

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02882

研究課題名(和文) 遺伝子指向性ケージド化合物の開発と光薬理学の創成

研究課題名(英文) Development of gene-directed caged compounds

研究代表者

古田 寿昭 (FURUTA, Toshiaki)

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：90231571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：記憶や学習などの脳の高次機能の解明，あるいは，がん代表される難治性疾患発症の分子機構の解明に貢献するような新しい実験技術の開発を目指した。光遺伝学と小分子性プローブの利点を併せ持つような遺伝子指向性ケージド化合物を複数種類開発した。大腸菌由来ガラクトシダーゼや豚肝臓エステラーゼなどの外因性酵素で目印を付けた哺乳動物細胞内で，細胞内シグナル伝達やエピジェネティクスを光制御できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

記憶や学習などの脳の高次機能の解明，および，がん代表される難治性疾患発症の分子機構の解明に貢献する技術開発を目指して，低分子量有機化合物(薬剤)とタンパク質の利点を併せ持つ光作動性機能性分子の設計・合成に成功した。光スイッチと遺伝子組み換え技術を利用して，任意の標的細胞内だけで，各種薬剤を選択的に機能させる光薬理学への道を拓くことができた。ドラッグデリバリーの新手法としても期待できる。

研究成果の概要(英文)：Our goal was to create innovative experimental techniques to better understand higher brain functions like memory and learning, as well as the molecular mechanisms behind complex diseases such as cancer. We successfully designed gene-directed caged compounds that overcome limitations of existing ones and combine the benefits of optogenetics and small molecular probes. Through our research, we demonstrated the ability to regulate intracellular signaling and epigenetics in mammalian cells using exogenous enzymes like galactosidase from Escherichia coli and porcine liver esterase. Additionally, we developed clickable caged compounds that allow for easy integration of functional components through click reactions. These compounds were utilized to create photoactivated prodrugs of anticancer drugs, conjugated with cell type-selective ligands.

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 光スイッチ 光薬理学 クリックケミストリー エピジェネティクス 抗菌薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ケージド化合物とは光分解性保護基で修飾した生理活性分子のことで、光照射によってその活性を制御できる。国内外の複数のグループの研究で、優れた性質を持つケージド化合物が開発され、細胞の生理機能の光制御に利用されている (Chem. Rev. 2013, 113, 119, Synthesis 2017, 49, 3337 Angew. Chem. Int. Ed., 2018, 57, 2768 など) に総説)。研究代表者のグループでも、1光子および2光子励起の感受性が高い (6-Bromo-7-hydroxycoumarin-4-yl)methyl (Bhc) ケージド化合物を開発して、培養細胞内や脳スライス上で、細胞内シグナル伝達や神経伝達を高い時空間分解能で光制御できること、ゼブラフィッシュ胚を用いて遺伝子の機能発現を光制御できることを示してきた。

一方、脳・神経科学分野では、チャンネルロドプシン等の光作動性タンパク質を利用する光遺伝学が、個体行動の光制御に大きなブレークスルーをもたらした (Neuron 2011, 71, 9 など)。遺伝子でコードされた利点を活かし、チャンネルロドプシンを特定の神経細胞にターゲティングしたトランスジェニック個体を作製できる。神経細胞の活性化と抑制に加えて、遺伝子発現、ゲノム編集、一部の細胞内シグナルの制御に優れた研究が報告されている (Acs Synthetic Biology 2017, 6, 1086, Nature Methods 2019, 16, 1029 など)。しかし、光制御できる生理機能はごく一部に限られ、さらなる研究の進展が望まれるのが現状である。

光遺伝学との比較でケージド化合物を用いる利点として、(i) 低分子量であること、(ii) 光応答速度が速いこと (ナノ秒程度)、(iii) テーラーメイドで多様な生理機能を制御できること、(iv) 合理的な分子設計で活性0から100%を実現できることが挙げられる。また、(v) 任意のタイミングで必要量を加えられるので、ある領域の細胞が生まれつき光感受性になる異常性も回避できる。しかし、ケージド化合物を目的の細胞や組織に自在にターゲティングすることは現状では困難である。自由に運動する個体の任意の細胞を光で狙うこともできないので、モデル生物も含めて個体での利用は著しく制限される。運動するモデル生物において高い時空間分解能で細胞内シグナル伝達の光制御を実現した報告例もなかった。

