

岐阜薬科大学博士（薬科学）学位論文

生体内鉄動態の解明を目的とした
二価鉄イオン蛍光プローブの開発に関する研究

丹羽 正人

2018 年

目 次

理論の部

第一章 序論.....	1
第一節 生体内で二価鉄イオンを検出する意義.....	1
第二節 二価鉄イオン選択的な蛍光プローブの開発に関する先行研究.....	2
第三節 著者の研究方針.....	4
第二章 分子内スピロ環化平衡の制御を基盤とした二価鉄蛍光プローブの開発.....	5
第一節 本章における研究目的.....	5
第二節 RhoNox-1 の背景光に関する考察とスピロ環化平衡に着目した分子設計.....	5
第三節 各プローブの合成.....	7
第四節 吸収スペクトル測定によるスピロ環化平衡の解析.....	9
第五節 スペクトル測定による鉄応答性の評価と LCMS を用いた反応解析.....	12
第六節 二価鉄イオンに対する選択性試験.....	16
第七節 膜透過性向上を指向した Ac-HMFluNox の開発.....	18
第八節 生細胞イメージングへの応用.....	20
第九節 トランスフェリン刺激により蓄積した鉄イオンの検出.....	27
第十節 小括.....	29
第三章 細胞膜局在型二価鉄イオン蛍光プローブの開発.....	30
第一節 本章における研究目的.....	30
第二節 細胞膜アンカリング型二価鉄イオン蛍光プローブの開発.....	31
第三節 キュベット中における Ac-RhoNox の鉄応答性の評価.....	34
第四節 二価鉄イオンに対する選択性試験.....	38
第五節 生細胞を用いた Mem-RhoNox の機能評価.....	39
第六節 Mem-RhoNox の応用①：トランスフェリン鉄取り込みの可視化.....	43
第七節 Mem-RhoNox の応用②：神経細胞における鉄取り込みの可視化.....	52
第八節 小括.....	56
総括.....	57
謝辞.....	60

実験の部

第一章に関する実験.....	61
第二章に関する実験.....	73
略語一覧.....	88
引用論文.....	89

理 論 の 部

第一章 序論

第一節 生体内で二価鉄イオンを検出する意義

鉄は、生体内において最も豊富に存在する遷移金属元素であり、主に酵素の補因子として酸素運搬、酵素反応、または DNA 合成を担い、生命維持に欠かせない存在である¹。一方で、鉄はタンパク質から遊離した鉄イオン（自由鉄）としても存在しており、その生物学的意義は興味深い。自由鉄は、細胞内がグルタチオン等の影響によって還元的環境に維持されていること²、および三価の鉄イオンと比較して二価の鉄イオンの水溶性が極めて高い点から、主に二価の鉄イオンとして細胞内環境に溶存していると考えられる。また、細胞膜上に存在する鉄イオンのトランスポーターや細胞質中に存在し、鉄イオンの細胞内輸送を担う鉄シャペロンタンパク質が二価の鉄イオンを選択的に認識することが報告されていることから³⁻⁵、鉄の輸送過程における二価鉄イオンの重要性が伺える。さらに、二価鉄イオンは細胞内の活性酸素種(ROS)と反応してヒドロキシラジカル等の高反応性の ROS を生成することから、細胞内鉄ホメオスタシスの崩壊が細胞傷害や DNA 損傷をもたらすことが指摘されている^{6,7}。実際、鉄の過剰投与による発がんが報告されており⁸、また、アルツハイマー病等の神経変性疾患における鉄の過剰な蓄積が示されている^{9,10}。一方で近年、神経細胞の興奮やがん細胞に特有の細胞死に二価鉄イオンが関与することが報告されており¹¹⁻¹⁴、新たな二価鉄イオンの機能も明らかとなってきた。

上記のように、自由鉄、特に二価鉄イオンの生理学的・病理学的重要性が示されているにも関わらず、生体内自由鉄を検出する有力な手段が皆無であり、その詳細な挙動に関しては多くの点が未解明とされてきた¹⁵。これまで、細胞内の鉄濃度に関する研究は、吸光度法やプラズマ発光分析法、蛍光 X 線分析法等により行なわれてきたが¹⁶、これらの手法は細胞を破碎、凍結または固定処理する必要があるため、生体内の動的な鉄の挙動を捉えることは不可能である。鉄イオンの生細胞イメージングを達成するべく、蛍光プローブ分子を用いたイメージング研究も行なわれてきたが、これまでに鉄イオンプローブとして汎用されてきた Calcein (**Fig.2a**)や PhenGreen-SK (**Fig.2b**)等は他の金属イオンに対しても応答を示し、二価鉄イオンに対する選択性が低い。また、これらは鉄イオンと反応して蛍光が減弱する turn-off 型の蛍光プローブであることから、プローブ自身の光退色や分解が偽陽性シグナルとして検出される点が問題であった^{17,18}。

以上のような背景から、生きたままの細胞中で、二価鉄イオンを高感度かつ選択的に検出することができる蛍光プローブを開発することができれば、これまでにない実用的な二価鉄イオンの検出手段となり、鉄代謝機構の解明研究に貢献できると考えた。

第二節 二価鉄イオン選択的な蛍光プローブの開発に関する先行研究

【*N*-オキシドの化学を基盤とした二価鉄イオン蛍光プローブ RhoNox-1 の開発】

以上の研究背景で述べた鉄代謝機構の全容解明を達成すべく、著者の所属研究室では過去に、*N*-オキシドの化学を利用した二価鉄イオン選択的な蛍光プローブ RhoNox-1 を開発している(*Fig.1*)¹⁹。

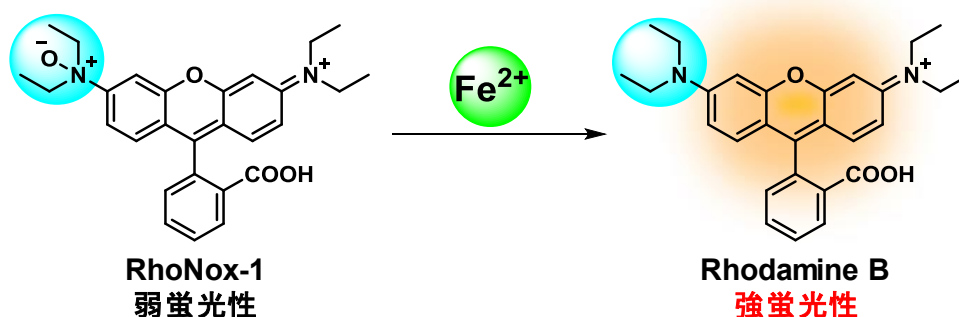


Figure 1. Structure of RhoNox-1 and its detection mechanism¹⁹

RhoNox-1 は、*N*-オキシド部位からの光誘起電子移動(PET)や分子内電荷移動状態(TICT)の形成、および *N*-オキシド窒素原子の π 共役系からの解離といったいくつかの消光作用が相乗的に作用し、弱蛍光性を示す。一方、二価鉄イオンによりジエチルアリアルアミン *N*-オキシドの脱酸素化反応が起こり、強蛍光性のローダミン B を生成し、これにより蛍光強度の増大が観察される。本反応は二価鉄イオンに特異的であり、従って、RhoNox-1 は二価鉄イオン選択的な turn-on 型の蛍光応答を示す蛍光プローブである。

【これまでに他グループより報告された二価鉄イオン蛍光プローブ】

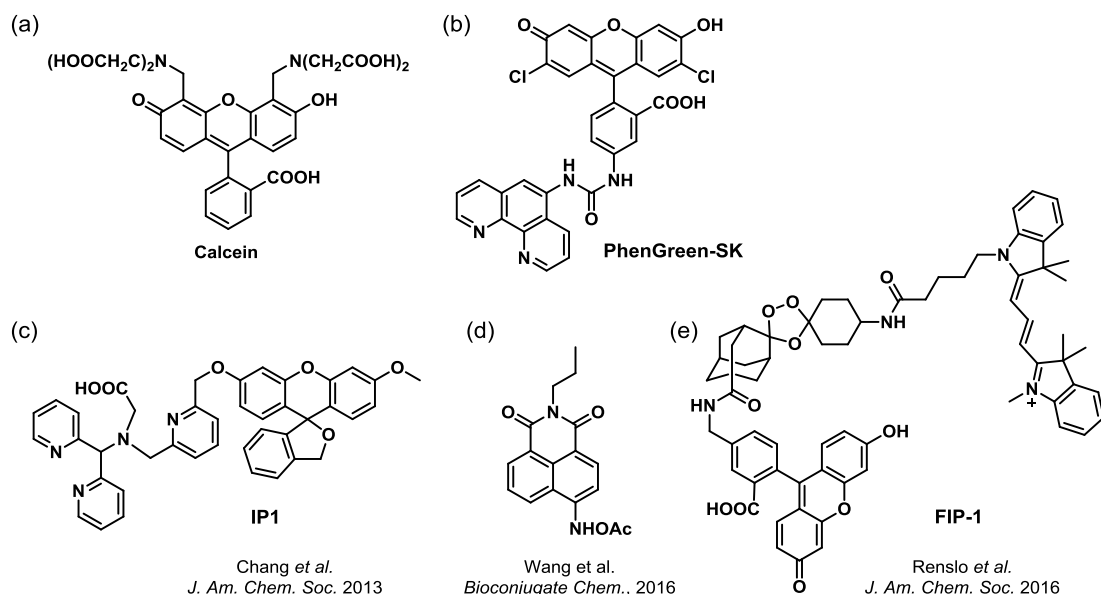


Figure 2. Structure of previously reported Fe(II) fluorescent probes^{20–22}

RhoNox-1 の報告後間もなく、Chang らは、二価鉄イオンとの錯形成による酸化的 C-O 結合開裂反応を基盤とした二価鉄イオン蛍光プローブ(IP1)を報告した(**Fig.2c**)²⁰。Chang らは IP1 を応用し、ビタミン C 処理等の薬理刺激により細胞内二価鉄イオン濃度が増大する様子を可視化することに成功している。また、Wang らは *O*-アセチルヒドロキシルアミン構造を蛍光団に導入した二価鉄イオン蛍光プローブを開発した(**Fig.2d**)²¹。Wang らは開発したプローブを用いることで、亜鉛イオンの添加により細胞内二価鉄イオン濃度が増大する様子を観察した。ごく最近、Renslo らは、トリオキソランの O-O 結合が二価鉄イオンとのフェントン反応を介して開裂することを利用したプローブ(FIP-1)を開発し、鉄依存的細胞死(ferroptosis)¹³ の誘導時において二価鉄イオン濃度が増大することを示した(**Fig.2e**)²²。以上のように現状ではいくつかの二価鉄イオン蛍光プローブが報告されてきているものの、以下の問題が残されている。IP1(**Fig.2c**)はコバルトイオンに対しても応答し、また、二価鉄イオンに対する応答性が不十分である。Wang らが開発したプローブ(**Fig.2d**)は、二価鉄イオンに対して鋭敏な応答を示すものの、二価銅イオンに対しても turn-on 型の応答を示す。FIP-1(**Fig.2e**)は、フェントン反応を基盤としているため、一価銅イオンに対しても二価鉄イオンと同様に反応し、さらに、その応答速度は非常に遅い。従って、二価鉄イオンに対する選択性の観点から、現状、RhoNox-1 の開発過程で見出した *N*-オキシドを使った二価鉄イオン検出手段が最も信頼性が高いと言える。

第三節 著者の研究方針

本研究では、二価鉄イオンの生理的・病理的役割を解明することを最終目的とし、過去に報告されてきたプローブを凌駕する性能を発揮する二価鉄イオン蛍光プローブの開発研究を行なった。具体的には、細胞内の二価鉄イオンをより鋭敏かつ高感度に検出することを目指し、*N*-オキシドを利用した二価鉄イオン蛍光プローブ RhoNox-1 を基に、背景光や応答速度といった問題点を解決した進化型プローブの開発を行なった。さらに、一細胞内における鉄の挙動を細胞小器官レベルで捉えることを目的とし、プローブの細胞内局在制御に関する検討を行なった。その詳細は以下の章にて記述する。

第二章 分子内スピロ環化平衡の制御を基盤とした二価鉄蛍光プローブの開発

第一節 本章における研究目的

序論にて記述した二価鉄イオン蛍光プローブ RhoNox-1 は、以下の問題点を有している。

1. 背景光：二価鉄イオンと未反応の状態でも弱蛍光性を示し、off-on コントラストが不十分である。
2. 反応速度：反応前後で十分なコントラストを得るために 1 時間程度を要し、秒から分単位で起こる生命現象を捉えることが困難である。

そこで第一章の研究においては、応答速度向上・背景光の抑制の観点から上記の問題点 1 と 2 を解決し、RhoNox-1 を凌駕する新たな二価鉄イオン蛍光プローブの開発とその応用について検討した。

第二節 RhoNox-1 の背景光に関する考察および進化型プローブの分子設計

RhoNox-1 は、**Fig.3(a)**に示すようにスピロラクトンの分子内開環・閉環の平衡状態にある¹⁹。**Fig.3(b)**は、キノイド型構造に由来する可視光領域の最大吸収波長における吸光度を pH に対してプロットしたグラフであるが、RhoNox-1 は、中性領域においてキノイド型構造として存在していることが分かる。キノイド型構造は蛍光性であるため、中性領域におけるキノイド構造の安定性が、RhoNox-1 が二価鉄イオンとの反応前においても弱蛍光性を示す原因であると考えた。

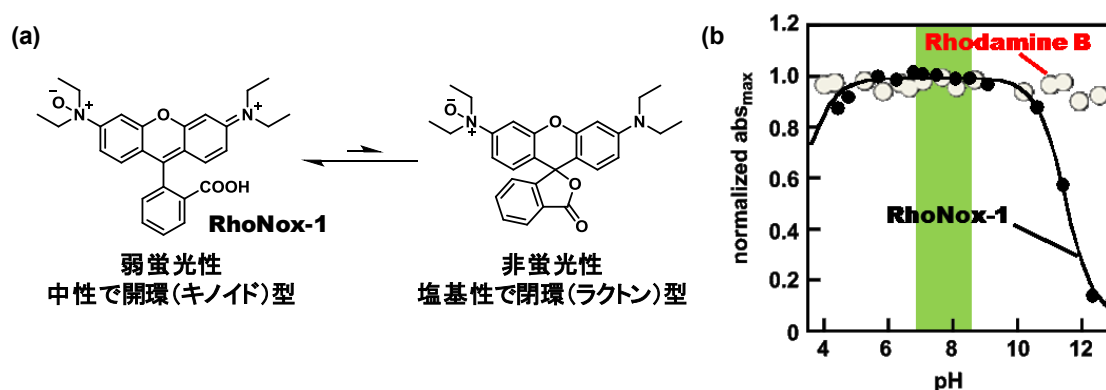


Figure 3. (a) Open (quinoid)-Close (lactone) equilibrium of RhoNox-1. (b) Plots of absorbance at each maximal wavelength in the visible region against pH. Each maximal absorbance value was adjusted to 1.0. RhoNox-1 (black) and Rhodamine B (red).

さらに、RhoNox-1 は中性領域においてはキノイド（開環）構造として存在するが、塩基性（ $\text{pH} > 11.5$ ）においては、吸光度が減少し、すなわち、スピロラクトン（閉環）構造が安定化されていることがわかる。ここで、吸光度が最大値の半分になるときの pH を、神谷らの報告²³に従って $\text{p}K_{\text{cycl}}$ と定義すると、RhoNox-1 の $\text{p}K_{\text{cycl}}$ は 11.3 であった。一方、*N*-オキシドを持たないローダミン B は pH 非依存的に強い吸収を示した。すなわち、ローダミン骨格の *N,N*-ジアルキルアリアルアミンを *N*-オキシド化することにより、水溶液中における非蛍光性のスピロラクトン構造が安定化されることがわかる。以上の結果より、ローダミン骨格の *N*-オキシド化が $\text{p}K_{\text{cycl}}$ の値を酸性側へとシフトさせ、非蛍光性のスピロラクトン構造を安定化する効果を持つことがわかった。

また、神谷らは、*N,N*-ジエチルアミノロドール(DER, **Fig.4, left**)があらゆる pH においてキノイド構造として存在するのに対し、HMDER (hydroxymethyl-DER, **Fig.4, right**)が、 $\text{pH} > 11.3$ においてはスピロ環化構造をとる($\text{p}K_{\text{cycl}} = 11.3$)ことを示している。すなわち、カルボキシ基をヒドロキシメチル基に変換することで、よりスピロ環化構造をとりやすくなることが分かっている²³。

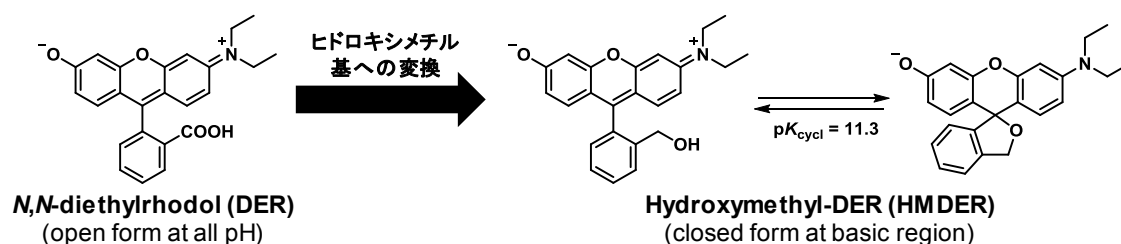


Figure 4. Structures of *N,N*-diethylrhodol (DER) and hydroxymethyl-DER (HMDER). Open (quinoid)-Close (lactone) equilibrium of HMDER and its $\text{p}K_{\text{cycl}}$ value are shown in right.²³

以上の知見と考察を踏まえ、著者はローダミン骨格において①アミノ基の *N*-オキシド化、②カルボキシ基のヒドロキシメチル基への変換、の両者がスピロ環化平衡を閉環型へシフトさせる効果を持つことに着目した。すなわち、カルボキシ基をヒドロキシメチル基へと変換したローダミン誘導体を *N*-オキシド化すれば、①、②の相乗効果により中性水溶液中で完全に非蛍光性の閉環構造となり、プローブの背景光を抑制できると考え、HMRhoNox-E の着想に至った(**Fig.5**)。さらに、多波長展開を指向し、ヒドロキシメチルロドールを蛍光団とした HMFluNox-E も考案した。また、*N*-オキシド周囲の立体環境が二価鉄イオンとの反応速度に影響を及ぼすと考え、反応速度の向上を期待して *N*-オキシド周囲の立体障害を低減させた HMRhoNox-M と HMFluNox-M を設計した。

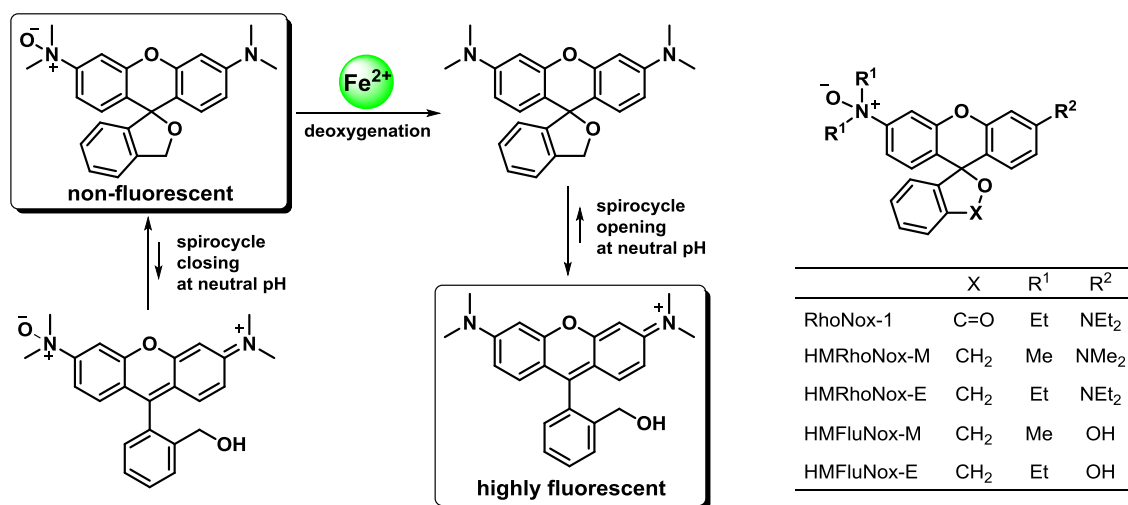
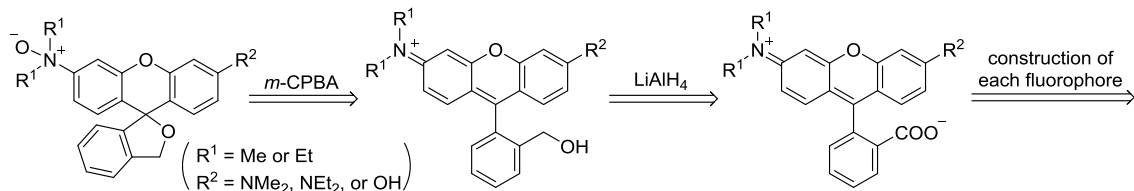


Figure 5. (a) Detection mechanism for Fe^{2+} based on *N*-oxide-controlled spirocyclization. HMRhoNox-M is shown as a representative. (b) Structures of RhoNox-1, HMRhoNox-M, HMRhoNox-E, HMFluNox-M, and HMFluNox-E.

第三節 各プローブの合成

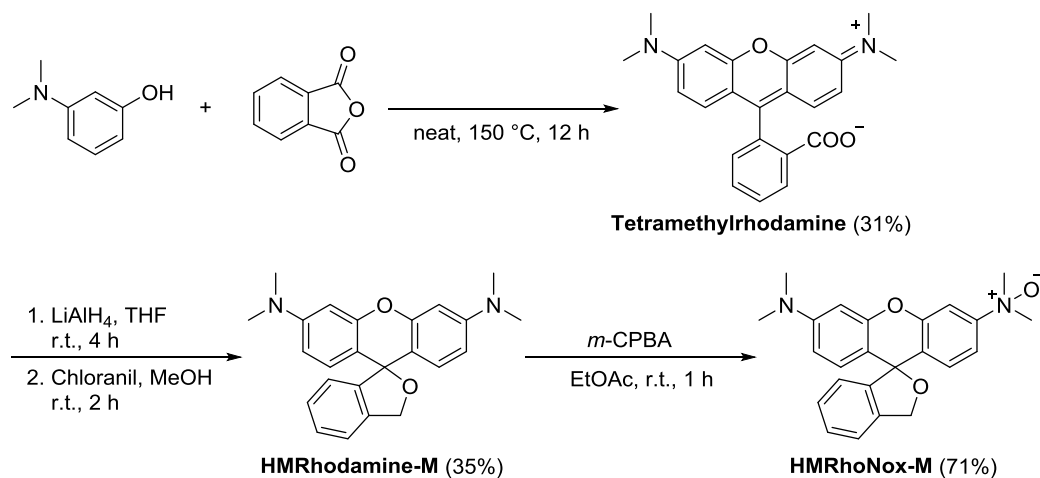
【合成戦略】



Scheme 1. Retrosynthetic strategy of HMRhoNox-M, HMRhoNox-E, HMFluNox-M, and HMFluNox-E

各蛍光団を合成した後に水素化アルミニウムリチウムによりカルボキシ基を還元し、ヒドロキシメチル化した各蛍光団を合成する。最後に、*m*-CPBA による *N*-オキシド化を行なう計画とした。

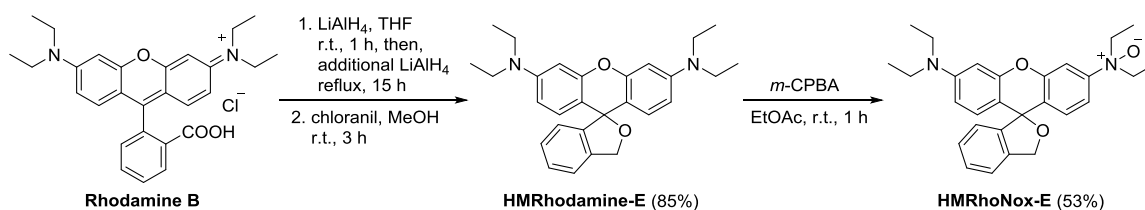
【HMRhoNox-M の合成】



Scheme 2. Synthesis of HMRhoNox-M

N,N-ジメチルアミノフェノールと無水フタル酸の Friedel-Crafts 反応を無溶媒条件下で行ない、テトラメチルローダミンを収率 31%で得た。続いて、水素化アルミニウムリチウムによりカルボキシ基をヒドロキシメチル基へと還元した。同時にキサンテンに対するヒドリド還元も進行するため、chloranil で再酸化することでキサンテン骨格を再生し、スピロ環型構造の HMRhodamine-M を 2 工程収率 35%で得た。最後に、*m*-CPBA により HMRhodamine-M を *N*-オキシド化した。TLC 上で原料と目的化合物のスポットが近接しておりシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製が困難であったが、塩基性活性アルミナを用いたカラムクロマトグラフィーにより容易に目的化合物の精製が可能であることを見出し、収率 71%で HMRhoNox-M を得た。

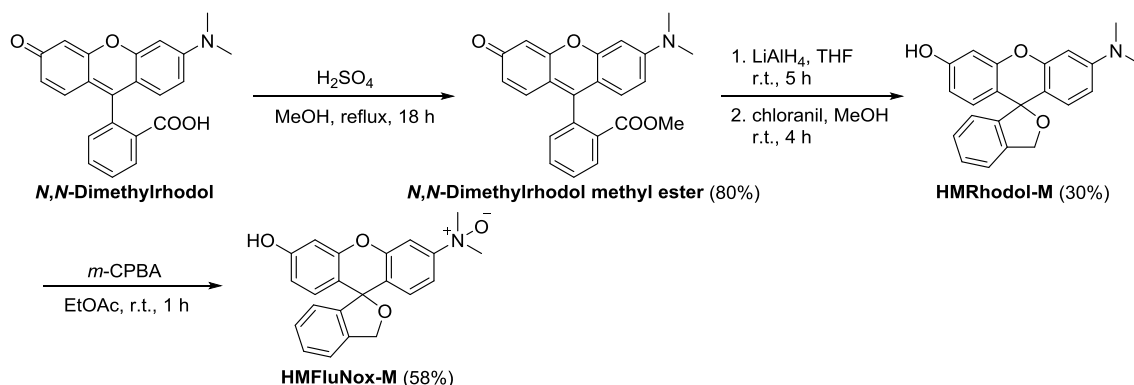
【HMRhoNox-E の合成】



Scheme 3. Synthesis of HMRhoNox-E

ローダミン B 塩酸塩を出発原料とし、HMRhoNox-M の合成と同様の経路でカルボン酸の還元と、続く *N*-オキシド化を実施し、HMRhoNox-E を総収率 45%で得た。

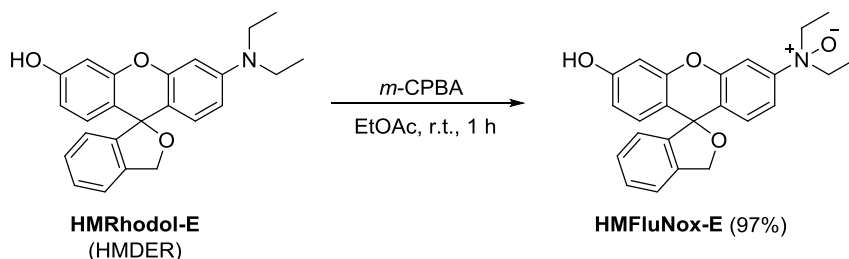
【HMFluNox-M の合成】



Scheme 4. Synthesis of HMFluNox-M

過去の報告²⁴に従い *N,N*-ジメチルロドールを合成した後に、触媒量の濃硫酸とメタノールを用いてメチルエステル化を実施し、*N,N*-ジメチルロドールメチルエステルを収率 80%で得た。続いて、水素化アルミニウムリチウムによるメトキシカルボニル基の還元を収率 30%で行ない、得られた HMRhodol-M を *m*-CPBA で *N*-オキシドし、HMFluNox-M を収率 58%で得た。

【HMFluNox-E の合成】



Scheme 5. Synthesis of HMFluNox-E

過去の報告²³に従って HMRhodol-E (HMDER)を合成した後、得られた HMRhodol-E を *m*-CPBA により *N*-オキシド化し、高収率で HMFluNox-E を得た。

第四節 吸収スペクトル測定によるスピロ環化平衡の解析

まず、合成したプローブについて、スピロ環の開閉環平衡を調べるために、様々な pH に調整したリン酸緩衝液を用いて吸収スペクトル測定を行なった。**Fig.6(a),(b)**の結果より、HMRhoNox-M 及び、HMRhoNox-E の pK_{cycl} の値は 4.7 及び 5.6 と算出され、それぞれ酸性領域(pH<5)においては主に開環構造として存在し、中性から塩基性領域(pH>6)においては、主に非蛍光性の閉環構造として存在していることを確認した。**Fig.6(e),(g)**は、ロドールを蛍光団とした HMFluNox-M 及び HMFluNox-E の結果を示し

ているが、今回測定した範囲の pH では可視光領域における吸収をほとんど確認できず、 pK_{cycl} の値は算出不可能であった。この結果は、HMFluNox-M 及び HMFluNox-E は、水溶液中においては常に非蛍光性の閉環構造として存在していることを示している。

一方で、二価鉄イオンと反応した後に生成すると予想される HMRhodamine-M、HMRhodamine-E、HMRhodol-M、および HMRhodol-E の pK_{cycl} の値は 9.3、8.4、11.0、および 11.3 と算出された。つまり、pH 8 以下においては開環（キノイド）構造として存在することが確認された (**Fig. 6b,d,f,h**)。

以上の結果より、ローダミンおよびロドールのヒドロキシメチル化と *N*-オキシド化の戦略に基づき開発したプローブ群は、設計通りに、反応前は中性領域において非蛍光性のスピロ環化構造が安定化し、反応後では強蛍光性のキノイド構造として存在することがわかった。

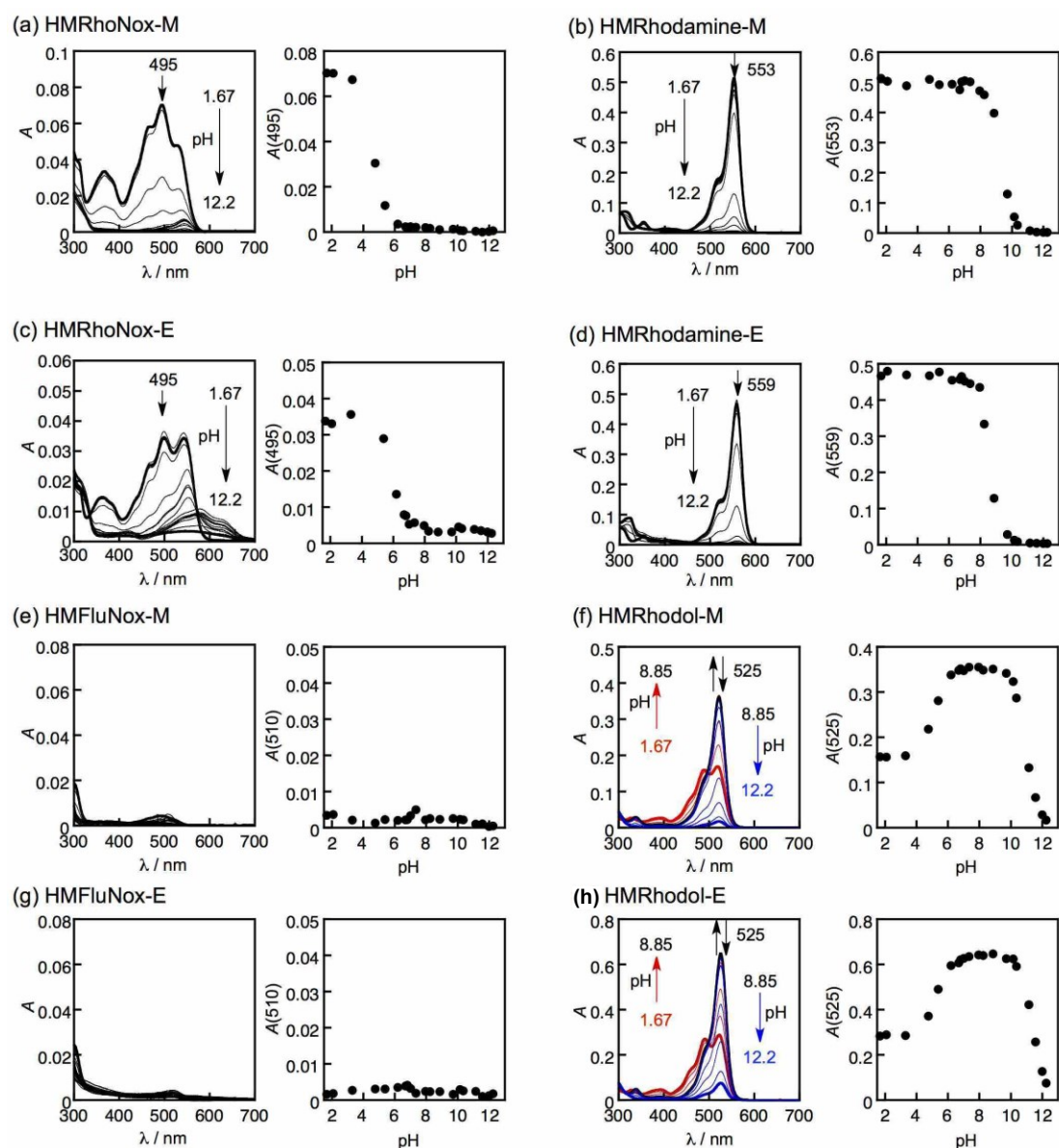


Figure 6. Absorbance spectra of (a) HMRhoNox-M, (b) HMRhodamine-M, (c) HMRhoNox-E, (d) HMRhodamine-E, (e) HMFluNox-M, (f) HMRhodol-M, (g) HMFluNox-E, and (h) HMRhodol-E at various pH (1.67, 2.07, 3.30, 4.75, 5.38, 6.18, 6.67, 6.80, 7.00, 7.34, 7.94, 8.24, 8.85, 10.35, 11.14, 11.56, 11.98, 12.24) (left) and plots of the absorbance at each maximal absorption wavelength against pH (right). All data was collected by using the dye concentrations of 5 μ M and 0.5% DMF as a co-solvent.

