

総説 (2017年度横浜市立大学医学会賞受賞研究)

蛋白質機能の光操作とその応用

竹 本 研

横浜市立大学医学部 生理学

要 旨：個々の分子活性の単純なON・OFFだけでなく、その時空間的な変動パターンにも細胞機能の制御メカニズムが内包すると示唆される。ところがこうした分子活性の時空間ダイナミクスがもつ生理的意義や個体レベルへの寄与の程度は、未だ多くが謎に包まれている。分子の時空間ダイナミクスにアプローチする手法として、生きた細胞の中で分子活性を光で可視化・操作する手法がある。光を用いることで、神経スパインなどのわずか数マイクロメートルの微小空間においても分子活性を迅速に操作することができ、その表現系を可視化することで、分子機能の時空間ダイナミクスについて、因果的な解析が可能になる。そこで本項では、近年注目される光で分子機能を不活性化するCALI法に関する最先端技術について解説する。

Key words: CALI法 (CALI), 光操作 (optical manipulation), AMPA 受容体 (AMPA receptor), 学習記憶 (learning and memory)

CALI法とは？

個々の分子活性が示す時空間ダイナミクスには、細胞機能の制御システムが内包すると示唆される。例えば齧歯類のシナプス活性化の際には、迅速な活性化が起こると共に分子活性が単一シナプスに限局する一部のリン酸化酵素¹⁾、あるいは植物の細胞壁パターン形成時に局所活性化する低分子量GTPase²⁾などはその典型であろう。ところが、こうした分子活性の時空間ダイナミクスがどの程度生きた組織に存在するか？あるいはその生理的意義や個体レベルへの寄与の程度など、詳細は今だ多くが謎に包まれている。これは現在の生理学には、分子活性を迅速・局所に操作する汎用性のある技術が不足していることが理由の一つと考えられる。そこで本項ではこれを可能にする光学技術として、CALI(Chromophore-assisted light inactivation)法に注目し、その可能性について論じたい。

CALI法は光照射依存的に活性酸素を産生する光増感物質を用いた、分子機能不活化法である³⁾。例えば標的分子に対する抗体を光増感物質で化学的にラベルし、標的分子と反応後に光照射をすると、光増感物質のごく近

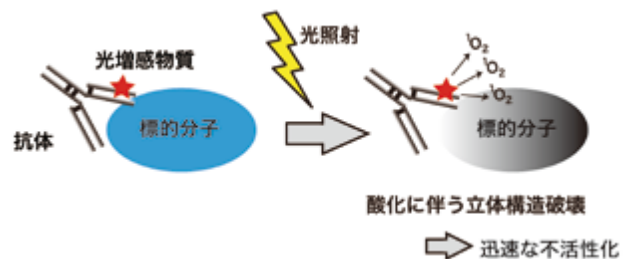


図1 CALI法の概略

標的分子に対する抗体を用いたCALI法の概略図。CALI法は、光照射により迅速かつ特異的な分子機能の不活性化を誘導する。

傍に存在する標的分子の特異的な酸化・不活化が誘導される(図1)。効果的なCALI法には、光増感物質を標的分子の近傍に置くことが重要であり、特異的抗体を光増感物質でラベル化し標的分子に反応する方法と、遺伝子でコードされた光増感蛋白質を標的分子と融合・発現する方法がある。前者の場合、細胞内分子への適用が困難であるが、内在性分子の膜表面分子をターゲットにできる利点がある。後者では抗体が不要であるため簡便にCALI実験が可能であるが、内在性分子を標的にするには

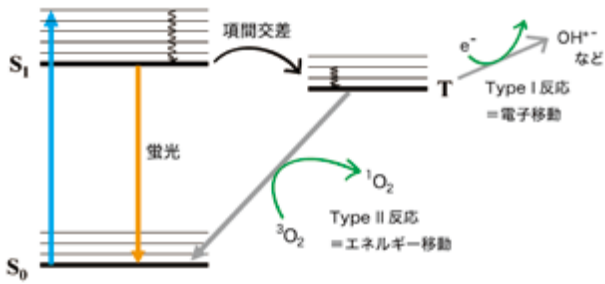


図2 活性酸素産生の原理について

ヤンブロンスキーダイアグラムを用いた活性酸素産生の原理。S₀は基底状態、S₁は励起一重項、Tは励起三重項を示す。TypeI反応では、光増感物質と標的分子間の電子移動によるラジカル発生が起こり、それが酸素分子と反応してヒドロキシラジカル(OH[•])などの活性酸素を産生する。TypeII反応では光増感物質から酸素分子にエネルギー移動が起こり、一重項酸素(¹O₂)が発生する。

