

## ケージド化合物の現状と生命科学への応用

百武 篤也

(筑波大学大学院数理工学物質科学研究科化学専攻)

### 1. はじめに

ケージド化合物は、生理活性物質を細胞内外の任意の場所に光照射により発生させるために作られた物質である。これを可視化技術と組み合わせて使うと、その活性物質が関与する、より直接的かつ精密な時間・空間的情報が得られる。ケージド化合物は、生理活性物質と光分解する物質(ケージング基)で構成される。ケージド化合物の応用範囲は金属イオンや小分子有機化合物から、タンパク質、核酸の巨大分子にまで広がっている。一度はケージド化合物の使用を考えたことがある研究者も多いのではないだろうか。一方で、目的のケージド化合物の入手・作成が困難であるケースも多いと思われる。

より優れたケージド化合物の開発と、それらの有効利用には異分野連携が欠かせない。そこで本稿ではケージド化合物の現状や問題点を、作成側である有機化学者の目線で述べてみたい。まずケージド化合物の現状として、代表的な生理活性物質別にケージド化合物の性能比較を試みる。さらに、ケージド化合物の入手・作成に関することを述べる。このようなことが、ケージド化合物の初めての使用や、作り手—使い手の連携強化の一助となれば幸いである。

なお、個々のケージド化合物の作用機序・応用例に関しては解説書・総説<sup>1-3)</sup>が既に存在するので本稿では割愛させていただく。

### 2. 優れたケージド化合物とは

光照射で発生させたい活性物質がヌクレオチド類、アミノ酸、カルシウムイオン等の場合、市販のケージド化合物を選択できるが、それらは多数報告されているケージド化合物の中の一部にすぎない。また、現在でも次々と新規ケージド化合物が報告され続けているが、残念ながら最新

=最良とは限らない。

いったい“優れた”ケージド化合物とはどういうものを指すのだろうか。それは可能な限り低濃度の使用で済み、さらにできるだけ弱い光で十分量の生理活性物質を放出できるものではないだろうか。そもそも、生命科学研究においてケージド化合物技術を用いる利点は、光を当てるだけで、任意の生理活性物質を発生させることができることにある。ケージド化合物自体は生体に不活性とされているが、異物であることには変わりがなく、できるだけ低濃度での使用が望ましいし、何といたっても照射する光の強度はできるだけ弱い方が良くであろう。そのように考えると、ケージド化合物の優劣を支配する主要な因子は光吸収特性と光分解反応の起こりやすさである。具体的には、細胞へのダメージが少ない波長領域 350-400nm での光吸収の起こりやすさの指標(モル吸光係数= $\epsilon$ )と、吸収された光が生理活性物質の放出に使われる効率(アンケージングの量子収率= $\Phi_p$ )を掛け合わせた値( $\epsilon \cdot \Phi_p$ )である。 $\epsilon \cdot \Phi_p$ 値が大きいケージド化合物は値の小さい化合物と比べて、より低濃度で、あるいは、より強度の小さい照射光で必要量の活性物質の発生が期待できる。すなわち $\epsilon \cdot \Phi_p$ 値が高いケージド化合物は、より多くの場面で使える可能性が高い。

$\epsilon \cdot \Phi_p$ 値以外にケージド化合物の性質を示す値として、暗所での安定性、光分解速度、溶解性などがあるが、どちらかというと、それらはケージド化合物として機能するための必要条件といえる。

本稿ではケージド化合物の性能の要である $\epsilon \cdot \Phi_p$ のみに焦点をあわせて比較した。注意しなければならないのは、化合物によって実験条件(溶媒、光照射波長、解析法)が異なるので、異なる論文間での $\epsilon \cdot \Phi_p$ 値の比較はおおいに参考にはなるが、必ずしも厳密に優劣を決定する値ではないということである。

