

「光スイッチ医療創出」プロジェクト

プロジェクトリーダー 佐藤 守俊

【基本構想】

本プロジェクトは、光操作に基づいて新たな医療技術を創出することを目的としている。医薬品として用いられる分子（化合物、ペプチド、抗体、酵素など）や細胞、ウイルス等は、いったん生体の中に入ってしまうと、その働きを生体の外からコントロールするのが極めて困難である。このことが、薬効が高く副作用が低い優れた医薬品を開発する上での大きなハードルとなっている。本プロジェクトでは、乗用車に取り付けられたアクセルやブレーキのように、生体の中に入った医薬品の働きを光で、特に、生体組織の透過性が極めて高い長波長の光で自由自在に操作するための、一般性・汎用性の高い基盤技術を開発する。さらに、この基盤技術を用いて、ゲノムの働きを光刺激でコントロールしたり、がん細胞を光刺激で破壊することで、革新的なゲノム治療やがん治療を実現する新たな技術を開発する。ゲノム治療については、生体組織に光を照射して変異遺伝子の塩基配列を正確に書き換えることができるようになったり、生体組織の遺伝子の発現を自由自在に光照射でコントロールできるようになれば、今までに治療法がなかった様々な難病（遺伝子疾患）の治療に大きく貢献し、アンメット・メディカル・ニーズに応えることが可能になる。DNA を標的とした光操作技術に加えて、RNA を標的とした光操作技術（RNA の転写レベルの光操作技術）を開発できれば、ゲノム治療の安全性をさらに高めるだけでなく、ゲノム治療の適用範囲を大幅に拡張できる。このような生体（*in vivo*）におけるゲノムの光操作だけでなく、例えば、人工多能性幹細胞（iPS 細胞）のゲノム DNA の塩基配列を、光で正確に書き換えることができるようになれば、遺伝子疾患を有する患者への再生医療にも大きく貢献できると考えている。またがん治療についても、本プロジェクトで開発する技術は、光照射を施した部位でのみ薬効を発揮させることができるため、従来のがん治療技術よりも大幅に薬効を高めるためのアイデアを導入しても安全性を担保できるのが大きな特長である。本プロジェクトで開発する技術により、今まで治療法がなかった難病の治療に加えて、長波長の光照射による革新的ながん治療が実現すれば、医療分野へのインパクトは非常に大きく、関連産業の振興に大きく貢献することが期待される。

1. 2025 年度の研究目的

生命現象の光操作を実現する上で、佐藤 P が最も重要と考えたのは、操り人形で言えばヒモとか棒に相当する基盤技術の開発である。植物や菌類のように光を利用して生きている生物は、光受容体と呼ばれるタンパク質を持っている。光受容体は、光を吸収すると大きく構造変化したり、別のタンパク質と結合したりすることにより情報を伝えている。つまり光受容体は、光による入力をタンパク質の構造変化や結合といった力学的シグナルとして出力できるのだ。しかし、野生型の光受容体は、反応速度が遅いなどの問題を抱えていることが多い。佐藤 P は糸状菌の一種であるアカパンカビ（*Neurospora crassa*）が持っている光受容体に着目し、これに対して様々なアミノ酸変異を導入してその性質を大幅に改良したり、新しい機能を付与したりするなどして、Magnet システムと名付けた光スイッチタンパク質を開発した（参考文献 1）。Magnet システムは、青色の光を照射すると互いに結合し、光照射をやめると解離するタンパク質のペアである。Magnet システムにタンパク質 A とタンパク質 B を連結すれば、A と B の結合・

解離を青色光のオン・オフでコントロールすることができる。この Magnet システムの特長を利用することで、光で指令を与えて、酵素などのあらゆるタンパク質の働きを私たちの意のままに操作できるようになった。

佐藤 P では先行研究によって、Magnet システムを様々なゲノムエンジニアリングツール（ゲノム編集で利用される CRISPR-Cas9 システムなど）と組み合わせて、多様な光操作技術を開発してきた。これにより、光が得意とする高い空間・時間制御能に基づいて、生体組織の中の狙った部位や狙ったタイミングで、ゲノム DNA の塩基配列を書き換えたり（参考文献 2）、ゲノムにコードされた遺伝子の組換えを実行したり（参考文献 3、4）、ゲノム遺伝子の発現を自由自在に操作できるようになった。さらに最近では、ゲノムエンジニアリングツールに限らず、がん治療に応用可能なタンパク質の光操作にも Magnet システムを展開している。このような佐藤 P の一連の研究は、基礎生命科学を革新するリサーチツールを提供するとともに、既存の治療技術とは全く異なる、次世代の治療技術（ゲノム治療、がん治療など）につながる可能性を秘めている。

上述のゲノムの光操作技術や光駆動型の腫瘍溶解性ウイルスはいずれも、佐藤 P が開発した光スイッチタンパク質“Magnet システム”に立脚している。Magnet システムは、光操作のためのツールを我々が制御するための「アクセル」や「ブレーキ」であり、様々な生命現象の光操作を実現する極めて汎用性の高い基盤技術として位置付けることができる。本プロジェクトでは、Magnet システムに代わる新たな基盤技術として、生体組織透過性が極めて高い長波長の光照射でコントロール可能な光スイッチタンパク質を創出し、これを新たなゲノム治療技術とがん治療技術に展開することを目的とする。プロジェクト 4 年目となる 2025 年度は、以下の(1)から(4)の各項目を重点項目として開発研究を実施した。

- (1) 光合成細菌の相互作用タンパク質に基づく長波長の光スイッチタンパク質の開発
- (2) 進化分子光学的手法に基づく長波長の光スイッチタンパク質の開発
- (3) 新たなコンセプトの光スイッチタンパク質の開発
- (4) ドラッグ・リポジショニングに基づく遺伝子操作技術の開発

2. 2025 年度の研究成果

以下に、2025 年度の具体的な研究成果を挙げる。

- (1) 光合成細菌の相互作用タンパク質に基づく長波長の光スイッチタンパク質の開発

青色光はヘモグロビンに吸収されてしまうため、生体組織での透過性が低い。一方、650 nm から 800 nm の光はヘモグロビンに吸収されず、生体組織透過性が高いことが知られている。このため、この波長領域で利用できる光スイッチタンパク質の開発ニーズは極めて高い。この観点から、光合成細菌が有する近赤外光受容体とその結合タンパク質が、近赤外光スイッチタンパク質として注目を集めている。佐藤 P は、前述のゲノム遺伝子の光活性化システムにおいて、Magnet システムをこの既存の近赤外光スイッチタンパク質で置き換えてみた。その結果、この近赤外光スイッチタンパク質には暗所でのリーク活性という致命的な欠点があることが明らかになった。このリーク活性は光操作の基盤技術としては致命的な欠点である。

佐藤 P は近赤外光スイッチタンパク質にアミノ酸変異を導入することで暗所でのリーク活性を低減させることを目的に研究を行なっている。さまざまな変異体を作製し、それぞれの変異体をゲノム遺伝子の光活性化システムに導入して、光照射条件と暗所条件での比較を行った。その結果、暗所リーク活性を大幅に低減させることに成功している。このように近赤外光スイッチタンパク質の改良版を導入した遺伝子活性化システムを NIR-CPTS (CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system by near-infrared light) と名付けた。まず培養細胞での評価を行い、近赤外光の照射によって、NIR-CPTS が非常に効率よくゲノム遺伝子の発現を活性化できることを明らかにした。さらに、マウスの生体 (*in vivo*) での NIR-CPTS の評価を行った。マウスの肝臓に NIR-CPTS を導入して、生体外から

