞のような姉妹染色分体を持たない非分裂細胞において DNA を正確に修復する機構として重要であると考えられている (Welty et al., 2017; Erikson et al., 1998; Ernst et al., 2014)。これまでに RNA を利用した DNA 修復経路の詳細は明らかにされていないが、詳細な反応ステップのモデルが 2 種類提唱されている (図 2)。1 つ目は RNA-bridging mechanism (McDevitt et al., 2018) と呼ばれるモデルである。このモデルでは、切断された DNA 同士を RNA が橋渡しするように DNA と RNA の間で塩基対が形成され、DNA リガーゼによって切断末端が連結される (図 2)。2 つ目は、RNA-templated mechanism (Mazina et al., 2017) である。この機構は、損傷部位の DNA を無傷の鋳型を元に合成するという点において相同組換え修復とよく似た経路である (図 2)。RNA-templated mechanism の場合、RNA を鋳型にした DNA 合成が行われる。この機構において DNA 合成を担う酵素は同定されていないが、近年、ヒトの pol η と pol θ は逆転写酵素活性を有することが報告されており (Su et al., 2019; Chandramouly et al., 2021)、これらの酵素はその候補として考えられる。RNA-bridging mechanism と RNA-templated mechanism の 2 つのモデルに共通する重要な反応ステップが存在する。それは RNA と DNA の間で鎖交換反応が起こり RNA・DNA ハイブリッドが形成されることである。先行研究では、この重要なステップを RAD52 が触媒することを示唆している (Mazina et al., 2017; McDevitt et al., 2018)。しかし、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。

1.4 RAD52 について

DSB の修復に重要であると考えられているタンパク質の一つとして RAD52 が知られている。RAD52 は電離放射線に対して野生型より高い感受性を示す出芽酵母 *S. cerevisiae* 変異株より

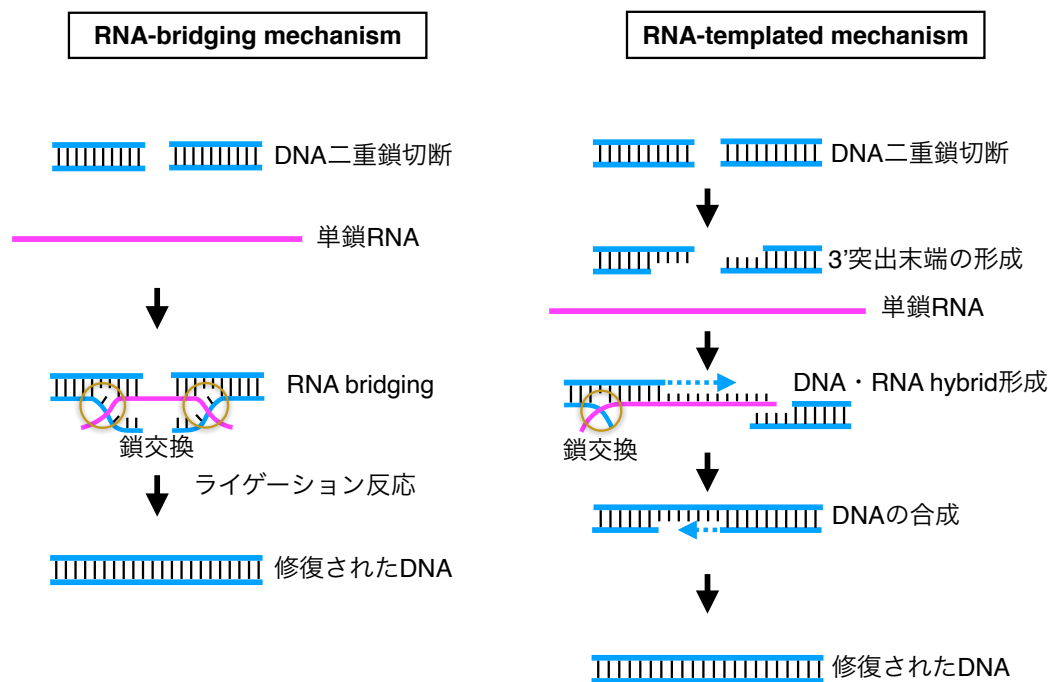


図2 提案された RNA を利用した DNA 修復のモデル

左側が RNA-bridging モデルで、右側が RNA-templated モデルである。RNA-bridging は、DSB が起こると、単鎖 RNA と切断された二重鎖 DNA の両方の切断末端の間に鎖交換反応が起こることによって、RNA が切断された末端同士をつなぎとめる。その後、DNA ligase によってライゲーション反応が起こることによって修復が完了するモデルである。一方で RNA-templated モデルでは、DNA に二重鎖切断が起こると、相同組換え修復と同様に切断された末端がヌクレアーゼによって片側の DNA 鎖が分解され 3'突出末端ができる。その後、一方の末端と単鎖 RNA の間に鎖交換反応が起こり DNA・RNA ハイブリッドが形成される。次に、逆転写酵素によって RNA を鋳型にして DNA を合成する。その後、DNA・RNA ハイブリッドが解体され、合成によって伸長された末端ともう一方の 3'突出末端の間にアニーリング反応が起こり対合する。最後に、もう片方の DNA が合成されることによって修復が完了するモデルである。

同定されたタンパク質であり (Game and Mortimer, 1974), ヒトを含む真核生物に広く保存されている。出芽酵母 Rad52 は主に 2 つの重要な機能があると考えられている。1 つは D-loop 形成を触媒する Rad51 の機能を補助する役割である。前述の通り, 相同組換えでは DSB により生じた DNA 末端にヌクレアーゼが 5'から 3'の方向に片方の DNA 鎖を分解し, 一本鎖領域が形成される。そこに一本鎖 DNA 結合タンパク質である RPA が結合し, 相同組換え反応の進行を制御している。相同組換えが進行するためには RPA が一本鎖領域から解離し, そこに RAD51 が結合する必要がある。RPA を Rad51 に置き換える反応を Rad52 が担っている (Sung, 1997; Sung and Klein, 2006)。過去の生化学的解析より, RPA および Rad51 と直接相互作用する Rad52 の領域が同定されており, 試験管の中で再現した相同組換え反応において Rad52 による RPA を Rad51 に置き換える反応が詳細に解析されている (Song and Sung, 2000; Sugiyama and Kowalczykowski, 2002)。出芽酵母 Rad52 のもう一つの重要な機能として, single-strand annealing (SSA) と呼ばれる DSB 修復経路において相補的な単鎖 DNA 同士のアニーリング反応を促進する。一方, ヒト RAD52 については相同組換え修復や RNA を利用した DNA 修復ではたらくことが考えられているが, その詳細な機能は明らかにされていない。

ヒト RAD52 タンパク質は電子顕微鏡解析と X 線結晶構造解析より立体構造が明らかにされており (Stasiak et al., 2000; Kagawa et al., 2002; Singleton et al., 2002), 多量体のリング構造を形成し, 単鎖 DNA が入る大きさの溝が存在することが明らかにされている (図 3) (Kagawa et al., 2001; Kagawa et al., 2008; Saotome et al., 2018)。さらに生化学的解析より, DNA と直接結合し, 相同な DNA の検索や塩基対形成の反応を触媒する活性を有することが明らかにされている (Saotome et al., 2018)。近年, 相補的な塩基配列を有する単鎖 DNA と単鎖 RNA の対合反応 (DNA・RNA ハイブリッド形成) または二重鎖 DNA と単鎖 RNA の間で鎖交換反応を触媒すると報告されているが (Mazina et al., 2017; McDevitt et al., 2018),

RNA に依存した DNA 修復反応における RAD52 の詳細な機能は明らかにされていない。

1.5 本研究の目的

本研究では RNA を利用した DNA 修復における RAD52 タンパク質の機能を明らかにすることを目的とした。先行研究より, RNA 依存的 DNA 修復における RAD52 の役割として, RNA と DNA 間で起こる鎖交換反応がある (Mazina et al., 2017; McDevitt et al., 2018)。しかしその詳細な仕組みは明らかにされていない。そこで, RAD52 の RNA 上での機能を試験管内で解析するための実験系を構築し, その解明を目指した。

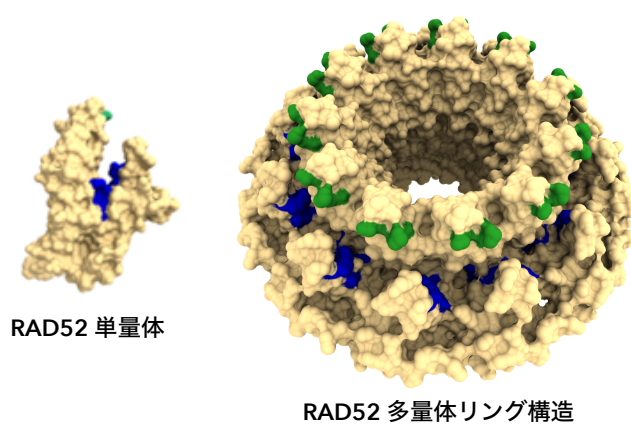


図3 RAD52¹⁻²¹² 多量体リング構造

RAD52 の N 末端半分を含む断片の結晶構造解析より, RAD52 の多量体リングの外周に溝が存在することが明らかになっている。この溝の内側 (青色の部分) に単鎖 DNA との結合, 上側 (緑色) の部分に二重鎖 DNA との結合に重要なアミノ酸残基が存在する。左側は RAD52¹⁻²¹² 単量体の構造。右側が RAD52¹⁻²¹² の 11 量体リング。

第2章 実験方法

2.1 タンパク質の大量調製

ヒト RAD52 (以下 RAD52) とその C 末端側半分が欠失したアミノ酸 1 番から 212 番の断片 (RAD52¹⁻²¹²) の大量調製は先行研究で確立された方法を元に行った (Kagawa et al., 2001; Kagawa et al., 2002)。RAD52 または RAD52¹⁻²¹² 遺伝子を含む pET15b と、アルギニン tRNA 遺伝子を含む pArg3,4 を大腸菌株 JM109(DE3) に導入した。形質転換された大腸菌株 JM109(DE3) のコロニーを 800 mL の LB 液体培地を用いて 30°C で培養を行い、菌体濁度 (OD) が 0.6 付近の時に IPTG を加えることで RAD52 の発現を誘導し、一晩培養した。翌日、培養液から遠心により菌体を回収し、RAD52 溶解 Buffer (50 mM Tris-HCl, pH7.8, 0.3 M KCl, 10% glycerol, 2 mM 2-mercaptoethanol, 10 mM imidazole) で懸濁し、超音波破碎機を用いて細胞破碎液を調製した。得られた細胞破碎液を 35,200×*g* で 30 分遠心し、可溶性画分と不溶性画分に分けた。次に、可溶性画分を Ni-NTA Agarose ビーズ (Qiagen) と混合し、RAD52 を吸着させた。RAD52 が結合した Ni-NTA Agarose をエコノカラムに充填し、RAD52 洗浄 Buffer (50 mM Tris-HCl, pH7.8, 0.3 M KCl, 10% glycerol, 2 mM 2-mercaptoethanol, 50 mM imidazole) で洗浄した。次に、結合している RAD52 を 50 mM から 400 mM の imidazole 直線濃度勾配で溶出した。溶出した RAD52 の N 末端側に付加されている His₆-tag を切除するために、thrombin プロテアーゼを加え、RAD52 透析 Buffer (20 mM HEPES-KOH, pH7.5, 0.2 M KCl, 0.5 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol, 5% glycerol) に対して透析を行った。His₆-tag の切除を SDS-PAGE で確認した後に、陽イオン交換ビーズ (SP Sepharose, Cytiva) に吸着させ、RAD52 透析 Buffer で洗浄した。SP Sepharose に結合している RAD52 を 0.2 M から 0.8 M の KCl 直線濃度勾配で溶出した。RAD52 が含まれる画分を回収し、RAD52 透析

Buffer に対して透析を行った。最後に濃縮を行い、分注した後に液体窒素で凍結し、 -80°C に保存した。濃度の測定は紫外吸光法を用い、モル吸光係数は ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) を用いて算出した。

RAD52 点変異体 (R55A, K62A, K102A, K133A, K152A, K169A, R173A, K177A) の大量発現には野生型と同様に *Nde*I と *Bam*HI の間に遺伝子が挿入された pET15b を使用し、点変異体の大量調製も野生型のそれと同様の方法で行った。K102A および K133A 点変異体については、陽イオン交換クロマトグラフィーの代わりにゲル濾過クロマトグラフィー (Superdex 200, Cytiva) を行った。

RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の大量調製には、pET15b に挿入された野生型 RAD52 遺伝子の 183 番目の Pro をコードするコドン (CCT) と 184 番目の Leu をコードする (CTT) の間に TEV プロテアーゼが特異的に認識して切断する Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly をコードする塩基配列 (GAA AAC CTG TAT TTT CAG GGC) を部位特異的変異導入法により挿入した。RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ を大量発現させるために、調製した発現ベクターと、アルギニン tRNA 遺伝子を含む pArg3,4 を大腸菌株 JM109(DE3) に導入した。形質転換された大腸菌株 JM109(DE3) のコロニーを 1.6 L の LB 液体培地を用いて 30°C で培養を行い、菌体濁度 (OD) が 0.6 付近の時に IPTG を終濃度が 0.5 mM になるように加えることで RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の発現を誘導し、一晚培養した。翌日、培養液から遠心により菌体を回収し、RAD52 溶解 Buffer で懸濁した後、超音波破碎機を用いて細胞を破碎した。得られた細胞破碎液を $35,200\times g$ で 30 分遠心し、可溶性画分と不溶性画分に分けた。次に、可溶性画分を 2 mL の Ni-NTA Agarose ビーズと 50 mL チューブ内で混合し、ローテーターでゆっくり 4°C 、15 分間転倒混和することにより RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ をビーズに吸着させた。その後、ビーズを遠心で落とし、上清を除き、ビーズを 50 mL の RAD52 洗浄 Buffer に懸濁することで未吸着のタンパク質を取り除いた。洗浄したビーズを 2 mL の RAD52 洗浄 Buffer に懸濁し、約 1 mg の TEV プロテアーゼを加えて、ロ

ーターでさらに 4°C, 1 時間転倒混和を行った。その後、ビーズを遠心で落とし、上清を回収した。RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ を含む上清を約 1 mL に濃縮したのちにゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。ゲル濾過カラム (ENrich SEC 650) の平衡化とサンプルの分離には RAD52 精製バッファー A (50 mM Tris-HCl, pH7.8, 0.3 M KCl, 5% glycerol, 2 mM 2-mercaptoethanol) を用いた。ピークの画分を回収し、濃縮を行い、分注した後に液体窒素で凍結し、-80°C に保存した。濃度の測定は紫外吸光法を用い、モル吸光係数は ProtParam を用いて算出した。

RAD52-GFP の大量調製には、pET15b に挿入された野生型 RAD52 遺伝子の 3'末端に GFP 遺伝子をシームレスクローニング法により挿入し、RAD52 の C 末端に GFP が融合されたりコンビナントタンパク質が発現するように設計した。RAD52-GFP の大量発現と精製は野生型 RAD52 のそれと同様の方法で行った。ただし、Ni アフィニティークロマトグラフィー後の透析には RAD52-GFP 透析 Buffer (20 mM Hepes-KOH, pH7.5, 0.5 M KCl, 0.5 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol, 5% glycerol) を使用した。また陽イオン交換クロマトグラフィーの代わりに、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。ゲル濾過カラム (ENrich SEC 650) の平衡化とサンプルの分離には RAD52 精製バッファー B (20 mM HEPES-KOH, pH7.5, 0.5 M KCl, 0.1 mM EDTA, 2 mM 2-mercaptoethanol, 2.5% glycerol) を用いた。ピークの画分を回収し、濃縮を行い、分注した後に液体窒素で凍結し、-80°C に保存した。濃度の測定は紫外吸光法を用い、モル吸光係数は ProtParam を用いて算出した。

2.2 RNA および DNA 基質

全ての RNA および DNA 基質はファスマック社または北海道システム・サイエンス社より購入した。購入した基質 DNA の配列は、ISE#1 (40-mer; 5'-ACA GCA CCA GAT TCA GCA ATT AAG CTC TAA GCC ATC CGC A-3'; 5'末端に Cy3 を付加), ISE#2 (71-mer; 5'-TGC GGA TGG CTT AGA GCT TAA TTG CTG AAT CTG GTG CTG

TAG GTC AAC ATG TTG TAA ATA TGC AGC TAA AG-3'),

ISE#3 (40-mer; 5'-UGC GGA UGG CUU AGA GCU UAA UUG CUG AAU CUG GUG CUG U-3'; 5'末端に Cy5 を付加),

ISE#4 (40-mer; 5'-TGC GGA TGG CTT AGA GCT TAA TTG CTG AAT CTG GTG CTG T-3'; 5'末端に Cy5 を付加),

CA#1 (40-mer; 5'-AAU ACC GCA UCA GGA AAU UGU AAG CGU UAA UAU UUU GUU A-3'; 5'に Cy5 を付加),

CA#2 (40-mer; 5'-ACA GCA CCA GAT TCA GCA ATT AAG CTC TAA GCC ATC CGC A-3'),

CA#3 (40-mer; 5'-AAU ACC GCA UCA GGA AAU UGU AAG CGU UAA UAU UUU GUU A-3'),

PS#1 (40-mer; 5'-TGC GGA TGG CTT AGA GCT TAA TTG CTG AAT CTG GTG CTG T-3'),

PS#2 (70-mer; 5'-TGC GGA TGG CTT AGA GCT TAA TTG CTG AAT CTG GTG CTG TAG GTC AAC ATG TTG TAA ATA TGC AGC TAA A-3'),

PS#3 (40-mer; 5'-UGC GGA UGG CUU AGA GCU UAA UUG CUG AAU CUG GUG CUG U-3'),

PS#4 (70-mer; 5'-UCC UUU UGA UAA GAG GUC AUU UUU GCG GAU GGC UUA GAG CUU AAU UGC UGA AUC UGG UGC UGU AGG UCA A-3') であった。

2.3 RAD52 と単鎖 RNA との相互作用解析

単鎖 RNA との相互作用解析には、Cy5 が 5'末端に付加された 40-mer の単鎖 RNA (ISE#3) を使用した。まず、5, 10, 15, 20 μ M の RAD52 希釈溶液を調製した。次に、単鎖 RNA を

含むマスターミックスを調製した。一反応分のマスターミックス (18 μ L) には 5x reaction mixture が 4 μ L, ssRNA (ISE#3, 625 nM ; 終濃度 62.5 nM) が 2 μ L, BSA (0.2 mg/mL ; 終濃度 0.01 mg/mL) が 1 μ L, RNase inhibitor (5 U/ μ L ; 終濃度 0.5 U/ μ L) が 1 μ L, Milli-Q 水が 10 μ L 含まれていた。このマスターミックスを 37°C で 5 分間プレインキュベーションした。次に、希釈した RAD52 を 2 μ L 加え (終濃度 0.5, 1, 1.5, 2 μ M ; 分子の濃度) 37°C で 10 分間反応させた。次に、40% スクロースを 4 μ L 加え、混合液から 15 μ L を取り、2% アガロースゲル電気泳動 (Agarose for 50~800 bp fragment, ナカライテスク) にて分離した (2.9 V/cm, 120 min)。また、定量を行うために、同じ反応液 5 μ L を 12% ポリアクリルアミドゲル電気泳動でも分離した (75 V, 90 min)。電気泳動には 0.5x TBE 緩衝液 (45.1 mM Tris-borate, 1 mM EDTA) を用いた。バンドの検出には Typhoon イメージアナライザー (Cytiva) を用いて Cy5 の蛍光を検出した。可視化された基質と生成物のバンドを Fiji ソフトウェア (Schindelin et al., 2012) を用いて定量し、形成された RAD52・単鎖 RNA 複合体の割合を算出した。RAD52 点変異体, RAD52¹⁻²¹², RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の単鎖 RNA との相互作用についても同様の方法で解析した。ただし、RAD52 点変異体については、2% アガロースゲル電気泳動のみを行った。

