

日本医療研究開発機構 先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業  
事後評価報告書



## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 生細胞内セントラルドグマ分子の光操作  
(英語) Opt-control of central dogma molecules in live cells

研究開発実施期間: 令和元年10月1日～令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 湯浅英哉  
(英語) Hideya Yuasa

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 国立大学法人東京工業大学・生命理工学院・教授  
(英語) Tokyo Institute of Technology・School of Life Science and Technology・Professor

## II 研究開発の概要

本研究では、核酸の光編集とタンパク質の光改変 (oxPKD) の2つの新規技術を確立することによって、生細胞における特定タンパク質の機能の ON/OFF を DNA・RNA・タンパク質の各段階においてリアルタイムで光操作する技術を開拓することを目的とする。これらの新技術により「セントラルドグマの光操作」を可能にし、これまでの分子標的治療薬とは時空間的に異なる作用機序に基づく前例のない光スイッチング操作による癌治療への応用を目指す。研究期間初期に本研究で用いる増感剤含有複合体の細胞への変異原性を確認し、これらの毒性が確認された場合は増感剤含有複合体の設計変更を行う。研究開発期間終了までに、細胞レベルで本光操作によるガン治療効果の可能性を確認する。

核酸に対しては、ビフェニル誘導体 (NBP) または相当する低分子増感剤 (PS) をオリゴヌクレオチドの一部の塩基に導入した複合体 (BP-oligoRNA または PS-oligoRNA) を RNA の光ロックダウンデバイス、および DNA の光点変異デバイスとして開発する。BP-oligoRNA は、RNA または DNA と二重鎖または三重鎖を形成した後に光増感すると、生成する  $^1\text{O}_2$  が相補鎖中の特定の G と反応して 8-オキソ G ( $^{\circ}\text{G}$ ) を生成することが期待される。RNA 中の  $^{\circ}\text{G}$  は翻訳過程でタンパク質合成をストールさせるので特定タンパク質のロックダウン (KD) が可能である。DNA 中の  $^{\circ}\text{G}$  は転写過程では T として認識され、G/C を T/A に変換できるので点変異が可能である。

いっぽう、標的タンパク質のリガンド分子 (Lg) に NBP を連結させた複合体 (Lg-BP) を新たに開発し、細胞内で Lg-BP が標的タンパク質に特異的に結合することで、NBP による  $^1\text{O}_2$  の産生を利用した生細胞内標的タンパク質の時空間的 oxPKD 法を開発する。Lg は低分子であり、生体内分子との相互作用が小さいことから、免疫原性が低く安定性が高いメリットがある。Lg-BP による oxPKD 法を開発することで、光の ON/OFF によって翻訳後にタンパク質ロックダウンのスイッチングを可能とし、タンパク質の時空間的なダイナミクスを観察する。先行研究として、リガンドにルテニウム光触媒を結合させることで、ルテニウム光触媒が産生する  $^1\text{O}_2$  によって分子夾雑環境下、リガンド結合タンパク質を酸化的にロックダウンさせることにすでに成功している。これらの基盤技術に、より小さな BP を融合させた Lg-BP による oxPKD 法の開発を目的とする。

まず開発の初期段階において、NBP そのものが変異原性を持つことが判明した。この変異原性は、これまでの知見などからニトロ基が原因である可能性が高い。そこで、ニトロ基を持たない増感剤の開発を開始することにした。いっぽうで、NBP が結合したオリゴヌクレオチドは変異原性を持たない可能性もあるので、同時並行で GLUT1 標的のアンチセンス核酸 (AON) 配列に NBP を結合したオリゴヌクレオチド AON1 と AON2 を外注で合成した。その結果、AON1 は変異原性 (micoAmes) も肝毒性 (nonGL) も示さなかった。NBP 以外の増感剤を含む RNA では変異原性等を試験できていないが、NBP 含有 RNA の変異原性と肝毒性が見いだせない現状で、他の増感剤を試す必要性は低くなった。いっぽう、ニトロ基を含まない増感剤 (KBP、MTB) を含む RNA は計画どおり合成した。また、以上の AON 以外に、NBP 含有の DNA/RNA を 23 種類合成した。AON2 をガン細胞に投与後、光照射し、全タンパク質を回収してウェスタンブロッティングを行った結果、光ロックダウン効果がほぼ 100% であることが判明した。さらに、NBP の結合位置が異なる多種の AON を合成し、G 酸化の位置選択性を研究した。その結果、NBP に近い G (+1~+5) より遠い G (+8~+10) の方が効率良く酸化されるという興味深い結果が得られた。Na<sub>3</sub>N による光酸化反応の阻害実験、光酸化反応の時間との関連、二重鎖の融解温度と CD スペクトルなどの基礎データの取得も行い、増感作用は Type II 型の  $^1\text{O}_2$  生成によるものであり、二重鎖は通常の B 型 DNA 構造であることを確認した。いっぽう、計画されていた DNA 段階での同技術の証明は現在のところ達成できていない。

