

生命現象の光操作技術の創出

Manipulating living systems by light

東京大学大学院総合文化研究科 教授 **佐藤 守俊**

Moritoshi Sato, PhD (Professor)

Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo



キーワード

光操作、ゲノム編集、CRISPR-Cas9システム

01 | はじめに

蛍光タンパク質の実用化を契機として、1990年代以降、光を使ったバイオイメージング技術が世界中の研究室で利用されるようになった。しかし、ライフサイエンスにおける光技術の将来は、必ずしもバイオイメージングに限定されない。光を使って生命現象を「見る」だけでなく、それらを光で「操る」ことができるとしたら、ライフサイエンスや医療はどうなるだろう？例えば、細胞内シグナル伝達を光で操作できるようになれば、代謝、分泌、細胞増殖、細胞分化、細胞死等の生命機能を自由自在にコントロールできるようになるかもしれない。ゲノムの塩基配列を光で自由自在に書き換えたり、遺伝子のはたらきを自由自在に制御できるようになったらどうだろう？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time windowのみで、狙った生体部位のみで、様々な生命機能や疾患をコントロールできるかもしれない(図1)。このような未来を実現すべく、筆者らは新しい技術の開発を行ってきた。

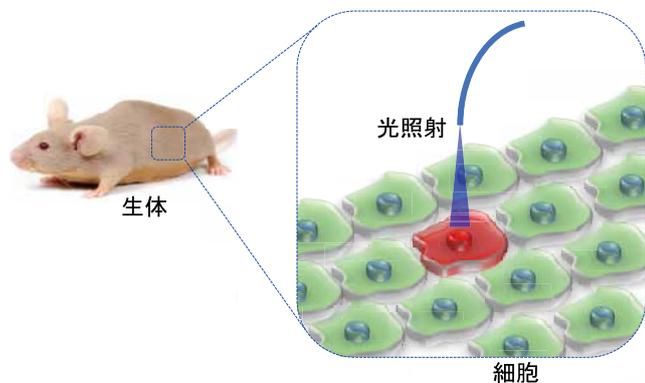


図1 生命現象の光操作の概念図

02 | 光操作の基盤技術 “Magnetシステム”の開発

筆者らがまず重要と考えたのは、操り人形で言えばヒモとか棒に相当する、汎用性の高い基盤ツールの開発である。植物や

菌類のように光を利用して生きている生物は光受容体と呼ばれるタンパク質を持っている。光受容体は、光を吸収すると大きく構造変化したり、別のタンパク質と相互作用することにより下流に情報を伝えている。つまり光受容体は、光による入力をタンパク質の構造変化や相互作用といった力学的シグナルとして出力できるのだ。しかし、野生型の光受容体は、光応答性や反応速度などに問題を抱えていることが多い。筆者らは、アカパンカビ(*Neurospora crassa*)が有する光受容体(Vivid)に対して多角的にプロテインエンジニアリングを施してその性質を大幅に向上したり、新しい機能を付与するなどして“Magnetシステム”と称する光スイッチタンパク質を開発した(図2)¹⁾。

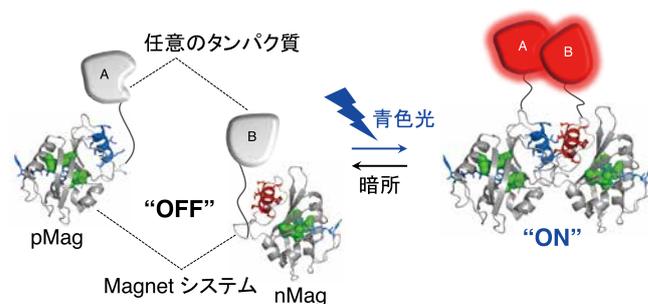


図2 光スイッチタンパク質“Magnetシステム”

青色の光を照射すると二量体を形成し、光照射をやめると元の単量体に戻る。その分子量は緑色蛍光タンパク質(GFP)の3分の2程度と非常に小さい。Magnetシステムを連結すれば二種類のタンパク質(A、B)の相互作用や活性を光照射のON/OFFでコントロールできる。