2.4 RAD52 と単鎖 DNA との相互作用解析

単鎖 DNA との相互作用解析には、Cy5 が 5'末端に付加された 40-mer の単鎖 DNA (ISE#4) を使用した。まず、上記と同様に RAD52 の希釈溶液を調製した。次に、単鎖 DNA を含むマスターミックスを調製した。一反応分のマスターミックス (18 μ L) には 5x reaction mixture が 4 μ L, ssDNA (ISE#4, 625 nM ; 終濃度 62.5 nM) が 2 μ L, BSA (0.2 mg/mL ; 終濃度 0.01 mg/mL) が 1 μ L, Milli-Q 水が 11 μ L 含まれていた。次に、このマスターミックスを 37°C で 5 分間プレインキュベーションした。次に、希釈した RAD52 を 2 μ L 加え (終濃度

0.5, 1, 1.5, 2 μ M ; 分子の濃度) 37°Cで 10 分間反応させた。次に, 40% sucrose dye を 4 μ L 加え, 上記と同様の方法で 2% アガロースゲル電気泳動と 12% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い, RAD52・単鎖 DNA 複合体の割合を算出した。RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ についても同様の方法で解析した。RAD52 点変異体の解析では, RAD52 の終濃度を 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 μ M (分子濃度) に調製し, 0.8% アガロースゲル電気泳動のみを行った。

2.5 単鎖 DNA 存在下での RAD52 と単鎖 RNA との相互作用解析

単鎖 DNA 存在下での RAD52 と単鎖 RNA との相互作用解析には, 互いに相補的な塩基配列を有さない 40-mer の単鎖 RNA (CA#1) と 40-mer の単鎖 DNA (ISE#1) を使用した。単鎖 RNA には Cy5 が 5'末端に付加されており, 単鎖 DNA には Cy3 が 5'末端に付加されていた。まず, 上記と同様に RAD52 の希釈溶液を調製した。次に, 単鎖 RNA および単鎖 DNA を含むマスターミックスを調製した。一反応分のマスターミックス (18 μ L) には 5x reaction mixture が 4 μ L, 単鎖 RNA (CA#1, 625 nM, 終濃度 62.5 nM ; 分子濃度) が 2 μ L, 単鎖 DNA (ISE#1, 625 nM, 終濃度 62.5 nM ; 分子濃度) が 2 μ L, BSA (0.2 mg/mL ; 終濃度 0.01 mg/mL) が 1 μ L, RNase inhibitor (5 U/ μ L ; 終濃度 0.5 U/ μ L) が 1 μ L, Milli-Q 水が 8 μ L 含まれていた。このマスターミックスを 37°C で 5 分間プレインキュベーションした。次に, 希釈した RAD52 を 2 μ L 加え (終濃度 0.5, 1, 1.5, 2 μ M ; 分子の濃度) 37°Cで 10 分間反応させた。次に, 40% スクロースを 4 μ L 加え, 上記と同様の方法で 2% アガロースゲル電気泳動と 12% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い, RAD52・単鎖 RNA 複合体および RAD52・単鎖 DNA 複合体の割合をそれぞれ算出した。

2.6 単鎖 RNA と単鎖 DNA による競合阻害実験

単鎖 DNA による競合阻害実験には, Cy5 が 5'末端に付加された 40-mer の単鎖 RNA (CA#1)

と、蛍光分子が付加されていない単鎖 DNA (CA#2) を使用した。まず、10 μ M (分子濃度) の RAD52 希釈溶液を調製した。次に、単鎖 RNA を含むマスターミックスを調製した。一反応分のマスターミックス (16 μ L) には、5x reaction mixture が 4 μ L, 単鎖 RNA (CA#1, 625 nM ; 終濃度 62.5 nM) が 2 μ L, BSA (0.2 mg/mL ; 終濃度 0.01 mg/mL) が 1 μ L, RNase inhibitor (5 U/ μ L ; 終濃度 0.5 U/ μ L) が 1 μ L, Milli-Q 水が 8 μ L 含まれていた。このマスターミックスを 37°C で 5 分間プレインキュベーションした。次に、希釈した competitor DNA (CA#2, 625, 1250, 3125, 6250, 31250, 62500, 93750 nM ; 終濃度 62.5, 125, 312.5, 625, 3125, 6250, 9375 nM ; 分子の濃度) を 2 μ L 加え 37°C で 10 分間反応させた。次に、40% スクロースを 4 μ L 加え、混合液から 20 μ L を取り、2% アガロースゲル電気泳動 (Agarose for 50~800 bp fragment, ナカライテスク) にて分離した (2.9 V/cm, 120 min)。電気泳動には 0.5x TBE 緩衝液を用いた。RAD52・単鎖 RNA 複合体の割合の算出は、上記と同様の方法で行った。

単鎖 RNA による競合阻害実験では、Cy3 が 5'末端に付加された 40-mer の単鎖 DNA (ISE#1) と、蛍光分子が付加されていない単鎖 RNA (CA#3) を使用し、上記と同様の方法で解析を行った。

2.7 鎖交換反応に用いる dsDNA の調製

鎖交換反応に使用した二重鎖 DNA は、Cy3 が 5'末端に付加された 40-mer の単鎖 DNA (ISE#1) と蛍光分子を付加していない 71-mer の単鎖 DNA (ISE#2) を用いて調製した。まず、PCR チューブにアニーリング反応液 (40 μ L) 調製した。アニーリング反応液には、ISE#1 が 20 μ L (終濃度 625 nM ; 分子濃度), ISE#2 が 3 μ L (終濃度 938 nM ; 分子濃度), アニーリング buffer (150 mM Hepes-KOH, pH 7.5, 0.5 M NaCl, 25 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 mM 2-mercaptoethanol) が 8 μ L, Milli-Q 水が 9 μ L 含まれていた。この反応液において、サーマル

サイクラー (S1000TM, Bio-Rad) を用いてアニーリング反応 (92°C, 2 min → 34°C, 10 min → 4°C, forever) を行った。得られた産物は 12% ポリアクリルアミド電気泳動により分離した (75 V, 180 min)。そして, SYBR Gold でゲルを染色し分離した二重鎖 DNA を検出した。次に, 検出した dsDNA を含むゲルを切り出し, Power Masher II (Funakoshi) を用いて細かく破碎した。その後, 破碎したゲルの重さを測り, ゲルの重さ 1 g あたり 1.5 mL の acrylamide gel elution buffer (0.5 M ammonium acetate, 10 mM magnesium acetate tetrahydrate, 1 mM EDTA, pH 8.0) を加えローテーターを用いて一晩 dsDNA の溶出を行った。翌日, 混合液を Vivaspin 15, 100 kDa MWCO (Sartorius) に移し, 遠心によって DNA 基質が溶けた acrylamide gel elution buffer とゲル片を分離した。次に, 分離した溶液を回収し, エタノール沈殿を行った。沈殿した基質 DNA は 50 μ L の TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0) に溶かした。最後に濃度の測定を行い, -30°C に保存した。

2.8 鎖交換アッセイ

単鎖 RNA と二重鎖 DNA 間の inverse 鎖交換反応の解析には, 精製した dsDNA (5'末端に Cy3 を付加した 40-mer 単鎖 DNA (ISE#1) と蛍光分子を付加していない 71-mer 単鎖 DNA (ISE#2) をアニーリングしたものと, Cy5 が 5'末端に付加された 40-mer の単鎖 RNA (ISE#3) を使用した。まず, 10 μ M (分子濃度) の RAD52 希釈溶液を調製した。次に, dsDNA を含むマスターミックスを調製した。一反応分のマスターミックス (16 μ L) には strand exchange buffer (0.1 M HEPES-KOH, pH 7.5, 25 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mM 2-mercaptoethanol) が 4 μ L, dsDNA (676 nM; 終濃度 67.6 nM) が 2 μ L, BSA (0.2 mg/mL; 終濃度 0.01 mg/mL) が 1 μ L, RNase inhibitor (5 units/ μ L; 終濃度 0.5 U/ μ L) が 1 μ L, Milli-Q 水が 8 μ L 含まれていた。このマスターミックスと希釈した RAD52 を別々に 37°C で 5 分間プレインキュベーションした。その後, プレインキュベーションした RAD52 をマスタ

ーミックスに 2 μ L 加え（終濃度 1 μ M；分子濃度）37°Cで 10 分間反応させた。次に、単鎖 RNA（ISE#3, 2500 nM, 終濃度 250 nM；分子濃度）を 2 μ L 加え, 37°Cで 1, 2, 5, 10, 20, 40 分間反応させた。反応を停止させるために、各反応溶液に 5% LDS を 2 μ L, proteinase K (800 U/mL) を 1 μ L 加え, 37°Cで 10 分間反応させ, 除タンパク質処理を行った。その後, 40% スクロースを 4 μ L 加え, 混合液から 10 μ L を取り, 12% ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した (75 V, 90 min)。電気泳動には, 0.5x TBE 緩衝液を使用した。バンドの検出および鎖交換反応によって形成された RNA・DNA ハイブリッドの定量は, 上記と同様の方法で行った。RAD52¹⁻²¹², RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ や, RAD52 点変異体についても同様の方法で inverse 鎖交換活性を解析した。さらに, 単鎖 DNA と二重鎖 DNA 間の inverse 鎖交換反応についても, 上記と同様の方法で解析を行った。ただし, RNase inhibitor の代わりに Milli-Q 水を加えた。

単鎖 RNA と二重鎖 DNA 間の forward 鎖交換反応の解析には, 精製した dsDNA (5'末端に Cy3 を付加した 40-mer 単鎖 DNA (ISE#1) と蛍光分子を付加していない 71-mer 単鎖 DNA (ISE#2) をアニーリングしたもの) と, Cy5 が 5'末端に付加された 40-mer の単鎖 RNA (ISE#3) を使用した。まず, 10 μ M (分子濃度) の RAD52 希釈溶液を調製した。次に, 単鎖 RNA を含むマスターミックスを調製した。一反応分のマスターミックス (16 μ L) には strand exchange buffer (0.1 M HEPES-KOH, pH 7.5, 25 mM MgCl₂ · 6H₂O, 10 mM 2-mercaptoethanol) が 4 μ L, 単鎖 RNA (ISE#3, 2500 nM, 終濃度 250 nM；分子濃度) が 2 μ L, BSA (0.2 mg/mL; 終濃度 0.01 mg/mL) が 1 μ L, RNase inhibitor (5 units/ μ L; 終濃度 0.5 U/ μ L) が 1 μ L, Milli-Q 水が 8 μ L 含まれていた。このマスターミックスと希釈した RAD52 を別々に 37°C で 5 分間プレインキュベーションした。その後, プレインキュベーションした RAD52 をマスターミックスに 2 μ L 加え (終濃度 1 μ M；分子濃度) 37°Cで 10 分間反応させた。次に, dsRNA (676 nM; 終濃度 67.6 nM) を 2 μ L 加え, 37°Cで 1, 2, 5, 10, 20,

40 分間反応させた。反応を停止させるために、各反応溶液に 5% LDS を 2 μ L, proteinase K (800 U/mL) を 1 μ L 加え、37°C で 10 分間反応させ、除タンパク質処理を行った。その後、40% スクロースを 4 μ L 加え inverse 鎖交換反応と同様の方法で電気泳動とバンドの解析を行った。

2.9 単鎖 RNA または単鎖 DNA 存在下における RAD52 の凝集実験

単鎖 RNA 存在下における RAD52 の凝集活性の解析には、Cy5 が 5'末端に付加された 40-mer の単鎖 RNA (ISE#3) を使用した。まず、2.5, 5, 7.5, 10 μ M (分子濃度) の RAD52 希釈溶液を調製した。次に、単鎖 RNA を含むマスターミックスを調製した。一反応分のマスターミックス (36 μ L) には、5x reaction mixture が 8 μ L, 単鎖 RNA (ISE#3, 625 nM ; 終濃度 62.5 nM) が 4 μ L, RNase inhibitor (10 U/ μ L ; 終濃度 0.5 U/ μ L) が 2 μ L, Milli-Q 水が 8 μ L 含まれていた。このマスターミックスを 37°C で 5 分間プレインキュベーションした。その後、希釈した RAD52 (終濃度 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 μ M ; 分子濃度) を 4 μ L 加え 37°C で 10 分間反応させた。次に、反応液を 15,000 rpm で 5 分間遠心した後に上層 20 μ L を新しいチューブに移した。取り分けた上層と残った反応液 (下層) にそれぞれ、2.5% LDS を 2 μ L, proteinase K (800 U/mL) を 1 μ L 加え、37°C で 10 分間反応させ、除タンパク質処理を行った。次に、40% sucrose dye を 4 μ L 加え、混合液から 10 μ L を取り、12% ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (75 V, 90 min, パワーパック Basic) により分離した。電気泳動には 0.5x TBE 緩衝液を用いた。分離した単鎖 RNA は上記と同様の方法で定量した。

単鎖 DNA 存在下における RAD52 の凝集活性の解析には、Cy5 が 5'末端に付加された 40-mer の単鎖 DNA (ISE#4) を使用し、上記と同様の方法で解析を行った。ただし、マスターミックスには、RNase inhibitor を加えなかった。

2.10 RAD52 を用いた液滴形成と蛍光観察

RAD52 の液滴を観察するために、まず、スライドガラスとカバーガラスのコーティングを行った。コーティングには、acetic acid 10 μ L, mPEG-silane-5000 5 mg, Milli-Q 水 1 mL を混合した溶液を調製し、その溶液をガラス全体に塗り広げてから 62°C で 1 時間以上インキュベートした。その後、ソニケーションで余分なコーティング液を取り除き、RO 水でよく濯ぎ自然乾燥させた。次に、25 μ M の RAD52-GFP を 12 μ L 用意した。また、新しい 1.5 mL チューブにマスターミックス (18 μ L) を用意した。ここには 10% dextran が 15 μ L, Milli-Q 水が 3 μ L 含まれていた。RAD52-GFP とマスターミックスをそれぞれドライバスにて 25°C で 5 分間インキュベートした。その後、RAD52 とマスターミックスを混ぜ (全量 30 μ L) 再び 25°C で 3 分間インキュベートした。次に、反応液 10 μ L を mPEG-silane-5000 でコーティングしたスライドガラスとカバーガラスで挟み、蛍光顕微鏡で観察した。1 枚のスライドガラスに対し、異なる 16 箇所において液滴の画像を撮影した。液滴の定量解析には Fiji ソフトウェアに含まれる粒子解析プログラムを使用した。解析では、粒子の面積が 0.3 μ m² 以上であり、真円度が 0.85 (真円の場合は 1) 以上のものを選択するように設定を行った。1,6-hexanediol を含む実験ではまず、25 μ M の RAD52-GFP を 12 μ L と、10% dextran を 15 μ L 別々のチューブに用意し、ドライバスにて 25°C で 5 分間インキュベートした。次に、RAD52 と 10% dextran を混ぜ 25°C で 3 分間インキュベートした。その後、30% の 1,6-hexanediol (終濃度 3%) を加え再び 25°C で 3 分間インキュベートした。反応液を 10 μ L 取り出し、上記と同様の方法で観察した。単鎖 RNA を含めた条件では、マスターミックスに 40-mer (PS#3) または 70-mer の単鎖 RNA (PS#4) を終濃度が 2 μ M (分子濃度) になるように加え、同様の方法で解析を行った。単鎖 DNA を含めた条件では、40-mer (PS#1) または 70-mer (PS#2) の単鎖 DNA を終濃度が 2 μ M (分子濃度) となるように加え、同様の方法で解析を行った。

第 3 章 結果

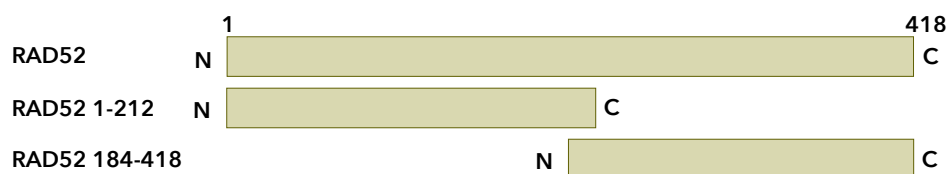
3.1 RAD52 タンパク質の大量調製

RAD52 の RNA 上での機能を生化学的に解析するために、先行研究で確立されている大量調製法で全長のヒト RAD52 と RAD52 の N 末端側半分の領域を含む断片 (RAD52¹⁻²¹²) の大量精製を行った (図 4) (Kagawa et al., 2001; Kagawa et al., 2008)。RAD52 の N 末端側半分には DNA 結合部位が存在し、これまでの研究により C 末端側半分が欠失しても全長タンパク質と同程度の DNA アニール活性や D-loop 形成活性を有することが明らかにされている。調製した RAD52 は 1.5 mL チューブに分注し -80°C で保存した。

3.1.1 RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸

RAD52 はこれまでに N 末端側半分の領域についてその立体構造や DNA との相互作用が明らかにされている。一方、C 末端側半分の領域についてはアミノ酸配列から天然変性領域であることが考えられているが、どのような機能を有しているのかは明らかにされていない。そこで、RAD52 の C 末端側半分の領域を含む断片の大量調製法を確立し、生化学的手法を用いて断片の機能の解明を試みた。RAD52 の C 末端側断片を調製するために、全長のタンパク質を発現させ、プロテアーゼ処理によって切り離された C 末端側の領域をクロマトグラフィーにより単離した (図 4)。プロテアーゼ切断部位は、先行研究で明らかにされている RAD52¹⁻²¹² の結晶構造を参考にして、二次構造を形成せず、溶媒に露出した領域 (RAD52 の 183 番目の Pro と 184 番目の Leu の間) に TEV プロテアーゼ認識配列 (Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly) を人工的に導入した。大量調製した断片には、RAD52 の 184 番目のアミノ酸から C 末端 (418 番目) のアミノ酸が含まれていた。

A



B

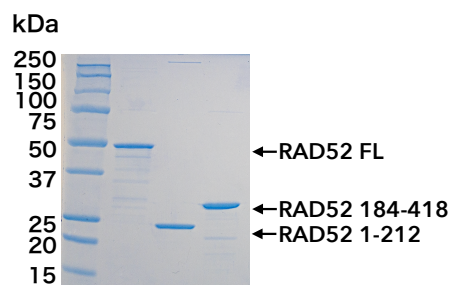


図4 全長RAD52とRAD52断片 (RAD52¹⁻²¹², RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸) の精製

- (A) 精製した全長RAD52とRAD52断片 (RAD52¹⁻²¹², RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸) の一次構造の模式図。全長RAD52の理論分子量は約48 kDa, RAD52¹⁻²¹²は約20 kDa, RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸は約26 kDaである。
- (B) RAD52およびその断片の最終精製物 (1 μg) を10-20%ポリアクリルアミドゲルにてSDS-PAGEし、CBB染色した。

3.1.2 RAD52 点変異体

RAD52 は先行研究により N 末端側領域で DNA と相互作用することが明らかにされており、その相互作用に重要なアミノ酸残基が同定されている。一方、RNA との相互作用領域や相互作用に重要なアミノ酸残基の同定は行われていない。そこで、RAD52 の点変異体を大量調製し、その RNA 結合活性を生化学的に解析することで RAD52 の RNA 結合領域の同定を試みた。まず、先行研究によって明らかにされている RAD52 の立体構造と DNA 結合に重要なアミノ酸残基の情報を参考にし、RAD52 の N 末端側に存在し表面に露出しているリジンやアルギニン、チロシンをアラニンに置換した 9 種類の点変異体 (R55A, K62A, Y65A, K102A, K133A, K152A, K169A, R173A, K177A) をそれぞれ大量調製した (図 5)。RAD52 点変異体は、1.5 mL チューブに分注し -80°C で保存した。

