

# 「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. 2024 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バシカビ (*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、3）、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 4、5、6）、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（参考文献 7）。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（参考文献 8）。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 3 年目となる 2024 年度は、以下の(1)から(3)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

## 2. 2024 年度の研究成果

以下に、2024 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（参考文献 7）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、進化分子光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。進化分子光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よ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。Red-CPTS を研究項目 (1) のケースと同様に、マウスの肝臓に導入して評価を行った。生体外から LED パネルを使って光照射を行ったところ、Red-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非常に効率よく活性化できることが明らかになった。加えて、暗所でのリーク活性はほとんど観察されなかったことから、MagRed が生体内でも極めて高い光制御能を示すことが明らかになった。

さらに MagRed を用いた新たな光操作技術の研究にも着手している。これは MagRed がさまざまなタンパク質の

働きを光操作できる高い一般性を有しているためである。MagRedは、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。現在、MagRedに対してさらにプロテインエンジニアリングを施し、その機能を向上させる研究に取り組んでいる。

### (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。この Magnet システムを用いることで、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させ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。例えば、PA-Cre について、その光応答性を大幅に向上させるとともに、暗所での活性（リーク活性）を大幅に低減させ、光照射による制御能を大幅に向上させることに成功している。本研究の光スイッチタンパク質は、これまでの相互作用型の光スイッチタンパク質にはない特長を有しているため、これまでの相互作用型の光スイッチタンパク質では困難だった新たな光スイッチ医薬の創出が可能になると考えている。これについても開発研究をスタートさせ、すでに有望な候補物質の創出に成功している。

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。

### 3. まとめと今後の展望

上述のように、2024 年度までの研究によって、研究項目

(1)、(2)、(3) の新たな光スイッチタンパク質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。2025 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、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. Y. Aono, T. Nakajima, W. Ichimiya, M. Yoshida and M. Sato, "Highly efficient fluorescent probe to visualize protein interactions at the superresolution" *ACS Chem. Biol.*, 19, 1271-1279 (2024).
8. 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).

# 光スイッチ細胞医薬のための 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ロ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、ヘモグロビンに吸収されず生体組織透過性が高い650 nm から800 nm の近赤外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無いという課題や、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800 nmで作動する。したがって、これを用いることで、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

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。

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番目のアミノ酸位変異を導入してDNA切断活性を欠損させた変異体（Cas9<sup>D10A/H840A</sup> ; 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、遺伝子活性化を誘起させる

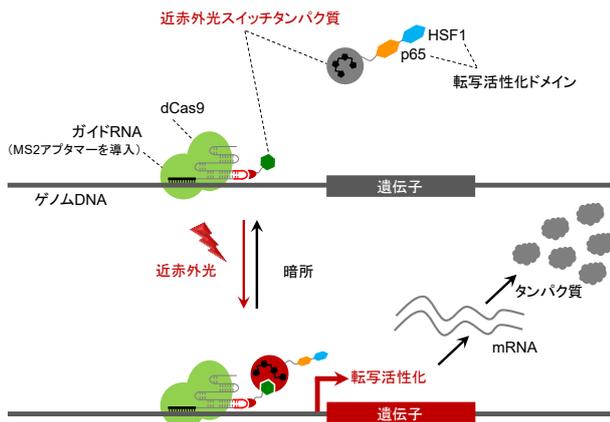


図1. ゲノム遺伝子の光活性化システム (CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system; CPTS) の原理図。

ことができる (図1)。ここに近赤外光スイッチタンパク質を導入したところ、光照射を行な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、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、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、光照射を行なっても、僅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、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、

