

## DNA二本鎖切断修復遺伝子 *MRE11* の構造的多様性

大 成 亮 次

広島大学医学部外科学第二講座 (指導: 浅原利正教授)

受付 平成 12 年 10 月 6 日

受理 平成 12 年 11 月 24 日

*MRE11* は出芽酵母の減数分裂の組換え変異株より同定された DNA 二本鎖切断修復遺伝子である。進化上酵母からヒトに至るまで構造的によく保存された遺伝子であり、高等真核生物においては RAD50 およびナイミーヘン染色体不安定症候群の原因となる NBS1 と蛋白質複合体を形成する。その変異が毛細血管拡張性失調症に類似した病態において発見されたことから、ヒトにおいて放射線感受性、染色体安定性に関与しているものと考えられる。また、遺伝性乳癌に関与する BRCA1 と蛋白質複合体を形成することから、発癌への関わりも示唆されている。このような多機能を有するヒト *MRE11* の構造に関してはバリエーションが存在することが知られているが、それらの分布、出現頻度は知られていないため機能解析の妨げとなっている。そこで本研究では正常単核球および乳癌における *MRE11* cDNA の構造解析を行った。その結果、エクソン 4 に 4 塩基対欠失のスプライスバリエーションが存在すること、これまで議論のあったエクソン 16 を有しない mRNA の発現は極めて稀であること、終止コドンの位置は Paull らの報告が正しく Petrini らの報告は確認できないことが明らかとなった。この解析により、これまで議論のあったヒト *MRE11* の構造が明らかにされ、機能解析に重要な情報がえられた。

**Key words** : DNA 二本鎖切断, 修復遺伝子, 乳癌, スプライス

酵母における DNA 二本鎖切断は主として相同組換えによって修復され、酵母の修復変異株から相同組換えに関わる RAD52 epistasis group とよばれる遺伝子群が同定されたが、*MRE11* もこの系において減数分裂の組換え変異株から同定された<sup>1)</sup>。*MRE11* の変異は減数分裂組換えを阻害するとともに、有糸分裂においては過剰組換えの表現型を示し、DNA 二本鎖切断が効率よく修復されない。高等真核生物においてはニワトリの DT40 細胞およびマウスの ES 細胞においてノックアウト実験が行われ、*MRE11* は細胞の生存に必須な遺伝子であることが示されている<sup>16,18)</sup>。

*MRE11* は酵母においては RAD50 と XRS2 と蛋白質複合体を形成するが、高等真核生物においては RAD50 と NBS1 と複合体を形成する<sup>2)</sup>。*NBS1* は放射線高感受性、染色体不安定性、免疫不全、高発癌性を呈するナイミーヘン染色体不安定症候群の原因遺伝子である<sup>3)</sup>。この病態は *ATM* の変異が原因となる毛細血管拡張性失調症と臨床的、細胞生物学的に極めて類似しているが、電離放射線照射により *ATM* が *NBS1* をリン酸化することが証明され、この二つの蛋白質は

生化学的にも関連している<sup>4)</sup>。また、*MRE11* の変異も毛細血管拡張性失調症に類似した病態において報告され<sup>4)</sup>、DNA 損傷時における *MRE11* のリン酸化に *NBS1* が必要であることもあわせると<sup>6)</sup>、*MRE11* はヒトにおいても DNA 修復に重要な遺伝子であると考えられている。

このような DNA 損傷における役割とは別に、*MRE11* は発癌にも関与する可能性がいくつかの結果から示唆されている。まず、遺伝性乳癌の発症に関与する BRCA1 が RAD50/*MRE11*/*NBS1* 複合体と結合することが報告されている<sup>15,19)</sup>。BRCA1 の機能に関しても、DNA 修復に関与すること<sup>10)</sup>、ATM 依存性に DNA 損傷時にリン酸化されることが証明され<sup>5)</sup>、遺伝性乳癌の発症と DNA 修復異常は密接に関連していることはほぼ確実である。また、RAD50/*MRE11*/*NBS1* 複合体はテロメアおよびテロメアのリモデリングに重要である TRF2 に結合することも示されている<sup>20)</sup>。さらには、酵母における *MRE11* の変異株においてはヒト癌で度々観察される染色体転座が高頻度に検出されることにより、その変異は発癌の関与する染色体転座

