

研究概要集2023 目次 【研究開発部】

有望シーズ展開事業

「光スイッチ医療創出」プロジェクト

◆総括	72
◆光スイッチ医療のための近赤外光スイッチタンパク質の開発	75
◆光スイッチ遺伝子医薬の開発	79
◆業績	82

「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. 2022 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、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強力なリサーチツールを提供するとともに

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 1 年目となる 2022 年度は、以下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. 2022 年度の研究成果

以下に挙げるのは、2022 年度の具体的な研究成果である。

- (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 8）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。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。

- (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ピリベルジン (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。抗体様分子であるアフィボディの変異体ライブラリを作製し、リボソームディスプレイ法を用いて、赤色光を照射した条件でのみ DrBphP と結合するアフィボディをバインダー候補として単離した。この進化分子工学的アプローチで得られたバインダー候補に対してアミノ酸変異や末端のアミノ酸の削除といった改変を加えることで、赤色光照射時の結合効率を改善したバインダーの開発に成功した。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。

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。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。

(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。

具体的には、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。

今後は、上述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。また、本研究の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、すでに研究をスタートさせている。

3. まとめと今後の展望

上述のように、2022 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。2023 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いる。光スイッチタンパク質を用いたさらなる応用展開の開拓に向けて研究を実施している。

本研究の一部は、文部科学省地域イノベーション・エコシステム形成プログラムにより実施した。

【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, 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).
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. 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).
6. 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).
7. 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).
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).

光スイッチ医療のための 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光スイッチタンパク質と呼ばれる光操作の基盤技術が開発された。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（図1）。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（図1）。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る。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）。MagRedは、放射線抵抗性細菌が有するバクテリオフィトクロム（DrBphP）と、これに結合する人工的なタンパク質（以下、バインダー）からなる。

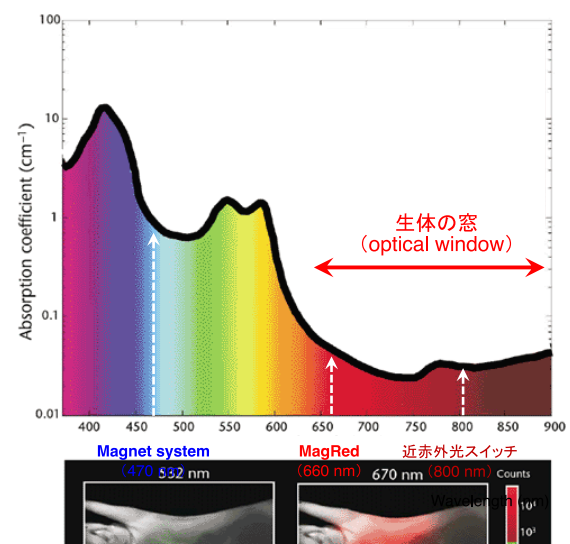


図1. 生体組織の光透過性。生体組織による赤色光や近赤外光の吸収は、青色光の場合の20分の1程度なので、赤色光や近赤外光の方が青色光よりも生体組織透過性が高い。

DrBphPは赤色光に応答して構造が大きく変化する性質を持っている。我々は、このDrBphPの構造変化を認識して結合するようなバインダーを、進化分子工学に基づいて開発した。具体的には、抗体様分子であるアフィボディの変異体ライブラリを作製し、リボソームディスプレイ法を用いて、赤色光を照射した条件でのみDrBphPと結合するアフィボディをバインダー候補としてまず単離した。さらにこのバインダー候補に対して、アミノ酸変異等の改変を加えて、赤色光照射時の結合効率を改善することに成功した。この開発したMagRedの性質を詳しく調べたところ、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ことがわかった。また、高い汎用性を持つこともわかり、MagRedを用いて、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）。

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を開発した。この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（図1）。

2. 実験と結果

(1) 近赤外光スイッチタンパク質の開発

MagRedの場合とは異なり、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2）。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_{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にのみ、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ことができる（図2）。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た（図3）。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1.8倍しか遺伝子活性化を誘起できない（図3）。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き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開発研究を行なった。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、暗所リーク活性を野生型の10分の1に低減させることに成功した（図4）。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。

