

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12748

研究課題名(和文)次世代チオクロモン型ケージド化合物の創成と新規細胞セレクション法の開発

研究課題名(英文)Creation of Novel Thiochromone-Caged Compounds and their Application to Developing New Cell Sorters

研究代表者

垣内 喜代三(Kakiuchi, Kiyomi)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・教授

研究者番号：60152592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、代表者らが開発した、光照射時に蛍光を発する化合物に変換される光分解性保護基(TCM)を様々な生理活性分子に導入した、新規ケージド化合物の創成と、その光アンケーシング挙動の調査を目的とした。アンチセンスオリゴ核酸のヌクレオシド核酸塩基部位、ルシフェリン阻害性レスベラトロールの水酸基、さらに、シクロデキストリンのグルコース部位それぞれに光分解性保護基TCMを導入した新規ケージド化合物を合成した。それぞれ光照射下でアンケーシングされ、元の生理活性機能が回復することが確認され、TCMが生理活性分子のケーシングに有効であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We aimed to synthesize and functionalize novel caged compounds, to which the thiochromone-type photolabile protecting group (TCM) is introduced. This TCM can protect various alcohols, amines, and phosphoric acids, and can be converted to a highly fluorescent compound after the uncaging process. We synthesized thymidine, resveratrol, and beta-cyclodextrin caged compounds with our TCM. Photoirradiation, namely uncaging, of these TCM-caged thymidine, resveratrol, and beta-cyclodextrin led to the recovery of their original compounds, respectively. Recovered compounds showed their own biological activity. Totally, we could demonstrate that the TCM protecting group is effective for the creation of various types of caged compounds.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：生体分子 ケージド化合物 チオクロモン誘導体 アンチセンスオリゴ核酸 シクロデキストリン コレステロール

### 1. 研究開始当初の背景

生命現象の解明には、複数の生命分子が協調して働くネットワークを壊すことなく、動的秩序形成とその高次機能を理解する研究手法が必要不可欠であり、生命分子であるタンパク質やシグナル分子の機能を、本来働くべき時期と場所で制御することが望まれている。これを可能にする手法としてケージド化合物がある。ケージド化合物は、生命分子に光分解性化合物を導入して一時的に活性を失わせた化合物であり、照射によって生命分子を放出し、その分子が関与するより直接的かつ精密な時間・空間情報が得られるため、細胞内外での動的秩序形成や高次機能の解明の有用な手法となりうる。これまでのニトロベンジル系やクマリン系などの光分解性化合物では、光吸収性や光分解性にまだまだ大いに改良の余地がある。さらに、これらの光変換体に蛍光特性を付与する等のさらなる高機能化に関する研究は全く行われていなかった。

### 2. 研究の目的

我々は、新規な光分解性化合物の開発を行い、これまでにチオクロモン型化合物が優れた光分解能を有していることを見出し、この光分解性化合物は、照射でほぼ定量的に相当するアルコール、アミン、カルボン酸及びリン酸を放出する。さらに、光反応後にチオクロモンが極めて高い蛍光(量子収率=0.85)を示す化合物に変換されることから、蛍光モニタリングが可能となる。本研究では、この高い蛍光発光性を有する光分解性化合物を、上述のケージド化合物に応用することにより、蛍光特性を併せ持つこれまでにない新しいケージド化合物を創成することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究期間中は、以下の項目を検討した。

#### (1) 次世代ケージドアンチセンスオリゴ核酸の合成とアンケーシング

DNA構成要素であるヌクレオシドをターゲット分子に選択し、ヌクレオシド同士が相補的な水素結合を形成する際に重要となる核酸塩基部位にチオクロモン光分解性保護基(TCM)を連結させ、核酸分子による次世代ケージドアンチセンスオリゴ核酸の合成を目指した。さらにその照射によるアンケーシングを行い、生理活性の回復状況を検討した。

#### (2) ルシフェラーゼ阻害を指向した新規ケージドレスベラトロールの合成とアンケーシング

ルシフェラーゼ阻害剤として知られているレスベラトロールが持つ3つの水酸基をTCMでマスクした、1、2および3ケージド体の合成を目指した。さらにこれらのアンケーシングとルシフェラーゼ阻害活性の相関性について検討した。

#### (3) コレステロール引き抜き能を有するケージドシクロデキストリンの合成とアンケーシング

細胞膜の形態恒常性の維持に重要な役割を担うコレステロールを包接することが知られているβ-メチルシクロデキストリンの一つのグルコースユニットにだけTCMを導入した新規ケージドシクロデキストリンを合成し、コレステロール包接能を光で制御することを試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) 次世代ケージドアンチセンスオリゴ核酸の合成とアンケーシング

