

Title	The RadA protein from a hyperthermophilic archaeon <i>Pyrobaculum islandicum</i>
Author(s)	Maria, Spies
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41901">https://hdl.handle.net/11094/41901</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	マリア Maria	スピース Spies
博士の専攻分野の名称	博士(理学)	
学位記番号	第 15181 号	
学位授与年月日	平成12年3月24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	The RadA protein from a hyperthermophilic archaeon <i>Pyrobaculum islandicum</i> . (超高温性古細菌 <i>Pyrobaculum islandicum</i> の RadA 蛋白質)	
論文審査委員	(主査) 教授 倉光 成紀	
	(副査) 教授 徳永 史生    教授 金澤 浩	

## 論文内容の要旨

DNAの相長的組換えは、ほとんどすべての生物にみられる基本的な生命現象であり、中でも RecA およびその相同蛋白質は、遺传的組換えの中心的な役割を果たしている。近年、RecA/RAD51のホモログ、すなわち RadA 蛋白質が原核生物から真核生物、さらに古細菌 (Archaea) にも発見され、DNA 相長的組換えのパラダイムは全生物界に広がってきた。しかし、原核・真核生物と比べると、古細菌の相長的組換えや組換え修復のメカニズムについてはほとんど研究されていない。そこで、*radA* 遺伝子を超好熱性古細菌 *Pyrobaculum islandicum* からクローニングし、その RadA 蛋白質の性質および活性について調べた。

他種の RadA の配列にもとづいて作製したプローブを用いて、*P. islandicum* ゲノムバンクから *radA* 遺伝子をクローニングした。コードされる蛋白質 P. is. RadA は、原核生物の RecA よりも真核生物の RAD51 や DMC1 とより高い相同性を示した。この遺伝子を大腸菌で大量発現させ、発現産物を精製した。

遠紫外部での円二色性 (CD) スペクトルを用いて P. is. RadA の構造安定性を調べたところ、その二次構造は温度は 87°C まで、変性剤に対しては 4.5M 塩酸グアニジンまで安定であった。一方、近紫外部の CD スペクトルと蛍光スペクトルでは、75°C 付近に構造転移を示す変化が見られた。これらのことから、P. is. RadA は 95°C での不可逆な二次構造崩壊の前に、75°C 付近で Trp-280 周辺の環境変化を伴う局所的な構造転移を起こすことが示唆された。

また、P. is. RadA は、RecA/RAD51 と同様に、ATP 加水分解、一本鎖 DNA 結合、さらに相長的な DNA 間でのストランド交換反応の活性を示す。興味深いことに、P. is. RadA の DNA 依存性 ATPase 活性の温度依存性を調べたところ、その Arrhenius プロットは 75°C を境として二相性を示し、75°C 以下での活性化エネルギーは、75°C 以上のときより高いという結果が得られた。さらに、一本鎖 DNA 結合能や DNA 鎖交換反応も、75°C を境に顕著な増大を見せた。

大腸菌 RecA の結晶構造に基づく P. is. RadA のモデル構造では、Trp-280 を含む領域は DNA 結合モチーフや ATPase の活性部位に近接していることから、蛍光スペクトルなどに見られる構造転移は、DNA 結合部位の構造変化を反映している可能性がある。*P. islandicum* の最適生育温度が 100°C であることと考えあわせると、P. is. RadA は 75°C 以上で DNA 結合部位を含む領域のコンフォメーション変化を起こすことによって、生育温度でより高い触媒効率を発揮しているのではないかと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

約100℃で生育する超好熱性古細菌 *Pyrobaculum islandicum* から DNA の相同的組換えに関与する RadA 蛋白質の遺伝子をクローニングするとともに、RadA 蛋白質を量産化し、精製蛋白質の種々の活性を測定した。そして、75℃で活性部位近傍の局所的な構造転移が起こることなど、超好熱菌酵素の特質を明らかにした。よって、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。