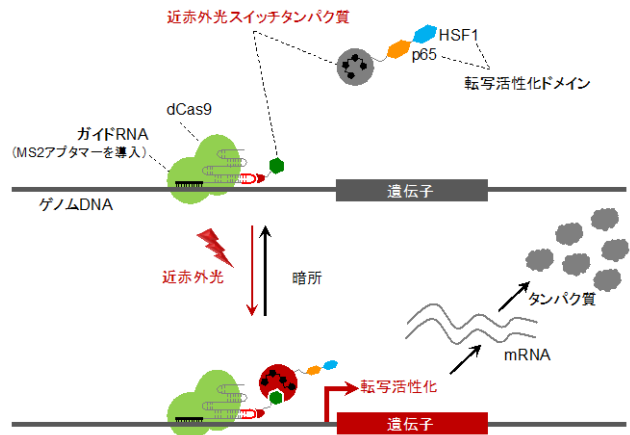


図2. ゲノム遺伝子の光活性化システム（CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system; CPTS）の原理図。

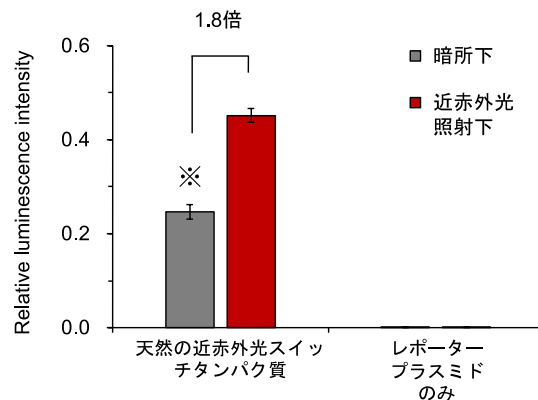


図3. 天然の近赤外光スイッチタンパク質のリーク活性。天然の近赤外光スイッチタンパク質は、暗所下でも結合してしまう。この「暗所下リーク活性（※）」が大変高いせいで、光照射による活性化はたかだか1.8倍の増加にしかない。

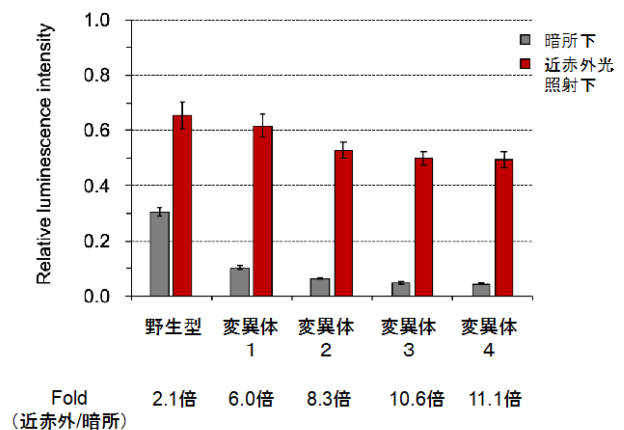


図4. 変異導入により改良した近赤外光スイッチタンパク質。さまざまな変異体を作製して、暗所下リーク活性を低減させる変異体を発見した。

(2) 培養細胞における近赤外光照射依存的なゲノム遺伝子の活性化

次に我々は NIR-CPTS を用いて、培養細胞内で近赤外光依存的にゲノム遺伝子を活性化できるかどうかを検討した。ヒト *ASCL1* 遺伝子をターゲットしたガイド RNA を用いたところ、NIR-CPTS は、暗所でのリーク活性がほとんど見られず、光照射によって 193 倍の遺伝子活性化を誘導できることがわかった。ガイド RNA としてヒト *HBG1* 遺伝子をターゲットした場合も、暗所でのリーク活性が見られず、光照射によって 1,366 倍もの遺伝子活性化を誘導できることがわかった。このように、近赤外光スイッチタンパク質の改良版を用いた NIR-CPTS は、培養細胞内で光照射依存的に非常に効率よくゲノム遺伝子の活性化を起こせることがわかった。