Magnetシステムに様々なタンパク質やペプチド(例えばAとB)を遺伝子工学的に連結することにより、それらを光刺激で近接させることができる。光刺激をやめればMagnetシステムは解離するので、AとBも元のようにバラバラになる。このようなMagnetシステムの特徴を利用してタンパク質の活性を光で自由自在にコントロールすることにより、ゲノムの塩基配列を光刺激で書き換えたり、ゲノム遺伝子の発現を操作することが可能になった。以下では、このようなゲノムの光操作技術について、筆者らの最近の研究を紹介したい。

03 CRISPR-Cas9システムの光操作技術

2012年、原核生物のCRISPR-Cas9システムに基づくゲノム編集 (genome editing) が報告されて以来、当該技術は爆発的な勢いで発展し、すでに世界中の研究室で利用されている (図3)。CRISPR-Cas9システムの報告を受け、Magnetシステム

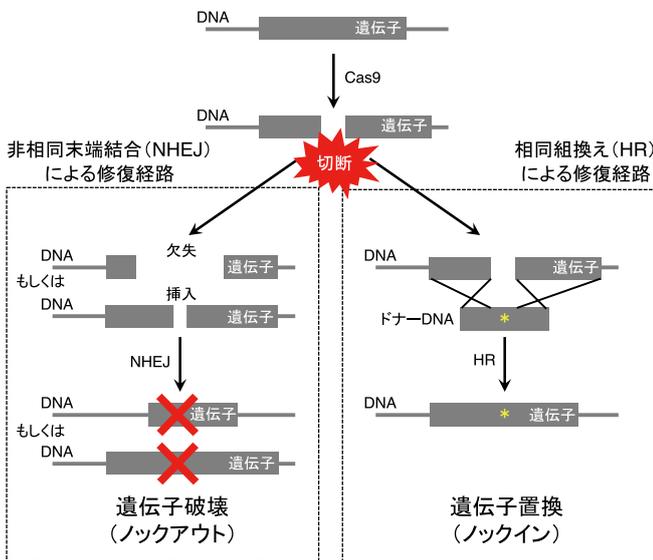


図3 CRISPR-Cas9システムによるゲノム編集
ゲノムのDNAは、Cas9により部位特異的に切断されると、細胞内で修復される。この修復経路には、非相同末端結合 (NHEJ) による修復 (図の左のボックス) と相同組換え (HR) による修復 (図の右のボックス) が知られている。Cas9で切断されたDNAの末端は欠失や挿入を起こしやすい。欠失挿入 (indel) を起こしたあと非相同末端結合 (NHEJ) により修復されると、当該遺伝子にフレームシフトやindel変異が導入され、その機能は破壊される (遺伝子ノックアウト)。一方、ドナーDNAを共存させておくと、切断部位は相同組換え (HR) による修復され、当該遺伝子にドナーDNAの塩基配列を導入できる (遺伝子ノックイン)。このように、Cas9による部位特異的なDNA切断と細胞内でのDNA修復を利用してゲノムの塩基配列を書き換えるのがゲノム編集技術である。

ムを応用した光操作技術の新しい展開を模索していた筆者らは、2013年初頭からCRISPR-Cas9システムとMagnetシステムを組み合わせた新しい技術の開発研究を開始した。

ゲノム編集を行うためには、ゲノム上の狙ったDNA配列を切断する必要がある。よく知られているように、Cas9はガイドRNAが指定するDNA配列を切断する酵素である。しかし、そのDNA切断活性は常にONであり、外部からコントロールすることはできなかった。このため、狙ったタイミングや狙った時間、組織の中の狙った細胞でのみゲノム編集を実行することができないなど、既存のゲノム編集技術には様々な制約が課せられていた。このような背景から、筆者らはCas9の活性を制御できる技術の開発が必要と考えた。CRISPR-Cas9システムに基づくゲノム編集技術が発表された当時、筆者らの研究室では、上述した光スイッチタンパク質“Magnetシステム”の開発が佳境を迎えていた。このMagnetシステムを使えばゲノム編集を自由自在に光で操作できるとの確信から、光駆動型のゲノム編集ツール“PA-Cas9 (photoactivatable Cas9)”の開発研究に着手した (図4)²⁾。

