

特集：過渡的複合体が関わる生命現象の統合的理解  
—生理的準安定状態を捉える新技術と応用—

## 過渡的複合体の解析を可能にするケージド化合物

古田 寿 昭, 鈴木 商 信

過渡的複合体の性質と機能を研究するには、一過的に形成される準安定状態を、高い時間および空間分解能で解析する実験手法の開発が望まれる。光照射によって活性化されるケージド化合物を利用すると、一過的に形成される活性型を凍結して一斉に活性化する実験や、細胞の局所を選択的に活性化する実験が可能になる。化学的な側面からケージド化合物の基礎を解説し、ケージド化合物に求められる要件をまとめる。これまでに報告された主なケージド化合物の性質を概観し、使用にあたって選択する基準を指摘する。続いて、細胞生物学への応用に焦点を絞り、培養細胞、組織切片、およびモデル生物個体の各階層で、どのように利用されてきたかを例示しながら、ケージド化合物の持つ有用性と今後の展開について考える。

### 1. はじめに

生体高分子の過渡的複合体を研究対象にするには、不安定で一過的に形成される準安定状態を解析する実験手法の開発が必須である。活性な状態の寿命が短いことに対応できる高い時間分解能を有する解析法、多数の分子の平均的な振る舞いの記述では見えてこない個々の分子の挙動を解析する技術。NMR, X線結晶解析, IR等の分光学的手法や1分子計測, および蛍光イメージング等を駆使して, 従来の生化学実験では捉えられないダイナミックな変化の解析を可能にする実験手法が求められている。過渡的複合体の解析を可能にするためには何が必要であろうか? まず, 一過的に形成される活性型を凍結して, 解析可能にする工夫が考えられる。あるいは, 定常状態に一斉に摂動を与えてその後の変化を追跡する実験手法も効果的であろう。分子レベルでは, タンパク質同士, レセプターとリガ

ンド, タンパク質とDNA等の相互作用や酵素反応を, 凍結した状態から一斉に開始させる仕掛け。また, 生理的に意味のある現象は局所で起こっていることが多いので, 細胞の局所だけを活性化することも重要と考えられる。

これらの要件を満たし, 過渡的複合体の実時間解析を実現する実験手法として, 光照射によって活性化されるケージド化合物の利用は非常に魅力的である。ケージド化合物とは, 生理活性物質に光照射により脱保護される保護基を有機化学的に導入し, その生理活性を一時的に失わせた化合物である<sup>1,2)</sup>。光を照射した瞬間に, 照射した部位選択的に元の生理活性物質を放出することが可能である。我々の研究グループでは, 有機化学者の立場から新しいケージド化合物の開発に興味を持って研究を行なっている。本稿では, 過渡的複合体の解析というキーワードを念頭に置いて, 現在までにどのようなケージド化合物が合成されて, 特に細胞生物学にどのように応用されてきたかを解説する(図1)。

### 2. ケージド化合物の基礎

どのような生理活性物質がケージド化合物に変換可能か, 生物実験で使えるケージド化合物にはどのような性質が要求されるのか, まず, 化学的な側面からケージド化合物の基礎を概説する。

東邦大学理学部生物分子科学科 (〒274-8510 千葉県船橋市三山 2-2-1)

The use of caged compounds for the study of transient complexes

Toshiaki Furuta and Akinobu Suzuki (Department of Biomolecular Science, Faculty of Science, Toho University, 2-2-1 Miyama, Funabashi, Chiba 274-8510, Japan)

ケージド化合物の設計にあたって考慮すべき要件は、以下の三項目にまとめることができる。第一に、対象とする生理活性物質（ケージド化合物に変換したい物質）は、光分解性保護基で保護可能な官能基を持つ必要がある。現状で、ケージド化合物に変換可能な官能基は、カルボン酸、リン酸、スルホン酸、アミド、第一級または第二級アミン、アルコール、フェノール、チオール、ケトン、アルデヒドのいずれかであり、これらの官能基が分子中に存在しなければ、ケージド化合物に変換することはほぼ不可能である（表1）。たとえば、神経伝達物質であるグルタミン酸には、修飾可能な官能基として第一級アミノ基と二つのカルボキシル基が存在するため、様々な性質のケージドグルタミン酸が報告されている。これに対して、アセチルコリン分子中には光分解性保護基で保護できる官能基が存在しないため、ケージドアセチルコリンの報告例はない（図2）。

第二に、これらの官能基を光分解性保護基で保護することにより、注目する現象に関する生理活性を完全に失う

か、少なくとも意味のある程度に抑制される必要がある。生理活性を発揮するのに必須な官能基が事前の研究で判明している場合は、そこを保護すればケージド化合物として機能する可能性が高い。また、光分解性保護基を結合させることによる分子のアロステリックな効果により、生理活性を失わせることもあるが、この場合は、保護しても生理活性に変化がなかったという場合も多々ある。ケージドATPの分子構造を例にこのことを説明してみよう。1978年にKaplanらによって初めて報告されたNPE-ATPの構造式を図3に示した。この分子は、ATPの $\gamma$ リン酸を光分解性保護基の1-(*o*-ニトロフェニル)エチル基（NPE基）で保護したものである。NPE基によってピロリン酸結合の加水分解が阻害されているので、ATPaseの基質にならない。光照射でNPE基が外れると元のATP分子に戻るのので、光照射をトリガーにして、ATPase活性に依存した現象を開始させることができる<sup>7)</sup>。しかし、 $\gamma$ リン酸部位に導入したNPE基が、ヌクレオチド結合タンパク質への結合を阻害するとは限らないため、ATPの結合によって開

