

Title	A novel auxin-based degron system for genetic analysis of the protein function in yeast and animal cells
Author(s)	西村, 浩平
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57996
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	にしむらこうへい 西村浩平
博士の専攻分野の名称	博 士（理 学）
学 位 記 番 号	第 2 3 5 8 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学 位 論 文 名	A novel auxin-based degron system for genetic analysis of the protein function in yeast and animal cells. (植物ホルモン・オーキシシンを利用した新たなデグロン法による酵母および動物細胞における遺伝学的研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 滝澤 温彦 (副査) 教 授 柿本 辰男 教 授 篠原 彰 教 授 升方 久夫

論 文 内 容 の 要 旨

細胞周期進行に関わる因子はその多くが必須タンパク質である。このようなタンパク質の細胞内における生理機能を解析するためには、そのタンパク質を条件特異的に不活化もしくは除去する方法が有効である。酵母における研究においては温度シフト依存的に標的とするタンパク質の急激な失活を誘導する温度感受性変異株(ts-mutants)が幅広く使用され、様々な細胞周期関連因子の機能解析に重要な役割を果たしてきた。一方で、動物の培養細胞における研究では DNA もしくは mRNA レベルでタンパク質の発現を制御する方法が一般的に用いられてきた。しかし、これらの方法は既に存在しているタンパク質を除去することができないため、一般的に標的タンパク質の除去に時間がかかり、時として二次的影響を生み出してしまう。現状において様々な動物細胞において共通に働き、かつ、標的とするタンパク質を速やかかつ効率的に除去する方法は存在していなかった。

そこで我々は植物におけるオーキシシン依存的なタンパク質分解系に着目し、標的とするタンパク質の安定性を制御する方法を考案し、このアイデアを **Auxin Inducible Degron (AID) system** と命名した。植物細胞においてオーキシシンは受容体である **TIR1** と転写阻害因子である **AUX/IAAs** との間の結合を促進する。**TIR1** はユビキチン E3 ライゲース SCF 複合体の構成成分であるため、SCF^{TIR1} に取り込まれた **AUX/IAAs** はポリユビキチン化された後、プロテアソームによって速やかに分解される(ユビキチン-プロテアソーム系)。この反応に関わる因子のうち、**TIR1**, **Auxin** そして **AUX/IAAs** は植物のみにみられる因子であり、一方で、SCF 複合体やユビキチン-プロテアソーム系はすべての真核生物に高度に保存されている。そこで、我々はこの植物に特有なタンパク質分解系を植物以外の真核生物に導入することによって、**AUX/IAA** を付加した標的タンパク質をオーキシシン依存的に分解することができるのではないかと考えた。

この方法は速やかかつ可逆的に目的とするタンパク質の発現を制御することができ、さらにこの方法を用いることによって出芽酵母細胞において優れた条件特異的変異株を作成することも可能となった。今回、我々はこの方法が出芽酵母から様々な動物の培養細胞において機能することを示し、さら

にニワトリ DT40 細胞を用いて必須因子に対して条件特異的変異株の作成が可能となったことを報告する。今回開発した AID 法は様々な真核生物で応用が可能であろうと考えられる。動物の培養細胞においては相同組換え技術と AID 法を組み合わせることで高度な遺伝学的解析が可能となると考えられる。

論文審査の結果の要旨

細胞周期の進行に関わる多くの因子は必須タンパク質である。このようなタンパク質の細胞内における生理機能を解析するためには、そのタンパク質を条件特異的に不活化もしくは除去する方法が必要となる。酵母の研究では、温度シフト依存的に標的とするタンパク質の急激な失活を誘導する温度感受性変異株が幅広く用いられ、様々な細胞周期関連因子の機能解析に重要な役割を果たしてきた。一方、動物の培養細胞における研究では、DNA もしくは mRNA レベルでタンパク質の発現を制御する方法が一般的に用いられてきた。しかし、これらの方法は既に存在しているタンパク質を除去することができず、結果として得られた表現型の解釈が困難な場合があった。これまで動物細胞において標的とするタンパク質を除去する方法はいくつか発表されているが、除去の効率や速度において問題があった。西村君は、植物におけるオーキシン依存的なタンパク質分解系に着目し、標的とするタンパク質の安定性をオーキシンの制御する方法、Auxin Inducible Degron (AID) system を考案した。植物細胞においてオーキシンは、受容体である TIR1 と転写阻害因子である AUX/IAAs との間の結合を促進する。TIR1 はユビキチン E3 ライゲース SCF 複合体の構成成分であるため、SCF^{TIR1} に取り込まれた AUX/IAAs はポリユビキチン化された後、プロテアソームによって速やかに分解される。この反応に関わる因子の中で、TIR1、Auxin そして AUX/IAAs は植物のみにみられる因子であるが、SCF 複合体やユビキチン-プロテアソーム系はすべての真核生物で高度に保存されている。西村君はこの植物に特有なタンパク質分解系を植物以外の真核生物に導入することによって、AUX/IAA を付加した標的タンパク質をオーキシン依存的に分解することに成功した。この方法は速やかで、かつ可逆的に目的とするタンパク質の発現を制御することができ、さらにこの方法を用いることによって出芽酵母細胞において優れた条件特異的変異株を作成することが可能となった。さらに、この方法は様々な動物の培養細胞において機能することを示し、またニワトリ DT40 細胞を用いて必須因子に対して条件特異的変異株の作成が可能である事を実証した。AID 法は、動物の培養細胞や個体において、相同組換え技術と組み合わせることで高度な遺伝学的解析を可能とする画期的な方法である。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。