

出芽酵母の相同組換えにおけるRad55と Rad57の役割

Role of Rad55 and Rad57 of budding yeast
in homologous recombination

総合研究大学院大学生命科学研究科遺伝学専攻

学籍番号 963109

渡辺 光一

目次

要旨	p. I
----	------

本論

序論	p. 1
----	------

材料と方法	p. 5
-------	------

菌株と培地	p. 5
-------	------

プラスミド	p. 5
-------	------

DNA	p. 6
-----	------

<i>RAD55</i> 遺伝子、および、 <i>RAD57</i> 遺伝子の改変	p. 7
---	------

酵母形質転換	p. 8
--------	------

減数分裂の誘導と減数分裂期組換え頻度の測定	p. 9
-----------------------	------

酵母孢子の解析（ランダムスポア解析）	p. 9
--------------------	------

酵母細胞核の染色	p. 10
----------	-------

<i>RAD55</i> のmRNAの検出	p. 10
-----------------------	-------

ウエスタンブロット	p. 10
-----------	-------

GST-Rad55CF融合タンパク質、および、	
-------------------------	--

GST-Rad57CH融合タンパク質の発現と精製	p. 11
--------------------------	-------

Rad55-57 複合体の精製	p. 12
-----------------	-------

ゲルシフトアッセイ	p. 13
-----------	-------

電子顕微鏡観察	p. 13
---------	-------

結果 p. 15

減数分裂期のRAD55機能の解析 p. 15

RAD55 mRNAの合成は減数分裂の極めて初期に誘導される p. 17

細胞内でRad55はRad57と複合体を形成する p. 17

GST Rad57タンパク質はDNAに結合する p. 19

Rad55-DNA複合体とRad57-DNA複合体の安定性 p. 21

Rad55とRad57のDNA結合領域の同定 p. 22

GST Rad57-DNA複合体の電子顕微鏡観察 p. 22

考察 p. 24

減数分裂期組換えでのRAD55の役割 p. 24

Rad55とRad57は複合体として機能する p. 25

Rad55とRad57はDNA結合タンパク質である p. 25

DNA鎖交換反応におけるRad55-57複合体の機能 p. 27

参考文献 p. 29

図表 p. 36

謝辞

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、組換えはDNAの損傷を正しく修復することにも関与している。真核生物における遺伝的組換え機構の研究は出芽酵母において進展してきた。出芽酵母の組換えはDNA二本鎖の切断（DSB : Double Strand Break）で開始する。*RAD52* エピスタシスグループに属する遺伝子群はこのDSBの形成とその修復に機能する遺伝子である。これらの遺伝子に変異が起ると、体細胞分裂期の細胞では、変異原処理に感受性になり、減数分裂期の細胞では、染色体を正確に分配できなくなるため、胞子の形成ができなくなる。または、胞子を形成できても、その胞子は致死となる。このグループに属する遺伝子として、現在、*RAD50*、*MRE11*、*XRS2*、*RAD51*、*RAD52*、*RAD54*、*RAD55*、*RAD57*の8遺伝子が同定されている。このグループに属する遺伝子のホモログは、真核生物に広く保存されており、構造的にも機能的にも似ていることから、組換えの基本的メカニズムが真核生物を通して共通であると考えられている。

減数分裂の時、ホットスポットと呼ばれる、組換えが高頻度に起こる染色体上の領域にDSBが入り、その切断末端で一方のDNA鎖が消化されて3'側に単鎖DNA (ssDNA)を持つ末端が形成される。このssDNAにRad51が結合して、相同な配列を持つDNAを検索し、これと対合して、DNA鎖を交換する。その後、相手のDNAを鋳型として、DSB形成時に消化された塩基配列が修復合成され、特異的なエンドヌクレアーゼによりDNA鎖の交叉が解消されて、組換え体が形成される。これが現在の組換え反応のモデルである。

ホットスポットでのDSB形成からssDNAの露出までには、Mre11、Rad50とXrs2と共にSpo11、Sae2/Com1が関与する。ssDNAと相同なDNAの検索から相手dsDNAとの対合からDNA鎖の交換までのステップには、ssDNA結合タンパク質であるRPAとRad51、Rad52、Rad54、Rad55、および、Rad57の機能が関与する。

Rad51は、大腸菌の組換え蛋白質であるRecA蛋白質のホモログであり、DNA鎖交換反応を行う。DNA鎖交換反応は、presynaptic filamentと呼ばれる、Rad51がssDNAに結合して作る特徴的なラセン構造を持つ複合体の形成で始まる。このpresynaptic

filament形成では、ssDNA、RPA、Rad51とRad52の間の相互作用がpresynaptic filament 形成を促進することが示されている。しかし、Rad55とRad57の組換えにおける機能はわかっていなかった。

体細胞分裂期のRAD55とRAD57の機能を遺伝学的に解析した結果、RAD55とRAD57はRAD51の上位で機能すると予想された。そこで、遺伝的組換えでのRAD55とRAD57の役割を知るために、減数分裂期組換えにおけるRAD55の機能を調べた。rad55Δ変異株で胞子の形成率が低いこと、減数分裂期遺伝子内組換えの頻度が低いこと、そして、胞子の生存率が、rad55Δspo13変異では低く、rad50spo13二重変異をrad55Δ変異株に導入することによって回復することから、RAD55は相同組換え機構のDSB形成後の段階で働くことが示された。また、野生株を減数分裂に導入すると、極めて早い時期にRAD55の転写が誘導されることが、そして、mRNAの発現量はRAD50、RAD52のmRNA量と比較して、極めて少ないことがわかった。

Rad55とRad57が複合体を形成することが遺伝学的に示唆されていたが、私はRad55とRad57を精製して、これらが安定な複合体を形成することを示した。細胞抽出液からの免疫沈降実験とGST pull down assayを行ったが、Yeast Two-Hybrid法の実験からいわれていたような、Rad55とRad51の相互作用は検出できなかった。

GST Rad55とGST Rad57は単鎖DNAと二重鎖DNAに対してヌクレオチド非依存性DNAの結合活性を持つことを示した。さらに、それぞれのタンパク質のDNA結合活性に必要な領域は、Rad55では、279番アミノ酸残基から325番アミノ酸残基までの領域であり、Rad57では、350番アミノ酸残基から380番アミノ酸残基までの領域であることがわかった。Rad55はC末端側がDNA結合領域であり、GST Rad55がrad55Δ変異株のMMS感受性を相補できなかったのも、N末端側が他のタンパク質との結合領域であると予想した。Rad55、および、Rad57は、アミノ酸配列上、Walker type-Aのヌクレオチド結合配列を持ち、実際にRad55にあるヌクレオチド結合配列は、Rad55の機能に必要である。Rad55のヌクレオチド結合配列はN末端側にあることから、ヌクレオチドの結合とタンパク質間相互作用、そして、Rad55-57の機能の発現に相関があることが期待できる。

GST Rad57は単鎖線状DNAと3'突出末端をもつ二重鎖DNAに対する親和性が高

い。3' 突出末端をもつ二重鎖DNAとGST Rad57の複合体を電子顕微鏡で観察したところ、GST Rad57がDNAの末端に結合している分子が多数、観察された。また、GST Rad57と反応させた複数のDNA分子が平行に寄せ集められている様子が観察された。DNAが凝集した結果、分子間の衝突頻度が高くなり、相同なDNA分子と対合する機会が増加して、それが組換えに有利に働くと考えられた。

Rad55の発現量が極めて少ないこととRad55とRad57が実際に複合体を形成することから、Rad55-57複合体は、ランダムにDNAに結合するのではなく、減数分裂期組換えに見られるような、3' OH末端が突出したssDNAを認識して結合すると考えた。そして、特徴的なDNA結合活性と*RAD55*と*RAD57*の遺伝学的解析から、Rad55-57複合体は3' OH末端が突出したssDNAに結合し、Rad51のssDNAへの結合の起点となり、DNAの一方の末端から効率良くpresynaptic filament が形成されるように機能することであると考察した。

序論

出芽酵母の組換えは、DNA二本鎖の切断（DSB : Double Strand Break）で開始する。*RAD52* エピスタシスグループに属する遺伝子群はこのDSBの形成とその修復に機能する遺伝子である。体細胞分裂期では主に、DNAに生じた損傷の修復に働き、減数分裂期では、両親由来の遺伝子を混ぜ合わせ、組換えるために働いている。このグループに属する遺伝子として、現在、*RAD50*、*MRE11*、*XRS2*、*RAD51*、*RAD52*、*RAD54*、*RAD55*、*RAD57* の8遺伝子が同定されている [Alani et al, 1989 ; Shinohara et al, 1992 ; Adzuma et al, 1984 ; Cole, 1987 ; Lovett, 1994 ; Kans and Mortimer, 1991 ; Johzuka & Ogawa, 1995 ; Ivanov et al, 1994]。その中で、*MRE11*、*RAD50*、*XRS2*はDSBの形成とその末端の消化に、他の遺伝子は相同な塩基配列を持つDNA鎖間での遺伝情報の交換反応で働くことが示されている。これらの遺伝子に変異が起ると、体細胞分裂期の細胞では、変異原処理に感受性になり、減数分裂期の細胞では、染色体を正確に分配できなくなるため、胞子の形成ができなくなる。または、胞子を形成できても、その胞子は致死となる。このグループに属する遺伝子のホモログは、真核生物に広く保存されており [Petrini et al, 1995 ; Dolganov et al, 1996 ; Camey et al, 1998 ; Shinohara et al, 1993 ; Benson et al, 1994 ; Kanaar et al, 1996]、構造的にも機能的にも似ていることから、組換えの基本的メカニズムが真核生物を通して共通であると考えられている [Ogawa et al, 1995]。

減数分裂期組換えは、ホットスポットと呼ばれる、組換えが高頻度に起こる染色体上の領域にDSBが入って開始する。その切断末端で、一方のDNA鎖が消化されて3' にssDNAを持つ末端が形成される [Cao et al, 1990 ; Sun et al, 1991]。このssDNAにRad51が結合して、相同な配列を持つDNAを検索、これと対合して、DNA鎖を交換する（ヘテロ二本鎖DNAの形成）。その後、相手のDNAを鋳型として、DSB形成時に消化された塩基配列が修復合成され、組換え中間体の構造に特異的なエンドヌクレアーゼによりDNA鎖の交叉（Holliday junction）が解消され

て、組換え体が形成される。さらに、DNA鎖が交換されるとき、Holliday junctionが移動し、ヘテロ二本鎖のDNA部分が伸長する。これをbranch migrationと呼ぶ。これが現在の組換え反応のモデルである（図1）[Szostak et al, 1983]。

ホットスポットでのDSB形成からssDNAの露出までには、Mre11、Rad50とXrs2と共にSpo11、Sae2/Com1が関与する（図2）[Keeney et al, 1997 ; McKee and Kleckner, 1997 ; Prinz et al, 1997 ; Ohta et al, 1998 ; Usui et al, 1998]。DSBの形成は、Mre11がホットスポットを認識して、そのDNA上に結合することから始まる。そして、Mre11が結合したDNA上にDSB形成に必要な因子が集合する[Ohta et al, 1998]。SPO11は減数分裂期に特異的に発現する遺伝子であり、spo11欠失株ではDSBが形成されないということ、そして、Spo11はトポイソメラーゼIIと相同な構造を持つことから、Spo11が二本鎖DNA切断に直接関与すると考えられている[Keeney et al, 1997 ; Bergeerat et al, 1997]。Mre11とRad50とXrs2は、この三者で複合体を形成することが示されている。そして、Mre11がヌクレアーゼ活性を有することから、この複合体がDNA二本鎖切断後のDNA鎖の消化とssDNA鎖の形成に機能すると考えられている。SAE2/COM1の欠失株ではDSBの形成は起きるが、DNA鎖の消化が起こらないことから、この遺伝子産物はDNA鎖の消化の段階で機能すると考えられている。生じたssDNAと相同なDNAの検索、相手dsDNAとの対合、およびDNA鎖の交換までのステップには、単鎖DNA結合タンパク質であるRPAとRad51、Rad52、Rad54、Rad55、および、Rad57の機能が関与する [Shinohara and Ogawa, 1995]。

Rad51は、大腸菌の組換えタンパク質であるRecAタンパク質のホモログである。このタンパク質はATP存在下で、ssDNAとdsDNAに結合し、ssDNA依存のATP加水分解活性を持ち[Shinohara et al, 1992]、DNA鎖交換反応を行う[Sung, 1994 ; Sung and Robberson, 1995]。DNA鎖交換反応の第一段階は、presynaptic filamentと呼ばれる、Rad51がssDNAに結合して作る特徴的なラセン構造を持つ複合体の形成である。このpresynaptic filament形成では、ssDNAにある二次構造がRPAによって解消されるので[Alani et al, 1992]、RPAはpresynaptic filament形成を促進する[Sugiyama et al, 1997]。一方、Rad51はRPAが結合し

たssDNAには結合できないので、Rad51よりも先にRPAがssDNAに結合している場合には、Rad51のDNA鎖交換反応は阻害される。細胞内のssDNA領域には、RPAが結合していると考えられるので、この阻害を除いてRad51の結合を促進する因子が存在すると予想された。Rad52がDNA結合活性を持つこと、また、実際にRad52にRad51が結合する[Shinohara et al, 1992]ことが示されたことから、Rad52がこのRPAの阻害効果を抑制する役割を担っているのではないかと考えられた。実際に、これは、DNA鎖交換反応の*in vitro*系におけるRad52の役割を解析することにより、証明された[Sung, 1997; Shinohara et al, 1998; New et al, 1998; Benson, 1998]。

Rad54はATPaseのSWI2/SNF2型サブファミリーに属するタンパク質であり[Eisen et al, 1995]、そのアミノ酸配列はDNAヘリケースのモチーフを保持している。そこで、DNAヘリケースの活性を有することが予想されたが、Rad54は、dsDNA依存性のATPase活性を示したものの、DNAヘリケースの活性を示さなかった。しかし、このタンパク質はDNA鎖交換反応を促進することが*in vitro*で示されている[Petukhova, 1998]。Rad54がDNA交換反応を促進する機構は不明であるが、以下の三点の可能性が考えられている。(i) Rad54はRad51と相互作用することから、DNA上をRad54が移動して、Rad51がDNA鎖交換反応を行いやすい状態にDNAを変換する。あるいは、(ii) Rad54がDNAに作用して、ヘテロ二本鎖DNAの伸長を促進するようにbranch migrationが起こる。その結果、DNA鎖交換反応が促進される。または、(iii) Rad54がDNAに作用して、ヘテロ二本鎖DNAから、DNAに結合しているRad51を剥がす。その結果、DNA鎖交換反応が促進される。[Petukhova, 1998; Swagemakers et al, 1998]。Rad54のDNA鎖交換反応における作用は、研究途上である。

Rad55とRad57は、アミノ酸配列上、Walker type-A [Walker et al, 1982]のヌクレオチド結合配列を持ち、その周辺のアミノ酸配列が大腸菌RecAのそれと似ていることから、Rad51と共に、RecA様タンパク質の一員ではないかと考えているが、その証明は全くない[Lovett, 1994; Kans and Mortimer, 1991]。*rad55*、あるいは、*rad57*と*rad51*の二重変異株の電離放射線照射に対する感受性が、それぞれの親株と同じであること、また、*RAD51*遺伝子を*rad55*と*rad57*変異株で過剰

発現させると、これらのMMS感受性と体細胞分裂期の組換え欠損が、野生株のそれにまで回復することから、*RAD55*と*RAD57*遺伝子は*RAD51*の上位で働くことが示唆された[Rattray and Symington, 1995 ; Hays et al, 1995 ; Johnson and Symington, 1995]。また、*rad55*と*rad57*変異株は、組換え体形成反応の欠損やメチルメタンスルホン酸感受性が、低温で高くなること[Lovette and Mortimer, 1987 ; Kuwahara and Ogawa, 未発表データ]、yeast two-hybrid 法を用いた実験から、Rad55とRad57が、そして、Rad55とRad51が相互作用することが示唆された[Hays et al, 1995 ; Johnson and Symington, 1995] ことから、これらのタンパク質は、組換え反応で相互作用しながら働くと考えられるようになった。そして実際に、Rad55とRad57の複合体がRad51のDNA鎖交換反応を促進することが示された[Sung, 1997]。しかし、DNA鎖交換反応の促進に関して、どのような作用機序の違いがRad52とRad55-57の間にあるのかは不明である。

本研究では、遺伝的組換え反応におけるRad55とRad57の役割を知るために、*RAD55*の遺伝子機能の解析とタンパク質のDNA結合活性、相互作用を解析した。その結果、Rad55とRad57はヘテロダイマーを形成し、Rad51組換え系で機能するDNA結合タンパク質であることがわかった。そして、その役割は、DNA二本鎖の切断後に生じるssDNAに結合し、Rad51のpresynaptic filamentの形成を促進することであると考えられる。

材料と方法

菌株と培地

用いた大腸菌と出芽酵母の株は表1に示す。大腸菌DH5 α 株はプラスミドの構築、プラスミドDNAの調製に用いた。大腸菌BL21 (DE3)株はGST融合タンパク質を発現させるために用いた。出芽酵母のプロテアーゼ欠損株であるBJ2168株（日本ジーン）を用いて、酵母からのタンパク質の精製を行った。NKY254, WKY31, WKY41はRad55と Rad57の融合タンパク質の相補性試験に用いた。WKY31はYEX-57CHを導入した株であり、WKY21はYEX-55CFを導入した株である(プラスミドの項参照)。SKY501からSKY504まで、そして、SKY509とSKY510は減数分裂期の*RAD55*の機能を調べるために用いた。

大腸菌と酵母の培養に用いた培地の組成を表2に示す。大腸菌の培養にはLBを用いた。酵母の培養にはYPDとSDを用いた。酵母の胞子形成にはSPMを用いた [Sherman et al, 1983]。酵母を減数分裂に導入するために、YPAとSIIを用いた。

プラスミド

i)大腸菌

DNAのサブクローニングには、pBluescript KS [Stratagene]、pT7Blue [Novagen]、pUC18、M13mp18を用いた。GST融合タンパク質の発現には、pGEX-KGとpGEX-KGに*Nde*Iの認識配列とFLAGタグの配列を挿入したプラスミドを用いた。PCRでRad55をコードする塩基配列の全長を増幅し、これをpGEX-KGに挿入し、これをpGEX55CFとした。このPCRに用いたプライマーは、N末端側は*Nde*Iの認識配列以降に*RAD55*のN末端側の遺伝子を含み、C末端側は*RAD55*のC末端側の遺伝子の後にFLAGタグの塩基配列と終止コドンの配列、そして、*Xho*Iの認識配列を持つプライマーである(55N2, 55C6 : 表3)。同様にして、pGEX57CHを作成したが、この為にC末端側プライマーは*RAD57*のC末端側の遺

伝子と終止コドンの配列の間に、Hisタグの塩基配列を挿入したプライマーを作成した(57N2, 57C3 : 表3)。

ii) 酵母

出芽酵母細胞内でFLAGタグ付きRad55、Hisx6タグ付きRad57を発現させるためにpKT10を、GST Rad55 FLAG融合タンパク質、GST Rad57 Hisx6融合タンパク質を発現させるためにYEX-4T-3 (日本ジーン) を用いた。*RAD55*のN末端側の遺伝子の上流に*EcoRI*の認識配列を含むプライマーと、*RAD55*のC末端側の遺伝子の後にFLAGタグの塩基配列と終止コドンの配列、そして、*XhoI*の認識配列を持つプライマー (55N5, 55C6 : 表3) で*RAD55*の全長をコードする塩基配列を増幅し、これをpKT10に挿入した。GAPのプロモーターからターミネーターまでを含むDNA断片をこのプラスミドから切り出し、YEplac195に挿入し、これをpGAP55CFとした。また、*RAD57*のN末端側の遺伝子の上流に*EcoRI*の認識配列を含むプライマーと、*RAD57*のC末端側の遺伝子の後にHisx6タグの塩基配列と終止コドンの配列、そして、*XhoI*の認識配列を持つプライマー (57N3, 57C3 : 表3) でRad57の全長をコードする塩基配列を増幅し、これをpKT10に挿入し、これをpGAP57CHとした。YEX-55CFとYEX-57CHは、それぞれ、*RAD55*と*RAD57*のORFを含むDNA断片をpGEX55CFとpGEX57CHから切り出して、YEX-4T-3に挿入したものである (図3)。