遺伝子ノックインを行う必要があるなど、研究によって両者を使い分けることが重要である。

CALI法では、光源としてレーザー光を用いることで光照射領域をごく微小な領域とし、局所的な分子機能の不活性化が可能になる。CALI法における分子不活性化の特異性は、活性酸素の拡散半径の狭さに依存している。例えば後述のようにTypeII反応で産生する一重項酸素の拡散半径は3 - 4 nmとも言われ、これは細胞内に発現する分子の平均的な大きさの約半分であるため、一般的にCALI法は高い分子特異性を有すると考えられる^{4, 5)}。とはいえ、各標的分子に対するCALI法を構築した際にはまず、同じ局在を示す他の蛋白質の活性が低下していないか？あるいはノックダウン・ノックアウトマウスによる分子特異性の確認実験を行うことで、分子特異性を押さえておくことが重要である。

活性酸素産生の物理化学

光増感物質が光を吸収後に活性酸素を産生するメカニズムには、TypeI反応とTypeII反応の2種類が知られている⁶⁾(図2)。いずれの反応においても、まず光増感物質が光を吸収し励起一重項状態になった後、項間交差により励起三重項状態に遷移することが重要である。TypeI反応では、励起三重項状態の光増感物質と標的分子の間で電子の移動が起こりラジカルが発生する。次に、発生したラジカルが酸素分子と反応することで、ヒドロキシラジカル等の活性酸素が産生される。それに対してTypeII反応ではラジカルの発生は起こらず、励起三重項状態の光増感物質から酸素分子にエネルギーが移動することで、一重項酸素が産生される。後述のエオシンやフルオロセインといったCALIで良く用いられる光増感物質は、主にTypeII反応を起こす物質である。よってこれらの物質を用いるCALI法では、一重項酸素の拡散の程度がCALI

の分子特異性を決める重要な因子である。ヒドロキシラジカルや一重項酸素の拡散については一本鎖抗体等を巧みに利用した解析により、それぞれ1 - 3 nmと3 - 4 nm程度と報告されており^{4, 5)}、こうした拡散半径の短さがCALI法の分子特異性を生み出すと考えられている。

光増感物質

CALI法の誕生以来、本手法において重要な役割を持つ光増感物質は、これまでに数多く報告されている。最初にCALI法で用いられた光増感物質は、マラカイトグリーンという物質である³⁾。最近では白点病などの観賞魚用治療薬として認可されており、熱帯魚を趣味とされる方には一般的な薬品であろう。CALI法の誕生に貢献したマラカイトグリーンであったが、CALI効果を誘導するには大出力のレーザーを必要としCALI効果も低いことから、残念ながら一般的な技術とはならなかった。このことから、CALI法が一般的な手法として世の中に普及するには、研究室に設置された顕微鏡に付属するレーザー或いは水銀ランプにて、CALI法を効率良く実行可能な光増感物質の探索が必要と考えられた。

第二世代の光増感物質は、フルオロセインである⁷⁾。一般的には入浴剤や眼科用の血管造影剤、あるいは聖パトリック日におけるシカゴ川の染色でも用いられる(現在はフルオロセイン以外の秘密の色素を使用しているとか)。またフルオロセインは抗体染色の際の二次抗体に付加される蛍光色素としてもかつて使用されていたが、顕微鏡観察の際に褪色しやすい色素として記憶している方も多いのではないだろうか？照射による褪色こそまさにCALIの反応であり、知らず知らずのうちに多くの人がCALI法を行ってたわけである。このようにフルオロセインは一般的な顕微鏡用のレーザーもしくは水銀ランプ等でCALIが可能になるなど、マラカイトグリーンの弱点を補う色素である。一方でCALIの効率という点ではマラカイトグリーンに比べ良好であるものの十分な効率とは言えず、その他にも励起波長の短さといった改良の余地が残された。

そこで第三世代の光増感物質として登場したのが、エオシンである⁸⁾。筆者らはフルオロセインと同じXanthene骨格(アントラセンの中心のベンゼン環がピラン環に置換されたもの)を持つ色素に絞り、各種化合物の光増感活性を調べたところ、エオシンはフルオロセインに比較して吸収ピークが約30nm長波長であり、約11倍強い光増感活性を持ち、*in vitro*においてCALI効果が約5倍高いことが明らかになった。その構造的要因としては、エオシンはフルオロセインにはない4個のBrを持つため、これが強い光増感活性につながると考えられている(図3)。