2. 研究の目的

システムとしての生命現象の理解に資することを目的に、光遺伝学とケミカルバイオロジー両者の利点を併せ持つような新規分子ツールを提案する。光機能性ケミカルプローブとして、任意の細胞種および組織にターゲティング可能なケージド化合物を合理的に設計・合成して、細胞、組織、生物個体の各階層において、低侵襲かつ高い時空間分解能で任意の生理機能を光制御可能にすることを目的にする。

3. 研究の方法

次の3つの研究項目を実施する。研究項目1: 遺伝子で目印を付けた細胞内だけで光活性化能力を獲得する“Lock-and-Key”型ケージド化合物の開発と任意の細胞内シグナルの光操作への応用、研究項目2: ターゲティング可能なケージド薬剤の開発と光薬理学への展開、研究項目3: 2光子励起とアップコンバージョンを利用する近赤外光アンケージングの実現。学理の追究に留まらず、脳の高次機能解明への貢献、ドラッグリバイバル、さらに、疾患の新しい治療戦略確立への展開を目指す。

研究期間内に、次の3項目の実施を計画した。(1) 特定の酵素存在下でのみ光活性化される“Lock-and-Key”型ケージド化合物を設計・合成して、従来型ケージド化合物の欠点を克服する。(2) 合成したケージド化合物を用いて、遺伝子で目印を付けた細胞内だけで任意の細胞内シグナルを光制御する手法を開発する。さらに、(3) モデル生物個体脳において神経活動依存的に任意のシグナル伝達経路を活性化および阻害する手法に展開して、運動するモデル生物の同一個体でシグナルのオン/オフ両方向制御を実現する。

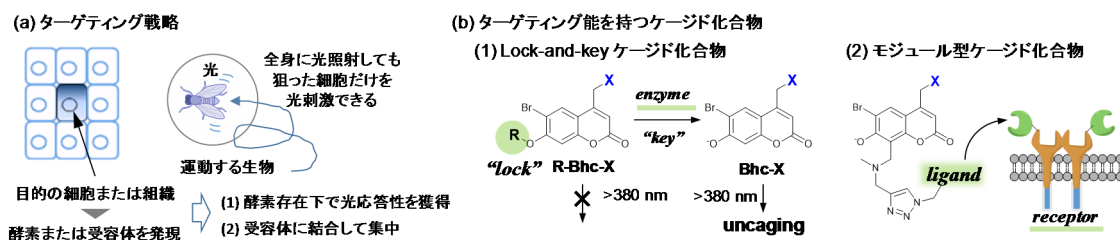


図1 ターゲティング能を付与した新規ケージド化合物のコンセプト

4. 研究成果

(1) 遺伝子で目印を付けた細胞内だけで光活性化能力を獲得する“Lock-and-Key”型ケージド化合物を設計して、任意の細胞機能の光操作を実現するための要素技術の開発を目的にした。光反応効

率の高いケージンググループである Bhc 基の光反応性を適切な修飾により一時的にマスクして (化学ロック), 特異的な酵素 (鍵) の存在下でのみ外れる化学ロックを設計することで, 鍵酵素発現細胞内だけで光作動性のケージド化合物を合成できる。鍵酵素の遺伝子で目的細胞に目印をつけることで, 小分子性有機化合物であるケージド化合物の機能に細胞種選択性を付与できる。これを「遺伝子指向性ケージド化合物 (gene-directed caged compounds)」と名付けた。

まず, 細胞内シグナル伝達の代表的なセカンドメッセンジャーである環状ヌクレオチドを用いて, コンセプトの実証を試みた。光スイッチとして Bhc 基, 化学ロックにβ-ガラクトシダーゼ (β-Gal) 作動性のβ-ガラクトシル基を持つ, 遺伝子指向性ケージド cAMP (Gal-Bhc-cAMP) を設計・合成した。Gal-Bhc-cAMP は 405 nm 光に感受性を持たないこと, β-Gal を発現する哺乳動物細胞溶解液存在下で Bhc-cAMP に変換されること, Bhc-cAMP は 405 nm 光で光分解して量子収率 0.40 で cAMP を生成することを明らかにした。Gal-Bhc-cAMP は β-Gal との反応において, ミカエリス定数 $K_m = 361 \mu\text{M}$, 特異性定数 $k_{cat}/K_m = 5.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ で, 十分な反応性を持つことも分かった (図 2)。さらに, 405 nm 光照射により, 鍵酵素β-Gal を発現する哺乳動物培養細胞内選択的に, cAMP の濃度上昇を誘起出来ることも実証した (図 3)。臓器のモデルとしてショウジョウバエの単離脳を選び, cAMP の蛍光インジケータ-Epac1-camps をキノコ体に発現したハエの単離脳で, フォルスコリン添加後の cAMP 濃度上昇を観察できることも確認した。培養細胞を用いる概念実証実験の結果を踏まえて, 単離臓器やモデル生物個体で検証するフェーズに入ったと考えている。

