

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H05534・20K20451

研究課題名（和文）近赤外光によるゲノムの光操作技術の創出

研究課題名（英文）Development of optical manipulation technology of the genome

研究代表者

佐藤 守俊（Sato, Moritoshi）

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：00323501

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：生体組織透過性が極めて高い長波長の光照射で生体深部の生命現象を操作できる新たな光スイッチタンパク質を開発した。光スイッチタンパク質は、細胞内や生体内のさまざまな生体分子の機能を光で操作するための基盤技術となるツールである。既にいくつかの光スイッチタンパク質が報告されていたが、光制御能が著しく低い点など、大きな課題が残されていた。本研究で開発した光スイッチタンパク質は、光照射のON・OFFで極めて高い制御能を有するとともに、その高い汎用性により、遺伝子発現等の光操作を実現した。この新しい光スイッチタンパク質は、生命現象の光操作の応用可能性を大きく広げることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、長波長の光照射による生命現象の光操作の基盤技術（プラットフォーム・テクノロジー）として、新たな光スイッチタンパク質を開発するとともに、当該の光スイッチタンパク質を応用した遺伝子発現の光操作技術を開発した。本研究の成果は、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。

研究成果の概要（英文）：We have developed a new photoswitching protein that can manipulate biological processes deep within the body by illuminating long-wavelength light. Photoswitching proteins are fundamental tools for manipulating the functions of various biomolecules in cells and living organisms using light. Although several photoswitching proteins have already been reported, there are still major issues to be solved, such as their remarkably low light-regulatability. The photoswitching protein developed in this study has an extremely high ability to respond to light illumination, and its high versatility enables manipulation of gene expression and other processes by light. This new photoswitching protein is expected to greatly expand the application possibilities of optical manipulation of biological processes.

研究分野：生体関連化学

キーワード：光操作 細胞 遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、生命現象の光操作を実現する基盤技術として、青色光でタンパク質間相互作用を制御できる“Magnet システム”を開発した (Nat. Commun. 2015). ゲノム編集ツールの CRISPR-Cas9 システムと Magnet システムを組み合わせ、青色光による光刺激でゲノムの塩基配列を自由自在に編集できる“PA-Cas9”を開発した (Nat. Biotechnol. 2015). さらに、Cre-loxP システムと Magnet システムを組み合わせ、DNA 組換え反応を青色光で光操作できる“PA-Cre” (Nat. Chem. Biol. 2016) を開発すると共に、ゲノム遺伝子の発現を光操作できる“Split-CPTS2.0” (Nat. Methods, 2017) を開発した. このように研究代表者は、光操作の基盤技術を創出し、これを応用して一連のゲノムの光操作技術を開発して新分野「オプトゲノミクス (opto-genomics)」の創成に繋げている.

### 2. 研究の目的

上述のように、研究代表者は、生命現象の光操作を実現する基盤技術を開発し、これを用いて新たな分野を開拓してきたが、それと同時に、当該光操作技術をマウスの生体 (in vivo) で用いた研究代表者の最近の事前検討により、当該技術が克服すべき課題が明確になってきた. 青色光は生体組織透過性が低いため、生体外からの照射で操作可能な部位は、生体表面から近い組織や器官に限定されてしまう点である. この技術的な課題を克服するために、本研究では、生体組織透過性が高い赤色光でコントロール可能な新たな光スイッチ (“MagRed”と名付けた) を開発することを目的とした. 赤色光は青色光に比べると生体組織に吸収されにくく、生体深部にまで届きやすい. 例えば、赤色光のレーザーポインターを親指に当てると、その赤色光が親指を透過することがわかる (図 1). 青色光や緑色光ではこうはいかない. この簡単な実験から、赤色光で作動する光スイッチを開発できれば、少なくとも数センチ程度の生体深部の光操作が実現可能になることを実感できる.



図 1. 赤色光は生体組織透過性が高い. 赤色のレーザーポインター (650 nm, 1 mW) を親指の腹側から照射し、反対側から撮影. 生体組織透過性が高い赤色光は親指程度の厚みの生体組織を容易に透過することがわかる.

### 3. 研究の方法

MagRed を開発するために、さまざまなバクテリアが有する赤色光受容体 (バクテリオフィトクロム、BphP) と呼ばれるタンパク質を検討し、特に放射線抵抗性細菌 (Deinococcus radiodurans) の赤色光受容体 (DrBphP) に着目した. DrBphP は哺乳類細胞に内在する化合物のビリベルジン (BV) を補因子として取り込み、赤色光を吸収すると構造変化する性質を持っている. しかし、DrBphP のこの性質だけを利用してさまざまなタンパク質の働きを操作するのは困難である. 研究代表者らは、赤色光による DrBphP の構造変化を認識して DrBphP に結合するタンパク質 (以下、結合パートナー) を開発することで、赤色光で作動する光スイッチを開発できると考えた.

