

## Caged 化合物と Ca イオン濃度測定

飯野正光

(東京大学医学部薬理)

### I. はじめに

ケージド化合物は主として生理活性のある物質を化学修飾し、活性を隠蔽した状態にした化合物であり、この化学修飾を光照射によって解除して活性を復活させるようにしたものである<sup>1,7,9,11,12</sup>。ケージド化合物の種類にもよるが、通常光分解反応はミリ秒かそれ以下で完了する。従って、標本にケージド化合物を予め投与しておき、光照射を行うと急速に生理活性物質の濃度を上昇させることができる。このことから、生理活性物質の作用動態の解析にケージド化合物は有効な手段となる。さらに光照射の部位を限定すれば、局所的な投与も可能である。従来、急速に生理活性物質の濃度を人為的に変化させたいときは急速に溶液を交換するか、電荷をもった物質なら電気泳動的に局所に投与する方法に頼らざるを得なかった。しかし、ある程度サイズのある標本全体に投与したい時は拡散に要する時間が無視できず、数秒から数分の時間遅延がどうしても生じていた。ケージド化合物を用いれば比較的大きな標本でも、光透過性が十分あれば急速に濃度変化を生じさせることができる。

一方、単離細胞のように微小な標本を用いるときは、パフイングピペットを用いれば数ミリ秒程度あるいはそれ以下の時間で細胞周囲の溶液交換が可能であると言われている。このような場合、ケージド化合物を使うべきかどうかは目的を考慮して良く考えるべきであろう。ケージド化合物では、単に光を照射するだけなので、溶液交換に伴う液流による細胞の移動などはないという利点があるが、後述する光照射に伴うアーチファクトが生じる可能性もあり、ケージ

ド化合物の種類が限られていることと、現時点では濃度変化の方向は単一(通常、増加のみ)であるという短所もある。もし、細胞内でしかも急速に濃度変化を与えたいのなら、ケージド化合物の有用性は高い。さらに、光照射のスポットを小さくできれば、自由に細胞内で濃度変化を起こす位置を決めることさえ理論的には可能である。

### II. 原理

図 1 A は例としてケージド IP<sub>3</sub> の光分解反応を示したものである。ケージド IP<sub>3</sub> は、IP<sub>3</sub> の 4 位(ないし 5 位)のリン酸にニトロベンジル基を修飾したものである。\* このために IP<sub>3</sub> 受容体はこの物質を IP<sub>3</sub> と認識できない。紫外光(< 360 nm)の照射による光化学反応の結果、この修飾がはずれて、IP<sub>3</sub> とニトロソベンズアルデヒドと H<sup>+</sup> が生じる。この反応自体は数ミリ秒で完了するので、強いパルス状の光照射を行うと IP<sub>3</sub> 濃度を急速に上昇させることができる。多くの生理活性物質は、IP<sub>3</sub> と同様にリン酸基あるいはカルボキシル基を持っているので、同じストラテジーでケージド化合物を作ることができる。

同じくケージド化合物として扱われているが、ケージド Ca<sup>2+</sup> は Ca<sup>2+</sup> 自身を修飾するのではなく、Ca<sup>2+</sup> キレート試薬に修飾を導入することによって作られている。Nitro 5 や Nitro 7 などは、EGTA のアナログであり、光照射により Ca<sup>2+</sup> に対する結合定数が変化する<sup>4)</sup>。しかし、あまり大きな変化ではないので、光分解されたケージド Ca<sup>2+</sup> にも Ca<sup>2+</sup> は結合できる。