第五節 スペクトル測定による鉄応答性の評価とLCMSを用いた反応解析

【吸収スペクトル測定による鉄応答性の解析】

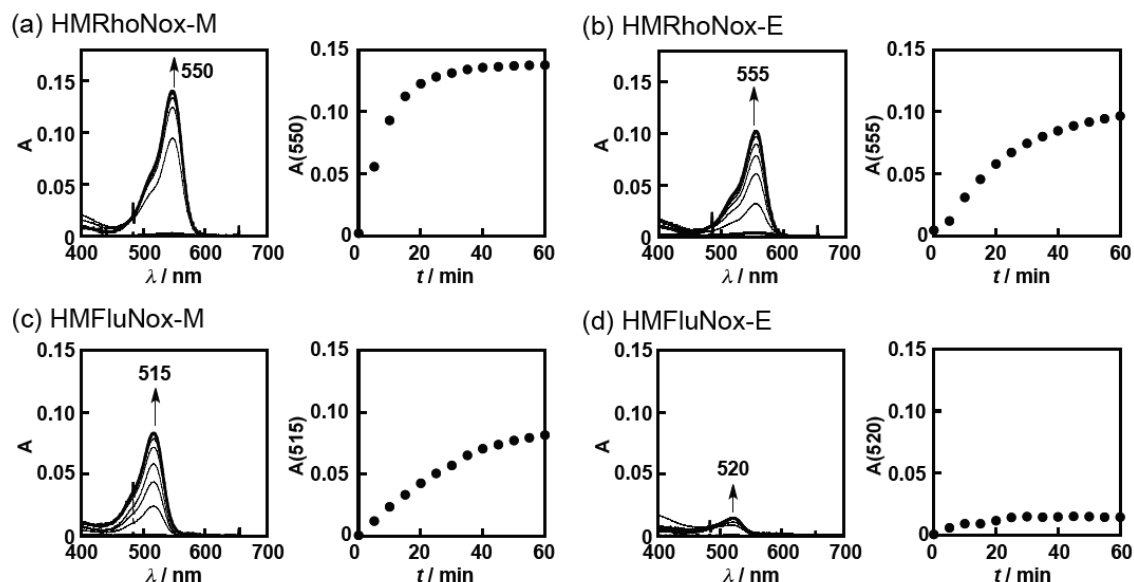


Figure 7. Absorbance spectral change of 2 μM (a) HMRhoNox-M (b) HMRhoNox-E (c) HMFluNox-M (d) HMFluNox-E upon addition of 20 μM Fe^{2+} (left) and plots of absorption at 550 nm (a, b) and 520 nm (c, d) against time (right). The data were acquired in 50 mM HEPES buffer containing 0.2% DMF as a co-solvent under Ar atmosphere, and $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ was used as Fe^{2+} source.

次に、水溶液中におけるプローブの二価鉄イオンに対する応答を吸収スペクトルにより確認した。HEPES緩衝液中、2 μM の各プローブを20 μM の二価鉄イオンで処理し、蛍光スペクトル測定を実施したところ、時間の経過に伴って可視光領域における吸収の増大が観察された(**Fig. 7**)。この結果は、**Fig. 6**にて示したように、反応前は可視光領域に吸収を持たないスピロ環化構造として存在するのに対し、反応後に生成するN-オキシドを持たない色素は可視領域に強い吸収を示す特性を反映していると考えられる。このことから、期待通りにN-オキシドの有無によるスピロ環の開環と閉環をスイッチとする戦略が機能したと言える。

【蛍光スペクトル測定による鉄応答性の解析】

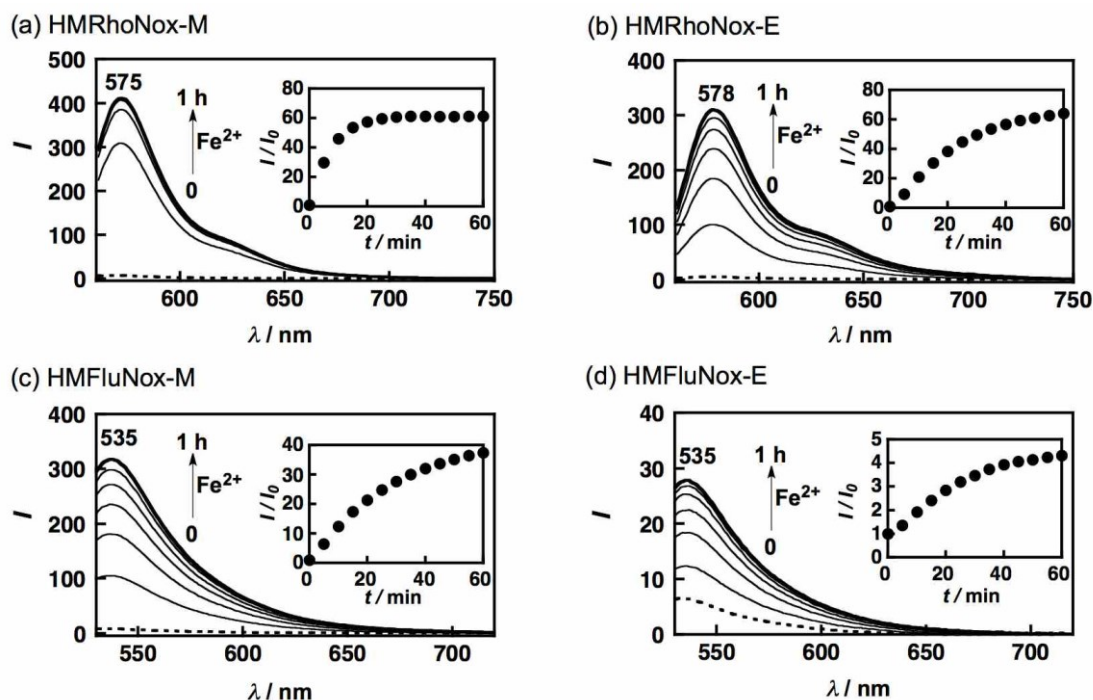


Figure 8. Fluorescence spectra of (a) HMRhoNox-M, (b) HMRhoNox-E, (c) HMFluNox-M, and (d) HMFluNox-E at 0, 10, 20, 30, 40, and 60 min after addition of $20 \mu\text{M Fe}^{2+}$. Dotted lines and bold lines indicate fluorescence spectra at 0 min and 60 min, respectively. The insets indicate the plots of relative fluorescence intensity at 575 nm (a, b) and 535 nm (c, d) against time. All the data were acquired with a probe concentration of $2 \mu\text{M}$ in 50 mM HEPES buffer (pH 7.4, 0.2% DMF) at 25°C under an Ar atmosphere. $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ was used as a ferrous ion source. Excitation was provided at 550 nm (a, b) or 515 nm (c, d).

蛍光スペクトル測定により各プローブの鉄応答性を解析した。**Fig.7**より、各プローブは反応前において閉環構造として存在するため、反応前の背蛍光はほとんど無視できる程度であった(**Fig.8, dotted lines**)。背景光が抑制されたことでHMRhoNox-MとHMRhoNox-Eは、RhoNox-1 (1時間で30倍の蛍光増大)²⁵と比較して高い反応前後のコントラスト (60倍)を示した。次に、蛍光強度変化を時間に対してプロットしたグラフ(**Fig.8, insets**)より、見かけの反応速度定数(k_{obs})を算出し、各プローブの応答速度を比較した。HMRhoNox-M ($k_{\text{obs}} = 2.2 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$)は、RhoNox-1 ($k_{\text{obs}} = 3.8 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$)やHMRhoNox-E($k_{\text{obs}} = 6.9 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$)と比較して速い反応速度を示した。このことから、*N,N*-ジエチルアミノ基を立体障害の少ない*N,N*-ジメチルアミノ基へと変換することで反応速度の向上を達成することができた。

ヒドロキシメチルロドールを蛍光団としたHMFluNox-MおよびHMFluNox-Eもそれぞ

れ二価鉄イオンに対するturn-on型の蛍光応答を示し、HMRhoNox(λ_{ex} =575 nm)とは異なる最大蛍光波長(λ_{ex} =535 nm)を示すことも確認された。HMFluNox-MおよびHMFluNox-Eの反応前後の蛍光増大比は35倍および4倍程度であり、RhoNox-1 (30倍)と比較してoff-onコントラストの向上は達成されなかった。しかしながら本結果は、*N*-オキシドを用いた二価鉄イオン検出メカニズムが、ローダミン以外の蛍光団にも適応可能であることを示唆するものである。

以上の結果より、今回開発した4種のプローブの中で、ヒドロキシメチルローダミン骨格を蛍光団とし、*N*-オキシド周囲の立体障害を低減させたHMRhoNox-Mが最も高い反応前後のコントラストと反応速度を示すことがわかった。

【LCMS を用いた反応解析】

以上の実験において観察された二価鉄イオン処理による蛍光増大が、*N*-オキシドが脱酸素化を受けて強蛍光性分子が生成する反応に由来することを確認するために、LCMSを用いた反応解析を行なった。

Fig.9において、それぞれ上段は反応前のプローブ、中段は、プローブと二価鉄イオンを1時間反応させた後の反応液、下段は、*N*-オキシド部位を持たない対応する蛍光色素のHPLCチャートを示す。結果として、全てのプローブは、二価鉄イオンとの反応の結果、対応する脱酸素化された色素に変換されていることが分かった。

また、HMRhoNox-M、HMRhoNox-E、およびHMFluNox-Mの結果から、それぞれ*N*-オキシドの脱酸素化と同時に、脱*N*-アルキル化反応が進行していることが示唆された。このことは、*N*-オキシドと二価鉄イオンの反応に付随するMeisenheimer転位様の脱アルキル化反応または酸化的脱アルキル化反応²⁶が原因であると考えられるが、その詳細な反応機構は不明である。

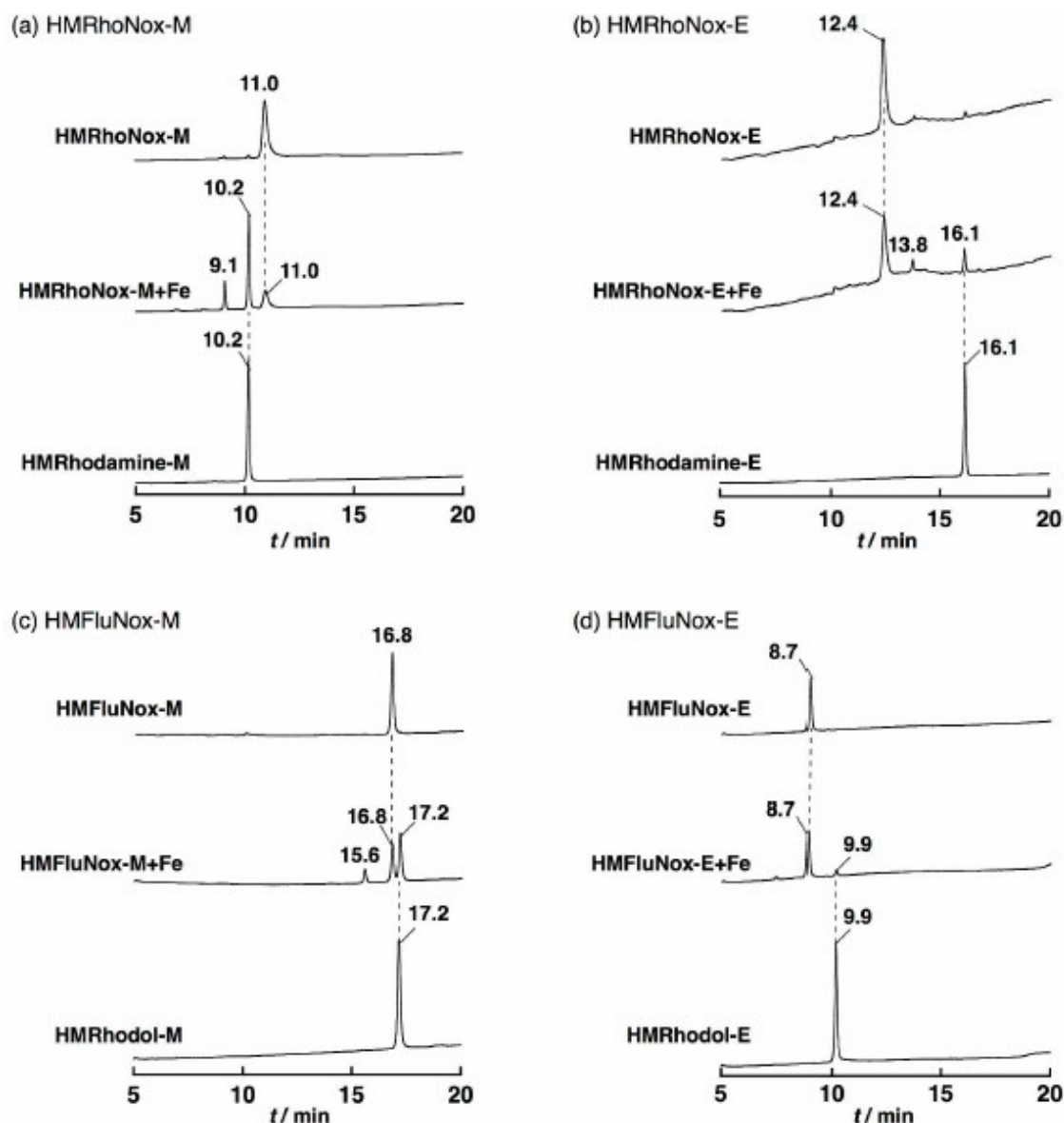


Figure 9. LC-MS analysis of the Fe^{2+} -triggered deoxygenation reaction of (a) HMRhoNox-M, (b) HMRhoNox-E, (c) HMFluNox-M, and (d) HMFluNox-E. The each probe (50 μM) was incubated with 200 μM Fe^{2+} for 1 h in 50 mM HEPES buffer (pH 7.4). $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ was used as Fe^{2+} source. The corresponding deoxygenated dyes, HMRhodamine-M, HMRhodamine-E, HMRhodol-M, and HMRhodol-E were used as the authentic samples in a, b, c, and d, respectively. The reaction mixtures were analyzed by a LC-MS system using a reverse phase column (Waters symmetry C18, 3.5 μm , 4.6 \times 75 mm) eluted with HPLC gradient as follows; $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ containing 0.05% formic acid (80:20 to 50:50 over 20 min for a, b, and c, and 90:10 to 70:30 over 20 min for d). The absorbance at 254 nm was monitored. Total ion mass spectra were simultaneously measured to give the mass peaks as follows:

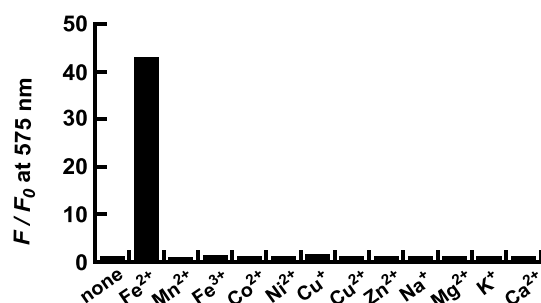
- (a) 389.1 (calcd for $[\text{HMRhoNox-M+H}]^+ = 389.2$) at 11.0 min, 373.1 (calcd for $[\text{HMRhodamine-M+H}]^+ = 373.2$) at 10.2 min, and 359.2 (a demethylated product of HMRhodamine-M, $[\text{M+H}]^+ = 359.2$) at 9.1 min.
- (b) 445.2 (calcd for $[\text{HMRhoNox-E+H}]^+ = 445.2$) at 12.4 min, 429.2 (calcd for $[\text{HMRhodamine-E+H}]^+ = 429.3$) at 16.1 min, and 401.2 (M = a deethylated product of HMRhodamine-E, $[\text{M+H}]^+ = 401.2$) at 13.8 min.
- (c) 362.1 (calcd for $[\text{HMFluNox-M+H}]^+ = 362.1$) at 16.8 min, 346.1 (calcd for $[\text{HMRhodol-M+H}]^+ = 346.1$) at 17.2 min, and 332.0 (a demethylated product of HMRhodol-M, $[\text{M+H}]^+ = 332.1$) at 15.6 min.
- (d) 390.1 (calcd for $[\text{HMFluNox-E+H}]^+ = 390.2$) at 8.7 min, and 374.2 (calcd for $[\text{HMRhodol-E+H}]^+ = 374.2$) at 9.9 min.

第六節 二価鉄イオンに対する選択性試験

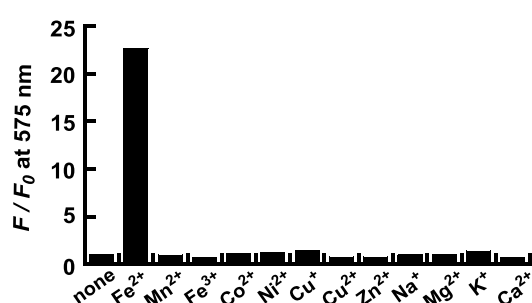
本節では、各プローブが他の金属種や生体内に存在する活性酸素種、およびチオール等の還元剤と反応せず、二価鉄イオン選択的に応答するかどうかを検証した。

【金属選択性試験】

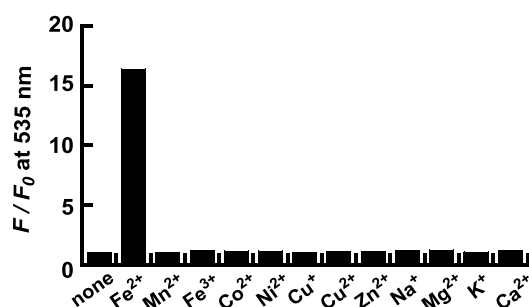
(a) HMRhoNox-E



(b) HMRhoNox-M



(c) HMFluNox-E



(d) HMFluNox-M

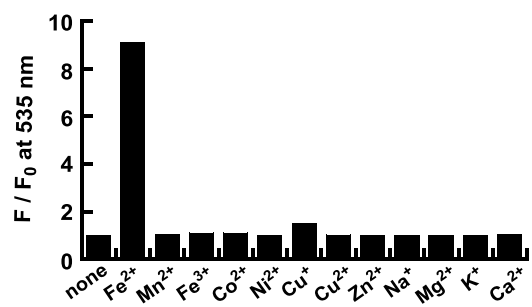
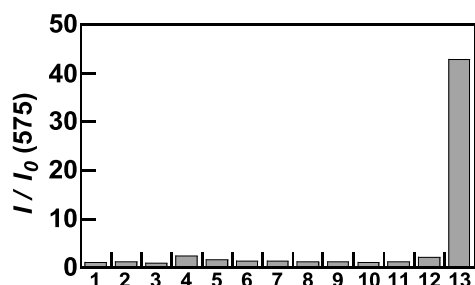


Figure 10. Fluorescence response of 2 μM (a) HMRhoNox-M (b) HMRhoNox-E (c) HMFluNox-M (d) HMFluNox-E upon addition of various metal ions (1 mM for Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , and Ca^{2+} , and 20 μM for all other metal ions). All the data were acquired in 50 mM HEPES buffer (pH 7.4, 0.2% DMF). Bars represent relative fluorescence intensities at 575 nm (a, b, $\lambda_{\text{ex}} = 550$ nm) and 535 nm (c, d, $\lambda_{\text{ex}} = 515$ nm).

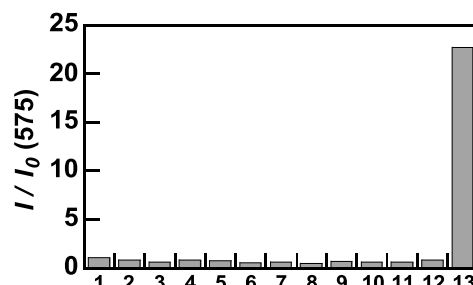
Fig.10は、各種金属イオンに対するプローブの蛍光増大比を示す。これより、各プローブは、他の遷移金属種やアルカリ金属イオン等に全く応答せず、二価鉄イオンに対して選択的に応答することが示唆された。

【生体内に存在する酸化剤や還元剤等に対する応答性】

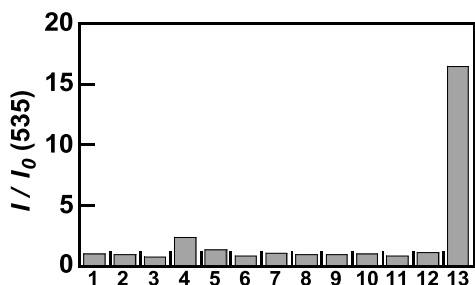
(a) HMRhoNox-M



(b) HMRhoNox-E



(c) HMFluNox-M



(d) HMFluNox-E

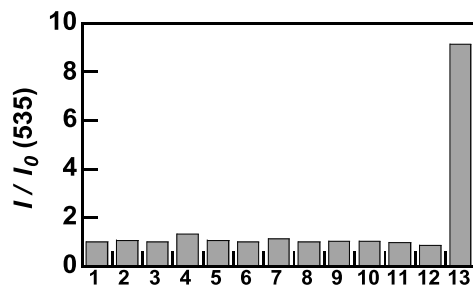


Figure 11. Fluorescence response of the probes against various reductants, reactive oxygen species, and chelator. Bars represent relative fluorescence intensities at 575 nm (a, b, $\lambda_{\text{ex}} = 550$ nm) and 535 nm (c, d, $\lambda_{\text{ex}} = 515$ nm)

1: apo, 2: 100 μM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 3: 1 mM sodium ascorbate, 4: 1 mM cysteine, 5: 1 mM glutathione, 6: 100 μM NaNO_2 , 7: 100 μM $\text{O}_2^{\bullet-}$, 8: 100 μM H_2O_2 , 9: $\bullet\text{OH}$, 10: 100 μM NaOCl , 11: 100 μM NOC-5, 12: 100 μM 2,2'-bipyridyl and 20 μM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 13: 20 μM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. All data were collected with 2 μM probe after 1 h incubation in 50 mM HEPES buffer (pH 7.4, 0.2% DMF as a co-solvent) at room temperature.

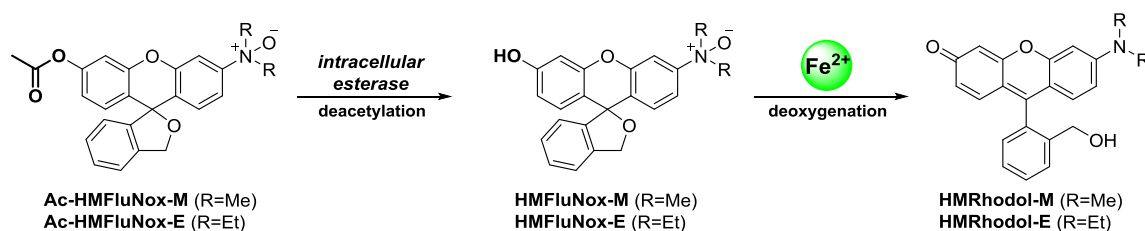
Fig.11は、生体内に存在する活性酸素種、チオール等の還元剤と各プローブを反応させた際の蛍光応答を示している。結果として、各プローブは、全ての酸化剤および還元剤に対して全く応答を示さないことが分かった。

以上、**Fig.10, 11**の結果より、合成した4種のプローブは、夾雑物質を多量に含む生細胞内において、二価鉄イオンと選択的かつ鋭敏に応答することが期待された。

第七節 膜透過性向上を指向した Ac-HMFluNox-M および Ac-HMFluNox-E の開発

【Ac-HMFluNox-M および Ac-HMFluNox-E の分子設計】

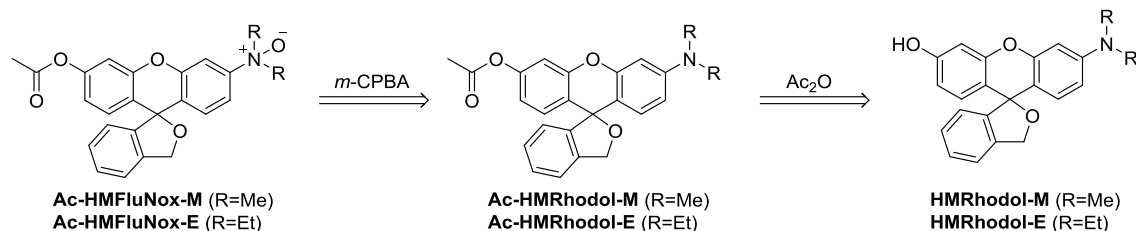
HMRhoNox-M および HMRhoNox-E は、分子全体が電荷を持たない状態にあるため、細胞膜を透過するための十分な脂溶性を持つと考えられる。一方、ヒドロキシメチルロドル骨格を持つ HMFluNox-M 及び HMFluNox-E は、中性でフェノール性水酸基が脱プロトン化するために親水性が高く、細胞膜透過性が低いと予想される²³。そこで、フェノール性水酸基をアセチル基で保護した Ac-HMFluNox-M 及び Ac-HMFluNox-E を設計した(**Scheme 6**)。



Scheme 6. Molecular design of Ac-HMFluNox-M and Ac-HMFluNox-E

一般的に、フェノール性水酸基の *O*-アセチル基は、分子が細胞膜を透過した後に細胞内エステラーゼにより即座に切断を受けるとされる。従って、プローブが細胞膜を透過した後、アセチル基の加水分解を経て、細胞内で HMFluNox-M および HMFluNox-E が生成すると考えた。

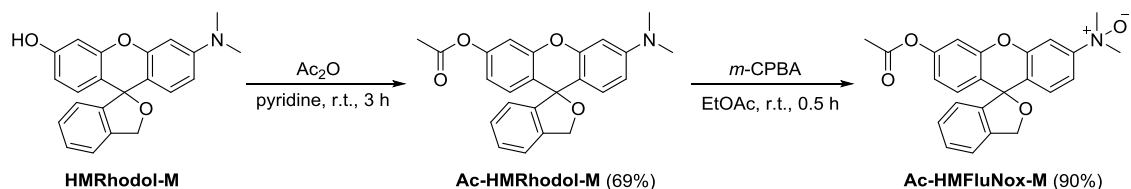
【合成戦略】



Scheme 7. Retrosynthetic strategy of Ac-HMFluNox-M and Ac-HMFluNox-E

第三節で示した HMRhodol-M および HMRhodol-E を出発原料とし、無水酢酸によるフェノール性水酸基のアセチル化と *m*-CPBA による *N*-オキシド化を行ない、目的のプローブを得る計画とした。

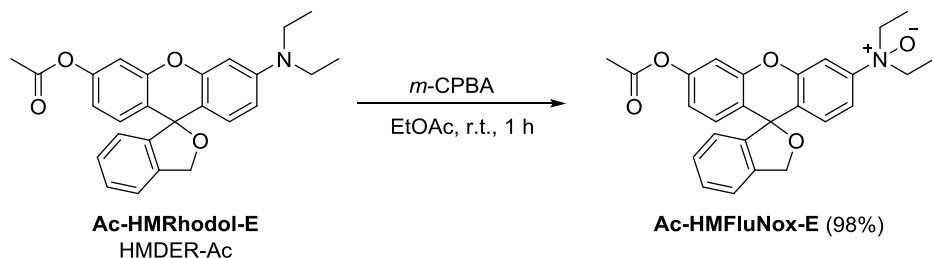
【Ac-HMFluNox-M の合成】



Scheme 8. Synthesis of Ac-HMFluNox-M

HMRhodol-M をピリジン中で無水酢酸と反応させ、Ac-HMRhodol-M を 69%の収率で合成し、続く *N*-オキシド化を収率 90%で実施し、Ac-HMFluNox-M を合成した。アセチル基を持たない HMRhodol-M を *N*-オキシド化した場合と比較して反応の進行が速く、5分程度で原料が消失したことが TLC 分析から示唆された。この結果は、フェノール性水酸基を保護した状態ではスピロ環化構造がより安定化し、*N*-オキシド化に参与する窒素原子の求核性が向上することに起因していると考えられる。

【Ac-HMFluNox-E の合成】



Scheme 9. Synthesis of Ac-HMFluNox-E

過去の報告²³と同様の実験操作で Ac-HMRhodol-E (HMDER)を合成した後に、Ac-HMRhodol-E を酢酸エチル中で *m*-CPBA と反応させ、目的の Ac-HMFluNox-E を 98%の収率で得た。

第八節 生細胞イメージングへの応用

【生細胞イメージング実験の計画と目的】

合成した各プローブ分子の、生細胞中における二価鉄イオンへの応答性を確認すべく、肝臓癌細胞株である HepG2 細胞を用いて蛍光イメージングを行なった。HepG2 細胞は、二価金属トランスポーターである DMT-1、トランスフェリン受容体 (TfR) 等の鉄輸送に関与するタンパク質を発現しており、鉄イオンの細胞内取り込みが活発であることが報告されている²⁷。また、プロトタイプである RhoNox-1 を生細胞イメージングに応用した際にも HepG2 細胞を用いており¹⁹、RhoNox-1 と比較する上でも、HepG2 細胞の使用が適切であると考え、本細胞株を選択した。

まず、①プローブの細胞内取り込みと局在性、②外部から加えた二価鉄イオンに対する応答性、③細胞内在性二価鉄イオンに対する応答性、の3点を評価し、生細胞イメージング実験における性能を RhoNox-1 と比較した。

【生細胞中における二価鉄イオン応答性の評価】

Fig.12 に示すように、HMRhoNox-M、HMRhoNox-E、Ac-HMFluNox-M、及び Ac-HMFluNox-E は、二価鉄イオンを添加していない細胞(**Fig.12, a1-d1**)と比較して、鉄処理した細胞(**Fig.12, a2-d2**)で顕著な蛍光シグナルの増大が確認された。

次に、増大した蛍光シグナルが各プローブと二価鉄イオンの反応由来であることを確認するために、二価鉄イオンのキレート分子である 2,2'-ビピリジル(Bpy)共存下でプローブを処理し、蛍光イメージングを行なった。先にキュベット中において Bpy がプローブと二価鉄イオンの反応を阻害することを確認しているが(**Fig.11, entry 12**)、生細胞中でも同様に、Bpy 処理による蛍光シグナルの減弱が観察された(**Fig.12, a3-c3**)。従って、鉄処理細胞における蛍光シグナルの増大は、確かにプローブと二価鉄イオンの反応に起因していることがわかった。

続いて、二価鉄イオンの添加無しで Bpy のみで処理した細胞を用いて、蛍光イメージングを行なった(**Fig.12, a4-d4**)。結果として、HMRhoNox-M、HMRhoNox-E、及び Ac-HMFluNox-M を用いた場合は、control の細胞(**Fig.12, a1-c1**)と比較して、蛍光シグナルが有意に減弱していることが確認された。すなわち、HMRhoNox-M、HMRhoNox-E、及び Ac-HMFluNox-M は、細胞内在性の二価鉄イオンを検出できることが示された。Ac-HMFluNox-E を用いた場合は、蛍光画像からビピリジル処理による蛍光シグナルの

減弱が観察できたものの、有意な差では無かった。この結果は、蛍光スペクトル測定 (Fig.8)にて、HMFluNox-E が他のプローブと比較して、off-on コントラストが低かったことと一貫している。

