

核内相分離構造形成メカニズムの解明(2):可視化プローブを用いた DNA 修復 foci の解析

(名大院工) ○渡邊 愛梨・深田 梨沙子・金岡 英徳・清中 茂樹

Characterization of nuclear bodies formation by phase separation (2): Analysis of DNA repair foci with visualization probe (*Graduate School of Engineering, Nagoya University*) ○Airi Watanabe, Risako Fukata, Hidenori Kaneoka, Shigeki Kiyonaka

Genomic DNA is constantly damaged such as double-strand break (DSB). To recover the damage, DNA repair protein complexes are recruited to the DSB site, which results in foci formation in the repair process. The foci are known as nuclear bodies formed by phase separation due to weak protein-protein interaction. However, the detailed mechanism is unknown. Here, we develop a novel split fluorescent protein probe vising RAP80-SUMO interaction to visualize and analyze the DNA repair foci. Confocal imaging revealed that most of the probes are localized on the damaged site, while some of them are colocalized with PML nuclear bodies (PML NBs). PML NBs are membrane-less organelle involved in diverse cellular functions such as DNA damage response, transcriptional regulation and apoptosis. To elucidate the mechanism of foci formation for DNA repair, we analyzed the DNA damage response of foci using PML knockout cells.

Keywords : Nuclear Bodies, Phase Separation, DNA Damage Response

ゲノム DNA は絶えず損傷を受けており、生体内にはそれに対する修復機構が備わっている。DNA 二本鎖切断の修復時には、複数の修復因子が損傷部特異的にタンパク質複合体(foci)を形成する。この DNA 修復 foci は翻訳後修飾依存的な弱いタンパク質-タンパク質間相互作用による相分離で形成される核内構造体であるが、その詳細な形成メカニズムは明らかになっていない。我々は split 型蛍光タンパク質を用いて RAP80 と SUMO 相互作用依存的な核内構造体の可視化プローブを開発し、DNA 修復 foci との局在解析を行った。その結果、ほとんどの蛍光プローブは DNA 損傷マーカーに局在したが、一部は PML ボディという別の核内構造体と共局在した。PML ボディは核内の様々なタンパク質と相互作用出来ることから DNA 損傷応答や転写、アポトーシスなど多様な細胞機能との関連が認められている核内小器官である。そこで我々は PML 欠損細胞株を樹立し、DNA 損傷による蛍光プローブの動態解析を行うことで、DNA 修復 foci 形成機構の解明を目指した。

