

哺乳類細胞のDNA複製機構の研究
—ポリオーマウイルスDNAの複製開始機構の解析—

益谷 央 豪

①

博士論文

哺乳類細胞のDNA複製機構の研究
-ポリオーマウイルスDNAの複製開始機構の解析-

東京大学大学院
薬学系研究科
薬学専門課程
生理化学教室

昭和63年度進学 益谷 央豪

指導教官 宇井 理生

目次

目次	1
論文の要旨	3
第1章 序論	7
F i g 1	
略語表	11
第2章 材料と方法	12
F i g 2 ~ F i g 3	
第3章 一本鎖DNA結合蛋白質 (SSB)	30
第1節 検出方法	30
第2節 FM3A細胞のSSBの精製	31
第3節 HeLa細胞のSSBの精製	32
第4節 ポリオーマウウイルス無細胞DNA複製系に おけるDNA合成の促進	32
第5節 DNAポリメラーゼ α 活性の促進	33
第6節 まとめと考察	34
F i g 4 ~ F i g 15	
第4章 FM3A細胞のDNAポリメラーゼ δ	38
第1節 DNAポリメラーゼ δ 活性の検出方法	38
第2節 FM3A細胞のDNAポリメラーゼ δ の部分精製	38
第3節 DNAポリメラーゼ δ 活性のPCNA依存性と 阻害剤の効果	42
第4節 まとめと考察	42
F i g 16 ~ F i g 25	

第5章	ポリオーマウイルス無細胞DNA複製系の宿主特異性	46
第1節	粗抽出液の種特異性と宿主特異性を決定する 因子の検索	46
第2節	精製した酵素・蛋白質による系の構築	47
第3節	精製した酵素・蛋白質の種特異性	49
第4節	まとめと考察	50
	Fig 26 ~ Fig 33 & Table 1	
第6章	二本鎖DNAを鋳型としてのDNAプライマーゼの 反応産物の解析	54
第1節	オリゴリボヌクレオチド合成の宿主特異性	54
第2節	オリゴリボヌクレオチド合成に対する DNAポリメラーゼ α の効果	55
第3節	オリゴリボヌクレオチド合成のorigin依存性	57
第4節	まとめと考察	57
	Fig 34 ~ Fig 39	
第7章	ポリオーマウイルスのT抗原とFM3A細胞の DNAプライマーゼとの相互作用	62
第1節	物理的複合体形成	62
第2節	複合体形成によるDNAプライマーゼ活性の促進	63
第3節	まとめと考察	64
	Fig 40 ~ Fig 44	
第8章	総括	68
	参考文献	74
	謝辞	82

第1章 序論

生物の生物たる由縁は、自己を複製し自身の子孫を残してゆける点にある。それ故に、今日の生物の繁栄がある。この生物を形成しているもっとも基本的な単位が細胞であり、従って、細胞の自己増殖こそ生命の基本原理の一つに他ならない。個々の細胞は、その親細胞から受け継いだ遺伝情報物質DNAを持ち、その情報は複製されて娘細胞へと受け継がれてゆく。つまり、こうして太古の昔より受け継がれてきた遺伝情報物質DNAの複製が、細胞増殖の基本である。

遺伝情報物質DNAは、基本的には、主としてわずか4種類の塩基よりなる2本の鎖が水素結合により相補的に二重鎖を形成し、螺旋状によじれあって存在するという単純なものである¹⁾。その複製についても、大腸菌やそれに感染するファージを中心とした解析により、原核細胞ではかなり明らかにされてきた²⁾³⁾。しかし、真核細胞では、原核細胞に比べてDNA量が約1,000倍と多く、複数の複製単位(レプリコン)がタンデムに結合したゲノム構成をとること、さらに、これが、ヌクレオソーム構造や染色体構造をとり、また、核マトリックスを含めた複雑な核内構造をとること、さらに、それらが細胞周期上の制御を受けること等複雑であるため、その複製機構の研究も遅れてきた。しかし、細胞レベルでの観察から、高等真核生物においても、その複製は、二重鎖DNAが複製開始点から巻き戻されて2本の鎖が解離することにより始まり、2本の一本鎖DNAをそれぞれ鋳型として相補的な新生DNA鎖が合成されること(半保存的複製)⁴⁾、また、DNA合成は、複製開始点より両方向へ進行すること(二方向複製)⁵⁾、さらに、lagging鎖の複製は、岡崎フラグメントと呼ばれる5'末端にプライマーRNAが共有結合した短鎖DNAの合成を介すること(不連続複製)⁶⁾等、基本的には大腸菌と同様の反応であることが示された。そこで、真核細胞のDNA複製機構を解明するために、大腸菌での解析を参考として研究

が進められた。

まず、大腸菌で同定されたDNA複製因子と同様の性質をもつ酵素・蛋白質の検索が行われた。その結果、DNAポリメラーゼ α をはじめとする多くの酵素・蛋白質が、多くの細胞より検出・精製された。当研究室においても、DNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体⁷⁾⁻¹²⁾、RNAアーゼH¹³⁾¹⁴⁾、DNAヘリカーゼ¹⁵⁾⁻¹⁹⁾、DNAトポイソメラーゼI及びII²⁰⁾²¹⁾をはじめとし、さらにDNAポリメラーゼ α の促進因子¹⁰⁾¹³⁾²²⁾等を検出・精製し、その解析を行ってきた。特にDNAポリメラーゼ α については、生化学的にも遺伝学的にもDNA複製への関与が証明され²³⁾²⁴⁾、真核細胞ではDNAプライマーゼと複合体を形成して存在すること²⁵⁾、複合体形成により効率よく岡崎フラグメント合成が行われること等解析が進んでいる⁹⁾¹⁰⁾²⁶⁾。しかし、遺伝学的に複製への関与が証明されているDNAポリメラーゼ α は、いわば例外であり、その他の酵素・蛋白質については、複製への関与を示す方法が必要となった。

そこで、大腸菌のDNA複製機構の解析で、その感染するファージを利用した無細胞DNA複製系が有効であったことから、動物細胞に感染するウイルスのDNAを利用した無細胞DNA複製系が構築された。まず、最初に、アデノウイルスの無細胞DNA複製系が確立された²⁷⁾。しかし、その複製様式は、動物細胞とは全く異なり、蛋白プライミングにより複製が開始され、また、複製に必要な因子もDNAポリメラーゼやDNA結合蛋白質はウイルス自身のコードするものであった。そのため、アデノウイルスの無細胞DNA複製系に必須の宿主細胞の因子としては、転写制御因子であるnuclear factor IとDNAトポイソメラーゼIが同定されたのみであった。

その後、現在おおいに成果をあげているSV40とポリオーマウウイルスの無細胞DNA複製系が構築された²⁴⁾²⁸⁾²⁹⁾。これらのウイルスの無細胞DNA複製系では、ウイルス側の因子としてウイルス複製originとウイルス初期遺伝子産物ラージT抗原の2つが必須で

あるが、その他の複製因子はすべて宿主細胞に依存している。また、複製の様式も、半保存的に、両方向へ、不連続に行われることが示されており、宿主細胞の1レプリコンにおける反応をよく反映した系であると考えられる。実際、SV40の無細胞DNA複製系を用いて多くの成果が報告されている³⁰⁾⁻³²⁾。Fig 1には、その成果を簡単にまとめた。SV40の無細胞DNA複製系においては、ウイルスの複製originを、複製開始蛋白質T抗原がATP存在下、認識して結合することにより複製が開始される³³⁾⁻³⁵⁾。T抗原の結合により二重鎖DNAは部分的に開裂すると考えられ、これを、さらにDNAヘリカーゼとしてT抗原が働くことにより巻き戻し、一本鎖DNA部分が露出すると考えられるが、この過程では、一本鎖DNAに結合して安定化する一本鎖DNA結合蛋白質(SSB)が必須である³⁶⁾³⁷⁾。その後、一本鎖DNA上では、DNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体によるプライマーRNA合成と、引続き最初の岡崎フラグメント合成が行われる。ここで、DNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体とDNAポリメラーゼ δ の切り替えが起こり、leading鎖をDNAポリメラーゼ δ が、また、lagging鎖をDNAポリメラーゼ α がそれぞれ担うことにより、両鎖が協調的に複製されていく。DNA合成の過程では、PCNAや、RF-Cあるいはactivator Iと呼ばれる蛋白質の関与が示されている³⁸⁾⁻⁴¹⁾。このように、SV40の無細胞DNA複製系を用いた解析より、特に、DNAポリメラーゼ α とDNAポリメラーゼ δ を中心としたDNA合成反応において、おおいに成果があげられてきた。しかし、T抗原が複製開始蛋白質であるばかりでなく、強力なDNAヘリカーゼであったため⁴²⁾⁴³⁾、宿主細胞のDNAヘリカーゼは要求されず、その同定は困難と考えられた。

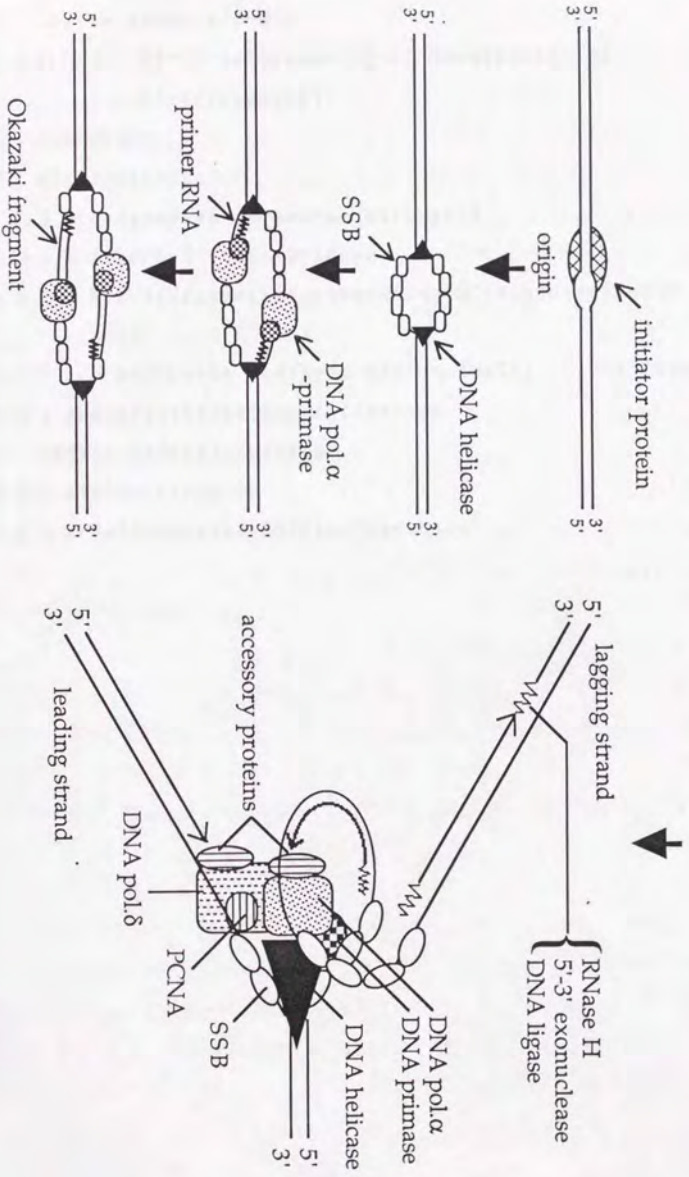
さて、本研究で重要なポリオーマウイルスは、SV40ときわめて近縁のウイルスであり、ほとんど同様の性質を示すが、唯一、感染する動物種の特異性において異なる。すなわち、SV40は、サルを宿主とするのに対し、ポリオーマウイルスは、マウスを宿主と

する²⁸⁾。そこで、当研究室の浴は、当研究室に蓄積していたマウス F M 3 A 細胞の温度感受性変異株より、DNA複製因子に変異点を持つものをスクリーニングするために、ポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系を構築した。その結果、ウイルスの宿主特異性に関しては、従来、融合細胞を用いた実験等から、ウイルスDNAの複製が、宿主細胞中の複製許容因子によって規定されていることによると考えられていたが⁴⁴⁾、その許容因子がDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体であり、その他の因子については、かなりの動物種の間で互換性のあることを見いだした²⁴⁾。この結果より、ポリオーマウイルスやSV40の無細胞DNA複製系における宿主特異性の決定には、宿主細胞のDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体、または、そのどちらかとウイルスのT抗原との相互作用のみが重要であることが予想された。つまり、もし、両蛋白間になんらかの相互作用が見いだされれば、高等真核細胞において、いまだに同定されていない複製開始蛋白質及びDNAヘリカーゼを同定するうえで重要な知見を与えられようと考えられる。

本研究では、以上の背景に基づき、ポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系における宿主特異性の決定機構について検討しながら、DNA複製の開始より最初のプライマーRNA合成が行われるにいたる反応について、特に、T抗原と宿主細胞のDNAプライマーゼとの蛋白間の相互作用を中心に検討した。

Fig.1

A model for DNA replication



略 語 表

B S A ; bovine serum albumin

B u P d G T P ; N²-(4-butylphenyl)-2'-deoxyguanosine
5'-triphosphate

d d w ; 二回蒸留水

D T T ; dithiothreitol

E D T A ; ethylenediamine tetraacetic acid

F u d R ; 5-fluoro-2'-deoxyuridine

H e p e s ; N-2-hydroxyethyl piperazine-2'-ethanesulfonic
acid

P B S (-) ; phosphate buffered saline (MgCl₂, CaCl₂-free)

P M S F ; phenylmethanesulfonyl fluoride

S D S ; sodium dodecyl sulfate

S V 4 0 ; simian virus 40

T r i s ; tris[hydroxymethyl]aminomethane

第2章 材料と実験方法

材料

ATP, CTP, GTP, UTP, dATP, dCTP, dGTP, dTTP (ヤマサ) は、ddwに溶解し KOHを用いて pH7.5 付近に調整して使用した。
[^3H]dATP, [^3H]dTTP, [α - ^{32}P]UTP, [α - ^{32}P]dCTP, [α - ^{32}P]dTTP, [γ - ^{32}P]ATPは NEN reserch productsまたは ICN radiochemicalsより購入した。poly(dA), poly(dT), oligo(dT)₁₀, oligo(dT)₁₂₋₁₈は P-L Biochemicalより、glycogen, 酵母tRNA, 大腸菌 DNA polymerase I(klenow enzyme), DNase Iは Behringer Mannheimより、heparinは Flukaより購入した。

DEAEセルロース (Brown)、ホスホセルロースP11 (Whatman) は常法により、酸・アルカリ処理を行って膨潤させた。ハイドロキシアパタイトは Bio·Radより購入した。一本鎖DNAセルロースは榎本らの方法⁷⁾により調整した。

活性化DNAは既述の方法⁷⁾で作成した。M13mp19フェージ一本鎖環状DNAは甲田岳生氏より、pBR322二本鎖閉環状DNAは西條將文博士より分与して頂いた。

SV40のT抗原は、バキュロウイルスの発現ベクターシステムにより調製したものを、またSV40のDNAは、アルカリ法により大腸菌を用いて調製したものを⁴⁵⁾、理科学研究所・放射線生物学研究室の菅澤薫博士より供与して頂いた。

その他の特に指定のない試薬は市販の特級試薬 (主に和光純薬) を用いた。

緩衝液

buffer1: 20 mM potassium phosphate(pH7.5), 0.1 mM EDTA- Na_3 ,
1 mM 2-mercaptoethanol, 0.25 mM PMSF
buffer2: buffer1 + 20% (v/v) ethylene glycol + 0.01% tritonX
-100

bufferH: 30 mM Hepes·KOH(pH7.5), 0.1 mM EDTA-Na₃, 10% (v/v) glycerol, 1 mM 2-mercaptoethanol, 0.25 mM PMSF, 0.01% triton X-100

F M 3 A 細胞

酵素精製用 (SSBを除く) ; C3Hマウス乳癌由来 F M 3 A 細胞は、花岡らの方法⁴⁶⁾に従って集めた。6~7 週齢の雌 ddyマウスの腹腔内に 1×10^6 個 (1×10^7 cells/ml の懸濁液を 0.1 ml) を植え込み、飼育5日目に 100 μ g の FudR を腹腔内投与し、16時間後に開腹し腹水を集めた。細胞は、PBS(-) で2回洗浄後、buffer1で2回洗浄して赤血球を除き、-80°C に凍結保存した。一匹のマウスより約 3×10^9 個以上の細胞が得られた。尚、FudR処理を省いても、本研究材料の採集法としては特に問題はない。

ポリオーマウイルス無細胞DNA複製系及びSSB精製用 ; 上述の方法でマウス腹腔内より回収した細胞をPBS(-)洗浄後、後述の細胞抽出液の調製にしたがって調製した。尚、従来ポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系用にはスピナー培養により集めた細胞を用いてきたが、本方法により集めた細胞を用いても特に問題はない。

細胞抽出液

ポリオーマウイルス無細胞DNA複製系及びSSB精製の F M 3 A 細胞抽出液は上記の方法で集めた細胞を凍結保存することなく、直ちに以下の方法により調製した。操作はすべて 0~4°C で行った。

PBS(-)洗浄後の細胞を低張緩衝液 (20 mM Hepes·KOH(pH7.5), 5 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.25 mM PMSF) で1回洗浄後、再度、細胞と等容量の低張緩衝液を加えて7分間氷上に置いて膨潤させた。細胞懸濁液を約10 mlずつ Teflon-Glassホモジナイザー (20 ml) に移し、ホモジナイズ (20~50回程度) により破碎した。細胞の破碎は、0.4% エリスロシンを用いて光顕により確認した。次に、細胞破碎液に、攪はんしながら 5 M NaCl を最終濃度が 0.2 M と

なるようにゆっくり加えた後、日立の小型超遠心機を用いて RP80A Tローターで、55,000 rpm, 30分間遠心した。遠心後上清を回収し、ポリオーマウイルス無細胞DNA複製系で用いる場合には 20 mM HEPES·KOH(pH7.0), 0.1 mM EDTA-Na₃, 50 mM NaCl, 10%(v/v) glycerol, 1 mM DTT, 0.25 mM PMSFに対して6時間透析し(3時間毎に透析外液を交換)、また、SSBの精製用には0.2 M NaCl-bufferH に対して6時間透析した後、再度、日立小型超遠心機により RP120ATローターで、55,000 rpm, 20分間遠心後、その上清を-80°Cに凍結保存した。最終的に、蛋白濃度が約 20~30 mg/mlの細胞抽出液が得られた。

HeLa細胞の抽出液は、スピナー培養により集めた細胞より、上記のFM3A細胞の場合と全く同様の方法により調製した。

ポリオーマウイルスT抗原

ポリオーマウイルスT抗原は、バキュロウイルス-昆虫細胞発現ベクター系を用いて調製した。基本的には、ポリオーマウイルスT抗原の遺伝子をバキュロウイルスベクターに組み込んだ組換えウイルスを、夜盗蛾(*Spodoptera frugiperda*)幼虫より樹立されたSF27細胞に感染させてT抗原を発現させた後、細胞を破碎して抗ポリオーマウイルスT抗原抗体カラムを用いて調製した。

組換えウイルス(vEV51LT)は、L.Millerらにより、夜盗蛾細胞に感染するバキュロウイルス *Autographa carfornia nuclear polyhedrosis virus* (環状二本鎖DNAゲノムが外膜で包まれた棒状ウイルス)を利用して作成されたものである⁴⁷⁾。ポリオーマウイルスT抗原の調製の成否はこのウイルス液を濃いものを調製できるかどうかで決まるといっても過言ではない。

抗ポリオーマウイルスT抗原抗体カラムは、抗ポリオーマウイルスT抗原抗体を産生するハイブリドーマF4⁴⁸⁾をヌードマウスに腹腔内注射して得た腹水を用いて作成した。腹水を50%飽和硫酸により沈澱させ、沈澱を0.1 M NaHCO₃(pH8.3), 0.5 M NaClに溶解させ

て透析したものを、CNBr-activated Sepharose CL4B (Sigma) と室温で2時間振とうして蛋白を結合させた。レジン回収した後、1 M ethanolamine (pH8.0) を加え、さらに室温で2時間振とうした後、ブフナーろうと上で 0.1 M NaHCO_3 (pH8.3), 0.5 M NaCl、次いで 0.1 M acetic acid (pH4.0), 0.5 M NaCl, 再度 0.1 M NaHCO_3 (pH8.3), 0.5 M NaCl で洗浄後、20 mM Tris·HCl (pH8.5), 1 mM EDTA- Na_3 , 0.5 M NaCl, 50% ethylene glycol, 10% glycerol 中に20分間放置した。レジンはさらに PBS(-) で充分洗浄して4℃で保存した。

T抗原は以下のように調製した。φ150 mmプレート (Lux) 50~60枚にSF27細胞を植え込み、70~80% confluentになったところで培地を取り除き、プレート当たり5 mlのウイルス液 (vEV51LT) を加えて室温で1時間放置した (時々プレートを揺すって、ウイルス液をまんべんなくひろげてやる)。次に、30 mlの10% 非動化牛胎児血清と抗生物質を添加したTC-100培地 (Gibco) を加え、28℃で60~72時間培養した。ウイルス液を調製する場合には、5~7日間程度培養し、ほとんど全ての細胞がウイルスの感染により破壊されていることを確認した後、無菌的に低速遠心の上清を回収して4℃で保存した。T抗原を得る場合には、顕鏡によりウイルスが充分感染して細胞が膨らんでいることを確認した後、優しいピベッティングにより細胞を回収して、800 rpm, 5分間の遠心により細胞を集め、氷冷したPBS(-)で2回洗浄した。細胞ペレット量はこの時点で6~10 mlであった。以下の操作は、全て0~4℃で行った。ペレットに60 mlのpH9.0 buffer (20 mM Tris·HCl (pH9.0), 1 mM EDTA- Na_3 , 0.3 M NaCl, 10% glycerol, 1% NP40, 1 mM DTT, 0.25 mM PMSF) を加え、5分毎によく攪はんしながら15分間氷中で抽出を行った。この細胞破砕液をトミー精工の4Nローターで15,000 rpm, 40分間遠心後、上清を回収し、その1/2量のpH6.8 buffer (100 mM Tris·HCl (pH6.8), 1 mM EDTA- Na_3 , 10% glycerol, 1% NP40, 1 mM DTT, 0.25 mM PMSF) を加えてpH8.0に合わせ、50 mlのコニカルチューブ2本に分注した。次いで、loading buffer (20 mM Tris·HCl (pH8.0),

1 mM EDTA-Na₃, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 1% NP40, 1 mM DTT, 0.25 mM PMSF) でよく洗浄した Sepharose CL4B をチューブ当り 3 ml ずつ加えて 4℃ で 1 時間振とうして、非特異的に吸着する蛋白や高分子 DNA を吸着させた後、遠心により除去した。遠心後の上清には、loading buffer で平衡化した抗ポリオーマウイルス T 抗原抗体 F4 を結合させた Sepharose CL4B をチューブ当り 2 ml ずつ加えて 0℃ で一晩振とうした。翌日、遠心によりレジンを回収し、氷冷した loading buffer (-NP40) で洗った後カラムにつめた。カラムは、loading buffer (-NP40) で洗った後、0.5 M NaCl-buffer B (20 mM Tris·HCl (pH8.5), 1 mM EDTA-Na₃, 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.25 mM PMSF) で洗い、溶出は 50% ethylene glycol-0.5 M NaCl-buffer B で行った。溶出は、7 ml/hr, 0.5 ml/fraction で行い、各フラクション 10 μl を用いて、Bio-Rad 社の蛋白定量キットにより蛋白定量を行った。蛋白のピーク付近を集め (通常 1 ml 程度のピークとその付近の 1.5 ml 程度のサイドピークを別々に集める)、1 l の透析 buffer (10 mM Hepes·KOH (pH7.5), 0.1 mM EDTA-Na₃, 5 mM NaCl, 50% glycerol, 1 mM DTT, 0.25 mM PMSF) に対して 0℃ で一晩透析した後、-20℃ で保存した。ポリオーマウイルス T 抗原は、凍結により失活するので凍結保存は避ける。Fig 2 に標品を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、クマジーブリリアントブルー染色により検出した結果を示した。T 抗原に相当する 100K のバンドが、検出され、精製度は、90% 以上であった。

鋳型プラスミド DNA

ポリオーマウイルス無細胞 DNA 複製系の鋳型 DNA として、ポリオーマウイルスの複製開始点 (origin) を含む、supercoiled closed circular (RF 1) プラスミド DNA を用いた。主に、ポリオーマウイルスの全ゲノムを含むプラスミド p37.3A2 DNA より、origin 及び enhancer 領域を含む BamH I サイトから Sac I サイトを切り出して (4633~569)、pUC19 DNA の Sma I サイトに組み込んだ

pPy1228UDNA を RbCl 法により大腸菌 HB101 (dam⁺) にトランスフォーメーションし、アルカリ法により大量に調製したものを使用した。

pPy1228UDNA は以下のように作成した。p37.3A2DNA を BamHI で切断した後、さらに、SacI で切断して 0.8% アガロースゲル電気泳動を行い、臭化エチジウムで染色後、ポリオーマウイルスの origin DNA を含む 1233 b.p. のフラグメントをゲルより回収した。このフラグメントの末端を、T4 DNA polymerase を用いて、平滑末端にした後、pUC19DNA を SmaI で切断後、大腸菌のアルカリ性フォスファターゼで処理したものに、Takara の DNA ライゲーションキットを用いて組み込んだ。得られたプラスミド DNA は、3914 塩基対 (計算上) で、種々の制限酵素による切断パターンより、ポリオーマウイルス DNA は、pUC19DNA に対して逆向きに組み込まれたものであった。尚、酵素は、すべて Takara より購入し付属のマニュアルに従って用いた。

