

光であやつる細胞機能

古田 寿 昭

Controlling Cellular Chemistry with Photo-Caged Compounds

Toshiaki FURUTA

Components of intracellular signaling are proteins and soluble small signaling molecules. The distribution, propagation and specific interactions of the signaling molecules are important for cells to respond various stimuli. By utilizing the chemistry of caged compounds, the intracellular distribution of a signaling molecule can be controlled with high spatial and temporal resolution. Caged compounds are the artificial molecules whose biological activities are masked by the covalent attachment of a photochemically removable protecting group, and can induce a concentration jump of the molecule of interest with temporally and spatially regulated manner upon irradiation. Cell biological applications including, caged second messengers, caged proteins and caged ribonucleic acids are discussed.

Key words: caged compounds, photochemical regulation, fluorescence microscopy, signal transduction, gene function

複雑で高度に秩序化された細胞機能を制御するために、生体はさまざまな情報をやり取りしている。これらはいくつかの細胞内シグナル伝達系で制御されているが、より深く理解するためには、シグナリングに関与する分子が、いつ、どこで、どのように働くかを明らかにすることが必要である。しかし、従来の方法論だけでは、この素過程を生理的条件に近い時間および空間分解能で再現して解析することは困難であった。蛍光プローブによるリアルタイム可視化解析の進展は、このような解析を可能にする強力な方法論を提供しつつある。このような状況下で、シグナル伝達に関与する分子どうしの相互作用を、できるだけ生理的環境に近い条件で再現する手法の重要性はますます高まりつつある。筆者らの研究室では、ケージド化合物の化学を活用して、細胞内あるいは細胞間での情報のやり取りを、高い時間および空間分解能で操作する手法の開発を目的として研究を行っている¹⁻³⁾。ケージド化合物とは、光分解性の保護基で生理活性分子を保護し、一時的にその活性を失わせた分子のことである。光を照射することで、瞬時にも

との生理活性分子を出現させることができる。シグナル分子が機能発現する時期と場所を、光を照射する時期と場所ですべて制御することが可能になり、照射光量で発現する量を調節することも原理的には可能となるため、細胞機能の発現に関与する分子の時空間動態をリアルタイムで制御する強力な方法になりうる(図1)。本稿では、まず、筆者らのグループで開発した Bhc-ケージド cAMP の分子設計を簡単に述べて、ケージド化合物の開発の背景にある思想の一端を紹介する。続いて、ケージド化合物への光照射で実際に細胞機能を制御した例をいくつかあげて解説する。

1. ケージド化合物

1.1 分子設計

ケージド化合物と聞いて、おそらくほとんどの人が文字通りカゴ型の分子を思い浮かべるであろう。しかし、ここでいうケージド化合物とは、生理活性あるいは分子の機能をあたかもカゴ(cage)の中に閉じ込めた(caged)ように不活性化した分子のことを指している。機能を閉じ込める

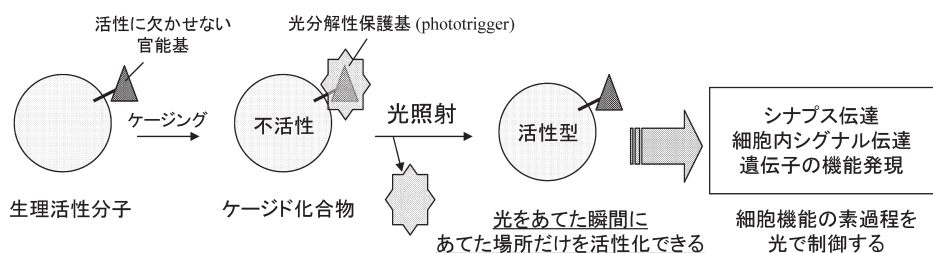


図1 ケージド化合物による細胞機能の光制御。

表1 ケージド化合物として用いることができる代表的な光分解性保護基。

構造式			
	2-ニトロベンジル型	ヒドロキシフェナシル型	クマリニルメチル型
X ^a	P, C, A, H, S	P, C	P, C, A, H, Ph, K
λ_{\max} (nm) ^b	260-345	280	370-390
ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹) ^c	~6000	14000	~19000
ϕ ^d	~0.8	~0.5	~0.3
k (s ⁻¹) ^e	~10 ⁵	~10 ⁸	~10 ⁹