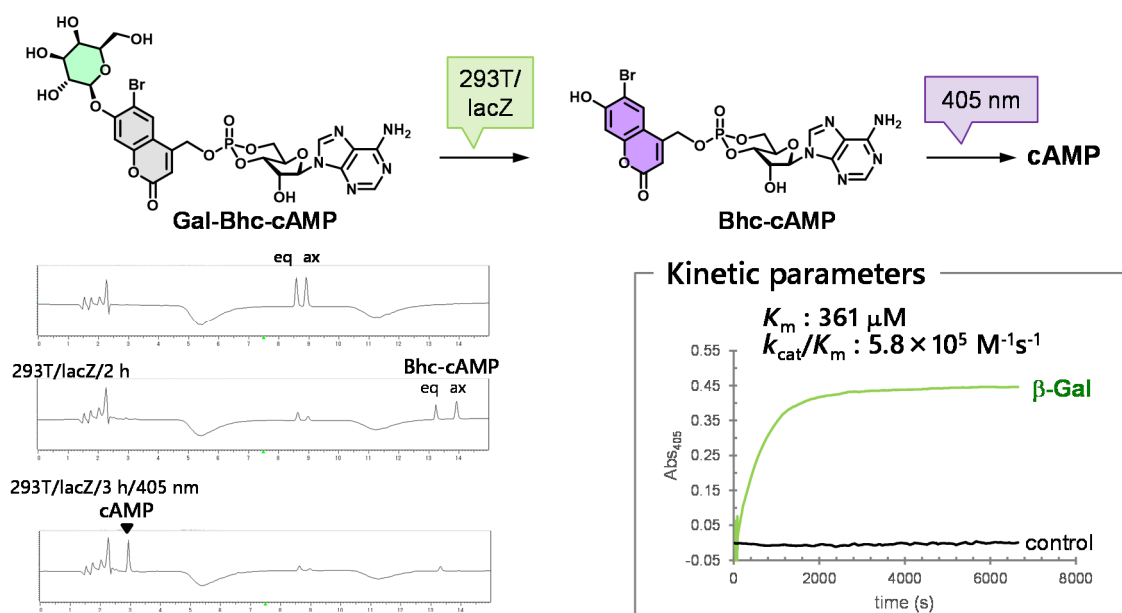


図 2 遺伝子指向性ケージド cAMP と鍵酵素β-ガラクトシダーゼとの反応

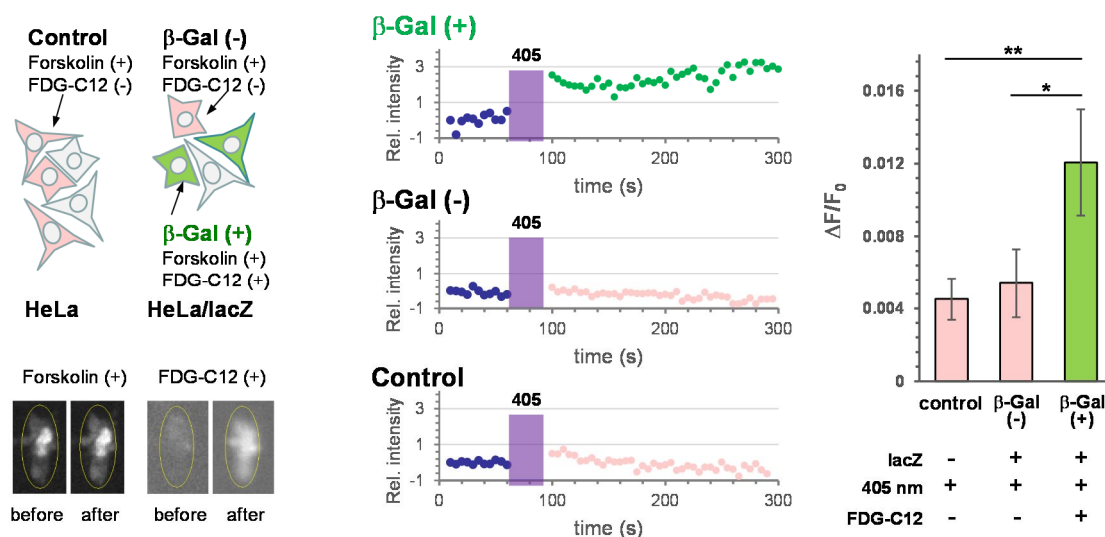


図 3 遺伝子指向性ケージド化合物を用いた鍵酵素β-Gal 発現哺乳動物細胞選択的な cAMP 濃度の光制御

続いて、p54 及び MAPK のアクチベーター、タンパク質合成阻害、アポトーシス誘導等の機能を有するアニソマイシンを用いて、遺伝子指向性ケージド化合物への変換を試みた。その結果、鍵酵素であるβ-ガラクトシダーゼ (β-Gal) 存在下でのみ 405 nm 光で光活性化が期待される遺伝子指向性ケージドアニソマイシン (1) の開発に成功した。生理的緩衝溶液中、405 nm 光照射によってアニソマイシンが生成しないこと、大腸菌由来 β-Gal 存在下で 405 nm 光感受性のケージドアニソマイシン (2) に変換されること、 $K_m = 730 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}}/K_m = 4.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ で、十分な反応性を持つことも明らかにした。

β-Gal によって化学ロックが外れた 2 は 405 nm 光でアニソマイシンを生成すること、その時の光反応の量子収率は 0.14 であることも分かった。

合成した遺伝子指向性ケージドアニソマイシンのうち、細胞膜透過性を付与した誘導体を細胞に導入後、405 nm 光を照射すると、鍵酵素を発現する哺乳動物細胞選択的にアポトーシスを誘導できることも明らかにした (図 4)。さらに、複数の Lock-and Key ペアを用いてケージドアニソマイシンを合成できることも見出した。

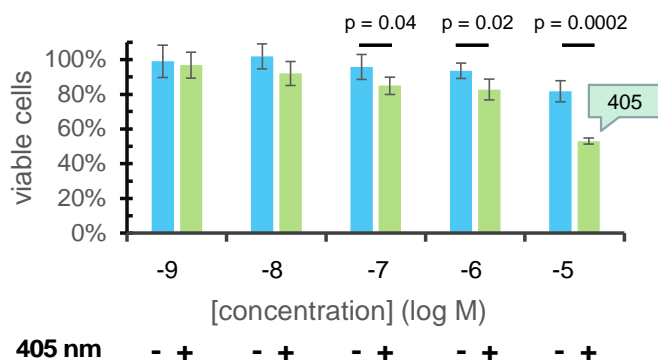


図 4 lacZ 発現 HEK293 細胞の生存率

表示した濃度の遺伝子指向性ケージドアニソマイシン投与後 405 nm 光照射後に生存率を測定。青：光照射無し，緑：405 nm 光照射