トランスフォーメーション及びアルカリ法によるプラスミド DNA の大量調製は、既述の方法⁴⁹⁾に従った。

無細胞 DNA 複製系における DNA 合成活性測定法

ポリオーマウイルスの無細胞 DNA 複製系における DNA 合成は、Fig 3 に示す反応液中で、また、SV40 の無細胞 DNA 複製系における DNA 合成は、鋳型 DNA 及び T 抗原を SV40 のものに変えた反応液中で、それぞれ 37℃ で 60~120 分間反応後、酸不溶性画分に取り込まれた放射活性をグラスフィルター (Whatman) 上に回収して測定した。また、粗抽出液を用いず、精製した酵素・蛋白質のみによる反応の場合には蛋白が希薄であることによる酵素の失活を防ぐために 0.1 mg/ml BSA を反応液に添加した。

無細胞 DNA 複製系における DNA 複製反応産物の解析

ポリオーマウイルス無細胞 DNA 複製系における DNA 合成反応

が、半保存的 (semiconservative) 複製タイプの反応であることを、制限酵素 Dpn I を用いて検討した。制限酵素 Dpn I は、二本鎖 DNA 中の -GATC- の 4 塩基配列を認識して、両鎖共にアデニン残基がメチル化されているものを選択的に切断する。そこで、鋳型 DNA を damメチラーゼを持つ大腸菌株 HB101 を利用して調製した場合、両鎖がメチル化された状態であるため Dpn I で切断されるが、複製が半保存的に行われれば少なくとも片鎖はメチル化されていない状態となり Dpn I で切断されなくなる。すなわち、Dpn I で切断されない反応産物を以下の方法により観察した。

ポリオーマウイルス無細胞 DNA 複製系において反応液組成を以下のように変えて行った。

25 μ M [3 H]dTTP \rightarrow 100 μ M dTTP (cold)

100 μ M dCTP(cold) \rightarrow 10 μ M [α - 32 P]dCTP

37°C で各時間反応後、各々 1 μ l の 0.5 M EDTA- Na_3 と 20 mg/ml glycogen、3 μ l の 10% SDS、5 μ l の 10 mg/ml proteinase K を加えて攪はん後、37°C で 30 分間反応させた。反応終了後、等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1) で 2 回、さらに、クロロホルム：イソアミルアルコール (24:1) で 2 回処理して蛋白及び SDS を除いた後、1/4 容量の 10 M 酢酸アンモニウムとさらに、その 2.5 容量のエタノールを加え、-80°C で DNA を沈澱させた。沈澱は、遠心により回収して 70% エタノールで洗った後、真空デシケーター中でよく乾燥し ddw に溶解した。サンプルは、さらに、付属のマニュアルに従って制限酵素処理を行った後、再度エタノール沈澱を行い、アガロースゲル電気泳動用のサンプル buffer (89 mM Tris·borate (pH 8.2), 2 mM EDTA- Na_3 , 0.1% bromphenol blue, 0.1% xylene cyanol, 10% glycerol) に溶解し、0.8% アガロースゲルにのせ、TBE buffer (Tris·borate (pH 8.2), 2 mM EDTA- Na_3) 中で電気泳動を行った。ゲルは、臭化エチジウムにより染色して、無処理の DNA の切断の有無を確認した後、乾燥してオートラジオグラフィを行った。

オリゴリボヌクレオチド反応産物の解析

DNAプライマーゼまたはDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体によるオリゴリボヌクレオチド合成産物の解析は、各実験ごとに指定した鋳型DNAと酵素・蛋白質を用いて、ポリオーマウイルス無細胞DNA複製系の反応液組成を以下のように変えた系で反応させて解析した。

200 μ M UTP (cold) \rightarrow 10 μ M [α - 32 P]UTP

(0.37~2.22 MBq/assay; 実験毎に指定)

100 μ M dATP, dCTP, dGTP \rightarrow なし

25 μ M [3 H]dTTP \rightarrow なし

37°Cで各時間反応後、各1 μ lの0.5 M EDTA-Na₃と20 mg/ml glycogen、3 μ lの10% SDS、5 μ lの10 mg/ml proteinase Kを加えて、さらに37°Cで30分間処理した。次に、フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1)で2回、クロロホルム:イソアミルアルコール(24:1)で2回処理した後、1/4容量の10 M 酢酸アンモニウムと2.5容量のエタノールを加えて-80°Cで核酸を沈澱させた。沈査は、70% エタノールで洗浄後、真空デシケーター中でよく乾燥させ、ddw(10 または 20 μ l)に溶解し、0.1 M 酢酸ナトリウム(pH5.0), 10 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 0.2 mg/ml ヘパリン, 0.2 mg/ml 酵母 tRNA, 1 unit DNase I よりなる反応液(50 μ l)中で、37°Cで3時間反応させ鋳型DNAを分解した。ヘパリン及び酵母 tRNAは、DNase I中にわずかに混在するRNase活性により反応産物が分解されるのを防ぐために加えた。尚、Fig 39に示すオリゴリボヌクレオチド合成のorigin依存性に関する実験では、オートラジオグラフィーのバックグラウンドを低く抑えるために、この操作の直前に付属のマニュアルに従って調製した反応液(20 μ l)中で大腸菌のアルカリ性フォスファターゼ(0.3 unit:Takara)で、37°Cで1時間処理して、取り込まれなかった[α - 32 P]UTPを分解した。DNase I処理後のサンプルは、6 μ lの0.5 M EDTA-Na₃を加

えて反応を停止し、酢酸アンモニウム及びエタノールを加えて再度沈澱させた。沈査は、70% エタノールで洗浄して乾燥し、10 μ l の 97% formamid, 0.01% bromphenol blue, 0.01% xylene cyanol に溶解し、沸騰水中で 30 秒間加熱後、氷水中で急冷した。これを、7 M 尿素を含む 20% ポリアクリルアミドゲル (30×20×0.1 cm) にのせ、TBE buffer 中で、電圧一定 (800~900 V) で約 4 時間、bromphenol blue が 16~18 cm 移動するまで電気泳動を行った。泳動後のゲルは、サララップで包み、-80°C でオートラジオグラフィーを行った (2~8 日間)。鎖長マーカーとして、oligo(rA)₁₀ を [γ -³²P]ATP と T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、5' 末端を標識したものを、各図中に 10 n.t. として示した。

DNA プライマーゼ活性測定法

DNA プライマーゼ活性は、poly(dT) を鋳型として合成された RNA 量を、それをプライマーとして大腸菌の DNA ポリメラーゼ I により合成された DNA 合成量を測定する間接法により行った。

反応液 (30 μ l) : 20 mM Tris·HCl (pH8.0), 3.3 mM 2-mercapto ethanol, 0.2 mg/ml BSA, 2 mM ATP, 2 mM MnCl₂, 0.1 mM [³H]dATP (0.1 Ci/mmol), 1.25 μ g poly(dT), 0.4 units E. coli DNA polymerase I (klenow fragment)

反応は 37°C で 15~120 分間行い、酸不溶性画分に取り込まれた放射活性をガラスフィルター上に集めて測定した。

酵素単位 1 unit は、37°C で 1 時間に 1 nmol の dAMP が取り込まれる量とした。

DNA ポリメラーゼ α 活性測定法

反応液 (30 μ l) : 20 mM Tris·HCl (pH8.0), 3.3 mM 2-mercapto ethanol, 0.2 mg/ml BSA, 5 mM MgCl₂, 15 μ g activated DNA, 0.1 mM dATP, dCTP, dGTP, 0.15 mM [³H]dTTP (0.1 Ci/mmol)

反応は 37°C で 30~60 分間行い、取り込まれた放射活性を既述の

DE 81ペーパー (Whatman) 法により測定した。

酵素単位 1 unitは、37°Cで1時間に 1 nmolの dTMPが取り込まれる量とした。

F M 3 A細胞のDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体、DNAポリメラーゼ α 、DNAプライマーゼ

当研究室では、種々のDNA複製関連因子を系統的に精製する方法を確立しており、DNAポリメラーゼ α 及びDNAプライマーゼは、それらの一つとして精製した。基本的には、高山らの方法¹¹⁾ ¹²⁾に従い、抗DNAポリメラーゼ α 抗体カラムを用いて行った。以下の操作は、すべて0~4°Cで行った。-80°Cで凍結保存しておいたF M 3 A細胞 (1×10^{11} 個)を、氷上で解冻し、 1.25×10^8 cells/mlとなるようbuffer1に懸濁させた。この懸濁液に、Branson Sonifer 40Wを用いて、10秒間ずつ3~5回、20秒間の冷却時間をおきながら、超音波処理を施して細胞を破碎した。細胞の破碎は顕鏡により確認した。この細胞破碎液に、1/10容量の3.3 M KCl-buffer1を、ゆっくり攪はんしながら少しずつ加えて0.3 M KClとし、さらに30分間緩やかに攪はんして蛋白を抽出した。これを、トミー精工の9Nローターを用いて、10,000 rpmで30分間遠心し、さらに、その上清を、日立のRP42ローターを用いて、40,000 rpmで1時間超遠心を行って上清を回収し、粗抽出液 (770 ml) とした。

粗抽出液は、あらかじめ0.3 M KCl-buffer1で平衡化しておいたDEAEセルロースカラム (1 l) にかけて、同緩衝液で洗浄した。素通り画分は、280 nmと260 nmの吸光度を測定し、蛋白の多い画分を集めた (840 ml)。この操作により、大部分の核酸は除去された。

除核酸後の画分は、1/1,000容量の10% tritonX-100を加えた後、50 mM KCl-buffer2になるまで透析した。透析後、トミー精工の9Nローターで、9,500 rpmで30分間遠心して沈殿物を除き、これを、あらかじめ50 mM KCl-buffer2で平衡化しておいたDEAEセルロースカラム (500 ml) にかけて。カラムは、同緩衝液で洗浄後、吸

着した蛋白を 0.5 M KCl-buffer2で溶出した。DNAポリメラーゼ α 及びDNAプライマーゼ活性は、0.5 M KCl-buffer2溶出画分に検出された。

2nd DEAEセルロースカラム吸着画分は 0.1 M KCl-buffer2に透析後(690 ml)、あらかじめ 0.1 M KCl-buffer2で平衡化しておいたフォスフォセルロースカラム(180 ml)にかけた。カラムは、同緩衝液で洗浄後、buffer2中、0.1~1 M KCl直線塩濃度勾配(1.8 l)により吸着した蛋白を溶出した。DNAポリメラーゼ α 及びDNAプライマーゼ活性は、0.35 M KCl付近で溶出され、0.4 M KCl付近に溶出されたDNAヘリカーゼBとまとめて回収した(750 ml)。

フォスフォセルロースカラム後の画分は、buffer2で希釈して 0.35 M KCl-buffer2として、あらかじめ同緩衝液で平衡化しておいた、抗DNAポリメラーゼ α 抗体カラムSJK287セファロースカラム(4 ml)にかけた。レジンに非特異的に吸着する蛋白を除去するために、セファロースCL4Bを前カラム(5 ml)として接続して行った。カラムは、同緩衝液でよく洗浄後、前カラムをはずし、吸着した蛋白を、1 M KCl-buffer2と、50 mM DiethanolamineHCl (pH 10.2)-1 M KCl-50% ethylene glycol-10% glycerol-0.1 mM EDTA-Na₃-1 mM 2-mercaptoethanol-0.25 mM PMSFで順次溶出した。アルカリ性で溶出する場合には、溶出後直ちに 1 M potassium phosphate (pH6.0)-20% ethylene glycolと混ぜ合わせて中和した。DNAポリメラーゼ α 活性は、アルカリ溶出画分にもみ検出され、DNAプライマーゼは、1 M KCl-buffer2溶出画分とアルカリ溶出画分の比較的前の方に検出された。アルカリ溶出画分のうち、DNAポリメラーゼ α 活性とDNAプライマーゼ活性が共に検出された部分は 0.1 M KCl-50% glycerol-buffer1に透析して、DNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体として、-80°Cに保存した。

DNAプライマーゼは、1 M KCl-buffer2溶出画分より得た。1 M KCl-buffer2溶出画分(30 ml)は、1/100容量の 10 mg/ml BSAを失活を防ぐために加え、0.1 M KCl-buffer2に透析した後、同緩衝液で

あらかじめ平衡化しておいたフオスフォセルロースカラム (1.5 ml) にかけた。カラムに吸着した蛋白は、buffer2中、0.15 M KCl~0.7 M KCl直線塩濃度勾配 (15 ml) により溶出した。DNAプライマーゼ活性は、0.46 M KCl付近に溶出された。DNAポリメラーゼ α 活性は、ごくわずかに、0.35 M KCl付近に溶出された。DNAポリメラーゼ α 活性の全く検出されなかった部分のDNAプライマーゼを回収し、0.1 M KCl-50% glycerol-buffer1に透析して、DNAプライマーゼとして、 -80°C に保存した。

DNAポリメラーゼ α は、アルカリ溶出画分のうち、DNAプライマーゼ活性のほとんど検出されなかった部分を回収し、0.05 M KCl-buffer2に透析し、あらかじめ同緩衝液で平衡化しておいたフオスフォセルロースカラム (1.5 ml) にかけた。カラムに吸着した蛋白は、buffer2中、0.05 M KCl~0.7 M KCl直線塩濃度勾配により溶出した。DNAポリメラーゼ α 活性は、0.3 M~0.35 M KCl付近に溶出され、DNAプライマーゼ活性は検出されなかった。活性のピークを回収後、0.1 M KCl-50% glycerol-buffer1に透析して、DNAポリメラーゼ α として、 -80°C に保存した。

Fig 2に、各標品のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示した。180Kとその分解産物である160K及び68Kの3本のバンドはDNAポリメラーゼ α 由来のものであり、54Kと46Kの2本のバンドはDNAプライマーゼに由来するものである。DNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体中には両方の、また、DNAポリメラーゼ α 及びDNAプライマーゼのサンプル中には、それぞれのバンドが検出され、相互の混在はない。

HeLa細胞のDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体

HeLa細胞のDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体は、抗DNAポリメラーゼ α 抗体カラムを用いて得ることはできなかった (抗DNAポリメラーゼ α 抗体カラムSJK237セファロースを用いた結果、DNAプライマーゼが素通りしてしまい、複

合体のまま得ることはできなかつた)ので、以下のように行った。操作は、すべて 0~4°C で行った。

2×10¹⁰個分の HeLa 細胞抽出液 (150 ml) を、0.2 M NaCl-bufferH に透析後、日立の RP42 ローターで、40,000rpm で 30 分間遠心した。その上清は、あらかじめ 0.2 M NaCl-bufferH で平衡化しておいた フォスフォルセルロースカラム (250 ml) にかけて、同緩衝液で洗浄後、吸着した蛋白を、bufferH 中、0.2 M NaCl~1 M NaCl 直線塩濃度勾配 (2 l) により溶出した。DNA ポリメラーゼ α 活性は、0.38 M NaCl 付近に溶出された。活性のピークを回収し (455 ml)、buffer2 を加えて 0.35 M KCl-buffer2 とイオン強度を揃えて、あらかじめ 0.35 M KCl-buffer2 で平衡化しておいた ハイドロキシアパタイトカラム (100 ml) にかけて。カラムは、同緩衝液で洗浄後、吸着した蛋白を、0.35 M KCl-80 mM (final 100 mM) potassium phosphate-buffer2 で溶出して回収した (54 ml)。ハイドロキシアパタイトカラムに吸着した画分は、50 mM KCl-buffer2 に透析後、あらかじめ同緩衝液で平衡化しておいた DEAE セルロースカラム (40 ml) にかけて。カラムは、同緩衝液で洗浄後、吸着した蛋白を 0.5 M KCl-buffer2 で溶出して回収した (29 ml)。DEAE セルロースカラムに吸着した画分は、50 mM KCl-buffer2 に透析後、あらかじめ同緩衝液で平衡化しておいた一本鎖 (ss) DNA セルロースカラム (15 ml) にかけて。カラムは、同緩衝液で洗浄後、吸着した蛋白を buffer2 中、50 mM KCl~0.5 M KCl 直線塩濃度勾配により溶出した。DNA ポリメラーゼ α 活性と DNA プライマーゼ活性は共に 140 mM KCl 付近に溶出された。活性のピークを回収し (41 ml)、50 mM KCl-buffer2 に透析後、FPLC の Mono Q カラムにかけて。カラムに吸着した蛋白は、buffer2 中、50 mM KCl~0.5 M KCl 直線塩濃度勾配 (20 ml) により溶出した。尚、流速は 0.5 ml/min で、また、分画は 1 min (0.5 ml)/fraction で行った。DNA ポリメラーゼ α 活性と DNA プライマーゼ活性は、共に、0.31 M KCl 付近に溶出された。活性のピークを回収し、0.1 M KCl-50% glycerol-buffer1 に透析し

て、DNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体として、
-80℃に保存した。

HeLa細胞のDNAポリメラーゼ α

HeLa細胞のDNAポリメラーゼ α は、DNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体より、抗DNAポリメラーゼ α 抗体カラムを用いて精製した。操作は、すべて0~4℃で行った。

DNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体(0.5 ml)は、0.2 mg/ml BSAを含む0.1 M KCl-buffer2(10 ml)で希釈して、あらかじめ0.1 M KCl-buffer2で平衡化しておいた抗DNAポリメラーゼ α 抗体カラムSJK237セファロースカラム(1 ml)にかけた。からむは、0.1 M KCl-0.2 mg/ml BSA-buffer2でせんじょうご、100 mM potassium phosphate(pH 7.5), 0.1 mM EDTA- Na_3 , 1 M KCl, 20% ethylene glycol, 0.2 mg/ml BSA, 1 mM 2-mercaptoethanol, 0.01% tritonX-100, 0.25 mM PMSF、続いて、100 mM potassium phosphate(pH 7.5), 0.1 mM EDTA- Na_3 , 1 mM 2-mercaptoethanol, 0.01% tritonX-100, 0.25 mM PMSFで洗浄した。DNAプライマーゼ活性は、0.1 M KCl-buffer2でカラムにかけた段階でほとんど溶出されてしまったが、活性は弱く、回収して使用することは困難であった。DNAポリメラーゼ α は、20 mM Tris-HCl(pH 8.5), 0.1 mM EDTA- Na_3 , 1 M KCl, 50% ethylene glycol, 1 mM 2-mercaptoethanol, 0.01% tritonX-100, 0.25 mM PMSFにより溶出した。この画分には、DNAプライマーゼ活性は全く検出されなかった。これを回収し、0.1 M KCl-50% glycerol-buffer1に透析して、DNAポリメラーゼ α として-80℃に保存した。

HeLa細胞のDNAプライマーゼ

DNAプライマーゼは、 1×10^{11} 個のHeLa細胞の抽出液を、フ*スフォセルロースカラムにかけた後、抗DNAポリメラーゼ α 抗体カラムSJK237に100 mM potassium phosphate(pH 7.5)を

む緩衝液でかけ、100 mM potassium phosphate(pH 7.5), 1 M KClを含む緩衝液で溶出された画分より、以下のように調製した。操作は、すべて 0~4℃で行った。尚、ここまでの操作については、詳しくは、当研究室の多田の修士論文⁵⁰⁾を参照されたい。

抗DNAポリメラーゼ α 抗体カラムの高塩洗浄画分(6 ml)は、50 mM KCl-buffer2に透析後、同緩衝液で洗浄しておいた ssDNA セルロースカラム(3 ml)にかけた。カラムは、同緩衝液で洗浄後、buffer2中、50 mM KCl~400 mM KCl直線塩濃度勾配(30 ml)により、吸着した蛋白を溶出した。DNAプライマーゼ活性は、250 mM KCl付近に溶出され、DNAポリメラーゼ α 活性は、全く検出されなかった。活性のピークを回収し、30 mM KCl-buffer2に透析後(4 ml)、さらにMono Qカラムにかけた。Mono Qカラムに吸着した蛋白は、buffer2中、30 mM KCl~300 mM KCl直線塩濃度勾配により溶出した。尚、流速は 0.5 ml/minで、分画は 1 min(0.5 ml)/fractionで行った。DNAプライマーゼ活性は、0.2 M KCl付近で溶出され、これを回収し、0.1 M KCl-50% glycerol-buffer1に透析して、DNAプライマーゼとして-80℃に保存した。

DNAポリメラーゼ α 活性促進活性測定法及び反応産物の解析

反応液(30 μ l) ; 20 mM Tris·HCl(pH7.5), 3 mM DTT, 40 μ g/ml BSA, 8% polyethylene glycol(6000), 7 mM MgCl₂, 0.2 μ g poly(dA)₄₀₀-oligo(dT)₁₂₋₁₈ (20:1), 0.1 mM [³H]dTTP (0.5 Ci/mol), DNA polymerase α

反応は 37℃で 30分間行い、酸不溶性画分に取り込まれた放射活性をグラスフィルター上に回収して測定した。

反応産物を解析する場合には、[³H]dTTPの代わりに[α -³²P]dTTP (37 KBq/assay)を標識ヌクレオチドとして、もしくは、あらかじめ [γ -³²P]ATPと T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、oligo(dT)₁₀の 5'末端を標識したものを鋳型DNAに加えて、以下のように行った。

各反応液中で 37°C で各時間反応後、30 μ l の 0.2 mg/ml 酵母の tRNA, 20 mM EDTA-Na₃ を加えて反応を停止させた。次に、等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25:24:1)、クロロホルム：イソアミルアルコール (24:1) で各 1 回処理後、1/4 容量の 10 M 酢酸アンモニウムと 2.5 容量のエタノールを加えて DNA を沈澱させた。沈澱は、よく乾燥させた後 10 μ l の 97% formamid, 0.01% bromphenol blue, 0.01% xylene cyanol に溶解し、沸騰水中で 30 秒間加熱後急冷し、7 M 尿素を含む 10% ポリアクリルアミドゲルにのせ TBE buffer 中で電気泳動を行った。ゲルは、-80°C でオートラジオグラフィを行った。鎖長マーカーとして、 ϕ X174 ファージ DNA の Hae III 消化断片 (1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 n.t.; Takara) の 5' 末端を [γ -³²P]ATP と T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて標識したものをを用いた。

DNA ポリメラーゼ δ 活性測定法

DNA ポリメラーゼ δ 活性は、基本的には PCNA (proliferating-cell nuclear antigen) の存在下、poly(dA)-oligo(dT) を鋳型として以下のように行った。

反応液 (30 μ l) : 20 mM Hepes·KOH (pH7.0), 2 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA, 7 mM MgCl₂, 0.2 μ g poly(dA)₄₀₀-oligo(dT)₁₂₋₁₈ (20:1), 33.3 μ M [³H]dTTP (0.5 μ Ci), 0.38 μ g PCNA

反応は 37°C で 15~30 分間行い、酸不溶性画分に取り込まれた放射活性をガラスフィルター上に回収して測定した。

グリセロール密度勾配遠心法

bufferH を基本とし、50 mM NaCl 及び 0.2 mg/ml BSA 存在下、15~35% glycerol 密度勾配 4.8 ml をニトロセルロース製の遠心管に作成し 200 μ l のサンプルを上層した。日立 RPS50 ローターを用い、44,000 rpm, 18 時間, 2°C で遠心した。分画は、遠心管の底より行った。分子量マーカーとしては、カタラーゼ (11.3 S)、アルコー

ルデヒドロゲナーゼ (7.4 S)、チトクロム C (1.83 S) を用いた。

E L I S A (enzyme-linked immunosorbent assay) 法

グリセロール密度勾配遠心後、T抗原はE L I S A法により以下のようにして検出した。

E L I S A用96穴プレート(住友ベークライト)を用い、各フラクション10 μ lに90 μ lの0.1 M sodium carbonate (pH9.5)を加えて、室温で6時間放置して蛋白をプレートに吸着させた後、TBS (20 mM Tris·HCl (pH8.0), 0.1 M NaCl) で2回洗浄し、150 μ lのブロッキング液(2% skim milkを含むTBS)を加えて室温で一晩放置してブロッキングした。翌日、洗浄液(0.1% tritonX-100を含むTBS)で3回洗浄後、抗ポリオーマウイルスT抗原抗体F4を含むブロッキング液(100 μ l)を加えて37°Cで1時間放置した。次に、洗浄液で3回洗浄後、抗マウスI g G抗体(MBL)を含むブロッキング液(100 μ l)を加えて37°Cで1時間放置し、再度洗浄液で3回洗浄後、マウスベルオキシダーゼ抗ベルオキシダーゼ抗体(Sigma)を含むブロッキング液(100 μ l)を加えて37°Cで1時間放置した。次いで、洗浄液で3回洗浄後、100 μ lの発色液(0.1 M sodium citrate (pH5.0), 0.04% o-phenylenediamine, 0.014% H₂O₂)を加えて、ベルオキシダーゼ活性を検出した。発色は、100 μ lの4 N 硫酸を加えて停止し、492 nm/405 nmの吸光を測定して数値化した。

大腸菌のSSB

大腸菌のSSBは、SSBのoverproducer strain RLM727を培養後、Lohmanらの方法⁵¹⁾で溶菌させ、硫酸アンモニウムによる塩析後、一本鎖DNAセルロースカラムにかけて精製した。

蛋白定量

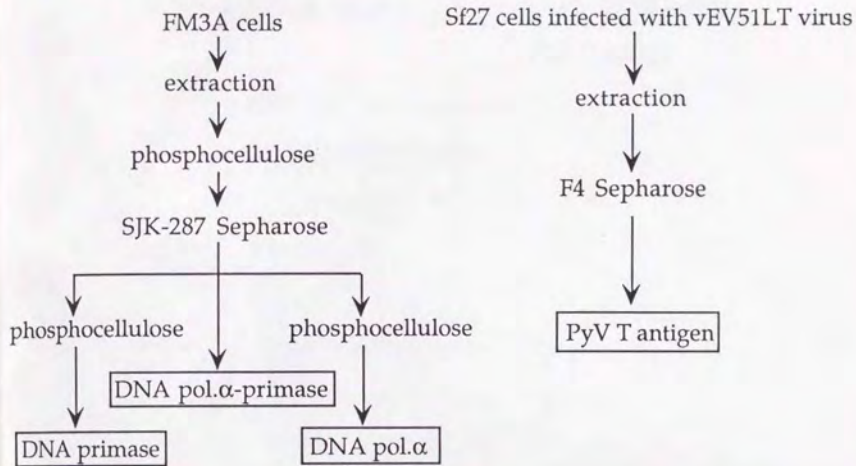
Bradfordの方法⁵²⁾により、ウシブラズマ γ グロブリン(Bio-Rad)を標準として決定した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Laemmli の方法⁵³⁾に従って行った。