^a 導入が報告されている官能基 (P:リン酸, C:カルボキシル基, A:アミノ基, H:ヒドロキシル基, Ph:フェノール, S:メルカプト基, K:ケトン), ^b 報告されている吸収極大波長, ^c モル吸光係数, ^d 光反応の量子収率, ^e 光反応の反応速度定数。

のに、その形は必ずしもカゴ型である必要はない。もちろん、このような分子設計が理想ともいえる。なぜなら、カゴ状の分子に任意の分子を封入し、しかもそのカゴは光で開くように設計することができれば、分子の大きさに合わせたカゴを何種類か用意するだけで、あらゆる分子をケージド化合物に変換することができるからである。しかし、このように都合のいいカゴ分子は現在のところ手に入らない。では、どうすればいいのか。機能の保護という観点から考えれば、有機合成で得意とするところの保護基の化学がそのまま使える。幸いなことに、光で外れる保護基がすでにいくつか報告されている。そこで、その分子の求める機能の発現に欠かせない官能基に光分解性保護基を導入することで、さまざまな分子をケージド化合物に変換できることになる。

ケージド化合物の合成に利用できる光分解性保護基としては、2-ニトロベンジル基およびその誘導体が知られていて、すでにいくつかのセカンドメッセンジャー、神経伝達物質、およびペプチドなどのケージド化合物合成に利用されている。しかし、光反応の効率が低い、ケージ解除の反応速度が遅い、ケージ解除後の副生成物に毒性がある、などの問題点も指摘されている。また、ケージド化合物として現在手に入れることができる分子の種類は非常に限られているため、誰でも簡単に自分の系に適用するまでには至

っていないのが現状である。そこで、2-ニトロベンジル基にかわりうる新しい光分解性保護基がいくつか開発されている。それらの中から、*o*-ヒドロキシフェナシル基とクマリニルメチル基の特性を表1にまとめた。

筆者らのグループでも、これまでに報告されているケージド化合物の問題点を解決するべく研究を進め、新しい光分解性保護基(ケージ)をいくつか開発してきた。なかでも、Bhc基(6-bromo-7-hydroxycoumarin-4-ylmethyl基)は、従来のものに比べてさまざまな点ですぐれていることが明らかとなってきた。ケージとしてのBhc基は、①紫外光によるケージ解除の効率が高い、②暗所での安定性が高い、③2光子励起を利用することで近赤外光によるケージ解除が可能である、④簡単な修飾を施すことでさまざまな方法で細胞内に導入することができる、などの特徴をもつ^{4,5)}。

次節では、筆者らのグループで開発したBhc-cAMPを例にして、ケージド化合物の設計思想について簡単に触れてみたい。

1.2 Bhc-cAMPの開発

cAMPには容易に修飾可能な官能基が3つある。環状リン酸部位、アデニン環の環外アミノ基、およびリボース環の2位ヒドロキシル基である。このうち、アミノ基あるいはヒドロキシル基を修飾してもcAMPとしての機能にはほとんど影響がない。それに対して、リン酸を保護してトリエステルにすれば活性は止まる。光分解性保護基として、Bhc基をリン酸に導入したのがBhc-cAMPである⁶⁾。Bhc基の構造上の特徴を簡単に記す。Bhc基の基本骨格であるクマリニルメチル基は、一種のアリールメチル基と考えることができる。6位のプロモ置換基は、三重項への項間交差を促進して光反応の量子収率を向上させるはたらきと(光反応に三重項が関与している)、7位ヒドロキシル基のpK_aを下げて中性条件下でイオン化させるはたらきを担っている(図2)。7位のヒドロキシル基のイオン化によって、Bhc基の吸収極大波長はおよそ375 nm、モル吸光係数は18000 M⁻¹ cm⁻¹程度となり、高い光反応効率を示す要因のひとつになっている。実際、Bhc-ケージド化合