一方、DM-nitrophen<sup>8)</sup> と NP-caged EGTA<sup>2)</sup>

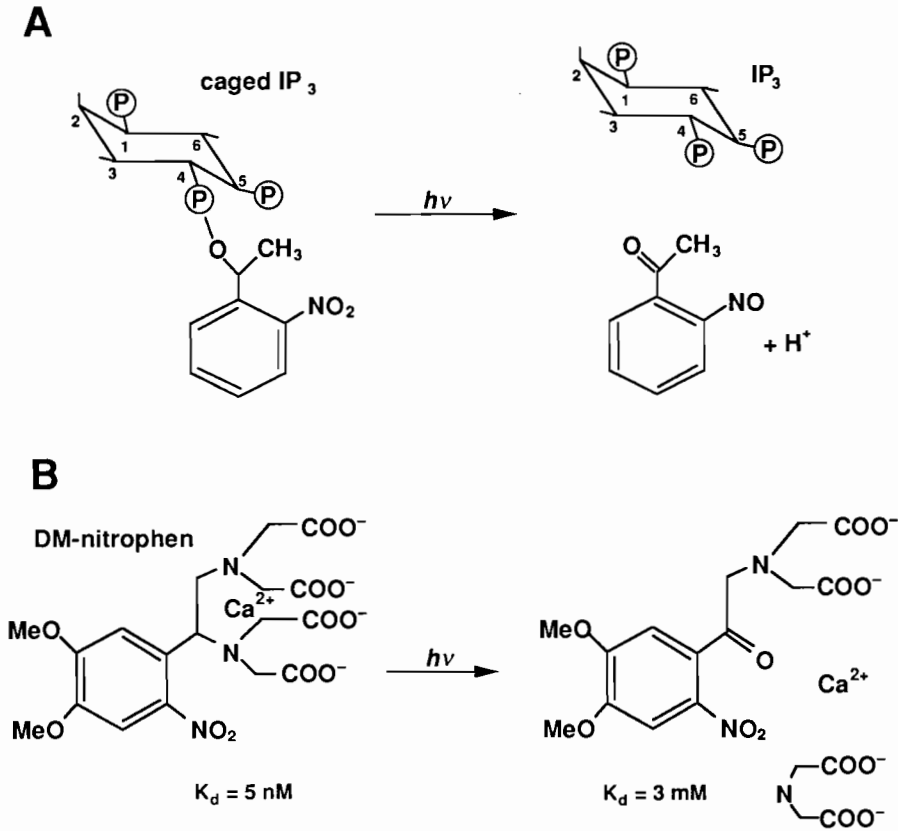


図1. ケージド IP<sub>3</sub>(A)と DM-nitrophen(B)の光分解反応

はそれぞれ EDTA と EGTA のアナログであり、光照射によって分子が二つに分かれ  $\text{Ca}^{2+}$  に対する親和性が著しく低下して  $\text{Ca}^{2+}$  を遊離する (図 1 B)。従って、 $\mu\text{M}$  付近の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度では、光分解されたケージド  $\text{Ca}^{2+}$  に  $\text{Ca}^{2+}$  が再結合することは事実上無視できる。しかし光照射によって100%光分解反応を起こすことは難しいので、ケージド  $\text{Ca}^{2+}$  が  $\text{Ca}^{2+}$  で飽和していない初期条件では、ケージド  $\text{Ca}^{2+}$  から遊離された  $\text{Ca}^{2+}$  が、未分解でかつ  $\text{Ca}^{2+}$  を結合していないケージド  $\text{Ca}^{2+}$  に再結合する可能性があることに留意する必要がある。DM-nitrophen は  $\text{Mg}^{2+}$  が存在する条件ではケージド  $\text{Mg}^{2+}$  としても機能するが、NP-caged EGTA は  $\text{Mg}^{2+}$  をほとんど結合しない。

1) 分解効率 1回の光照射によって分解されるケージド化合物の量は、光の強度、照射時間

と量子収率によって規定される。量子収率は、吸収された光子数に対して、実際に光化学反応が進行した分子数の比を表し、ケージド化合物では1より小さい。ケージド ATP では0.54と報告されている。したがって、効率良く短時間で光分解を行うためにはできるだけ強い光を照射することが必要となる。