筆者らは、Cas9のDNA切断活性をON/OFF制御するために、まず、Cas9タンパク質を二分割してそのDNA切断活性を不活性化した。さらに、二分割により活性を失った“split-Cas9”のN末端側断片 (N-Cas9) とC末端側断片 (C-Cas9) にMagnetシステム (pMagおよびnMag) を連結した。このようにsplit-Cas9にMagnetシステムを連結して開発したのがPA-Cas9である。Magnetシステムは青色の光に反応して結合する光スイッチタンパク質である。青色の光を照射すると、Magnetシステムの結合に伴って、split-Cas9も互いに近接し結合する。これにより、split-Cas9は本来のCas9タンパク質のようにDNA切断活性を回復し、標的の塩基配列を切断できるようになる。そして、光照射を止めるとMagnetシステムは結合力を失うため、split-Cas9は元のようにバラバラになり、DNA

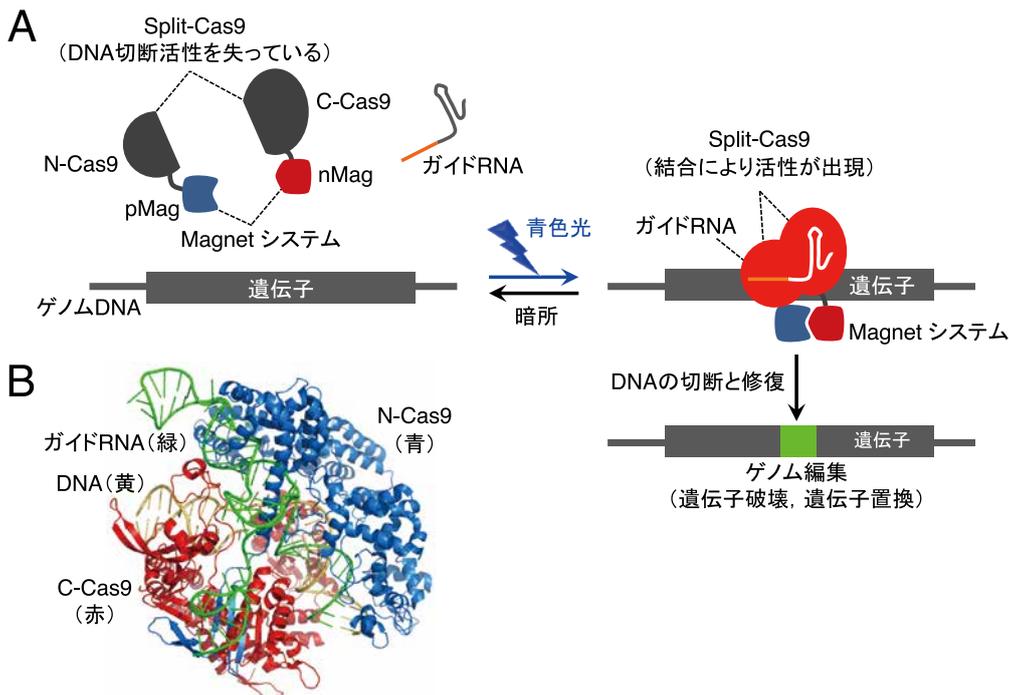


図4 PA-Cas9
(A) PA-Cas9の原理 二分割により活性を失わせたsplit-Cas9のN末端側断片 (N-Cas9) とC末端側断片 (C-Cas9) にMagnetシステム (pMagとnMag) を連結する。青色光を照射すると、Magnetシステムの二量体化に伴ってN-Cas9とC-Cas9も互いに近接し結合する。これにより、N-Cas9とC-Cas9は本来のCas9タンパク質のようにDNA切断活性を回復し、標的の塩基配列を切断できるようになる。光照射を止めるとMagnetシステムは結合力を失うため、N-Cas9とC-Cas9も離れ離れになり、DNA切断活性は消失する。このため光を照射している間だけ、ゲノム編集を実行できる。(B) Cas9の結晶構造 青:N-Cas9に相当する部分、赤:C-Cas9に相当する部分、緑:ガイドRNA、黄:DNA。

