

## 論文の内容の要旨

# ケイジド化合物の解除光長波長化と 蛋白質複合体化に関する研究

梅田 暢大

### 序論

現代の生命科学研究において、生物を「見る」ための計測・分析技術と、生物を「操る」ための摂動技術は、ともに欠かすことのできない実験技術の両輪である。解除光照射によってその活性を回復させることができるケイジド化合物は、摂動の非侵襲的な時空間制御を可能にする数少ない技術の一つであり、これまでも時間と空間を観測軸に持つ細胞内イベントの解明に利用されてきた。

### 第1章

#### BODIPY 誘導体の光反応に基づいたケイジド化合物の解除光長波長化とその生体応用

【研究の背景】従来の一光子励起による光分解性保護基（ケイジ基）はその分解（アンケイジ）に 350 nm 程度の紫外光を必要とするため、解除光の細胞傷害性や組織透過性の低さが問題となるほか、紫外域に対応した光学系が実験系に必須になるなど実用上の観点からも不便が多い。長波長可視光でのアンケイジを可能にする二光子励起法も、特殊な光学系を必要とするため簡便性に欠け、励起範囲の拡張性も乏しい。私は、蛍光団として知られる BODIPY (Boron dipyrromethene) の新規光反応に基づき、長波長可視光により一光子アンケイジ可能なケイジド化合物の開発研究を行なった。

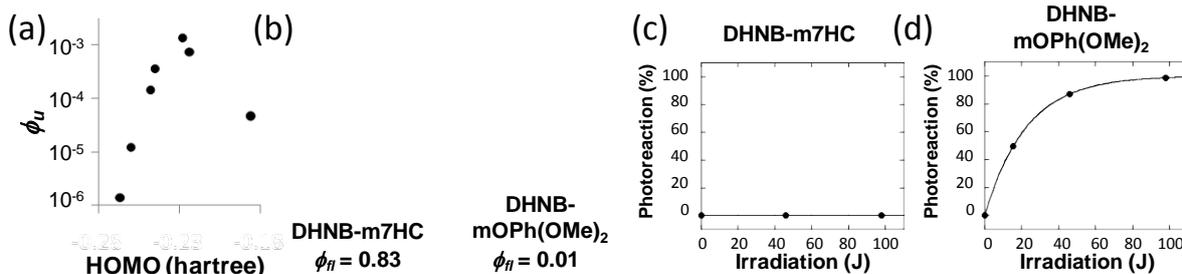
【研究の内容】私が本学修士課程において見出した、4 位に Phenol 類を導入した BODIPY 誘導体の可視光照射依存的な Phenol 誘導体の脱離反応 (**Scheme 1**) において、光反応量子収率の最適化、および光反応機構の解明を目的とし、4-phenoxy BODIPY 誘導体を合成、4 位に導入した Phenol 誘導体の HOMO エネルギーレベル（以下 HOMO レベル）とその分光学的および光化学的性質との関係を精査した (**Table 1**)。その結果、BODIPY の蛍光量子収率  $\phi_f$  に関しては、HOMO レベル-0.24 hartree 付近を境界として蛍光の消光が観測される (**Table 1**)、消光機構として 4 位 phenyl 基から BODIPY への光誘起電子移動 (PeT) が働

**Scheme 1.** Reaction scheme of light-induced phenol release from 4-phenoxy BODIPY derivatives.

**Table 1.** HOMO energy level of the incorporated phenol derivatives and spectroscopic and photochemical properties of 4-phenoxy BODIPY derivatives.

ROH	HOMO*	$\lambda_{abs}$ **/nm	$\phi_u$ **	$\phi_f$ **
3-NMe <sub>2</sub> PhOH	-0.186	503	<0.001	4.6 x 10 <sup>-5</sup>
3,4-(OMe) <sub>2</sub> PhOH	-0.224	503	0.001	7.1 x 10 <sup>-4</sup>
4-OMe PhOH	-0.228	502	0.002	1.3 x 10 <sup>-3</sup>
7-Hydroxycoumarin	-0.245	501	0.31	3.5 x 10 <sup>-4</sup>
4-COOMe PhOH	-0.248	502	0.57	1.4 x 10 <sup>-4</sup>
4-CN PhOH	-0.260	502	0.58	1.2 x 10 <sup>-5</sup>
4-NO <sub>2</sub> PhOH	-0.267	502	0.56	1.4 x 10 <sup>-6</sup>

