

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16568

研究課題名(和文)細胞膜透過性光分解性保護基の開発と多機能型Bhc-ケージド化合物への応用

研究課題名(英文)Development of cell membrane-permeable photolabile protecting group and its application to multifunctional Bhc-caged compounds

研究代表者

鈴木 商信(SUZUKI, Akinobu)

東邦大学・理学部・博士研究員

研究者番号：30532105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、光で生理活性分子の活性を制御できるケージド化合物に関し、それらを安定して細胞内に送達する方法を確立した。光分解性保護基であるBhc基の8位を改変して細胞膜透過性ペプチドを導入し、それらを用いてケージド緑色蛍光物質を合成した。生細胞を用いた実験により、この化合物が細胞内に分布し、また光活性化した領域で細胞が緑色蛍光で染色されることを確認した。一方で、ペプチド導入前の化合物は、凝集塊となり細胞内への導入が見られなかった。以上の結果から、光分解性保護基に対する細胞膜透過性ペプチドの付加は、水溶性を大きく向上させ、なおかつ細胞膜透過能をケージド化合物に付与できることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I have developed a new method for intracellular delivery of caged compounds which are biological tools to precisely control their bioactivities with light irradiation. I introduced a cell-penetrating peptide into the 8 position of Bhc group, a photolabile protecting group with high photolysis efficiency, and synthesized caged green fluorescent compounds using it. In living cells, the compounds were distributed intracellularly and cells were stained with green fluorescence by photoactivation of the caged compounds. On the other hand, the caged green fluorescent compound before addition of the cell-penetrating peptide was aggregated and attached to the cell surfaces probably because of its hydrophobicity, and cells were not stained by photoirradiation. These results strongly suggested that an addition of cell-penetrating peptide to a photolabile protecting group provides to caged compounds a great increase of water solubility and an ability of cell permeability.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ケージド化合物 細胞膜透過性ペプチド クリックケミストリー ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

ケージド化合物とは、生理活性分子を光分解性保護基で保護することで一時的に活性を失わせ、光を照射することで元の生理活性分子を放出することができる化合物である。細胞の生理機能を時空間的に厳密に制御するための手法の一つとして、生命科学の分野で広く利用されている。細胞内で働く生理活性分子のケージド化合物を設計する場合、その生理活性分子が細胞膜透過性であり且つ光活性化後に速やかに細胞に取り込まれる場合を除き、ケージド化合物が細胞膜を越えて細胞内に移行しなければならない。イノシトール 3 リン酸 (IP₃) のような水溶性の非常に高い化合物、逆に脂質のような水溶性の非常に低い化合物、または mRNA やタンパク質のような高分子量のケージド化合物は、そのままでは細胞膜を透過できないため、マイクロインジェクション等の方法により直接細胞内に化合物を導入するか、サポニン等の界面活性剤を用いて細胞膜の分子透過性を上昇させて細胞内に化合物を導入させる方法を取らねばならない。細胞膜を透過できないことで、ケージド化合物の導入自体に多大な労力がかかるため、生物実験への応用に大きな制限がかかってしまうのである。また、ケージド化合物の合成の面においても、化合物が細胞膜透過性を持つかどうかを厳密に予想する手段はなく、実際に合成してみないと生物実験で使えるかどうか分からないという問題もある。

細胞膜透過性ペプチドは、その名の通り細胞膜を透過する能力を持つペプチドである。タンパク質に融合させたり、有機合成的に低分子化合物へ結合させたりすることで、その対象を細胞内に導入する事が可能であり、ドラッグデリバリーの研究等で幅広く応用されている。

我々は、世界に先立って、タグを導入した光分解性保護基を一つのモジュールとし、タグに様々な機能性分子を導入することで、ケージド化合物そのものに多様な機能を持たせるといふ研究を報告した (Org. Lett. 2012)。そこで私は、細胞内で働くケージド化合物の開発において一番の障壁となる細胞膜透過性を光分解性保護基に付与することで、ケージド化合物の構造を問わず、細胞外に化合物を投与するだけで自然と細胞膜を透過し、細胞内の生理活性分子を光制御できるようなケージド化合物の開発を目指した。

私が所属する研究室で開発された 6-bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylmethyl 基 (Bhc 基) は、一般的に使われているニトロベンジル系の光分解性保護基と比較して 10~100 倍以上の光分解効率を持つ保護基である (Furuta, T. et al. PNAS 1999)。現在、我々は、特定のタンパク質と結合するような Bhc 基や (Chem. Commun. 2014)、特定の細胞種のみで光活性化する Bhc 基を開発している (特許: U.S. Pat. Appl. Publ. 2014)。それら