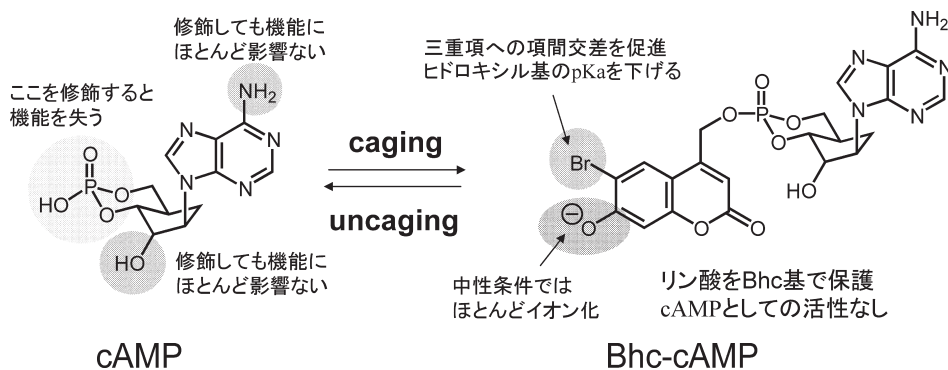


図2 cAMP のケージド化合物 (Bhc-cAMP) の分子設計。

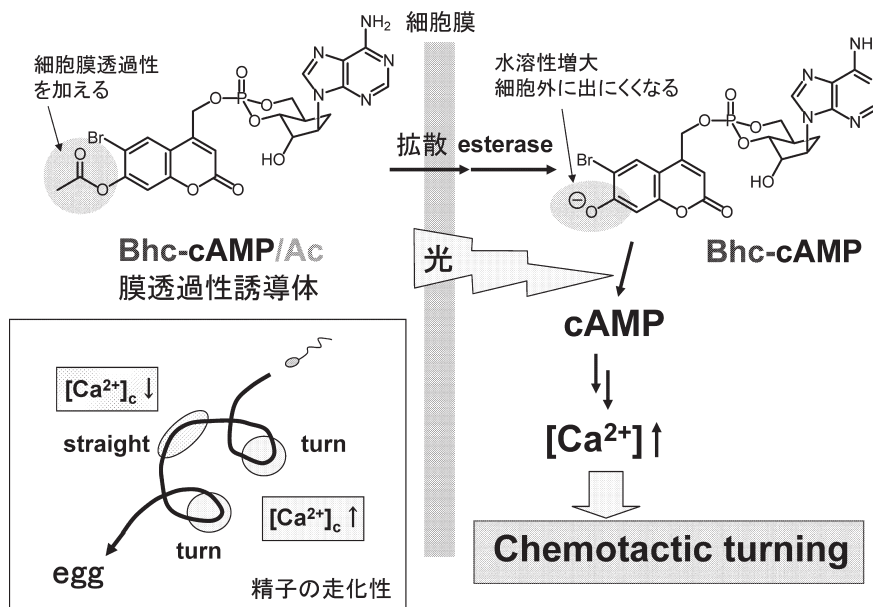


図3 膜透過性ケージド cAMP (Bhc-cAMP/Ac) を用いた精子の走化性の光制御。

物を使えば、対応する 2-ニトロベンジル型のケージド化合物に比べて 5 分の 1 から 10 分の 1 程度の照射光量で、同様の細胞応答を引き起こせることが確かめられている。

1.3 膜透過性ケージド cAMP : Bhc-cAMP/Ac

さらに、細胞内で使うためには、細胞への導入法を工夫する必要がある。cAMP を例にして考えてみよう。未修飾の cAMP は、環状リン酸部位がイオン化している影響が強いため、ほとんど膜透過性がない。アデニンの環外アミノ基にジアルキル基を導入したり、アデニン環に直接ブromo基を導入することで脂溶性を高めると、膜透過性の cAMP 誘導体とすることができる。また、リン酸イオンの負電荷を、例えばアセトキシメチルエステルにしてマスクすると、さらに膜透過性が向上する。これらはいずれも、単純な拡散によって膜を通過し細胞内に入ると考えられる。

Bhc 基は、中性付近の pH ではそのほとんどがイオン化

しているため、ある程度の水溶性をもっている。実際、Bhc-cAMP は膜透過性が低く、このままでは細胞内にほとんど入らない。逆にこの水溶性を利用すると (Bhc-cAMP は、pH 7 の緩衝液に 500 μ M 程度溶解する)、パッチピペットに詰めて導入したり、マイクロインジェクションで導入する実験に使うことができる。しかし、例えば一度に大量の細胞集団あるいは組織に加える必要のある実験には、このままでは使えない。そこで、Bhc 基の 7 位のヒドロキシル基をアセチル化した Bhc-cAMP/Ac を開発した。アセチル基によって 7 位の負電荷がマスクされるので脂溶性が高まり、より細胞膜を通過しやすくなると考えられる。細胞内では、内在性のエステラーゼによってアセチル基が加水分解され、再び負電荷が露出するので細胞外に出にくくなる。生成した Bhc-cAMP は、少ない光量で非常に効率よく光分解して cAMP を放出することができる⁶⁾。

