

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651204

研究課題名（和文）

マルチプレックスデグロンによる複数タンパク質の独立発現調節法の開発

研究課題名（英文）

Development of a multiplex degron system for the independent control of multiple proteins.

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）：私たちは植物ホルモンオーキシンの作用機構を利用して、細胞内で標的タンパク質を分解除去する新規手法オーキシンドグロン(AID)法を開発した。植物はジャスモン酸イソロイシン (JA-ile) によって、オーキシンと類似の方法で JAZ 因子を分解することから、あらたな JA-ile デグロンシステムを作ることができれば、AID と組み合わせて利用できることが期待された。そこで、JA-ile デグロンの開発を試みたが、残念ながら今のところ成功していない。今後は植物における JA-ile 作用機構の再検証と現在作製したアッセイ系の至適化を検証する必要がある。一方、AID 法の方は改良に成功し、すでに特許申請を行った。

研究成果の概要（英文）：We have developed a novel protein depletion method, termed the auxin-inducible degron (AID) system, by transplanting a plant specific degradation pathway controlled by auxin. Because another plant hormone, Jasmonate-isoleucine (JA-ile), works in a similar way for degrading JAZ proteins in plants, we expected to make a new degron system in order to control two proteins independently by AID and JA-ile degrons. We tried to make a JA-ile degron system, but so far unfortunately, we have not succeeded yet. It seems to be necessary to revisit the working mechanism of JA-ile in plants and to optimize our assay conditions to test degradation of proteins using JA-ile. On the other hand, we have successfully improved the original AID system 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
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・システムゲノム科学

キーワード：タンパク質ネットワーク、タンパク質分解

## 1. 研究開始当初の背景

植物が持つオーキシン分解系を異種真核生物に移植することで、標的タンパク質をオーキシン添加により分解する方法を（オーキシンドグロン法：AID法）を確立した。植物細胞内において、IAA/AUX 因子はオーキシ

ン存在下において F-box 因子 TIR1 が形成する SCF<sup>TIR1</sup> により認識され、ポリユビキチン化を受けたのち、速やかに分解される。そこで、AID 法は IAA/AUX を標的タンパク質に付加する分解標識（デグロン）として利用し、さらに TIR1 を導入することで元々は出芽酵

母を材料として開発された。

植物は他のホルモンにより制御される類似の分解システムを持っており、これらを利用して新たなデグロン法を開発し、さらに AID 法と組み合わせることにより、複数タンパク質を制御することができるのではないかと考えられた。

## 2. 研究の目的

タンパク質に特定のデグロンを付加し、培地に植物ホルモンを添加することで、複数の因子を独立かつごく短時間に分解する方法を開発する。すでにオーキシン分解系を利用した AID 法は確立しているため、オーキシン以外の植物ホルモン分解系として、ジャスモン酸イソロイシン分解系に注目した。この分解系を出芽酵母に導入し、新たなデグロン法を確立することをめざした。さらに AID 法と組み合わせることで、最終的には出芽酵母からヒトまでの真核生物において機能するマルチプレックスデグロンシステムの確立を目的とした。

## 3. 研究の方法

植物はジャスモン酸イソロイシン存在下で転写抑制因子であり JAZ ファミリー因子を分解する。JAZ を認識する F-box 因子 COI1 は、SCF<sup>COI1</sup> として存在しており、通常では不活性なユビキチン付加酵素である。しかし、ジャスモン酸イソロイシン存在下において、SCF<sup>COI1</sup> は JAZ を認識、ポリユビキチン化することで JAZ を速やかに分解することが知られている。そこで JAZ をコンディショナルデグロンとして利用し、分解に必要な F-box タンパク質 COI1 を導入することで、新たなデグロンシステムを構築できるのではないかと予想された。そこで、これら因子をクローニングし、出芽酵母に導入することで、GFP-JAZ の分解を検証した。また、JAZ を複数の細胞増殖に必須な因子に付加し、この細胞株がジャスモン酸イソロイシン存在下で増殖阻害を受けるかどうか検証した。

## 4. 研究成果

シロイヌナズナより、デグロンとして JAZ1, 2, 5, 10 をクローニングし、GFP 融合タンパク質として発現する酵母株を作製した。この株に COI1 を導入し、ジャスモン酸イソロイシンを添加した。GFP-JAZ の分解をウェスタンブロットおよび顕微鏡観察で検証したが、GFP-JAZ の分解が観察されなかった。また必須因子 Mcm4 の C 末端にこれら JAZ タンパク質を付加した株を作成し、ジャスモン酸イソロイシンを添加した培地で成育させたが、生育阻害は観察されなかった。ジャスモン酸イソロイシンと同様に植物内で作用することが知られている細菌由来

の毒素 Coronatine (COR) も用いて培地添加濃度 100 $\mu$ M までテストしたが、GFP-JAZ の分解や Mcm4-JAZ 細胞株の成育阻害は見られなかった。残念ながら、現在まで新たなデグロンシステムの開発に成功していない。問題点として、現在入手できているジャスモン酸イソロイシン/COR の量や精製度が十分でないために、条件を至適化で来ていない可能性や、植物においてジャスモン酸イソロイシンによる分解系の理解がまだ足りていない可能性が上げられる。今後は十分量のジャスモン酸イソロイシン、もしくは COR を調製し、条件検討することが必要である。

近年、植物ホルモンジベレリンもその作用機構が詳細に理解されるようになった。ジベレリンは SLR1 と GID1 の結合を促進し、この複合体が GID2 を含む SCF<sup>GID2</sup> により、認識、ポリユビキチン化されて SLR1 の分解を促進する。現在、このシステムを利用できないか検証している。

一方で、すでに確立していた AID 法の改良には成功し、より小さなデグロンや高効率デグロンの作製に成功した。この研究成果はすでに論文投稿後、Molecular Cell 誌にアクセプトされた。また、同時に特許申請を行った。

AID 法を利用した出芽酵母における機能解析研究は共同研究も含めて 2 報出版した (Watase et al., 2012. Masumoto et al., 2011)。さらに、AID 法が分裂酵母において機能することを示した論文を 1 報 (Kanke et al., 2011) 発表した。これまで開発されたデグロン法をまとめた総説を 1 報 (Kanemaki., 2013) 出版した。

## 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 6 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)

[学会発表] (計 4 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

[図書] (計 2 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>

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)  
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、三村覚、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

○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](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