

DNA 付加体を部位特異的に含む DNA オリゴマーの構築法に関する研究

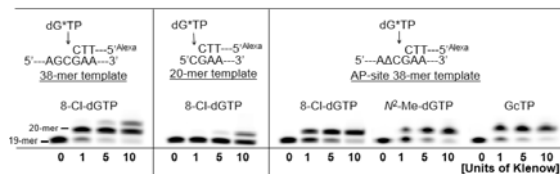
近年、生物のゲノム DNA 中に多種多様な DNA 付加体が検出され、ますます個々の付加体が有する遺伝的影響の解析が重要になってきている。付加体を導入させた修飾 DNA オリゴマーは、ミュータジェネシスや DNA 修復の研究などでよく利用されているが、それを作るにはその付加体のフォスフォアミダイト体が必要である。しかしながら、その合成方法を確立するためには一般的に長期間を要し、また現在市販で利用可能な数も限定的である。それをサポートするために、我々はフォスフォアミダイトを使用せずに、損傷を持たせた 2'-デオキシグアノシン 5'-三リン酸 (dG*TP 付加体) と DNA 合成酵素を用いて、DNA オリゴマーを作製する生化学的方法をすでに報告している⁽¹⁾。本研究では、この方法の更なる最適化を行い、修飾 DNA オリゴマーの構築を高速化させることを試みた。図 1 に示したように、グアニンに損傷を持つ dG*TP を DNA プライマーの 3' 末端へ 1 塩基だけ伸長させた後、引き続きライゲーションを行うことで、興味のある DNA 配列中に自由に付加体を部位特異的に配置させることが可能である。しかしながら、これまでは dG*TP が DNA 合成酵素によって DNA プライマーへ取り込まれる際に、その効率が付加体構造によって異なるため、1 塩基だけ伸長させる最適条件を付加体ごとに見つける必要があった。また、DNA 合成酵素の活性が強すぎると、1 塩基だけでなく、テンプレート DNA 配列を無視して 2 塩基以上に伸長してしまう問題があった (図 2 左上)。そこで、1 塩基の伸長で止まるように、塩基対形成する隣の部位に塩基の無い状態 (つまり脱塩基状態; AP site) の DNA テンプレートを用いた。その結果、付加体構造に関係無く同じ条件で 3 種類の修飾塩基 (付加体あるいはアナログ塩基) が 1 塩基だけ取り込まれ、19-mer から 20-mer に伸長したプライマーが長い時間蓄積した (図 2 右上)。つまり、あらかじめポリメラーゼ、プライマー、テンプレート DNA を混合したプレミックス反応液を用意しておけば、dG*TP 付加体を添加するだけで 1-mer だけ伸長した目的の生成物を効率的に得られることが分かった。その後のライゲーション反応液についても、プレミックス化させたところ、付加体修飾 DNA オリゴマーをわずか二日間で作製できることを確認した (図 2 下)⁽²⁾。

以上のように、この構築系は、付加体を部位特異的に含む DNA オリゴマーを合成する際に、フォスフォアミダイト法と並ぶ選択肢の一つになり得ると考えられる。



図1. DNA付加体を含むDNAオリゴマーの生化学的構築

Optimization of 1-mer extension reaction for dG*-20-mer preparation



1-mer extended products (20-mer) were efficiently obtained on AP-site 38-mer template when 8-Cl-dGTP, N²-Me-dGTP, and GcTP were used in the premix of the 1-mer extension reaction.

Optimization of ligation reaction for dG*-38-mer preparation

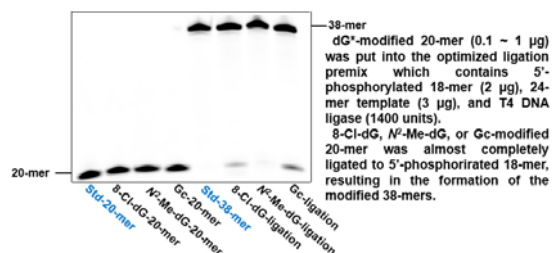


図2. dG*TP付加体によるプライマー伸長反応 (上), および付加体を含むオリゴのライゲーション反応 (下)

関連論文

- 1) Yasui, M., Matsui, S., Ihara, M., Santosh Laxmi, Y.R., Shibutani, S. and Matsuda, T. (2001) Translesional synthesis on a DNA template containing N²-methyl-2'-deoxyguanosine catalyzed by the Klenow fragment of Escherichia coli DNA polymerase I. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1994-2001.
- 2) Sassa, A., Kamoshita, N., Matsuda, T., Kuraoka, I., Ohta, T., Nohmi, T., Honma, M., and Yasui, M. (2013) Miscoding properties of 8-chloro-2'-deoxyguanosine, a hypochlorous acid-induced DNA adduct, catalyzed by human DNA polymerases. *Mutagenesis* **28**, 81-88.