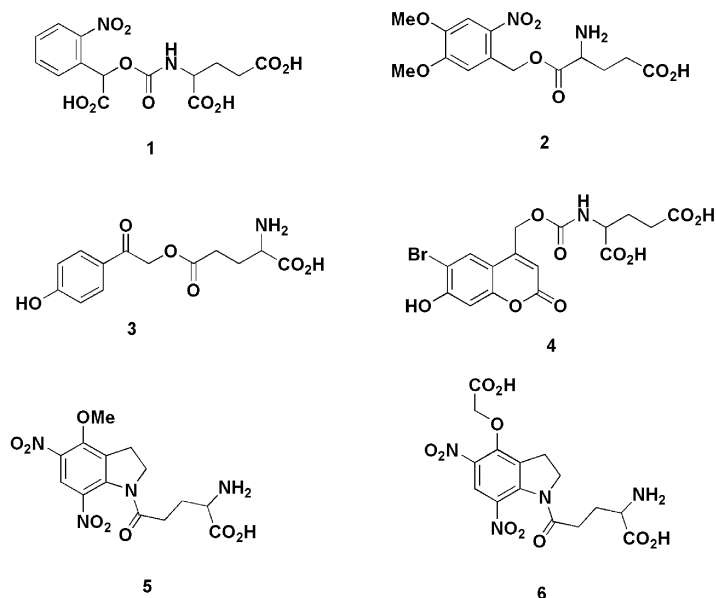
#### 2-1. どのケージドグルタミン酸が良いか(図1)

ケージドグルタミン酸は光照射によりグルタミン酸を放出する化合物である。ケージドグルタミン酸だけでもす

Current topics of caged compounds for biological application

Atsuya Momotake (Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, Tennoudai 1-1-1, Tsukuba-city, Ibaraki 305-8571, Japan)

## テクニカルノート



化合物	$\varepsilon/M^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (波長/nm)	$\Phi_p$	$\varepsilon \cdot \Phi_p$
1 <sup>4)</sup>	670* (350 nm)	0.11	68
2 <sup>5)</sup>	4900 (365 nm)	0.006	29
3 <sup>6)</sup>	-	0.08	-
4 <sup>5)</sup>	17300 (365 nm)	0.019	329
5 <sup>7)</sup>	8600 (350 nm)	0.47	4042
6 <sup>8)</sup>	-	-	-

\*文献4)中の吸収スペクトルからの見積値

図1 ケージドグルタミン酸の構造, 各化合物のモル吸光係数 $\varepsilon$ とその波長, アンケーシングの量子収率 $\Phi_p$ 及びそれらを掛け合わせた値 $\varepsilon \cdot \Phi_p$ .

に多くの化合物が報告・市販されている。代表例を図1に示す。様々なケーシング基が用いられているが、この中でいったいどれを使えば良いのだろうか。論文に示された数値を比較する限りは $\varepsilon \cdot \Phi_p$ の大きい化合物4や5、さらに5の改良版の6が優れていると言えるだろう。

ここでケーシング基別に化合物についてコメントしたい。

① 化合物1<sup>4)</sup>, 2<sup>5)</sup> (*o*-ニトロベンジル系) : *o*-ニトロベンジル基及びその類縁体は、ケージド化合物の光分解保護基部位として最も多く利用されており、合成法も確立され、光反応性なども良く知られている。市販品のケージド化合物のケーシング基の大部分は*o*-ニトロベンジル基の骨格を有する。

1のケーシング基の光励起は260-270nmで行われるが、

核酸塩基の吸収領域と重なり、細胞へのダメージが考えられ好ましくない。そこで、ダメージを減らすため、吸収領域を長波長側に移動させたケーシング基が、化合物2のジメトキシニトロベンジル基である。しかし、2は光分解量子収率が良くない。

② 化合物3<sup>6)</sup> (*p*-ヒドロキシフェナシル系) : *p*-ヒドロキシフェナシル基は比較的新しいケーシング基である。構造がシンプルで合成面では有利に見えるが、350nm以上の波長領域の $\varepsilon$ 値が小さい。

③ 化合物4<sup>5)</sup> (クマリニル系) : クマリン系化合物は光吸収特性に優れ、官能基導入により350-400nmの $\varepsilon$ 値を増大させることができる。このクマリン骨格を基に、特にケージド化合物用に改良されたケーシング基が、化合物4に用いられている Bhc (6-bromo-7-hydroxycoumarin-4-

ylmethyl) 基である。Bhc 基は7-位に OH 基を有し、その OH 基の  $pK_a$  は隣接する Br 基によってコントロールされ、光物性が調整されている。さらに細胞膜内への蓄積効果も有する。Bhc 基はグルタミン酸だけでなく、後述する cNMP や、他の多くの生理活性物質のケージド化合物に応用されており、実際に細胞実験で使えることが証明されているケージング基である。

