

生体分子のパスウェイ・ネットワークの光制御法の確立

●古田 寿昭^{1),2)} ◆渡辺 直子¹⁾

1) 東邦大学理学部生物分子科学科 2) 東邦大学複合物性研究センター

<研究の目的と進め方>

細胞内および細胞間情報伝達のパスウェイおよびネットワークを任意のタイミングでしかも任意の場所でかく乱する手法を確立し、細胞機能への影響を解析する新手法を提供することを目的とする。具体的には、我々のグループで蓄積してきたケージド化合物の化学を活用して、様々な情報伝達のパスウェイ・ネットワークを光制御する方法を確立し、さらにこの手法を用いて細胞死、細胞運動、および細胞の分化等に関与する因子の時空間動態を人為的に制御して解析することを目指して、次の2項目を進める。

(1) ケージド化合物を用いた光制御法を要素技術として確立すること、(2) 光照射による局所刺激を細胞機能と結び付けて解析する実験系を構築すること。ケージド化合物とは、生理活性分子に光分解性の保護基を付けて、その活性を一時的に失わせたものの総称である。この状態で細胞内に負荷しておく、光をあてた瞬間にあてた場所だけに、元の生理活性分子の濃度ジャンプをおこすことができる。照射光量で、機能発現の程度を調節することも原理的には可能である。平成18年度までの研究で、神経伝達物質、セカンドメッセンジャー、mRNA、ペプチド等のケージド化合物を合成し、生きた細胞や組織で使えることを明らかにした。引き続きこれらの手法の最適化をはかり、要素技術として確立する。例えば、均一な細胞集団の中の1細胞のみに摂動を引き起こす手法への展開が考えられる。光制御する分子の範囲を拡げて、細胞内情報伝達のパスウェイ解析研究を支援する技術へと展開していく。

<2007年度の研究の当初計画>

ケージド化合物とは、生理活性分子に光分解性の保護基を付けて、その活性を一時的に失わせたものの総称である。この状態で細胞内に負荷しておく、光をあてた瞬間にあてた場所だけに、元の生理活性分子の濃度ジャンプをおこすことができる。これをRNAiと組み合わせることができれば、任意の遺伝子の機能阻害の時期と場所を、光照射の時期と場所で制御することが可能になる。さらに、照射光量で、機能阻害の程度を調節することも原理的には可能である。ケージド化合物を用いた光制御法を要素技術として確立することを目指し、以下の項目の実現を図る。

1. ケージド化合物を用いた光制御を可能にする要素技術の確立

・ケージド siRNA 法の最適化： これまでの研究で、光によって外すことの出来る光応答性の dsRNA クロスリンカーを開発することに成功した。このクロスリンカーと反応した siRNA (EGFP をターゲットにする) は、HeLa 細胞における RNAi 誘導能が著しく低下していた。一方、光照射した細胞では RNAi 誘導能が回復することも確認した。さらに、内在性の遺伝子として Lamin B1 を選び、その発現を光照射で制御することも確かめた。今年度も引き続きこの方法の最適化をはかるため、クロスリンカーの長さ、構造、および光応答性部位を系統的に変えた誘導体を合成し、RNAi を光制御するのに最適な分子構造を明らかにし、要

素技術として確立することを目指す。

・dsRNA 発現プラスミドのケージング： siRNA を直接化学修飾する方法に加えて、dsRNA 発現プラスミドを修飾して dsRNA への転写を光で制御することを目指す。準備状況にも記した新規ケージング試剤である Bhc-diazo、または、dsRNA クロスリンカーを用いて、GFP やルシフェラーゼを発現するプラスミド DNA のケージング条件を最適化し、哺乳類の培養細胞でその発現を光調節する方法を確立する。

・ケージドペプチド核酸の合成： 以上2つのアプローチに加えて、ペプチド核酸（以下 PNA）のケージド化合物を用いて遺伝子の機能発現を光制御する可能性も検討する。PNA のケージド化合物を合成することができれば、遺伝子の転写のオン、オフを光で制御できることになる。合成したケージド PNA の安定性、光物理学的特性、および光反応性を詳細に検討する。紫外光照射で元の PNA が定量的に生成すること、その時の量子収率、2光子励起における光反応性も明らかにする。

