

研究報告書

「デグロン変異細胞創出のための基盤技術開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 12 月～平成 29 年 3 月

研究者: 鐘巻 将人

1. 研究のねらい

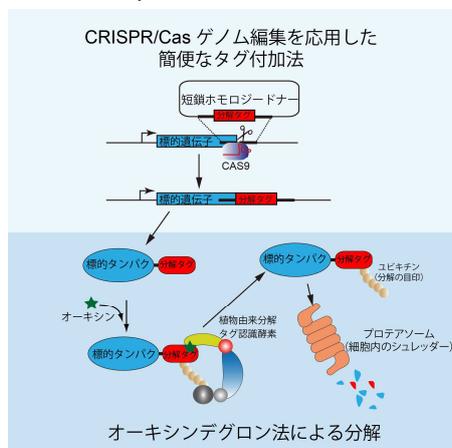
細胞内においてタンパク質の発現量を人為的にコントロールすることは、細胞内機能を設計する際に有用である。その際に利用する発現コントロール技術には、迅速性があり、可逆性と調節性があれば理想的である。私は植物のオーキシン依存的分解系を、出芽酵母に移植することにより、標的タンパク質の半減期をオーキシン添加によりコントロールする、オーキシンドグロン法 (AID 法) を発明した。この技術は、まさに上記 3 つのクライテリアを満たす新規発現コントロール法である。

AID 法は当初から動物培養細胞でも機能することがわかっており、ヒト細胞への応用が期待されていた。そこで、本研究において実際に内在性タンパク質を自由に発現調節できるヒト細胞を創出することを目指した。また、AID 法を進化させるための周辺技術も合わせて開発し、AID 法を中心としたヒト培養細胞における技術革新を目指した。さらには、ヒト培養細胞における発現制御だけでなく、将来 AID 法を ES 細胞やマウス個体レベルに応用することも視野に入れ研究を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

ヒト細胞内において内在性因子を AID 法によりコントロールするにあたり、植物由来デグロンタグを付加する必要がある。そこで、近年利用が進んでいる CRISPR-Cas ゲノム編集を利用することにより、簡便に両アリルにデグロンタグを付加する技術を開発した(特許出願)。また、実際にヒト HCT116 細胞を材料として、複数の細胞増殖に必要な因子にデグロンタグを付加することにより、デグロン変異細胞を作ることに成功した。これら成果を 2016 年 4 月に論文として公表した(Natsume et al. Cell Reports, 2016)。



(2) 詳細

研究テーマ A 「AID 変異細胞創出のための技術開発」【特許出願、論文公表】

ヒト培養細胞において、CRISPR-Cas を利用したタグ付加条件を検証したところ、従来用いられていた 1kbp 程度のホモロジーアームを用いず、150bp 程度の短鎖ホモロジーアームを用いてもタグ付加が可能であることが明らかになった。そのため、ホモロジーアーム部分をゲノムからのクローニングではなく、遺伝子合成などにより人工合成可能になった。また、タグ付加に利用するドナーDNA に二つの異なるセレクションマーカーを持たせ、ダブルセレクションすることにより両アリルに効率良くタグ導入が可能であることが明らかになった。開発した技術はデグロンタグ付加のみならず、蛍光タンパク質やアフィニティータグなどのタグ導入にも有効である。様々なタグに対応したドナーDNA 作成用プラスミドを作り、Addgene および NBRP に全て寄託した。2016 年 4 月から 11 月までの約半年で、すでに 400 件以上のリクエストを受けている。

ヒト AID 細胞を作るにあたり、ヒト HCT116 を材料に植物由来ユビキチンリガーゼを構成する OsTIR1 を発現する細胞を発現する親細胞樹立を行った。その親細胞を材料として、上記方法でデグロンタグ導入を行った。細胞核タンパク質コヒーシンを構成する RAD21 や細胞質ダイニンを構成する DHC1 に対する AID 変異細胞を作成し、オーキシン添加に伴いそれらタンパク質の分解除去を確認し、機能不全による表現系観察を行った。これら一連の研究により、細胞核および細胞質タンパク質両方において AID 変異細胞を作成することが示された。配布のため親細胞は NBRP に寄託した(2016 年 12 月配布開始予定)。

研究テーマ B 「AID 法の改良と新デグロン技術開発」

これまでオーキシンとしては、天然オーキシン IAA(インドール酢酸)および合成オーキシン NAA(ナフタレン酢酸)を利用してきた。これらのリガンドは化学修飾が可能であり、安定性、細胞毒性、膜透過性、光制御などに対する改良が可能である。アセトメチル化による膜透過性と低濃度における強い作用を確認した。

