

生命機能を光で操作する分子プローブの開発

応用化学専攻 分子創成化学講座 ケミカルバイオロジー領域

准教授 蓑島 維文

教授 菊地 和也

1. はじめに

細胞内では多くの生体分子がそれぞれの機能を果たし、恒常性が保たれている。われわれのグループでは、生命機能を理解するために化合物を用いたアプローチ（ケミカルバイオロジー）を展開しており、中でも光を利用した分子プローブの開発と生物応用を行っている。これらの分子プローブは生命科学や医学分野で広く利用されている強力なツールである。例えば、光照射により蛍光を発する分子プローブは生体分子の局在、動態、濃度を蛍光シグナルとして可視化し、その時空間的な情報を得ることができる。一方で、光照射に伴う化学反応が引き金となり、特定の生体分子に作用する分子プローブは、その生体分子が関わる機能を時空間的に操作することができる。本稿では後者の「生体分子を光操作可能な分子プローブ」における近年の成果について紹介する。

2. 緑色光応答型ケージド化合物の開発

ケージド化合物は生理活性物質に光照射で外せる保護基が導入された化合物であり、この状態では活性を示さない。光照射によって保護基の分解反応が起こり、生理活性物質が放出されはじめて活性を示す（図1）。このような特性から、ケージド化合物は生体分子機能を光照射するタイミングと場所によって操作する化学ツールとして古くから利用されており、ヌクレオチド、神経伝達物質などのシグナル伝達物質、薬剤などのケージド化合物が報告されている¹。ケージド化合物の開発においては、光照射で外せる保護基の部分が重要であり、光照射時の分解効率が高く、暗所では安定であることが求められる。このような保護基として、オルト-ニトロベンジルやクマリンの誘導体が広く使われている。一方でこれらの保護基を外すためには300~400 nmの紫外から短波長の可視領域の光が必要であり、細胞への光毒性や組織透過性の低さが懸念される。このため、より長い可視光の領域で外せる保護基がさまざまな色素を基に近年開発されている²。しかしながら、とりわけ生体応用に適した水溶液中においては分解効率が低いという点が課題であった。そこで、長波長の可視光で効率よく生理活性物質の放出が可能なケージド化合物の開発を目的として研究を進めた。

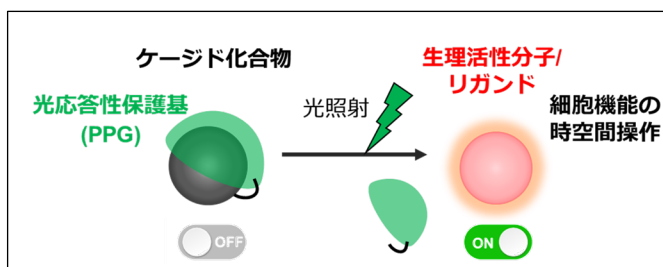


図1：ケージド化合物

保護基の設計において、可視光を吸収する色素であるチアゾールオレンジに着目した。この色素はベンゾチアゾール環とキノリン環の部分から構成され、核酸の染色などで用いられる化合物である。われわれはチアゾールオレンジのキノリン環部分を修飾することで

新たな光応答型保護基 HTO (Hydroxylated Thiazole Orange) を設計し、興奮性の神経伝達物質であるグルタミン酸を HTO で保護したケージドグルタミン酸 (Sul-HTO-Glu) を合成した (図 2a)³。このケージド化合物は 500 nm 付近の緑色光を吸収し、この波長に相当する可視光の照射で徐々に分解が起こり、グルタミン酸が放出されていくことを確認した (図 2b)。一方で、暗所、水溶液中では数日間安定であった。光分解の効率 (モル吸光係数と分解量子収率の積) は 111 であり、同波長領域で応答する化合物として高い値を示した。さらに、二光子励起レーザーを用いることで近赤外領域 (900~1000 nm) の光応答も見られた。

次に、可視光応答型ケージドグルタミン酸を用いて、NMDA 型グルタミン酸受容体の光操作を試みた。グルタミン酸受容体は細胞膜に発現するイオンチャネル型受容体であり、神経細胞間の情報伝達、記憶、学習に深く関与している。グルタミン酸がリガンドとして結合することで構造が変化し、細胞膜を介して陽イオンが透過する (図 2c)。まず、アフリカツメガエル卵母細胞にグルタミン酸受容体を発現させ、Sul-HTO-Glu を添加し、光照射前後での受容体の挙動 (細胞膜を介したイオンの流れ) を電位固定法によって計測した。505 nm の緑色光を照射すると即座に大きな電流変化が生じたことから、光照射によって受容体が活性化し、陽イオンの透過が促進されたことを確認できた (図 2d)。合わせて、グルタミン酸受容体を発現させたヒト培養細胞に Sul-HTO-Glu を添加し、光照射に伴う Ca^{2+} イオンの流入をイメージングによって確認した (図 2e)。これらの結果から、開発したケージドグルタミン酸が緑色光に応答し、グルタミン酸受容体の機能を制御できることが示された。