DNA

ゲルシフトアッセイの基質として、D1 (5'-CACGCTACCGAATTCTGACTTGC TAGGACATCTTTGCCCACGT TGAC-3'), D2 (5'-GATCGTACAACGTGGGCAA A GATGTCCTAGCAAGTCA GAATTCGGTAGCGTG-3'), D3 (5'-GTCAACGTGG GCAAAGATGTCCTAGC AAGTCAGAATTCGGTAGCGTG-3'), D4 (5'-ACGTGG GCAAAGATGTCCTA GCAAGTCAGAATTCGGTAGCGTG-3')を Amarshamから購入した。T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用い、 $[^{32}\text{P}]$ で1 pmolのD1の5'末端を標識した。標識したD1 DNAを3 pmolのD2、D3、または、D4と、100 mM NaClを含む12.5 μl のTE 中でアニールさせた。アニールしてできたdsDNAを10%のボ

リアクリルアミド電気泳動にかけ、DNAをゲルから回収した。

ゲルシフトアッセイに用いるため、pUC18 プラスミド DNAから、基質DNA調整した。pUC18 プラスミド DNA を *Sma* I で消化し、2.7 Kbp の線状 dsDNA を得た。また、pUC18 プラスミド DNA を *Nde* I で消化し、これを鋳型として Taq ポリメラーゼを用いて 0.82 kb の線状 ssDNA を合成した。pUC-1 (5'-GTATCCG GTAAGCGGCAG-3')[Amarsham から購入] をプライマーとして、この ssDNA 合成に用いた。これを 7M の尿素を含む 7% のポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、ゲルから DNA を回収して精製した。dsDNA、ssDNA とともに、放射性同位体で標識する場合には、T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用い、 $[^{32}\text{P}]$ で DNA の 5' 末端を標識した。

PCR プライマーとして、或いは、Rad57 のペプチド断片をコードする DNA 断片を得るため、表 3 に示したオリゴ DNA と 57BDN (5'-GATCCAAAAAGAAACCAC CCATAATTGAGAATAAAACCGTTGAGCGAAATTCATCAAGTCCTATCAGTCGA CAAAGTAAGAAACGGAAATGA-3') と 57BDC (5'-TCGATCATTTCCGTTTCTTA CTTTGTCGACTGATAGGACTTGATGAATTTTCGCTCAACGGTTTTATTCTCAATT ATGGGTGGTTTCTTTTTG-3') を Amarsham から購入した。これらのプライマーを使用して増幅した DNA 断片は、Rad55、Rad57、そして、両者のタンパク質のペプチド断片を大腸菌、あるいは、出芽酵母で発現させるためのプラスミドの構築に用いた。

RAD55 遺伝子、および、*RAD57* 遺伝子を改変するため、表 4 に示したオリゴ DNA を Amarsham から購入した。55N6 と 55C5 は、Rad55 のアミノ酸配列の 49 番目のアミノ酸である Lys を Ala に変えるために用い、55N7 と 55C8 は、*RAD55* の ORF 中にある、大腸菌の SD 配列様の塩基配列を改変するために用いた。Rad55 と Rad57 の、DNA 結合に必要な最少領域を欠く遺伝子を作成するために 55N11、55C11、57-9 と 57-10 を用いた。

***RAD55* 遺伝子、および、*RAD57* 遺伝子の改変**

i) *RAD55* ORF 中の大腸菌 SD 配列様配列の改変

*RAD55*のORF 中にある、大腸菌のSD配列様の塩基配列（翻訳開始点より450から453番目までの塩基配列）を改変するため、酵母ゲノムDNAを鋳型DNAとして、55N7と55C9、55N9と55C8（表4）の間でPCRを行った。得られたDNA断片を鋳型DNAとして、再度、55N9と55C9の間でPCRを行い、*RAD55* ORF 中にある、大腸菌のSD配列様配列を改変した遺伝子を含むDNA断片を得た。

ii) *RAD55K49A*の作成

Rad55のアミノ酸配列の49番目のアミノ酸であるLysをAlaに変えた遺伝子、*RAD55K49A*を作成するために以下の方法を用いた。(i)で得られたDNAを鋳型DNAとして、55N9と55C5、55N6と55C9（表4）の間でPCRを行った。得られたDNA断片を鋳型DNAとして、再度、55N9と55C9の間でPCRを行い、これにより、Rad55のアミノ酸配列の49番目のアミノ酸残基をAlaに変えた遺伝子を含むDNA断片を得た。

iii) Rad55、および、Rad57のDNA結合領域を欠失した遺伝子の作成

酵母ゲノムDNAを鋳型DNAとして、55N9と55C11、55N11と55C9（表4）の間でPCRを行った。55N11と55C11には*BamH* Iの認識配列があるので、得られたDNA断片を、各々、*BamH* Iで消化し、これらの二つのDNA断片をT4 リガーゼでライゲーションした。これにより、Rad55のDNA結合に必要な最少領域を欠失した遺伝子を得た。酵母ゲノムDNAを鋳型DNAとして、57aと57-9、57cと57-10の間でPCRを行った。57-9と57-10には*BamH* Iの認識配列があるので、得られたDNA断片を、各々、*BamH* Iで消化し、これらの二つのDNA断片をT4 リガーゼでライゲーションした。これにより、Rad57のDNA結合に必要な最少領域を欠失した遺伝子を得た。

酵母形質転換

形質転換したい酵母をYPD上にひろげ、翌日、シングルコロニーを拾って、40 ml のYPDの液体培地で培養した。菌液の吸光度がOD₆₀₀ = 1.0~2.0 になったところで、培養液を遠心し、集菌した。2 ml の TE (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.5 mM EDTA)、次に、Li Acetate 溶液 (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.5 mM EDTA,

100 mM Li Acetate) で菌体を洗浄し、400 μ l のLi Acetate 溶液で菌体を懸濁する。ここまでの操作は全て室温で行った。30 $^{\circ}$ Cで30 分間、懸濁液を保温した後、100 μ l の酵母懸濁液に4 μ g のキャリアーDNA (変性サケ精子DNA) と酵母に導入したいDNAを加えた。これを30 $^{\circ}$ Cで30 分間、保温した後、700 μ l のPEG 溶液 (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.5 mM EDTA, 35 % PEG 4000) を加え、更に30 $^{\circ}$ Cで30 分間、保温した。これを42 $^{\circ}$ Cで5 分間、加熱した後、遠心して集菌し、TE で2 回、菌体を洗浄した後、選択培地上にこれをひろげた。プレートを30 $^{\circ}$ Cで3 日、培養し、出てきたコロニーを選択培地上にひろげ、シングルコロニーを拾って、これを形質転換体とした。

減数分裂の誘導と減数分裂期組換え頻度の測定

胞子形成開始4 日前に、酵母をMYPL 上にひらく。この操作で ρ^{-} 株を除く。2 日後、シングルコロニーをとり、2~10 mlのYPDに懸濁して培養する。翌日、菌数を測定した後、500 mlのYPA に加える。0.7~2.0 $\times 10^7$ cell/mlの菌濃度であることを確認した後、遠心して集菌する。蒸留水で1 回洗った後、100 mlのSPIIに懸濁する。適当な温度で培養し、減数分裂期へ誘導した。組換え頻度を測定する場合は、適当な時間で試料を取り、希釈した後、SD寒天培地とSD-His寒天培地にひろげた。そして、減数分裂期に誘導するのに設定したのと同じ温度で培養を続けた。

酵母胞子の解析 (ランダムスポア解析)

SPM上で胞子形成させた菌体を竹ヒゴでかき取り、1 ml の dilution buffer に懸濁した。40 μ l の0.5 M EDTA [pH8.0]、2 μ l の2-メルカプトエタノールを加え、30 $^{\circ}$ C、10 分間、振盪した。この処理により、Zymolyase (生化学工業) によって細胞壁が消化されやすくなり、また、凝集している細胞をバラバラにすることができる。Dilution buffer で2 回洗った後、再び1 ml の dilution buffer に懸濁した。10 μ l の 10 mg/ml Zymolyase を加え、30 $^{\circ}$ C、60 分間振盪した。顕微鏡下で、Zymolyase 処理が完全なことを確認した後、希釈し、選択培地上にプレーテ

ィングした。

酵母細胞核の染色

酵母細胞を70%のエタノールで、4℃、10分間、固定する。試料を滅菌水で一回、洗ったのち、1 μ g/mlの4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)で、一分間、室温で染色した。そして、試料を滅菌水で一回、洗ったのち、滅菌水に懸濁し、オリンパス蛍光顕微鏡セットで観察した。

***RAD55*のmRNAの検出**

RNA試料を減数分裂期の細胞から、グラスビーズとフェノール/クロロホルムを用いて抽出した[Carlson and Botstein, 1982]。*RAD55*遺伝子を含む1.8 kbpの*Hind* III断片をM13mp18に挿入したプラスミドであるpM13-R4 (図4) からssDNAを調製し、1 μ gのこのssDNAと50 μ gのRNAをハイブリダイズさせた。次に、これにS1ヌクレアーゼを加えてハイブリダイズしなかった核酸を消化した後、未消化のDNA-RNAハイブリッドをアガロースゲルで電気泳動した。そして、DNA-RNAハイブリッドの量を、*RAD55*遺伝子を含む1.8 kbpの*Hind* III断片(図4)をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行って検出した。

ウェスタンブロット

タンパク質のSDS polyacrylamide gelからPVDF メンブレン (Millipore; Immobilon™) への転写には、BIO-RAD社のトランスブロットSDセル・セミドライ・プロットティング装置を使用した。トランスファーバッファーはセミドライバッファー (48 mM Tris-base, 39 mM Glycine, 20% Methanol, 0.1% SDS) を用い、10Vの定電圧で、20分間、タンパク質をメンブレンへ転写した。メンブレンをイオン交換水で5分間、洗浄したのち、非特異的な抗体の結合を防ぐために、これをブロッキングバッファー (20 mM Tris-HCl [pH7.5], 150 mM NaCl, 5% スキムミルク) に浸し、室温で1時間、振盪した。次に、1次抗体、そして、ホー

スラディッシュペルオキシダーゼで標識した2次抗体を反応させた。メンブレンの洗浄には、リンスバッファー (10 mM Tris-HCl [pH7.5], 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) を用いた。シグナルの検出にはAmersham社のECL systemを使用した。

GST Rad55CF融合タンパク質、および、GST Rad57CH融合タンパク質の発現と精製

GST Rad55CFを発現させるために、pGEX-55CFを持つ大腸菌株を4 lのLB培地で、37℃で培養し、OD₆₀₀が0.6になったところで、Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) を0.4 mMになるように加えた。30℃に温度を変えて、さらに3時間、培養を行った。集菌した菌体 (約15 g) を25 mlのbufferA-0.5 (bufferA { 25 mM Tris-HCl [pH7.5], 10% glycerol, 0.1 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF }, 0.5M NaCl) に懸濁し、氷上で、超音波破碎器 (Branson Sonifier B15) で、細胞を破碎した。この破碎液にNP-40 (Nonidet P-40) を0.1%になるように加え、これを12,000gで20分間、遠心し、上清を回収した。この上清に100 μlのGlutathione Sepharose (Pharmacia) を加えて、4℃で1時間、回転させた。10倍量のbufferA-0.5で5回、レジンを洗った後、16 mMのグルタチオンを含む300 μlのbufferA-0.5でタンパク質をレジンから溶出した。次に、この溶出液にATPとMgCl₂を、それぞれ、5 mMになるように添加し、これに50 μlのギガバイト・ハイドロキシアパタイトレジン (生化学工業株式会社) を加えて、4℃で1時間、回転により攪拌した。10倍量のbufferP-20 (bufferP {10% glycerol, 0.1 mM EDTA, 50 mM KCl, 5 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF に、3倍量のbufferP-40 (bufferP, 40 mM potassium phosphate [pH7.5]) で1回、レジンを洗浄した後、150 μlのbufferP-150 (bufferP, 150 mM potassium phosphate [pH7.5]) でレジンからタンパク質を溶出した。溶出液をbufferA-0.1 (bufferA, 0.1 M NaCl) に対して透析した後、これをMini Q カラム (SMART system [Pharmacia]) にかけて、bufferA 0.1-0.5 (bufferA, 0.1-0.5 M NaCl) の溶出グラジエントでタンパク質をレジンから溶出した。GST Rad55を含む画分をSDS-PAGE で確認し、Microcon-50 (Amicon) を用いて、その画分

を濃縮し、これをbufferA-0.1に対して透析した後、-80℃で保存した。

GST Rad57CHを発現させるために、pGEX-57CHを持つ大腸菌株を4 lの LB培地で、37℃で培養し、OD₆₀₀が0.6になったところで、IPTGを0.4 mMになるように加えた。30℃に温度を変えて、さらに3時間、培養を行った。集菌した菌体（約15 g）を25 mlのbufferB-0.5 (bufferB { 20 mM Tris-HCl[pH7.5], 10% glycerol, 5 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF }, 0.5 M NaCl)に懸濁し、氷上で、超音波破碎器で、細胞を破碎した。この破碎液にNP-40を0.1%になるように加え、これを12,000gで20分間、遠心し、上清を回収した。この上清に100 µlのNi-NTA Agarose (Qiagen)を加えて、4℃で1時間、タンパク質を吸着させた。10倍量のbufferB-0.5でレジンを洗った後、200 mMのイミダゾールを含む300 µlのbufferB-0.5でタンパク質をレジンから溶出した。次に、この溶出液にATPとMgCl₂を、それぞれ、5 mMになるように添加し、これに10倍量のbufferA-0.5で平衡化した50 µlのGlutathione Sepharoseを加えて、4℃で1時間、回転により攪拌した。10倍量のbufferA-0.5でレジンを洗浄した後、16 mMのグルタチオンを含む150 µlのbufferA-0.5でレジンからタンパク質を溶出した。溶出液をbufferA-0.1に対して透析した後、これに20 µlのNative DNA cellulose (Pharmacia)を加え、4℃で2時間、タンパク質を吸着させた。10倍量のbufferA-0.1でレジンを洗浄した後、70 µlのbufferA-0.5でレジンからGST Rad57を溶出し、この溶出液を-80℃で保存した。タンパク質の濃度は、BSAをスタンダードとしたBradfordアッセイで決定した。

Rad55-57 複合体の精製

プラスミドpGAP55CFとpGAP57CHの両方を持つ酵母BJ2168株を8 lのUracilとLeuを除いたSD 最少培地で、30℃で培養した。培養液の吸光度がOD₆₀₀で2附近になるまで培養を行った。集菌後、菌体を3倍量のLysis buffer (50 mM Tris-Acetate [pH 7.5], 10 % glycerol, 5 mM Mg Acetate, 1.0 M NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol, proteinase inhibitor cocktail [Boehringer]) に懸濁し、懸濁液と等量のグラスビーズ (BZ-06 : イウチ) を加え、ビーズビーター (Biospec)

で酵母細胞を破碎した。この破碎液にNP-40を0.1 %になるように加え、これを12,000gで30分間、遠心し、上清を回収した。50 ml の上清に250 μ lのNi-NTA Agarose (Qiagen)を加えて、4℃で1時間、タンパク質を吸着させた。10倍量の Lysis buffer+0.1 % NP-40 でレジンを洗った後、200 mMのイミダゾールを含む750 μ lの Lysis buffer+0.1 % NP-40 でタンパク質をレジンから溶出した。溶出液に 20 μ l の Anti FLAG M2 Agarose (Sigma) を加え、4℃で4時間、レジンにタンパク質を吸着させた。レジンを50 倍量のbufferC (50 mM Tris-Acetate [pH 7.5], 10 % glycerol, 5 mM Mg Acetate, 0.3 M NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol, proteinase inhibitor cocktail, 0.1 % NP-40)で洗浄した後、0.2 mg/ml のFLAG ペプチドを含む75 μ l のbufferCでタンパク質をレジンから溶出した。Anti FLAG M2 Agaroseから溶出したタンパク質をSDS-PAGEした後、タンパク質の銀染色とウエスタンブロットを行い、この溶出液にRad55とRad57が含まれていることを確認した。

ゲルシフトアッセイ

反応液の組成は、断わらない限り、次のとおりである。35 mM PIPES [pH6.5], 1 mM DTT, 3 mM Mg Acetate, 100 mM NaCl, 0.1 mg/ml BSA, DNA, GST Rad55タンパク質、または、GST Rad57タンパク質。反応液を37℃で20分間、加温した後、0.8% アガロースゲルで、電気泳動を行った。泳動バッファーは0.5 X TBEを用いた。 $[^{32}\text{P}]$ で標識したDNAを基質として用いた場合、電気泳動後、BAS2000 system (Fuji) により、DNAの移動を検出した。移動度したDNAの割合は、BAS2000 system で標識したDNA の放射活性を取り込み、得られたDNAのバンドの強度から算出した。具体的には、試料タンパク質を加えていないサンプルで見られるDNAのバンドの強度を基準として、試料タンパク質を加えてもシフトせずに残ったDNAのバンドの強度から、その割合を100分率で求め、その値からシフトしたDNAの割合を逆算した。

電子顕微鏡観察

5 nMのM13mp8 線状DNA分子と50 nMのGST Rad57をDNA結合反応実験に用いた条件で反応させ、反応液を35 mM PIPES [pH6.5]で希釈して、電子顕微鏡観察の試料とした。カーボンのグリッドに試料をのせ、2分間、静置した。グリッドをwash buffer (15 mM Triethanolamine [pH6,8], 5 mM Mg Acetate)で3回洗った。次に、0.2% 酢酸ウランをグリッドにのせて試料を染色し、試料を洗浄した後、乾燥した。試料を蒸着装置にセットして、白金パラジウムでシャドウイングした。

結果

減数分裂期の **RAD55** 機能の解析

(i) *RAD55* の機能は減数分裂期組換えに必要である。

減数分裂組換えにおける *RAD55* の役割を知るために *rad55* Δ ホモ接合株の孢子形成率を顕微鏡で観察して調べた。野生株は減数分裂に入ると 8 時間目で二核になり（減数第一分裂）36 時間目で四分子（孢子）を形成する（減数第二分裂）。*rad55* Δ 変異株は、体細胞分裂期において低温感受性であることがわかっている [Lovette and Mortimer, 1987 ; Kuwahara and Ogawa, 未発表データ]。この変異株の制限温度である 23℃ で細胞を培養した時と 30℃ で培養した時の孢子形成率は、野生株で 60% と 46%、*rad55* Δ ホモ接合株で 4.0% と 5.7% であった。*rad55* Δ ホモ接合株では、30℃ で培養した時、79% の細胞が減数第一分裂の前で止まっていた（表 5）。このことは、*RAD55* が減数分裂での染色体の正確な分配に必要であることを示唆する。

組換えは減数分裂での染色体の正確な分配に必要である。減数分裂期組換えでの *RAD55* の機能を知るために、*rad55* Δ 変異株の遺伝子内組換えの頻度を調べた。野生株 (SKY502) と *rad55* Δ ホモ接合株 (SKY501) を孢子形成用培地 (SPM) で培養し、図 5 に示した時間に試料を取り出し、YPD 培地のプレートとヒスチジンを除いた SD 培地のプレートに蒔いた。これらの株は *his4* のヘテロアリル (*his4-4/his4-290*) を持っているので、His⁺ に変化したコロニーの割合を調べることで遺伝子内組換えの頻度を計ることができる。

