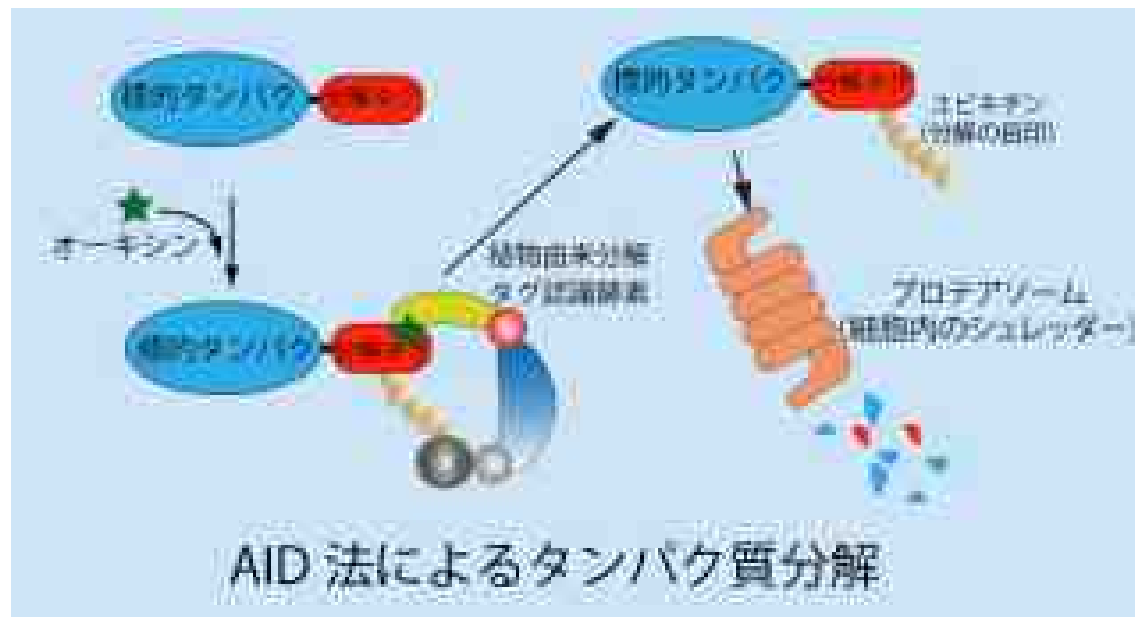


# 植物ホルモンを利用してヒト細胞の タンパク質を迅速に発現制御する : オーキシンデグロン (AID) 技術



国立遺伝学研究所  
分子細胞工学研究部門  
教授・鐘巻将人

すかぢ  
PRESTO  
新技術説明会  
New Technology Presentation Meetings!

# ヒト細胞に必須な遺伝子

Resource

Cell, Dec. 2015

High-Resolution CRISPR  
Screens Reveal Fitness Genes  
and Genotype-Specific Cancer Liabilities

David Holt, Wang (Correspondence), ... (List of authors)

Science, Nov. 2015

Identification and characterization  
of essential genes in the  
human genome

Tim Wang, ... (List of authors)

Science, Nov. 2015

Gene essentiality and synthetic  
lethality in haploid human cells

Thomas A. Brown, ... (List of authors)

ヒト細胞の全遺伝子数:

17,661



コア必須遺伝子: 1,500 (8%)

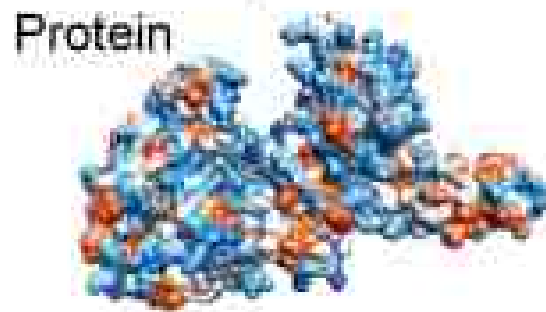


必須遺伝子はロックアウト不可。  
よってコンディショナルシステムが必須！  
また、コンディショナルシステムは全ての  
細胞生物学研究に有用。

# 従来のコンディショナル技術



Transcription



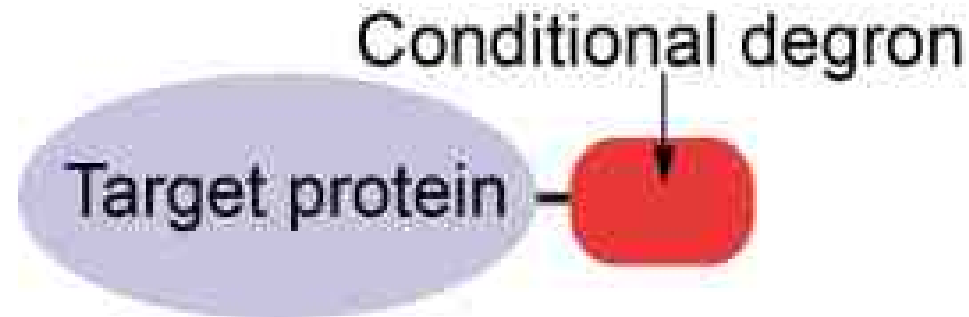
Recombinase-mediated KO  
(e.g. Cre-LoxP)

