

氏 名 Yesbolatova, Aisha

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2371 号

学位授与の日付 2022 年 9 月 28 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Integrative studies of chromosome structural proteins by
improving targeted protein degradation system and
developing biochemical reconstitution system

論文審査委員 主 査 仁木 宏典
遺伝学専攻 教授
澤 斉
遺伝学専攻 教授
野々村 賢一
遺伝学専攻 准教授
島本 勇太
遺伝学専攻 准教授
角井 康貢
早稲田大学高等研究所 講師

(Form 3)

Summary of Doctoral Thesis

Name in full Yesbolatova, Aisha

Title Integrative studies of chromosome structural proteins by improving targeted protein degradation system and developing biochemical reconstitution system

Genomic DNA is packed, duplicated, and expressed with the aid of thousands of chromosomal proteins, many of which are derived from essential genes. Gene disruption is a powerful approach for dissecting protein function but remains difficult to be applied to proteins essential for cell viability. Hence, novel approaches that enable intended protein degradation by combining genetic manipulation and chemical biology are getting more attention in a wide range of recent biology. The auxin-inducible degron (AID) technology is a plant-derived protein degradation application that allows rapid and specific depletion of a protein of interest (POI) in non-plant cells utilizing the ubiquitin-proteasome system of the host organisms, with an option to re-express after target depletion. AID can be applied to a wide range of organisms including human cells by introducing the two factors via genetic modifications: ectopic expression of the auxin-perceptive plant protein, transcription inhibition response 1 (TIR1), and introduction of the AID tag (TIR1 recognition peptide) to POI. The addition of auxin mediates the recognition of the AID tag by the auxin receptor TIR1, which recruits an endogenous ubiquitin ligase complex for ubiquitylation and proteasomal degradation of the POI. Typically, a POI is degraded within an hour upon the addition of auxin, bearing the AID system as one of the fastest protein depletion technologies. This acute and efficient degradation allows us the direct functional analysis of many proteins, in particular those required for cell viability, before secondary effects of protein depletion accumulate.

In principle, no protein degradation should take place in the absence of auxin.

However, due to the nature of the TIR1 (ubiquitin ligase) – AID tag-fused POI recognition and the presence of auxin-like chemicals in the cell culture medium, even in the absence of auxin, basal degradation is observed, which occasionally hampers functional analyses. An additional drawback of the system is the use of relatively high concentrations of auxin. Even though the concentrations used for human culture cells do not affect their growth, this is a potential problem for application to mice and other multicellular organisms. *Therefore, the main goal of Chapter 1 is to resolve the issues of basal degradation and high auxin concentration to make AID a robust technology that can be used as a standard tool for genetic perturbation to study protein function and ultimately be applied to mice.*

First, I addressed the problem of basal degradation in the absence of auxin. The first described result is the use of the inhibitor auxinole for timely control of degradation and re-expression of the AID tag-fused proteins. Second, I took another approach to improve the AID system from the genetic perspective by developing an all-in-one plasmid encoding the TOL2 transposon sites and all required components for stable integration and controlling the expression of transgenes. Genetic manipulations for generating AID mutants can be performed using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)–CRISPR-associated protein 9 (Cas9)-mediated genome editing. By combining it with TOL2 transposase encoding plasmid and CRISPR–Cas9 knockout plasmid for simultaneous transfection, I created a new protocol for generating AID mutants in polyploid human cells.

The final and major result is creating the updated version of the AID technology, AID2, by increasing the specificity of the TIR1 – AID tag interaction to suppress basal degradation and decrease the ligand concentration. This was done by introducing a mutation to the TIR1 receptor and using an auxin analog that binds specifically to the mutant receptor. Due to the high specificity of the new receptor – inducer pair, the problem of basal degradation was mostly eliminated. Importantly, I found that several

hundred times lower inducer concentration is required for efficient protein degradation. Moreover, the improved system allows the construction of AID mutants previously proved to be complicated or impossible. This improvement significantly enhances the utility of the AID technology and reveals new perspectives for its use, such as its application to stem cells, mice, and other multicellular organisms.

In Chapter 2, I took a different approach to characterize one of the essential chromosomal proteins, cohesin, by establishing biochemical reconstitution assays using purified protein components. Cohesin is a ring-shaped protein complex that mediates sister chromatid cohesion, one of the chromosomal structures essential for faithful chromosome segregation during cell division. I have reconstituted the meiosis-specific cohesin complex to analyze its ATP-dependent DNA loading, which is vital for creating sister chromatid cohesion. I found that meiotic cohesin topologically entraps DNA in a similar way to the somatic version of cohesin whereas its dissociation appears to be differently regulated. The established *in vitro* assay will provide a novel opportunity for molecular studies of meiotic chromosome organization driven by meiotic cohesin complexes.

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 Yesbolatova, AishaTitle
論文題目 Integrative studies of chromosome structural proteins by improving targeted protein degradation system and developing biochemical reconstitution system

生命活動は、数万種以上のタンパク質の働きに支えられている。その分子作用機構を解明するアプローチとして、1) 遺伝子破壊、ノックダウン、特異的タンパク質分解等により標的タンパク質の機能を欠損させることにより表現型を解析する逆遺伝学的方法、2) 標的タンパク質を精製し、試験管内で活性を再構成する生化学的方法があげられる。Aisha Yesbolatovaさんは、遺伝情報の担体である染色体の複製・維持・継承を支える分子機構に興味を持ち、その解明に向け、これら両方のアプローチについて技術開発と機能解析を行い、主に以下のことを見出した。

オーキシシンドグロン(AID)技術の改良を行い、特異的タンパク質分解手法の革新的な向上を行った。AID法は、植物特異的なプロテアソーム経路を、ヒトを含む非植物の異種生物細胞内で再構成することにより、小分子であるオーキシシンの添加によって、標的とするタンパク質の分解を数十分から数時間で迅速に、且つ高効率に誘導する技術である。原理的に、必須遺伝子を含む全てのタンパク質に適応可能で、機能抑制に時間がかかる遺伝子ノックダウン法で懸念される二次的影響を最小限にとどめ、特定の生命現象における標的タンパク質の機能解析を行える。具体的には、標的タンパク質にAIDタグを付加し、このタグとオーキシシン依存的に結合するOsTIR1を発現することによりAID細胞を樹立する。しかし、第一世代のAIDは、オーキシシン無添加状態でも標的タンパク質の種類によっては分解が起こる、あるいは高濃度のオーキシシンが毒性を示すために細胞株が樹立できない等の問題があった。Aishaさんは、OsTIR1のオーキシシン結合部位への変異(F74G)とそれに対応したオーキシシンアナログ(5-Ph-IAA)を組み合わせることにより、OsTIR1とAIDタグの結合特異性を向上させることで、この第一世代版の問題解決に取り組んだ。まず、AIDタグしたGFPを分解指標マーカーとして新システムの評価を行い、オーキシシン非依存的な分解がほぼ完全に抑えられていること、オーキシシンアナログの添加量が第一世代方に比べ 10^{-2} オーダーの極低濃度で効率的な分解誘導を行えることを見出した。次にヒトHCT116細胞株を用いて、第一世代ではAID細胞株の樹立が不可能だったDHC1(ダイニンの主要サブユニット、染色体分配装置の紡錘体形成に必須)について新システムを適用し、AID株の樹立が出来ること、分解誘導により紡錘体形成が行われなくなることを示した。また、第一世代で細胞株が樹立できたRAD21(コヒーシンの主要サブユニット、姉妹染色分体間接着の形成に必須)についても新システムでは、非特異的分解が抑えられAIDタグ化Rad21が安定化すること、さらに第一世代よりもオーキシシンアナログ添加により2倍の速さでRad21の分解が誘導でき、姉妹染色分体間接着がほぼ完全に形成されなくなることを

を示した。これに加え、新システムではマウス個体においても AID 法の適用に道を開き、その後実際にマウス個体での作成が可能となっている。これらの結果から、確立した新システム(AID2 法)は、細胞のみならず、個体レベルの解析に適応できる細胞操作技術であることを示した。AID2 法の開発と並行して、オーキシン阻害剤の使用法、一度の遺伝子ターゲティングで AID 細胞を樹立する方法を確立する等、AID 技術の改良も行なった。

次に、試験管内で活性を再構成する生化学的方法による生命機能の解明に取り組み、染色体構造タンパク質複合体コヒーシンの試験管内再構成の研究を行った。複製を経て倍加した染色体はコヒーシンと呼ばれるリング構造の ATPase 複合体により接着する。この姉妹染色分体接着は、紡錘体が染色体を牽引する時の張力起点となり、正確な染色体分配を保証する。コヒーシンはリング構造を形成しており、その中空に DNA を通す形で結合することが知られ(トポロジカル DNA 結合)、このリングからの DNA の着脱が姉妹染色分体間接着の形成と染色体分配の制御に重要であると考えられている。減数分裂においてもコヒーシンは接着を形成するが、一部サブユニットが入れ替わり、この細胞周期特異的な染色体分配に機能する。Aisha さんは、分裂酵母の減数分裂型コヒーシンを精製し、その活性について体細胞型のコヒーシンと比較しながら生化学的な解析を行った。まず、リングを構成する最小単位の複合体を精製し、減数分裂型コヒーシンが ATP 依存的にトポロジカル DNA 結合活性を有することを示した。この DNA 結合は、体細胞型コヒーシンと同様に活性化因子であるローダーを必要とすること、一方で減数分裂特異的な制御因子 Rec11 は、減数分裂型コヒーシンのみを活性化し、体細胞型には作用しないことを示した。コヒーシンの DNA からの解離はローダーの代わりに Pds5-Wapl が作用することで促進される。興味深いことに、体細胞型コヒーシンでは脱離反応は試験管内で再構成されるが、減数分裂型はこの反応が著しく制限されていた。これらの結果は、減数分裂型コヒーシンはトポロジカル DNA 結合を介して接着に機能するが、その結合・解離反応は体細胞型とは異なる制御機構が存在することを示唆する。

これら一連の解析から、Aisha さんは生細胞で標的タンパク質の機能を解析する技術の開発に加え、主要な染色体構造タンパク質であるコヒーシンを生化学的にする実験系の構築に貢献した。得られた成果は、染色体タンパク質の分子作用機構の解析を進める上で学術上意義ある研究である。以上のことから Aisha さんの学位提出論文は博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。