

生体利用を目的とした  
含ビスマスローダミン類の開発

2020年

向峯 あかり



# 目次

## 理論の部

序論 .....	1
本論 .....	4
第一章 新規蛍光分子ビスマスローダミンの開発 .....	4
第一節 BiR の分子設計 .....	4
第二節 BiR の合成 .....	5
第三節 X 線結晶構造解析 .....	5
第四節 吸収・蛍光特性 .....	7
第五節 一重項酸素生成能の評価 .....	9
第六節 生細胞中における機能評価 .....	11
第七節 <i>In vivo</i> における機能評価 .....	14
第八節 小括 .....	15
第二章 選択的活性化型ビスマスローダミンの開発 .....	16
第一節 BiRNH および BiRAc の分子設計 .....	16
第二節 BiRNH および BiRAc の合成 .....	17
第三節 BiRNH および BiRAc の光学特性評価 .....	20
第四節 BiRGlu の分子設計 .....	27
第五節 BiRGlu の合成 .....	28
第六節 BiRGlu の光学特性評価 .....	28
第七節 BiRGlu の GGT 応答性評価 .....	32
第八節 生細胞中における BiRGlu の機能評価 .....	34
第九節 小括 .....	38
総括 .....	39
謝辞 .....	41

## 実験の部

第一章に関する実験 .....	43
BiR の合成 .....	43
X 線結晶構造解析 .....	45
吸収・蛍光スペクトル測定 .....	46

サイクリックボルタンメトリー .....	47
DFT 計算 .....	47
一重項酸素生成確認試験 .....	47
細胞培養 .....	48
共焦点蛍光イメージング .....	48
MTT アッセイによる細胞毒性評価 .....	49
ゼノグラフトマウスモデルを用いた PDT 評価実験 .....	49
第二章に関する実験 .....	50
BiRNH, BiRAc および BiRGl <sub>u</sub> の合成 .....	50
吸収・蛍光スペクトル測定 .....	58
一重項酸素生成確認試験 .....	58
BiRGl <sub>u</sub> と GGT の反応における生成物分析 .....	59
細胞培養 .....	59
共焦点蛍光イメージング .....	59
MTT アッセイによる細胞毒性評価 .....	60
略語一覧 .....	62
引用文献 .....	63
主論文目録 .....	66

## 理論の部



## 序論

### ビスマスの利用法

ビスマス ( $^{209}\text{Bi}$ ) は、周期表第 15 族、第 6 周期に位置する典型重元素である。 $^{209}\text{Bi}$  は準安定同位体であるものの、その半減期は  $1.9 \times 10^{19}$  年と非常に長く、<sup>1</sup> 安定な非放射性の元素として扱われている。周期表においてビスマスの周囲に位置するヒ素 (As)、アンチモン (Sb)、タリウム (Tl)、鉛 (Pb)、水銀 (Hg)、ポロニウム (Po) に代表されるように、重元素は一般的に毒性が高い傾向がある。しかし、ビスマスは例外的に毒性が低いことが知られており、<sup>2</sup> 次サリチル酸ビスマスや次没食子酸ビスマスは胃腸系疾患に対する経口製剤として用いられている。<sup>3-8</sup>

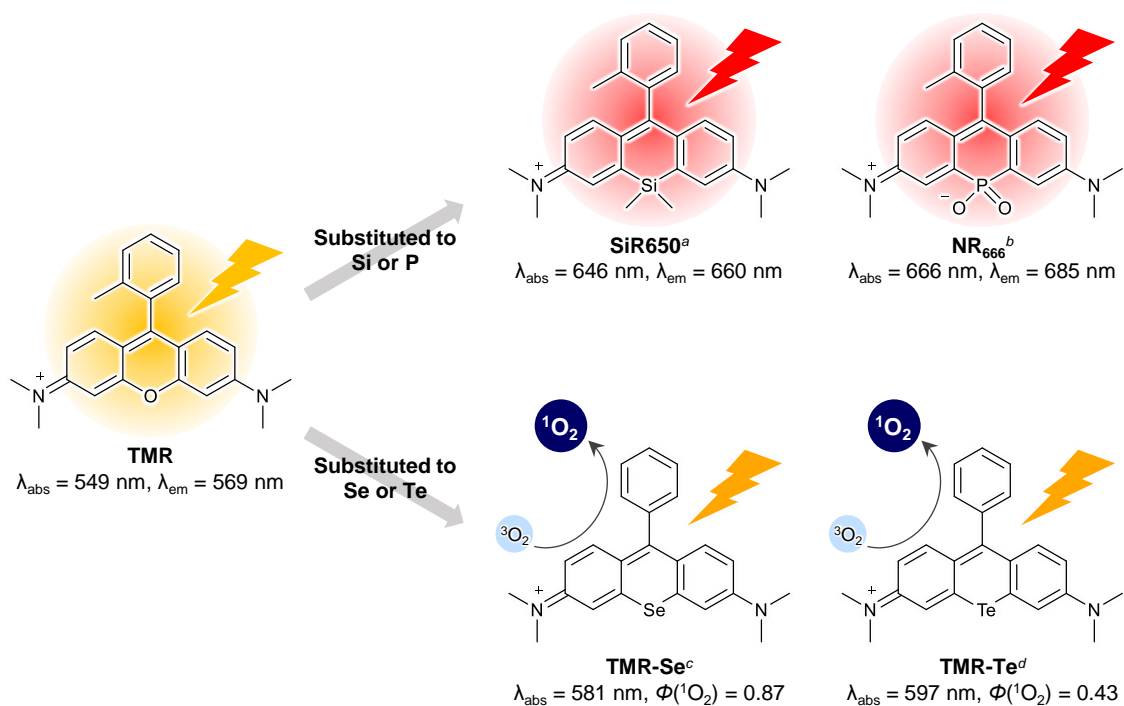
有機化学、有機金属化学分野においてのビスマスは、ルイス酸<sup>9,10</sup> や酸化剤、<sup>11-13</sup> アリール化剤<sup>14-18</sup> など反応試薬としての利用が一般的である。例えば、三塩化ビスマス ( $\text{BiCl}_3$ ) やトリフルオロメタンスルホン酸ビスマス(III) ( $\text{Bi}(\text{OTf})_3$ ) はルイス酸として働き、毒性が低く、比較的安価であることからグリーンケミストリーの観点からも近年注目されている。これら以外にも、ビスマスのルイス酸性に着目した研究は盛んに行われている。<sup>19,20</sup> また、5 価のビスマス化合物は酸化能が高く、3 価ビスマスへ容易に還元されることから、酸化剤としても利用される。さらに、有機ビスマス化合物は炭素-ビスマス結合が比較的開裂しやすいこと、メタセシス反応を起こしやすいことを利用してアリール化剤としても用いられており、アミンやフェノール、 $\beta$ -ケトン類のアリール化を可能にしている。<sup>21</sup> このような反応剤としての利用はいずれもビスマス特有の性質を利用したものであり、ビスマスの有用性は広まりつつある。しかしながら、有機ビスマス化合物自身を機能性分子として利用した例は限られている。既存の報告としては、酵母に対する増殖阻害活性や培養細胞に対する抗がん活性といったビスマス化合物の薬理活性に着目したもの<sup>22-24</sup> と、りん光性発光塗料としての利用を目的としたもののみであり、<sup>25</sup> ビスマスの独特な性質を鑑みるとその応用に関する研究は十分ではない。

このように、ビスマスは他の元素にはない特徴や有用性を秘めているにも関わらず、その応用に関しては未開拓な部分が多く残されている。

### 10 位置換型ローダミン類の光学特性

ローダミンは低分子蛍光色素の一つであり、吸収・蛍光強度が大きいこと、水溶性や光安定性が高いこと、生体に対する毒性が低いことが特長である。構造修飾が比較的容易であるため、蛍光の off/on などの機能付与や吸収・蛍光波長領域の調節がしやすく、現在でも様々なタイプの蛍光プローブの基本骨格として利用されている。<sup>26-28</sup>

ローダミンの吸収・蛍光波長域を拡張する戦略の一つとして、ローダミン骨格 10 位の酸素原子を他のヘテロ原子に置き換える手法があり、これまでに炭素 (C),<sup>29</sup> ケイ素 (Si),<sup>30</sup> ゲルマニウム (Ge),<sup>31</sup> リン (P),<sup>32,33</sup> 硫黄 (S),<sup>34,35</sup> セレン (Se),<sup>36</sup> テルル (Te)<sup>37</sup> 等が 10 位に組み込まれたローダミン分子が報告されている (Figure 1)。中でも、ケイ素が組み込まれた Si-ローダミンはテトラメチルロサミン (TMR) と比較して励起・蛍光波長ともに約 90 nm の長波長化を達成しており、現在では近赤外蛍光色素としてよく用いられている。この長波長化は環外メチル基の炭素-ケイ素結合の  $\sigma^*$  軌道とキサントンの  $\pi^*$  電子系間での軌道間相互作用により、LUMO のレベルが低下し、HOMO-LUMO ギャップが小さくなることに起因している。<sup>31,38</sup> また、リン (V) に置き換えた P-ローダミンは、赤外～近赤外領域に吸収蛍光波長を有し、また光退色耐性が高く、新たな近赤外蛍光イメージングプローブの骨格として注目されている。一方で、セレンやテルルといった 16 族の重元素に置き換えた Se-ローダミンや Te-ローダミンは、Si-ローダミンや P-ローダミンのような吸収波長の長波長化は見られず、また蛍光もほとんど発しない。しかし、その重原子効果から、励起光の照射により一重項酸素を生成する光増感剤として機能することが知られている。一重項酸素は細胞傷害性を有するため、光増感剤投与と光照射を行なった細胞のみを選択的に殺傷することが可能である。特に Se-ローダミンは特定の酵素存在下でのみ光増感能が回復し細胞障害性を示す選択的活性化型光増感剤としての展開がなされている。<sup>39,40</sup>



**Figure 1.** Structures of 10-position substituted rhodamine derivatives. <sup>a</sup>Ref. 30. <sup>b</sup>Ref. 32. <sup>c</sup>Ref. 36. <sup>d</sup>Ref. 37.



## 本研究の目的および方針

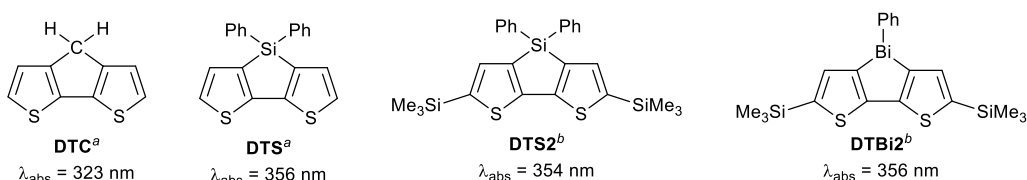
典型重元素でありながら低毒性であるという性質はビスマスに特有のものである。しかし、この点に着目し、これを利用した有機ビスマス化合物はこれまでに報告がない。そこで、本研究では低毒性な典型重元素としての有機ビスマス分子の新たな可能性を探索し、その有用性を広げるべく、生体利用可能な新規含ビスマス蛍光分子の開発を行なうこととした。具体的には、ローダミンを基本骨格とした新規含ビスマス化合物の合成を行ない、その物性および *in vitro*, *in vivo* レベルでの機能評価を行なう。さらに、生体における物性制御機能の修飾とその評価も行なう。本論ではその詳細について記述する。

# 本論

## 第一章 新規蛍光分子ビスマスローダミンの開発

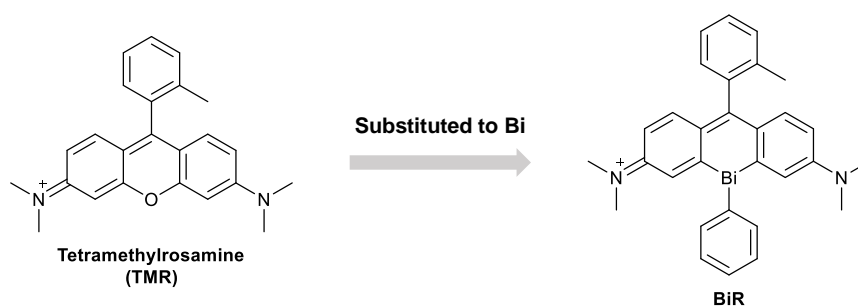
### 第一節 BiR の分子設計

序論で述べたように、ローダミン骨格 10 位にケイ素を組み込んだ Si-ローダミンの吸収・蛍光波長の長波長化は LUMO レベルの低下によるものである。<sup>31</sup> 同様の傾向は dithienosilole (DTS) 型の色素でも報告されており、チオフェンをケイ素で架橋した DTS は炭素で架橋した DTC よりも LUMO レベルが低下し、それによる長波長化がみられる。<sup>41</sup> さらに、チオフェンをビスマスで架橋した DTBi2 はそれに対応する DTS2 と同程度の吸収帯を有していることが報告されている (Figure 2)。<sup>25</sup>



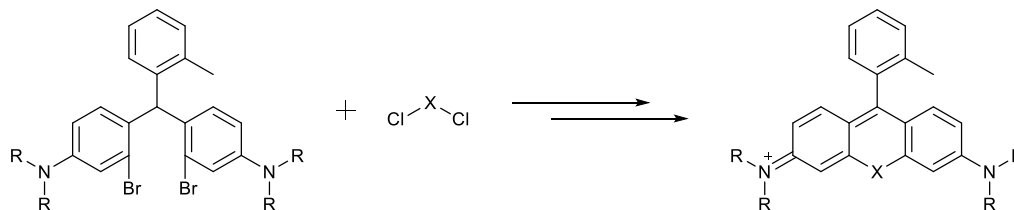
**Figure 2.** Structures of carbon- or heteroatom-bridged bithiophenes. <sup>a</sup>Ref. 41. <sup>b</sup>Ref. 25.

この知見を基に、ローダミン 10 位にビスマスを組み込むことで、Si-ローダミンと同程度の長波長化が起きることを期待した。さらに、ビスマスの重原子効果から Te-ローダミンや Se-ローダミンのような光増感能を有することも予測される。そこで、まずはビスマスローダミンの光学特性を調査すべく、テトラメチルロサミン (TMR) を基本骨格とし、10 位にフェニルビスムチノ基を組み込んだ BiR を設計した (Figure 3)。



**Figure 3.** Structure of BiR.

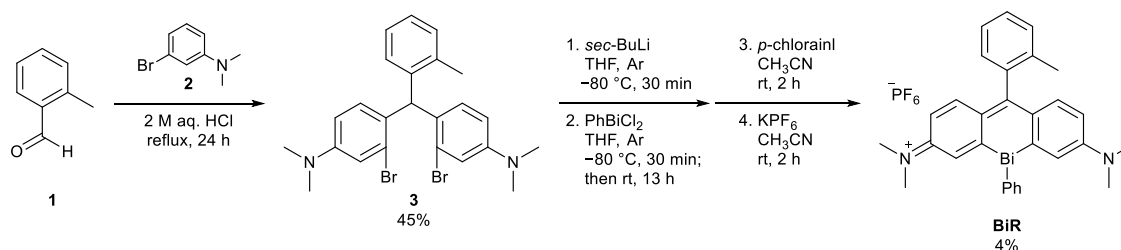
ビスマスローダミン骨格の合成は、対応するジブロモトリアリールメタンからローダミン骨格を構築する手法を選択した。このようなローダミン合成法は小出らによる Si-ローダミン合成<sup>30</sup>や Zhou らによる P-ローダミン合成<sup>32</sup>で用いられている (Scheme 1)。



**Scheme 1.** Synthesis strategy of rhodamine derivatives from triarylmethane.

## 第二節 BiR の合成

Scheme 2 に BiR の合成経路を示す。2-メチルベンズアルデヒド **1** に対して 2 当量の 3-ブromo-*N,N*-ジメチルアニリン **2** を用いて 2 M 塩酸水溶液中で Friedel-Crafts 反応を行ない、トリアリールメタン **3** を収率 45% で得た。続いて、*sec*-BuLi を用いてトリアリールメタン **3** のリチオ化を行なった後、ジクロロフェニルビスマスを加えて構造内にビスマスを有するジヒドロキサンテン骨格を形成した。その後、精製は行なわず、*p*-クロラニルを用いてビスマスローダミン (キノン構造) への酸化を行なった。最後に KPF<sub>6</sub> を使った塩交換と再結晶により、目的化合物である BiR をヘキサフルオロリン酸塩の暗緑色結晶として、化合物 **3** より収率 4% で得た。BiR の構造は、<sup>1</sup>H NMR スペクトル、<sup>13</sup>C NMR スペクトル、高分解能マスマスペクトル、元素分析、および単結晶 X 線構造解析 (次節参照) により同定した。

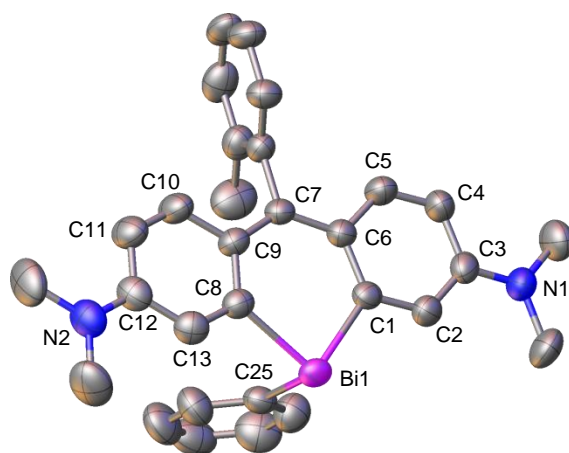


**Scheme 2.** Synthesis of BiR.

## 第三節 BiR の X 線結晶構造解析

得られた BiR の単結晶 X 線結晶構造解析を行なった (Figure 4)。ビスマス原子は平面構造のキサンテン骨格内に組み込まれており、結合している 2 つのフェニル基との角度は 89.8° (C1–Bi1–C8) であった。また、10 位のビスマスに結合したフェニル基は、キサンテン平面に対して直行しており、ビスマスと直接結合した炭素原子がなす角度はすべてほぼ直角であった (C1–Bi1–C25: 92.4°, C8–Bi1–C25: 89.6°)。このような C–Bi 結合の直角三角錐構造は、有機ビスマス(III)化合物に特徴的なものであり、第 6 周期元素であるビスマスの 6p 軌道と 6s

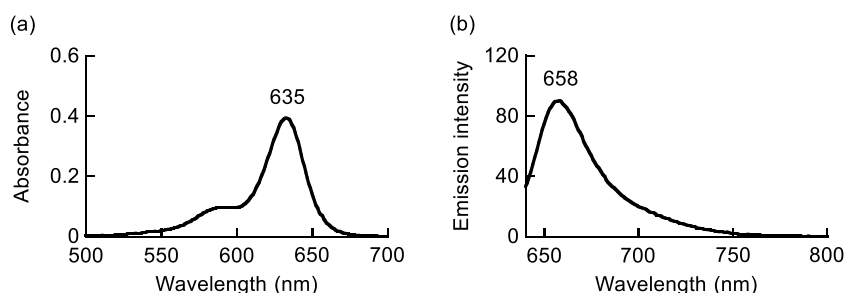
軌道がほとんど混成軌道を形成せず、6p 軌道が結合に寄与するためである。<sup>17,21,42,43</sup> また、この構造的な特徴から予測されるように、キサントレン 9 位のトリル基のメチル基と 10 位のフェニル基の配向性から 2 種の幾何異性体が生じる可能性があった。しかし、得られた BiR の結晶構造ではメチル基とフェニル基がビスマスキサントレン平面に対し、同一側にある異性体のみが観察された。キサントレン平面中における C–Bi 結合はそれぞれ 2.236 Å, 2.226 Å と芳香環における炭素–炭素結合 (1.39–1.43 Å) に比較して約 1.5 倍程度長くなっており (Bi1–C1 = 2.226, Bi1–C8 = 2.236 Å), Bi1–C1–C6–C7–C9–C8 からなる六員環において、各炭素上のなす角は 120° より大きく、ビスマス部位が突き出た歪んだ六角形構造となっていることがわかった。さらに、C3–N1 (1.349 Å) と C12–N2 (1.335 Å) の結合長は一般的な単結合よりも短いこと、窒素原子上のメチル基がすべてビスマスキサントレン骨格と同一平面上に配置されていることから、両窒素原子が sp<sup>2</sup> 性を持ち、炭素–窒素結合が二重結合性であること、正電荷が両窒素間で非局在化していること、および N1 から N2 まで π 共役系が存在していることが示唆された。



**Figure 4.** Crystal structure of BiR. Only selected atoms are labeled; hydrogen atoms, solvent (acetonitrile), and counter anion (PF<sub>6</sub><sup>−</sup>) molecules are omitted for clarity; gray: carbon; blue: nitrogen; purple: bismuth. Selected bond lengths (Å): Bi1–C1 = 2.226(5), Bi1–C8 = 2.236(5), Bi1–C25 = 2.283(7), C1–C2 = 1.389(6), C1–C6 = 1.426(7), C2–C3 = 1.412(6), C3–C4 = 1.407(8), C3–N1 = 1.349(6), C4–C5 = 1.361(7), C5–C6 = 1.405(7), C6–C7 = 1.432(6), C7–C9 = 1.418(6), C7–C18 = 1.508(7), C8–C9 = 1.428(7), C8–C13 = 1.361(6), C9–C10 = 1.449(7), C10–C11 = 1.331(7), C11–C12 = 1.411(8), C12–C13 = 1.421(7), C12–N2 = 1.335(6). Selected angles (°) C1–Bi1–C8 = 89.8(2), C1–Bi1–C25 = 92.4(2), C8–Bi1–C25 = 89.6(2), Bi1–C1–C2 = 116.1(4), Bi1–C1–C6 = 123.6(4), C2–C1–C6 = 120.2(5), C1–C2–C3 = 122.7(5), C2–C3–C4 = 116.4(5), C2–C3–N1 = 122.3(5), C4–C3–N1 = 121.2(5), C3–C4–C5 = 120.8(6), C4–C5–C6 = 124.1(6), C1–C6–C5 = 115.6(5), C1–C6–C7 = 126.2(5), C5–C6–C7 = 118.1(5), C6–C7–C9 = 129.3(5), C6–C7–C18 = 115.1(5), Bi1–C8–C9 = 122.3(4), Bi1–C8–C13 = 115.0(4), C9–C8–C13 = 122.2(5), C7–C9–C8 = 127.3(5), C7–C9–C10 = 119.0(5), C8–C9–C10 = 113.7(5).

### 第三節 吸収・蛍光特性

DMSO (0.2% v/v) を共溶媒として用いて、HEPES 緩衝液 (50 mM, pH 7.4) 中にて BiR の吸収・蛍光スペクトル測定を行なった。BiR は吸収極大を 635 nm ( $\epsilon = 77600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 蛍光極大を 658 nm に有し, 10 位が酸素原子であるテトラメチルロサミン (TMR) と比較してそれぞれ 86 nm, 91 nm 長波長化していることが示された。また, 絶対蛍光量子収率を測定したところ, 0.039 であった (Figure 5, Table 1)。



**Figure 5.** (a) Absorption spectra of BiR (5  $\mu\text{M}$ ) in HEPES buffer (50 mM, pH 7.4, 0.5% DMSO). (b) Fluorescence spectra of BiR (2  $\mu\text{M}$ ) in HEPES buffer (50 mM, pH 7.4, 0.2% DMSO). Excitation was provided at 630 nm.

**Table 1.** Photophysical properties of BiR and comparison with other xanthene-based fluorophores and photosensitizers.

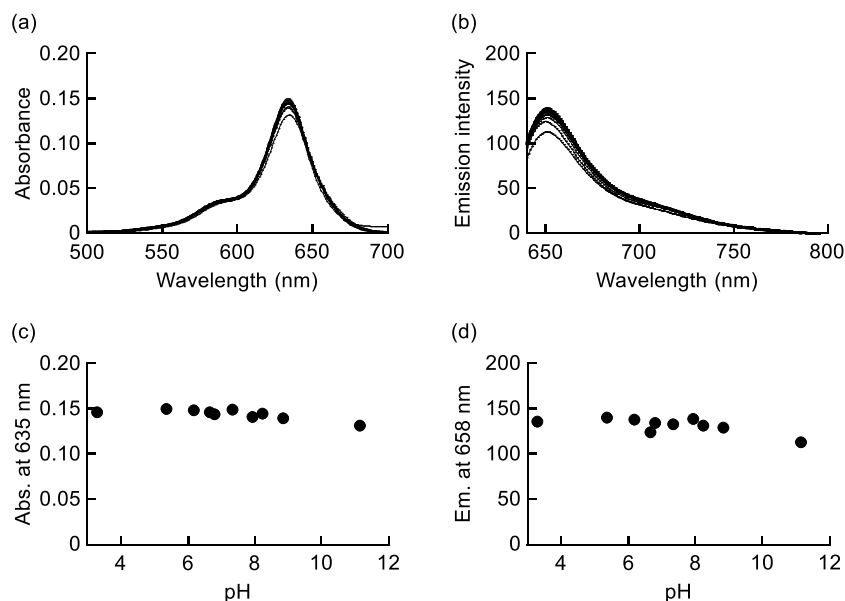
	Heteroatom at 10-position	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\epsilon$ ( $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	$\Phi_{\text{Fl}}$	$\Phi(^1\text{O}_2)$
BiR	Bi	635	77600	658	0.039	0.66
TMR	O	549	52400	569	0.35	n.d. <sup>e</sup>
SiR650 <sup>a</sup>	Si	646	110000	660	0.31	n.d. <sup>e</sup>
NR <sub>666</sub> <sup>b</sup>	P	666	165000	685	0.38	n.d. <sup>e</sup>
TMR-Se <sup>c</sup>	Se	581	44000	n.d. <sup>e</sup>	0.009	0.87
TMR-Te <sup>d</sup>	Te	597	81000	n.d. <sup>e</sup>	n.d. <sup>e</sup>	0.43

<sup>a</sup>Ref. 30. <sup>b</sup>Ref. 32. <sup>c</sup>Ref. 35. <sup>d</sup>Ref. 36. <sup>e</sup>Not determined.