図 5 で示すように遺伝子内組換えの頻度は、30℃ で 36 時間培養した時、野生株では体細胞分裂期の 1000 倍に上昇する。これに対して、*rad55* Δ ホモ接合株の組換え頻度は、野生株の 1/30 から 1/100 であった。*rad55* 変異株の制限温度である 23℃ で 36 時間培養した時、野生株の組換え頻度は 30℃ で培養した時の様に上昇したのに対し、*rad55* Δ ホモ接合株では、野生株の 1/100 から 1/300 であった。

23℃で培養した時、*rad55*Δ変異株は組換え頻度が上昇する時間が野生株よりも3時間遅れた。36時間培養した試料の生存率は、野生株が、ほぼ、100%であったのに対し、*rad55*Δホモ接合株では20~33%に減少した。*rad55*Δホモ接合株を*RAD55*遺伝子を持つプラスミドで形質転換した株の組換え頻度と生存率は、野生株と同じであった。これらの結果は、*rad55*Δ変異株が減数分裂期組換えに関して低温感受性を示し、*RAD55*の機能が減数分裂期組換えに必要であることを示す。

(ii)*spo13*変異は*rad55*Δ変異株の胞子の致死性を抑制できない

減数分裂期組換えに欠損を示す突然変異株は染色体を正確に分配できないため、その形成する胞子は致死となる。野生株 (SKY502) の胞子生存率が92.5%であるのに対して、*rad55*Δ変異株 (SKY501) の胞子の生存率は0.2%であった (表6)。*spo13*変異は減数第一分裂をバイパスするので、減数分裂期組換えに欠損を示す突然変異株の中には、*spo13*変異を導入することによって胞子生存率が回復する株が存在する。*mre11*変異株、*rad50*変異株、そして、*xrs2*変異株は*spo13*変異の導入によって胞子生存率が回復するが、一方、*rad51*変異株、*rad52*変異株、そして、*dmc1*変異株は*spo13*変異を導入しても胞子生存率が回復しない。これは、*MRE11*、*RAD50*、*XRS2*の欠損により、DNA二本鎖切断が生じないと組換えが開始しないので、減数第一分裂をバイパスした時に胞子が形成できるようになることを示し、組換え反応が途中で止まると致死になることを示している。そこで、*RAD55*が組換えの開始に働くか、それとも、その後の反応で働くのか調べるために、*spo13*変異を*rad55*Δ変異株に導入し、その胞子の致死性を調べた。

*rad55*Δ *spo13::hisG*ホモ接合株 (SKY503) の胞子生存率は、わずか1-4%である。これに対して、ヘテロ接合体であるSKY504 (*RAD55/rad55*Δ) の胞子生存率は、54-76%である (表6)。この結果は、*rad51 spo13*二重変異株や*rad52 spo13*二重変異株の胞子生存率に似ているが[Shinohara et al, 1992 ; Malone, 1983]、*rad50 spo13*二重変異株のそれとは異なっている[Malone, 1983]。次に、*rad50 spo13*二重変異は減数第一分裂をバイパスすることができるので、*rad50 rad55*Δ *spo13::hisG*三重変異株について調べた。この変異株 (SKY509) の胞子生存率は約70%であり、*rad55*についてヘテロな*rad50 spo13*二重変異株 (SKY510) の胞子生存率と同じであった。

以上の結果は、*rad55* Δ 変異による胞子の致死は、DSBの修復過程の欠損の結果生じることを示している。

***RAD55* mRNAの合成は減数分裂の極めて初期に誘導される**

減数分裂期組換えに関与する遺伝子の転写は減数分裂の直前、そして、減数分裂に入ったところで誘導されることが知られている [*SPO11*: Atcheson et al, *RAD50*: Raymond and Kleckner, 1993 ; *RAD51*: Shinohara et al, 1992; *RAD52*, *RAD54*: Cole et al, 1989; *MER1*: Engbrecht and Roeder, 1990; *DMC1*: Bishop et al, 1992]。減数分裂に入ってから*RAD55* mRNAの量と転写の誘導を知るために、出芽酵母細胞をSPMで培養し、合成された*RAD55* mRNAの量を時間をおって調べた。同時に、*RAD50*と*RAD52*のmRNAの合成量も調べた。*RAD55*の場合、前2者と比べ、その転写量が極めて少なく、poly(A)⁺ RNAを用いてもノーザンブロットで*RAD55*の転写を検出することができなかった。そこで、*RAD55*の転写産物を検出するために、合成した*RAD55*の相補鎖とtotal RNAをハイブリダイズして、ハイブリダイズしなかった核酸をS1ヌクレアーゼで消化した。そして、RNA-DNAハイブリッドの量をサザンブロットによって解析した。

図6に示すように、*RAD55* mRNA の量は酵母をSPMに移して直ぐに上昇し、2時間で最大値に達し、徐々に減少した。*RAD55* mRNA の転写量は、2時間目でSPMで培養を開始した時の7倍であった。これに対して、*RAD50*と*RAD52*は最大値に達するまでに、それぞれ、6時間と8時間を要した。

これらの結果は、*RAD55*の転写が減数分裂の極初期に誘導され、その量は*RAD50*と比べて非常に少ないことを示唆している。

細胞内でRad55はRad57と複合体を形成する

出芽酵母の細胞内でRad55とRad57が安定な複合体を形成するかどうか調べるために、酵母の細胞抽出液から、これらのタンパク質複合体の精製を試みた。タン

パク質のウエスタンブロットの解析から、これらのタンパク質は細胞内で極めて微量で存在することがわかったので、出芽酵母用の発現プラスミドにタグをつけた *RAD55*と*RAD57*を挿入し、これらを出芽酵母細胞中で発現させて、タグに対するアフィニティーレジンを用いてRad55-57複合体を精製した。そのために、酵母の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAP)プロモーターの支配下で、C末端にFLAGペプチドの配列をつけた*RAD55*を発現する遺伝子を持つプラスミド、pGAP55CFとGAPプロモーターの支配下で6xHisのタグをつけた*RAD57*を発現する遺伝子を持つプラスミド、pGAP57CHを作成した。pGAP55CFを酵母の*rad55*欠失株に、pGAP57CHを*rad57*欠失株に導入したところ、これらのプラスミドは各欠失株のMMS感受性を回復させることができた。これは*RAD55*と*RAD57*のC末端側にタグを付けたそれぞれの遺伝子が細胞内でも機能することを示している。

次に、この2つのプラスミドを出芽酵母BJ2168株に形質導入し、Rad55タンパク質とRad57タンパク質を共発現させた。1MのNaClを含む抽出バッファーで懸濁した酵母細胞から粗抽出液を調製し、これに対して、6xHisタグに対するアフィニティーレジン (Ni-NTA Agarose) を加え、Rad57を吸着させた後、タンパク質を溶出し、その溶出液にFLAGタグに対するアフィニティーレジン (Anti-FLAG M2 Affinity Gel) を加えてRad55を吸着させ、レジンからタンパク質を溶出した。Anti-FLAG M2 Affinity Gel からの溶出液をSDS-PAGEにかけ、銀染色とウエスタンブロットをおこなうと、銀染色で2本のバンドが確認された。これについて、それぞれの抗体を用いてウエスタンブロットを行って、2本のバンドがRad55とRad57であることを確認した (図7)。精製したRad55とRad57は複合体を形成し、そのモル比は、銀染色したタンパク質で判断する限り、1 : 1 であることがわかった。さらに、1 MのNaClを含むバッファーを用いてRad55-57複合体を精製していることから、Rad55とRad57の結合は1 MのNaCl に対して安定な結合であることを示している。

Haysら[1995]は、*rad55*欠失または*rad57*欠失によって示される電離放射線感受性がRad51、Rad52、あるいは、その両方を過剰発現することによって抑制されることを示した。また、Yeast Two-hybrid Systemを用いた実験は、Rad55とRad51が相互作用する可能性を示した[Hays et al, 1995 ; Johnson and

Symington, 1995] ので、Rad57のほかにも、Rad55とRad51、あるいは、Rad52が同時に精製されてくると予想された。そこで、低塩濃度のバッファーで調製した酵母の粗抽出液を用いてRad55を免疫沈降し、免疫沈降物の構成を調べた。pGAP55CFのみを保持する酵母細胞から、0.3 MのNa Acetateを含む抽出バッファーを用いて、粗抽出液を調製した。この細胞抽出液にAnti-FLAG M2 Affinity Gelを加え、Rad55を免疫沈降し、タンパク質を溶出した。この溶出液を、Rad51、Rad52、Rad54、Rad55、Rad57とRPAの抗体でウエスタンブロットして、その構成成分を調べた。しかし、この方法でも、Rad55とRad57のみが検出された。

以上の結果は、Rad55とRad57が安定な複合体として酵母細胞内に存在し、他のタンパク質とは安定な複合体を形成しないことを示した。

GST Rad57タンパク質はDNAに結合する

Rad51の組換え反応で、Rad55-57複合体はDNA 2本鎖切断後、Rad51によるpresynaptic filamentの形成に働くと考えられる。Rad55-57複合体の機能を知るために、Rad55とRad57を精製し、それぞれのタンパク質のDNA結合活性やタンパク質相互作用等の活性を調べた。これらのタンパク質を酵母で精製すると大部分のタンパク質が不溶性となった。そこで、大腸菌からこれらのタンパク質の精製を試みた。

RAD55のORF中には、大腸菌のSD配列に相当する塩基配列が存在するため、大腸菌で発現させると、ORFの途中から翻訳されるタンパク質が生じた。そこで、アミノ酸配列は変化しないが、SD配列としては機能しないようにこの領域を改変した(図8)。また、大腸菌でRad55とRad57を発現させると、不溶性画分にタンパク質が移行した。そこで、タンパク質を可溶化するために、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質にして、これらが発現させて、精製した(図8)。

GST Rad55とGST Rad57が出芽酵母の細胞内で機能しうるタンパク質である

かどうか確認するために、出芽酵母 *CUP1* プロモーターの調節下で GST Rad55 と GST Rad57 を発現するプラスミドを構築し (YEX-55CF と YEX-57CH)、YEX-55CF を *rad55* 欠失株に、YEX-57CH を *rad57* 欠失株に導入し、これらのプラスミドから発現されるタンパク質がこれら欠失株の MMS 感受性を回復させるかどうかを調べた。YEX-57CH を導入した株 WKY31 は MMS 耐性を示したが、YEX-55CF を導入した株 WKY21 は MMS 感受性のままであった。このことから GST Rad57 は細胞内で機能できることが明らかになった。一方、Rad55 の N 末端側は MMS 耐性に必要な役割を担っていることが示唆された。

これらのタンパク質の DNA 結合を調べた結果を図 9 と図 10 に示す。BAS2000 で取り込んだゲルシフトパターンから、反応系に加えた DNA のうち、シフトした DNA の割合を算出した。110 nM の dsDNA を完全にシフトするのに、200 nM の GST Rad55 が必要であり、110 nM の ssDNA の内、65% の分子をシフトするのに、200 nM の GST Rad55 が必要であった (図 9、図 11A)。反応系に ATP を加えていないこと、Rad55 のヌクレオチド結合配列に変異をいれたタンパク質が野生型 Rad55 と同等の DNA 結合活性をもっていたことから、GST Rad55 の DNA 結合活性は ATP を補因子としなかった。この様に GST Rad55 は dsDNA と ssDNA に結合する活性を持っていた。single strand circular DNA を除いて、DNA に対する GST Rad55 の親和性は、 Mg^{++} 、 Mn^{++} 、 Ca^{++} 、そして、 Zn^{++} を反応系に添加すると減少した。

GST Rad57 の DNA 結合活性は、110 nM の dsDNA を完全にシフトさせるために、200 nM の GST Rad57 が必要であり、110 nM の ssDNA の内、65% の分子をシフトするのに、100 nM の GST Rad57 が必要であった (図 10、図 11B)。GST Rad57 の DNA 結合活性も ATP を補因子としなかった。さらに、GST Rad55 と異なり、GST Rad57 は Mg^{++} 存在下でも DNA に結合することができた。細胞内には Mg^{++} が存在することから、Rad55-57 タンパク質複合体の DNA 結合能は、主に、Rad57 に依存していると考えられる。

GST Rad57 の DNA 結合実験の結果から、GST Rad57 は dsDNA よりも ssDNA に対する親和性が高いことが示された。減数分裂期の組換えでは、DSB 末端の単鎖 DNA が消化されて 3' 末端に ssDNA を持つ末端が形成されることから、基質

dsDNAの末端構造の違いによって、Rad57タンパク質の親和性が異なるのではないかと考えられた。そこで5'末端に4ヌクレオチドの突出を持つオリゴdsDNAと3'末端に4ヌクレオチドの突出を持つオリゴdsDNA、そして、平滑末端を持つオリゴdsDNAを作成し、これらを基質としてDNA結合実験を行った。図12で示しているように、5'突出末端を持つDNA (D12)と平滑末端をもつDNA (D13)を基質とした時、それぞれ、40 nM分子のDNAに45 nMのGST Rad57を加えると、シフトするDNAが現れた。これに対して、3'突出末端を持つDNA (D14)を基質とした時は、40 nM分子のDNAに15 nMのGST Rad57を加えるとシフトするDNAが現れる。これにより、GST Rad57は、3'突出末端を持つDNAへの親和性が、平滑末端や5'突出末端をもつDNAよりも高いことが明らかになった。

Rad55-DNA複合体とRad57-DNA複合体の安定性

GST Rad55は二価の金属イオンの存在下でDNAに対する結合活性が減少することから、GST Rad55とDNAの結合は、不安定であることが予想された。そこで、GST Rad55-DNA複合体の安定性とGST Rad57-DNA複合体の安定性を調べた。

GST Rad55とGST Rad57がdsDNAと複合体を形成するために必要な時間を調べた。200 nMのGST Rad55と76 nMのpUC18 線状DNAを加温し、図13Aと図14Aに示した時間でサンプリングを行った。その結果、GST Rad55は1分以内にDNAとの結合を開始し、15分から20分の間に平衡状態に達した。GST Rad57の場合、200 nMのGST Rad57と76 nMのpUC18 線状DNAを加温したところ、GST Rad55と同様に、GST Rad57は1分以内にDNAとの結合を開始し、15分から20分の間に平衡状態に達した。

DNAとGST Rad55、または、GST Rad57とDNAの結合の安定性の程度を調べるために、pUC18 線状DNA(76 nM)とGST Rad55 (200 nM)、または、GST Rad57 (200 nM)を平衡状態に達するまで結合させ(20分)、これに10倍、50倍、そして、100倍量のラベルしていないpUC18 線状DNAを加え、さらに15分と30分反応させた後に³²Pで標識したDNAとタンパク質の複合体の量を測定した。この結果はDNAに結合したGST Rad55、あるいは、GST Rad57の解離が非常に遅い

ことを示し、これらのタンパク質のDNAとの結合が安定であることを示してた(図13Bと図14B)。

Rad55とRad57のDNA結合領域の同定

次に、Rad55,および、Rad57のDNA結合領域を同定するために、種々の領域を欠失したタンパク質を作成し(図15、図16)、そのDNA結合能を調べた。その結果、Rad55では、279番アミノ酸残基から325番アミノ酸残基までの領域が、Rad57では、350番アミノ酸残基から380番アミノ酸残基までの領域がDNA結合に必要であることがわかった。Rad55のDNA結合領域は、ヘリックス、ターン、ヘリックス構造をとることがアミノ酸配列から予想された。Rad57のDNA結合領域は塩基性のアミノ酸に富んでいることが特徴としてあげられる。

GST Rad57-DNA複合体の電子顕微鏡観察

DNAとGST Rad57の結合実験では、GST Rad57とDNAの複合体がアガロースゲルのウェルに残り、その移動度が遅くなっていた。これは、多数のGST Rad57がDNAに結合したか、Rad57と反応したDNAが巨大分子を形成しているかのどちらかである。そこで、これを確かめるためにGST Rad57とM13mp8 線状DNA (*Pst*I 消化)の複合体を電子顕微鏡で観察した。

5 nMのM13mp8 線状DNA分子と50 nMのGST Rad57を37℃で30分、加温し、これを電子顕微鏡観察の試料とした。試料は、固定せずに、カーボンコートしたグリッドにのせ、酢酸ウランで染色した。さらに、白金パラジウムでシャドウイングし、観察した。電子顕微鏡の視野にはDNAに結合したタンパク質と結合していないタンパク質が観察された。DNAと結合したGST Rad57がその末端に観察された(図17)。また、1分子のDNAに多数のGST Rad57が結合している分子は観察できなかった。同じ視野に複数のDNA分子が平行に寄せ集められている分子が観察された(図17)。ゲルシフトでゲルのウェルの位置に残っている、移動度の遅い

DNAはこのようなDNA分子の集合体であると考えられる。

考察

減数分裂期組換えでの *RAD55* の役割

RAD55 は *RAD52* エピスタシスグループに属する遺伝子で、この遺伝子の欠失株は、体細胞分裂期で、低温培養下で高い γ 線感受性、および、組換え欠損を示す [Lovett and Mortimer, 1987 ; Hays et al, 1995]。しかし、これまで、減数分裂期における *RAD55* の機能とそのタンパク質の性質は調べられてこなかった。

減数分裂期の細胞での *RAD55* の役割を知るために、まず、*rad55* Δ ホモ接合株の孢子形成率を調べた。*rad55* Δ 変異株の許容温度である 30℃ で培養した時、60% の野生株の細胞が孢子を形成するのに対して、*rad55* Δ ホモ接合株では、79% の細胞が減数第一分裂の前で止まっており、孢子形成が観察できなかった。このことは、*RAD55* が減数分裂に必要であることを示唆している。

減数分裂での染色体の正確な分配には組換えが必要であることから、*his4* アリル間の遺伝子内組換えの頻度を調べると、*rad55* Δ ホモ接合株は野生株の 1/30 から 1/100 に頻度が減少していた。このことは、*RAD55* が減数分裂期の組換えで機能していることを示している。

rad55 Δ ホモ接合株の孢子生存率は野生株と比べると極めて低い。*rad55* Δ ホモ接合株のこの低い孢子生存率は、*spo13* 変異の導入では回復しないが、*rad50 spo13* 変異の導入によって回復した。このことは、*RAD55* の機能が減数分裂期組換えの開始 (DSB 形成) 後の段階で働くことを示している。

RAD55 mRNA の転写は減数分裂に導入後、極めて初期に誘導される。これは *RAD50*、*RAD52* よりも早い時間である。また、*RAD55* が欠失した株では、組換え体の出現が野生株よりも 3 時間遅れることから、減数分裂期組換えの初期の段階に *RAD55* の機能が必要であると考えられる。*RAD55* mRNA を検出するために、S1 ヌクレアーゼのプロテクションアッセイを行わなければならない程、*RAD55* の転写量が少ないことから、Rad55 が機能する場所は限定されることが考えられる。

Rad55とRad57は複合体として機能する

Rad55とRad57を共発現した出芽酵母細胞からRad55とRad57を精製したところ、Rad55とRad57は1 : 1のモル比で複合体を形成し、この複合体は1 MのNaClに対しても安定であることがわかった。これは、Rad55とRad57がヘテロダイマーを形成することを意味し、Rad55-57複合体をゲルろ過カラムにかけると、この複合体の分子量が100 K付近に溶出すること[Sung, 1997]と一致する。*rad55*と*rad57*変異株の表現型がほとんど一致すること、そして、yeast two-hybrid法でRad55 Rad57間の相互作用が示唆されたこと[Hays et al, 1995 ; Johnson and Symington, 1995] などから、Rad55とRad57は複合体を形成して組換え反応で働く結論できる。

