

Effect of Cobaltous Chloride on the Repair of UV-induced DNA Damage

Kug-Chan Kim, Yung-Jin Kim*, Kang-Suk Lee

Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon 305-353

*Department of Biology, Chungnam National University, Taejon 305-764

(Received 25 February 1995; Accepted 15 June 1995)

UV에 의해 손상된 DNA 회복에 미치는 cobaltous chloride의 효과

김국찬·김영진*·이강석
한국원자력연구소, 충남대학교 생물학과*

Abstract - To develop methods to reduce radiation risk and apply such knowledge to improvement of radiation protection, the effects of cobaltous chloride known as bioantimutagen on the function of *E. coli* RecA protein involved in the repair of DNA damage were examined. The results demonstrated two distinct effects of cobaltous chloride on the RecA protein function necessary for the strand exchange reaction. Cobaltous chloride enhanced the ability of RecA protein to displace SSB protein from single-stranded DNA and the duplex DNA-dependent ATPase activity. RecA protein was preferentially bound with UV-irradiated supercoiled DNA as compared with nonirradiated DNA. The binding of RecA protein to UV-irradiated supercoiled DNA was enhanced in a dose-dependent manner. It is likely that studies on the factors affecting repair efficiency and the DNA repair proteins may provide information on the repair of ionizing radiation-induced DNA damage and the mechanism for DNA radioprotection.

Key words : Bioantimutagen, Cobaltous Chloride, DNA Repair, RecA Protein, Radioprotective Effect

요약 - 본 연구에서는 유전자 손상회복에 관여하는 단백질을 이용하여 돌연변이 생성을 억제시키는 물질로서 알려진 cobaltous chloride가 유전자 손상회복에 미치는 영향을 연구하므로써 방사선으로 인한 손상방지 및 방사선 방어효과에 대한 적용가능성을 평가하였다.

Cobaltous chloride가 RecA 단백질의 기능에 미치는 영향을 조사한 결과 RecA 단백질에 의한 DNA strand exchange 반응에 있어 cobaltous chloride 처리로 RecA 단백질이 ssDNA로부터 SSB 단백질과 더 효과적으로 경쟁함으로써 안정된 RecA-ssDNA complex의 형성을 유도하고, 증가된 ATPase 활성에 의한 ATP 가수분해로 손상된 DNA의 회복이 촉진될 수 있다는 사실을 입증 해주었다. 또한 RecA 단백질은 UV에 의해 손상된 supercoiled DNA에 더 효과적으로 결합 됨이 관찰되었으며 UV 선량과도 상관관계가 있음을 확인하였다. 따라서 이와같은 연구결과들은 방사선으로 인한 유전적인 손상방지 및 방사선 방어효과에 관한 연구에 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

Key words : 항돌연변이원, 코발트클로라이드, DNA 회복, RecA 단백질, 방사선 방어효과

서 론

돌연변이 및 암발생의 원인이 되고있는 많은 종류의 돌연변이 유발물질에 관한 연구는 물론, 이들 물질에 의한 돌연변이 생성을 억제시키는 항돌연변이원 (antimutagen) 들 또한 우리 주변에 널리 분포되어 있음이 확인되었다[1, 2]. DNA 손상에 대한 방어기전으로서 항돌연변이원에 관한 연구는 돌연변이 생성에 관한 작용기전을 이해할 수 있게 할 뿐 아니라, 유전적 손상을 일으키는 물질에 의한 질병과 함께 암을 유발 하는 돌연변이 생성 억제에 관한 유용한 정보를 얻을 수 있어서 주요 관심의 대상이 되고있다.

