

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H04702

研究課題名(和文) 新たな光スイッチタンパク質の開発に基づく遺伝子および細胞機能の光操作技術の創出

研究課題名(英文) Development of photoswitching proteins for optical manipulation of genes and cellular functions

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) 32,300,000円

研究成果の概要(和文)：生体深部で生起する生命現象の光操作を可能にする基盤技術として、生体組織透過性が高い赤色光の照射でタンパク質の働きをコントロールすることができる新たな光スイッチタンパク質を開発した。さらに、この赤色光スイッチタンパク質をDNA組み換え酵素(DNAリコンビナーゼ)と組み合わせることで、赤色光でDNA組み換え反応をコントロールすることができる新たな技術を開発し、当該技術が生体外からの非侵襲的な光照射によってマウスの生体の深部に位置する臓器でのDNA組み換え反応をコントロールできることを実証した。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、生命現象の光操作の基盤技術として、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DNA組み換え反応の光操作技術を開発した。本研究の成果は、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)：As a core technology that enables optical manipulation of biological processes occurring in deep tissues, we have developed a new photoswitch protein that can control the function of proteins by red light illumination, which is highly permeable to biological tissues. Furthermore, by combining the photoswitch protein with DNA recombinase, we have developed a new technology that can control DNA recombination reactions with red light, and have demonstrated that this technology can control DNA recombination reactions in organs located deep within the mouse in vivo by non-invasive light illumination from outside the living body. This technology can control DNA recombination reactions in organs located deep inside the mouse (in vivo) by non-invasive light illumination from outside the body. This new photoswitch protein is expected to greatly expand the applicability of light manipulation of life phenomena.

研究分野：合成生物学

キーワード：光スイッチタンパク質 光操作 遺伝子 細胞 DNA組み換え Cre-loxP

1. 研究開始当初の背景

研究代表者が、生命現象の光操作に基づく学問分野 (optogenetics, 光遺伝学) を新たに開拓する上で、最も重要と考えて、まず最初に取り組んだのは、汎用性の高い基盤技術の開発である。この目的のために、研究代表者は、アカパンカビの青色光受容体 (Vivid) に目をつけ、様々なプロテインエンジニアリングを施して、サイズが非常に小さく、高い光反応性と可逆性を有する光スイッチタンパク質 “Magnet” を開発した (Nat. Commun. 2015)。さらに研究代表者は、Magnet とゲノム編集技術の CRISPR-Cas9 システムを組み合わせ、ゲノムの塩基配列を光刺激で自在に書き換える技術 (PA-Cas9) を開発した (Nat. Biotechnol. 2015)。さらに研究代表者は、PA-Cas9 の分子骨格に新たなアイデアを導入して、ゲノムにコードされた遺伝子の発現を自由自在に光操作する技術 (Split-CPTS2.0) を開発し、遺伝子発現の光操作に基づいて細胞分化を光操作できることを実証した (Nat. Methods 2017)。上述の光操作技術は、Cas9 タンパク質を二分割した断片 (split-Cas9) の会合を Magnet システムで制御するという方法論に基づいている。研究代表者は、この独自の方法論が、Cas9 のみならず、様々なタンパク質の光操作に応用できることを実証し、Cre-loxP 反応に基づく DNA 組換え反応の光操作技術 (PA-Cre: split-Cre) の会合を Magnet で制御 (Nat. Chem. Biol. 2016) や、精度と安全性を大幅に高めたゲノム編集の光操作技術 (PA-Cpf1: split-Cpf1) の会合を Magnet システムで制御 (Nat. Chem. Biol. 2019) 等を開発した。さらに、腫瘍溶解性ウイルスの RNA ポリメラーゼを二分割して Magnet を連結することで、光で狙って生体内のがん細胞を破壊できる光駆動型の腫瘍溶解性ウイルスを開発するなど、光操作技術の医療技術への応用展開も開始している (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019)。以上のように、研究代表者は、生命現象の光操作を実現する基盤技術として Magnet システムを開発すると共に、これを用いて生命の設計図であるゲノムの働きを自在に光操作する技術を次々と開発し、ゲノムの光操作に基づく新分野の潮流を生み出した。