一方、yeast two-hybrid 法を用いたデータから、Rad51とRad55が *in vivo*で相互作用する可能性が示唆されていたが、今回の結果は、これらのタンパク質は複合体を作らないことを示した。しかし、Rad51とRad55の相互作用は酵母細胞抽出液の調製の際に解離する程の弱いものかもしれない。GST Rad55は*rad55*Δ変異株のMMS感受性を相補できなかったが、Rad55CF（C末端にFLAGタグを付けたRad55）は相補できた。これは、Rad55のN末端がDNA鎖交換反応に関与する他のタンパク質と相互作用する部位であることを示唆している。GST Rad55、そして、Rad55の断片とGSTの融合タンパク質であるGST Rad55-1、GST Rad55-2、および、GST Rad55-4（図15参照）とHisタグ付きRad51の間でGST pull down assayを行ったが、この方法でも、両タンパク質間の相互作用は検出できなかった。以上の結果は、Rad51とRad55は直接に相互作用しないことを示唆している。Rad51とRad55がDNAに結合した状態で相互作用している可能性も考えられる。

Rad55とRad57はDNA結合タンパク質である

(i) GST Rad55とGST Rad57の精製とDNA結合活性

出芽酵母と大腸菌でRad55とRad57を共発現したところ、大部分のタンパク質が不溶性画分に移行した。そこで、タンパク質を可溶化するために、GSTとの融合タンパク質にして精製することにしたが、このタンパク質を*rad55* Δ 変異株で発現させたところ、この融合タンパク質は*rad55* Δ のMMS感受性を相補することができなかった。このことは、Rad55のN末端側が、DNA二本鎖切断の修復に必要な機能をもっていることを示しているので解析を進めることにした。

GST Rad55とGST Rad57は、どちらもヌクレオチド結合のコンセンサス配列を持っているが、両タンパク質ともそのDNA結合にはATPを補因子として必要としなかった。GST Rad55のDNA結合ドメインはN末から279番アミノ酸残基から325番アミノ酸残基までの領域であることがわかった。この領域は、ヘリックス・ターン・ヘリックス構造をとることがアミノ酸配列から予測された。

Rad57のDNA結合ドメインはN末から350番アミノ酸残基から380番アミノ酸残基までの領域であることがわかった。塩基性アミノ酸のクラスターがこの領域のN末側とC末側に存在した。Rad55とRad57のどちらのタンパク質のDNA結合領域もヌクレオチド結合のコンセンサス配列を含んでいないことがわかった。

(ii) GST Rad57は3'突出末端を持つDNAに親和性が高い

GST Rad57はdsDNAよりもssDNAに対する親和性が高く、また、3'突出末端を持つDNAに親和性が高かった。また、オリゴssDNAを基質としたときも、3'突出末端を持つDNAを基質とした時と同等の親和性を示した。Rad57はRad55と複合体として働き、しかも、*RAD55*の発現量が極めて少ないことから、Rad55-57複合体がランダムにssDNA、または、dsDNAに結合するとは考えにくい。一方、減数分裂期の組換えでは、DSB末端の5'端が消化されて3'端にssDNAを持つ末端が形成されるので、Rad55-57複合体は、このような3'末端に結合し、Rad51のDNA鎖交換反応を促進すると考えられる。

(iii) GST Rad57-DNA複合体の電子顕微鏡観察

GST Rad57とM13mp8 線状DNA (*Pst*I 消化) の複合体を電子顕微鏡で観察したところ、GST Rad57がDNAの末端に結合している分子が、多数、観察された。また、GST Rad57と結合したDNAが複数個、並列に並んだ分子が観察された。このようなDNA分子の形成が組換えにどのような意味を持つのか、まだ、わからないが、DNAが凝集した結果、分子間の衝突頻度が高くなり、相同なDNA分子と対合する機会が増加して、それが組換えに有利に働くと考えられることもできる。

GST Rad57が3'突出末端を持つDNAに高い親和性を持つことは、Rad57が、減数分裂開始に形成される3'にssDNAを伸ばしたDNAの末端に結合することを示唆しており、Rad55とRad57が複合体を作ることからRad55も3'末に存在すると考えられる。

DNA鎖交換反応におけるRad55-57複合体の機能

Lovett とMortimer [1987]は多数のサブユニットから成るタンパク質複合体を安定化することにRad55とRad57が機能すると、熱力学上の観点から示唆した。これは*rad55*Δと*rad57*Δ変異株の組換え反応が低温感受性を示すことを説明する。

*RAD55*はDSB形成後の組換え反応のヌクレオプロテイン・フィラメントの形成過程で機能しているという本研究の結果は、*rad51*、*rad55*、*rad57*変異株の細胞内の組換え中間体が形成段階で止まっていることを示した結果とよく一致する [Schwacha and Kleckner, 1997]。さらにRad57が3'末端突出のdsDNAに高い親和性をもって結合することは、組換えのホットスポットに生じる3'末端にRad55とRad57が結合することを示唆する。

Gasiorらは、蛍光抗体法による減数分裂期の出芽酵母の細胞核の顕微鏡観察で、野生株ではRad51のフォサイが観察され、数がRad51と比べて少なくなるものの、RPA とRad52のフォサイも存在することを報告している [Gasior et al, 1998]。これに対して、*rad52*Δ変異株、*rad55*Δ変異株と*rad57*Δ変異株では、Rad51のフォサイは観察されず、RPA、または、RPAとRad52のフォサイが蓄積する。そこで、彼等は、Rad51のssDNAへの集合にはRad52、Rad55とRad57が必要であると考察した。*in vitro*のDNA鎖交換反応の結果から、DSB末端の消化により生じ

たssDNAにRPAとRad52が結合し、そこへ、Rad51が集合してpresynaptic filamentの形成が促進することが示された[Sung, 1997 ; Benson et al, 1998 ; Shinohara et al, 1998 ; New et al, 1998]。Sungにより、*in vitro*で、Rad55-57複合体もDNA鎖交換反応に対するRPAの阻害的効果を抑制して、反応を進める機能を持つことが示されている[Sung, 1997]。このようにRad55-57複合体もRad52と同様に、presynaptic filamentの形成に関与する。

以上の結果から、ヌクレオプロテイン・フィラメント形成過程をまとめた(図18)。

(i) DSB末端の5'端のDNA鎖が消化されて3'端にssDNAを持つ末端が形成される。

(ii) ssDNAにRPAとRad52が結合し、複合体を形成する。また、Rad55-57複合体はssDNAの3'末端に結合する。

(iii) Rad51がRad52との相互作用によってssDNA鎖に集まり、presynaptic filamentの形成を始める。DNAに結合しているRad55-57複合体が、Rad51が結合し始めるDNA上の位置を規定し、その位置を起点としてRad51がポリマー化する。

(iv) Rad51がssDNAを覆い、presynaptic filamentの形成が完了する。

Rad51のssDNA上への結合はランダムな位置のから始まるが、組換えのホットスポットで形成されるRad51のヌクレオプロテイン・フィラメントの形成では、Rad55-57複合体がRad51のDNA結合の起点を決め、DNAの一方の末端から効率良くヌクレオプロテイン・フィラメントが形成されると予想される。大腸菌の組換えでヌクレオプロテイン・フィラメント形成の促進に機能している因子は、RecF、RecOとRecRであり[Madiraju et al, 1988 ; Umez et al, 1993 ; Sandler and Clark, 1994; Umez and Kolodner, 1994]、RecFOR複合体がdsDNAからssDNAへの分岐部分に結合してRecAのDNA結合の起点となり、ヌクレオプロテイン・フィラメント形成を促進すると考えられている[Madiraju et al, 1992 ; Hegde et al, 1996]。Rad55-57複合体がssDNAの3' OH末端に結合するのか、あるいは、RecFOR複合体のようにdsDNAからssDNAへの分岐部分に結合するのかは、現在のところ、わかっていない。その結合の位置はRad51のヌクレオプロテイン・フィラメントの伸長方向を決めると考えられるため、興味ある課題である。

参考文献

Adzuma, K., T. Ogawa and H. Ogawa. 1984. Primary structure of the *RAD52* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 4: 2735-2744.

Alani, E., S. Subbiah and N. Kleckner. 1989. The yeast *RAD50* gene encodes a predicted 153-kD protein containing a purine nucleotide-binding domain and two large hepta-repeat regions. *Genetics* 122: 47-57.

Alani, E., R. Thresher, J. D. Griffith and R. D. Kolodner. 1992. Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of γ -RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein. *J Mol Biol* 227: 54-71.

Atcheson, C. L., B. DiDomenico, S. Frackman, R. E. Esposito and R. T. Elder. 1987. Isolation, DNA sequence, and regulation of a meiosis-specific eukaryotic recombination gene. *Proc. Natl. Sci. USA* 84: 8035-8039.

Benson, F. E., A. Stasiak and S. C. West. 1994. Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of *E. coli* RecA. *EMBO J* 13(23): 5764-5731.

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

Bergeerat, A., B. deMassy, D. Gadelle, P. C. Varoutas, A. Nicolas and P. Forterre. 1997. An atypical topoisomerase II from archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* 386: 414-417.

Bishop, D. K., D. Park, L. Xu and N. Kleckner. 1992. *DMC1*: a meiosis-specific yeast homolog of bacterial *recA* required for meiotic recombination, synaptonemal complex formation and cell cycle progression. *Cell* 69: 439-456.

Cao, L., E. Alani and N. Kleckner. 1990. A pathway for generation and processing of double-strand breaks during meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 61: 1089-1101.

Carlson, M. and D. Botstein. 1982 Two differentially regulated mRNA with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell* 28, 145-154

Cole, G. M., S. T. Shild, S. T. Lovett and R. K. Mortimer. 1987. Regulation of *RAD54*- and *RAD52*-lacZ gene fusions in *Saccharomyces cerevisiae* in response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 7: 1078-1084.

Cole, G. M. and R. K. Mortimer. 1989. Failure to induce a DNA repair Gene, *RAD54*, in *Saccharomyces cerevisiae* does not affect DNA repair of recombination phenotypes. *Mol. Cell. Biol.* 9(8): 3314-3322.

Dolganov, G. M., R. Maser, A. Novikov, L. Tosto, S. Chong, D. A. Bressan and J. Petrini. 1996. Human Rad50 is physically associated with human Mre11: Identification of a conserved multiprotein complex implicated in recombinational DNA repair. *Mol. Cell. Biol.* 16(9): 4832-4841.

Eisen, J. A., K. S. Sweder and P. C. Hanawalt. 1995. Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res.* 23: 2715-2723.

Engelbrecht, J. and G. S. Roeder. 1989. Yeast *mer1* mutants display reduced levels of meiotic recombination. *Genetics* 121: 237-247.

Gasior, S. L., A. K. Wong, Y. Kora, A. Shinohara and D. K. Bishop. 1998. Rad52 associates with RPA and functions with Rad55 and Rad57 to assemble meiotic recombination complexes. *Genes Dev.* 12: 2208-2221.

Hays, S. L., A. A. Firmenich and P. Berg. 1995. Complex formation in yeast double-strand break repair: Participation of Rad51, Rad52, Rad55, and Rad57 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 6925-6929.

Hegde, S. P., M. Rajagopalan and M. V. V. S. Madiraju. 1996. Preferential binding of *Escherichia coli* RecF protein to gapped DNA in the presence of adenosine (γ -thio) triphosphate. *J. Bacteriol.* 178: 184-190.

Ivanov, E., N. Sugawara, C. I. White, F. Fabre and J. E. Haber. 1994.

Mutations in *XRS2* and *RAD50* delay but do not prevent mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 14: 3414-3425.

Johnson, R. D. and L. S. Symington. 1995. Functional differences and interactions among the putative RecA homologs Rad51, Rad55, and Rad57. *Mol. Cell. Biol.* 15: 4843-4850.

Johzuka, K. and H. Ogawa. 1995. Interaction of Mre11 and Rad50: Two Proteins Required for DNA Repair and Meiosis-Specific Double Strand Break Formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 139: 1521-1532.

Kanaar, R., Troelstra C., Swagemakers S. M., Essers J., Smit B., Franssen, J. H., Pastink A., Bezzubova O. Y., Buerstedde J. M., Clever B., Heyer W. D., Hoeijmakers J. H. 1996. Human and mouse homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* *RAD54* DNA repair gene: evidence for functional conservation. *Current Biology* 6: 828-838.

Kans, A. and R. K. Mortimer. 1991. Nucleotide sequence of the *RAD57* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 105: 139-140.

Keeney, S., C. N. Giroux and N. Kleckner. 1997. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 88: 375-84.

Lovett, S. T. 1994. Sequence of the *RAD55* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: similarity of *RAD55* to prokaryotic RecA and other RecA-like proteins. *Gene* 142: 103-106.

Lovett, S. T. and R. K. Mortimer. 1987. Characterization of null mutants of the *RAD55* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Effects of temperature, osmotic strength, and mating type. *Genetics* 116: 547-553.

Madiraju, M. Y., A. Templin and A. J. Clark. 1988. Properties of a mutant *recA*-encoded protein reveal a possible role for *Escherichia coli* *recF*-encoded protein in genetic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6592-6596.

Madiraju, M. V. and A. J. Clark. 1992. Evidence for ATP binding and double-stranded DNA binding by *Escherichia coli* RecF protein. J Bacteriol 174: 7705-7710.

Malone, R. E. 1983. Multiple mutant analysis of recombination in yeast. Mol. Gen. Genet. 189: 405-412.

McKee, A. H. and N. Kleckner. 1997. A general method for identifying recessive diploid-specific mutations in *Saccharomyces cerevisiae*, its application to the isolation of mutants blocked at intermediate stages of meiotic prophase and characterization of a new gene *SAE2*. Genetics 146: 797-816.

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

Ogawa, T., A. Shinohara and T. Ikeya. 1995. A species-specific interaction of Rad51 and Rad52 proteins in eukaryotes. Advance Biophysics 31: 93-100.

Ohta, K., A. Nicolas, M. Furuse, A. Nabetani, H. Ogawa and T. Shibata. 1998. Mutations in *MRE11*, *RAD50*, *XRS2*, and *MRE2* genes alter chromatin configuration at meiotic DSB sites in premeiotic and meiotic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 646-651.

Petrini, J., M. E. Walsh, C. DiMare, X. Chen, J. R. Kornberg, and D. T. Weaver. 1995. Isolation and characterization of the Human Mre11 Homologue. GENOMICS 29: 80-86.

Petukhova, G., Stratton, S., and Sung, P. (1998). Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. Nature 393: 91-94.

Prinz, S., A. Amon and F. Klein. 1997. Isolation of *COM1*, a new gene required to complete meiotic double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 146: 781-795.

- Rattray, A. J. and L. S. Symington. 1995. Multiple pathways for homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 139: 45-56.
- Raymond, W. E. and N. Kleckner. 1993. Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* *RAD50* gene during meiosis: steady-state transcript levels rise and fall while steady-state protein levels remain constant. *Mol. Gen. Genet.* 238: 390-400.
- Register, J. C. and J. Griffith. 1985. The direction of RecA protein assembly onto single strand DNA is the same as the direction of strand assimilation during strand exchange. *J. Biol. Chem.* 260: 12308-12312.
- Sandler, S. J. and A. J. Clark. 1994. RecOR suppression of *recF* mutant phenotypes in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 176: 3661-3672.
- Schwacha, A. and N. Kleckner. 1997. Interhomolog bias during meiotic recombination: Meiotic functions promote a highly differentiated interhomolog-only pathway. *Cell* 90: 1123-1136.
- Sherman, F. G.R.Fink, and J.B.Hicks. 1986. Laboratory course manual for methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Shinohara, A., H. Ogawa and T. Ogawa. 1992. Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* 69: 457-470.
- Shinohara, A. and T. Ogawa. 1995. Homologous recombination and the roles of double-strand breaks. *TiBS* 20: 387-391.
- Shinohara, A., H. Ogawa, Y. Matsuda, N. Ushio, K. Ikeo and T. Ogawa. 1993. Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to *RAD51* and *recA*. *Nat. Genet.* 4: 239-243.
- Shinohara, A. and T. Ogawa. 1998. Stimulation by yeast Rad52 of Rad51-mediated recombination. *Nature* 391: 404-407.

Shinohara, A., M. Shinohara, T. Ohta, S. Matsuda and T. Ogawa. 1998. Rad52 forms ring structures and co-operates with RPA in single-strand DNA annealing. *Genes to Cells* 3: 145-156.

Sugiyama, T., E. M. Zaitseva and S. C. Kowalczykowski. 1997. A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein. *J. Biol. Chem.* 272: 7940-7945.

Sun, Z., D. Treco and J. W. Szostak. 1994. Extensive 3'-overhanging, single-stranded DNA associated with the meiosis-specific double-strand breaks at the *ARG4* recombination initiation site. *Cell* 64: 1155-1161.

Sung, P. 1994. Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science* 265: 1241-1243

Sung, P and D. L. Roberson. 1995. DNA strand exchange mediated by a Rad51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell* 82: 453-461

Sung, P. 1997a. Yeast Rad55 and Rad57 proteins form a heterodimer that functions with replication protein A to promote DNA strand exchange by Rad51 recombinase. *Genes Dev.* 11: 1111-1121.

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

Swagemakers, S. M. A., J. Essers, J. de Wit, J. H. J. Hoeijmakers and R. Kanaar. 1998. The human Rad54 recombinational DNA repair protein is a double-stranded DNA-dependent ATPase. *J. Biol. Chem.* 273: 28292-28297.

Szostak, J. W., T. L. Orr-Weaver and R. J. Rothstein. 1983. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33: 25-35.

Umez, K., N. W. Chi and R. D. Kolodner. 1993. Biochemical interaction of the *Escherichia coli* RecF, RecO, and RecR proteins with RecA protein and

single-stranded DNA binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3875-3879.

Umezu, K. and R. D. Kolodner. 1994. Protein interactions in genetic recombination in *Escherichia coli*. Interactions involving RecO and RecR overcome the inhibition of RecA by single-stranded DNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* 269: 30005-30013.

Usui, T., T. Ohta, H. Oshiumi, J. Tomizawa, H. Ogawa and T. Ogawa. 1998. Complex formation and functional versatility of Mre11 of budding yeast in recombination. *Cell* 95: 705-716.

Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., and Gay, N. J. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1: 945-951.