3.1.3 RAD52-GFP

RAD52 は C 末端側半分の領域がアミノ酸配列から天然変性領域であることが予測されている。また、近年 RNA と相互作用し天然変性領域を有するタンパク質の液-液相分離について注目されている。さらに、先行研究にて出芽酵母の Rad52 が液滴を形成することが明らかにされた。このことからヒト RAD52 の DNA 修復における機能の一つとして液-液相分離が考えられる。そこで RAD52 の液滴形成について顕微鏡解析を試みた。そのためにまず RAD52 の C 末に GFP (green fluorescent protein) タンパク質が融合された RAD52-GFP の発現ベクターを構築した。次に、すでに確立されている 野生型 RAD52 の大量調製系を参考にし、RAD52-GFP の大量調製系を確立した (図 6)。精製した RAD52-GFP は 1.5 mL チューブに分注し -80°C で保存した。

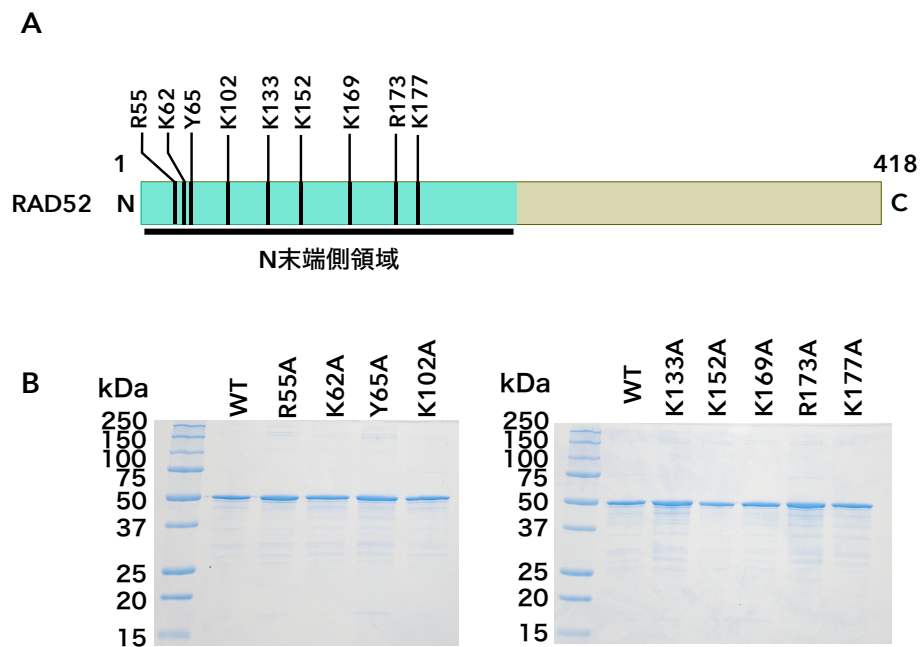
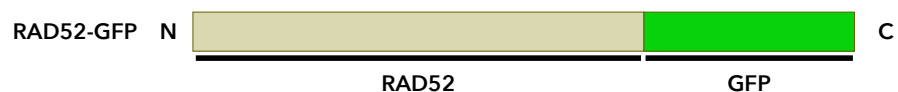


図5 RAD52 点変異体の精製

(A) 本研究で調製したアラニン点変異体の変異部位とそのアミノ酸残基。

(B) RAD52 点変異体の最終精製物 (1 μ g) を 10-20%ポリアクリルアミドゲルにて SDS-PAGE し、CBB 染色した。

A



B

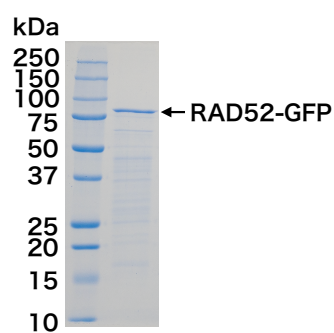


図6 RAD52-GFP の精製

(A) RAD52 の C 末端側に GFP が融合されたコンストラクトを大量発現させ、精製した。RAD52-GFP の理論分子量は約 80 kDa である。

(B) RAD52-GFP の最終精製物 (1.5 μ g) を 10-20%ポリアクリルアミドゲルにて SDS-PAGE し、CBB 染色した。

3.2 RAD52 の RNA 結合活性

3.2.1 単鎖 RNA との相互作用

これまでに報告されている酵母における遺伝学的研究から, RAD52 は RNA を利用した DNA 修復において重要な役割を持つことが示唆されている。そこで, 精製した RAD52 を用いて, RNA 結合活性を調べた。そのために, 相互作用を *in vitro* で検証できるゲルシフト法を用いた (図 7 A)。基質には 5'末端に Cy5 蛍光分子が付加された 40-mer の単鎖 RNA (ISE#3) を用いた。この実験系では, 各濃度の RAD52 と単鎖 RNA を反応させると, RAD52・RNA 複合体が形成される。それぞれのサンプルについて 2%のアガロースゲルおよび 12%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い, 複合体と複合体を形成していない単鎖 RNA を検出した。その結果, RAD52 の濃度が 0.5 μ M 以上の条件 (図 7 B ; lane 2) で, 単鎖 RNA のバンドのシフトが見られ, RAD52 の終濃度が 1.0 μ M 以上の条件 (図 7 B ; lanes 3-5) では全ての RNA がシフトしていた (図 7 B and C)。このことから RAD52 は濃度依存的に単鎖 RNA と結合することがわかった。

3.2.2 DNA 結合活性との比較

前節の結果から, RAD52 は単鎖 RNA と濃度依存的に複合体を形成することがわかった。そこで, 精製した RAD52 を用いて単鎖 DNA 結合活性を調べ, 単鎖 RNA との結合と比較を行うことにした。単鎖 DNA 結合活性も, 単鎖 RNA 結合活性と同様にゲルシフト法を用いて解析した (図 8 A)。基質には, 5'末端に Cy5 蛍光分子が付加された 40-mer の単鎖 DNA (ISE#4) を用いた。各濃度の RAD52 と単鎖 DNA を反応させ, それぞれのサンプルについて 2%のアガロースゲルおよび 12%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い, 複合体と複合体を形成していない単鎖 DNA を検出した。その結果, RAD52 の濃度が 0.5 μ M 以上の条件

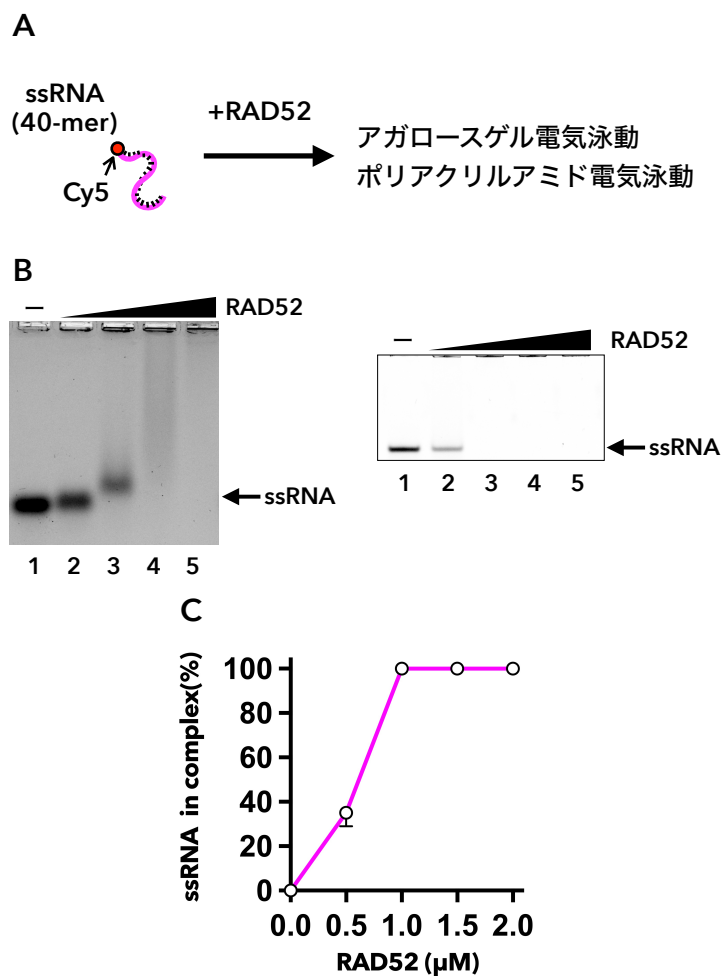


図7 RAD52 の RNA 結合活性

- (A) 実験系の模式図。試験管内で各濃度の RAD52 (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 μM) と Cy5 を付加した 40-mer の単鎖 RNA (ISE#3, 62.5 nM) を 37°C で 10 分間反応させた。得られた反応液を 2% アガロースゲル電気泳動および 12% ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離した。
- (B) アガロースゲル電気泳動 (左) およびポリアクリルアミドゲル電気泳動 (右) による複合体の分離。Cy5 の蛍光を Typhoon イメージアナライザーで検出し、複合体とフリーの単鎖 RNA を可視化した。
- (C) RAD52 の単鎖 RNA 結合活性。ポリアクリルアミドゲルで検出されたフリーの単鎖 RNA を Fiji ソフトウェアにて定量し、複合体の割合を算出した。縦軸は、形成した RAD52・RNA 複合体の割合、横軸は RAD52 の濃度を示す。

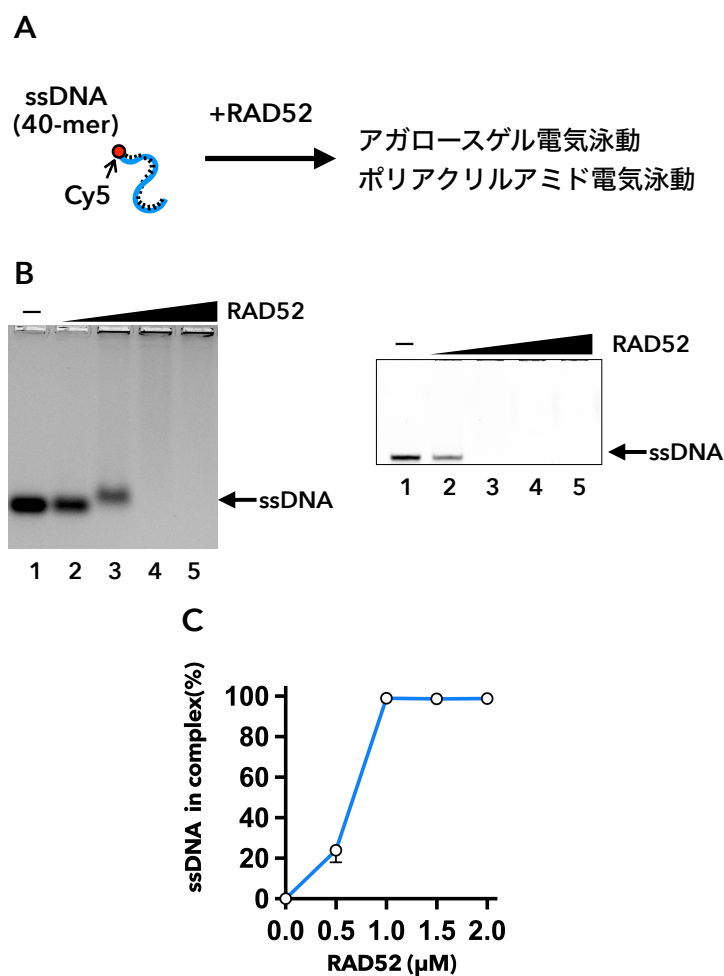


図8 RAD52 の DNA 結合活性

- (A) 実験系の模式図。試験管内で各濃度の RAD52 (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 μM) と Cy5 を付加した 40-mer の単鎖 DNA (ISE#4, 62.5 nM) を 37°C で 10 分間反応させた。得られた反応液を 2% アガロースゲル電気泳動および 12% ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離した。
- (B) アガロースゲル電気泳動 (左) およびポリアクリルアミドゲル電気泳動 (右) による複合体の分離。Cy5 の蛍光を Typhoon イメージアナライザーで検出し、複合体とフリーの単鎖 DNA を可視化した。
- (C) RAD52 の単鎖 DNA 結合活性。ポリアクリルアミドゲルで検出されたフリーの単鎖 DNA を Fiji ソフトウェアにて定量し、複合体の割合を算出した。縦軸は、形成した RAD52・DNA 複合体の割合、横軸は RAD52 の濃度を示す。

(図 8 B ; lane 2) で単鎖 DNA のバンドのシフトが見られ、RAD52 の終濃度が 1.0 μ M 以上の条件 (図 8 B ; lanes 3-5) では全ての DNA がシフトしており相互作用していることが確認できた (図 8 B and C)。この結果から、RAD52 は単鎖 RNA と単鎖 DNA に対して同程度の親和性を示すことが考えられた。

さらに、RAD52 の単鎖 RNA に対する親和性を調べるために、DNA 存在下における RNA 結合活性を検討した。そのために、ゲルシフト法を用いた (図 9 A)。基質には、ハイブリッドを形成しない 5'末端に Cy5 蛍光分子が付加された 40-mer の単鎖 RNA (CA#1) と 5'末端に Cy3 蛍光分子が付加された 40-mer の単鎖 DNA (ISE#1) を用いた。この実験系では、各濃度の RAD52 と単鎖 RNA 及び単鎖 DNA を反応させると、それぞれの基質に RAD52 が結合した複合体が形成されることが予想される。各サンプルについて 2%のアガロースゲルおよび 12%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行った。電気泳動したゲルを Typhoon イメージアナライザーにて Cy3 と Cy5 の蛍光をそれぞれ検出した。その結果、単鎖 RNA と単鎖 DNA どちらも RAD52 の終濃度が 1 μ M 以上の条件でバンドのシフトが見られたことから、RAD52 は単鎖 DNA 存在下でも単鎖 RNA と相互作用することがわかった (図 9 B ; lane 4)。また、複合体を形成しなかった単鎖 RNA および単鎖 DNA を Fiji ソフトウェアにて定量した結果、RAD52 の単鎖 RNA と単鎖 DNA に対する結合活性は同程度であることがわかった (図 9 C and D)。さらに、RAD52・ssRNA 複合体はアガロースゲルの中に入りスミアが見られたのに対して、RAD52・ssDNA 複合体はアガロースゲルの中には入らずウェルに溜まっていることがわかった。このことから、RAD52・単鎖 RNA 複合体の大きさは RAD52・単鎖 DNA 複体のそれより小さいことが考えられた。

3. 2. 3 RAD52・RNA 複体の安定性

RAD52 は単鎖 RNA、単鎖 DNA のいずれとも複合体を形成し、複体の形成効率は同程度

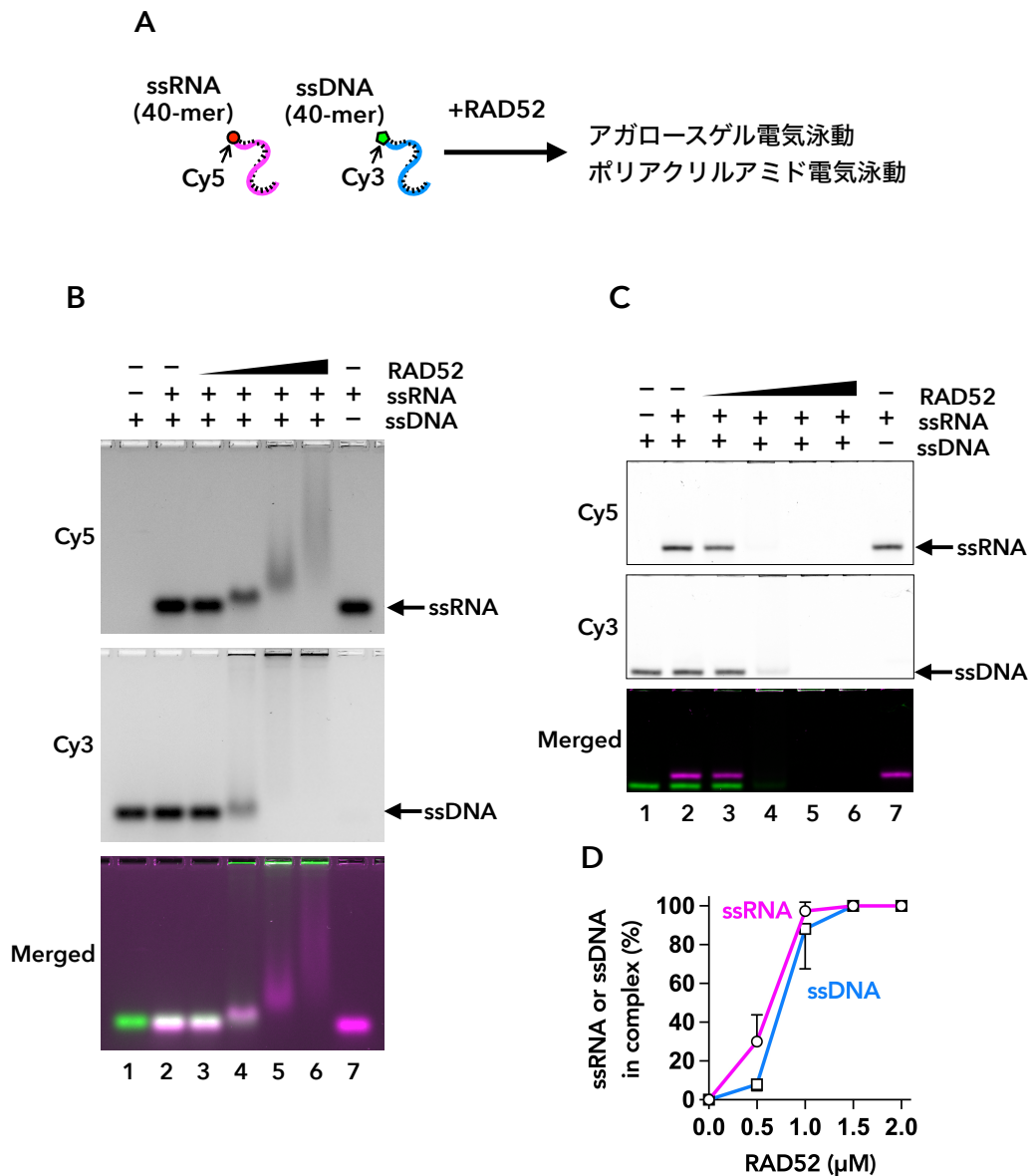


図9 単鎖 DNA 共存下での RNA 結合活性

- (A) 実験系の模式図。試験管内で RAD52 (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 μM) と Cy5 を付加した 40-mer の単鎖 RNA (CA#1) および Cy3 を付加した 40-mer の単鎖 DNA (ISE#1) を 37°C で 10 分間反応させた。反応液を 2%アガロースゲル電気泳動および 12%ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離した。
- (B,C) RAD52 の単鎖 RNA および単鎖 DNA 結合活性。複合体を分離したゲルを Cy3 と Cy5 の蛍光を Typhoon イメージアナライザーで別々に検出し、それぞれの複合体を可視化した。下のゲル写真では、Fiji ソフトウェアによって各蛍光シグナルを色付けし (Cy3, green ; Cy5, magenta) それらを重ね合わせた。

(D) RAD52 の単鎖 DNA 存在下における単鎖 RNA に対する親和性。ポリアクリルアミドゲルで検出されたフリーの単鎖 RNA およびフリーの単鎖 DNA を Fiji ソフトウェアにて定量し、それぞれの複合体の割合を算出した。縦軸は、形成した RAD52・単鎖 RNA および RAD52・単鎖 DNA 複合体の割合、横軸は RAD52 の濃度を示す。