DNA構成要素であるチミジンに注目し、ケージドチミジンとすることによりヌクレオシド同士が相補的な水素結合によるワトソン-クリック塩基対を形成することを抑制するとともに、照射により保護基が外れることで元の塩基対形成が復元することを検討した。これまでのケージングではチオクロモン型保護基TCMをエステル結合を介して導入していたが、生体加水分解酵素の影響を低減すべく、本研究ではエーテル結合を介して導入した(図1)。

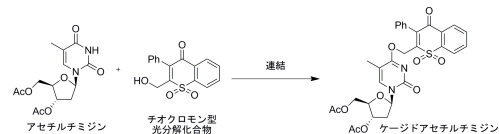


図1. ケージドチミジンの合成

続いて、このケージドチミジンへの照射による蛍光強度の変化を調査した。照射を継続するにつれて蛍光強度の増加が確認されたが、その蛍光発光体の化学構造はこれまでの化合物とは異なっていた。詳細な検討の結果、ケージドチミジンへの照射が蛍光性中間体を生成し、その中間体にさらに光を照射することにより、蛍光強度の減少を伴いながら元のチミジンが再生することが明らかとなった(図2)。つまり蛍光強度をモニターすることで脱保護プロセスを追跡可能な系が確立できた。

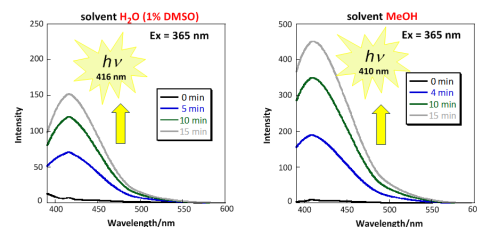


図2. ケージドチミジンへの照射下での蛍光強度変化

さらに、ケージドチミジンを含むケージドオリゴ核酸を合成し、これをルシフェラーゼ酵素のmRNAに対するアンチ

センス分子として利用したところ、ケージドアンチセンス分子では通常通りの mRNA 発現に伴うルシフェラーゼの発現が確認されたのに対し、光を照射することでアンチセンス分子としての機能が復元し、ルシフェラーゼの発現が抑制されていることが確認された。これと他の結果から、光照射をトリガーとする機能抑制を達成した。

しかしながら、その後の詳細な検討により、蛍光性を示す極めて複雑な中間体を経て本反応が進行し、アンケーシングの効率も低く、ケージドアンチセンス分子の合成効率が低いことから、研究の続行を断念した。

(2) ルシフェラーゼ阻害を指向した新規ケージドレスベラトロールの合成とアンケーシング

ルシフェラーゼ阻害剤として知られているレスベラトロールの三つの水酸基を TCM でマスクしたケージド体の詳細な検討を行い、2 もしくは 3 ケージド体を用いて、光照射によるアンケーシングを行った。その結果、2 ケージド体において、光照射時間と共に四環性化合物の蛍光発光 FL は増大し、これに相関してルシフェラーゼ阻害能(化学発光 CL)が増強していくことを見出した(図3)。しかし、これらケージドレスベラトロールの水溶性が低く、水溶液中でのアンケーシングの効率が非常に低いことが判明し、TCM に高水溶性を持たせる必要があることが今後の課題として残った。

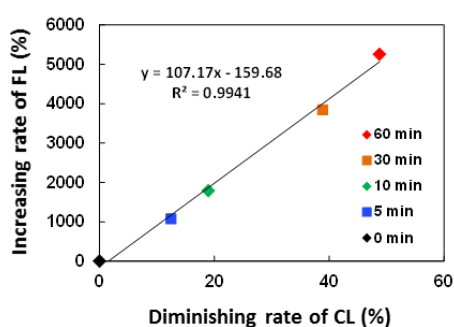


図3. 2 ケージド体のアンケーシング時の蛍光発光 FL とルシフェラーゼ阻害由来化学発光 CL の相関

(3) コレステロール引き抜き能を有するケージドシクロデキストリンの合成とアンケーシング

まず、細胞膜の恒常性の維持に重要な役割を担うコレステロールを包接可能なβ-メチルシクロデキストリン MβCD に対し、一つのグルコースユニットにだけ光解離性保護基を導入した新規ケージドシクロデキストリンを合成した(図4)。