表1 使用した菌株

出芽酵母

Strain	Genetic marker
SKY501	$\frac{MAT\alpha \text{ leu2 his4-4}}{MATa \text{ leu2 his4-290}}$ $\frac{rad55\Delta::TRP1}{rad55\Delta::TRP1}$ $\frac{met2 \text{ lys2}}{+ \text{ lys2}}$ $\frac{+ \text{ } +}{ura3-52 \text{ can1}}$ $\frac{+ \text{ } +}{ade6 \text{ cyh2}}$ $\frac{ade2}{+}$
SKY502	$\frac{MAT\alpha \text{ leu2 his4-4}}{MATa \text{ leu2 his4-290}}$ $\frac{trp1}{trp1}$ $\frac{met2 \text{ lys2}}{+ \text{ lys2}}$ $\frac{+ \text{ } +}{ura3-52 \text{ can1}}$ $\frac{+ \text{ } +}{ade6 \text{ cyh2}}$ $\frac{ade2}{+}$
SKY503	$\frac{MAT\alpha \text{ leu2 his4-4}}{MATa \text{ leu2 his4-290}}$ $\frac{rad55\Delta::TRP1}{rad55\Delta::TRP1}$ $\frac{spo13::hisG-URA3-hisG}{spo13::hisG-URA3-hisG}$ $\frac{met2 \text{ lys2}}{+ \text{ lys2}}$ $\frac{ura3-52 \text{ } +}{ura3-52 \text{ can1}}$ $\frac{+ \text{ } +}{ade6 \text{ cyh2}}$ $\frac{ade2}{+}$
SKY504	$\frac{MAT\alpha \text{ leu2 his4-4}}{MATa \text{ leu2 his4-290}}$ $\frac{rad55\Delta::TRP1}{+}$ $\frac{spo13::hisG-URA3-hisG}{spo13::hisG-URA3-hisG}$ $\frac{met2 \text{ lys2}}{+ \text{ lys2}}$ $\frac{ura3-52 \text{ } +}{ura3-52 \text{ can1}}$ $\frac{+ \text{ } +}{ade6 \text{ cyh2}}$ $\frac{ade2}{+}$
SKY509	$\frac{MAT\alpha \text{ leu2 his4-4}}{MATa \text{ leu2 his4-290}}$ $\frac{rad55\Delta::TRP1}{rad55\Delta::TRP1}$ $\frac{spo13::hisG}{spo13::hisG}$ $\frac{rad50\Delta::hisG-URA3-hisG}{rad50\Delta::hisG-URA3-hisG}$ $\frac{met2}{+}$ $\frac{lys2}{lys2}$ $\frac{ura3-52 \text{ } +}{ura3-52 \text{ can1}}$ $\frac{+ \text{ } +}{ade6 \text{ cyh2}}$ $\frac{ade2}{+}$
SKY510	$\frac{MAT\alpha \text{ leu2 his4-4}}{MATa \text{ leu2 his4-290}}$ $\frac{rad55\Delta::TRP1}{+}$ $\frac{spo13::hisG}{spo13::hisG}$ $\frac{rad50\Delta::hisG-URA3-hisG}{rad50\Delta::hisG-URA3-hisG}$ $\frac{met2}{+}$ $\frac{lys2}{lys2}$ $\frac{ura3-52 \text{ } +}{ura3-52 \text{ can1}}$ $\frac{+ \text{ } +}{ade6 \text{ cyh2}}$ $\frac{ade2}{+}$

BJ2168	<i>MATa prc1-407 prb1-1122 pep4-3 leu2 trp1 ura3-52</i>
NKY276	<i>MATa ho::LYS2 lys2 ura3</i>
WKY20	<i>MATa ho::LYS2 lys2 ura3 rad55Δ::hisG</i>
WKY30	<i>MATa ho::LYS2 lys2 ura3 rad57Δ::hisG</i>

大腸菌

DH5α	<i>F', φ80d lacZΔM15Δ(lacZY A-argF) U169, endA1, recA1, hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺), deoR, thi-1, supE44, λ, gyrA96, relA1</i>
BL21 (DE3)	<i>E. coli B F⁻ dcm ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3)</i>

表2 培地

大腸菌

LB培地	bactopeptone	1%
	yeast extract	0.5%
	NaCl	1%
	(NaOHでpHを7.0に調製)	
	agar	1.2%

酵母

SD最少培地	yeast nitrogen base	0.67%
	glucose	2%
	anino acid supplements	
	agar	2.0%

MYPL培地	malt extract	0.3%
	yeast extract	0.3%
	bactopeptone	0.5%
	lactate	1%
	agar	1.5%

YPD	bactopeptone	2.0%
	yeast extract	1.0%
	glucose	2.0%
	agar	2.0%

YPA	bactopeptone	2.0%
	yeast extract	1.0%
	potassium acetate (pH7.0)	1.0%

SP II	potassium acetate (pH7.0)	1.0%
	1/4 amino acid supplement	

SPM	yeast extract	0.1%
	glucose	0.05%
	potassium acetate (pH7.0)	1.0%
	1/4 amino acid supplement	
	agar	2.0%

Complete amino acids

adenine sulfate	20 µg/ml
arginine	20 µg/ml
histidine	20 µg/ml
leucine	30 µg/ml
lysine	30 µg/ml
methionine	20 µg/ml
phenylalanine	50 µg/ml
threonine	20 µg/ml
tryptophane	20 µg/ml
tyrosine	30 µg/ml
uracil	20 µg/ml

LB、SD最少培地、そして、YPDの液体培地を調製するときは、agarを除く。

表3 (A) Rad55、Rad57、および、両者のペプチド断片の発現に用いるプラスミドの構築に用いたPCRプライマー

	塩基配列
55N2	5'-ATCATATGTCGCTTGGTATACCAC-3'
55N5	5'-GAATTCACCACCATGTCGCTTGGTATACCA-3'
55C6	5'-CTCGAGTCATTTATCGTCATCGTCTTTGTAGTCACCTTCACTATCATAA ATTATCTC-3'
55-1	5'-TTCTCGAGAACTAGTTTATATCGCAC-3'
55-2	5'-TTCTCGAGTCCCATAGCGATATTGGC-3'
55-3	5'-AACATATGGTGCGATATAAACTAGTT-3'
55-4	5'-AACATATGGCCAATATCGCTATGGGA-3'
55-5	5'-AACATATGAGAGTGAAGGCGTCATCC-3'
55-7	5'-CACTCGAGTCGTCTTCTCTTTTCT-3'
55-8	5'-CGCTCGAGTGTTGCTTTATCAAAATC-3'
57N2	5'-GGTACCACCATGCACCACCACCATCATCATATGCCTAGGGCCTTATCA -3'
57N3	5'-GAATTCACCACCATGCCTAGGGCCTTATCA-3'
57C3	5'-CTCGAGTCAGTGGTGGTGGTGGTGGGCTGTTTCTATTCCTCGCT -3'
57-1	5'-TTCTCGAGGAATATTTCTGTAATGCC-3'
57-2	5'-TTCTCGAGCTTGTTCTGAAGCTCCAC-3'
57-3	5'-TTGCGGCCGCGTCGACCCGGTCATTTACAGTGCT-3'
57-4	5'-AACATATGGGCATTACAGAAATATTC-3'
57-5	5'-AACATATGGTGGAGCTTCAGAACAAG-3'
57-6	5'-AACATATGAGCACTGTAAATGACCGG-3'

(B) (A)のPCR プライマーを用いて増幅したDNA断片

(i) *RAD55*

DNA断片名	プライマーセット (5'側, 3'側)	増幅される領域 (翻訳開始点を1とした)
55CF(大腸菌用)	(55N2, 55C6)	1-1218 (<i>RAD55</i> ORF の全長)
55CF(酵母用)	(55N5, 55C6)	1-1218 (<i>RAD55</i> ORF の全長)
55-1	(55N2, 55-1)	1-396
55-2	(55N2, 55-2)	1-735
55-3	(55-3, 55C6)	379-1218
55-4	(55-4, 55C6)	718-1218
55-5	(55-4, 55-7)	718-975
55-6	(55-5, 55-8)	835-1044
55-8	(55-4, 55-8)	718-1044

(ii) *RAD57*

DNA断片名	プライマーセット (5'側, 3'側)	増幅される領域 (翻訳開始点を1とした)
57CH(大腸菌用)	(57N2, 57C3)	1-1380 (<i>RAD57</i> ORF の全長)
57CH(酵母用)	(57N3, 57C3)	1-1380 (<i>RAD57</i> ORF の全長)
57-1	(57N2, 57-1)	1-372
57-2	(57N2, 57-2)	1-714
57-3	(57N2, 57-3)	1-1038
57-4	(57-4, 57C3)	355-1380
57-5	(57-5, 57C3)	697-1380
57-6	(57-6, 57C3)	1022-1380

表4 遺伝子の改変に用いたオリゴDNA

	塩基配列
55N6	5'-GGCGCGACTAATTTTGGCATT-3'
55N7	5'-ACACTAAGTAAGCGTGGCGGC-3'
55N9	5'-TCTAGACAGCTGTATTGAAGATAG-3'
55N11	5'-GCGGATCCGTCCACTTGTTCAATCCA-3'
55C5	5'-AATGCCAAAATTGGTCGCGCC-3'
55C8	5'-GCCGCCACGCTTACTTAGTG-3'
55C9	5'-TGGTACCGTTGTCGGATTC-3'
55C11	5'-GCGGATCCTTACACGGCGAAGATAGA-3'
57a	5'-CTCTAGAGATCCGCGATTATTCCGA-3'
57c	5'-GCTGCAGTTGTGAATTTTCCTTGTC-3'
57-9	5'-CGGGATCCAAAAAATCATAATTCCG-3'
57-10	5'-AAGGATCCTTTGACTATCGTGTCCCC-3'

表5 胞子形成率

Strain	Genotype	Temp.	percentage observed*		
			mono-nucleus	Meiosis I	Meiosis II
SKY501	<i>rad55Δ</i>	30°C	79.0	15.3	5.7
	<i>rad55Δ</i>	23°C	86.9	9.1	4.0
SKY502	<i>RAD55</i>	30°C	25.2	29.1	45.7
	<i>RAD55</i>	23°C	11.2	27.7	61.1

* 胞子形成用培地で36時間、培養した細胞をDAPIで染色し、蛍光顕微鏡で観察して、胞子形成率を決定した。

表6 二重変異株と三重変異株の孢子生存率

Strain	Genotype	Temp.	Viability* (%)	<u>No. of viable asci</u> <u>No. of total asci</u>
SKY501	<u>rad55Δ</u>	30℃	0.2	0/240
	<u>rad55Δ</u>	23℃	0.2	0/240
SKY502	<u>RAD55</u>	30℃	92.5	148/160
	<u>RAD55</u>	23℃	-	
SKY503	<u>rad55Δ spo13</u>	30℃	3.9	8/204
	<u>rad55Δ spo13</u>	23℃	1.0	2/194
SKY504	<u>RAD55 spo13</u>	30℃	76.1	35/46
	<u>rad55Δ spo13</u>	23℃	54.3	61/112
SKY509	<u>rad55Δ spo13 rad50Δ</u>	30℃	70.0	112/160
	<u>rad55Δ spo13 rad50Δ</u>	23℃	70.6	113/160
SKY510	<u>RAD55 spo13 rad50Δ</u>	30℃	65.0	65/100
	<u>rad55Δ spo13 rad50Δ</u>	23℃	75.0	75/100

* 各変異株を孢子形成用培地で3-5日、表記の温度で培養した。孢子を単離して寒天培地に蒔き、同じ温度で培養した。孢子の生存率は単離した孢子のうち、コロニーを形成したものの数から推定した。

- : 単離せず。

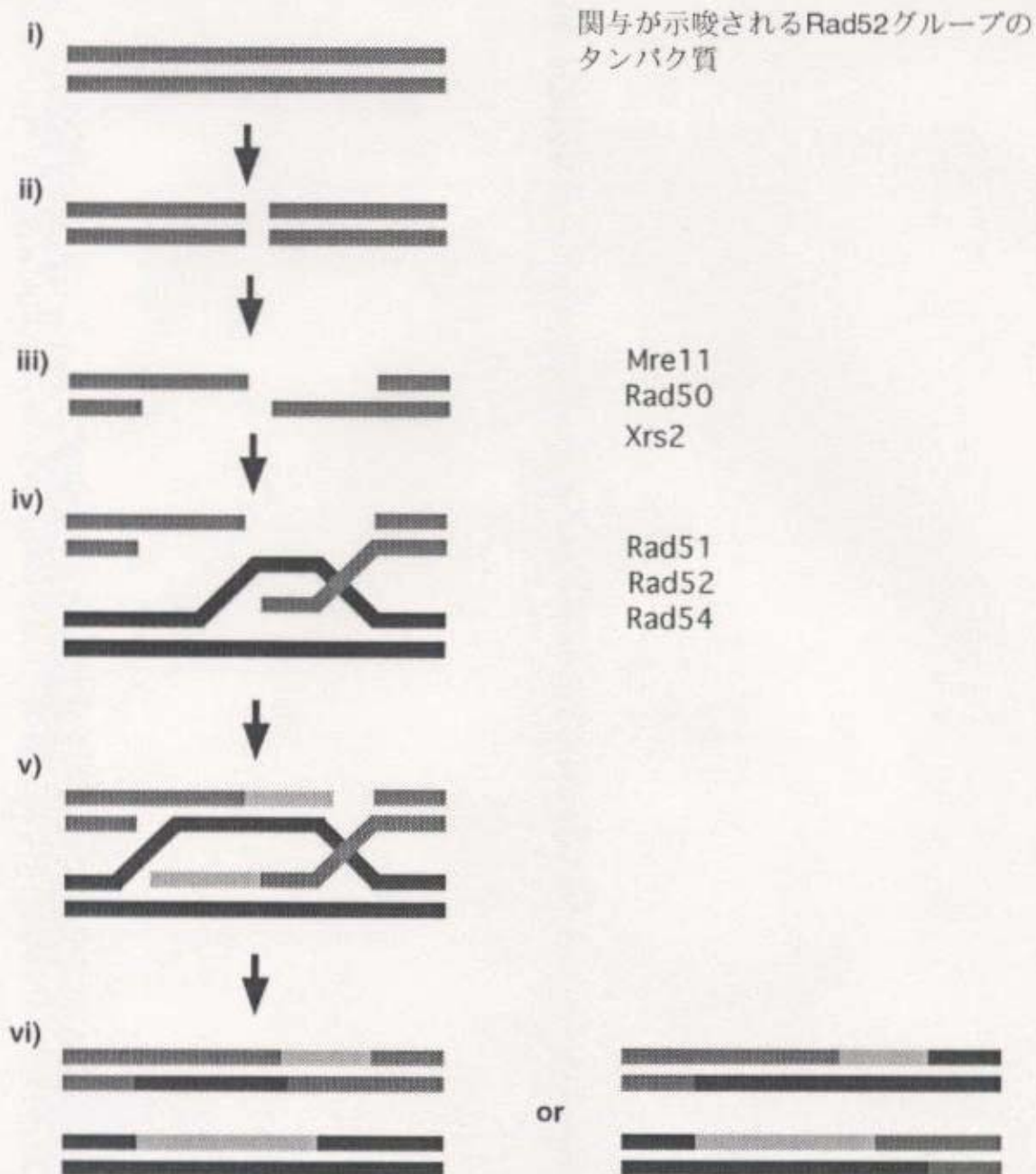
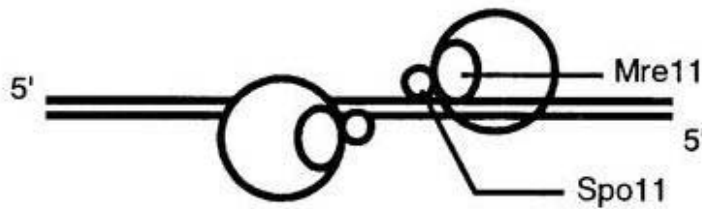


図1 遺伝的組換え機構のモデル

(i) 二本鎖DNAが切断される。(ii) 切断末端から片方のDNA鎖が消化され、3'側に突出した一本鎖DNAが生じる。(iii) 組換えタンパク質が一本鎖DNAに結合する。このタンパク質が、結合したDNAと相同な塩基配列をもつDNAを検索し、これと対合した後、DNA鎖を交換する(heteroduplex formation)。(iv) 二本鎖DNAが切断された時に失われたDNA鎖をDNAポリメラーゼが修復合成する。(v) 組換え中間体に見られるDNA鎖の交叉(Holliday junction)が移動してヘテロ二本鎖DNAが伸長する(branch migration)。Holliday junctionに特異的なヌクレアーゼによって、DNA鎖の交叉が解消され、組換え反応が完了する。交叉の切断の方向によって、二種類の組換え体が生じる。

i) Pre-DSB 複合体の集合



関与が示唆されているタンパク質

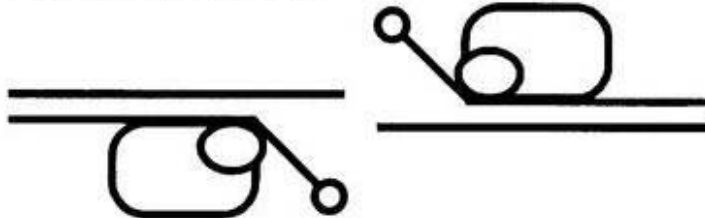
Mre11
Rad50
Xrs2
Spo11

ii) Spo11 によるDSB の形成



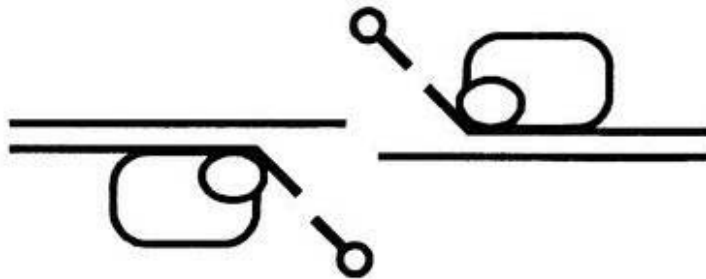
Mre11
Rad50
Xrs2
Spo11

iii) Post-DSB複合体の集合



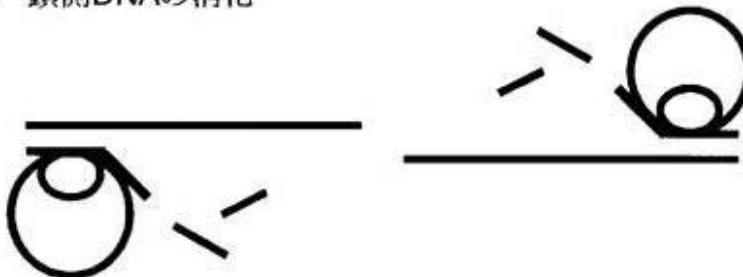
Mre11
Rad50
Xrs2
Spo11
Sae2/Com1

iv) Spo11 の解離



Mre11
Rad50
Xrs2
Spo11
Sae2/Com1

v) 5' 鎖側DNAの消化



Mre11
Rad50
Xrs2

図2 減数分裂期 DSBの形成とDNA 末端のプロセッシングのモデル

Mre11を含む幾つかのタンパク質から構成されるpre-DSB 複合体によってDSBが形成される。Spo11 がDNA鎖を切断すると考えられている。Mre11を含むpost-DSB 複合体によって、DSB 末端のプロセッシングが行われる。Mre11が、dsDNAが巻き戻されて生じたssDNAを切断すると同時に、Spo11をDNA末端から切除する。post-DSB 複合体が、dsDNAが巻き戻されて生じたssDNAを5' 末端から3' 末端方向に消化し、その結果、3' 側に突出したssDNA 鎖が生じる。このssDNA鎖がDNA鎖交換反応の基質となる。