新デグロンとして植物ホルモンジャスモン酸イソロイシンによる分解系を利用した新たな分解システムの開発を行った。必要なユビキチンリガーゼ COI1 やデグロン JAZ1 を利用して、AID 法と同様のセットアップにより、酵母およびヒト培養細胞においてシステムの構築を行ったが、これまでのところ分解系の作成には成功していない。

3. 今後の展開

さきがけ期間による一連の研究により、出芽酵母で確立していた AID 法をヒト HCT116 細胞に移植することに成功した。現在、OsTIR1 を導入した親細胞を複数のヒト細胞株で樹立することを進めており、近い将来様々なヒト培養細胞で本技術が利用可能になることが期待される。また、培養細胞株のみならず、iPS 細胞や ES 細胞といった幹細胞への応用が可能である。これら幹細胞で AID 技術が利用できる環境を整えることにより、細胞分化における迅速なタンパク質発現制御が可能になるであろう。さらには、マウス個体レベルでの応用も期待されるが、そのためにはオーキシンの投与方法確立や毒性低減など、薬理的な視点からの技術開発が重要になるであろう。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

研究テーマAに関しては、当初の目標であるヒトAID変異細胞を実際に作成することに成功し、基本技術を完成させることができた。作成した材料は全て論文公表に伴い、バイオリソースに寄託しているため、ヒト培養細胞における利用が急速に進むと期待している。AID技術に関しては、最初の出芽酵母を用いた開発から、ヒト細胞への利用まで全て論文として公表することができたため、本技術に関しては原理開発者として貢献することができた。今後はAID技術が世界的に認知されることを期待している。

研究テーマBの、オーキシナンalogの利用に関しては現在進行形であり、これらアナログの利用により、AID技術をより汎用性の高い技術へと改良したいと思っている。ジャスモン酸イソロイシン分解系に関しては、二匹目のドジョウを狙いに行ったが、残念ながらうまくいかず、そうこうしている間にアメリカのグループが同様のアイデアを成功させて論文報告した。この点は競争に勝てなかったところを残念に思っている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

ヒトHCT116細胞を材料として、内在性遺伝子に対する効率的なデグロンタグ付加技術を開発し、デグロン変異細胞作出に成功した。実際に1.5ヶ月で変異細胞を作成できるようになった成果は大きい。そして、共同研究など多くの使用例が増えて、このシステムの有効性・独自性が認められるようになったことは大きな成果である。その成果をすでに論文にして、公表し、着実に実績としていることも評価できる。オーキシナンalogを開発する上で、新たに光制御が可能なケージドオーキシシンを用いる光操作も興味深く、その成果を期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Natsume T, Kiyomitsu T, Saga Y, Kanemaki MT. Rapid Protein Depletion in Human Cells by Auxin-Inducible Degron Tagging with Short Homology Donors. Cell Reports, 15, 210-218 (2016)
2. Devrekanli A, Kanemaki MT. Conditional Budding Yeast Mutants with Temperature-Sensitive and Auxin-Inducible Degrons for Screening of Suppressor Genes. Methods in Molecular Biology, 1369, 257-278 (2016)
3. Nishimura K, Kanemaki MT. Rapid Depletion of Budding Yeast Proteins via the Fusion of an Auxin-Inducible Degron (AID). Current Protocols in Cell Biology, 64, 20.9.1-20.9.16 (2014)
4. Kanemaki MT. Frontiers of Protein Expression Control with Conditional Degrons. Pflugers Archive - European Journal of Physiology, 465, 419-425 (2013)

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

1.

発 明 者: 鐘巻将人、夏目豊彰

発 明 の 名 称: 動物細胞ゲノム部位特異的外来 DNA 挿入方法

出 願 人: 大学共同利用機関法人情報・システム研究機構

出 願 日: 2015/8/20

出 願 番 号: 特願 2015-162612

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 鐘巻将人 「短鎖ホモロジー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」、第一回日本ゲノム編集学会 (広島)、2016年9月7日
2. 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(AID)法」、日本細胞生物学会 染色体諸機能の連携と機能統合体としての理解(京都)、2016年6月15日
3. 鐘巻将人 「Auxin-inducible degron (AID) technology in human cells.」第33回染色体ワークショップ、第14回核ダイナミクス研究会(焼津)、2016年1月12日
4. 鐘巻将人 「A short-homology-mediated tagging method for generation of human conditional mutants by use of the auxin-inducible degron (AID) technology」Conference on Transposition and Genome Engineering 2015(奈良)、2015年11月19日
5. プレスリリース(JST、遺伝研) 「取り除けば働きがわかる 特定のヒト細胞内タンパク質を素早く取り除いて機能を探る方法を開発」2016年3月25日
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20160325/>