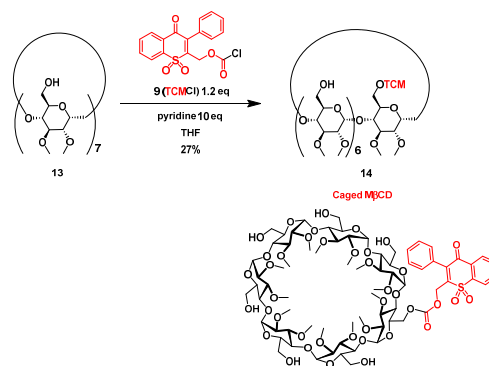


図4. ケージド MβCD の合成

続いて、コレステロール包接能を光で制御することを検討した。予想通り、光照射前ではコレステロールとケージドシクロデキストリンとの包接錯体は観測されなかったが光照射後には、包接錯体の形成が確認された。この結果より、光照射によってコレステロールの包接能を制御可能であることが明らかとなった。

さらに、リン脂質およびコレステロールから調製した擬似細胞膜リポソームを用いて、このケージド化合物のコレステロール引き抜き能を調査した結果、光照射前に、コレステロールおよび一部のリン脂質を取り込み、リポソームの破壊をもたらすことが分かった。続いて、光照射することにより、アンケーシングされ主としてコレステロールを包接し、リン脂質が放出され、リポソームの再形成を導く興味深い新現象を発見した。

5. 主な発表論文等

(原著論文)(計4件)

1. Shin Hikage, Yasuhiro Nishiyama, Yasuo Sasaki, Hiroki Tanimoto, Tsumoru Morimoto, Kiyomi Kakiuchi, "Quantitative Photodeprotection Assessment of Caged Resveratrol by Fluorescence Measurement," *ACS Omega* **2017**, 2, 2300-2307, 査読有, DOI: 10.1021/acsomega.7b00250
2. Chi Ma, Youlai Zhang, Huan Zhang, Junru Li, Yasuhiro Nishiyama, Hiroki Tanimoto, Tsumoru Morimoto, Kiyomi Kakiuchi, "Synthesis and Photochemistry of a New Photolabile Protecting Group for Propargylic Alcohols," *Synlett* **2017**, 28, 560-564, 査読有, DOI: 10.1055/s-0036-1588915
3. Youlai Zhang, Huan Zhang, Chi Ma, Junru Li, Yasuhiro Nishiyama, Hiroki Tanimoto, Tsumoru Morimoto, Kiyomi Kakiuchi, "Study of the Paternò-Büchi Type Photolabile Protecting Group and Application to Various Acids," *Tetrahedron Lett.* **2016** 57, 5179-5184, 査読有, <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.09.065>

4. Shin Hikage, Yasuo Sasaki, Terunobu Hisai, Hiroki Tanimoto, Tsumoru Morimoto, Yasuhiro Nishiyama, Kiyomi Kakiuchi, "Synthesis of novel caged antisense oligonucleotides with fluorescence property," *Photochem. Photobiol. A Chem.* **2016**, *331*, 175-183, 査読有, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.01.007>

