博士論文

Hydroxymethyl rhodamine 類を用いた蛍光プローブの理論的設計法の開発

橘　椋

目次

第一章　序論..4

第一節　Hydroxymethyl rhodamine 類 5

第二節　HMR 類の分子内スピロ環化平衡を利用した蛍光プローブの開発.......................... 8

第三節　本研究の目的 10

第二章　HMR 類のスピロ環化平衡における pK_{cycl}の予測と応用 11

第一節　pK_{cycl} 計算に向けた予備検討・計算モデル構築.. 12

第二節　HMR 類の分子内平衡に関する水和様式の解析... 18

第三節　pK_{cycl} 計算モデルの評価.. 37

第四節　pK_{cycl} 予測に基づく新規蛍光プローブの開発 60

第三章　HMR 類のスピロ環閉環反応におけるτの予測と応用 71

第一節　τ計算に向けた考察・計算モデル構築.. 72

第二節　HMR 類のスピロ環閉環反応に関する水和様式の解析... 81

第三節　τ計算モデルの評価... 93

第四節　τ予測に基づく新規蛍光プローブの開発 105

第四章　総括と今後の展望 112

第一節　総括.. 113

第二節　今後の展望 114

実験の部 116

Materials and Methods 117

Synthesis 121

参考文献 157

第一章

序論

第一節　Hydroxymethyl rhodamine 類

Hydroxymethyl rhodamine（HMR）類は、rhodamine のベンゼン環部位 2 位に hydroxymethyl 基（HM 基）ないし代替する求核性官能基を有する化合物群の総称であり、代表例として HMTMR[1] が挙げられる(Figure 1-1)。

HMR 類はベンゼン環部位の HM 基がキサンテン環 9 位に求核攻撃し分子内スピロ環化反応を起こす性質を有しており、プロトン性溶媒中で open form と closed form の平衡状態として存在する。Open form はキサンテン環由来の強い蛍光性を持つ。これに対して closed form では共役系が分断されたスピロ環型構造となりキサンテン環構造が消失するため、キサンテン環に由来する吸収・蛍光が観測されない。

水を含む溶媒の場合、HMR 類の open form / closed form の平衡は溶媒の pH によって可逆的に変化する性質を有しており、二者の存在比はキサンテン環に由来する吸収・蛍光の強度によって測定が可能である。酸性側では色素のほぼすべてが open form となり、塩基性側では色素のほぼすべてが closed form となる。酸性条件での蛍光団に由来する蛍光度もしくは吸光度を最大値とし、その半分となる pH をその誘導体固有の値として pK_{cycl} と定義する。HMR 類の分子内スピロ環化平衡は、この pK_{cycl} を通して単一の酸塩基平衡のように振る舞う。また、HMR 類は溶液中で絶えず open form / closed form 間の遷移を繰り返しており、そのうちスピロ環閉環反応の速度定数の逆数（open form の平均寿命）を τ と定義する。既に合成されている HMR 類の例を figure 1-3 に示す。

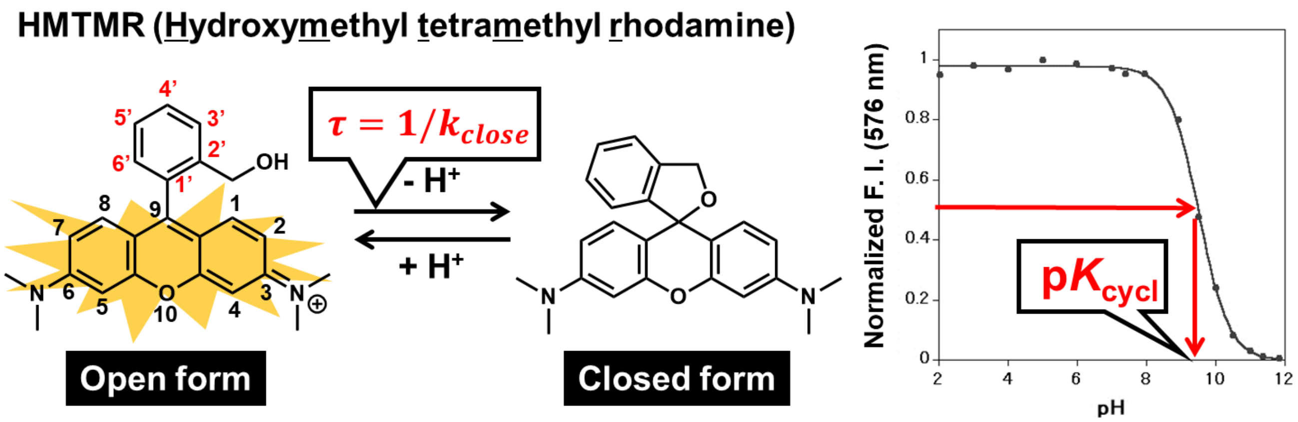


Figure 1- 1　Equilibrium state between closed form and open form of HMRG.

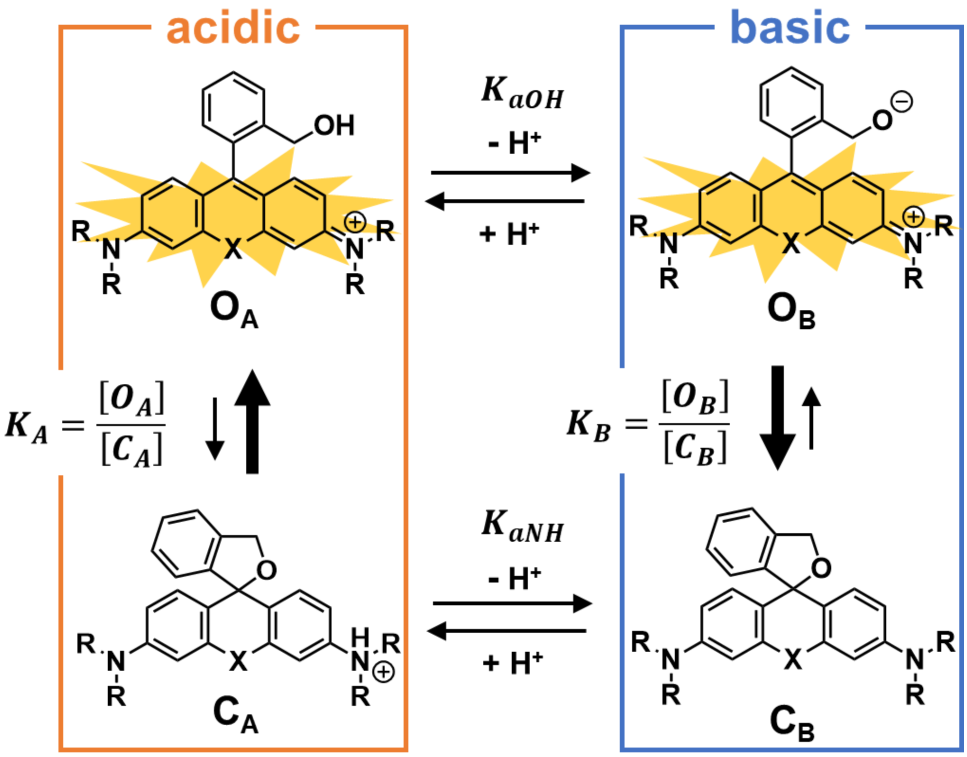


Figure 1- 2　Acid-base equilibrium of HMR derivatives.

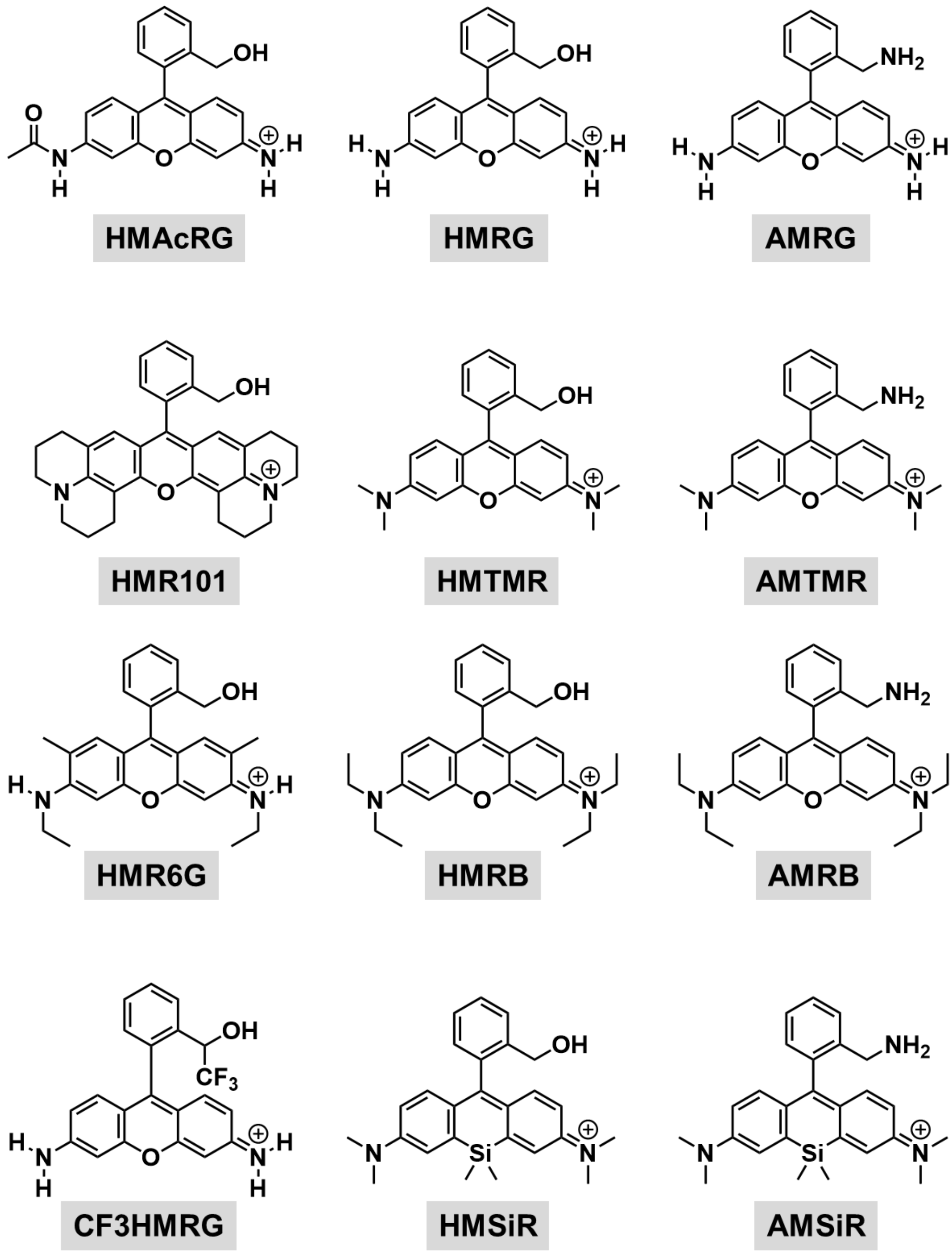


Figure 1- 3　Examples of the structures of HMR derivatives.

第二節　HMR 類の分子内スピロ環化平衡を利用した蛍光プローブの開発

前節で述べた HMR 類のユニークな性質を利用し、これまで多彩な蛍光プローブが生み出されてきた。pK_{cycl} とτを指標に最適な誘導体化を行うことで、プローブの標的に合わせ蛍光の on/off を合理的に調節することが可能となる。その一つとして、gGlu-HMRG を始めとした peptidase プローブ[2–4]が挙げられる。HMRG の片方のアミノ基をアミノ酸等によりアミド結合とすると pK_{cycl} は 5 程度となることが知られており、生理的条件下（pH=7.4）では大部分が closed form をとることで蛍光が観測されない。ターゲットとする酵素との反応によりこのアミノ酸が切断されると、プローブは HMRG となり pK_{cycl} は 8.1 まで上昇する。この状態では、同条件で大部分が open form となるため蛍光が観測されるようになる。このようにして、ターゲットとなる酵素の活性が系中に存在するかを蛍光の有無によって可視化することが可能となる。

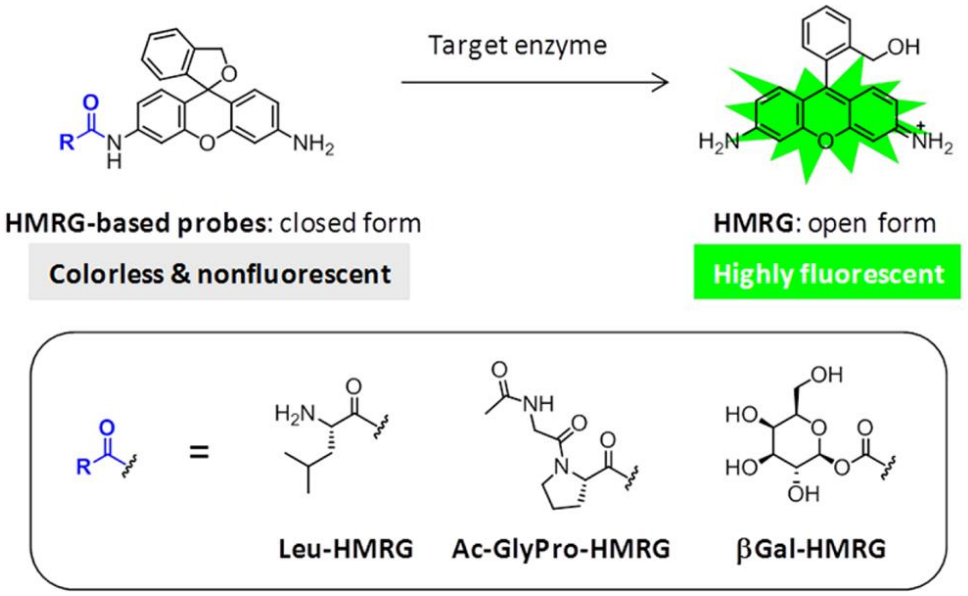


Figure 1- 4　Concept of peptidase probes based on spirosyslization of HMR derivatives. Cited from the reference[3].

また、パラメータτを巧みに利用した例として超解像イメージングプローブが挙げられる。これは、従来の蛍光イメージングにおいて光の回折により隣り合う輝点の区別が不可能となる、解像度の限界を突破する技術である。

超解像イメージングの主要な戦略の一つに SMLM[5–7] がある。この方法では蛍光色素を何らかの手段で明滅させることで回折限界に単一の輝点が存在する(それぞれの位置を正確に決定できる)状態を作り出す。この状態で複数の画像を取得し、これらを合成することで一枚の超解像画像を取得する。

HMR 類は closed form と open form の二種の状態間の遷移によって、蛍光として観測すると 1 分子毎に明滅していることになり、これを利用して近年 SMLM への直接的な応用が試みられた[8]。HMR 類の明滅の時間スケール(すなわちτ)、および全色素分子のうち蛍光性状態(open form)にあるものの割合(すなわち pK_{cycl})は構造展開によって柔軟に調節可能であり、これらのパラメータを超解像顕微鏡の撮像特性に合わせることで、特別な条件(添加物や強いレーザー照射など)を必要としない超解像イメージングが可能である。

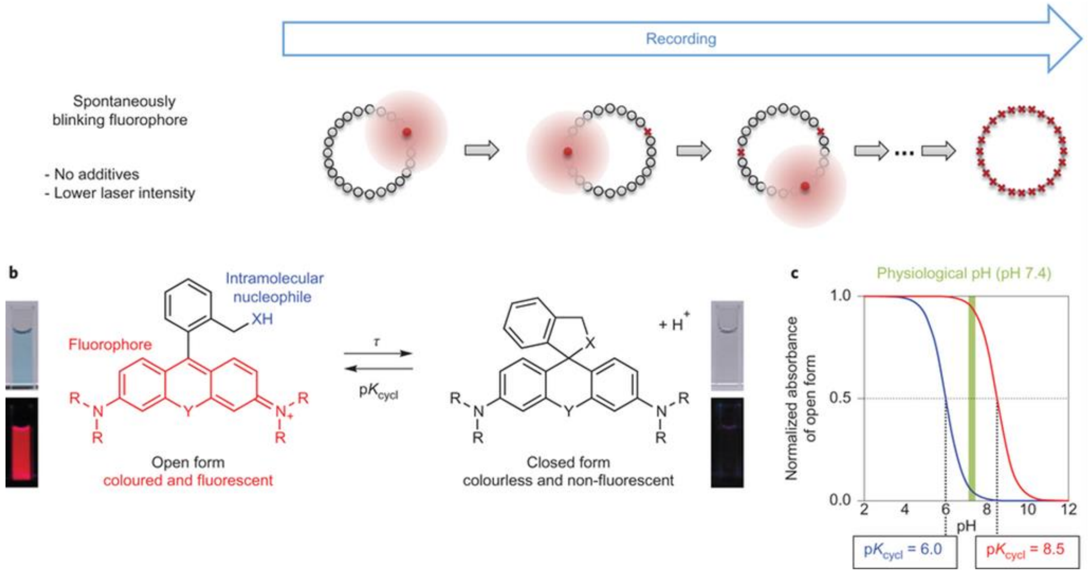


Figure 1- 5　Concept of super-resolution microscopy based on spirocyclizationof HMR derivatives. Sited from reference[8].

第三節　本研究の目的

構造展開による適切なスピロ環化特性の調節は、電子求引基・供与基の効果など有機化学的な経験則によりある程度可能であるが、構造からその値を正確に予測する方法は知られていない。プローブデザインによってはこれらのパラメータを精度よく調節することが求められるが、現状ではこれまで合成された誘導体のデータなどの限られた情報をもとに多種にわたる構造展開を行い、トライアンドエラー方式で適切なものを見出すまで合成と測定を繰り返す他は無い。

こうした問題を解決すべく、分子内スピロ環化という一つの「化学反応」を理論化学的な解析を元に考察することを考えた。pK_{cycl} や open/close 間の遷移速度を化合物の構造のみから正確に予測することが実現すれば、これまで最適化が困難だった様々な標的に対する蛍光プローブを容易に設計することが可能となり得る。汎用量子化学計算パッケージである Gaussian09[9] では、化合物の自由エネルギーや遷移状態に至るまでのエネルギー障壁、また溶媒の及ぼす効果などを計算することができる。本研究では計算化学を用いた化学反応経路解析によって HMR 類の分子内スピロ環化平衡を定量的に理解し正確に予測することで効率的に蛍光プローブを設計する方法を確立することを目的とした。

第二章

HMR 類のスピロ環化平衡における $\mathrm{p}K_{cycl}$ の予測と応用

第一節　pK_{cycl}計算に向けた予備検討・計算モデル構築

まず、最小限の計算によって得られる簡素な状態量が pK_{cycl} と相関を持っているか否かを調べた。具体的には、以下に示すように open form での LUMO（蛍光団の求電子性を代表する）と closed form でのキサンテン環9位炭素と HM 基のヘテロ原子の結合長（スピロ環の安定性を代表する）を取り上げ、これらと pK_{cycl} 実測値との関係を見た。なお、本研究の計算においては特に言及がない限り B3LYP/6-31G(d)の条件[10]を用いて行い、水溶媒の連続誘電体モデル PCM[11–13]を用いている。量子化学によれば LUMO が蛍光団の求電子性を完全に表現し得るわけではなく、また結合長が環構造の安定性を完全に表現し得るわけでもないが、計算コストを考えるとこれらと pK_{cycl} の間に何らかの相関があった場合にはそれを用いることが実用面では好ましいと言える。

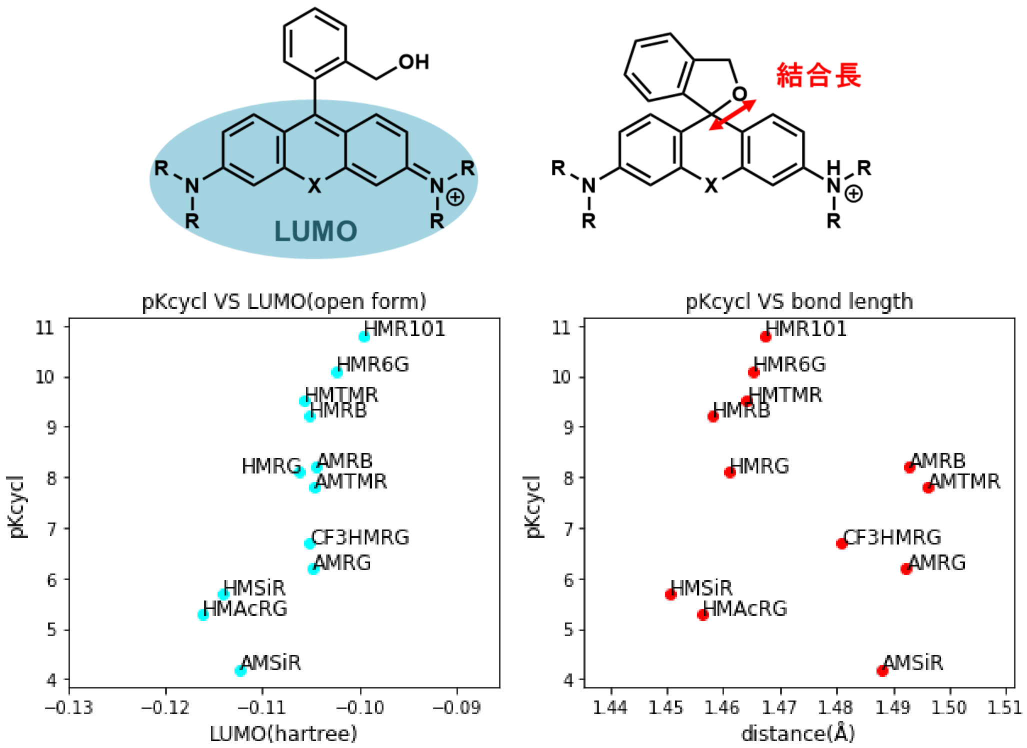


Figure 2- 1　Correlation between pK_{cycl} and LUMO of fluorophore or bond length of spiro-ring.

結果、これらの状態量と pK_{cycl} 実測値との間に予測法として有力になるほどの相関は見られなかった

ここで改めて HMR 類の平衡を考えた。Figure 1-2 の酸塩基平衡を考え、この他の化学種の寄与が無いと仮定すると、pK_{cycl} は以下の式(1)で表されることが導ける。ただし実測における pK_{cycl} の定義は「蛍光団由来の吸光度・蛍光度が最大値の半分となる pH」であるが、ここでは「open / close 存在比が 1:1 となる pH」と定義を読み替えた。この読み替えはほとんどの既知 HMR 誘導体において成立するが、蛍光団由来の吸光度・蛍光度が最大値となる pH で open form の比率が 100%とならない一部の誘導体では値にずれが生じることに注意されたい。

$$pK_{cycl} = log\frac{K_A - 1}{K_{aNH} - K_{aOH}K_A} \quad (1)$$

$$K_A = \exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right) \quad (2)$$

$$\Delta G = G(O_A) - G(C_A) \quad (3)$$

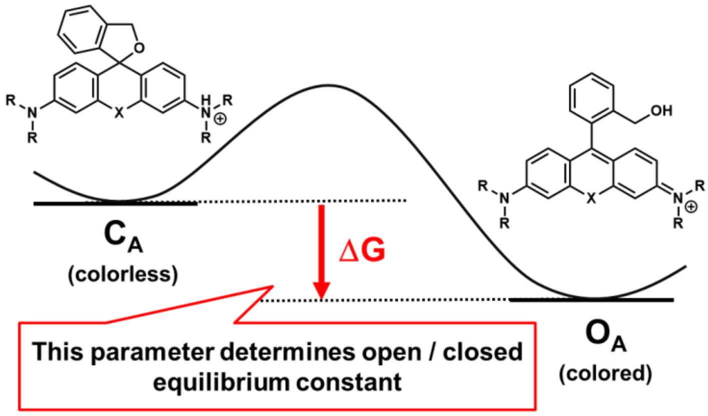


Figure 2- 2　Formula for pK_{cycl} based on statistical mechanics.

(1)の式は以下のように導出した。

$$[C_B] = \frac{K_{aNH}[C_A]}{[H^+]} \qquad [O_A] = K_A[C_A] \qquad [O_B] = \frac{K_{aOH}[O_A]}{[H^+]} = \frac{K_{aOH}K_A[C_A]}{[H^+]}$$

pH = pK_{cycl}のとき

$$[C_A] + [C_B] = [O_A] + [O_B]$$

$$[C_A] + \frac{K_{aNH}[C_A]}{[H^+]} = K_A[C_A] + \frac{K_{aOH}K_A[C_A]}{[H^+]}$$

$$[H^+] = \frac{K_{aNH} - K_{aOH}K_A}{K_A - 1}$$

$$pK_{cycl} = log\frac{K_A - 1}{K_{aNH} - K_{aOH}K_A}$$

式中、pK_{aNH}とpK_{aOH}については色素部分構造のpK_aであり類似構造の報告値[14–16]を用いることができる。本研究はこの値を以下のように設定した。pK_{aNH}については二つともR=Hの場合のみanilineの値、それ以外の場合は*N*-methylanilineの値を用いることとした。

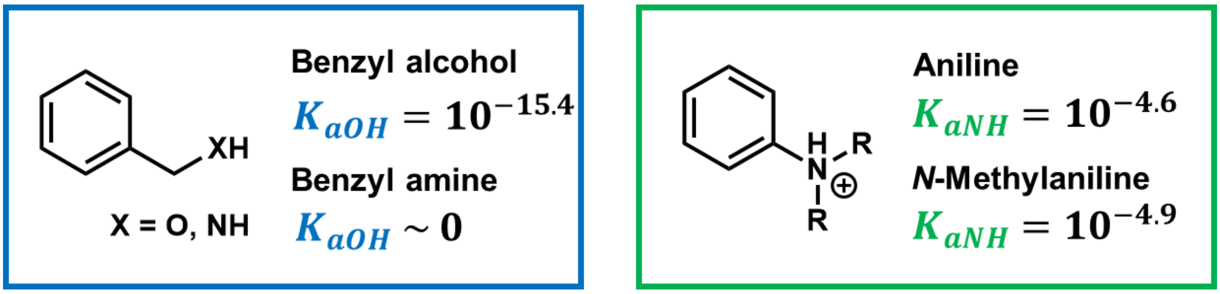


Figure 2- 3　Parameters for K_{aOH}, K_{aNH}.

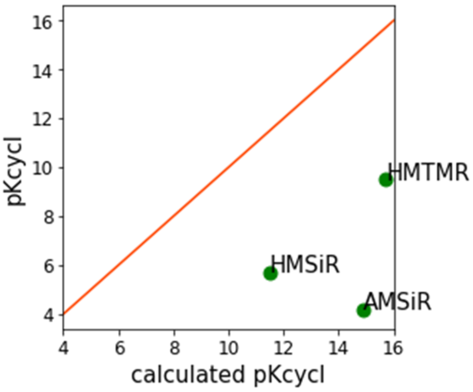
したがって計算によって K_A を正しく求めることができれば、正確な pK_{cycl} を計算できることになる。K_A は、figure 1-2より酸性側すなわち総電荷1の二状態間の平衡定数である。統計力学を元にすると、この平衡定数は二状態それぞれの自由エネルギーを用いて式(2) (3)のように表すことができる。

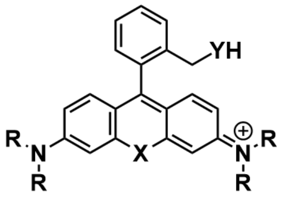
つまり総電荷1の open form および closed form の間の自由エネルギー差を正しく量子化学計算で求めるこ

とができれば pK_{cycl} を計算によって再現できると言える。

そこで8つの誘導体構造を用いて自由エネルギー差を求め、上記の式に代入して pK_{cycl} の計算・実測値 [8] との比較を試みた。しかしながら次に示すようにほとんどの化合物で上記の計算式に入れられず（式(1)の対数内の項が負となる）計算できた誘導体においても実測値よりも非常に大きく算出されることが分かった。

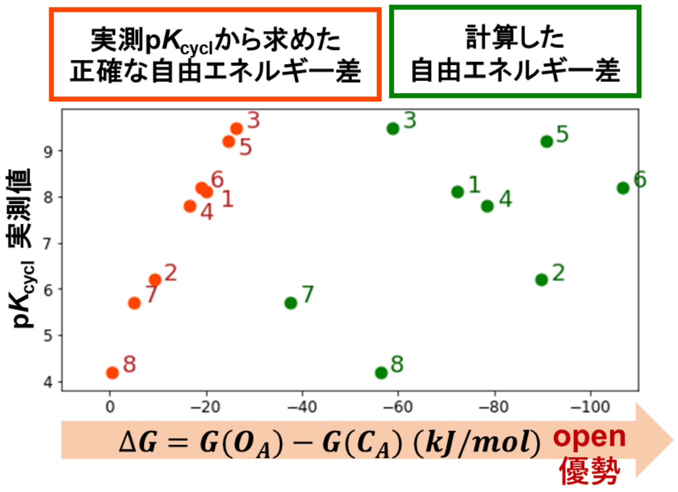
$$pK_{cycl} = log\frac{K_A - 1}{K_{aNH} - K_{aOH}K_A}$$

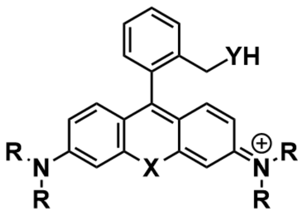




	pK_{cycl} 実測値	pK_{cycl} 計算値	R	X	Y
HMRG	8.1	N/A※	H	O	O
AMRG	6.2	N/A※	H	O	NH
HMTMR	9.5	15.7	Me	O	O
AMTMR	7.8	N/A※	Me	O	NH
HMRB	9.2	N/A※	Et	O	O
AMRB	8.2	N/A※	Et	O	NH
HMSiR	5.7	11.5	Me	$SiMe_2$	O
AMSiR	4.2	14.9	Me	$SiMe_2$	NH

Figure 2- 4　Caclulation of ΔG and pK_{cycl}.





		R	X	Y
1	HMRG	H	O	O
2	AMRG	H	O	NH
3	HMTMR	Me	O	O
4	AMTMR	Me	O	NH
5	HMRB	Et	O	O
6	AMRB	Et	O	NH
7	HMSiR	Me	$SiMe_2$	O
8	AMSiR	Me	$SiMe_2$	NH

Figure 2- 5　Comparison of calculated ΔG and precise ΔG converted form experimental pK_{cycl}.

自由エネルギー差としての比較を行うと(Figure 2-5)、全ての誘導体で open form が大きく優勢に計算されていることが分かる。open form・closed form ともに総電荷1の状態を計算しているため、正電荷が蛍光団全体に非局在化できる open form の方が、アミノ基を中心とした色素の片側に局在するしかない closed form と比べて大きく安定として計算されたと考えられる。

以上の検討から実験値を再現・予測するに足る計算結果を得るには、ここまでで取得した計算において用いた条件では考慮していない要素を加える必要があると言える。不足している要素として、用いた計算法（汎関数・基底関数）の精度の可能性等も考えられたが、それ以上に色素が溶媒から受ける効果を十分に考慮できていないことが大きく影響しているのではないかと考えた。

実験系において色素分子は溶媒としての水分子に取り囲まれており、この溶媒分子が直接的に化学反応や化学平衡に関与していることが考えられる。溶媒分子の役割を、ここでは大きく二つに分けて定義する。

① 第一水和 (first-shell hydration)

化合物のプロトンドナー・アクセプターと水素結合を形成することによって、色素の分子軌道に直接的な影響を及ぼす水分子。また、化学反応におけるプロトン移動を触媒的に促進する役割も持ちうる。計算では、分子と一緒に構造最適化・振動解析に含める[17,18]。

② 第二水和 (second-shell hydration)

化合物に対して直接的な影響は及ぼさないが、高い誘電率を持った「場」として化合物の分極を外から和らげ

る水分子。計算では SCRF (Self Consistent Reaction Field)[11,12] という方法を用いる。これは、まず化合物の電子密度を計算し、その状態を安定化する溶媒の分極を計算し、その分極状態でさらに安定するように化合物の電子密度を補正し、またその状態で溶媒を補正、というように双方が停留点に達するまで繰り返す方法である。SCRF にはいくつかの種類が提案されているが、先に述べたように本研究では特に言及がない限り Gaussian09 のデフォルトである PCM (polarizable-continuum model)[13] を用いている。この方法では、各原子をその van der waals 半径の 1.2 倍ほどの半径の空孔に置き、その周りを誘電体とする。

ここまでの計算では第二水和の効果のみを取り入れており、第一水和の効果は全く考慮していなかった。なお、ここで述べる第一水和は溶媒分子の軌道が色素分子に及ぼす影響を量子化学計算に含めるための仮想的なものであり、実験系によって実際に観測可能な現象とは意味合いが異なることに注意されたい。

次節では HMR 類を取り巻く溶媒の中から何分子かの水分子を第一水和水としてその影響をより精密に計算し、これによって計算結果が実験値に近くなり得るか検討した。

第二節　HMR 類の分子内平衡に関する水和様式の解析

Open-close 自由エネルギー差を指標とした水和解析

まず色素構造に1つ水分子を追加した。前節の考察に基づけば、open form 比べ closed form の方が正電荷の安定化の見積もりが不十分であると考えられ、この水分子による安定化の効果を計算に含めるべきと考えられる。量子化学計算としては元素の組成が同じであればどのような配置であってもエネルギー差の算出が可能であるが、エネルギー差をとる二つの構造間で水素結合を含む化学結合の構成が近い方が、化学的な考察を行いやすいと考えた。そこで、以下の図のように水分子を配置した状態間で自由エネルギーを取り直し、同じようにプロットをとった。

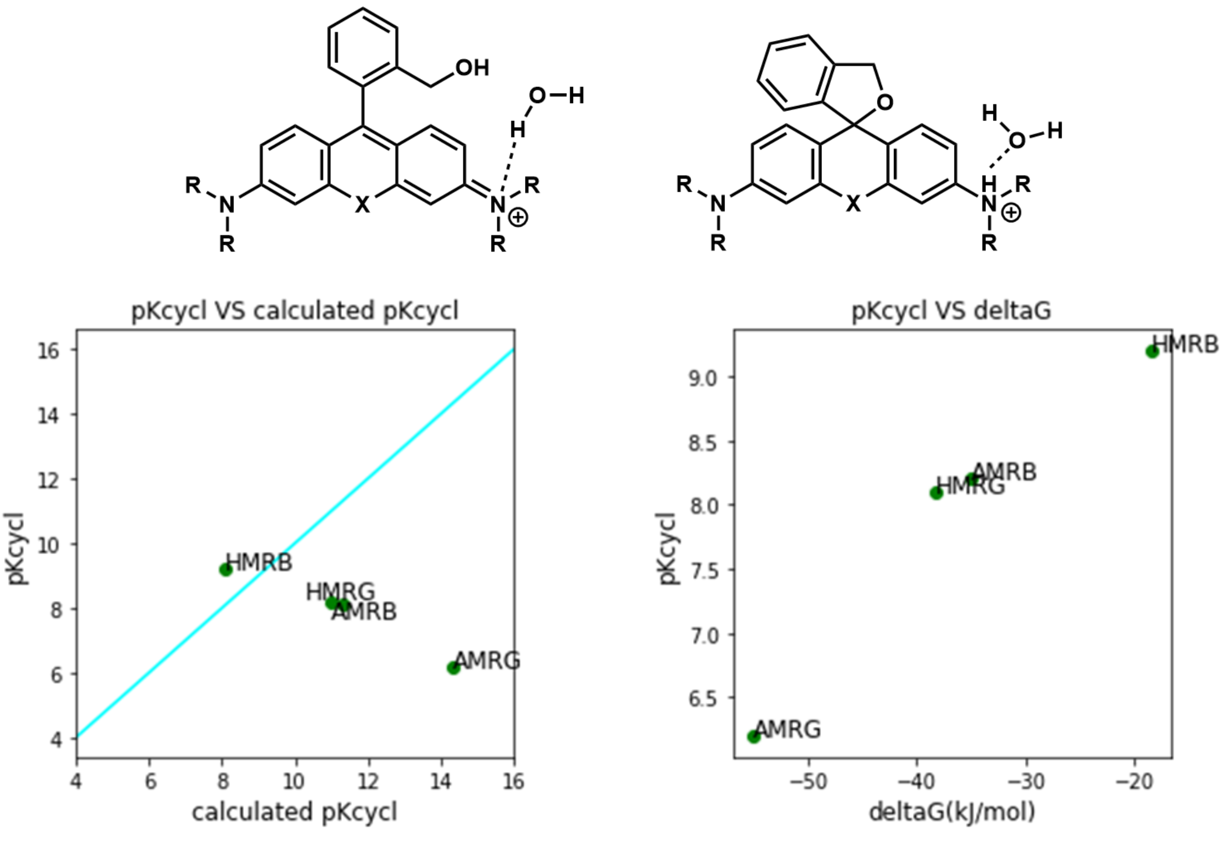


Figure 2- 6　 Caclulation of ΔG and pK_{cycl} (with 1 molecule of 1st shell water to amino group).

この条件では、HMTMR, AMTMR, HMSiR、AMSiR において open form の構造最適化が困難であり、水分子がアミノ基にとどまる構造が得られなかった。これは open form においてはアミノ基の lone pair が蛍光団に非局在化しており、水素結合が形成されることによるエネルギーの低下度が少なくなっている（水素結合しにくい）ためと考えられる。すなわちこの条件では open form においてはアミノ基に対する水素結合による安定化は起こっていないことが示唆される。そこで、open form での水分子を HM 基のプロトン（反応に際して解離する）に移した状態での比較も行った。

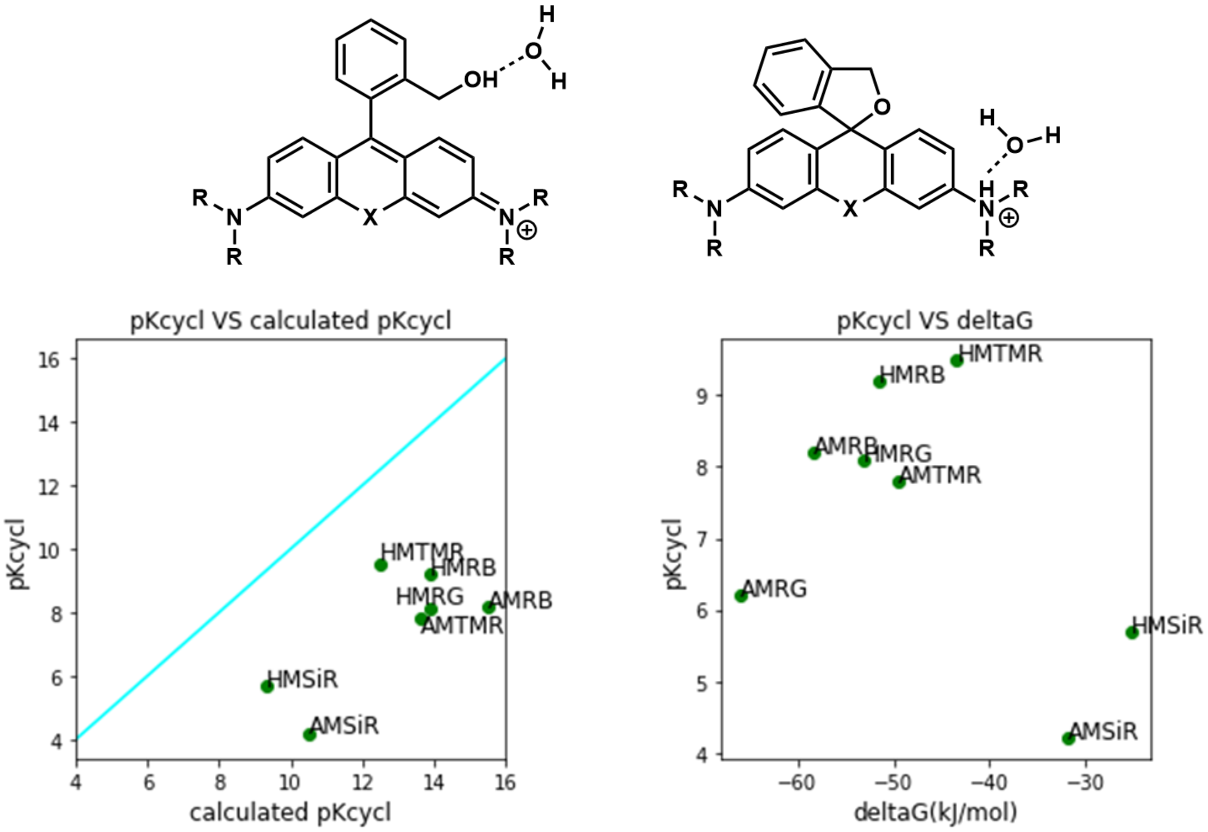
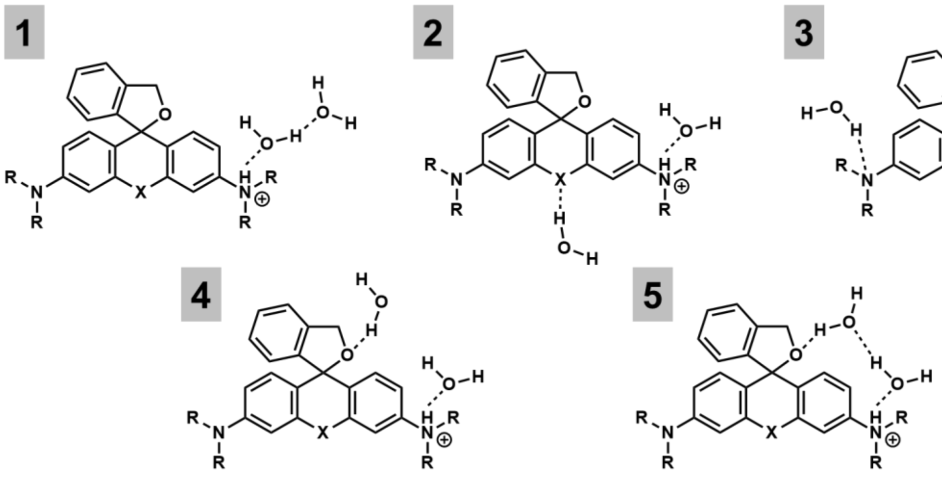


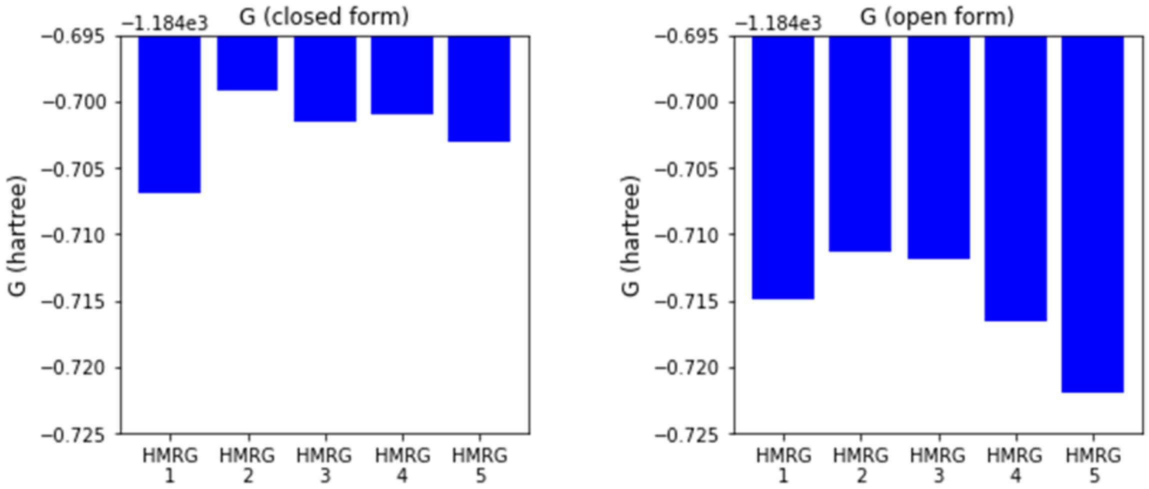
Figure 2- 7　Caclulation of ΔG and pK_{cycl} (with 1 molecule of 1st shell water to amino group and HM group).

自由エネルギー差の絶対値が小さくなり、水分子の無い場合に比べ実測値に近づいた。水分子無しでは計算式に代入できなかった多くの誘導体で計算ができるようになった。しかしながら計算値と実測値の一致度は高くな

く、さらなる溶媒効果の必要性が示唆された。

これを踏まえ、アミノ基に水分子を置いた構造に水分子をもう一つ追加した構造を計算した。構造が多岐にわたるため、様々な水和配置について色素を HMRG,AMRG,HMTMR に絞って計算を行った。





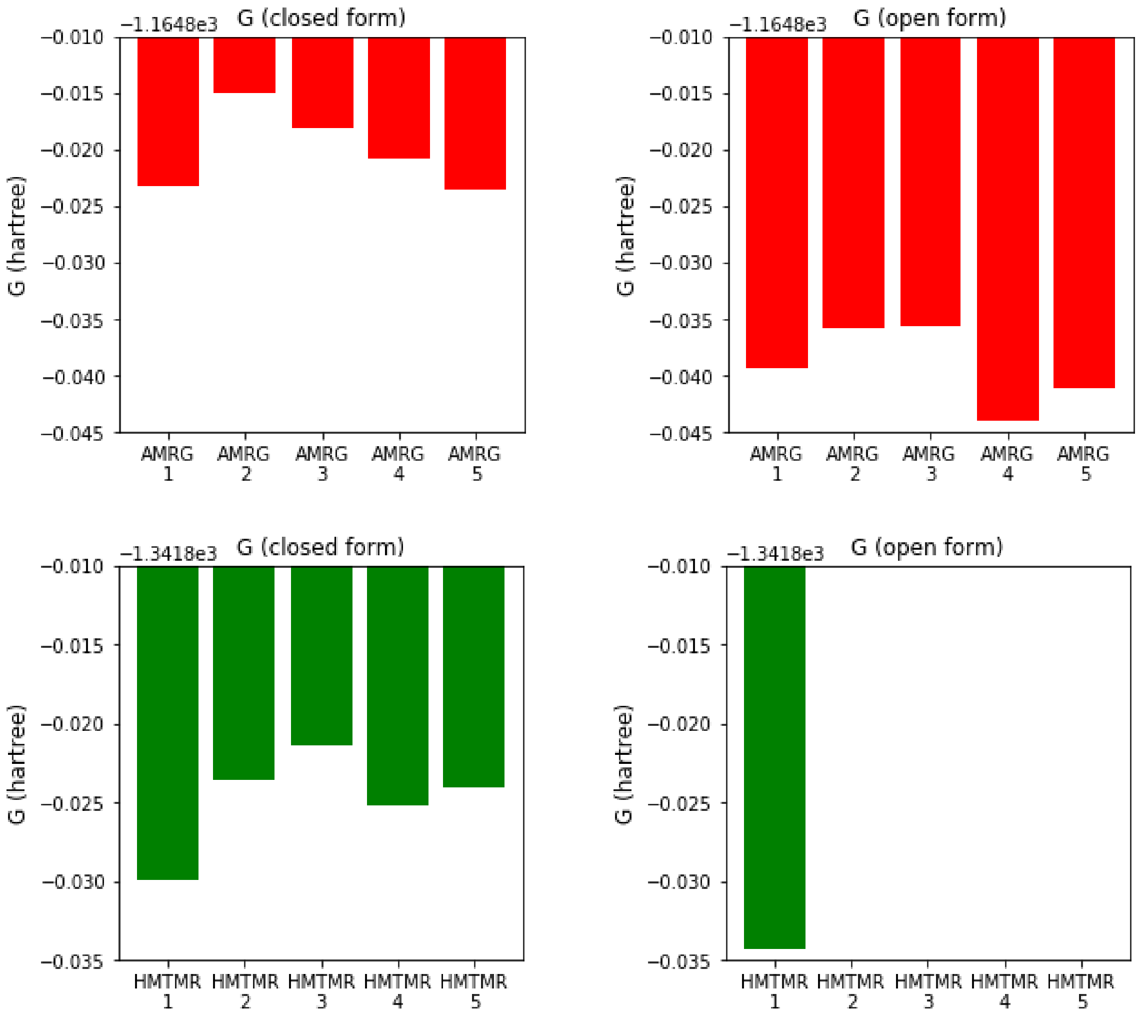
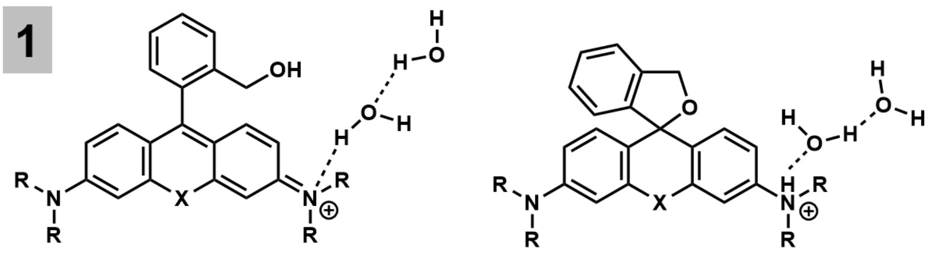


Figure 2- 8　Caclulation of G (with 2 molecule of 1st shell water).

大まかな傾向として、closed form では1番、open form では5番の構造が安定であった。いずれも水分子がアミノ基から二つ連なる構造であることから、二つ目の水分子もアミノ基に局在するカチオンの安定化に寄与していることが示唆される。この二つの水素結合様式において、pK_{cycl} 計算を試みた。



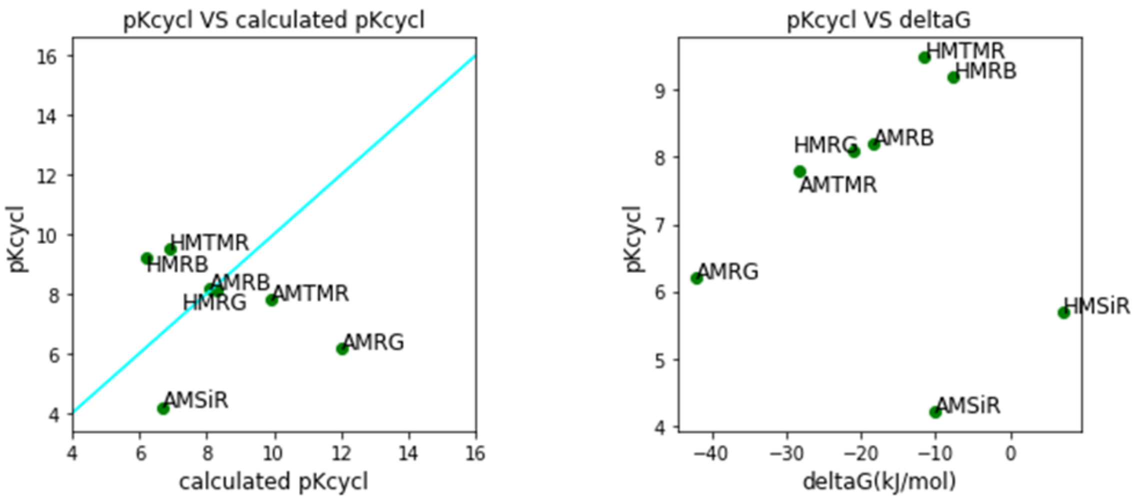


Figure 2- 9　Caclulation of ΔG and pK_{cycl} (with 2 molecule of 1st shell water to amino group).

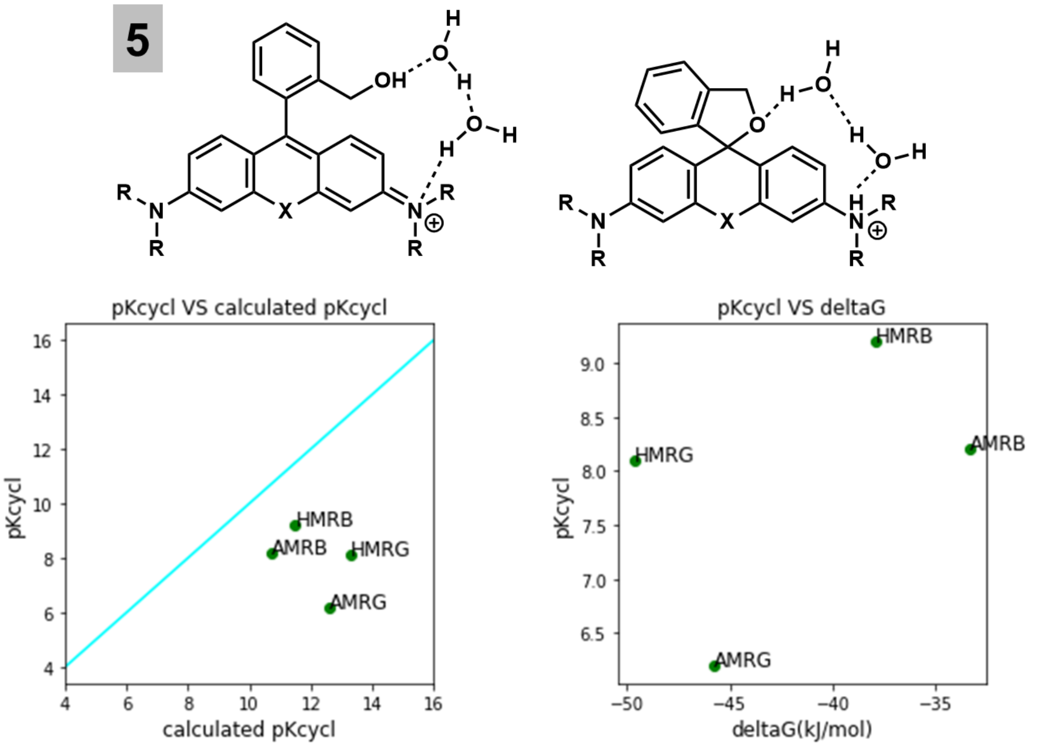
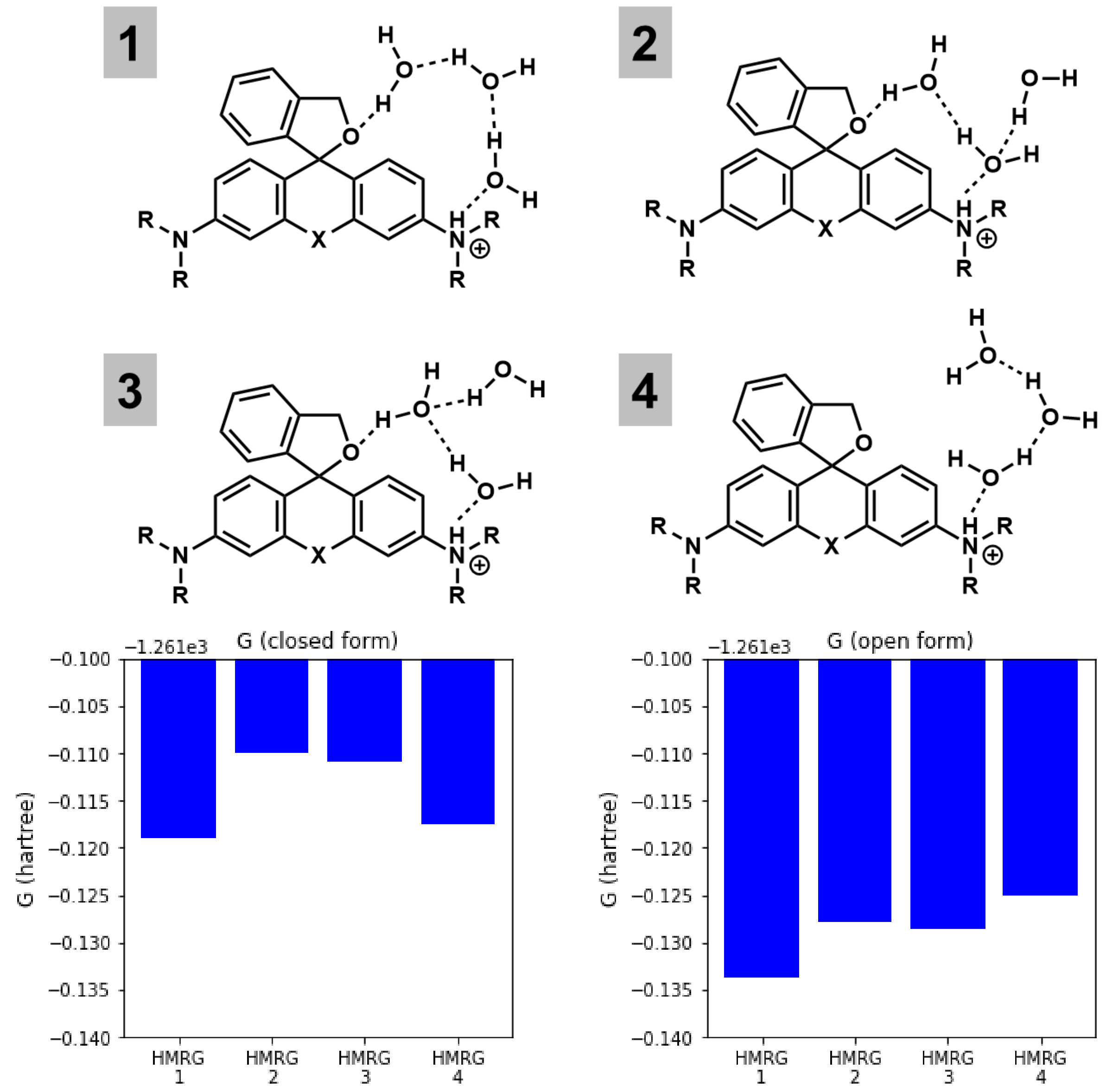


Figure 2- 10　Caclulation of ΔG and pK_{cycl} (with 2 molecule of 1st shell water to amino group, bridge).