切断活性は消失する。このようにPA-Cas9は、DNA切断活性を光照射で自由自在にコントロールできるツールである。なお、ガイドRNAはゲノム上での案内役をつとめるRNAであり、その5'末端の塩基配列(20塩基程度)を設計することにより、どの遺伝子を光操作するのかをあらかじめ指定できる。

PA-Cas9により、光で指令を与えて意のままにゲノム遺伝子の機能を破壊(knockout)したり、別の塩基配列で置換(knockin)できるようになった。筆者らは、主としてHEK293T細胞を用いて様々な検討を行っている。例えば、当該細胞の染色体にコードされた*EMX1*遺伝子と*VEGFA*遺伝子を、光照射で同時にゲノム編集できることを示した。その効率をCas9のゲノム編集効率と比べると、両者にそれほど大きな差がないことが明らかになった。さらに、PAM配列や標的配列に対する選択性なども、PA-Cas9とCas9ではほとんど差がないことがわかった。上述のようにPA-Cas9は、Cas9を真っ二つにするという、かなり荒っぽい手法で開発されているが、そのDNA切断活性や配列特異性がCas9とそれほど変わらないというのは、筆者らにとって驚きであった。

このように筆者らは、CRISPR-Cas9システムを光照射のON/OFFで制御する技術を開発し、光によるゲノム編集の制御を実現した。既存の技術では、狙ったタイミングや狙った時間でのみゲノム編集を実行することは不可能だったが、PA-Cas9を用いればDNA切断活性の持続時間を非常に短く制御できるため、オフターゲット(off-target)に関する既存技術の問題を低減できるかもしれない。また、既存の技術ではゲノム編集を空間的に制御することは不可能だったが、PA-Cas9を用いれば、例えば脳における神経細胞のように、組織の中で狙った細胞単位でのゲノム編集が実現するかもしれない。このようにPA-Cas9は、ゲノム編集の応用可能性を大きく広げることが期待される。

04 | ゲノム遺伝子の発現を光操作する技術

分化や発生、代謝、免疫、記憶・学習など、私たちの生体でみられる多様な生命現象は、さまざまな遺伝子の発現によって成り立っている(図5)。それぞれの遺伝子がどのように生命現象

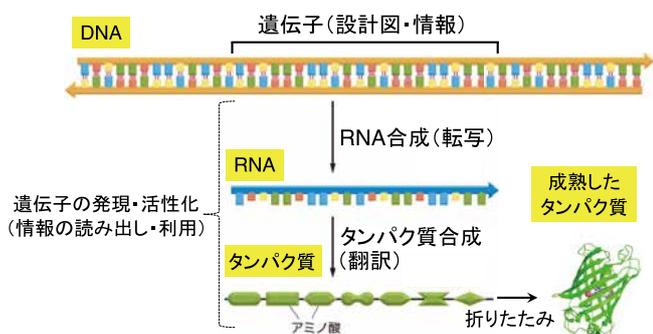


図5 遺伝子の発現

遺伝子(DNA)の塩基配列はRNAの塩基配列に転写され、さらにタンパク質のアミノ酸配列に翻訳される。このアミノ酸配列に基づいてタンパク質は折りたたまれ、成熟したタンパク質となる。このような遺伝子の発現こそが生命現象や疾患には重要な役割を果たす。

の制御に関わっているのかを明らかにするには、ゲノム上に散らばったそれぞれの遺伝子の発現を自由自在にコントロールする技術が必要である。この目的のために筆者らは、新たなゲノムエンジニアリングツール(Split-CPTS2.0)³⁾(図6)を開発した。Split-CPTS2.0はゲノムの塩基配列を改変する上述のPA-Cas9とは大きく異なり、ゲノムにコードされた遺伝子の発現を自由自在に光で操作するツールである。しかもその効率が著しく高いことが大きな特徴であり、既存のツールでは実現困難だった新たな応用が可能になる。