CRISPR-Cas9 の最大の特長は、様々な遺伝子をターゲットするガイド RNA を同時に用いて、様々な遺伝子を同時にコントロールできることである。NIR-CPTS においても、多種類のゲノム遺伝子を同時に光活性化できるかどうか検討した。その結果、4 種類のゲノム遺伝子 (*ASCL1* 遺伝子、*HBG1* 遺伝子、*MYOD1* 遺伝子、*IL1R2* 遺伝子) をそれぞれターゲットするガイド RNA を同時に用いてこれらの遺伝子を同時に光刺激で活性化できることがわかった (図 5)。

(3) 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 (図 1)。近赤外光スイッチタンパク質の改良版の波長依存性を、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 6)。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。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た (図 7)。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 8a)。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 (図 8b)。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改良版の特性を、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、近赤外光スイッチタンパク質の改良版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。

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

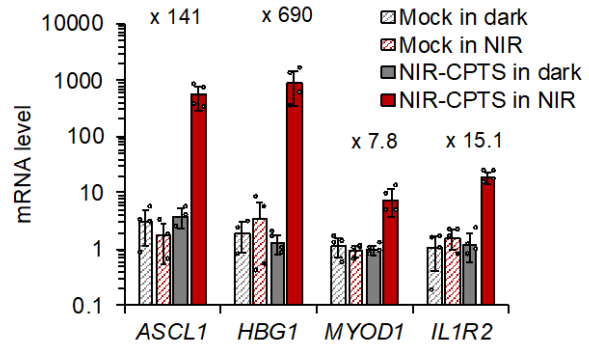


図 5. 複数の遺伝子の同時活性化。4 種類のガイド RNA を同時に用いることで、NIR-CPTS は 4 種類のゲノム遺伝子 (*ASCL1* 遺伝子、*HBG1* 遺伝子、*MYOD1* 遺伝子、*IL1R2* 遺伝子) を同時に光活性化することができた。

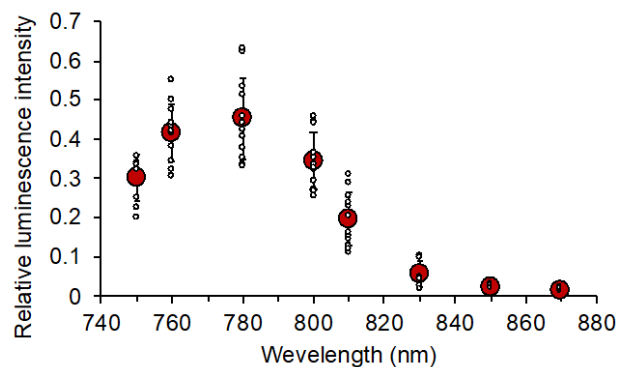


図 6. NIR-CPTS の活性の波長依存性。800 nm 以上の長波長光でも光活性化できる。

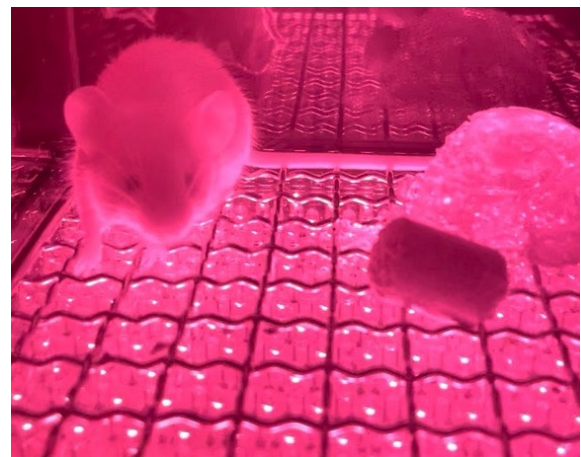


図 7. LED アレイを用いてマウスの生体外から光照射。

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. Hausser, M. *et al.*, *Nature*, **446**, 617-619 (2007)
2. Zhang, F. *et al.*, *Nature Protocols*, **5**, 439-456 (2010)
3. Kawano, F. *et al.*, *Nature Communications*, **6**, 6256 (2015)
4. Kuwasaki, Y. *et al.*, *Nature Biotechnology*, **40**, 1672-1679 (2022)