であることがわかった。そこで次に、RAD52 に対する単鎖 RNA と単鎖 DNA の競合解析を行うことで RAD52・単鎖 RNA 複合体の安定性を調べた。実験では、蛍光分子を付加した単鎖 RNA と RAD52 との複合体を形成させ、そこに competitor の単鎖 DNA を過剰に加え、複合体から解離される単鎖 RNA の量を解析することで複合体の安定性を評価した。RAD52・ssRNA 複合体に単鎖 DNA を競合させる実験では、5'末端に Cy5 蛍光分子が付加された 40-mer の単鎖 RNA (CA#1) を RAD52 と結合させ、蛍光分子を付加していない 40-mer の単鎖 DNA (CA#2) を competitor として用いた。RAD52・ssDNA 複合体に単鎖 RNA を競合させる実験では、5'末端に Cy3 蛍光分子が付加された 40-mer の単鎖 DNA (ISE#1) を RAD52 と結合させ、蛍光分子を付加していない 40-mer の単鎖 RNA (CA#3) を competitor として用いた。まず RAD52 と単鎖 RNA または単鎖 DNA を混合した後に、各濃度の competitor を反応させ、それぞれのサンプルについてアガロースゲル電気泳動で分離を行った。その結果、RAD52・ssRNA 複合体、RAD52・ssDNA 複合体のどちらも competitor を加えると competitor の濃度依存的に複合体の解体が見られた。RAD52・ssRNA 複合体は competitor DNA が RNA に対して 100 倍存在する条件 (図 10 A ; lane 8) において RAD52 から解離した RNA が見られた。一方、RAD52・ssDNA 複合体では competitor RNA が DNA に対して 5 倍存在する条件 (図 10 B ; lane 5) において RAD52 から解離した DNA が見られた。これらに結果から、RAD52・ssRNA 複合体の方が RAD52・ssDNA 複合体より安定であることが示唆された。

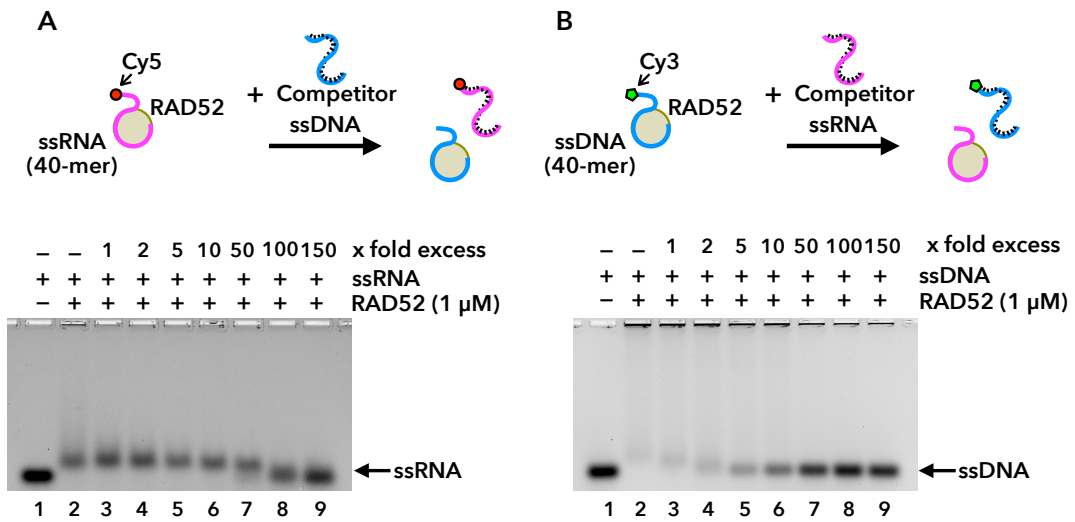


図 10 RAD52・RNA 複合体の安定性

- (A) 単鎖 DNA を competitor にした競合阻害実験。RAD52 (1 μ M) と Cy5 を付加した単鎖 RNA (CA#1, 62.5 nM) を 37°C で 10 分間反応させた。次に、各濃度の competitor DNA (CA#2; 62.5, 125, 312.5, 625, 3125, 6250, 9375 nM) を加え 37°C で 10 分間反応させた。RAD52・単鎖 RNA 複合体と解離した単鎖 RNA を 2% のアガロースゲル電気泳動にて分離した後、Cy5 の蛍光を Typhoon イメージアナライザーで検出した。
- (B) 単鎖 RNA を competitor にした競合阻害実験。RAD52 (1 μ M) と Cy3 を付加した単鎖 DNA (ISE#1, 62.5 nM) を 37°C で 10 分間反応させた。次に、各濃度の competitor RNA (CA#3; 62.5, 125, 312.5, 625, 3125, 6250, 9375 nM) を加え 37°C で 10 分間反応させた。RAD52・単鎖 DNA 複合体と解離した単鎖 DNA を 2% のアガロースゲル電気泳動にて分離した後、Cy3 の蛍光を Typhoon イメージアナライザーで検出した。

3.2.4 RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の RNA 結合活性

これまでの報告から RAD52 と DNA との相互作用は、RAD52 の N 末端側半分の領域が重要であることが明らかにされている。一方、RAD52 の RNA との相互作用に重要な領域は明らかにされていない。そこで、RAD52 の N 末端側半分の領域 (RAD52¹⁻²¹²) と C 末端側半分の領域 (RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸) を断片として大量精製し、それぞれの単鎖 RNA 結合活性を全長 RAD52 と同様の方法で調べた。基質には、5'末端に Cy5 蛍光分子が付加された 40-mer の単鎖 RNA (ISE#3) を用いた。各濃度の RAD52 断片 (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 μ M) と単鎖 RNA を反応させ、それぞれのサンプルについて 2% アガロースゲルおよび 12% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、複合体の分離を試みた。その結果、RAD52¹⁻²¹² は全長 RAD52 と比べ、終濃度が 0.5 μ M から 1 μ M のときの単鎖 RNA 結合活性が低いことがわかった (図 11 B, 左グラフと図 7 C を比較)。RAD52 の終濃度が 1.5 μ M 以上では、RAD52¹⁻²¹² は全長タンパク質と同様にウェルに溜まる大きな複合体を形成することがわかった (図 11 A と図 7 B)。一方、RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ は単鎖 RNA と相互作用を示したが、RAD52¹⁻²¹² や全長 RAD52 のようにウェルに溜まるような大きな複合体は検出されなかった (図 11 A と図 7 B)。また、RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の終濃度が 2 μ M の条件でもフリーの単鎖 RNA が検出された。このことから、RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ は RAD52¹⁻²¹² や全長 RAD52 と比べ、単鎖 RNA 結合活性がかなり低いことがわかった (図 11 B)。特筆すべきことに、RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ と単鎖 RNA との複合体はフリーの単鎖 RNA 付近にスミアとして検出され、このような複合体は RAD52¹⁻²¹² では見られなかった (図 11 A)。これらの結果から、RAD52 の N 末端側半分の領域と C 末端側半分の領域の RNA 結合様式は異なることが考えられた。

次に、RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の単鎖 DNA 結合活性を調べ、それらを RNA 結合活性と比較した。RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の単鎖 DNA 結合活性は、全長 RAD52 と同様の方法で解析した。基質には、5'末端に Cy5 蛍光分子が付加された 40-mer の単鎖 DNA (ISE#4)

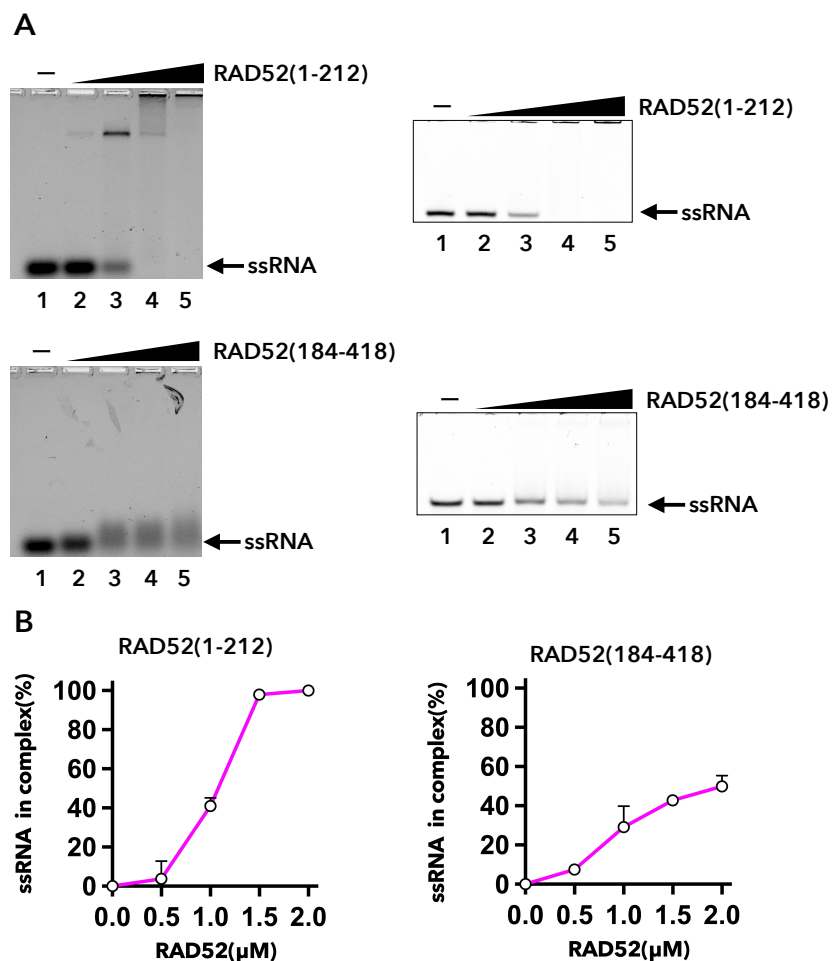


図 11 RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の RNA 結合活性

- (A) 試験管内で RAD52 断片 (RAD52¹⁻²¹², RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸; 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 μM) と Cy5 を付加した 40-mer の単鎖 RNA (ISE#3, 62.5 nM) を 37°C で 10 分間反応させた。複合体とフリーの単鎖 RNA を 2% アガロースゲル電気泳動および 12% ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離した。Cy5 の蛍光を Typhoon イメージアナライザーで検出し、複合体とフリーの単鎖 RNA を可視化した。
- (B) RAD52¹⁻²¹² (左) と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ (右) の RNA 結合活性。ポリアクリルアミドゲルで検出されたフリーの単鎖 RNA を Fiji ソフトウェアにて定量し、複合体の割合を算出した。縦軸は、形成した RAD52・RNA 複体の割合、横軸は RAD52 の濃度を示す。

を用いた。各濃度の RAD52 断片 (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 μ M) と単鎖 DNA を反応させ、それぞれのサンプルについて 2% アガロースゲルおよび 12% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、複合体の分離を行った (図 12 A)。複合体の定量を行ったところ、RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ はどちらも単鎖 DNA に対する親和性の方が単鎖 RNA に対する親和性より低いことがわかった (図 12 B と図 11 B を比較)。この傾向は、全長 RAD52 でも見られている (図 7 と図 8 を比較)。

3.2.5 RAD52 点変異体と単鎖 RNA との相互作用解析

先行研究では、RAD52 の N 末端側半分の立体構造が明らかにされており、RAD52 が形成する多量体リング構造を一周する溝の内側で単鎖 DNA と結合し、その相互作用に重要なアミノ酸残基が明らかにされている (Kagawa et al., 2002; Saotome et al., 2018)。本研究で RAD52 の N 末端側の領域は単鎖 RNA との結合にも重要であることがわかった。そこで、N 末端側の領域のどのアミノ酸残基が単鎖 RNA との結合に重要なのかを明らかにすることを目指した。そのために、RAD52 の溝の内側に存在するアミノ酸残基に加え、N 末端側半分が形成する多量体リング構造の表面に露出している塩基性や芳香属アミノ酸をアラニンに置換した点変異体 (R55A, K62A, Y65A, K102A, K133A, K152A, K169A, R173A, K177A) を精製し、それらの単鎖 RNA 結合活性をゲルシフト法により調べた (図 13 A and B)。基質には、5'末端に Cy5 蛍光分子が付加された 40-mer の単鎖 RNA (ISE#3) を用いた。各濃度の RAD52 点変異体 (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 μ M) と単鎖 RNA を反応させた後、それぞれのサンプルについて 2% アガロースゲル電気泳動を行い、複合体とフリーの単鎖 RNA を分離した。その結果、いずれの点変異体も単鎖 RNA と結合し、野生型 RAD52 と比べ結合活性の顕著な低下は見られなかった (図 13 C)。従って、N 末端側領域の単鎖 RNA 結合部位は、単鎖 DNA 結合部位とは同一ではないことが考えられた。

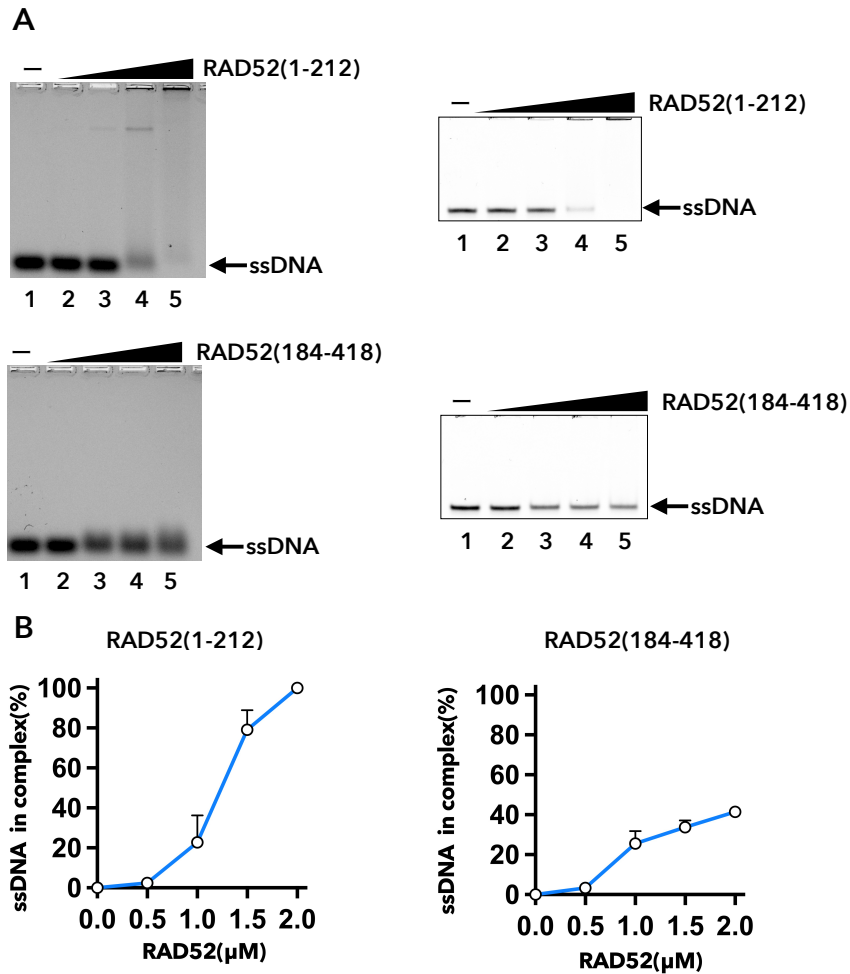


図 12 RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の DNA 結合活性

- (A) 試験管内で RAD52 断片 (RAD52¹⁻²¹², RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸; 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 μM) と Cy5 を付加した 40-mer の単鎖 DNA (ISE#4, 62.5 nM) を 37°C で 10 分間反応させた。複合体とフリーの単鎖 DNA を 2% アガロースゲル電気泳動および 12% ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離した。Cy5 の蛍光を Typhoon イメージアナライザーで検出し、複合体とフリーの単鎖 DNA を可視化した。
- (B) RAD52¹⁻²¹² (左) と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ (右) の DNA 結合活性。ポリアクリルアミドゲルで検出されたフリーの単鎖 DNA を Fiji ソフトウェアにて定量し、複合体の割合を算出した。縦軸は、形成した RAD52・DNA 複合体の割合、横軸は RAD52 の濃度を示す。

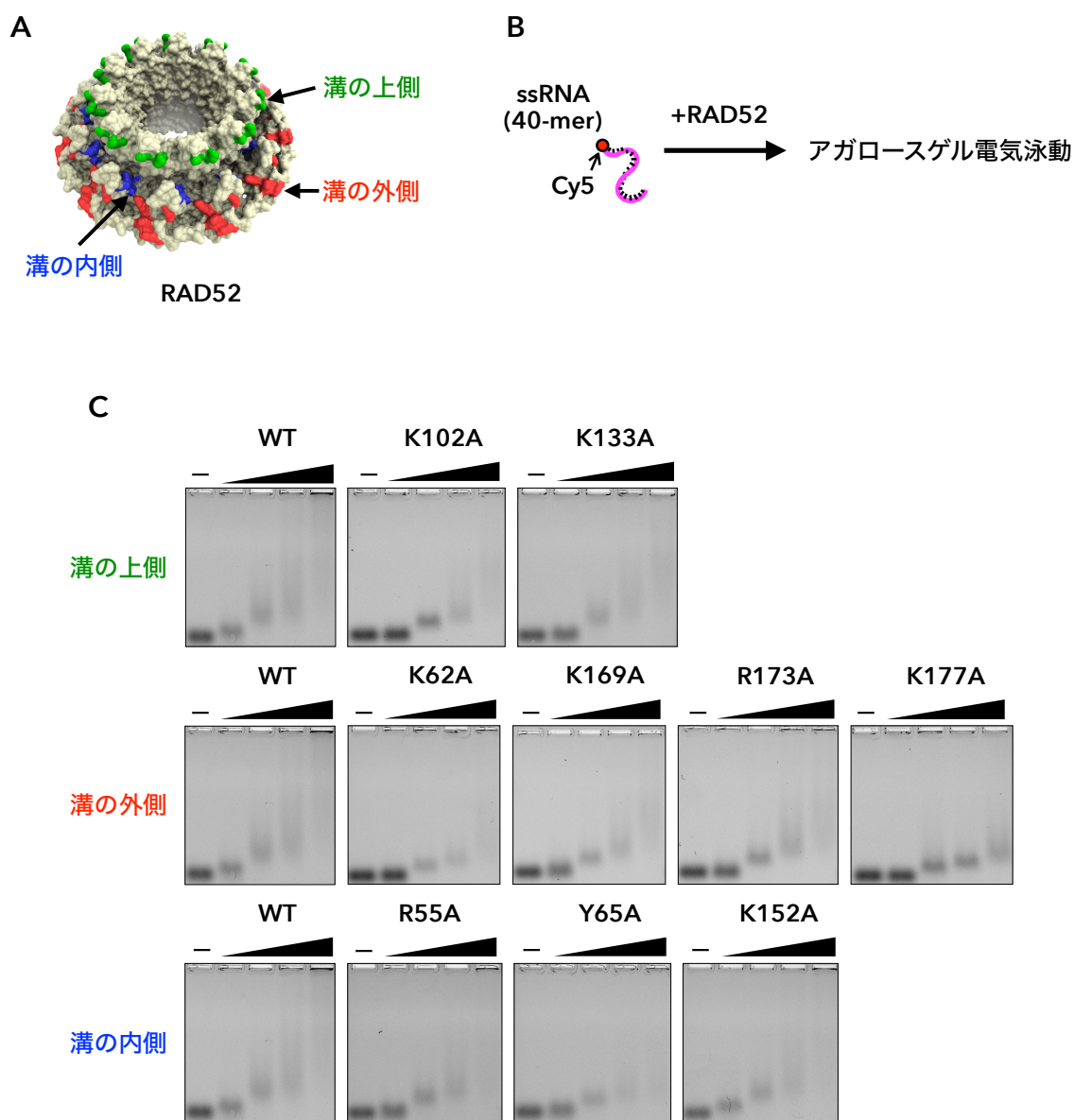


図 13 RAD52 点変異体の RNA 結合活性

- (A) RAD52¹⁻²¹² の結晶構造上に、導入した点変異の領域を示す。緑色で示した部位が溝の上側、青色で示した部位が溝の内側、赤色で示した部位が溝の外側である。
- (B) 実験の模式図。試験管内で各濃度の RAD52 点変異体 (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 μ M) と Cy5 を付加した 40-mer の単鎖 RNA (ISE#3, 62.5 nM) を 37°C で 10 分間反応させた。複合体とフリーの単鎖 RNA を 2% アガロースゲル電気泳動にて分離した。
- (C) RAD52 点変異体の単鎖 RNA 結合活性。Cy5 の蛍光を Typhoon イメージアナライザーで検出し、複合体とフリーの単鎖 RNA を可視化した。