LED パネルを使って光照射を行ったところ、NIR-CPTS がマウスのゲノムにコードされた遺伝子を生体外からの非侵襲的な光照射で活性化できることが明らかになった。現在、より複雑な遺伝子の働きを自在に操作するための新たな技術開発を実施している。加えて、近赤外光スイッチタンパク質の作動メカニズムを解明し、その機能をさらに向上させるきっかけを掴むことにも成功している。

- (2) 進化分子光学的手法に基づく長波長の光スイッチタンパク質の開発

研究項目 (1) の光スイッチタンパク質は、光合成細菌の細胞の中で実際に使われている天然のタンパク質を改変して開発する光スイッチタンパク質である。研究項目 (2) では、研究項目 (1) とは全く異なり、進化分子工学的手法に基づいて、全く新しい長波長の光スイッチタンパク質を開発することを目標とする。進化分子工学的手法に基づいて、全く新しいタンパク質相互作用に基づいて光スイッチタンパク質を開発することにより、天然のタンパク質相互作用のデメリットを克服するような、新たな光スイッチタンパク質が開発できるとの期待を持ってこの研究項目 (2) を遂行している。

さまざまなバクテリアが持つ赤色光受容体タンパク質のバクテリオフィトクロム (BphP) の中で、特に放射線抵抗性細菌 (*Deinococcus radiodurans*) が有する BphP (DrBphP) に着目した。DrBphP は哺乳類細胞に内在する色素のビリベルジン (BV) を補因子として結合し、赤色光 (~660 nm) に応答して構造が大きく変化する性質を持っている。この DrBphP の構造変化を認識して結合するタンパク質 (以下、バインダー) を開発することで、赤色光スイッチタンパク質を開発できると考えた。この DrBphP とアフィボディ (バインダー) からなる光スイッチタンパク質は、本研究グループが先行研究で開発した青色光スイッチタンパク質 “Magnet” (マグネット) の赤色バージョンという意味を込めて “MagRed” (マグレッド) と名付けた (参考文献 9)。

さらに、MagRed を用いてゲノムにコードされた遺伝子を発現の赤色光で操作する技術 (Red-CPTS) を開発したところ、暗環境下で遺伝子発現の活性がほとんど検出されず、赤色光照射で非常に効率良く遺伝子発現を誘導できることから、MagRed が極めて高い光制御能を有することがわかった。

加えて、研究項目 (1) で開発した NIR-CPTS と研究項目 (2) で開発した Red-CPTS を同時に使って、近赤外光と赤色光でそれぞれ異なる遺伝子を光操作するための技術開発とその実証に関する研究を実施した。生体組織透過性の高い近赤外光と赤色光での光操作が実現したことで、生体深部における生命現象の解明や、遺伝子疾患や細胞治療など生命科学・医学分野を含む幅広い研究分野において役立つことが期待される。

- (3) 新たなコンセプトの光スイッチタンパク質の開発

佐藤 P では先行研究で、アカパンカビ (*Neurospora crassa*) が持っている光受容体に着目し、これに対して様々なアミ

ノ酸変異を導入してその性質を大幅に改良したり、新しい機能を付与したりするなどして、光スイッチタンパク質の Magnet システムを開発してきた。Magnet システムを用いることで、光で指令を与えて、様々なタンパク質の働きを私たちの意のままに操作できるようになり、PA-Cas9 や PA-Cre といった光操作ツールが佐藤 P によって生み出されている。佐藤 P では現在、この Magnet システムの改良を進めている。この研究の過程で、単なる改良にとどまらず、今までの光スイッチタンパク質とは異なる、新たなコンセプトの光スイッチタンパク質を開発しつつある。

Magnet システムは光刺激で 2 量体を形成する相互作用型の光スイッチタンパク質であるが、現在、この Magnet システムに対して、「concatenation」と名付けたアプローチでの改良を進めている。このアプローチによって、光照射で極めて効率よく分割タンパク質を活性化でき、かつ暗所ではほとんど活性を持たない、新たな構造変化型の光スイッチタンパク質を開発しつつある。加えて、この光スイッチタンパク質を、PA-Cas9 や PA-Cre といった佐藤 P がこれまで開発してきた光操作ツールに導入することで、これらのパフォーマンスを大幅に向上できることが明らかになりつつある。このアプローチをさらに継続して、新たな光スイッチタンパク質の開発を完結させるとともに、佐藤 P で開発を進めている新たな光操作ツールに導入し、特に光スイッチ遺伝子医薬としての開発を進めて、細胞レベルや動物レベルでの検証研究を実施していく予定である。

なお、Magnet システムを用いた応用研究にも積極的に取り組んでおり、例えば、Magnet システムと制限酵素を組み合わせた新たなツールを設計・開発し、光刺激によって細胞内の染色体の再編成を誘導することにも成功している（参考文献 8、9）。

(4) ドラッグ・リポジショニングに基づく遺伝子操作技術の開発

細菌感染症の治療に用いられている薬（承認薬）のトリメトプリム（trimethoprim; TMP）を用いて（＝ドラッグ・リポジショニングのアプローチに基づいて）、遺伝子のはたらきを生体内（*in vivo*）でコントロールする技術を開発した（参考文献 10）。この「SPEED（split-protein-based efficient and enhanced degradation）」と名付けた技術は、タンパク質の「分割」と「分解」という 2 つの制御機構を組み合わせた戦略に基づいており、DNA 組換え酵素の Cre など、様々なタンパク質の操作に利用できることを示した。TMP は血流に乗って全身に速やかに送達されるため、SPEED は生体の広い領域（全身など）や生体深部での遺伝子の操作において強みを発揮する。

3. まとめと今後の展望

上述のように、2025 年度までの研究によって、新たな光スイッチタンパク質等を開発することができた。最も重要なのは、光スイッチタンパク質が極めて一般性が高く、様々な光操作技術を実現できる基盤技術になり得ることである。佐藤 P は、光スイッチタンパク質によって、幅広い

創薬モダリティを大きく革新できると考えている。この観点から、遺伝子医薬や細胞医薬を含めた様々な創薬モダリティに光操作技術を導入するための研究を実施している。2026 年度以降は、この様に幅広く展開する探索研究の結果を踏まえて、事業としてより大きな価値を持つ医療技術と光操作技術を組み合わせて、社会実装に向けた研究を進めていくことが重要と考えている。さらに、光スイッチタンパク質は、医療技術としてのみならず、幅広い分野に応用可能と考えており、バイオものづくり等の先端分野への光スイッチタンパク質の応用に向けて研究を実施している。