いずれの構造でも一分子における結果から若干の向上見られたが、依然として実測値の再現には至らなかった。特に5番の計算では open form の最適化において多くの計算で架橋構造が維持できなかった（水分子がアミノ基から浮いてしまった）。最適化が成功した構造においても、水分子2つの架橋では HM 基とアミノ基の間を

つなぐためには長さが不十分であり、水素結合の距離が引き延ばされることにより相互作用が弱まっていると推察された。水分子をもう一つ追加するにあたって、この架橋の周辺構造に絞って探索を行った。



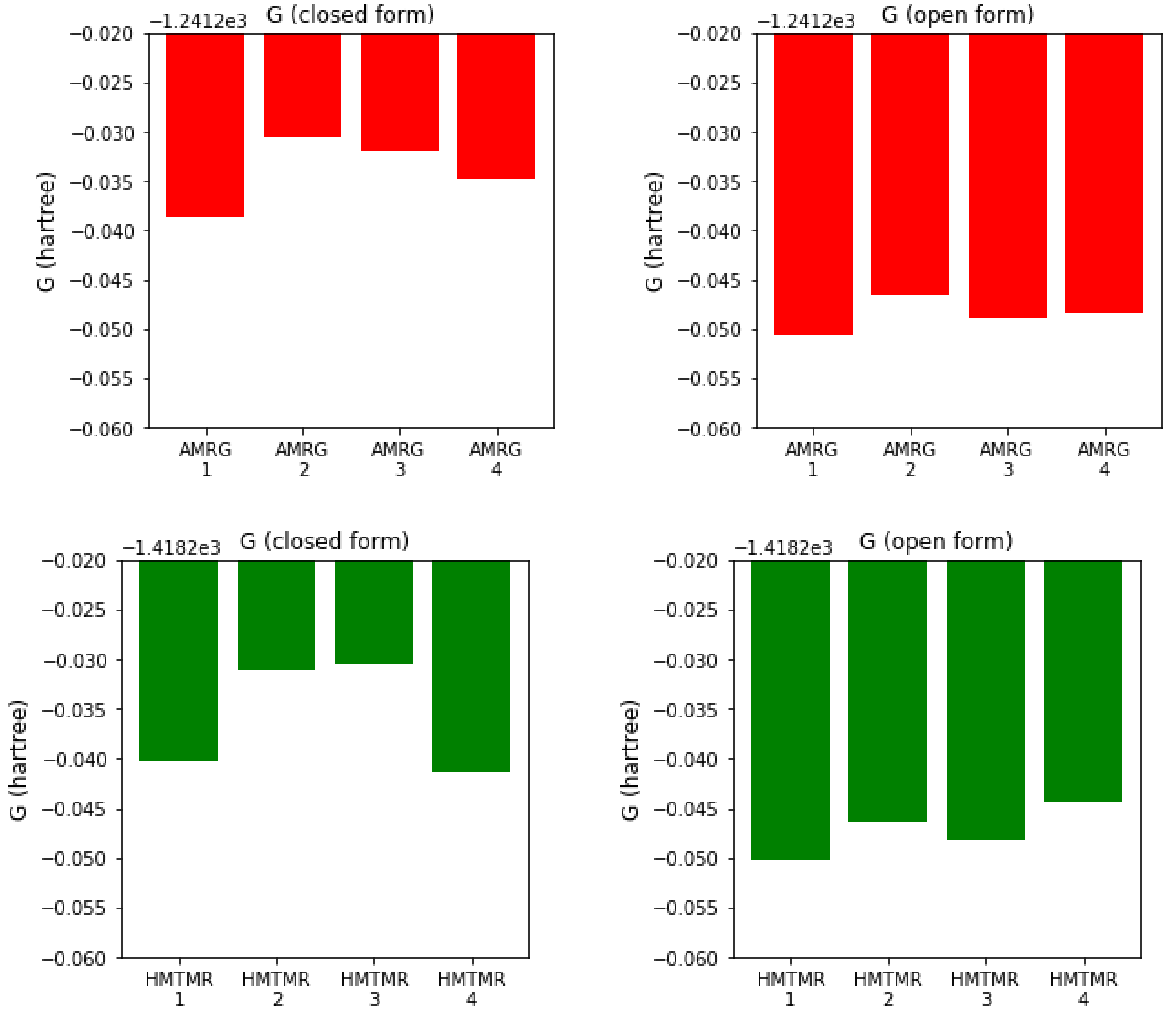


Figure 2- 11　Caclulation of G (with 3 molecule of 1st shell water).

2分子での場合とは異なり、closed form, open form ともに1番(架橋構造)が最安定となる傾向が伺えた。これは、水分子をもう一つ加えたことで HM 基とアミノ基の間をつなぐための長さとして十分となり、架橋構造においてもひずみのかからない自然な状態を計算できたためと考えられる。スピロ環へテロ原子との間の水素結合による安定化が、この部分の固定によるエントロピー減少による不安定化よりも大きいと言える。

念のため、1番と4番の構造を用いてそれぞれ $\mathrm{p}K_{\mathrm{cycl}}$ 計算を行った。

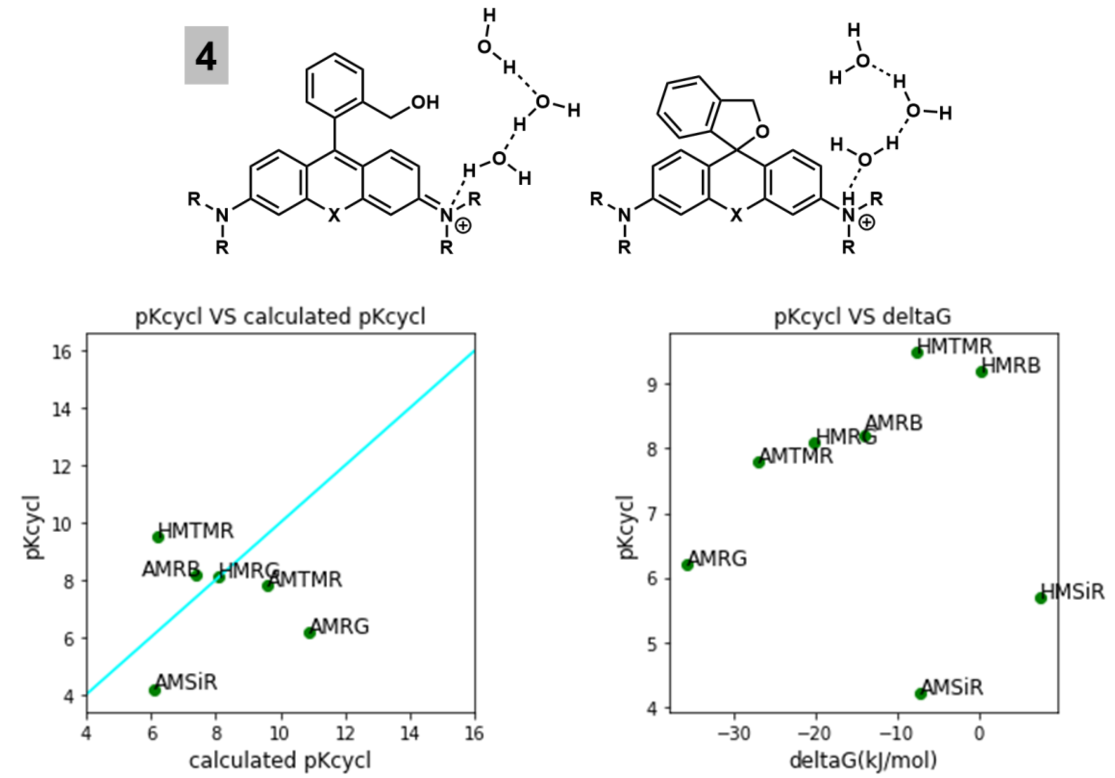


Figure 2- 12 Caclulation of ΔG and pK_{cycl} (with 3 molecule of 1st shell water to amino group).

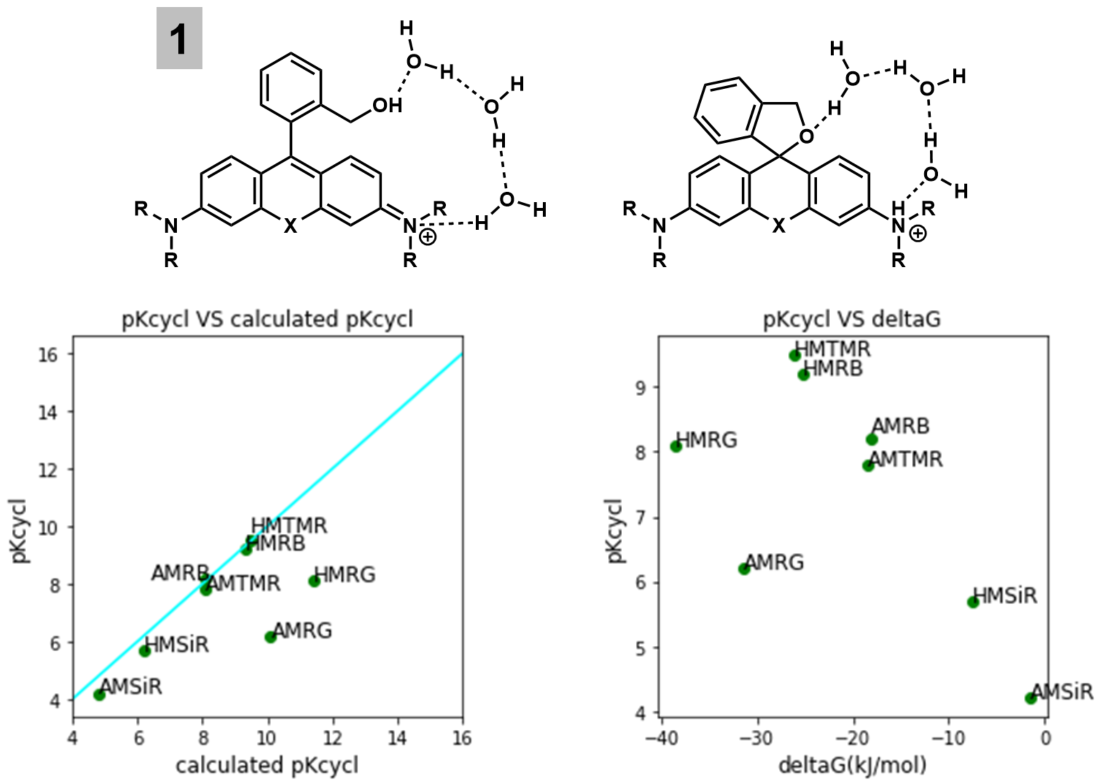


Figure 2- 13 Caclulation of ΔG and pK_{cycl} (with 3 molecule of 1st shell water to amino group, bridge).

アミノ基から単純に水分子を連結させる場合、架橋を担う水分子が2分子から3分子に増えることで（2分子構造1→3分子構造4）計算結果はほとんど変化しなかった。これ対して、水分子をアミノ基とスピロ環の間に架橋させた場合、水分子が2分子から3分子に増えることで計算結果が大きく向上した。pK_{cycl} の計算結果についても、AMRG, HMRG を除いて実験値をよく再現するまでになった。HMR 類の分子内スピロ環化反応が架橋の両端となる二つの原子間のプロトン移動を伴うことを考えるとこの結果は合理的であり、水分子を通じたプロトン移動がHMR 類の分子内スピロ環化反応に重要な役割を果たすと予想できる。

架橋を担う水分子を増やしたことで計算結果が良くなったことを考え、さらに水分子を一つ追加し4分子で架橋した構造を用いて同様の検討を行い、AMRG, HMRG においても計算結果が向上するか検討した。

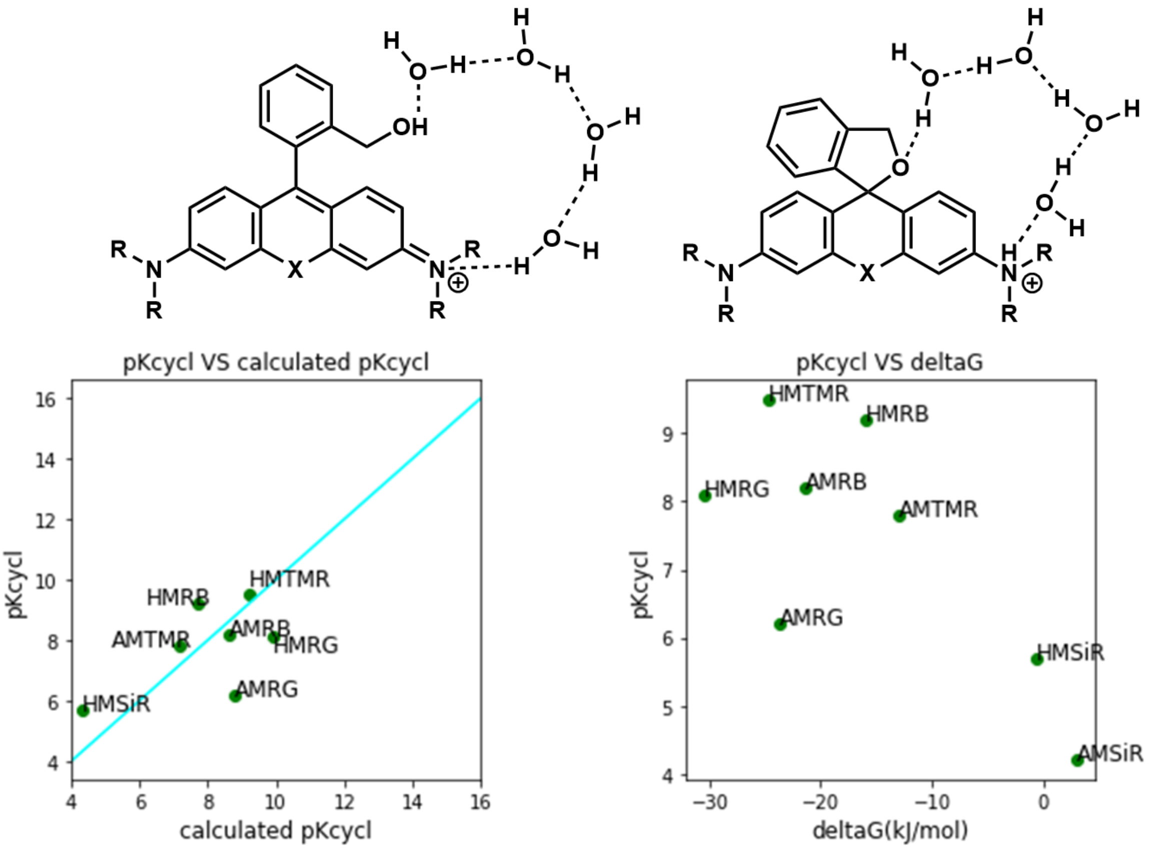


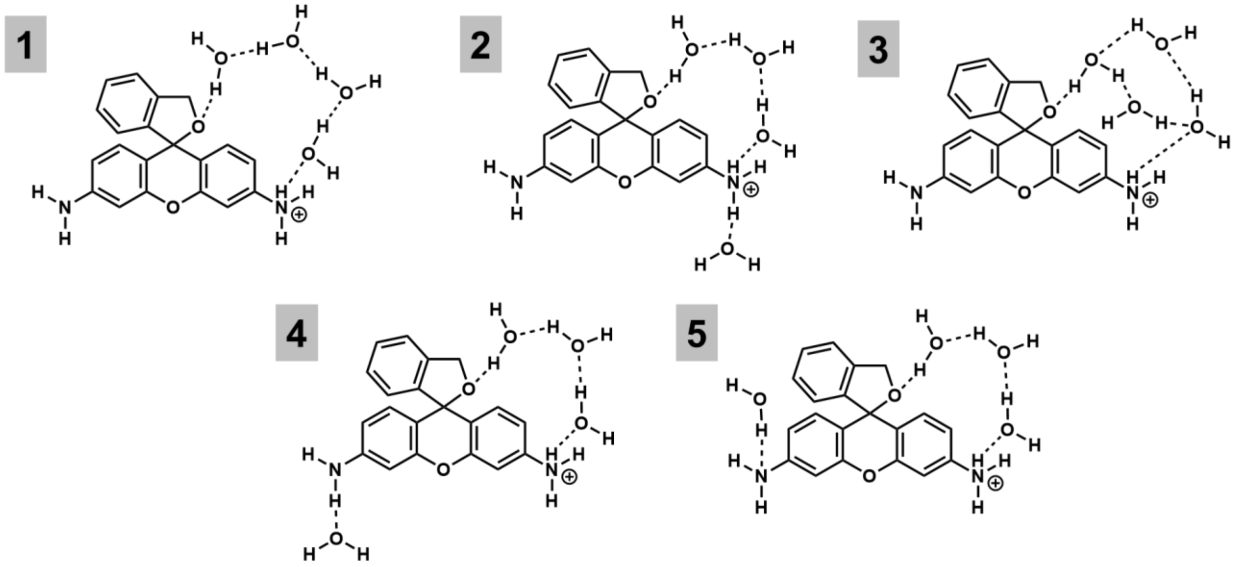
Figure 2- 14 Caclulation of ΔG and pK_{cycl} (with 4 molecule of 1st shell water to amino group, bridge).

架橋を担う水分子が3分子から4分子に増えることでは HMRG,AMRG の計算結果の向上は1程度にとどまった。また、他の誘導体においては3分子の場合よりも結果が悪化するものが見られた。これは、3分子の架橋がキサンテン環アミノ基とHM 基のヘテロ原子を結ぶ架橋として最も適切な長さであることを示唆する。実際、4分子を用いた架橋では両原子の間をかなり遠回りにつなぐような構造となってしまい、計算自体の収束性も悪化する。

架橋の長さに応じてエネルギー計算に取り込まれる効果については後の章でも解析を行う。

Rhodamine green 類の取り扱い

ここまでの検討で、AMRG, HMRG を除いては実測値を再現可能なエネルギー計算を行うことができた。架橋に含まれる水分子を増やすことではこれ以上の改善が見込めないため、これら RG 類に関しては架橋の他にもさらに重要な第一水和が存在すると予想した。そこで架橋以外の部位に水分子を配置し、自由エネルギーが大きく変動するものを探索した。



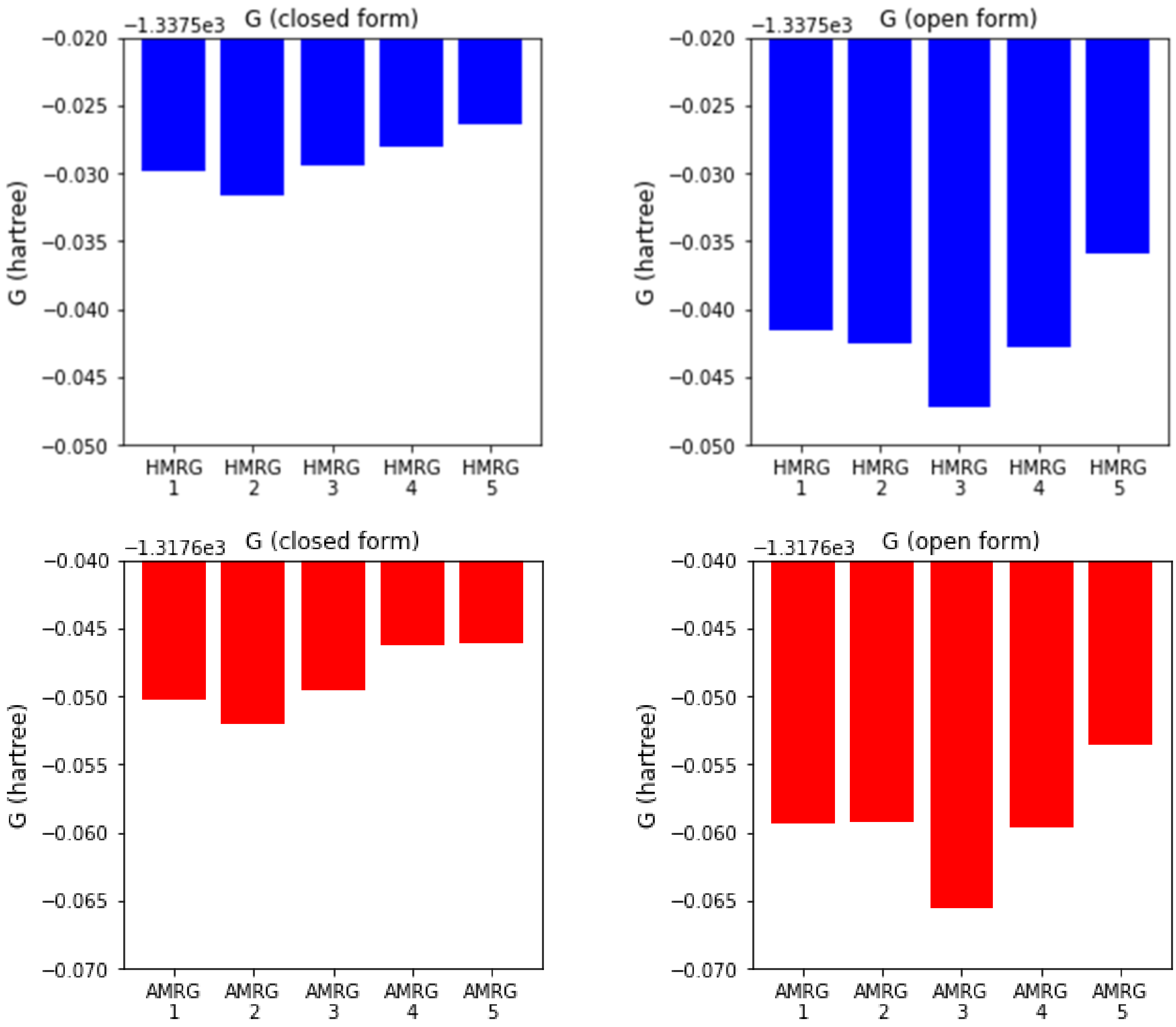


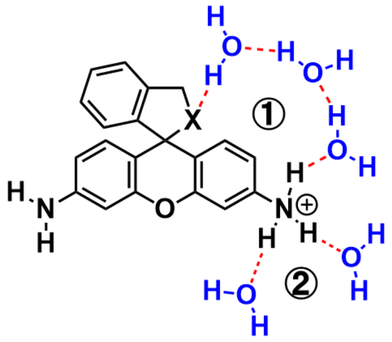
Figure 2- 15　Caclulation of G (with 4 molecule of 1st shell water).

結果、closed form ではアミノ基のプロトンに対して水分子の酸素原子の電子対をあてがう状態が架橋長を伸ばすよりもより低いエネルギー計算結果となることが分かった。このことからキサンテン環アミノ基にプロトンが存在する誘導体では、closed form においてカチオンの存在するアミノ基に対してさらなる水和による安定化が起こることが予想される。これに対して open form ではカチオンが分散しているため単純に水素結合の本数が一つ多い3番がより安定となる。アミノ基のカチオンがさらに安定化されていることに関しては、カチオンの無いアミノ基への水素結合(4, 5)ではエネルギーの安定化がなされないことからも言える。

ここまでで検討した化合物のうち、3分子架橋のみですでに良い計算結果となっている誘導体に関しては、この効果が加わる余地がない（アミノ基にプロトンが存在しない）ため、この部分の関与は非常に合理的であると言える。この水分子を含めて再度計算を行った結果、以下のように計算値は実測値をよく再現した。

Table 2- 1 Caclulation of pK_{cycl} (with 3 molecule of 1st shell water bridge and additional water molecules)

	X	pK_{cycl} 実測値	pK_{cycl} 計算値 水和 ①	pK_{cycl} 計算値 水和 ①②
HMRG	O	8.1	11.3	7.9
AMRG	NH	6.2	10.1	6.2



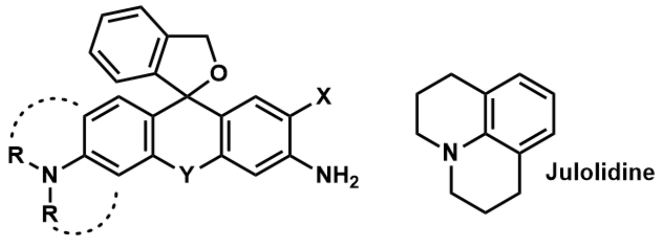
非対称 rhodamine 類の取り扱い

上記の計算モデルでは HMR 類が左右対称であると暗に仮定し、3分子架橋自体が2種類存在する場合のことは考慮していない。したがって非対称 HMR 類の場合、片方の構造のみしか考慮しないことによって計算精度が低下することが懸念された。これに関して、実際に測定精度が下がるのかを検証した。アミノ基の片方が NH_2, もう一方が NR_2 となっている種々の非対称 rhodamine の pK_{cycl} 実測値 [19,20] に対して、NR_2 から架橋を伸ばした計算値（C3pK_{cycl}）、NH_2 から架橋を伸ばしアミノ基（NH_2）に2つの水分子を追加した計算値（C5pK_{cycl}）を比較した。

結果、アミノ基がアルキル化されている側で計算を行えば従来の方法そのままでも±0.5 程度の精度を維持できることが明らかになった（Table 2-2）。またキサンテン環にハロゲンが置換する誘導体に関しても計算が通用し

そうだということも分かった。NH_2 側よりも NR_2 側の方がアルキル基の電子供与によって塩基性が高くなりプロトンを引き付けやすいと考えられる。

Table 2- 2　Calculated pK_{cycl} values of asymmetric HMR derivatives



	X	Y	R	pK_{cycl}	$C3pK_{cycl}$ (error)	$C5pK_{cycl}$ (error)
HMDiMeR	H	O	Me	8.9	9.2 (0.3)	7.9 (1.0)
HMDiEtR	H	O	Et	9.3	8.8 (0.5)	7.9 (1.4)
HMJR	H	O	Julolidine	10.3	10.7 (0.4)	9.8 (0.5)
HMDiMeFR	F	O	Me	8.2	8.3 (0.1)	7.5 (0.7)
HMDiMeCR	Cl	O	Me	7.7	7.3 (0.4)	5.9 (1.8)
HMJFR	F	O	Julolidine	9.8	9.8 (0.0)	8.5 (1.3)
HMJCR	Cl	O	Julolidine	9.1	8.7 (0.4)	8.4 (0.7)
HMSiR620h	H	$SiMe_2$	Me	5.0	4.8 (0.2)	< 4 (>1.0)
HMJSiR	H	$SiMe_2$	Julolidine	6.6	7.1 (0.4)	not obtained

実際に、水分子を 3 分子架橋のみにそろえて（原子数を合わせて）自由エネルギーを比較したところ、下のような結果を得た。

Table 2- 3　Free energy values of asymmetric HMR derivatives with 3 first-shell water molecules.

closed form	close-1 (NR_2, a.u.)	close-1 (NH_2, a.u.)	ΔG (NR_2-NH_2, kJ/mol)
HMDiMeR	-1339.681046	-1339.679229	-4.77
HMDiEtR	-1418.258229	-1418.256083	-5.63
HMJR	-1494.471946	-1494.469060	-7.58

open form	open-1 (NR_2, a.u.)	open-1 (NH_2, a.u.)	ΔG (NR_2-NH_2, kJ/mol)
HMDiMeR	-1339.690500	-1339.693448	7.61
HMDiEtR	-1418.266813	-1418.270807	10.49
HMJR	-1494.484.620	-1494.486929	6.06

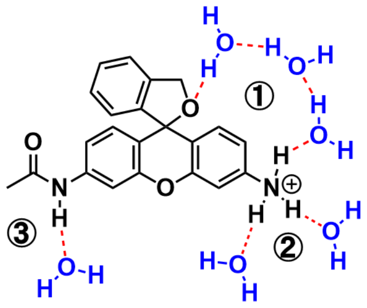
closed form では塩基性の強い NR_2 側の方が安定となり、open form では立体障害の小さい NH_2 側の方が安定となると考えられる。この結果から、HMR 類が非対称構造であったとしても塩基性の強いアミノ基からの架橋が優勢となるため、分子内平衡の予測としては片側の経路のみの評価だけで十分な精度が出せると結論できる。

Ac 基の取り扱い

非対称な誘導体でも計算が可能だということが分かったため、peptidase プローブなどに見られる Ac 化 HMR 類への適用を試みた。これらの誘導体では、プロトン化されていない方のアミノ基についても Ac 基の電子求引性により lone pair が大きく影響される。この影響を和らげるように、Ac 化されているアミノ基の N-H 結合を安定化する第一水和をもう一つ追加することで計算値が実測値 [3] に大きく近づくことが確かめられた。

Table 2- 4　Caclulation of pK_{cycl} (HMAcRG) with additional water molecules

	pK_{cycl} 実測値	pK_{cycl} 計算値 水和 ①	水和 ①②	水和 ①②③
HMAcRG	5.3	6.4	N/A	5.8



ただし、Ac 化 HMR 類の実測データがほとんど存在しないこともあり、この方法で十分かどうかはさらに検討が必要である。

ここまでの検討をまとめると、計算に際した第一水和の置き方は以下のようにまとめられる。

① キサンテン環アミノ基と HM 基へテロ原子を架橋する3分子の水分子を置く。非対称の場合、塩基性が強い(アルキル化されている)方を選ぶ。

② 架橋を置いたキサンテン環アミノ基に直接結合する H 原子がある場合、それらに対して水分子を配置する。

③ 架橋を置いていないキサンテン環アミノ基に電子求引基が結合しており、さらに直接結合する H 原子がある場合、それに対して水分子を配置する。

今後さらに多様な誘導体を開発するにあたって、これらの水和効果だけでは不十分なものが出てくることも考えられるが、ここまで見てきたように「電荷の偏りが大きい部分に水分子を配置する」という原則に従えば適切な条件を定めることができると考えられる。

解析プログラムを用いた発展的水和解析

これまで実験値を再現する自由エネルギー差を求めるために、溶媒としての水分子が色素分子に水素結合を起こすことによる効果を考えてきた。その中で水3分子が架橋を形成する状態が再安定であり最重要であると結論付けた。しかしながら、そこに至るまでに計算した水和状態はごく少数であり、水分子の置き方の恣意性（架橋に指向しすぎていないか）が排除できない。例えば水3分子での検討では、「3分子架橋」か「2分子架橋＋1分子」の組み合わせのみで比べている。

そこで、全くバイアスをかけずに水素結合ドナー・アクセプターにランダムに水分子を配置して大量の局所安定構造を計算し、3分子架橋よりも closed form に対する安定化効果が大きいものが見つかるか探索した。これを手で行うことは非常に手間がかかり恣意性も生まれるため、python プログラムを設計し以下の全ての過程を自動で行わせることにした。

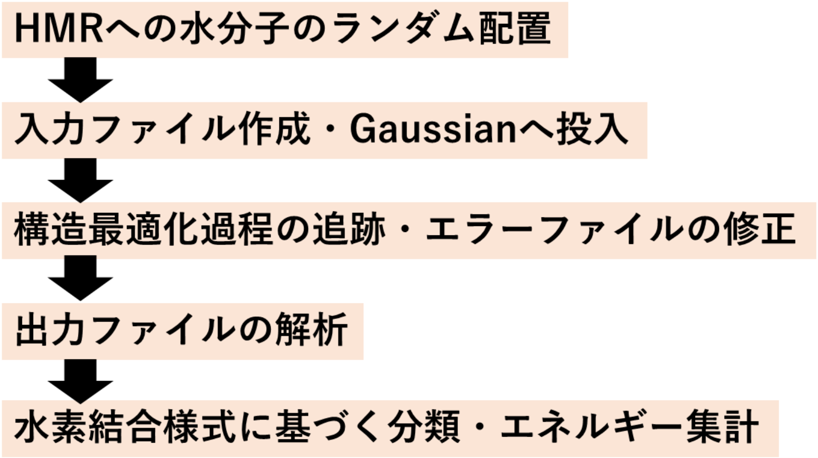
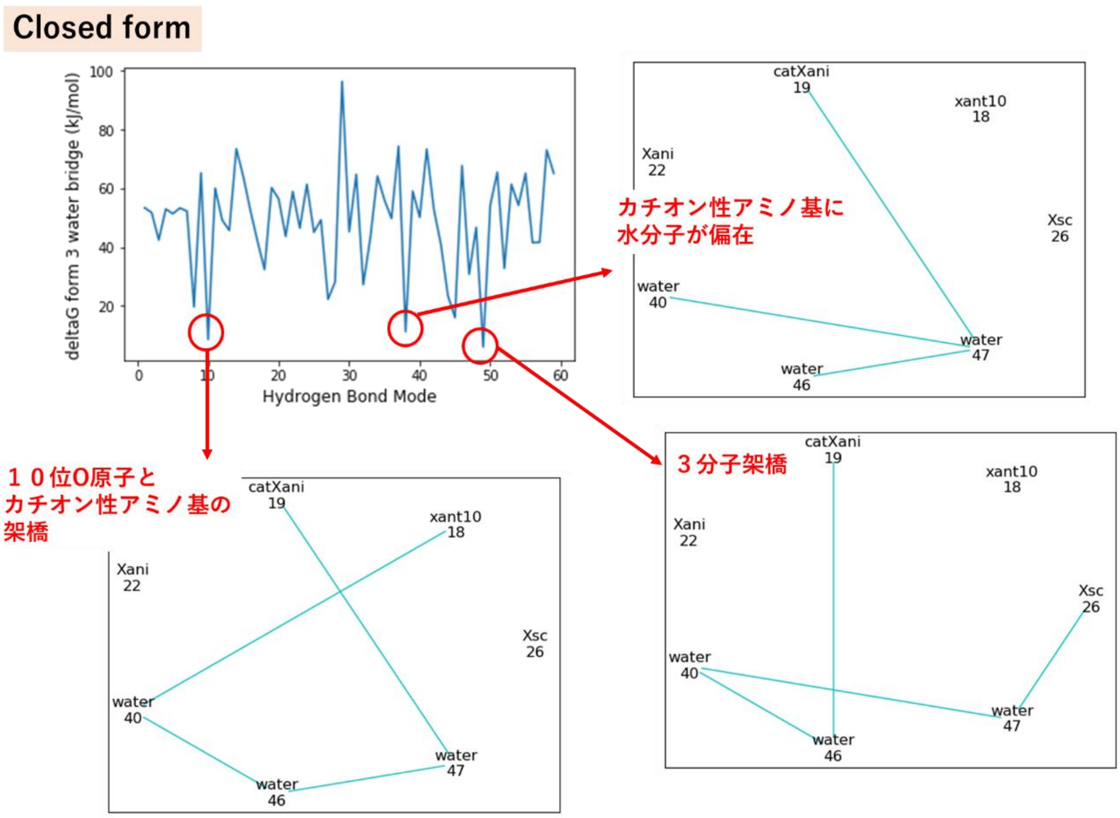


Figure 2- 16　Automated process in the Gaussian-assisting program (hydrogen bond search).

水分子のランダム配置に関しては、誘導体中に存在する水素結合可能なヘテロ原子（水分子も含む）からランダムに一つ選び出し、そこに対する水素結合が起こる位置・配向という拘束条件の下で無作為に水分子の座標を設定した。また水素結合様式の分類としては、ヘテロ原子同士が 3.4Å以内に位置している部分に水素結合があると設定し、ヘテロ原子をノードとしたグラフによって分類することとした。新しい水素結合様式が見つかりにくくなるまでプログラムを流し、HMRG の closed form について 200 種、open form について 100 種（ヘテロ原子の繋がり方で分類すると 50 通り程度）の局所安定構造を取得した。

以下に、全体の傾向と、比較的安定だった水素結合様式を示す。



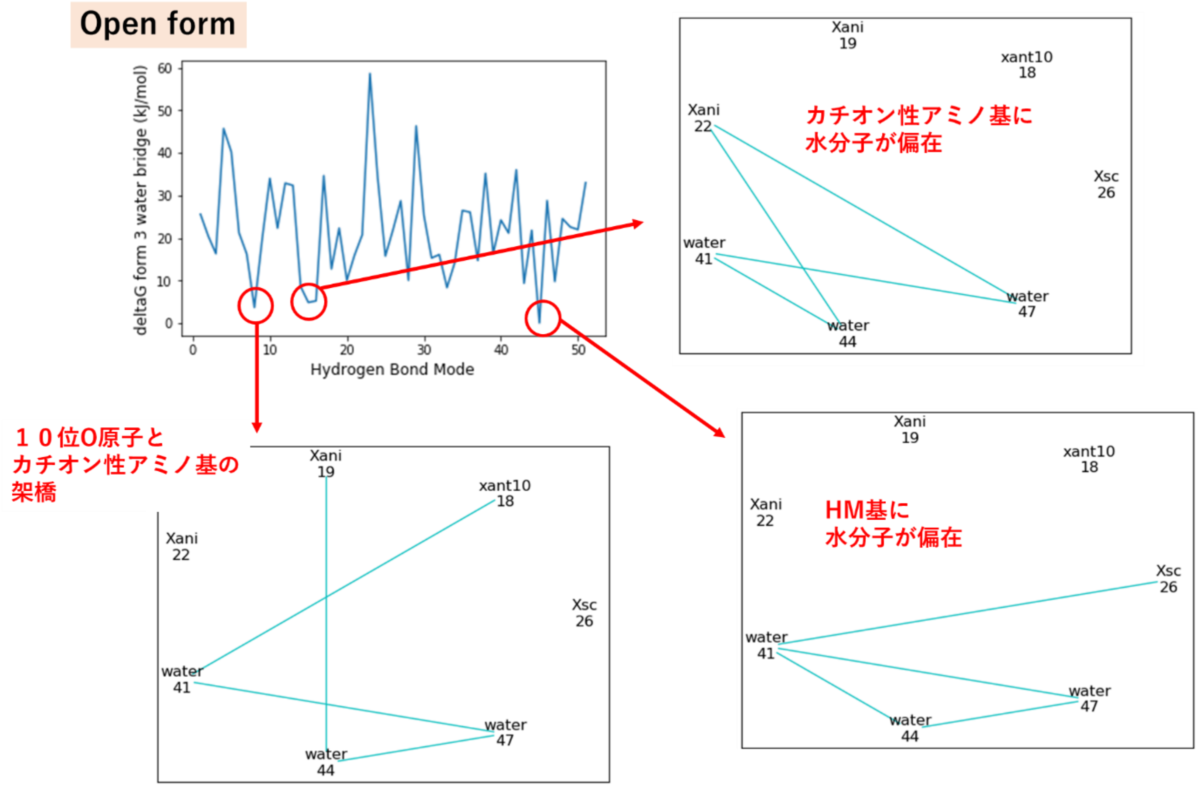


Figure 2- 17　The result of automated hydrogen bond search algorithm.

※水素結合している原子同士が水色の線で繋がれている

【Xsc】HM 基のヘテロ原子 【catXani】プロトンを有し一価の陽イオンであるアニリン性アミノ基

【Xani】アニリン性アミノ基 【Xant10】 キサンテン環 10 位ヘテロ原子

Closed form においては、この探索プログラムにおいても三分子架橋が最も安定な構造として見つかってきた。ほかに安定だったものとしては、10 位の O 原子と架橋が起こるものや、カチオンの乗っているアミノ基を囲むように水が来るものが見つかった。色素として HMRG を用いたため、これらの構造が比較的安定になるのは合理的である。Open form においては、試行回数が足りないためか三分子架橋は見つかってこなかったが、再安定な local minimum として水分子が HM 基を取り囲むものが再安定なものとして取れてきた。次いで安定だったもの

は、closed formと同系のものであり、水和の安定化効果に両formの整合性が伺える。

Closed form, open formともに、取得した局所安定構造の中でこれまで議論に用いてきたものよりも安定なものは存在しなかった。プログラムの後半は新しい水素結合様式がほとんど見つからなくなっていったことから、溶媒中の自然な水分子の取りうる水和構造のサンプリングとして十分な量を捕らえられたと考えている（今までに見つかっていない水素結合様式を優先的にサーチする仕様にプログラムを変更することも可能である）。この結果から、カチオンの局在を安定化するというこれまでの推論を経ない場合でも、三分子架橋が重要な意味を持つ水和状態であると言う結論に帰着したと予想される。

第三節　pK_{cycl} 計算モデルの評価

計算精度の限界について

次に、計算モデルの精度の面から適用範囲について考察を行った。計算した平衡定数の log スケールを用いる本計算式では、高 pK_{cycl} 域に比べ要求される K_{cto+}の精度が高くなる。また、ΔG が小さくなるため、エネルギー計算における要求精度も高くなる。このような理由から、低 pK_{cycl} 域では予測精度が低下する。

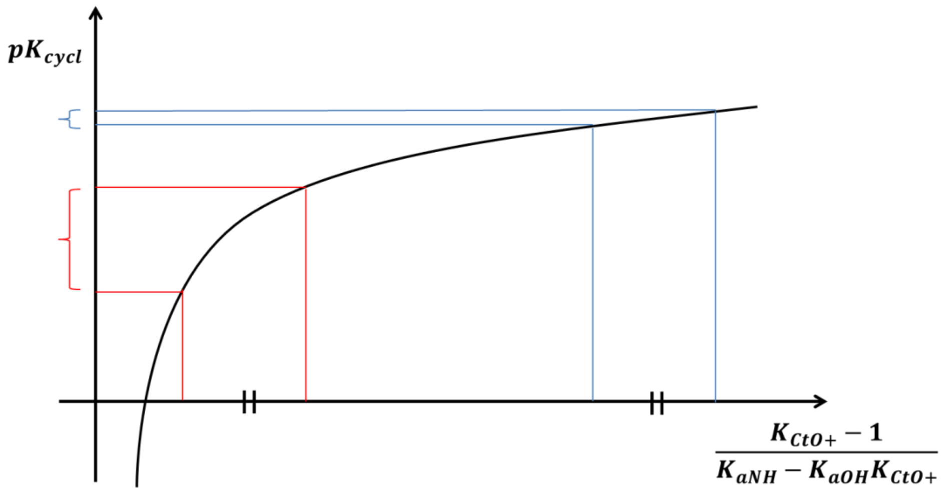


Figure 2- 18　Schematic diagram of correlation between pK_{cycl} and calcrated parameter.

この問題点についてさらに具体的に考察すべく、計算式を K_{CtO+}について解くことで計算式から各 pK_{cycl} の値が導出されるためには計算の output データ上でどのような結果となればよいのかを逆算した。

Table 2- 5　Correlation between pK_{cycl} and calcrated parameter

$$K_{CtO+} = \frac{10^{pKcycl} K_{aNH} + 1}{10^{pKcycl} K_{aOH} + 1}$$

pK_{cycl}	K_{CtO+}	ΔG (a.u.)
2	1.001258925	0.0000011932
3	1.012589254	0.000011865
4	1.125892541	0.000112
5	2.258925411	0.000772
6	13.58925406	0.002474
7	126.8925361	0.004593
8	1259.92491	0.006770
9	12590.204	0.008953
10	125888.5295	0.011137
11	1258425.424	0.013320

ここで、ΔG は close-1 と open-1 の自由エネルギー差を表す。一般的に、原子単位（a.u.）ではエネルギーは

小数点第1～2位――原子核による寄与（回転・振動）

3～4位――電子による寄与（電子配置等）

5位以下――化学的な効果に帰結できない SCF 計算における収束結果のぶれ等

というようにスケールが定まっている[21]。上の表も併せて考えると、本計算式を用いて正しく予測できる pK_{cycl} は最小で 4 程度と考えられる。このため、計算値が 4 を下回る場合や K_{cto+}が 1 を下回り計算値が算出されない場合（closed form と open form の自由エネルギーにおいて前者の方が小さくなる場合であり、closed form の方が安定であることを意味する）には、計算結果としては pK_{cycl} < 4 と表記することにする。

量子化学特徴量抽出プログラムを用いた詳細な考察

ここまでの推論で「closed form のカチオンの局在を緩和する溶媒効果を計算上で考慮することで正確なエネルギー差が求められる」という予想を元に三分子架橋という水和様式に行き着いたが、実際にこの三分子架橋を配置して計算を行うことで、第一水和を含めない場合の計算からどのような効果が計算上で新たに考慮され、自由エネルギー差が実験値に近づいたのかをさらに踏み込んで調べることを考えた。また、HMR 類の種々の誘導体化によって、open form, closed form のエネルギー差のどのような箇所に変化が現れ pK_{cycl} の変化につながったのかを確かめることができれば有用であると考えた。これを行うために、これまでの自由エネルギーを用いた議論をさらに細分化して考えることとした。

自由エネルギーは実際の系での平衡を直接的に反映する物理量であるため、他の物理量と比べて実験値との乖離が少なく、実験化学的な議論にも比較的理解の容易な範囲で応用ができる。

しかしながら、その利便性の代償として、自由エネルギーのみを用いた議論には限界も存在する。まず、計算にかかる誤差のリスク（Figure 2-19 ①）が挙げられる。量子化学計算では、コンピュータの性能の限界から現実の分子軌道を完全に再現することはできない。また数値計算の都合上、非線形成分を計算に取り込むことも難しい。したがって、何かしらの物理計算が行われた場合、そこには必ず実験値を説明できなくなる誤差が発生するリスクが伴う。特に自由エネルギーは下に示すように様々な効果がより合わさって算出される [22]。この過程のどこか一カ所で、全体の計算を埋め尽くすような誤差が出てしまうと計算結果は意味をなさなくなる。

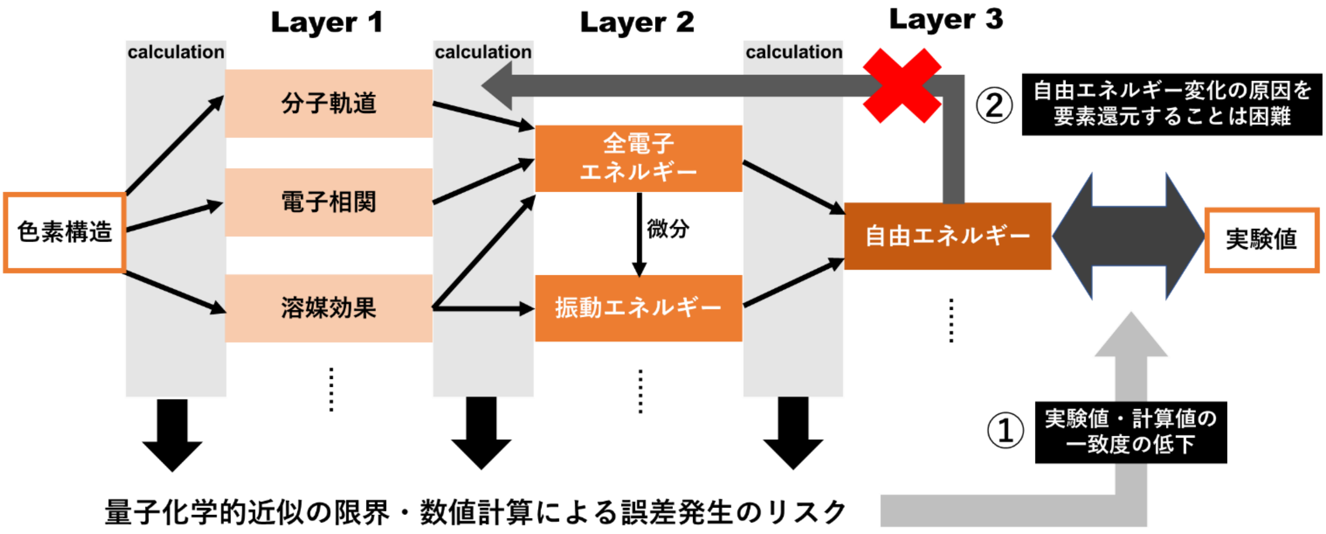


Figure 2- 19　Pitfalls of free energy calculation.

また、自由エネルギーを用いた議論をさらに詳細な物理化学的効果に要素還元することも難しい（Figure 2-19 ②）。自由エネルギーという形で各要素を単純な和にしてしまうと、そこでいくらかの情報を失っていることになる。誘導体化を行ったことで実際にどのような化学的変化があり最終的に分子内平衡が変化するに至ったかを自由エネルギーの値からさかのぼることはできない。

そこで、自由エネルギーという高次の物理量が計算される過程で一緒に計算されている低次な物理量を量子化学的な特徴量と捉え、自由エネルギーと合わせて評価に用いることで、上記の問題点を克服したより詳細な物理化学的議論を実験化学に持ち込めるのではないかと考えた。

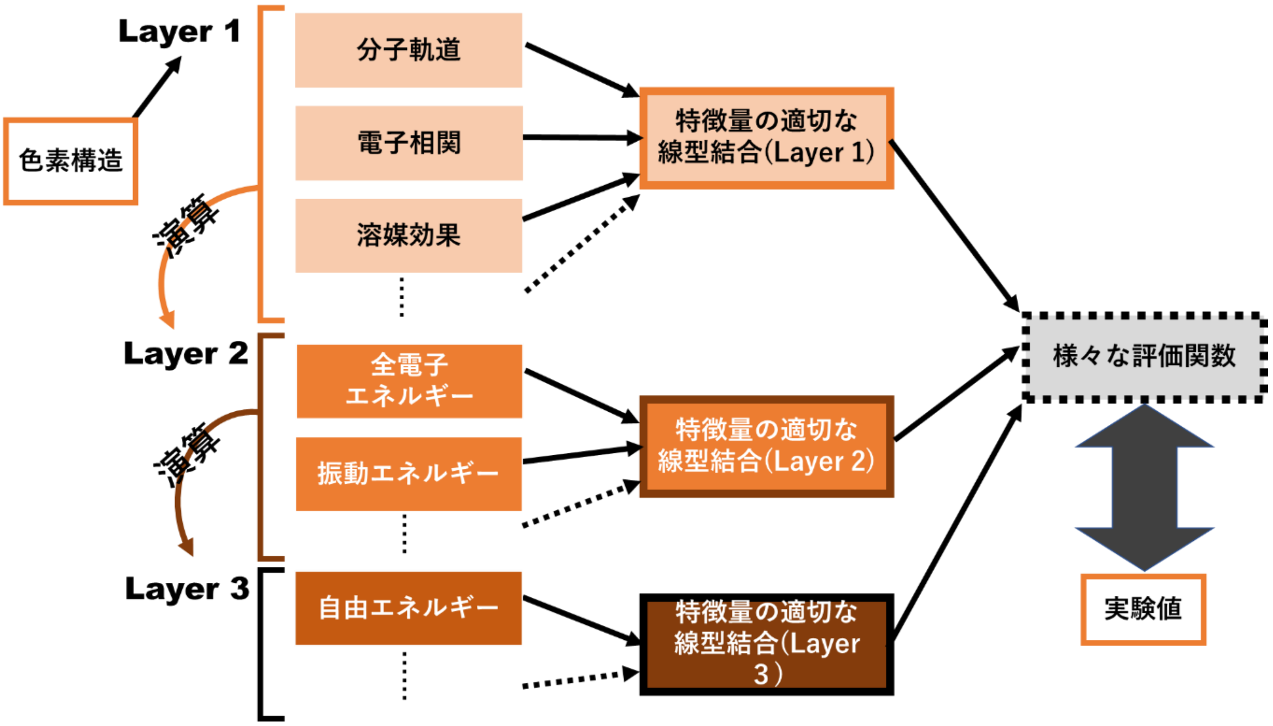


Figure 2- 20　Evaluation of all calculated parameters can be successful for finding hidden correlation between experimental and theoretical data.

簡単のため、ここではこれまで用いてきた自由エネルギー(Figure 2-20, layer 3)を電子エネルギーと振動・回転・並進エネルギー(Figure 2-20, layer 2)に分解して考えることとした。具体的な説明に移る。量子化学計算での自由エネルギーは、以下のような要素で計算されている[22]。

$$G = H - TS = E + PV - TS$$

E:内部エネルギー　H:エンタルピー　S:エントロピー
P:圧力　V:体積　T:温度

定温定圧条件では　PV=一定　のため、open-closeのΔGをとると

$$\Delta G = \Delta E - T\Delta S$$

$$= \Delta E_{el} + \Delta E_{vib} + \Delta E_{rot} + \Delta E_{trans}$$

$$-T(\Delta S_{el} + \Delta S_{vib} + \Delta S_{rot} + \Delta S_{trans})$$

$$\sim \Delta E_{el} + \Delta E_{vib} - T(\Delta S_{el} + \Delta S_{vib})$$

el: 電子の寄与　vib: 分子内振動の寄与
rot: 分子回転の寄与　trans: 並進運動の寄与

Figure 2- 21　Calculation process of free energy in quantum chemistry.

回転(rot)と並進(trans)による寄与は open form, closed form ではほぼ変化がないため、実効的なΔG は内部エネルギーとエントロピーに対する各分子軌道および各分子振動の寄与の合算で成り立っていると言える。open / close 平衡の自由エネルギー差が要素分解できた場合、pK_{cycl}が小さすぎない条件ではそれぞれの要素による pK_{cycl}への寄与分を以下のようにして求めることができる。

$$pK_{cycl} = \log\frac{K_A - 1}{K_{aNH} - K_{aOH}K_A} \sim \log\frac{K_A}{K_{aNH}}$$

pK_{cycl} > 6 のとき　$K_A - 1 \sim K_A$

2 < pK_{cycl} < 12 で常に
$K_{aNH} - K_{aOH}K_A \sim K_{aNH}$

$$\log\frac{K_A}{K_{aNH}} = pK_{aNH} + \log K_A$$

$$= pK_{aNH} + \log(\exp\left(-\frac{\sum_n \Delta G_n}{RT}\right))$$

$$= pK_{aNH} + \sum_n \frac{1}{ln10}\left(-\frac{\Delta G_n}{RT}\right)$$

$$\Delta pK_{cycl} \sim \frac{1}{ln10}\left(-\frac{\Delta G_n}{RT}\right)$$

Figure 2- 22　Approximation of formula for pK_{cycl}.

