

新たなゲノムの光操作技術の開発

Development of technology for optical manipulation of the genome

(日本化学会推薦)

代表研究者 東京大学 佐藤守俊 The University of Tokyo Moritoshi SATO

Deep penetration of red light into mammalian tissues, coupled with its low phototoxicity, presents a promising avenue for optogenetic applications. However, the development of effective red light-based optogenetic tools has been limited. In this study, we have developed MagRed, a red light-activatable photoswitch. MagRed comprises a red light-absorbing bacterial phytochrome incorporating a mammalian endogenous chromophore, biliverdin, and a photo-state-specific binder of the bacterial phytochrome. Red light illumination triggers the binding of these components, leading to the assembly of split-proteins. A key application of MagRed is the development of a red light-activatable Cre recombinase. This enables light-controlled DNA recombination in deep mammalian tissues, expanding the scope of biological research. Additionally, we have created red light-inducible transcriptional regulators based on CRISPR-Cas9 technology. These regulators demonstrate up to a 378-fold activation (average, 135-fold induction) of multiple endogenous target genes. The versatility and efficacy of MagRed position it as a pivotal tool for advancing optogenetic applications in diverse biological research fields.

研究目的

米国スタンフォード大学の Karl Deisseroth 博士の研究グループは、2005 年、緑藻の光受容器官に発現する光駆動型の陽イオンチャネル（チャネルロドプシン）を使って、光刺激で神経細胞の脱分極を引き起こし、神経細胞の活動を光操作することに成功した。以来、チャネルロドプシンは、脳の神経細胞の機能を解明するツールとして利用され、生命現象の光操作に基づく新たな学問分野（オプトジェネティクス）の開拓に繋がっている。しかし、このツールは細胞膜の膜電位の操作にしか利用できないため、その有用性は神経細胞等の興奮性細胞に限定され、それ以外の、いわば生体内で生起するほとんどの生命現象は、この新しい技術や学問の適用外であった。研究代表者は、もしオプトジェネティクスの適用範囲を大幅に拡張し、様々な生命現象を光で自在に操ることができるようになれば生命科学は大きく変わると考え、新しい光操作技術の開発を戦略的に行ってきた。

研究代表者が、生命現象の光操作に基づく学問分野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（参考文献 1）。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て、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（参考文献 2）。さらに研究代表者は、PA-Cas9 の分子骨格に新たなアイディアを導入して、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（参考文献 3）。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) (参考文献 4) 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) (参考文献 5) 等を開発した。さらに、腫瘍溶解性ウィルスの RNA ポリメラーゼを二分割して Magnet を連結することで、光照射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ィルス (参考文献 6) 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。このように、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てきた。

研究代表者が上述の研究を進める中で、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、生体外からの光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タンパク質 (“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。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タンパク質を開発できれば、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。

研究経過

赤色光でコントロール可能な新たな光スイッチタンパク質 (MagRed) を開発するために、さまざまなおかげアリアが有する赤色光受容体 (オカゲリオフィトクロム、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ビン (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動きを操作

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。

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プラリーを作製し、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タンパク質を、Magnet の赤色バージョンという意味を込めて「MagRed」と名付けた。研究代表者が先行研究で開発した青色光スイッチタンパク質の 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タンパク質の 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タンパク質が開発されている。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、さまざまなお用が可能である。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。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技術（赤色光による光スイッチタンパク質を 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。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タンパク質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タンパク質であることがわかった。

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。

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。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。

考察

本研究では、新たな光スイッチタンパク質として、赤色光のON-OFFで結合・解離を制御できる MagRed を開発するとともに、これを CRISPR-Cas9 システムや Cre-loxP システムと組み合わせて、新たなゲノムの光操作技術を開発した。本研究で開発した技術によって、ゲノムにコードされた遺伝子の発現を光刺激で自在に活性化することが可能になった。また、DNA 組み換え反応を自在に操作することが可能になった。このような高い時間・空間分解能で、かつ個々の遺伝子レベルで摂動を加えることが可能な光操作技術を用いることで、生命現象のメカニズムをさらに深く理解することが可能になるかもしれない。例えば、ヒトの脳では約 860 億個、マウスの脳では約 7000 万個の神経細胞がそれぞれの役割を持って活動している。マウスの脳にピンポイントで光を当て特定の神経細胞の特定の遺伝子の働きを操作した上で、その影響を観察すれば、光刺激で狙った神経細胞の遺伝子が脳の中でどのような役割を持っているのかを解明できるかもしれない。本研究の光操作技術は極めて一般性が高く、中枢神経系のみならず、生体内の様々な生命現象の理解を可能にする期待される。

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”, *Nature Communications*, **6**, 6256 (2015).

2. Y. Nihongaki, F. Kawano, T. Nakajima and M. Sato, “Photoactivatable CRISPR–Cas9 for optogenetic genome editing”, *Nature Biotechnology*, **33**, 755-760 (2015).
3. Y. Nihongaki, Y. Furuhata, T. Otabe, S. Hasegawa, K. Yoshimoto and M. Sato, “CRISPR–Cas9-based photoactivatable transcription systems to induce neuronal differentiation”, *Nature 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”, *Nature Chemical Biology*, **12**, 1059-1064 (2016).
5. Y. Nihongaki, T. Otabe, Y. Ueda and M. Sato, “A split CRISPR–Cpf1 platform for inducible genome editing and gene activation”, *Nature Chemical Biology*, **15**, 882-888 (2019).
6. M. Tahara, Y. Takishima, S. Miyamoto, Y. Nakatsu, K. Someya, M. Sato, K. Tani and M. Takeda, “Photocontrollable mononegaviruses”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **116**, 11587-11589 (2019).

研究の発表

口頭発表

1. 佐藤守俊, 生命現象の光操作技術の創出, サイエンスティクノフロンティアフォーラム, 2024 年 4 月 6 日
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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سفォーメーション研究センターウークショップ, 2024 年 11 月 18 日
6. 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

誌上発表

なし.