「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、ウィルス等は、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ィ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. 2023 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ィルスはいずれも、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 2 年目となる 2023 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. 2023 年度の研究成果

以下に、2023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。 NIR-CPTS に加えて、より複雑な遺伝子の働きを光操作するための新たな技術開発も実施している。

(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。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。特に、 遺伝子治療への応用の観点から、MagRed を導入した光 操作技術をアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターに搭載 して、マウスでの検討を実施している。

(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。当該光スイッチタンパク質を応用 した最近の成果として、例えば、モノネガウイルスの光 操作に基づく新たなコンセプトのウイルスベクターが実 現している (参考文献 10)。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、2023 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。2024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, 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. Furuhata, 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).
- 9. 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).
- 10. 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).

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

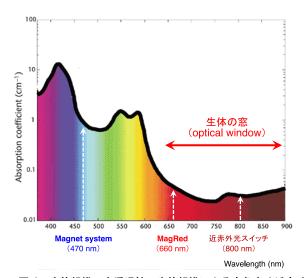


図 1. 生体組織の光透過性。生体組織による赤色光や近赤外 光の吸収は、青色光の場合の 20 分の 1 程度なので、赤色光 や近赤外光の方が青色光よりも生体組織透過性が高い.

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、へ 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)。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

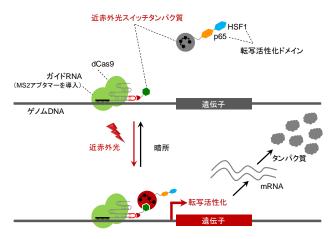


図 2. ゲノム遺伝子の光活性化システム (CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system; CPTS) の原理図。

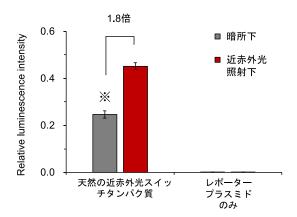


図 3. 天然の近赤外光スイッチタンパク質のリーク活性。天 然の近赤外光スイッチタンパク質は、暗所下でも結合してし まう。この「暗所下リーク活性(※)」が大変高いせいで、光 照射による活性化はたかだか 1.8 倍の増加にしかならない。

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(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

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

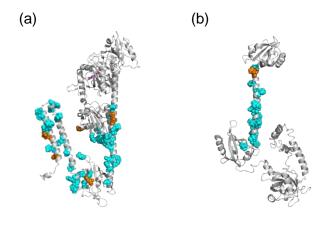


図 5. 近赤外光受容体(a) および結合パートナー(b) のアミノ酸残基のアノテーション付け。アラニン置換により、各アミノ酸残基の役割を調べた。シアン色は暗所下の結合に影響を与えると判明したアミノ酸残基であり、オレンジ色は近赤外光照射下の結合に影響を与えると判明したアミノ酸残基である。

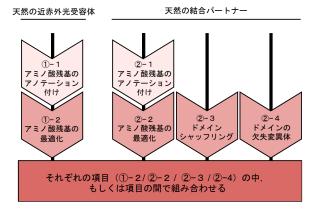


図 4. 天然の近赤外光スイッチタンパク質の暗所リーク活性を低減させるために、我々がとったアプローチ。まず、光受容体と結合パートナーのそれぞれに、変異導入やドメイン改変を施す。その後、それぞれの項目で最適化した変異体を、さまざまに組み合わせる。

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(Cas9DIOA/H840A; dCas9)とガイドRNAの複合体を、ゲノム遺伝子の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

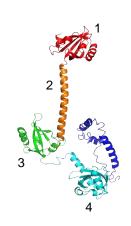


図 6. 天然の結合パートナーは、5つのドメインから構成される(図中1から5)。これらドメインの順番を入れ替えたり、いくつかのドメインを欠失させたりすることで、天然には存在し得ないドメイン変異体を作製できる。