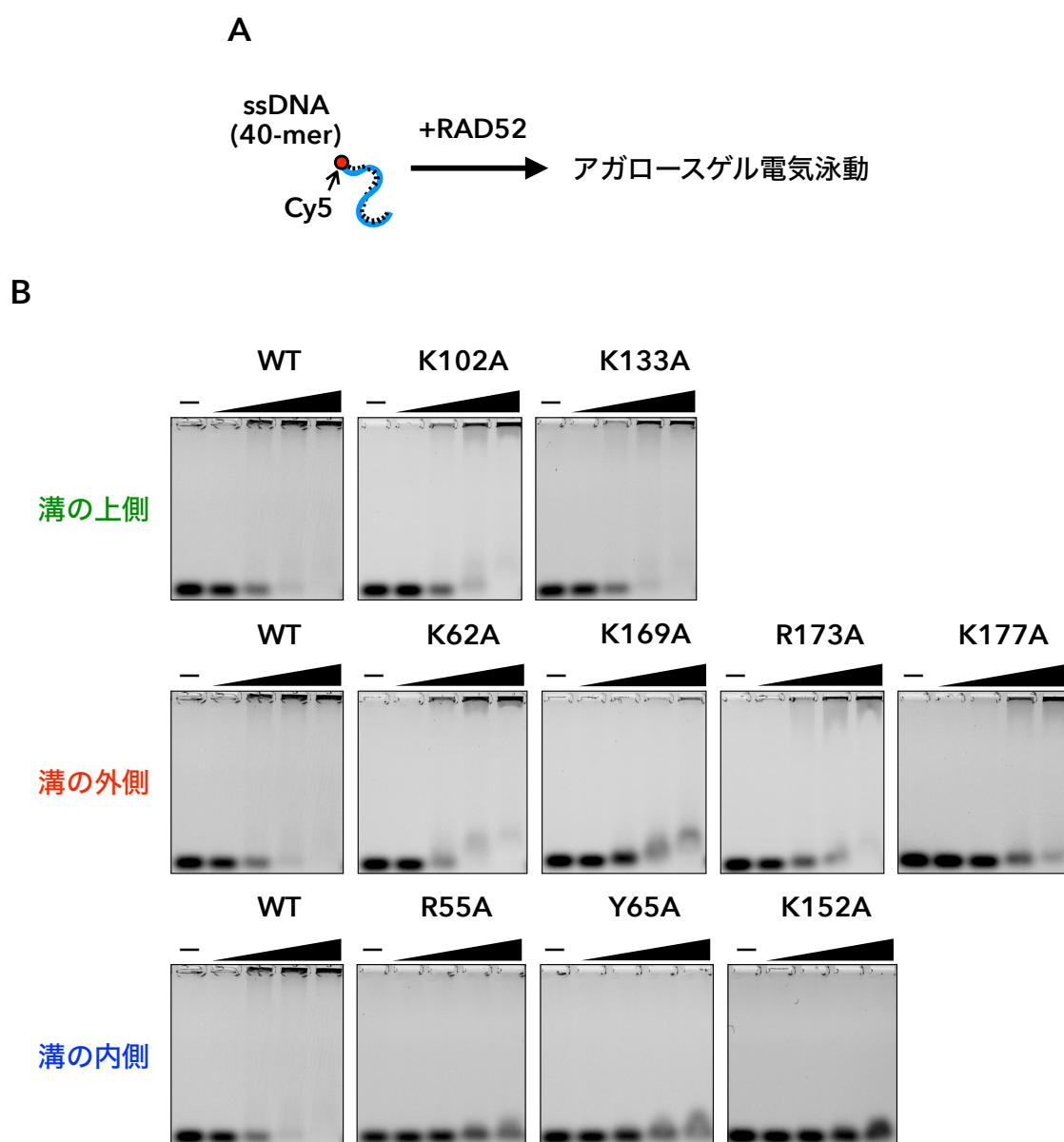


図 14 RAD52 点変異体の DNA 結合活性

(A) 実験の模式図。試験管内で各濃度の RAD52 点変異体 (0.4, 0.8, 1.2, 1.6 μ M) と Cy5 を付加した 40-mer の単鎖 DNA (ISE#4, 62.5 nM) を 37°C で 10 分間反応させた。複合体とフリーの単鎖 DNA を 0.8% アガロースゲル電気泳動にて分離した。

(B) RAD52 点変異体の単鎖 DNA 結合活性。Cy5 の蛍光を Typhoon イメージアナライザーで検出し、複合体とフリーの単鎖 DNA を可視化した。

上述の通り，単鎖 DNA と結合する RAD52 の N 末端側領域のアミノ酸残基は既に先行研究で明らかにされているが，RAD52 点変異体の単鎖 RNA 結合活性と単鎖 DNA 結合活性を厳密に比較する目的で，精製した RAD52 点変異体の単鎖 DNA 結合活性を調べた（図 14 A）。基質には，5'末端に Cy5 蛍光分子が付加された 40-mer の単鎖 DNA (ISE#4) を用いた。各濃度の RAD52 点変異体（0.4, 0.8, 1.2, 1.6 μ M）と単鎖 DNA を反応させ，それぞれのサンプルについて 0.8% アガロースゲル電気泳動を行った。その結果，先行研究で報告されている通り，RAD52 の溝の内側に存在する R55, Y65, K152 をアラニンに置換した点変異体で著しい結合活性の低下が見られた（図 14 B）。以上の結果から，RAD52 の N 末端側領域の RNA 結合部位は DNA 結合部位とは異なることが考えられた。

3.3 RAD52 の inverse RNA-DNA 鎖交換活性

3.3.1 全長 RAD52 の活性

RAD52 は、RNA を利用した DNA 修復反応において、損傷した二重鎖 DNA と損傷領域から転写された RNA の間で鎖交換反応を触媒すると考えられている (Mazina et al., 2017; McDevitt et al., 2018)。そこで、単鎖 RNA・二重鎖 DNA 間の鎖交換反応を RAD52 が触媒する分子機構を明らかにするために、Mazina らが報告した反応系を参考にして鎖交換反応系を構築した (図 15 A)。この系では、二重鎖 DNA と RAD52 を先に混合した後、二重鎖 DNA の片方の鎖と相補的な単鎖 RNA を加えると、RAD52 が鎖交換反応を触媒し、RNA・DNA ハイブリッドが形成される。鎖交換反応はリコンビナーゼである RecA タンパク質とその真核ホモログである RAD51 タンパク質が触媒することが古くから知られており、リコンビナーゼはまず単鎖 DNA と結合し、その後二重鎖 DNA と相互作用して鎖交換反応を触媒する。一方、RecA の場合、先に二重鎖 DNA と結合した後に、単鎖 DNA と相互作用して鎖交換反応を触媒することも知られており、この反応が「inverse」鎖交換反応と呼ばれている (Kasahara et al., 2000; Zaitsev et al., 2000)。

鎖交換反応系に用いた二重鎖 DNA は片方の末端において 3'末端が突出しており、5'末端に Cy3 が付加された 40-mer の DNA (ISE#1) と蛍光分子が付加されていない 71-mer の DNA (ISE#2) をアニーリングさせることにより調製した。単鎖 RNA は、5'末端に Cy5 が付加された 40-mer (ISE#3) を用いた。RAD52 の終濃度は 1 μ M で固定し、単鎖 RNA を加えてからの反応時間を複数条件検討した。生成物は除タンパク質処理を行った後に、12%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、Typhoon イメージアナライザーを用いて検出した。鎖交換反応を行った結果、二重鎖 DNA とは移動度が異なるバンドが検出された (図 15 A ; lanes 2-7)。このバンドは反応時間の経過とともに強度が強くなり、Cy3, Cy5 どちらで検出

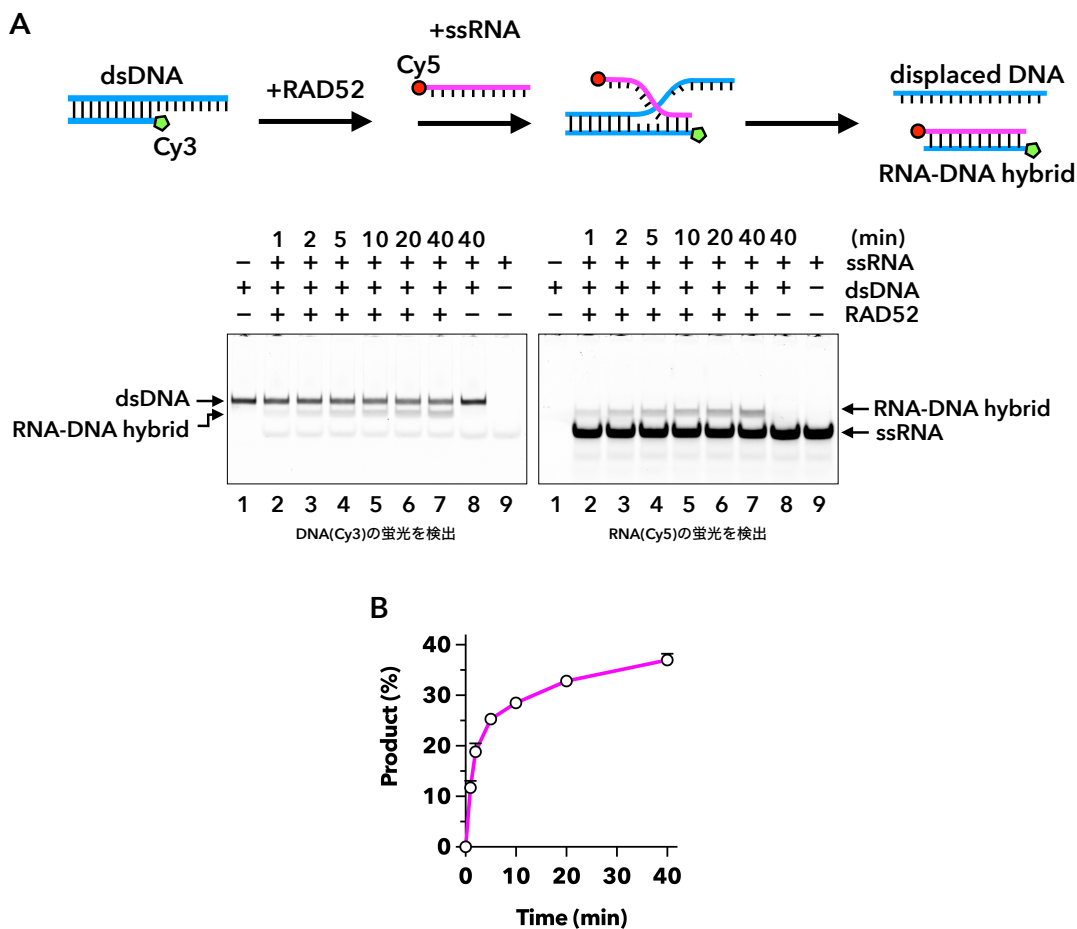


図 15 RAD52 の inverse RNA-DNA 鎖交換活性の解析

- (A) Inverse RNA-DNA 鎖交換反応の模式図。3'突出末端をもつ二重鎖 DNA (ISE#1/2, 67.6 nM) と RAD52 (終濃度, 1 μ M) を 37°C で 10 分間反応させた後に単鎖 RNA を加え (ISE#3, 250 nM) 37°C で 1 分, 2 分, 5 分, 10 分, 20 分, または 40 分反応させた。基質と生成物は 5% LDS と proteinase K で徐タンパク質処理し, 12% ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離した。左右のゲル写真は, 同じゲルを Typhoon イメージアナライザーにより Cy3 または Cy5 の蛍光を検出したときに得られた像である。
- (B) RAD52 の inverse RNA-DNA 鎖交換活性。Cy3 の蛍光を, Fiji ソフトウェアを用いて定量した。縦軸は, RAD52 の触媒により形成された RNA・DNA ハイブリッドの割合を示す。横軸は, 単鎖 RNA を加えてからの反応時間を示す。

しても移動度が同じであったことから、鎖交換反応によって形成された RNA・DNA ハイブリッドであると判断した。DNA に付加した Cy3 の蛍光を定量したところ、反応が 20 分経過した時点で約 30% の二重鎖 DNA が RNA・DNA ハイブリッドに変換されたことがわかった (図 15 B)。この変換効率は Mazina らが報告した効率と同程度であった。また、RAD52 非存在下では RNA・DNA ハイブリッドの形成は見られなかった。以上の結果から、Mazina らが報告した鎖交換反応系は本研究において問題なく再現できたと判断した。

3.3.2 RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の活性

前節で述べた通り、RAD52 の C 末端側の領域が RNA に対して親和性を示すことを明らかにした。RAD52 の RNA-DNA 鎖交換の触媒に重要な領域を明らかにするために RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ を用いて全長 RAD52 と同様の方法で inverse RNA-DNA 鎖交換活性を調べた (図 16 A)。その結果、RAD52¹⁻²¹² の鎖交換活性は全長 RAD52 の活性の 6 割程度であった (図 16 B)。一方、RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ は inverse RNA-DNA 鎖交反応を触媒しないことがわかった (図 16 C)。これらの結果から、RAD52 が触媒する inverse RNA-DNA 鎖交反応は、その N 末端側領域が触媒部位となっていることが考えられた。

次に、RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ が共存する条件で鎖交換反応を行ったところ、興味深いことにそれらのモル比が 1:1 の時に、全長 RAD52 と同程度の触媒効率が見られた (図 16 D)。次に、この反応における RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の濃度依存性を調べた。RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の濃度が RAD52¹⁻²¹² の濃度の半分以上であれば、全長 RAD52 と同程度の触媒効率であることがわかった (図 16 E)。一方、RAD52¹⁻²¹² の濃度に対して RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の濃度が 5 分の 1 以下の場合には、RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の効果はほぼ見られなかった (図 16 E)。これらの結果から、RAD52 の C 末端側半分の領域は、inverse RNA-DNA 鎖交換反応において N 末端側領域による触媒を補助する機能があることが示唆された。

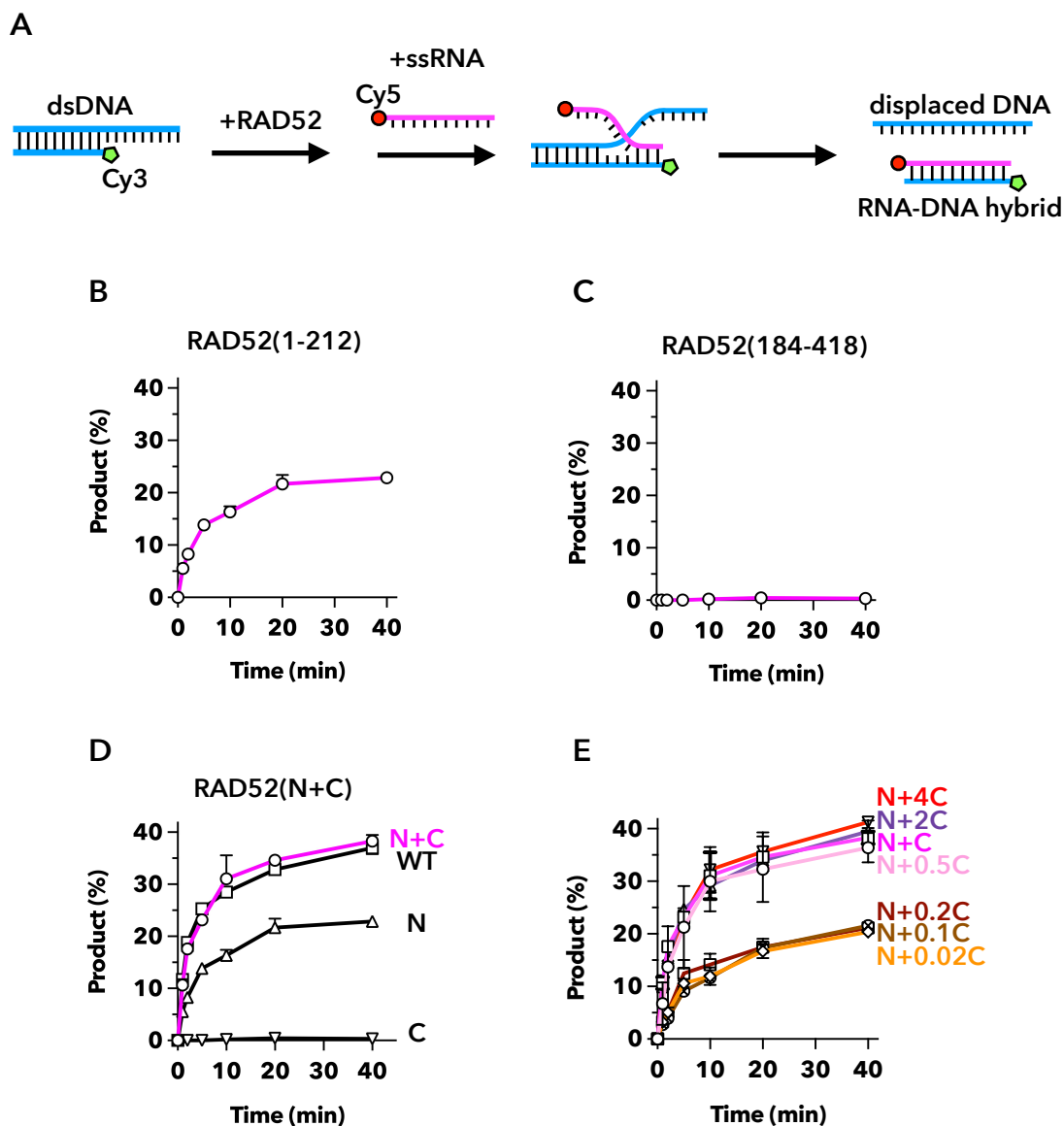


図 16 RAD52¹⁻²¹², RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の inverse RNA-DNA 鎖交換活性の解析

(A) inverse RNA-DNA 鎖交換反応の模式図。

(B) RAD52¹⁻²¹² の inverse RNA-DNA 鎖交換活性。縦軸は、RAD52¹⁻²¹² の触媒により形成された RNA・DNA ハイブリッドの割合を示す。横軸は、単鎖 RNA を加えてからの反応時間を示す。

(C) RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の inverse RNA-DNA 鎖交換活性。

(D) RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ を等モル加えた時の inverse RNA-DNA 鎖交換反応。N+C は RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ を等モル加えた時の反応、WT は全長 RAD52 の反応、N は RAD52¹⁻²¹² の反応、C は RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の反応を示す。

(E) RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ のモル比を検討した。N+4C, N+2C, N+0.5C, N+0.2C, N+0.1C, N+0.02C は RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ のモル比がそれぞれ 1:4, 1:2, 1:0.5, 1:0.2, 1:0.1, 1:0.02 の時の inverse RNA-DNA 鎖交換反応を示す。