2) 内部遮蔽効果 ケージド化合物は当然紫外部に吸収があるので、ケージド化合物を含む溶液中では光分解用の光が減衰する。光路が短ければほとんど問題にならないが、光分解用の照射光が高濃度のケージド化合物溶液を長い距離通過するときは、光路の前方部と後方で分解量が異なってしまふ。そのような実験系はできるだけ避けるのが賢明である。

### Ⅲ. 必要な実験器材

1) 機器・設備 基本的機器は紫外光の照射装置である。光源として、大きくレーザーとキセノンランプがある。大きな標本全体をレーザー光で照射するには強力なレーザーが必要であ

り、ルビーレーザーの周波数を2倍にして用いたり(347 nm), Nd:YAG レーザー(355 nm)が用いられている。一方、照射する標本が顕微鏡で観察するような小さなものであれば、照射光を顕微鏡の落射照明装置から導き対物レンズを用いて集光し、視野の一部分だけに照射するよ

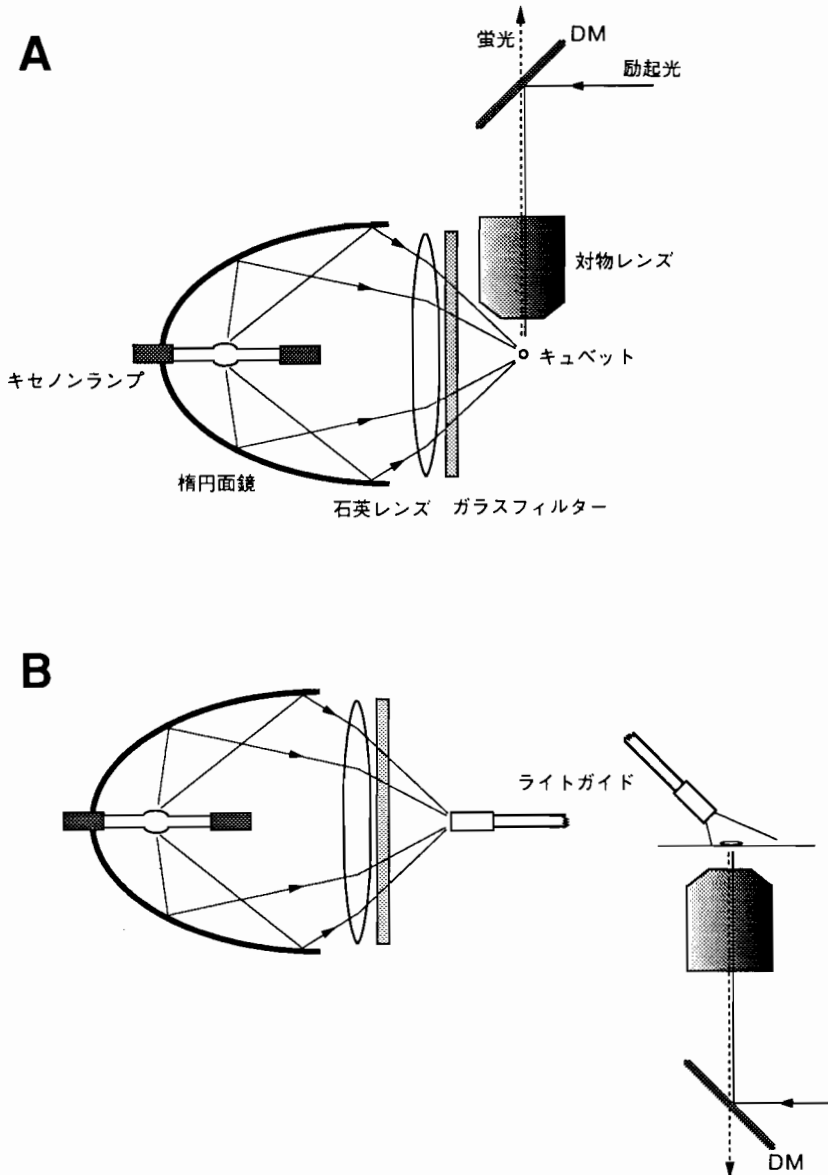


図2. キセノンフラッシュランプを用いた光分解と同時に蛍光測定を行う方法の例。A. フラッシュの焦点にキューベットを置く方法。B. ライトガイドを用いて離れた場所に光を照射する方法。フラッシュランプの代わりにレーザーを用いることも可能。DM: ダイクロイックミラー。

