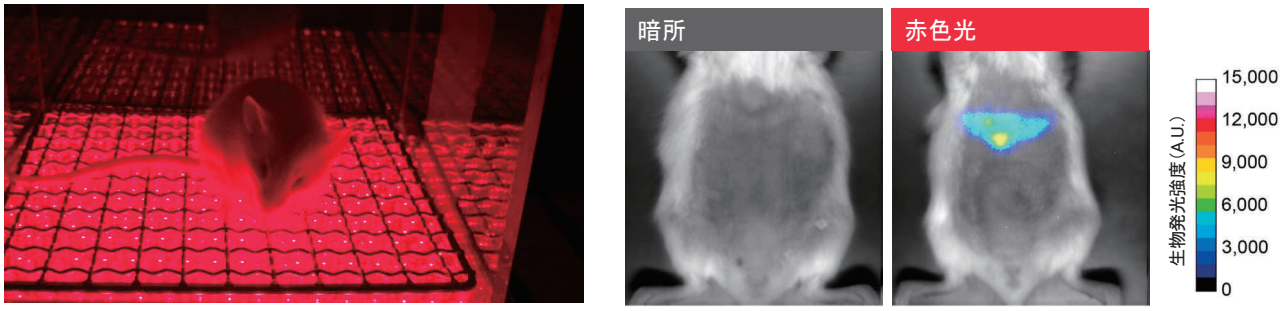
70　次世代光操作技術の創出	佐藤　守俊

【目的】研究代表者らは、生命現象を光で操作するために「Magnet」と名付けた光スイッチを 2015 年に開発した。Magnet は、青色光を吸収すると結合する二つのタンパク質のペアであり、操り人形で言えばヒモとか棒に相当する、光操作の基盤技術である。Magnet の開発によって、青色光で指令を与え、生命現象に関与するさまざまなタンパク質の働きを私たちの意図で操作することが可能になった。Magnet を応用した研究が進む一方で、Magnet の課題も明らかになっている。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を開発することを目的とした。

【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。

【結果】上述の着想を実現するために、アフィボディと呼ばれる抗体様分子の変異体ライブラリーを作製し、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。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を開発した。研究代表者らは先行研究で、ゲノム編集技術の CRISPR-Cas9 システムと Magnet を用いて、遺伝子発現の光操作技術「CPTS」を開発していた。CPTS に導入した Magnet を MagRed で置き換えることで、赤色光による遺伝子発現の光操作技術（Red-CPTS）を開発することができた。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。研究代表者らは、Red-CPTS を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、Red-CPTS が生体深部の遺伝子の働きを効率良く操作できることを実証した。

赤色光による生体内での遺伝子発現の光操作



70. 次世代光操作技術の創出

佐藤　守俊

東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻

Key words：光操作，光スイッチ，赤色，CRISPR，遺伝子

緒　言

研究代表者らは、生命現象を光で操作するための技術を開発している。細胞や生体に光を当て、分子レベルの現象を意のままに操作しようというのだ。光が得意とする高い時間・空間制御能をもってすれば、狙ったタイミングでのみ、狙った部位でのみ、様々な生命現象をコントロールできるかもしれない。このような未来を実現すべく、研究代表者らは「Magnet」と名付けた光スイッチを 2015 年に開発した［1］。Magnet は、青色光を吸収すると結合する二つのタンパク質のペアであり、操り人形で言えばヒモとか棒に相当する、光操作の基盤技術である。Magnet の開発によって、青色光で指令を与え、生命現象に関与するさまざまなタンパク質の働きを私たちの意図で操作することが可能になった。

Magnet を応用した研究が進む一方で、Magnet の課題も明らかになっている。Magnet は青色光で作動する光スイッチだが、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。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。

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。

結　果

1. 赤色スイッチの開発

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）[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。