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

si/shRNA  
Morpholinos

**Degron technology**

# デグロン技術の特徴と利点



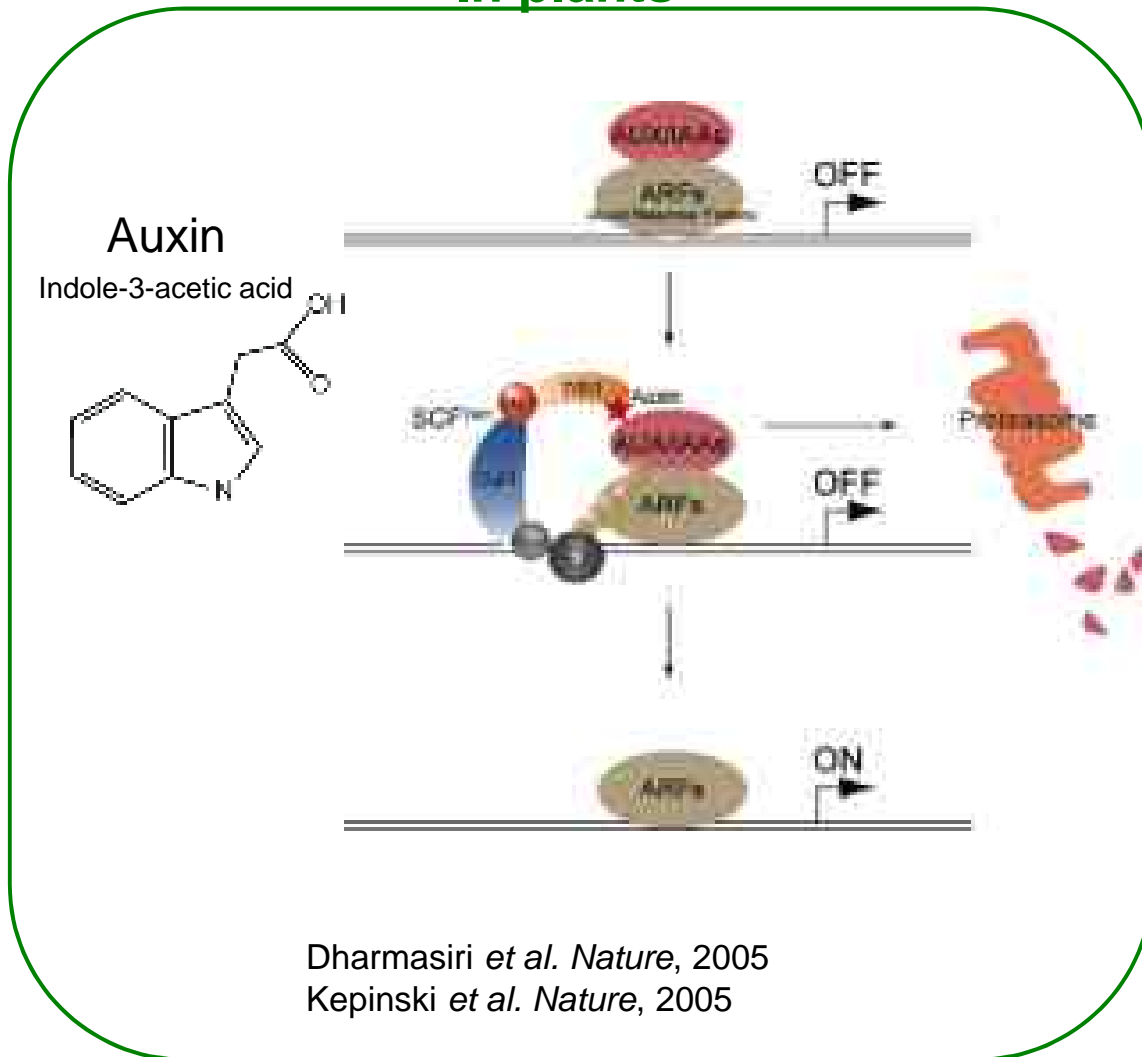
## タンパク質レベルの発現調節技術

- 迅速性
- 可逆性
- 調節性
- オフターゲットが無い

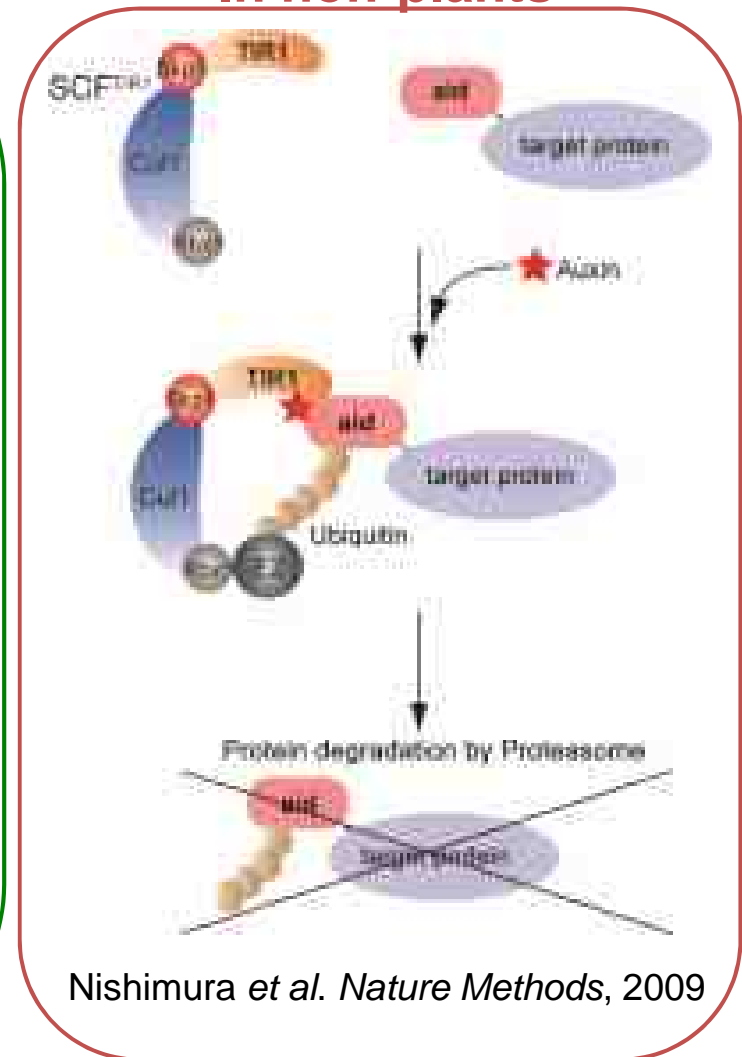
# オーキシングレグロン (AID) 技術の概念

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

In plants



In non-plants



# AID技術は酵母の研究において すでに広く使われている

Nature Methods, Dec, 2009

ARTICLES

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

Kohei Nishimura<sup>1</sup>, Tatsuo Fukagawa<sup>2</sup>, Haruhiko Takisawa<sup>1</sup>, Tatsuo Kakimoto<sup>1</sup> & Masato Kanemaki<sup>1</sup>

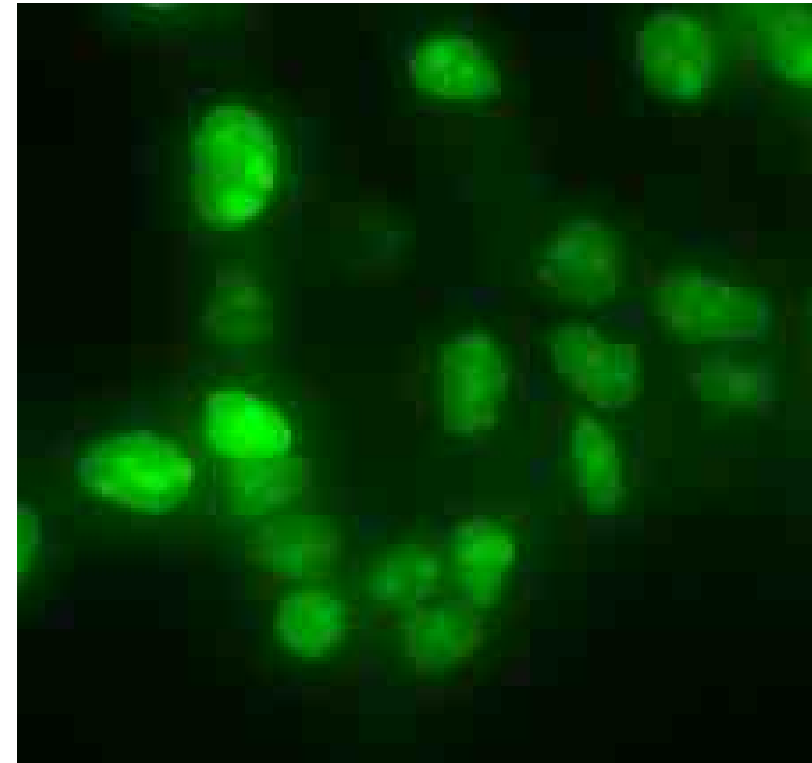
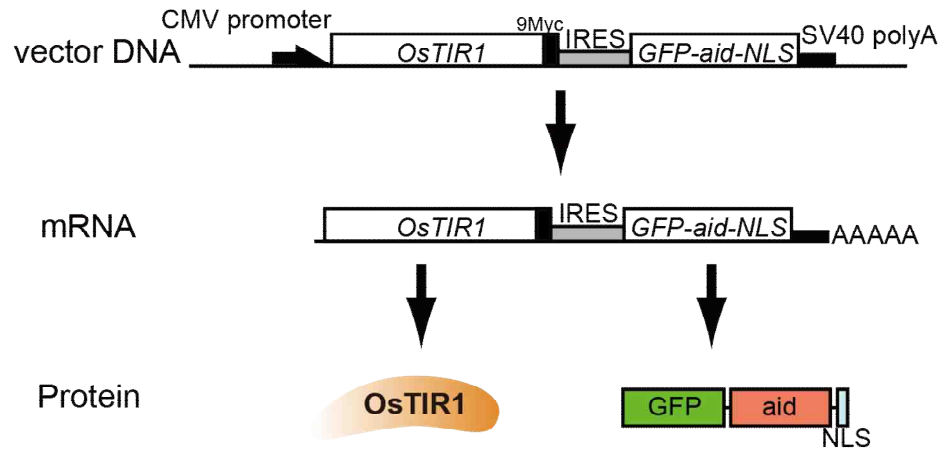
被引用回数: 307 (Google Scholars)