の多機能型ケージド化合物の細胞膜透過性もまた、Bhc 基を修飾する機能性分子や保護対象となる生理活性分子の性質に大きく依存する。細胞膜透過性 Bhc 基は、それらの多機能型ケージド化合物への展開も見据え、研究を行うことにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、光分解性保護基に細胞膜透過性を付与することで細胞膜透過性光分解性保護基を開発し、細胞内で働かせたいケージド化合物を、生理活性分子の水溶性や分子量に依らずに、安定して細胞内に導入する方法を確立することである。また、多機能型ケージド化合物に細胞膜透過性光分解性保護基を応用することで、実験目的に応じてカスタマイズされたケージド化合物に、その分子構造を問わず細胞膜透過性を付与することを目的とする。本研究は、細胞外に導入するだけで簡単に細胞内に導入できるケージド化合物を開発することにより、細胞内の生理機能を光操作するための技術を飛躍的に拡充させることを目指すものである。

3. 研究の方法

研究に先立ち、私は、緑色蛍光物質であるフルオレセインの Bhc ケージド化合物を合成した。Bhc-ケージドフルオレセインは、紫外光照射により Bhc 基が外れ、青色励起で緑色の蛍光を発するフルオレセインが放出される化合物である。生細胞での実験において、Bhc-ケージドフルオレセインは、単純な細胞外投与では紫外光照射により細胞がフルオレセインで染色されず、サポニンを用いて細胞膜の透過性を上げることで初めて紫外光照射により細胞が染色されたため、細胞膜透過能を持たないと考えられた。逆に言えば、Bhc-ケージドフルオレセインの誘導体を細胞外投与した時に、光活性化に伴って細胞内が緑色蛍光で染色されたかどうかを観察することで、ケージド化合物が細胞内に導入されたかどうかを簡単に判断することが可能となる。

本研究は、この Bhc-ケージドフルオレセインを用いて、Bhc 基に細胞膜透過性ペプチドを結合させることで、ケージド化合物が細胞膜透過性を持つかどうかを判断し、細胞膜透過性光分解性保護基を開発していく。また、Bhc 基を用いた多機能型ケージド化合物は、Bhc 基の 7 位を修飾することにより行われているが、私は、Bhc 基の 8 位に置換基を導入する方法を確立していたため、将来的に細胞膜透過性光分解性保護基を多機能型ケージド化合物に応用することを視野に入れ、8 位修飾 Bhc 基を元に、細胞膜透過性光分解性保護基の開発を進めることとした。

8 位修飾 Bhc 基への細胞膜透過性ペプチドの導入方法は、アジドとアルキンを用いた Huisgen 環化反応、または末端チオール同士をジスルフィドで結合させる方法を計画し

た。Bhc 基へは、8 位の末端にアルキンまたはチオール基を導入し、末端にアジドまたはシステインを持つ細胞膜透過性ペプチドを結合させる。両経路共に、温和な条件で反応させることができ、合成収率も高く、反応溶媒として水を使うことが可能であり、細胞膜透過性ペプチドを導入する反応として適していると考えられる。

4. 研究成果

まずは、Bhc の 8 位にアルキンを持つケージドフルオレセインの開発を行った。Bhc-フルオレセインの合成経路を元にし、8 位にアルキンを持つフルオレセイン (8-Alk-Bhc-フルオレセイン) を合成した。また細胞膜透過性ペプチドとして、アルギニン を 8 個もしくは 12 個持つペプチドを選択し、受託合成にて、末端にアジドを持つ細胞膜透過性ペプチド (N3-Arg8 及び N3-Arg12) を得た。続いて、8-Alk-Bhc-フルオレセインに N3-Arg8 をリン酸緩衝液 / DMSO 混合溶媒中で反応させた。しかし、8-Alk-Bhc-フルオレセインは水系溶媒中で速やかに加水分解を引き起こしてしまうことが判明し、目的の化合物が得られなかった。