うにすれば、それほど強力なレーザーでなくとも局所的に強いエネルギーを得ることができる。波長 337 nm の窒素レーザーを我々は用いて概ね良好な結果を得ている。

キセノンフラッシュランプは、安価に強力な紫外光を得るのに有効である。堀内と船津によって開発され<sup>5)</sup>、現在国内で市販されている光源は、楕円面鏡と石英レンズを用いて集光し、ガラスフィルターによって 300~360 nm の紫外光を選んで照射することができる(図2)。フラッシュの時間は1ミリ秒程度であり、レーザーより  $10^5$  程度長いが、光分解効率の点ではそれだけ有利である。この光源を顕微鏡の落射蛍光装置に導いて対物レンズを介した光照射を行う装置もニコンとオリンパスから発売され

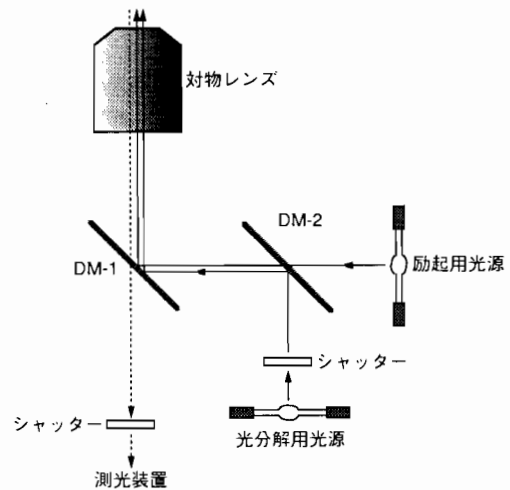


図3. 対物レンズに励起光と光分解光を導く方法の一例。

表1. 市販されているケージド化合物

細胞内メッセンジャー等		ケージドCa <sup>2+</sup>	
c-AMP*	M,D	Nitr 5 (AM)	D
c-GMP*	M,D	Nitr 7	D
IP <sub>3</sub>	C	DM-nitrophen	C
GPIP <sub>2</sub>	C	NP-caged EGTA (AM)	M
ATP	M,D		
ADP	M	ケージドCa <sup>2+</sup> キレート剤	
GTP	M,D	diazo-2 (AM)	M
GTP-γ-S	M		
GDP-β-S	M	アミノ酸	
Pi	M,D	lysine	M
		tyrosine	M
神経伝達物質等 (含む拮抗薬)		cysteine	M
carbachol	M	alanine	M
noradrenaline	M	isoleucine	M
phenylephrine	M	leucine	M
isoprenaline	M	methionine	M
propranolol	M	phenylalanine	M
serotonin	M	tryptophan	M
dopamine	M	valine	M
haloperidol	M		
GABA	M	その他	
aspartate	M,D	luciferin*	M
glutamate	M,D	penicillin	M
glycine	M,D	taxol	M
NMDA	M	fluorescein	M,D
MK-801	M	HPTS	M
arachidonic acid	M	rhodamine green	M
NO	M,D		

C: Calbiochem, D: Dotite, M: Molecular Probe. (AM)と表示のあるのは、アセトキシメチル体が存在する。\*は細胞膜を通過する。

ている。また、連続紫外光の照射時間をシャッターでコントロールして顕微鏡上で用いる装置もオリンパスから市販されている。

レーザーおよびキセノン(あるいは水銀)ランプいずれの場合も、光分解光と蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬の励起光を同時に対物レンズに導くためには、例えば図3に示すように落射蛍光装置の光路に変更を加える必要がある。

