

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15095

研究課題名(和文)ES細胞およびマウスにおけるAID技術の確立

研究課題名(英文)The AID technology for ES cells and mice

研究代表者

鐘巻 将人(Kanemaki, Masato)

国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・教授

研究者番号：20444507

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): マウスES細胞への導入に当たっては、まずユビキチンリガーゼOsTIR1を導入する必要がある。そのためのベクターを作成し、E14TG2a細胞のROSA26部位にOsTIR1の導入を行った。他のマウスES細胞株においても同様の研究を進めており、そちらの方はOsTIR1の導入後、複数の因子にデグロンタグを付加することにも成功した。
マウス個体への導入にあたっては、複数のIAAアナログを合成し、IAAと同等の分解誘導活性を持つアナログを複数同定した。

研究成果の概要(英文): In order to use auxin-inducible degron in mouse ES cells, it is required to introduce the ubiquitin ligase subunit, OsTIR1. We constructed a vector for introducing the OsTIR1 gene at the ROSA26 locus. We are currently making OsTIR1 expressing cells in E14TG2a background. In other ES lines, we successfully tagged genes with the degron to make conditional mutants. To use in mice, we synthesized auxin analogs that might have low toxicity. We identified couples of analogs that showed a similar degradation-inducing activity to the natural auxin, IAA.

研究分野：細胞工学

キーワード：発現制御 デグロン

1. 研究開始当初の背景

タンパク質機能解析、ネットワーク解析、さらには細胞そのものを人為操作するためには、タンパク質の発現制御を行う必要がある。既存の siRNA 法や転写レベルでの制御は迅速性や可逆性に困難があった。研究費受給者は従来技術の問題を克服し、短時間かつ可逆的にタンパク質レベルで分解制御するオーキシン誘導デグロン (AID) 法を開発した。

2. 研究の目的

研究費受給者はタンパク質レベルで発現調節をする新技術オーキシン誘導デグロン (AID) 法を開発し、これまでの研究により出芽酵母およびヒト HCT116 細胞の内在性因子の発現調節を可能とする技術を完成した。本技術を利用することで、細胞内で数十分と短時間かつ可逆的に標的タンパク質の発現調節が可能になる。本研究提案では、AID 技術をマウス ES 細胞およびマウス個体レベルで利用するための技術を開発することを目的とする。本研究により、細胞レベルにおける分化や初期化、さらには個体レベルにおける発生や脳内でのタンパク質人為発現操作が可能になることが期待される。

3. 研究の方法

研究費受給者はすでにヒト HCT116 細胞において、CRISPR-Cas9 を利用して内在性遺伝子に直接デグロンタグを導入することにより AID 細胞を作成する技術を確立している。そこで、同様の方法をマウス ES 細胞に応用する。使用するタギングベクターは短鎖ホモロジーアームを持つ、人工合成コンストラクトを使用する。さらには、作成した AID-ES 細胞からマウスを作成し、個体レベルでの分解誘導条件を調べる。同時にオーキシンの投与方法および薬理学的性質を検証し、動物投与用の性質を持たせるための改良も行う。

4. 研究成果

マウス ES 細胞への導入に当たっては、スタンダードな E14TG2a を材料とし、研究室への培養技術の導入を行った。オーキシンデグロンを確立するにあたり、まずユビキチンリガーゼ OsTIR1 を導入する必要がある。そのためのベクターを作成し、ROSA26 部位に OsTIR1 の導入を行っている。また、共同研究により他のマウス ES 細胞株においても同様の研究を進めており、そちらの方は OsTIR1 の導入後、複数の因子にデグロンタグを付加することにも成功した。現在、オーキシン添加による分解の確認を行っている。

マウス個体への導入に当たっては、一番の懸念材料は天然オーキシンインドール酢酸

(IAA) の腎毒性であった。この問題を回避するため、複数の IAA アナログを合成し、IAA と同等の分解誘導活性を持つアナログを複数同定した。現在、マウスに投与して毒性試験を行っている。また、ゼノグラフィト実験を行うために、マウスに細胞を注射して腫瘍形成実験を進行中である。

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16件)