(2) ターゲティング可能なケージド薬剤の開発と光薬理学への展開を目的にした。薬剤として、ニューキノロン系抗菌薬を選択して、細菌種選択性を付与可能な多機能性ケージド化合物を設計・合成した。病原性細菌 12 種を用いて、合成したケージド抗菌薬の性能を評価したところ、ケージドの状態では抗菌活性が有意に抑制されていること、光照射で 6 倍 (2 の 6 乗倍) 以上抗菌活性が上昇することを確認した。さらに、クリック反応でビオチンなどの機能性部位を導入することも明らかにした。

(3) 遺伝子指向性ケージド化合物のコンセプトをエピジェネティクス制御分子等の機能性分子に適用した化合物の合成も完了したので、哺乳動物培養細胞を用いてコンセプトの実証を試みた。豚肝臓エステラーゼ (PLE) を鍵酵素にした、エピジェネティクス関連酵素であるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤の遺伝子指向性ケージド化合物 CM-Bhc-SAHA は、PLE 存在下で Bhc-SAHA に変換されること ($K_m = 3.2 \text{ mM}$, $k_{\text{cat}}/K_m = 2.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)、生成した Bhc-SAHA は 405 nm 光照射で SAHA を生成することを明らかにした (量子収率 0.12)。HDAC の阻害活性は、SAHA の IC_{50} 39.6 nM に対して Bhc-SAHA ($\text{IC}_{50} = 16 \mu\text{M}$) も遺伝子指向性 CM-Bhc-SAHA ($\text{IC}_{50} > 73 \mu\text{M}$) も 1000 分の 1 以下に抑制されていることを確認した。さらに、哺乳動物培養細胞を用いて、PLE を発現する標的細胞選択的にヒストン脱アセチル化酵素活性を 405 nm 光照射で抑制できることを明らかにして、遺伝子指向性ケージド化合物に標的細胞選択性を付与できること、生物学的に意味のある生理機能を標的細胞内で光制御できることを実証した (図 5)。

