



# 論文内容要旨

動物細胞中に存在するDNAポリメラーゼについては1958年頃から報告があるが、DNAポリメラーゼが1種類のみではなく、同一細胞内に性質の異なる2種類、あるいはそれ以上の分子種の存在することが明らかにされたのは1968年以降のことである。私はこの時期にラット腹水癌細胞のDNAポリメラーゼに関する研究に着手し、以来特にDNAポリメラーゼ分子種の分離とそれら相互の関係について研究を進めてきた。大腸菌においては、DNAポリメラーゼⅠ、Ⅱ、Ⅲが明らかにされ、それらのDNA複製機構における役割についても研究が進んでいるが、真核細胞におけるDNAポリメラーゼの各分子種のもつ真の役割は必ずしも明確になってはいない。これらの分子種の分離とその細胞内局在、そしてそれらのDNA複製系に占める位置についての研究は、特に癌細胞におけるDNA生合成の制御機構を明らかにしていくためにも、今後さらに詳細な追求が必要と考えられる。ここでは、ラット腹水癌AH130細胞から抽出したDNAポリメラーゼの分子種とそれら相互の関係について、これまでに私が明らかにした以下の3点に関して報告する。(なお、ここで $\alpha$ とは、主として細胞質に見出され、6-8Sで、至適pHは中性、SH基をブロックするN-エチルマレイミド(NEM)等の薬剤で強く阻害されるDNAポリメラーゼ、 $\beta$ とは主に核内にあり、3-4Sで、アルカリ性側に至適pHをもち、NEM等に抵抗性のポリメラーゼである。 $\alpha$ 、 $\beta$ のよび方は1975年に研究者間の申し合わせによって統一されたもので、本論文には用いていないが、整理のためこのよび方をここでは用いる。)

1. ラット腹水癌細胞から低張抽出したDNAポリメラーゼ活性は、はじめ $\alpha$ の性質を示す酵素複合体として得られるが、塩処理等の操作によりこれから $\beta$ が遊離する現象が観察される。
2. 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にかけると、 $\alpha$ は少なくとも2つの活性ピークに分れて溶出されるが、それぞれの活性形に種々の塩処理を加えても $\beta$ の遊離は全く観察されず、 $\beta$ が $\alpha$ のサブユニットである可能性は否定できる。
3.  $\alpha$ の各活性形の間には、塩処理による部分的な分子変換が認められる。

## I 酵素複合体からの $\beta$ の遊離(論文I)

ラット腹水からAH130細胞を集め、洗った後、10倍量の低張液(10mM $\beta$ メルカプトエタノールと1mMEDTAを含む)に懸濁すると、細胞はほとんど破壊しないが、DNAポリメラーゼ活性は能率よく上清分画に抽出される。抽出液に酢酸を加えてpH5沈殿法で濃縮し、0.15MKClを含むリン酸緩衝液中でセファデックスG200によるゲル濾過にかけると、DNAポリメラーゼ活性は溶出先端付近に、至適pH7~7.5の単一ピークとして溶出される。しかしながら、

抽出液を 0.15 M KCl を含む緩衝液中で 0℃ 数日間保存した後、同様のゲル濾過にかけると、より低分子量で、至適 pH が 9 以上にある新しい DNA ポリメラーゼ活性が出現する。同様の現象は細胞の凍結や、0.2 M リン酸緩衝液添加などの場合、保存期間なしで観察される。またショ糖濃度勾配遠心によっても 3~4 S の低分子量酵素活性の出現が確認できる。この低分子量ポリメラーゼは、その大きさや諸性質から、現在  $\beta$  とよばれている酵素の典型的な例である。これに対し、ゲル濾過で最初に溶出される高分子量酵素は  $\alpha$  の性質を示すが、分子量は 60 万以上もあり、何らかの酵素複合体ないし凝集体であろうと考えている。

## II $\beta$ が $\alpha$ のサブユニットではないことの証明 (論文 II)

低張抽出液中に存在する酵素複合体からの  $\beta$  の遊離を観察したが、この事実だけから  $\beta$  が  $\alpha$  のサブユニットであるとはいえない。他の方法で  $\beta$  を含まない  $\alpha$  を単離し、この  $\alpha$  から  $\beta$  が遊離することがあるか否かを調べなければ結論はできない。低張抽出液を DEAE セルロース・カラムクロマトグラフィーにかけ、リン酸緩衝液の濃度勾配で溶出した。リン酸濃度 0.05 M 以下で最初に溶出される p-I は、至適 pH が 9~9.5、NEM や KCl 濃度に抵抗性で、ショ糖濃度勾配遠心による沈殿定数が 3.6 S であり、典型的な  $\beta$  の性状を示す。リン酸濃度 0.12~0.14 M で溶出される p-II は 8.3 S、0.17~0.19 M で溶出される p-III は 6.7 S であるが、いずれも至適 pH は 7~7.5 で、NEM で強く阻害され、塩濃度を上げて活性が抑えられるなど、共に典型的な  $\alpha$  の性質をもっている。この  $\alpha$  の 2 つの活性形について、それぞれ 0.15 M 硫安、0.2 M リン酸、0.4 M 食塩などの塩処理を加え、DEAE セルロースによる再クロマトグラフィーやショ糖濃度勾配遠心で分析したが、いずれの場合にも  $\beta$  の位置には全く活性が観察されなかった。このように  $\alpha$  から塩処理による  $\beta$  の遊離がないことから、 $\beta$  が  $\alpha$  の一部を構成するサブユニットであるとは考えられない。

## III $\alpha$ の活性形の変換 (論文 II)

$\alpha$  の DEAE セルロース・カラムからの溶出図形は実験毎に大きく変動し、時には p-II の p-III に対する相対量が極めて小さくなることもある。この変動の原因としては何らかの選択的抽出が起ること、または II と III の間に分子変換の起ることが考えられる。II を 0.4 M 食塩処理後に再度 DEAE セルロース・カラムにかけた場合、活性の約 40% が III の溶出位置に移動することから、II から III への変換が起っている可能性を見出した。なお、抽出残査には II が比較的多いことから、選択的抽出も原因の一つである可能性もあり得る。現在  $\alpha$  には、II の前にもう一つの活性ピークが存在することが明らかになっており、溶出順に A、B、C とよんでいるが、これら相互の関係と、DNA 複製系における役割を明らかにすることが今後の課題である。

## 審 査 結 果 の 要 旨

DNAポリメラーゼはDNAの生合成を触媒する、細胞増殖の鍵ともいふべき重要な酵素で、複数の分子種が存在することもすでによく知られている。代表的なものは、ミトコンドリアの酵素を別にすれば $\alpha$ と $\beta$ のポリメラーゼであるが、それらの実体、相互関係、細胞内局在、生理的役割についてはまだまだ不明の点が多い。この酵素が単純な可溶酵素でなく、細胞内で複雑な存在様式をもち、これがin vitroでの存在様式にも反映する点が、解析を困難にしているおもな原因と思われ、したがって、よくコントロールされた穏和な実験条件下で得られる分子種について、その存在様式と相互関係を慎重に検討する必要がある。

さて本論文は、著者のDNAポリメラーゼ研究の総括ともいふべきものである。この研究において著者は、増殖が旺盛なラット腹水肝癌AH-130を用い、これから抽出されるDNAポリメラーゼを上観点から追求した。

イ 癌細胞の低張抽出液をセファデクスG-200でゲルろ過すると $\alpha$ の性状をもつDNAポリメラーゼが得られるが、あらかじめ抽出液を塩処理すると、ゲルろ過後 $\beta$ の性状をもつ酵素が検出されるようになる。

ロ 上の抽出液をDEAE-セルロースのカラムクロマトグラフィーにかけると、 $\beta$ がまず溶出され、ついで $\alpha$ が溶出順にI、IIのピークとして現われる。このIとIIをイの条件で塩処理したが、 $\beta$ は得られなかった。

ハ したがって $\beta$ は $\alpha$ のサブユニットではない。それを思わせるイの結果は、ゲルろ過で得られた $\alpha$ が、実は $\alpha$ と $\beta$ の複合体であったことからきている。

ニ ロで得られる $\alpha$ -ポリメラーゼのIとIIはその量比が実験条件により変動し、かつIは塩処理により部分的にIIに変換できる。

以上が本論文に述べられた、著者の成果の概要である。これらの成果はまだ問題を根本的に解決したものとはいえないが、解決へとみちびく有益な手掛りを提供したものであることには疑いがない。また $\alpha$ -ポリメラーゼに複数の分子種を検出し、しかもこれらが相互に変換し得る可能性を示唆した点は、 $\alpha$ が増殖に直接関与する分子種とみなされるだけに、増殖の制御機構の解明にもつながる貴重な知見と評価できる。

以上の理由により本論文を学位授与に値するものと判断する。