

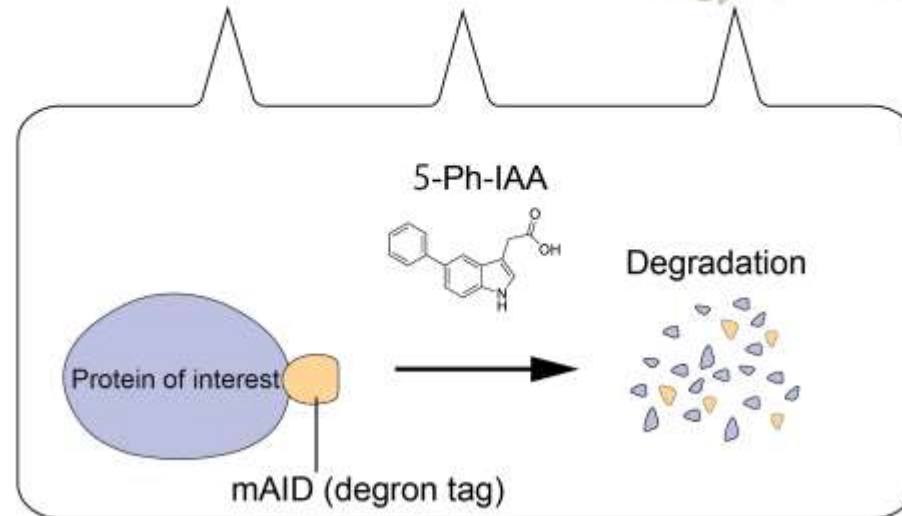
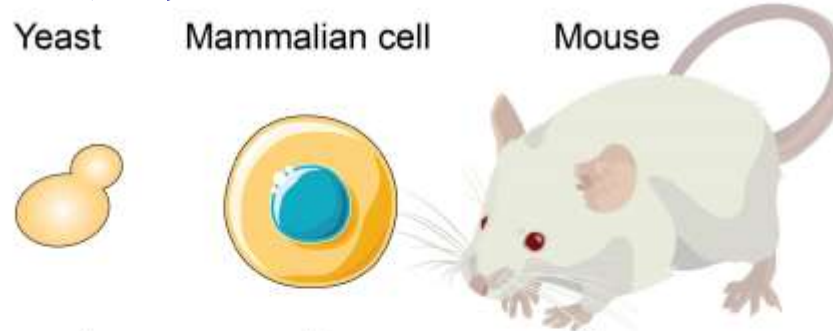
改良型オーキシンドェグロンAID2法による 迅速なタンパク質分解除去



情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所

教授・鐘巻将人

Yeast Mammalian cell Mouse



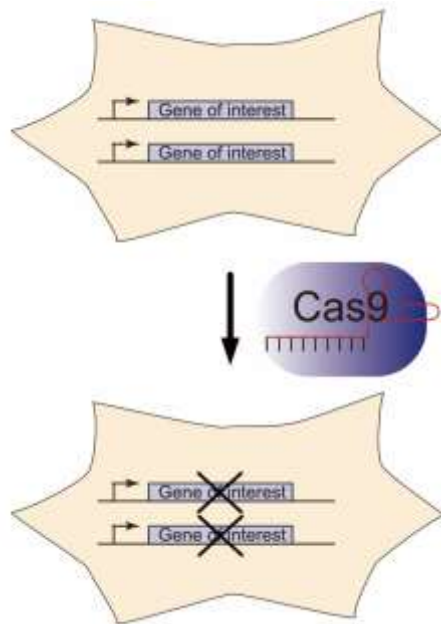
2021年10月15日

新技術説明会
New Technology Presentation Meetings!

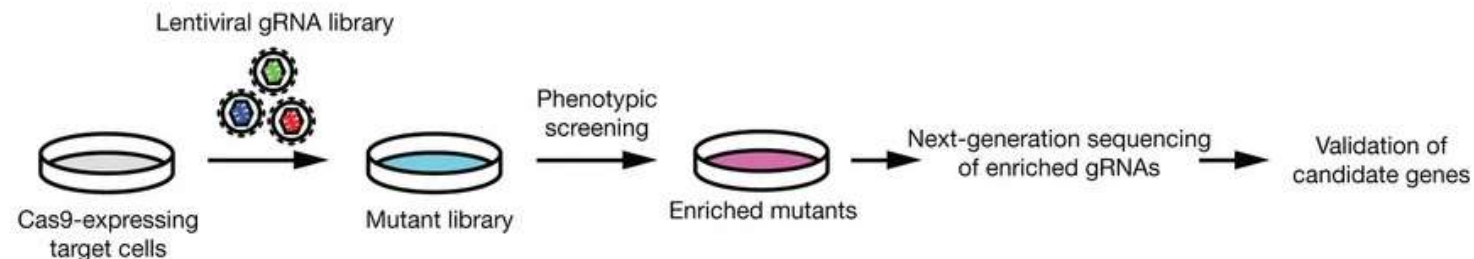


ゲノム編集による遺伝子ノックアウト

CRISPR-Cas9ゲノム編集による
遺伝子ノックアウト (KO)



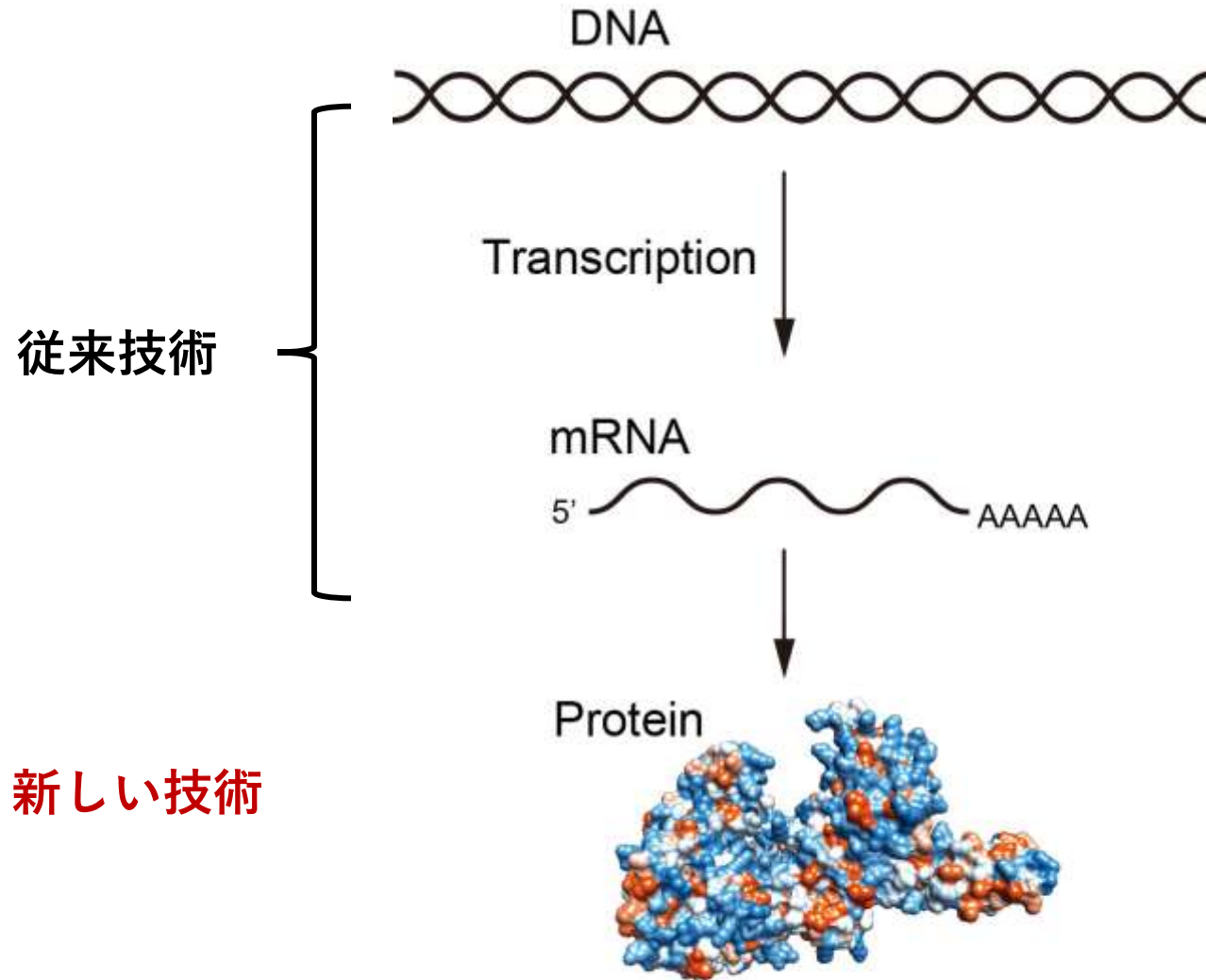
ゲノム編集スクリーニング等により数多くの創薬候補因子が見つまっている



1. 重要な遺伝子はノックアウトできない
2. 最終的に見えてくる定常状態の表現型 (遺伝子KOへの適応等の懸念)

タンパク質分解創薬において、どのようにしてターゲットのvalidationを行うか？

タンパク質除去は生命科学及び創薬研究に役立つ



Recombinase-mediated KO
(e.g. Cre-LoxP)

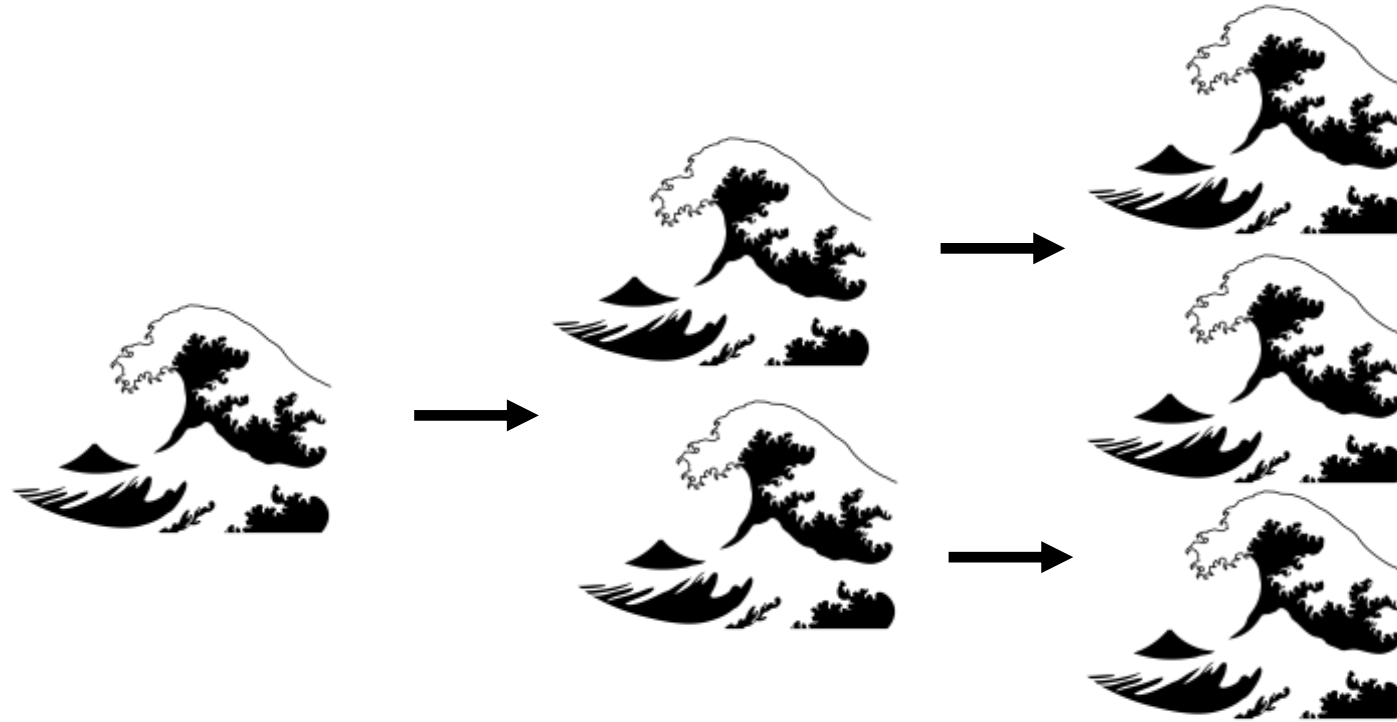
Conditional promoters
(e.g. Tet-ON/OFF)
CRISPRi

si/shRNA
Morpholinos

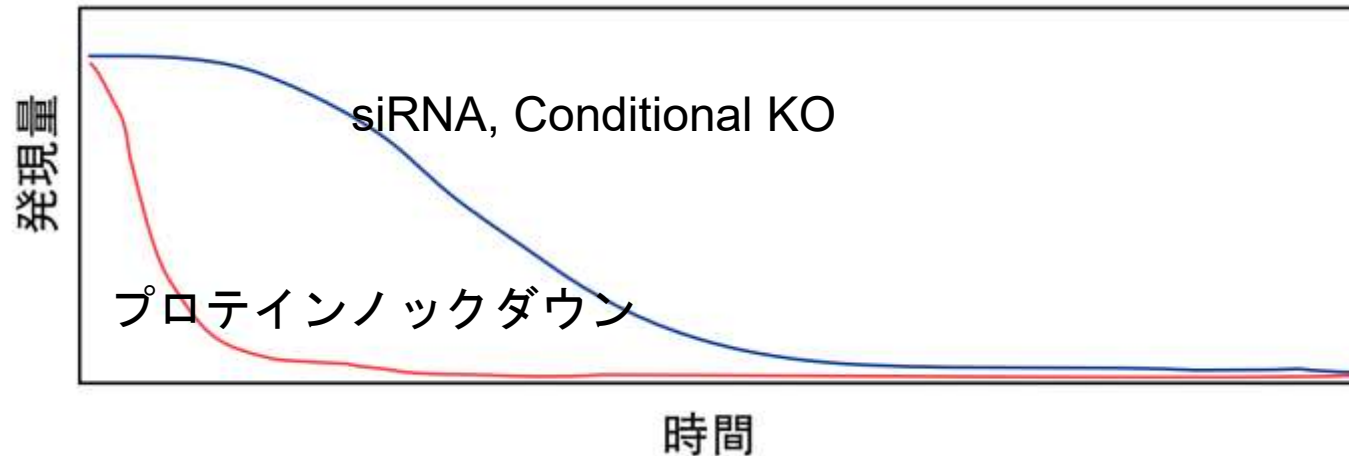
プロテインノックダウン

- **Degrans: AID, dTAG etc.**
- **PROTACs (タンパク質分解創薬)**

迅速なタンパク質除去の重要性



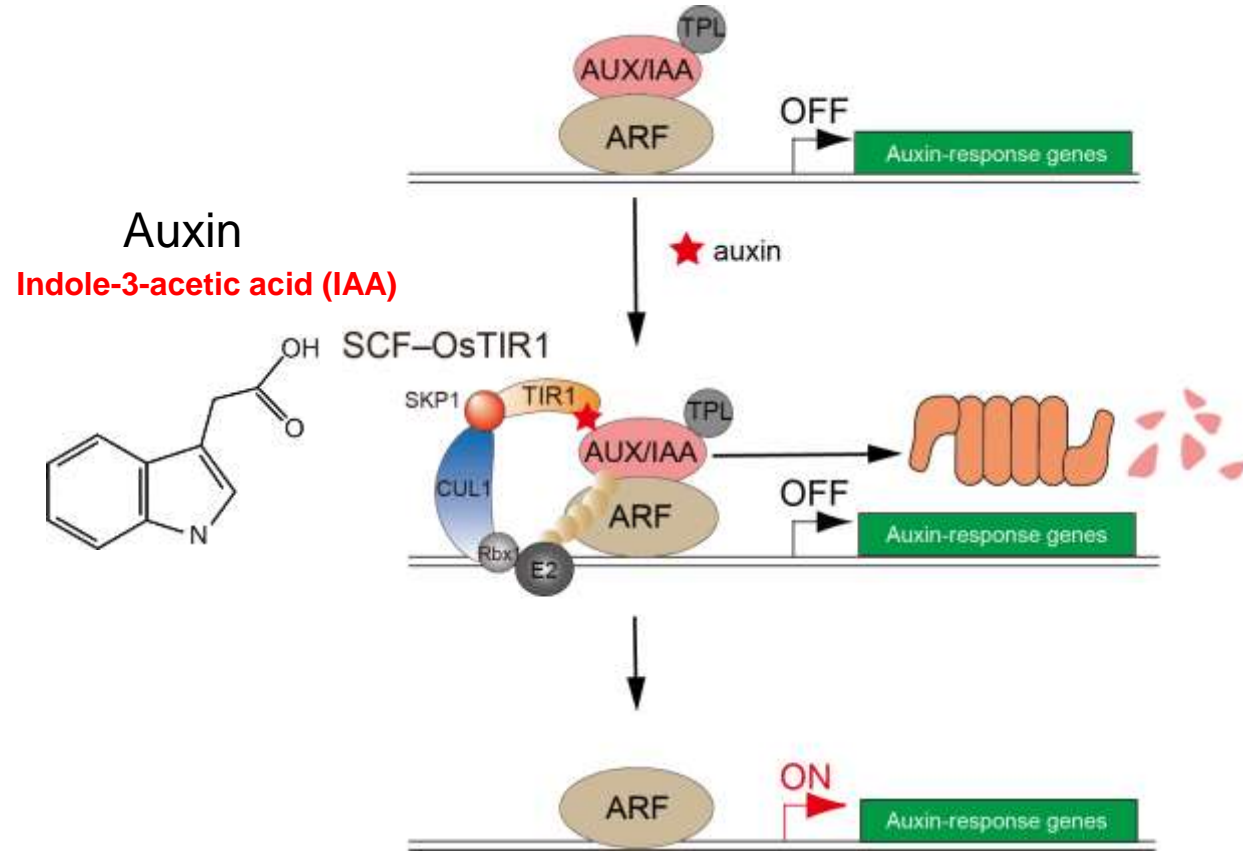
最初に起きた影響を調べるには、迅速なタンパク質除去が非常に重要



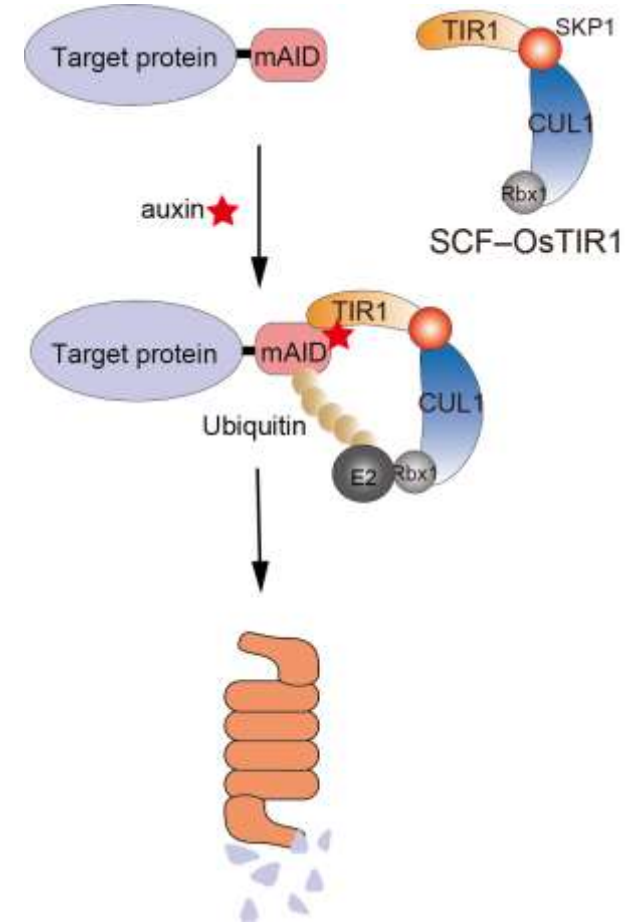
プロテインノックダウンは迅速な分解が可能

Concept of the **A**uxin-**I**nducible **D**egron (**AID**) system

In plant cell



In non-plant cell

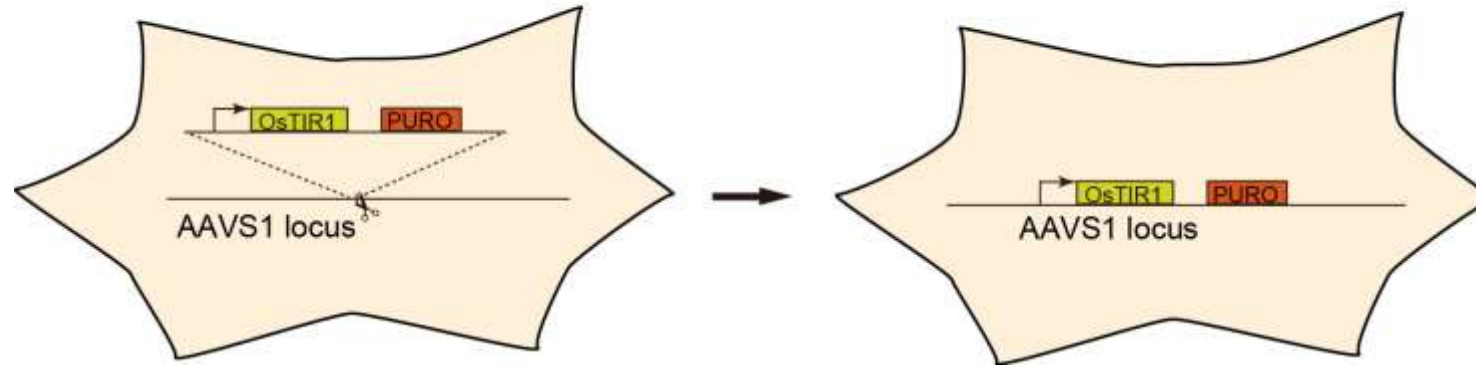


Nishimura et al. Nature Methods, 2009

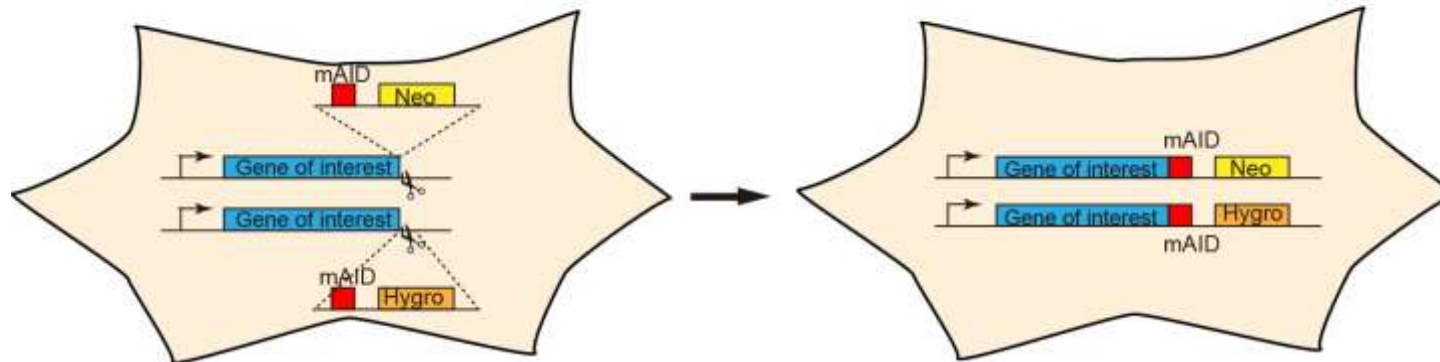
CRISPR-Cas9によりデグロンタグ導入して、 AID変異細胞を作成する

HCT116 cell line

Parental cell

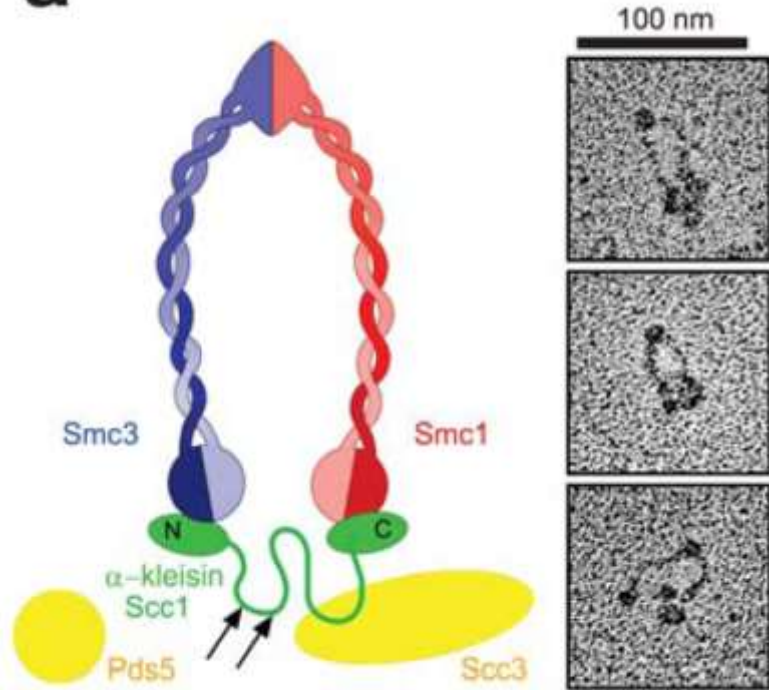


AID mutant



培養細胞におけるAIDによるRAD21 (コヒーシン) の迅速な分解誘導

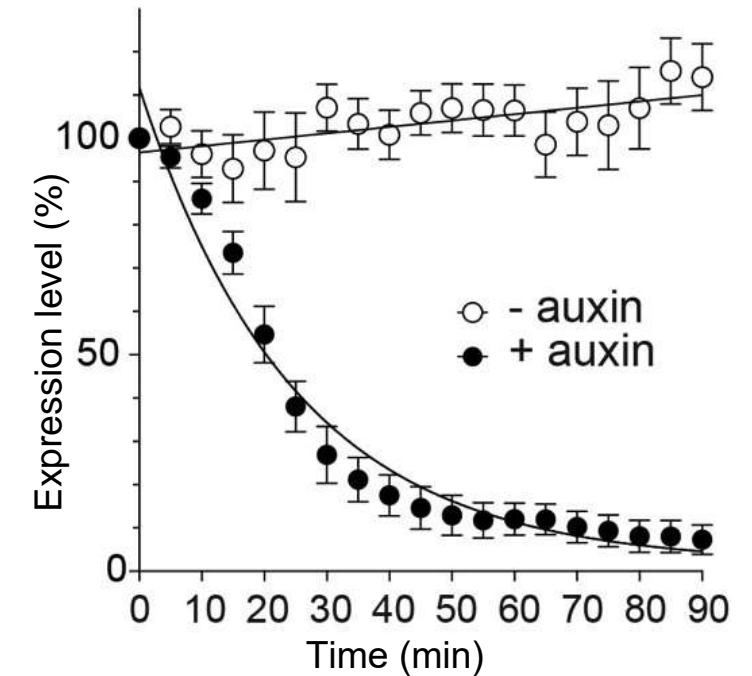
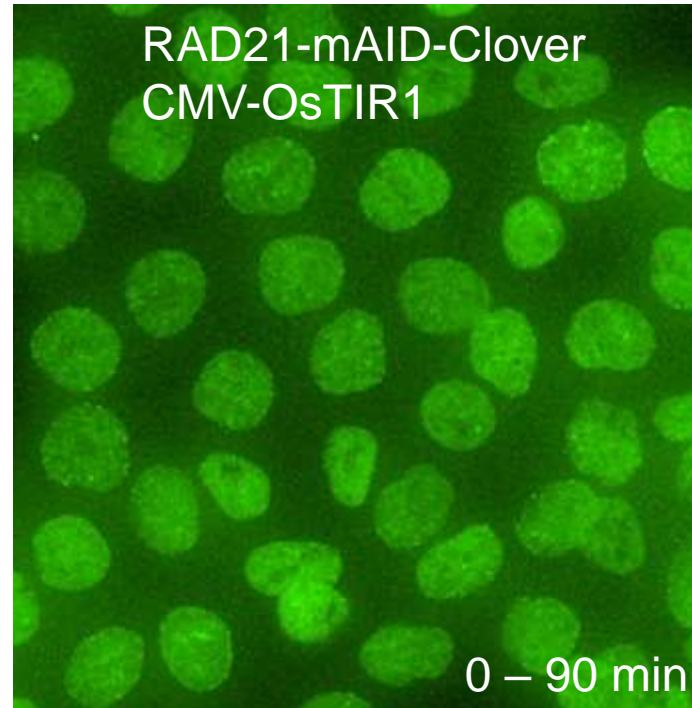
a



Cohesin

Nasmyth and Haering, Annu. Rev. Biochem., 2005

RAD21/SCC1



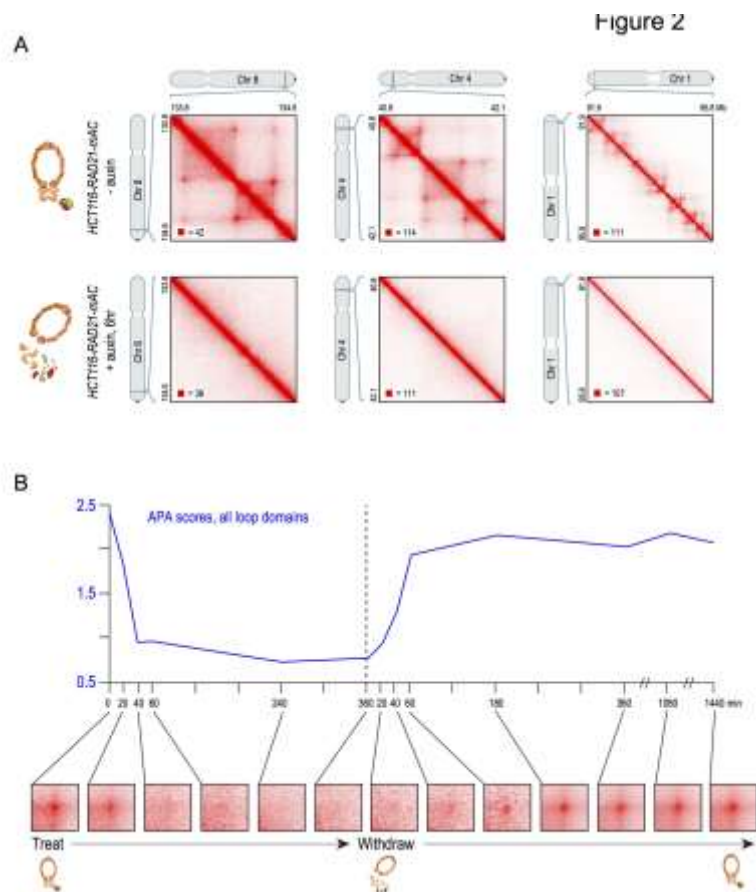
Natsume et al. Cell Reports, 2016

AID法は世界中の先端的研究で使われている

Cell, 171, 305-320, 2017

Cohesin Loss Eliminates All Loop Domains

Suhas S.P. Rao,^{1,2,3} Su-Chen Huang,^{1,2} Brian Glenn St Hilaire,^{1,2,4} Jesse M. Engreitz,⁵ Elizabeth M. Perez,⁵ Kyong-Rim Kieffer-Kwon,⁶ Adrian L. Sanborn,^{1,4,7} Sarah E. Johnstone,^{5,8} Gavin D. Bascom,⁶ Ivan D. Bochkov,^{1,2} Xingfan Huang,^{1,10} Muhammad S. Shamim,^{1,2,10,11} Jaeweon Shin,^{1,10} Douglass Turner,^{1,12} Ziyi Ye,^{1,10} Arina D. Omer,^{1,2} James T. Robinson,^{1,5,12} Tamar Schlick,^{9,13,14} Bradley E. Bernstein,^{5,8} Rafael Casellas,^{5,15} Eric S. Lander,^{5,16,17} and Erez Lieberman Aiden^{1,2,4,5,10,16,*}



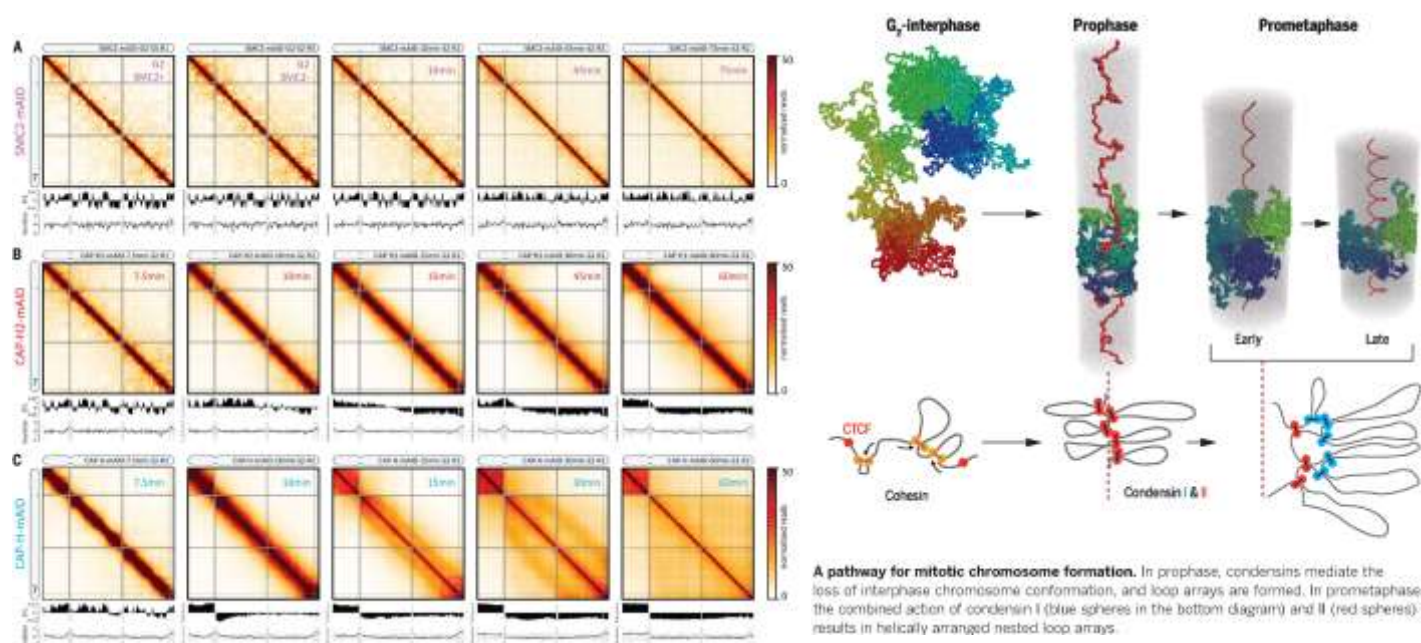
RESEARCH ARTICLE

Science, 2018

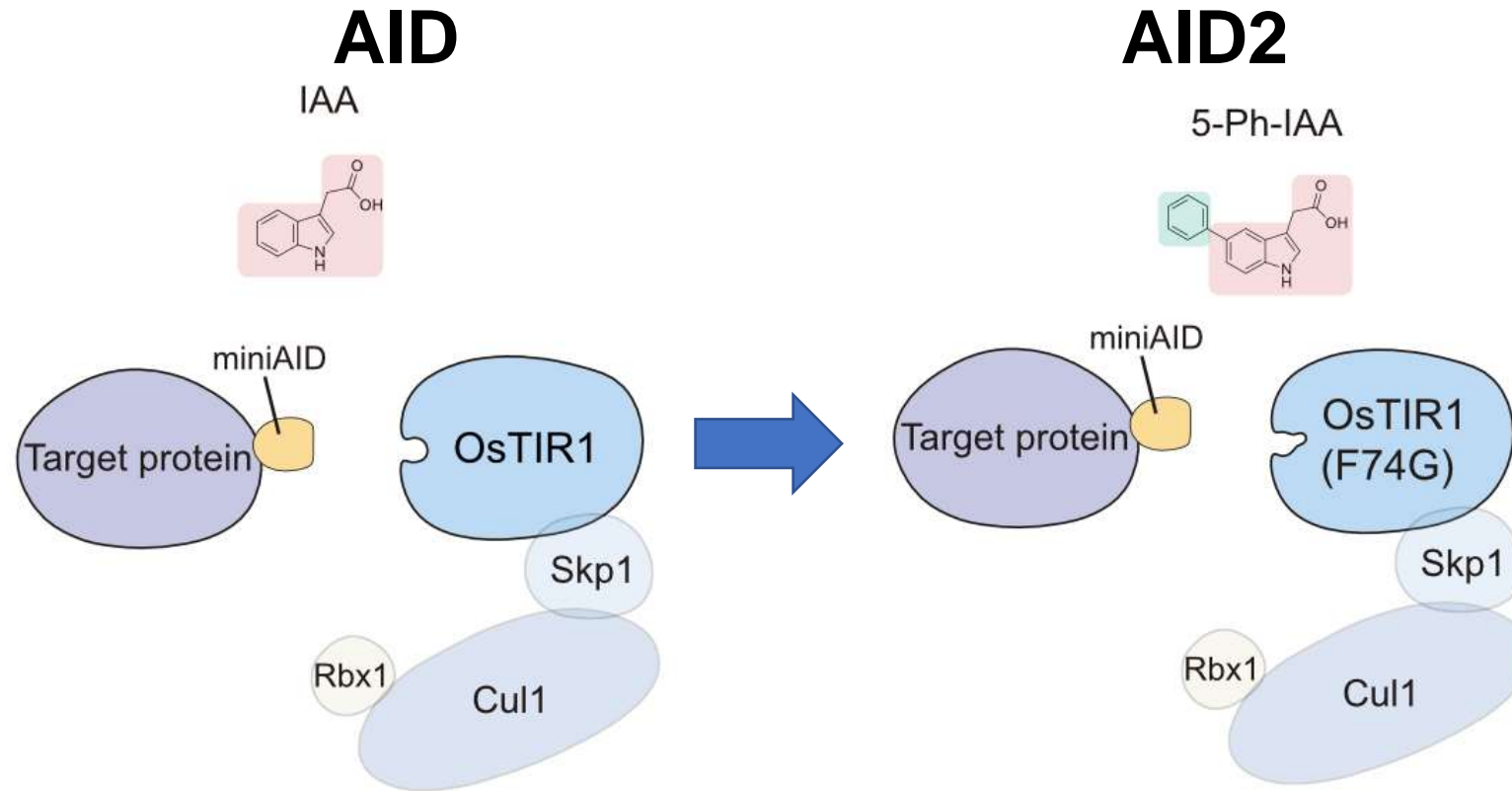
MOLECULAR BIOLOGY

A pathway for mitotic chromosome formation

Johan H. Gibcus,^{1*} Kumiko Samejima,^{2*} Anton Goloborodko,^{3*} Itaru Samejima,² Natalia Naumova,¹ Johannes Nuebler,³ Masato T. Kanemaki,⁴ Linfeng Xie,⁵ James R. Paulson,⁵ William C. Earnshaw,^{2†} Leonid A. Mirny,^{3†} Job Dekker^{1,6†}



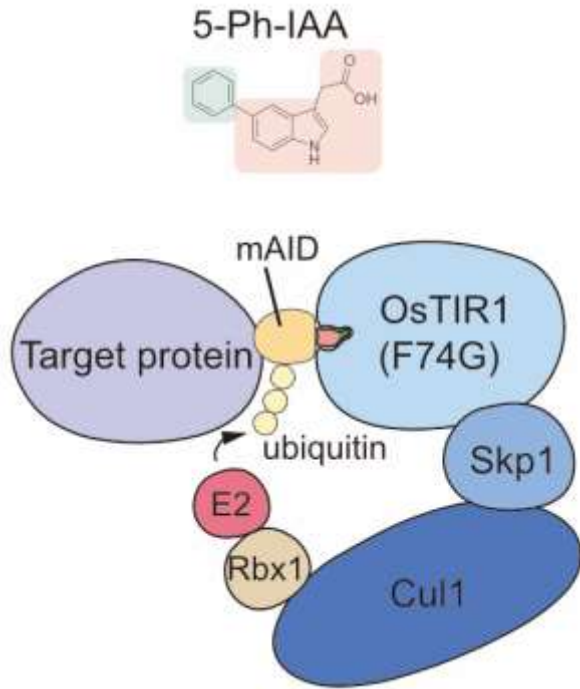
改良型AIDシステム (AID2)



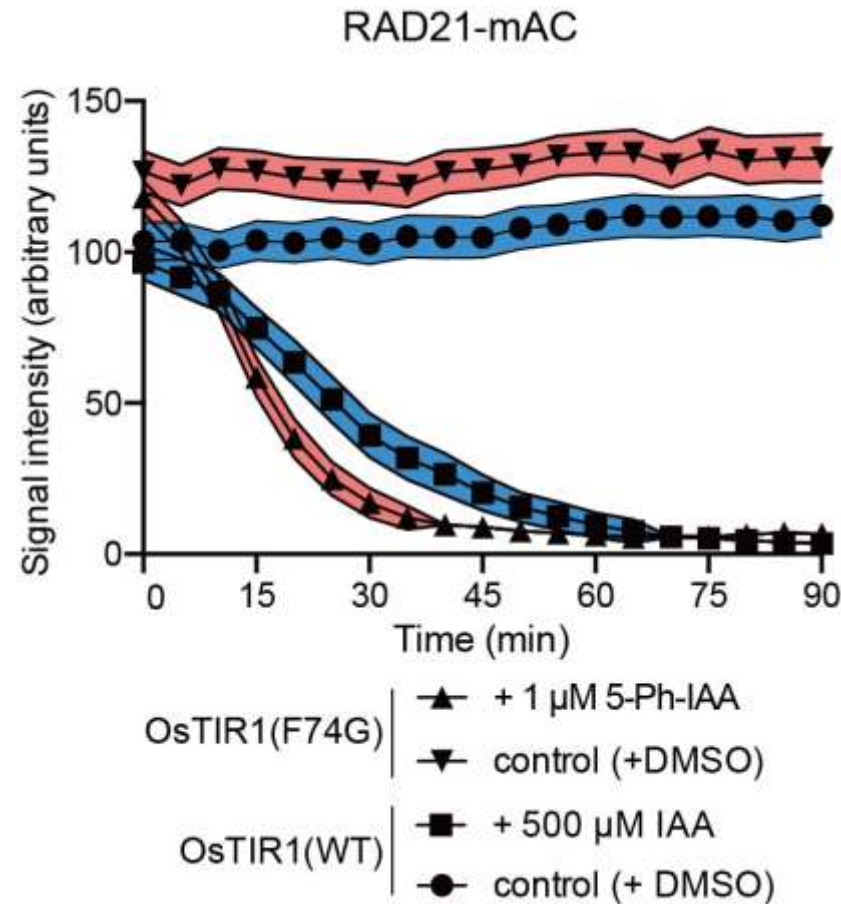
比較項目	AID	AID2
リガンド濃度	高濃度 (100-500 μM)	低濃度 (1 μM 以下)
リガンド非依存的分解	あり	なし
分解速度	半減期20-40分	半減期10-30分
マウスへの応用	不可	可能

改良型AIDシステム (AID2)

AID2



RAD21 (コヒーシン) のAIDと AID2による分解比較実験



リガンド濃度比較

AID2: 1 μM 5-Ph-IAA

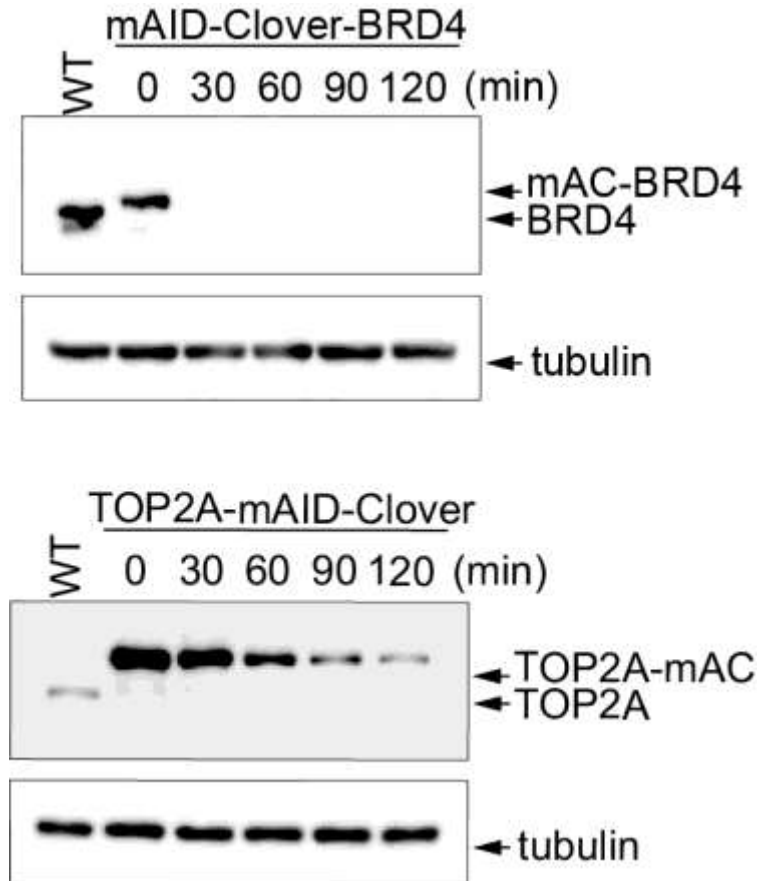
AID: 500 μM IAA

半減期比較

AID2: $t_{1/2} = 11.7$ min

AID: $t_{1/2} = 26.5$ min

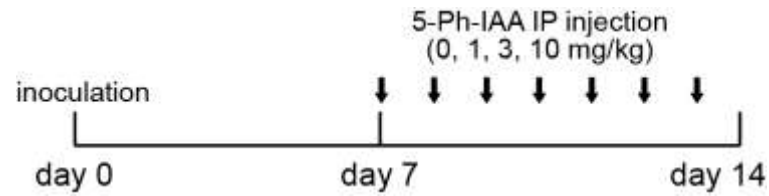
マウス個体への応用：AID技術でのマウス ゼノグラフトにおける腫瘍形成抑制



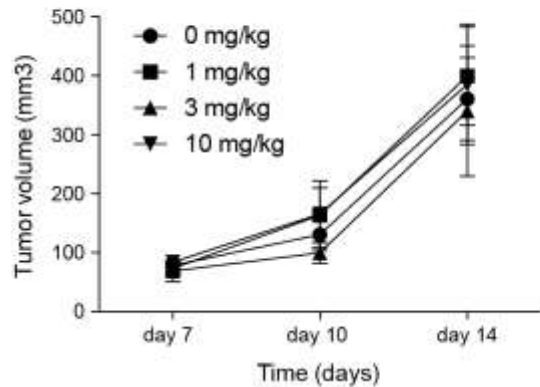
Mice Balb/c nu/nu, ♀, 7W

HCT116 CMV-OsTIR1(F74G) background

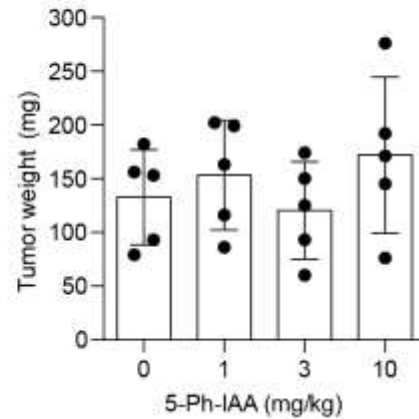
マウス個体への応用：AID技術でのマウス ゼノグラフトにおける腫瘍形成抑制



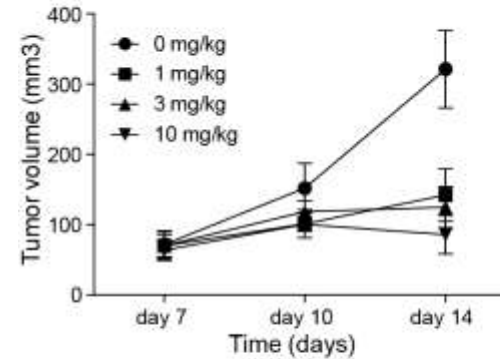
control
(CMV-OsTIR1(F74G))



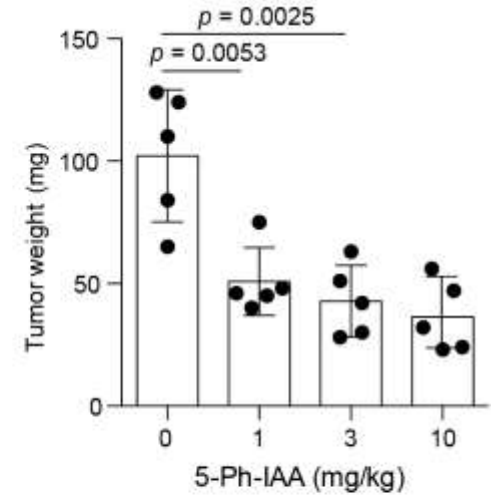
control
(CMV-OsTIR1(F74G))



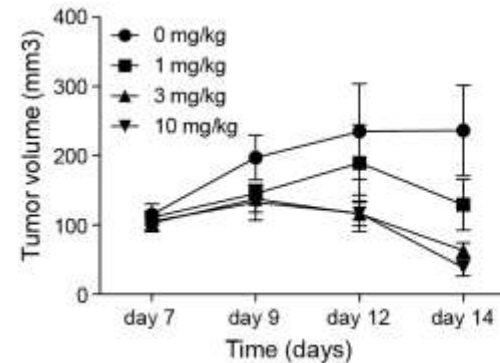
mAID-BRD4



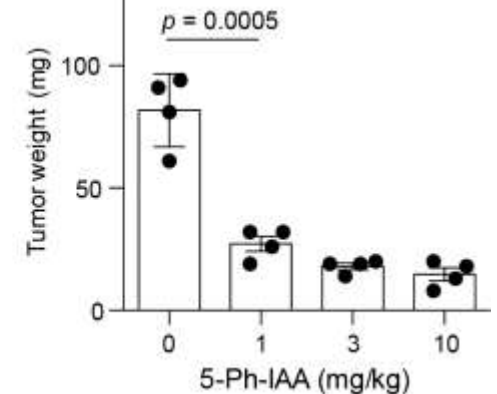
mAID-BRD4



TOP2A-mAID-Clover



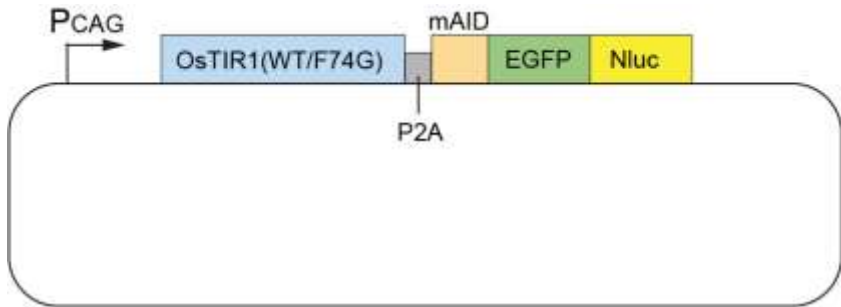
TOP2A-mAID-Clover



マウス個体レベルでAID2技術を利用するための トランスジェニックマウス作出

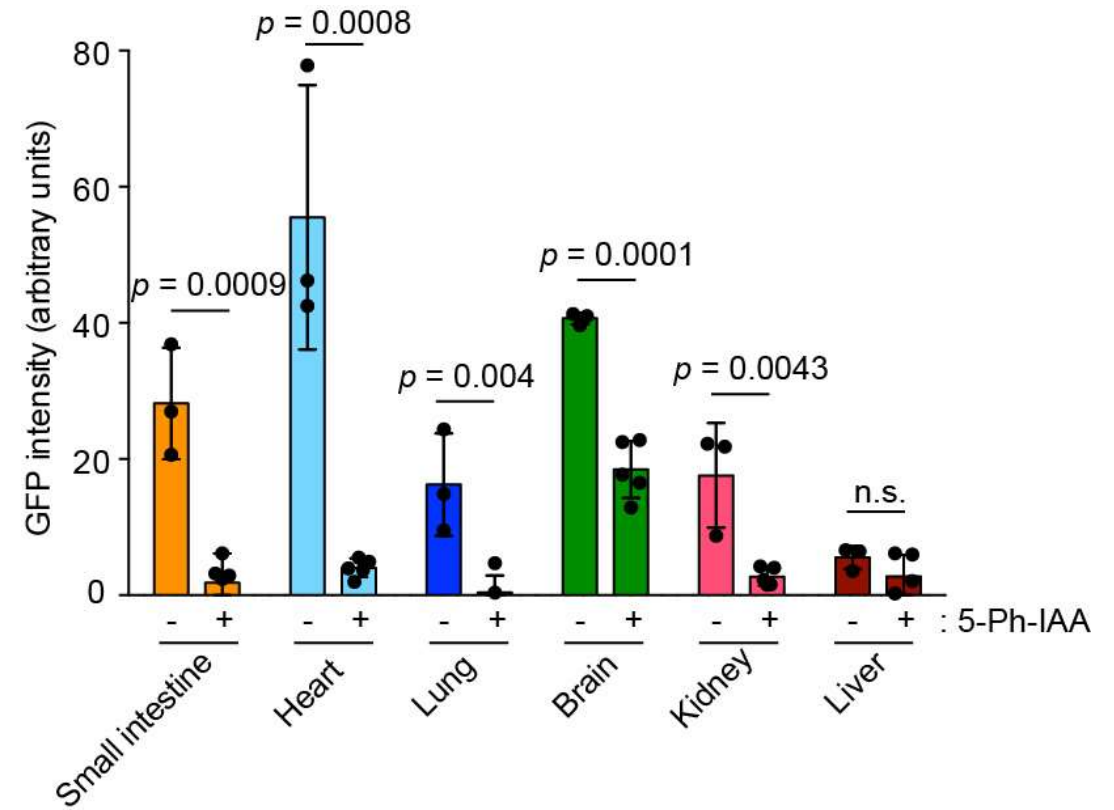
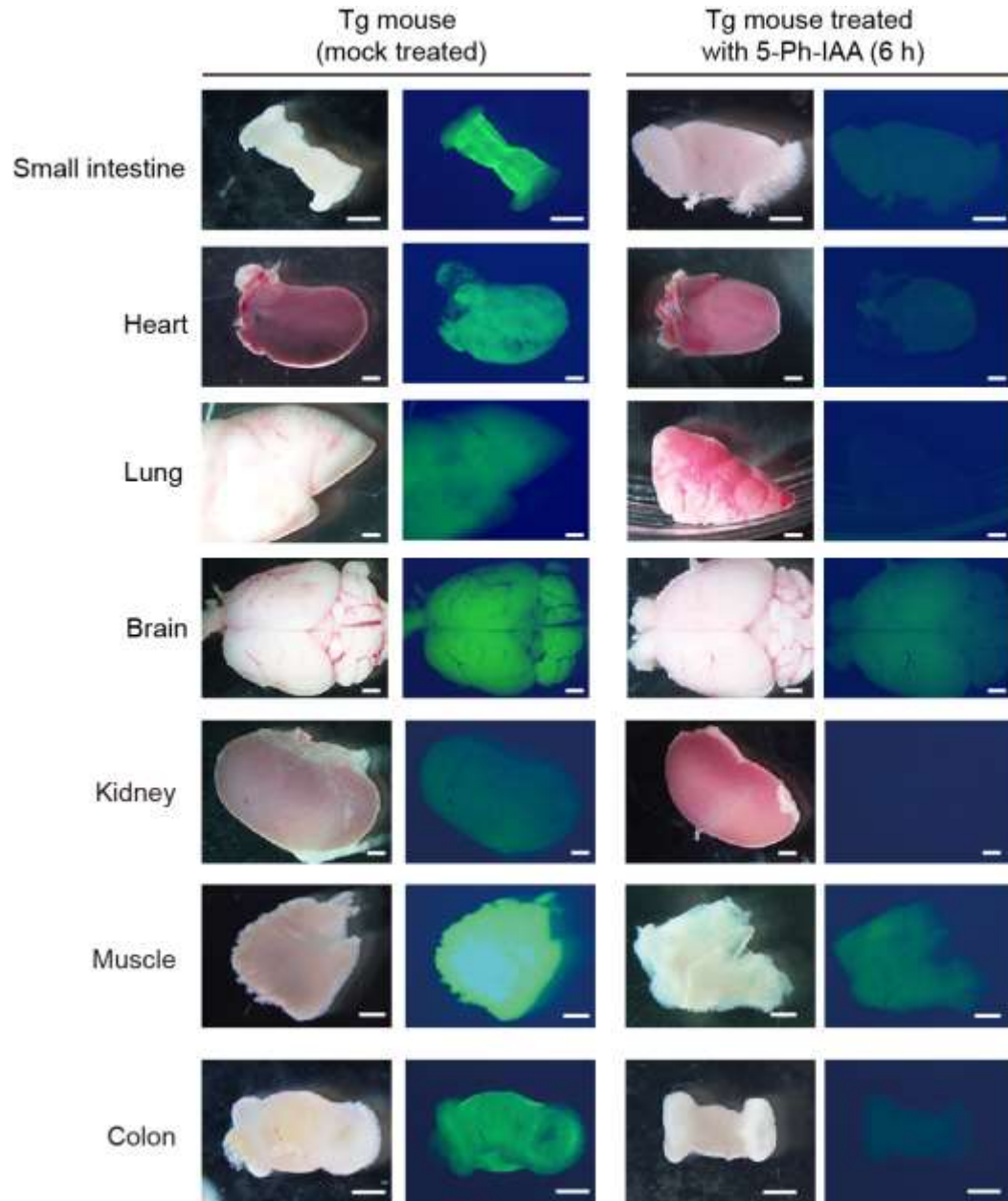


	Injected zygotes	Transferred embryos	Born pups	Tg+	GFP+
OsTIR1(WT)-P2A -mAID-EGFP	97	84	19	0	0
	206	156	48	0	0
OsTIR1(F74G)-P2A -mAID-EGFP	171	134	23	8	6
	174	148	44	10	6

