

光アフィニティーラベルによる核内タンパク質の Pt-DNA 結合解析

○友廣 岳則<sup>1</sup>, 菅井 彩佳<sup>1</sup>, 畑中 保丸<sup>1</sup>(<sup>1</sup>富山大院薬)

【目的】シスプラチン (cDDP) 結合により DNA 鎖は屈曲し, HMGB 等核内タンパク質と相互作用する。我々は光アフィニティークロスリンク法を用いて DNA-タンパク質結合解析を行ってきた。今回, 新たな光反応性 DNA プローブを合成し, 損傷 DNA-タンパク質結合解析を検討したので報告する。

【方法】25mer 二本鎖 DNA の特定カ所に cDDP を結合させ, その部位近傍へ光反応性クロスリンカーであるジアジリン基, および検出用タグのビオチンを導入したプローブを調整した。タンパク質は HMGB1/2 混合物及び HeLa 細胞核抽出物 (NE) を用い, ラベルタンパク質は SDS-PAGE 後, PVDF 膜にプロットしてビオチン-アビジン結合を利用した化学発光法により行った。

【結果及び考察】これまで光アフィニティークロスリンク法/SDS-PAGE を用いた解析法により, 複数 DNA 結合タンパク質の同時解析が可能であることを示した。本法は EMSA に比べ高分解能検出であるため, 単独の相互作用系だけでなく, 細胞内タンパク質混合系での個別相互作用の結合解析が可能である。今回, cDDP 結合 DNA を用いて, 特に核内に多く存在し親和性が知られる HMGB1/2 について検討した。異なるタイプのプローブや阻害剤存在下によるラベル実験, および各種反応条件を変えてそのラベル量を比較したところ, HMGB1 と HMGB2 では損傷 DNA のタイプにより各親和性が異なることが示唆された。HeLa NE 中の混合系では, 単離されたタンパク質による個別解析とは異なるラベル結果を示した。本法により実際の系を反映した, 核内タンパク質混合系での結合挙動を解析できる可能性を示した。