

博士論文

光誘起電子移動を作用原理とする
可視光励起光ラベル化剤群の開発

井上 大輝

目次

1. 序論.....	4
1-1. 光ラベル化剤とは.....	5
1-2. 光ラベル化剤の歴史.....	6
1-3. Photoaffinity Labeling.....	12
1-4. 紫外光照射による細胞傷害.....	16
1-5. 本研究の目的.....	19
1-6. Diazoacetate.....	20
1-7. カルベン.....	21
1-8. 長波長化戦略 その1: ジアゾの共役系を拡大.....	24
1-9. 長波長化戦略 その2: ジアゾを一電子還元.....	34
2. Fluorescein を母核とした 光ラベル化剤の開発.....	38
2-1. 合成.....	39
2-2. 光学特性.....	40
2-3. 光誘起電子移動の有無.....	41
2-4. 光反応特性.....	44
2-5. 5DA2Me の可視光による分解の有無.....	65
2-6. 三重項励起状態の関与.....	67
2-7. Wolff 転移.....	72
2-8. 抗体認識.....	73
2-9. 小括.....	75
3. 光反応量子収率の改善.....	76
3-1. d-PeT と a-PeT.....	77
3-2. ラジカルアニオン, ラジカルカチオン状態での脱窒素反応.....	79

3-3. d-PeT が優先して起こる光ラベル化剤の設計.....	82
3-4. 合成.....	83
3-5. 光学特性.....	84
3-6. 水中での反応性.....	85
3-7. タンパク質との反応性.....	86
3-8. 光反応量子収率.....	87
3-9. 小括.....	90
4. 更なる長波長化.....	91
4-1. 分子設計, 合成.....	92
4-2. 光学特性.....	93
4-3. 光反応特性.....	95
4-4. 暗所での安定性.....	100
4-5. 小括.....	101
5. Photoaffinity Labeling への応用.....	104
5-1. 標的タンパク質とリガンド.....	105
5-2. SA-PEG(n)-5DA2Me-Fluo の合成.....	106
5-3. 精製 CA-II での検討.....	107
5-4. Lysate 存在下での検討.....	108
5-5. Living RBCs の内在性 CA-II.....	109
5-6. 光ラベル化部位の同定.....	110
6. 一細胞蛍光標識への応用.....	115
6-1. 一細胞蛍光標識.....	116
6-2. 細胞内滞留性の評価.....	117
6-3. 一細胞蛍光標識.....	120

7. 総括・今後の展望.....	121
7-1. 総括.....	122
7-2. 今後の展望.....	124
8. 実験の部.....	128
8-1. Synthesis.....	129
8-2. Characterization	139
8-3. Computation Details	181
8-4. Cartesian Coordinates and Total Electron Energies.....	182
8-5. Photophysical and Electrochemical Properties.....	203
8-6. Photoreaction Properties.....	205
8-7. Photolabeling of Proteins	208
8-8. Cell Culture and Fluorescence Microscopy	212
9. 参考文献.....	214
10. 謝辞.....	223

1. 序論

1-1. 光ラベル化剤とは

光ラベル化剤とは、暗所では安定であるが光照射を受けると活性種を産生し、タンパク質などの生体分子と反応して共有結合を形成する分子である。主に、標的とするタンパク質を機能性分子（蛍光色素やビオチンなど）で標識する目的で用いられる。光ラベル化剤から産生される活性種は、他のラベル化剤と比較して、反応性に富んでおり、タンパク質中の様々なアミノ酸残基と共有結合を形成できる。また生細胞内への応用を考えると、他のラベル化剤は常に活性型として存在するため、標的とする生体分子に到達するまでに、水分子やGSHなどの求核種と意図しない反応を引き起こし得る。一方で、光ラベル化剤は暗所では不活性型であるため、標的とする生体分子に到達した後、光を照射し活性種を産生することで、細胞内の求核種との反応を最小限に抑えることができる。光ラベル化剤は、このような利点を有しており、多くの研究者から愛用されている。

1-2. 光ラベル化剤の歴史

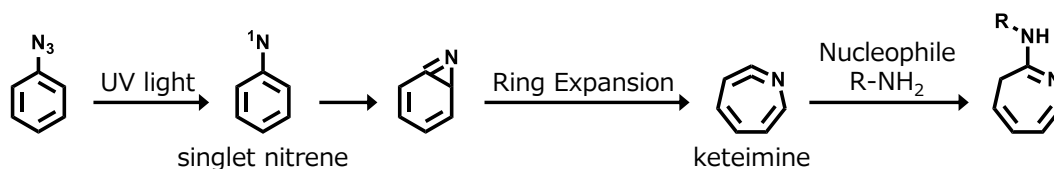
1962年, Frank H. Westheimer らによって光ラベル化という方法論が提案されて以来¹, これまでに数多くの光ラベル化剤が開発されてきた. 主に, 暗所での安定性, 生体分子への傷害性, ラベル化効率, アミノ酸残基への選択性, という観点から改良が行われ, 現在では, arylazide, benzophenone, diazirine が主に使用されている.

	1962	1969	1973	1973	1976	1980	1980	1983	1989	1989	2016	2017	2018
光ラベル化剤													
活性種													
波長 (nm)	254	300	362	365	350	353	295	312	350	313	302	365	365

Figure 1-1 | Photolabeling reagents and their active species. diazoacetyl (1962)¹, arylazide (1969)², aryl-diazirine (1973)³, benzophenone (1973)⁴, diazotrifluoropropionyl (1976)⁵, diazirine (1980)⁶, aryl-diazonium (1980)⁷ ※ energy transfer from tryptophan, diazocyclopentadienylcarbonyl (1983)⁸, diazocyclohexadienones (1989)⁹, polyfluorinated arylazide (1989)¹⁰, 2-aryl-5-carboxytetrazole (2016)¹¹, 4-azidophthalimide (2017)¹², thienyl-substituted α -ketoamide (2018)¹³.

■ Arylazide

Arylazide は 265-275 nm の紫外光を照射することで、脱窒素反応が進行し一重項 nitrene を生成する。その後、速やかに環拡大反応が進行し keteimine を産生する。Keteimine は、求電子性の活性種として働き、求核性のアミノ酸残基と共有結合を形成する (Scheme 1-1)。Arylazide は、置換基サイズの小ささ、合成の容易さが利点として評価され、現在汎用されている。



Scheme 1-1 | Photoreaction scheme of arylazide.

一方で、arylazide の欠点としては、活性種の産生に必要な紫外光が UV-C と呼ばれる波長域に属し (265-275 nm)、タンパク質などの生体分子に損傷を与えることが挙げられる¹⁴。¹⁵ Arylazide の 3 位にニトロ基を導入した 3-nitrophenylazide は、吸収波長が長波長化し 365 nm の光によって活性種を産生することができ、より温和な光ラベル化剤として利用される場合もある^{2, 16}。

その他の欠点としては、arylazide がチオール類によって還元され、arylamine となり得ることが挙げられる¹⁷。この反応は pH 10 付近の塩基性条件で最も効率的に進行するものの、生理的条件とされている pH 7.4 でも同様に進行する¹⁸。

もう一つの欠点としては, arylazide の活性種である keteimine は求電子剤として働くため, 近傍に求核性のアミノ酸残基がない場合は, タンパク質との間に共有結合を形成できないことが挙げられる. 一方, 三重項 nitrene は, C-H insertion やアルケンへの付加反応を引き起こすことができるため, より多くの種類のアミノ酸残基との間に共有結合を形成することが期待できる. Arylazide の 2,6 位または 3,5 位にフッ素が導入された類縁体 (2,6- or 3,5-difluoro-arylazide) は, arylazide と比較して, 一重項 nitrene から三重項 nitrene への項間交差の速度 (k_{isc}) は大きく変化しない. 一方で, 2,6-difluoro-arylazide から生成する一重項 nitrene の寿命 ($\tau_{\text{singlet phenylnitrenes}}$) は, arylazide および 3,5-difluoro-arylazide と比較して長く, その寿命の逆数 ($1/\tau_{\text{singlet phenylnitrenes}}$) は k_{isc} と同程度である. つまり, 2,6 位へのフッ素導入によって環拡大反応が抑制され, 三重項 nitrene への項間交差が相対的に早くなり, 三重項 nitrene が活性種として働くことが知られており, polyfluorinated arylazide (2,3,5,6-tetrafluoro-arylazide) が三重項カルベンを活性種とする光ラベル化剤として利用されている.

Table 1-1 | Lifetimes ($\tau_{\text{singlet phenylnitrenes}}$) and intersystem crossing rate constants (k_{isc}) of non-, 2,6- and 3,5-substituted singlet phenylnitrenes.

	k_{isc} (10^6 s^{-1})	$\tau_{\text{singlet phenylnitrenes}}$ (10^{-9} s)	$1/\tau_{\text{singlet phenylnitrenes}}$ (10^6 s^{-1})	Solvent
Arylazide	3.2±0.3	~1	1000~	Pentane
3,5-Difluoro-arylazide	3.1±1.5	~3	333~	Pentane
2,6-Difluoro-arylazide	2.4±0.3	240±20	4.2	Hexane

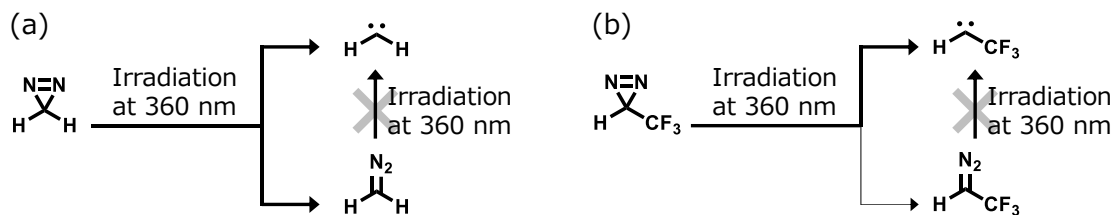
■ Benzophenone

Benzophenone は 360 nm 付近の紫外光を照射することで、活性種である diradical を産生する。Diradical は水分子と反応せず、methionine^{19,20} などのアミノ酸残基と共有結合を形成する。そのため、diradical の近傍に共有結合を形成できる生体分子が存在しない場合、diradical は benzophenone へと戻り、360 nm 付近の紫外光によって再度 diradical を産生する。この光反応特性は、タンパク質へのラベル化効率という観点からは利点であるが、活性種の寿命、つまりラベル化半径という観点からは欠点となる。また、その他の欠点としては、置換基サイズの大きさが挙げられる。しかし、360 nm という arylazide よりも長い波長で機能すること、合成の容易さが利点として評価され、現在汎用されている。

■ Diazirine

Diazirine は 360 nm の光を照射することで、脱窒素反応が進行し carbene を産生する。Carbene は、C-H、O-H insertion やアルケンへの付加反応などを引き起こすため、多くの種類のアミノ酸残基との間に共有結合を形成することができる。Diazirine は、置換基サイズの小ささ、既存の光ラベル化剤の中では比較的温和であること、活性種である carbene の反応性、phenyl の有無に限らず 360 nm の光によって機能すること、が利点として評価され、現在最も汎用されている。一方で、diazirine の欠点としては、合成の煩雑さが挙げられる。しかし近年、diazirine の合成方法について盛んに研究が行われており、以前よりも容易に合成できるようになっている。

Diazirine は 360 nm の光によって carbene を産生する以外にも、diazo への異性化反応が進行することが知られている (Scheme 1-2-a)。その異性化により生じた diazo 化合物は 360 nm の光をほとんど吸収しないため、diazirine の光反応効率を低下させる原因となっている。しかし、diazirine に trifluoromethyl を導入した trifluoromethyl-diazirine では、diazo への異性化反応が抑制されるため (Scheme 1-2-b)、現在では trifluoromethyl-diazirine が一般的に利用されている。



Scheme 1-2 | Photoreaction scheme of (a) diazirine and (b) trifluoromethyl-diazirine.

また、diazirine に導入される置換基によって、一重項 carbene と三重項 carbene の安定性が変化することが知られており、diazirine, trifluoromethyl-phenyl-diazirine では三重項 carbene が、phenyl-diazirine, chloro-phenyl-diazirine では一重項 carbene がより安定である。

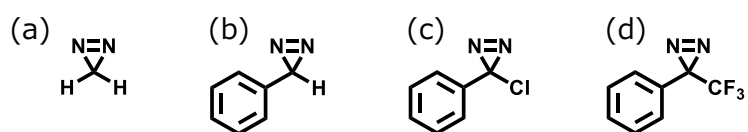


Figure 1-2 | The structure of (a) diazirine, (b) phenyl-diazirine, (c)chloro-phenyl-diazirine and (d) trifluoromethyl-phenyl-diazirine.

1-3. Photoaffinity Labeling

光ラベル化剤の特性を活かした応用としては、photoaffinity labeling と呼ばれる「リガンドの標的タンパク質の同定」が挙げられる。この手法で用いる分子は、光ラベル化剤の他に、薬剤と検出用官能基、計 3 つの要素から構成されており、下記の流れで標的タンパク質の同定が行われる。この手法により、リガンドの標的タンパク質や、リガンドの結合部位の同定が行われ、標的未知の薬剤の機能解明に大きく貢献してきた。

1. Photoaffinity labeling プローブが、細胞もしくはライセート内の標的タンパク質と可逆的に結合する。
2. 紫外光により活性種を産生し、標的タンパク質と共有結合する。
3. 細胞を溶解した後、ビオチンなどの Tag を目印に免疫沈降を行い、LC-MS/MS 装置によってラベル化タンパク質を同定する。

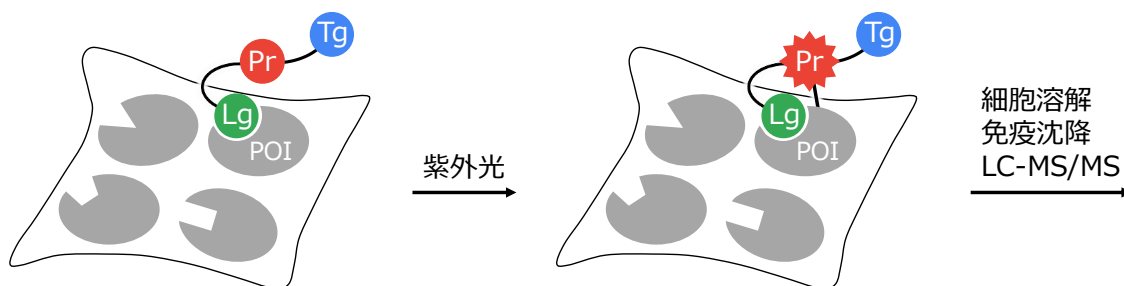


Figure 1-3 | The procedure of photoaffinity labeling. Lg: Ligand. Pr: Photolabeling reagent. Tg: Tag. POI: Protein of Interest.

1-3-1. ケミカルプロテオミクスへの応用

リガンドの標的タンパク質の同定や，リガンドの結合部位の同定を行う場合，photoaffinity labeling プローブのリガンド部位は，標的タンパク質に対して選択的なものが望ましい．一方で，リガンド部位を脂質²¹や金属キレータ²²などにする事で，リガンド部位と相互作用のある多種多様な標的タンパク質を網羅的に光ラベル化することも可能である．これは，ケミカルプロテオミクスと呼ばれる photoaffinity labeling の一つの応用例である．

Micah J. Niphakis らは²¹，リガンド部位を arachidonoyl ethanolamide と呼ばれる脂質，光ラベル化剤を diazirine，検出用官能基を alkyne とした photoaffinity labeling プローブを設計した．そして，arachidonoyl ethanolamide と相互作用する多種多様な標的タンパク質を網羅的に同定することを試みた．

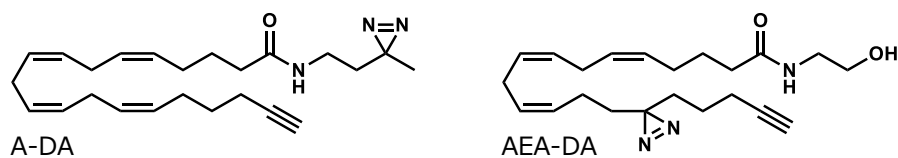


Figure 1-4 | Structures of photoaffinity labeling probes featuring arachidonoyl (A-DA and AEA-DA), as well as photoreactive (diazirine) and alkyne groups.

前述の photoaffinity labeling プローブで光ラベル化した標的タンパク質を LC-MS/MS 装置で分析した結果、A-DA では 442 種類、AEA-DA では 317 種類の標的タンパク質が同定された。次に、SILAC (stable isotope labeling by amino acids in cell culture) によって、既知薬剤 (Competitor) の有無で、photoaffinity labeling プローブによる光ラベル化が阻害されるかを精査することで、既知薬剤と標的タンパク質との間の相互作用を探索できると考えた。その結果、一部の既知薬剤と標的タンパク質との組み合わせでは MS intensity が減弱しており (Competed Target)、既知薬剤と標的タンパク質との相互作用が示唆された。

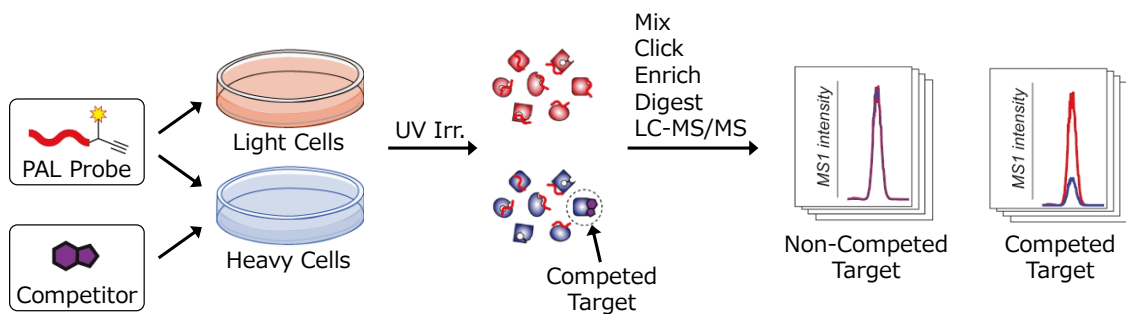


Figure 1-5 | Scheme for *in situ* competitive profiling of ligands using PAL probes (A-DA or AEA-DA). Isotopically light and heavy cells are treated with vehicle (DMSO) or competitor ligand, respectively, along with a lipid probe for 30 min. Cells are then UV irradiated and lysed, and light and heavy lysates are combined, enriched, and digested for LC-MS/MS analysis. Ligand targets are designated as proteins that show light/heavy ratios of ≥ 3.0 .

最終的に Figure 1-6 のような既知薬剤と標的タンパク質との相互作用マップが得られている。この手法は、既知薬剤をそのまま利用できるという点で優れており、photoaffinity labeling プローブの標的タンパク質という制約は付くものの、既知薬剤とタンパク質との相互作用を広範に探索する上で有用な手法である。

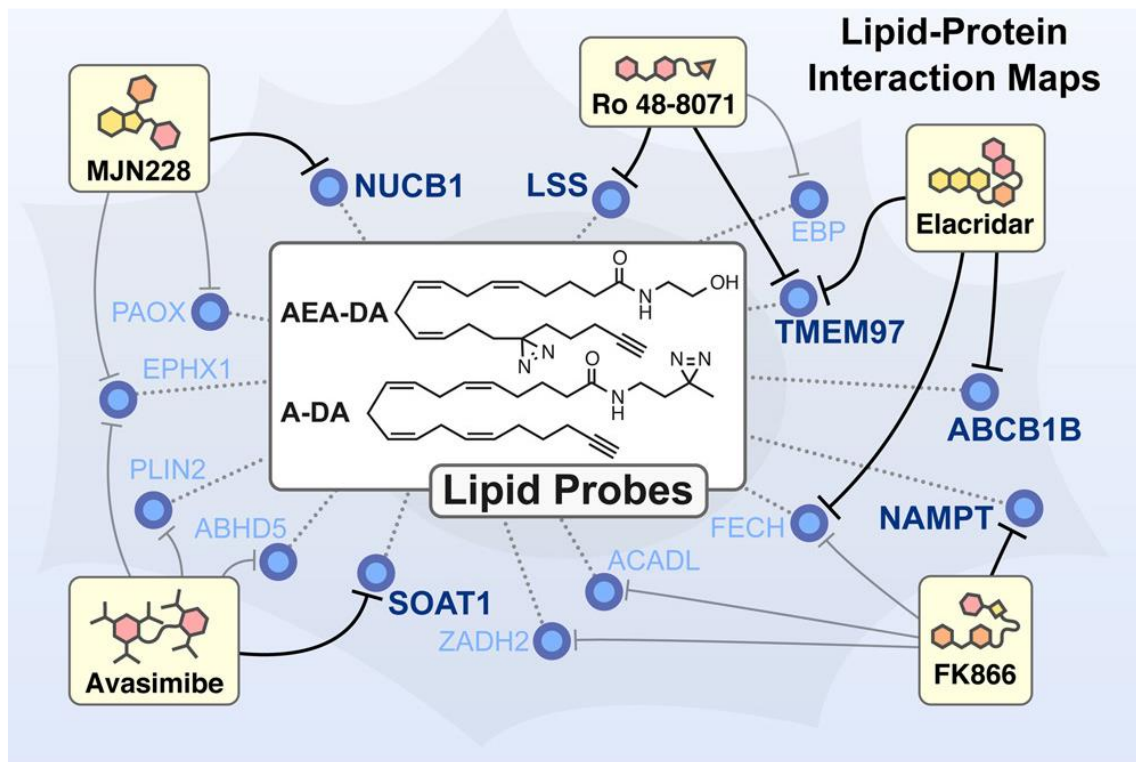


Figure 1-6 | A global map of lipid-binding proteins and their ligandability in cells.

1-4. 紫外光照射による細胞傷害

1-4-1. Diazirine の活性種産生に必要な UV-A の積算光量

紫外線はその波長により，短波長（UV-C: 100-280 nm），中波長（UV-B: 280-320 nm），長波長（UV-A: 320-400 nm）に分類される．光ラベル化剤の中で最も汎用される diazirine は UV-A によって活性種であるカルベンを産生する．その際に必要となる積算光量（Radiant Exposure）は，数 J/cm² ~ 数十 J/cm² である（Table 1-2）．

Table 1-2 | Radiant exposure of UV-A to release carbene from trifluoromethyl-diazirine. W = J/sec.

Device	Irradiance ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$)	Irradiation Time (sec)	Radiant Exposure (J/cm ²)	Ref.
Spectroline, SB-100P	4,800	900	4.32	23
Spectroline, ML-3500S	50,000	600	30.0	24
UVP Inc, BA100AF	11,000	300	3.30	25

1-4-2. UV-A による ROS, RNS 産生

UV-A の細胞傷害性を精査するため G. R. Aitken らは、積算光量 2 J/cm^2 の UV-A を照射した後、細胞を可溶化し、電気化学的手法を用いて ROS (Figure 1-7) および RNS (Figure 1-8) を検出した²⁶。それぞれ、UV-A の照射によってシグナルが検出されており、そのシグナルは SOD (superoxide dismutase, 活性酸素の分解酵素) の添加、または L-NAME (NG-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, nitric oxide synthase の阻害剤) の事前添加によって抑制されることを示した。先述したように、diazirine からカルベンを産生させるのに必要な積算光量は数 J/cm^2 ~ 数十 J/cm^2 であるので、diazirine を生細胞系に適用した場合、カルベン産生と同時に ROS および RNS も産生されると考えられる。この ROS および RNS が、タンパク質や DNA に酸化損傷を与え、細胞傷害を引き起こすことも報告されており^{27, 28, 29}、diazirine は細胞傷害性を有する光ラベル化剤であることが言える。

一方で、azide は活性種産生に UV-B または UV-C が必要であり、ROS および RNS 産生だけでなく、DNA 内の核酸が直接励起されることで、シクロブタン型ピリミジンダイマー形成、ピリミジン (6-4) ピリミドン形成などの DNA 損傷を引き起こし得る³⁰。そのため、diazirine よりも細胞傷害性が高い光ラベル化剤であると言える。また、benzophenone は diazirine よりも多くの UV-A 積算光量が必要であり、汎用されている光ラベル化剤は総じて細胞傷害性を有していると言える。

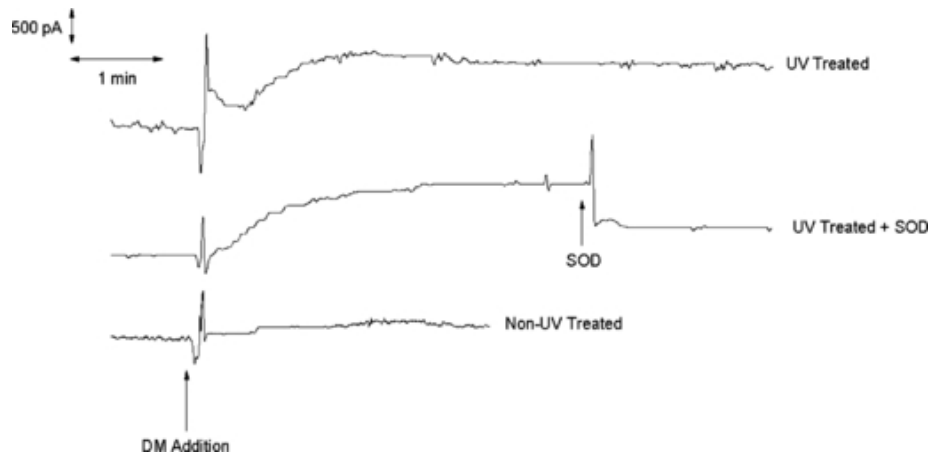


Figure 1-7 | Time course of O_2^- production in \pm UV-irradiated HaCaT cells following stimulation with the membrane-permeabilizing agent DM. The increase in current was proportional to the flux of O_2^- generation by the cells. The addition of SOD brought about a rapid decrease in current as O_2^- produced by the cells was scavenged.

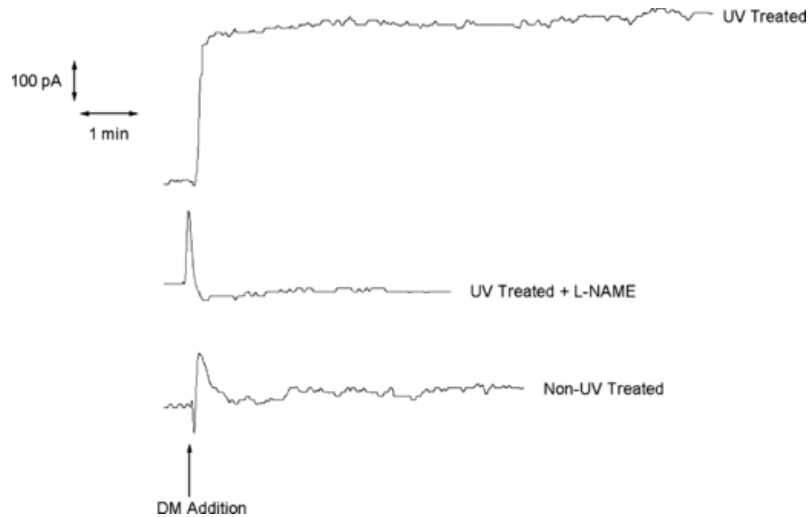


Figure 1-8 | Time course of NO production in \pm UV-irradiated HaCaT cells following stimulation with the membrane-permeabilizing agent DM. The increase in current was proportional to the degree of NO generation by the cells. No increase in NO generation was observed following the stimulation of UV-irradiated cells with DM in the presence of L-NAME.

1-5. 本研究の目的

先述したように、数多くの光ラベル化剤がこれまでに開発されてきたにも関わらず、可視光で機能する光ラベル化剤は未だ報告されていない。この理由として、長波長化戦略が確立されておらず、光ラベル化剤の長波長化は困難な課題であることが挙げられる。さらに、photoaffinity labeling の用途に限って言えば、多少の細胞傷害性があっても問題ないと考えられているため、光ラベル化剤の長波長化は困難な課題である割に、差し迫った需要がないことも大きな要因として挙げられる。しかし、光ラベル化剤の長波長化が達成されれば、より温和な条件での光ラベル化が可能となるだけでなく、異なる波長の光で、複数の時刻、空間での光ラベル化も可能となる。以上より、可視光で機能する光ラベル化剤は、生命科学研究の発展に資する新たなケミカルツールになり得ると考え、本研究の目的を「可視光励起光ラベル化剤群の開発」とした。

1-6. Diazoacetate

本研究の目的を達成するため、diazoacetate 誘導体に着目した (Figure 1-9). これはジアゾ化合物の一つであり、紫外光励起または一電子還元によって活性種であるカルベンを産生することが知られている. 本学修士課程では、紫外光励起によるカルベン産生に着目し、「1-8. 長波長化戦略 その1: ジアゾの共役系を拡大」を提案した. また博士課程では、一電子還元によるカルベン産生に着目し、「1-9. 長波長化戦略 その2: ジアゾを一電子還元」を本博士論文で提案している.

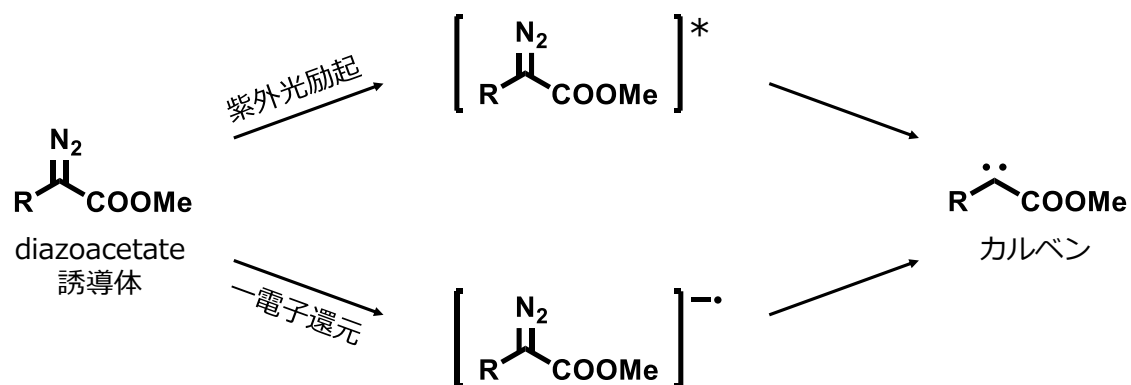


Figure 1-9 | Carbene generation from diazoacetate derivatives by UV excitation or one electron reduction.

1-7. カルベン

カルベンは、価電子が 6 つで、電荷を持たない、二配位の炭素であり、2 つの空軌道に結合に関与しない 2 つの電子が入っている。電子のスピンは平行、反平行の状態を取ることができ、全スピン角運動量を S とすると、スピン多重度は $2S + 1$ で表される。カルベンの 2 つの空軌道に、結合に関与しない電子が 1 つずつ平行な状態が入っている場合は、 $2(1/2 + 1/2) + 1 = 3$ で三重項カルベンとなる。一方で、カルベンの 1 つの空軌道に、結合に関与しない電子が 2 つ反平行な状態が入っている場合は、 $2(1/2 - 1/2) + 1 = 1$ で一重項カルベンとなる (Figure 1-10)。このように、カルベンは 2 つの電子状態を取ることが可能であり、構造と多重度の関係、多重度と反応性の関係について、これまでに盛んに研究が行われてきた。

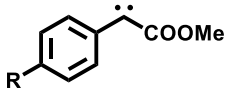


Figure 1-10 | Triplet and singlet state carbene

1-7-1. 構造と多重度

本研究で取り扱う methyl phenyldiazoacetate 誘導体から生じるカルベンの「構造と多重度の関係」については多くの知見が存在する。例えば、*p*-substituted methoxycarbonyl-(phenyl)carbene の一重項と三重項のエネルギー差 (ΔG_{ST}) は、*p* のハメットの置換基定数 (σ_p) と正の相関があることが知られている (Table 1-3)。これは、電子供与基が一重項カルベンの空の p 軌道と相互作用することで安定化することに起因する。

Table 1-3 | Calculated singlet-triplet energy gaps (ΔG_{ST} , kcal/mol) and Hammett *p* values for *p*-substituted methoxycarbonyl(phenyl)carbene. A positive value of ΔG_{ST} indicates that the triplet state is more stable. Calculation condition : B3LYP/6-311+G**//B3LYP/6-31G*

 Substituents (R)	ΔG_{ST} at 298 K (kcal/mol)	σ_p
4-NH ₂	-2.8	-1.111
4-OH	-0.2	-0.853
4-Me	1.6	-0.256
4-H	2.5	0.000
4-Cl	2.4	0.035
4-CN	5.2	-
4-NO ₂	6.1	0.740

1-7-2. 多重度と反応性

カルベンは高い反応性を有し，C-H 結合との反応，C-C 結合との反応，O-H 結合との反応，アルケンとの反応，酸素との反応などが報告されている^{31,32}。その中でも，O-H 結合との反応，酸素との反応は多重度選択的に反応することが知られている (Table 1-4)。

Table 1-4 | Reactivity of singlet and triplet carbene

	一重項カルベン	三重項カルベン
C-H 結合との反応	○	○
C-C 結合との反応	○	○
O-H 結合との反応	○	×
アルケンとの反応	○	○
酸素との反応	×	○

1-8. 長波長化戦略 その1: ジアゾの共役系を拡大

1-8-1. 分子設計

ジアゾ化合物は、紫外光によって活性種であるカルベンを産生し、光ラベル化剤として機能する。またジアゾ化合物は、photoaffinity labeling という方法論が初めて提案された論文¹で使われており、光ラベル化剤の中において先駆的な存在である。ジアゾ化合物の一つである diazoacetate 誘導体は、ジアゾの共役系が α 位の置換基にまで拡大することで、カルベン産生に必要な光が長波長化することが知られている (Figure 1-11-a, b, c, 図中の赤字で示した波長の光でカルベンが産生する)。

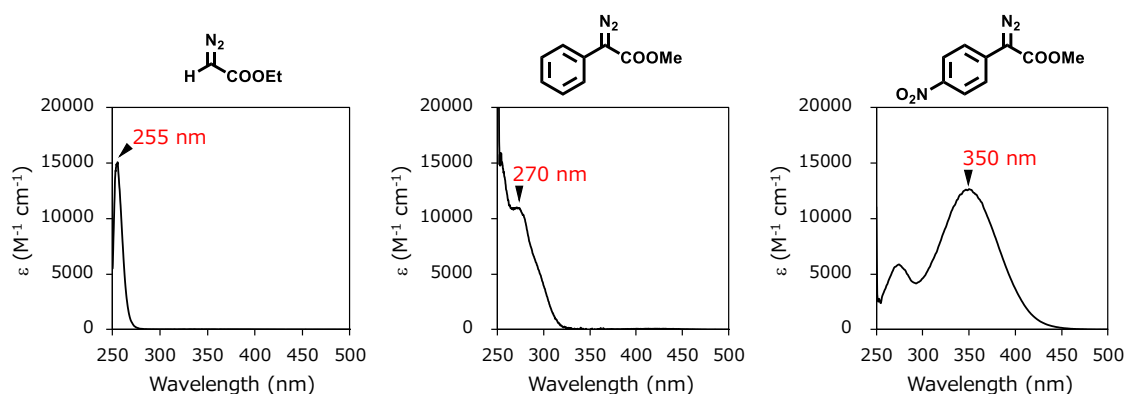


Figure 1-11 | Molar extinction coefficient of (a) ethyl diazoacetate, (b) methyl phenyldiazoacetate and (c) methyl 4-nitrophenyl diazoacetate in H_2O .

この置換基によってカルベン産生に必要な光の波長が変化する性質に着目し、本学修士課程では、ジアゾの共役系を可視光を吸収する色素に拡大させることで、可視光で機能する光ラベル化剤となると考えた。そして、蛍光色素として汎用される umbelliferone の 4 位に diazoacetate 構造を導入した 4DA-Umb を設計した (Figure 1-12, right)。また、その比較対象として umbelliferone の 4 位に acetate 構造を導入した 4A-Umb を設計した (Figure 1-12, left)。

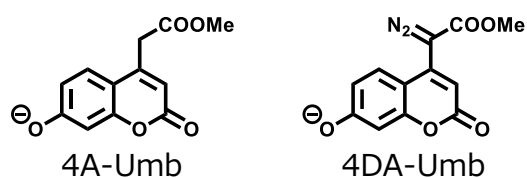


Figure 1-12 | The structure of 4A-Umb and 4DA-Umb.

1-8-2. 光学特性

4A-Umb および 4DA-Umb を合成し、それらの光学特性を取得したところ、ジアゾ化によって長波長化する様子が認められた (Figure 1-13-a). この結果は、期待通り、ジアゾの共役系が umbelliferone にまで拡大したことを示唆している. Umbelliferone は高い蛍光量子収率を示すことが知られているが、4DA-Umb は無蛍光性であることが明らかとなった (Figure 1-13-b). 一般的に、紫外光励起による diazoacetate 誘導体からのカルベン産生は非常に速い過程であり、diazoacetate 誘導体の励起状態の寿命は数百 fs ($= 10^{-15}$ s) であることが知られている (methyl 4-biphenyl diazoacetate: 140 fs in MeOH³³, methyl 2-naphthyl diazoacetate: 300 fs in CH₃CN³⁴). 一方で、umbelliferone の励起状態の寿命は数百 ps ($= 10^{-12}$ s) である (umbelliferone: >150 ps in MeOH³⁵). そのため、4DA-Umb では蛍光放出過程よりもカルベン産生経路が優先されており、無輻射的に励起状態が緩和された結果として無蛍光性となっていると考えられる.

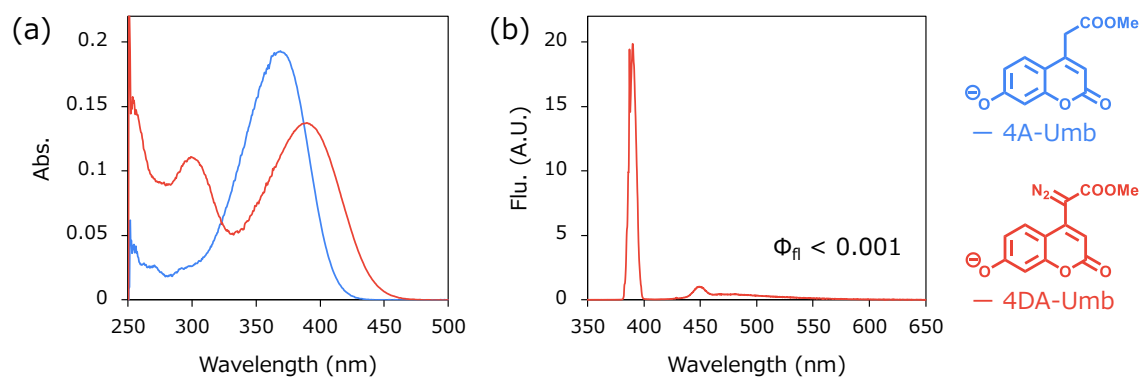


Figure 1-13 | (a) Absorption spectra of 10 μ M 4DA-Umb and 4A-Umb in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 9.0). (b) Fluorescence spectra and absolute quantum yield of 1 μ M 4DA-Umb in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 9.0).

1-8-3. 光反応特性

続いて、4DA-Umb の光反応進行の有無について精査した。まず、4DA-Umb を暗所で 30 min 静置した場合、4DA-Umb の分解は認められなかった。次に、400 nm の光を 30 min 照射した場合、光照射時間依存的に 4DA-Umb が消失し diazoacetate 構造が hydroxyacetate 構造となった光反応生成物が認められた (Figure 1-14-a)。また、光反応効率の指標として、照射した光のモル吸光係数×光反応量子収率を算出したところ、 $\epsilon_{400\text{ nm}} \times \Phi_{\text{photoreaction}} = 46$ となった。次に、各光照射時間ごとの蛍光スペクトルを取得したところ、光照射時間依存的に蛍光強度が増大することが明らかとなった (Figure 1-14-b)。これは無蛍光性の 4DA-Umb から、強蛍光性の光反応生成物が生成したことに起因すると考えられる。最後に、タンパク質を光ラベル化できるかを精製タンパク質 BSA を用いて検証した。結果、光照射を行った場合にのみ BSA のバンドから蛍光が認められ、4DA-Umb が光ラベル化剤として機能することを示した (Figure 1-14-c)。

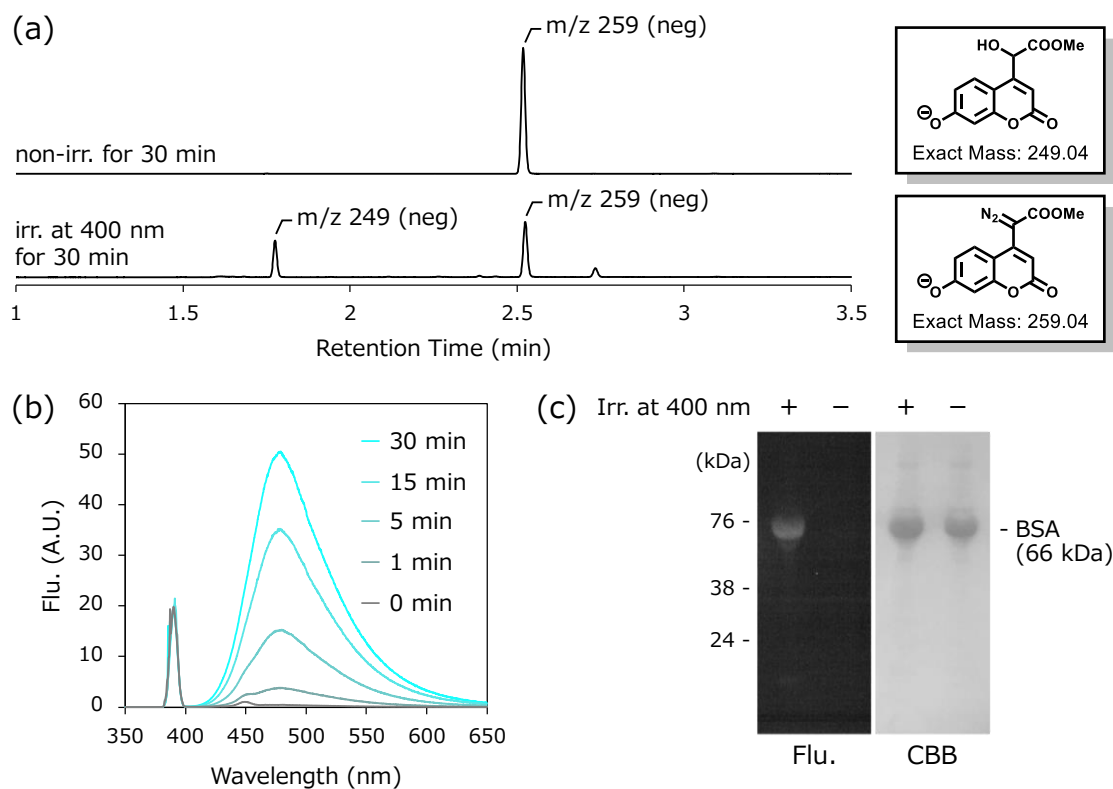


Figure 1-14 | (a) UPLC-MS analysis of 0.1 mM 4DA-Umb in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) with or without irradiation at 400 nm for 30 min. Monitored wavelength: 330 nm. (b) Fluorescence spectra of 1 μM 4DA-Umb 0.1 M sodium phosphate buffer with irradiation at 400 nm for 0-30 min. Excitation wavelength: 389 nm. (c) Photolabeling of 1 mg/mL purified BSA by 0.1 mM 4DA-Umb with or without irradiation at 400 nm for 30 min.

1-8-4. 更なる長波長化

更なる長波長化を目指し, umbelliferone よりも長波長光を吸収する rhodamine を母核とした diazorhodamine を合成した (Figure 1-15-a). diazorhodamine の光反応進行の有無について検討したところ, 光照射依存的に diazorhodamine は一部消失したものの, 515 nm の光を吸収する光反応生成物は認められなかった (Figure 1-15-b). この結果は, 産生したカルベンが色素の共役系で非局在化され, 意図しない反応を引き起こしたためであると考えられる.

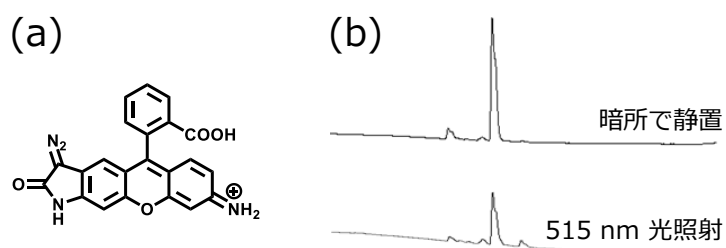


Figure 1-15 | (a) The structure of diazorhodamine. (b) UPLC-MS analysis of 0.1 mM diazorhodamine in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) with or without irradiation at 515 nm for 20 min. Monitored wavelength: 515 nm.

さらに, diazorhodamine は DMSO stock solution 中で徐々に分解し, 暗所での安定性が乏しいことも分かった. また, 4DA-Umb および 3DA-Umb (Figure 1-16-a) の酸性, 中性, 10 mM GSH 溶液中の暗所での安定性を UPLC-MS にて精査したところ, 4DA-Umb はいずれの条件でも分解は認められなかったのに対し (Figure 1-16-b), 3DA-Umb では中性, 10 mM GSH 水溶液中で分解が認められ, 暗所で不安定であることが分かった (Figure 1-16-c).

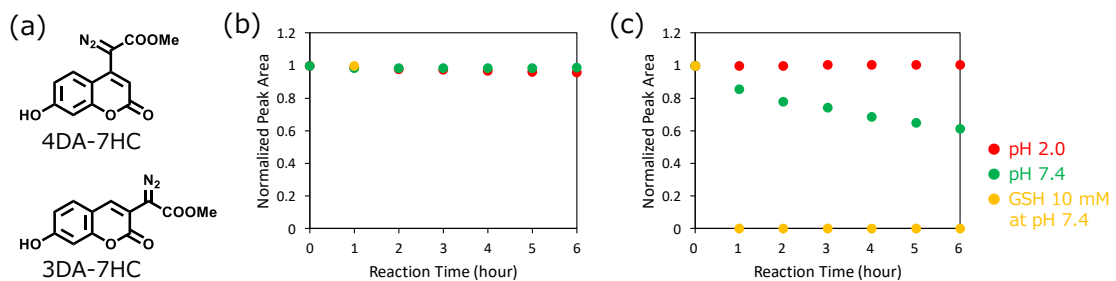


Figure 1-16 | (a) The structure of 4DA-Umb and 3DA-Umb. UPLC-MS analysis of 10 μ M (b) 4DA-7HC and (c) 10 μ M 3DA-Umb in 0.1 M sodium phosphate buffer at pH 2.0 (red), pH 7.4 (green) or pH 7.4 with 10 mM GSH (orange) for 0-6 hours under the dark.

Figure 1-16 における, 3DA-Umb の 10 mM GSH 水溶液中での分解生成物は ESI⁺ および ESI⁻ スペクトルより, Figure 1-17 に示した GSH との S-H 挿入生成物であると推定した. 暗所でのジアゾ化合物の分解は Figure 1-18 に示した diazonium からの S_N2 反応, または carbocation の生成によって進行する. また, 3DA-Umb の pK_a は 7.35 (4DA-Umb の pK_a は 7.47) であり, アニオン型の 3DA-Umb が diazonium を形成することで分解反応が進行していると考えられる. また, 同じ pH 7.4 でも 10 mM GSH の有無で分解速度が変化していることから, 10 mM GSH 水溶液中での分解反応は主に diazonium からの S_N2 反応によって進行していると考えた. 一方で, 4DA-Umb がいずれの条件においても暗所で安定であるのは, Figure 1-19 に示したように, 4DA-Umb ではジアゾ基の炭素上の負電荷が非局在化されているため, プロトン化が起こり難くなり, diazonium を形成し難くなったためであると考えられる.

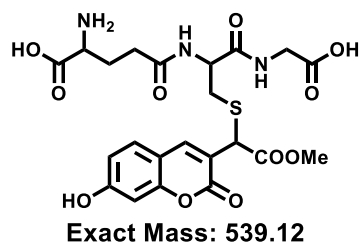


Figure 1-17 | The decomposition product in 10 mM GSH aq. (pH 7.4)

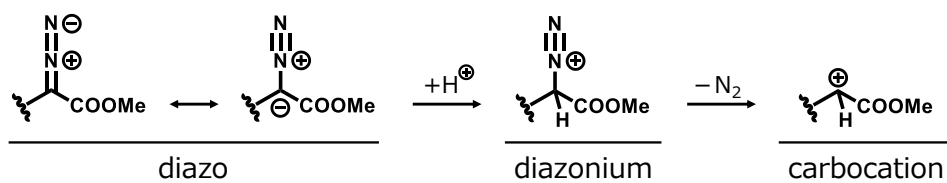


Figure 1-18 | The decomposition pathway of diazo compounds in the dark

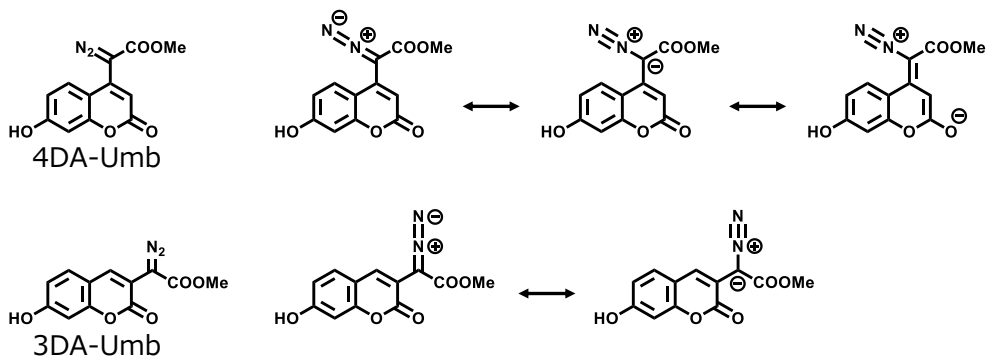


Figure 1-19 | The resonance structure of 4DA-Umb and 3DA-Umb

本学修士課程での研究より“ジアゾの共役系を拡大”という戦略では、以下 2 つの問題点が挙げられ、これにより単純に色素母核を変えるだけでは更なる長波長化が達成できないことが分かった。

1. カルベンが色素の共役系で非局在化され得るため、活性種が必ずしもラベル化能を有するわけではない。
2. 母核とする色素, diazoacetate の導入位置によっては、暗所での安定性が乏しい場合がある。

1-9. 長波長化戦略 その2: ジアゾを一電子還元

1-9-1. 一電子還元によるカルベン産生

一電子還元されることによって進行する反応は古くから知られている。例えば、スルホニル保護基は一電子還元により脱保護できるアミンやフェノールの保護基であったり^{36,37}、ジアゾ化合物が電解還元により分解されるとの報告もある³⁸。さらに特筆すべきは、分子間の光誘起電子移動によって methyl 4-nitrophenyl diazoacetate が一電子還元され、最終的にカルベンが産生するという反応である³⁹ (Figure 1-20)。博士課程では、この一電子還元によるカルベン産生に着目して研究を進めてきた。

1. Pe を光励起すると、A から Pe* に一電子が移動する (光誘起電子移動)。
2. Pe* から 1 に一電子が移動する。
3. 1 から窒素が脱離し 2 が生成する。
4. 2 から A⁺ へ一電子が移動し、2 が産生する。

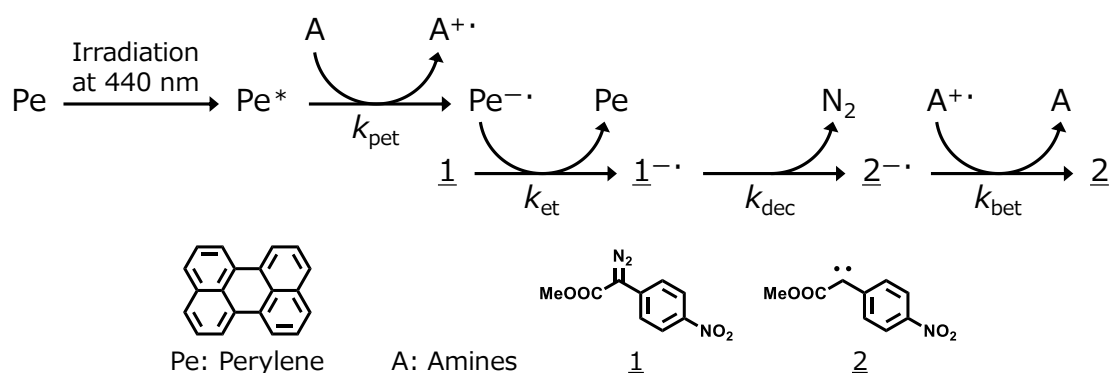


Figure 1-20 | The total scheme Tadashi Mizushima et al. proposed for the perylene-sensitized photolysis of methyl (4-nitrophenyl)diazoacetate in the presence of perylene and electron-donating amines.

