

博士論文

論文題目 細胞内滞留性 β -galactosidase 活性検出
赤色蛍光プローブの開発と応用

氏名 伊藤 央樹

目次

第一章 序論	4
第一節 レポータータンパク質としての β -galactosidase.....	5
第二節 既存の β -galactosidase 活性検出蛍光プローブとその課題.....	7
第三節 細胞内滞留性 β -galactosidase 活性検出蛍光プローブ.....	9
第四節 GFP とのマルチカラーイメージング.....	11
第五節 本研究の目的.....	12
第二章 赤色蛍光団の選択.....	13
第一節 赤色蛍光の開発戦略.....	14
第二節 Sirhod 類の設計・合成と光学特性.....	16
第三章 2-Me-4'-CH ₂ F-Sirhod- β gal の機能評価と応用.....	23
第一節 2-Me-4'-CH ₂ F-Sirhod- β gal の開発と光学特性.....	24
第二節 <i>in vitro</i> での機能評価	29
第三節 培養細胞への応用.....	35
第四節 固定脳スライスへの応用.....	40
第五節 小括.....	42
第四章 leuco-2-Me-4'-CH ₂ F-Sirhod- β gal の機能評価と応用.....	43
第一節 作業仮説に基づく leuco-2-Me-4'-CH ₂ F-Sirhod- β gal の設計.....	44

第二節 <i>in vitro</i> での機能評価.....	46
第三節 培養細胞と固定組織への応用.....	49
第四節 小括.....	54
第五章 総括と今後の展望.....	55
合成項.....	59
実験項.....	73
参考文献.....	79
謝辞.....	83

第一章

序論

第一節 レポータータンパク質としての β -galactosidase

レポーターアッセイとは目的の遺伝子の発現の有無や、その上流の調節領域がどのように制御されているかを観測可能とする実験手法であり、検出感度の高さや遺伝子導入動物を作成することで均一な実験群が得られるといった利点を持つことから生命科学研究において広く汎用されている。具体的な手法としては、観測対象とする遺伝子をレポーター遺伝子に置換した DNA コンストラクトを作成し、これを生細胞や実験動物に遺伝子導入することにより発現するレポータータンパク質の活性を検出することで、目的の遺伝子の発現活性を観測可能としている¹(Figure 1-1-1)。このアッセイでは蛍光で容易に活性検出が可能である GFP (green fluorescent protein)をはじめとして、 β -galactosidase や luciferase、alkaline phosphatase などいくつかのレポータータンパク質が利用されている³。

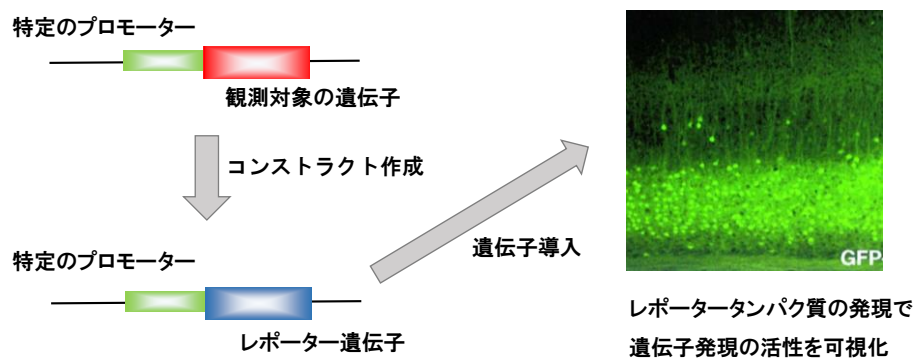


Figure 1-1-1. Schematic illustration of reporter assay. A fluorescence image was reprinted with permission from Feng, G.; Mellor, R.; Bernstein, M.; Keller-Peck, C.; Nguyen, Q.; Wallace, M.; Nerbonne, J.; Lichtman, J.; Sanes, J., Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* **2000**, 28 (1), 41-51. Copyright 2000 Cell Press.

その中の一つである β -galactosidase は大腸菌の *lacZ* 遺伝子にコードされる、ガラクトースが付与した糖鎖のグリコシド結合を切断する加水分解酵素であり、約 500 kDa の四量体を形成することで代謝活性を発揮する³。 β -galactosidase は高い代謝活性や哺乳類細胞種における内在性の発現

の低さ、また遺伝子導入時の細胞毒性の低さなどレポーターアッセイに適する生物学的特性を有する。

また、糖鎖に限らずガラクトースの形成するグリコシド結合を加水分解する高い基質許容能を利用して、その活性検出試薬として β -galactosidase より加水分解を受けることで青色沈殿を形成する呈色試薬 X-Gal が開発され、これまでに遺伝子導入の有無を確認するブルーホワイトスクリーニングや固定処理を施した動物組織の *lacZ* 発現部位の同定に応用されてきた⁴(Figure 1-1-2)。このように、その生物学的特性に加え容易な活性検出が可能であることから β -galactosidase は GFP や luciferase と並び、代表的なレポーター遺伝子として汎用されている。

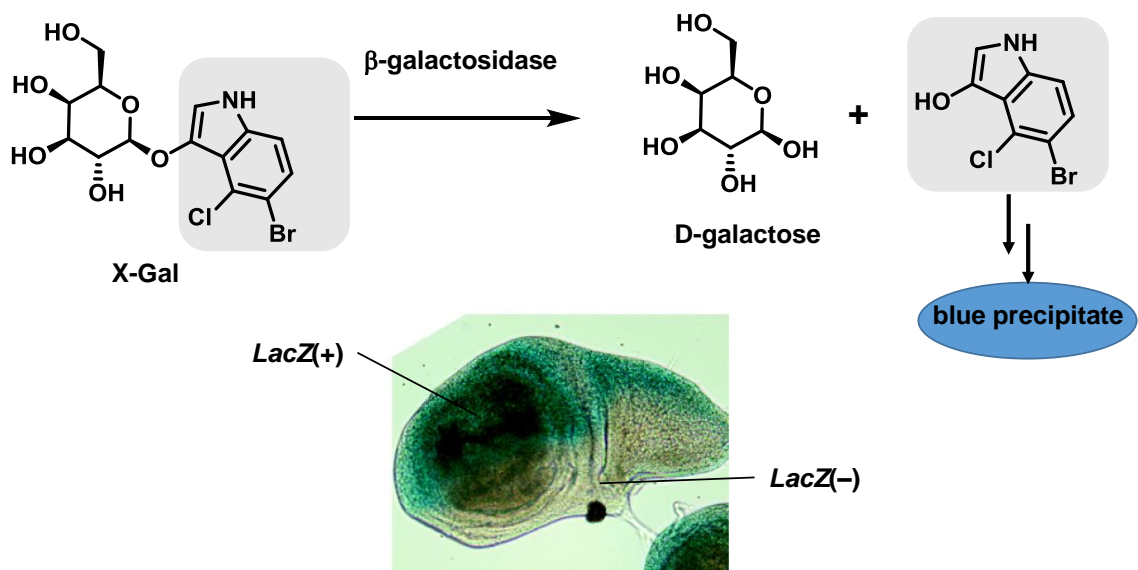


Figure 1-1-2. Schematic illustration of X-Gal assay. A figure of X-gal staining was reprinted with permission from Kamiya, M.; Asanuma, D.; Kuranaga, E.; Takeishi, A.; Sakabe, M.; Miura, M.; Nagano, T.; Urano, Y., beta-Galactosidase Fluorescence Probe with Improved Cellular Accumulation Based on a Spirocyclized Rhodol Scaffold. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133 (33), 12960-12963. Copyright 2011 American Chemical Society.

第二節 既存の β -galactosidase 活性検出蛍光プローブとその課題

レポーターアッセイにおける高い汎用性を示すことより、吸光法や蛍光法、MRI(magnetic resonance imaging)法など数多くの β -galactosidase 活性検出法が開発されてきたが、中でも酵素反応前後で大きく蛍光特性が変化する蛍光プローブを用いる蛍光法では、生細胞や組織において高い感度および高い時空間分解能で酵素活性の検出を可能としてきた。

その開発の歴史において、最初期のものとしてはクマリンを基本骨格とする MUG⁶ (4-Methylumbelliferyl β -D-Galactopyranoside)やフルオレセインを基本骨格として galactoside 基を二つ付与した FDG⁷ (Fluorescein di- β -D-galactopyranoside)などが挙げられるが、これらはその水溶性が高いため細胞内に導入されづらく、また後者に関しては蛍光性を獲得するために多段階の酵素反応を経る必要があり、生細胞アッセイに応用する上で問題点を抱えていた。その後、TG- β Gal⁸ (2-Me-4-OMe-Tokyo-Green O- β -galactoside) や DDAOG⁹ (9H-(1,3-Dichloro-9,9-Dimethylacridin-2-One-7-yl) β -D-Galactopyranoside)、HMDER- β Gal⁵ など分子全体としてより高い脂溶性を持ち、かつ光誘起電子移動や分子内スピロ環化といった蛍光制御原理を精巧に利用することで酵素反応に伴い蛍光が大きく上昇する蛍光プローブが開発され、生細胞や組織中において *lacZ* 遺伝子を導入した β -galactosidase 活性部位の可視化が達成されてきた (Figure 1-2-1, 1-2-2)。

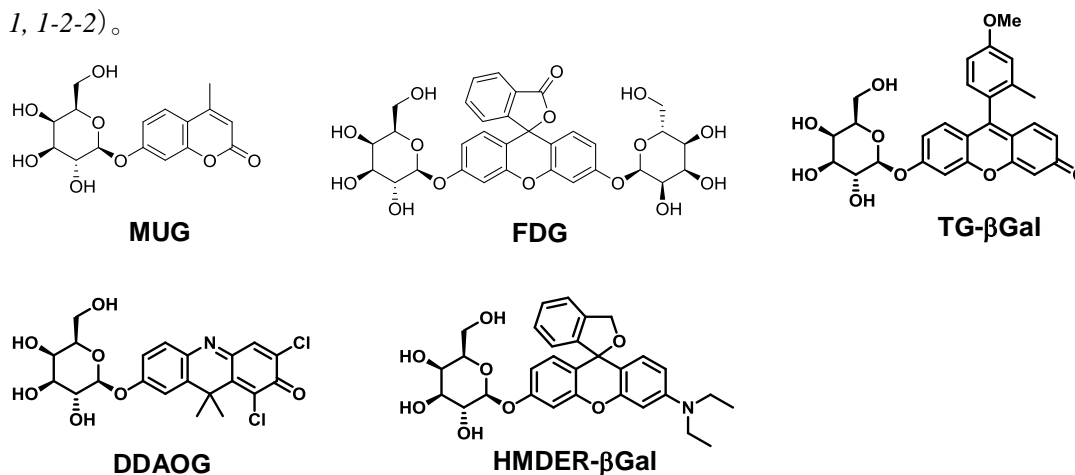


Figure 1-2-1. Examples of β -galactosidase probes.

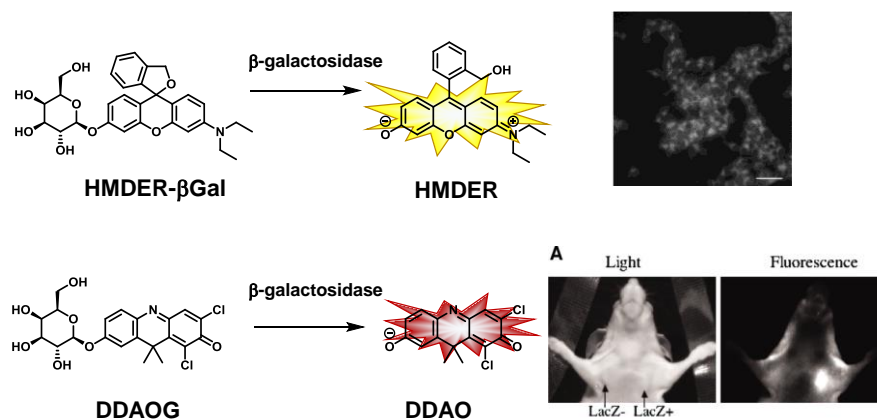


Figure 1-2-2. Applications of β -galactosidase probes for detecting β -galactosidase activity in cell and mouse. A figure of HMDER imaging was reprinted with permission from Kamiya, M.; Asanuma, D.; Kuranaga, E.; Takeishi, A.; Sakabe, M.; Miura, M.; Nagano, T.; Urano, Y., beta-Galactosidase Fluorescence Probe with Improved Cellular Accumulation Based on a Spirocyclized Rhodol Scaffold. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133 (33), 12960-12963. Copyright 2011 American Chemical Society. A figure of DDAO imaging was reprinted Tung, C.; Zeng, Q.; Shah, K.; Kim, D.; Schellingerhout, D.; Weissleder, R., In vivo imaging of beta-galactosidase activity using far red fluorescent switch. *Cancer Research* **2004**, 64 (5), 1579-1583. Copyright 2004 American Association for Cancer.

しかし、これらの生細胞・組織のアッセイに実用されている β -galactosidase 活性検出蛍光プローブは、その課題として細胞内滞留性が低いことが挙げられる。*lacZ(+)*細胞内において産生される蛍光性酵素反応生成物は細胞膜を透過するのに十分な脂溶性を有するため、自由拡散により細胞膜を透過して細胞外や β -galactosidase 活性の低い細胞へと漏出してしまふ。このような理由から、既存の蛍光プローブを用いて一般的なレポーターアッセイで想定される *lacZ(+)*細胞と *lacZ(-)*細胞が混在する系において、1 細胞レベルで *lacZ(+)*細胞を特異的に蛍光標識することは困難であった。

第三節 細胞内滞留性 β -galactosidase 活性検出蛍光プローブ

前述した β -galactosidase 活性検出蛍光プローブの低い細胞内滞留性という課題を克服するべく、近年では β -galactosidase との酵素反応後に高い細胞内滞留性を獲得する分子設計を施したクマリンを基本骨格とする青色蛍光プローブ¹⁰ や、ロドールを基本骨格とする黄色蛍光プローブ SPiDER- β Gal¹⁹ が開発されてきた (Figure 1-3-1)。これらの蛍光プローブが細胞内滞留性を獲得する機構としては、 β -galactosidase との酵素反応に伴い酵素基質部位のオルト位に脱離基として導入された F 原子が脱離し、キノンメチド中間体が形成されることを鍵とする。細胞内環境においてはタンパク質などの細胞膜を自由拡散で透過しない高分子がこのキノンメチド中間体に対して求核攻撃して共有結合を形成することで細胞内滞留性を獲得し、また同時に蛍光性を獲得する (Figure 1-3-2)。

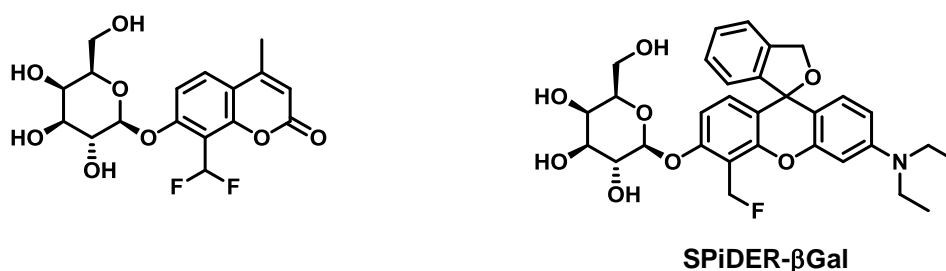


Figure 1-3-1. Structure of β -galactosidase probes with superior cellular retention.

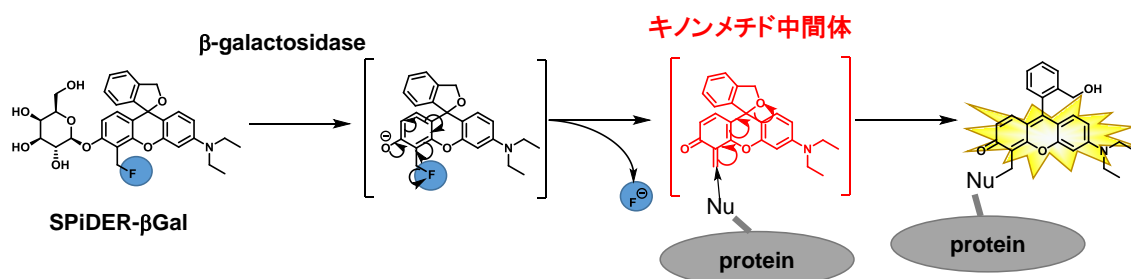


Figure 1-3-2. Activation mechanism of SPiDER- β Gal

このようなキノンメチドケミストリーの導入した SPiDER- β Gal を用いることで *lacZ(-)* 細胞と *lacZ(+)* 細胞が共存している培養系において、*lacZ(+)* 細胞を特異的に黄色蛍光で蛍光標識することが達成されてきた¹⁹ (Figure 1-3-3)。

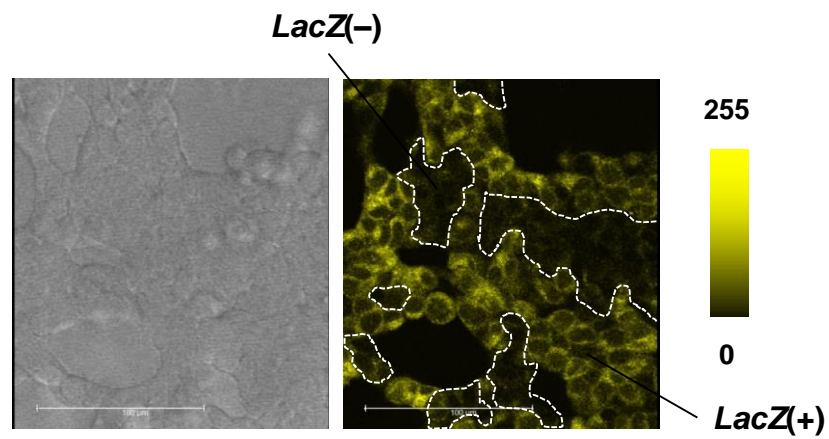


Figure 1-3-3. Fluorescence imaging of HEK-*lacZ(+)* and HEK-*lacZ(-)* cells with SPiDER- β Gal reprinted from ref. 19.

