

核スペckルによる DNA 二本鎖切断修復の制御

Regulation of DNA double-strand break repair by nuclear speckles

分子生物学研究室

池亀 颯稀

指導教員 西 良太郎

東京工科大学 応用生物学部 応用生物学科

キーワード:核スペckル, DNA 二本鎖切断, 相同組換え

1. 背景、目的

生物のゲノム DNA に損傷が生じると変異タンパク質の発現など細胞機能低下を引き起こす可能性がある。DNA 損傷の中でも電離放射線や抗がん剤などによって生じる DNA 二本鎖切断 (DNA double-strand break: DSB) は細胞毒性の高い DNA 損傷であることが知られており、DSB の修復には細胞機能を維持するために必要である。ヒト細胞における DSB の修復は主に二つの経路が存在する。一つは、修復時間は短いが正確性の低い非相同末端再結合 (non-homologous end-joining: NHEJ) と、もう一つが修復時間は長いが正確性の高い相同組換え (homologous recombination: HR) である (図1)。転写領域で生じた DSB の多くは正確性の高い HR により修復される。

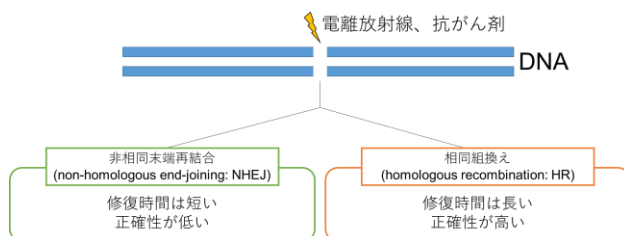


図 1. DNA 二本鎖切断の修復

また、細胞の核内において転写領域付近にはタンパク質と RNA の複合体である核スペckルという核内構造体が存在している。DSB 修復を制御している

核スペckル構成因子は示唆されているが、核スペckルを介した DSB 修復の空間的な制御は不明である。よって、本研究では核スペckルを介した DSB 修復制御を明らかにすることを目的とする (図 2)。

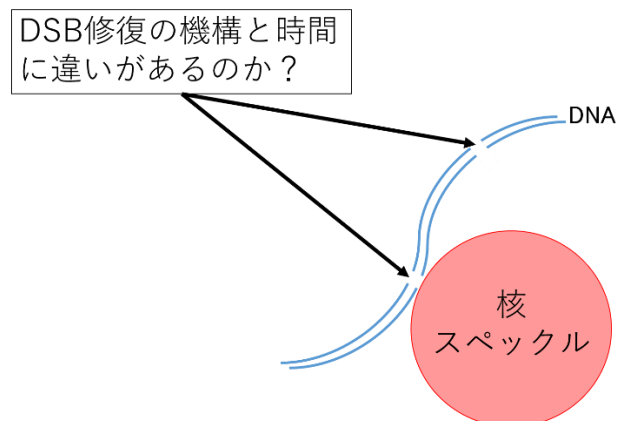


図 2. 本研究の目的: 核スペckルによる DSB 修復制御の検討

2. 方法

①pEGFP-C1-PuroR の作製

核スペckル近傍の DSB 修復系を可視化するために、DSB 応答タンパク質には緑色蛍光タンパク質である GFP を、核スペckル構成因子には赤色蛍光タンパク質である mCherry を融合させたものをヒト骨肉腫由来細胞 (U2OS) に発現させようと考えた。しかし、pEGFP-C1 と pmCherry-C1 の選択マーカーはどちらもネオマイシン耐性遺伝子のため両方の

DNA が導入された細胞を選択しにくい。そのため、pEGFP-C1 にピューロマイシン耐性遺伝子 (PuroR) を in-fusion 反応により組み込み、pEGFP-C1-PuroR を作製した(図 3)。

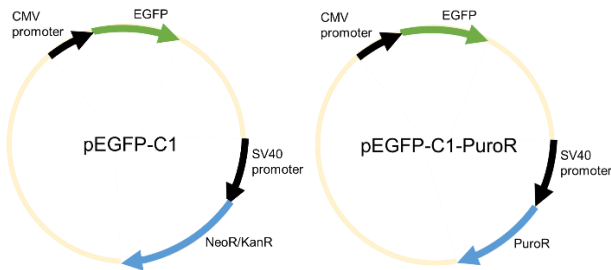


図 3. pEGFP-C1 と作製した pEGFP-C1-PuroR

②クローニング

作製したpEGFP-C1-PuroR には DSB 応答の足場となる mediator of DNA damage checkpoint 1 (MDC1)の BRCTドメイン (1883-2090 a.a.) または HR 因子である CtBP-interacting protein (CtIP)の遺伝子を組み込み、pEGFP-C1-PuroR-MDC1 (BRCT) 及び pEGFP-C1-PuroR-CtIP を作製した。また、pmCherry-C1 には核スペckル構成因子である SC35 の遺伝子を組み込み、pmCherry-C1-SC35 を作製した。

③安定発現細胞株の樹立

pmCherry-C1-SC35 と pEGFP-C1-PuroR-MDC1 (BRCT)または pEGFP-C1-PuroR-CtIP を PEI-MAX と OPTI-MEM を用いて U2OS 細胞にトランスフェクションした。後日、1 mg/ml ジェネティシンと 1 µg/ml ピューロマイシンを含む培地に交換し、2 週間、2種類のプラスミドがともに導入された細胞を選別し、十分に育った細胞株のみを新しいディッシュで培養した。

④安定発現細胞株の検討

樹立した安定発現細胞株にレーザー感受性を高めるために 10 µM BrdU を含む培地で 24 時間培養し、GFP-MDC1 (BRCT)とmCherry-SC35 または、GFP-CtIP とmCherry-SC35 を発現しているかを共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV3000

(OLYMPUS)と FLUOVIEW を用いて検討した。また、405 nm のレーザーを核内に照射し、GFP-MDC1 (BRCT)及び GFP-CtIP の動態を観察した。

樹立した細胞株の細胞抽出液を 0.3M NaCl/CSK Buffer で作製し、SDS-PAGE により細胞抽出液中のタンパク質を分離した。分離したタンパク質をメンブレンに転写し、抗 GFP 抗体または抗 CtIP 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、Lumino Graph I (ATTO)と Image Saver6 で検出した。

3. 結果、展望

GFP-MDC1 (BRCT)とmCherry-SC35 の安定発現細胞株と GFP-CtIP とmCherry-SC35 の安定発現細胞株のmCherry-SC35 はどちらも核内に局在していた。GFP-MDC1 (BRCT)は核内だけでなく細胞質にも局在し、GFP-CtIP は核内に局在していた。GFP-MDC1 (BRCT)と GFP-CtIP は 405 nm のレーザーを照射した部位に集積した。

ウエスタンブロッティングにより GFP-MDC1 (BRCT) と GFP-CtIP の発現を確認した。

次は、この安定発現細胞株に核スペckル構成因子である USP42 の免疫蛍光染色を行い、mCherry-SC35 が核スペckルに局在しているかを検討し、この安定発現細胞株を研究に用いることができるかどうかを判断する。

安定発現細胞株が決定した後、mCherry-SC35 の近傍とそれ以外の場所に 405 nm のレーザーを照射することで DSB を引き起こし、レーザー照射部位に GFP-MDC1 (BRCT)及び GFP-CtIP が集積してから解消するまでの時間をmCherry-SC35 の近傍とそれ以外の場所で比較し、核スペckルを介した DSB 修復にかかる時間を評価する。