1-9-2. キサンテン系色素における光誘起電子移動

Fluorescein や rhodamine に代表される xanthenes 系色素は、可視光を吸収する xanthene 部位と、benzene 部位が直交しており、それぞれの共役系が独立している。そのため、励起された xanthene 部位から benzene 部位へ一電子が移動する分子内の光誘起電子移動 (Photoinduced electron Transfer : PeT) を引き起こし得ることが知られている⁴⁰ (Figure 1-21)。ニトロ基などの強力な電子吸引力の官能基が benzene 部位にあり、還元され易さの指標となる benzene 部位の LUMO エネルギーが十分に低い場合、蛍光放出過程 (k_f) よりも PeT (k_{et}) が優先され、低蛍光性になる。逆に LUMO エネルギーが高く、benzene 部位が還元され難い場合、蛍光放出過程 (k_f) が優先され、高蛍光性になる。この PeT による消光を利用し、当研究室ではこれまでに、生体分子を可視化する off/on 型の蛍光色素を数多く開発してきた^{41, 42, 43} (Figure 1-22)。

しかし今回注目すべきは、分子内の PeT により benzene 部位が一電子還元されていることであり、benzene 部位への diazoacetate 構造の導入によって、分子内 PeT によるカルベン産生を期待した。

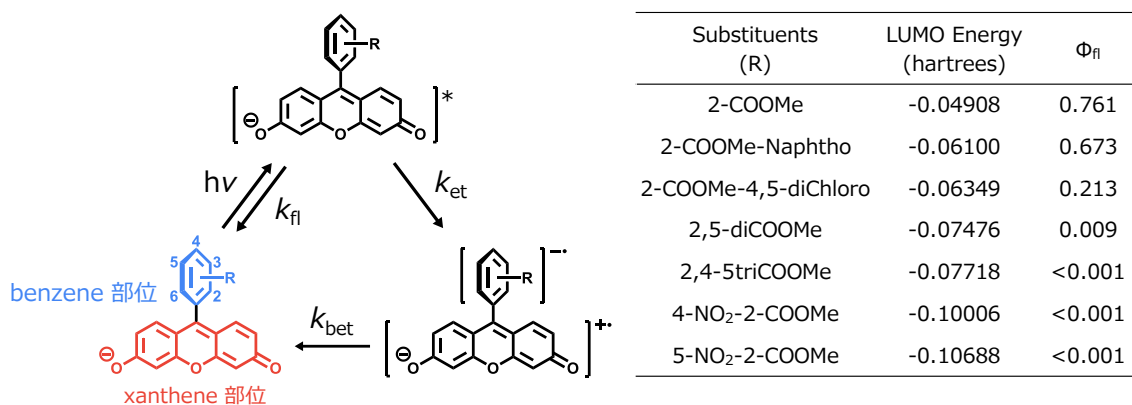


Figure 1-21 | Dynamic change of the fluorescence quantum yield (Φ_f) of fluorescein derivatives depending on the LUMO energy level of their benzene moiety⁴⁰. Φ_f shows relative fluorescence quantum yield in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 9.0), using $\Phi_f = 0.85$ of fluorescein in 0.1 M NaOH aq. as a fluorescence standard⁴⁴. Calculation condition : opt freq b3lyp/6-31g(d) scrf=(solvent=water).

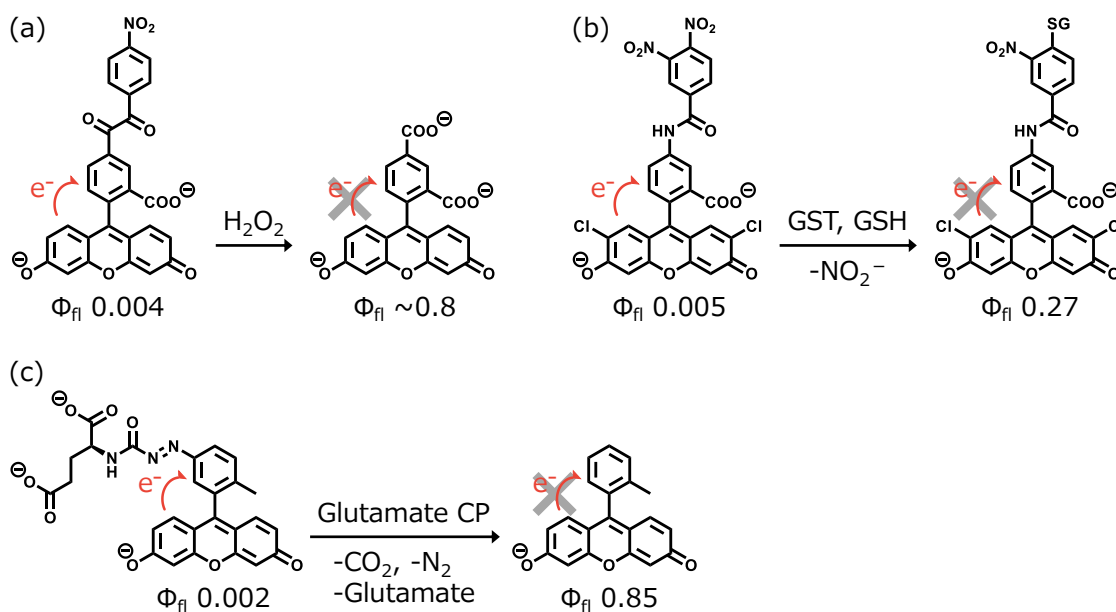


Figure 1-22 | Activatable fluorescence probes for detection of (a) hydrogen peroxide⁴¹, (b) GSTs (Glutathione S-transferases)⁴² and (c) Glutamate CP (Glutamate Carboxypeptidase)⁴³.

1-9-3. 可視光で機能する光ラベル化剤

前述の 2 つの知見を受け, xanthene 系色素の benzene 部位に diazoacetate 構造を導入した 5DA2Me-Fluo を設計した. この分子は, fluorescein の benzene 部位の 5 位に diazoacetate 構造 (DA) を, 2 位に methyl 基 (Me) を導入しているため, 5DA2Me-Fluo と命名した. そして, 以下に示した反応機構によって進行し, 可視光で機能する光ラベル化剤となることを期待した (Figure 1-23).

1. xanthene 部位を可視光励起する ($h\nu$).
2. 分子内の光誘起電子移動により benzene 部位が一電子還元される (k_{et}).
3. 一電子還元された diazoacetate 構造から窒素が脱離し, カルベンアニオンラジカルが生成する (k_{dec}). この反応は逆電子移動 (k_{bet}) との競合となる.
4. 逆電子移動によりカルベンが産生する ($k_{bet'}$).

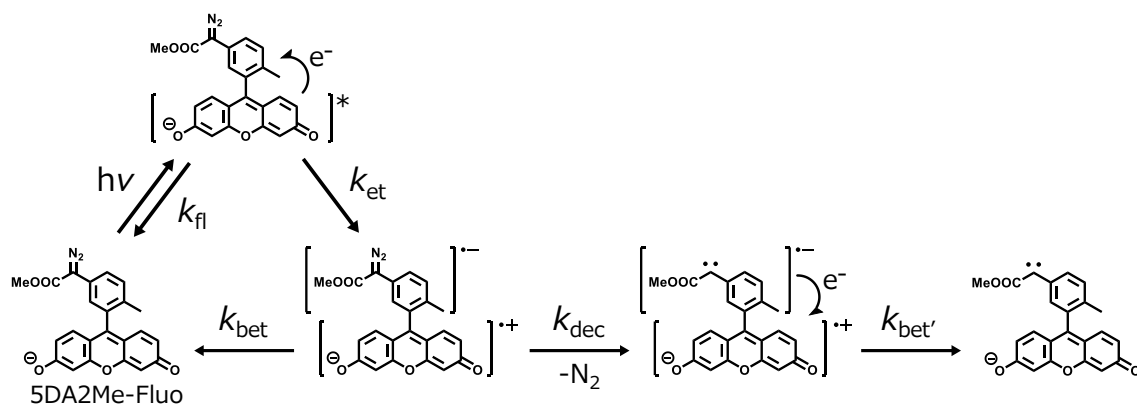
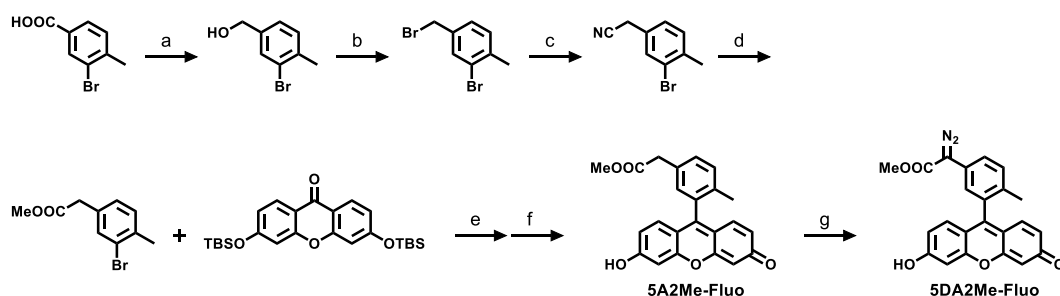


Figure 1-23 | The expected reaction mechanism for the carbene generation via photoinduced electron transfer.

2. Fluorescein を母核とした 光ラベル化剤の開発

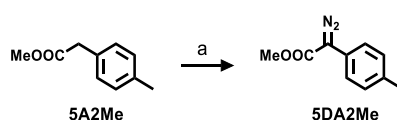
2-1. 合成

Scheme 2-1 に従い 5DA2Me-Fluo と、そのジアゾ化前の誘導体である 5A2Me-Fluo を合成した。この分子は、Fluorescein の benzene 部位の 5 位に acetate 構造 (A) を、2 位に methyl 基 (Me) を導入しているため、5A2Me-Fluo と命名した。反応 (g) では、ジアゾ化だけでなく、キサンテン環の OH 基のトシル化も進行するため、反応追跡をこまめに行いトシル化が始まり出した時点で反応を止めると、最も収率高く 5DA2Me-Fluo を得ることができた。



Scheme 2-1 | Synthesis of 5A2Me-Fluo and 5DA2Me-Fluo. (a) $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$, THF. Yield: quant. (b) PBr_3 , CH_2Cl_2 . Yield: quant. (c) TMSCN , TBAF, CH_3CN . Yield: 43.1 %. (d) H_2SO_4 , MeOH. Yield: 74.1 %. (e) sec-BuLi , THF. (f) 2N HCl aq. Yield in 2 steps: 60.7 %. (g) Tosyl Azide, DBU, DMSO, CH_3CN . Yield: 20.7 %.

また、5DA2Me-Fluo の各種特性との比較を行うため 5DA2Me-Fluo の benzene 部位に相当する 5DA2Me を Scheme 2-2 に従い合成した。



Scheme 2-2 | (a) Tosyl Azide, DBU, CH_3CN . Yield: quant.

2-2. 光学特性

合成した 5A2Me-Fluo および 5DA2Me-Fluo の光学特性を取得した。吸収スペクトルの紫外光領域を見ると、ジアゾ化により吸光度増大が認められた。これは、diazoacetate のジアゾ基が benzene 部位の共役系に組み込まれたことを示唆する結果である (Figure 2-1-b, e)。次に、可視光領域を見ると変化は認められず、xanthene 部位は diazoacetate 導入の影響をほとんど受けないことが示唆される (Figure 2-1-b, e)、一方で、蛍光量子収率 Φ_f を見ると (Figure 2-1, table)、ジアゾ化によって低蛍光性になることが分かり、5DA2Me-Fluo で光誘起電子移動が起こっていることが期待された。

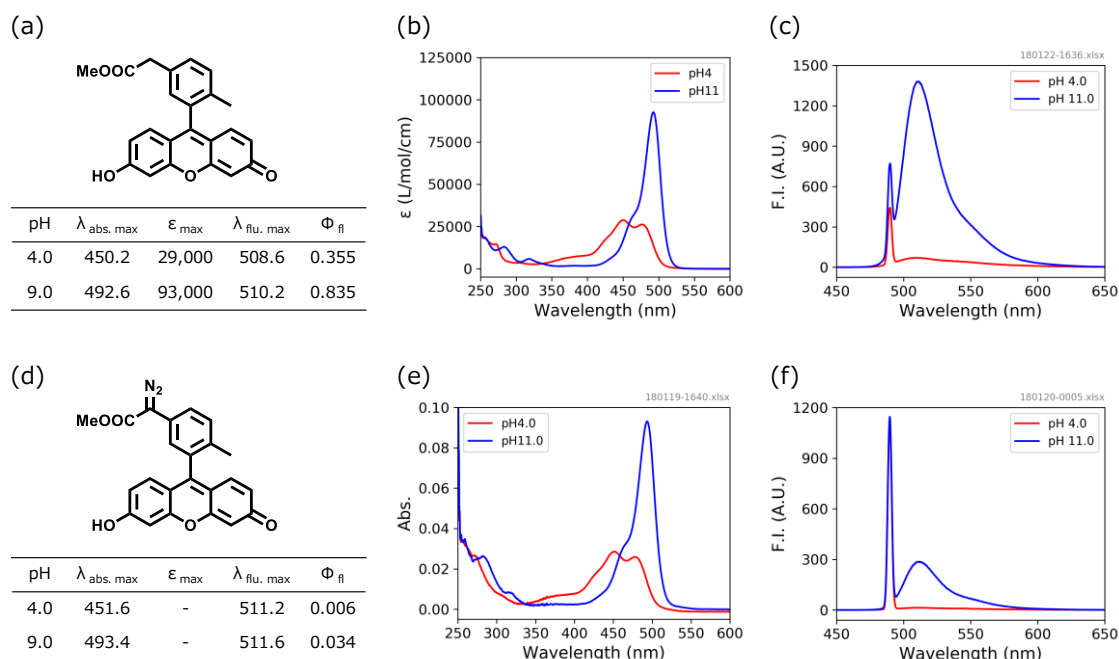


Figure 2-1 | (a) The structure of 5A2Me-Fluo. (b) Molar extinction coefficient of 5A2Me-Fluo in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 4.0 or pH 11.0). (c) Fluorescence spectra of 0.5 μM 5A2Me-Fluo in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 4.0 or pH 11.0). Ex : 490.0 nm. (d) The structure of 5DA2Me-Fluo. (e) Absorption spectra of 1 μM 5DA2Me-Fluo in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 4.0 or pH 11.0). (f) Fluorescence spectra of 0.5 μM 5DA2Me-Fluo in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 4.0 or pH 11.0). Ex : 490.0 nm. ※ Φ_f shows absolute fluorescence quantum yield.

2-3. 光誘起電子移動の有無

前述したように、fluorescein 誘導体の中には光誘起電子移動を消光原理とする弱蛍光性誘導体が存在し、その蛍光量子収率と benzene 部位の LUMO エネルギーまたは還元電位との間に相関があることが知られている。先程示したジアゾ化による消光が、光誘起電子移動に因るものかを確認するため、横軸を benzene 部位の LUMO エネルギー、縦軸を fluorescein 誘導体の蛍光量子収率として散布図を作成した (Figure 2-2)。結果、5DA2Me の LUMO エネルギーは光誘起電子移動が起こる閾値を超えており、ジアゾ化による消光は光誘起電子移動に因ることが示唆された。

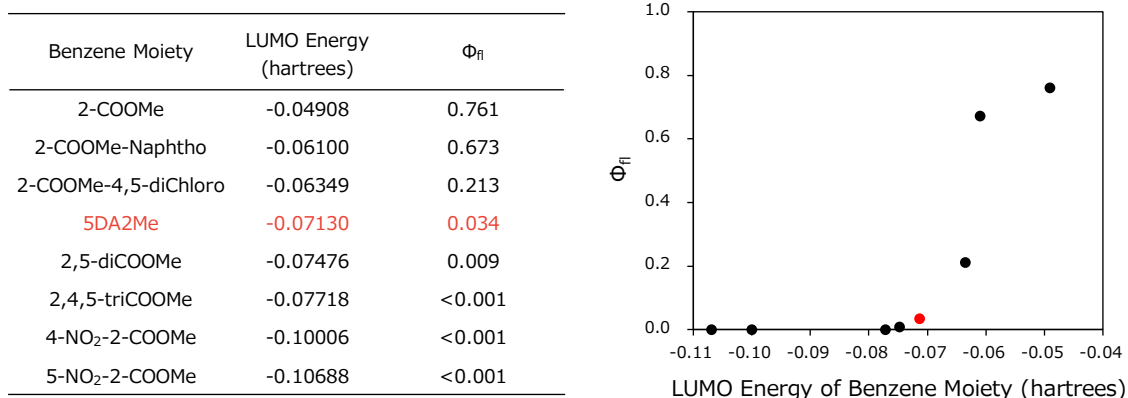


Figure 2-2 | Dynamic change of the fluorescence quantum yield (Φ_f) of fluorescein derivative and 5DA2Me-Fluo, depending on the LUMO energy level of their benzene moiety. Φ_f of 5DA2Me-Fluo was absolute fluorescence quantum yield in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 9.0). Φ_f of other fluorescein derivatives were relative fluorescence quantum yield in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 9.0)⁴⁰, using $\Phi_f = 0.85$ of fluorescein in 0.1 M NaOH aq. as a fluorescence standard⁴⁴. Calculation condition : opt freq b3lyp/6-31g(d) scrf=(solvent=water).

続いて、蛍光量子収率と benenze 部位の還元電位との関係を精査するため、5DA2Me の酸化還元電位、同時に 5A2Me の酸化電位の測定も行った。5A2Me の還元電位は検出できる領域に存在しないと考え、測定を行っていない (Figure 2-3-a)。まず 5DA2Me の還元電位の測定結果を見ると (Figure 2-3-b)、負の方向に掃引した場合はピークが検出されたが、正の方向に掃引した場合はピークは検出されなかった。これは、負の方向の掃引により 5DA2Me の一電子還元が誘発され大きな電流の変化が観測されたが、一電子還元された 5DA2Me は不安定であるため分解し、その生成物は $-2.0 \sim -1.5$ の間の電位では一電子酸化されないためであると考察できる。これは、一電子還元されたジアゾ化合物からカルベンが産生される知見と矛盾しない。一方で、酸化電位の測定結果を見ると (Figure 2-3-c, d)、正および負の方向に掃引した場合、共にピークが検出されている。

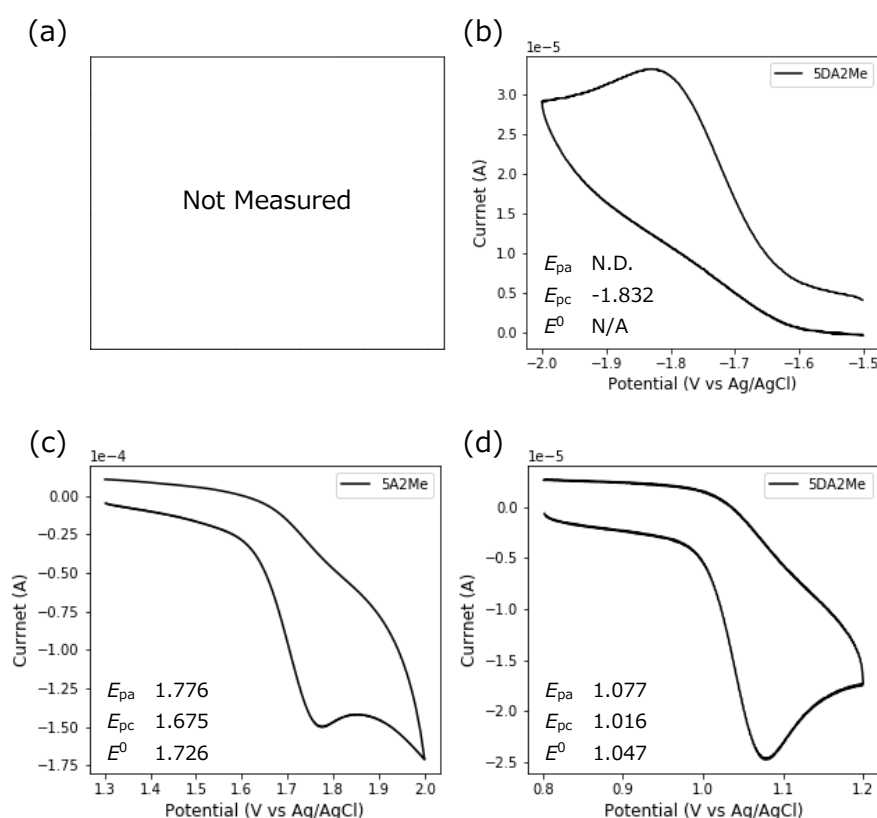


Figure 2-3 | Cyclic voltammogram of (a), (c) 5A2Me and 5DA2Me (b), (d) for measuring (a), (b) reduction and (c), (d) oxidation potential. Solvent: CH_3CN containing 0.1 M TBAP. Electrode: glassy carbon.

これまでの知見を活用するため、下記の式を用いて、単位を “V vs Ag/AgCl” から “V vs SCE” に変換した。先述したように 5DA2Me の還元電位測定の際に E_{pa} を検出できなかったため、 $E_{pa} = E^0$ としている。

$$E^0 = \frac{1}{2}(E_{pa} + E_{pc})$$

$$\text{Reduction Potential (V vs SCE)} = E^0 + 0.296$$

そして、縦軸を fluorescein 誘導体の蛍光量子収率、横軸を benzene 部位の Reduction Potential (V vs SCE) として散布図を作成した (Figure 2-4)。結果、5DA2Me の還元電位も同様に光誘起電子移動が起こる閾値を超えており、ジアゾ化による消光は光誘起電子移動に因ることが強く示唆された。

Substituent	Reduction Potential (V vs SCE)	Φ_f
2,4,5-TriCOOMe	-1.65	0.001
2,4-DiCOOMe	-1.79	0.009
4,5-DiCl-2-COOMe	-1.84	0.213
2-COOMeNaph	-2.11	0.673
2-COOMe	-2.36	0.761
5DA2Me	-1.536	0.074

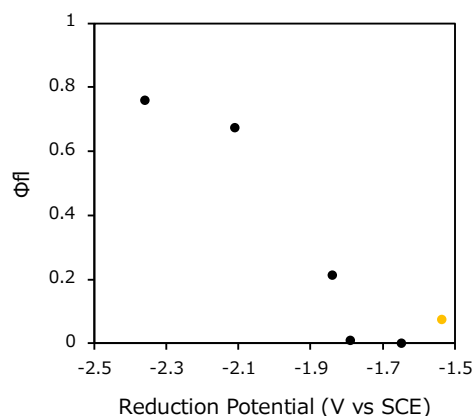


Figure 2-4 | The relationship between the fluorescence quantum yield (Φ_f) and the reduction potential (V vs SCE).

2-4. 光反応特性

2-4-1. 水中での反応性

水溶液中で、最大吸収波長である 493 nm の光照射により 5DA2Me-Fluo の光反応が進行するかを検証した。まず、ジアゾ化前の 5A2Me-Fluo に 493 nm の光を照射したところ、分解は認められなかった (Figure 2-5)。

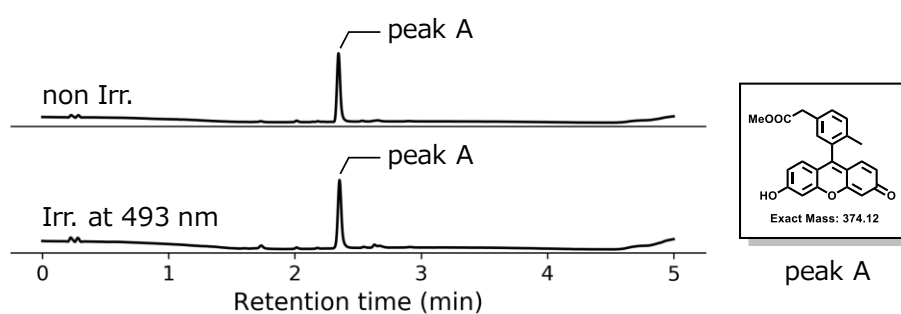


Figure 2-5 | Product analysis of photoreaction of 5A2Me-Fluo in pH 9.0 0.1 M sodium phosphate buffer. 5 μ M 5A2Me-Fluo (50 μ L) was exposure to 493 \pm 5 nm light for 30 min or standing under the dark for 30 min. Irradiation light (493 nm) intensity 3.14 mW/cm². UPLC-MS analysis condition, Eluent : A (H₂O, 0.1 M formic acid), B (CH₃CN/H₂O = 8/2, 0.1 M formic acid), Gradient : A/B = 95/05 to 05/95 for 3.5 min , Flow rate : 0.6 mL/min, Detection wavelength : 441 nm.

続いて、5DA2Me-Fluo に対して 493 nm の光照射を行った場合、5DA2Me-Fluo が完全に消失し、光反応生成物が観測された (Figure 2-6)。ESI⁻ 質量分析結果より、光反応生成物は hydroxyacetate 構造を有する 5HA2Me-Fluo である推定した。また、暗所で静置した場合に分解は認められず、この反応が 493 nm 光照射依存的事であることを示した。

α -diazocarbonyl 化合物は、酸を触媒として α -hydroxycarbonyl 化合物となることが知られている⁴⁵。そこで Scheme 2-3 に従い、5HA2Me-Fluo を合成した。その合成標品と、5DA2Me-Fluo の光反応生成物を UPLC-MS で分析したところ、溶出時刻は一致し、光反応生成物が 5HA2Me-Fluo であることが明らかとなった。

続いて、化学収率を算出した。Figure 2-6 の 5DA2Me-Fluo (non-irr. for 10 min) と、5HA2Me-Fluo (irr. at 493 nm for 10 min) のピーク面積から、化学収率 99.0 % が算出された (Table 2-1)。これは活性種を産生に伴い xanthene 部位が分解しないことを表す。予想されるカルベン産生の反応経路を見ると (Figure 1-23)、光誘起電子移動による一電子還元によって窒素が脱離し、カルベンアニオンラジカルを産生した後、逆電子移動が起こりカルベンが産生される。反応中間体であるカルベンアニオンラジカルは、カルベンと同様に活性種として機能し得る。その場合、xanthene 部位は一電子酸化された状態であり、他の分子との反応によって xanthene 部位が分解する恐れがある。これを考慮すると、化学量子収率 99.0 % という結果は、カルベンアニオンラジカルが活性種として機能せず、逆電子移動により速やかにカルベンとなると同時に、一電子酸化された xanthene 部位が基底状態の xanthene 部位に戻ることを示唆する。

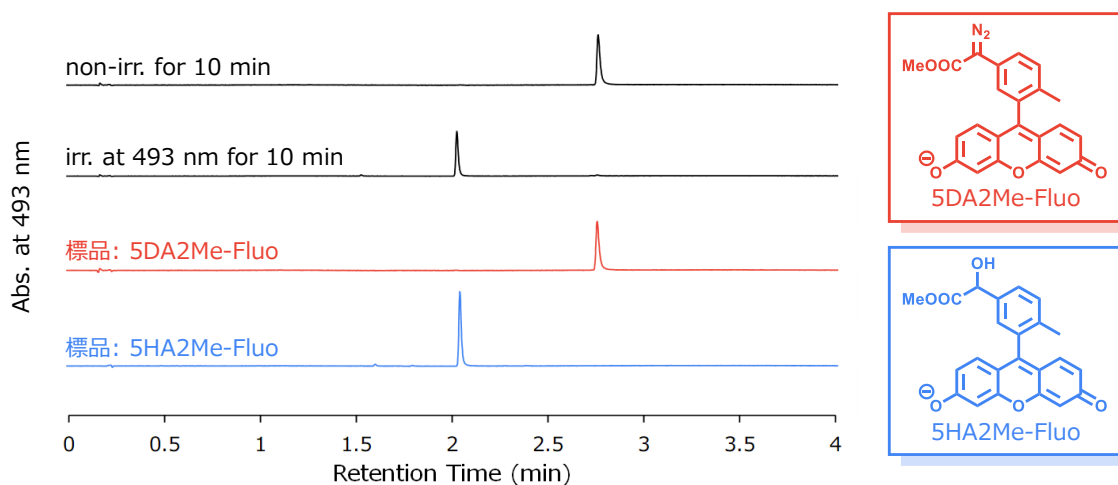
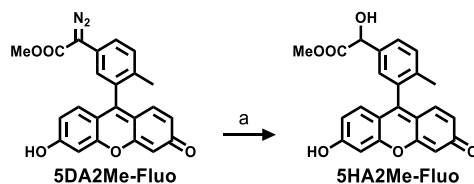


Figure 2-6 | Product analysis of photoreaction of 5DA2Me-Fluo in pH 9.0 0.1 M sodium phosphate buffer with or without irradiation at 493±5 nm for 10 min. Irradiation light (493 nm) intensity 3.14 mW/cm². UPLC-MS analysis condition, Eluent : A (H₂O, 0.1 M formic acid), B (CH₃CN/H₂O = 8/2, 0.1 M formic acid), Gradient : A/B = 95/05 to 05/95 for 3.5 min , Flow rate : 0.6 mL/min, Detection wavelength : 441 nm.



Scheme 2-3 | (a) TFA, H₂O.

Table 2-1 | Peak Area of 5DA2Me-Fluo (non-irr. for 10 min) and 5HA2Me-Fluo (irr. at 493 nm for 10 min) in Figure 2-6. Chemical Yield (%) = "Peak Area of 5HA2Me-Fluo" / "Peak Area of 5DA2Me-Fluo" ×100. Detected Wavelength (nm) is the wavelength of maximum absorbance under UPLC-MS analysis condition

	Detected Wavelength (nm)	Peak Area	Chemical Yield (%)
5DA2Me-Fluo (non-irr. for 10 min)	500.0	1038.90	99.0
5HA2Me-Fluo (irr. at 493 nm for 10 min)	499.0	1028.73	

2-4-2. 光照射時間依存的な蛍光増大

次に、各光照射時間ごとの蛍光スペクトルを取得したところ、光照射時間依存的に蛍光強度が増大することが明らかとなった (Figure 2-7). これは、低蛍光性の 5DA2Me-Fluo から、強蛍光性の 5HA2Me-Fluo ($\Phi_f = 0.981$) が生成したためであり、ジアゾ基を有さない光反応生成物のほとんどは光誘起電子移動が起こらず高蛍光性になることが期待された。

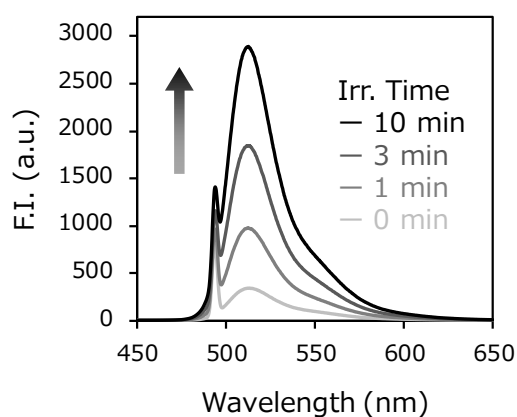


Figure 2-7 | Fluorescence spectra of 0.5 μ M 5DA2Me-Fluo in pH 9.0 0.1 M sodium phosphate buffer with 493 nm irradiation for 0-10 min. Excitation wavelength 490 nm.

2-4-3. 光反応量子収率

5DA2Me-Fluo の光反応効率を評価するため、光反応量子収率を算出した。光反応効率を $\epsilon_{\text{irradiation}} \times \Phi_{\text{photoreaction}}$ で定義すると、 $\epsilon_{493\text{ nm}} \times \Phi_{\text{photoreaction}} = 135$ となり、4DA-Umb ($\epsilon_{400\text{ nm}} \times \Phi_{\text{photoreaction}} = 46$) よりも光反応効率が良いと言える。また、最も代表的な光ラベル化剤である diazirine の光反応効率は 173 ($\epsilon_{353\text{ nm}}: 266$, $\Phi_{\text{photoreaction}}: 0.65$ in cyclohexane)⁶ であり、5DA2Me-Fluo は diazirine と遜色ない光反応効率を有すると言える。

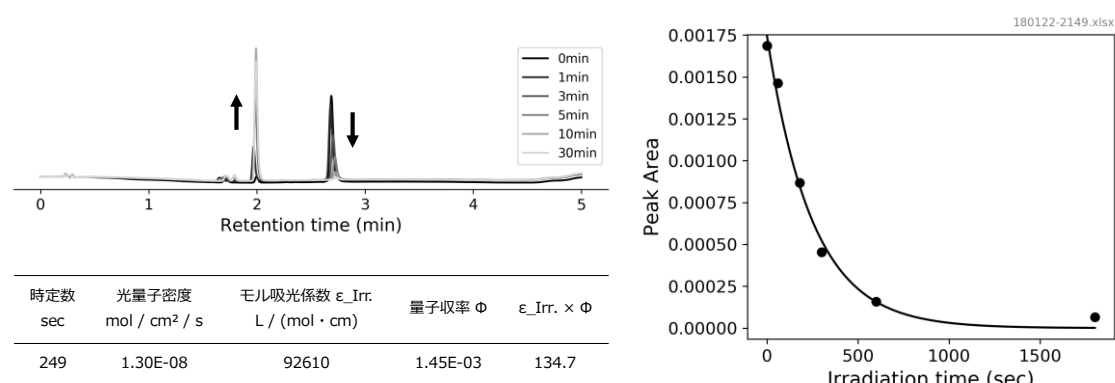


Figure 2-8 | Calculation of photoreaction quantum yield. 5 μM 5DA2Me-Fluo in pH 9.0 0.1 M sodium phosphate buffer (400 μL) were exposure to 493 ± 5 nm light for each time. The irradiated solution was analyzed with UPLC-MS and the peak area of 5DA2Me-Fluo was calculated. Irradiation light intensity was 3.15 mW/cm^2 .

2-4-4. アルケンとの反応性

カルベンはアルケンと反応し、シクロプロパンを形成するという特徴的な反応性を有する。先行研究としては、MeOH と 2-methyl-2-butene の混合溶液中で methyl 4-nitrophenyl diazoacetate から紫外光によってカルベンを産生させると、2-methyl-2-butene と反応しシクロプロパンを形成することが報告されている⁴⁶。そこで、5DA2Me-Fluo に 493 nm の光を照射すると、同様に 2-methyl-2-butene と反応し、シクロプロパンを形成するかを検証した。結果、光照射によりいくつかの生成物が観測された。ESI⁺ と ESI⁻ より、ピーク A は MeOH と反応した生成物、ピーク B は酸素と反応した生成物、ピーク D および E は 2-methyl-2-butene と反応しシクロプロパンを形成した化合物であると推定した。一般的に、一重項カルベンは酸素と反応せず、三重項カルベンが選択的に酸素と反応しケトンを生成することが知られている^{47, 48}。つまり、推定通り ピーク B が酸素との光反応生成物であれば、産生したカルベンが三重項カルベン様の反応性を有することが示唆される。D および E は互いにジアステレオマーの関係にあるため、同じ m/z を示すが、溶出時刻は異なると考えられる。以上の結果より、5DA2Me-Fluo から産生した活性種がアルケンと反応し、シクロプロパンを形成する様子が認められ、活性種がカルベンであることが強く示唆された。

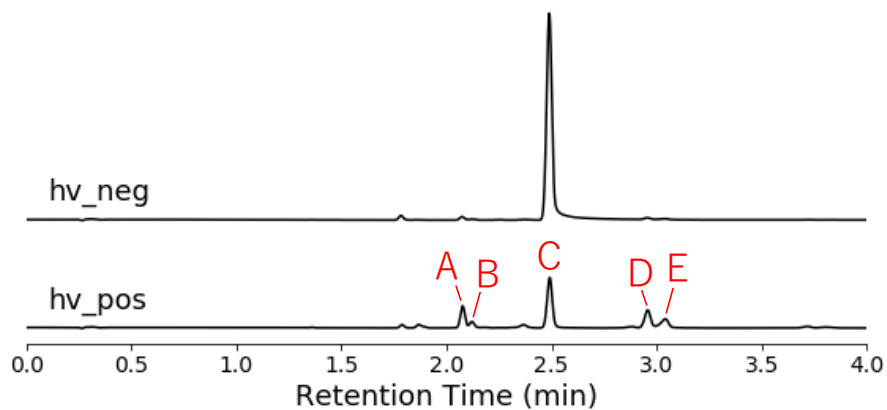


Figure 2-9 | UPLC-MS analysis of 2.5 μM 5DA2Me-Fluo in 99 % 2-methyl 2-butene and 1 % MeOH with or without irradiation at 493 nm for 60 min. Flow rate: 0.60 mL/min. Gradient: A/B = 95/05 at 0 min, 05/95 at 3.5 min, 05/95 at 4.0 min (A = H_2O , 10 mM Ammonium Formate. B = $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ = 4/1, 10 mM Ammonium Formate). Injected volume: 5 μL . Monitored wavelength: 493 nm. [190603-2219]

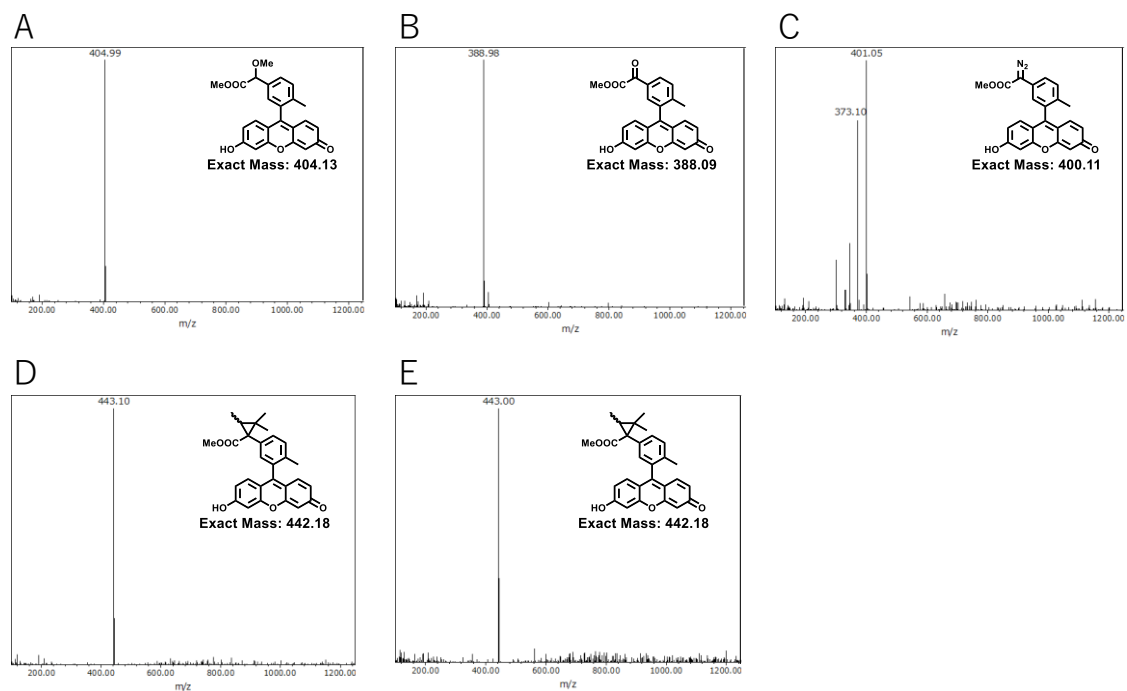


Figure 2-10 | ESI+ spectra of photoreaction products A, B, C, D and E.

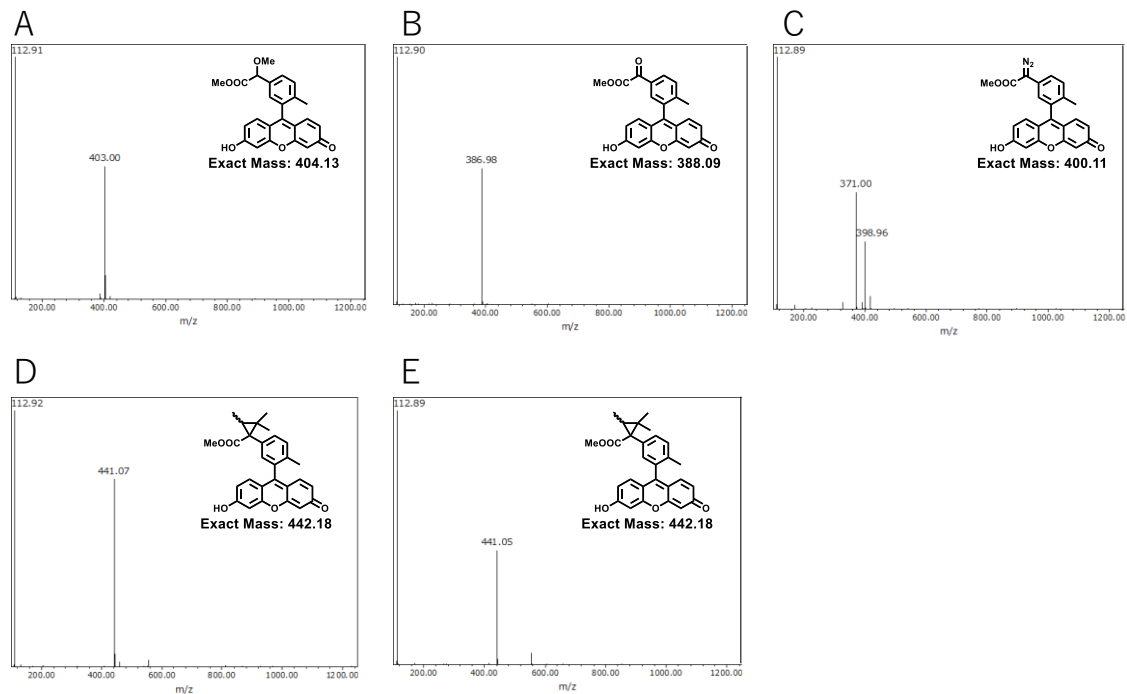


Figure 2-11 | ESI- spectra of photoreaction products A, B, C, D and E.

先行研究では MeOH に対して 2-methyl-2-butene がカルベンとどのくらい反応し易いかの指標 Relative Reactivity を算出している⁴⁶ (値が大きいほど 2-methyl-2-butene と反応し易い). この指標を基に先行研究と比較すると, 5DA2Me-Fluo は 2.9×10^{-2} (Table 2-2), methyl (4-nitrophenyl)diazoacetate は 2.9 となり, 5DA2Me-Fluo の方が 2-methyl-2-butene と反応し難いという結果となった.

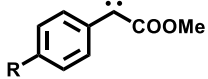
Table 2-2 | Peak area of Peak A and D+E in Figure 2-9. Relative reactivity calculated from A and D+E peak area. Relative reactivity = (D+E Peak area / A Peak area) * (MeOH moles / 2-methyl-2-butene moles).

Peak	Peak Area	Relative Reactivity
A	78,257	2.9×10^{-2}
D+E	107,764	

一般的に、アルケンとの反応は一重項カルベンおよび三重項カルベンで共に起こることが知られている。一方で、一重項カルベンの O-H insertion は、三重項カルベンの C-H insertion やアルケンとの反応と比べて非常に速やかに進行すること、また、三重項カルベンは O-H insertion を引き起こさないことが知られており、MeOH との反応生成物は一重項カルベンと反応した結果であると考えられる。以上より、Relative Reactivity を決める因子は、一重項カルベンと三重項カルベンのエネルギー差 (ΔG_{ST}) であると考えられる。つまり、一重項カルベンが三重項カルベンよりも安定、または ΔG_{ST} が 0 に近い場合は、一重項カルベンが MeOH と速やかに反応し、Relative Reactivity が低下する。逆に、三重項カルベンが一重項カルベンよりも大きく安定な場合は、MeOH との反応が遅く、2-methyl-2-butene との反応が相対的に速くなり、Relative Reactivity が大きくなる。このように、カルベンが基質と反応する前に、一重項カルベンと三重項カルベンは平衡にあるという仮定を前平衡機構と呼び、カルベンの反応性を説明する最も有力な説である^{49,50}。これまでの結果で、H₂O との光反応生成物から一重項カルベンとしての反応性、酸素との光反応生成物から三重項カルベンとしての反応性が、それぞれ認められているが、これは前平衡機構によって説明できる。

para-substituted methoxycarbonyl(phenyl)carbene の一重項と三重項のエネルギー差 (ΔG_{ST}) と、para のハメットの置換基定数 (σ_p) との間に正の相関があることが知られており (Table 2-3)、4 位にニトロ基が導入されている場合は三重項カルベンが安定である。一方で、4 位にメチル基が導入されている場合も三重項カルベンが安定であるが、 ΔG_{ST} は 4 位にニトロ基が導入されている場合よりも ΔG_{ST} は小さい。この知見は、Relative Reactivity を決める因子は、一重項カルベンと三重項カルベンのエネルギー差 (ΔG_{ST}) であるという考えに矛盾せず、5DA2Me-Fluoの方が methyl(4-nitrophenyl)diazoacetate よりも 2-methyl-2-butene と反応し難いという結果を説明できる。

Table 2-3 | Calculated singlet-triplet energy gaps (ΔG_{ST} , kcal/mol) and Hammett para values for para-substituted methoxycarbonyl(phenyl)carbene. A positive value of ΔG_{ST} indicates that the triplet state is more stable. Calculation condition : B3LYP/6-311+G**//B3LYP/6-31G*

 Substituents (R)	ΔG_{ST} at 298 K (kcal/mol)	σ_p
4-NH ₂	-2.8	-1.111
4-OH	-0.2	-0.853
4-Me	1.6	-0.256
4-H	2.5	0.000
4-Cl	2.4	0.035
4-CN	5.2	-
4-NO ₂	6.1	0.740

2-4-5. タンパク質との反応性

5DA2Me-Fluo がタンパク質を光ラベル化できるかを精製タンパク質 BSA を用いて検証した。結果、光照射を行った場合にのみ BSA のバンドから蛍光が認められ、5DA2Me-Fluo が光ラベル化剤として機能することが示された。

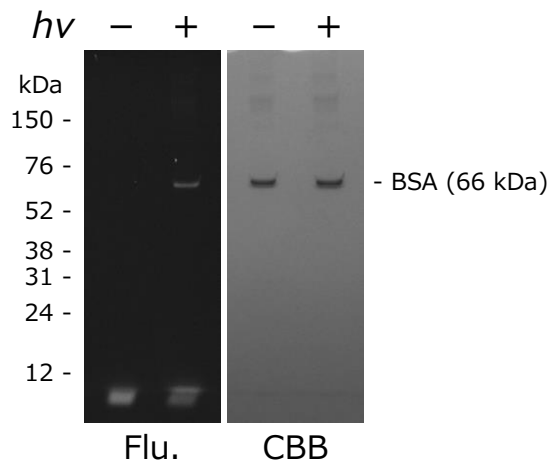


Figure 2-12 | Photolabeling of 1 mM purified BSA by 1 mM 5DA2Me-Fluo with irradiation for 30 min (ASAHI SPECTRA MAX-301, XF3075 480AF30). After 1000 fold dilution, SDS-PAGE was performed without the heat denaturation. Fluorescence was observed with gel imager (E-BOX-VX2/20M, VILVER LOURMAT). Hg lamp was used as excitation light source. F-590 filter was used and detects lights at 520–656 nm.

2-4-6. *N*-Acetyl Amino Acids との反応性

5DA2Me-Fluo から産生される活性種がどのアミノ酸と反応し易いかの傍証を得るため 1 M *N*-acetyl amino acids 水溶液中 (pH 7.4) での反応性を UPLS-MS を用いて精査した。まず、暗所での安定性を評価したところ、いずれの 1 M *N*-acetyl amino acids 水溶液中でも 5DA2Me-Fluo の分解は認められなかった (Figure 2-13)。続いて、493 nm の光照射による光反応生成物の分析を行った (Figure 2-14)。結果、ほとんどの *N*-acetyl amino acids 水溶液中では、5HA2Me-Fluo のピークのみが認められたのに対し、Tyrosine, Cysteine, Methionine 水溶液中では、その他のピークが認められた。それぞれのピークの ESI⁺ (Figure 2-15) および ESI⁻ (Figure 2-16) のスペクトルより、Y1 は O-H 挿入生成物、C1 は S-H 挿入生成物であると推定した。また M3 は、ESI⁺ および ESI⁻ のスペクトルと、求電子性の一重項カルベンが硫黄上の孤立電子対から攻撃を受けイリドを生成するという知見⁵¹より、スルホニウムイリド様の光反応生成物であると推定した。M1, M2 の構造は推定することは出来なかった。一方で、Tryptophan 水溶液中では 5DA2Me-Fluo が分解されないことが分かった。

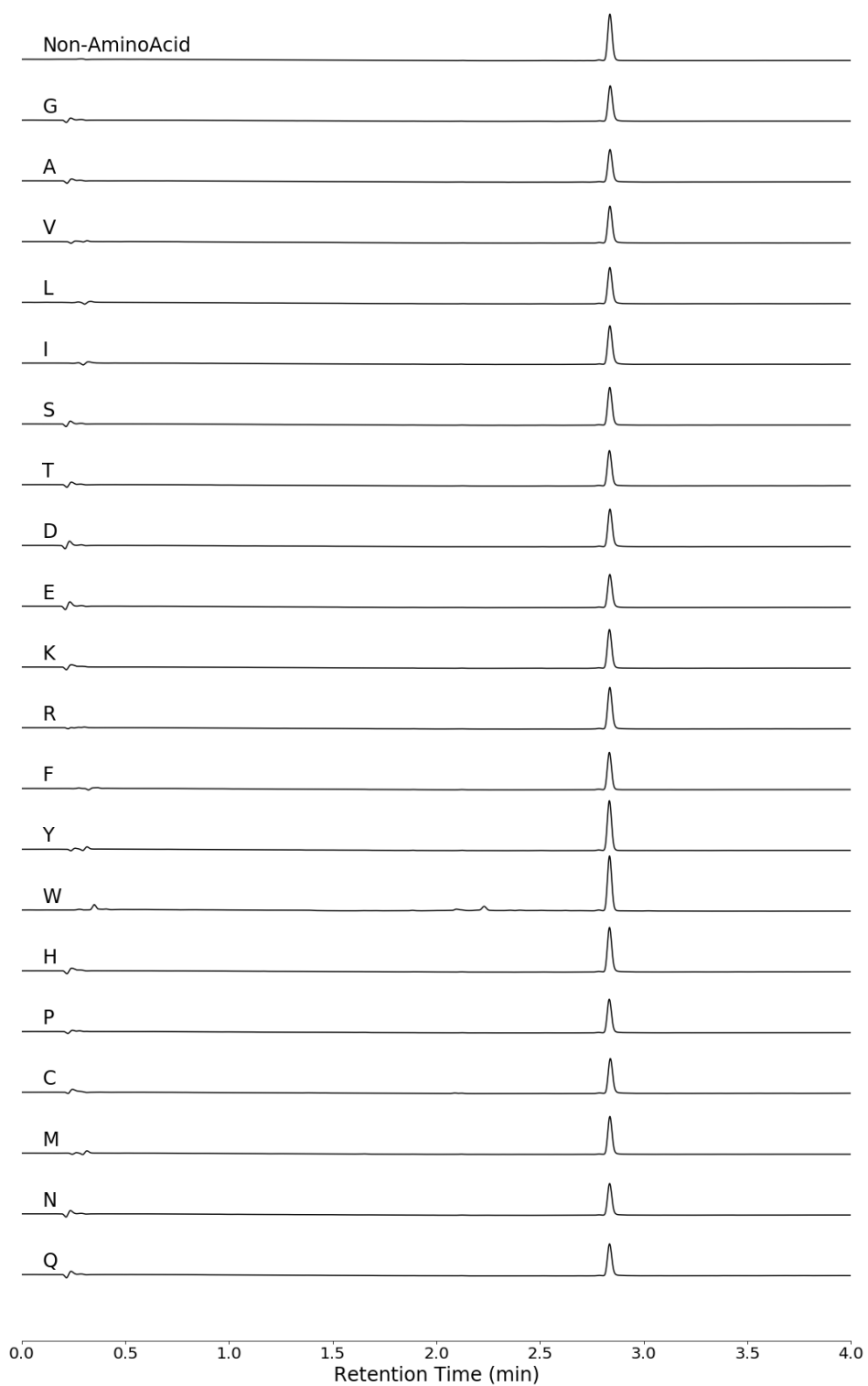


Figure 2-13 | UPLC-MS analysis of 10 μM 5DA2Me-Fluo in pH 7.4 1 M N-acetyl amino acid without irradiation for 60 min. Flow rate: 0.60 mL/min. Gradient: A/B = 95/05 at 0 min, 05/95 at 3.5 min, 05/95 at 4.0 min (A = H₂O, 10 mM Ammonium Formate. B = H₂O/CH₃CN = 4/1, 10 mM Ammonium Formate). Injected volume: 10 μL . Monitored wavelength: 493 nm.

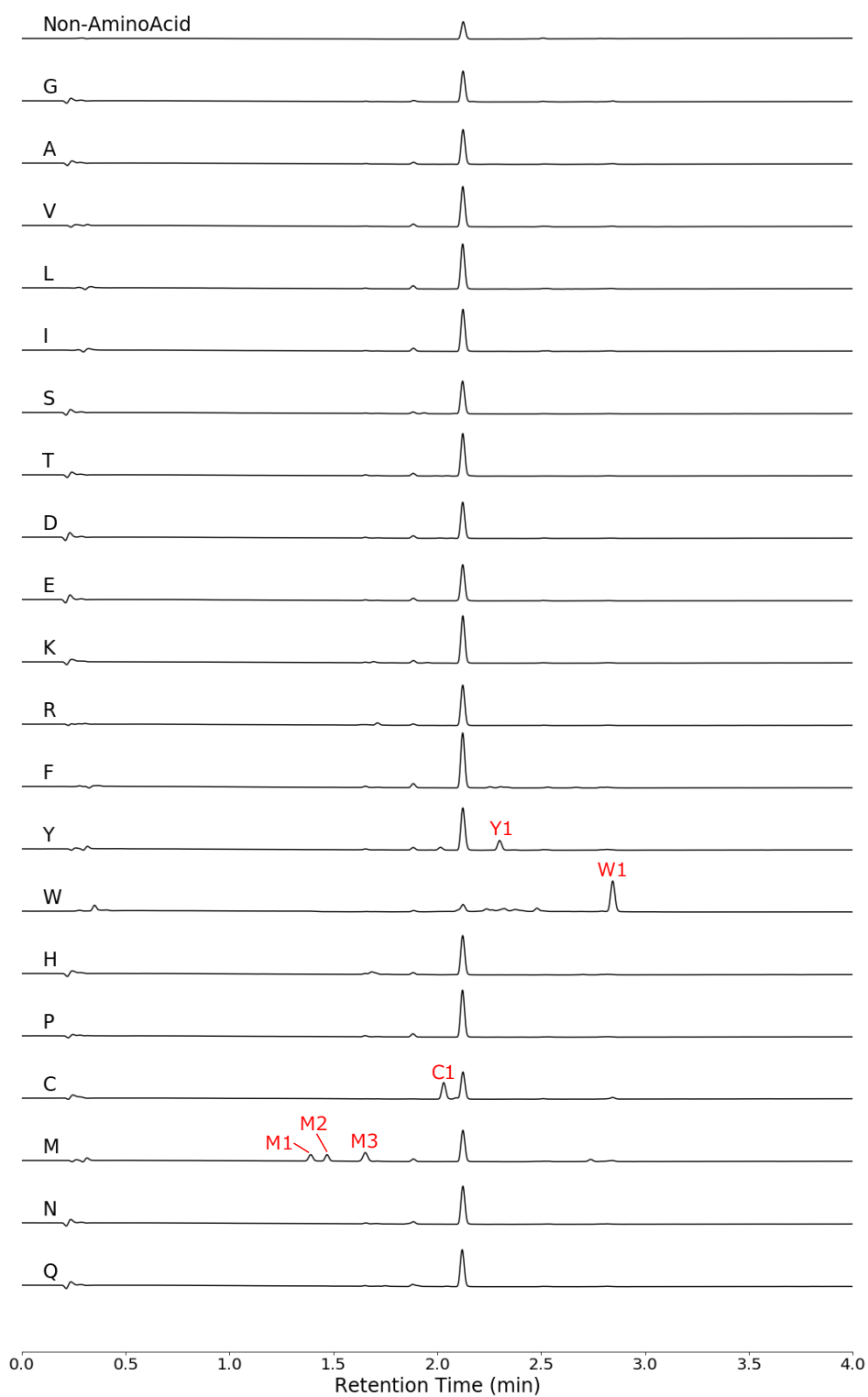


Figure 2-14 | UPLC-MS analysis of 10 μ M 5DA2Me-Fluo in pH 7.4 1 M N-acetyl amino acid with irradiation at 493 nm for 60 min. Flow rate: 0.60 mL/min. Gradient: A/B = 95/05 at 0 min, 05/95 at 3.5 min, 05/95 at 4.0 min (A = H₂O, 10 mM Ammonium Formate. B = H₂O/CH₃CN = 4/1, 10 mM Ammonium Formate). Injected volume: 10 μ L. Monitored wavelength: 493 nm.