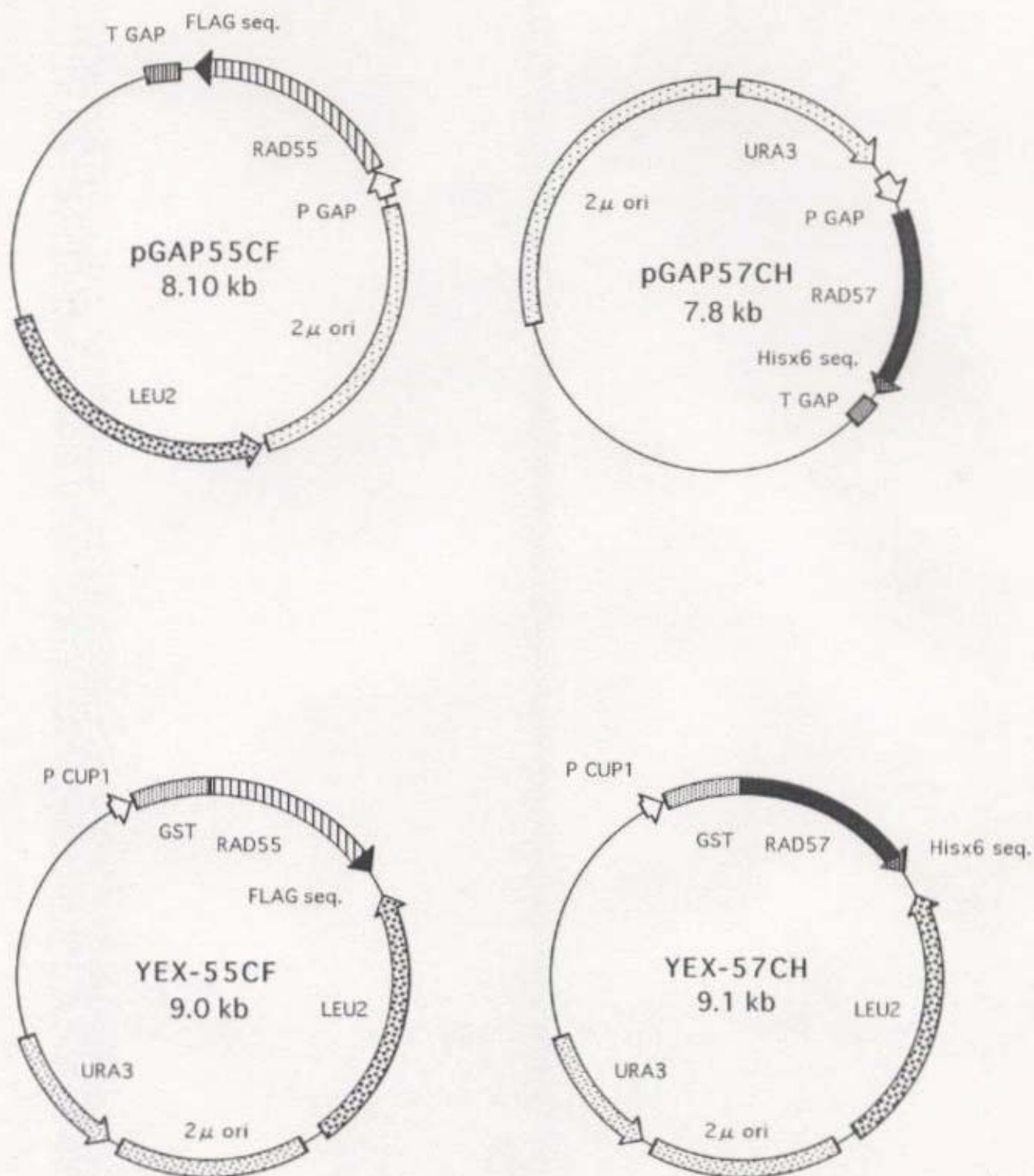


図3 出芽酵母でRad55、および、Rad57を発現するために用いたプラスミドGAPのプロモーターとターミネーターをP GAP、および、T GAPで表す。また、CUP1のプロモーターをP CUP1で表す。

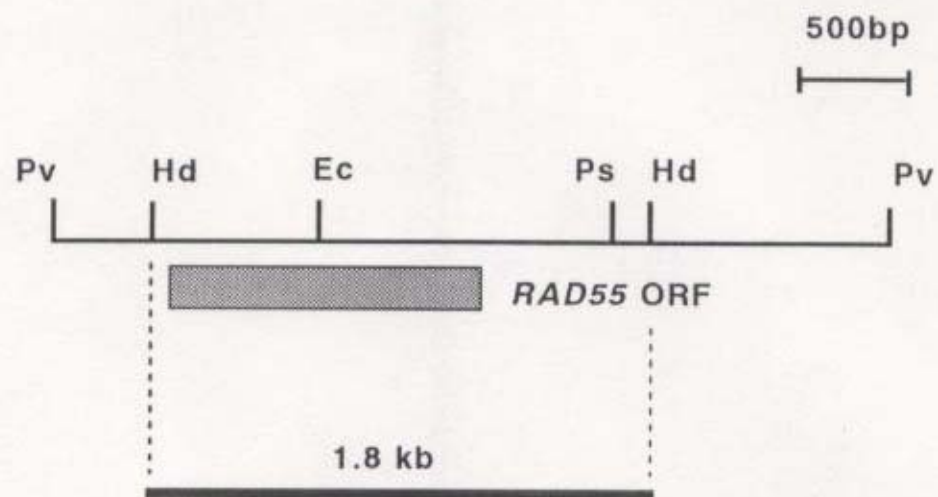


図4 *RAD55*遺伝子を含む3.0 kbp *Pvu* II 断片の制限酵素地図
 Pv: *Pvu* II, Hd: *Hind* III, Ec: *Eco*RI, Ps: *Pst* I. 1.8kbpの*Hind* III断片を
 M13mp18に挿入したプラスミド、pM13-R4から*RAD55*のmRNAの相補鎖
 を調製した。また、この断片をサザンハイブリダイゼーションのプロープ
 とした。

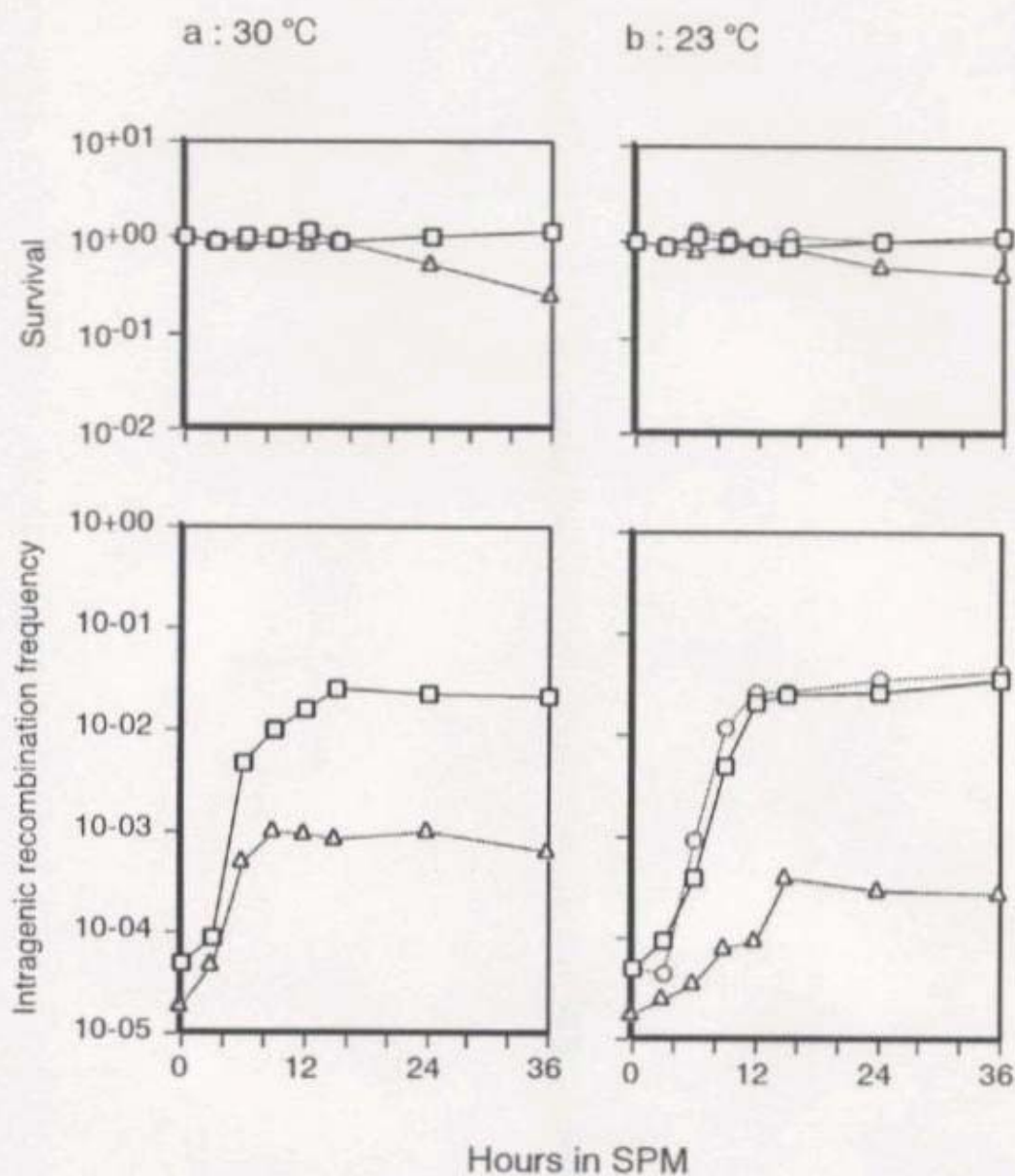


図5 減数分裂期の細胞の生存曲線と組換え頻度 上のグラフは細胞の生存曲線を示し、下のグラフは*his4*ヘテロアリル間の遺伝子内組換え頻度を示す。(a) 30°Cで培養。(b) 23°Cで培養。triangleはSKY501株 (*rad55Δ*) を示し、squareはSKY502株 (wild type)を示す。SKY501株の生存と組換えの欠損は*RAD55*遺伝子をプラスミドで持たせることで、相補される (b; circle)。

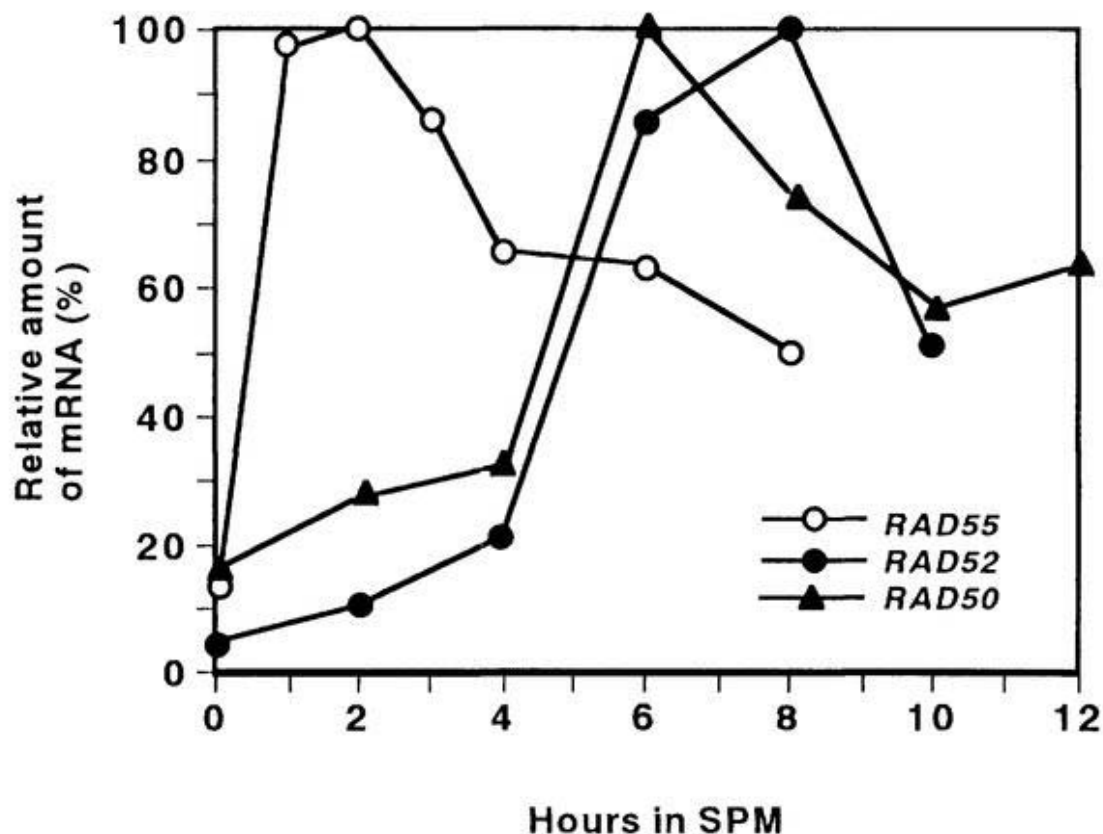


図6 *RAD55* mRNA転写の誘導 細胞をSPMで培養し、グラフに示した時間に取り出した試料からRNAを調製した。このうち50 μ gのRNAをS1ヌクレアーゼ・プロテクションアッセイに用いた。RNAとpM13-R4のviral single-stranded DNAを37°Cでハイブリダイズした。DNAをS1ヌクレアーゼで処理した後、1.0%のアガロースで電気泳動を行い、DNA-RNAハイブリッドをサザンブロットで検出した。減数分裂期でのRAD遺伝子の転写産物の相対量を比較した。*RAD50* (closed triangle)と*RAD52* (closed circle)のmRNAは*RAD55* (open circle)のmRNAと同じ方法で解析した。

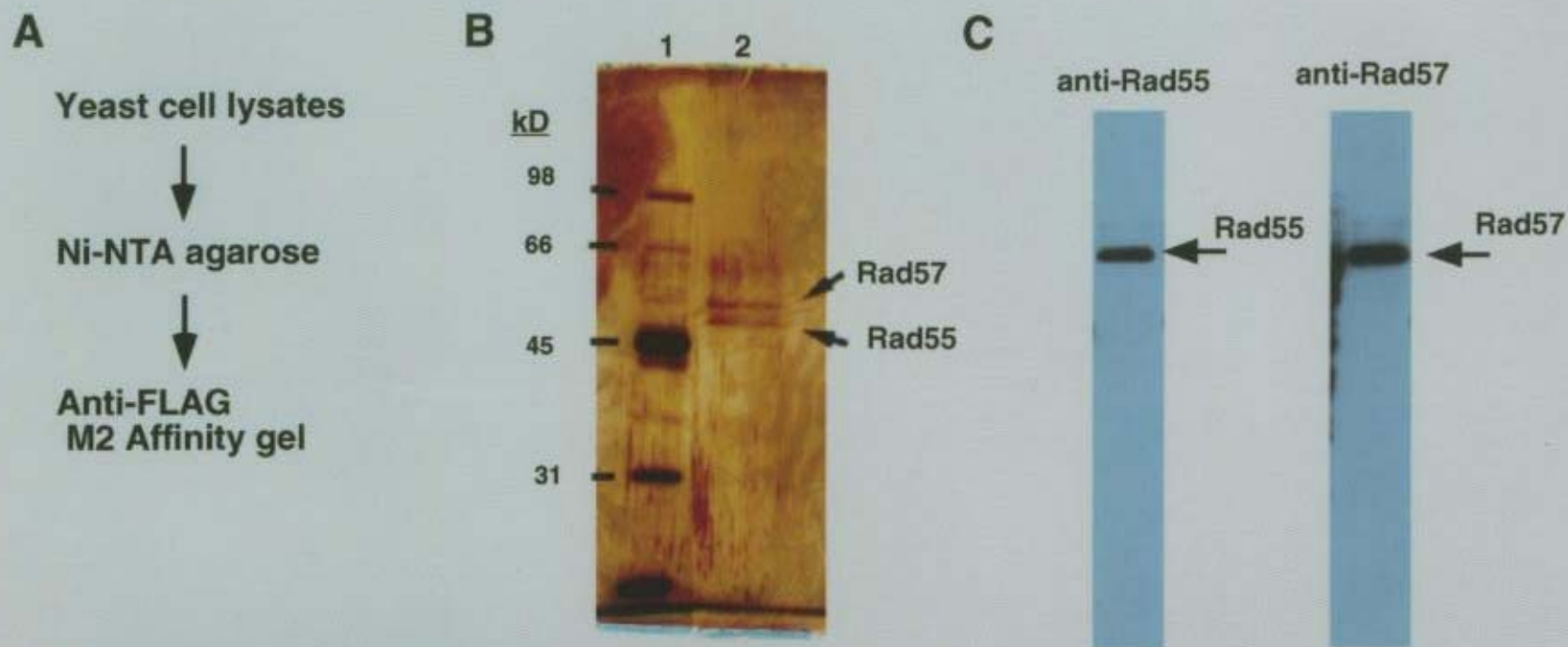


図7 Rad55-57複合体の精製

(A) 出芽酵母細胞で過剰発現させたRad55-57複合体の精製の過程

(B) 精製したタンパク質複合体のSDS-PAGE (10%) の結果。ゲルを銀染色した。

Lane 1 分子量マーカー、lane 2 精製タンパク質。

(C) タンパク質複合体の構成タンパク質のウエスタンブロットによる解析。Anti-FLAG M2 Affinity gel からの溶出画分に含まれるRad55とRad57をそれぞれの抗体で検出した。

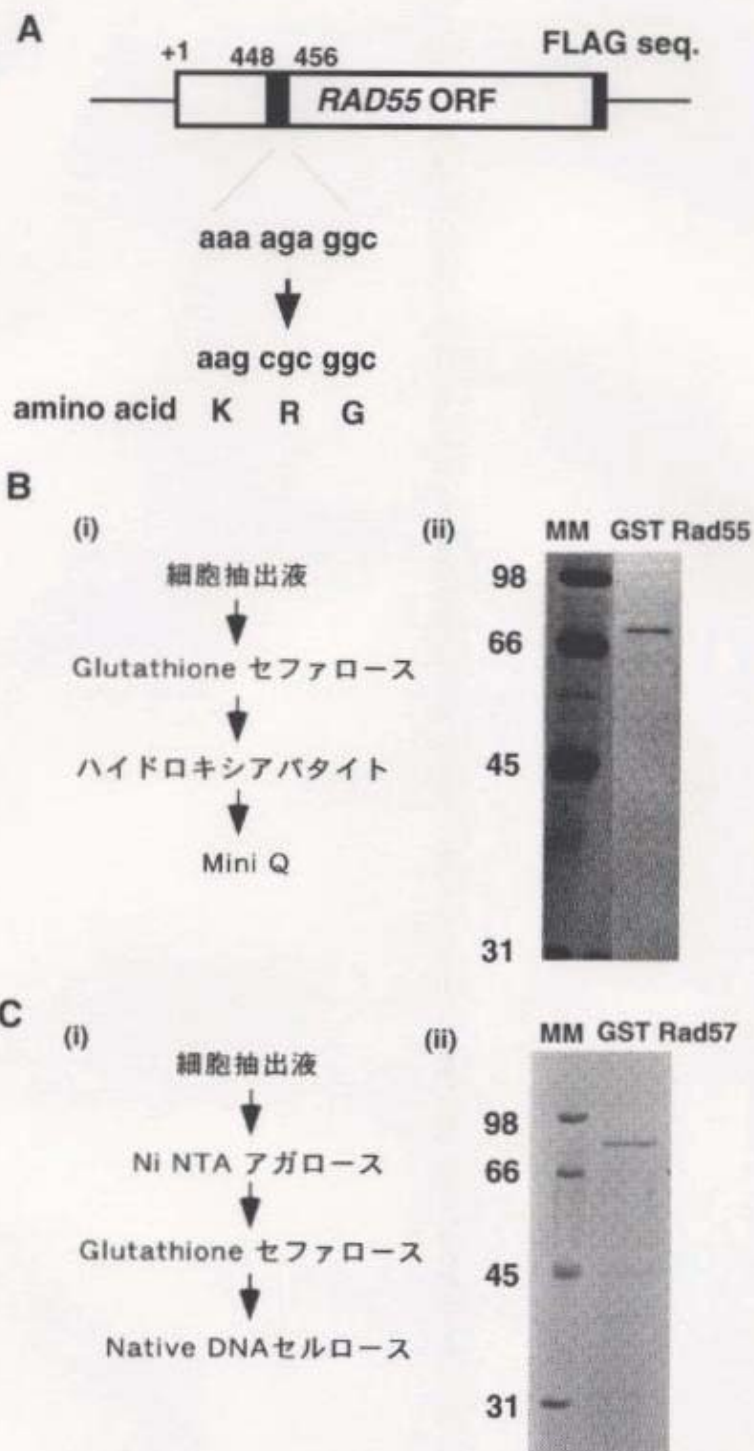


図8 GST Rad55とGST Rad57の精製

(A) RAD55遺伝子の改変。RAD55遺伝子の3rd ATGから、448番目から456番目までの塩基配列を、SD配列として機能しないように、改変した。

(B) GST Rad55の精製過程と最終精製品のSDS-PAGEによる解析。

(C) GST Rad57の精製過程と最終精製品のSDS-PAGEによる解析。

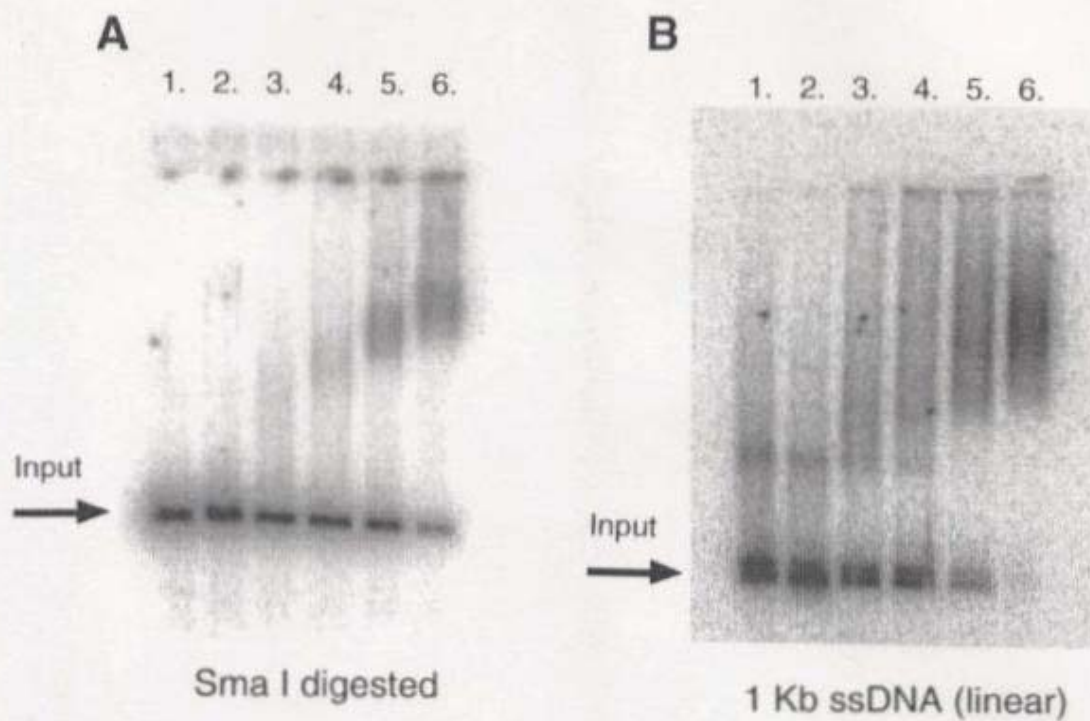


図9 GST Rad55によるゲルシフト。(A) 基質 (*Sma*Iで切断した pUC18 DNA)の濃度は $0.30 \mu\text{M}$ 、(B)基質 (1 Kbの線状ssDNA)の濃度は $0.11 \mu\text{M}$ 。lane 1, BSAのみ。lane 2, 200 nM GST。lane 3, 25 nM GST Rad55。lane 4, 50 nM GST Rad55。lane 5, 100 nM GST Rad55。lane 6, 200 nM GST Rad55。反応産物を0.8%のアガロースゲルで電気泳動して解析した。