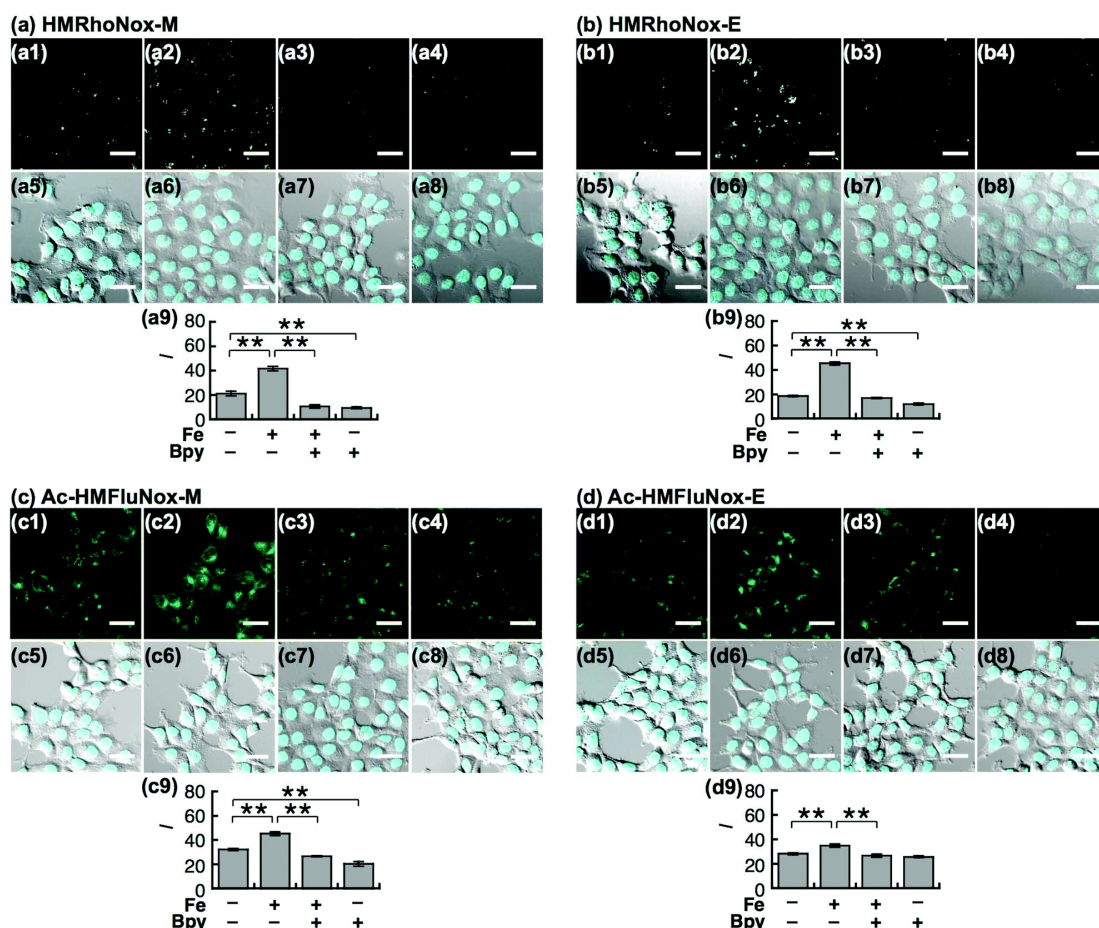


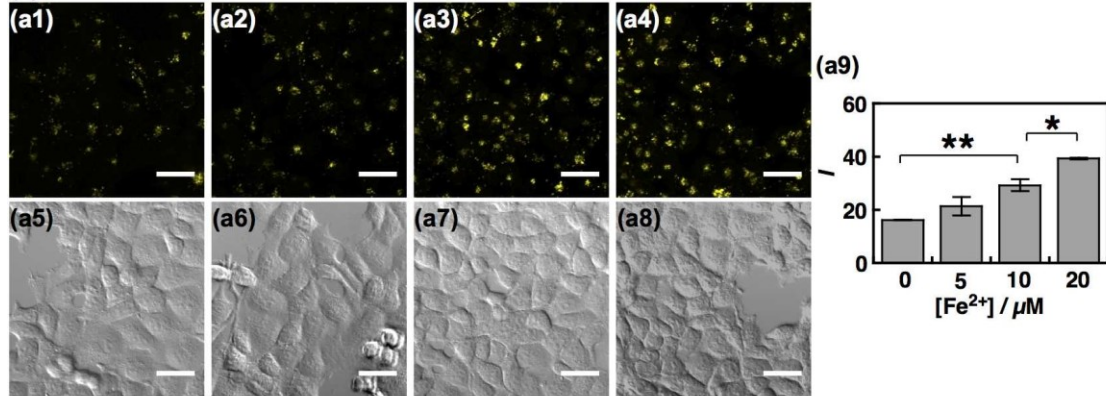
Figure 12. Confocal fluorescence microscopy images for Fe^{2+} detection in HepG2 cells by using (a) HMRhoNox-M, (b) HMRhoNox-E, (c) Ac-HMFluNox-M, or (d) Ac-HMFluNox-E. (1) Images of HepG2 cells treated with probe at 37 °C for 30 min. (2) Images of the cells supplemented with 100 μM Fe^{2+} at 37 °C for 30 min and then treated with probe at 37 °C for 30 min. (3) Images of the cells treated with 100 μM Fe^{2+} at 37 °C for 30 min, and then 1 mM 2,2'-bipyridyl (Bpy) and probe at 37 °C for 30 min. (4) Images of the cells treated with 1 mM Bpy and probe at 37 °C for 30 min. (5), (6), (7), (8) Bright field images overlaid with nuclear staining (Hoechst 33342) for the same slices of (1), (2), (3), and (4), respectively. (9) Quantification of data in (1), (2), (3), and (4). Statistical analyses were performed with a Student's *t*-test. $**P < 0.01$, ($n = 3$). Error bars show \pm s.e.m. Scale bars indicate 30 μm . All the

data were acquired with the probe concentration of 1 μM (for HMRhoNox-M and HMRhoNox-E) and 5 μM (for HMFluNox-M and HMFluNox-E) and by using ferrous ammonium sulfate, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (FAS) for Fe^{2+} source. Excitation was provided with 555 nm laser for (a) and (b) or 488 nm laser for (c) and (d).

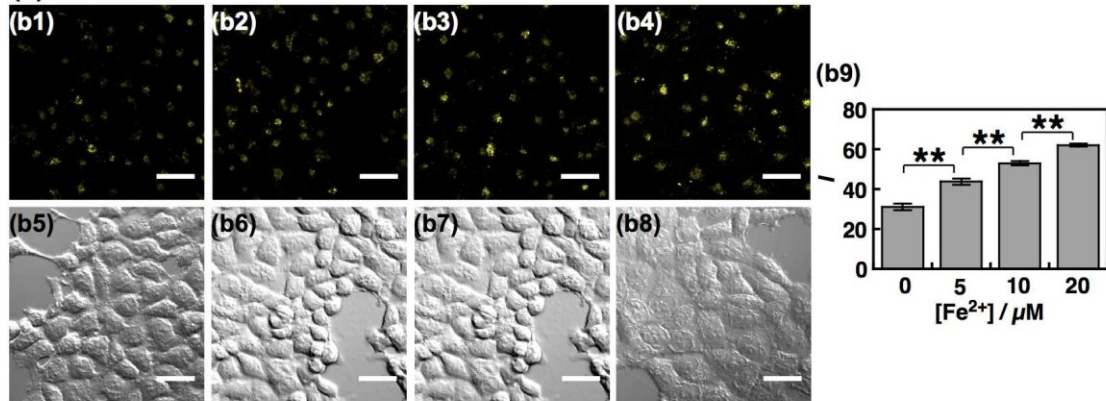
【各プローブの検出感度（検出限界）の評価】

続いて、種々の濃度の二価鉄イオンを添加した HepG2 細胞を各プローブで処理し、生細胞中における二価鉄イオンに対する濃度依存性試験を行なった(**Fig.13**)。その結果、各プローブは二価鉄イオンに対する濃度依存的な蛍光応答を示し、HMRhoNox-M および HMRhoNox-E の検出限界はそれぞれ 10 μM および 5 μM であった。HMRhoNox-M については、5 μM の二価鉄イオンで処理した実験においても、僅かながら蛍光シグナルの増大が観察されたが、有意差は認められなかった。RhoNox-1 の検出限界が 10 μM であったことと比較すると²⁵、生細胞中においては検出感度がそれほど向上していないことがわかった。これは、RhoNox-1 と HMRhoNox-M および HMRhoNox-E の細胞内局在位置が異なること (**Fig. 14** にて後述) に起因していると考えられる。Ac-HMFluNox-M および Ac-HMFluNox-E の検出感度は、共に 10 μM であり、RhoNox-1 と同程度の結果を示した。

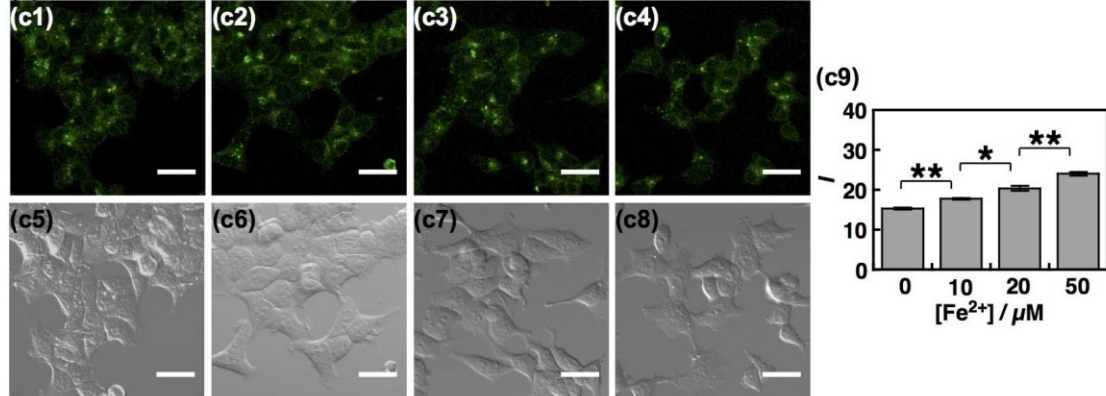
(a) HMRhoNox-M



(b) HMRhoNox-E



(c) Ac-HMFluNox-M



(d) Ac-HMFluNox-E

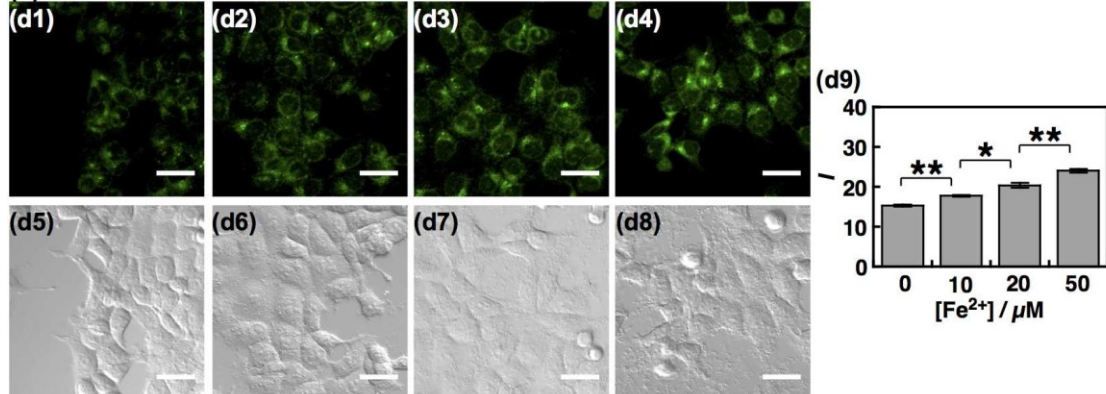


Figure 13. Confocal fluorescence microscopic images of HepG2 cells supplemented with various concentrations of Fe^{2+} and stained with (a) HMRhoNox-M, (b) HMRhoNox-E, (c) Ac-HMFluNox-M or (d) Ac-HMFluNox-E. (a), (b) The cells were treated with (1) 0, (2) 5, (3) 10, or (4) 20 μM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ for 30 min in MEM. After washing the cells, 1 μM HMRhoNox-M or HMRhoNox-E was added, and the cells were incubated for 30 min. (c), (d) The cells were treated with (1) 0, (2) 10, (3) 20, or (4) 50 μM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ for 30 min in MEM. After washing the cells, 5 μM Ac-HMFluNox-M or Ac-HMFluNox-E was added, and the cells were incubated for 30 min. Excitation was provided with 555 nm laser (a), (b) or 488 nm laser (c), (d). (5)–(8) Bright field images of the same slices of (1)–(4). (9) Quantification of data in (1)–(4). Statistical analyses were performed with a Student's *t*-test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ($n = 3$). Error bars show \pm s.e.m. Scale bars indicate 30 μm . Pearson's colocalization value was calculated by ImageJ.

【生細胞中におけるプローブの局在位置の確認】

Fig.12, 13 の結果より、HMRhoNox-M 及び HMRhoNox-E は点状の染色パターンを示しており、リソソームへの局在性が示唆された。一方で、HMFluNox-M および HMFluNox-E は、小胞体様の染色パターンを示した。そこで、それぞれの細胞内局在位置を厳密に解析するため、各種オルガネラマーカールとの共染色実験を行なった(**Fig.14**)。

HepG2 細胞を HMRhoNox-M または HMRhoNox-E で処理し、それぞれをリソソームマーカである Lyso Tracker[®] Green と共染色した。**(Fig.14, a-3)**および**(Fig.14, b-3)**は、プローブ由来の蛍光シグナル（赤色）と、Lyso Tracker[®] Green 由来の蛍光シグナル（緑色）の重ね合わせ画像である。それぞれの蛍光シグナルが重なった部分は黄色の擬似カラーとして表示される。プローブ由来の蛍光シグナル（赤色）と Lyso Tracker[®] Green 由来の蛍光シグナル（緑色）の大部分が重なっている様子が観察できることから（ピアソンの相関係数 $R \approx 0.70$ for HMRhoNox-M; $R \approx 0.57$ for HMRhoNox-E）、HMRhoNox-M および HMRhoNox-E はリソソーム局在性であることが確認された。

Ac-HMFluNox-M および Ac-HMFluNox-E についても同様に、小胞体マーカである ER-tracker[™] Red と共染色したところ、**(Fig.14, c-3)**および**(Fig.14, d-3)**の重ね合わせ画像に示すように、プローブの局在位置（緑色）は、小胞体マーカ（赤色）とほぼ一致し（ピアソンの相関係数 $R \approx 0.79$ for HMFluNox-M; $R \approx 0.88$ for HMFluNox-E）、Ac-HMFluNox-M および Ac-HMFluNox-E は、共に小胞体局在性を示すことが分かった。近年、小胞体表面には鉄代謝制御タンパクである IRP (iron responsible protein)が存在していることが報告されており²⁸、さらに、ヘムを分解して遊離の鉄イオンを取り出すヘム

オキシゲナーゼが小胞体において機能している知見²⁹を勘案すると、小胞体への局在性を有する二価鉄イオン蛍光プローブは、細胞内の鉄代謝を解明する上で有用と言える。

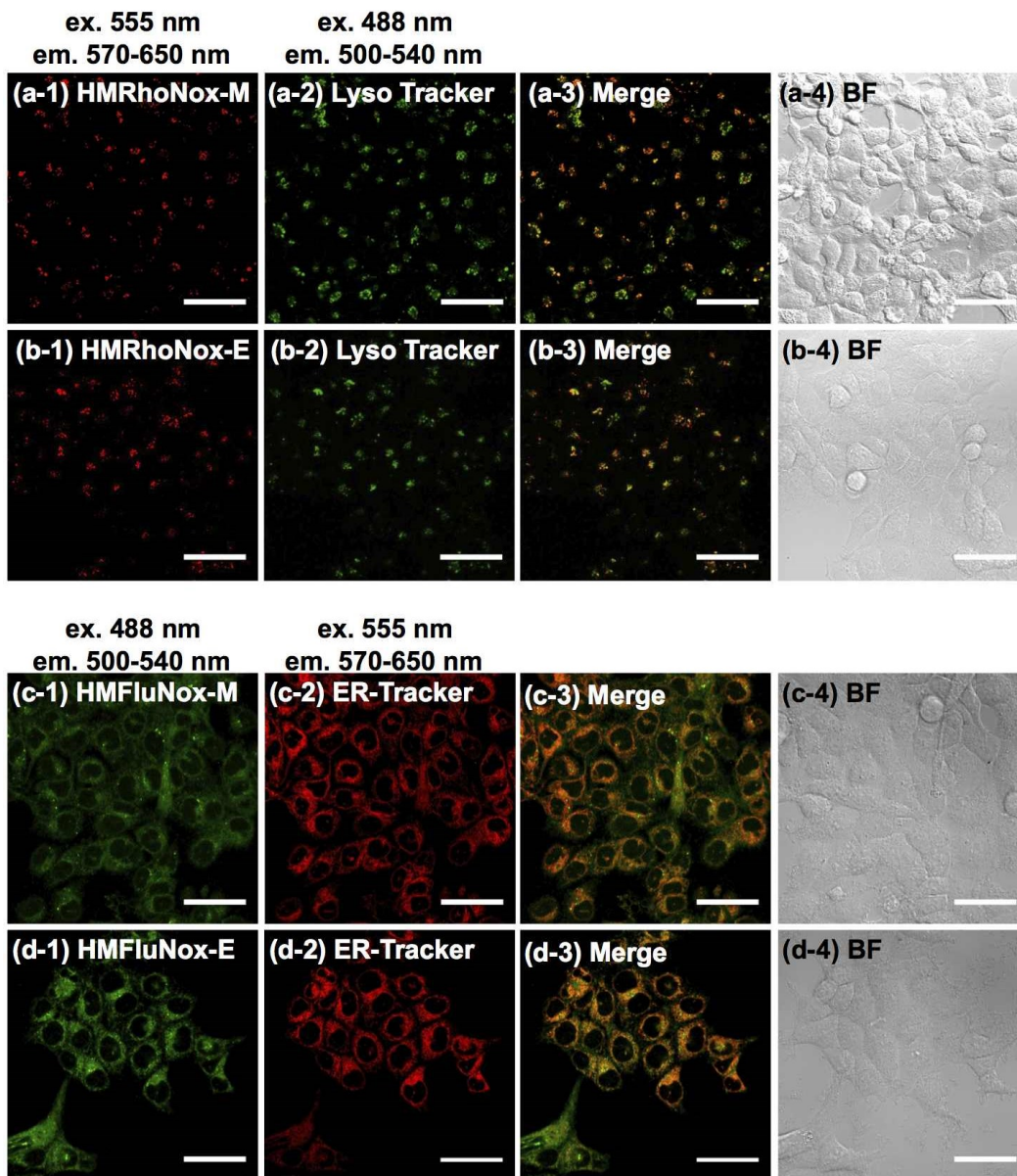


Figure 14. Co-staining experiments of (a) HMRhoNox-M ($1 \mu\text{M}$), (b) HMRhoNox-M ($1 \mu\text{M}$), (c) Ac-HMFluNox-M ($5 \mu\text{M}$), or (d) Ac-HMFluNox-E ($10 \mu\text{M}$). In (a) and (b), HepG2 cells were co-stained with the probe and Lyso Tracker[®] Green. (c), (d) HepG2 cells were co-stained with the probe and ER-tracker[™] Red. (1) Images obtained by detecting the signals from the probes. Band path filters of 570–650 nm with a 555 nm excitation and 500–540 nm with a 488 nm excitation were used for HMRhoNox series (a, c) and HMFluNox series (c, d), respectively. (2) Images obtained by detecting the signals from the corresponding organelle targeting dyes (Lyso Tracker[®] Green for (a) and (b), and ER-tracker[™] Red for (c) and (d)). Band path filters of 500–540 nm with a 488 nm excitation and 570–650 nm with a 555 nm

excitation were used for Lyso Tracker[®] Green (a, c) and ER-tracker[™] Red (c, d), respectively. (3) Merged images of (1) and (2). (4) Bright field images of the same slices as (1)–(3).

【酸性条件下における HMRhoNox-M および HMRhoNox-E の特性】

Fig.14 の結果より、HMRhoNox-M および HMRhoNox-E の局在位置がリソソームであることが示された。ここで、リソソームが酸性オルガネラであることを考慮すると、酸性条件でプローブの開環構造が有利となり、RhoNox-1 と同様に背景光が問題となることが懸念された。実際に、**Fig.6** の結果から、HMRhoNox-M および HMRhoNox-E は pH 5 程度において完全に閉環構造をとっておらず、一部開環構造として存在していることがわかる。そこで、各 pH におけるプローブの蛍光強度変化および、酸性条件下におけるプローブと二価鉄イオンの反応性を評価した。

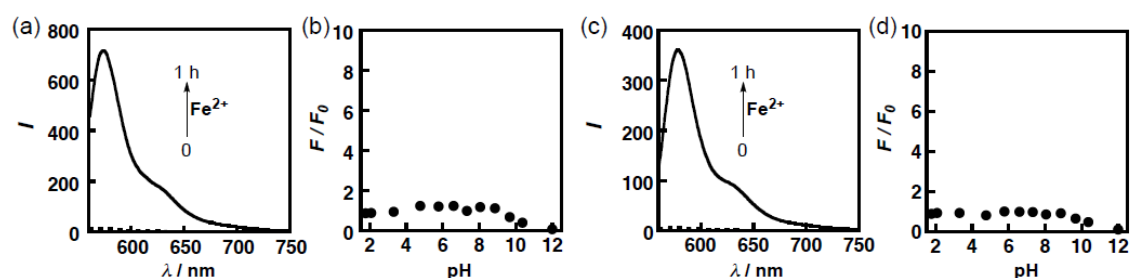


Figure 15. Fluorescence spectral change of (a) HMRhoNox-M (2 μ M), (c) HMRhoNox-E (2 μ M) upon addition of 20 μ M $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ at pH 5.0. pH profiles of relative fluorescence intensity of (b) HMRhoNox-M (2 μ M) and (d) HMRhoNox-E (2 μ M).

蛍光強度の pH 依存性試験を、HMRhoNox-M および HMRhoNox-E について行なったところ、酸性領域における開環構造由来の蛍光強度増大は確認されなかった(**Fig.15b, d**)。RhoNox-1 と同様に、*N*-オキシドの HOMO からの光誘起電子移動(PET, photo-induced electron transfer)またはプローブ分子が TICT(twisted internal charge transfer)状態をとることにより消光が起きていることが原因として考えられる¹⁹。続いて、酸性条件下(pH 5)における HMRhoNox-M および HMRhoNox-E の二価鉄イオンに対する応答性を蛍光スペクトル測定により検討したところ、酸性条件下においても、二価鉄イオンに対する顕著な turn-on 型の蛍光応答を示すことが分かった(**Fig.15a,c**)。

以上の結果より、HMRhoNox-M および HMRhoNox-E を用いた蛍光イメージング(**Fig.12, 13**)で観察された蛍光応答は、酸性オルガネラによる pH 変化の結果ではなく、確かに二価鉄イオンとの反応に由来することが示された。

第九節 トランスフェリン刺激により蓄積した二価鉄イオンの検出

【本節の実験方針および生体内におけるトランスフェリンの機能】

第八節までの結果において、HMRhoNox-M がキュベット中で最も優れた鉄応答性と off-on コントラストを示し、さらに、生細胞のリソソーム中で二価鉄イオンを検出できることがわかった。そこで、HMRhoNox-M を応用し、トランスフェリン(Tf)により細胞内に蓄積する二価鉄イオンの検出を試みた。Tf は、肝臓において産生されるタンパク質であり、血球細胞を始めとする各種細胞への鉄輸送の中心を担っている。鉄 2 原子と結合した Tf (holoTf) は、細胞膜上の Tf 受容体(TfR)と結合し、エンドサイトーシスにより細胞内へと取り込まれる³⁰⁻³²。続いて、エンドソーム内へのプロトン流入によりエンドソーム内が酸性となると、holoTf から三価の鉄イオンが遊離する^{30,33}。次いで、鉄還元酵素(STEAP3)により三価鉄イオンが二価鉄イオンへと還元され^{34,35}、生じた二価鉄イオンが二価金属イオントランスポーター(DMT1)を経由して細胞質中に放出される^{5,36}メカニズムが推定されている。以上の経路により取り込まれ、細胞内に蓄積した二価鉄イオンの検出を試みた。

【トランスフェリン処理細胞における二価鉄イオンのイメージング】

HepG2 細胞に 5 μ M の holoTf を添加して 30 分間インキュベートした後に、1 μ M の HMRhoNox-M で細胞を 30 分間処理し、蛍光イメージングを実施した。その結果、holoTf で処理した細胞は、プローブのみで処理した細胞と比較して、有意な蛍光シグナルの増大を示した(**Fig.16a, b**)。また、TfR の競合的阻害剤であるアポトランスフェリン(apoTf)³¹を holoTf と共に加えたところ、蛍光シグナルが減弱した(**Fig.16c**)。さらに、エンドサイトーシスの阻害剤であるアジ化ナトリウム(NaN_3)³²の共存下やエンドサイトーシスが停止する 4 °C 条件下³²で holoTf を加えた場合でも、蛍光シグナル強度は control の細胞と同程度であった(**Fig.16d, e**)。

以上の結果より、holoTf の処理により増大した蛍光シグナルは、トランスフェリンエンドサイトーシスを介して取り込まれた二価鉄イオンと HMRhoNox-M の反応由来であることが示唆された。すなわち、HMRhoNox-M を応用することで、トランスフェリンにより取り込まれた二価鉄イオンを可視化することに成功した。

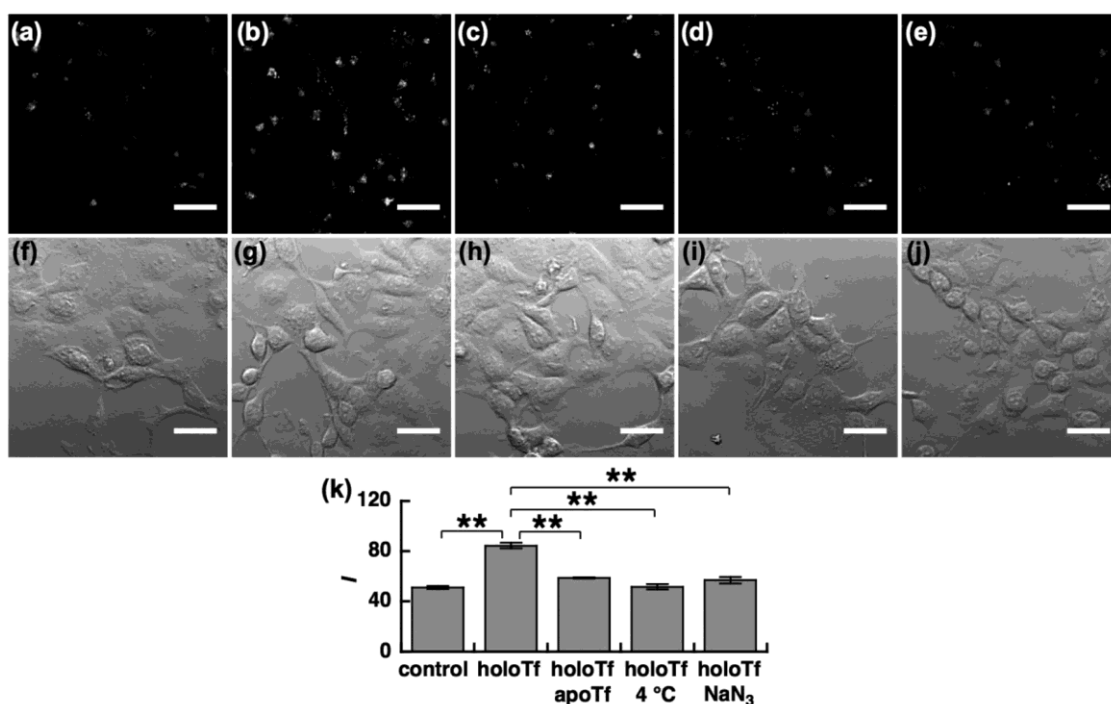
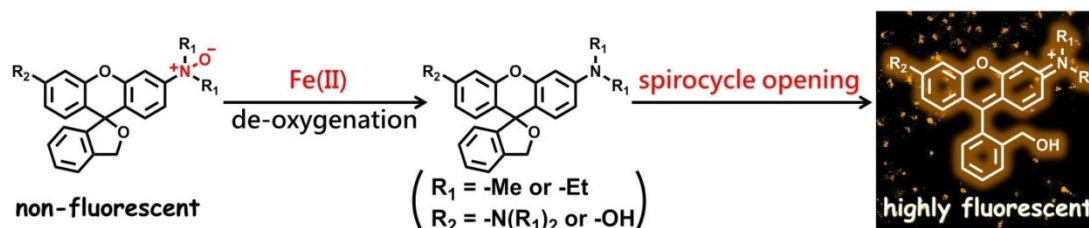


Figure 16. Confocal fluorescence microscopy images for monitoring Tf-induced iron uptake of HepG2 cells using HMRhoNox-M. (a) Image of HepG2 cells incubated with 1 μ M HMRhoNox-M at 37 °C for 30 min. (b) Image of HepG2 cells supplemented with 5 μ M holoTf at 37 °C for 30 min prior to treatment with 1 μ M HMRhoNox-M at 37 °C for 30 min. (c) Image of HepG2 cells supplemented with 5 μ M holoTf and 25 μ M apoTf at 37 °C for 30 min prior to treatment with 1 μ M HMRhoNox-M at 37 °C for 30 min. (d) Image of HepG2 cells supplemented with 5 μ M holoTf at 4 °C for 30 min and then treated with 1 μ M HMRhoNox-M at 37 °C for 30 min. (e) Image of HepG2 cells supplemented with 5 μ M holoTf and 1 mM NaN₃ at 37 °C for 30 min and then treated with 1 μ M HMRhoNox-M at 37 °C for 30 min. (f)–(j) Bright field image of the same slice of (a)–(e). (k) Quantification of data in (a)–(e). Statistical analyses were performed with a Student's *t*-test. ***P* < 0.01 (*n* = 3). Error bars in (k) show \pm s. e. m. Scale bars indicate 30 μ m.

第十節 小括

N-オキシドの脱酸素化による分子内スピロ環の開・閉環制御を基盤として、新たな二価鉄イオン検出蛍光プローブである HMRhoNox-M、HMRhoNox-E、HMFluNox-M、および HMFluNox-E を新たに開発した(*Scheme 10*)。



Scheme 10. Graphical abstract (Fe(II) fluorescent probes based on spirocyclized scaffolds)

蛍光団にヒドロキシメチル基と *N*-オキシドを導入することで、 pK_{cycl} 値を酸性側へシフトさせ、中性で非蛍光性のスピロ環化型構造が安定化するプローブ群を開発した。開発したプローブは設計通りに、反応前に背蛍光をほとんど持たないことがわかった。さらに、二価鉄イオンに対する応答速度の向上を目的として *N*-オキシド周囲の立体障害を低減させたプローブの開発も行なった結果、高い off-on コントラストと応答速度を示す HMRhoNox-M を見出すことに成功した。

合成したプローブはそれぞれ、生細胞中においても二価鉄イオンへの turn-on 型の蛍光応答を示し、HMFluNox-E を用いた場合を除き、細胞内在レベルの二価鉄イオンを検出することに成功した。さらに、HMRhoNox-M を応用し、トランスフェリン刺激により蓄積した二価鉄イオンを検出することにも成功した。加えて、ヒドロキシメチルロドールを蛍光団とした HMFluNox の開発にも成功したことから、*N*-オキシドの化学を基盤とした二価鉄イオン選択的スイッチングシステムは、第三級アミノオキシド構造を有する他の蛍光団にも応用可能であることが期待された。

第三章 細胞膜局在型二価鉄蛍光プローブの開発

第一節 本章における研究目的

【細胞小器官レベルで二価鉄イオンを解析する意義】

第一章で記述したように、二価鉄イオンは、その生理学的・病理学的重要性が示されてきたが、細胞内における詳細な挙動は未解明とされてきた。ここで、**Fig.17**に細胞内における鉄イオン輸送・濃度制御システムの概略図を示す。鉄は、細胞膜上における酸化還元やトランスポーターまたはエンドサイトーシスにより取り込まれ、細胞内に取り込まれた後には様々な細胞内区画に輸送され、貯蔵・利用されている^{15,18}。

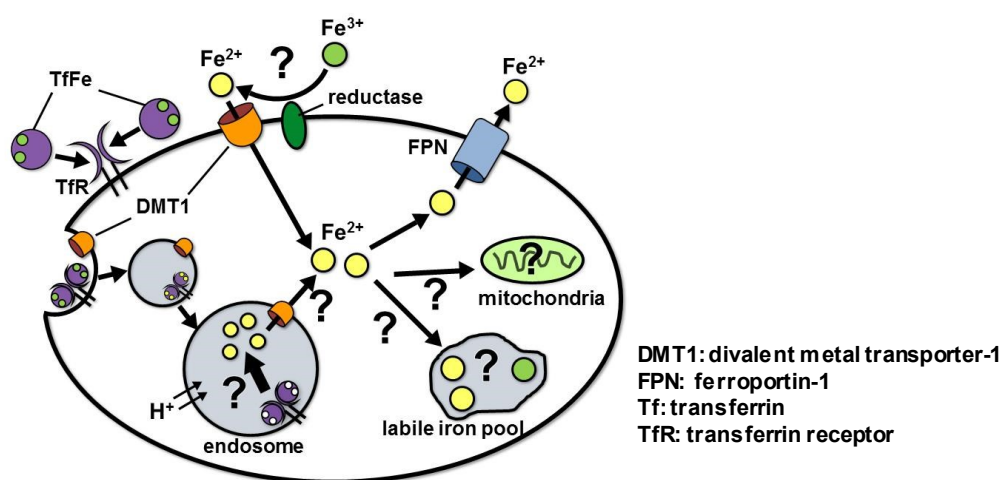


Figure 17. A schematic model for intracellular iron homeostasis.