第四節 GFP とのマルチカラーイメージングへの応用

マルチカラーイメージングとは観測対象とする複数の生体分子を、蛍光タンパク質や蛍光プローブで蛍光標識することでその細胞内・組織内における挙動を同時に可視化する技術であり、生命科学の発展に大きく寄与してきた¹¹。中でも GFP は励起光照射によりそれ自身が蛍光を発すること、また生体環境内において安定に存在し細胞毒性が低いなど生体応用に適した性質を持つことから¹²、これまでに様々な遺伝子領域下でレポータータンパク質として GFP を発現する細胞株やトランスジェニックマウスが樹立されており¹³、マルチカラーイメージングにおいて汎用されている。特に神経科学分野においては DsRed などの赤色蛍光タンパク質を神経細胞に発現させると凝集体を形成して細胞毒性を示すことが知られていることから¹⁴⁻¹⁶、GFP を用いることが主流となっている。

このような背景から GFP とのマルチカラーイメージングへ応用可能な蛍光プローブの開発が求められているが、前述の細胞内滞留性 β -galactosidase 活性検出蛍光プローブの SPiDER- β Gal は、その蛍光波長が GFP の蛍光波長領域と重なり併用できないという課題がある (Figure 1-4-1)。

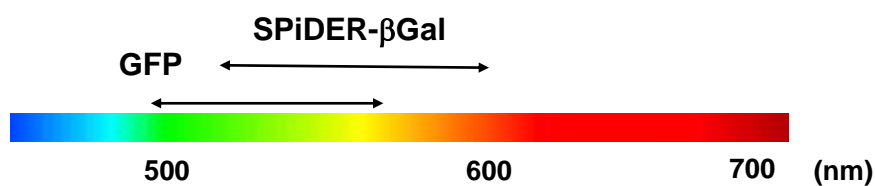


Figure 1-4-1. Emission wavelengths of GFP and SPiDER- β Gal

第五節 本研究の目的

以上の背景から、本研究では1細胞レベルで酵素活性を可視化し、GFPとの共染色が可能な赤色領域(>600 nm)で機能する β -galactosidase 活性検出蛍光プローブの開発を目指す (Figure. 1-5-1)。

このような性質を兼ね備える蛍光プローブを開発することで、生命科学研究、特に神経科学研究において GFP と *lacZ* を併用したレポーターアッセイにより構造的に多様性に富む細胞群¹⁷ それぞれの果たす機能¹⁸を解明することに大きく貢献できると期待される。

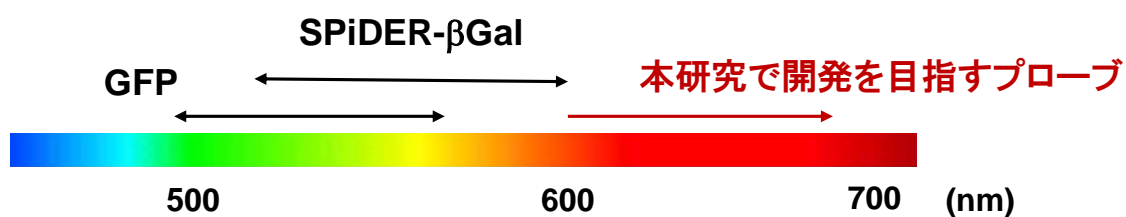


Figure 1-5-1. Expected emission wavelength for β -galactosidase probe enabling multi-color imaging with GFP.

第二章

赤色蛍光団の選択

第一節 赤色蛍光団の開発戦略

前述した本研究の目的を満たす蛍光プローブを開発するために母核となる蛍光団が満たすべき要件としては1)細胞や組織内などの生理的条件下において赤色領域(>600 nm)の蛍光を発する、2)細胞内滞留性を付与するために酵素基質部位の β -galactoside 基のオルト位にキノンメチド中間体の形成を可能とする脱離基が導入できる構造を有する、3)酵素基質部位の有無で光学特性が大きく変化し、酵素反応に伴う蛍光制御が可能であることの3点が求められる。

はじめに、先行研究においてキサンテン系色素の10位のO原子をSi原子に置換することで吸収・蛍光波長がそれぞれ約90nm長波長化することが報告されていることから²⁰(Figure 2-1-1)、本研究では1)と2)の条件を満たす母核としてSiキサンテン系色素に着目した。

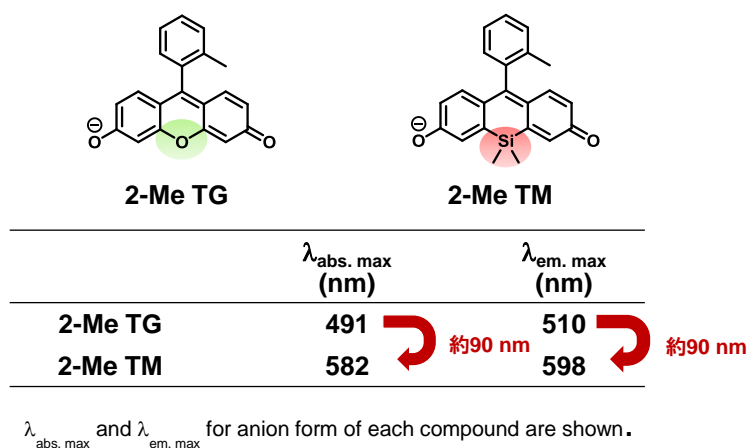


Figure 2-1-1. Excitation and emission wavelengths of 2-Me TG⁸ and 2-Me TM²⁰.

また、3)の条件で挙げた酵素基質部位の有無で光学特性が大きく変化する蛍光制御法としては励起波長シフトの利用および分子内スピロ環化の二つの方法を適用することを考えた。励起波長シフトでは 2-Me TM のキサンテン環のフェノール性水酸基にアルキル基を導入すると、吸収最大波長が 100nm 程度短波長化することが報告されていることから²⁰、2-Me TM の構造類縁体でも同様にアルキル基ならびにβ-galactoside 基の有無で吸収最大波長がシフトすると考え、これを利用して酵素反応生成物の蛍光団においてのみ長波長で励起される分子設計ができると考えた。また、分子内スピロ環化に関してはキサンテン系色素で報告例の多い蛍光制御原理であり^{27,28}、HMDER のようにフェノール性水酸基にアルキル基が付与した状態ではスピロ環を形成して可視光吸収をほとんど持たない一方で、脱アルキル化とともにスピロ環が開いて可視光吸収が回復するような分子設計が Si キサンテン系色素にも適用できると考えた (Figure 2-1-2)。

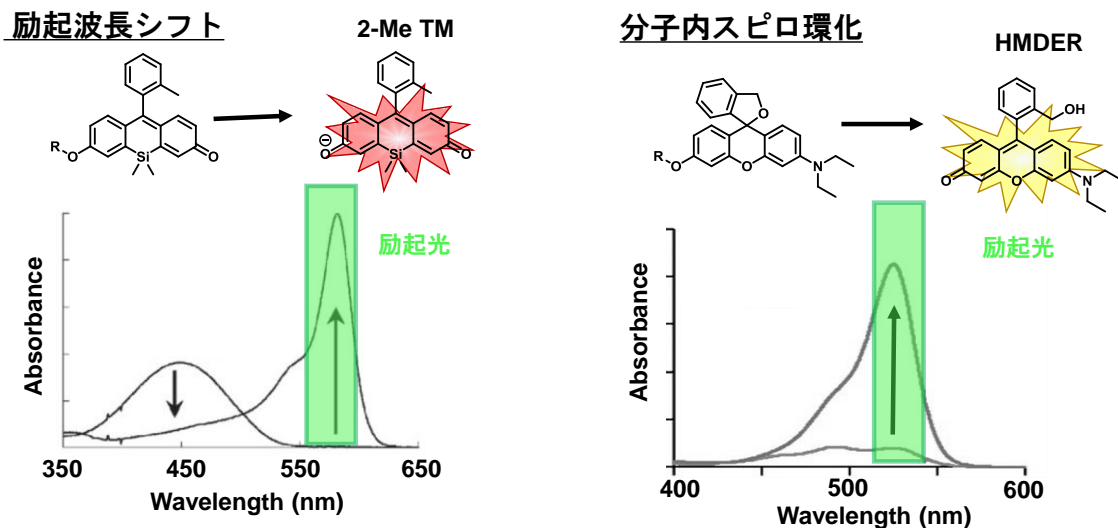


Figure 2-1-2. Absorption spectra changes of 2-Me TM and HMDER upon enzymatic reaction. An absorbance spectrum of 2-Me TM was reprinted with permission from Egawa, T.; Koide, Y.; Hanaoka, K.; Komatsu, T.; Terai, T.; Nagano, T., Development of a fluorescein analogue, TokyoMagenta, as a novel scaffold for fluorescence probes in red region. *Chemical Communications* **2011**, 47 (14), 4162-4164. Copyright 2011 Royal Society of Chemistry. An absorbance spectrum of HMDER was reprinted with permission from Kamiya, M.; Asanuma, D.; Kuranaga, E.; Takeishi, A.; Sakabe, M.; Miura, M.; Nagano, T.; Urano, Y., beta-Galactosidase Fluorescence Probe with Improved Cellular Accumulation Based on a Spirocyclized Rhodol Scaffold. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133 (33), 12960-12963. Copyright 2011 American Chemical Society.

第二節 Sirhod 類の設計・合成と光学特性

前節における考察を基にして、SPiDER- β Gal の母核であるロドールのキサンテン環 10 位の O 原子を Si 原子に置換した Si-ロドール (Sirhod) 類を設計した。具体的には、ベンゼン環部位の 2 位の置換基として、2-Me TM と同様に methyl 基を導入して励起波長シフトを狙った 2-Me Sirhod、および分子内スピロ環化による蛍光制御を狙い carboxyl 基、hydroxymethyl 基を導入した 2-COOH Sirhod と 2-CH₂OH Sirhod の 3 種の Sirhod を設計し (Figure 2-2-1)、その合成に着手した。

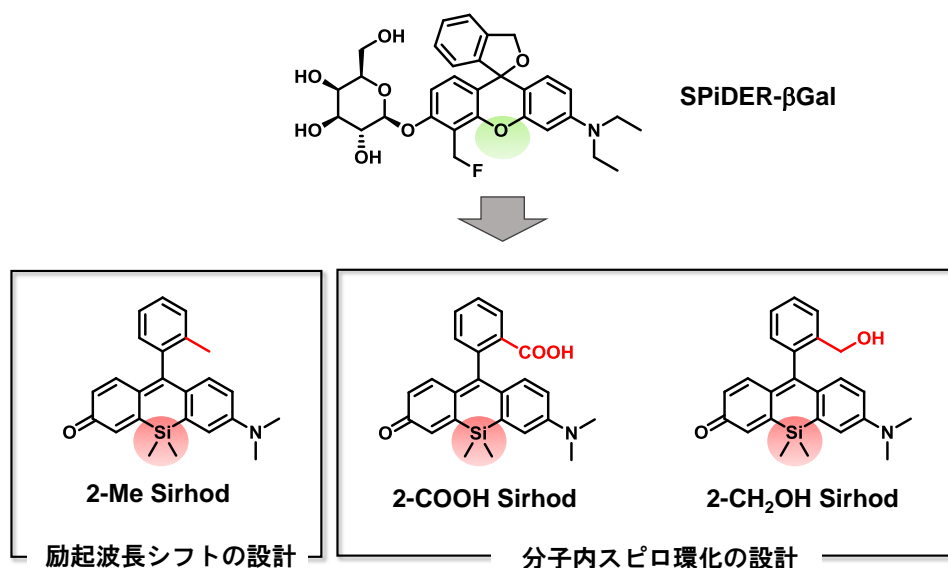
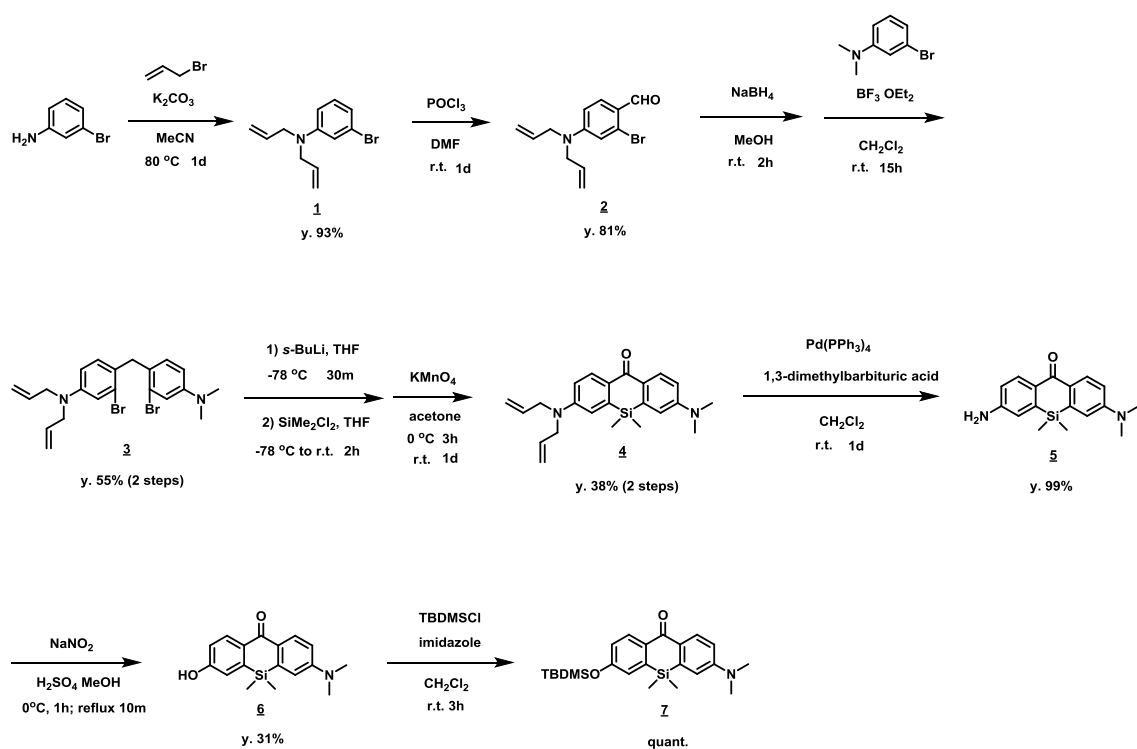
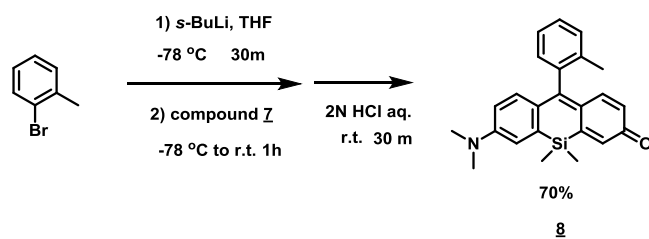
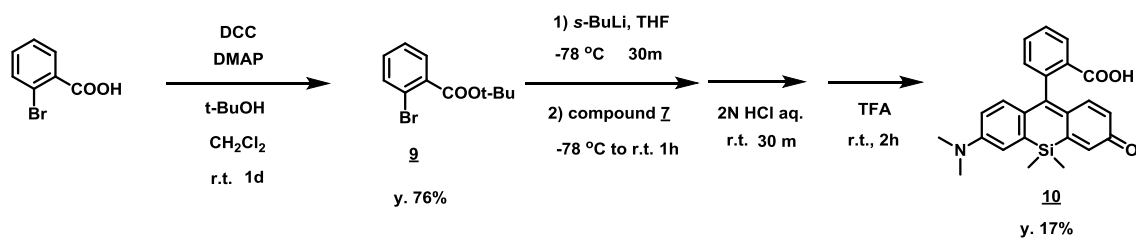


Figure 2-2-1. Design of Sirhod derivatives.

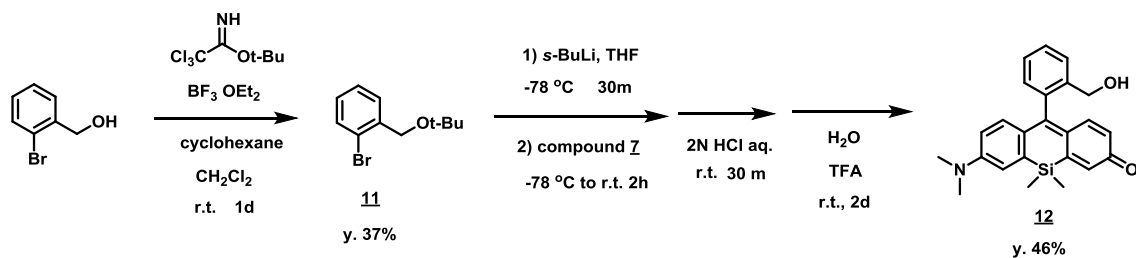


アニリン誘導体のヘテロ二量体化を鍵反応として²¹、Si-キサントン (compound 7) を合成した (Scheme 2-2-1)。そして、ベンゼン環 2 位に種々の置換基を持つブロモベンゼン誘導体からリチオ化反応により Sirhodol 類を合成した (Scheme 2-2-2, 2-2-3, 2-2-4)。





Scheme 2-2-3. Synthesis of 2-COOH Sirhod (compound **10**).



Scheme 2-2-4. Synthesis of 2-CH₂OH Sirhod (compound **12**).

次に得られた 3 種類の Sirhodol 類 (2-Me Sirhod, 2-COOH Sirhod, 2-CH₂OH Sirhod) について、バッファー中における光学特性を評価した (Figure 2-2-2, 2-2-3, 2-2-4, Table 2-2-1)。

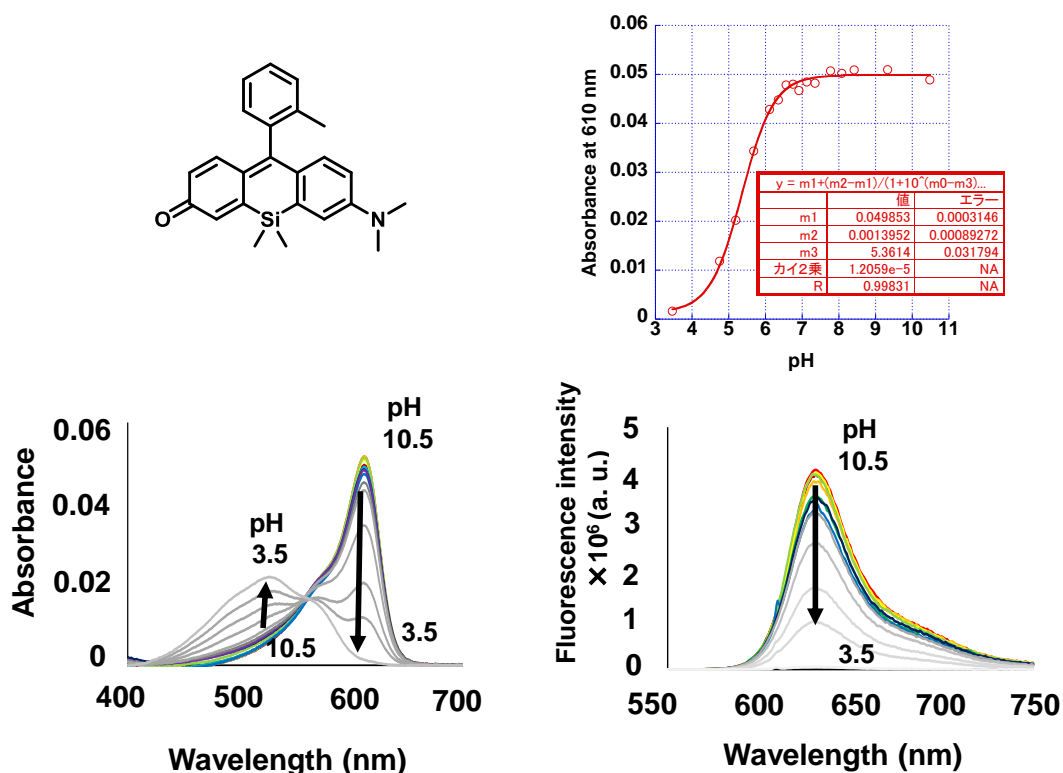


Figure 2-2-2. Absorption (left) and fluorescence spectra (right) of 1 μM 2-Me Sirhod measured in 100 mM sodium phosphate buffer containing 0.1 % DMSO. Ex. 610 nm. Slit 2/2 nm.

