

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2012

課題番号：21681027

研究課題名（和文）

培養細胞及び個体レベルにおけるオーキシン誘導デグロン法基盤技術の開発

研究課題名（英文）

Development of the auxin inducible degron system for the study of cultured cells and animals.

研究代表者

鐘巻将人（KANEMAKI MASATO）

国立遺伝学研究所・新分野創造センター・准教授

研究者番号：20444507

研究成果の概要（和文）：本助成により、植物ホルモンオーキシンが植物内で引き起こす分解システムを、異種真核生物に移植することに成功した。これにより、非植物細胞において標的タンパク質をオーキシン依存的に分解除去することが可能になり、私たちは本手法をオーキシン誘導デグロン（AID）法と命名した。私たちは本手法が出芽酵母、分裂酵母、ニワトリ DT40 細胞、マウスおよびヒト培養細胞で機能することを確認し、その成果を論文公表した。さらに、本手法を利用して、出芽酵母内の因子の機能解析に応用し、その成果を論文公表した。また、改良版 AID 法を開発することに成功し、特許申請を行った。

研究成果の概要（英文）：We have successfully transplanted a plant specific degradation pathway, that is controlled by the plant hormone auxin, to non-plant cells. This new technology, termed the auxin-inducible degron (AID) system, allows us to deplete a protein of interest in an auxin dependent manner. We showed that AID works in budding and fission yeasts, as well as in chicken DT40, mouse and human cells, and the results were published. We also applied the AID technology for the characterization of proteins in budding yeast and the results were published. Moreover, we successfully made an improved version of AID and applied for a patent.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2010年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2012年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
総計	19,700,000	5,910,000	25,610,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノミクス

キーワード：条件特異的変異株

1. 研究開始当初の背景

細胞内の特定のタンパク質を即座に分解することで発現コントロールするオーキシン誘導デグロン（AID）システムを構築した。

これは植物特有のオーキシン依存分解系を他種真核生物に導入することによりなされた。AID法は出芽酵母では、実際にオーキシン感受性変異株を作成することができるこ

とが示されていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、培養細胞レベルで AID を利用した条件特異的変異細胞を作成する技術を完成することである。また、より挑戦的ではあるがその技術をマウスなど個体レベルへの応用にむけた技術開発もおこなう。これら技術は、今後 ES 細胞を用いた基礎研究に応用することで、多くの研究に役立つことが期待される。

3. 研究の方法

出芽酵母を材料として開発した AID 法を動物培養細胞において利用するために、遺伝子改変の可能なニワトリ DT40 細胞を利用して、標的因子に AID タグを付加した細胞株を樹立し、AID 法の機能性を確認する。また、遺伝子改変ができない通常の培養細胞に対して、AID 法を利用する方法を開発する。またマウスレベルにおいて利用するための方法を開発する。

4. 研究成果

DT40 細胞において AID の機能性を複数の因子に関して確認した。キネトコアタンパク質 CENP-H に対して、AID 株を作製したところ、オーキシン添加により CENP-H は 30 分で分解除去され、一細胞周期以内に M 期進行阻害が観察された。これら研究成果は、AID 法の開発と合わせて論文公表した (Nishimura et al., *Nature Methods*, 2009)。その他、MCM-BP, MCM8, MCM9 など他の因子に対して AID 株を作成したが、いずれの場合も 30 分程度で標的タンパク質を分解除去することが可能であった。現在、これら因子の機能解析を進めている。遺伝子改変できないヒト細胞においては現在、新たに登場したゲノム編集法と組み合わせることで、AID 株作成に挑戦している。マウスレベルにおける活用に関しても、現在共同研究で研究を進めている。その他、分裂酵母における AID 法が機能することを示した (Kaneke et al., *BMC Cell Biology*, 2011)。出芽酵母において、AID 法を利用することで、複製因子 Mcm10 が複製開始反応に機能するメカニズムを明らかにし、論文公表を行った (Watase et al., *Current Biology*, 2012)。その他、共同研究として、AID 法を利用した機能解析で複数の論文を発表した (Renshaw et al. 2010. Masumoto et al. 2011)。また、従来の AID 法を改良して、より小さなデグロン (ミニデグロン) の開発に成功し、これを使って高効率な改良型デグロンも作製し特許申請を行った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Kanemaki MT.

Frontiers of Protein Expression Control with Conditional Degrons
Pflügers Archive - European Journal of Physiology, 465, 419-425, 2013 (査読あり)

2. Nishimura K, Ishiai M, Horikawa K, Fukagawa T, Takata M, Takisawa H, Kanemaki MT.

Mcm8 and Mcm9 Form a Complex that Functions in Homologous Recombination Repair Induced by DNA Interstrand Crosslinks
Molecular Cell, 47, 511-522, 2012 (査読あり)

3. Watase G, Takisawa H, Kanemaki MT.

Mcm10 Plays a Role in Functioning of the Eukaryotic Replicative DNA Helicase, Cdc45-Mcm-GINS
Current Biology, 22, 343-349, 2012 (査読あり)

