

令和元年6月13日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14721

研究課題名(和文) ヒトタンパク質の急速分解系の確立と分裂期特異的分解操作の実現

研究課題名(英文) AID-mediated acute protein degradation system in human mitotic cells

研究代表者

清光 智美 (Kiyomitsu, Tomomi)

名古屋大学・理学研究科・講師

研究者番号：10503443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：標的タンパク質を急速に分解できれば、未知の分子機能を明らかにする可能性が拓ける。本研究では、オーキシン誘導デグロン(AID)法とCRISPR/Cas9によるゲノム編集技術を融合し、ヒト細胞においてRan関連因子群を急速(30分以内)に分解できる実験系の確立を目指した。主要な成果として、1.Ran制御ネットワークは、NuMAの紡錘体極局在制御には必要なく、HURPの動原体微小管の局在に必要なこと(Tsuchiya et al., 投稿中)、2.NuMAのクラスターリング活性は紡錘体の極収束機能に不要であるが、配置制御に機能すること(Okumura et al., eLife 2018)を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで任意の標的タンパク質を分裂期に特異的に30分以内で急速に分解できる実験系は存在しなかった。この実験系の汎用性は極めて高く、核内外輸送因子Ran以外にも、分子モーターダイニンを含む様々な多機能タンパク質に応用でき、これらの鍵分子の特定のステージの機能を明らかにすることが期待できる。またRanによる制御システムは、ヒト卵母細胞において紡錘体形成に極めて重要な働きを示すが、体細胞ではいかに機能するか十分に検討されていなかった。本研究により、ヒト体細胞では、Ranの紡錘体形成機能は卵母細胞ほど優勢ではなく、並行する別経路がNuMA等の紡錘体形成因子を活性化する可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：Compared to DNA- or RNA-based depletion methods, acute degradation of proteins is more useful to understand protein functions in rapid biological processes such as mitosis. In this study, we sought to degrade target proteins within 30 min by combining auxin-mediated degradation (AID) technology and CRISPR/Cas-mediated genome editing in human cells. Importantly, we succeeded in establishing 3 AID cell lines for RCC1 (Ran GEF), RanGAP1, and importin-beta. Furthermore, we revealed that NuMA is not substantially affected by Ran-based network, whereas HURP is dynamically polarized and maintained on k-fibers near chromosomes by chromosome-derived Ran-GTP gradient (Tsuchiya et al., submitted). In addition, we demonstrated that clustering activity of NuMA is dispensable for spindle-pole focusing, but indispensable for spindle positioning/orientation via astral microtubule capture/pulling using AID-based replacement (Okumura et al., eLife 2018).

研究分野：細胞生物学

キーワード：オーキシン誘導デグロン法 分裂期特異的分解 Ran-GTP濃度勾配 RCC1 NuMA HURP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核内外輸送因子 Ran のように、間期で必須機能を担う遺伝子群の分裂期機能を理解するためには、それらの因子を分裂期に急速分解できる実験系が必要となる。その実現のために、これまでハムスター細胞(BHK 細胞)の温度感受性変異体 tsBN2(Ran-GEF である RCC1 の変異体)や、importin- を標的とした低分子阻害剤(importazole)が開発されてきたが、任意の標的分子を組織的かつ急速に分解操作できる実験系は存在しなかった。

一方、2009 年、鐘巻将人博士(現国立遺伝学研究所教授)らによって、オーキシン誘導デグロン(auxin-inducible degron, AID)法が開発された。この方法を用いれば、任意の標的遺伝子を組織的かつ急速(30 分以内)に分解できる。しかし AID 法は、酵母等の相同組み換えが利用できるモデル生物において主に用いられてきた。ところが、近年 CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術が開発されたため、このゲノム編集技術と AID 法を融合することによって、ヒト内在性遺伝子の分解操作を実現する可能性が拓けた。

