

Title	遺伝子工学研究用ポリメラーゼと長鎖DNA切断法の開発に関する研究
Author(s)	小谷, 博一
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38661
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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

氏 名	小 谷 博 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 9 7 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 5 年 11 月 30 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	遺伝子工学研究用ポリメラーゼと長鎖 DNA 切断法の開発に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 新 名 惇 彦 教 授 高 野 光 男 教 授 大 嶋 泰 治 教 授 山 田 靖 宙 教 授 今 中 忠 行 教 授 卜 部 格 教 授 二 井 将 光

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、遺伝子操作の発展を支援する目的で、新たな研究用酵素試薬の開発を目指したものである。新規有用酵素として SP6 ファージの RNA ポリメラーゼ、DNA ポリメラーゼの遺伝子を同定するとともに、遺伝子を大腸菌にクローニングし、大量製造法を確立し、生成酵素が遺伝子工学用試薬として利用可能なこと、また、巨大染色体 DNA の部位特異的切断のためにヌターミナーゼおよび新たに発見した 8 塩基認識制限酵素の実用性に関する研究をまとめたもので、緒論と総括および本文 5 章から構成されている。

緒論では、本研究の背景として、遺伝子工学研究用酵素に関して懸案となっている諸問題を概説し、本研究の概略を述べている。

第 1 章では、遺伝子工学研究用酵素試薬の開発材料として、*Salmonella typhimurium* に感染する SP6 ファージを用い、SP6 ファージにコードされる RNA ポリメラーゼ遺伝子のクローニングによる構造解析を行っている。さらに大腸菌での大量発現系により遺伝子工学研究用酵素試薬としての RNA ポリメラーゼの高純度かつ安価な供給を可能にしている。

第 2 章では、SP6 ファージの核酸代謝系遺伝子群の構成ならびに構造を明らかにする目的で、第 1 章で解析した RNA ポリメラーゼ遺伝子を含め 10,297bp の塩基配列を決定するとともに、初期遺伝子領域の構成要素および機能の解析を行っている。

第 3 章では、第 2 章で存在が明らかにされた DNA ポリメラーゼ遺伝子のクローニングを行い、酵素特性の解析および大量発現系の構築を行っている。さらに、この DNA ポリメラーゼが DNA 塩基配列決定用酵素として応用可能なことを示している。

第 4 章では、ゲノム遺伝子のような巨大 DNA を解析するうえで必要な長鎖認識制限酵素のスクリーニングを行い、放線菌、*Streptomyces* sp. 8387 から新規な 8 塩基認識制限酵素、Sse8387I を発見し、その反応特性を明らかにするとともに、その利用例を示している。

第 5 章では、制限酵素以外の、より特異性の高い DNA 切断法として、ヌターミナーゼを利用した部位特異的染

色体切断法の開発を行っている。モデル実験系として大腸菌染色体に特異的切断部位、*cos* 配列を導入し、その部位での特異的な切断が可能であることを示している。

総括では、本研究で得られた主たる結論を総括するとともに、遺伝子工学研究用酵素試薬開発の展望について述べている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、新たな遺伝子工学研究用酵素試薬の開発を行い、その酵素遺伝子の大腸菌へのクローニングにより、純度の高い酵素の大量供給を可能にしている。また、染色体 DNA のような巨大 DNA を特異的に切断する方法を開発し、ゲノムマッピングへの応用の可能性を示している。主な成果を要約すると以下の通りである。

- (1) SP6ファージの RNA ポリメラーゼの遺伝子構造、タンパク質の1次構造を明らかにするとともに、大腸菌での大量発現系を作製し、高純度、高比活性のポリメラーゼをインビトロでの RNA 合成用の安価な試薬として供給可能にしている。
- (2) これまで未知であった SP6ファージの初期遺伝子群の塩基配列、10,297bp を決定し、遺伝子の構成要素、機能を明らかにし、この遺伝子群のなかの DNA ポリメラーゼ遺伝子に試験管内で変異を与え、塩基配列決定に使用可能な DNA ポリメラーゼを大腸菌で大量に生産させることに成功している。
- (3) 巨大 DNA の解析に重要な酵素として、放線菌より *Sse8387I* と名付けた新規 8 塩基認識制限酵素を発見し、5'-CCTGC↑AGG-3' 配列を認識し、矢印の位置で切断することを明らかにしている。この認識配列は G, A, T, C の4種の塩基から成る最初の例であり、幅広い生物種の DNA 解析に有用な酵素である。
- (4) 制限酵素以外のより特異性の高い DNA 切断法として、標的 *cos* 部位を大腸菌染色体に導入し、λターミナーゼにより *cos* 部位を特異的に切断できることを示している。ヒト・ゲノムのマッピングなどに要求される、長鎖の特異的 DNA 断片の調製、遺伝子間距離の測定などへの利用が可能である。

以上のように、本論文は遺伝子工学研究用新たな有用な酵素を発見し、一部は遺伝子クローニングにより大量生産に成功し、安定かつ安価な供給を可能にしている。さらに、今後重要度を増すと思われるゲノムマッピングに貴重な酵素とその利用方法を示している。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。