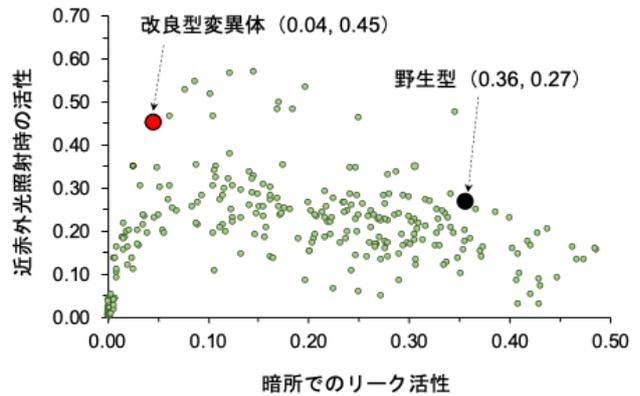


図2. 各アプローチを組み合わせ、さまざまな変異体を作製することで、暗所下リーク活性を大幅に低減させることに成功した。

さまざまな変異体の組み合わせを作製し、その結果、図2に示すように、暗所リーク活性を野生型の10分の1に低減させ (図2、野生型 0.36 に対して改良型変異体 0.04)、近赤外光照射時の活性を野生型よりも向上 (図2、野生型 0.27 に対して改良型変異体 0.45) させた変異体を作製できた。そして、このようにして開発した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。

## (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。我々の開発した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3)。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4)。マウスへの近赤外光照射は、生体外から LED パネルを使って行なっ

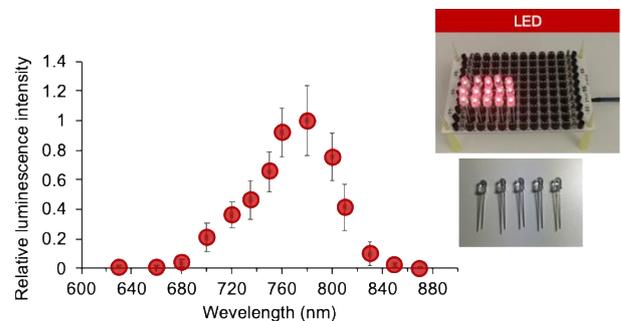


図3. NIR-CPTS の活性の波長依存性。800 nm 以上の長波長光でも光活性化できる。各波長で図右上のような LED を用いて光照射した。

た(図5)。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。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でき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

生体組織透過性が極めて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. Kakihara, M. Nishiwaki, K. Miyake, K. Fushimi, R. Bekdash, Y. Shimizu, R. Narikawa, T. Nakajima, M. Yazawa and M. Sato, "A red light-responsive

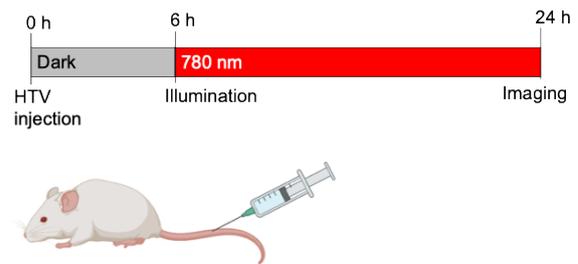


図4. Hydrodynamic tail vein injection法を用いて、マウス肝臓にNIR-CPTSを遺伝子導入する。図上部に実験のタイムスケジュールを記した。

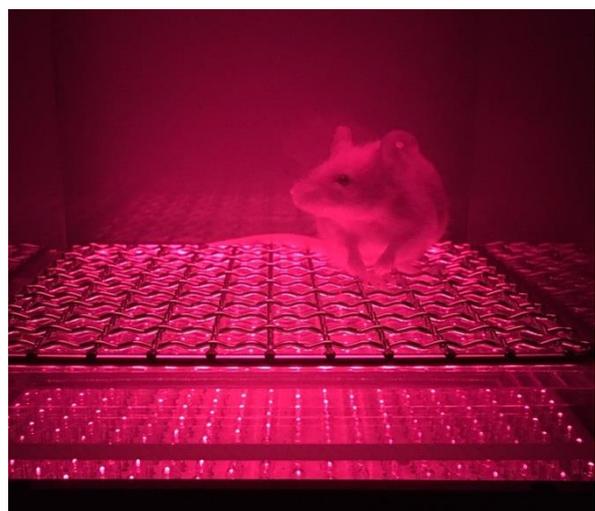


図5. LEDアレイを用いてマウスの生体外から光照射。

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" *Methods Mol. Biol.*, **2840**, 45-55 (2025).