1. Yesbolatova A and *Kanemaki MT. TAGing for Destruction, **Nature Chemical Biology**, doi:10.1038/s41589-018-0024-5, 2018. (査読なし)

2. *Platani M, Samejima I, Samejima K, Kanemaki MT, and *Earnshaw WC. Seh1 Targets GATOR2 and Nup153 to Mitotic Chromosomes, **Journal of Cell Science** (accepted). (査読有り)

3. *Takagi M, Ono T, Natsume T, Sakamoto C, Nakao M, Saitoh N, Kanemaki MT, Hirano T, and Imamoto N. Ki-67 and Condensins Support the Integrity of Mitotic Chromosomes through Distinct Mechanisms. **Journal of Cell Science**, 131, jcs.212092, 2018. (査読有り)

4. Okamoto Y, Iwasaki WM, Kugou K, Takahashi KK, Oda A, Sato K, Kobayashi W, Kawai H, Sakasai R, Takaori-Kondo A, Yamamoto T, Kanemaki MT, Taoka M, Isobe T, Kurumizaka H, Innan H, Ohta K, Ishiai M, and *Takata M. Replication Stress Induces Accumulation of FANCD2 at Central Region of Large Fragile Genes. **Nucleic Acids Research**, doi: 10.1093/nar/gky058, 2018. (査読有り)

5. Eaton JD, Davidson L, Bauer DLV, Natsume T, Kanemaki MT, and *West S. Xrn2 Accelerates Termination by RNA Polymerase II, Which is Underpinned by CPSF73 Activity. **Genes & Development**, 32, 127-139, 2018. (査読有り)

6. *Samejima K, Booth DG, Ogawa H, Paulson JR, Xie L, Watson CA, Platani M, Kanemaki MT, and *Earnshaw WC. Functional Analysis After Rapid Degradation of Condensins and 3D-EM Reveals Chromatin Volume is Uncoupled from Chromosome Architecture in Mitosis. **Journal of Cell Science**, 131, jcs210187, 2018. (査読有り)