このようにCALI用の色素は光感受性・光増感活性の

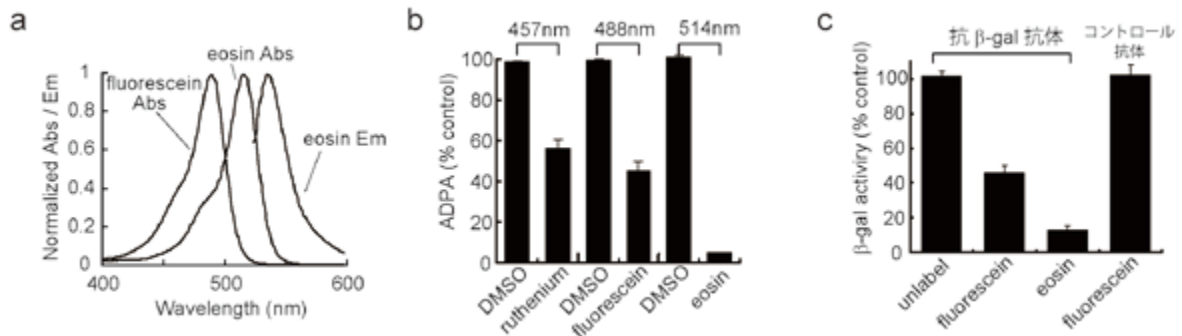


図3 強力な光増感作用を持つエオシンの特性

a. エオシンの吸収・蛍光スペクトルおよびフルオロセインの吸収スペクトル. エオシンの吸収ピークは517nmである. b. 一重項酸素産生能の比較. 一重項酸素に反応し消光する ADPA (anthracene-9,10-dipropionic acid) を用いて, 各光増感物質の一重項酸素酸性性能を測定. エオシンはフルオロセインの約11倍の産生能を持つ. c. β ガラクトシダーゼの CALI. 抗 β -ガラクトシダーゼ抗体を用いて CALI を行った. エオシンはフルオロセインに比較し5倍以上の CALI 効果がある. 文献8を改変.

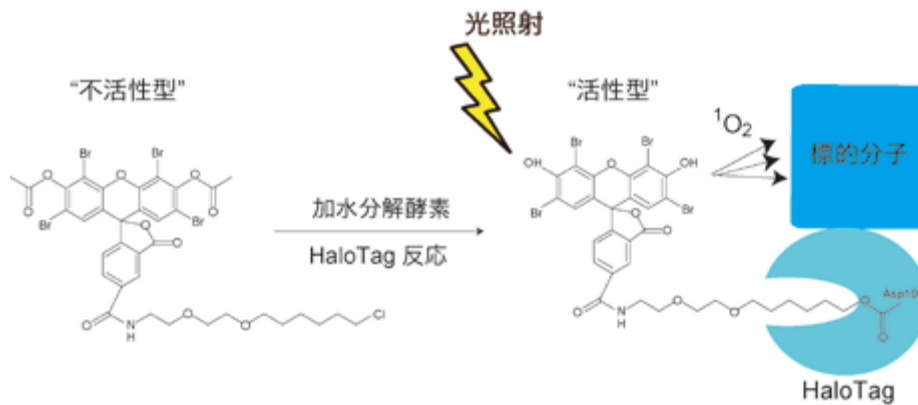


図4 HaloTagを用いたエオシンラベリング

本リガンドはエオシン骨格と HaloTag 反応配列からなる. エオシン骨格にはジアセチル基が付加されており, 細胞内に透過後にエステラーゼによる加水分解を経てジアセチル基が外れると, 光を吸収可能な活性型に変換される. これにより細胞内に取り込まれたもののみ機能する.

面で発展を続けているが, 一方で標的分子をどうやって光増感物質でラベル化するかが大きな問題であった. 例えば細胞表面分子を CALI 法で光不活化する場合, 標的分子の細胞外ドメインに対する抗体を反応基が付加された光増感物質で化学的にラベル化し, CALI を行うことができる (図1). ここで使用する反応基は, アミンに反応するイソチオシアネート基やチオールに反応するマレイミド基などである. イソチオシアネートの場合, 反応バッファーの pH がアルカリであればリジン側鎖のアミノ基に反応し, 中性の場合は α アミノ基に反応するため, ラベル化位置を変更することでより CALI 効率が高いものを選択することも可能である. ところが抗体を用いた CALI 法の場合, 細胞内分子を標的に実験する際にはラベル化抗体のマイクロインジェクションが必要であるため *in vivo* で用いるには極めて困難であり, この点も CALI 法が普及しない壁の一つと考えられた. そこで様々なグループから, 抗体を用いることなく細胞内分子に光増感剤を付加するため各種手法の開発が試みられている.

