

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、 〈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・(本籍)	平野英保
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、 ^3H -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

① DNA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 MgCl₂, 37°C, 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 MgCl₂, 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 MnCl₂, 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°C, 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Mg²⁺濃度は7mM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pH7.5, 至適Mg²⁺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

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性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。