# 光スイッチ遺伝子医薬の開発

「光スイッチ医療創出」プロジェクト

小田部堯広

## 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の制御が難しく、意図しない組織や細胞においても編集が行われてしまうリスクがあり、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、安全性と有効性を高め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*) が有する光受容体タンパク質に着目し、そこに多様なアミノ酸変異を導入して性質を改良するとともに新たな機能を付加することで、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、青色光を照射すると互いに結合し、光を止めると解離する一対のタンパク質からなる。これらに任意のタンパク質 A および B を結合させることで、青色光の照射によって A と B の相互作用を制御できる。Magnet システム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。この技術により、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な制御性を活かし、生体組織内の特定の部位やタイミングでゲノム 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、これを応用することで、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)。

二つ目の例としては、バクテリオファージ由来の DNA 組換え酵素 Cre による DNA 組換え反応を、青色光の照射によって誘導可能とした光活性化型 Cre (PA-Cre) の開発がある (参考文献 4, 5, 6, 7)。この PA-Cre の技術により、特定の生体組織や細胞を標的にして遺伝子機能を制御できるようになった。これにより、疾患に関わるさまざまな遺伝子の機能解明への貢献が期待されるとともに、現在では治療に必要な遺伝子発現を調節する遺伝子医薬としての応用も検討を進めている。

さらに、我々はこの Magnet システムをゲノム編集ツールにとどまらず、その他の多様なタンパク質へと応用展開してきた (参考文献 8)。前述の通り、Magnet システムは 2 分子間の結合と解離を青色光によって制御できる優れた光スイッチタンパク質である。しかし一方で、改良すべき課題も存在する。それは、2 分子間の相互作用を前提としているため、細胞内に導入した際の濃度に性能が大きく依存しやすい点である。具体的には、細胞内で 2 分子が出会う確率が低いと反応効率が低下し、遺伝子治療薬として応用する際には十分な治療効果を発揮しにくくなる可能性がある。そこで我々は、この課題を克服すべく Magnet システムの改良に取り組み、新たな基盤技術の開発を進めてきた。

## 2. 実験方法

### (1) Magnet システムの改良

従来の Magnet システムには、2 分子間の相互作用に依存するため、細胞内濃度に大きく影響を受けやすいという課題があった。そこで我々は、構造情報に基づく

「concatenation」アプローチを導入し、この課題を克服する新たな Magnet システムを開発した (図 1)。この改良により、青色光照射時の反応効率の向上が期待される。さらに、開発した新しい Magnet システムを既存の光活性化型 Cre リコンビナーゼ (PA-Cre) に適用し、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 の評価は、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 upstream に配置した評価系を用いて行った。この系では、通常、ストップカセットによってレポーター遺伝子の発現は阻害される。しかし、青色光を照射して改良型の光活性化型 Cre リコンビナーゼ (PA-Cre) が作動すると、ストップカセットが除去され、レポーター遺伝子の発現が可能と

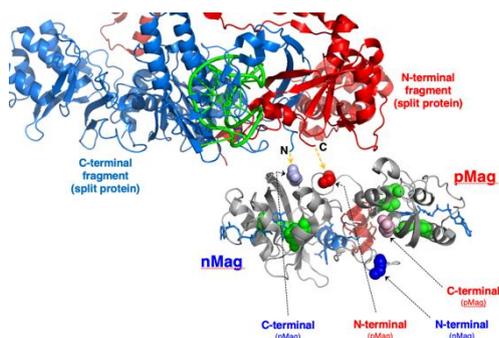


図 1: 構造情報をもとにした Magnet システムの改良

なる。一方、青色光を照射しない暗所下ではストップカセットは残存し、レポーター遺伝子の発現は起こらない。この暗所下でわずかに見られるレポーター発現を「リーク活性」と呼ぶ。今回の実験では、レポーター遺伝子として生物発光タンパク質のホタルルシフェラーゼ (Fluc) を用いた。具体的には、まず2枚の96ウェルプレートに細胞を播種し、24時間後にリポフェクション法により各プラスミドDNAを細胞に導入した。プラスミド導入後は24時間、プレートを暗所に置き、さらにその後、青色光を照射するグループと暗所下に置くグループの2群に分け、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養した。青色光の照射にはLEDアレイを使用した(図2A)。24時間後、暗所下および青色光を照射したプレートの培地を、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に交換し、その発光シグナルを検出した。