Fig.2

Purification of FM3A DNA polymerase α -primase complex, DNA primase, DNA polymerase α and PyV T antigen



SDS polyacrylamide gel electrophoresis of purified enzymes

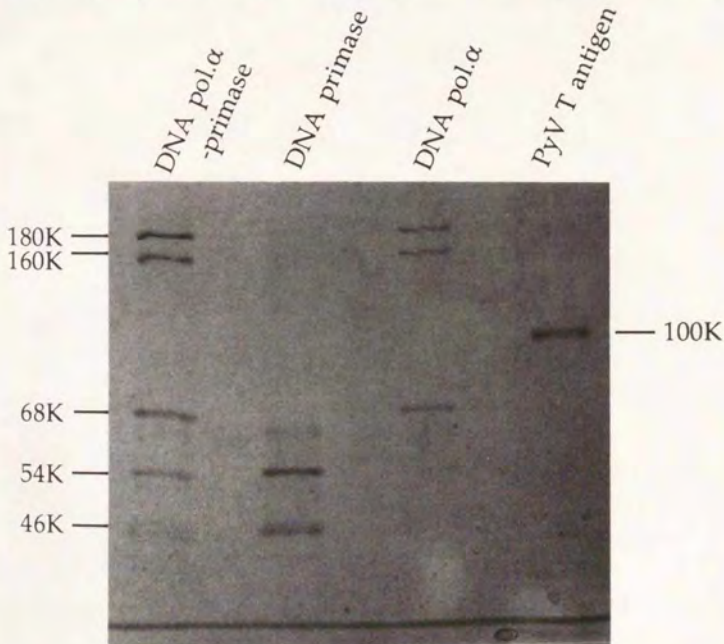


Fig.3

PyV DNA replication system (cell-free)

(50 μ l / assay)

100 mM Tris-HCl (pH 7.9)

0.5 mM dithiothreitol

7 mM MgCl₂

3.5 mM ATP

200 μ M CTP, GTP, UTP

100 μ M dATP, dCTP, dGTP

25 μ M [³H]TTP (22 - 74 kBq)

40 mM creatine phosphate

20 μ g / ml creatine kinase

0.1 - 0.4 μ g PyV origin (+) DNA

1 - 3 μ g PyV T antigen

200 μ g FM3A cell extract

第3章 一本鎖DNA結合蛋白質(SSB)

第1節 検出方法

一本鎖DNA結合蛋白質(SSB)は、SV40の無細胞DNA複製系を用いて、その細胞抽出液を分画することによりDNA複製の必須因子として同定されている。しかし、マウス細胞より検出・精製された例はない。そこで、ポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系を用いて、マウスFM3A細胞の抽出液を分画することによりSSBを検出・精製しようと試みたが、分画した画分を組み合わせでDNA複製活性を再現性よく回復させることは困難であった。そこで、活性の検出方法について検討した結果、DNAポリメラーゼ α 活性に対する促進活性を検出する方法とポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系に対する促進活性を検出する方法を併用するのが有効であった。SSBの精製については後述するが、その予備検討で行った結果についてFig 4~Fig 8に示した。Fig 4には、フォスフォセルロース及びハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー後のサンプルを、Q-セファロースカラムにかけbufferH中NaClの濃度勾配により溶出し、DNAポリメラーゼ α 活性の促進活性を検出した結果について示した。その結果、Q-セファロースカラムクロマトグラフィーによりDNAポリメラーゼ α 活性促進活性は0.1 M NaClで素通りする画分と塩濃度が上がり始めた直後、及び0.22 M NaCl付近に溶出された。素通り画分と塩濃度が上昇しはじめてすぐ溶出される画分をIとし、また、0.22 M NaCl付近に溶出される画分をIIとして集め、それぞれ一本鎖DNAセルロースカラムにかけた結果をFig 5とFig 6に示した。Iは、0.15 M NaClを含む、IIは0.2 M NaClを含むbufferHでカラムにかけた後、それぞれ、0.75 M NaClを含むbufferH及び1.5 M NaClと50%エチレングリコールを含むbufferHで溶出し、蛋白の溶出は280 nmの吸光度により検出した。各溶出画分は、蛋白のピークを集めて、

0.1 M NaClを含む bufferHに透析後 DNAポリメラーゼ α 活性促進活性を測定した。その結果、DNAポリメラーゼ α 活性促進活性は、11-1.5 M NaCl溶出画分と 11-0.75 M NaCl溶出画分に強く検出された (Fig 7)。さらに、これらの画分についてポリオーマウイルスの無細胞 DNA複製系に対する促進活性について検討した結果、11-1.5 M NaCl溶出画分にのみ促進活性が検出された (Fig 8)。これらの結果より、この検出法により SSB が検出されると期待された。

第2節 FM3A細胞のSSBの精製

上述の条件検討をもとに、最終的に以下のように行った。尚、操作はすべて 0~4℃で行った。

細胞を回収後、凍結保存することなく直ちに破碎して調製した抽出液 118 ml (5.4×10^{10} 細胞分) を 0.2 M NaCl-bufferHで平衡化したフォスフォセルロースカラム (80 ml) にかけて、同緩衝液でよく洗浄後、その素通り画分を集めた。素通り画分 (150 ml) は、bufferHで2倍に希釈して 0.1 M NaClに合わせ、0.1 M KCl-bufferHで平衡化したハイドロキシアパタイトカラム (300 ml) にかけて。同緩衝液で洗浄後、カラムに吸着した蛋白は、80 mM potassium phosphate (pH7.5)-0.1 M KCl-bufferHで溶出した。溶出された蛋白を回収し、0.4 M NaCl-bufferHに透析した後 (200 ml)、0.4 M NaCl-bufferHで平衡化した一本鎖DNAセルロースカラム (20 ml) にかけて。カラムは、同緩衝液で洗浄後、さらに、0.8 M NaCl-bufferHで洗浄し、吸着した蛋白は 1.5 M NaCl-50% ethylene glycol-bufferHで溶出した。溶出画分 (11 ml) は、0.1 M NaCl-bufferHに透析後、FPLC MonoQ (HR5/5)カラムにかけて、bufferH中 0.1~0.3 M NaCl直線濃度勾配により溶出した (Fig 9)。SSBは、DNAポリメラーゼ α 活性促進活性により検出して回収し、0.1 M NaCl-40% (final 50%) glycerol-bufferHに透析後、-20℃または -80℃に保存した。最終

的に、 5.4×10^{10} 個分のFM3A細胞抽出液より約0.9 mgのSSBが得られた。最終精製標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル(8~16%)電気泳動後クマジーブリアントブルーにより染色した結果、HeLa細胞のSSB(次節)と全く同様の70K, 35K, 14kの3本のバンドが検出された(Fig 10)。

第3節 HeLa細胞のSSBの精製

第2節のFM3A細胞のSSBの精製と同様の方法によりHeLa細胞からもSSBを精製した。

HeLa細胞の抽出液150 ml(2×10^{10} 細胞分)を0.2 M NaCl-bufferHで平衡化したフォスフェルロースカラム(250 ml)にかけ、素通り画分(260 ml)を得た。これを、bufferHで2倍に希釈してハイドロキシアパタイトカラム(150 ml)にかけ、吸着した蛋白を、80 mM potassium phosphate (pH7.5)-0.1 M NaCl-bufferHで溶出して(275 ml)、0.2 M NaCl-bufferHに透析した。透析後、一本鎖DNAセルロースカラム(8 ml)にかけ、0.2 M NaCl-bufferH次いで0.8 M NaCl-bufferHで洗浄後、1.5 M NaCl-50% ethylene glycol-bufferHで溶出した。高塩溶出画分(3.5 ml)は、0.1 M NaCl-bufferHに透析後、FPLC MonoQカラムにかけbufferH中0.1~0.3 M NaClの直線塩濃度勾配により溶出した。DNAポリメラーゼ α 活性促進活性が検出された画分を集め、0.1 M NaCl-40% (final 50%) glycerol-bufferHに透析して、 -20°C または -80°C で保存した。最終的に、 2×10^{10} 個分の細胞抽出液より、約1.4 mgのSSBが得られた。

第4節 ポリオーマウイルス無細胞DNA複製系におけるDNA合成の促進

精製したSSBによるポリオーマウイルス無細胞DNA複製系におけるDNA合成の促進について解析した。

ポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系に、FM3A細胞、HeLa細胞及び大腸菌のSSBを添加した結果、FM3A細胞及びHeLa細胞のSSBでは、全く同様に約4倍、DNA合成が促進されたが、一方、大腸菌のSSBでは、促進は約2倍程度にとどまった(Fig 11)。次に、その反応産物を $[\alpha-^{32}\text{P}]d\text{CTP}$ を標識ヌクレオチドとして解析した。T抗原の存在下及び非存在下で、各SSBを加えて反応後、制限酵素Dpn I(±)で処理して、反応産物のDpn Iによる切断の有無について検討した。制限酵素Dpn Iによる切断は、DNA合成が部分的なもの(修復等による)であることを示し、Dpn Iで切断されない反応産物はDNA合成が完全に近いもの(複製による)であることを示す(詳しくは方法参照)。T抗原の非存在下では、SSBを添加してもDpn I耐性の反応産物は合成されなかったが、T抗原の存在下では、どの種のSSBを加えた場合にもDpn I耐性の反応産物が明らかに増加した。特に、各SSBについて、Dpn I処理の有無で比較すると、HeLa細胞及びFM3A細胞のSSBではDpn I処理により切断されてしまう反応産物はほとんどないが、大腸菌のSSBの場合には、それらに比べて、ある程度の反応産物がDpn I処理により切断された(Fig 12)。これらの結果は、HeLa細胞とFM3A細胞のSSBは、DNA複製反応の中で、二本鎖DNAの巻き戻しにより生じる一本鎖DNA部分の安定化とDNA合成反応の2つのモードで関与するのに対し、大腸菌のSSBの場合には、一本鎖DNAの安定化でのみ関与していることを反映していると考えられる。

第5節 DNAポリメラーゼ α 活性の促進

poly(dA)-oligo(dT)を鋳型としてのDNAポリメラーゼ α によるDNA合成に対するFM3A細胞のSSBの効果を、2種類の方法で反応産物を標識して解析した。

$[\alpha-^{32}\text{P}]d\text{TTP}$ で標識して、SSB無添加、0.2 μg SSB、2 μ

g SSB存在下でそれぞれ 30分間反応させた結果、SSBの添加により高分子量の反応産物の増加が観察された (Fig 13)。

次に、5'末端をあらかじめ標識した oligo(dT)₁₀をプライマーとして、SSBの存在下及び非存在下で、反応産物を経時的に解析した結果、SSBの非存在下に比べ、SSBの存在下では、短時間の反応から、より高分子量の反応産物が観察された (Fig 14)。

これらの結果より、SSBによるDNA合成の促進は、主としてDNAポリメラーゼ α による1回の反応で合成されるDNA鎖長の増加、すなわち processivityの上昇によると考えられる。

第6節 まとめと考察

マウスFM3A細胞より、初めてSSBを精製した。HeLa細胞より同様の方法でSSBを精製したところ、FM3A細胞のSSBは、HeLa細胞ですでに報告されているものと全く同様の分子構成よりなる蛋白質であると考えられた。得られたSSBは、ポリオーマウイス無細胞DNA複製系におけるDNA複製反応を促進した。また、DNAポリメラーゼ α による poly(dA)-oligo(dT)を鋳型プライマーとしてのDNA合成を、主としてDNAポリメラーゼ α の processivityを上昇させることにより促進した。

SSBは、SV40の無細胞DNA複製系においては、その細胞抽出液を分画して、DNA複製に必須の因子として同定されてきた³⁶⁾³⁷⁾⁵⁴⁾⁵⁵⁾。しかし、ポリオーマウイスの無細胞DNA複製系において同様の方法による分画を試みた結果、分画した各画分を組み合わせて再現性よくDNA複製活性を検出することが困難であった。この原因としては、分画後の特に高塩溶出画分を系に添加するにあたって、塩濃度を下げるための透析により複製に必要な蛋白質が析出してしまったと思われること、また、そのことにより、各蛋白質のバランスが崩れ、系に阻害的なもの(例えばヌクレアーゼ等)の効果が強くでてしまったこと等を考えている。

SSBの精製においては、HeLa細胞よりSSBを精製した報告をもとにかなり条件検討を行った。HeLa細胞からの精製では、基本的には、フォスフォセルロースと一本鎖DNAセルロースカラムクロマトグラフィーの2ステップでかなり精製度の高いサンプルが得られる(SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で主要なバンドとして検出される)。しかし、FM3A細胞の場合、フォスフォセルロースカラムクロマトグラフィー後のサンプルを直接一本鎖DNAセルロースカラムにかけた場合、SSBは全く得られなかった。この原因は、同様の方法で調製したにも関わらず、HeLa細胞の抽出液に比べてFM3Aの抽出液中では、SSBが混在する微量の核酸に結合した状態にあり、一本鎖DNAセルロースに効率よく結合できなかったことによると考えられた。実際、フォスフォセルロースカラムクロマトグラフィー後、大容量のハイドロキシアパタイトカラムにかけ、ある程度のリン酸(80 mM potassium phosphate)存在下で溶出することにより、大部分の核酸はカラムに吸着させたまま蛋白のみを溶出するステップを行うことにより、一本鎖DNAセルロースカラムに結合するようになった。

精製において、もう1つ注意すべき点として、抽出液を調製するための細胞を凍結してはならない。細胞を回収後1度凍結保存し、後日解凍して調製した抽出液を用いて同様の方法でSSBの精製を試みた結果、全くSSBは得られなかった。この凍結保存した細胞より調製した細胞抽出液は、ポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系におけるDNA複製活性も非常に低く、SSBの添加によりDNA合成活性が回復した(Fig 1⁵)。このことから、細胞の凍結によりSSBは、核構造体に強固に組み込まれた状態となってしまう等の原因により、ほとんど抽出されなくなってしまうこと、また、SSBは、ポリオーマウイルス無細胞DNA複製系における必須の因子であると考えられる。ただし、凍結せずに調製した細胞抽出液にSSBを添加した場合にも、凍結した細胞より調製した抽出液に添加した場合とほぼ同様のDNA合成の促進が観察されたことから、

SSB以外にも細胞の凍結により損なわれたDNA複製因子の存在が示唆される。

ポリオーマウイルス無細胞DNA複製系に対するSSB添加の効果について検討した結果、FM3A細胞とHeLa細胞のSSBではほぼ同程度に、添加量に依存したDNA合成の促進が観察されたが、大腸菌のSSBを添加した場合には、より少量で促進効果が飽和した。また、反応産物を解析した結果、FM3A細胞とHeLa細胞のSSBを加えた場合には制限酵素Dpn Iに耐性の反応産物が大部分であるのに対し、それらに比べて大腸菌のSSBを加えた場合には、ある程度の反応産物がDpn Iで切断された。この結果は、SV40の系での観察により説明される。SV40の無細胞DNA複製系を用いた解析より、SSBは、DNA複製において、2つの段階、すなわち、開始とDNA鎖合成反応で関与していることが示されている。DNA複製の開始の段階では、SSBは二本鎖DNAの開裂に伴って生じる一本鎖DNA部分に結合することにより一本鎖DNAを安定化していると考えられる。この反応では、SSBは、単に一本鎖DNAに強く結合できればよく、大腸菌のSSBでも二本鎖DNAの開裂は観察できる⁵⁶⁾⁻⁵⁹⁾。一方、DNA鎖伸長反応の過程ではSSBに種特異性が観察される。HeLa細胞のSSBは、哺乳類細胞のDNAポリメラーゼ α 活性及びDNAポリメラーゼ δ 活性を促進することが示されているが、この効果は、大腸菌のSSBでは観察されない³⁸⁾⁵⁹⁾。また、原核生物においても、DNAポリメラーゼとSSBとの相互作用は知られており、大腸菌のSSBは、大腸菌のDNAポリメラーゼIIIを促進するが、バクテリオファージT4のSSB (gene 32 protein) では促進されず、逆に、T4のSSBでT4のDNAポリメラーゼは促進されるが、大腸菌のSSBでは促進されないことが報告されている⁶⁰⁾。当研究室でも、高山により、HeLa細胞のSSBによってFM3A細胞のDNAポリメラーゼ α 活性が促進されるが、大腸菌のSSBでは促進されないことが示されている¹²⁾。また、本研究によって、FM3A細胞の

SSBは、高山が示したHeLa細胞のSSBによるFM3A細胞のDNAポリメラーゼ α 活性の促進と同様の効果を与えることが示された。これらの知見をもとに考察すれば、大腸菌のSSBは、二本鎖DNAの開裂の過程でのみ関与して、複製の開始の頻度をあげることによりポリオーマウイルス無細胞DNA複製系におけるDNA合成を促進するが、その後のDNA鎖伸長反応においてDNAポリメラーゼとの相互作用がないため、DNA合成の促進は少量で飽和し、また、複製開始点近傍でのみDNA合成が行われたような反応産物が生じる。一方、FM3A細胞とHeLa細胞のSSBとの間には種特異性がなく、どちらのSSBも二本鎖DNAの開裂とDNA鎖伸長反応の両方の過程に関与できるので、大腸菌のSSBよりも高い促進効果が観察され、また、反応産物も鋳型プラスミドDNA全体が複製されたと考えられる。

SSBは3種のペプチドより成る蛋白と考えられるが、現在までに抗体を用いた解析により、70KのサブユニットにDNA結合活性があることが示されている⁶¹⁾。また、酵母よりhomologが見いだされており⁶²⁾⁶³⁾、SV40の無細胞DNA複製系で有効なこと⁶²⁾、34Kのサブユニットが細胞周期上、S期からG2期にかけてリン酸化されていることが報告されている⁶⁴⁾。SSBは、複製の開始においても重要な蛋白質であり、他の蛋白質との相互作用やリン酸化による制御には興味もたれる。34KサブユニットはすでにcDNAが得られており⁶⁵⁾、今後の研究に期待される。

FM3A細胞とHeLa細胞のSSBが、きわめて似かよった性質を示し、その分子構成も同様に思えること、また、酵母より同様のものが得られたことから、SSBは真核細胞の間で広く保存された蛋白質と考えられる。

Fig.4

Q-Sepharose for SSB

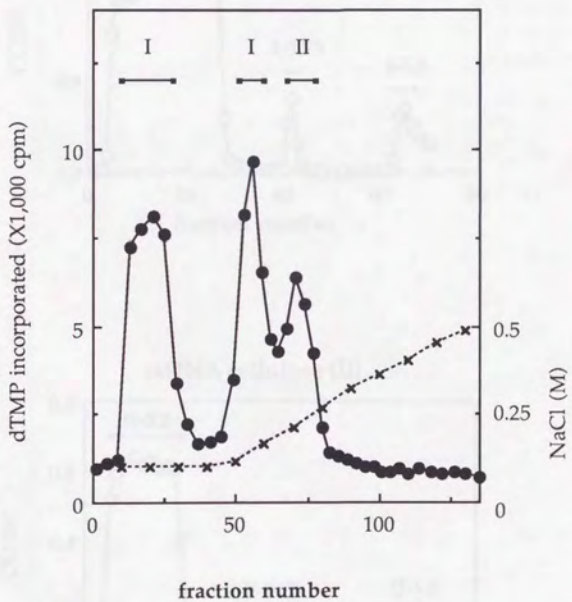


Fig.5

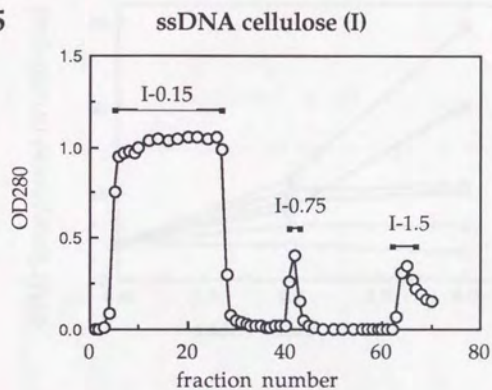


Fig.6

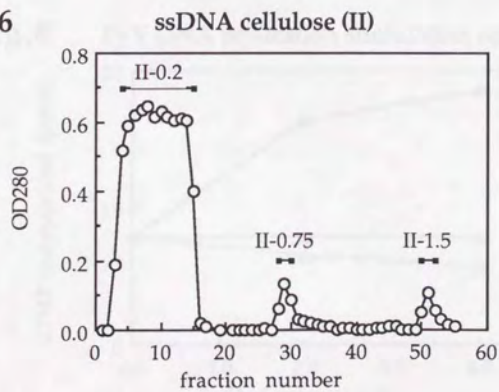


Fig.7

DNA pol α stimulation activity

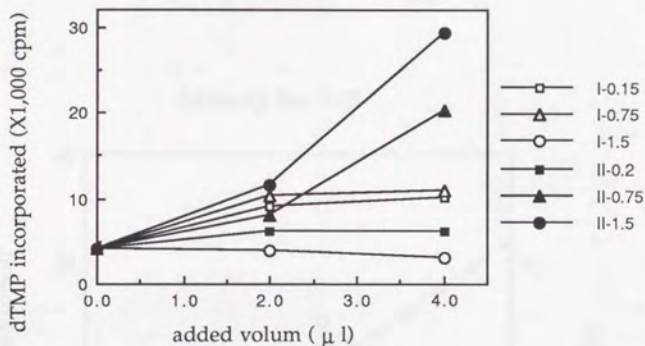


Fig.8

PyV DNA replication stimulation activity

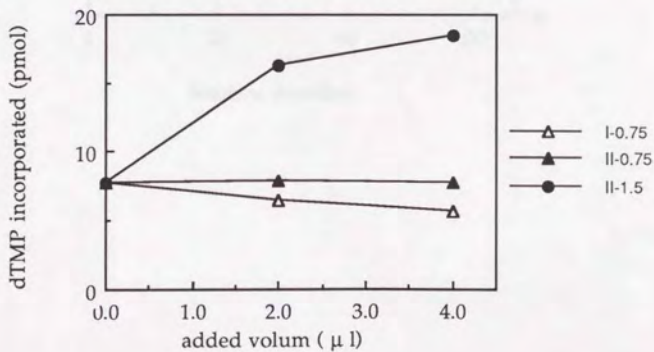


Fig.9

MonoQ for SSB

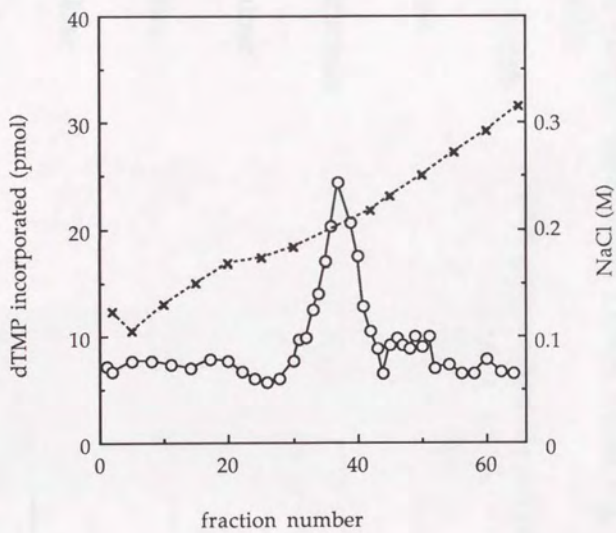


Fig.10

Purification of single-stranded DNA binding protein (SSB)
from FM3A cells

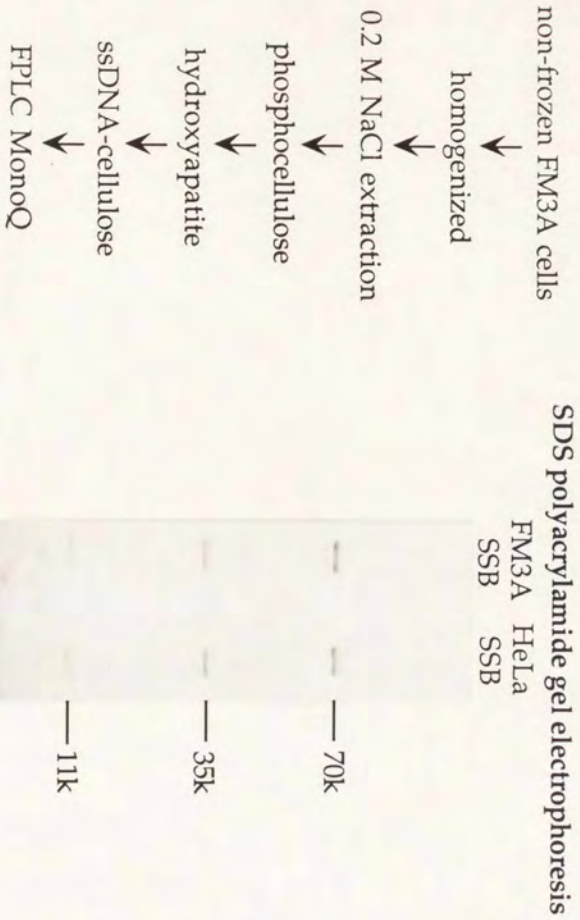


Fig.11 Stimulation of PyV DNA replication by SSB

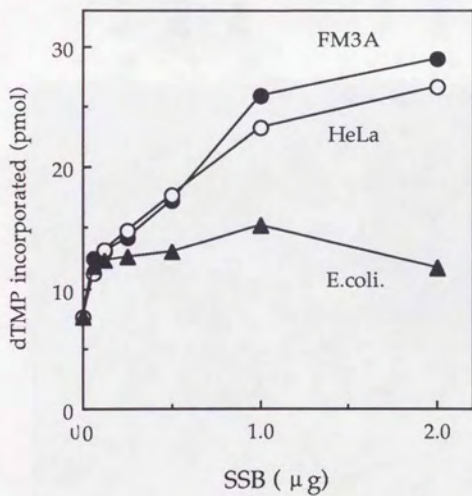


Fig.12

Effect of SSB on the DNA products synthesized in the PyV DNA replication system

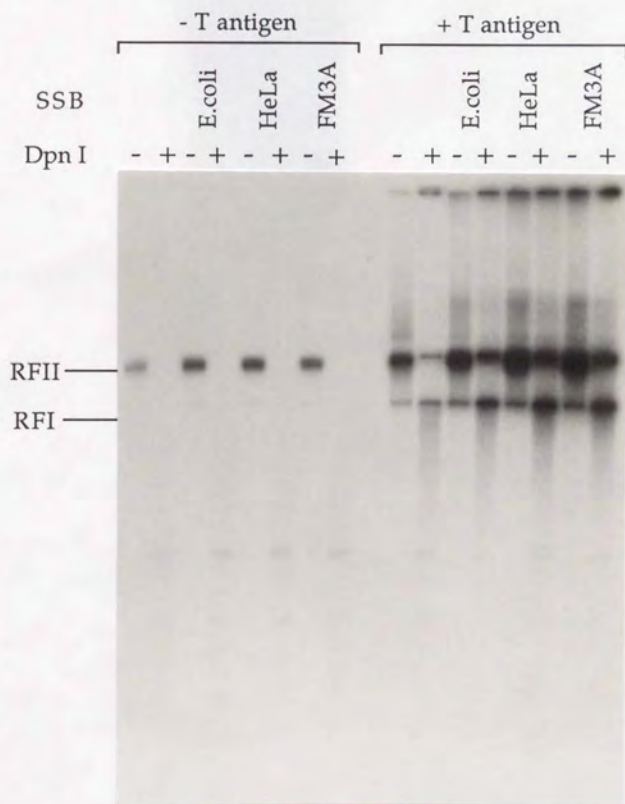


Fig.13

Effect of SSB on DNA pol. α activity

SSB
(μg) 0 0.2 2



Fig.14

Stimulation of DNA polymerase α activity by SSB

($[^{32}\text{P}]$ oligo(dT) $_{10}$ - poly(dA) $_{4000}$)