④ 化合物 5<sup>7)</sup>, 6<sup>8)</sup> (7-ニトロインドリン系) : 化合物 5, 6 ではケージング基とグルタミン酸の結合様式がアミド結合であり、細胞内で高い安定性を示すと考えられる。光物性にも優れ、5 の  $\epsilon \cdot \Phi_p$  はこれまでの全てのケージドグルタミン酸のなかで最高値を示している。詳しい光物性は報告されていないが、6 のケージング基は5の水溶性を高めた改良型である。7-ニトロインドリン系のケージング基は構造がシンプルで、アミノ酸などのカルボン酸のケージング基としては、理にかなった無駄の無い分子設計である。

## 2-2. どのケージド環状ヌクレオチド (ケージド cNMPs) が良いか (図2)

環状ヌクレオチド cAMP 及び cGMP (cNMPs) は、細胞内シグナル伝達のセカンドメッセンジャーとして代表的な物質であるが、両環状ヌクレオチドによって調節を受けている遺伝子発現や細胞機能の発現の研究には不明な点も多く、ケージド化合物及び光を用いた高精度の量的コントロールが有効な手段になると考えられる。そのため幾つかの種類のケージング基がケージド cNMP に用いられてきた。それらの中でも特に継続的に改良が重ねられているのはクマリニル系ケージング基である。現時点で特に優れているケージング基は7の Bhc 基<sup>9)</sup>及び8<sup>10)</sup>の BCMACM 基

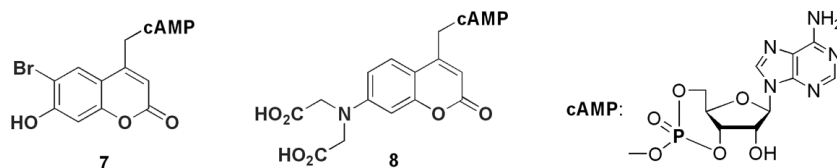
([7-[bis(carboxymethyl)-amino]coumarin-4-yl] methyl 基) である。

## 2-3. どのケージドカルシウムが良いか (図3)

ケージドカルシウムも改良が重ねられてきている。Ca<sup>2+</sup> の場合、それ自体に化学修飾することはできない。そこでケージドカルシウムは、Ca<sup>2+</sup> と錯形成するキレート試薬にケージング基を導入することにより作られる。ケージドカルシウムの場合、他のケージド化合物と異なり、高い  $\epsilon \cdot \Phi_p$  だけでは不十分で、生理条件において暗所で Ca<sup>2+</sup> に対する  $K_d$  値 (解離定数) が十分に低いことと、錯体形成時に Ca<sup>2+</sup> 選択性が必要となる。以上の理由から、現時点での実用的なケージドカルシウムは、分子中のキレート部位の構造が Tsien により開発された BAPTA (1,2-bis(*o*-aminophenoxy)ethane-*N, N, N', N'*-tetraacetic acid) か EGTA (ethyleneglycol bis(2-aminoethylether)-*N, N, N', N'*-tetraacetic acid) のものに絞られる。

BAPTA を基本構造とする代表的なケージド化合物は Nitr5<sup>11)</sup> や Azid1<sup>12)</sup> である。これらの化合物の長所は光分解前に顕著に見られる。すなわち BAPTA 骨格に由来する、Mg<sup>2+</sup> に対する Ca<sup>2+</sup> 高選択な錯形成能と、Ca<sup>2+</sup> 錯体形成における pH の影響が小さいことである。一方、短所は照射による Ca<sup>2+</sup> 濃度ジャンプの度合いが小さいことである。これは光反応後も BAPTA 骨格が分解せずに残ることが原因である。さらに Nitr5 の場合  $\Phi_p$  値が小さく、Azid1 の  $\Phi_p$  値は最高の1であるが、Ca<sup>2+</sup> 放出速度が小さい。これは Azid1 の光反応後に起こる熱反応が、Ca<sup>2+</sup> 放出の律速段階となっているためである。

EGTA 骨格を有するケージドカルシウムは Kaplan, Ellis-

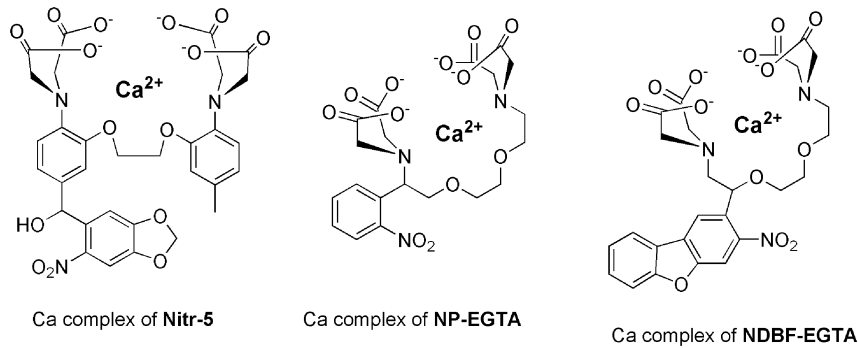


化合物	$\epsilon/M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (波長/nm)	$\Phi_p$	$\epsilon \cdot \Phi_p$
7 <sup>9)</sup>	17000 (371)	0.10	1120 *
8 <sup>10)</sup>	17900 (383)	0.30	5370