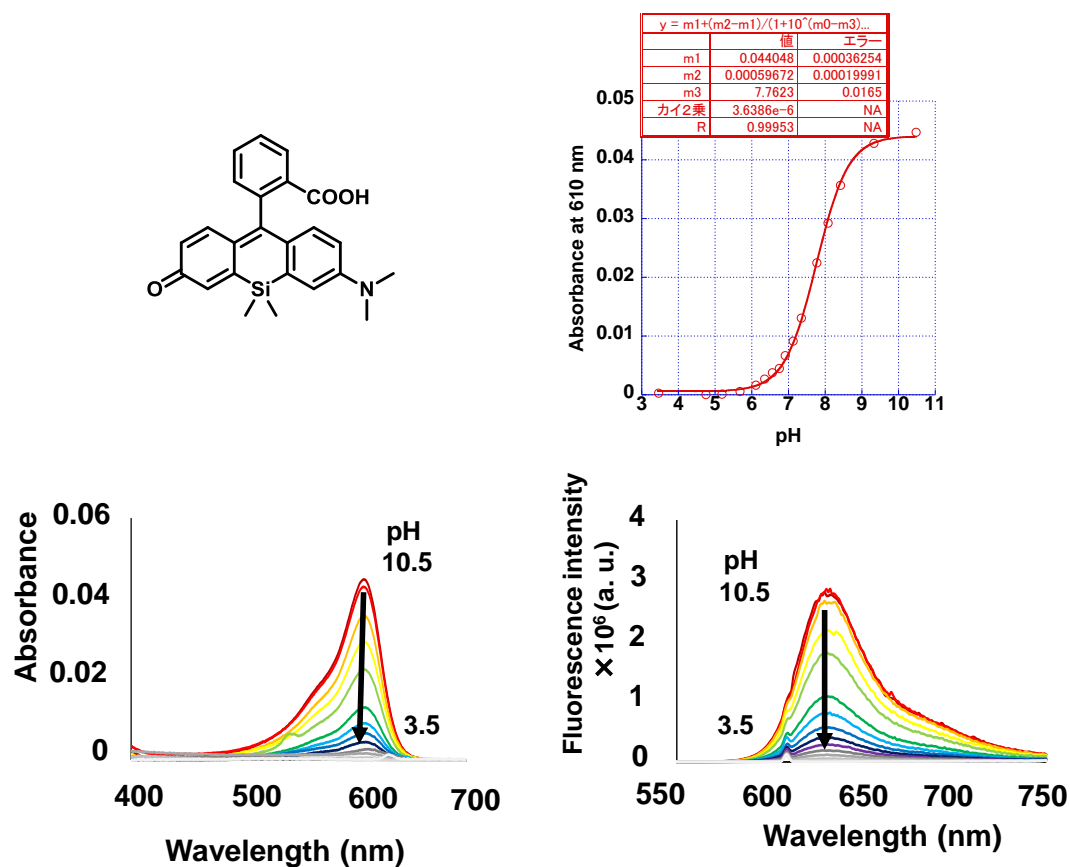


Figure 2-2-3. Absorption (left) and fluorescence spectra (right) of 1 μ M 2-COOH Sirhod measured in 100 mM sodium phosphate buffer containing 0.1 % DMSO. Ex. 610 nm. Slit

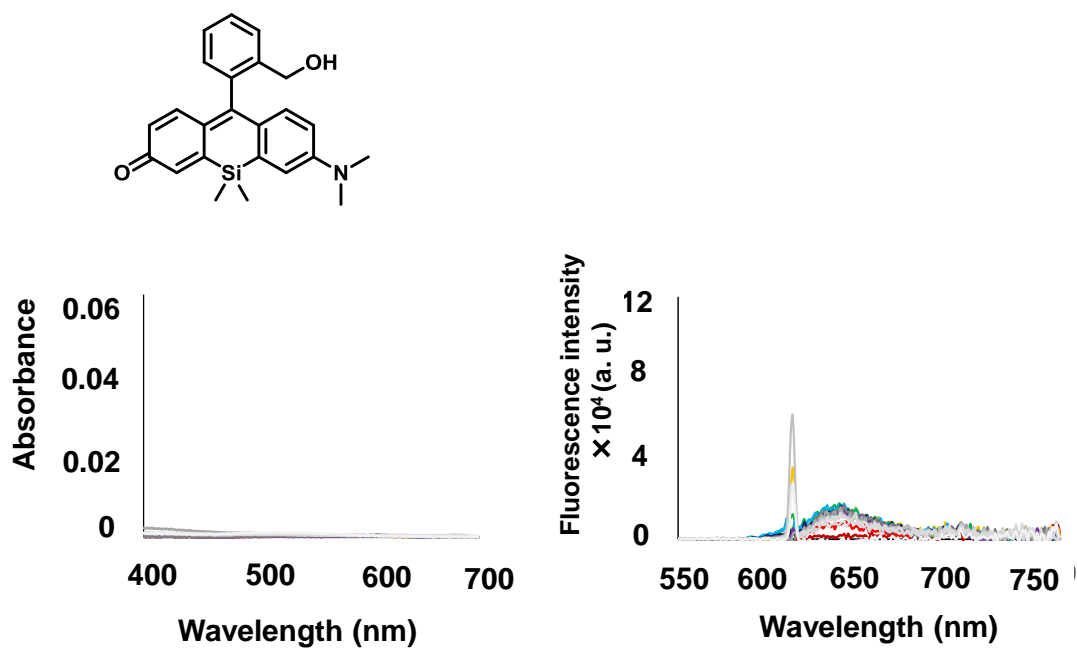


Figure 2-2-4. Absorption (left) and fluorescence spectra (right) of 1 μ M 2-CH₂OH Sirhod measured in 100 mM sodium phosphate buffer containing 0.1 % DMSO. Ex. 610 nm. Slit 2/2 nm.

Table 2-2-1. Photophysical properties of Sirhodol series.

	$\lambda_{\text{abs. max}}$	$\lambda_{\text{em. max}}$	Φ (%) at indicated pH ^a			pK_{al}	pK_{cycl}
	(nm)	(nm)	pH3.5	pH7.4	pH10.5		
2-Me Sirhod	612, 528	630	4.0	28	28	5.4	-
2-COOH Sirhod	609	632	3.3	22	29	-	7.8
2-CH ₂ OH Sirhod	n. d. ^b	637	4.6	8.8	4.5	-	-

^a Absolute quantum yields were determined with an integrating sphere. Ex. 610 nm.

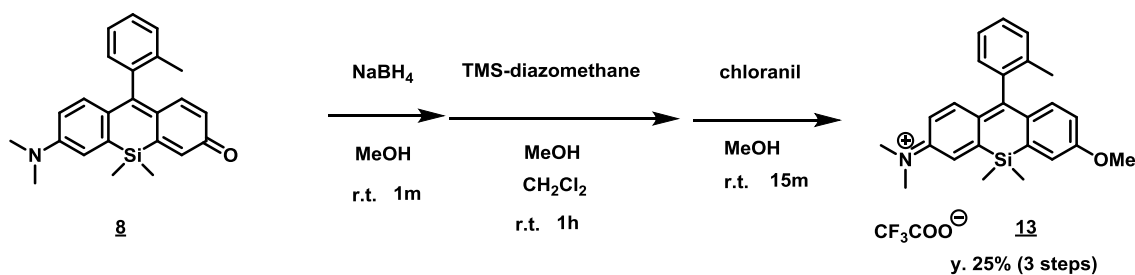
2-Me Sirhod は酸性領域では 528 nm に吸収極大をもつ一方で中性から塩基性領域においては 612 nm に吸収極大がシフトし、目的とする励起波長シフト型の蛍光制御が可能であることが示唆された。その pH 依存的な波長シフトの pK_a は 5.4 であることから、2-Me Sirhod は生理的条件下 (pH = 7.4) では 610 nm 付近を吸収極大とする吸収が保持されており、蛍光量子収率 28% と高い赤色蛍光性 ($\lambda_{\text{em. max}} = 630$ nm) を示した。

2-COOH Sirhod では塩基性 pH では赤色領域に吸収・蛍光を持つ分子フォームで存在し 2-Me Sirhod と同様に高い赤色蛍光性を示したが、酸性 pH になるに従い無色・無蛍光の分子内スピロ環化フォームが優先した。その分子内スピロ環化の pH 依存性は $pK_{\text{cycl}} = 7.8$ であり、生理的条件下 (pH = 7.4) において無蛍光性の分子内スピロ環化フォームが約 50% 占めている。

なお、2-CH₂OH Sirhod は全 pH 領域において分子内スピロ環フォームが優先し、ほとんど可視光吸収を持たなかった。

以上の結果より、この 3 種類の Sirhod 類の中では生理的条件下 (pH = 7.4) において強い吸収と赤色蛍光性を示す 2-Me Sirhod が目的とする細胞内滞留性赤色蛍光プローブ開発の母核として最適と考えた。

そこで次に β -galactosidase の基質モデルとして 2-Me Sirhod のフェノール性水酸基をメチル化した誘導体 2-Me Sirhod-OMe を設計・合成し (Scheme 2-2-5)、その光学特性について検討した。



Scheme 2-2-5. Synthesis of 2-Me Sirhod-OMe (compound **13**).

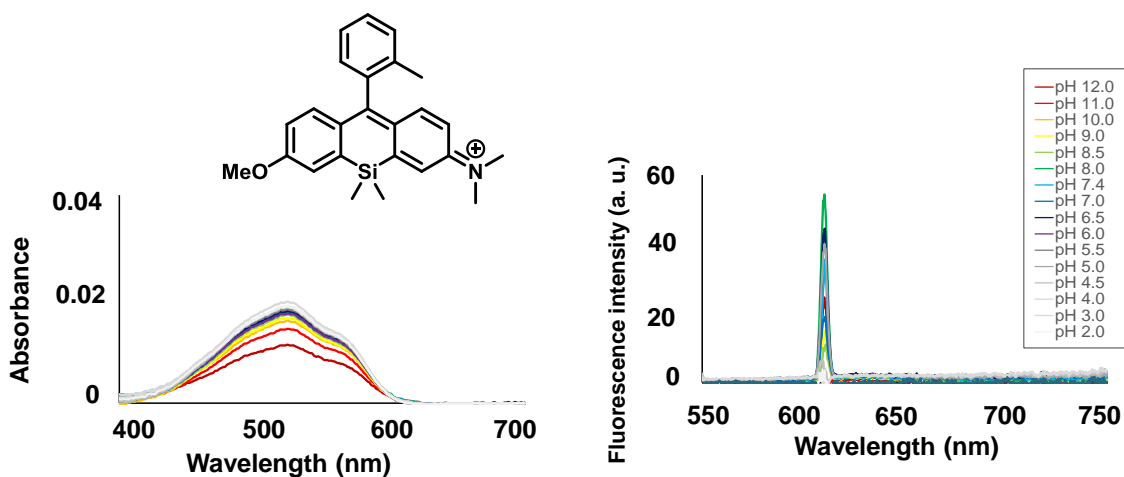


Figure 2-2-5. Absorption (left) and fluorescence spectra (right) of 1 μM 2-Me Sirhod-OMe measured in 100 mM sodium phosphate buffer containing 0.1 % DMSO. Ex. 610 nm. Slit 2/2 nm.

Table 2-2-2. Photophysical properties of 2-Me Sirhod-OMe.

	$\lambda_{\text{abs. max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em. max}}$ (nm)	Φ (%) ^a
2-Me Sirhod-OMe	525	n. d. ^b	5.8

^a Absolute quantum yields were determined with an integrating sphere at pH 7.4. Ex.

610 nm. ^bnot determined

2-Me Sirhod-OMe の光学特性を評価すると、いずれの pH 領域でも 2-Me Sirhod の吸収極大である 610 nm 付近にほとんど吸収をもたず (Figure 2-2-5)、また蛍光量子収率が $\Phi = 5.8\%$ と低いことからこの波長で励起してもほとんど赤色蛍光が観測されないことが明らかとなった (Table 2-2-2)。

以上の検討より、2-Me Sirhod は β -galactosidase の酵素反応に伴い励起波長がシフトして、610 nm 付近の吸収が大きく上昇することが示唆されたため (Figure 2-2-6)、以降は 2-MeSirhod を母核として蛍光プローブ開発を行うこととした。

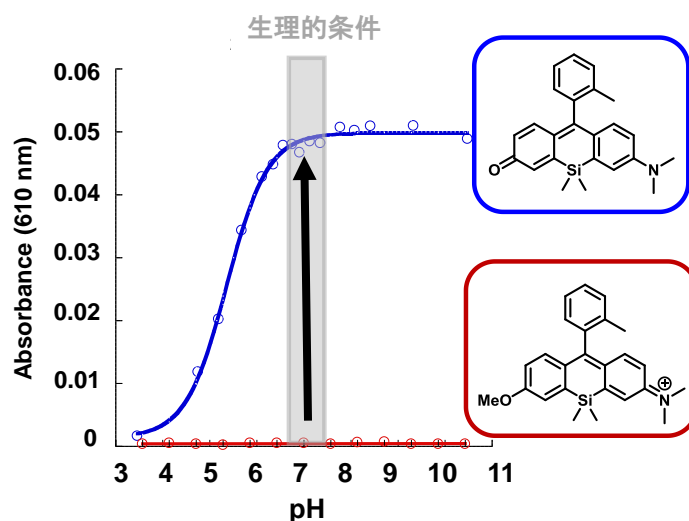


Figure 2-2-6. Absorption of 1 μ M 2-Me Sirhod and 2-Me Sirhod-OMe at 610 nm measured at various pH conditions.

第三章

2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal の機能評価と応用

第一節 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal の開発と光学特性

本研究の目的である細胞内滞留性β-galactosidase 活性検出赤色蛍光プローブの候補化合物として、前章で選定した赤色蛍光団の 2-Me Sirhod に酵素基質部位としてβ-galactoside 基、そしてフェノール性水酸基のオルト位に SPiDER-βGal と同様の CH₂F 基を導入した 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal を設計した (Figure 3-1-1)。

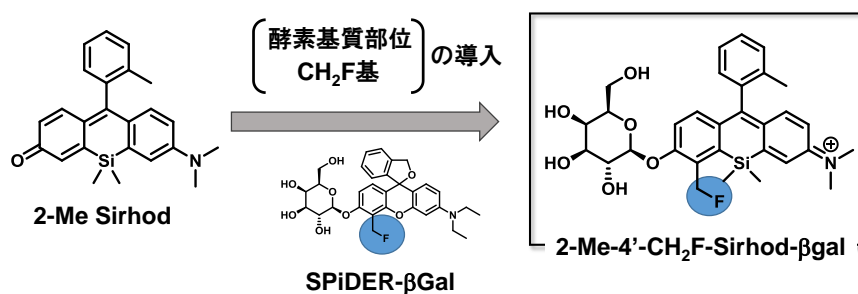


Figure 3-1-1. Design of 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal.

このような分子設計を施すことで、SPiDER-βGal と同様にβ-galactosidase の酵素反応に伴い反応性の高いキノンメチド中間体を形成し、細胞内高分子がこれに求核攻撃することで細胞内滞留性を獲得し、同時に赤色蛍光が上昇すると考えた (Figure 3-1-2)。

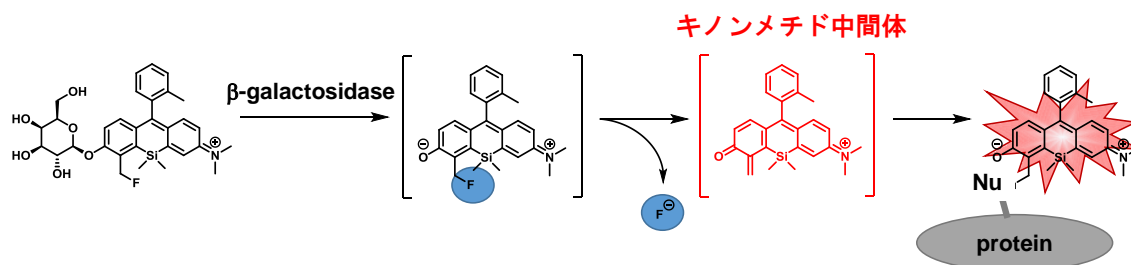
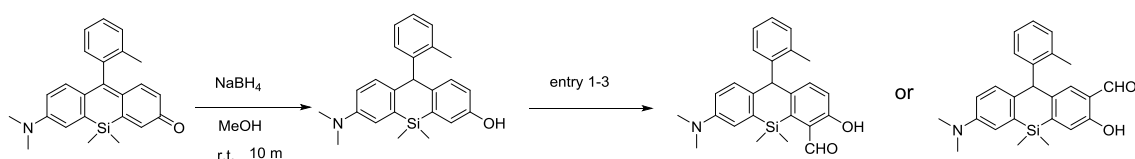


Figure 3-1-2. Proposed activation mechanism of 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal.

この 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal の合成スキームとして、母核の 2-Me Sirhod のフェノール性水酸基のオルト位をホルミル化し、これを脱酸素素的フッ素化により CH₂F 基に変換することを考えた。この検討のために、2-Me Sirhod を還元し、求電子置換反応の反応性がより高いと考えられる leuco 体を基質として、種々のホルミル化反応が進行するか検討した (Scheme 3-1-1, Table 3-1-1)。



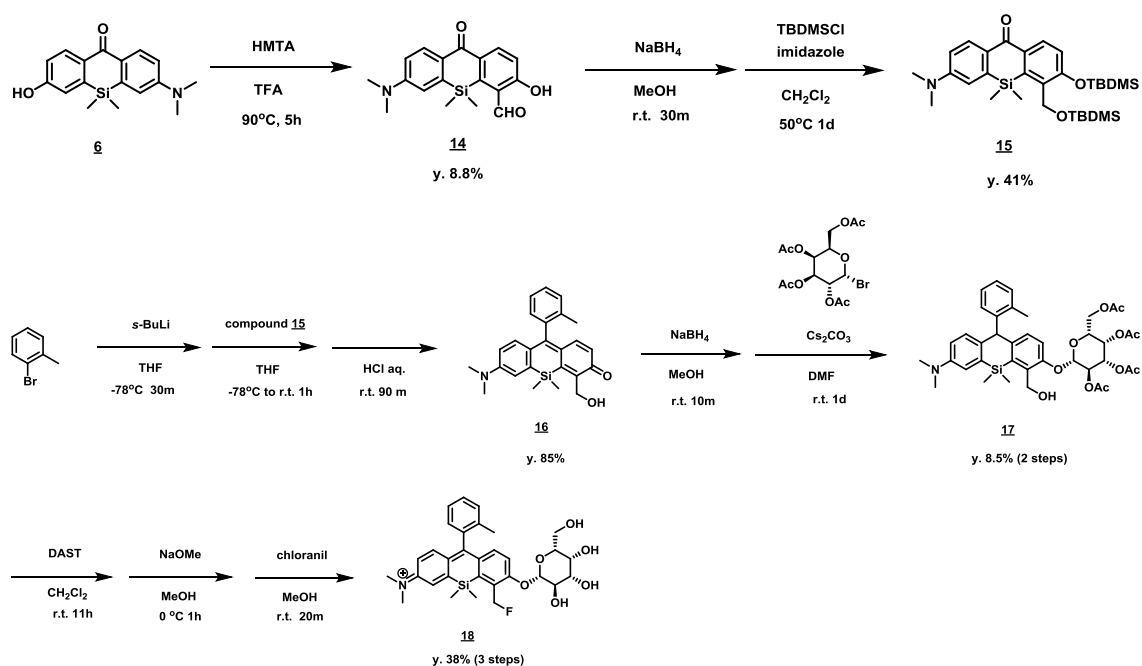
Scheme 3-1-1. Formylation of leuco-2-Me-Sirhod

Table 3-1-1. Conditions for formylation reaction

entry	reagent	solvent	temperature	time	yield
1	HMTA	TFA	100 °C	24 h	-
2	CHCl ₃ + NaOH aq.		100 °C	24 h	-
3	POCl ₃	DMF	r.t.	24 h	-

