

論文の内容の要旨

Taq DNAポリメラーゼをはじめとするDNAポリメラーゼの 鋳型・プライマー非依存性DNA合成メカニズムの検証

花 木 賢 一

DNAポリメラーゼが鋳型・プライマーを加えなくともヌクレオチドを重合する現象については、1960年に *Escherichia coli*由来のDNAポリメラーゼ(PolI)で最初に報告され、その後、いくつかのDNAポリメラーゼで同様の現象が報告された。それらの特徴は、(1)鋳型・プライマーを反応系へ加える必要がないこと、(2)DNAの合成を認めるまでの空白時間が存在すること、(3)合成されたDNAは概ねpoly d(A-T)である、というように要約することができる。しかし、1970年代後半にそれらの現象に疑問を呈する論文が発表され、1980年代以降はDNAポリメラーゼによる鋳型・プライマー非依存性DNA合成反応の報告は皆無となった。一方、我々のグループでハイブリダイゼーション用の相補的DNAの3'末端にATの繰り返し配列をつなぎ、AT部分がDNAポリメラーゼで伸長することを期待して考案した新しいDNA標識法：hybridization-AT-tailing (HybrAT)法[Nakajima *et al.* (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **248**, 613-620]の開発初期に、*Thrmus aquaticus*由来の*Taq* DNAポリメラーゼが鋳型・プライマー非依存的に高分子DNAを合成するという現象を見出した。また、同時期に*Thermus thermophilus*由来の*Tth* DNAポリメラーゼと*Thermococcus litoralis*由来の*Vent* DNAポリメラーゼについても同様の現象が報告された。本研究では、*Taq* DNAポリメラーゼの鋳型・プライマー非依存性DNA合成の性状解析を行った。また、同様の活性が報告されているDNAポリメラーゼについても、本当にDNAを鋳型・プライマー非依存的に合成するか否かの検証を行った。

Taq DNAポリメラーゼを鋳型・プライマー非存在下で0.2 mM dATP, dTTP, dCTPおよびdGTPと共に65°C, 3

時間保温すると、2,000~5,000 ntの鎖長を主とする高分子DNAを合成した(図1)。この高分子DNA合成の至適温度はdATPとdTTPを基質とした場合で60~68℃, dATP, dTTP, dCTPおよびdGTPを基質とした場合で62~70℃であった。そして、65℃において合成された

高分子DNAの配列をnearest neighbor base sequence解析で推定すると、AとTのみから成るpoly d(A-T)であることが明らかになった。この鋳型・プライマー非依存性poly d(A-T)合成反応(=dAdT重合反応)は、*Thermus* 属由来の種々のDNAポリメラーゼに認められたが、*Thermus*属以外の細菌由来の耐熱性DNA

ポリメラーゼでは認められなかった。また、*Tth* DNAポリメラーゼと*Taq* DNAポリメラーゼの5'→3'エクソヌクレアーゼ活性に関与するN末ドメインを欠失させた ΔTth DNAポリメラーゼとStoffel fragmentも、その活性を有していなかった。dAdT重合反応は鋳型・プライマー非依存的にoligo d(A-T)を合成する初期反応と、oligo d(A-T)を鋳型・プライマーとしてpoly d(A-T)を合成する後期反応からなることが推定され、それらのDNA合成阻害剤:N-ethylmaleimideに対する感受性は異なった。従って、dAdT重合反応は異なる2つの酵素反応から成ることが示唆された。しかし、oligo d(A-T)はpoly d(A-T)合成によって反応液中のdATPとdTTPが消費され尽くすと、5'→3'エクソヌクレアーゼ活性により、poly d(A-T)を分解して生じることも明らかになった。

実験に使用した*Taq* DNAポリメラーゼは高度に精製された*Thermus aquaticus*由来の天然酵素、或いは大腸菌で発現させた遺伝子組換え酵素であるが、それら*Taq* DNAポリメラーゼ標品に鋳型・プライマーとなる核酸が共精製されていないか、DNaseI, ピリミジン塩基特異性のRNaseA, 或いはG特異性のRNaseT₁処理により検討を行った。その結果、dAdT重合反応はRNaseAにより阻止されたが、DNaseIでは阻止されなかった。これによりRNAがdAdT重合反応の鋳型・プライマーであることが示唆された。また、dAdT重合反応はRNaseT₁により阻止されなかったため、鋳型・プライマーRNAはGを含まないことが示唆された。一方、鋳型・プライマー非依存性のdAdT重合反応が認められなかった ΔTth DNAポリメラーゼ或いはStoffel fragmentの反応液にoligo r(A-U)を加えると、poly d(A-T)を合成した。そこで、RNAは*Taq*或いは*Tth* DNAポリメラーゼのN末ドメインと付着していると推測される。

これまでの知見から、推定される*Taq* DNAポリメラーゼのdAdT重合反応メカニズムを図2に要約した。AU反復配列を有するRNAは*Taq* DNAポリメラーゼのN末ドメインと付着しており、62~70℃において、そのRNAを鋳型・プライマーとして逆転写酵素(RT)活性によりoligo d(A-T)を合成する(図2A)。oligo d(A-T)の最小鎖長

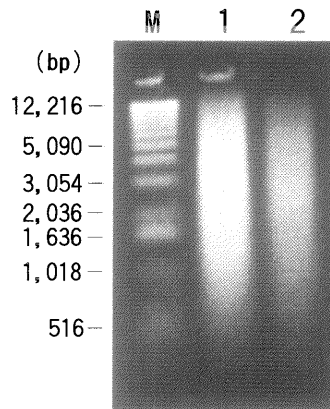


図1 アルカリ変性アガロースゲル電気泳動解析
 レーン1: dATP・dTTP, レーン2: ATCGのdNTPsを基質として鋳型・プライマー非依存的に合成されたDNA, レーンM: DNAサイズマーカー。1.4% アルカリ変性ゲル(30 mM 水酸化ナトリウム, 2 mM EDTA)を用いて30 V, 4時間の条件の電気泳動法により分析した。

Vent (*exo*-) DNAポリメラーゼは、鋳型・プライマー非依存性DNA合成活性を消失していた。*Taq*, *Tth* DNAポリメラーゼ同様、エクソヌクレアーゼ活性を除くことにより鋳型・プライマー非依存性DNA合成活性は消失することなどから、*Vent* DNAポリメラーゼもまた混入しているDNAまたはRNAを鋳型・プライマーとしている可能性が極めて高い。

本研究により1960年代以降報告されてきた様々なDNAポリメラーゼによる鋳型・プライマー非依存性DNA合成は、不完全なタンパク質精製によって残存した核酸、或いは、高度な蛋白精製技術によってもDNAポリメラーゼと分離できない核酸が鋳型・プライマーとして関与する現象であることが明らかになった。従って、現存するDNAポリメラーゼのすべてには鋳型・プライマー非依存的にDNAを合成する活性は存在しないのではないかと結論づけることができる。