従って、二価鉄イオンの動態・機能を解明するためには、細胞全体ではなく、各細胞小器官における二価鉄イオンの濃度変化を区別して解析する必要があると考え、細胞小器官レベルで二価鉄イオンを検出できる蛍光プローブの開発を計画した。

【細胞膜上で二価鉄イオンを検出できる蛍光プローブの開発】

本章における研究では細胞内外のゲートウェイとして機能する細胞膜に着目した。**Fig.17**に示した通り、細胞膜は鉄の細胞内外への輸送の場として機能しており、実際に細胞膜上では、トランスフェリン受容体(TfR)を介したエンドサイトーシスによる鉄取り込みやフェロポルチン(FPN)による鉄の排出等が行なわれている¹⁸。従って、細胞膜上における二価鉄イオンの挙動を解析できる蛍光プローブを開発することができれば、様々な鉄輸送機構における二価鉄イオンの挙動を明らかにすることができると考え、細胞膜上にアンカリングし、膜上で二価鉄イオンを検出可能できる蛍光プローブの開発を行なった。

第二節 細胞膜アンカリング型二価鉄イオン蛍光プローブの開発

【Mem-RhoNox の分子設計】

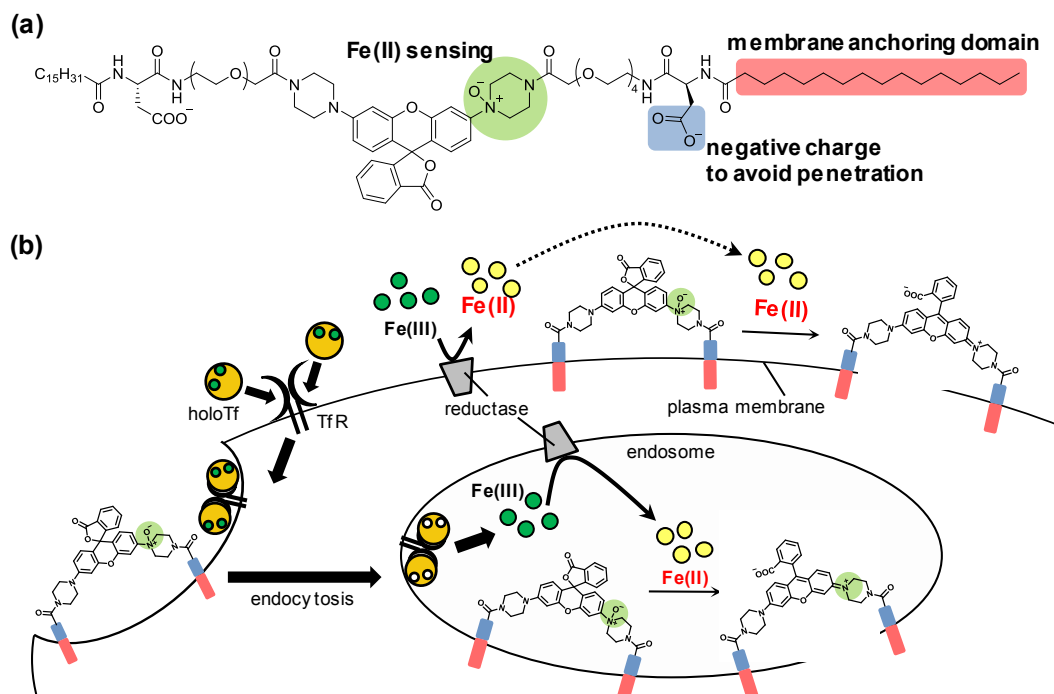
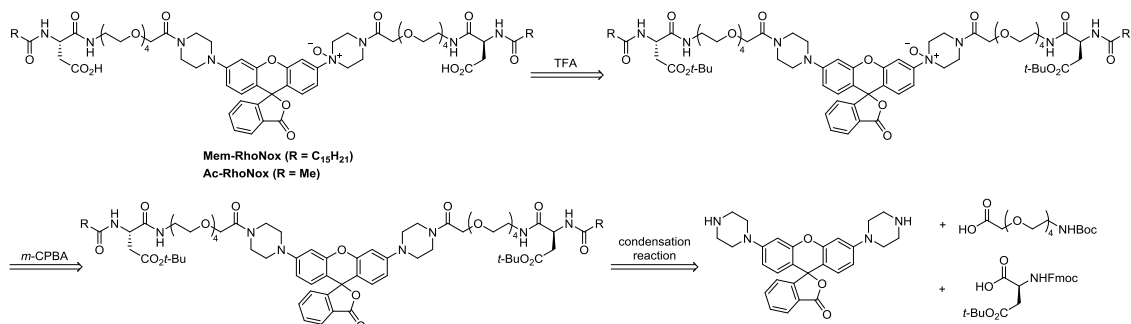


Figure 18. (a) Design of a membrane-anchoring fluorescent Fe(II) probe, Mem-RhoNox. (b) Concept of a membrane-anchoring fluorescent probe for the detection of Fe(II) on a cell surface and in internalized endosomes.

Fig.18(a)に細胞膜アンカリング型二価鉄イオン蛍光プローブ(Mem-RhoNox)の構造を示す。二価鉄イオン応答部位としてピペラジン *N*-オキシド構造を採用した。これにより、*N*-オキシドが二価鉄イオン応答部位として機能することに加え、ピペラジンの *N*-アシル構造を介して細胞膜アンカリング部位を組み込むことが可能となる。細胞膜アンカリング部位としては、細胞膜のリン脂質二重層と親和性の高いパルミトイル基を選んだ。また、プローブが細胞膜を透過することを妨げるために、テトラエチレングリコールを含むリンカー構造とパルミトイル基の間にアスパラギン酸を導入した。アスパラギン酸の側鎖のカルボキシ基は負電荷を帯びており、この性質により膜状のリン酸基との静電反発によりプローブの膜透過が抑制されると考えた。

以上の設計から Mem-RhoNox は、**Fig.18(b)**に示すように細胞膜上にアンカリングし、細胞膜上における還元反応で生じた二価鉄イオンを検出できると考えた。また、エンドサイトーシスが生じた際にエンドソーム膜上にアンカリングすることから、トランスフェリンエンドサイトーシスの過程で放出される二価鉄イオンをエンドソーム中で直接モニタリングできると考えた。

【Mem-RhoNox および Ac-RhoNox の合成戦略】

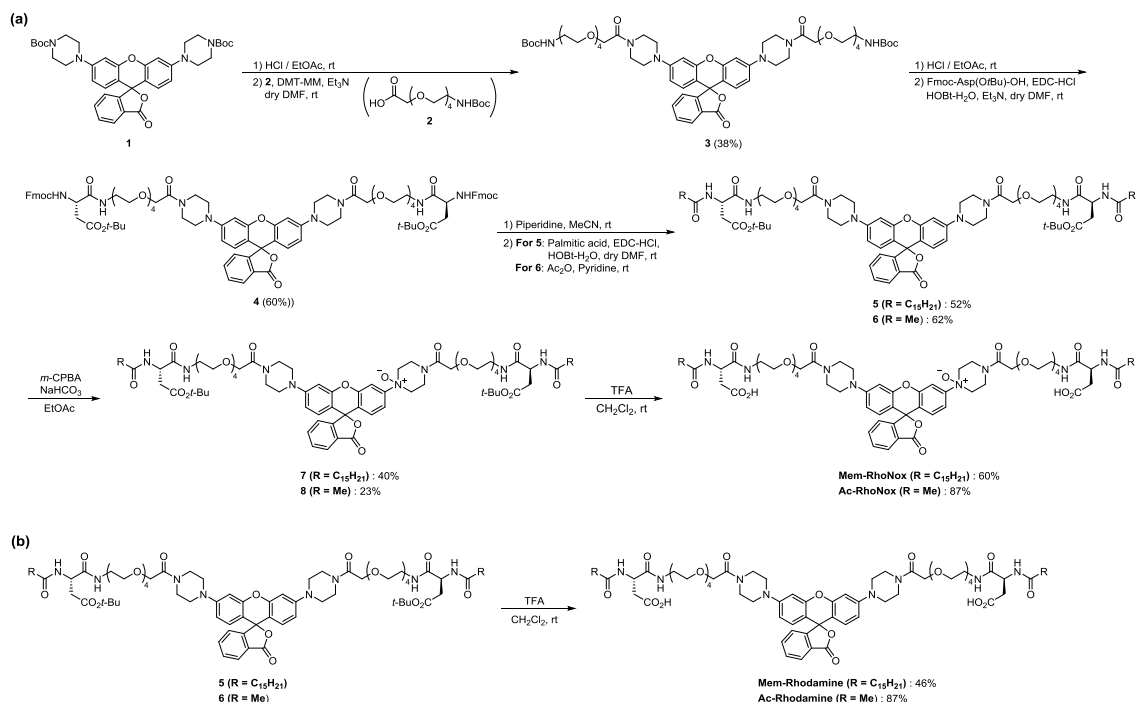


Scheme 11. Retrosynthetic strategy of Mem-RhoNox and Ac-RhoNox

順相系のシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる簡便な精製を指向し、極性の高いアスパラギン酸側鎖のカルボキシ基を、*N*-オキシド化した後の最終段階で脱保護する戦略とした(**Scheme 11**)。細胞膜アンカリング構造を持つローダミン誘導体は、ピペラジン構造を有するローダミンにテトラエチレングリコールリンカー、アスパラギン酸誘導体、パルミチン酸を順次縮合させて合成する計画とした。

ここで、パルミトイル基は細胞膜アンカリング構造として機能する設計であることから、細胞膜上における二価鉄イオンとの反応には関与しないことが予想される。そこで、キュベット中において二価鉄イオンとプローブの反応性を厳密に解析するべく、パルミトイル基の代わりにアセチル基を導入したモデル化合物 Ac-RhoNox も設計し、その合成戦略についても **Scheme 11** に示した。Ac-RhoNox はパルミトイル基の代わりにアセチル基を導入することで合成する計画とした。

【Mem-RhoNox および Ac-RhoNox の合成】



Scheme 12. (a) Synthesis of Mem-RhoNox and Ac-RhoNox. (b) Synthesis of Mem-Rhodamine and Ac-Rhodamine

まず、過去の報告³⁷に従ってピペラジン構造を有するローダミン誘導体**1**を合成した。続いて、**1**の脱 Boc 化を行ない、テトラエチレングリコールリンカー**2**³⁸との縮合反応により、化合物**3**を2工程収率38%で得た。**3**の *N*-Boc 基を除去した後にアスパラギン酸誘導体 Fmoc-Asp(OtBu)-OH と縮合させ、2工程収率60%で**4**を得た。次に、ピペリジンにより**4**の *N*-Fmoc 保護基を除去し、得られた第一級アミンをパルミチン酸と縮合させることで、2工程40%の収率で**5**を合成した。次に、*m*-CPBA を用いた**5**の *N*-オキシド化を実施し(収率40%)、最後に TFA による *t*-ブチルエステルの脱保護を行なった。ここで、Mem-RhoNox の精製に際して種々の TLC 分析を実施し、シリカゲルや ODS を単体とした TLC を検討したが、Mem-RhoNox と考えられるスポットが展開される条件は無かった。しかしながら、ジオールシリカ(富士シリシア、CHROMATOREX)を担体とした TLC を用いた場合に、Mem-RhoNox と考えられるスポットが容易に展開され、さらに不純物のスポットとの分離が可能であることを見出した。そこで、ジオールシリカゲルを用いた分離精製を実施し、高純度な Mem-RhoNox を60%の収率で得ることに成功した。

モデル化合物 Ac-RhoNox は、Mem-RhoNox の合成中間体**4**を出発原料とし、Mem-RhoNox と同様の経路で合成を行なった。まず、**4**の *N*-Fmoc 保護基をピペリジン

により除去した後に、生成した第一級アミンを無水酢酸と反応させ、**6**を2工程62%の収率で合成した。続いて、先程と同様に *N*-オキシド化とカルボキシ基の脱保護を **6**に適用した。脱保護した生成物は順相シリカゲルによる精製は困難であったものの、逆相 ODS により分離精製が可能であり、結果としてモデル化合物 Ac-RhoNox を収率 87%で得た。

Mem-RhoNox および Ac-RhoNox の合成とは別に、*N*-オキシド構造を持たない Mem-Rhodamine および Ac-Rhodamine の合成も実施した。それぞれは合成中間体 **5** および **6** のカルボキシ基を TFA により脱保護することで、46%および 87%の収率で得た。

第三節 キュベット中における Ac-RhoNox の鉄応答性の評価

【吸収および蛍光スペクトル測定による鉄応答性の評価】

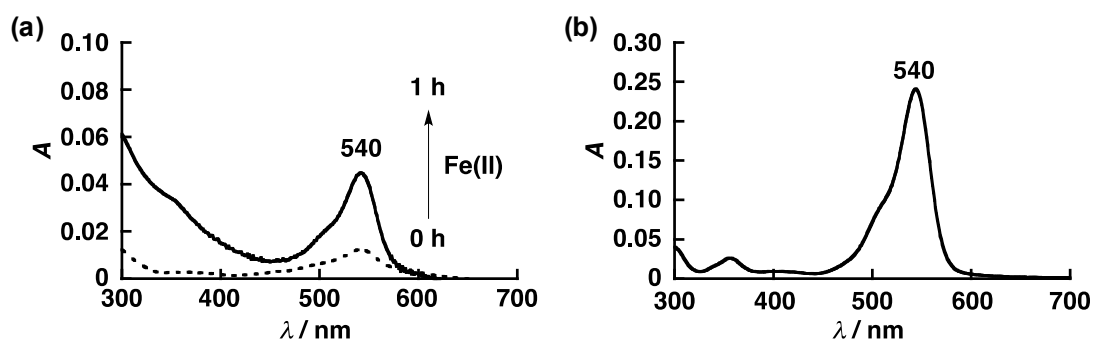


Figure 19. (a) UV-vis spectral change of 2 μM Ac-RhoNox upon reaction with 20 μM Fe(II). Dashed line and solid line indicate the spectra before and after incubation for 1 h, respectively. The data were acquired in 50 mM HEPES buffer containing 0.2% DMSO as a co-solvent, and FeSO_4 was used as Fe(II) source. (b) UV-vis spectrum of 2 μM Ac-Rhodamine in 50 mM HEPES buffer (0.2% DMSO as a co-solvent).

まず、モデル化合物 Ac-RhoNox および Ac-Rhodamine の吸収スペクトル測定を実施した。Ac-RhoNox は可視光領域に弱い吸収を持ち($\epsilon_{540} = 6,100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; **Fig.19a, dashed line**)、一方で *N*-オキシドを持たない Ac-Rhodamine は、可視光領域に強い吸収を示した($\epsilon_{540} = 116,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; **Fig.19b**)。この結果は、第一章で記述した HMRhoNox や HMFluNox と同様に、反応前は *N*-オキシドにより非蛍光性のスピロ環化構造が安定化され、*N*-オキシドを持たない Ac-Rhodamine は強蛍光性のキノイド型構造として存在す

ることを示している。続いて、Ac-RhoNox を二価鉄イオンと 1 時間反応させた後に吸収スペクトルを測定したところ、可視光領域における吸光度の増大が観察された(**Fig.19a, solid line**)。

以上の結果より Ac-RhoNox は、HMRhoNox や HMFluNox の場合と同様に、反応前は主にスピロラクトン型構造として存在し、二価鉄イオンとの反応後はキノイド構造へと変化することがわかった。

次に、蛍光スペクトル測定によりモデル化合物 Ac-RhoNox の鉄応答性を評価した(**Fig.20**)。

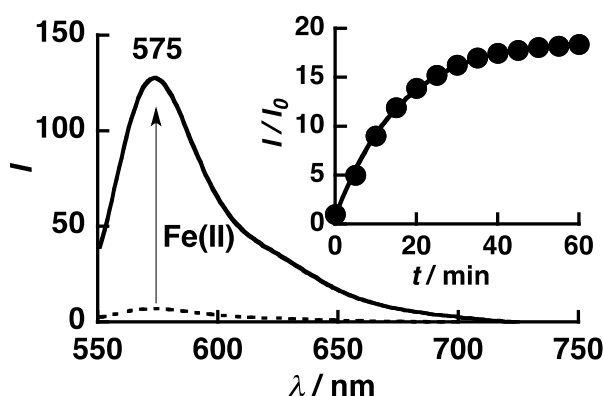


Figure 20. Fluorescence spectral change of 2 μM Ac-RhoNox upon the addition of 20 μM Fe(II). The dashed line and solid lines indicate the fluorescence spectra at 0 min and 60 min, respectively. (Inset) Plot of the relative fluorescence intensity at 575 nm against time. FeSO_4 was used as the ferrous iron source.

Ac-RhoNox は反応前、ほとんど蛍光を持たないことがわかった($\lambda_{\text{em}} = 575 \text{ nm}$, $\Phi = \text{n.d.}$; **Fig.20, dashed line**)。続いて、二価鉄イオンと 1 時間反応させたところ、20 倍の蛍光応答を示した(**Fig.20, solid line**)。この結果は、Ac-RhoNox は反応前、*N*-オキシドによる消光効果や非蛍光性のスピロ環構造の安定化により弱蛍光性を示す一方、二価鉄イオンによる脱酸素化により強蛍光性の Ac-Rhodamine ($\lambda_{\text{em}} = 575 \text{ nm}$, $\Phi = 0.44$)を生成したと考えられる。

また、二価鉄イオンに対する Ac-RhoNox の反応速度($k_{\text{obs}} = 1.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, **Fig.20, inset**)は、プロトタイプである RhoNox-1 ($k_{\text{obs}} = 3.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$)¹⁹と比較して高いことが明らかとなった。第一章で記述したように、RhoNox-1 は中性条件下でキノイド型構造を取り、可視光領域に強い吸収を示す($\epsilon_{492} = 24,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。一方で、Ac-RhoNox はスピロ環化

構造が安定化されており、可視光領域におけるモル吸光係数が小さい($\epsilon_{540} = 6,100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; **Fig.19a, dashed line**)。著者の所属研究室では最近、*N*-オキシドの求核性の観点から、スピロ環化構造の含 *N*-オキシド二価鉄イオンプローブは、キノイド構造のプローブと比較して高い反応速度を示すことを報告している³⁹。従って、Ac-RhoNox が主にスピロ環化構造として存在するために、RhoNox-1 と比較して高い反応速度を示したと考えられる。また、Ac-RhoNox が第一章で示した HMRhoNox-M(**Fig.8a**, $k_{\text{obs}} = 2.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)と比較して反応速度が低いこともわかった。この原因は、HMRhoNox-M が完全に閉環型構造として存在することと、HMRhoNox-M の *N*-オキシド周囲の立体障害が小さいことの2点にあると考えられる。

以上の結果より、今回開発したプローブは、テトラエチレングリコールリンカーやアスパラギン酸といった構造を有するものの、これまでに開発してきた二価鉄イオン蛍光プローブ^{25,39,40}と同様に機能することが確認された。

【Ac-RhoNox の検出感度の評価】

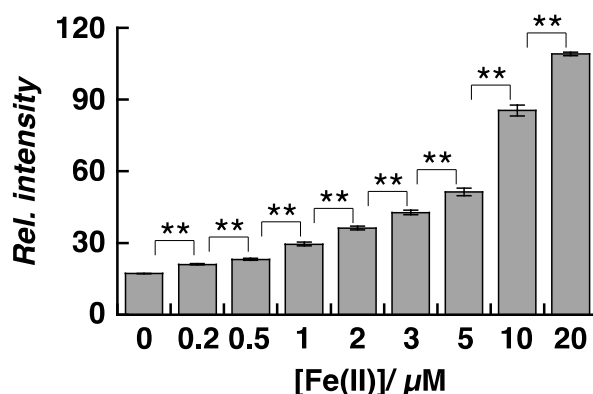


Figure 21. Plot of fluorescence intensity changes of 2 μM Ac-RhoNox upon reaction with multiple concentrations of Fe(II) (0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10, and 20 μM) for 1 h. Statistical analyses were performed with a Student's *t*-test. ** $P < 0.005$, ($n = 5$). Error bars show \pm S.E.M.

プローブ濃度を 2 μM とし、様々な濃度の二価鉄イオンと反応させたところ、Ac-RhoNox は 0.2 μM から 20 μM までの広範囲の二価鉄イオンに対して濃度依存的な蛍光応答を示すことが分かった。

【LCMS を用いた反応解析】

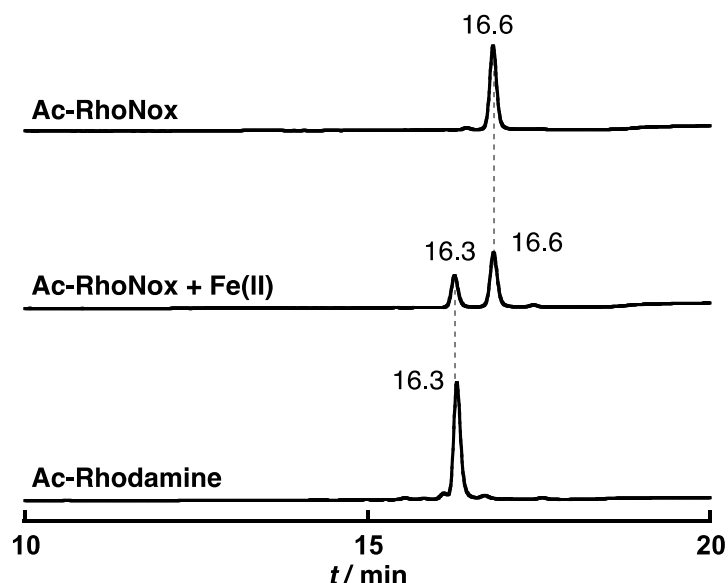


Figure 22. LC-MS analysis of the Fe(II)-triggered deoxygenation reaction of Ac-RhoNox. Ac-RhoNox (50 μ M) was incubated with 200 μ M Fe(II) for 1 h in 50 mM HEPES buffer (pH 7.4). FeSO₄ was used as Fe(II) source. The corresponding deoxygenated dye Ac-Rhodamine was used as the authentic sample. The reaction mixtures were analyzed by an LC-MS system with a reverse phase column (Waters symmetry C18, 3.5 μ m, 4.6 \times 75 mm) eluted with a gradient as follows; H₂O/MeCN containing 0.05% formic acid (90:10 to 50:50 over 30 min, 0.5 mL/min). The absorbance at 254 nm was monitored. Total ion mass spectra were simultaneously measured to give the mass peaks as follows: 633.3 (calcd for [Ac-RhoNox+2H]²⁺ = 633.3) at 16.6 min, 625.3 (calcd for [Ac-Rhodamine+2H]²⁺ = 625.3) at 16.3 min.

Ac-RhoNoxと二価鉄イオンの反応をLCMSにより詳細に解析した。**Fig.22**上段はAc-RhodamineのHPLCチャートを示し、中段は、Ac-RhoNoxと二価鉄イオンを1時間反応させた後のHPLCチャートである。下段は、*N*-オキシド部位を持たないAc-RhodamineのHPLCチャートを示す。結果として、二価鉄イオンとの反応の結果、Ac-RhoNoxが消費され、脱酸素化体であるAc-Rhodamineが生成していることが分かった。また、第一章で記述したHMRhoNoxやHMFluNoxとは異なり、脱*N*-アルキル化反応により生成する副生成物は確認されず、脱酸素化反応のみが進行していることが確認された。

第四節 二価鉄イオンに対する選択性試験

二価鉄イオンに対する選択性試験を実施した。結果として、Ac-RhoNox は、二価鉄イオン以外の金属イオン種や酸化剤、還元剤等とは全く反応せず、二価鉄イオンのみに turn-on 型の蛍光応答を示すことが分かった(**Fig.23**)。

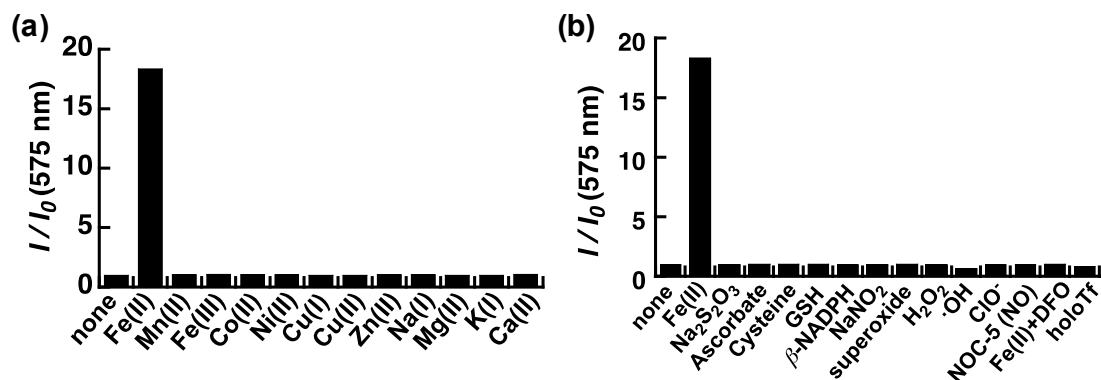


Figure 23. (a) Fluorescence response of 2 μ M Ac-RhoNox upon the addition of various metal ions (1 mM for Na(I), Mg(II), K(I), and Ca(II) and 20 μ M for all other metal ions). (b) Fluorescence response of Ac-RhoNox against various biological reductants, reactive oxygen species, chelator. Bars represent the relative fluorescence intensities at 575 nm. All of the data were acquired after 1 h incubation in a 50 mM HEPES buffer (pH 7.4, 0.2% DMSO). Excitation was provided at 540 nm.

第五節 生細胞を用いた Mem-RhoNox の機能評価

【細胞膜局在性の評価】

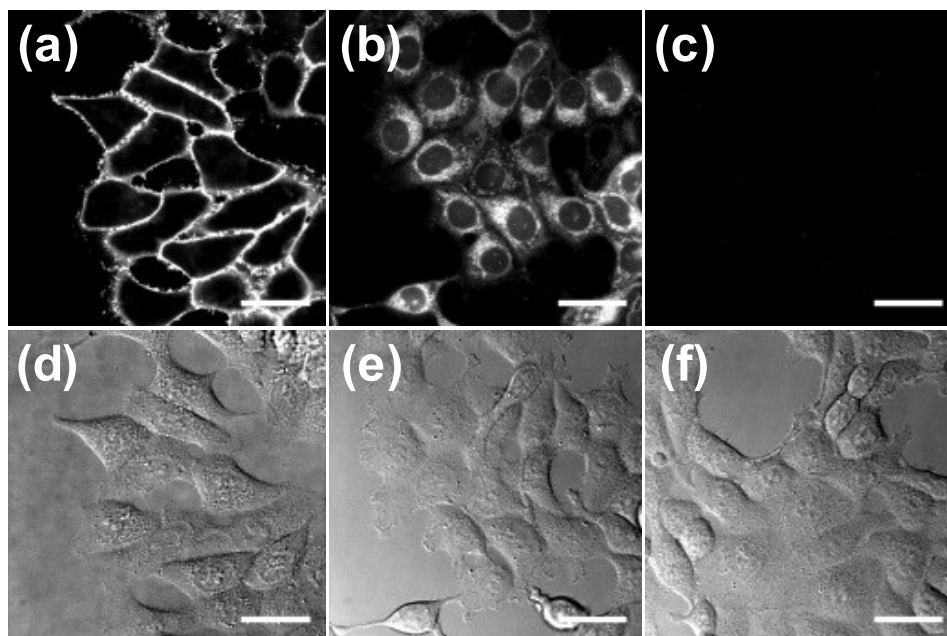


Figure 24. Fluorescence microscopic images of HepG2 cells treated with (a) Mem-Rhodamine, (b) 5, and (c) Ac-Rhodamine in HBSS at 37 °C for 30 min. The dye concentration was 0.2 μ M in all of the experiments. (d)–(f) Differential interference contrast (DIC) images for the same slices of (a)–(c), respectively. Scale bars indicate 30 μ m.

まず、Mem-RhoNox の細胞膜局在性を確認するために、*N*-オキシドを持たない強蛍光性の色素である Mem-Rhodamine で HepG2 細胞を処理し、培地洗浄後に蛍光イメージングを実施した。その結果、細胞の輪郭状に蛍光シグナルが見られ、プローブが膜上に局在する様子が観察された。さらに、細胞内からは蛍光シグナルが全く観察されなかったことから、Mem-Rhodamine の細胞内移行は、無視できるレベルにあることが示唆された(**Fig.24a**)。

同様の手法にて、カルボン酸部位が *t*-ブチル基で保護された色素 **5** で細胞を処理したところ、細胞膜上における蛍光シグナルは観察されず、細胞内にシグナルがみられたことから、色素 **5** は細胞内へと移行していることが分かった(**Fig.24b**)。このことから、アスパラギン酸側鎖のカルボキシ基は、プローブの細胞膜透過を抑制するために必須の構造要件であることが分かった。

次に、パルミトイル基の代わりにアセチル基を持つ Ac-Rhodamine で細胞を処理した

ところ、全領域において蛍光シグナルが観察されなかった(**Fig.24c**)。このことから、パルミトイル基は細胞膜へのアンカリングに必須の構造要件であることが分かった。

以上の結果より、分子設計にて期待したとおり、細胞膜のリン脂質二重層と相互作用するためのパルミトイル基と、分子の細胞膜透過を防ぐカルボキシ基の両者が、細胞膜への保持に必須の構造要件であることが示された。

【細胞膜上における二価鉄イオンの検出】

続いて、細胞膜上における Mem-RhoNox の二価鉄イオン応答性を評価した。HepG2細胞を $1\ \mu\text{M}$ の Mem-RhoNox で 10 分間処理し、培地洗浄後に $10\ \mu\text{M}$ の硫酸アンモニウム鉄(FAS)を添加し、1 分後、15 分後および 30 分後に蛍光顕微鏡にて観察した。二価鉄イオン添加直後 (1 分後) はほとんど蛍光シグナルが観察されなかったが、15 分後に、細胞膜上における顕著な蛍光シグナルの増大が観察された(**Fig.25b**)。

続いて、**Fig.25b** で観察された蛍光応答が細胞膜上における二価鉄イオンと Mem-RhoNox の反応由来であることを確認するため、細胞膜透過性の低い鉄イオンキレーターであるデフェロキサミン(DFO)⁴¹ 共存下で二価鉄イオンの添加実験を実施した。ここで、本実験を行なうに際し、キュベット中において DFO がプローブと二価鉄イオンの反応を阻害することを確認している(**Fig.23b**)。イメージングの結果、キュベット中における実験と同様、DFO 存在下では蛍光シグナルの増大が抑制された。すなわち、二価鉄イオン添加により観察された蛍光応答は、細胞外膜上における二価鉄イオンと Mem-RhoNox の反応由来であることが示された(**Fig.25c**)。

さらに、二価鉄イオン未処理の場合、30 分の間蛍光シグナル強度にほとんど変化がないことが分かった(**Fig.25a**)。この結果は、Mem-RhoNox が分解して蛍光を示すこと無く細胞膜上に安定的に存在していることを示している。

以上の結果より、Mem-RhoNox は細胞膜上に十分保持され、細胞膜上で二価鉄イオンを検出できることが分かった。

【細胞膜上で鉄還元酵素により還元されて生じた二価鉄イオンの検出】

HepG2 細胞を Mem-RhoNox で処理した後に、三価の鉄イオンであるクエン酸アンモニウム鉄(FAC)を添加したところ、二価鉄イオン添加の場合と比較して反応は緩やかであるものの、30 分後に細胞膜上における蛍光シグナルの増大が観察された(**Fig.25e**)。前章に記述したように、プローブは三価の鉄イオンに対して全く応答を示さない(金属選択性試験(**Fig.23a**))ことから、本現象は興味深いものであると考えた。実際、**Fig.17**に示したように、細胞膜上で鉄還元酵素が三価鉄イオンを二価鉄イオンへと還元し、生成した二価鉄イオンが二価金属イオントランスポーター(DMT1)を介して細胞内へと取り込まれる機構が提唱されているが、鉄イオンの価数を調査し、細胞膜上で二価鉄イオンが発生していることを直接的に証明した例は無い^{34,35}。そこで、今回得られた結果が細胞膜上における鉄イオンの還元反応に起因することを検証すべく、鉄還元酵素を含む NADPH 依存的酵素の阻害剤である diphenyliodonium chloride (DPI)^{42,43}を用いた還元反応の阻害実験を行なった。その結果、DPI の共存下においては、FAC 添加による蛍光増大が有意に抑制された(**Fig.25f**)。

以上の結果より、Mem-RhoNox を使ったイメージング実験から、実際に鉄イオンの取り込み過程において、細胞膜上で三価鉄イオンが還元され、二価鉄イオンが生じる様子を観察することができた。また、三価鉄イオン処理による蛍光シグナルの増大は二価鉄イオンの場合と比較して緩やかであったが、この結果は、三価鉄イオンの鉄取り込みは、二価鉄イオンを直接添加した場合と比較してタイムラグが生じることを示した過去の報告⁴⁴を支持するものである。

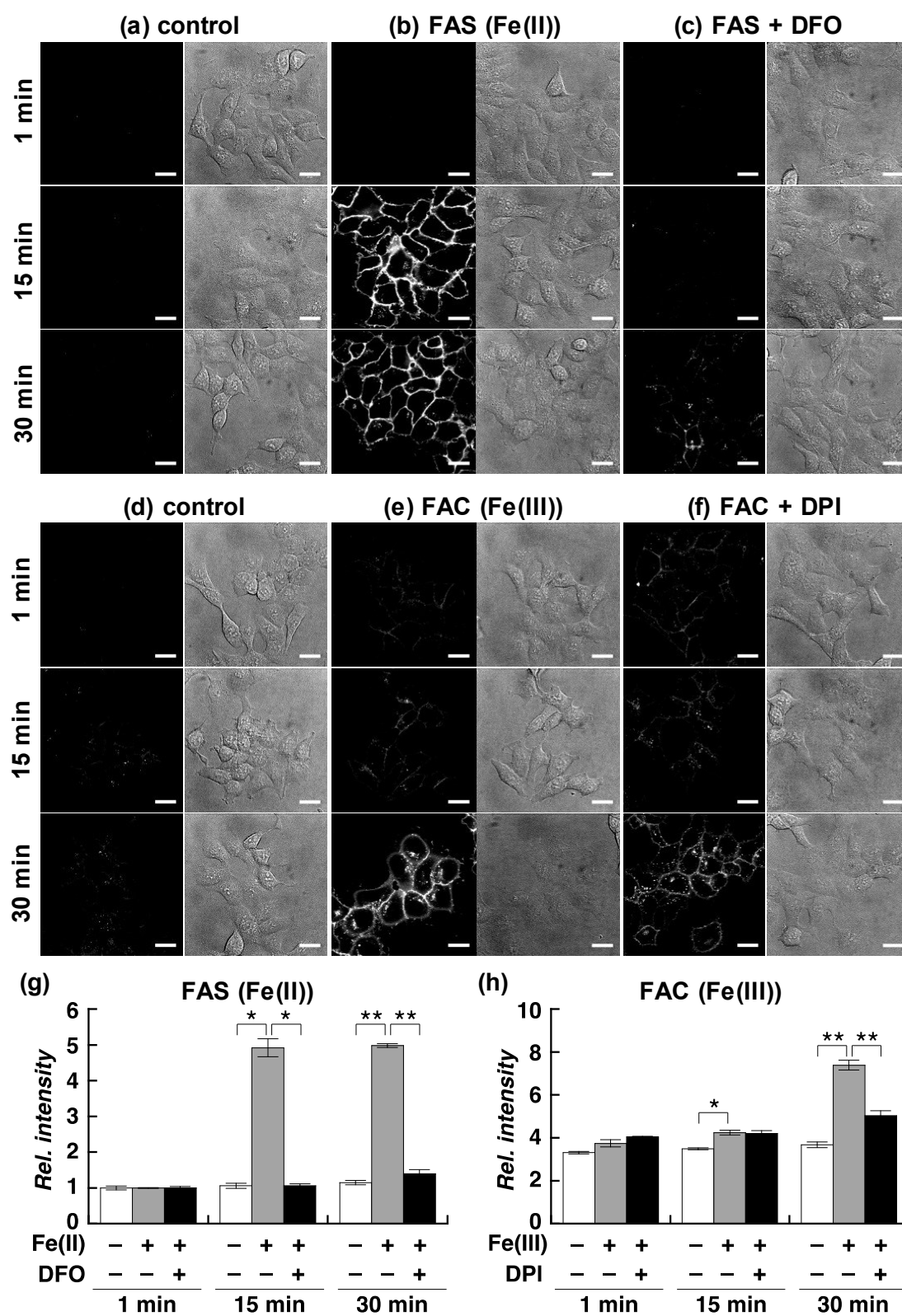


Figure 25. Representative confocal microscopy images of HepG2 cells labeled with Mem-RhoNox for the detection of Fe(II) on the plasma membrane. Cells were labeled with 1

μ M Mem-RhoNox for 10 min and then treated with (a) vehicle, (b) 10 μ M ferrous ammonium sulfate (FAS), (c) 10 μ M FAS in the presence of deferoxamine (DFO), (d) vehicle, (e) 10 μ M ferric ammonium citrate (FAC), or (f) 10 μ M FAC in the presence of 100 μ M diphenyliodonium chloride (DPI). DIC images for the same fluorescence image slices are shown at the right. Imaging pictures were taken at 1, 15, and 30 min after each treatment. Scale bars indicate 20 μ m. (g) Quantification of the fluorescence signal data in panels (a) (white bars), (b) (gray bars), and (c) (black bars) (h) Quantification of the fluorescence signal data in panels (d) (white bars), (e) (gray bars), and (f) (black bars). Scale bars indicate 20 μ m. Statistical analyses were performed with a Student's *t*-test: **P* < 0.01, ***P* < 0.001, and *n* = 3. Error bars show \pm S.E.M.

