

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870180

研究課題名(和文) In vivoで機能する近赤外光駆動性ケージド化合物の創製

研究課題名(英文) Development of novel caged compounds activatable by single-photon uncaging with longer wavelength light

研究代表者

神谷 真子 (Kamiya, Mako)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90596462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ケージド化合物は、高い時空間分解能で細胞機能を制御することが出来る強力な研究ツールである。本研究では、boron dipyrromethene (BODIPY)の4位ボウ素にフェノール誘導体を導入した化合物が光分解性を示すことを利用し、500 nm以上の可視光で活性化可能なBODIPYケージド化合物を開発した。本化合物は、1)長波長の光での活性化が可能であるため生体組織深部への適応が期待できる、2)蛍光性であるためその細胞内局在の確認が可能である、といった従来のケージド化合物にはない特徴を有し、標的分子の局在に合わせた効果的なケージド化合物の創製が可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Caged compounds are useful tools for precise spatiotemporal modulation of cell functions, but in most cases uncaging requires ultraviolet (UV) light, which is cytotoxic and has limited tissue penetration. Therefore, caged compounds that can be activated by longer-wavelength light are required. In this research project, we describe a novel photoelimination reaction of 4-aryloxy boron dipyrromethene (BODIPY) derivatives and show that BODIPY can function as a caging group for phenol groups. We developed a novel BODIPY-caged histamine compound, which is photoactivatable with blue-green visible light to stimulate cultured HeLa cells in a spatiotemporally well-controlled manner. This caging strategy is expected to be widely applicable to develop tools for probing various cellular functions.

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 BODIPY

1. 研究開始当初の背景

ケージド化合物とは、光照射により分解する保護基(ケージ基)で生理活性分子を保護し、一時的にその活性を失わせた化合物である。光照射により瞬時に元の生理活性物質を放出する(アンケージ)ことができるため、これらのケージド化合物を用いることで、任意の時間に任意の部位へ生理活性物質を添加することが出来、生きた生物試料における生理活性物質の動態や作用に関する多くの知見が得られる。

これまでに様々なケージド化合物が開発されてきたが、現在は280~400 nm程度の紫外光照射で機能するケージド化合物が汎用されている。例えば、ケージドグルタミン酸存在下で紫外光を照射することによりグルタミン酸を局所放出させ、限られた範囲の神経細胞のみを興奮させることができる。しかしながら紫外光は、細胞毒性があり組織透過性が低いために、生体組織での使用に適さないことがある。そこで最近では、細胞障害性が低く組織透過性の高い可視光でのアンケージが可能な化合物の開発が進められているが、これらの化合物は比較的幅広い吸収スペクトルを持つため、他の化合物との併用が難しいという課題があった。

2. 研究の目的

本研究では、紫外光より長波長の可視光領域で機能する新たなケージド化合物の開発を目指した。具体的には、可視光領域に強く鋭い吸収特性を有する蛍光色素 boron dipyrromethene (BODIPY) をケージ基骨格として利用することで、比較的長波長の可視光で1光子アンケージ可能な化合物の開発を目的とした。

3. 研究の方法

当研究室ではこれまでに、可視光蛍光色素である1,3,5,7-tetramethyl-BODIPYの4位ホウ素にフェノール誘導体を導入した化合物(4-Phenoxy BODIPY)に可視光を照射すると、B-O結合の開裂が誘起され、アンケージ反応が起こることを見出した(図1)。またこの光化学反応の収率が、4位フェノール誘導体の電子密度に依存して変化することから、この電子供与体から励起状態の色素分子への電子移動(光誘起電子移動 PeT: Photo-induced Electron Transfer)が初発となり、結合の開裂が誘起されることが強く示唆された。

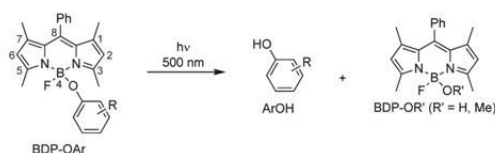


図1. 4-Phenoxy BODIPYの光脱離反応

そこで本研究では、上記の知見に基づきBODIPY骨格をケージ基として用いることで、500 nm以上の可視光で活性化可能なケージド化合物を合成した。具体的には、Benzyloxycarbonyl リンカーを介してヒスタミンを導入したBODIPYケージドヒスタミン(BcHA-1, BcHA-2)を合成した。また、開発した化合物が可視光照射依存的にヒスタミンを放出するか、オルトフタルアルデヒドとメルカプトエタノールによるヒスタミンの蛍光誘導体化を用いて、HPLC分析により定量分析を行った。

