The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	THE EARLY PROCESS OF GENETIC RECOMBINATION : ROLE OF T7 DNA-BINDING PROTEIN
Author(s)	Araki, Hiroyuki
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/24602
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【1】

氏名・(本籍)	荒木弘之（あらき ひろゆき）
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	**遺伝的組換えの初期過程の解析 —T7DNA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T7DNA結合蛋白質がT7ファージの遺伝的組換え・復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 El DNA をセルロースに結合させたものと ^{3}H—Col El DNAを混ぜ，DNA組換え反応が起こると^{3}H—Col El —Col El —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^{3}H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T7DNA結合蛋白質がその因子であると結論された。

さらにT7DNA結合蛋白質が生体内においても遺伝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T7DNA結合蛋白質変異株の分離を試みた。T7DNA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

おいても，in vitro 同様T7DNA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T7DNA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エキ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，エキソヌクレアアーゼがDNAに働き，ギヤップをつくり，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セルロース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ファージ組換え系でエキソヌクレアーゼの他に必要な因子を発見し，それがT7DNA結合蛋白質であることを明らかにした。また，このT7DNA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。この変異株では野性株の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，組換え頻度が野性型の約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ファージの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。