第六節 Mem-RhoNox の応用①：トランスフェリンによる鉄取り込みの可視化

【トランスフェリンによる鉄取り込み機構に関する考察】

トランスフェリンエンドサイトーシスは、多様な細胞における主要な鉄イオンの取り込み機構である。その機構は、まず **Fig.17** に示すようにトランスフェリン-鉄複合体 (holoTf) が細胞膜上のトランスフェリン受容体 (TfR) に結合することから開始する^{30,31}。次いで、holoTf-TfR 複合体がエンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれ、エンドソームが酸性化を受けることで holoTf から三価鉄イオンが遊離する^{30,33}。続いて、エンドソーム膜に存在する鉄還元酵素 (STEAP3)^{34,35} により三価鉄イオンが二価鉄イオンへと還元され、生成した二価鉄イオンがエンドソーム膜に存在する二価金属トランスポーター1 (DMT1) を経由して細胞内に放出される^{5,36}。以上の機構がこれまでに提唱されているが、エンドソーム中で二価の鉄イオンが遊離することは、エンドソーム膜に STEAP3 および DMT1 が存在する知見^{3,34,35} から間接的に推定されたメカニズムであり、その真偽は定かではなかった。

そこで、今回開発した Mem-RhoNox を用い、本現象の解析に着手した。分子設計に示したように、Mem-RhoNox はトランスフェリンエンドサイトーシスが誘起された際に、Tf-TfR 複合体と共にエンドソーム内へと取り込まれる。そのため、エンドソーム内で放出された二価鉄イオンを直接検出できれば (**Fig.18**)、本メカニズムを直接証明することができると考えた。

ここで、トランスフェリンエンドサイトーシスはクラスリン依存性のエンドサイトーシスであるため、早期エンドソームの直径は~100 nm であると推定される^{45,46}。holoTf に結合している鉄は2原子であることから、鉄2原子がエンドソーム中で放出された際

の早期エンドソーム内の局所的な鉄イオン濃度は $\sim 6 \mu\text{M}$ と考えられる(実験の部参照)。ここで、**Fig.21**の濃度依存性試験の結果より、プローブの検出限界は $6 \mu\text{M}$ より十分低いことが分かっており、Mem-RhoNoxは本現象を解析するために十分な感度を有していると考え、以下に続く実験を開始した。

【トランスフェリンによる鉄取り込み過程のイメージング】

HepG2細胞を $1 \mu\text{M}$ のMem-RhoNoxで処理した後に $5 \mu\text{M}$ のholoTfを添加し、30分間のタイムラプスライブ蛍光イメージングを実施した。また、得られた画像については、微分干渉(DIC)画像中で任意に選択した細胞の細胞膜上に10点の対象領域(region of interest, ROI)を設定し、各ROIにおける蛍光強度を平均化した値($n=10$)を時間に対してプロットし、その蛍光シグナルの時間変化を評価した(**Fig.26g**)。

その結果、holoTf添加後にエンドソーム様の点状の蛍光シグナルが観察され、次いで、核周辺の細胞内区画や細胞膜における蛍光シグナルも増大した(**Fig.26a**)。ここで観察されたエンドソーム様の蛍光シグナルは、エンドソーム内でMem-RhoNoxが二価鉄イオンと反応し、強蛍光性のMem-Rhodamineが生成したことに起因すると考えられる。また、細胞膜や細胞内区画における蛍光シグナル増大は、エンドソームの細胞膜へのリサイクリング機構およびトランスゴルジネットワーク機構に起因すると考えられる^{36,46}。

続いて、holoTf刺激により生じた蛍光シグナル増大が、エンドソーム中で二価鉄イオンが放出される現象に由来することを確かめるために、**Fig.26(b)–(e)**に示す各種阻害剤を用いて、トランスフェリンを介した鉄取り込み機構の阻害実験を行なった。各阻害剤の詳細に関して以下に列挙した。

- ・ アポトランスフェリン(apoTf) : holoTfのTfRへの結合を競合的に阻害する。³¹
- ・ アジ化ナトリウム(NaN_3) : ATP依存性エンドサイトーシスを阻害する。³²
- ・ 塩化アンモニウム(NH_4Cl) : エンドソーム酸性化を阻害し、鉄イオンの遊離を抑制する。^{32,47}
- ・ デフェロキサミン(DFO) : 細胞膜透過性の低い鉄イオンキレーターであり、エンドソームと一緒に取り込まれ、エンドソーム中で放出された鉄イオンを捕捉する。一方で、holoTfから直接鉄イオンを引き抜くことは無い(**Fig.27**)。⁴¹

以上の阻害剤共存下でholoTfを添加したところ、蛍光シグナルの増大はholoTfのみ

の場合と比較して有意に抑制された(**Fig.26b-e**)。塩化アンモニウムを阻害剤として用いた場合において僅かながら蛍光の増大が観察されたが(**Fig.26d**)、この結果は、塩化アンモニウムによる鉄取り込みの阻害効果が 60%程度であることに起因していると考えられる。

さらに、鉄原子の代わりにマンガン原子と結合したトランスフェリン(Mn_2Tf)で細胞を処理したところ、蛍光シグナルの増大は全く観察されなかった(**Fig.26f**)。 Mn_2Tf は holoTf と同様の機構でエンドサイトーシスをによって取り込まれ、エンドソーム中でマンガンイオンを放出することが知られている^{48,49}。従って、トランスフェリンエンドサイトーシスの過程における一連のメカニズム自体は、**Mem-RhoNox** による蛍光応答を引き起こさないことがわかった。

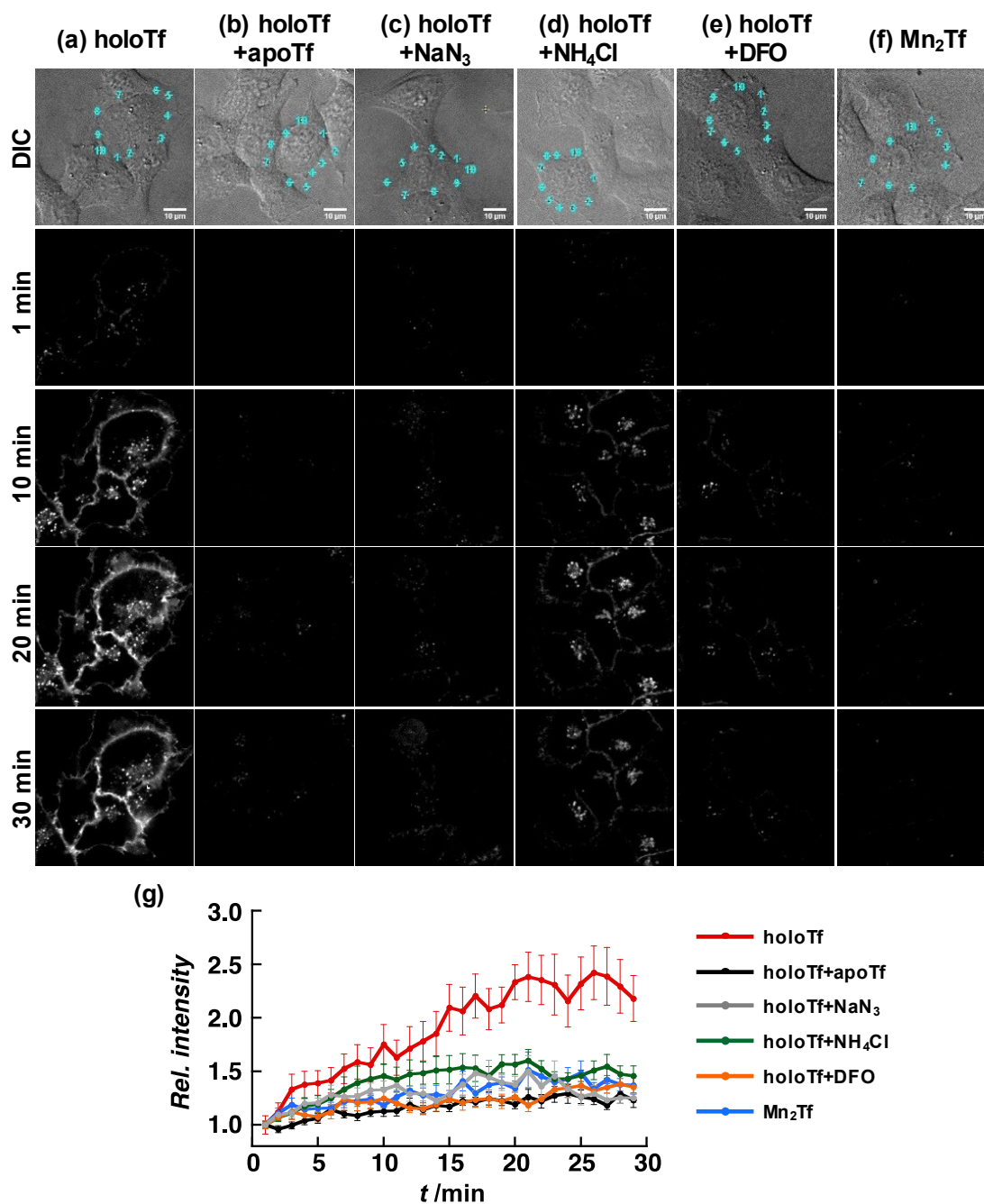


Figure 26. Representative confocal microscopy images of HepG2 cells labeled with Mem-RhoNox for the detection of Fe(II) on the plasma membrane. Cells were labeled with 1 μ M Mem-RhoNox for 10 min and then treated with (a) vehicle, (b) 10 μ M ferrous ammonium sulfate (FAS), (c) 10 μ M FAS in the presence of deferoxamine (DFO), (d) vehicle, (e) 10 μ M ferric ammonium citrate (FAC), or (f) 10 μ M FAC in the presence of 100 μ M diphenyliodonium chloride (DPI). DIC images for the same fluorescence image slices are shown at the right. Imaging pictures were taken at 1, 15, and 30 min after each treatment. Scale bars indicate 20 μ m. (g) Quantification of the fluorescence signal data in panels (a)

(white bars), (b) (gray bars), and (c) (black bars) (h) Quantification of the fluorescence signal data in panels (d) (white bars), (e) (gray bars), and (f) (black bars). Scale bars indicate 20 μm . Statistical analyses were performed with a Student's *t*-test: * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, and $n = 3$. Error bars show \pm S.E.M.

【holoTf に対する DFO の影響の確認】

ここで、鉄イオンキレーターである DFO が holoTf から直接鉄イオンを引き抜かないことを、吸収スペクトル測定を用いて確認した(**Fig.27**)。

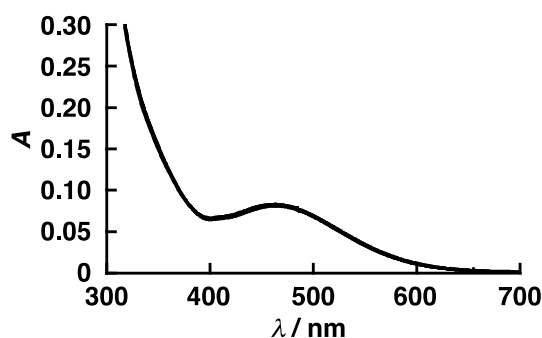


Figure 27. Absorbance spectra of 20 μM holoTf upon addition of various concentrations of DFO (10, 20, 50, 100, 200, and 400 μM). All the spectra are overlapped. All the data were acquired in 50 mM HEPES buffer (pH 7.4, 0.2% PBS) at 25 °C.

holoTf は鉄イオンと配位しており、可視光領域に強い吸収を示すが、鉄イオンが遊離した状態の apoTf は可視光領域に吸収を持たない。HEPES 緩衝液中、holoTf に対して各種濃度の DFO を添加し、吸収スペクトルを測定したところ、DFO の濃度変化に関わらず、holoTf は一定の吸光度を示した。従って、DFO は holoTf から直接鉄イオンを引き抜かない、すなわち、**Fig.26e** における蛍光シグナル増大の抑制は、エンドソーム中で遊離した鉄イオンを DFO が捕捉したことによるものであることが示している。

【pH 依存性試験】

次に、エンドソームは酸性オルガネラであることから、pH 変化がプローブに与える影響を確認した(Fig.28,29)。

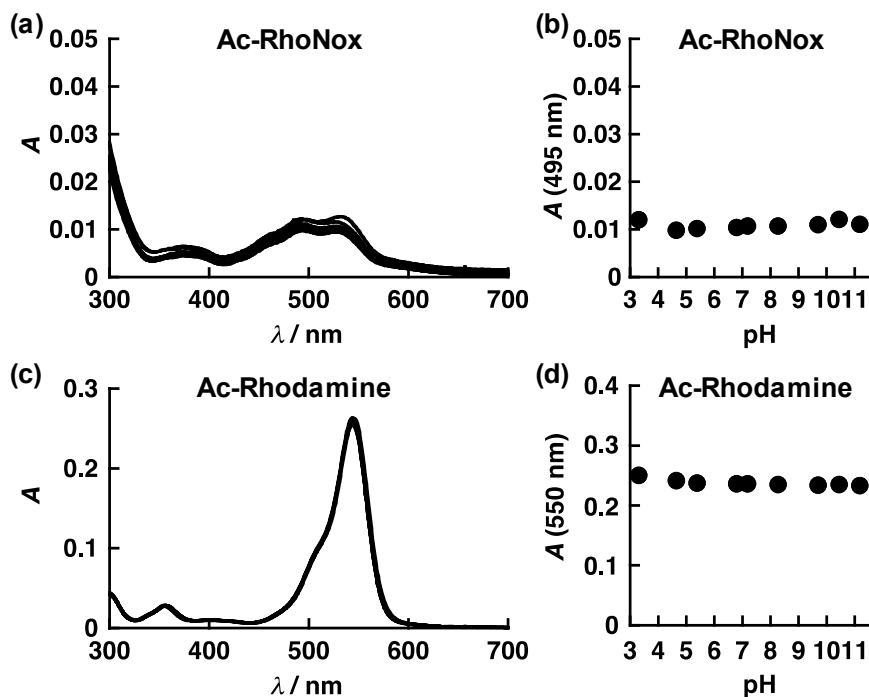


Figure 28. Absorbance spectra of (a) Ac-RhoNox and (c) Ac-Rhodamine at various pH (1.64, 2.08, 3.30, 4.64, 5.38, 6.80, 7.18, 8.26, 9.69, 10.44, 11.18, 12.44). Plots of absorbance of (b) Ac-RhoNox and (c) Ac-Rhodamine at each maximal absorption wavelength (495 nm and 550 nm, respectively) against pH (right). All the data was collected with dye concentrations of 2 μ M and 0.2% DMSO as a co-solvent.

Ac-RhoNox および Ac-Rhodamine の各 pH における吸収スペクトル測定を実施したところ、それぞれ pH の変化に関わらず、一定の吸収スペクトルを示した。

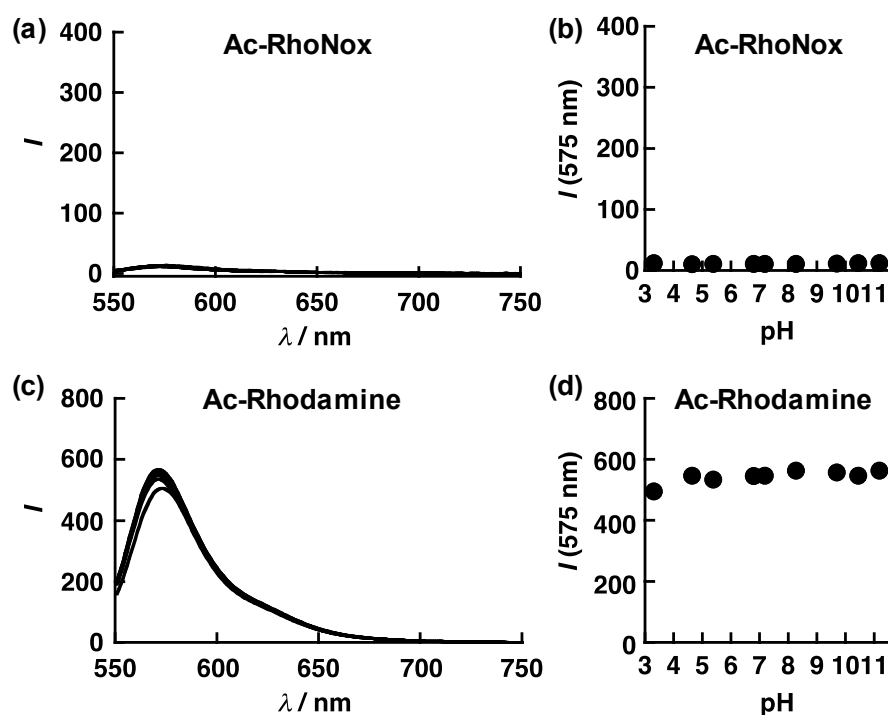


Figure 29. Fluorescence spectral change of (a) Ac-RhoNox and (c) Ac-Rhodamine at various pH (1.64, 2.08, 3.30, 4.64, 5.38, 6.80, 7.18, 8.26, 9.69, 10.44, 11.18, 12.44). Plots of fluorescence intensity of (b) Ac-RhoNox and (c) Ac-Rhodamine at maximal emission wavelength (575 nm, respectively) against pH (right). All the data was collected with dye concentrations of 2 μM and 0.2% DMSO as a co-solvent. Excitation was provided at 540 nm.

Ac-RhoNox と Ac-Rhodamine の pH 依存性を蛍光スペクトル測定により確認したところ、吸収スペクトルの場合と同様に、それぞれ pH の変化に関わらず一定の蛍光スペクトルを示した(**Fig.29**)。

【酸性条件下におけるプローブの鉄応答性】

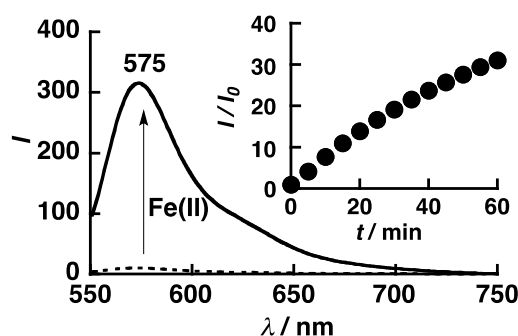


Figure 30. (a) Fluorescence spectra of Ac-RhoNox after addition of 20 μM Fe(II) in the acidic condition. Dotted line and solid line indicate fluorescence spectra at 0 min and 60 min, respectively. (Inset) Plot of relative fluorescence intensity at 575 nm against time. All the data were acquired at every 5 min for 1 h with a probe concentration of 2 μM in 50 mM HEPES buffer (pH 5.0, 0.2% DMSO) at 25 $^{\circ}\text{C}$. FeSO_4 was used as a ferrous iron source. Excitation was provided at 540 nm.

酸性条件下における二価鉄イオン応答性を確認した(**Fig.30**)。pH 5.0 に調製した HEPES 緩衝液中で Ac-RhoNox と二価鉄イオンを 1 時間反応させたところ、顕著な蛍光強度の増大が観察された。

以上の pH 依存性試験と酸性条件下での鉄応答性試験の結果より、Mem-RhoNox の分光化学的性質自体はエンドソームの酸性化の影響を受けず、また、酸性化を受けたエンドソーム中においても、二価鉄イオンを高感度に検出できることが分かった。従って、holoTf 処理により観察された蛍光シグナルの増大は、エンドソームの酸性化によるものではなく、Mem-RhoNox と二価鉄イオンの反応に由来していることが示唆された。

【蛍光標識トランスフェリンを用いたマルチカラー蛍光イメージング】

次に、holoTf 処理により観察された蛍光シグナルの増大は、トランスフェリンエンドサイトーシスの過程で生じたエンドソーム内で起きた現象であることを厳密に確認するべく、蛍光標識した holoTf とのマルチカラー蛍光イメージングを実施した(**Fig.31**)。

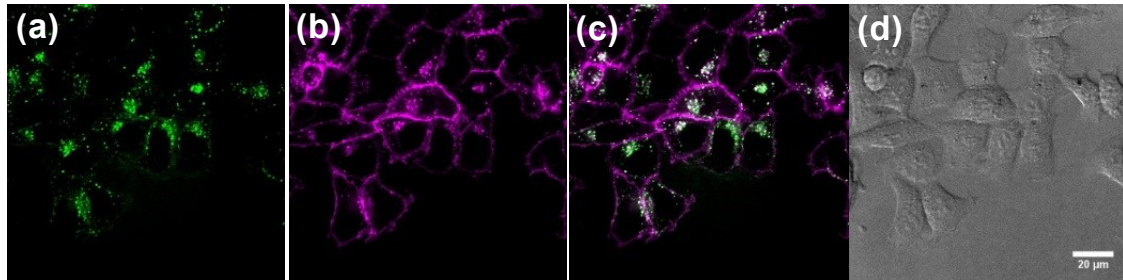


Figure 31. Co-staining experiments of Mem-RhoNox with AlexaFluor 488-labeled holoTf. After incubation of HepG2 cells with 1 μ M Mem-RhoNox, the cells were treated with 1 μ M AlexaFluor 488-holoTf for 20 min. (a) Signals from AlexaFluor 488-Tf. (b) Signals from the corresponding deoxygenated dye of Mem-RhoNox. (c) Merged image of (a) and (b). (d) The DIC image for the same slices of (a)–(c). Scale bar indicates 20 μ m.

細胞膜を Mem-RhoNox でラベル化した後に AlexaFluor 488 標識 holoTf を添加し、共染色実験を行なった。Mem-RhoNox 由来の蛍光シグナルをマゼンダ、AlexaFluor-488 由来の蛍光シグナルを緑色で表示した。それぞれの蛍光シグナルが重なった場合、蛍光画像上で白色として表示されるが、**Fig.31** より、それぞれの蛍光シグナルは共局在していることが明らかとなった。この結果は、Mem-RhoNox と二価鉄イオンの反応は、確かに holoTf 陽性のエンドソーム内部で進行していることを示唆している。

以上第六節の結果より、Mem-RhoNox を応用することで、トランスフェリンエンドサイトーシスの過程において、エンドソーム中で放出された二価鉄イオンを直接検出することに成功した。本結果は、これまで間接的に提唱されてきたトランスフェリンによる鉄取り込み機構における二価鉄イオンの存在を直接的に示した初めての例である。

第七節 Mem-RhoNox の応用②：神経細胞における鉄取り込み過程の可視化

【神経細胞における鉄輸送・代謝機構に関する考察】

近年、鉄ホメオスタシスの崩壊が神経変性疾患に繋がることが報告され、中枢神経系における鉄代謝研究が注目されてきた^{1,11,50}。従って、脳神経系における二価鉄イオンの挙動を理解することは、これらの病態研究における一助と成り得る。しかしながら、神経細胞中で二価鉄イオンの挙動を検出した例は皆無である。そこで今回、神経細胞においても主要な鉄取り込み経路がトランスフェリンエンドサイトーシスである知見^{51,52}に着目し、神経細胞におけるトランスフェリンエンドサイトーシスの過程で放出される二価鉄イオンのイメージングを、Mem-RhoNox を用いて行なった。

【マウス由来海馬神経細胞における鉄取り込み過程の可視化】

初代培養したマウス由来海馬神経細胞を 5 μ M の Mem-RhoNox で処理した後に 1 μ M の holoTf を添加し、タイムラプス蛍光イメージングを 30 分間実施した。**Fig.32(a)**は control 細胞および holoTf 添加細胞の DIC 画像である。それぞれの DIC 画像中で観察される神経細胞体を拡大した蛍光イメージング画像を、**Fig.32(c)**および **Fig.32(d)**に示した。また、**Fig.32(b)**は、ここで観察された蛍光シグナル強度の変化を時間に対してプロットしたグラフである。

holoTf 添加細胞では control の細胞と比較して顕著な蛍光シグナルの増大が観察された。holoTf を処理していない control の細胞においても僅かながら点状の蛍光シグナルが観察されたが、この結果は、神経細胞で定常的に起きるエンドサイトーシス⁵³に由来すると考えられる。

Fig.33 は、緑色蛍光タンパク(GFP)導入細胞の軸索における蛍光イメージング画像である。ここでは、神経突起の位置を明瞭にするために GFP 由来の蛍光シグナル(緑色)とプローブ由来の蛍光シグナル(黄色)の重ね合わせ画像として表示した。**Fig 33(c)**に見られるように、holoTf 処理による蛍光シグナルの増大は、細胞体のみならず、神経突起に沿った領域においても生じることがわかった。ここで観察された蛍光シグナルは、点状でかつ突起に沿った興味深い染色パターンであった。この結果は、神経細胞の樹状突起のスパインにおいてはトランスフェリン受容体(TfR)が高発現しており、エンドサイトーシスが活発である事実⁵⁴⁻⁵⁶を考慮して、合理的なものであると言える。

次に、holoTf 添加により観察された蛍光シグナルの増大が、holoTf から遊離した二価鉄イオンとプローブの反応に起因することを確認するために、エンドソーム内で機能す

る鉄イオンキレーターである DFO の共存下で同様の実験を行なった(**Fig.34**)。その結果、DFO 共存下においては、holoTf 処理による蛍光シグナルの増大が control の細胞と同程度まで抑制されていることが分かり、holoTf 処理により増大した蛍光シグナルは、エンドソーム中における二価鉄イオンとプローブの反応由来であることが示された。

以上第七節の結果より、Mem-RhoNox を応用し、神経細胞においても、トランスフェリンエンドサイトーシスの過程において、過渡的に発生する二価鉄イオンを直接検出することに成功した。

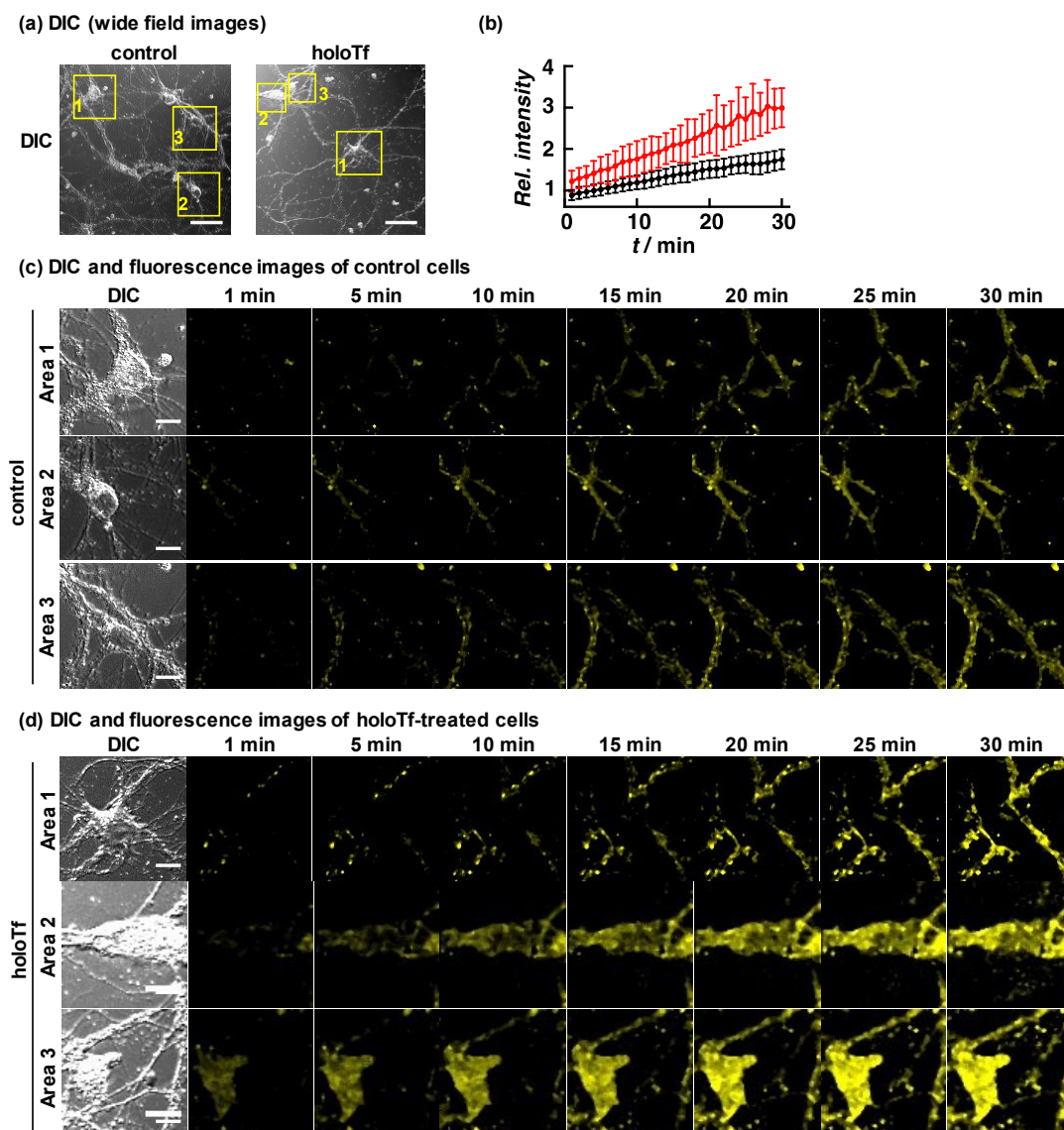


Figure 32. Time-lapse fluorescence imaging of holoTf-triggered Fe(II) release in primary cultured hippocampal neurons (DIV15) with Mem-RhoNox. Cultured neurons were sparsely express green fluorescent protein (GFP) for single neuron visualization. (a) The wide-field DIC images overlaid with GFP images of the control (left) and holoTf (1 μ M)-treated cells (right).