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 前原渉平、高橋克洋、森本積、安原主馬、西山靖浩、垣内喜代三、「ケージドメチル-β-シクロデキストリンの合成と擬似生体膜への応用」、日本化学会第 98 春季年会、日本大学理工学部船橋キャンパス(千葉県・船橋市) 2018 年 3 月 21 日。
2. Shohei Maehara, Katsuhiko Takahashi, Tsumoru Morimoto, Kazuma Yasuhara, Yasuhiro Nishiyama, Kiyomi Kakiuchi, "Synthesis of Caged Methyl-β-Cyclodextrin and its Application to Simulated Biological Membrane," International Symposium on Caged Compounds (Hiroshima, Hiroshima), 2018 年 3 月 9 日。
3. Shin Hikage, Yasuhiro Nishiyama, Tsumoru Morimoto, Kiyomi Kakiuchi, "Quantitative Photodeprotection Assessment of Caged Resveratrol by Fluorescence Measurement," International Symposium on Caged Compounds (Hiroshima, Hiroshima), 2018 年 3 月 9 日。
4. 前原渉平、高橋克洋、西山靖浩、北又学、末次志郎、垣内喜代三、「ケージドシクロデキストリンの合成と擬似生体膜への応用」、2017 年光化学討論会、東北大学青葉山キャンパス(宮城県・仙台市) 2017 年 9 月 4 日。
5. 前原渉平、高橋克洋、西山靖浩、垣内喜代三、「ケージドシクロデキストリンを用いたコレステロール包摂能の光制御」、第 38 回光化学若手の会、休暇村志賀島(福岡県・福岡市) 2017 年 6 月 17 日。
6. 西山靖浩、日影薪、高橋克洋、前原渉平、垣内喜代三、「蛍光測定による新規ケージド化合物からの生理活性機能復元能評価」、日本化学会第 97 春季年会、慶應義塾大学日吉キャンパス(神奈川県・横浜市) 2017 年 3 月 17 日。
7. Yasuhiro Nishiyama, Shin Hikage, Katsuhiko Takahashi, Kiyomi Kakiuchi, "Monitoring of the Bioactivity Recovery with Fluorescence Emission Generated by Photoirradiation to Caged Compounds," 9th Asian and Oceanian Photochemistry Conference (APC 2016), Nanyang Technological University (Singapore, Nanyang), 2016 年 12 月 5 日。
8. Shin Hikage, Yasuhiro Nishiyama, Kiyomi Kakiuchi, "Development of The Second Generation of Thiochromone-type Photolabile Protecting Groups," The 10th International Symposium on Integrated Synthesis (ISONIS-10), Awaji Yumebutai International Conference Center (Hyogo, Awaji), 2016 年 11 月 18 日。
9. 高橋克洋、日影薪、西山靖浩、垣内喜代三、「ケージドシクロデキストリンを用いたコレステロール包摂能の光制御」、第 60 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、東京農業大学オホーツクキャンパス(北海道・網走市) 2016 年 10 月 29 日。
10. 日影薪、西山靖浩、垣内喜代三、"Monitoring of the bioactivity with fluorescence emission generated by photoirradiation of caged compounds," 2016 光化学討論会、東京大学駒場キャンパス(東京都・目黒区) 2016 年 9 月 6 日。
11. 日影薪、佐々木康夫、西山靖浩、垣内喜代三、「蛍光測定を利用した生理活性発現の定量評価」、第 37 回光化学若手の会、アイ・アイ・ランド(大阪府・四条畷市) 2016 年 6 月 18 日。
12. Shin Hikage, Yasuo Sasaki, Yasuhiro Nishiyama, Kiyomi Kakiuchi, "Control of an enzyme reaction using caged resveratrol having thiochromone-type photolabile protecting group," 26th IUPAC International Symposium on Photochemistry, Osaka City Central Public Hall (Osaka, Osaka), 2016 年 4 月 8 日。
13. 日影薪、佐々木康夫、西山靖浩、垣内喜代三、「チオクロモン型光解離性保護基を有する新規ケージドレスベラトロールの蛍光測定による脱保護評価」、日本化学会第 96 春季年会、同志社大学京田辺キャンパス(京都府・京田辺市) 2016 年 3 月 26 日。
14. Shin Hikage, Yasuo Sasaki, Yasuhiro Nishiyama, Kiyomi Kakiuchi, "Synthesis of Novel Caged Resveratrol with Thiochromone-type Photolabile Protecting Group," GIST/NAIST/NCTU Joint Symposium 2015, NCTU (Taiwan, Hsinchu.), 2015 年 11 月 20 日。
15. Yasuhiro Nishiyama, Yasuo Sasaki, Shin Hikage, Kiyomi Kakiuchi, "Synthesis and Evaluation of Novel Caged Nucleic Acids possessing Fluorescence Property," International Symposium Photonic and Electronic Molecular Machines, CEMES (France, Toulouse), 2015 年 10 月 6 日。
16. 日影薪、佐々木康夫、西山靖浩、垣内喜代三、"Synthesis and Photodeprotection of the Caged Resveratrol with Thiochromone-type Photolabile Protecting Group," 2015 光化学討論会、大阪市立大学杉本キャンパス(大阪府・大阪市) 2015 年 9 月 9 日。
17. 日影薪、佐々木康夫、西山靖浩、垣内喜代三、「蛍光発光特性を有する光解離性保

護基を導入したケージド核酸の合成」第  
35 回有機合成若手セミナー、京都府立大  
学下鴨キャンパス(京都府・京都市)、2015  
年 8 月 1 日。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://mswebs.naist.jp/LABs/kakiuchi/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

垣内 喜代三 (KAKIUCHI KIYOMI)

奈良先端科学技術大学院大学・

物質創成科学研究科・教授

研究者番号：60152592

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし