

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21423

研究課題名(和文)低毒性かつ迅速なタンパク質分解系・AID法を用いた人為的細胞周期制御

研究課題名(英文)Artificial cell cycle control using the AID method, a low-toxicity and rapid proteolytic system

研究代表者

嘉村 巧(Kamura, Takumi)

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：40333455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：低毒性かつ速やかなタンパク質分解系であるAID法を用いて、培養細胞で人為的な細胞周期コントロールを行うことを目的に研究を進めた。細胞周期進行は、CDK複合体によって正の制御を、一方CKIによって負の制御を受けているので、これら因子の発現をAID法により制御し、細胞周期に及ぼす影響を調べた。その結果Cdk1のAID細胞株ではCdk1の分解により、細胞周期がG2期で停止することを明らかにした。ニワトリのDT40細胞株だけでなく、マウスのES細胞においても同様の結果が得られたことから、様々な細胞において、Cdk1を制御することにより、人為的な細胞周期制御が可能となると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、速やかなタンパク質分解法であるAID法を標的因子の機能解明という目線に加えて、生命現象を操るツールの一つとして確立することができた。これにより、(1)基礎的な哺乳類培養細胞実験における細胞同調システムの確立に有用であり、様々な細胞周期における哺乳類細胞実験を可能とした。(2)多くの生物学的な技術を因子の機能解析とは別の視点で見ることから、このAIDの技術の利用もしくは発展性について違った視点から捉えることが可能となった。(3)細胞周期制御を行うCDKやCKIのペプチドに更に改良を加えることにより、細胞周期を停止させる抗がん剤としての活用法も視野に入ってきた。

研究成果の概要(英文)：The AID method, a low-toxicity and rapid proteolytic system, was used to artificially control the cell cycle in cultured cells. Since cell cycle progression is positively regulated by CDK complexes and negatively regulated by CKI, the expression of these factors was controlled by the AID method and their effects on the cell cycle were examined. We found that in the Cdk1 AID cell line, the cell cycle is arrested in the G2 phase due to Cdk1 degradation. Similar results were obtained not only in the chicken DT40 cell line but also in mouse ES cells, suggesting that artificial cell cycle control can be achieved by regulating Cdk1 in a variety of cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：オーキシン AID法 細胞周期制御 培養細胞 CDK タンパク質分解

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動物細胞や酵母などの真核生物の細胞周期進行は、Cyclin・Cyclin Dependent Kinase (CDK) 複合体によって正の制御を、一方 CDK の阻害因子である Cyclin Dependent Kinase Inhibitor (CKI) によって負の制御を受けている。これら細胞周期制御因子の発現の多くは、転写に加えてユビキチンを介したタンパク質分解系により厳密に制御されている。これまでに細胞周期制御タンパク質の活性制御を用いて細胞周期をコントロールする系として、出芽酵母では CKI である Sic1 の過剰発現による S 期への進行停止が、そして哺乳類培養細胞では Cdk1 の変異体 (Cdk1as) を用いた分裂期への進行阻害が報告されている。

2. 研究の目的

今回の研究においてはこれらの因子の CDK 阻害部位とオーキシンによる分解配列の融合タンパク質を安定発現する培養細胞を樹立し、その発現を AID 法により制御することにより CDK 活性をコントロールし、細胞周期を人為的に制御する系を構築することを目的とする。このような細胞周期制御系は基礎研究としての新たな細胞周期同調系として有用のみならず、抗腫瘍剤として用いられる Cdk4, 6 の阻害剤であるパルボシクリブなどのような薬剤開発においても重要な知見を与えるものと思われる。

3. 研究の方法

申請者は迅速なタンパク質分解制御系である AID 法を用いることにより、哺乳類培養細胞において、人為的に細胞周期を制御する系を構築できるのではないかと考えた。哺乳類細胞において S 期への進行を担う Cdk2 の阻害因子として知られているのが、p16, p19, p21, p27 などの CKI の一群である。これらの CKI は Cdk2 活性の阻害部位とユビキチン化による分解標的部位を備えている。そのため、これらの因子の発現量を速やかなたんぱく質分解系である AID 法によりコントロールすることにより、様々な培養細胞に汎用的な細胞周期制御系を開発する。

4. 研究成果

A. 人工的変異オーキシシンを用いた低毒性 AID 法の開発

上記の目的を達成するために低毒性かつ高効率なタンパク質分解系が不可欠である。AID 法は高効率かつ速やかに標的タンパク質の分解を誘導することが可能であるが、哺乳類培養細胞においては現状では高濃度のオーキシン (500 μ M) を加える必要があり、長時間培養する場合には細胞毒性を示してしまう。そのため、より低濃度のオーキシシンで働く AID 法の構築を行う必要がある。名古屋大学の山田らは TIR1 の変異体 (OsTIR1^{F74A}) と合成オーキシン (5-Ad-IAA) を用いて、植物や酵母細胞においてオーキシシンの感度を 10000 倍にまで増強することに成功した。そこで分担者の西村はこの TIR1 変異体と合成オーキシシンを用いた高感度 AID(ssAID)法を動物の培養細胞で確立した (図 1)