ローダミン骨格における酸素原子の代わりにケイ素 (Si) やリン (P) を組み込んだ Si-ローダミンや P-ローダミンも赤色領域に吸収・蛍光を有することが既に報告されている。一方で, テルル (Te) やセレン (Se) といった重元素を組み込んだ Te-ローダミンや Se-ローダミンでは同レベルの吸収波長の長波長化は見られず, また蛍光は検出不可能であることが報告されており, 長波長化はビスマスを含む第 14 族および第 15 族元素に特有であると考えられる。Table 1 に各種ローダミン類と BiR の比較について示す。

また, 吸収, 蛍光いずれにおいても pH に対するスペクトルの変化はみられず, pH の変動

に対しては安定であることがわかった (Figure 6)。

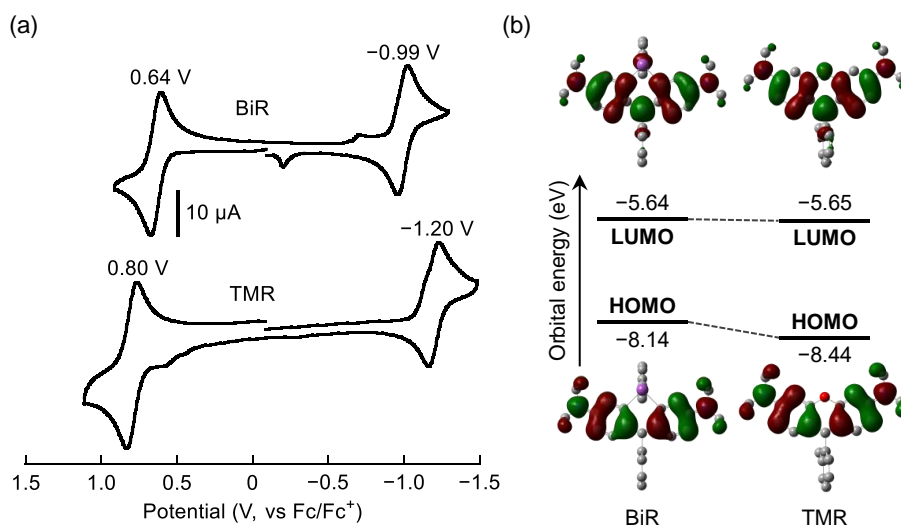


**Figure 6.** (a) Absorption and (b) Fluorescence spectra of BiR (5  $\mu\text{M}$ ) in aqueous buffer at various pH (3.3, 5.4, 6.2, 6.7, 6.8, 7.3, 7.9, 8.2, 8.9, 11.1). For fluorescence measurement, excitation was provided at 630 nm. (c) Plot of absorption at 635 nm of (a) against pH. (d) Plot of fluorescence intensity at 658 nm of (b) against pH.

BiRの長波長化に関して、サイクリックボルタンメトリーによる酸化還元電位測定と密度汎関数理論 (DFT) 計算から考察した。BiR とテトラメチルロサミン (TMR) のサイクリックボルタモグラムを Figure 7a に示す。BiR はそれぞれ  $-0.99\text{ V}$ ,  $0.64\text{ V}$  に可逆な還元波と酸化波を示した。一方、テトラメチルロサミンでは、 $-1.20\text{ V}$ ,  $0.80\text{ V}$  にそれぞれ還元電位と酸化電位が観察され、BiR 比較して酸化電位が  $0.16\text{ V}$  高く、還元電位が  $0.21\text{ V}$  低い結果となった。それぞれの電位は化合物の HOMO および LUMO に対応するものであることから、両電位間の差を比較すると、BiR は TMR よりも HOMO-LUMO ギャップが狭いことがわかる。

一方、DFT 計算 (B3LYP/LANL2DZ) から、LUMO レベルは大きく変化しなかったものの、BiR の HOMO レベルは顕著に上昇 ( $0.30\text{ eV}$ ) しており、この上昇により TMR に比較して HOMO-LUMO 間のエネルギー差が縮小している結果が得られた (Figure 7b)。なお、ビスマス原子の軌道への関与は観察されなかった。

以上の結果から、酸化還元電位、DFT 計算いずれの場合においても BiR は TMR と比較して HOMO-LUMO 間のエネルギー差が小さくなっていることがわかった。HOMO-LUMO 間のエネルギー差は励起波長のエネルギーと対応している。すなわち、ここで得られた結果から、BiR の励起エネルギーがテトラメチルロサミンの励起エネルギーより小さく、励起波長の長波長化と合致する結果が得られた。

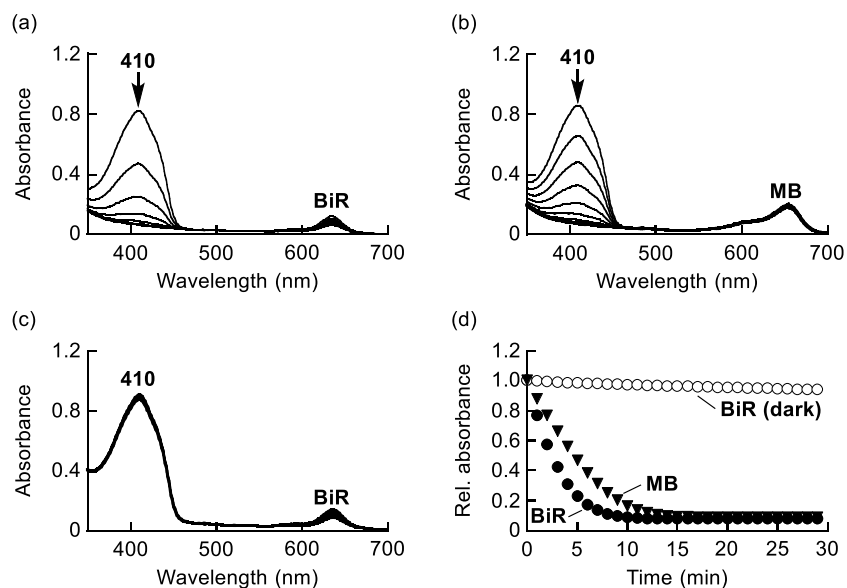


**Figure 7.** (a) Cyclic voltammograms of BiR and TMR in acetonitrile (0.1 M tetrabutylammonium perchlorate as an electrolyte). The data were acquired with a glassy carbon electrode. The sample concentrations were 1 mM. The scan speed was 0.2 V s<sup>-1</sup>. (b) Energy diagrams and HOMO/LUMOs for BiR and TMR calculated using the B3LYP/LANL2DZ set.

## 第五節 一重項酸素生成能の評価

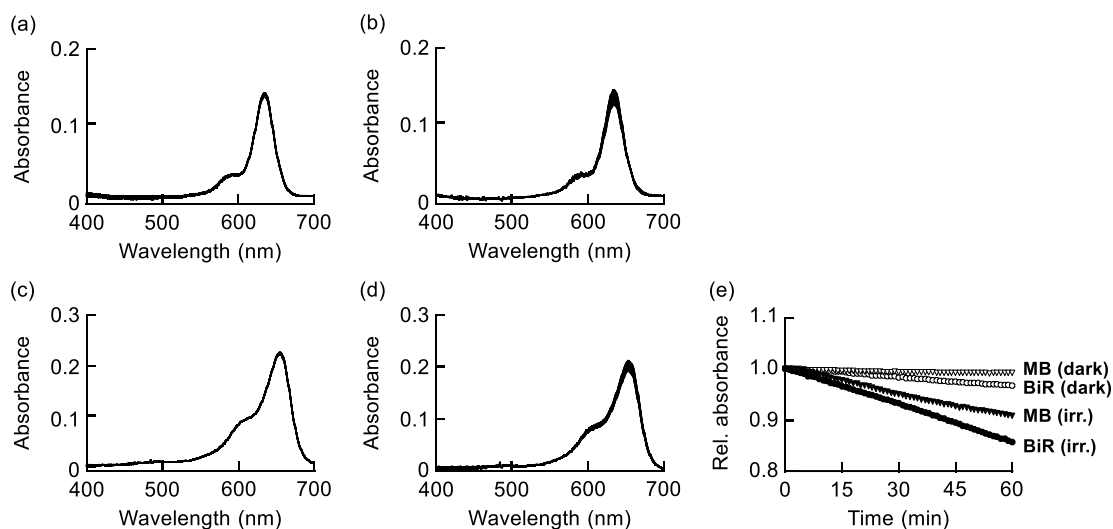
ビスマスは重元素であることから、骨格内にビスマス原子を含む BiR は重原子効果による光増感作用を有すると予測した。実際、ローダミン骨格内の 10 位の酸素原子をテルルやセレンといった重元素に置き換えた Se-ローダミンや Te-ローダミンは光照射により一重項酸素を生成する光増感剤として機能することが報告されている (Table 1)。そこで、BiR に光照射した際の一重項酸素生成能を評価した。ここでは、比色型一重項酸素捕捉剤である 1,3-ジフェニルベンゾフラン (DPBF) を利用することにした。DPBF は一重項酸素と反応すると 410 nm の吸収が消失するため、これにより一重項酸素の存在を確認することができる。また、標準物質として、同励起波長帯にて光増感作用を示すメチレンブルー (MB) を用いた。

Figure 8 に示すのは、BiR およびメチレンブルー (MB) 存在下で光照射した場合の DPBF の吸光度変化である。光源には赤色 LED (625 nm, 1.2 mW cm<sup>-2</sup>) を用いた。BiR および MB 溶液に光照射した際には、DPBF の吸収が照射時間依存的に減少し、一重項酸素が発生していることが確認できた。一方、光照射を行なわなかった場合には DPBF の吸収はほとんど変化せず、BiR は光依存的に一重項酸素を生成することが示された。さらに、DPBF の吸光度の減少速度から一重項酸素生成量子収率  $\Phi(^1O_2)$  を算出したところ、0.66 であり、汎用の光増感剤である MB ( $\Phi(^1O_2) = 0.52$ )<sup>44</sup> よりも効率よく一重項酸素を生成することがわかった。



**Figure 8.** Absorption spectral changes of DPBF upon irradiation with red light (625 nm, 1.2 mW cm<sup>-2</sup>) in the presence of BiR (a) and MB (b). (c) Absorption spectral change of DPBF without irradiation in the presence of BiR. (d) Plots of absorption at 410 nm measured in (a), (b), and (c) against time. The data were collected every 1 minute.

また、DPBF 非存在下にて 60 分間赤色光照射 (625 nm, 1.2 mW cm<sup>-2</sup>) をしたところ、BiR は約 15%、MB は約 10%の吸光度減少を示した (Figure 9)。これらの結果から、BiR は MB と同程度の光安定性を有するといえる。

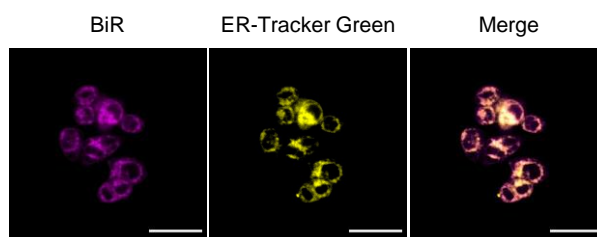


**Figure 9.** Absorption spectral changes of DPBF upon irradiation with red light (625 nm, 1.2 mW cm<sup>-2</sup>) in the presence of BiR (a) and MB (b). (c) Absorption spectral change of DPBF without irradiation in the presence of BiR. (d) Plots of absorption at 410 nm measured in (a), (b), and (c) against time. The data were collected every 1 minute.



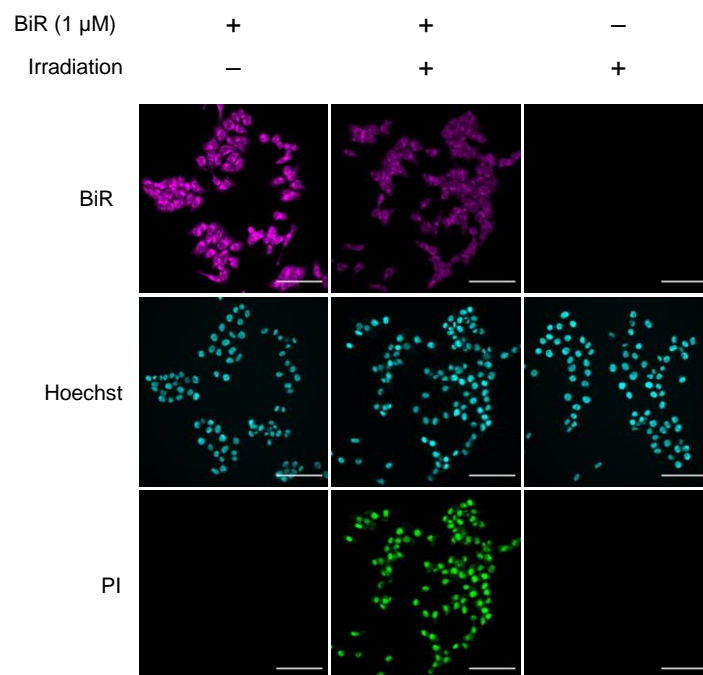
## 第六節 細胞中で機能評価

生細胞中での BiR の機能評価を行なった。HepG2 細胞 (ヒト肝がん細胞) を BiR で 30 分間処理したのち、共焦点蛍光顕微鏡, Cy5 フィルターにて観察を行なった。その結果, 細胞中で BiR の蛍光が観察され, BiR は細胞に容易に取り込まれることが明らかとなった。また, 小胞体 (ER) 局在プローブ ER-Tracker Green との共染色の結果, BiR は ER に局在することがわかった (Figure 10)。



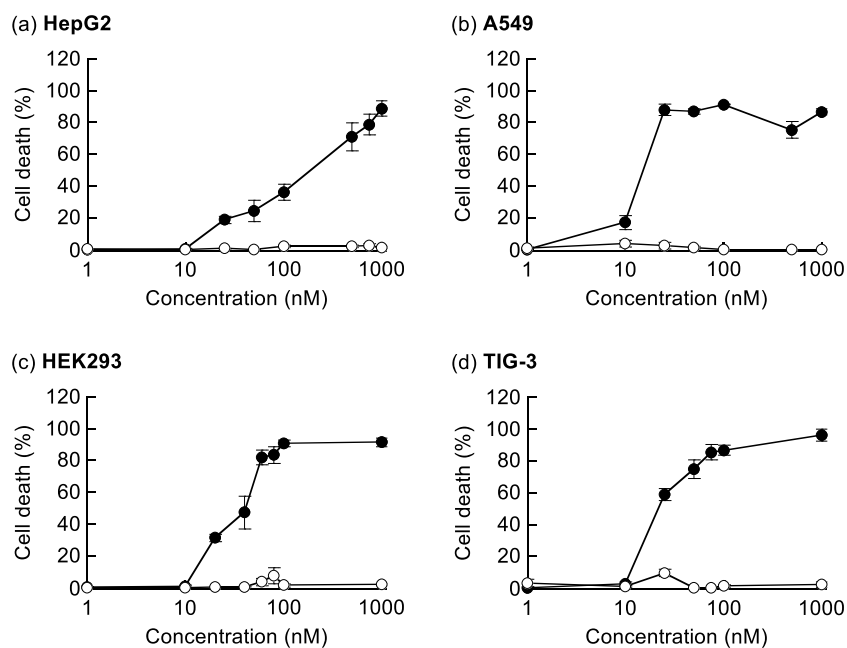
**Figure 10.** Colocalization assay of BiR (1  $\mu\text{M}$ ) and ER-Tracker Green (0.2  $\mu\text{M}$ ) in HepG2 cells. Left and middle images were acquired using a Cy5 filter (BiR) and a FITC filter (ER-Tracker Green), respectively. The right image is the merged image of the left and middle images. Scale bars indicate 25  $\mu\text{m}$ .

次に, BiR で処理した HepG2 細胞に赤色光 (608–648 nm, 9.0 J cm<sup>-2</sup>) を照射した後, ヨウ化プロピジウム (PI, 死細胞染色剤) と Hoechst 3342 (全細胞の染色剤) で染色を行ない, それぞれの蛍光を観察した (Figure 11)。BiR 処理のみ, 光照射なしの場合には PI で染色された細胞は確認できず, BiR 自体の急性毒性は低いことがわかった。一方で, BiR 処理と光照射の両方を行なった細胞では PI で染色された細胞が観察され, 顕著な細胞死が確認された。光照射後では BiR の蛍光がわずかに減弱しており, 細胞中では光照射により BiR の分解が起きていることを示唆する結果が得られた。また, BiR 処理なし, 光照射のみでは細胞死は確認されなかった。

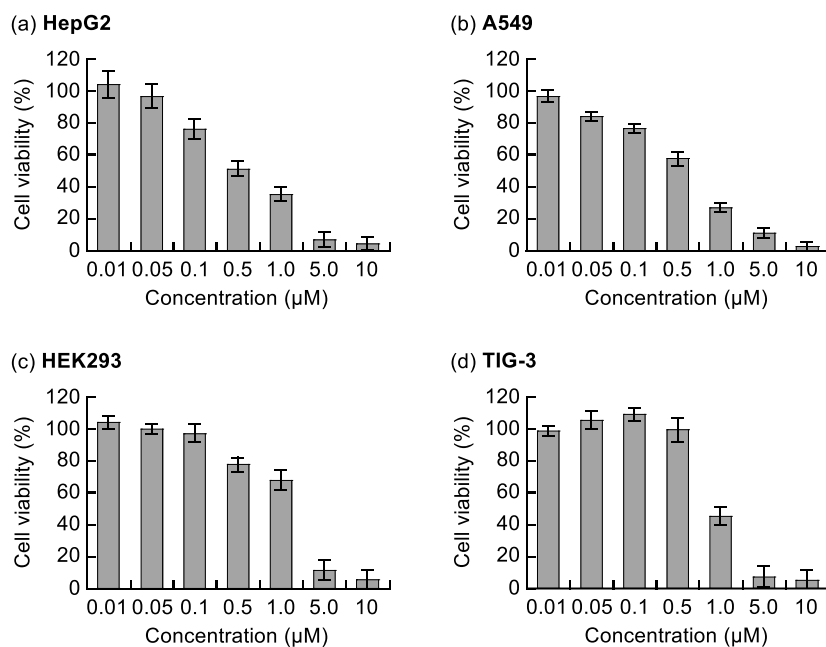


**Figure 11.** Fluorescence microscopic images of HepG2 cells stained with BiR followed by PI/Hoechst. Left column: images of the irradiated cells without BiR staining. Middle column: images of the non-irradiated cells stained with BiR. Right column: images of the irradiated cells stained with BiR. All the cells were treated with a mixture of PI and Hoechst 33342 after irradiation. Scale bars indicate 100  $\mu$ m.

さらに、HepG2 細胞に加え、A549 細胞 (ヒト肺がん細胞)、HEK293 細胞 (ヒト胎児腎細胞)、TIG-3 細胞 (ヒト胎児線維芽細胞) の 4 種の細胞株を用いて、光照射時の 50%細胞死濃度 ( $EC_{50}$ ) を算出した (Figure 12)。いずれの細胞株でも光照射を行なわなかった際には細胞死は確認できなかった。一方で、光照射を行なった場合では、HepG2 細胞、A549 細胞、HEK293 細胞、TIG-3 細胞の 4 種でそれぞれ  $EC_{50}$  が 375 nM, 11 nM, 40 nM, 20 nM と低濃度での殺細胞効果があった。また、BiR を 24 時間処理後、光照射を行なわなかった場合の 50%細胞死濃度 ( $IC_{50}$ ) は HepG2 細胞で 0.53  $\mu$ M, A549 細胞で 0.62  $\mu$ M, HEK293 細胞で 2.26  $\mu$ M, TIG-3 細胞で 0.96  $\mu$ M であった (Figure 13)。以上のことから、がん細胞選択性は見られなかったものの、BiR が細胞内においても光依存的に一重項酸素を発生させることが明らかになった。



**Figure 12.** Plot of the population of PI-stained cells to Hoechst-stained cells against BiR concentration, with irradiation (filled circles) and without irradiation (open circles). (a) HepG2 cells, (b) A549 cells, (c) HEK293 cells, (d) TIG-3 cells. Error bars indicate standard deviations ( $n = 3$ ).

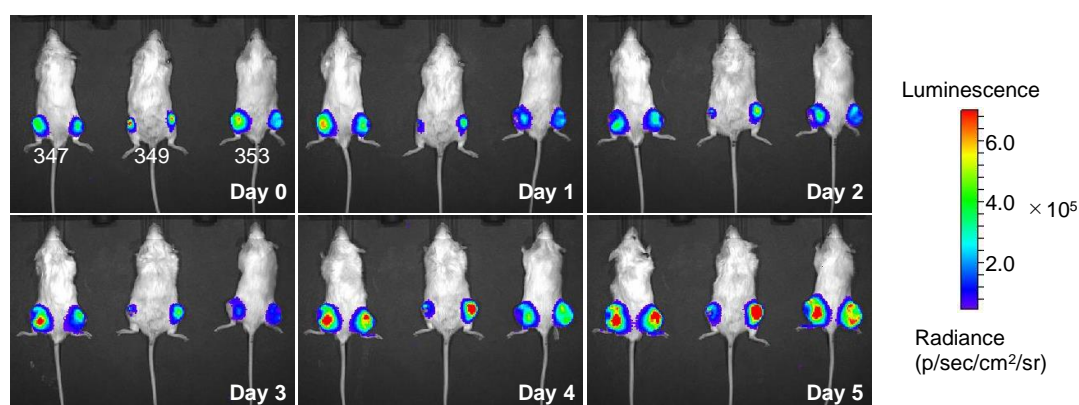


**Figure 13.** Cell viability assay (MTT assay) of (a) HepG2 cells, (b) A549 cells, (c) HEK293 cells, and (d) TIG-3 cells after treatment with various concentrations of BiR for 24 h. Error bars indicate standard deviations ( $n = 3$ ).

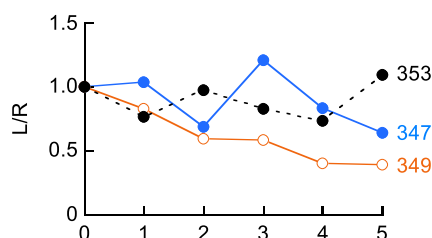
## 第七節 *In vivo*における機能評価

ゼノグラフトマウスモデルを用いて *in vivo* 評価を行なった。マウスの両足皮下にルシフェラーゼ発現肺がん細胞 (LLC-luc 細胞) を移植し, 17日後から光増感治療 (PDT) 評価実験を行なった。あらかじめ, LLC-luc 細胞は BiR の投与と光照射により細胞死が起きることを MTT アッセイにて確認した ( $EC_{50} = 15.4 \text{ nM}$ )。

BiR を両足病変部にそれぞれ局注後, 左足のみ光照射 ( $625 \text{ nm}$ ,  $102 \text{ J cm}^{-2}$ ) し, 24 時間後にルシフェリンを投与し, ルシフェラーゼの発光を測定, これを 5 回繰り返ルシフェラーゼの発光強度から BiR を用いた PDT による腫瘍の縮小効果について評価を行なった。0.5 mg/kg 投与群の移植腫瘍のルシフェラーゼ発光を撮影したものを Figure 14, 各個体における光照射部 (左足) と照射を行なわなかった部位 (右足) の発光の比をグラフにしたものを Figure 15 に示す。0.5 mg/kg 投与群では照射の有無により腫瘍の縮小がみられた個体もあったが, BiR 投与群, 非投与群ともに個体による腫瘍成長速度の差が大きく, 光照射による腫瘍の縮小あるいは成長阻害の傾向はみられなかった。光照射後に BiR 由来の蛍光が消失しており, 生体中では BiR が光照射後に分解し, 十分な光増感効果が得られなかったのではないかと考察している。



**Figure 14.** *In vivo* imaging of luminescence. Mice bearing subcutaneous tumors were injected with BiR (0.5 mg/kg) and irradiated with red right ( $625 \text{ nm}$ ,  $102 \text{ J cm}^{-2}$ ) and imaged at 24 h after irradiation. Injection and irradiation were repeated five times every 24 h.



**Figure 15.** Relative luminescence intensity (left leg without irradiation / right leg with irradiation) obtained from the images in Figure 14.

## 第八節 小括

ローダミン骨格の 10 位にフェニルビスムチノ基を導入したビスマスローダミン (BiR) を設計・合成した。得られた BiR の単結晶 X 線結晶構造解析を行なったところ、平面構造を有するキサンテン骨格内にビスマスが組み込まれていることが確認できた。BiR は極大吸収波長 635 nm ( $\epsilon = 77600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 極大蛍光波長 658 nm, 絶対蛍光量子収率 0.039 の赤色蛍光分子としての性質を示した。さらに、赤色光励起により効率的に一重項酸素を生成し、光増感能を有することがわかった。生細胞を用いた機能評価を行なったところ、光依存的な細胞死を引き起こした。以上の結果より、ビスマスローダミンが赤色蛍光性光増感分子として有用であることが示された。

## 第二章 選択的活性化型ビスマスローダミンの開発

### 第一節 BiRNH および BiRAc の分子設計

前章にてビスマスローダミンが新たな光増感剤のプラットフォームとして有用であることが示された。そこで、赤色蛍光性光増感剤としてのビスマスローダミンの応用可能性を拡張するべく、その光物性制御に関する分子構造的知見の獲得と、それを通して特定の条件下でのみ蛍光および光増感能が変化するような機能の付与を目指した。

まず筆者は、ビスマスローダミンの構造変化と物性の関係を調べる上で、ローダミン骨格中のアミノ基の電子供与性の変化が吸収波長に与える影響に着目した。ジアミノキサントレン骨格中の 2 つのアルキルアミノ基の間に存在する非局在性の正電荷は、強蛍光性ローダミン類縁体に必須の特徴である。また、アミノ基の電子供与性のケーシングがローダミンの  $\pi$  共役系や光物性に影響を及ぼすということは既に知られており、これまでに、アミノ基の *N*-アシル化/脱アシル化を蛍光スイッチとして利用したローダミン型蛍光プローブは数多く報告されている。<sup>45-48</sup> 同様に、当研究室で開発した二価鉄イオン選択的蛍光プローブである RhoNox-1 は、片方のジエチルアミノ基の *N*-オキシド化による電子供与性の低下と、それによる吸収波長の短波長化と発光強度の減弱を利用している。<sup>49</sup> これらのことから、ビスマスローダミンにおいてもアミノ基の電子供与性を制御することで、吸収波長、蛍光強度、光増感能を制御できるのではないかと期待した。

この仮説を実証するべく、筆者はビスマスローダミンの片方のアミノ基をアセチル化した BiRAc とその脱アセチル化体に相当する BiRNH を設計し、両者の光物性を比較することにした (Figure 16)。

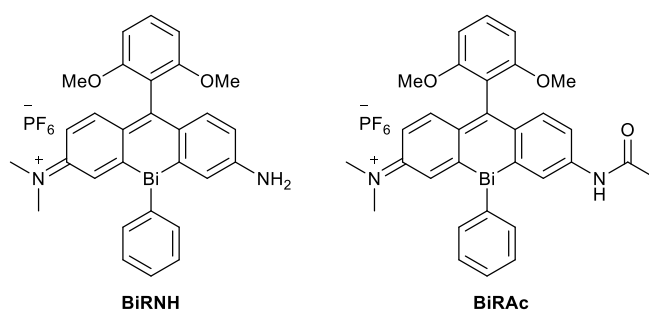
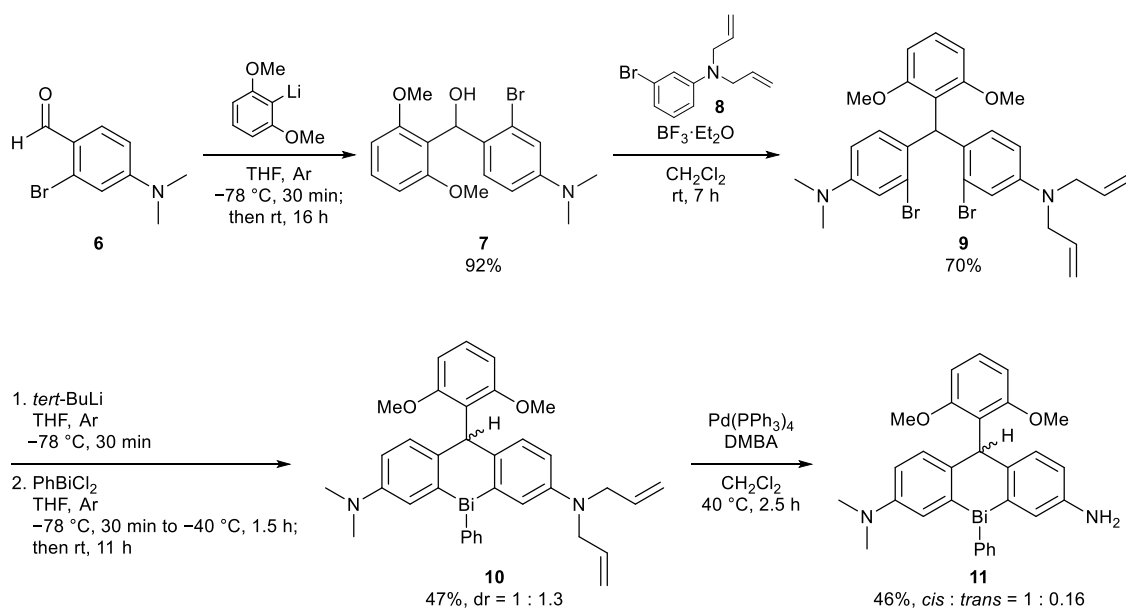


Figure 16. Structures of BiRNH and BiRAc.

## 第二節 BiRNH および BiRAc の合成

ビスマスローダミン骨格の構築は BiR と同様に、ジブromotリアリールメタンを介してフェニルビスムチノ基を導入する経路を選択した。BiRNH および BiRAc の共通合成中間体である化合物 **11** の合成を Scheme 3 に示す。1,3-ジメトキシ-2-ブロモベンゼンを *sec*-BuLi を用いてリチオ化した後、4-アミノ-2-ブロモベンズアルデヒド **6** に対して求核付加させ、ジフェニルメタノール **7** を収率 92% で得た。続いて、花岡らによるアニリンヘテロダイマー (非対称 Si-ローダミン) の合成<sup>50</sup> を参考にし、BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O を用いてジフェニルメタノール **7** とジアリルアニリン **8** での芳香族求電子置換反応を行ない、トリアリールメタン **9** を収率 70% で得た。続いて、*tert*-BuLi を用いてトリアリールメタン **9** のリチオ化を行なった後、ジクロロフェニルビスマスを加えて含ビスマスジヒドロキサンテン **10** を収率 47% で得た。化合物 **10** は 10 位のビスマス上のフェニル基と 9 位の水素の配向性から 1 : 1.3 のジアステレオマー混合物として得られたことを <sup>1</sup>H NMR スペクトルから確認した。続いて、Pd 触媒を用いて化合物 **10** の脱アリル化を行ない、化合物 **11** をジアステレオマー混合物として得た。化合物 **11** のジアステレオマーはジエチルエーテルへの溶解性の差からジエチルエーテルに可溶性 *cis* 体 (**11-cis**, *trans* 体を 14% 含む) と難溶性 *trans* 体 (**11-trans**) に分離することができた。



Scheme 3. Synthesis of compound **11**.

化合物 **11** の *cis-trans* 配置は両者の NOESY スペクトルの比較から決定した。2つの異性体の NOESY スペクトルのうち、片方のスペクトルでは 10 位のフェニル基中のビスマスのオルト位のプロトン (H<sub>A</sub>) とジヒドロキサンテン中の 9 位のプロトン (H<sub>B</sub>) の間で NOE 相関が検出された (Figure 17, 上図)。一方で、もう片方の異性体の NOESY スペクトルからは同様の相関は見られなかった (Figure 17, 下図)。この 2つのプロトンはジヒドロキサンテン構造に対して同一平面上に存在する (*trans* 配置) ときに近接するため、NOE 相関が観測さ

れた化合物を *trans* 体 (**11-trans**), 相関が検出されなかったものを *cis* 体 (**11-cis**) として同定した。

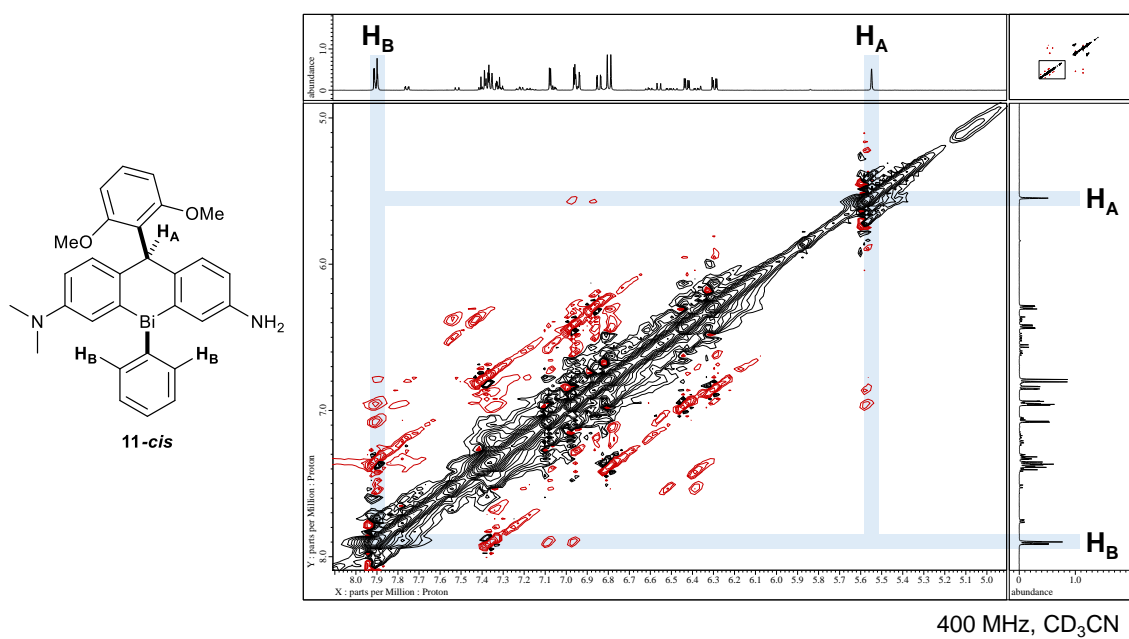
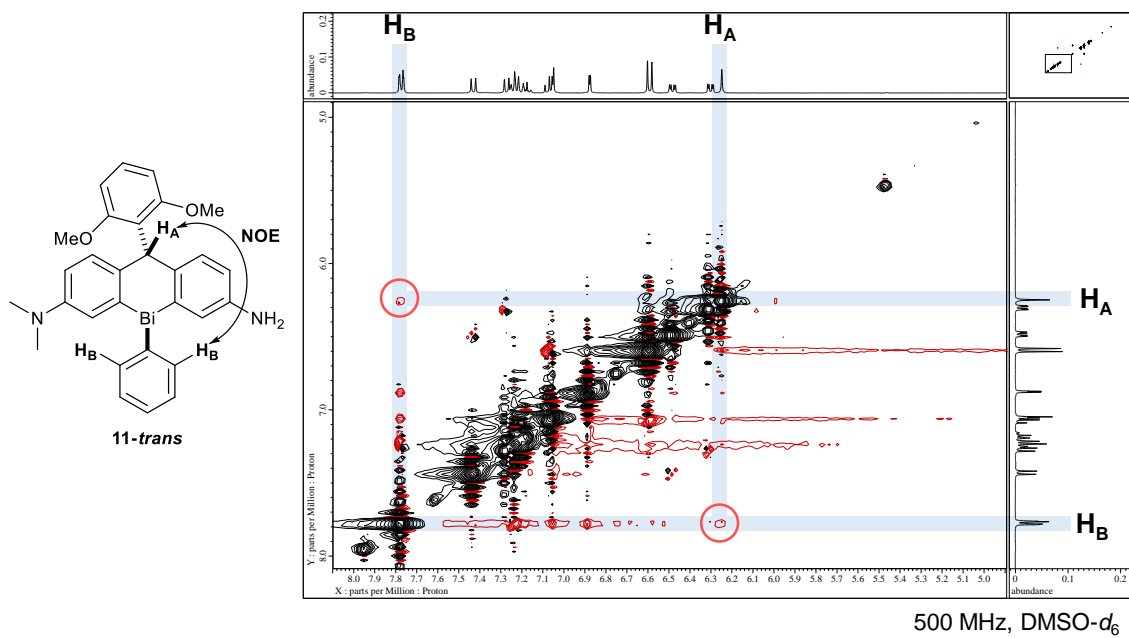
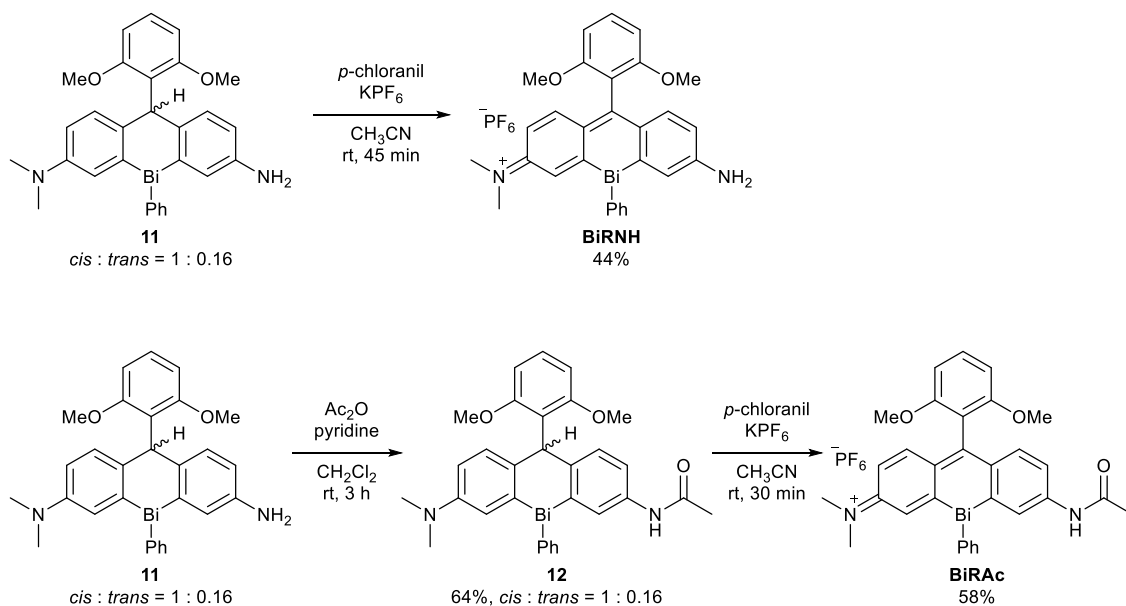


Figure 17. NOESY spectra of **11-cis** and **11-trans**.



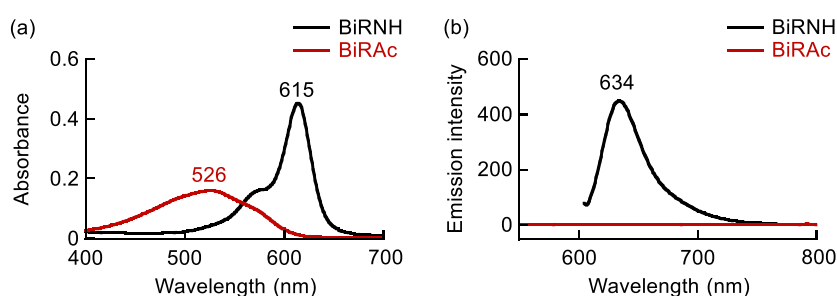
*cis* 体過剰な化合物 **11** (*cis* : *trans* = 1 : 0.16) を *p*-クロラニルを用いて酸化し, BiRNH を収率 44%にて得た (Scheme 4)。一方, 単離に成功した純粋な **11-trans** からは BiRNH が全く得られず, *cis-trans* 異性体で異なる反応性を示した。化合物 **11** をアセチル化した化合物 **12** の *cis-trans* 異性体においても同様に反応性の差がみられ, **12-trans** は酸化が進行せず, **12-cis** (**12-trans** を 14%含む) は *p*-クロラニルにより容易に酸化され BiRAc が収率 58%で得られた。得られた BiRNH および BiRAc は <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, <sup>19</sup>F-NMR, 高分解マスペクトルにより同定した。



**Scheme 4.** Synthesis of BiRNH and BiRAc.

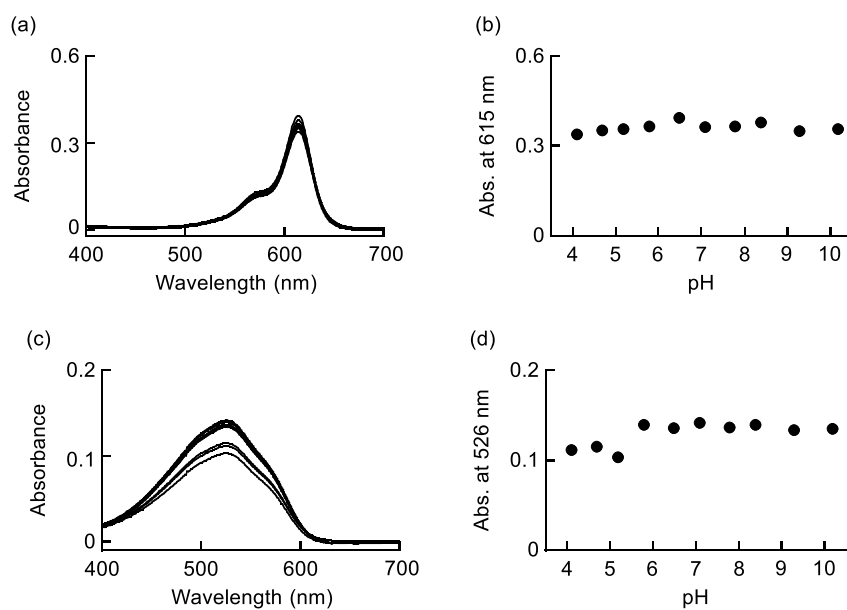
### 第三節 BiRNH および BiRAc の光学特性評価

DMSO (0.5% v/v) を共溶媒として用い、HEPES 緩衝液 (50 mM, pH 7.4) 中における BiRNH と BiRAc の吸収・蛍光スペクトル測定を行なった (Figure 18)。BiRNH は 615 nm ( $\epsilon = 90400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) に吸収極大, 634 nm に蛍光極大を示した。BiR と比較すると吸収・蛍光ともに約 20 nm の短波長化を示したものの, BiRNH は赤色領域に吸収・蛍光帯を有することがわかった。また, 蛍光量子収率は 0.033 であった。一方で, BiRAc の吸収極大は 526 nm ( $\epsilon = 31700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) であり, BiRNH と比較して約 90 nm 短波長シフトし, モル吸光係数も低い値であった。さらに, 蛍光はほとんど検出されなかった。これらの光物性の傾向は, 浦野らによって報告された Si-ローダミンの *N*-アシル化による吸収の短波長化と蛍光強度の減弱と一致した。<sup>48</sup>



**Figure 18.** (a) Absorption spectra of BiRNH (black) and BiRAc (red) in HEPES buffer (50 mM, pH 7.4, 0.5% DMSO). Sample concentrations are 5  $\mu\text{M}$ . (b) Fluorescence spectra of BiRNH and BiRAc. In HEPES buffer (50 mM, pH 7.4, 0.2% DMSO). Sample concentrations are 2  $\mu\text{M}$ . Excitation was provided at 600 nm for BiRNH and 530 nm for BiRAc.

BiRNH と BiRAc の各 pH における吸収スペクトル変化を測定したところ、pH 変化による光物性の差は無く、pH の変化に対して安定であることがわかった(Figure 19)。



**Figure 19.** Absorption spectra of (a) BiRNH (5 μM) and (c) BiRAc (5 μM) in phosphate buffer (200 mM, 0.5% DMSO) at various pH (4.1, 4.7, 5.2, 5.8, 6.5, 7.1, 7.8, 8.4, 9.3, 10.2). Plots of absorbance of (b) BiRNH and (d) BiRAc at the maximum (615 nm for BiRNH, 526 nm for BiRAc) against pH obtained in (a) and (c).

BiRNH と BiRAc の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルから両者の光物性の違いを考察した。BiRNH のジメチルアミノ基は等価であり、3.22 ppm に 6H のシングレットピークとして現れており、炭素-窒素間が回転可能な結合であることを示している。これは他のローダミン分子でも同様であり、正電荷がキサンテン骨格両端の窒素から窒素までの長い共役系中で非局在化しているためである。対して、BiRAc ではジメチルアミノ基の2つのメチル基は非等価であり、それぞれ 3.28 ppm (3H) と 3.36 ppm (3H) に観察された。これは炭素-窒素結合の二重結合性が強いことを表している。すなわち BiRAc では正電荷がジメチルアミノ基の窒素に局在しており、アセタミドの窒素は  $\pi$  共役系に組み込まれていないことが示唆された。また、BiRAc におけるアセタミド基の *o* 位のプロトン (Figure 20a,  $\text{H}_A$  および  $\text{H}_B$ ) は、BiRNH の対応するプロトン (Figure 20b,  $\text{H}_A$  および  $\text{H}_B$ ) と比較して低磁場領域にピークが見られた。この低磁場シフトは *N*-アセチル化により窒素原子からの電子供与性が低下したためであり、その結果アセタミド基が  $\pi$  共役系から切り離され、吸収波長が短波長化していることを示唆している。以上の結果から、ビスマスローダミンの吸収・蛍光特性は *N*-アセチル化の影響を大きく受けており、BiRAc の短波長化は共役系の縮小に起因することが裏付けられた。

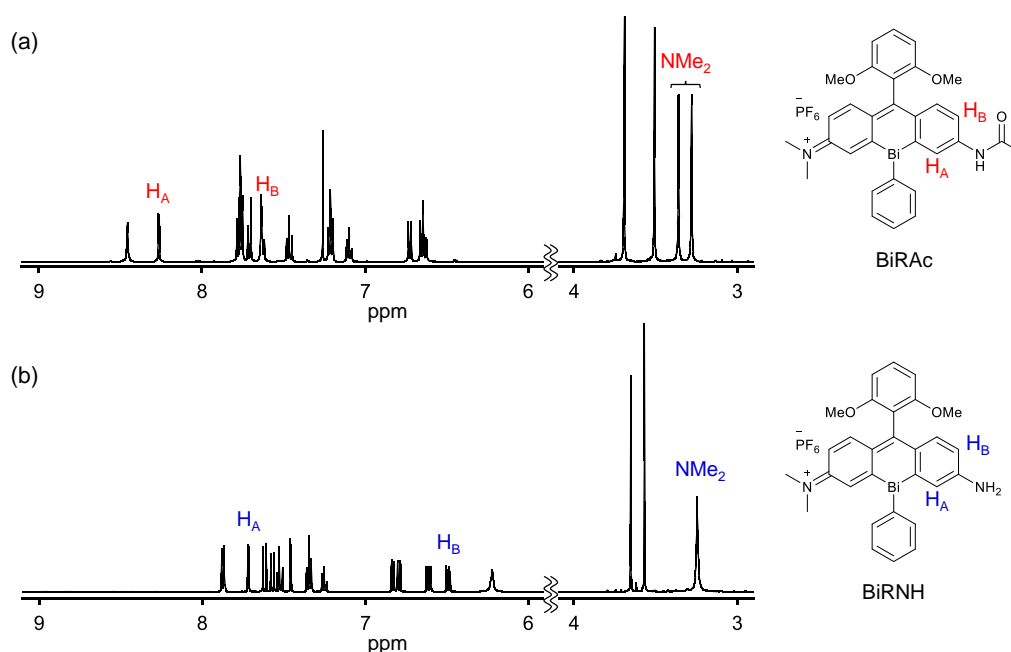
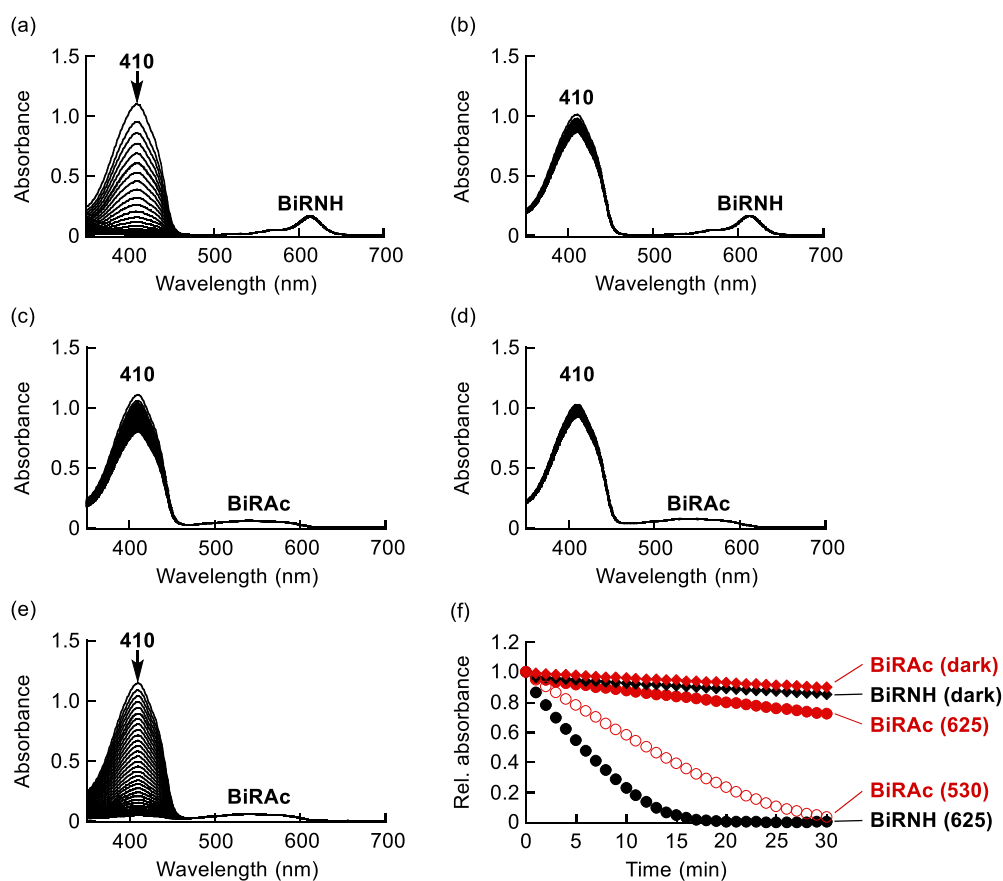


Figure 20.  $^1\text{H}$  NMR spectra of (a) BiRAc and (b) BiRNH.

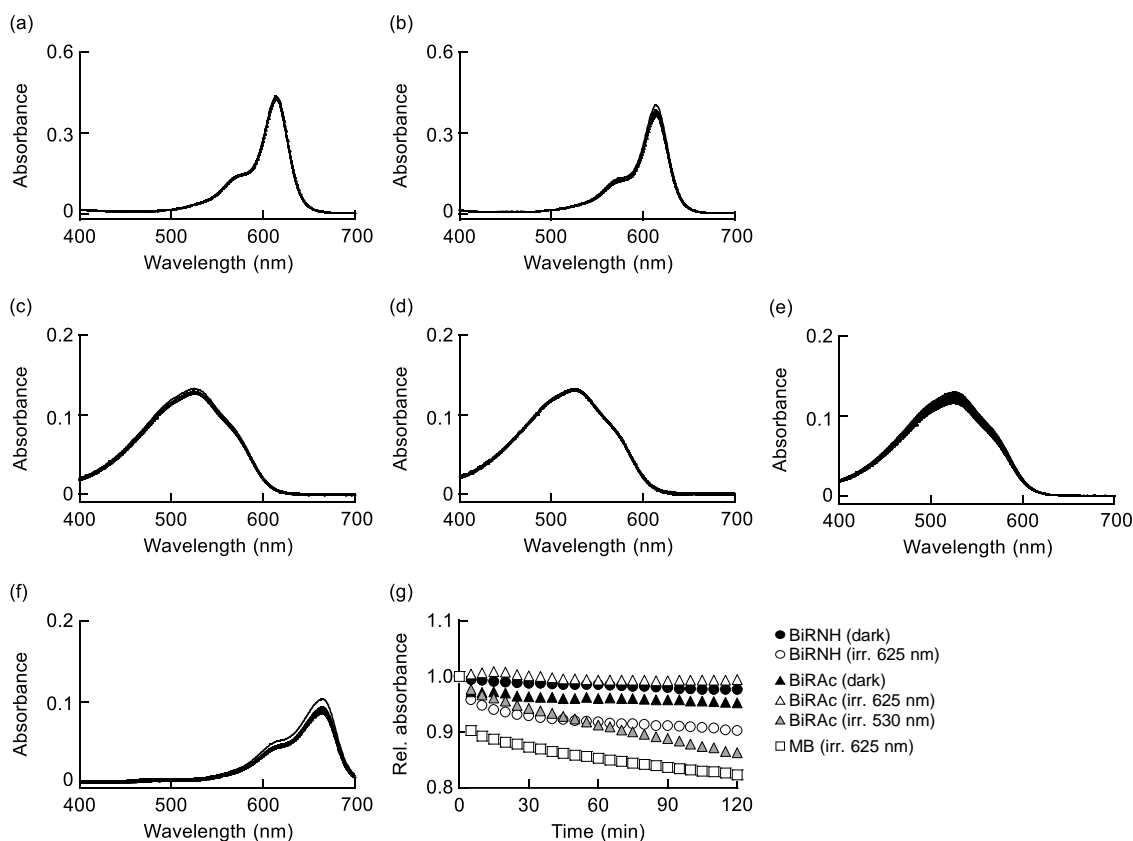
BiR 同様、一重項酸素捕捉剤である DPBF を用いた吸光度分析により BiRNH および BiRAc に照射した際の一重項酸素生成能を評価した。標準物質として、赤色光励起で光増感作用を示すメチレンブルーおよび緑色光励起で光増感作用を示すローズベンガルを用いた。赤色 LED ( $\lambda_{\text{ex}} = 625 \text{ nm}$ ,  $1.1 \text{ mW cm}^{-2}$ ) を用いて BiRNH に照射した場合、DPBF の吸収が顕著に減少し、一重項酸素が生成していることを確認できた (Figure 21a)。一重項酸素生成量子収

率を算出したところ、0.74 であり、BiR よりもわずかに高い値を示した。一方で、BiRAc に赤色光照射 ( $\lambda_{\text{ex}} = 625 \text{ nm}$ ,  $1.1 \text{ mW cm}^{-2}$ ) した際には DPBF の吸収の減少は BiRNH に比較して緩やかであり、*N*-アシル化によって赤色光照射による一重項酸素生成が抑えられていることが示された (Figure 21c)。赤色光照射下での一重項酸素生成能の抑制は BiRAc の吸収は 625 nm 付近にほとんどないことに起因している。実際、BiRAc が吸収帯を有する緑色光 (530 nm,  $1.1 \text{ mW cm}^{-2}$ ) を照射したところ、DPBF の吸収は減少し、一重項酸素の生成が観察された (Figure 21e)。この場合の一重項酸素生成量子収率は 0.66 だった。また、BiRNH, BiRAc いずれの場合においても光照射を行なわなかった場合には DPBF の吸収はほとんど変化しなかった (Figure 21b, d)。これらの結果から、BiRNH および BiRAc はそれぞれ吸収帯に合致する波長の光を照射した場合のみ一重項酸素を生成することが示された。



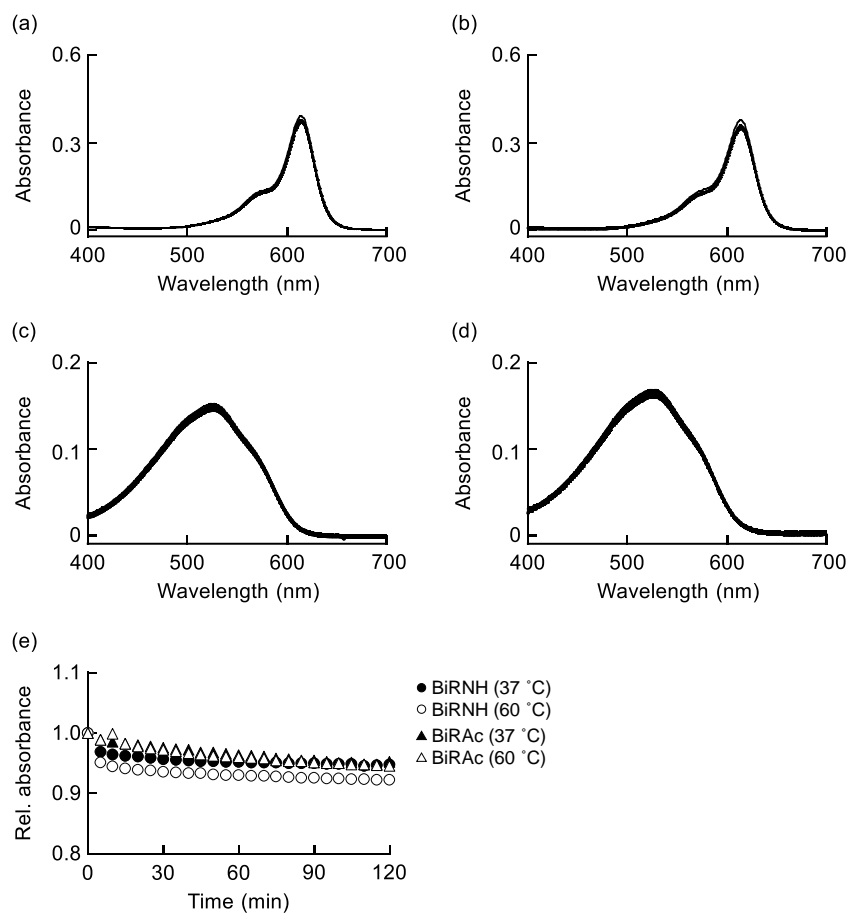
**Figure 21.** Evaluation of the red light-induced photogeneration of  $^1\text{O}_2$  for (a, b) BiRNH ( $1.7 \mu\text{M}$ ) and (c, d, e) BiRAc ( $1.7 \mu\text{M}$ ). Absorption spectral change of 1,3-diphenyldibenzofuran (DPBF) in the presence of BiRNH (a) with a red light irradiation ( $625 \text{ nm}$ ,  $1.1 \text{ mW cm}^{-2}$ ) or (b) in the dark. Absorption spectral change of DPBF in the presence of BiRAc (c) with a red light irradiation ( $625 \text{ nm}$ ,  $1.1 \text{ mW cm}^{-2}$ ), (d) in the dark, or (e) with a green light irradiation ( $530 \text{ nm}$ ,  $1.1 \text{ mW cm}^{-2}$ ). All the measurements were performed with a DPBF concentration of  $60 \mu\text{M}$  in acetonitrile. (f) Plots of absorption measured at  $410 \text{ nm}$  in (a)–(e) against time. The data were acquired every 60 seconds.

BiRNH および BiRAc を HEPES 緩衝液中にて 2 時間照射しその吸光度変化を観察したところ、吸光度の減少は 15%以内であった (Figure 22)。また、同一条件下にて MB の赤色光に対する安定性を調べたところ、吸光度減少は 18%であった。すなわち、BiRNH および BiRAc の光安定性は MB と同程度であり、消光や光分解の影響は少ないことがわかった。



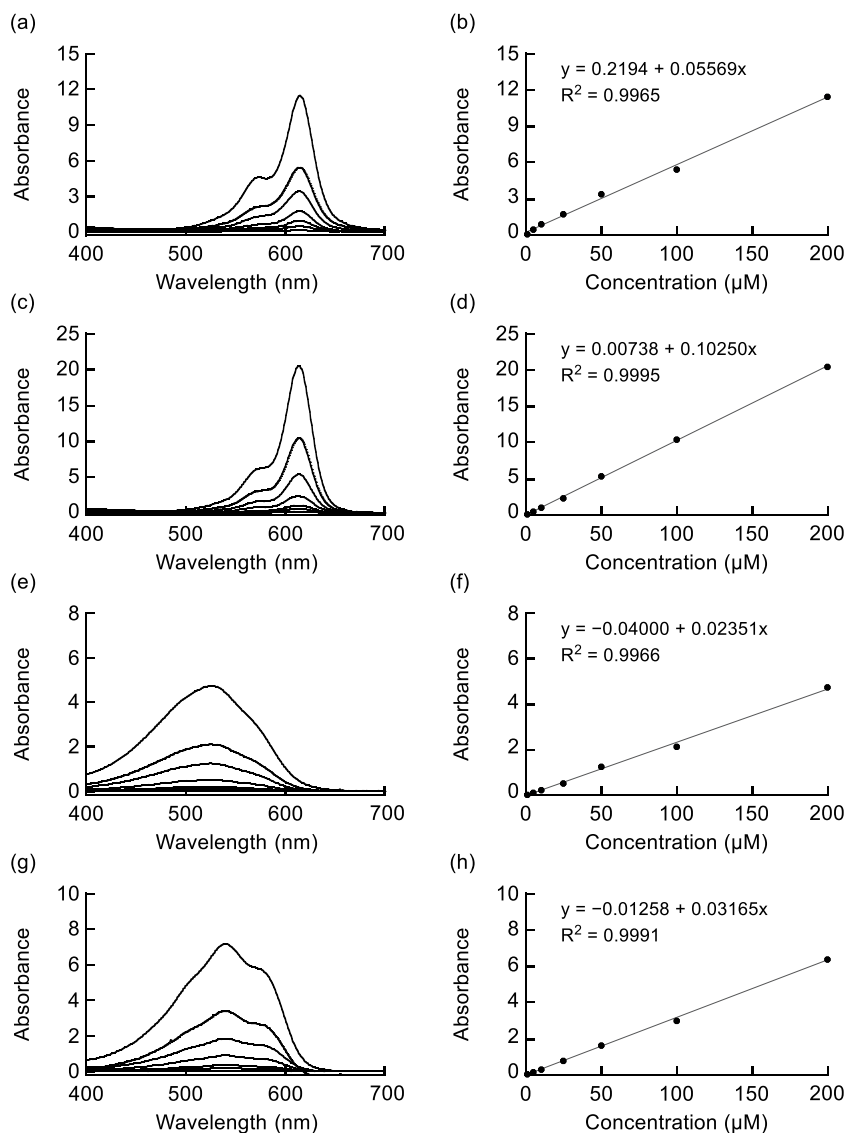
**Figure 22.** Photostability tests of BiRNH and BiRAc. Absorption spectra of (a) BiRNH in the dark, (b) BiRNH under continuous irradiation with a red LED light (625 nm,  $1.1 \text{ mW cm}^{-2}$ ) (c) BiRAc in the dark, (d) BiRAc under continuous irradiation with the red LED light (625 nm,  $1.1 \text{ mW cm}^{-2}$ ), (e) BiRAc under continuous irradiation with a green LED light (530 nm,  $1.1 \text{ mW cm}^{-2}$ ), (f) MB under continuous irradiation with the red LED light (625 nm,  $1.1 \text{ mW cm}^{-2}$ ). The absorption spectra were acquired with the sample concentration of  $5 \mu\text{M}$  every 5 min for 2 h in HEPES buffer (50 mM, pH 7.4, 0.5%DMSO). (g) Plots of the relative absorption at each maximum (615 nm for BiRNH, 526 nm for BiRAc) measured in (a)–(f).

また、いずれの化合物も光照射なし、加熱条件下 (37 °C, 60 °C) においても吸収スペクトル変化は観察されず、熱による影響はほぼ受けないことがわかった (Figure 23)。



**Figure 23.** Stability tests of BiRNH and BiRAC in the dark. Absorption spectra of (a) BiRNH at 37 °C, (b) BiRNH at 60 °C, (c) BiRAC at 37 °C and (d) BiRAC at 60 °C in HEPES buffer (50 mM, pH 7.4, 0.5% DMSO). Absorption spectra were obtained every 5 min for 2 h. (e) Time course plots of relative absorbance at the maximum (615 nm for BiRNH and 526 nm for BiRAC) obtained in (a)–(d).

BiRNH および BiRAc の溶解性の確認を行なった。HEPES 緩衝液中 (50 mM, pH 7.4, 1% DMSO) およびアセトニトリル中にて種々の濃度における BiRNH および BiRAc の吸光度を測定し、それぞれの濃度に対する吸光度をプロットした (Figure 24)。いずれの吸光度においても 200  $\mu\text{M}$  まで直線的に増加しており、これらの光増感剤は緩衝液中および非プロトン性有機溶媒中に対して良好な溶解性を示すことがわかった。

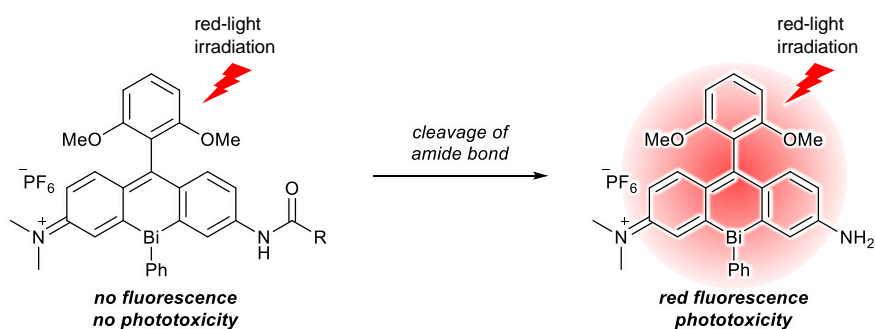


**Figure 24.** Solubility tests of BiRNH and BiRAc. Absorption spectra of (a) BiRNH (1, 5, 10, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$ ) and (e) BiRAc (1, 5, 10, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$ ) in HEPES buffer (50 mM, pH 7.4, 1% DMSO). Plots of absorbance of (b) BiRNH and (f) BiRAc at the maximum (615 nm for BiRNH, 526 nm for BiRAc) against concentration measured in (a) and (e). Absorption spectra of (c) BiRNH (1, 5, 10, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$ ) and (g) BiRAc (1, 5, 10, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$ ) in acetonitrile. Plots of absorbance of (f) BiRNH and (h) BiRAc at the maximum (615 nm for BiRNH, 526 nm for BiRAc) against concentration measured in (e) and (g).



#### 第四節 BiRGlU の分子設計

前節までの結果から、ビスマスローダミンは *N*-アセチル化によりその光学特性, すなわち, 吸収, 蛍光, 光増感能が変化することがわかった。これを利用することによって, *N*-アシル・脱アシル化をトリガーとした光学特性の off/on が可能だと考えた。すなわち, *N*-アシル化体に赤色光を照射した場合に蛍光と光増感能といった活性を有しないが, 刺激によって脱アシル化され BiRNH に変化した場合のみ赤色光励起による蛍光および光増感能が活性化することが期待できる (Scheme 5)。以下, この概念の実証を行なうことにした。

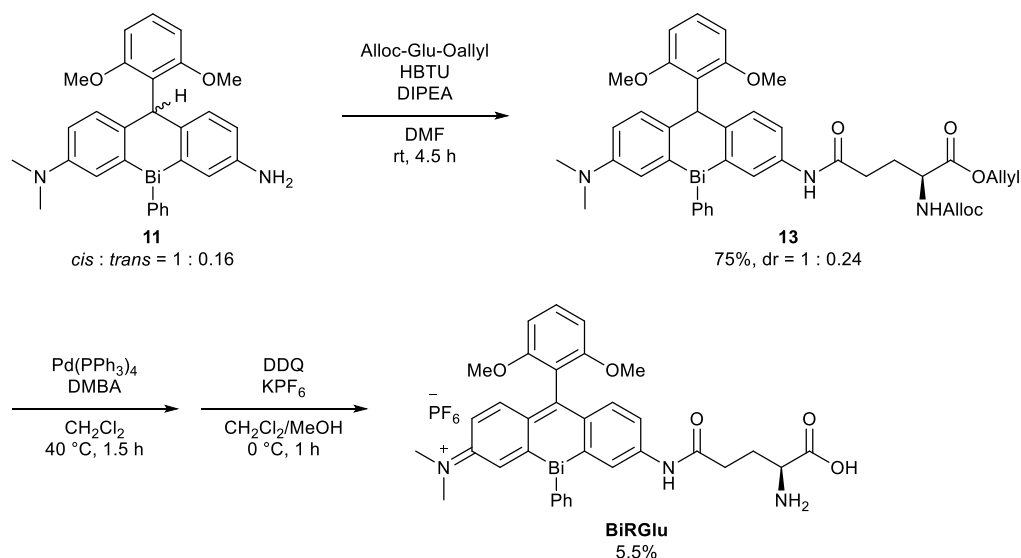


**Scheme 5.** Concept of activation of fluorogenic photosensitizer by *N*-deacylation.

今回,  $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチターゼ (GGT) の酵素反応を活性化のトリガーとして利用することとし, アセチル基の代わりに *L*-グルタミン酸の側鎖カルボン酸をアミド結合させた BiRGlU を設計した。GGT は種々のがん細胞の膜上に強発現しているアミノトランスぺプチターゼであり, *L*-グルタミン酸はその基質の一つである。<sup>51</sup> また, アミノキサントンを基本骨格とした GGT 活性化蛍光プローブはこれまでも報告されている<sup>40,52,53</sup> ことから,  $\gamma$ -グルタミルアミノキサントンの構造は GGT の基質として機能するといえる。

## 第五節 BiRglu の合成

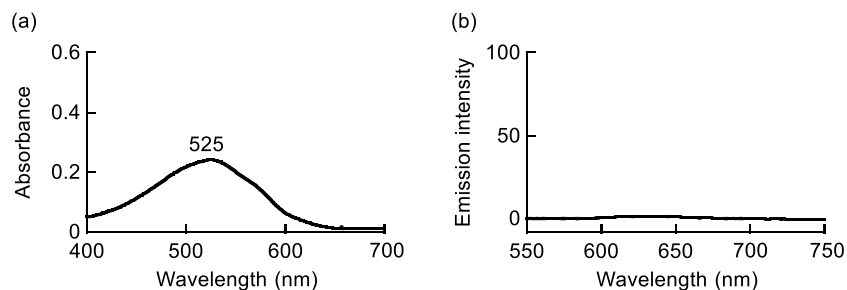
BiRglu の合成手順を Scheme 6 に示す。BiRglu の合成中間体となる化合物 **11** は第二章、第二節で述べた通りに合成した。化合物 **11** と L-グルタミン酸誘導体 (Alloc-Glu-Oallyl) を HBTU を用いて縮合し、化合物 **13** をジアステレオマー比 1 : 0.24 のジアステレオマー混合物として収率 75% で得た。続いて、化合物 **11** の脱保護と酸化を行なった後、逆相 HPLC にて分取精製を行ない、BiRglu を収率 5.5% で得た。



Scheme 6. Synthesis of BiRglu.

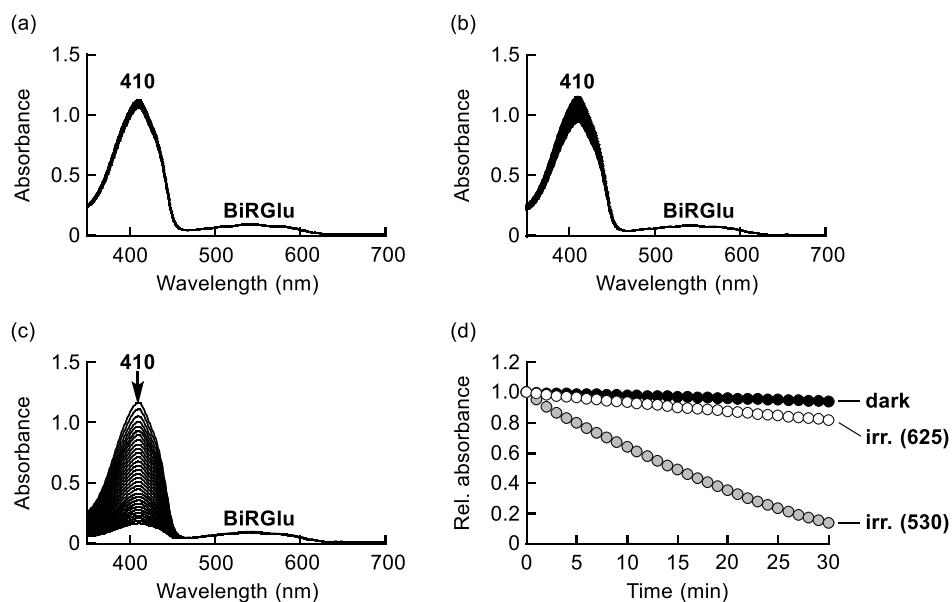
## 第六節 BiRglu の光学特性評価

次に、得られた BiRglu を用いて HEPES 緩衝液中 (50 mM, pH 7.4), 吸収, 蛍光測定を行なった (Figure 25)。BiRglu は 525 nm に吸収極大を有し ( $\epsilon = 48000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 525 nm での励起では蛍光は検出されなかった。



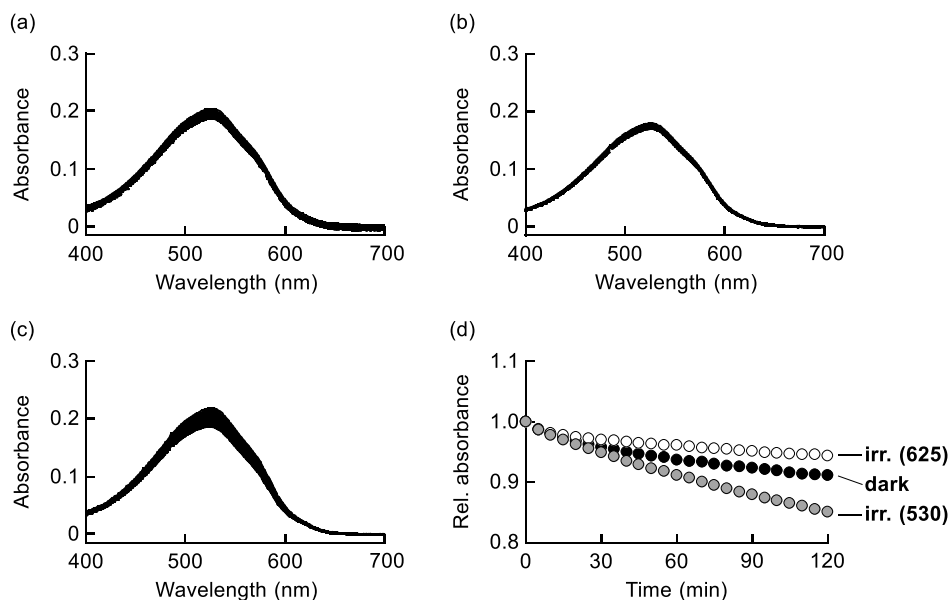
**Figure 25.** (a) Absorption spectra of BiRglu (5  $\mu\text{M}$ ) in HEPES buffer (50 mM, pH 7.4, 0.5% DMSO). (b) Fluorescence spectra of BiRglu (2  $\mu\text{M}$ ) in HEPES buffer (50 mM, pH 7.4, 0.2% DMSO). Excitation was provided at 526 nm.

また、赤色光照射下では DPBF の吸光度変化はわずかであり、BiRNH のような顕著な一重項酸素生成はみられなかった。これらの結果から BiRGlu の吸収、蛍光、光増感能に関する光学特性は BiRAc のものと類似しており、赤色光励起による蛍光・光増感作用は抑制されていることがわかった (Figure 26)。



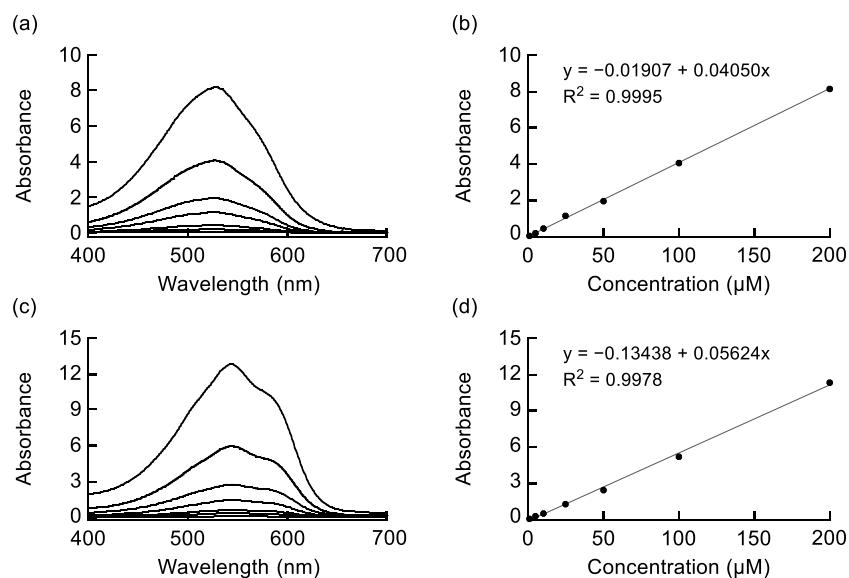
**Figure 26.** Absorption spectral change of DPBF (60 μM) without irradiation (a), with red light irradiation (625 nm, 1.1 mW cm<sup>-2</sup>) (b) and with green light irradiation (530 nm, 1.1 mW cm<sup>-2</sup>) (c) in the presence of BiRGlu (1.7 μM) in acetonitrile. (d) Plots of absorption at 410 nm measured in (a), (b) and (c). The data were collected every 1 minute.

BiRGlu を HEPES 緩衝液中にて光照射中の吸光度変化を観察し、光安定性を評価した。2 時間光照射を行なったところ、吸光度の減少は 15% 以内であり (Figure 27), BiRAc と同程度の光安定性を示した (Figure 22c–e, g)。



**Figure 27.** Photostability tests of BiRGlu. Absorption spectra of (a) BiRGlu in the dark, (b) under continuous irradiation with a red LED light (625 nm, 1.1 mW cm<sup>-2</sup>), (c) under continuous irradiation with a green LED light (530 nm, 1.1 mW cm<sup>-2</sup>). The absorption spectra were acquired with the sample concentration of 5 μM every 5 min for 2 h in HEPES buffer (50 mM, pH 7.4, 0.5% DMSO). (d) Plots of the relative absorption at maximum (525 nm) measured in (a)–(c).