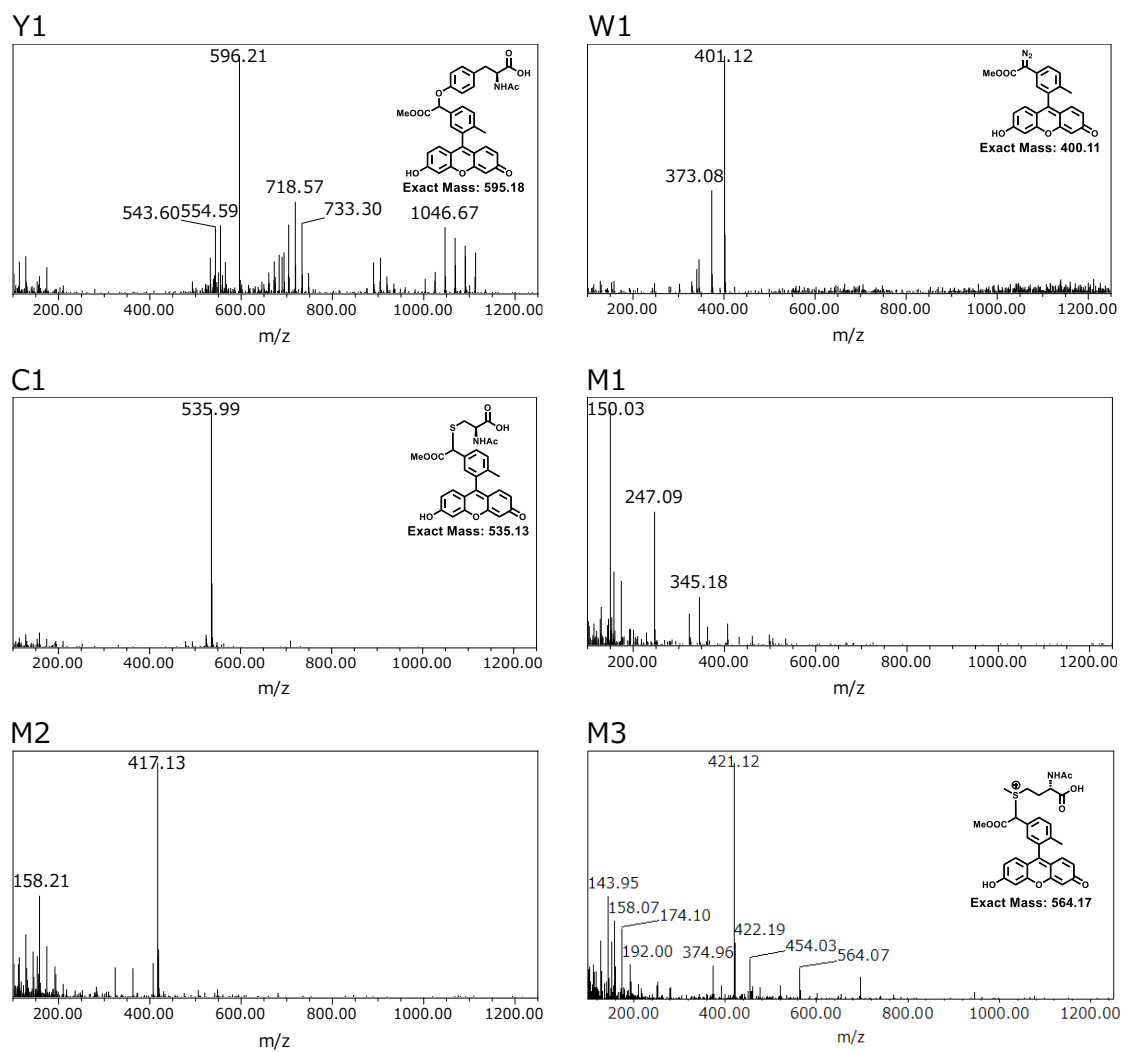


Figure 2-15 | ESI⁺ spectra of photoreaction products in pH7.4 1 M tyrosine, cysteine or methionine.

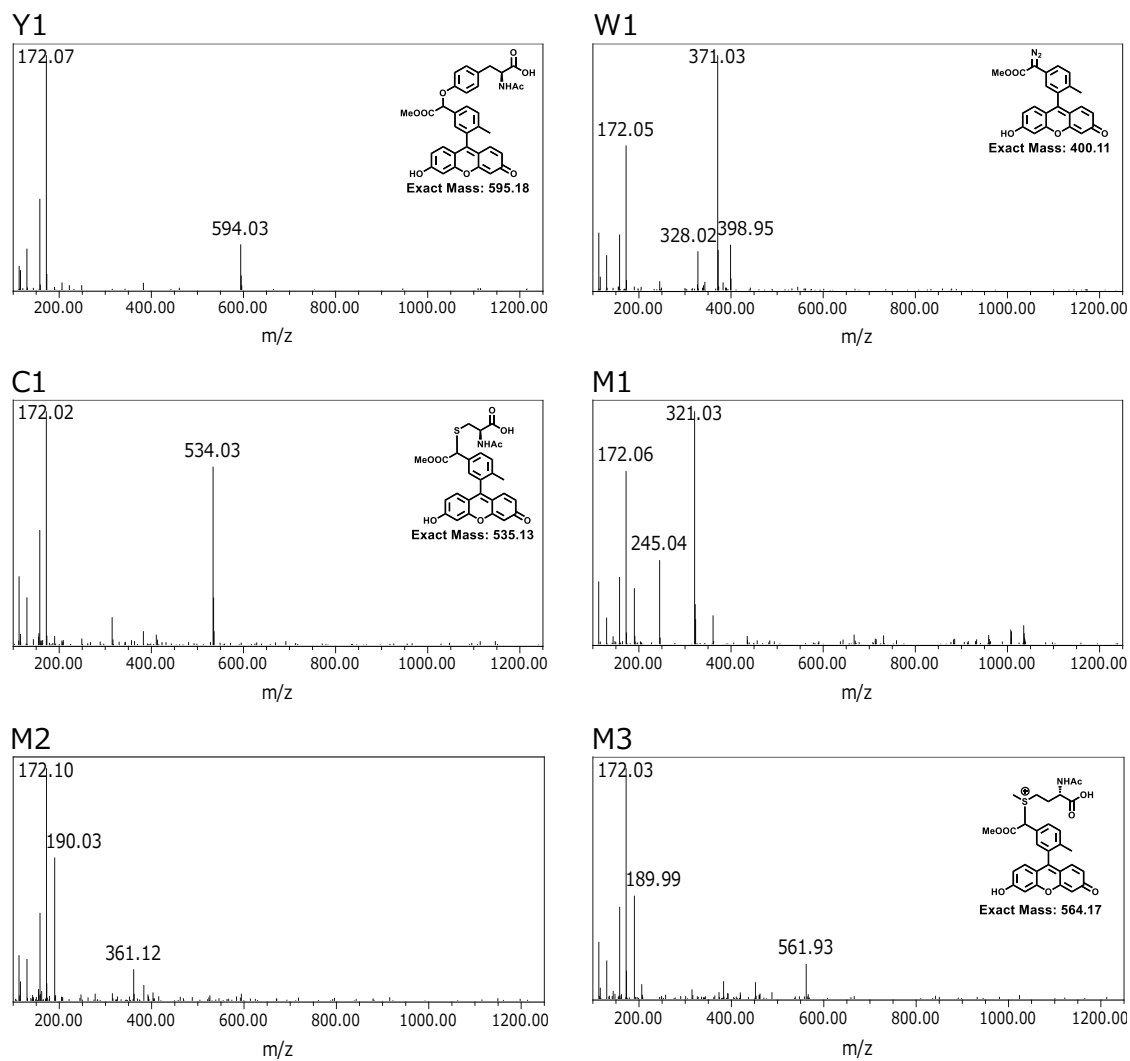


Figure 2-16 | ESI⁻ spectra of photoreaction products in pH7.4 1 M tyrosine, cysteine or methionine.

今回、反応性の評価に使用した 1 M *N*-acetyl amino acids 水溶液中での、*N*-acetyl amino acids : H₂O のモル比は、およそ 1 : 56 である。つまり、*N*-acetyl amino acids が H₂O に対して 56 倍高い反応性を有していれば、*N*-acetyl amino acids : H₂O の光反応生成物の比は 1 : 1 となる。逆に、H₂O と同程度またはそれを下回る反応性の場合は、光反応生成物として検出されない。一重項カルベンである dimethoxycarbonylcarbene の、様々な基質に対する相対反応性を精査した先行研究によれば^{52, 51, 53} (Figure 2-17), dimethyl sulfide が methanol に対して 7.7 倍 (1/0.13 倍) 高い反応性を示しており、methanol と H₂O, dimethyl sulfide と Cystein または Methionine が同程度の反応性を有すると仮定すれば、Cystein や Methionine は H₂O よりもカルベンとの反応性が高く、先の実験で光反応生成物が検出されたと考えられる。

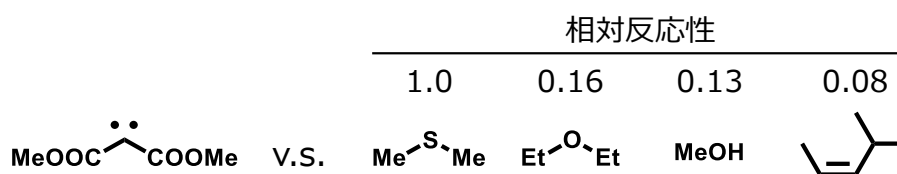


Figure 2-17 | Relative reactivities between single state carbene and, dimethyl sulfide, diethyl ether, methanol or 4-methyl-2-pentene.

N-acetyl amino acids との反応性を精査した際に、特徴的な結果が認められたものに関して、吸収および蛍光スペクトルを取得した。Tryptophan 溶液中では 5DA2Me-Fluo の光反応が抑制される結果が得られているが、Figure 2-18-a を見ると、1.0 M Tryptophan (pH 7.4) 水溶液中での吸収スペクトル（水色線）は、0.1 M NaPi buffer (pH 7.4) 中での吸収スペクトル（赤線）に比べて長波長化しており、スタッキングが起こっていることが示唆される。さらに Figure 2-18-b を見ると、1.0 M Tryptophan (pH 7.4) 水溶液中では無蛍光性であることが分かる。これは、スタッキングによる効果だけでなく、5DA2Me-Fluo と Tryptophan との間で分子間の光誘起電子移動が起こっているためであると考えられる。以上を踏まえると、ジアゾの分解が抑制された理由は、スタッキングや分子間の光誘起電子移動により、分子内の光誘起電子移動が阻害されたためであると考えた。

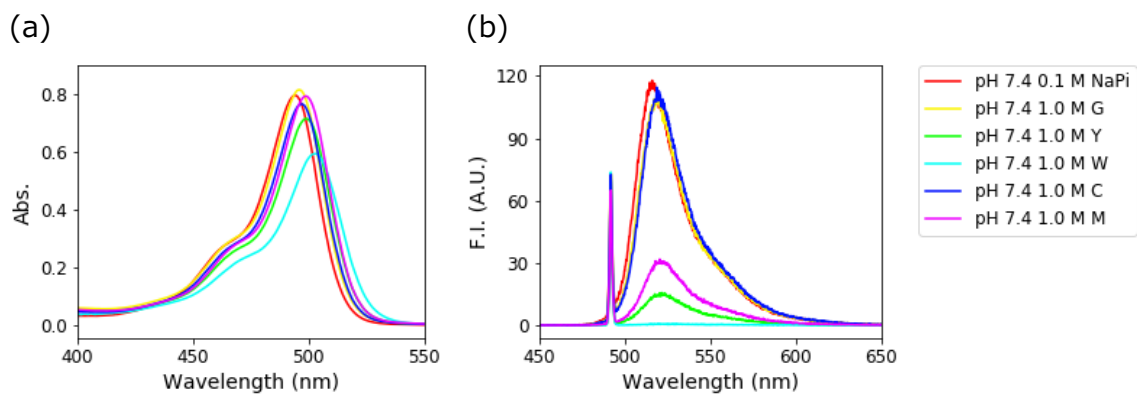


Figure 2-18 | (a) Absorption and (b) fluorescence spectra of 10 μ M 5DA2Me-Fluo in pH 7.430 0.1 M NaPi, pH 7.398 1.0 M N-acethyl glycine, pH 7.430 1.0 M tyrosine, pH 7.417 1.0 M tryptophan, pH 7.371 1.0 M cysteine and pH 7.435 1.0 M methionine. Excitation wavelength: 493 nm.

続いて、5DA2Me-Fluo の benzene 部位に相当する 5DA2Me (Scheme 2-2 で合成済み) を紫外光励起した際に産生するカルベンの 1 M *N*-acetyl amino acids (pH 7.4) 水溶液中での反応性を精査することとした。青線が 1 M *N*-acetyl amino acids + DMSO, 赤線が 1 M *N*-acetyl amino acids + 1 mM 5DA2Me のクロマトグラムを表す (Figure 2-19)。結果、5DA2Me と良く反応する *N*-acetyl amino acids は Tyrosine, Tryptophan, Histidine, Cysteine, Methionine であることが分かった。5DA2Me-Fluo では光反応が進行しなかったため評価できなかった Tryptophan を除くと、最も良く反応するのは Tyrosine, Cysteine である結果は 5DA2Me-Fluo の結果と概ね一致する。この結果より、5DA2Me を紫外光励起した際に産生するカルベンと 5DA2Me-Fluo から産生する活性種は非常によく似た反応性を示し、5DA2Me-Fluo から産生する活性種がカルベンであることを支持する傍証となった。

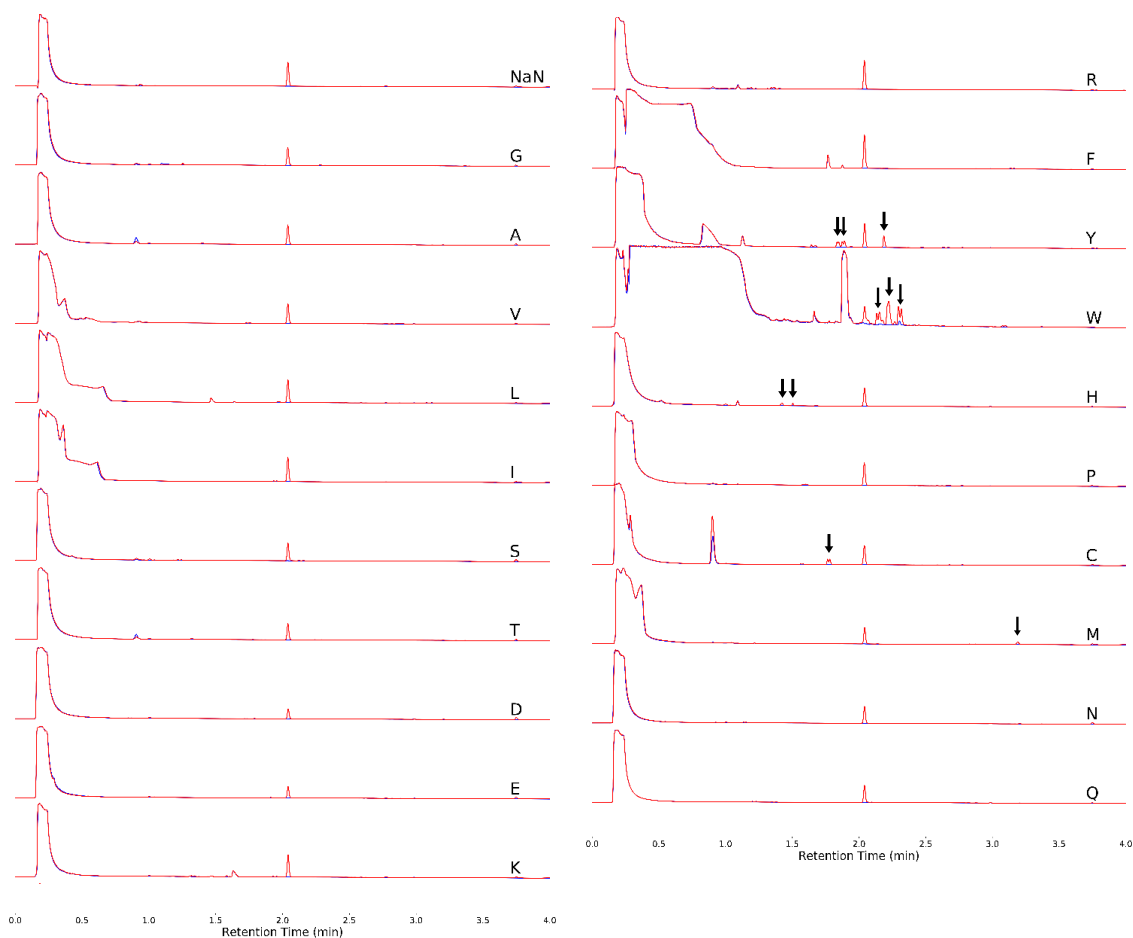


Figure 2-19 | UPLC-MS analysis of 1 mM 5DA2Me (red) and blank (blue) in pH 7.4 1 M N-acetyl amino acid with white light irradiation for 60 min. Flow rate: 0.80 mL/min. Gradient: A/B = 95/05 at 0 min, 05/95 at 3.5 min, 05/95 at 4.0 min (A = H₂O, 10 mM Ammonium Formate. B = H₂O/CH₃CN = 4/1, 10 mM Ammonium Formate). Injected volume: 5 μ L. Monitored wavelength: 220 nm.

2-5. 5DA2Me の可視光による分解の有無

ここまでの検討で、493 nm の光照射によって 5DA2Me-Fluo が光ラベル化剤として機能することを示した。しかし、光照射装置の特性（回折格子の特性）として、指定した波長の整数倍（低調波）、または整数分の 1 の波長（高調波）も照射し得る。実際、使用している光照射装置で、近赤外光（900 nm）を照射すると、本来は目には見えないはずであるが、青色光（450 nm）が観測されている（Figure 2-20-a, b）。しかし、これは回折後にフィルターを通さない場合の話であり、実際は 493 nm の光を照射する場合には L37 フィルター（Figure 2-20, 水色のスペクトル）を通しており、紫外光の大部分はカットされていると思われる。しかし、フィルターによって 493 nm の高調波（247 nm）が完全にカットできない恐れがある。そこで、5DA2Me-Fluo の光反応の進行が高調波によるものか否かを 5DA2Me (Scheme 2-2 で合成済み) を用いて検証した。

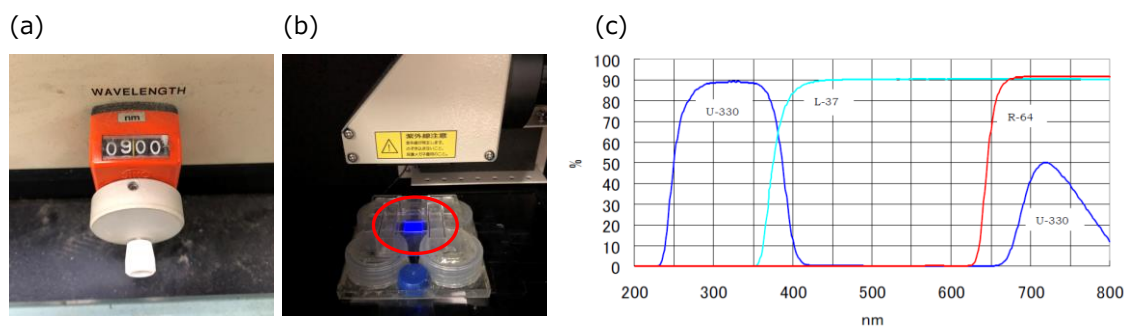


Figure 2-20 | (a) The irradiation wavelength was set at 900 nm. (b) The color when irradiation at 900 nm. (c) Filter characteristics.

5DA2Me-Fluo および 5DA2Me に 493 nm の光照射にした場合、5DA2Me では分解が認められなかったが (Figure 2-21), 5DA2Me-Fluo では光照射依存的な分解が認められた (Figure 2-22). 以上より、5DA2Me-Fluo の光反応は 493 nm の高調波 (247 nm) ではなく、493 nm の光依存的に進行していることを示した.

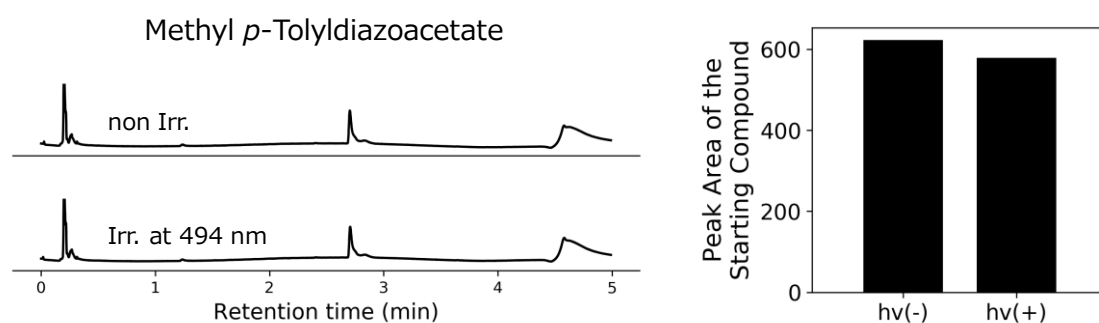


Figure 2-21 | UPLC-MS analysis of 40 μ M 5DA2Me in pH 9.0 0.1 M sodium phosphate buffer with or without irradiation at 493 nm for 30 min. Eluent : A (H_2O , 0.1 M formic acid), B ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O} = 8/2$, 0.1 M formic acid), Gradient : A/B = 95/05 to 05/95 for 3.0 min , Flow rate : 0.6 mL/min, Detection wavelength : 280 nm.

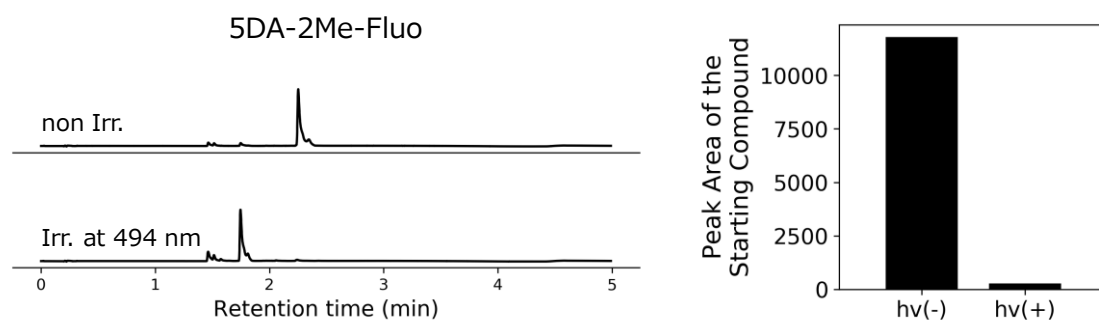


Figure 2-22 | UPLC-MS analysis of 40 μ M 5DA2Me-Fluo in pH 9.0 0.1 M sodium phosphate buffer with or without irradiation at 493 nm for 30 min. Eluent : A (H_2O , 0.1 M formic acid), B ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O} = 8/2$, 0.1 M formic acid), Gradient : A/B = 95/05 to 05/95 for 3.0 min , Flow rate : 0.6 mL/min, Detection wavelength : 441 nm.

2-6. 三重項励起状態の関与

ここまで、カルベン産生の機構として光誘起電子移動を経由する経路を考えているが、下記のように三重項励起状態が関与する可能性も考えられる。しかし、ここまでの結果からは三重項励起状態の関与について否定はできない。

1. キサンテン環が励起され、一重項励起状態となる ($h\nu$).
2. 項間交差により、三重項励起状態となる (k_{isc}).
3. エネルギー移動が起こり、ベンゼン環が三重項励起状態となり、ジアゾ基が分解する (k_{dec}).

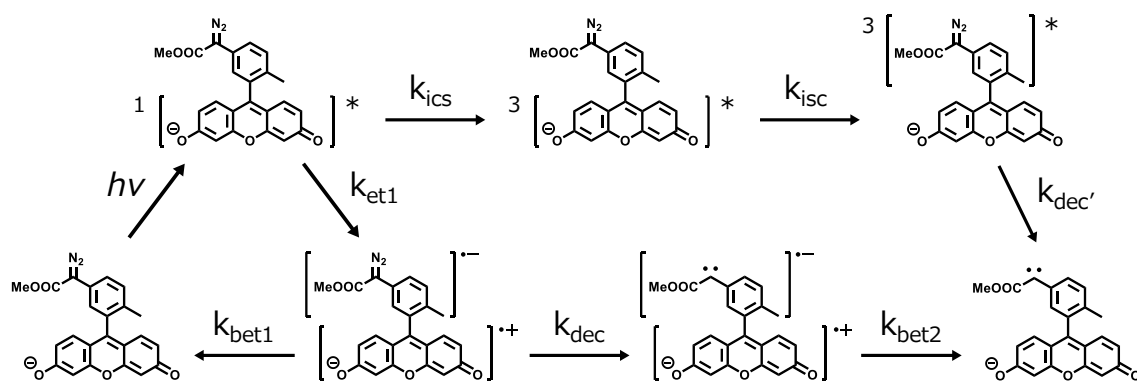


Figure 2-23 | The expected reaction mechanism for the carbene generation via photoinduced electron transfer and triplet excited state.

そこで、以下の 3 点について文献調査を行った。① 三重項励起状態のジアゾ化合物からカルベンを産生し得るか。② Fluorescein は三重項励起状態となり得るか。③ Fluorescein が三重項励起状態になるとして、xanthene 部位から benzene 部位へのエネルギー移動は起こり得るか。

■ 三重項励起状態のジアゾ化合物からのカルベン産生

TMBP (tetramethoxybenzophenone) を触媒とすることで、ジアゾ化合物が三重項励起状態となり、三重項カルベンを産生するという報告がある⁵⁴。

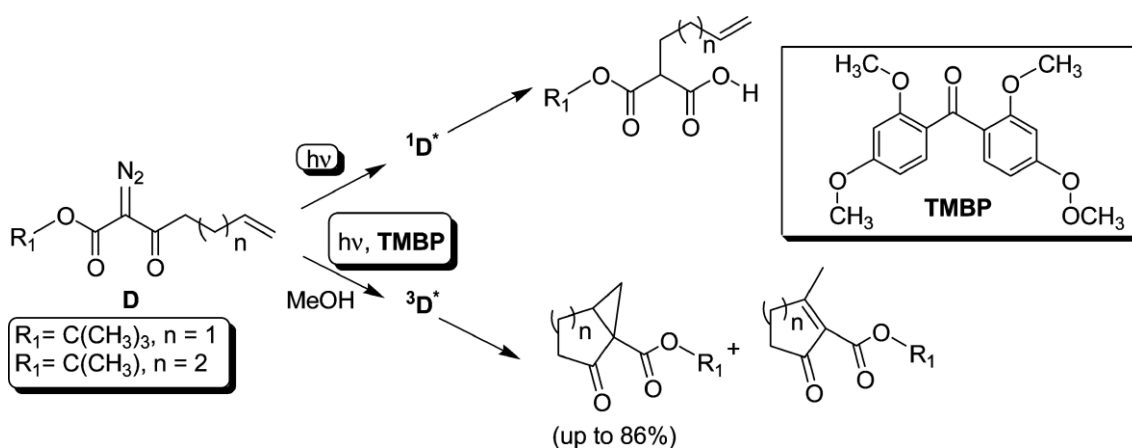


Figure 2-24 | Triplet-sensitized photolysis of α -diazo carbonyl compounds in the presence of a high excess of TMBP (tetramethoxybenzophenone).

■ Fluorescein の三重項励起状態

Fluorescein は項間交差の速度 $k_{isc} = 6.6 \mu\text{s}^{-1}$ が実測されている⁵⁵。同じ論文内で算出された Fluorescein の蛍光放射過程の速度 $k_d = 213.4 \mu\text{s}^{-1}$ を見ると、一重項励起状態となった後は蛍光放出を伴い基底状態に戻る経路が主であることが分かる。さらに、この論文では、三重項励起状態の Fluorescein が酸素によりクエンチされ基底状態に戻る過程の速度定数 $k_8 = 1560 \text{ M}^{-1} \mu\text{s}^{-1}$ が示されている。また別の論文で算出された k_{isc} は、Fluorescein: $= 13.5 \mu\text{s}^{-1}$, ATTO 488: $1.7 \mu\text{s}^{-1}$, Rho110: $1.3 \mu\text{s}^{-1}$, Rho123: $1.2 \mu\text{s}^{-1}$ となっている⁵⁶。以上より、Fluorescein は一重項励起状態から三重項励起状態となり得るが、他の経路と比較して項間交差の速度は遅く、大半は三重項励起状態にならないということが分かった。

■ Xanthene 部位から benzene 部位へのエネルギー移動

光増感剤として知られる erythrosine, phloxine, rose bengal は、基底状態から一重項励起状態となった後、速やかに項間交差を起こして三重項励起状態となる。それらの benzene 部位の 2 位から anthracene をエステル結合で繋いだ化合物を合成し、xanthene 部位から anthracene へのエネルギー移動の有無を観測したところ、erythrosine, phloxine では比較的効率よくエネルギー移動が起こっていると報告されている⁵⁷。

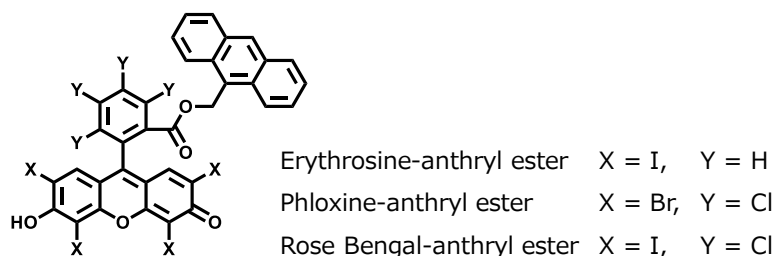


Figure 2-25 | Intramolecular triplet-triplet energy transfer from xanthene dyes to an anthryl substituent.

■ 含酸素，脱酸素溶液中での光反応

先の文献調査で，三重項励起状態を介したカルベンの産生を強く否定する知見は得られなかったが，酸素が fluorescein の三重項励起状態をクエンチするという知見が得られた⁵⁵。そこで，含酸素溶媒と脱酸素溶媒での光反応効率を比較することとした。つまり，三重項励起状態を介してカルベンが産生する場合，含酸素溶媒では三重項励起状態が速やかにクエンチされ光反応効率が低下すると考えた。そして，Ar を 30 分間バブルして用意した脱酸素溶液，O₂ を 30 分間バブルして用意した含酸素溶液，バブリングを行っていない溶液での 5DA2Me-Fluo の光反応効率を比較した (Figure 2-26)。結果として，含酸素溶液 (O₂)，バブリングを行っていない溶液 (Air)，脱酸素溶液 (Ar) の間で 5DA2Me-Fluo の消失量，すなわち光反応効率に差異はなく (Figure 2-27)，酸素の有無は 5DA2Me-Fluo の光反応効率に関与しないことが示され，三重項励起状態の関与を否定する結果を得た。

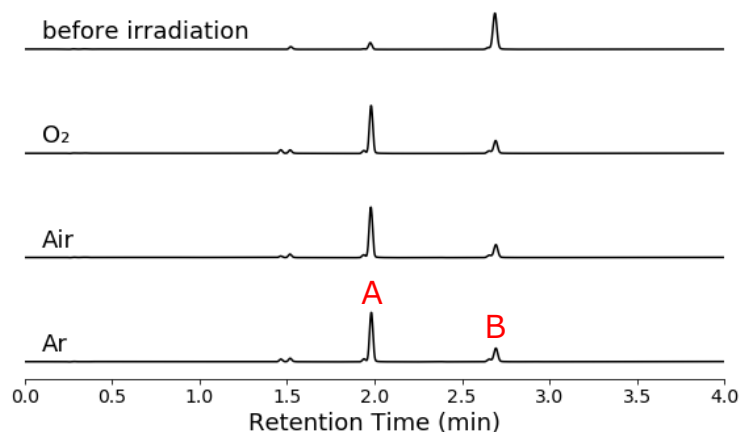


Figure 2-26 | UPLC-MS analysis of 10 μ M 5DA2Me-Fluo in O₂ bubbled, non-bubbled or Ar bubbled pH 7.4 0.1 M sodium phosphate buffer with irradiation at 493 nm for 60 min. Flow rate: 0.60 mL/min. Gradient: A/B = 95/05 at 0 min, 05/95 at 3.5 min, 05/95 at 4.0 min (A = H₂O, 10 mM Ammonium Formate. B = H₂O/CH₃CN = 4/1, 10 mM Ammonium Formate). Injected volume: 5 μ L. Monitored wavelength: 493 nm.

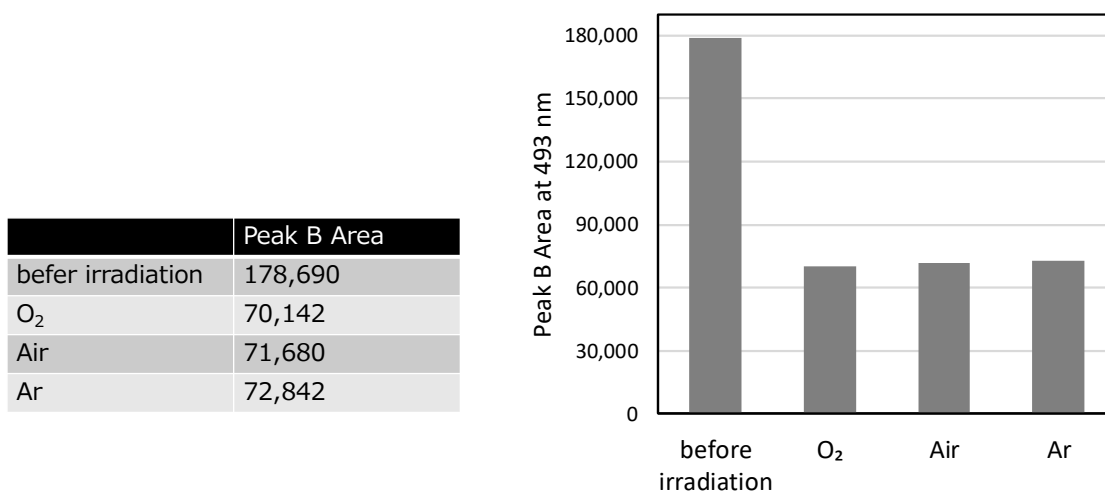


Figure 2-27 | Table and bar chart of peak B area in Figure 2-26.

2-7. Wolff 転移

ジアゾ化合物は、カルベンからケテンの産生を経て Wolff 転移を起こし得ることが知られている。しかし、ここまでの結果で 5DA2Me-Fluo から Wolff 転移による光反応生成物は認められていない。一般的に、Wolff 転移を引き起こすケテンの産生には concerted mechanism と stepwise mechanism の2つの機構が提唱されている (Figure 2-28)⁵⁸。それらの機構を介してケテンが産生するかは R₁ の転移能によって決まり、一般的に H > alkyl >> aryl > SR > OR >> NR₂ の順に転移能が低下することが実験的に示されている⁵⁹。この中で OR は転移能がかなり低く Wolff 転移はほとんど進行しないとされており、実際に 5DA2Me の類縁体である methyl phenyldiazoacetate の Wolff 転移は、痕跡量でしか進行しないと報告されている⁶⁰。しかし R₁ が OR の場合でも、diazo Meldrum's acid のように配座が syn 型に固定されている場合、concerted mechanism によりケテンが産生されることが知られている⁶¹。以上より、5DA2Me-Fluo の R₁ は OMe で転移能が低く、配座が syn 型に固定されていないため Wolff 転移は進行しないと考察した。

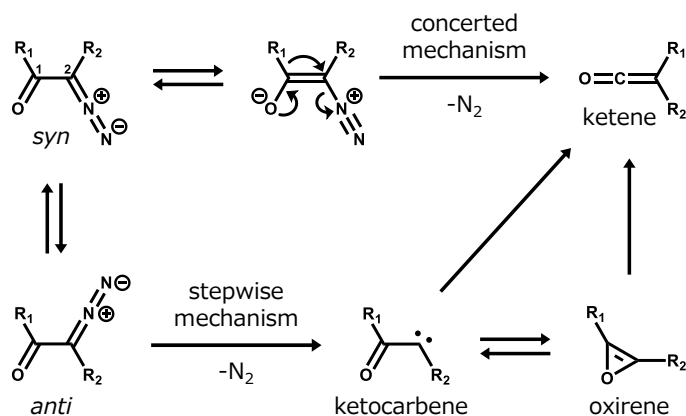


Figure 2-28 | The general mechanism of producing ketene.

2-8. 抗体認識

抗 fluorescein 抗体が GeneTex 社より販売されており，5DA2Me-Fluo が抗 fluorescein 抗体に認識されるかを検証した．5DA2Me-Fluo で光ラベル化した BSA，ポジティブコントロールとして FITC でラベル化した BSA，ネガティブコントロールとして色素の代わりに DMSO を添加し，光照射をした BSA を用意した．これら 3 種類の BSA が抗 fluorescein 抗体によるウェスタンブロットで検出できるかを確かめた．まずは，5DA2Me-Fluo および FITC で BSA をラベル化できているかを SDS-PAGE によって確かめた (Figure 2-29-a)．結果，両者とも BSA を蛍光ラベル化できていることが分かった．また，その蛍光強度が同程度あることから，degree of labeling も同程度であると判断した．続いて，抗 fluorescein 抗体によるウェスタンブロットを行った (Figure 2-29-b)．結果，5DA2Me-Fluo で光ラベル化された BSA は抗 fluorescein 抗体に認識され，検出用官能基として機能することが分かった．しかし，FITC でラベル化された BSA から，より強い発色が認められている．これは，5DA2Me-Fluo の benzene 部位の 2 位はメチルであるのに対し，fluorescein の benzene 部位はカルボン酸であり，この差が抗 fluorescein 抗体の認識に影響を与えていると考えられる．すなわち，5DA2Me-Fluo の benzene 部位 2 位の Me を COOH にすると，より強い抗 fluorescein 抗体との相互作用が期待できる．

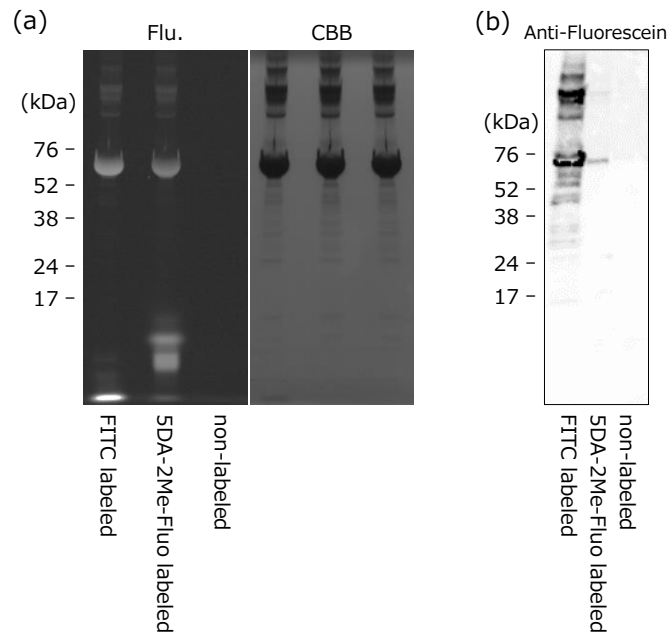


Figure 2-29 | (a) SDS-PAGE analysis for checking whether labeling was done. 1 mM BSA was labeled with 1 mM 5DA2Me-Fluo or 1 mM FITC. Fluorescence and white light image were obtained with the gel imager (E-BOX-VX2/20M, VILVER LOURMAT). Excitation light: Hg lamp. Emission filter: F-590 filter (520–656 nm). [190301-1800] (b) Western blot analysis for checking whether Anti-Fluorescein antibody recognizes 5DA2Me-Fluo labeled BSA. Protein amount: 0.2 μ g/well. Dilution rate of Anti-Fluorescein antibody: 1/500. Dilution rate of Rabbit IgG HRP Linked F(ab')₂: 1/1000.

2-9. 小括

- 分子内の光誘起電子移動を作動原理とする光ラベル化剤として， fluorescein の benzene 部位の 5 位に diazoacetate 構造を， 2 位に methyl 基を導入した 5DA2Me-Fluo を設計および合成し， 493 nm の光照射依存的にタンパク質を光ラベル化し， 光ラベル化剤として機能することを示した。
- 5DA2Me-Fluo の光反応効率 $\epsilon \times \Phi_{\text{photoreaction}}$ は， 既存の光ラベル化剤の中で最も汎用される diazirine と同程度であることを示した。
- 5DA2Me-Fluo から光照射依存的に産生される活性種は 2-methyl-2-butene と反応してシクロプロパンを形成することを支持する結果が得られ， 分子設計通りにカルベンが産生していることが示唆された。

3. 光反応量子収率の改善

3-1. d-PeT と a-PeT

Figure 2-2, Figure 2-4 で fluorescein 誘導体の蛍光量子収率と, benzene 部位の LUMO エネルギーまたは還元電位の関係を精査し, 5DA2Me-Fluo で光誘起電子移動が起こっていることを示唆する結果を得た. この光誘起電子移動は xanthene 部位から benzene 部位へ一電子が移動しており, xanthene 部位が donar として機能するため d-PeT と呼ばれる. 一方で, xanthene が accepter として機能する場合は a-PeT と呼ばれており, d-PeT と同じように, fluorescein 誘導体の蛍光量子収率と, benzene 部位の HOMO エネルギーまたは酸化電位との間に相関があることが知られている⁶². そこで, 縦軸を fluorescein 誘導体の蛍光量子収率, 横軸を benzene 部位の HOMO エネルギーとして散布図を作成したところ (Figure 3-1), 5DA2Me は a-PeT が起こる閾値を超えていることが明らかとなった. つまり, 5DA2Me-Fluo では a-PeT と d-PeT が共に起こり得ることが示唆された.

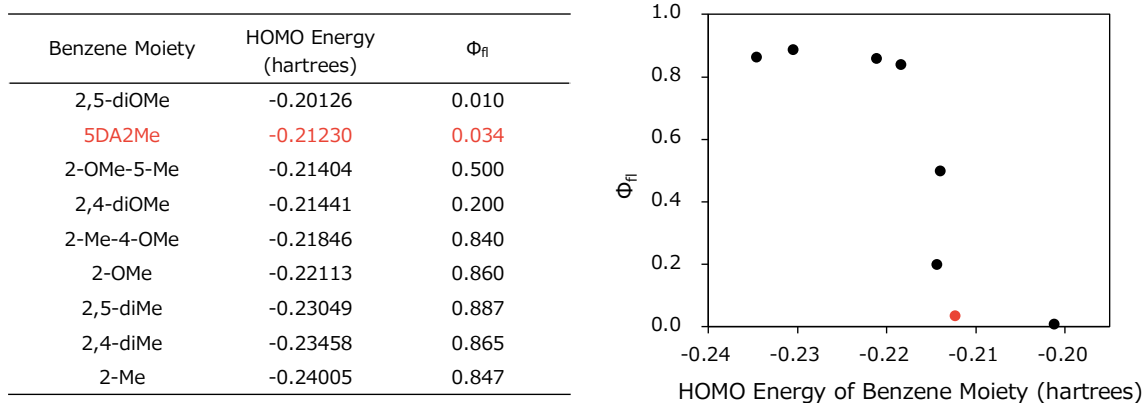


Figure 3-1 | Dynamic change of the fluorescence quantum yield (Φ_f) of fluorescein derivative and 5DA2Me-Fluo, depending on the HOMO energy level of their benzene moiety. Φ_f of 5DA2Me-Fluo was absolute fluorescence quantum yield in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 9.0). Φ_f of other fluorescein derivatives were relative fluorescence quantum yield in NaOH aq. (pH 13)⁶², using $\Phi_f = 0.85$ of fluorescein in 0.1 M NaOH aq. as a fluorescence standard⁴⁴. Calculation condition : opt freq b3lyp/6-31g(d) scrf=(solvent=water).

3-2. ラジカルアニオン, ラジカルカチオン状態での脱窒素反応

5DA2Me-Fluo のカルベン産生が a-PeT, d-PeT のどちらに因るものを議論するため, ラジカルアニオン状態, ラジカルカチオン状態の 5DA2Me における脱窒素反応を量子化学計算より精査した. まず, 計算条件の検討も兼ねて構造最適化を行ったところ, ラジカルアニオン状態では C=N=N の結合角は 133° なのに対し (Figure 3-2-b), ラジカルカチオン状態では C=N=N の結合角は 180° であった (Figure 3-2-a). ラジカルアニオン状態の methyl 4-nitrophenyl diazoacetate の最適化構造は既に報告されており³⁹, Figure 3-2-b の最適化構造と同様に C=N=N の結合角は 133° であった (Figure 3-2-c).

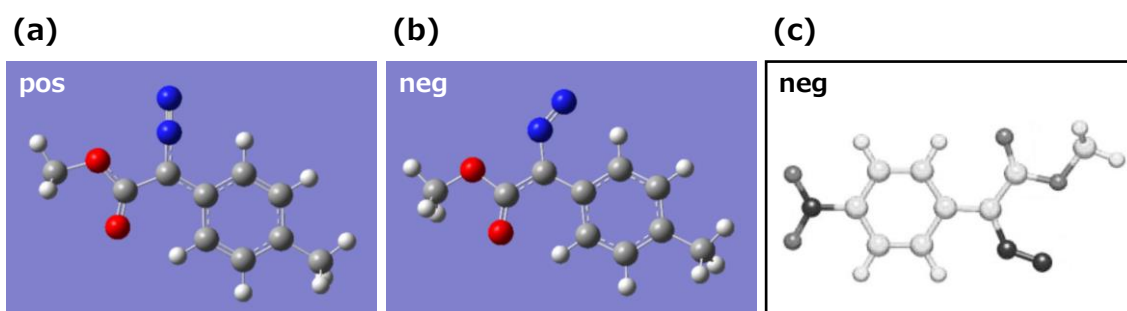


Figure 3-2 | The optimized structure of (a) negatively and (b) positively charged 5DA2Me. Calculation condition: opt freq ub3lyp/6-31+g(d) scrf=(solvent=water) geom=connectivity. S**2 values : 0.7630 (pos), 0.7580 (neg). (c) The optimized structure of negatively charged methyl 4-nitrophenyl diazoacetate. Calculation condition: UB3LYP/6-31G(d).

続いて、脱窒素反応の遷移状態を取得し、IRC 計算を行い、Figure 3-3, Figure 3-4 を得た。ラジカルアニオン状態の活性化自由エネルギーは 17.6 kcal/mol となり、脱窒素反応は室温で十分進行する値となった (Table 3-1, 上段)。一方で、ラジカルカチオン状態の活性化自由エネルギーは 24.6 kcal/mol となり、脱窒素反応は室温での進行は困難であるとの結果が得られた (Table 3-1, 下段)。

Table 3-1 | Reaction rate constant of positively or negatively charged 5DA2Me.

	Local minimum	TS	ΔG (kcal / mol)	k (1 / sec)	τ (sec)
Neg	-647.009823	-646.981757	1.76E+01	7.26E-01	1.38E+00
Pos	-646.678621	-646.639481	2.46E+01	5.74E-06	1.74E+05

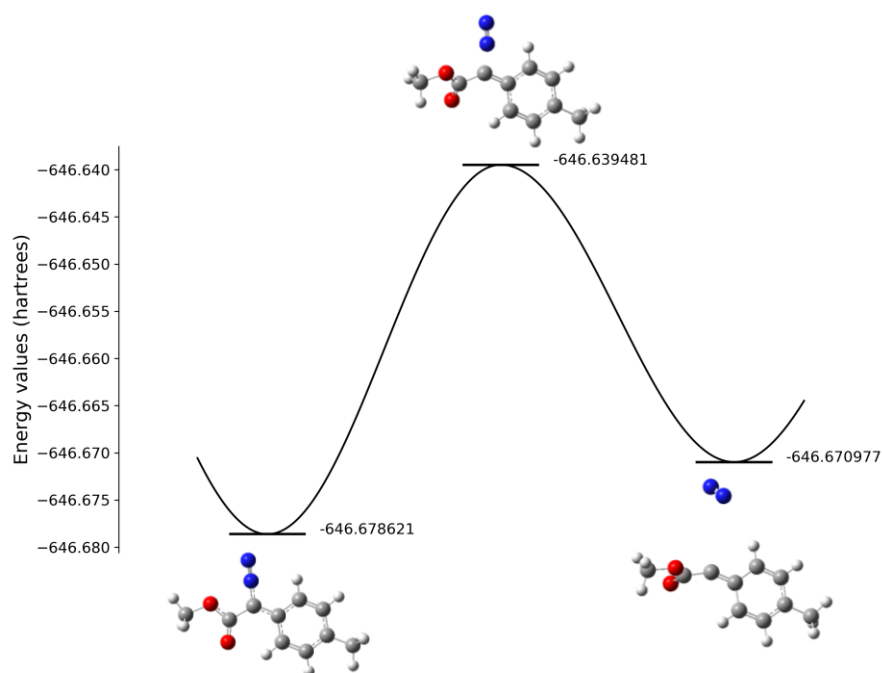


Figure 3-3 | Free energy values of TS and local minima of positively charged 5DA2Me. Calculation condition : opt freq ub3lyp/6-31+g(d) scrf=(solvent=water) geom=connectivity. S**2 values : 0.7630 (before), 0.7615 (TS), 0.7692 (after).

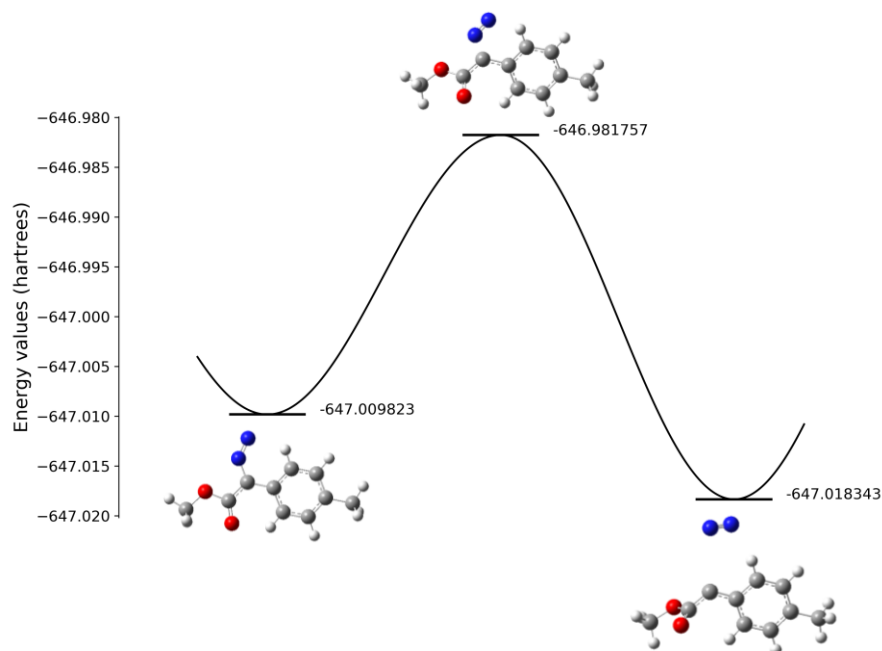


Figure 3-4 | Free energy values of TS and local minima of negatively charged 5DA2Me. Calculation condition : opt freq ub3lyp/6-31+g(d) scrf=(solvent=water) geom=connectivity. S**2 values : 0.7580 (before), 0.7650 (TS), 0.7797 (after).

3-3. d-PeT が優先して起こる光ラベル化剤の設計

先の結果より, a-PeT よりも d-PeT を優先させれば, 光反応量子収率を改善できると考え, 改めて分子設計を行った. その結果, benzene 部位の 2 位を trifluoromethyl 基とした 5DA2CF3 の LUMO および HOMO エネルギーと fluorescein 誘導体の蛍光量子収率の関係を見ると, d-PeT が起こる閾値を超えているが, a-PeT が起こる閾値を超えておらず (Figure 3-5), その構造を benzene 部位に持つ fluorescein 誘導体 5DA2CF3-Fluo は a-PeT よりも d-PeT が優先されると予想された.

