

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02170

研究課題名（和文）オーキシンドグロン技術のケミカルバイオロジー基盤開発

研究課題名（英文）Improvement of the AID technology through chemical biology approaches

研究代表者

鐘巻 将人（KANEMAKI, MASATO）

国立遺伝学研究所・遺伝メカニズム研究系・教授

研究者番号：20444507

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：オーキシンドグロン（AID）法は、植物由来のユビキチンリガーサブユニットTIR1を異種細胞に導入することにより、植物AUX/IAA由来デグロンを付加したタンパク質をオーキシン添加により分解除去することを可能にした。AID法における問題は、デグロン付加したタンパク質がオーキシン非添加時においても弱い分解を受けることであった。

本研究費を利用してAID法の改良をおこなった。変異型TIR1と新たなリガンドを利用することにより、従来の問題点を克服したAID2を開発することに成功した。さらに、AID2は細胞のみならず、マウス個体にも応用可能であることを示した。本研究成果を論文公表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AID2を確立できたことにより、タンパク質分解による発現制御を細胞から個体まで応用できることを示した。タンパク質分解に基づく発現制御は、ごく短時間に標的タンパク質の発現を抑制できるために、標的タンパク質除去直後に起きる影響を観察できる。また、この分解は可逆的であるため、再発現も可能である。本技術は細胞から個体を用いた基礎研究の貢献できるのみならず、創薬における実証実験や疾患モデル動物作成に役立つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：The auxin-inducible degron (AID) method allows the degradation of degron-fused proteins in cells by expressing the plant-derived ubiquitin ligase subunit TIR1 by the addition of auxin. The problem with the AID method is that degron-fused proteins are weakly degraded even without auxin.

To overcome this problem, we improved AID. By using a mutant TIR1 and a new ligand, we succeeded in developing AID2, which overcomes the problem. Furthermore, we showed that AID2 can be applied not only to cells but also to living mice. We have published the results of this research in a paper.

研究分野：分子生物学

キーワード：発現制御 デグロン タンパク質分解

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は植物細胞の分解経路を異種細胞に移植することにより、植物ホルモンオーキシン添加を引き金として、目的タンパク質を分解するオーキシンデグロン(AID)法を開発した(Nishimura et al. Nature Methods, 2009)。本手法は標的タンパク質を迅速に分解除去できることから、さまざまな遺伝学研究に応用できると期待される。研究代表者は本技術を出芽酵母のみならず、ゲノム編集と組み合わせ、ヒト細胞の内在性タンパク質の分解制御を可能にする方法を開発してきた(Natsume et al. Cell Reports, 2016)。

2. 研究の目的

これまでの研究によりゲノム編集によるタグ付加を応用することで、本技術によりヒト細胞内の内在性標的タンパク質を半減期 10~30 分という短時間で分解除去することが可能になった。しかしながら、現在の AID システムでは、空間的発現制御を行うことができない。また、オーキシン非添加時に標的タンパクが弱く分解を受けることがあり、厳密な発現制御の障害となっている。さらには、使用する天然オーキシンインドール酢酸(IAA)は、マウス等に投与すると代謝誘導体が腎毒性を示すため、マウス個体に応用することができない。これら現 AID システムが抱えている問題を、オーキシンアナログを利用したケミカルバイオロジー的手法により克服する。

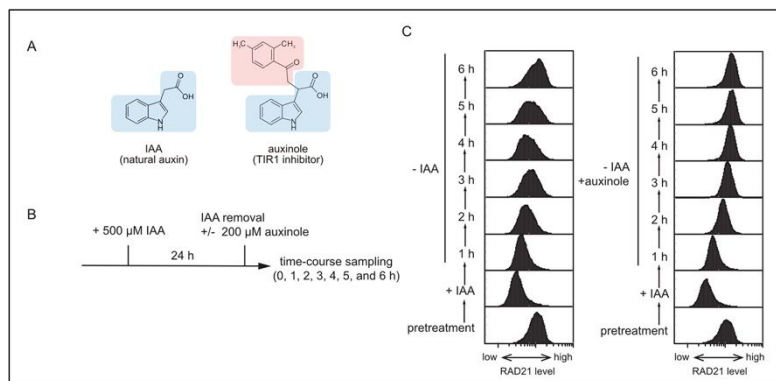
3. 研究の方法

オーキシン非存在下における分解を抑制する目的で、TIR1 に結合する阻害剤を複数合成した。これらは、オーキシンと同様のインドール環を持つため、TIR1 に結合するが、デグロンが結合する部分に付加残基を持つため阻害剤として機能する。複数の阻害剤候補を選択した。