HMTA: hexamethylenetetramine

いずれのエントリーにおいても目的のホルミル化体は得られなかった。これらの反応が進行しなかった原因としては、キサントン環の SiMe₂ 基の存在による立体障害と、キサントン環 10 位が O 原子の場合と比較して電子密度が低いことの相乗効果により、Sirhod 類は求電子置換反応の基質として反応性が低いことが考えられた。そこで次に反応性の向上を期待して、キサントン環より電子密度が高いと想定されるキサントン (compound 6) に対するホルミル化を検討した。



Scheme 3-1-2. Synthesis of 2-Me-4-CH₂F-Sirhod-βgal (compound **18**)

90 °Cの加熱条件で TFA 中において hexamethylenetetramine と作用させることで、8.8%と低収率ながら芳香環の 4 位にホルミル基が導入された compound **14** を得た。これを NaBH₄ により還元して、TBDMS で保護した後に 2-bromotoluene とのリチオ化反応に付すことで 4 位に hydroxymethyl 基が導入された蛍光団 2-Me-4'-CH₂OH-Sirhod (compound **16**) を得た。その後、β-galactoside 基の付加と 4 位の hydroxymethyl 基を脱酸素的フッ素化することで目的とする 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal (compound **18**) の合成を達成した (Scheme. 3-1-2)。

以下で合成した 2-Me-4-CH₂F-Sirhod-βgal、および 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal と β-galactosidase の酵素反応後に形成されるキノンメチド中間体が水分子と反応することで形成すると想定される 2-Me-4'-CH₂OH-Sirhod の光学特性を精査した (Figure 3-1-3, 3-1-4, Table 3-1-2)。

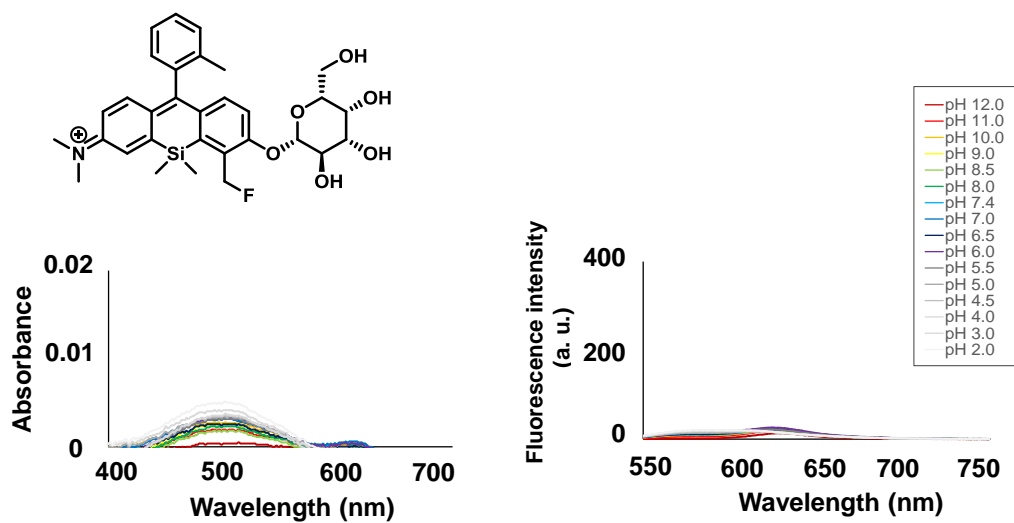


Figure 3-1-3. Absorption and fluorescence spectra of 1 μM 2-Me-4'- CH_2F -Sirhod- βgal measured in 100 mM NaPi buffer containing 0.1 % DMSO as a cosolvent. Ex. 510 nm. Slit 5/5 nm. PMT 700 V.

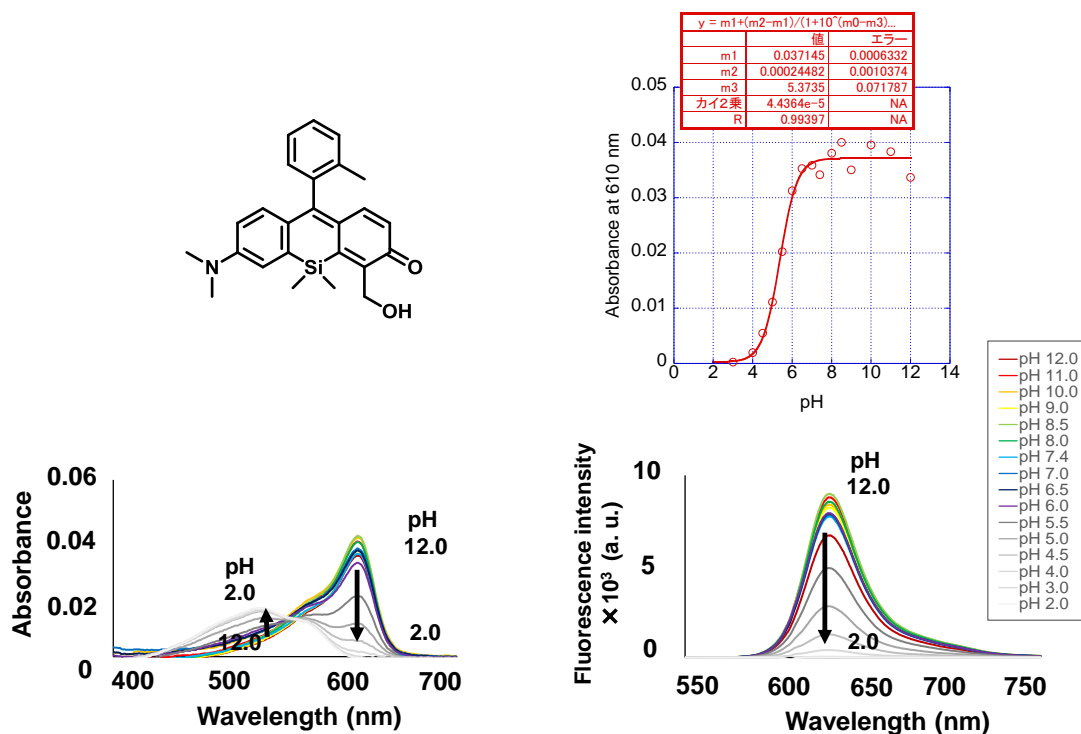


Figure 3-1-4. Absorption and fluorescence spectra of 1 μM 2-Me-4'- CH_2OH -Sirhod measured in 100 mM NaPi buffer containing 0.1 % DMSO as a cosolvent. Ex. 610 nm. Slit 5/5 nm. PMT 700 V.

Table 3-1-2. Photophysical properties of 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal and 2-Me-4'-CH₂OH-Sirhod .

	$\lambda_{\text{abs. max}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em. max}}(\text{nm})$	Φ (%)	pK_a
2-Me-4'-CH ₂ F-Sirhod-βgal	500	627	3.4 ^a	n. d. ^c
2-Me-4'-CH ₂ OH-Sirhod	613, 528	631	30 ^b	5.4

Absolute quantum yields were determined with an integrating sphere at pH 7.4. ^aEx. 510 nm or ^bEx. 610 nm. ^cnot determined

開発した 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal は 610 nm 付近にほとんど吸収を持たず、その蛍光量子収率は 3.4 であることから、生理的条件下においてほぼ無蛍光性であることが確認された。その一方で、想定される酵素反応生成物の一つである 2-Me-4'-CH₂OH-Sirhod はその pK_a の値が 2-Me-Sirhod とほぼ同じ 5.4 であり、生理的条件下において 613 nm をピークトップとする吸収を持ち $\Phi = 30\%$ と高い赤色蛍光性を示した。これらの結果から 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal は酵素反応に伴い大きな蛍光上昇を示すことが示唆された。

なお、2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal および 2-Me-4'-CH₂OH-Sirhod のいずれにおいても pH 12 の塩基性条件においてその吸収・蛍光スペクトルのピークトップの値が pH 7.0-10.0 と比べて低くなっている。また以下に示す様に、蛍光団 2-Me-4'-CH₂OH-Sirhod を pH 7.4 の sodium phosphate buffer 中に 60 分間静置するとその吸収および蛍光が約 3 分の 2 程度まで経時的に低減した (Figure 3-1-5)。これらの原因としては 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal および 2-Me-4'-CH₂OH-Sirhod のキサンテン環 9 位が求核攻撃を受けやすく、水分子が求核付加したためであると考えられる。

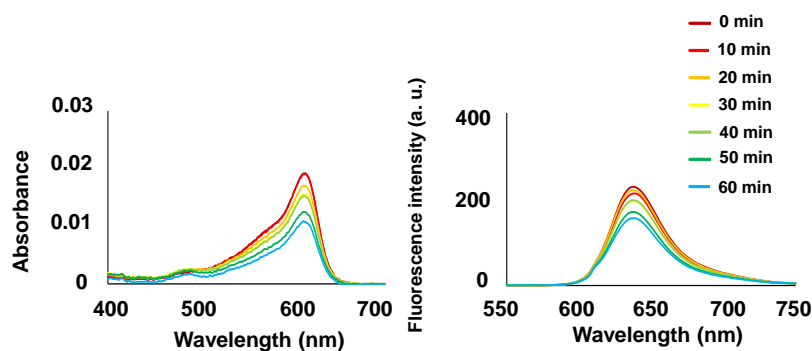


Figure 3-1-5. Absorption and fluorescence spectra of 1 μM 2-Me-4'-CH₂OH-Sirhod measured in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.1 % DMSO as a cosolvent. Ex. 610 nm. Slit 2.5/2.5 nm. PMT 700 V.

第二節 *in vitro* での機能評価

前節の検討より開発した 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal は目的とする赤色蛍光プローブの光学特性を示すことが確認されたので、次に *in vitro* においてβ-galactosidase の基質となるか酵素反応の検討を行った。

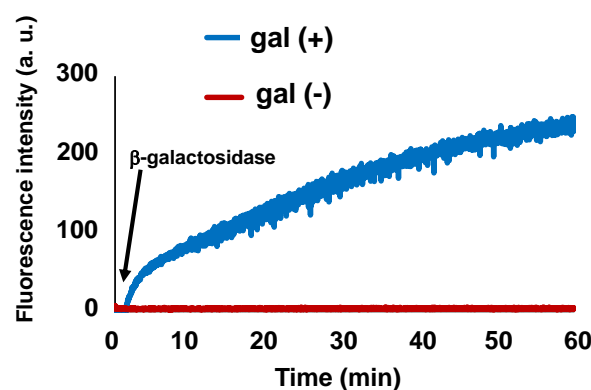


Figure 3-2-1. Time dependent fluorescence change of 1 μM 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal upon addition of 5 units β-galactosidase (gal (+)) or non treat (gal (-)) in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.1 % DMSO at room temperature. Ex. 610 nm. Em. 630 nm. Slit 5/5 nm. PMT 700 V.

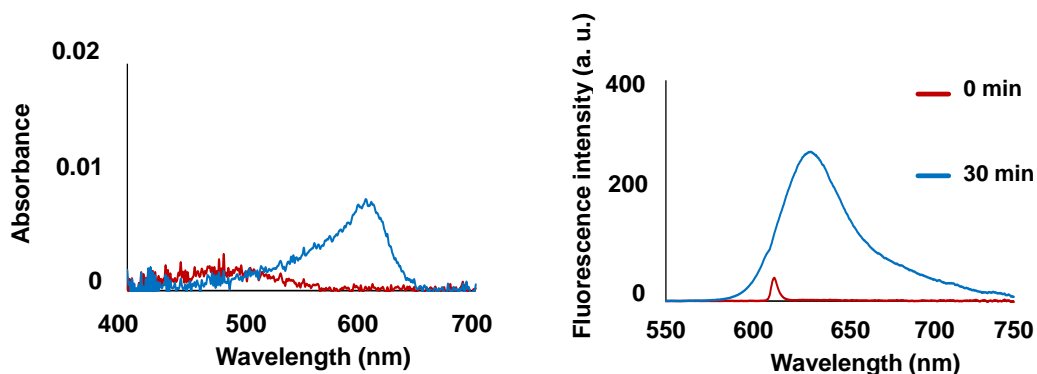


Figure 3-2-2. Absorption and fluorescence spectra of 1 μM 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal before and 30 min after the addition of 5 units β-galactosidase measured in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.1 % DMSO as a cosolvent at 37 °C. Ex. 610 nm. Slit 2.5/2.5 nm. PMT 700 V.

β-galactosidase 添加に伴う 630 nm の蛍光強度の経時変化を測定すると、観測開始から 60 分後まで経時的に蛍光上昇を示した (Figure 3-2-1)。また、酵素反応開始 30 分後における吸収スペクトルは 500 nm から 610 nm 付近をピークトップとした形状へ変化し、蛍光スペクトルでは 630 nm をピークトップとしたスペクトルとなり、蛍光強度が 154 倍と大きく上昇した (Figure 3-2-1)。以上から 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal は酵素の基質となることが確認され、その吸収・蛍光スペクトルの形状

的に蛍光団 2-Me-4'-CH₂OH-Sirhod 様化合物が生成することが確認された。そこで LC-MS 測定により酵素反応生成物の解析を行った。

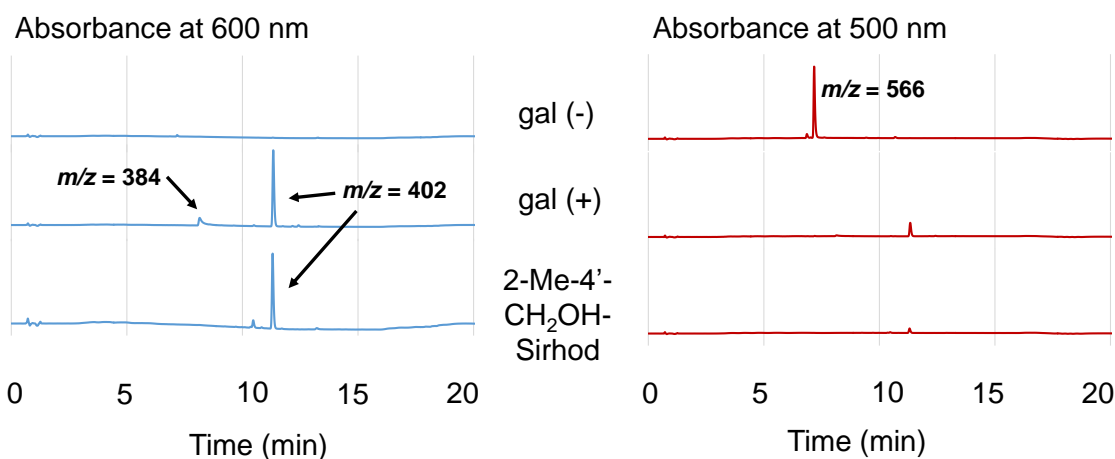
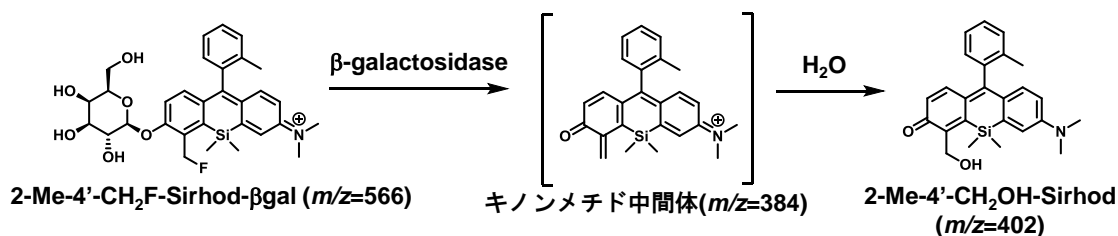


Figure 3-2-3. LC-MS profiles of absorbance at 600 nm (left) and 500 nm (right) for enzymatic reaction of 20 μ M 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal with/without 5 units β-galactosidase in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.1 % DMSO as a cosolvent at room temperature for 60 minutes.

In vitro でβ-galactosidase を添加すると酵素反応開始から 60 分の時点で原料の 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal が消失し、その大半は水とそのキノンメチド中間体が反応して生じる 2-Me-4'-CH₂OH-Sirhod になっていた (Figure 3-2-3)。また一部はキノンメチド中間体と同じ質量数 ($m/z = 384$) を持つ化合物が生成していた。この LC-MS 解析の結果より、開発したプローブは酵素の基質となつて赤色蛍光団へと代謝され、その酵素反応の過程において設計通りキノンメチド中間体が産生していることが示唆された。なお、キノンメチド中間体と同じ質量数を持つ化合物としてはキノンメチド中間体の他に、2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal からβ-galactoside 基が切断された構造体が候補として考

えられ、これが質量分析器の中ではイオン化条件においてキノンメチド中間体へと変換している可能性も考えられる。

β -galactosidase をレポータータンパク質として利用する上において、その高い代謝回転により蛍光プローブのシグナルが増幅されることは利点として働くが、一方で 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal は酵素反応依存的に細胞内高分子と共有結合を形成するという分子設計上、 β -galactosidase の酵素活性中心に結合してこれを失活させ、この特性を損なう可能性が考えられる。そこで次に 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal が β -galactosidase の自殺基質になるか否かを確認した (Figure 3-2-4)。

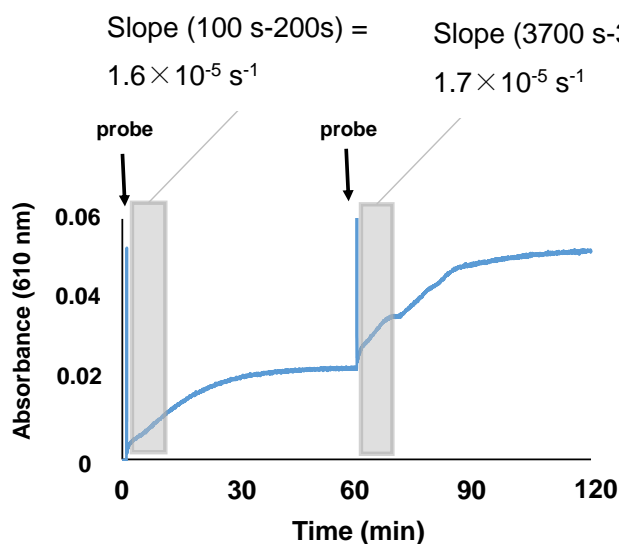


Figure 3-2-4. Time-dependent absorbance change at 610 nm for 5 units β -galactosidase at 37°C. 1 μ M 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal was added at 60 sec and 3600 sec to 100 mM sodium phosphate buffer solution (pH 7.4).