### National Bio-Resource (Yeast)

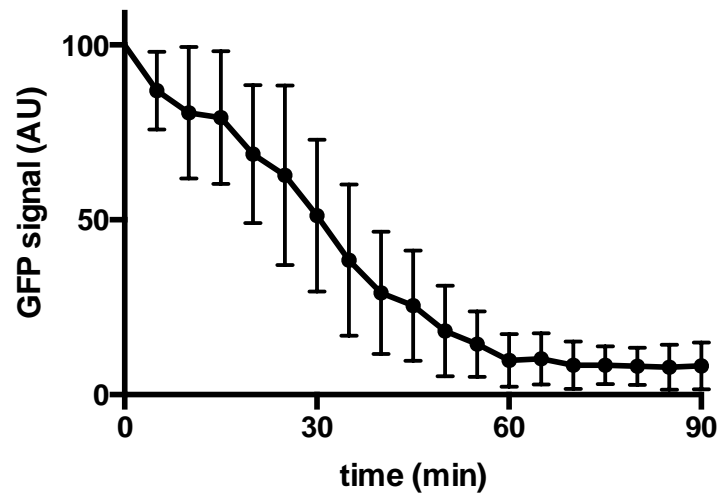
Fiscal year	Plasmid	Strain
2010	172	84
2011	114	23
2012	183	51
2013	232	55
2014	189	172
Total	890	114

Fiscal year	Request rank
2010	1 ~ 8, 10
2011	1 ~ 8
2012	All top 10
2013	1 ~ 9
2014	All top 10

# AID技術はヒト細胞でも機能する

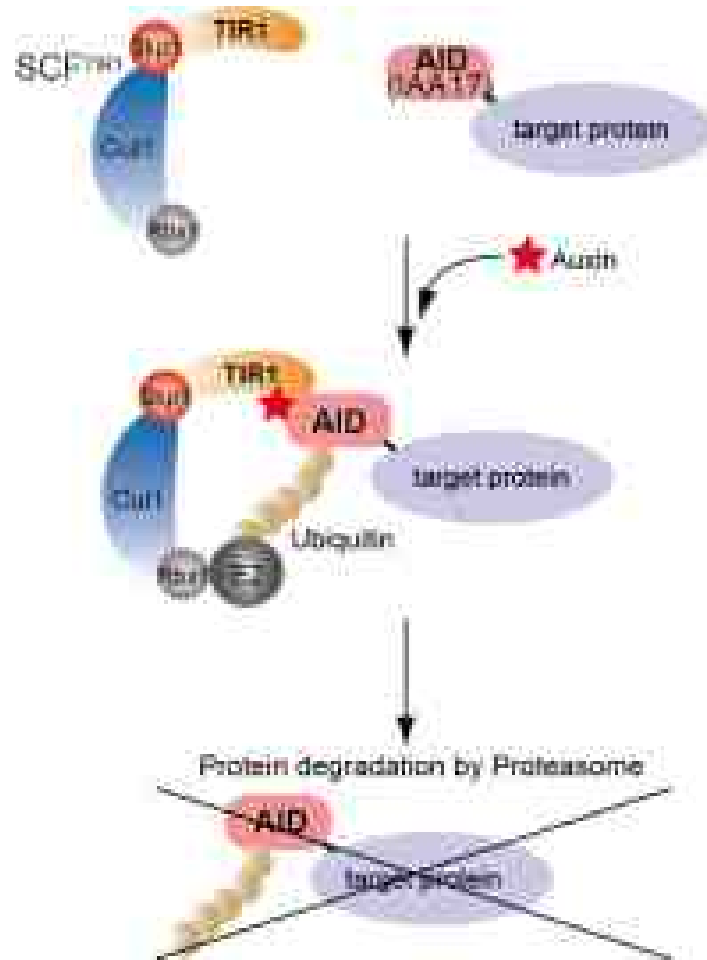


293 cell (Random integration)