2. 研究の目的

オーキシン誘導デグロン(AID)と CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を融合し、ヒト細胞において「任意」のタンパク質を「急速(30 分以内)」に分解できる新規実験系の確立を目指す。特に、核内外輸送因子 Ran の関連因子群を分裂期特異的に分解し、染色体派生の Ran-GTP 濃度勾配の増加や減少、下流標的因子が紡錘体の配置や形成を制御する仕組みを明らかにすることを第一の目的とする。本研究で樹立された実験系や細胞株は、RNAi や阻害剤に代わるツールとして世界中で様々な基礎研究に応用され、標的因子の隠された新規機能の発見に貢献することが期待される。

3. 研究の方法

3-1. オーキシン誘導デグロン(AID)タグを近年開発された CRISPR/Cas9 法を用いて任意の遺伝子領域にノックインし、ヒト培養細胞(HCT116 細胞)において分裂期特異的に任意のタンパク質を急速(30 分以内)に分解できる実験系を確立する。

3-2. その技術を用いて、3 種類の Ran-GTP 制御因子(RCC1, RanGAP1, Importin-)とその下流因子(NuMA, Dynein, Dynactin, HURP)を分裂期特異的に分解誘導できるヒト細胞株を樹立する。

3-3. 各因子を分裂期特異的に分解し、それぞれの分裂期機能、特に紡錘体配置制御機能を解析する。内在性の遺伝子産物を分解すると同時に、変異体タンパク質を発現する実験系を樹立し、変異体タンパク質の表現型を解析することで、機能ドメインを同定する。

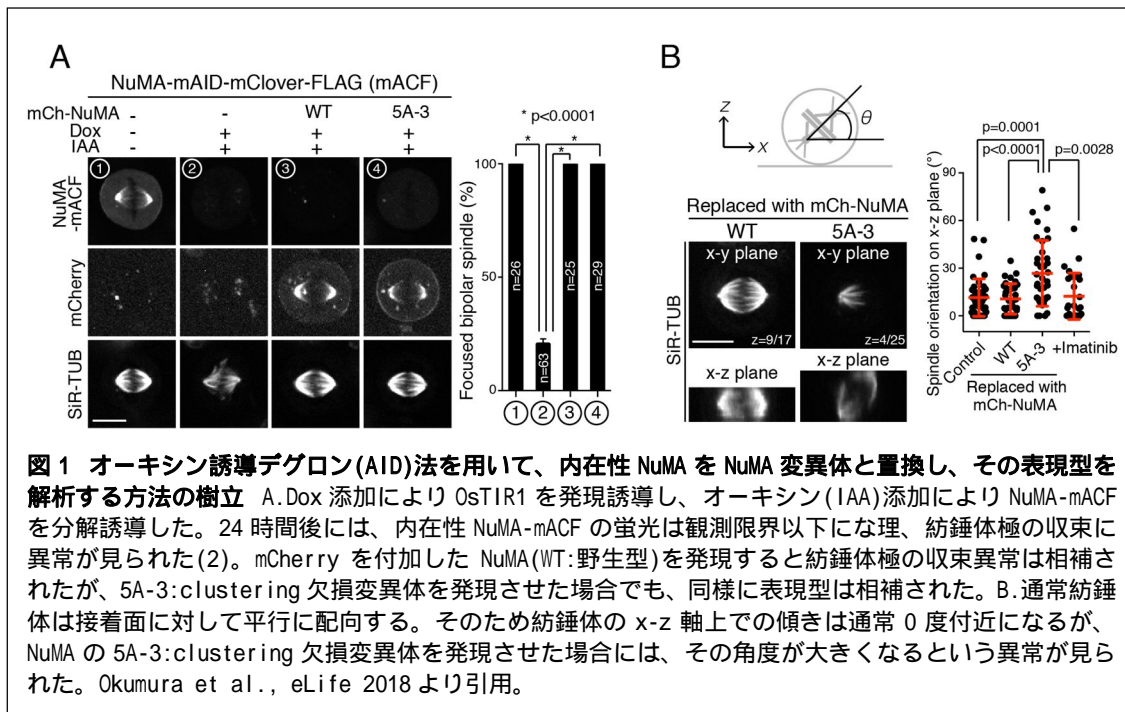
4. 研究成果

4-1. 遺伝学研究所鐘巻将人教授と共同して、遺伝子合成した donor plasmid を用いて、Dynein heavy chain (DHC)遺伝子の C 末端に mAID-mClover タグを両遺伝子領域にノックインする株を樹立した(Natsume et al., Cell Reports 2016)。また mAID-mClover-3xFLAG カセットなどの各種 plasmid も作成した。

