

氏名 (年齢) 設楽 久志 (35 歳)
所属・職名 三重大学大学院医学系研究科 生化学分野 助教

受賞の感想と今後の抱負

この度、三重医学若手研究者賞を受賞し、大変光栄に存じます。研究を進めるにあたり、ご指導いただいた本学医学系研究科生化学の竹本研教授ならびにスタッフの皆様、大阪大学産業科学研究所の永井健治教授に心より感謝申し上げます。本受賞を励みに、臨床研究の基盤となる基礎医学研究に貢献できるよう、一層精進してまいります。今後ともご指導ご鞭撻のほど、何卒よろしくお願いいたします。

受賞テーマ

「哺乳類細胞内分子を高効率に光操作可能にする光増感蛍光タンパク質の開発」

研究の概要と将来展望

ヒトの体内には約 2 万種類のタンパク質が異なる細胞種で発現し、時期特異的な機能を有する。故に、「いつ」「どこで」そのタンパク質が働くのか解明することは、生命現象及びそれに係わる疾患を理解する上で重要である。生命現象を分子レベルで理解するためには、任意の時間と空間で標的分子を操作し、原因と結果の関係を明らかにしなければならない。特に学習・記憶形成に関わる神経科学や、劇的に内部状態が変化する発生学の研究では迅速な分子操作が期待される。光を用いた分子操作はこうしたニーズに応える技術であり、その一つに Chromophore-Assisted Light Inactivation (CALI) 法がある (Jay DG et al. *PNAS* 1988; Shidara H et al. *Biophysics and Physicobiology* 2024)。CALI 法は光照射により活性酸素を産出する光増感物質を利用した、光で分子機能を不活化する技術である。例えば光増感物質である光増感蛍光タンパク質 SuperNova (Takemoto et al. *Sci. Rep.* 2013) を標的タンパク質につなげて発現させ、光照射により発生する活性酸素で標的分子を酸化・立体構造破壊により不活化する。

光増感蛍光タンパク質の一つである SuperNova は幅広い分野で利用されてきた (Goto A et al. *Science* 2021, Gabriela TT et al. *Sci. Adv.* 2020 等) が、37°Cでの成熟化効率が悪く哺乳類細胞中で分子の光不活化効率が低かった。そこで SuperNova をベースに遺伝子変異スクリーニングにより 37°Cで成熟化効率の高い HyperNova を新たに開発した (Shidara H et al. *Commun. Biol.* 2024)。HyperNova のスクリーニングは SuperNova の変異体が大腸菌に発現させ、発現誘導をかけた後に早く発色する変異体を得ることで行った。こうして得られた成熟化効率の高くなった HyperNova が、その成熟化効率の改善により細胞内での活性酸素産出量が上昇したかを調べた。ミトコンドリア移行シグナルを付加した HyperNova を HeLa 細胞に発現させ光照射を行い、その後 HeLa 細胞の動態を観察した。その結果、HyperNova を用いると Supernova では難しかった遺伝子導入後 24 時間で HeLa 細胞の細胞死を誘導することに成功した。つまり、HyperNova は成熟化効率の上昇に伴い多くの活性酸素を産出できることがわかった。さらに、HyperNova により SuperNova では困難であったターンオーバーの短い c-jun や p53 といった転写因子でも CALI ができるか調べた。HyperNova は SuperNova と異なり、これらのターンオーバーの早い分子につなげても哺乳類細胞内で成熟し蛍光を発色することが示された。そして、この様に成熟化することで光照射により、c-jun や p53 を不活化できることが明らかになった。また、ERK2 や JNK1 といったリン酸化酵素にも HyperNova をつなげ光照射を行い、従来では難しかった光不活化に成功した。これらの結果は HyperNova が哺乳類細胞で分子を光操作するためのツールになり得ることを示す。現在は HyperNova を利用し、様々な標的分子に対しさらに高効率で CALI を可能にする基盤技術の開発に取り組んでいる。

関連分野における本研究の特筆すべき点

HyperNova を開発することで、従来 SuperNova では困難であった分子の光不活化を可能にした。光増感物質には大きく分けて蛍光色素分子と光増感蛍光タンパク質の 2 種類がある。色素分子を用いる場合、抗体に色素を標識化し、標識化された抗体を標的分子に反応させ CALI を行う。従って、CALI を行うためには標的分子ごとに CALI 効率が高い抗体を作製する必要があり、標的分子ごとの CALI 開発が困難である。一方で、HyperNova の様な遺伝子にコードされた光増感蛍光タンパク質は遺伝的に導入することで簡便に CALI 開発を行うことができる。これまで用いられてきた SuperNova は哺乳類細胞への適用が難しかったため、CALI 法を適用できる分子に限界があった。故に、より多くの分子の光不活化を可能にした HyperNova の登場により、生命現象を分子レベルで理解する研究を発展させることができると期待される。

生命現象を分子レベルで理解するために従来は遺伝子を欠損させる遺伝学的手法や、阻害剤により分子の機能を欠損させる薬理学的手法が用いられてきた。しかし、これらの手法は迅速で精密な分子やその機能を欠損させることができず時空間制御が難しい。一方で、CALI 法は光を当てる場所とタイミングをコントロールすることで迅速な分子制御を可能にする。こうした CALI 法の特徴は、神経科学分野で分子機能を明らかにするための次世代ツールとして期待されている (Humeau Y et al. *Nat. Neurosci.* 2019 等)。したがって、HyperNova の開発はこうした期待に応え、将来的に医療分野などの基礎研究に貢献できる。

本研究の将来期待される点

光増感蛍光タンパク質である HyperNova は遺伝的にコードされているという特徴を持つ。従って、ゲノム編集技術と組み合わせることで、内在性分子と HyperNova をつなげて CALI を行うことができる。つまり、*in vivo* で内在性分子の光操作することを可能にする。HyperNova を使い、個体レベルで起きている現象を分子レベルで解き明かす研究の発展に貢献できる。

今回は成熟化効率を上げるという手法により、哺乳類細胞で機能する HyperNova の量が増え CALI 効率の改善に成功した。一方で、十分に HyperNova が産出する活性酸素の量は十分に成熟化した SuperNova と比較して必ずしも高くはない。したがって、HyperNova が産出できる活性酸素の量を増やすことでさらなる CALI 効率の改善が見込まれる。以上から、引き続き HyperNova の改良に努めたい。

また、HyperNova の改善とは異なる方法で CALI 効率を上げるための研究にも現在取り組んでいる。光増感物質が光照射によって産出する活性酸素の拡散半径は約 4 nm と非常に短く、光増感物質と標的分子の位置関係は CALI 効率に大きな影響を与える。したがって、標的分子に対する HyperNova の位置を柔軟に変えることができればより高い CALI 効率で分子を光不活化することが可能になる。現在はより柔軟に HyperNova と標的分子の位置関係をチューニングできる方法を開発し、CALI 効率の上昇を目指すことを考えている。この様に今回開発した HyperNova をベースに新規 CALI 法を開発することで、誰でも興味のある分子を簡便に光操作可能にする基盤技術の開発を進めて行く。

本研究に関連する代表的な原書学術論文 (1 編)

Shidara H, Shirai T, Ozaki-Noma R, Jitsuki S, Nagai T, Takemoto K. Optical inactivation of intracellular molecules by fast-maturing photosensitizing fluorescence protein, HyperNova., *Commun. Biol.* 7(1):945., 2024

略歴

2012 年 3 月

慶應義塾大学理工学部生命情報学科卒業

2012 年 4 月～2013 年 9 月	慶應義塾大学大学院理工学研究科修士課程
2013 年 9 月～2017 年 3 月	慶應義塾大学大学院理工学研究科博士課程
2014 年 4 月～2017 年 3 月	日本学術振興会 特別研究員（DC1）
2017 年 4 月～2018 年 3 月	北海道大学大学院理学研究院 博士研究員
2018 年 4 月～2021 年 2 月	日本学術振興会 特別研究員（PD）
2021 年 3 月～現在	三重大学大学院医学系研究科生化学 助教
2022 年 10 月～現在	北里大学未来工学部 特任講師（非常勤）

専門分野

神経科学、バイオイメージング

医学博士、専門医資格など

博士（理学）