【参考文献】

1. F. Kawano, H. Suzuki, A. Furuya and M. Sato, “Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins” Nat. Commun., 6, 6256 (2015).
2. Y. Nihongaki, T. Otabe, Y. Ueda and M. Sato, “A split CRISPR–Cpf1 platform for inducible genome editing and gene activation” Nat. Chem. Biol., 15, 882–888 (2019).
3. K. Morikawa, K. Furuhashi, C. de Sena-Tomas, A. L. Garcia-Garcia, R. Bekdash, A. D. Klein, N. Gallerani, H. E. Yamamoto, S.-H. E. Park, G. S. Collins, F. Kawano, M. Sato, C.-S. Lin, K. L. Targoff, E. Au, M. Salling and M. Yazawa, “Photoactivatable Cre recombinase 3.0 for in vivo mouse applications” Nat. Commun., 11, 2141 (2020).
4. Y. Koganezawa, M. Umetani, M. Sato and Y. Wakamoto, “History-dependent physiological adaptation to lethal genetic modification under antibiotic exposure” eLife, 11, e74486 (2022).
5. Y. Kuwasaki, K. Suzuki, G. Yu, S. Yamamoto, T. Otabe, Y. Kakihara, M. Nishiwaki, K. Miyake, K. Fushimi, R. Bekdash, Y. Shimizu, R. Narikawa, T. Nakajima, M. Yazawa and M. Sato, “A red light-responsive photoswitch for deep tissue optogenetics” Nat. Biotechnol., 40, 1672–1679 (2022).
6. T. Okura, M. Tahara, N. Otsuki, M. Sato, K. Takeuchi and M. Takeda, “Generation of photocontrollable recombinant bovine parainfluenza virus type 3” Microbiol. Immunol., 67, 166–170 (2023).
7. T. Nakajima, Y. Kuwasaki, S. Yamamoto, T. Otabe and M. Sato, “A red light-activatable endogenous gene transcription system” Methods Mol. Biol., 2840, 45–55(2025).
8. H. Yone, Y. Kawashima, H. Hirai, A. H. Oda, M. Sato, H. Kono and K. Ohta, “Light-controlled Spo11-less meiotic DNA breaks by MagTAQing lead to chromosomal aberrations” Nucleic Acids Res., 53, gkaf206 (2025).
9. H. Yone, H. Kono, M. Sato and K. Ohta, “AlphaFold3-guided optimization of a photoactivatable endonuclease for top-down genome engineering” J. Biol. Chem., 301, 110762 (2025).
10. D. Cai, F. Kawano, T. Otabe, K. Hashimoto and M. Sato, “A chemically inducible, leakless Cre recombinase by split-protein-based efficient and enhanced degradation (SPEED)” Commun. Biol., 9, 93 (2026).

近赤外光スイッチタンパク質の開発

「光スイッチ医療創出」プロジェクト

中嶋 隆浩

1. はじめに

光操作技術・オプトジェネティクスは、淡水性プランクトンであるクラミドモナスが有するチャンネルロドプシンというタンパク質の発見により始まった。チャンネルロドプシンは、光を受容することで活性化し、構造変化をして陽イオンを透過するようになる光活性化型の陽イオンチャンネルである。マウスの培養神経細胞にチャンネルロドプシンを異所性に発現させると、光照射依存的に活動電位を発生させられることが示された（参考文献1）。さらに、マウスの脳にチャンネルロドプシンを発現させて、光ファイバーを脳に埋め込むことで、光によってマウスの行動をコントロールできることも示された（参考文献2）。このように、チャンネルロドプシンを用いた光操作技術は、神経科学の分野に革命をもたらした。

しかし、チャンネルロドプシンは細胞内の陽イオン濃度を操作することしかできない。より一般的に、例えばタンパク質や酵素の活性を光で操作できるようになったり、遺伝子の発現を光で操作できるようになれば、神経細胞だけでなく様々な細胞・生物に対して光操作技術を用いることができる。そのような目的のために、佐藤プロジェクトは、光スイッチタンパク質と呼ばれる光操作の基盤技術の開発を行っている。光スイッチタンパク質とは、光によって結合・解離をコントロールできるタンパク質ペアのことである。佐藤プロジェクトの先行研究では、Magnet システムという青色光スイッチタンパク質を開発した（参考文献3）。Magnet システムを用いることで、光操作技術は、細胞内の様々なタンパク質や酵素の活性を光で自在に操作できる時代に突入した。

しかし、青色の光はヘモグロビンなどに吸収されてしまうため、生体組織透過性が比較的低い。そのため、生体外からの青色光照射で効率よく操作できる部位は、皮膚や筋肉、肝臓の腹側など、生体表面から近い組織・器官に限定されてしまい、青色光が届きにくい生体深部に位置する臓器や骨の中の骨髄、あるいは頭蓋骨に覆われた脳などの操作は困難であることが明らかになりつつある。したがって生体深部で光操作を行うためには、ヘモグロビンなどによる吸収が小さく生体組織透過性が高い650 nm から800 nm の光を用いることが望ましい。近年、赤色光（660 nm）による光スイッチタンパク質は、いくつか報告されてきている。しかし、そのいずれもが汎用性や一般性がないという課題や、光照射に関係なく作動してしまい光制御能が著しく低いといった課題、また、哺乳類細胞内には無い光合成生物由来の色素の添加が必要といった課題を抱えていた。そこで、我々はこれ

らの既存の技術の問題を克服できる、新たな赤色光スイッチタンパク質（MagRed：マグレッド）を開発した（参考文献4、5）。MagRed は、外来性の色素の添加を必要とせず、赤色光のON・OFFによる極めて高い制御能を有する。また、MagRed は、高い汎用性を持ち、赤色光による遺伝子発現やDNA組換え反応の光操作を実現した（参考文献4、5）。

今回我々は、さらに長波長の光で作動する近赤外光スイッチタンパク質の開発を行った。この目的のために我々は、さまざまなアミノ酸変異体やドメインの欠失変異体、あるいはドメインを人工的に並び替えた変異体を作製して評価した。このようにして得られた近赤外光スイッチタンパク質は、MagRedの活性化光である660 nmよりさらに100 nm以上長波長の、760 nmから800 nmの近赤外光によって効率よく作動する。したがって、近赤外光スイッチタンパク質を用いることで、さらに生体の奥深くでの光操作が可能になる。

2. 実験と結果

(1) 近赤外光スイッチタンパク質の開発

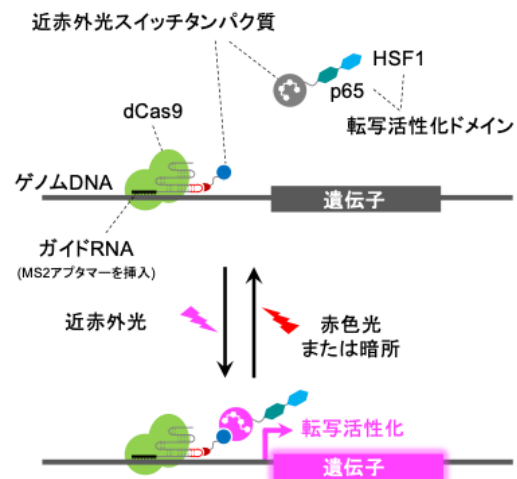


図1 ゲノム遺伝子光活性化システム・CPTSの原理

CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system (CPTS)は、次のようにして標的遺伝子を活性化できる。DNA切断活性を失活させたdCas9とMS2アプタマーを含むガイドRNAを用いて、標的遺伝子上流に光スイッチタンパク質の一方を係留させる。もう一方の光スイッチタンパク質には、転写活性化因子を繋いでおく。こうすることで、光照射によって光スイッチタンパク質ペアが結合すると、転写活性化因子が標的遺伝子の近傍にリクルートされ、遺伝子発現が誘導される。一方、暗所では光スイッチタンパク質ペアは結合しないので、標的遺伝子の活性化は低く保たれる。

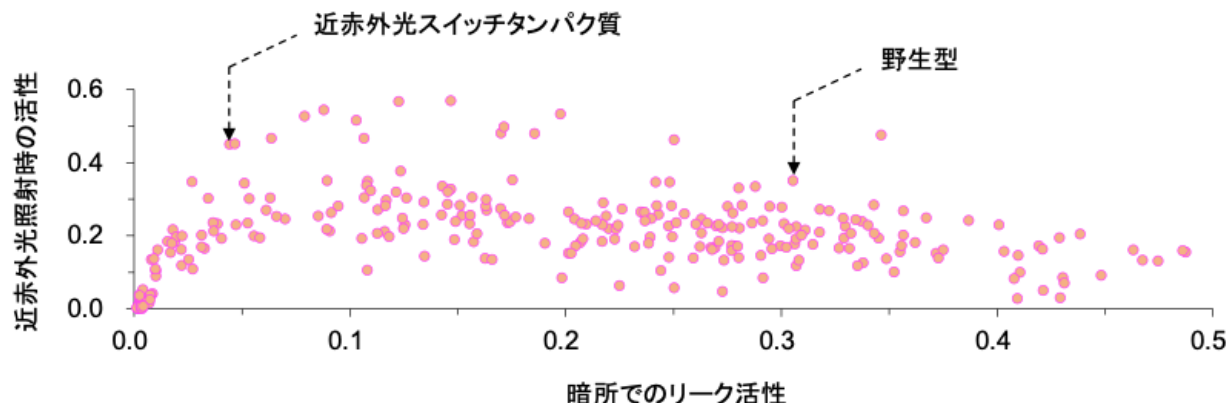


図2 近赤外光スイッチタンパク質変異体のスクリーニング

天然の近赤外光スイッチタンパク質ペア（野生型）を出発点として、光受容体側および結合パートナー側にアミノ酸置換、ドメイン欠失、ドメインシャッフリングを導入した。各変異体の組み合わせを CPTS に組み込み、暗所でのリーク活性と近赤外光照射時の活性を評価した。プロット中の各点が各変異体の組み合わせが与えた活性を表している。暗所でのリーク活性が低く（左側寄り）、近赤外光照射時の活性が高い（上側寄り）のものが、このスクリーニングで狙っているものである。出発物質の野生型とスクリーニング成果物である最適化変異体の位置を矢印で示す。

近赤外光スイッチタンパク質の開発は、光合成細菌が有する天然の近赤外光受容体とその結合タンパク質を出発物質として用いた。まず、我々はこの天然の近赤外光スイッチタンパク質が、致命的な欠点を持つことを明らかにした。この性質を評価する系として、佐藤プロジェクトで開発したゲノム遺伝子の光活性化システムを用いた。以下にその詳細を述べる（図1）。

このゲノム遺伝子の光活性化システムは、CRISPR-Cas9 システムを利用しており、次のような動作原理となっている（図1）。Cas9 の 10 番目のアミノ酸と 840 番目のアミノ酸に変異を導入して DNA 切断活性を失活させた変異体（Cas9^{D10A/H840A}； dCas9）とガイド RNA の複合体を、

ゲノム遺伝子上流に結合させておく。ガイド RNA には、MS2 タンパク質が結合するアプタマー配列が挿入してある。MS2 タンパク質と光スイッチタンパク質の一方を繋ぎ、もう一方の光スイッチタンパク質には転写活性化因子を繋いでおく。こうすることで、光照射によって光スイッチタンパク質を結合させた時のみ、転写活性化因子をゲノム遺伝子直上に近接させて、遺伝子活性化を誘導することができる（図1）。ここに天然の近赤外光スイッチタンパク質を導入したところ、光照射を行った場合のみならず、暗所に保持した場合においても遺伝子活性化を誘起してしまうことがわかった。Magnet や MagRed を利用した場合にはこの暗所での活性化は観察されなかったことから、天然の近赤外光スイッチタンパク質を導入した場合に観察された活性化は、天然の近赤外光スイッチタンパク質の暗所での結合活性（リーク活性）に原因があると考えられる。このリーク活性は非常に高いため、光照射を行って

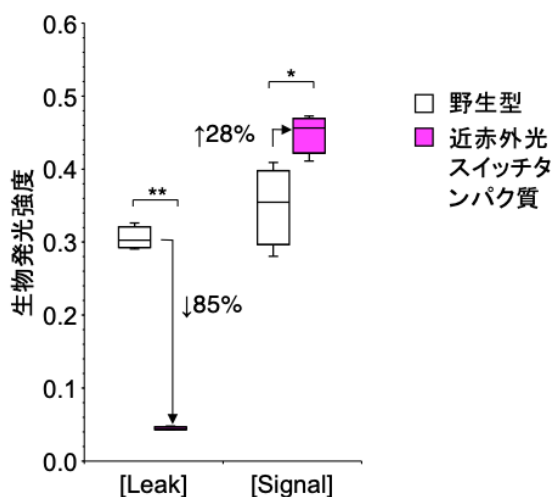


図3 プロテインエンジニアリングによる暗所リーク活性の低減と近赤外光照射時活性の向上

スクリーニングにより得られた変異体は、野生型の近赤外光スイッチタンパク質ペアと比較して、暗所でのリーク活性を 85%低減し、近赤外光照射時の活性を 28%向上させた。アスタリスクは t 検定による有意差を示す（* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ）。

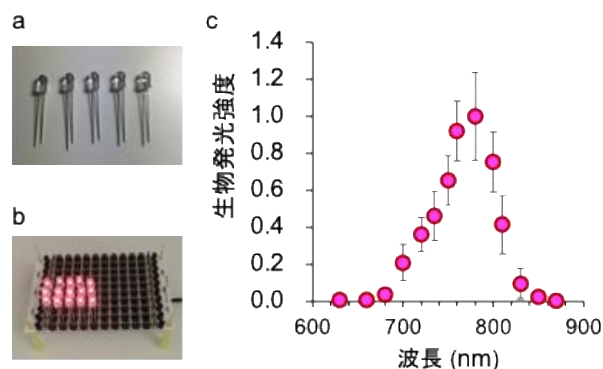


図4 近赤外光スイッチタンパク質を搭載した NIR-CPTS の波長依存性

(a, b) さまざまな波長の LED を用いて、異なる波長の光照射による遺伝子活性化効率を評価した。(c) NIR-CPTS は 780 nm 付近で最も高い活性を示し、800 nm という長波長光でも十分な遺伝子活性化を誘導した。