さらに AID 法の改良をすすめ、変異型 OsTYIR1(F74G)とオーキシンアナログ 5-Ph-IAA を用いた改良型システム AID2 の開発をおこなった。

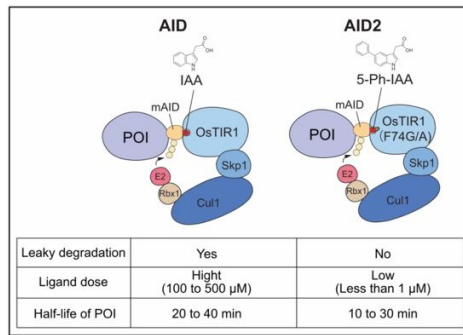
4. 研究成果

阻害剤をスクリーニングした結果、植物でもっとも阻害効果が高いことが知られている、auxinole が培養細胞でもっとも阻害効果が高いことが明らかになった。培地に auxinole を添加することにより、TIR1 によるオーキシン非添加時の分解を抑制することが可能になった。さらに、分解誘導後オーキシンを除去して発現回復を行う際に、auxinole を添加すると発現回復が早まることも見出した(下図)。

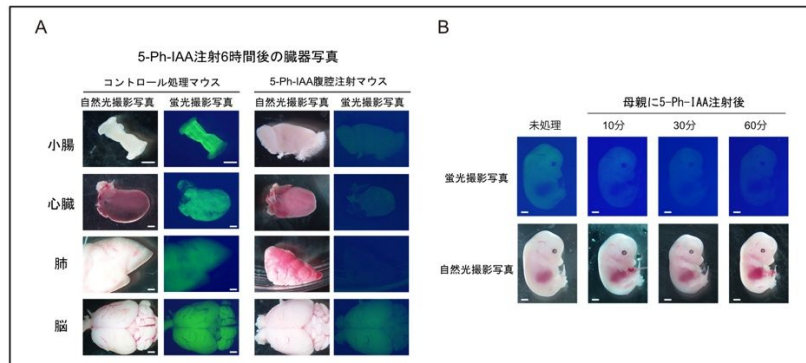


これは、オーキシン除去後も TIR1 がしばらく継続して分解を続けているが、この継続的分解を阻害することによって考えられる。auxinole の利用法とデグロンタグの新たな付加方法などの一連の改良をまとめて、論文投稿をおこなった。投稿論文は Methods 誌に公表された(Yesbolatova et al. Methods, 2019)。

本研究で新たに開発した AID2 は従来問題であったリガンド非依存分解が全くなく、従来より 1/600 程度のリガンドでよりシャープな分解を誘導できる。下図に AID と AID2 の違いをまとめた。



さらに AID2 は従来の細胞レベルでの使用にとどまらず、マウス個体における分解誘導を可能とした（下図）。



これらの研究成果をまとめて、Nature Communications に論文発表した（Yesbolatova et al. Nature Communications, 2020）。一連の研究により、AIDの問題点を克服したAID2の開発に成功し、本技術を細胞のみならず動物個体に応用するための基礎技術を確立することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 18件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 14件）

1. 著者名 Yesbolatova Aisha, Natsume Toyoaki, Hayashi Ken-ichiro, Kanemaki Masato T.	4. 巻 164-165
2. 論文標題 Generation of conditional auxin-inducible degron (AID) cells and tight control of degron-fused proteins using the degradation inhibitor auxinole	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods	6. 最初と最後の頁 73 ~ 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymeth.2019.04.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yesbolatova Aisha, Tominari Yusuke, Kanemaki Masato T.	4. 巻 31
2. 論文標題 Ligand-induced genetic degradation as a tool for target validation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Drug Discovery Today: Technologies	6. 最初と最後の頁 91 ~ 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ddtec.2018.11.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida Satoko, Tsuchiya Yuki, Ohta Midori, Gupta Akshari, Shiratsuchi Gen, Nozaki Yuka, Ashikawa Tomoko, Fujiwara Takahiro, Natsume Toyoaki, Kanemaki Masato T., Kitagawa Daiju	4. 巻 132
2. 論文標題 HsSAS-6-dependent cartwheel assembly ensures stabilization of centriole intermediates	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 217521 ~ 217521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.217521	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakano Risako, Ihara Naoki, Morikawa Shota, Nakashima Ai, Kanemaki Masato T., Ikegaya Yuji, Takeuchi Haruki	4. 巻 30
2. 論文標題 Auxin-mediated rapid degradation of target proteins in hippocampal neurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 NeuroReport	6. 最初と最後の頁 908 ~ 913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/WNR.0000000000001299	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hustedt Nicole, Saito Yuichiro, Zimmermann Michal, Alvarez-Quilon Alejandro, Setiাপutra Dheva, Adam Salome, McEwan Andrea, Yuan Jing Yi, Olivieri Michele, Zhao Yichao, Kanemaki Masato T., Jurisicova Andrea, Durocher Daniel	4. 巻 33
2. 論文標題 Control of homologous recombination by the HROB-MCM8-MCM9 pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes & Development	6. 最初と最後の頁 1397 ~ 1415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/gad.329508.119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Akagawa Remi, Trinh Hai Thanh, Saha Liton Kumar, Tsuda Masataka, Hirota Kouji, Yamada Shintaro, Shibata Atsushi, Kanemaki Masato T., Nakada Shinichiro, Takeda Shunichi, Sasanuma Hiroyuki	4. 巻 23
2. 論文標題 UBC13-Mediated Ubiquitin Signaling Promotes Removal of Blocking Adducts from DNA Double-Strand Breaks	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101027 ~ 101027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yesbolatova Aisha, Natsume Toyooki, Hayashi Ken-ichiro, Kanemaki Masato T.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Generation of conditional auxin-inducible degron (AID) cells and tight control of degron-fused proteins using the degradation inhibitor auxinole	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymeth.2019.04.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minamino Masashi, Tei Shoin, Negishi Lumi, Kanemaki Masato T., Yoshimura Atsunori, Sutani Takashi, Bando Masashige, Shirahige Katsuhiko	4. 巻 28
2. 論文標題 Temporal Regulation of ESCO2 Degradation by the MCM Complex, the CUL4-DDB1-VPRBP Complex, and the Anaphase-Promoting Complex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 2665 ~ 2672.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2018.06.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yesbolatova Aisha, Kanemaki Masato T.	4. 巻 14
2. 論文標題 TAGing for destruction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 414 ~ 415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-018-0024-5	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Platani Melpomeni, Samejima Itaru, Samejima Kumiko, Kanemaki Masato T., Earnshaw William C.	4. 巻 131
2. 論文標題 Seh1 targets GATOR2 and Nup153 to mitotic chromosomes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs213140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.213140	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Okamoto Yusuke, Iwasaki Watal M, Kugou Kazuto, Takahashi Kazuki K, Oda Arisa, Sato Koichi, Kobayashi Wataru, Kawai Hidehiko, Sakasai Ryo, Takaori-Kondo Akifumi, Yamamoto Takashi, Kanemaki Masato T, Taoka Masato, Isobe Toshiaki, Kurumizaka Hitoshi, Innan Hideki, Ohta Kunihiro, Ishiai Masamichi, Takata Minoru	4. 巻 46
2. 論文標題 Replication stress induces accumulation of FANCD2 at central region of large fragile genes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 2932 ~ 2944
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gky058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yesbolatova Aisha, Tominari Yusuke, Kanemaki Masato T.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Ligand-induced genetic degradation as a tool for target validation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Drug Discovery Today: Technologies	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ddtec.2018.11.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takagi Masatoshi, Ono Takao, Natsume Toyoaki, Sakamoto Chiyomi, Nakao Mitsuyoshi, Saitoh Noriko, Kanemaki Masato T., Hirano Tatsuya, Imamoto Naoko	4. 巻 131
2. 論文標題 Ki-67 and condensins support the integrity of mitotic chromosomes through distinct mechanisms	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs212092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.212092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Samejima Kumiko, Booth Daniel G., Ogawa Hiromi, Paulson James R., Xie Linfeng, Watson Cara A., Platani Melpomeni, Kanemaki Masato T., Earnshaw William C.	4. 巻 131
2. 論文標題 Functional analysis after rapid degradation of condensins and 3D-EM reveals chromatin volume is uncoupled from chromosome architecture in mitosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs210187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.210187	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Takahashi Akiko, Okada Ryo, Nagao Koji, Kawamata Yuka, Hanyu Aki, Yoshimoto Shin, Takasugi Masaki, Watanabe Sugiko, Kanemaki Masato T., Obuse Chikashi, Hara Eiji	4. 巻 9
2. 論文標題 Publisher Correction: Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 06613-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-06613-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamano Koji, Wang Chunxin, Sarraf Shireen A, Munch Christian, Kikuchi Reika, Noda Nobuo N, Hizukuri Yohei, Kanemaki Masato T, Harper Wade, Tanaka Keiji, Matsuda Noriyuki, Youle Richard J	4. 巻 7
2. 論文標題 Endosomal Rab cycles regulate Parkin-mediated mitophagy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 eLife.31326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.31326	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Okumura Masako, Natsume Toyoaki, Kanemaki Masato T, Kiyomitsu Tomomi	4. 巻 7
2. 論文標題 Dynein-Dynactin-NuMA clusters generate cortical spindle-pulling forces as a multi-arm ensemble	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 eLife.36559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.36559	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kuscu Cem, Mammadov Rashad, Czikora Agnes, Unlu Hayrunnisa, Tufan Turan, Fischer Natasha Lopes, Arslan Sevki, Bekiranov Stefan, Kanemaki Masato, Adli Mazhar	4. 巻 431
2. 論文標題 Temporal and Spatial Epigenome Editing Allows Precise Gene Regulation in Mammalian Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 111 ~ 121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2018.08.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Goto Hidemasa, Natsume Toyoaki, Kanemaki Masato T., Kaito Aika, Wang Shujie, Gabazza Esteban C., Inagaki Masaki, Mizoguchi Akira	4. 巻 132
2. 論文標題 Chk1-mediated Cdc25A degradation as a critical mechanism for normal cell cycle progression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs223123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.223123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Masato Kanemaki
2. 発表標題 The Auxin-Inducible Degron (AID) system as a tool for target validation
3. 学会等名 TPD Forum Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masato Kanemaki
2. 発表標題 MCMBP is an MCM chaperon protecting the MCM subunits from degradation
3. 学会等名 CSHL meeting on eukaryotic DNA replication and genome maintenance (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masato Kanemaki
2. 発表標題 Auxin-inducible degron (AID) technology for rapid protein depletion in human cells
3. 学会等名 日本遺伝学会 国際シンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masato Kanemaki
2. 発表標題 The Auxin-Inducible Degron (AID) system as a tool for target validation
3. 学会等名 TPD summit in Boston (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鐘巻将人
2. 発表標題 MCMBP is an MCM chaperon protecting the MCM subunits from degradation
3. 学会等名 3Rワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鐘巻将人
2. 発表標題 オーキシンドェグロン技術を標的タンパク質誘導分解薬開発に利用する
3. 学会等名 日本分子生物学会 ワークショップ3AW-19 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masato Kanemaki
2. 発表標題 Rapid protein depletion in human cells by the auxin-inducible degron technology
3. 学会等名 NIG International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masato Kanemaki
2. 発表標題 A non-canonical DNA replication important for genome maintenance
3. 学会等名 Okazaki Fragment Memorial Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 鐘巻将人	4. 発行年 2018年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 5
3. 書名 生物の科学遺伝 ヒト疾患とモデル生物：ヒト培養細胞を用いた解析	

1. 著者名 鐘巻将人	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 2
3. 書名 実験医学 2018年 6月号：抗体による内在性タンパク質分解除去	

1. 著者名 鐘巻将人	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 2
3. 書名 実験医学 2018年 12月号：複製フォークの異常が自己炎症性疾患を引き起こす	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 オーキシンドグロンシステムのキット、およびその使用	発明者 鐘巻将人、林謙一郎	権利者 大学共同利用機 関法人情報・シ ステム研究機
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-131464	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>オーキシンドグロン(AID)法のためのCRISPR/Cas9を利用した新規タグ導入と分解阻害剤の開発 https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2019/05/research-highlights_ja/rh20190510.html 遺伝子が転写される際のDNAの「動き」を生きた細胞の中で捉えた! https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2019/03/research-highlights_ja/20190305.html 世界初！光で細胞分裂装置の操作に成功 ～体作りに重要な細胞分裂の仕組みの理解促進に期待～ https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2018/07/research-highlights_ja/20180709.html</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	林 謙一郎 (Hayashi Kenichiro) (30289136)	岡山理科大学・理学部・教授 (35302)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関