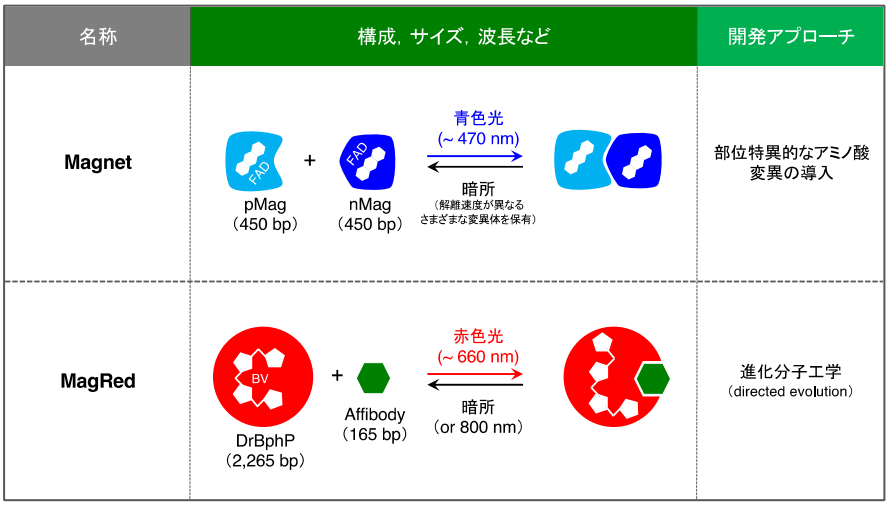


図 2.　研究代表者が開発した光スイッチ（Magnet、MagRed）
Magnet は青色光でコントロール可能な光スイッチ。MagRed は赤色光でコントロール可能な光スイッチ。

2. MagRed を用いた遺伝子発現の光操作技術の開発

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）[2]。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［3, 4］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 5）。

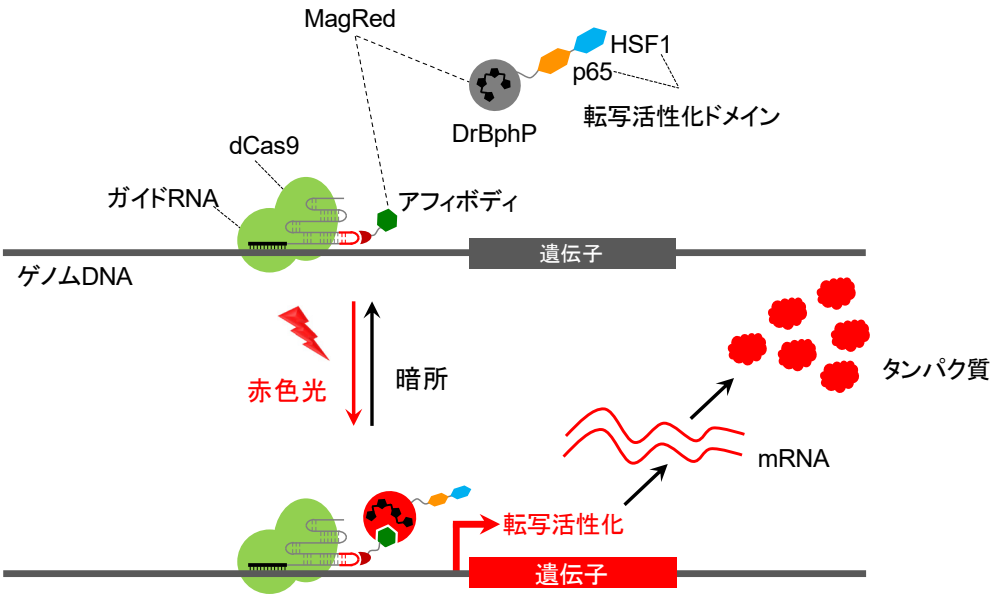


図 3. 赤色光による遺伝子発現の光操作技術（Red-CPTS）
MagRed を dCas9 と転写活性化ドメイン（p65 - HSF1）に連結して細胞内に発現させると、赤色光の照射により、ガイド RNA が規定する標的遺伝子の転写開始点の上流領域に転写活性化ドメインを呼び寄せることで、当該遺伝子の転写を活性化できる。