Nishigaki らは、卵が放出するペプチドに対するウニ精

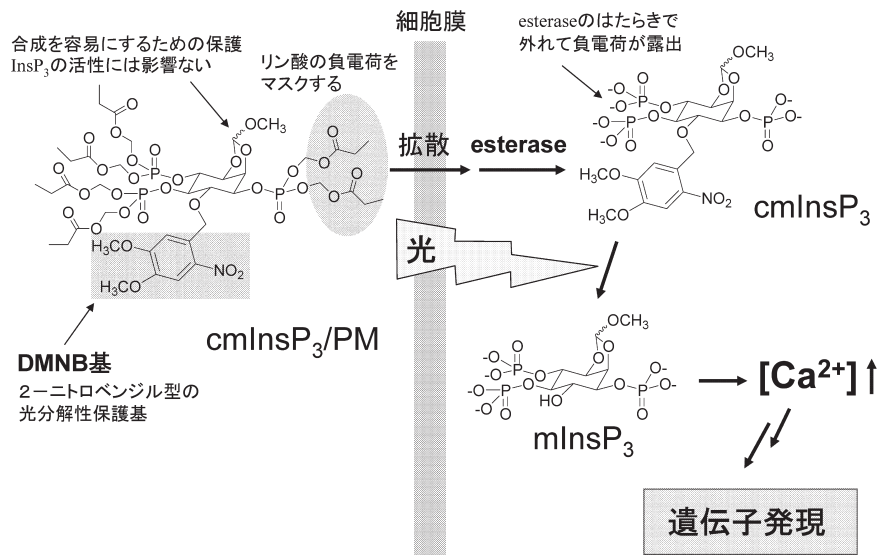


図4 膜透過性ケージド InsP_3 ($\text{cmInsP}_3/\text{PM}$) による遺伝子発現の光制御.

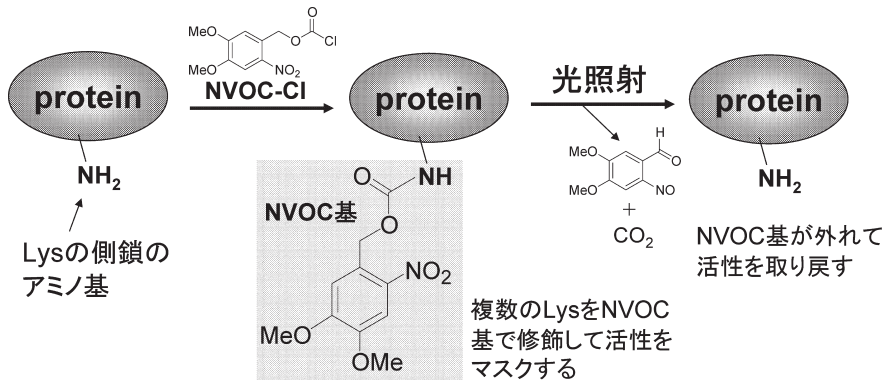


図5 NVOC-ケージドタンパク質.

子の走化性と細胞内シグナル伝達機構の関連を詳細に調べている。精子は誘因性ペプチドの濃度勾配を感知して、卵に向かっていているときはまっすぐに、卵から離れるとターンしながら進むことが知られている。この運動性は、細胞内カルシウムイオン濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$) で制御されていると考えられていて、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ が低いときはまっすぐ進み、上昇するとターンすることも明らかになっている。ターンするときの $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ の上昇は、細胞内の cAMP 濃度が上昇することによるといわれていたが、精子の運動と $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ の濃度変化を同時観察し、Bhc-cAMP/Ac が無傷の精子に導入されること、さらに紫外光照射によって放出された cAMP が、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ の上昇と走化性ターンを引き起こすことを証明した (図 3)⁷⁾。激しく運動している精子の運動を乱すことなく、細胞内の cAMP 濃度を瞬時に上昇させる方法はこれ以外にないといえる。まさに、ケージド化合物の特性を生かしきった実験ということが出来る。