Scale bars indicate 40 μm . (b) Quantification of the fluorescence signals from neurons after treatment without (black) and with holoTf (red). The fluorescence intensities inside the entire neurons were measured and plotted every 1 min. Error bars show \pm S.E.M (n=3). (c) Magnified images of the same slices of each area in (a, left). Scale bars indicate 10 μm . (d) Magnified images of the same slices of each area in (a, right). Scale bars indicate 10 μm .

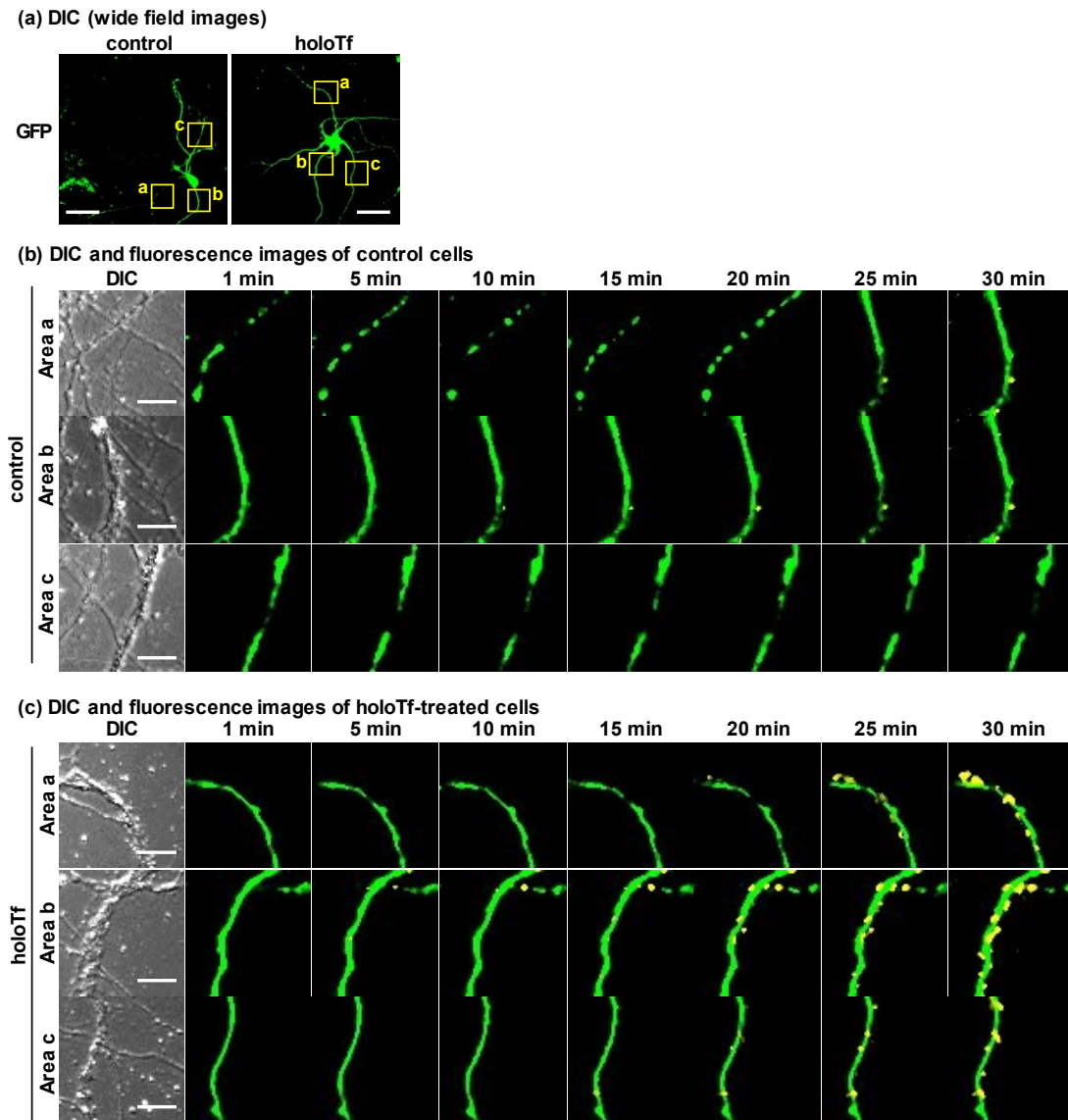
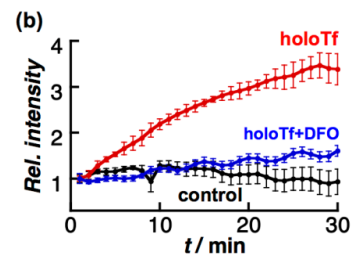
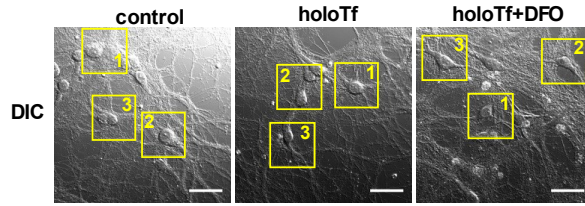
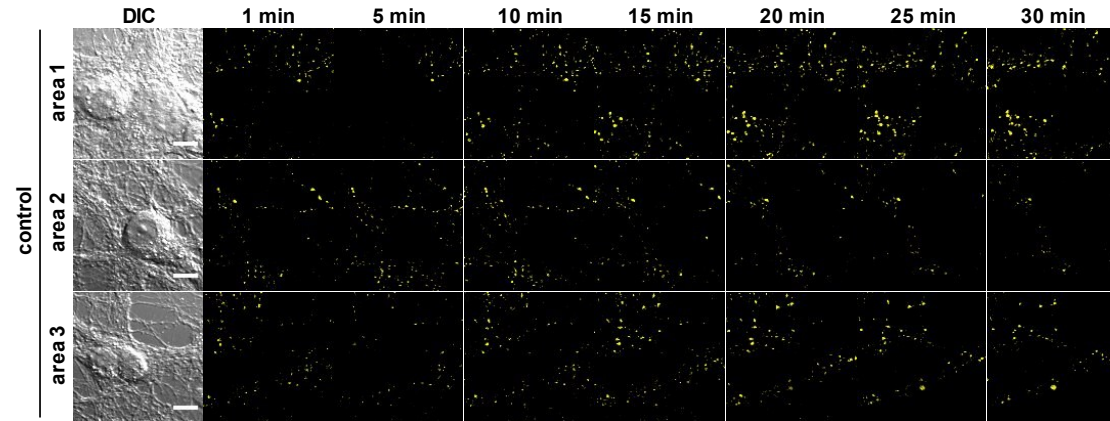


Figure 33. Time-lapse fluorescence imaging of holoTf-triggered Fe(II) release in primary cultured hippocampal neurons (DIV15) with Mem-RhoNox. Cultured neurons were sparsely express green fluorescent protein (GFP) for single neuron visualization. GFP images are overlaid for clear visualization of the neuronal processes. (a) Wide field green fluorescent protein (GFP) images of control (left) and holoTf (1 μM)-treated cells (right). Scale bars indicate 40 μm . (b) Magnified images of the same slices of each area in (a, left). (c) Magnified images of the same slices of each area in (a, right). Scale bars indicate 10 μm .

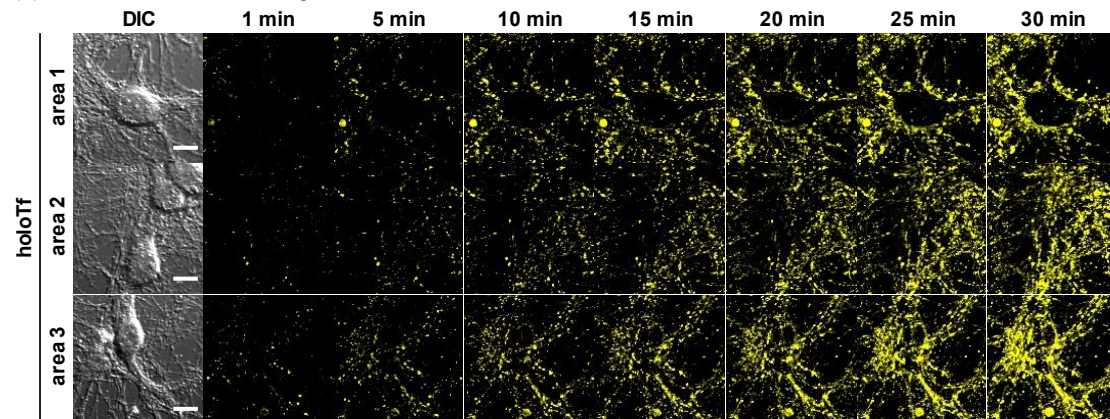
(a) DIC (wide field images)



(c) DIC and fluorescence images of control cells



(d) DIC and fluorescence images of holoTf-treated cells



(e) DIC and fluorescence images of holoTf-treated cells in the presence of DFO

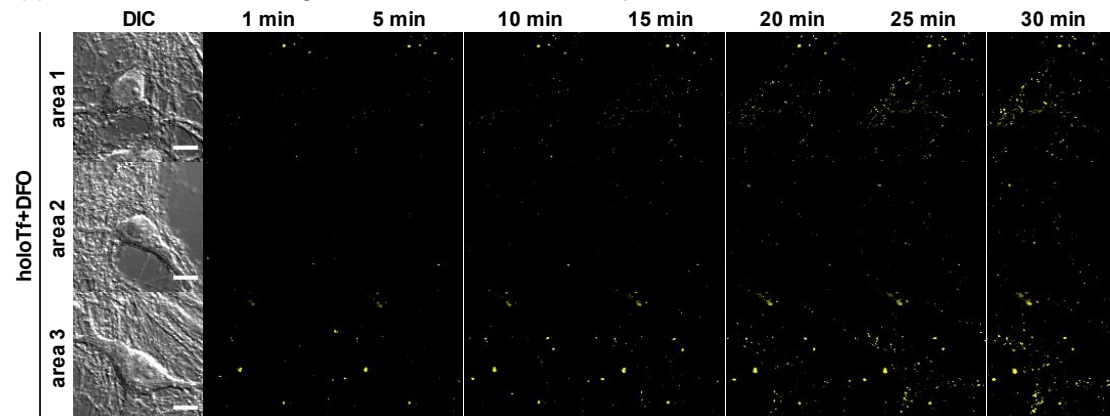


Figure 34. Time-lapse fluorescence imaging of holoTf-triggered Fe(II) release in primary cultured hippocampal neurons (DIV15) with Mem-RhoNox. (a) The representative wide-field DIC images of the control cells (left), and holoTf-treated cells (middle), and holoTf with DFO-treated cells (right). Scale bars indicate 40 μ m. (b) Quantification of the fluorescence signals from neurons after treatment without (black), with holoTf (red), and with holoTf in the presence of DFO (blue). The fluorescence intensities inside the entire neurons were measured and plotted every 1 min. Error bars show \pm S.E.M (n=3). Magnified DIC and fluorescence images of the same slices of areas 1, 2, and 3 (cell body) in the left panel (c), middle panel (d), and right panel (d) in (a) at 1, 5, 10, 15, 20, 25, and 30 min after the treatments. Scale bars indicate 10 μ m.

第八節 小括

二価鉄選択的スイッチングシステムである *N*-オキシド、細胞膜アンカリング構造であるパルミトイル基、およびプローブの細胞膜透過を防ぐカルボキシ基を蛍光団であるローダミン骨格に導入した細胞膜アンカリング型の二価鉄イオン蛍光プローブ Mem-RhoNox を設計・合成した。

モデル化合物である Ac-RhoNox を用いてキュベット中におけるプローブの機能を評価したところ、Ac-RhoNox は二価鉄イオンに対して選択的かつ鋭敏な蛍光応答を示すことが分かった。

Mem-RhoNox を用いた生細胞蛍光イメージングの結果、Mem-RhoNox は細胞膜上に局在し、細胞膜上で二価鉄イオンを検出可能であることが示された。また、Mem-RhoNox を用いて三価鉄イオンが細胞膜上で二価鉄イオンと還元される現象をイメージングすることにも成功した。

また、トランスフェリンによる鉄取り込みの過程において、エンドソーム中で放出された二価鉄イオンを Mem-RhoNox を応用したタイムラプス蛍光イメージングで直接検出することに成功した。さらに、本現象はマウス由来海馬神経細胞にも適応可能であり、本実験結果はトランスフェリンによる鉄取り込み機構の全容解明に貢献するものであると考えている。

総 括

鉄は、生体内で最も多く存在する遷移金属元素であり、主に酵素の補因子として酸素運搬や電子伝達等の重要な機能を発揮する一方、生体内には恒常的にタンパク非結合鉄（自由鉄）も存在している。自由鉄は、細胞内の還元的環境・水溶性の観点から主に二価として存在しており、その生物学的意義に注目が集まっている。また、二価鉄イオンはフェントン反応を介して高反応性の活性酸素種を生成することから、鉄ホメオスタシスの崩壊が細胞障害を引き起こし、最終的には神経変性疾患やがん等に繋がることが指摘されている。このように、自由鉄の病理学的重要性が示されているにもかかわらず、その主成分である二価鉄イオンを検出する有力な手段が皆無であり、その詳細な挙動に関しては多くの点が未解明とされてきた。

当研究室では過去に、こうした自由鉄の機能を解明するべく、*N*-オキシドの化学を基盤とした二価鉄イオン検出プローブ(RhoNox-1)を開発している。本研究では、RhoNox-1を凌駕するプローブを開発すべく、*N*-オキシドによる二価鉄イオン検出システムを基盤とし、多様な二価鉄イオン蛍光プローブを開発した。

以下に研究の成果及び得られた知見を要約する。

1. *N*-オキシドの化学を基盤とした二価鉄イオン蛍光プローブ RhoNox-1 を基に、二価鉄イオンへの応答性および off-on コントラスト向上を目的とした改良型プローブを開発した。ここでは、「分子内スピロ環化平衡の制御」および「*N*-オキシド周囲の立体障害低減」の観点から HMRhoNox-M、HMRhoNox-E、HMFluNox-M、および HMFluNox-E を設計した。
2. 合成した各プローブは期待通り、スピロ環化構造の安定化を受けて背景光を全く持たず、高い反応前後の off-on コントラストを達成した。また、*N*-オキシド周囲の立体障害を低減させた HMRhoNox-M は、二価鉄イオンに対して最も高い反応速度を示した。さらに、これらのプローブは二価鉄イオン選択的に応答し、生体内の夾雑系においても有力な二価鉄イオン検出ツールと成り得ることが示された。
3. キュベット中の測定において最も優れた性能を示した HMRhoNox-M を用いて生細胞蛍光イメージングを実施したところ、HMRhoNox-M はリソソーム局在性を示し、外部から加えた二価鉄イオンのみならず、細胞内在性の二価鉄イオンも高

感度に検出できることがわかった。さらに、HMRhoNox-M を用いて、holoTf 刺激により蓄積した二価鉄イオンの検出にも成功した。

4. ローダミン骨格に細胞膜アンカリング構造および *N*-オキシド部位を導入した細胞膜局在型プローブ Mem-RhoNox を設計し、合成した。また、キュベット中における測定により評価するためのモデル化合物 Ac-RhoNox の設計と合成も行った。
5. スペクトル測定の結果、モデル化合物 Ac-RhoNox は二価鉄イオン選択的な蛍光応答を示し、その反応速度は RhoNox-1 を上回った。また、生細胞蛍光イメージングの結果、Mem-RhoNox は設計通りに細胞膜上に局在し、二価鉄イオンを検出できることがわかった。
6. トランスフェリンを介した鉄取り込み機構の解析に Mem-RhoNox を応用し、トランスフェリン陽性エンドソーム中で放出される遊離の二価鉄イオンをタイムラプスイメージングにより可視化することに成功した。本実験結果は、トランスフェリンエンドサイトーシスの過程において、エンドソーム中で過渡的に遊離する二価鉄イオンを直接検出した世界初の知見である。本現象は初代培養マウス由来海馬神経細胞においても観察可能であった。さらに、軸索に沿って生じたトランスフェリンエンドサイトーシスを直接可視化することにも成功した。

本研究では、二価鉄イオン選択的な *N*-オキシドの化学を拡張し、二価鉄イオンに対する反応性を最適化したプローブおよび細胞膜局在性を付与したプローブを開発することに成功した。現在、これらの研究成果を基盤として、さらに鉄応答性の高い二価鉄イオン蛍光プローブの開発や、細胞膜以外の細胞小器官（ゴルジ体、細胞質、核、小胞体、ミトコンドリア）を標的としたプローブの開発を遂行中である。これら実用的な二価鉄イオン蛍光プローブ群を創製することは、細胞内鉄代謝機構の解明のみならず、今後、鉄の関与する様々な重要疾患の研究の推進や創薬の分野への応用に繋がると信じている。

論文目録

主論文の基礎となる公表論文

- 1) Masato Niwa, Tasuku Hirayama, Ikumi Oomoto, Dan Ohtan Wang, and Hideko Nagasawa, Fe(II) ion release during endocytotic uptake of iron visualized by a membrane-anchoring Fe(II) fluorescent probe. *ACS Chem. Biol.*, doi: 10.1021/acschembio.7b00939
- 2) Masato Niwa, Tasuku Hirayama, Kensuke Okuda, and Hideko Nagasawa, A new class of high-contrast Fe(II) selective fluorescent probes based on spirocyclized scaffolds for visualization of intracellular labile iron delivered by transferrin. *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 6590–6597

参考論文

- 1) Masahiko Mori, Fumiya Ito, Lei Shi, Yue Shi, Yue Wang, Chiharu Ishida, Yuka Hattori, Masato Niwa, Tasuku Hirayama, Hideko Nagasawa, Akira Iwase, Fumitaka Kikkawa, Shinya Toyokuni; Ovarian endometriosis-associated stromal cells reveal persistently high affinity for iron; *Redox Biology*, **2015**, 6, 578–586
- 2) Tasuku Hirayama, Hitomi Tsuboi, Masato Niwa, Ayaji Miki, Satoki Kadota, Yukie Ikeshita, Kensuke Okuda, and Hideko Nagasawa; A universal fluorogenic switch for Fe(II) ion based on *N*-oxide chemistry permits the visualization of intracellular redox equilibrium shift towards labile iron in hypoxic tumor cells; *Chem. Sci.*, **2017**, 8, 4858–4866

謝 辞

本研究に際して終始懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室・永澤秀子教授に深甚たる謝意を表します。

研究室配属時から長きにわたり本研究の計画・実施並びに本論文の作成にあたり直接御指導、御討論、御激励を頂きました岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室・平山祐准教授に深く感謝いたします。

本研究の推進において御助言、御討論、並びに御激励を頂きました神戸薬科大学薬化学研究室・奥田健介教授に感謝いたします。奥田健介教授には、神戸薬科大学に移籍された後も御指導、御激励を頂きました。

本研究の推進、並びに論文の作成に際して有益な御助言、御討論、並びに御激励を頂きました岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室・辻美恵子助教に感謝いたします。

神経細胞の初代培養の実施に当たり、直接御指導、御助言並びにご激励を頂きました岐阜薬科大学生体機能解析学大講座分子生物学研究室・福光秀文教授、宗宮仁美助教に感謝致します。

神経細胞の初代培養及び蛍光イメージング実験に御協力、並びに論文の作成に際して御指導、御助言、並びに御激励を頂きました京都大学高等研究院物質—細胞統合システム拠点(ICeMS)・Dan Ohtan Wang 准教授、大本育美修士に深く感謝致します。

本研究で見出したプローブを病態モデルにおける鉄の挙動解析へと応用して下さり、新たな鉄代謝に関する知見を報告するとともに、開発したプローブの実用性を示して頂いた名古屋大学医学系研究科生体反応病理学研究室・豊國伸哉教授に感謝致します。

本研究の推進にあたり多岐に渡る事務手続きをお引き受け下さり、有益な御助言並びに御激励を頂きました岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室・因幡栄美事務員に深く感謝いたします。

実験に際して御討論、御助言、御激励を頂きました岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室内の卒業生、同輩、および後輩諸氏に感謝致します。

JSPS 特別研究員 (DC1, No.15J11637) として採用して戴き、博士後期過程における研究遂行のための経済的援助により、研究に専念する機会を賜った日本学術振興会に感謝の意を表します。

最後に、研究室配属時からここまで研究を続けてこられたのは、一重に家族をはじめ著者を支えてくださった皆様のおかげです。心より感謝いたします。

実 験 の 部

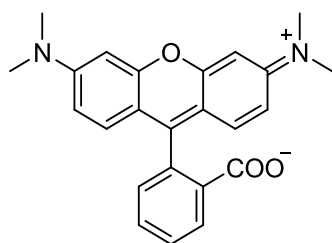
第一章に関する実験

1. General

購入可能な試薬および溶媒は特別な精製は行わずに用いた。 ^1H -NMR スペクトルは、JEOL 社 ECA 500 (500 MHz)および JEOL 社 JNM-AL400 (400 MHz)を用いて測定した。測定溶媒は重水素化クロロホルム(CDCl_3)または重水素化メタノール(CD_3OD)を用いた。 ^1H -NMR は化学シフトを δ 値(ppm)で表記し、テトラメチルシランのシングレットピークを 0 ppm の基準とした。 ^{13}C -NMR は JEOL 社 ECA 500 (125 MHz)および JEOL 社 JNM-AL400 (100 MHz)を用いて測定した。測定溶媒は CDCl_3 または CD_3OD を用いた。 ^1H -NMR は化学シフトを δ 値(ppm)で表記し、 CDCl_3 を溶媒として測定した場合は CDCl_3 のトリプレットシグナルを 77.0 ppm の基準とした。 CD_3OD の場合は、溶媒由来のピークを 49.0 ppm の基準とした。結合定数(J 値)は Hz で表した。シグナルの分裂様式は、s=singlet, d=doublet, t=triplet, dd=doubledoublet, td=tripledoublet, q=quartet, m=multiplet と略記した。高分解能質量分析(HRMS)は、JEOL 社 JMS-T100TD を使用し、ポリエチレングリコール(PEG)を標準物質として測定した。薄層カラムクロマトグラフィー(TLC)は Silca gel 60 F₂₅₄ (Merck)を用い、UV(254 nm)吸収、リンモリブデン酸による呈色、もしくは蛍光色素由来の蛍光で検出した。化合物の精製にはシリカゲル AP-300S (Taiko-shoji)および活性アルミナ(Wako pure chemicals, activated, basic, 200 mesh)を用いた。

2. HMRhoNox-M の合成

Preparation of Tetramethylrhodamine⁵⁷

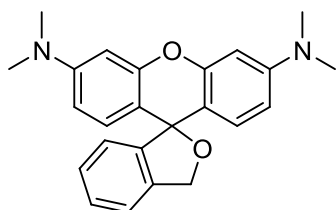


3-ジメチルアミノフェノール(100 mg, 0.73 mmol) と無水フタル酸(55 mg, 0.37 mmol) をneat条件下、150 °Cで12時間加熱した。室温まで放冷した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl_3 : MeOH = 10 : 1 to 5 : 1)で精製し、tetramethylrhodamine

を得た(45 mg, 31%, as a purple solid)。

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ : 7.99 (dd, J = 7.5 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.56–7.47 (m, 2H), 7.11 (m, 3H), 6.79 (dd, J = 9.7 Hz, 2.4 Hz, 2H), 6.65 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 3.07 (s, 12H).

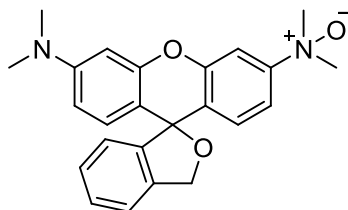
Preparation of HMRhodamine-M^{57,58}



Tetramethylrhodamine (120 mg, 0.31 mmol)を脱水THF (7 mL)に懸濁し、0 °Cで LiAlH_4 (49 mg, 1.28 mmol)を加え、窒素雰囲気下、室温で3時間撹拌した。反応液に H_2O (49 μL)、15% aq. NaOH (49 μL)、次いで H_2O (148 μL)をゆっくりと滴下し、室温で1時間激しく撹拌した。セライトを用いた濾過により不溶性の沈殿を除去した後、反応溶媒を減圧下留去した。残渣を CH_2Cl_2 (50 mL)に溶解し、混合液を水(50 mL)および飽和食塩水(50 mL)で洗浄し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。続いて、得られた残渣をMeOH (7 mL)に溶解し、chloranil (228 mg, 0.93 mmol)を加え、室温で3時間撹拌した。セライトを用いた濾過により不溶性の沈殿を除去した後、反応溶媒を減圧下留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl_3 : MeOH= 100 : 1 to 8 : 1)で精製し、HMRhodamine-Mを得た(93 mg, 77%, as a purple powder)。

^1H -NMR (500MHz, CDCl_3) δ : 7.34 (d, J = 3.9 Hz, 2H), 7.28–7.23 (m, 1H), 6.93 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 6.77 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.48 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 6.42 (dd, J = 8.7 Hz, 2.4 Hz, 2H), 5.24 (s, 2H), 2.95 (s, 12H).

Preparation of HMRhoNox-M



HMRhodamine-M (90 mg, 0.24 mmol)をEtOAc (18 mL)に溶解し、0 °Cで*m*-CPBA (83 mg, 0.48 mmol)を加え、室温で1時間撹拌した。反応溶媒を減圧下留去し、残渣をシリカゲ

ルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃ : MeOH = 50 : 1 to 20 : 1)で精製し、HMRhoNox-Mを得た(64 mg, 71%, as a colorless powder)。

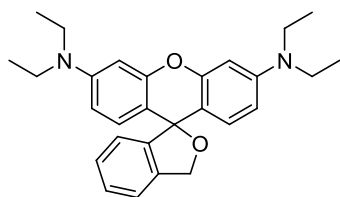
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.93 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.45 (dd, *J* = 8.6 Hz, 2.3 Hz, 1H), 7.39–7.38 (m, 2H), 7.29–7.26 (m, 1H), 7.05 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.48–6.46 (m, 2H), 5.30 (dd, *J* = 20.0 Hz, 12.6 Hz, 2H), 3.58 (m, 6H), 2.98 (s, 6H).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 154.5, 151.5, 151.3, 150.9, 144.5, 139.1, 129.9, 129.2, 128.4, 128.2, 128.2, 125.7, 123.8, 120.7, 114.2, 111.7, 109.2, 109.0, 98.5, 83.3, 72.1, 63.2, 63.1, 40.3.

HRMS (ESI+): *m/z* calculated for C₂₄H₂₅N₂O₃⁺ : 389.1860, found 389.1871.

3. HMRhoNox-E の合成

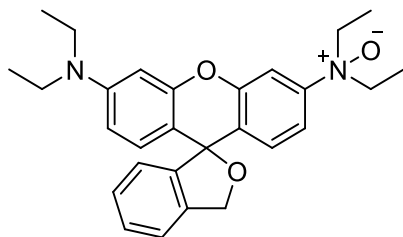
Preparation of HMRhodamine-E⁵⁹



ローダミンB塩酸塩 (1.00 g, 2.09 mmol)を脱水THF (50 mL)に懸濁し、0 °CでLiAlH₄ (317 mg, 8.35 mmol)を加え、窒素雰囲気下、室温で5時間攪拌した。反応液を0 °Cに冷却した後、LiAlH₄ (634 mg, 16.7 mmol)を追加し、窒素雰囲気下、反応液を加熱還流条件下で15時間攪拌した。反応液を室温まで放冷した後、H₂O (950 μL)、15% aq. NaOH (950 μL)、次いでH₂O (2.85 mL)をゆっくりと滴下し、室温で1時間激しく攪拌した。セライトを用いた濾過により不溶性の沈殿を除去した後、反応溶媒を減圧下留去した。続いて、残渣をMeOH (50 mL)に溶解し、chloranil (1.54 mg, 6.27 mmol)を加え、室温で3時間攪拌した。セライトを用いた濾過により不溶性の沈殿を除去した後、反応溶媒を減圧下留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(EtOAc : Hexane = 1 : 1, then CHCl₃ : MeOH = 10 : 1)で精製し、HMRhodamine-E (764 mg, 85%, as a purple powder).を得た。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.33 (d, *J* = 5.7 Hz, 1 H), 7.25–7.24 (m, 2H), 6.97 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.71 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.40 (d, *J* = 2.9 Hz, 2H), 6.34 (dd, *J* = 8.6, 2.9 Hz, 2H), 5.20 (s, 2H), 3.33 (q, *J* = 6.9 Hz, 8H), 1.15 (t, *J* = 6.9 Hz, 12H).

Preparation of HMRhoNox-E



HMRhodamine-E (267 mg, 0.62 mmol)をEtOAc (20 mL)に溶解し、0 °Cで*m*-CPBA (214 mg, 1.24 mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。反応溶媒を減圧下留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃ : MeOH= 20 : 1 to 10 : 1)で精製し、HMRhoNox-Eを得た(145 mg, 53%, as a pale purple solid)。

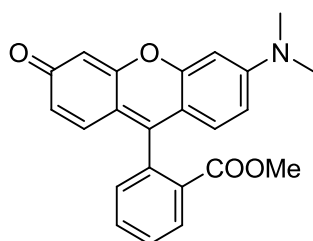
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.78 (d, *J* = 1.9 Hz, 1 H), 7.38–7.37 (m, 2H), 7.29–7.25 (m, 2H), 7.03 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.77 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.43 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.41 (dd, *J* = 8.7 Hz, 2.7 Hz, 1H), 5.29 (dd, *J* = 16.2 Hz, 12.3 Hz, 2H), 3.73–3.65 (m, 4H), 3.38 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H), 1.18–1.13 (m, 12H).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: 151.7, 151.0, 149.0, 148.8, 144.4, 139.2, 129.6, 129.4, 128.3, 128.1, 125.5, 123.8, 120.6, 115.5, 111.1, 110.7, 108.5, 97.5, 83.3, 71.9, 66.9, 44.4, 12.5, 8.3.

HRMS (ESI⁺): *m/z* calculated for C₂₈H₃₃N₂O₃⁺: 445.2486, found 445.2501.

4. HMFluNox-M の合成

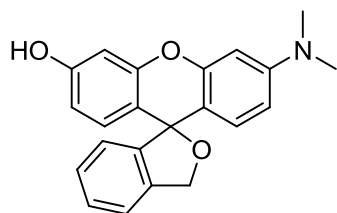
Preparation of *N,N*-dimethylrhodol methyl ester



N,N-ジメチルロドル²⁴ (602 mg, 1.32 mmol)をMeOH (30 mL)に溶解し、濃硫酸(1.5 ml)をゆっくりと滴下した後に、反応溶液を加熱還流下18時間攪拌した。室温まで放冷した後、反応溶液に炭酸水素ナトリウムを加え、生じた不溶性の沈殿をセライトを用いた濾過を行ない除去した。反応溶媒を減圧下留去した後に、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃ : MeOH= 20 : 1)で精製し、*N,N*-dimethylrhodol methyl esterを得た(a red solid, 393 mg, 80%)。

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.21 (dd, $J = 7.7$ Hz, 1.0 Hz, 1H), 7.71 (td, $J = 7.5$ Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.65 (td, $J = 7.5$ Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.31 (dd, $J = 7.5$ Hz, 1.2 Hz, 1H), 6.83–6.80 (m, 2H), 6.63 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.55–6.50 (m, 2H), 6.45 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 3.62, (s, 3H), 3.12 (s, 6H).

Preparation of HMRhodol-M



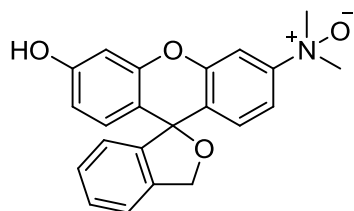
N,N-dimethylrhodol methyl ester (393 mg, 1.05 mmol)を脱水THF (30 mL)に懸濁し、0 °Cで LiAlH_4 (80 mg, 2.10 mmol)を加え、窒素雰囲気下、室温で2.5時間攪拌した。反応液を0 °Cに冷却した後、 LiAlH_4 (80 mg, 2.10 mmol)を追加し、窒素雰囲気下、室温で2.5時間攪拌した。反応液に H_2O (160 μL)、15% aq. NaOH (160 μL)、次いで H_2O (480 μL)をゆっくりと滴下し、室温で2時間激しく攪拌した。セライトを用いた濾過により不溶性の沈殿を除去した後、反応溶媒を減圧下留去した。残渣を CH_2Cl_2 (50 mL)に溶解し、水(50 mL)および飽和食塩水(50 mL)で洗浄し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。続いて、得られた残渣をMeOH (30 mL)に溶解し、chloranil (716 mg, 2.91 mmol)を加え、室温で4時間攪拌した。セライトを用いた濾過により不溶性の沈殿を除去した後、反応溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(EtOAc : hexane = 1 : 2 to 1 : 1)で精製し、HMRhodol-M (98 mg, 30%, as a red solid)を得た。HMRhodol-MのNMR測定を CDCl_3 や CD_3OD で行なったところ、スピロ環の開環型構造と閉環型構造の平衡状態として存在していた。開環構造を有利にするべく、得られた化合物のうち5 mgを1 M HCl/MeOHに溶解し、溶媒を減圧下留去することで、HMRhodol-Mの塩酸塩を得た。ここで得られたHMRhodolの塩酸塩を用いてNMR分析を実施したところ、キノイド構造を支持するスペクトルが観察された。

^1H -NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.74–7.68 (m, 2H), 7.59–7.58 (m, 1H), 7.33–7.30 (m, 4H), 7.17 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.03 (dd, $J = 9.6$ Hz, 2.0 Hz, 1H), 4.34, (s, 2H), 3.41 (s, 6H).