さらにわれわれは保護基である HTO の構造について検討し、ベンゾチアゾール環側に置換基を導入することで光分解効率が変化することを見出した。特に、メトキシ基などの電子供与基を導入することで分解効率が約 3 倍まで上昇することが分かった。この改良型保護基を用い、可視光により DNA 組み換えを引き起こすケージド化合物 DiMeO-HTO-Ind を合成した (図 3a)。この化合物はエストロゲン受容体 (ER) リガンドを保護したものであり、ER リガンド放出により、CreER^{T2}/loxP システムを導入した細胞で DNA の組み換えが起こる。実際に DNA 組み換えにより赤色蛍光タンパク質 (mCherry) の遺伝子から青色蛍光タンパク質 (BFP) の遺伝子に組み換えが起こる細胞を用いて、緑色光照射依存的に細胞の遺伝子発現パターンを操作できることを示した (図 3b)⁴。

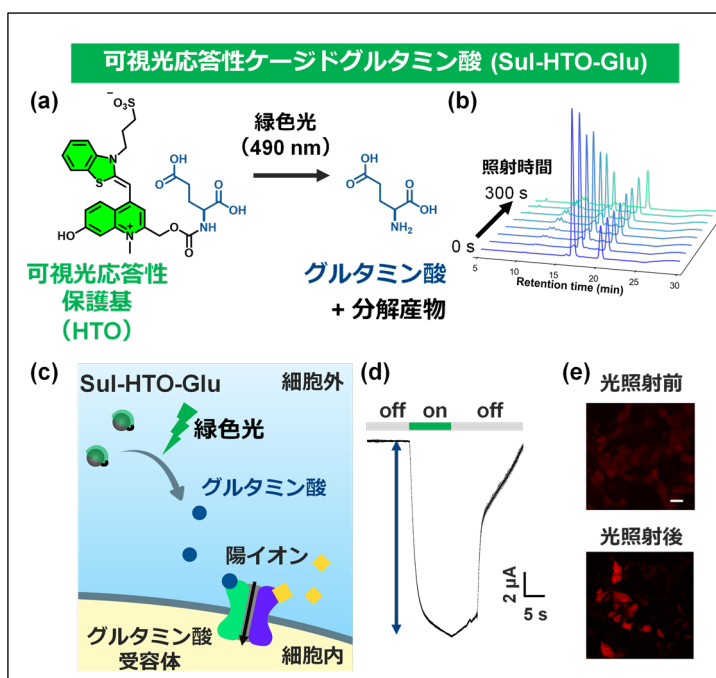


図 2: (a)可視光応答性ケージドグルタミン酸の構造、(b)光照射による Sul-HTO-Glu の分解、(c)グルタミン酸受容体の機能制御スキーム、(d)光照射によるアフリカツメガエル卵母細胞膜を介した電流の変化、(e) 光照射による Ca^{2+} 流入の蛍光イメージング

3. 保護基フリーの光応答性リガンドを用いた遺伝子発現光制御システムの構築

前項で記したケージド化合物は生命機能の光制御ツールとして有用である一方で、光照射後に外れた保護基も放出されるため、その影響が懸念される場合もある。例えば、オルト-ニトロベンジル基の脱保護では反応性の高いニトロソ基やアルデヒド基を含む保護基由来の物質が放出される。われわれは最近、保護基を有しない光応答性リガンドを利用した新たな遺伝子発現制御システムを開発している⁵。本システムに用いたリガンドはSi-キサントン系の光応答性色素、PaX₅₆₀である。この色素は光照射によって保護基の脱離を伴わず構造変換し、大きく蛍光が上昇するため超解像イメージング等へ利用されている。われわれはこの構造変換において色素分子が中性からカチオン性になるもう一つの特性に着目した。加えて転写制御システムを構築する要素として、特定の細菌が有する転写リプレッサー、QacRを利用した。QacRは通常は対応するDNA配列(IRI配列)に結合することで遺伝子発現を抑制するリプレッサーとしてはたらいっているが、脂溶性でカチオン性のリガンドが結合すると、QacRはIRI配列から解離し、下流の遺伝子発現(薬剤排出に関わる遺伝子群)が活性化される(図4a)。そこで、光照射によってカチオン性を示すPaX₅₆₀をリガンドとして利用できるのではないかと考えた。