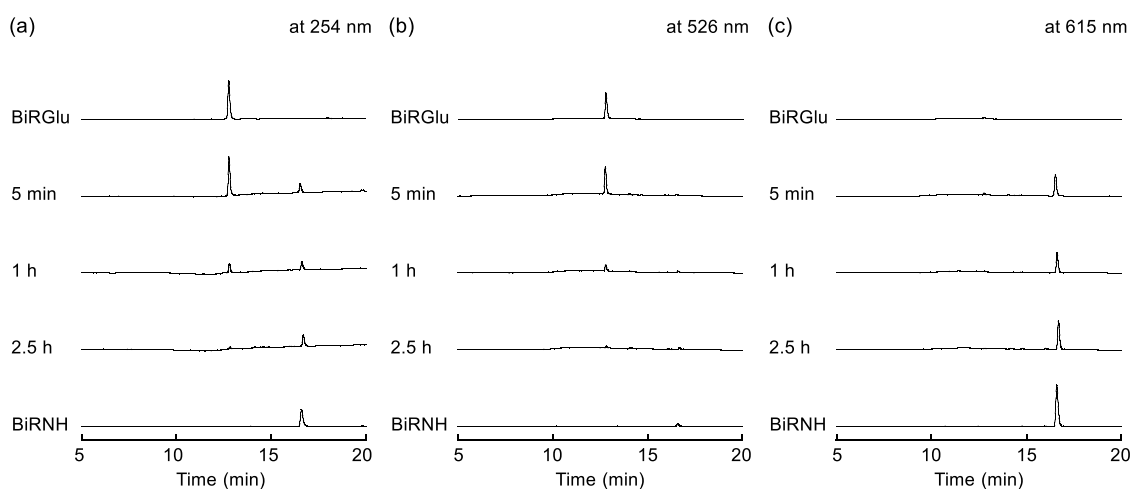
緩衝液中およびアセトニトリルに対する BiRGlu 溶解性を確認した (Figure 28)。BiRGlu 濃度に対して吸光度をプロットしたところ、200  $\mu\text{M}$  まで直線性が保たれており、溶解性はよいことがわかった。



**Figure 28.** Solubility tests of BiRGlu. Absorption spectra of BiRGlu (1, 5, 10, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{M}$ ) (a) in HEPES buffer (50 mM, pH 7.4, 1% DMSO) and (c) in acetonitrile. (b, d) Plots of absorbance of BiRGlu at the maximum (525 nm) against concentration measured in (a) and (c).

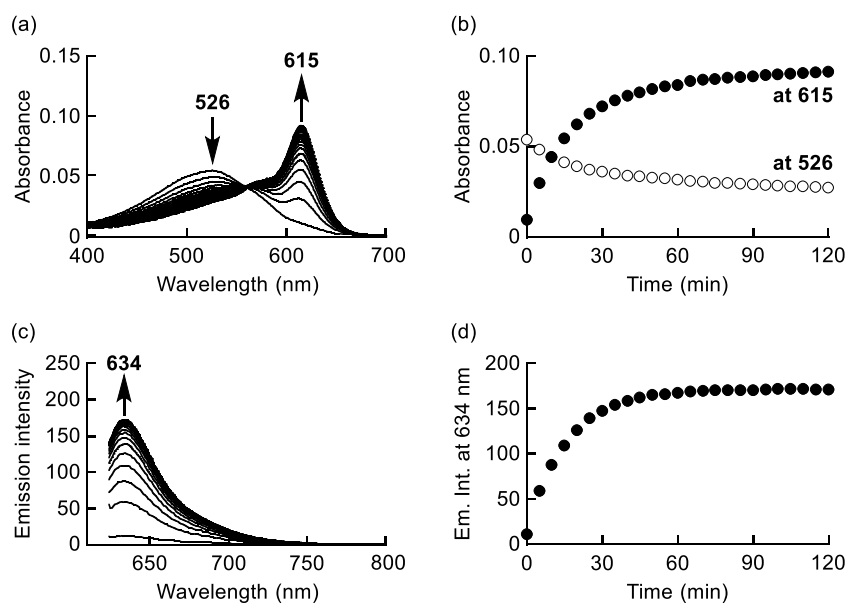
## 第七節 BiRGlu の GGT 応答性評価

BiRGlu の GGT に対する応答性について評価した。37 °C, HEPES 緩衝液中 (50 mM, pH 7.4, 0.5% DMSO) における BiRGlu (10  $\mu$ M) と GGT (10 U/mL) の反応を, 時間経過ごとに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて追跡した (Figure 29)。反応開始後 5 分にて 16.6 分に新たなピークが出現した。このピークは 254 nm, 615 nm では検出されたが, 526 nm では検出されず, 溶出時間が BiRNH と一致した。一方, 12.8 分の BiRGlu のピークは時間経過とともに減少し, 2.5 時間後にはほぼ消失した。この結果から, BiRGlu の  $\gamma$ -グルタミル基が GGT によって切断され, BiRNH に変化することが示された。



**Figure 29.** HPLC analysis of the reaction between BiRGlu (10  $\mu$ M) and GGT (10 U mL<sup>-1</sup>) in HEPES buffer (50 mM, pH 7.4, 5% DMSO). The reaction mixture was analyzed at each time point (5 min, 1 h, and 2.5 h) by reversed phase HPLC (A: 0.05% formic acid in water, B: 0.05% formic acid in acetonitrile, A/B = 20/80 to 80/20 for 5–20 min). Elutes were monitored at (a) 254nm, (b) 526 nm, and (c) 615 nm. Pure samples of BiRGlu and BiRNH were also analyzed at the same concentrations.

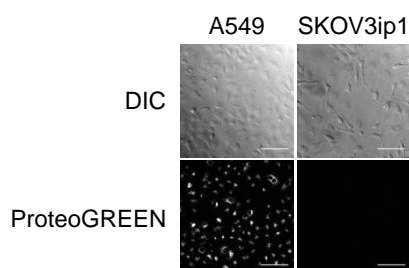
また、GGT に対する応答性は吸収・蛍光スペクトル変化によっても評価した。GGT 存在下、時間経過とともに 525 nm 付近の吸収は減弱し、615 nm 付近の吸収が増加した (Figure 30)。この新たに現れた吸収は BiRNH の極大吸収と一致した。吸収スペクトル変化は 560 nm の等吸収点を有しており、この反応が反応中間体や副生成物の生成なしに進行していることを示している。また、GGT 存在下での蛍光スペクトル変化も観察した。GGT 添加前は 530 nm および 615 nm での励起による蛍光は全く観察されなかった。しかし、GGT 添加後、時間経過とともに 630 nm 付近の蛍光強度が増加し、30 分以内にプラトーに達した。



**Figure 30.** (a) Absorption spectral change of BiRGluc (1 μM) upon the reaction with GGT (1.5 U mL<sup>-1</sup>) in HEPES buffer (50 mM, pH 7.4, 0.5% DMSO). (b) Plot of absorption at 526 nm (open circles) and 615 nm (filled circles) measured in (a) against time. (c) Fluorescence spectral change of BiRGluc (1 μM) upon the reaction with (1.5 U mL<sup>-1</sup>) in HEPES buffer (50 mM, pH 7.4, 0.5% DMSO). Excitation was provided at 615 nm. (d) Plots of emission intensity at 634 nm, indicated by an arrow, in (c), against time. The data in (a) and (c) were collected every 1 min.

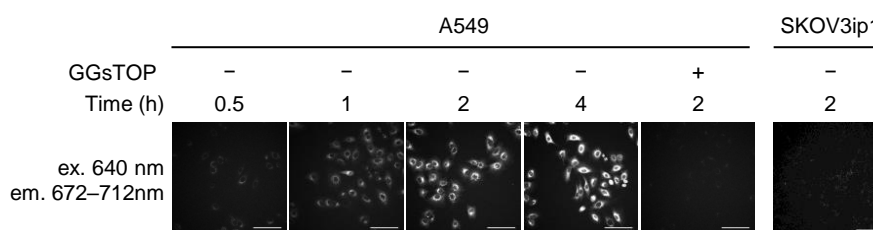
## 第八節 生細胞中における BiRGlu の機能評価

生細胞中での機能評価を行なった。細胞株には GGT 活性が高いことが報告されている A549 細胞 (ヒト肺がん細胞), および GGT 活性の低い SKOV3ip1 細胞 (ヒト卵巣がん細胞) を用いることにした。<sup>40,52,54,55</sup> まず, 市販の GGT 選択的蛍光プローブである ProteoGREEN-gGlu を用いて両細胞株の GGT 活性を確認した。その結果, A549 細胞ではプローブ由来の蛍光が観察されたが, SKOV3ip1 細胞では蛍光シグナルは検出されず, それぞれの GGT 活性が高いあるいは低いことが確認できた (Figure 31)。



**Figure 31.** (Upper) Differential interference contrast (DIC) images of the same field of view of the fluorescence images. (Lower) Fluorescence microscopic images of A549 cells (left) and SKOV3ip1 cells (right) stained with ProteoGREEN-gGlu (GGT probe, referred as to gGlu-HMRG in the literature<sup>10</sup>). The images were acquired using an FITC filter set (excitation = 470 nm, emission = 516–556 nm). Scale bars indicate 100  $\mu$ m.

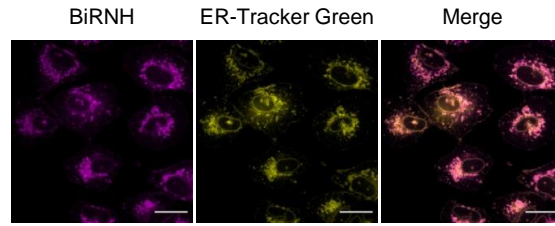
A549 細胞を BiRGlu で処理したところ, 処理時間依存的に蛍光シグナルが増強した (Figure 32)。A549 細胞を GGT 阻害剤 (GGsTOP) で前処理した後, BiRGlu で処理した場合には蛍光は観察されなかった。一方, SKOV3ip1 細胞に BiRGlu を処理した場合には蛍光は観察されなかった。これらの蛍光イメージングの結果から BiRGlu で処理した場合の蛍光シグナル増強は細胞由来の GGT により BiRGlu が BiRNH に変化したことを示唆している。



**Figure 32.** Fluorescence microscopic images of A549 cells and SKOV3ip1 cells treated with BiRGlu (1  $\mu$ M) for 0.5, 1, 2, and 4 h (A549) or for 2 h (SKOV3ip1). Pretreatment with a GGT inhibitor, GGsTOP (100  $\mu$ M), was performed for 1 h prior to the treatment with BiRGlu for 2 h.

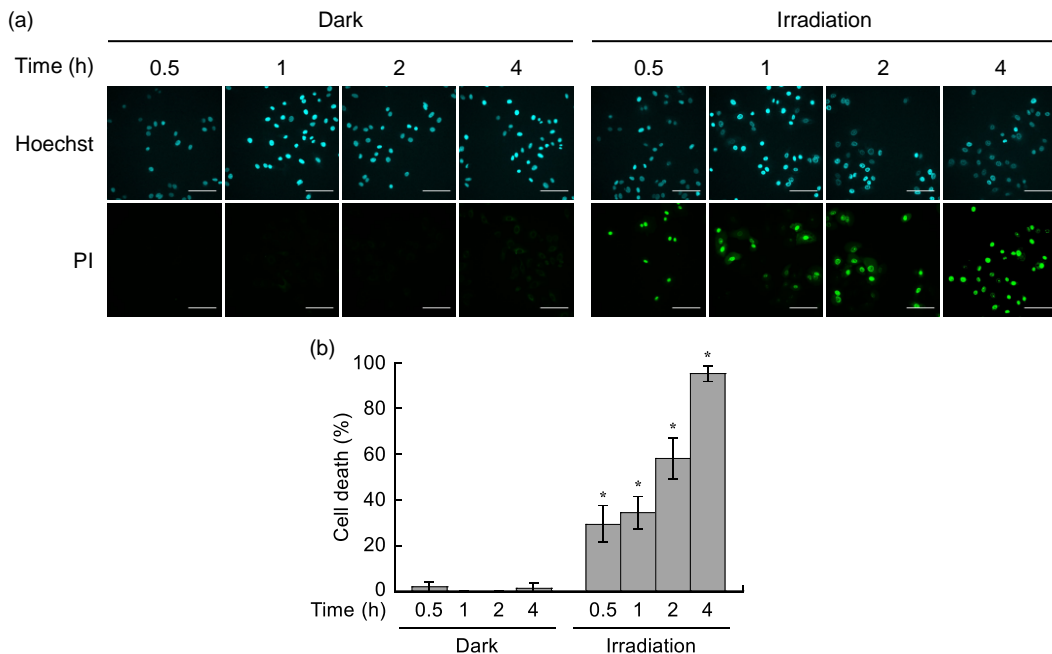
局在を確認するために, 活性化体である BiRNH と ER Tracker を用いて共染色実験を行なった。BiRNH は細胞内に容易に取り込まれ, 主に小胞体を集積することがわかった (Figure 33)。GGT は細胞膜表面に発現しているため, GGT 発現細胞を BiRGlu で処理した場合, 細胞膜表面で  $\gamma$ -グルタミル基が切断された, BiRNH として細胞に取り込まれると推測している。





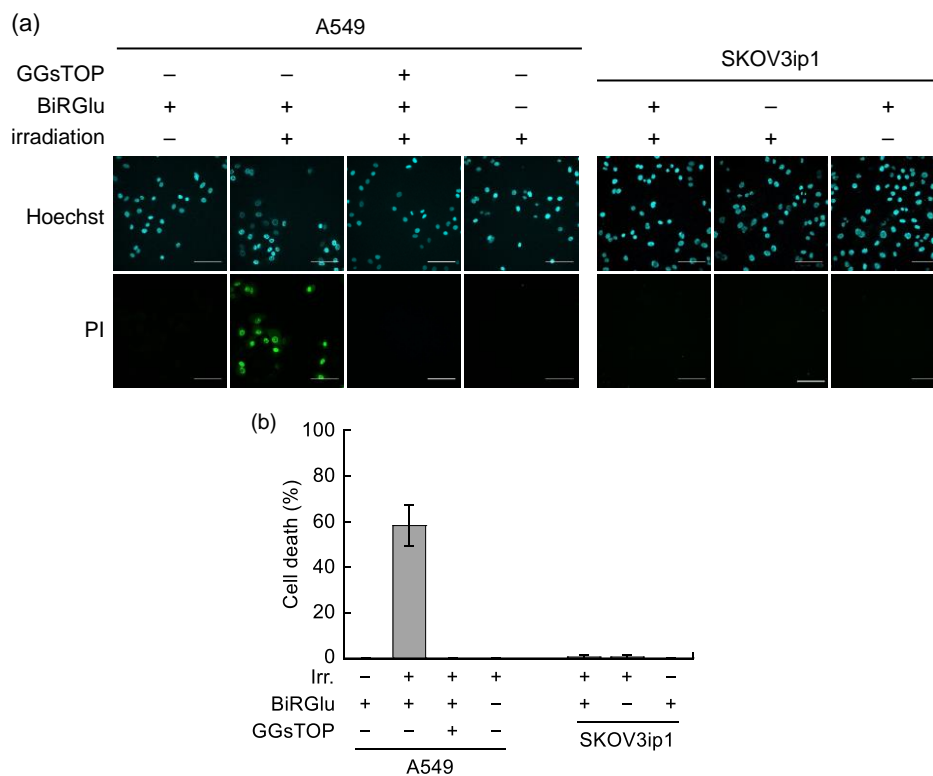
**Figure 33.** Colocalization assay of BiRNH (1  $\mu\text{M}$ ) and ER-Tracker Green (0.2  $\mu\text{M}$ ) in A549 cells. Left and middle images were acquired using a Cy5 filter (BiRNH) and a FITC filter (ER-Tracker Green), respectively. The right image is the merged image of the left and middle images. Scale bars indicate 25  $\mu\text{m}$ . Pearson's correlation value ( $R_{\text{coloc}}$ ) was calculated to be  $0.87 \pm 0.05$  ( $n = 3$ ).

細胞中における BiRGlu の光増感能評価を行なった。A549 細胞を BiRGlu で 2 時間処理した後、赤色光を照射し、ヨウ化プロピジウム (PI, 死細胞染色剤) と Hoechst 3342 (全細胞の染色剤) で染色することで細胞生存率を調べた。その結果、赤色光照射を行なった細胞は BiRGlu の処理時間依存的に PI 陽性細胞比率が上昇、すなわち細胞死率が上昇した。この結果は BiRGlu の処理時間依存的な蛍光シグナル上昇と一致した。一方で、光照射を行なわなかった細胞では BiRGlu の処理時間によらず PI 陽性細胞は観察されなかった (Figure 34)。



**Figure 34.** (a) Fluorescence microscopic images of A549 cells stained with propidium iodide (PI) and Hoechst 33342 after the treatment with BiRGlu (1  $\mu\text{M}$ ) for the indicated times (0.5, 1, 2, and 4 h) followed by (right) irradiation with red light (640 nm,  $14.1 \text{ mW cm}^{-2}$ , 1 min) or (left) no irradiation. Scale bars indicate 100  $\mu\text{m}$ . (b) Plot of the populations of PI-positive cells in the total cells (Hoechst-stained cells) under each condition in (a). Each value indicates the mean  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). Statistical analysis was performed with Student's *t*-test (vs dark condition of the corresponding incubation times). \* $P < 0.005$ .

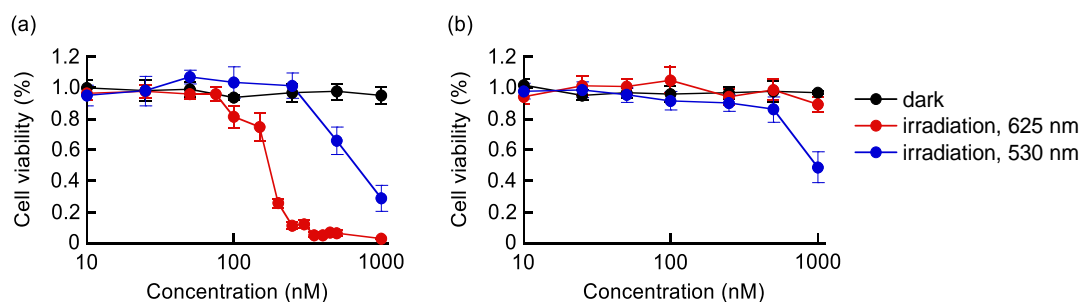
また、GGT 阻害剤である GGsTOP で前処理した細胞では、赤色光照射を行なった赤色照射を行なった場合においても PI 陽性細胞が観察されなかった。さらに、GGT 活性の低い SKOV3ip1 細胞では光照射の有無に関わらず、PI 陽性細胞は観察されなかった (Figure 35)。



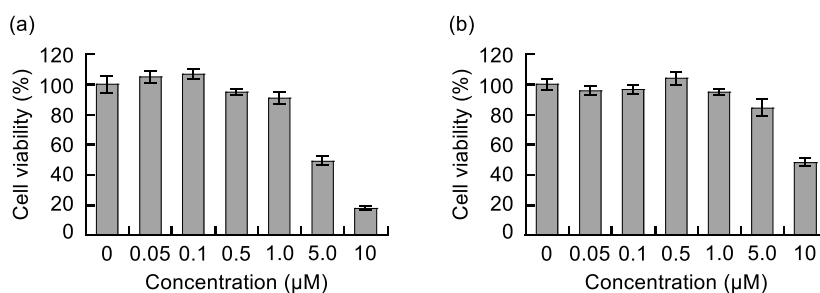
**Figure 35.** (a) Representative fluorescence images of A549 cells and SKOV3ip1 cells stained with Hoechst 33342 and propidium iodide (PI). The cells were irradiated with red light (640 nm,  $14.1 \text{ mW cm}^{-2}$ ) for 1 min after incubation with BiRGlu ( $1 \mu\text{M}$ ) for 2 h. Pretreatment with GGsTOP ( $100 \mu\text{M}$ ) was performed for 1 h prior to the treatment with BiRGlu. Scale bars indicate  $100 \mu\text{m}$ . (b) Graph of the population of PI-positive cells (dead cells) acquired from the images under the conditions indicated in (a). Each value shows the mean  $\pm$  SD ( $n = 4$ ).

最後に、赤色光照射下での EC<sub>50</sub> 値を MTT アッセイにより求めた。赤色光照射下において、A549 細胞の BiRGlu の EC<sub>50</sub> は 175 nM であったが、SKOV3ip1 細胞では 1 mM まで顕著な細胞死は見られなかった (Figure 36)。また、光照射を行わない場合には細胞死はほとんど観察されなかった (Figure 37)。

以上の結果から、BiRGlu の光毒性は GGT 依存的に活性化されることが示された。一方、BiRGlu で処理した細胞に緑色光を照射した場合、A549 細胞、SKOV3ip1 細胞いずれにおいてもわずかに光毒性が見られた。これは BiRGlu だけでなくわずかながらも BiRNH にも緑色領域に吸収があるためである。



**Figure 36.** (a) Cell viability assay of A549 cells and (b) SKOV3ip1 cells after the treatment with the indicated concentrations of BiRGlu for 2 h followed by irradiation with a red light (625 nm, 20 J cm<sup>-2</sup>) or a green light (530 nm, 20 J cm<sup>-2</sup>) and by no irradiation. Each value indicates the mean ± SD (n = 6).



**Figure 37.** Cell viability assay (MTT assay) of (a) A549 and (b) SKOV3ip1 cells after 24 h treatment with various concentrations of BiRGlu. Each value indicates the mean ± SD (n = 6).

## 第九章 小括

非対称型ビスマスローダミン誘導体の合成法を確立し、新たに BiRNH と BiRAc の合成を達成した。BiRNH は赤色領域に吸収・蛍光を有し、さらに赤色光励起により一重項酸素を生成した。一方で、BiRAc は吸収波長が短波長シフトし、赤色光励起による蛍光・光増感作用は見られず、両者は異なる光学特性を示した。これらの結果から、ビスマスローダミンはアミノ基における窒素原子のアシル化・脱アシル化によりその光物性を制御できることがわかった。

上記で得られた知見から、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチターゼ (GGT) により蛍光と光増感作用が活性化されることを期待し、BiRAc のアセチル基を  $\gamma$ -グルタミル基に置き換えた BiRGlu を設計・合成した。BiRGlu は BiRAc と同様に BiRNH と比べて吸収波長が短波長シフトし、赤色光励起による蛍光・光増感作用は見られなかった。BiRGlu に GGT を作用させたところ、時間経過とともに  $\gamma$ -グルタミル基が切断され BiRNH が生成し、615 nm 付近の吸収および 635 nm 付近の蛍光増強がみられた。生細胞中での機能評価を行なったところ、GGT 活性の高い A549 細胞を用いた場合には、BiRGlu 処理後、時間経過とともに赤色蛍光が増強し、さらに赤色光照射量依存的な細胞死が確認できた。一方で、GGT 活性の低い SKOV3ip1 細胞では赤色蛍光、および光照射による細胞死は確認できず、BiRGlu は GGT 高活性細胞株でのみ赤色蛍光と光増感作用を発揮することが示された。

以上の結果から、ビスマスローダミンの *N*-アシル・脱アシル化は光学特性を制御するためのトリガーに利用できることが実証された。

## 総括

典型重元素であるビスマスは独特な性質を有するものの、物性や応用に関する研究は未開拓な部分が多く、ビスマスの特徴を活かしきれていない。特に、低毒性な重元素であるにも関わらず、生体利用を目的とした有機ビスマス化合物の報告例は少ない。本研究では、ビスマスの低毒性な典型重元素という特徴に焦点を当て、生体利用を目的とした新たな有機ビスマス化合物を創製することで、ビスマスの新たな可能性を探索することとした。

以下に、本研究で得られた知見を要約する。

1. 吸収・蛍光波長の長波長化および光増感能を期待して、ローダミン骨格の 10 位にフェニルビスマスを導入したビスマスローダミン **BiR** を設計・合成した。X 線結晶構造解析より、キサテン骨格内にビスマスが組み込まれていること、すべての C-Bi-C からなる結合角はほぼ直角であり、有機ビスマス(III)化合物に特徴的な構造を有することがわかった。
2. **BiR** は極大吸収波長 635 nm, 極大蛍光波長 658 nm, 絶対蛍光量子収率 0.039 を示し、赤色蛍光分子として機能することがわかった。さらに、赤色光励起により一重項酸素を生成する光増感能を有することがわかった。
3. **BiR** は細胞に容易に取り込まれ、赤色蛍光を示した。また、**BiR** を処理した細胞に対して赤色光照射をすることで細胞死が引き起こされた。
4. 非対称型のビスマスローダミン誘導體として **BiR** の片方のジメチルアミノ基をアミノ基にした **BiRNH** とアセトアミド基にした **BiRAc** を設計・合成した。**BiRNH** は **BiR** と同等の光学特性を示した。一方で、**BiRAc** は吸収波長が短波長シフトし、赤色光励起による蛍光と光増感能を示さなかった。すなわち、ビスマスローダミンは *N*-アシル化によりその光学特性が大きく変化することがわかった。
5. *N*-アシル化・脱アシル化をトリガーとした光学特性の活性制御がビスマスローダミンに有効であることを実証するため、**BiRAc** のアセチル基を  $\gamma$ -グルタミル基に置き換えた **BiRGlu** を設計・合成した。**BiRGlu** は **BiRAc** と同等の光学特性を示したが、GGT 存在下でのみ赤色光励起による蛍光と光増感能を示した。
6. GGT 高発現細胞株に **BiRGlu** を処理すると、時間経過とともに蛍光シグナルが増強し、赤色光照射により細胞死が引き起こされた。一方で、GGT 低発現細胞株では蛍光は観察されず、また光照射依存的な細胞死も起こらなかった。

以上、新規含ビスマスローダミン類が蛍光性光増感剤として有用であることが示された。これまでに蛍光と光増感能を併せ持つ化合物はごくわずかに報告されているが、<sup>56-58</sup> 赤色領

域に吸収・蛍光波長を有するものではなく、赤色蛍光と光増感能の両立はビスマス元素を利用したからこそ達成できたものである。さらに、生体への利用が可能であることから、光線力学療法への応用も視野に入れることができる。その場合、従来のポルフィリン系光増感剤とは異なり、あらかじめビスマスローダミンの活性化と局在を蛍光で確認することができるため、診断と治療を同時に行うセラノスティクスへの展開も可能である。

本研究の成果は、ビスマスの低毒性な典型重元素という特徴を十二分に活かした結果得られたものであり、これからの有機ビスマス化合物の生体利用を広げる一手になると期待している。

## 謝辞

終わりに臨み、本研究に対して終始懇篤なる御指導、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。

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、御鞭撻、並びに御激励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 平山祐准教授に感謝いたします。

本研究の推進において御助言、御討論、並びにご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。

X 線結晶構造解析あたり、御指導、ご協力いただきました岐阜大学工学研究科 海老原昌弘教授に感謝いたします。

ゼノグラフィトマウスモデルによる PDT 評価実験並びに本論文作成にあたり、直接御指導、御協力、御激励をいただきました東京工業大学生命理工学院 近藤科江教授、口丸高弘元助教 (現、自治医科大学講師) に感謝いたします。

SKOV3ip1 細胞株をご提供いただきました、岐阜大学大学院医学系研究科産科婦人科学分野 野森重健一郎教授、小池大我氏に感謝いたします。

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くださり、有益な御助言や御激励をいただきました岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室 因幡栄美氏、宮路千乃氏に感謝いたします。