### 4. 研究成果

上述の着想を実現するために、結合パートナーとして、ペプチドに加えて抗体様分子のナノボディやアフィボディ等を検討した結果、アフィボディと呼ばれるブドウ球菌のプロテイン A に由来する 58 アミノ酸からなる小さな抗体様分子が有望であることがわかった. 研究代表者等は、アフィボディの 13 個のアミノ酸残基に対してランダム変異を導入したライブラリーを作製し、リボソームディスプレイ法と次世代シーケンサーを用いた新たなアプローチを導入して、赤色光を照射した条件でのみ DrBphP と結合するアフィボデ

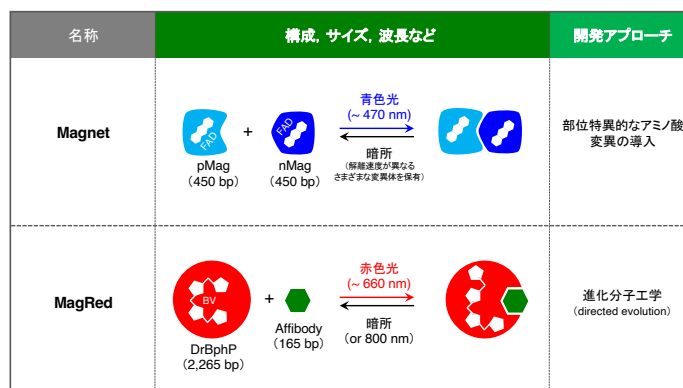


図 2. 研究代表者が開発した光スイッチ (Magnet, MagRed). Magnet は青色光でコントロール可能な光スイッチ. MagRed は赤色光でコントロール可能な光スイッチ.

ィを結合パートナーの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、さらに部位特異的なアミノ酸変異やアフィボディの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結合パートナーの開発に成功した。この DrBphP と結合パートナー (アフィボディ) からなる光スイッチを、Magnet の赤色バージョンという意味を込めて「MagRed」と名付けた (図 2)。研究代表者が先行研究で開発した青色光スイッチの Magnet は、アカパンカビが有する光受容体 (Vivid) に対して、その二量体の相互作用界面や補因子結合ドメインに部位特異的なアミノ酸変異を導入することで開発されている。一方、本研究の赤色光スイッチの MagRed の場合は、天然の結合パートナーが未発見であったため、進化分子工学のアプローチに基づいて光スイッチが開発されている。Magnet と MagRed では光操作に利用できる波長が異なるという点以外に、この開発のアプローチが全く異なる点も重要なポイントと言える。

MagRed は光操作の基盤技術なので、さまざまな応用が可能である。本研究では、MagRed を用いて赤色光による遺伝子発現の光操作技術 (Red-CPTS) を開発した (図 3)。この技術では、ゲノム編集で利用される CRISPR-Cas9 に変異を導入してヌクレアーゼ活性を欠失させた dCas9 タンパク質を用いている。さらに、MS2 RNA アプタマーを挿入したガイド RNA、MS2 タンパク質とアフィボディの融合タンパク質、

DrBphP と転写活性化ドメイン (p65 および HSF1) の融合タンパク質を用いる。赤色光を照射すると、アフィボディと DrBphP が結合することで転写活性化ドメインが標的遺伝子の転写開始点の上流領域に集積し、当該遺伝子の転写を活性化する。光照射をやめると、上述のアフィボディと DrBphP は再びバラバラになり、標的遺伝子の転写は停止する。このように、赤色光照射の有無によって、ガイド RNA で狙った遺伝子の発現をコントロールできる。

Red-CPTS は CRISPR-Cas9 システムを用いているので、ガイド RNA の塩基配列を設計するだけで、ゲノムにコードされたどんな遺伝子でも、その発現を赤色光で操作できる点が非常に使いやすい。

なお、他の研究グループから発表された赤色光スイッチを CPTS に導入したところ、赤色光を照射していない暗環境下にもかかわらず非常に高いレベルの遺伝子発現が観察された (図 4)。これはまさに、アクセルを踏んでいないのに猛スピードで走ってしまう車のようなものだろう。既存の赤色光スイッチは赤色光による制御能が著しく低いことがわかる。一方、MagRed を用いた Red-CPTS では、暗環境下では遺伝子発現がほとんど検出されず、赤色光を照射すると非常に効率良く遺伝子発現を誘導できることから、MagRed が極めて光制御能が高い光スイッチであることがわかった (図 4)。