\*calculated with Gaussian98W, unit: hartree \*\*Measured in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

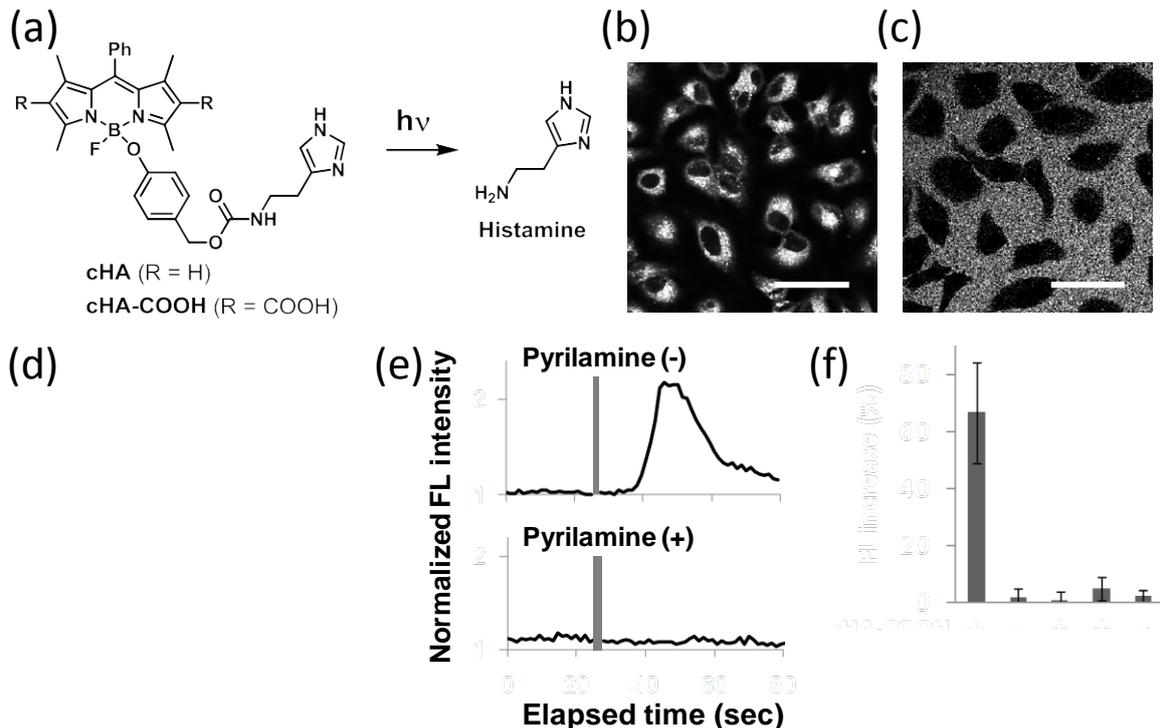


**Figure 1.** (a) HOMO energy level and uncaging quantum efficiencies of 4-phenoxy BODIPY derivatives. (b) Chemical structure and fluorescence quantum yields of DHNB-m7HC and DHNB-mOPh(OMe)<sub>2</sub>. (c-d) Photoreaction time course of DHNB-m7HC (c) and DHNB-mOPh(OMe)<sub>2</sub> (d) upon irradiation of 620 nm light.

いていることが示唆された。一方光反応量子収率 $\phi_u$ に関しては、PeTによる消光機構が働いていないと考えられる誘導体は低い反応量子収率を示したが、PeTにより消光していると考えられる誘導体の多くは高い反応量子収率を示すことが明らかになり(**Figure 1 a**)、4-phenoxy BODIPY 誘導体の光反応には、4位 phenyl 基から BODIPY への PeT が必要であることが示唆された。

この仮説を別の角度から検証するため、BODIPY の $\pi$ 共役系を拡張した長波長型誘導体である DHNB (Dihydronaphtho-BODIPY) を基本骨格とし、Phenol 類を導入した誘導体を合成(**Figure 1 b**)、その分光学的および光化学的性質を精査した。その結果、7-Hydroxycoumarin を導入した DHNB-m7HC は DHNB と同等の高い蛍光性を有し、光反応量子収率も低かった一方で、3,4-dimethoxyphenol を導入した DHNB-mOPh(OMe)<sub>2</sub> は PeT による蛍光の消光が観測され、光反応の進行が確認された(**Figure 1 c, d**)。即ち、DHNB を骨格とした誘導体においても、PeT による蛍光の消光機構が働いている誘導体が高い反応量子収率を有していることが明らかになり、Phenol 誘導体の光脱離反応に、Phenol 誘導体から BODIPY への PeT が必要であることをより強く示唆する結果となった。また、修飾した phenyl 基の HOMO レベルを調整することで、DHNB を 600 nm 以上の長波長領域の光を解除光とするケイジ基として利用可能であることが明らかになった。