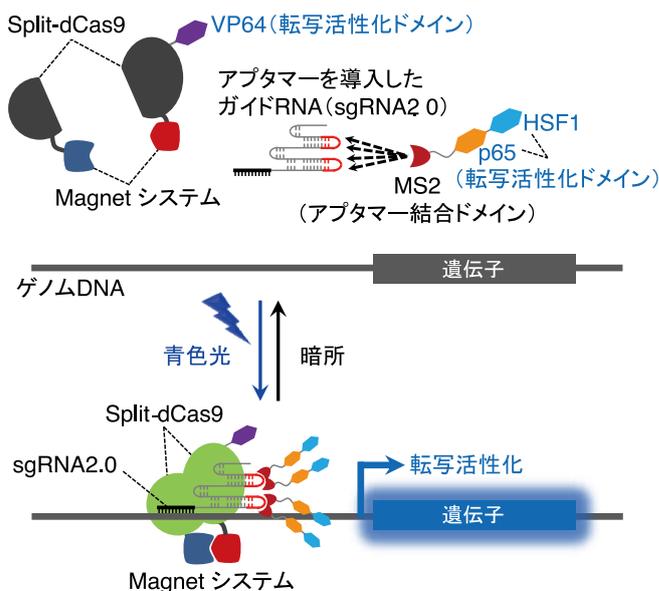


図6 Split-CPTS2.0の原理

dCas9の二分割体(split-dCas9)とMagnetシステムを用いて、3種類の異なる転写活性化ドメイン(VP64、p65、HSF1)を合計9つ、標的ゲノム遺伝子の転写開始点の上流領域に光刺激によって集積することにより、そのゲノム遺伝子の転写を高効率で活性化できる。

Split-CPTS2.0の開発においては、まずCas9に変異を導入してヌクレアーゼ活性を欠失させたdCas9を作成し、さらにこのタンパク質を二分割してN末端側断片とC末端側断片を作製した。この両断片(split-dCas9)に、筆者らが開発した光スイッチタンパク質のMagnetシステムと転写活性化ドメイン(VP64)を連結した。さらに、アダプターと呼ばれるRNA配列を挿入したガイドRNA(sgRNA2.0)、MS2タンパク質(アダプターと結合するタンパク質)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た。なお、sgRNA2.0は標的遺伝子の転写開始点の上流領域に結合するように設計する。青色光を照射すると、split-dCas9とsgRNA2.0が標的遺伝子の転写開始点の上流領域に集積し、転写活性化ドメインの働きにより、当該ゲノム遺伝子の転写を活性化する。光照射をやめると、上述のsplit-dCas9とsgRNA2.0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、光照射の有無によって、標的遺伝子の発現をコントロールできる。筆者らが開発した一世代前の技術(CPTS: CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system)⁴⁾では、光刺激により、1種類の転写活性化ドメイン(p65)を1つだけ、ゲノム遺伝子のの上流領域に呼び寄せていたが、Split-CPTS2.0では、3種類の異なる転写活性化ドメイン(VP64、p65、HSF1)を合計

9つ同時にゲノムに集めたため(split-dCas9にVP64を一つ導入。sgRNA2.0にはアプターが二つ導入してあり、一つのアプターにMS2-p65-HSF1は二つ結合。従って、VP64×1、p65×4、HSF1×4が光刺激によりゲノム遺伝子上流領域に集積)、著しく高い効率でゲノム遺伝子の発現を光操作できるようになった。なお、sgRNA2.0の5'末端の塩基配列(20塩基程度)は、ゲノム上でのSplit-CPTS2.0の結合部位を決定する因子である。sgRNA2.0の設計を通じて、任意のゲノム遺伝子を選択し、それを自在に光操作することもSplit-CPTS2.0の大きな特長である。複数の異なるガイドRNAを細胞に導入しても良い。Split-CPTS2.0は同時に複数の標的遺伝子を光操作することも可能である。