Antimutagen은 작용기전에 따라 두종류로 나눌 수 있다. 즉, DNA 손상이 일어나기 전에 세포의 외부에서 돌연변이원 (mutagen)을 화학적 또는 생화학적으로 변형시키는 desmutagen과 세포 내부에서 DNA 복제 및 회복과정 등에 작용하여 돌연변이 생성을 감소시키는 bioantimutagen으로 구분할 수 있다. 현재 자연계에 존재하는 bioantimutagen의 예로서 cinnamaldehyde, vanillin, tannic acid, epigallocatechin gallate, cobaltous chloride 등이 알려져 있으며 [3, 4], 이들 가운데 cobaltous chloride는 자연발생적인 돌연변이의 유발을 억제하였을 뿐만 아니라 자외선, 감마선, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), frameshift mutagen (Trp-P-1)이 처리된 세균에 돌연변이 발생빈도를 크게 감소시키는 것으로 확인되었다 [2-6]. 이와 같이 미생물에서 DNA 회복에 영향을 미치는 돌연변이 억제효과 외에도 생쥐의 경우 Co-60 조사 (7.7Gy) 후 cobaltous chloride 처리로 치사율이 크게 감소되는 것으로 나타나 방사선 방어효과에도 효과적임이 밝혀 졌으나[7], 현재까지 그 작용기전에 관하여는 자세히 규명되지 않은 상태에 있다. 지금까지의 연구결과들은 cobaltous chloride가 *E. coli* RecA 단백질의 보조인자로 작용하여 recombination repair를 촉진시킬 가능성을 제시하고 있으므로, RecA 단백질의 기능과 cobaltous chloride의 상호작용에 관한 연구는 cobaltous chloride의 bioantimutagen으로서의 작용기전을 이해하는데 있어 유용한 정보를 제공해줄 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 RecA 단백질에 의해 일어나는 DNA repair system을 모델로 하여 cobaltous chloride가 RecA 단백질의 기능에 미치는 생화학적 특성을 규명함으로써 방사선으로 인한 유전적인 손상방지 및 방사선

방어효과에 대한 적용가능성을 평가하였다.

재료 및 방법

1. DNA

E. coli JM109를 bacteriophage M13mp19의 숙주로 사용하여 Sambrook 등 [8]의 방법에 따라 M13mp19 single-stranded DNA (ssDNA)와 M13mp 19 replicative form (RF) DNA를 분리하였으며, Salmon sperm DNA는 Wako Pure Chemical사 제품을 사용하였다. RecA 단백질과 손상된 DNA와의 결합에 미치는 영향을 분석하기 위한 DNA 기질로는 double-stranded DNA (dsDNA)를 mercury gemicidal UV lamp로 $1\text{J}/\text{m}^2/\text{s}$ 의 선량율로 조사 ($900\text{J}/\text{m}^2$ 또는 $1,800\text{J}/\text{m}^2$) 시킨 후 사용하였다. ssDNA와 dsDNA의 농도는 260nm에서 각각 $8784, 6500\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 의 흡광계수를 이용하여 결정하였다.

2. RecA 단백질의 정제

recA 유전자를 가진 plasmid들의 multicopy에 의한 증폭으로 다량의 RecA 단백질의 생성을 유도할 수 있는 *E. coli* KM4104/pDR1453을 배양하여 세포를 용해시키고 10% polymin P, ammonium sulfate(0.28g/ml)로 단백질을 침전시킨 다음 hydroxyapatite chromatography, singlestranded DNA-cellulose chromatography 과정으로 RecA 단백질을 정제하였다[9].

3. ATPase 활성도 측정

ATPase 활성도 측정은 2반복으로 3회에 걸쳐 실험하였으며, 반응용액(20mM Tris-HCl [pH7.5], 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol, 1mM ATP, 2mM phosphoenolpyruvate, 1mM NADH) 0.5ml에 pyruvate kinase와 lactate dehydrogenase를 각각 12.5 unit 씩 첨가하여 37°C (또는 20°C)에서 1~2 분간 처리한 다음 이 용액에 90μM dsDNA (또는 20μM ssDNA), 2μM RecA를 첨가 후 380nm에서 NADH에 대한 시간에 따른 흡광도 변화를 측정하므로써 ATPase 활성도를 조사하였다[10, 11].

4. DNA-binding 분석

RecA 단백질과 손상된 DNA와의 결합 분석은 3반복으로 3회에 걸쳐 실험하였으며, 반응용액 (20mM Tris-HCl [pH7.5], 10mM MgCl₂, 1mM

dithiothreitol, 1mM EDTA, 30mM NaCl, 1mM ATP)에 duplex DNA와 RecA 단백질을 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후 TBE (89mM Tris-borate, 8mM boric acid, 8mM EDTA) 완충 용액을 사용하여 0.8% agarose gel electrophoresis로 gel retardation assay를 수행하였다[12].