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 169.3, 161.3, 160.7, 160.4, 158.7, 141.2, 133.6, 133.2, 131.9, 131.6, 130.5, 129.7, 128.9, 118.5, 118.2, 117.5, 116.6, 103.4, 97.6, 63.1, 28.2.

HRMS (ESI⁺): m/z calculated for $C_{22}H_{20}NO_3^+$: 346.1438, found 346.1451.

Preparation of HMFluNox-M



HMRhodol-M (34 mg, 0.098 mmol)をEtOAc (4 mL)に溶解し、0 ° Cで*m*-CPBA (34 mg, 0.20 mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。再び0 ° Cに冷却し、*m*-CPBA (34 mg, 0.20 mmol)を追加した後に、反応溶液を室温で1時間攪拌した。反応溶媒を減圧下留去した後に、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃ : MeOH= 10 : 1 to 8 : 1)で精製し、HMFluNox-Mを得た(21 mg, 58%, as a white powder)

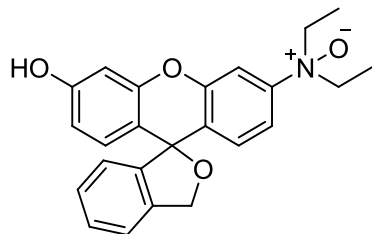
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.83 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 7.47 (dd, J = 8.6 Hz, 2.3 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.30 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.17 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 6.73 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.69 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 6.55 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.46 (dd, J = 8.6 Hz, 2.3 Hz, 1H) 5.24 (s, 2H), 3.50 (s, 3H), 3.49 (s, 3H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ : 159.8, 153.7, 151.5, 151.0, 144.4, 139.0, 129.9, 129.4, 128.4, 128.2, 126.1, 124.0, 120.6, 113.7, 113.4, 112.8, 110.5, 103.1, 83.3, 72.1, 63.1, 62.2.

HRMS (ESI⁺): m/z calculated for $C_{22}H_{20}NO_4^+$: 362.1387, found 362.1389

5. HMFluNox-E の合成

Preparation of HMFluNox-E



HMDER²³ (100 mg, 0.27 mmol)をEtOAc (10 mL)に溶解し、0 ° Cで*m*-CPBA (93 mg, 0.54 mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。反応液を0 ° Cに冷却した後に、*m*-CPBA (34 mg, 0.20 mmol)を追加し、反応溶液を室温で1時間攪拌した。反応溶媒を減圧下留去した後に、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃ : MeOH= 20 : 1 to 10 : 1)で精製し、HMFluNox-Eを得た(102 mg, 97%, as a white powder)。

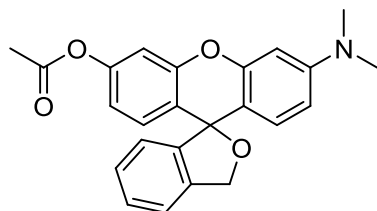
¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ: 7.81 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.42–7.39 (m, 3H), 7.27 (m, 1H), 7.12 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.65 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.55 (dd, *J* = 8.9 Hz, 2.6 Hz, 1H), 5.33 (s, 2H), 3.88–3.84 (m, 2H), 3.66–3.62 (m, 2H), 1.11 (q, *J* = 6.7 Hz, 6H).

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ: 160.1, 152.4, 152.0, 149.7, 146.0, 140.0, 131.3, 131.1, 129.7, 129.6, 129.3, 124.5, 122.1, 117.2, 116.6, 113.6, 112.2, 103.0, 84.6, 73.5, 67.7, 8.6.

HRMS (ESI+): *m/z* calculated for C₂₄H₂₄NO₄⁺ : 390.1700, found 390.1695.

6. Ac-HMFluNox-M の合成

Preparation of Ac-HMRhodol-M



HMRhodol-M (51 mg, 0.15 mmol)をピリジン(10 mL)に溶解し、無水酢酸(312 μL, 3.3mmol)を加え、室温で3時間攪拌した後に、反応溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃ : MeOH = 100 : 1)により精製し、Ac-HMRhodol-M を得た(40 mg, 69%, as a pale red solid).

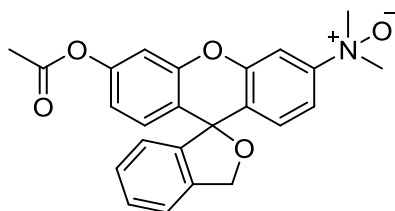
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.35 (m, 2H), 7.28–7.25 (m, 2H), 6.97–6.91 (m, 3H), 6.80 (d,

$J = 8.2$ Hz, 1H), 6.74 (dd, $J = 8.7$ Hz, 2.4 Hz, 1H), 6.48- 6.45 (m, 2H), 5.28 (s, 2H), 2.96 (s, 6H), 2.29 (s, 3H).

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 169.1, 151.5, 151.4, 151.3, 150.7, 144.8, 139.3, 129.8, 129.3, 128.3, 128.0, 124.1, 120.6, 116.5, 109.6, 109.1, 98.7, 85.6, 71.9, 40.4, 21.3.

HRMS (ESI⁺): m/z calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{NO}_4^+$: 388.1543, found 388.1552.

Preparation of Ac-HMFluNox-M



Ac-HMRhodol-M (37 mg, 0.15 mmol)をEtOAc (5 mL)に溶解し、0 °Cで*m*-CPBA (33 mg, 0.19 mmol)を加え、室温で0.5時間攪拌した。溶媒を減圧下留去した後に、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl_3 : $\text{MeOH} = 20 : 1$ to $10 : 1$)で精製し、Ac-HMFluNox-Mを得た(35 mg, 90%, as a white powder)。

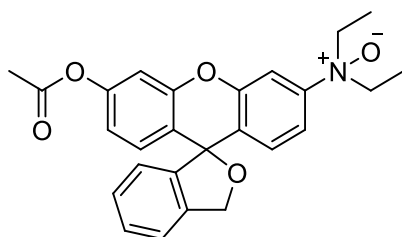
^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.95 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.52 (dd, $J = 8.6$ Hz, 1.7 Hz, 1H), 7.39–7.38 (m, 2H), 7.27 (m, 1H), 7.09 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.00 (m, 2H), 6.87 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.81 (dd, $J = 8.6$ Hz, 2.3 Hz, 1H) 5.35, (s, 2H), 3.61 (m, 6H), 2.30 (s, 3H).

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 169.1, 154.6, 151.2, 150.6, 150.4, 144. 2, 138.5, 130.0, 129.7, 128.72, 128.69, 125.6, 123.8, 121..9, 120.9, 117.6, 114.9, 109.9, 109.2, 82.9, 72.9, 63.0, 62.9, 21.1.

HRMS (ESI⁺): m/z calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{NO}_5^+$: 404.1493, found 404.1503.

7. Ac-HMRhoNox-E の合成

Preparation of Ac-HMFluNox-E



HMDER-Ac²³ (100 mg, 0.24 mmol)をEtOAc (7 mL)に溶解し、0 °Cで*m*-CPBA (3 mg, 0.48

mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧下留去した後に、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl_3 : MeOH = 30 : 1 to 10 : 1)で精製し、Ac-HMFluNox-Mを得た(102 mg, 99%, as a white powder)。

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.89 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.39 (m, 2H), 7.36 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.28 (m, 1H), 7.09 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.03–7.01 (m, 2H), 6.89 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.82 (dd, J = 8.6 Hz, 2.3 Hz, 1H), 5.37 (s, 2H), 3.74–3.65 (m, 4H), 2.30 (s, 3H), 1.17–7.14 (m, 6H)
 ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ : 169.0, 151.0, 150.5, 150.3, 144.2, 138.4, 129.6, 129.5, 129.0, 128.6, 128.5, 128.1, 123.7, 121.9, 120.8, 117.4, 116.2, 111.5, 109.9, 82.9, 72.8, 67.2, 67.1, 21.1, 8.4.

HRMS (ESI+): m/z calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{NO}_5^+$: 432.1801, found 432.1819.

8. 吸収および蛍光スペクトル測定

紫外可視吸収スペクトルは、Agilent 8453 photodiode array spectrometer (equipped with a Unisoku thermo-static cell holder (USP-203))を使用して測定した。測定セルは、光路長 1 cm で測定容量が 3 mL のものを用いた。蛍光スペクトル測定は、JASCO FP6600 を使用して測定した。励起側バンド幅は 5 nm、蛍光側バンド幅は 6 nm に設定して測定した。石英セルは光路長が 1 cm で測定容量が 3 mL のものを用いた。

吸収スペクトルによる pK_{cycl} の算出

pK_{cycl} を決定するために、吸収スペクトルは様々な pH に調製した 200 mM リン酸緩衝液中で測定した。可視領域の最大吸収波長における吸収の変化を pH に対してプロットしたグラフは、KaleidaGraph を用いて以下の式(eq.1)または(eq.2)により最小二乗法によるカーブフィッティングを行なった。HMRhoNox-M、HMRhoNox-E、HMRhodamine-M、およびHMRhodamine-Eは(eq.1)によりフィッティングを行ない、算出された pK_{a1} を pK_{cycl} 値とした。HMRhodol-M およびHMRhodol-Eは、(eq.2)によりフィッティングし、算出された pK_{a2} を pK_{cycl} 値とした。

$$A = \frac{A_0 + A_1 \times 10^{(\text{pH} - \text{pK}_{\text{a1}})}}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_{\text{a1}})}} \quad (\text{eq. 1})$$

$$A = \frac{A_0 + A_1 \times 10^{(\text{pH} - \text{pK}_{\text{a1}})} + A_2 \times 10^{(\text{pH} - \text{pK}_{\text{a1}} - \text{pK}_{\text{a2}})}}{1 + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_{\text{a1}})} + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_{\text{a1}} - \text{pK}_{\text{a2}})}} \quad (\text{eq. 2})$$

(pK_{a1} and pK_{a2} are the acid dissociation constants of probe; A_0 is the initial absorbance at each

wavelength at pH =1.60; and A_1 and A_2 are the maximum absorbance at each wavelength associated with the corresponding pK_a values.)

金属選択性試験

金属選択性試験の詳細な条件は以下の通りである。各遷移金属種(MnSO_4 , CoSO_4 , NiSO_4 , FeSO_4 , FeCl_3 , CuSO_4 , ZnSO_4)は10 mMのストック水溶液を各プローブ溶液に加え、最終濃度を20 μM とした。アルカリ金属イオンおよびアルカリ土類金属イオン種(NaCl , KCl , MgCl_2 , and CaCl_2)は1 Mのストック水溶液をHEPES緩衝液中で希釈し、最終濃度を1 mMとした。一価の銅イオンの場合は、 $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4\text{PF}_4$ をMeCNに溶解し、10 mMの濃度に調製したものをストック溶液として使用した。

還元剤、酸化剤などに対する選択性試験

HEPES緩衝液中、2 μM の各プローブを以下の条件で1時間処理し、蛍光スペクトル測定を実施した。

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$: 100 μM (from 100 mM stock solution in water).

Sodium ascorbate: 1 mM (from 100 mM stock solution in water).

Cysteine : 1 mM (from 100 mM stock solution in water).

Glutathione : 1 mM (from 100 mM stock solution in HEPES buffer). ストック溶液はグルタチオンの影響で酸性となるため、水酸化ナトリウム水溶液で最終pHを7.4に調節した。

NaNO_2 : 100 μM (from 100 mM stock solution in water).

$\text{O}_2^{\bullet-}$: 100 μM (from saturated KO_2 solution in DMSO (ca. 1 mM)⁶⁰).

H_2O_2 : 100 μM (from 100 mM stock solution in water).

$\bullet\text{OH}$: 200 μM H_2O_2 と20 μM FeSO_4 を混和し、Fenton反応により $\bullet\text{OH}$ を発生させた。

NaOCl : 100 μM (from 100 mM stock solution in water).

NO : 100 μM NOC-5 (from 10 mM stock solution in 0.1 M NaOH aq.).

$\text{Bpy} + \text{Fe(II)}$: 100 μM 2,2'-bipyridyl (from 10 mM in stock solution in DMSO)の存在下でプローブを20 μM FeSO_4 と反応させた。

9. LCMSを用いた反応解析

HEPES緩衝液(50 mM, pH 7.4)中、各プローブ(50 μ M)を $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{NH}_4)_2$ (final, 200 μ M)と室温で1時間反応させた。LC-MSによる反応解析は、HP 1100 LC system (equipped with Agilent 1946B ESI-mass system)とWaters symmetry C18 column (3.5 μ m, 4.6 \times 75 mm)を使用して実施した。

10. 細胞培養

Human hepatocellular carcinoma (HepG2)細胞は、10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)、1% Antibiotic-Antimycotic (Gibco)、2 mM glutamineを添加したmodified essential medium (MEM, Gibco) を培地として使用し、37 °C, 5% CO_2 インキュベーターを用いて培養した。蛍光イメージングを実施する際には、Advanced TC glass-bottomed dishes (CELL_{view}TM Cell Culture Dish, Greiner)に 1.0×10^5 cells/wellとなるようにHepG2細胞を播種し、2日間培養した後に実験に使用した。

11. 共焦点蛍光イメージング

生細胞イメージングでは、Zeiss LSM 700 laser-scanning microscope systemを使用して共焦点イメージング画像を撮影した。鉄添加実験では20倍対物レンズを使用し、共染色実験およびトランスフェリン添加実験では40倍油浸対物レンズを使用した。各実験の詳細は以下に示した。

鉄添加・キレート実験

培地をFBS未添加のMEMに交換した後、硫酸アンモニウム鉄6水和物 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (100 μ M from 10 mM stock in H_2O)を添加し、37 °Cで30分間インキュベートした。その後、HBSSで細胞を3回洗浄した。続いて、HBSSに溶解した各プローブ(1 μ M or 5 μ M)で30分間処理した後に、細胞をHBSSで1回洗浄し、蛍光イメージング観察を行なった。2, 2'-bipyridyl (Bpy)を用いたキレート実験では、1 mMのBpy (from 100 mM stock solution in DMSO)をプローブと同時に加えた。ヘキストによる核染色のために、Hoechst 33342 (1.0 μ g/mL, from 0.1 mg/mL stock solution in water)をプローブと同時に添加した。また、全ての条件において鉄添加実験の場合は水を、キレート実験の場合はDMSOをvehicleとして添加した。

生細胞中におけるプローブの検出限界決定

上記鉄添加実験と同様の手法で実施した。

共染色実験

リソソーム染色実験では、Lyso tracker® Green DND-26 (50 nM)のHBSS溶液を細胞に加え、37 °Cで2時間インキュベートした。小胞体染色実験では、ER-tracker™ Green (500 nM)のHBSS溶液を細胞に加え、37 °Cで30分間インキュベートした。上記の染色処理後、HBSSによる洗浄を3回行ない、各プローブ(1 μ M or 10 μ M in HBSS)で30分間37 °Cでインキュベートした。その後、HBSSで細胞を1回洗浄し、蛍光イメージングを実施した。

トランスフェリン添加実験

HepG2細胞を下記(a)–(b)の条件で処理した後、細胞をHBSSで1回洗浄し、1 μ M HMRhoNox-M のHBSS溶液で30分間、37 °Cでインキュベートした。HBSSで細胞を1回洗浄し、蛍光イメージングを行なった。イメージング画像の解析はImageJを用いた。

a) Control実験

MEM (containing 30% PBS)を処理し、30分間37 °Cでインキュベートした。

b) トランスフェリン添加実験

5 μ M holoTf (from human blood, Wako Pure Chemicals, from 100 μ M stock solution in PBS)のMEM溶液を細胞に添加し、30分間37 °Cでインキュベートした。

c) apoTfによる競合阻害実験

5 μ M holoTfと25 μ M apoTf (from human blood, Nacalai Tesque, from 100 μ M stock solution in PBS)のMEM溶液を細胞に添加し、30分間37 °Cでインキュベートした。

d) 低温処理によるエンドサイトーシスの阻害実験

5 μ M holoTfのMEM溶液を細胞に添加し、4 °Cで30分間インキュベートした。

e) アジ化ナトリウム処理によるエンドサイトーシスの阻害実験

5 μ M holoTfと1 mM NaN₃ (from 100 mM stock solution in PBS)のMEM溶液を細胞に添加し、37 °Cで30分間インキュベートした。

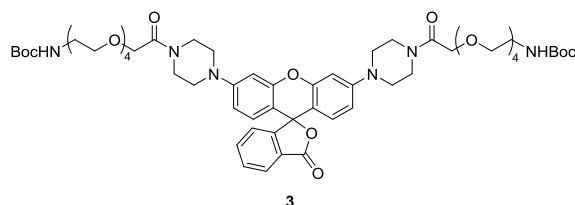
第二章に関する実験

1. General

購入可能な試薬および溶媒は特別な精製は行わずに用いた。 ^1H -NMR スペクトルは、JEOL 社 ECA 500 (500 MHz)および JEOL 社 JNM-AL400 (400 MHz)を用いて測定した。測定溶媒は重水素化クロロホルム(CDCl_3)または重水素化メタノール(CD_3OD)を用いた。 ^1H -NMR は化学シフトを δ 値(ppm)で表記し、テトラメチルシランのシングレットピークを 0 ppm の基準とした。 ^{13}C -NMR は全てデカップリング化して行ない、JEOL 社 ECA 500 (125 MHz)および JEOL 社 JNM-AL400 (100 MHz)を用いて測定した。測定溶媒は CDCl_3 または CD_3OD を用いた。 ^1H -NMR は化学シフトを δ 値(ppm)で表記し、 CDCl_3 を溶媒として測定した場合は CDCl_3 のトリプレットシグナルを 77.0 ppm の基準とした。 CD_3OD の場合は、溶媒由来のピークを 49.0 ppm の基準とした。結合定数(J 値)は Hz で表した。シグナルの分裂様式は、s=singlet, d=doublet, t=triplet, dd=doubledoublet, td=tripledoublet, q=quartet, m=multiplet, brs=broad singlet と略記した。高分解能質量分析(HRMS)は、JEOL 社 JMS-T100TD を使用し、ポリエチレングリコール(PEG)または YOKUDELNA (JEOL)を標準物質として測定した。薄層カラムクロマトグラフィー(TLC)は Silca gel 60 F₂₅₄ (Merck)または DIOL TLC (Fuji Silysia, Chromatorex)を用い、UV(254 nm)吸収、リンモリブデン酸による呈色、もしくは蛍光色素由来の蛍光で検出した。化合物の精製にはシリカゲル担体 AP-300S (Taiko-shoji)、ジオール担体(Fuji Silysia, Chromatorex)、または Sep-Pack C18 cartridge (Waters)を用いた。

2. Mem-RhoNoxおよびMem-Rhodamineの合成

Preparation of 3



過去の報告に従って別途合成したローダミン誘導体 $\mathbf{1}^{37}$ (378 mg, 0.565 mmol)をEtOAc (5 mL)に溶解し、0 °Cで4 M HCl/EtOAc (5 mL)を滴下した。室温で18時間攪拌した後、

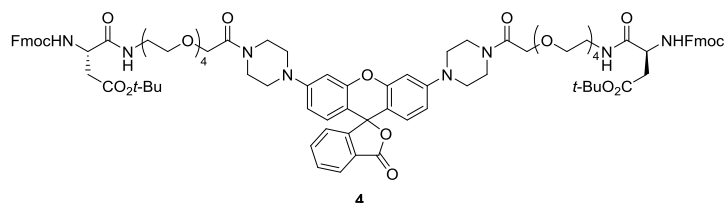
反応溶媒を減圧下留去した。得られた紫色固体を脱水DMF (20 mL)に溶解し、Et₃N (787 μ L, 5.65 mmol)と $\mathbf{2}^{38}$ (1.70 mmol)を加えた後、0 °Cに冷却し、DMT-MM (470 mg, 1.70 mmol)を加えた。窒素雰囲気下、室温で17時間攪拌した後、反応溶液にEtOAc (50 mL)を加えた。反応混合液を水(50 mL \times 5)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(50 mL)、飽和食塩水(50 mL)で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃ : MeOH = 20 : 1)で精製し、**3**を得た(263 mg, 49% for 2 steps, as purple oil)。

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 8.02 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.67 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.62 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.16 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 6.70 (d, J = 2.2 Hz, 2H), 6.66 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.60 (dd, J = 8.8 Hz, J = 2.2 Hz, 2H), 5.09 (m, 2H), 4.26 (s, 4H), 3.73–3.64 (m, 32H), 3.52 (t, J = 4.8 Hz, 4H), 3.30–3.26 (m, 12H), 1.44 (s, 18H).

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 169.5, 167.7, 155.9, 153.0, 152.4, 152.3, 134.8, 129.5, 128.8, 126.9, 124.9, 123.8, 112.1, 110.0, 102.4, 83.4, 79.1, 70.7, 70.5, 70.44, 70.42, 70.3, 70.1, 48.6, 48.1, 44.6, 41.3, 40.3, 28.4.

HRMS (ESI⁺): m/z calculated for [C₅₈H₈₂N₆Na₂O₁₇]²⁺: 590.2761, found: 590.2765.

Preparation of **4**



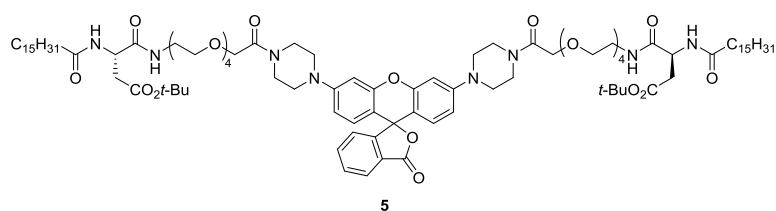
3 (37 mg, 0.033 mmol)を CH₂Cl₂ (1 mL)に溶解し、0 °C でトリフルオロ酢酸(0.5 mL)を滴下し、室温で5時間攪拌した。溶媒を減圧下留去し、残渣をトルエンで共沸した後(3 mL \times 3)、ジエチルエーテルで洗浄した(3 mL \times 3)。得られた紫色固体を脱水 DMF (2 mL)に溶解し、Et₃N (22 μ L, 0.16 mmol)と Fmoc-Asp(O*t*-Bu)-OH (38 mg, 0.093 mmol)を加えた。0 °C に冷却した後、HOBt \cdot H₂O (14 mg, 0.093 mmol)と EDC \cdot HCl (18 mg, 0.093 mmol)を混合液に加え、窒素雰囲気下、室温で5時間攪拌した。反応溶液を減圧下濃縮した後、残渣を CHCl₃ (10 mL)に溶解した。得られた混合液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(10 mL \times 2)と飽和食塩水(10 mL)で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃ : MeOH = 20 : 1)で精製し、**4**を得た(36 mg, 64% for 2 steps, purple oil)。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 8.02 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.75 (d, $J = 7.4$ Hz, 4H), 7.63–7.60 (m, 6H), 7.39 (t, $J = 7.5$ Hz, 4H), 7.30 (t, $J = 7.5$ Hz, 4H), 7.14 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.92 (m, 2H), 6.67 (m, 2H), 6.64–6.61 (m, 2H), 6.57–6.53 (m, 2H), 6.06–6.05 (m, 2H), 4.53–4.52 (m, 2H), 4.41–4.37 (m, 4H), 4.23 (m, 6H), 3.74–3.44 (m, 40H), 3.21 (m, 8H), 2.87 (dd, $J = 17$ Hz, 5.8 Hz, 2H), 2.67 (dd, $J = 17$ Hz, 5.8 Hz, 2H), 1.44 (s, 18H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 170.8, 170.4, 169.5, 167.8, 155.9, 152.5, 152.3, 143.7, 143.6, 141.2, 135.8, 134.8, 129.6, 128.9, 127.7, 127.0, 126.9, 125.0, 124.9, 123.9, 120.0, 112.0, 109.9, 102.4, 81.6, 70.6, 70.5, 70.43, 70.40, 70.3, 70.2, 69.5, 67.1, 51.2, 48.6, 48.1, 47.0, 44.6, 41.3, 39.4, 37.7, 28.0.

HRMS (ESI $^{+}$): m/z calculated for $[\text{C}_{94}\text{H}_{112}\text{N}_8\text{Na}_2\text{O}_{23}]^{2+}$: 883.3812, found: 883.3829.

Preparation of 5



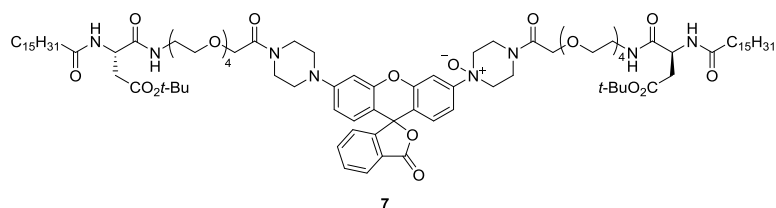
4 (36 mg, 0.021 mmol)を MeCN (2 mL)に溶解し、ピペリジン(800 μL)を滴下した。室温で1時間攪拌した後に溶媒を減圧下留去し、残渣をヘキサンで洗浄した(5 mL \times 5)。得られたピンク色固体とパルミチン酸(16 mg, 0.063 mmol)を脱水 DMF (2 mL)に溶解し、0 $^{\circ}\text{C}$ で HOBt \cdot H $_2$ O (9.6 mg, 0.063 mmol)と EDC \cdot HCl (17 mg, 0.063 mmol)を反応溶液に加えた後に、窒素雰囲気下、室温で23時間攪拌した。反応溶媒を減圧下濃縮し、残渣に水(10 mL)を加えた後に、 CHCl_3 で抽出した(20 mL \times 3)。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(30 mL)と飽和食塩水(30 mL)で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl_3 : MeOH = 30 : 1)で精製し、**5**を得た(14 mg, 38% for 2 steps, as purple oil).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 8.03 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.66 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.63 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.97 (brs, 2H), 6.84 (brs, 1H), 6.69 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H), 6.66 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.60 (dd, $J = 8.6$ Hz, 2.3 Hz, 2H), 4.75–4.73 (m, 2H), 4.27 (s, 4H), 3.68–3.50 (m, 40H), 3.26 (m, 8H), 2.81 (dd, $J = 16.6$ Hz, 4.6 Hz, 2H), 2.58 (dd, $J = 15.8$ Hz, 6.0 Hz, 2H), 2.21 (t, $J = 7.4$ Hz, 4H), 1.62–1.60 (m, 4H), 1.44 (s, 18H), 1.27–1.24 (m, 48H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 6H).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 173.3, 171.3, 170.8, 170.7, 169.7, 167.9, 153.1, 152.6, 152.5, 135.0, 129.7, 129.0, 127.1, 125.1, 124.0, 112.2, 110.1, 102.6, 83.6, 81.6, 70.53, 70.50, 70.47, 70.44, 70.35, 70.33, 70.26, 49.27, 49.25, 48.7, 48.6, 48.15, 48.13, 44.7, 44.6, 41.4, 39.3, 37.2, 36.5, 31.9, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.3, 29.2, 28.0, 25.6, 22.7, 14.1.

HRMS (ESI⁺): m/z calculated for $[\text{C}_{96}\text{H}_{152}\text{N}_8\text{Na}_2\text{O}_{21}]^{2+}$: 899.5428, found: 899.5425.

Preparation of 7



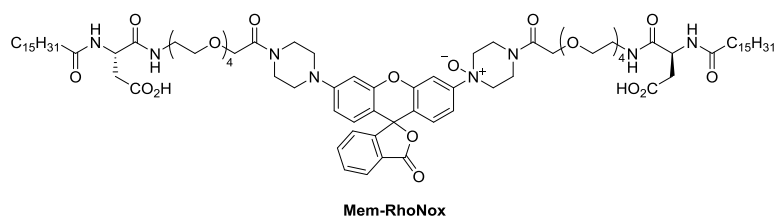
5 (84 mg, 0.048 mmol)を EtOAc (9 mL)に溶解し、0 °C で *m*-CPBA (9.1 mg, 0.053 mmol)を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応溶液を 0 °C に冷却した後に *m*-CPBA (3.3 mg, 0.019 mmol)を追加し、室温で 30 分間攪拌した。反応溶媒を減圧下留去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl_3 : MeOH = 20 : 1 to 5 : 1 to 3 : 1)で精製し、**7**を得た(23 mg, 22%, a pale purple solid)。

^1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ : 8.05 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.69 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 7.63 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.53–7.57 (m, 1H), 7.10 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.79 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.69 (dd, J = 9.2 Hz, 2.3 Hz, 1H), 6.58 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 4.62–4.60 (m, 2H), 4.50 (d, J = 13.7 Hz, 1H), 4.32 (d, J = 13.7 Hz, 1H), 4.20 (s, 2H), 4.16 (d, J = 13.7 Hz, 1H), 4.04–4.02 (m, 4H), 3.56–3.42 (m, 36H), 3.25–3.23 (m, 4H), 2.65 (dd, J = 16.0 Hz, 5.7 Hz, 2H), 2.45 (q, 2H), 2.19–2.10 (m, 4H), 1.48 (m, 4H), 1.32 (s, 18H), 1.18–1.16 (m, 48H), 0.79 (t, J = 6.9 Hz, 6H).

^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ : 176.0, 173.0, 171.2, 170.9, 170.2, 170.1, 156.7, 154.4, 154.1, 153.4, 136.9, 131.5, 130.6, 129.8, 127.6, 126.1, 125.1, 122.1, 113.9, 109.8, 103.1, 83.6, 82.2, 71.74, 71.67, 71.58, 71.56, 71.51, 71.48, 71.45, 71.42, 71.29, 71.26, 71.1, 71.0, 70.4, 51.3, 45.7, 42.6, 40.5, 38.6, 38.5, 38.1, 36.9, 33.1, 30.80, 30.78, 30.76, 30.74, 30.63, 30.51, 30.48, 30.3, 28.4, 28.4, 26.9, 23.7, 14.5.

HRMS (ESI⁺): m/z calculated for $[\text{C}_{96}\text{H}_{152}\text{N}_8\text{Na}_2\text{O}_{22}]^{2+}$: 907.5403, found: 907.5382.

Preparation of Mem-RhoNox



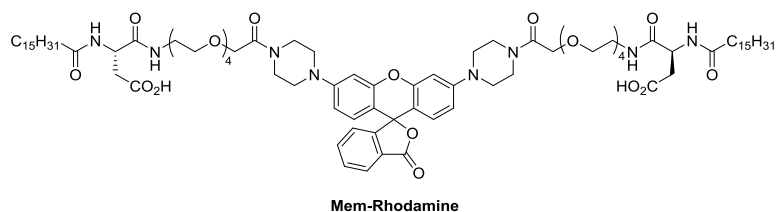
7 (7.3 mg, 0.0041 mmol)をCH₂Cl₂ (1 mL)に溶解し、0 °CでTFA (1 mL)を滴下した後に、室温で2時間攪拌した。溶媒を減圧下留去した後に、残渣をトルエンで共沸した。得られた残渣をジオールシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃ : MeOH = 100 : 1 to 50 : 1)で精製し、Mem-RhoNoxを得た(4.1 mg, 60%, as a pale pink solid)。

¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ: 7.98–7.96 (m, 2H), 7.82–7.71 (m, 1H), 7.70 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.65 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.59–7.57 (m, 1H), 7.12 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.74–6.72 (m, 1H), 6.69 (dd, *J* = 8.6 Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.58 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.60–4.59 (m, 3H), 4.34 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H), 4.20–4.14 (m, 6H), 4.00–3.98 (m, 1H), 3.61–3.37 (m, 39H), 3.25–3.20 (m, 4H), 2.81–2.75 (m, 2H), 2.71–2.68 (m, 2H), 2.57–2.53 (m, 2H), 2.12–2.11 (m, 4H), 1.48–1.47 (m, 4H), 1.18–1.16 (m, 48H), 0.79 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H).

¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ: 176.2, 173.9, 173.2, 170.8, 170.3, 170.2, 154.4, 153.9, 153.4, 153.3, 136.9, 131.7, 131.3, 129.8, 127.6, 126.2, 125.1, 123.1, 116.6, 116.5, 114.0, 111.4, 109.5, 103.0, 83.4, 71.7, 71.6, 71.52, 71.45, 71.41, 71.3, 71.2, 71.1, 70.9, 70.5, 70.4, 51.3, 45.7, 42.6, 41.2, 40.5, 37.9, 37.1, 37.0, 36.9, 33.1, 30.8, 30.6, 30.5, 30.4, 30.3, 26.9, 23.7, 14.5.