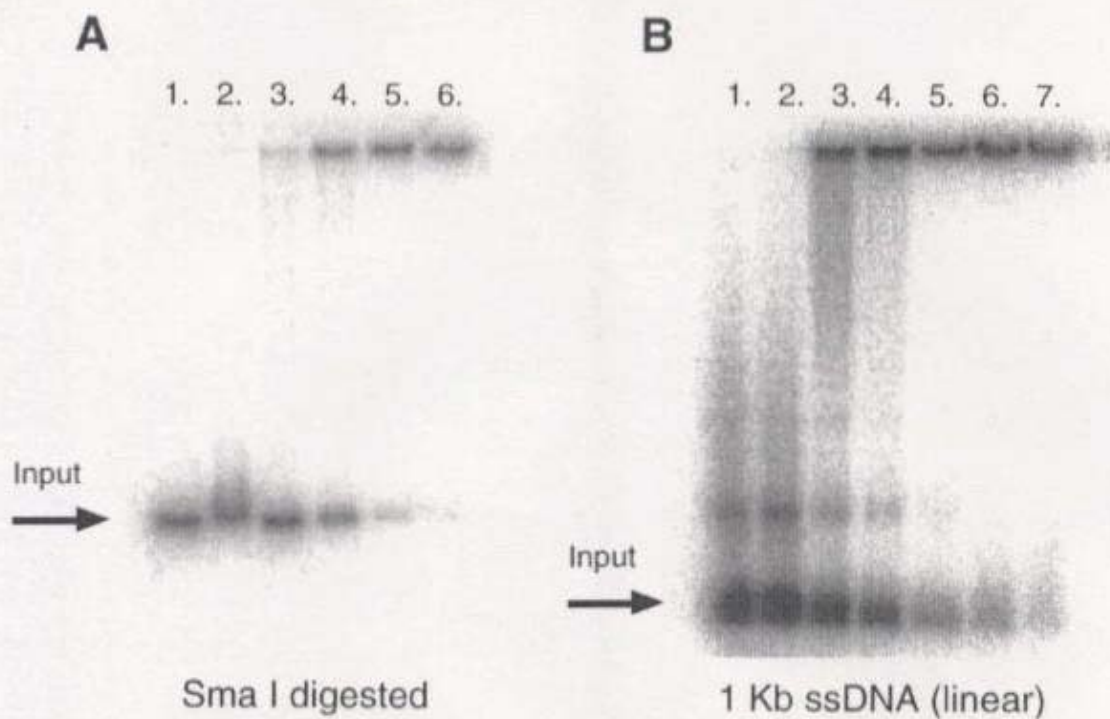


図10 GST Rad57によるゲルシフト。(A) 基質(*Sma*Iで切断したpUC18 DNA)の濃度は76 nM。lane 1, BSAのみ。lane 2, 200 nM GST。lane 3, 25 nM GST Rad57。lane 4, 50 nM GST Rad57。lane 5, 100 nM GST Rad57。lane 6, 200 nM GST Rad57。(B) 基質(1 Kbの線状ssDNA)の濃度は0.30 μ M。lane 1, BSAのみ。lane 2, 200 nM GST。lane 3, 5 nM GST Rad57。lane 4, 10 nM GST Rad57。lane 5, 20 nM GST Rad57。lane 6, 40 nM GST Rad57。lane 7, 80 nM GST Rad57。

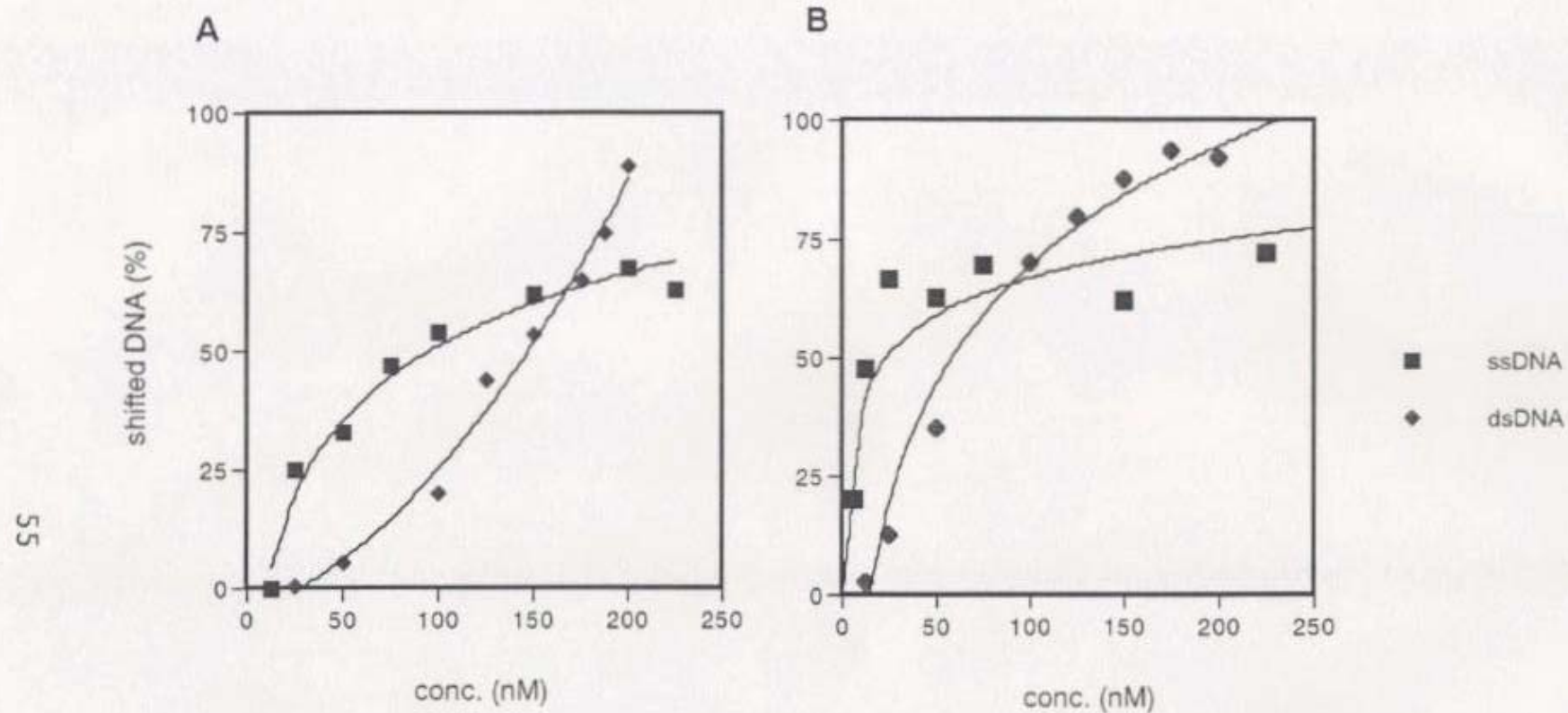


図11 GST Rad55とGST Rad57のゲルシフトアッセイの結果

(A) GST Rad55。(B) GST Rad57。縦軸にシフトしたDNAの割合、横軸で反応系に加えた (A) Rad55、(B) Rad57の濃度を示す。どちらの実験も、0.11 nM の1.0 Kb の線状ssDNA、または、0.11 nM の2.7 Kbp の線状 dsDNAをを基質に用いた。

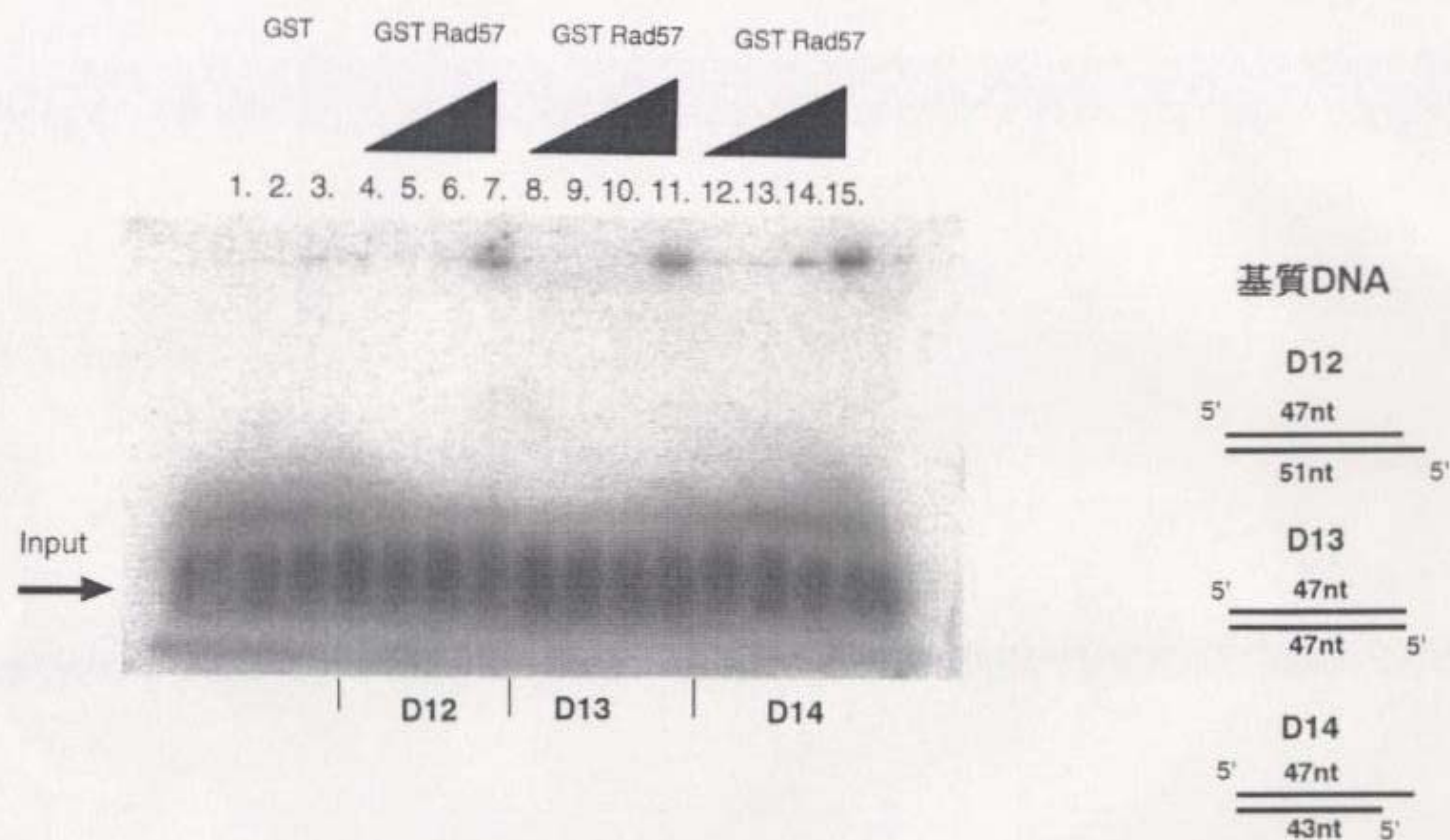


図12 GST Rad57の基質DNAの末端構造による親和性の違い

lane 1-3では100 nMのGSTと40 nMの基質DNA(D12,D13,D14)を反応させた。lane 4-7ではD12、lane 8-11ではD13、lane 12-15ではD14を基質とした。lane 4,8,12で0 nM、lane 5,9,13で5 nM、lane 6,10,14で15 nM、lane 7,11,15で45 nMのGST Rad57と基質を反応させた。

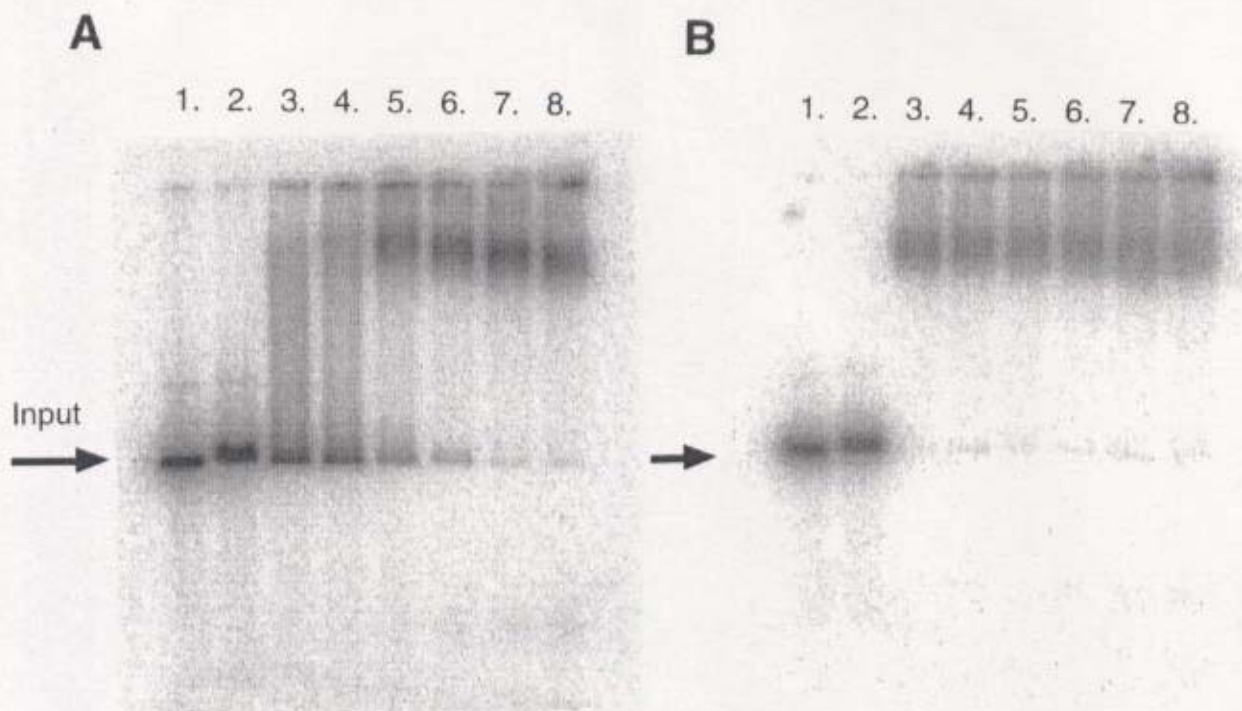


図13 GST Rad55-DNA複合体の安定性

(A) 76 nMのpUC18 DNA断片と200 nMのGST Rad55を加温。次の時間でサンプリングを行い、0.8% アガロースゲルで電気泳動を行った。lane 3, 1 min. lane 4, 2 min. lane 5, 5 min. lane 6, 10 min. lane 7, 15 min. lane 1,2,8, 20 min. GST Rad55の代わりにlane 1はBSA、lane 2はGSTを添加。

(B) 76 nMのpUC18 DNA断片と200 nMのGST Rad55を、20分間、加温。10倍 (lane 2,3) 、50倍 (lane 4,5) 、100倍 (lane 6,7) のpUC18 DNA断片をcompetiterとして加え、次の時間でサンプリングを行い、0.8% アガロースゲルで電気泳動を行った。lane 2,4,6, 15 min. lane 1,3,5,7, 30 min. lane 1はGST Rad55の代わりにBSAを添加。

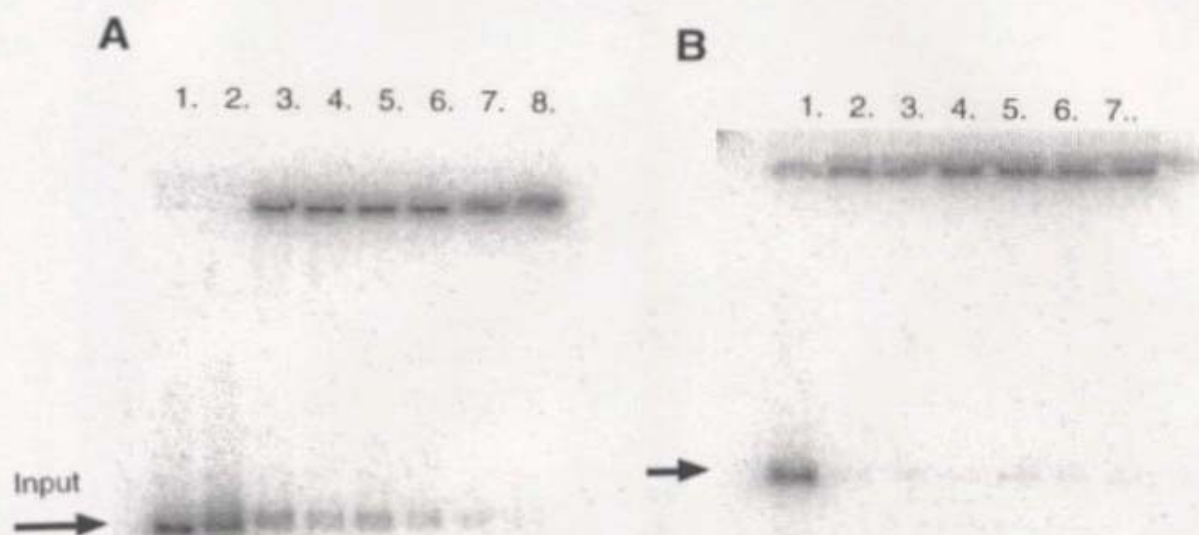


図14 GST Rad57-DNA複合体の安定性

(A) 76 nMのpUC18 DNA断片と200 nMのGST Rad57を加温。次の時間でサンプリングを行い、0.8 % アガロースゲルで電気泳動を行った。

lane 3, 1 min. lane 4, 2 min. lane 5, 5 min. lane 6, 10 min. lane 7, 15 min. lane 1,2,8, 20 min. GST Rad57の代わりにlane 1はBSA, lane 2はGSTを添加。

