

Title	ニワトリ胚細胞におけるDNAポリメラーゼ $\beta$ の生合成
Author(s)	山口, 政光
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/33302">https://hdl.handle.net/11094/33302</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・(本籍)	やま 山	ぐち 口	まさ 政	みつ 光
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6009	号	
学位授与の日付	昭和58年3月25日			
学位授与の要件	医学研究科 病理系専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	ニワトリ胚細胞におけるDNAポリメラーゼ $\beta$ の生合成			
論文審査委員	(主査) 教授	松田 守弘		
	(副査) 教授	松代 愛三	教授	近藤 宗平

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目 的〕

多細胞動物には、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ と呼ばれる3種のDNAポリメラーゼが存在し、 $\alpha$ は核DNAの複製、 $\beta$ はDNA修復、 $\gamma$ はミトコンドリアDNAの複製においてそれぞれ主役をなすと推測されている。 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の物理的・酵素学的性質の解明はかなり進んでいるが、これらの酵素の細胞内での合成と分解の過程、それらをコードする遺伝子あるいは、mRNA等については全くわかっていない。各酵素に特異的な抗体は、これらの研究を可能にする有効な手段となる。さらに各酵素に特異的な抗体は、DNA複製あるいは修復の際機能する各酵素を含む複合体の単離等にも利用でき、遺伝学的解析手段が充分駆使できない真核細胞DNA複製及び修復を分子レベルで研究するひとつの手段となりうる。この研究の目的は、哺乳動物に対して抗原性が高いと考えられるニワトリ胚を材料としてDNAポリメラーゼ $\beta$ をほぼ均一になるまで大量精製し、ウサギに免疫して $\beta$ に特異的な抗体を作製する事、またさらにこの抗体を利用して $\beta$ に特異的な免疫沈降法を確立し、培養ニワトリ胚細胞における $\beta$ の生合成と分解の過程を明らかにする事にある。

#### 〔方法ならびに成績〕

- (1)  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の精製と構造解析。11日目のニワトリ胚からの $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ の分別精製法を確立し高度精製標品を得た。これらの標品を分析する事により、 $\alpha$ は分子量13~15万5千の3~4本の高分子量サブユニットと分子量5~6万の4本の低分子量サブユニットからなる事(参考論文6)、 $\gamma$ は分子量4万7千のポリペプチドの4量体として存在する事(参考論文3)、 $\beta$ は分子量4万のシングルポリペプチドからなる事(参考論文1)等が明らかとなった。

- (2) 抗 $\beta$  抗体の作製及びその性質。計10kqのニワトリ胚から精製した純度95%以上の $\beta$  標品約300 $\mu$ g を数度に分けてウサギに免疫し抗 $\beta$  抗体を作製した。抗 $\beta$  抗体は $\beta$  活性を中和するが、 $\alpha$ 、 $\gamma$  活性は全く中和しない。オクタロニーテストさらには、ニワトリ胚細胞粗抽出液から、分子量4万の $\beta$  タンパクが抗 $\beta$  抗体により特異的に沈降する事等から、得られた抗 $\beta$  抗体は $\beta$  タンパクに特異的であると考えられる。
- (3) パルス・チェイス実験。 $\beta$  の生合成過程を明らかにするため、次の3つの条件を満たすポリペプチドとしてその前駆体の検索を試みた。1) [ $^{35}$ S]メチオニンで30分パルス標識した細胞粗抽出液から抗 $\beta$  抗体によって特異的に沈降し分子量が4万と異なるポリペプチド、2) [ $^{35}$ S]メチオニンでパルス標識されたポリペプチドで、その量がチェイスする間に減少するもの、3) 免疫沈降する際精製した $\beta$  を加える事により沈降物から除去されるポリペプチド。しかしながらこれらの条件を満たすものは検出できず、分子量4万のタンパクのみが、30分パルス標識した細胞及び5時間チェイスした細胞の粗抽出液から特異的に沈降し、またこの沈降反応において精製した $\beta$  と競合した。次にパルス標識後チェイスする時間を長くしていくとこの分子量4万のポリペプチドの量は減少していき、その半減期は約10時間と見積もられた。

#### [総括]

ほぼ均一に精製した $\beta$  をウサギに免疫する事により、 $\beta$  に特異的な抗体を作製しこの酵素の代謝過程を調べた。パルス標識及びパルス・チェイスの実験において、この酵素の前駆体であると考えられるポリペプチドは検出できなかった。この結果は多くの場合タンパク分解によるプロセッシングの起こらないウサギ赤血球ライセートを用いた、ニワトリ胚polyA<sup>+</sup>RNAの*in vitro*翻訳産物からもやはり分子量4万のタンパクが抗 $\beta$  抗体により沈降してくるとい最近の結果とも一致している。従って $\beta$ は翻訳後プロセッシングをうけないか、あるいはプロセスされるとしてもそのアミノ酸の長さはかなり短いものであると考えられ、この点においてかなり長い前駆体として合成される分泌性タンパクやオルガネラに局在する酵素類とは異なる様である。

長時間チェイスの実験により、ニワトリ胚2次培養細胞における $\beta$  タンパクの半減期は約10時間と見積もられ、一度合成された酵素が世代時間を越えて常に安定に存在するのではなく、新しい酵素の合成・利用・そして分解が細胞内で順次起こっていると考えられる。

[ $^{35}$ S]メチオニンで12時間連続標識した細胞粗抽出液から、免疫沈降により分子量4万のポリペプチドとして回収される放射活性は全細胞タンパクにとり込まれた放射活性のわずか0.002%と計算された。この値にもとづいて細胞あたりの酵素分子の数を計算すると5~10万分子/細胞となる。

この研究において確立した抗 $\beta$  抗体を用いた免疫沈降法は上記の*in vitro*翻訳系とあわせて $\beta$  のmRNAの精製及び性質の研究、さらにそのcDNAクローニングをめざした研究に現在利用している。また抗 $\gamma$  抗体は抗 $\beta$  抗体同様ウサギに免疫して作製し(参考論文5)、抗 $\alpha$  抗体はハイブリドーマ法を用いてモノクローナル抗体として作製に成功しており(参考論文7)、抗 $\beta$  抗体とあわせて今後、真核細胞DNA複製及び修復の研究に幅広く利用できる。

著者はニワトリ胚から、DNAポリメラーゼ $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ を分離精製し、それらのサブユニット構造を明らかにするとともに、各酵素に対して特異的な抗体を作製した。そのうち、抗 $\beta$ 抗体を用いて免疫沈降法を確立し、ニワトリ胚細胞における $\beta$ の生合成と分解の過程を始めて明らかにした。本研究はさらに $\beta$ 遺伝子のクローニングへ道を開き、真核細胞DNA複製あるいは修復の調節機構解明において重要な意義を持ち、高く評価される。