光増感物質の導入法

光増感物質を標的分子にラベル化する方法として, 遺伝子でコードされた特定の蛋白質やアミノ酸配列に反応する光増感物質誘導体が報告されている. FIAsh-EDT2 と ReAsH-EDT2 は, それぞれフルオロセインとローダミンを含む膜透過性化合物である⁹⁾. これらは連続する4システイン配列に反応するため, 標的分子に4xCys配列を融合するだけで, 光増感物質を標的分子にラベル化することができる. しかしながら, 非特異的ラベル化や毒性といった問題も報告されている^{10, 11)}. 他方, SNAP タグを用いた特異性の高いフルオロセインのラベル化システムも報告されており, これを応用した α , γ チューブリンの CALI が報告されている¹²⁾. しかしながら, 当論文において CALI 時に照射した光強度が極めて高く (67.5 kJ cm^{-2} 以上), 細胞や組織によっては強い光毒性が懸念された.

それに対して我々の研究グループでは, HaloTag を利

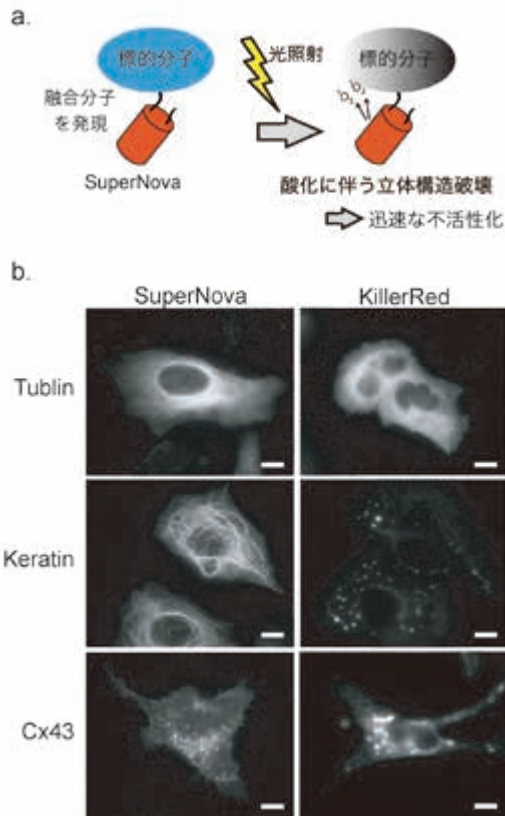


図5 単量体光増感蛋白質SuperNovaによる融合分子の発現

a. SuperNovaによるCALIの模式図. b. SuperNovaとKillerRedそれぞれをTublin・Keratin・Connexin43と融合し細胞内に発現した. SuperNovaでは内在性分子と同様の発現パターンを示すが, KillerRedでは発現パターンが変わったり凝集体の形成が認められる. 写真内のスケールバーは10μmを示す. 文献15を改変.

用したエオシンラベル化法の開発に成功している⁸⁾. HaloTagは天然の脱ハロゲン酵素の一種を改良して開発された分子量33kDaの酵素であり, HaloTag反応基を持つ化合物(HaloTagリガンド)と共有結合を形成する. よって標的分子とHaloTagとの融合分子を細胞に発現し, HaloTagリガンドを細胞に添加すれば, 速やかに標的分子をHaloTagリガンドでラベル化することができる. 我々はHaloTagリガンドとして機能するエオシン(ジアセチルエオシンリガンド)を化学合成し, 細胞透過性が高く分子特異性も高いエオシンラベル化システムを開発した(図4). 実際にこのシステムを用いることで, リン酸化酵素であるPKC γ やAuroraBをCALIで光不活性化することに成功している. これにより, 標的分子にエオシンをラベル化しCALIを簡便に行う手法の確立に成功した. 他方このHaloTagシステムでは, HaloTagと様々な遺伝子を融合した“Flexi HaloTag”クローンライブラリーを利用できる. これはヒトの7000以上のORFの5'側にHaloTagを融合させた発現ベクターである¹³⁾. こうしたライブラリーが一層充実してゆけば, これまで見逃されがちであった様々な蛋白質の時空間的機能について, CALI

を用いたスクリーニングが可能になると期待できる.