2. 光照射による局所刺激を細胞機能と結び付けて解析する実験系の構築

プロテインキナーゼ C (PKC) の機能制御をモデルに選び、細胞内シグナリングの局所活性化と生理機能の相関を解析する実験系を構築する。まず、PKC のサブタイプ特異的な活性化剤および阻害剤のケージド化合物として、各種脂質性シグナリング分子、セカンドメッセンジャー、ペプチド性阻害剤のケージド化合物を合成する。合成したケージド化合物を哺乳動物培養細胞に導入し、細胞局所の光照射によって局所の PKC 活性を制御可能か検討する。

<2007年度の成果>

1. ケージド化合物を用いた光制御を可能にする要素技術の確立

(1) ケージドプラスミドを用いた遺伝子の機能発現の光誘導
遺伝子の発現を時空間的に制御する手法は生命現象を理解する上で非常に有用である。遺伝子発現関連分子を光分解性保護基によって機能的にマスキング (caging) し、光照射によって回復 (uncaging) する技術によって高い時空間分解能で実現できると期待される。Caging 試薬である Bhc-diazo は DNA のリン酸と反応して、Bhc 基により修飾された caged DNA を形成する。caged DNA は UV 照射による Bhc 基の切断によって初めて転写の鋳型となると予想される。しかし caged DNA を用いた光による発現制御は再現性に乏しく、このことは in vitro において DNA の caging の程度を示す有効な指標がないことに一因がある。そこで、DNA の caging の指標を得ること、および caged pDNA を用いて哺乳類培養細胞において遺伝子発現を光制御することを目指した。caged pDNA は pDNA を Bhc-diazo 溶液と混和し遮光条件下で反応させることで得た。通常 DNA は熱に対して安定であり 94℃ で加熱しても電気泳動パターンにはほとんど影響が見られな

いが、caged pDNA では加熱により泳動バンドが消失しスミアになることから、高温により断片化すると考えられる。それに対し UV 照射による uncaged DNA では加熱後もバンドが観察された。そこでこの熱不安定性を caging の指標として条件設定を行い、再現性よくプラスミド DNA を合成する条件を確立することができた。得られた caged pDNA を用いて、*in vitro* および *in vivo* における遺伝子発現の光誘導を試みた。*in vitro* の系はウサギ網状赤血球由来の転写・翻訳系を使用し、*in vivo* の系は HeLa 細胞にトランスフェクションレポーター遺伝子の一過発現を観察した。レポーターが GFP の場合には蛍光強度に、ルシフェラーゼの場合には発光量に基づき、遺伝子発現に対する caging の効果を定量的に調べた。その結果、*in vitro* の系でも、HeLa 細胞内においても、UV 照射により用いたレポーター遺伝子の発現を数倍以上増大させることに成功した。また caged DNA の熱不安定性が caging の指標として有効であることも示された。

(2) 光誘導型アンチジーンおよびアンチセンス試薬としてのケージドペプチド核酸の合成と光反応性

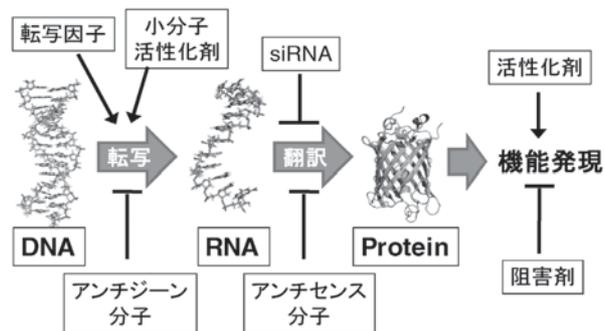
オリゴヌクレオチドやその誘導体は、相補的な DNA または RNA と塩基対を形成して、配列特異的にターゲットを認識する。これを光制御するために、核酸塩基間の水素結合の形成能をケージングする方法を計画した。まず、ヌクレオシドの核酸塩基に 4 種類の光分解性保護基を導入し、もっとも光反応性の高いものを選び出した。その結果、我々のグループで開発した Bmcmoc 基および Bmcmoc 基の光反応性が 1 光子励起、2 光子励起のいずれの場合も、最も優れていることを見出した。このうち、より汎用性の高い Bmcmoc 基をペプチド核酸の核酸塩基に導入して、相補鎖形成によって配列特異的に引き起こされる PNA の機能を光制御することを目的にした。