実験に際して御討論、御助言、ご激励をいただきました薬化学研究室の先輩方、同級生、後輩の皆様に感謝いたします。





## 実験の部



市販の試薬及び溶媒は特別な精製を行わずに用いた。

$^1\text{H}$  NMRスペクトルはJEOL社JNM-ECA500 (500 MHz), JEOL社JNM-ECZ400 (400 MHz) およびJEOL社LNM-AL400 (400 MHz) を用いて測定した。 $^{13}\text{C}$  NMRスペクトルはJEOL社JNM-ECA500 (125 MHz) およびJEOL社JNM-ECZ400 (100 MHz) を用いて測定した。 $^{19}\text{F}$  NMRスペクトルはJEOL社JNM-ECZ400 (376 MHz) を用いて測定した。NMRスペクトルは重水素化クロロホルム ( $\text{CDCl}_3$ ), 重水素化アセトニトリル ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ) あるいは重水素化ジメチルスルホキシド ( $d_6$ -DMSO) を測定溶媒として用いた。 $^1\text{H}$  NMRは化学シフト値 ( $\delta$ 値) をppm, 結合定数 ( $J$ 値) をHzで表記し,  $\text{CDCl}_3$ および $d_6$ -DMSOで測定した場合はテトラメチルシランのシングレットシグナルを0.00 ppmの基準とし,  $\text{CD}_3\text{CN}$ を用いた場合は $\text{CHD}_2\text{CN}$ 由来のクインテットシグナルを1.94 ppmの基準とした。 $^{13}\text{C}$  NMRは化学シフト値 ( $\delta$ 値) をppmで表記し,  $\text{CDCl}_3$ を用いた場合は溶媒由来のトリプレットシグナルを77.0 ppmの基準とし,  $\text{CD}_3\text{CN}$ を用いた場合は溶媒由来のシングレットピークを118.0 ppmの基準とした。 $^{19}\text{F}$  NMRは化学シフト値 ( $\delta$ 値) をppm, 結合定数 ( $J$ 値) をHzで表記し, ヘキサフルオロベンゼンのシングレットピークを-165.0 ppmの基準とした。シグナルの多重度はs = singlet, d = doublet, t = triplet, dd = doublet of doublet, dt = doublet of triplet, td = triplet of doublet, q = quartet, m = multiplet, br = broadと略記した。

高分解能質量分析 (HRMS) はJEOL社JMS-T100Tを使用し, 標準物質としてポリエチレングリコール (PEG) を使用した。

反応は薄層カラムクロマトグラフィー (TLC) にて追跡し, TLCにはSilica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) を用い, UV吸収 (254 nm) あるいはリンモリブデン酸による呈色にて検出した。

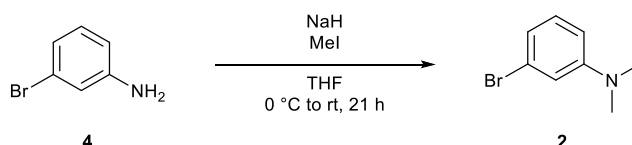
カラムクロマトグラフィーにはノーマルシリカゲル (AP-300, 大興商事) およびDIOLシリカゲル (CHROMATOREX DIOL MB 100-40/75, 富士シリシア) を用いた。

逆相HPLCはChromaster series (日立) を使用し, 分析用HPLCカラムはODS-80Ts analytical column (5.0  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  75 mm, 東ソー) を流速0.5 mL min<sup>-1</sup>で使用した。逆相分取HPLCはポンプ (PU-986, JASCOおよびPU-2086, JASCO), 溶媒ミキサー (MX-2080-32, JASCO), UV検出器 (UV-970, JASCO) を組み合わせて使用し, 分取用HPLCカラムはTSKgel ODS-80Ts preparative column (5.0  $\mu\text{m}$ , 20  $\times$  250 mm, 東ソー) を流速10 mL min<sup>-1</sup>で使用した。

## 第一章に関する実験

### BiRの合成

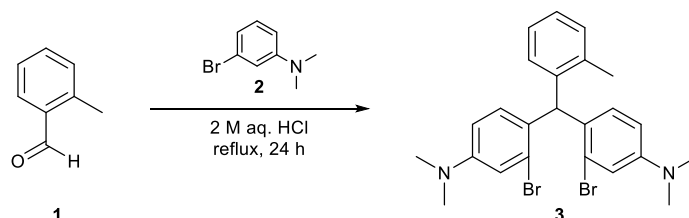
#### 3-Bromo-*N,N*-dimethylaniline (2)<sup>59</sup>



3-ブロモアニリン**4** (5.00 g, 29.1 mmol, 1.0 eq.) のTHF溶液 (50 mL) を0° Cに冷却し、水素化ナトリウム (5.82 g, 146 mmol, 60%w/w, 5.0 eq.) を加え、30分間攪拌した。その後、反応液にヨウ化メチル (9.05 mL, 145 mmol, 5.0 eq.) を加え、室温で21時間攪拌した。余剰の水素化ナトリウムを水 (50 mL) で処理した後、反応混合溶液を酢酸エチル (50 mL × 3) で抽出した。有機層を飽和食塩水 (100 mL) で洗浄し、硫酸マグネシウム乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/*n*-ヘキサン) にて精製し、目的化合物を薄黄色液体として得た (5.78 g, 28.9 mmol, 99%)。

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.07 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.82 (m, 2H), 6.63 (dd, *J* = 2.5, 8.5 Hz, 1H), 2.94 (s, 6H).

#### 4,4'-(*o*-Tolylmethylene)bis(3-bromo-*N,N*-dimethylaniline) (3)



3-ブロモ-*N,N*-ジメチルアニリン**2** (2.00 g, 10.0 mmol, 2.0 eq.) の2 M塩酸溶液 (20 mL) に2-メチルベンズアルデヒド**1** (601 mg, 5.00 mmol, 1.0 eq.) を加え、24時間加熱還流した。その後、炭酸水素ナトリウムで中和し、混合溶液をジクロロメタン (50 mL × 3) で抽出した。有機層は飽和食塩水 (40 mL) にて洗浄し、硫酸マグネシウムにて乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/*n*-ヘキサン) にて精製し、目的の化合物を白色固体として得た (1.14 g, 2.27 mmol, 45%)。

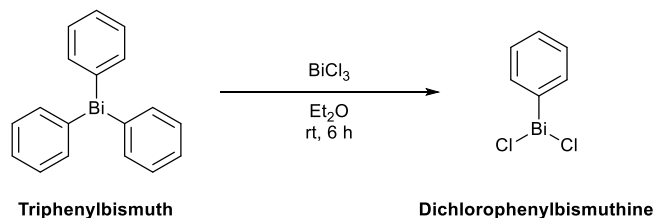
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.12–7.16 (m, 2H), 7.08 (dd, *J* = 7.5, 1.7 Hz, 1H), 6.94 (d, *J* = 2.9 Hz, 2H), 6.73 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.63 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.54 (dd, *J* = 8.6, 2.9 Hz, 2H), 5.96 (s, 1H), 2.92 (s, 12H), 2.20 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 150.0, 141.7, 137.1, 131.1, 130.4, 129.6, 128.8, 126.6, 126.3, 125.7,

116.6, 111.3, 51.5, 40.5, 19.7.

HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 503.0516; found 503.0544.

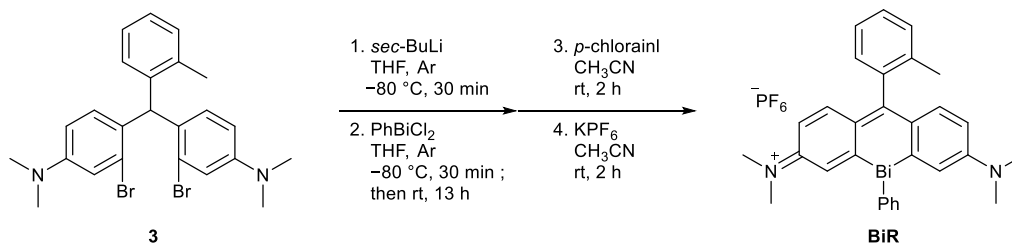
### Dichlorophenylbismuthine<sup>43</sup>



トリフェニルビスマス (2.20 g, 5.00 mmol, 1.0 eq.) のジエチルエーテル溶液 (25 mL) を三塩化ビスマス (3.15 g, 10.0 mmol, 2.0 eq.) のジエチルエーテル懸濁液 (25 mL) に加えて、室温で6時間攪拌した。その後、溶媒を減圧留去し、得られた残渣をジエチルエーテルで洗浄した。減圧乾燥後、目的物が白色粉末として得られ (4.35 g, 12.2 mmol, 81%), 粗生成物のまま次の反応に用いた。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.95–8.97 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.88–7.92 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.37–7.40 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H).

### BiR



アルゴン雰囲気下にて、化合物 **3** (900 mg, 1.80 mmol, 1.0 eq) の脱水 THF 溶液 (10 mL) を -80 °C に冷却し, *sec*-BuLi (4.50 mL, 4.50 mmol, 2.5 eq. 1.00 M シクロヘキサン/*n*-ヘキサン溶液) を滴下した。-80 °C にて 30 分間攪拌した後, ジクロロフェニルビスマス (771 mg, 2.16 mmol, 1.2 eq.) の THF 懸濁液 (15 mL) を反応溶液に滴下した。反応溶液を -80 °C にて 30 分間攪拌後, 室温下で 13 時間攪拌した。その後, 2 M 塩酸 (100 μL) を加え, 溶媒を減圧留去した。得られた残渣をアセトニトリル (20 mL) に溶解し, *p*-クロロアニル (885 mg, 3.60 mmol, 2.0 eq.) を加えた。室温にて 2 時間攪拌した後, 反応溶液に KPF<sub>6</sub> (663 mg, 3.60 mmol, 2.0 eq.) を加え, さらに室温で 2 時間攪拌した。その後, 溶媒を減圧留去し, 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (メタノール/ジクロロメタン) にて精製し, 暗赤色固体を得た (308 mg)。これをアセトニトリル溶液とし, ジエチルエーテル蒸気拡散法にて再結晶し, 目的の化合物を暗緑色結晶として得た (51 mg, 66 μmol, 4%)。

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.75 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 2.9 Hz, 2H), 7.43 (d, *J* = 9.7 Hz,

2H), 7.40 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.26–7.33 (m, 4H), 7.20 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.06 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 6.47 (dd,  $J = 9.8, 2.9$  Hz, 2H), 3.29 (s, 12H), 1.80 (s, 3H).

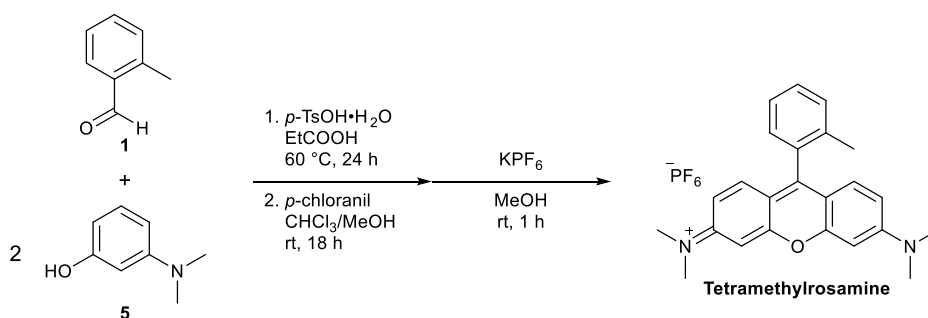
$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  178.8, 168.1, 157.1, 154.5, 143.5, 140.3, 136.7, 135.7, 130.9, 130.3, 129.3, 128.7, 128.0, 125.7, 125.1, 124.4, 113.5, 40.9, 19.2.

HRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  calcd. for  $[\text{M}-\text{PF}_6]^{+} \text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{BiN}_2^{+}$ : 627.2207; found 627.2201.

Anal. calcd for  $\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{BiF}_6\text{N}_3\text{P}$  [ $\text{BiR}+\text{CH}_3\text{CN}$ ]: C, 47.24, H, 4.09; N, 5.16; found: C, 46.96; H, 4.09; N, 5.11.

m.p. 208.1–210.5 °C (decomp.).

### Tetramethylrosamine (TMR)<sup>60</sup>



3-(*N,N*-ジメチルアミノ)フェノール**5** (400 mg, 2.92 mmol, 2.0 eq.), 2-メチルベンズアルデヒド**1** (178 mg, 1.46 mmol, 1.0 eq.), *p*-トルエンスルホン酸一水和物 (26 mg, 0.29 mmol, 0.2 eq.) をプロピオン酸 (20 mL) に溶解した。反応溶液を60 °C, 24時間攪拌した後, 3 M酢酸ナトリウム水溶液 (100 mL) に注ぎ中和し, クロロホルム (50 mL × 3) で抽出した。有機層は硫酸マグネシウムで乾燥した後, 溶媒を減圧留去した。得られた残渣をクロロホルム/メタノール (1/1, 40 mL) の混合溶媒に溶解させ, *p*-クロラニル (356 mg, 1.46 mmol, 1.0 eq.) を加えて室温にて18時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後, シリカゲルカラムクロマトグラフィー (メタノール/クロロホルム) にて精製した (17 mg)。その後, 得られた生成物をメタノール (5 mL) に溶解し,  $\text{KPF}_6$  (160 mg, 0.89 mmol, 2.0 eq.) のメタノール溶液 (5 mL) を加え, 室温にて1時間攪拌した。その後, 溶媒を減圧留去し, 残渣にクロロホルム (10 mL) を加え, 不溶物をセライトろ過で除去した。得られたろ液の溶媒を減圧留去し, tetramethylrosamineの  $\text{PF}_6$  塩を暗紫色固体として得た (18 mg, 36  $\mu\text{mol}$ , 2.5%)。

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.51 (t,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.44–7.39 (m, 2H), 7.17–7.15 (m, 3H), 6.90–6.87 (m, 4H), 3.33 (s, 12H), 2.04 (s, 3H).

### X線結晶構造解析

$\text{BiR}$ の暗緑色結晶を適切な大きさ (0.33 × 0.31 × 0.28 mm<sup>3</sup>) にしてガラスファイバー上にのせた。X線源には $\text{MoK}\alpha$  ( $\lambda = 0.71075$  Å) を用い, Rigaku Mercury CCD二次元検出器を搭載

したRigaku AFC7Rを使用して測定した。最大 $2\theta_{\max}$ を $55.0^\circ$ とし、12952回反射を測定した。結晶データと構造精密化の結果はTable SXにまとめた。BiRの構造に関する結晶データはCCDC 1530802としてCambridge Crystallographic Data Centreに登録した。

Table SX. Crystallographic data and structure refinements for BiR

	<b>BiR</b>
Empirical formula	$C_{32}H_{33}BiF_6N_3P$
Formula weight	813.56
Crystal system	triclinic
Space group	$P\bar{1}$
$a$ (Å)	10.7064 (18)
$b$ (Å)	11.8965 (17)
$c$ (Å)	14.505 (2)
$\alpha$ (°)	66.593 (6)
$\beta$ (°)	77.962 (6)
$\gamma$ (°)	70.259 (6)
$V$ (Å <sup>3</sup> )	1589.9 (4)
$Z$	2
Temperature (K)	293
$D_c$ (gm <sup>-3</sup> )	1.699
Absorption coefficient (mm <sup>-1</sup> )	5.657
$F$ (000)	796
Crystal size (mm <sup>3</sup> )	$0.33 \times 0.31 \times 0.28$ mm <sup>3</sup>
Measured reflections	12952
Independent reflections	7179 [ $R_{\text{int}} = 0.0300$ ]
Goodness-of fit on $F^2$	1.062
$R$ [ $I > 2\sigma(I)$ ]	$R_1 = 0.0391, wR_2 = 0.0997$
$R$ (all data)	$R_1 = 0.0458, wR_2 = 0.1065$

### 吸収・蛍光スペクトル測定

紫外可視吸収スペクトルはCoolSpeK温度制御セルホルダー (USP-203, Unisoku) を搭載したAgilent 8453フォトダイオードアレイ式分光光度計 (Agilent) を使用して測定した。測定セルは、光路長1 cm、測定容量3 mLの2面透明石英セルを使用した。

蛍光スペクトルは分光蛍光高度計FP6600 (JASCO) を使用し、励起側スリット幅は5 mm、蛍光側スリット幅は6 mmに設定して測定した。測定セルは、光路長1 cm、測定容量3 mLの4面透明石英セルを使用した。

## 蛍光量子収率測定

HEPES緩衝液 (50 mM, pH 7.4) 中にて絶対PL量子収率測定装置Quantaaurus-QY (C11347-01, 浜松ホトニクス) を用いて測定した。

## pH耐久性試験

各pH (3.3, 5.4, 6.2, 6.7, 6.8, 7.3, 7.9, 8.2, 8.9, 11.1) に調製したリン酸緩衝液中 (200 mM, 0.5% DMSO) にて, BiR (5  $\mu$ M) の吸収を測定した。測定は各溶液を調整し, 30分間静置後に行なった。

## サイクリックボルタンメトリー

サイクリックボルタンメトリーは600A electrochemical analyzer (ALS) を用いて測定した。測定には, 補助電極として白金電極, 作用電極としてグラッシーカーボン電極, 基準電極としてAg/Ag<sup>+</sup>電極を用いた。測定サンプル (BiRおよびtetramethylrosamine) は0.1 Mの tetrabutylammonium perchlorate (TBAP) アセトニトリル溶液を用いて1 mMに調製し, 測定前にアルゴンバブリングを10分間行なった。得られた電位はフェロセンを内部標準として, vs (Fc/Fc<sup>+</sup>) に変換した。スキャン速度は0.2 V s<sup>-1</sup>で行なった。

## DFT計算

全ての計算は密度汎関数理論 (DFT) によって行い, 汎関数はB3LYP, 基底関数はLANL2DZを用いた。分子軌道エネルギーはGaussian09を用いて計算した。

## 一重項酸素生成確認試験

光照射には液体ライトガイド (1.2 m,  $\phi = 5$  mm, LLG-0538-4, Thorlabs) を接続した赤色LEDライト (625 nm, M625L3, Thorlabs) を使用し, 電源にはT-Cube LEDドライバー (Thorlabs) を使用した。各光増感剤 (BiRおよびメチレンブルー (MB)) と1,3-ジフェニルベンゾフラン (DPBF, 一重項酸素補足剤) を混合したアセトニトリル溶液の吸収スペクトルを赤色光照射下 (1.2 mW cm<sup>-2</sup>) にて1分毎に測定した。BiRの一重項酸素生成量子収率 ( $\Phi(^1\text{O}_2)_{\text{BiR}}$ ) はDPBFの光酸化の初速度 ( $k$ ) から, 以下の式を用いて算出した。

$$\Phi(^1\text{O}_2)_{\text{BiR}} = \Phi(^1\text{O}_2)_{\text{SP}} \cdot (k_{\text{BiR}}/k_{\text{SP}}) \cdot (F_{\text{SP}}/F_{\text{BiR}})$$

標準光増感剤 (SP) として, メチレンブルー ( $\Phi(^1\text{O}_2) = 0.52$  in CH<sub>3</sub>CN)<sup>44</sup> を用いた。式中のFは $F = 1 - 10^{-\text{OD}}$ からなる係数であり, ODは光照射波長における吸光度の初期値を示す。410 nmにおけるDPBFの初期吸光度を0.8, BiRおよびMBの初期吸光度は0.1として測定溶液を調製した。



光安定性試験については、BiRおよびMBのアセトニトリル溶液 (625 nmにおける初期吸光度が0.1) に対して赤色光照射 ( $1.2 \text{ mW cm}^{-2}$ ) 下, 1分毎, 1時間吸光度の測定を行なった。

### **細胞培養**

HepG2 細胞 (ヒト肝がん細胞) および HEK293 細胞 (ヒト胎児腎細胞) は 1%イーグル最小必須培地 (MEM) 用必須アミノ酸 (NEAA, Gibco), 1 mM ピルビン酸ナトリウム (Wako), 10% ウシ胎児血清 (FBS, Gibco), 1% Antibiotic-Antimycotic (ABAM, Gibco) を添加した MEM 培地 (Gibco) を用い, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベータで培養した。

A549 細胞 (ヒト肺上皮腺がん細胞) は 1 mM ピルビン酸ナトリウム (Wako), 10% FBS (Gibco), 1% Antibiotic-Antimycotic (ABAM, Gibco) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM, Gibco) を用い, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベータで培養した。

TIG-3 細胞 (ヒト胎児線維芽細胞) は 1% MEM 用必須アミノ酸 (NEAA, Gibco), 1 mM ピルビン酸ナトリウム (Wako), 10% ウシ胎児血清 (FBS, Gibco), 1% Antibiotic-Antimycotic (ABAM, Gibco) を添加した E-MEM (L-グルタミン, フェノールレッド含有, Wako) を用い, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベータで培養した。

### **共焦点蛍光イメージング**

共焦点蛍光イメージングは, ガス制御装置付ステージインキュベータ (STX series, 東海ヒット), ディスクスキャン共焦点ユニット (DSU), EMCCDカメラ (ImagEM, 浜松ホトニクス), 130 W水銀ランプを搭載した倒立型共焦点顕微鏡 (IX83, Olympus) を使用して実施した。励起波長, 蛍光フィルター, ダイクロイックミラーは色素に応じて以下の通りに設定した。

- BiR: excitation = 608–648 nm, emission = 672–712 nm, and dichroic mirror = 660 nm.
- ER-Tracker Green: excitation = 465–500 nm, emission = 516–556 nm, and dichroic mirror = 495 nm.
- Hoechst33342: excitation = 330–380 nm, emission = 460–480 nm, dichroic mirror = 400 nm.
- Propidium iodide (PI) : excitation = 465–500 nm, emission = 572–642 nm, dichroic mirror = 562 nm.

細胞は 4 分画ガラスボトムシャーレ (Advanced TC CELLview Cell Culture Dish, Greiner) に  $2.5 \times 10^4$  cells/well で播種し, 適切な培地中で 48 時間培養した後に実験に使用し, イメージングの際にはフェノールレッド不含 Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco) を用いた。共染色実験には 60 倍油浸対物レンズ, その他のイメージングには 20 倍対物レンズを使用した。

## 共染色実験

HepG2 細胞を HBSS で洗浄 (× 3) した後, BiR (1  $\mu\text{M}$ , from 1 mM stock solution in DMSO) および ER-Tracker Green (0.5  $\mu\text{M}$ ) を加えて 30 分間, 37 °C でインキュベートした。その後, HBSS で洗浄し (× 1) 蛍光イメージングを行なった。解析には Image J を用いた。

## PI/Hoechst染色による細胞死アッセイ

細胞をHBSSで洗浄 (× 2) した後, BiRを加え, 37 °Cで30分間インキュベートした。その後, 細胞をHBSSで洗浄 (× 2) し, 顕微鏡の励起光 (608–648 nm, ca. 150 mW  $\text{cm}^{-2}$ ) を最大強度で照射した。Propidium iodide (PI, 5  $\mu\text{M}$ , from 500  $\mu\text{M}$  stock solution in EtOH) と Hoechst 33342 (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , from 0.1 mg  $\text{mL}^{-1}$  stock solution in water) で30分間処理し, HBSSで洗浄 (× 1) した後, 蛍光イメージングを行なった。PIで核染色された細胞 (死細胞) とHoechstで核染色された細胞 (全細胞) の数を計測し, PI陽性細胞/Hoechst染色細胞の比から細胞死の割合を算出した。

## MTTアッセイによる細胞毒性評価

細胞は96ウェルプレート (Techno Plastic Products AG) に $5.0 \times 10^3$  cells/wellで播種し, 培地中で24時間インキュベートした。その後, 細胞を種々の濃度のBiRで37 °Cで24時間インキュベートし, 5 mg  $\text{mL}^{-1}$  MTT試薬を加え4時間, 37 °Cで処理した。その後, DMSOで細胞を溶解し, マイクロプレートリーダー (Multiskan JX plate, Thermo Fisher Scientific) を用いて 570 nmの吸光度を測定し, 細胞生存率を算出した。

## ゼノグラフトマウスモデルを用いた PDT 評価実験

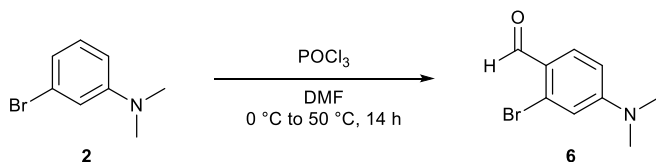
6 週齢の B6 albino (B6N-Tyrc-Brd/BrdCrCrI) マウス (日本チャールス・リバー株式会社より購入) の両足皮下に LLC/luc 細胞 (ルシフェラーゼ発現マウス肺がん細胞,  $1.0 \times 10^6$  cells) を移植した。移植後 17 日目 (腫瘍サイズ約 1 cm) から BiR 投与および光照射を開始した。両足の腫瘍部分に BiR (0.5, 0.1, 0.01 mg/kg in saline (25% DMSO)) を局注し, T-Cube LED ドライバー (Thorlabs) を接続した赤色 LED ライト (625 nm, M625L3, Thorlabs) を用いてマウス左足に光照射 ( $102 \text{ J cm}^{-2}$ ) した。24 時間後, D-luciferin を腹腔内注射 (10  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ ) し, 15 分後に IVIS Imaging System (SPECTRUM, PerkinElmer) を用いて, ルシフェラーゼ発光および BiR 蛍光 ( $\lambda_{\text{ex}} = 605 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 660 \text{ nm}$ ) を測定した。BiR 投与と光照射は 24 時間毎, 5 回行ない, ルシフェラーゼの発光から腫瘍のサイズを評価した。

ゼノグラフトマウスモデルを使用した *in vivo* 実験は東京工業大学生命理工学院近藤科江教授, 口丸高弘元助教 (現, 自治医科大学講師) の協力のもと, 東京工業大学動物実験等管理規則を順守し, 東京工業大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

## 第二章に関する実験

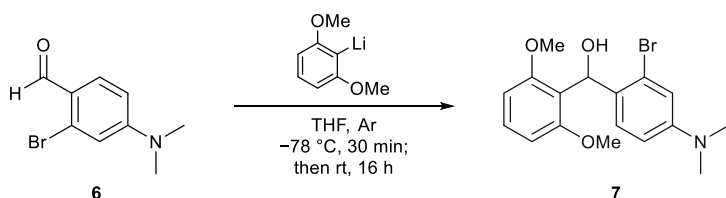
### BiRNH, BiRAcおよびBiRGluの合成

#### 2-Bromo-4-(dimethylamino)benzaldehyde (**6**)<sup>61</sup>



窒素雰囲気、氷冷下にて塩化ホスホリル (752  $\mu$ L, 8.09 mmol, 1.2 eq.) を脱水 DMF (10 mL) に加え、0 °C で 15 分間攪拌した後、化合物 **2** (1.35 g, 6.75 mmol, 1.0 eq.) を加えた。さらに 0 °C にて 10 分間攪拌後、反応液を 50 °C に昇温し、14 時間攪拌した。反応液は飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (40 mL) で中和した後、得られた混合溶液を酢酸エチル/*n*-ヘキサン混合溶媒 (1/1, 40 mL  $\times$  3) で抽出した。有機層は飽和食塩水 (100 mL) で洗浄し、硫酸マグネシウム乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/*n*-ヘキサン) にて精製し、目的化合物を白色固体として得た (1.33 g, 5.83 mmol, 86%)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  10.09 (s, 1H), 7.81 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 6.80 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H), 6.64 (dd,  $J = 8.8, 2.4$  Hz, 1H), 3.08 (s, 6H).

#### [2-Bromo-4-(dimethylamino)phenyl](1,3-dimethoxyphenyl)methanol (**7**)



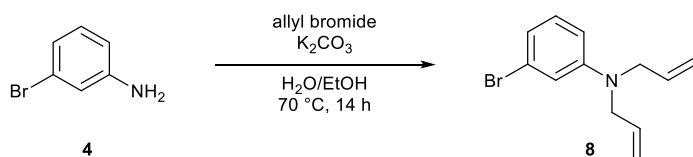
アルゴン雰囲気下にて、-78 °C に冷却した 2-ブロモ-1,3-ジメトキシベンゼン (1.60 g, 7.37 mmol, 1.0 eq.) の脱水 THF 溶液 (10 mL) に対して、*sec*-BuLi (7.70 mL, 8.09 mmol, 1.1 eq. 1.05 M シクロヘキサン/*n*-ヘキサン溶液) を滴下した。-78 °C にて 30 分間攪拌した後、カンユラを用いて化合物 **6** (1.68 g, 7.37 mmol, 1.0 eq.) の THF 溶液 (10 mL) に上記の反応溶液を滴下した。-78 °C にて 30 分間攪拌した後、反応溶液を室温に戻し、16 時間攪拌した。その後、反応溶液に水 (50 mL) を加えて反応を停止させ、得られた混合溶液をクロロホルム (50 mL  $\times$  3) で抽出した。有機層は飽和食塩水 (100 mL) で洗浄し、硫酸ナトリウムにて乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/*n*-ヘキサン) にて精製し、目的化合物を黄色アモルファスとして得た (2.47 g, 6.74 mmol, 92%)。

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.24 (t,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 6.98 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 6.95 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 6.61 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 6.49 (dd,  $J = 8.6, 2.9$  Hz, 1H), 6.46 (d,  $J = 10.9$  Hz, 1H), 4.40 (d,  $J = 11.5$  Hz, 1H), 3.82 (s, 6H), 2.90 (s, 6H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  157.85, 150.51, 129.41, 128.92, 128.68, 125.73, 118.01, 116.47, 110.80, 104.38, 68.93, 55.74, 40.25.

HRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  calcd. for  $[\text{M}+\text{Na}]^+ \text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{Br}_2\text{NNaO}_3^+$  388.0519; found 388.0496.

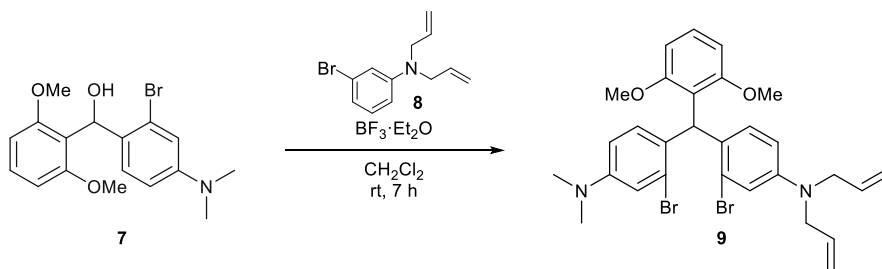
### 3-Bromo-*N,N*-diallylaniline (**8**)<sup>62</sup>



3-ブロモアニリン **4** (400 mg, 2.33 mmol, 1.0 eq.) の水/エタノール混合溶液 (1/4, 25 mL) に炭酸カリウム (1.28 g, 9.26 mmol, 4.0 eq) と臭化アリル (605  $\mu\text{L}$ , 7.00 mmol, 3.0 eq.) を加え,  $70^\circ\text{C}$  にて 14 時間攪拌した。反応液を室温に戻した後, 不溶物をセライトろ過にて取り除き, 溶媒を減圧留去した。得られた残渣を水 (60 mL) に懸濁した後, 酢酸エチル (60 mL  $\times$  3) で抽出した。有機層は飽和食塩水 (60 mL) で洗浄し, 硫酸マグネシウムにて乾燥後, 溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/*n*-ヘキサン) にて精製し, 目的化合物を無色液体として得た (595 mg, quant.)。

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.02 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 6.80–6.77 (m, 2H), 6.59 (dd,  $J = 8.0, 2.3$  Hz, 1H), 5.86–5.79 (m, 2H), 5.18–5.14 (m, 4H), 3.90–3.89 (m, 4H).

### *N,N*-Diallyl-3-bromo-4-[[2-bromo-4-(dimethylamino)phenyl]1,3-dimethoxyphenylmethyl]aniline (**9**)



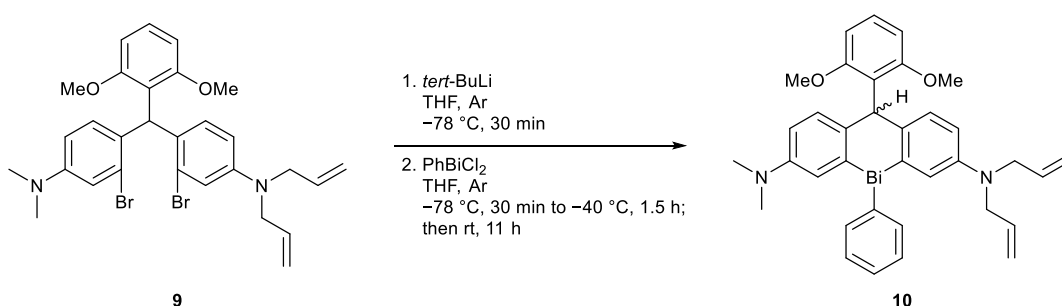
化合物 **7** (1.59 g, 4.34 mmol, 1.0 eq.) と化合物 **8** (1.31 g, 5.20 mmol, 1.2 eq.) のジクロロメタン溶液 (20 mL) に三ふっ化ほう素ジエチルエーテル錯体 (1.10 mL, 8.75 mmol, 2.0 eq.) を滴下した。室温にて 7 時間攪拌した後, 反応液を水 (50 mL) で処理し, 得られた混合溶液をクロロホルム (50 mL  $\times$  3) で抽出した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥した後, 溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/*n*-ヘキサン) にて精製し, 目的化合物を白色アモルファスとして得た (1.83 g, 3.05 mmol, 70%)。

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.18 (t,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 6.90 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 6.87–6.84 (m, 3H), 6.56–6.54 (m, 3H), 6.50 (dd,  $J$  = 8.6, 2.9 Hz, 1H), 6.21 (s, 1H), 5.85–5.77 (m, 2H), 5.16–5.12 (m, 4H), 3.84 (d,  $J$  = 5.2 Hz, 4H), 3.55 (s, 6H), 2.88 (s, 6H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  158.9, 149.5, 147.8, 133.8, 131.9, 131.7, 130.4, 129.8, 127.8, 125.6, 125.5, 120.2, 116.1, 116.0, 115.8, 111.0, 110.9, 105.5, 56.1, 52.6, 45.4, 40.5.

HRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  calcd. for  $[\text{M}+\text{Na}]^+ \text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{Br}_2\text{N}_2\text{NaO}_2^+$  623.0708; found 623.0710.

## 2-Diallylamino-9,10-dihydro-10-(2,6-dimethoxy)phenyl-7-dimethylamino-9-bisanthracene (10)



アルゴン雰囲気下,  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  に冷却した化合物 **9** (1.81 g, 3.01 mmol, 1.0 eq) の脱水 THF 溶液 (40 mL) に対し, *tert*-BuLi (7.90 mL, 12.6 mmol, 4.2 eq. 1.60 M *n*-ペンタン溶液) を滴下した。 $-78\text{ }^\circ\text{C}$  にて 30 分間攪拌した後, ジクロロフェニルビスマス (1.08 g, 3.03 mmol, 1.0 eq.) の THF 懸濁液 (10 mL) を反応溶液に滴下した。 $-78\text{ }^\circ\text{C}$  にて 30 分間攪拌した後, 反応溶液を 1.5 時間かけて  $-40\text{ }^\circ\text{C}$  に昇温した。その後, 室温に戻しさらに 11 時間攪拌した。反応溶液に水 (50 mL) を加えて反応を停止させ, 得られた混合溶液を酢酸エチル (80 mL  $\times$  3) で抽出した。有機層は飽和食塩水 (80 mL) で洗浄し, 硫酸ナトリウム乾燥後, 溶媒を減圧留去した。得られた残渣を DIOL シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/*n*-ヘキサン) にて精製し, 目的化合物を無色アモルファスのジアステレオマー混合物として得た (1.02 g, 1.40 mmol, 47%, diastereomer A : B = 1 : 1.3)。

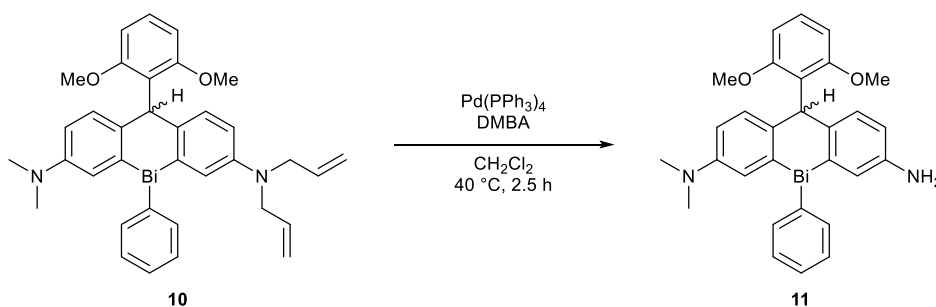
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Diastereomer A:  $\delta$  8.01 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 2H), 7.37–7.29 (m, 4H), 7.20–7.16 (m, overlapped, 1H), 7.10–7.03 (m, overlapped, 3H), 6.71 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 6.47 (dd, overlapped,  $J$  = 8.9, 2.6 Hz, 1H), 6.39 (dd,  $J$  = 8.6, 2.9 Hz, 1H), 5.71 (s, 1H), 5.72–5.65 (m, 2H), 5.10–5.05 (m, 4H), 3.85–3.74 (m, overlapped, 2H), 3.69–3.65 (m, 2H), 3.67 (s, 6H), 2.75 (s, 6H); Diastereomer B:  $\delta$  7.83 (dd,  $J$  = 8.0, 1.1 Hz, 2H), 7.55 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 7.53 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 7.24 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 7.20–7.16 (m, overlapped, 1H), 7.10–7.03 (m, overlapped, 3H), 6.53 (dd,  $J$  = 8.9, 2.6 Hz, 1H), 6.50 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 6.47 (dd, overlapped,  $J$  = 8.9, 2.6 Hz, 1H), 6.39 (s, 1H), 5.79–5.75 (m, 2H), 5.03–4.97 (m, 4H), 3.85–3.74 (m, overlapped, 4H), 3.75 (s, 6H), 2.83 (s, 6H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  159.2, 157.4, 154.5, 154.3, 154.0, 152.9, 152.8, 152.6, 152.5, 150.2, 149.3, 148.0, 147.3, 138.6, 137.6, 134.4, 134.3, 133.4, 132.8, 132.3, 131.4, 129.9, 129.8,

129.7, 129.5, 128.5, 128.2, 127.4, 126.9, 126.7, 124.2, 121.5, 120.9, 120.8, 120.6, 117.5, 115.9, 115.8, 113.4, 113.0, 112.0, 111.4, 104.8, 104.4, 56.0, 55.4, 52.9, 52.8, 52.1, 51.4, 41.0, 40.8.

HRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  calcd. for [M+H]<sup>+</sup> C<sub>35</sub>H<sub>38</sub>BiN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> 727.2332; found 727.2716.

## 2-Amino-9,10-dihydro-10-(2,6-dimethoxy)phenyl-7-dimethylamino-9-bismaanthracene (11)



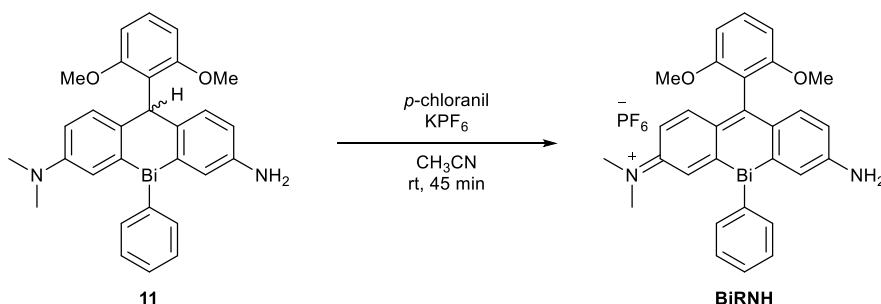
アルゴン雰囲気下にて Pd (PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (85.0 mg, 73.6 μmol, 5 mol%) と *N,N*-ジメチルバルビツール酸 (DMBA, 920 mg, 5.89 mmol, 4.0 eq.) を化合物 **10** (1.07 g, 1.47 mmol, 1.0 eq. dr = 1 : 1.3) のジクロロメタン溶液 (30 mL) に加えた。反応溶液は 40 °C にて 2.5 時間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 mL) にて中和した。得られた混合溶液を酢酸エチル (50 mL × 3) で抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を DIOL シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/*n*-ヘキサン) にて精製した。得られたジアステレオマー混合物はジエチルエーテルに懸濁し、白色沈殿物をろ取した。ろ液は減圧留去し、目的化合物を淡水色アモルファスとして得た (440 mg, 0.681 mmol, 46%, **11-cis** : **11-trans** = 1 : 0.16)。ろ取した白色沈殿物は減圧乾燥し、純粋な **11-trans** として得た (150 mg, 0.232 mmol, 16%)。

<sup>1</sup>H NMR: **11-cis** (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 7.91 (dd,  $J = 7.7, 1.4$  Hz, 2H), 7.42–7.30 (m, 4H), 7.08 (d,  $J = 2.9$  Hz, 1H), 6.96–6.94 (m, 2H), 6.84 (dd,  $J = 8.6, 1.1$  Hz, 1H), 6.80 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 6.43 (dd,  $J = 8.6, 2.9$  Hz, 1H), 6.30 (dd,  $J = 8.3, 2.6$  Hz, 1H), 5.55 (s, 1H), 3.83 (brs, overlapped, 2H), 3.64 (s, 6H), 2.71 (t,  $J = 7.7$  Hz, 6H); **11-trans** (400 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO): δ 7.76 (dd,  $J = 7.8, 1.4$  Hz, 2H), 7.43 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.27 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.21–7.24 (m, 2H), 7.15–7.19 (m, 1H), 7.09–7.05 (m, 2H), 6.88 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 6.59 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 6.48 (dd,  $J = 8.7, 2.7$  Hz, 1H), 6.48 (dd,  $J = 8.6, 2.7$  Hz, 1H), 6.30 (dd,  $J = 8.2, 2.3$  Hz, 1H), 6.25 (s, 1H), 4.76 (brs, 2H), 3.754 (s, 6H), 2.76 (s, 6H).

<sup>13</sup>C NMR: **11-cis** (100 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ 159.7, 157.7, 154.2, 153.0, 151.1, 147.8, 138.7, 132.5, 132.1, 130.6, 130.2, 129.3, 129.2, 129.0, 128.3, 123.2, 122.0, 114.2, 112.6, 105.5, 55.8, 52.0, 40.6 (the peaks of **11-trans** were not detected); **11-trans** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 157.3, 154.9, 152.7, 152.4, 149.4, 144.7, 137.9, 135.0, 133.1, 130.0, 129.8, 129.7, 127.0, 126.9, 124.4, 123.1, 120.9, 115.8, 113.5, 104.9, 56.1, 52.2, 40.8.

HRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  calcd. for [M+H]<sup>+</sup> C<sub>29</sub>H<sub>30</sub>BiN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> 647.2106; found 647.2099.

## BiRNH



化合物 **11** (40.1 mg, 62.0  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq. *cis* : *trans* = 1 : 0.16) のアセトニトリル溶液 (3 mL) に  $\text{KPF}_6$  (22.5 mg, 0.122 mmol, 2.0 eq.) と *p*-クロラニル (30.5 mg, 0.124 mmol, 2.0 eq.) を加え、室温にて 45 分間攪拌した。その後、不溶物をセライトろ過にて取り除き、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー (DIOL シリカゲル, アセトン/クロロホルム) にて精製し、目的化合物を濃紺色固体として得た (21.4 mg, 27.1  $\mu\text{mol}$ , 44%)。

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $\delta$  7.87 (dd,  $J = 8.0, 1.1$  Hz, 2H), 7.72 (d,  $J = 2.9$  Hz, 1H), 7.62 (d,  $J = 9.7$  Hz, 1H), 7.57 (d,  $J = 9.7$  Hz, 1H), 7.53 (t,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 7.46 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 7.35 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.25 (tt,  $J = 7.4, 1.3$  Hz, 1H), 6.83 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 6.79 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 6.61 (dd,  $J = 9.7, 2.9$  Hz, 1H), 6.49 (dd,  $J = 9.5, 2.6$  Hz, 1H), 6.23 (brs, 2H), 3.65 (s, 3H), 3.57 (s, 3H), 3.25 (s, 6H).

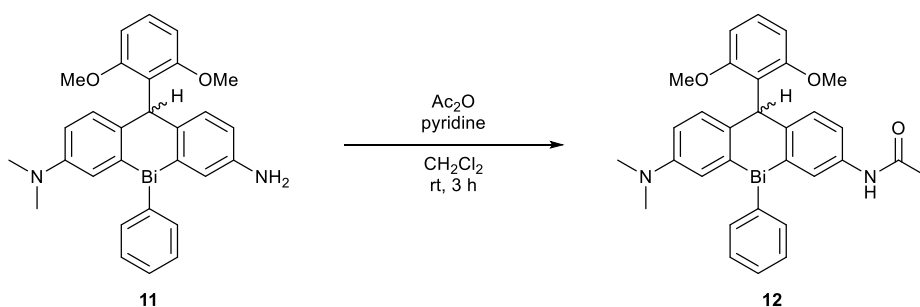
$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ): 176.4, 168.2, 167.5, 157.7, 157.7, 156.6, 155.8, 144.0, 143.9, 137.3, 131.5, 131.2, 128.5, 126.1, 125.9, 125.4, 125.2, 116.0, 114.9, 105.0, 104.7, 56.4, 56.4, 41.0.

$^{19}\text{F}$  NMR (376 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $\delta$  -73.5 (d,  $J_{\text{FP}} = 707$  Hz, 6F).

HRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  calcd. for  $[\text{M}-\text{PF}_6]^{+}$   $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{BiN}_2\text{O}_2^{+}$  645.1949, found 645.1923.

m.p. 193.0–196.0 °C (decomp.).

## 2-Acetylamino-9,10-dihydro-10-(2,6-dimethoxy)phenyl-7-dimethylamino-9-bismaanthracene (12)



ピリジン (150  $\mu\text{L}$ , 1.86 mmol, 10 eq.) と無水酢酸 (88.0  $\mu\text{L}$ , 0.931 mmol, 5.0 eq.) を化合物 **11** (120 mg, 0.186 mmol, 1.0 eq. *cis* : *trans* = 1 : 0.16) のジクロロメタン溶液 (5 mL) に加えた

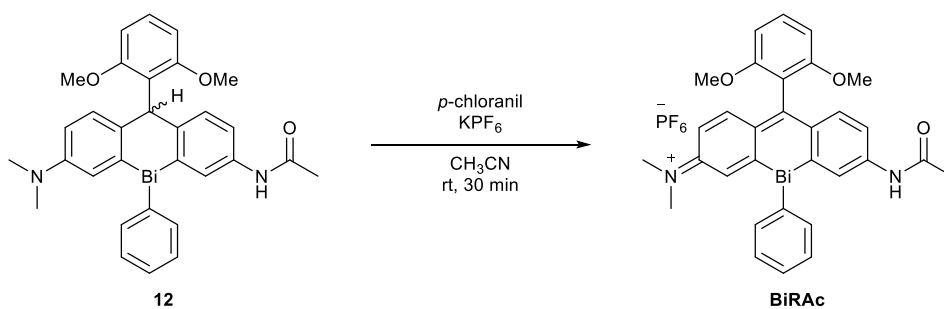
後、室温で3時間攪拌した。反応液を水 (10 mL) で処理した後、得られた混合溶液をクロロホルム (10 mL × 3) で抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を DIOL シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/*n*-ヘキサン) にて精製し、目的化合物を薄紫色固体として得た (82.4 mg, 0.120 mmol, 64%, **12-cis** : **12-trans** = 1 : 0.16)。

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): **12-cis**: δ 7.93 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.46 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.38–7.35 (m, 2H), 7.30–7.09 (m, 5H), 6.71 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.50–6.45 (m, 2H), 5.68 (s, 1H), 3.64 (s, 6H), 2.74 (s, 6H), 1.87 (s, 3H); **12-trans**: δ 7.78 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 7.64–7.61 (m, 3H), 7.30–7.09 (m, 7H), 7.02–7.01 (m, 2H), 6.54 (dd, *J* = 8.3, 2.6 Hz, 1H), 3.72 (s, 6H), 2.80 (s, 6H), 1.91 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 168.3, 159.1, 157.2, 154.4, 153.0, 152.4, 150.3, 149.4, 140.6, 139.6, 138.8, 137.8, 137.1, 136.3, 132.5, 131.1, 130.0, 129.8, 129.7, 128.7, 128.6, 128.5, 127.9, 127.7, 123.7, 121.3, 120.6, 120.1, 119.1, 116.9, 113.5, 112.1, 104.7, 104.5, 56.0, 55.4, 52.5, 52.1, 40.8, 40.7, 24.2 (several peaks were overlapped).

HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* calcd. for [M+H]<sup>+</sup> C<sub>31</sub>H<sub>32</sub>BiN<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> 689.2211, found 689.2209.

## BiRAc



化合物 **12** (75.0 mg, 0.109 mmol, 1.0 eq. *cis* : *trans* = 1 : 0.16) のアセトニトリル用溶液 (2 mL) に KPF<sub>6</sub> (40.2 mg, 0.218 mmol, 2.0 eq.) と *p*-クロラニル (40.2 mg, 0.163 mmol, 1.5 eq.) を加え、室温で30分間攪拌した。その後、不溶物をセライトろ過にて取り除き、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を DIOL シリカゲルカラムクロマトグラフィー (アセトン/クロロホルム) にて精製し、目的化合物を暗紫色固体として得た (52.8 mg, 63.4 μmol, 58%)。

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.46 (s, 1H), 8.26 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.78–7.75 (m, 3H), 7.71 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.63 (dd, *J* = 8.3, 2.3 Hz, 1H), 7.47 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.21 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.10 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.65 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.63 (dd, *J* = 9.6, 2.6 Hz, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.51 (s, 3H), 3.36 (s, 3H), 3.28 (s, 3H), 2.14 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 176.3, 172.1, 170.3, 162.8, 157.2, 157.0, 156.9, 156.4, 146.7, 144.4, 140.4, 136.7, 131.9, 131.4, 130.9, 128.9, 128.1, 127.6, 126.4, 120.1, 117.0, 116.1, 104.2, 103.9, 56.1, 56.0, 41.8, 41.5, 24.6.

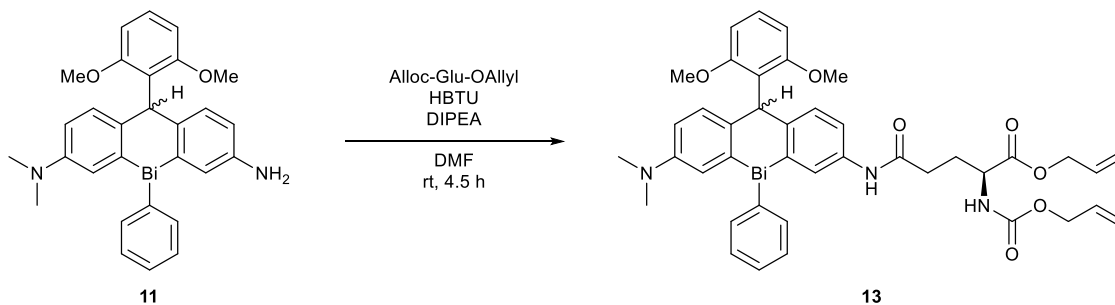
<sup>19</sup>F NMR (376 MHz, CD<sub>3</sub>CN): δ -73.5 (d, *J*<sub>FP</sub> = 706 Hz, 6F).



HRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  calcd. for  $[M-PF_6]^- C_{31}H_{30}BiN_2O_3^+$  687.2055, found 687.2030.

m.p. 195.0–196.5 °C (decomp.).