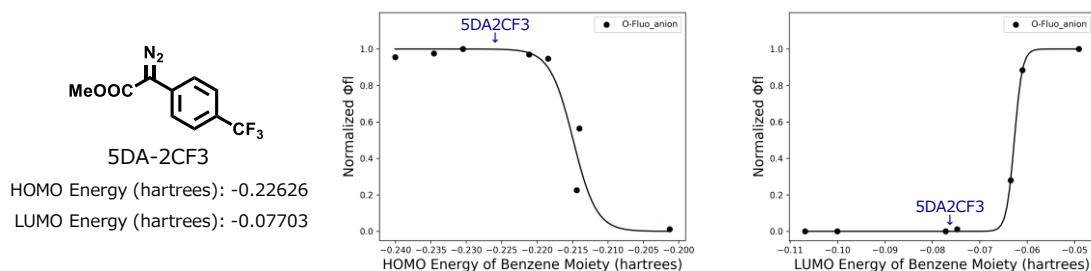
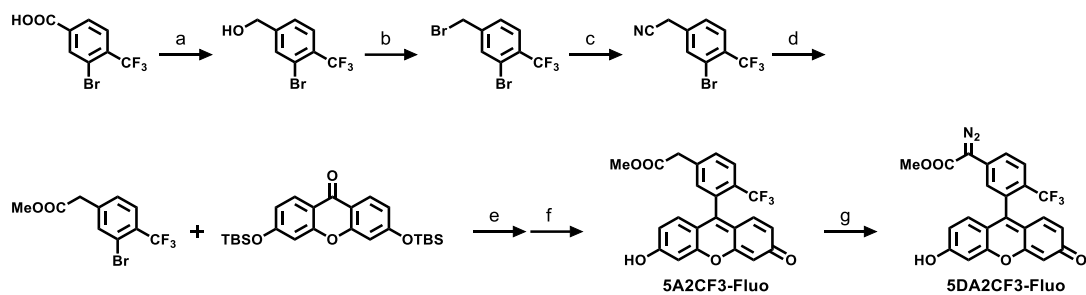


Figure 3-5 | HOMO and LUMO energy of 5DA2CF3 calculated at the opt freq b3lyp/6-31g(d) scrf=(solvent=water) nosymm geom=connectivity.

3-4. 合成

a-PeT よりも d-PeT が優先して起こることが期待される 5DA2CF3-Fluo と、そのジアゾ化前の 5A2CF3-Fluo を Scheme 3-1 に従い合成した。



Scheme 3-1 | Synthesis of 5A2CF3-Fluo and 5DA2CF3-Fluo. (a) $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$, THF. (b) PBr_3 , CH_2Cl_2 . (c) TMSCN , TBAF, CH_3CN . (d) H_2SO_4 , MeOH. (e) *sec*-BuLi, THF. (f) 2N HCl aq. (g) Tosyl Azide, DBU, DMSO, CH_3CN .

3-5. 光学特性

合成した 5A2CF3-Fluo および 5DA2CF3-Fluo の光学特性を取得したところ (Figure 3-6), 5A2Me-Fluo と 5DA2Me-Fluo との比較と同じように, ジアゾ化によって紫外光領域の吸収スペクトルに変化が認められたが, 可視光領域の吸収スペクトルには変化が認められなかった. 一方で, 蛍光量子収率を比較すると, ジアゾ化によって低蛍光性になっていることが分かり, Figure 3-5 の結果より d-PeT による消光が起こっていることが示唆される.

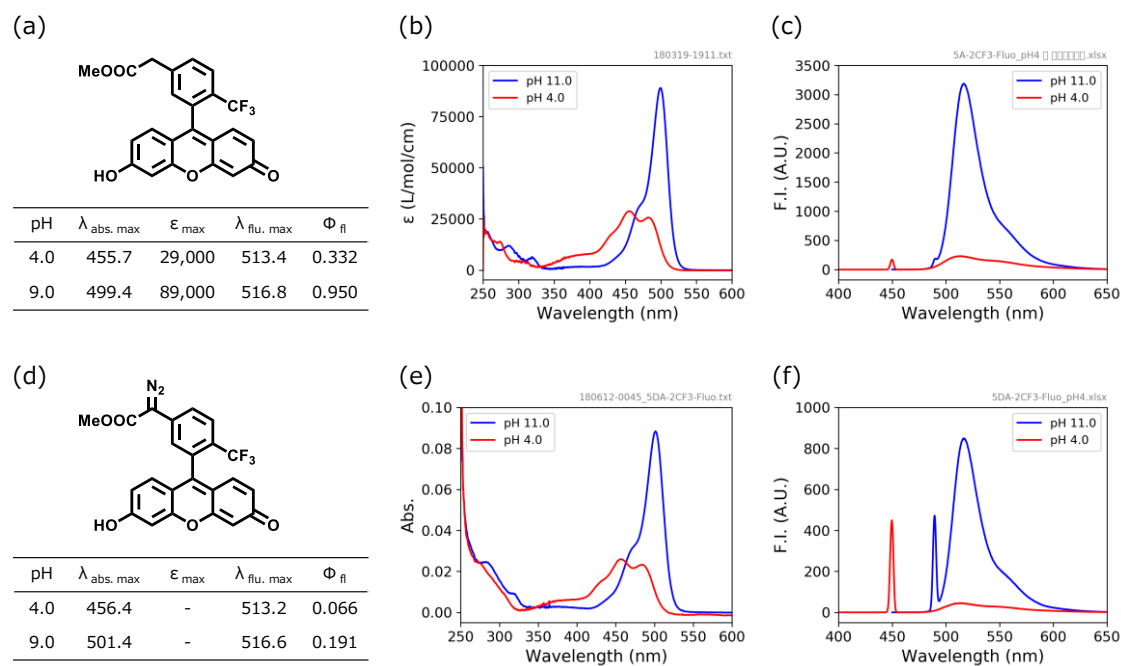


Figure 3-6 | (a) The structure of 5A2CF3-Fluo. (b) Molar extinction coefficient of 5A2CF3-Fluo in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 4.0 or pH 11.0). (c) Fluorescence spectra of 0.65 μM 5A2CF3-Fluo in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 4.0 or pH 11.0). Ex : 450.0 or 490.0 nm. (d) The structure of 5DA2CF3-Fluo. (e) Absorption spectra of 1 μM 5DA2CF3-Fluo in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 4.0 or pH 11.0). (f) Fluorescence spectra of 0.75 μM 5DA2CF3-Fluo in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 4.0 or pH 11.0). Ex : 450.0 or 490.0 nm. ※ Φ_{fl} shows absolute fluorescence quantum yield.

3-6. 水中での反応性

続いて、501 nm の光照射によって 5DA2CF3-Fluo の光反応が進行するかを検証した (Figure 3-7). 結果として、5DA2Me-Fluo と同様に、光照射依存的に diazoacetate 構造が hydroxyacetate 構造となった光反応生成物が認められた.

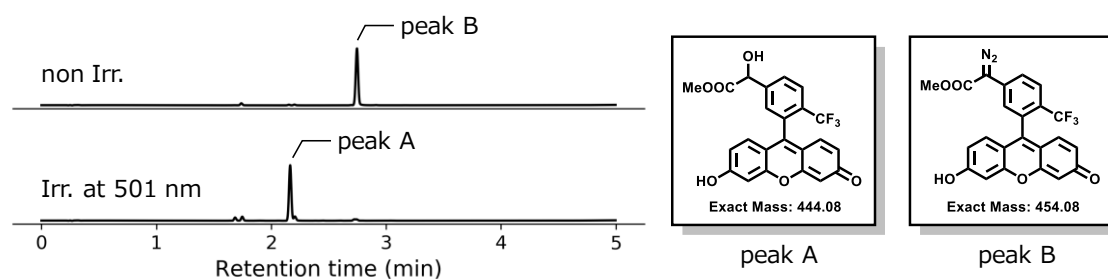


Figure 3-7 | UPLC-MS analysis of 5DA2CF3-Fluo in pH 9.0 0.1 M sodium phosphate buffer. with or without irradiation at 501 for 10 min. UPLC-MS analysis condition, Eluent : A (H₂O, 0.1 M ammonium formate), B (CH₃CN/H₂O = 8/2, 0.1 M ammonium formate), Gradient : A/B = 95/05 to 05/95 for 3.0 min , Flow rate : 0.6 mL/min, Detection wavelength : 490 nm.

3-7. タンパク質との反応性

5DA2CF3-Fluo がタンパク質を光ラベル化できるかを精製タンパク質 BSA を用いて検証した (Figure 3-8). 結果, 光照射を行った場合にのみ BSA のバンドから蛍光が認められ, 5DA2Me-Fluo と同様に光ラベル化剤として機能することが示された.

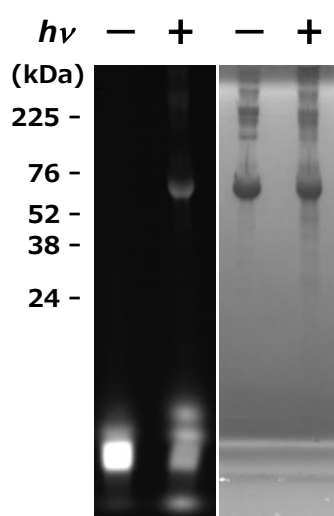
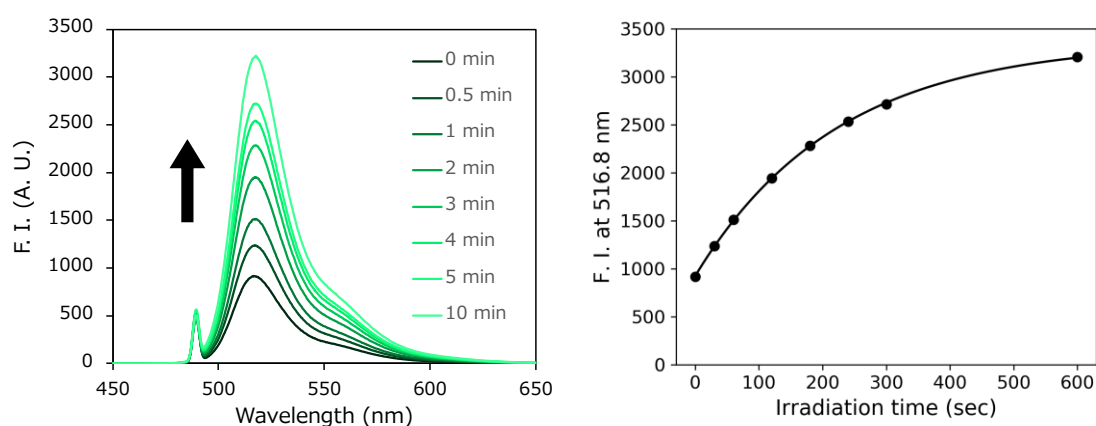


Figure 3-8 | Photolabeling 1 mg/mL purified BSA by 0.1 mM 5DA2CF3-Fluo with or without irradiation at 501 nm light for 60 min. SDS-PAGE was performed without the heat denaturation. Fluorescence was observed with gel imager (E-BOX-VX2/20M, VILVER LOURMAT). Hg lamp was used as excitation light source. F-590 filter was used and detects lights at 520–656 nm.

3-8. 光反応量子収率

次に、各光照射時間ごとの蛍光スペクトルを取得したところ、5DA2Me-Fluo と同様に、光照射時間依存的な蛍光増大が認められた。またこの結果より、光反応量子収率を算出すると、光反応量子収率は $1.86E-03$ となり (Figure 3-9), 5DA2Me-Fluo ($1.30E-03$) と比較して、光反応量子収率の改善に成功した。



時定数 sec	光量子密度 mol / cm ² / s	モル吸光係数 ϵ_{Irr} L / (mol · cm)	量子収率 Φ	$\epsilon_{\text{Irr}} \times \Phi$
222	$1.18E-08$	89006	$1.86E-03$	165.6

Figure 3-9 | Calculation of photoreaction quantum yield. 5DA2CF3-Fluo in pH 9.0 0.1 M sodium phosphate buffer (3 mL) were exposure to 501 ± 5 nm light for each time. The irradiated solution was measured with fluorometer. Irradiation light intensity was 2.82 mW/cm^2 .

今回提案したカルベン産生経路には、次の 2 つの分岐点が存在する (Figure 3-10). 分岐点① 励起された xanthene 部位では、 k_{fl} , k_{nr} , k_{a-et} , k_{d-et} これら 4 つの過程が競合する. 分岐点② benzene 部位が一電子還元, xanthene 部位が一電子酸化された電荷分離状態では、 k_{d-bet} と k_{dec} が競合する. 光反応量子収率 $\Phi_{\text{photoreaction}}$ は、それぞれの分岐点で意図した過程 (k_{d-et} および k_{dec}) がどのくらいの割合で進行しているかによって決まると考えられる. そこで、5DA2Me-Fluo の benzene 部位の methyl 基を trifluoromethyl 基とすることで k_{d-et} を上げ、 k_{a-et} を下げ、分岐点① を改善しようと考えた. しかし、5DA2Me-Fluo で既に k_{d-et} が十分に早く、光反応量子収率が僅かしか改善しなかったと考えられる. また、methyl 基を trifluoromethyl 基とすることで、分岐点② の k_{d-bet} および k_{dec} も変化し得る. そのため、分岐点① では改善の方向に変化した、分岐点② では改悪の方向に変化したため、その結果、光反応量子収率が僅かしか改善しなかったとも考えられる.

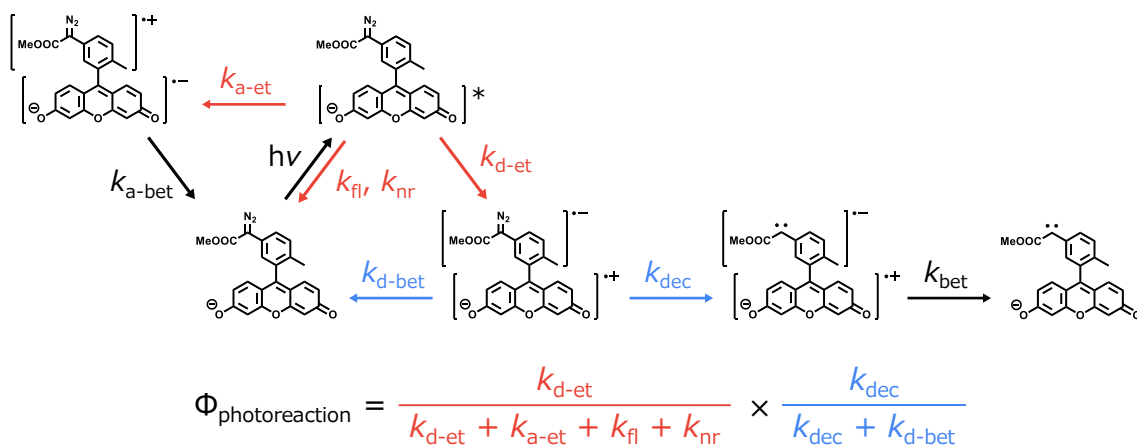


Figure 3-10 | The expected reaction mechanism for the carbene generation via photoinduced electron transfer.

Fluorescein の蛍光放出過程の速度定数 k_{fl} は $2.4 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ (at 25°C in 0.1 N NaOH aq.)⁶³ で、fluorescein の蛍光量子収率 Φ_{fl} は 0.85 (in 0.1 N NaOH aq.)⁴⁴ である。そして以下の 4 つの仮定を置くと、fluorescein の k_{fl} と Φ_{fl} , 5DA2CF3-Fluo の Φ_{fl} (0.191) から、5DA2CF3-Fluo の k_{d-et} は $9.7 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ と算出され、分岐点① では 77.5% の割合で d-PeT が進行していると見積もられた。この値は 5DA2CF3-Fluo の光反応量子収率 0.19% と比較して大きな値であり、光反応量子収率のより大きな改善には、分岐点② の窒素脱離反応の速度 (k_{dec}) を上昇させること、または逆電子移動の速度 (k_{d-bet}) を低下させることが重要であることが分かった。

仮定① 蛍光量子収率は次のように定義される $\Phi_{fl} = k_{fl} / (k_{fl} + k_{nr} + k_{a-et} + k_{d-et})$.

仮定② Xanthene 部位が同一の fluorescein 誘導体間では k_{fl} および k_{nr} は同じ値

仮定③ Fluorescein では a-PeT および d-PeT が起こっておらず $k_{d-et} + k_{a-et} \ll k_{fl} + k_{nr}$

仮定④ 5DA2CF3-Fluo では a-PeT が起こっておらず $k_{a-et} \ll k_{d-et} + k_{fl} + k_{nr}$

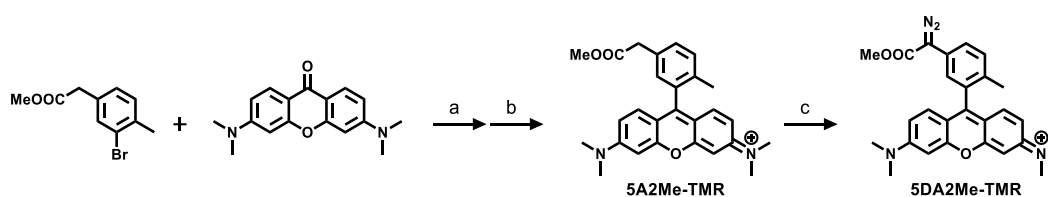
3-9. 小括

- 5DA2Me-Fluo は a-PeT および d-PeT が共に起こり得ることが示唆された。
- d-PeT を a-PeT よりも優先させることで光反応量子収率を改善できると考えた。そこで, fluorescein 誘導体の benzene 部位の LUMO エネルギーを計算し, 5DA2Me-Fluo の benzene 部位 2 位の methyl 基を trifluoromethyl 基とした 5DA2CF3-Fluo は, d-PeT が a-PeT よりも優先されると予想した。
- 5DA2CF3-Fluo を合成し, 5DA2Me-Fluo と同様に光ラベル化剤として機能することを示した。
- 5DA2CF3-Fluo が 5DA2Me-Fluo よりも高い光反応量子収率を示し, 光反応量子収率の改善に成功した。

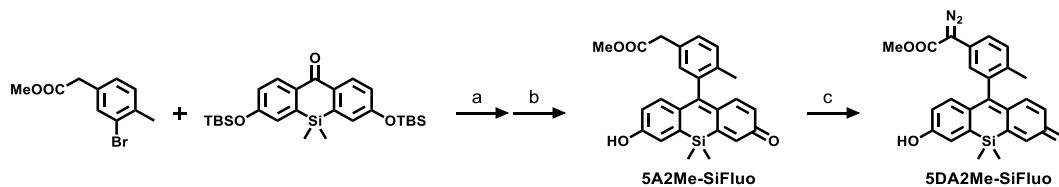
4. 更なる長波長化

4-1. 分子設計, 合成

更なる長波長化を目指し, fluorescein よりも長波長光を吸収する tetramethylrhodamine または Si-fluorescein を母核とした分子を設計した. そして, Scheme 4-1 に従い 5A2Me-TMR と 5DA2Me-TMR を, Scheme 4-2 に従い 5A2Me-SiFluo と 5DA2Me-SiFluo を合成した.



Scheme 4-1 | Synthesis of 5DA2Me-TMR (a) *sec*-BuLi, THF. (b) 2N HCl aq. (c) Tosyl Azide, DBU, DMSO, CH₃CN.



Scheme 4-2 | Synthesis of 5DA2Me-SiFluo (a) *sec*-BuLi, THF. (b) 2N HCl aq. (c) Tosyl Azide, DBU, DMSO, CH₃CN.

4-2. 光学特性

合成した 5A2Me-TMR, 5DA2Me-TMR, 5A2Me-SiFluo, 5DA2Me-SiFluo の光学特性を取得した. その結果, 5A2Me-Fluo と 5DA2Me-Fluo との比較と同じように, それぞれジアゾ化によって紫外光領域の吸収スペクトルに変化が認められたが, 可視光領域の吸収スペクトルには変化が認められなかった. 一方で, 蛍光量子収率を比較すると, 5A2Me-TMR (Φ_{fl} : 0.387) \rightarrow 5DA2Me-TMR (Φ_{fl} : 0.185), 5A2Me-SiFluo (Φ_{fl} : 0.629) \rightarrow 5DA2Me-SiFluo (Φ_{fl} : 0.038) となり, 程度は異なるが, それぞれジアゾ化によって低蛍光性になっていることが分かった. しかし, tetramethylrodamine および Si-fluorescein については, 蛍光量子収率と benzene 部位の LUMO エネルギーまたは還元電位については精査が行われておらず, 消光の原因が d-PeT か否かは定かでない.

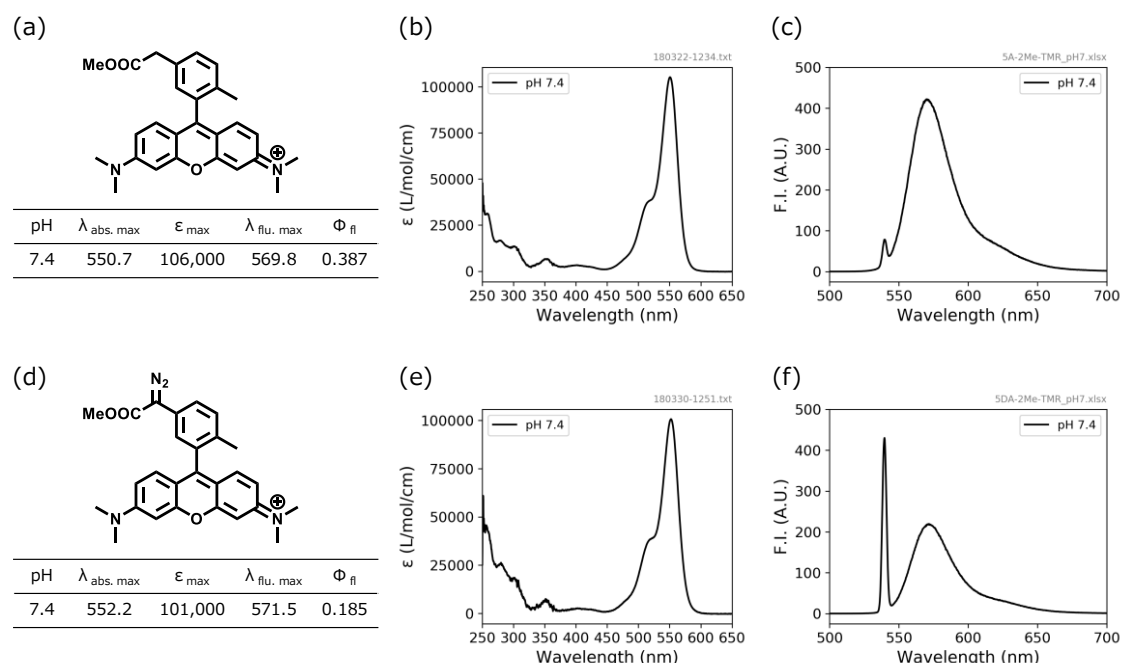


Figure 4-1 | (a) The structure of 5A2Me-TMR. (b) Molar extinction coefficient of 5A2Me-TMR in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4). (c) Fluorescence spectra of 0.33 μ M 5A2Me-TMR in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4). Ex : 540.0 nm. (d) The structure of 5DA2Me-TMR. (e) Molar extinction coefficient of 5DA2Me-TMR in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4). (f) Fluorescence spectra of 0.33 μ M 5DA2Me-TMR in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4). Ex : 540.0 nm. ※ Φ_{fl} shows absolute fluorescence quantum yield.

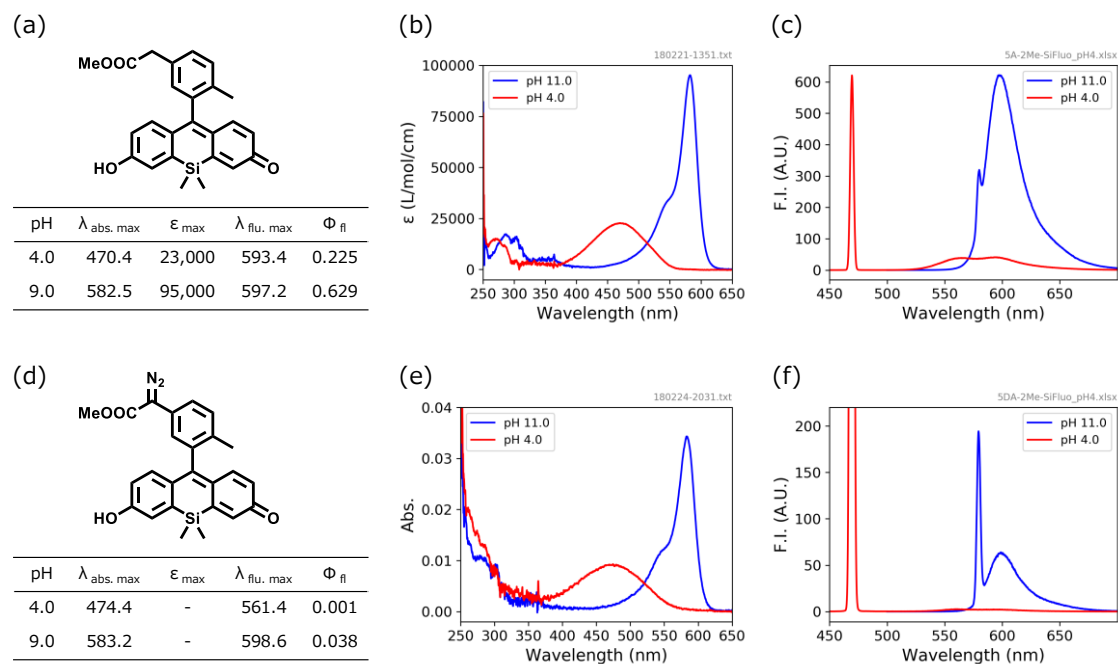


Figure 4-2 | (a) The structure of 5A2Me-SiFluo. (b) Molar extinction coefficient of 5A2Me-SiFluo in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 4.0 or pH 11.0). (c) Fluorescence spectra of 0.33 μM 5A2Me-SiFluo in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 4.0 or pH 11.0). Ex : 470.0 or 580.0 nm. (d) The structure of 5DA2Me-SiFluo. (e) Absorption spectra of 0.33 μM 5DA2Me-SiFluo in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 4.0 or pH 11.0). (f) Fluorescence spectra of 0.33 μM 5DA2Me-SiFluo in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 4.0 or pH 11.0). Ex : 470.0 or 580.0 nm. $\times \Phi_{\text{fl}}$ shows absolute fluorescence quantum yield.

4-3. 光反応特性

4-3-1. 水中での反応性

続いて、552 nm または 583 nm の光照射によって 5DA2Me-TMR, 5DA2Me-SiFluo の光反応が進行するかを検証した (Figure 4-3, Figure 4-4). 結果として、5DA2Me-Fluo と同様に、光照射依存的に diazoacetate 構造が hydroxyacetate 構造となった光反応生成物が共に認められた。

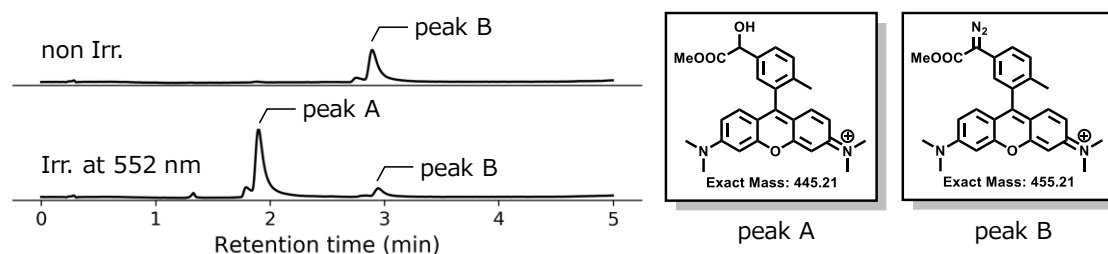


Figure 4-3 | Product analysis of photoreaction of 5DA2Me-TMR in pH 7.4 0.1 M sodium phosphate buffer. 10 μM 5DA2Me-TMR (100 μL) was exposure to 552 \pm 5 nm light for 60 min or standing under the dark for 60 min. Irradiation light (552 nm) intensity 2.80 mW/cm². UPLC-MS analysis condition, Eluent : A (H₂O, 0.1 M ammonium formate), B (CH₃CN/H₂O = 8/2, 0.1 M ammonium formate), Gradient : A/B = 95/05 to 05/95 for 3.0 min , Flow rate : 0.6 mL/min, Detection wavelength : 551 nm.

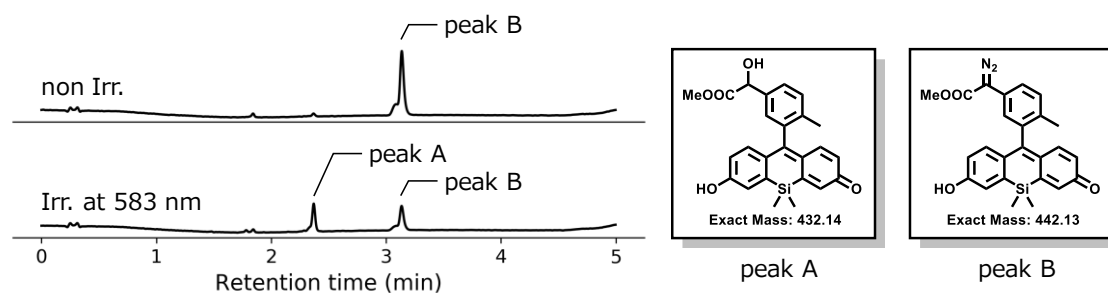
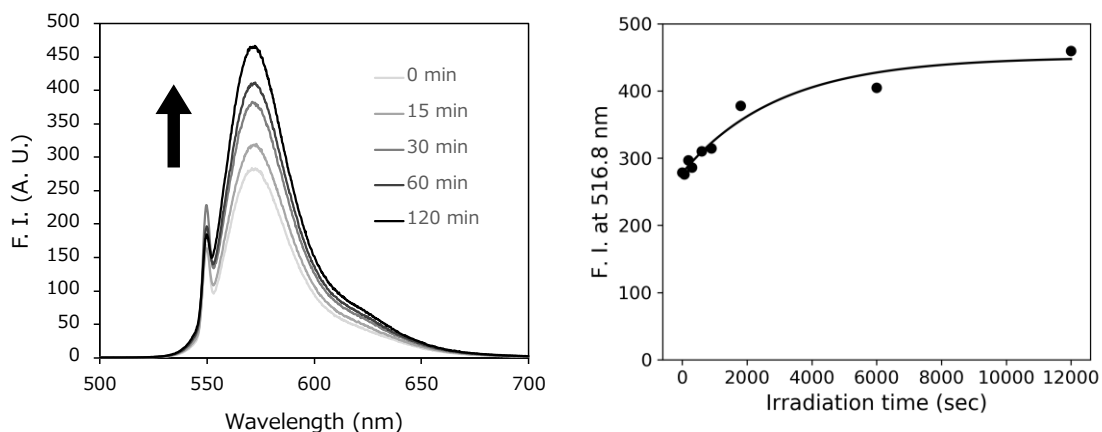


Figure 4-4 | Product analysis of photoreaction of 5DA2Me-SiFluo in pH 9.0 0.1 M sodium phosphate buffer. 5 μM 5DA2Me-SiFluo (100 μL) was exposure to 583 \pm 5 nm light for 60 min or standing under the dark for 60 min. Irradiation light (583 nm) intensity 2.8 mW/cm². UPLC-MS analysis condition, Eluent : A (H₂O, 0.1 M ammonium formate), B (CH₃CN/H₂O = 8/2, 0.1 M ammonium formate), Gradient : A/B = 95/05 to 05/95 for 3.0 min , Flow rate : 0.6 mL/min, Detection wavelength : 457 nm.

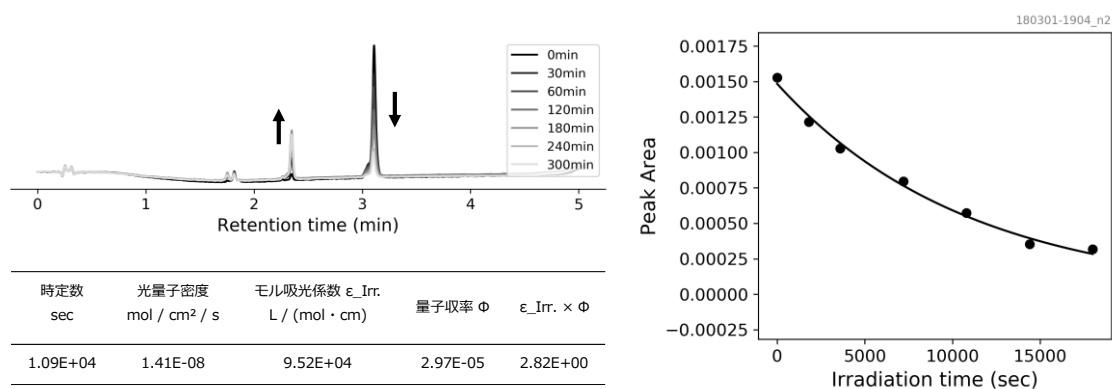
4-3-2. 光反応量子収率

次に、5DA2Me-TMR および 5DA2Me-SiFluo の光反応量子収率を算出したところ、5DA2Me-TMR ($1.12\text{E-}04$), 5DA2Me-SiFluo ($2.97\text{E-}05$) となり、5DA2Me-Fluo ($1.30\text{E-}03$) と比較して低い光反応量子収率を示した。



時定数 sec	光子密度 mol / cm ² / s	毛吸光係数 ε _{Irr.} L / (mol · cm)	量子収率 Φ	ε _{Irr.} × Φ
2990	1.29E-08	100683	1.12E-04	11.3

Figure 4-5 | Calculation of photoreaction quantum yield. 5DA2Me-TMR in pH 7.4 0.1 M sodium phosphate buffer (3 mL) were exposure to 552±5 nm light for each time. The irradiated solution was measured with fluorometer. Irradiation light intensity was 2.79 mW/cm².



時定数 sec	光子密度 mol / cm ² / s	毛吸光係数 ε _{Irr.} L / (mol · cm)	量子収率 Φ	ε _{Irr.} × Φ
1.09E+04	1.41E-08	9.52E+04	2.97E-05	2.82E+00

Figure 4-6 | Calculation of photoreaction quantum yield. 5 μM 5DA2Me-SiFluo in pH 9.0 0.1 M sodium phosphate buffer (400 μL) were exposure to 583±5 nm light for each time. The irradiated solution was analyzed with UPLC-MS and the peak area of 5DA2Me-SiFluo was calculated. Irradiation light intensity was 2.90 mW/cm². UPLC-MS analysis condition, Eluent : A (H₂O, 0.1 M ammonium formate), B (CH₃CN/H₂O = 8/2, 0.1 M ammonium formate), Gradient : A/B = 95/05 to 05/95 for 3.0 min , Flow rate : 0.6 mL/min, Detection wavelength : 457 nm.

4-3-3. タンパク質との反応性

5DA2Me-TMR および 5DA2Me-SiFluo がタンパク質を光ラベル化できるかを精製タンパク質 BSA を用いて検証した (Figure 4-7, Figure 4-8). 結果, 共に光照射を行った場合にのみ BSA のバンドから蛍光が認められ, 光ラベル化剤として機能することが示された.

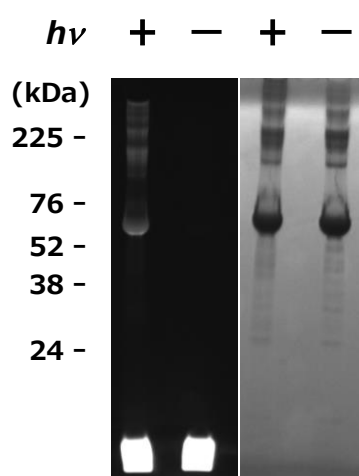


Figure 4-7 | Labeling ability of 5DA2Me-TMR. 100 μ M 5DA2Me-TMR in 1 mg/mL BSA (100 μ L) was exposure to 552 ± 5 nm light for 120 min or standing under the dark for 120 min. Then, SDS-PAGE was performed and fluorescence was observed with gel imager (E-BOX-VX2/20M, VILVER LOURMAT). Hg lamp was used as excitation light source. F-590 filter was used and detects lights at 520–656 nm.

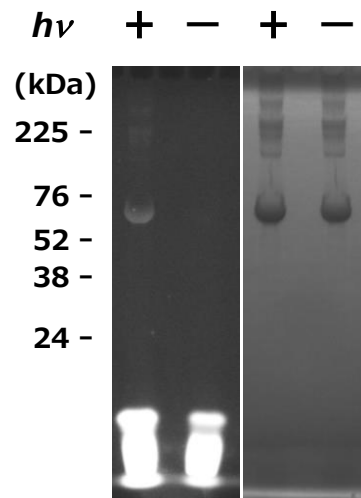


Figure 4-8 | Labeling ability of 5DA2Me-SiFluo. 100 μ M 5DA2Me-SiFluo in 1 mg/mL BSA (100 μ L) was exposure to 583 ± 5 nm light for 120 min or standing under the dark for 120 min. Then, SDS-PAGE was performed and fluorescence was observed with gel imager (E-BOX-VX2/20M, VILVER LOURMAT). Hg lamp was used as excitation light source. F-590 filter was used and detects lights at 520–656 nm.

4-4. 暗所での安定性

続いて、開発した光ラベル化剤 5DA2Me-Fluo, 5DA2Me-TMR, 5DA2Me-SiFluo の暗所での安定性を UPLC-MS を用いて評価したところ、酸性条件では不安定ではあるものの、pH 7.4, 10 mM GSH の生理的条件下、および塩基性条件下では、いずれも安定であることが分かった。

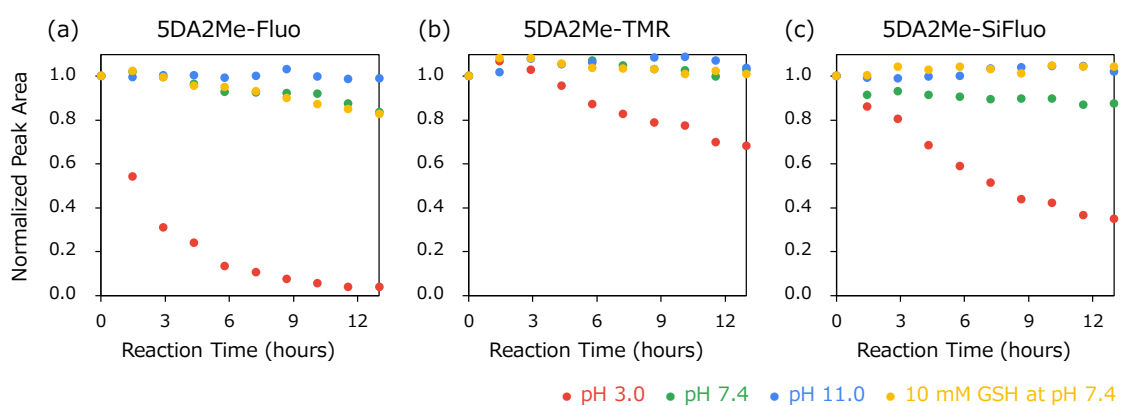


Figure 4-9 | UPLC-MS analysis of (a) 5 μ M 5DA2Me-Fluo, (b) 5 μ M 5DA2Me-TMR and (c) 5 μ M 5DA2Me-SiFluo in 0.1 M sodium phosphate buffer at pH 3.0 (red), 7.4 (green) or 11.0 (blue) or 0.1 M sodium phosphate buffer with 10 mM GSH at pH 7.4 (orange) for 0-12 hours under the dark.

4-5. 小括

- Rhodamine または Si-fluorescein を母核とすることで 552, 583 nm の光で機能する光ラベル化剤の開発に成功した。
- 開発した光ラベル化剤群はいずれもタンパク質への光ラベル化能を有し、生理的条件下において暗所で安定であることを示した。この結果より、本戦略は、本学修士課程で提案した「長波長化戦略 その1: ジアゾの共役系を拡大」で挙げられた 2 つの問題を解決する優れた戦略であると言える。
- これまでに開発した光ラベル化剤と、そのジアゾ化前の化合物の光学特性および光反応特性を Table 4-1 にまとめた。また、キサントン系色素の蛍光量子収率と LUMO エネルギーの関係を Figure 4-10 に、HOMO エネルギーとの関係を Figure 4-11 にまとめた。

Table 4-1 | Photophysical and photoreaction properties

	pH	Abs. max (nm)	ϵ_{max}	荧光量子收率 Φ_{fl}	光反应量子收率 $\Phi_{\text{photoreaction}}$	光反应效率 $\epsilon_{\text{max}} \times \Phi_{\text{photoreaction}}$
5A2Me-Fluo	4.0	450.2	29,000	0.355	-	-
	9.0	492.6	93,000	0.835	-	-
5DA2Me-Fluo	4.0	451.6	-	0.006	1.22E-03	3.53E+01
	9.0	493.4	-	0.034	1.45E-03	1.35E+02
5A2CF3-Fluo	4.0	455.7	29,000	0.332	-	-
	9.0	499.4	89,000	0.950	-	-
5DA2CF3-Fluo	4.0	456.4	-	0.066	4.09E-03	1.19E+02
	9.0	501.4	-	0.191	1.86E-03	1.66E+02
5A2Me-TMR	7.4	550.7	106,000	0.387	-	-
5DA2Me-TMR	7.4	552.2	101,000	0.185	1.12E-04	1.13E+01
5A2Me-SiFluo	4.0	470.4	23,000	0.225	-	-
	9.0	582.5	95,000	0.629	-	-
5DA2Me-SiFluo	4.0	474.4	-	0.001	2.43E-05	5.60E-01
	9.0	583.2	-	0.038	2.97E-05	2.82E+00
diazirine	-	353	266	-	6.50E-01	1.73E+02

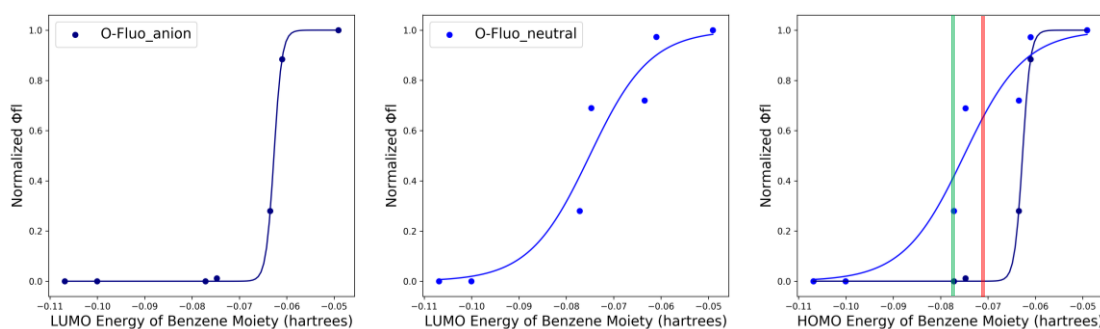


Figure 4-10 | O-Fluo⁴⁰. LUMO energy of benzene moiety calculated at the opt freq b3lyp/6-31g(d) scrf=(solvent=water) nosymm geom=connectivity. LUMO energy of 5DA2Me (-0.07130, red line) and 5DA2CF3 (-0.07703, green line).

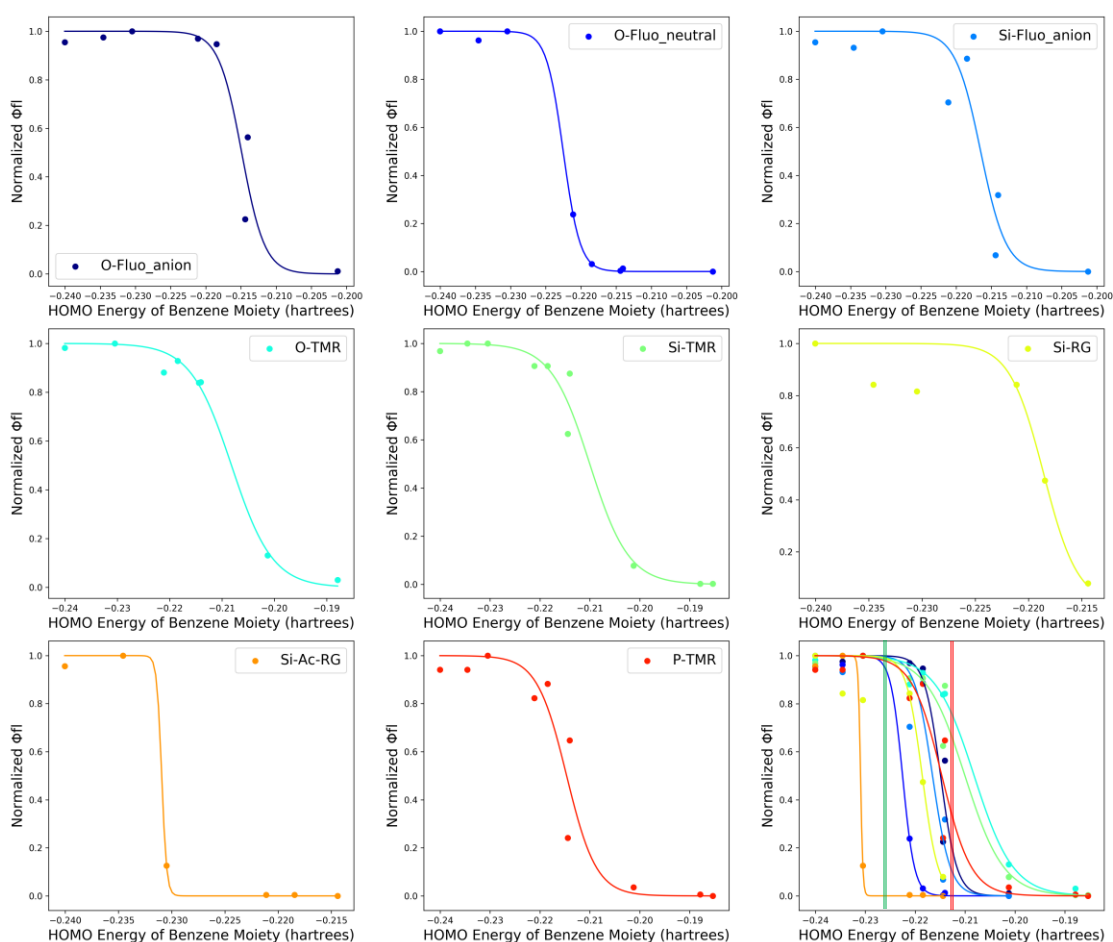


Figure 4-11 | O-Fluo⁶², Si-Fluo⁶⁴, O-TMR⁶⁵, Si-TMR⁶⁶, Si-RG⁶⁷, Si-Ac-RG⁶⁷, P-TMR⁶⁸. HOMO energy of benzene moiety calculated at the opt freq b3lyp/6-31g(d) scrf=(solvent=water) nosymm geom=connectivity. HOMO energy of 5DA2Me (-0.21230, red line) and 5DA2CF3 (-0.22626, green line).

5. Photoaffinity Labeling への応用

5-1. 標的タンパク質とリガンド

開発した光ラベル化剤が Photoaffinity Labeling に応用できるかを検証するため、二酸化炭素の水和を触媒する酵素で、赤血球内に豊富に存在する CA-II (carbonic anhydrase-II) を標的タンパク質とした (Figure 5-1-a). CA-II を標的として photoaffinity labeling を行った論文¹²を参考に photoaffinity labeling プローブの設計を行った. リガンド部位に CA-II の阻害剤として知られる 4-sulfamoylbenzamide を導入し, PEG リンカーの長さを変えることで, CA-II への光ラベル化効率の最適化を行った (Figure 5-1-b).

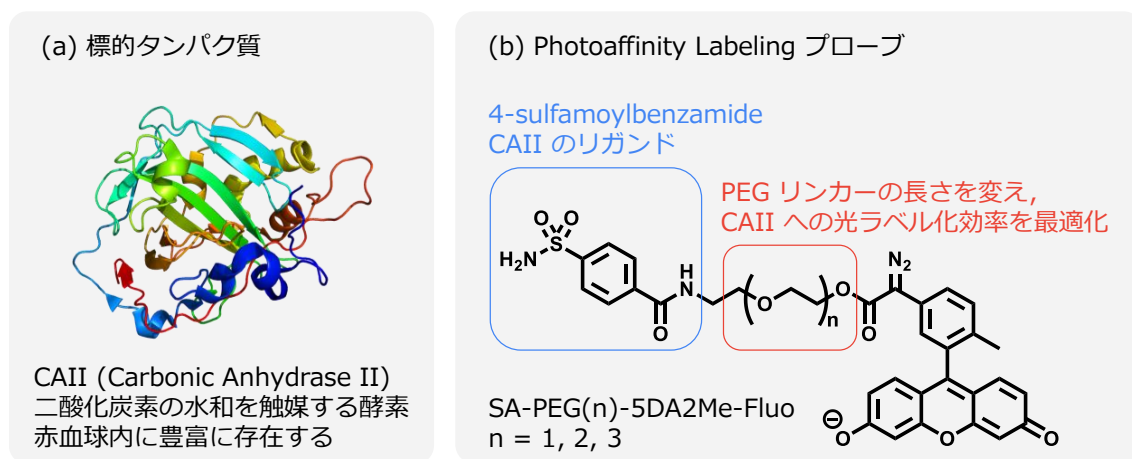
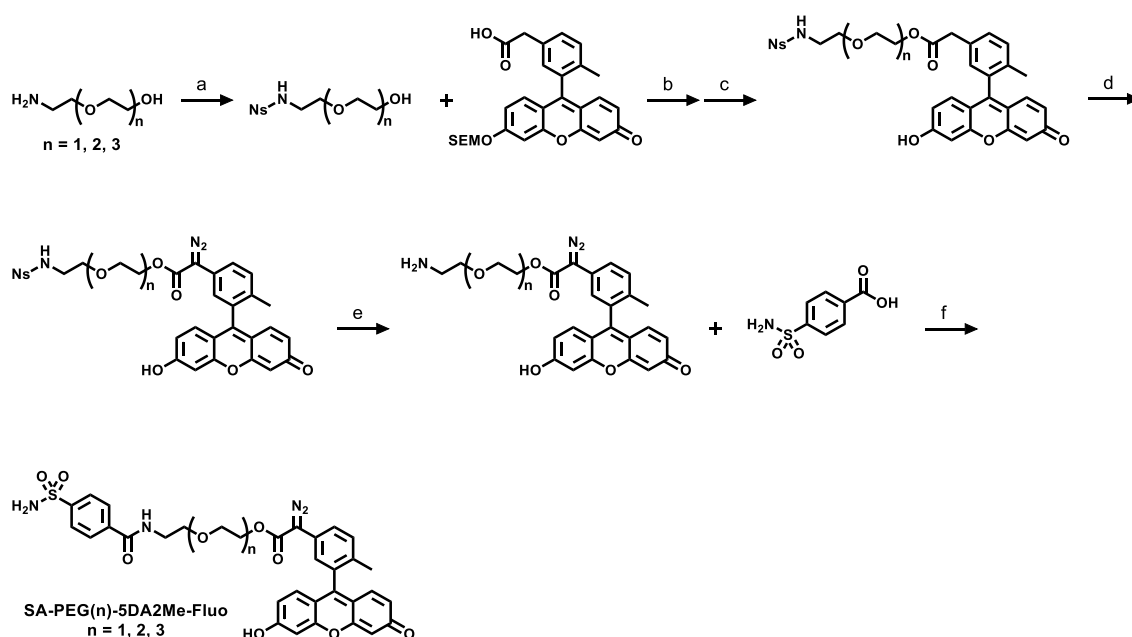


Figure 5-1 | X-ray structure of (a) bovine carbonic anhydrase-II (PDB ID: 1V9E). (b) The design of photoaffinity labeling for CA-II.

5-2. SA-PEG(n)-5DA2Me-Fluo の合成

Scheme 5-1 に従い SA-PEG(n)-5DA2Me-Fluo ($n = 1, 2, 3$) を合成した。合成上の注意点は以下の通りである。反応 (b) で CH_2Cl_2 への溶解性を上げるため xanthene 部位の OH 基を SEM 基で保護している。反応 (d) の条件では、末端のアミノ基が無保護の場合、アジド化するのでアミノ基を保護する必要がある。ジアゾ基は酸性条件に不安定なのに対し、塩基性、求核材の存在下では安定なので、保護基に Ns 基を選択した。反応 (f) ではスルホンアミドのアミノ基も縮合されるので、過剰量の 4-Sulfamoylbenzoic Acid を加えずに、1 等量にすること。合成の順序としては、まず 4-Sulfamoylbenzoic Acid を縮合させた後に、ジアゾ化を行うと、スルホンアミドのアミノ基が、反応 (d) の条件でアジド化される。そのため、ジアゾ化した後に 4-Sulfamoylbenzoic Acid を縮合する Scheme 5-1 を採用した。



Scheme 5-1 | Synthesis of SA-PEG(n)-5DA2Me-Fluo, $n=1\sim3$ (a) Ns-Cl, TEA, CH_2Cl_2 . (b) DCC, DMAP, CH_2Cl_2 . (c) TFA. (d) Tosyl Azide, DBU, DMSO, CH_3CN . (e) PhSH, CsCO_3 , CH_3CN . (f) EDC, HOBT, DIEA, DMF.

5-3. 精製 CA-II での検討

合成したリンカー長の異なる 3 つのプローブを使って、精製 CA-II に対して光ラベリ化を行ったところ、リンカー長 $n = 1$ のプローブ SA-PEG1-5DA2Me-Fluo で最も強い蛍光が認められた。

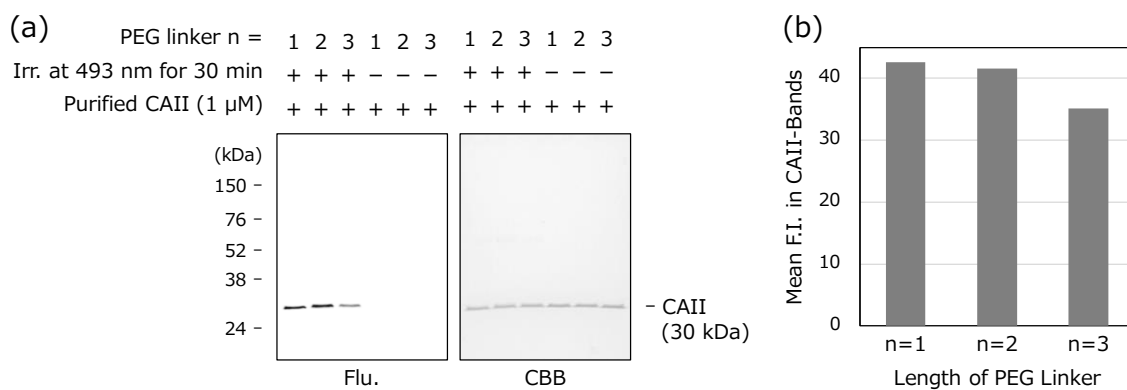


Figure 5-2 | (a) Photolabeling of 1 μ M purified bovine CA-II by 1 μ M SA-PEG(n)-5DA2Me-Fluo ($n = 1, 2, 3$) with or without irradiation at 480 ± 15 nm for 30 min. (b) Mean fluorescence intensity in CA-II bands.