光増感蛋白質

化学合成された光増感物質は強い活性を持つ利点があり, 前項で紹介したとおりHaloTagのような優れた光増感物質の導入法が開発されたため, 細胞内分子への適用も可能になった. 一方で, 光増感物質自体が遺伝子で完全にコードされていれば, トランスジェニック動物やノックイン動物の作成が可能になり, CALI法は極めて簡便な手法として一層普及すると考えられた. そうした中, ロシアのLukianovのグループが開発したのが, KillerRedという光増感「蛋白質」である¹⁴⁾. KillerRedはanm2CPというヒドロ由来の色素タンパク質を元に遺伝子変異スクリーニングを行い, 照射依存的に大腸菌を殺す活性があるかを指標に開発された. KillerRedでのCALIは, 標的分子との融合分子を発現ベクターで目的の部位に発現し, 照射を行うだけである(図5a). これだけでは内在性分子のCALIはできないとはいえ, 極めて簡便に分子操作実験が可能になる点で, 画期的な手法と言えた. 一方で, KillerRedは世界初の遺伝子でコードされた光増感物質であるが, 二量体を形成することにより融合する標的分子の局在が非生理的になる問題が散見された. 例えば標的分子をKillerRedを融合した場合, 細胞質への非生理的局在(Fibrillarin)や凝集体(KeratinとCx43)が認められ, このことからKillerRedの単量体化が望まれていた(図5b). それに対して我々のグループでは, 立体構造予測とランダム変異スクリーニングを駆使することで, 単量体KillerRedであるSuperNovaの開発に成功した¹⁵⁾. SuperNovaはKillerRedでは生理的な分布を示さない蛋白質と融合しても, 生理的な分布を示すなどKillerRedの弱点を大幅に改良することに成功している(図5b). SuperNovaは現在世界中の研究室で利用されており(Kim K et al. Neuron 2015など), 今後のCALI法の普及において中心的な光増感蛋白質と言える.

他方, GFPに類似した β can構造を持つSuperNovaやKillerRed以外にも, Phototropin2のLOVドメインを元に開発された光増感蛋白質miniSOGも報告されている^{16,17)}. miniSOGは, 一重項酸素を産生する光増感蛋白質であるが, SuperNovaとは異なり発色団は細胞内に存在するフラビンモノヌクレオチド(FMN)であり, 発色団以外が遺伝子でコードされている. FMNは細胞内に豊富に存在し, 高い一重項酸素産生効率($\Phi=0.47$)を持つ. このため, miniSOGはCALI用の光増感物質として利用される以外にも, 電子顕微鏡観察のための四酸化オスミウムによる検出にも利用されている. 例えば, miniSOGを標的分子に融合し細胞内に発現させることで, 電子顕微鏡により抗体を用いることなく簡便に標的分子の発現分布を

