

氏 名 立 田 大 輔

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第532号

学位授与の日付 平成13年3月23日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Basic functions of Mre11 and their roles in recombination
and repair in *Saccharomyces cerevisiae*

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 荒木 弘之
教授 嶋本 伸雄
教授 廣瀬 進
教授 品川 日出夫 (大阪大学)
教授 杉野 明雄 (大阪大学)

論文内容の要旨

遺伝的組換えは両親由来の遺伝子を組み換えて子孫に伝える重要な機能を担っている。また、電離放射線の照射や放射線に類似した効果を及ぼす薬剤によって生じる2重鎖切断の修復反応にも、遺伝的組換えは関与している。2重鎖切断は、相同組換えに加えて末端結合反応によっても修復される。末端結合反応は、さらに直接末端がDNAリガーゼにより結合される反応と、2重鎖切断部位からの消化により生じた1本鎖のアニーリングを介した反応に分類されると考えられている。Mre11タンパク質は、真核生物によく保存されている組換え・修復タンパク質である。出芽酵母のMre11はRad50, Xrs2と複合体を形成し、減数分裂時の2重鎖切断から開始する組換え、体細胞分裂時には2重鎖切断修復反応、テロメア長の保持に関与している。Mre11タンパク質は、N末から中央にかけてフォスフォエステラーゼとの相同領域を持ち、実際にヌクレアーゼ活性を持っていることが示されている。また、2つのDNA結合部位を中央部(A)とC末(B)に持ち、B部位は2重鎖の切断に、A部位は2重鎖切断部位からの消化に必要である。一方、Rad50との結合領域は、Mre11の中央とN末側に位置する。そして、Rad50もATP依存的にDNAに結合する。

本論文では、2重鎖切断後のMre11タンパク質による修復の機能を解明するため、野生型及び種々の変異型Mre11タンパク質を精製し、その活性を調べた。そして、これら活性と変異型Mre11の示す細胞内での表現型との関連から、Mre11の関与する2重鎖切断修復反応機構を考察した。

精製した野生型Mre11タンパク質とブラントエンド又は5'オーバーハングを持つ線状2本鎖DNAを混ぜ合わせると、 Mn^{2+} とDNA末端の短い相同配列に依存して、線状DNAが結合され、マルチマーが生じる。アルカリゲル電気泳動では、マルチマーは観察されないため、Mre11により形成されるマルチマーは水素結合により結合している。この反応を、相同性依存末端結合(homology-dependent end-ligation)と名付けた。DNA結合のA部位を欠いたMre11-6またはB部位を欠いたMre11-7変異タンパク質は、野生型の40~50%の相同性依存末端結合活性を示すが、A, B両部位を欠いたMre11-8変異タンパク質では、この活性を検知することができない。このことは、DNA結合部位がこの反応に必須であることを示している。また、Mre11-6タンパク質のヌクレアーゼ活性は検知できず、相同性依存末端結合反応にはヌクレアーゼ活性は関与していない。Mre11タンパク質が、相同性依存末端結合活性を示すことは、このタンパク質が2本鎖DNAの末端をアンワインディング活性により開き、その後アニーリングさせていることを示唆している。

予想されたように、精製した野生型Mre11タンパク質は、環状1本鎖ファージDNA上にアニーリングした短い1本鎖を剥がすアンワインディング活性を持つことが分かった。このアンワインディング活性は、 Mn^{2+} に依存し、3'端がオーバーハング構造をとらない基質を要求する。DNA結合部位の1つを欠くMre11-6, Mre11-7変異タンパク質は、アンワインディング活性を示すが、両DNA結合部位を欠くMre11-8、フォスフォエステラーゼ相同領域に変異を持つMre11-NQ及びMre11-58はこの活性を示さない。しかし、Rad50タンパク質とATPの添加により、Mre11-8とMre11-NQタン

パク質はアンワインディング活性を部分的に回復する。Mre11-58 タンパク質は Rad50 タンパク質との結合に欠損を持つため、回復が起らないと考えられる。

一方、2本鎖 DNA を変性させて生じた 1本鎖 DNA と Mre11 タンパク質を混ぜ合わせると、2本鎖 DNA が生じる。これは、Mre11 タンパク質がアニーリング活性を持っていることを示している。Mre11-6 と Mre11-NQ タンパク質は、アニーリング活性を部分的に保持しているが、Mre11-7 と Mre11-8 タンパク質ではアニーリング活性を検出することが出来ない。Mre11-6 と Mre11-NQ タンパク質が DNA 結合部位 B を保持しているのに対し、Mre11-7 と Mre11-8 では B 結合部位を欠いているため、アニーリング活性には DNA 結合部位 B が必要であると結論できる。