4-2. 4-1.の方法を用いて、RCC1, RanGAP1, Importin- , NuMA, Dynactin, HURP に対する mAID-mClover ノックイン細胞株を樹立した。またそれらの株を親株にして、さらに mCherry タグや SNAP タグを他の遺伝子領域にノックインした株を複数樹立した((Tsuchiya et al., bioRxiv 2018, 投稿中)。

4-3. 4-1,2 で樹立した細胞株を nocodazole、APC/C 阻害剤で処理することで、分裂期前中期、分裂期中期に停止させ、その間にオーキシンを添加することで、分裂期前中期、中期特異的に標的遺伝子産物を 60 分程度で分解する実験系を樹立した(Tsuchiya et al., 投稿中)。これらの手法を用いて RCC1 を前中期、中期に分解したところ、NuMA は RCC1 に依存せずに紡錘体極近傍に集積し、極の収束に機能することを実証した。一方、HURP は紡錘体が形成された中期においても RCC1 に依存して染色体近傍の動原体微小管に維持されることを見出した(Tsuchiya et al., 投稿中)。

4-4. 内在性の NuMA をオーキシン依存的に分解することで、NuMA は紡錘体極の収束に機能することを示した。これは siRNA による分解ではみられない表現型であり、NuMA のように安定なタンパク質の機能を理解する上で、AID 法が有効であることを示した。また Rosa26 部位から dox 添加依存的に NuMA の変異体や部分断片を発現誘導できるノックイン株を樹立した。これらの株を用いて、NuMA の C 末 clustering domain が紡錘体極の収束には不必要であるが、細胞表層での星状体微小管の補足/牽引を介した紡錘体配置の制御に必要であることを示した(Okumura et al., eLife 2018)。



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

- Okumura M, Natsume T, Kanemaki TM, Kiyomitsu, T.
Optogenetic reconstitution reveals that Dynein-Dynactin-NuMA clusters generate cortical spindle-pulling forces as a multi-arm ensemble
eLife 7. pii: e36559. (2018) doi: 10.7554/eLife.36559. 査読あり
- Tsuchiya K, Hayashi H, Nishina M, Okumura M, Kanemaki TM, Gohta Goshima, Kiyomitsu, T.
Importin-β targets HURP to kinetochore-fibers in coordination with Ran-GTP in human mitotic cells
bioRxiv (2018) doi: https://doi.org/10.1101/473538 査読なし

[学会発表](計 8 件)

- 土屋賢汰、林久登、仁科桃子、奥村雅子、鐘巻将人、五島剛太、清光智美、Importin-β targets HURP to kinetochore-fibers in coordination with Ran-GTP in human mitotic cells、分子生物学会、2018 年
- 清光智美、Mechanisms of dynein-based force generation at the cell cortex and spindle poles during metaphase、分子生物学会、2018 年
- 清光智美、OPTOGENETIC RECONSTITUTION REVEALS CORE FUNCTIONAL MODULES AND ARCHITECTURE OF THE CORTICAL FORCE-GENERATING MACHINERY DURING MITOSIS、IUBMB、2018 年
- 清光智美、Optogenetic reconstitution reveals that Dynein-Dynactin-NuMA clusters generate cortical spindle-pulling forces as a multi-arm ensemble、EMBL microtubule meeting、2018 年
- 仁科桃子、夏目豊彰、鐘巻将人、清光智美、ヒト細胞質ダイニン複合体による紡錘体二極構造の維持、分子生物学会、2016 年
- 仁科桃子、夏目豊彰、鐘巻将人、清光智美、Mechanism of dynein-mediated bipolar spindle maintenance in human cells、CDB symposium、2016 年
- 清光智美、Manipulation of cytoplasmic dynein during mitosis、第 54 回生物物理学会年会、2016 年

- ・ 清光智美、デグロン及び光操作による細胞質ダイニンの分裂期局所機能の解析、第 6 回分子モーター
討論会、2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。