# ヒト細胞でAID技術を利用するには？

The auxin-inducible degron (**AID**) system



ヒト細胞における、内在性遺伝子(タンパク質)のタグ付加は難しかった。

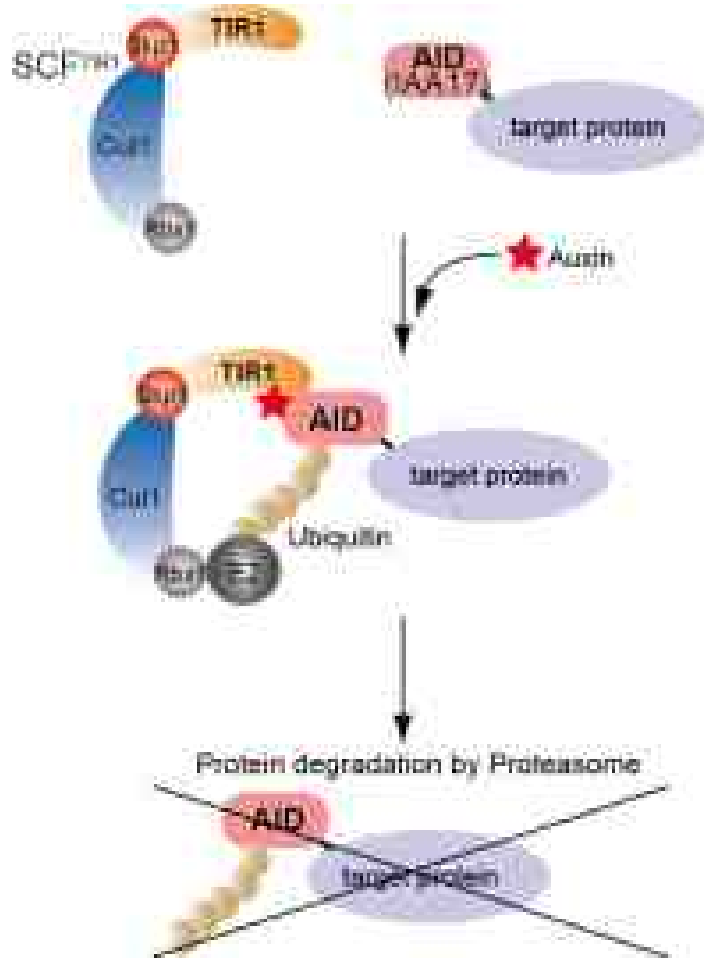
Nishimura et al. Nature Methods, 2009



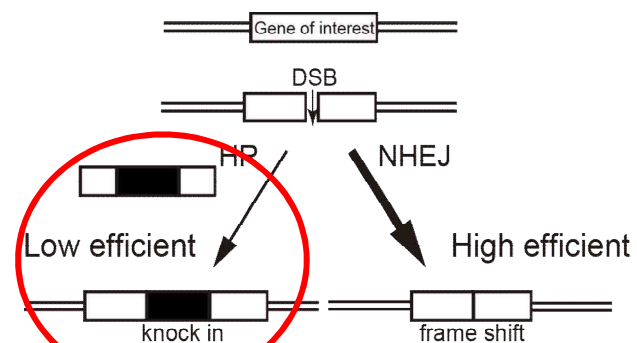
# ヒト細胞でAID技術を利用するには？

The auxin-inducible degtron (**AID**) system

Gene editing by CRISPR-CAS

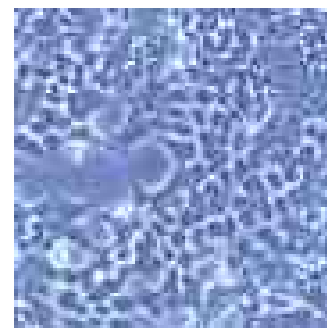


Nishimura et al. Nature Methods, 2009



Cong et al. Science, 2013

Mali et al. Science, 2013



1. Human diploid cell line
2. Efficient in knock-in

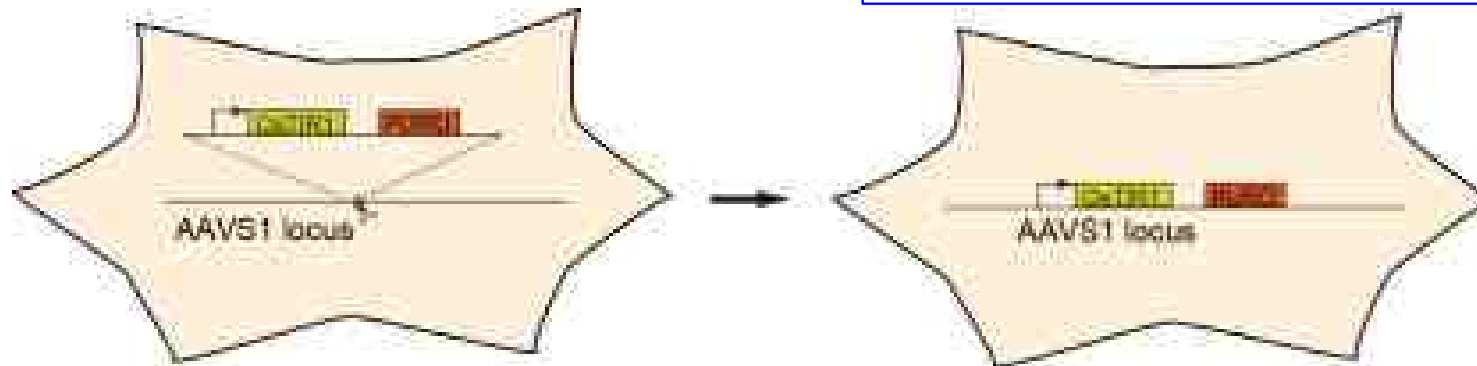


human colon cancer  
**HCT116 cells**

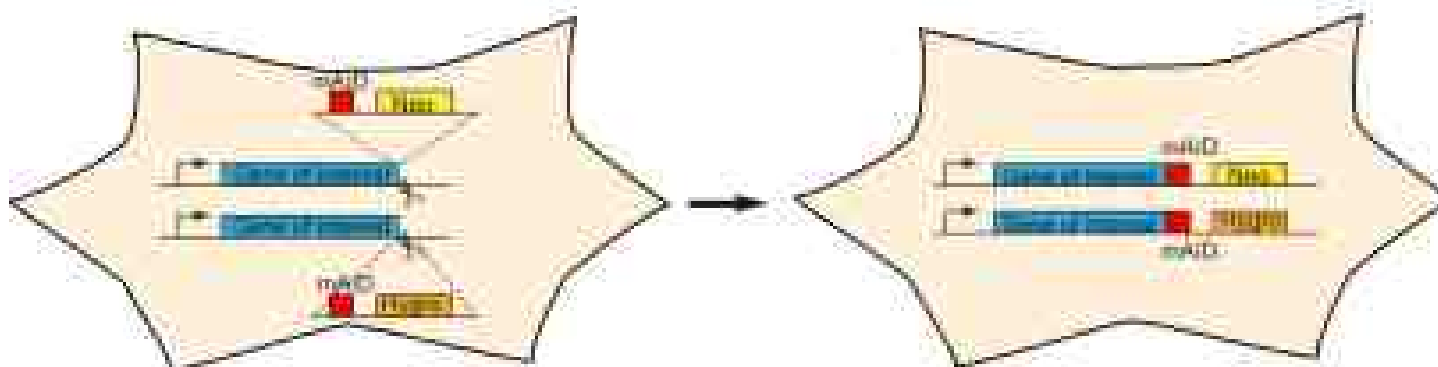
# AID変異細胞をつくる方法

Parental cell

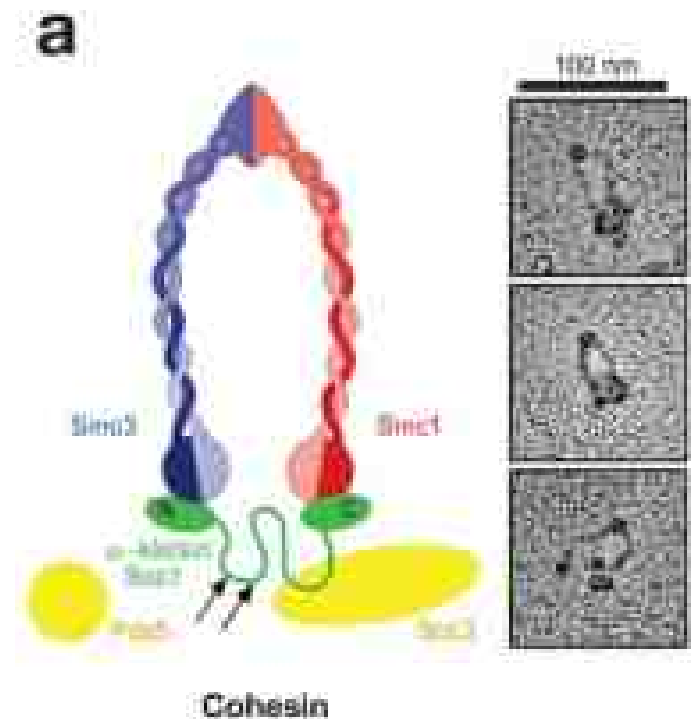
CMV promoter: Constitutive  
Tet promoter: Tet/Dox-dependent



