

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「光の特性を活用した生命機能の時空間
制御技術の開発と応用」
研究課題「ゲノムの光操作技術の開発と生命現象
解明への応用」

研究終了報告書

研究期間 2016年10月～2022年3月

研究代表者：佐藤 守俊
(東京大学大学院総合文化研究科
教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

2005 年、チャンネルロドプシンの神経科学への応用により、光操作に立脚した新しい学問分野が始まった。しかし、チャンネルロドプシンはイオンチャンネルであるため、その応用範囲は神経細胞等の興奮性細胞に限定されるのが一般的である。もし光操作の応用範囲を大幅に拡張し様々な生命現象を自由自在に光で操ることができるようになればライフサイエンスは大きく変わると考え、研究代表者の佐藤は先行研究において新しい光操作技術の開発を行ってきた。具体的には、様々なタンパク質の活性を自由自在に光操作するために、アカパンカビの小さな青色光受容体 (Vivid) に様々なプロテインエンジニアリングを施し、独自の光スイッチタンパク質 (Magnet システム) を開発した (*Nat. Commun.* 2015)。さらに、ゲノムを光操作する技術の創出が重要と考え、ゲノム編集ツール (CRISPR-Cas9 システム) と Magnet システムを組み合わせ、ゲノムの塩基配列を光刺激で編集できる光操作ツール (PA-CRISPR) を開発した (*Nat. Biotechnol.* 2015)。JST-CREST における本研究では、研究代表者が先行研究で開拓したゲノムの光操作の研究分野をさらに大きく発展させるべく、青色光よりも生体組織透過性の高い長波長の光照射で様々な生命現象をコントロールできる新たな基盤技術 (光スイッチタンパク質) を創出するとともに、新たなゲノムの光操作技術を開発し、それらのマウス生体 (*in vivo*) での検証を行うことを目標に研究を実施した。本研究は、プロテインエンジニアリングを専門とする研究代表者の佐藤、光生物学を専門とする共同研究者の成川、幹細胞科学やマウスを使った生命現象の解明を専門とする矢澤といった特色ある若手研究者 (PI) の研究グループが緊密に連携することにより実施した。

本研究の開始から現在までに、佐藤 G では、矢澤 G と共同で DNA 組換え反応の光操作技術として PA-Cre (*Nat. Chem. Biol.* 2016) を開発するとともに、ゲノムにコードされた遺伝子の発現を光操作する技術 (Split-CPTS2.0) を開発して、iPS 細胞のゲノム遺伝子 (*NEUROD1*) の発現を光刺激で活性化することで、iPS 細胞の神経細胞への分化を光刺激で操作できることを示した (*Nat. Methods* 2017)。また、佐藤 G が 2015 年に開発した上述の技術 (PA-CRISPR) よりもさらに精度の高いゲノム編集の光操作技術を開発した (*Nat. Chem. Biol.* 2019)。さらに、共同研究に基づいて、腫瘍溶解性ウイルスの増殖を光操作する技術を開発し、マウスの生体に非侵襲的に光を照射することでがん細胞を破壊してがんを治療できることを示した (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2019)。また佐藤 G は、矢澤 G、成川 G と共同で、赤色光で生命現象を操作可能な基盤技術として赤色スイッチタンパク質 (MagRed) を開発し、当該技術が従来技術よりもはるかに高い光制御能と汎用性・一般性を有することを実証した (*Nat. Biotechnol.*, accepted)。成川 G は、佐藤 G と共同で、ビリベルジン結合型のシアノバクテリオクロム (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2019) を創出し、遠赤色光～近赤外光を用いた光スイッチタンパク質の開発に活路を開いた。矢澤 G は、佐藤 G と共同で、PA-Cre の改良版を開発するとともに、AAV やノックインマウスの開発を通じて、PA-Cre の *in vivo* での応用を推進した (*Nat. Commun.* 2020)。なお、上述の青色光スイッチタンパク質 (Magnet システム) に加えて、佐藤チーム全体として、生体透過性の高い長波長の光刺激で生命現象を操作するための基盤技術 (光スイッチタンパク質) の開発に取り組んでおり、順調に成果を上げている。研究期間の途中から高山 G と三上 G が加わり、光操作技術のマウスでの応用や蛍光イメージング技術へのスピノフ研究が大幅に強化されている。本研究から生み出される新しい技術やアプローチ、およびこれらを応用して得られる新しい知見は、基礎生命科学のみならず創薬や医療を含む広範な分野に非常に大きなインパクトを与えると確信している。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1.

概要:

ゲノムエンジニアリングツールの Cre-*loxP* システムと青色光スイッチタンパク質の Magnet システムを組み合わせ、DNA 組み換え反応を生体内で自由自在に光操作できるツール (PA-Cre) を開発し、PA-Cre が生体外からの非侵襲的な光照射でもマウスの生体深部での遺伝子の働きをコントロ

ールできることを示した。本研究は、遺伝子が関わる様々な生命現象や疾患を研究する上で極めて重要なリサーチツールを提供し、今後の科学技術に大きなインパクトを与えた(佐藤 G・矢澤 G) (下記文献参照)。

Fuun Kawano, Risako Okazaki, Masayuki Yazawa and Moritoshi Sato, “A photoactivatable Cre-loxP recombination system for optogenetic genome engineering”, *Nature Chemical Biology*, vol. 12, pp. 1059-1064, 2016.