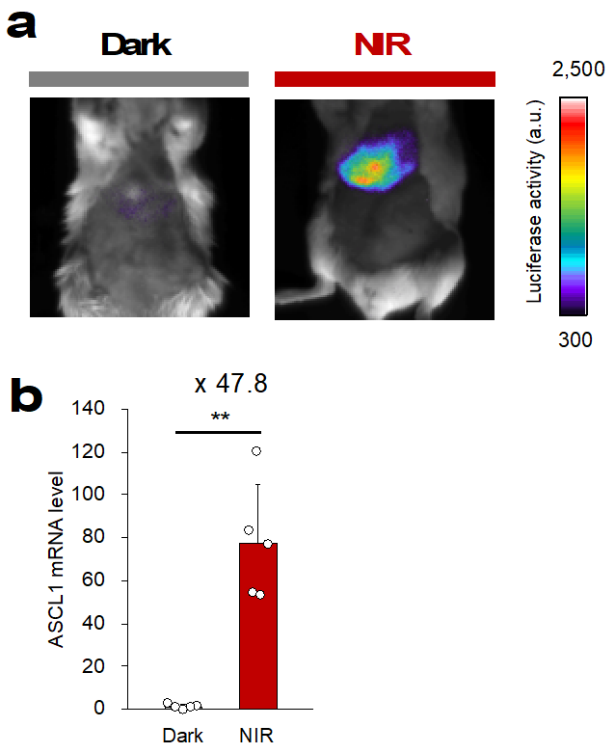


図 8. (a) NIR-CPTSを導入したマウス肝臓における生物発光レポーター遺伝子の光活性化。(b) NIR-CPTSを導入したマウス肝臓におけるゲノム遺伝子 (マウス *ASCL1* 遺伝子)

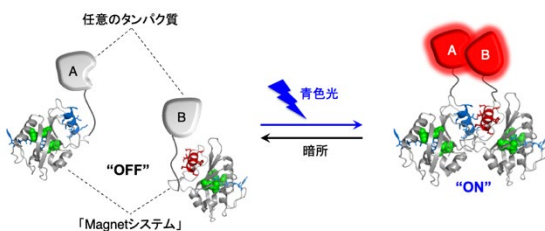
光スイッチ遺伝子医薬の開発

「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、ゲノム編集などの遺伝子治療技術の臨床応用が盛んに行われている。しかし、ゲノム編集技術の酵素活性の制御ができず、意図しない組織や細胞でも編集が起ってしまうなど、安全性の問題が課題となっている。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導入したゲノム編集の光操作技術を用いることで、安全性と有効性を高めた新たなコンセプトの光スイッチ遺伝子医薬の創出を目的としている。

我々の研究グループでは、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、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改良したり、新しい機能を付加したりすることで、光スイッチタンパク質である Magnet システムを開発した(参考文献 1)。Magnet システムは、青色の光を照射するとお互いに結合し、光照射を止めると解離するタンパク質のペアである。Magnet システムに任意のタンパク質 A とタンパク質 B の二分子を連結すると、青色光照射の照射によって A と B のタンパク質間の結合と解離を制御できるようになる(図 1)。この Magnet システムの特徴を利用することで、興味のある酵素などあらゆるタンパク質の働きを光を介することで自由自在に制御できるようになった。



Nature Communications, 6, 6256 (2015)

図 1: 我々のグループが先行研究開発した青色光スイッチタンパク質「Magnet システム」。青色光に反応して二量体を形成し、暗所下に戻すと単量体に戻る。任意のタンパク質 A・B を連結することで、結合と乖離を青色光照射のオンとオフで制御できる。