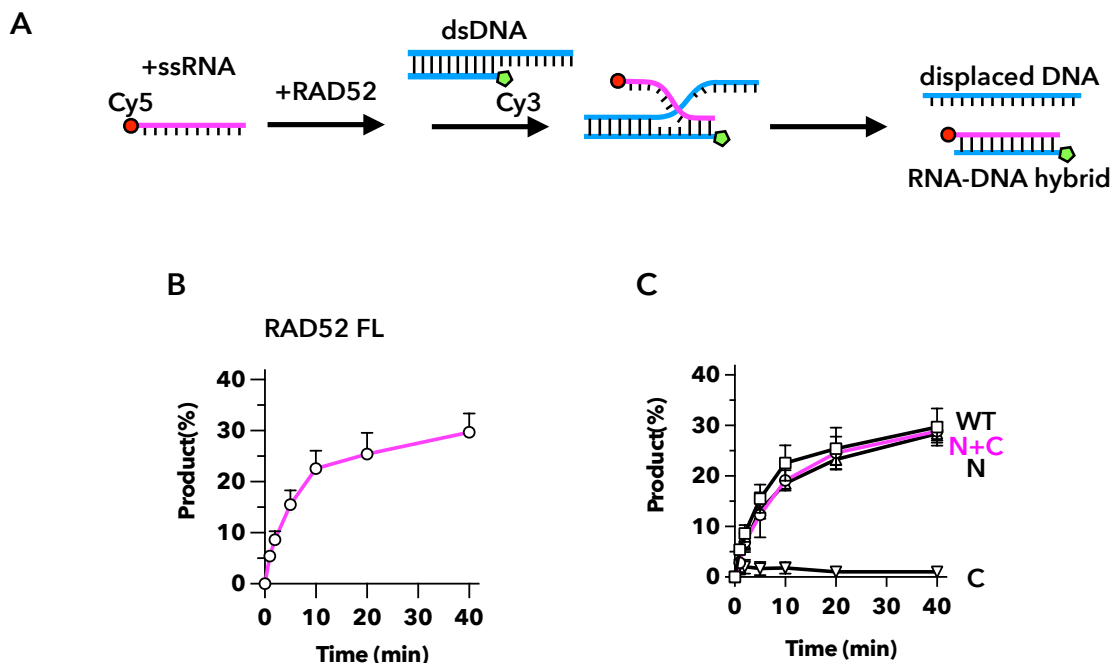


図 17 RAD52 の forward RNA-DNA 鎖交換活性の解析

- (A) forward RNA-DNA 鎖交換反応の模式図。単鎖 RNA (ISE#3, 250 nM) と RAD52 (終濃度, 1 μ M) を 37°C で 10 分間反応させた後に 3' 突出末端をもつ二重鎖 DNA (ISE#1/2, 67.6 nM) を加え 37°C で 1 分, 2 分, 5 分, 10 分, 20 分, または 40 分反応させた。基質と生成物は 5% LDS と proteinase K で徐タンパク質処理し, 12% ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離した。
- (B) RAD52 の forward RNA-DNA 鎖交換活性。Cy3 の蛍光を, Fiji ソフトウェアを用いて定量した。縦軸は, RAD52 の触媒により形成された RNA・DNA ハイブリッドの割合を示す。横軸は, 二重鎖 DNA を加えてからの反応時間を示す。
- (C) RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ を等モル加えた時の forward RNA-DNA 鎖交換反応。N+C は RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ を等モル加えた時の反応, WT は全長 RAD52 の反応, N は RAD52¹⁻²¹² の反応, C は RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の反応を示す。

3.3.3 forward RNA-DNA 鎖交換活性との比較

次に、RAD52 と単鎖 RNA を先に反応させる forward RNA-DNA 鎖交換活性を調べ、inverse RNA-DNA 鎖交換活性を比較した (図 17 A)。その結果、全長 RAD52 は forward RNA-DNA 鎖交換反応を触媒したが、その効率は inverse RNA-DNA 鎖交換反応に比べやや低く (図 17 B)、先行研究の結果と一致した (Mazina et al., 2017)。次に、RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の活性を調べた。inverse RNA-DNA 鎖交換反応では全長 RAD52 と RAD52¹⁻²¹² の間で活性に約 2 倍の差があったのに対し (図 16 D)、forward RNA-DNA 鎖交換反応では、全長 RAD52 と RAD52¹⁻²¹² との間で活性に差はほとんど見られなかった (図 17 B)。また、inverse RNA-DNA 鎖交換反応で見られた RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ による鎖交換反応の補助は、forward RNA-DNA 鎖交換反応では見られなかった。このことから RAD52 の C 末端側領域は inverse RNA-DNA 鎖交換反応でのみ N 末端側領域の活性を補助することがわかった。

3.3.4 RAD52 点変異体の活性

RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の RNA-DNA 鎖交換活性の解析により、反応の触媒には RAD52 の N 末端側半分の領域が重要であることがわかった。そこで、RAD52 が触媒する RNA-DNA 鎖交換反応の詳細を明らかにするために RAD52 点変異体の inverse RNA-DNA 鎖交換活性を調べた (図 18 A)。その結果、点変異体の触媒活性は野生型 RAD52 の活性に対して少し低下するグループ、半分程度低下するグループ、著しく低下するグループの 3 つに分かれることが明らかになった (図 18 B and C)。鎖交換活性が野生型 RAD52 と比べて著しく低下するグループには、RAD52 の溝の内側に存在する R55A, Y65A, K152A が含まれていた。これらのアミノ酸残基は、過去の報告により RAD52 と DNA との相互作用に重要であることが知られている。このことから本研究で見られた著しい活性の低下は、RAD52 と二重鎖 DNA との相互作用ができなくなった影響であることが考えられた。鎖交換活性が野生型 RAD52

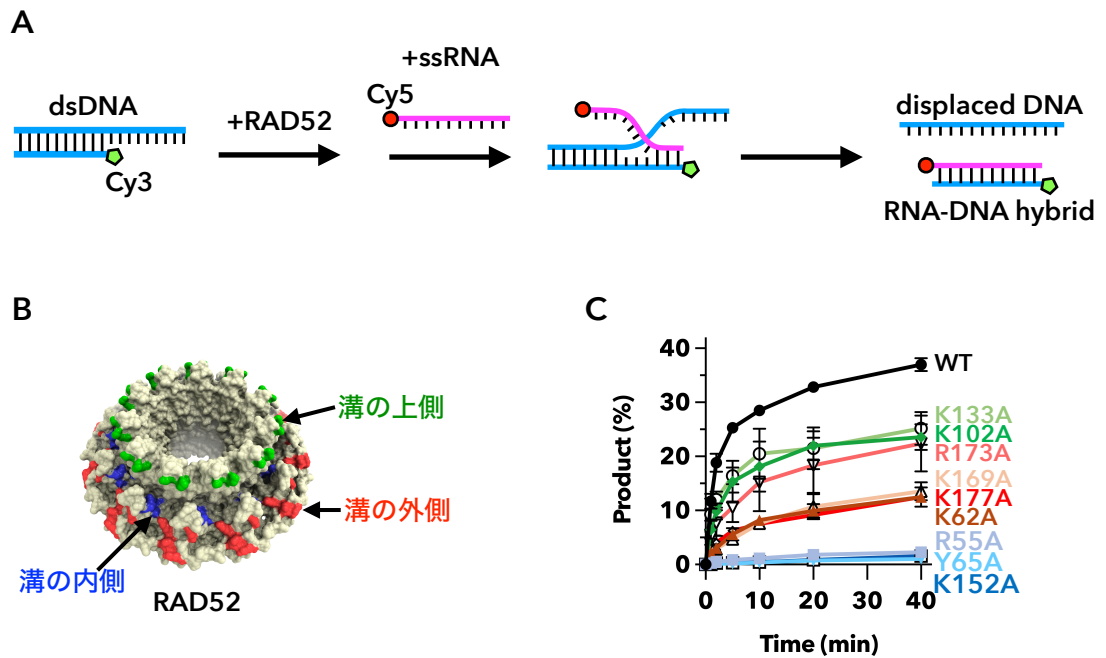


図 18 RAD52 点変異体の inverse RNA-DNA 鎖交換活性の解析

(A) inverse RNA-DNA 鎖交換反応の模式図。

(B) RAD52¹⁻²¹² の結晶構造 (PDB ID : 1KN0) に導入した点変異の部位を示す。緑色で示した部位が溝の上側、青色で示した部位が溝の内側、赤色で示した部位が溝の外側である。

(C) RAD52 点変異体の inverse RNA-DNA 鎖交換活性。縦軸は、点変異体の触媒により形成された RNA・DNA ハイブリッドの割合を示す。横軸は、単鎖 RNA を加えてからの反応時間を示す。

と比べて半分程度低下するグループには K62A, K169A, K177A が含まれていた。これらのアミノ酸残基はこれまでにその機能が明らかにされていないことから、RNA-DNA 鎖交換反応において重要な役割を担うことが考えられた。

3.3.5 inverse DNA-DNA 鎖交換活性との比較

前項までは、RAD52 が触媒する単鎖 RNA と二重鎖 DNA の鎖交換反応において、RAD52 の C 末端側半分の領域は N 末端側半分の領域を補助する役割について議論した。この C 末端側半分の領域の機能は inverse RNA-DNA 鎖交換反応で特異的に見られるのかを判断するために、単鎖 DNA と二重鎖 DNA を用いた inverse DNA-DNA 鎖交換反応における RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の活性を調べた (図 19 A)。基質には 5'末端に Cy3 が付加された 40-mer の DNA (ISE#1) と蛍光分子が付加されていない 71-mer の DNA (ISE#2) からなる二重鎖 DNA と、5'末端に Cy5 が付加された 40-mer の単鎖 DNA (ISE#4) を用いた。まず、全長 RAD52 を用いて実験を行ったところ、基質の二重鎖 DNA の約 6 割が生成物に変換されることがわかった (図 19 B)。次に、RAD52¹⁻²¹² の活性を調べたところ、基質の二重鎖 DNA の約 4 割が生成物に変換された (図 19 C)。一方、RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の触媒効率は RAD52¹⁻²¹² のその半分以下であった (図 19 D)。これらの結果から、RAD52 が触媒する inverse DNA-DNA 鎖交換反応についても N 末端側半分の領域が重要であることがわかった。

興味深いことに、RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ 共存下では、inverse RNA-DNA 鎖交換反応で見られた C 末端側断片による活性の補助は見られなかった (図 19 E)。RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の濃度を増やしても鎖交換反応の効率に大きな変化は見られなかった (図 19 F)。このことから、RAD52 の C 末端側領域による鎖交換反応の補助は RNA 依存的な効果であることが考えられた。さらに、RAD52 点変異体の inverse DNA-DNA 鎖交換活性を調べたところ、inverse RNA-DNA 鎖交換反応と同様の傾向が見られたことから (図 19 G と図 18 C を比較)、N 末端側領

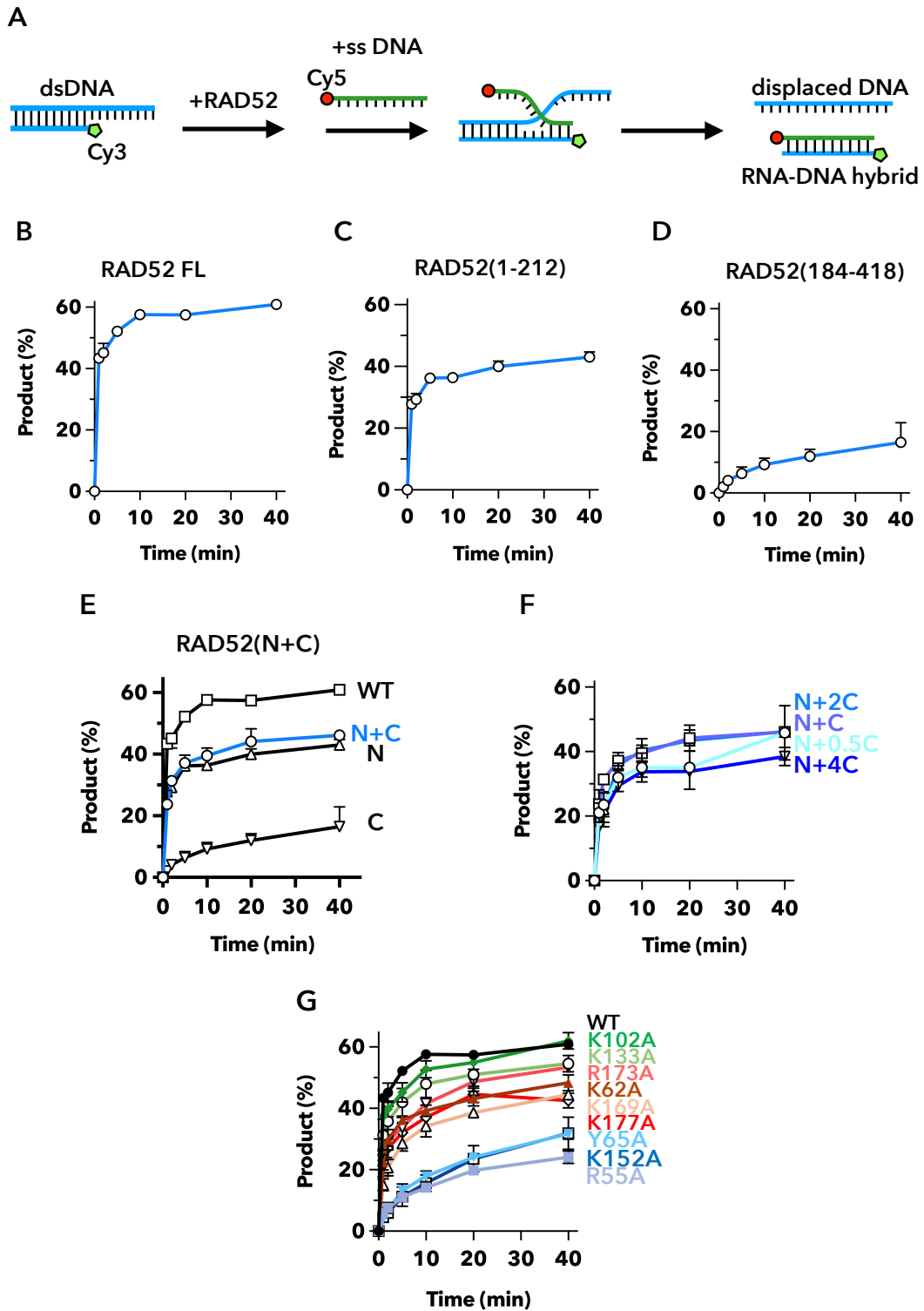


図 19 RAD52 の inverse DNA-DNA 鎖交換活性の解析

(A) inverse DNA-DNA 鎖交換反応の模式図。

(B) RAD52 の inverse DNA-DNA 鎖交換活性。縦軸は、RAD52 の触媒により形成された生成物（二重鎖 DNA）の割合を示す。横軸は、単鎖 DNA を加えてからの反応時間を示す。

- (C) RAD52¹⁻²¹² の inverse DNA-DNA 鎖交換活性。
- (D) RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の inverse DNA-DNA 鎖交換活性。
- (E) RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ を等モル加えた時の inverse DNA-DNA 鎖交換反応。N+C は RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ を等モル加えた時の反応、WT は全長 RAD52 の反応、N は RAD52¹⁻²¹² の反応、C は RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の反応を示す。
- (F) RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ のモル比を検討した。N+4C, N+2C, N+0.5C は、RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ のモル比がそれぞれ 1:4, 1:2, 1:0.5 の時の inverse DNA-DNA 鎖交換反応を示す。
- (G) RAD52 点変異体の inverse DNA-DNA 鎖交換活性。

域における鎖交換反応の分子機構は DNA-DNA 間と RNA-DNA 間とで類似している可能性が考えられた。

3.4 RAD52 による液滴形成

3.4.1 タンパク質の液-液相分離

細胞核内に存在するタンパク質の多くは、反応時に局所的かつ一過的に集まり、液-液相分離を起こすと考えられている。このようにして形成された液滴は、特定の反応の制御に関与することが報告されている。これまでの研究から、液-液相分離を引き起こすタンパク質の特徴として、天然変性領域を有し、RNA 結合タンパク質であることが知られている。前節では、RAD52 は RNA と直接結合することが明らかになった。また、RAD52 の C 末端側半分の領域は、そのアミノ酸配列から天然変性領域であると予想されている。これらのことから、RNA を利用した DNA 修復における RAD52 の機能の一つとして、液-液相分離による液滴の形成が考えられた。そこで本研究では RAD52 の凝集活性や液滴形成について試験管内反応系を用いて解析した。

3.4.2 単鎖 RNA に依存した RAD52 の凝集活性

RAD52 は単鎖 DNA 存在下で凝集することが知られている (Saotome et al., 2018)。一方、単鎖 RNA 存在下で RAD52 が凝集するかについては明らかにされていない。そこで、単鎖 RNA を用いて RAD52 の凝集活性を解析した。まず、RAD52 の凝集活性を *in vitro* で調べるために RAD52 aggregation アッセイ法を構築した (図 20 A)。基質には、5'末端に Cy5 蛍光分子が付加された 40-mer の単鎖 RNA (ISE#3) と 40-mer の単鎖 DNA (ISE#4) を用いた。RAD52 の RNA aggregation アッセイを行った結果、全長 RAD52 の終濃度が 0.75 μM の条件で全ての RNA が下層に見られた (図 20 B and C)。次に、RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ を用いて同様の解析を行った。その結果、RAD52¹⁻²¹² は、終濃度が 0.75 μM の条件でも上層に RNA が残っていたことから、全長 RAD52 と比べ凝集活性が少し低いことがわかった (図 20 D)。

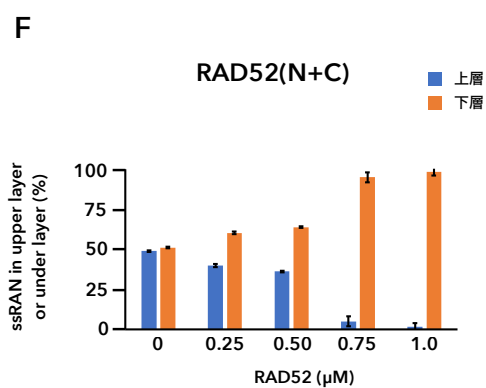
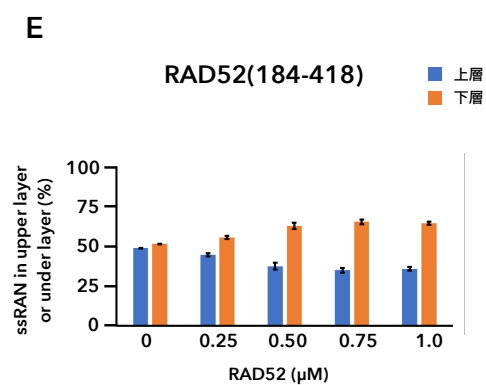
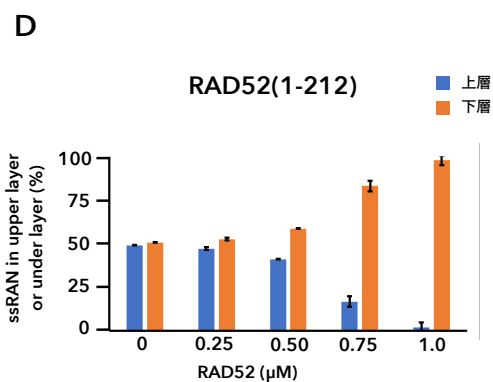
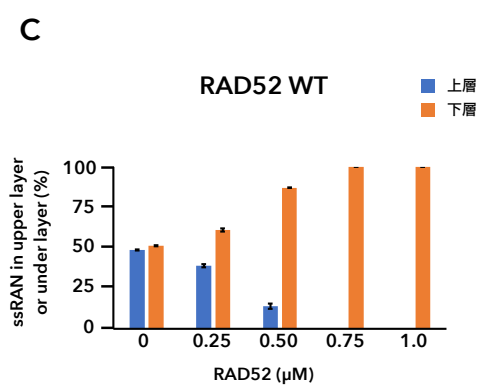
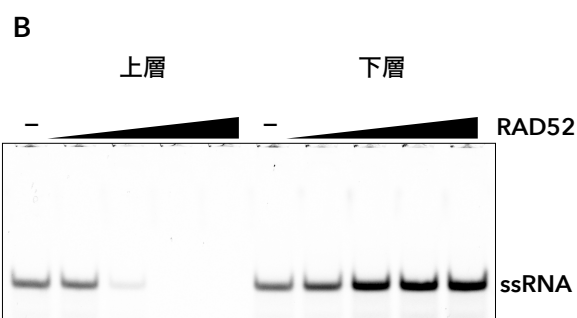
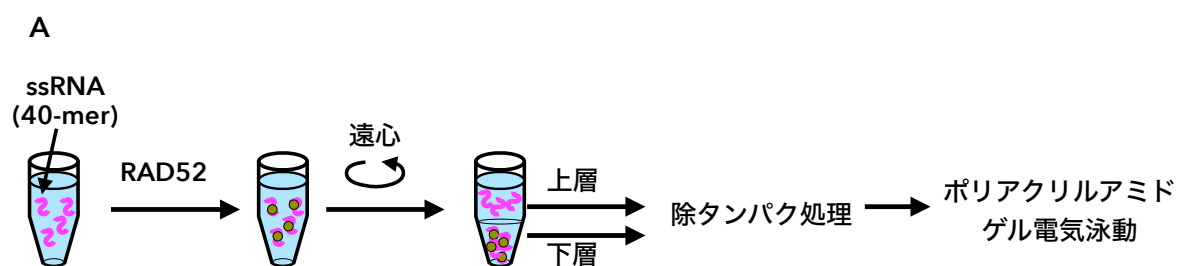