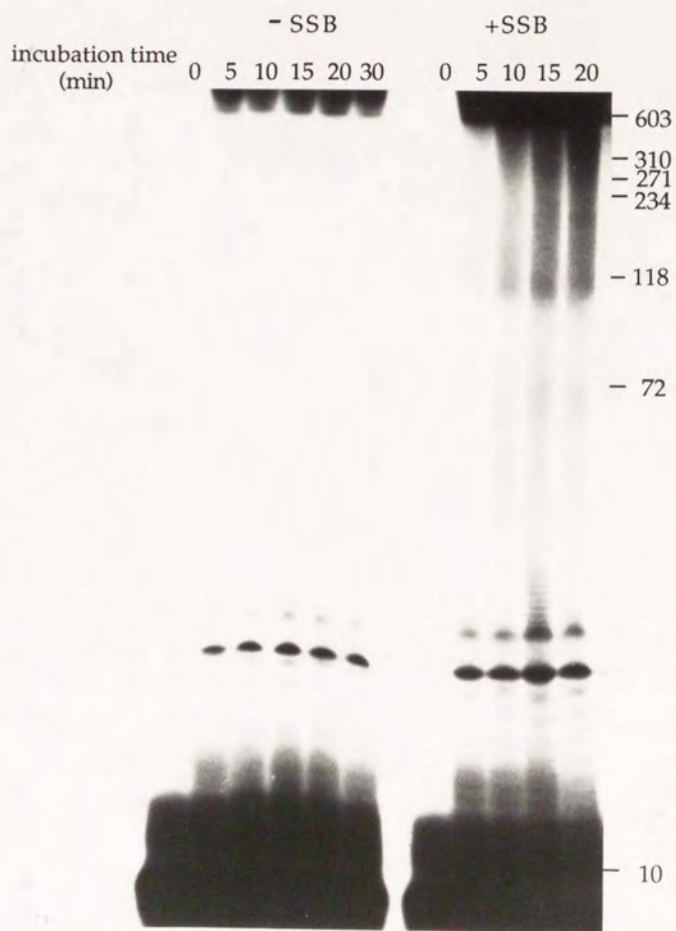
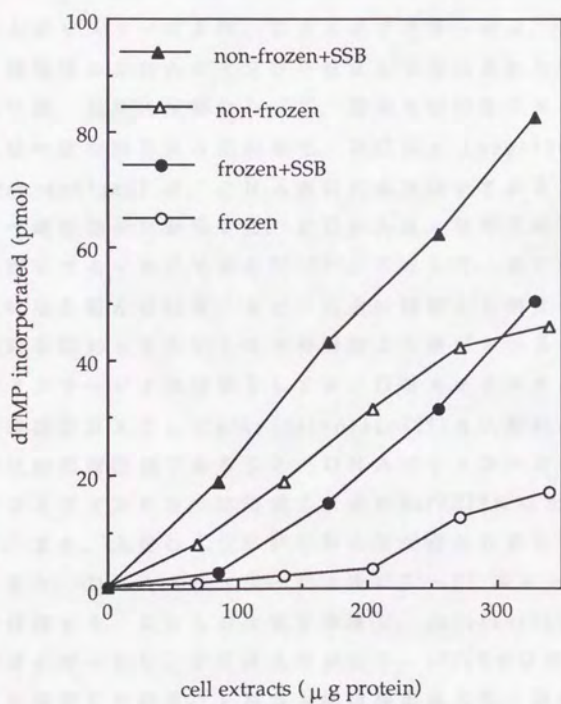


Fig.15 Restoration of PyV DNA replication with extracts prepared from frozen cells by SSB



第4章 FM3A細胞のDNAポリメラーゼ δ

本章では、FM3A細胞抽出液中より、DNAポリメラーゼ δ 活性を検出した結果について述べるが、本章の内容は、本論文の他の章とは関連性がないので、本論文の全体の流れを理解するためには、次の章以降を先に読まれることをおすすめする。

第1節 DNAポリメラーゼ δ 活性の検出方法

DNAポリメラーゼ δ は、DNAポリメラーゼ α 、 β 、 γ とは異なる4種類目のDNAポリメラーゼとして検出された⁶⁶⁾⁶⁷⁾。その後、長い間、DNA複製において、脚光を浴びることはなかったが、SV40の無細胞DNA複製系で、PCNA (proliferating-cell nuclear antigen) が、DNA複製の必須因子であることが示されると、一躍表舞台に登場した。PCNAは、DNAポリメラーゼ δ の促進因子であったのである⁶⁸⁾⁶⁹⁾。こうして、多くの研究室でその精製に取り組んだ結果、まだ、完全に精製した例はないが、HeLa細胞を始めとするいくつかの細胞より検出されるに至った。DNAポリメラーゼ δ の特徴としては、DNAポリメラーゼ活性としては、鋳型DNAとしてpoly(dA)-oligo(dT)を比較的好むこと、最適pHが比較的酸性側であること、DNAポリメラーゼ α の阻害剤であるアフィディコリンでは阻害されるがBuPdGTPには比較的耐性であること、また、上記のようにPCNAで促進されること等があげられる。また、DNAポリメラーゼ活性に3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が付随する。これらの性質を考慮し、poly(dA)-oligo(dT)を鋳型プライマーとし、PCNAの存在下、pH7.0でDNAポリメラーゼ活性を測定した結果、FM3A細胞抽出液より、DNAポリメラーゼ δ 様の活性が検出された。

第2節 FM3A細胞のDNAポリメラーゼ δ の部分精製

DNAポリメラーゼ δ の精製は、第3章で示したSSBの精製の最初のステップであるフォスフォセルロースカラムに0.2 M NaCl-bufferHで結合した画分より行った。尚、以下の操作はすべて0~4℃で行った。

フォスフォセルロースカラム

0.2 M NaCl-bufferHで洗浄して、SSBを含む画分を素通りさせた後、フォスフォセルロースカラム(80 ml)に結合した蛋白は、bufferH中、0.2 M~0.8 M NaCl直線濃度勾配(800 ml)により溶出し、DNAポリメラーゼ α 活性とDNAポリメラーゼ活性を測定した(Fig 16)。活性化DNAを鋳型としてのDNAポリメラーゼ α 活性検出法では、0.28 M NaCl付近に唯一のDNAポリメラーゼ活性が検出された。一方、poly(dA)-oligo(dT)を鋳型として、PCNA存在下で行ったDNAポリメラーゼ δ 活性測定法では、DNAポリメラーゼ α 活性と同じ位置以外に、0.33 M NaCl付近と0.57 M NaCl付近に活性のピークが検出された。0.57 M NaCl付近に溶出された活性は、溶出塩濃度から経験的に、DNAポリメラーゼ β と考えられる。ここでは、低塩側の2つの活性のピークを含むフラクション34~55を回収した(184 ml)。

SJK287セファロースカラムとハイドロキシアパタイトカラム

フォスフォセルロースカラム後の画分は、そのまま、0.2 M KCl-bufferHで平衡化した抗DNAポリメラーゼ α 抗体カラム、SJK287セファロースカラム(4 ml)を素通りさせ、0.2 M NaCl-bufferHで平衡化したハイドロキシアパタイトカラム(30 ml)にかけた。ハイドロキシアパタイトカラムは、同緩衝液で洗浄後、吸着した蛋白を0.2 M KCl-bufferH中、0 M~0.2 M potassium phosphate(pH 7.5)直線濃度勾配(300 ml)により溶出して、DNAポリメラーゼ α 活性とDNAポリメラーゼ δ 活性を測定した(Fig 17)。その

結果、DNAポリメラーゼ α 活性は、ごくわずかに75 mM potassium phosphate付近に検出されるのみであり、抗DNAポリメラーゼ α 抗体カラムにより、ほぼ完全に除去されたと考えられる。DNAポリメラーゼ δ 活性は、20 mM、50 mM、及び100 mM potassium phosphate付近に、3つのピークを形成して検出された。溶出順に、フラクション52~59を画分I (27 ml)、フラクション60~70を画分II (38 ml)、フラクション80~99を画分III (68 ml)として回収し、それぞれ以降のカラムクロマトグラフィーを行った。

F P L C M o n o Q カラム

I、II、III、全ての画分について、以下のようにMono Qカラムを行った。各サンプルは、50 mM NaCl-bufferHに透析後、Mono Qカラムにかけ、同緩衝液で洗浄後、bufferH中、0.05 M~0.4 M NaCl直線塩濃度勾配 (15 ml)により、吸着した蛋白を溶出した。流速は、0.5 ml/minで、また、分画は、1 min(0.5 ml)/fractionで行った。DNAポリメラーゼ δ 活性は、PCNAの存在下及び非存在下で測定を行った。

1) Fig 18に、画分Iについて行った結果を示した。PCNAの存在下では、DNAポリメラーゼ δ 活性は、0.15 M NaClと0.22 M NaCl付近に2つのピークを形成して検出された。PCNAの非存在下では、0.22 M NaCl付近のピークはPCNAの存在下と全く同様に検出されたが、0.15 M NaCl付近のピークは完全に消失した。PCNAに依存して検出された0.15 M NaCl付近の活性のピーク (フラクション14~17)を回収し、0.1 M NaCl-40%(final 50%) glycerol-bufferHに透析して-20℃に保存した。これを、便宜上、DNAポリメラーゼ δ Iとした。

II) Fig 19に、画分IIについて行った結果を示した。DNAポリメラーゼ δ 活性は、0.19 M NaCl付近を中心に、0.14 M NaCl~0.25 M NaCl辺りに広範なピークとして検出されたが、PCNAの存在下及び非存在下で、活性の強さや溶出パターンに差異は認められ

なかった。予備検討では、160 mM NaCl付近にピークを形成したことを考慮して比較的低塩側（フラクション13～19）を回収し、さらに、後述のようにMono Sカラムにかけた。

III) Fig 20に、画分IIIについて行った結果を示した。PCNAの存在下では、0.2 M NaCl付近に最大のピークが検出され、0.15 M NaCl付近と0.3 M NaCl付近に小さなピークが検出された。PCNAの非存在下では、0.15 M NaClと0.2 M NaClの活性のピークはほとんど検出されなかったが、0.3 M NaCl付近の活性は、むしろPCNAの非存在下の方が高く検出された。ここでは、PCNAに依存して検出された0.2 M NaCl付近のピーク（フラクション18～23）を回収し、後述のようにMono Sカラムにかけた。

F P L C Mono Sカラム

上記のII及びIII由来の画分について、以下のようにMono Sカラムを行った。各サンプルは、bufferHによる希釈により0.05 M NaClにして、Mono Sカラムにかけた。カラムは、同緩衝液で洗浄後、bufferH中、0.05 M NaCl～0.5 M NaCl直線塩濃度勾配（15 ml）により、吸着した蛋白を溶出した。流速は、0.5 ml/minで、また、分画は、1 min(0.5 ml)/fractionで行った。

Fig 21に、画分II由来のものについて行った結果を示した。DNAポリメラーゼδ活性は、0.3 M NaCl付近に検出された。活性のピーク（フラクション18～23）を回収し、0.1 M NaCl-40%(final 50%) glycerol-bufferHに透析して-20℃に保存した。これを、便宜上、DNAポリメラーゼδ IIとした。

Fig 22には、画分III由来のものについて行った結果を示した。活性は、0.28 M NaCl付近に、PCNAに依存して検出された。活性のピーク（フラクション17～24）を回収し、0.1 M NaCl-40%(final 50%) glycerol-bufferHに透析して-20℃に保存した。これを、便宜上、DNAポリメラーゼδ IIIとした。

第3節 DNAポリメラーゼ δ 活性のPCNA依存性と阻害剤の効果

第2節で得られた2つのPCNA依存性のDNAポリメラーゼ δ (IとIII)とPCNA非依存性のDNAポリメラーゼ δ (II)について、PCNA (0.75 μ g)の存在下及び非存在下で、その量を変えて検討した (Fig 23A)。その結果、DNAポリメラーゼ δ IとIIIについては明かにPCNAに依存したDNA合成活性の促進が認められた。DNAポリメラーゼ δ IIについては、PCNAによる促進はほとんど認められなかった。DNAポリメラーゼ α について同様に検討した結果、DNAポリメラーゼ α 活性はPCNAにより、やや阻害される傾向がみられた (Fig 23B)。次に、DNAポリメラーゼ δ I、II、III各一定量に、PCNAの量を変えて加えた結果、DNAポリメラーゼ δ II活性は、PCNAによって促進されなかったが、DNAポリメラーゼ δ IとIIIは、PCNAにより促進された。その促進は、0.2 μ g以下のPCNAで効果が飽和した (Fig 24)。

次に、DNAポリメラーゼ α の阻害剤の一つであるBuPdGTPを添加して、PCNAの存在下で、その効果をDNAポリメラーゼ α と比較した (Fig 25)。その結果、DNAポリメラーゼ α は、100 μ MのBuPdGTPでほぼ完全に阻害された。文献的には、10 μ Mでほぼ完全に阻害されるはずであるが、ここでは、鑄型-プライマーとして、活性化DNAではなく、poly(dA)-oligo(dT)を用いているため、効果が弱いと考えられる。DNAポリメラーゼ δ IとIIIは、100 μ M BuPdGTP存在下でも、非存在下の60%の活性が認められ、DNAポリメラーゼ α に比べて、この阻害剤に耐性であった。DNAポリメラーゼ δ IIは、DNAポリメラーゼ α とほぼ同程度に、BuPdGTPにより阻害された。

第4節 まとめと考察

F M 3 A 細胞より、今までに検出されていない3つのDNAポリメラーゼ活性を検出した。これらのうち2つはPCNAにより、DNAポリメラーゼ活性が促進され、また、BuPdGTPに耐性であったことから、DNAポリメラーゼ δ と考えられる。

哺乳類細胞においては、現在までに5種類のDNAポリメラーゼ(α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ)が見いだされている。まず、最初にDNAポリメラーゼ α が見いだされ、続いて、DNAポリメラーゼ β と γ が検出された。これらの3種類のDNAポリメラーゼは、分子量、阻害剤や塩濃度に対する耐性、種々の鋳型-プライマーの利用度等により区別され、DNAポリメラーゼ α はDNA複製及び修復に、DNAポリメラーゼ β は修復に関与すると考えられ、また、DNAポリメラーゼ γ は、ミトコンドリアのDNAポリメラーゼであることが示されている⁶⁷⁾。

第4のDNAポリメラーゼであるDNAポリメラーゼ δ は、1976年にByrnesらにより兎の骨髄より検出された⁶⁶⁾。このDNAポリメラーゼの特徴としては、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を持つこと、また、DNAポリメラーゼ α の阻害剤BuPdGTPに比較的耐性であること等が報告された。その後、DNAポリメラーゼ δ はPCNAにより促進されるものと、PCNAにより促進されないものが存在することが報告され、現在では、前者はDNAポリメラーゼ δ と、また、後者はDNAポリメラーゼ ϵ と呼ばれている。しかし、当初は、仔牛胸腺⁷⁰⁾等でしか得られなかったため、免疫系の細胞にのみ存在する特殊なDNAポリメラーゼと考えられてきた。

ところで、PCNAは、自己免疫疾患の患者の産生した抗体により検出された分子量36Kの酸性蛋白質である。PCNAは、増殖細胞の核で強く検出され⁷¹⁾、また、静止期の細胞を血清刺激によりS期へ導入すると、核に検出されるようになる⁷²⁾⁷³⁾ことが報告されている。さらに、核内でも、特に、DNA合成がまさに行われている部位に局在することが知られており⁷⁵⁾⁷⁸⁾、従来よりDNA複製へ

の関与が示唆されていた。そのPCNAが、SV40の無細胞DNA複製系においてDNA複製に関与していることが示されるとDNAポリメラーゼ δ も一躍脚光を浴びた。そして、多くの研究者がその単離を試みた結果、種々の細胞よりその活性が検出された。マウス細胞からは、ごく最近になって、M.Goulianらによって初めて検出された⁷⁹⁾。さらに、酵母の解析から、3種類のDNAポリメラーゼが複製に関与していることが遺伝学的に示された。すなわち、酵母のDNA複製には、哺乳類細胞のDNAポリメラーゼ α に相当すると考えられるDNAポリメラーゼI以外に、DNAポリメラーゼ δ に相当すると考えられるDNAポリメラーゼIII⁸⁰⁾と、さらに、DNAポリメラーゼII⁸¹⁾が関与することが示された。このことから、哺乳類細胞においても、3種類のDNAポリメラーゼ、すなわち、DNAポリメラーゼ α 、 δ 、 ϵ が複製に関与していると考えられるようになってきた。

さて、本研究で検出されたDNAポリメラーゼについて整理する。まず、フォスフォセルロースカラムにより、DNAポリメラーゼ β が、高塩濃度側に溶出され、他のDNAポリメラーゼと分離されたと考えられる。次に、抗DNAポリメラーゼ α 抗体カラムを素通ししたことにより、次のハイドロキシアパタイトカラムにおいて活性化DNAを鋳型としてのDNAポリメラーゼ活性が、ほとんど消失しており、DNAポリメラーゼ α がほぼ完全に除去されたと考えられる。除去されなかったDNAポリメラーゼ α が、わずかにハイドロキシアパタイトカラムの画分IIIに混在したと予想されるが、画分IIIのMono Qカラムにおいて、高塩側に溶出された弱いピークが、その溶出位置、及び、DNAポリメラーゼ α の標品を用いた場合と同様にPCNAの非存在下で活性が高いことから、混在したDNAポリメラーゼ α と考えられる。ハイドロキシアパタイトカラムにより、DNAポリメラーゼ活性は、3つに分離された(低塩側よりI、II、IIIとした)。DNAポリメラーゼ γ は、ハイドロキシアパタイトカラムには、比較的弱く結合することが知られており、画分Iに

混在していると予想され、画分IのMono Qカラムにおいて、高塩側に溶出されたPCNAによって促進されないピークを形成したと考えられる。PCNAにより活性が促進されるDNAポリメラーゼδの活性は、画分Iと画分IIIより得られた。画分Iと画分IIIのMono Qカラムの結果、それぞれ異なる溶出位置に最大のDNAポリメラーゼδの活性が検出された。両者が、異なるDNAポリメラーゼであるかどうかについては、現在までのところ不明であるが、PCNAの要求性や、BuPdGTPの効果等について顕著な違いは認められず、また、画分IIIのMono Qカラムにおいて、最大のピークより低塩側に小さなピークが、画分IのMono Qカラムにおける溶出位置と同様な位置に観察されたことから、DNAポリメラーゼδIはDNAポリメラーゼδIIIの分解産物ではないかと考えている。実際、DNAポリメラーゼδは、分解を受け安いことは報告されている。画分IIからは、PCNAに依存しないDNAポリメラーゼ活性が検出された。このDNAポリメラーゼδIIは、DNAポリメラーゼεである可能性が考えられる。しかし、得られた標品は、DNAポリメラーゼαと全く同様にBuPdGTPにより阻害された点で問題が残る。但し、BuPdGTPで阻害されてしまう例は、仔牛胸腺のDNAポリメラーゼδについても報告されており⁸²⁾、今後さらに精製したうえで検討する必要がある。また、他のDNAポリメラーゼδについてもさらに精製して、3'→5'エキソヌクレアーゼの検出とDNAポリメラーゼとしての正確さや、ポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系における機能、及び、各DNAポリメラーゼの役割分担について検討したいと考えている。