表1 ケージド化合物に変換可能な官能基

保護できる官能基	保護した後の構造 <sup>a</sup>	ケージド化合物の例
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—C—OH} \\ \text{carboxylate} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \qquad \text{O} \\ \parallel \qquad \parallel \\ \text{—C—OR} \quad \text{—C—X} \end{array}$	グルタミン酸 <sup>3,5)</sup> Ca <sup>2+</sup> キレート <sup>6)</sup>
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—O—P—OH} \\ \text{phosphate} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—O—P—OR} \end{array}$	ATP <sup>7,8)</sup> , cAMP <sup>9)</sup> , cGMP <sup>9),10)</sup> , InsP <sub>3</sub> <sup>11),12)</sup> , プロトン <sup>13)</sup> リン酸化ペプチド <sup>14,16)</sup> , DNA <sup>17)</sup> , mRNA <sup>18)</sup> , siRNA <sup>19),20)</sup>
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—O—S—OH} \\ \text{sulfate} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—O—S—OR} \end{array}$	
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—N—H} \\ \text{amide, imide} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \qquad \text{R} \\ \parallel \qquad \parallel \\ \text{—N—R} \quad \text{—N—} \\ \text{H} \qquad \text{H} \end{array}$	ペプチド <sup>21)</sup> , siRNA <sup>22)</sup> , DNA <sup>23),24)</sup> , アプタマー <sup>25)</sup>
$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{—N—H} \\ \text{amine} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \qquad \text{R} \\   \qquad \parallel \\ \text{—N—C—O—R} \quad \text{—N—R} \\ \text{H} \qquad \text{H} \end{array}$	グルタミン酸 <sup>3),4)</sup> , ペプチド (Lys) <sup>26)</sup> , DNA <sup>27)</sup>
$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{—O—H} \\ \text{alcohol \& phenol} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \qquad \text{R} \\ \parallel \qquad   \\ \text{—O—C—O—R} \quad \text{—O—R} \end{array}$	ペプチド (Ser, Tyr, Thr) <sup>28)</sup> DAG <sup>29)</sup>
$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{—S—H} \\ \text{thiol} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{R} \\   \\ \text{—S—} \end{array}$	ペプチド (Cys) <sup>30),31)</sup>
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{—C—} \\ \text{ketone \& aldehyde} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{R} \\   \\ \text{O} \qquad \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{O} \qquad \text{O} \end{array}$	

a. 表中の R および X は光分解性保護基をあらわす。

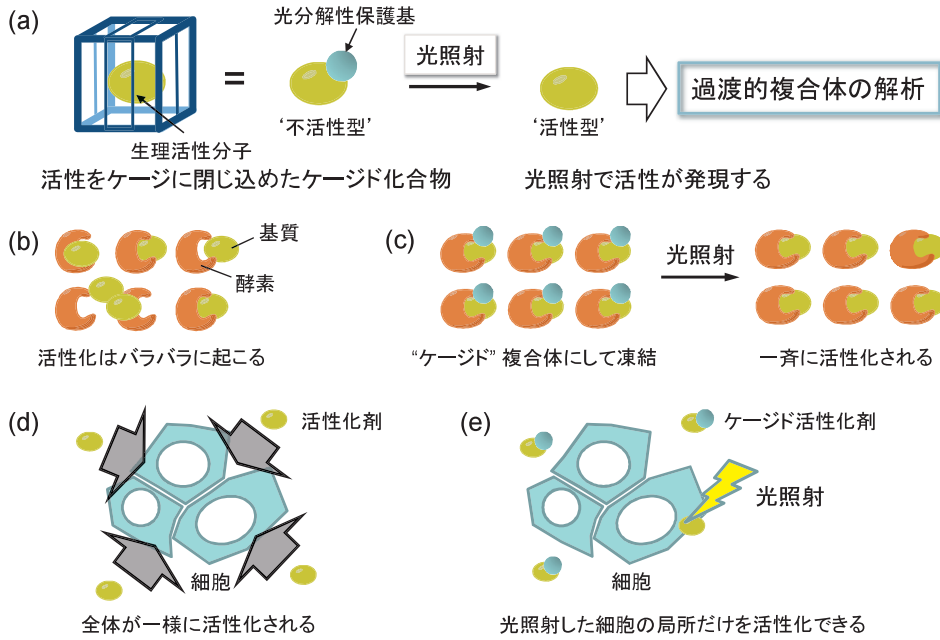


図1 ケージド化合物を過渡的複合体の解析に利用する

(a) 活性をケージに閉じ込めたケージド化合物, (b) 通常の生化学的解析, (c) ケージド化合物で反応を凍結して光で一斉に開始させる, (d) 通常の薬理的解析, (e) ケージド化合物を用いると狙った細胞の局所を活性化できる