ここから、例えば HM 基のヘテロ原子が関与する軌道・振動の寄与のみを取り出して比べることができれば、HM 基のヘテロ原子が open / close 平衡にどれほどの影響力を持っているか等が分かると期待されるし、特定の位置を変化させた様々な誘導体で寄与率の変化の推移をみれば、その位置の誘導体化が open / close 平衡にとってどの程度意味のあるものかを見積もることができると考えられる。

【エントロピーの寄与についての検討】

自由エネルギーの寄与はまず大きく分けてエンタルピー由来の成分（H）とエントロピー由来の成分（-TS）に分けられる。仮に自由エネルギーG の代わりにエンタルピーH を公式に代入し、計算結果があまり変わらないのであれば、その化合物の分子内平衡にエントロピーはあまり重要でないということになる。水和解析に用いた8つの誘導体を用いて実際に比較すると、以下のようになった。

Table 2- 6　Measured and calculated pK_{cycl} values with G or H

	pK_{cycl}実測値	pK_{cycl}計算値 G	pK_{cycl}計算値 H	Δ pK_{cycl} H	Δ pK_{cycl} -TS
AMSiR	4.2	4.8	＜4	-3.5	3.8
HMSiR	5.7	6.2	＜4	-0.9	2.2
AMRG	6.2	6.2	＜4	-2.0	3.6
AMTMR	7.8	8.1	5.0	0.4	2.9
HMRG	8.1	7.9	5.5	0.9	2.4
AMRB	8.2	8.1	4.3	0.1	3.1
HMRB	9.2	9.3	8.0	3.1	1.3
HMTMR	9.5	9.5	7.9	3.0	1.5

どの化合物もエントロピー変化の無視によって pK_{cycl} が低く（close が有利に）見積もられた。つまり、一般的に open form の方がエントロピーの寄与によって安定化している成分が多いことを示している。これは、open form ではベンゼン環とキサンテン環の間が自由に回転できることもあり、振動数の小さい（＝ばね定数が小さい＝やわらかい）振動モードが多いことに起因すると考えられる。

エントロピーによる寄与も一緒に表に示した。この値は上記の式に従って計算しているため、一部の低 pK_{cycl} の誘導体では G による計算値と H による計算値の差とは一致しないことに注意されたい。この値を見ると、エントロピー項による寄与は誘導体によってまちまちであり、この寄与を含めなければ（H による計算では）誘導体間の

pK_{cycl}の大小関係すらも確実な予測ができないことが分かる。また AM 基を持つ化合物で特に絶対値が大きいことが興味深い。一般に OH→NH の変化で求核性が増加し pK_{cycl}が低下すると考察できるが、その効果はこのエントロピー項によって pK_{cycl}にして1程度中和されていると考えられる。

このエントロピーの効果をより詳しく解析するために、ΔpK_{cycl}をさらに化合物の部位に分解して計算を行った。第一水和を配置しない計算・3分子架橋を用いた計算・3分子架橋以外の水和を用いた計算(2分子構造5、3分子構造4)を用いて、第一水和の検討過程で特に計算による評価精度が改善された部位にあたりをつけることを試みた。具体的には、構造を以下のように区分し、各振動モードに対するエントロピー項(-TS)を各位置の寄与率で重みづけして合算しΔpK_{cycl}を算出した。

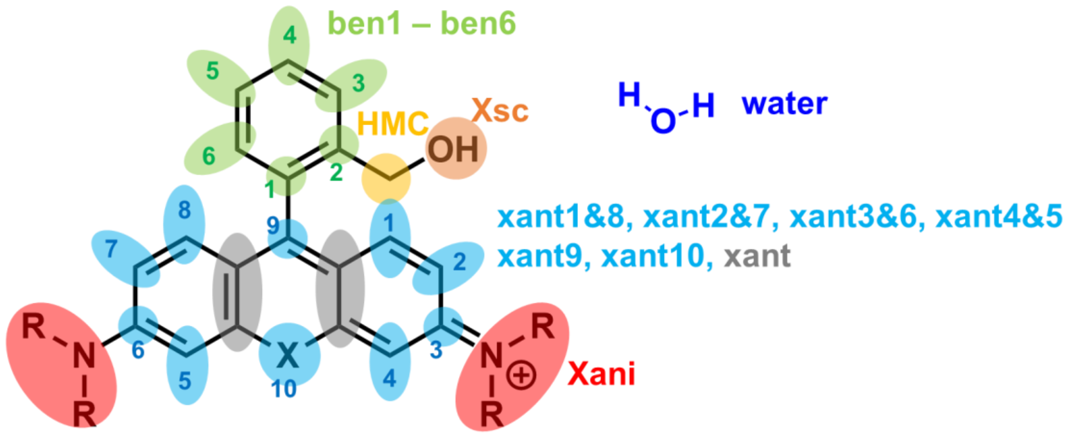
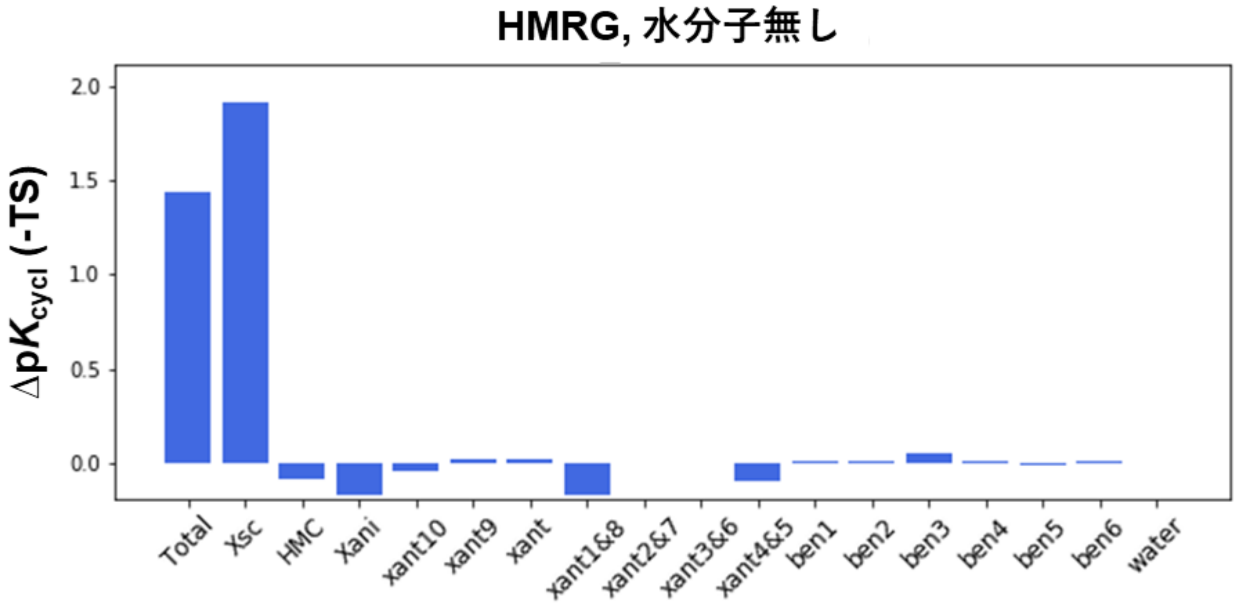
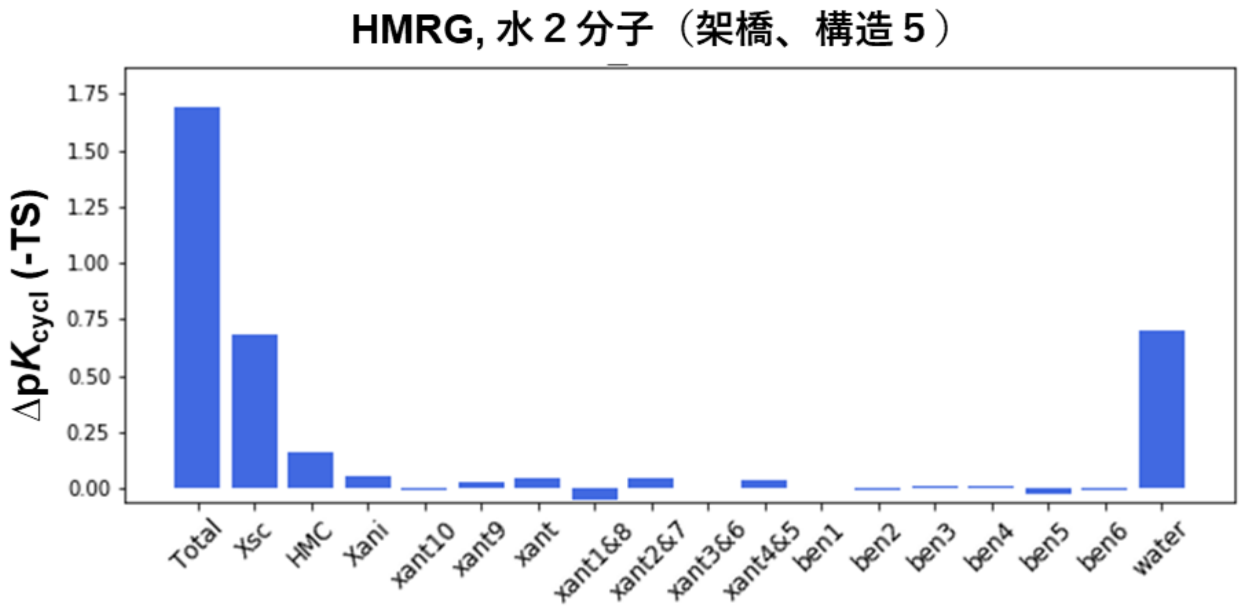
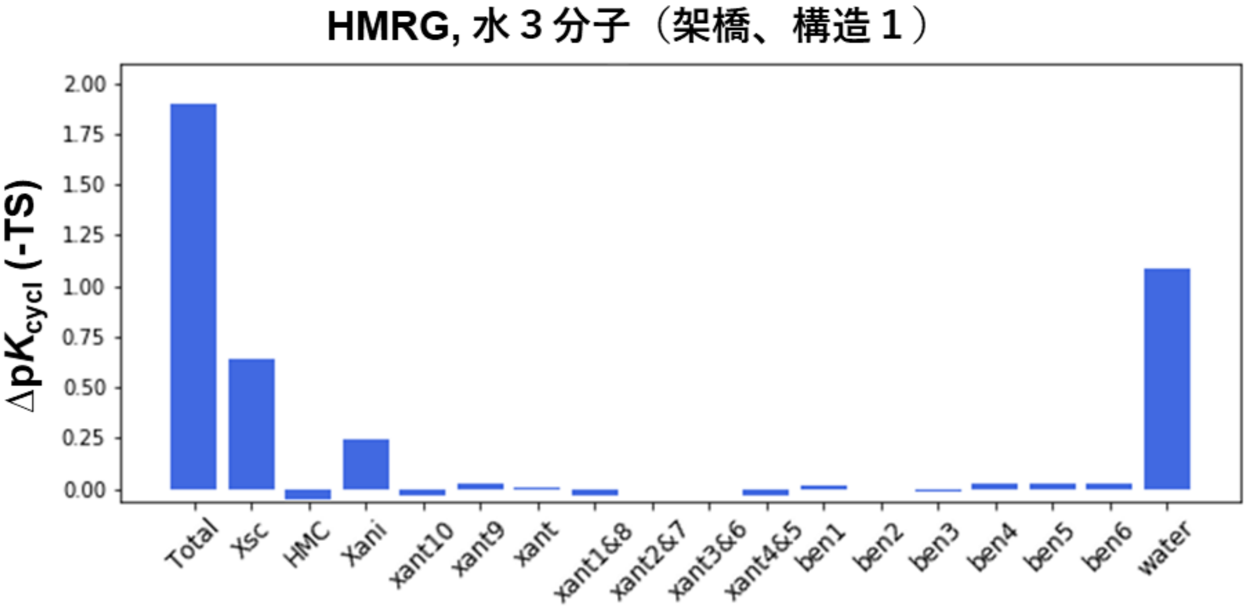
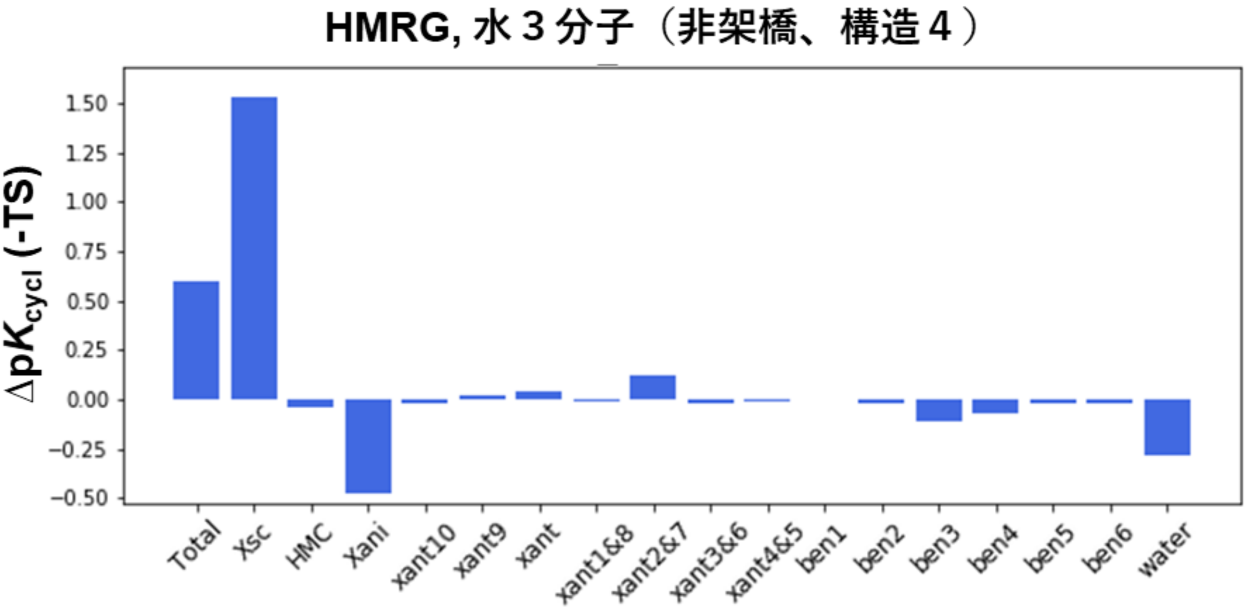


Figure 2- 23　Structure fragment for analysis of calculated parameters.


HMRG, 水分子無し
ΔpKcycl (-TS)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Total
Xsc
HMC
Xani
xant10
xant9
xant
xant1&8
xant2&7
xant3&6
xant4&5
ben1
ben2
ben3
ben4
ben5
ben6
water


HMRG, 水２分子（架橋、構造５）
ΔpKcycl (-TS)
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
Total
Xsc
HMC
Xani
xant10
xant9
xant
xant1&8
xant2&7
xant3&6
xant4&5
ben1
ben2
ben3
ben4
ben5
ben6
water


HMRG, 水３分子（架橋、構造１）
ΔpKcycl (-TS)
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
Total
Xsc
HMC
Xani
xant10
xant9
xant
xant1&8
xant2&7
xant3&6
xant4&5
ben1
ben2
ben3
ben4
ben5
ben6
water


HMRG, 水３分子（非架橋、構造４）
ΔpKcycl (-TS)
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
−0.25
−0.50
Total
Xsc
HMC
Xani
xant10
xant9
xant
xant1&8
xant2&7
xant3&6
xant4&5
ben1
ben2
ben3
ben4
ben5
ben6
water

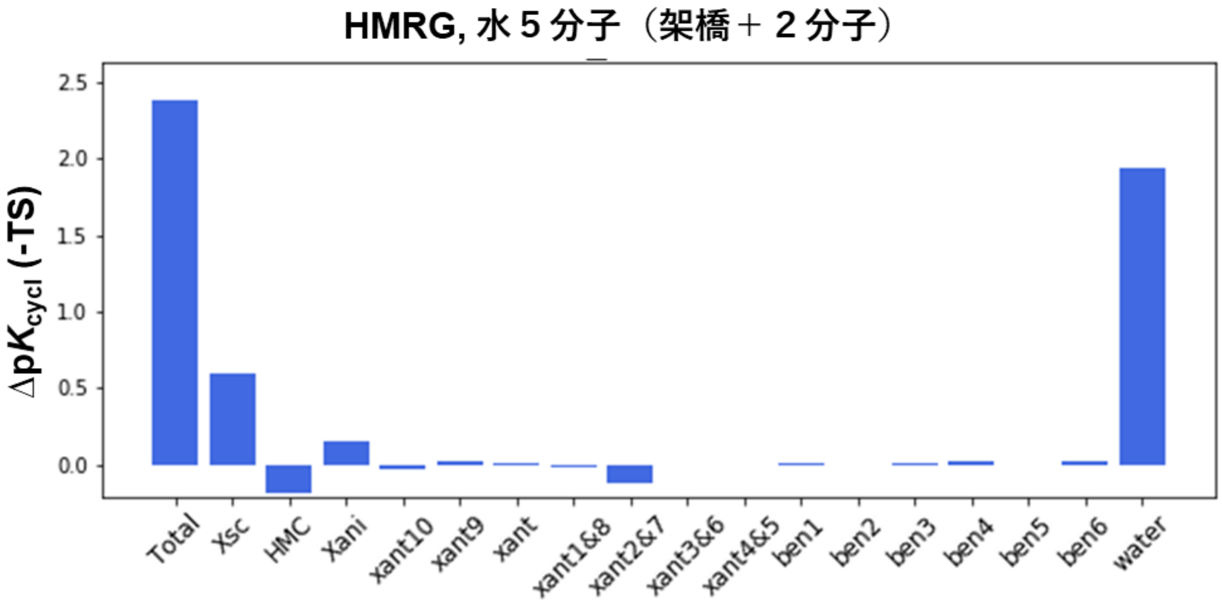


Figure 2- 24　Calculated pK_{cycl} contribution of each position.

3分子架橋を用いた計算・3分子架橋以外の水和を用いた計算（2分子構造5、3分子構造4）の比較から、主に Xsc（HM 基ヘテロ原子）と水分子自身の寄与が大きく変化している。

前者に関しては、スピロ環化によって移動するプロトンの open form / closed form それぞれの位置での振動状態を評価するために、HM 基ヘテロ原子とカチオン化アミノ基の両方に水分子を配位させる必要があるということを示している。つまり、架橋させない（HM 基ヘテロ原子）に水を置かない場合、open form においてこの部分の HM 基ヘテロ原子－プロトンの分子振動に水素結合の効果が乗らないため自由エネルギー差の算出が不公平になる。

後者に関しては、色素だけではなく水分子においても現実を反映するような状況下で配置しなくてはならないことが読み取れる。つまり、架橋させない場合、末端の水分子は隣の水分子にしか固定されていないため比較的自由に動ける状態であるが、現実の系では他の水分子からも水素結合による固定を受けているためエントロピー

を過大評価してしまう。

したがって、「架橋構造」が今回の計算法において功を奏した理由としては、エントロピー項においては以下のようにまとめられる。

- open form / closed form の遷移の過程で大きく変化する部分（プロトンの所在）の分子振動の変化を中心に溶媒効果を含めて二種の form で公平かつ精密に見積もることができた
- 配置する水分子の状況をより現実系に近くすることで、この部分の自由エネルギーに起因する誤差を最小限にできた

なお、架橋数を3にした場合が最善だった理由についてはエントロピーからは考察ができない。2分子では長さが足りず、色素分子と水分子の軌道の重なりが十分に得られないため電子的な効果として計算結果が不正確であったと予想できるが、量子化学的に厳密に示すためには一度波動関数を抽出し重なり積分を比べる等する必要がある。

【電子エネルギーの寄与についての検討】

次に、電子的な項によってどの部位がΔpK_{cycl}にどれほどの影響力を持ちうるか解析を試みた。密度汎関数法（DFT）においては一電子軌道のエネルギーを計算するプロセスと全電子エネルギーを計算するプロセスが等価でない式によって行われるため、最終的な結果となる全電子エネルギーと分子軌道（コーン・シャム軌道）のエネルギーとの間に明確な（簡単な計算で相互変換できるような）関連が無い[23]。したがって、上記のエントロピーの解析でのように色素の部位ごとの要素分解を厳密に行いたい場合は計算された分子軌道と電子密度から改めて汎関数の計算を行い、その際に積分計算を部位ごとの成分に分ける等の処理を行うか、DFT による計算をあきらめ HF 法などを用いて一電子演算子・二電子演算子を別々に計算する必要があり、容易ではない。

しかしながら、DFT 計算が HF 法に類似した SCF 計算によって軌道計算を行っている[23]ことを踏まえると、そこから算出される固有値（軌道エネルギー）にも厳密ではないにしろ最終的な結果の元になる情報が込められていると考えられる。そこで、各々の軌道エネルギーを各原子の寄与率で重みづけして合算し、各部位ごとのΔEを算出した後、これらの総和が全電子エネルギーのΔEと等しくなるように一律にスケーリングし、近似的なΔpK_{cycl}を求めた。

電子的に影響の大きい部位はアミノ基とキサンテン環の中央の環を構成する原子、カチオンを安定化している水分子であり、水和解析の際に立てた仮説通り、蛍光団は open form が安定（$\Delta pK_{cycl} > 0$）でありその影響を水分子が緩和している（$\Delta pK_{cycl} < 0$）ことが分かる。他の誘導体においても同様の傾向が見られている。

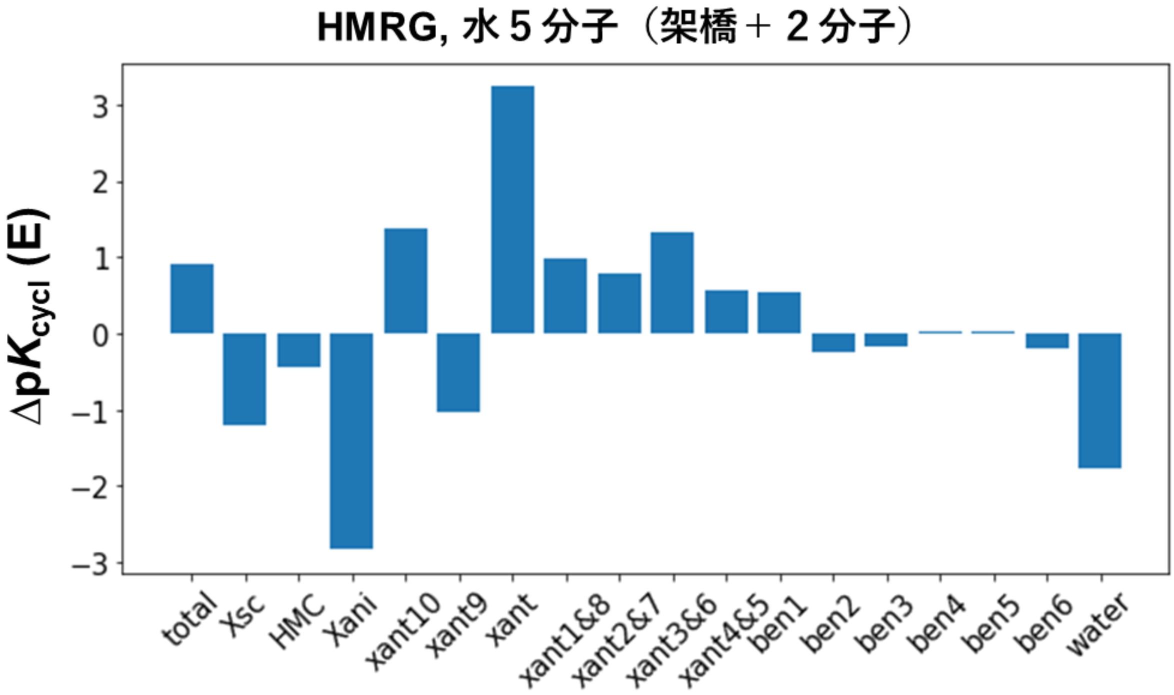


Figure 2- 25　Calculated pK_{cycl} contribution of each position (Eel).

ベンゼン環３位における置換基の効果

次に、この計算法を未知の誘導体群について網羅的に計算し、各部位の誘導体化が pK_{cycl} にどのような影響を与えるかを探索することとした。ここではこれまで誘導体化の例が少なかったベンゼン環部位の変化を検討した。

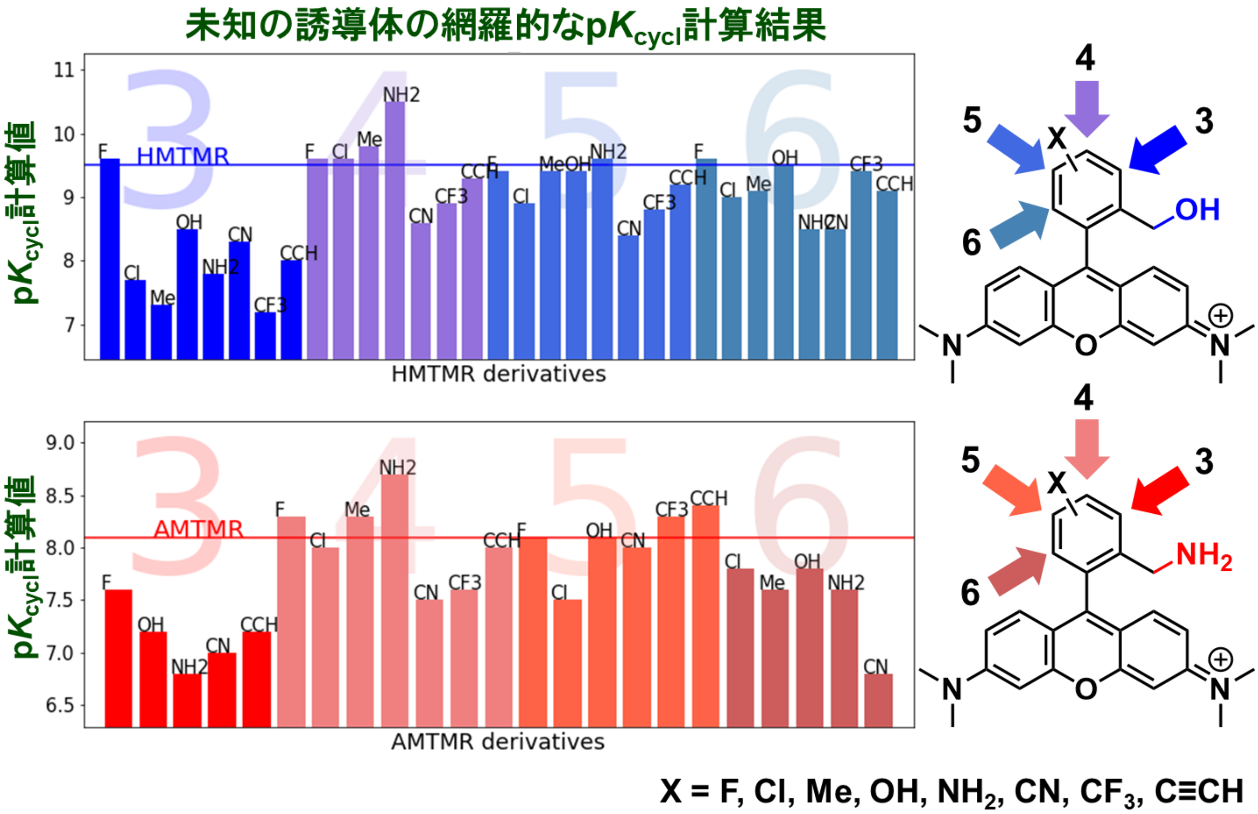
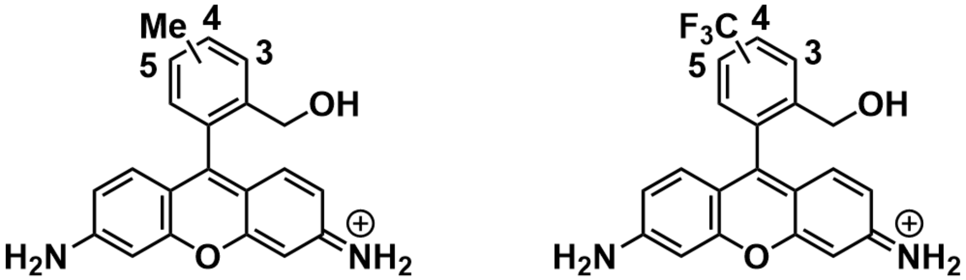


Figure 2- 26　Calculated pK_{cycl} values of HMTMR derivatives.

官能基の電子求引性・供与性による pK_{cycl} の変化は4位において特に目立つが、1程度の変化にとどまった。これに対し、3位に置換基が入ることで官能基の電子求引性・供与性に関係なく pK_{cycl} が大きく低下することが予想された。下の図のように3位に官能基があることによって特に open form が不安定化していること、またこの効果は原子半径の小さいフッ素原子では比較的小さいことから、open form において官能基と HM 基の間に働く立体障害による効果であると考えた。

Table 2- 7　Free energy values of Me(CF_3)-substituted HMRG with 5 water molecules.

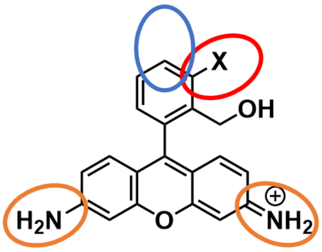


	3-Me	4-Me	5-Me
Open form	-1453.239658	-1453.244653	-1453.243302
Closed form	-1453.23629	-1453.237249	-1453.237625

	3-CF_3	4-CF_3	5-CF_3
Open form	-1750.984035	-1750.987576	-1750.988663
Closed form	-1750.982368	-1750.984056	-1750.982288

単位：hartree

先の検討と同様に自由エネルギーの要素分解を行った。ΔE_{el}については前述の通り直接的な算出ができないため、他二つの合計と最終的な計算値との差分として計算した。下図に示すように Me 基、CF_3 基の導入によって電子的な効果（軌道間の電子反発）で 1.5 程度、CF_3 基の場合はさらにエントロピーの効果（立体的な混み合いによる振動の制限）によって 0.8 の pK_{cycl} 低下が見られる。3位のエントロピーの効果については Me 基の場合にも生じるが、これが蛍光団アミノ基のエントロピー効果によって打ち消されていることが分かる。このアミノ基とベンゼン環3位は離れたところに位置するため直接的な相互作用ではなく Me 基の導入によって蛍光団側の軌道・化学結合の強さに影響が生じアミノ基周辺の振動数が変化したことが原因と考えられる。この要因についてはさらなる検討が必要である。



	X	pK_{cycl} 計算値	Δ pK_{cycl} 計算値	ΔΔpK_{cycl} ΔE_{el}	ΔΔpK_{cycl} ΔE_{vib}	ΔΔpK_{cycl} $-T\Delta S_{vib}$
HMRG	H	7.9				
3FHMRG	F	8.1	0.2	0.2	- 0.1	0.1
3MHMRG	Me	6.1	- 1.8	- 1.5	- 0.2	- 0.1
3CF3HMRG	CF_3	5.3	- 2.6	- 1.7	- 0.1	- 0.8

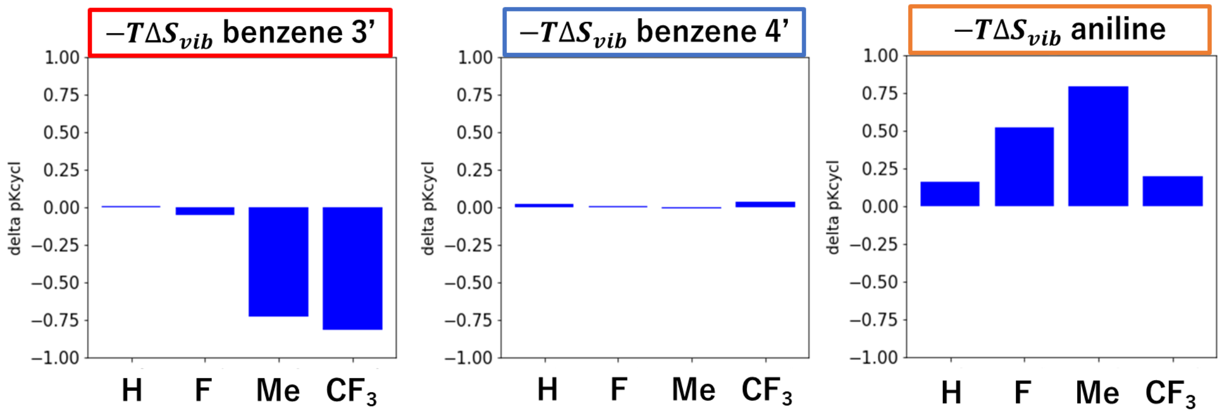
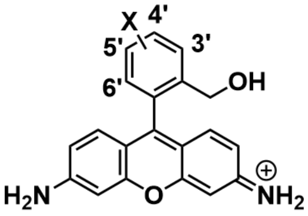


Figure 2- 27　pK_{cycl} contribution of each part of position-3'-substituted HMRG.

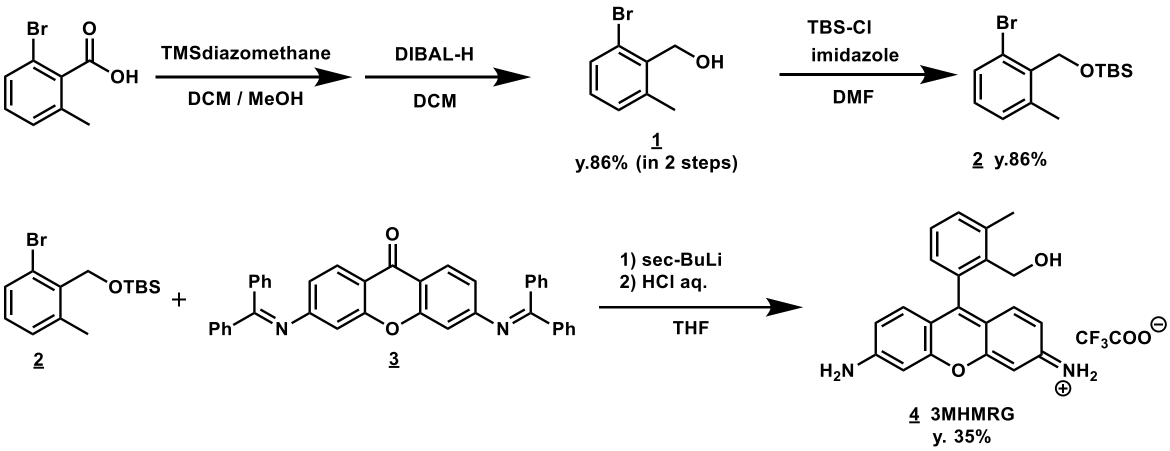
次に、計算上で見られた効果が実際に働くかどうかを調べた。いくつかの化合物を合成し測定を行うと、確かにベンゼン環3位に置換基が入った場合、計算から予測された pK_{cycl} が低下作用が見られることが分かった。

Table 2- 8　Position-3’ effect on pK_{cycl}

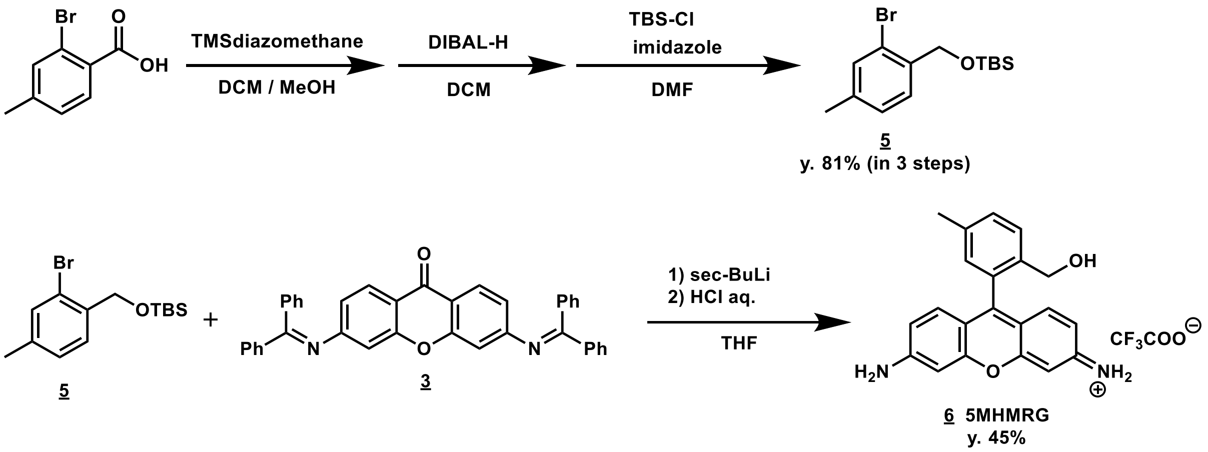


	Measured pK_{cycl}	Calculated pK_{cycl}			
X	3’ (5’)	3’	4’	5’	6’
F	8.0	8.1	8.3	7.4	8.1
Me	6.6 (8.2)	6.1	8.1	7.9	7.2
CF_3	5.3	5.3	7.1	7.4	7.6
H	8.1	7.9			

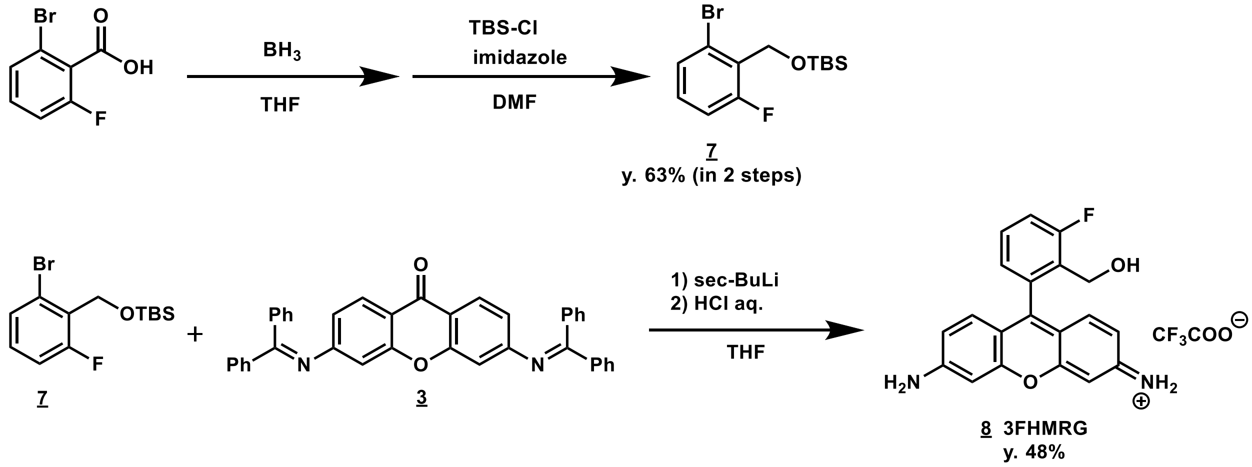
表中の3(5)位置換誘導体の合成は以下のように行った。



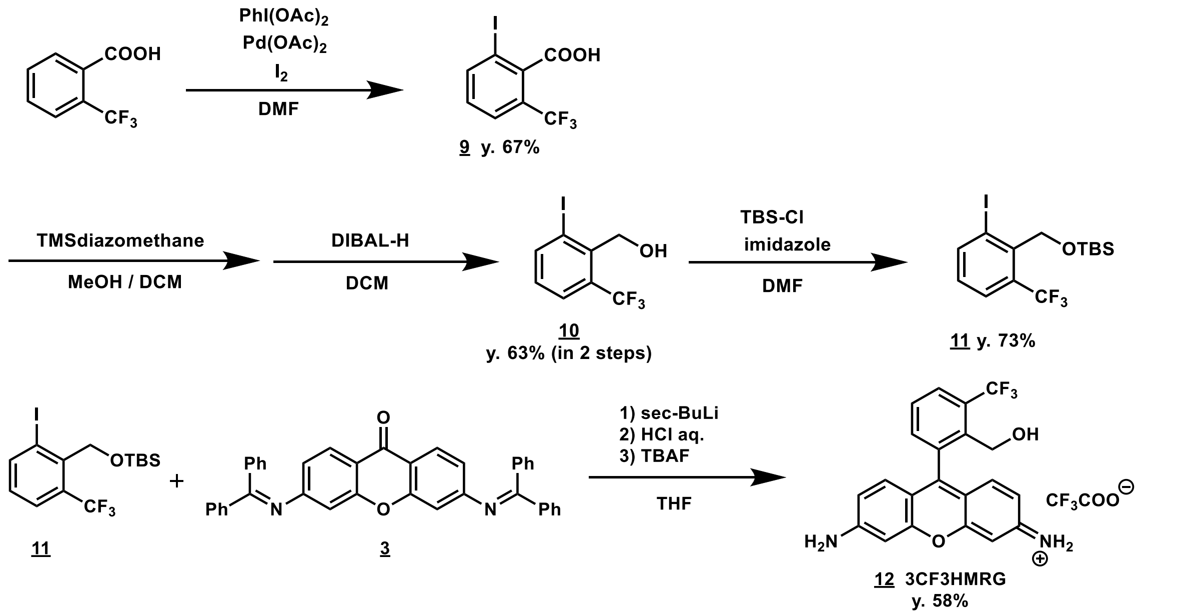
Scheme 2- 1　Synthesis of 3MHMRG.



Scheme 2- 2　Synthesis of 5MHMRG.



Scheme 2- 3　Synthesis of FMHMRG.



Scheme 2- 4　Synthesis of 3CF3HMRG.

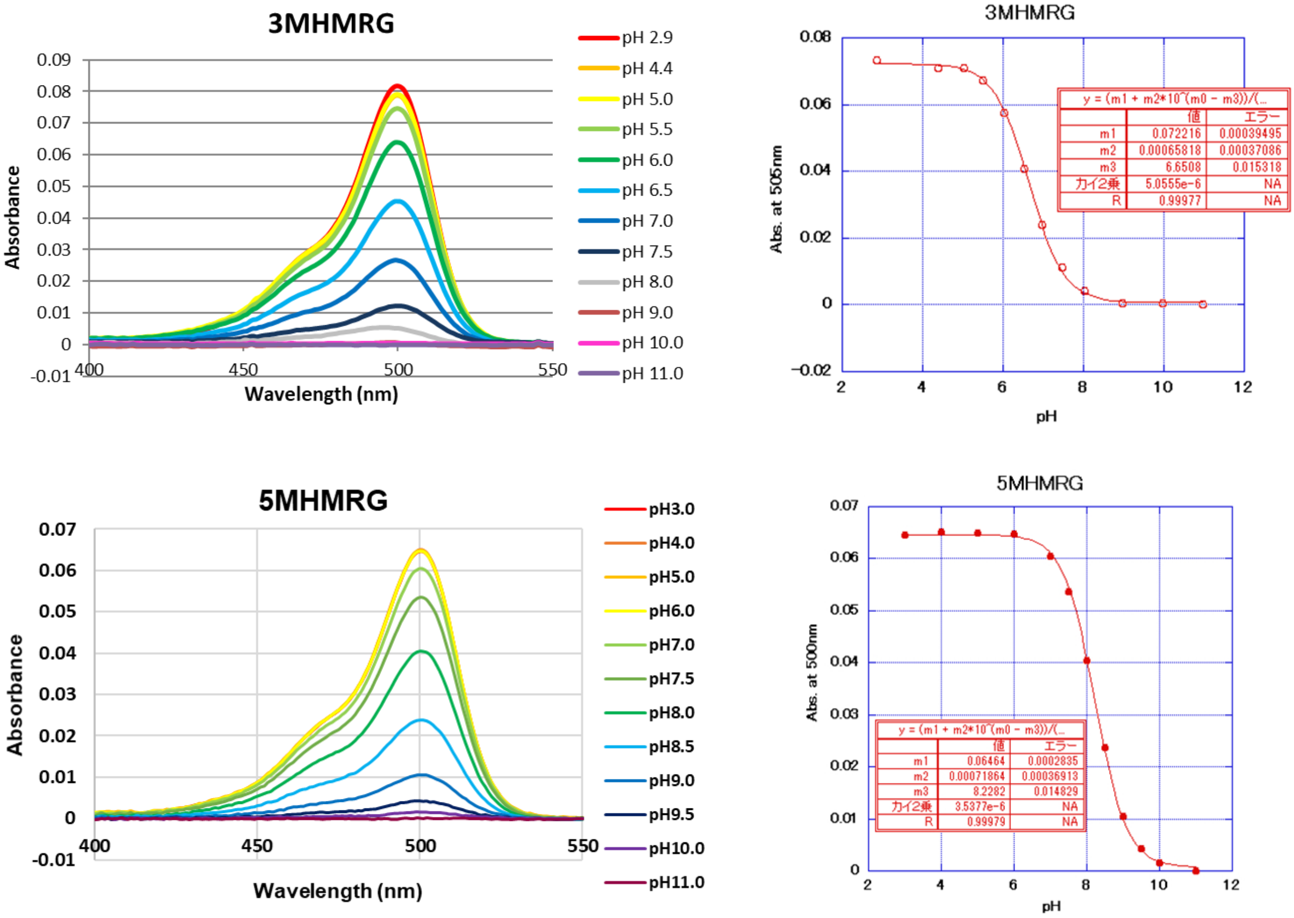
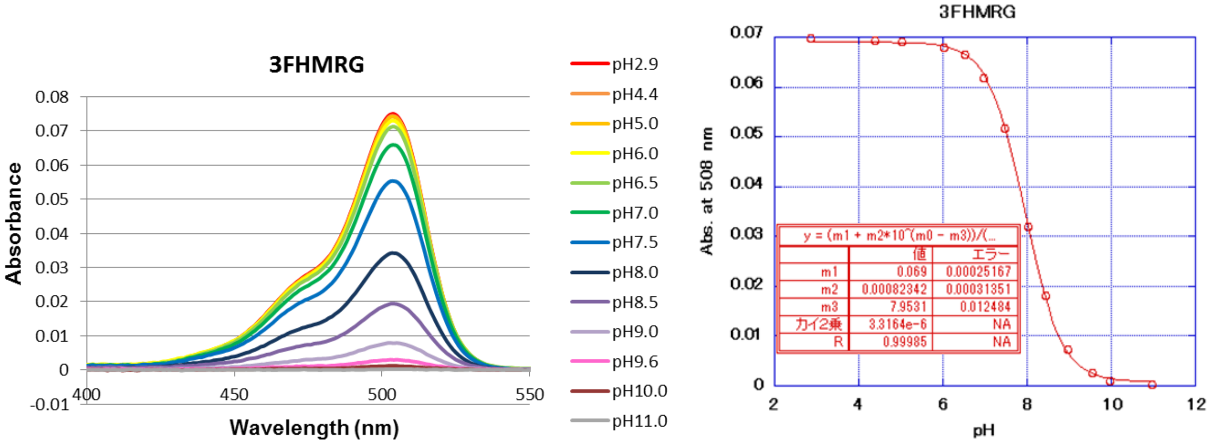


Figure 2- 28 Absorption spectra of 1μM 3MHMRG, 5MHMRG (left) and correlation between absorbance at 505nm (3MHMRG), 500nm (5MHMRG) and pH (right) in 0.1M NaPi buffer containing 0.1% DMSO as cosolvent.



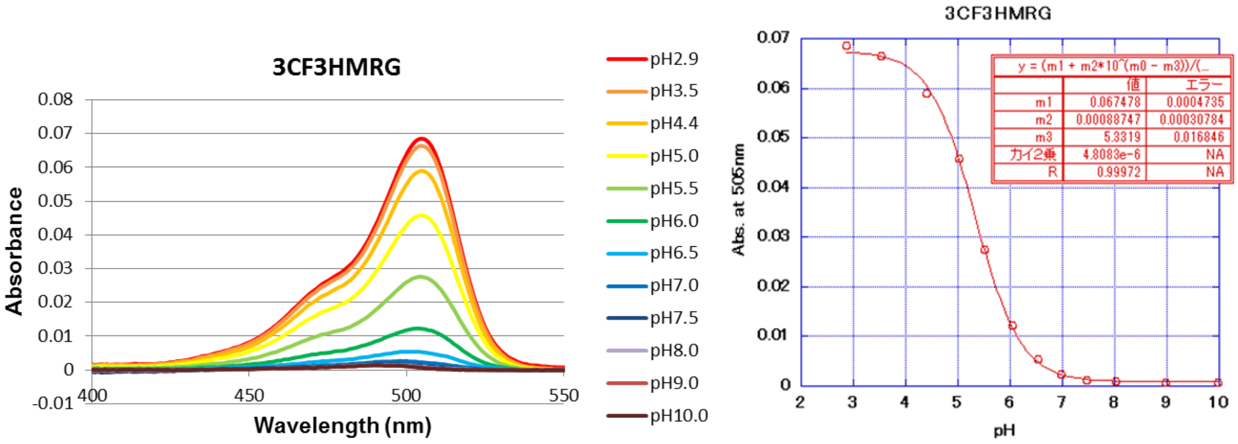


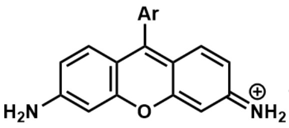
Figure 2- 29　Absorption spectra of 1μM 3FHMRG, 3CF3HMRG (left) and correlation between absorbance at 508nm (3FHMRG), 505nm (3CF3HMRG) and pH (right) in 0.1M NaPi buffer containing 0.1% DMSO as cosolvent.

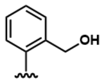
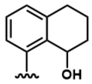
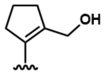
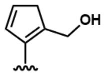
この効果は、分子設計において pK_{cycl} を下方修正するときに有用な分子設計戦略になると考えられる。このように、pK_{cycl} 計算とその解析によってこれまで知られてこなかった分子設計戦略を効率的に探索することが可能になると言える。

スピロ環の結合角ひずみによる効果

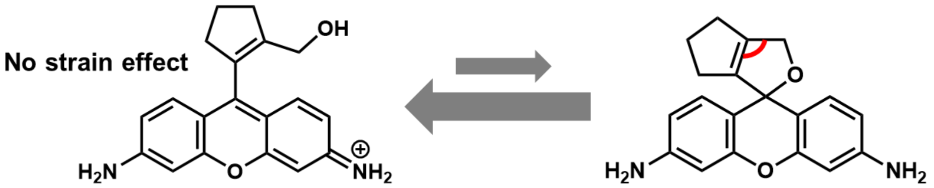
さらに、HM 基周辺を剛直な構造とすることでスピロ環形成時にひずみを強くし、pK_{cycl} を大きく上昇させることができることを見出した。THNaphtRG においては計算値と実測値のずれが少し大きくなったが、これは open form, closed form それぞれにおいてベンゼン縮合環の配座が複数考えられ、それらを十分に考慮できていないためと考えられる。

Table 2- 9　Ring-distortion effect on pK_{cycl}

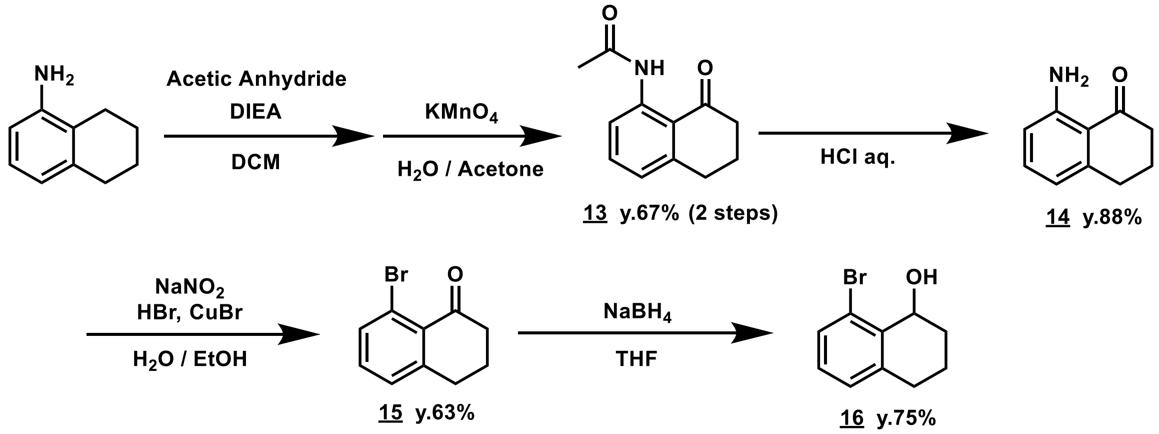


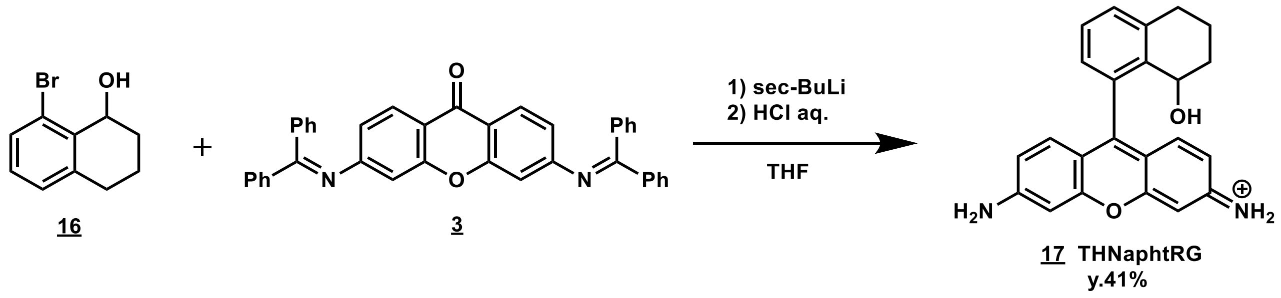
	Ar	Measured pK_{cycl}	Calculated pK_{cycl}
HMRG		**8.1**	**7.9**
THNaphtRG		**9.7**	**8.5**
HMCPRG		**-**	**12.1**
HMCPDRG		**-**	**13.8**

Relative destabilization of closed form



THNaphtRG の合成は以下のように行った。





Scheme 2- 5　Synthesis of THNaphtRG.

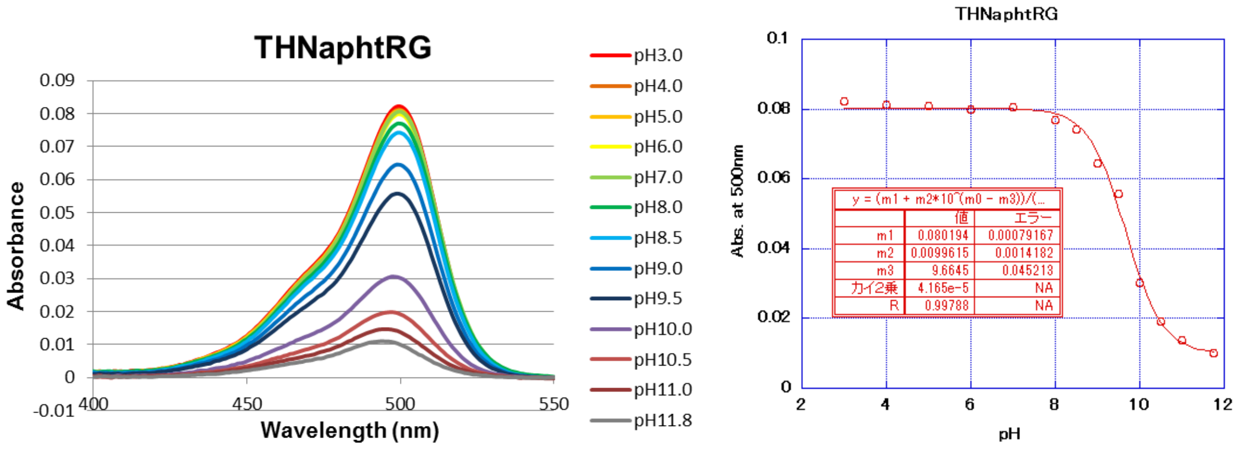


Figure 2- 30　Absorption spectra of 1μM THNaphtRG (left) and correlation between absorbance at 500nm and pH (right) in 0.1M NaPi buffer containing 0.1% DMSO as cosolvent.

