

Title	Proteolytic processing of MucA protein in SOS mutagenesis : Both processed and unprocessed MucA may be active in the mutagenesis
Author(s)	柴, 肇一
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37213
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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

氏名・(本籍)	しば 柴	とし 肇	かず 一
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	9 6 6 0	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	Proteolytic processing of MucA protein in SOS mutagenesis : Both processed and unprocessed MucA may be active in the mutagenesis (大腸菌の突然変異誘発を促進する MucA タンパクの プロセッシングについて)		
論文審査委員	(主査) 教 授 中田 篤男		
	(副査) 教 授 吉川 寛 教 授 島田 和典		

論文内容の要旨

(目 的)

Ames らは、薬剤抵抗性プラスミド pKM101 をネズミチフス菌に導入して変異原性試験 (Ames test) の感度を上昇させ、それを実用化した。pKM101 は接合性で、宿主域が広く、紫外線 (UV) 照射や種々の変異原による DNA 損傷の修復や突然変異の誘発を促進する。このような機能はこのプラスミド上の *mucAB* オペロンに依存している。

大腸菌では、染色体上に突然変異誘発に関与する *umuDC* オペロンが存在している。*mucAB* と *umuDC* は機能的にも構造的にも高い相同性が見られる。

両者は SOS レギュロンに属し、LexA リプレッサーにより発現が抑制されている。UV 照射や、変異原処理をすると DNA の損傷がシグナル (単鎖 DNA の蓄積と考えられている) となって、RecA タンパクが活性化され、それ (RecA*) によって、LexA タンパクの自己切断が促進されてリプレッサー活性を失い、その結果 *umuDC*、*mucAB* などの SOS 遺伝子の発現が誘導される。*umuDC* に依存する突然変異の誘発には、その上に、UmuD タンパクが RecA* の機能によって切断され、N 端の 24 残基のアミノ酸が取り除かれた形 (UmuD*) になることが必須である。

mucAB は *umuDC* と高い相同性をもつ。しかしながら、aflatoxin-B 1 による突然変異は *mucAB* 遺伝子をもつ大腸菌では誘発されるが、*mucAB* を持たない野生型の菌 (*umuD⁺C⁺*) では誘発されない。また、UV やその他の変異原による突然変異誘発能は、*umuDC* に比べ *mucAB* の方がかなり高く (コピー数が同一の状態でも)、自然突然変異率も *mucAB* の方が *umuDC* に比べて高い。これらのことは両者の機能に質的な相違があることを示唆している。本論文では RecA* による MucA タンパクの切断反

応と突然変異誘発との関係の解析を行った。

(方法と結果)

1. 活性化された RecA (RecA^{*}) は UmuD と同様に MucA タンパクの切断を促進する。

mucAB プラスミドをもつ *recA*⁺ 株を Mitomycin C で処理した後、MucA タンパクに対する抗体を用いて western blot 法で調べたところ、MucA 抗体と反応する 13kDa のタンパクを見いだした。塩基配列から推定した MucA タンパクは 16kDa であることから、このタンパクは MucA が切断されてできた MucA^{*} であると考えられる。この切断産物は、Mitomycin C で処理しない *recA*⁺ *lexA* (Def) 株や、*recA* 欠損株では検出できなかった。以上、MucA も UmuD と同様に RecA^{*} によって切断が促進されることを明らかにした。

2. MucA は切断されなくても突然変異の誘発を促進する機能をもつ。

recA の突然変異株の 1 つである *recA430* 株では UmuD の切断は見られず、*umuDC* に依存した突然変異誘発も起こらない。一方、*mucAB* に依存した突然変異は *recA430* 株でも野生型とほぼ同等に誘発されている。*recA430* 株での Mitomycin C 処理後の MucA タンパクの切断を調べたところ、切断された断片 (13kDa のタンパク) を検出することができなかった。*recA430* 株では MucA が切断されなくても突然変異誘発が起こると考えられる。

MucA の切断部位と考えられる Ala25-Gly26 のアミノ酸配列を、部位特異的突然変異によって Thr25-Gly26 (*mucA202*), Ala25-Asp26 (*mucA203*), Cys25-Asp26 (*mucA204*) に変異させた遺伝子を作製した。これらの変異型 *mucA* と *mucB*⁺ を持つ株 (*umuC*⁻) での変異型 MucA の切断の有無と、UV による突然変異誘発能を比較した。その結果、MucA202, MucA203, MucA204 のいずれも UV 照射後の RecA^{*} による切断産物は検出されなかった。また、*mucA203* (Ala25-Asp26) と *mucA204* (Cys25-Asp26) では、突然変異誘発は殆どみられなかった。しかしながら、*mucA202* (Thr25-Gly26) では野生型と同程度の突然変異誘発が見られた。以上のことから、*mucA202* (Thr25-Gly26) の遺伝子産物は、RecA^{*} による切断がおこなわれても、MucA と同程度の突然変異誘発能をもつと考えられる。

(総括)

本研究では、突然変異誘発の過程で MucA タンパクも UmuD タンパクと同様、RecA^{*} に依存して切断されることを証明した。さらに、MucA は UmuD と異なり、N 端の 25 個のアミノ酸が除去されなくても突然変異誘発の活性があることを発見した。*mucAB* は元来ネズミチフス菌で発見された遺伝子で、多種類のバクテリア間で存在する接合性プラスミド上に存在している。従って、多くのバクテリアでの DNA 修復や突然変異の誘発に働いていると考えられる。MucA が RecA^{*} による切断反応がなくても突然変異の誘発能があるということは、*mucAB* が自然突然変異率を高めたり、*umuDC* に比べ高い突然変異誘発活性を持つことと関係していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

Ames らは、薬剤耐性プラスミド pKM101 をネズミチフス菌に導入することによって変異原性テスト (Ames test) の感度を上昇させて実用化した。この感度上昇は、pKM101 上の *mucAB* オペロンが、種々の突然変異誘発物質や紫外線照射による DNA 損傷を、修復エラー (突然変異) というリスクを伴った形で修復する機能をもつためである。

本論文は、紫外線照射などによってできた RecA* タンパク (活性 RecA タンパク) の機能によって *mucAB* オペロンが発現し、さらに、MucA タンパクの N 末端の 25 個のアミノ酸が除去され、残った C 末端領域が突然変異誘発に働くことを明らかにした。また、MucA タンパクは UmuD タンパク (大腸菌染色体にコードされた構造も機能も相同性の高いタンパク) と違って、N 末端のアミノ酸の除去が起こらなくても、突然変異誘発能を持つことも証明した。これらの知見は突然変異誘発機構の解明に重要な手がかりとなるもので、本論文は学位論文として評価できるものである。