β -galactosidase を加えた溶液に 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal を 1 min および 60 min の二回に分けて添加したところ、1 分で 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal を添加した直後の反応速度 (100-200 sec の傾きで計算) は $1.6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、一方で 60 分では 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal を添加した直後の反応速度 (3700-3800 sec の傾きで計算) は $1.7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ となった。このように二度目の 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal 添加時に酵素反応速度が低下していないことから、2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal は β -galactosidase の自殺基質にはならず、すなわち 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal のキノンメチド中間体は酵素活性中心から拡散する程度の寿命があることが確認された。

前節で記載したように 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal の分子設計の狙いは酵素反応に伴い生成するキノンメチド中間体が、タンパク質等の細胞内高分子と共有結合して高い細胞内滞留性を獲得する点にあり、2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal がこの概念通りに機能するか確認するため BSA や細胞ライセートと 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal を共存させた系の反応生成物を SDS-PAGE で解析した (Figure 3-2-5)。

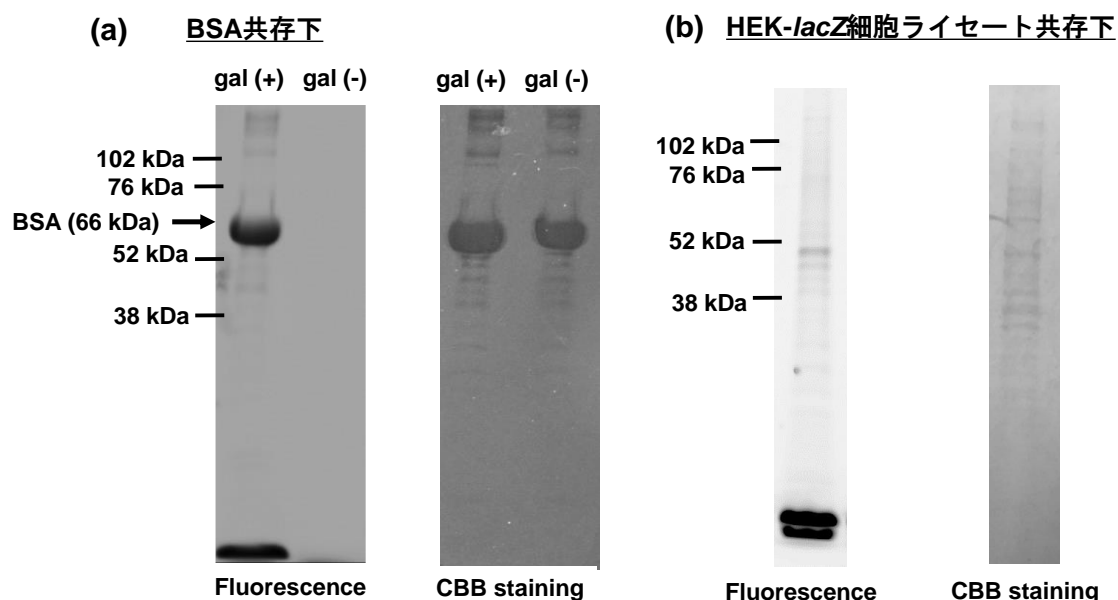


Figure 3-2-5. SDS-PAGE. (a) 7 μ L solution of 100 mM NaPi buffer (pH 7.4) containing 10 μ M 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal and 2 mg/mL BSA after 2 hr incubation with/without 5 units β-galactosidase. (b) 7 μ L lysate of HEK-*lacZ* cells with 5 μ M 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal after 4 hr incubation. Excitation wavelength 630 nm. 670 nm long pass filter. (left) fluorescence imaging (right) CBB staining.

BSA と共存させた場合にはβ-galactosidase を添加したレーン(gal (+))のみ BSA 由来の CBB 染色のバンドと対応する位置から赤色蛍光が観測された。また、β-galactosidase を発現している HEK-*lacZ* 細胞の細胞ライセートと共存させた場合には、CBB 染色と同様に高分子成分由来の位置からラダー状の赤色蛍光のバンドが観測された。以上の結果より 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal は酵素反

応依存的にタンパク質と共有結合することが確認され、またこの反応は細胞内環境においても進行しうることが示唆された。ただし、いずれの実験においても CBB 染色とは対応しない一番下の位置から赤色蛍光が最も強く観測されている。これは細胞内高分子と共有結合していないものが 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal の赤色蛍光性酵素反応生成物が大部分を占めている、すなわち酵素反応後のキノンメチド中間体はタンパク質と比較して小分子とより反応していることが示唆された。

細胞内環境においてキノンメチド中間体と共有結合を形成する小分子の候補としては GSH が挙げられる。GSH は細胞内に 1-10 mM と高濃度に存在し、また *o*-quinonemethide に対しては水分子より 1.6×10^5 倍高い反応速度定数で求核付加反応を起こすことが報告されている²²。そこで、細胞内においてキノンメチド中間体と共有結合を形成している小分子成分の候補の洞察を得るために、異なる生理的濃度 (0-10 mM) の GSH 存在下において、BSA と共有結合を形成している 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal の酵素反応生成物の割合がどの程度変化するかを SDS-PAGE で解析した (Figure 3-2-6)。

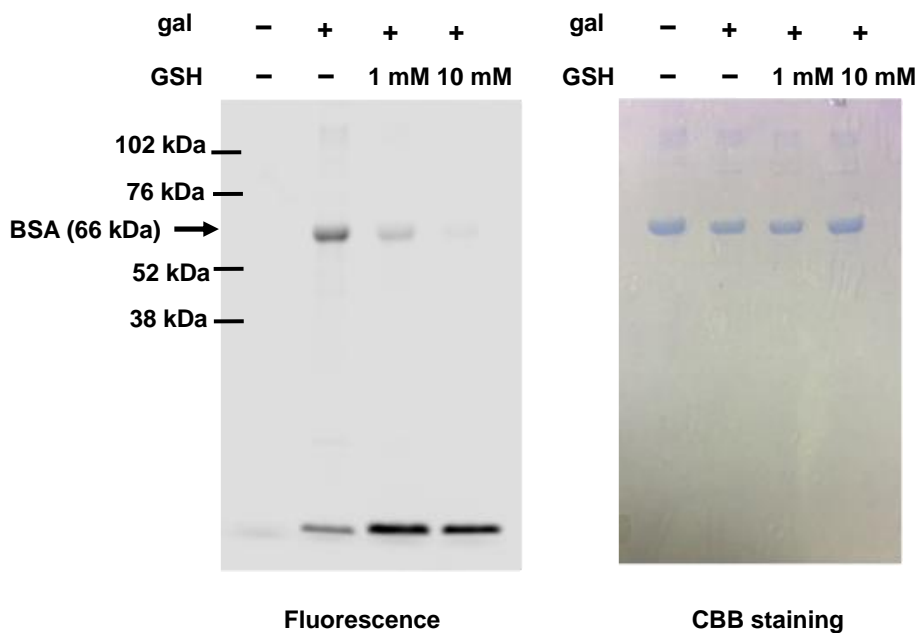


Figure 3-2-6. SDS-PAGE. (left) Fluorescence image. (right) bright field image after CBB staining. Lane 1) 7 μ L solution of 100 mM NaPi buffer (pH 7.4) containing 10 μ M 2-Me-4-CH₂F-Sirhod-βgal and 1 mg/mL BSA. Lane 2) 7 μ L solution of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 10 μ M 2-Me-4-CH₂F-Sirhod-βgal and 1 mg/mL BSA after 2 hr incubation with 5 units β-galactosidase. Lane 3) 7 μ L solution of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) GSH 1mM containing 10 μ M 2-Me-4-CH₂F-Sirhod-βgal and 1 mg/mL BSA after 2 hr incubation with 5 units β-galactosidase. Lane 4) 7 μ L solution of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) GSH 10mM containing 10 μ M 2-Me-4-CH₂F-Sirhod-βgal and 1 mg/mL BSA after 2 hr incubation with 5 units β-galactosidase. Excitation wavelength 630 nm. 670 nm long pass filter.

その結果、共存する GSH の濃度が高くなるにつれて BSA に対応する位置から観測される赤色蛍光の強度は弱くなり、また逆に一番下の小分子成分に由来する赤色蛍光は GSH の濃度が高くなるほど強くなった。

この結果と、1 mM の GSH 共存下における 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal の酵素反応生成物を LC-MS で解析すると、600 nm に吸収を持つ酵素反応生成物の大半は GSH 共有結合体である結果を併せて鑑みると、細胞内環境ではタンパク質より GSH が優先して 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal のキノンメチド中間体と共有結合を形成していることが示唆された (Figure 3-2-7)。

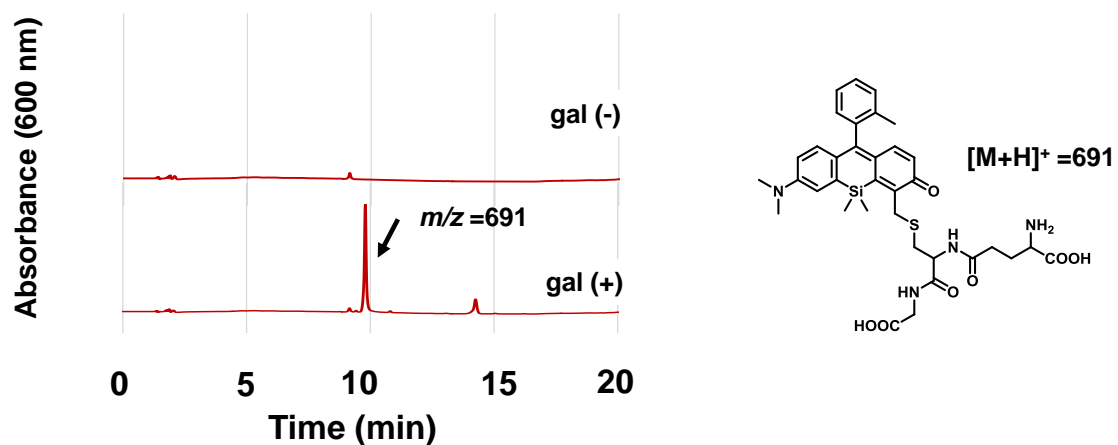


Figure 3-2-7. LC-MS profiles of absorbance at 600 nm for enzymatic reaction of 20 μM 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal with/without 5 units β-galactosidase in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and GSH 1 mM containing 0.1 % DMSO as a cosolvent at room temperature for 50 minutes.

これは研究当初に想定していた 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal のキノンメチド中間体が細胞内高分子と共有結合を形成して細胞内滞留性を獲得する分子機構とは異なるが、GSH は 1 価の負電荷を帯び細胞膜を透過しないことから、細胞内でキノンメチド中間体と GSH の共有結合体が優先的に形成されていても細胞内滞留性を示すと考えられる。

第三節 培養細胞への応用

前節までの検討で 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal は *in vitro* の系において酵素反応依存的に赤色蛍光が上昇し、また細胞内滞留性を獲得しうることを示された。そこで 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal を用いて生細胞中においてβ-galactosidase 活性の差を検出し、レポーターアッセイに適用できるか検討するため、内在性のβ-galactosidase 活性が低い HEK 293 細胞と、これに *lacZ* 遺伝子を導入した HEK-*lacZ* 細胞に対して 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal を添加し蛍光イメージングを行った。

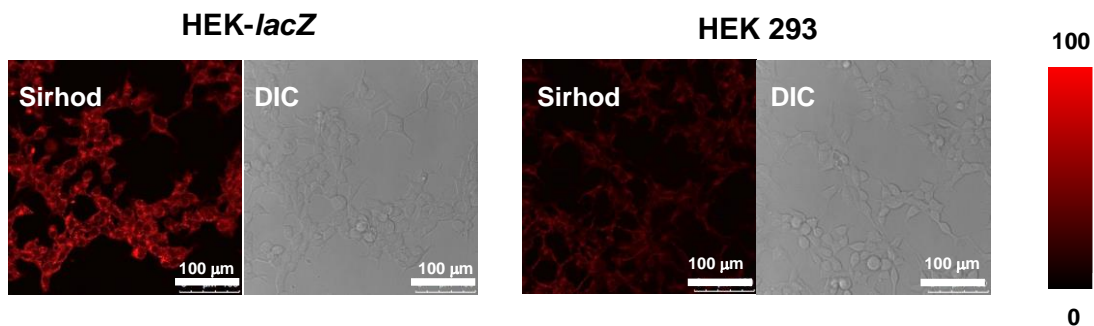


Figure 3-3-1. Fluorescence images and differential interference contrast (DIC) images of HEK-*lacZ* and HEK 293 cells after incubation with 1 μM 2-Me-4-CH₂F-Sirhod-βgal at 37 °C for 30 min. Images were captured using a confocal microscope equipped with a white light laser and an objective lens (40×). Excitation 600 nm, emission 610-660 nm

30 分の 37°C で培養後に共焦点蛍光顕微鏡で観察した結果、期待どおりβ-galactosidase の発現量が高い HEK-*lacZ* 細胞にプローブを負荷した場合にのみ細胞内から強い赤色蛍光が観測され、生細胞中のβ-galactosidase 活性の検出に成功した (Figure 3-3-1)。また、細胞内で酵素反応依存的に赤色蛍光生成物が細胞内滞留性を獲得しているか検証するために、PBS による洗浄操作前後における細胞内の蛍光強度を比較した。

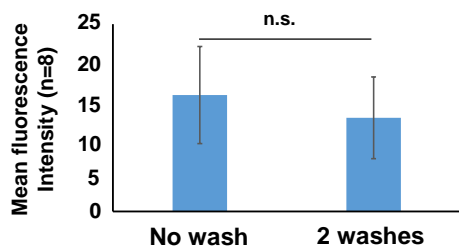
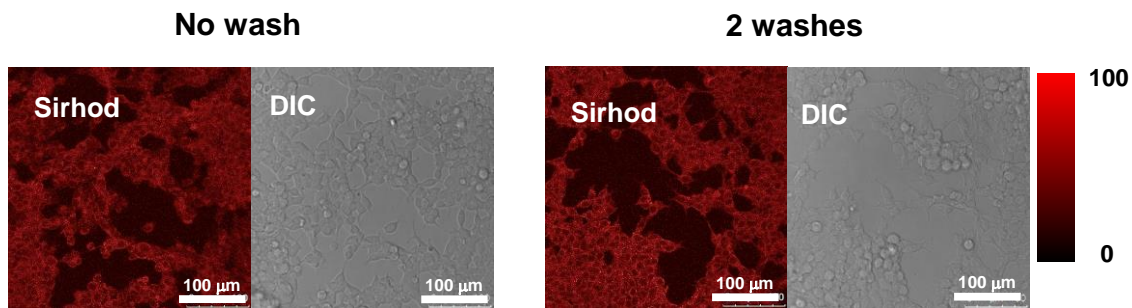


Figure 3-3-2. Fluorescence images and differential interference contrast (DIC) images of HEK-*lacZ* cells after incubation with 1 μ M 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal at 37 °C for 30 min (left) and washed twice with PBS (right). Images were captured using a confocal microscope equipped with a white light laser and an objective lens (40 \times). Condition: excitation 600 nm, emission 610-680 nm. Mean fluorescence intensity was calculated by taking ROIs on the images, n = 8, error bars; SD.n.s. = not significant. (p >0.05).

その結果、洗浄前後で細胞内の赤色蛍光強度には有意な変化がなかったことから (Figure 3-3-2)、赤色蛍光性酵素反応生成物は細胞内に滞留していることが示唆された。その一方で、2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal の想定される酵素反応生成物の一つである 2-Me-4'-CH₂OH-Sirhod は、HEK 293 細胞に添加後、30 分培養して蛍光イメージング行くと洗浄操作の有無で細胞内の赤色蛍光強度が有意に変化した (Figure 3-3-3)。

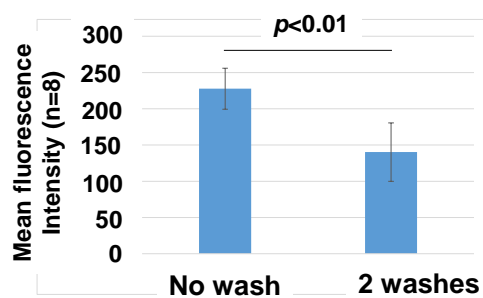
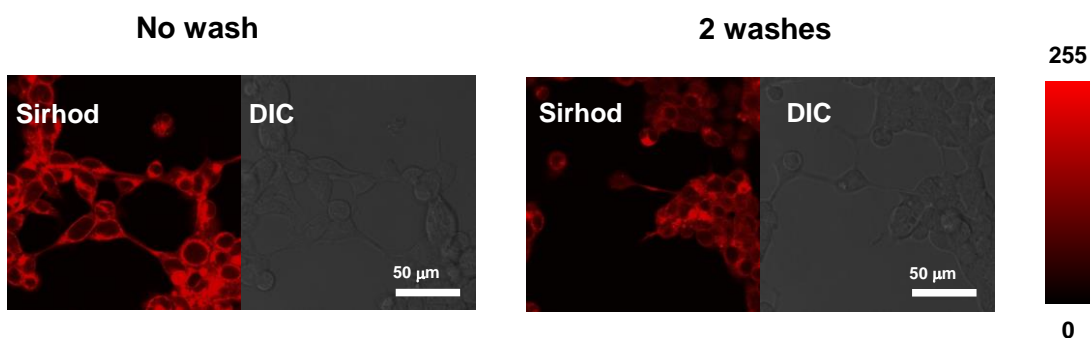


Figure 3-3-3. Fluorescence images and differential interference contrast (DIC) images of HEK 293 cells after incubation with 1 μ M 2-Me-4'-CH₂OH-Sirhod at 37 °C for 30 min (left) and washed twice with PBS (right).. Images were captured using a confocal microscope equipped with a white light laser and an objective lens (40 \times). Condition: excitation 600 nm, emission 610-660 nm. Mean fluorescence intensity was calculated by taking ROIs on the images, n = 8, error bars; SD.

この結果より、2-Me-4'-CH₂OH-Sirhod は細胞外に漏出することが確認された。さらに、前述の実験で HEK-*lacZ* 細胞内から観測された細胞内に滞留する 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal の赤色蛍光性酵素反応生成物は、2-Me-4'-CH₂OH-Sirhod ではなくタンパク質または GSH に共有結合した化合物であることが示唆された。

ここで、2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal の酵素反応生成物の細胞内局在について検証した。

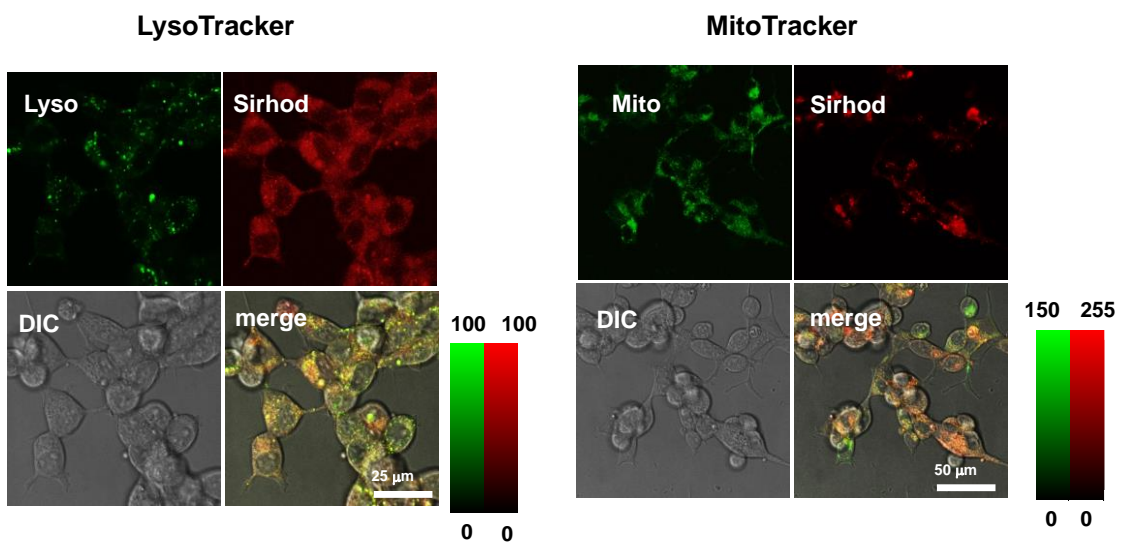


Figure 3-3-4. Fluorescence images and differential interference contrast (DIC) images of HEK-*lacZ* cells after incubation with (left) 50 nM LysoTracker Green DND-26 or (right) 50 nM MitoTracker Green FM for 30 min at 37 °C and 1 μM 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal at 37 °C for 30 min. Images were captured using a confocal microscope equipped with a white light laser and an objective lens (40×). Condition: excitation 495 nm (PMT 1)/ 600 nm (PMT 2), emission 505-555 nm (PMT 1)/610-660 nm (PMT 2).

LysoTracker と MitoTracker との共染色した結果、その一部はリソソームに局在していることが観測された (Figure 3-3-4)。マーカーと共局在していない部位からも粒状の赤色輝点が観測されたことから、細胞核を除く小胞系に多く局在していると考えられる。これは 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal の酵素反応生成物がリソソームなどの小胞系に局在しやすいためだと推測される。

これらの結果を踏まえて 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal により1細胞レベルでβ-galactosidase 活性を検出して *lacZ*(+)細胞を特異的に蛍光標識できるか検証した。プロトコルとしては CellTracker™ Green CMFDA Dye で蛍光標識した HEK293 細胞 (*lacZ*(-)細胞)と、蛍光標識していない HEK-*lacZ* 細胞 (*lacZ*(+)細胞)を共培養し、2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal を添加して蛍光イメージングを行った。

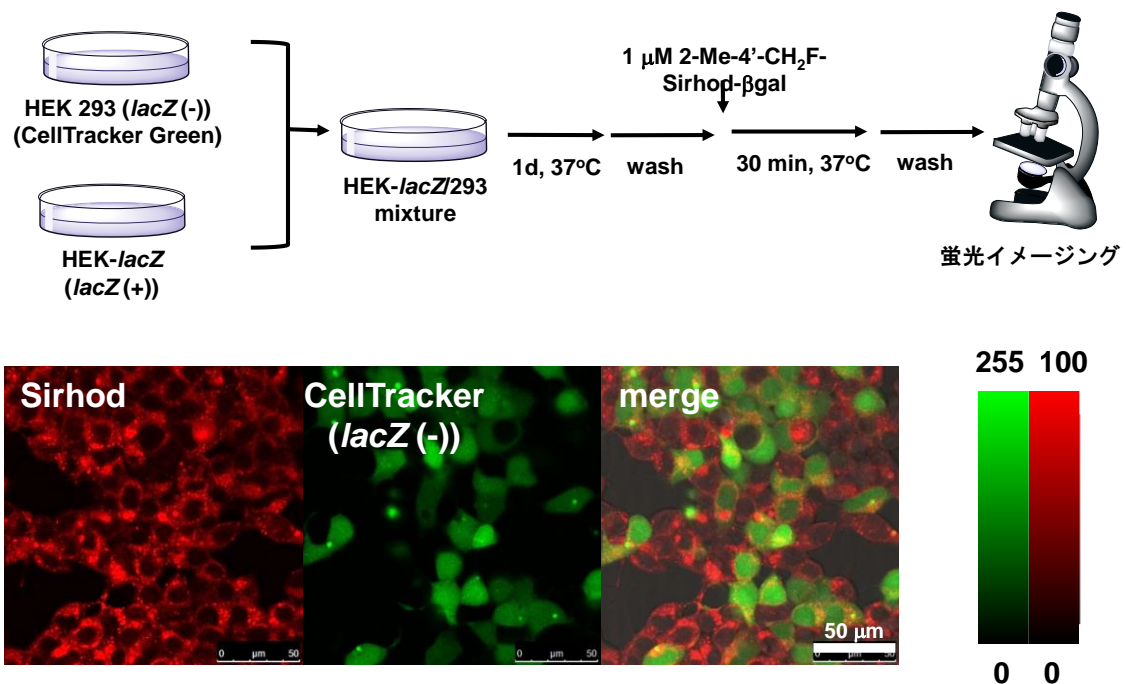


Figure 3-3-5. Fluorescence image and differential interference contrast (DIC) images of mixture of HEK 293 cells (pre-stained with 10 μM CellTracker™ Green CMFDA Dye for 30 minutes) and HEK-*lacZ* cells after incubation with 1 μM 2-Me-4-CH₂F-Sirhod-βgal at 37 °C for 30 min. Images were captured using a confocal microscope equipped with a white light laser and an objective lens (40×). Condition: excitation 495 nm (PMT 1)/ 600 nm (PMT 2), emission 505-555 nm (PMT 1)/610-660 nm (PMT 2).

視野内の一部の細胞群が CellTracker™ Green CMFDA Dye によって蛍光で標識されており、*lacZ*(-)細胞と *lacZ*(+)細胞が混在した系が確立されていることが確認された。これに対して 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal 由来の赤色蛍光は緑色蛍光標識されていない *lacZ*(+)細胞だけでなく、緑色蛍光標識された *lacZ*(-)細胞からも一様に観測された (Figure 3-3-5)。このように生細胞においてはβ-galactosidase の活性を指標として二種類の細胞群から *lacZ*(+)細胞を特異的に蛍光標識は達成できなかった。

また、CellTracker™ Green CMFDA Dye が HEK 293 細胞 (*lacZ*(-)細胞) の内在性の β -galactosidase 発現量に影響を与えている可能性を否定するため、CellTracker™ Green CMFDA Dye で蛍光標識していない HEK 293 細胞と HEK-*lacZ* 細胞を共培養した系に対し、2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal を添加して蛍光イメージングを行った。

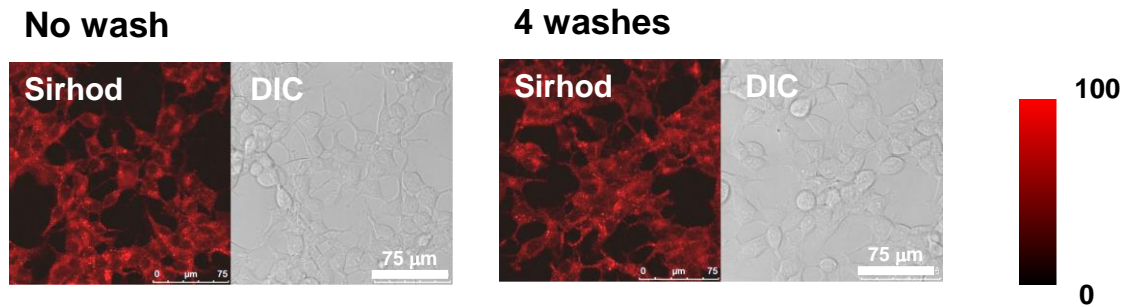


Figure 3-3-6. Fluorescence image and differential interference contrast (DIC) images of mixture of HEK 293 cells and HEK-*lacZ* cells after incubation with 1 μ M 2-Me-4-CH₂F-Sirhod- β gal at 37 °C for 30 min (left) and after 4 washes with PBS (right). Images were captured using a confocal microscope equipped with a white light laser and an objective lens (40 \times). Condition: excitation 600 nm, emission 610-660 nm.

その結果、洗浄操作の有無にかかわらず、全ての細胞から一様に 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal 由来の赤色蛍光が観測されことから (Figure 3-3-6)、CellTracker™ Green CMFDA Dye による蛍光標識の有無にかかわらず 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal では *lacZ*(+)細胞を特異的に蛍光標識できないことが示唆された。

第四節 固定脳スライスへの応用

生細胞系においては 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal を用いてβ-galactosidase の活性を1細胞レベルで検出することは困難であったが、固定した組織において *lacZ* 発現を蛍光プローブで可視化することにも一定の意義があると考えられる。これは、蛍光プローブを用いることで従来より用いられている呈色指示薬の X-Gal では達成できない3次元画像の構築やマルチカラーイメージングを可能とすることから、X-Gal 染色よりも組織の深部において複数の観測対象に対する情報を与えるためである。

そこで、2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal のレポーターアッセイのツールとしての実用的な側面を模索するべく、高次の系への応用としてマウス脳スライスの蛍光イメージングを試みた。具体的には *lacZ* と GFP が大脳皮質部位に遺伝子導入されている固定マウス脳スライスに対して、2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal を添加し、20分室温で培養して洗浄操作の後に蛍光イメージングを行った (Figure 3-4-1)。

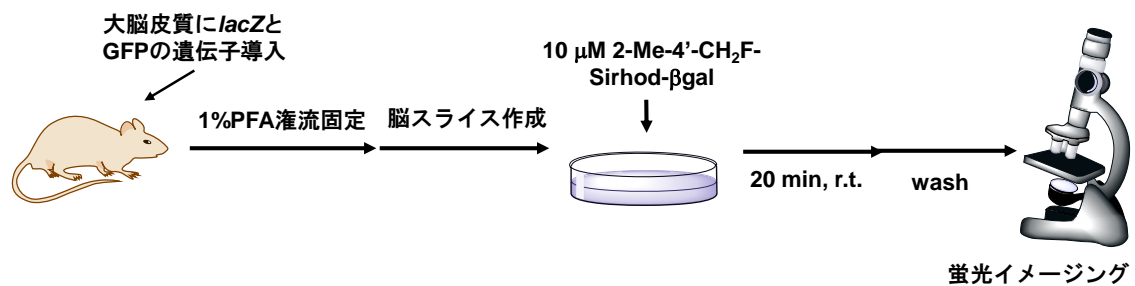
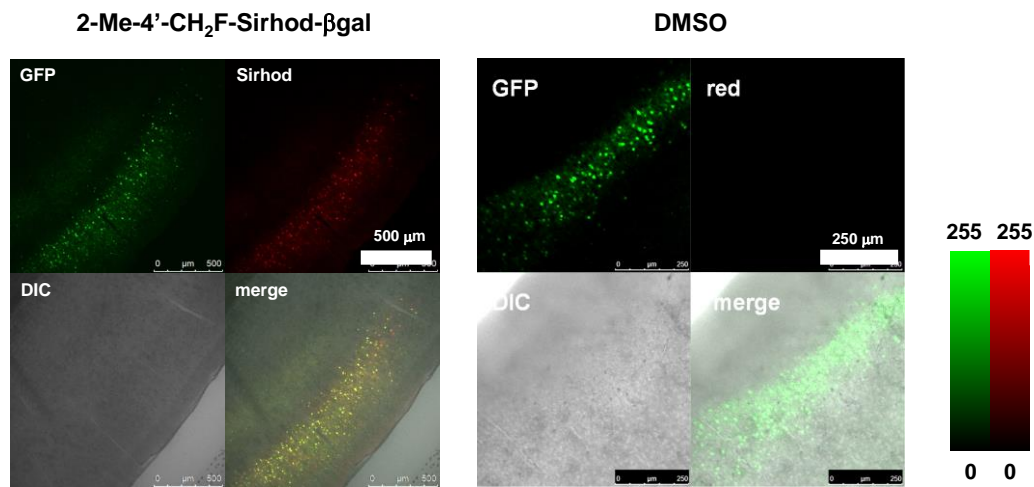


Figure 3-4-1. Protocol for fluorescence imaging of fixed mouse brain slices with 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal



↓ 拡大図

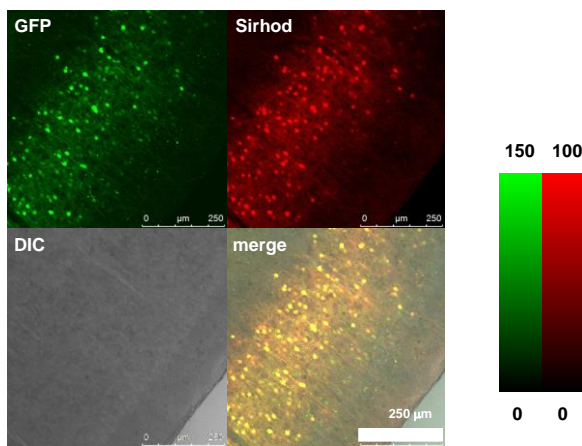


Figure 3-4-2. Fluorescence images and differential interference contrast (DIC) images of mouse brain slice incubated with 10 μ M 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal (left) or DMSO (right) in PBS (pH 7.4) at room temperature for 20 min. Images were captured using a confocal microscope equipped with a white light laser and an objective lens (10 \times). Condition: excitation 495 nm/594 nm, emission 505-540 nm (PMT 1)/620-700 nm (HyD)

その結果、2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal を添加した場合のみ、大脳皮質の外側部位から赤色蛍光が観測され、GFP の緑色蛍光部位と大方一致していた (Figure 3-4-2)。また、拡大図の merge 画像を確認すると、GFP 発現領域の中でもまばらに蛍光を発していない部位があり、この部位では赤色蛍光も観測されてなかった。このように固定組織においては *lacZ*(+)細胞と *lacZ*(-)細胞が混在する中で、*lacZ*(+)細胞を特異的に蛍光標識することに成功した。この結果は HEK 293/HEK-*lacZ* の共培養系での実験と相反するが、その理由としてはマウス脳スライスの *lacZ*(+)細胞に発現している β -galactosidase の活性が生細胞より高く、*lacZ*(-)細胞と赤色蛍光の強度に有意なコントラストがついた、または生細胞と固定細胞の細胞内環境の違いが酵素反応生成物を細胞内に留める上で有利に働いたためと考えられる。

第五節 小括

本章では赤色蛍光団 2-Me Sirhod に対して SPiDER- β Gal と同様に CH_2F 基を導入することで、酵素反応依存的にキノンメチド中間体を形成し、細胞内高分子と共有結合を形成する β -galactosidase 活性検出赤色蛍光プローブ 2-Me-4'- CH_2F -Sirhod- β gal を開発した。

本プローブは赤色蛍光強度の違いで細胞内の β -galactosidase 活性検出を可能とし、洗浄操作後も赤色蛍光性酵素反応生成物は細胞内に滞留した。

また、固定組織において GFP とのマルチカラーイメージングを可能とし、1 細胞レベルでの酵素活性検出することで *lacZ*(+)細胞を特異的に蛍光標識することに成功した。

しかし、生細胞においては β -galactosidase 活性の異なる二種類の細胞群が共存する系で、*lacZ*(+)細胞を特異的に蛍光標識することはできなかった。

次章ではこの原因を解明し、レポーターアッセイのツールとしてより実用的な分子設計の指針を見出すためにモデル化合物 leuco-2-Me-4'- CH_2F -Sirhod- β gal を設計し、その機能評価を行った。

第四章

leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal の機能評価と応用

第一節 作業仮説に基づく leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal の設計

以上のように、*lacZ*(-)細胞と *lacZ*(+)細胞をそれぞれ個別に培養した場合には 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal を用いて赤色蛍光の酵素活性の違いを検出することが可能である一方で、共培養した場合にはこれが達成できなかった。この理由としては1) 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal の細胞膜透過性が低いまたは生細胞内でのβ-galactosidase との反応性が低い、2) 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal の細胞内高分子に共有結合していない酵素反応中間体が細胞外に漏出している、3) 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal の酵素反応生成物が細胞内滞留性を獲得していないことが候補として挙げられる。しかし、1)の可能性は *lacZ*(-)細胞と *lacZ*(+)細胞の個別の培養系で赤色蛍光上昇に差がついたことから否定され、また 3)は洗浄操作を行っても赤色蛍光強度が変化しなかったことから否定される。よって2)の酵素反応中間体、すなわち酵素反応に伴いβ-galactoside 基が切断された構造体およびキノンメチド中間体が *lacZ*(+)細胞外に漏出して、*lacZ*(-)細胞内に取り込まれていることが可能性として考えられる (Figure 4-1-1)。

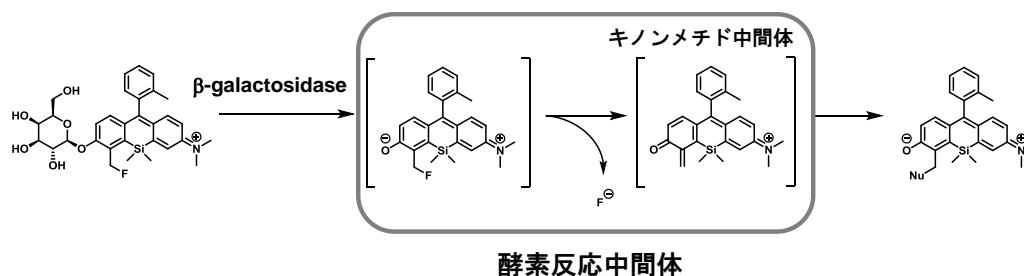


Figure 4-1-1. Activation mechanism of 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal and intermediates.

これは化学的には酵素反応中間体の反応性が低い場合、すなわちβ-galactoside 基が切断された構造体からキノンメチド中間体が生成する速度や、またキノンメチド中間体に対して求核種が求核反応する速度が低い場合にこれらの酵素反応中間体が細胞外に漏出すると考えられ、この化学的特性を改善すれば目的とする 1 細胞レベルでのβ-galactosidase 活性検出蛍光プローブの開発が可能になると考えた。

キノンメチドの反応性に関する先行研究に着目すると、キノンメチドの生成過程においては、芳香族性を崩すためのエネルギー障壁が高すぎるためナフタレンやビフェニルなどの連続した芳香環からはキノンメチド形成を伴う脱離基の放出が起こらないことが報告されており^{25,26}、またキノンメチドの反応過程においては *o*-quinonemethide に導入された置換基の電子求引性が高いほど反応遷移状態が安定化され、求核種との反応速度定数が最大で 1000 倍高くなることが報告されている²³。このように、一般的にキノンメチドの生成速度や反応速度は芳香環の共役鎖の広がり方やキノンメチドの生成速度や反応速度が大きく異なってくることが知られており²⁴、この知見を鑑みて 1 細胞レベルでの β -galactosidase の酵素活性検出を達成した SPiDER- β Gal と 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal の構造の違いに着目すると、キサンテン環の共役鎖の繋がりの有無が酵素反応中間体の化学的反応性を決める大きな要因の一つになっていると考えた。そこで、SPiDER- β Gal のようにキサンテン環の共役鎖が切断されている方が、キノンメチド中間体の生成速度あるいは反応速度が高くなるという作業仮説を立て、この作業仮説を検証するためのモデル化合物として 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal の共役鎖を還元することで切断した leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal を設計 (Figure 4-1-2)・合成 (Scheme 4-1-1)し、この化合物を用いて本研究の目的である 1 細胞レベルで β -galactosidase 活性を検出し、赤色蛍光で蛍光標識できるか検討することとした。

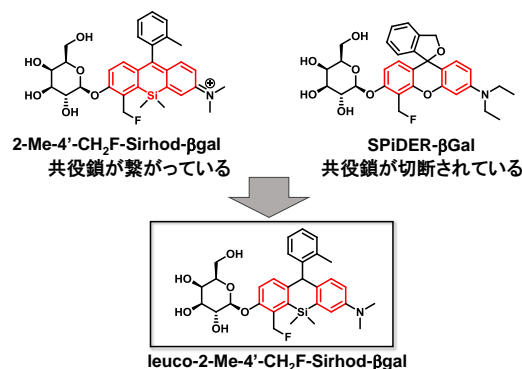
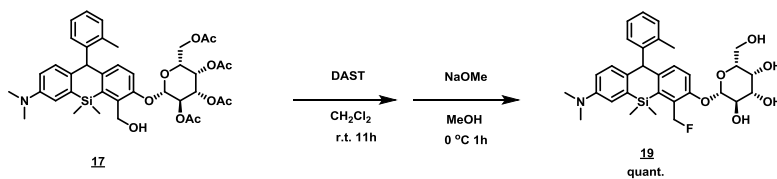


Figure 4-1-2. Design of leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal.



Scheme 4-1-1. Synthesis of leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal.

第二節 *in vitro* での機能評価

まず始めに、モデル化合物の leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal がβ-galactosidase の基質となるか *in vitro* で検証した。なお、leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal の酵素反応生成物は蛍光団の還元体であることが想定されたため、酸化条件についても同時に検討した。

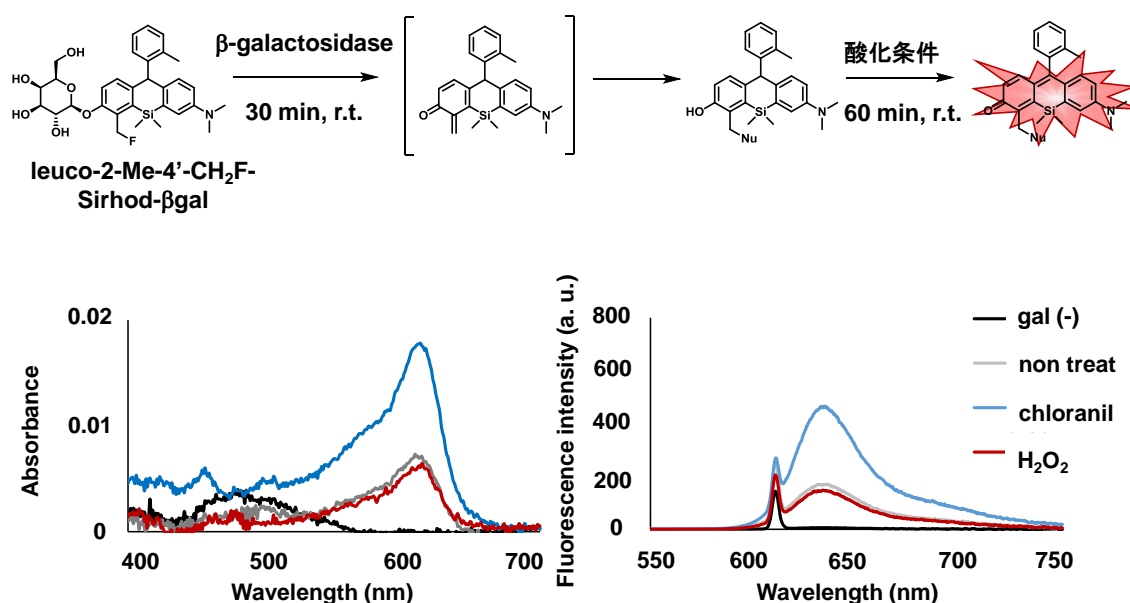


Figure 4-2-1. Absorption and fluorescence spectra of 12 μM leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal. The measurements were performed after the 30 minutes incubation with/without β-galactosidase and 60 minutes incubation under the oxidation condition (8.8 mM H₂O₂ or 1 mg/mL chloranil) in 100 mM NaPi buffer (pH 7.4) containing 0.1 % DMSO as a cosolvent at 37 °C. Ex. 610 nm. Slit 2.5/2.5 nm.

その結果、β-galactosidase を添加しない場合には 610 nm をピークトップとする吸収の上昇は観測されず、従ってこの波長で励起しても赤色蛍光は観測されなかったが、その他のβ-galactosidase を添加した条件 (non treat, chloranil, H₂O₂) では 610 nm の吸収および赤色蛍光が上昇した (Figure 4-2-1)。以上より、leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal はβ-galactosidase の基質となり、酵素反応に伴い赤色蛍光が上昇することが確認された。

次に開発した leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal が細胞内高分子と反応性を持つか検討する為、β-galactosidase の有無の二つの条件下で BSA と leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal を反応させ、その酵素反応生成物を SDS-PAGE で解析した。

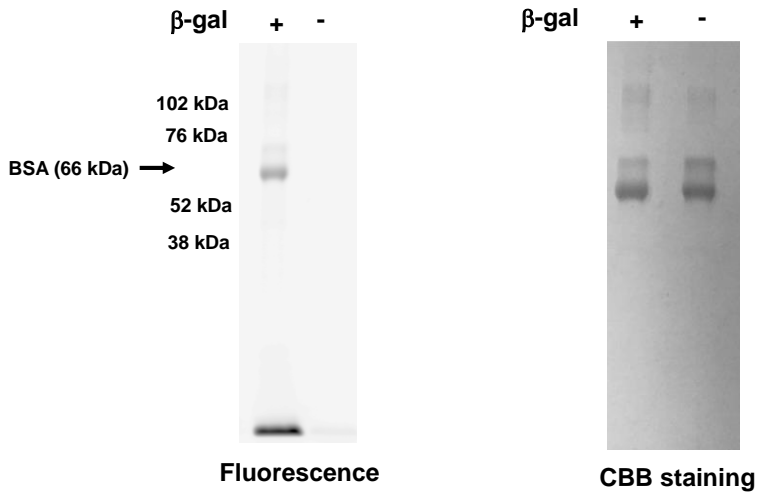


Figure 4-2-2. SDS-PAGE. 7 μ L solution of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 10 μ M leuco-2-Me-4-CH₂F-Sirhod-βgal and 2 mg/mL BSA after 2 hr incubation with/without 5 units β-galactosidase. Chloronil was added to the samples oxidant right before SDS- analysis. Excitation wavelength 630 nm. 670 nm long pass filter.

その結果、β-galactosidase を添加した条件のみ CBB 染色の BSA 由来のバンドと対応する位置から赤色蛍光が観測された (Figure 4-2-2)。このように leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal においても酵素反応依存的にキノンメチド中間体を形成し、細胞内高分子と反応し得ることが示唆された。そこで、この反応が細胞内環境でも進行しうるかβ-galactosidase を発現している HEK-lacZ 細胞の細胞ライセートと培養して同様に SDS-PAGE で検討した。なお、比較対象として 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal についても同時に検討した。

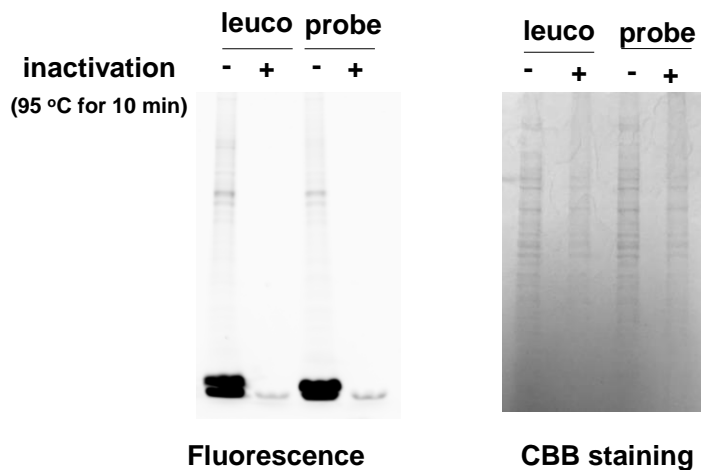


Figure 4-2-3. SDS-PAGE. 7 μ L lysate of HEK-lacZ cells with 10 μ M leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal (leuco) or 10 μ M 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal (probe) after 4 hr incubation at ambient temperature. Cell lysate was inactivated by heating at 95 °C for 10 minutes before the addition of Sirhod compounds. Samples were irradiated with 254 nm UV light for 10 minutes before measurement. Excitation wavelength 630 nm. 670 nm long pass filter.

その結果、酵素反応依存的に高分子由来のラダー状の赤色蛍光が観測され、細胞内環境でも高分子と共有結合することが示唆された (Figure 4-2-3)。なお、leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal と 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal の結果を比較すると、高分子成分に対応する位置の赤色蛍光の強度は同程度で、いずれもレーンの一番下の小分子成分に対応する位置から強く赤色蛍光が観測されていることから、4 時間の反応条件下ではキノンメチド中間体と反応する求核種には大きな差がないことが示唆された。

また、*in vitro* において細胞内環境を模倣し、1 mM GSH の共存下で leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal とβ-galactosidase を反応させ、反応開始 50 分の時点で酸化剤として NaOCl を添加し、酵素反応生成物を LC-MS で解析した。

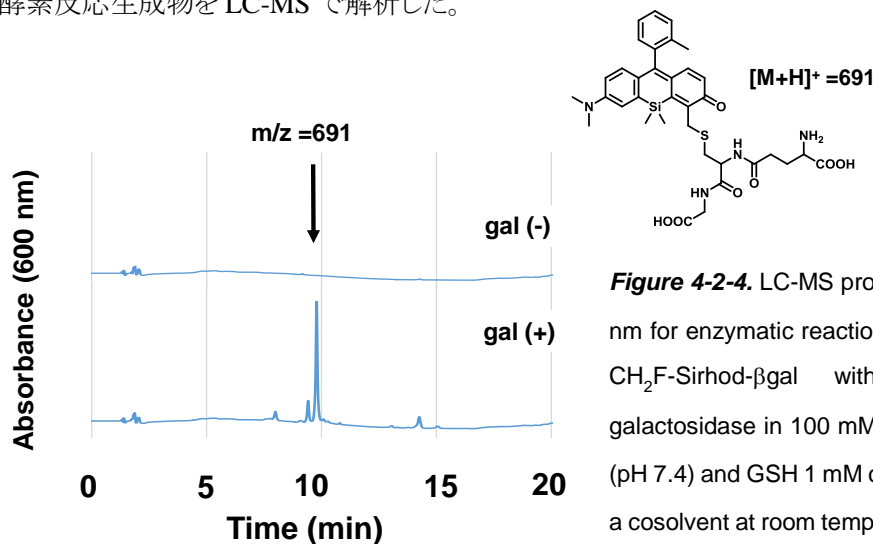


Figure 4-2-4. LC-MS profiles of absorbance at 600 nm for enzymatic reaction of 20 μM leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal with/without 5 units β-galactosidase in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) and GSH 1 mM containing 0.1 % DMSO as a cosolvent at room temperature for 50 minutes and subsequent addition of 24 mM NaOCl.

その結果、600 nm の吸収を持つ化合物の中ではキノンメチド中間体に GSH が付加した化合物と同じ質量数を持つものが主成分として得られた (Figure 4-2-4)。これは SDS-PAGE の実験と同様に leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal においても酵素反応に伴いキノンメチド中間体を形成し、求核種と共有結合を形成することを示唆している。以上より、*in vitro* において酵素の基質になり、その酵素反応の過程でキノンメチド中間体を形成して求核種と共有結合を形成するという定性的な部分では leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal は 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal と同じ性質を有していることが明らかとなった。

第三節 培養細胞と固定組織への応用

以上より、モデル化合物は leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal は 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal と同様にβ-galactosidaseと反応することで赤色蛍光が上昇し、細胞内滞留性を獲得しうる事が明らかとなった。そこで次に生細胞イメージングにより生細胞内のβ-galactosidase の酵素活性を検出できるか検討した。

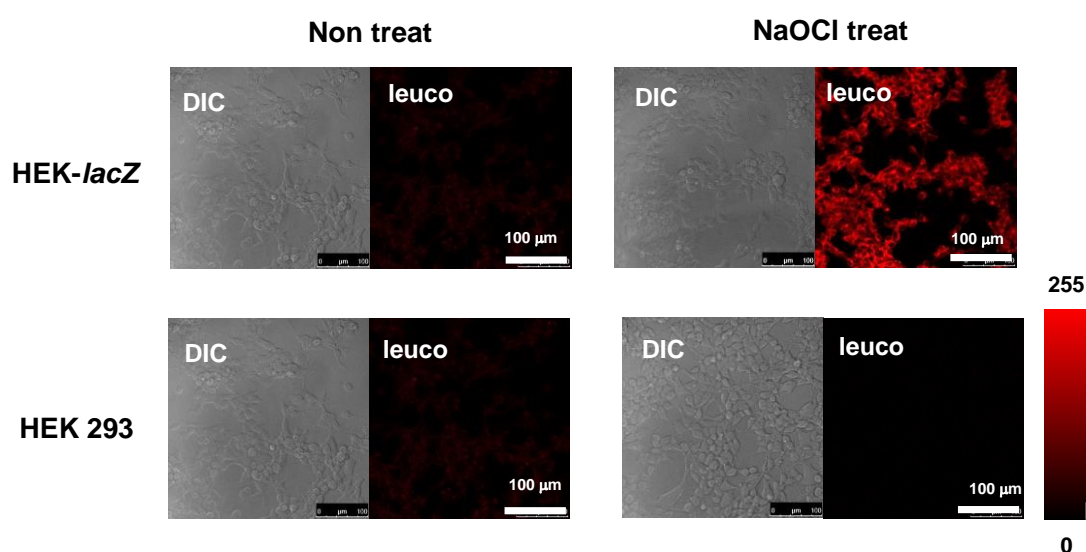


Figure 4-3-1. Fluorescence images and differential interference contrast (DIC) images of HEK-*lacZ* and HEK 293 cells after incubation with 10 μM leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal at 37 °C for 30 min. 24 mM NaOCl was added right before the imaging (for NaOCl treat). Images were captured using a confocal microscope equipped with a white light laser and an objective lens (40x). Excitation 600 nm, emission 610-660 nm

その結果、酸化剤として NaOCl を添加した HEK-*lacZ* 細胞では細胞内から強い赤色蛍光が観測された一方で HEK 293 細胞からはほとんど赤色蛍光は観測されなかった (Figure 4-3-1)。このように、モデル化合物 leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal を用いて細胞内のβ-galactosidase 活性の検出が可能であった。なお、*in vitro* の場合と異なり、生細胞系において酵素反応依存的に赤色蛍光が上昇するためには酸化剤の添加を必要とすることが明らかとなったが、どのような酸化条件のもとで leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal の赤色蛍光が上昇するか、以下で検討した。

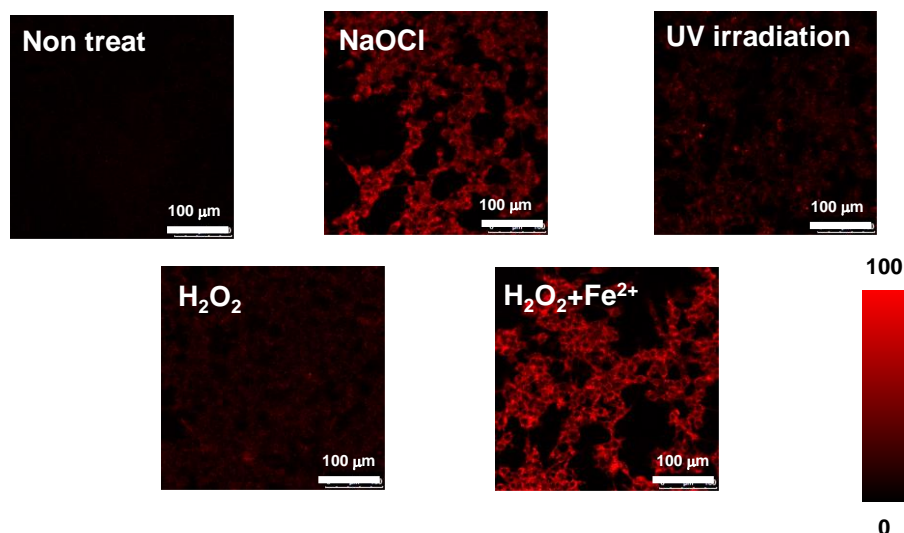


Figure 4-3-2. Fluorescence images and differential interference contrast (DIC) images of HEK-*lacZ* cells after incubation with 10 μM leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal at 37 °C for 30 min. Oxidation condition (NaOCl, H₂O₂, UV irradiation, or H₂O₂+Fe²⁺) was applied right before the imaging. Images were captured using a confocal microscope equipped with a white light laser and an objective lens (40x). Excitation 600 nm, emission 610-660 nm

その結果、NaOCl やフェントン反応により生じる $\cdot\text{OH}$ といった活性酸素種によって赤色蛍光が上昇した (Figure 4-3-2)。このように元々はキサンテン環の共役鎖の有無が酵素反応中間体の反応性にどのような影響を与えるかを検討するためのモデル化合物として leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal を設計したが、“ β -galactosidase 活性+活性酸素種”という二つの条件認識能を有する β -galactosidase 活性検出プローブとしても機能することが明らかとなった。

ここまでの検討により leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal は細胞膜を透過性して生細胞内での β -galactosidase と反応し、*lacZ*(+)細胞と *lacZ*(-)細胞で赤色蛍光の上昇によりその活性の違いを可視化できること、また酵素反応生成物は細胞内滞留性を獲得しうることが確認された。そこで、当初の狙いであるキサンテン環の共役鎖の有無が酵素反応中間体の反応性に与える影響を検討するためのモデル化合物として、leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal を用いて生細胞における1細胞レベルでの β -galactosidase 活性の検出が可能か、CellTracker Green™ CMFDA Dye で蛍光標識した HEK 293 細胞(*lacZ*(-)細胞)と HEK-*lacZ* 細胞(*lacZ*(+)細胞)を共培養した系で検証した。

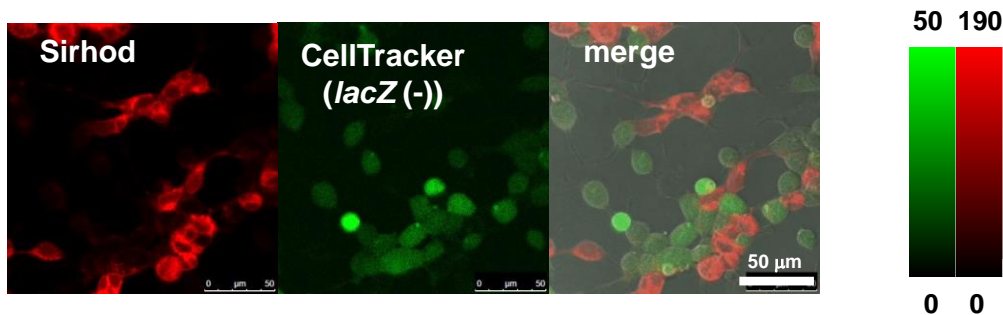


Figure. 4-3-3 Fluorescence image and differential interference contrast (DIC) images of mixture of HEK 293 cells (*lacZ* (-)) (pre-stained with 10 μ M CellTracker™ Green CMFDA Dye for 30 minutes) and HEK-*lacZ* cells after incubation with 10 μ M leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal at 37 °C for 30 min. After addition of 24 mM NaOCl, images were captured using a confocal microscope equipped with a white light laser and an objective lens (40 \times). Condition: excitation 495 nm (PMT 1)/ 600 nm (PMT 2), emission 505-555 nm (PMT 1)/610-660 nm (PMT 2).

その結果、leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal 由来の赤色蛍光との CellTracker Green™ CMFDA Dye 由来の緑色蛍光はそれぞれ別の細胞群から観測された (Figure 4-3-3)。これは、*lacZ*(-)細胞では leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal 由来の赤色蛍光は上昇せず、*lacZ*(+)細胞においてのみ leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal 由来の赤色蛍光が上昇したことを意味する。すなわち、2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal では達成できなかった、1 細胞レベルで β -galactosidase 活性を検出し、*lacZ*(+)細胞を特異的に蛍光標識することを達成した。

以上のように、キサンテン環の共役鎖の繋がり有無において構造的に大きな違いを持つ二つの化合物、2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal と leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal は β -galactosidase との酵素反応に関連した化学的性質において、キサンテン環の共役鎖が切断された leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal のみが 1 細胞レベルでの酵素活性検出が可能であるという 1 点においてのみ大きな違いを示した。

これは、キサンテン環の共役鎖が切断されたキノンメチド中間体の方が生成速度あるいは反応速度が高くなるという当初の作業仮説と矛盾しない結果となった。先行研究において、キノンメチド前駆体の芳香環上の置換基として高い電子供与性を持つものほどキノンメチドになる生成速度が高くなるという報告があり²³、これと還元体である leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal の方が 2-Me-4'-

CH₂F-Sirhod-βgalよりキサンテン環部位の電子密度が高いと考えられることを考慮すると、キサンテン環の共役鎖が切断されたキノンメチド中間体の方が、特にキノンメチド中間体の生成速度が高いことが推測される (Figure 4-3-4)。

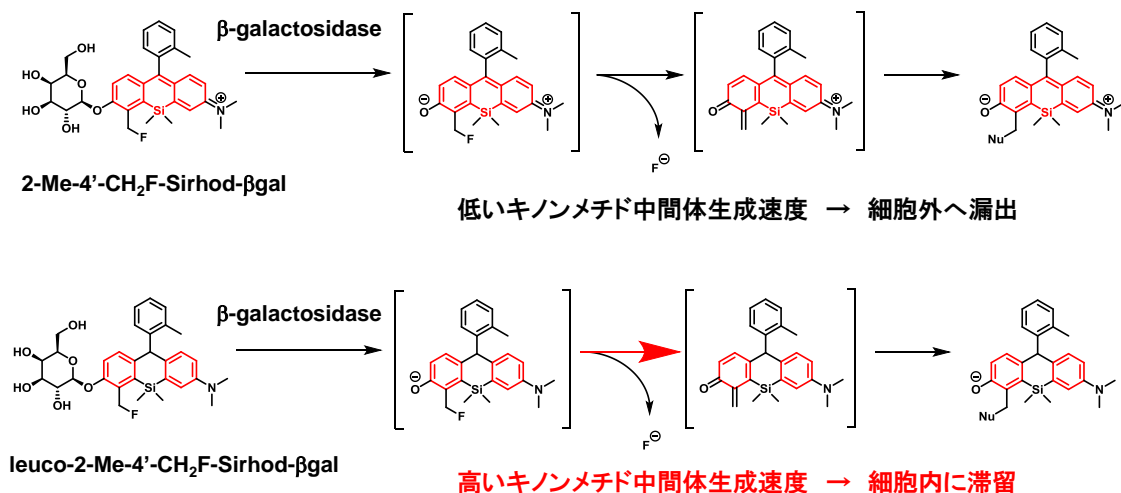


Figure 4-3-4. Hypothesis on reaction rates of β-galactosidase reactions .