筆者らは、Split-CPTS2.0をiPS細胞の分化を光操作するツールとして応用している(図7)。Split-CPTS2.0をiPS細胞に

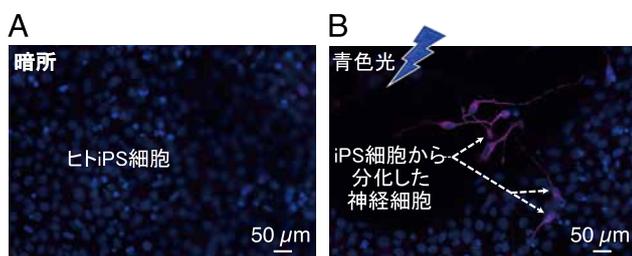


図7 Split-CPTS2.0による細胞分化の光操作 (A, B) Split-CPTS2.0を用いてiPS細胞の*NEUROD1* 遺伝子の発現を光刺激で強く活性化し、iPS細胞から神経細胞への分化を光操作(A:暗所, B:4日間の光照射後)。細胞をDAPI(青)と神経細胞のマーカであるβ-III tubulinの抗体(マゼンタ)で染色。

導入し、神経細胞への分化を制御する*NEUROD1* 遺伝子を光操作すると、上述の先行技術(CPTS)と比べて2000倍強く、*NEUROD1* 遺伝子の発現を光刺激で活性化できる。このため、Split-CPTS2.0ではiPS細胞を光刺激で神経細胞に分化させることが可能になる。一方、先行技術では、*NEUROD1* 遺伝子の発現を光刺激で操作することはできないが、その効率が十分でないため、iPS細胞を神経細胞に分化させることはできない。このように、遺伝子発現の効率を著しく高めたSplit-CPTS2.0では、ゲノム遺伝子発現の光操作に基づく新たな応用が可能になった。

05 | Cre-loxPシステムの光操作技術

最後に、ツール開発の方法論について触れたい。上述のCRISPR-Cas9システムを用いた二つの光操作技術(PA-Cas9, Split-CPTS2.0)は、Cas9タンパク質を二分割して両断片の会合をMagnetシステムでコントロールするというアプローチに基づいている。ツール開発のために我々が導入したこのアプローチは一般性が高く、Cas9以外のタンパク質を利用した光操作ツールの開発にも応用できることが極めて重要と筆者らは考えている。この観点から、CRISPR-Cas9システムに続く第二の例として、今やライフサイエンスには欠くことのできないツールとなったCre-loxPシステムとMagnetシステムを組み合わせてDNA組み換え反応の光操作を可能にしたツール(PA-Cre)について紹介する(図8)⁵⁾。

Cre-loxPシステムはバクテリオファージP1が有するDNA

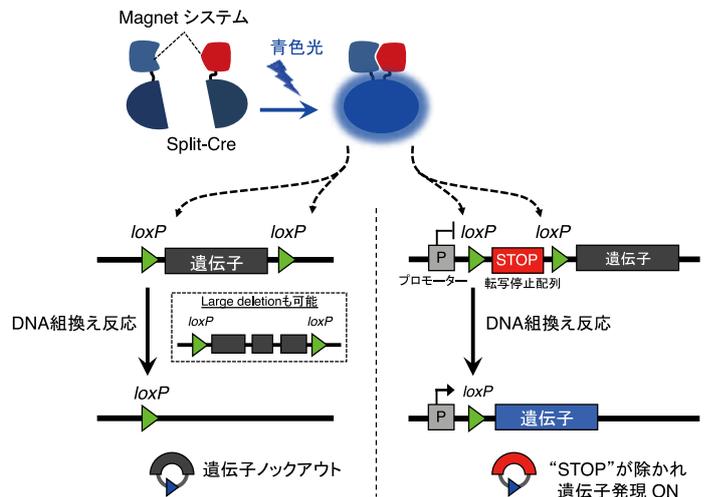


図8 PA-Creの原理

Split-CreとMagnetシステムからなるPA-Creは青色光で活性化するDNA組換え酵素である(上図)。遺伝子もしくは遺伝子群をloxPで挟むことにより、当該遺伝子・遺伝子群を光刺激でノックアウトできる(左下図)。また、転写停止配列(STOP)をloxPで挟むことにより、遺伝子の発現を光刺激で活性化できる(右下図)。

