

Title	Domain Organization and Functional Analysis of Thermus thermophilus MutS Protein
Author(s)	立木, 秀尚
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41558
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	立 木 秀 尚
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 14409 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Domain Organization and Functional Analysis of <i>Thermus thermophilus</i> MutS Protein (高度好熱菌 MutS 蛋白質の構造及び機能ドメインの解析)
論文審査委員	(主査) 教授 倉光 成紀 (副査) 教授 品川日出夫 教授 福山 恵一

論文内容の要旨

MutS 蛋白質は DNA のミスマッチ修復系の初期過程において、ミスマッチ塩基対の認識に働く蛋白質である。この MutS 蛋白質は、原核生物から真核生物までその相同蛋白質の存在が知られているが、その機能と構造との関係についてはほとんど明らかにされていない。私は、その蛋白質が熱や pH に安定で生化学的解析に適している高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の MutS 蛋白質を材料に用い、構造と機能の解明をめざした。

まず、MutS 蛋白質の構造ドメインを推定するために、変性実験とプロテアーゼによる限定分解実験を行った。その結果、MutS 蛋白質は大きさのほぼ等しい3つのドメインからなると推定された。そこで、その各々のドメインの機能についてより詳細に解析するために、N末端から順にA、B、Cドメインと名付けた各ドメインに相当する断片化蛋白質を大腸菌内で大量発現させる事を試みた。その結果、N末端に His-tag を融合させた形で、AおよびBドメインを、N末端に GST (glutathione-S-transferase) を融合させた形でCドメインを、それぞれ大量発現させることに成功し、それらを MutS-A、MutS-B、MutS-C と名付けた。これらの3種類の断片化蛋白質を精製し、ゲル濾過クロマトグラフィーで分子量の推定を行ったところ、MutS-B が溶液中で二量体として存在していた。そして、MutS-C だけが ATPase 活性を示した。次に、ゲルシフト法による DNA 結合実験を行ったところ、MutS-B がミスマッチに非特異的に二本鎖 DNA に結合した。また、MutS-C はミスマッチ特異的に二本鎖 DNA に結合した。これらの結果から、Bドメインは MutS 蛋白質の会合体形成に関与すること、および、ミスマッチ非特異的な二本鎖 DNA 結合能を持つことが推測された。さらに、Cドメインが MutS 蛋白質の ATPase 活性を担っており、ミスマッチ特異的な二本鎖 DNA 結合能を持つことが明らかになった。

MutS 蛋白質と MutS-C のミスマッチ認識機構を明らかにするために、表面プラズモン共鳴を利用して DNA 結合過程の解析を行った。その結果、MutS 蛋白質と MutS-C のいずれも、結合速度定数 (k_{on}) は基質 DNA のミスマッチの有無に関わらずほぼ同じであった。解離速度定数 (k_{off}) は、ミスマッチ DNA の方が相補鎖 DNA よりもわずかに低い値を示した。また、MutS-C の結合速度定数は、MutS 蛋白質の約4分の1という小さい値を示し、解離速度定数は約2倍大きい値を示した。これらの結果から、MutS 蛋白質の DNA への結合は、CドメインだけでなくBドメインも必要であることが示唆された。以上のことから、MutS 蛋白質はBドメインの働きによってより速く二本鎖 DNA へ結合し、その後、Cドメインの機能によって DNA 上のミスマッチ部分の認識が行われるというモデルが考えられる。

論文審査の結果の要旨

MutS 蛋白質は、DNA の複製過程などで生じるミスマッチ DNA 部分を認識し、その後続くミスマッチ DNA 修復の初期過程を担う。高度好熱菌の MutS 蛋白質を利用して、この蛋白質が A, B, C の少なくとも 3 つのドメインからなることを、塩酸グアニジンによる変性とプロテアーゼによる限定分解とから明らかにした。その結果を基に、遺伝子操作法を利用してこれらのドメインを調製した後、それらの機能解析を行い、C ドメインがミスマッチ DNA 結合部位と ATPase 活性部位とを持つこと、また、B ドメインが蛋白質間会合部位と非特異的 DNA 結合部位とを持つことを明らかにした。本研究によって得られた知見は、ドメイン単位で MutS 蛋白質の機能を理解するうえで重要であり、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。