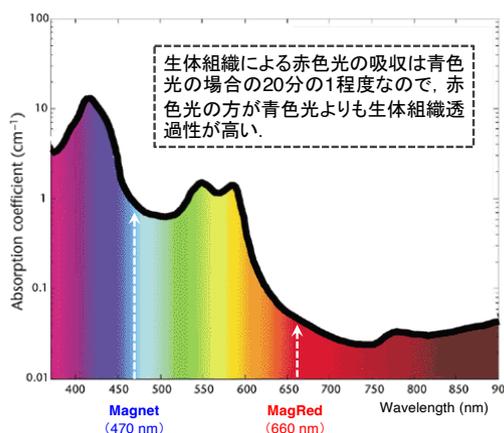


図 1. 赤色光は青色光よりも生体組織透過性が高い。赤色光で制御可能な光スイッチタンパク質を開発できればより生体深部の光操作が可能になる。

2. 研究の目的

Magnet を用いて開発した上述の技術は、いずれも、生体組織透過性が低い青色光で操作する必要がある (図 1)。このため、生体外からの光照射で操作可能な部位は皮膚や筋肉、肝臓の腹側など、生体表面から近い組織・器官に限定されることが、マウスで PA-Cre (研究代表者が先行研究で開発した DNA 組換え反応の光操作技術) を用いた研究代表者の最近の研究で明らかになった (Lab. Invest. 2020)。さらに、PA-Cre を用いて一定レベル以上の DNA 組換えを実行するには、生体表面から近い組織・器官でも、数時間以上、青色光を照射し続ける必要があることも明らかになっている。これらの結果は、光操作に利用する波長 (青色光) の問題を明確にしている。研究代表者は、Magnet システムの開発以来、世界中の研究者から 600 件以上に及ぶ問い合わせ (マテリアルリクエストや共同研究の依頼) を受けているが、その 38% は PA-Cre に関するものである。このことから、DNA 組換え反応の光操作技術に対する期待の大きさがうかがえる。もし、生体外からの非侵襲的な光照射で、PA-Cre では困難だった生体深部での DNA 組換え反応を光操作できるようになれば、そのインパクトは計り知れない。本研究では、青色光よりも遥かに生体組織透過性が高い赤色光の照射でコントロール可能な新たな基盤技術として、赤色光スイッチタンパク質を開発すると共に、光スイッチタンパク質を用いて、赤色光で活性化できる DNA 組み換え酵素 “RedPA-Cre” を開発する (図 2)。開発した RedPA-Cre をマウスに導入し、生体外からの非侵襲的な光照射で、生体深部で DNA 組換え反応を光操作できることを示す。

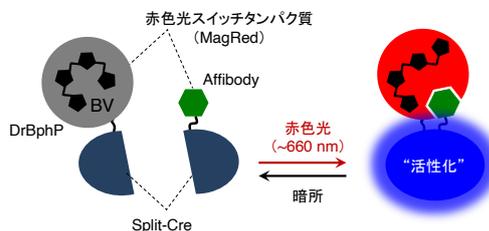


図 2. 赤色光による DNA 組換え反応の光操作技術 (RedPA-Cre)。

3. 研究の方法

本研究の赤色光スイッチタンパク質を開発するために、さまざまな細菌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タンパク質を開発できると考えた. また, Cre-loxP システムはバクテリオファージ P1 が有する DNA 組換えシステムであり, DNA 組換え酵素の Cre は loxP と呼ばれる 34bp の塩基配列に結合して 2 つの loxP 配列の間での組換え反応を触媒する. 研究代表者はまず, Cre タンパク質を二分割してその DNA 組換え活性を不活性化した. そして, 二分割により失活した split-Cre の N 末端側断片 (N-Cre) と C 末端側断片 (C-Cre) に赤色光スイッチタンパク質 (DrBphP とその結合パートナー) を連結することで赤色光でコントロール可能な DNA 組み換え酵素 (RedPA-Cre) を開発した (図 2).