(B) 76 nMのpUC18 DNA断片と200 nMのGST Rad57を、20分間、加温。

10倍 (lane 2,3) 、50倍 (lane 4,5) 、100倍 (lane 6,7) のpUC18 DNA断片をcompetitorとして加え、次の時間でサンプリングを行い、0.8 % アガロースゲルで電気泳動を行った。lane 2,4,6, 15min. lane 1,3,5,7, 30min.

lane 1はGST Rad57の代わりにBSAを添加。

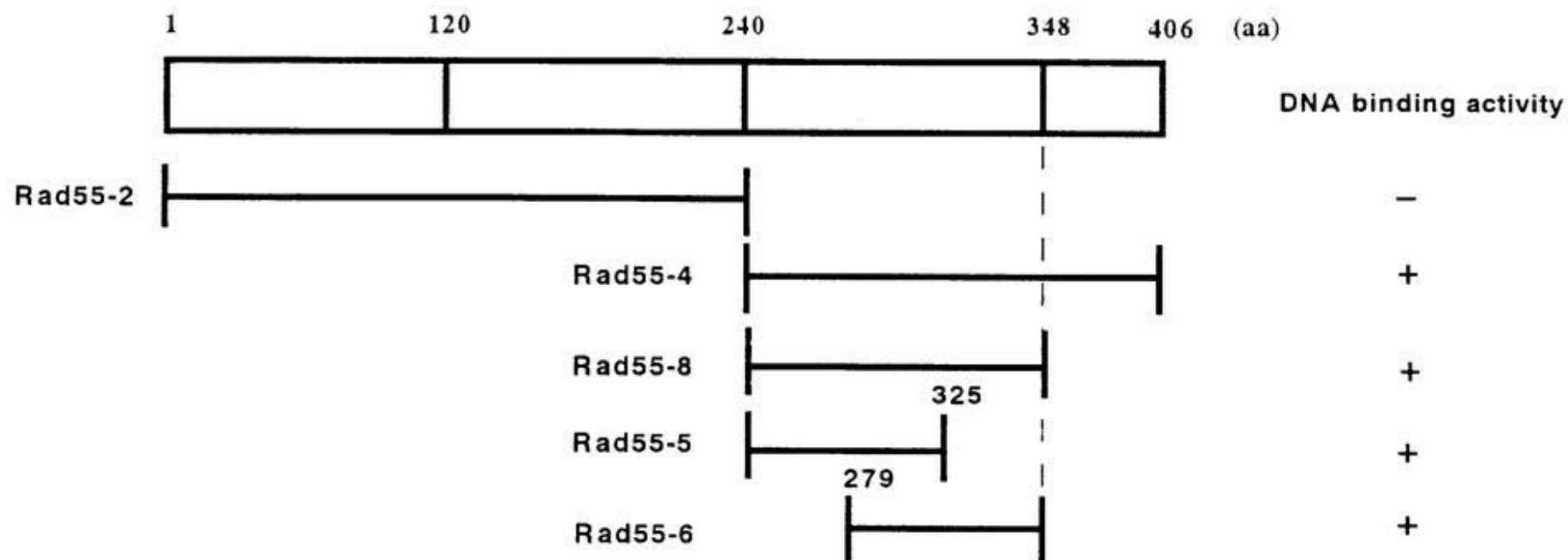


図15 Rad55 DNA binding domain の解析

上記の断片を持つGST融合タンパク質を作成し、ゲルシフト解析でDNA結合能を持つ領域を同定した。348番アミノ酸以降の領域を欠失した変異株でも、MMS感受性を示さない。279から325番アミノ酸までの領域がDNA結合に必要である。

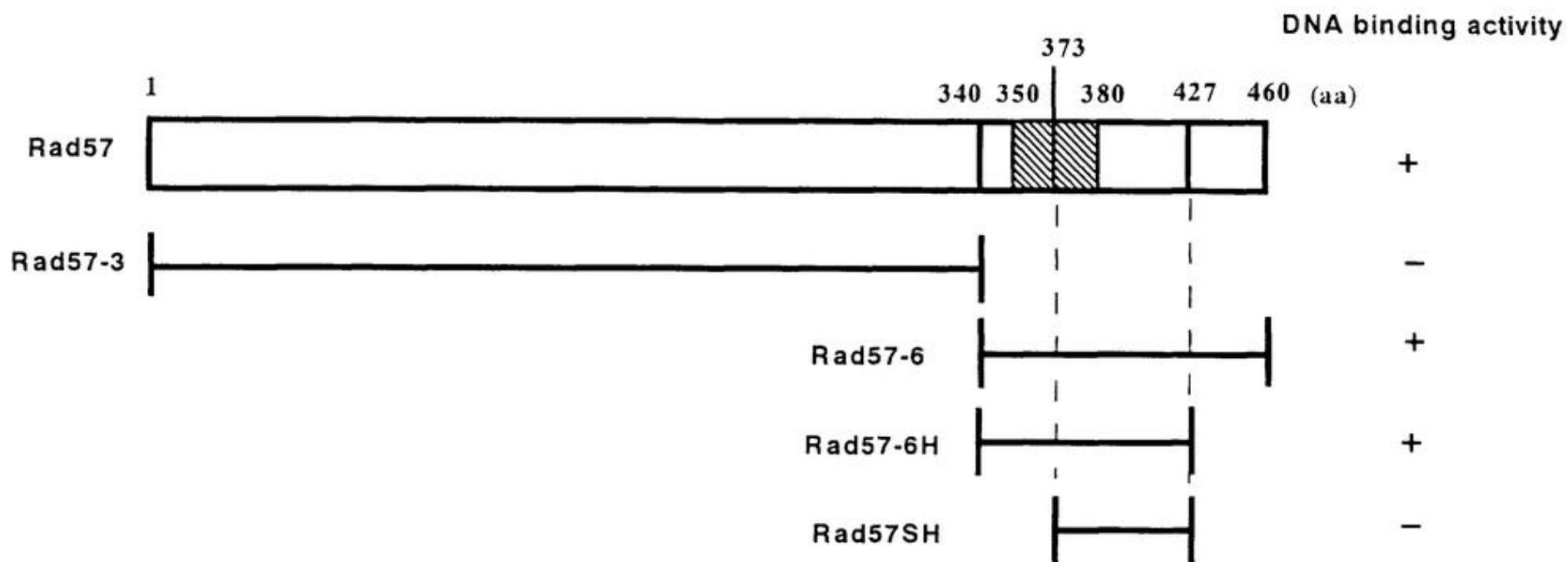
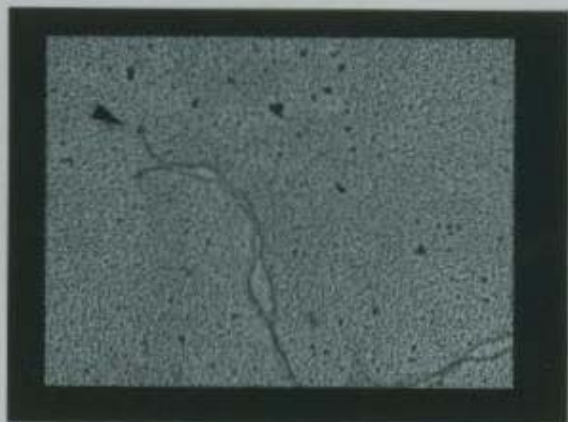


図16 Rad57 DNA binding domain の解析

上記の断片を持つGST融合タンパク質を作成し、ゲルシフト解析でDNA結合能を持つ領域を同定した。350から380aaまでの領域に塩基性アミノ酸のクラスターが存在し、この領域がDNA結合能に必要である。

A



B

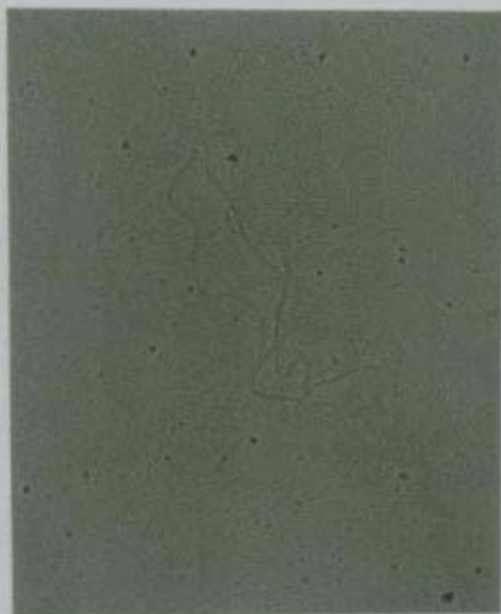
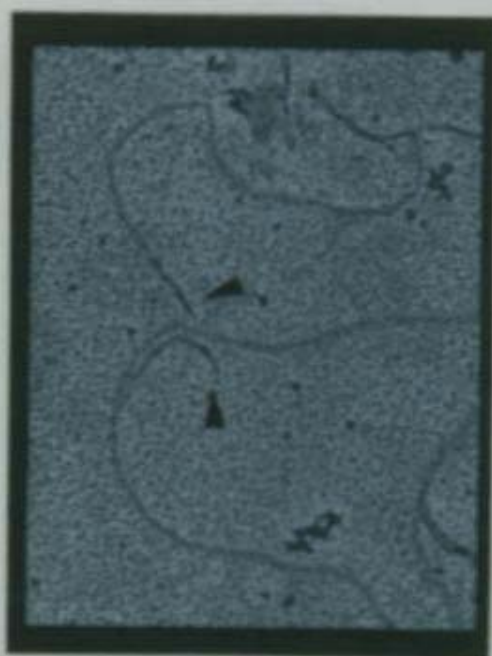


図17 GST Rad57-DNA複合体の電子顕微鏡像 5 nMのM13mp8線状DNA分子と50 nMのGST Rad57を37°Cで30分間反応させた反応液を電子顕微鏡観察の試料とした。パネルA、Bでは、DNAの末端にタンパク質分子が結合している (arrow head) 。パネルCでは、DNA末端に電子密度が高い部分が存在することが観察される (arrow head) 。パネルA、B、Cで、右側の写真は左側の写真を拡大したものである。パネルB、C、Dで、複数のDNA分子が集結して巨大分子を形成しているのが観察される。(次ページにつづく。)

C



D



E



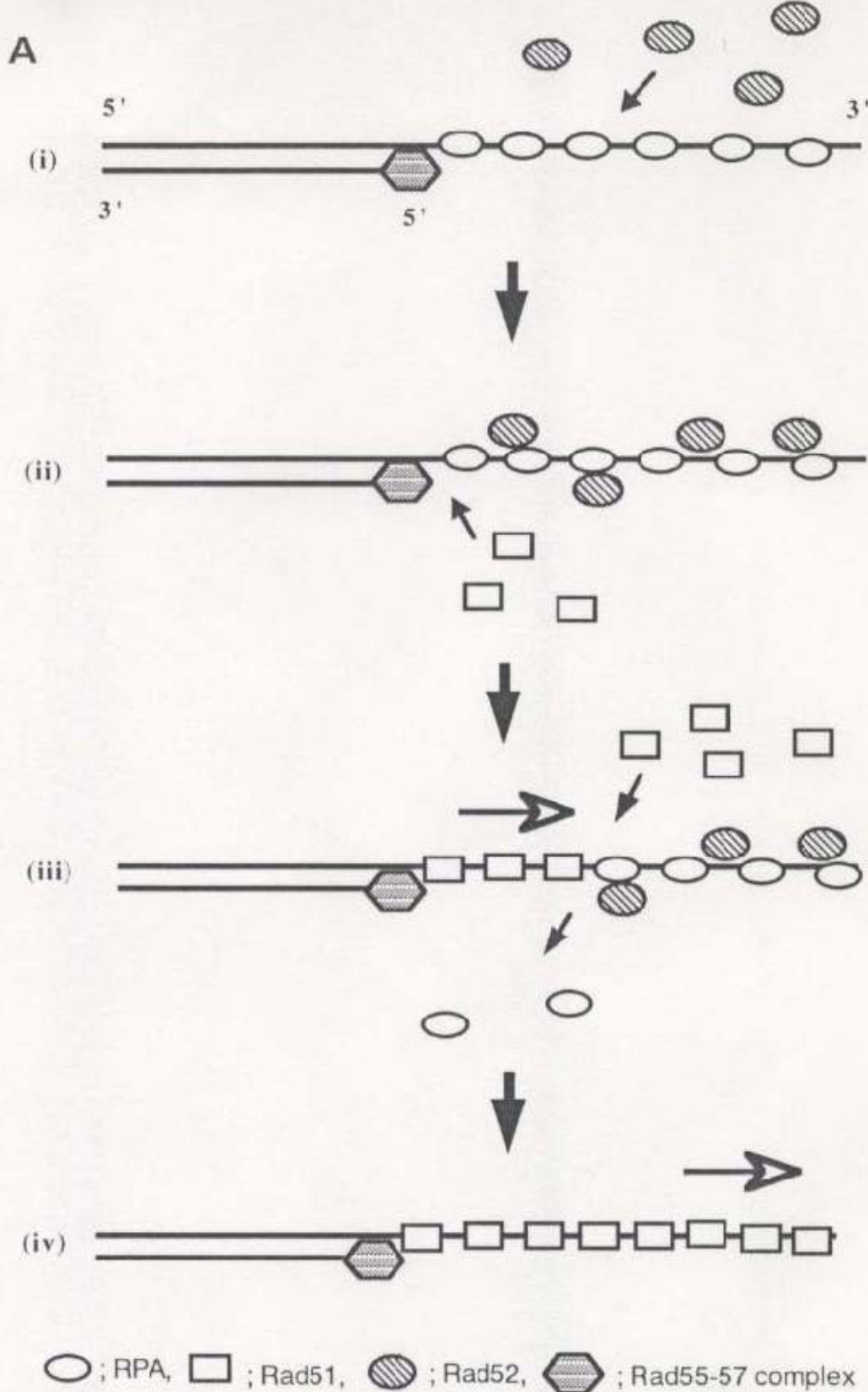


図18 ヌクレオプロテイン・フィラメント形成時のRad55-57複合体の役割
 (A)Rad55-57複合体がssDNAとdsDNAの分岐に結合している場合。(i) ssDNAにRPAとRad52が集まり、DNAと複合体を形成する。Rad55-57複合体がssDNAとdsDNAの分岐に結合する。(ii) Rad55-57複合体が結合しているDNA上の位置を起点としてRad51がヌクレオプロテイン・フィラメントの形成を始める。Rad52がRPAとRad51を置き換える。(iii) ヌクレオプロテイン・フィラメントの形成が完了する。白抜きの矢印はヌクレオプロテイン・フィラメントの伸長方向を表す。

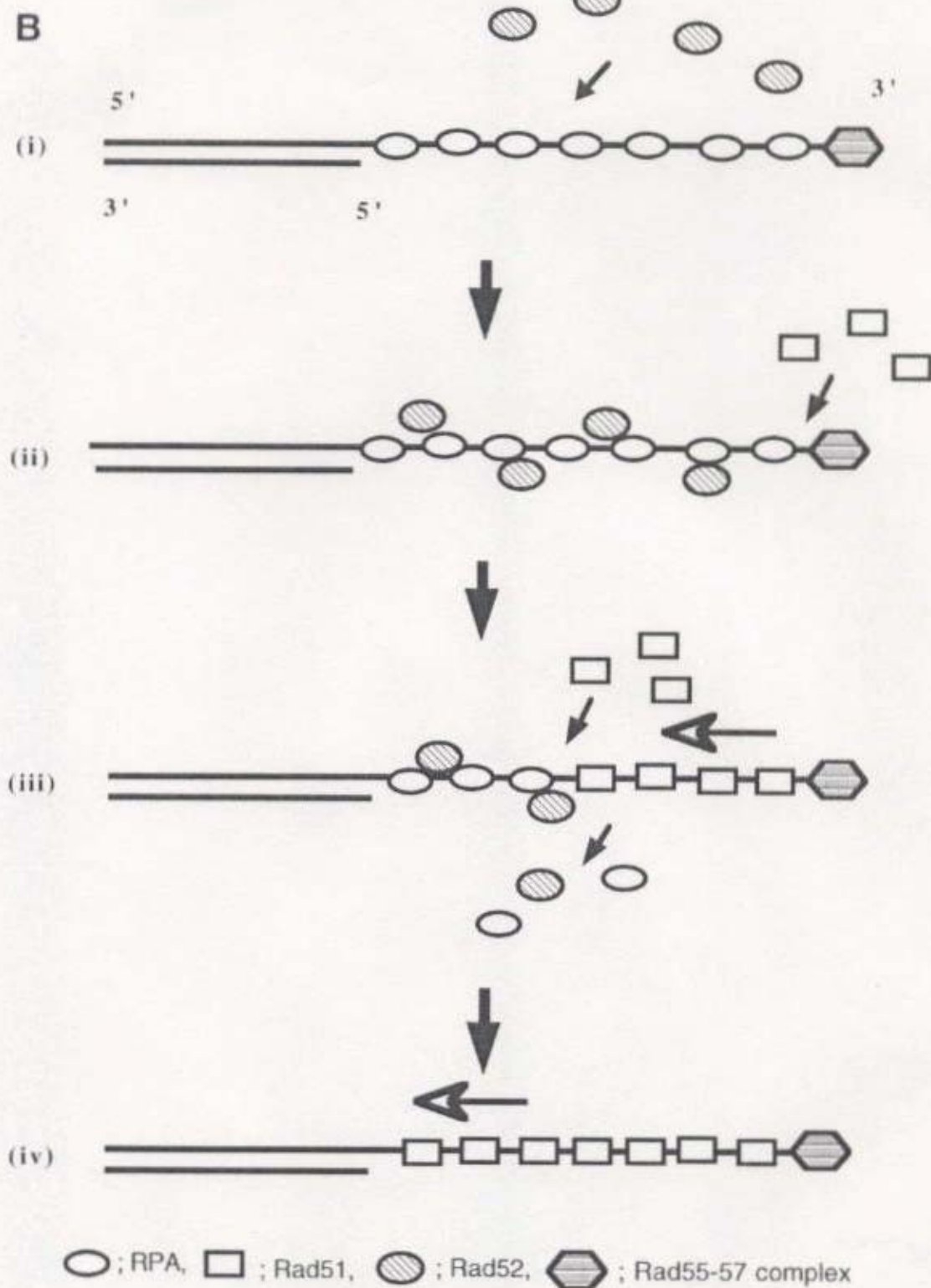


図18 (B) Rad55-57複合体がssDNAの3' OH末端に結合している場合。(i) ssDNAにRPAとRad52が集まり、DNAと複合体を形成する。Rad55-57複合体がssDNA 3' OH末端に結合する。(ii) Rad55-57複合体が結合しているDNA上の位置を起点としてRad51がヌクレオプロテイン・フィラメントの形成を始める。Rad52がRPAとRad51を置き換える。(iii) ヌクレオプロテイン・フィラメントの形成が完了する。白抜きの矢印はヌクレオプロテイン・フィラメントの伸長方向を表す。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、熱心に御指導してくださった、小川智子教授、太田力助手。良き相談相手であり、適切な助言を頂いた田中茂夫助手、松田志麻子さん、押海裕之君、実験を手伝ってくれた古山嘉美さんと池谷優子さんに心からの感謝の意を表します。