これまでに Magnet システムを基盤技術として、さまざまなゲノム編集ツールを組み合わせることで多様な光操作技術を開発してきた。

一つ目として、CRISPR-Cas9 システムの光操作技術の開発に取り組んでいる。これにより、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制御能を用いて、生体組織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)、遺伝子の発現のオン・オフを自由自在に繰り返し操作したりすることができるようになった(参考文献 3)。

二つ目として、バクテリオファージ由来の DNA 組換え酵素(Cre)の DNA 組換え反応を青色光の照射で誘導することができる光活性化型 Cre(PA-Cre)である(参考文献 4, 5, 6, 7)。PA-Cre の開発によって、狙った生体組織や細胞を標的として、遺伝子の働き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に役立つことが期待できる。また、治療に必要な遺伝子の発現を調整することができる遺伝子医薬としての応用が期待できる。さらにゲノム編集ツール以外のタンパク質へも我々の Magnet システムは展開されている(参考文献 8)。

上述したように Magnet システムは、2 分子間のタンパク質の結合・乖離を青色光で制御する優れた光スイッチタンパク質である。しかし、Magnet システムにも改善点が存在する。それは、2 分子間の反応を利用するため、細胞内へ導入したツールの性能が細胞内での濃度に大きく影響を受けてしまう点である。つまり、2 分子が細胞内で出会う確率が低いと反応効率も低くなり、遺伝子治療薬として応用する際に高い治療効果を得ることが難しくなることが予想される。そこで、この課題を克服ために Magnet システムへの改良を施し、新たな基盤技術の開発を行なった。

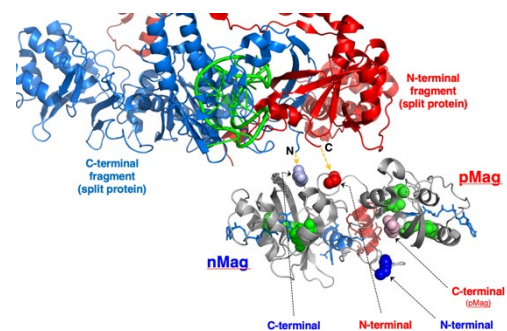


図 2: 構造情報を利用した Magnet システムの改良

2. 実験方法

(1) Magnet システムの改良

既存の Magnet システムでは 2 分子間の反応を利用するため細胞内での濃度に影響を受けやすくなってしまふ。そこで我々は、構造情報をもとにした「Concatenation」のアプローチを導入することで新たな Magnet システムを開

発した(図 2)。これにより青色光照射時における反応効率の改善を期待した。新たに開発した Magnet システムを既存の光活性化型 Cas9(PA-Cas9)に導入してその反応効率を評価した(参考文献 2)。

(2) 改良型 PA-Cas9 の評価

改良型 PA-Cas9 の評価は、細胞内に存在する遺伝子に対してゲノム編集によって生じる Insertion and Deletion (indel) の効率を観測することで行った。2 枚の 96 ウェルプレートに細胞を播種して、24 時間後にリポフェクション法を用いて各プラスミド DNA を細胞へ導入した。プラスミド DNA の導入後、暗所に置くプレートと

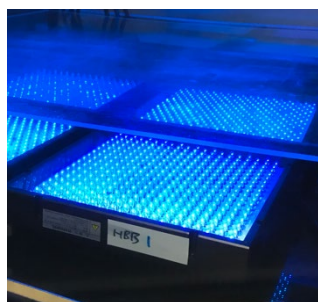


図 3: 細胞への光照射に用いた青色 LED アレイ(波長: 470 ± 20 nm, 光強度: 1.0 W m^{-2})。

青色光を照射するプレートに分けて 37°C の CO_2 インキュベーター内で 48 時間の反応を行った。青色光の照射は、LED アレイを用いて行った(図 3)。48 時間後、暗所に置いたプレート及び青色光を照射したプレート内の細胞からゲノム DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA をテンプレートとして PCR 法を用いて、*VEGFA* 遺伝子の編集部位近傍の配列を増幅した。増幅して得られた PCR 産物を精製し、Tracking of Indels by Decomposition (TIDE) assay 法を用いてゲノム編集によって生じた Indel の効率を評価した(参考文献 9)。