4. 研究成果

赤色光受容体 (BphP) の結合パートナーとして, アフィボディと呼ばれるブドウ球菌のプロテイン A に由来する抗体様分子が有望であることがわかった. アフィボディは 3 本のアルファヘリックスからなる 58 アミノ酸の小さなタンパク質である. アフィボディの表面を構成する 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た. このライブラリーから, 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に基づいて, 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, 部位特異的なアミノ酸変異や削除変異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. このように開発した結合パートナー

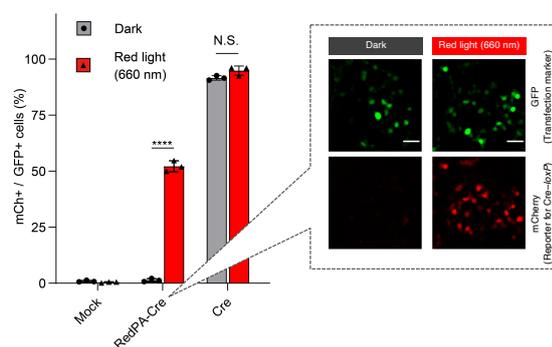


図 3. RedPA-Cre は赤色光を照射することで DNA 組み換え反応をコントロールすることができる.

(アフィボディ) と DrBphP 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. 先行研究で開発した青色光スイッチの Magnet は, アカパンカビの青色光受容体に対して, 二量体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.

さらに, MagRed を用いて, 赤色光でコントロール可能な DNA 組み換え酵素 (RedPA-Cre)

の開発を行なった. DNA 組換え反応を触媒する Cre リコンビナーゼは, 狙った遺伝子の塩基配列をゲノムからノックアウト (削除) するための酵素として世界中の研究室で広く利用されている. そこで Cre リコンビナーゼを 2 つに分割して不活性化し, この分割体 (split-Cre) に MagRed を連結することで, 暗環境下では DNA 組換え活性を持たず, 赤色光照射によって高い活性が出現する DNA 組換え酵素 (RedPA-Cre) を開発した (図 3). 赤色光で制御する 4 種類の従来技術と今回開発した RedPA-Cre を比較したところ, RedPA-Cre の方がはるかに効率良く DNA 組換え反応を光操作できることがわかった (赤色光と暗環境下での応答の比率を比べると, RedPA-Cre は既存の技術よりも 27 倍から 46 倍効率良く DNA 組換え反応を操作できた).

さらに, RedPA-Cre と上述の Red-CPTS をそれぞれマウスの肝臓に導入し, 生体外から非侵襲的に赤色光を照射することで, いずれも当該臓器において遺伝子の働きを効率良く操作できることを明らかにした (図 4).

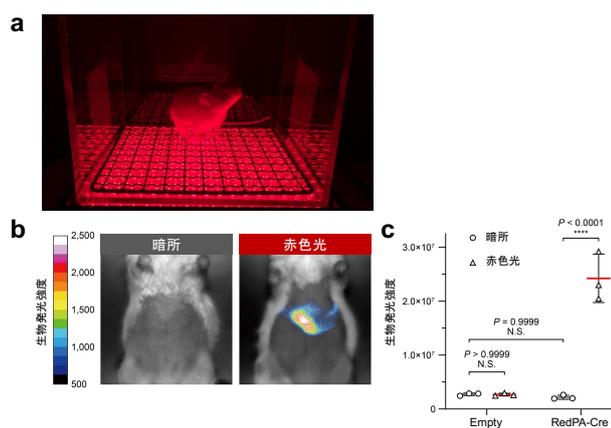


図 4. RedPA-Cre のマウス生体 (in vivo) での評価. (a) RedPA-Cre とレポーターを肝臓に発現させたマウスに赤色 LED で光照射. (b) 赤色光照射によって肝臓で DNA 組み換え反応が起こりルシフェラーゼは発現する要するを可視化. (c) b の実験の生物発光シグナルと定量化.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Y. Kuwasaki, K. Suzuki, G. Yu, S. Yamamoto, T. Otabe, Y. Kakahara, 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

1. 著者名 Y. Koganezawa, M. Umetani, M. Sato and Y. Wakamoto	4. 巻 11
2. 論文標題 History-dependent physiological adaptation to lethal genetic modification under antibiotic exposure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e74486
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.74486	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 -

〔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
---------	---------