5-4. Lysate 存在下での検討

SA-PEG1-5DA2Me-Fluo を用いて HeLa cells ライセート中で, 精製 CA-II を選択的に光ラベル化できるかを検討した. 結果, 精製 CA-II を選択的に光ラベル化することができ, そのバンドは炭酸脱水酵素阻害剤 EZA (ethoxzolamide) の存在下で消失することを確認した.

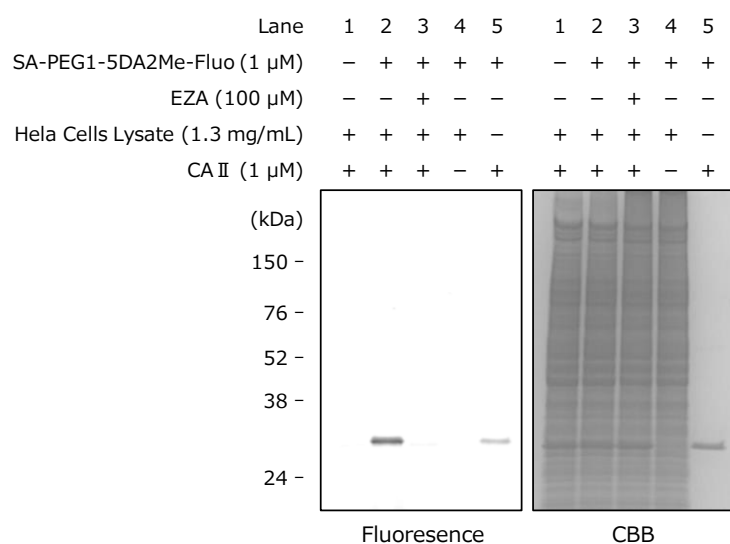


Figure 5-3 | Photolabeling of 1 μ M purified bovine CA-II in 1.3 mg/mL HeLa cells lysate by 1 μ M SA-PEG1-5DA2Me-Fluo (n = 1, 2, 3) with irradiation at 480 \pm 15 nm for 30 min.

5-5. Living RBCs の内在性 CA-II

続いて、living RBCs (red blood cells) の内在性 CA-II を選択的に光ラベル化できるかを検証した。ウシ由来の血液から living RCBs を精製し、SA-PEG1-5DA2Me-Fluo で光ラベル化を行った。結果、living RBCs の内在性 CA-II を選択的に光ラベル化することができ、そのバンドは EZA の存在下で消失することを確認し、開発した光ラベル化剤が生細胞にも適用できることを示した。

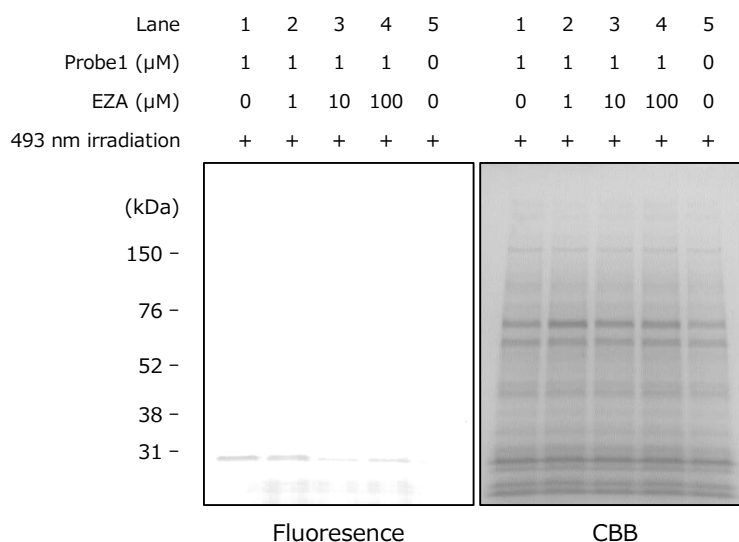


Figure 5-4 | Photolabeling of endogenous CA-II in living RBCs by 1 μM SA-PEG1-5DA2Me-Fluo with irradiation at 480 ± 15 nm for 30 min. RBCs were quickly isolated from bovine blood and used for labeling.

5-6. 光ラベル化部位の同定

続いて、LC-MS/MS 装置を用いて CA-II 内の光ラベル化部位の同定を試みた。SA-PEG2-5DA2Me-Fluo で CA-II の光ラベル化を行った後、SDS-PAGE、トリプシンによるゲル内消化を経て、LC-/MS/MS 測定を行った。そして、光ラベル化による分子量の増分を 672.177766 Da として、MASCOT (Version: 2.6.2) を用いて測定結果の解析を行った。その結果、光ラベル化されたペプチド配列として、Met58-Lys75 [MVNNGHSFNVEYDDSDK] および Tyr126-Lys147 [YGDFGTAAQQPDGLAVVGVFLK] が得られた。また、未ラベルのペプチド配列の sequence coverage は 93.0 % であり、実施した測定および解析の精度を支持する結果となった。labeled Met58-Lys75 の MS クロマトグラムを見ると (Figure 5-5, lower), 隣接する 2 つのピークが認められ、Met58-Lys75 に 2 つのラベル化部位が存在することが示唆された。次に、labeled Met58-Lys75 の MS/MS スペクトルを見ると (Figure 5-7), labeled b9 のピークが認められたことから Met58-Val67 に 2 つのラベル化部位が存在することが示唆された。続いて、labeled Tyr126-Lys147 の MS クロマトグラムを見ると (Figure 5-5, middle), 単一のピークが認められ、Tyr126-Lys147 に 1 つのラベル化部位が存在することが示唆された。次に、labeled Tyr126-Lys147 の MS/MS スペクトルを見ると (Figure 5-6), labeled y14, labeled b9 が認められたことから Gln134 がラベル化部位であることが強く示唆された。

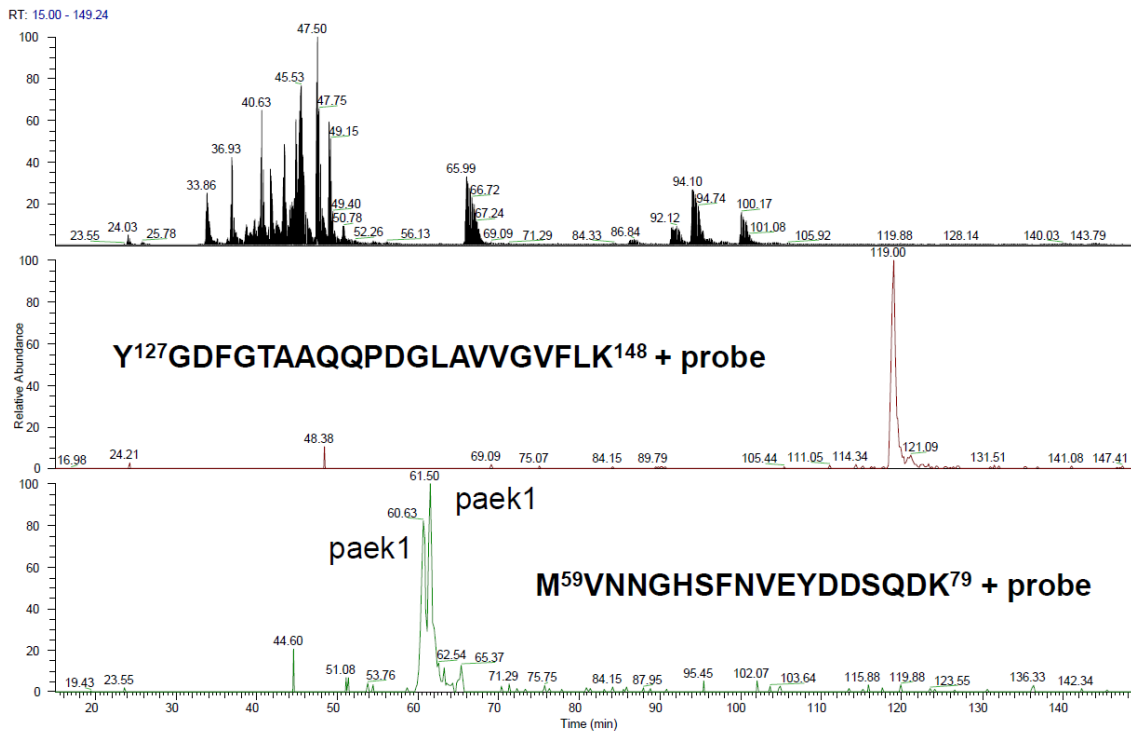


Figure 5-5 | Identification of the labeled peptides by LC-MS/MS analysis. Bovine CA-II was labeled by SA-PEG2-5DA2Me-Fluo with irradiation at 493 nm for 30 min. The labeled CA-II was subjected to SDS-PAGE and in-gel tryptic digestion, and then analysed by LC-MS/MS. (b) MS chromatograms of (upper) total ion current, (middle) labeled Tyr126-Lys147: extracted ion current in the range of $m/z=975.77-975.80$, and (lower) labeled Met58-Lys75: extracted ion current in the range of $m/z=693.49-693.54$.

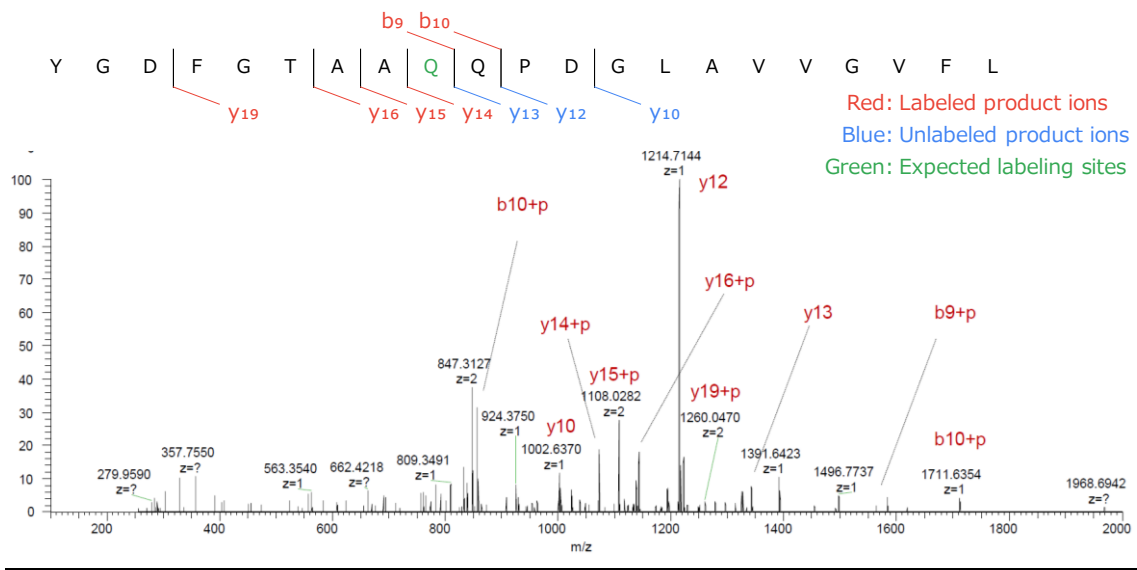


Figure 5-6 | MS/MS spectra of labeled Tyr126-Lys147 (retention time: 118.88 min). (Red) Labeled and (Blue) unlabeled peptide fragment ions were detected by collision-induced dissociation (CID). Amino acids highlighted in green were expected labeling sites.

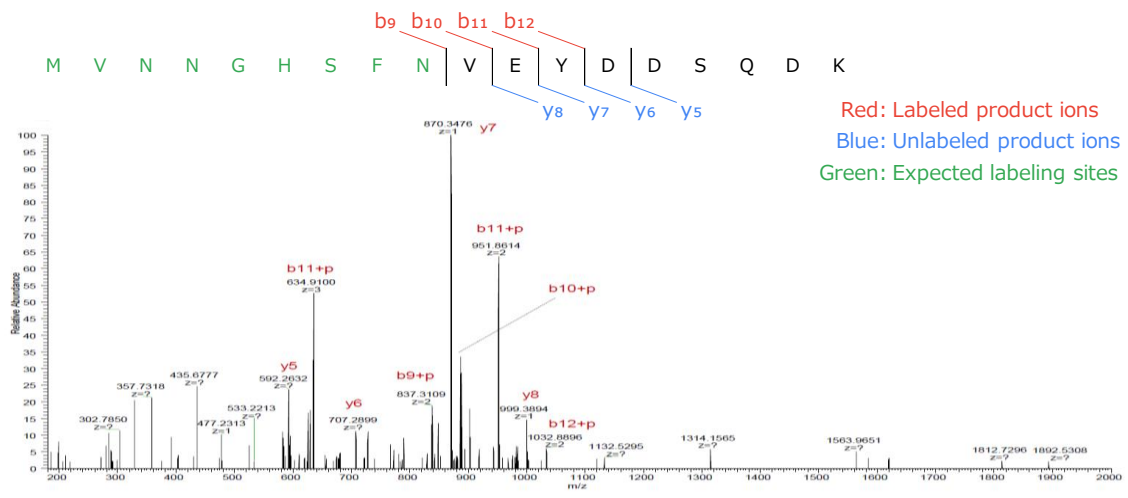


Figure 5-7 | MS/MS spectra of labeled Met58-Lys75 (retention time: 60.76 min). (Red) Labeled and (Blue) unlabeled peptide fragment ions were detected by collision-induced dissociation (CID). Amino acids highlighted in green were expected labeling sites.

続いて、光ラベル化部位であることが強く示唆された Met59-Val68 および Gln135 が bovine CA-II のリガンド結合部位周辺に位置しているかを確かめた。bovine CA-II と sulfamoylbenzamide 類の共結晶構造は報告されていない一方で、human CA-II と *N*-hexyl-4-sulfamoylbenzamide の共結晶構造は報告されている。そこで、bovine CA-II の結晶構造 (Figure 5-8-a) と、human CA-II と *N*-hexyl-4-sulfamoylbenzamide の共結晶構造 (Figure 5-8-b) で、それぞれ対応する α 炭素の平均二乗偏差を算出・可視化した (Figure 5-8-c)。その結果、ほとんどの配列、特にリガンド結合部位周辺は良く重なっており、類似の構造を有することが分かった。

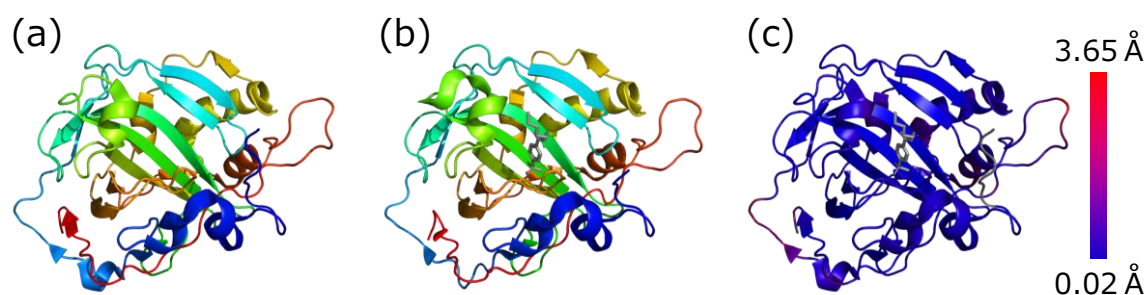


Figure 5-8 | X-ray structures of (a) bovine CA-II (PDB ID: 1V9E) and (b) human CA-II with (gray) *N*-hexyl-4-sulfamoylbenzamide (PDB ID: 3RZ8). (c) The colored structure of bovine CA-II by root mean square deviation (RMSD) between (a) bovine CA-II and (b) human CA-II. Minimum distance: 0.02 Å (blue), Maximum distance: 3.65 Å (red). RMSD was calculated using colorbyrmsd.py in pyMOL.

先の結果より, bovine CA-II と human CA-II のリガンド結合部位は, ほぼ同一であると
考え, bovine CA-II の結晶構造と *N*-hexyl-4-sulfamoylbenzamide を同時に合わせて可視化
した (Figure 5-9). *N*-hexyl-4-sulfamoylbenzamide を青色, Met58-Val67 を赤色, Gln134
を緑色, Gln135 を黄色に色付けすると, 光ラベル化部位であることが強く示唆された
Met59-Val68 および Gln135 は, リガンド結合部位の近傍に位置していることが明らかと
なった. また, Gln134 は光ラベル化される一方で, 隣の Gln135 は光ラベル化されない
のは, Gln135 がリガンド結合部位の方向を向いていないためであると考察した. ここまで
の結果で, 開発した光ラベル化剤がリガンドの標的タンパク質の同定だけでなく, リガンド
の結合部位の同定にも応用できることを示した.

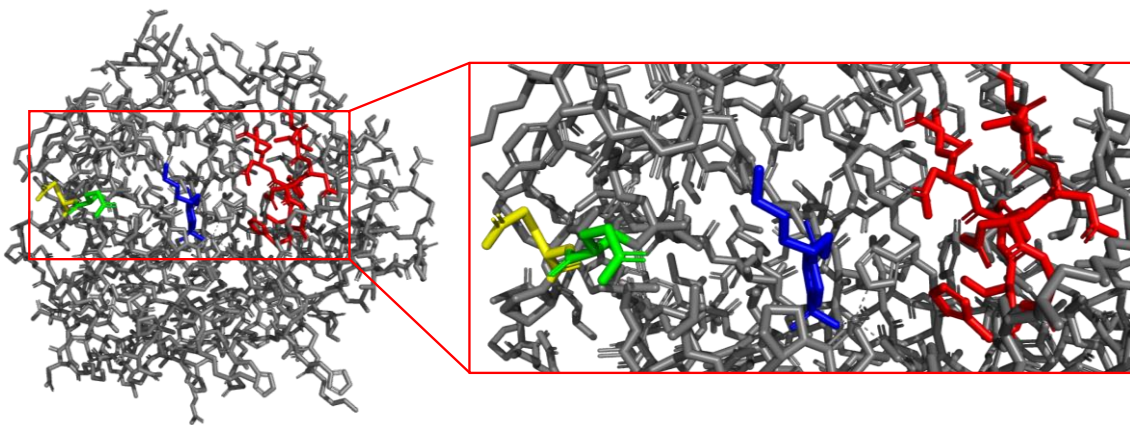


Figure 5-9 | The X-ray structure of bovine CA-II (PDB ID: 1V9E) with *N*-hexyl-4-sulfamoylbenzamide (PDB ID: 3RZ8). (Blue) *N*-hexyl-4-sulfamoylbenzamide, (Red) Met58-Val67, (Green) Gln134, (Yellow) Gln135.

6. 一細胞蛍光標識への応用

6-1. 一細胞蛍光標識

一細胞蛍光標識とは, caged 蛍光色素や光変換蛍光タンパク質を使って, 光を照射した細胞だけを選択的に蛍光標識する手法であり, 生体分子の機能解析や, 細胞系譜解析に利用される. 一般的に, 多くの caged 蛍光色素は細胞内滞留性に乏しく, 固定操作や長時間の観察に適していない (Figure 6-1-a). しかし, これまでの検討より, 5DA2Me-Fluo は光照射依存的に蛍光性を回復し, 同時にタンパク質を光ラベル化する特性を有することが分かっている. つまり, 5DA2Me-Fluo は caged 蛍光色素としての特性と, 細胞内タンパク質を光ラベル化する細胞内滞留性の蛍光色素としての特性を有しており (Figure 6-1-b), 一細胞蛍光標識に適した蛍光色素であると考えた.

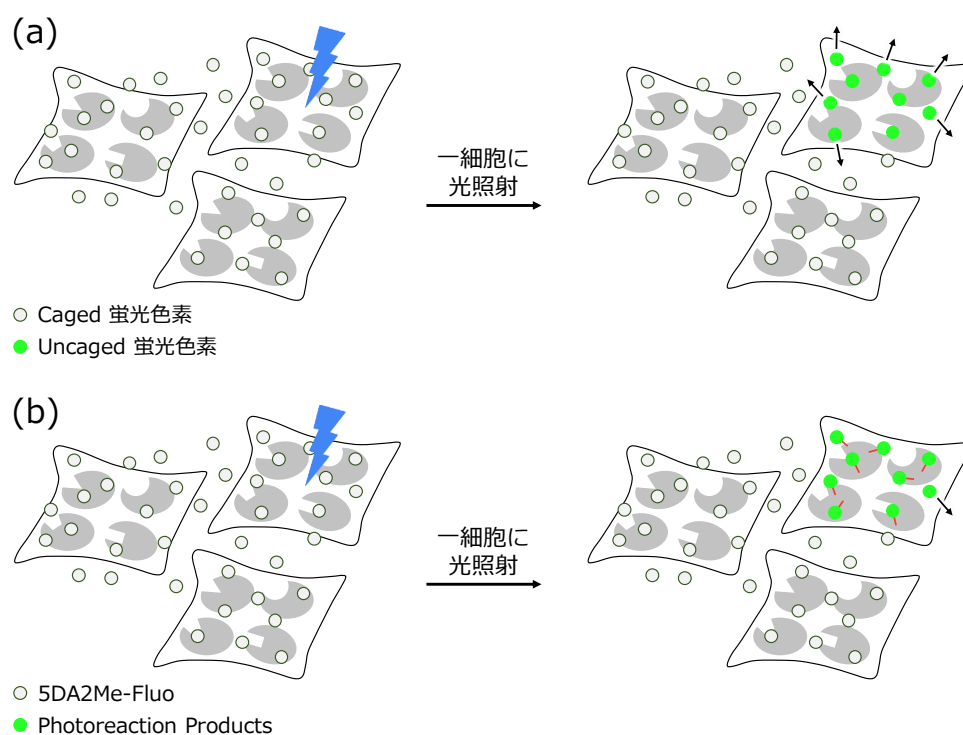


Figure 6-1 | A single cell tracking by (a) the caged fluorescence dyes or (b) 5DA2Me-Fluo.

6-2. 細胞内滞留性の評価

まずは 5DA2Me-Fluo が細胞内のタンパク質を光ラベル化し、細胞内滞留性を獲得するかを検証した。具体的には、MeOH 固定処理前後で色素が滞留しているかを観察した。固定処理前後で、同じ視野をイメージングするため、35 mm Glass Base Dish with Grid (IWAKI, 3922-035) を使用した。このディッシュの底面にグリッドと番号が描かれているので、同じ視野でイメージングすることが出来る。その後の画像処理で位置合わせをすると、固定処理前後でも同じ視野の画像が得られる。位置合わせ前 (Figure 6-2-a), 後 (Figure 6-2-b)。

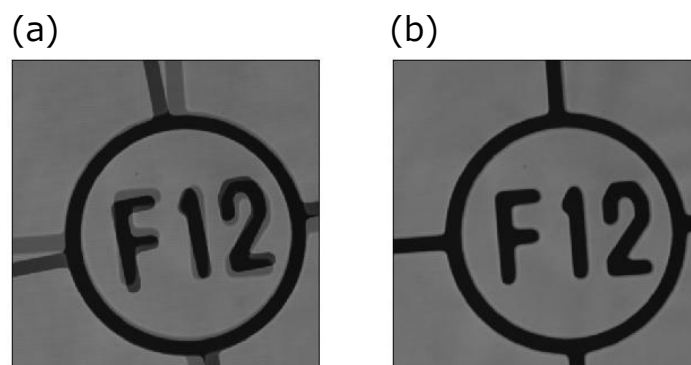


Figure 6-2 | The unfixed BF image was overlaid with the fixed BF image. (a) before and (b) after rotating and xy-shifting the image.

まず、ネガティブコントロールとして、5A2Me-Fluo の細胞内滞留性を評価した。Cell Tracker Red (細胞質に局在) は、5A2Me-Fluo および 5DA2Me-Fluo の局在を精査するため同時にロードした。また、Cell Tracker Red は細胞内滞留性の色素としても知られるので (細胞内の GSH と反応して細胞内滞留性を獲得)、細胞内滞留性を評価する上での比較対象とした。5A2Me-Fluo の固定処理前後の蛍光像を見ると、固定処理に耐える程の細胞内滞留性はないことが分かる (Figure 6-3, left)。これは Cell Tracker Red でも同様で、GSH と反応するだけでは固定処理に耐える細胞内滞留性を獲得できないことが分かる (Figure 6-3, middle)。また、Before MeOH Fixiation の Merge の蛍光像を見ると、5A2Me-Fluo と Cell Tracker Red の局在は一致していることが分かり、5A2Me-Fluo は Cell Tracker Red と同じく細胞質に局在することが示唆された (Figure 6-3, right upper)。

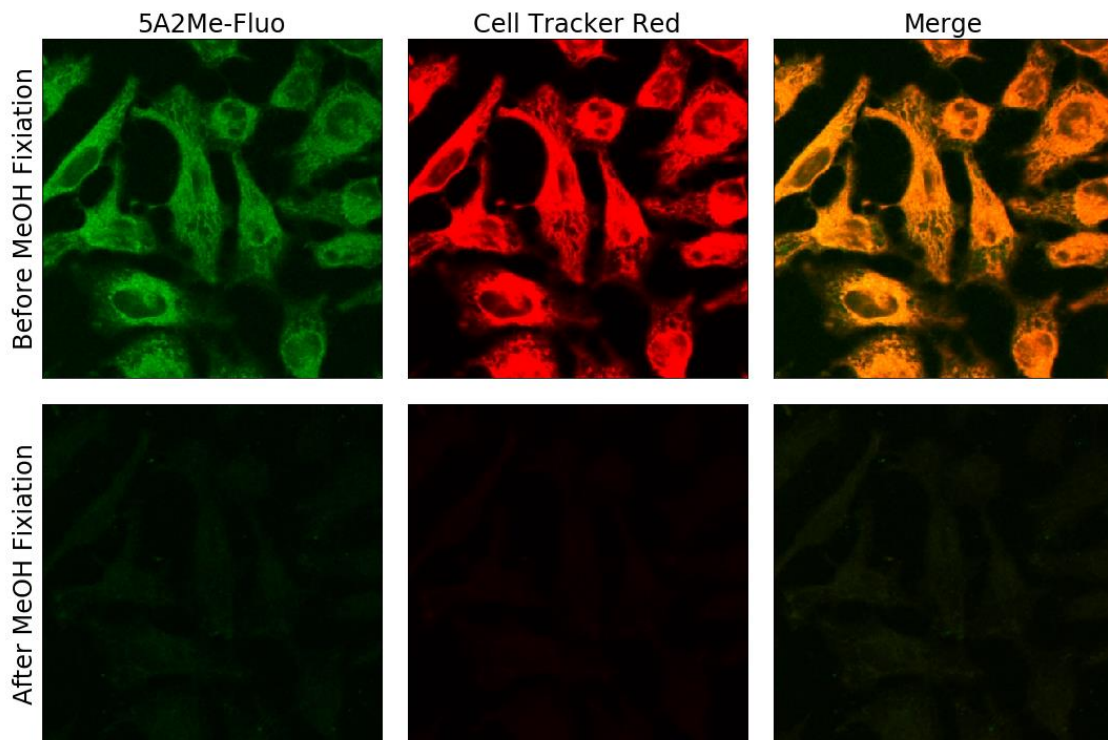


Figure 6-3 | Leica TCS SP5 images of HeLa cells before and after MeOH fixation. 1 μ M 5A2Me-Fluo. 1 μ M Cell Tracker Red. 0.2 % DMSO. 0.2 % Pluronic® F127. 5DA2Me-Fluo: Ex. 405 nm, 50 %, PMT (511-564 nm), Gain 800. Cell Tracker Red: Ex. 594 nm, 10 %, PMT (616-669 nm), Gain 800. Objective lens: HC PL APO CS2 63 \times /1.40 OIL. Pin hole: 95.56 μ m. LineAverage: 1. Color scale: Green 0-255, Red: 0-255.

続いて、5DA2Me-Fluo を使って実験を行った。すると固定処理後でも蛍光が観測され (Figure 6-4, left), 想定通り 5DA2Me-Fluo が細胞内のタンパク質を光ラベル化し、細胞内滞留性を獲得していることが示唆された。また、局在は 5A2Me-Fluo と同様に細胞質であることが示唆された (Figure 6-4, upper right).

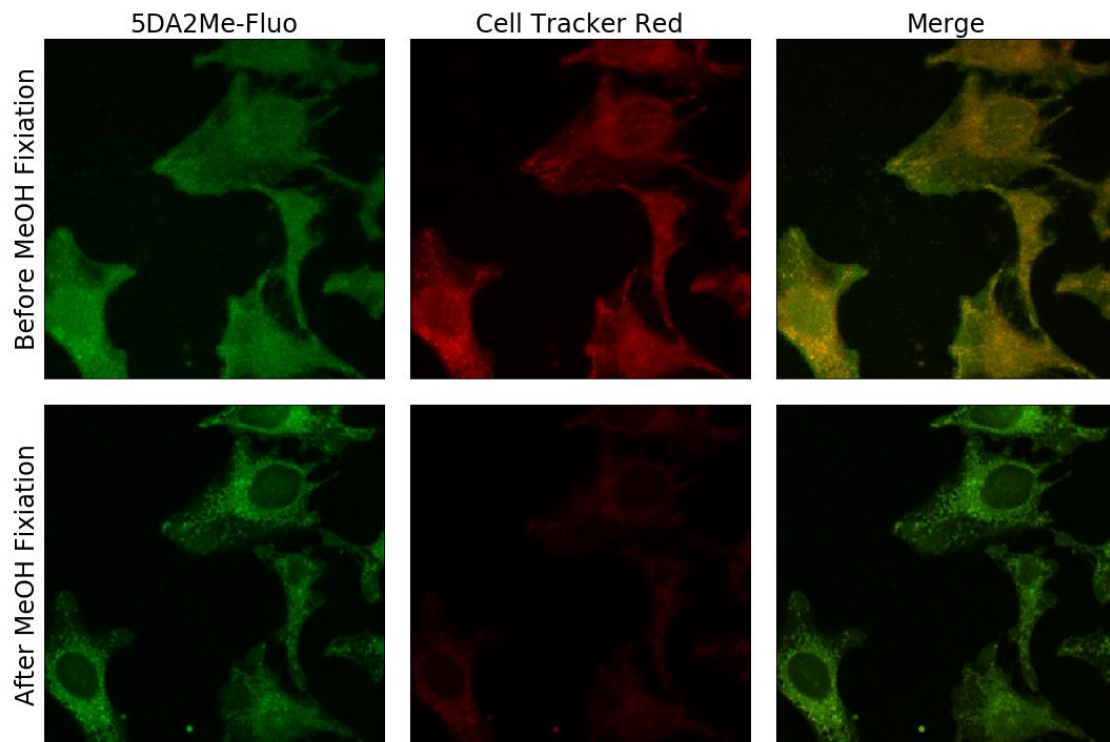


Figure 6-4 | Leica TCS SP5 images of HeLa cells before and after MeOH fixation. 1 μ M 5DA2Me-Fluo. 1 μ M Cell Tracker Red. 0.2 % DMSO. 0.2 % Pluronic® F127. 5DA2Me-Fluo: Ex. 405 nm, 50 %, PMT (511-564 nm), Gain 800. Cell Tracker Red: Ex. 594 nm, 10 %, PMT (616-669 nm), Gain 800. Objective lens: HC PL APO CS2 63 \times /1.40 OIL. Pin hole: 95.56 μ m. LineAverage: 1. Color scale: Green 0-255, Red: 0-255.

6-3. 一細胞蛍光標識

続いて、一細胞だけに 488 nm の光を照射することで一細胞蛍光標識が可能であるかを検証した。まず、光照射を行う前の蛍光像を見ると (Figure 6-5-a), 低蛍光性である 5DA2Me-Fluo 由来の蛍光はほとんど認められなかった。続いて、一細胞を囲うように ROI を作成し、488 nm の光を 5 min 照射した (Figure 6-5-b)。すると、光照射した細胞から強い緑色蛍光が認められ (Figure 6-5-c), 光照射した細胞内で高蛍光性の光反応生成物が生じていることが示唆された。最後に、0.1 % TWEEN20 in HBSS での洗浄操作を 3 回行い、蛍光像を取得したところ (Figure 6-5-d), 光照射した細胞から選択的に緑色蛍光が認められ、5DA2Me-Fluo が一細胞蛍光標識に応用できることを示した。

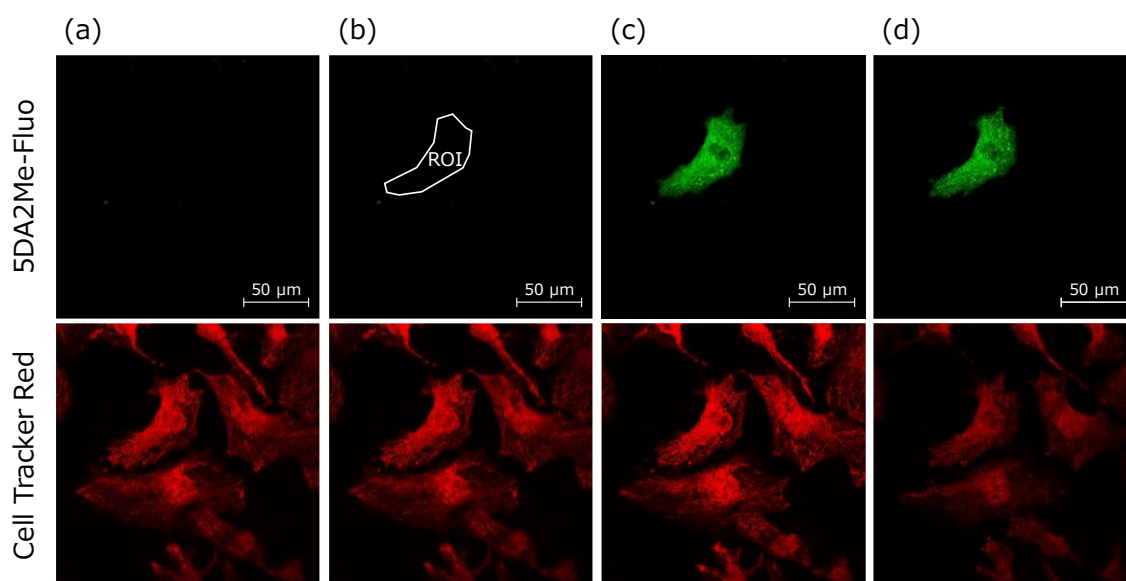


Figure 6-5 | Confocal fluorescence microscopy images. HeLa cells were incubated with 1 μ M 5DA2Me-Fluo, 1 μ M Cell Tracker Red and 0.2 % Pluronic® F127 in HBSS at 37 °C for 30 min, (a) captured the image, (b) irradiated to ROI at 488 nm for 5 min, (c) captured the image, washed 3 times with 0.1 % TWEEN20 in HBSS, incubated with HBSS at 37 °C for 30 min, washed once with HBSS, (d) captured the image. Microscopy conditions. Objective lens: HC PL APO CS2 63 \times /1.40 OIL. 5DA2Me-Fluo: excitation (488 nm), detection range (505-545 nm), detector (PMT), gain (800), color scale (25-100). Cell Tracker Red: excitation (543 nm), detection range (580-620 nm), detector (PMT), gain (800), color scale (0-255).

7. 総括・今後の展望

7-1. 総括

本研究では, diazoacetate 誘導体が分子間の光誘起電子移動によってカルベンを産生する知見と, xanthene 系色素が分子内の光誘起電子移動によって benzene 部位が一電子還元される知見に着目し, 可視光で機能する光ラベル化剤の開発・応用を行った. 以下にその成果をまとめる.

- 493-583 nm の光で機能する光ラベル化剤群の開発に成功した. これらは紫外光で機能する既存の光ラベル化剤と比較して, 独自性に富んだ光ラベル化剤であると言える.
- 本学修士課程で提案した長波長化戦略は, diazoacetate 構造の導入位置, 母核とする色素によって暗所での安定性・光ラベル化能が変わり得ることが問題であった. しかし, 本研究で提案した d-PeT を作働原理とする長波長化戦略は, 光を吸収する部位と, 活性種を産生する部位を分離することで, 暗所での安定性・光ラベル化能を保ったまま長波長化することを可能にした.
- 5DA2Me-Fluo の光反応量子収率の改善を目指し, 5DA2CF3-Fluo を設計・合成した. この分子は, a-PeT (k_{a-et}), 蛍光放出過程 (k_{fl}), 無輻射失活過程 (k_{nr}) よりも, d-PeT (k_{d-et}) をより優先させることを意図して設計しており, 結果, 僅かではあるが光反応量子収率の改善に成功した. また本検討によって, より大きな光反応量子収率の改善には, 窒素脱離反応の速度 (k_{dec}) を上昇させること, または逆電子移動の速度 (k_{d-bet}) を低下させることが重要であることが分かり, これを実現する分子設計は今後の課題である.
- 開発した光ラベル化剤が photoaffinity labeling へ応用できるかを評価するため, CA-II を標的タンパク質として, photoaffinity labeling プローブを設計・合成した. 結果として, 生きた赤血球中の CA-II を選択的に光ラベル化すること, CA-II 内の光ラベル化部位を同定することに成功した.

- 開発した光ラベル化剤が, caged 蛍光色素としての特性を有することに着目し, 一細胞蛍光標識への応用を試みた. 結果として, 光照射した一細胞を選択的に蛍光標識できることを示した. さらに, 細胞内のタンパク質を光ラベル化することで MeOH 固定操作後も蛍光が認められ, 高い細胞内滞留性を有することを示した.

7-2. 今後の展望

■ 新たな光機能性分子の開発

本研究では, xanthene 系色素の分子内の光誘起電子移動を利用することで, diazoacetate 構造が一電子還元により活性種を産生するという, 一電子還元反応の知見を基に光機能性分子の開発が可能であることを示した. これにより, 他の一電子還元反応に限らず, 一電子酸化反応の知見を基に新たな光機能性分子の開発も期待できる. これにより例えば, フェノールまたはアミンの保護基として利用されるスルホニル基が一電子還元により脱保護される知見から^{36, 37}, xanthene 系色素の benzene 部位にスルホニル基を導入し, かつ d-PeT が起こるように設計すれば, xanthene 部位の励起によってフェノールまたはアミンを放出する caged 化合物となり得る. また当研究室では, xanthene 系色素の benzene 部位の 2 位に hydroxymethyl 基を導入することで, 酵素反応前後で xanthene 部位の可視光吸収を無から有に制御できること見出している (Figure 7-1). つまり, xanthene 系色素を母核することで, 酵素反応後のみ uncaged することができる caged 化合物の開発も可能である. これにより, 標的とした酵素が高活性の細胞で, かつ光が照射された場合にのみ薬剤を放出するプロドラッグの開発も期待できる.

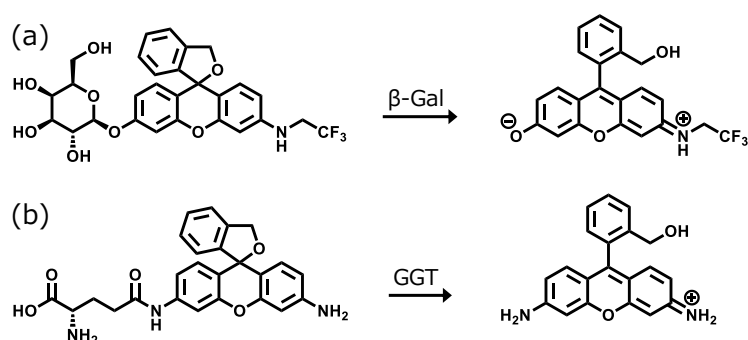


Figure 7-1 | Activatable fluorescence probes for detection of (a) β -Galactosidase (β -Gal)⁶⁹ and (b) γ -glutamyltranspeptidase (GGT)⁷⁰.

■ 細胞内タンパク質の分解速度計測

本研究で開発した光ラベル化剤は、既存の光ラベル化剤よりも長波長光で機能するため、より細胞傷害性の低い光ラベル化が可能である。この温和な光ラベル化を活かした応用として、細胞内タンパク質の分解速度計測が考えられる。タンパク質の分解速度を計測する一般的な手法としては、Halo Tag や SNAP Tag などを用いた pulse-chase protein labeling が挙げられる⁷¹。この手法で算出されるのは標的タンパク質の分解速度でなく、厳密には標的タンパク質とタグタンパク質の融合タンパク質の分解速度である。一方で、photoaffinity labeling プローブによって内在性の標的タンパク質を光ラベル化し、直ちに細胞を可溶化したサンプルと、任意の時間培養した後に細胞を可溶化したサンプルを、SDS-PAGE の対象とし、標的タンパク質のバンドの蛍光強度を定量することで、内在性の標的タンパク質の分解速度を算出することができると考えた。この実験系では、一般的な photoaffinity labeling とは異なり、光ラベル化後に生細胞の状態で培養する必要があるため、細胞傷害性を抑えることが重要である。また、一般的な pulse-chase protein labeling と比較して、タグタンパク質の導入が不要であること、より短いタイムスケールでのラベル化が期待できることが利点である。

■ 二光子蛍光観察への応用

現在、生体深部の観察を行う際に二光子蛍光観察が汎用されている。一般的な蛍光観察では、吸収波長 λ に相当するエネルギー E ($E = hc/\lambda$) の光子によって蛍光色素を励起し、その後、基底状態に戻る際に放出される蛍光を観察する。一方で、二光子蛍光観察では、吸収波長 λ の半分に相当するエネルギー $E/2$ の光子を高密度に保つことで、吸収波長 λ の蛍光色素を励起する。そのため、可視光領域の蛍光色素を用いても赤外領域での蛍光観察が可能となり、*in vivo* イメージングや脳スライスの観察などに有用な手法となっている。二光子吸収の効率、光褪色という観点から、二光子蛍光観察に利用できる蛍光色素は限られており、xanthene 系色素の中では rhodamine 類が汎用される^{72, 73}。本研究では、tetramethylrhodamine を母核とする光ラベル化剤 5DA2Me-TMR を開発しており、二光子励起による一細胞蛍光標識に応用できると考えている。これが実現すれば、生体深部の細胞を蛍光標識し、細胞の挙動、細胞系譜の観察に適した手法となることが期待される。

■ 摂動前後のオルガネラ内のプロテオーム解析

本研究では、光ラベル化剤の多色化に成功している。これにより複数の時刻で、それぞれ異なるプロテオームを光ラベル化することが可能になった。例えば、緑色と赤色光ラベル化剤を核に局在させるように分子設計すれば、摂動前後での核のプロテオーム変化を解析することができる（必ずしも核である必要はない）。まず長波長光で機能する光ラベル化剤で核内のプロテオームを光ラベル化する。続いて摂動を与えた後、短波長光で機能する光ラベル化剤で核内のプロテオームを光ラベル化する。そして、細胞を可溶化し、二次元電気泳動を展開する。赤色の区画は摂動前だけ核内に局在、緑色の区画は摂動後だけ核内に局在、赤と緑が重なっている区画は摂動前後で局在が変化しないタンパク質であると考えられる。これにより、摂動によって産生、分解、局在変化のいずれかが起こったタンパク質を網羅的に同定できる。

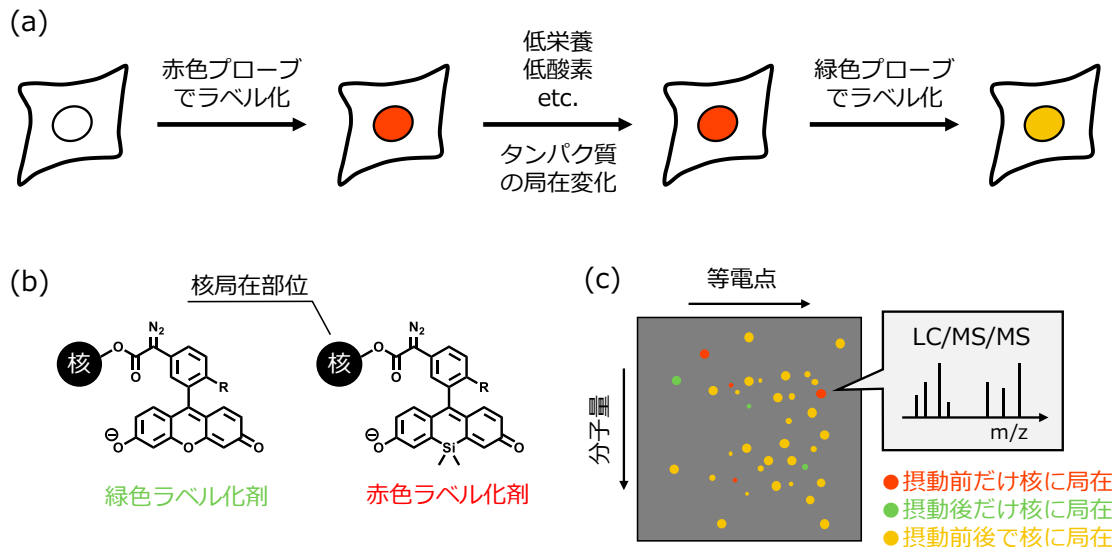


Figure 7-2 | (a) Schematic illustration of the comprehensive search for proteins whose localization changes by perturbation. (b) The molecular design of green and red labeling probe localized in the nucleus. (c) The method for identifying POI protein using two-dimensional electrophoresis like DEG assay.

8. 実験の部

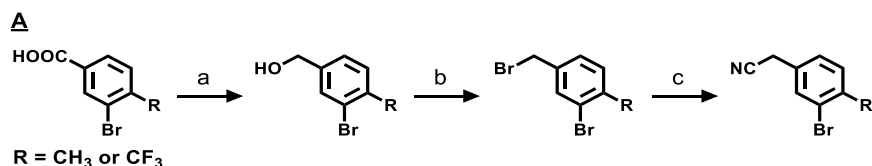
8-1. Synthesis

■ General Information for Synthesis

All chemical reagents and dry solvents for synthesis were purchased from commercial suppliers (Tokyo Chemical Industries, Wako Pure Chemical, Aldrich Chemical Company, Dojindo, Kanto Chemical Co., and Watanabe Chemical Industry) and were used without further purification or distillation. The composition of mixed solvents is given by the volume ratio (v/v). Reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) performed on TLC glass plates (TLC Silica gel 60 F₂₅₄, Merck) or analytical ultraperformance liquid chromatography–mass spectrometry (UPLC-MS, Waters). Analytical UPLC-MS was equipped with an UV-VIS detector (D13UPL585A, Waters) and a MS detector (KAB0812, Waters) for product visualization on a reversed phase column (ODS, 1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm, Waters). Solvent A: = 0.1 % HCOOH (v/v) in H₂O, Solvent B: 0.1 % HCOOH (v/v) and 20 % H₂O (v/v) in CH₃CN. Typical gradient was from 5 % to 95 % solvent B within 3.5 min. Flow rate was 0.6 mL/min. All compounds were purified by preparative medium pressure liquid chromatography (MPLC) or preparative high-performance liquid chromatography (HPLC). Reversed phase preparative MPLC was performed on Isolera One UV-VIS system (Biotage) on a reversed phase column (SNAP Ultra C18, Biotage). Solvent A: = 0.1 % TFA (v/v) in H₂O, Solvent B: 0.1 % TFA (v/v) in CH₃CN. Typical gradient was from 20 % to 100 % solvent B within 14 min. Normal phase preparative MPLC was performed on Smart Flash EPCLC AI-580S system (Yamazen) on a normal phase column (Silicagel 40 μm or Amino 40 μm, Yamazen). Solvents were Hexane, CH₂Cl₂, EtOAc or MeOH. Reversed phase preparative HPLC was equipped with an UV-VIS detector (MD-2015, JASCO) for product visualization on a reversed phase column (Inertsil ODS-3 10.0 mm × 250 mm, GL Sciences).

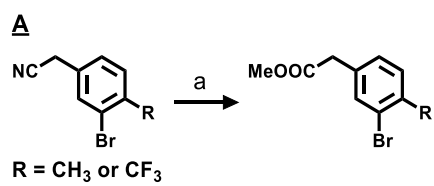
Solvent A: = 0.1 % TFA (v/v) in H₂O, Solvent B: 0.1 % TFA (v/v) and 20 % H₂O (v/v) in CH₃CN. Typical gradient was from 30 % to 100 % solvent B within 15 min. The compounds purified by reversed phase preparative MPLC or HPLC were lyophilized on a lyophilizer (VD-800F, TAITEC) equipped with a vacuum pump (GCD-136X, ULVAC).

■ Synthesis of 5DA2Me-Fluo, -TMR, -SiFluo and 5DA2CF3-Fluo



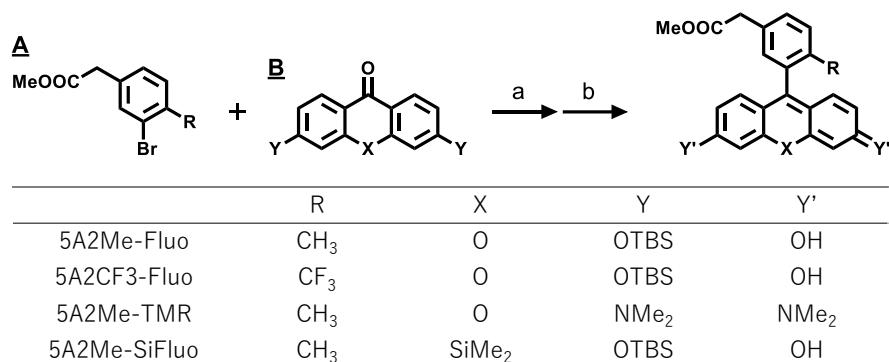
(a) $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$, THF. (b) Phosphorus Tribromide, CH_2Cl_2 . (c) Trimethylsilyl Cyanide, Tetrabutylammonium Fluoride, CH_3CN .

A (1.0 eq.) was dissolved in THF, 0.9 mol/L $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ (2.0 eq.) was added, and stirred at room temperature for 2 h. The reaction mixture was washed with saturated Na_2CO_3 aq. $\times 2$, dried over anhydrous Na_2SO_4 , and the solvent was removed under reduced pressure. The alcohol compound was dissolved in CH_2Cl_2 , phosphorus tribromide (2.0 eq.) was added, and stirred at room temperature for 10 min. The reaction mixture was quenched with saturated Na_2CO_3 aq., extracted with CH_2Cl_2 , dried over anhydrous Na_2SO_4 , and the solvent was removed under reduced pressure. The bromide compound, trimethylsilyl cyanide (3.0 eq.) and tetrabutylammonium fluoride (3.0 eq.) were dissolved in CH_3CN , and stirred at room temperature for overnight. The reaction mixture was quenched with H_2O , the solvent was removed under reduced pressure, extracted with CH_2Cl_2 , dried over anhydrous Na_2SO_4 , and the solvent was removed under reduced pressure. The crude was purified with EPCLC (Hexane/EtOAc). Colorless oil was obtained. Yield: 43.1 % ($\text{R} = \text{CH}_3$), 41.4 % ($\text{R} = \text{CF}_3$).



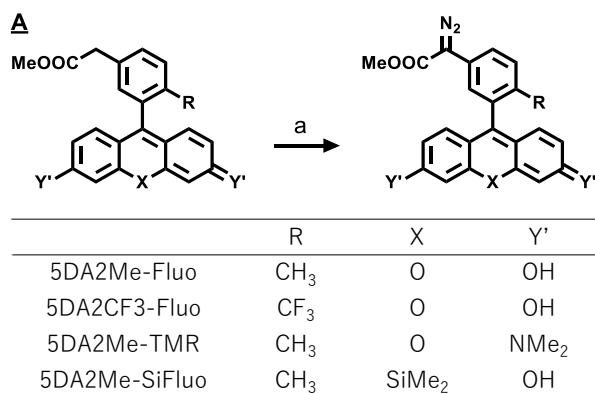
(a) MeOH, H₂SO₄

A was dissolved in MeOH/H₂SO₄=5/1, and stirred at 120 °C for 5 min with microwave. The reaction mixture was extracted with CH₂Cl₂ × 3, dried over anhydrous Na₂SO₄, and the solvent was removed under reduced pressure. The crude was purified with EPCLC (Hexane/EtOAc). Colorless oil was obtained. Yield: 74.1 % (R = CH₃), 87.8 % (R = CF₃).



(a) *sec*-BuLi, THF. (b) 2N HCl aq.

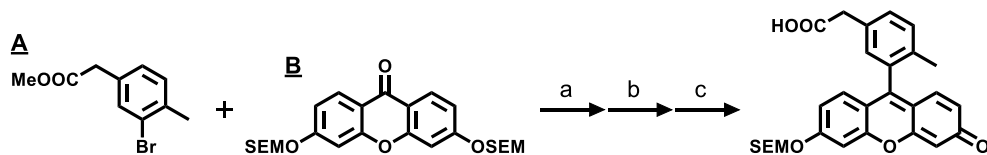
A (5.0 eq.) was dissolved in THF, stirred at -78 °C for 10 min, *sec*-BuLi (10.0 eq.) was added dropwise, stirred at -78 °C for 10 min, B (1.0 eq.) in THF was added, and stirred at room temperature for 30 min. The reaction mixture was quenched with 2N HCl aq., extracted with CH₂Cl₂ × 2, dried over anhydrous Na₂SO₄, and the solvent was removed under reduced pressure. The crude was purified with acidic HPLC (A : H₂O and 0.1% TFA, B : H₂O/CH₃CN = 2/8 and 0.1% TFA, Gradient : A/B = 70/30 to 0/100 for 20 min). Orange powder was obtained. Yield: 60.7 % (5A2Me-Fluo), 73.4 % (5A2CF₃-Fluo), 98.1 % (5A2Me-TMR), 32.4 % (5A2Me-SiFluo)



(a) Tosyl Azide, DBU, CH₃CN, DMSO.

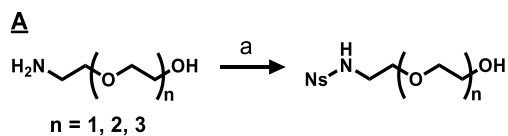
A (1 eq.) was dissolved in CH₃CN/DMSO = 1/1, DBU (6.0 eq.) and Tosyl Azide (5.0 eq.) were added, stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was purified acidic HPLC (A : H₂O and 0.1% TFA, B : H₂O/CH₃CN = 2/8 and 0.1% TFA, Gradient : A/B = 70/30 to 0/100 for 20 min). Orange (5DA2Me-Fluo), orange (5DA2CF3-Fluo), red (5DA2Me-TMR), and red (5DA2Me-SiFluo) powder was obtained. Yield: 20.7 % (5DA2Me-Fluo), 92.8 % (5DA2CF3-Fluo), 30.6 % (5DA2Me-TMR).