ケージド化合物の溶液を調製する部屋と実験室では、紫外光を避ける必要がある。太陽光が入らないように窓には暗幕ないしブラインドを設置するが、完全暗黒にする必要はない。室内の照明は紫外線をカットした黄色い色付きの蛍光灯管を用いる。

2) 試薬 表1にこれまでに市販されているケージド化合物のリストを示す。通常これらの試薬は細胞膜を通過しないので、細胞内に導入してその効果を見る必要がある。細胞内に注入するか、細胞膜を透過的にした標本を用いる必要がある。但し、表1でアスタリスクを付したケージド化合物は細胞膜を透過することが知られている。また(AM)と付したものは Fura-2 AM 等と同様に細胞内に負荷可能なアセトキシメチル体も市販されている。

#### IV. 実験法と注意点

1) 試薬の調製 ケージド化合物のストック液：蒸留水か場合によっては DMSO に溶解する。我々の研究室では、ケージド  $\text{IP}_3$  は蒸留水で 5 mM に調製している。ケージドノルアドレナリンは、DMSO を用いる必要があった。ケージド化合物は、現在まだかなり高価で微量しかバイアル中に入っていないことが多いので、十分注意して調製する。

ケージド化合物のストック液は、我々の経験ではアルミホイルなどで遮光して  $-20^\circ\text{C}$  で数ヶ月以上保存可能である(ATP,  $\text{IP}_3$ , DM-nitrophenなど)。しかし、個別に確認する必要がある。

2) 蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬の選択 光分解と蛍光測光を同時に行う際には、使用する色素の選択

にも注意を要する。Fura-2 や Indo-1 のような紫外光で励起する色素では、励起光で光分解が起きてしまう。十分に弱い光で励起できるなら別であるが<sup>10)</sup>、紫外励起の色素は避け長波長励起の色素を用いる方が安全であろう。これまでの、長波長励起色素(Fluo-3, Rhod-2)は、蛍光ないし励起スペクトルに  $\text{Ca}^{2+}$  結合による波長シフトがなく、蛍光強度比を用いる測定ができなかったが、最近、BTC の様に蛍光強度比の測定が可能な長波長励起色素も入手可能になってきた。

3) 迷光 ケージド化合物の光照射にはかなり強い光を用いるので、蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  測定を同時に行う上で注意が必要である。強い紫外光を照射するので、たとえ長波長励起の蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬を用いても、励起スペクトルの裾野にかかって蛍光が生じる可能性がある。また標本の自家蛍光も生じる。キセノンランプを用いた場合、フィルターで長波長をカットしても、そもそも非常に強い光なので、蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬の蛍光波長領域にもカットしきれない光が残存する可能性がある。このようなことから、測光装置に瞬間的に強い入力加わることが考えられ、光電子倍增管を用いているときはそれが一時的に不安定になる可能性がある。強い入力は CCD カメラでは問題にならないかも知れないが、残像が残る SIT カメラ等では問題となる可能性が高い。従って、場合に応じてフラッシュ中は、シャッターを閉じてセンサーに光が入らないようにする工夫が必要となるかも知れない。

4) 電気生理学的方法との併用 もし、パッチクランプなどによる電気生理学的測定も同時に考えるなら、電気的および機械的なアーチファクトにも注意をする必要が生じる<sup>3)</sup>。照射光が金属にあたると光電効果による光電流が生じる。従って銀塩化銀電極などに光が当たらないようにする工夫が必要となる。放電に伴う電気ノイズも生じる。また放電とともにランプハウスからボンという音が発生するが、これはキセノンランプがランプハウス内で動く音などと考えられ、これが機械的ノイズとして顕微鏡に伝

われは、電極と細胞のコンタクトが失われることも考えられる。何れにしても、キセノンランプはファラデーケージの外に出せばそのほうがよい。その場合には、紫外光をライトガイドで導くことが必要となる(図2B)。

