Osaka University Knowledge Archive

Title	核小体におけるDNAポリメラーゼの存在とその分子種
Author(s)	平野, 英保
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32134
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【22】

氏名・(本籍)	平野英保（ひらの ひでやす）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 4570 号
学位授与の日付	昭和54年3月24日
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**核小体におけるDNAポリメラーゼの存在とその分子種**
論文審査委員	(主査) 教授 坂本 幸哉 (副査) 教授 浜岡 利之 教授 山野 俊雄

論文内容の要旨

〔目 的〕

増殖細胞における核小体では，核当りの数の減少並びに巨大化が起っている。この様な核小体では，リボソームRNAの前駆体が盛んに生成されているが，同時に自己のクロマチンDNA合成酵素が存在するかどうか，又，存在するとすれば，どのような酵素（哺乳動物では，DNAポリメラーゼα，β，γが存在する）が関与しているか，を明らかにする事を目的とした。

〔方法及び成績〕

Ⅰ．分離核小体でのDNAポリメラーゼ活性の証明

①核小体の分離精製……マウス（ddY）に移殖後6日目のエールリッヒ腹水癌細胞より村松等の方法に準じて，低張下，NP－40を用い核を分離後，超音波処理を行い，不連続蔗糖密度勾配遠沈法により核小体を得た。

②核小体でのDNAポリメラーゼ活性の測定

核レベルに使われている反応液（0.02％Triton X－100，5mM ATP等を含む緩衝液）を用いたが，ATPはむしろ阻害的に働らくので，核小体ではATPを除いて行った。

③核小体でのDNAポリメラーゼの反応性

基質であるDeoxynucleoside Triphosphate を除いてゆくと，^{3}H－Deoxythymidine Triphosphate の取込は低下し，マグネシウム要求性で，SH阻害剤（NEM＝N-Ethylmaleimide）に感受性であるが，一部耐性の部分を含んでいた。至適pHは，アルカリ側にあり，外より鋳型DN

Aを加えたり，DNase を添加すると，取込活性は上昇した。

これ等の結果より，分離した核小体にはDNAポリメラーゼの存在が示唆されたので，次に酵素を可溶化して分子種（DNAポリメラーゼ α，β，γ）の検討を行った。

Ⅱ．可溶化した核小体のDNAポリメラーゼ

①DNAポリメラーゼ α，β，γ 活性の測定

α活性は，活性化した子牛胸腺DNAを鋳型とし，pH7.5，10mM $MgCl_2$，37℃，30分で測定した。

β活性は，DNAポリメラーゼαの活性が抑えられる条件，pH8.3，20mM $MgCl_2$，3mM NEMを含む反応液で行った。

γ活性は，DNAポリメラーゼαが殆んど利用できない合成鋳型 Poly（rA）・$(dT)_{10}$を用い，pH7.5，0.5mM $MnCl_2$，0.1M KCl（KCl 0.1MではDNAポリメラーゼαはほぼ抑えられる）を含む反応液にて，30℃，30分で行った。

②段階的DEAEセルロースクロマトグラフィーによる検討

核小体より0.1％Triton X－100を含む緩衝液中で超音波処理して可溶化した後の遠心上清を，Cazillis 等の方法に準じて，段階的DEAEセルロースクロマトグラフィーを行い，0.08M，0.15M，0.4M NaCl で溶出する3つの分画を得た。0.08Mにて吸着しない分画（Peak 1）は，至適pHは8.0を中心に幅広く，また至適Mg^{2+}濃度は7 mMであるが，高濃度（30mM）になっても比較的活性が維持されており，NEMに対しても比較的耐性であった。このPeak 1は活性子牛胸腺DNAだけでなく，合成鋳型poly（rA）・$(dT)_{10}$を利用することにより，DNAポリメラーゼβと考えられる。

次に0.15Mで溶出されてくるPeak Ⅱは，鋳型に活性子牛胸腺DNAを用いると，至適pH 7.5，至適Mg^{2+}濃度10mMで，高濃度ではPeak Ⅰに比し著明に阻害された。またNEMに対しての感受性が高いことより，Peak ⅡにはDNAポリメラーゼαが存在するものと考えられる。

次に，γ活性を0.15M，0.4M NaCl 溶出分画で測定すると，各々に活性が認められたので，更に直線的溶出法による検討を行った。

③直線的DEAEセルロースクロマトグラフィーによる検討

核小体のγ活性は，0.13M NaCl 溶出部に最高活性を持つピークとして検出され，核のγ活性に略ぼ近似していた。

〔総　括〕

①核小体には，自己のクロマチンDNAを鋳型とするDNAポリメラーゼ活性が存在することをみつけた。

②核のままでDNAポリメラーゼ活性を測定する時に必要なATPは，核小体レベルではむしろ阻害的に作用した。

③核小体より可溶化したDNAポリメラーゼをDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーで分けた後，条件を変えて測定した結果，核小体にも，DNAポリメラーゼα，β，γの三種のポリメラ

ーゼが存在していることが分った。

論文の審査結果の要旨

増殖細胞における核小体においては，リボソームRNAの前駆体が盛んに生成され，リボソームの組立てが行われている事は良く知られた事実であるが，本研究は，分離精製した核小体中にDNAポリメラーゼが存在する事を生化学的に初めて証明したものである。本反応はATPにより阻害された。更に，DEAEセルロースクロマトグラフィーを行い，条件を変えて測定した結果，DNAポリメラーゼα，β，γの三っつの分子種を認める。これ等の結果は，増殖細胞における核小体がRNA合成だけでなく，DNA合成を行い，分裂増殖のサイクルを活発化している事を示唆したものであり，又，未だ良く知られていない核小体においての DNA 合成の様相，更に，殆ど理解されていないDNAポリメラーゼγの機能に関しての今後の研究に方向性を与えたものとして，きわめて高く評価のできるものである。