

鐘巻 将人 准教授

鐘巻准教授が開発した「AID法」は、植物ホルモン「オーキシン」を利用し、細胞の中の特定のタンパク質だけをわずか15分～30分ほどの短時間で分解する技術だ。

この画期的なAID法を活用して、これまでできなかった動物細胞の増殖機構の解析を行うことを計画している。

AID法とはどんなものか?それによりどんなことが可能になるのか?鐘巻准教授に聞いた。



PROFILE

■かねまき まさと / 1974年生まれ

千葉大学大学院博士課程修了、Cancer Research UK(イギリス)、
大阪大学大学院理学研究科生物科学研究科助教。2010年10月より現職。
趣味 / ロードバイク

画期的なタンパク質分解技術「AID法」

高校の教科書にも出てくる「オーキシシン」。1940年代に発見された、植物の胚発生や重力屈性、光屈性などに関わる植物ホルモンだ。しかしその詳細な分子機構が報告されたのは2005年と新しい。その知見をもとに「AID(オーキシシン誘導デグロン)法」は発明された。鐘巻准教授は2009年12月に論文発表し、特許も取得した。

「AID法を簡単に言うと、植物ホルモンの『オーキシシン』という物質を、細胞の培養液に加えることによって、細胞の中にある目的のタンパク質を非常に短時間で分解する方法です。タンパク質が無くなったことで起こる現象を調べれば、表現型からそのタンパク質の機能を知ることが可能になります。」

植物細胞の中で、オーキシシンは、SCF型ユビキチン付加酵素というタンパク質複合体とAUX/IAAというタンパク質を結合させる。それにより、AUX/IAAがユビキチン化し、プロテアソームに速やかに分解される。

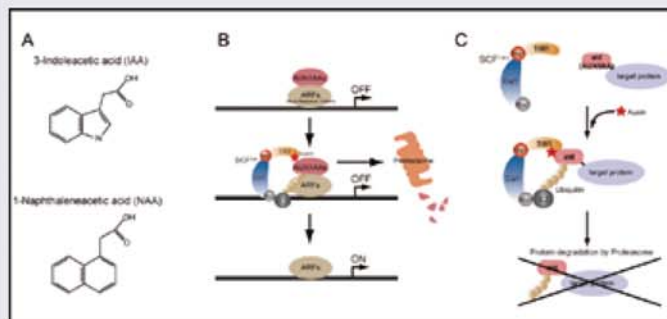
「僕らが考えたAIDのコンセプトは、こういう細胞自身のシステムをうまくハイジャックするということでした。標的とするタンパク質に、AUX/IAAをタグみたいにくっつけておくだけで、オーキシシンがあるときにだけ結合して、結果的にプロテアソームに壊されるだろうと考えたんです。」

SCF型ユビキチン付加酵素は、真核細胞すべてに存在している。ただし、AUX/IAAを認識する部分を構成するTIR1というタンパク質は植物にしかない。そこで、植物以外の細胞でもTIR1を導入したうえで、目的のタンパク質にIAA/AUXを結合させておけば、オーキシシンを与えたときだけ目的のタンパク質を分解することができる。

このアイデアを最初に試したのは酵母細胞。オーキシシンを与えると、わずか30分でターゲットのタンパク質が分解された。酵母以外にも、サル、ハムスター、マウス、ヒトなど、様々な細胞で試した結果、どの細胞でもうまく機能した。

「ターゲットのタンパク質は15分くらいでほとんど無くなります。このスピードでタンパク質を除去する方法はたぶん他に無いと思います。RNAi、転写抑制など、転写をオフすることでタンパク質を作らせない方法がありますが、数～数十時間かかることもある。

これに対し、AID法はタンパク質を数十分という短時間で積極的に壊します。もうひとつの利点は、植物の分解システムなのでオーキシシン自体が動物細胞にはほとんど毒性が無く、二次効果とかを心配なくていいことです。」



図ーオーキシシン誘導デグロン(AID)法 (A) 天然オーキシシンとして知られるインドール酢酸(IAA)と合成オーキシシンとして知られるナフタレン酢酸(NAA)の構造。(B) 植物内でのオーキシシン反応。オーキシシンによって誘導される遺伝子のプロモーター上には転写因子ARFsとその抑制因子AUX/IAAが結合している。オーキシシンはSCF E3ユビキチン化リガーゼのF-box因子であるTIR1を活性化することで、AUX/IAAをポリユビキチン化することで分解に導く。(C) AID法の原理。非植物細胞内で構成したSCFTIR1は標的因子にAUX/IAA(aid)を融合したものを、オーキシシン依存的にポリユビキチン化することでプロテアソームによる分解に導く。

動物細胞を酵母のように簡単に扱えるようにならないか?

