

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | 大腸菌recA蛋白質の同定, 精製とその諸活性   |
| Author(s)    | 中下, 広悦  |
| Citation     | 大阪大学, 1980, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/32637">https://hdl.handle.net/11094/32637</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

|         |                                  |         |         |                 |
|---------|----------------------------------|---------|---------|-----------------|
| 氏名・(本籍) | なか<br>中                          | した<br>下 | ひろ<br>広 | まつ<br>悦         |
| 学位の種類   | 理                                | 学       | 博       | 士               |
| 学位記番号   | 第                                | 4866    | 号       |                 |
| 学位授与の日付 | 昭和55年3月25日                       |         |         |                 |
| 学位授与の要件 | 理学研究科 生物化学専攻<br>学位規則第5条第1項該当     |         |         |                 |
| 学位論文題目  | 大腸菌 <i>recA</i> 蛋白質の同定, 精製とその諸活性 |         |         |                 |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教授                       | 倉橋      | 潔       |                 |
|         | (副査)<br>教授                       | 松原 謙一   | 教授      | 松代 愛三 助教授 小川 英行 |

### 論文内容の要旨

大腸菌 *recA* 遺伝子は多面的な形質発現をする特異な遺伝子である。*recA* 遺伝子の機能を解明する目的で *recA* 蛋白質の同定, 精製を行ないその性質を明かにした。

*recA*<sup>+</sup>およびその変異を形質導入する  $\lambda$ ファージを宿主に感染させ, ファージから合成される蛋白質のみを標識し, SDS電気泳動で分解した。 $\lambda$ *precA*<sup>+</sup>を感染した時合成され,  $\lambda$ *precA*<sub>9</sub> (アンバー) の場合には合成されない蛋白質が同定された。さらに *recA* の変異 *recA*<sub>1</sub>, *tif-1* によりこの蛋白質の等電点が変わり, しかも分子量は同一であった。従って同定された蛋白質は *recA* 遺伝子からの直接の産物であることがわかった。

*recA* 蛋白質を多量に作る系, つまり *recA*<sup>+</sup> 遺伝子を含むプラスミドを持つ菌をナリデイキシン酸処理をした。*recA* 蛋白質の所在を SDS電気泳動により確かめながら精製した。変異 *recA* 蛋白質を多量に作る工夫をした後, 同様に精製した。得られた蛋白質の分子量, 等電点, 免疫学的交叉反応を調べ *recA* 蛋白質に他ならないことを確かめた。そして *recA*<sup>+</sup> 蛋白質は次のような性質を持っていた。1) ATP存在下で構造が変化する。2) 一本鎖DNAに依存の ATPase 活性を持つ。3) ATPに依存し, DNAとの複合体を形成する。

また変異蛋白質 *lexB*<sub>30</sub> においてはATPに対する親和性が低下しており, *recA*<sub>1</sub> では欠失していることがわかった。*recA*<sub>1</sub> 蛋白質は *recA*<sup>+</sup> や *lexB*<sub>30</sub> 蛋白質と複合体を作ることによりその ATPase 活性を失わせることも明らかとなった。このことは, *recA*<sub>1</sub> をもつプラスミドを *recA*<sup>+</sup> や *lexB*<sub>30</sub> の菌に入ると, 紫外線に対し *recA*<sub>1</sub> と同じく非常に感受性となる事実とよく合う。

また *recA* 蛋白質の活性はpHにより大きな影響を受ける。アルカリ性では *recA*<sub>1</sub> 又は *recA*<sub>44</sub> と一本

鎖DNAとの複合体は検出できないにもかかわらず、酸性では野生型と同じ効率でそれが観察された。同時に  $recA_1$  蛋白では ATPase の活性も持つという事実が明らかとなった。一方 STS  $recA_1$  という  $recA_1$  蛋白を多量に作る菌では紫外線抵抗性が増していた。生体外での酸性側 pH での ATPase の回復と、生体内での紫外線抵抗性の回復はよく対応していることがわかる。

## 論文の審査結果の要旨

大腸菌の  $recA$  遺伝子は、遺伝的組換えのみならず、DNA 障害の修復や突然変異の誘発、細胞分裂にまで深く関わり合った特異な遺伝子である。

中下君は、 $rec$  遺伝子のこのような多面形質発現性はその蛋白質の性質に負うに違いないと考え、 $recA$  蛋白質の同定と精製を行い、その性質について解析した。

まず、同君は先に同定していた  $recA$  蛋白質が疑いもなく  $recA$  遺伝子直接の産物であることを、 $recA$  ミスセンス変異からつくられる蛋白質の等電点が異なることによって証明した。次に大腸菌に  $recA$  蛋白質を多量につくらせる系を開発した。それは、 $recA$  遺伝子を繋いだコリシン因子を持つ菌にナリデキシン酸を添加するもので、合成される蛋白質の実に約 30% が  $recA$  蛋白質であり、この系を用いることによって  $recA$  蛋白質を 90% 以上の純度にまで精製することが出来た。精製された  $recA$  蛋白質は分子量約 38,000 で、濃度に依存し、また ATP 存在下に、構造変化を行うことが明らかになり、更に、一本鎖 DNA に依存し、Mg イオンを要求する ATPase の活性を有することも証明された。その  $K_m$  値は  $29.4 \mu M$  であった。

同君は次に  $recA^+$  蛋白質精製と同じ方法を用い、 $recA$  変異である、 $recA_1$ 、 $lexB_{30}$ 、 $recA_4$  (温度感受性変異) の各蛋白質を精製した。 $recA_1$  と  $recA_4$  蛋白質は ATPase 活性を示さなかったが、 $lexB_{30}$  蛋白質は ATPase 活性を有しているものの、 $recA^+$  蛋白質に比して ATP に対する  $K_m$  値が約 4 倍大きいことが明らかになった。 $recA$  蛋白質がオリゴマーを形成して ATPase 活性を持つことは、 $recA^+$  蛋白質の ATPase 活性が、 $recA^+$  蛋白質の濃度に依存していること、その活性が  $recA_1$  蛋白質の添加によって抑制されることなどから示唆された。この  $recA_1$  変異蛋白質による ATPase 活性の抑制は、 $recA_1$  変異を持つプラスミドが存在すると、 $recA^+$  宿主菌の紫外線感受性が  $recA_1^-$  変異株とほぼ同じ位、非常に高くなる現象とよく対応している。生体内に於て、この ATPase 活性が  $recA$  遺伝子のどの表現型と最もよく対応するかに関し、各変異株について比較検討した結果、紫外線感受性、恐らく DNA 修復機能と密接に関係しているということが明らかにされた。

以上中下君の研究結果は、遺伝学的手法や遺伝子操作技術を効果的に用い、 $recA^+$  蛋白質を多量に生産させ、精製純化し、その諸性質を明らかにすると共に、 $recA$  変異蛋白質も同様に精製し、その比較検討によって  $recA$  蛋白質の ATPase 活性の意味づけに大きな貢献を行ったもので、理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。