2.

概要:

哺乳類内色素・ビリベルジン(BV)を結合できるシアノバクテリオクロムの配列情報を基に、BV 結合に重要な 4 つのアミノ酸残基を見出した。さらに、それら 4 つのアミノ酸残基を導入することで、BV 非結合型分子を BV 結合型に改変し、その分子構造を決定した。また、哺乳類細胞・個体での BV 結合型蛍光分子の応用利用について検討し、実際にマウス個体の肝臓からの蛍光を非侵襲的に可視化することに成功した。この研究は、遠赤色光～近赤外光を用いた光操作の基盤技術の開発に新たな活路を開くもので、今後の科学技術に大きなインパクトを与えた(成川 G・佐藤 G) (下記文献参照)。

K. Fushimi, T. Miyazaki, Y. Kuwasaki, T. Nakajima, T. Yamamoto, K. Suzuki, Y. Ueda, K. Miyake, Y. Takeda, J. -H. Choi, H. Kawagishi, E. Y. Park, M. Ikeuchi, M. Sato, R. Narikawa, “Rational conversion of chromophore selectivity of cyanobacteriochromes to accept mammalian intrinsic biliverdin”, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 116, No.17, pp.8301-8309, 2019.

3.

概要:

先行研究で開発した DNA 組換え反応の光操作技術(PA-Cre)に改良を施した PA-Cre 3.0 を開発すると共に、PA-Cre 3.0 のノックインマウスおよびアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を開発し、マウスの生体(*in vivo*)での検証を行った。これまで JST-CREST「オプトバイオ」領域の佐藤チームにより開発されてきた基盤技術は非常に独創的で国際的に高い水準であることから、PA-Cre 3.0 が未発表・未公開の段階から、積極的な国際共同研究に基づいて、国内外の様々な研究者たちと PA-Cre 3.0 の応用研究を展開している(矢澤 G・佐藤 G) (下記文献参照)。

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, “Photoactivatable Cre recombinase 3.0 for *in vivo* mouse applications” *Nature Communications*, vol. 11, pp2141, 2020.

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1.

概要:

ゲノムにコードされた遺伝子の発現を光刺激で強く活性する新技術(Split-CPTS2.0)を開発した。同技術を用いて iPS 細胞のゲノム遺伝子(*NEUROD1*)の発現を光刺激で活性化することにより、iPS 細胞の神経細胞への分化を光刺激で操作できることを示した。この技術は、細胞分化だけでなく、遺伝子発現のコントロールに基づく様々な応用を可能にし、科学技術イノベーションに貢献すると期待される(佐藤 G) (下記文献参照)。

Y. Nihongaki, Y. Furuhashi, T. Otabe, S. Hasegawa, K. Yoshimoto and M. Sato, “CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription systems to induce neuronal differentiation” *Nature Methods*, vol. 14, pp963-966, 2017.

2.

概要

近年、CRISPR-Cas9に加えて、CRISPR-Cpf1 がゲノム編集技術として利用できることが報告された。Cpf1 は、Cas9 と比べて標的 DNA への特異性が高く、オフターゲット効果が小さい。また、ガイド RNA を自身で切り出せる機能を持っていて、複数の遺伝子を同時に標的にすることも可能である。しかし、Cpf1 の分子構造は Cas9 とは大きく異なるため、Cas9 を基に開発されてきた応用技術が、そのままでは Cpf1 に適用できないという問題があった。本研究では Cpf1 を分割して split-Cpf1 を開発し、光刺激による精度の高いゲノム編集や極めて高い効率での遺伝子発現制御を実現した。この技術は、ゲノム治療など、科学技術イノベーションに貢献すると期待される(佐藤 G) (下記文献参照)。

Y. Nihongaki, T. Otabe, Y. Ueda and M. Sato, “A split CRISPR-Cpf1 platform for inducible genome editing and gene activation” *Nature Chemical Biology*, vol. 15, pp. 882-888, 2019.

3.

概要

光で増殖をコントロールできる光駆動型の腫瘍溶解性ウイルスを開発し、マウスの生体に非侵襲的に光を照射することでがん細胞を破壊してがんを治療できることを示した。この技術は、がん治療など、科学技術イノベーションに貢献すると期待される(佐藤 G) (下記文献参照)。

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*, vol. 116, pp11587-11589, 2019.

<代表的な論文>

1. Y. Nihongaki, Y. Furuhashi, T. Otabe, S. Hasegawa, K. Yoshimoto and M. Sato, “CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription systems to induce neuronal differentiation” *Nature Methods*, vol. 14, pp963-966, 2017.

概要:

佐藤 G は、ゲノムにコードされた遺伝子の発現を光刺激で活性する新技術 (Split-CPTS2.0) を開発した。同技術が佐藤グループが先行研究で開発した関連技術 (CPTS, *Chemistry & Biology* 2015) に比べて約 2000 倍程度の効率でゲノム遺伝子の発現を活性化できることを示した。さらに同技術を用いて iPS 細胞のゲノム遺伝子 (*NEUROD1*) の発現を光刺激で活性化することにより、iPS 細胞の神経細胞への分化を光刺激で操作できることを示した。

2. K. Fushimi, T. Miyazaki, Y. Kuwasaki, T. Nakajima, T. Yamamoto, K. Suzuki, Y. Ueda, K. Miyake, Y. Takeda, J. -H. Choi, H. Kawagishi, E. Y. Park, M. Ikeuchi, M. Sato and R. Narikawa, “Rational conversion of chromophore selectivity of cyanobacteriochromes to accept mammalian intrinsic biliverdin”, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 116, pp8301-8309, 2019.

概要:

成川 G は、シアノバクテリオクロムに 4 つのアミノ酸変異を導入することにより、哺乳類細胞で生産される色素 (ビリベルジン) に結合できることを明らかにし、X 線結晶構造解析により、当該変異体がビリベルジンに結合できるようになった分子機構を解明した。さらに、シアノバクテリオクロムに基づく非常に小さな蛍光プローブを開発し、生きたマウスでの非侵襲的な *in vivo* イメージングに応用できることを示した。

3. 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, “Photoactivatable Cre recombinase 3.0 for *in vivo* mouse applications” *Nature Communications*, vol. 11, pp2141, 2020.

概要:

矢澤 G は、佐藤 G が開発した DNA 組換え反応の光操作技術 (PA-Cre) に改良を施した PA-Cre

3.0 を開発すると共に、PA-Cre 3.0 のノックインマウスおよびアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を開発し、マウスの生体(*in vivo*)での検証を行った。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 佐藤グループ

研究代表者: 佐藤 守俊 (東京大学大学院総合文化研究科 教授)

研究項目:

- ・新たな光スイッチタンパク質の開発
- ・ゲノムの光操作技術の開発と生命現象解明への応用

② 成川グループ

主たる共同研究者: 成川 礼 (東京都立大学理学部生命科学科 准教授)

研究項目:

- ・シアノバクテリアクロムの探索・改変と構造基盤の解明

③ 矢澤グループ

主たる共同研究者: 矢澤 真幸 (コロンビア大学 Department of Rehabilitation and Regenerative Medicine アシスタントプロフェッサー)

研究項目:

- ・ゲノムの光操作技術の改良と生命現象解明への応用

④ 高山グループ (2020年4月より参画)

主たる共同研究者: 高山 和雄 (京都大学 iPS 細胞研究所 講師)

研究項目:

- ・ゲノムの光操作技術の生命現象解明への応用

⑤ 三上グループ (2021年4月より参画)

主たる共同研究者: 三上 秀治 (北海道大学電子科学研究所 教授)

研究項目:

- ・光受容体に基づく蛍光タンパク質の蛍光イメージング技術への応用

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

佐藤グループ

2019年5月17日に、さきがけ「光操作」領域など、「オプトバイオ」領域以外の研究者との連携を目的としたクローズドの国内ワークショップを開催した。また、2020年3月26日、27日には、矢澤グループが所属する米国コロンビア大学において、光操作分野の国際的なリーダー(シニアおよびさきがけ「光操作」領域の個人研究者を含む若手)や Nature Methods、Nature Chemical Biology 等の editor を招待して、佐藤チーム(佐藤 G, 成川 G, 矢澤 G)とクローズドの国際ワークショップを開催し、研究に関する意見交換・情報交換とネットワーキングを行う予定であったが、2020年2月以降に顕在化した新型コロナウイルス感染症の蔓延の影響を受け、大幅な延期となっている(2022年3月に開催予定。オンライン開催の可能性もあり)。また、CREST 研究で開発した光操作ツールについては、「オプトバイオ」領域やさきがけ「光操作」領域はもとより、addgene (<http://www.addgene.org>)に寄託するなどして、関連分野の研究者と速やかに共有し、当該分野の発展に貢献してきた。

成川グループ

平成30年度に、本領域の国内研究者の海外派遣支援の枠組みにおいて、本課題で雇用している特任助教・伏見圭司特任助教が、UC Davis の J. Clark Lagarias 教授の研究室において半年間、研究開発を行った。現在、その研究成果に関する共同研究論文を執筆中である。今後も、この共同研究ネットワークを活かして、さらなる研究開発・論文執筆を進めていく予定である。

矢澤グループ

国際強化支援の下、米国コロンビア大学でのワークショップを通して、欧米の研究者や雑誌編集者との情報交換や連携、共同研究を進める。コロナ禍で本ワークショップは延期したため、2022年3月に予定している。また、別途の国際強化支援を受け、上記に取り上げている PA-Cre 3.0 の応用において国際共同研究を促進している。