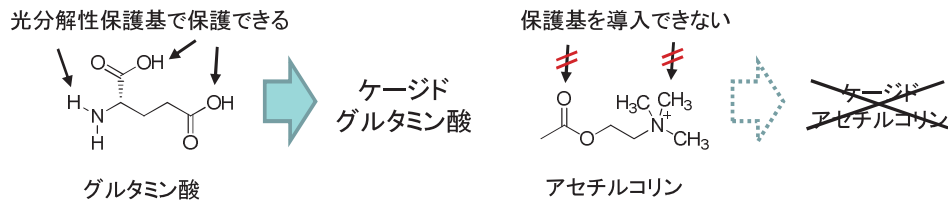


図2 適切な官能基が存在しないとケージド化合物に変換できない

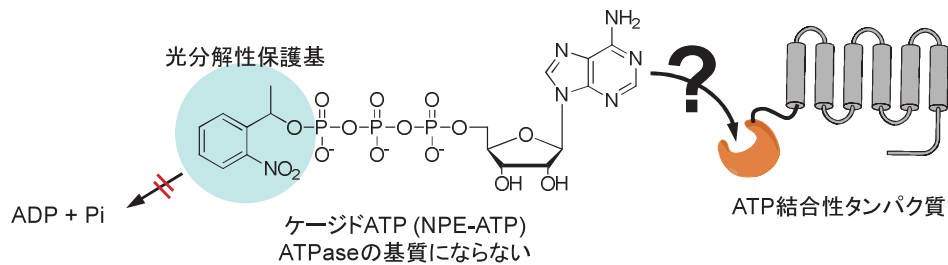


図3 注目する現象についてケージド化合物としてはたらく官能基を保護する

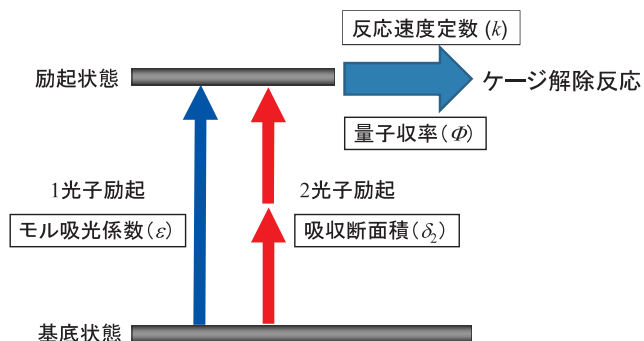


図4 ケージド化合物の光物理過程

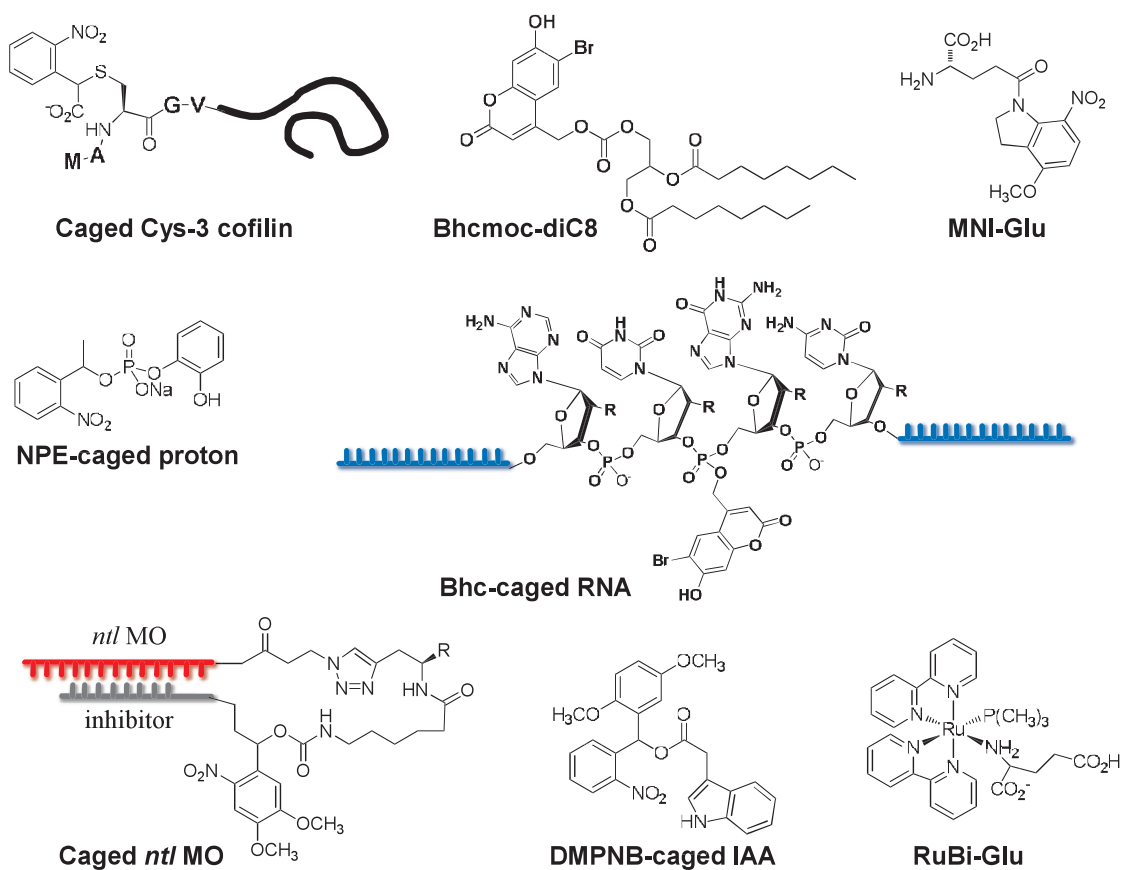


図5 本稿で取り上げたケージド化合物の構造

始される現象に関して、NPE-ATPをケージドATPとして使用できるとは限らない。使用する系ごとに、注目する現象に関して、確かに“ケージド”化合物になっていることを確認する必要がある(図3)。