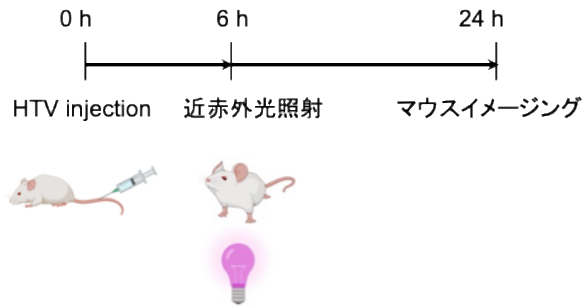


図5 マウス肝臓への NIR-CPTS 導入と近赤外光照射実験のスケジュール

Hydrodynamic tail vein injection 法により、NIR-CPTS をマウス肝臓へ遺伝子導入した。遺伝子導入後、所定の時間に近赤外光を体外から照射し、その後、*in vivo* イメージングによりレポーター遺伝子の活性化を評価した。

も、わずかにしか遺伝子活性化を誘起できない。このように、暗所でも高いリーク活性を持つことは、光照射を行う前から活性化が起こっていることを意味しており、光操作の基盤技術としては致命的な欠点となる。

そこで、我々は天然の近赤外光スイッチタンパク質にさまざまな変異を導入することで、この暗所のリーク活性を低減させられるかを検討した。我々の変異導入は複数のアプローチからなる。まず、天然の近赤外光受容体のさまざまなアミノ酸残基を1つずつアラニンに置換して、どのアミノ酸残基が結合活性に影響を与えるかを調べていった。この結果、暗所下の結合に影響を与えるアミノ酸残基と近赤外光照射下の結合に影響を与えるアミノ酸残基が存在することがわかり、アミノ酸残基のアノテーション付けに成功した。次に、そのうちのいくつかのアミノ酸残基を選択して、20 種類のアミノ酸すべての置換体を作製し、暗所下の結合活性が低い性質や近赤外光照射下の結合活性が高い性質を持つものを選び出した。次に、天然の結合パートナーについても同様に、アラニン置換体によるアノテーション付けと、アミノ酸残基の最適化を行った。また、

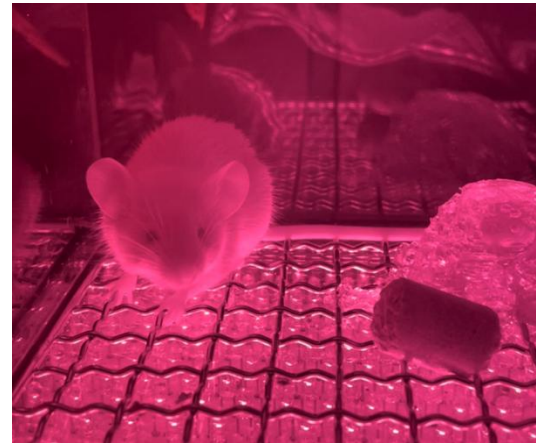


図6 LED パネルを用いたマウスへの近赤外光照射

NIR-CPTS を導入したマウスに対して、LED パネルを用いて体外から近赤外光を照射した。

天然の結合パートナーは5つのドメインからなっており、これらのドメインの順番を入れ替えたり（ドメインシャッフリング）、欠失させたり（ドメイン欠失変異体）することで暗所リーク結合活性が変化するかどうかを調べた。その結果、天然では存在しない順番のドメイン連結体が、暗所でのリーク活性を抑えることを見出した。以上に述べてきた変異体は、それぞれ組み合わせることが可能である。我々は、さまざまな変異体の組み合わせを作製し、前述の遺伝子光活性化システム CPTS に導入して測定を行った（図2）。

その結果、図3に示すように、暗所リーク活性を野生型から 85%低減させ、近赤外光照射時の活性を野生型よりも 28%向上させた変異体（近赤外光スイッチタンパク質）の開発に成功した。また、この近赤外光スイッチタンパク質を導入した遺伝子活性化システムを NIR-CPTS (CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system by near-infrared light) と名付けた。

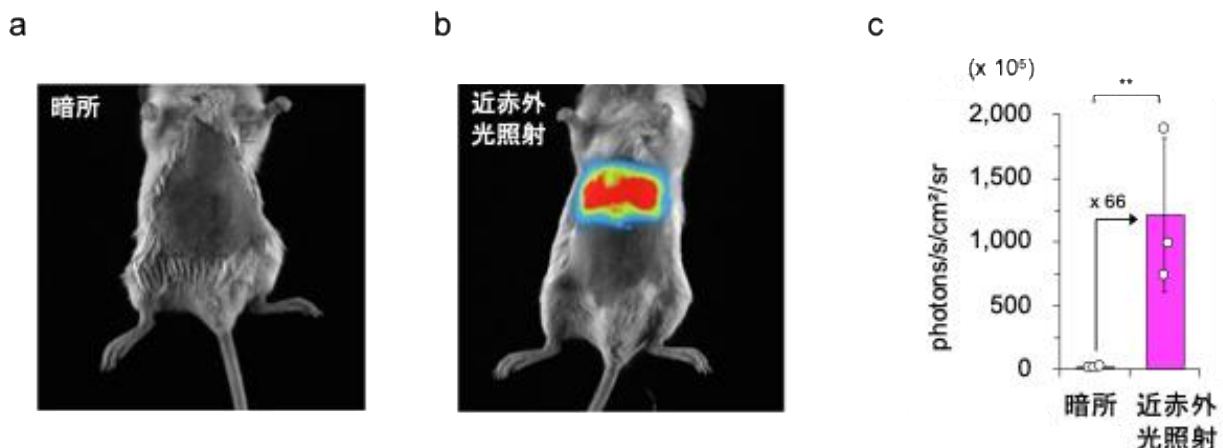


図7 マウス肝臓における近赤外光依存性なレポーター遺伝子活性化

NIR-CPTS を導入したマウスを暗所保持群 (a) と近赤外光照射群 (b) に分け、レポーター遺伝子の発現を *in vivo* イメージングにより評価した。近赤外光照射群では肝臓領域に強い発光シグナルが観察され (b)、定量解析においても暗所群と比較して顕著な発光強度の増加が認められた (c)。アスタリスクは t 検定による有意差を示す (**P < 0.01)。

(2) マウス生体 (*in vivo*) における近赤外光照射依存的なゲノム遺伝子の活性化

先に述べたように、650 nm から 800 nm の光は生体組織透過性が高い。近赤外光スイッチタンパク質の波長依存性を、NIR-CPTS の遺伝子活性化を指標として調べたところ、当該システムは、780 nm が最適の波長であり、800 nm でも十分な遺伝子活性化を誘導できることがわかった (図 4)。そこで我々は、NIR-CPTS を用いてマウスの生体 (*in vivo*) で遺伝子活性化を制御できるかどうか調べた。まず、hydrodynamic tail vein injection 法でマウスの肝臓に NIR-CPTS を導入した (図 5)。マウスへの近赤外光照射は、生体外から LED パネルを使って行った (図 6)。このような非侵襲的な光照射方法でも、マウス肝臓において、レポーター遺伝子の活性化を誘起することができた (図 7)。さらに、NIR-CPTS を用いて、マウスのゲノムにコードされた遺伝子 (*ASCL1* を例に) を非侵襲的な光照射で活性化することも明らかになった。このように、我々は開発した近赤外光スイッチタンパク質の特性を、NIR-CPTS というゲノム遺伝子の活性化技術として評価した。その結果、開発した近赤外光スイッチタンパク質は生体内でも光操作の基盤技術として利用できることがわかった。