Fig.16

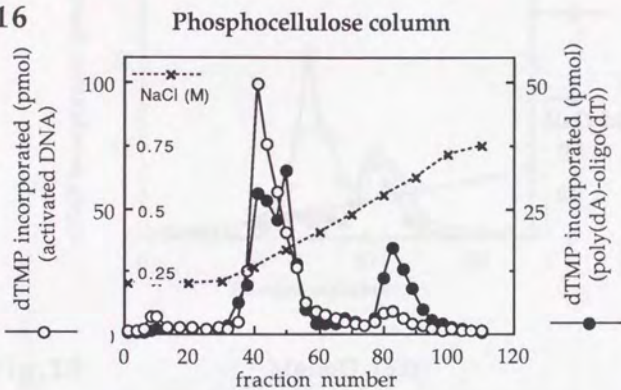


Fig.17

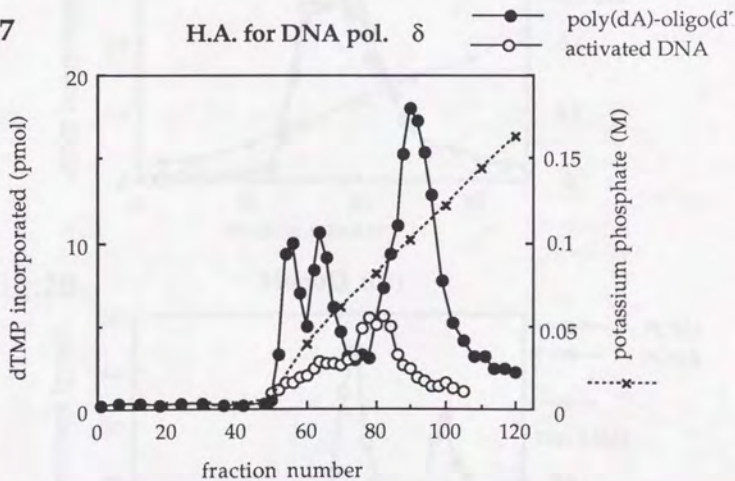


Fig.18

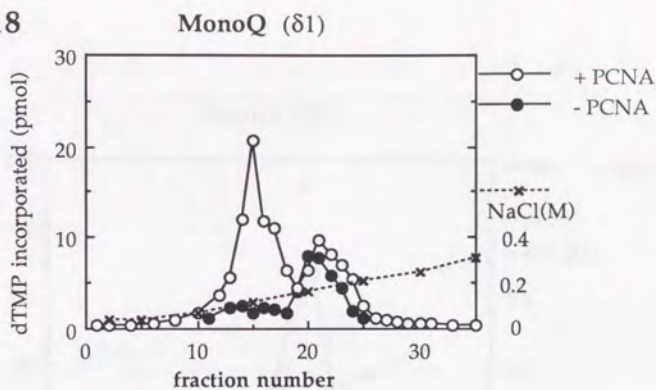


Fig.19

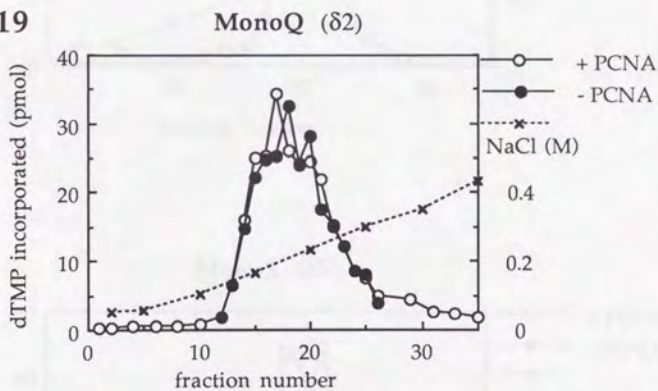


Fig.20

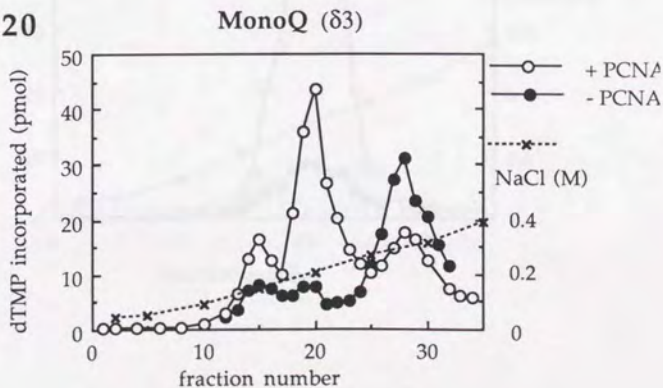


Fig.21

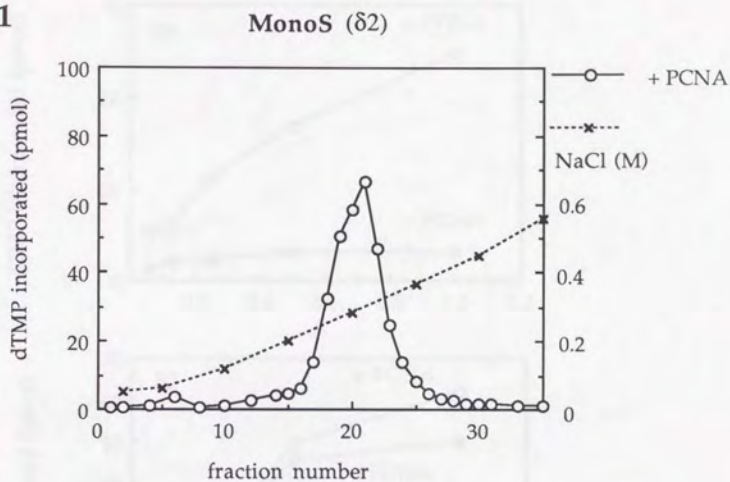


Fig.22

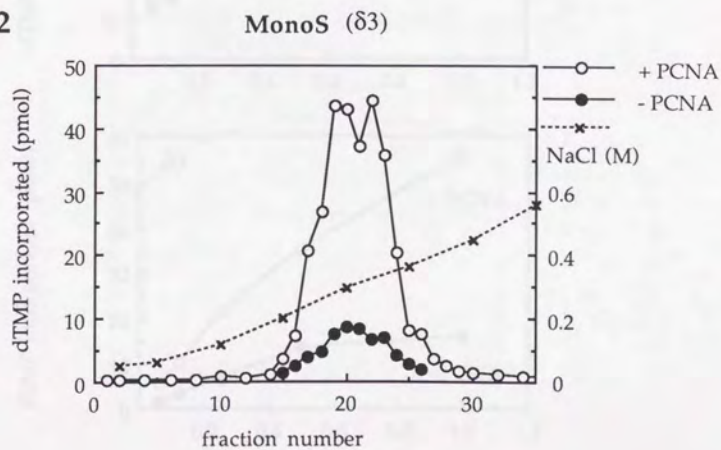


Fig.23-A

DNA pol δ titration in the presence or absence of PCNA

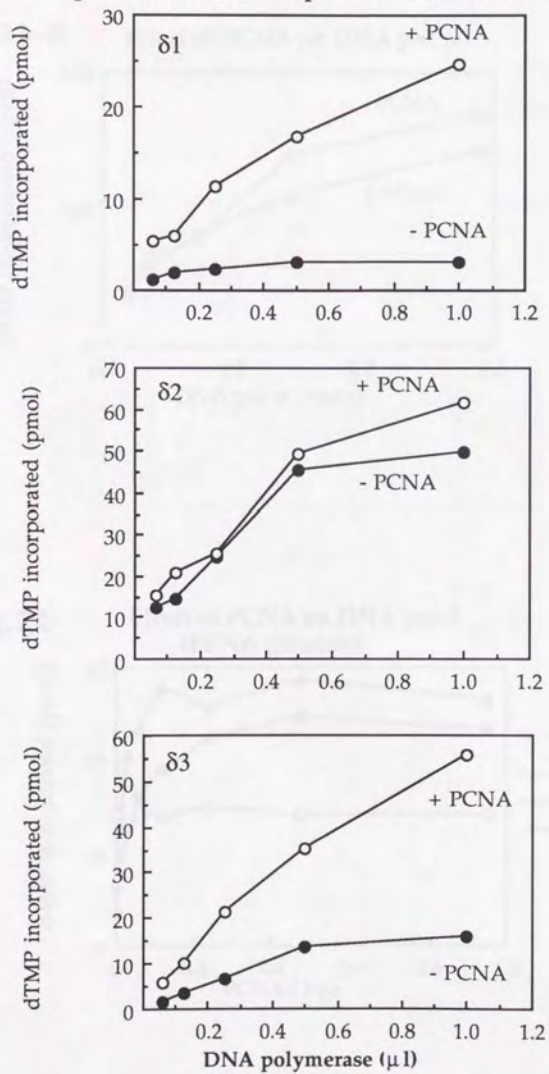


Fig.23-B Effect of PCNA on DNA pol. α

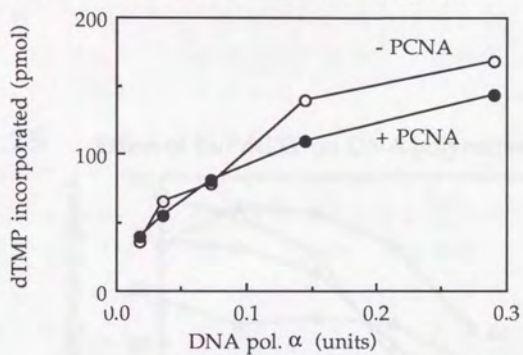


Fig.24 Effect of PCNA on DNA pol. δ (PCNA titration)

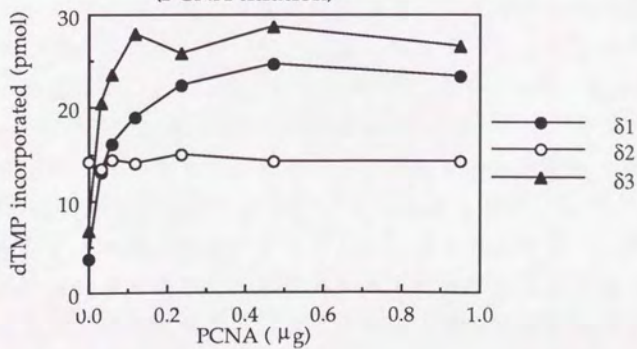
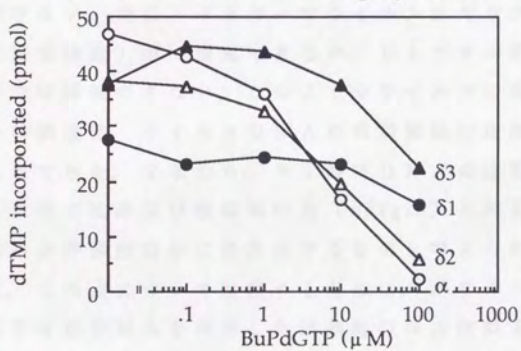


Fig.25 Effect of BuPdGTP on DNA polymerase activities



第5章 ポリオーマウイルス無細胞DNA複製系の宿主特異性

第1節 粗抽出液の種特異性と宿主特異性を決定する因子の検索

ポリオーマウイルスとSV40は、共にパポウイルスに属する二本鎖閉環状DNAウイルスである。両ウイルスは、そのゲノム構成も含めて極めて類似しているが、感染する宿主細胞の動物種の特異性において決定的に異なる。すなわち、SV40はヒトやサルの細胞（許容細胞）中では増殖できるが、マウスの細胞（非許容細胞）中では増殖できない。逆に、ポリオーマウイルスはマウスやハムスターの細胞（許容細胞）中で増殖できるが、ヒトやサルの細胞（非許容細胞）中では増殖できない。このようなウイルスの感染する細胞の動物種の特異性は、ウイルスDNAの複製開始の機構に原因があると考えられてきた。すなわち、ウイルスDNAの複製開始において、ウイルスのT抗原及び複製開始点（origin）と相互作用する複製の必須因子が許容細胞中には存在するものと考えられてきた。当研究室浴は、この点について検討するために、ポリオーマウイルスDNAとSV40DNAを利用した無細胞DNA複製系で、用いる細胞抽出液の種特異性について検討し、無細胞DNA複製系においてもウイルスの感染する細胞の動物種の特異性が認められること、すなわち、ウイルス感染の宿主細胞特異性がウイルスDNAの複製で決定されていることを示した^{24) 83)}。その結果をFig 26に示した。マウスFM3A、Ehrlich、ハムスターV79、ヒトHeLaS3、293、サルCV1、昆虫SF27の各細胞抽出液を用いて検討した結果、ポリオーマウイルス無細胞DNA複製系では、FM3A、Ehrlich（マウス）、V79（ハムスター）の細胞抽出液が、また、SV40無細胞DNA複製系では、HeLaS3、293（ヒト）、CV1（サル）の細胞抽出液が、それぞれDNA複製活性を示した。また、昆虫細胞SF27抽出液は、両系共にDNA複製活性を示さなかった。浴は、さらに、ポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系

で、ポリオーマウイルスに非許容であるヒトHeLa, 293、サルCV1、昆虫SF27の細胞抽出液に、FM3A細胞のDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体を添加することにより、DNA複製活性が、いずれの細胞抽出液についても回復することを示した(Fig 27)。これらの結果より、ポリオーマウイルス無細胞DNA複製系において宿主特異性を決定している細胞側の因子はDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体であると考えられた。そこで、私は、まず、この宿主特異性を決定している因子がDNAポリメラーゼ α であるのか、DNAプライマーゼであるのか、あるいは複合体でなければならないのかについて検討した。

ポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系で、非許容細胞であるHeLa細胞の抽出液(200 μ g)を用いて、FM3A細胞より精製したDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体、それぞれ完全に分離したDNAポリメラーゼ α 及びDNAプライマーゼを添加した結果、DNAポリメラーゼ α のみを加えてもDNA複製活性の回復は認められなかったが、DNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体を加えた場合とDNAプライマーゼを加えた場合にはDNA複製活性が回復した(Fig 28)。また、HeLa細胞より精製したDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体を加えてもDNA複製活性の回復は認められなかった。この結果より、ポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系における細胞の宿主特異性決定因子はDNAプライマーゼであると考えられる。

第2節 精製した酵素・蛋白質による系の構築

ポリオーマウイルス無細胞DNA複製系では、第1節の結果より、その宿主特異性はDNA複製の開始よりプライマーRNA合成が行われる過程で決定されると考えられた。そこで、粗抽出液による鋳型プラスミドDNA全体の複製を観察する代わりに、精製した酵素・蛋白質によって複製開始後、比較的初期の反応を再現した系を構

築し、粗抽出液中の因子の影響を排除して観察することを考えた。DNA複製の開始よりプライマーRNA合成及びそれに引き続いて起こる岡崎フラグメント合成の過程には、複製開始蛋白質でありDNAヘリカーゼであるT抗原、二本鎖DNAが巻き戻されて生じた一本鎖DNAに結合して安定化する一本鎖DNA結合蛋白質(SSB)、プライマーRNA合成を担うDNAプライマーゼと岡崎フラグメント合成を担うDNAポリメラーゼ α 、及び、二本鎖DNAの巻き戻しにより生じる二本鎖DNA上のひずみを解消するDNAトポイソメラーゼが必要と考えられる。そこで、これらの酵素・蛋白質のみによる反応について検討した。Fig 29には、SSB(0.5 μ g)、DNAトポイソメラーゼII(0.1 unit)の存在下で、T抗原(4 μ g)の存在下及び非存在下、DNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体の量を変えた結果を、また、Fig 30には、T抗原(4 μ g)、DNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ(0.1 units)、DNAトポイソメラーゼII(0.1 unit)の存在下、SSBの量を変えた結果を示した。その結果、これらの精製した酵素・蛋白質のみによる反応は、T抗原とDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体及びSSBに依存した。

次に、DNA合成産物のDpn I耐性について検討した。T抗原(4 μ g)、DNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体(0.1 units)、SSB(0.5 μ g)、DNAトポイソメラーゼII(0.1 unit)による反応をcompleteとして示し、T抗原、DNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体、SSBをそれぞれ除いた場合の反応産物のDpn I耐性について検討した結果(Fig 31)、completeでは、nicked circularの位置にある程度Dpn Iに耐性の反応産物が観察されたが、T抗原やDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体を除いた場合には、全く反応産物は観察されなかった。また、SSBを除いた場合には、Dpn I処理によって、完全に消失してしまうような反応産物のみが観察された。これらの結果より、この様な精製した酵素・蛋白質のみによって、T抗原とDNA

ポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体に完全に依存した反応が行われることが示された。また、SSBに依存しないDNA合成については、Dpn Iで切断されるような鋳型DNA上の局所的な反応であること、また、第3節で行うようにT抗原及びDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体の量がより少ない場合には行われないことから、DNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体が多すぎるために、二本鎖DNAの巻き戻しにより生じた一本鎖DNA部分が安定化されなくても部分的なDNA合成が行われてしまったと考えられる。

第3節 精製した酵素・蛋白質の種特異性

第2節で構築した精製した酵素・蛋白質を用いた系において、まず、DNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体の種特異性について検討した。FM3A細胞のSSB (0.5 μ g)、DNAトポイソメラーゼII (0.1 unit) の存在下、ポリオーマウイルスのT抗原 (2 μ g) の存在下及び非存在下で、FM3A細胞とHeLa細胞のDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体によるDNA合成を比較した結果、T抗原に依存して、FM3A細胞のDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体の方がHeLa細胞のものよりも高いDNA合成活性を示した (Fig 32)。SV40の無細胞DNA複製系も、同様に精製した酵素・蛋白質で再構築し、HeLa細胞のSSB (0.5 μ g) とFM3A細胞のDNAトポイソメラーゼII (0.1 unit) の存在下、SV40のT抗原 (1 μ g) の存在下及び非存在下で、DNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体の種特異性について検討した結果、ポリオーマウイルスの系とは逆にHeLa細胞のDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体の方が高いDNA合成活性を示した (Fig 33)。これらの結果より、このように単純化した系においても、粗抽出液を用いた場合に比べてその規定は厳密ではなくなるものの、基本的に宿

主特異性は観察されたと考えられる。

次に、ポリオーマウイルスの系で、T抗原、DNAプライマーゼ、DNAポリメラーゼ α 、SSBの種特異性について検討した (Table 1)。ポリオーマウイルスのT抗原 (2 μ g)、FM3A細胞のDNAポリメラーゼ α (0.029 unit) - DNAプライマーゼ (0.15 unit) 複合体、FM3A細胞のSSB (1 μ g) により 5.25 pmolのdTMPが取り込まれたが、T抗原をSV40 (1 μ g) のものに変えた場合、あるいはDNAポリメラーゼ α - DNAプライマーゼ複合体をHeLa細胞のものに変えた場合にはほとんどDNA合成は行われなかった。SSBは、除いた場合にはほとんどDNA合成は行われなかったが、HeLa細胞のものを用いてもDNA合成は行われ、宿主特異性の決定には関与しないと考えられる。DNAポリメラーゼ α とDNAプライマーゼの組合せについて検討した結果、FM3A細胞のDNAプライマーゼを用いた場合には、DNAポリメラーゼ α はFM3A細胞のものでもHeLa細胞のものでも同様にDNA合成が行われた。しかし、HeLa細胞のDNAプライマーゼを用いた場合には、DNAポリメラーゼ α はFM3A細胞のものを用いてもHeLa細胞のものを用いてもDNA合成はほとんど行われなかった。これらの結果より、ポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系において宿主特異性を決定する細胞側の因子はDNAプライマーゼであることが明らかになった。

第4節 まとめと考察

ポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系において宿主特異性を決定している細胞側の因子が、DNAポリメラーゼ α - DNAプライマーゼ複体のうちDNAプライマーゼであることを、精製した酵素・蛋白質のみによる系を構築して明らかにした。

ポリオーマウイルスは、主としてマウスを宿主とし、マウス細胞中で増殖する。その宿主特異性は、DNA複製の段階で決定されて

いると考えられてきた。我々は、ポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系を構築し、種々の細胞より抽出液を調製して、その種特異性について検討した結果、ウイルスの許容細胞より調製した細胞抽出液を用いた場合にのみDNA複製が行われること、すなわち、ウイルスの宿主特異性がDNA複製の段階で決定されることを示した。また、ポリオーマウイルスの非許容細胞の抽出液を用いても、宿主であるFM3A細胞のDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体を添加すればDNA複製が行われることを示してきた。今回、さらに、それぞれ分離したDNAポリメラーゼ α とDNAプライマーゼを用いて検討した結果、HeLa細胞の抽出液を用いた場合には、FM3A細胞のDNAプライマーゼのみを添加すればDNA複製が行われることが明かとなった。

さらに、ポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系において、細胞抽出液の代わりに、DNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体、SSB、DNAトポイソメラーゼIIのみを用いてDNA合成反応を行わせた結果、これらの因子のみによって、T抗原に依存した反応が行われた。この系で、各酵素・蛋白質の種特異性について検討した結果、SSBとDNAポリメラーゼ α は、HeLa細胞のものでDNA合成が行われたのに対し、T抗原とDNAプライマーゼについては、それぞれポリオーマウイルス及びFM3A細胞のものでのみDNA合成が行われ、SV40のものやHeLa細胞のものではDNA合成は行われなかった。この結果より、ポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系で宿主特異性の決定に関与している蛋白質因子は、ポリオーマウイルスのT抗原とFM3A細胞のDNAプライマーゼであることが示された。SV40の無細胞DNA複製系においては、その宿主特異性を決定する細胞側の因子は、DNAポリメラーゼ α やDNAプライマーゼそれぞれ単独ではなく、DNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体であるとする村上らの報告⁸⁴⁾を考え合わせると、この結果は非常に興味深い。このポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系とSV40の無細胞DN

A複製系との宿主特異性の決定の違いについては、第5章でDNAプライマーゼによるオリゴリボヌクレオチド合成産物の解析について示した後に考察する。

精製した酵素・蛋白質のみによる系では、ウイルスの非許容細胞のDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体を用いた場合にもある程度のDNA合成が行われたことから、細胞粗抽出液の存在下に比べて、宿主特異性の規定が厳密でなくなつたと考えられた。この原因としては、用いたDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体等の量が多いことや、DNA鎖伸長反応に必要な蛋白質を加えていないため本来の(?)複製複合体が形成されていないこと等が考えられるが、さらに、細胞抽出液中にはDNA合成を負に制御することによって宿主特異性を規定している因子が存在する可能性も示唆される。SV40の無細胞DNA複製系を用いた解析から、この種の例として、宿主特異性の決定への関与は否定されているが⁸⁵⁾癌抑制遺伝子産物p53が、DNA複製を負に制御することが示されている⁸⁶⁾。また、レチノブラストーマ(RB)遺伝子産物のDNA複製開始の制御への関与も示唆されてきており⁸⁷⁾⁸⁸⁾、今後、さらに、幾つかのDNA複製の制御に関与する蛋白質が同定されると期待される。ポリオーマウイルスの宿主特異性の研究は複製の開始機構に直結する問題であり、今後これらのDNA複製を制御する可能性のある因子との関連についても検討してみたい。

精製した酵素・蛋白質による系の反応産物の解析の結果、ある程度の反応産物は、制限酵素Dpn Iで切断されない nicked circularの位置に観察されたことから、これらの蛋白質によって、最初の岡崎フラグメント合成のみでなく、以後のDNA鎖伸長反応まである程度行われたと考えられる。本論文では、詳しく述べないが、さらに、FMSA細胞よりRNAアーゼH、5'→3'エキソヌクレアーゼ、DNAリガーゼを精製して添加した結果、これらの因子によって、closed circularの位置に反応産物が観察されるようになった。このようなDNA鎖伸長反応の過程に関する検討は、SV40の無細胞

DNA複製系において詳しく、すでに、DNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体、SSB、DNAトポイソメラーゼ、RNAアーゼH、5'→3'エキソヌクレアーゼ、DNAリガーゼによって二本鎖閉環状DNA合成が行われること⁵⁵⁾、さらに、DNAポリメラーゼ δ 、PCNA、RF-Cあるいは activator Iと呼ばれる因子の関与により leading鎖と lagging鎖が協調して複製されていくことが示されている³⁰⁾⁻⁴¹⁾⁸⁹⁾。ポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系における宿主特異性がDNAプライマーゼにより決定され、他の因子についてはHeLa細胞のもので反応が行われたことから、これらのDNA複製因子については、種特異性はなく互換性があり、ポリオーマウイルスの無細胞複製系においても、SV40の無細胞DNA複製系と同様の反応が行われると予想される。

Fig.26

Species-specific DNA synthesis in the cell-free replication systems of PyV DNA and SV40 DNA

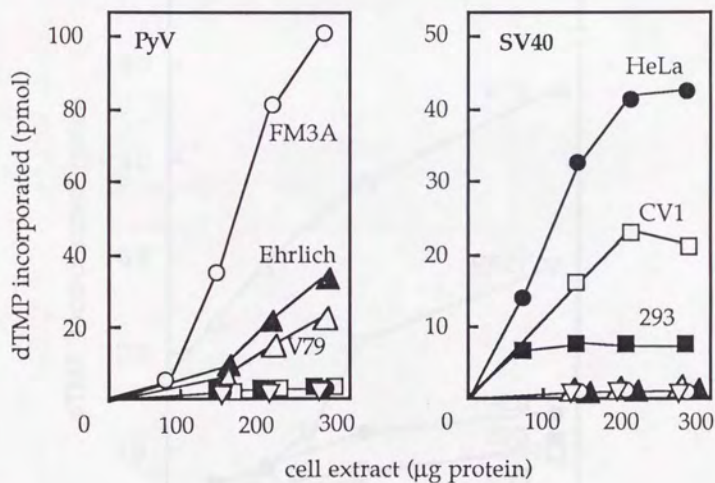


Fig.27

PyV DNA synthesis by various cell extracts
in the presence of FM3A DNA pol. α -primase

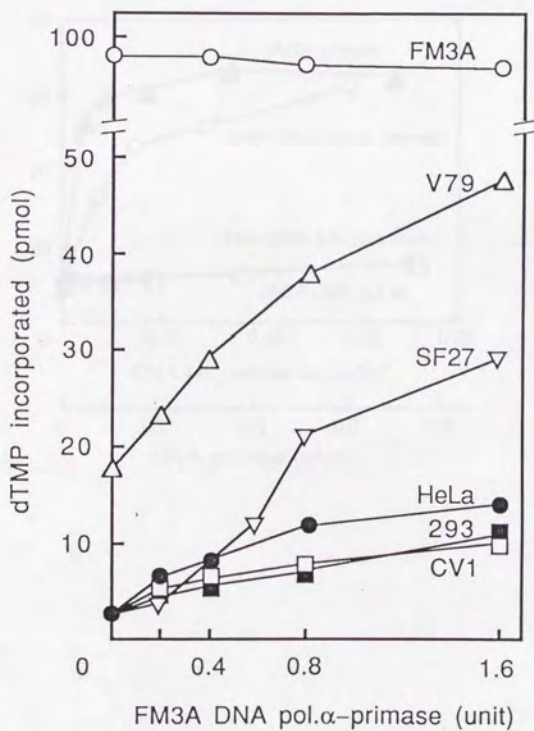


Fig.28

Restoration of DNA synthesis with FM3A DNA primase

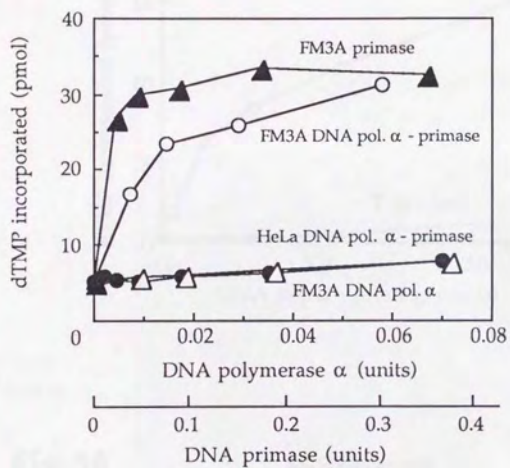


Fig.29

DNA pol. α - primase titration

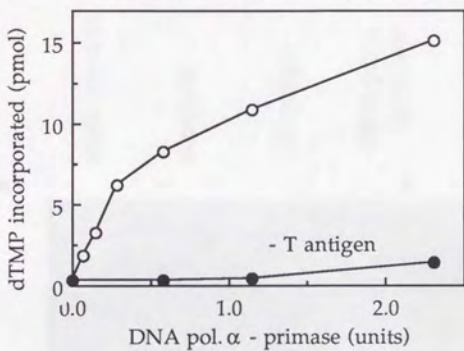


Fig.30

SSB titration

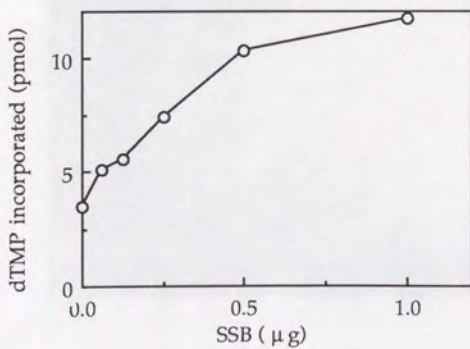


Fig.31

Analysis of DNA products synthesized by purified enzymes in the PyV DNA replication system

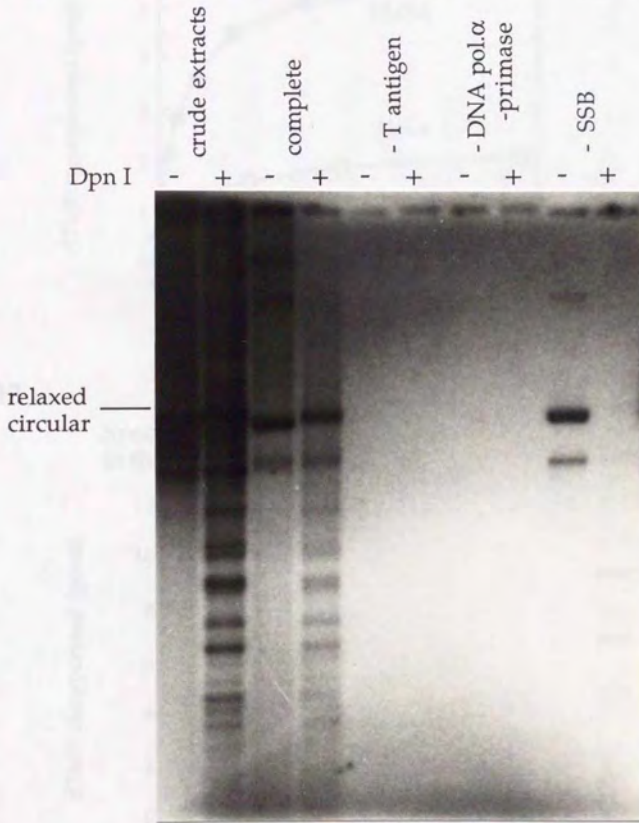


Fig.32

Species-specific DNA synthesis by purified enzymes
in the PyV DNA replication system