光応答性リガンドとなるPaX₅₆₀を合成し、405 nmの弱い可視光照射を行ったところ速やかに蛍光性を有するカチオン性化合物へと変換された。光照射前後におけるQacRとの結合を評価したところ、光照射後の化合物はQacRに結合することが確認された。続いてT7プロモーターとIRI配列を連結し、その下流に遺伝子産物をコードしたDNAと、QacR、PaX₅₆₀を加えた無細胞転写系を構築した。光照射の有無で産生されるmRNA量を評価したところ、光照射によってmRNA量の増加が見られた(図4b)。さらに本システムを大腸菌に導入し、QacR制御下で緑色蛍光タンパク質(sfGFP)が発現する系を構築した。PaX₅₆₀添加後に光照射を行い蛍光顕微鏡で観察すると、sfGFP由来の蛍光シグナルが上昇し、本システムは生細胞で遺伝子発現の光操作ができることを示した(図4c)。

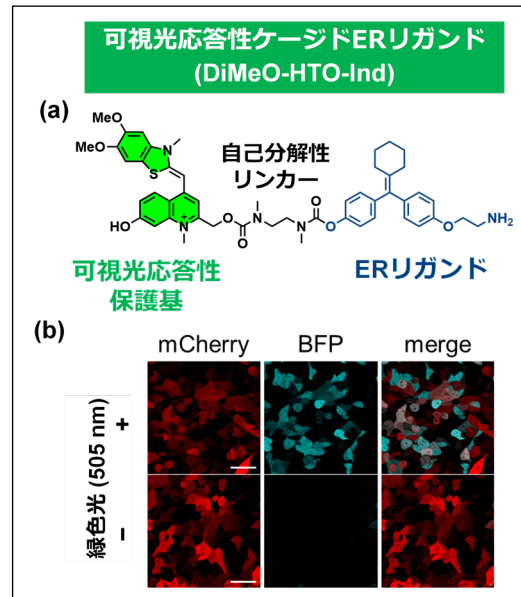


図3: (a) 可視光応答性ケージドERリガンドの構造、(b) 緑色光照射依存的DNA組み換えの蛍光イメージング

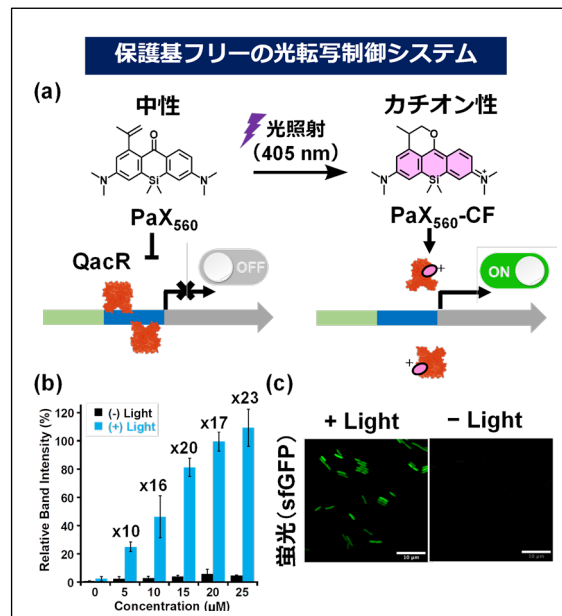


図4: (a) 保護基フリーの光転写制御システムのスキーム、(b) 無細胞転写系を利用した光照射によるmRNA量の解析、(c) 本システムを組み込んだ大腸菌の光照射依存的な蛍光タンパク質の発現活性化

4. おわりに

以上、本稿では光応答性の分子プローブを用いた生体分子、細胞機能の操作ツールについて述べた。近年は遺伝的にコードされた光操作ツールの進展から、光遺伝学（オプトジェネティクス）という分野が確立され、「実際に操作することで生命の仕組みを理解する」アプローチが注目されている。ケージド化合物をはじめとした光応答性の分子プローブにおいても応答する波長や効率、標的とするリガンドについて化学の視点から設計、調節することが可能である。これらの分子プローブを細胞操作へと応用することで、複雑な生命のシステムの再構築や理解に貢献したい。

5. 参考文献

1. G.C.R. Ellis-Davies, *Nat. Methods*, 4, 619-628 (2007).
2. R. Weinstain, T. Slanina, D. Kand, P. Klán, *Chem. Rev.*, 120, 13135-13272 (2020).
3. R. Hashimoto, M. Minoshima, S. Sakata, F. Ono, H. Ishii, Y. Watakabe, T. Nemoto, S. Yanaka, K. Kato, K. Kikuchi, *Chem. Sci.*, 13, 7462-7467 (2022). <https://doi.org/10.1039/D2SC02364D>
4. R. Hashimoto, M. Minoshima, K. Kikuchi, *ChemBioChem*, 25, e202300799 (2024). <https://doi.org/10.1002/cbic.202300799>
5. T. Nonomura, M. Minoshima, K. Kikuchi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 63, e202416420 (2024). <https://doi.org/10.1002/anie.202416420>

京大理学部卒（2005年）、京大院理学研究科修士（2007年）、博士（2010年）

東大薬学部卒（1988年）、東大院薬学研究科修士（1990年）、博士（1994年）