■ Synthesis of SA-PEG(n)-5DA2Me-Fluo (n = 1, 2, 3)



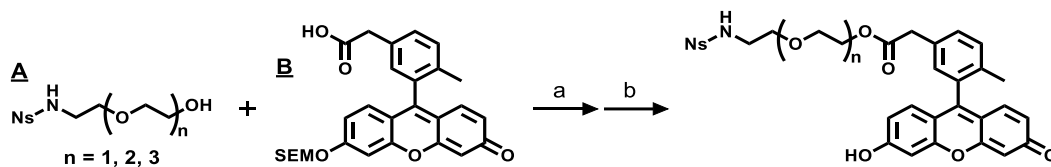
(a) sec-BuLi, THF. (b) 2N HCl aq. (c) 2N NaOH aq.

A (5.0 eq.) was dissolved in THF, stirred at -78 °C for 10 min, sec-BuLi (10.0 eq.) was added dropwise, stirred at -78 °C for 10 min, B (1.0 eq.) in THF was added, and stirred at room temperature for 30 min. The reaction mixture was quenched with 2N HCl aq., excess 2N NaOH aq. was added, and THF was removed under reduced pressure. The crude was purified with acidic HPLC (A : H₂O and 0.1% TFA, B : H₂O/CH₃CN = 2/8 and 0.1% TFA, Gradient : A/B = 70/30 to 0/100 for 20 min). Orange powder was obtained.



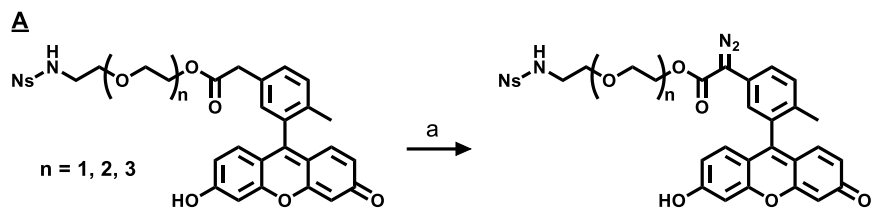
(a) 2-Nitrobenzenesulfonyl Chloride, TEA, CH_2Cl_2 .

A (1.0 eq.) was dissolved in CH_2Cl_2 , 2-Nitrobenzenesulfonyl Chloride (1.2 eq.) and TEA (2.0 eq.) were added, and stirred at room temperature for 3 h. The reaction mixture was extracted with $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \times 3$, dried over anhydrous Na_2SO_4 , and the solvent was removed under reduced pressure. The crude was purified with EPCLC (Hexane/EtOAc). Colorless solid was obtained.



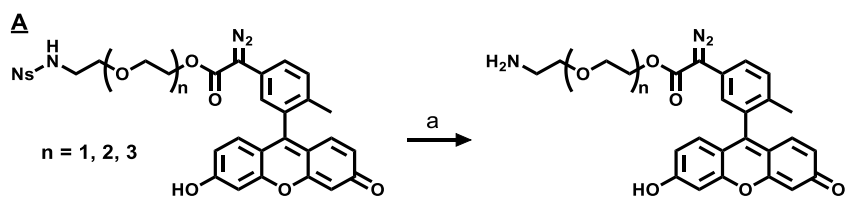
(a) DCC, DMAP, CH_2Cl_2 . (b) TFA.

A (1.0 eq), B (1.1 eq.), DCC (1.1 eq.) and DMAP (0.1 eq.) was dissolved in CH_2Cl_2 , and stirred at room temperature for overnight. TFA was added to the reaction mixture, and the solvent was removed under reduced pressure. The crude was purified with reversed phase preparative MPLC. Orange powder was obtained.



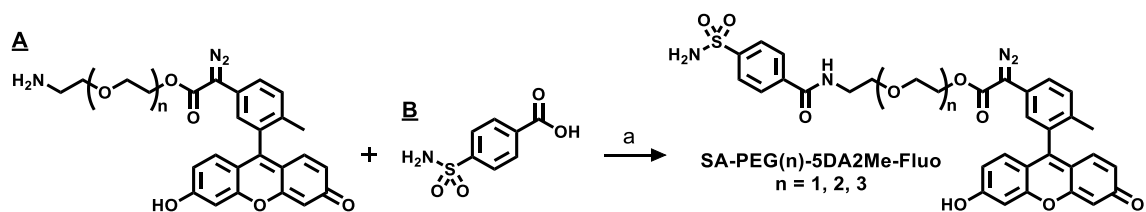
(a) Tosyl Azide, DBU, DMSO, CH₃CN.

A (1.0 eq.) was dissolved in CH₃CN/DMSO = 1/1, DBU (6.0 eq.) and Tosyl Azide (5.0 eq.) were added, stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was purified acidic HPLC (A : H₂O and 0.1% TFA, B : H₂O/CH₃CN = 2/8 and 0.1% TFA, Gradient : A/B = 70/30 to 0/100 for 20 min). Orange powder was obtained.



(a) PhSH, CsCO₃, CH₃CN.

A (1.0 eq.) was dissolved in CH₃CN, CsCO₃ (3.0 eq.) and PhSH (6.0 eq.) were added, stirred at room temperature for 3 h. The reaction mixture was purified with reversed phase preparative MPLC. Orange powder was obtained.



(a) EDC, HOBT, DIEA, DMF.

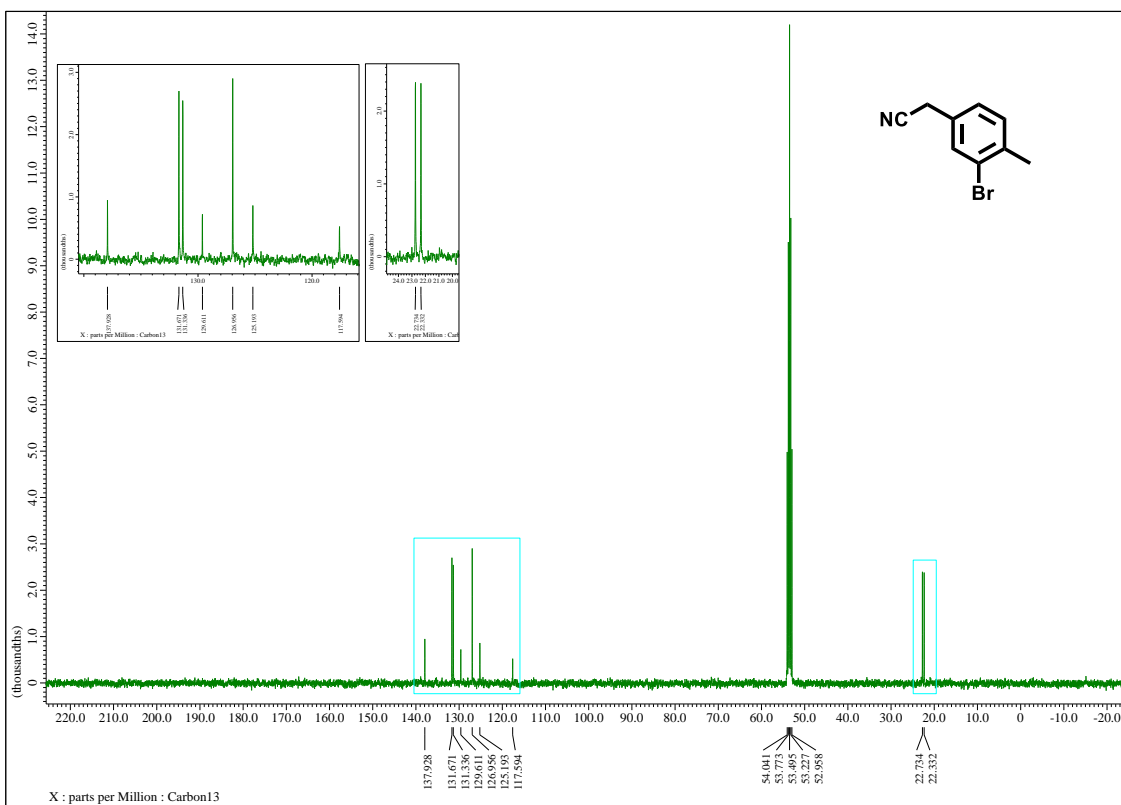
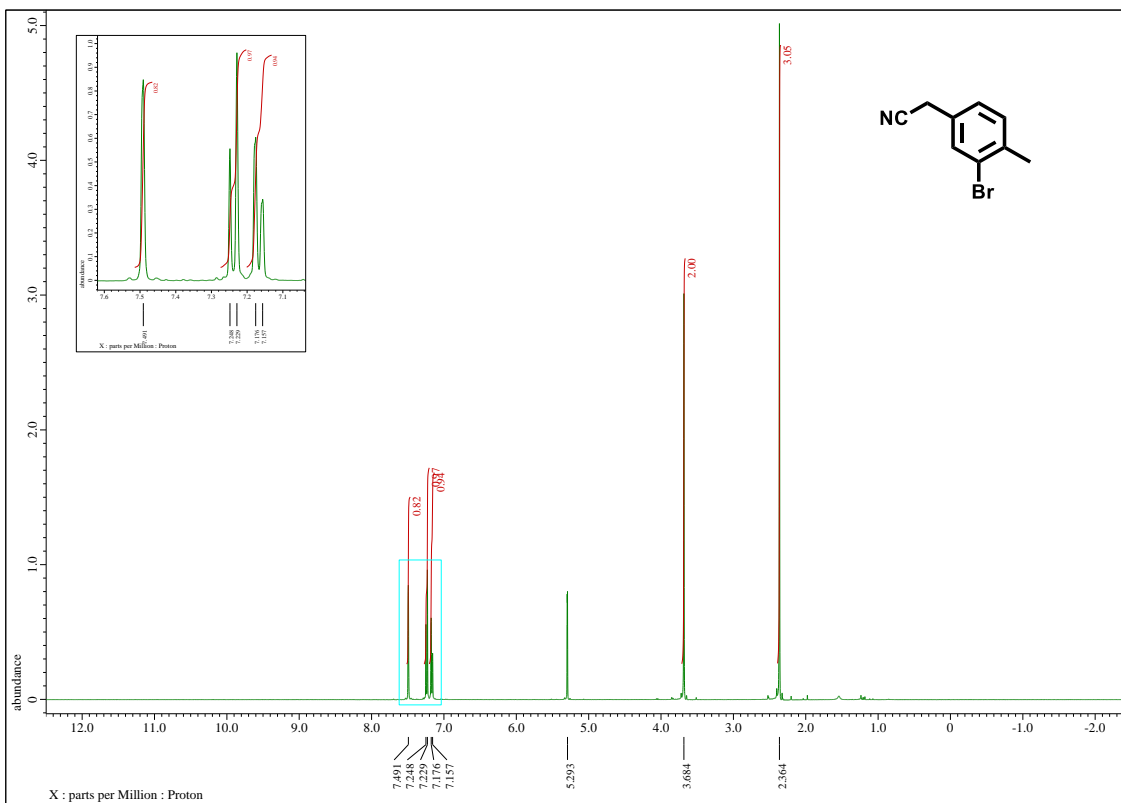
A (1.0 eq), B (1.0 eq.), EDC (1.5 eq.), HOBT (1.5 eq.) and DIEA (5.0 eq.) was dissolved in DMF, and stirred at room temperature for 3 h. The reaction mixture was purified with reversed phase preparative MPLC. Orange powder was obtained.

8-2. Characterization

^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a JEOL JNM-LA300, JMN-LA400, or JMN-ECZ400S. Data for ^1H -NMR spectra are reported as follows: chemical shift (δ ppm), multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, dd = doublet of doublets, m = multiplet), coupling constant (Hz), integration. Data for ^{13}C -NMR spectra are reported by chemical shift (δ ppm).

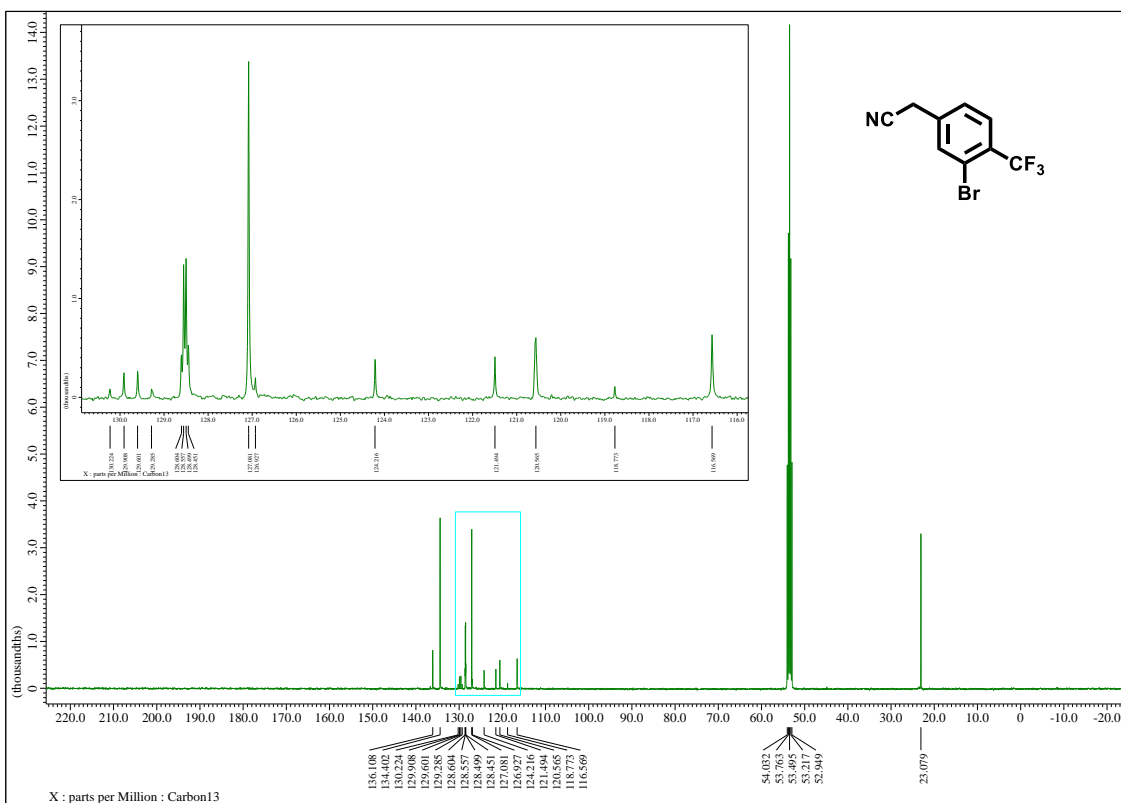
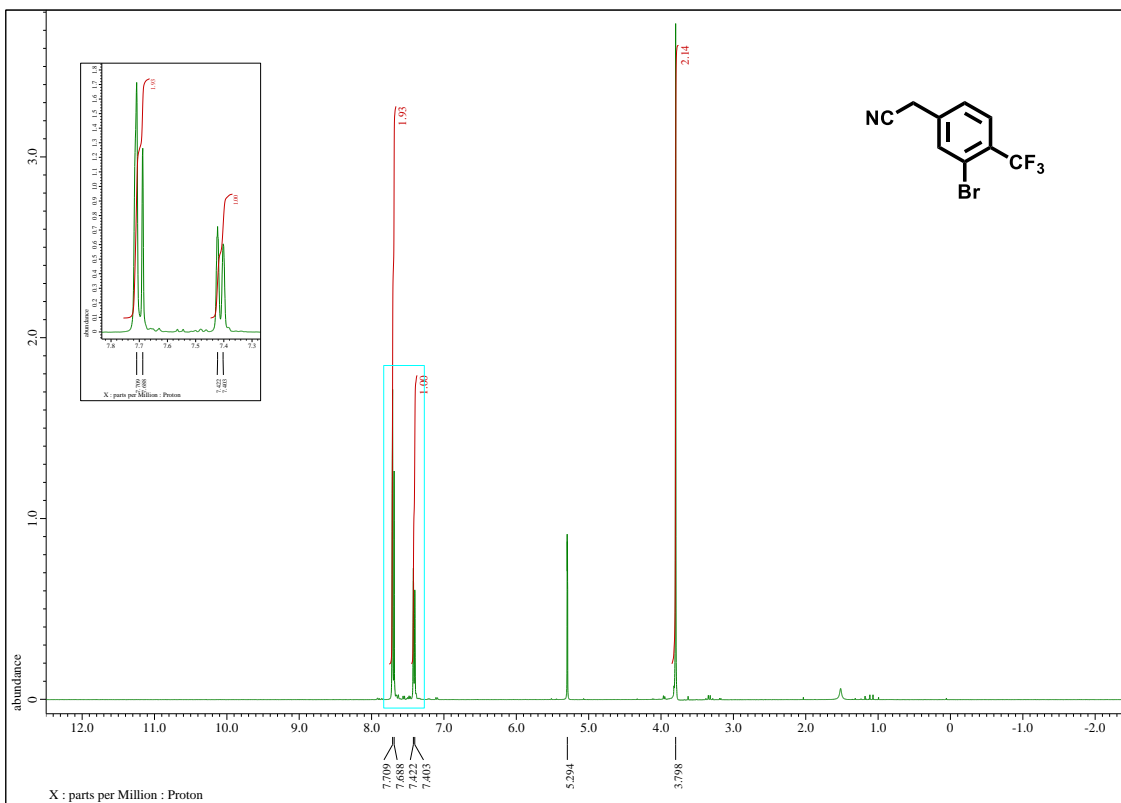
The purity of synthesized compounds were measured on liquid chromatograph-mass spectrometry (LC-MS, Shimadzu). Analytical LC-MS was equipped with an UV-VIS detector (SPD-M30A, Shimadzu), a fluorescent detector (RF-20A XS, Shimadzu) and a MS detector (LCMS-2020, Shimadzu) for product visualization on a reversed phase column (Poroshell 120, EC-C18, 1.9 μm , 2.1 mm \times 100 mm, Agilent). Solvent A: = 10 mM ammonium formate in H_2O , Solvent B: 10 mM ammonium formate in CH_3CN . Gradient was from 10 % to 90 % solvent B within 15 min. Flow rate was 0.45 mL/min. Inject volume: 1 μL (fluorescence chromatogram) or 10 μL (absorbance chromatogram).

High resolution mass spectra (HRMS) were measured on AccuTOF 4G LC-plus mass spectrometer (JEOL) with electron spray ionization (ESI).



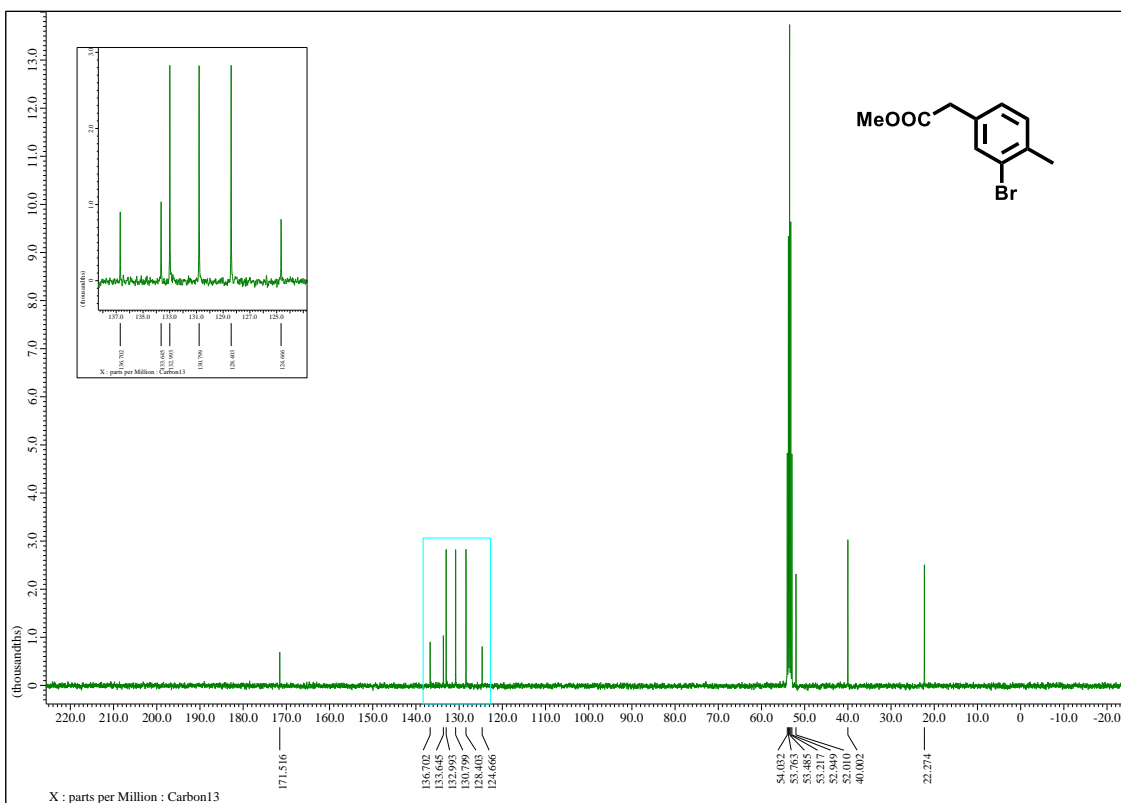
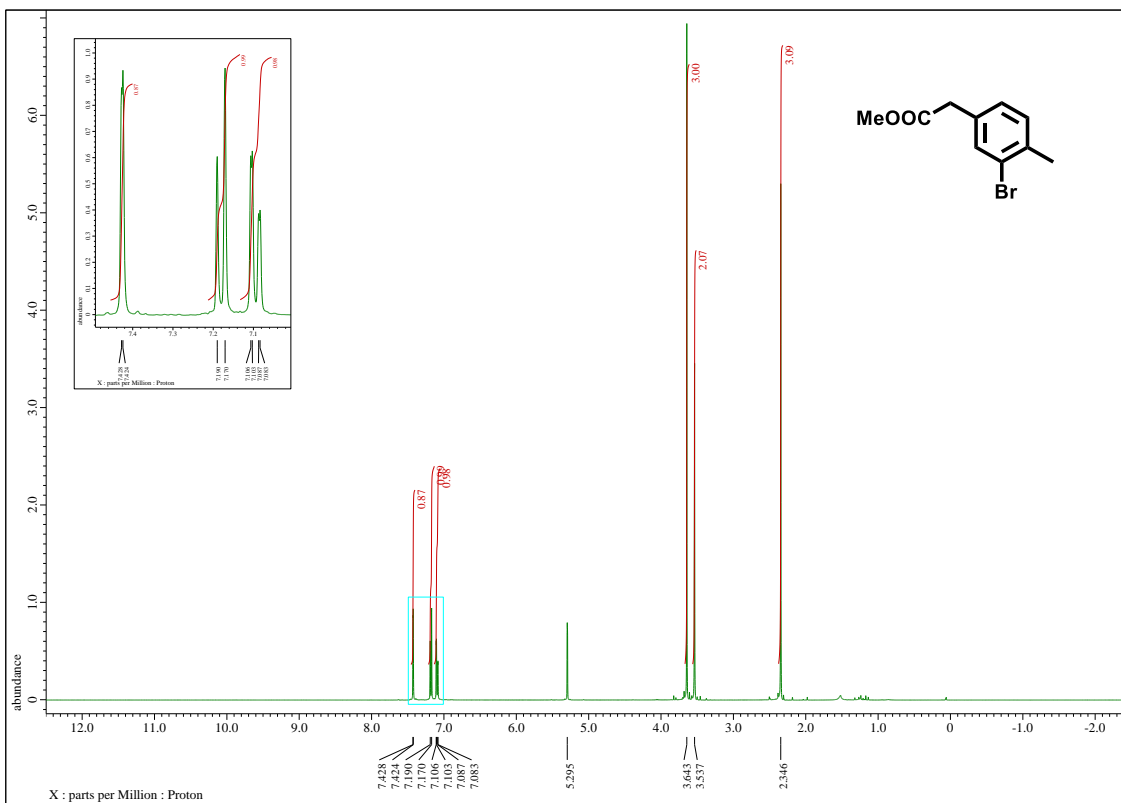
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, METHYLENE-CHLORIDE- D_2) δ 7.49 (s, 1H), 7.24 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.17 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 3.68 (s, 2H), 2.36 (s, 3H). tino171204-2206_Proton-1-1.jdf

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, METHYLENE-CHLORIDE- D_2) δ 137.93, 131.67, 131.34, 129.61, 126.96, 125.19, 117.59, 22.73, 22.33. tino171204-2206_Carbon-1-1.jdf



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, METHYLENE-CHLORIDE- D_2) δ 7.69-7.71 (m, 2H), 7.41 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 3.80 (s, 2H). tino180313-2220_Proton-1-1.jdf

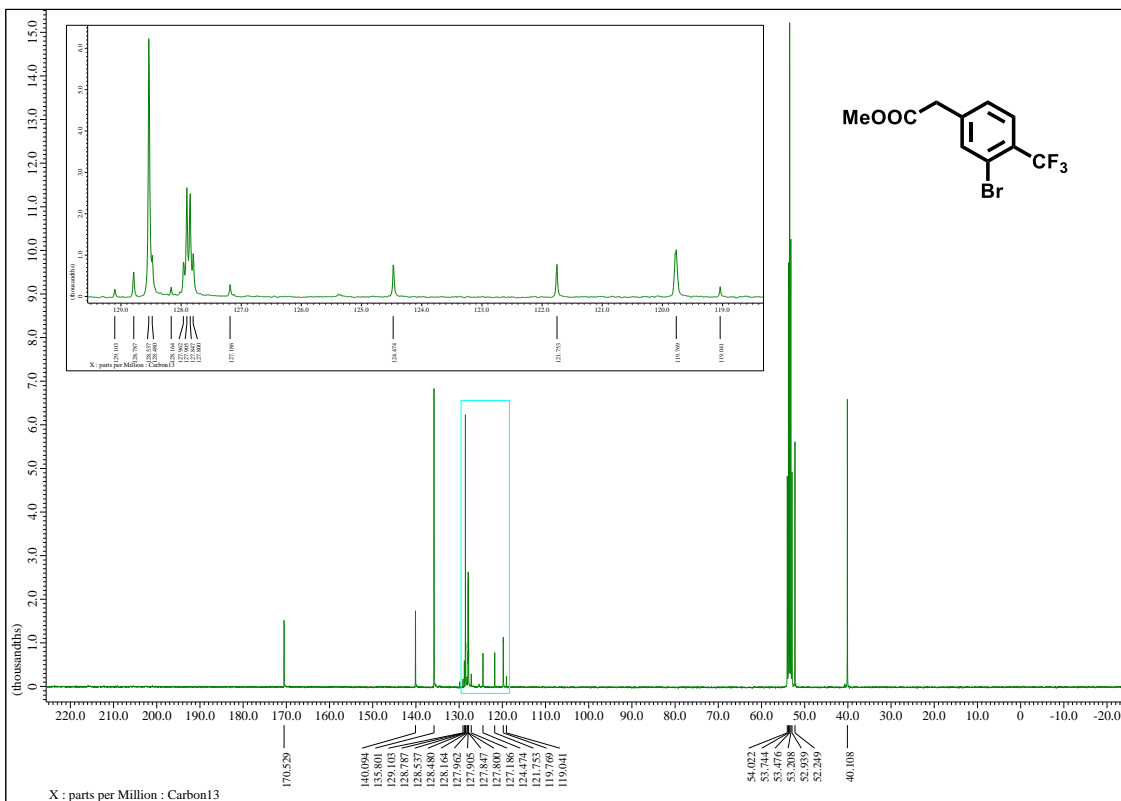
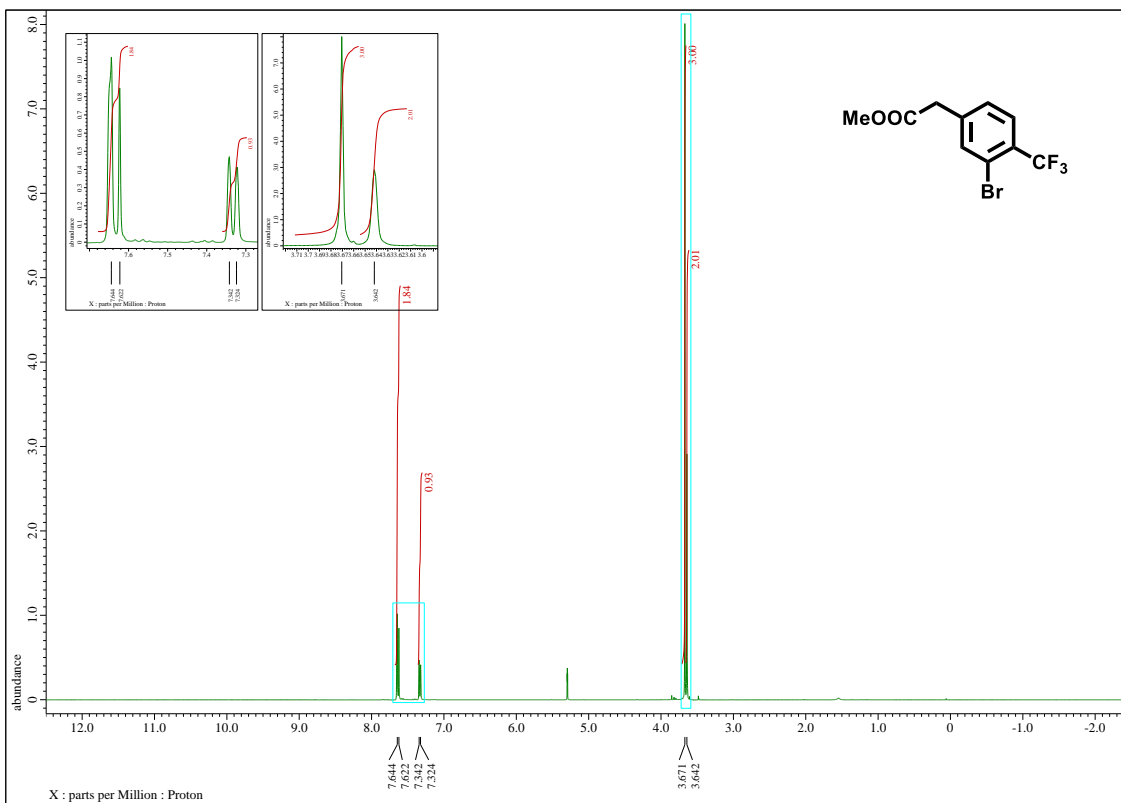
$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, METHYLENE-CHLORIDE- D_2) δ 136.11, 134.40, 129.75 (q, $J = 31.5$ Hz), 128.53 (q, $J = 5.1$ Hz), 127.08, 122.85 (q, $J = 273.3$ Hz), 120.56, 116.57, 23.08. tino180313-2220_Carbon-1-1.jdf



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, METHYLENE-CHLORIDE- D_2) δ 7.43 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.09 (dd, $J = 7.8, 1.4$ Hz, 1H), 3.64 (s, 3H), 3.54 (s, 2H), 2.35 (s, 3H).

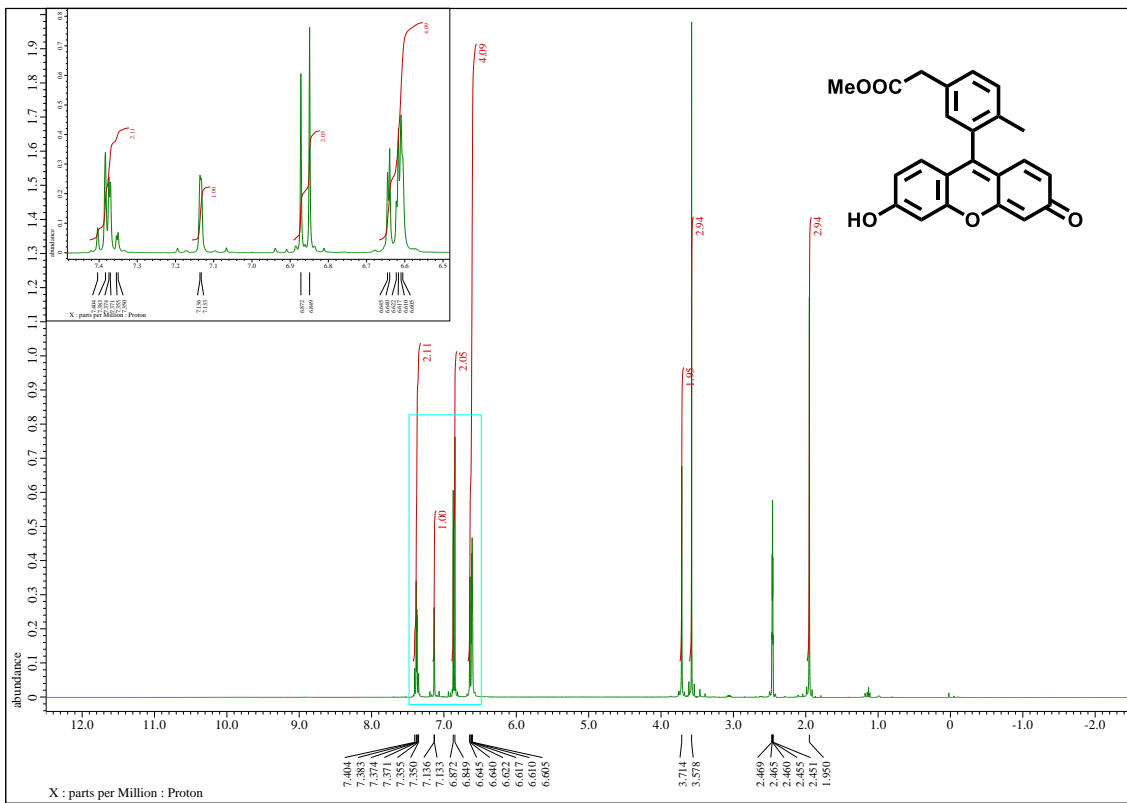
tino171115-2220_Proton-1-1.jdf

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, METHYLENE-CHLORIDE- D_2) δ 171.52, 136.70, 133.64, 132.99, 130.80, 128.40, 124.67, 52.01, 40.00, 22.27. tino171115-2220_Carbon-1-1.jdf

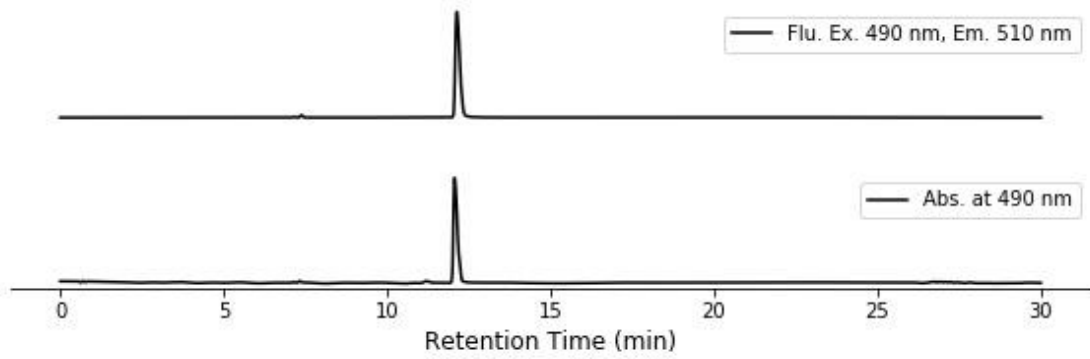


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, METHYLENE-CHLORIDE-D₂) δ 7.62-7.64 (m, 2H), 7.33 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.64 (s, 2H). tino180314-2240_Proton-1-1.jdf

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, METHYLENE-CHLORIDE-D₂) δ 170.53, 140.09, 135.80, 128.63 (q, J = 31.5 Hz), 128.54, 127.88 (q, J = 5.5 Hz), 123.11 (q, J = 272.9 Hz), 119.77, 52.25, 40.11. tino180314-2240_Carbon-1-1.jdf



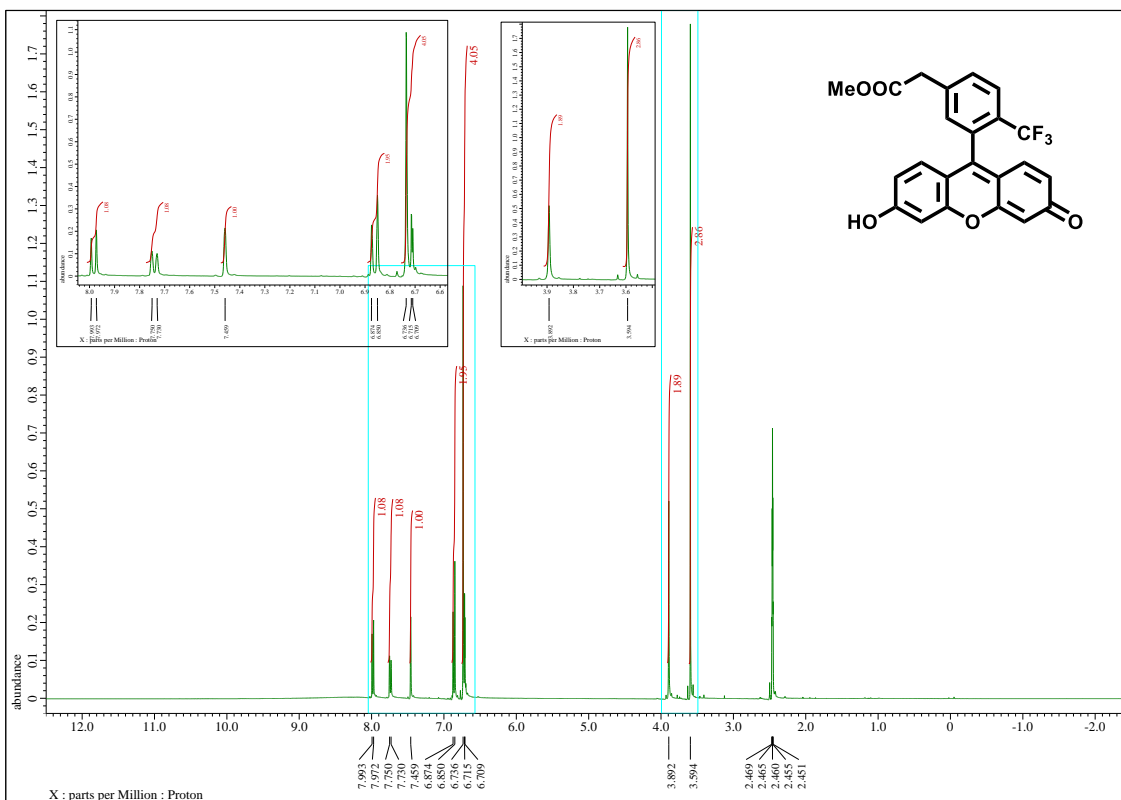
5A2Me-Fluo



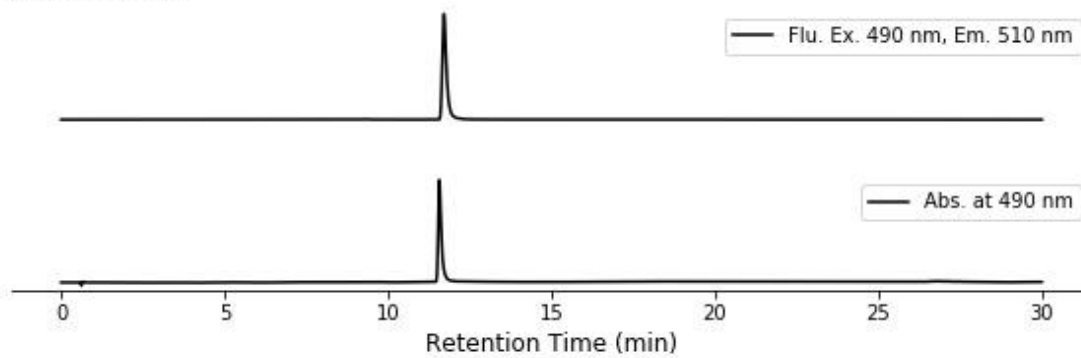
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- D_6) δ 7.35-7.40 (m, 2H), 7.13 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 6.61-6.65 (m, 4H), 3.71 (s, 2H), 3.58 (s, 3H), 1.95 (s, 3H). tino200207-2157_Proton-1-1.jdf

5A2Me-Fluo (tino200106-2023), HRMS (ESI $^+$) [M+H]

Found Mass: 375.12211, Calc. Mass: 375.12325, Mass Difference (mDa): -1.14



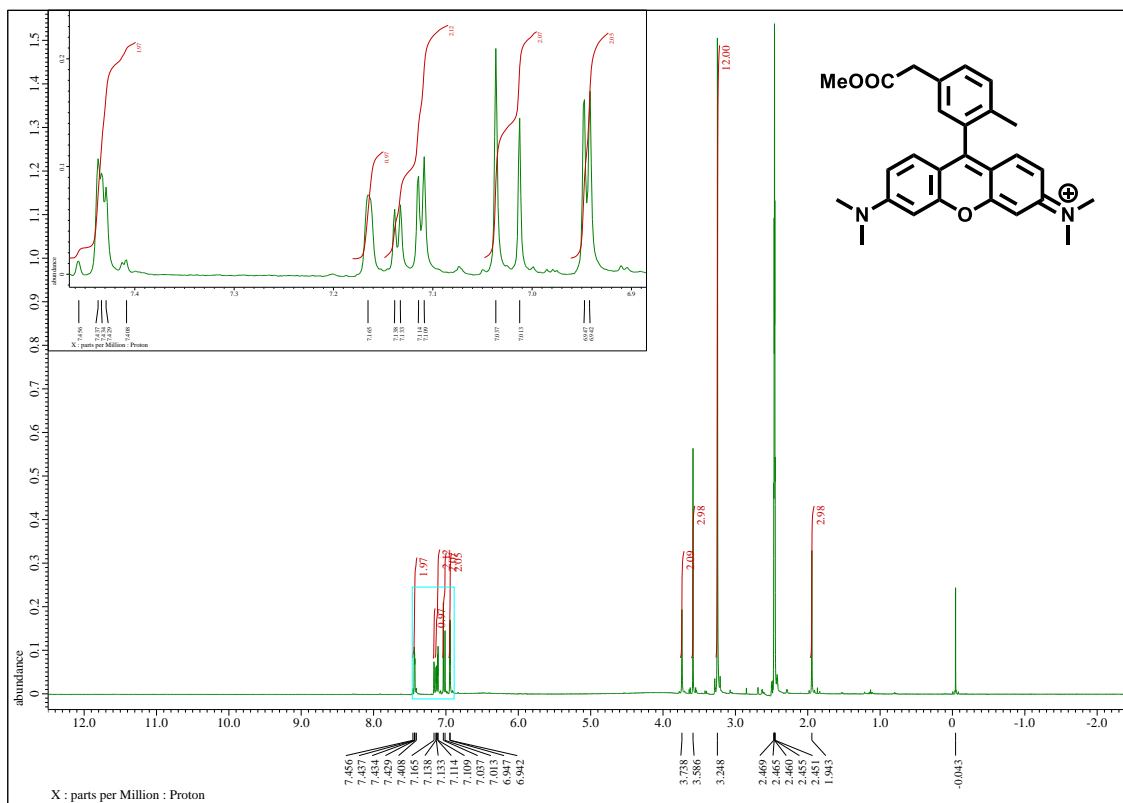
5A2CF3-Fluo



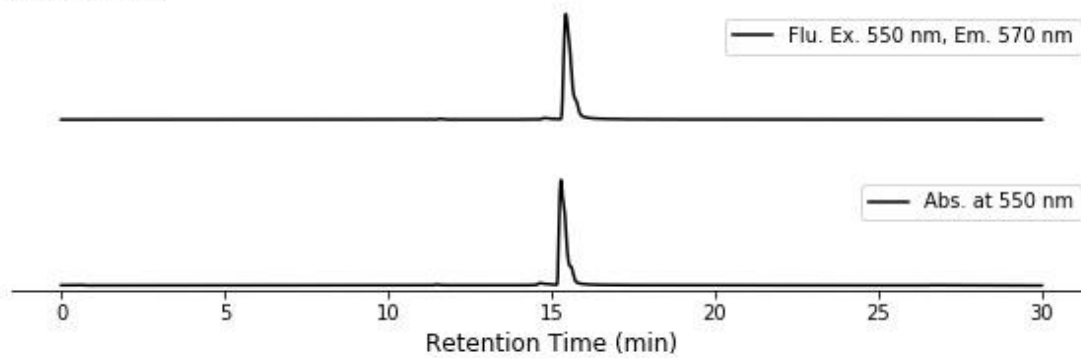
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- D_6) δ 7.98 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.74 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 6.86 (d, $J = 9.6$ Hz, 2H), 6.71-6.74 (m, 4H), 3.89 (s, 2H), 3.59 (s, 3H). tino200117-2004_Proton-1-1.jdf

5A2CF3-Fluo (tino200106-2028), HRMS (ESI $^+$) [M+H]

Found Mass: 429.09496, Calc. Mass: 429.09498, Mass Difference (mDa): -0.02



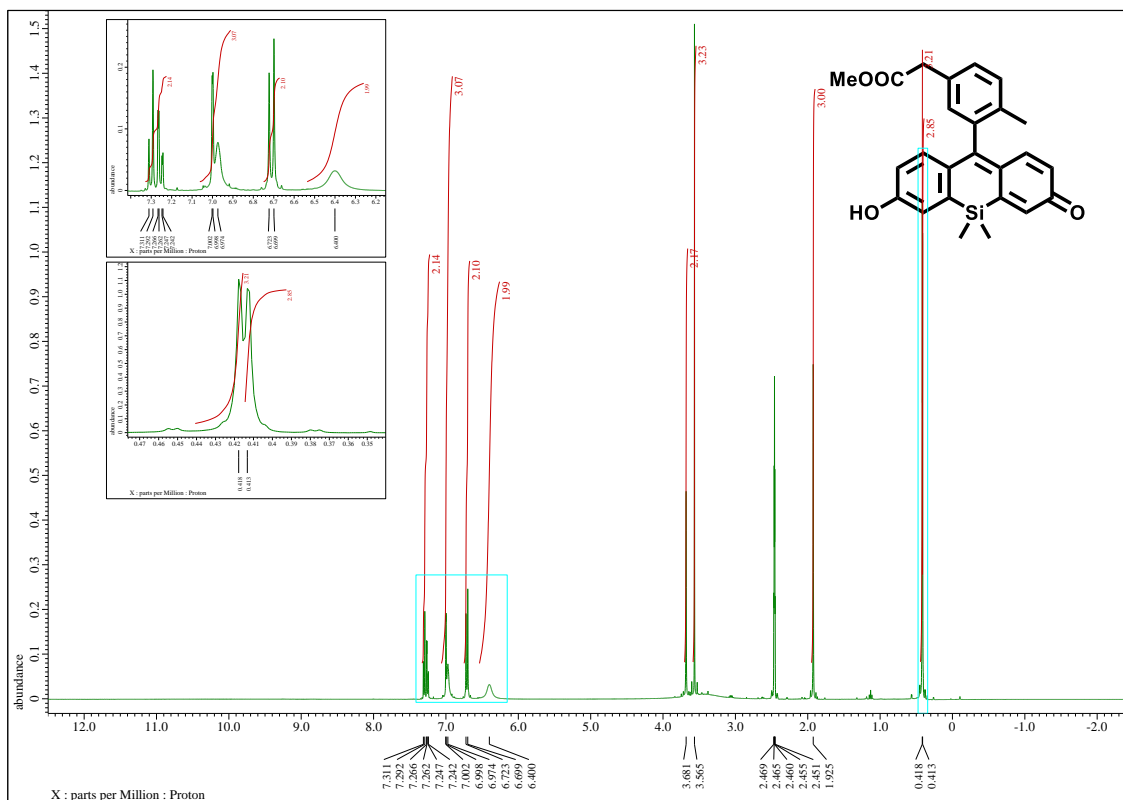
5A2Me-TMR



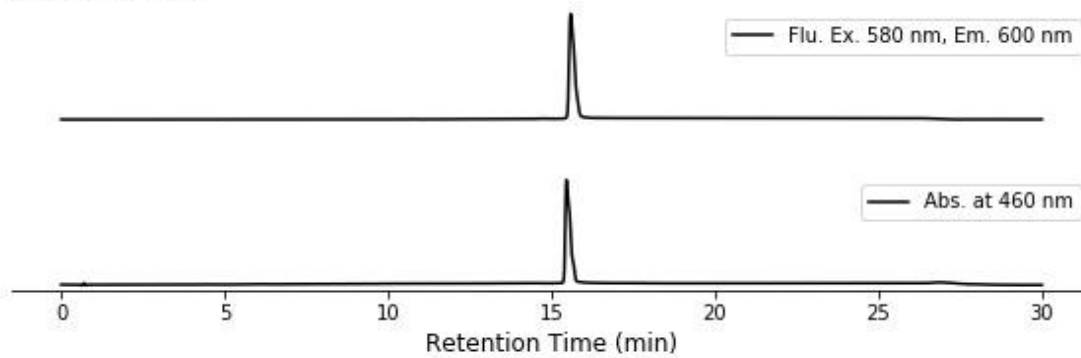
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- D_6) δ 7.41-7.46 (m, 2H), 7.17 (s, 1H), 7.12 (dd, $J = 9.6, 2.3$ Hz, 2H), 7.02 (d, $J = 9.6$ Hz, 2H), 6.94 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 3.74 (s, 2H), 3.59 (s, 3H), 3.25 (s, 12H), 1.94 (s, 3H). tino200220-1106_Proton-1-1.jdf

5A2Me-TMR (tino200106-2033), HRMS (ESI $^+$) [M+H]

Found Mass: 429.21727, Calc. Mass: 429.21782, Mass Difference (mDa): -0.54



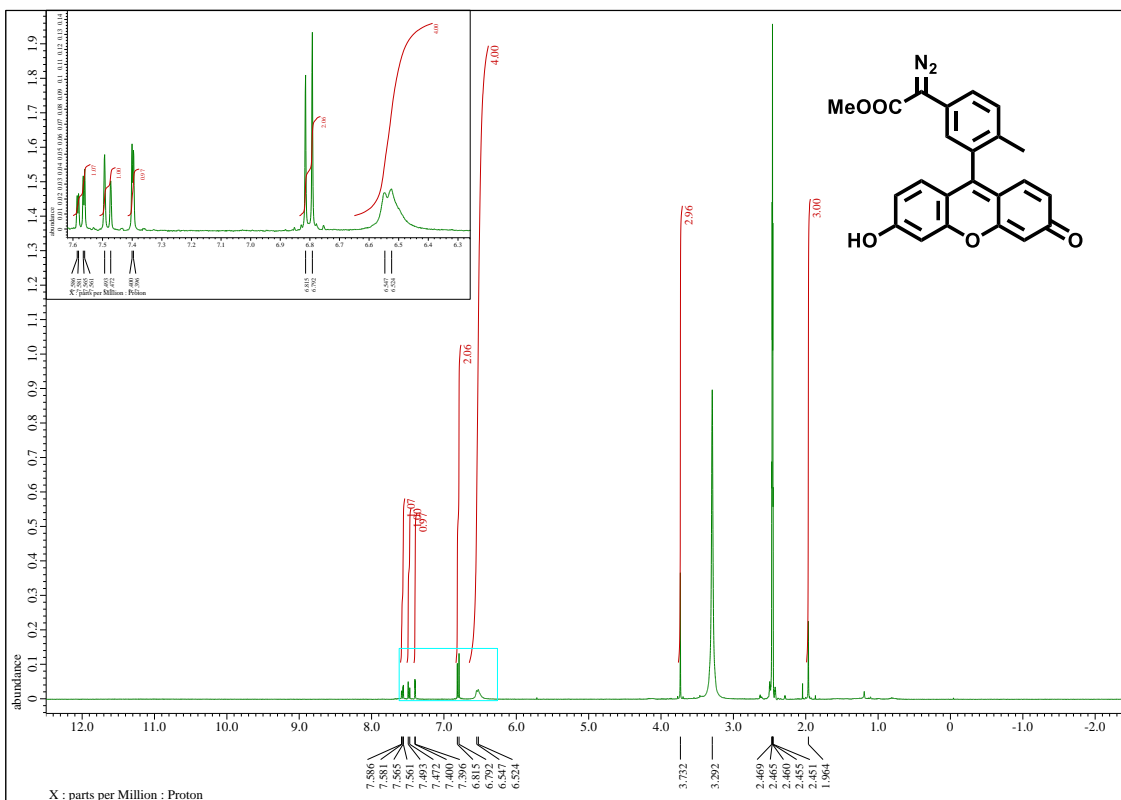
5A2Me-SiFluo



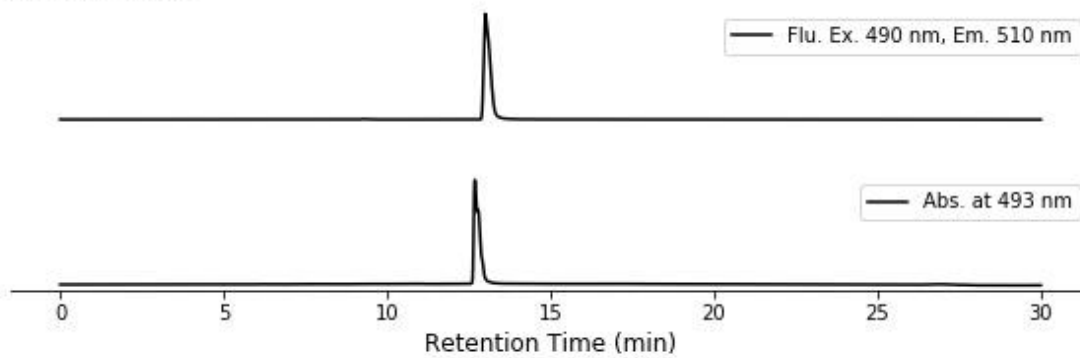
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- D_6) δ 7.24-7.31 (m, 2H), 6.97-7.00 (m, 3H), 6.71 (d, $J = 9.6$ Hz, 2H), 6.40-6.40 (m, 2H), 3.68 (s, 2H), 3.57 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 0.42 (s, 3H), 0.41 (s, 3H). tino200127-2116_Proton-1-1.jdf

5A2Me-SiFluo (tino200106-2037), HRMS (ESI $^+$) [M+H]