결과 및 고찰

1. RecA 단백질의 정제

E. coli RecA 단백질은 353개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 분자량은 37,842 dalton으로서 re-

combination, repair, mutagenesis, 세포분열 등과 같은 주요 세포기능에 관여하는 것으로 알려졌다. 본 연구에서는 cobaltous chloride가 *E. coli* RecA 단백질의 기능에 미치는 생화학적 특성을 규명하기 위해 다량의 RecA 단백질의 생성을 유도할 수 있는 *E. coli* strain KM4104 /pDR1453를 사용하여 RecA 단백질을 정제한 결과는 다음과 같다. 그림 1은 ammonium sulfate로 침전된 시료를 hydroxyapatite column에 흡착시켜 염농도구배 (salt gradient)로 chromatography를 실시한 결과이다. 이 과정에서 얻어진 첫번째 분획은 DNA-independent ATPase 활성을 지니는 물질이 다소 포함되어 있기 때문에 두번째 분획만을 채택하였다. 최종적으로 single stranded DNA-cellulose chromatography를 이용하여 RecA 단백질을 용출시킨 결과 1mM ATP에 의해 DNA-cellulose로부터 RecA 단백질이 특이적으로 용출됨이 확인되었다(그림 2). 또한 각 과정 별로 분리 정제한 RecA 단백질 분획을 SDS-PAGE 방법을 이용하여 확인한 결과 최종 단계에서 RecA 단백질에 해당하는 단일밴드 (38kDa)를 보여주고 있어 RecA 단백질이 순수 분

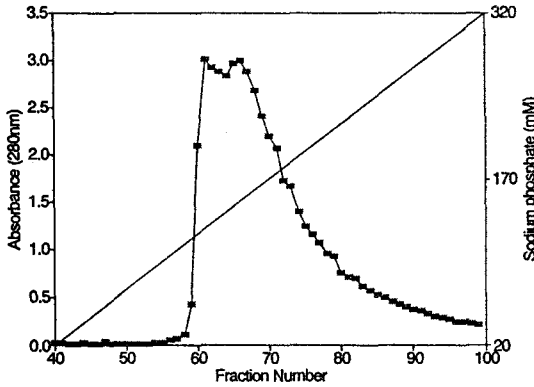


Fig. 1. An elution profile of *E. coli* RecA protein from hydroxyapatite column chromatography.

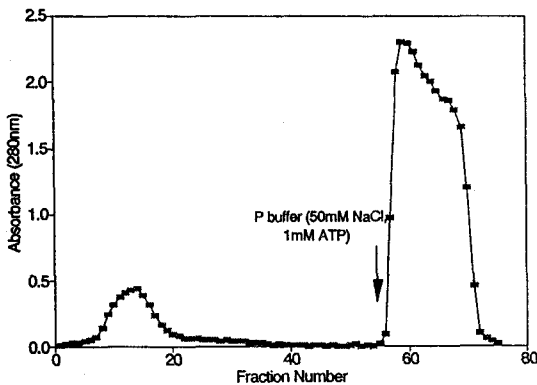


Fig. 2. DNA-cellulose chromatographic separation of *E. coli* RecA protein.

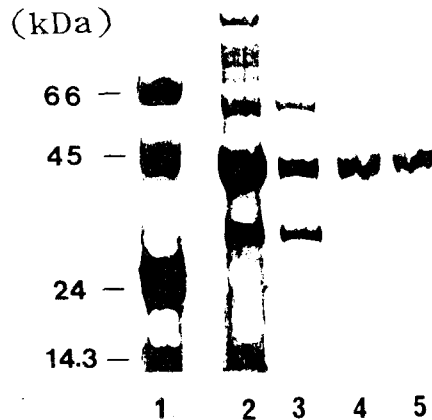


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of RecA protein fractions. Lane 1 :standard molecular markers, from top to bottom, Bovine albumin (66kDa), Egg albumin (45kDa), Trypsinogen(24kDa), Lysozyme (14.3 kDa); Lane 2: polymin P-ammonium sulfate fraction II; Lane 3: fraction at the first peak from hydroxyapatite column; Lane 4: pooled fractions from the second peak from hydroxyapatite column; Lane 5 : fraction from the DNA-cellulose column.