\*350nm照射による値

図2 ケージド cAMP の構造, 各化合物のモル吸光係数  $\epsilon$  とその波長, アンケージングの量子収率  $\Phi_p$  及びそれらを掛け合わせた値  $\epsilon \cdot \Phi_p$

## テクニカルノート



化合物	$\epsilon/M^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (波長/nm)	$\Phi_P$	$\epsilon \cdot \Phi_P$
Nitr-5 <sup>11)</sup>	5500 (355-360)	0.012	66
Azid-1 <sup>12)</sup>	33000 (342)	1	33000
NP-EGTA <sup>13)</sup>	970 (347)	0.20	194
NDBF-EGTA <sup>14)</sup>	15300 (350)	0.7	10710

図3 ケージドカルシウムの構造, 各化合物のモル吸光係数 $\epsilon$ とその波長, アンケーシングの量子収率 $\Phi_P$ 及びそれらを掛け合わせた値 $\epsilon \cdot \Phi_P$

Davies らにより開発された<sup>13)</sup>. これらのケージドカルシウムの長所は光反応でEGTA骨格が分解するため, より大きな $\text{Ca}^{2+}$ 濃度ジャンプを引き起こされることである. 短所は中性付近のpH変化が $\text{Ca}^{2+}$ 錯形成能に影響を与えてしまうことであるが, pH7.2付近なら実用範囲内に収まると考えられる.

ケージドカルシウムの $\epsilon \cdot \Phi_P$ 値を比較すると, Azid1とNDBF(3-nitrodibenzofuran-2-yl)-EGTA<sup>14)</sup>が優れているが, Azid1の短所を考慮すると, 最も実用的なのはNDBF-EGTAである. NDBF-EGTA中のNDBF基は*o*-ニトロベンジル基の光反応性を大幅に改善した新しいケージング基である. 多くの官能基への応用が可能と予想され, 今後の優れたケージド化合物開発への貢献が期待される.

### 3. 各官能基に最適なケージング基はどれか

現時点で各官能基に適していると思われるケージング基を, 過去の報告をふまえてピックアップしてみた. ただし合成のしやすさは考慮していない.

**カルボキシル基**(アミノ酸, タンパク質, 脂肪酸中など): ケージドグルタミン酸の項で述べたように, 7-ニトロインドリン系がベストと思われる.

**リン酸基**(ATP, cNMP, DNA, RNA, ホスファチジルイノシトール中など): ケージドcNMPの項にあるように, クマリン骨格を有するケージング基が優れている.

**アミノ基**(アミノ酸, タンパク質, カテコールアミン, 核

酸塩基中など): クマリニル系または*o*-ニトロベンジル系  
**水酸基**(糖, カテコールアミン, リボヌクレオチド, グリセロール中など): *o*-ニトロベンジル系  
**チオール基**(システイン中など): *o*-ニトロベンジル系

### 4. もっと長波長の光でアンケーシングできるか

ケージド化合物をアンケーシングさせる光の波長は, 長波長であればあるほど, 細胞へのダメージを軽減できる. そのため, もともと300nm以下の光でアンケーシングされていた当初のケージド化合物は350-400nm辺りの光でも使えるように改善されてきた. ところで, アンケーシングするための励起光をもっと長波長にすることはできるだろうか. 筆者は500-800nmの光(緑色光~赤色光)で高効率にアンケーシングするケージド化合物を作ることは難しいと考えている. 一つは光励起エネルギーの問題である. つまり長波長領域の光エネルギーは小さくなり, 共有結合を効率よく切断するのに問題がでてくる. これを克服するために一重項酸素を介したアンケーシングが報告されている<sup>15)</sup>が, 実はさらに深刻な問題がある. それは実験環境についてである. 仮に600nmの波長でアンケーシング可能なケージド化合物を作ろうとすると, 合成・精製の間, 少なくとも650nm以下の波長の光をカットした部屋の中で実験をせねばならない. それは例えば現像室中での実験生活を意味し, 極めて非現実的である. 筆者の経験では, 慎重かつ長期的な実験は500nm以下の光をカットし