2. 細胞機能の制御

ケージド化合物を用いて細胞機能を光制御した報告の中から、4 例を選んで紹介する。この分野は、日本人の手になる素晴らしい仕事がいくつもある。そちらは、ご本人たちが書かれた非常にわかりやすい解説記事があるので、ぜひご参照いただきたい^{8,9)}。

2.1 膜透過性ケージドイノシトール三リン酸

細胞質のカルシウムイオン濃度が、リンパ系細胞の遺伝子発現、分化、増殖などの活性化に重要であることがわかっている。ケージドイノシトール三リン酸 (InsP_3) の光活性化により、強制的にカルシウムスパイクを起こすことができる。光照射の強さと間隔を制御することで、カルシウムスパイクの繰り返しの頻度と間隔を制御するような膜透過性のケージド InsP_3 誘導體 $\text{cmInsP}_3/\text{PM}$ が、Tsien らによって報告されている¹⁰⁾。 $\text{cmInsP}_3/\text{PM}$ は、 InsP_3 の活性発現に重要な 2 位のヒドロキシル基を 4,5-dimethoxy-

2-nitrobenzyl 基 (DMNB 基) で保護し、さらに3つあるリン酸の負電荷がすべて PM エステルでマスクされているので、拡散によって膜を通りやすくなっていると考えられる。細胞内では、エステラーゼのはたらきで PM エステルが加水分解されて負電荷が再生される。水溶性が高くなって細胞外へ漏れにくくなるので、ケージド InsP_3 誘導体である cmInsP_3 が細胞内に蓄積する。ここで光照射すると、2位の DMNB 基が外れて InsP_3 とほぼ同等のはたらきをする mInsP_3 が放出され、それに応じて $[\text{Ca}^{2+}]_i$ も上昇する (図4)。この効果は、さまざまな培養細胞株 (HeLa, HEK293, REF-52, T84, RBL-2H3 など) で観測することができた。

リンパ系の細胞で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上がると、活性化されたカルシニューリンが細胞質中の転写因子 NF-AT を脱リン酸化する。脱リン酸化された NF-AT は核へ移行し、他のタンパク質とともに DNA に結合して、下流の遺伝子、例えば IL-2 などの発現を活性化する。Tsien らは、RBL-2H3 細胞を用いて、この活性化の強さをレポーター遺伝子の発現でモニターしながら、 InsP_3R の活性化による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇パターンの遺伝子発現への影響を調べた。ケージド InsP_3 へ適当な間隔でパルス的に UV 光を照射すると、任意の大きさや頻度のカルシウムスパイクを人工的に起こすことができた。1分間隔で16発の UV 光をパルス的に照射したときに最も遺伝子発現の効率が高く、例えば、同じ光量で間隔を3分にしたときの3.5倍発現レベルが高かった。これは、ケージド化合物を使うことによって、細胞に余計な擾動を与えずにその機能を制御することに成功し、しかもバイオリジカルに意味のある実験をした好例といえる。

2.2 ケージド転写活性化因子 GAL4

細胞内の主役分子はタンパク質である。タンパク質のケージド化合物を使えば、より直接的に細胞機能を光制御することができる。ケージドタンパク質を合成する方法はすでにいくつか報告されている¹¹⁾。図5にはそのうちのひとつを示した。2-nitroveratryloxy chloroformate (NVOC-Cl) は、タンパク質中の Lys のアミノ基と選択的に反応して、対応するカルバメートを生成する。複数の Lys を NVOC 基で修飾したタンパク質は、その機能を失うことが期待できる。2-ニトロベンジル型の光分解性保護基である NVOC 基は光照射で脱保護できるので、もとのタンパク質を生成し活性が回復する (図5)。次に、この方法で合成したケージドタンパク質の例を2つ紹介する。