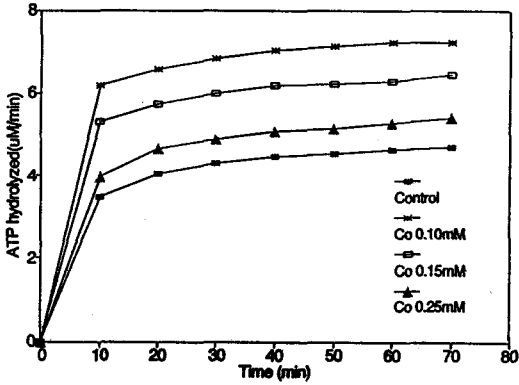


Fig. 4. Effects of cobaltous chloride concentration on salmon sperm duplex DNA-dependent ATPase activity of RecA protein at 20°C.

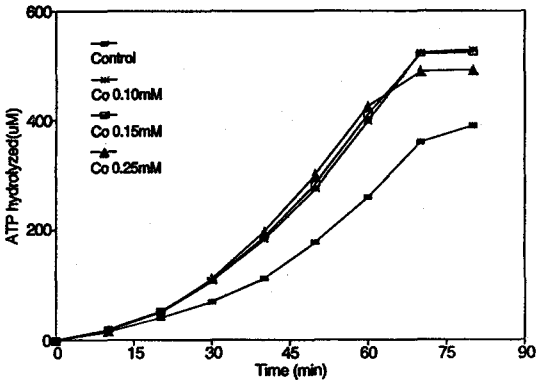


Fig. 5. Effects of cobaltous chloride concentration on M13mp19 RF DNA-dependent ATPase activity of RecA protein at 37°C. 리 정제 되었음을 확인할 수 있었다(그림 3).

2. Cobaltous chloride가 RecA 단백질의 기능에 미치는 영향

RecA 단백질이 지니는 주요 기능 중 DNA-dependent ATPase는 genetic recombination 또는 DNA repair 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[13]. RecA 단백질은 손상된 DNA와 우선적으로 결합하여 nucleoprotein filament를 형성한다. 이와같은 RecA의 presynaptic complex 형성은 LexA repressor 단백질의 절단을 위해 필요

할 뿐 아니라, ATP 가수분해를 하기위한 활성화 상태로서 strand exchange 반응에 중요한 역할을 하고 있다. ssDNA-dependent ATPase 활성은 RecA 단백질이 ssDNA로 부터 single-stranded binding protein (SSB)을 치환 할 수 있는 능력 및 LexA 단백질을 절단하는 능력과 비례하는 것으로 알려져 RecA 단백질이 presynaptic complex의 형성능력을 측정하는 좋은 방법이 될 수 있다[14]. 또한 dsDNA-dependent ATPase 활성은 RecA 단백질에 의한 strand exchange 반응때 생성되는 최종

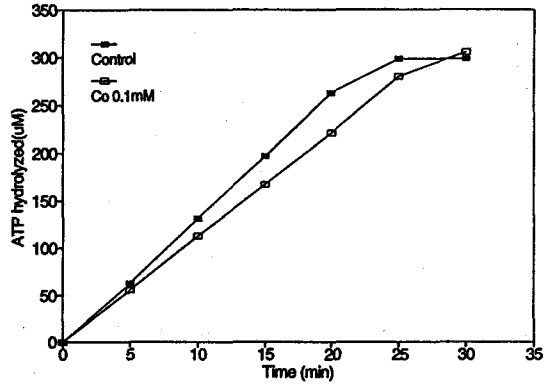


Fig. 6. Effect of cobaltous chloride on fragmented single strand salmon DNA-dependent ATPase activity of RecA protein at 20°C.