炭酸脱水酵素 (CA) に対して、NBP とリガンドの複合体は光ロックダウン (oxPKD) 能が低かったが、BODIPY 誘導体 (IBDP) とリガンドの複合体 (PS-Lg 6) は標的タンパク質の1つである CAIX に対して高

い oxPKD 効果を発揮した。PS-Lg 6 は、すでに高い oxPKD 効果が認められている Ru 光触媒型光増感剤 PS-Lg 1 と同等の oxPKD 効果を持つことから、GLUT1 を標的とする oxPKD 型がん治療薬 PS-Lg(GLU)に十分用いることができると判断し、GLUT1 のリガンドと IBDP の複合体 (PS-Lg(GLU)) を合成した。PS-Lg(GLU)の oxPKD 効果をウェスタンブロッティング法によって細胞内 GLUT1 存在量を確認することで検証したところ、ほぼ 100%の oxPKD が判明した。既存の光線力学治療用増感剤である Laserphyrin と oxPKD 効果の比較を行ったところ、Laserphyrin は GLUT1 以外にも  $\alpha$ -チューブリンのタンパク質など他のタンパク質も非選択的に分解する一方、PS-Lg(GLU)は GLUT1 のみ分解した。このタンパク質標的酸化活性に加え、PS-Lg(GLU)は、Laserphyrin と同等の光線力学細胞障害活性を示すことから、「分子標的型光線力学療法」という新たな概念を確立した。さらに、モノカルボン酸輸送体 (MCT1) を標的とした PS-Lg(MCT)の前駆体の合成を行った。

以上のように、生細胞における特定タンパク質の機能の ON/OFF を RNA・タンパク質の各段階においてリアルタイムで光操作する技術について、研究開発計画どおりコンセプトを証明することができた。

This study aims to develop the methods to enable real time photoswitching of targeted protein functions in living cells, by establishing two new technologies, photo-editing of nucleic acids and photo-modification (oxPKD) of proteins. With these new technologies in hand, we will apply them to cancer treatment in unprecedented spatiotemporally manners.

As to nucleic acids, more than 25 kinds of antisense RNA conjugates (AONs) with a biphenyl derivative (NBP) or an equivalent small molecule sensitizer (PS) attached at a base were synthesized as the molecular devices that allow optical knockdown of RNAs. For proteins themselves, we synthesized three kinds of the conjugates of protein ligands with NBP (Lg-BP) or another photosensitizer.

In the early stage of this study, it was found that NBP itself had mutagenicity probably due to the nitro group. We therefore parallelly started the development of a sensitizer that does not have a nitro group. On the other hand, NBP-attached oligonucleotides may not have mutagenicity, because of the small occupancy of the nitro group in the whole molecule, and thus we synthesized the NBP-AON, AON1 and AON2, as previously designed for glucose-transporter (GLUT1) knockdown. As a result, AON1 showed neither mutagenicity (micoAmes) nor hepatotoxicity (nonGL). In addition, the photoknockdown effect of AON2 against GLUT1 was almost 100%, as proved by the cell experiments, in which Western blotting was carried out on the lysate of the light-irradiated cancer cells incorporating AON2. Studies for the regioselectivity of G oxidation with various AONs with different NBP binding positions demonstrated that G (+8 to +10) bases farther from NBP are more efficiently oxidized than the closer G (+1 to +5).

Lg-BP had a low oxPKD ability against carbonic anhydrase (CA), whereas the complex of BODIPY derivative (IBDP) and ligand (PS-Lg 6) exerted a high oxPKD effect on CAIX, one of CAs. PS-Lg(GLU), a conjugate of GLUT1 ligand and IBDP was found to show almost 100% oxPKD effect on GLUT1 as verified by the Western blotting. The GLUT1 selectivity on oxPKD of PS-Lg(GLU) was revealed by comparison with oxPKD of Laserphyrin, in which unwanted degradation of  $\alpha$ -tubulin protein in addition to the GLUT1 degradation was observed. PS-Lg(GLU) also exhibited photodynamic cytotoxic activity equivalent to that of Laserphyrin, thus establishing a new concept of "molecular-targeted photodynamic therapy". Furthermore, we synthesized a precursor of PS-Lg(MCT) targeting a monocarboxylic acid transporter (MCT1).

We thus were able to prove the concept of the technology for photo-manipulating the ON / OFF of the function of a specific protein in living cells in real time at each stage of RNA and protein as planned.