現在、より複雑なゲノム遺伝子の働きを自在に操作できるようにするために、複数の波長の光照射で操作する新たな技術の開発を行っている。また、それに加えて、近赤外光スイッチタンパク質の作動メカニズムの解明も行った。この知見を用いて、さらなる機能向上も開始している。

3. 今後の展望

生体組織透過性が高い近赤外光でコントロール可能な光スイッチタンパク質を開発し、これを用いて、近赤外光照射によってゲノム遺伝子を活性化する光操作ツール

(NIR-CPTS) の開発を行った。今後は、がんを治療する細胞医薬に NIR-CPTS を搭載させて、光スイッチ細胞医薬を開発する。これは、光照射を施した部位でのみ薬効を発揮させることができるため、従来のがん治療に比べて、正常組織への副作用を抑えて安全性を担保しながら、薬効を大幅に高めることが可能である。長波長の光照射による革新的ながん治療が実現すれば、医療分野へのインパクトは非常に大きく、関連産業の振興に大きく貢献することが期待される。

【参考文献】

1. M. Hausser and S. Smith, “Controlling neural circuits with light” *Nature*, **446**, 617-619 (2007).
2. F. Zhang, V. Gradinaru, A. Adamantidis, R. Durand, R. Airan, L. Lecea and K. Deisseroth, “Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures. *Nature Protocols*, **5**, 439–456 (2010).
3. F. Kawano, H. Suzuki, A. Furuya and M. Sato, “Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins” *Nature Communications*, **6**, 6256 (2015)
4. Y. Kuwasaki, K. Suzuki, G. Yu, S. Yamamoto, T. Otabe, Y. Kakiyama, M. Nishiwaki, K. Miyake, K. Fushimi, R. Bekdash, Y. Shimizu, R. Narikawa, T. Nakajima, M. Yazawa and M. Sato, “A red light-responsive photoswitch for deep tissue optogenetics” *Nature Biotechnology*, **40**, 1672-1679 (2022)
5. T. Nakajima, Y. Kuwasaki, S. Yamamoto, T. Otabe and M. Sato, “A red light-activatable endogenous gene transcription system with Red-CPTS” *Methods Mol. Biol.*, **2840**, 45-55 (2025).

光スイッチ遺伝子医薬の開発

「光スイッチ医療実証」プロジェクト

小田部亮広

1. はじめに

近年、ゲノム編集をはじめとする遺伝子治療技術の臨床応用が急速に進展している。しかし、ゲノム編集技術では酵素活性を空間的・時間的に厳密に制御することが難しく、意図しない組織や細胞において編集が生じるリスクがあるため、安全性の確保が大きな課題となっている。そこで本プロジェクトでは、我々の研究グループが独自に開発した光スイッチタンパク質を組み込んだゲノム編集の光操作技術を活用し、安全性と有効性を向上させた新しい概念の光スイッチ遺伝子医薬の創出を目指している。我々は、糸状菌の一種である赤パンカビ (*Neurospora crassa*) 由来の光受容体タンパク質に着目し、多様なアミノ酸変異を導入することでその性質を改良するとともに新たな機能を付加し、光スイッチタンパク質「Magnet システム」を開発した (参考文献 1)。Magnet システムは、青色光の照射によって互いに結合し、照射を止めると解離する一対のタンパク質から構成される。これらに任意のタンパク質 A および B を融合することで、青色光照射に応じて A と B の相互作用を制御することができる。この特性を利用することで、興味のある酵素をはじめとするさまざまなタンパク質の機能を、光を介して自在に調節することが可能となった。これまで我々は、Magnet システムを基盤技術として活用し、さまざまなゲノム編集ツールと組み合わせることで、多様な光操作技術を開発してきた。まず一つ目の例として、CRISPR-Cas9 システムの光操作技術の開発が挙げられる。この技術では、標的となるガイド RNA を設計するだけで、光による高い時空間的制御性を活かし、生体組織内の特定の部位やタイミングにおいてゲノム DNA の塩基配列を書き換えることが可能となった (参考文献 2)。さらに、この技術を応用することで、遺伝子発現のオン・オフを自由に、かつ繰り返し制御することも実現している (参考文献 3)。

二つ目の例として、バクテリオファージ由来の DNA 組換え酵素 Cre の組換え活性を、青色光照射によって制御可能とした光活性化型 Cre (PA-Cre) を開発した (参考文献 4, 5, 6, 7)。本技術により、特定の組織や細胞を標的として DNA 組換え反応を誘導し、遺伝子機能を時空間的に制御することが可能となった。この技術は、さまざまな疾患関連遺伝子の機能解析に有用であるだけでなく、近年では治療に必要な遺伝子発現を制御する遺伝子医薬への応用も視野に入れ、研究開発を進めている。

また我々は、Magnet システムをゲノム編集ツールの光制御に限定することなく、多様なタンパク質へと応用することで、その利用範囲を拡大してきた (参考文献 8)。Magnet システムは、青色光に反応して 2 分子の結合と解離を可逆的に制御できる優れた光スイッチタンパク質である。一方で、その機能は 2 分子間相互作用を基本原理としているため、細胞内における各分子の発現量や局所濃度の影響を受けやすいという課題がある。すなわち、細胞内で両分子が十分に遭遇できない場合には反応効率が低下し、遺伝子治療への応用時には期待される治療効果が十分に得られない可能性がある。この課題を解決するため、我々は Magnet システムのさらなる高機能化に取り組み、次世代の基盤技術の構築を進めてきた。この基盤技術をさらに発展させることで、PA-Cre のさらなる高機能化を進めている (図 1)。

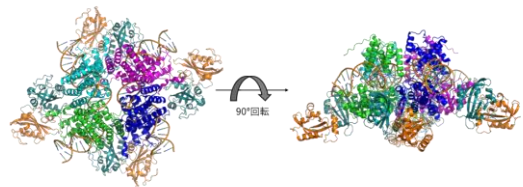


図 1 AlphaFold による予測構造をもとにした PA-Cre の改良
一方で我々は、光応答だけでなく、低分子化合物を利用した遺伝子制御技術の開発にも取り組んでいる (参考文献 9)。Cre リコンビナーゼを利用した薬剤誘導型 DNA 組換えシステムは、強力な遺伝学的解析や遺伝子制御を実現す

るための有用なツールである。しかし、既存の薬剤誘導型 Cre システムの一部では、薬剤非存在下でもリーク活性を示すことが課題となっている。そこで我々は、この課題を解決するため、承認薬によって作動を制御でき、かつ意図しない Cre-loxP 組換え反応を極めて低く抑制した新たな薬剤応答型 Cre システム (SPEED-Cre) を開発した。SPEED-Cre は、新規手法である SPEED 戦略 (Split-Protein-based Efficient and Enhanced Degradation) にもとづいて設計した薬剤応答型 Cre である。