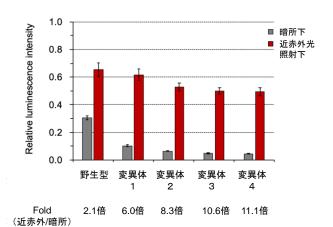


図 7. 各アプローチを組み合わせて、さまざまな変異体を作製することで、暗所下リーク活性を低減させることに成功した。

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 (図4)。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 (図4)。この結果、暗所下の結合に影響を与えるアミ ノ酸残基(図5aのシアン色)と近赤外光照射下の結合に 影響を与えるアミノ酸残基 (図5aのオレンジ色) 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(図 5b)。 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



図 9. LED アレイを用いてマウスの生体外から光照射。

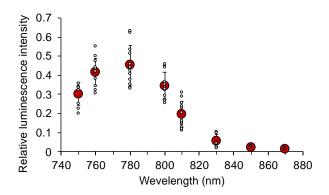


図 8. NIR-CPTS の活性の波長依存性。800 nm 以上の長波 長光でも光活性化できる。

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(図6)。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(図4)。我々は、さまざまな変異体の組み合わせを作製し、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7)。また、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(図1)。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8)。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9)。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10a)。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1 Ob)。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。

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. 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)

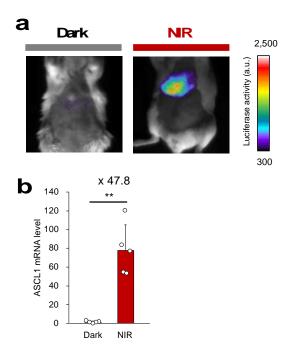


図 10. (a) NIR-CPTS を導入したマウス肝臓における生物 発光レポーター遺伝子の光活性化。(b) NIR-CPTS を導入 したマウス肝臓におけるゲノム遺伝子(マウス ASCL1 遺 伝子)の光活性化。

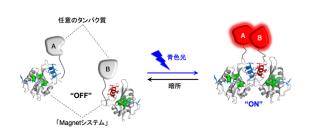
光スイッチ遺伝子医薬の開発

「光スイッチ医療創出」プロジェクト 小田部尭広

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、ゲノム編集技術では酵素活性の制御が難しく、意図しない組織や細胞でも編集が行われてしまうことがあり、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使用し、安全性と有効性を向上させた新しいコンセプトの光スイッチ遺伝子医薬の創出を目指している。

我々の研究グループは、糸状菌の一種である赤パンカビ (Neurospora crassa) が持つ光受容体タンパク質に注目し、これに様々なアミノ酸変異を導入して性質を改良したり、新機能を追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ことで、青色光の照射により 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して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で開発した青色光スイッチタンパク質「Magnet システム」。このシステムは、青色光に応答して二量体を形成し、暗所に戻すと単量体に戻る特性を持っている。任意のタンパク質 A・B をこのシステムに連結することで、青色光の照射オンとオフによって結合と解離を制御することができる。

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

一つ目の例として、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、生体組織中の特定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できるようになった(参考文献2)。さらに、遺伝子の発現のオン・オフを自由自在に繰り返し操作することも可能になった(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 DNA 組換え反応を青色光の照射で誘導する光活性化型 Cre (PA-Cre) の開発がある (参考文献 4,5,6,7)。PA-Cre の開発により、特定の生体組織や細胞を標的にして、遺伝子の働きを制御することが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されるとともに、現在、治療に必要な遺伝子の発現を調整する遺伝子医薬としての応用も検討している。

さらに、我々の Magnet システムは、ゲノム編集ツール以外のタンパク質へも展開している(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 システムは改善点が存在する。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やすい点である。具体的には、2 分子が細胞内で出会う確率が低いと反応効率も低下し、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、我々はこの課題を克服するためにMagnet システムを改良し、新たな基盤技術の開発を行なった。