7. *Yamano K, Wang C, Sarraf SA, Münch C, Kikuchi R, Noda NN, Hizukuri Y, Kanemaki MT, Harper W, Tanaka K, Matsuda N, and Youle RJ. Endosomal Rab Cycles Regulate Parkin-mediated Mitophagy. **eLife**, 7, e31326, 2018. (査読有り)
8. Gibcus JH, Samejima K, Goloborodko A, Samejima I, Naumova N, Nuebler J, Kanemaki MT, Xie L, Paulson JR, *Earnshaw WC, *Mirny LA, and *Dekker J. A Pathway for Mitotic Chromosome Formation. **Science**, 359, eaao6135, 2018. (査読有り)
9. Natsume T and *Kanemaki MT. Conditional Degrons for Controlling Protein Expression at the Protein Level. **Annual Review of Genetics**, 51, 83-102, 2017. (査読有り)
10. Natsume T, Nishimura K, Minocherhomji S, Bhowmick R, Hickson ID, and *Kanemaki MT. Acute Inactivation of the Replicative Helicase in Human Cells Triggers MCM8-9-dependent DNA Synthesis. **Genes & Development**, 31, 816-829, 2017. (査読有り)
11. Nozaki T, Imai R, Tanbo M, Nagashima R, Tamura S, Tani T., Joti Y, Tomita M, Hibino K, Kanemaki MT, Wendt KS, Okada Y, Nagai T, and *Maeshima K. Dynamic Organization of Chromatin Domains Revealed by Super-Resolution Live-Cell Imaging. **Molecular Cell**, 67, 282-293, 2017. (査読有り)
12. Takahashi A, Okada R, Nagao K, Kawamata Y, Hanyu A, Yoshimoto S, Takasugi M, Watanabe S, Kanemaki MT, Obuse C, and *Hara E. Exosomes Maintain Cellular Homeostasis by Excreting Harmful DNA from Cells. **Nature Communications**, 8, 15287, 2017. (査読有り)
13. Ode KL, Ukai H, Susaki EA, Narumi R, Matsumoto K, Hara J, Koide N, Abe T, Kanemaki MT, Kiyonari H, and *Ueda HR. Knockout-Rescue Embryonic Stem Cell-Derived Mouse Reveals Circadian-Period Control by Quality and Quantity of CRY1. **Molecular Cell**, 65, 176-190, 2017. (査読有り)
14. *Takagi M, Natsume T, Kanemaki MT, and mamoto N. Perichromosomal protein Ki67 Supports Mitotic Chromosome Architecture. **Genes to Cells**, 21, 1113-1124, 2016. (査読有り)
15. Imai R, Komeda S, Shimura M, Tamura S, Matsuyama S, Nishimura K, Rogge R, Matsunaga A, Hiratani I, Takata H, Uemura M, Iida Y, Yoshikawa Y, Hansen JC, Yamauchi K, Kanemaki MT, and *Maeshima K. Chromatin Folding and DNA Replication Inhibition Mediated by a Highly Antitumor-active Tetrazolato-bridged Dinuclear Platinum(II) Complex. **Scientific Reports**, 6, 24712, 2016
16. Natsume T, Kiyomitsu T, Saga Y, and *Kanemaki MT. Rapid Protein Depletion in Human Cells by Auxin-Inducible Degron Tagging with Short Homology Donors. **Cell Reports**, 15, 210-218, 2016. (査読有り)
- {学会発表}(計12件)
1. 鐘巻将人、ヒト細胞における染色体機能を理解するためのオーキシンドグロン法、日本細胞生物学会年会 2016 年 6 月 15 日
 2. 鐘巻将人、短鎖ホモロジドナーを利用したオーキシンドグロンタグ付加による迅速なヒト細胞中のタンパク質除去、日本ゲノム編集学会年会 2016 年 9 月 7 日
 3. 鐘巻将人、MCM8-9 複合体は切断誘導 DNA 合成に関与する、日本生化学会年会 2016 年 9 月 26 日
 4. 鐘巻将人、MCM8-9 is involved in break-induced DNA replication (BIR)、日本癌学会年会 2016 年 10 月 9 日
 5. Masato Kanemaki、Artificial destruction of active DNA replication forks reveals the HR-dependent for recovery involving MCM8-9、3R symposium 2016 年 11 月 17 日
 6. 鐘巻将人、ヘリカーゼの観点から DNA 複製と組換え修復を考へてみる、岡崎フラグメント 50 周年シンポジウム 2016 年 12 月 21 日
 7. 鐘巻将人、オーキシンドグロン法によるヒト細胞内タンパク質の特異的除去と機能解析、日本呼吸器学会 2017 年 4 月 22 日
 8. Masato Kanemaki、Acute inactivation of the replicative helicases induces MCM8-9-dependent DNA synthesis, US-Japan DNA repair meeting 2017 年 5 月 20 日
 9. 鐘巻将人、ヒト細胞における複製ヘリカーゼの人為的迅速な不活化は MCM8-9 依存的な DNA 合成を誘導する、日本細胞生物学会年会 2017 年 6 月 15 日
 10. Masato Kanemaki、Rapid protein depletion in human cells by the auxin-inducible degron technology,

日本ゲノム編集学会年会 2017年7月1日

11. Masato Kanemaki, MCM-BP is an MCM chaperon protecting the MCM sub-complexes from degradation, Cold Spring Harbor meeting on eukaryotic DNA replication and genome maintenance 2017年9月6日
12. 鐘巻将人、染色体機能研究におけるオーキシンデグロン (AID) 技術の活、ConBio2017 2017年12月6日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：オーキシンデグロンシステムにおけるタンパク質分解阻害剤及びその使用
発明者：鐘巻将人、夏目豊彰、林謙一郎
権利者：大学共同利用機関法人情報・システム研究機構、学校法人加計学園
種類：特許出願
番号：特願 2017-228310
出願年月日：2017年11月28日
国内外の別：国内

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.nig.ac.jp/labs/MolFunc/Jpn/>

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・分子遺伝研究系・教授
研究者番号：20444507

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

平谷伊智朗 (HIRATANI, Ichiro)

理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・グループリーダー

研究者番号：40583753