鐘巻准教授は、以前は出芽酵母を使って、染色体の複製や維持機構について研究していた。動物細胞を扱うようになったことがAID法を開発した理由だという。

「『培養細胞を酵母のように簡単に扱えるようにならないのか?』っていうのが僕のアイデアの根底にあったんです。酵母は細胞を操作するテクノロジーがいろいろあるので、実験が進みます。だから酵母はこの3、40年間で大いに生物学の研究に役に立った。でも、みんな気になるのはマウスやヒトの細胞だったらどうなのか、っていうことですよ。でもそれをダイレクトに調べる遺伝学的な方法はなかなか無いんです。だから、もっといいテクノロジーがないといけないと思って。」



細胞の中のタンパク質の機能を調べるには、そのタンパク質が無い状況を作ったときに細胞がどうなるかを見ればよい。

酵母細胞では、たとえば温度感受性変異株という、温度を一時的に高くした時だけ目的タンパク質を働かなくしてタンパク質の機能を調べる方法がある。しかしこの手法を動物細胞で行うと、場合によって細胞自体に影響があり、時には細胞は死んでしまう。

AID法の手順は、培養細胞の標的タンパク質にタグをつけておき、実験をしたいときにオーキシンを細胞にかけるだけ。細胞が死んだり、オーキシンの影響を受けたりしない。

「ひとつの分野にずっといたりすると、そこでスタンダードで使われている手法から飛び出して何か作ろうというのはなかなか出てこないと思うんですね。

僕は酵母から培養細胞に移ってきたので、酵母と同じように培養細胞を扱える、自分に都合のいいものを作りたいんです。みんなそういうことを実行してこなかっただけだと思うんです。」

科学と技術は両輪の輪

「結局、サイエンスはテクノロジーが分野を作って、またテクノロジーにフィードバックされて進化してきたように僕は思うんです。顕微鏡がなかったら細胞は見えなかったように、顕微鏡もどんどん進化していくし、細胞の中のことがわかるにつれ、興味も広がってきました。科学と技術は両輪の輪なんです。」

鐘巻研究室では、テクノロジーと培養細胞の基礎研究と2本柱で研究を進めていこうとしている。

まずテクノロジーについては、AID法の新しい使い道の開発を目指す。

「AID法は、目的のタンパク質を分解するのですが、オーキシンを入れるとAとBのタンパク質がくっつくということですから、分解しないような工夫をしたら、AとBのタンパク質が出会うというアイデアも当然出てきます。

細胞工学みたいなものですが、ある特別な条件になったときに、タンパク質が出会うとか、乖離するとかが人為的にできれば、実験の幅がもっともっと広がると思うので、そういう開発もしていきたい。」

培養細胞については、染色体の安定に関するテーマが複数ある。

「細胞にはDNA複製の時に起こるミスをちゃんと直すしくみがありますが、それはどうなっているのか？それがおかしくなると細胞がガン

になったり、死んでしまったり、老化につながったりします。

これをマウスやヒトの細胞でダイレクトに証明したい。

AID法というテクノロジーを使ったからわかった、という宣伝にもなると思うので、サクセスフルな事例を自分たちで作りたいです。」

異分野の交流から生まれるもの

AIDのアイデアは、隣にあった植物の研究室での会話がヒントになったという。

「その教授が『植物にこんなオモロイ分解システムがあるんだよ!』っていう話をしてくれたのがヒントになっています。植物って面白いですよ!植物の研究者は植物しか考えてこなかったし、動物の研究者は動物しか考えてなかったんだけど、話し合ってみるとお互い面白いことが多くて、異分野交流は重要ななと思います。」

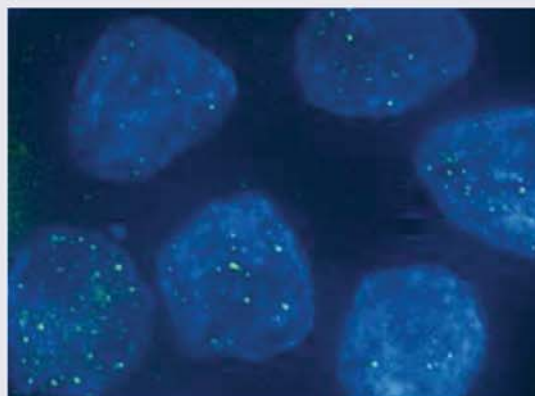
今、遺伝研の他の研究室から、共同研究のオファーが来ている。

「ご近所のラボでも使ってみたいという希望が来ていて、相談しながらやっていこうとしています。まだ始まったばかりですけどね。

技術を作る側の喜びと言いますか、AID法は僕ら以外のラボ、異分野の人も使えて、みんなに喜んでもらえるのもいいですよ。そういうところにもコントリビューションできるのはありがたい話です。」

新しいコラボレーションで何が発見され、生まれるのか?

共同研究の今後が楽しみだ。



DT40細胞核内に局在するDNA修復タンパク質の様子



新たな動物細胞遺伝学に向けて

2010年度発足した本研究室は、これまでに無い方法を編み出すことにより動物細胞を用いた新たな遺伝学を創生するとともに、これらを利用してDNA複製と修復、組換え反応のカップリング機構を明らかにしたいと思っています。私たちは植物ホルモンオーキシシンにより活性化される、植物内のタンパク質分解メカニズムを動物細胞に移植することで、特定のタンパク質をオーキシシン依存的に分解除去する方法を開発しました(AID法)。これにより、オーキシシン添加によりごく短時間にタンパク質発現抑制することが可能な細胞株の作成が可能になりました。

現在、下記のテーマに関して研究を行っています。

- 動物培養細胞における染色体複製、修復、組換えのクロストーク解析
- 動物細胞遺伝学を発展させるための、新たな遺伝子改変法や変異細胞株作成法の開発

Publications

Nishimura, K., Ishiai, M., Horikawa, K., Fukagawa, T., Takata, M., Takisawa, H., and Kanemaki, M. (2012). Mcm8 and Mcm9 Form a Complex that Functions in Homologous Recombination Repair Induced by Interstrand Crosslinks. *Molecular Cell*, 47, 511-522.

Watase, G., Takisawa, H., and Kanemaki, M. (2012). Mcm10 Plays a Role in Functioning of the Eukaryotic Replicative DNA Helicase, Cdc45-Mcm-GINS. *Current Biology* 22, 343-349.

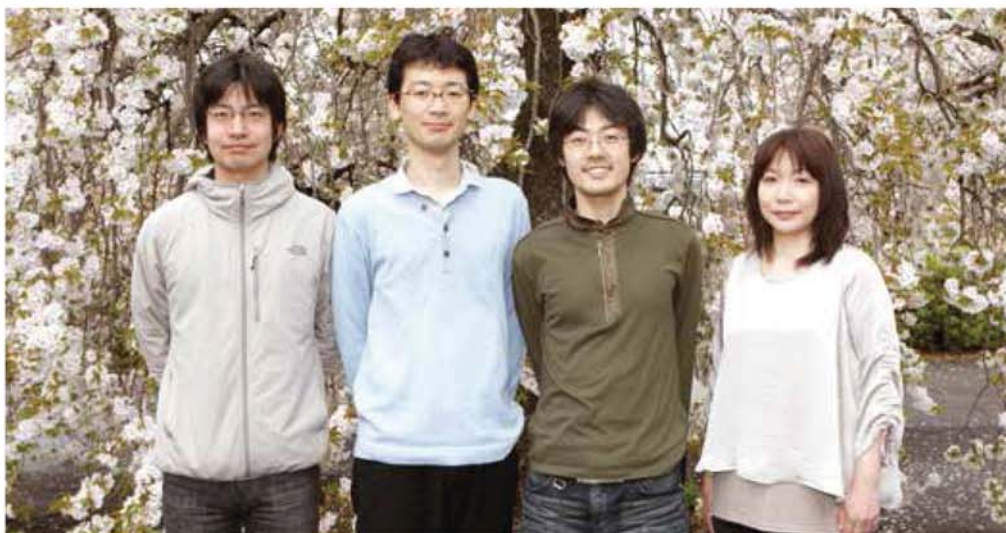
Masumoto, H., Nakato, R., Kanemaki, M., Shirahige, K., and Hachinohe, M. (2011). The Inheritance of Histone Modifications Depends upon the Location in the Chromosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 6(12):e28980.

Tanaka, T., Umemori, T., Endo, S., Muramatsu, S., Kanemaki, M., Kamimura, Y., Obuse, C., and Araki, H. (2011). Sld7, an Sld3-associated protein required for efficient chromosomal DNA replication in budding yeast. *EMBO Journal* 30, 2019-30.

Kanke, M., Nishimura, K., Kanemaki, M., Kakimoto, T., Takahashi, T.S., Nakagawa, T., and Masukata, H. (2011). Auxin-inducible protein depletion system in fission yeast. *BMC Cell Biology* 12, 8.

Renshaw, M.J., Ward, J.J., Kanemaki, M., Natsume, K., Nedelec, F.J., and Tanaka, T.U. (2010). Condensins promote chromosome recoiling during early anaphase to complete sister chromatid separation. *Developmental Cell* 19, 232-244.

Nishimura, K., Fukagawa, T., Takisawa, H., Kakimoto, T., and Kanemaki, M. (2009). An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nature Methods* 6, 917-922.



※2012年度要覧より



大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構

国立遺伝学研究所

National Institute of Genetics

〒411-8540 静岡県三島市谷田1111

<http://www.nig.ac.jp/>