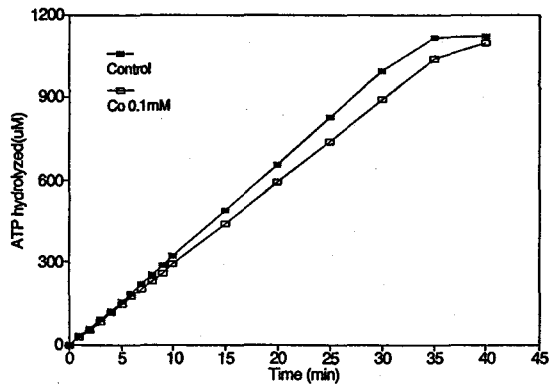


Fig. 7. Effect of cobaltous chloride on M13mp19 ssDNA-dependent ATPase activity of RecA protein at 37°C.

산물 (nicked circular duplex DNA)과 비례관계를 보이는 것으로 밝혀졌다[15, 16]. 따라서 본 연구에서는 cobaltous chloride의 처리로 유전자 손상 회복에 관여하고 있는 RecA 단백질의 DNA-dependent ATPase 활성에 미치는 영향 및 SSB 단백질의 치환능력에 관하여 조사하였다. Cobaltous chloride 농도에 따른 RecA 단백질의 dsDNA-dependent ATPase 활성을 조사한 결과 그림 4, 5에서 보는 바와 같이 DNA종류와 처리된 온도에 상관없이 0.1mM의 cobaltous chloride에서 가장 촉진되는 것으로 나타났다.

Kada 등[3]은 *E. coli* B/r WP2의 경우 자외선이나 감마선 조사 (200Gy) 후 cobaltous chloride 처리 (20 μ g/ml)로 돌연변이가 크게 억제됨을 보고하였고, Izumo 등 [7]은 생쥐의 경우 Co-60 조사 (7.7Gy) 후 cobaltous chloride를 처리 (20mg/kg-body weight) 한 결과 처리하지 않은 생쥐에 비해 치사율이 크게 감소함을 보고한 바 있어 본 실험에서 처리한 농도와 잘 일치하고 있다. 이같은 결과는 dsDNA-dependent ATP 가수분해가 일어나기 위해 요구되는 dsDNA의 구조적인 변이 즉, ATP, RecA, 부분적으로 변성된 dsDNA와의 open ternary complex를 형성하는 과정인 lag time이 cobaltous chloride 처리로 감소되기 때문인 것으로 생각된다.

반면 그림 6, 7에서 보는 바와 같이 SSB 단백질이 존재하지 않을 경우 cobaltous chloride 처리에 의해 RecA 단백질의 ssDNA-dependent ATPase 활성은 촉진되지 않았으며, DNA 종류나 처리온도에 따른 차이 또한 보이지 않았다. 따라서 cobaltous chloride 처리로 RecA 단백질이 ssDNA에 결합된 SSB 단백질의 치환 (displacement)에 어떤 영향을 미치는가를 조사하기 위하여 ssDNA에 RecA 단백질을 첨가하기 이전에 SSB 단백질을 처리한 실험조건에서 RecA 단백질의 ssDNA-dependent ATPase 활성을 측정하였다. 그 결과 그림 8에서 보는 바와 같이 0.1mM의 cobaltous chloride를 처리로 RecA 단백질의 ssDNA-dependent ATPase 활성이 촉진되는 것으로 나타났다. SSB 단백질이 치환되는 초기 과정에 ATP 가수분해가 거의 일어나지않는 lag time이 관찰되었다. RecA 단백질에 의한 SSB 단백질의 치환속도는 이 lag time의 길이와 반비례하는 것으로 알려져 [14] lag time의 길이를 측정한 결과 cobaltous chloride를 처리하지 않은 경우 (1,050초)에 비해 cobaltous chloride를 처리하였을 경우 (840초) 감

소되는 것으로 보아 cobaltous chloride 처리로 SSB 단백질이 ssDNA로부터 더 빠른 속도로 해리됨을 알 수 있었다(표 1). 또한 cobaltous chloride 처리로 lag time 이후에 일어나는 ATP 가수분해도 촉진되는 것으로 보아 RecA 단백질이 ssDNA에 더 많이 결합될 수 있음을 보여 주었다.