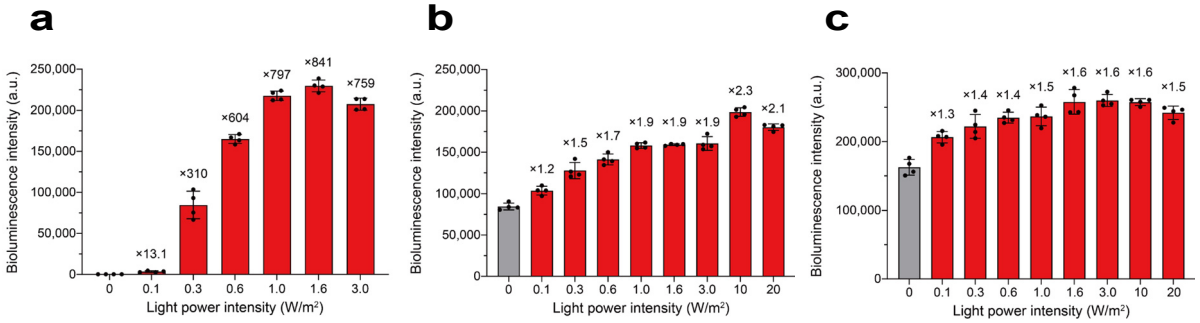


図 4. 本技術と類似技術の比較

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。

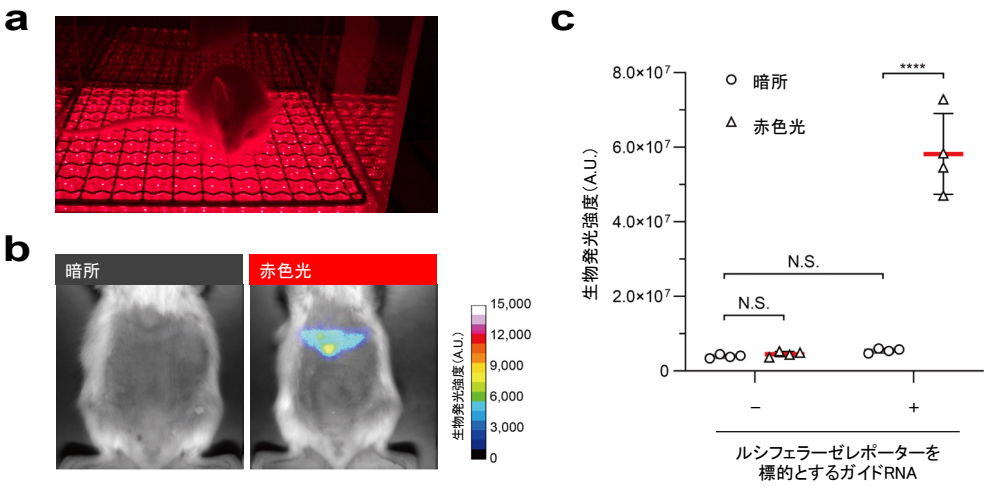


図 5. マウスの生体で遺伝子発現を光操作

a) Red-CPTS をコードするプラスミドと Red-CPTS の働きによりルシフェラーゼを発現するレポータープラスミドをマウスの肝臓に導入し、LED を用いて当該マウスに生体外からの非侵襲的に赤色光を照射。

b) 赤色光の照射で活性化した Red-CPTS の働きによりマウスの肝臓でレポーターからルシフェラーゼが発現する様子を可視化（右図）。一方、暗所では全くルシフェラーゼの発現は観察されなかった（左図）。

c) b) の実験においてルシフェラーゼの生物発光強度を定量化。Red-CPTS は暗所では全く働かないが、赤色光の照射によって遺伝子発現を誘導できる（右の 2 つのデータ）。左から N.S.：P＞0.9999、N.S.：P＝0.9999、****P＜0.0001（two-way ANOVA）。