この問題を解決するため、Bhc とフルオレセインの炭酸エステル結合の間に、N,N'-Dimethylethylenediamine のリンカーを挟むことで、加水分解に対し強い耐性を持つような分子を設計し、その分子を合成することに成功した。得られた 8-Alk-Bhc-Ink-フルオレセインは、紫外光照射からリンカーが脱離しフルオレセインが放出されるまで 10 分程度のタイムラグがあるものの、ケージドフルオレセインとしての機能を有しており、細胞膜透過性を判断する分子として用いることが可能であった。8-Alk-Bhc-Ink-フルオレセインと N3-Arg8 をリン酸緩衝液 / DMSO 混合溶媒中で反応させた後、分取 HPLC にて精製を行い、Arg8 ペプチドが導入されたと思われる化合物 (8-Arg8-Bhc-Ink-フルオレセイン) を得た。物質量が少なく NMR 等での物質同定はできなかったが、細胞実験を行うには十分な量が確保できたため、HeLa 細胞を用いてアッセイを行った。ガラスボトムディッシュに播種した HeLa 細胞に対し、細胞外の緩衝液に 8-Arg8-Bhc-Ink-フルオレセインを溶解させたものを投与した。30 分後、細胞外液を除去し、緩衝液で 3 回洗浄した後、蛍光顕微鏡にて細胞を観察した。ディッシュの一部に紫外光を照射し、20 分後に細胞を洗浄し蛍光を観察したところ、紫外光照射領域の細胞がフルオレセインで染色されていたため、8-Arg8-Bhc-Ink-フルオレセインが細胞膜を透過し、細胞内に導入されている可能性が考えられた。続いて、Bhc 基の分布を確認した。Bhc 基は、紫外光励起により光分解を引き起こす一方で、励起エネルギーの一部は水色蛍光を発する経路を取る。このことを利用し、8-Arg8-Bhc 基を持つ物質がどこに存在する

のかを観察した。化合物投与、細胞洗浄後、5 秒の露光時間で紫外光励起による蛍光像を撮影した。この時間スケールであれば、分解後の光分解性保護基の影響はほぼ無視でき、蛍光は 8-Arg8-Bhc-Ink-フルオレセインの存在位置を反映しているものと考えられる。その結果、Bhc 基の水色蛍光は細胞内にて観察された。これらの結果から、Bhc 基に細胞膜透過性ペプチドを結合させることで、ケージド化合物が細胞内に導入されることが示唆された。

次に、同様の方法で、末端にカルボキシル基を持つ Bhc-Ink-フルオレセインを合成した。カルボキシル基に 2-aminoethanethiol を結合させることで末端をチオール基にした後、チオール基を持つ Arg8 ペプチド (Cys-Arg8) を反応させた。HPLC での精製後、ジスルフィド結合で Arg8 が結合した Bhc-Ink-フルオレセイン (8-Arg8-SS-Bhc-Ink-フルオレセイン) と思われる化合物を得た。HeLa 細胞を用いたアッセイを行い、細胞膜透過性を検証した結果、8-Arg8-Bhc-Ink-フルオレセインと同様の結果が得られた。すなわち、紫外光照射領域の細胞がフルオレセインで染色され、8-Arg8-SS-Bhc-Ink-フルオレセインは細胞内に存在することが確認された。

Bhc 基の 8 位に導入された置換基に依存してケージド化合物の水溶性や分子量が変化し、その細胞膜透過性も変化するため、ネガティブコントロールを設定することは非常に難しいが、比較対象として細胞膜透過性ペプチドを導入する前の化合物である 8-Alk-Bhc-Ink-フルオレセインを選択し、細胞でのアッセイを行った。その結果、8-Alk-Bhc-Ink-フルオレセインでは、紫外光照射領域において、フルオレセインによる明瞭な細胞染色は引き起こされなかった。化合物の分布を Bhc 基の蛍光を元に観察した結果、化合物は凝集塊となり細胞表面へ無作為に付着する形で存在していた。8-Alk-Bhc-Ink-フルオレセインは、試験管内では紫外光照射によりフルオレセインの放出が起こり、ケージド化合物としての機能は維持されていることから、細胞での結果は、水溶性が低すぎるため細胞内に化合物が導入されなかったことが原因だと考えられた。

以上の結果から、光分解性保護基に対する細胞膜透過性ペプチドの付加は、付加前のケージド化合物の水溶性が低く細胞実験に不適であったとしても、水溶性を大きく向上させ、なおかつ細胞膜透過性をケージド化合物に付与可能であることが強く示唆された。研究目的である、生理活性分子の水溶性や分子量に依らずにケージド化合物を安定して細胞内に導入する方法が達成されたのではないかと考えられる。