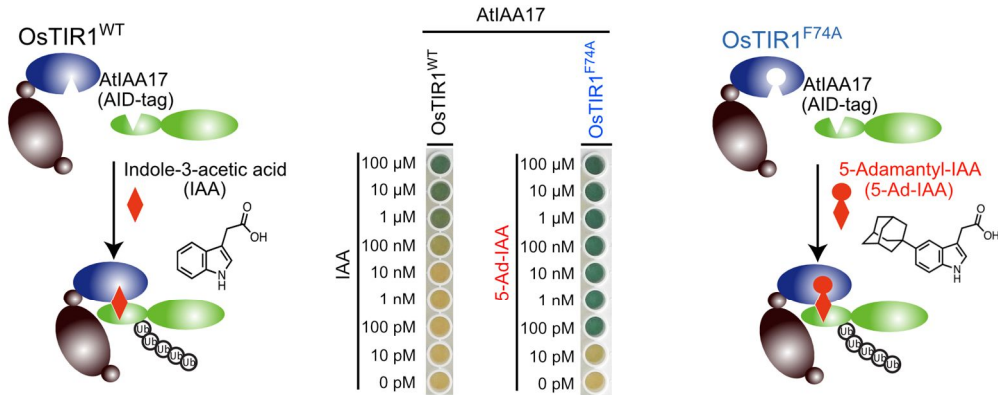


図1. 従来型のAuxin Inducible Degron (AID)法と5-Ad-IAAとOsTIRF74A変異体を用いた高感度AID法

AID法においてはオーキシン受容体であるTIR1と分解用のタグであるAtIAA17とがオーキシン (IAA) を介して結合することにより、タグを付加した標的タンパク質の分解が誘導される。従来型のAID法と比較すると高感度AID法では分解誘導剤の濃度を1/1000まで減少させることができる。

B. ssAID 法を用いた人為的細胞周期制御

今回作成された高感度 AID 法では従来の AID 法と比較して 1/1000 の濃度で分解誘導が可能となり、動物細胞に対する化合物毒性を著しく減少させることが可能となった。次にこの方法を用いて細胞周期制御を行うために Cdk1、Cdk2、そして CDK 阻害因子である p16、p21、p27 に注目した。dominant negative 型 Cdk1 (Cdk1dn) Cdk2 (Cdk2dn) もしくは CDK 阻害因子を細胞に過剰発現させることにより、細胞周期の停止を引き起こし、AID 法による分解で、細胞周期のリスタートを試みた。テトラサイクリンにより過剰発現を誘導することができる Tet on system を用いて、OsTIR1^{F74A} と GFP と AID-tag とを付加したそれぞれの因子を HeLa 細胞、マウス ES 細胞などに導入し、テトラサイクリンによる発現誘導ののち、AID 法によるタンパク質分解を試みた。しかし、Tet on system により標的タンパク質の発現量が多くなりすぎていたため、AID 法によるタンパク質の除去が困難であることがわかった。次に細胞周期にかかわる因子を AID 法で制御することができる AID 細胞株の作製を行った。その結果、細胞周期制御において主要な役割を果たす Cdk1 の AID 細胞株では Cdk 1 の分解により、細胞周期が G2 期で停止することが明らかとなった。ニワトリの DT40 細胞株だけではなく、マウスの ES 細胞においても同様の結果が得られたことから、様々な細胞において、Cdk 1 を制御することにより、人為的な細胞周期制御が可能となると考えられた。

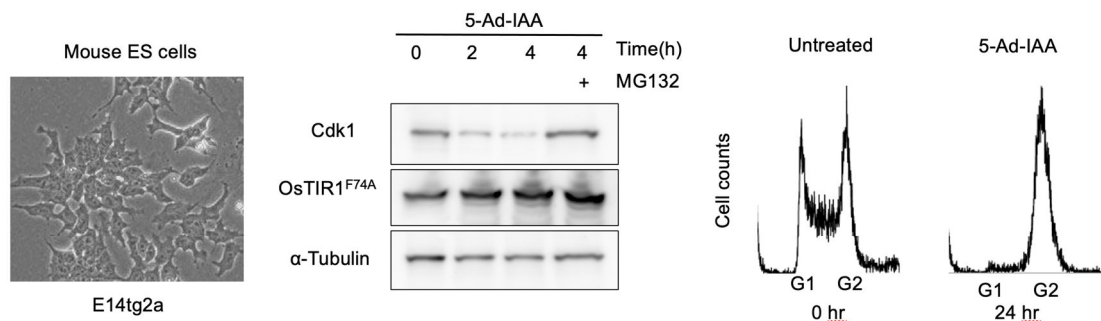


図2. ssAID法を利用したCdk1の発現制御
マウスES細胞 (E14tg2a) において細胞周期制御因子であるCdk1の分解を制御できる細胞株を作製した。この株において分解誘導剤である5-Ad-IAAを加えたところ、Cdk1の減少が確認された。また、5-Ad-IAAを添加後、24時間後の細胞を回収し、細胞周期の解析を行ったところ、細胞周期がG2/M期に集積していることが明らかとなった。