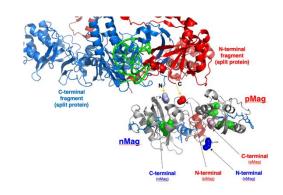


図 2: 構造情報をもとにした Magnet システムの改良

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いという課題があ

る。そこで我々は、構造情報をもとにした「Concatenation」 アプローチを導入し、新たな Magnet システムを開発した (図 2)。この新システムにより、青色光照射時の反応効 率の改善が期待される。新たに開発した Magnet システム を既存の光活性化型 Cre リコンビナーゼ (PA-Cre) に導入 し、DNA 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)がレポーター遺伝子の上流に配置 され、通常はレポーター遺伝子の発現が起こらないような 評価系で実施した。この評価系において、青色光を照射し た際に改良型の光活性化型 Cre リコンビナーゼ (PA-Cre) が存在すると、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になる。青色光を照射しない場合(暗 所下にあるとき)には、レポーター遺伝子の発現は起こら ない。暗所下におけるレポーター遺伝子の発現を「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であるホタルルシフェラーゼ(Fluc)を 用いた。以下の手順で実験を進めた。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、24 時間の間プレートを暗所に置 いた。プラスミド DNA の細胞導入から 24 時間後、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組分 け、37℃の CO2 インキュベーター内で培養した。青色光 の照射は、LEDアレイを用いて行なった(図3)。

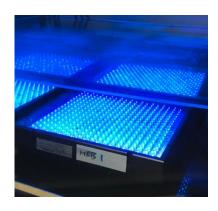


図 3:細胞への光照射に用いた青色 LED アレイ(波長: 470 ± 20 nm, 光強度: $1.0~\rm W~m^{-2}$)。

24 時間後、暗所に置いたプレートおよび青色光を照射したプレート内の培地を Fluc の基質であるルシフェリンを加えた培地に置換して、Fluc の生物発光を検出した。

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ことで、暗所下でのリーク活性はほぼ変わらずに、青色光を照射した時の活性は既存の PA-Cre よりも大幅に向上した(図 4)。これは、「Concatenation」により、細胞内での濃度の影響を克服できたからである。

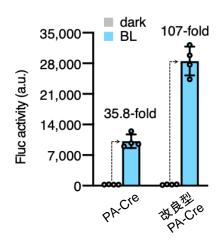


図 4:改良した Magnet システムを導入した PA-Cre は、暗 所での活性 (リーク活性) が PA-Cre とほとんど変わらず低 いままである。一方で、青色光を照射した時の活性はオリジ ナルの PA-Cre よりも大幅に向上した。

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。この新たに開発した Magnet システムをPA-Cre にも導入し、その有効性を検証することができた。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、改良型PA-Cre を搭載し、マウスを用いた動物実験へと展開し、光スイッチ医療の創出へ向けた実証を行っていく。それと同時に遺伝子医薬としての実用化を見据え、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、光スイッチ遺伝子医薬の開発を進めていく。我々の開発した光スイッチ技術は、医療への応用だけでなく、微生物による有用物質の生産にも展開している。

【参考文献】

- 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).
- Y. Nihongaki, F. Kawano, T. Nakajima, and M. Sato, "Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing" *Nat. Biotechnol.*, 33, 755-760 (2015).
- Y. Nihongaki, Y. Furuhata, 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).

- 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).
- 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).
- 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).
- K.Yoshimi, Y.Yamauchi, T.Tanaka, T.Shimada, M.Satoan d 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】

- T. Okura, M. Tahara, N. Otsuki, M. Sato, K. Takeuchi and M. Takeda, "Generation of photocontrollable recombinant bovine parainfluenza virus type 3" *Microbiology and Immunology*, 67, 166-170 (2023).
- Y. Koganezawa, Y. Wakamoto, M. Sato and M. Umetani, "Detecting photoactivatable Cre-mediated gene deletion efficiency in *Escherichia coli*" *Bio-protocol*, 13, e4685 (2023).