1つの細胞だけでねらった遺伝子の発現を制御する方法として、転写活性化因子 GAL4VP16 融合タンパク質のケ

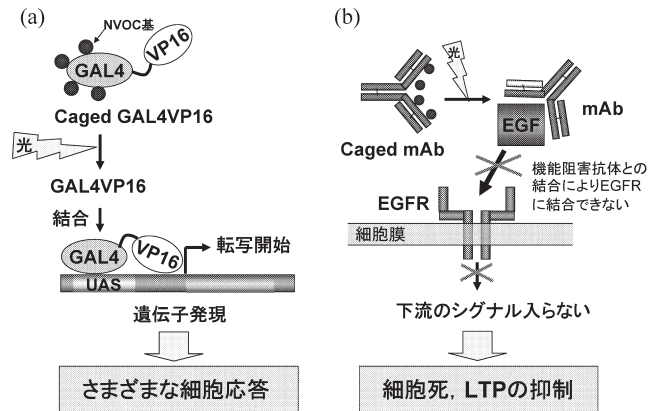


図6 (a) ケージド GAL4. NVOC 基で修飾した GAL4VP16 には転写活性化能はない。光照射して NVOC 基を外すと標的配列 UAS に結合して下流の遺伝子の転写が開始される。(b) ケージドモノクローナル抗体。EGF の機能阻害抗体をケージド化合物にすると、光照射した場所だけで EGF の機能を阻害することができる。

ージド化合物が報告されている¹²⁾。GAL4VP16 に NVOC-Cl を反応させると、14個ある Lys のうち8個が修飾されたケージド GAL4VP16 を合成することができた。UAS_o lacZ の導入により GAL4 依存的に β -ガラクトシダーゼを発現するように改変されたショウジョウバエ胚に、合成したケージド GAL4VP16 を導入しても β -ガラクトシダーゼの発現はみられず、GAL4 の転写活性化能はほぼ消失していることが確かめられた。一方、UV 光を照射した細胞では、未修飾の GAL4 を導入したものに比べて74%まで転写活性化能が回復することも確かめられた (図6(a))。また、UV 光の照射領域を5~10 μm に絞ることで、転写誘導を1細胞のみに限定することも可能で、 β -ガラクトシダーゼの発現を指標にして細胞をマーキングすることができる。これを利用すると、例えば細胞運命を解析する実験がより簡単にできるようになる。ケージド GAL4VP16 をアフリカツメガエルの胚に導入して使用した例も報告されている。この方法は、GAL4 依存的に発現するような外来性 DNA の発現制御に限定されるが、時間と空間を限局した異所発現のシステムとして利用価値は高い。

2.3 ケージドモノクローナル抗体

内在性のタンパク質のはたらきを光照射によって特異的に阻害する方法として、機能阻害抗体のケージド化合物が Bonhoeffer らによって報告されている¹³⁾。脳由来神経栄養因子 (BDNF) の阻害抗体を NVOC-Cl で修飾すると、BDNF への結合能はほとんど消失する。このケージドモノクローナル抗体 (mAb) に UV 光を照射すると、BDNF への結合が回復し、そのはたらきを効果的に阻害することが、培養神経細胞の系で確かめられている (図6(b))。さ

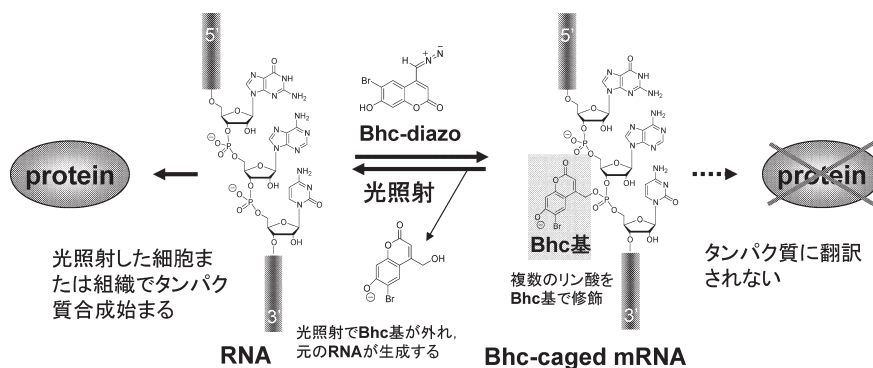


図7 Bhc-ケージド mRNA.

らに、マウス脳海馬領域のスライスサンプルにケージド mAb を灌流しながら、長期増強 (LTP) 誘導への影響を調べると (BDNF の阻害抗体の存在によって LTP が抑制されることが知られているので)、CA1 領域のみをごく短時間 UV 光照射して BDNF のはたらきを抑えただけで、LTP の強度が有意に減少することも確かめられた。

たとえ、ケージド化合物に光照射する領域を絞ったとしても、生成した分子が自由に拡散してしまえば、局所的な活性化 (または不活性化) を達成したことにはならない。CA1 領域へのスポット光照射 (直径 800 μm ぐらい) によって生成した BDNF 阻害抗体は、1 時間後でも約 60% がそこにとどまっていた。BDNF の機能阻害による LTP への影響はこれよりずっと速い過程なので、拡散はまったく問題にならない。すなわち、スポット光照射によるケージ解除で生成した機能阻害抗体は、拡散して空間分解能が低くなることなく、局所的に BDNF の機能を阻害することができたわけである。

2.4 ケージド mRNA/DNA

時間と空間を限定した異所発現の方法として、プラスミド DNA のケージド化合物と mRNA のケージド化合物が報告されている。

Haselton らは、プラスミド DNA を 1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl) diazoethane と反応させて、インターヌクレオチド結合のリン酸部位を 1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl) ethyl 基 (DMNPE 基) で修飾する方法を報告した¹⁴⁾。green fluorescent protein (GFP) 発現プラスミド (pGFP) をケージングし、HeLa 細胞にトランスフェクションすると、GFP の発現はコントロールの 25% まで抑えられていた。これに 365 nm 光を照射すると、最高で 50% まで GFP の発現が回復した。平均してプラスミド 1 分子 (約 10000 個のリン酸ジエステル結合を含む) あたりおよそ 270 個の DMNPE 基が結合していることがスペクトル測定から見積もられているが、未修飾のプラスミドとの分

離等の操作はなく、ここで得られた結果はランダムに DMNPE 基が結合した混合物によるものと考えられる。プラスミド DNA のケージングは、*in vivo* での発現制御に利用することもできる。ルシフェラーゼ発現プラスミド (pCEP-luciferase) を DMNPE 基で修飾し、遺伝子銃でラット皮膚の直径 1 cm ほどの領域に導入後 UV 光を照射することで、ポジティブコントロールの 17% 程度までルシフェラーゼを発現させることに成功している。

Ando らは、mRNA に 6-bromo-4-diazomethyl-7-hydroxycoumarin (Bhc-diazo) を反応させて Bhc-ケージド mRNA を合成している¹⁵⁾。GFP をコードする mRNA (*Gfp* mRNA) を Bhc 基で修飾し、1 細胞期のゼブラフィッシュ胚に微量注入しても、GFP 由来の蛍光はほとんど観測されない。一方、ケージド mRNA を導入後、紫外光を照射した胚では、GFP の生成による緑色の蛍光が有意に増大していた。この場合も、mRNA のインターヌクレオチド結合に Bhc 基がエステルとして結合し、タンパク質への翻訳が阻害されたと考えられる。Bhc 基は 370 nm 近辺の紫外光照射で効率よく外れるので、そこから一気にタンパク質合成が開始されたと考えられる (図 7)。Bhc 基の結合によって、注入された mRNA の安定性も増大している。ゼブラフィッシュ胚に注入した未修飾の mRNA のほとんどが受精後 15 時間以内に分解してしまうのに対し、Bhc-ケージド mRNA は、24 時間後でもかなり残っていることが確かめられている。これに関しては、開発の経緯および実験法に関する詳しい日本語の解説があるので、こちらも参照していただきたい^{16,17)}。

ケージド化合物による機能性分子の光制御法が目指すところは、結局のところ、どれだけ生理的な環境を再現した方法で細胞機能を人工的にあやつれるかという点にある。特に、細胞内シグナル伝達にかかわる分子をケージド化合物に変換し、機能発現する場所と時間を制御することがで

きれば、情報伝達の特異性を解明する手がかりが得られるであろう。例えば、細胞内では、共通のシグナル伝達の機構を使用しているにもかかわらず、入力としての刺激が異なればその結果出力されてくる細胞応答も異なる。これは、シグナル伝達に関与する分子の時空間動態を厳密に制御することによっていると考えられる。蛍光プローブによる可視化解析とケージド化合物による局所活性化を組み合わせる手法は、このような分子の時空間動態の制御のしくみを解析する強力な手法となるであろう。また、生体内では、ゲノム上のすべての遺伝子がいつも発現しているわけではない。いつ、どこで、どの遺伝子が、どれだけの期間発現しているかは、厳密に制御されている。本稿でもいくつか紹介した遺伝子機能の光制御法は、解析対象の遺伝子が本来もっている機能を解析する技術として貢献するであろう。