4. Masumoto H, Nakato R, Kanemaki M., Shirahige K, Hachinohe M.

The Inheritance of Histone Modifications Depends upon the Location in the Chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*
PLoS One, 6(12):e28980, 2011 (査読あり)

5. Tanaka T, Umemori T, Endo S, Muramatsu S, Kanemaki M., Kamimura Y, Obuse C, Araki H.

Sld7, an Sld3-associated protein required for efficient chromosomal DNA replication in budding yeast.
EMBO Journal, 30, 2019-30, 2011 (査読あり)

6. Kanke M, Nishimura K, Kanemaki M., Kakimoto T, Takahashi TS, Nakagawa T, Masukata H.

Auxin-inducible protein depletion system in fission yeast
BMC Cell Biology, 12(1):8, 2011 (査読あり)

7. Renshaw MJ, Ward JJ, Kanemaki M., Natsume K, Nédélec FJ, Tanaka TU.

Condensins promote chromosome recoiling during early anaphase to complete sister chromatid separation

Developmental Cell, 19, 232-44, 2010 (査読あり)

8. Nishimura K, Fukagawa T, Takisawa H, Kakimoto T, Kanemaki M.

An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in non-plant cells

Nature Methods, 6, 917-22, 2009 (査読あり)

[学会発表] (計 8 件)

1. Kanemaki M. Mcm8 and Mcm9 form a complex that functions in homologous recombination repair induced by DNA interstrand crosslinks

The 8th 3R symposium, Awaji island, Japan, 2012年11月25-28日

2. Nishimura K., Ishiai M., Fukagawa T., Takata M., Takisawa H. and Kanemaki M. Mcm8 and Mcm9 Form a Complex that Functions in Homologous Recombination Repair Induced by DNA Interstrand Crosslinks

24th Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium, Denver, USA, 2012年9月27-30日

3. 鐘巻 将人 Mcm8 and Mcm9 form a novel complex that functions in HR repair induced by DNA interstrand crosslinks

染色体ワークショップ, 仙台, 2012年1月26日

4. Kanemaki M. MCM8 and MCM9 form a novel complex involved in resistance to DNA crosslinking reagents

Cold Spring Harbor Meeting on Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance, Cold Spring Harbor, USA, 2011年9月7日

5. K. Nishimura and M. Kanemaki An auxin based degron system to the new genetics of animal cells

International Symposium on Cell Function mediated by Small Molecules, 筑波大学, 2010年11月8日

6. 鐘巻将人 合成生物学的アイデアに基づいた植物ホルモン誘導デグロン法によりタンパク質発現調節

第19回酵母合同シンポジウム, 東京大学, 2010年6月25日

7. 鐘巻 将人, 西村浩平、渡瀬成治、深川竜郎、滝澤温彦 AID法を用いた出芽酵母および動物細胞内における染色体制御因子の遺伝学的解析

染色体ワークショップ, 箱根, 2010年1月20日

8. Nishimura, K., Takisawa, H., Kakimoto, T. and Kanemaki, M. Exploring factors involving maintenance and restart of the stalled forks by using a novel method to induce rapid degradation in budding yeast

Clod Spring Harbor Symposium on Eukaryotic DNA Replication and Genome Maintenance, Cold Spring Harbor, USA, 2009年9月3日

[図書] (計 3 件)

1. 鐘巻将人 (翻訳)

ケミカルバイオロジー 成功事例から学ぶ研究戦略 p137-150, 2012年, 丸善出版

2. 西村浩平, 鐘巻将人

Mcm8とMcm9は複合体を形成しDNA二本鎖間架橋の引き起こす相同組換え修復において機能する

First Author's, 2012年

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/5309>

3. 西村浩平, 鐘巻将人

動物の培養細胞における迅速なタンパク質発現制御法 (AID法)

実験医学 28, 2279-2284, 2010年

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

1. 名称: 改良型オーキシン分解誘導法を用いたタンパク質発現制御

発明者: 鐘巻将人、西村浩平、小畑有以、三村寛、滝澤温彦

権利者: 大阪大学、国立遺伝学研究所

種類: 特許

番号: 特願 2011-252147

出願年月日: 2011年11月18日

国内外の別: 国内、PCT 出願

2. 名称: 哺乳類動物細胞におけるタンパク質分解誘導法

発明者: 鐘巻将人、西村浩平、柿本辰男、深川竜郎、滝澤温彦

権利者: 大阪大学、国立遺伝学研究所

種類: 特許

番号: 特願 2009-110449

出願年月日: 2009年11月25日

国内外の別：国内、PCT 出願

○取得状況（計 1 件）

名称：タンパク質分解誘導性細胞、その製造方法、および、タンパク質分解の制御方法

発明者：鐘巻将人、西村浩平、柿本辰男、滝澤温彦

権利者：大阪大学

種類：特許

番号：特許第 5250811 号

取得年月日：2013 年 4 月 26 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

研究所内 HP

<http://www.nig.ac.jp/section/kanemaki/kanemaki-j.html>

研究室 HP

http://www.nig.ac.jp/labs/MolFunc/Molecular_Function_HP/Home.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鐘巻将人 (KANEMAKI MASATO)

国立遺伝学研究所・新分野創造センター・准教授

研究者番号：20444507

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし