

# 幹細胞における迅速なタンパク質発現制御技術の開発

研究代表者

鐘巻将人 国立遺伝学研究所 教授

共同研究者

夏目豊彰 国立遺伝学研究所 助教



## 1. 研究の背景と達成目標

私は植物特異的分解経路を移植することにより、ヒト培養細胞の目的タンパク質分解するオーキシンドグロン (AID) 法を開発しました。AID 法は最も迅速に機能する発現制御技術として、近年世界中で利用が進んでいます。本研究では、マウス ES 細胞およびヒト iPS 細胞などの幹細胞にシステム導入し、さらに CRISPR-Cas9 ゲノム編集を利用した内在性因子への分解タグ付加技術を確立することにより、これら幹細胞において AID 法を利用できるように技術開発をおこないました。さらに幹細胞から、オルガノイド等の組織やマウス個体レベルにおける利用を目指しました。

## 2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・ AID 技術をマウス ES 細胞に導入し、実際に機能させることに成功した。
- ・ 誘導的分解を阻害する阻害剤の開発に成功した (Yesbolatova et al. Methods, 2019)。
- ・ AID 技術を使うための様々なプラスミドツールを開発した。全ての基礎研究者が利用できるようにバイオリソースセンター addgene および RIKEN BRC より分与を開始した。
- ・ AID 技術をマウス個体に応用し、分解誘導できることを示した。

## 3. 研究成果

AID システムをマウス ES 細胞に導入するにあたり、植物由来ユビキチンリガーゼをコードする OsTIR1 遺伝子を ROSA26 領域に導入した。この細胞に AID-GFP をコードするレポータータンパク質を発現させ、その後オーキシンを添加して分解誘導が起きるか検証した (図 1)。その結果、5 時間以内にレポータータンパク質の発現消失を確認することができた。

次に AID システムの分解を誘導するのはオーキシシン (インドール酢酸もしくはナフタレン酢酸) であるが、このインドール酢酸のアナログを合成し、分解阻害剤オーキシノールを作成することに成功した。オーキシシンは OsTIR1 に結合して AID デグロンの結合を仲介するが、オーキシノールは OsTIR1 に結合するが AID デグロンの結合を妨げる機能を持つ (図 2)。これまで開発した AID 関連のプラスミドおよびオーキシノールの利用法をまとめて論文公表した (Yesbolatova et al. Methods, 2019)。プラスミド材料に関しては、

研究者が自由に使えるようにするために、バイオリソース addgene および RIKEN BRC に寄託して配布を開始した。

マウス個体における AID システムの有効性を検証するために、マウスゼノグラフト実験をおこなった。ヒト HCT116 細胞を改変し、内在性 RAD21 遺伝子に AID タグを導入した細胞を作成した。RAD21 は細胞増殖に必須なコヒーシサブユニットをコードするため、この細胞はオーキシシン添加により RAD21 が分解しプレート状で細胞死を引き起こす。この細胞をヌードマウスに接種し 7 日後から人工オーキシシンナフタレン酢酸を静脈注射して腫瘍形成阻害をしらべた。その結果、コントロール細胞 (野生型 HCT116) が形成する腫瘍はオーキシシン投与に影響を受けないが、RAD21 AID 細胞が形成する腫瘍はオーキシシン投

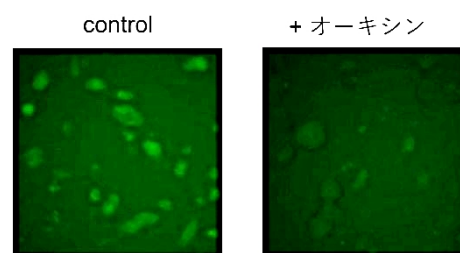


図 1: マウス B6 由来 ES 細胞に OsTIR1 とレポーター(AID-GFP)を導入した。リガンド添加 5 時間後の顕微鏡写真。

与により量依存的な縮小が観察された。これは AID 法がマウス個体でも機能することを示している。

#### 4. 今後の展開

近年、標的蛋白質分解誘導薬(PROTAC またはケミカル分解薬とも呼ばれる)が全く新たな創薬分野として大きな注目を集めている。標的蛋白質分解誘導薬はユビキチンリガーゼに結合する化合物とターゲットタンパク質に結合する化合物をリンカーで繋いだキメラ化合物で、AID 法と類似の方法で分解される。標的蛋白質分解誘導薬は、まだ医薬品として出てきていないが、ほぼ全ての製薬会社が研究開発しており、これまで阻害剤を作ることができなかった転写因子等も標的にできると期待されている。標的蛋白質分解誘導薬を作る上で問題は、化合物の分子量が大きいため合成が難しくたくさんの化合物をライブラリーとして作成することができない。また、作成した標的蛋白質分解誘導薬を検証するための方法がない。AID 技術は遺伝学を利用してタグを付加するだけで、単一のリガンドで分解誘導できることから、標的蛋白質分解誘導薬を開発する現場において、検証実験やターゲットの選択などに役に立つことが期待される。このアイデアはレビュー論文として公表した (Yesbolatova et al. Drug Discovery Today: Technologies, 2018) 。マウスでの改良 AID 法が利用できれば、創薬 (特に標的蛋白質分解誘導薬開発) に大いに役立つことが期待される。今後は創薬現場における AID 技術利用促進を進めるとともに、幹細胞研究分野での利用も働きかけていく。

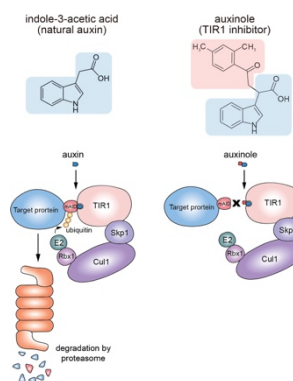


図 2：オーキシンおよびオーキシノールの作用原理。オーキシノールは TIR1 に結合するが、AID デグロンの結合を阻害する。

#### 5. 発表実績

- Generation of Conditional Auxin-Inducible Degron (AID) Cells and Tight Control of Degron-fused Proteins Using the Degradation Inhibitor Auxinole. Yesbolatova A, Natsume T, Hayashi K, \*Kanemaki MT. Methods, advanced online, 2019
- Ligand-Induced Genetic Degradation as a tool for Target Validation. Yesbolatova A, Tominari Y, \*Kanemaki MT. Drug Discovery Today: Technologies, advanced online, 2018
- A Pathway for Mitotic Chromosome Formation. Gibcus JH, Samejima K, Goloborodko A, Samejima I, Naumova N, Nuebler J, Kanemaki MT, Xie L, Paulson JR, \*Earnshaw WC, \*Mirny LA, \*Dekker J. Science, 359, eaao6135, 2018
- Conditional Degrons for Controlling Protein Expression at the Protein Level. Natsume T, \*Kanemaki MT. Annual Review of Genetics, 51, 83-102, 2017

\*責任著者