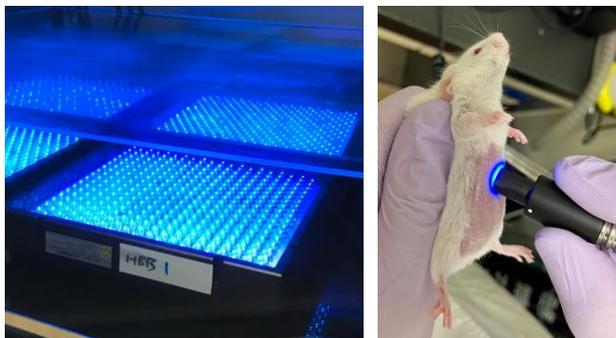


図2:(A)細胞への光照射に用いた青色LEDアレイ(波長:470±20nm,光強度:1.0Wm<sup>2</sup>), (B)マウスへのLEDポイント照明装置による局所的な光照射の様子

### 3. 実験結果と考察

「concatenation」アプローチをMagnetシステムに適用した結果、暗所下での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と比べて顕著に向上させることに成功した。これは、細胞内における濃度依存性の課題を「concatenation」により克服できたためである。現在、改良型PA-Creについては、分割位置や細胞内での局在、さらにCreとMagnetシステム間の距離といったパラメータの最適化を進めており、暗所下でのリーク活性をさらに低減しつつ、青色光照射時の活性を一層高めたPA-Creの開発を目指している。

### 4. 今後の展開

本研究では、既存のMagnetシステムに「concatenation」アプローチを導入し、従来を凌駕する新たな基盤技術の開発に成功した。この改良型MagnetシステムをPA-Creに適用し、その有効性を検証した。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)に改良型PA-Creを搭載し、マウスを用いた動物実験へと展開することで、光スイッチ医療の実現に向けた実証研究を進める予定である(図2B)。

さらに、遺伝子医薬としての実用化を見据え、近年AAVベクターへの搭載が可能となったCRISPR-Casシステムに、本研究で開発した新しい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も進めている。今回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長を備えており、これまでの技術では困難だった新たな光スイッチ医薬の創出を可能にすると考えている。これについても研究開発を進めている。

また、我々が開発した光スイッチ技術は、医療分野への応用にとどまらず、微生物を利用した有用物質の生産への応用にも着手している。

### 【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, 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).

# 業績

## 【原著論文】

1. Y. Aono, T. Nakajima, W. Ichimiya, M. Yoshida, and M. Sato, "A highly efficient fluorescent probe to visualize protein interactions at the super-resolution" *ACS Chemical Biology*, 19, 1271-1279 (2024)
2. T. Nakajima, Y. Kuwasaki, S. Yamamoto, T. Otabe and M. Sato, "A red light-activatable endogenous gene transcription system" *Methods in Molecular Biology*, 2840, 45-55 (2025).

## 【総説】

1. 佐藤守俊「生命現象の光操作技術の創出」*細胞*, Vol.56 No.9 p4-8(2024)
2. 佐藤守俊「生体イメージング研究への応用が期待される光操作技術の創出」*実験医学*, Vol.42 No.19 p2979-2984(2024)

## 【書籍】

なし

## 【口頭発表】

1. 佐藤守俊  
「生命現象の光操作技術の創出」  
サイエンステクノフロンティアフォーラム、2024年4月6日、東京
2. 佐藤守俊  
「光スイッチによる物質生産プラットフォームの開発」  
GX 実現に向けた異分野連携シンポジウム、2024年4月15日、東京
3. HE JIXUAN、佐藤守俊  
「Enhancing the Photoactivated Heterodimerization "Magnet" by Directed Evolution」  
東京大学生命科学シンポジウム、2024年6月22日、東京
4. 河田紗弥、小田部堯広、佐藤守俊  
「Development of light-controllable bacteria」  
東京大学生命科学シンポジウム、2024年6月22日、東京
5. Cai Dewen、Kawano Fuun、Sato Moritoshi  
「Split-protein-based efficient and enhanced degradation (SPEED) approach for chemogenetic engineering with no leakiness」  
東京大学生命科学シンポジウム、2024年6月22日、東京
6. 佐藤守俊  
「ゲノムの光操作技術の創出」  
第30回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、2024年7月18日、横浜
7. Dewen Cai、Fuun Kawano、Moritoshi Sato  
「Split-protein-based efficient and enhanced degradation (SPEED) for Chemogenetic Engineering in Mammalian Cells with no Leakiness」