考　察

本研究では、赤色光スイッチの MagRed を開発するとともに、MagRed を用いて赤色光で遺伝子発現を光操作できる技術の Red-CPTS を開発した。遺伝子発現はあらゆる生命現象の基盤となっているため、Red-CPTS を用いることで、様々な生命現象を私たちの意図で時間的・空間的に操作できるかもしれない。加えて、MagRed は一般性・汎用性

の高い基盤技術なので、その応用は遺伝子発現の光操作技術に限定されない。MagRed の開発は、生命現象の解明や、遺伝子治療、細胞治療など、新たな生命科学・医学分野の開拓に貢献すると期待される。

MagRed の開発以前にも、赤色光で制御できる光スイッチがいくつか報告されている。特に、シロイヌナズナ（Arabidopsis thaliana）に由来する光受容体（フィトクロム B : PhyB）とその結合タンパク質（PIF3 や PIF6）からなる赤色光スイッチタンパク質はよく知られている［5, 6］。しかし、この PhyB からなる赤色光スイッチを哺乳類細胞で使うには大きな制約があった。フィトクロモビリン（PΦB）もしくはフィコシアノビリン（PCB）という分子量 580 程度の有機化合物を添加する必要があるのだ。これは哺乳類細胞が PhyB の機能に必須の補因子である PΦB や PCB を産生できないためである。特にこの問題は、PhyB からなる赤色光スイッチタンパク質を生体内（*in vivo*）で使おうとする場合により深刻になる。PΦB や PCB を生体内で安定的に供給しなくてはならない。一方、MagRed を構成する DrBphP はビリベルジン（BV）という有機化合物を補因子とする。BV はヘムの代謝の過程で常に産生されているため、多くの哺乳類細胞や生体組織に存在している。このため、BV を添加しなくても、多くの哺乳類細胞や生体組織で MagRed は機能することができる。このような簡便性も MagRed の特長と言えるだろう。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、理化学研究所の清水義宏博士、東京都立大学の成川礼博士、コロンビア大学の矢澤真幸博士である。

文　献

1） Kawano F, Suzuki H, Furuya A, Sato M. Engineered pairs of distinct photoswitches for optogenetic control of cellular proteins. Nat Commun. 2015 Feb 24;6:6256. doi: 10.1038/ncomms7256. PMID: 25708714.

2） Kuwasaki Y, Suzuki K, Yu G, Yamamoto S, Otabe T, Kakihara Y, Nishiwaki M, Miyake K, Fushimi K, Bekdash R, Shimizu Y, Narikawa R, Nakajima T, Yazawa M, Sato M. A red light-responsive photoswitch for deep tissue optogenetics. Nat Biotechnol. 2022 Nov;40(11):1672-1679. doi: 10.1038/s41587-022-01351-w. Epub 2022 Jun 13. PMID: 35697806.

3） Kaberniuk AA, Shemetov AA, Verkhusha VV. A bacterial phytochrome-based optogenetic system controllable with near-infrared light. Nat Methods. 2016 Jul;13(7):591-7. doi: 10.1038/nmeth.3864. Epub 2016 May 9. PMID: 27159085; PMCID: PMC4927390.

4） Redchuk TA, Omelina ES, Chernov KG, Verkhusha VV. Near-infrared optogenetic pair for protein regulation and spectral multiplexing. Nat Chem Biol. 2017 Jun;13(6):633-639. doi: 10.1038/nchembio.2343. Epub 2017 Mar 27. PMID: 28346403; PMCID: PMC6239862.

5） Shimizu-Sato S, Huq E, Tepperman JM, Quail PH. A light-switchable gene promoter system. Nat Biotechnol. 2002 Oct;20(10):1041-4. doi: 10.1038/nbt734. Epub 2002 Sep 3. PMID: 12219076.

6） Levskaya A, Weiner OD, Lim WA, Voigt CA. Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction. Nature. 2009 Oct 15;461(7266):997-1001. doi: 10.1038/nature08446. Epub 2009 Sep 13. PMID: 19749742; PMCID: PMC2989900.