Found Mass: 417.15226, Calc. Mass: 417.15221, Mass Difference (mDa): 0.05



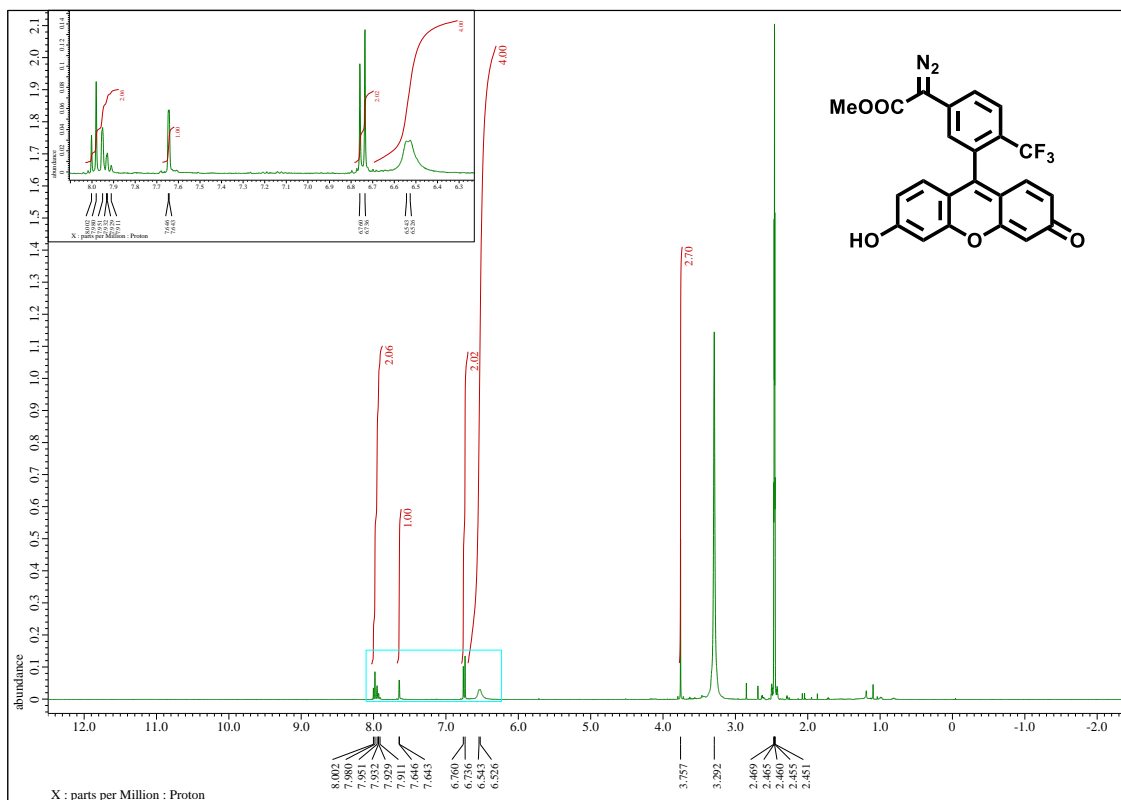
5DA2Me-Fluo



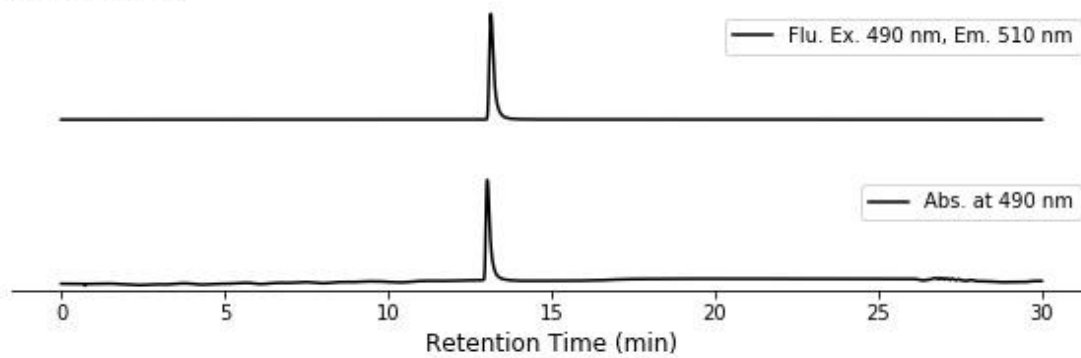
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- D_6) δ 7.57 (dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 6.80 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 6.52-6.55 (m, 4H), 3.73 (s, 3H), 1.96 (s, 3H). tino200213-1223_Proton-1-1.jdf

5DA2Me-Fluo (tino180119-1439), HRMS (ESI $^+$) [M+H]

Found Mass: 401.11468, Calc. Mass: 401.11375, Mass Difference (mDa): 0.93



5DA2CF3-Fluo

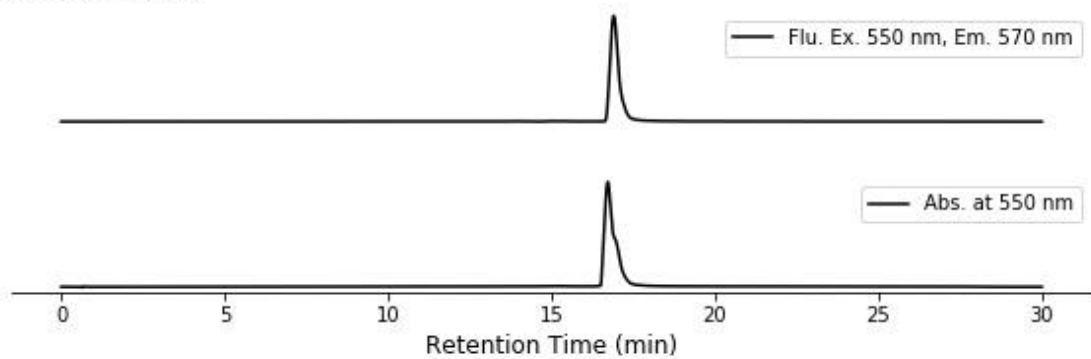


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- D_6) δ 7.91-8.00 (m, 2H), 7.64 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 6.75 (d, $J = 9.6$ Hz, 2H), 6.53-6.54 (m, 4H), 3.76 (s, 3H). tino200213-1437_Proton-1-1.jdf

5DA2CF3-Fluo (tino200106-2044), HRMS (ESI $^+$) [M+H]

Found Mass: 455.08495, Calc. Mass: 455.08548, Mass Difference (mDa): -0.53

5DA2Me-TMR



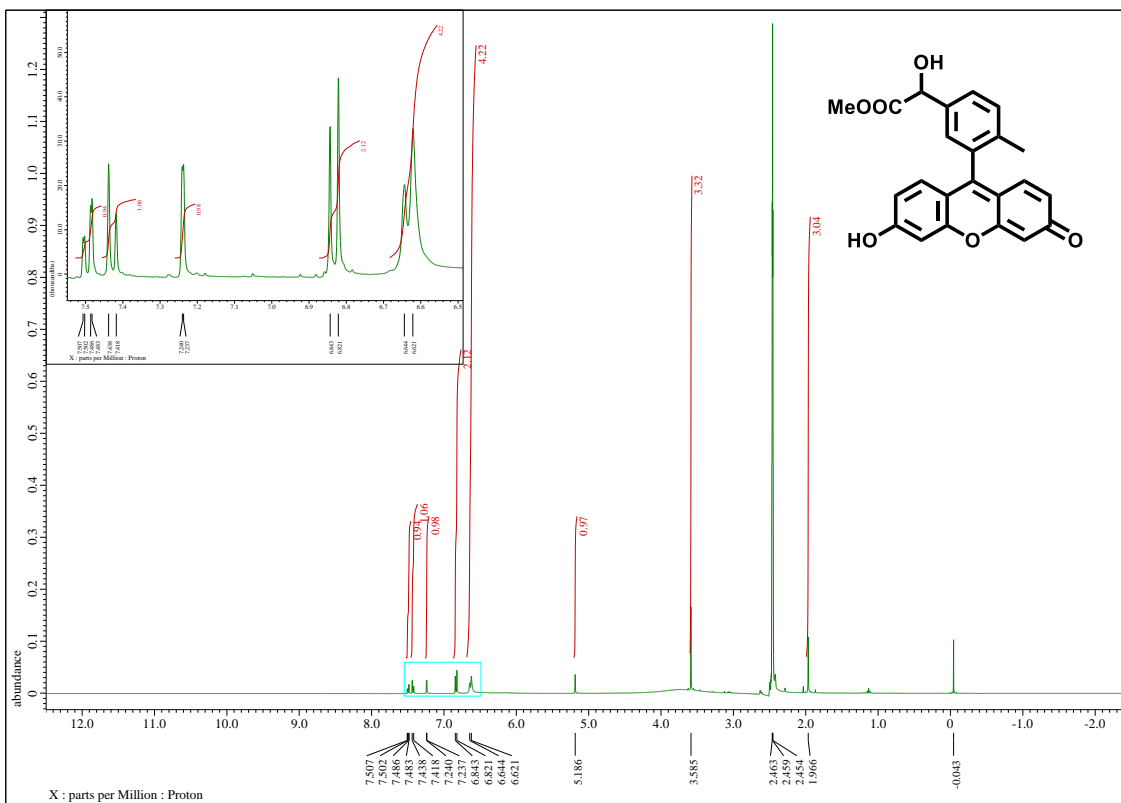
5DA2Me-TMR (tino200106-2048), HRMS (ESI⁺) [M+H]

Found Mass: 455.20760, Calc. Mass: 455.20831, Mass Difference (mDa): -0.71

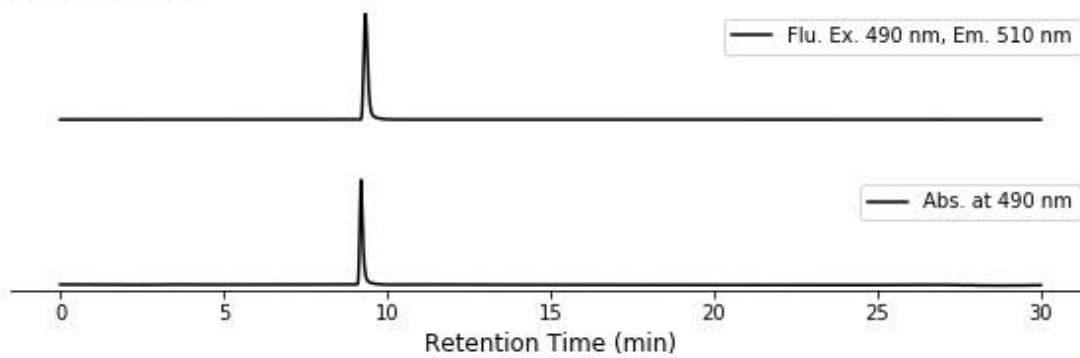
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- D_6) δ 7.46 (dd, $J = 8.0, 2.1$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 6.97 (s, 2H), 6.71 (d, $J = 9.6$ Hz, 2H), 6.40 (s, 2H), 3.73 (s, 3H), 1.93 (s, 3H), 0.43 (s, 3H), 0.41 (s, 3H). tino200224-2231_Proton-1-1.jdf

5DA2Me-SiFluo (tino200106-2052), HRMS (ESI $^+$) [M+H]

Found Mass: 443.14314, Calc. Mass: 443.14271, Mass Difference (mDa): 0.43



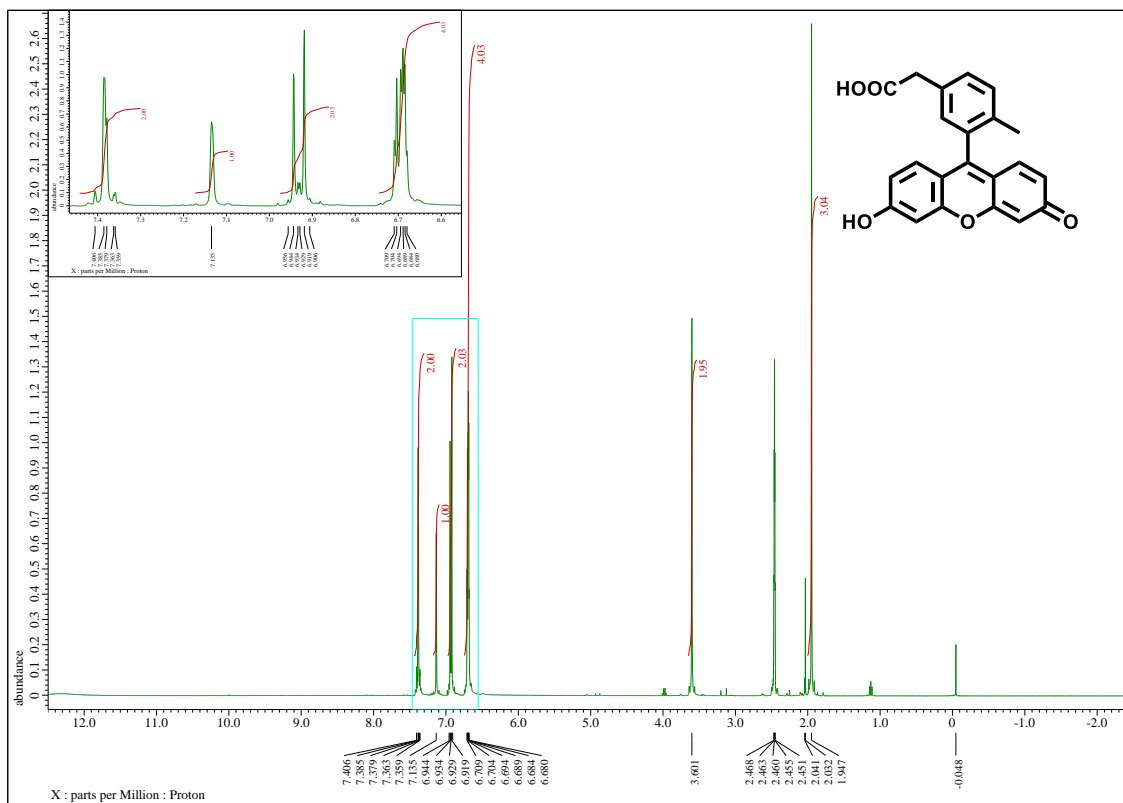
5HA2Me-Fluo



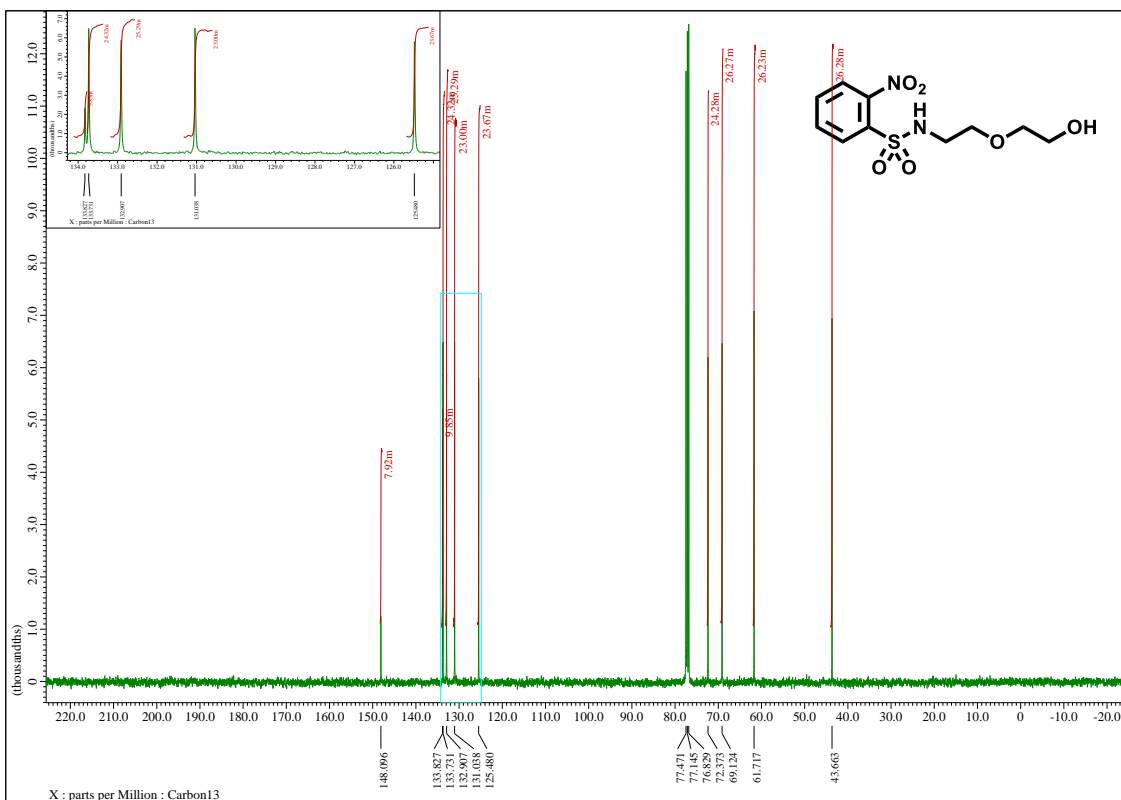
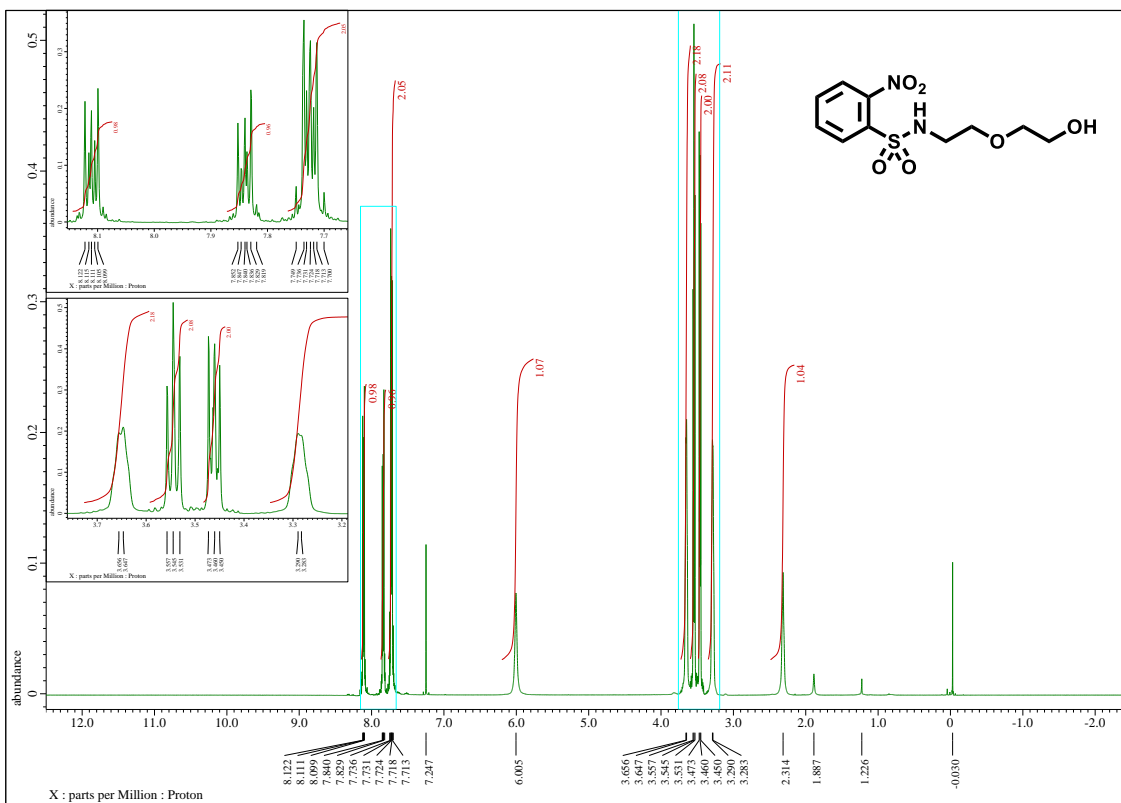
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- D_6) δ 7.49 (dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 6.83 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.63 (d, $J = 9.1$ Hz, 4H), 5.19 (s, 1H), 3.59 (s, 3H), 1.97 (s, 3H). tino200224-2238_Proton-2-1.jdf

5HA2Me-Fluo (tino200106-2058), HRMS (ESI $^+$) [M+H]

Found Mass: 443.14314, Calc. Mass: 443.14271, Mass Difference (mDa): 0.43

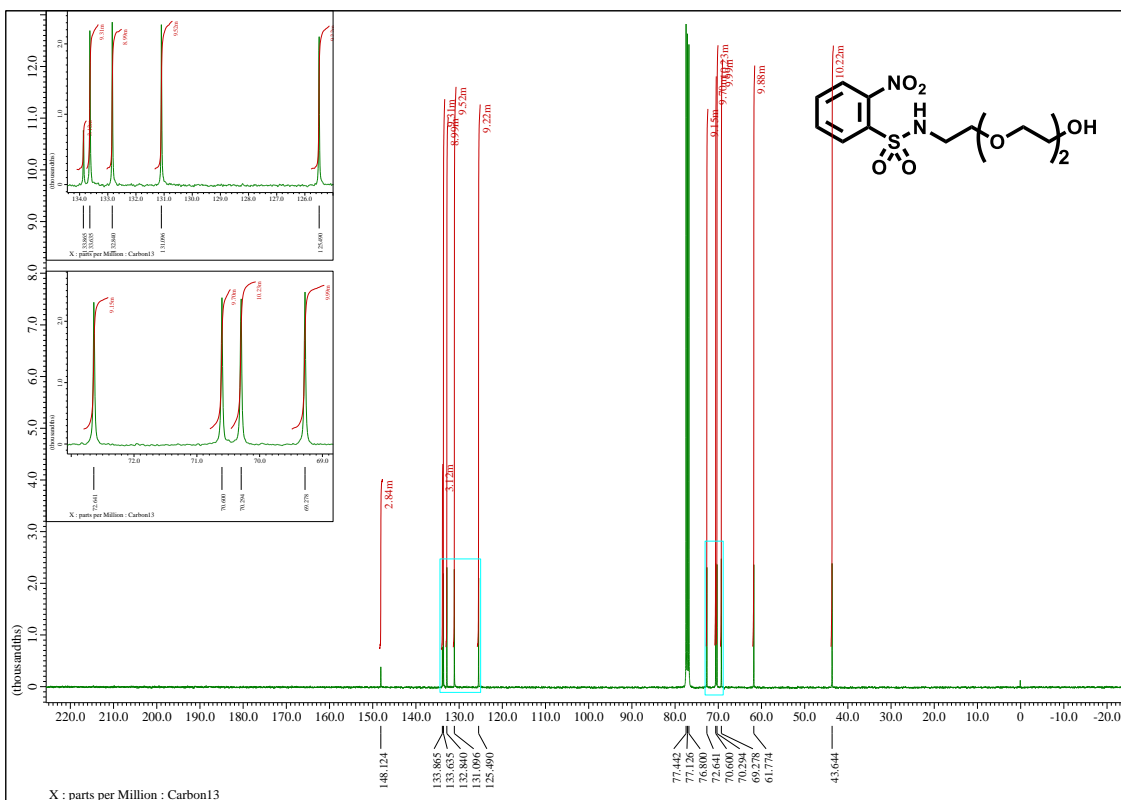
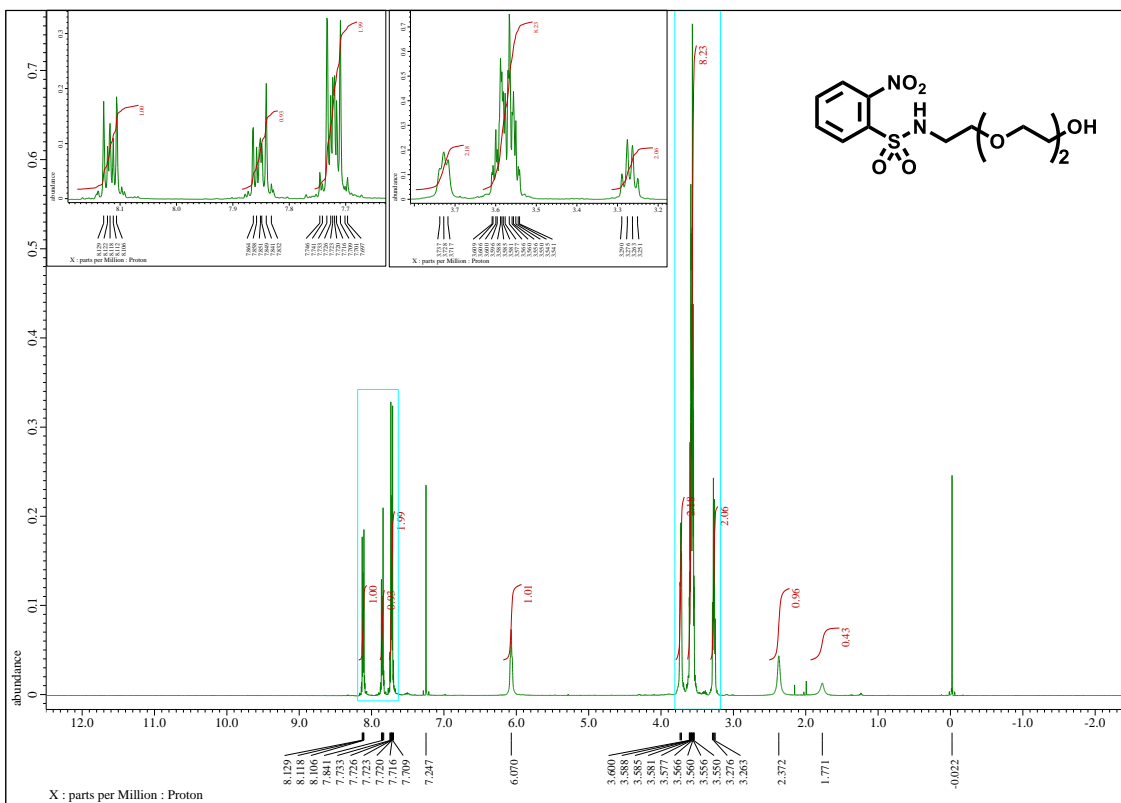


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- D_6) δ 7.36-7.41 (m, 2H), 7.13 (s, 1H), 6.91-6.96 (m, 2H),
6.68-6.71 (m, 4H), 3.60 (s, 2H), 1.95 (s, 3H). tino200224-2209_Proton-1-1.jdf



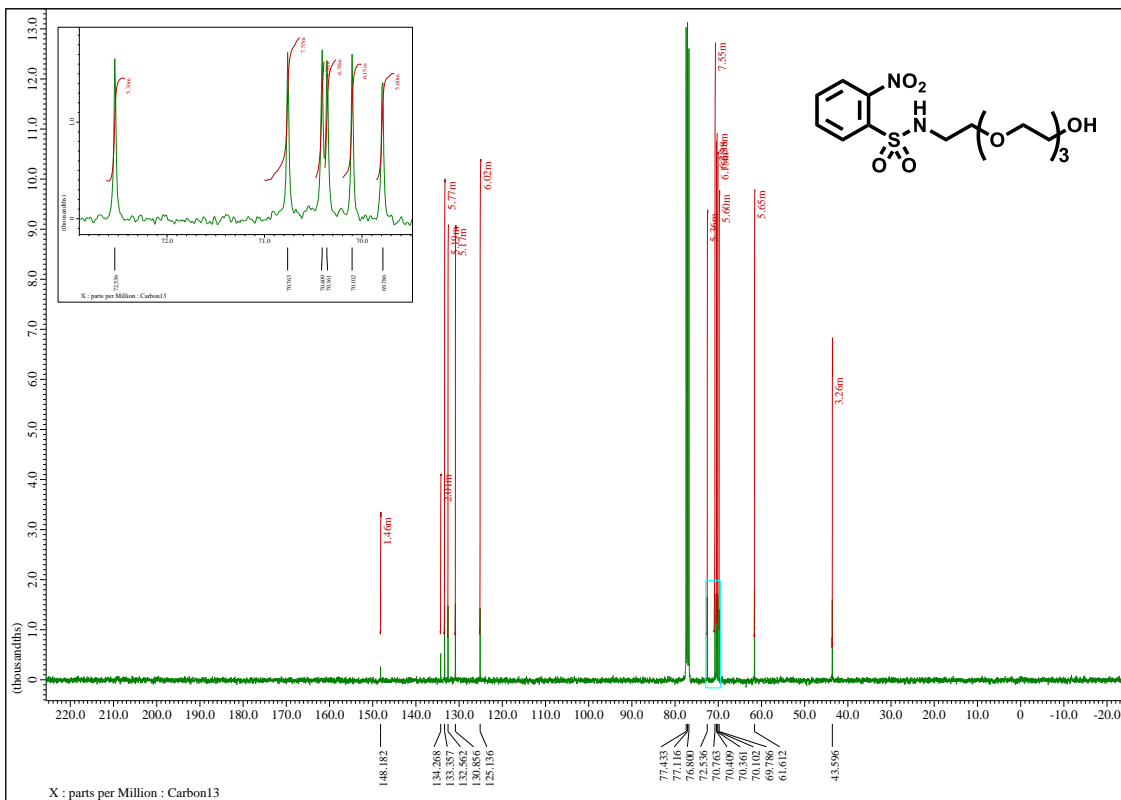
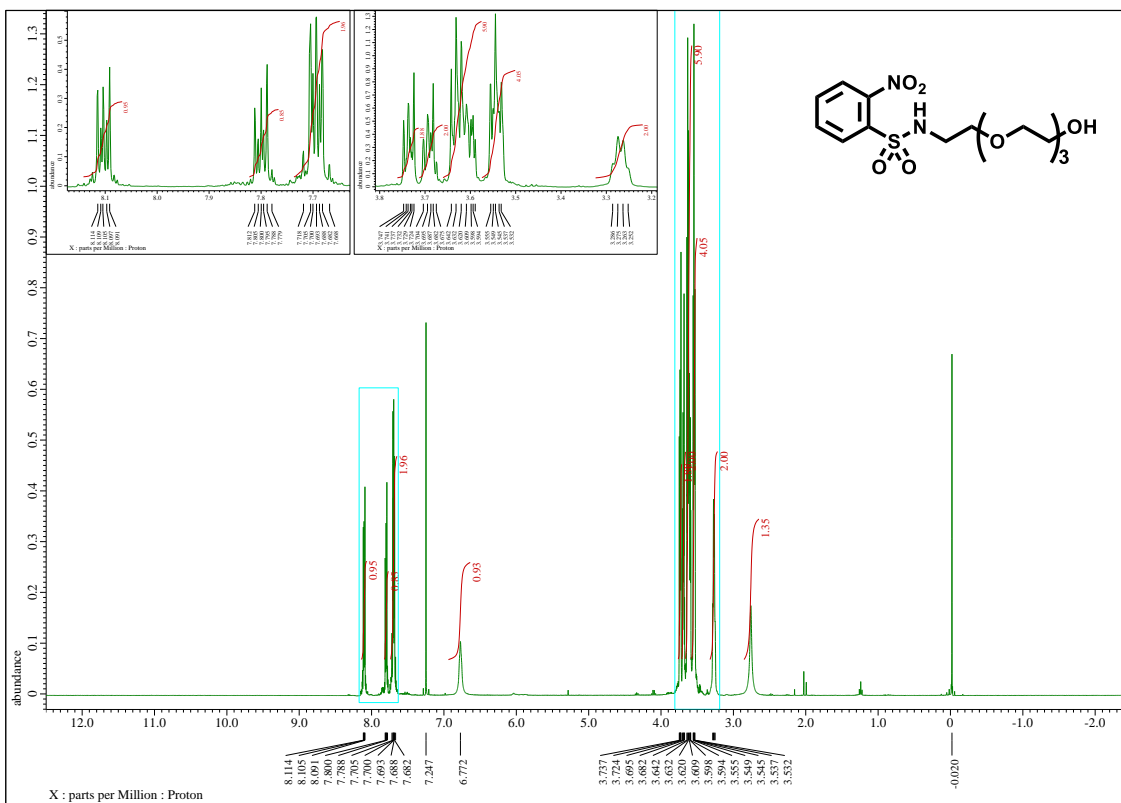
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ 8.10-8.12 (m, 1H), 7.82-7.85 (m, 1H), 7.70-7.75 (m, 2H), 6.00 (s, 1H), 3.65-3.66 (m, 2H), 3.54 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 3.46 (t, J = 4.6 Hz, 2H), 3.28-3.29 (m, 2H), 2.31 (s, 1H). tino20005-2102_Proton-1-1.jdf

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CHLOROFORM-D) δ 148.10, 133.83, 133.73, 132.91, 131.04, 125.48, 72.37, 69.12, 61.72, 43.66. tino20005-2102_Carbon-1-1.jdf



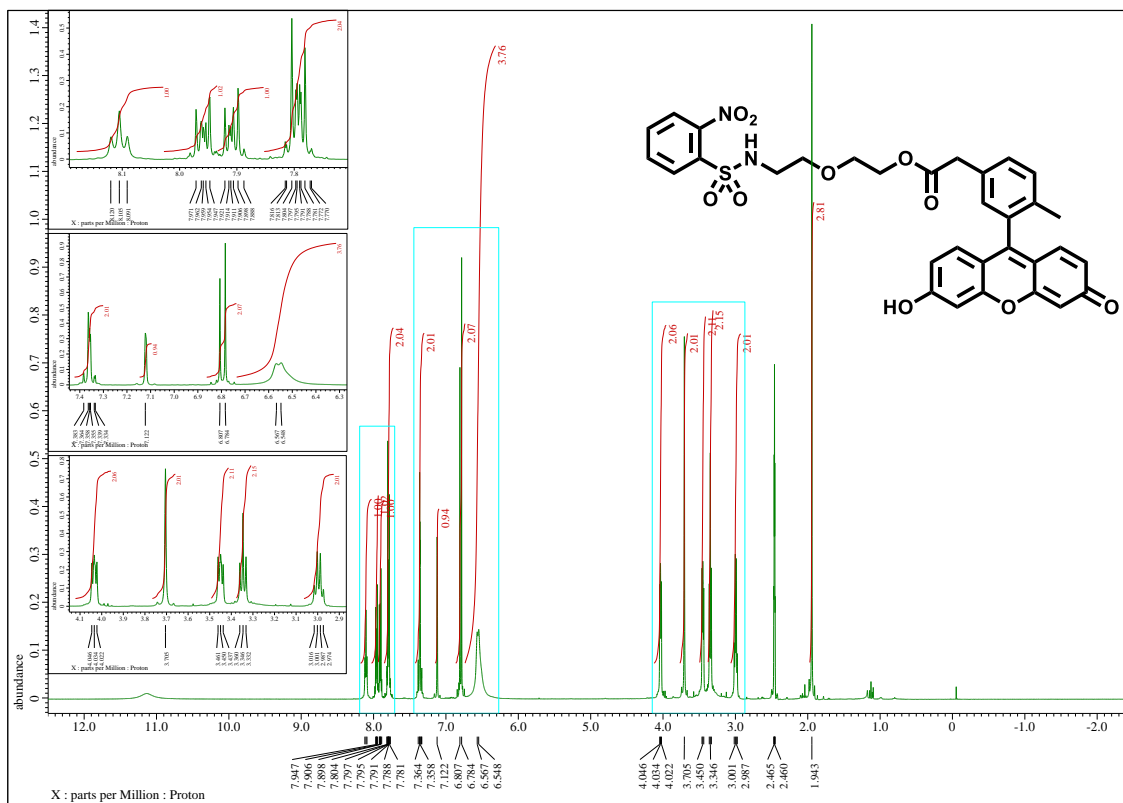
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ 8.11-8.13 (m, 1H), 7.83-7.86 (m, 1H), 7.70-7.75 (m, 2H), 6.07 (s, 1H), 3.72-3.74 (m, 2H), 3.54-3.61 (m, 8H), 3.25-3.29 (m, 2H), 2.37 (s, 1H). tino200208-2121_Proton-1-1.jdf

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CHLOROFORM-D) δ 148.12, 133.87, 133.64, 132.84, 131.10, 125.49, 72.64, 70.60, 70.29, 69.28, 61.77, 43.64. tino200208-2121_Carbon-1-1.jdf

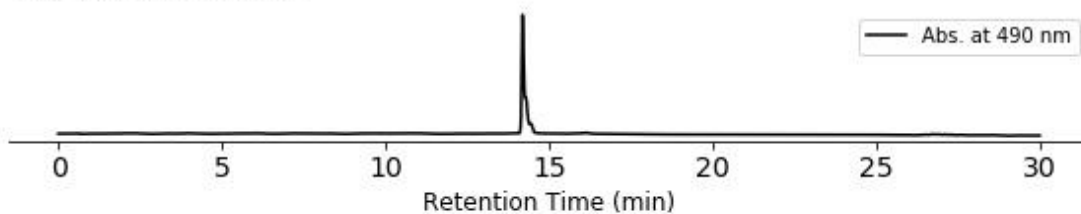


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CHLOROFORM-D) δ 8.09-8.11 (m, 1H), 7.78-7.81 (m, 1H), 7.67-7.72 (m, 2H), 6.77 (s, 1H), 3.72-3.75 (m, 2H), 3.68-3.70 (m, 2H), 3.59-3.64 (m, 6H), 3.53-3.55 (m, 4H), 3.25-3.29 (m, 2H), 2.85-2.65 (1H). tino200209-1316_Proton-1-1.jdf

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CHLOROFORM-D) δ 148.18, 134.27, 133.36, 132.56, 130.86, 125.14, 72.54, 70.76, 70.41, 70.36, 70.10, 69.79, 61.61, 43.60. tino200209-1316_Carbon-1-1.jdf



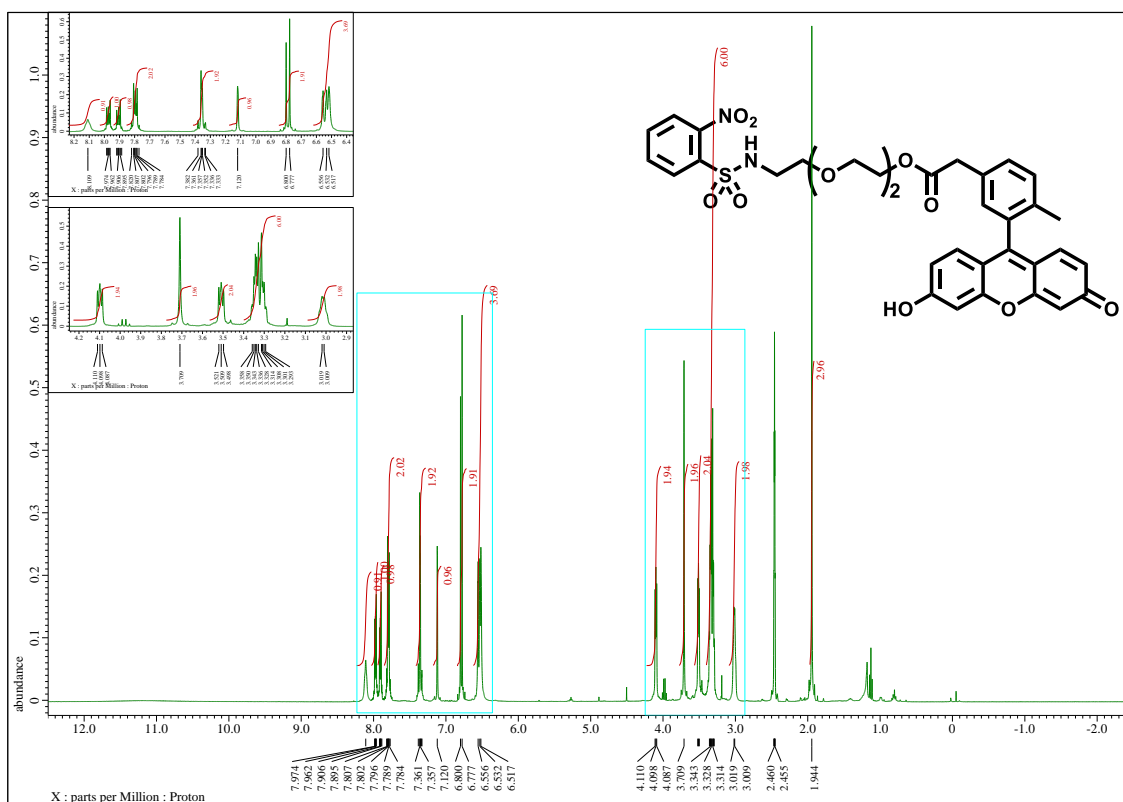
Ns-PEG1-5A2Me-Fluo



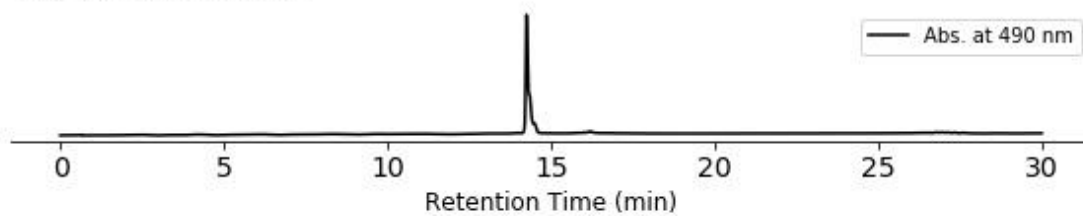
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- D_6) δ 8.11 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.95-7.97 (m, 1H), 7.89-7.92 (m, 1H), 7.77-7.82 (m, 2H), 7.33-7.38 (m, 2H), 7.12 (s, 1H), 6.80 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 6.55-6.57 (m, 4H), 4.03 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.70 (s, 2H), 3.45 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.35 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.99 (q, $J = 5.6$ Hz, 2H), 1.94 (s, 3H). tino200211-1722_Proton-1-1.jdf

Ns-PEG1-5A2Me-Fluo (tino200211-2014), HRMS (ESI $^+$) [M+H]

Found Mass: 633.15386, Calc. Mass: 633.15429, Mass Difference (mDa): -0.43



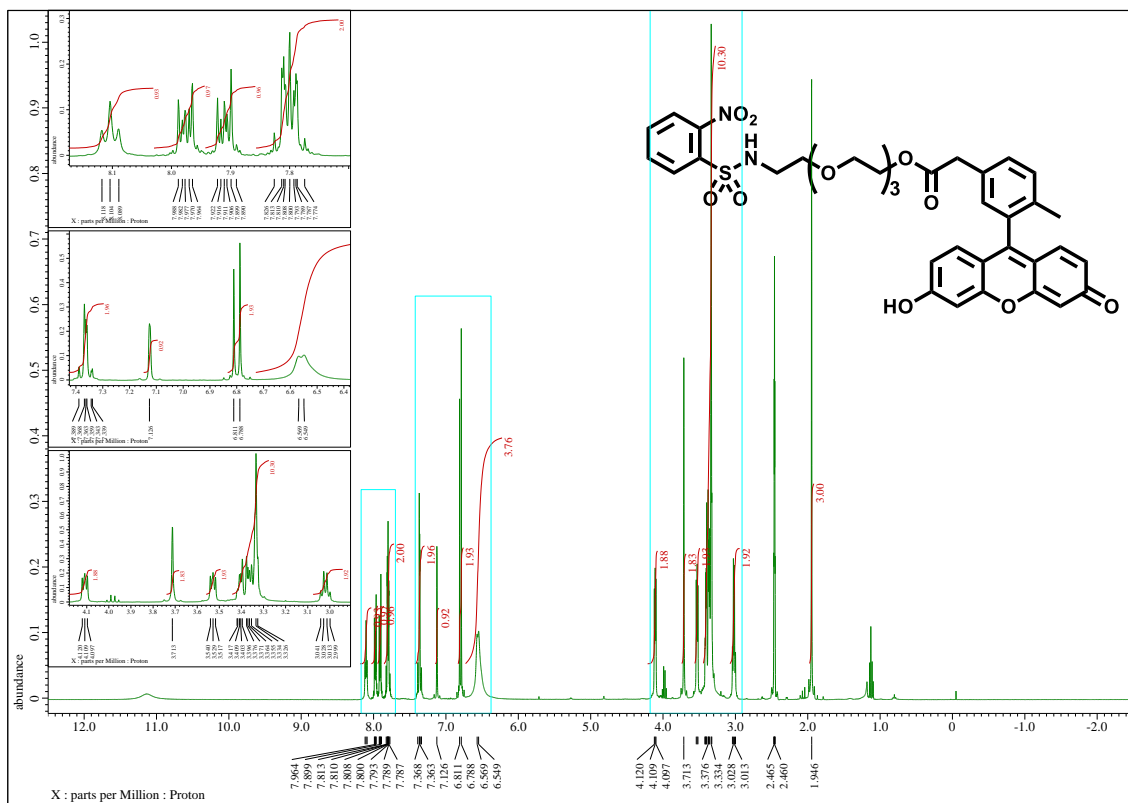
Ns-PEG2-5A2Me-Fluo



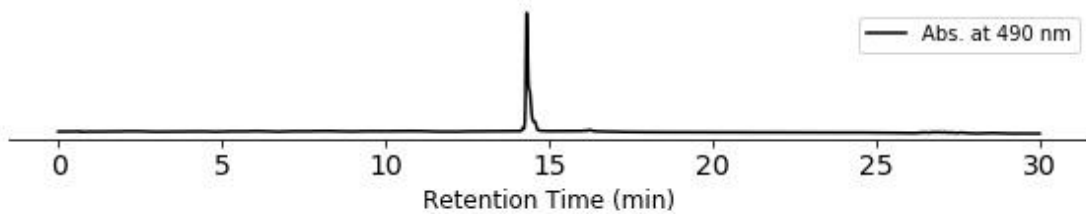
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- D_6) δ 8.11 (s, 1H), 7.96-7.99 (m, 1H), 7.89-7.92 (m, 1H), 7.77-7.82 (m, 2H), 7.33-7.38 (m, 2H), 7.12 (s, 1H), 6.79 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 6.52-6.56 (m, 4H), 4.10 (t, $J = 4.6$ Hz, 2H), 3.71 (s, 2H), 3.51 (t, $J = 4.6$ Hz, 2H), 3.29-3.36 (m, 6H), 3.01-3.02 (m, 2H), 1.94 (s, 3H). tino200210-2223_Proton-1-1.jdf

Ns-PEG2-5A2Me-Fluo (tino200211-2017), HRMS (ESI $^+$) [M+H]

Found Mass: 677.18088, Calc. Mass: 677.18050, Mass Difference (mDa): 0.38



Ns-PEG3-5A2Me-Fluo



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- D_6) δ 8.10 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.96-7.99 (m, 1H), 7.89-7.92 (m, 1H), 7.77-7.83 (m, 2H), 7.34-7.39 (m, 2H), 7.13-7.13 (m, 1H), 6.80 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 6.55-6.57 (m, 4H), 4.11 (t, $J = 4.6$ Hz, 2H), 3.71 (s, 2H), 3.53 (t, $J = 4.6$ Hz, 2H), 3.33-3.42 (m, 10H), 3.02 (q, $J = 5.6$ Hz, 2H), 1.95 (s, 3H). tino200211-1723_Proton-1-1.jdf

Ns-PEG3-5A2Me-Fluo (tino200211-2021), HRMS (ESI $^+$) [M+H]

Found Mass: 721.20658, Calc. Mass: 721.20672, Mass Difference (mDa): -0.14

SA-PEG1-5DA2Me-Fluo (tino200106-2204), HRMS (ESI⁺) [M+H]

Found Mass: 657.16478, Calc. Mass: 657.16552, Mass Difference (mDa): -0.74

SA-PEG2-5DA2Me-Fluo (tino200106-2209), HRMS (ESI⁺) [M+H]

Found Mass: 701.19114, Calc. Mass: 701.19174, Mass Difference (mDa): -0.59

SA-PEG3-5DA2Me-Fluo (tino200106-2226), HRMS (ESI⁺) [M+H]

Found Mass: 745.22083, Calc. Mass: 745.21795, Mass Difference (mDa): 2.88

8-3. Computation Details

Density functional theory (DFT) calculations were performed at the B3LYP^{74, 75, 76, 77} level as implemented in Gaussian 09⁷⁸. The 6-31+G(d) basis set was used for all atoms. The number of imaginary frequencies was 0 for all structures.