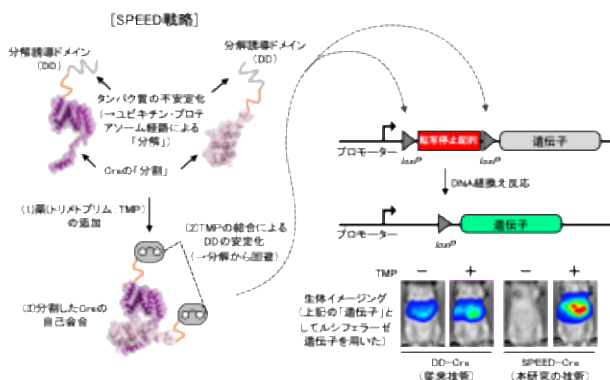


図2 薬剤応答型 DNA 組換え技術「SPEED-Cre」の概要。「分割×分解」の分子設計戦略により、承認薬トリメトプリム (TMP) で DNA 組換えを誘導しつつ、薬剤非存在下でのリーク活性を極めて低く抑制した。生命科学研究および遺伝子治療研究への応用が期待される。

本システムでは、自発的に会合する分割 Cre に、大腸菌由来ジドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の不安定化ドメイン (DD) 変異体を融合しており、この DD は抗生物質トリメトプリム (TMP) の存在下で安定化される。その結果、TMP 非存在下では有意なバックグラウンド DNA 組換え活性を示さない一方、哺乳類細胞およびマウス生体内において、TMP 依存的な Cre-loxP 組換え反応を高効率に誘導できることを示した (図 2)。これらの成果は、光と薬剤という異なる外部刺激を利用した相補的な遺伝子制御技術として、目的や用途に応じた最適な遺伝子制御システムの構築につながるものと期待される。

2. 実験方法

(1) Magnet システムの改良

Magnet システムは 2 分子間相互作用を利用して機能するため、反応効率が細胞内の分子濃度に依存しやすいという課題があった。そこで我々は、構造情報を活用した「concatenation」アプローチにより、この課題の解決を図った新規 Magnet システムを構築した (図 1)。本システムでは、青色光照射時の反応効率向上が期待される。さ

らに、開発した Magnet システムを既存の光活性化型 Cre リコンビナーゼ (PA-Cre) へ適用し、DNA 組換え反応効率を評価した。

(2) 改良型 PA-Cre の評価

改良型 PA-Cre の機能評価には、loxP サイトで挟まれた停止配列 (ストップカセット) をレポーター遺伝子の上流に配置した評価系を用いた。この評価系では、ストップカセットの存在により通常はレポーター遺伝子の発現が抑制されているが、青色光照射によって改良型光活性化 Cre リコンビナーゼ (PA-Cre) が活性化されると、ストップカセットが切除され、レポーター遺伝子が発現可能となる。一方、暗所では PA-Cre は作動しないためストップカセットは除去されず、レポーター遺伝子は発現しない。このとき暗所においてわずかに検出されるレポーター遺伝子の発現を「リーク活性」と定義した。本実験では、レポーター遺伝子として生物発光タンパク質であるホタルルシフェラーゼ (Fluc) を使用した。

実験では、まず細胞を 2 枚の 96 ウェルプレートに播種し、24 時間後にリポフェクション法を用いて各種プラスミド DNA を導入した。導入後は 24 時間暗所で培養した後、プ

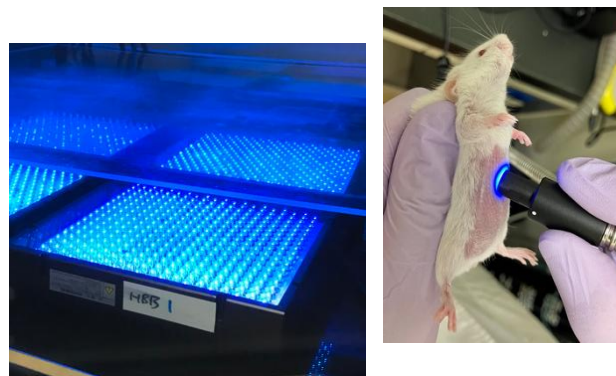


図3 (A) 細胞への光照射に用いた青色 LED アレイ (波長: 470 ± 20 nm、光強度: 1.0 W m^{-2})。 (B) LED ポイント照明装置によるマウスへの局所光照射の様子

レートは青色光照射群と暗所維持群の 2 群に分け、 37°C 、 CO_2 インキュベーター内でさらに 24 時間培養した。青色光の照射には LED アレイを使用した (図 3A)。その後、両群の培地をホタルルシフェラーゼ (Fluc) の基質であるルシフェリンを含む培地へ交換し、生物発光シグナルを測定した。

3. 実験結果と考察

Magnet システムに「concatenation」アプローチを導入し

た結果、暗所におけるリーク活性をほとんど増加させることなく、青色光照射時の活性を従来の PA-Cre と比較して大幅に向上させることに成功した。この性能向上は、「concatenation」によって細胞内濃度への依存性が低減され、従来の課題を克服できたことによるものと考えられる。現在は、改良型 PA-Cre のさらなる高性能化を目指し、分割位置、細胞内局在、および Cre と Magnet システム間の距離などの設計パラメータについて最適化を進めている。今後は、暗所でのリーク活性を一層抑制するとともに、青色光照射時の活性をさらに向上させた PA-Cre の開発を目指す。

4. 今後の展開

本研究では、既存の Magnet システムに「concatenation」アプローチを取り入れることで、従来を上回る性能を有する新たな基盤技術を構築した。さらに、この改良型 Magnet システムを PA-Cre へ適用し、その有用性を実証した。今後は、遺伝子治療ベクターとして広く利用されているアデノ随伴ウイルス (AAV) へ改良型 PA-Cre を搭載し、マウスを用いた動物実験へ展開することで、光スイッチ医療の実現に向けた実証研究を進める (図 3B)。加えて、遺伝子医薬への応用を見据え、近年 AAV ベクターへの搭載が可能となった CRISPR-Cas システムと、本研究で開発した新規 Magnet システムを組み合わせた光スイッチ遺伝子医薬の開発にも取り組んでいる。本研究で開発した光スイッチタンパク質は、従来の相互作用型光スイッチタンパク質にはない特徴を備えており、これまで実現が困難であった新たな光スイッチ医薬の創出につながるものと期待される。この技術についても、さらなる研究開発を進めている。また、我々は光だけでなく薬剤を入力とする遺伝子制御技術の開発にも取り組んでおり、それぞれの特徴を活かした外部刺激応答型遺伝子制御基盤の構築を進めている。これらの技術は医療分野のみならず、微生物を利用した有用物質生産など産業応用への展開も期待される。

