



Title	Mechanism of SOS mutagenesis of Escherichia coli : Activation of UmuD protein by proteolytic processing mediated by RecA*
Author(s)	岩崎, 博史
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37206">https://hdl.handle.net/11094/37206</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">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

【1】

氏名・(本籍)	いわ 岩	さき 崎	ひろ 博	し 史
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9 6 5 2		号
学位授与の日付	平成 3 年 3 月 26 日			
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当			
学位論文題目	Mechanism of SOS mutagenesis of <i>Escherichia coli</i> : Activation of UmuD protein by proteolytic processing mediated by RecA* (大腸菌の突然変異誘発の分子機構 : RecA* 蛋白質によるUmuD 蛋白質の活性化)			
論文審査委員	(主査) 教 授	中田 篤男		
	(副査) 教 授	吉川 寛	教 授	野村 大成

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

大腸菌の紫外線や種々の化学変異原による突然変異誘発には *umuD*, *umuC* および *recA* 遺伝子の機能が必要である。これらの遺伝子は SOS 遺伝子群に属し、通常は LexA リプレッサーにより発現が抑制されている。大腸菌を紫外線照射や化学物質で処理することによって DNA が損傷を受けたり、あるいは DNA 合成が阻害されると、菌体内にあらかじめ少量存在する RecA 蛋白質が活性化(活性型 RecA 蛋白質=RecA\*)され、LexA 蛋白質に作用して、その切断反応を促進してリプレッサー活性を不活性化し、SOS 遺伝子群の発現誘導が起こる。本研究では、このような遺伝子発現によって産生された UmuD, UmuC および RecA 蛋白質の突然変異誘発における機能的役割を明らかにしようと試み、その一過程を明らかにした。

(方法ならびに結果)

(1) RecA\* 蛋白質による UmuD 蛋白質のプロセッシングの促進

大腸菌体内の UmuD 蛋白質を同定するために抗 UmuD 血清を作成した。先ず *lacZ-umuD* 融合遺伝子を作成し、 $\beta$ -galactosidase-UmuD キメラ蛋白質を精製した。このキメラ蛋白質でウサギを免疫した血清は  $\beta$ -galactosidase と UmuD 蛋白質に特異的に反応した。この血清を用いてウエスタンブロッティング法により、UmuD 蛋白質の同定を行った。

大腸菌野生型株をマイトマイシン C で処理すると UmuD 蛋白質は 17kDa と 14kDa の 2 個の蛋白質バンドとして同定された。SOS 遺伝子を構成的に発現している *lexA* 欠損株では UmuD 蛋白質はマイトマイシン C 処理をしなければ 17kDa の、マイトマイシン C 処理をすると 14kDa の分子量として同定さ

れた。*recA* 欠失 *lexA* 欠損の二重突然変異株ではマイトマイシンC処理によっても、14kDa の UmuD 蛋白質は同定されなかった。一方、RecA<sup>\*</sup>蛋白質を構成的に産生する *recA730* 突然変異株ではマイトマイシンC処理をしなくても14kDa の UmuD 蛋白質が同定された。以上のことはマイトマイシン処理によって17kDa の UmuD 蛋白質の合成が誘導され、それが RecA<sup>\*</sup>蛋白質の作用によって14kDa 蛋白質へプロセスされるという一連の反応が起こることを示唆している。遺伝学的解析から、この過程が突然変異誘発に必須であると考えられる。

## (2) UmuD 蛋白質のプロセッシングと突然変異の誘発

LexA リプレッサーと UmuD 蛋白質との相同性、およびプロセスされた UmuD 蛋白質の大きさから、UmuD 蛋白質の切断部位は Cys24-Gly25 であると予測された。この部位に site-directed mutagenesis により突然変異を導入して UmuD 蛋白質のプロセッシングの有無と突然変異誘発能との関係を調べた。

Cys24-Gly25 を Ala24-Gly25 にかえた UmuD 蛋白質は、紫外線照射によってプロセスされ、突然変異を誘発した。Ala24-Asp25 あるいは Cys24-Asp25 にかえた UmuD 蛋白質は紫外線を照射してもプロセスされず、突然変異は誘発されなかった。以上のことは UmuD 蛋白質が切断されることが、突然変異の誘発に必須であることを示している。

## (3) 14kDa-UmuD 蛋白質が突然変異における活性型である

UmuD 蛋白質のプロセッシングの過程が突然変異誘発に必須なのか、あるいはプロセッシング後の 14kDa の UmuD 蛋白質（あるいは未同定の他方のプロセッシング産物）が突然変異誘発に必須なのかを調べるために、N末端の24個のアミノ酸を欠失した UmuD 蛋白質をコードする突然変異遺伝子 (*umuD1025*) を作成した。

*umuD1025* プラズミドをもつ *umuD* 欠損変異株では、野生株と同じ程度に突然変異の誘発が見られた。すなわち、UmuD1025 蛋白質は *umuD* 遺伝子の欠損を相補する機能をもっていた。従って、17kDa の UmuD 蛋白質がプロセッシングされてできた14kDa の UmuD 蛋白質が突然変異誘発における活性型であると結論した。

## (総括)

大腸菌では、DNA 損傷などにより *umuD* 遺伝子の発現が誘導され UmuD 蛋白質が合成される。17 kDa の UmuD 蛋白質は DNA 損傷などによって活性化された RecA<sup>\*</sup> 蛋白質によって proteolytic なプロセッシングが促進されて、14kDa 蛋白質となる。この14kDa UmuD 蛋白質が突然変異誘発の反応に働く。

## 論文審査の結果の要旨

紫外線や種々の化学変異原による突然変異の誘発は、損傷を受けた DNA が修復される過程での単なる“修復エラー”によるのではなく、生物が備えているある種の fail safety 機構によることが分かっているから久しいが、そのメカニズムは殆ど解明されていない。本研究は、大腸菌の突然変異誘発には、突然変異誘発物質によってできた活性型 RecA (RecA<sup>\*</sup>) 蛋白質が LexA リプレッサーを不活化して UmuD

蛋白質の合成を誘導するだけでなく、合成された UmuD 蛋白質がらさに RecA\* によって切断されてできた UmuD\* が必須であること、つまり DNA 損傷の修復に伴った突然変異の誘発にはこのように少なくとも二段階の過程が存在することを明らかにしたものである。このことは、大腸菌の突然変異誘発のメカニズムの解明に大きく貢献するもので、学位論文として価値あるものと認める。