図 20 単鎖 RNA 存在下における RAD52 の凝集活性の解析

- (A) RAD52 RNA aggregation アッセイの模式図。各濃度の RAD52 (0.25, 0.5, 0.75, 1.0 μM) と単鎖 RNA (ISE#3, 62.5 nM) を 37°C で 10 分間反応させた。反応液を 15,000 rpm で 5 分間遠心し、上層と下層に分けてから LDS 及び proteinase K にて除タンパク質処理を行った。得られた反応液を 12% ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離した。
- (B) 反応液をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、Typhoon イメージアナライザーにて Cy5 の蛍光を検出した。
- (C) 全長 RAD52 の凝集活性。上層と下層に含まれる単鎖 RNA を Fiji ソフトウェアにて定量した。縦軸は、各層に存在する単鎖 RNA の割合、横軸は RAD52 の濃度を示す。
- (D) RAD52¹⁻²¹² の凝集活性。
- (E) RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の凝集活性。
- (F) RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ が共存した時の凝集反応。

一方、RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ は、終濃度が 1 μM でも約 4 割の RNA が上層に残っており、凝集活性が全長と比べかなり低いことがわかった (図 20 E)。次に、RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の両方の断片を共存させて解析を行った。その結果、RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の終濃度が 0.75 μM の条件でほぼ全ての RNA が下層に見られ、全長 RAD52 の凝集活性に近いことがわかった (図 20 F)。

次に、RNA aggregation アッセイと同様の方法で、DNA aggregation アッセイも行った (図 21 A and B)。その結果、単鎖 DNA 存在下における RAD52 の凝集活性は単鎖 RNA 存在下でのそれと同程度であることがわかった (図 21 C と図 20 C を比較)。RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の凝集活性についても単鎖 RNA と同様の傾向が見られることがわかった (図 21 D-F と図 20 D-F を比較)。これらの結果から RAD52 の凝集活性には C 末端側半分の領域が重要であると考えられた。また今回得られた結果から、RAD52 は単鎖 RNA や単鎖 DNA 存在下で液滴を形成する可能性が考えられた。

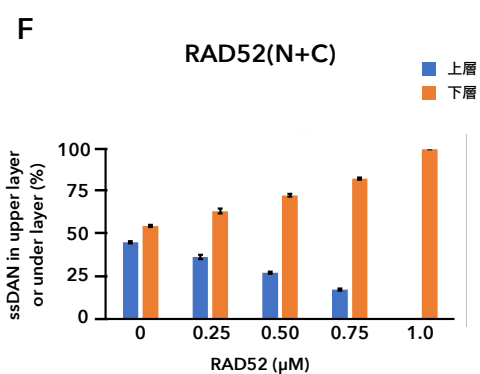
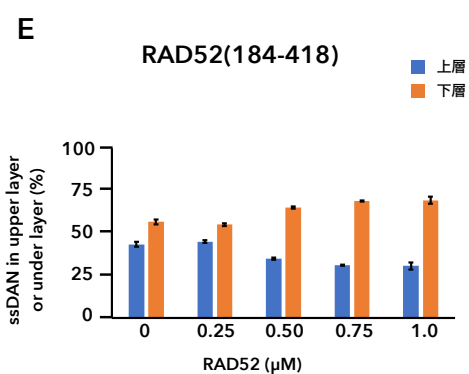
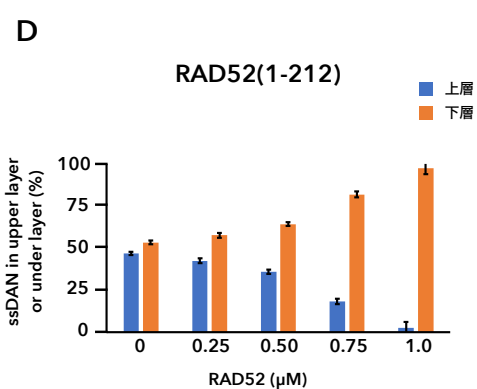
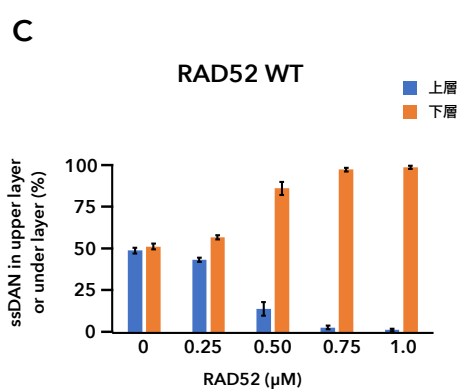
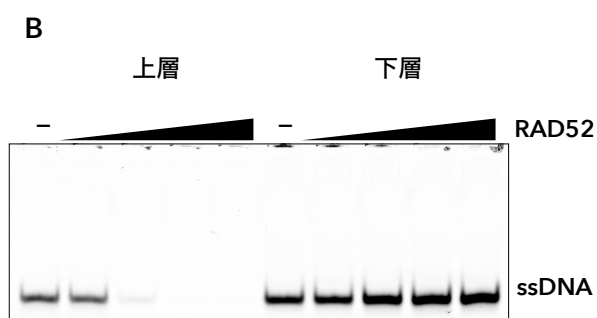
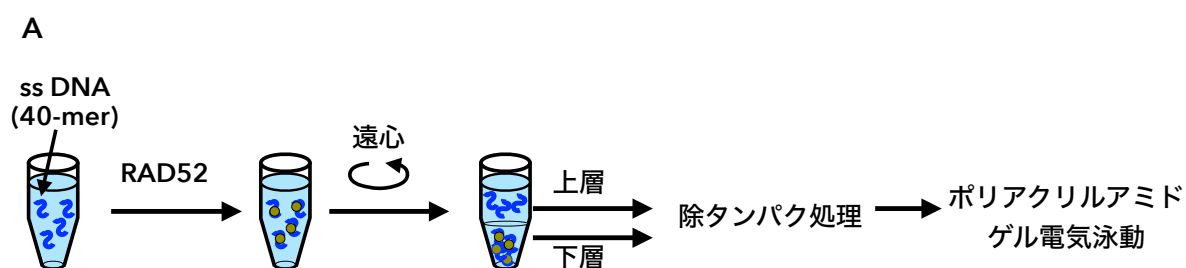


図 21 単鎖 DNA 存在下における RAD52 の凝集活性の解析

- (A) RAD52 DNA aggregation アッセイの模式図。各濃度の RAD52 (0.25, 0.5, 0.75, 1.0 μ M) と単鎖 DNA (ISE#4, 62.5 nM) を 37°C で 10 分間反応させた。反応液を 15,000 rpm で 5 分間遠心し、上層と下層に分けてから LDS 及び proteinase K にて除タンパク質処理を行った。得られた反応液を 12% ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離した。
- (B) 反応液をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、Typhoon イメージアナライザーにて Cy5 の蛍光を検出した。
- (C) 全長 RAD52 の凝集活性。上層と下層に含まれる単鎖 DNA を Fiji ソフトウェアにて定量した。縦軸は、各層に存在する単鎖 DNA の割合、横軸は RAD52 の濃度を示す。
- (D) RAD52¹⁻²¹² の凝集活性。
- (E) RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の凝集活性。
- (F) RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ が共存した時の凝集反応。

3.4.3 RAD52 液滴の観察

RAD52 の RNA-DNA および DNA-DNA 鎖交換活性の解析により、RAD52 の C 末端側領域は 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。RAD52 の C 末端側半分の機能については、RPA や RAD51 と相互作用する他にほとんど知られていない。C 末端側半分のアミノ酸配列の特徴として、天然変性領域であることが予測されている (図 22 A)。近年、RNA と相互作用し天然変性領域を有するタンパク質が、液-液相分離を起こす報告が増えている。さらに、*S. cerevisiae* Rad52 は試験管内で液-液相分離を起こし液滴を形成することが報告された (Oshidari et al., 2020)。そこで、ヒト RAD52 が液滴を形成するかを調べた。液滴の形成を調べるために、RAD52 の C 末端に GFP を融合した RAD52-GFP を精製し、蛍光顕微鏡を用いた実験系を構築した。その結果、終濃度 5% dextran 存在下で球状の粒子が多く見られた (図 22 B and E)。この粒子を形成させた後に、終濃度 3% の 1,6-

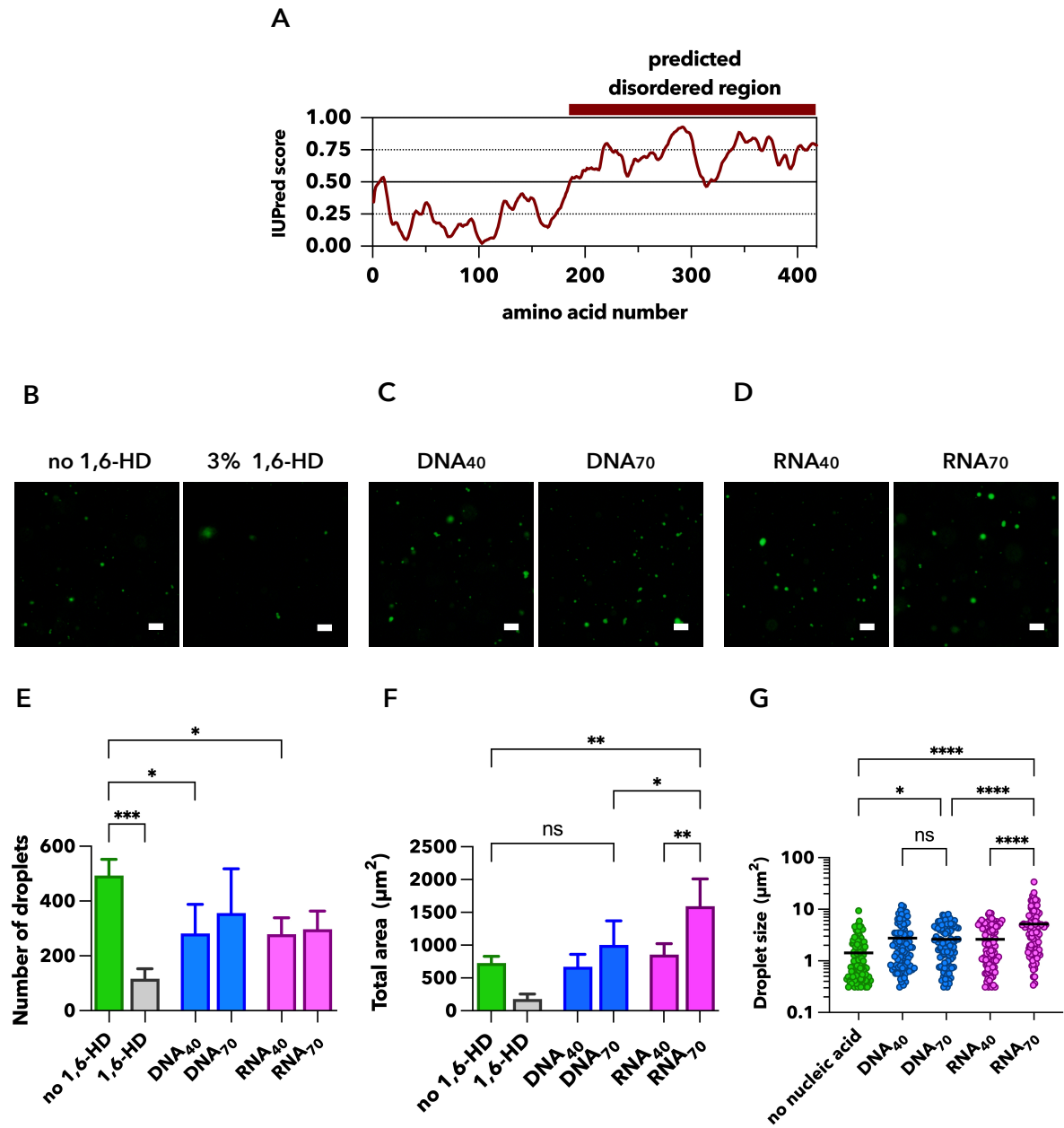


図 22 RAD52 液滴の観察

Dextran を含むマスターミックスと RAD52-GFP を 25°C で 5 分間インキュベートした後に混合し、再度 25°C で 3 分間インキュベートした。次に反応液 10 μL を m-PEG-silane-5000 でコーティングしたスライドガラスとカバーガラスで挟み、蛍光顕微鏡にて観察した。

(A) 天然変性領域予測プログラム IUPred3 (<https://iupred3.elte.hu>) (Erdős et al., 2021) を用いてヒト RAD52 のアミノ酸配列を解析した。

(B-D) RAD52-GFP の液滴の画像。「no 1,6-HD」は 1,6-hexanediol を加えていない条件, 「3% 1,6-HD」は終濃度 3% の 1,6-hexanediol を加えた条件, 「DNA₄₀」は 40-mer の DNA を加えた条件, 「DNA₇₀」は 70-mer の DNA を加えた条件, 「RNA₄₀」は 40-mer の RNA を加えた条件, 「RNA₇₀」は 70-mer の RNA を加えた条件。画像内のスケールバーは 10 μ m を示す。

(E) 液滴の総数。*, $p < 0.04$, ***, $p < 0.0002$

(F) 液滴の総面積。*, $p < 0.04$, **, $p < 0.002$

(G) 液滴 1 つあたりの平均面積。各条件について, 無作為に 100 個の液滴を選択しその大きさを分布として示している。*, $p < 0.01$, ****, $p < 0.0001$

hexanediol で処理すると, 粒子の数は顕著に減少した。この結果から, ヒト RAD52 は液滴を形成することが考えられた (図 22 B and E)。

3. 4. 4 単鎖 RNA 存在下での RAD52 の液滴形成

RAD52 は dextran 存在下で液滴を形成することが考えられたので次に, 単鎖 RNA または単鎖 DNA を加えることによる液滴形成への影響を調べた。基質には, 40-mer の単鎖 RNA (#117-2_40_RNA), 70-mer の単鎖 RNA (#117-3_70_RNA), 40-mer の単鎖 DNA (#117-2_40), 70-mer の単鎖 DNA (#117-2_70) を用いた。その結果, 液滴の総数は RAD52 のみの条件に比べて少なくなった (図 22 E)。一方, 液滴の総面積は核酸を加えることによって RAD52 のみと比べ増加する傾向にあった (図 22 F)。また, 液滴一つあたりの平均面積は 70-mer の単鎖 RNA 存在下で顕著に大きくなった (図 22 G)。これらの結果から, RAD52 の液滴形成は RNA や DNA 存在下で促進され, RNA 存在下でより大きな液滴が形成されることが示唆された。

第4章 考察

4.1 RAD52 と RNA との相互作用

本研究では、これまでほとんど研究が進んでいない RAD52 の RNA 上での機能を明らかにするために、まず RAD52 と RNA の相互作用を解析した。RAD52 の単鎖 RNA に対する親和性と単鎖 DNA に対する親和性を比較するために、それぞれをゲルシフト法にて解析した。RAD52 は単鎖 RNA、単鎖 DNA のいずれとも複合体を形成し、単鎖 RNA、単鎖 DNA に対する親和性は同程度であった。一方、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わかった。次に、RAD52 の RNA 相互作用領域を明らかにするために、RAD52 の N 末端側半分 (RAD52¹⁻²¹²) と C 末端側半分の領域 (RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸) をそれぞれ断片として精製し、それらの RNA 結合活性を調べた。RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ はどちらも RNA と結合することがわかった。RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ については、活性は低いものの単鎖 DNA とも結合することを初めて明らかにした。

先行研究で N 末端側半分の立体構造が明らかにされており、構造の表面に露出しているアミノ酸残基がわかるため、N 末端側半分のどこに単鎖 RNA が結合するのかを合理的に予想することが可能である。そこで、RAD52 の N 末端側半分の RNA 結合部位を明らかにするために 9 種類の RAD52 点変異体を精製し、それらの単鎖 RNA 結合活性を調べた。しかし、単鎖 RNA との相互作用が野生型 RAD52 と比べ著しく低い変異体はなく、単鎖 RNA 結合部位の同定には至らなかった。RAD52 の単鎖 RNA 結合部位に関して 2 通りの考察が考えられる。1 つは、本研究で試した変異箇所の中に単鎖 RNA との相互作用に関与する残基が存在するものの、複数種類のアミノ酸残基にまたがって結合しているために、1 箇所の変異だけでは顕著な活性の低下が見られない可能性である。もう 1 つは、本研究で変異を導入した箇所

は RAD52 の N 末端から 180 番目のアミノ酸残基の間であったが、単鎖 RNA との相互作用部位は 180 番目のアミノ酸残基から C 末端の間に存在する可能性である。今後、RNA との結合様式や相互作用部位を明らかにするためには、他の点変異体解析を行うのと並行して複合体の X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡構造解析を行う必要性が考えられる。

4.2 RAD52 が触媒する RNA-DNA 間の鎖交換反応

本研究では、RNA を利用した DNA 修復機構における RAD52 の機能を明らかにするために、先行研究によって RAD52 の RNA 上での機能の一つとして報告されている、RNA-DNA 鎖交換反応の触媒を *in vitro* で観察する実験系を再現し、その活性を詳細に解析した。RAD52 は、inverse RNA-DNA 鎖交換反応を効率よく触媒することがわかった。次に、RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ の活性を調べたところ、RAD52¹⁻²¹² の活性は全長 RAD52 の活性と比べ半分程度であることがわかった。一方、RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ は、inverse RNA-DNA 鎖交換活性がほとんどないことがわかった。これらの結果から、RAD52 の inverse RNA-DNA 鎖交換活性には N 末端側半分の領域が重要であることがわかった。興味深いことに、RAD52¹⁻²¹² と RAD52¹⁸⁴⁻⁴¹⁸ を共存させると全長 RAD52 と同程度の活性を示すことがわかった。このことから、RAD52 の C 末端側半分の領域は inverse RNA-DNA 鎖交換反応を直接触媒はしないが、N 末端側半分の領域による触媒を補助するのに重要であることが考えられた。さらに、C 末端側半分の領域の効果は、inverse DNA-DNA 鎖交換反応では見られなかったため、RNA 特異的に起こる現象であることが示唆された。