本研究の目的は研究分担者により開発された速やかなタンパク質分解系である Auxin

Inducible Degron (AID)法を用いて、哺乳類培養細胞系において、人為的な細胞周期コントロールを行うことである。本年は細胞周期の主要制御因子である Cdk1 の分解を制御することにより、様々な細胞で、細胞周期を G2 期に集積できることが明らかとなった。マウスの ES 細胞においては他の細胞で用いられる Cdk4,5 を標的とするパルボシクリブを利用した G1 期での細胞周期停止は見られない。この原因としてはマウス ES 細胞では Cdk4,5 の発現量が低いためであると考えられる。そのため、マウス ES 細胞においては Cdk1 による細胞周期制御の比重が大きく、人為的な細胞周期制御においても Cdk1 を標的とするのは理にかなっている。以上の結果から、AID 法を用いて Cdk1 を分解した際に細胞周期を G2 期で停止させることが可能となった。今後は Cdk1 の分解を止めて、Cdk1 の再発現を誘導し、細胞周期の再開を人為的に引き起こすことが可能であるかを検証したい。現在、化合物のスクリーニングを通じて、AID 法による標的タンパク質分解を停止させる薬剤のスクリーニングを行っている。また、分解用 tag を持たない Cdk1 の発現誘導によっても上記の実験は可能であると考えられるため、いくつかの方法を用いて細胞周期の再開実験を行っていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishimura Kohei, Yamada Ryotaro, Hagihara Shinya, Iwasaki Rie, Uchida Naoyuki, Kamura Takumi, Takahashi Koji, Torii Keiko U, Fukagawa Tatsuo	4. 巻 48
2. 論文標題 A super-sensitive auxin-inducible degron system with an engineered auxin-TIR1 pair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 e108 ~ e108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkaa748	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hori Tetsuya, Cao JingHui, Nishimura Kohei, Ariyoshi Mariko, Arimura Yasuhiro, Kurumizaka Hitoshi, Fukagawa Tatsuo	4. 巻 33
2. 論文標題 Essentiality of CENP-A Depends on Its Binding Mode to HJURP	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108388 ~ 108388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108388	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Villa Fabrizio, Fujisawa Ryo, Ainsworth Johanna, Nishimura Kohei, Lie A Ling Michael, Lacaud Georges, Labib Karim PM	4. 巻 22
2. 論文標題 CUL2 LRR1 , TRAP and p97 control CMG helicase disassembly in the mammalian cell cycle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e52164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202052164	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nishimura Kohei, Fukagawa Tatsuo	4. 巻 11
2. 論文標題 A Simple Method to Generate Super-sensitive AID (ssAID)-based Conditional Knockouts using CRISPR-based Gene Knockout in Various Vertebrate Cell Lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 e4092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.4092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura Kohei, Fukagawa Tatsuo	4. 巻 2377
2. 論文標題 A Simple Method that Combines CRISPR and AID to Quickly Generate Conditional Knockouts for Essential Genes in Various Vertebrate Cell Lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)	6. 最初と最後の頁 109 ~ 122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1720-5_6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Haraguchi Tokuko, Koujin Takako, Shindo Tomoko, Bilir ??kriye, Osakada Hiroko, Nishimura Kohei, Hirano Yasuhiro, Asakawa Haruhiko, Mori Chie, Kobayashi Shouhei, Okada Yasushi, Chikashige Yuji, Fukagawa Tatsuo, Shibata Shinsuke, Hiraoka Yasushi	4. 巻 5
2. 論文標題 Transfected plasmid DNA is incorporated into the nucleus via nuclear envelope reformation at telophase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 78-88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03021-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nishimura K
2. 発表標題 A super-sensitive Auxin-Inducible Degron (ssAID) system for conditional knockdown in various vertebrate cell lines
3. 学会等名 2nd Webinar on Nucleic Acid and CRISPR (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村浩平、山田遼太郎、萩原伸也、岩崎理恵、打田直行、嘉村巧、高橋宏二、鳥居恵子、深川竜郎
2. 発表標題 人工オーキシンとTIR1のペアを用いた高感受性AID法
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福原佳乃、中島優希、 角房直哉、佐藤綾人、 打田直行、小原圭介、 西村 浩平、嘉村巧
2. 発表標題 Auxin Inducible Degron (AID) 株を 利用したオーキシン分子のスクリーニング
3. 学会等名 第62回日本植物整理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村 浩平
2. 発表標題 改良型オーキシンと受容体を用いた高感度タンパク質分解法
3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kohei Nishimura
2. 発表標題 A super-sensitive Auxin Inducible Degron (ssAID) system for conditional knockdown in various vertebrate cell lines
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深瀬文奈子、佐々木怜菜、小原圭介、西村浩平、嘉村巧
2. 発表標題 出芽酵母Tsk1はSnf1依存的低グルコース応答シグナルの負の制御因子である
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

嘉村研へようこそ
<https://sites.google.com/view/kamura-lab/%E3%83%9B%E3%83%BC%E3%83%A0>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西村 浩平 (Nishimura kohei) (80582709)	名古屋大学・理学研究科・助教 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------