AID mutant

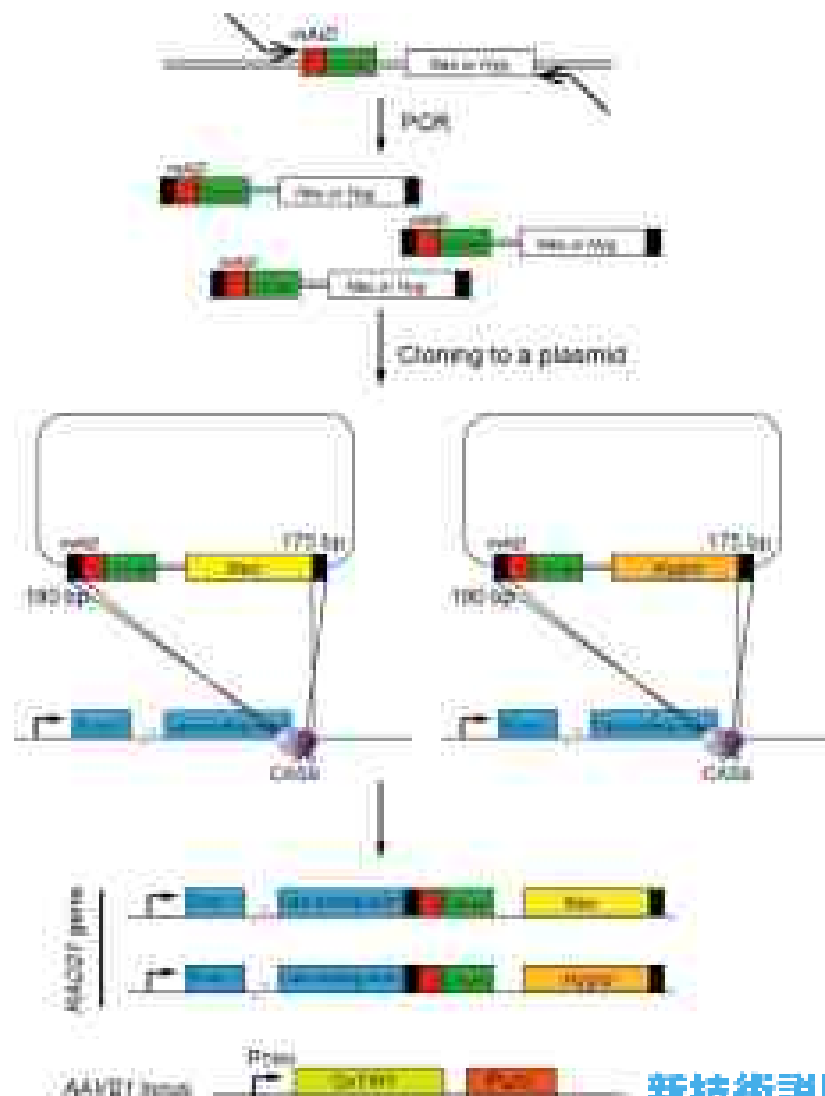


# PCRでタグ付加用コンストラクトをつくる

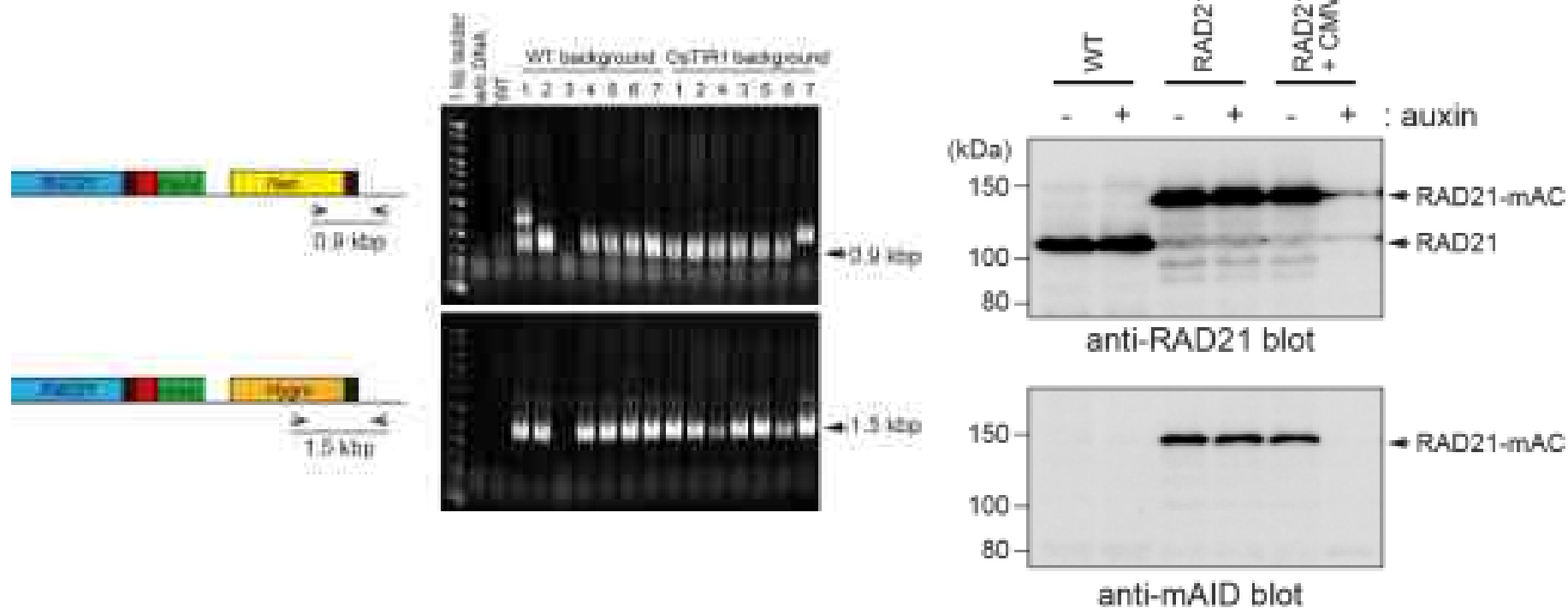


Nasmyth and Haering, Annu. Rev. Biochem., 2005

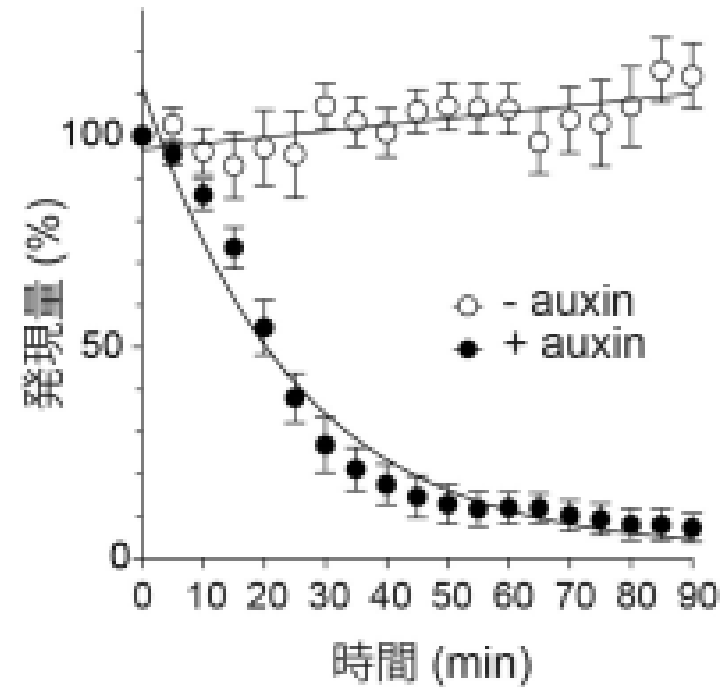
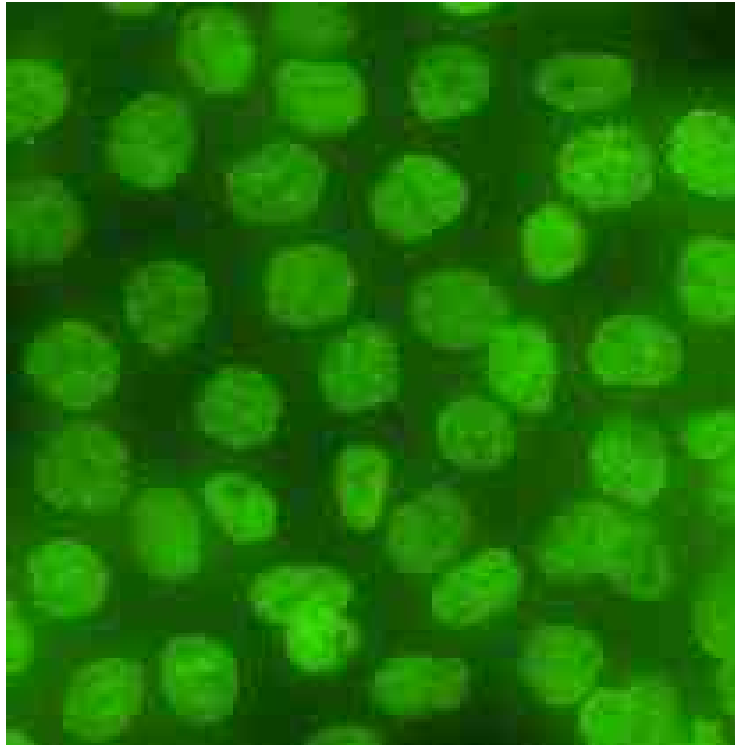
RAD21/SCC1



# ダブルセレクションによる簡単な 両アリルタグ付加

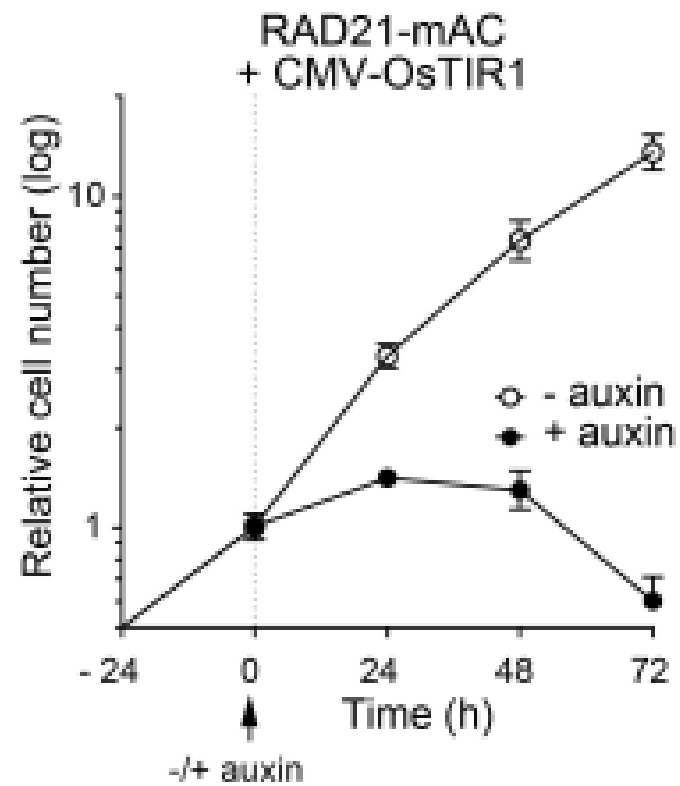


# RAD21(コヒーシン)の迅速な分解

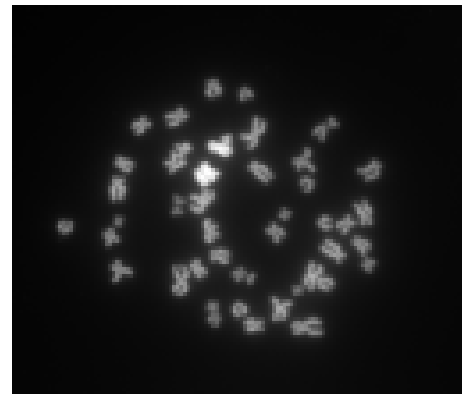


半減期 = 17 min

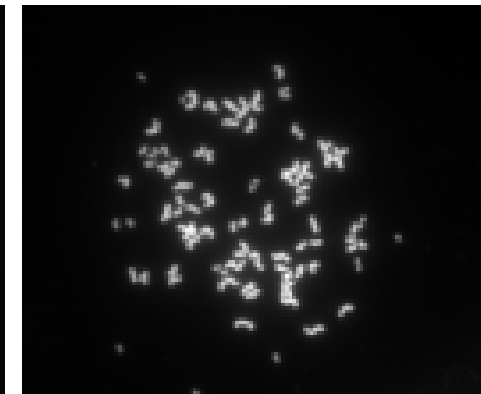
# RAD21(コヒーシン)変異細胞の表現系



- auxin

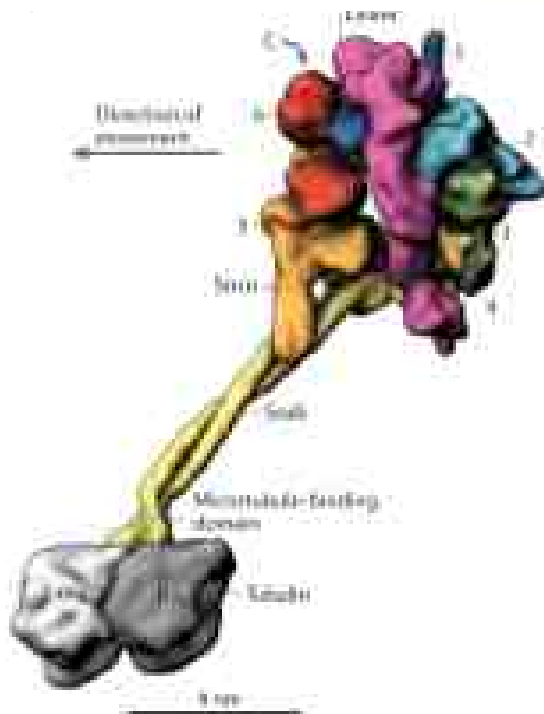
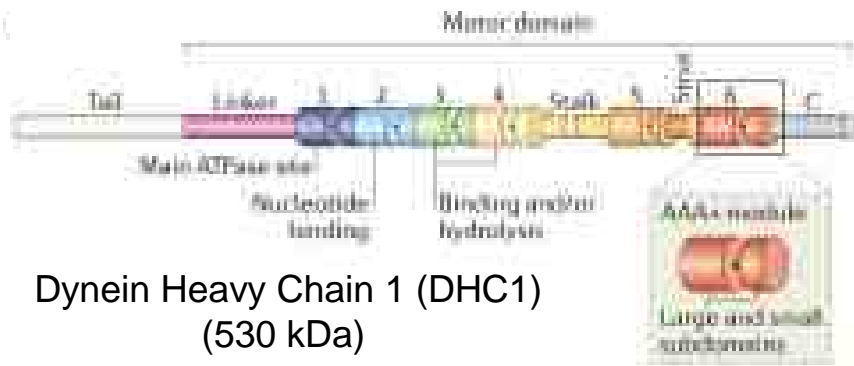