研究代表者らは、Red-CPTS をコードするプラスミドを hydrodynamic tail vein injection 法を用いてマウスの肝臓に遺伝子導入し、Red-CPTS を当該臓器に発現させた。LED 光源を用いて、生体外から非侵襲的に赤色光を照射したところ、レポーター遺伝子 (ルシフェラーゼ遺伝子) の発現が肝臓で観察された。一方、赤色光を照射しなかったマウスでは、レポーター遺伝子の発現は全く観察されなかった。以上の検討から、Red-CPTS は生体外から非侵襲的に赤色光を照射することによって、肝臓での遺伝子の働きを効率良く操作できることを実証した。

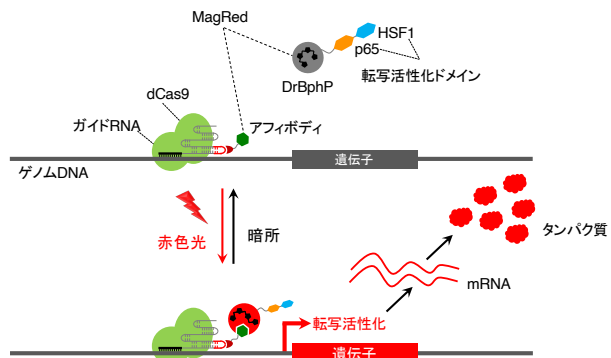


図 3. 赤色光による遺伝子発現の光操作技術 (Red-CPTS). MagRed を dCas9 と転写活性化ドメイン (p65-HSF1) に連結して細胞内に発現させると、赤色光の照射により、ガイド RNA が規定する標的遺伝子の転写開始点の上流領域に転写活性化ドメインを呼び寄せることで、当該遺伝子の転写を活性化できる。

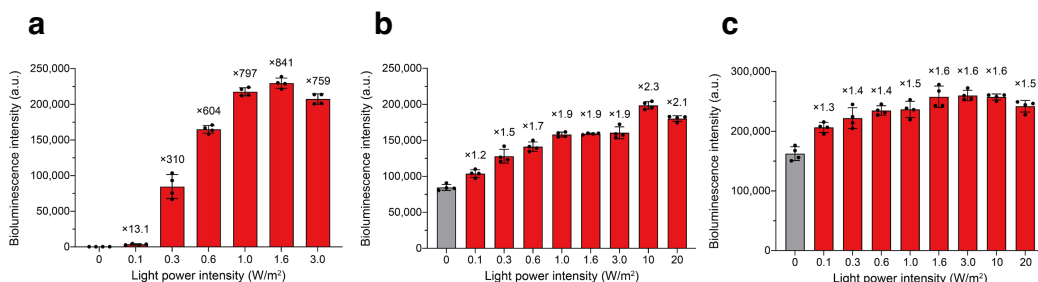


図 4. 本技術と類似技術の比較. (a) MagRed を遺伝子発現の光操作技術 (Red-CPTS) では暗所の遺伝子発現がほとんど観察されず、赤色光の照射により遺伝子発現を効率良く誘導できた. (b, c) 既存の赤色光スイッチ (b: RpBphP1-PpsR2, c: RpBphP1-QPAS1) を用いたところ、暗所にもかかわらず非常に高いレベルの遺伝子発現が観察され、赤色光による遺伝子発現の制御能は極めて低かった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 K. Kishi, H. Koyama, S. Oka, A. Kato, M. Sato and T. Fujimori	4. 巻 59
2. 論文標題 Repetitive short-pulsed illumination efficiently activates photoactivatable-Cre as continuous illumination in embryonic stem cells and pre-implantation embryos of transgenic mouse	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 genesis	6. 最初と最後の頁 e23457
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvg.23457	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 T. Takao, Y. Hiraoka, K. Kawabe, D. Yamada, L. Ming, K. Tanaka, M. Sato and T. Takarada	4. 巻 526
2. 論文標題 Establishment of a tTA-dependent photoactivatable Cre recombinase knock-in mouse model for optogenetic genome engineering	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 213-217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.03.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 K. Morikawa, K. Furuhashi, C. de Sena-Tomas, A. L. Garcia-Garcia, N. Gallerani, H. E. Yamamoto, A. D. Klein, R. Bekdash, S.-H. E. Park, G. S. Collins, F. Kawano, M. Sato, C.-S. Lin, K. L. Targoff, E. Au, M. Salling and M. Yazawa	4. 巻 11
2. 論文標題 Photoactivatable Cre recombinase 3.0 for in vivo mouse applications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-16030-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 K. Yoshimi, Y. Yamauchi, T. Tanaka, T. Shimada, M. Sato, and T. Mashimo	4. 巻 101
2. 論文標題 Photoactivatable Cre knock-in mice for spatiotemporal control of genetic engineering in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 125-135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-020-00482-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 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	4. 巻 40
2. 論文標題 A red light-responsive photoswitch for deep tissue optogenetics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1672-1679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41587-022-01351-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------