の原因である可能性も示唆されている<sup>4)</sup>。

MRE11 のヒト疾患との関わりについては、癌のみならず神経疾患に関しても重要な実験結果が報告されている<sup>13)</sup>。CAG リピートを代表とする3塩基対の繰り返し配列が正常よりも長くなることで多くの神経疾患の発症原因となることが示唆されているが、酵母において変異型 *MRE11* ないしは *RAD50* の過剰発現により CAG リピートが延長することが報告され<sup>13)</sup>、*MRE11* 機能異常はトリプレット病の発症にも関与するという仮説も提唱されている。

このように *MRE11* は様々なヒト疾患と密接なつながりをもっている可能性があるため、その機能解析はそのような疾患の発症機構の解明に極めて重要である。特にヒト遺伝子を使った生化学的、細胞生物学的解析はまだ不十分であり、これからの解析が期待される場所であるが、Petrini らのヒト遺伝子の報告以来その構造に関しては2つの問題点が議論されている<sup>12)</sup>。ひとつはエクソン16の有無に関してである。Paul らは C 末端側に84塩基対が挿入された cDNA を睾丸および HeLa 細胞よりクローニングしているが<sup>11)</sup>、これは GenBank のデータベースの検索ではエクソン16に相当するものと考えられる。同時に、Chamankhah らはこの84塩基対挿入クローンを HeLa 細胞より単離し *MRE11B* として報告している<sup>3)</sup>。もう一つは終止コドンの位置である。Paul と Chamankhah の *MRE11B* はともに Petrini のヌクレオチド2213番の T が欠けているために28アミノ酸が短くなっている。これらはいずれも cDNA ライブラリーより単離されたものである。

*MRE11* は、N 末端にヌクレース活性に重要なホスホジエステラーゼモチーフと、C 末端に DNA 結合に重要な荷電アミノ酸クラスターの二つの機能ドメインを有する<sup>7)</sup>。ヒト遺伝子において問題となった二つの相違点は、いずれも C 末端の荷電アミノ酸クラスター近傍に位置することから、それらがヒト細胞においてどのような発現パターンを呈するかは機能解析に極めて重要な情報である。そこで私は Petrini の配列に基づいて、ヒト末梢血単核球と乳癌細胞の *MRE11* cDNA のバリエーションを PCR および single-strand conformational polymorphism (SSCP) によって検討した。その結果、問題となったエクソン16を有する mRNA は細胞の種類を問わず優位に発現していること、終止コドンの位置は Paul らの報告のみしか見出されないことに加え、エクソン4にスプライスバリエーションによると考えられる4塩基対を欠損した mRNA が乳癌症例で認められた。これらは、*MRE11*