+ auxin

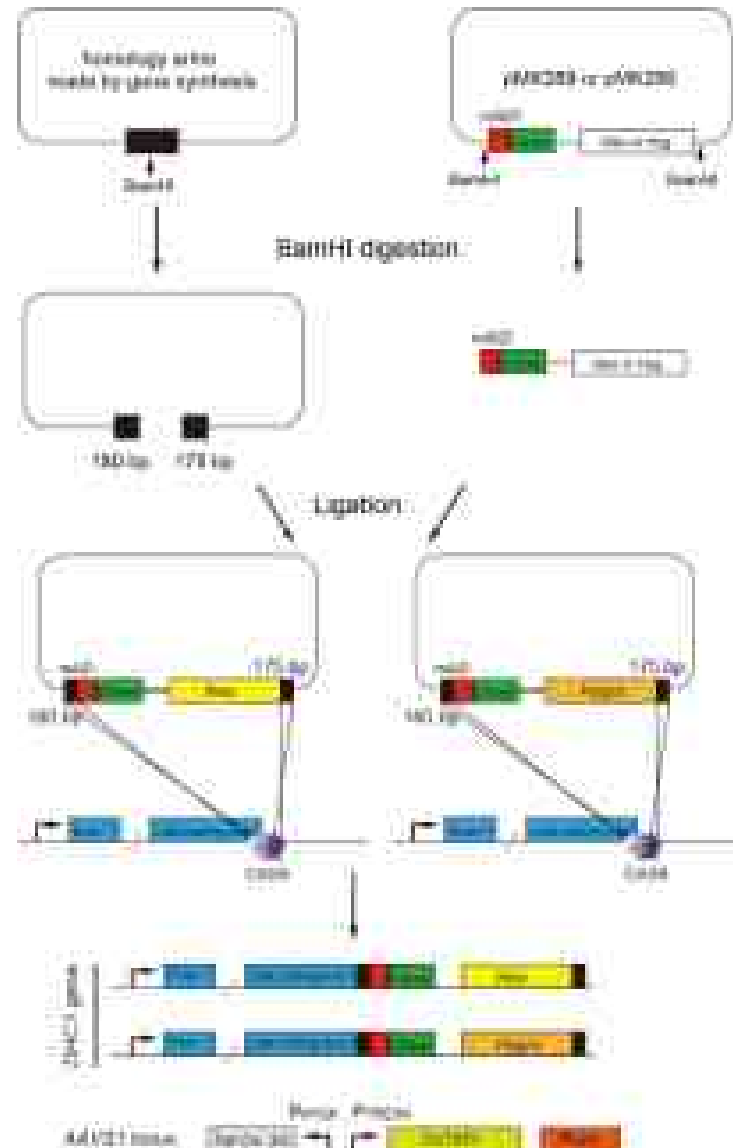


1 h treatment

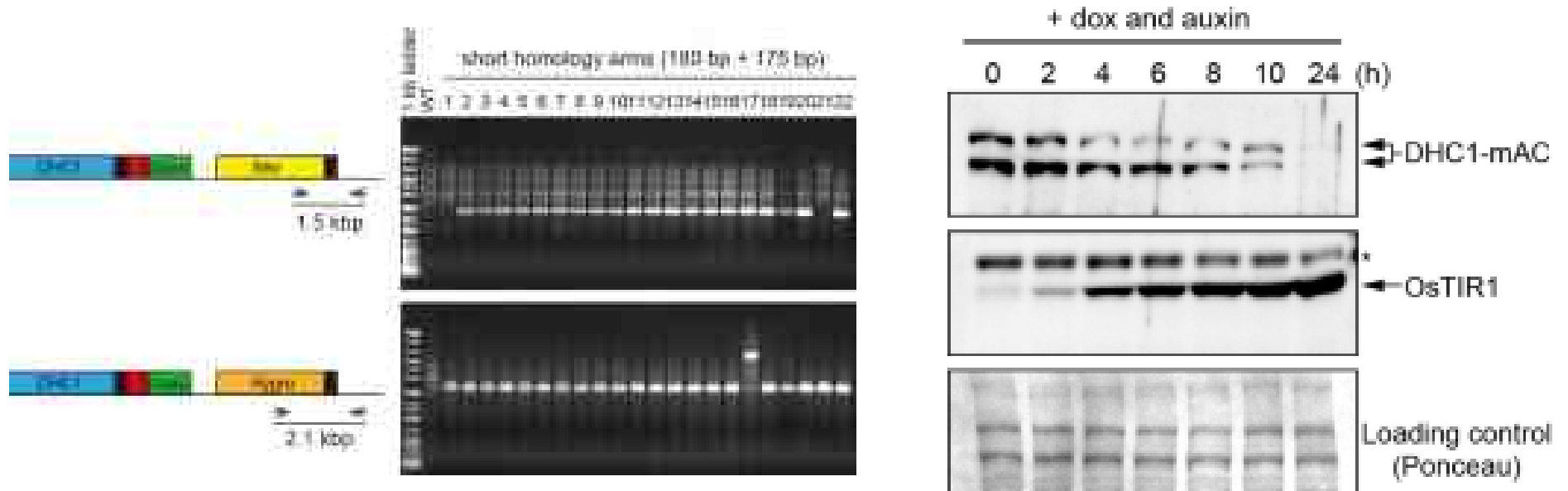
# DHC1 (細胞質ダイニン) 変異細胞作成



Roberts et al. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013

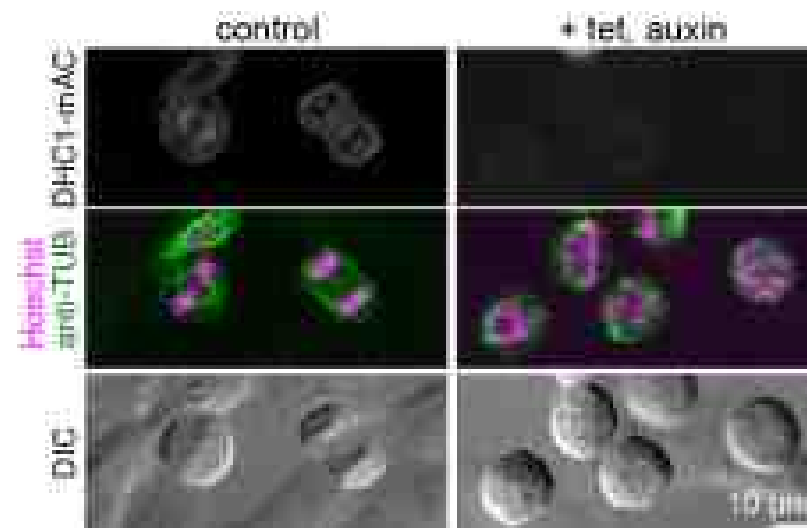
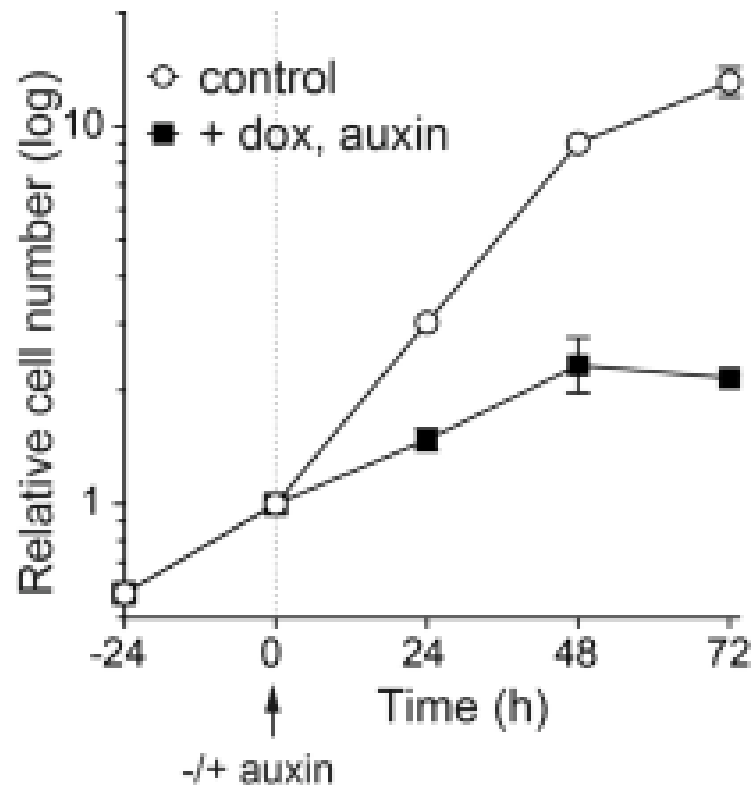


# DHC1 (細胞質ダイニン) 変異細胞作成





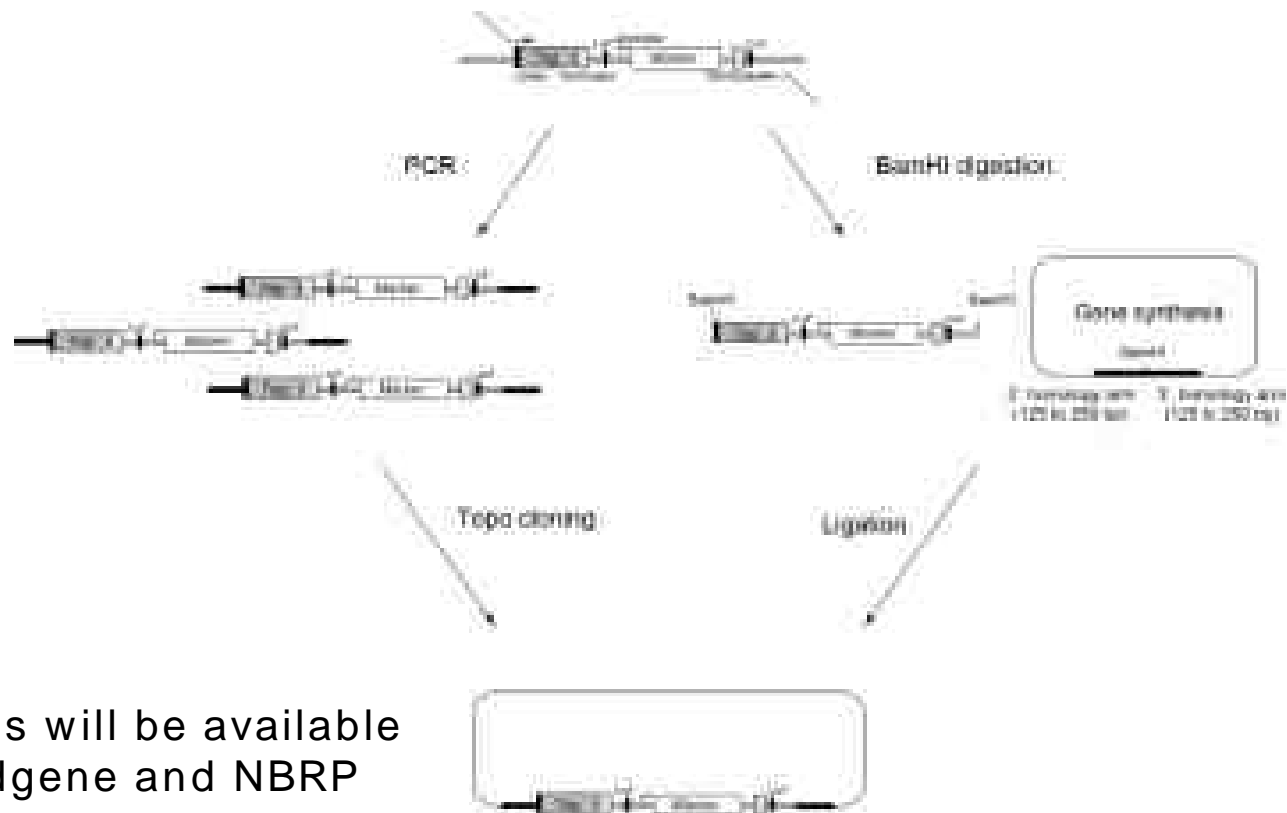
# DHC1 (細胞質ダイニン) 変異細胞の表現系



Collaboration with Dr. Kiyomitsu

# タグ付加用ベクター

Selection marker	Attached tag at the C-terminus					
	mClover	mCherry2	S-tag-3FLAG	mAID	mAID-mClover	mAID-mCherry2
Neo	pMK277	pMK280	pMK283	pMK286	pMK289	pMK292
Hygro	pMK278	pMK281	pMK284	pMK287	pMK290	pMK293
Bar	pMK279	pMK282	pMK285	pMK288	pMK291	pMK294



All plasmids will be available from Addgene and NBRP

# AID技術： ゲノム編集によるノックアウトの次の技術



Natsume et al. Cell Reports  