4.3 RAD52 の液滴形成

本研究では、RNA を利用した DNA 修復における RAD52 の機能を明らかにするために、RAD52 の C 末端側領域に天然変性領域が存在することと、その天然変性領域が RNA との相

相互作用に関与する可能性に着目した。細胞内において一般的に、天然変性領域を持つ RNA 結合タンパク質は、液-液相分離と呼ばれるタンパク質と RNA が凝集した液滴を形成することが知られている。先行研究により、酵母 Rad52 は液滴を形成することが報告されている。そこで、ヒト RAD52 は液滴形成を形成するのかを調べた。その結果、ヒト RAD52 は dextran 存在下で液滴を形成することがわかった。また、単鎖 DNA または単鎖 RNA を加えることで液滴形成に与える影響を調べた。今回の条件では、40-mer と 70-mer の基質を用いた。その結果、単鎖 DNA または単鎖 RNA 存在下では、液滴の形成が促進されることがわかった。40-mer の DNA と RNA では液滴形成の促進に差がほとんど見られなかった。これは、RAD52 の凝集活性の結果と一致した。一方、70-mer の DNA と RNA を加えた条件では RNA で顕著な促進が見られた。この結果から、RNA 依存的な液滴の形成には長さが重要であることが考えられた。RAD52 断片を用いた凝集活性の解析では、C 末端側半分が欠失すると活性が低下するが、そこに C 末端側半分の領域を加えると全長と同程度の凝集活性が見られた。このことから、液滴形成においても C 末端側半分の領域が重要であることが考えられるため、RAD52 断片を用いた解析を行うことで、RAD52 の液滴形成と RNA を利用した DNA 修復の関係性がより詳細に解明できる可能性が考えられる。

4.4 RNA を利用した DNA 修復における RAD52 の役割

本研究で得られた結果は、RNA を利用した DNA 修復反応における RAD52 の機能が RNA-DNA 間の鎖交換を触媒するモデルと一致した。今回、これまでに機能がよくわかっていない RAD52 の C 末端側の領域が inverse RNA-DNA 鎖交換反応の触媒に重要であることを見出した。また、単鎖 RNA 存在下で RAD52 は液滴を形成し、RNA の長さ依存的に液滴形成が促進され、RAD52 断片の凝集実験の結果から液滴形成には C 末端側半分の領域が重要であることが考えられた。このことから RNA-DNA 鎖交換反応における RAD52 の役割は、C 末

端側半分の領域による RNA および RAD52 の凝集の促進と修復反応場の形成と、N 末端側半分の領域による inverse RNA-DNA 鎖交換反応の触媒であることが考えられた。

RNA-DNA 鎖交換反応における RAD52 の役割について、細胞核内で起こるイベントと関連させると、転写と共役した二重鎖切断修復 (transcription-coupled homologous recombination: TC-HR) が考えられる (図 23)。転写と共役して起こる DNA 修復では、転写中の RNA ポリメラーゼの周辺に DNA 損傷が生じると、転写が一時的に停止され、損傷の修復が行われる (Hanawalt and Spivak, 2008; Svejstrup, 2007; Lainé and Egly, 2006)。その後 RNA ポリメラーゼの転写が開始される。これまでの研究では、転写と共役したヌクレオチド除去修復 (TC-NER) が先行しており、その分子機構が明らかにされている (Xu et al., 2017)。しかし、TC-HR については未だ不明である。この機構を明らかにするためには、RAD52 がクロマチン上の損傷部位にリクルートされる仕組みと、RNA を利用した DNA 修復で働く因子がどのように関与するのかを明らかにする必要がある。RNA を利用した DNA 修復で働く主な因子として CSB (Cockayne syndrome protein B) が考えられる。CSB は、難病の一つであるコケイン症候群の原因遺伝子として知られており、その機能の一つとしてクロマチンリモデリングが考えられている (Wang et al., 2019)。さらに、先行研究により CSB は RAD52 と直接相互作用することが明らかにされている (Wei et al., 2015; Teng et al., 2018; Jun et al., 2019)。今回、構築した試験管内で RNA-DNA 鎖交換反応を観察する実験系に、CSB や RNA ポリメラーゼを組み込むことで TC-HR の詳細な分子メカニズムの解明につながることを期待される。

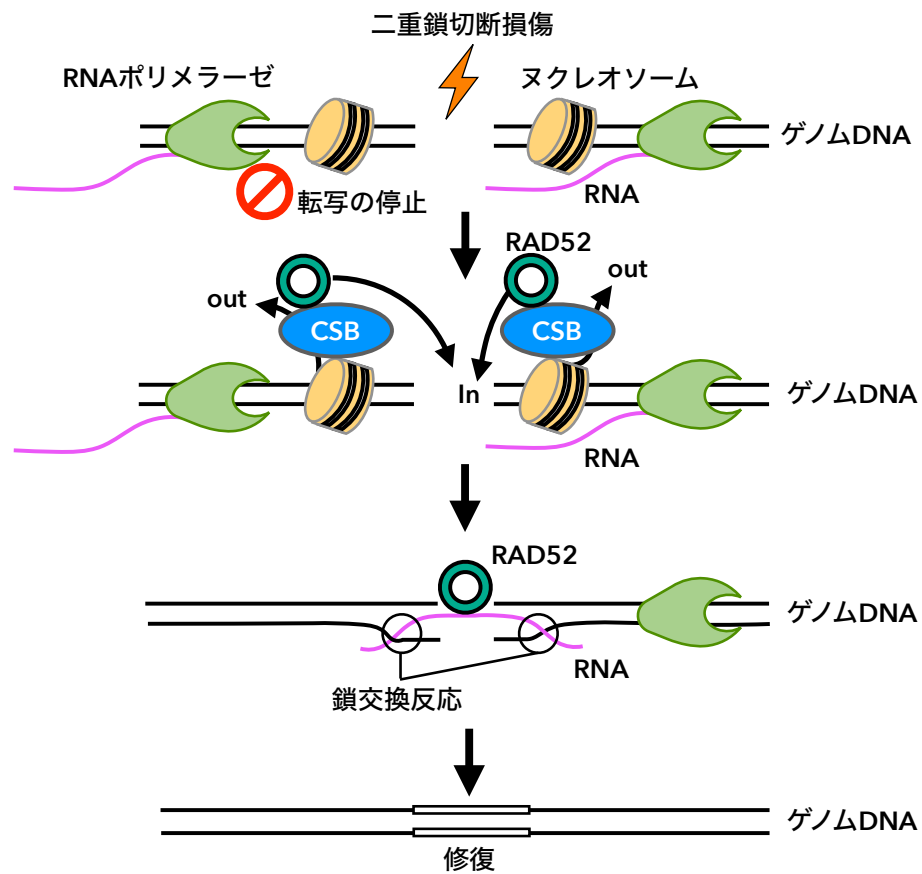


図 23 転写と共役した DNA 修復のモデル

RNA ポリメラーゼが転写を行っている近傍で DNA 二重鎖切断が起こると、まず転写が停止する。次に損傷領域に存在するヌクレオソームを排除するために、クロマチン離モデリングタンパク質である CSB が損傷付近に集積しヌクレオソームを排除する。この時 RAD52 は CSB と相互作用することで同時に損傷付近に集積し、損傷領域で RNA と DNA 間の鎖交換反応を触媒する。その後 RNA を鋳型に DNA を合成することで損傷を修復するモデルである。

引用文献

Allers, T. and Lichten, M. (2001) Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell* **106**, 47-57.

Benson, F. E., Baumann, P., and West, S. C. (1998) Synergistic action of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair. *Nature* **391**, 401-404.

Chandramouly, G., Zhao, J., McDevitt, S., Rusanov, T., Hoang, T., Borisonnik, N., Treddinick, T., Lopezcolorado, F. W., Kent, T., Siddique, L. A., Mallon, J., Huhn, J., Shoda, Z., Kashkina, E., Brambati, A., Stark, J. M., Chen, X. S., and Pomerantz, R. T. (2021) Pol θ reverse transcribes RNA and promotes RNA-templated DNA repair. *Sci. Adv.* **7**, 1126.

Erdős, G., Pajkos, M., and Dosztányi, Z. (2021) IUPred3: prediction of protein disorder enhanced with unambiguous experimental annotation and visualization of evolutionary conservation. *Nucleic Acids Res.* **49**, W297-W303.

Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., and Gage, F. H. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* **4**, 1313-1317.

Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., and Frisé, J. (2014) Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* **156**, 1072-

1083.

Esashi, F., Galkin, V. E., Yu, X., Egelman, E. H., and West, S. C. (2007) Stabilization of RAD51 nucleoprotein filaments by the C-terminal region of BRCA2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 468-474.

Game, J. C. and Mortimer, R. K. (1974) A genetic study of x-ray sensitive mutants in yeast. *Mutat. Res.* **24**, 281-292.

Hanawalt, P. C. and Spivak, G. (2008) Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **12**, 958-970.

Heyer, W. E., Ehmsen, E. T., and Liu, J. (2010) Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **44**, 113-139.

Jackson, S. P. and Bartek, J. (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* **461**, 1071-1078.

Kagawa, W., Kagawa, A., Saito, K., Ikawa, S., Shibata, T., Kurumizaka, H., and Yokoyama, S. (2008) Identification of a second DNA binding site in the human RAD52 protein. *J. Biol. Chem.* **283**, 24264-24273.

Kagawa, W., Kurumizaka, H., Ikawa, S., Yokoyama, S., and Shibata, T. (2001) Homologous

pairing promoted by the human Rad52 protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 35201-35208.

Kagawa, W., Kurumizaka, H., Ishitani, R., Fukai, S., Nureki, O., Shibata, T., and Yokoyama, S. (2002) Crystal structure of the homologous-pairing domain from the human Rad52 recombinase in the undecameric form. *Mol. Cell* **10**, 359-371.

Kasahara, M., Clikeman, J. A., Bates, D. B., and Kogoma, T. (2000) RecA-protein-dependent R-loop formation in vitro. *Genes Dev.* **14**, 360-367.

Keskin, H., Shen, Y., Huang, F., Patel, M., Yang, T., Ashley K., Mazin, V. A., and Storici, F. (2014) Transcript-RNA-templated DNA recombination and repair. *Nature* **515**, 436-439.

Krogh, B. O. and Symington, L. S. (2004) Recombination proteins in yeast. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 233-271.

Lainé, J.-P. and Egly, J.-M. (2006) Initiation of DNA repair mediated by a stalled RNA polymerase II. *EMBO J.* **25**, 387-397.

Mazina, O. M., Keskin, H., Hanamshet, K., Storici, F., and Mazin, A. V. (2017) Rad52 inverse strand exchange drives RNA-templated DNA double-strand break repair. *Mol. Cell* **67**, 19-29.

McDevitt, S., Rusanov, T., Kent, T., Chandramouly, G., and Pomerantz, R. T. (2018) How RNA transcripts coordinate DNA recombination and repair. *Nat. Commun.* **9**, 1091.

Mehta, A. and Haber, J. E. (2014) Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a016428.

Moynahan, M. E. and Jasin, M. (2010) Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 196-207.

New, J. H., Sugiyama, T., Zaitseva, E., and Kowalczykowski, S. C. (1998) Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* **391**, 407-410.

Nimonkar, A. V. and Kowalczykowski, S. C. (2009) Second-end DNA capture in double-strand break repair: How to catch a DNA by its tail. *Cell Cycle* **8**, 1816-1817.

Nimonkar, A. V., Sica R. A., and Kowalczykowski, S. C. (2009) Rad52 promotes second-end DNA capture in double-stranded break repair to form complement-stabilized joint molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 3077-3082.

Oshidari, R., Huang, R., Medghalchi, M., Tse, W. T. E., Ashgriz, N., Lee, O. H., Wyatt, H., and Mekhail, K. (2020) DNA repair by RAD52 liquid droplets. *Nat. Commun.* **11**, 695.

Park, M. S., Ludwig, D. L., Stigger, E., and Lee, S. H. (1996) Physical interaction between human RAD52 and RPA is required for homologous recombination in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 18996-19000.

Rossi, J. M., Didomenico, S. F., Patel, M., and Mazin, A. V. (2021) RAD52: Paradigm of synthetic lethality and new developments. *Front. Genet.* **12**, 780293.

San Filippo, J., Sung, P., and Klein, H. (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 229-257.

Saotome, M., Saito, K., Yasuda, T., Ohtomo, H., Sugiyama, S., Nishimura, Y., Kurumizaka, H., and Kagawa, W. (2018) Structural basis of homology-directed DNA repair mediated by RAD52. *iScience* **3**, 50-62.

Schindelin, J., Carreras, I. A., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., and Cardona, A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676-682.

Singleton, M. R., Wentzell, L. M., Liu, Y., West, S. C., and Wigley, D. B. (2002) Structure of the single-strand annealing domain of human RAD52 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 13492-13497.

Song, B. and Sung, P. (2000) Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and replication protein A in DNA strand exchange. *J. Biol. Chem.* **275**, 15895-15904.

Stasiak, A. Z., Larquet, E., Stasiak, A., Müller, S., Engel, A., Van Dyck, E., West, S. C., and Egelman, E. H. (2000) The human Rad52 protein exists as a heptameric ring. *Curr. Biol.* **10**, 337-340.

Su, Y., Ghodke, P. P., Egli, M., Li, L., Wang, Y., and Guengerich, F. P. (2019) Human DNA polymerase η has reverse transcriptase activity in cellular environments. *J. Biol. Chem.* **294**, 6073–6081.

Sugiyama, T. and Kowalczykowski, S. C. (2002) Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-strand DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. *J. Biol. Chem.* **277**, 31663-31672.

Sung, P. (1997) Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 28194-28197.

Sung, P. and Klein, H. (2006) Mechanism of homologous recombination: Mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 739-750.

Svejstrup, J. Q. (2007) Elongator complex: how many roles does it play? *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 331-336.

Tan, J., Duan, M., Yadav, T., Phoon, L., Wang, X., Zhang J.-M., Zou, L., and Lan, L. (2020) An R-loop-initiated CSB-RAD52-POLD3 pathway suppresses ROS-induced telomeric DNA

breaks. *Nucleic Acids Res.* **48**, 1285-1300.

Teng, T., Yadav, T., Duan, M., Tan, J., Xiang, Y., Gao, B., Xu, J., Liang, Z., Liu, Y., Nakajima, S., Shi, Y., Levine, A. S., Zou, L., and Lan, L. (2018) ROS-induced R loops trigger a transcription-coupled but BRCA1/2-independent homologous recombination pathway through CSB. *Nat. Commun.* **9**, 4115.

Xu, J., Lahiri, I., Wang, W., Wier, A., Cianfrocco, M. A., Chong, J., Hare, A. A., Dervan, P. B., DiMaio, F., Leschziner, A. E., and Wang, D. (2017) Structural basis for the initiation of eukaryotic transcription-coupled DNA repair. *Nature* **551**, 653-657.

Walker, J. R., Corpina, R. A., and Goldberg, J. (2001) Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implication for double-strand break repair. *Nature* **412**, 607-614.

Wang, L., Xu, J., Limbo, O., Fei, J., Kassavetis, G. A., Chong, J., Kadonaga, J. T., Russell, P., Bing, L., and Wang, D. (2019) Molecular basis of chromatin remodeling by Rhp26, a yeast CSB ortholog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **116**, 6120-6129.

Wei, L., Nakajima, S., Böhm, S., Bernstein, K. A., Shen, Z., Tsang, M., Levine, A. S., and Lan, Li. (2015) DNA damage during the G0/G1 phase triggers RNA-templated, Cockayne syndrome B-dependent homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, E3495–E3504.

Welty, S., Teng, Y., Liang, Z., Zhao, W., Sanders, L., Greenamyre, J. T., Rubio, M. E., Thathiah, A., Kodali, R., Wetzel, R., Levine, A. S., and Lan, L. (2018) RAD52 is required for RNA-templated recombination repair in post-mitotic neurons. *J. Biol. Chem.* **293**, 1353-1362.

Zaitsev, E. N. and Kowalczykowski, S. C. (2000) A novel pairing process promoted by *Escherichia coli* RecA protein: inverse DNA and RNA strand exchange. *Genes Dev.* **14**, 740-749.

Zelensky, A., Kanaar, R., and Wyman, C. (2014) Mediators of homologous DNA pairing. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **6**, a016451.

Zhao, F., Kim, W., Kloeber, J. A., and Lou, Z. (2020) DNA end resection and its role in DNA replication and DSB repair choice in mammalian cells. *Exp. Mol. Med.* **52**, 1705-1714.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、数多くのご指導とご鞭撻を賜り、また本論文を作成するにあたり、御助言を賜りました明星大学 大学院 理工学研究科 教授 香川亘先生に心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、基礎的な技術をはじめ、数多くのご指導とご助言、ご助力を賜りました、明星大学 理工学研究科 五月女美香 博士に心より御礼を申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多大なるご助力を賜りました、常勤研究員の木下千明さんに心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、ご助力を賜りました、明星大学 理工学研究科 化学専攻 荻野駿修士並びに鴨井一輝修士に心より御礼申し上げます。

最後に研究生生活を送る上で、多大なる支援をしてくれた、家族並びに両祖父母に心より感謝いたします。

研究業績

① 論文

Tsuchiya, R., Saotome, M., Kinoshita, C., Kamoi, K., and Kagawa, W.

Biochemical characterization of the RNA-binding and RNA-DNA strand exchange activities of the human RAD52 protein. The Journal of Biochemistry

<https://doi.org/10.1093/jb/mvad019>

② 学会発表

・国内学会（口頭発表）

土屋怜平, 五月女美香, 荻野駿, 香川亘

RNA を利用した DNA 修復における RAD52 の機能

第 37 回染色体ワークショップ・第 18 回核ダイナミクス研究会, 2019 年, 12 月, 新潟

土屋怜平, 五月女美香, 荻野駿, 香川亘

RNA 依存的二重鎖切断修復における RAD52 の機能の生化学的解析

第 92 回日本生化学会大会, 2019 年, 9 月, 横浜

・国内学会（ポスター発表）

土屋怜平, 五月女美香, 木下千明, 鴨井一輝, 荻野駿, 香川亘

生化学的解析から見てきた RAD52 の RNA 依存的 DNA 修復における機能

第 45 回日本分子生物学会年会, 2022 年, 11 月, 幕張

土屋怜平, 五月女美香, 木下千明, 鴨井一輝, 荻野駿, 香川亘

RNA-DNA 鎖交換反応における RAD52 C 末端側領域の役割

第 39 回染色体ワークショップ・第 20 回核ダイナミクス研究会, 2021 年, 12 月, オンライン開催

土屋怜平, 五月女美香, 木下千明, 鴨井一輝, 荻野駿, 香川亘

DNA 修復における RAD52 の RNA 上での機能の生化学的解析

第 44 回日本分子生物学会年会, 2021 年, 12 月, 横浜

土屋怜平, 五月女美香, 荻野駿, 鴨井一輝, 香川亘

RAD52 が触媒する RNA-DNA 鎖交換反応の生化学的解析

第 43 回日本分子生物学会年会, 2020 年, 12 月, オンライン開催

土屋怜平, 五月女美香, 香川亘

RAD52 が触媒する DNA・RNA 間の鎖交換活性の生化学的解析

第 42 回日本分子生物学会年会, 2019 年, 12 月, 福岡

土屋怜平, 五月女美香, 香川亘

RAD52 の RNA 結合活性と鎖交換活性の生化学的解析

第 41 回日本分子生物学会年会, 2018 年, 11 月, 横浜

土屋怜平, 五月女美香, 香川亘

RAD52 が触媒する RNA 依存的相同組換えの生化学的解析

第 91 回日本生化学会大会, 2018 年, 9 月, 横浜