ケージドアンチセンス分子として、シトシン塩基に Bmcmoc 基を導入したケージド PNA モノマー (C^{Bmcmoc}) を 1 つ組み込んだ Caged 10-mer PNA (cAS10, H₂N-TAGCBmcmocTGTTTC-Gly-CO₂H) および C^{Bmcmoc} を 2 つ導入した Caged 12-mer PNA (cAS12, H₂N-C^{Bmcmoc}ATAGC^{Bmcmoc}TGTTTC-Gly-CO₂H) を固相合成した。さらに、ケージドアンチジーン試薬として、dsDNA と triplex を形成する配列を持つ Caged 16-mer PNA (cAG16, H₂N-TTCTCTTC^{Bmcmoc}CTTCTCTT-Gly-CO₂H) を合成した。合成した Caged PNA に 350 nm の光を照射して光反応性を検討したところ、量子収率 (Φ) は 0.17、光反応効率 (εΦ) は 1090 で、いずれも高い光反応効率を維持していることがわかった。また、光照射で元の PNA を放出することを確認した。導入した Bmcmoc 基が相補鎖形成に与える影響を、T_m 値の測定と PCR 反応の競合阻害で調べた。その結果、1 個の Bmcmoc 基の導入でも相補鎖形成を阻害できること、および、光照射で相補鎖形成能が回復することを確認した。

2. ペプチド性生理活性分子のケージド化合物の合成

光照射で機能制御可能なケージドペプチドを合成する方法が確立できると、その有用性は高い。細胞の局所刺激を可能にするツールの開発を目指して、ε PKC のサブタイプ特異的な阻害ペプチドのケージド化合物 EAVSLK(Bmcmoc)PT、および、細胞接着阻害ペプチドのケージド化合物 RGD(Bhc)S を合成した。合成したケージドペプチドは、紫外光照射によって元のペプチドを放出することを確認した。またその時の、1 光子および 2 光子励起条件下での光反応効率を定量した。あわせて、いくつかのアミノ酸および蛍光性機能分子のケージド化合物の 2 光子励起効率を定量し

比較したところ、いずれの化合物も生きた細胞での使用が可能なるほどの uncaging cross-section を持つことがわかった。



<国内外での成果の位置づけ>

我々のグループで開発したケージド化合物は、他のグループのものに比べて、光化学的な性質が優れている。プラスミド、ペプチド核酸、およびペプチド等のケージド化合物はいずれも、共通の合成法を経由しながら、例えば塩基配列やアミノ酸配列を選ぶだけで、機能の活性化と抑制をそれぞれ光制御可能であると期待される。このようなコンセプトは他にないものである。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

ケージドプラスミド DNA によって、遺伝子の機能発現を光誘導することに関しては、再現性のいい実験系を確立することができた。*in vitro* の系の再現性を確認するのに時間がかかってしまい、これを dsRNA 発現プラスミドに適用するまでには至らなかった。また、ケージド PNA を細胞内に高い効率で導入する分子修飾も達成できなかった。合成したケージドペプチド類を用いて、PKC のトランスロケーション活性、および、細胞接着を光制御する実験系の構築を試みているが、まだ実現するに至っていない。

<今後の課題>

- ・ dsRNA 発現プラスミドのケージングによる光誘導型機能抑制の実現
- ・ ケージド PNA を用いるアンチセンス効果および転写誘導の光制御の実現。
- ・ 細胞内シグナル伝達分子の阻害剤と活性化剤のケージド化合物を用いた生理機能の光制御の実現

<成果公表リスト>

1) 論文
 1 0801300915
 T. Furuta, S. Tanabe, T. Watanabe, J. Sakyo, C. Matsuba, Phototriggers for Nucleobases with Improved Photochemical Properties *Org. Lett.* 9, 4717-4720 (2007)
 2 0801300927
 C. Orang, A. Specht, D. Puliti, E. Sakr, T. Furuta, B. Winsor, M. Goeldner, Synthesis and Photochemical Properties of a Light-activated Fluorophore to label His-tagged Proteins, *Chem. Commun. in press.*