8-4. Cartesian Coordinates and Total Electron Energies

8-4-1. Acetate and Diazoacetate

■ 5-A-2-CF₃

HOMO Energy = -0.2596 (hartrees)

LUMO Energy = -0.03385 (hartrees)

E(RB3LYP) = -836.48213494 A.U.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	-0.839830	1.276154	-0.035356
2	6	0	-0.200996	0.254589	-0.752171
3	6	0	-0.869439	-0.961051	-0.939780
4	6	0	-2.153201	-1.153277	-0.431385
5	6	0	-2.780582	-0.126137	0.278167
6	6	0	-2.121482	1.091469	0.476561
7	1	0	-0.327230	2.220096	0.126048
8	1	0	-0.384960	-1.763930	-1.488210
9	1	0	-2.660581	-2.100317	-0.582233
10	1	0	-2.605204	1.888680	1.031360
11	6	0	1.206045	0.459872	-1.288535
12	1	0	1.440238	-0.296025	-2.041610
13	1	0	1.298190	1.450325	-1.742869
14	6	0	2.223087	0.385481	-0.158393
15	8	0	2.554057	1.326948	0.535593
16	8	0	2.682038	-0.866474	0.006572
17	6	0	3.608955	-1.061364	1.095060
18	1	0	3.140586	-0.793954	2.045189
19	1	0	3.860165	-2.121220	1.076901
20	1	0	4.503865	-0.452910	0.945339
21	6	0	-4.185442	-0.306978	0.777454
22	9	0	-4.466939	-1.601419	1.052529
23	9	0	-4.420905	0.403567	1.904961

24 9 0 -5.105337 0.101713 -0.133715

■ 5-A-2-Me

HOMO Energy = -0.2368 (hartrees)

LUMO Energy = -0.01277 (hartrees)

E(RB3LYP) = -538.76203459 A.U.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	-0.836666	1.279886	-0.057881
2	6	0	-0.187467	0.262355	-0.770575
3	6	0	-0.853211	-0.955356	-0.946248
4	6	0	-2.136851	-1.147125	-0.431044
5	6	0	-2.793707	-0.131895	0.276018
6	6	0	-2.117532	1.084236	0.456123
7	1	0	-0.332125	2.230276	0.098553
8	1	0	-0.366601	-1.761267	-1.490413
9	1	0	-2.634879	-2.102207	-0.582066
10	1	0	-2.601022	1.889030	1.005532
11	6	0	1.219495	0.473521	-1.308857
12	1	0	1.454519	-0.281494	-2.063582
13	1	0	1.312413	1.464070	-1.763167
14	6	0	2.239768	0.397399	-0.184287
15	8	0	2.621213	1.346807	0.473065
16	8	0	2.642205	-0.868489	0.029828
17	6	0	3.561699	-1.062341	1.123485
18	1	0	3.108042	-0.740407	2.063981
19	1	0	3.767662	-2.131999	1.145166
20	1	0	4.482099	-0.499093	0.952062
21	6	0	-4.194831	-0.328199	0.807069
22	1	0	-4.942170	0.091101	0.120298
23	1	0	-4.428854	-1.389973	0.934791
24	1	0	-4.330603	0.170537	1.772898

■ 5-DA-2-CF₃

HOMO Energy = -0.22626 (hartrees)

LUMO Energy = -0.07703 (hartrees)

E(RB3LYP) = -944.72738254 A.U.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	-1.032023	-1.125608	-0.034437
2	6	0	-0.503613	0.178709	0.013220
3	6	0	-1.402732	1.263731	0.040239
4	6	0	-2.776004	1.054729	0.023325
5	6	0	-3.289092	-0.244942	-0.023400
6	6	0	-2.408569	-1.328956	-0.051436
7	1	0	-0.360676	-1.972497	-0.060595
8	1	0	-1.035499	2.284559	0.071654
9	1	0	-3.447271	1.906846	0.039628
10	1	0	-2.795504	-2.341886	-0.093332
11	6	0	0.951934	0.411417	0.031309
12	6	0	2.016052	-0.605164	0.000668
13	8	0	1.831088	-1.809709	-0.046086
14	8	0	3.239130	-0.036169	0.031304
15	6	0	4.357455	-0.945445	0.006518
16	1	0	5.242572	-0.311525	0.040535
17	1	0	4.327828	-1.609232	0.873534
18	1	0	4.345961	-1.538487	-0.910776
19	7	0	1.729670	2.738095	0.123500
20	7	0	1.376853	1.659913	0.080894
21	6	0	-4.770537	-0.474532	0.017764
22	9	0	-5.460952	0.540465	-0.552689
23	9	0	-5.234789	-0.586493	1.289550
24	9	0	-5.128576	-1.612911	-0.620986

■ 5-DA-2-Me

HOMO Energy = -0.2123 (hartrees)

LUMO Energy = -0.0713 (hartrees)

E(RB3LYP) = -647.00701563 A.U.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	-1.030453	-1.113674	-0.161568
2	6	0	-0.496342	0.178042	-0.011780
3	6	0	-1.395622	1.250628	0.139066
4	6	0	-2.770322	1.036304	0.139831
5	6	0	-3.310513	-0.249953	-0.001854
6	6	0	-2.410941	-1.311831	-0.153546
7	1	0	-0.364099	-1.957342	-0.281522
8	1	0	-1.026338	2.265429	0.257853
9	1	0	-3.435732	1.888666	0.256241
10	1	0	-2.793940	-2.322841	-0.273668
11	6	0	0.963246	0.415518	-0.027332
12	6	0	2.024538	-0.598919	0.037788
13	8	0	1.838771	-1.802343	0.116189
14	8	0	3.252174	-0.034069	0.001120
15	6	0	4.365241	-0.946136	0.064206
16	1	0	5.254095	-0.318100	0.015667
17	1	0	4.345840	-1.509049	1.000395
18	1	0	4.339875	-1.639064	-0.780034
19	7	0	1.734161	2.743208	-0.143284
20	7	0	1.386890	1.661451	-0.089945
21	6	0	-4.803534	-0.479251	0.032371
22	1	0	-5.175255	-0.519730	1.064904
23	1	0	-5.344019	0.328550	-0.473045
24	1	0	-5.072650	-1.424798	-0.449176

8-4-2. d-PeT

■ 2-COOMe-4,5-diChloro

LUMO Energy = -0.06349 (hartrees)

E(RB3LYP) = -1379.32027734 A.U.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.272140	0.697491	0.000005
2	6	0	1.044538	-0.468778	-0.000003
3	6	0	0.415916	-1.719749	-0.000032
4	6	0	-0.970975	-1.806213	-0.000054
5	6	0	-1.744173	-0.642119	-0.000048
6	6	0	-1.118441	0.612871	-0.000018
7	1	0	0.748084	1.670017	0.000027
8	1	0	1.021627	-2.618791	-0.000039
9	1	0	-1.464598	-2.771588	-0.000077
10	6	0	2.536582	-0.425907	0.000017
11	8	0	3.015320	0.829240	0.000072
12	8	0	3.243575	-1.418294	0.000021
13	6	0	4.451281	0.957740	0.000112
14	1	0	4.645782	2.029412	0.000151
15	1	0	4.873590	0.490159	0.892514
16	1	0	4.873635	0.490216	-0.892299
17	17	0	-3.485232	-0.790253	-0.000077
18	17	0	-2.049049	2.095846	-0.000010

■ 2-COOMe-Naphtho

LUMO Energy = -0.061 (hartrees)

E(RB3LYP) = -613.7798109 A.U.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	-0.459163	1.715047	0.000003
2	6	0	0.902393	1.893322	0.000005
3	6	0	1.786256	0.777750	0.000002
4	6	0	1.229763	-0.544356	-0.000003
5	6	0	-0.179906	-0.698667	-0.000004
6	6	0	-1.014336	0.404952	-0.000002
7	1	0	3.619749	1.929416	0.000007
8	1	0	-1.134282	2.563899	0.000005
9	1	0	1.323748	2.895309	0.000008
10	6	0	3.198733	0.927208	0.000003
11	6	0	2.107606	-1.663775	-0.000006
12	1	0	-0.600144	-1.698983	-0.000008
13	6	0	3.472910	-1.484862	-0.000004
14	6	0	4.022425	-0.177739	0.000000
15	1	0	1.680990	-2.663629	-0.000010
16	1	0	4.135680	-2.345464	-0.000007
17	1	0	5.101393	-0.050896	0.000001
18	6	0	-2.497561	0.278882	-0.000004
19	8	0	-3.265776	1.227274	0.000000
20	8	0	-2.914369	-1.002721	0.000002
21	6	0	-4.340219	-1.200403	0.000005
22	1	0	-4.483813	-2.280471	0.000011
23	1	0	-4.787784	-0.754871	0.891787
24	1	0	-4.787787	-0.754879	-0.891779

■ 2-COOMe

LUMO Energy = -0.04908 (hartrees)

E(RB3LYP) = -460.13466436 A.U.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z

1	6	0	0.750573	-1.180711	-0.000035
2	6	0	0.229981	0.122203	0.000002
3	6	0	1.102957	1.219963	0.000022
4	6	0	2.481321	1.018496	0.000005
5	6	0	2.996854	-0.281234	-0.000032
6	6	0	2.130773	-1.378387	-0.000052
7	1	0	0.076301	-2.029630	-0.000050
8	1	0	0.686434	2.221810	0.000050
9	1	0	3.153291	1.871848	0.000021
10	6	0	-1.235187	0.392943	0.000021
11	8	0	-1.971924	-0.735417	0.000011
12	8	0	-1.729242	1.508598	0.000033
13	6	0	-3.400171	-0.554559	0.000018
14	1	0	-3.820514	-1.559783	0.000009
15	1	0	-3.715760	-0.007589	0.891776
16	1	0	-3.715767	-0.007571	-0.891727
17	1	0	2.530889	-2.388156	-0.000081
18	1	0	4.071846	-0.438658	-0.000045

■ 2,4,5-triCOOMe

LUMO Energy = -0.07718 (hartrees)

E(RB3LYP) = -915.88631278 A.U.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	-1.095815	0.518921	0.066507
2	6	0	-1.975939	-0.561725	-0.051514
3	6	0	-1.465219	-1.852841	-0.228419
4	6	0	-0.090117	-2.059125	-0.265006
5	6	0	0.796250	-0.984767	-0.127552
6	6	0	0.286008	0.321581	0.012316
7	1	0	-1.479270	1.525022	0.184230

8	1	0	-2.153218	-2.685207	-0.327042
9	1	0	0.311116	-3.060148	-0.381913
10	6	0	2.258044	-1.317956	-0.082428
11	8	0	2.888798	-0.665299	0.905336
12	6	0	4.305053	-0.916788	1.024093
13	1	0	4.820474	-0.605546	0.112570
14	1	0	4.634195	-0.320313	1.873782
15	1	0	4.486959	-1.978342	1.205072
16	8	0	2.786879	-2.136515	-0.809936
17	6	0	1.139057	1.553043	0.046821
18	8	0	0.886322	2.533306	0.721660
19	8	0	2.169074	1.475846	-0.810539
20	6	0	3.051030	2.617591	-0.841840
21	1	0	2.497962	3.514057	-1.130399
22	1	0	3.508948	2.768316	0.138415
23	1	0	3.808551	2.377363	-1.586538
24	6	0	-3.459390	-0.388819	-0.004411
25	8	0	-3.821584	0.892698	0.169295
26	8	0	-4.253321	-1.306871	-0.110460
27	6	0	-5.239750	1.146441	0.226880
28	1	0	-5.335750	2.221916	0.369909
29	1	0	-5.717889	0.838174	-0.705702
30	1	0	-5.687752	0.605557	1.063586

■ 2,5-diCOOMe

LUMO Energy = -0.07476 (hartrees)

E(RB3LYP) = -688.01595365 A.U.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	-0.841437	-1.119466	0.000147
2	6	0	-1.388089	0.172374	0.000097
3	6	0	-0.539109	1.287791	0.000052

4	6	0	0.841424	1.119483	0.000058
5	6	0	1.388078	-0.172357	0.000110
6	6	0	0.539096	-1.287773	0.000153
7	1	0	-1.496004	-1.983144	0.000182
8	1	0	-0.975107	2.280808	0.000015
9	1	0	1.495989	1.983162	0.000026
10	6	0	2.862033	-0.413581	0.000129
11	8	0	3.571280	0.728830	-0.000073
12	6	0	5.004752	0.581388	-0.000235
13	1	0	5.331102	0.041601	-0.892266
14	1	0	5.400590	1.596244	-0.000386
15	1	0	5.331320	0.041782	0.891826
16	8	0	3.372966	-1.520399	0.000045
17	6	0	-2.862037	0.413594	0.000097
18	8	0	-3.571264	-0.728826	-0.000041
19	8	0	-3.372973	1.520408	-0.000080
20	6	0	-5.004738	-0.581403	-0.000233
21	1	0	-5.400562	-1.596265	-0.000323
22	1	0	-5.331328	-0.041742	0.891786
23	1	0	-5.331084	-0.041682	-0.892305
24	1	0	0.975093	-2.280790	0.000194

■ 4-NO₂-2-COOMe

LUMO Energy = -0.10006 (hartrees)

E(RB3LYP) = -664.63775299 A.U.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	-0.660655	0.578950	0.000017
2	6	0	0.735075	0.593531	0.000587
3	6	0	1.430438	1.811967	0.000092
4	6	0	0.723679	3.016969	-0.000977
5	6	0	-0.666014	2.975774	-0.001535

6	6	0	-1.376252	1.774078	-0.001055
7	1	0	-1.193093	-0.366256	0.000409
8	1	0	1.288321	-0.338311	0.001422
9	1	0	1.252056	3.961125	-0.001366
10	1	0	-2.458813	1.785855	-0.001515
11	6	0	2.923338	1.885762	0.000679
12	8	0	3.550823	2.929901	0.000276
13	8	0	3.494289	0.671340	0.001666
14	6	0	4.936267	0.650278	0.002291
15	1	0	5.321810	1.148652	0.894578
16	1	0	5.210193	-0.403821	0.003031
17	1	0	5.322566	1.147596	-0.890258
18	7	0	-1.410279	4.240890	-0.002685
19	8	0	-2.641525	4.188009	-0.003197
20	8	0	-0.767787	5.292389	-0.003151

■ 5-NO₂-2-COOMe

LUMO Energy = -0.10688 (hartrees)

E(RB3LYP) = -664.63698102 A.U.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	-0.655804	0.568822	0.000156
2	6	0	0.735328	0.587436	0.000624
3	6	0	1.422342	1.810070	0.000146
4	6	0	0.709937	3.017368	-0.000814
5	6	0	-0.680040	3.012996	-0.001295
6	6	0	-1.339678	1.783996	-0.000792
7	1	0	-1.206131	-0.363219	0.000520
8	1	0	1.287439	-0.344452	0.001369
9	1	0	1.256885	3.953229	-0.001173
10	6	0	2.917298	1.881588	0.000654
11	8	0	3.545652	2.924992	0.000298

12	8	0	3.487288	0.666974	0.001602
13	6	0	4.929302	0.644578	0.002209
14	1	0	5.315067	1.142751	0.894528
15	1	0	5.202238	-0.409763	0.002927
16	1	0	5.315802	1.141727	-0.890363
17	7	0	-2.809003	1.769092	-0.001262
18	8	0	-3.399088	2.850705	-0.002132
19	8	0	-3.377397	0.675934	-0.000712
20	1	0	-1.247922	3.934421	-0.002038

8-4-3. a-PeT

■ 2-Me-4-NMe₂

HOMO Energy = -0.18789 (hartrees)

E(RB3LYP) = -405.53737943 A.U.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	1.465251	-1.218225	-0.002743
2	6	0	0.913828	-0.773224	-1.207493
3	6	0	0.226649	0.460378	-1.308876
4	6	0	0.090473	1.227900	-0.128440
5	6	0	0.638592	0.779390	1.071766
6	6	0	1.324690	-0.432466	1.149794
7	1	0	0.516064	1.389310	1.964000
8	1	0	1.023131	-1.404731	-2.082012
9	1	0	-0.445352	2.169352	-0.140535
10	7	0	-0.284530	0.903694	-2.524445
11	6	0	-0.351500	-0.022269	-3.646101
12	1	0	-0.766172	0.497765	-4.511331
13	1	0	0.647725	-0.377201	-3.922329

14	1	0	-0.979587	-0.903410	-3.438226
15	6	0	-1.201179	2.035072	-2.533916
16	1	0	-0.720368	2.932934	-2.129779
17	1	0	-1.487526	2.251876	-3.564506
18	1	0	-2.117884	1.849170	-1.951540
19	6	0	2.222070	-2.527300	0.047504
20	1	0	1.957644	-3.178347	-0.792122
21	1	0	3.306797	-2.360857	0.003462
22	1	0	2.019749	-3.070458	0.977459
23	1	0	1.740912	-0.770362	2.095561

■ 2-Me-4-OMe

HOMO Energy = -0.21846 (hartrees)

E(RB3LYP) = -386.093698 A.U.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.760375	1.183341	-0.000015
2	6	0	-0.481816	1.830103	-0.000002
3	6	0	-1.671128	1.107900	0.000011
4	6	0	-1.644664	-0.298642	0.000007
5	6	0	-0.408733	-0.944046	-0.000002
6	6	0	0.792096	-0.214955	-0.000014
7	1	0	1.672750	1.768226	-0.000027
8	1	0	-0.350764	-2.029317	-0.000003
9	1	0	-0.509287	2.916846	0.000004
10	1	0	-2.625026	1.629584	0.000025
11	8	0	1.934541	-0.966109	-0.000008
12	6	0	3.185993	-0.285551	0.000016
13	1	0	3.302969	0.338698	0.894312
14	1	0	3.950098	-1.064473	0.000043
15	1	0	3.303004	0.338681	-0.894287
16	6	0	-2.931631	-1.091955	0.000001

17	1	0	-2.738783	-2.169011	0.000219
18	1	0	-3.542225	-0.858603	0.880979
19	1	0	-3.542017	-0.858929	-0.881210

■ **2-Me-5-NMe₂**

HOMO Energy = -0.18536 (hartrees)

E(RB3LYP) = -405.53676428 A.U.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	1.468438	-1.192110	0.002622
2	6	0	0.075613	-1.204525	-0.043266
3	6	0	-0.664434	-0.000068	-0.083132
4	6	0	0.075872	1.204454	-0.043783
5	6	0	1.468513	1.191957	0.002105
6	6	0	2.203577	-0.000207	0.020405
7	1	0	1.994874	-2.144429	0.033273
8	1	0	1.994967	2.144302	0.032363
9	1	0	-0.433178	-2.161271	-0.041947
10	1	0	-0.432856	2.161245	-0.042945
11	6	0	3.714938	0.000048	0.040935
12	1	0	4.136634	0.024286	-0.973710
13	1	0	4.108885	0.873977	0.571954
14	1	0	4.108995	-0.897514	0.530539
15	7	0	-2.055236	0.000119	-0.168976
16	6	0	-2.773850	-1.242369	0.075587
17	1	0	-3.843640	-1.063898	-0.047497
18	1	0	-2.483078	-2.011326	-0.648593
19	1	0	-2.604136	-1.646135	1.087068
20	6	0	-2.773723	1.242522	0.076502
21	1	0	-2.483292	2.011870	-0.647383
22	1	0	-3.843556	1.064104	-0.046275
23	1	0	-2.603634	1.645733	1.088138

■ 2-Me

HOMO Energy = -0.24005 (hartrees)

E(RB3LYP) = -271.56925109 A.U.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.194817	-1.203169	-0.008841
2	6	0	0.915154	0.000283	-0.011100
3	6	0	0.194480	1.203341	-0.008846
4	6	0	-1.202263	1.206160	0.002153
5	6	0	-1.906701	-0.000188	0.008358
6	6	0	-1.201770	-1.206421	0.002151
7	1	0	0.734908	-2.147529	-0.017786
8	1	0	0.734239	2.147877	-0.017769
9	1	0	-1.739723	2.151064	0.001536
10	1	0	-2.993410	-0.000421	0.013738
11	1	0	-1.738995	-2.151461	0.001524
12	6	0	2.426949	0.000143	0.008784
13	1	0	2.810205	-0.016172	1.038024
14	1	0	2.834533	-0.879204	-0.501398
15	1	0	2.834245	0.894945	-0.473817

■ 2-OMe-5-Me

HOMO Energy = -0.21404 (hartrees)

E(RB3LYP) = -386.09302596 A.U.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.098950	1.381997	0.000014

2	6	0	-1.276720	1.186942	0.000030
3	6	0	-1.835937	-0.103353	0.000029
4	6	0	-0.954216	-1.186755	0.000053
5	6	0	0.435634	-1.013231	0.000041
6	6	0	0.968751	0.279391	0.000006
7	1	0	0.523339	2.381897	0.000026
8	1	0	1.079589	-1.885189	0.000076
9	1	0	-1.932739	2.054930	0.000051
10	8	0	2.304529	0.574356	-0.000002
11	6	0	3.229937	-0.508213	-0.000052
12	1	0	3.116264	-1.133480	-0.894249
13	1	0	4.222127	-0.054097	-0.000182
14	1	0	3.116452	-1.133394	0.894230
15	6	0	-3.334731	-0.300048	-0.000069
16	1	0	-3.801266	0.157205	-0.881821
17	1	0	-3.596308	-1.362977	0.000957
18	1	0	-3.801630	0.159042	0.880524
19	1	0	-1.352077	-2.199167	0.000094

■ 2-OMe-6-Me

HOMO Energy = -0.21846 (hartrees)

E(RB3LYP) = -386.09361277 A.U.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.105832	1.398742	0.001385
2	6	0	-1.226367	1.183020	0.332946
3	6	0	-1.759638	-0.111610	0.342531
4	6	0	-0.955062	-1.206659	0.015307
5	6	0	0.393297	-0.990313	-0.318066
6	6	0	0.922677	0.304101	-0.326553
7	1	0	0.535347	2.395996	-0.008029
8	1	0	1.015975	-1.842960	-0.567411

9	1	0	-1.857455	2.029972	0.589710
10	8	0	2.219404	0.607448	-0.636161
11	6	0	3.100913	-0.459071	-0.974876
12	1	0	2.759096	-0.993675	-1.869614
13	1	0	4.067182	0.005325	-1.178065
14	1	0	3.206375	-1.170696	-0.146885
15	6	0	-1.515552	-2.611022	0.000518
16	1	0	-2.505849	-2.649425	0.464467
17	1	0	-1.614448	-2.988523	-1.025558
18	1	0	-0.861556	-3.309197	0.535831
19	1	0	-2.802583	-0.267940	0.605464

■ 2-OMe

HOMO Energy = -0.22113 (hartrees)

E(RB3LYP) = -346.77562731 A.U.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.099100	1.386207	0.000003
2	6	0	-1.278932	1.193942	0.000020
3	6	0	-1.816676	-0.099036	0.000047
4	6	0	-0.953637	-1.193725	0.000055
5	6	0	0.434970	-1.017308	0.000039
6	6	0	0.964083	0.279724	0.000013
7	1	0	0.529324	2.383440	-0.000019
8	1	0	1.084006	-1.885332	0.000047
9	1	0	-1.937404	2.058621	0.000012
10	8	0	2.298599	0.572622	-0.000005
11	6	0	3.226295	-0.508963	-0.000048
12	1	0	3.113774	-1.133736	-0.894488
13	1	0	4.217141	-0.052199	-0.000094
14	1	0	3.113858	-1.133736	0.894403
15	1	0	-1.354728	-2.203915	0.000075

16 1 0 -2.892730 -0.246553 0.000061

■ 2,4-diMe

HOMO Energy = -0.23458 (hartrees)

E(RB3LYP) = -310.88713355 A.U.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	-0.007140	-0.939431	-0.162504
2	6	0	1.219887	-0.270787	-0.107353
3	6	0	1.212621	1.124816	0.051710
4	6	0	0.008139	1.817624	0.152009
5	6	0	-1.208646	1.130321	0.094928
6	6	0	-1.231820	-0.259221	-0.064816
7	1	0	-0.013164	-2.021499	-0.284799
8	1	0	2.155626	1.665395	0.097532
9	1	0	0.012930	2.897702	0.276532
10	1	0	-2.144760	1.678172	0.175197
11	6	0	2.525865	-1.025785	-0.211653
12	1	0	3.129939	-0.905542	0.696387
13	1	0	2.358026	-2.096687	-0.362418
14	1	0	3.133289	-0.659264	-1.048369
15	6	0	-2.537305	-1.018397	-0.140083
16	1	0	-2.681606	-1.466971	-1.131335
17	1	0	-2.566566	-1.838490	0.587450
18	1	0	-3.391864	-0.363245	0.055801

■ 2,4-diOMe

HOMO Energy = -0.21441 (hartrees)

E(RB3LYP) = -461.30029659 A.U.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	1.030227	1.658645	-0.000055
2	6	0	-0.293431	2.076128	-0.000040
3	6	0	-1.353665	1.159143	-0.000053
4	6	0	-1.056600	-0.206818	-0.000017
5	6	0	0.277563	-0.650933	0.000035
6	6	0	1.315495	0.280889	-0.000005
7	1	0	1.851806	2.367677	-0.000103
8	1	0	0.460279	-1.718520	0.000308
9	1	0	-0.516941	3.139676	-0.000105
10	8	0	2.640337	-0.048837	0.000359
11	6	0	2.992564	-1.429640	-0.000179
12	1	0	2.613024	-1.938800	-0.894359
13	1	0	4.083172	-1.459735	-0.001009
14	1	0	2.614404	-1.939136	0.894408
15	1	0	-2.376418	1.515481	-0.000179
16	8	0	-1.991763	-1.202825	-0.000207
17	6	0	-3.368135	-0.833376	0.000145
18	1	0	-3.627022	-0.253544	-0.894019
19	1	0	-3.928305	-1.769674	-0.000071
20	1	0	-3.626702	-0.254353	0.894922

■ 2,5-diMe

HOMO Energy = -0.23049 (hartrees)

E(RB3LYP) = -310.88704476 A.U.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	1.029154	0.689610	0.884355
2	6	0	1.226482	-0.289768	-0.098841
3	6	0	0.176307	-0.531838	-0.994784

4	6	0	-1.021562	0.180175	-0.913967
5	6	0	-1.218894	1.159271	0.069230
6	6	0	-0.168545	1.401607	0.965241
7	1	0	1.824781	0.900842	1.595950
8	1	0	0.296944	-1.286694	-1.769201
9	1	0	-1.816868	-0.031122	-1.625888
10	6	0	2.535809	-1.037365	-0.207482
11	1	0	2.388095	-2.048834	-0.600989
12	1	0	3.233105	-0.525862	-0.884721
13	1	0	3.031991	-1.119546	0.765370
14	1	0	-0.289534	2.156604	1.739362
15	6	0	-2.528195	1.906864	0.178321
16	1	0	-3.019469	1.998837	-0.796133
17	1	0	-3.229398	1.389156	0.846727
18	1	0	-2.381754	2.914185	0.582478

■ 2,5-diOMe

HOMO Energy = -0.20126 (hartrees)

E(RB3LYP) = -461.29740502 A.U.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	0.780292	0.085572	0.981760
2	6	0	-0.609032	0.198962	1.030449
3	6	0	-1.368575	0.260798	-0.143244
4	6	0	-0.715350	0.207637	-1.382536
5	6	0	0.673794	0.094295	-1.431231
6	6	0	1.433360	0.032483	-0.257478
7	1	0	1.336658	0.040536	1.910924
8	1	0	1.186196	0.052568	-2.387884
9	1	0	-1.121389	0.240642	1.987112
10	8	0	2.789836	-0.077872	-0.422473
11	6	0	3.600343	-0.145833	0.745423

12	1	0	3.355217	-1.024618	1.355231
13	1	0	4.629549	-0.227998	0.392066
14	1	0	3.498779	0.758094	1.359165
15	1	0	-1.271815	0.252586	-2.311686
16	8	0	-2.725114	0.370768	0.021626
17	6	0	-3.535375	0.439210	-1.146308
18	1	0	-4.564598	0.521435	-0.792975
19	1	0	-3.290247	1.318200	-1.755866
20	1	0	-3.434145	-0.464579	-1.760358

■ 2,6-diMe

HOMO Energy = -0.23458 (hartrees)

E(RB3LYP) = -310.88713355 A.U.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	-0.007140	-0.939431	-0.162504
2	6	0	1.219887	-0.270787	-0.107353
3	6	0	1.212621	1.124816	0.051710
4	6	0	0.008139	1.817624	0.152009
5	6	0	-1.208646	1.130321	0.094928
6	6	0	-1.231820	-0.259221	-0.064816
7	1	0	-0.013164	-2.021499	-0.284799
8	1	0	2.155626	1.665395	0.097532
9	1	0	0.012930	2.897702	0.276532
10	1	0	-2.144760	1.678172	0.175197
11	6	0	2.525865	-1.025785	-0.211653
12	1	0	3.129939	-0.905542	0.696387
13	1	0	2.358026	-2.096687	-0.362418
14	1	0	3.133289	-0.659264	-1.048369
15	6	0	-2.537305	-1.018397	-0.140083
16	1	0	-2.681606	-1.466971	-1.131335
17	1	0	-2.566566	-1.838490	0.587450

18	1	0	-3.391864	-0.363245	0.055801
----	---	---	-----------	-----------	----------

8-5. Photophysical and Electrochemical Properties

■ Absorption and Fluorescence spectra

Absorption spectra were recorded on UV-1850 spectrometer (Shimadzu). Fluorescence spectra were recorded on a F-7100 spectrometer (Hitachi).

■ Absolute Fluorescence Quantum Yields

Absolute fluorescence quantum yields were recorded on a Quantaurus QY C11347 spectrometer (Hamamatsu) at room temperature, which determines photons absorbed and emitted through an integrating sphere. Measurements were carried out using dilute samples ($A \approx 0.1$).

■ Molar Extinction Coefficient

The molar extinction coefficient was measured with $^1\text{H-NMR}$ and UV-1850 spectrometer, in the following procedure. The target molecule or fluorescein (F0095, Tokyo Chemical Industries) were dissolved in 0.1 % *N,N*-dimethylacetamide (v/v, 042-32353, Wako Pure Chemical) in DMSO-d_6 (11561-96, Kanto Chemical Co.), and then $^1\text{H-NMR}$ measurement was performed. The fluorescein solution was diluted 1,000 times with in 0.1 N NaOH aq., and then absorbance measurement was performed. The target molecule solution was diluted 1,000 times with 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 4.0, 7.4 or 11.0), and then absorbance measurement was performed. In order to calculate the concentration of fluorescein (the molar extinction coefficient of fluorescein in 0.1 N NaOH aq. at 490 nm is 93,000), Lambert-Beer law was applied. The concentration ratio between fluorescein and the target molecule was calculated from the peak integration of $^1\text{H-NMR}$, using the methyl group of *N,N*-

dimethylacetamide as a reference. The concentration of the target molecular was calculated from the concentration of fluorescein and the concentration ratio. Lambert-Beer law was applied to calculate the molar extinction coefficient of the target compound.

■ Cyclic Voltammetry

Cyclic voltammetry was performed on a 600A electrochemical analyzer (ALS). A three-electrode arrangement in a single cell was used for the measurements: a Pt wire as the auxiliary electrode, a glassy carbon electrode as the working electrode, and a Ag/Ag⁺ electrode as the reference electrode. The sample solutions contained 1.0×10^{-3} M sample and 0.1 M tetrabutylammonium perchlorate (TBAP) as a supporting electrolyte in acetonitrile, and argon was bubbled for 10 min before each measurement. Obtained potentials (vs Ag/Ag⁺) were converted to those vs SCE by adding 0.248 V.

8-6. Photoreaction Properties

■ General Procedure of UPLC-MS Analysis

Analytical UPLC-MS was equipped with an UV-VIS detector (D13UPL585A, Waters) and a MS detector (KAB0812, Waters) for product visualization on a reversed phase column (ODS, 1.7 μm , 2.1 mm \times 50 mm, Waters). Solvent A: = 10 mM ammonium formate in H_2O , Solvent B: 10 mM ammonium formate and 20 % H_2O (v/v) in CH_3CN . Gradient was from 5 % to 95 % solvent B within 3.5 min. Flow rate was 0.8 mL/min. Injected volume: 10 μL .

■ Photoreaction in H_2O

1 mM 5DA2Me-Fluo DMSO stock solution (0.5 μL) was added to H_2O (100 μL). The solution was non-irradiated for 10 min or irradiated at 493 ± 5 nm (BUNKOUKEIKI, UB-25, intensity: 3 mW/cm²) for 10 min. The samples were analyzed with UPLC-MS.

■ Photoreaction in 2-Methyl-2-Butene and MeOH

250 μM 5DA2Me-Fluo MeOH stock solution (1 μL) was added to 2-methyl-2-butene (99 μL). The solution was non-irradiated for 60 min or irradiated at 493 ± 5 nm (BUNKOUKEIKI, UB-25, intensity: 3 mW/cm²) for 60 min. The non-irradiated and irradiated solution were dried up with centrifugal evaporator (EYELA, CVE-2200), added DMSO (50 μL) and H_2O (50 μL), and analyzed with UPLC-MS.

■ Photoreaction in *N*-Acetyl Amino Acids aq.

100 μM 5DA2Me-Fluo DMSO stock solution (2 μL) was added to H_2O (18 μL) or pH 7.4

1 M *N*-acetyl amino acids aq. (18 μ L) in the 384-well plate. The 384-well plate was non-irradiated for 60 min or irradiated at 480 ± 15 nm (ASAHI SPECTRA, MAX-301, Filter: XF3075 480AF30, intensity: 150 mW/cm²) for 60 min. The non-irradiated and irradiated solution were diluted 2 times with H₂O, and analyzed with UPLC-MS.

■ Photoreaction Quantum Yields

Absorbed photons " I_{abs} " can be defined with incident photons " I_0 " and transmitted photons " I " as:

$$\begin{aligned}
 I_{abs} &= I_0 - I \\
 &= I_0 (1 - I/I_0) && \text{Lambert-Beer law} \\
 &= I_0 (1 - 10^{-\epsilon cl}) && \epsilon cl \ll 1, \text{ Maclaurin series} \\
 &\approx (\ln 10) \epsilon cl I_0 && eq(1)
 \end{aligned}$$

The amount of substance of the target molecule is " q ", and the rate of change " dq/dt " can be defined as:

$$\begin{aligned}
 dq/dt &= -\phi I_{abs} \\
 &= -\phi (\ln 10) \epsilon cl I_0 \\
 &= -\phi (\ln 10) \epsilon cl S (I_0/S) && q = clS \\
 &= -\phi (\ln 10) \epsilon I_s q && eq(2)
 \end{aligned}$$

S : irradiated area, I_s : irradiation intensity per unit area

The constant " $-\phi (\ln 10) \epsilon I_s$ " in $eq(2)$ was defined as " $-\lambda$ ", and $eq(3)$ is obtained. Solving

eq(3) gives eq(4). A scatter plot was created with the vertical axis indicating parameters correlated with the amount of substance (Ex. the peak area of the target molecule in LC-MS analysis), and the horizontal axis is irradiation time (sec). “ λ ” can be calculated by fitting the scatter plot with eq(4).

$$dq/dt = -\lambda q \quad eq(3)$$

$$\int 1/q dq = \int -\lambda dt$$

$$\log(q) = -\lambda t + C$$

$$q = e^{-\lambda t + C} = A \cdot e^{-\lambda t} \quad eq(4)$$

“ λ ”, “ ε ” and “ I_s ” are measurable values. Therefore, photoreaction quantum yield “ ϕ ” can be calculated from eq(5). The time constant “ τ ” ($1/\lambda$) was recorded as an indicator of photoreaction speed.

$$-\lambda = -\phi (\ln 10) \varepsilon I_s$$

$$\phi = \lambda / ((\ln 10) \varepsilon I_s) \quad eq(5)$$

$$\lambda: 1/sec, \quad \varepsilon: m^2/mol, \quad I_s: mol/(m^2 \cdot sec)$$

8-7. Photolabeling of Proteins

■ General Procedure of SDS-PAGE

The samples (15 μL) were mixed with トリス SDS β -ME サンプル処理液 (15 μL , 423437, Cosmo Bio), heated at 95 $^{\circ}\text{C}$ for 3 min. The denatured samples (20 μL) were subjected to SDS-PAGE. Gel: MULTIGEL[®] II mini 10/20 (13W) (415074, Cosmo Bio). Marker: Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers (5 μL , RPN800E, GE Healthcare). Voltage : 500 V. Current : 30 mA/gel. Time: 55 min. Composition of loading buffer: 5L MilliQ, 150 g tris(hydroxymethyl)aminomethane, 720 g Glycine, 50 g sodium dodecyl sulfate. The gel was visualized with in-gel fluorescence imager (VILVER LOURMAT, E-BOX-VX2/20M Excitation light: Hg lamp, Emission filter: F-590 filter 520–656 nm), stained with ページブルー83 染色液(CBB-R250) (423406, Cosmo Bio), destain with 7 % acetic acid (v/v), 5 % MeOH (v/v) in H₂O, visualized with in-gel fluorescence imager.

■ Photolabeling of BSA

10 mM 5DA2Me-Fluo DMSO stock solution (2 μL) was added to 1.11 mM BSA aq. (18 μL), non-irradiated for 60 min or irradiated at 493 ± 5 nm (BUNKOUKEIKI, UB-25, intensity: 3 mW/cm²) for 30 min, diluted 1,000 times with H₂O. The samples were subjected to SDS-PAGE.

■ Photolabeling of CA-II

1 μM purified bovine CA-II (Carbonic Anhydrase Isozyme II from bovine erythrocytes, C2522-5MG, SIGMA) in PBS (pH 7.4, 10010023, Thermo Fisher Scientific) was incubated with 1 μM SA-PEG(n)-5DA2Me-Fluo (n = 1, 2, 3) at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min, non-irradiated for 30

min or irradiated at 493 nm (ASAHI SPECTRA, MAX-301, Filter: XF3075 480AF30, intensity: 150 mW/cm²) for 30 min. The samples were subjected to SDS-PAGE.

■ Photolabeling of CA-II in the Presence of HeLa Cell Lysate

HeLa cells pellet was lysed with CellLytic™ M (C2978-50ML, Sigma-Aldrich), centrifuged at 15,000 g for 15 min to pellet the cellular debris, collected supernatant, used as HeLa cells lysate. 1 μM purified bovine CA-II (Carbonic Anhydrase Isozyme II from bovine erythrocytes, C2522-5MG, SIGMA) in PBS (pH 7.4) or HeLa cells lysate (1.3 mg/mL) were pre-incubated with 1 % DMSO (v/v) or 100 μM ethoxzolamide (333328-1G, Sigma-Aldrich) containing 1 % DMSO (v/v) at 37 °C for 30 min, then incubated with 1 μM SA-PEG1-5DA2Me-Fluo (n = 1, 2, 3) at 37 °C for 30 min, irradiated at 493 nm (ASAHI SPECTRA, MAX-301, Filter: XF3075 480AF30, intensity: 150 mW/cm²) for 30 min. The samples were subjected to SDS-PAGE.

■ Photolabeling of CA-II in Living Red Blood Cells

Bovine whole blood (1 mL, BOVINE/CALF BLOOD in Sodium Citrate, R200-0100, Rockland Immunochemicals, Inc.) was mixed with EDTA (0.75 mg) and 0.9 % saline (1 mL, w/v), centrifuged at 5,000 g for 5 min. The heaviest red phase was collected as purified living red blood cells (RBCs). Living RBCs (10 μL) in HEPES-buffered saline (100 μL) were pre-incubated with 1 % DMSO (v/v) or 1, 10, 100 μM ethoxzolamide containing 1 % DMSO (v/v) at 37 °C for 30 min, then incubated with 1 μM SA-PAG1-5DA2Me-Fluo at 37 °C for 30 min, irradiated at 493 nm (ASAHI SPECTRA, MAX-301, Filter: XF3075 480AF30, intensity: 150 mW/cm²) for 30 min, centrifuged at 5,000 g for 5 min, removed supernatant,

lysed with CellLytic™ M (100 µL), centrifuged at 15,000 g for 15 min to pellet the cellular debris, collected supernatant, filtered with Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit (30 kDa, UFC503096, Millipore), collected concentrated sample, diluted 5 times with H₂O. The samples were subjected to SDS-PAGE.

■ Mass Spectrometric Analysis

1 µM 5DA2Me-Fluo in 1 µM bovine CA-II aq. was irradiated at 480 ± 15 nm with ASAHI SPECTRA MAX-301 (Filter: XF3075 480AF30, intensity: 150 mW/cm²) for 2 hours, and then removed low-molecular weight compounds with PD SpinTrap™ G-25 (GE Healthcare, 28918004). The photolabeled sample was subjected to SDS-PAGE. The bands of CA-II were cropped, washed 2 times with 800 µL H₂O for 1 min under shaking, destained 2 times with 800 µL 30 % CH₃CN (v/v) in 20 mM Tris-HCl aq. (pH 8.5) for 1 min under shaking, dehydrated with 800 µL CH₃CN for 1 min under shaking, dried up with a concentrator. Gels for 2 lanes were digested with 300 ng trypsin (Promega, v5113) or 300 ng chymotrypsin (Thermo, #90056) in 200 µL TG buffer (0.01% DG (w/v) in 50 mM Tris-HCl aq (pH 8.0)), incubated at 37 °C for overnight. The external solution was recovered, further recovered 2 times with 100 µL TG buffer/acetonitrile = 1/1 (v/v), concentrated with a concentrator. The digested sample was analyzed with LC-MS/MS.

蛍光検出器の社名および品番

MS 検出器の社名および品番

カラムの仕様と社名および品番

移動相 A および B の組成

グラジェントの条件

流速

注入量

Analytical UPLC-MS was equipped with a fluorescence detector (品番) and a MS detector (KAB0812, Waters) for product visualization on a reversed phase column (ODS, 1.7 μ m, 2.1 mm \times 50 mm, Waters). Solvent A: = 10 mM ammonium formate in H₂O, Solvent B: 10 mM ammonium formate and 20 % H₂O (v/v) in CH₃CN. Gradient was from 5 % to 95 % solvent B within 3.5 min. Flow rate was 0.8 mL/min. Injected volume: 10 μ L.

8-8. Cell Culture and Fluorescence Microscopy

Human Cervix Adenocarcinoma cell line (HeLa) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC). HeLa cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 11965-092, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10 % fetal bovine serum (v/v, S1810-500, BioWest) and 1 % penicillin streptomycin (v/v, 15140-122, ,Thermo Fisher Scientific). The cells were maintained at 37 °C in a humidified 5 % CO₂ (v/v) environment. Cell lines were split every 3-4 days or at confluence.

■ Evaluation of Cellular Retention

HeLa cells were cultured on 35 mm Glass Base Dish with Grid (IWAKI, 3922-035) for 1 day before imaging. HeLa cells were incubated with 1 μM 5DA2Me-Fluo, 1 μM CellTracker™ Red CMTPX Dye (C34552, Thermo Fisher Scientific) and 0.2 % Pluronic® F127 (v/v, P2443, Sigma-Aldrich) in HBSS (084-08965, FUJIFILM) at 37 °C for 30 min, irradiated to cells in the field of view at 405 nm for 5 min, and then imaged with SP5 (Before Fixation). The image medium was removed, incubated with -20 °C MeOH at -20 °C for 15min, washed 3 times with HBSS, and then image with SP5 (After Fixation). Microscopy conditions. Objective lens: HC PL APO CS2 63×/1.40 OIL. 5DA2Me-Fluo: excitation (405 nm), detection range (511-564 nm), detector (PMT), gain (800), color scale (0-255). CellTracker™ Red CMTPX Dye: excitation (594 nm), detection range (616-669 nm), detector (PMT), gain (800), color scale (0-255).

■ Photolabeling of Intracellular Proteins in a Single Cell

HeLa cells were cultured on 35 mm Glass Base Dish with Grid (IWAKI, 3922-035) for 1

day before imaging. HeLa cells were incubated with 1 μ M 5DA2Me-Fluo, 1 μ M CellTracker™ Red CMTPX Dye (C34552, Thermo Fisher Scientific) and 0.2 % Pluronic® F127 (v/v, P2443, Sigma-Aldrich) in HBSS (084-08965, FUJIFILM) at 37 °C for 30 min, and then imaged directly with SP5 (Before Irradiation image). Region of Interest (ROI) surrounding a single cell was decided, irradiated to ROI at 488 nm for 5 min, and then imaged with SP5 (After Irradiation). The HeLa cells were washed 3 times with 0.1 % TWEEN20 (P9416-50ML, SIGMA) in HBSS, incubated with HBSS at 37 °C for 30 min, washed once with HBSS, and then image with SP5 (After Washing). Microscopy conditions. Objective lens: HC PL APO CS2 63 \times /1.40 OIL. 5DA2Me-Fluo: excitation (488 nm), detection range (505-545 nm), detector (PMT), gain (800), color scale (25-100). CellTracker™ Red CMTPX Dye: excitation (543 nm), detection range (580-620 nm), detector (PMT), gain (800), color scale (0-255).

9. 参考文献

1. Singh, A., Thornton, E. R. & Westheimer, F. H. *The Photolysis of Diazoacetylchymotrypsin*. (1962).
2. Fleet, G. W. J., Porter, R. R. & Knowles, J. R. Affinity labelling of antibodies with aryl nitrene as reactive group. *Nature* **224**, 511–512 (1969).
3. Smith, R. A. G. & Knowles, J. R. Aryldiazirines. Potential reagents for photolabeling of biological receptor sites. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 5072–5073 (1973).
4. Galardy, R. E., Craig, L. C. & Printz, M. P. Benzophenone triplet: A new photochemical probe of biological ligand-receptor interactions. *Nat. New Biol.* **242**, 127–128 (1973).
5. Chowdhry, V., Vaughan, R. & Westheimer, F. H. 2-diazo-3,3,3-trifluoropropionyl chloride: reagent for photoaffinity labeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 1406–1408 (1976).
6. Brunner, J., Senn, H. & Richards, F. M. 3-Trifluoromethyl-3-phenyldiazirine. A new carbene generating group for photolabeling reagents. *J. Biol. Chem.* **255**, 3313–8 (1980).
7. Goeldner, M. P. & Hirth, C. G. *Specific photoaffinity labeling induced by energy transfer: Application to irreversible inhibition of acetylcholinesterase*. **77**, (1980).
8. Vodovozova, E. L., Pazynina, G. V., Tuzikov, A. B., Grechishnikova, I. V. & Molotkovsky, J. G. The synthesis of photoaffinity neoglycolipid probes as tools for studying membrane lectins. *Russ. J. Bioorganic Chem.* **30**, 154–160 (2004).
9. Goeldner, M. P., Hawkinson, J. E. & Casida, J. E. Diazocyclohexadienones as photoaffinity ligands: Syntheses of trioxabicyclooctane probes for the convulsant binding site of the GABAA receptor. *Tetrahedron Lett.* **30**, 823–826 (1989).
10. Young, M. J. T. & Platz, M. S. Polyfluorinated aryl azides as photoaffinity labelling reagents; the room temperature CH insertion reactions of singlet pentafluorophenyl nitrene with alkanes. *Tetrahedron Lett.* **30**, 2199–2202 (1989).

11. Herner, A. *et al.* 2-Aryl-5-carboxytetrazole as a New Photoaffinity Label for Drug Target Identification. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 14609–14615 (2016).
12. Chiba, K. *et al.* Specific fluorescence labeling of target proteins by using a ligand-4-azidophthalimide conjugate †. *Chem. Commun* **53**, 8751 (2017).
13. Ota, E. *et al.* Thienyl-Substituted α -Ketoamide: A Less Hydrophobic Reactive Group for Photo-Affinity Labeling. *ACS Chem. Biol.* **13**, 876–880 (2018).
14. Chan, H.-L. *et al.* Proteomic analysis of UVC irradiation-induced damage of plasma proteins: Serum amyloid P component as a major target of photolysis. *FEBS Lett.* **580**, 3229–3236 (2006).
15. Uehara, F. *et al.* Comparison of UVB and UVC Effects on the DNA Damage-Response Protein 53BP1 in Human Pancreatic Cancer. *J. Cell. Biochem.* **115**, 1724–1728 (2014).
16. Voskresenska, V. *et al.* Photoaffinity Labeling via Nitrenium Ion Chemistry: Protonation of the Nitrene Derived from 4-Amino-3-nitrophenyl Azide to Afford Reactive Nitrenium Ion Pairs. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 11535–11547 (2009).
17. Smith, E. & Collins, I. Photoaffinity labeling in target-and binding-site identification Europe PMC Funders Group. *Futur. Med Chem* **7**, 159–183 (2015).
18. Staros, J. V., Bayley, H., Standring, D. N. & Knowles, J. R. Reduction of aryl azides by thiols: Implications for the use of photoaffinity reagents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**, 568–572 (1978).
19. Fillion, D., Deraët, M., Holleran, B. J. & Escher, E. Stereospecific Synthesis of a Carbene-Generating Angiotensin II Analogue for Comparative Photoaffinity Labeling: Improved Incorporation and Absence of Methionine Selectivity. *J. Med. Chem.* **49**, 2200–2209 (2006).
20. Rihakova, L. *et al.* METHIONINE PROXIMITY ASSAY, A NOVEL METHOD FOR

- EXPLORING PEPTIDE LIGAND–RECEPTOR INTERACTION. *J. Recept. Signal Transduct.* **22**, 297–313 (2002).
21. Niphakis, M. J. *et al.* A Global Map of Lipid-Binding Proteins and Their Ligandability in Cells. *Cell* **161**, 1668–1680 (2015).
 22. Sieber, S. A., Niessen, S., Hoover, H. S. & Cravatt, B. F. Proteomic profiling of metalloprotease activities with cocktails of active-site probes. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 274–281 (2006).
 23. Müskens, F. M. *et al.* Design, synthesis, and evaluation of a diazirine photoaffinity probe for ligand-based receptor capture targeting G protein–coupled receptors. *Mol. Pharmacol.* **95**, 196–209 (2019).
 24. Arguello, A. E., Deliberto, A. N. & Kleiner, R. E. RNA Chemical Proteomics Reveals the N⁶-Methyladenosine (m⁶A)-Regulated Protein–RNA Interactome. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 40 (2017).
 25. Yamaguchi, T. & Saneyoshi, M. *A photolabile 2′, 3′-dideoxyuridylate analog bearing an aryl(trifluoromethyl)diazirine moiety: photoaffinity labeling of HIV-1 reverse transcriptase.* *Nucleic Acids Research* **24**, (1996).
 26. Aitken, G. R., Henderson, J. R., Chang, S.-C., McNeil, C. J. & Birch-Machin, M. A. Direct monitoring of UV-induced free radical generation in HaCaT keratinocytes. *Clin. Exp. Dermatol.* **32**, 722–727 (2007).
 27. Kvam, E. & Tyrrell, R. M. *Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation.* *Carcinogenesis* **18**, (1997).
 28. Girard, P. M. *et al.* UVA-induced damage to DNA and proteins: direct versus indirect photochemical processes. *J. Phys. Conf. Ser* **261**, 12002 (2011).
 29. McAdam, E., Brem, R. & Karran, P. Oxidative stress-induced proteindamageinhibits

- DNA repair and determines mutation risk and therapeutic efficacy. *Mol. Cancer Res.* **14**, 612–622 (2016).
30. Pfeifer, G. P., You, Y. H. & Besaratinia, A. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **571**, 19–31 (2005).
 31. Moss, R. A., Platz, M. S. & Jones, M. *Reactive Intermediate Chemistry*. (2003).
 32. 富岡秀雄. 最新のカルベン化学. (2009).
 33. Wang, J., Burdzinski, G., Gustafson, T. L. & Platz, M. S. Ultrafast Study of p-Biphenyldiazomethane and p-Biphenylcarbene. (2006). doi:10.1021/jo061029
 34. Burdzinski, G. & Platz, M. S. Ultrafast time-resolved studies of the photochemistry of diazo carbonyl compounds. *J. Phys. Org. Chem.* n/a-n/a (2009). doi:10.1002/poc.1601
 35. Krauter, C. M., Möhring, J., Buckup, T., Pernpointner, M. & Motzkus, M. Ultrafast branching in the excited state of coumarin and umbelliferone. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 17846 (2013).
 36. Civitello, E. R. & Rapoport, H. The regioselective cleavage of aryl tosylates by electrochemical reduction. *J. Org. Chem.* **57**, 834–840 (1992).
 37. Sridhar, M., Kumar, B. A. & Narender, R. Expedient and simple method for regeneration of alcohols from toluenesulfonates using Mg-MeOH. *Tetrahedron Lett.* **39**, 2847–2850 (1998).
 38. Bethell, D. & Parker, V. D. In Search of Carbene Ion Radicals in Solution: Reaction Pathways and Reactivity of Ion Radicals of Diazo Compounds. *Acc. Chem. Res.* **21**, 400–407 (1988).
 39. Mizushima, T., Monden, G., Murata, S., Ishii, K. & Hamaguchi, H. Mechanistic studies of direct and sensitized photolysis of methyl (4-nitrophenyl)diazoacetate in the presence of

- an electron-donating amine: photochemical generation of the diazoalkane radical anion. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1274–1282 (2002). doi:10.1039/b202800j
40. Ueno, T. *et al.* Rational principles for modulating fluorescence properties of fluorescein. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 14079–14085 (2004).
 41. Abo, M. *et al.* Development of a Highly Sensitive Fluorescence Probe for Hydrogen Peroxide. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, (2011).
 42. Fujikawa, Y. *et al.* A practical fluorogenic substrate for high-throughput screening of glutathione S-transferase inhibitors. *Chem. Commun.* **51**, 11459–11462 (2015).
 43. Kawatani, M. *et al.* Fluorescence Detection of Prostate Cancer by an Activatable Fluorescence Probe for PSMA Carboxypeptidase Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 10409–10416 (2019).
 44. Parker, C. A. & Rees, W. T. Correction of fluorescence spectra and measurement of fluorescence quantum efficiency. *Analyst* **85**, 587–600 (1960).
 45. REGITZ, M. & MAAS, G. Diazo Compounds Properties and Synthesis. Chapter 3 - Reactivity toward Acids. in *Diazo Compounds* 96–165 (Elsevier, 1986).
doi:10.1016/b978-0-12-585840-3.50007-6
 46. Tomioka, H. *et al.* *Neighboring Group Participation in Carbene Chemistry. Effect of Neighboring Carboxylate Group on Carbene Reactivities.* *J. Am. Chem. Soc.* **112**, (UTC, 1990).
 47. Moss, R. A., Platz, M. S. & Jones, M. *Reactive Intermediate Chemistry (6.5. Laser Flash Photolysis Studies)*. (John Wiley & Sons, Inc., 2003). doi:10.1002/0471721492
 48. A. Fleming, S. Chemical reagents in photoaffinity labeling. *Tetrahedron* **51**, 12479–12520 (1995).
 49. 富岡秀雄. 最新のカルベン化学 (2-2 前平衡機構に基づいた評価). (2009).

50. Bethell, D., Hayes, J. & Newall, A. R. Intermediates in the decomposition of aliphatic diazo-compounds. Part XI. Mechanistic studies on the reaction of diphenylmethylenediazide with amines in solution. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1307 (1974).
doi:10.1039/p29740001307
51. Ando, W. *et al.* Reactions of dimethyl diazomalonate with divalent sulfides. *J. Org. Chem.* **37**, 1721–1727 (1972).
52. 富岡秀雄. 最新のカルベン化学 (4-2 イリドの形成). (2009).
53. Ando, W., Yagihara, T., Tozune, S. & Migita, T. Formation of stable sulfonium ylides via photodecomposition of diazocarbonyl compounds in methyl sulfide. *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 2786–2787 (1969).
54. Pastor-Pérez, L., Wiebe, C., Pérez-Prieto, J. & Stiriba, S.-E. A Tetramethoxybenzophenone as Efficient Triplet Photocatalyst for the Transformation of Diazo Compounds. (2007). doi:10.1021/jo062426n
55. Song, L., Varma, C. A., Verhoeven, J. W. & Tanke, H. J. Influence of the triplet excited state on the photobleaching kinetics of fluorescein in microscopy. *Biophys. J.* **70**, 2959–2968 (1996).
56. Blom, H., Chmyrov, A., Hassler, K., Davis, L. M. & Widengren, J. Triplet-State Investigations of Fluorescent Dyes at Dielectric Interfaces Using Total Internal Reflection Fluorescence Correlation Spectroscopy. doi:10.1021/jp8110088
57. Tran, J. & Olmsted, J. Intramolecular triplet-triplet energy transfer from xanthene dyes to an anthryl substituent. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **71**, 45–49 (1993).
58. Arora, R. & Kakkar, R. Theoretical study of the mechanism of the Wolff rearrangement of some diazocarbonyl compounds. *Comput. Theor. Chem.* **1094**, 32–41 (2016).
59. Kirmse, W. 100 Years of the Wolff Rearrangement. *European J. Org. Chem.* **2002**, 2193

- (2002).
60. Tomioka, H., Okuno, H. & Izawa, Y. Carbenes in a rigid matrix. Substituent effects on the temperature dependence of α -carbonylcarbene reactions. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1636–1641 (1980). doi:10.1039/P29800001636
 61. Kammula, S. L., Tracer, H. L., Shevlin, P. B. & Jones, M. Intramolecular decomposition of isopropylidene diazomalonate (diazo Meldrum's acid). *J. Org. Chem.* **42**, 2931–2932 (1977).
 62. Urano, Y. *et al.* Evolution of fluorescein as a platform for finely tunable fluorescence probes. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 4888–4894 (2005).
 63. Arik, M., Elebi, N. C. , & Onganer, Y. Fluorescence quenching of fluorescein with molecular oxygen in solution. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **170**, 105–111 (2005).
 64. 江川堯寛. 修士論文「新規赤色蛍光色素および長波長蛍光Ca²⁺プローブの開発」.
 65. 和田洋子. 修士論文「Rhodamine骨格を有する蛍光プローブの論理的設計法の確立とその応用」.
 66. 小出裕一郎. 博士論文「10位置換ローダミン」.
 67. Ogasawara, A. *et al.* Red Fluorescence Probe Targeted to Dipeptidylpeptidase-IV for Highly Sensitive Detection of Esophageal Cancer. *Bioconjug. Chem.* **30**, 1055–1060 (2019).
 68. 高橋翔大. 博士論文「生体深部のCa²⁺イメージング・in vivo における pH測定を目標とした近赤外蛍光プローブの開発」.
 69. Asanuma, D. *et al.* Sensitive β -galactosidase-targeting fluorescence probe for visualizing small peritoneal metastatic tumours in vivo. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
 70. Urano, Y. *et al.* Rapid cancer detection by topically spraying a γ -glutamyltranspeptidase-activated fluorescent probe. *Sci. Transl. Med.* **3**, (2011).

71. Simon, E. & Kornitzer, D. Pulse-Chase Analysis to Measure Protein Degradation. in 65–75 (2014). doi:10.1016/B978-0-12-420070-8.00006-4
72. Kulkarni, R. U. *et al.* In Vivo Two-Photon Voltage Imaging with Sulfonated Rhodamine Dyes. *ACS Cent. Sci.* **4**, 1371–1378 (2018).
73. Mütze, J. *et al.* Excitation spectra and brightness optimization of two-photon excited probes. *Biophys. J.* **102**, 934–944 (2012).
74. Becke, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A* **38**, 3098–3100 (1988).
75. Becke, A. D. A new mixing of Hartree-Fock and local density-functional theories. *J. Chem. Phys.* **98**, 1372–1377 (1993).
76. Becke, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **98**, 5648–5652 (1993).
77. Lee, C., Yang, W. & Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **37**, 785–789 (1988).
78. Frisch, M. *et al.* Gaussian 09, Revision A.02. (2009).

10. 謝辭

本研究を遂行するにあたり、ご指導を受け賜りました東京大学大学院薬学系研究科、薬品代謝化学教室、浦野泰照 教授 に心より感謝申し上げます。非常に多忙な中、研究成果を瞬時に把握し、鋭く的確なご指摘、ご提案をして頂きました。

極めて貴重なご助言を頂きました、花岡健二郎 准教授、上野匡 助教、小松徹 特任助教、に深く感謝致します。特に、上野匡 助教は、研究の方針を決める際や研究に行き詰まった際の実験の指導や議論など、貴重な時間を多く割いて頂きました。重ねて深く感謝申し上げます。

常に励まし合い、共に研究を行い、忙しい中で相談相手になってくださった薬品代謝化学教室の全ての皆様に感謝致します。特に、学生生活の心の支えとなってくれた同期の橘椋 博士、林健人 博士、柳光一 博士、に深く感謝致します。

最後に、学生生活を支えてくれた家族に心より感謝致します。

2020年3月

東京大学大学院 薬学系研究科 薬科学博士課程 薬品代謝化学教室

井上 大輝