の機能解析に極めて重要な情報であるとともに発癌への関与を示唆する結果でもある。

## 材料と方法

### 1. RNA 抽出

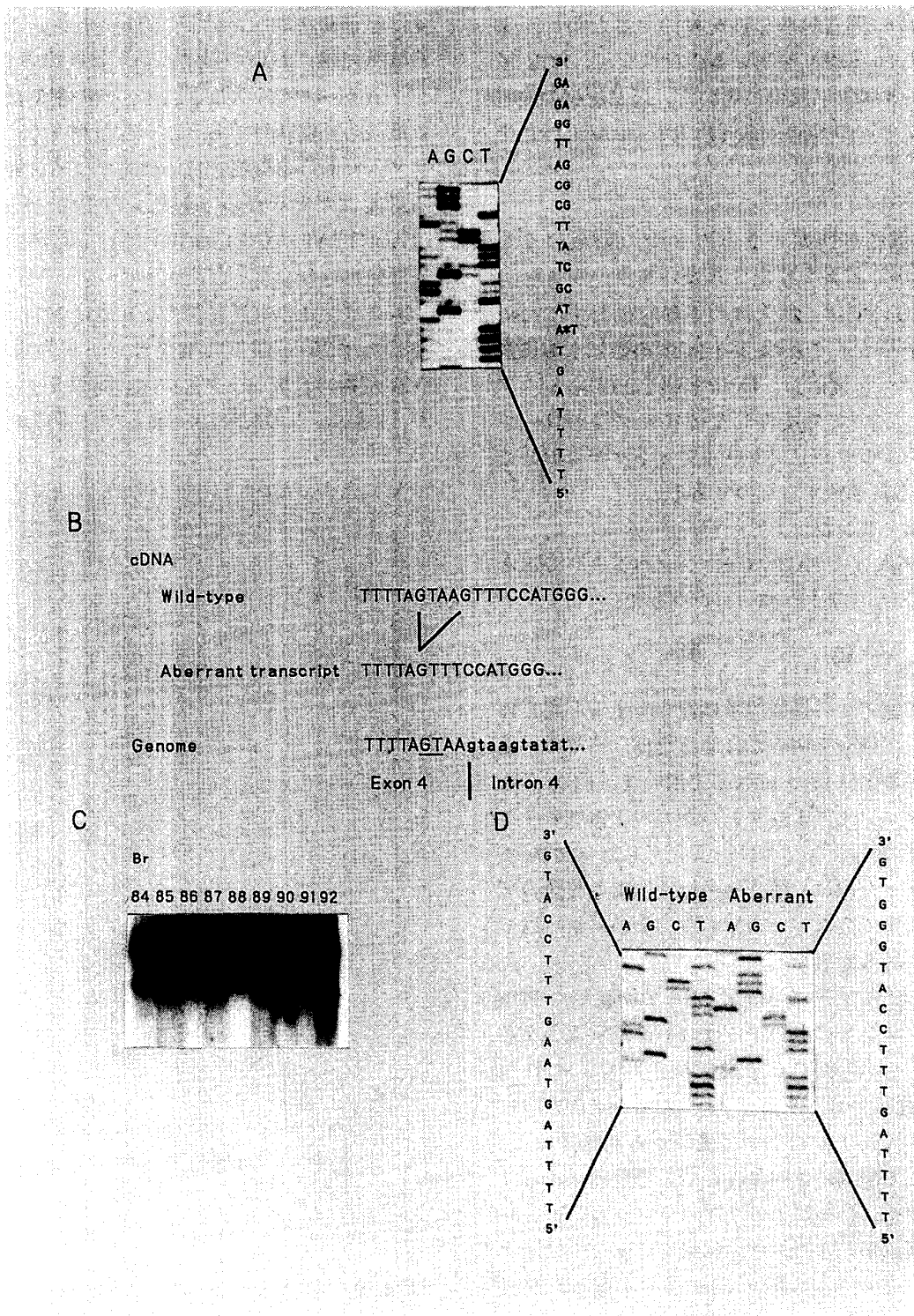
健康人44人の末梢血から採取した単核球および乳癌手術症例38例の癌部、非癌部よりグアニジンイソチアネート法によって RNA を抽出した。

### 2. RT-PCR

RNA から reverse transcriptase によって cDNA を作製し、これを用いて nested PCR を行った。すなわち Petrini らの発表した構造に従い、*MRE11* のタンパクコード領域全体をカバーするように2つに分割し、M5 と M6, M15 と M16 のプライマーによって 1st PCR を行った (Table 1)。さらにこの増幅産物を用いて 2nd PCR を行った。N 末端側では M7 と M8, M9 と M10, M11 と M12, M13 と M14 の各プライマーセットを用いた。C 末端側では M17 と M18, M19 と M20, M21 と M22, M23 と M24 の各プライマーセットを用いた。PCR はアマーシャムの *Taq* polymerase によって、添付のプロトコールに従って作成した反応液中において行った。反応条件は 94°C, 50°C, 72°C 各1分で30サイクルとした。