5<sup>th</sup> of April, 2016

<b>CRISPR-Cas</b>	遺伝子ノックアウト (恒常的発現喪失) 塩基改変
<b>siRNA</b>	発現抑制 (遅い、効率、オフターゲット)
<b>AID</b>	自由な時間的発現制御 (迅速性、可逆性、特異性)

# AID技術： ゲノム編集によるロックアウトの次の技術

すでに可能なこと

- **AID変異細胞の樹立**  
(通常のヒト培養細胞)

創薬企業、生命科学分野における基礎  
研究利用



Natsume et al. Cell Reports  
5<sup>th</sup> of April, 2016

今後の展開

- ヒトES/iPS細胞への応用
- マウス個体レベルにおけるAID  
技術の利用

再生医療研究分野への利用

# AID技術の知財状況、分与実績

## AID技術関連特許

- 海外: 2件 (US仮出願中1件、PCT出願中1件)
- 国内: 4件 (査定済3件、出願中1件)

## 企業との契約締結

- 海外: 1件
- 国内: 4件

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) から配布中(8ヶ月で約400件以上の分譲実績)
- 国内: NBRPにプラスミド寄託。近年連続してリクエスト数トップ10をほぼ独占

# 企業への期待

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

# お問い合わせ先

国立遺伝学研究所

知的財産室

室長・鈴木睦昭

e-mail: [chizai@nig.ac.jp](mailto:chizai@nig.ac.jp)

Tel: 055-981-5831