RecA-ssDNA complex의 형성능력과 안정성은 RecA 단백질에 의한 strand exchange 반응 증진과 밀접한 관련이 있기 때문에 cobaltous chloride 처리로 ssDNA로부터 SSB 단백질 (ssDNA 내에 형성된 2차구조를 제거)의 해리를 촉진시키고 이 부위에 RecA 단백질이 ssDNA를 완전히 포화되게 함으로서 recombination repair를 촉진시킬 가능성을 시사하고 있다.

3. RecA 단백질과 손상된 DNA와의 결합

RecA 단백질은 손상된 DNA repair 과정에 관여하기 때문에 손상된 dsDNA와 RecA 단백질의 상

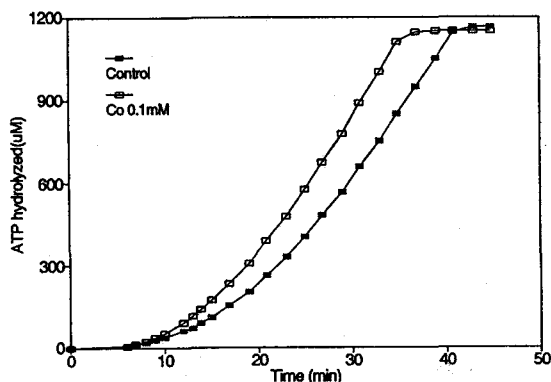


Fig. 8. Effect of cobaltous chloride on M13mp19 ssDNA-dependent ATPase activity of RecA protein in the presence of SSB protein.

Table 1. Effect of cobaltous chloride on SSB displacement by RecA protein

Concentration of CoCl ₂ (mM)	Lag time (sec)	Rate of ATP hydrolysis (μM ATP /min)
0	1,050	22
0.1	840	27

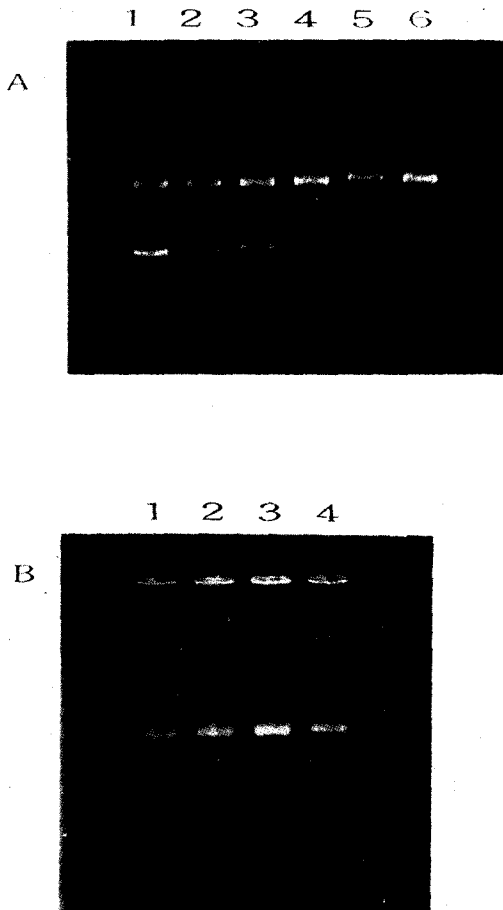


Fig. 9. Binding of RecA protein to supercoiled DNA. (A) Supercoiled M13mp19 DNA ($35\mu\text{M}$) was incubated with RecA protein. The DNA was either non-irradiated or irradiated with $900\text{J}/\text{m}^2$. The binding of RecA protein to DNA was measured by the RecA-mediated alteration in mobility of M13mp19 DNA during agarose gel electrophoresis. Lane 1: RecA ($3.5\mu\text{M}$); Lane 2: UV, no RecA; Lane 3: UV, RecA ($3.5\mu\text{M}$); Lane 4: UV, RecA ($7\mu\text{M}$); Lane 5: UV, RecA ($14\mu\text{M}$); Lane 6: UV, RecA ($14\mu\text{M}$), CoCl_2 (0.1mM). (B) Supercoiled M13mp19 DNA ($70\mu\text{M}$) was incubated with RecA protein. The DNA was either non-irradiated or irradiated with $1,800\text{J}/\text{m}^2$. Lane 1: no RecA; Lane 2: UV, no RecA; Lane 3: RecA ($7\mu\text{M}$); Lane 4: UV, RecA ($7\mu\text{M}$).

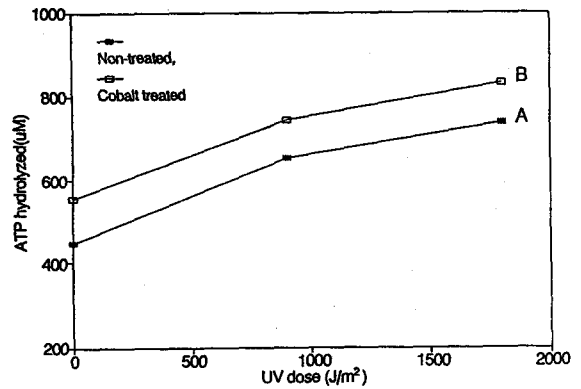


Fig. 10. Enhancement of the ATPase activity of RecA protein by UV irradiation to supercoiled DNA. The ATPase activity of RecA was measured in a reaction mixture containing RecA ($2.5\mu\text{M}$) and M13mp19 RF DNA ($15\mu\text{M}$), using either non-irradiated or UV-irradiated DNAs. Reactions were performed for 60 min at 37°C in reaction buffer containing no cobaltous chloride (A) or 0.125mM cobaltous chloride (B).

Table 2. Effects of DNA substrates on the RecA ATPase activity by UV irradiation

Type of DNA	Rate of ATP hydrolysis ($\mu\text{M}/\text{min}$)		
	UV irradiation (J/m^2)		
	0	900	1,800
Circular ssDNA	22.7	21.7	20.1
Linear dsDNA	10.2	10.6	14.6
Supercoiled DNA	14.8	21.7	24.5

호작용에 미치는 영향을 조사하기 위하여 자외선에 피폭된 supercoiled DNA와 nicked circular dsDNA를 RecA 농도를 달리하여 반응시킨 후 gel retardation assay를 수행한 결과 그림 9A에서 보는 바와같이 RecA 농도가 $14\mu\text{M}$ (RecA와 supercoiled DNA의 molar ratio가 1:5) 일때 agarose gel 상에서 retardation 효과를 보이기 시작했으나, nicked circular DNA의 경우는 $21\mu\text{M}$ RecA 농도

에서도 gel retardation 효과를 보이지 않았다. 또한 그림 9B 에서 보는 바와 같이 RecA 단백질은 자외선에 피폭되지 않은 DNA에서 보다 자외선에 피폭된 supercoiled DNA에서 더 효과적으로 결합됨이 관찰되었다. 따라서 RecA와 dsDNA와의 결합 및 자외선 손상에 의해 생성된 unwinding은 negatively supercoiled DNA에 의해 더 유리하게 일어남을 알 수 있었다. 위의 결과를 확인하기 위하여 RecA 단백질과 dsDNA 와의 결합에 대한 확인 방법으로 ATPase 활성을 조사한 결과 그림 10에서 보는 바와 같이 자외선에 의해 손상된 supercoiled DNA와 RecA와의 결합은 자외선에 피폭되지 않은 DNA와의 결합에 비해 dsDNA-dependent ATPase 활성이 증가되는 것으로 나타났으며, 또한 자외선 선량과도 상관관계가 있음을 확인하였다. 이 경우 자외선에 피폭된 super-coiled DNA에 의해 RecA ATPase 활성은 증가되었으나, ssDNA 또는 linear dsDNA의 자외선 손상으로 인한 RecA ATPase 활성의 증가효과는 관찰되지 않았다 (표 2 참조). 따라서 pyrimidine dimer나 (6-4) photo-product와 같은 DNA 손상 (lesion) 자체보다는 이들 adduct 형성에 의해 초래된 supercoiled DNA의 구조변형이 RecA 단백질과의 결합에 더 큰 영향을 미치는 것으로 생각된다. 이와같은 연구결과는 cobaltous chloride가 RecA 단백질에 의한 DNA strand exchange 반응과정에 손상된 DNA와 RecA 단백질이 안정된 complex의 형성을 유도하고, 증가된 dsDNA-dependent ATPase에 의한 ATP 가수분해로 recombination repair가 촉진될 수 있다는 사실을 입증 해주고 있다. 따라서 이와같은 DNA 손상회복에 관한 연구결과들은 방사선으로 인한 유전적인 손상방지 및 방사선 방어효과에 크게 기여 할 수 있을 것으로 기대되어 이에 관한 더많은 연구가 요구된다.