**Table 1.** PCR primers used in this study

Primer	Sequence
1st PCR	
M5	5'-TCGAAGAGTCCAGCAGTG-3'
M6	5'-CTCGCAGTCGTACAAGAG-3'
M15	5'-ACCCAAGCCATACAAAGC-3'
M16	5'-CTTACTACAACAACCAGG-3'
2nd PCR	
M7	5'-AACCTGGTCCCAGAGGAG-3'
M8	5'-TCAAACCTGGACAGGCCGA-3'
M9	5'-TACATACCTGCCTCGAGT-3'
M10	5'-GCCTTTTCATCTGGAATGG-3'
M11	5'-GGAAGCACAAAGATTGCG-3'
M12	5'-GCTTCTCTGGGGAAAGA-3'
M13	5'-CACAACCTGGAAGCTCAG-3'
M14	5'-GCTTCTCTGGCTGGTGAG-3'
M17	5'-ATGCTGAACGGGAACGTC-3'
M18	5'-GTACTGCTTCACCCATCC-3'
M19	5'-GCAGCTCTACTGCTAAC-3'
M20	5'-ACTCATAAGGTCATCAGC-3'
M21	5'-CAGAGGAGTCTGCTTCTG-3'
M22	5'-TGTGCTGGACCACCTTTG-3'
M23	5'-CTACCACTCAAAGACAG-3'
M24	5'-GGAGTTATGCTCAGGAA-3'



**Fig. 1.** An aberrant transcript in breast cancer. A. Direct sequencing of the PCR product from Br6. PCR was performed with primers M9 and M10. The superimposition of two cDNAs is seen from A indicated by an asterisk. B. cDNA and genomic structure of the aberrant transcript. A 4-bp deletion was seen in the cDNA from Br6. However, no genomic deletion was found, suggesting that this tumor used GT nucleotides in exon 4 marked by underlining as an additional splice donor site. C. SSCP analysis of the aberrant transcript in a series of breast cancer samples. Shifted bands were observed in Br90. D. Sequence of the aberrant transcript in Br90. A 4-bp deletion that was identical to the deletion in Br6 was observed in Br90.

### 3. 塩基配列決定

細胞における構造的多様性を検討するために、クローニングした cDNA を用いるのではなく、PCR 産物を直接シーケンス反応に用いた。塩基配列の決定にはアマーシャムの Sequenase PCR sequencing kit を用いた。

### 4. SSCP

構造的多様性が問題となった3つの領域のうち PCR では微小な差異を検出できないエクソン4とエクソン20においては、個人間の差異を検討するために SSCP を行った。これは 2nd PCR の際に末端標識したプライマーを使用し、PCR 産物を90%ホルムアミド存在下において熱変性した後10%グリセロールを含む5%の非変性ポリアクリルアミドゲルにおいて15°C 30W で電気泳動するものである。

### 5. サブクローニング

PCR 反応後直ちに TA クローニングベクターである pCR2.1 に挿入してサブクローニングした。

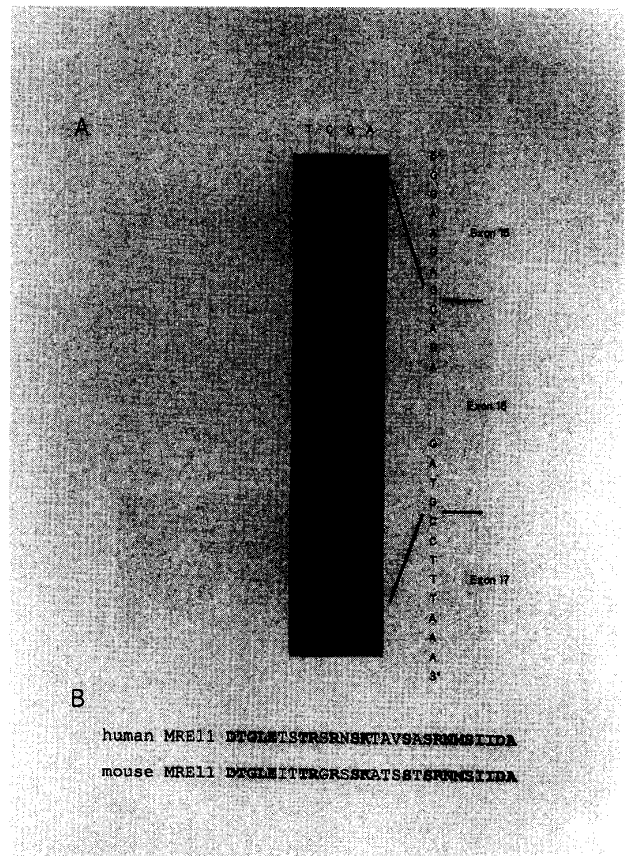
## 結 果

これまでの報告から構造的多様性を有すると考えられる *MRE11* の構造を明らかにするため、正常末梢単核球および乳癌各1例の cDNA を用いて、PCR 産物の直接シーケンスによりタンパクコード領域すべての塩基配列を決定した。クローニングした cDNA 断片を用いなかったのは、構造的多様性による複数の配列の存在を同定できないためである。その結果、以下の3つの点が明らかとなった。