次に、BODIPY ケイジド化合物の生体応用可能性を示すため、BODIPY の光反応に基づき、500 nm の可視光でアンケイジ可能なケイジドヒスタミン **cHA** を開発し(**Figure 2 a**)、HeLa 細胞への適用を試みた。Histamine (HA)は HeLa 細胞膜上の H1 受容体を介して小胞体からの Ca<sup>2+</sup>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。**cHA** はキュベット中で解除光照射依存的に HA を放出することが確認されたが、HeLa 細胞において **cHA** 存在下で光照射を行なっても一過性の Ca<sup>2+</sup>上昇は観測されなかった。



**Figure 2.** (a) Reaction scheme of histamine release from **cHA** and **cHA-COOH**. (b-c) Confocal fluorescence images of **cHA** (b) and **cHA-COOH** (c) in HeLa epithelial cells. (d) Time course of **cHA-COOH** and histamine in aqueous solution upon irradiation of visible light. Irradiation intensity: 21 mW/cm<sup>2</sup>. (e) Time course of normalized fluorescence intensity of Ca<sup>2+</sup> indicator Rhod2 in HeLa cells upon irradiation (gray bar) of 470-495 nm light in the presence of 1 μM **cHA-COOH** with/without 1 μM pyrilamine. (f) Fluorescence increase in HeLa cells upon irradiation of uncaging light under various conditions. Error bar: Standard deviation; Scale bar: 50 μm.

BODIPY に由来する **cHA** の蛍光によりその分布を観察したところ、**cHA** はその高い脂溶性のために HeLa 細胞に取り込まれ、膜構造に集積していることが分かった(**Figure 2 b**)。このことから、光照射時に **cHA** が細胞内に集積しており、細胞外液に HA が十分放出されなかったために細胞応答が得られなかったと考えられた。そこで、BODIPY の 2,6 位にカルボキシ基を導入したケイジドヒスタミン **cHA-COOH** を開発(**Figure 2 a**)、HeLa 細胞外液に添加してその分布を蛍光観察し、細胞外液に一樣に分布していること(**Figure 2 c**)、キュベット中で HA を光照射依存的に放出することを確認した(**Figure 2 d**)。 **cHA-COOH** 細胞外液存在下に可視光照射を行なったところ、光照射依存的な一過性の Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が観測され、この応答は H1 阻害剤 pyrilamine によって選択的に阻害された (**Figure 2 e**)。 **cHA-COOH** 非存在下での光照射は細胞応答を引き起こさなかったことから、細胞外液に一樣に分布した **cHA-COOH** から放出された HA が H1 受容体を介して細胞応答を誘起したと考えられる(**Figure 2 f**)。以上の結果から、構造修飾によるケイジド化合物の適切な分布制御を行なうことで、BODIPY をケイジ基としたケイジド化合物は長波長一光子励起可能なケイジド化合物として生体試料にも応用可能であることが示された。