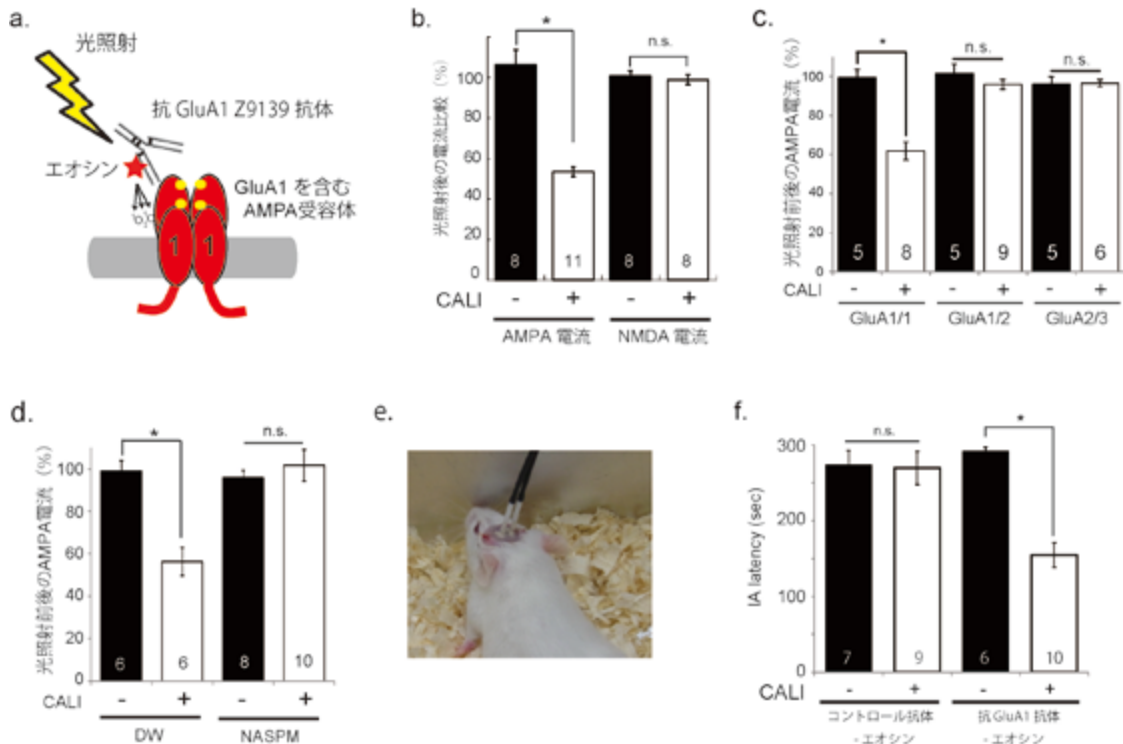


図6 CALI法の実践：AMPA受容体CALI法の開発

a. AMPA受容体CALI法の模式図。シナプスのGluA1を標的にするために、GluA1細胞外ドメインに対する抗体を用いる。b. シナプスにおけるCALIの分子特異性。海馬初代培養ニューロンの各シナプス電流について、CALI前後で比較。NMDA受容体の活性は変化しない。c. 各AMPA受容体における分子特異性について、各複合体をCHO細胞に発現しCALIを行ったところ、GluA1/1に複合体特異性があることを見出した。d. シナプスにおけるGluA1/1に対する特異性。海馬初代培養ニューロンのシナプス電流をCALIしたところ、GluA1/1阻害剤NASPM存在下ではCALI効果がなくなる。e. *in vivo* CALI用に光カスラを設置したマウス。f. *in vivo* CALIによる記憶消去。縦軸は記憶の強さに相関するIA latencyを示す。文献18を改変。

解析することができる。こうしたminiSOGを用いてCALIによるloss of function実験を行う場合には、実験を行う組織でFMNが実際に十分に発現するかをあらかじめ確認することも重要と考えられる。

CALI法の開発の実際：我々のAMPA受容体CALI法の開発について

これまでCALI法に関する基本事項を解説したが、本項を読んで新しい分子へCALI法を適用したいと考えた方もいると期待している。そこで我々が2017年に発表したモノクローナル抗体を用いたAMPA受容体のCALI法¹⁸⁾の例を取り上げ、CALI法開発の実際を紹介したい(図6)。

本研究の目的は、神経可塑性に重要なシナプスのAMPA受容体GluA1を光で不活性化することである。AMPA受容体は、成体の海馬ではGluA1~3の3種類のサブユニットが発現しそれらが組み合わさることで、GluA1/1・GluA1/2・GluA2/3の3種類の複合体が形成される。このうちGluA1を含む2種類の複合体は神経活動依存的にシナプスに移行し機能する。よってGluA1の光不活化が可能になれば、将来的には1シナプスレベルでの脳情報の

解読が可能になると期待できる。

抗体によるCALI法は標的分子に対するモノクローナル抗体を取得するところから始まる(図6a)。市販の抗体でnativeな分子を認識する抗体があればCALIは可能ではないのか?という質問を受けることがあるが、残念ながらそう単純ではない。同一のエピトープであっても抗体によって標的分子との結合構造・様式が異なるため、CALI効果がある抗体とない抗体にわかれる。この厳格な効果の違いは、前述の通りエオシンが産生する一重項酸素の拡散半径の短さに起因する。この拡散半径内に、酸化されると標的蛋白質の立体構造が解消されるアミノ酸残基が入っている必要があり、これが高い特異性と選択性を生み出すと考えられている。

本研究では東京大学の浜窪教授との共同研究でバキュロディスプレイ法により、GluA1の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体を33種類取得した。これらの候補の中から、CALIに適した抗体を正確にスクリーニングすることが、質の高い技術を確認する重要なポイントである。AMPA受容体の場合、グルタミン酸を添加すれば細胞内の電気的な変化をパッチクランプで検出することで、その活性を測定できる。その他にも例えばPKCであれば、活性型PKCは膜移行するためイメージングによ