第三の要件は、設計したケージド化合物が生理的な条件下、暗所で安定に存在しなければならないことである。このことは、有機合成の観点からは見逃されがちであるが、生理的な環境を模倣した実験条件では重要になってくる。ケージド化合物の合成途上では、基本的には有機溶媒を用いて反応・精製を行うため安定な場合が多い。しかし、合成したケージド化合物を生理食塩水中に溶解させると、加水分解によって保護基が外れて元の生理活性物質が放出されてしまう場合がある。短いものだと生理食塩水中での半減期がおよそ30分というものもあった。ケージド化合物を生物実験で用いるときは、生理活性物質の有効濃度の10倍ほどの濃度のケージド化合物の使用が望ましい。生理食塩水中での半減期が短いと、光照射前に有効濃度に相当する活性物質が放出される危険性を、常に念頭に置く必要がある。以上の要件を満たすケージド化合物が入手できれば、注目する現象を高い時間および空間分解能で制御することが可能になる。次項では、実際に使用するケージド化合物を選択する際に考慮すべきこととして、光分解性保護基の性質と、実現できる時間および空間分解能について解説する。

### 3. ケージド化合物の選択にあたって考慮すべきこと

#### 3-1 ケージド化合物を合成するための光分解性保護基の性質

本稿で扱っているケージド化合物の性質は、導入した光分解性保護基の性質に依存する。これまでに利用されてきた光分解性保護基のうち、汎用性が高いものとして、*o*-ニトロベンジル基、(クマリン-4-イル)メチル基<sup>32,33)</sup>、2-(*o*-ニトロフェニル)エチル基、7-ニトロインドリニル基を選び、その性質を表2にまとめた。光分解性保護基の選択にあたっては、吸収極大波長とモル吸光係数、光反応の量子収率と反応速度定数、さらに、2光子励起の反応効率(uncaging action cross section,  $\delta_0$ )をよく理解することが肝要である(図4)。ここで、光反応の効率について簡単に触れておく。

ケージド化合物のケージ解除反応の効率は、光を吸収する効率と吸収した光を反応に利用する効率(光反応の量子収率,  $\Phi$ )で評価することができる。光を吸収する効率は、1光子励起の場合はモル吸光係数( $\epsilon$ )、2光子励起の場合は吸収断面積( $\delta_0$ )であらわすことが多い。ケージド化合物を利用する実験では、照射できる光量に制限のあることがほとんどなので、1光子励起では $\epsilon$ と $\Phi$ の積をケージ解除反応の効率として評価する。2光子励起の場合も同様

に、吸収断面積と量子収率の積を uncaging action cross section ( $\delta_0$ )と定義して、2光子励起による光反応の効率とする。反応効率の高さを指標に選択する場合は、1光子励起では $\epsilon\Phi$ が100 ( $M^{-1} cm^{-1}$ )を超えるもの、2光子励起では $\delta_0$ が0.1 (GM)を超えるものを目安にするといふ。

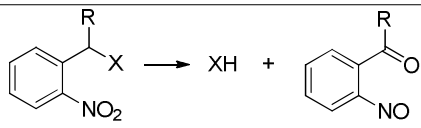
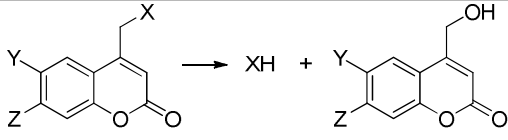
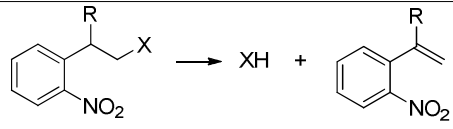
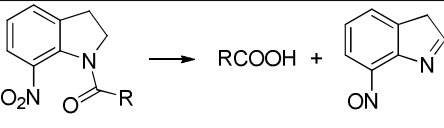
#### 3-2 期待される時間分解能と空間分解能

ケージド化合物を用いることにより解析可能な時間スケールについて述べる。必要とされる時間分解能は、リガンド結合による受容体の構造変化や神経の電位変化については「マイクロ秒」単位となる。細胞刺激後のシグナル伝達に関しては「100 ミリ秒～数秒」の単位となり、遺伝子の発現では「分～時間」程度の時間幅で構わない。ケージド化合物の光物理過程は、まず、光分解性保護基の励起に1フェムト秒( $10^{-15}$  s)程度を要する。その後、一重項励起状態からはナノ秒、三重項励起状態からはマイクロ秒以内に光分解性保護基との結合が切断される。いずれの過程を経る反応も光照射の瞬間からマイクロ秒以内に生理活性分子の放出が期待できる。しかし、励起状態からの結合開裂が律速ではない、*o*-ニトロベンジル基や2-(*o*-ニトロフェニル)エチル基の場合は、生理活性分子が放出されるまでにさらに時間がかかり、ミリ秒から秒の時間がかかるものもある。また、生理活性物質と光分解性保護基の結合がカーバメート(N-C(=O)-O)またはカーボネート(O-C(=O)-O)の場合は、光分解性保護基の切断後に脱炭酸してから生理活性物質が放出されるので、光分解性保護基の種類に関わらず、およそ1 msほど必要となる。以上のように、分子構造によって多少の制限はあるものの、実験者の目的にあったケージド化合物を選択すれば、非常に高い時間分解能で望んだ生理現象をコントロール可能であることがわかる。