5) 光分解のキャリブレーション すでに述べたように、光分解がどの程度起こるかは、そのケージド化合物の量子収率、光照射時間、使用する光源の強度、光源から試料までの光学系の集光能および損失率に依存するわけである。従って、各実験装置と用いるケージド化合物で光分解率をキャリブレーションする必要がある。先に述べたように内部遮蔽効果が生じることも考え、キャリブレーションには、実際の試料と同等の光学的条件が得られるように工夫しなければならない。

もし光照射と同時に蛍光強度測定ができる実験装置であれば、BCECFなどのpH指示薬を用いることができる。多くのケージド化合物は分解とともに量子論的に $H^+$ を放出するので、 $H^+$ の増加濃度を測定すれば分解量を推定できる。

ケージド $Ca^{2+}$ の場合は、 $Ca^{2+}$ 濃度の増加を $Ca^{2+}$ 指示薬で測れば良いわけであるが、実際にはかなり注意を要する。分解されたケージド $Ca^{2+}$ 、未分解のケージド $Ca^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 指示薬、(もしその他にも $Ca^{2+}$ バッファーが存在すればそれも)の間で $Ca^{2+}$ の取り合いが起こるため、一般的には分解量に正比例した蛍光強度の変化が見られるわけではない。また、ケージド化合物を高濃度(～1 mM以上)用いるときは、ケージド化合物の蛍光や吸収が蛍光 $Ca^{2+}$ 指示薬を用いた測定に影響を与える可能性に注意しなければならない。特に光分解の前後で蛍光や吸収が異なる時は、さらに注意を要する。我々の経験では、Fluo-3(～100  $\mu$ M)よりDM-nitrophenを低めの濃度で用い、初期遊離 $Ca^{2+}$ 濃度を100 nM程度(DM-nitrophenはほぼ $Ca^{2+}$ で飽和している)にして小さなキューベットで実験すれば、おおむね分解量に比例した蛍光強度の変化が見られるはずである<sup>6)</sup>。

光学的測定が行えない状況であれば、分解産物を直接測定することが必要となる。ATPなどは、クロマトグラフィーでケージドATPとATPのピークに分けることも可能である。一方、生じたATPをルシフェリン・ルシフェラーゼ反応を用いて定量することもできる。IP<sub>3</sub>の定量キットも市販されている。我々は、細いガラス毛細管中にケージドIP<sub>3</sub>を含んだ溶液を0.2  $\mu$ l程入れこれに光照射を行い、この液を少量の水に洗いだし、IP<sub>3</sub>濃度を測定してキャリブレーションを行った<sup>6)</sup>。なかなか測定しにくい物質の場合は、もしケージドATPと同じケージ基を持っているなら、同様の分解が起こるものと仮定してケージドATPで代用して推定することも行われている。

顕微鏡を用いて単一細胞のサイズの照射を行う場合のキャリブレーションはかなり難しい。溶液の一部分だけを光照射しても直ちに周囲の溶液とのミキシングが起きてしまう。従って光照射スポットと同サイズの溶液を用いる必要がある。オイル中にケージド化合物の水溶液の水玉を作り、これを照射する等の工夫が必要となる。しかし、照射スポットが小さいと水玉全体を照射できない。また、水玉を小さくするとオイルに水が吸収されて、水玉が消失したりするので、オイルを予め水で飽和させておく必要がある。

6) うまくいかなかったら ケージド化合物による反応が全く見られない理由として次のようなことが考えられる。まずケージド化合物が目的とする部位に到達しているかという問題がある。大きな組織を使う場合、あるいはパッチ電極から細胞内に導入する場合には特に注意を要する。たとえ、十分にケージド化合物が到達していても、照射光の強度が低くて分解が十分に行われないことも考えられる。光学系の検討が必要となる。さらに、ケージド化合物自身に競合拮抗薬としての作用がある可能性も否定できない。これは、純粋な化合物の作用をケージド化合物が抑制しないかなどの実験を行えばチェックできる。また意外な盲点として、ケ-