乳癌症例 Br6 において M9 と M10 で増幅した PCR 産物のシーケンスにおいて Fig. 1A に示すような複数のクローンが混在する結果が得られた。これは Petrini らの配列ではヌクレオチド485番から3'方向にみられるものである。バンドの濃淡から判断すると、報告されている配列に比べ混在している配列はかなり少量であるため、目視によるサブトラクションにより混在配列の判読ができた。その結果を Fig. 1B に示すが、報告されている483番から486番の4塩基対が欠損したクローンであった。この異常がどの個人にも出現するバリエーションであるのか、それともその発現が乳癌に特異的であるのかを検討するために SSCP を行った。その結果、正常末梢単核球44例では全く異常が検出されなかったのに対して乳癌38症例では Br6 以外に Br90 において Fig. 1C に示すような異常の存在を示唆するバンドのシフトを認めた。その塩基配列を決定するため PCR 産物を TA クローニングし、6つのクローンの塩基配列を解析すると、Fig. 1D に

示すように Br6 と同様の4塩基対欠損のクローンが4つと正常クローンが2つ同定された。この症例の正常乳腺組織において異常バンドは検出されなかった。ゲノムデータベースによれば、この部位はエクソン4の最後の4塩基対であった。したがって、この異常はゲノムにおける欠損あるいはスプライス異常に起因する可能性があるため、ゲノムの PCR を M9 と M33 (TAGCTTATATGGAAGGC) で行ったが、ゲノムの変異は見出されなかった。

エクソン16の有無に関する検討は M21 と M22 で増幅した PCR によって検討した。正常末梢単核球の PCR 産物の直接シーケンスの結果を Fig. 2A に示すが、Petrini らの配列1955番と1956番の間に84塩基対



**Fig. 2.** An 84-bp insertion expressed in mononuclear cells and breast cancer. A. Direct sequencing of the PCR product from normal mononuclear cells. PCR was performed with primers M21 and M22. A splice variant lacking the 84-bp sequence was not identified, suggesting that the mRNA form with exon 16 was dominantly expressed. B. Comparison of the amino acid sequence encoded by the 84-bp insertion between human and mouse *MRE11*. Sequence of mouse *MRE11* is derived from GenBank accession No. U58987.

の挿入を認めた。これは Fig. 2B に示す28アミノ酸残基の挿入に相当し、フレームシフトは生じない。この配列は Paull らの報告した84塩基対の挿入と完全に一致した。またゲノムデータベースによると、この配列は5'側と3'側のエクソンとは連続性を有さずにイントロンにはさまれて存在しているため、一つの独立したエクソンと考えられエクソン16とするのが妥当である。PCR の直接シーケンスにおいて Petrini らの配列は全く認められなかった。他の正常単核球43例および乳癌38例におけるエクソン16の有無は、84塩基対の差が PCR で検出可能であるため、すべての症例において PCR を行った。その結果、全例においてエクソン16の存在を認め、エクソン16を含まないアイソフォームは全く認められなかった。

終止コドンの位置の検討は、正常単核球1例における M23 と M24 によって増幅された PCR 産物の直接シーケンスによって行った。Fig. 3 に示すように Petrini らの配列2213番および2214番は TT ではなく

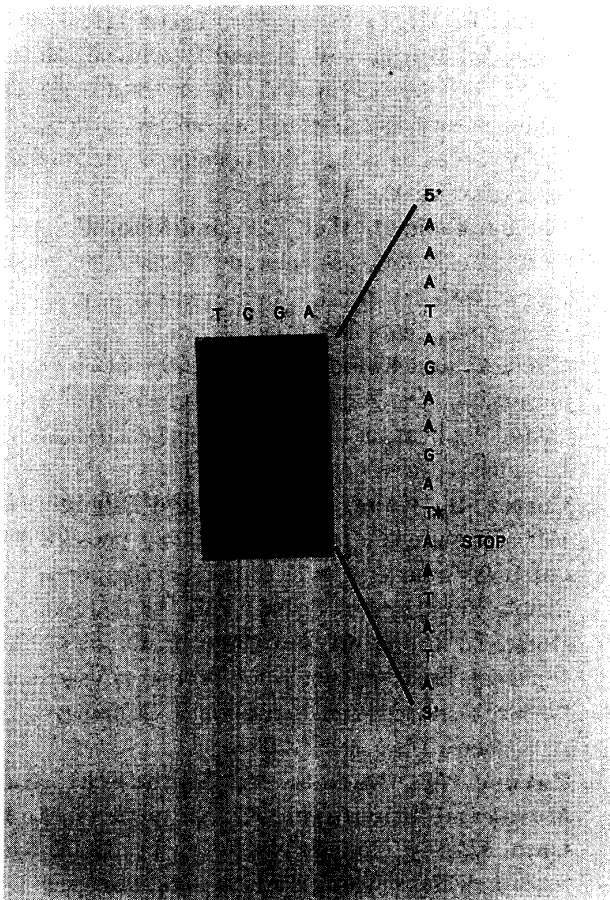
T のみであった。この1塩基対欠損の差を他の正常および乳癌全例において SSCP によって検討したが、全例において同じパターンがみられたため、TT 型は存在せずすべて T 型であると考えられた。したがって終止コドンは2213番からの TAA であると結論される。

## 考 察

乳癌2症例で発見された cDNA レベルにおけるエクソン4の4塩基対欠損は、ゲノム解析において欠損およびスプライスドナー部位に変異が認められなかったことにより、変異ではなくスプライス異常であると考えられる。ただしスプライスドナー部位より離れたイントロンにスプライスに影響を及ぼす変異が存在する可能性は否定できない。いずれにしても、この異常は当該症例の非癌部および正常単核球には発現がみられなかったことより癌に特異的な変化である可能性がある。4塩基対欠損はフレームシフトを生じるため終止コドンが3'側で出現し、この mRNA からはエクソン5以降蛋白質がコードされない。MRE11 は20のエクソンからなり、エクソン5は N 末端に近い部位に位置するために、この異常により MRE11 蛋白質は発現しないことが予想され、結果としてこれらの腫瘍における MRE11 発現量は低下していると考えられる。

MRE11 発現低下に関する機能的解析はマウス ES 細胞とニワトリ DT40 細胞におけるノックアウト実験によって報告されている。ES 細胞においては2つのアレルが破壊された細胞は採取されなかったので、1つのアレルをノックアウトした後に2つ目に対してはコンディショナルノックアウトが行われた<sup>16)</sup>。その結果、MRE11 が全く発現しない場合は細胞は生存することができず、MRE11 は細胞増殖に必須の因子であることが示された。DT40 細胞においてもコンディショナルノックアウトが行われたが、やはり MRE11 の発現が消失すると細胞は死滅することが示された<sup>18)</sup>。さらに死滅するまでの過程において染色体の切断やセントロソームの増幅が観察された。これらは放射線に対する高感受性に関与することが知られており、実際 MRE11 欠損細胞は放射線照射に対して高い感受性を示した。このような事実は MRE11 が DNA 損傷に対する修復過程に深く関与していることを示唆するものである。一方で、同様の染色体異常は遺伝性乳癌の原因となる *BRCA1* のノックアウト細胞においても観察されていることから<sup>17)</sup>、発癌過程に関わる可能性も示唆されている。

MRE11 のノックアウト実験によって、その機能は



**Fig. 3.** Identification of the termination codon of *MRE11*. An asterisk indicates the position where Petrini et al. reported that the sequence was TT but not T.

染色体の安定性に関与していることが明らかとなったため、乳癌における MRE11 の発現低下は染色体不安定性を誘導している可能性がある。ヘテロ接合性のノックアウト細胞における異常は現在まで報告がない。またホモ接合性ノックアウトは細胞致死である。したがって、MRE11 発現低下が発癌に関与するとすれば、全くの無発現ではないまでも、正常に比べヘテロ接合以下すなわち50%以下まで発現は低下しているはずである。このような観点からエクソン4に異常を有する乳癌2症例における MRE11 発現量をみると、Br90 では50%以下に低下しているのに対して Br6 における低下は極めてわずかである。したがって Br6 における MRE11 の発現低下がどの程度遺伝的不安定性に寄与しているかは疑問である。もちろん、癌組織に正常組織が混入している可能性はあるが、以上の仮説を証明するためにはまだ証拠が不十分である。

エクソン16の有無に関しては、本研究の結果から正常、癌を問わずこのエクソンを有するフォームが主であり、少なくとも単核球、乳腺においてこのエクソンを有しないアイソフォームは検出限界以下であるといえる。しかし、本研究とは別に私がヒト睾丸 cDNA ライブラリーより単離したクローンはエクソン16を有していなかった。また Petrini らのクローンは胎盤由来であることを考えると、エクソン16を有しないアイソフォームは組織特異的に発現している可能性が高い。それに対してエクソン16を有するものは睾丸からも単離されていることから広く発現しているものと考えられる。エクソン16は28アミノ酸をコードするが、荷電アミノ酸クラスターには含まれていないものの特に特徴的な構造をとっているわけではないので、機能的意義は不明である。ただし、Fig. 2B に示すようにヒトとマウスの比較では、この部位のアミノ酸一致率は71.4% (20/28) であり、MRE11 全体における88.3%という高い一致率に比べると明らかに低い。またこの部位は線虫以下の生物には存在しないため、進化に伴って出現した配列と考えられ、その機能に興味をもたれる。

終止コドンに関しては Petrini らの報告が確認できなかったこと、また1塩基対違いがエクソン内にあることから、Petrini らのクローンのみの特異的な変化であると考えられる。したがって、機能解析においては Paull らの配列に従うべきである。また Chamankhah らが Paull らの配列と同じものを MRE11B として報告しているが<sup>3)</sup>、これまでの研究から MRE11 と同じものであることが明白であり、別の遺伝子と誤解される命名は取り消すべきであると考えられる。

以上、本研究によりヒト MRE11 の構造に関して議論があった部位の問題が解決され、機能解析に重要な情報がえられた。またエクソン4におけるスプライスの異常による4塩基対の欠損は発癌との関連性を考えるうえで極めて重要な知見であると考えられる。

## 謝 辞

本稿を終えるに臨み、御指導を賜った浅原利正教授に謹んで感謝の意を表します。また本研究にあたり終始ご協力をいただいた福田敏勝先生、高橋 護先生、片岡 健先生、吉岡伸吉郎先生、原爆放射能医学研究所分子生物研究部門分子病理研究分野の教室員に深く感謝いたします。

## 参 考 文 献

1. Ajjimura, M., Leem, S. H. and Ogawa, H. 1993. Identification of new genes required for meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 133 : 51-66.
2. Carney, J. P., Maser, R. S., Olivares, H., Davis, E. M., Le Beau, M., Yates III, J. R., Hays, L., Morgan, W. F. and Petrini, J. H. J. 1998. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 93 : 477-486.
3. Chamankhah, M., Wei, Y.-F. and Xiao, W. 1998. Isolation of *hMRE11B*: failure to complement yeast *mre11* defects due to species-specific protein interactions. *Gene* 225 : 107-116.
4. Chen, C. and Kolodner, R. D. 1999. Gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* replication and recombination defective mutants. *Nature Genet.* 23 : 81-85.
5. Cortez, D., Wang, Y., Qin, J. and Elledge, S. 1999. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of Brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* 286 : 1162-1166.
6. Dong, Z., Zhong, Q. and Chen, P.-L. 1999. The Nijmegen breakage syndrome protein is essential for Mre11 phosphorylation upon DNA damage. *J. Biol. Chem.* 274 : 19513-19516.
7. Furuse, M., Nagase, Y., Tsubouchi, H., Murakami-Murofushi, K., Shibata, T. and Ohta, K. 1998. Distinct roles of two separable *in vitro* activities of yeast Mre11 in mitotic and meiotic recombination. *EMBO J.* 17 : 6412-6425.
8. Lim, D.-S., Kim, S.-T., Xu, B., Maser, R. S., Lin, J., Petrini, J. H. J. and Kastan, M. B. 2000. ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature* 404 : 613-617.

