

氏名	別 所 忠 昌		
学位の種類	学 術 博 士		
学位授与番号	博 甲 第 949 号		
学位授与の日付	平成 3年 3月 28日		
学位授与の要件	自然科学研究科生体調節科学専攻 (学位規則第5条第1項該当)		
学位論文題目	DNA損傷のDNA polymerase による読み過ごしと突然変異		
論文審査委員	教授 早津彦哉	教授 篠田純男	教授 土屋友房
	教授 榎本雅敏	教授 奥 八郎	

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

一本鎖 DNA フェージである M13mp2 フェージを亜硫酸-ヒドラジン, または, 亜硫酸-メトキシアミンで処理するとフェージの失活が観察される。これは亜硫酸-アミン混液処理により DNA 上に生じた N^4 -amino-5, 6-dihydrocytosine-6-sulfonate residue および N^4 -methoxy-5, 6-dihydrocytosine-6-sulfonate residue が複製を阻害したためと考えられる。この損傷による DNA 複製の阻害のメカニズムを調べるために M13mp2 一本鎖 DNA を鋳型にして *in vitro* DNA 鎖伸長反応を行なった。亜硫酸-ヒドラジン, または, 亜硫酸-メトキシアミン処理した DNA を鋳型にして, Klenow fragment を用いて *in vitro* DNA 鎖伸長反応を行なうと鎖伸長反応は損傷のひとつ手前で停止していた。これはこれらの損傷による DNA の構造の変化が原因ではないかと考えられる。この反応の際に RecA protein や SSB protein を加えてやると Klenow fragment によるこの DNA 損傷の読み過ごしが観察された。このときの Klenow fragment による dNTP の turnover rate が上昇していることから, 読みごしは polymerase の 3'-5' exonuclease 活性の阻害により起こっているのではなく, タンパクが DNA に結合することによりこの損傷による構造変化が和らげられて起きていると考えられる。

また, N^4 -methoxy-5, 6-dihydrocytosine-6-sulfonate を決まった場所に一つだけもつオリゴヌクレオチドを鋳型として Klenow fragment による *in vitro* DNA 鎖伸長反応を行なうと, 鎖伸長反応はこの損傷のひとつ手前のところで停止した。この鎖伸長反応の阻害は polymerase の濃度, 基質である dNTP の濃度, 反応時間の延長によっても解除されることはなかった。つまりこの損傷は Klenow fragment による鎖伸長反応を完全に阻害するものであることが明らかになった。

これらの損傷をもったフェージの DNA 上の誘発される突然変異を調べたところ, これ

らの損傷は、致死的であるとともに CG-TA のトランジションを引き起こすものであることがわかった。さらに SOS 応答を誘導した大腸菌中では error-prone の複製により読み過ぎられて CG-TA のトランジション, CG-AT のトランスバージョンを引き起こした。

論文審査の結果の要旨

一本鎖 DNA フェージである M13mp2 フェージを亜硫酸-ヒドラジン, または亜硫酸-メトキシアミンで処理するとフェージの失活が観察される。これは亜硫酸-アミン混合液処理により DNA 上に生じた N^4 -amino-5, 6-dihydrocytosine-6-sulfonate residue および N^4 -methoxy-5, 6-dihydrocytosine-6-sulfonate residue が複製を阻害したためと考えられる。この損傷による DNA 複製の阻害のメカニズムを調べるために M13mp2 一本鎖 DNA を鋳型にして in vitro DNA 鎖伸長反応を行なったところ鎖伸長反応は損傷の一つ手前で停止した。これはこれらの損傷による DNA の構造の変化が原因ではないかと考えられる。この反応の際に RecA protein や SSB protein を加えてやると Klenow-fragment によるこの DNA 損傷の読み過ぎが観察された。

また N^4 -methoxy-5, 6-dihydrocytosine-6-sulfonate を決まった場所に一つだけ持つオリゴヌクレオチドを鋳型として Klenow fragment による in vitro DNA 鎖伸長反応をおこなうと、鎖伸長反応はこの損傷の一つ手前のところで完全に停止した。

これらの損傷をもったフェージの DNA 上に誘発される突然変異を調べたところ、これらの損傷は致死的であるとともに CG-TA のトランジションを引き起こすものであることがわかった。さらに SOS 反応を誘導した大腸菌は、error-prone の複製により読み過ぎられて CG-TA のトランジションおよび CG-AT のトランスバージョンを引き起こした。

以上の研究は、DNA の傷の典型的な例について、その生物学的意義の一端を明快に示したものとして高く評価できる。別所忠昌君に学術博士の学位を授与することが適当であると判断する。