

審査の結果の要旨

氏名 花木 賢一

本研究は1960年以降様々なDNAポリメラーゼで報告されている鋳型・プライマー非依存性DNA合成について、*Thermus aquaticus*由来のTaq DNAポリメラーゼを中心に、その合成メカニズムの解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. Taq DNAポリメラーゼは、60～70℃において鋳型・プライマーを添加することなく poly d(A-T)を合成した。この反応はTaq DNAポリメラーゼがN末289アミノ酸を介して共精製したAU反復配列をもつRNAを鋳型・プライマーとして、逆転写酵素活性により oligo d(A-T)を合成し、続いて、そのoligo d(A-T)を鋳型・プライマーとするDNAポリメラーゼ反応により poly d(A-T)を合成する現象であることが示された。
2. *Thermus thermophilus*由来のTth DNAポリメラーゼは、一見鋳型・プライマー非依存的に、また反応温度によって様々な配列の高分子DNAを合成するが、やはり共精製したRNAを鋳型・プライマーとするDNA合成反応であることが示された。その温度依存的に合成される高分子DNAの配列の多様性は、Tth DNAポリメラーゼのN末250アミノ酸と共精製されるRNAの多様性に依存すると推測される。
3. *Escherichia coli*由来のDNAポリメラーゼIとウシ胸腺DNAポリメラーゼ α は、かつて鋳型・プライマー非依存的に poly d(A-T)を合成すると報告されたが、その現象を再現できなかった。その理由として、鋳型・プライマー非依存性DNA合成活性が見出された当時と現在の蛋白精製技術の差を挙げることができる。
4. *Thermococcus litoralis*由来のVent DNAポリメラーゼは、ヌクレアーゼ処理により鋳型・プライマー非依存性DNA合成を阻止することができなかった。しかし、2アミノ酸置換により proofreading活性を欠失させたVent (exo-) DNAポリメラーゼには鋳

型・プライマー非依存性DNA合成活性を認めなかったことから、proofreading活性に関与する領域が鋳型・プライマー非依存性高分子DNA合成に関与することが示された。従って、Vent DNAポリメラーゼについては鋳型・プライマー非依存性DNA合成の可能性を否定できないが、一方、proofreading活性に関与する領域と鋳型・プライマー核酸とが付着し、その核酸がDNase或いはRNaseの作用を受けにくい状態で存在している可能性も残る。

以上、本論文は1960年代以降今日に至るまで様々なDNAポリメラーゼで見出され、認知されてきた鋳型・プライマー非依存的にDNAを合成する現象が、不完全な蛋白質精製によって残存した核酸、或いは、高度な蛋白質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・プライマーとして働いて生じる現象であることを明らかにした。本研究はDNAポリメラーゼの鋳型・プライマー非依存的DNA合成メカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。