

氏名	にし 西	おか 岡	もとむ 求
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)		
学位記番号	論 工 博 第 3670 号		
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
学位論文題目	Studies on the Enzymes Related to DNA Replication, Cleavage and Repair Functions in Hyperthermophilic Archaeon <i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1 (超好熱始原菌サーモコッカス・コダカラエンシス KOD1 における DNA の複製, 切断および修復酵素に関する研究)		
論文調査委員	(主 査) 教授 今 中 忠 行 教授 田 中 渥 夫 教授 木 村 俊 作		

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株における DNA 複製, 切断および修復に関係する酵素として, DNA ポリメラーゼ, インテイン・エンドヌクレアーゼおよび O<sup>6</sup>-メチルグアニン DNA メチル基転移酵素 (MGMT) の特性に関する研究の成果をまとめたものであり, 6 章よりなっている。

第 1 章は序論であり, 生物界における超好熱始原菌の位置づけ, 本論文で使用した超好熱始原菌 *T. kodakaraensis* KOD1 株についての概説, 超好熱始原菌における DNA 複製・転写・翻訳系の研究状況, DNA 複製および修復に関する酵素群の概説および DNA 切断に関係するインテイン・エンドヌクレアーゼについて述べている。

第 2 章では, KOD1 株より family B に属する DNA ポリメラーゼ遺伝子 (5013塩基対, 1671アミノ酸) を取得し, 2 つの介在配列を含んでいることを示した。精製酵素 (KOD DNA ポリメラーゼ) の酵素化学的特性の解析を行い, 高い熱安定性および強い 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有しているとともに, 非常に高いプロセスビティと速い DNA 合成速度を示すことを明らかにした。さらにこれらの特徴を踏まえ, 迅速かつ正確なポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に適用できることを実証した。

第 3 章では, KOD ポリメラーゼに存在する 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性モチーフ及びその周辺部位において部位特異的アミノ酸置換を行い, 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性が減少したエキソ変異型 KOD ポリメラーゼの取得を行い, 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性, PCR fidelity 及び増幅効率を調べた。さらに得られた変異型 KOD ポリメラーゼの 1 つ (N210D) と野生型 KOD ポリメラーゼを混合することにより, DNA ポリメラーゼ活性と 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性をバランスよく発揮する KOD-dash ポリメラーゼを開発し, 長鎖 DNA 配列 (15 kbp) を正確に増幅可能であることを示した。

第 4 章では, KOD ポリメラーゼ遺伝子内に存在する 2 つの介在配列, KOD pol intein-1 (PI-*PkoI*; 1080塩基対, 360アミノ酸) および KOD pol intein-2 (PI-*PkoII*; 1611塩基対, 537アミノ酸) について解析を行い, タンパク質スプライシングにより切り出されるインテインであり, 部位特異的エンドヌクレアーゼ活性を持つことを見出した。PI-*PkoI* および PI-*PkoII* の切断部位 (自分自身の遺伝子の欠失部位近傍) および切断形状 (4 塩基 3' 突出) を明らかにし, 認識・切断配列を決定したところ, PI-*PkoI* について 19 bp, PI-*PkoII* について 16 bp が決定された。両酵素に対する Na<sup>+</sup>イオンや K<sup>+</sup>イオンの添加効果を調べた結果, いずれの酵素についても高濃度の K<sup>+</sup>イオン存在下でより高い活性を示した。また PI-*PkoII* の認識・切断配列が KOD ポリメラーゼ遺伝子にも存在するため, 切断の有無について調べたところ, KOD1 染色体が PI-*PkoII* により切断されることを示した。

第 5 章は, DNA 修復酵素として, O<sup>6</sup>-meG よりメチル基を除去するタンパク質, O<sup>6</sup>-meG DNA メチル基転移酵素 (MGMT) 遺伝子をクローニングし, その解析を行った。標識されたメチル基が MGMT のシステイン残基に転移することを利用して, 活性測定を行い, KOD1 MGMT が 75°C あるいは 90°C 1 時間の熱処理後でもそれぞれ 77%, 33% の残存活性を示し, CD スペクトル解析からも高い熱安定性を有することを明らかにした。また MGMT 欠損大腸菌 *E. coli* KT233

( $\Delta$ ada,  $\Delta$ ogt) にて, KOD1 MGMT を発現させたところ, アルキル化剤 (MNNG) に対して耐性を示し, KOD1 MGMT が, 本来の環境とは大幅に異なる大腸菌内でも機能することが明らかになり, MGMT の種を超えた反応の同一性を示した。

第6章は結論であり, 本論文で得られた成果について要約している。

#### 論文審査の結果の要旨

本論文は, 超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 株における DNA 複製, 切断および修復に関する酵素として, DNA ポリメラーゼ, インテイン・エンドヌクレアーゼおよび O<sup>6</sup>-メチルグアニン DNA メチル基転移酵素 (MGMT) の特性に関する研究の成果をまとめたものであり, 得られた主な成果は次のとおりである。

- (1) KOD1 株より DNA ポリメラーゼ遺伝子を取得し, 精製酵素 (KOD DNA ポリメラーゼ) の酵素化学的特性の解析を行い, 非常に高いプロセシビティーと速い DNA 合成速度を有することを明らかにするとともに, 迅速かつ正確なポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に適用できることを示している。
- (2) エキソヌクレアーゼ活性を低下させた変異型 KOD DNA ポリメラーゼを作成し, 変異させたアミノ酸残基との相関関係を調べ, さらに, 野生型と混合することにより, 長鎖 DNA 配列を正確に増幅しうる酵素系 (KOD-Dash DNA ポリメラーゼ) を開発・実用化している。
- (3) DNA ポリメラーゼ遺伝子内に, タンパク質スプライシングにより切り出される介在配列 (インテイン) の存在を明らかにし, 長鎖 DNA 配列を認識・切断する部位特異的エンドヌクレアーゼであることを示している。
- (4) DNA 修復酵素として, MGMT 遺伝子を KOD1 株より取得し, 本酵素の高い熱安定性を明らかにし, さらに大腸菌内においても DNA 修復活性を有することを示している。

以上要するに, 本論文は, 超好熱始原菌における DNA 複製, 切断および修復酵素の酵素化学的特性とその応用について記述しており, 学術上, 実際上寄与するところが少なくない。よって, 本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また平成14年2月20日, 論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果, 合格と認めた。