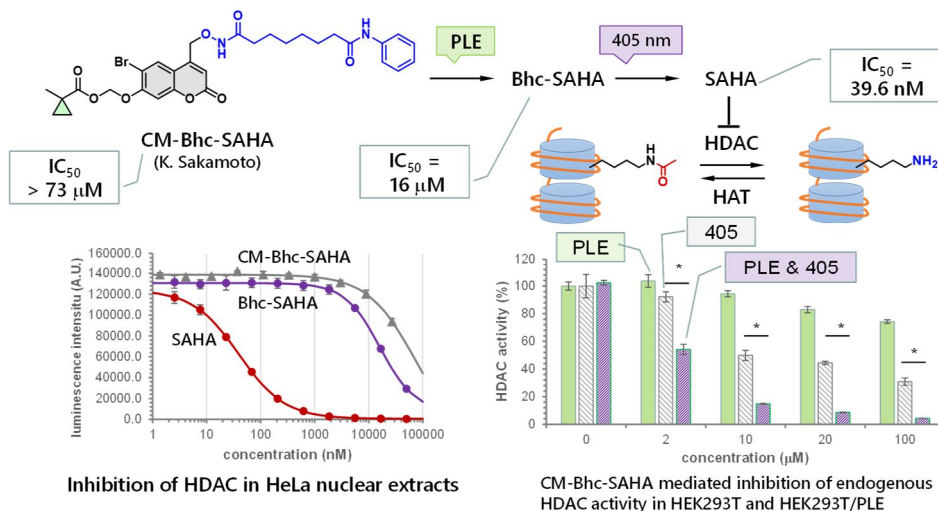


図 5 遺伝子指向性ケージド HDAC 阻害剤による標的細胞選択的光制御

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 A. Z. Suzuki, T. Sakano, H. Sasaki, R. Watahiki, M. Sone, K. Horikawa, T. Furuta	4. 巻 57
2. 論文標題 Design and synthesis of gene-directed caged cyclic nucleotides exhibiting cell type selectivity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chem. Commun.	6. 最初と最後の頁 5630-5633
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d1cc01405f	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 T. Yoshii, C. Oki, R. Watahiki, A. Nakamura, K. Tahara, K. Kuwata, T. Furuta, S. Tsukiji	4. 巻 16
2. 論文標題 Chemo-optogenetic Protein Translocation System Using a Photoactivatable Self-Localizing Ligand	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acs Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1557-1565
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acscchembio.1c00416	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 古田寿昭	4. 巻 142
2. 論文標題 遺伝子指向性ケージド化合物の開発と光薬理学への展開	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 495-502
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/yakushi.21-00203-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 古田寿昭	4. 巻 53
2. 論文標題 遺伝子指向性ケージド化合物の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 68-71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 K Sakamoto, A. Hirano, R. Hidaka, A. Z. Suzuki, T. Ueno, T. Furuta	4. 巻 58
2. 論文標題 Elucidation of the working principle of a gene-directed caged HDAC inhibitor with cell-type selectivity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chem. Commun.	6. 最初と最後の頁 10484-10487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2cc03552a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Toshiaki Furuta
2. 発表標題 Design and synthesis of gene-directed caged compounds
3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (Pacifichem 2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古田寿昭
2. 発表標題 遺伝子指向性ケージド化合物の設計と合成
3. 学会等名 第69回日本感染症学会東日本学術集会・第67回日本化学療法学会東日本支部総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木 紘那, 古田寿昭
2. 発表標題 標的細胞選択的に光活性化可能なケージド化合物の開発
3. 学会等名 第10回CSJ化学フェスタ2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木 紘那, 古田寿昭
2. 発表標題 標的細胞選択性を付与した遺伝子指向性ケージドアニソマイシンの設計と合成
3. 学会等名 2020年Web光化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古田寿昭
2. 発表標題 細胞種選択的にはたらく遺伝子指向性ケージド化合物の開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第16回年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関