次に、開発したBODIPYケージドヒスタミンを培養細胞に適用し、可視光照射により、局所的なヒスタミン放出および細胞活性化が誘発可能か、カルシウム蛍光指示薬Rhod-2を併用したライブセルイメージングを行い評価した。

さらに、BODIPYケージド化合物の有効性・汎用性を検証するべく、ヒスタミン以外の生理活性分子を導入したBODIPY誘導体や、より長波長の吸収蛍光特性を示すBODIPY誘導体を母核とした新たなケージド化合物の開発を試みた。

4. 研究成果

開発したBODIPYケージドヒスタミンBcHAは、BODIPYの励起波長である500 nmの光を照射すると、4位のB-O結合が開裂してフェノレート構造が放出され、これが速やかに分解することでヒスタミンを生成することを確認した(図2)。この際、キノンメチドが副生成物として産生されるが、周囲の水分子によりクエンチされるため、細胞への毒性は少ないと考えられる。

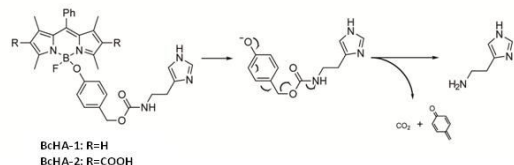


図2. BODIPYケージドヒスタミン(BcHA)

BcHA-1, BcHA-2の可視光アンケージ量子収率(Φ_u)を*in vitro*で算出した結果、それぞれ、 3.0×10^{-4} 、 3.9×10^{-4} となり、既存のケージド化合物と比較して低い値となったが、BcHAのモル吸光係(ϵ)が 10^4 オーダーと大きいため、アンケージ効率の目安である $\epsilon \times \Phi_u$ は、10-100の値となり、実用的な範囲にあると考えられる。

また、BcHA-1, BcHA-2は、BODIPYに由来する蛍光性を持つため、蛍光観察によりその分布を確認することが出来る。実際に、BcHA-1, BcHA-2をHeLa細胞に適用しその局在を確認したところ、比較的脂溶性が高いBcHA-1は細胞内膜系に集積するのに対し、BODIPYの2,6-位にカルボキシ基を導入し水溶性を高めたBcHA-2は細胞外液に一樣に分布することを確認した(図3)。

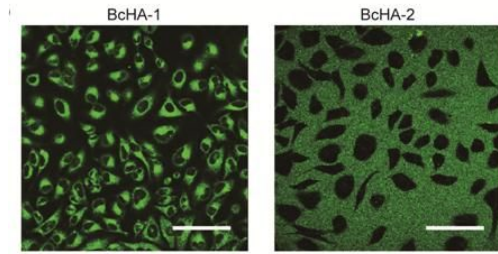


図 3. BcHA の局在分布 (HeLa 細胞)

次に、培養細胞 (HeLa 細胞) を用いた BcHA の機能評価を実施した。具体的には、ヒスタミンは細胞膜上の H1 受容体を介して小胞体からの Ca^{2+} 放出を誘導し、細胞質における一過性のカルシウム濃度上昇を引き起こすことに着目し、BcHA とスペクトル分離が可能な Ca^{2+} 蛍光指示薬 Rhod-2-AM との同時適用で評価した。また、H1 受容体のリガンド結合部位は細胞外に存在していることから、ケージドヒスタミンとしては、細胞外の分布を示す BcHA-2 が適切と考えられた。そこでまず、ヒスタミンと BcHA-2 を用いて用量作用曲線を作成したところ、BcHA-2 の生理活性はヒスタミンに比べて低下しており、最大 $5 \mu\text{M}$ の濃度で用いることが出来ることが示された (図 4)。また、最大使用濃度の $5 \mu\text{M}$ では、BcHA-2 はアンタゴニスト活性を示さないことを確認した。

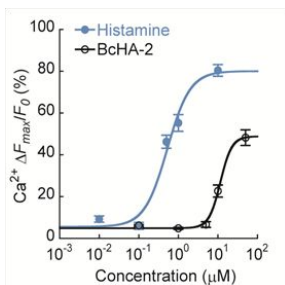


図 4. BcHA-2 とヒスタミンの容量作用曲線

次に、BcHA-2 を適用して可視光照射をおこなったところ、光照射依存的に一過性の Ca^{2+} 上昇が観察された (図 5)。この光照射依存的な細胞応答は、H1 阻害剤 pyriamine によって抑制されたことから、可視光照射依存的に生成したヒスタミンが細胞膜上の H1 受容体を介して細胞応答を引き起こすことを確認した。また、光照射範囲を変えることで、刺激範囲を調整可能であることも確認した。