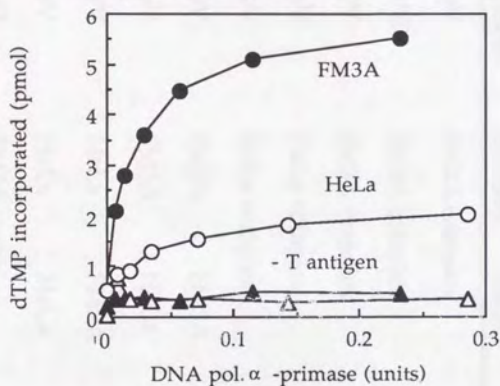


Fig.33

Species-specific DNA synthesis by purified enzymes
in the SV40 DNA replication system

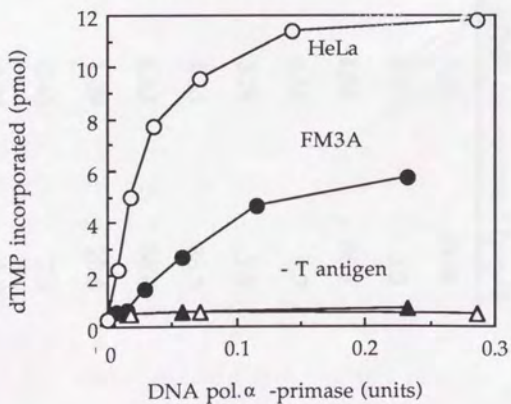


Table 1

Requirements for PyV DNA replication with purified proteins

T antigen	primase	pol. α	SSB	DTMP incorporated (pmol)
PyV	FM3A complex	FM3A	FM3A	5.25
SV40	FM3A complex	FM3A complex	FM3A	0.28
PyV	FM3A complex	FM3A complex	HeLa	4.52
PyV	HeLa complex	HeLa complex	FM3A	0.51
PyV	HeLa complex	HeLa complex	HeLa	0.28
PyV	FM3A	FM3A	FM3A	4.53
PyV	FM3A	HeLa	FM3A	4.43
PyV	HeLa	FM3A	FM3A	1.09
PyV	HeLa	HeLa	FM3A	0.40
PyV	FM3A complex	FM3A complex	—	0.31
				5.9

第6章 二本鎖DNAを鋳型としてのDNAプライマーゼの反応産物の解析

第1節 オリゴリボヌクレオチド合成の宿主特異性

第5章の結果より、ポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系の宿主特異性は、DNAプライマーゼによって決定されていることが示された。そこで、本章では、実際に、DNAプライマーゼの合成するオリゴリボヌクレオチド産物を観察し、宿主特異性の決定がプライマーRNA合成のレベルで行われているのかどうかについて検討した。反応産物の解析方法は、第2章(材料と方法)を参照されたいが、基本的には、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ を標識ヌクレオチドとして取り込ませた反応産物を回収して、変性条件下ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、オートラジオグラフィーにより検出した(Fig 34)。本章では、鋳型DNAは、すべて、スーパーコイルした二本鎖閉環状のものを用い、また、複製フォークの進行は避け、なるべく複製開始点近傍の反応のみを観察するために、DNAトポイソメラーゼは添加せずに行った。

まず、始めに、FM3A細胞及びHeLa細胞のDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体を用いて、ポリオーマウイルスの系(ポリオーマウイルスのDNA、T抗原、FM3A細胞のSSB)とSV40の系(SV40のDNA、T抗原、HeLa細胞のSSB)とで、オリゴリボヌクレオチド合成産物を解析した(Fig 35)。その結果、全ての場合について、T抗原の非存在下(-)では反応産物は観察されなかったが、T抗原の存在下(+)で反応産物が、約10ヌクレオチドの位置に観察された。また、反応産物の量については、ポリオーマウイルスの系ではFM3AのDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体が、逆にSV40の系ではHeLa細胞のDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体がより多くのオリゴリボヌクレオチド合成を行った。この結果は、

前章の Fig 32 と Fig 33 で観察された DNA 合成のレベルでの DNA ポリメラーゼ α -DNA プライマーゼ複合体の種特異性を非常によく反映しており、宿主特異性が、DNA プライマーゼによるプライマー RNA 合成のレベルで決定されていることが示された。

次に、DNA ポリメラーゼ α -DNA プライマーゼ複合体のかわりに、FM3A 細胞及び HeLa 細胞の DNA プライマーゼを用いて、全く同様に解析した (Fig 36)。その結果、FM3A 細胞の DNA プライマーゼはポリオーマウイルスの系で、T 抗原に依存してオリゴリボヌクレオチド合成を行ったが、HeLa 細胞の DNA プライマーゼでは、どちらの系でもオリゴリボヌクレオチド合成産物は観察されなかった。尚、一本鎖 M13DNA を鋳型としての FM3A 細胞と HeLa 細胞の DNA プライマーゼの反応産物を観察した結果、どちらの DNA プライマーゼも、ほぼ同様にオリゴリボヌクレオチド合成を行えた。これらの結果より、ポリオーマウイルスの系では、宿主特異性は DNA プライマーゼのみで決定されるのに対し、SV40 の系では DNA ポリメラーゼ α の関与が予想された。

第2節 オリゴリボヌクレオチド合成に対する DNA ポリメラーゼ α の効果

ポリオーマウイルスと SV40 の無細胞 DNA 複製系における宿主特異性の決定機構を探るために、両系で、DNA プライマーゼによるオリゴリボヌクレオチド合成に対する DNA ポリメラーゼ α の添加の効果について検討した。Fig 37 には、ポリオーマウイルスの系で、Fig 38 には、SV40 の系で、それぞれ、FM3A 細胞及び HeLa 細胞の DNA プライマーゼに、FM3A 細胞及び HeLa 細胞の DNA ポリメラーゼ α を添加した場合のオリゴリボヌクレオチド合成産物を解析した結果を示した。ポリオーマウイルスの系では (Fig 37)、HeLa 細胞の DNA ポリメラーゼ α -DN

Aプライマーゼ複合体 (lane 1) では、ほとんど反応産物は観察されないが、FM3A細胞のDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体 (lane 2) によりオリゴリボヌクレオチド合成が行われた。HeLa細胞のDNAプライマーゼを用いた場合には、単独の場合 (lane 3)、あるいは、HeLa細胞及びFM3A細胞のDNAポリメラーゼ α を加えた場合 (lane 4及び5) とともに、ほとんど反応産物は観察されなかった。一方、FM3A細胞のDNAプライマーゼを用いた場合には、単独の場合にもある程度の反応産物が観察された (lane 6) が、HeLa細胞及びFM3A細胞のDNAポリメラーゼ α を加えることにより明らかに反応産物の増加が観察された (lane 7及び8)。SV40の系では (Fig38)、逆に、HeLa細胞のDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体によりオリゴリボヌクレオチド合成がよく行われた (lane 1) が、FM3A細胞のDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体では、反応産物はあまり観察されなかった (lane 2)。HeLa細胞のDNAプライマーゼを用いた場合には、単独ではほとんど反応産物は観察されない (lane 3) が、HeLa細胞及びFM3A細胞のDNAポリメラーゼ α を加えた場合にはオリゴリボヌクレオチド合成産物が認められ、特にFM3A細胞のDNAポリメラーゼ α を加えた場合の方が顕著であった (lane 4及び5)。FM3A細胞のDNAプライマーゼを用いた場合にも、単独ではほとんど反応産物は観察されなかった (lane 6) が、HeLa細胞及びFM3AのDNAポリメラーゼ α を加えた場合にはオリゴリボヌクレオチド合成産物が観察された (lane 7及び8)。しかし、HeLa細胞のDNAプライマーゼによる反応の方が顕著であった。以上の結果より、ポリオーマウイルス及びSV40の無細胞DNA複製系において、DNAポリメラーゼ α によりDNAプライマーゼによるオリゴリボヌクレオチド合成は促進されることが示された。しかし、DNAポリメラーゼ α によるオリゴリボヌクレオチド合成の促進には、種特異性は観察されなかったことから、DNAポリメラーゼ α による促進は、

T抗原との宿主特異的な相互作用によるものではないと考えられた。

第3節 オリゴリボヌクレオチド合成の origin依存性

本章で観察してきた二本鎖DNAを鋳型としてのDNAプライマーゼによるオリゴリボヌクレオチド合成の origin依存性について、ポリオーマウイルスの系で、FM3A細胞のDNAプライマーゼを用いて検討した(Fig 39)。鋳型DNAとしてポリオーマウイルスのoriginを含むDNAと、これとほぼ同じ大きさでoriginを含まないpBR322DNAを用い、SSBの存在下及び非存在下でDNAプライマーゼによる反応産物を解析した。尚、ポリオーマウイルスのDNAを鋳型とした場合に比べて、pBR322DNAを鋳型とした場合には、2倍量の $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ を加えて反応産物を標識した。その結果、どちらのDNAを鋳型とした場合にも、T抗原の存在下でオリゴリボヌクレオチド合成産物が観察された。また、SSBの非存在下(-SSB)では、どちらのDNAを鋳型とした場合にも、同様にT抗原に依存した反応産物が合成されたのに対し、SSBの存在下(+SSB)では、ポリオーマウイルスDNAを鋳型とした反応に比べてpBR322DNAを鋳型としての反応は著しく抑制された。この結果より、SSBの非存在下では、T抗原に依存してoriginに依存しないオリゴリボヌクレオチド合成が行われるのに対し、SSBは、これを抑制することが示された。

第4節 まとめと考察

オリゴリボヌクレオチド合成産物を直接観察して、ポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系における宿主特異性が、DNAプライマーゼで決定されることを明確にした。また、SV40の無細胞DNA複製系においても宿主特異性の決定は、DNAプライマーゼによって行われている可能性を示唆した。DNAポリメラーゼ α は、

これらの系でDNAプライマーゼによるオリゴリボヌクレオチド合成を促進したが、種特異性は観察されなかった。SSBがオリゴリボヌクレオチド合成のorigin依存性の決定に関与している可能性を示唆した。

ポリオーマウイルス及びSV40の無細胞DNA複製系において、DNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体を用いて、そのオリゴリボヌクレオチド合成産物を観察した結果、両系共にプライマーRNA合成の有無のレベルで宿主特異性が観察された。さらに、DNAプライマーゼのみを用いて検討した結果、ポリオーマウイルスの系においては、DNAプライマーゼのみでオリゴリボヌクレオチド合成が行われたが、SV40の系ではDNAプライマーゼのみではほとんど行われなかった。以上の観察は、ポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系において、宿主特異性は宿主細胞のDNAプライマーゼにより決定されていることを示し、また、SV40の無細胞DNA複製系においては、宿主特異性を決定する因子はDNAプライマーゼあるいはDNAポリメラーゼ α 単独ではなく、DNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体であることを示すと考えられた。しかし、FM3A細胞及びHeLa細胞のDNAポリメラーゼ α を添加した実験の結果、ポリオーマウイルスの系でもSV40の系でも、DNAポリメラーゼ α の種に関係なく、その添加により、それぞれの宿主細胞のDNAプライマーゼによるオリゴリボヌクレオチド合成が選択的に促進されたことを考慮すると、どちらの系においても宿主特異性を決定している細胞側の因子はDNAプライマーゼであり、DNAポリメラーゼ α は宿主特異性の決定には関与せず、DNAプライマーゼによるオリゴリボヌクレオチド合成を促進していると考えられる。DNAポリメラーゼ α の添加によるDNAプライマーゼのオリゴリボヌクレオチド合成の促進は、両酵素の複合体の形成のしやすさと関連がある。FM3A細胞のDNAプライマーゼとFM3A細胞のDNAポリメラーゼ α 、HeLa細胞のDNAプライマーゼとFM3A細胞のDNAポリメラーゼ α 、

HeLa細胞のDNAプライマーゼとHeLa細胞のDNAポリメラーゼ α を、それぞれ混ぜ合わせてグリセロール密度勾配遠心を行い、複合体形成の有無について検討すると、FM3A細胞のものどうし、あるいは、FM3A細胞のDNAポリメラーゼ α とHeLa細胞のDNAプライマーゼとの組合せについては、DNAプライマーゼ活性が高分子量側に観察されるようになり、複合体を形成しやすいことが観察されるが、それらに比べてHeLa細胞のものどうしでは、複合体を形成しにくい傾向がある。この観察は、DNAポリメラーゼ α の添加による、宿主細胞のDNAプライマーゼによるオリゴリボヌクレオチド合成産物の増加とよく一致する。すなわち、SV40の系においては、HeLa細胞のDNAプライマーゼによる反応はHeLa細胞のDNAポリメラーゼ α よりも、複合体を形成しやすいFM3A細胞のDNAポリメラーゼ α の添加により強く促進されたと考えられる。これらのことから、ポリオーマウイルス、SV40、どちらの無細胞DNA複製系においても、その宿主特異性を決定している因子はDNAプライマーゼであると考えられる。しかし、特にSV40の系では、DNAプライマーゼ単独では、二本鎖DNAが部分的に巻き戻されて生じた一本鎖DNA上でプライマーRNA合成を行うことはできず、プライマーRNA合成を行うためにはDNAポリメラーゼ α と複合体を形成している必要があると考えられる。その場合、DNAポリメラーゼ α は宿主特異性の決定には関与せず、DNAプライマーゼと複合体を形成することが重要であり、おそらく鋳型DNAやT抗原との立体的な位置関係等をDNAプライマーゼにとってオリゴリボヌクレオチド合成を行いやすい状態にしていると考えられる。

以上の考察は、SV40の無細胞DNA複製系において、宿主特異性を決定している細胞側の因子は、宿主細胞のDNAポリメラーゼ α と宿主細胞のDNAプライマーゼとの複合体であるとする村上らの報告⁸⁴⁾と一見矛盾する。村上らは、HeLa細胞の抽出液を抗DNAポリメラーゼ α 抗体による免疫沈降処理してDNAポリメラ

ーゼ α -DNAプライマーゼ複合体を除去し、そこへHeLa細胞とFM3A細胞のDNAポリメラーゼ α 及びDNAプライマーゼを種々の組合せで加えた結果、HeLa細胞の酵素どうしの場合のみDNA複製が行われることを示した。しかし、本研究では精製した酵素・蛋白質のみを用いてオリゴリボヌクレオチド合成を観察しているのに対し、彼らは、細胞の粗抽出液を加えており、また、DNA合成のみを観察している点に注意しなければならない。粗抽出液の添加により、粗抽出液中のDNA複製を負に制御する因子の影響を受ける可能性は高い。例えば、マウス細胞のp53蛋白はSV40の無細胞DNA複製系の反応を強く阻害することが示されており⁸⁶⁾(HeLa細胞のp53蛋白でも阻害されるがマウス細胞のものが阻害が強く観察される)、実際、SV40の無細胞DNA複製系で、FM3A細胞の抽出液を用いて、HeLa細胞のDNAポリメラーゼ α -DNAプライマーゼ複合体を加えてもDNA合成は行われなかった。今後、このような、種特異的にDNA合成を制御する因子が粗抽出液中に存在するかどうかについて検討を要する。また、本研究では、SV40の無細胞DNA複製系におけるオリゴリボヌクレオチド合成後のDNA合成の有無について詳しく検討していないが、SV40のT抗原はDNAポリメラーゼ α と相互作用し得ることが免疫沈降法等により報告されており⁹⁰⁾⁻⁹³⁾、DNAプライマーゼによるオリゴリボヌクレオチド合成のレベルとDNAポリメラーゼ α によるDNA合成のレベルとの二段階で宿主特異性が規定されている可能性は考えられる。今後、T抗原とDNAポリメラーゼ α の相互作用の有無及びその種特異性や、オリゴリボヌクレオチド合成後のDNA合成について検討を要するが、以上の結果を考慮すると、ポリオーマウイルス、SV40、どちらの無細胞DNA複製系においても、宿主特異性は、まず、T抗原とDNAプライマーゼ(及びorigin)との相互作用により決定されると考えられる。

ポリオーマウイルスのT抗原とFM3A細胞のDNAプライマーゼによる、二本鎖DNAを鋳型としてのオリゴリボヌクレオチド合

成の origin 依存性について検討した結果、SSB の非存在下では、T 抗原に依存して、origin に依存しない反応産物が合成された。この結果より、ポリオーマウイルスの T 抗原は、origin 以外の二本鎖 DNA 部位で、これを巻き戻して部分的に一本鎖 DNA を露出させられると考えられる (SV40 の T 抗原では、origin 以外の二本鎖 DNA 巻き戻し活性が報告されている⁹⁴⁾⁹⁵⁾)。しかし、この一本鎖 DNA 部分は SSB が存在しないため安定化されることはなく、一時的に露出した状態にあると考えられる。このような一本鎖 DNA 部分を DNA プライマーゼが認識して鋳型として利用してオリゴリボヌクレオチド合成を行えたことから、DNA プライマーゼは T 抗原と相互作用があることが予想された。ポリオーマウイルスの T 抗原と FM3A 細胞の DNA プライマーゼとの相互作用については第 7 章に示した。さて、このような origin に依存しないオリゴリボヌクレオチド合成は、SSB の存在下では、強く抑制された。その機構については第 7 章で考察するが、この結果より、SSB は、origin 以外の部位でプライマー RNA 合成が行われることを抑制し、すなわち、プライマー RNA 合成の origin 依存性の決定に関与している可能性が示唆された。ただし、当然のことながら、origin 依存性を積極的に決定しているのは T 抗原である。

Fig.34

Analysis of products of oligoribonucleotide synthesis

reaction mixture (50 μ l)

100 mM Tris-HCl (pH 7.9)

0.5 mM dithiothreitol

0.1 mg/ml bovine serum albumin

7 mM MgCl₂

3.5 mM ATP

200 μ M CTP, GTP

10 μ M [α -³²P] UTP (1.11 MBq)

40 mM creatine phosphate

20 μ g/ml creatine kinase

0.15 μ g PyV or SV40 DNA

\pm 1 μ g PyV or SV40 T antigen

1 μ g FM3A SSB

DNA pol. α -primase complex

incubation at 37 °C



phenol-chloroform treatment



ethanol precipitation



DNase I treatment



ethanol precipitation



electrophoresis in 7 M urea
-20 % polyacrylamide gel



autoradiography

Fig.35

Species-specific oligoribonucleotide synthesis
by DNA polymerase α -primase complex
in the PyV and SV40 DNA replication systems

	PyV				SV40			
DNA pol. α -primase	FM3A		HeLa		FM3A		HeLa	
T antigen	-	+	-	+	-	+	-	+

10 n.t.—

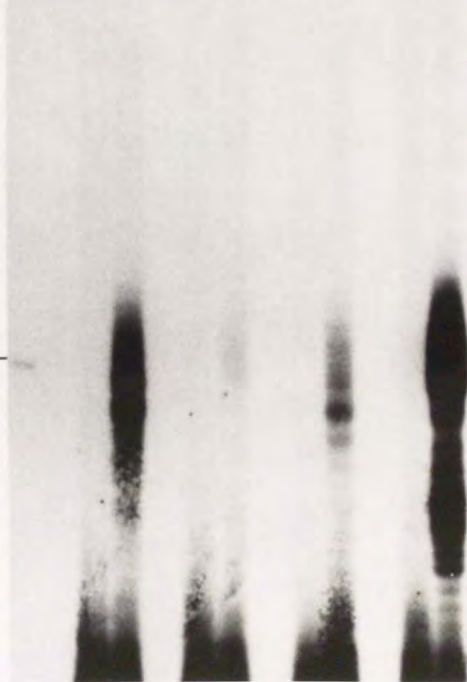


Fig.36

Species-specific oligoribonucleotide synthesis
by DNA primase in the PyV and SV40 DNA
replication systems

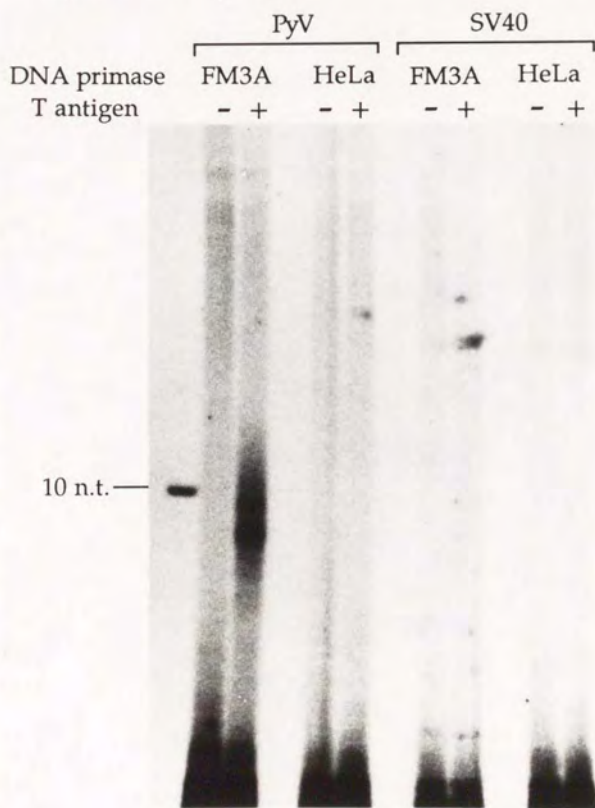


Fig.37

Effect of DNA pol. α on oligoribonucleotide synthesis by DNA primase in the PyV DNA replication system

- lane
- 1 HeLa DNA pol. α -primase
 - 2 FM3A DNA pol. α -primase
 - 3 HeLa primase
 - 4 HeLa primase + HeLa pol. α
 - 5 HeLa primase + FM3A pol. α
 - 6 FM3A primase
 - 7 FM3A primase + HeLa pol. α
 - 8 FM3A primase + FM3A pol. α

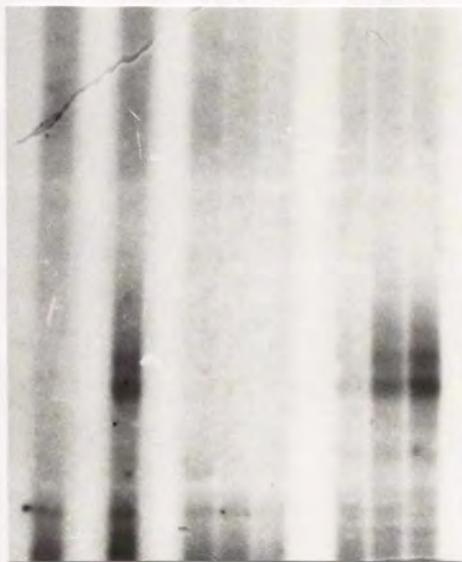


Fig.38

Effect of DNA pol.α on oligoribonucleotide synthesis by DNA primase in the SV40 DNA replication system

lane	1	2	3	4	5	6	7	8
	HeLa DNA pol.α-primase	FM3A DNA pol.α-primase	HeLa primase	HeLa primase + HeLa pol.α	HeLa primase + FM3A pol.α	FM3A primase	FM3A primase + HeLa pol.α	FM3A primase + FM3A pol.α

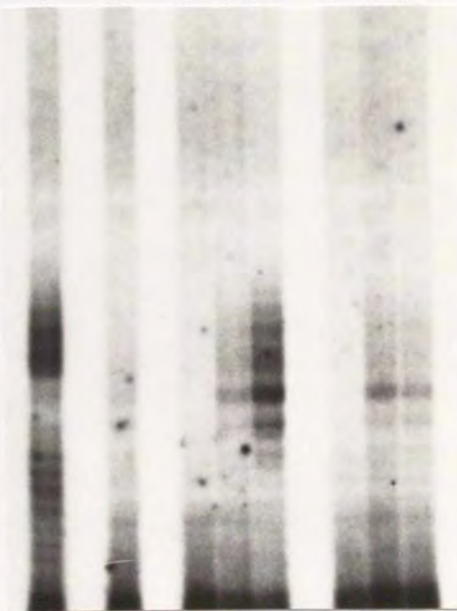
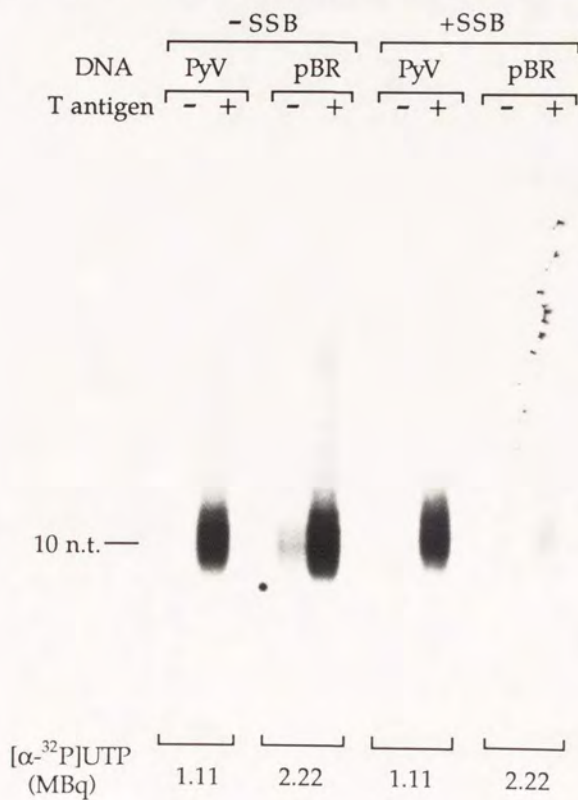


Fig.39

Origin-dependent oligoribonucleotide synthesis
by DNA primase in the presence of SSB



第7章 ポリオーマウイルスのT抗原とFM3A細胞のDNAプライマーゼとの相互作用

第1節 物理的複合体形成

第6章の結果より、ポリオーマウイルスのT抗原とFM3A細胞のDNAプライマーゼとの間には、蛋白間の相互作用があるのではないかと考えられた。そこで、まず、両酵素の複合体形成の可能性について検討した。

FM3A細胞のDNAプライマーゼ(12 μ g)及びポリオーマウイルスのT抗原(38 μ g)をそれぞれ単独で、または、混ぜ合わせて、50 mM NaCl-bufferHに対して3時間透析した。DNAプライマーゼ及びT抗原は、50% glycerolを含むbuffer中で保存してあるのて透析により10% glycerolにした。各サンプルは、第2章に示した方法にしたがって、グリセロール密度勾配遠心を行い、管底より30フラクションに分画した。DNAプライマーゼは、その活性により検出したが、T抗原はポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系でのDNA複製活性とDNAヘリカーゼ活性について検出を試みたが、いずれも検出限界以下であったため、抗T抗原抗体を用いてELISA法により検出した。その結果をFig 40に示した。DNAプライマーゼ単独の場合には、活性は5~6s付近に沈降した。また、T抗原単独の場合には、広範囲にわたって検出されたが、主に5~10sに沈降したものと、12s以上に沈降したものが存在すると考えられる。SV40のT抗原を用いた解析より、T抗原はいくつかの分子が結合した複数の存在状態があることが報告されており、ポリオーマウイルスのT抗原についても、同様に高分子複合体が形成されているものと思われる。沈降位置及びSV40のT抗原を用いた報告から、5~10sに沈降したものは単量体及び2量体、また、12s以上に沈降したものは主として6量体と予想される。両酵素を混ぜ合わせて行った結果、特にDNAプライマーゼ活性について、単独の

場合に比べて顕著な沈降位置の変化が観察された。DNAプライマーゼ活性は、ほぼ全量が非常に高分子量側へ移動しており、T抗原の沈降パターンについては顕著な変化は認められなかったが、両酵素は複合体を形成したことが示された。

第2節 複合体形成によるDNAプライマーゼ活性の促進

第6章では、二本鎖DNAを鋳型としてのオリゴリボヌクレオチド合成産物を解析したが、本章では、ポリオーマウイルスのT抗原とFM3A細胞のDNAプライマーゼが複合体を形成したことによる効果を、一本鎖のM13ファージDNAを鋳型として解析した。

Fig 41では、一本鎖M13DNA ($0.1 \mu\text{g}$)を鋳型としてのDNAプライマーゼの反応に、T抗原及びSSBを加えた結果について示した。一本鎖DNAを鋳型とした場合DNAプライマーゼは約10ヌクレオチド及び、その2倍、3倍の鎖長のオリゴリボヌクレオチドを合成する。T抗原の添加により、明らかにオリゴリボヌクレオチド合成産物の増加が認められ、その効果は、 $0.5 \mu\text{g}$ で十分観察された。逆に、SSBを添加した場合には、 $4 \mu\text{g}$ で明らかに阻害が認められた。次に、T抗原によるオリゴリボヌクレオチド合成の促進とSSBによる阻害に対する鋳型DNA量の効果について検討した。鋳型DNA量が、 $0.1 \mu\text{g}$ の場合と $2 \mu\text{g}$ の場合について、T抗原及びSSBをそれぞれ $4 \mu\text{g}$ 添加した場合の反応産物を解析した結果 (Fig 42)、T抗原については、鋳型DNA量が $0.1 \mu\text{g}$ の場合にも $2 \mu\text{g}$ の場合にも、その添加 (+)により、添加していない場合 (-)に比べてオリゴリボヌクレオチド合成産物の増加が観察された。しかし、SSBについては、鋳型DNA量が $0.1 \mu\text{g}$ の場合にはSSBの添加 (+)によりオリゴリボヌクレオチド合成の強い阻害が認められるのに対し、鋳型DNA量が $2 \mu\text{g}$ の場合には、SSBを添加 (+)しても、添加していない場合 (-)と全く同様にオリゴリボヌクレオチド合成産物が観察された。Fig 43

には、T抗原によるオリゴリボヌクレオチド合成の促進に対する鋳型DNA量の効果について、鋳型DNA量が0.1 μ gの場合と2 μ gの場合に、T抗原の量を変えて検討した結果について示した。その結果、鋳型DNA量が2 μ gの場合には、0.1 μ gの場合に比べて、やや促進の効果が弱くなるものの、基本的に同様の傾向、すなわち、0.5 μ g程度のT抗原により十分促進の効果が観察された。これらの結果より、SSBによるDNAプライマーゼのオリゴリボヌクレオチド合成の阻害の効果は、鋳型DNA量の影響を受けやすいことから、SSBのDNAへの結合によってもたらされたものであるのに対し、T抗原による促進の効果はDNAプライマーゼとの蛋白質間の相互作用によるものであると考えられた。

次に、SSBとT抗原が共存する場合のDNAプライマーゼの反応について検討した。SSB(4 μ g)の存在下及び非存在下でT抗原の量を変えて、オリゴリボヌクレオチド合成産物を解析した結果(Fig 44)、SSBの非存在下では、先に示したように、オリゴリボヌクレオチド合成の促進が少ない量のT抗原の添加により認められた。SSBの存在下では、T抗原を加えない場合、DNAプライマーゼによるオリゴリボヌクレオチド合成は、ほぼ完全に阻害され反応産物はほとんど観察されなかったが、T抗原の添加によりオリゴリボヌクレオチド合成産物が観察されるようになった。この結果より、SSBの存在下でもT抗原と共存することによりDNAプライマーゼはオリゴリボヌクレオチド合成を行えることが示された。

第3節 まとめと考察

ポリオーマウイルスのT抗原とFM3A細胞のDNAプライマーゼが、物理的に複合体を形成することを示した。そのことにより、DNAプライマーゼによる一本鎖DNAを鋳型としてのオリゴリボヌクレオチド合成は促進された。また、SSBはオリゴリボヌクレ

オチド合成を阻害したが、T抗原によりその阻害は解除された。

ポリオーマウイルスのT抗原とFM3A細胞のDNAプライマーゼを混ぜ合わせてグリセロール密度勾配遠心を行った結果、DNAプライマーゼの沈降位置が明らかに高分子量側へ移動し、両酵素が複合体を形成したことが示された。T抗原は、6量体等の高分子量のもの、2量体及び単量体と予想される低分子量のものが存在すると考えられたが、それらの分子種の機能的な違いや、そのどちらとDNAプライマーゼが複合体を形成したかについては現時点では明らかではない。SV40のT抗原に関する実験から、6量体の形成にはATPを要求することが報告されているが³⁵⁾、本研究ではATPは加えておらず、今後、ATPの影響については検討したいと考えている。ポリオーマウイルスのT抗原とFM3A細胞のDNAプライマーゼの複合体形成時の分子数の比については、T抗原の分子量は100Kであるのに対し、DNAプライマーゼは、54Kと46Kが1:1で計100Kと同じであること、実験で用いた蛋白量がT抗原は38 μ gに対し、DNAプライマーゼは12 μ gであること、また、グリセロール密度勾配遠心の沈降パターンから、DNAプライマーゼ全量に対して、複合体形成に要したT抗原は全量の半分以下と予想されることから、T抗原1~2分子に対してDNAプライマーゼ1分子程度であろうと予想される。

次に、一本鎖DNAを鋳型としてのDNAプライマーゼによるオリゴリボヌクレオチド合成産物を解析した結果、T抗原は、DNAプライマーゼとの蛋白間の相互作用によりオリゴリボヌクレオチド合成を促進することが示された。原核細胞においては、バクテリオファージT7のgene4遺伝子産物がDNAプライマーゼ活性とDNAヘリカーゼ活性を合わせ持つこと⁹⁶⁾、バクテリオファージT4では、gene61遺伝子産物(DNAプライマーゼ)とgene41遺伝子産物(DNAヘリカーゼ)とは複合体を形成して相互に活性を促進すること⁹⁷⁾⁹⁸⁾、また、大腸菌では、DNAプライマーゼ(dnaG蛋白)とDNAヘリカーゼ(dnaB蛋白)とが相互作用することが示されており

99)、DNAプライマーゼとDNAヘリカーゼとの相互作用が知られている。しかし、真核細胞においては、DNAプライマーゼはDNAポリメラーゼ α と複合体を形成して存在していることが種々の細胞で観察されているが、DNAヘリカーゼとの相互作用を見いだした報告はない。ポリオーマウイルスのT抗原は、DNAヘリカーゼ活性を持つことが、当研究室の関により見いだされており¹⁷⁾¹⁰⁰⁾、従って、本研究により初めて、真核細胞のDNAプライマーゼがDNAヘリカーゼ活性を持つ蛋白質と物理的に複合体を形成し、また、機能的にも相互作用することが示された。

T抗原とは逆に、SSBは、一本鎖DNAを鋳型としてのDNAプライマーゼによるオリゴリボヌクレオチド合成を阻害した。この阻害は、鋳型DNA量を増やすと解除されたことがら、SSBが一本鎖DNAに結合することにより、DNAプライマーゼはオリゴリボヌクレオチド合成を行えなくなったものと考えられる。しかし、SSBの存在下でも、T抗原を加えることによりDNAプライマーゼによるオリゴリボヌクレオチド合成は行われた。この結果は、前章で示した二本鎖DNAを鋳型としてのオリゴリボヌクレオチド合成のorigin依存性へのSSBの関与を考えるうえで興味深い。二本鎖DNAを鋳型とした場合、SSBの存在下では、DNAプライマーゼはT抗原に依存して、originに依存したオリゴリボヌクレオチド合成を行ったが、originに依存しない反応はほとんど行われなかった。しかし、SSBの非存在下では、originに依存しない反応もかなり行われた。これらの結果は、originから始まった反応では、一本鎖DNA上においても、T抗原とDNAプライマーゼが相互作用を保ち、本章で示した一本鎖DNAを鋳型としてのSSBとT抗原の共存下でのDNAプライマーゼの反応が行われたのに対し、origin以外の部位から始まった反応では、DNAプライマーゼはT抗原と相互作用して存在することにより一本鎖DNA部分を速やかに認識はできるものの、一本鎖DNA上では、T抗原との相互作用による反応は行われておらず、SSBによる阻害のみを受けたことに

Fig.40

Co-sedimentation of DNA primase and T antigen
(glycerol density gradient centrifugation)

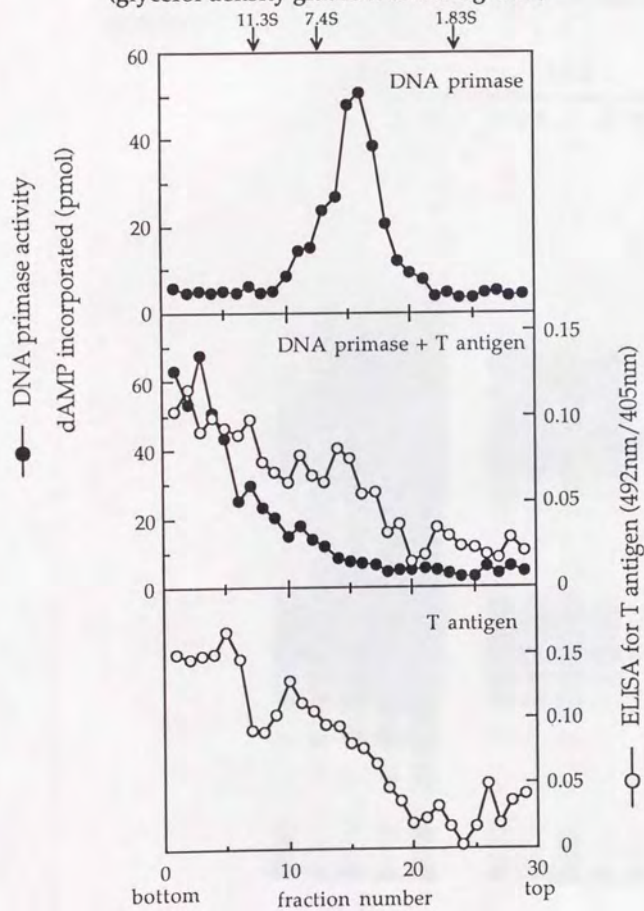


Fig.41

Stimulation by PyV T antigen and inhibition by SSB
of DNA primase-catalyzed oligoribonucleotide
synthesis on sscM13 DNA

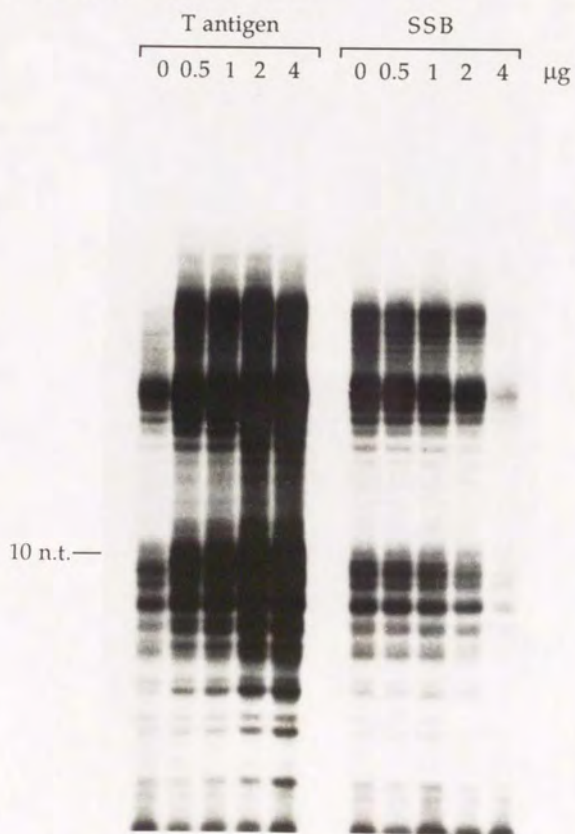


Fig.42

Effect of DNA concentration on the stimulation and the inhibition of oligoribonucleotide synthesis

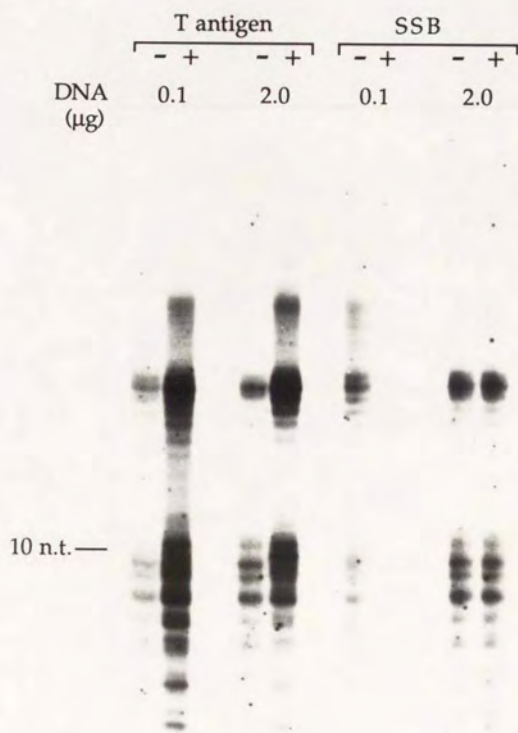


Fig.43

Effect of DNA concentration on the stimulation of DNA primase-catalyzed oligoligonucleotide synthesis by PyV T antigen

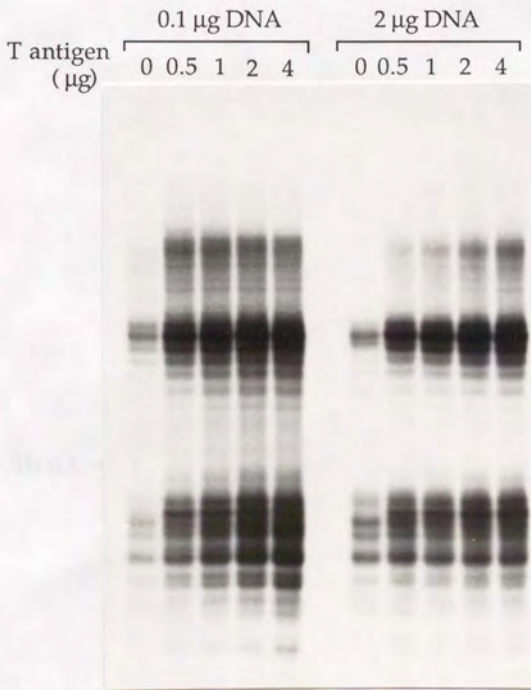
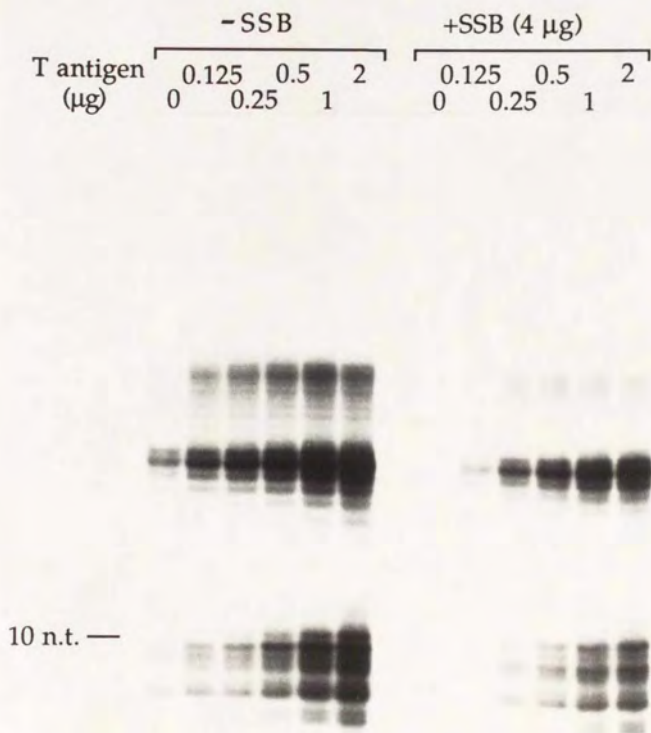


Fig.44

Stimulation of oligoribonucleotide synthesis
by PyV T antigen in the presence of SSB



よると考えられる。今後、T抗原と各種DNAとの結合様式について検討する必要があるが、originとoriginでないDNAとでは、originへの特異的な結合にはATPが必要であり、当然その結合様式は異なり、また、二本鎖DNAに結合して、部分的に二本鎖DNAが開裂した後、さらに、T抗原がDNAヘリカーゼとして二本鎖DNA巻き戻し反応へ移行する過程についても、originとoriginでない場合とでは異なるであろう⁹⁵⁾。

以上の結果より、ポリオマウイルスの無細胞DNA複製系において、DNA複製は、T抗原が二本鎖DNA上のoriginを認識して結合し、二本鎖DNAが部分的に開裂して開始された後、T抗原との相互作用によりDNAプライマーゼが導入されて、DNAプライマーゼはT抗原との相互作用により一本鎖DNA上でSSBの存在下プライマーRNA合成を行えることが示された。このように、真核細胞において、DNA複製因子であるDNAプライマーゼが複製開始蛋白質あるいはDNAヘリカーゼと相互作用することが示された例はなく、この知見は、いまだに同定されていない真核細胞の複製開始蛋白質及びDNAヘリカーゼを同定する上できわめて重要と考えられる。

第 8 章 総括

本研究により、以下のことを明らかにした。

1) マウス FM3A 細胞細胞より、一本鎖 DNA 結合蛋白質 (SSB) を精製した。SSB は SV40 の無細胞 DNA 複製系の必須因子の一つであり、ヒトやサルの細胞からは容易に検出されているが、マウス細胞より得たものは本研究が最初である。得られた SSB は、ポリオーマウイルスの無細胞 DNA 複製系に対する促進活性、DNA ポリメラーゼ α 活性促進活性、及び、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により検出されたバンドのパターンにおいて、HeLa 細胞のものとの差異は認められず、種を越えて保存された蛋白質であると考えられた。しかし、SSB を得たことによって、複製開始後プライマー RNA 合成が行われる過程について、分子レベルでの解析が可能となった。また、SSB が、T 抗原と DNA プライマーゼによる、origin に依存しないオリゴリボヌクレオチド合成を抑制することをあらたに見いだした。

2) マウス FM3A 細胞より、DNA ポリメラーゼ δ 活性を検出した。マウス細胞では、2 例目である。DNA ポリメラーゼ δ は、従来、仔牛胸腺等の限られた材料でしか検出されていなかったが、SV40 の無細胞 DNA 複製系を用いた解析により複製への関与が示されると、種々の細胞より検出されるに至った。その DNA 複製における役割についても、SV40 の無細胞 DNA 複製系を用いた解析により、PCNA 等の補助因子の存在下、leading 鎖の複製を担うものと考えられてきた。すなわち、DNA 複製は、lagging 鎖を担う DNA ポリメラーゼ α と、leading 鎖を担う DNA ポリメラーゼ δ の 2 種類の DNA ポリメラーゼにより行われると考えられるようになってきた。しかし、最近、酵母の研究により、第 3 の DNA ポリメラーゼが複製に関与していることが示されたことにより、高等真核細胞においても、3 種類の DNA ポリメラーゼが複製に関与する可能性が示唆されている。その第 3 の DNA ポリメラーゼが、近年

命名されたDNAポリメラーゼεである。これは、従来、DNAポリメラーゼδ II (PCNA非依存性)と呼ばれていたものである。本研究においても、DNAポリメラーゼα、β、γ、δ以外に、PCNAに依存しないDNAポリメラーゼ活性を検出しており、今後、このDNAポリメラーゼも含めて、各DNAポリメラーゼの複製における役割についておおいに検討の余地がある。

3) ポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系において、宿主特異性を決定している細胞側の因子がDNAプライマーゼであることを示した。精製した酵素・蛋白質のみを用いた系で示したこと、また、二重鎖DNAを鋳型としてのオリゴリボヌクレオチド合成産物を解析して、実際にDNAプライマーゼの反応のレベルで特異性を示したことは、いずれも、本研究によりはじめて行われたものである。これらの解析によりもたらされた結果は、単にウイルスの宿主特異性の決定機構を示すものではなく、宿主細胞におけるプライマーRNA合成機構を反映したものと考えている。

4) ポリオーマウイルスのT抗原と宿主FM3A細胞のDNAプライマーゼが物理的に複合体を形成し、また、機能的にも相互作用することが示された。この結果は、高等真核細胞においては、いまだに同定されていない複製開始蛋白質及びDNAヘリカーゼが、DNA複製因子であるDNAプライマーゼと相互作用し得ることを強く示唆したものであり、今後、これらを同定するうえで重要な知見を与えたものと確信する。

本研究は、細胞増殖制御機構を解明するために、その基礎的知見となるDNA複製機構、特に、その開始制御機構を解明することを目的として行ったものである。現在、DNA複製開始機構を解明するためのポイントとして、origin及び複製開始蛋白質の同定が最も重要と考えられる。高等真核細胞においては、その有無についてさえ統一的な見解は得られていないのが現状であるが、最近の研究の状況をまとめてみた。

高等真核細胞のoriginの研究は、チャイニーズハムスターの卵巣細胞の増幅しているDHFR (dihydrofolate reductase) 遺伝子を用いたものが、最も進んでいる。複数の研究室が、この遺伝子上のoriginの同定に取り組んだ結果、かなり範囲が狭められつつある。しかし、各グループともDHFR遺伝子の下流域にoriginが存在するとしているものの、統一的な見解は得られていない¹⁰¹⁾。すなわち、G1/S期同調して、S期の最初にDNA合成が行われた部分を解析したグループは、22 Kbの距離で2カ所のoriginがあるとしている¹⁰²⁾¹⁰³⁾のに対し、leading鎖とlagging鎖の切り替えが行われるところを捜したBurhansらは、それらのうちの1つの中のごく狭い部分であるとしている¹⁰⁴⁾¹⁰⁵⁾。さらに、最近開発された2次元電気泳動法を用いて、複製が開始された地点を検索したVaughnらは、これらの全てにまたがる非常に広い範囲(28 Kb)の中のいろいろなところから複製が開始されていると報告している¹⁰⁶⁾。そのような状況の中で、ごく最近、Heintsらのグループは、Burhansらの得たorigin候補のフラグメントを用いて、その湾曲した部位に結合する2種類の蛋白質を見だし¹⁰⁷⁾、それらのうちの一つにDNAヘリカーゼ活性を見いだした¹⁰⁸⁾。もう一つの蛋白質が複製開始蛋白質であり、このDNAがoriginであるのか、非常に興味もたれる。

originを同定する主な手法として、いわゆる自律増殖配列(ARS: autonomous replicating sequence)を分離するという方法があげられる。この方法は、あるDNA上にoriginが存在すれば、細胞内で自律増殖できるはずであるという原理によるものであるが、高等真核細胞では、導入したDNAが染色体に組み込まれてしまうことが多く、染色体外で自律増殖させることが困難であった。しかし、EBV (Epstein-Barr Virus)のorigin領域に存在する、DNAの核内での安定維持に関与する配列が同定され、今後、この配列を利用してARSの単離が期待される¹⁰⁹⁾。また、別の方法で得たDNAが細胞内で自律増殖できるかどうか検討するうえでも有効である。

以上の研究は、まずoriginを同定し、それから、複製開始蛋白質

の同定へと向かうものであるが、逆に、まず複製開始蛋白質を同定することも可能であろう。つまり、T抗原に代わる細胞自身の蛋白質は何かという研究である。この場合、ウイルスのDNA複製が、細胞周期でどのような制御を受けているのか、また、T抗原は、複製を行ううえでどのような蛋白質と相互作用しているのかといったことが重要となる。