ジド化合物の濃度が高すぎる可能性もある。ケージド化合物の試料にわずかながら分解して活性を持った化合物が混入している恐れもあるし、ケージド化合物自身に弱いながらも作用がある可能性も考えられる。高濃度のケージド化合物を導入すると、それだけで反応が完全に起きてしまい、光分解した時にそれ以上の反応が観察できないということも考えられる。ケージド化合物として歴史の浅いものについては特にこのような点を注意して用いる必要がある。

照射光の影響として考えなければならないのは、強い紫外光による標本の損傷である。当然、照射回数にも依存するであろうが、標本の反応が紫外光照射によって変わらないことを確かめておく必要がある。また、同時に光学的測定を行う場合には、用いる色素の退色なども起こりえる。強力な光照射により温度変化が起こる可能性もある。とくに長波長の光が混入するのは防がなければならない。

光分解によって生じる副産物が試料に対して作用を及ぼすのを防ぐ目的で、通常 mM 以上の DTT を溶液に加えておくのが推奨されている。また、 $H^+$  が放出される場合には、それによって溶液の pH が大きく変化しないように十分な濃度の pH 緩衝剤を用いることが必要である。

## V. お わ り に

ケージド化合物を用いる方法は、それ自体が独立した実験法というより、種々の実験法の中に組み込んで用いる実験であるため、どのように組み込んでいくかという時点で、試行錯誤を繰り返す必要がある。従って、ケージド化合物の実験は、比較的やさしいこともあれば、なかなか困難な場合もある。その辺を覚悟してかかる必要がある。しかし、確立できれば強力な手段となる。

## 参 考 文 献

- 1) Adams, S.R. & Tsien, R. Y. (1993) Controlling cell chemistry with caged compounds. *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 755-784
- 2) Ellis-Davies, G. C. R. & Kaplan, J. H. (1994) Nitrophenyl-EGTA, a photolabile chelator that selectively binds  $Ca^{2+}$  with high affinity and releases it rapidly upon photolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 187-191.
- 3) Gurney, A. M. (1994) Flash photolysis of caged compounds. In: Ogden, D. *Microelectrode Techniques*, Chap 15, The Company of Biologists Ltd, Cambridge, 389-406
- 4) Gurney, A. M., Tsien, R. Y. & Lester, H. A. (1987) Activation of a potassium current by rapid photochemically generated step increases of intracellular calcium in rat sympathetic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3496-3500
- 5) Horiuti, K., Sakoda, T., Takei, M. & Yamada, K. (1992) Effects of ethylene glycol on the kinetics of contraction on flash photolysis of caged ATP in rat psoas muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **13**, 199-205
- 6) Iino, M. & Endo, M. (1992) Calcium-dependent immediate feedback control of inositol 1, 4, 5-trisphosphate-induced  $Ca^{2+}$  release. *Nature* **360**, 76-78
- 7) Kaplan, J. H. (1990) Photochemical manipulation of divalent cation levels. *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 897-914.
- 8) Kaplan, J. H. & Ellis-Davies, G. C. R. (1988) Photolabile chelators for the rapid photorelease of divalent cations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 6571-6575
- 9) Kaplan, J. H., Forbush, B. & Hoffman, J. F. (1978) Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analogue: Utilization by the Na:K pump of human red blood cell ghosts. *Biochemistry* **17**, 1929-1935.
- 10) Kirby, M. S., Hadley, R. W. & Lederer, W. J. (1994) Measurement of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration using indo-1 during simultaneous flash photolysis to release  $Ca^{2+}$  from DM-nitrophen. *Pflügers Arch.* **427**, 169-177
- 11) McCray, J. A. & Trentham, D. R. (1989) Properties and uses of photoreactive caged compounds. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **18**, 239-270.
- 12) Somlyo, A. P. & Somlyo, A. V. (1990) Flash photolysis studies of excitation-contraction coupling, regulation, and contraction in smooth muscle. *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 857-874.