9. **Matsuura, S., Tauchi, H., Nakamura, A., Kondo, N., Sakamoto, S., Endo, S., Smeets, D., Solder, B., Belohradsky, B. H., Der Kaloustian, V. M., Oshimura, M., Isomura, M., Nakamura, Y. and Komatsu, K.** 1998. Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome. *Nature Genet.* **19** : 179–181.
10. **Moynahan, M. E., Chiu, J. W., Koller, B. H. and Jasin, M.** 1999. Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Mol. Cell* **4** : 511–518.
11. **Paull, T. T. and Gellert, M.** 1998. The 3' to 5' exonuclease activity of Mre11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell* **1** : 969–979.
12. **Petrini, J. H. J., Walsh, M. E., DiMare, C., Chen, X.-N., Korenberg, J. R. and Weaver, D. T.** 1995. Isolation and characterization of the human *MRE11* homologue. *Genomics* **29** : 80–86.
13. **Richard, G.-F., Goellner, G. M., McMurray, C. T. and Haber, J. E.** 2000. Recombination-induced CAG trinucleotide repeat expansions in yeast involve the *MRE11-RAD50-XRS2* complex. *EMBO J.* **19** : 2381–2390.
14. **Stewart, G. S., Maser, R. S., Stankovic, T., Bressan, D. A., Kaplan, M. I., Jaspers, N. G. J., Raams, A., Byrd, P. J., Petrini, J. H. J. and Taylor, A. M. R.** 1999. The DNA double-strand break repair gene *hMRE11* is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* **99** : 577–587.
15. **Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S. J. and Qin, J.** 2000. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev.* **14** : 927–939.
16. **Xiao, Y. and Weaver, D. T.** 1997. Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand-break repair Mre11 protein in murine embryonic stem cells. *Nucl. Acids Res.* **25** : 2985–2991.
17. **Xu, X., Weaver, Z., Linke, S. P., Li, C., Gotay, J., Wang, X.-W., Harris, C. C., Ried, T. and Deng, C.-X.** 1999. Centrosome amplification and a defective G2-M checkpoint induce genetic instability in Brca1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol. Cell* **3** : 389–395.
18. **Yamaguchi-Iwai, Y., Sonoda, E., Sasaki, M. S., Morrison, C., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Yamashita, Y. M., Yagi, T., Takata, M., Price, C., Kakazu, N. and Takeda, S.** 1999. Mre11 is essential for the maintenance of chromosomal DNA in vertebrate cells. *EMBO J.* **18** : 6619–6629.
19. **Zhong, Q., Chen, C.-F., Li, S., Chen, Y., Wang, C.-C., Xiao, J., Chen, P.-L., Sharp, Z. D. and Lee, W.-H.** 1999. Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science* **285** : 747–750.
20. **Zhu, X.-D., Küster, B., Mann, M., Petrini, J. H. J. and de Lange, T.** 2000. Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nature Genet.* **25** : 347–352.

Structural Variation of the DNA Double-strand Break Repair Gene *MRE11*

Ryoji OHNARI

Second Department of Surgery, Hiroshima University School of Medicine

(Director: Prof. Toshimasa ASAHARA)

*MRE11* plays a role in DNA double-strand break repair. Hypomorphic mutations have been found in individuals exhibiting ataxia-telangiectasia-like disorders. *MRE11* forms a protein complex with the breast cancer suppressor gene product BRCA1. Therefore, functional analysis of *MRE11* is important for understanding the relationship between genomic instability and tumor formation. Since possible structural variations of *MRE11* have been reported, fine structural analysis is needed. To address this issue, I sequenced the entire coding region of *MRE11* from normal mononuclear cells and breast cancer. I found an aberrant transcript lacking the 4-bp sequence in exon 4, which was exclusively expressed in breast cancers. Another variant lacking exon 16 was identified in no samples examined, suggesting that the isoform with exon 16 is dominantly expressed. Additionally, I determined the correct termination codon, which was different from the original termination codon. These findings contribute to functional studies of *MRE11*.