細胞内では、DNA 末端は DNA リガーゼにより共有結合される。Mre11 タンパク質を T4 DNA リガーゼによる結合反応に加えると、結合反応が促進されること見だし、この反応を Mre11 仲介非相同末端結合 (Mre11-mediated joining of non-homologous ends) と名付けた。A 結合部位を欠く Mre11-6 タンパク質では、この活性は野生型同様に保持されているが、B 結合部位を欠く Mre11-7 と Mre11-8 タンパク質では非相同末端結合の促進は検知できない。しかし、Mre11-7 タンパク質に Rad50 タンパク質と ATP を加えると、非相同末端結合の促進が観察されるようになる。従って、この反応には B 結合部位が必要であるが、B 結合部位は Rad50 タンパク質により置き換えることができる。また、Mre11-8 では Rad50 による活性の回復は観察されず、Rad50 タンパク質による相補には結合部位 A がなければならないことが示唆される。さらに、ヌクレアーゼ活性を欠く Mre11-NQ, Mre11-58 でも非相同末端結合の促進は観察されるので、ヌクレアーゼ活性はこの反応には必要ない。

制限酵素で一ヶ所切断したプラスミドを細胞に導入すると、細胞内で切断ヶ所が結合して環状化し、細胞を形質転換することができる。この形質転換反応にも、MRE11 遺伝子が必要である。mre11-8 変異株では、この形質転換能が mre11 欠失株同様に低い。他の mre11 変異ではこの形質転換能を保持している。細胞内では、Mre11 は Rad50, Xrs2 と複合体を形成しているので、in vitro での Rad50 を加えた Mre11 仲介非相同末端結合活性とよく一致する。MMS に対する感受性は、mre11-7 は野生株同様に、mre11-6, mre11-8 は野生株と mre11 欠失株の中間程度の感受性を示し、Rad50 タンパク質との結合の重要性を窺わせた。

以上のことから、Mre11 タンパク質は、Rad50 を含むタンパク質との結合により DNA 結合部位 A と B の使い分け、組換え、修復に関与していることが示唆される。

論文審査結果の要旨

Mre11 タンパク質は、真核生物によく保存されている組換え・修復タンパク質である。出芽酵母の Mre11 は Rad50, Xrs2 と複合体を形成し、減数分裂時の 2 重鎖切断から開始する組換え、体細胞分裂時の 2 重鎖切断修復反応、テロメア長の保持に関与している。これまで Mre11 がヌクレアーゼ活性を持つことが示されているが、この活性だけでは生体内での Mre11 の機能をすべて説明することはできない。立田君は、Mre11 の生体内での機能を解析する目的で、*in vitro* の系を用いて Mre11 の持つ活性を調べ、新たな 2 つの活性を Mre11 が持つことを明らかにした。

1 つは、末端に相同性を有する DNA 断片を結合する反応 (Homology dependent end association) である。この反応は共有結合を形成するわけではないが、 Mn^{2+} に依存して 2 つの DNA 断片を会合させることができる。Mre11 には、ヌクレアーゼ活性に必要なフォスフォエステラーゼドメインと 2 つの DNA 結合ドメインをもつが、この反応にはどちらかの DNA 結合ドメインが必要であることが分かった。この活性の生物学的な意味は、今のところ分からない。

2 つめは、DNA リガーゼによる DNA 断片結合反応を促進する活性である。この反応には、Mre11 のフォスフォエステラーゼドメインと DNA 結合ドメインが要求される。種々の変異 Mre11 の *in vivo* での性質と、精製タンパク質を用いた *in vitro* の活性の比較から、この反応は MMS 等による DNA ダメージによる 2 本鎖切断の修復反応に関与していると考えることが出来る。また、Mre11 の DNA 結合ドメインを欠いた場合でも、Rad50 と複合体を形成すると、Rad50 の ATP 依存的 DNA 結合によりその活性を回復する。これも、Mre11 変異株の性質と一致する。

以上のように立田君は多数の実験を注意深く行い、Mre11 の機能について新しい知見を与えたことは、この分野への寄与も大きく、学位授与の要件を満たすものと審査員一同判断した。また、本論分が英語により書かれ、その英文から学位授与にふさわしい英語による表現力を有していると判断した。