さらに、BODIPY ケージド化合物の有効性・汎用性を検証するべく、ヒスタミン以外の生理活性分子を導入した BODIPY ケージド化合物の開発を試みた。その結果、実に様々な生理活性分子 (神経伝達物質・阻害剤) を、 500 nm の光照射でアンケージ可能であることを見出し、可視光で駆動する一連のケージド化合物の開発に成功した。

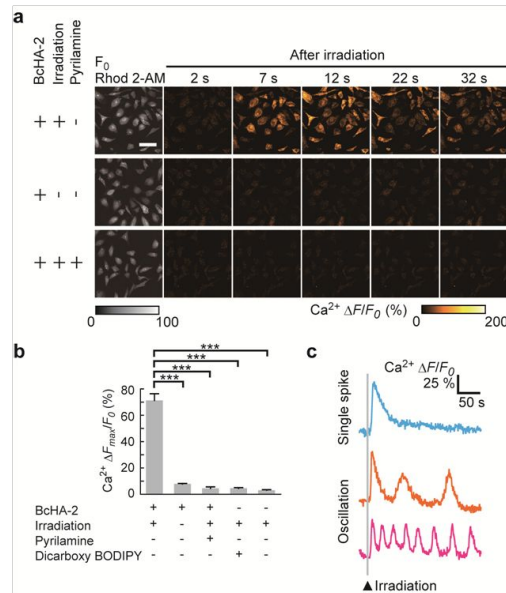


図 5. BcHA-2 の HeLa 細胞への適用

a) 青色光照射により、BcHA-2 からヒスタミンが放出され細胞が応答する; b) 統計データ; c) 細胞内 Ca^{2+} 変化の代表例

また、上記で得られた知見を、より長波長の吸収蛍光特性を示す BODIPY 誘導体に適用することで、長波長で機能する新たなケージド化合物の開発を試みた。具体的には、電子共役系を拡張した BODIPY 誘導体に各種フェノール誘導体を導入した一連の誘導体を開発し、これらの光化学特性を精査した。その結果、 600 nm 以上という長波長の光照射依存的に B-0 結合の開裂が誘起されアンケージ反応が起こることを確認した。つまり、 600 nm 以上という長波長で生理活性分子を放出するケージド化合物の分子設計指針が確立されたことから、生体深部で生理活性分子を添加できる光機能分子の開発が期待される。

また上述のように BODIPY ケージド化合物は、BODIPY 由来の蛍光シグナルを観察することでその細胞局在を観察することが出来る。そのため、化学修飾によりその脂溶性・水溶性を調整することで、光制御したい標的分子 (各種受容体や酵素など) に合わせた、化合物の局在調節も可能だと考えられる。また、細胞応答を各種蛍光プローブで観察する場合には、蛍光プローブの励起波長がケージド化合物の吸収スペクトルと重ならないよう留意する必要があるが、BODIPY ケージド化合物は、強く狭い吸収特性を持つため、他の蛍光プローブと併用出来るという利点がある。

以上、BODIPY 骨格に適切な構造修飾を施すことで、可視光で駆動する新たなケージド化合物の開発に成功した。今後、我々が開発した BODIPY ケージド化合物を積極的に利用することで、細胞生理機能のさらなる解明が進むことを期待したい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Umeda N, Takahashi H, Kamiya M, Ueno T, Komatsu T, Terai T, Hanaoka K, Nagano T, Urano Y. Boron dipyrromethene as a fluorescent caging group for single-photon uncaging with long-wavelength visible light. *ACS Chem Biol.* 2014, 9, 2242-2246.
DOI: 10.1021/cb500525p

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 高橋光規, 梅田暢大, 神谷真子, 長野哲雄, 浦野泰照, BODIPY ケージド化合物の生物学的応用, 日本顕微鏡学会第 70 回記念学術講演会, 2014 年 5 月 11 日, 幕張メッセ国際会議場(千葉県千葉市)
2. 高橋光規, 梅田暢大, 神谷真子, 長野哲雄, 浦野泰照, BODIPY ケージド化合物の生物学的応用, 日本薬学会 第 134 年会, 2014 年 3 月 28 日, 熊本大学黒髪キャンパス

〔図書〕(計 1 件)

1. 神谷真子, 高橋光規, 浦野泰照, 金原一郎 医学医療振興財団, 生体の科学, 第 66 巻 2 号, 132-136 (2015).

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特になし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

神谷 真子 (KAMIYA, Mako)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 90596462