참고문헌

1. P. E. Harman and D. M. Shankel, "Antimutagens and anticarcinogens." Environ. Mol. Mut. 15, 145-182 (1990).
2. M. D. Waters, A. L. Brady, H. F. Stack and H. E. Brockman, "Antimutagenicity profiles for some model compounds." Mutation Res. 238, 57-85 (1990).
3. T. Kada, T. Inoue, T. Ohta and Y. Shirasu, 1986. "Antimutagens and their mode of action", in: *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms*, D. M. Shankel, P. E. Hartman, T. Kada and A. Hollaender, eds., pp. 181-196, Plenum Press, New York (1986).
4. Y. Kuroda and T. Inoue, "Antimutagenesis by factors affecting DNA repair in" Mutation Res. 202, 387-391 (1988).
5. T. Inoue, Y. Ohta, Y. Sadaie and T. Kada, "Effect of cobaltous chloride on spontaneous mutation induction in *Bacillus subtilis* mutator strain." Mutation Res. 91, 41-45 (1981).
6. H. Mochizuki and T. Kada, "Antimutagenic action of cobaltous chloride on Trp-P-1-induced in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA 1538." Mutation Res. 95, 145-157(1982).
7. Y. Izumo and H. Ogata, "Radioprotective effects in mice by a single dose of subcutaneous administration of cobaltous chloride post gamma-ray irradiation with a sublethal dose." Radioisotopes 42, 164-168 (1993).
8. J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., pp. 1. 38-1. 41, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989).
9. M. M. Cox, K. McEntee and I. R. Lehman, "A simple and rapid procedure for the large scale purification of the recA protein of *E. coli*." J. Biol. Chem. 256, 4676-4678 (1981).
10. K. N. Kreuzer and C. V. Jongeneel, "*E. coli* phage T4 topoisomerase", in: *Methods in Enzymology*, R. Wu, L. Grossman and K. Moldave, eds., Vol. 100, pp. 151-153, Academic Press, New York (1983).
11. S. C. Kowalczykowski and R. A. Krupp, "Effects of *E. coli* SSB protein on the single-stranded DNA-dependent ATPase activity of *E. coli* recA protein." J. Mol. Biol. 193, 97-113 (1987).
12. C. Lu, R. H. Scheuermann and H. Echols, "Capacity of recA protein to bind preferentially to UV lesions and inhibit the editing subunit of DNA polymerase III: A possible mechanism for SOS-induced targeted mutagenesis." Proc. Natl. Acad. Sci. USA

- 83, 619-623 (1986).
13. A. I. Roca and M. M. Cox, "The recA protein: structure and function." *CRC Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25, 415-456(1990).
 14. P. E. Lavery and S. C. Kowalczykowski, "Biochemical basis of the constitutive repressor cleavage activity of recA 730 protein." *J. Biol. Chem.* 267, 20648-20658 (1992).
 15. L. J. Roman and S. C. Kowalczykowski, "Relationship of the physical and enzymatic properties of *E. coli* recA protein to its strand exchange activity." *Biochemistry* 25, 7375-7385 (1986).
 16. S. C. Kowalczykowski, J. Clow and R. A. Krupp, "Properties of the duplex DNA-dependent ATPase activity of *E. coli* recA protein and its role in branch migration." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3127-3131 (1987).