

DNA 修復機構における核内相分離構造体を可視化できる新規蛍光

タンパク質プローブの開発と動態解析

○渡邊愛梨<sup>1</sup>・深田梨沙子<sup>1</sup>・田代有輝<sup>1</sup>・金岡英徳<sup>2</sup>・清中茂樹<sup>1</sup> (1名大院工、<sup>2</sup>愛工大工)

**Development of a fluorescent protein probe for visualizing phase-separated cellular bodies in DNA repair processes and analyzing** (Graduate School of Engineering, Nagoya University<sup>1</sup>, Graduate School of Engineering, Aichi Institute of Technology<sup>2</sup>) WATANABE Airi; FUKATA Risako, TASHIRO Yuki, KANEOKA Hidenori, KIYONAKA Shigeki

真核生物の細胞内には高度に組織化された細胞内小器官が存在し、タンパク質合成や代謝など複雑な生命活動の機能を制御している。これらはミトコンドリアなどの脂質二重膜をもつオルガネラと、核小体などの膜構造を持たないメンブレンレスオルガネラに大別される。近年の研究から、メンブレンレスオルガネラはタンパク質や RNA の相分離によって形成され、ダイナミックな挙動を介して生体制御に深く関わっていることが示唆されている。しかし、構造形成に関わる分子間相互作用は弱く、構成因子が一過的であることから解析が困難であった。そのため、これらの形成機構や意義、及びその構成因子の解明は不十分な状態である。

本研究ではメンブレンレスオルガネラを蛍光イメージングによって可視化及びラベル化を可能とする新規蛍光タンパク質プローブの開発を行った。特に DNA 二本鎖切断 (DNA double-strand break : DSB) 時に形成されるタンパク質複合体 (foci) に着目した。DNA 修復 foci は翻訳後修飾因子依存的なタンパク質-タンパク質間相互作用により DNA 修復因子が集積して形成される核内相分離構造体である。Foci 形成には SUMO 化やユビキチン化といった翻訳後修飾が大きく関与している。DNA 修復 foci の形成因子の一つであり、DSB 初期の修復経路の選択を担うタンパク質 RAP80 は、SUMO と相互作用する SIM (SUMO-interacting motif) を持ち、SUMO-SIM 相互作用によって機能が制御されている。我々は split 型の蛍光タンパク質に RAP80 と SUMO を融合させ、それらのタンパク質間相互作用に基づくプローブを作製した (Fig. 1)。新たに作製したプローブでは、蛍光タンパク質を直接 RAP80 に融合させた GFP-RAP80 と比較して複合体形成非依存的な蛍光が大幅に減少し、SUMO-SIM 相互作用依存的な蛍光の検出に成功した。さらにこのプローブで検出された foci と DNA 損傷マーカーとの局在解析を行った結果、大半の foci が損傷部と一致した。また、RAP80 変異体を用いたプローブの結果から、修復 foci に対する RAP80 の各ドメインの役割を明らかにした。

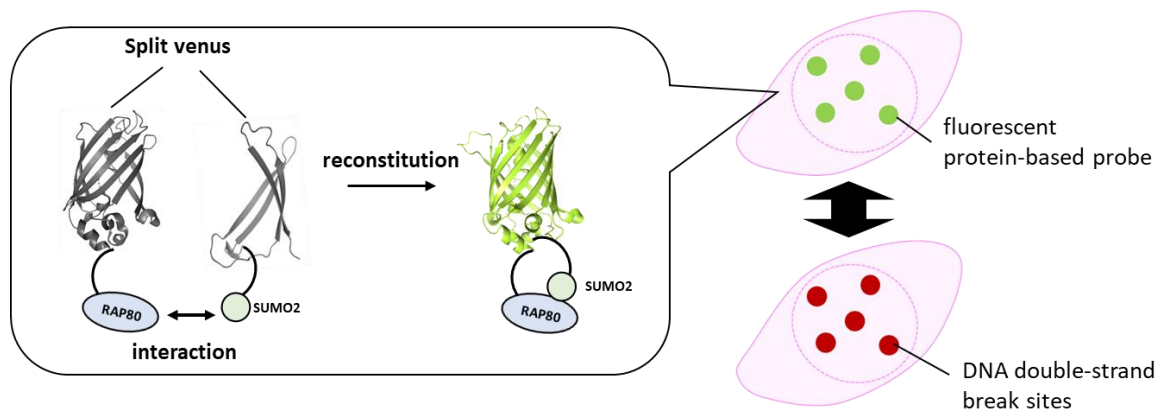


Fig. 1 SUMO-SIM 相互作用を利用した DNA 修復 foci に対する蛍光タンパク質プローブ