

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：12102  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22750143  
 研究課題名（和文） カルシウムシグナルを発生させる光機能性分子の創生  
 研究課題名（英文） Development of photofunctional molecules that generate calcium signals  
 研究代表者  
 百武 篤也 (MOMOTAKE ATSUYA)  
 筑波大学・数理物質系・講師  
 研究者番号：70375369

研究成果の概要（和文）：カルシウムシグナルを発生させる分子（ケージドカルシウム）の性能向上及び新たなメカニズムで機能する分子の開発を目指し研究を行った。カルシウムキレート剤 BAPTA 骨格を有するケージドカルシウムではカルシウム放出の反応は見られたが効率が著しく低かった。これは基底状態での電荷移動錯体の形成によるものと判明した。また、ケージドカルシウムに用いることができる一連の新規光分解性保護基を開発し、それらの高性能化に成功し高い分解量子収率（0.5 以上）を達成した。

研究成果の概要（英文）： In this research we aimed to improve photochemical efficiency of the molecules that are able to release calcium ion by photo excitation (caged calcium). The quantum yield for photolysis of new BAPTA-based caged calcium is found to low due to forming charge transfer complex in the ground state. On the other hands, we successfully developed novel photolabile protecting groups for caged calcium whose quantum yield of photolysis was more than 0.5.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：生体関連化学

キーワード：光分解・ケージド化合物・カルシウムシグナル・光誘起電子移動

### 1. 研究開始当初の背景

近年、細胞内のカルシウムイメージング技術は飛躍的に向上し、生命科学分野で広く用いられているが、その作用機序や局在の状態について不明な点が多かった。カルシウムイオンの動きをより詳細に理解するためには、イメージング技術と同時にカルシウム濃度を任意にコントロールするケージドカルシウムが有用である。ケージドカルシウムはケ-

ジング基、すなわち、光分解性保護基と、カルシウムイオンとの錯形成を起こすキレート骨格を足し合わせた分子で光励起によりカルシウムイオンが放出される。ケージドカルシウム分子は一部市販されているものもあるが、分子性能の点で改良の余地があった。

### 2. 研究の目的

まず以前に我々が開発したケージドカルシウム (NDBF-EGTA) を用い新たな生命現象

解明にむけた応用研究を行い、次にケージドカルシウムの改良および新規メカニズムで作用する分子の開発をおこなった。カルシウムイオンと錯形成するキレート骨格はほとんど改良の余地がないため、光分解性保護基の高性能化を重点的に行った。

### 3. 研究の方法

(1) 以前合成したケージドカルシウムを用いて、カエルおよびマウスの骨格筋収縮における基本的な過程を光で発現させる研究を共同で行った。

(2) 従来型のケージドカルシウムの改良  
ケージドカルシウムに用いられる光分解性保護基は 350–400nm 付近に吸収極大を持ち、且つ光分解量子収率の高いものが望ましい。一方市販のケージド化合物の問題点として、望ましい吸収波長と分解量子収率の両方を示すものがない。そこで、市販品 (NP-EGTA、Azid-1) と類似した構造を有し、吸収特性および光分解性に優れた改良品の合成を試みた。

#### (3) 新規光分解性保護基の開発

ケージドカルシウムあるいはケージド神経伝達物質に代表されるケージド化合物の性能を向上させるには、同時に新しい光分解性保護基の継続的な開発が必須である。ケージド化合物の光分解性保護基部位に用いることのできるクロモフォアは、未だ発見されていないものを含めると膨大な種類が存在すると考えられる。ここでは、ケージドカルシウムへの応用を見据え、これまでケージド化合物には用いられなかったクロモフォアを有する光分解性保護基の開発および性能評価を行った。

#### (4) 電子移動型光分解性保護基の開発

従来の光分解性保護基は光を吸収し、励起状態から分解反応を起こす過程を1つのクロモフォアが担っている。そのため、やや構造及び性能に制限を受けてしまう。この問題から脱却するため、光吸収と、活性物質放出反応の役割を2つの別の色素に持たせることを考え性能向上を目指し分子設計・合成および改良を行った。

### 4. 研究成果

(1) カエル及びマウスの骨格筋細胞外の膜近辺でケージドカルシウムを含む溶液に光照射を行うと、ケージドカルシウムからカルシウムイオンが放出され、その微量なカルシウムイオンが引き金となり、細胞内で大きなカルシウムシグナルが発生した。この現象はカルシウム誘発性カルシウム放出 (CICR) と呼ばれ、筋収縮メカニズムにおける基本的な素過程として知られているが、この結果はケージドカルシウムと光技術、イメージング技術を組み合わせることにより再現できた良い例である。またこの現象を人工的に再現できたことにより、両生類と哺乳類における

筋収縮メカニズムの違いに関する知見が得られた。

(2) 2種類の改良型のケージドカルシウムの合成を試みた。一つ目はカルシウムキレート剤として広く知られている EGTA に、本研究で開発した光分解量子収率が 0.2–0.3 と高い値を示す光分解性保護基、2,4-ジニトロ-5-メトキシベンジルを導入した新規ケージドカルシウムである。この化合物は光分解性保護基の性能は高いものの、電子吸引性が当初の予想より高く、従来のケージドカルシウムに用いられて来た有機合成反応の各段階に影響を及ぼすことから、合成ルートの変更が必要となり、最終化合物の単離には至らなかった。一方、二つ目のケージドカルシウムとして、R.Tsien が開発したカルシウムキレート剤 BAPTA と表記の新規光分解性保護基を連結させたケージドカルシウムの合成は比較的容易に達成できた。この化合物は光照射で保護基が外れ、カルシウムを放出する構造に変化するが、光分解量子収率が著しく低かった。これは光分解性保護基の電子吸引性が予想より著しく、電子供与性基を有するカルシウムキレート剤の BAPTA 部位と基底状態で電荷移動錯体を形成し、それが溶媒の水分子に安定化され、励起状態のエネルギーが低下し、光分解反応よりも熱的失活が優先的に起こるようになったためと考えられる。このことは、溶媒の極性を下げることで量子収率が増大したことからも裏付けられた。

以上のことから、市販のケージドカルシウムの性能を大きく上回る化合物の合成には至っていないが、そのための重要な知見が得られたことから、現在も改良型の合成を推進している。

#### (3) 新規光分解性保護基の開発

o-ニトロアニリンを基本骨格として、アニリン窒素にカルボキシメチレン基を導入し水溶性を向上させた新規光分解性保護基 (CNA 基) を開発した。また一連の置換基を導入した誘導体を合成し、その光物性への置換基効果について検討した。CNA 基はアニリン窒素と様々なカルボン酸との間でアミド結合を形成し暗所における安定性を高める一方、光励起によりアミド結合部位が開裂し、元のカルボン酸を放出する。本研究では酢酸を放出する一連の化合物を合成した。無置換の CNA 基では光吸収特性および分解効率は 0.02 程度と低かったが、吸収特性は電子供与基の導入により改善でき、更に分解効率については励起三重項経路により分解させることにより分解量子収率約 0.1 まで高めることができた。一方、吸収波長を長波長側に移動させることにより分解効率は低下することから、吸収特性と分解効率のバランスを取りながらより詳細な検討をして行く必要がある。

#### (4) 電子移動型光分解性保護基の開発

光誘起電子移動経路の光分解を起こさせるため、光吸収を行う色素を電子ドナー部位とし、電子アクセプター側で結合開裂を起こすような一連の分子を設計・合成し、構造-光活性相関について検討した。これら分子では、特に電子アクセプター側の構造を 4-アセトキシメチルピリジニウム塩に固定し、電子ドナー側に様々なクロモフォアを連結させた。カルバゾール、ピレン、アントラセンを連結させた化合物では分解反応による酢酸放出の効率はそれぞれ 0.001 以下と極めて低かった。これはドナーからアクセプター部位への光誘起電子移動反応はほぼ定量的に進むものの、その後の逆電子移動反応速度が目的の分解反応 (= 酢酸の放出) 速度より著しく大きいためだと考えた。そこで犠牲還元剤の添加により、逆電子移動反応の抑制を試みたところ、7-11 倍程度の量子収率の分解反応の向上が見られた。さらに励起三重項を経由させることにより逆電子移動反応を抑制するため、ドナー部位にベンゾフェノン、キサントンを導入した化合物を合成したところ、分解反応の量子収率の向上が確認された。さらにこの系に犠牲還元剤を用いたところ、分解量子収率が更に向上し、0.5 以上となった。この値は過去の全てのケージド化合物の中でも最も高い部類であり、現在、この系を応用したケージ度化合物の高性能化を推進している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