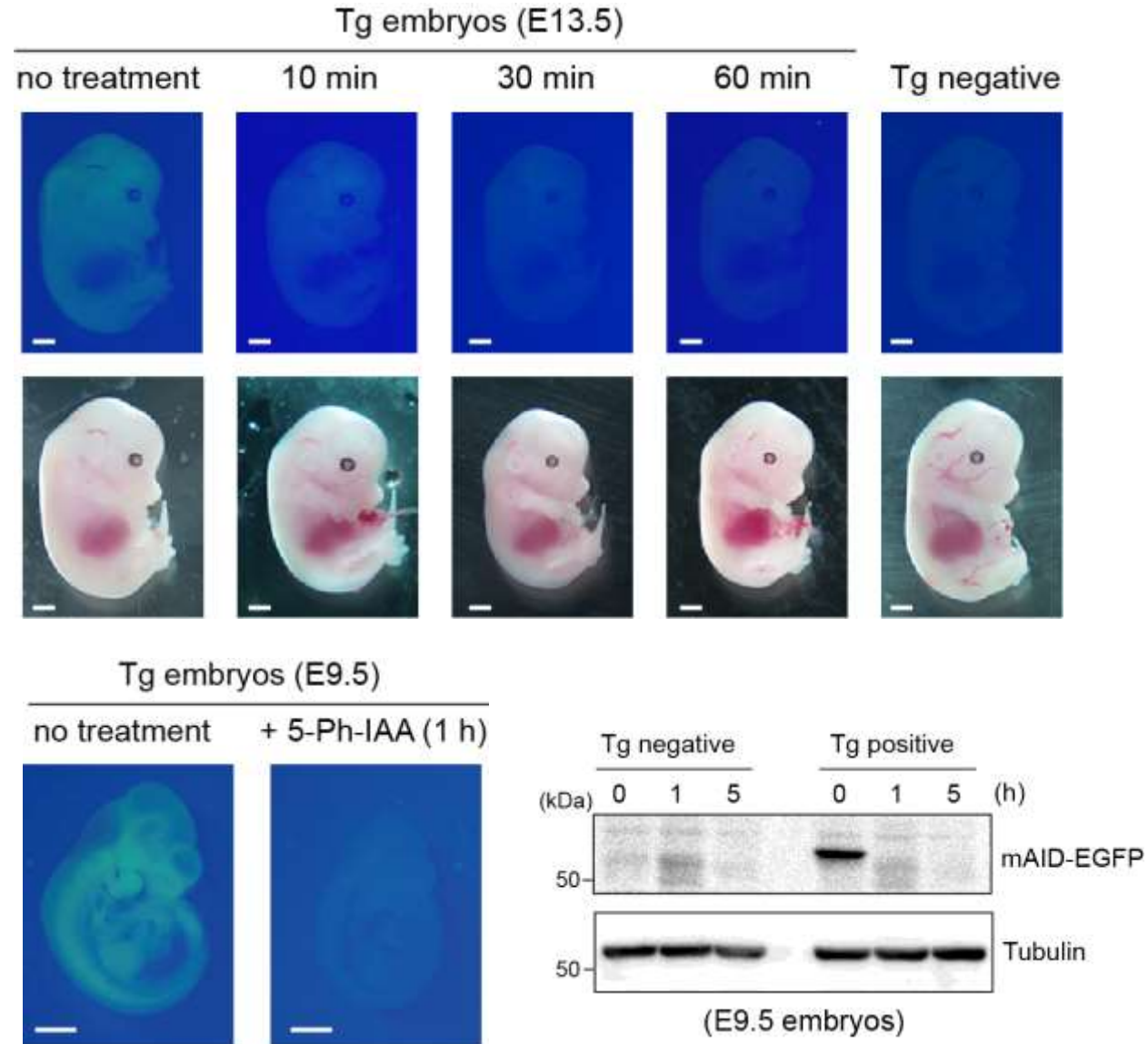


**OsTIR1(WT) を発現するマウスは
作出できないようだ**

トランスジェニックマウスにおける分解誘導



トランスジェニックマウスにおける分解誘導



本技術に関連するオリジナル論文

AID法初出論文

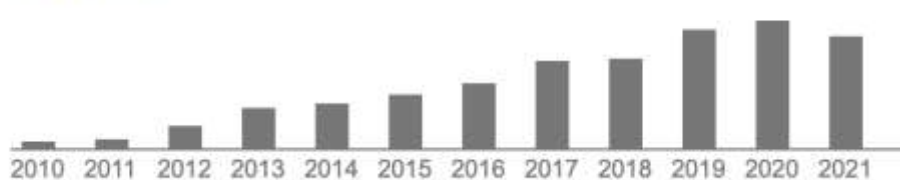
Nature Methods, 2009

An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells

Kohei Nishimura¹, Tatsuo Fukagawa², Haruhiko Takisawa¹, Tatsuo Kakimoto¹ & Masato Kanemaki¹

被引用回数 : 1102 (Google Scholar)

総被引用数 引用元 1102



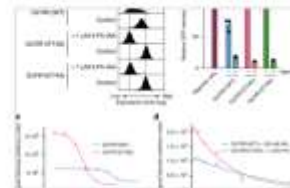
AID2法論文

ARTICLE
OPEN ACCESS
11 NOV 2020
Nature Communications

The auxin-inducible degron 2 technology provides sharp degradation control in yeast, mammalian cells, and mice

Auxin-inducible degron systems can be leaky and require high doses of auxin. Here the authors establish AID2 which uses an OstTIR1 mutant and the ligand 5-Ph-IAA to overcome these problems and establish AID-mediated target depletion in mice.

Aisha Yesbolatova, Yuichiro Saito ... Masato T. Kanemaki



nature communications

View all journals

Search

Login

Explore content

Journal information

Publish with us

nature > nature communications > collection

COLLECTION | 12 MARCH 2021

2020 Top 50 Life and Biological Sciences Articles

We are pleased to share with you the 50 most downloaded *Nature Communications* articles* in the life and biological sciences published in 2020. (Please note we have a separate collection on the [Top 50 SARS-CoV-2 papers](#).) Featuring authors from around the world, these... [show more](#)



2020年Nature Communicationsライフサイエンス部門
高ダウンロード論文12位

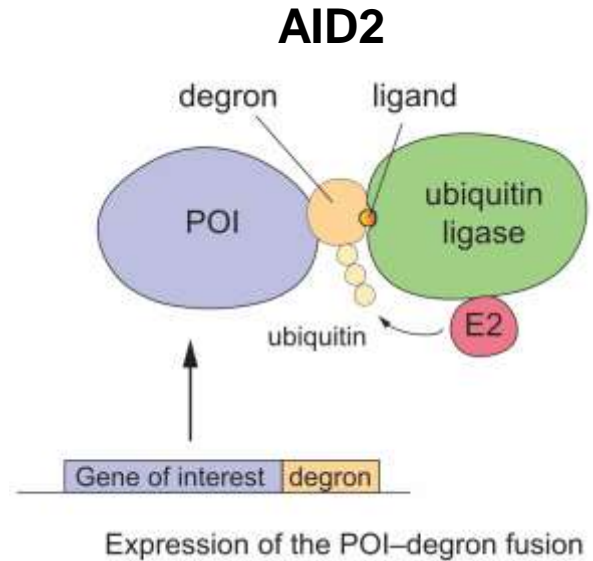
新技術の特徴・従来技術との比較

1. ゲノム編集を利用した遺伝学的改変により、様々なタンパク質の発現操作が可能
2. 圧倒的な迅速分解除去（半減期30分以下）と可逆性
3. 培養細胞のみならず、マウス個体、酵母、線虫にも応用可能

役立つと予想される研究領域

- 基礎生命科学、合成生物学
- 創薬（特に標的タンパク質分解薬関連）
- 脳科学研究分野
- 疾患モデル動物

標的タンパク質分解薬（PROTACs, SNIPER等） 開発への利用例



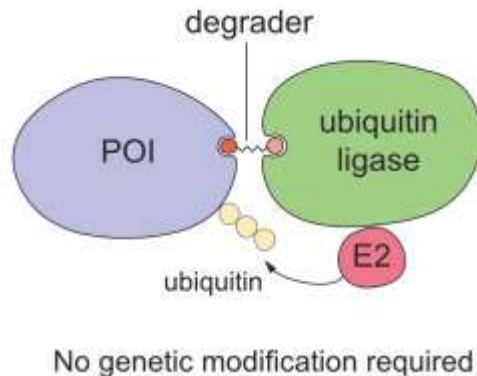
AID2を利用すれば、遺伝学的改変により数多くの標的タンパク質のvalidationが可能になる



確実な標的タンパク質の発見



タンパク質分解薬



化合物を最適化して標的タンパク質分解薬を開発

本技術に関する知財状況、分与実績

AID技術関連特許

- 海外：4件（US/欧州出願 各1件、PCT出願中3件）
- 国内：7件（査定済4件、出願中3件）

企業との契約締結

- 海外：4社
- 国内：9社

大手製薬企業との有償MTA、ライセンス契約、共同研究契約締結および交渉実績

大学、研究機関への分譲実績

- Addgene（米国のプラスミド分譲機関）からアカデミアに配布中（これまで**3700件以上**の分譲実績）

企業への期待

- 有償MTAおよびライセンスによるAID2技術の使用
- AID2関連製品（プラスミド、関連試薬、AID細胞）の共同開発、販売
- AID2技術の共同開発（幹細胞、マウスへの応用）

お問い合わせ先

国立遺伝学研究所
産学連携・知的財産室

chizai@nig.ac.jp

Tel: 055-981-5831