た部屋（黄色いランプの部屋）においてはなんとか可能である。つまり、通常の研究室で作成可能なケージド化合物の光吸収極大波長はせいぜい450nm以下のものではないだろうか。また光吸収波長が長波長になればなるほど分子の共役系が拡大し構造が複雑になり、合成上取り扱いが困難になる傾向がある。以上のことからケージング基に用いる色素分子のアンケージング波長は350-450nm程度のもので今後発展していくと思われる。

またケージド化合物のアンケージングの量子収率 $\Phi_f$ をいかにして上げるかという課題もある。これはケージング基の励起状態からの失活過程をどうコントロールするかという話である。 $\Phi_f$ 値はケージング基の構造だけに依存するのではなく、ケージド化合物全体の立体構造や分子の置かれる外部環境に非常に敏感な値であり、予測するのは難しい。現時点では作り手の経験とかんが頼りになるといわざるを得ない。

#### 5. どうやって手に入れるのだろうか

**ケージドアミノ酸**、**ケージドcNMP**、**ケージドカルシウム**等：市販品を用いるか、有機合成の経験があれば、研究目的に沿うケージド化合物を自分で作成することが可能かもしれない。そうでなければ共同研究となるであろう。もし研究目的に合うケージド化合物が報告されている場合、作った本人と共同研究すれば、合成のノウハウがあるので何かと話が早い。あるいは研究室の冷凍庫にケージド化合物が眠っているかもしれない。ケージド化合物は、元来生命科学研究のためのものであるから、使われずにいるのは非常に惜しい。

**ケージドタンパク質<sup>16-18)</sup>**、**ケージドポリヌクレオチド鎖<sup>19,20)</sup>**等：この場合は、活性物質自体が極めて少量しか得られないケースが多い。従って、合成化学者がケージング基を色々変えて、性能を比較することは困難であり、それよりも目的物質が確実に得られ、機能することに重点が置かれる。作成方法としては、あらかじめケージングされたアミノ酸やヌクレオチドのモノマーをタンパク質あるいはヌクレオチド鎖中に組み込むか、活性化されたケージング基を用いて直接タンパク質やヌクレオチド鎖を化学修飾する方法が考えられる。いずれの場合も、取り扱い方が研究されているニトロベンジル系か、クマリニル系のケージング基を使うことになるだろう。そして、それらのケージド化合物は生体高分子の取り扱いに慣れている研究者が作る方がよいかもしれない。

以上のことを考えると、ケージド化合物を供給する側の課題の一つは、より高性能のケージング基をより簡便に生体高分子に導入する方法論の確立かもしれない。そのため

にはまず構造が簡単な生理活性物質を用いて基礎データを収集する必要がある。とくに、生物実験でなければ見つけられない実用上の欠陥などを化学者側が知ることが必要である。

#### 6. ケージド化合物合成

有機合成化学の中でケージド化合物合成は非常にマイナーな分野であり、限られた研究者によって行われている。それは合成化学者の興味の範囲外であるからかもしれないし、単に認知されていないからかもしれない。より優れたケージング基の開発に必要なのはアイデアであり、合成上必ずしも高度なテクニックを必要としない。良いアイデアを得るためには、やはり異分野連携が必要であると思う。

つぎに、共同研究を想定して合成化学者がどんな様子でケージド化合物を作るのか、筆者の例をごく簡単に述べてみたい。ケージドカルシウムなどの低分子量の有機化合物は一般的に多段階合成で作られる。

市販の出発物質から、目的のケージド化合物まで10段階を要すると仮定する。仮に出発物質の量を100mmolとし、各合成段階の平均の収率が60%だったとすると、10段階後のケージド化合物は $100 \times 0.6^{10} = 0.6 \text{ mmol}$ になってしまう。ちょっと失敗して平均が50%に下がった場合、0.09mmolである。ケージド化合物の物性を調べたり共同研究したりで0.5mmol程度必要だとすると、10段階の反応を何度もやらなければならないことになる。全てを失う操作ミス・アクシデントは合成の間、常に付きまとう。当然のことながら、新規合成したケージド化合物がうまく機能する確率は高くない。ちなみに筆者の場合、2年間の留学中に13種類のケージド化合物を設計し、最後まで合成できたのが8種類、狙い通りに機能したものが、わずか1種類のみであった。合成できなかった5種類は合成のスキル不足が原因で、うまく機能しなかった7種類は分子設計ミスかもしれない。

