

## 組換え蛋白質複合体の精製と機能解析

### Purification and Characterization for Recombination-enzyme-complex

研究代表者 国立遺伝学研究所細胞遺伝部門 助手  
Cell Genetics, National Institute of Genetics  
Tsutomu OHTA

太田 力

DSB initiation requires many genes (at least 10 genes), Mre11, Rad50, Xrs2, Spo11, Mer2, Mre2, Mek1/Mre4, Mei4, Rec102, Rec104 and Rec114. We thought that it was important to identify the DSB introducing protein(s) in order to characterize the mechanisms of DSB formation

Recently it has been shown that Spo11 protein binds to DSB site, but it was less clear whether Spo11 protein has DSB activity. And recently, it has been shown that Mre11 was homologous to *E. coli* SbcD which has an ATP-independent single-stranded DNA endonuclease activity and further SbcC/SbcD protein complex has an ATP-dependent double-stranded DNA exonuclease activity.

We therefore focused to Mre11 protein and thought to characterize it. Our experimental strategy was to gather over-expressed flag-tagged Mre11 in yeast cells.

Then, the purified Mre11 protein complex have been assayed for nuclease activities.

#### 1. 研究目的:

真核生物の遺伝的組換えは、減数分裂期組換え、DNA傷害の修復、DNA複製時エラーの除去、遺伝子発現制御など多方面で機能して、生物の多様性と子孫の安定な保持において重要な役割を担っている。特に、組換えは減数分裂期で高頻度で起こり、出芽酵母では、これまで数十個の遺伝子が同定され、3つのグループに分けられている。即ち、組換えを制御するグループ (I)、組換えの開始である二本鎖DNA切断の導入に関与するもの (II)、相同DNAの検索、対合と交叉に働くもの (III) である。これら3つのグループの遺伝子産物は蛋白質複合体を形成することがTwo-Hybrid法、共同的免疫沈降法及び遺伝的解析から示唆されている。私はこれまでヒト培養細胞から転写の制御に働くSWI蛋白質複合体の役割を研究してきた。ま

た、DNAのトポロジーと転写の効率との関連も研究してきた。本研究では、これらの経験をもとに、組換えを行う蛋白質複合体を分離、精製し、その構成及び各成分の機能解析と組換えを効率よく行う染色体構造の解析を目的とする。

#### 2. 研究経過:

##### 2.1. 組換えに関与する蛋白質複合体の精製 I

方法; 酵母の遺伝学的研究から相同組換えの最初の反応である二本鎖DNAの切断に関与する遺伝子 (RAD50, XRS2, MRE11) のアミノ末端あるいはカルボキシル末端にflag-tag (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lysの8個のアミノ酸) を付けた遺伝子をPCR法を用いて作成した。これらの遺伝子を酵母で発現させ、酵母の中で組換えに関与す

る蛋白質複合体を形成させた。次に、酵母を物理的に破碎して蛋白質を抽出し、flag-tag に対する抗体カラムを用いて蛋白質複合体を精製した。

結果； MRE11 のアミノ末端に flag-tag を付けたものから MRE11 と RAD50 の二つからなる蛋白質複合体の精製に成功した。また、RAD50 のミノ末端に flag-tag を付けたものからも RAD50 と MRE11 の二つからなる蛋白質複合体の精製に成功した。しかし、XRS2 のアミノ末端に flag-tag を付けたものは分解がはやく蛋白質複合体の精製はできなかった。

活性； MRE11 と RAD50 の二つからなる蛋白質複合体は ssDNA エンドヌクレアーゼ活性を持つことがわかった。

## 2.2. 組換えに関与する蛋白質複合体の精製 U

方法； 酵母の遺伝学的研究から相同組換えの最初の反応である二本鎖 DNA 切断に続いて起こる DNA 鎖の交換に関与する遺伝子 (RAD51, RAD52, RAD54, RAD55) のアミノ末端に flag-tag を付けた遺伝子を酵母で発現させ、酵母の中で組換えに関与する蛋白質複合体を形成させ、精製した。

結果； RAD52 のアミノ末端に flag-tag を付けたものから RAD52、RAD51、RPA からなる蛋白質複合体の精製に成功した。

活性； in vitro での活性はいまのところわかっていない。

## 3. 今後の課題と発展：

今回、組換え蛋白質複合体は体細胞期の酵母から精製したが、組換えは減数分裂期で高頻度で起こることが知られている。そこで、これから組換え蛋白質複合体を減数分裂期の酵母から精製し、活性を比較検討することが重要であると思われる。

## 4. Publication List (1997-1998)

(1) T. Okamoto, S. Yamamoto, Y. Watanabe, T. Ohta, F. Hanaoka, R. R. Roeder, and Y. Ohkuma (1998). Analysis of the role of TFIIIE in transcriptional regulation through structure-function studies of TFIIIEb. **J. Biol. Chem.** **273:19866-19876**

(2) A. Shinohara, M. Shinohara, T. Ohta, S. Matsuda, and T. Ogawa (1998). Yeast Rad52-dependent homologous recombination involved an interaction with a single-stranded DNA binding protein, RPA. **Genes to Cells** **3:145-156**

(3) T. Wakasugi, T. Nagai, M. Kapoor, M. Sugita, M. Ito, S. Ito, J. Tsudzuki, K. Nakashima, T. Tsudzuki, Y. Suzuki, A. Hamada, T. Ohta, A. Inamura, K. Yoshinaga, and M. Sugiura (1997). Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the green alga *Chlorella vulgaris*; The existence of genes possibly involved in chloroplast division. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **94:5967-5972**