【総説】

 1.佐藤守俊「生命現象の光操作技術の創出」分析化学、 Vol.73 No.3 p87-93(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」

新学術領域研究「高速分子動画」シンポジウム、2023 年 5 月 10 日、横浜

2.佐藤守俊

「ゲノムの光操作技術の創出」

第96回内分泌学会学術総会、2023年6月3日、名古 屋

3.佐藤守俊

Manipulating biological processes by light

SPEED x Bottom-up biotech x ELSI joint workshop、2023 年7月3日、東京

4.河田紗弥、小田部尭広、佐藤守俊

「光操作可能な医薬品としてのオプトバクテリアの開 ※」

第 11 回 Chem-Bio Joint Seminar 2023、2023 年 8 月 4 日、八王子

5.小田部尭広、中嶋隆浩、佐藤守俊

「遺伝子治療のための分割型 CRISPR-Cas12a の開発」 第 11 回 Chem-Bio Joint Seminar 2023、2023 年 8 月 4 日、八王子

6.Jixuan He、河野風雲、佐藤守俊

「Enhancing the Performance of Photoswitch the "Magnet" for Optogenetic Control of Cellular Proteins」

第 11 回 Chem-Bio Joint Seminar 2023、2023 年 8 月 4 日、八王子

7.Dewen Cai、河野風雲、佐藤守俊

Split-protein-based efficient and enhanced degradation (SPEED) approach for leakless chemogenetic gene editing in

mammals]

第 11 回 Chem-Bio Joint Seminar 2023、2023 年 8 月 4 日、八王子

8.大木悠翔、小田部尭広、佐藤守俊

「光刺激で標的 DNA 配列を自在に書き換えるゲノム編 集技術の開発」

第 11 回 Chem-Bio Joint Seminar 2023、2023 年 8 月 4 日、八王子

9.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」 第 11 回 Chem-Bio Joint Seminar 2023、2023 年 8 月 4 日、八王子

10.鈴木彩音、中嶋隆浩、佐藤守俊

「赤色光で制御可能な photoactivatable Cas9 (paCas9)の創出」

第 11 回 Chem-Bio Joint Seminar 2023、2023 年 8 月 4 日、八王子

11.佐藤守俊

「生命現象の光操作技術の創出」

第31回東北生活習慣病研究会、2023年8月8日、仙台

12.佐藤守俊

「生命現象の光操作技術の創出」

コラボ Web セミナー第 11 弾 LSI メディエンス×セツロテック セミナー、2023 年 9 月 7 日、オンライン

13.佐藤守俊

「ゲノムの光操作」

15th International conference on tetrapyrrole photoreceptors in photosynthetic organisms、2023 年 9 月 21 日、静岡

14.中嶋隆浩、桑﨑勇人、山本翔太、小田部尭広、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」

キングスカイフロントサイエンスフォーラム 2023、 2023 年 11 月 2 日、川崎

15.小田部尭広、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」 キングスカイフロントサイエンスフォーラム 2023、 2023 年 11 月 2 日、川崎

16.佐藤守俊

「生命現象を光で操作する」

KISTEC Innovation Hub、2023 年 11 月 16 日、川崎

17. 佐藤守俊

Manipulating biological systems by light

The 46th annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan、2023 年 12 月 1 日、オンライン

18.佐藤守俊

「生命現象の光操作技術の創出」 光塾、2024年1月18日、東京

19. Nakajima Takahiro, Kuwasaki Yuto, Yamamoto Shota,

Otabe Takahiro, Sato Moritoshi

 $\lceil A \text{ red light--responsive photoswitch for deep tissue} \\ \text{optogenetics} \rfloor$

第 52 回日本免疫学会学術集会、2024 年 1 月 18 日、幕 張

20.佐藤守俊

「生命現象の光操作技術の創出」 第 12 回日本生物工学会東日本支部コロキウム、2024 年 2 月 29 日、東京

21.佐藤守俊

「生命現象の光操作技術の創出」 第 23 回日本再生医療学会総会、2024 年 3 月 21 日、新 潟

【特許】

- (1)国内特許出願 1件
- (2)国際特許出願 1件