文 献

- 古田寿昭：“光で生理活性をオンオフできるスイッチ”，現代化学，9月号（2002）24-31.
- 古田寿昭：“ケージド化合物”，先端の分析法「理工学からナノ・バイオまで」（エヌ・ティー・エス，2004）pp. 332-339.
- T. Furuta: “Coumarin-4-ylmethyl phototriggers,” *Dynamic Studies in Biology: Phototriggers, Photoswitches and Caged Biomolecules*, eds. M. Goeldner and R. S. Givens (Wiley-VCH, 2005) pp. 29-55.
- T. Furuta, S. S. -H. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk and R. Y. Tsien: “Brominated 7-hydroxycoumarin-4-ylmethyls: Photolabile protecting groups with biologically useful cross-sections for two photon photolysis,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96** (1999) 1193-1200.
- T. Furuta and K. Noguchi: “Controlling cellular systems with Bhc-caged compounds,” *Trends Anal. Chem.*, **23** (2004) 501-509.
- T. Furuta, H. Takeuchi, M. Isozaki, Y. Takahashi, M. Sugimoto, M. Kanehara, T. Watanabe, K. Noguchi, T. M. Dore, T. Kurahashi, M. Iwamura and R. Y. Tsien: “Bhc-cNMPs as either water-soluble or membrane-permeant photo-releasable cyclic nucleotides for both one and two-photon excitation,” *ChemBioChem.*, **5** (2004) 1119-1128.
- T. Nishigaki, C. D. Wood, Y. Tatsu, N. Yumoto, T. Furuta, D. Ellias, K. Shiba, S. A. Baba and A. Darszon: “A sea urchin jelly peptide induces a cGMP-mediated decrease in sperm intracellular Ca²⁺ before its increase,” *Dev. Biol.*, **272** (2004) 376-388.
- 河西春郎，松崎政紀，伊集院良祐：“新しいケージドグルタミン酸と2光子励起法を用いた神経機能の解析”，細胞工学，**22** (2003) 161-164.
- 竹内裕子：“嗅覚情報伝達におけるセカンドメッセンジャーはcAMPである”，生物物理，**44** (2004) 176-179.
- W. Li, J. Llopis, M. Whitney, G. Zlokarnik and R. Y. Tsien: “Cell-permeant caged InsP₃ ester shows that Ca²⁺ spike frequency can optimize gene expression,” *Nature*, **392** (1998) 936-941.
- Y. Shigeri, Y. Tatsu and N. Yumoto: “Synthesis and application of caged peptides and proteins,” *Pharmacol. Ther.*, **91** (2001) 85-92.
- S. B. Cambridge, R. L. Davis and J. S. Minden: “Drosophila mitotic domain boundaries as cell fate boundaries,” *Science*, **277** (1997) 825-828.
- A. H. Kossel, S. B. Cambridge, U. Wagner and T. Bonhoeffer: “A caged Ab reveals an immediate/instructive effect of BDNF during hippocampal synaptic potentiation,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98** (2001) 14702-14707.
- W. T. Monroe, M. M. McQuain, M. S. Chang, J. S. Alexander and F. R. Haselton: “Targeting expression with light using caged DNA,” *J. Biol. Chem.*, **274** (1999) 20895-20900.
- H. Ando, T. Furuta, R. Y. Tsien and H. Okamoto: “Photo-mediated gene activation using caged RNA/DNA in zebrafish embryos,” *Nat. Genet.*, **28** (2001) 317-325.
- 安藤秀樹，古田寿昭，岡本 仁：“光で遺伝子発現を操る方法の開発”，蛋白質核酸酵素，**47** (2002) 125-132.
- 安藤秀樹，古田寿昭，岡本 仁：“新規ケージド化合物を用いた遺伝子の光によるスイッチオン/オフ技術”，生化学，**75** (2003) 1251-1254.

(2004年11月22日受理)