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。筆者らはまず、CRISPR-Cas9のケースと同様に、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。次に、二分割により活性を失った“split-Cre”のN末端側断片(N-Cre)とC末端側断片(C-Cre)のそれぞれにMagnetシステムを連結した。筆者らは、培養細胞での評価系でこのツール(PA-Cre)をテストすると共に、マウスでの検証も行なっている(図9)。

マウスでの検証では、まず、PA-Creをコードするプラスミドとレポーターのプラスミドをマウスの尾静脈に導入して、肝臓に当該プラスミドを導入した。レポーターはDNA組換え反応によりルシフェラーゼが発現するように設計しているので、マウスの肝臓の細胞の中でPA-Creが活性化すれば、その様子をEM-CCDカメラを用いて可視化できる。PA-Creは非常に感度が良いため、生体外からの光照射でもDNA組換え反応をコントロールできる。青色LEDをアレイ化した光源(470 ± 20 nm)を用いてマウスの腹側から光照射したところ、ルシフェラーゼの明るい生物発光が肝臓から観察された。興味深いことに、30秒間程度のパルス照射を生体外から施すだけでも、PA-Creの活性化を十分に誘起できることが分かった。一方、暗所ではルシフェラーゼの生物発光は全く観察されず、DNA組換え反応は起こらない。また、通常の部屋の明るさでも、暗所の場合と同様に、マウスの肝臓ではPA-Creは活性化せず、DNA組換え反応は全く起こらないことが分かった。このツール(PA-Cre)は、暗所ではほとんど活性を示さず、青色光を照射すると速やかに強いDNA組換え活性が出現する。つまり、PA-Creを使えば光刺激によって自由自在にDNA組換え反応を時空間制御できる。

06 | おわりに

本稿では光操作の基盤技術としての光スイッチタンパク質“Magnetシステム”について触れる共に、CRISPR-Cas9システムとCre-loxPシステムの光操作技術に関する研究事例を紹介した。筆者らが開発した技術により、ゲノムの塩基配列を自由自在に光刺激で書き換えることが可能になった。加えて、染色体にコードされた遺伝子の発現を光刺激で自在に活性化、つまりゲノム情報を光で読み出すことが可能になった。例えば、ヒトの脳では約860億個、マウスの脳では約7,000万個の神経細胞がそれぞれの役割を持って活動している。細い光ファイバーを使ってマウスの脳にピンポイントで光を当て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、マウスの行動等がどのように変化するかを観察すれば、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。また、同様のアプローチで、生体内で生じたゲノムや遺伝子の異常(変異や欠失など)が、どのようにガンや精神疾患などの様々な疾患に繋がるのかを解明できるかも

しれない。このような期待から、化学や生命科学に携わる国内外の研究者が筆者らの技術に関心を寄せている。本稿で紹介したCRISPR-Cas9システムやCre-loxPシステムと光遺伝学の出会いは、ライフサイエンスの可能性を大きく広げると筆者らは考えている。その試みは始まったばかりであり、技術のさらなる応用や改良・展開が可能だろう。さらに、筆者らのツール開発のアプローチは一般性・汎用性が高く、今後、様々な光操作ツールの設計・開発に貢献するだろう。上述したツールやツール開発の方法論が読者のみなさんのアイデアを刺激し、化学や生命科学の諸分野の研究に役立てば幸いである。

参考文献

- 1) F. Kawano, H. Suzuki, A. Furuya, M. Sato, *Nat Commun* **6**, 6256 (2015).
- 2) Y. Nihongaki, F. Kawano, T. Nakajima, M. Sato, *Nat. Biotechnol.* **33**(7), 755-760 (2015).
- 3) Y. Nihongaki, Y. Furuhashi, T. Otabe, S. Hasegawa, K. Yoshimoto, M. Sato, *Nat. Methods* **14**(10), 963-966 (2017).
- 4) Y. Nihongaki, S. Yamamoto, F. Kawano, H. Suzuki, M. Sato, *Chem. Biol.* **22**(2), 169-174 (2015).
- 5) F. Kawano, R. Okazaki, M. Yazawa, M. Sato, *Nat. Chem. Biol.* **12**(12), 1059-1064 (2016).

