

Title	THE EARLY PROCESS OF GENETIC RECOMBINATION : ROLE OF T7 DNA-BINDING PROTEIN
Author(s)	Araki, Hiroyuki
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/11094/24602
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	あら 荒	き 木	ひろ 弘	ゆき 之
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	第	5581	号	
学位授与の日付	昭和57年3月25日			
学位授与の要件	理学研究科 生理学専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	遺传的組換えの初期過程の解析 — T7 DNA 結合蛋白質の関与とその役割 —			
論文審査委員	(主査) 教授	小川 英行		
	教授	松原 謙一	助教授	伊藤 建夫

論 文 内 容 の 要 旨

1 本鎖DNAに特異的に結合する蛋白質は種々の生物から分離され、核酸の代謝上重要な働きをしていると考えられている。複製や組換えの研究に単純な系として用いられるT7ファージも、同様のDNA結合蛋白質を合成する。本論文は、このT7 DNA結合蛋白質がT7ファージの遺传的組換え・複製に関与していることを示すとともに、その作用機作を明らかにしたものである。

T7ファージの組換えにはT7エキソヌクレアーゼが必須であるが、先に確立した *in vitro* 組換え系を用いた研究からその外に別の因子が組換えの中間体生成に関与していると示唆された。その因子の検索のため先ず簡便な組換え検出法、DNA—セルロース法、を開発した。これはプラスミド Col E1 DNA をセルロースに結合させたものと ³H—Col E1 DNA を混ぜ、DNA組換え反応が起こると³H—Col E1—Col E1—セルロース複合体が形成されるので、組換え反応を、反応液をろ過後フィルターに残った³Hの量で測定できるものである。この方法を用いてT7エキソヌクレアーゼと中間体生成を行なう因子をT7感染菌から精製した。精製途上のカラムでの挙動およびその分子量からT7 DNA結合蛋白質がその因子であると結論された。

さらにT7 DNA結合蛋白質が生体内においても遺传的組換えに関与していることを示すため、今まで誰も成功していないT7 DNA結合蛋白質変異株の分離を試みた。T7 DNA結合蛋白質は *in vitro* のDNA複製において大腸菌DNA結合蛋白質と互換性があるため、大腸菌DNA結合蛋白質変異株に生育できないT7ファージの中から選択した。分離した変異株のDNA塩基配列の決定から、変異株には野生型結合蛋白質(231アミノ酸)のC末から17アミノ酸を欠くようなナンセンス変異がおこっていることがわかった。変異株は、組換え能・複製能・修復能が低下していた。このことは生体内に

においても、*in vitro* 同様 T7 DNA 結合蛋白質が遺伝的組換えに関与していることを示しているとともに、複製・修復への関与も意味している。

次に T7 DNA 結合蛋白質の作用機作を明らかにするため、変異型と野生型の結合蛋白質を精製し、その活性を比較した。その結果変異型蛋白質では、アニーリング活性（相同な 1 本鎖 DNA を 2 本鎖にする）・T7 エクソヌクレアーゼの活性を促進する活性・2 本鎖 DNA の合成を促進する活性が低下していることがわかった。遺伝的組換えには特に前の 2 つの活性が重要であると思われる。又、変異型蛋白質の構造から C 末付近がその活性に重要な役割を持っていると考えられる。

論文の審査結果の要旨

普遍的組換えの初期過程、すなわち 2 つの相同な DNA 分子が対合体を形成する段階には、現在 2 つの様式のあることが知られている。1 つは、大腸菌 *recA* 蛋白質が行うもので、一方の DNA の 1 本鎖部分を他方の DNA のそれと相補的な部分に、もぐり込ませていき安定な結合 DNA 分子をつくるものであり、もう 1 つは、エクソヌクレアーゼが DNA に働き、ギャップをつくり、相補的ギャップ同志の間で対合分子をつくるというものである。後者の様式には、他の因子の関与が予想されながらこれまで研究方法の開発がなされず不明のままであった。荒木君は、DNA セルローズを利用して対合分子を高感度で検出するという画期的な方法を考案し、その研究の突破口を開いた。そして実際にこの方法を用いて T7 フェージ組換え系でエクソヌクレアーゼの他に必要因子を発見し、それが T7 DNA 結合蛋白質であることを明らかにした。また、この T7 DNA 結合蛋白質が生体中でも遺伝的組換えに関与していることを、その突然変異株を分離することによって証明した。すなわち、分離した突然変異は遺伝子 2 と遺伝子 3 の間に位置する新しい遺伝子の変異で、遺伝子 2.5 と命名し、変異の種類も DNA の塩基配列からオパール・ナンセンス変異であることを明らかにした。この変異株では野生株の DNA 結合蛋白質の約 10% を C 末端側から欠いた蛋白質をつくっており、組換え頻度が野生型の約 1/10 に低下し、実際に組換え中間体の形成も非常に悪く、又同時に、DNA 複製、DNA 修復能も低下していることを明らかにした。更に、この変異型蛋白質を分離精製し、野生型蛋白質と種々の活性を比較検討して、変異蛋白質は DNA 結合能、相同な一本鎖 DNA 同志をより合わせる能力、DNA 合成促進能などに実際に差が見られることを証明した。このことによって、T7 フェージの DNA 結合蛋白質が遺伝的組換えの初期過程に関与している事を初めて、しかも厳密に証明し、その作用機作も明らかにした事は、組換えの分子機構の研究を大きく進めることになった。従って、この論文は、理学博士の学位論文として十分に価値あるものと認められる。