## 第2章

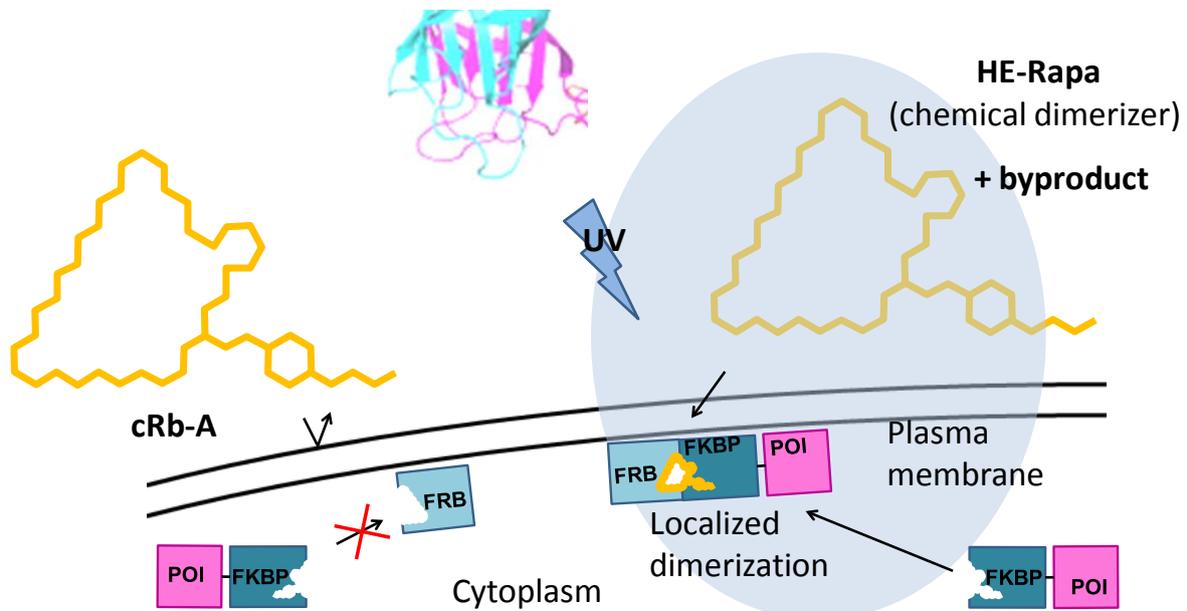
### ケイジド Rapamycin の蛋白質複合体化による small GTPase の局所的活性化

【研究の背景】細胞内における Rho ファミリー-small GTPase (以下 Rho GTPase)のダイナミックかつ精細な活性制御は、細胞遊走、貪食、細胞接着、分泌といった多様な細胞運動に密接に関わっている。細胞遊走における細胞内シグナルの流れは、近年の蛋白質可視

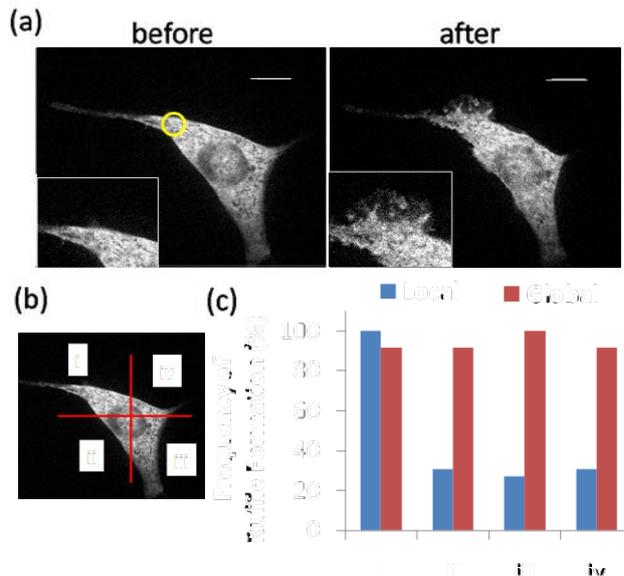
化技術によって明らかになってきているが、Rho GTPase の振る舞いに関してさらに深い知見を得るためには、これまでの可視化技術に加えて、これら Rho GTPase の活性を Subcellular レベルで制御する技術が必要である。Johns Hopkins 大学の Inoue らは、Rapamycin 誘導体(Rapalog) による FKBP-FRB ヘテロ二量化を利用して、Rapalog 依存的な Rho GTPase 活性化を誘導する実験系を開発した。この系を利用して、Rapalog の局所的な投与を可能にするケージド Rapamycin を開発すれば、Rho GTPase の時空間制御が可能になると考えられる。

【研究の内容】 Rapamycin のケージド化合物はこれまで数例の報告例があるが、いずれも光照射前のバックグラウンド活性を十分に抑制できておらず、Subcellular レベルでの局所的ヘテロ二量化は達成されていない。私は、光開裂性のリンカーで Rapamycin と蛋白質を結合した Rapamycin 蛋白質複合体を設計することで、Rapamycin のバックグラウンド活性を十分に抑えたケージド Rapamycin が開発可能であると考えた。すなわち、蛋白質と複合体化し細胞外に滞留させることで、細胞質内でのヘテロ二量化誘導活性をほぼ完全に失わせ、光照射によりリンカーが切断されると、膜透過性の Rapalog が光照射部位でのみ放出され、局所的なヘテロ二量化を誘導すると考えられる(**Figure 3**)。蛋白質-小分子の結合ペアとしては Avidin-Biotin ペアを、リンカーの光開裂部位としては、4,5-Dimethoxy  $\alpha$ -methyl nitrobenzyl 基を採用し、Rapamycin **cRb** を合成、PBS 中過剰量の Avidin と混合しサイズ濾過カラムで精製することで **cRb-Avidin** 複合体 **cRb-A** を得た。

まず、YFP-FKBP 融合蛋白質(YF)と細胞膜上に発現する FRB (LDR)を発現させた HeLa 細胞に対して **cRb-A** を添加し、UV 照射を行なった。Rapalog による FKBP-FRB 二量化は YF の細胞膜移行を誘導する。細胞全体に対し **cRb-A** 存在下 UV 照射を行なった結果、照射直後から YF の細胞膜移行が観察された一方で、UV 照射なしの場合は YF の細胞膜移行は観測されず、**cRb-A** は Rapamycin のバックグラウンド活性を十分に抑えたケージド



**Figure 3.** Schematic of spatially confined protein dimerization using caged rapamycin-avidin conjugate (cRb-A) and UV light. UV irradiation cleaves the linker between rapamycin and biotin, resulting in the release of chemical dimerizer (HE-Rapa) and its by-product. The released dimerizer then diffuses into cells and induces dimerization between FKBP-POI (protein of interest) and plasma membrane anchored FRB only in the proximity of the irradiated region (shown as a blue circle).



**Figure 4.** Spatially confined ruffle formation in a transfected NIH3T3 cell induced by localized UV irradiation with **cRb-A** conjugate. (a) Confocal fluorescence images of YF-Tiam1 before and after local UV irradiation at 365 nm (yellow circle). (b-c) Frequency of ruffle formation in each quadrant with local or global UV irradiation in the presence of **cRb-A**. Cells were divided into quadrants with the irradiated spot in the area i (b) and ruffle formation was counted in each quadrant (c). Scale bar: 10  $\mu$ m.

Rapalog として機能することがわかった。

次に、開発した **cRb-A** を用いて Subcellular レベルでの Rho GTPase 活性化を試みた。NIH3T3 細胞に、Rac 活性化因子である Tiam1 と YF の融合蛋白質、YFP-FKBP-Tiam1 (YF-Tiam1) と LDR を発現させた形質転換細胞において、Rapalog は細胞辺縁部におけるラフリングの形成を誘導する。**cRb-A** 存在下局所的な UV 照射を行なった結果、UV 照射直後から照射部位近傍の細胞辺縁部に限局したラフリング形成が確認された (**Figure 4 a**)。細胞を 4 象限 i-iv に分割し、各象限でのラフリング形成の頻度を定量化した結果、局所 UV 照射を行なった i 象限では全ての細胞でラフリングの形成が認められたのに対して、その他の象限ではほとんどの細胞でラフリング形成は観察されなかった (**Figure 4 b**,  $p < 0.0002$ )。一方で細胞全域に対する UV 照射は細胞辺縁部全体でのラフリングを誘導した (**Figure 4 b**)。この結果から、**cRb-A** と UV 照射によって Rac の Subcellular レベルでの局所的活性化が可能であることが示された。

### 総括

本研究で、私はケイジド化合物に関して 2 つの研究を行なった。BODIPY をケイジ基として用いた長波長一光子励起ケイジド化合物の開発研究では、BODIPY ケイジドヒスタミンを開発、HeLa 細胞に応用し、BODIPY ケイジド化合物が 500 nm 以上の可視光で一光子アンケイジ可能かつ生体応用可能なケイジ基として利用できることを示した。また、DHNB が 600 nm というより長波長の光照射でアンケイジ可能なケイジ基として利用可能であることも示した。開発した BODIPY ケイジド化合物は、500 nm 以上の可視光で一光子励起可能な初めてのケイジド化合物であり、解除光の組織透過性の高さや照射領域の広域拡張性を活かし、動物個体や組織レベルでの小分子光制御法としての発展が期待される。第 2 章における、ケイジド化合物の蛋白質複合体化戦略に基づいた細胞内シグナル制御研究では、Rapamycin のケイジド化合物を、Biotin を介して Avidin と複合体化させることでバックグラウンドの二量化活性を抑制し、Subcellular レベルでの Rac の細胞局所的活性化に成功した。本手法は Rac 以外のシグナル蛋白質へも容易に拡張可能であると考えられ、細胞遊走などの細胞運動におけるシグナル伝達機構のより詳細な解明に寄与することが期待される。