8. 小田部堯広、大木悠翔、橋本講司、佐藤守俊  
「ゲノムの光操作技術の開発」  
Chem-Bio Joint Seminar 2024、2024年8月26日、仙台
9. Yuki Aono, Takahiro Nakajima, Wataru Ichimiya, Mayumi Yoshida and Moritoshi Sato  
「Highly efficient fluorescent probe to visualize protein interactions at super-resolution」  
Chem-Bio Joint Seminar 2024、2024年8月26日、仙台
10. 中舘尚人、青野侑基、橋本講司、佐藤守俊  
「バイオものづくりの商用化の鍵となる光操作型 T7RNAP の開発」  
Chem-Bio Joint Seminar 2024、2024年8月26日、仙台
11. 中嶋隆浩、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 2024、2024年8月26日、仙台
12. 展天騏、青野侑基、河野風雲、佐藤守俊  
「赤色光スイッチング抗体様分子の開発」  
Chem-Bio Joint Seminar 2024、2024年8月26日、仙台
13. 鈴木彩音、中嶋隆浩、佐藤守俊  
「赤色光で制御可能な photoactivatable Flp (RedPA-Flp) の創出」  
Chem-Bio Joint Seminar 2024、2024年8月26日、仙台
14. 河田紗弥、小田部堯広、佐藤守俊  
「光操作可能な細胞医薬 (オプトバクテリア) の開発」  
第64回生命科学夏の学校、2024年8月30日、長崎
15. 河田紗弥、小田部堯広、駒大輔、大橋博之、山中勇人、佐藤守俊  
「光スイッチによる物質生産プラットフォームの開発」  
第76回日本生物工学会大会、2024年9月8日、東京
16. 佐藤守俊  
「生命現象の光操作技術の創出」  
第55回中部化学関係学協会支部連合秋季大会、2024年11月2日、名古屋
17. 青野侑基、中嶋隆浩、一宮航、吉田まゆみ、佐藤守俊  
「タンパク質間相互作用を超高解像度で可視化する蛍光プローブ」  
第97回日本生化学会大会、2024年11月6日、横浜
18. 佐藤守俊  
「生命現象の光操作技術の創出」  
第97回日本生化学会大会、2024年11月7日、横浜
19. 佐藤守俊  
「生命現象の光操作技術の創出」  
第34回日本光線力学学会学術講演会、2024年11月9日、京都
20. 佐藤守俊  
「生命現象の光操作技術の創出」  
メディカルトランスフォーメーション研究センターワークショップ、2024年11月18日、神戸

21. 佐藤守俊  
「Optical manipulation of the genome」  
第 47 回日本分子生物学会年会、2024 年 11 月 27 日、  
福岡
22. 青野侑基、中嶋隆浩、一宮航、吉田まゆみ、佐藤守俊  
「タンパク質間相互作用を超高解像度で可視化する蛍光  
プローブ」  
第 47 回日本分子生物学会年会、2024 年 11 月 29 日、  
福岡
23. 野田昌生、甲州亮太、滝野直美、伊藤美加、小田部堯  
広、伊藤真人、佐藤守俊、村松慎一  
「AAV ベクターによる難聴の遺伝子治療開発」  
第 7 回 JMU-CGTR シンポジウム 2025、2025 年 2 月  
20 日、栃木
24. 佐藤守俊  
「光スイッチ技術の開発と応用」  
日本農芸化学会 2025 年度大会、2025 年 3 月 6 日、  
札幌
25. 小田部堯広、佐藤守俊  
「ゲノムの光操作技術の開発」  
核酸の生物有機化学ミニシンポジウム、2025 年 3 月 8  
日、大阪

#### 【特許】

- (1) 国内特許出願 0 件
- (2) 国際特許出願 1 件