細胞膜透過性光分解性保護基の多機能型ケージド化合物への応用に関しても、実験を進めた。現在までに開発してきた多機能型ケ-

ジド化合物は、Bhc 基の 7 位のヒドロキシル基に機能性分子を導入することで成り立っている。8-Alk-Bhc 基を始めとする 8 位修飾 Bhc 基も 7 位にヒドロキシル基を持つが、その反応性が極端に低く、今までの多機能型ケージド化合物の合成経路では、7 位に置換基を導入することができなかった。また、7 位のヒドロキシル基に置換基を入れた場合は、8 位への置換基導入が合成上不可能になる。7 位のヒドロキシル基の反応性の低さは、細胞膜透過性光分解性保護基の開発においては、7 位を無保護で合成を進めることができたため非常に大きなメリットであったが、多機能型ケージド化合物へ研究を展開する上では大きな問題点であった。しかし、合成を進めた結果、今までとは異なる合成経路を用いることで、8-Alk-Bhc 基の 7 位のヒドロキシル基に機能性分子を導入することに成功した。これにより、細胞膜透過性光分解性保護基を多機能型ケージド化合物へ応用する道が開けた。現在、この分子に関し、Bhc 基の 4 位をジアゾ化するところまで合成が進んでおり、将来的にはリン酸基を持つ化合物(cAMP、IP3 等)と反応させることで、それらのケージド化合物へと応用できればと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 25 件)

1. SAKANO, Taichi; SUZUKI, Akinobu; UENO, Taro; FURUTA, Toshiaki, Latent caged cNMPs that can be photoactivated only in the target cells expressing certain enzymes, 日本化学会 第 97 春季年会, 2017 年 3 月 18 日, 慶應義塾大学日吉キャンパス(神奈川県横浜市)
2. Kotoko Sakamoto, Akinobu Z. Suzuki, Toshiaki Furuta, Design and synthesis of modified inhibitors for epigenetic research, 4th Asian Chemical Biology Conference, Nov. 29, 2016, 85 Sky Tower Hotel, Kaohsiung, TAIWAN
3. Kazunari Kodama, Shin ' nosuke Tada, Akinobu Z. Suzuki, Toshiaki Furuta, Synthesis of caged gRNAs for photoactivatable CRISPR-Cas9, 4th Asian Chemical Biology Conference, Nov. 29, 2016, 85 Sky Tower Hotel, Kaohsiung, TAIWAN
4. Shiori Takeda, Akinobu, Z. Suzuki, Toshiaki Furuta, Design and synthesis of autophagy inhibitors having cell type specificity, 4th Asian Chemical Biology Conference, Nov. 29, 2016, 85 Sky Tower Hotel, Kaohsiung, TAIWAN
5. Taichi Sakano, Akinobu Z. Suzuki, Toshiaki Furuta, Latent caged cNMP that can be photoactivated only in the -Galactosidase-expressing cells, 4th Asian Chemical Biology Conference, Nov. 29, 2016, 85 Sky Tower Hotel, Kaohsiung, TAIWAN
6. Yuki Iketani, Akinobu Z. Suzuki, Toshiaki Furuta, Design and synthesis of caged 4-aminopyridine which can be photoactivated in the presence of specific enzymes, 4th Asian Chemical Biology Conference, Nov. 29, 2016, 85 Sky Tower Hotel, Kaohsiung, TAIWAN
7. Shin ' nosuke Tada, Akinobu Z. Suzuki, Toshiaki Furuta, Design and synthesis of site-selectively modified caged plasmid DNAs using modular nucleotide caging agents, 4th Asian Chemical Biology Conference, Nov. 28, 2016, 85 Sky Tower Hotel, Kaohsiung, TAIWAN
8. 竹田詩織, 鈴木商信, 古田寿昭, 細胞種選択的にオートファジーを阻害する分子の開発, 第 6 回 CSJ 化学フェスタ 2016, 2016 年 11 月 16 日, タワーホール船堀(東京都江戸川区)
9. 児玉一徳, 多田慎之介, 鈴木商信, 古田寿昭, CRISPR/Cas9 の光制御を目指したケージド gRNA の合成, 第 6 回 CSJ 化学フェスタ 2016, 2016 年 11 月 16 日, タワーホール船堀(東京都江戸川区)
10. 坂元琴子, 鈴木商信, 古田寿昭, 細胞種選択的にエピジェネティクスを制御する分子の開発, 第 6 回 CSJ 化学フェスタ 2016, 2016 年 11 月 16 日, タワーホール船堀(東京都江戸川区)
11. 坂野太一, 鈴木商信, 古田寿昭, 細胞種選択的に光活性化能を獲得するケージド cNMP の開発, 第 6 回 CSJ 化学フェスタ 2016, 2016 年 11 月 15 日, タワーホール船堀(東京都江戸川区)
12. 坂野 太一, 鈴木 商信, 古田 寿昭, 酵素存在下で光活性化能を獲得するケージド環状リン酸類の開発, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 2016 年 9 月 8 日, もてなしドーム地下広場(石川県金沢市)
13. 鈴木商信, 古田 寿昭, 8 位修飾 Bhc 基の