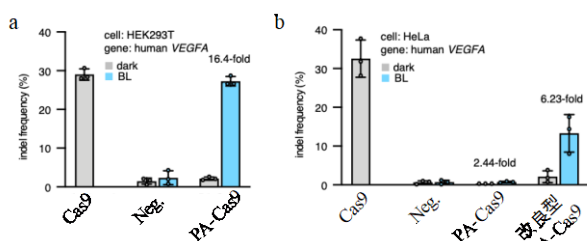


図 4: a) HEK293T 細胞のようなタンパク質の発現レベルが高い細胞内では、2 分子型 PA-Cas9 の活性は非常に高い。b) HeLa 細胞のようなタンパク質の発現レベルが低い細胞では、2 分子型 PA-Cas9 の活性は著しく低下したが、改良型 PA-Cas9 では、HeLa 細胞でも高いゲノム編集効率を示した。

3. 実験結果と考察

Magnet システムに「Concatenation」によるアプローチを導入したことで、暗所下での活性はほぼ変わらず、青色

光を照射した時の活性は既存の PA-Cas9 よりも大幅に向上した(図 4)。これは「Concatenation」による改良を施したことによって、細胞内での濃度の影響を克服できたことを示している。

4. 今後の展開

本研究では、既存の Magnet システムに「Concatenation」によるアプローチを導入することで、既存の Magnet システムを超える新たな基盤技術の創出に成功した。現在、PA-Cas9 と並行してこの新たに開発した Magnet システムを PA-Cre にも導入して、その有効性を検証しているところである。今後は、遺伝子治療のベクターとして多く利用されているアデノ随伴ウイルス(AAV)をベクターとして、我々の開発したゲノム編集の光操作技術を搭載して、マウスを用いた動物実験へと展開していく予定である。しかし、現状の AAV ベクターには搭載できる遺伝子サイズに制限がある。そこで、遺伝子医薬としての出口を見据えて、近年報告されている AAV ベクターに搭載可能な CRISPR-Cas システムに本研究で新たに開発した Magnet システムを展開して、光スイッチ遺伝子医薬の開発を進めていく。

【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.deSena-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. E. K. Brinkman, T. Chen, M. Amendola, B. van Steensel, “Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition” *Nucleic Acids Res.* **42**, e168 (2014).

業績

【原著論文】

- 1.Y. Koganezawa, M. Umetani, M. Sato and Y. Wakamoto, "History-dependent physiological adaptation to lethal genetic modification under antibiotic exposure" *eLife*, 11, e74486 (2022).
- 2.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" *Nature Biotechnology*, 40, 1672-1679 (2022).

【総説】

- 1.佐藤守俊「ゲノムの光操作技術の創出」*生物工学会誌*, 日本生物工学会, 2022年, 第100巻, 8号, p429-432.
- 2.T. Otabe, Y. Nihongaki and M. Sato, "A split CRISPR-Cpf1 platform for inducible gene activation" *Methods in Molecular Biology*, 2577, 229-240 (2022).
- 3.佐藤守俊「光で操る生命現象」*バイオサイエンスとインダストリー*, 2023年, 第81巻, 1号, p8-9.
- 4.佐藤守俊「赤色光を用いて生体深部における遺伝子発現を操作する技術」*バイオサイエンスとインダストリー*, 2023年, 第81巻, 1号, p35-37.
- 5.佐藤守俊「赤色光による遺伝子発現の光操作」*実験医学*, 2023年, 第41巻, 4号, p596-602.

