Osaka University Knowledge Archive

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、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

【9】

氏名・(本籍)	柴(しば) 肇(とし) 一(かず)
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 9660 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*recA*430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*recA*430株でも野生型とほぼ同等に誘発されている。*recA*430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。*recA*430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（*mucA*202），Ala25-Asp26（*mucA*203），Cys25-Asp26（*mucA*204）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，*mucA*203（Ala25-Asp26）と*mucA*204（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，*mucA*202（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，*mucA*202（Thr25-Gly26）の遺伝子産物は，RecA*による切断がおこらなくても，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。