開発と多機能型ケージド化合物への応用, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 2016 年 9 月 8 日, もてなしドーム地下広場 (石川県金沢市)

14. 池谷袖季, 鈴木商信, 古田寿昭, 細胞種選択的に光活性を獲得する新規ケージド化合物の開発, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 2016 年 9 月 7 日, もてなしドーム地下広場 (石川県金沢市)
15. 多田慎之介, 鈴木商信, 古田寿昭, モジュール型ケージング試薬を利用したケージドオリゴヌクレオチドの設計と合成, 日本化学会第 96 春季年会, 2016 年 3 月 26 日, 同志社大学京田辺キャンパス (京都府・京田辺市)
16. 竹田詩織, 鈴木商信, 古田寿昭, 細胞種選択的にオートファジーを阻害する分子の設計と合成, 日本化学会第 96 春季年会, 2016 年 3 月 26 日, 同志社大学京田辺キャンパス (京都府・京田辺市)
17. 児玉一徳, 多田慎之介, 鈴木商信, 古田寿昭, 光作動性 CRISPR/Cas9 の実現を目指したケージド gRNA の合成, 日本化学会第 96 春季年会, 2016 年 3 月 26 日, 同志社大学京田辺キャンパス (京都府・京田辺市)
18. 坂元琴子, 鈴木商信, 古田寿昭, 細胞種選択的に DNA メチル化を制御する分子の開発, 日本化学会第 96 春季年会, 2016 年 3 月 26 日, 同志社大学京田辺キャンパス (京都府・京田辺市)
19. 坂野太一, 鈴木商信, 古田寿昭, 酵素存在下で光感受性を獲得するケージド環状リン酸類の設計と合成, 日本化学会第 96 春季年会, 2016 年 3 月 26 日, 同志社大学京田辺キャンパス (京都府・京田辺市)
20. 池谷袖季, 鈴木商信, 古田寿昭, PLE 存在下で光感受性を獲得するケージド 4-AP の設計と合成, 日本化学会第 96 春季年会, 2016 年 3 月 26 日, 同志社大学京田辺キャンパス (京都府・京田辺市)
21. 船山瑞季, 鈴木商信, 上野太郎, 齊藤実, 古田寿昭, 細胞種選択的に働くリアノジンレセプターアゴニストの設計と合成, 日本化学会第 96 春季年会, 2016 年 3 月 26 日, 同志社大学京田辺キャンパス (京都府・京田辺市)
22. T. Sakano, A. Suzuki, T. Ueno, M. Saitoe, T. Furuta, Latent caged cAMPs that can be photoactivated in the

presence of specific enzymes, 2015 International chemical congress of Pacific Basin Societies, Dec. 19, 2015, Hawaii(USA)

23. Y. Iketani, A. Suzuki, T. Furuta, Design and synthesis of new caging groups having cell type specificity, 2015 International chemical congress of Pacific Basin Societies, Dec. 19, 2015, Hawaii(USA)
24. A. Z. Suzuki, R. Aikawa, K. Kakehi, T. Furuta, Design and synthesis of clickable caged compounds, 2015 International chemical congress of Pacific Basin Societies, Dec. 19, 2015, Hawaii(USA)
25. S. Tada, W. Hashiba, E. Ikeda, A. Suzuki, T. Furuta, Chemo-enzymatic preparation of site-selectively modified caged DNAs, 2015 International chemical congress of Pacific Basin Societies, Dec. 19, 2015, Hawaii(USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 商信 (SUZUKI Akinobu)
東邦大学・理学部・博士研究員
研究者番号: 30532105

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし