

Title	Study on Structure and Function of Escherichia coli RecA Protein Through the Characterization of Its Mutant RecA Proteins -The Role of C-Terminal Region in DNA Binding-
Author(s)	立石, 智
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37076
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">大阪大学の博士論文について 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)	たて	いし	さとし
学位の種類	理	学	博 士
学位記番号	第	9051	号
学位授与の日付	平成2年3月24日		
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当		
学位論文題目	Study on Structure and Function of <i>Escherichia coli</i> RecA Protein Through the Characterization of Its Mutant RecA Proteins —The Role of C-Terminal Region in DNA Binding— (変異RecA蛋白質を用いた大腸菌RecA蛋白質の構造と機 能の研究—特にDNA結合におけるC末端領域の機能について) (主査)		
論文審査委員	教授	小川 英行	(副査)
	教授	濱口 浩三	講師 小川 智子 教授 松原 央

論文内容の要旨

(1) はじめに

大腸菌RecA蛋白質は遺伝的組換え及びSOS誘導反応に関与している。ATPとssDNAを補助因子として次の二つの反応を行なう。即ち、(1)相同な配列を持つ二本のDNA分子の間でDNA鎖の交換を行なう反応 (2)リプレッサー蛋白質の自己分解反応を促進する反応である。これら二つの反応には、RecA蛋白質がATPの存在下で単鎖DNA上に連続的に結合したpresynaptic complexの形成が重要である。私はこのpresynaptic complexが担う機能をより詳細に解析する事を試みた。

RecA蛋白質のC末端から25アミノ酸残基を欠失した蛋白質をつくるrecA5327はSOS機能を構成的に誘導する性質を持っている。変異株recA91及びrecA430はプロフェージの誘導に特異性を示す。これらの変異株から精製した変異RecA蛋白質の生化学的性質を調べ、その変異がRecA蛋白質の持つどのような活性に変化を与えるかを明らかにし、変異と活性の関連を考察して蛋白質の構造と機能の関係を知らうと試みた。

(2) RecA5327変異蛋白質の性質

RecA5327蛋白質はC末端のアミノ酸25残基を欠失した蛋白質である。リプレッサー切断反応を調べてみると、これらの反応の補助因子であるssDNAの要求性が変化していて野性型蛋白質よりも低い濃度のssDNAで充分な活性を示した。RecA5327蛋白質のDNA結合の性質を調べてみると単鎖DNAにたいする結合の親和性は野性型蛋白質に比べ約10倍高いことがわかった。又、野性型RecA蛋白質は単鎖DNAに結合した後に2本鎖DNAに結合できるようになるがRecA5327は単鎖DNA非存在下においても2本鎖DNAに結合した。一方、dsDNAの巻戻しが効率よく起こること、し

かも結合した複合体を電子顕微鏡で観察すると野性型 Rec A 蛋白質のそれとほとんど同じ形態を示していること等がわかり、この ds DNA に対する結合能と ss DNA に対する結合力の増加が SOS 誘導を構成的にする原因であると考えられた。以上の事から Rec A 蛋白質の C 末端の 25 アミノ酸残基が Rec A 蛋白質の DNA への結合を負に制御していると考えられる。

(3) Rec A 91, Rec A 430 変異蛋白質の性質

上に述べたように、これらの変異株はプロフェージの誘発に特異性を示す。この遺伝的性質は精製した変異蛋白質の性質によく反映され、誘発の特異性が Rec A 蛋白質の変化に直接に起因することが明らかになった。これら変異蛋白質の ATPase, DNA 鎖交換反応, リプレッサー切断反応に対する SSB 蛋白質の促進効果を調べることによりこれら変異蛋白質の結合の強さを知ることができる。実験の結果、これらの活性は SSB 蛋白質で阻害されたので、これらの変異蛋白質は DNA 結合にも欠陥があることがわかった。又これらの活性の阻害は反応液の pH を下げるにより除かれることが見つかった。

Rec A 91 及び Rec A 430 はそれぞれ N 末端から 229 番目及び 204 番目の Glycine が Serine に置換した蛋白質である。これらの変異を含む Rec A 蛋白質のこの領域には、いくつか同じようにプロフェージの誘発に特異性を示す変異が取られている。これらの事実は、Rec A 蛋白質のこの領域がリプレッサー蛋白質との相互作用、または認識に関与していることを示している。一方、これら変異蛋白質は ss DNA との結合も弱くなっているため、この領域は DNA との結合にも関与していると考えられる。

論文の審査結果の要旨

大腸菌 rec A 遺伝子は遺伝的組換えと SOS 機能、つまり DNA 障害に対処し修復するための機能、の誘導に関与している。その産物の Rec A 蛋白質はそれに対応して(1)相同な塩基配列を持つ二本の DNA 分子の間で DNA 鎖の交換を行う反応と(2)リプレッサー蛋白質を切断不活化する反応を行い、両反応とも一本鎖 DNA と ATP との間で作る三者複合体 (presynaptic complex) によって行なわれることがあきらかになっている。

立石君は、この反応の鍵を握る三者複合体形成を詳細に解析し、特にリプレッサー切断反応の制御について新しい知見を数々得た。立石君が成功したのは rec A 変異株を巧妙に選択した点にある。

先ず SOS 機能を構成的に誘導する rec A 5327 株より精製した Rec A 5327 蛋白質の解析を通じて、Rec A 蛋白質活性化の制御機構に C 末端 25 アミノ酸残基が重要な役割を果たしている可能性を示した。特に Rec A 蛋白質がその C 末端領域を失うと単鎖 DNA に対する親和性が約 10 倍高くなる事、二本鎖 DNA にも効率良く結合できる様になる事を示し、Rec A 蛋白質の DNA に対する結合の強弱が、SOS 機能の発現制御に直接関連あることを示した。そして Rec A 蛋白質の C 末端 25 アミノ酸残基が DNA に対する結合を負に制御している仮説を提出した。

次にプロフェージの種類により、その誘発効率が異なる rec A 91 と rec A 430 から精製した蛋白質を用いて、リプレッサーに対する認識機構について考察した。まず反応液の pH 及び大腸菌単鎖 DNA 結合蛋

白質 (SSB) が Rec A 蛋白質が前述の三者複合体をつくるのに影響を持つことを利用して、リプレッサーに対する特異性は、三者複合体の形成能の強弱とは無関係であり、むしろ変異のおこったアミノ酸の位置と性質によることを示した。

また変異の起った位置から Rec A 蛋白質のリプレッサー認識部位の位置を提案した。

以上のように、本研究は Rec A 蛋白質のリプレッサー切断の活性化制御機構並びにリプレッサー認識機構に多大の貢献をしたもので、理学博士の学位論文として十分価値のあるものと認める。