### 化合物 13



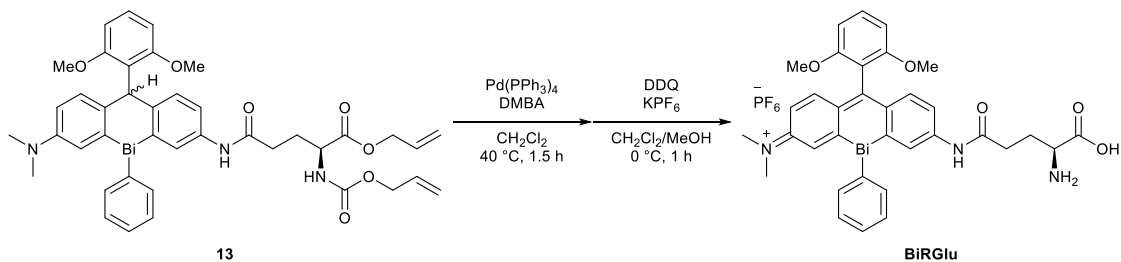
Alloc-Glu-OAllyl<sup>63</sup> (240 mg, 0.885 mmol, 1.1 eq. *cis* : *trans* = 1 : 0.16) と DIPEA (280  $\mu$ L, 1.61 mmol, 2.0 eq.) の混合 DMF 溶液 (3 mL) と HBTU (335 mg, 0.885 mmol, 1.1 eq.) を化合物 **11** (120 mg, 0.186 mmol, 1.0 eq.) の DMF 溶液 (5 mL) に加えた。室温にて 4.5 時間攪拌した後、反応溶液を水 (20 mL) で処理し、得られた混合溶液を酢酸エチル/*n*-ヘキサン (4/1, 25 mL  $\times$  3) で抽出した。有機層は飽和食塩水 (25 mL) で洗浄し、硫酸マグネシウム乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を DIOL シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/*n*-ヘキサン) にて精製し、目的化合物を薄紫色アモルファスとして得た (545 mg, 0.605 mmol, 75%, dr = 1 : 0.24)。

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): Major diastereomer:  $\delta$  8.00 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 7.65–7.61 (m, 1H), 7.56–7.52 (m, 1H), 7.40–7.33 (m, 4H), 7.17 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 7.11–7.13 (m, 2H), 6.73 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 6.48–6.51 (m, 1H), 5.93–5.76 (m, 2H), 5.69 (s, 1H), 5.54 (br, 1H), 5.31–5.15 (m, 4H), 4.60–4.59 (m, 2H), 4.53–4.43 (m, 2H), 4.41–4.32 (m, 1H), 3.68 (s, 6H), 2.77 (s, 6H), 2.42–2.31 (m, 2H), 2.31–2.21 (m, 1H), 2.04–1.93 (m, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  171.6, 169.8, 159.1, 157.2, 156.2, 154.3, 152.9, 152.4, 152.4, 150.3, 149.4, 139.7, 139.6, 138.7, 137.8, 137.1, 137.1, 136.3, 132.4, 131.3, 130.0, 129.8, 129.7, 128.8, 128.6, 127.6, 127.4, 127.2, 126.9, 123.7, 121.3, 120.6, 119.9, 119.1, 118.8, 118.0, 1167.0, 113.5, 112.1, 104.7, 104.5, 66.1, 65.9, 56.0, 55.4, 53.5, 52.5, 52.1, 40.8, 40.7, 33.4, 28.8, 28.7.

HRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  calcd. for  $[M+H]^+ C_{41}H_{45}BiN_3O_7^+$  900.3056, found 900.3037.

## BiRGlu



アルゴン雰囲気下にて Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (18.1 mg, 15.7 μmol, 5 mol%) と *N,N*-ジメチルバルビツール酸 (DMBA, 195 mg, 1.25 mmol, 4.0 eq.) を化合物 **13** (282 mg, 0.313 mmol, 1.0 eq. dr = 1 : 0.24) のジクロロメタン溶液 (3 mL) に加え, 40 °C にて 1.5 時間攪拌した。その後, 溶媒を減圧留去し, 得られた残渣を DIOL シリカゲルカラムクロマトグラフィー (メタノール/クロロホルム) にて精製した。得られた脱保護体 (196 mg, 0.252 mmol, 1.0 eq.) をジクロロメタン/メタノール (1/1, 5 mL) に溶解し, 氷冷下 KPF<sub>6</sub> (92.8 mg, 0.504 mmol, 2.0 eq.) と 2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-1,4-ベンゾキノン (DDQ, 86.0 mg, 0.379 mmol, 1.5 eq.) を加え, 1 時間攪拌した。その後, 溶媒を減圧留去し, 得られた残渣を逆相分取 HPLC にて精製し, 目的化合物を紫色粉末として得た (15.7 mg, 17.1 μmol, 5.5%)。

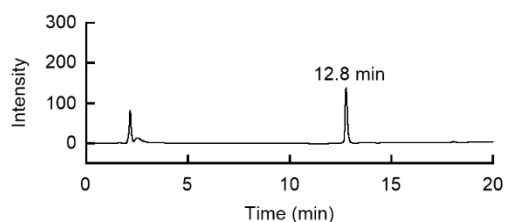
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO): δ 8.53 (s, 1H), 8.27 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.60–7.54 (m, 3H), 7.43 (s, 1H), 7.32 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.21 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.97–6.94 (m, 1H), 6.92 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.60 (s, 1H), 3.56 (s, 3H), 3.49 (s, 3H), 3.37 (overlapped with H<sub>2</sub>O, 3H), 2.54 (s, 2H), 1.96 (s, 2H).

<sup>19</sup>F NMR (376 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO): δ -72.5 (d, *J*<sub>FP</sub> = 711 Hz, 6F).

HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z* calcd. for C<sub>34</sub>H<sub>35</sub>BiN<sub>3</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup> [M-PF<sub>6</sub><sup>-</sup>]<sup>+</sup> 774.2375, found 774.2347.

m.p. 210.9–215.0 °C (decomp.).

### BiRGlu の HPLC 解析



HPLC conditions: Solvent A/B = 20/80 for 5 min, and then 20/80–80/20 for 15 min. The eluate was monitored at 254 nm. Retention time = 12.8 min. Solvent A: 0.05% (v/v) formic acid in water, Solvent B: 0.05% (v/v) formic acid in acetonitrile.

## **吸収・蛍光スペクトル測定**

紫外可視吸光スペクトルはCoolSpeK温度制御セルホルダー (USP-203, Unisoku) を搭載したAgilent 8453フォトダイオードアレイ式分光光度計 (Agilent) を使用して測定した。測定セルは、光路長1 cm, 測定容量3 mLの2面透明石英セル, および光路長0.1 cm, 測定容量5  $\mu$ Lの2面透明石英セルを使用した。

蛍光スペクトル測定は第一章と同様の方法にて実施した。

## **蛍光量子収率測定**

第一章と同様の方法にて実施した。

## **pH耐久性試験**

各pH (4.1, 4.7, 5.2, 5.8, 6.5, 7.1, 7.8, 8.4, 9.3, 10.2) に調製したリン酸緩衝液中 (200 mM, 0.5% DMSO) にて, BiRNH (5  $\mu$ M) およびBiRAc (5  $\mu$ M) の吸収を測定した。測定は各溶液を調製し, 室温にて30分間静置した後に行なった。

## **溶解性確認試験**

様々な濃度に調製したBiRNH, BiRAc, BiRGlu (1, 5, 10, 25, 50, 100, 200  $\mu$ M)のアセトニトリルおよびHEPES緩衝液溶液 (50 mM, pH 7.4, 1%DMSO) の吸収を測定した。

## **一重項酸素生成確認試験**

光照射には液体ライトガイド (1.2 m,  $\phi = 5$  mm, LLG-0538-4, Thorlabs) を接続した赤色LEDライト (625 nm, M625L3, Thorlabs) および緑色LEDライト (530 nm, M530L3, Thorlabs) を使用し, 電源にはT-Cube LEDドライバー (Thorlabs) を使用した。各光増感剤 (BiRX = BiRNH, BiRAc, BiRGlu) と1,3-ジフェニルベンゾフラン (DPBF, 一重項酸素補足剤) の混合溶液について, 光照射下 ( $1.1 \text{ mW cm}^{-2}$ ) にて1分毎, 30分間吸収スペクトル測定を行なった。BiRXの一重項酸素生成量子収率 ( $\Phi(^1\text{O}_2)_{\text{BiRX}}$ ) はDPBFの光酸化の初速度 ( $k$ ) から, 以下の式を用いて算出した。

$$\Phi(^1\text{O}_2)_{\text{BiRX}} = \Phi(^1\text{O}_2)_{\text{SP}} \cdot (k_{\text{BiRX}}/k_{\text{SP}}) \cdot (F_{\text{SP}}/F_{\text{BiRX}})$$

標準光増感剤 (SP) として, メチレンブルー ( $\Phi(^1\text{O}_2) = 0.52$  in  $\text{CH}_3\text{CN}$ )<sup>44</sup> およびローズベンガル ( $\Phi(^1\text{O}_2) = 0.54$  in  $\text{CH}_3\text{CN}$ )<sup>64</sup> を用いた。式中のFは $F = 1 - 10^{-\text{OD}}$ からなる係数であり, ODは光照射波長における吸光度の初期値を示す。DPBFの初期濃度は60  $\mu$ M, BiRNH, BiRAcおよびBiRGluの初期濃度は1.7  $\mu$ Mになるように各サンプルを調製した。

光安定性試験については, BiRX (5  $\mu$ M) のHEPES緩衝液 (50 mM, pH 7.4, 0.5% DMSO) に対して光照射 ( $1.1 \text{ mW cm}^{-2}$ ) 下, 5分毎, 2時間吸光度の測定を行なった。

熱安定性試験については, BiRX (5  $\mu$ M) の HEPES 緩衝液 (50 mM, pH 7.4, 0.5% DMSO) に対して加熱条件 (37 °C, 60 °C) 下, 5 分毎, 2 時間吸光度の測定を行なった。

### **BiRGluとGGTの反応における生成物分析**

HEPES緩衝液中 (50 mM, pH 7.4, 5% DMSO), BiRGlu (10  $\mu$ M) にGGT (10 U mL<sup>-1</sup>) を添加し, インキュベートした。インキュベート後, 5分, 1時間, 2.5時間時点の反応液をサンプリングしHPLC (Solvent A: 0.05% (v/v) ギ酸水溶液, Solvent B: 0.05% (v/v) ギ酸アセトニトリル溶液, Solvent A/B = 20/80 to 80/20 for 5–20 min) で分析した。溶出液は254, 526および615 nmにおける吸光度にてモニタリングした。

### **細胞培養**

A549細胞 (ヒト肺上皮腺がん細胞) およびSKOV3ip1細胞 (ヒト卵巣がん細胞) は1 mMピルビン酸ナトリウム (Wako), 10% ウシ胎児血清 (FBS, SIGMA), 50 U mL<sup>-1</sup>ベンジルペニシリンカリウム (ペニシリン, Meiji), 50 ng mL<sup>-1</sup>硫酸ストレプトマイシン (ストレプトマイシン, Meiji), 50 ng mL<sup>-1</sup>硫酸カナマイシン (カナマイシン, Meiji) を添加したD-MEM (Wako) を培地として用い, 37 °C, 5%CO<sub>2</sub>インキュベータを用いて培養した。

### **共焦点蛍光イメージング**

共焦点蛍光イメージングは, ガス制御装置付ステージインキュベータ (STX series, 東海ヒット), ディスクスキャン共焦点ユニット (DSU), EMCCDカメラ (ImagEM, 浜松ホトニクス), レーザーダイオード (LDI with 7 laser lines, 89 North) を搭載した倒立型共焦点顕微鏡 (Olympus IX83) を使用して実施した。励起波長, 蛍光フィルター, ダイクロイックミラーは色素に応じて以下の通りに設定した。

- BiRGlu and BiRNH: excitation = 640 nm, emission = 672–712 nm, and dichroic mirror = 660 nm.
- ProteoGREEN-gGlu: excitation = 470 nm, emission = 516–556 nm, and dichroic mirror = 495 nm.
- ER-Tracker Green: excitation = 470 nm, emission = 516–556 nm, and dichroic mirror = 495 nm.
- Hoechst: excitation = 405 nm, emission = 423–467 nm, dichroic mirror = 414 nm.
- Propidium iodide (PI) : excitation = 555 nm, emission = 572–642 nm, dichroic mirror = 562 nm.

細胞はガラスボトムシャーレ (Advanced TC CELLview Cell Culture Dish, Greiner) に  $5.0 \times 10^4$  cells/well となるよう播種し, D-MEM 中で 24 時間培養した後に実験に使用した。イメージングの際にはフェノールレッド不含 Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco) を用いた。共染色実験には 60 倍の油浸対物レンズ, その他のイメージングには 20 倍対物レンズを使用した。

### GGT発現確認

A549細胞あるいはSKOV3ip1細胞をHBSSで洗浄 (× 2) した後, ProteoGREEN-gGlu (1  $\mu\text{M}$ , from 0.1 mM stock solution in DMSO) を加え30分間, 37 °Cでインキュベートした。その後, HBSSで洗浄し (× 1) 蛍光イメージングを行なった。

### GGT阻害実験

A549細胞をHBSSで洗浄 (× 2) した後, GGT阻害剤 (GGSTOP, 100  $\mu\text{M}$ , from 10 mM stock solution in water, Wako) を加えて1時間, 37 °Cでインキュベートした。その後, BiRGlu (1  $\mu\text{M}$ , from 0.2 mM stock solution in DMSO) を加え, 2時間, 37 °Cでインキュベートした後に蛍光イメージングを行なった。

### 共染色実験

A549細胞をHBSSで洗浄 (× 2) した後, BiRNH (1  $\mu\text{M}$ , from 0.2 mM stock solution in DMSO) およびER-Tracker Green (0.2  $\mu\text{M}$ , from 20  $\mu\text{M}$  stock solution in DMSO) を加えて30分間, 37 °Cでインキュベートした。その後, HBSSで洗浄し (× 1) 蛍光イメージングを行なった。共局在の解析はFijiのColoc2プログラムを用いてピアソン相関係数 ( $R_{\text{coloc}}$ ) を算出することによって行なった (n = 3)。

### PI/Hoechst染色による細胞死アッセイ

細胞をHBSSで洗浄 (× 2) した後, BiRGlu (1  $\mu\text{M}$ , from 0.2 mM stock solution in DMSO) を加え, 0.5, 1, 2, 4時間, 37 °Cでインキュベートした。その後, 細胞を顕微鏡の励起光 (640 nm, ca. 14 mW  $\text{cm}^{-2}$ ) で照射した。Propidium iodide (PI, 5  $\mu\text{M}$ , from 500  $\mu\text{M}$  stock solution in DMSO) とHoechst 33342 (1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , from 0.1 mg  $\text{mL}^{-1}$  stock solution in water) で30分間処理した後, 蛍光イメージングを行なった。PIで核染色された細胞 (死細胞) とHoechstで核染色された細胞 (全細胞) の数を計測し, PI陽性細胞/Hoechst染色細胞の比から細胞死の割合を算出した。

### MTTアッセイによる細胞毒性評価

光毒性試験の際には, 細胞を96ウェルプレート (Techno Plastic Products AG) に $1.0 \times 10^4$  cells/wellで播種し, 培地中で24時間インキュベートした。細胞を種々の濃度のBiRXで37 °C, 2時間インキュベートした後, 赤色LEDライト (625 nm, 20 J  $\text{cm}^{-2}$ , M625L3, Thorlabs) および緑色LEDライト (530 nm, 20 J  $\text{cm}^{-2}$ , M530L3, Thorlabs) を用いて光照射を行なった。その後, 5 mg  $\text{mL}^{-1}$  MTT試薬で4時間, 37 °Cで処理した後, DMSOで細胞を溶解した。24時間毒性試験の際には, 細胞を96ウェルプレート (Techno Plastic Products AG) に $5.0 \times 10^3$  cells/wellで播種し, 培地中で24時間インキュベートした。細胞を種々の濃度のBiRXで37 °C, 24時間インキュベートした後5 mg  $\text{mL}^{-1}$  MTT試薬で4時間, 37 °Cで処理した。その後, DMSOで細胞を溶解し,

マイクロプレートリーダー (SpectraMax iD3, Molecular Devices) を用いて560 nmの吸光度を測定し、細胞生存率を算出した。

## 略語一覽

Ac<sub>2</sub>O: acetic anhydride

Alloc-Glu-OAllyl: *N*-allyloxycarbonyl-L-glutamic acid 1-allyl ester

DFT: density functional theory

DIPEA: *N,N*-diisopropylethylamine

DMBA: 1,3-dimethylbarbitic acid

D-MEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DMF: *N,N*-dimethylformamide

DMSO: dimethylsulfoxide

DPBF: 1,3-diphenylbenzofuran

FBS: fetal bovine serum

GGT;  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase

HBSS: Hanks' balanced salt solution

HBTU: 1-[bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-benzotriazolium 3-oxide hexafluorophosphate

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

HOMO: highest occupied molecular orbital

LUMO: lowest unoccupied molecular orbital

HPLC: high performance liquid chromatography

MB: methylene blue

MEM: minimum essential medium

MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide

Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>: tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0)

PDT: photodynamic therapy

PI: propidium iodide

THF: tetrahydrofuran

## 引用文献

- 1 P. de Marcillac, N. Coron, G. Dambier, J. Leblanc and J.-P. Moalic, *Nature*, 2003, **422**, 876–878.
- 2 Y. Hong, Y.-T. Lai, G. C.-F. Chan and H. Sun, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2015, **112**, 3211–3216.
- 3 G. G. Briand and N. Burford, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2601–2658.
- 4 D. M. Keogan and D. M. Griffith, *Molecules*, 2014, **19**, 15258–15297.
- 5 T. E. Sox and C. A. Olson, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1989, **33**, 2075–2082.
- 6 K. D. Fine and E. L. Lee, *Gastroenterology*, 1998, **114**, 29–36.
- 7 L.-M. Mai, C.-Y. Lin, C.-Y. Chen and Y.-C. Tsai, *Biomaterials*, 2003, **24**, 3005–3012.
- 8 S. A. Puia, S. J. Renou, E. A. Rey, M. B. Guglielmotti and C. E. Bozzini, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 2009, **38**, 785–789.
- 9 T. Ollevier, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 2740–2755.
- 10 F. Mathia and P. Szolcsányi, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 2830–2839.
- 11 D. H. R. Barton, J. P. Kitchin and W. B. Motherwell, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1978, 1099–1100.
- 12 M. Postel and E. Duñach, *Coord. Chem. Rev.*, 1996, **155**, 127–144.
- 13 Y. Matano and H. Nomura, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, **41**, 3028–3031.
- 14 S. Combes and J.-P. Finet, *Tetrahedron*, 1998, **54**, 4313–4318.
- 15 P. K. Koech and M. J. Krische, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 5350–5351.
- 16 S. Yasuike, M. Nishioka, N. Kakusawa and J. Kurita, *Tetrahedron Lett.*, 2011, **52**, 6403–6406.
- 17 H. Suzuki, T. Ikegami and Y. Matano, *Synthesis*, 1997, **1997**, 249–267.
- 18 T. Ooi, R. Goto and K. Maruoka, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 10494–10495.
- 19 S. Balasubramaniam, S. Kumar, A. P. Andrews, B. Varghese, E. D. Jemmis and A. Venugopal, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2019, **2019**, 3265–3269.
- 20 K. M. Marczenko, S. Jee and S. S. Chitnis, *Organometallics*, 2020, **39**, 4287–4296.
- 21 L. D. Freedman and G. O. Doak, *Chem. Rev.*, 1982, **82**, 15–57.
- 22 K. Iuchi, K. Akagi and T. Yagura, *J. Pharmacol. Sci.*, 2009, **582**, 573–582.
- 23 Y. Liu, J. Lei, L. Tang, Y. Peng, C. Au, Y. Chen and S. Yin, *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, **139**, 826–835.
- 24 T. Murafuji, Y. Fujiwara, D. Yoshimatsu and I. Miyakawa, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**, 519–525.
- 25 J. Ohshita, S. Matsui, R. Yamamoto, T. Mizumo, Y. Ooyama, Y. Harima, T. Murafuji, K.



- Tao, Y. Kuramochi, T. Kaikoh and H. Higashimura, *Organometallics*, 2010, **29**, 3239–3241.
- 26 J. Chan, S. C. Dodani and C. J. Chang, *Nat. Chem.*, 2012, **4**, 973–984.
- 27 K. P. Carter, A. M. Young and A. E. Palmer, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 4564–4601.
- 28 L. D. Lavis and R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.*, 2014, **9**, 855–866.
- 29 J. B. Grimm, A. J. Sung, W. R. Legant, P. Hulamm, S. M. Matlosz, E. Betzig and L. D. Lavis, *ACS Chem. Biol.*, 2013, **8**, 1303–1310.
- 30 Y. Koide, Y. Urano, K. Hanaoka, W. Piao, M. Kusakabe, N. Saito, T. Terai, T. Okabe and T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 5029–5031.
- 31 Y. Koide, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Terai and T. Nagano, *ACS Chem. Biol.*, 2011, **6**, 600–608.
- 32 X. Zhou, R. Lai, J. R. Beck, H. Li and C. I. Stains, *Chem. Commun.*, 2016, **52**, 12290–12293.
- 33 M. Grzybowski, M. Taki, K. Senda, Y. Sato, T. Ariyoshi, Y. Okada, R. Kawakami, T. Imamura and S. Yamaguchi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2018, **57**, 10137–10141.
- 34 M. K. Gannon, J. J. Holt, S. M. Bennett, B. R. Wetzell, T. W. Loo, M. C. Bartlett, D. M. Clarke, G. A. Sawada, J. W. Higgins, G. Tomblin, T. J. Raub and M. R. Detty, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 3328–3341.
- 35 G. Dejoux, M. Laly, I. E. Valverde and A. Romieu, *Dye. Pigment.*, 2018, **159**, 262–274.
- 36 T. Y. Ohulchanskyy, D. J. Donnelly, M. R. Detty and P. N. Prasad, *J. Phys. Chem. B*, 2004, **108**, 8668–8672.
- 37 B. Calitree, D. J. Donnelly, J. J. Holt, M. K. Gannon, C. L. Nygren, D. K. Sukumaran, J. Autschbach and M. R. Detty, *Organometallics*, 2007, **26**, 6248–6257.
- 38 S. Yamaguchi and K. Tamao, *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.*, 1998, 3693–3702.
- 39 W. Piao, K. Hanaoka, T. Fujisawa, S. Takeuchi, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, T. Tahara, T. Nagano and Y. Urano, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 13713–13719.
- 40 M. Chiba, Y. Ichikawa, M. Kamiya, T. Komatsu, T. Ueno, K. Hanaoka, T. Nagano, N. Lange and Y. Urano, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2017, **56**, 10418–10422.
- 41 J. Ohshita, *Macromol. Chem. Phys.*, 2009, **210**, 1360–1370.
- 42 A. Soran, H. J. Breunig, V. Lippolis, M. Arca and C. Silvestru, *Dalt. Trans.*, 2009, 77–84.
- 43 A. Schulz and A. Villinger, *Organometallics*, 2011, **30**, 284–289.
- 44 Y. Usui, H. Koike and Y. Kurimura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1987, **60**, 3373–3378.
- 45 M. Beija, C. A. M. Afonso and J. M. G. Martinho, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 2410–2433.
- 46 S. L. Mangold, R. T. Carpenter and L. L. Kiessling, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 2997–3000.
- 47 L. D. Lavis, T.-Y. Chao and R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.*, 2006, **1**, 252–260.
- 48 A. Ogasawara, M. Kamiya, K. Sakamoto, Y. Kuriki, K. Fujita, T. Komatsu, T. Ueno, K. Hanaoka, H. Onoyama, H. Abe, Y. Tsuji, M. Fujishiro, K. Koike, M. Fukayama, Y. Seto and Y. Urano, *Bioconjug. Chem.*, 2019, **30**, 1055–1060.

- 49 T. Hirayama, K. Okuda and H. Nagasawa, *Chem. Sci.*, 2013, **4**, 1250–1256.
- 50 K. Hanaoka, Y. Kagami, W. Piao, T. Myochin, K. Numasawa, Y. Kuriki, T. Ikeno, T. Ueno, T. Komatsu, T. Terai, T. Nagano and Y. Urano, *Chem. Commun.*, 2018, **54**, 6939–6942.
- 51 D. M. Goldberg, *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 1980, **12**, 1–58.
- 52 Y. Urano, M. Sakabe, N. Kosaka, M. Ogawa, M. Mitsunaga, D. Asanuma, M. Kamiya, M. R. Young, T. Nagano, P. L. Choyke and H. Kobayashi, *Sci. Transl. Med.*, 2011, **3**, 110–119.
- 53 F. Liu, Z. Wang, T. Zhu, W. Wang, B. Nie, J. Li, Y. Zhang, J. Luo and L. Kong, *Talanta*, 2019, **191**, 126–132.
- 54 Z. Luo, L. Feng, R. An, G. Duan, R. Yan, H. Shi, J. He, Z. Zhou, C. Ji, H.-Y. Chen and D. Ye, *Chem. – A Eur. J.*, 2017, **23**, 14778–14785.
- 55 D. Yu, J. K. Wolf, M. Scanlon, J. E. Price and M. Hung, *Cancer Res.*, 1993, **53**, 891–898.
- 56 P. G. Seybold, M. Gouterman and J. Callis, *Photochem. Photobiol.*, 1969, **9**, 229–242.
- 57 J. T. Ngo, S. R. Adams, T. J. Deerinck, D. Boassa, F. Rodriguez-Rivera, S. F. Palida, C. R. Bertozzi, M. H. Ellisman and R. Y. Tsien, *Nat. Chem. Biol.*, 2016, **12**, 459–465.
- 58 Y. Wang, H. Chen, C. Li and P. Wu, *Dye. Pigment.*, 2019, **170**, 107635.
- 59 T. Pastierik, P. Šebej, J. Medalová, P. Štacko and P. Klán, *J. Org. Chem.*, 2014, **79**, 3374–3382.
- 60 T. Nagano, Y. Wada and Y. Urano, 2005, #US2008/0249321 A1.
- 61 J. Garcia, J. Sorrentino, E. J. Diller, D. Chapman and Z. R. Woydziak, *Synth. Commun.*, 2016, **46**, 475–481.
- 62 T. Egawa, Y. Koide, K. Hanaoka, T. Komatsu, T. Terai and T. Nagano, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 4162–4164.
- 63 H.-K. Cui, Y. Guo, Y. He, F.-L. Wang, H.-N. Chang, Y.-J. Wang, F.-M. Wu, C.-L. Tian and L. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 9558–9562.
- 64 F. Wilkinson, W. P. Helman and A. B. Ross, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 1993, **22**, 113–262.

## 主論文目録

本学位論文内容は、以下の発表論文による。

- 1 Tasuku Hirayama, Akari Mukaimine, Kenta Nishigaki, Hitomi Tsuboi, Shusaku Hirose, Kensuke Okuda, Masahiro Ebihara and Hideko Nagasawa, Bismuth-rhodamine: a new red light-excitable photosensitizer, *Dalton Trans.* **2017**, *46*, 15991–15995.
- 2 Akari Mukaimine, Tasuku Hirayama and Hideko Nagasawa, Asymmetric bismuth-rhodamines as an activatable fluorogenic photosensitizer, *Org. Biomol. Chem.*, **2021**, *in press* (DOI: 10.1039/D0OB02456B).