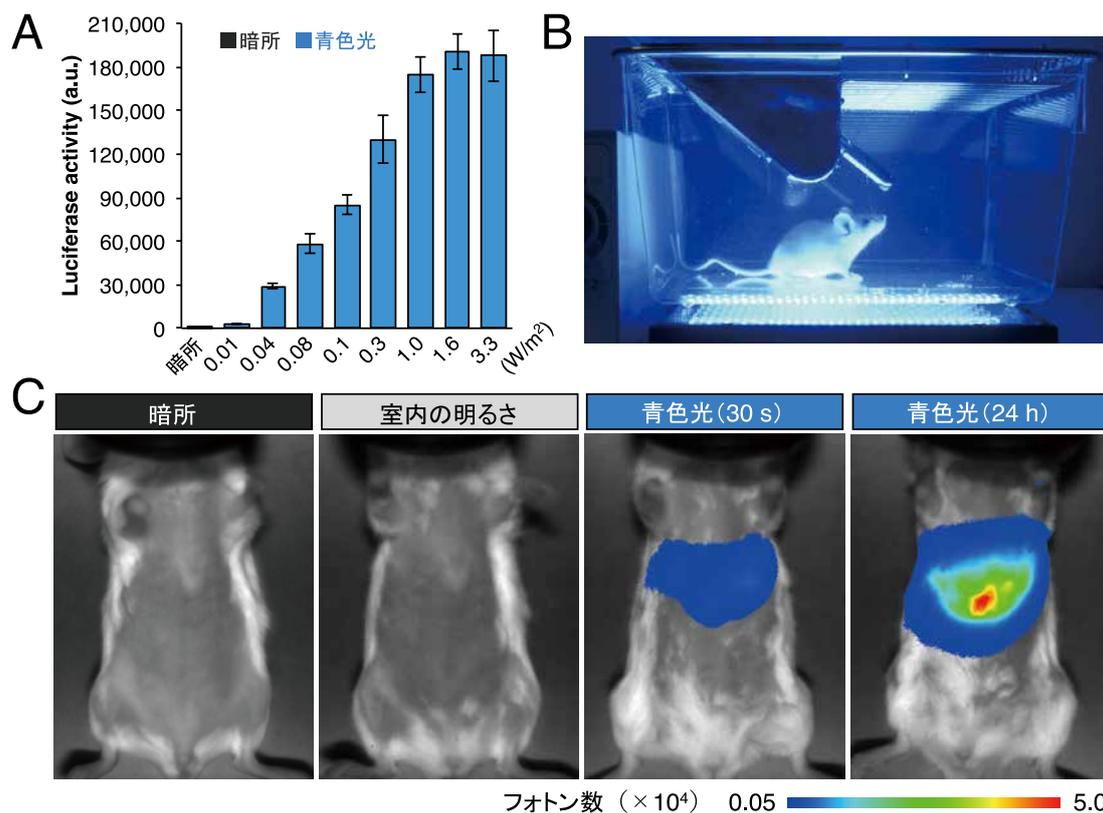


図9 PA-Creを用いて生体深部の遺伝子の働きをコントロール

(A) DNA組換え反応によりルシフェラーゼを発現するレポーターを用いて、PA-CreによるDNA組換え反応の青色光依存性を培養細胞で評価。(B) DNA組換え反応によりルシフェラーゼを発現するレポーターとPA-CreをコードするcDNAをマウスの肝臓に導入した後、LEDを用いてマウスに生体外からの非侵襲的に青色光を照射。(C) 青色光によりマウスの肝臓でDNA組換え反応が誘起され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。24時間の照射はもとより、30秒間という短時間の照射でも肝臓で遺伝子発現が観察された。一方、暗所や室内の明るさでは全くルシフェラーゼの発現は観察されなかった。