Osaka University Knowledge Archive

Title	Studies on the molecular mechanism of initiation of ColE2 DNA replication
Author(s)	武知, 進士
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/2964367
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【21】

氏名・(本籍)	武知進士（たけちしんじ）
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 9647 号
学位授与の日付	平成3年3月26日
学位授与の要件	理学研究科 生理学専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	Studies on the molecular mechanism of initiation of ColE 2 DNA replication (ColE 2 プラスミドの複製開始機構)
論文審査委員	(主査) 教授 小川 英行 (副査) 教授 谷口 維紹　教授 森田 敏照　助教授 伊藤 建夫

論文内容の要旨

プラスミドはDNA複製の機構および調節を研究するのに有用なモデル系である。複製の調節機構を知るには開始機構と調節因子の同定が必要である。ColE 2 プラスミドの複製に必要な領域には特異的な複製開始蛋白をコードする遺伝子（rep）と複製開始部位（ori）が含まれている。細胞抽出液を用いた試験管内反応系において，DNA合成は ori を含む領域から一方向に進行すること，複製開始にはDNAポリメラーゼI（Pol I）が必要であるがRNAポリメラーゼは必要ないことなどが知られている。この様に ColE 2 プラスミドを用いた複製開始機構の研究は，自身にコードされた必須複製開始蛋白による複製調節の分子機構を試験管内反応系を用いて解析できる点に特徴がある。本研究では Rep 蛋白による複製開始機構を分子レベルで解明することを目的としている。

まず，細胞抽出液を用いた試験管内DNA合成系で複製開始部位を塩基配列上へ位置付けることを試みた。伸長反応の阻害剤である ddTTPを加え複製中間体を蓄積させた後，中間体を制限酵素断片にして解析した結果からリーディング鎖（5′－3′伸長鎖）合成は ori 内の一点から始まり，ラギング鎖（3′－5′伸長鎖）合成は ori のすぐ右隣の一点で止まることが明らかとなった。また，リーディング鎖に由来する断片には5′端に約3残基のRNAが結合しており，塩基配列および5′末端リン酸数を解析した結果から，その構造は ppApGpA であり ori 内の一点から合成されることが示された。またリーディング鎖合成は，ATPとGTPを要求し，CTPとUTPを要求しないことも示された。次に，以上の結果をもとに，精製された Rep 蛋白と Pol I を用いてリーディング鎖合成を再構成することを試みた。最適化された条件下で，再構成系ではUTP，CTPに依存せずATP，GTPに加えてADPを要求することが明らかとなった。さらに ^{32}P標識ADPを基質に用いた反応において標識されたリーディ

ング鎖に由来の産物が回収でき，この結果よりプライマーＲＮＡ合成はＡＤＰから開始することが明らかとなった。また，再構成系ではPol Ｉによる鋳型切り換えが起り一本鎖になったラギング鎖の鋳型上でＤＮＡ合成が進み易いことが，大腸菌ＳＳＢ（単鎖ＤＮＡ結合蛋白）によりラギング鎖合成が特異的に抑えられることから明らかになった。

ColE 2のＤＮＡ合成開始は，Rep蛋白がori内の一定点から，ＡＤＰで始まるプライマー（ppApGpA）を合成しPol Ｉによるリーディング鎖合成を開始させる機構であることが示された。Rep蛋白は二重鎖ＤＮＡ上の塩基配列特異的な結合蛋白であり，二重鎖の開裂に他の蛋白を必要とせず5′端にＡＤＰを特異的に用いてプライマーを合成する点が既知のプライマーＲＮＡ合成酵素と異なり，新しいタイプのプライマー合成酵素であることが示された。

論文審査の結果の要旨

ＤＮＡ複製の制御は，主としてその開始の部分で行なわれている。ＤＮＡ複製がどのようにして開始されるかを明らかにすることが，その制御を明らかにする鍵である。

武知君は最も簡単な複製系の一つであるColE 2プラスミドを用いて，複製開始について次のような新しい事実を明らかにした。

先ず細胞抽出液を用いた試験管内ColE 2 ＤＮＡ複製系による解析から

(1) リーディング鎖（5′－3′伸長鎖）はori領域内の一点から始まること。

(2) ラギング鎖（3′－5′伸長鎖）はori領域のすぐ右隣の一点で止ること。

(3) リーディング鎖にはプライマーＲＮＡがついており，それはppApGpAであること。を明らかにした。

この結果からプラスミド自身がコードする複製開始に必須であるRep蛋白質がプライマーＲＮＡを合成すると考え，精製したRep蛋白質ＤＮＡポリメラーゼＩ，ＳＳＢ蛋白質を含む試験管内反応系を構築して見事に，プライマーＲＮＡから始まるリーディング鎖ＤＮＡ合成に成功し，Rep蛋白質がプライマー合成酵素であることを疑いなく示した。またこの精製した系を用いてプライマーＲＮＡはＡＤＰから合成が開始することを明確に証明した。

これまでにプライマーＲＮＡ合成酵素は数種報告されているが，ColE 2のRep蛋白質は，(1)二重鎖ＤＮＡ上の塩基配列特異的な結合蛋白質であること，(2)二重鎖の開裂に別の蛋白質を必要としないこと，(3)5′端にＡＤＰを用いてプライマーを合成することなどの点で全く新しい反応機構を行う酵素であることが明らかになった。

これらの成果はＤＮＡ複製開始機構に全く新らしい知見を加えたもので，複製機構解明の研究に大きな貢献をした。従って理学博士の学位論文として十分価値のあるものと認める。