でもPKCの活性を定量できる。こうした活性の定量が可能な手法が抗体のスクリーニングには重要である。

CALI用の抗体スクリーニングではまず、western blotにてGluA1自体の抗体かを確認し、その後にGluA1を発現する生細胞に対して生細胞染色を行った。その結果、生細胞染色に陽性な抗体は33中5個であった。次に、用意したモノクローナル抗体5種類をエオシンイソチオシアネートでラベル化し、GluA1を発現したCHO細胞に反応後にCALIを行う。本研究の場合は、光照射前後のAMPA電流をホールセルパッチクランプにて測定・比較し、CALIの効率を算出した。我々はこれらのスクリーニングにより、最もCALI効率の良い抗体Z9139抗体を同定した。本抗体によるCALIはシナプス性のAMPA受容体にも効果がある(図6b)。また興味深いことに本抗体でCALIを行うと、3種類のAMPA受容体複合体のうちGluA1ホモマーを特異的に不活性化することも見出した(図6c-d)。前述の通りCALIの効果は立体構造レベルの問題である。GluA1ホモマーとGluA1/2の構造は異なると示唆されるため、GluA1を含むGluA1/2ヘテロマーは不活性化しないという複合体特異性が生まれたと考えている。CALIが可能な抗体を同定した後に検討すべきことは、同じ局在を持つ他の蛋白質をコントロールにCALIの特異性を証明することである。本研究では海馬初代培養において、シナプス性のNMDA受容体をコントロールに電気生理学的に分子特異性を証明した(図6b)。

これまでのところCALI法を*in vivo*に適用した例はほとんど無く、脳の高次機能を操作した報告は全く存在しない。ここでは*in vivo*の組織中でラベル化抗体が拡散するか? 光照射が行えるか? が鍵になる。本研究ではエオシンの代わりに非常に明るく観察しやすいAlexa596色素で抗体をラベル化し海馬に注入後、組織中での抗体の拡散範囲を解析し、lateralに約400 μ m, sagittalに約200 μ m拡散することを見出している。こうした広範囲でCALIを行うために光照射用のカメラを設置したが、このカメラの先端が海馬の直上にあたるように設置し(図6e)、AMPA受容体が発現する海馬CA1領域において広くCALIができるようにしている。これにより*in vivo*においてもGluA1ホモマーのCALIが可能になり、さらにGluA1のKOマウスや他のAMPA受容体をコントロールとした電気生理学的解析により*in vivo* CALIの分子特異性も明らかにした。我々はこの実験系により、海馬依存的な記憶課題である受動的回避学習に関する記憶を光照射により消去することに成功し(図6f)、GluA1ホモマーは学習初期の記憶を時期特異的にコードすることを発見した。

CALI法の今後の可能性について

このようにAMPA受容体CALI法は*in vivo*でも記憶の操作を可能にし、今後の記憶情報の解読に大きな一歩を踏み出したと言える。今後は様々な分子をCALI法で操作し、記憶における各分子の時空間的な機能を解明することが目標の一つである。一方でAMPA受容体のように抗体を用いるCALI法の場合は、上記で示したようにCALIが可能な抗体を分子ごとに取得する必要がある。様々な分子を簡便にCALIで光操作することは実際のところ困難である。よって今後、様々な分子をゲノムワイドに光で簡便に操作することが可能な革新技術の開発が成功すれば、CALI法が次世代生物学のキーテクノロジーになると期待できる。

またCALI法はPDT(Photodynamic Therapy)のように医療への応用が期待されている⁶⁾。PDTで用いられる光増感物質はポルフィリン化合物などであり、がん細胞に集積する性質がある。またがん細胞に特異的な表面抗原に対する抗体に光増感物質をラベル化し、PDTに用いる方法も考えられている¹⁹⁾。ポルフィリン化合物の光照射波長は690nmであるが、PDTの効率は発生する活性酸素類の産生効率に加えて、深部到達が可能な長波長の光を用いることが鍵になる。現在のところPDTは主に皮膚癌などの組織表面の癌に適用が限られており、今後は光照射波長をより長波長にシフトできる新しい光増感物質の開発が今後の課題である。もちろんこれは基礎研究においても重要なポイントであり、例えば現在は大脳基底核などの脳の深部に光照射をする場合には光カヌラを脳の奥深くに刺す必要があり、比較的侵襲度の高い実験になっている。もしも長波長の光増感物質が開発されれば、将来的には組織にカヌラを刺すことなく脳の深部でCALIが可能になり、侵襲製の低い実験が可能になると期待できる。

このようにCALI法は約30年前に開発された手法にもかかわらず技術的な改良の余地が豊富に残されており、現在では想像も付かない技術革新を遂げる可能性を秘めている。我々は、これらをつづつクリアし次世代生物学を牽引する新技術の開発を目指したいと考えている。