SV40のT抗原のリン酸化及び脱リン酸化による活性の制御の研究から、細胞周期におけるDNA複製の制御機構に関連した興味深い知見がいくつか得られている¹¹⁰⁾。T抗原は、古くからリン酸化された核蛋白質であることが知られており、仔牛小腸由来のアルカリ性フォスファターゼ処理により、originへの結合活性が上がり、無細胞DNA複製系における複製活性も上がること¹¹¹⁾¹¹²⁾、また、リン酸化サイト(Ser-679)の変異により、細胞内でもウイルスDNAの複製が上がることを示されていた¹¹³⁾。さらに、最近になって、細胞周期上で活性が変動し、異なる制御因子(cyclin)との複合体を形成することが知られているcdc2キナーゼにより、ある特定のサイト(Thr-124)がリン酸化され、無細胞DNA複製系における活性が上がること¹¹⁴⁾、また、無細胞DNA複製系における促進因子として検出された因子RP-Cが蛋白脱リン酸化酵素PP2Aであり⁵⁸⁾¹¹⁵⁾、G1期に同調した細胞より調製した細胞抽出液による無細胞DNA複製系における低レベルの複製活性が、RP-C/PP2Aの添加によりS期と同レベルまで回復することが示された¹¹⁵⁾¹¹⁶⁾。これらのリン酸化・脱リン酸化酵素の細胞内でのターゲットは同定されておらず、今後の研究が期待される。

T抗原と、より直接的な相互作用をする蛋白質としては、癌抑制遺伝子産物であるp53蛋白とレチノブラストーマRb蛋白が知られている。これらの蛋白は、共に、T抗原と直接結合することにより、細胞増殖を抑制し、また、無細胞DNA複製系においてDNA複製を阻害する。特に、RB蛋白は、細胞周期によりそのリン酸化状態が変化し、また、リン酸化の状態によりT抗原との結合も制御される。

その結果、細胞周期上S期にのみT抗原はRb蛋白と解離した状態にありDNA複製を行えるという機構が考えられている⁸⁷⁾⁸⁸⁾。これらの癌抑制遺伝子産物と特異的に結合する細胞の蛋白の解析が現在行われていると予想される。それらの蛋白質の中から、複製開始蛋白質が見いだされる可能性は十分あり、続報が期待される。

複製開始蛋白質やoriginを同定することと並んで、真核細胞におけるDNA複製の制御を考えるうえで、忘れてはならない重要な問題の一つに、クロマチン構造による制御があげられる。まだ、クロマチン構造を形成していることによる複製の制御機構についてはほとんど解析されていない。しかし、近年、ヒストンの集合様式等に関する研究も進み、また無細胞系でクロマチン構造をとらせたいうでDNA複製を観察する試みが行われ始めた¹¹⁷⁾⁻¹¹⁹⁾。その中で、SV40の無細胞DNA複製系を用いた解析により、origin近傍に転写因子NF-1の結合サイトを持つDNAを鋳型とした場合、裸のDNAではNF-1による効果は認められないのに対し、クロマチン構造をとらせた場合には、NF-1の添加により複製が促進されることが報告された¹²⁰⁾。origin近傍に転写因子の結合サイトが見いだされている例は多く、転写と複製は密接な関係にあると予想され、この知見は興味深い。特に、ポリオマウイルスは、細胞内でのDNA複製に、origin近傍に位置する転写エンハンサーに対する強い要求性が知られている¹²¹⁾ (SV40のエンハンサー要求性は低い)、無細胞DNA複製系ではその要求性が全く見いだされていなかった¹²²⁾。もし、クロマチン構造をとらせることにより、細胞内で観察されるようなエンハンサーの要求性が回復すれば、種々の複製調節機構を探るうえで優れたモデル系となるであろうと期待される。

細胞外の細胞増殖刺激物質によりもたらされた情報は、細胞膜に伝わり、そして細胞内へ伝わり、大きなブラックボックスを経て核内へ伝わり、そしてDNA複製が行われる。このブラックボックス

が、徐々に徐々に小さくなり、そして、やがて全容が明らかになる
日を楽しみにしながら本稿は終わる。

- 1) ...
- 2) ...
- 3) ...
- 4) ...
- 5) ...
- 6) ...
- 7) ...
- 8) ...
- 9) ...
- 10) ...
- 11) ...
- 12) ...
- 13) ...
- 14) ...
- 15) ...
- 16) ...
- 17) ...
- 18) ...
- 19) ...
- 20) ...
- 21) ...
- 22) ...
- 23) ...
- 24) ...
- 25) ...
- 26) ...
- 27) ...
- 28) ...
- 29) ...
- 30) ...
- 31) ...
- 32) ...
- 33) ...
- 34) ...
- 35) ...
- 36) ...
- 37) ...
- 38) ...
- 39) ...
- 40) ...
- 41) ...
- 42) ...
- 43) ...
- 44) ...
- 45) ...
- 46) ...
- 47) ...
- 48) ...
- 49) ...
- 50) ...
- 51) ...
- 52) ...
- 53) ...
- 54) ...
- 55) ...
- 56) ...
- 57) ...
- 58) ...
- 59) ...
- 60) ...
- 61) ...
- 62) ...
- 63) ...
- 64) ...
- 65) ...
- 66) ...
- 67) ...
- 68) ...
- 69) ...
- 70) ...
- 71) ...
- 72) ...
- 73) ...
- 74) ...
- 75) ...
- 76) ...
- 77) ...
- 78) ...
- 79) ...
- 80) ...
- 81) ...
- 82) ...
- 83) ...
- 84) ...
- 85) ...
- 86) ...
- 87) ...
- 88) ...
- 89) ...
- 90) ...
- 91) ...
- 92) ...
- 93) ...
- 94) ...
- 95) ...
- 96) ...
- 97) ...
- 98) ...
- 99) ...
- 100) ...

参考文献

- 1) Watson, J.D. & Crick, F.H.C. *Nature* 171, 737 (1953)
- 2) Kornberg, A. *DNA Replication*
W.H. Freeman, San Francisco, CA. (1980)
- 3) Kornberg, A. *Supplement to DNA Replication*
W.H. Freeman, San Francisco, CA. (1982)
- 4) Tayler, J.H., Wood, R.S., & Hughes, W.L.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 43, 122 (1957)
- 5) Huberman, J.A. & Riggs, A.D. *J. Mol. Biol.* 32, 327 (1968)
- 6) Wager, M.A. & Huberman, J.A. *Cell* 6, 551 (1975)
- 7) Enomoto, T., Suzuki, M., Takahashi, M., Kawasaki, K.,
Watanabe, Y., Nagata, K., Hanaoka, F., & Yamada, M.
Cell Struct. Funct. 10, 161 (1985)
- 8) Suzuki, M., Enomoto, T., Hanaoka, F., & Yamada, M.
J. Biochem. 98, 581 (1985)
- 9) Suzuki, M., Enomoto, T., Masutani, C., Hanaoka, F.,
Yamada, M., & Ui, M. *J. Biol. Chem.* 264, 10065 (1989)
- 10) 鈴木理 東京大学大学院薬学系研究科博士論文 (1988)
- 11) Takada-Takayama, R., Suzuki, M., Enomoto, T., Hanaoka, F.,
& Ui, M. *FEBS* 273, 27 (1990)
- 12) 高山律子 東京大学大学院薬学系研究科博士論文 (1989)
- 13) Masutani, C., Enomoto, T., Suzuki, M., Hanaoka, F., & Ui, M.
J. Biol. Chem. 265, 10210 (1990)
- 14) 益谷央豪 東京大学大学院薬学系研究科修士論文 (1988)
- 15) Seki, M., Enomoto, T., Hanaoka, F., & Yamada, M.
Biochemistry 26, 2924 (1987)
- 16) Seki, M., Enomoto, T., Yanagisawa, J., Hanaoka, F., & Ui, M.
Biochemistry 27, 1766 (1988)
- 17) 関政幸 東京大学大学院薬学系研究科博士論文 (1989)
- 18) 柳澤純 東京大学大学院薬学系研究科修士論文 (1989)

- 19) 甲田岳生 東京大学大学院薬学系研究科修士論文 (1990)
- 20) Saijo, M., Enomoto, T., Hanaoka, F., & Ui, M.
Biochemistry 29, 583 (1990)
- 21) 西條將文 東京大学大学院薬学系研究科博士論文 (1990)
- 22) Kawasaki, K., Enomoto, T., Suzuki, M., Seki, M., Hanaoka, F.,
& Yamada, M. Bioshemistry 25, 3044 (1986)
- 23) Murakami, Y., Yasuda, H., Miyazawa, H., Hanaoka, F.,
& Yamada, M. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 1761 (1985)
- 24) 浴俊彦 東京大学大学院薬学系研究科博士論文 (1988)
- 25) Lehman, I. R. & Kaguni, L. S. J. Biol. Chem. 264, 4265 (1989)
- 26) Kuchta, R. D., Reid, B., & Chang, M. S.
J. Biol. Chem. 265, 16158 (1990)
- 27) Nagata, K., Guggenheimer, R. A., Enomoto, T., Lichy, J.,
& Hurwitz, J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6779 (1982)
- 28) 村上康文・浴俊彦 蛋白質・核酸・酵素 33, 1766 (1988)
- 29) Kelly, T. J. J. Biol. Chem. 263, 17889 (1988)
- 30) Stillman, B. Annu. Rev. Cell Biol. 5, 197 (1989)
- 31) Challberg, M. D. & Kelly, T. J.
Annu. Rev. Biochem. 58, 671 (1989)
- 32) Borowiec, J. A., Dean, F. B., Bullock, P. A., & Hurwitz, J.
Cell 60, 181 (1990)
- 33) Deb, S. P. & Tegtmeyer, P. J. Virol. 61, 3649 (1987)
- 34) Dean, F. B., Dodson, M., Echols, H., & Hurwitz, J.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 8981 (1987)
- 35) Mastrangelo, I. A., Hough, P. V. C., Wall, J. S., Dodson, M.,
Dean, F. B., & Hurwitz, J. Nature 338, 658 (1989)
- 36) Fairman, M. P. & Stillman, B. EMBO J. 7, 1211 (1988)
- 37) Wold, M. S. & Kelly, T.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 2523 (1988)
- 38) Turimoto, T. & Stillman, B. EMBO J. 8, 3883 (1989)

- 39) Turimoto, T., Melendy, T., & Stillman, B.
Nature 346, 534 (1990)
- 40) Weinberg, D. H., Collins, K. L., Simanacek, P., Russo, A.,
Wold, M. S., Virshup, D. M., & Kelly, T. J.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87, 8692 (1990)
- 41) Lee, S. -H. & Hurwitz, J.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87, 5672 (1990)
- 42) Sthal, H., Droge, P., & Knippers, R.
EMBO J. 5, 1939 (1986)
- 43) Matson, S. W. & Kaiser-Rogers, K. A.
Annu. Rev. Biochem. 59, 289 (1990)
- 44) DePamphilis, M. L. & Bradley, M. K. in The Papovaviridae 1
(N. P. Saltzman Ed) p99 Plenum Press NY, London (1986)
- 45) 菅澤薫 東京大学大学院薬学系研究科博士論文 (1989)
- 46) Hanaoka, F., Nagata, K., Watanabe, Y., Enomoto, T.,
& Yamada, M. Cell Struct. Funct. 6, 357 (1981)
- 47) Rice, W. C., Lorimer, H. E., Prives, C., & Miller, L. K.
J. Virol. 61, 1712 (1987)
- 48) Pallas, D. C., Schley, C., Mahoney, M. Harlor, E.,
Schaffhausen, B. B., & Roberts, T. M.
J. Virol. 60, 1075 (1986)
- 49) Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sambrook, J.
Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring
Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982)
- 50) 多田周右 東京大学大学院薬学系研究科修士論文 (1988)
- 51) Lohman, T. M., Green, J. M., & Beyer, R. S.
Biochemistry 25, 21 (1986)
- 52) Bradford, M. M. Anal. Biochem. 72, 248 (1976)
- 53) Laemmli, U. K. Nature 227, 680 (1970)
- 54) Wobbe, C. R., Weissbach, L., Borowiec, J. A., Dean, F. B.,

- Murakami, Y., Bullock, P., & Hurwitz, J.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 1834 (1987)
- 55) Ishimi, Y., Clayde, P., Bullock, P., & Hurwitz, J.
J. Biol. Chem. 263, 19723 (1988)
- 56) Wold, M.S., Li, J.J., & Kelly, T.J.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 3643 (1987)
- 57) Dean, F.B., Bullock, P., Murakami, Y., Wobbe, C.R.,
Weissbach, L., & Hurwitz, J.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 16 (1987)
- 58) Virshup, D.M. & Kelly, T.J.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 3584 (1989)
- 59) Kenny, M.K., Lee, S.-H., & Hurwitz, J.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 9757 (1989)
- 60) Chase, J.W. & Williams, K.R.
Annu. Rev. Biochem. 55, 103 (1986)
- 61) Wold, M.S., Weinberg, D.H., Virshup, D.M., Li, J.J.,
& Kelly, T.J. J. Biol. Chem. 264, 2801 (1989)
- 62) Brill, S.J. & Stillman, B. Nature 342, 92 (1989)
- 63) Heyer, W.-D., Rao, M.R.S., Erdile, L.F., Kelly, T.J.,
& Kolodner, R.D. EMBO J. 9, 2321 (1990)
- 64) Salah-ud-Din, Brill, S.J., Fairman, M.P., & Stillman, B.
Genes Develop. 4, 968 (1990)
- 65) Erdile, L.F., Wold, M.S., & Kelly, T.J.
J. Biol. Chem. 265, 3177 (1990)
- 66) Byrnes, J.J., Downey, K.M., Black, V.L., & So, S.G.
Biochemistry 15, 2817 (1976)
- 67) Burgers, P.M.J.
Prog. Nuc. Acid Res. Mol. Biol. 37, 235 (1989)
- 68) Bravo, R., Frank, R., Blundell, P.A., & MacDonald-Bravo, H.
Nature 326, 515 (1987)

- 69) Prelich, G., Tan, C.-K., Kostura, M., Mathews, M.B.,
So, A.G., Downey, K.M., & Stillman, B.
Nature 326, 517 (1987)
- 70) So, A.G. & Downey, K.M. Biochemistry 27, 4591 (1988)
- 71) Miachi, K., Frilzler, M.J., & Tan, E.M.
Immunol. 121, 2228 (1978)
- 72) Bravo, R. & Celis, J.E. J. Cell. Biol. 84, 795 (1980)
- 73) Bravo, R., Fey, S.J., Bellatin, J., Larsen, P.M.,
Arevalo, J., & Celis, J.E. Exp. Cell Res. 136, 311 (1981)
- 74) Morris, G.F. & Mathews, M.B.
J. Biol. Chem. 264, 13856 (1989)
- 75) Bravo, R. Exp. Cell Res. 163, 287 (1986)
- 76) Bravo, R. & MacDonald-Bravo, H. EMBO J. 4, 655 (1985)
- 77) Celis, J.E. & Celis, A.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3262 (1985)
- 78) Madsen, P. & Celis, J.E. FEBS Lett. 193, 5 (1985)
- 79) Goulian, M., Herrmann, S.M., Sackett, J.W., & Grimm, S.L.
J. Biol. Chem. 265, 16402 (1990)
- 80) Sitney, K.C., Budd, M.E., & Campbell, J.L.
Cell 56, 599 (1989)
- 81) Morrison, A., Araki, H., Clark, A.B., Hamatake, R.K.,
& Sugino, A. Cell 62, 1143 (1990)
- 82) Whal, A.F., Crute, J.J., Sabatino, R.D., Bodner, J.B.,
Marraccino, R.L., Harwell, L.W., Load, E.M., & Bambara, A.
Biochemistry 25, 7821 (1986)
- 83) Murakami, Y., Eki, T., Yamada, M., Prives, C., & Hurwitz, J.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 6347 (1986)
- 84) Murakami, Y., Wobbe, C.R., Weissbach, L., Dean, F.B.,
& Hurwitz, J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 2869 (1986)
- 85) Murakami, Y.

- 86) Wang, E.H., Friedman, P.N., & Prives, C.
Cell 57, 379 (1989)
- 87) DeCaprio, J.A., Ludlow, J.W., Figge, J., Shew, J.-Y.,
Huang, C.-M., Lee, W.-H., Marsilio, E., Paucha, E.,
& Livingston, D.M. Cell 54, 275 (1988)
- 88) Ludlow, J.W., DeCaprio, J.A., Huang, C.-M., Lee, W.-H.,
Paucha, E., & Livingston, D.M. Cell 56, 57 (1989)
- 89) Prelich, G. & Stillman, B. Cell 53, 117 (1988)
- 90) Smale, S.T. & Tjian, R. Mol. Cell Biol. 6, 4077 (1986)
- 91) Gough, G., Gannon, J.V., & Lane, D.P.
Cancer Cells 6, 153 (1988)
- 92) Gannon, J.V. & Lane, D.P. Nature 329, 456 (1987)
- 93) Dornreiter, I., Hoss, A., Arthur, A.K., & Fanning, E.
EMBO J. 9, 3329 (1990)
- 94) Scheffner, M., Wessel, R., & Stahl, H.
Nuc. Acids Res. 17, 93 (1989)
- 95) Schiedner, G., Wessel, R., Scheffner, M., & Stahl, H.
EMBO J. 9, 2937 (1990)
- 96) Tabor, S. & Richardson, C.C.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 205 (1981)
- 97) Nossal, N.G. & Hinton, D.M.
J. Biol. Chem. 262, 10879 (1987)
- 98) Cha, T.-A. & Alberts, B.M. J. Biol. Chem. 261, 7001 (1986)
- 99) Arai, K.-I. & Kornberg, A.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4308 (1979)
- 100) Seki, M., Enomoto, T., Eki, T., Miyajima, A., Murakami, Y.,
Hanaoka, F., & Ui, M. Biochemistry 29, 1003 (1990)
- 101) Linskens, M.H.K. & Huberman, J.A. Cell 62, 845 (1990)
- 102) Leu, T.-H. & Hamlin, J.L. Mol. Cell Biol. 9, 523 (1989)
- 103) Handeli, S., Klar, A., Meuth, M., & Cdar, H.

Cell 57, 909 (1989)

- 104) Burhans, W.C., Vassilev, L.T., Caddle, M.S., Heintz, N.H.,
& DePamphilis, M.L. Cell 62, 955 (1990)
- 105) Vassilev, L.T., Burhans, W.C., & DePamphilis, M.L.
Mol. Cell. Biol. 10, 4685 (1990)
- 106) Vaughn, J.P., Dijkwel, P.A., & Hamlin, J.L.
Cell 61, 1075 (1990)
- 107) Caddle, M.S., Dailey, L., & Heintz, N.H.
Mol. Cell. Biol. 10, 6236 (1990)
- 108) Dailey, L., Caddle, M.S., Heintz, N., & Heintz, N.H.
Mol. Cell. Biol. 10, 6225 (1990)
- 109) Baichwal, V.R. & Sugden, B. in Gene Transfer,
R. Kucherlapati, ed. (NY: Plenum), pp. 117 (1986)
- 110) Prives, C. Cell 61, 735 (1990)
- 111) Mohr, I.J., Stillman, B., & Gluzman, Y.
EMBO J. 6, 153 (1987)
- 112) Graesser, F.A., Mann, K., & Walter, G.
J. Virol. 61, 33 (1987)
- 113) Schneider, J. & Fanning, E. J. Virol. 62, 1598 (1988)
- 114) McVey, D., Brizuela, L., Mohr, I., Marshak, D.R.,
Gluzman, Y., & Beach, D. Nature 341, 503 (1989)
- 115) Virshup, D.M., Kauffman, M.G., & Kelly, T.J.
EMBO J. 8, 3891 (1989)
- 116) Roberts, J.M. & D'Urso, G. Science 241, 1486 (1988)
- 117) Smith, S. & Stillman, B. Cell 58, 15 (1989)
- 118) Banerjee, S. & Cantor, C.R.
Mol. Cell. Biol. 10, 2863 (1990)
- 119) Bonne-Andrea, C., Wong, M.L., & Alberts, B.M.
Nature 343, 719 (1990)
- 120) Cheng, L. & Kelly, T.J. Cell 59, 541 (1989)

- 121) Rochford, R., Davis, C.T., Yoshimoto, K.K.,
& Villarreal, L.P. Mol. Cell. Biol. 10, 4996 (1990)
- 122) Prives, C., Murakami, F., Kern, F.G., Folk, W.,
Basilico, C., & Hurwitz, J. Mol. Cell. Biol. 7, 3694 (1987)

謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始御指導と御鞭撻を賜りました東京大学薬学部生理化学教室の宇井理生教授に感謝致します。

また、本研究室配属時の指導教官であり、研究を始める機会を与えてくださいました山田正篤名誉教授に感謝致します。

本研究の実質的な指導者であり、常に経験に基づく深い洞察をもって、適宜の御指導と御助言を頂きました榎本武美講師に心より感謝致します。

有益な御助言と暖かい励ましを頂きました花岡文雄前助教授に心より感謝致します。

鈴木理博士、関政幸博士、西條將文博士には、日々適切な御助言と御助力を頂き、また、研究者としての姿勢を、身をもって教えて頂きました。深く感謝すると共に今後の御活躍をお祈り致します。

柳澤純氏、甲田岳生氏、木村圭志氏には、種々の御助力を頂き、また、リラックスして研究を行える環境をつくって頂きました。深く感謝すると共に今後の御発展をお祈り致します。

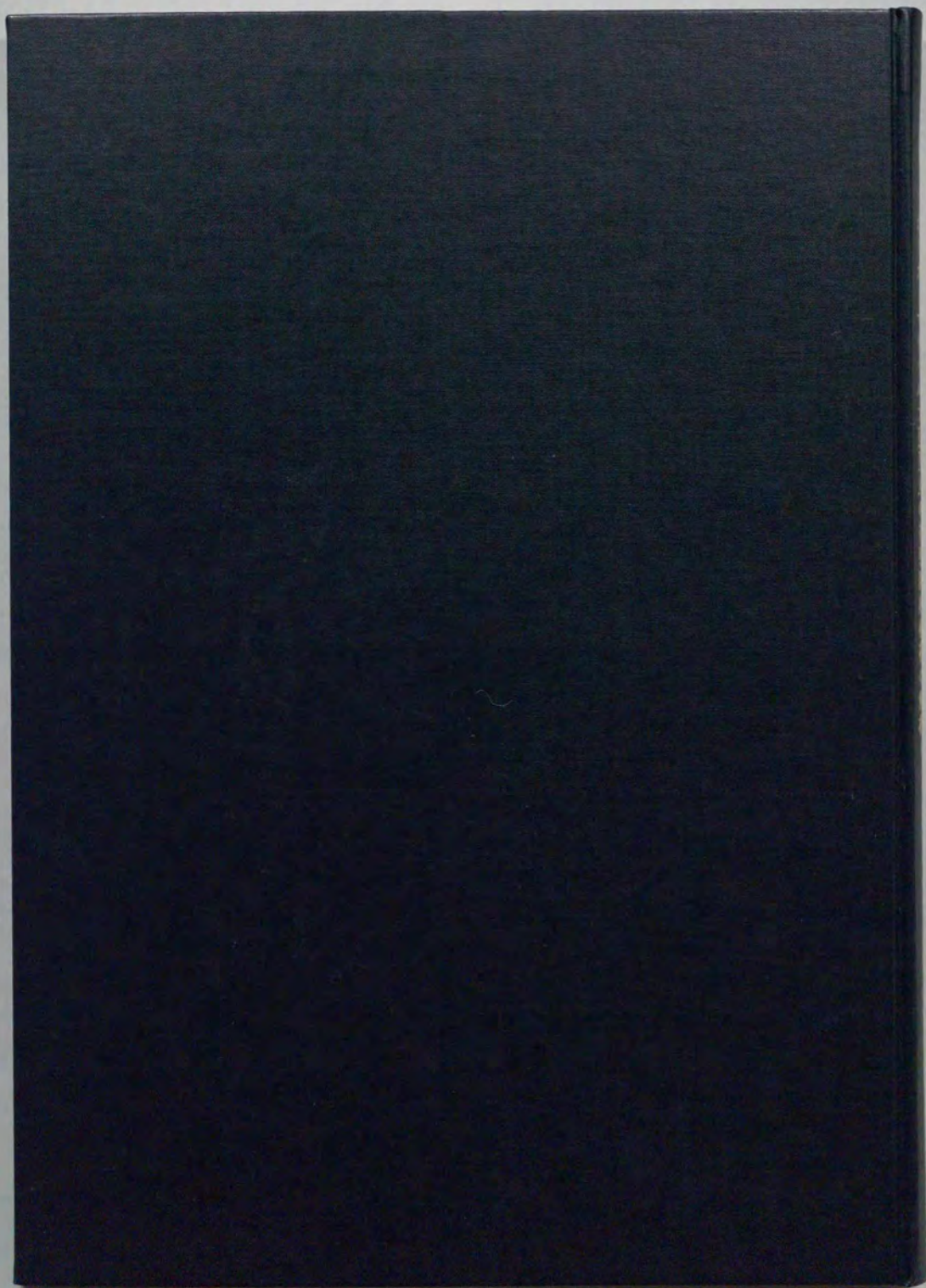
本研究の基礎となったポリオーマウイルスの無細胞DNA複製系の構築に御尽力くださり、また、適宜御助言くださいました浴俊彦博士、並びにその手足となって働いた宮島敦子氏に心より感謝致します。

SV40のT抗原とDNAを頂き、また、暖かく励ましてくださいました菅澤薫博士に感謝致します。

常に暖かく見守ってくださいました櫛木修博士、星野真一博士、多田周右氏をはじめとする東京大学薬学部生理化学教室の皆様にも心より感謝致します。

最後に、本研究のよき理解者であり、種々の御助力と御鞭撻を賜りました益谷美都子博士に心より感謝致します。

平成3年1月18日 益谷央豪



inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