#### 7. さ い ご に

繰り返しになるが、筆者は今後生命科学の発展に貢献するような優れたケージド化合物が多く作られ、入手も容易になることを願っている。そのためには光物性に優れたケージング基を少量の活性物質に効率よく導入できる方法の確立が必須であり、最大の課題である。理想的には個々の活性物質に最適化されたオーダーメイド型のケージド化合物ができると良いのだが、それには現在知られているケージング基だけでは足りず、もっと革新的なケージング基の創造が必要となってくる。最後に筆者が考える最もオリジナリティーあふれるケージド化合物の例として藤森ら

## テクニカルノート

が開発したケージド NO を挙げておく<sup>21)</sup>。このケージング基はケージド NO にしか用いることができないが、NO を光で発生させる必要最小限の構造を持ち、NO 専用のケージング基としては極めて洗練された分子ではないかと考えている。

- 1) Goeldner, M. & Givens, R. (Ed.) (2005) *Dynamic Studies in Biology*, WILEY-VCH, Weinheim.
- 2) Marriott, G. (Ed.) (1998) *Methods in Enzymology*, vol. 291: *Caged Compounds*, Academic Press, New York.
- 3) Mayer, G. & Heckel, A. (2006) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 4900–4921.
- 4) Rossi, F.M., Margulis, M., Tang, C.-M., & Kao, J.P.Y. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 32933–32939.
- 5) Furuta, T., Wang, S.S.-H., Dantzker, J.L., Dore, T.M., Bybee, W.J., Callaway, E.M., Denk, W., & Tsien, R.Y. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1193–1200.
- 6) Givens, R.S., Jung, A., Park, C.-H., Weber, J., & Wenzel Bartlett, W. (1997) *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 8369–8370.
- 7) Fedoryak, O.D., Sul, J.-Y., Haydon P.G., & Ellis-Davies, G.C.R. (2005) *Chem. Commun.*, 3664–3666
- 8) Ellis-Davies, G.C.R., Matsuzaki, M., Paukert, M., Kasai, H., & Bergles, D.E. (2007) *J. Neuroscience*, **27**, 6601–6604.
- 9) Furuta, T., Takeuchi, H., Isozaki, M., Takahashi, Y., Kanehara, M., Sugimoto, M., Watanabe, T., Noguchi, K., Dore, T.M., Kurahashi, T., Iwamura, M., & Tsien, R.Y. (2004) *Chem. Bio. Chem.*, **5**, 1119–1128.
- 10) Hagen, V., Dekowski, B., Nache, V., Schmidt, R., Geißler, D., Lorenz, D., Eichhorst, J., Keller, S., Kaneko, H., Benndorf, K., & Wiesner, B. (2005) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 7887–7891.
- 11) Adams, S.R., Kao, J.P.Y., Gryniewicz, G., Minta, A.V., & Tsien, R.Y. (1988) *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 3212–3220.
- 12) Adams, S.R., Lev-Ram, V., & Tsien, R.Y. (1997) *Chem. Biol.*, **4**, 867–868.
- 13) Ellis-Davies, G.C.R. & Kaplan, J.H. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 187–191.
- 14) Momotake, A., Lindegger, N., Niggli, E., Barsotti, R.J., & Ellis-Davies, G.C.R. (2006) *Nat. Methods*, **3**, 35–40.
- 15) Rotaru, A. & Mokhir, A. (2007) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 6180–6183.
- 16) 達 吉郎, 茂里 康, 湯元 昇 (2005) *生物物理*, **45**, 161–164.
- 17) Petersson, E.J., Brandt, G.S., Zacharias, N.M., Dougherty, D. A., & Lester, H.A. (2003) *Methods in Enzymology*, 360: *Biophotonics*, pp. 258–273, Academic Press, New York.
- 18) Marriott, G., Roy, P., & Jacobson, K. (2003) *Methods in Enzymology*, 360: *Biophotonics*, pp. 274–289, Academic Press, New York.
- 19) Wenter, P., Fürtig, B., Hainard, A., Schwalbe, H., & Pitsch, S. (2005) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 2600–2603.
- 20) Ando, H., Furuta, T., Tsien, R.Y., & Okamoto, H. (2001) *Nat. Genet.*, **28**, 317–325.
- 21) Namiki, S., Arai, T., & Fujimori, K. (1997) *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 3840–3841.