

損傷部位を安定同位体標識した長鎖 DNA の作製法の開発

○小川 雄大<sup>1</sup>, 上田 卓見<sup>1,2</sup>, 加藤 暁<sup>1</sup>, 倉光 成紀<sup>3</sup>, 寺沢 宏明<sup>1</sup>, 嶋田 一夫<sup>1,4</sup>

(<sup>1</sup>東大院薬,<sup>2</sup>生物情報解析研セ・バイオ産業情報化コンソーシアム,<sup>3</sup>阪大院理,  
<sup>4</sup>生物情報解析研セ・産総研)

【目的】DNA に紫外線を照射すると cyclobutane pyrimidine dimer(CPD)などの損傷 DNA が生じる。一方、生体内には CPD photolyase 等の損傷 DNA を修復する酵素が存在する。CPD photolyase が二重らせんの内側に存在する CPD を直接認識するためには CPD をフリップアウトさせる必要があると考えられている。本研究では、NMR 法により CPD photolyase と CPD を含む二本鎖 DNA の複合体の立体構造を解明することを目指し、複合体形成後も二本鎖を維持できる、20 mer 以上の安定同位体標識損傷 DNA の作製法を確立することにした。

【方法】DNA ポリメラーゼおよび [<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N] 標識 dNTPs を用いて 6 mer のプライマー(TGTGTA)を伸長させることで、損傷を導入する部位を [<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N] 標識した 11 mer(TATGTATTAATG)を作製した。11 mer を逆相 HPLC で精製し、紫外線を照射して損傷を導入した。逆相 HPLC および CPD photolyase を用いたアフィニティーカラムにより CPD を含む 11 mer を単離した。

【結果・考察】短いプライマーを用いて伸長部分を分離する必要をなくすなどの改良を加えることで、従来の酵素法と比較して、安価に安定同位体標識 DNA を作製することに成功した。また、CPD photolyase を用いたアフィニティーカラムを導入することにより、<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC スペクトルで単一のシグナルを与える程度の高純度の CPD を含む DNA を得ることができた。CPD を含む 11 mer の収量は 35 nmol であり、この値より複合体の NMR 解析を行うことが可能なる二本鎖 DNA の大量調製法を確立できたと判断した。現在、CPD を含む 11 mer をライゲーション反応により 31 mer に伸長することを試みている。