次に、ケージド化合物で生理活性物質の放出を制御可能な空間分解能について考える。培養細胞を用いる実験では、xy平面内の空間解像度が要求される。倒立型蛍光顕微鏡に励起光源を取り付けて、光路上にピンホールを入れることで、直径1  $\mu m$ 以下の微小領域の光照射も可能で<sup>18)</sup>、細胞内の局所を活性化する実験が比較的容易に行える。また、2光子励起を利用すると、励起が焦点面のみに局限して起こるため、z軸方向についても、およそ2  $\mu m$ の空間解像度で励起領域を制御できる。2光子励起を用いれば、1 fL ( $10^{-15}$  L, 1  $\mu m \times 1 \mu m \times 1 \mu m$ の立方体の体積に相当する)以下のごく微小領域内の分子だけを励起可能と考えてよい<sup>5,34)</sup>。

最後に、ケージド化合物の活性化に用いる励起光に望まれる条件を述べる。まず、励起光の波長は内在性の分子に吸収されないことが必要である。DNAとRNAの塩基部位は260 nm、タンパク質中のトリプトファンやチロシンは

表2 主な光分解性保護基の性質

光分解性保護基の構造と光反応 <sup>a</sup>	$\lambda_{\max}$ <sup>b</sup>	$\epsilon_{\max}$ <sup>c</sup>	$\phi^d$	$k^e$	$\delta_u^f$
 o-nitrobenzyl	260-350	6,000	0.01-0.7	$10^5$	0.01
 (coumarin-4-yl)methyl	330-400	19,000	0.05-0.3	$10^9$	3.1
 2-(o-nitrophenyl)ethyl	260-350	6,000	0.3	$10^3$	0.6
 7-nitroindoliny	330-350	9,000	0.5		0.06

a. 構造式は基本骨格を示した。実際に使われているのは、置換基を有する誘導体。b. 吸収極大波長 (nm)。これまでに報告されている誘導体の典型的な波長範囲を示した。c. 吸収極大波長におけるモル吸光係数 ( $M^{-1} cm^{-1}$ )。報告されているものの最大値を示した。d. 光反応の量子収率。報告されているものの最大値。ただし、誘導体の構造で大きく異なるものはおよその範囲を示した。e. 光反応の速度定数 ( $s^{-1}$ )。最大値。f. 2光子励起の uncaging action cross section (GM)

280 nm に吸収極大を持つので、300 nm 以上の光が必要である。NADH のような補酵素類は 340 nm 付近に吸収極大があり、350 nm より長波長光を用いるのが望ましい。培養細胞の場合は、350 nm より長波長の光にはほぼ透明と考えてよい。組織切片は厚みと不均一性を考慮する必要がある。散乱によって光が直進しないことが問題になる。レイリー散乱係数は波長の 4 乗に反比例することから、できるだけ長波長光を用いるのが望ましい。モデル生物個体の場合は、可視光領域の生体透過率が低いいため、生体の窓と呼ばれる、生体透過率の高い 650 nm ~ 1,050 nm の近赤外光を用いることが望ましい。現在手に入るケージド化合物の大部分は、300 nm ~ 450 nm の間に吸収極大を持つ。培養細胞では、実際にそれらの波長がケージド化合物の励起光として使われている。近年、2光子吸収による励起で光分解を起こす光分解性保護基が開発されてきており、この場合 1光子励起波長の 2 倍の長さを持つ光を励起光として用いることが可能となる。実際の 2光子励起には、およそ 720 ~ 840 nm の近赤外パルスレーザーが用いられており、脳組織切片やモデル生物個体での利用も報告されている<sup>35)</sup>。

#### 4. 過渡的複合体の解析にケージド化合物の光照射を利用する

以下の項では、培養細胞、組織切片、およびいくつかのモデル生物個体において、ケージド化合物を利用すると、どのような現象が光で制御可能になるのかを紹介する。使用されたケージド化合物の構造は図5にまとめた。

##### 4-1 培養細胞

まず、過渡的に形成される活性型を瞬時に生成させた例を紹介する。Lawrenceらは、アクチン重合調節タンパク質であるコフィリンに対し、3番目のアミノ酸である Ser を Cys に置換することで、恒常的活性型コフィリン (Cys-3 cofilin) を作成し、その Cys のチオール基を  $\alpha$ -CNB 基で保護することにより、恒常的活性型コフィリンのケージドタンパク質 (Caged Cys-3 cofilin) を作成した。試験管内のアクチン重合実験により、ケージドコフィリンはコフィリンのアクチン脱重合作用が抑えられ、光を照射することによりアクチン脱重合作用が回復することを示した<sup>30)</sup>。当時、コフィリンの活性化とアクチン重合および脱重合反応

の関係は不明瞭であったが、ケージドコフィリンを細胞内の局所で活性化することにより、活性化型コフィリンが反矢じり端の形成とアクチン重合を促進し、細胞の動きの方向性を決めていることを発見した<sup>31)</sup>。タンパク質の強制発現の系では、コフィリンの活性はリン酸化による不活性化により補償されてしまい時間分解能も低いため、コフィリンの詳細な機能を探索することは不可能であった。Caged Cys-3 cofilin の照射により、局所で一斉にコフィリンの活性化を達成することで、初めてコフィリンの詳細な働きを解明したのである。この研究は、恒常的活性型タンパク質を光分解性保護基で不活性化した例であるが、他の研究グループから、リン酸化タンパク質やリン酸化ペプチドのリン酸基に対し直接光分解性保護基を結合させたケージド化合物も報告されている<sup>14-16)</sup>。