HRMS (ESI[−]): *m/z* calculated for [C₈₈H₁₃₅N₈O₂₂][−]: 1655.9696, found: 1655.9670.

Preparation of Mem-Rhodamine



5 (6.5 mg, 0.0037 mmol)を EtOAc (1 mL)に溶解し、0 °C で 4 M HCl/EtOAc (1 mL)を滴下した。室温で 20 時間攪拌した後、反応混合液にヘキサン(5 mL)を加えた。生じた紫色沈殿を濾取して減圧下乾燥させ、Mem-Rhodamine を得た(4.3 mg, 68%, as a purple solid)。

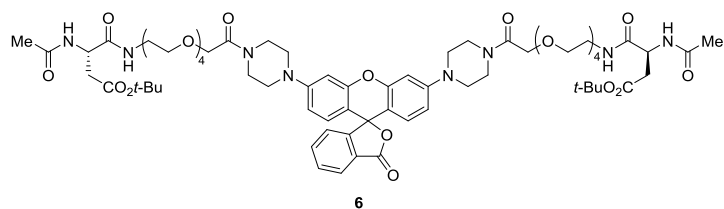
¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ : 8.16 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.81–7.80 (m, 1H), 7.73 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.68 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.24 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 6.97–6.95 (m, 6H), 4.59 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 4.21 (s, 4H), 3.66–3.46 (m, 40H), 3.39 (t, J = 5.4 Hz, 4H), 3.24–3.20 (m, 4H), 2.70 (dd, J = 16.9 Hz, 6.0 Hz, 2H), 2.55 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 2.11 (t, J = 7.4 Hz, 4H), 1.48 (t, J = 6.9 Hz, 4H), 1.17–1.15 (m, 48H), 0.79 (t, J = 6.9 Hz, 6H).

¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ : 176.1, 173.8, 173.2, 170.5, 169.0, 158.0, 157.3, 134.6, 131.8, 131.5, 130.7, 130.7, 129.6, 115.3, 114.5, 99.9, 99.8, 71.58, 71.48, 71.46, 71.43, 71.32, 71.26, 70.9, 70.5, 51.3, 48.3, 47.8, 45.1, 42.4, 40.4, 36.94, 36.86, 33.1, 30.81, 30.76, 30.6, 30.50, 30.47, 30.3, 26.8, 23.7, 14.5.

HRMS (ESI[−]): m/z calculated for [C₈₈H₁₃₅N₈O₂₁][−]: 1639.9742, found: 1639.9729.

3. Ac-RhoNox および Ac-Rhodamine の合成

Preparation of **6**



4 (84 mg, 0.049 mmol)を MeCN (3.5 mL)に溶解し、ピペリジン(1.5 mL)を滴下した。室温で 1 時間攪拌した後に溶媒を減圧下留去し、残渣をヘキサンで洗浄した(5 mL×5)。得られたピンク色固体をピリジン(2 mL)に溶解し、無水酢酸(14 μ L 0.15 mmol)を滴下した後に、室温で 2 時間攪拌した。反応溶媒を減圧下留去し、残渣をトルエンで共沸した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃ : MeOH = 50 : 1 to

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 8.02 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.67 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.62 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.98–6.95 (m, 4H), 6.69 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 6.64 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 6.60 (dd, *J* = 8.6 Hz, 2.1 Hz, 2H), 4.76–4.72 (m, 2H), 4.27 (s, 4H), 3.73–3.63 (m, 32H), 3.52–3.51 (m, 4H), 3.42–3.41 (m, 4H), 3.28–3.25 (m, 8H), 2.81 (dd, *J* = 16.6 Hz, 4.6 Hz, 2H), 2.61 (dd, *J* = 16.6 Hz, 6.3 Hz, 2H), 2.02 (s, 6H), 1.44 (s, 18H).

HRMS (ESI+): m/z calculated for $[\text{C}_{68}\text{H}_{98}\text{N}_8\text{O}_{21}]^{2+}$: 631.2616, found: 631.2627.

CNC(=O)[C@H](C(=O)OC(C)(C)C)NCCOC(=O)N1CCN(CC1)C2=CC=C3C(=C2)Oc4ccccc4C(=O)O3[N+]1CCN(CC1)C(=O)OCCOC(=O)N[C@H](C(=O)OC(C)(C)C)NC(=O)C

8

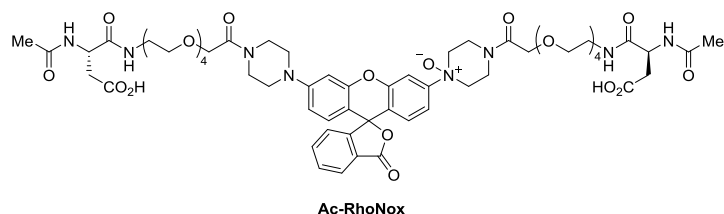
¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ: 8.04 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.70 (td, *J* = 7.4 Hz, 1.1 Hz, 1H), 7.64 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.60–7.56 (m, 1H), 7.12 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.92 (dd, *J* = 8.9 Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.72 (dd, *J* = 8.9 Hz, 2.0 Hz, 1H), 6.59 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.62–4.59 (m, 2H), 4.51 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H), 4.39 (d, *J* = 14.3 Hz, 1H), 4.21 (s, 2H), 4.16 (d, *J* = 14.3 Hz, 1H), 4.01–3.98 (m, 4H), 3.64–3.37 (m, 40H), 3.28–3.26 (m, 4H), 2.64 (dd, *J* = 16.0 Hz, 5.7 Hz, 2H), 2.44 (q, *J* = 8.0 Hz, 2H), 1.87 (s, 6H), 1.32 (s, 18H).

79

45.7, 42.6, 41.3, 40.5, 38.6, 38.5, 38.1, 28.3, 22.6, 18.4.

HRMS (ESI⁺): m/z calculated for $[\text{C}_{68}\text{H}_{98}\text{N}_8\text{O}_{22}]^{2+}$: 703.3237, found: 703.3263.

Preparation of Ac-RhoNox



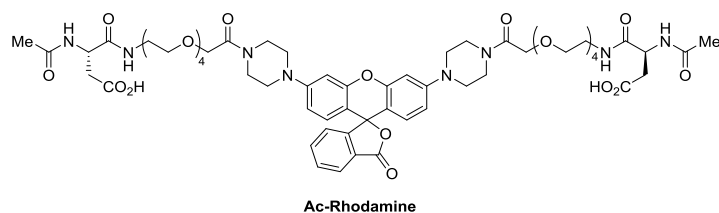
8 (29 mg, 0.021 mmol)を CH_2Cl_2 (1 mL)に溶解し、0 °C で TFA (1 mL)を滴下した。室温で3時間攪拌した後に反応溶媒を減圧下濃縮し、次いでトルエンで共沸した。得られた残渣を Sep-Pack C18 cartridge (MeOH: H_2O = 0 : 1 to 1 : 5 to 1 : 2)で精製し、Ac-RhoNox を得た(21 mg, 81%, as a pale pink solid)。

^1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ : 8.04 (dd, J = 10.3 Hz, 1.7 Hz, 1H), 7.95 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.86 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 7.69 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.63 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.57 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 7.12 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.92 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.78 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.69 (dd, J = 9.2 Hz, 2.3 Hz, 1H), 6.58 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 4.76–4.74 (m, 1H), 4.59 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 4.50 (d, J = 14.3 Hz, 1H), 4.33 (d, J = 13.7 Hz, 1H), 4.20 (s, 2H), 4.15 (d, J = 14.3 Hz, 1H), 4.01–3.98 (m, 4H), 3.63–3.36 (m, 38H), 3.27–3.23 (m, 4H), 2.67 (dd, J = 16.6 Hz, 5.7 Hz, 2H), 2.55 (q, J = 8.0 Hz, 2H), 1.87 (s, 3H), 1.87 (s, 3H).

^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz) δ : 173.2, 173.2, 170.9, 170.3, 170.3, 156.3, 154.5, 154.1, 153.4, 153.2, 136.9, 131.6, 130.7, 130.7, 129.8, 127.6, 126.2, 125.2, 122.3, 114.0, 109.7, 103.1, 83.6, 71.74, 71.66, 71.57, 71.51, 71.48, 71.46, 71.42, 71.29, 71.25, 71.1, 71.0, 70.4, 51.5, 45.7, 42.6, 41.4, 40.5, 22.6.

HRMS (ESI[−]): m/z calculated for $[\text{C}_{60}\text{H}_{78}\text{N}_8\text{O}_{22}]^{2-}$: 631.2616, found: 631.2627.

Preparation of Ac-Rhodamine



6 (7.7 mg, 0.0062 mmol)を CH_2Cl_2 (0.5 mL)に溶解し、0 °C で TFA (0.5 mL)を滴下した。

室温で2時間攪拌し、反応溶媒を減圧下留去した後に、トルエンで共沸した。得られた残渣を Sep-Pack C18 cartridge (MeCN: H₂O = 0 : 1 to 1 : 5) で精製し、Ac-Rhodamine を得た (6.4 mg, 87%, as a purple solid)。

¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ : 7.95 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.66 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.61 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.11 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 6.78 (d, J = 2.3 Hz, 2H), 6.73 (dd, J = 9.2 Hz, 2.3 Hz, 2H), 6.64 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 4.58 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 4.21 (s, 4H), 3.58–3.52 (m, 32H), 3.39 (t, J = 5.7 Hz, 4H), 3.34–3.32 (m, 4H), 3.30–3.23 (m, 4H), 3.21–3.20 (m, 4H), 2.67 (dd, J = 16.6 Hz, 5.7 Hz, 2H), 2.65 (dd, J = 16.6 Hz, 6.3 Hz, 2H), 1.87 (s, 6H).

¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ : 173.3, 173.2, 173.2, 170.4, 170.4, 155.0, 155.0, 154.9, 135.8, 131.2, 130.3, 126.9, 126.3, 113.8, 111.7, 102.4, 71.63, 71.56, 71.53, 71.47, 71.41, 71.3, 71.0, 70.5, 51.6, 45.6, 42.6, 40.5, 22.7.

HRMS (ESI[−]): m/z calculated for [C₆₀H₇₈N₈O₂₁]^{2−}: 623.2647, found: 623.2632.

4. 吸収および蛍光スペクトル測定

紫外可視吸収スペクトルは、Agilent 8453 photodiode array spectrometer (equipped with a Unisoku thermo-static cell holder (USP-203)) を使用して測定した。測定セルは、光路長 1 cm で測定容量が 3 mL のものを用いた。蛍光スペクトル測定は、JASCO FP6600 を使用して測定した。励起側バンド幅は 5 nm、蛍光側バンド幅は 6 nm に設定して測定した。四面透過石英セルは光路長が 1 cm で測定容量が 3 mL のものを用いた。全てのスペクトル測定において、プローブおよび対応する脱酸素化色素の濃度は 2 μ M (from 1 mM stock solution in DMSO) とした。

pH依存性試験

pH依存性試験を行なう際は、様々な濃度に調製した200 mMのリン酸緩衝液中で測定を行なった。

蛍光量子収率測定

蛍光量子収率は、HEPES緩衝液(50 mM, pH 7.4)中、絶対PL量子収率測定装置 Quantaurus-QY absolute photo-luminescence quantum yields measurement system (C11347-01, Hamamatsu Photonics)を用いて測定した。

金属選択性試験

各遷移金属種(MnSO₄, CoSO₄, NiSO₄, FeSO₄, FeCl₃, CuSO₄, ZnSO₄)は10 mMのストック水溶液をHEPES緩衝液中で希釈し、最終濃度を20 μ Mとした。アルカリ金属イオンおよびアルカリ土類金属イオン種(NaCl, KCl, MgCl₂, and CaCl₂)は1 Mのストック水溶液をHEPES緩衝液中で希釈し、最終濃度を1 mMとした。一価の銅イオンの場合はCu(CH₃CN)₄]PF₄をMeCNに溶解し、10 mMの濃度に調製したものをストック溶液として使用した。

還元剤、酸化剤等に対する選択性試験

HEPES緩衝液中、2 μ MのAc-RhoNoxを以下の条件で1時間処理し、蛍光スペクトル測定を実施した。

Na₂S₂O₃ : 100 μ M (from 100 mM stock solution in water).

Sodium ascorbate: 1 mM (from 100 mM stock solution in water).

Cysteine : 1 mM (from 100 mM stock solution in water).

Glutathione : 1 mM (from 100 mM stock solution in HEPES buffer). ストック溶液はグルタチオンの影響で酸性となるため、水酸化ナトリウム水溶液で最終pHを7.4に調節した。

β -NADPH : 200 μ M (from 10 mM stock solution in water).

NaNO₂ : 100 μ M (from 100 mM stock solution in water).

O₂^{•-} : 100 μ M (from saturated KO₂ solution in DMSO (ca. 1 mM)⁶⁰).

H₂O₂ : 100 μ M (from 100 mM stock solution in water).

•OH : 200 μ M H₂O₂と20 μ M FeSO₄を混和し、Fenton反応により•OH

を発生させた。DMSOはヒドロキシラジカルのクエンチャーとなるため⁶¹、DMSOの代わりにDMFを用いてAc-RhoNoxのストック溶液を調製した。

NaOCl : 100 μ M (from 100 mM stock solution in water).
NO : 100 μ M NOC-5 (from 10 mM stock solution in 0.1 M NaOH aq.).
holoTf : 20 μ M (from 100 μ M stock solution in HEPES buffer (50 mM, pH 7.4)).
DFO + Fe(II) : 100 μ M DFO (from 10 mM in stock solution in water)の存在下でプローブを20 μ M FeSO₄と反応させた。

濃度依存性試験による検出限界の決定

2 μ M Ac-RhoNoxを50 mM HEPES緩衝液(pH 7.4)中で各種濃度のFeSO₄と室温で1時間反応させた後に、蛍光強度変化を測定した。反応は96-well plate (Greiner)上で実施し、蛍光応答の測定はGlomax[®] Multi Detection System (excitation = 525 nm, emission = 580–640 nm)を用いた。

5. LCMSによる反応解析

第一章と同様の条件で実施した。

6. 細胞培養

第一章と同様の条件で細胞培養を行なった。

7. 共焦点蛍光イメージング

生細胞イメージングは、Olympus IX83倒立型顕微鏡(130 W水銀ランプ, EMCCDカメラ(Hamamatsu Photonics, ImagEM), ガス制御装置付ステージインキュベータ (STX series, TOKAI Hit, Japan), ディスクスキャン共焦点ユニット (DSU))を使用して共焦点蛍光イメージング画像を撮影した。蛍光イメージング画像は、Mem-RhoNoxおよびMem-Rhodamine由来の蛍光を観察する場合はRhodamine filter set (excitation = 532–554 nm, emission = 572–642 nm, and dichroic mirror = 565 nm)を使用し、Alexafluor488-Tf由来の蛍光を検出する場合はFITC filter set (excitation = 465–500 nm, emission = 516–556 nm, and dichroic mirror = 495 nm)を使用した。全てのイメージング実験において、60倍の油浸対物レンズを使用し、培地はHank's Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco, containing calcium and magnesium without phenol red)を選択した。

細胞膜への局在性の確認

HepG2細胞をHBSSで2回洗浄した後、Mem-Rhodamine (0.2 μM in HBSS)、5 (0.2 μM in HBSS)、またはAc-Rhodamine (0.2 μM in HBSS)を加えた。30分間37 °Cでインキュベートした後、HBSSで2回洗浄し、それぞれ蛍光イメージングを行なった。

細胞膜上での鉄応答性の確認

HepG2細胞をHBSSで2回洗浄した後、MemRhoNox (1 μM in HBSS)を加え、室温で10分間インキュベートした。HBSSで2回洗浄した後、細胞を10 μM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (FAS, from 10 mM stock solution in water)または10 μM ferric ammonium citrate (FAC, from 10 mM stock solution in water)で処理し、30分間37 °Cでインキュベートした。HBSSにより培地洗浄を1回行ない、蛍光イメージングを実施した。鉄イオンキレーターへの添加や鉄還元酵素の阻害実験では、deferoxamine (DFO, from 10 mM stock solution in water)またはdiphenyleneiodonium chloride (DPI, from 10 mM stock solution in DMSO)の存在下で細胞にFASまたはFACを添加した。Control実験においては、対応する量のvehicle (FAS, FAC, and DFO: water, DPI: DMSO)を加えた。得られた蛍光イメージング画像は、ImageJを用いて解析した。

トランスフェリン処理実験

HepG2細胞をHBSSで2回洗浄した後、Mem-RhoNox (1 μM in HBSS)を加え、室温で10分間インキュベートした。細胞をHBSSで2回洗浄した後、以下に示す条件下でタイムラプス蛍光イメージングを実施し、蛍光画像を1分毎に30分間撮影した。

- (a) Control: HBSSのみで30分間37 °Cでインキュベートした。
- (b) holoTf: 5 μM holoTf (from human blood, Wako Pure Chemicals, from 100 μM stock solution in HBSS)のHBSS溶液で30分間37 °Cでインキュベートした。
- (c) holoTf + apoTf: 5 μM holoTfおよび25 μM apoTf (from human blood, Nacalai Tesque, from 100 μM stock solution in HBSS)のHBSS溶液で処理し、30分間37 °Cでインキュベートした。
- (d) holoTf + NaN_3 : 5 μM holoTfおよび1 mM NaN_3 (from 100 mM stock solution in HBSS)のHBSS溶液で処理し、30分間37 °Cでインキュベートした。

- (e) holoTf + NH₄Cl: 5 μ M holoTfおよび20 mM NH₄Cl (from 2 M stock solution in HBSS, pH was adjusted to 7.4 by addition of 2 M NH₃ aq.)のHBSS溶液で処理し、30分間37 °Cでインキュベートした。
- (f) holoTf + DFO: 5 μ M holoTfおよび100 μ M DFO (deferoxamine, from 10 mM stock solution in water, pH was adjusted to 7.4) のHBSS溶液で処理し、30分間37 °Cでインキュベートした。
- (g) MnTf: 5 μ M MnTf (from 83 μ M stock solution in 50 mM HEPES (pH 7.4), prepared from apoTf and MnCl₂ as previously described^{48,49}) のHBSS溶液で処理し、30分間37 °Cでインキュベートした。

蛍光標識トランスフェリンとの共染色実験

HepG2細胞をHBSSで2回洗浄した後、Mem-RhoNox (1 μ M in HBSS)を加え、室温で10分間インキュベートした。細胞をHBSSで2回洗浄した後、AlexaFluor 488-labeled holoTf (1 μ M in HBSS)を加え、37 °Cで20分間インキュベートした。HBSSで2回洗浄した後、マルチカラー蛍光イメージングを実施した。

8. マウス由来海馬神経細胞の初代培養と蛍光イメージング実験

マウス由来海馬神経細胞の初代培養

ICR mice (Shimizu, Japan)は京都大学物質—細胞統合システム拠点(iCeMS)の動物実験施設にて使用した。本研究は、the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals from the Society for Neuroscience に従って遂行され、the Animal Care and Use Committee of Kyoto Universityの認可を受けたものである。

海馬神経細胞の初代培養は、過去の報告⁶²に変更を加え、以下の通りに行なった。まず、マウス胎児(P0)から海馬組織を摘出し、SUMITOMO Nerve-Cell Culture System (Sumitomo Bakelite)を用いて細胞を分散させた。分散させた細胞は $3.0\text{--}3.5\times 10^4$ cells/cm² ($4.5\text{--}5.0\times 10^4$ cells per chamber)の密度でglass-bottom 8-chamber cover (Matsunami Glass, Japan)に播種した。ガラスボトムディッシュは、poly-L-lysineをMEM (supplemented with 10% horse serum (Gibco), 0.6% D-glucose, 1 mM sodium pyruvate and 1% pen-strep)に溶解したもので処理し、コーティングを行なったものを使用した。3時間後、培地をNeurobasal-A (supplemented with B-27 supplement and GlutaMAX (Gibco))に交換した。その後、37 °C、5% CO₂インキュベーターを用いて15日間培養した。GFP導入海馬神経

細胞を作製する場合は、培養開始2日後にpCAG-EGFPプラスミドをLipofectamine2000 (Thermo Fisher Scientific)を用いて海馬神経細胞にトランスフェクションした。

蛍光イメージングの条件や機器の設定

DIV15の神経細胞を用いた蛍光イメージングは、全てHBSSを培地として使用し、蛍光イメージング画像はLSM710システム(GaAsP QUASAR検出器、炭酸ガス・湿度供給型生細胞イメージングチャンバー)を用いて撮影した。撮影はPlan Apochromat 40× objective (excitation: 561nm, detection: BP 575–610 nm, scanning speed: 3.15 μ sec/pixel, optical zoom: X1)の条件で実施した。ピンホール径は1 airy unitに設定した。

トランスフェリンの添加実験

DIV15の海馬神経細胞をHBSSで1回洗浄した後、Mem-RhoNox (5 μ M in HBSS)を加え、室温で10分間インキュベートした。細胞をHBSSで2回洗浄した後、以下に示す条件下でタイムラプス蛍光イメージングを実施し、蛍光画像を1分毎に30分間撮影した。

- (a) Control: HBSSのみで37 °Cで30分間インキュベートした。
- (b) holoTf: 5 μ M holoTf (from 100 μ M stock solution in HBSS)のHBSS溶液で37 °Cで30分間インキュベートした。
- (c) holoTf + DFO: 5 μ M holoTfおよび100 μ M DFO (deferoxamine, from 10 mM stock solution in water) のHBSS溶液で処理し、37 °Cで30分間インキュベートした。

イメージング画像の撮影は、Z-stack 機能を用いて、スキャン毎に5つのZ-sliceを撮影した。5つのZ-sliceの中で最も輝度の高い画像をZEN black software (Zeiss)のMaximum Intensity Z-projection機能を用いて抽出し、抽出画像をImageJで解析した。蛍光画像を定量化するために、細胞体を含むROIを設定し、ROIにおける蛍光強度変化を解析した。

9. エンドソーム中における二価鉄イオンの推定濃度の算出

エンドソームの半径を $r \times 100 \text{ nm}$ ($= r \times 10^{-5} \text{ cm}$)とすると、エンドソームの体積($V [\text{cm}^3] = V [\text{mL}]$) は以下のように表すことができる。

$$V = \frac{4}{3} \pi (r \times 10^{-5})^3$$

トランスフェリンからは2つの鉄イオンが放出されるため、エンドソーム中に存在する鉄原子のモル数(N)は、 $2/N_A$ となる(N_A : Avogadro constant)。以上より、エンドソー

ム中の鉄イオン濃度(M , $[M]$)は以下のように示される。

$$M = \frac{(2/N_A)}{(V \times 10^{-3})}$$

V に関する式を M に関する式に代入すると、エンドソーム中の鉄イオン濃度 M は、エンドソームの半径 r を用いて以下のように表される

$$M = \frac{2.5}{\pi r^3} \times 10^{-6} [M] = \frac{2.5}{\pi r^3} [\mu M]$$

早期エンドソームの直径は 100 nm 程度とされるため $r=0.5$ を代入すると、上記の式より、エンドソーム中の二価鉄イオン濃度(M)はおよそ $6.2 \mu M$ と推定される。

本論文における略語一覧

Ac : acetyl

apoTf: apo transferrin

Boc : *t*-butoxycarbonyl

Bpy: 2,2'-bipyridyl

DMSO : dimethylsulfoxide

DMF : *N,N*-dimethylformamide

DMT-MM : 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride

DFO: deferoxamine

DIC: defferential interference contrast microscope

DPI: diphenyleneiodonium chloride

DMT1: divalent metal transporter 1

EDCI·HCl : 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrogencchloride

Fmoc : 9-fluorenylmethoxycarbonyloxy

Fmoc-Asp(*O-t*Bu)-OH : *N*-Fmoc-*L*-aspartic acid 4-*t*-butyl ester

FluNox: Rhodol-*N*-oxide

FAS: ferrous ammonium sulfate

FAC: ferric ammonium chloride

GFP: green fluorescent protein

HOBt : 1-hydroxybenzotriazole

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

holoTf: holo transferrin

*m*CPBA : 3-chloroperoxybenzoic acid

MEM: minimum essential media

MnTf: manganese transferrin

PBS: phosphate-buffered saline

ROI: region of interest

STEAP3: six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3

Tf: transferrin

TfR: transferrin receptor

引用論文

- (1) Hentze, M. W.; Muckenthaler, M. U.; Galy, B.; Camaschella, C. *Cell* **2010**, *142* (1), 24.
- (2) Hider, R. C.; Kong, X. L. *BioMetals* **2011**, *24* (6), 1179.
- (3) Tabuchi, M.; Yoshimori, T.; Yamaguchi, K.; Yoshida, T.; Kishi, F. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (29), 22220.
- (4) Shi, H.; Bencze, K. Z.; Stemmler, T. L.; Philpott, C. C. *Science* (80-.). **2008**, *320*, 1207.
- (5) Yanatori, I.; Yasui, Y.; Tabuchi, M.; Kishi, F. *Biochem. J.* **2014**, *462*, 25.
- (6) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *FEBS Lett.* **1992**, *307* (1), 108.
- (7) Zhang, Z.; Wei, T.; Hou, J.; Li, G.; Yu, S.; Xin, W. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *467* (1), 41.
- (8) Toyokuni, S. *Cancer Sci.* **2009**, *100* (1), 9.
- (9) Belaidi, A. A.; Bush, A. I. *J. Neurochem.* **2016**, *139*, 179.
- (10) Telling, N. D.; Everett, J.; Collingwood, J. F.; Dobson, J.; van der Laan, G.; Gallagher, J. J.; Wang, J.; Hitchcock, A. P. *Cell Chem. Biol.* **2017**, *24* (10), 1205.
- (11) Codazzi, F.; Pelizzoni, I.; Zacchetti, D.; Grohovaz, F. *Front. Mol. Neurosci.* **2015**, *8* (June), 1.
- (12) Watts, R. N.; Hawkins, C.; Ponka, P.; Richardson, D. R. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 7670.
- (13) Dixon, S. J.; Lemberg, K. M.; Lamprecht, M. R.; Skouta, R.; Zaitsev, E. M.; Gleason, C. E.; Patel, D. N.; Bauer, A. J.; Cantley, A. M.; Yang, W. S.; Iii, B. M. *Cell* **2012**, *149* (5), 1060.
- (14) Cheah, J. H.; Kim, S. F.; Hester, L. D.; Clancy, K. W.; Iii, S. E. P.; Papadopoulos, V.; Snyder, S. H. *Neuron* **2006**, *51*, 431.
- (15) Anderson, G. J.; Vulpe, C. D. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 3241.
- (16) Bourassa, D.; Gleber, S.-C.; Vogt, S.; Yi, H.; Will, F.; Richter, H.; Shin, C. H.; Fahrni, C. *J. Metallomics* **2014**, *6* (9), 1648.
- (17) Shvartsman, M.; Fibach, E.; Cabantchik, Z. I. *Biochem. J.* **2010**, *429*, 185.
- (18) Que, E. L.; Domaille, D. W.; Chang, C. J. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (5), 1517.
- (19) Hirayama, T.; Okuda, K.; Nagasawa, H. *Chem. Sci.* **2013**, *4* (3), 1250.
- (20) Au-Yeung, H. Y.; Chan, J.; Chantarojsiri, T.; Chang, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (40), 15165.
- (21) Xuan, W.; Pan, R.; Wei, Y.; Cao, Y.; Li, H.; Liang, F.; Liu, K.; Wang, W. *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27* (2), 302.
- (22) Aron, A. T.; Loehr, M. O.; Bogena, J.; Chang, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (43), 14338.

- (23) Kamiya, M.; Asanuma, D.; Kuranaga, E.; Takeishi, A.; Sakabe, M.; Miura, M.; Nagano, T.; Urano, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (33), 12960.
- (24) Peng, T.; Yang, D. *Org. Lett.* **2010**, *12* (3), 496.
- (25) Hirayama, T.; Okuda, K.; Nagasawa, H. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1250.
- (26) Hitomi, Y.; Takeyasu, T.; Kodera, M. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9929.
- (27) Lane, D. J. R.; Chikhani, S.; Richardson, V.; Richardson, D. R. *BBA - Mol. Cell Res.* **2013**, *1833* (6), 1527.
- (28) Patton, S. M.; Piñero, D. J.; Surguladze, N.; Beard, J.; Connor, J. R. *J. Cell Sci.* **2005**, *118* (19), 4365.
- (29) Willemetz, A.; Pilard, N.; Delaby, C.; Rondeau, C.; Desjardins, M. *PLoS One* **2012**, *7* (7), e42199.
- (30) Klausner, R. D.; Vanrenswoude, J.; Ashwell, G.; Kempf, C.; Schechter, A. N.; Dean, A.; Bridges, K. R. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258* (8), 4715.
- (31) Klausner, R. D.; Ashwell, G.; Renswoude, J. O. S. V. A. N.; Harford, J. O. E. B.; Bridges, K. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1983**, *80* (April), 2263.
- (32) Iacopetta, B. J.; Morgan, E. H. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258* (15), 9108.
- (33) Rao, K.; van Renswoude, J.; Kempf, C.; Klausner, R. D. *FEBS Lett.* **1983**, *160* (1–2), 213.
- (34) Ohgami, R. S.; Campagna, D. R.; Greer, E. L.; Antiochos, B.; McDonald, A.; Chen, J.; Sharp, J. J.; Fujiwara, Y.; Barker, J. E.; Fleming, M. D. *Nat. Genet.* **2005**, *37* (11), 1264.
- (35) Ohgami, R. S.; Campagna, D. R.; McDonald, A.; Fleming, M. D.; Ohgami, R. S.; Campagna, D. R.; McDonald, A.; Fleming, M. D. *Blood* **2006**, *108* (4), 1388.
- (36) Tabuchi, M.; Yanatori, I.; Kawai, Y.; Kishi, F. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 756.
- (37) Grimm, J. B.; Lavis, L. D. *Org. Lett.* **2011**, *13* (24), 6354.
- (38) Ranjitkar, P.; Brock, A. M.; Maly, D. J. *Chem. Biol.* **2010**, *17* (2), 195.
- (39) Hirayama, T.; Tsuboi, H.; Niwa, M.; Miki, A.; Kadota, S.; Ikeshita, Y.; Nagasawa, H. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 4858.
- (40) Niwa, M.; Hirayama, T.; Okuda, K.; Nagasawa, H. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (34), 6590.
- (41) Kicic, A.; Chua, A. C.; Baker, E. *Cancer* **2001**, *92* (12), 3093.
- (42) Riganti, C.; Gazzano, E.; Polimeni, M.; Costamagna, C.; Bosia, A.; Ghigo, D. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (46), 47726.
- (43) Chakraborty, S.; Massey, V. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (44), 41507.
- (44) Jordan, I.; Kaplan, J. *Biochem. J.* **1994**, *302*, 875.
- (45) Huotari, J.; Helenius, A. *EMBO J.* **2011**, *30* (17), 3481.
- (46) McMahon, H. T.; Boucrot, E. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2011**, *12* (8), 517.

- (47) Asanuma, D.; Takaoka, Y.; Namiki, S.; Takikawa, K.; Kamiya, M.; Nagano, T.; Urano, Y.; Hirose, K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53* (24), 6085.
- (48) Aisen, P.; Aasa, R.; Redfield, A. G. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244* (17), 4628.
- (49) Gunter, T. E.; Gerstner, B.; Gunter, K. K.; Malecki, J.; Gelein, R.; Valentine, W. M.; Aschner, M.; Yule, D. I. *Neurotoxicology* **2013**, *34*, 118.
- (50) Pelizzoni, I.; Macco, R.; Morini, F.; Zacchetti, D. *Aging Cell* **2011**, *10* (November 2010), 172.
- (51) Mills, E.; Dong, X.; Wang, F.; Xy, H. *Futur. Med. Chem.* **2010**, *2* (1), 51.
- (52) Singh, N.; Haldar, S.; Tripathi, A. K.; Horback, K.; Wong, J.; Sharma, D.; Suda, S.; Anbalagan, C.; Dev, S.; Mukhopadhyay, C. K.; Singh, A. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *20* (8), 1324.
- (53) Wang, D.; Quick, M. W. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (19), 18703.
- (54) Wang, Z.; Edwards, J. G.; Riley, N.; Provance, D. W.; Karcher, R.; Li, X. dong; Davison, I. G.; Ikebe, M.; Mercer, J. A.; Kauer, J. A.; Ehlers, M. D. *Cell* **2008**, *135* (3), 535.
- (55) Kennedy, M. J.; Davison, I. G.; Robinson, C. G.; Ehlers, M. D. *Cell* **2010**, *141* (3), 524.
- (56) Ji, C.; Kosman, D. J. *J. Neurochem.* **2015**, *133* (5), 668.
- (57) Akita, S.; Umezawa, N.; Kato, N.; Higuchi, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (16), 7788.
- (58) Kenmoku, S.; Urano, Y.; Kojima, H.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (23), 7313.
- (59) Best, Q. A.; Xu, R.; McCarroll, M. E.; Wang, L.; Dyer, D. J. *Org. Lett.* **2010**, *12* (14), 3219.
- (60) Lippert, A. R.; New, E. J.; Chang, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (26), 10078.
- (61) Setsukinai, K. ichi; Urano, Y.; Kakinuma, K.; Majima, H. J.; Nagano, T. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (5), 3170.
- (62) Kaeck, S.; Banker, G. *Nat. Protoc.* **2007**, *1*, 2406.