1. Suzuki, M.; Momotake, A.; Kanna, Y.; Nishimura, Y.; Hirota, K.; Morihashi, K.; Arai, T., Photochemistry of arylacetylenyl-substituted stilbenes. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry* **2013**, 252, 203-210. 査読有 DOI:10.1016/j.jphotochem.2012.11.019
2. Tasaki, S.; Momotake, A.; Kanna, Y.; Arai, T., Excited state intramolecular hydrogen atom transfer of phenylethynyl-substituted 2'-hydroxychalcones. *Research on Chemical Intermediates* **2013**, 39 (1), 61-72. DOI: 10.1007/s11164-012-0632-8 査読有
3. Miura, Y.; Momotake, A.; Kanna, Y.; Nishimura, Y.; Arai, T., Extremely efficient photoisomerization of water-soluble diphenylbutadiene dendrimers. *Dyes and Pigments* **2012**, 92 (2), 802-806. DOI:10.1016/j.dyepig.2011.05.002 査読有
4. Honda, T.; Momotake, A.; Arai, T., N-Acyl-N-carboxymethyl-2-nitroaniline and its analogues: a new class of water-soluble photolabile precursor of carboxylic acids. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, 11 (3), 493-496. DOI:10.1039/c2pp05322e 査読有
5. Kudo, K.; Momotake, A.; Tanaka, J. K.; Miwa, Y.; Arai, T., *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2012**, 11, 674-678, DOI: 10.1039/C2PP05337C, Paper 査読有
6. Tanaka, Y.; Momotake, A.; Arai, T., 2-(N-acyl-N-carboxymethylamino)-1-nitrobenzo[b,d]thiophene: a new class of caging group for environmental selective photorelease of carboxylic acid. *Chemistry Letters* 2012, 41 (6), 642-643. DOI:10.1246/cl.2012.642 査読有
7. Kimura, Y.; Momotake, A.; Takahashi, N.; Kasai, H.; Arai, T., Polarity-dependent photophysical properties of hemicyanine dyes and their application in 2-photon microscopy biological imaging. *Chemistry Letters* 2012, 41 (5), 528-530. DOI:10.1246/cl.2012.528 査読有
8. Ikeda, M.; Momotake, A.; Kanna, Y.; Shimotori, K.; Arai, T., Self-assembly of a poly(glutamate) dendrimer: solvent-dependent expression of molecular chirality and a [2 + 2] photocrosslinking reaction. *Photochemical & Photobiological Sciences* 2012, 11 (10), 1524-1527. DOI:10.1039/c2pp25221j 査読有
9. Miura, Y.; Momotake, A.; Takeuchi, K.; Arai, T., The use of dendrimers as high-performance shells for round-trip energy transfer: efficient trans-cis photoisomerization from an excited triplet state produced within a dendrimer shell. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2011**, 10 (1), 116-122. DOI:10.1039/c0pp00272k 査読有
10. Nishida, M.; Horiuchi, H.; Momotake, A.; Nishimura, Y.; Hiratsuka, H.; Arai, T., Singlet molecular oxygen generation by water-soluble phthalocyanine dendrimers with different aggregation behavior. *J. Porphyrins and Phthalocyanines* **2011**, 15 (1), 47-53. DOI:10.1142/S1088424611003008 査読有
11. Kudo, K.; Momotake, A.; Kanna, Y.; Nishimura, Y.; Arai, T., Development of a quinoxaline-based fluorescent probe for quantitative estimation of protein binding site polarity. *Chem. Commun.*, **2011**, 47 (13), 3867-3869. DOI:10.1039/c1cc10183h 査読有
12. Miura, Y.; Momotake, A.; Kanna, Y.; Nishimura, Y.; Arai, T., Energy Transfer and trans-cis Isomerization in Dendrimer Aggregates, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2011**, 84

- (4), 363-365. DOI:10.1246/bcsj20100318 査読有
13. Tabuchi, M.; Momotake, A.; Kanna, Y.; Nishimura, Y.; Arai, T., Extremely efficient and long lifetime fluorescence of cis-stilbene contained in a rigid dendrimer. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2011**, *10* (10), 1521-1523. DOI:10.1039/c1pp05126a 査読有
14. Akatsuka R.; Momotake, A.; Shinohara, Y.; Kanna, Y.; Sato, T.; Moriyama, M.; Takahashi, K.; Nishimura, Y.; Arai, T., Observation of Anthracene Excimer Fluorescence at Very Low Concentrations Utilizing Dendritic Structures, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **2011**, *223* (1), 1-5. DOI:10.1016/j.jphotochem.2011.07.008 査読有
15. Miura, Y.; Momotake, A.; Kanna, Y.; Nishimura, Y.; Arai, T., Unusually efficient trans-to-cis photoisomerization of diphenylbutadiene dendrimers in water, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2011**, *10* (10), 1524-1526. DOI:10.1039/c1pp05212h 査読有
16. Kanemoto, Y.; Matsuzaki, M.; Morita, S.; Hayama, T.; Noguchi, J. Senda, N.; Momotake, A.; Arai, T.; Kasai, H., Spatial distributions of GABA receptors and local inhibition of Ca<sup>2+</sup> transients studied with GABA uncaging in the dendrites of CA1 pyramidal neurons, *PLoS One* **2011**, *6* (7), e22652. 査読有 DOI:10.1371/journal.pone.0022652
17. Obi, N.; Momotake, A.; Kanemoto, Y.; Matsuzaki, M.; Kasai, H.; Arai, T., 1-Acyl-5-methoxy-8-nitro-1,2-dihydroquinoline: a biologically useful photolabile precursor of carboxylic acids. *Tetrahedron Lett.*, **2010**, *51* (13), 1642-1647. DOI:10.1016/j.tetlet.2009.12.081 査読有
18. Senda, N.; Momotake, A.; Arai, T., Fluorescence enhancement in 7-hydroxy quinoline analogs by methyl substitution and their spectroscopic characteristics in aqueous solution. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2010**, *83* (10), 1272-1274. 査読有 DOI:10.1246/bcsj.20100119
19. Senda, N.; Momotake, A.; Arai, T., Substituent effect of 7-hydroxy-1-methylquinolinium derivatives: a photochemical approach to development of new fluorescent pH indicator. *Heterocycles*, **2010**, *81* (10), 2343-2350. DOI:10.3987/COM-10-11996 査読有
20. Sugiyama, Y.; Shinohara, Y.; Momotake, A.; Takahashi, K.; Kanna, Y.; Nishimura, Y.; Arai, T., Photochemistry of Linear-Shaped Phenylacetylenyl- and (Phenylacetylenyl)phenylacetylenyl-Substituted Aromatic Enediynes. *J. Phys. Chem. A*, **2010**, *114* (41), 10929-10935. DOI:10.1021/jp1054827 査読有
- [学会発表] (計 10 件)
1. 森山晴加・百武篤也・新井達郎 光誘起電子移動経由でカルボン酸を放出するケージド化合物の研究 2012年9月13日光化学討論会 東京工業大学大岡山キャンパス
  2. 高橋洋平・百武篤也・新井達郎 ニトロベンゼン骨格を活用したケージド化合物合成への展開 2012年9月14日光化学討論会 東京工業大学大岡山キャンパス
  3. 福嶋瞬・百武篤也・新井達郎 ドナー・アクセプター型アゾベンゼンの光化学的挙動とイオンセンシングに関する研究 2012年9月14日光化学討論会 東京工業大学大岡山キャンパス
  4. 滝澤努・百武篤也・西村賢宣・新井達郎、エステル表面官能基を有するベンジルエーテル型スチルベン dendrimer の光化学的挙動と溶媒効果、2011年9月6日光化学討論会、宮崎市河畔コンベンションエリア、宮崎市
  5. 本田拓也・百武篤也・新井達郎、ニトロアニリン骨格を用いたケージド化合物の合成と置換基効果、2011年9月6日光化学討論会、宮崎市河畔コンベンションエリア、宮崎市
  6. 田中佑二・百武篤也・新井達郎、ニトロフルオレンまたはニトロジベンゾチオフェンを用いた新規ケージド化合物の合成とその光化学、2011年9月7日光化学討論会、宮崎市河畔コンベンションエリア、宮崎市
  7. 池田愛・百武篤也・新井達郎、ポリグルタミン酸 dendrimer の光化学的特性、2011年9月8日光化学討論会、宮崎市河畔コンベンションエリア、宮崎市
  8. 森山晴加・百武篤也・西村賢宣・新井達郎、光誘起電子移動反応を利用したケージドグルタミン酸の高性能化に関する研究、2011年9月8日光化学討論会、宮崎市河畔コンベンションエリア、宮崎市
  9. 高橋洋平・百武篤也・新井達郎、ニトロベンゼン骨格を有する新規ケージド化合物の合成と光化学的挙動、日本化学会第92春季年会、慶應義塾大学日吉キャンパス・矢上キャンパス、2012年3月26日
  10. 福嶋瞬・百武篤也・新井達郎、新規アゾベンゼン色素の光化学的特性とそれらを利用した細胞膜イメージングへの応

用に関する研究、日本化学会第 92 春季年会、慶應義塾大学日吉キャンパス・矢上キャンパス、2012 年 3 月 26 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

百武 篤也 (MOMOTAKE ATSUYA)

筑波大学・数理物質系・講師

研究者番号：70375369