次に細胞内の局所を活性化した例を紹介する。T細胞が抗原提示細胞に対し細胞傷害性因子や各種サイトカインを放出する際には、抗原提示細胞に特異的な方向性を持って行われる。T細胞と抗原提示細胞の間に形成される接点部分は免疫シナプスと呼ばれており、その形成にはT細胞受容体活性化後の微小管形成中心の極性形成が重要と言われていたが、その詳細なメカニズムは謎であった。Huseらは、ケージドT細胞受容体アゴニストペプチド<sup>36)</sup>およびケージドジアシルグリセロール (Bhcmoc-diC8)<sup>29,37)</sup>を用いることで、微小管形成中心の再構成には局所でジアシルグリセロールが蓄積されることが必要であり、ひき続いて微小管モータータンパク質であるダイニンが動員されるという時間関係を明らかにした。また、微小管形成中心の極性形成には、カルシウムイオンは必要とせずジアシルグリセロールのみが必要であることもわかった。T細胞局所でのジアシルグリセロールの蓄積が、細胞傷害性T細胞の細胞傷害機能に必要であることも示され、T細胞にはジアシルグリセロール依存的な微小管極性制御シグナルが存在することが証明された<sup>38)</sup>。

#### 4-2 組織切片

松崎と河西のグループは、Ellis-Daviesらと共に、2光子励起によりグルタミン酸を放出可能なMNI-Gluを開発し、それをラットの海馬切片に応用した。MNI-Gluは2光子励起により海馬切片中で1 fLという極微小領域に局限してグルタミン酸を放出し、CA1錐体細胞の単一棘突起ごとにグルタミン酸感受性を測定できることを示した。その結果、棘突起中のAMPA受容体の数は、棘突起の頭部の容量が大きいほど多く、小さいほど少ないという相関関係が初めて明らかにされた<sup>5)</sup>。頭部の小さい棘突起は、MNI-Gluの2光子励起により繰り返し刺激されると、刺激された棘突起特異的にその容積が急激に増大し、その後維持されることを見出した<sup>39)</sup>。また、容量の増大に伴いグルタミ

ン酸感受性も増大し、それが維持されることがわかった。すなわち、神経細胞では単一棘突起ごとに長期増強が誘導可能で、それぞれが記憶素子として働いていることを証明したのである。

#### 4-3 線虫 (*C. elegans*)

線虫の排便行動は、後部体収縮、前部体収縮、腸管収縮、排便の順番で引き起こされる。BegとJorgensenらは、後部体収縮に異常のある線虫の変異体をスクリーニングし、プロトン ( $H^+$ ) が、後部体収縮を引き起こすための必要な伝達物質であることを発見した<sup>40)</sup>。彼らは、変異体のスクリーニングから、 $Na^+/H^+$ 交換輸送体 (*pbo-4*)、およびプロトン作動性陽イオンチャネルをコードする遺伝子 (*pbo-5* と *pbo-6*) を同定した。問題は、線虫個体内においてもプロトンが後部体収縮に必要なのかどうかだが、これを証明するためにケージドプロトンが用いられた。NPE-caged proton<sup>13)</sup>を体腔に導入された線虫は、UV照射に応じて後部体収縮を引き起こすことがわかった。プロトン作動性陽イオンチャネルに変異があるPBO-5変異体は後部体収縮を引き起こさなかったことから、プロトンが後部体収縮を引き起こすのに必要な伝達物質であることが証明されたのである。

#### 4-4 ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*)

ゼブラフィッシュにおいては、ケージド化合物を用いた遺伝子の強制発現およびノックダウンの制御が報告されている。安藤と岡本のグループは、mRNAのリン酸骨格部位をBhc基で保護したケージドmRNA (Bhc-caged mRNA) を報告した<sup>18)</sup>。リン酸骨格が光分解性保護基で保護されているため、ゼブラフィッシュの胚中において、ケージドmRNAは通常のmRNAよりも安定に存在可能なことがわかり、1細胞期にマイクロインジェクションにより導入されたケージド *gfp* mRNA や *eng 2a* mRNA を用いて、胚発生中の任意の時期に照射した場所特異的に、それらのタンパク質の発現を制御することに成功した。Chenらは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの一種であるモルフォリノオリゴ (MO) のケージド化合物を合成し、ゼブラフィッシュの胚中で遺伝子のノックダウンを光制御する実験を行った<sup>41)</sup>。彼らは、no tail (*ntl*) 遺伝子に対する25塩基対からなるMO (*ntl* MO) とそのMOに対する10塩基対 (inhibitor) を、3,4-ジメトキシニトロベンジル基を含むリンカーで結合させたケージドMO (Caged *ntl* MO) を作成した。こうすることにより、照射前は *ntl* MO に inhibitor が結合しているためMOの効果は発揮されないが、照射後にはリンカーの切断に伴い inhibitor も外れるため、MOが働くようになる。Caged *ntl* MO を1細胞期に導入された胚に対し、受精後4時間後の段階でUVを照射した

ところ、Caged *ntl* MOが導入された胚のみで尾部が欠損した胚が生じた。また、尾芽期の脊索中胚葉領域でのみCaged *ntl* MOを光活性化することにも成功し、それらの細胞が脊索から底板細胞に変化する様子が観察された。このように、ゼブラフィッシュの胚発生は体が透明であることを生かし、ケージド化合物による遺伝子の強制発現およびノックダウンが可能となっている。

#### 4-5 シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)

植物ホルモンであるオーキシンは、植物中で適切な濃度勾配が維持されることにより、植物を正常に生長させる。オーキシンの作用は、細胞型や組織の違い、さらに同細胞においてもオーキシンの濃度の違いにより異なるため、オーキシンの作用濃度を厳密に制御する技術は、オーキシンの生理的意義の解明に極めて重要である。林らは、オーキシンに応答して $\beta$ -ガラクトシダーゼを発現するように改変したシロイヌナズナの芽生えを用いて、新たに開発したケージドオーキシンの効果を調べた<sup>42)</sup>。その中で、DMPNB基で保護したオーキシンが、シロイヌナズナ内での加水分解に耐性が高く安定に存在でき、また光照射により局所的にオーキシン応答を引き起こすことができることを見出した。DMPNB-インドール-3-酢酸 (DMPNB caged IAA) を用いて、光照射によりシロイヌナズナ芽生えの根端成長を制御することにも成功した。タバコ株細胞のBY-2に対しては、二細胞のうちの片方の細胞に対してのみ、光照射によるオーキシン応答を引き起こすことができることがわかった。ケージドオーキシンは、水耕培地に添加するだけで植物に導入可能であり、シロイヌナズナ個体内でもケージド化合物を応用可能であることを実証した興味深い研究である。

#### 4-6 マウス

MNI-Gluと2光子励起を組み合わせる手法は、最近、成体マウスの脳内にも応用可能であることが示された。松崎と河西のグループは、頭蓋骨と硬膜を一部切除したマウスに対し、MNI-Gluを軟膜上から投与し、大脳皮質錐体細胞をパッチピペットによるホールセル記録した<sup>34)</sup>。この実験により、マウス大脳皮質中でのMNI-Gluのアンケーシングは、深さ方向200  $\mu\text{m}$ の範囲内において、xy軸方向で0.6–0.8  $\mu\text{m}$ 、z軸方向で1.9  $\mu\text{m}$ の空間分解能で行うことができることがわかった。また、棘突起の容積とグルタミン酸感受性の相関や、グルタミン酸刺激に伴う $\text{Ca}^{2+}$ 上昇濃度と棘突起容積の逆相関関係のような、脳切片においてみられた現象が、マウスの個体脳中でも見られることを発見した。MNI-Gluと2光子励起を用いた本実験系は、マウスを遺伝子改変することなく、*in vivo*でシナプスの機能を探索できることを示した重要な研究と言える。

## 5. おわりに

適切に設計されたケージド化合物を利用すると、過渡的複合体の解析が飛躍的に進むと期待される。しかし、市販品で手に入るケージド化合物はごく少数に限られているため、必要に応じて新たに設計して合成するしかないのが現状である。化学的な性質の面でも、また生物利用で要求される性質の面でも、万能なケージド化合物は存在しない。求められる性質を理解して、解析対象に応じた選択ができるようにレパートリーを増やさなければいけない。有機化学者の参加が必須であることは言うまでもないが、特に、使う側の視点に立ったモノづくりが求められている。自らを省みると、作りたいものを作って、使いたい人はどうぞというスタンスで研究してきたことを反省している。

あくまでも作る側の立場からではあるが、今後の展開を考えて結びにする。キーワードは、「可逆性」、「個体での使用」、「暗所での安定性」である。光分解性保護基で官能基を保護し、光で共有結合を切断するタイプのケージド化合物は、活性のオンオフを繰り返せない。「可逆性」を達成するには、典型元素同士の共有結合の切断によらないケージド化合物の開発が重要と考えられる。本稿では扱わなかったが、ケージドカルシウムはその候補の一つである。EGTAのようなキレート剤と金属イオンの相互作用は、配位結合による。配位子の配位能を可逆的に光制御できれば、遊離の金属イオン濃度の可逆制御が期待される。これに関連して、遷移金属錯体の配位子の光解離を利用するケージド化合物が最近報告された。ルテニウムのピピリジン錯体にアミノ基が配位することを利用したもので、RuBi-Gluは可視光(吸収極大波長は450 nm)で活性化されるケージドグルタミン酸としてはたらく<sup>43,44)</sup>。「個体での使用」を容易にするには、生体の窓を通して活性化できる波長特性と、働く場所を限定できるターゲティング機能が重要と考えている。生物試料での利用を考えると、「暗所での安定性」の重要性も高い。光さえ遮断すれば半永久的に安定で、光照射によってのみ活性化されるような、切れ味の鋭い光感受性化合物が実はもっとも求められているのかも知れない。光化学の知識に立脚した深い洞察力と新しい発想に基づく新規光機能性分子の開発が望まれる。

## 文 献

- 1) Lee, H.M., Larson, D.R., & Lawrence, D.S. (2009) *ACS Chem. Biol.*, 4, 409–427.
- 2) Mayer, G. & Heckel, A. (2006) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 45, 4900–4921.
- 3) Wieboldt, R., Gee, K.R., Niu, L., Ramesh, D., Carpenter, B.K., & Hess, G.P. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 8752–8756.



- 4) Furuta, T., Wang, S.S., 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.
- 5) Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G.C., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., & Kasai, H. (2001) *Nat. Neurosci.*, **4**, 1086–1092.
- 6) Tsien, R.Y. & Zucker, R.S. (1986) *Biophys. J.*, **50**, 843–853.
- 7) Kaplan, J.H., Forbush, B., 3rd, & Hoffman, J.F. (1978) *Biochemistry*, **17**, 1929–1935.
- 8) Goldman, Y.E., Hibberd, M.G., McCray, J.A., & Trentham, D. R. (1982) *Nature*, **300**, 701–705.
- 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) *ChemBioChem*, **5**, 1119–1128.
- 10) Wood, C.D., Nishigaki, T., Furuta, T., Baba, S.A., & Darazon, A. (2005) *J. Cell Biol.*, **169**, 725–731.
- 11) Li, W., Llopis, J., Whitney, M., Zlokarnik, G., & Tsien, R.Y. (1998) *Nature*, **392**, 936–941.
- 12) Kantevari, S., Gordon, G.R., MacVicar, B.A., & Ellis-Davies, G.C. (2011) *Nat. Protoc.*, **6**, 327–337.
- 13) Khan, S., Castellano, F., Spudich, J.L., McCray, J.A., Goody, R.S., Reid, G.P., & Trentham, D.R. (1993) *Biophys. J.*, **65**, 2368–2382.
- 14) Vazquez, M.E., Nitz, M., Stehn, J., Yaffe, M.B., & Imperiali, B. (2003) *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 10150–10151.
- 15) Nguyen, A., Rothman, D.M., Stehn, J., Imperiali, B., & Yaffe, M.B. (2004) *Nat. Biotechnol.*, **22**, 993–1000.
- 16) Kawakami, T., Cheng, H., Hashiro, S., Nomura, Y., Tsukiji, S., Furuta, T., & Nagamune, T. (2008) *ChemBioChem*, **9**, 1583–1586.
- 17) Monroe, W.T., McQuain, M.M., Chang, M.S., Alexander, J.S., & Haselton, F.R. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 20895–20900.
- 18) Ando, H., Furuta, T., Tsien, R.Y., & Okamoto, H. (2001) *Nat. Genet.*, **28**, 317–325.
- 19) Shah, S., Rangarajan, S., & Friedman, S.H. (2005) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **44**, 1328–1332.
- 20) Nguyen, Q.N., Chavli, R.V., Marques, J.T., Conrad, P.G., Jr., Wang, D., He, W., Belisle, B.E., Zhang, A., Pastor, L.M., Whitney, F.R., Morris, M., Heitz, F., Divita, G., Williams, B.R., & McMaster, G.K. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**, 394–403.
- 21) Ohmuro-Matsuyama, Y. & Tatsu, Y. (2008) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **47**, 7527–7529.
- 22) Mikat, V. & Heckel, A. (2007) *RNA*, **13**, 2341–2347.
- 23) Tanaka, K., Katada, H., Shigi, N., Kuzuya, A., & Komiyama, M. (2008) *Chem Bio Chem*, **9**, 2120–2126.
- 24) Young, D.D., Lively, M.O., & Deiters, A. (2010) *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 6183–6193.
- 25) Heckel, A. & Mayer, G. (2005) *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 822–823.
- 26) Nomura, A., Uyeda, T.Q., Yumoto, N., & Tatsu, Y. (2006) *Chem. Commun.*, 3588–3590.
- 27) Furuta, T., Watanabe, T., Tanabe, S., Sakyo, J., & Matsuba, C. (2007) *Org. Lett.*, **9**, 4717–4720.
- 28) Priestman, M.A. & Lawrence, D.S. (2010) *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 547–558.
- 29) Suzuki, A.Z., Watanabe, T., Kawamoto, M., Nishiyama, K., Yamashita, H., Ishii, M., Iwamura, M., & Furuta, T. (2003) *Org. Lett.*, **5**, 4867–4870.
- 30) Ghosh, M., Ichetovkin, I., Song, X., Condeelis, J.S., & Lawrence, D.S. (2002) *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 2440–2441.
- 31) Ghosh, M., Song, X., Mouneimne, G., Sidani, M., Lawrence, D.S., & Condeelis, J.S. (2004) *Science*, **304**, 743–746.
- 32) Furuta, T. & Noguchi, K. (2004) *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **23**, 511–519.
- 33) Furuta, T. (2005) In *Dynamic Studies in Biology: Phototriggers, Photoswitches and Caged Biomolecules* (Goeldner, M. & Givens, R.S. eds.), pp. 29–55, WILEY-VCH.
- 34) Noguchi, J., Nagaoka, A., Watanabe, S., Ellis-Davies, G.C., Kitamura, K., Kano, M., Matsuzaki, M., & Kasai, H. (2011) *J. Physiol.*, **589**, 2447–2457.
- 35) Dore, T.M. (2005) In *Dynamic Studies in Biology: Phototriggers, Photoswitches and Caged Biomolecules* (Goeldner, M. & Givens, R.S. eds.), pp. 435–459, WILEY-VCH.
- 36) Huse, M., Klein, L.O., Girvin, A.T., Faraj, J.M., Li, Q. J., Kuhns, M.S., & Davis, M.M. (2007) *Immunity*, **27**, 76–88.
- 37) Robu, V.G., Pfeiffer, E.S., Robia, S.L., Balijepalli, R.C., Pi, Y., Kamp, T.J., & Walker, J.W. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 48154–48161.
- 38) Quann, E.J., Merino, E., Furuta, T., & Huse, M. (2009) *Nat. Immunol.*, **10**, 627–635.
- 39) Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C., & Kasai, H. (2004) *Nature*, **429**, 761–766.
- 40) Beg, A.A., Ernstrom, G.G., Nix, P., Davis, M.W., & Jorgensen, E.M. (2008) *Cell*, **132**, 149–160.
- 41) Shestopalov, I.A., Sinha, S., & Chen, J.K. (2007) *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 650–651.
- 42) Kusaka, N., Maisch, J., Nick, P., Hayashi, K.-i., & Nozaki, H. (2009) *ChemBioChem*, **10**, 2195–2202.
- 43) Fino, E., Araya, R., Peterka, D.S., Salierno, M., Etchenique, R., & Yuste, R. (2009) *Front. Neural Circuits*, **3**, 1–9.
- 44) Salierno, M., Marceca, E., Peterka, D.S., Yuste, R., & Etchenique, R. (2010) *J. Inorg. Biochem.*, **104**, 418–422.