

Title	The DNA binding site of RecA protein
Author(s)	森松, 克実
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39427
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名	もり 森 まつ 松 かつ 克 み 実
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 0 9 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 1 0 月 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	The DNA binding site of RecA protein (RecA 蛋白質の DNA 結合部位)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 小 川 英 行 (副査) 教 授 品 川 日 出 夫 教 授 小 川 智 子 助 教 授 堀 井 俊 宏 教 授 倉 光 成 紀

論 文 内 容 の 要 旨

大腸菌 RecA 蛋白質は相同的換え反応において中心的役割を果たす蛋白質であり、試験管内において DNA 鎖交換反応を行う。この DNA 鎖交換反応の分子機構を理解するため、私は、RecA 蛋白質内の DNA 結合部位を形成する領域の同定を、2つの異なる実験により行った。1つは、現在までに DNA 結合部位である可能性が提案されている領域を部位特異的変異導入によって改変し、得られた変異型蛋白質を解析するものであり、もう一つは紫外線により DNA - RecA 間でクロスリンクを行い、クロスリンク部位を同定するというものである。

まず私は、RecA 蛋白質の、他の短鎖 DNA 結合蛋白質と相同性のある領域に注目し、その領域が部位特異的変異導入によって改変された 15 種類の変異型 RecA 蛋白質を作成した。変異は、3 - 24 残基からなる α - helix 内と、243 - 257 残基からなる β - sheet の周辺に導入した。生体内、及び試験管内に於ける解析から、 β - sheet 243 - 257 内の変異が RecA 蛋白質の活性を変化させることが分かった。また、精製した変異型 RecA 蛋白質の、DNA 結合能と重合能を調べた結果、 β - sheet 243 - 257 が DNA 結合部位であることが示唆された。

次に DNA 結合部位を同定する別の方法として、紫外線による DNA とのクロスリンクを行った。短鎖 DNA (p (dT) 14 及び 55mer single - stranded DNA) を RecA 蛋白質にクロスリンクさせ、どの領域がクロスリンクしたかを同定した。その結果、64 - 68 残基、178 - 183 残基、199 - 216 残基、257 - 280 残基からなる各領域内と Tyr103 がクロスリンクされた。64 - 68 残基、199 - 216 残基、257 - 280 残基の各領域内のクロスリンクは、それぞれ Tyr65, Phe203, Tyr264 で起こっていると考えられた。これらの領域は立体構造において β - sheet 243 - 257 の周辺に存在し、この β - sheet 構造が DNA 結合部位の中心をなす領域であることが強く示唆された。

Tyr103 と Tyr264 はこれまでの報告により、ヌクレオチドコファクターの結合に重要な役割をすることが示されているため、次に、Tyr103 と、Tyr264 のヌクレオチド及び DNA との相互作用を、蛍光解析及び直線二色性 (linear dichroism) により解析した。この目的のため私は、Tyr103 もしくは Tyr264 の一方がトリプトファンに変化した 2 つの修飾 RecA 蛋白質を作成し、精製した。これらの修飾 RecA 蛋白質のトリプトファン蛍光の解析から、Trp103 及び Trp264 はヌクレオチドと DNA の両方とも相互作用することが示された。Trp103 は、ADP とスタッキングしたが、

ATPとはスタッキングとは異なる相互作用をした。Trp264は、ATP、ADPのいずれともスタッキング以外の相互作用を行った。また、直線二色性の解析により、Trp103及びTrp264は、DNAの塩基とはスタッキングとは異なる相互作用をすることが示された。

結論として、変異型RecA蛋白質の生化学的解析とDNA-RecA間のクロスリンク部位の同定の両方の解析から、RecAフィラメント上の第一のDNA結合部位は立体構造において β -sheet 243-257の周辺に存在することが分かった。この β -sheetの近くに存在するTyr103もまた、DNA結合に関与しており、RecA蛋白質とDNAの親和性の調節に関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

大腸菌のRecA蛋白質は、遺伝子の組換えとDNA障害修復遺伝子群の発現制御に関与している。そのRecAの機能は、一本鎖DNAに結合してはじめて発現する。

森松君は、(1) 部位特異的な突然変異導入法 (2) 紫外線照射によるRecAのDNAとの架橋法 (3) 結合部位近傍の芳香族残基のDNA結合時の変化等を用いて、RecAのDNA結合部位を確定した。これはRecAの機能を分子レベルで明らかにする上で必須の成果であり、博士(理学)の学位論文として十分価値のあるものと認める。