文 献

- 1) Murakoshi H, Wang H, Yasuda R: Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature*, **472**: 100–132, 2011.
- 2) Oda Y, Fukuda H: Initiation of Cell Wall Pattern by a Rho- and Microtubule-Driven Symmetry Breaking. *Science*, **337**: 1333–1336, 2012.
- 3) Jay DG: Selective destruction of protein function by

- chromophore-assisted laser inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**: 5454 – 5458, 1988.
- 4) Linden KG, Liao JC, Jay DG: Spatial specificity of chromophore assisted laser inactivation of protein function. *Biophysical Journal*, **61**: 956 – 962, 1992.
 - 5) Beck S, Sakurai T, Eustace BK et al.: Fluorophore-assisted light inactivation: a high-throughput tool for direct target validation of proteins. *Proteomics*, **2**: 247 – 255, 2002.
 - 6) Wojtovich AP, Foster TH: Optogenetic control of ROS production. *Redox Biology*, **2**: 368 – 376, 2014.
 - 7) Surrey T, Elowitz MB, Wolf P-E et al.: Chromophore-assisted light inactivation and self-organization of microtubules and motors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**: 4293 – 4298, 1998.
 - 8) Takemoto K, Matsuda T, McDougall M et al.: Chromophore-Assisted Light Inactivation of HaloTag Fusion Proteins Labeled with Eosin in Living Cells. *Acs Chem Biol*, **6**: 401 – 406, 2011.
 - 9) Tour O, Meijer RM, Zacharias DA, Adams SR, Tsien RY: Genetically targeted chromophore-assisted light inactivation. *Nature Biotechnology*, **21**: 1505, 2003.
 - 10) Stroffekova K, Proenza C, Beam KG: The protein-labeling reagent FLASH-EDT2 binds not only to CCXXCC motifs but also non-specifically to endogenous cysteine-rich proteins. *Pflugers Arch*, **442**: 859 – 866, 2001.
 - 11) Martin BR, Giepmans BN, Adams SR, Tsien RY: Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity. *Nat Biotechnol*, **23**: 1308 – 1314, 2005.
 - 12) Keppeler A, Ellenberg J: Chromophore-Assisted Laser Inactivation of α - and γ -Tubulin SNAP-tag Fusion Proteins inside Living Cells. *Acs Chem Biol*, **4**: 127 – 138, 2009.
 - 13) Nakajima D, Koga H, Yamakawa H et al.: Exploration of Human ORFeome: High-Throughput Preparation of ORF Clones and Efficient Characterization of Their Protein Products. *DNA Research*, **15**: 137 – 149, 2008.
 - 14) Bulina ME, Chudakov DM, Britanova OV et al.: A genetically encoded photosensitizer. *Nature Biotechnology*, **24**: 95, 2005.
 - 15) Takemoto K, Matsuda T, Sakai N et al.: SuperNova, a monomeric photosensitizing fluorescent protein for chromophore-assisted light inactivation. *Sci Rep*, **3**: 2629, 2013.
 - 16) Shu X, Lev-Ram V, Deerinck TJ et al.: A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms. *PLoS Biol*, **9**: e1001041, 2011.
 - 17) Qi YB, Garren EJ, Shu X, Tsien RY, Jin Y: Photo-inducible cell ablation in *Caenorhabditis elegans* using the genetically encoded singlet oxygen generating protein miniSOG. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**: 7499 – 7504, 2012.
 - 18) Takemoto K, Iwanari H, Tada H et al.: Optical inactivation of synaptic AMPA receptors erases fear memory. *Nature Biotechnology*, **35**: 38 – 47, 2017.
 - 19) Hudson R, Carcenac M, Smith K et al.: The development and characterisation of porphyrin isothiocyanate-monoclonal antibody conjugates for photoimmunotherapy. *British Journal Of Cancer*, **92**: 1442, 2005.

Abstract

OPTICAL TECHNOLOGY FOR INACTIVATION OF
PROTEIN FUNCTION

Kiwamu TAKEMOTO

Department of Physiology, School of Medicine, Yokohama City University

The control mechanism of cell function is involved in not only the simple on/off function of individual molecular activities, but also temporal and spatial patterns; however, its contribution to in vivo systems are still unknown. To analyze the spatiotemporal properties of molecular activity, visualization and manipulation methods with light have recently been attracting increased attention. By using light, molecular activities can be manipulated rapidly, even in microspaces measuring a few micrometers, such as dendritic spines, to reveal the causal relationships between molecular and physiological functions. In this section, among the technology for molecular controlling, we mention the powerful strategy, chromophore-assisted light inactivation chromophore-assisted light inactivation, which allows us to inactivate molecular functions by light irradiation.