【口頭発表】

- 1.佐藤守俊
「光スイッチタンパク質の発明とその応用」
ミーバイオ×セツロテック コラボ Web セミナー, 2022年6月9日, オンライン
- 2.小田部堯広, 中嶋隆浩, 佐藤守俊
「Split-CRISPR-Cas12a システムの開発と応用」
第10回 Chem-Bio Joint seminar 2022, 2022年8月9日, 東京大学駒場キャンパス
- 3.中嶋隆浩, 桑崎勇人, 山本翔太, 小田部堯広, 佐藤守俊
「生体深部での光操作を可能とする赤色光スイッチタンパク質の開発」
第10回 Chem-Bio Joint seminar 2022, 2022年8月9日, 東京大学駒場キャンパス
- 4.佐藤守俊
「生命現象の光操作技術の創出」
遺伝子・デリバリー研究会 第20回夏期セミナー,

- 2022年8月26日, 東京工業大学大岡山キャンパス
- 5.佐藤守俊
「生命現象の光操作技術の創出」
科学技術交流財団講演会, 2022年9月5日, オンライン
- 6.佐藤守俊
「生命現象の光操作技術の創出」
日本分析化学会第71年会, 2022年9月16日, 岡山大学津島キャンパス
- 7.佐藤守俊
「生命現象の光操作技術の創出」
奈良県立医科大学 V-iCliniX 講座 セミナー講演, 2022年9月20日, オンライン
- 8.佐藤守俊
「生命現象の光操作技術の創出」
第73回日本皮膚科学会中部支部学術大会, 2022年10月30日, 富山国際会議場
- 9.小田部堯広, 中嶋隆浩, 佐藤守俊
「遺伝子治療のための split-CRISPR-Cas12a システムの開発」
第95回生化学会大会, 2022年11月9日, 名古屋国際会議場
- 10.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コントロールするための赤色光スイッチタンパク質(MagRed)の開発」
第95回生化学会大会, 2022年11月10日, 名古屋国際会議場
- 11.中嶋隆浩, 桑崎勇人, 山本翔太, 小田部堯広, 佐藤守俊
「A red light-responsive photoswitch for deep tissue optogenetics」
The 13th international Meeting of the Asian Network of Research Resource Centers, 2022年11月18日, オンライン
- 12.佐藤守俊
「Optical control of the genome」
19th International conference on retinal proteins, 2022年11月2日, ロイトン札幌ホテル
- 13.小田部堯広, 中嶋隆浩, 佐藤守俊
「分割型 CRISPR-Cpf1 システムによるゲノム操作技術の開発」
第45回日本分子生物学会年会, 2022年11月30日, 幕張メッセ
- 14.中嶋隆浩, 桑崎勇人, 山本翔太, 小田部堯広, 佐藤守俊
「生体深部での光操作を可能とする赤色光スイッチタンパク質(MagRed)」

第 45 回日本分子生物学会年会, 2022 年 11 月 30 日, 幕
張メッセ

15.佐藤守俊

「生命現象の光操作技術の創出」

第 45 回日本分子生物学会年会, 2022 年 12 月 2 日, 幕
張メッセ

16.小田部堯広, 中嶋隆浩, 佐藤守俊

「新たな遺伝子治療のための光操作技術の開発」

第一回キングスカイフロントサイエンスフォーラム,
2023 年 2 月 6 日, 川崎生命科学研究センター(LiSE)

17.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」

第一回キングスカイフロントサイエンスフォーラム,
2023 年 2 月 6 日, 川崎生命科学研究センター(LiSE)

18.佐藤守俊

「生命現象の光操作技術の創出」

大隅基礎科学創成財団微生物コンソーシアム第 7 回全
体会, 2023 年 3 月 3 日, 東京都立大学南大沢キャン
パス

19.佐藤守俊

「Manipulating living systems by light」

RIKEN BDR Symposium 2023, 2023 年 3 月 8 日, 理化
学研究所神戸事業所

20.小田部堯広, 中嶋隆浩, 佐藤守俊

「Split-Cpf1 システムによるゲノム操作技術の開発」

化学工学会第 88 年会, 2023 年 3 月 16 日, 東京農工大
学小金井キャンパス

21.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」

化学工学会第 88 年会, 2023 年 3 月 17 日, 東京農工大
学小金井キャンパス

22.佐藤守俊

「生命現象の光操作技術の創出」

2023 年度東京都立大学若手研究者等選抜型研究支援
(重点研究)キックオフ研究会, 2023 年 3 月 28 日, 東
京都立大学南大沢キャンパス

【特許】

(1)国内特許出願 1 件

(2)国際特許出願 1 件