

シグナル伝達の時空間動態を光で制御して光で解析する - 生理活性を光で制御するケージド化合物の開発とその応用 -

古田 寿昭

(東邦大学・理学部・生物分子科学科)

1. 研究のねらい

複雑で高度に秩序化された生体内反応を制御するために、生体はさまざまな情報をやり取りしている。これらはいくつかのシグナル伝達系で制御されているが、より深く理解するためには、シグナリングに関与する分子が、いつ、どこで、どのように働くかを明らかにする必要がある。しかし従来の方法論だけでは、この素過程を生理的条件に近い時間および空間分解能で解析することは困難である。そこで、ケージド化合物を利用して細胞内あるいは細胞間での情報のやり取りを高い時空間分解能で操作する手法の開発を目的として研究を行った。

2. 研究成果と考察

ケージド化合物とは、光分解性の保護基で生理活性分子を保護し、一時的にその活性を失わせた分子のことである。光を照射することで、瞬時に元の生理活性分子を出現させることが出来る。シグナル分子が機能発現する時期と場所を、光を照射する時期と場所で制御することが可能になり、照射光量で発現する量を調節することも原理的には可能となる。本研究では、我々のグループで開発した光分解性保護基であるBhc基（6-ブロモ-7-ヒドロキシマリリン-4-イルメチル基）を用いて、さまざまな情報分子のケージド化合物を合成することから始めた。

(1) 神経伝達物質およびセカンドメッセンジャーのケージド化合物の設計・合成

神経伝達物質のケージド化合物として、グルタミン酸、グリシン、アスパラギン酸、GABAおよびD-セリンのケージド化合物の合成に成功した。これらの化学的な性質を調べて、ケージド化合物として適当かどうか検討した結果、いずれの化合物も、1光子励起の光感受性の面では申し分ない性質を持っていた。カルボキシル基側にケージを導入したものについては、暗所での安定性がそれほど高くない（半減期12-30時間）という問題点も明らかとなったが、Bhc基がアミノ酸全般をケージド化合物に変換できることが分かったので、これをペプチドに拡張し、RGD（アルギニン-グリシン-アスパラギン酸）モチーフを持つペプチドのケージド化合物を合成した。合成したケージドRGDペプチドが、光照射によってほぼ定量的に元のRGDペプチドを放出することと、HL-60細胞（前骨髄性白血病細胞）のアポトーシスを光制御できることが確認出来た。例えば、細胞接着に伴うインテグリンを介したシグナル伝達の分子機構を調べるツールとしての応用が期待できる。また、合成したケージド神経伝達物質を脳スライスサンプルに適用して、電気生理学的手法と組み合わせることで、神経細胞間の情報伝達を光照射によって擬似的に再現して解析することも可能となる。

続いて、セカンドメッセンジャーのケージド化合物として、cAMP、cGMP、ジアシルグリセロールおよびアラキドン酸のケージド化合物を合成した。合成法の最適化、光反応性の検討および酵素反応の光制御能等を明らかにし、さらに、cAMPに関しては、様々な細胞内への導入法に対応できるように、膜透過性のものと水溶性が高いものを合成した。膜透過性誘導体はメダカの色素胞へ導入し、cAMPが関わるシグナル伝達系を光照射によって繰り返し制御できることを確認した。また、水溶性誘導体をパッチピペットによって単離嗅細胞に導入し、匂い感知後のシグナル伝達を光照射によって再現できることも確認できた。しかし、これらのケージド化合物に2光子励起を適用し、高い空間分解能で反応を制御することも目標としていたが、

そちらはほとんど手付かずとして残ってしまった。今後の課題としたい。

(2) 任意の遺伝子の機能を光で制御する方法の開発

生体における情報のやりとりの主役分子はタンパク質である。Bhcケージド化合物の応用の1つとして、遺伝子の機能を制御することを検討した。サイクリックヌクレオチドのケージド化合物合成用に開発したBhc-ジアゾを用いることで、mRNAのケージド化合物 (Bhc-mRNA) を合成することができた。Bhc-mRNAをゼブラフィッシュ初期胚に導入することで、任意のmRNAの時期および部位特異的な過剰発現をin vivoで行うことにも成功した。同様な考え方でタンパク質レベルでの機能発現の光制御も可能となる。さらに、ケージド化合物の化学を拡張することで、任意の遺伝子およびタンパク質の機能阻害を行うことも可能になるであろう。今後のさらなる発展への足掛かりができたと考えている。

(3) 新しいケージの開発

Bhc基は、従来のものに比べて1光子励起の効率が遥かに高いという特徴を持つが、まだ万能ではない。そこで、これとは異なる性質を持ち、相補的に用いる事ができるようなケージの開発を目指し、Anthraquinon-2-ylmethoxycarbonyl (Aqmoc) 基の開発に成功した。これは、水酸基やアミノ基を持つ生理活性物質のケージド化合物合成への応用が可能で、特徴としては、1光子励起の効率が比較的高いことと、ケージ解除後の副生成物が紫外領域の光を吸収しないことがあげられる。今後は、さらに異なる性質を持つケージ (例えば、暗所での安定性が高いもの、可視光でケージ解除できるものなど) の開発も進めていく必要がある。

3. 主な論文

1. Mizuta, H., Watanabe, S., Sakauchi, H., Nishiyama, K., Furuta, T., Kobayashi, Y., and Iwamura, M. (2002). Design, synthesis, photochemical properties and cytotoxic activities of water-soluble caged leucyl-leucine methyl esters that control apoptosis of immune cells. *Bioorg. Med. Chem.* 10, 675-683.
2. Furuta, T., Hirayama, Y., and Iwamura, M. (2001). Anthraquinone-2-ylmethoxycarbonyl (Aqmoc): a new photochemically removable protecting group for alcohols. *Org. Lett.* 3, 1809-1812.
3. Ando, H., Furuta, T., Tsien, R. Y., and Okamoto, H. (2001). Photo-mediated gene activation using caged RNA/DNA in zebrafish embryos. *Nature Genetics* 28, 317-325.

4. その他

招待講演 国内1件