【参考文献】

1. F. Kawano, H. Suzuki, A. Furuya and M. Sato, “Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins” *Nat. Commun.*, **6**, 6256 (2015).
2. Y. Nihongaki, F. Kawano, T. Nakajima, and M. Sato, “Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing” *Nat. Biotechnol.*, **33**, 755-760 (2015).
3. Y. Nihongaki, Y. Furuhashi, T. Otabe, S. Hasegawa, K. Yoshimoto, and M. Sato, “CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription systems to induce neuronal differentiation” *Nat. Methods*, **14**, 963-966 (2017).
4. F. Kawano, R. Okazaki, M. Yazawa and M. Sato, “A photoactivatable Cre-*loxP* recombination system for optogenetic genome engineering” *Nat. Chem. Biol.*, **12**, 1059-1064 (2016).
5. T. Takao, Y. Hiraoka, K. Kawabe, D. Yamada, L. Ming, K. Tanaka, M. Sato, and T. Takarada, “Establishment of a tTA- dependent photoactivatable Cre recombinase knock-in mouse model for optogenetic genome engineering” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **526**, 213-217 (2020).
6. K. Morikawa, K. Furuhashi, C. de Sena-Tomas, A. L. Garcia-Garcia, R. Bekdash, A. D. Klein, N. Gallerani, H. E. Yamamoto, S.-H. E. Park, G. S. Collins, F. Kawano, M. Sato, C.-S. Lin, K. L. Targoff, E. Au, M. Salling and M. Yazawa, “Photoactivatable Cre recombinase 3.0 for in vivo mouse applications” *Nat. Commun.*, **11**, 2141 (2020).
7. K. Yoshimi, Y. Yamauchi, T. Tanaka, T. Shimada, M. Sato and T. Mashimo, “Photoactivatable Cre knock-in mice for spatiotemporal control of genetic engineering in vivo” *Lab. Invest.*, **101**, 125-135 (2021).
8. M. Tahara, Y. Takishima, S. Miyamoto, Y. Nakatsu, K. Someya, M. Sato, K. Tani, and M. Takeda, “Photocontrollable mononegaviruses” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 11587-11589 (2019).
9. D. Cai, F. Kawano, T. Otabe, K. Hashimoto, M. Sato, “A Chemically Inducible, Leakless Cre Recombinase by Split-Protein-Based Efficient and Enhanced Degradation (SPEED),” *Communications Biology*, Vol. 9, p. 93 (2025).

業績

【原著論文】

1. H. Yone, Y. Kawashima, H. Hirai, Arisa H. Oda, M. Sato, H. Kono, and K. Ohta, “Light-controlled Spo11-less meiotic DNA breaks by MagTAQing lead to chromosomal aberrations” *Nucleic Acids Research*, 53, (2025)
2. H. Yone, H. Kono, M. Sato, and K. Ohta, “AlphaFold3-guided optimization of a photoactivatable endonuclease for top-down genome engineering” *Journal of Biological Chemistry*, 301, (2025)
3. D. Cai, F. Kawano, T. Otabe, K. Hashimoto and M. Sato, “A chemically inducible, leakless Cre recombinase by split-protein-based efficient and enhanced degradation (SPEED)” *Communications Biology* 9, 93 (2026)

【総説】

なし

【書籍】

なし

【口頭発表】

1. 中嶋隆浩、桑崎勇人、山本翔太、小田部堯広、佐藤守俊
「生体深部で生命現象を光操作するための赤色光スイッチタンパク質」
第 31 回 日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2025 年 7 月 24 日、東京
2. 小田部堯広、大木 悠翔、橋本 講司、佐藤 守俊
「光制御型プライムエディターの開発」
第 31 回 日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2025 年 7 月 24 日、東京
3. 河田紗弥、小田部堯広、佐藤守俊
「光操作可能なバクテリアの開発」
第 65 回生命科学夏の学校、2025 年 8 月 29 日、東京
4. 中嶋隆浩、小田部堯広、佐藤守俊
「近赤外光によるゲノム遺伝子の活性化システム」
Chem-Bio Joint Seminar 2025、2025 年 8 月 30 日、つくば
5. 小田部堯広、大木悠翔、橋本講司、佐藤守俊
「光操作可能なプライムエディターの開発」
Chem-Bio Joint Seminar 2025、2025 年 8 月 30 日、つくば
6. Dewen Cai, Fuun Kawano, Takahiro Otabe, Koji Hashimoto, Moritoshi Sato
「A chemically inducible, leakless Cre recombinase achieved by split protein based efficient and enhanced degradation (SPEED)」
Chem-Bio Joint Seminar 2025、2025 年 8 月 30 日、つくば
7. 何季璇、橋本講司、河野風雲、佐藤守俊
「Enhancing the Photoactivated Heterodimerization“Magnet” by Directed Evolution」

- Chem-Bio Joint Seminar 2025、2025 年 8 月 30 日、つくば
8. 上野李王、橋本講司、佐藤守俊
「赤色光操作に基づく DNA 組換え制御システム「RedPA-Cre」の改良」
Chem-Bio Joint Seminar 2025、2025 年 8 月 30 日、つくば
 9. 常峰、小田部堯広、佐藤守俊
「光応答可能な Cas13 によるスプライシング制御技術の開発」
Chem-Bio Joint Seminar 2025、2025 年 8 月 30 日、つくば
 10. 青野侑基、一宮航、吉田まゆみ、中嶋隆浩、佐藤守俊
「Highly efficient fluorescent probe to visualize nanoscale architecture of protein interaction by super-resolution microscopy」
Chem-Bio Joint Seminar 2025、2025 年 8 月 30 日、つくば
 11. 福武幸之助、小田部堯広、佐藤守俊
「生体外から制御可能なリコンビナーゼの開発」
Chem-Bio Joint Seminar 2025、2025 年 8 月 30 日、つくば
 12. 于柔、中嶋隆浩、青野侑基、佐藤守俊
「Optogenetic Control of Fluorescence Fluctuations for Super-resolution Imaging」
Chem-Bio Joint Seminar 2025、2025 年 8 月 30 日、つくば
 13. 佐藤守俊
「Manipulating biological processes by light」
8th Stockholm Trio-The University of Tokyo – Workshop、2025 年 9 月 29 日、東京
 14. 佐藤守俊
「Optical manipulation of the genome」
第 54 回内藤コンファレンス、2025 年 10 月 8 日、札幌
 15. 佐藤守俊
「光スイッチ技術の創出」
第 2 回 OEB×GteX 連携イベント、2025 年 9 月 29 日、東京
 16. Dewen Cai, Fuun Kawano, Takahiro Otabe, Koji Hashimoto, Moritoshi Sato
「A chemically inducible, leakless Cre recombinase achieved by split protein based efficient and enhanced degradation (SPEED)」
第 54 回内藤コンファレンス、2025 年 10 月 9 日、札幌
 17. Takahiro Nakajima, Yuto Kuwasaki, Shota Yamamoto, Takahiro Otabe, Moritoshi Sato
「MagRed: a red light-responsive photoswitch for deep tissue optogenetics」
Pacifichem 2025、2025 年 12 月 16 日、ハワイ
 18. Yuki Aono, Takahiro Nakajima, Moritoshi Sato
「A highly efficient fluorescent probe to visualize protein

interactions at the super-resolutions」

Pacificchem 2025、2025 年 12 月 17 日、ハワイ

19. Saya Kawata, Takahiro Otabe, Moritoshi Sato
「Development of light-controllable bacteria using photoactivatable Cre」

Pacificchem 2025、2025 年 12 月 19 日、ハワイ

20. Rio Ueno, Koji Hashimoto, Moritoshi Sato
「Lentivirus-based directed evolution for enhancing red-light-activated Cre recombinase」

Pacificchem 2025、2025 年 12 月 19 日、ハワイ

【特許】

(1)国内特許出願 0 件

(2)国際特許出願 0 件