この効果は、分子設計において pK_{cycl}を上方修正するときに有用な分子設計戦略になると考えられる。結合角ひずみによる効果については、次節において述べるプローブ開発への応用においても実測に基づく評価を行う。

第四節　pK_{cycl}予測に基づく新規蛍光プローブの開発

最後に、構築した計算モデルに基づく蛍光プローブ設計のモデルケースとして、キサンテン環 10 位の原子をC, Si に置換した C-rhodamine, Si-rhodamine を用いたスピロ環化型黄色・赤色 peptidase プローブの開発を試みた。スピロ環化型赤色 peptidase プローブの開発例は既に存在する[19]が、pK_{cycl}調節法の乏しさから、従来の候補探索においては非対称な蛍光団修飾に頼らざるを得ず、蛍光量子収率が低く S/N 比の悪いプローブ（酵素反応を起こしても平衡が完全に open form に傾き切らない）にとどまっていた。

そこで、キサンテン環部位のアミノ基は両方とも NH_2 とした蛍光団のみを用いることとし、この制限の下で蛍光プローブとして機能する誘導体を探索した。

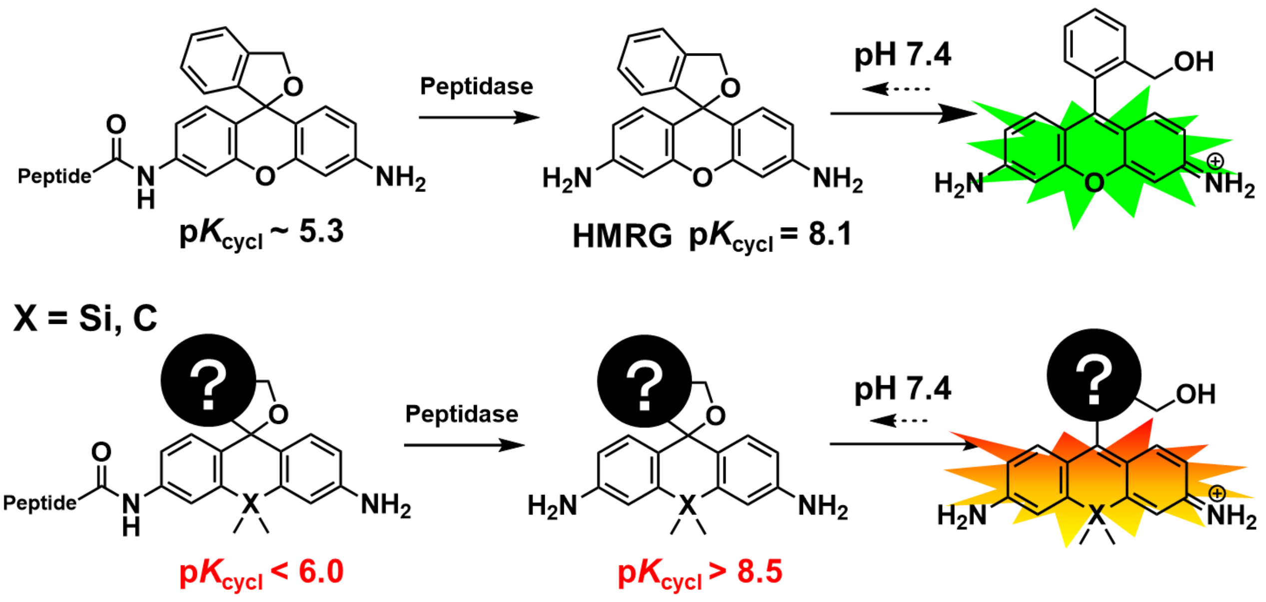
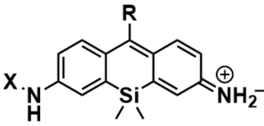
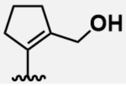
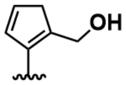
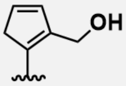
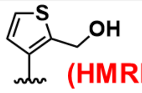
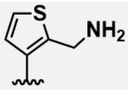
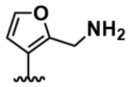


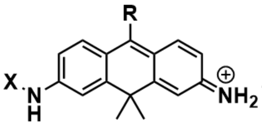
Figure 2- 31　Optimization of pK_{cycl} for peptidase probe design.

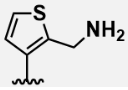
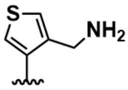
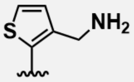
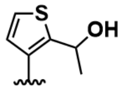
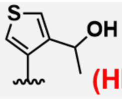
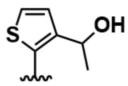
報告されている緑色プローブに鑑み、酵素反応前は closed form が優勢（pK_{cycl} < 6.0）、酵素反応後は openform が優勢（pK_{cycl} > 8.5）となる候補化合物を探索した。これまで合成された他の誘導体のデータから、C-rhodamine, Si-rhodamin は closed form が優勢になる（閉環しやすい）傾向にあることが分かっていたため前節の「結合角ひずみ」を主に用いて pK_{cycl} を上昇させようと考えた。様々な誘導体の pK_{cycl} を計算し、適切な誘導体を探索した。なお、簡単のためアミノ酸部位は Ac 基として計算を行った。

Table 2- 10　Prediction of pK_{cycl} (SiR600, CR550)

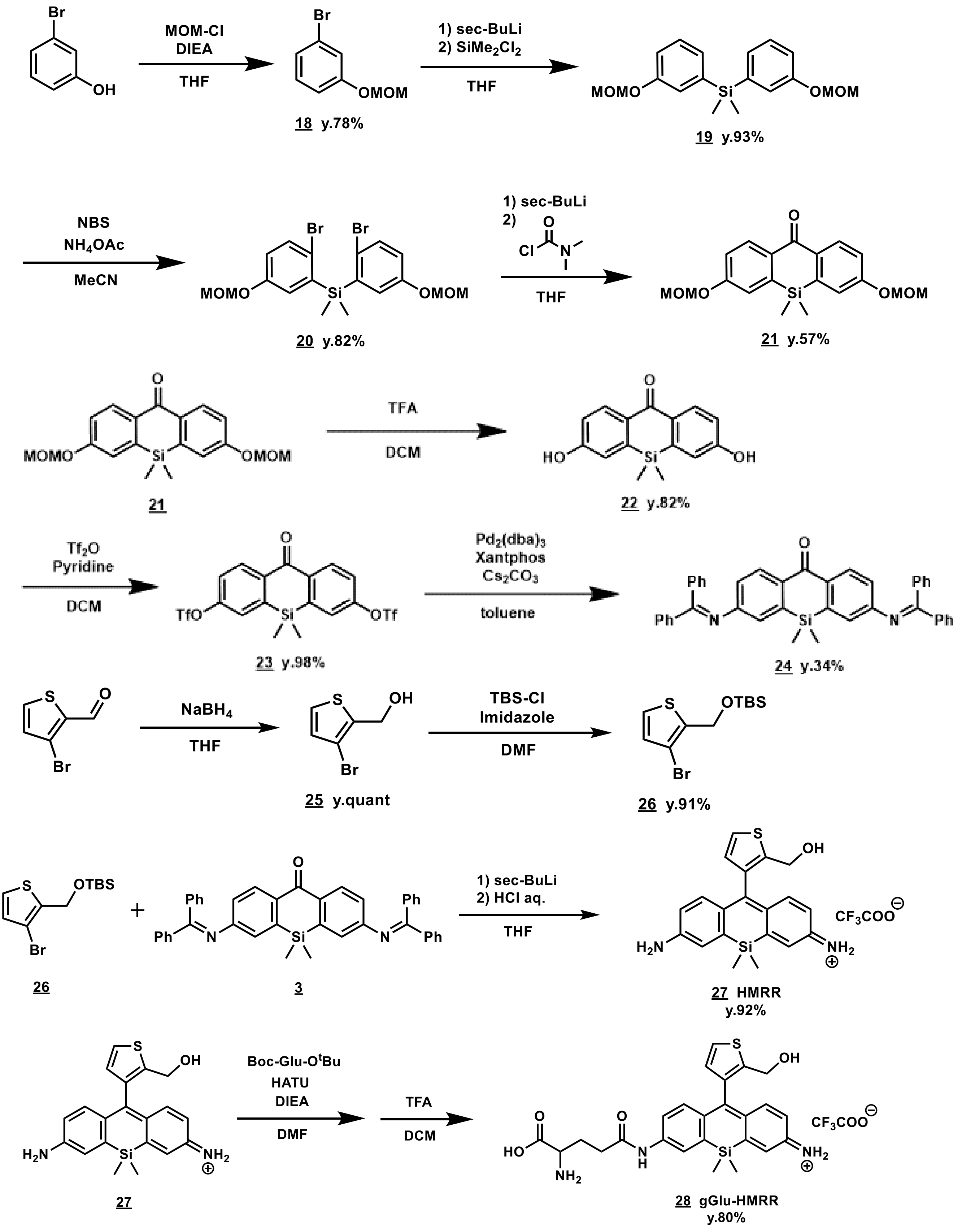


R	Calculated pK_{cycl} X = Ac	Calculated pK_{cycl} X = H
	4.5	7.5
	< 4	7.9
	5.9	8.3
 (HMRR)	< 4	8.6
	< 4	5.9
	7.7	11.0

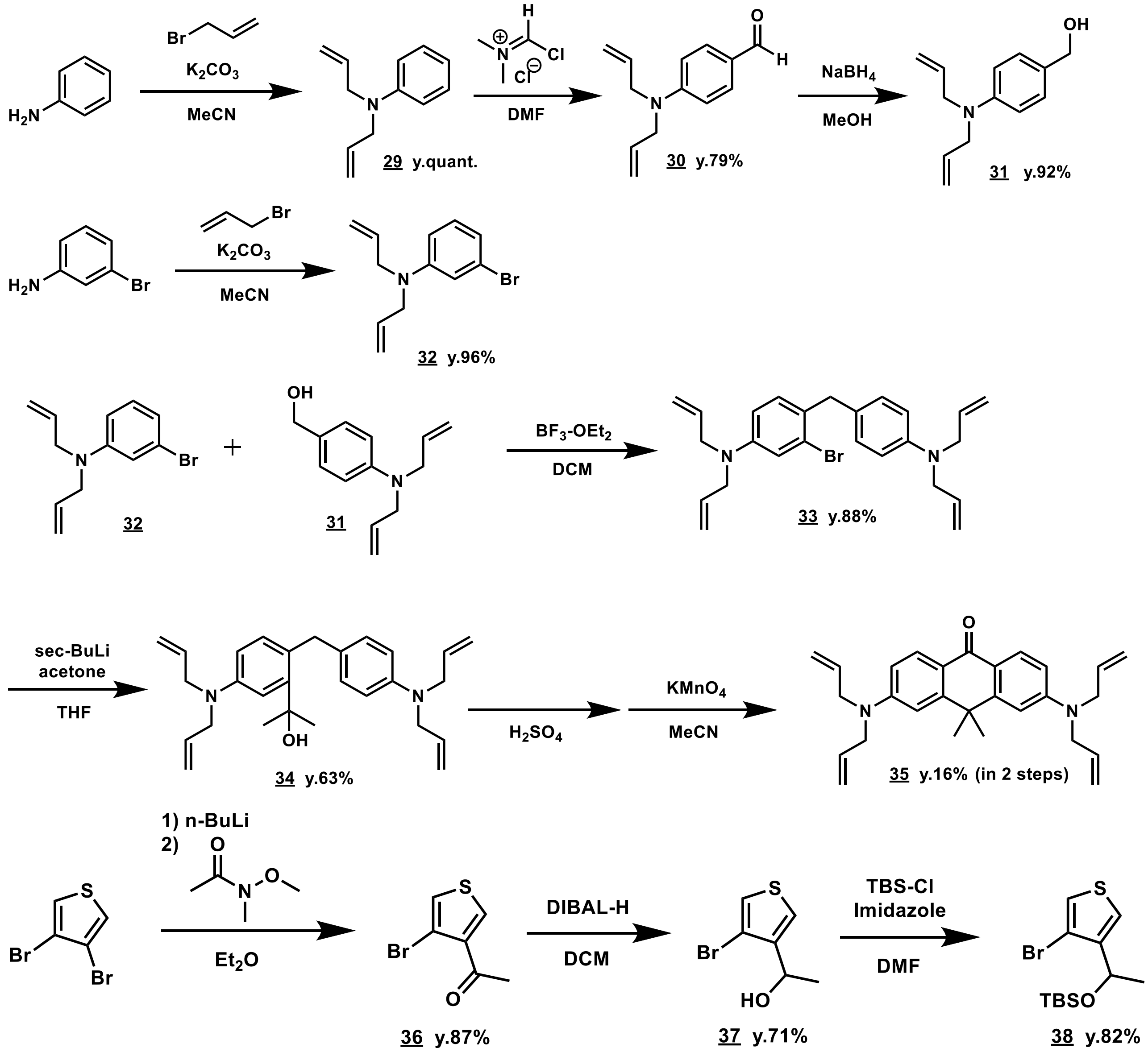


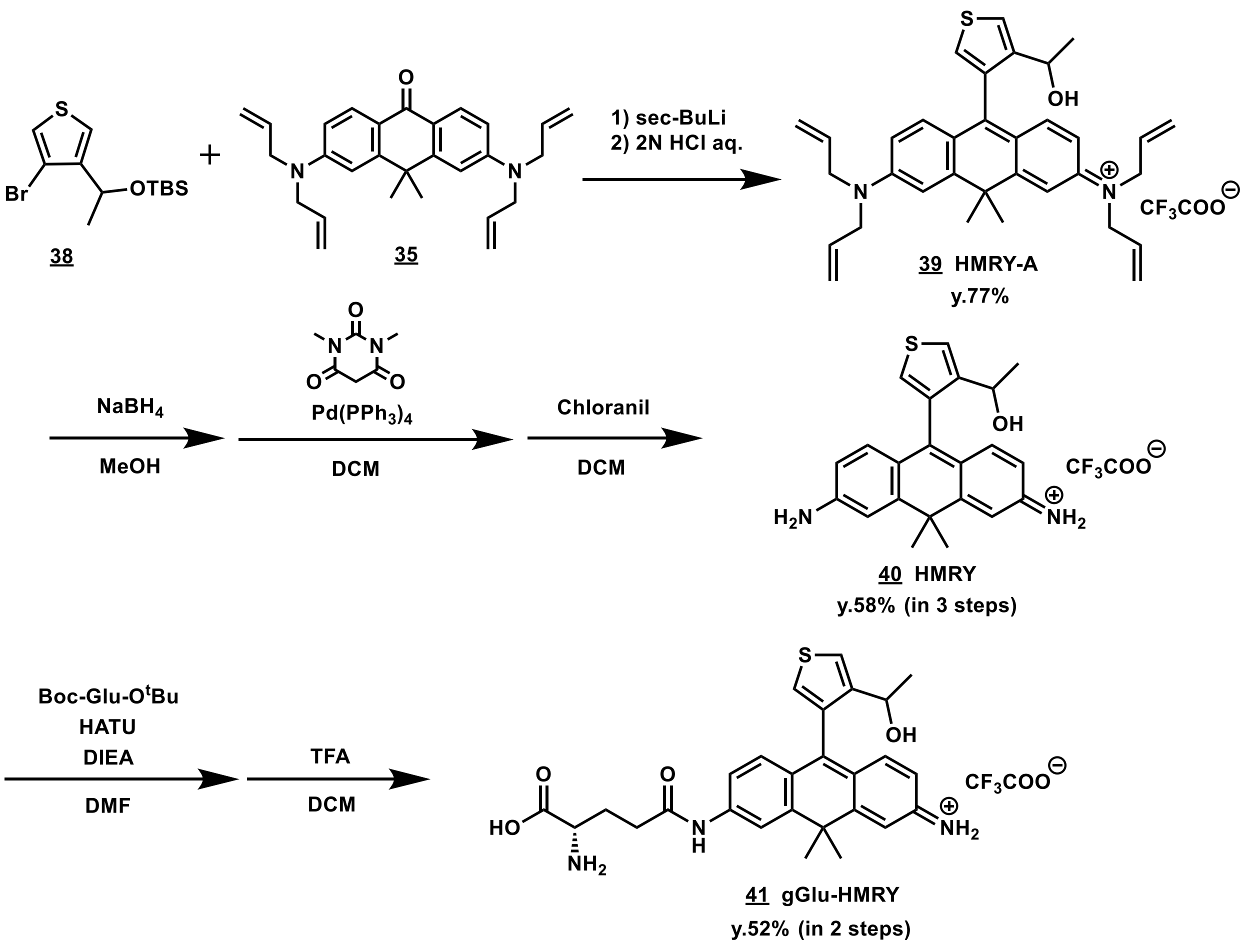
R	Calculated pK_{cycl} X = Ac	Calculated pK_{cycl} X = H
	5.0	7.9
	5.6	8.9
	4.2	7.5
	5.2	9.0
 (HMRY)	5.5	8.7
	5.3	8.3

これらのヒット化合物の中から合成の難易度等を考慮して一つずつ選択しこれらの色素およびその gGlu 体を以下のように合成した。



Scheme 2- 6 Synthesis of gGlu-HM3ThPSiR600 (HMRR).


Br
K2CO3
MeCN
29 y.quant.
H
N
Cl
Cl
DMF
O
H
30 y.79%
NaBH4
MeOH
OH
31 y.92%
H2N
Br
K2CO3
MeCN
32 y.96%
32
31
BF3-OEt2
DCM
33 y.88%
sec-BuLi
acetone
THF
OH
34 y.63%
H2SO4
KMnO4
MeCN
35 y.16% (in 2 steps)
1) n-BuLi
2)
Et2O
36 y.87%
DIBAL-H
DCM
HO
37 y.71%
TBS-Cl
Imidazole
DMF
TBSO
38 y.82%



Scheme 2- 7　Synthesis of gGlu-MHM4ThPCR550 (HMRY).

合成した色素のスピロ環化特性を測定したところ、以下のように計算による予測結果とよく一致した。gGlu-HMRR における一致度のみあまり高くないが、これは低 pK_{cycl} 帯であること、またアミノ酸を省略して Ac 基として計算したことで精度が落ちていることが考えられる。

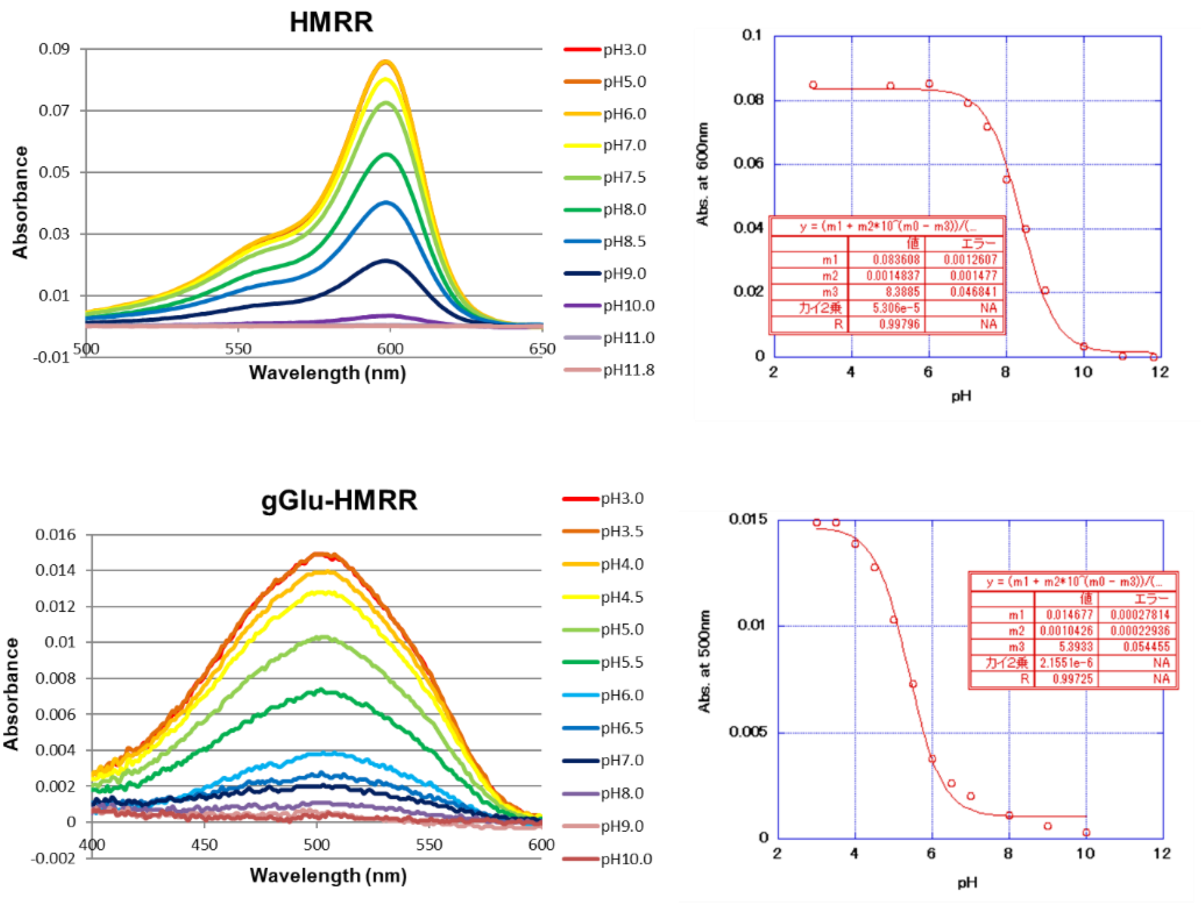


Figure 2- 32 Absorption spectra of 1μM (gGlu-)HMRR (left) and correlation between absorbance at 600nm (HMRR), 500nm (gGlu-HMRR) and pH (right) in 0.1M NaPi buffer containing 0.1% DMSO as cosolvent.

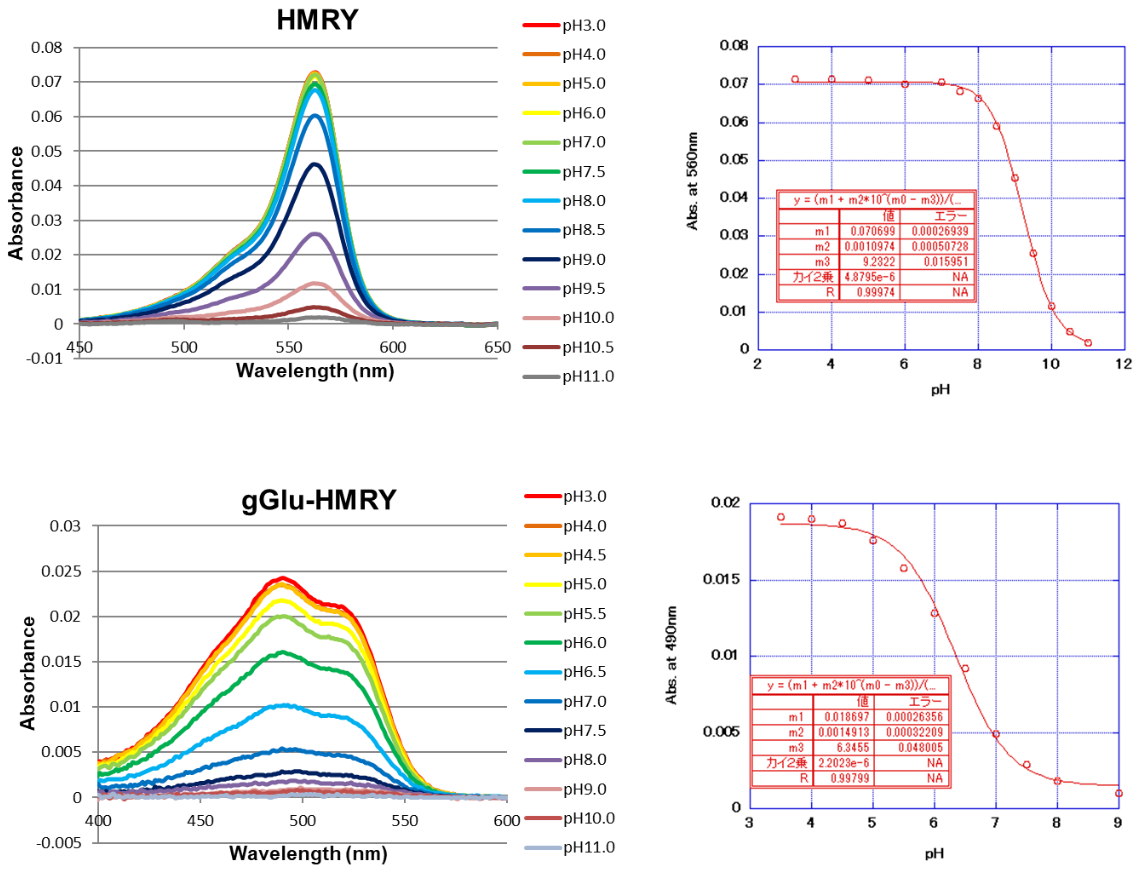
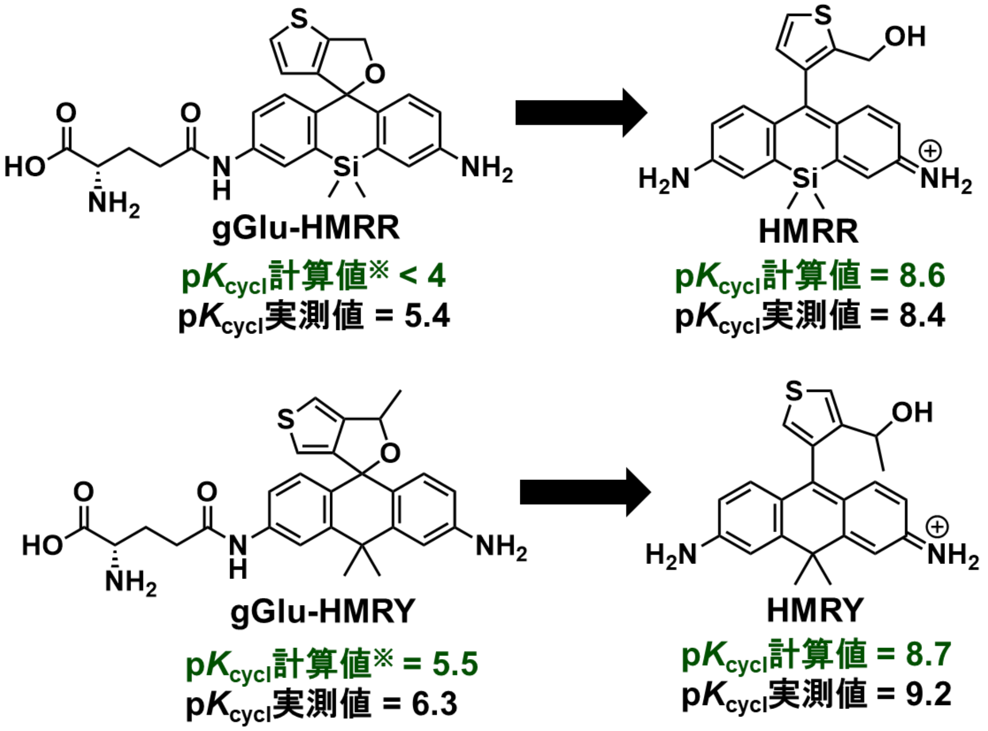


Figure 2- 33 Absorption spectra of 1μM (gGlu-)HMRY (left) and correlation between absorbance at 560nm (HMRY), 480nm (gGlu-HMRY) and pH (right) in 0.1M NaPi buffer containing 0.1% DMSO as cosolvent.



※gGlu→Acとして計算

Figure 2- 34　Calculated and measured pKcycl of (gGlu-)HMRR, (gGlu-)HMRY.

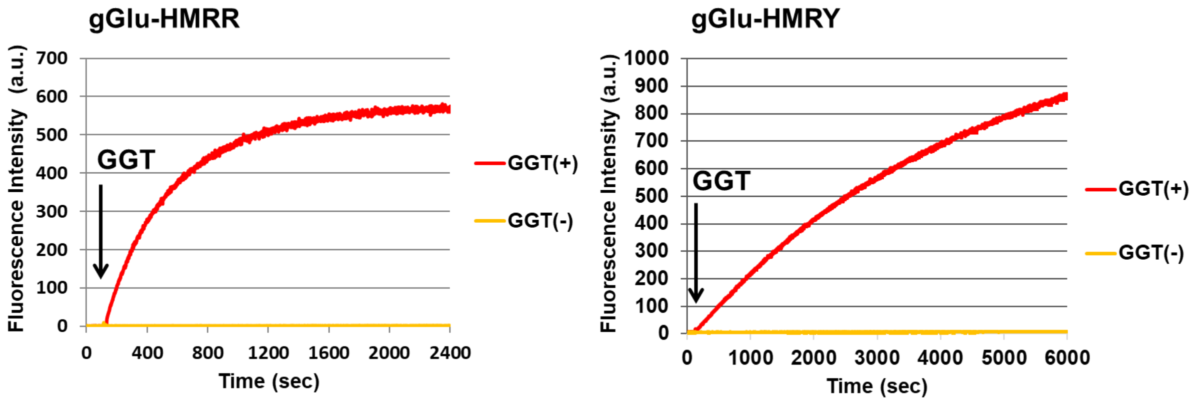


Figure 2- 35　Reaction of gGlu-HMRR, gGlu-HMRY (3μM) with GGT (1.1U) in 10mM NaPi buffer (pH7.4) containing 0.03% DMSO as cosolvent. GGT was added at 120 sec.

開発した二種のプローブ gGlu-HMRR, gGlu-HMRY（hydroxymethyl rhodamine rouge/yellow）は確かに GGT と反応し、蛍光プローブとして機能することが分かった。

さらにマウス腹膜播種モデルを使った in vivo がんイメージングを行った。プローブ濃度等、実験条件に関しては緑色プローブ gGlu-HMRG に関する実験と同様のものを用いることができた。

各プローブにおける代表的な結果を以下に示す。

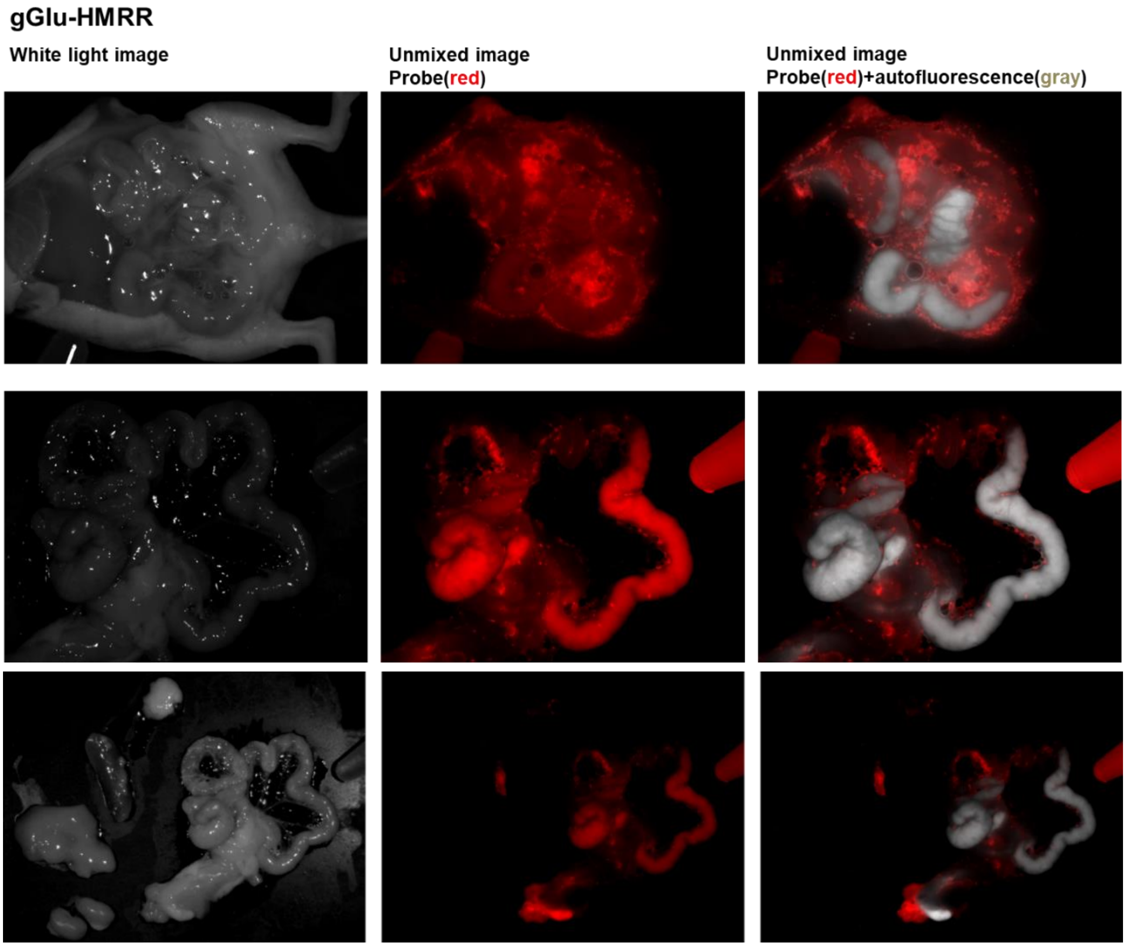


Figure 2- 36　Fluorescence spectral imaging of mouse models of peritoneal metastases at 5 min post-treatment with gGlu-HMRR (100 μM, 300 μL). In unmixed images images, the probe fluorescence and autofluorescence were assigned as red and gray, respectively. excitation, 575 to 605 nm; emission, 645 nm long-pass.

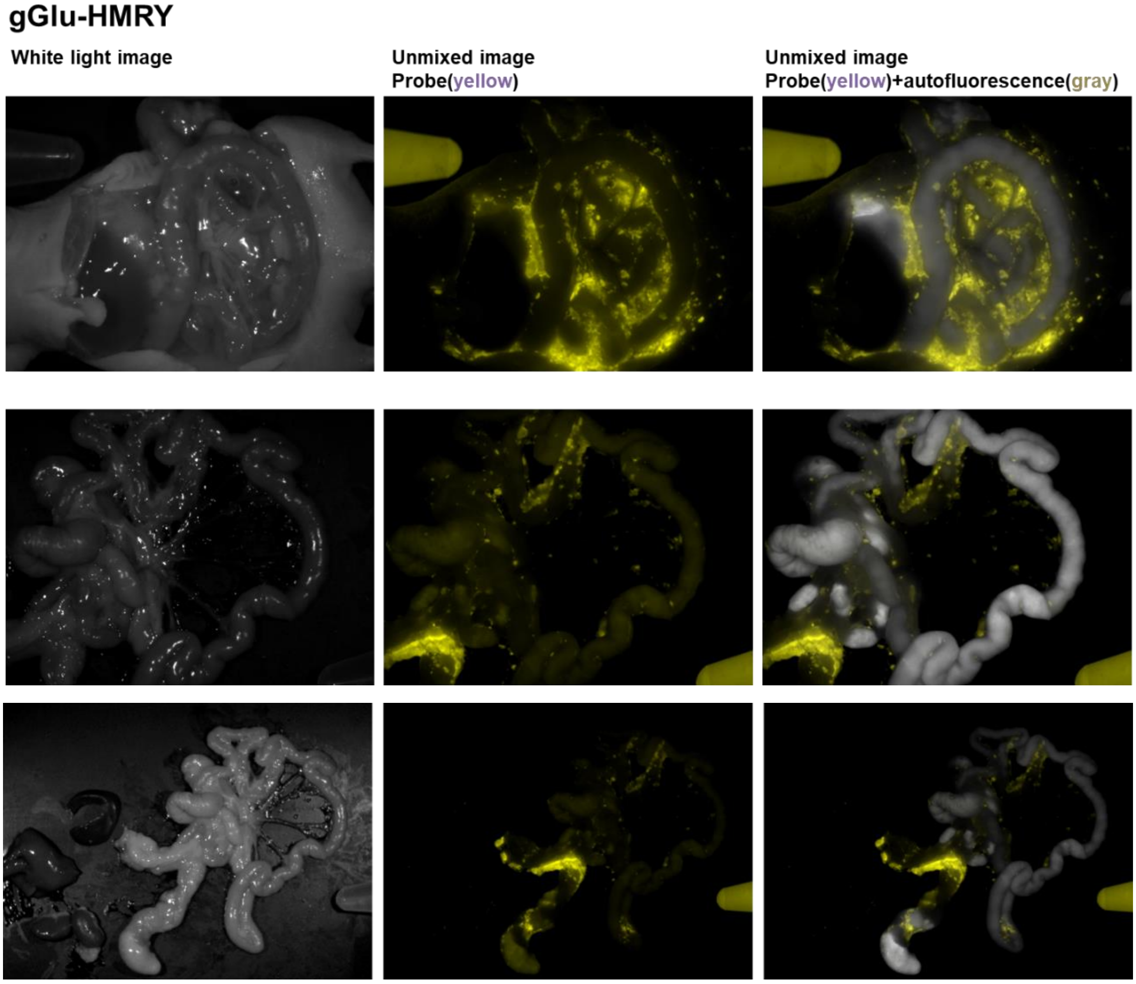


Figure 2- 37　Fluorescence spectral imaging of mouse models of peritoneal metastases at 5 min post-treatment with gGlu-HMRY (100μM, 300μL). In unmixed images images, the probe fluorescence and autofluorescence were assigned as yellow and gray, respectively. excitation, 503 to 555 nm; emission, 580 nm long-pass.

腸間膜のがん細胞と思われる部分が染まっていることが分かる。さらに、開いた腸に対して gGlu-HMRG の重ねがけを行った。

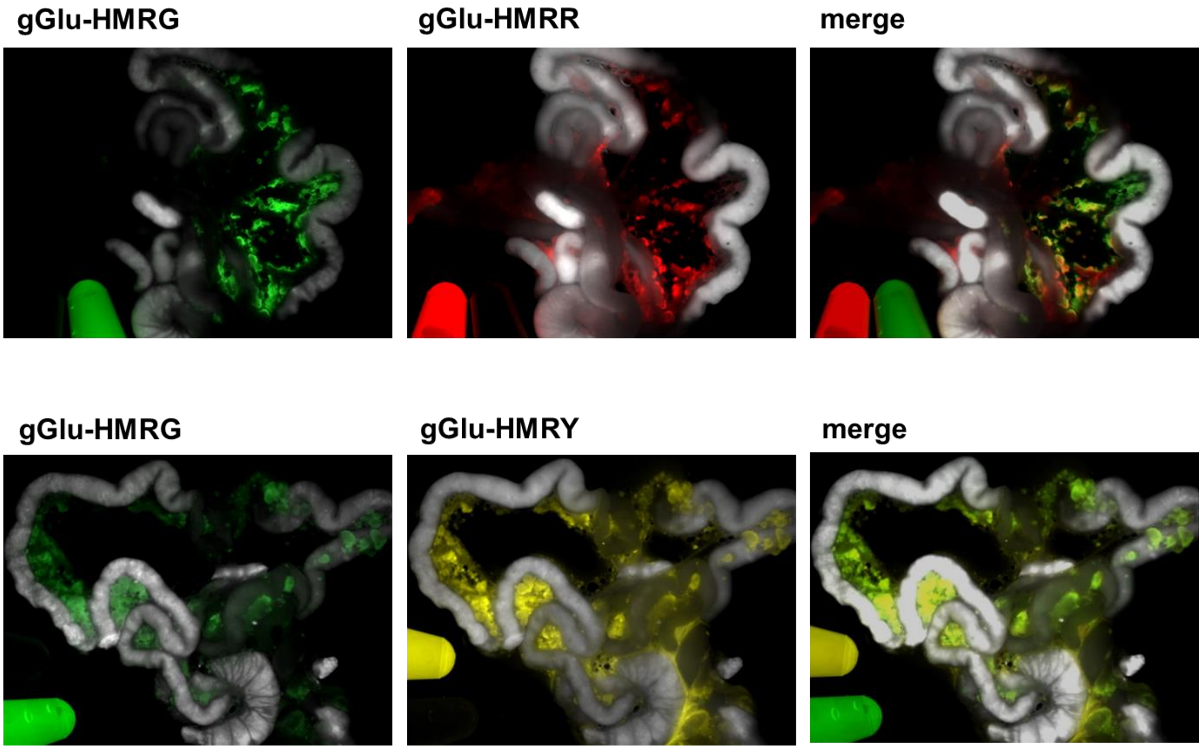


Figure 2- 38　Fluorescence spectral imaging of mouse models of peritoneal metastases at 5 min post-treatment with red GGT probes (100μM, 300μL) and gGlu-HMRG (100μM, 300μL). In unmixed images images, the probe fluorescence and autofluorescence were assigned as red (gGlu-HMRR), yellow (gGlu-HMRY), green (gGlu-HMRG) and gray (autofluorescence), respectively.

プローブの適用法が違うため（新規プローブは開腹前に腹腔内に注射しているのに対し gGlu-HMRG は直接腸に滴下している）厳密にはプローブの到達範囲が完全にはならないが、全体として同じ部位がイメージングできていると言える。

これらの結果から、新規プローブは gGlu-HMRG と同様の挙動を示すことが示唆された。

第三章

HMR 類のスピロ環閉環反応における τ の予測と応用

第一節　τ計算に向けた考察・計算モデル構築

第一章でも述べたが、自発的に明滅する HMR 類をうまく利用することで、添加剤等の特殊な条件を必要としない SMLM による超解像イメージングを行うことができる。第二章で予測法を確立した open / close 間の平衡に加え、これら二状態間の遷移速度を予測する方法を構築し、超解像イメージングプローブを論理的に設計する方法を確立することとした。

SMLM に用いる蛍光プローブの特性としては、

① ある時点で系中に存在する色素のうち蛍光性状態でいるものの割合

② 蛍光性状態の持続時間

が重要なパラメータとなる。つまり、一枚の画像を取得するごとに、各々の輝点が回折限界内に被らないように存在し(①)かつ画像ごとに別々の輝点がバランスよく光る(②)必要がある。

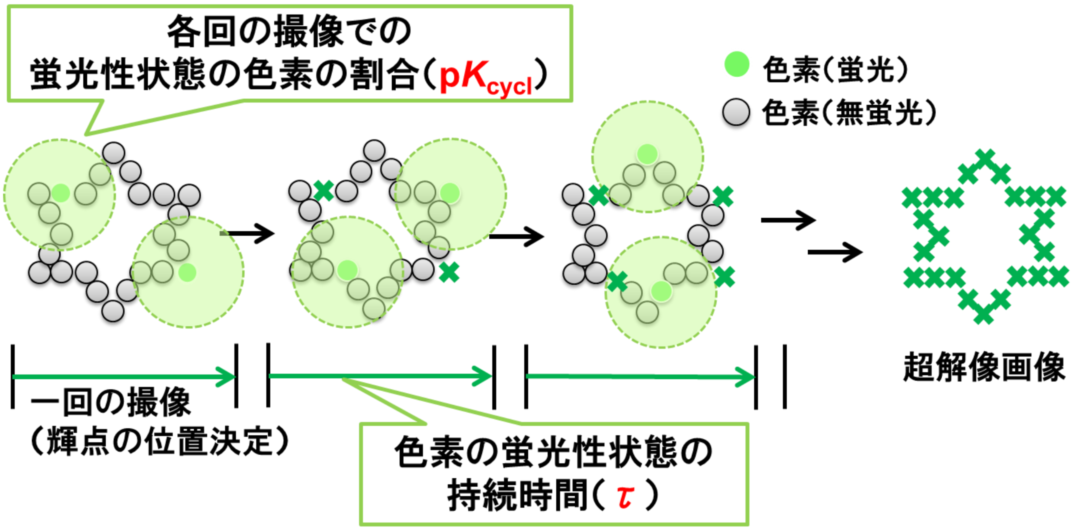


Figure 3- 1 Overview of SMLM.

HMR 類を用いた SMLM では、要素①を pK_{cycl} によって、要素②を τ (open form の平均持続時間)として、比較的容易に測定可能なデータによって評価することが可能である。pK_{cycl} (要素①)については、前章での検討において、高い精度・広い適用範囲で計算を用いた予測が達成された。そこで、ここからは τ (要素②)の予測を目標とした。

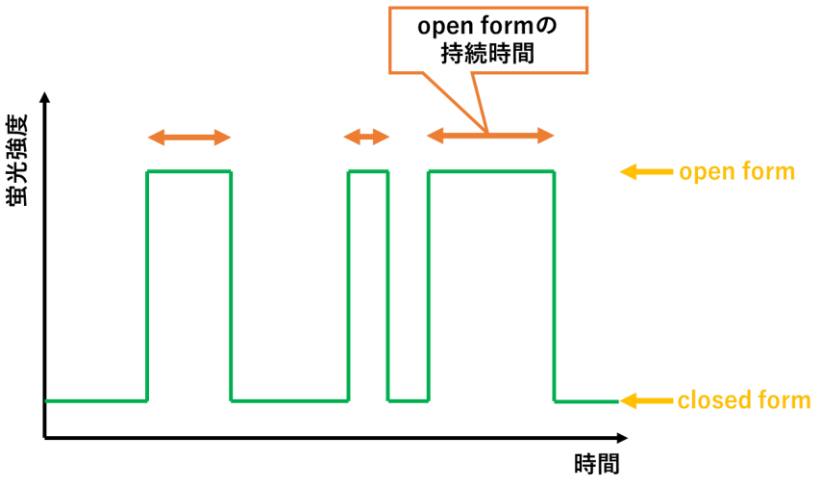


Figure 3-2　　Lifetime of open form.

先行研究での検討[8]から、open form の寿命には pH 依存性があり、その挙動はシグモイド様となることが分かっている。Open form の寿命の予測にはその pH 依存性の考慮を避けては通れない。そこで始めの目標として、下図に示されるような pH に対する τ のプロットを計算により再現・予測することとした。

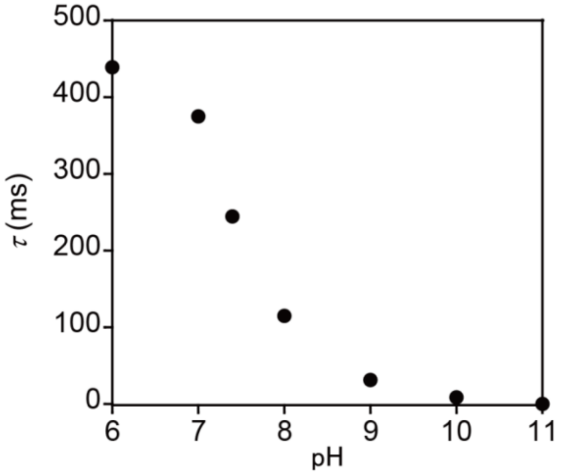


Figure 3-3　Correlation between τ (measured by LFP, HMSiR) and solvent pH. Cited from the literature[8].

open form の寿命の実測は、laser flash photolysis (LFP)などを用いた過渡吸収測定によって行った。これは、分子に光パルスを当てることで瞬間的に誘起された過渡種を、吸収スペクトルの時間変化を測定することで追跡する手法である。本研究においては、closed form のスピロ環化合物にレーザーパルス(266nm ないし 308 nm)を照射することで開環させ、生じた open form が熱的に閉環体へと戻る過程を open form の吸光度の時間変化を測定して評価する[8]。

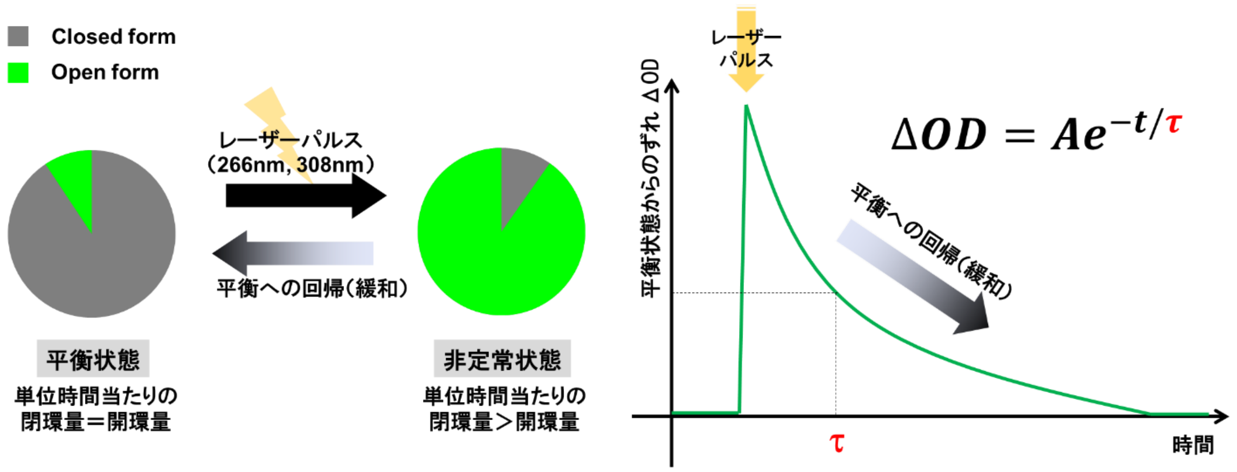


Figure 3-4　　Overview of laser flash photolysis.

ある pH で既に成立している平衡状態を瞬間的に非定常状態（open form が過剰）に移し、そこから元の平衡状態へと戻っていく過程の過渡吸収の減衰曲線をとる。反応速度論によると、このとき観測される open form の平均寿命 τ は緩和時間と呼ばれ、下に示すように開環・閉環の両速度定数の和の逆数となる[24]。

$$
\begin{cases}
-\dfrac{d[open]}{dt} = k_{close}[open] - k_{open}[close] \\
0 = k_{close}[open]_e - k_{open}[close]_e \\
[open] + [close] = [open]_e + [close]_e
\end{cases}
$$

※平衡状態をeで表す

3式より[close], [close]$_e$を消去すると

$$-\frac{d([open]-[open]_e)}{dt} = (k_{close}+k_{open})([open]-[open]_e)$$

$([open]-[open]_e)$**がLFPでのΔODに対応するので**

$$\tau = \frac{1}{k_{close}+k_{open}} \sim \frac{1}{k_{close}}$$

（closed formが優勢となるpH条件下）

したがって、過渡吸収測定において見えている減衰の速度と、顕微鏡によって色素を1分子ごとに観察して得られる閉環速度（k_{close} のみに依存）は厳密には一致しない。しかしながらΔOD の検出感度の都合上、取得可能な過渡吸収測定のデータは主に closed form が十分に優勢となる状態（$pH > pK_{cycl} + 2$）を扱っている。このような状況下では k_{close} が k_{open} に比べ十分に大きくなるため、近似的に k_{close} の逆数と考えてよいと言える。

これを踏まえ、τ の pH プロットを再現するモデルを構築した。

HMR 類の閉環反応は、まず大きく分類して「HM 基の脱プロトン化」と「HM 基の蛍光団への求核攻撃」という二つの要素から成り立つ。これらの過程を分離して考えることができると仮定すると、閉環反応に関わる素反応は以下の二つに分類できる。

A: 色素自身による「HM 基の蛍光団への求核攻撃」が起こることで「HM 基の脱プロトン化」が誘発する

B: 周囲の塩基により「HM 基の脱プロトン化」が起こることで「HM 基の蛍光団への求核攻撃」が誘発する

A 反応・B 反応それぞれについて、二つの要素が段階的に起こる場合、協奏的に起こる場合の双方を含むとすると、HMR 類の閉環反応に対応する全ての素反応は必ず A もしくは B に分類され、かつ A と B は排反事象であると考えられる。そこで、pH に応じたシグモイド様の挙動が2種の閉環反応 A,B それぞれの代表的素反応の重ね合わせによって表現できるのではないかと考えた。

すなわち、A 反応は色素自身が自発的に引き起こす反応であり pH 依存性がなく、B 反応は周囲の塩基の濃度に応じて確率的に引き起こされるため pH に依存する。溶媒の pH の変化によって B 反応の寄与率が変動しこの二つの反応のどちらが律速となるかが変わることで実験において見られているシグモイド様の pH 依存性が成立しているのではないかと予想した。

A 反応は色素自身による分子内反応であり、これまでと同様の方法で計算を行って活性化自由エネルギーを算出すればよい。これに対して B 反応は周囲の塩基による反応であるので、一対多の分子間反応となる。このよ

うな過程を直接的に計算で再現するためには、様々な環境下にある周囲の塩基をモデル化しなければならず、また反応に使われる塩基が周囲から除かれたことへの影響も考慮しなければならないため困難である。

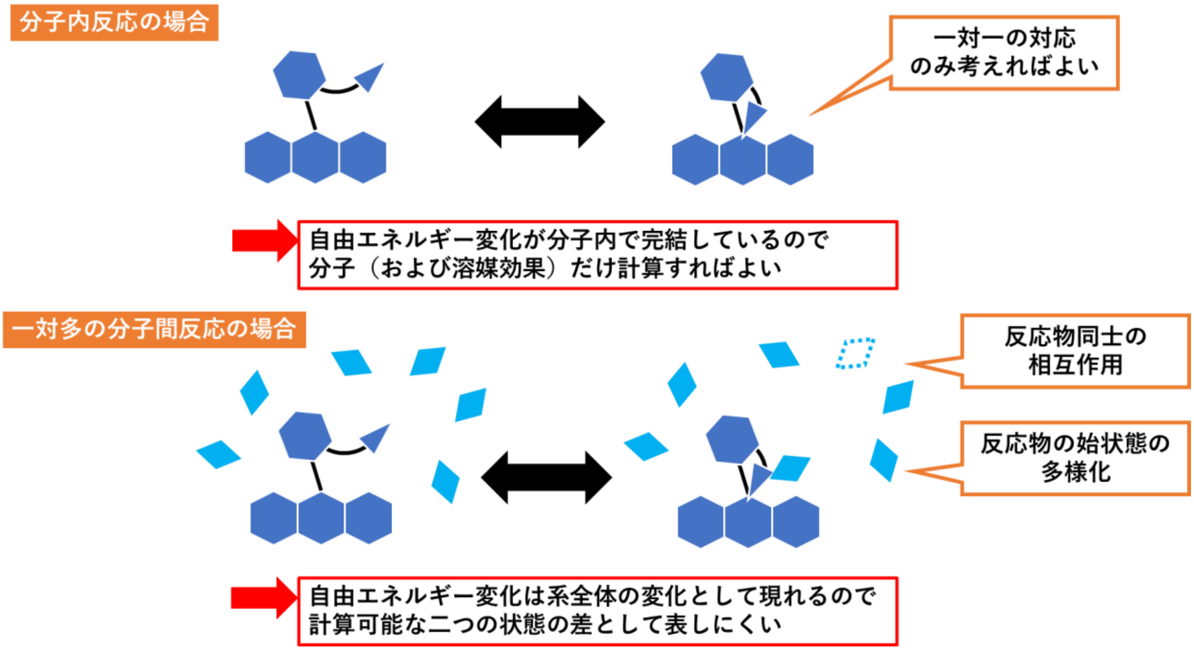


Figure 3- 5　Difficulties in calculating intermolecular reactions.

これを解決するため、B 反応の速度の見積もりに関してさらに以下のような近似を加えることとした。

- 閉環反応を引き起こすのは水酸化物イオンのみと考え、他の分子（緩衝液のリン酸イオン等）が直接的に影響しないと仮定する
- 水酸化物イオンによる作用は henderson–hasselbalch の式に従って、HM 基の pK_a（pK_{aOH}）に応じた確率で生じるとする
- 水酸化物イオンが作用した後の反応はアニオン化した色素自身が自発的に引き起こす反応であると考え、この速度と水酸化物イオンが作用する確率の積が実質的な反応速度となる

このように、一対多の分子間反応を pK_{aOH} に応じた確率的過程と色素による分子内反応に分離してモデル化することで、B 反応においてもこれまでと同様の方法で計算が行える。

ここまでに議論をまとめると、下のように図示でき、τ の計算式が導かれる。

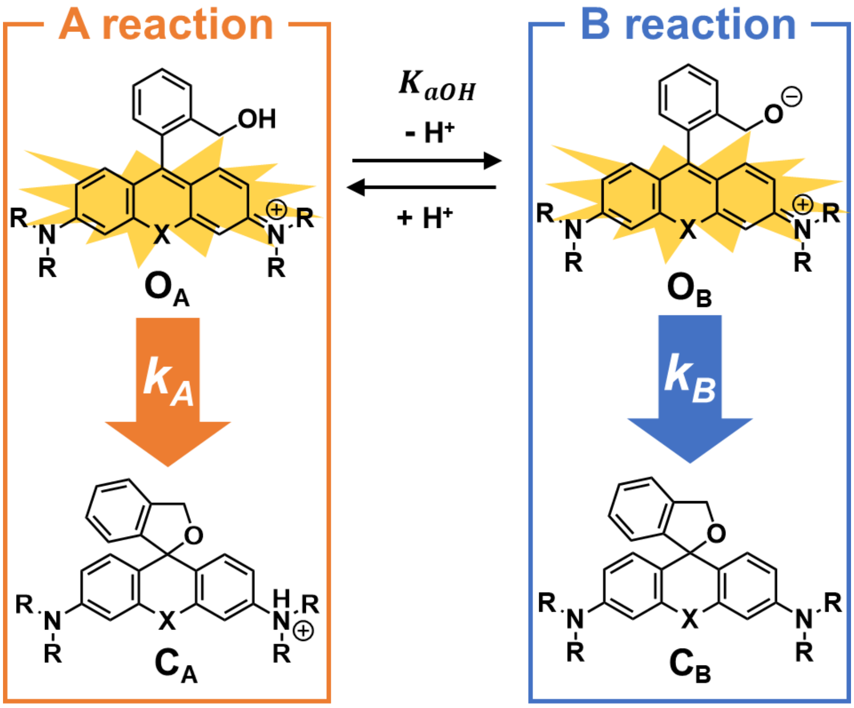


Figure 3-6　Expected reaction model of open-to-close prescess.

Henderson–Hasselbalchの式より

$$\begin{cases} pH = pK_{aOH} + \log\frac{[O_B]}{[O_A]} \leftrightarrow [O_B] = 10^{pH-pKaOH}[O_A] \\ V_{close} = k_A[O_A] + k_B[O_B] \\ [HMRG \cdot open] = [O_A] + [O_B] \sim [O_A] \end{cases}$$

※ $pH \ll pK_{aOH}$

3式より $V_{close} = (k_A + k_B 10^{pH-pKaOH})[HMRG \cdot open]$

したがって、 $k_{close} = k_A + k_B 10^{pH-pKaOH}$

$$\tau = \frac{1}{k_{close}+k_{open}} \sim \frac{1}{k_{close}} = \frac{1}{k_A+k_B 10^{pH-pKaOH}} = \frac{1}{k_A} \cdot \frac{1}{1+\frac{k_B}{k_A}10^{pH-pKaOH}}$$

τ 最大値の半値を与えるpHをpK_tとすると、

$$\frac{k_B}{k_A}10^{pKt-pKaOH}=1 \qquad \text{より} \qquad pK_t=\log\frac{k_A}{k_B}+pK_{aOH}$$

$$k=\frac{k_bT}{h}\exp(-\frac{\Delta G^{\ddagger}}{RT}) \qquad \text{であるから}$$

$$\frac{k_A}{k_B}=\frac{\frac{k_bT}{h}\exp(-\frac{\Delta G^{\ddagger}{}_A}{RT})}{\frac{k_bT}{h}\exp(-\frac{\Delta G^{\ddagger}{}_B}{RT})}=exp(\frac{\Delta G^{\ddagger}{}_B-\Delta G^{\ddagger}{}_A}{RT})$$

したがって、

$$pK_t=\log exp\left(\frac{\Delta G^{\ddagger}{}_B-\Delta G^{\ddagger}{}_A}{RT}\right)+pK_{aOH}=\frac{1}{\ln 10}\cdot\frac{\Delta G^{\ddagger}{}_B-\Delta G^{\ddagger}{}_A}{RT}+pK_{aOH}$$

このように、A･B 反応の活性化自由エネルギーを正しく求めることが出来れば、HMR 類の open form の寿命 τ を pH 依存性（pK_t）も含めて予測することが可能であると考えられる。

pK_{cycl} に対して十分に大きくない pH 条件下においては先述の近似が成立せずシグモイド近似からのずれが生じる可能性がある。しかし k_{open} も加味した式を考えると、下のように酸性側での閉環反応速度は近似を入れた場合と同様に A 反応に収束していくことが分かる。したがって、先述の近似を用いた式で十分に τ の pH 依存性をモデル化可能であると言える。

Henderson–Hasselbalchの式より

$$\begin{cases} pH = pK_{aNH} + \log\frac{[C_B]}{[C_A]} \quad \leftrightarrow \quad [C_B] = 10^{pH-pKaNH}[C_A] \\ V_{open} = k'_A[C_A] + k'_B[C_B] \\ [HMRG\cdot close] = [C_A] + [C_B] = (1 + 10^{pH-pKaNH})[C_A] \\ [HMRG\cdot close] = 10^{pH-pKcycl}[HMRG\cdot open] \end{cases}$$

4式より

$$V_{open} = \frac{10^{pH-pKcycl}}{1 + 10^{pH-pKaNH}}(k'_A + k'_B 10^{pH-pKaNH})[HMRG\cdot open]$$

したがって、

$$k_{open} = \frac{10^{pH-pKcycl}}{1 + 10^{pH-pKaNH}}(k'_A + k'_B 10^{pH-pKaNH})$$

$$\tau = \frac{1}{k_{close} + k_{open}} = \frac{1 + 10^{pH-pKaNH}}{(1 + 10^{pH-pKaNH})(k_A + k_B 10^{pH-pKaOH}) + 10^{pH-pKcycl}(k'_A + k'_B 10^{pH-pKaNH})}$$

$$pH \to -\infty \ \Rightarrow \ \tau \to \frac{1}{k_A}$$

以降、このモデルを基本としてA反応・B反応の計算条件を検討し、実測値を再現する計算条件の探索を行った。

第二節　HMR 類のスピロ環閉環反応に関する水和様式の解析

pK_{cycl} 計算からの類推による水和様式の推定

pK_{cycl} の計算モデルでは pK_{aOH}, pK_{aNH} という二つの既知定数を盛り込むことで計算によって評価すべき平衡定数を一つに集約させることができたが、上記のモデルのように τ の計算では HMR 類の酸塩基平衡の両方の経路を評価する必要がある。また、新しく遷移状態の自由エネルギーを正確に見積もる必要がある。これらの化学種における電荷の偏り方（ないし電子状態）はこれまで計算した局所安定構造とは異なると考えられる。このため、酸性側の open form・closed form 間の平衡のみ評価で予測が行えた pK_{cycl} のエネルギー計算とは異なる第一水和の効果や計算条件が重要となる可能性がある。

この検討において最も確実な方法は、様々な計算条件と水和パターンを列挙しグリッドサーチを行うことであるが、遷移状態の構造最適化は難易度・計算コストが高いため、大量の計算を行うことは困難である。そこで、これまで検討してきた条件での結果を基盤として、τ の計算のみに考慮が必要となる効果を順次付け加えていくことで実験値を再現する ΔG を導くことのできる条件を探っていくこととした。

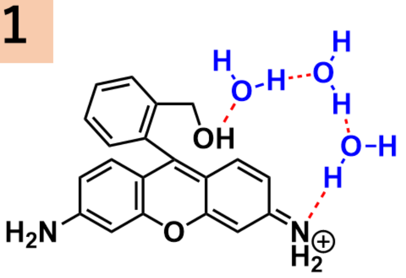
A 反応については、ここまで解析した酸性条件下での開環反応の逆反応であると考えられる。水3分子の架橋を通じた open / close 構造が酸性側の平衡定数を規定していたため、その間をつなぐ遷移状態が反応速度の評価に重要であると考えることは自然である。実際に、水3分子からなる水和パターンにおいて遷移状態の自由エネルギーを比較してみると、3分子の架橋を有する構造がもっとも安定となることが分かった（Table 3-1）。このた

め、始めにこの架橋構造をそのまま基本とし、検討の過程で必要が生じた場合はさらに水分子を追加していくこととした。なお、これより後の計算では遷移状態最適化計算の収束性を向上させるため、水素原子に対しても分極関数 p を添加して計算を行っている。

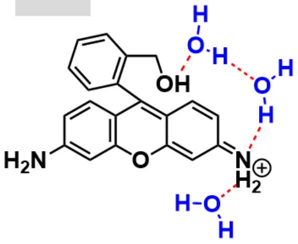
Table 3- 1　Calculated free energy of TSs of HMRG with 3 explicit water molecules (B3LYP/6-31G(d), scrf=pcm).

	ΔG (kJ/mol)	存在比(%)
TS 1	0.0	98.86
TS 2	22.5	0.01
TS 3	26.1	< 0.01
TS 4	34.0	< 0.01
TS 5	11.2	1.12

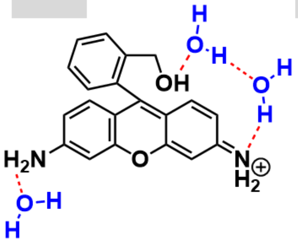
1



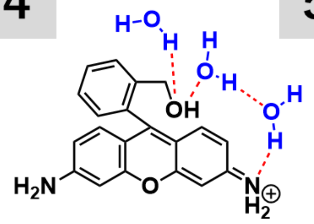
2



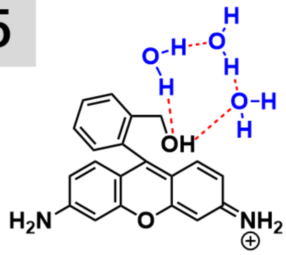
3



4



5



B 反応は、中・塩基性条件下でのアルコキシドイオンによるキサンテン環 9 位への求核攻撃である。この反応の始状態は hydroxymethyl 基にアニオンが強く局在している電荷の偏りが極めて大きい状態であり、この部分に対する水分子の水素結合による効果が特に重要であると考えられる。

これを考え、まず hydroxymethyl 基に水分子を一つ配置して計算を行った。しかしながら、構造最適化を行うと HMRG は open form の局所安定構造に行き着かずに closed form へと収束してしまった。初期構造を様々

に変えて計算を行ってみても closed form へと収束することから、水分子一つによる作用ではアニオンの安定化が十分ではなく、強いクーロン相互作用によって蛍光団（カチオン性）への求核攻撃が速やかに起こってしまうことが考えられた。

Figure 3- 7　Optimization of HMRG (open form, anionic) with a water molecule.

同様の検討を水2分子においても行ったところ、下のように hydroxymethyl 基に水分子を二つ配置して計算を行った場合のみ、構造が open form として収束することが分かった。

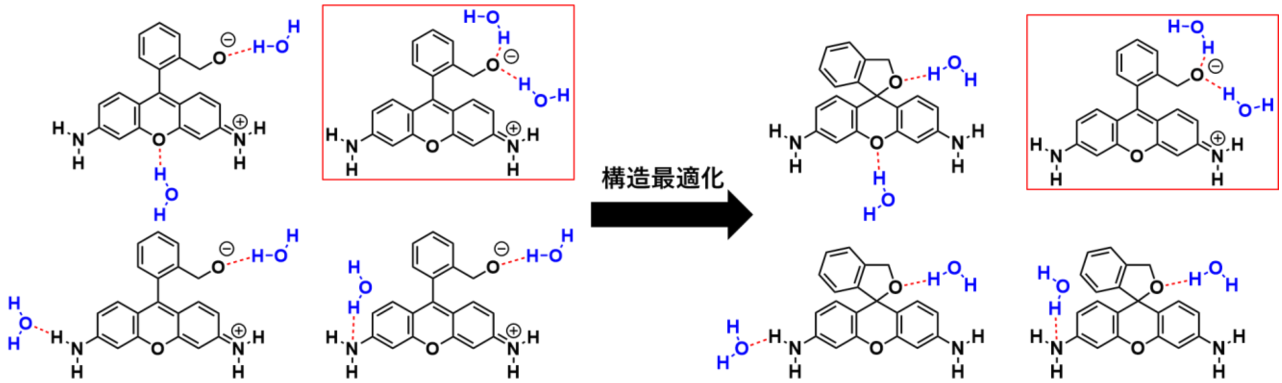


Figure 3- 8　Optimization of HMRG (open form, anionic) with 2 water molecules.

これを踏まえ、B 反応においては hydroxymethyl 基のアニオンの安定化に少なくとも水 2 分子の効果が必要と判断し、初期検討の条件に設定した。

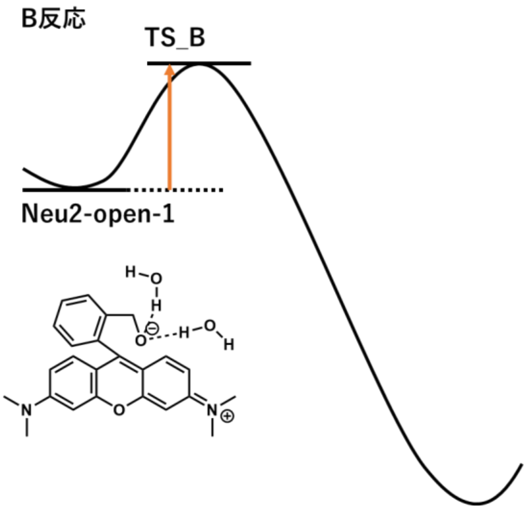


Figure 3-9　　First-shell hydration related to B reaction.

計算条件の最適化

これらの水和・計算条件における初期設定を踏まえ遷移状態を計算し、実験値との照合を行いながら少しずつ改良していくこととした。

まず、pK_{cycl} 計算において重要であると明らかになっている A 反応の方を信頼性が高いと考えて固定し、B 反応の計算条件を様々に変えて予測値がどう変わるかを検討した。計算対象は実験データの存在する HMRG, pH10 を選択した。活性化自由エネルギーの算出にあたっては、まず遷移状態を計算し、その後 IRC 計算[25]をかけることによって open form 側に終端構造を求め、これら二つの構造の自由エネルギー差とした。

Table 3- 2　Benckmark calculation of B reaction. (**A:** B3LYP/6-31G(d, p), PCM)

Model Chemistry (B)	ΔG A (kJ/mol)	k A (/sec)	ΔG B (kJ/mol)	k B (/10^{-8}sec)	Calculated TAU (msec)
HF/6-31+G(d)	56.4	808.0	8.6	1910	0.00132
HF/6-31+G(d), scrf=SMD	56.4	808.0	22.4	7.17	0.273
HF/6-31+G(d,p)	56.4	808.0	10.7	825	0.00304
HF/6-31+G(d,p), scrf=SMD	56.4	808.0	22.5	7.03	0.277
APFD/6-311+G(2d,p), scrf=SMD	56.4	808.0	10.4	926	0.00271
HF/6-31+G(d), corrected with E(MP2/6-311+G(2d,p))	56.4	808.0	-4.6	404000	0.00000622
HF/6-31+G(d,p), scrf=SMD, corrected with E(MP2/6-31+G(d,p),scrf=SMD)	56.4	808.0	-6.5	842000	0.00000298
Measured TAU (sec)					8.93

下二行の「corrected with E」とは、低級な条件（HF）で構造最適化・振動解析を行った後に高級な計算（MP2）で内部エネルギーE のみを補正していることを意味する。つまり、

$$G = G_{HF} - E_{HF} + E_{MP2}$$

として算出しており、HF の最適化構造で内部エネルギーを MP2、熱力学補正を HF で計算している。

結果から、B 反応の条件を「HF / 6-31+G(d,p), scrf=SMD」とすると計算モデルは実測値に近い値を返すことが分かった。SMD[26] は溶媒中の自由エネルギーを正しく見積もることができるようにパラメータが設定された scrf である。低級な条件（HF）で構造最適化・振動解析を行った後に高級な計算（MP2）で内部エネルギーを計算する方法は、今回の目的には合致しなかった。なお表中の条件以外にも様々な条件を試したが、pK_{cycl} 計算に用いている B3LYP による計算では負の振動モードとしてスピロ環開閉の反応経路を含んだ遷移状態に収束しなかった。エネルギー曲面を見るとスピロ環閉環に際してエネルギーが単調減少しており、遷移状態付近で上に凸と

ならないため遷移状態に近い構造をとったとしても計算プログラムとして厳密に鞍点を決めることが出来ないのではないかと考えられた。すなわち、ここで用いた水和パターンの条件での B3LYP による計算は精度が悪く、遷移状態とその反応前の構造のわずかなエネルギー差を区別できないことが示唆された。

この条件「HF / 6-31+G(d,p), scrf=SMD」を用いて種々の誘導体における計算値・測定値の比較を行った。

Table 3- 3 τ calculation of HMR derivatives
(**A:** B3LYP/6-31G(d, p), PCM, **B:** HF/6-31+G(d, p), SMD).

Compound	pK_{aOH}	ΔG_A (kJ/mol)	k_A (/sec)	ΔG_B (kJ/mol)	k_B (/10^{-8}sec)	計算値 pH10 (msec)	測定値 pH10 (msec)	pK_t
HMRG	15.4	56.4	808.0	22.5	7.03	0.277	8.9	9.45
HMAcRG	15.4	36.2	2789626.1	13.1	312	0.000343	0.78	11.35
CF3HMRG	12.4	57.8	448.5	22.8	6.09	0.000412	0.3	6.26
HMSiR600	15.4	42.0	265533.4	19.7	21.9	0.00365	1.8	11.48
HMSiR	15.4	48.7	17718.2	22.7	6.56	0.0492	8.55	10.83

結果から、大小関係の大まかな相関は見られるものの HMRG 以外の誘導体では計算値は実測値を再現するものとはならなかった。計算条件としては比較的低級のものを用いているため、より正確な計算を使って計算してみることもアプローチの一つとして考えられたが、HMRG での結果（Table 3-3）からは単に計算精度のみを向上させても結果が良くならないことが示唆される。そこで、この計算レベルのままでどこまで精度が上がり得るのかを検討することが先決と判断し、計算に用いるモデル、具体的には「どこを ΔG とするか」という点について再考することにした。

ここまでの検討では、下のように local minimum, TS の自由エネルギー差を使用している。

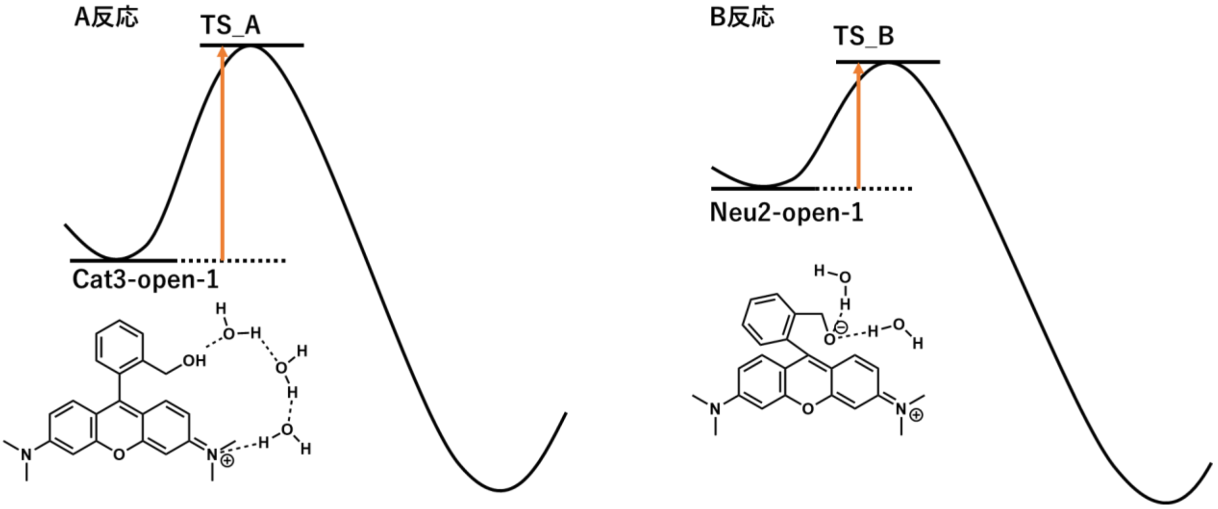


Figure 3-10　　First-shell hydration related to A/B reaction.

しかし、これはあくまでも HMR 類の閉環が起こる素反応の自由エネルギー変化に過ぎず、必ずしも open form から closed form への変化の反応過程全体での総自由エネルギー変化を表しているとは限らない。すなわち、閉環反応自体のスタート地点（cat3-open-1, neu2-open-1）に至るまでに必要な自由エネルギーがさらに存在する場合、それらも考慮に入れなければならない。

まず B 反応であるが、前述の通りここまでの検討では単純に遷移状態からの IRC 計算の終端構造を採用していた。しかし、改めて水和の自由エネルギーを見てみると、図のように HM 基がひっくり返った構造（neu2-open-2）の方がさらに安定となることが分かった。ここまでの　τ の計算結果を見ると、活性化自由エネルギーを低く見積もりすぎている（計算された反応速度が実測値より速すぎる）ことがわかる。したがって、この open-1 / open-2 間の自由エネルギー変化（HM 基の回転にかかる変化）を計算に含める必要があるのではないかと考えた。

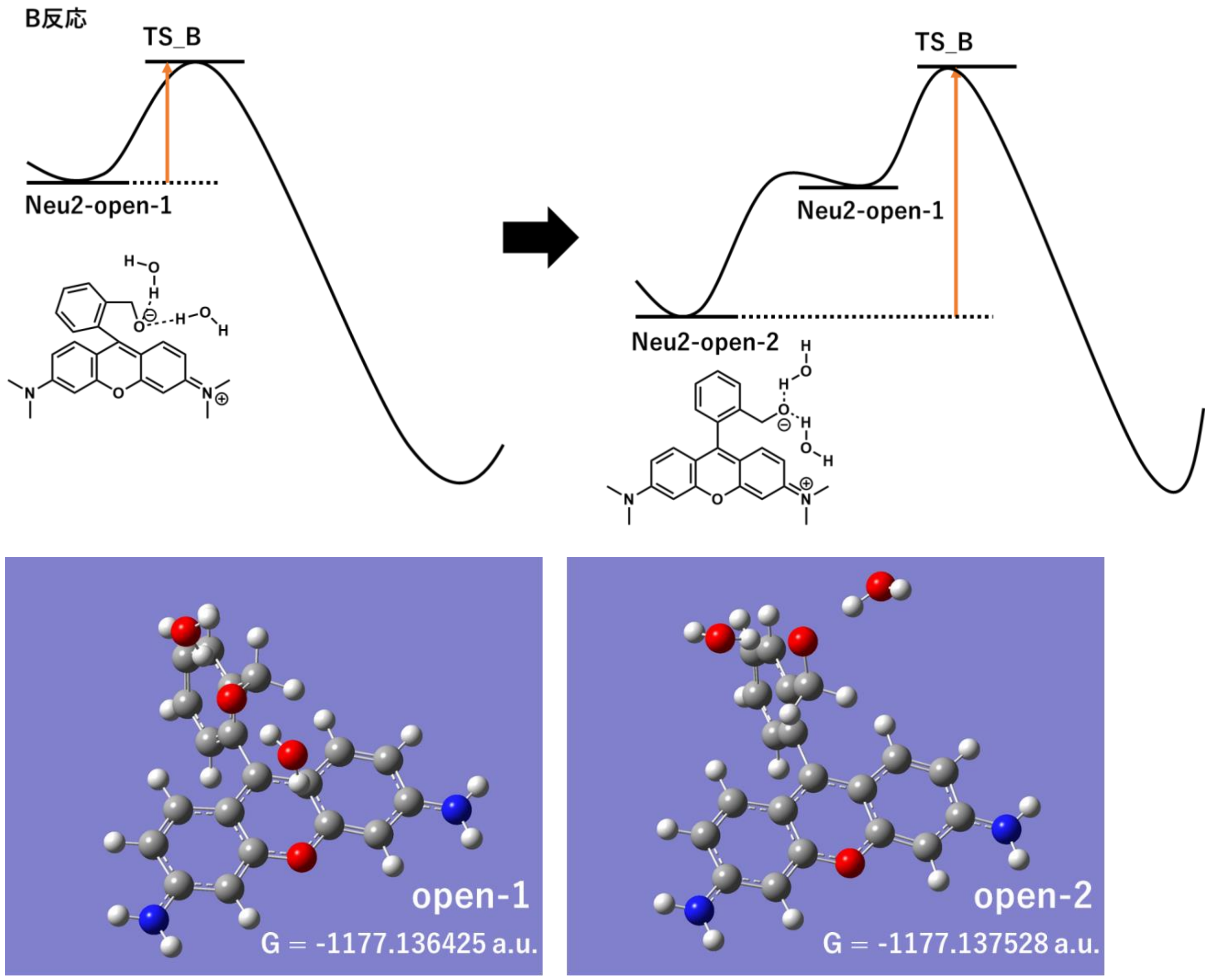


Figure 3-11　Modification of calculation model (B reaction, HF/6-31+G(d,p), scrf=SMD).

IRC 計算は鞍点（遷移状態）を始点として反応経路に対応する勾配にそって極小点まで数値的に進むため、途中に open-1 のような底の浅い極小点がある場合はそこで計算が終了してしまう。このように、真に安定な始状態（open-2）に計算が行きつかない場合が考えられる。

同様に A 反応においても、IRC の終点が反応の始状態ではない可能性を考えた。前章で行った水分子のランダム配置における網羅的水和配置計算を見ると、水分子が HM 基を取り囲むような構造（cat3-open-2）が最も安定な構造であることが分かる。

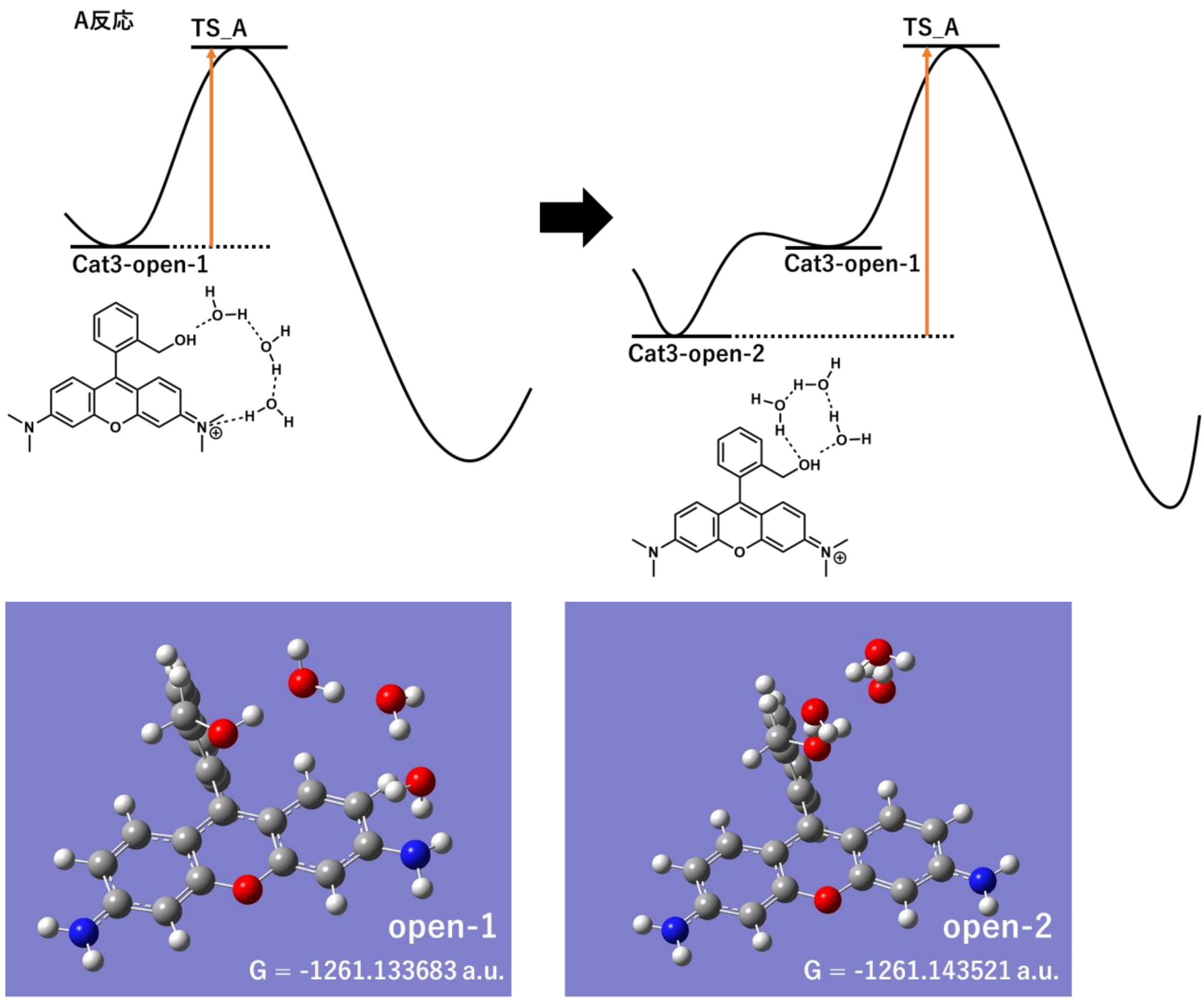


Figure 3-12　Modification of calculation model (A reaction).

カチオンがアミノ基に集中する closed form と異なり、open form ではカチオンがキサンテン環全体に広がるため、水分子を引き付ける力が弱くなり、またベンゼン-キサンテン間の結合軸の回転が可能となるため 3 分子架橋は不安定化する。HM 基が非イオン型の状態から閉環が起こるためには、この 3 分子架橋がいくらかの自由エネルギーの損失を伴って形成されなければならない（open-2 から直接スピロ環化が起こる経路が不安定であることは先述の遷移状態比較（Table 3-1）から明らかである）。この分のエネルギー変化を計算において考慮するため、この構造を改めて A 反応の始状態として設定した。また、HMAcRG については、pK_{cycl} 計算での水分子の配置

法に従ってアミド基の N-H に配位する水分子も計算に含めた。

Table 3- 4　τ calculation of HMR derivatives (**A:** B3LYP/6-31G(d, p), PCM,　**B:** HF/6-31+G(d, p), SMD, open-2)

Compound	pK_{aOH}	ΔG_A (kJ/mol)	k_A (/sec)	ΔG_B (kJ/mol)	k_B ($/10^{-8}$sec)	計算値 pH10 (msec)	測定値 pH10 (msec)	pK_t
HMRG	15.4	82.19	0.02	25.39	2.18	1.15	8.9	5.43
HMAcRG	15.4	65.77	18.03	23.93	3.94	0.63	0.78	8.05
CF3HMRG	12.4	72.09	1.41	32.61	0.118	0.02	0.3	5.47
HMSiR600	15.4	60.85	131.80	30.00	0.34	3.75	1.8	9.98
HMSiR	15.4	71.36	1.89	28.90	0.529	4.71	8.55	7.94

計算値は実測値に比べおおむね良い一致を見せた。

K_{aOH}の報告値が存在しない場合

ここまで、pK_{cycl}、τ 計算ともに pK_{aOH}（HM 基部位の pK_a）を類似構造の pK_a 実測値で代用してきたが、誘導体の種類によってはこれが存在しない場合も考えられる。現状の予測モデルを HM 基の pK_a に依らない（その分も活性化自由エネルギーとして計上されている）モデルに拡張できる可能性も考えられるが、計算モデル自体を変更するよりも pK_a を予測する系を別に考案したほうが融通の利くモデルになると考え、これを試みた。

pK_a の絶対値を予測するのではなく、信頼性の高い実測値がある構造からのΔpK_a として計算するほうが確実であると考えた。またプロトンの濃度といったマクロなパラメータを直接的に扱うのは量子化学計算上困難であるので、「類似した構造間でのプロトンの受け渡し反応」を仮想し、解離定数 K_a 中の$[H^+]$項を消去しよう考えた。具

体的には、以下のようにエタノールの pK_a報告値[27]を用いてアルコール類の pK_aを算出するモデルを構築した。

自由エネルギー変化は分子量が小さいことを考え比較的高精度な条件 APFD/6-311+G(2d,p), scrf=SMD で計算した。また、アルコキシド側に最大3分子の第一水和を置いて計算を行った。

R-OH　（基準とするアルコール）

R'-OH　（pK_aを求めたいアルコール）　とする

$$\boldsymbol{K_{aOH}} = \frac{[\boldsymbol{RO^-}][\boldsymbol{H^+}]}{[\boldsymbol{ROH}]} \qquad \boldsymbol{K'_{aOH}} = \frac{[\boldsymbol{R'O^-}][\boldsymbol{H^+}]}{[\boldsymbol{R'OH}]}$$

辺々を割って

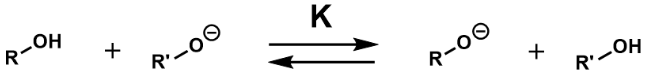
$$\frac{\boldsymbol{K_{aOH}}}{\boldsymbol{K'_{aOH}}} = \frac{[\boldsymbol{RO^-}][\boldsymbol{R'OH}]}{[\boldsymbol{ROH}][\boldsymbol{R'O^-}]}$$

両辺の常用対数をとると

左辺$= \log\frac{K_{aOH}}{K'_{aOH}} = \log\frac{1}{K'_{aOH}} - \log\frac{1}{K_{aOH}} = \boldsymbol{pK'_{aOH} - pK_{aOH}}$

右辺$= \log K = \log\left(exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right)\right)$

※　ただし平衡定数Kは



ΔG： pK_aを求めたいアルコールが
基準アルコールからプロトンを奪う
自由エネルギー変化

よって

$$\boldsymbol{pK'_{aOH} = pK_{aOH} + log\left(exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right)\right)}$$

Table 3- 5　pK_a calculation with first-shell hydtaion

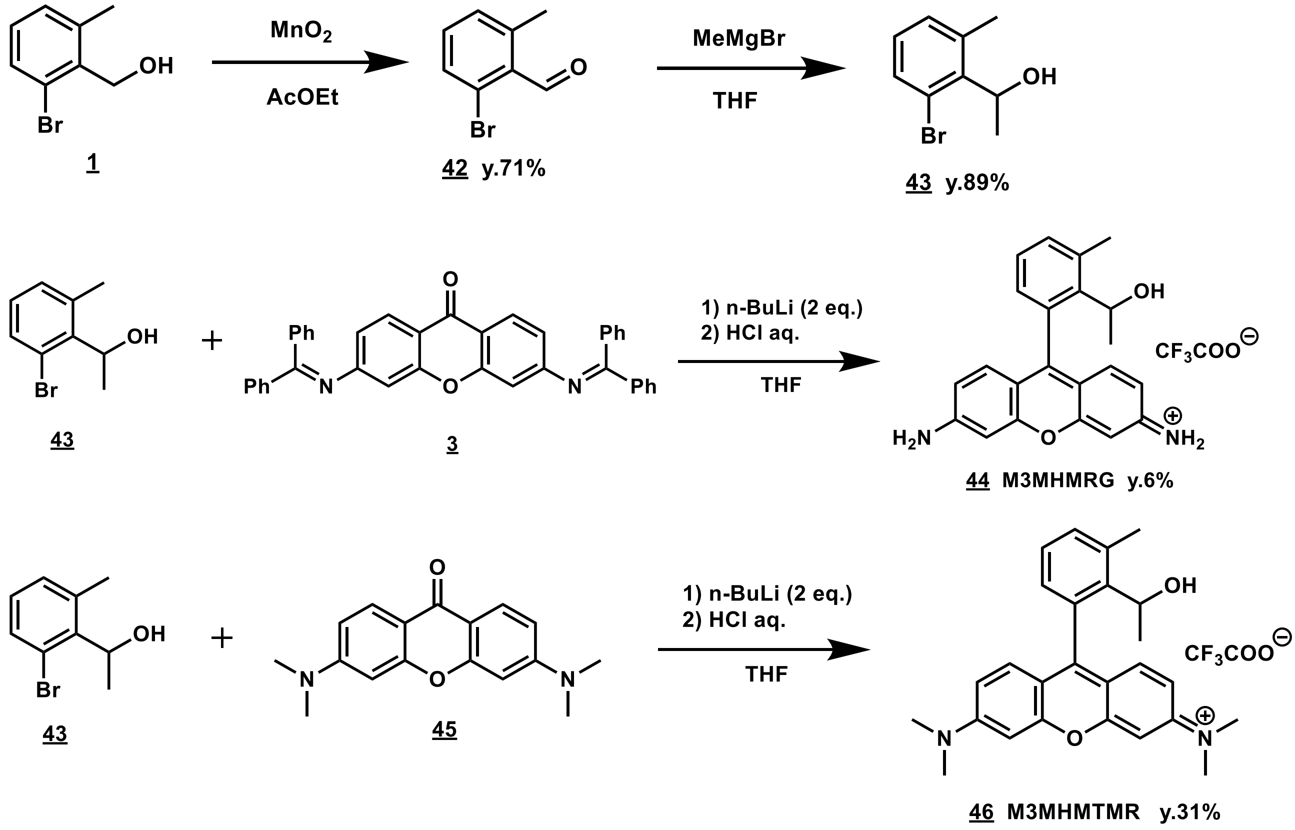
	calculated pKa			measured pKa
	No　Water	2 Water	3 water	
CF3CH2OH	8.6	10.5	11.9	12.4
CF3CH(OH)CF3	3.4	6.7	9.7	9.3
PhOH	4.8	8.5	10.5	10.0
BnOH	14.4	13.9	14.9	15.4
EtOH(Reference)				15.9

結果から、アルコキシドに第一水和を置くごとに計算値の精度が良くなり、3 分子を配位させた状態では誤差 0.5 程度で pK_a を再現することが可能であった。この方法を使えば、未知のアルコールを用いても計算モデルから τ を予想することが可能である他、同様の手順でアニリン誘導体等の pK_a を予測することも可能だと考えられる。

第三節　τ 計算モデルの評価

スピロ環閉環速度の実測と計算値との比較

ここまで構築してきた予測モデルの検証を行うため、第一節で述べた過渡吸収測定をいくつかの化合物において行い、τ の pH プロットを取得することとした。測定化合物は 4COOH-HMSiR, 5COOH-HMSiR600, M3MHMRG, M3MHMTMR, 3MHMRG を用意し、このうち M3MHMRG, M3MHMTMR は新規に合成を行った。

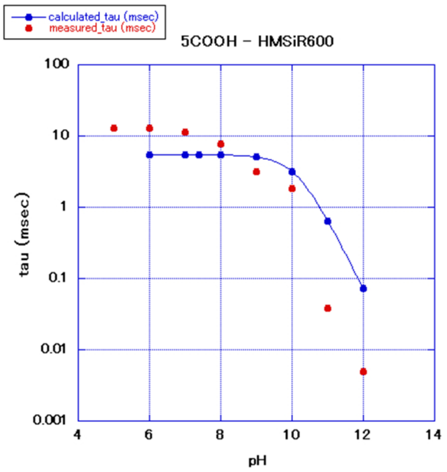


Scheme 3- 1　Synthesis of M3MHMRG, M3MHMTMR.

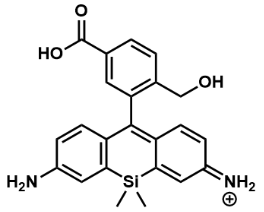
測定の結果、M3MHMTMR ではレーザー照射で不可逆的な副反応が起き測定不可であった。レーザーパルスを照射するにつれて試料が蛍光を発するようになっていったことから、closed form の励起により open form への遷移以外の不可逆的な副反応が進行してしまったと考えられる。残りの四種に関して、実測値と理論値の重ね合わせを行った結果を以下に示す。縦軸が対数であることに注意されたい。

Table 3- 6　Comparison between measured and calculated lifetime of open form. LFP measurements were performed with 5COOH-HMSiR (50μM) in 10mM NaPi and 266nm layser.

5COOH-HMSiR600



		calculation	
pH	measured tau (msec)	tau (msec)	A reaction rate (%)
5	13.1	5.45	100
6	13.0	5.45	100
7	11.5	5.45	99.9
8	7.7	5.41	99.3
9	3.1	5.08	93.1
10	1.8	3.14	57.6
11	0.038	0.65	11.9
12	0.0050	0.073	1.3



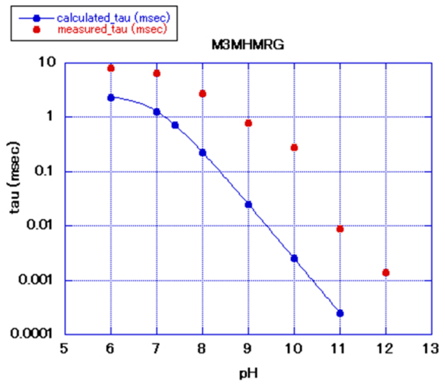
	Calc.	Meas.
pK_{cycl}	< 4	4.4
pK_t	10.1	8.2

計算条件
A反応：B3LYP/6-31G(d,p) scrf=SMD
B反応：HF/6-31+G(d,p) scrf=SMD
※COOH基は除いて計算

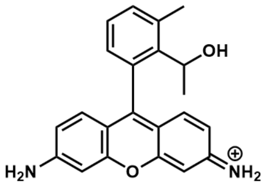
B反応の推定誤差：　7 kJ/mol

Table 3- 7　Comparison between measured and calculated lifetime of open form. LFP measurements were performed with M3MHMRG (50μM) in 10mM NaPi and 266nm layser.

M3MHMRG



		calculation	
pH	measured tau (msec)	tau (msec)	A reaction rate (%)
6	8.1	2.36	90.6
7	6.6	1.28	48.9
8	2.8	0.228	8.7
9	0.8	0.0248	0.9
10	0.3	0.0025	0.1
11	0.0088	0.00025	0.0
12	0.0014	0.000025	0.0



	Calc.	Meas.
pK_{cycl}	< 4	4.7 ※
pK_t	7.0	7.7

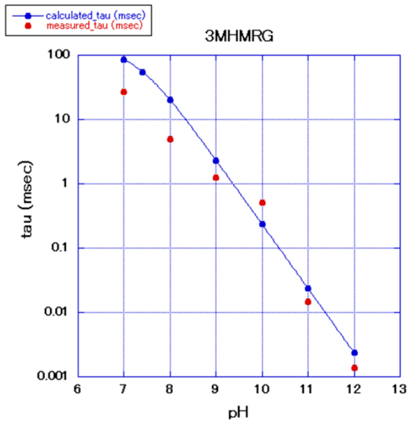
※最大値で100% openになって
いないため実際の値はさらに低い

計算条件
A反応：B3LYP/6-31G(d,p) scrf=SMD
B反応：HF/6-31+G(d,p) scrf=SMD

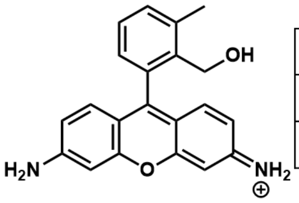
B反応の推定誤差：　10 kJ/mol

Table 3- 8　Comparison between measured and calculated lifetime of open form. LFP measurements were performed with 3MHMRG (50μM) in 10mM NaPi and 266nm layser.

3MHMRG



		calculation	
pH	measured tau (msec)	tau (msec)	A reaction rate (%)
7	27.3	85.1	64.1
8	4.9	20.1	15.1
9	1.3	2.33	1.8
10	0.5	0.237	0.2
11	0.015	0.0237	0.0
12	0.0014	0.00237	0.0



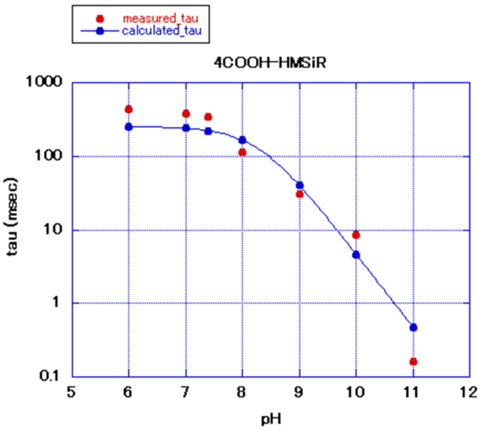
	Calc.	Meas.
pK_{cycl}	6.1	6.6
pK_t	7.2	N.D.

計算条件
A反応：B3LYP/6-31G(d,p) scrf=SMD
B反応：HF/6-31+G(d,p) scrf=SMD

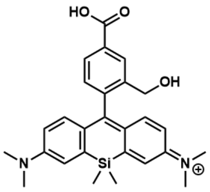
A反応の推定誤差：　4 kJ/mol

Table 3- 9　Comparison between measured and calculated lifetime of open form. LFP measurements were performed with 4COOH-HMSiR (50μM) in 10mM NaPi and 306nm layser.

4COOH-HMSiR



pH	measured tau (msec)	calculation tau (msec)	calculation A reaction rate (%)
6	439	251	99.5
7	375	240	94.9
7.4	338	223	88.2
8	115	165	65.3
9	31.1	40	15.8
10	8.55	4.66	1.8
11	0.164	0.474	0.2



	Calc.	Meas.
pK_{cycl}	6.2	5.7
pK_t	8.3	7.4

計算条件
A反応：B3LYP/6-31G(d,p) scrf=SMD
B反応：HF/6-31+G(d,p) scrf=SMD
※COOH基は除いて計算

B反応の推定誤差：　3 kJ/mol

生理的 pH 付近での誤差は 2-3 倍程度に収まり、このモデル化・計算による予測を用いて本格的な応用も視野に入れることができると考えられた。比較的誤差の大きくなった B 反応に関しては、実測値をモデルにおける式にフィッティングし、活性化自由エネルギーに換算することで推定誤差を求めた。A/B 反応が切り替わる pH（pK_t）が化合物によって大きく異なる点が興味深い。

計算条件のさらなる改良に向けた検討

さらに安定した結果を期待できる計算条件を目指し、ここまで固定して考えていた第一水和の置き方についてさらに検討を行った。

初期条件検討の部分でも述べたが、アニオン状態の HM 基においては、その強い負電荷を周辺の水分子が和らげていると考えられる。水素結合可能な酸素原子の電子対は三つあり、三分子の水がこれらの電子対を埋めるように配位していると考えることができる。しかし closed form となると下のように酸素原子の電子対は二つとなるため、三つ目の水分子は追い出されてしまう。ここまでのモデルでは、水分子の追加配置を二分子の状態までで見合わせており、この三つ目の水分子によるアニオンの安定化作用は無視されている。

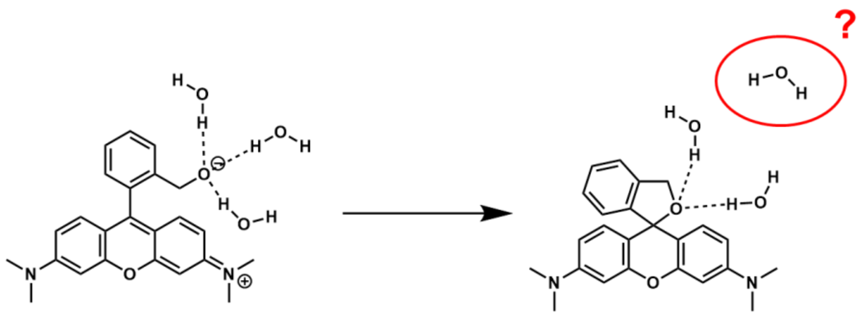


Figure 3- 13　Role of 3rd first-shell water molecule in open-to-close reaction.

しかし、pK_{cycl} 計算を含めたここまでの全ての検討から考えて、電荷が強く局在化している部位に十分な水和分子を配置することが正確なエネルギー計算の必要条件であると言える。実際に水3分子を配置した構造の自由エネルギーを比較すると3分子全てをアルコキシドアニオンに配位させたものが特に安定であることから、水2分子を用いた安定化では不十分であることが考えられる。

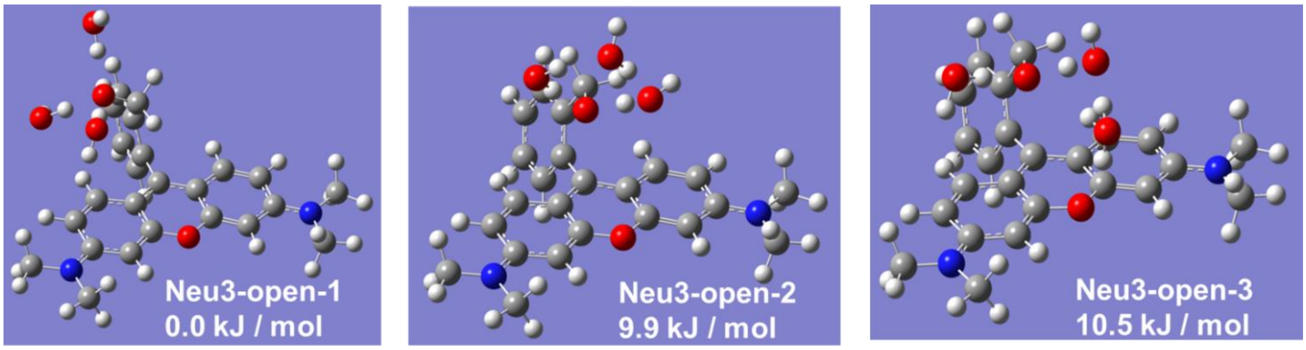


Figure 3- 14　Structures and free energy values (from neu3-open-1) of neutral HMTMR with 3 first-shell water molecules.

より安定した計算結果を返す条件を確立するため、三分子目の効果を入れ込むことを考えた。スピロ環化によって酸素原子から引き剥がされた水分子は、近傍にある別の水分子と水素結合を形成して安定すると考えられる。この新しくできる水素結合を計算に入れれば、量子化学的に評価する水素結合の本数が二つの計算で同じになるため、全体のエネルギー差の計算として公平なものになると言える。下のように、この水素結合の切り替わりを他の第一水和水との相互作用で代表させることを考えた。

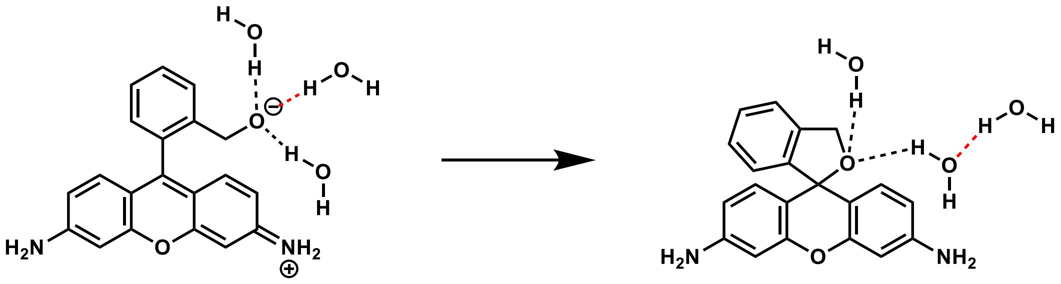


Figure 3- 15　Computationally estimation of 3rd first-shell water molecule in open-to-close reaction.

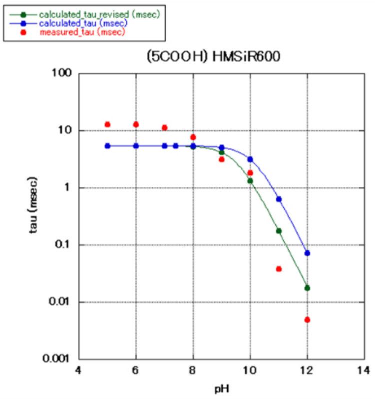
さらに、B 反応の計算条件についても再考した。ここまで用いている HF 法は電子相関を考慮していない等、エネルギー計算法としてはかなり粗い方法であり [22]、新規誘導体の実験値を信頼性高く予測するためには、様々な電子的効果を取り込んだエネルギー評価法を用いるべきだと考えられる。

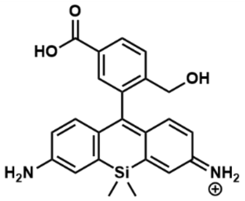
これまでこの条件を用いてきた理由としては、B3LYP 汎関数では反応に伴うエネルギー障壁を計算できない（遷移状態が鞍点にならない）ためであった。そこで、B3LYP 汎関数よりも安定した結果を返すことが知られている post-B3LYP 汎関数のうち、A 反応に用いている B3LYP 汎関数との評価の一貫性を期待し、CAM-B3LYP 汎関数 [28]（B3LYP 汎関数に対し長距離相互作用補正等を加え、活性化エネルギーの過小評価を防いでいる）を用いてエネルギー計算を試すこととした。

B 反応の計算を改良した場合の結果と改良前の計算の比較を以下に示す。

Table 3- 10　Comparison between measured and calculated lifetime of open form. LFP measurements were performed with 5COOH-HMSiR (50μM) in 10mM NaPi and 266nm laser.

5COOH-HMSiR600



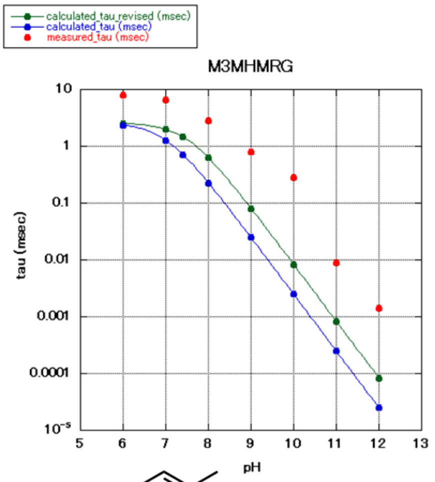


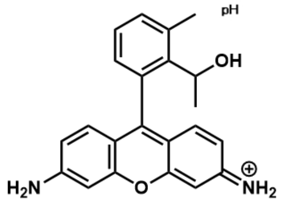
		revised calculation		calculation	
		A: B3LYP/6-31G(d,p) scrf=SMD B: Neu3, CAM-B3LYP/6-31+G(d,p) scrf=SMD		A: B3LYP/6-31G(d,p) scrf=SMD B: Neu2, HF/6-31+G(d,p) scrf=SMD	
pH	measured tau (msec)	tau (msec)	A reaction rate (%)	tau (msec)	A reaction rate (%)
5	13.1	5.45	100	5.45	100
6	13.0	5.45	100	5.45	100
7	11.5	5.43	99.7	5.45	99.9
8	7.7	5.29	97.1	5.41	99.3
9	3.1	4.19	76.8	5.08	93.1
10	1.8	1.35	24.9	3.14	57.6
11	0.038	0.18	3.2	0.65	11.9
12	0.0050	0.018	0.3	0.073	1.3
B reaction error (kJ/mol)		+ 3		+ 7	
pK_t		9.51		9.98	

※COOH基は除いて計算

Table 3- 11　Comparison between measured and calculated lifetime of open form. LFP measurements were performed with M3MHMRG (50μM) in 10mM NaPi and 266nm laser.

M3MHMRG

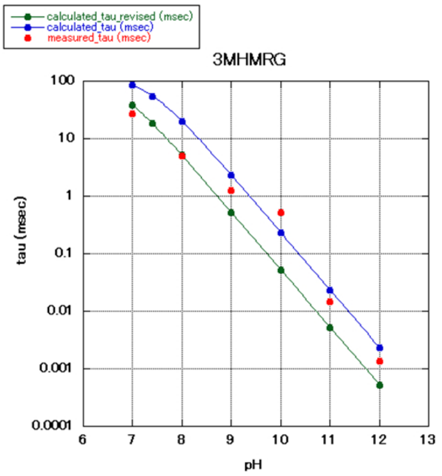


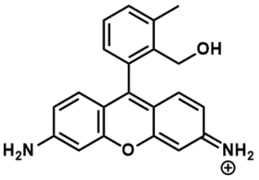


		revised calculation		calculation	
		A: B3LYP/6-31G(d,p) scrf=SMD B: Neu3, CAM-B3LYP/6-31+G(d,p) scrf=SMD		A: B3LYP/6-31G(d,p) scrf=SMD B: Neu2, HF/6-31+G(d,p) scrf=SMD	
pH	measured tau (msec)	tau (msec)	A reaction rate (%)	tau (msec)	A reaction rate (%)
6	8.1	2.53	97.0	2.36	90.6
7	6.6	1.99	76.3	1.28	48.9
8	2.8	0.63	24.3	0.228	8.7
9	0.8	0.081	3.1	0.0248	0.9
10	0.3	0.0084	0.3	0.0025	0.1
11	0.0088	0.00084	0.0	0.00025	0.0
12	0.0014	0.000084	0.0	0.000025	0.0
B reaction error (kJ/mol)		- 6		- 10	
pK_t		7.50		6.97	

Table 3- 12　Comparison between measured and calculated lifetime of open form. LFP measurements were performed with 3MHMRG (50μM) in 10mM NaPi and 266nm laser.

3MHMRG

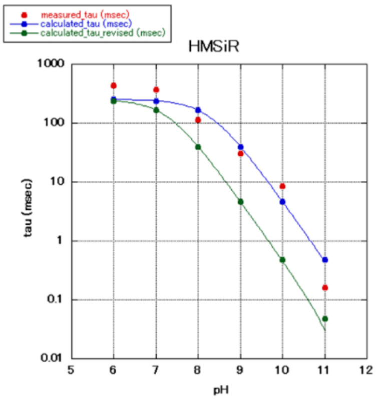


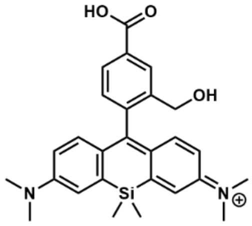


		revised calculation		calculation	
		A: B3LYP/6-31G(d,p) scrf=SMD B: Neu3, CAM-B3LYP/6-31+G(d,p) scrf=SMD		A: B3LYP/6-31G(d,p) scrf=SMD B: Neu2, HF/6-31+G(d,p) scrf=SMD	
pH	measured tau (msec)	tau (msec)	A reaction rate (%)	tau (msec)	A reaction rate (%)
7	27.3	38.0	28.6	85.1	64.1
8	4.9	5.12	3.9	20.1	15.1
9	1.3	0.53	0.4	2.33	1.8
10	0.5	0.053	0.0	0.237	0.2
11	0.015	0.0053	0.0	0.0237	0.0
12	0.0014	0.00053	0.0	0.00237	0.0
B reaction error (kJ/mol)		- 2		+ 1.5	
pK_t		6.59		7.24	

Table 3- 13　Comparison between measured and calculated lifetime of open form. LFP measurements were performed with 4COOH-HMSiR in 10mM NaPi and 308nm laser (by Dr. Uno).

4COOH-HMSiR





		revised calculation		calculation	
		A: B3LYP/6-31G(d,p) scrf=SMD B: Neu3, CAM-B3LYP/6-31+G(d,p) scrf=SMD		A: B3LYP/6-31G(d,p) scrf=SMD B: Neu2, HF/6-31+G(d,p) scrf=SMD	
pH	measured tau (msec)	tau (msec)	A reaction rate (%)	tau (msec)	A reaction rate (%)
6	439	240	94.9	251	99.5
7	375	165	65.2	240	94.9
8	115	39.9	15.8	165	65.3
9	31.1	4.65	1.8	40.0	15.8
10	8.55	0.474	0.2	4.66	1.8
11	0.164	0.0474	0.0	0.475	0.2
B reaction error (kJ/mol)		- 3		+ 3	
pK_t		7.26		8.27	

※COOH基は除いて計算

結果から、修正後の条件の方がより安定した結果が得られたと言える。3MHMRG については修正前より塩基性側の誤差こそ広がったものの、A 反応との相対値が正解に近づいたことで中性付近での精度は大幅に向上した。逆に 4COOH-HMSiR では誤差の大きさはさほど変わらないものの、A 反応との相対値がずれたことによって pKt が変動したことで最終結果の精度は幾分悪くなった。

いずれの場合も、計算式と実測値から求めた自由エネルギー誤差は修正後の条件でおよそ 3 kJ/mol まで狭まっており、エネルギーのスケールから考えて限界に近いところまで条件を最適化できていると考えられる。

スピロ環閉環速度に与える置換基の効果

超解像プローブとしての性質に影響を与えそうな構造展開（主にまだ合成されていない誘導体群）を多種計算し、置換基の導入による pK_{cycl} 計算値（CpK_{cycl}）と τ 計算値の変化を調べた。一部の誘導体・条件においては実測値との比較を行っている。

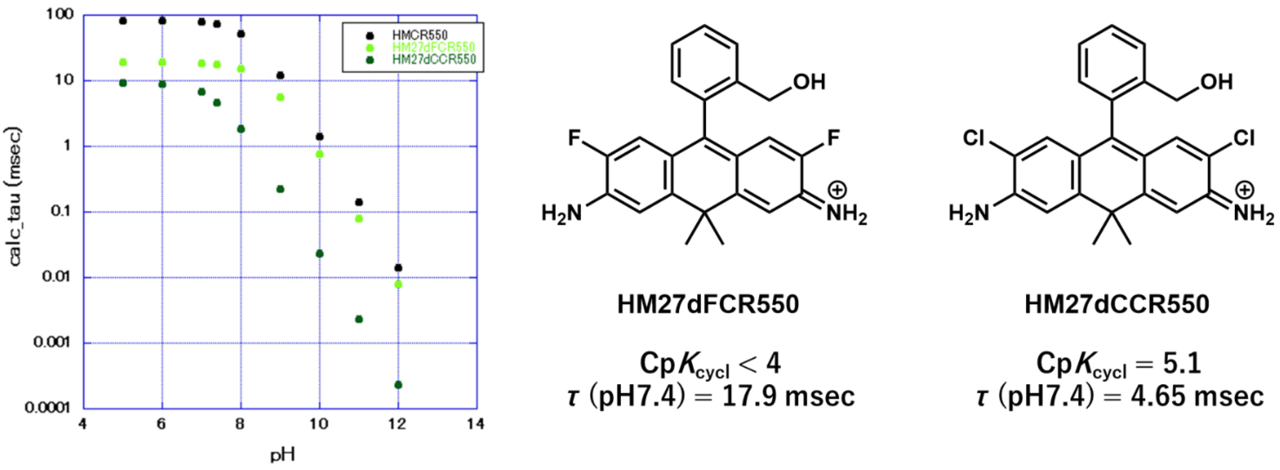


Figure 3- 16　Calculated pK_{cycl} and τ values of HM27dFCR550 and HM27dCCR550.

キサンテン環にハロゲンを導入したものでは、予想通り pK_{cycl} と τ の減少が見られた。pK_{cycl} に関しては Cl の場合あまり減少していないことが分かる。

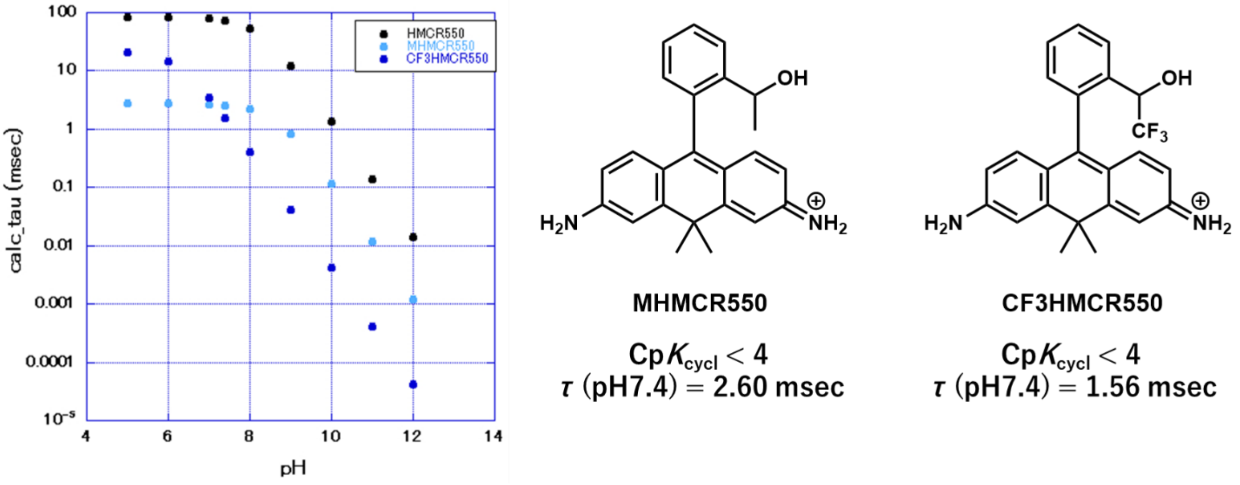
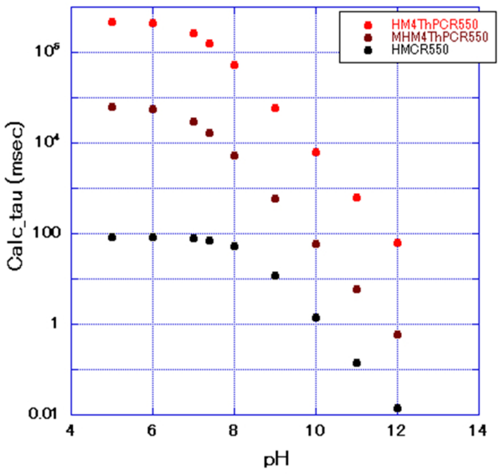
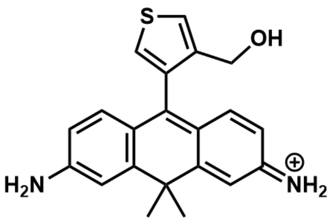


Figure 3- 17　Calculated pK_{cycl} and τ values of MHMCR550 and CF3HMCR550.

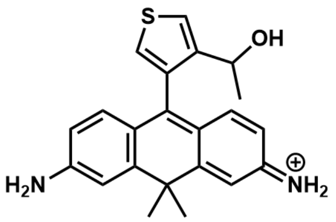
HM 基に立体障害を導入した場合、pK_{cycl} と τ の減少が見られた。ただし CF_3 基の場合は求核性を減少させる効果も働くため酸性側では CF3HMCR550 の方が、塩基性側では MHMCR550 の方が速いという結果になった。





HM4ThPCR550

CpK_{cycl} = 9.8
τ (pH7.4) = 1630 sec

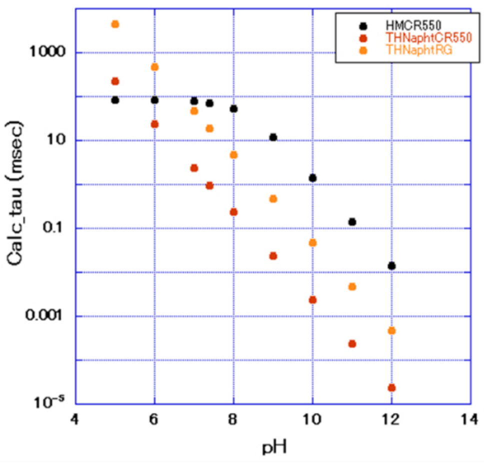


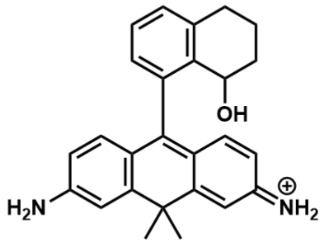
MHM4ThPCR550 (HMRY)

CpK_{cycl} = 8.7
pK_{cycl} = 9.2
τ (pH7.4) = 17 sec
τ (pH12) = 586 μsec
τ 実測値(pH12) = 307 μsec

Figure 3- 18　Calculated pK_{cycl} and τ values of HM4ThPCR550 and HMRY.

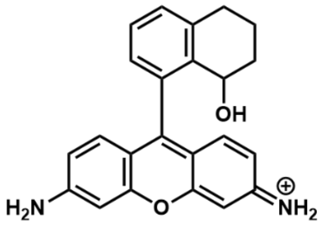
五員環を導入するとτは極めて長く、秒スケールとなった。pK_{cycl}が大きいため酸性・中性での LFP による実測はできないことに注意されたい。HMRY における実測値とはかなり良い一致を見せている。





THNaphtCR550

CpK_{cycl} = 7.3
τ (pH7.4) = 0.92 msec



THNaphtRG

CpK_{cycl} = 8.5
pK_{cycl} = 9.7
τ (pH7.4) = 18.6 msec
τ (pH12) = 0.5 μsec
τ 実測値(pH12) = 7.0 μsec

Figure 3- 19　Calculated pK_{cycl} and τ values of THNaphtCR550 and THNaphtRG.

Tetrahydro naphthol を導入し HM 基をキサンテンの方向に固定すると、τ は短くなった。五員環を導入した場合と比較すると、どちらも pK_{cycl} を上昇させる効果がありながら、τ に関しては五員環では上昇し THNapht では下降するということになる。これは、pK_{cycl} と τ を独立して調節するための戦略になり得る。

THNapht で τ が下降した理由としては、HM 基の向きの影響も考えられるが、それに加えてキサンテン環による立体障害によって水分子によるアニオン安定化が妨げられるためであると考えている。下図のようにアルコキシドに三分子の水が四面体型に配位できないためひずみが大きくなる。

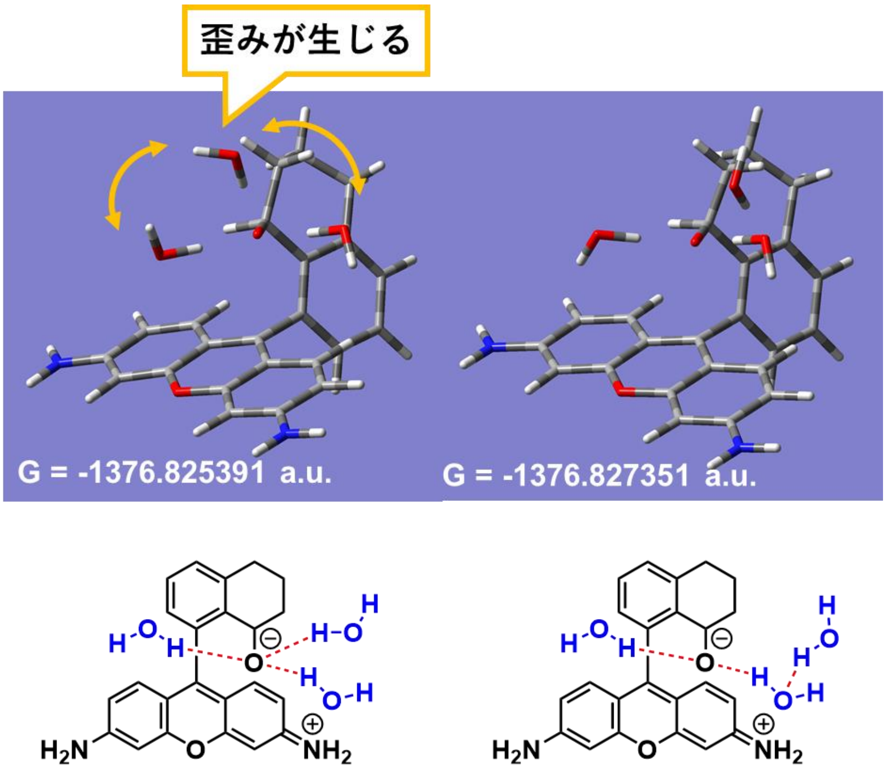


Figure 3- 20　(left) Structures hydrated THNaphtRG,

第四節　τ予測に基づく新規蛍光プローブの開発

構築した計算モデルに基づく蛍光プローブ設計のモデルケースとして、C-rhodamine を用いたスピロ環化型黄色超解像プローブの開発を試みた。既報 [8] におけるイメージング条件を同様に使うことを考え、各パラメータの目標値を以下のように設定した。この条件は超解像顕微鏡の性質や細胞内 pH 等によって変化するため、以降の検討で不適とされた化合物においても条件によってはプローブとして機能する可能性はある。

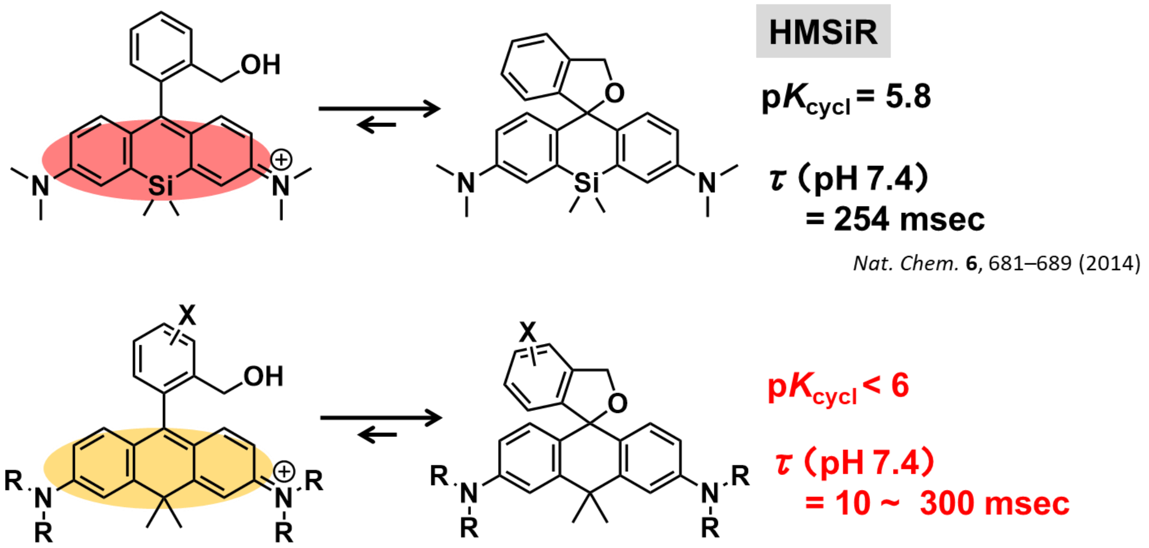


Figure 3- 21　Design of super-resolution imaging probe based on C-rhobamine.

まず、比較的計算コストの低い pK_{cycl} 計算から始め、様々な C-rhodamine 誘導体の計算を行って条件を満たす候補化合物の絞り込みを行った。

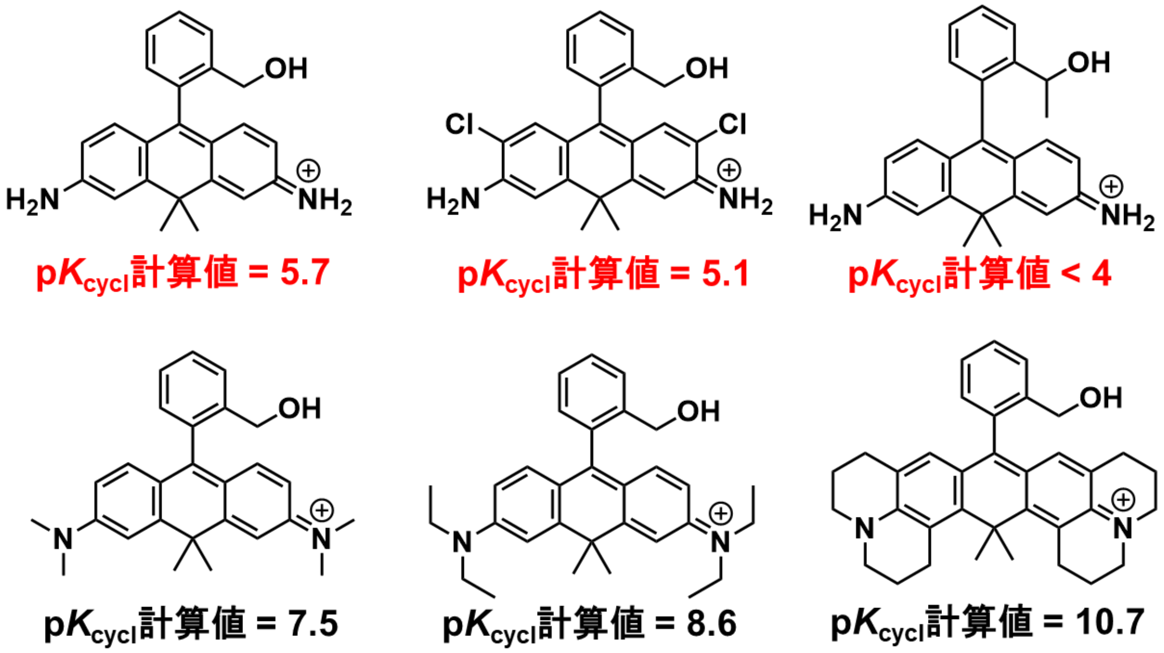


Figure 3- 22　Calculated pK_{cycl} of candidate derivatives.

続いて、pK_{cycl} の条件を満たした上記の化合物に対して τ の計算を行った。下のように、設定した条件において最適と考えられる構造を見出した。

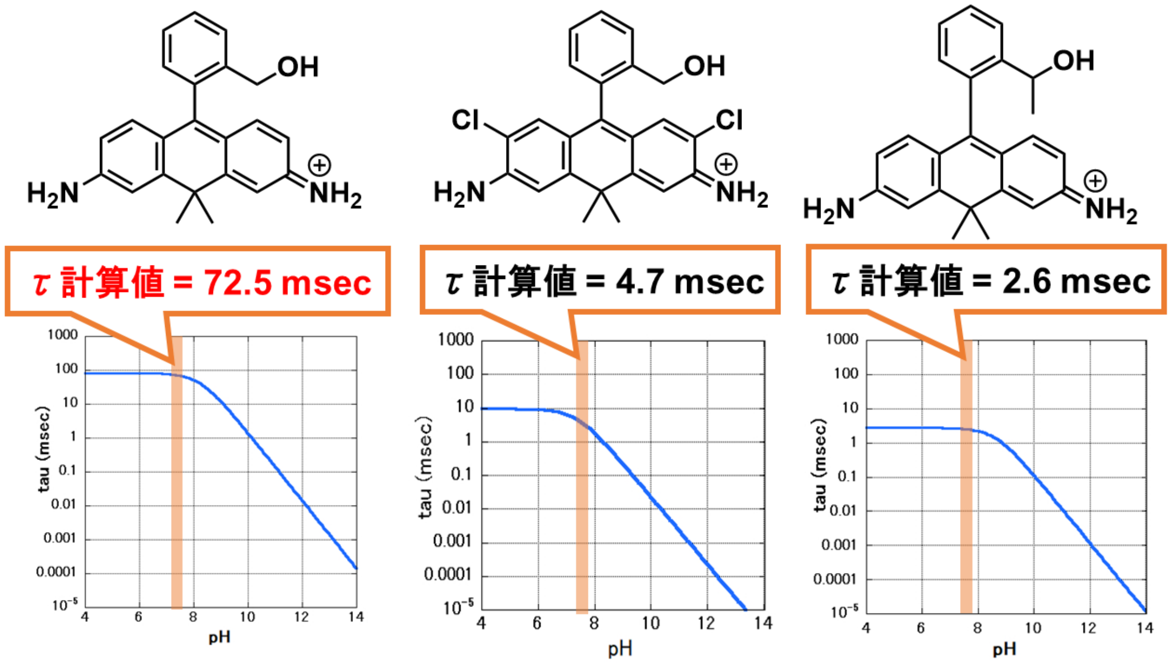
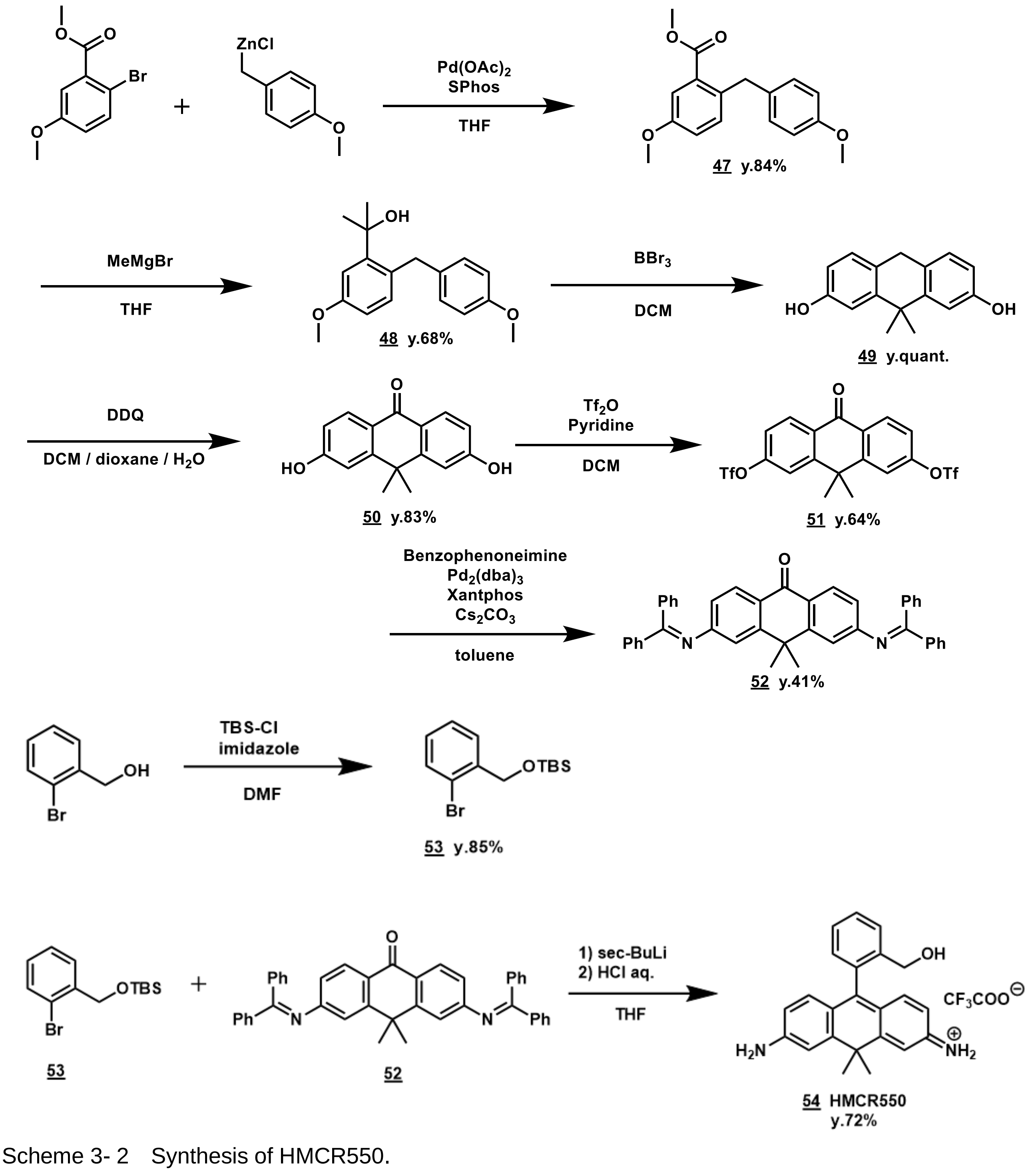


Figure 3- 23　Calculated τ of candidate derivatives.

この化合物を以下のように合成した。

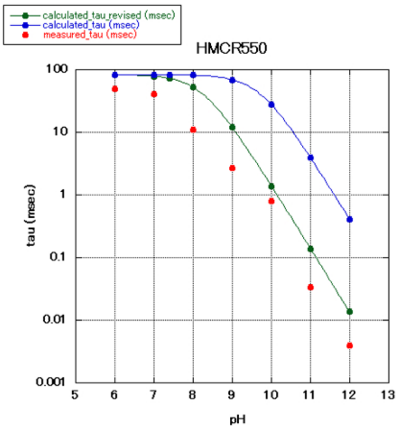


Scheme 3- 2 Synthesis of HMCR550.

過渡吸収測定による実測値との比較を行ったところ、この化合物は計算値と近い閉環速度を示し、SMLM に適した特性を有することが分かった。特に、改良した計算条件においてよく一致している。

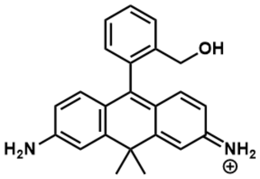
Table 3- 14　Comparison between measured and calculated pK_{cycl} and lifetime of open form. LFP measurements were performed with HMCR550 (50μM) in 10mM NaPi and 266nm laser.

HMCR550



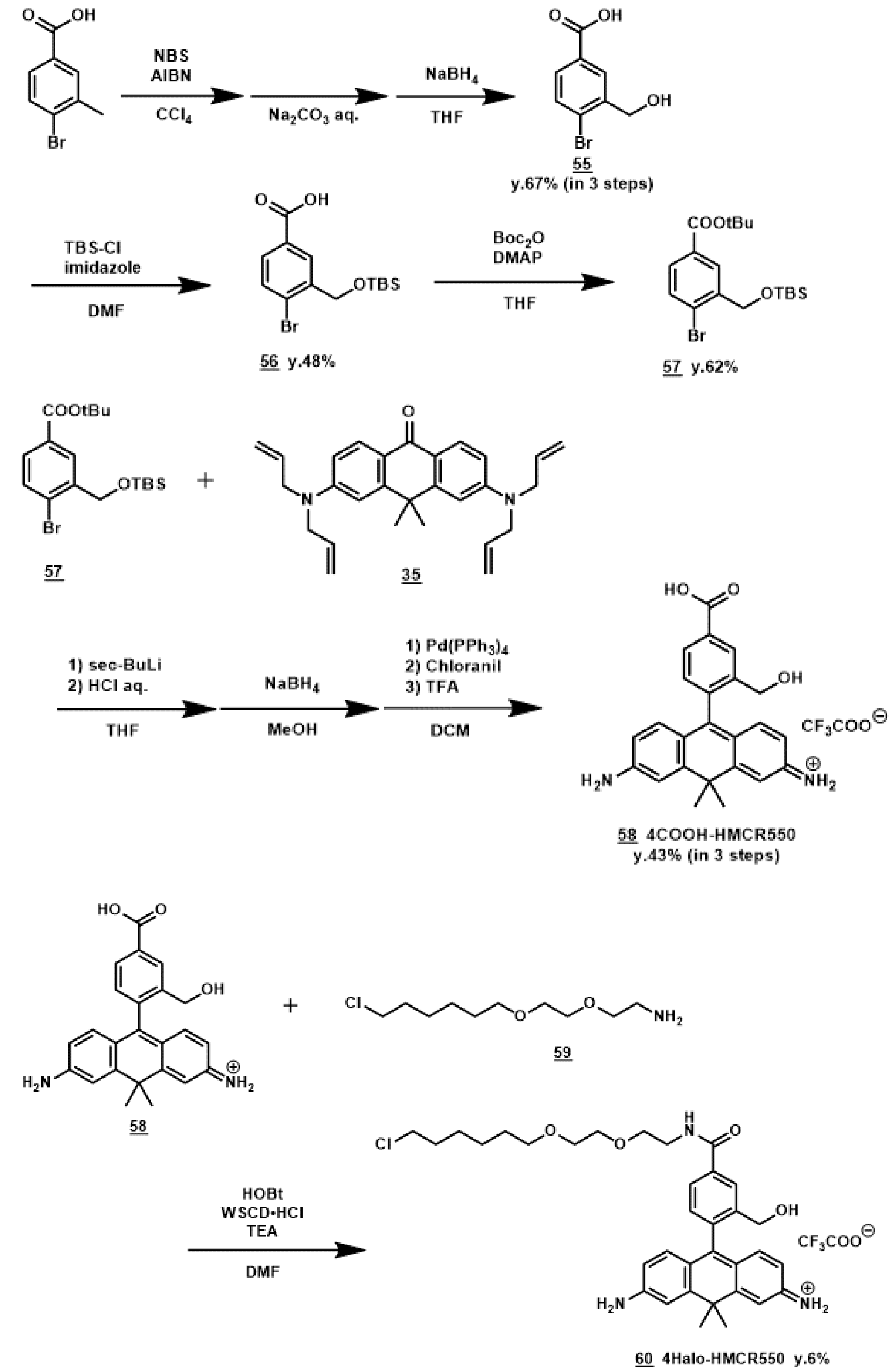
pH	measured tau (msec)	revised calculation A: B3LYP/6-31G(d,p) scrf=SMD B: Neu3, CAM-B3LYP/6-31+G(d,p) scrf=SMD tau (msec)	A reaction rate (%)	calculation A: B3LYP/6-31G(d,p) scrf=SMD B: Neu2, HF/6-31+G(d,p) scrf=SMD tau (msec)	A reaction rate (%)
6	49.4	82.7	99.4	83.1	100
7	40.9	78.6	94.5	83.0	99.8
8	11.0	52.4	63.0	81.5	98.0
9	2.7	12.1	14.5	69.2	83.2
10	0.8	1.39	1.7	27.6	33.1
11	0.034	0.14	0.2	3.93	4.7
12	0.0039	0.014	0.0	0.41	0.5

	revised calculation	calculation
B reaction error (kJ/mol)	+ 3	+ 12
pK_t	8.22	9.69



pK_{cycl} = 5.7（計算値）
5.4（実測値）

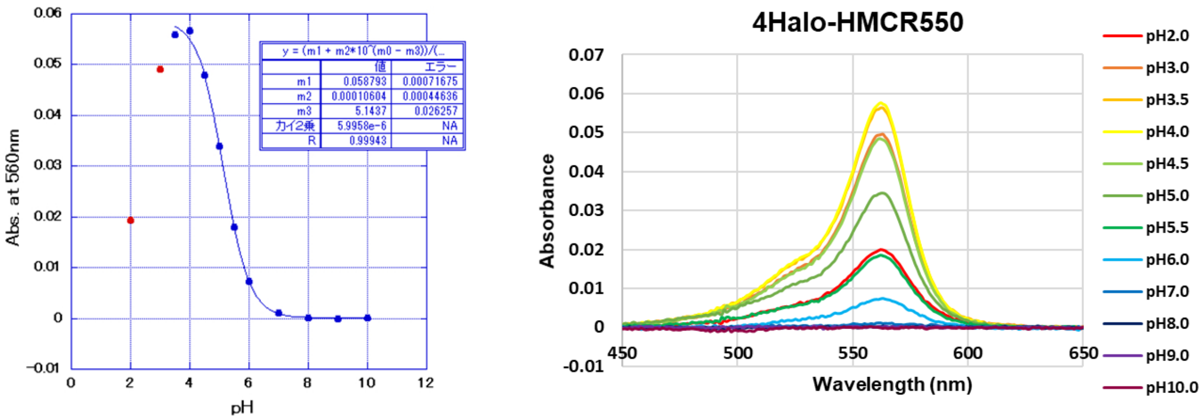
超解像イメージングのターゲットとして生細胞微小管を扱うこととし、β-tubulin にあらかじめ結合させた HaloTag を介してラベル化を行うことを考えた。そこで、この HMCR550 から halo ligand を伸ばした 4Halo-HMCR550 を合成した。合成は以下のように行った。



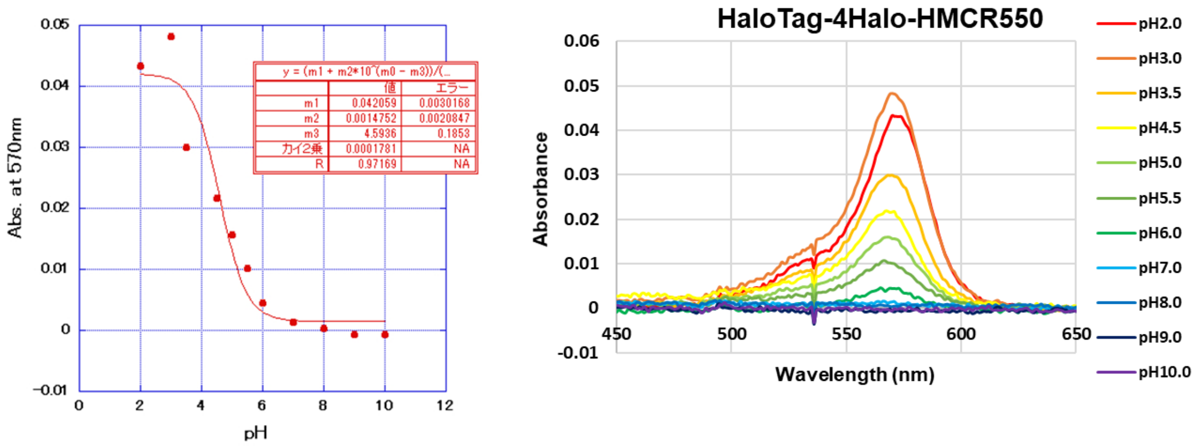
Scheme 3- 3 Synthesis of 4Halo-HMCR550.

合成した 4Halo-HMCR550 を HaloTag にラベル化し、pK_{cycl}を測定した。

4Halo-HMCR550



HaloTag-4Halo-HMCR550



	pK_{cycl}
4Halo-HMCR550	5.1
HaloTag-4Halo-HMCR550	4.6

Figure 3- 24 (top-right) Absorption spectra of 1μM HaloTag bound 4Halo-HMCR550 in 0.1M NaPi buffer containing 0.1% DMSO as cosolvent, (top-left) correlation between absorbance at 560nm and pH, (bottom-right) Absorption spectra of 1μM HaloTag bound 4Halo-HMCR550 in NaPi buffer containing

0.1% DMSO as cosolvent, (bottom-left) correlation between absorbance at 560nm and pH, and pK_{cycl} of 4Halo-HMCR550 before and after binding to HaloTag.

Halo ligand, HaloTag 結合後も pK_{cycl} の大きな変化は見られず、超解像イメージングに適切な値となった。

これを用いて生細胞中の β-tubulin の超解像イメージングを行った。

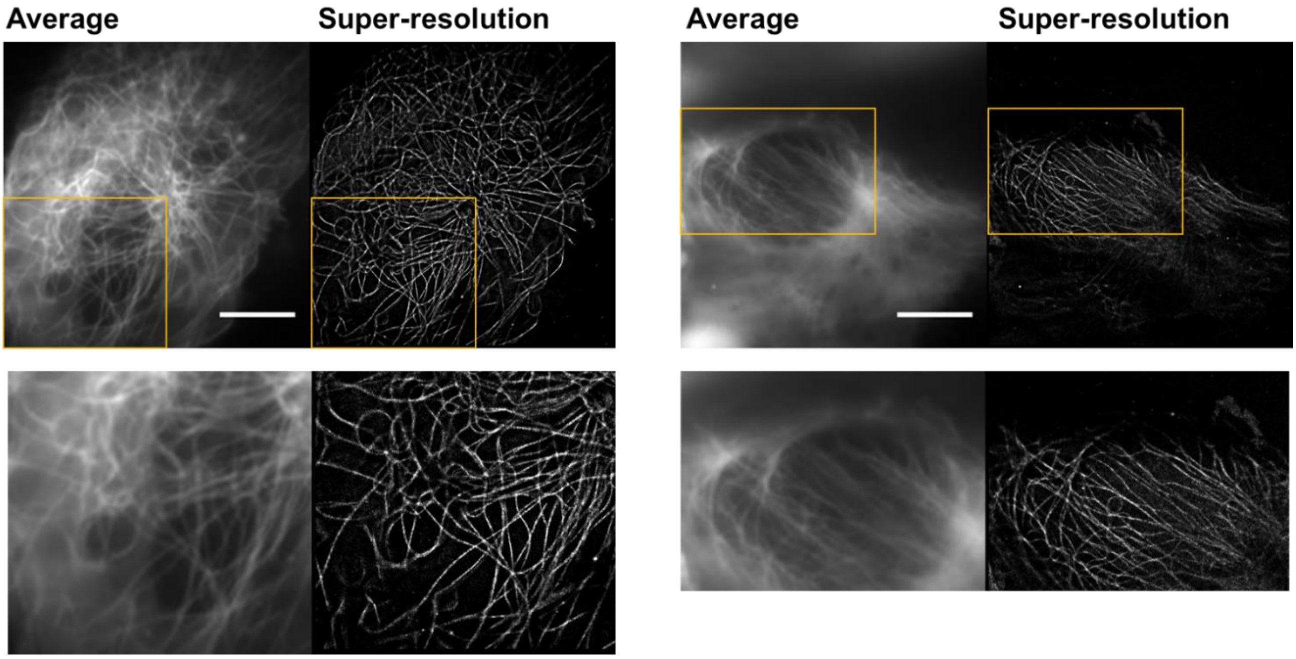


Figure 3- 25　Live-cell SMLM of Halo-tubulin fusion proteins stained with 4Halo-HMCR550 in Vero cells. (upper) Average and super-resolution images of microtubules. (bottom) Average and super-resolution images of the region enclosed by the yellow box in.

非常にきれいな超解像画像が取得可能であった。このように、計算を用いて設計した新規超解像プローブを用いて微小管の生細胞超解像イメージングを達成した。

第四章

総括と今後の展望

第一節　総括

本研究では HMR 類の性質を決定する二つのパラメータ pK_{cycl}, τに対して統計力学を用いた実験値の予測モデルを立て、量子化学計算によって求めた自由エネルギーから実測値を正確に予測する方法を確立した。

第二章では pK_{cycl}、第三章ではτにおいて、それぞれ計算モデルを考案し、予測法実現のために色素分子を取り囲む水分子の水素結合の効果を入念に検討し正確な計算結果を実現するための自由エネルギー計算法を見出した。

計算モデルの妥当性を実験化学の面から検証するとともに、これを用いて既知誘導体の実測値再現・新規誘導体の実測値予測を行った。分子デザインに有用な pK_{cycl} 調節法を複数見出した他、構築したモデルを応用し、これまで設計が困難であった新規スピロ環化型赤色・黄色 GGT プローブ、黄色超解像プローブの開発に成功し、これらを用いて *in vivo* 迅速がんイメージングや生細胞超解像イメージングに成功した。

構築した pK_{cycl} 計算モデルはこれまで経験則による最適化の困難だったターゲットに対して合理的な分子設計を実現し、HMR 類を用いた蛍光プローブ開発の可能性を大きく広げたと考えられる。

第二節　今後の展望

本研究で用いた方法は、実際にこれまで開発の困難だった HMR 骨格の蛍光プローブの設計を容易にし、実験の積み重ねによる経験則からは見つけにくい分子設計戦略の探索も可能にする。第二章で少し試みたが、計算結果を量子化学的な「特徴量」として要素還元した様々な評価関数を様々に考案することができる。これらと実験データの対応を主成分分析[29]など機械学習を用いた評価を行うことで

- プローブの性質に最も影響を与えている化学的要素は電子的なものか、立体障害や力学的なものか
- 構造変換して最も意味のある分子の部位はどこか、それはどのような変化か
- 鍵となる化学効果の計算に最も適切な計算条件（汎関数等）はどれか。適切でない条件ではどの段階で誤差が発生してしまうのか

といった、実験データが本来内包しているはずの情報を網羅的に抽出・評価し、より深い化学的考察に繋げることができるのではないかと考えている。汎化性能が高く理論上では明確な繋がりのない事象も扱うことのできる機械学習的手法の長所を取り入れ、その結果を量子化学・統計力学的手法によって人間が理解可能なモデルに帰着させる手法を確立することができれば、化学・生命科学の様々な問題に対してこれまでにない解決法を炙り出す効果的な方法となることが期待される。

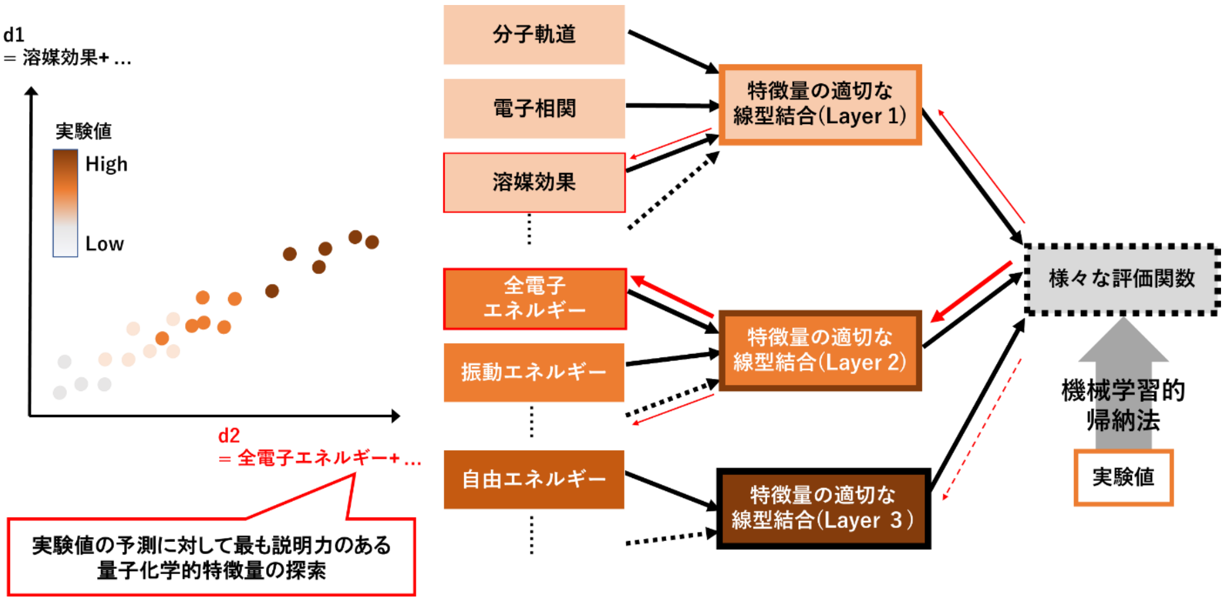


Figure 4- 1　Feature extraction and analysis based on quantum chemistry and statistical mechanics.

実験の部

Materials and Methods

Reagents

General chemicals were of the best grade available, supplied by Aldrich Chemical Co., Ltd., Tokyo Chemical Industries, and Wako Pure Chemical, and were used without further purification. Special chemicals: dimethyl sulfoxide (from DOJINDO) used in spectroscopic analysis was of fluorometric grade. Other solvents were used after appropriate distillation or purification.

Instruments

NMR spectra were recorded on a JEOL JNM-LA300 instrument at 300 MHz for ^{1}H NMR and 75 MHz for ^{13}C NMR or on a JEOL JNM-LA400 instrument at 400 MHz for ^{1}H NMR and 100 MHz for ^{13}C NMR. All chemical shifts (δ) are reported in ppm relative to internal standard tetramethylsilane (δ = 0.0 ppm), or relative to the signals of residual solvent $CDCl_3$ (7.26 ppm for ^{1}H, 77.16 ppm for ^{13}C), CD_3OD (3.31 ppm for ^{1}H, 49.00 ppm for ^{13}C) or DMSO-d_6 (2.50 ppm for ^{1}H, 39.52 ppm for ^{13}C), and coupling constants are given in Hz. Mass spectra were measured with a JEOL AccuTOF 4GLC-plus mass spectrometer for ESI+ and ESI-. HPLC analyses were performed on an Inertsil ODS-3 (4.5×250 mm) column (GL Sciences Inc.) using an HPLC system composed of a pump (PU-2080, JASCO) and a detector (MD-2015, JASCO). Preparative HPLC was performed with an Inertsil ODS-3 (10.0 mm ×250 mm) reverse-phase column (GL Science Inc.), using eluent A (H_2O containing 0.1% TFA (v/v)) and eluent B (CH_3CN with 20% H_2O), on a Jasco PU-1587S2 system. Silica gel column chromatography was performed with Wakogel C-200 (Wako, Japan), Chromatorex-NH (FujiSilysia Chemical Ltd., Kasugai, Japan), silica Gel 60 (Kanto Chemical Co. Inc., Tokyo, Japan), or silica gel 60N (Kanto Chemical Co. Inc., Tokyo, Japan). Absorbance spectral measurements were obtained on a Shimadzu UV-1800.

Computational details

We performed calculations using the Gaussian09[9] program. Stationary points were optimized without any symmetry assumptions, and tight convergence criteria were used.

Tumor model of peritoneal implants

All procedures were carried out in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animal Resources and the National Research Council and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. The tumor implants were established by intraperitoneal injection of 1×10^6 SHIN3 cells[30] suspended in 300 ml of PBS into 7-week-old female nude mice (CLEA Japan, Inc., Japan). Experiments with tumor-bearing mice were performed at 30 days after injection of SHIN3 cells.

In vivo spectral fluorescence imaging

Mice were injected intraperitoneally with 300 µl of 100 µM probe solution. After 5 min, the mice were killed with isoflurane and the abdominal cavity was exposed. Fluorescence images were obtained with the Maestro In-Vivo imaging system (CRi Inc.). The yellow-filter setting (excitation, 575 to 605 nm; emission, 645 nm long-pass) and green-filter setting (excitation, 503 to 555 nm; emission, 580 nm long-pass) were used. The tunable filter was automatically stepped in 10-nm increments, from 500 to 800 nm, while the camera sequentially captured images at each wavelength interval. The spectral fluorescence images consisting of autofluorescence and spectra were unmixed for visual assessments with Maestro software.

Determination of τ by laser photolysis

A XeCl excimer laser (Lambda Physik, Lextra 50, pulse width 17 ns, 308 nm, 10 mJ/pulse) was used as the excitation source. The transient signal was recorded on a digital storage oscilloscope (Tektronix, TDS-744 500 MHz 2G samples/s or TDS-540 500 MHz 1G sample/s). Experiments were performed at 22 °C. Compounds were dissolved in 10 mM sodium phosphate buffer containing 1 % anhydrous DMSO, and absorbance at 308 nm was adjusted to be -0.2. The duration times of the fluorescent, dissociated form (τ) were determined by fitting the decay curves to a single exponential

by using KaleidaGraph 4.5 or a self-written Python script implemented with "curvefit" method of "scipy.optimize" module.

Microscope

SMLM imaging was carried out using an N-STORM system (Nikon) equipped with the following:

- Inverted fluorescence microscope (Eclipse Ti-E; Nikon)
- Oil-immersion objective (CFI Apo TIRF 100X Oil, NA 1.49; Nikon)
- Irradiation lasers
- 647 nm (Visible Fiber Laser, 2RU-VFL-P-200-647; MPB Communications)
- 561 nm (Sapphire 561 LP; Coherent)
- Cooled electron-multiplying charge-coupled device (EMCCD) camera (iXon3 DU897; Andor).
- Software for system control and image analysis (NIS-Elements Advanced Research; Nikon)

During data acquisition, a Perfect Focus System was used to maintain a constant focal plane. For dual-colour SMLM, chromatic aberrations were corrected using a function offered by the software, which processes an experimental data set according to a reference data set pre-obtained by imaging multi-coloured fluorescent particles (TetraSpeck Microspheres; 0.1 μm, fluorescent blue/green/orange/dark red; Invitrogen).

Culturing and preparing cells

Green monkey kidney Vero cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, high glucose) containing L-glutamine (Wako Pure Chemical), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco) and 1% penicillin-streptomycin (PS) solution (Gibco) at 37 °C in humidified air containing 5% CO_2. To minimize the background fluorescence, phenol red-free medium (Gibco) was preferred. Cells were regularly passaged using TrypLE Express not containing phenol red (Gibco).

For imaging experiments, cells were seeded into 8-well Lab Tek II Chambered Coverglass (No. 1.5 borosilicate; Nunc). (For some kinds of cells, it is recommended to coat the surface of the cover glass beforehand with some coating material, such as collagen (Cellmatrix Type I-C; Nitta Gelatin), which is left in the chambers for 10-15 min and then removed.) To avoid non-specific adsorption of fluorophores, the coating process was preferably done by using a solution of 2 M glycine (Wako Pure Chemical) or 0.01% poly-L-lysine (Sigma) for 30-60 min, followed by washing with phosphate-buffered saline (PBS; Gibco) several times. (An alternative way to reduce the background signals is

to detach the cells (after labelling) from the glass surface by trypsinization and transfer them into a new Lab-Tek II chamber. This step is taken 1-3 h before imaging, so that the cells have time to reattach to the glass surface.)

General procedure for labelling β-tubulin-Halo in live Vero cells

1. The day before imaging, transfect Vero cells transiently with β-tubulin-Halo plasmid in the presence of a transfection reagent (X-treamGENE HP DNA Transfection Reagent) according to the manufacturer's protocol. Incubate the cells at 37 °C under 5% CO_2 overnight.
2. Dissolve 4Halo-HMCR550 in dimethyl sulfoxide (DMSO) to obtain a stock solution at a convenient concentration (i.e. 100 μM or 1 mM).
3. After washing the cells once with culture medium, incubate the cells in culture medium to which a stock solution of the probe has been added to give a final concentration of 1 μM.

General procedure for live-cell SMLM imaging in Vero cells

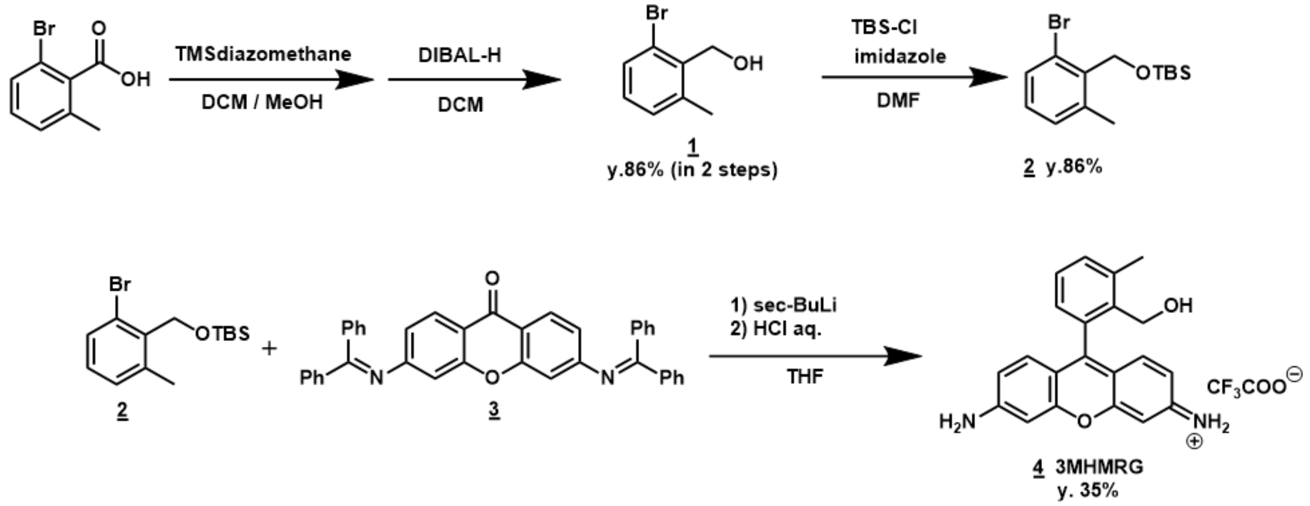
1. Renew the medium of the sample.
2. Carry out data acquisition for SMLM with the N-STORM system at room temperature (23 °C). 4Halo-HMCR550 are excited at 561 nm laser, respectively, in a total-internal-reflection or oblique incidence geometry.

· For fast time-lapse SMLM, record typically tens of thousands of consecutive frames of images at 8.8 ms/frame, applying continuous illumination at 561 nm with a relatively low (100-400 W/cm^2) intensity.

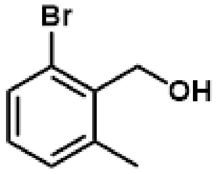
3. Analyze the raw images to reconstruct super-resolution images with NIS-Elements Advanced Research software implemented with an N-STORM module.

.

Synthesis



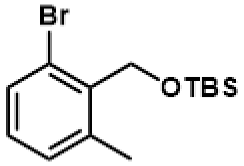
1



2-Bromo-6-methylbenzoic acid (2050 mg, 9.5 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (20 mL) and methanol (6 mL). Trimethylsilyldiazomethane (18.6 mL, 11.2 mmol) was added and the solution was stirred at r.t. for 10 minutes. The reaction was quenched with AcOH and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 from saturated $NaHCO_3$ aq.. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was dissolved in anhydrous CH_2Cl_2 (20 mL), and the resulting solution was stirred at 0˚C under an Ar atmosphere. Diisobutylaluminium hydride (18.6 mL, 18.6 mmol) was added and stirring was continued at r.t. under an Ar atmosphere for 2 hours. The reaction was quenched with methanol and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 from saturated potassium sodium tartrate aq.. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane/AcOEt = 9/1 to 7/3) to give compound 1 as a colorless solid (1640 mg, 86%).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 2.46 (s, 3H), 4.82 (s, 2H), 7.04 (dd, 1H, *J* = 8.1 Hz, 8.1 Hz), 7.12 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.40 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 20.0, 62.1, 125.4, 129.4, 129.9, 130.6, 137.4, 139.7.

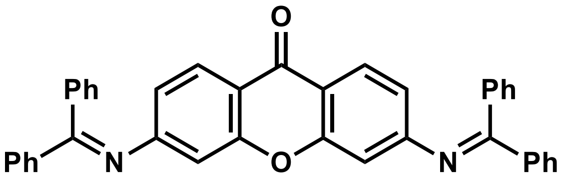
2



Compound 1 (1640 mg, 8.2 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (20 mL). tert-Butyldimethylchlorosilane (1402 mg, 9.3 mmol) and imidazole (1266 mg, 18.6 mmol) were added and the solution was stirred at r.t. under an Ar atmosphere for 4 hours. The mixture was extracted with CH_2Cl_2. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane/AcOEt = 9/1 to 7/3) to give compound 2 as a colorless liquid (2169 mg, 86%).

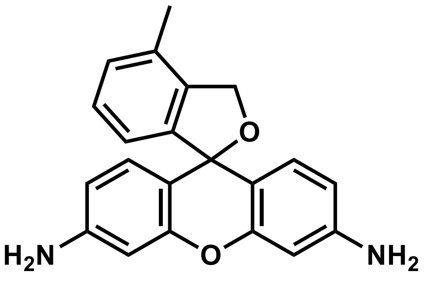
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.12 (s, 6H), 0.92 (s, 9H), 2.46 (s, 3H), 4.88 (s, 2H), 7.01 (dd, 1H, *J* = 8.1 Hz, 8.1 Hz), 7.10 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.38 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ -5.2, 18.4, 19.9, 25.9, 63.1, 125.2, 128.9, 129.7, 130.5, 137.6, 140.4.

3



Compound 3 was prepared according to the literature[31].

4 3MHMRG



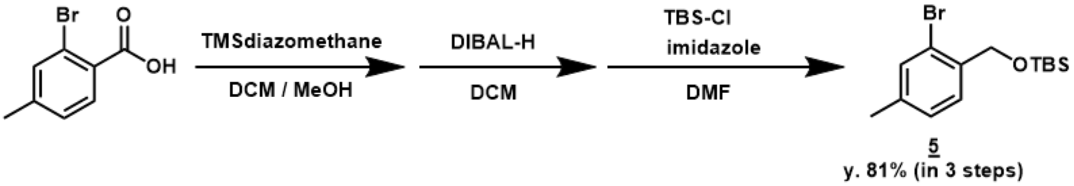
To a flame-dried flask flushed with Ar, compound 2 (851 mg, 2.7 mmol) and anhydrous THF (7 mL) were added. The mixture was cooled to -90°C and then 1 M *sec*-BuLi (2.6 mL, 2.7 mmol) was added to it. Compound 3 (150 mg, 0.27 mmol) in anhydrous THF (5 mL) was further added, and the mixture was stirred at -90°C for 10 minutes, then at r.t. for 4 hours. The reaction was quenched with 2 N HCl aq. and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 from saturated $NaHCO_3$ aq.. The

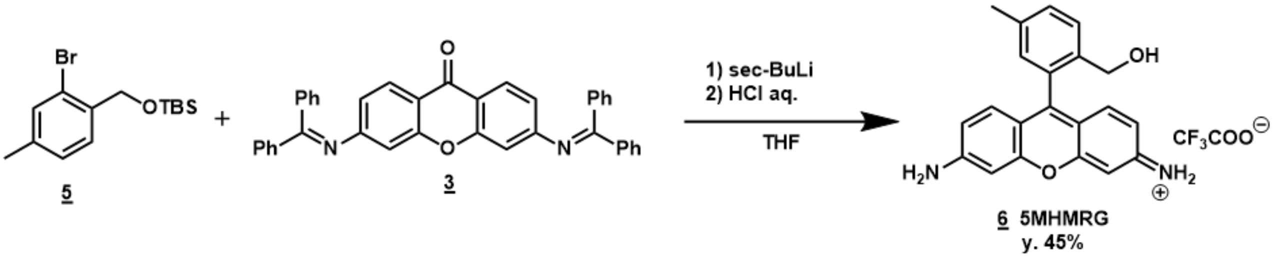
organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by preparative HPLC under the following conditions: A/B = 80/20 (0 min) to 0/100 (30 min) linear gradient (solvent A: H_2O, 0.1% TFA; solvent B: acetonitrile/H_2O = 80/20, 0.1% TFA). Compound 4 was obtained as an orange solid (31 mg, 35%).

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD+NaOD): δ 2.36 (s, 3H), 5.16 (s, 2H), 6.39 (dd, 2H, J = 8.4 Hz, 2.4 Hz) 6.47 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 6.59 (s, 1H), 6.60 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.14-7.19 (m, 2H).

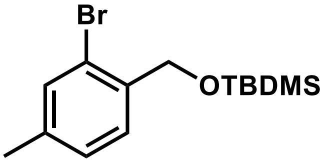
^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD+NaOD): δ 18.5, 71.6, 86.5, 102.2, 112.5, 115.3, 122.1, 129.6, 130.8, 132.2, 139.2, 145.8, 150.3, 153.0, 170.2

HRMS (ESI+): Calcd for $[M+H]^+$, 331.14465, Found, 331.14731 (+2.66 mmu)





5

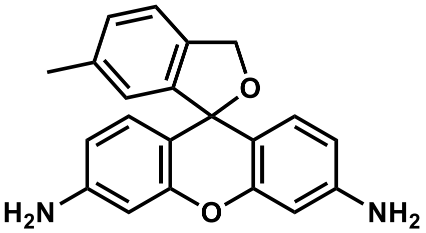


2-Bromo-4-methylbenzoic acid (2000 mg, 9.3 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (45 mL) and methanol (15 mL). Trimethylsilyldiazomethane (17 mL, 10.2 mmol) was added and the solution was stirred at r.t. for 30 minutes. The reaction was quenched with AcOH and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 from saturated $NaHCO_3$ aq.. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was dissolved in anhydrous CH_2Cl_2 (50 mL), and the solution was stirred at 0˚C under an Ar atmosphere. Diisobutylaluminium hydride (18.6 mL, 18.6 mmol) was added and stirring was continued at r.t. under an Ar atmosphere for 6 hours. The reaction was quenched with methanol and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 from saturated potassium sodium tartrate aq..

The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was dissolved in anhydrous DMF (40 mL). tert-Butyldimethylchlorosilane (2110 mg, 14.0 mmol) and imidazole (1900 mg, 27.9 mmol) were added and the solution was stirred at r.t. under an Ar atmosphere for 20 hours. The mixture was extracted with CH_2Cl_2. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane) to give compound 5 as a colorless liquid (2374 mg, 81%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.12 (s, 6H), 0.96 (s, 9H), 2.31 (s, 3H), 4.71 (s, 2H), 7.12 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.32 (s, 1H), 7.41 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ -5.2, 18.5, 20.8, 26.1, 64.6, 120.9, 127.5, 128.2, 132.6, 137.3, 138.3

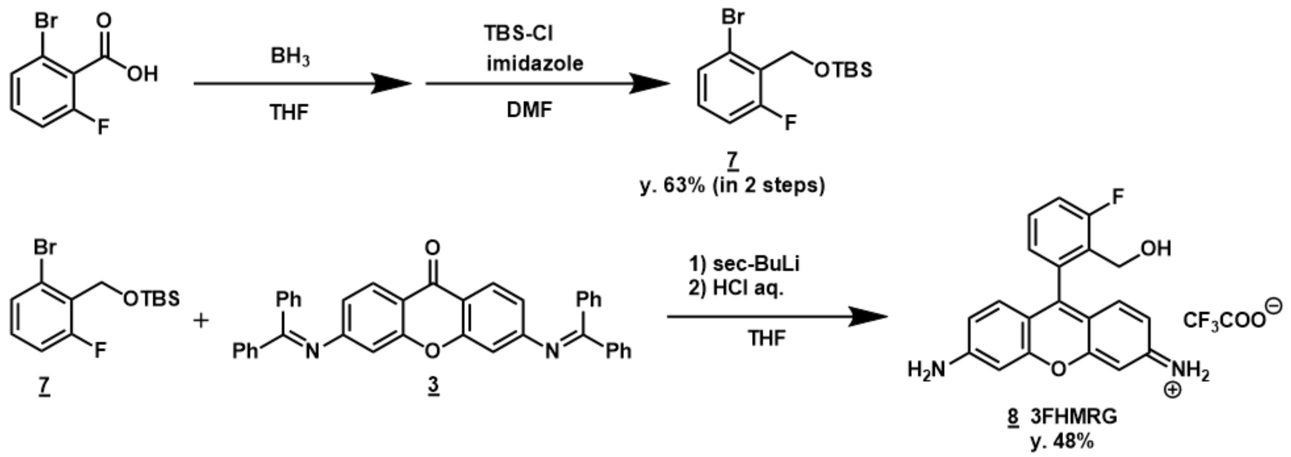
6 5MHMRG



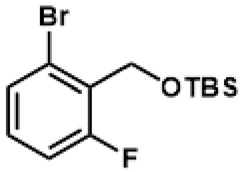
To a flame-dried flask flushed with Ar, compound 5 (568 mg, 1.8 mmol) and anhydrous THF (15 mL) were added. The mixture was cooled to -78°C and then 1 M *sec*-BuLi (1.4 mL, 1.4 mmol) was added to it. Compound 3 (100 mg, 0.18 mmol) in anhydrous THF (4 mL) was further added, and the mixture was stirred at -78°C for 10 minutes, then at r.t. for 1 hour. The reaction was quenched with 2 N HCl aq. and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 from saturated $NaHCO_3$ aq.. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by preparative HPLC under the following conditions: A/B = 80/20 (0 min) to 0/100 (45 min) linear gradient (solvent A: H_2O, 0.1% TFA; solvent B: acetonitrile/H_2O = 80/20, 0.1% TFA). Compound 6 was obtained as an orange solid (27 mg, 45%).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD+NaOD): δ 2.22 (s, 3H), 5.11 (s, 2H), 6.37 (dd, 2H, *J* = 8.8 Hz, 2.4 Hz) 6.45 (d, 2H, *J* = 2.4 Hz), 6.56 (s, 1H), 6.57 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.15 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.24 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD+NaOD): δ 20.0, 70.8, 84.5, 100.8, 111.2, 113.9, 120.2, 123.8, 128.7, 129.5, 136.1, 138.0, 145.2, 149.0, 151.7

HRMS (ESI$^+$): Calcd for $[M+H]^+$, 331.14465, Found, 331.14144(-3.21 mmu)



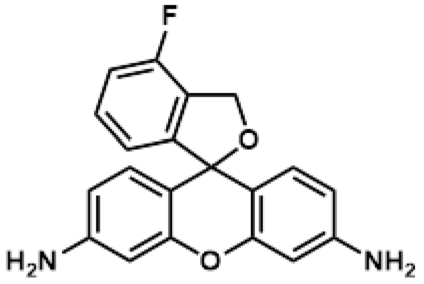
7



2-Bromo-6-fluorobenzoic acid (1000 mg, 4.57 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (10 mL) and methanol (3 mL). Trimethylsilyldiazomethane (8.4 mL, 5.02 mmol) was added and the solution was stirred at r.t. for 30 minutes. The reaction was quenched with AcOH and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 from saturated $NaHCO_3$ aq.. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was dissolved in anhydrous CH_2Cl_2 (20 mL), and the solution was stirred at 0°C under an Ar atmosphere. Diisobutylaluminium hydride (9.1 mL, 9.14 mmol) was added and stirring was continued at r.t. under an Ar atmosphere for 3 hours. The reaction was quenched with methanol and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 from saturated potassium sodium tartrate aq.. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was dissolved in anhydrous DMF (10 mL). tert-Butyldimethylchlorosilane (1033 mg, 6.86 mmol) and imidazole (933 mg, 13.7 mmol) were added, and the solution was stirred at r.t. under an Ar atmosphere for 4 hours. The mixture was extracted with CH_2Cl_2. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane/AcOEt = 10/0 to 8/2) to give compound 7 as a colorless liquid (920 mg, 63%).

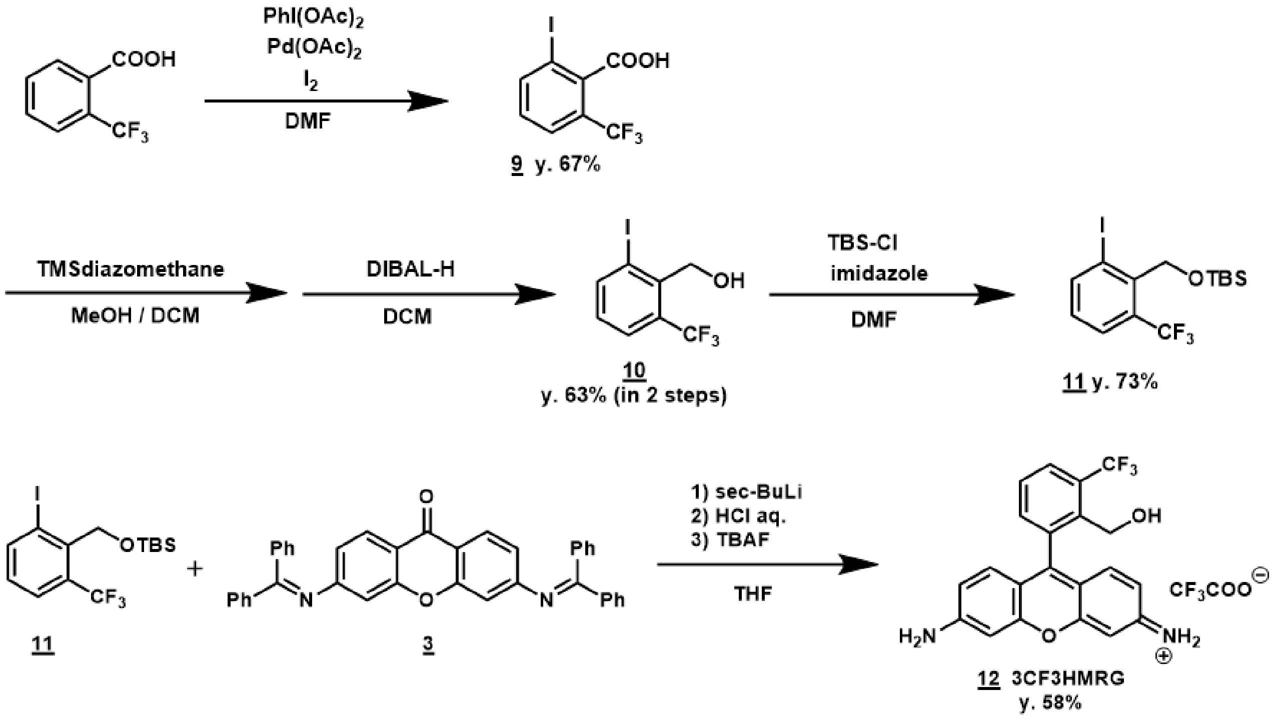
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 0.12 (s, 6H), 0.91 (s, 9H), 4.83 (s, 2H), 7.01 (dd, 1H, *J* = 8.1 Hz, 8.1 Hz), 7.13 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.36 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ -5.3, 18.4, 25.9, 58.8, 114.8 (d, *J* = 23.0 Hz), 125.9 (d, *J* = 5.0 Hz), 127.9 (d, *J* = 17.4 Hz), 128.6 (d, *J* = 3.8 Hz), 130.0 (d, *J* = 9.9 Hz), 161.5 (d, *J* = 250.7 Hz).

8 3FHMRG

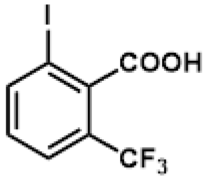


To a flame-dried flask flushed with Ar, compound 7 (230 mg, 0.72 mmol) and anhydrous THF (5 mL) were added. The mixture was cooled to -90°C and then 1 M *sec*-BuLi (0.7 mL, 0.72 mmol) was added to it. Compound 3 (80 mg, 0.14 mmol) in anhydrous THF (5 mL) was further added, and the mixture was stirred at -90°C for 10 minutes, then at r.t. for 18 hours. The reaction was quenched with 2 N HCl aq. and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 from saturated $NaHCO_3$ aq.. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by preparative HPLC under the following conditions: A/B = 80/20 (0 min) to 0/100 (30 min) linear gradient (solvent A: H_2O, 0.1% TFA; solvent B: acetonitrile/H_2O = 80/20, 0.1% TFA). Compound 8 was obtained as an orange solid (23 mg, 48%).

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD+NaOD): δ 5.23 (s, 2H), 6.40 (dd, 2H, *J* = 8.4 Hz, 2.0 Hz), 6.46 (d, 2H, *J* = 2.0 Hz), 6.61 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 6.61 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.08 (dd, 1H, *J* = 8.0 Hz, 8.4 Hz), 7.30 (m, 1H). HRMS (ESI$^+$): Calcd for $[M+H]^+$, 335.11958, Found, 335.11932 (-0.26 mmu).



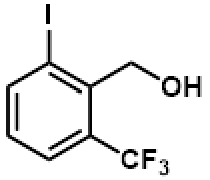
9



o-Trifluoromethylbenzoic acid (2000 mg, 10.5 mmol), iodobenzene diacetate (3382 mg, 10.5 mmol), palladium(II) acetate (119 mg, 0.53 mmol) and iodine (2665 mg, 10.5 mmol) were dissolved in anhydrous DMF (40 mL) and the solution was stirred at 100°C under an Ar atmosphere for 24 hours. The reaction was quenched with saturated Na_2SO_3 aq. and the mixture was acidified with 2 N HCl aq., then extracted with CH_2Cl_2. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane/AcOEt containing 2% AcOH = 7/3 to 5/5) to give compound 9 as a colorless solid (2206 mg, 67%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 7.39 (dd, 1H, *J* = 7.3 Hz, 7.3 Hz), 7.83 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 8.22 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 13.8-14.3 (br, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 59.7, 94.5, 125.8, 125.8, 130.9, 143.2, 168.1, 170.3.

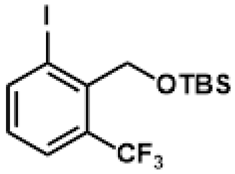
10



Compound 9 (1500 mg, 4.75 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (20 mL) and methanol (6 mL). Trimethylsilyldiazomethane (9.5 mL, 5.70 mmol) was added and the solution was stirred at r.t. for 4 hours. The reaction was quenched with AcOH and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 from saturated $NaHCO_3$ aq.. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was dissolved in anhydrous CH_2Cl_2 (20 mL), and the solution was stirred at 0°C under an Ar atmosphere. Diisobutylaluminium hydride (9.5 mL, 9.50 mmol) was added and stirring was continued at r.t. under an Ar atmosphere for 4 hours. The reaction was quenched with methanol and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 from saturated potassium sodium tartrate aq.. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane/AcOEt = 93/7 to 72/28) to give compound 10 as a colorless liquid (900 mg, 63%).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 2.16 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz), 4.90 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.12 (dd, 1H, *J* = 8.1 Hz, 8.1 Hz), 7.68 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 8.10 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*$_6$): δ 60.4, 65.2, 103.7, 126.2, 126.3, 129.6, 143.8, 171.1.

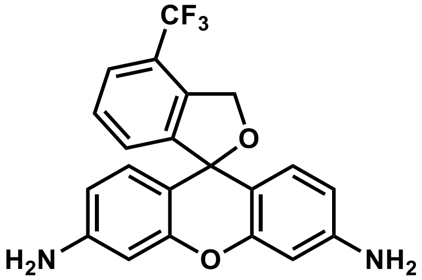
11



Compound 10 (800 mg, 2.65 mmol), tert-butyldimethylchlorosilane (598 mg, 3.97 mmol) and imidazole (361 mg, 5.30 mmol) were dissolved in anhydrous DMF (10 mL), and the solution was stirred at r.t. under an Ar atmosphere for 9 hours. The mixture was extracted with CH_2Cl_2. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane/AcOEt = 100/0 to 87/13) to give compound 11 as a colorless liquid (800 mg, 73%).

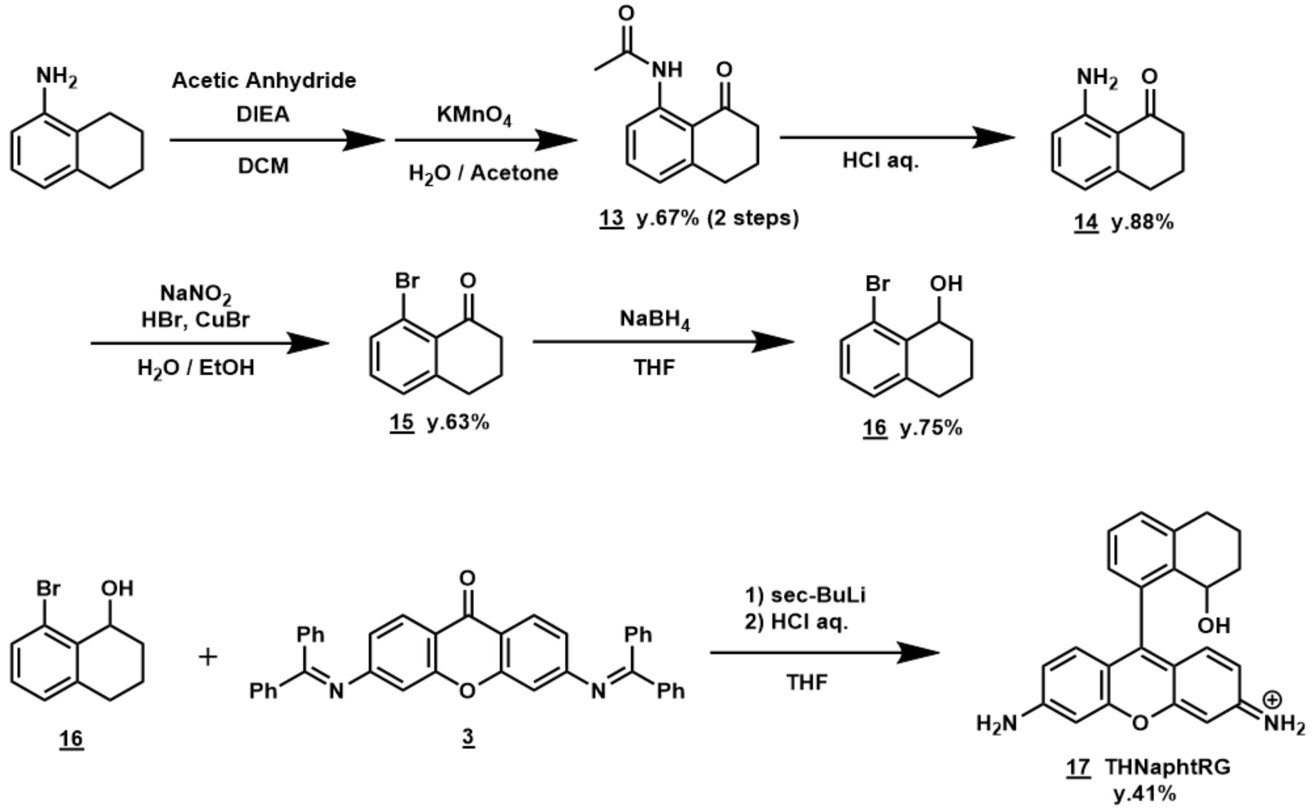
^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 0.17 (s, 6H), 0.94 (s, 9H), 4.86 (s, 2H), 7.07 (dd, 1H, *J* = 8.1 Hz, 8.1 Hz), 7.65 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 8.08 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ -3.5, 25.7, 53.4, 93.7, 125.9, 130.8, 142.8, 167.4.

12 3CF3HMRG

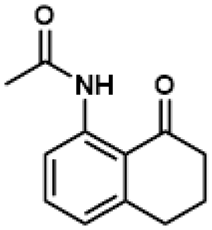


To a flame-dried flask flushed with Ar, compound 11 (300 mg, 0.72 mmol) and anhydrous THF (5 mL) were added. The mixture was cooled to -90˚C and then 1 M *sec*-BuLi (0.7 mL, 0.72 mmol) was added to it. Compound 3 (80 mg, 0.14 mmol) in anhydrous THF (5 mL) was further added, and the mixture was stirred at -90˚C for 10 minutes, then at r.t. for 4 hours. The reaction was quenched with 2 N HCl aq. and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 from saturated $NaHCO_3$ aq.. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was dissolved in anhydrous THF (10 mL). Tetrabutylammonium fluoride (0.25 mL) was added and the solution was stirred at r.t. for 2 hours. The residue was purified by preparative HPLC under the following conditions: A/B = 80/20 (0 min) to 0/100 (30 min) linear gradient (solvent A: H_2O, 0.1% TFA; solvent B: acetonitrile/H_2O = 80/20, 0.1% TFA). Compound 12 was obtained as an orange solid (32 mg, 58%).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD+NaOD): δ 5.31 (s, 2H), 6.39 (dd, 2H, J = 8.8 Hz, 2.2 Hz), 6.46 (d, 2H, J = 2.2 Hz), 6.55 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.06 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 7.46 (dd, 1H, J = 8.1 Hz, 8.1 Hz), 7.66 (d, 1H, J = 8.1 Hz). HRMS (ESI^+): Calcd for $[M+H]^+$, 385.11639, Found, 385.11343 (+2.96 mmu)

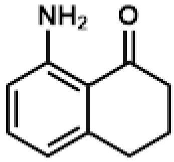


13



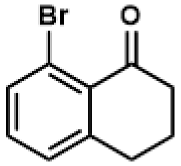
Compound 13 was prepared according to the literature[32].

14



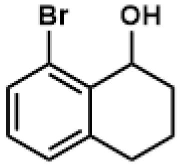
Compound 14 was prepared according to the literature[32].

15



Compound 15 was prepared according to the literature[33].

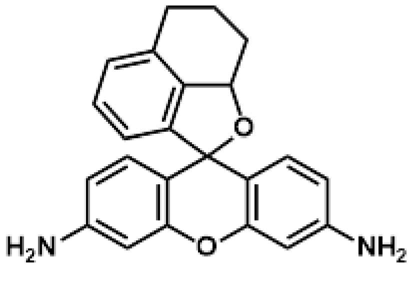
16



Compound 16 (400 mg, 1.8 mmol) was dissolved in anhydrous THF (10 mL) and stirred at 0˚C. Sodium tetrahydroborate (101 mg, 2.7 mmol) was added and stirring was continued at r.t. for 18 hours. The reaction was quenched with 1 N HCl aq. and the mixture was extracted with CH_2Cl_2. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane/AcOEt = 10/0 to 8/2) to give compound 16 as a colorless liquid (304 mg, 75%).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.68-1.82 (m, 2H), 1.90-2.07 (m, 1H), 2.18-2.29 (m, 1H), 2.45 (br, 1H), 2.67-2.77 (m, 1H), 2.81-2.91 (m, 1H), 5.01 (t, 1H, *J* = 3.7 Hz), 7.04-7.12 (m, 2H), 7.42 (dd, *J* = 2.2 Hz, 6.6 Hz, 1H).

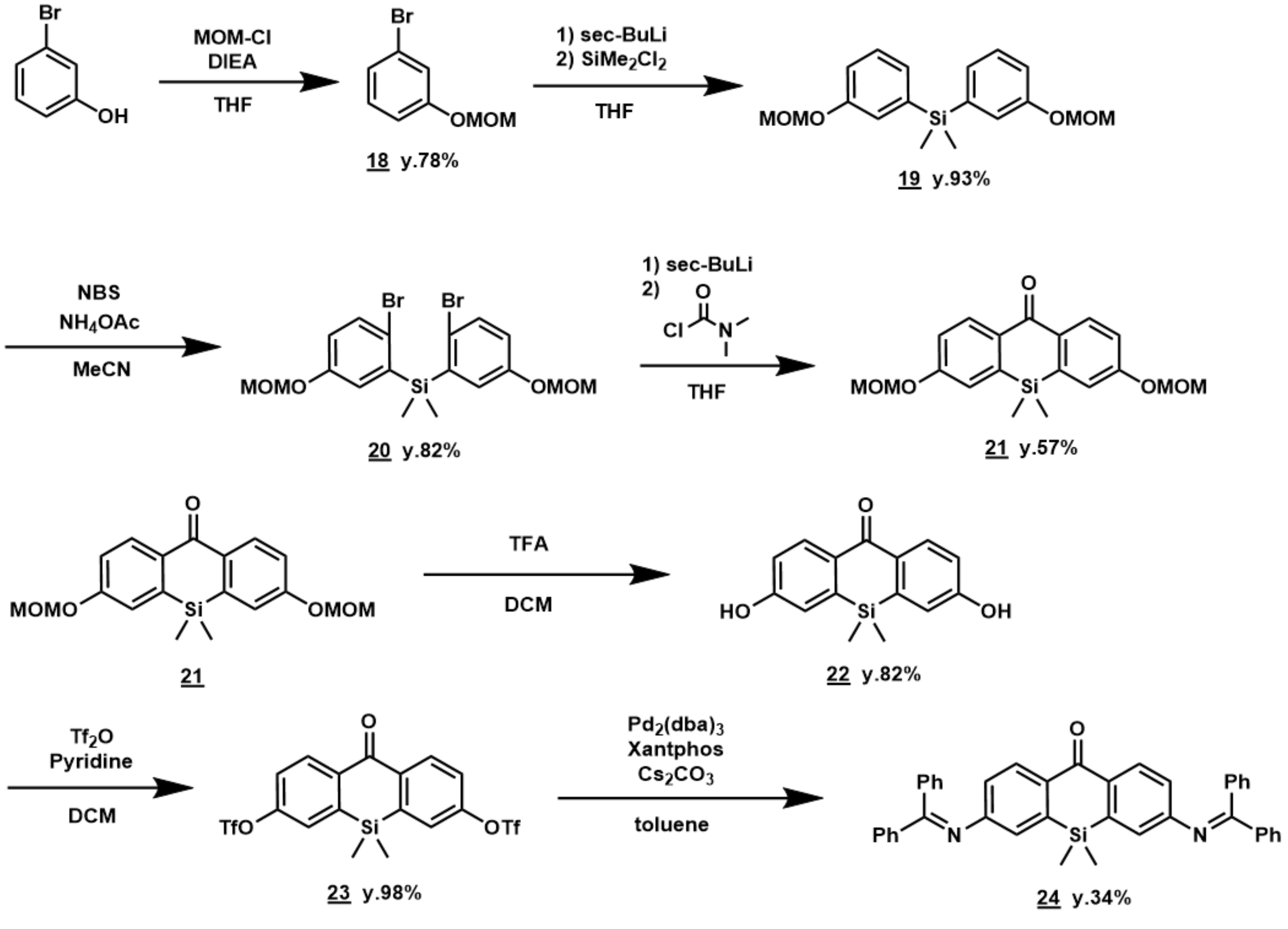
17 THNaphtRG



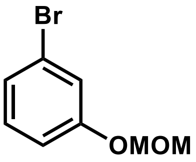
To a flame-dried flask flushed with Ar, compound 17 (294 mg, 1.30 mmol) and anhydrous THF (5 mL) were added. The mixture was cooled to -78˚C and then 1 M *sec*-BuLi (2.6 mL, 2.60 mmol) was added to it. Compound 3 (80 mg, 0.14 mmol) in anhydrous THF (5 mL) was added to it. The mixture was stirred at r.t. for 1 hour. The reaction was quenched with 2 N HCl aq. and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 from saturated $NaHCO_3$ aq.. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by preparative HPLC under the following

conditions: A/B = 80/20 (0 min) to 0/100 (45 min) linear gradient (solvent A: H_2O, 0.1% TFA; solvent B: acetonitrile/H_2O = 80/20, 0.1% TFA). Compound 17 was obtained as an orange solid (21 mg, 41%).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD+NaOD): δ 1.32-1.43 (m, 1H), 1.85-2.05 (m, 1H), 2.10-2.24 (m, 2H), 2.70-2.80 (m, 1H), 2.95-3.01 (m, 1H), 4.97-5.00 (m, 1H), 6.33-6.50 (m, 5H), 6.66 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 6.77 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.11-7.23 (m, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD+NaOD): 21.5, 26.4, 31.3, 78.5, 86.0, 101.9, 102.7, 112.2, 112.3, 113.8, 114.7, 121.6, 127.7, 130.0, 130.1, 131.7, 134.0, 142.6, 144.8, 150.5, 150.6, 153.1, 154.1. HRMS (ESI$^+$): Calcd for $[M+H]^+$, 357.16030, Found, 357.15948 (-0.82 mmu)

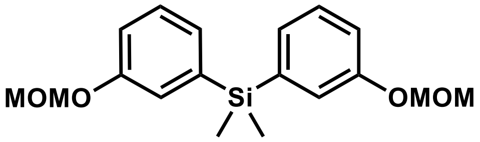


18



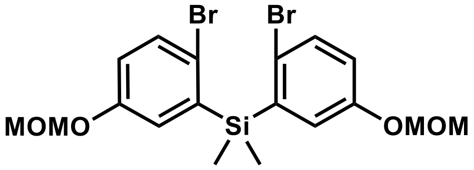
Compound 18 was prepared according to the literature[34].

19



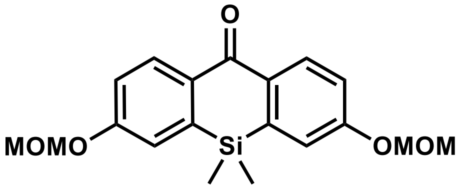
Compound 19 was prepared according to the literature[34].

20



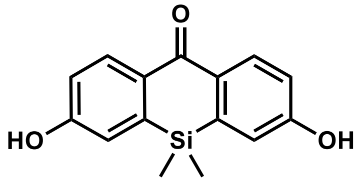
Compound 20 was prepared according to the literature[34].

21



To a flame-dried flask flushed with Ar, compound 20 (4200 mg, 8.6 mmol) and anhydrous THF (50 mL) were added. The mixture was cooled to -78°C and then 1 M *sec*-BuLi (17.2 mL,17.2 mmol) was added to it. Dimethylcarbamoyl chloride (926 mg, 0.8mL, 8.6 mmol) was added to it. The mixture was stirred at r.t. for 1.5 hour. The reaction was quenched with 2 N HCl aq. and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 from saturated $NaHCO_3$ aq.. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane/AcOEt = 8/2 to 6/4) to give compound 21 as a colorless solid (1760 mg, 57%).
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.46 (s, 6H), 7.19 (dd, 2H, *J* = 2.8 Hz, 8.8 Hz), 7.22 (d, 2H, *J* = 2.8 Hz), 8.42 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz).

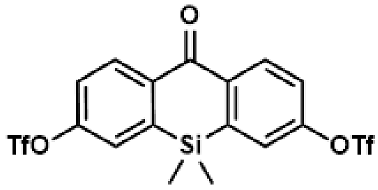
22



Compound 21 (1760 mg, 4.9 mmol) was dissolved in anhydrous CH_2Cl_2 (6 mL) and the mixture was stirred at r.t.. Then, TFA (6 mL) was added, and stirring was continued for 2 hours. The reaction solution was evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane/AcOEt = 3/1 to 1/1) to give compound 23 as colorless solid (1090 mg, 98%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.45 (s, 6H), 6.97 (dd, 2H, *J* = 2.8 Hz, 8.8 Hz), 7.04 (d, 2H, *J* = 2.8 Hz), 8.38 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz).

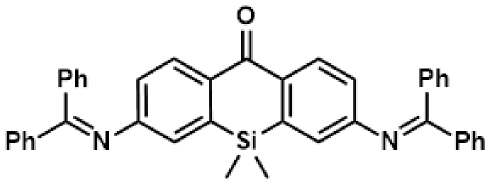
23



Compound 22 (1000 mg, 3.7 mmol) and pyridine (1.2 mL, 14.8 mmol) were dissolved in anhydrous CH_2Cl_2 (20 mL) and the mixture was stirred at 0°C. Then, trifluoromethanesulfonic anhydride (2.4 mL, 14.8 mmol) was added, and stirring was continued for 3 hours. The reaction was quenched with H_2O and the mixture was extracted with CH_2Cl_2. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, CH_2Cl_2) to give compound 23 as colorless solid (1940 mg, 98%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.55 (s, 6H), 7.48 (dd, 2H, *J* = 2.8 Hz, 8.8 Hz), 7.57 (d, 2H, *J* = 2.8 Hz), 8.49 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ -2.14, 118.8 (q, *J* = 320 Hz), 123.2, 125.6, 132.9, 140.0, 142.2, 152.2, 184.8.

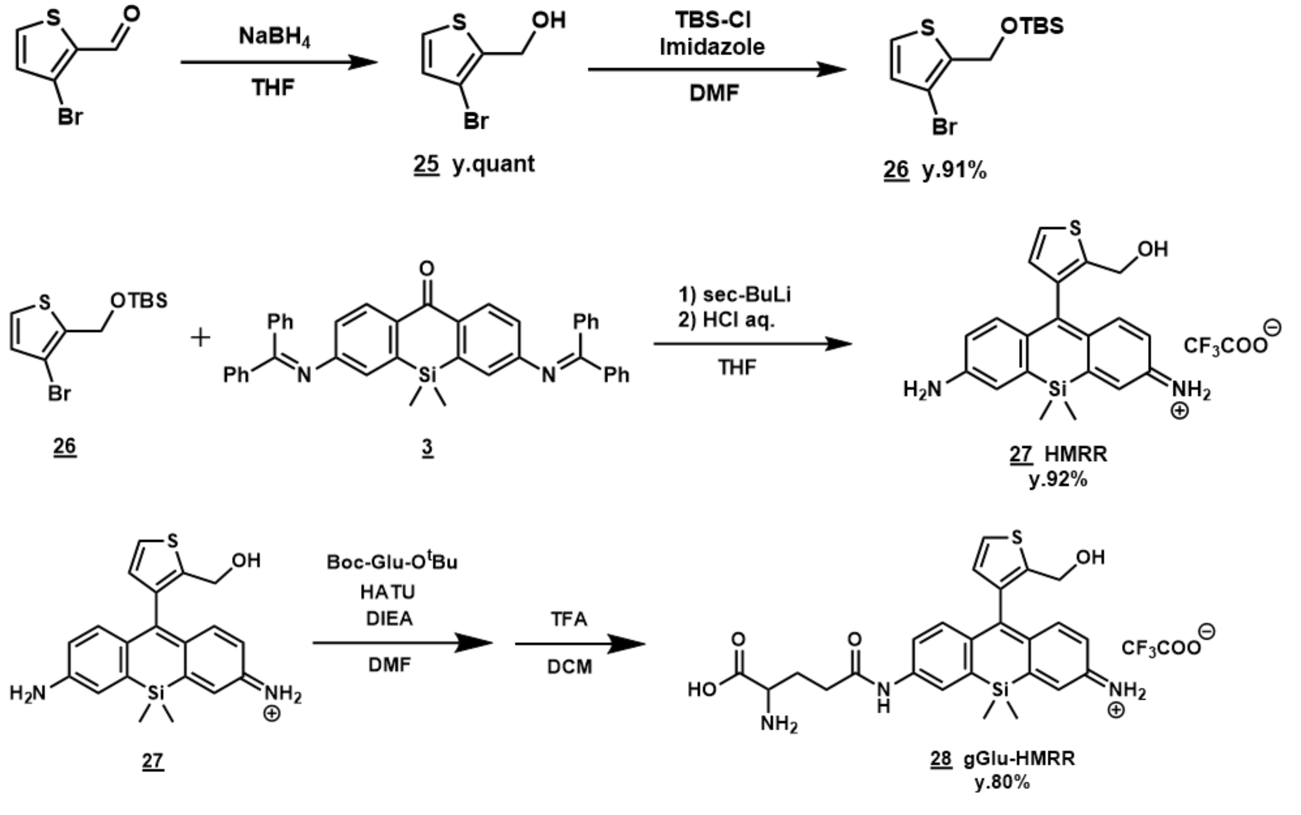
24



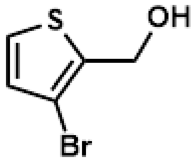
Compound 23 (1300 mg, 2.4 mmol), benzophenone imine (4404 mg, 24.3 mmol), $Pd_2(dba)_3$ (449 mg, 0.49 mmol), xantphos (284 mg, 0.49 mmol) and Cs_2CO_3 (7917 mg, 24.3 mmol) were dissolved in

deaerated dioxane (30 mL) and the solution was stirred at 100˚C under Ar atmosphere for 3 hours. The mixture was extracted with CH_2Cl_2 and the organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel (NH), *n*-hexane/AcOEt = 8/2 to 6/4) to give compound 24 as a yellow solid (490 mg, 34%).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ 0.13 (s, 6H), 6.82 (d, 2H, *J* = 2.4 Hz), 6.95 (dd, 2H, *J* = 8.4, 2.4 Hz), 7.11-7.15 (m, 3H), 7.22-7.32 (m, 6H), 7.42-7.53 (m, 7H), 7.78 (d, 4H, *J* = 8.0 Hz), 8.20 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_2Cl_2) δ -1.64, 123.1, 125.2, 128.4, 128.6, 129.2, 129.6, 129.8, 130.3, 130.6, 131.5, 136.3, 139.3, 140.2, 154.6, 169.2, 186.1. HRMS (ESI$^+$): calcd for $[M+H]^+$, 597.23621 ; found, 597.23370 (-2.51 mmu).



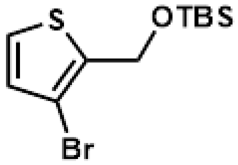
25



3-Bromothiophene-2-carboxaldehyde (1910 mg, 10.0 mmol) was dissolved in anhydrous THF (40 mL) and the solution was stirred at 0°C. Sodium tetrahydroborate (757 mg, 20.0 mmol) was added and stirring was continued at r.t. for 3 hours. The reaction was quenched with 2 N HCl aq. and the mixture was extracted with CH_2Cl_2. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane/AcOEt = 9/1 to 7/3) to give compound 25 as a colorless liquid (2015 mg, quant.).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 2.25 (t, 1H, *J* = 5.1 Hz), 4.79 (d, 2H, *J* = 5.1 Hz), 6.96 (d, 1H, *J* = 5.9 Hz), 7.27 (d, 1H, *J* = 5.9 Hz).

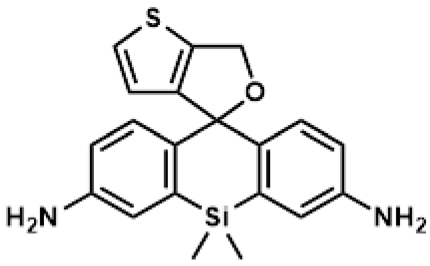
26



Compound 25 (2000 mg, 10.36 mmol), tert-butyldimethylchlorosilane (2342 mg, 15.54 mmol) and imidazole (2116 mg, 31.08 mmol) were dissolved in anhydrous DMF (20 mL), and the solution was stirred at r.t. under an Ar atmosphere for 3 hours. The mixture was extracted with *n*-hexane from brine. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane) to give compound 26 as a colorless liquid (2884 mg, 91%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.11 (s, 6H), 0.93 (s, 9H), 4.80 (s, 2H), 6.90 (d, 1H, *J* = 4.8 Hz), 7.20 (d, 1H, *J* = 4.8 Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ -5.2, 18.4, 25.9, 90.7, 106.1, 124.6, 129.8, 140.4.

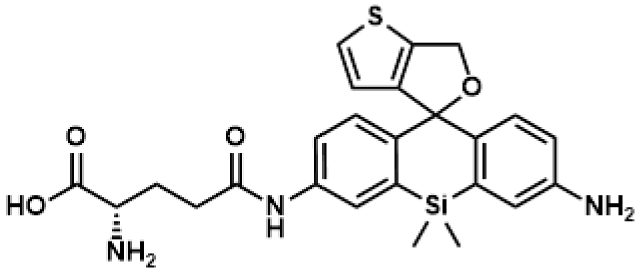
27 HMRR



To a flame-dried flask flushed with Ar, compound 26 (412 mg, 1.34 mmol) and anhydrous THF (10 mL) were added. The mixture was cooled to -78°C and then 1 M *sec*-BuLi (1.3 mL, 1.30 mmol) was added to it. Compound 24 (80 mg, 0.13 mmol) in anhydrous THF (4 mL) was further added, and the mixture was stirred at r.t. for 1 hour. The reaction was quenched with 2 N HCl aq. and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 from saturated $NaHCO_3$ aq.. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by preparative HPLC under the following conditions: A/B = 80/20 (0 min) to 0/100 (30 min) linear gradient (solvent A: H_2O, 0.1% TFA; solvent B: acetonitrile/H_2O = 80/20, 0.1% TFA). Compound 27 was obtained as an orange solid (50 mg, 92%).

^{1}H NMR (300 MHz, CD_3OD+NaOD): δ 0.37 (s, 3H), 0.46 (s, 3H), 4.37 (s, 2H), 6.69 (dd, 2H, *J* = 8.8 Hz, 2.4 Hz), 6.91 (d, 2H, *J* = 2.4 Hz), 7.01-7.10 (m, 4H). ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD+NaOD): δ -0.9, 0.0, 60.5, 85.0, 118.8, 119.1, 122.0, 129.8, 132.5, 136.6, 138.7, 139.4, 147.1, 147.4. HRMS (ESI$^+$): Calcd for $[M+H]^+$, 365.11438, Found, 365.11429 (-0.09 mmu)

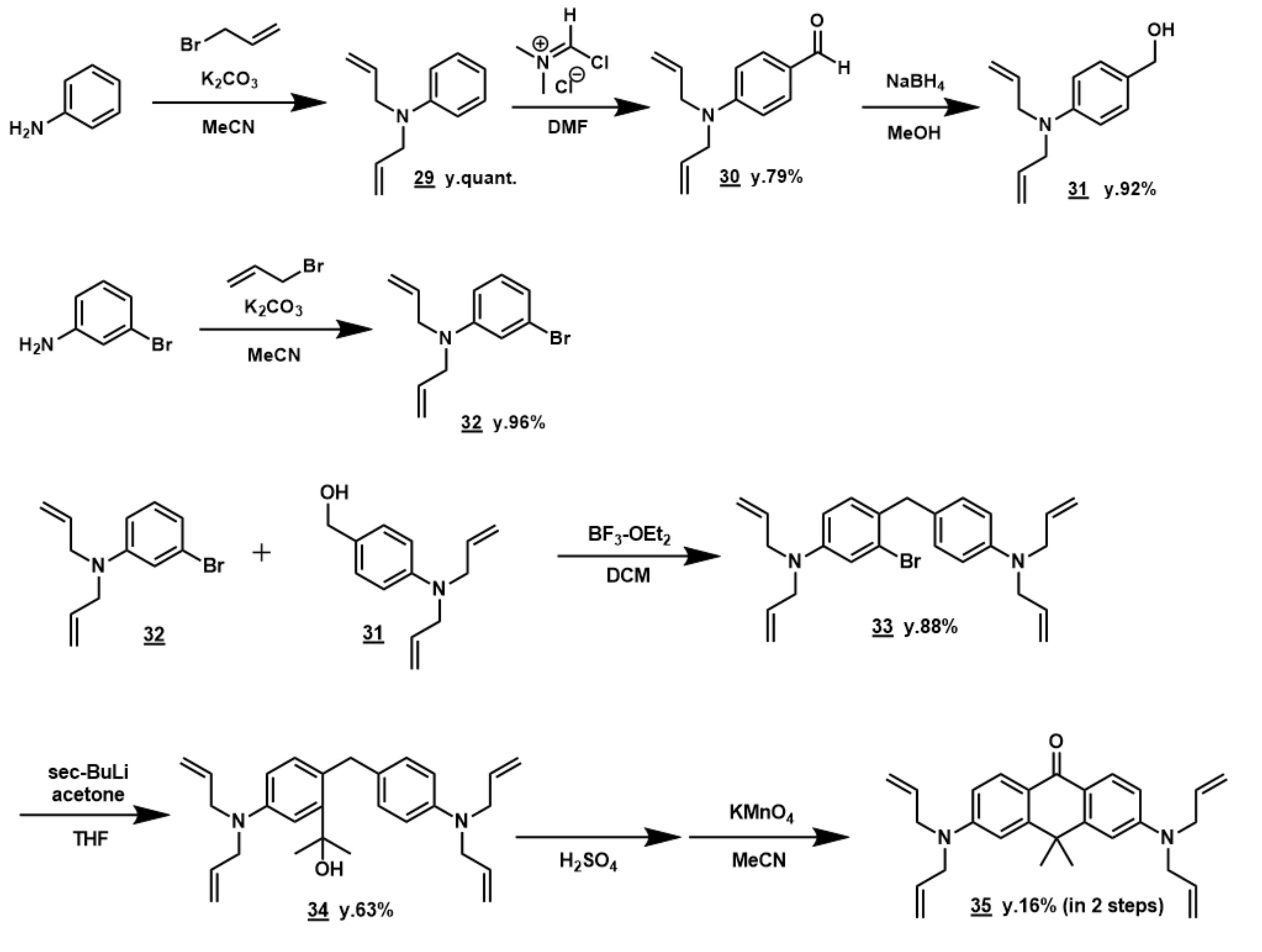
28 gGlu-HMRR



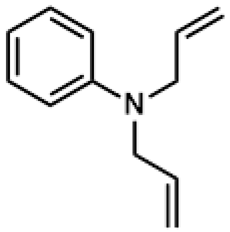
Compound 27 (30 mg, 0.082 mmol), boc-Glu-OtBu (12.4 mg, 0.041 mmol) and N,N-diisopropylethylamine (106 mg, 0.82 mmol) were dissolved in anhydrous DMF (2 mL), and the solution was stirred at r.t.. HATU (15.6 mg, 0.041 mmol) was added, and stirring was continued for 1 hour. The mixture was evaporated and the residue was dissolved in CH_2Cl_2 (5 mL) and trifluoroacetic acid (5 mL). The resulting solution was stirred at 40°C for 1 hour, and then evaporated. The residue was purified by preparative HPLC under the following conditions: A/B =

80/20 (0 min) to 0/100 (45 min) linear gradient (solvent A: H_2O, 0.1% TFA; solvent B: acetonitrile/H_2O = 80/20, 0.1% TFA). Compound 28 was obtained as a red solid (16 mg, 80%).

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD+NaOD): δ 0.55 (s, 6H), 2.18-2.36 (m, 2H), 2.74-2.79 (m, 2H), 4.09 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz), 4.42 (s, 2H), 6.85 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.97 (d, 1H, *J* = 5.2 Hz), 7.21 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.41 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.46 (s, 1H), 7.62 (d, 1H, *J* = 5.2 Hz), 7.72 (dd, 1H, *J* = 8.8 Hz, 2.4 Hz), 8.15 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz) HRMS (ESI$^+$): Calcd for $[M+H]^+$, 494.15698, Found, 494.15708 (+0.10 mmu).

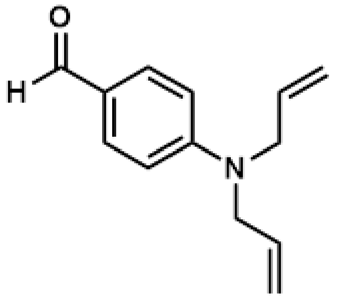


29



Compound 29 was prepared according to the literature[35].

30

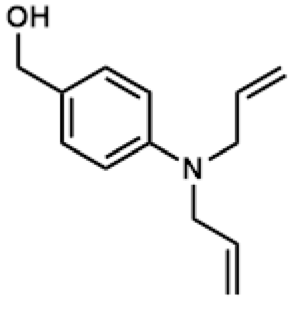


Vilsmeier reagent (7.4 g, 57.7 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (40 mL) and the solution was stirred at 0°C under an Ar atmosphere. Then, compound 29 (10.0 g, 10.9 mL, 57.7 mmol) was added, and stirring was continued at r.t. for 20 hours. The reaction was quenched with saturated $NaHCO_3$ aq. and the mixture was extracted with CH_2Cl_2. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane/AcOEt = 9/1 to 2/1) to give compound 30 as a colorless liquid (9.14 g, 79%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 3.99 (d, 4H, *J* = 5.6 Hz), 5.12-5.20 (m, 4H), 5.79-5.87 (m, 2H), 6.69 (d, 2H, *J* = 9.2 Hz), 7.69 (d, 2H, *J* = 9.2 Hz), 9.71 (s, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 52.8, 111.5, 116.8, 125.7, 132.1, 132.3, 153.3, 190.3.

31



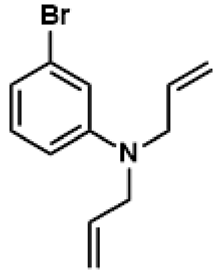
Compound 30 (8000 mg, 39.7 mmol) was dissolved in anhydrous methanol (50 mL) and stirred at 0˚C. Sodium tetrahydroborate (1654 mg, 43.7 mmol) was added and stirring was continued at r.t. for 4 hours. The reaction was quenched with H_2O and the mixture was extracted with CH_2Cl_2. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane/AcOEt = 2/1 to 1/1) to give compound 31 as a colorless liquid (7450 mg, 92%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 3.92 (d, 4H, *J* = 4.0 Hz), 4.53 (s, 2H), 5.14-5.19 (m, 4H), 5.80-5.89 (m, 2H), 6.67 (d, 2H, *J* = 9.2 Hz), 7.19 (d, 2H, *J* = 9.2 Hz).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 52.9, 65.4, 112.4, 116.1, 128.7, 128.8, 133.9, 148.5.

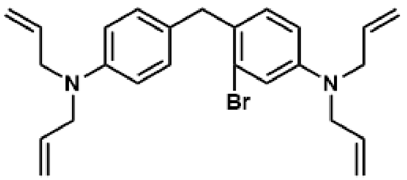
HRMS (ESI$^+$): Calcd for $[M+H]^+$, 204.13884, Found, 204.13520 (-3.64 mmu).

32



Compound 32 was prepared according to the literature[36].

33



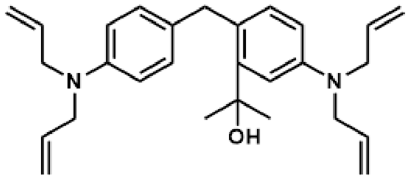
Compound 32 (2522 mg, 10.0 mmol) and compound 31 (2030 mg, 10.0 mmol) were dissolved in anhydrous CH_2Cl_2 (20 mL) and the solution was stirred at 0˚C. Boron trifluoride ethyl ether complex (2.5 mL, 20.0 mmol) was added, and stirring was continued at r.t. for 22 hours. The reaction was quenched with saturated $NaHCO_3$ aq. and the mixture was extracted with CH_2Cl_2. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane/AcOEt = 10/0 to 8/2) to give compound 33 as a colorless liquid (3870 mg, 88%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 3.85-3.90 (m, 10H), 5.12-5.19 (m, 8H), 5.77-5.90 (m, 4H), 6.55 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, 2.8 Hz), 6.63 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 6.87 (d, 1H, *J* = 2.8 Hz), 6.93 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.02 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 39.7, 52.8, 52.9, 111.8, 112.5, 116.0, 116.1, 116.3, 125.5, 128.4, 128.6, 129.6, 131.1, 133.6, 134.4, 147.1, 148.1.

HRMS (ESI$^+$): Calcd for $[M+H]^+$, 437.15924, 439.15719, Found, 437.16055, 439.15909 (+1.32 mmu, +1.90 mmu)

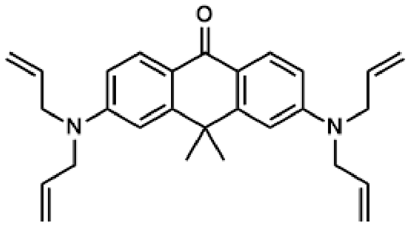
34



To a flame-dried flask flushed with Ar, compound 33 (1800 mg, 4.1 mmol) and anhydrous THF (15 mL) were added. The mixture was cooled to -78°C and then 1 M *sec*-BuLi (4.1 mL, 4.1 mmol) was added to it. Acetone (0.6 mL, 8.2 mmol) was further added, and the mixture was stirred at r.t. for 3 hours. The reaction was quenched with H_2O and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 from saturated $NaHCO_3$ aq.. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane/AcOEt = 10/0 to 8/2) to give compound 34 as a colorless solid (1073 mg, 63%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.60 (s, 6H), 1.76 (s, 1H), 3.87-3.91 (m, 8H), 4.16 (s, 2H), 5.11-5.22 (m, 8H), 5.79-5.92 (m, 4H), 6.56 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.61 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz), 6.82 (s, 1H), 6.93-6.97 (m, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 31.8, 38.0, 53.0, 53.2, 74.3, 110.2, 111.3, 112.6, 116.0, 116.2, 126.5, 129.4, 130.9, 134.0, 134.4, 134.6, 146.6, 146.9, 146.9.

35

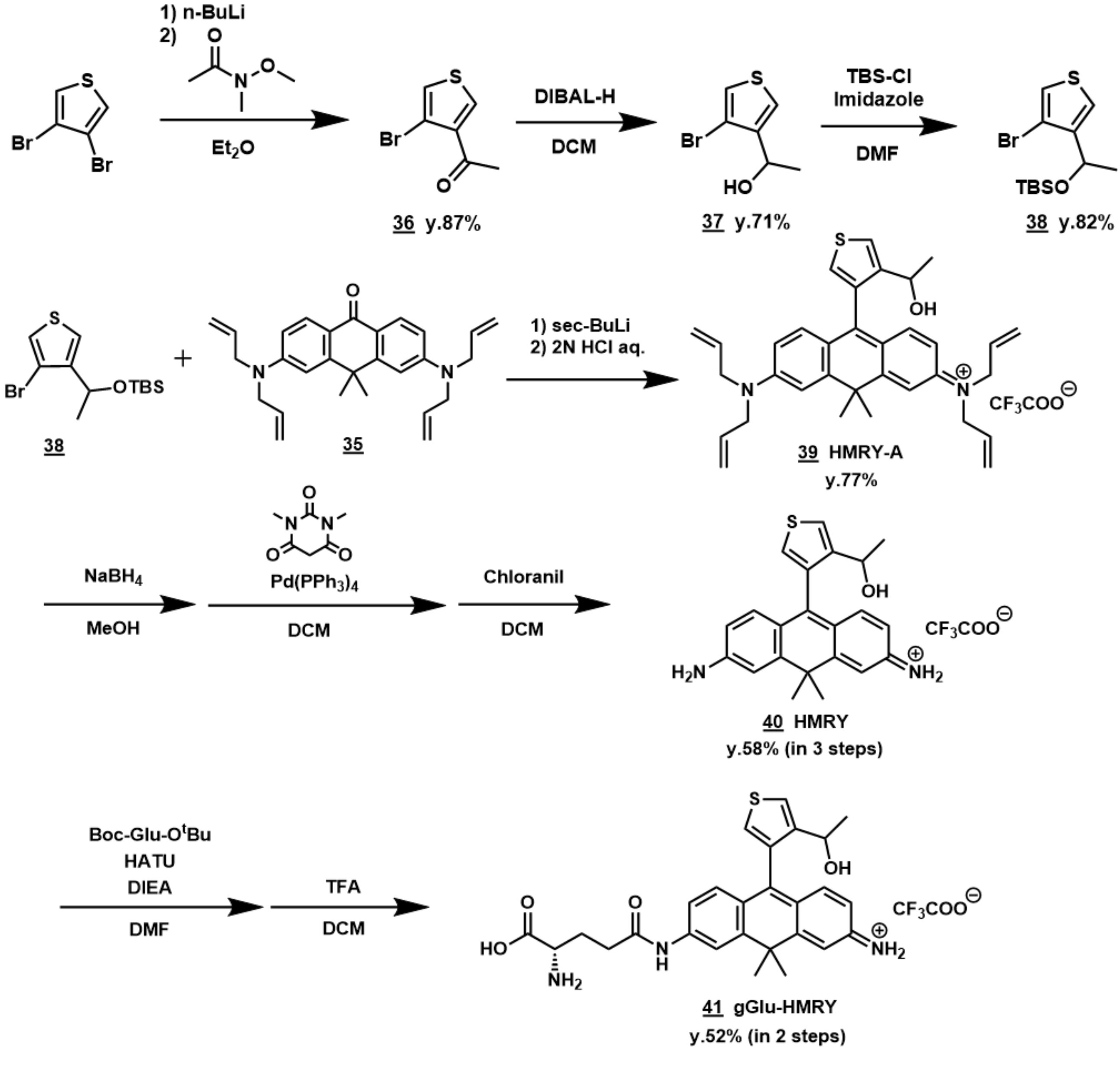


Compound 34 (8900 mg, 21.4 mmol) was dissolved in 95% H_2SO_4 (10 mL) and the solution was stirred at 0°C for 10 minutes. The reaction was quenched with saturated Na_2CO_3 aq. and the

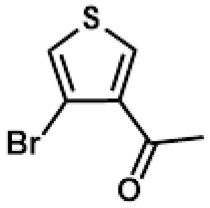
mixture was extracted with CH_2Cl_2. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was dissolved in acetonitrile (120 mL) and the solution was stirred at 0˚C. $KMnO_4$ (10128 mg, 64.1 mmol) was added portionwise, then the mixture was stirred at r.t. for 2 hours, and the reaction was quenched with methanol. The mixture was filtered through Celite, and the filtrate was evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, CH_2Cl_2/methanol = 100/0 to 97/3) to give compound 35 as a light yellow solid (1420 mg, 16%)

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.63 (s, 6H), 4.02 (d, 8H, J = 2.8 Hz), 5.20-5.23 (m, 8H), 5.84-5.93 (m, 4H), 6.72 (dd, 2H, J = 2.0 Hz, 8.8 Hz), 6.76 (d, 2H, J = 2.0 Hz), 8.20 (d, 2H, J = 8.8 Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 33.6, 38.1, 53.0, 108.5, 111.1, 116.6, 120.3, 129.2, 133.3, 151.8, 152.3, 181.1.

HRMS (ESI$^+$): Calcd for [M+H]$^+$, 413.25929, Found, 413.25696(-2.23mmu)

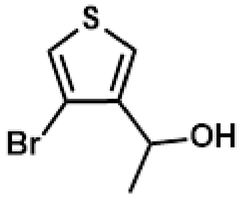


36



Compound 36 was prepared according to the literature[37].

37

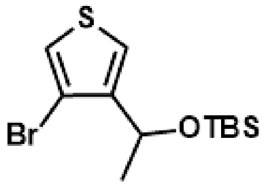


Compound 36 (1000 mg, 4.9 mmol) was dissolved in anhydrous THF (20 mL), and the solution was stirred at 0°C. Sodium tetrahydroborate (278 mg, 7.4 mmol) was added and stirring was continued at r.t. for 22 hours. The reaction was quenched with 1 N HCl aq. and the mixture was extracted with CH_2Cl_2. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane/AcOEt = 9/1 to 7/3) to give compound 37 as a colorless liquid (714 mg, 71%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.49 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz), 2.43 (d, 1H, *J* = 4.4 Hz), 4.91-4.97 (m, 1H), 7.23 (d, 1H, *J* = 3.6 Hz), 7.27 (d, 1H, *J* = 3.6 Hz).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 23.4, 66.0, 109.9, 121.3, 123.7, 145.2.

38



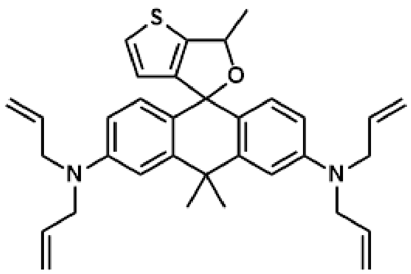
Compound 37 (1077 mg, 5.23 mmol), tert-butyldimethylchlorosilane (2366 mg, 15.7 mmol) and imidazole (2136 mg, 31.4 mmol) were dissolved in anhydrous DMF (12 mL). The solution was stirred at r.t. under an Ar atmosphere for 4 hours, then extracted with *n*-hexane from brine. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash

column chromatography (silica gel, *n*-hexane/AcOEt = 10/0 to 9/1) to give compound 38 as a colorless liquid (1384 mg, 82%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.01 (s, 3H), 0.06 (s, 3H), 0.90 (s, 9H), 1.41 (d, 3H, *J* = 6.0 Hz), 4.91 (q, 1 H, *J* = 6.0 Hz), 7.20 (d, 1H, *J* = 3.6 Hz), 7.26 (d, 1H, *J* = 3.6 Hz).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ -4.86, -4.82, 18.3, 25.6, 25.9, 67.5, 108.9, 121.2, 123.1, 146.5.

39

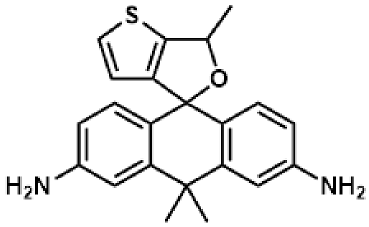


To a flame-dried flask flushed with Ar, compound 38 (546 mg, 1.7 mmol) and anhydrous THF (12 mL) were added. The mixture was cooled to -85°C and then 1 M *sec*-BuLi (1.6 mL, 1.7 mmol) was added to it. Compound 35 (140 mg, 0.34 mmol) in anhydrous THF (4 mL) was further added. The mixture was stirred at r.t. for 1 hour, then the reaction was quenched with 2 N HCl aq., and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 from saturated $NaHCO_3$ aq.. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by preparative HPLC under the following conditions: A/B = 80/20 (0 min) to 0/100 (30 min) linear gradient (solvent A: H_2O, 0.1% TFA; solvent B: acetonitrile/H_2O = 80/20, 0.1% TFA). Compound 39 was obtained as a dark violet solid (137 mg, 77%).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD+NaOD): δ 1.23 (d, 3H, *J* = 6.0 Hz), 1.69 (s, 3H), 1.74 (s, 3H), 4.28-4.32 (m, 8H), 4.46 (q, 1H, *J* = 6.0 Hz), 5.26 (d, 4H, *J* = 17.6 Hz), 5.28 (d, 4H, *J* = 10.4 Hz), 5.89-5.97 (m, 4H). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD+NaOD): δ 23.3, 32.0, 33.7, 41.6, 53.5, 64.5, 111.7, 111.7, 113.4, 113.4, 116.6, 121.3, 121.4, 122.1, 126.8, 131.4, 134.2, 137.7, 138.0, 147.4, 156.4, 156.4, 157.2, 161.8.

HRMS (ESI$^+$): Calcd for $[M+H]^+$, 523.27831, Found, 523.27729 (-1.02 mmu)

40 HMRY

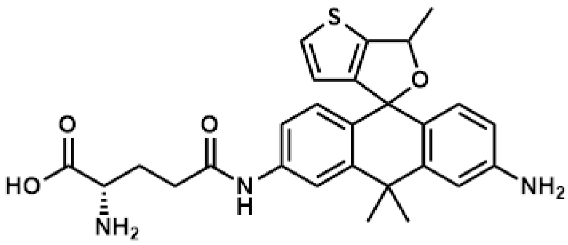


Compound 39 (125 mg, 0.24 mmol) was dissolved in methanol (20 mL), and the solution was stirred at 0˚C. Sodium tetrahydroborate (18 mg, 0.48 mmol) was added and stirring was continued at r.t. for 15 minutes. The reaction was quenched with saturated $NaHCO_3$ aq. and the mixture was extracted with CH_2Cl_2. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was dissolved in dehydrated CH_2Cl_2 (20 mL), and 1,3-dimethylbarbituric acid (186 mg, 1.19 mmol) and $Pd(PPh_3)_4$ (58 mg, 0.05 mmol) were added. The resulting solution was stirred at 35˚C under an Ar atmosphere for 14 hours. Then chloranil (118 mg, 0.48 mmol) was added, and stirring was continued at r.t. for 30 minutes. The mixture was extracted with CH_2Cl_2 from 2 N NaOH aq.. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by preparative HPLC under the following conditions: A/B = 80/20 (0 min) to 0/100 (60 min) linear gradient (solvent A: H_2O, 0.1% TFA; solvent B: acetonitrile/H_2O = 80/20, 0.1% TFA). Compound 40 was obtained as a violet solid (51 mg, 58%).

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD+NaOD): δ 1.23 (d, 3H, J = 6.4 Hz), 1.66 (s, 3H), 1.71 (s, 3H), 4.46 (q, 1H, J = 6.4 Hz), 6.62 (dd, 2H, J = 9.2 Hz, 3.2 Hz), 7.12 (d, 1H, J = 3.2 Hz), 7.13 (d, 1H, J = 3.2 Hz), 7.16 (d, 1H, J = 9.2 Hz), 7.21 (d, 1H, J = 9.2 Hz), 7.42 (d, 1H, J = 3.2 Hz), 7.63 (d, 1H, J = 3.2 Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD+NaOD): δ 23.4, 31.5, 33.4, 41.0, 64.6, 112.6, 112.7, 114.6, 114.6, 120.7, 120.9, 121.9, 126.5, 134.4, 138.5, 138.8, 147.4, 157.9, 159.3, 159.4, 161.4.

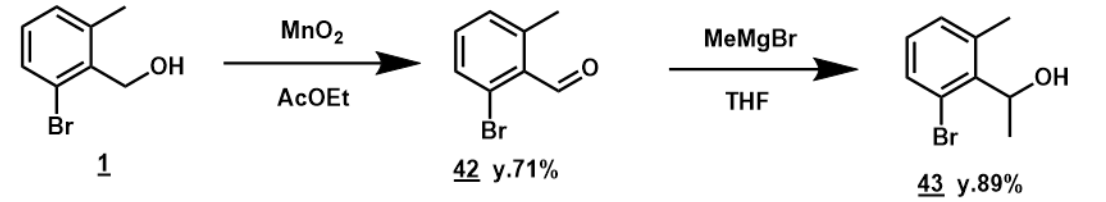
HRMS (ESI$^+$): Calcd for $[M+H]^+$, 363.15311, Found, 363.15147 (-1.64 mmu)

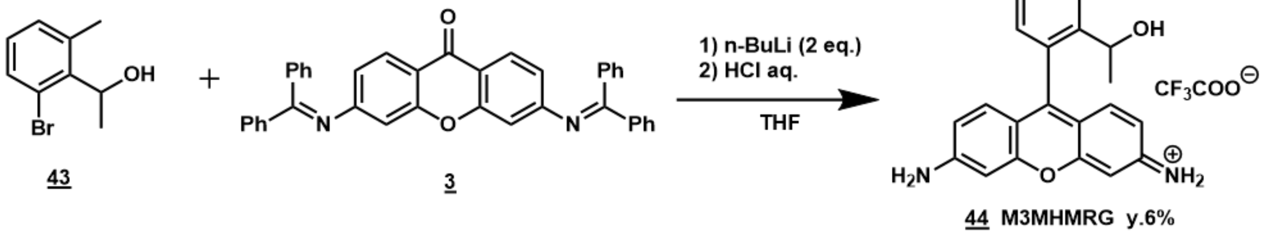
41 gGlu-HMRY

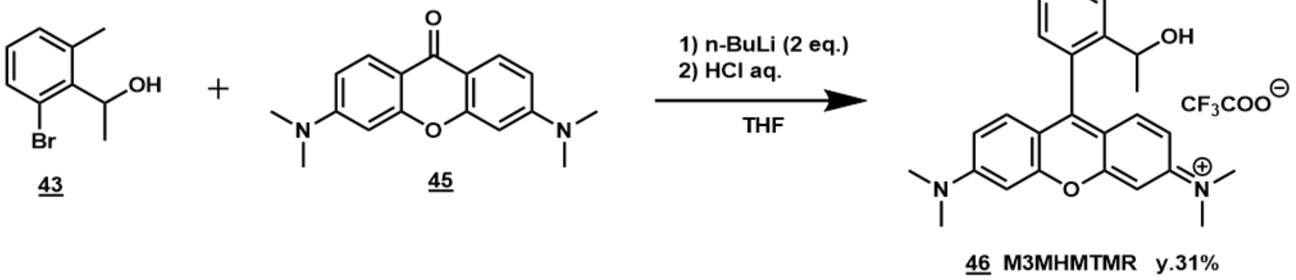


Compound 40 (31 mg, 0.085 mmol), boc-Glu-OtBu (13 mg, 0.043 mmol) and N,N-diisopropylethylamine (110 mg, 0.85 mmol) were dissolved in anhydrous DMF (2 mL), and the solution was stirred at r.t.. HATU (16.2 mg, 0.043 mmol) was added, and stirring was continued for

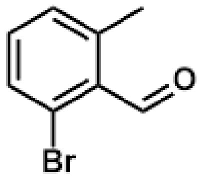
2 hours, then the mixture was evaporated. The residue was dissolved in CH2Cl2 (5 mL) and trifluoroacetic acid (5 mL), and the resulting solution was stirred at 40˚C for 1 hour, and evaporated. The residue was purified by preparative HPLC under the following conditions: A/B = 80/20 (0 min) to 0/100 (45 min) linear gradient (solvent A: H2O, 0.1% TFA; solvent B: acetonitrile/H2O = 80/20, 0.1% TFA). Compound 41 was obtained as an orange solid (11 mg, 52%).
1H NMR (400 MHz, CD3OD+NaOD): δ 1.24-1.30 (m, 3H), 1.71 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 2.20-2.32 (m, 2H), 2.75 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 4.05 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 4.42-4.50 (m, 1H), 6.83 (t, 1H, J = 8.4 Hz), 7.20-7.34 (m, 2H), 7.42-7.52 (m, 2H), 7.59 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 7.66 (t, 1H, J = 3.2Hz), 8.26 (s, 1H). 13C NMR (100 MHz, CD3OD+NaOD): δ 22.9, 23.3, 25.4, 31.1, 31.1, 32.2, 33.1, 41.3, 52.4, 64.4, 64.6, 115.2, 115.3, 116.9, 117.0, 117.8, 118.0, 118.1, 122.4, 122.6, 124.5, 124.6, 125.8, 125.9, 127.3, 127.3, 133.7, 134.0, 134.4, 134.8, 141.8, 142.2, 145.4, 145.4, 147.1, 147.5, 152.6, 160.8, 161.1, 161.8, 163.4, 163.5, 170.6, 171.9.
HRMS (ESI+): Calcd for [M+H]+, 492.19570, Found, 492.19380 (-1.90 mmu)







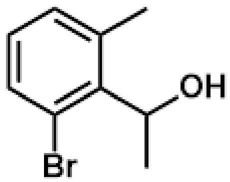
42



Compound 1 (1600 mg, 8.0 mmol) was dissolved in anhydrous AcOEt (40 mL). Manganese dioxide (6919 mg, 80.0 mmol) was added and the mixture was stirred at 70˚C for 18 hours. The mixture was filtered with celite and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane/AcOEt = 10/0 to 9/1) to give compound 42 as a pale yellow solid (1120 mg, 71%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 2.55 (s, 3H), 7.18 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz), 7.22 (dd, 1H, *J* = 7.2 Hz, 7.6 Hz), 7.48 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 10.5 (s, 1H).
^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 31.7, 128.4, 131.5, 131.7, 131.8, 133.7, 142.7, 194.6.

43

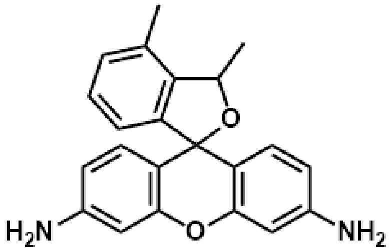


To a flame-dried flask flushed with Ar, compound 42 (400 mg, 2.0 mmol) and anhydrous THF (10 mL) were added. The mixture was cooled to -78˚C and then 3 M methylmagnesium Bromide (0.7 mL, 2.0 mmol) was added to it. The mixture was stirred at r.t. for 1 hour, then the reaction was quenched with H_2O, and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 from saturated $NaHCO_3$ aq.. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane/AcOEt = 9/1 to 7/3) to give compound 43 was obtained as a colorless solid (384 mg, 89%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.56 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz), 2.49 (s, 3H), 2.49 (s, 1H), 5.45-5.52 (m, 1H), 7.00 (dd, 1H, *J* = 7.6 Hz, 7.6 Hz), 7.08 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.37 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 20.8, 21.5, 70.2, 122.7, 128.3, 131.3, 131.4, 138.7, 140.7.

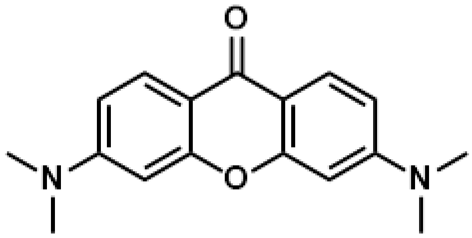
44 M3MHMRG



To a flame-dried flask flushed with Ar, compound 43 (387 mg, 1.8 mmol) and anhydrous THF (13 mL) were added. The mixture was cooled to -78°C and then 1 M *n*-BuLi (2.0 mL, 3.2 mmol) was added to it. Compound 3 (100 mg, 0.2 mmol) in anhydrous THF (4 mL) was further added. The mixture was stirred at r.t. for 1 hour, then the reaction was quenched with 1 N HCl aq., and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 from saturated $NaHCO_3$ aq.. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by preparative HPLC under the following conditions: A/B = 80/20 (0 min) to 0/100 (45 min) linear gradient (solvent A: H_2O, 0.1% TFA; solvent B: acetonitrile/H_2O = 80/20, 0.1% TFA). Compound 44 was obtained as a dark violet solid (4 mg, 6%).

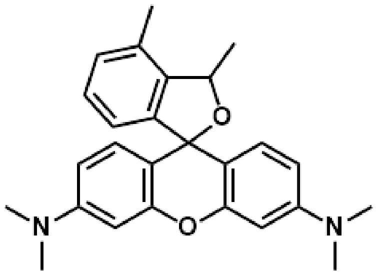
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD+NaOD): δ 1.57 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz), 2.41 (s, 3H), 5.48 (q, 1H, *J* = 6.4 Hz), 6.32 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 6.38-6.46 (m, 4H), 6.57 (d, 1H, *J* = 6.0 Hz), 6.71 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.12-7.17 (m, 2H). HRMS (ESI$^+$): Calcd for $[M+H]^+$, 345.16030, Found, 345.15620 (-4.10 mmu)

45



Compound 45 was prepared according to the literature[38].

46 M3MHMTMR

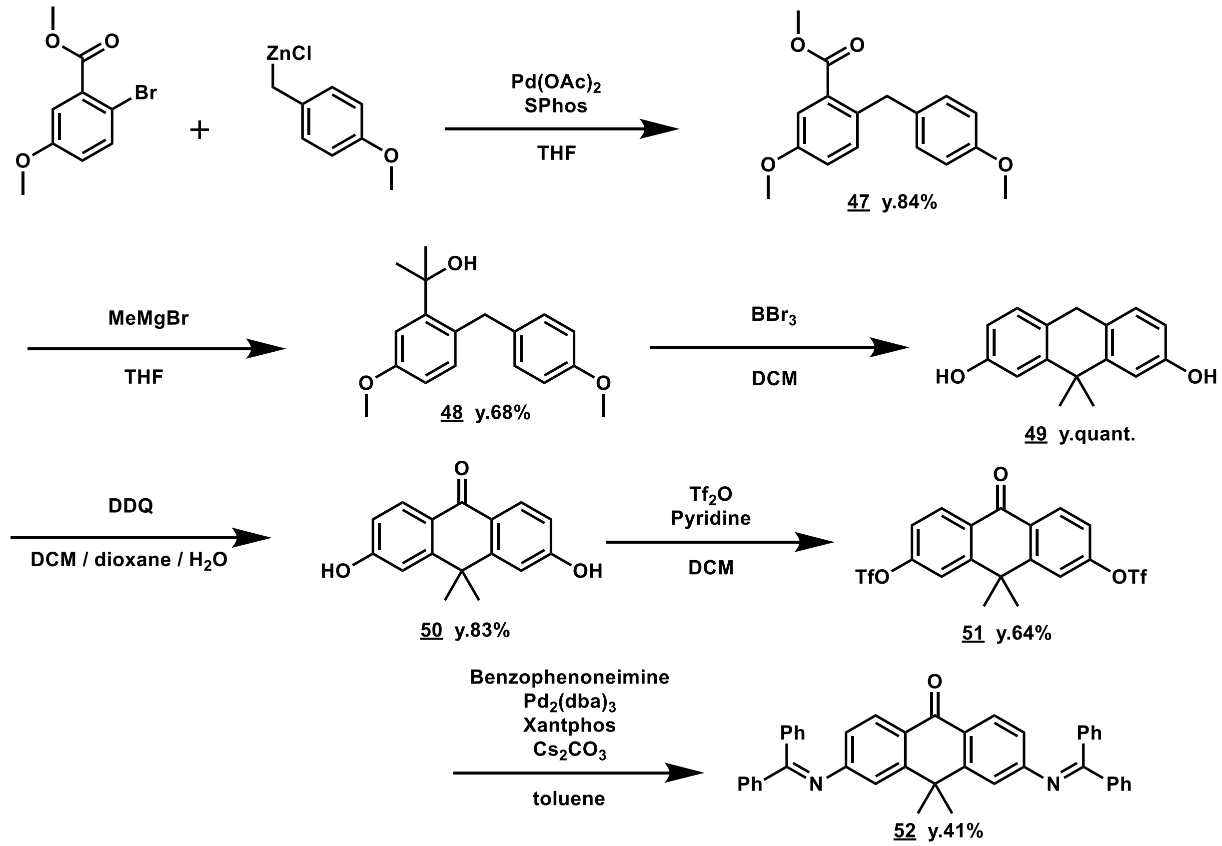


To a flame-dried flask flushed with Ar, compound 43 (381 mg, 1.8 mmol) and anhydrous diethyl ether (8 mL) were added. The mixture was cooled to -78°C and then 1 M *n*-BuLi (2.2 mL, 3.5 mmol) was added to it. Compound 45 (50 mg, 0.18 mmol) in anhydrous THF (6 mL) was further added. The mixture was stirred at r.t. for 1 hour, then the reaction was quenched with 1 N HCl aq., and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 from saturated $NaHCO_3$ aq.. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by preparative HPLC under the following conditions: A/B = 60/40 (0 min) to 0/100 (30 min) linear gradient (solvent A: H_2O, 0.1% TFA; solvent B: acetonitrile/H_2O = 80/20, 0.1% TFA). Compound 44 was obtained as a dark violet solid (22 mg, 31%).

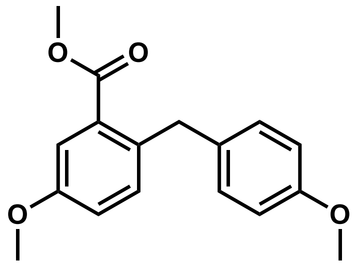
^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD+NaOD): δ 1.58 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz), 2.41 (s, 3H), 2.91 (s, 6H), 2.93 (s, 6H), 5.50 (q, 1H, *J* = 6.4 Hz), 6.40-6.44 (m, 3H), 6.48-6.50 (m, 1H), 6.55-6.58 (m, 2H), 6.81 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.13-7.15 (m, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD+NaOD): δ 19.1, 22.7, 40.7, 79.6, 85.2, 99.6, 99.8, 109.9, 109.9, 114.5, 115.0, 122.6, 129.7, 130.2, 130.6, 131.5, 132.2, 142.7, 146.2, 152.9, 153.0, 153.0, 153.7.

HRMS (ESI^{+}): Calcd for $[M+H]^{+}$, 401.22290, Found, 401.21930 (-3.60 mmu)

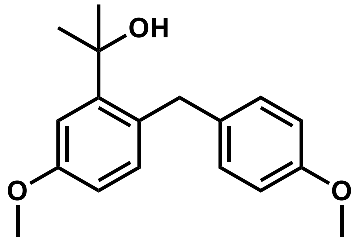


47



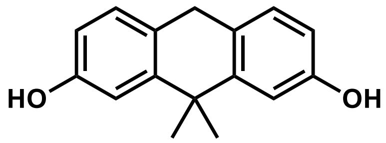
Compound 47 was prepared according to the literature[39].

48



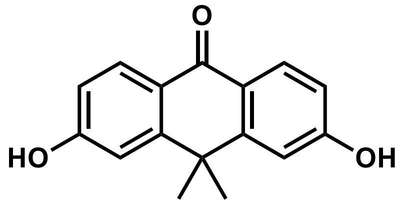
Compound 48 was prepared according to the literature[39].

49



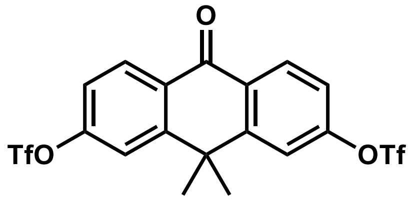
Compound 49 was prepared according to the literature[39].

50



Compound 50 was prepared according to the literature[39].

51

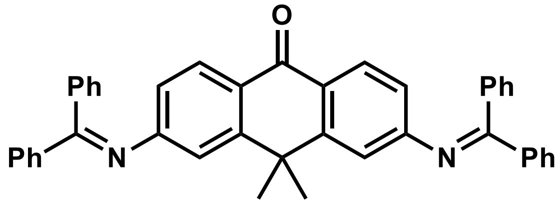


Compound 50 (1750 mg, 6.9 mmol) and pyridine (2.2 mL, 27.5 mmol) were dissolved in anhydrous CH_2Cl_2 (40 mL) and the mixture was stirred at 0°C. Then, trifluoromethanesulfonic anhydride (4.5 mL, 27.5 mmol) was added, and stirring was continued for 16 hours. The reaction was quenched with H_2O and the mixture was extracted with CH_2Cl_2. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane/AcOEt = 9/1 to 7/3) to give compound 51 as colorless solid (2290 mg, 64%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.77 (s, 6H), 7.37 (dd, 2H, J = 2.4 Hz, 8.8 Hz), 7.57 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 8.45 (d, 2H, J = 8.8 Hz).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 32.9, 38.9, 118.8(q, J = 320.8 Hz), 119.9, 120.5, 129.3, 130.8, 152.6, 153.3, 180.8.

52



Compound 51 (2270 mg, 4.4 mmol), benzophenone imine (7938 mg, 43.8 mmol), $Pd_2(dba)_3$ (403 mg, 0.44 mmol), xantphos (633 mg, 1.1 mmol) and Cs_2CO_3 (14271 mg, 43.8 mmol) were dissolved in deaerated dioxane (20 mL) and the solution was stirred at 80°C under Ar atmosphere for 15 hours. The mixture was extracted with CH_2Cl_2 and the organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane/AcOEt = 8/2 to 6/4) and washed with hexane/AcOEt = 2/1 to give compound 52 as a yellow solid (1050 mg, 41%).

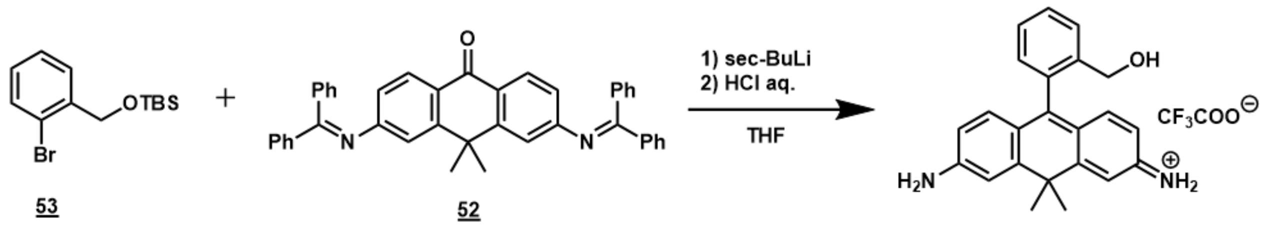
^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 1.25 (s, 6H), 6.78 (d, 2H, J = 2.0 Hz), 6.82 (dd, 2H, J = 8.0 Hz, 2.0 Hz), 7.09-7.11 (m, 4H), 7.21-7.23 (m, 6H), 7.38-7.52 (m, 6H), 7.79 (d, 2H, J = 7.6 Hz), 8.14 (d, 2H, J = 8.0 Hz).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 32.5, 37.7, 118.6, 120.3, 125.7, 128.2, 128.4, 128.4, 128.9, 129.4, 129.6,

131.3, 135.9, 139.1, 151.3, 155.9, 169.2, 182.4.

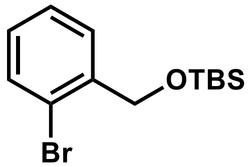
HRMS (ESI+): Calcd for $[M+H]^+$, 581.25929, Found, 581.25803 (-1.25 mmu)

<u>53</u> y.85%



<u>53</u> <u>52</u> <u>54</u> HMCR550 y.72%

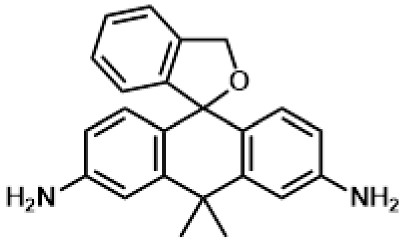
<u>53</u>



2-Bromobenzyl alcohol (2000 mg, 10.7 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (40 mL). tert-Butyldimethylchlorosilane (2412 mg, 16.0 mmol) and imidazole (2185 mg, 32.1 mmol) were added and the solution was stirred at r.t. under an Ar atmosphere for 4 hours. The mixture was extracted with *n*-hexane. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane) to give compound <u>53</u> as a colorless liquid (2750 mg, 85%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.14 (s, 6H), 0.97 (s, 9H), 4.74 (s, 2H), 7.11 (dd, 1H, J = 8.0 Hz, 8.0 Hz), 7.33 (dd, 1H, J = 8.0 Hz, 8.0 Hz), 7.49 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 7.56 (d, 1H, J = 8.0 Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ -5.2, 18.5, 26.0, 64.7, 121.1, 127.4, 127.6, 128.2, 132.1, 140.4.

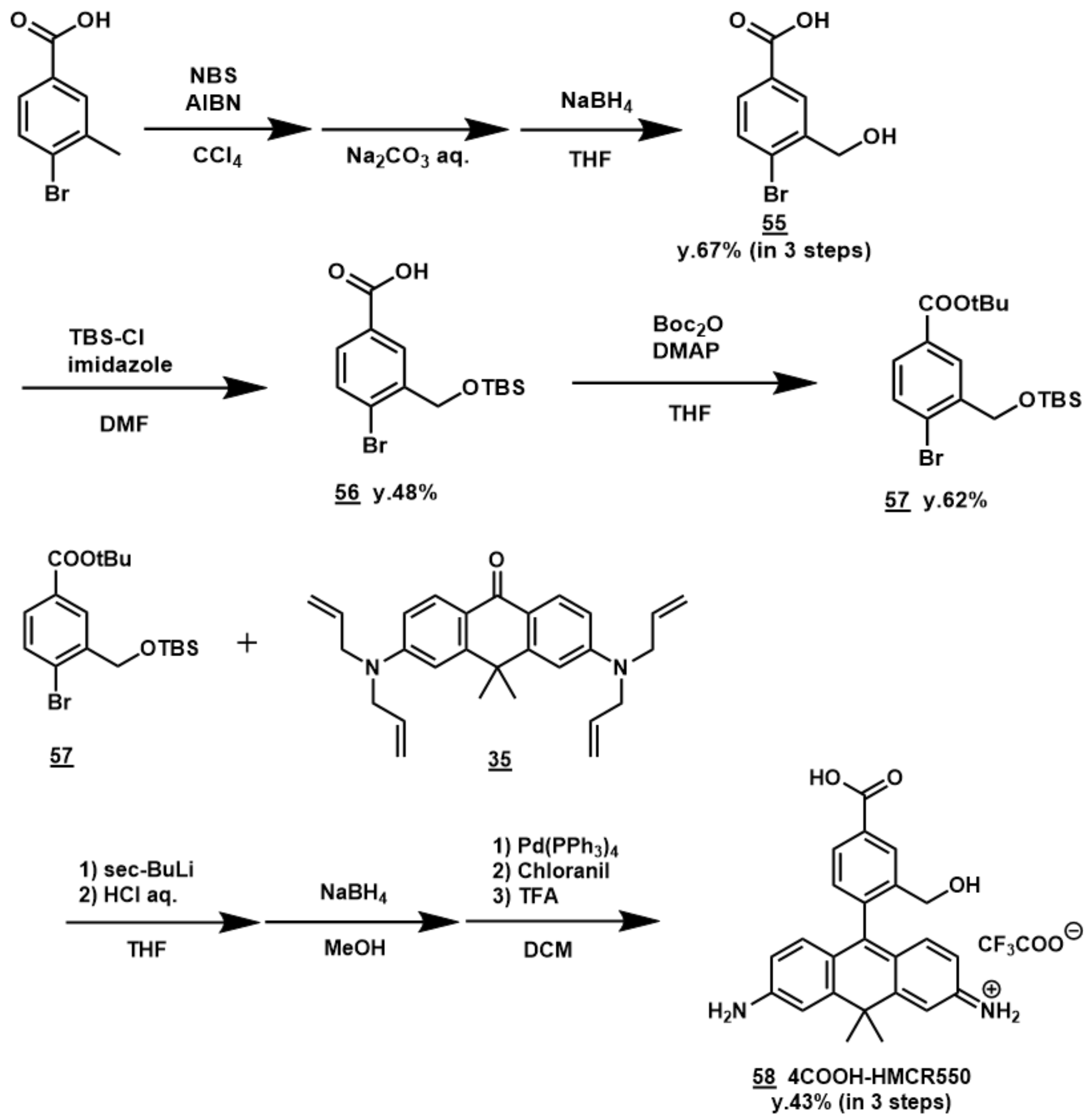
54 HMCR550



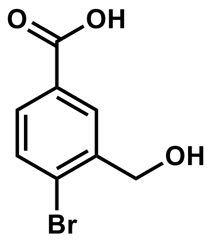
To a flame-dried flask flushed with Ar, compound 53 (512 mg, 1.7 mmol) and anhydrous THF (15 mL) were added. The mixture was cooled to -80°C and then 1 M *sec*-BuLi (1.3 mL, 1.3 mmol) was added to it. Compound 52 (100 mg, 0.17 mmol) in anhydrous THF (5 mL) was further added, and the mixture was stirred at r.t. for 1 hours. The reaction was quenched with 2 N HCl aq. and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 from saturated $NaHCO_3$ aq.. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by preparative HPLC under the following conditions: A/B = 80/20 (0 min) to 0/100 (30 min) linear gradient (solvent A: H_2O, 0.1% TFA; solvent B: acetonitrile/H_2O = 80/20, 0.1% TFA). Compound 54 was obtained as an orange solid (42 mg, 72%).

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD+NaOD): δ 1.65 (s, 3H), 1.72 (s, 3H), 5.28 (s, 2H), 6.49 (dd, 2H, *J* = 8.4 Hz, 2.0 Hz), 6.61 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.62 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 6.94 (d, 2H, *J* = 2.0 Hz), 7.16 (dd, 2H, *J* = 8.0 Hz, 8.0 Hz), 7.28 (dd, 2H, *J* = 8.0 Hz, 8.0 Hz), 7.36 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD+NaOD): δ 32.9, 33.8, 37.3, 71.8, 88.5, 111.9, 114.5, 120.5, 123.3, 127.2, 127.3, 127.8, 129.7, 138.3, 145.1, 147.0, 147.8.

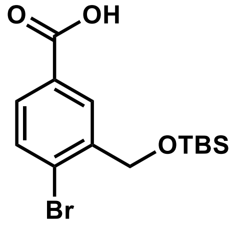


55



Compound 55 was prepared according to the literature[8].

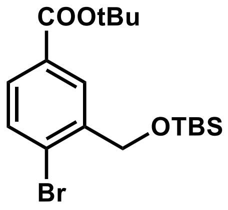
56



Compound 55 (3600 mg, 15.6 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (30 mL). tert-Butyldimethylchlorosilane (4696 mg, 31.2 mmol) and imidazole (3182 mg, 46.8 mmol) were added and the solution was stirred at r.t. under an Ar atmosphere for 6 hours. The mixture was evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane/AcOEt = 8/2 to 6/4) to give compound 56 as a colorless liquid (2169 mg, 86%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.07 (s, 6H), 0.89 (s, 9H), 4.69 (s, 2H), 7.68 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, 2.0 Hz), 7.72 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 8.06 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ -4.9, 18.5, 26.3, 64.4, 126.2, 129.0, 130.0, 130.8, 133.1, 140.7, 167.2.

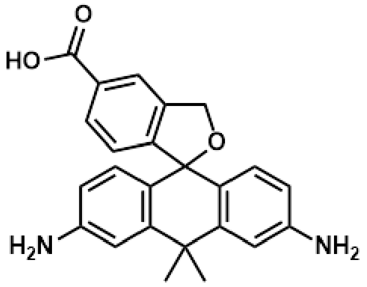
57



Compound 56 (2800 mg, 8.1 mmol) was dissolved in anhydrous THF (30 mL). Di-tert-butyl Pyrocarbonate (4425 mg, 20.3 mmol) and *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine (495 mg, 4.1 mmol) were added and the solution was refluxed at 80°C for 20 hours. Then the reaction was quenched with brine, and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 and AcOEt. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was purified by flash column chromatography (silica gel, *n*-hexane/AcOEt = 10/0 to 9/1) to give compound 57 as a colorless liquid (2000 mg, 62%).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 0.13 (s, 6H), 0.97 (s, 9H), 1.57 (s, 9H), 4.72 (s, 2H), 7.52 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.72 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, 2.0 Hz), 8.16 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz).

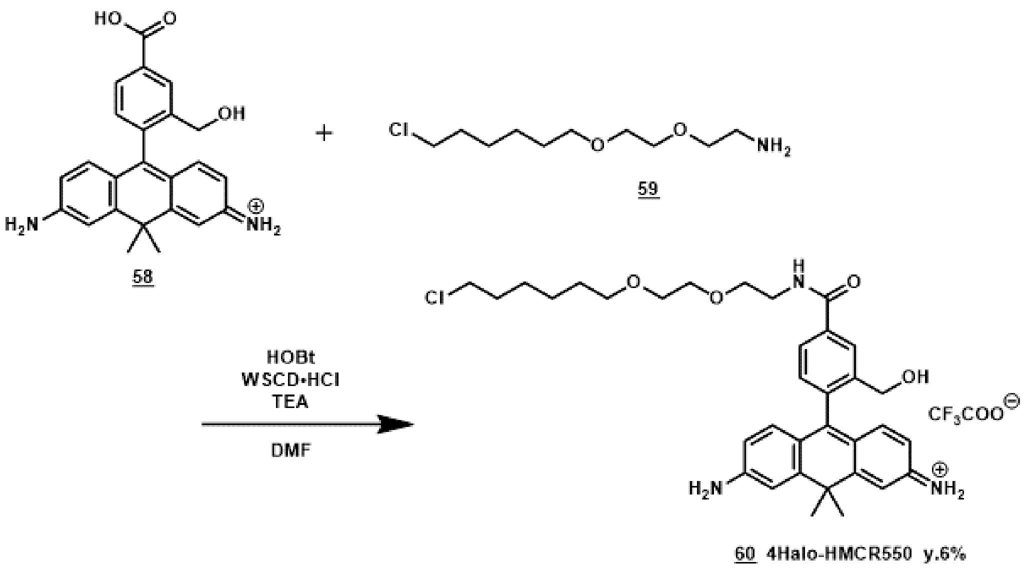
58 4COOH-HMCR550



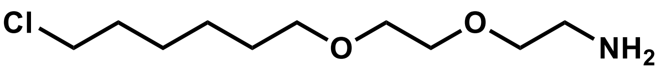
To a flame-dried flask flushed with Ar, compound 57 (482 mg, 1.2 mmol) and anhydrous THF (10 mL) were added. The mixture was cooled to -78°C and then 1 M *sec*-BuLi (1.2 mL, 1.2 mmol) was added to it. Compound 35 (100 mg, 0.24 mmol) in anhydrous THF (4 mL) was further added. The mixture was stirred at r.t. for 1 hour, then the reaction was quenched with 2 N HCl aq., and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 from saturated $NaHCO_3$ aq.. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was dissolved in methanol (5 mL), and the solution was stirred at 0°C. Sodium tetrahydroborate (27 mg, 0.72 mmol) was added and stirring was continued at r.t. for 10 minutes. The reaction was quenched with H_2O and the mixture was extracted with AcOEt. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated. The residue was dissolved in dehydrated CH_2Cl_2 (20 mL), and 1,3-dimethylbarbituric acid (187 mg, 1.2 mmol) and $Pd(PPh_3)_4$ (55 mg, 0.05 mmol) were added. The resulting solution was stirred at 40°C under an Ar atmosphere for 20 hours. The mixture was evaporated and dissolved in CH_2Cl_2 (5 mL). Then chloranil (118 mg, 0.48 mmol) and TFA (5 mL) were added, and stirring was continued at r.t. for 6.5 hours. The mixture was evaporated. The residue was purified by preparative HPLC under the following conditions: A/B = 80/20 (0 min) to 0/100 (30 min) linear gradient (solvent A: H_2O, 0.1% TFA; solvent B: acetonitrile/H_2O = 80/20, 0.1% TFA). Compound 58 was obtained as a violet solid (40 mg, 43%)..

^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD+NaOD): δ 1.64 (s, 3H), 1.71 (s, 3H), 5.31 (s, 2H), 6.50 (dd, 2H, *J* = 8.4 Hz, 2.0 Hz), 6.58 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.64 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz), 6.94 (d, 2H, *J* = 2.0 Hz), 7.75 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.92 (s, 1H).

HRMS (ESI$^+$): Calcd for $[M]^+$, 387.17087, Found, 387.16793 (-2.94mmu)

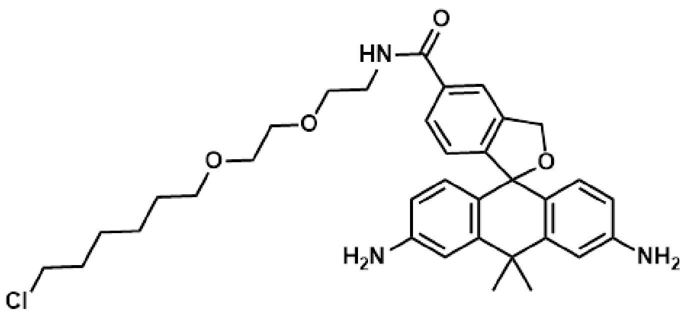


59



Compound 59 was prepared according to the literature[40].

60 4Halo-HMCR550



Compound 58 (20 mg, 0.05 mmol), Compound 59 (33 mg, 0.15 mmol) and HOBt (8 mg, 0.05 mmol) and WSCD-HCl (10 mg, 0.05 mmol) were dissolved in anhydrous DMF (2 mL), and the solution was stirred at 0˚C. Triethylamine (15 mg, 0.15 mmol) was added, and stirring was continued at r.t. for 6 hours, then the mixture was extracted with CH_2Cl_2. The organic solution was dried over Na_2SO_4, filtered, and evaporated.The residue was purified by preparative HPLC under the following conditions: A/B = 80/20 (0 min) to 0/100 (30 min) linear gradient (solvent A: H2O, 0.1% TFA; solvent B: acetonitrile/H2O = 80/20, 0.1% TFA). Compound 60 was obtained as an orange solid (2 mg, 6%).

HRMS (ESI$^+$): Calcd for $[M]^+(Cl^{35})$, 592.29421, Found, 592.29497 (+0.77mmu)

参考文献

1. Kenmoku, S., Urano, Y., Kojima, H. & Nagano, T. Development of a highly specific rhodamine-based fluorescence probe for hypochlorous acid and its application to real-time imaging of phagocytosis. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 7313–7318 (2007).

2. Urano, Y. *et al.* Rapid cancer detection by topically spraying a γ-glutamyltranspeptidase-activated fluorescent probe. *Sci. Transl. Med.* **3**, (2011).

3. Sakabe, M. *et al.* Rational design of highly sensitive fluorescence probes for protease and glycosidase based on precisely controlled spirocyclization. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 409–414 (2013).

4. Onoyama, H. *et al.* Rapid and sensitive detection of early esophageal squamous cell carcinoma with fluorescence probe targeting dipeptidylpeptidase IV. *Sci. Rep.* **6**, 1–7 (2016).

5. Sauer, M. & Heilemann, M. Single-Molecule Localization Microscopy in Eukaryotes. *Chem. Rev.* **117**, 7478–7509 (2017).

6. Sage, D. *et al.* Quantitative evaluation of software packages for single-molecule localization microscopy. *Nat. Methods* **12**, 717–724 (2015).

7. Izeddin, I. *et al.* Wavelet analysis for single molecule localization microscopy. *Opt. Express* **20**, 2081–2095 (2012).

8. Uno, S. N. *et al.* A spontaneously blinking fluorophore based on intramolecular spirocyclization for live-cell super-resolution imaging. *Nat. Chem.* **6**, 681–689 (2014).

9. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ort, and D. J. F. Gaussian09 Revision D.01.

10. Stephens, P. J., Devlin, F. J., Chabalowski, C. F. & Frisch, M. J. Ab Initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. *J. Phys. Chem.* **98**, 11623–11627 (1994).

11. Tomasi, J., Mennucci, B. & Cammi, R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.* **105**, 2999–3093 (2005).

12. Scalmani, G. & Frisch, M. J. Continuous surface charge polarizable continuum models of solvation. I. General formalism. *J. Chem. Phys.* **132**, 0–15 (2010).

13. Cancès, E., Mennucci, B. & Tomasi, J. A new integral equation formalism for the polarizable continuum model: Theoretical background and applications to Isotropic and anisotropic dielectrics. *J. Chem. Phys.* **107**, 3032–3041 (1997).

14. Howard, P. H. *Handbook of physical properties of organic chemicals.* (CRC press, 1996).

15. Clayden, J., Greeves, N., Warren, S. & Wothers, P. Organic chemistry. (2001).

16. Dugard, P. H., Walker, M., Mawdsley, S. J. & Scott, R. C. Absorption of some glycol ethers through human skin in vitro. *Environ. Health Perspect.* **57**, 193–197 (1984).

17. Zhang, H. & Kim, C.-K. Hydration of formaldehyde in water: insight from ONIOM study. *Bull. Korean Chem. Soc.* **29**, 2528–2530 (2008).

18. Fogarasi, G. & Szalay, P. G. Quantum chemical MP2 results on some hydrates of cytosine: Binding sites, energies and the first hydration shell. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 29880–29890 (2015).

19. Iwatate, R. J. *et al.* Silicon Rhodamine-Based Near-Infrared Fluorescent Probe for γ-Glutamyltransferase. *Bioconjug. Chem.* **29**, 241–244 (2018).

20. Iwatate, R. J., Kamiya, M. & Urano, Y. Asymmetric Rhodamine-Based Fluorescent Probe for Multicolour in Vivo Imaging. *Chem. - A Eur. J.* **22**, 1696–1703 (2016).

21. Foresman, J B, Frisch, Æ. Exploring chemistry with electronic structure methods. 3rd ed. *Gaussian, Inc.* (2015).

22. 原田義也. 量子化学 下巻. vol. 3 (裳華房, 2007).

23. 常田貴夫. 密度汎関数法の基礎. (講談社, 2012).

24. 慶伊富長. 反応速度論 第3版. (2001).

25. Maeda, S., Harabuchi, Y., Ono, Y., Taketsugu, T. & Morokuma, K. Intrinsic reaction coordinate: Calculation, bifurcation, and automated search. *Int. J. Quantum Chem.* **115**, 258–269 (2015).

26. Marenich, A. V., Cramer, C. J. & Truhlar, D. G. Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *J. Phys. Chem. B* **113**, 6378–6396 (2009).

27. Riddick, J. A., Bunger, W. B. & Sakano, T. K. Organic solvents: physical properties and methods of purification. (1986).

28. Yanai, T., Tew, D. P. & Handy, N. C. A new hybrid exchange-correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). *Chem. Phys. Lett.* **393**, 51–57 (2004).

29. Pearson, K. LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.* **2**, 559–572 (1901).

30. Imai, S., Kiyozuka, Y., Maeda, H., Noda, T. & Hosick, H. L. Establishment and characterization of a human ovarian serous cystadenocarcinoma cell line that produces the tumor markers CA-125 and tissue polypeptide antigen. *Oncology* **47**, 177–184 (1990).

31. Piao, W. *et al.* Development of azo-based fluorescent probes to detect different levels of hypoxia. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **52**, 13028–13032 (2013).

32. Kumar, N. N. B., Mukhina, O. A. & Kutateladze, A. G. Photoassisted synthesis of enantiopure alkaloid mimics possessing unprecedented polyheterocyclic cores. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 9608–9611 (2013).

33. Chen, C. T., Chen, C. H. & Ong, T. G. Complementary helicity interchange of optically

switchable supramolecular-enantiomeric helicenes with (-)-gel-sol-(+)-gel transition ternary logic. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 5294–5297 (2013).

34. Grimm, J. B., Brown, T. A., Tkachuk, A. N. & Lavis, L. D. General Synthetic Method for Si-Fluoresceins and Si-Rhodamines. *ACS Cent. Sci.* **3**, 975–985 (2017).

35. O'Sullivan, S., Doni, E., Tuttle, T. & Murphy, J. A. Metal-free reductive cleavage of C-N and S-N bonds by photoactivated electron transfer from a neutral organic donor. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **53**, 474–478 (2014).

36. Hirabayashi, K. *et al.* Analysis of Chemical Equilibrium of Silicon-Substituted Fluorescein and Its Application to Develop a Scaffold for Red Fluorescent Probes. *Anal. Chem.* **87**, 9061–9069 (2015).

37. Gao, S., Wu, Z., Wu, F., Lin, A. & Yao, H. Catalyst-Controlled Regiodivergent Dehydrogenative Heck Reaction of 4-Arylthiophene/Furan-3-Carboxylates. *Adv. Synth. Catal.* **358**, 4129–4135 (2016).

38. Horváth, P., Šebej, P., Šolomek, T. & Klán, P. Small-Molecule Fluorophores with Large Stokes Shifts: 9-Iminopyronin Analogues as Clickable Tags. *J. Org. Chem.* **80**, 1299–1311 (2015).

39. Grimm, J. B. *et al.* Carbofluoresceins and carborhodamines as scaffolds for high-contrast fluorogenic probes. *ACS Chem. Biol.* **8**, 1303–1310 (2013).

40. Singh, V., Wang, S. & Kool, E. T. Genetically Encoded Multispectral Labeling of Proteins with Polyfluorophores on a DNA Backbone. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 6184–6191 (2013).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導ならびに御教授を賜りました東京大学大学院薬学系研究科・薬品代謝化学教室の浦野泰照教授に深く感謝を申し上げます。計算化学を中心に据えたあまり前例のない研究であったにも関わらず、自身の興味のままに研究を進める私を見捨てずにご指導いただき、時には学びを深める機会を下さったことに、心より御礼申し上げます。

また、非常に貴重な御指導、御助言を頂きました東京大学大学院薬学系研究科・薬品代謝化学教室の花岡健二郎准教授、上野匡助教、小松徹助教、東京大学大学院医学系研究科・生体情報学分野の神谷真子准教授、小嶋良輔助教に深く感謝いたします。

国内留学の機会を頂き、計算化学的手法について御指導、御助言を頂きました京都大学福井謙一記念研究センターの諸熊奎治教授、鈴木聡博士に深く感謝いたします。

反応速度の貴重な実測データの取得を中心として共同研究をさせて頂きました群馬大学理工学府の飛田成史教授、吉原利忠准教授に深く感謝いたします。

最後に、日々の研究生活を支えてくださった秘書の羽賀瑞恵さん、同期の皆さんをはじめ、東京大学大学院薬学系研究科・薬品代謝化学教室および東京大学大学院医学系研究科・生体情報学分野の方々に厚く御礼申し上げます。

2020 年 3 月

東京大学大学院薬学系研究科

薬品代謝化学教室

橘　椋