本研究において構造的な違いとその細胞内滞留性に与える影響を比較検討したのは leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal と 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal、ならびに先行研究で報告されている SPiDER-βGal の 3 化合物のみであるため、他の構造的要因 (化合物全体の電荷が 1 価の正電荷か中性か、キサンテン環 10 位が O 原子か Si 原子かの違い) については更なる検討の余地があるが、今後、細胞内滞留性酵素活性蛍光プローブを分子設計する上でキサンテン環の共役鎖が切断されていることが重要という一つの指針を本研究で与えたといえる。

最後に、本研究の目的である 1 細胞レベルでの β-galactosidase 活性の検出を可能とした leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal をモデル化合物として用いて、本研究で提唱してきた分子設計に則った蛍光プローブが実用的なレポーターアッセイのツールになるか、マウス脳スライスの蛍光イメージングで検討した。

Protocol



10 μ M leuco-2-Me-
4'-CH₂F-Sirhod-
 β gal

10 min, r.t.

wash

NaOCl

10 min, r.t.



蛍光イメージング

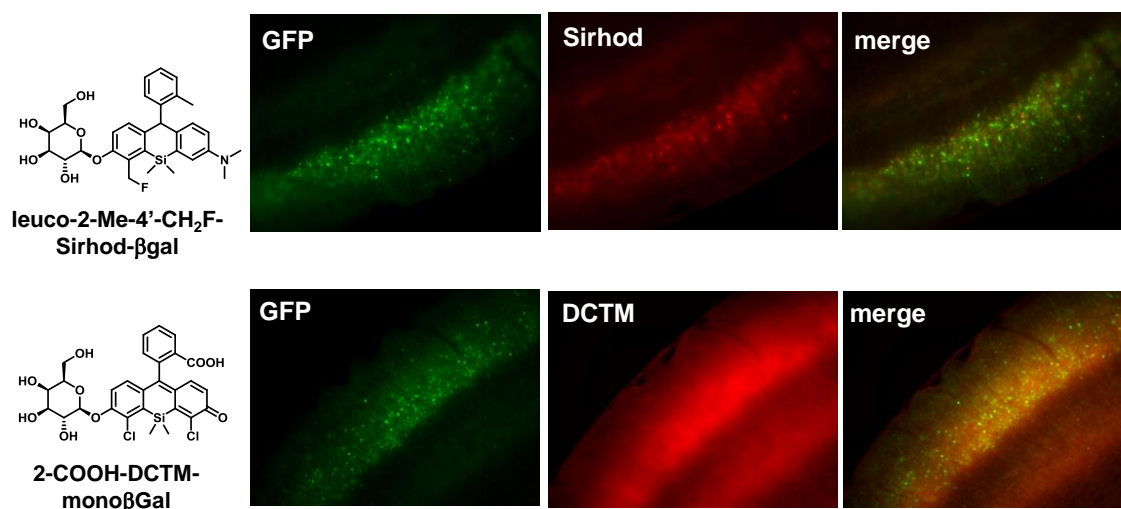


Figure 4-3-5. Fluorescence images of mouse brain slice incubated with 10 μ M leuco2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal (upper row) or 10 μ M 2-COOH-DCTM-mono β Gal (right) in PBS (pH 7.4) at room temperature for 10 min. For leuco2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal, 24 mM NaOCl was added afterward and incubated for another 10 minutes. Images were captured using a Keyence BZ-X700 fluorescence microscope. excitation filters were set at 470/40 nm (for GFP) and 560/40 nm (for probes). Emission filters were set at 525/50 nm (for GFP) and 630/75 nm (for probes).

その結果、leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal では GFP の緑色蛍光と対応する位置から 1 細胞レベルでの赤色蛍光が観測される一方で、コントロールとして用いたキノンメチド中間体を形成しない β -galactosidase 活性検出赤色蛍光プローブ 2-COOH-DCTM-mono β Gal²⁹ では視野全体から赤色蛍光が観測された (Figure 4-3-5)。このように leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal を用いて固定組織で GFP と併用可能かつ 1 細胞レベルでの酵素活性検出に成功したことから、本研究で提唱するキサンテン環の共役鎖が切断された分子設計を持つ赤色蛍光プローブは実用的なレポーターアッセイのツールになりうることを示唆された。

第四節 小括

本章では 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal で 1 細胞レベルでの酵素活性検出が出来なかった理由を検証するべく、先行研究で 1 細胞レベルでの酵素活性検出を達成した SPiDER-βGal ではキサンテン環の共役鎖が切断されていることに着目し、2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal を還元してその共役鎖を切断したモデル化合物 leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal を設計した。

モデル化合物 leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal は 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal と同様に、細胞膜を透過性して生細胞内のβ-galactosidase と反応し、*lacZ*(+)細胞と *lacZ*(-)細胞で赤色蛍光の上昇によりその活性の違いを可視化でき、また酵素反応生成物が細胞内滞留性を獲得しうる事が確認された。

そして、モデル化合物 leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal は GFP と併用可能であり、生細胞の 1 細胞レベルでの酵素活性検出を可能とした。

これらの結果より、キノンメチドケミストリーにより細胞内滞留性を持つ蛍光プローブを開発する為には、キサンテン環の共役鎖が切断された分子構造を持つことが重要だと推測された。

第五章

総括と今後の展望

私は本研究においてキサントゲン系色素のキサントゲン環 10 位の O 原子を Si 原子に置換することでその吸収・蛍光波長が長波長化する Si キサントゲン系色素に着目し、酵素反応に伴いキノンメチド中間体形成とそれに続く細胞内高分子の求核付加による共有結合形成を細胞内滞留性獲得の原理とした GFP と共染色可能かつ 1 細胞レベルで酵素活性検出可能な細胞内滞留性 β -galactosidase 活性検出赤色蛍光プローブの開発を目指した。

はじめに、先行研究で細胞内滞留性 β -galactosidase 活性検出黄色蛍光プローブとして機能することが報告されている SPiDER- β Gal のロドールを基本骨格として、このキサントゲン環 10 位の O 原子を Si 原子に置換し、励起波長シフトおよび分子内スピロ環化を蛍光制御原理とする Si-ロドール類を 3 種類開発し、その中で生理的条件下において高い吸収および赤色蛍光性を示す 2-Me Sirhod をプローブ開発の母核として選定した。

次に 2-Me Sirhod に酵素基質部位およびキノンメチド中間形成に必要な構造である CH_2F 基を導入した赤色蛍光プローブ 2-Me-4'- CH_2F -Sirhod- β gal を設計・合成した。In vitro での検討の結果、2-Me-4'- CH_2F -Sirhod- β gal は酵素の基質となって赤色蛍光が経時的に上昇し、当初の分子設計通り酵素反応に伴いキノンメチド中間体を形成して細胞内高分子と共有結合を形成しうることが示された。さらに、個別に培養された生細胞系においては酵素活性検出赤色蛍光プローブとして機能し、その酵素反応生成物は細胞内滞留性を持つことが示された。しかし、 β -galactosidase 活性の異なる細胞群が共存する系において蛍光イメージングで 1 細胞レベルの酵素活性検出を達成することはできなかった。

この原因が 2-Me-4'- CH_2F -Sirhod- β gal の酵素反応中間体の反応性の低さに起因すると考え、キサントゲン環 10 位に Si 原子が導入された赤色蛍光プローブにおいて 1 細胞レベルの酵素活性検出を可能とする分子設計を模索した。具体的には SPiDER- β Gal ではキサントゲン環の共役鎖が切断されていることに着目し、2-Me-4'- CH_2F -Sirhod- β gal を還元してその共役鎖を切断したモデル化合物 leuco-2-Me-4'- CH_2F -Sirhod- β gal を設計した。このモデル化合物は、酸化条件に付す必要はあるものの、2-Me-4'- CH_2F -Sirhod- β gal と同様に in vitro および生細胞系において酵素の基質とな

って赤色蛍光が上昇し、また酵素反応に伴いキノンメチド中間体を形成し、細胞内高分子と共有結合を形成して細胞内滞留性を獲得しうることが示された。さらに、2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal では達成できなかった、生細胞系における1細胞レベルでの酵素活性検出を達成した。これらの結果より、キノンメチドケミストリーを利用してβ-galactosidase 酵素活性を 1 細胞レベルで検出可能な赤色蛍光プローブを開発する上で「キサンテン環の共役鎖が切断されている分子設計」が重要であることが推測された。また、固定組織において GFP と併用可能で 1 細胞レベルで酵素活性を検出可能であることを示した。

今後の展望の一つとしては上述した分子設計法に則り、酸化条件を必要としない実用的な細胞内滞留性β-galactosidase 活性検出赤色蛍光プローブを開発することが挙げられる。本研究で提唱した分子設計法は端的には 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal と leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal の構造の違いに着目したものであり、他の構成要素については検討の余地があるといえる。具体的な展望としては、2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal のベンゼン環 2 位を methyl 基から carboxyl 基に置換した 2-COOH-4'-CH₂F-Sirhod-βgal の開発を考えている。このプローブを足掛かりとして、種々の置換基をベンゼン環 2 位に導入した誘導体を開発して、生細胞系で 1 細胞レベルの酵素活性検出が可能であるか確認し、本設計で提唱した分子設計法の真偽について検証する。また、これと同時にレーザーフラッシュフォトリシスによりキノンメチド中間体の生成速度、反応速度を測定することで 1 細胞レベルの酵素活性検出を達成する上で化学的パラメータを明らかにする。このように本研究で提唱した分子設計法を確立すれば、レポーターアッセイのツールとして個別の実験に最適化した機能を付与する(ex. 特定の細胞小器官への局在)ことが可能となり、またβ-galactosidase 以外の加水分解酵素へ検出対象を拡張することも期待される。

もう一つの展望としては本研究で見出したモデル化合物 leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal のさらなる応用が挙げられる。具体的には leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal は生細胞内では“β-galactosidase+活性酸素種”の二つの条件を認識して、初めてその赤色蛍光が上昇するこれまでに

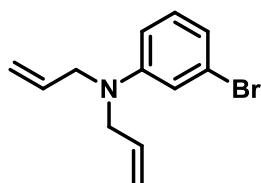
ない新たな条件認識能を持つ蛍光プローブと捉えることができる。この性質を利用して *lacZ* 遺伝子を導入した細胞群特異的に、細胞外刺激依存的に活性酸素種を産生する過程を検出するのに応用可能であると考えられる。

このように本研究を分子設計とアプリケーションの両側面において突き詰めることにより、生命科学の発展に寄与できるものへと展開していきたい。

合成項

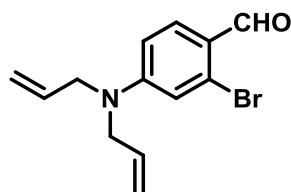
General Information.

All the reagents were purchased from Tokyo Kasei Co., Ltd. (Japan), Sigma Aldrich (MO, USA), or Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Japan). They were of the highest grade available, and were used without further purification. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra were recorded on a JEOL JNM-LA300 or JNM-LA400; δ values are given in ppm relative to tetramethylsilane. Mass spectra were recorded on a JEOL JMS-T100LC (ESI⁺). Silica gel column chromatography was performed using either silica gel 60 (Kanto Kagaku Co., Ltd), or Hi-FlashTM Column silica gel 40 μ m (Yamazen Co., Ltd) fitted on EPCLC-AI-580S (Yamazen Co., Ltd). Preparative HPLC purification was performed on a reverse-phase ODS column (GL Sciences, Inertsil ODS-3 30 mm *250 mm) fitted on a JASCO PU-1587 HPLC system, with a flow rate of 25 mL/min or a reverse-phase ODS column (GL Sciences, Inertsil ODS-3 10 mm*250 mm) fitted on a JASCO PU-2086 Plus HPLC system, with a flow rate of 5 mL/min. HPLC analyses were performed on a reverse-phase ODS column (GL Sciences, Inertsil ODS-3 4.6 mm*250 mm) using eluent A and eluent B specified below, fitted on a JASCO PU-2080 Plus system, with a flow rate of 1.0 mL/min. Recycling preparative HPLC was performed on JAIGEL-2H fitted on a LC-9210NEXT (Japan Analytical Industry Co., Ltd., Japan), with a flow rate of 4.5 mL/min.



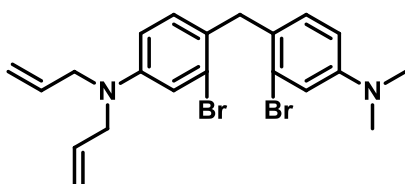
Compound 1

Compound 1 was synthesized according to the reported procedure with slight modifications.²⁰ 3-bromoaniline (4.0 mL, 37 mmol) and allyl bromide (11 mL, 131 mmol) was dissolved in MeCN (40 mL), followed by the addition of potassium carbonate (11 g, 80 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at 80 °C under Ar atmosphere. Then, the reaction mixture was cooled to room temperature and filtered through celite pad to remove insoluble solid. The organic solvent was evaporated and the resulting oil was purified by silica gel column chromatography (60 SiO₂, AcOEt : hexane = 2.5 : 97.5 to AcOEt : hexane = 10 : 90) to yield compound 1 (8.6 g, 93%) as a clear oil. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.89-3.90 (4H, m), 5.12-5.16 (2H, m), 5.19 (2H, m) 5.76-5.89 (2H, m), 6.57-6.61 (1H, m), 6.77-6.81 (2H, m), 7.03 (1H, t, *J* = 8.1 Hz)



Compound 2

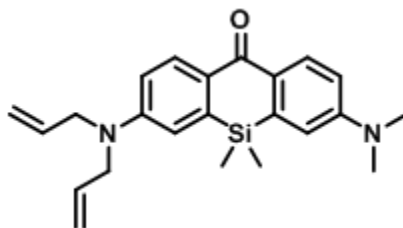
Compound 1 (1.0 g, 4.0 mmol) was dissolved in DMF (3 mL), followed by the addition of phosphoryl chloride (490 μ L, 5.2 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at ambient temperature under Ar atmosphere. Then, the reaction mixture was diluted in 2N NaOH aq., extracted with CH_2Cl_2 , and the solvent was evaporated. The resulting oil was diluted in AcOEt, washed sat. NH_4Cl aq. $\times 3$, dried over Na_2SO_4 , and evaporated, which was purified by EPCLC-AI-580S (Hi-FlashTM Column SiO_2 , CH_2Cl_2 :hexane = 67:33 to 100:0) to yield compound 2 (902 mg, 81%). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 3.98-3.99 (4H, m), 5.15-5.23 (4H, m), 5.81-5.85 (2H, m), 6.64 (1H, dd, $J = 8.8$ Hz, 2.2 Hz), 6.81 (1H, d, $J = 2.9$ Hz), 7.77 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 10.07 (1H, s) $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 52.7, 111.0, 115.2, 117.0, 122.4, 129.7, 131.1, 131.6, 153.5, 190.1



Compound 3

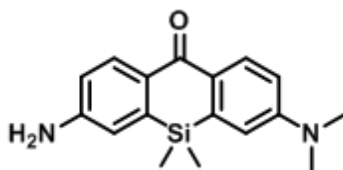
Compound 2 (3.6 g, 13 mmol) was dissolved in MeOH (15 mL) and sodium borohydride was added slowly. The reaction mixture was stirred at ambient temperature for two hours under Ar atmosphere. Then the reaction mixture was diluted in sat. NaHCO_3 aq., extracted with $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \times 2$, dried over Na_2SO_4 , and evaporated. The resulting oil (2.9 g, 10 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (30 mL). 3-bromo-*N,N*-dimethylaniline (1.4 mL, 10 mmol) and boron trifluoride ethyl ether complex (1.7 mL, 13 mmol) were added and stirred overnight at ambient temperature under Ar atmosphere. The reaction mixture was diluted in sat. NaHCO_3 aq., extracted with $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \times 2$, dried over Na_2SO_4 , and evaporated. The resulting residue was purified by EPCLC-AI-580S (Hi-FlashTM Column SiO_2 , CH_2Cl_2 : hexane = 0 : 100 to 50: 50) to yield compound 3 (3.2 g, 55%). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 2.91 (6H, s), 3.87 (4H, d, $J = 5.1$ Hz), 3.98 (2H, s), 5.16 (4H, dd, $J = 1.8, 13.6$ Hz), 5.78-5.87 (2H, m), 6.54 (1H, dd, $J = 8.8$ Hz, 2.9 Hz), 6.59 (1H, dd, $J = 8.8$ Hz, 2.9 Hz), 6.79 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 6.87 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 6.90 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 6.93 (1H, d, $J = 2.9$ Hz) $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 39.8, 40.5, 52.7, 111.6,

111.8, 115.9, 116.2, 116.2, 125.5, 125.6, 126.8, 127.0, 130.7, 130.8, 133.4, 148.1, 150.0



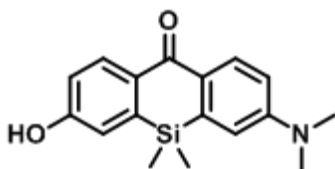
Compound 4

In a flame-dried three necked flask, compound 3 (3.3 g, 7.1 mmol) was dissolved in THF (15 mL) and stirred for 20 minutes at -78 °C under Ar atmosphere. *s*-BuLi (18 mL, 18 mmol) was added dropwise to the solution and the reaction mixture was stirred for 30 minutes at -78 °C under Ar atmosphere, followed by the addition of dichlorodimethylsilane (1.3 mL, 11 mmol). The reaction mixture was warmed to ambient temperature and stirred for two hours under Ar atmosphere, followed by the addition of 2N HCl aq. to quench the reaction. sat. NaHCO₃ aq. was added to neutralize the solution, which was then extracted with CH₂Cl₂ × 3, dried over Na₂SO₄, and evaporated. The resulting green oil was dissolved in acetone (30 mL) and cooled to 0 °C under Ar atmosphere. Potassium manganite (VII) was added at 0 °C and the reaction was monitored using TLC (SiO₂, CH₂Cl₂). After three hours and the addition of 3 equivalents of potassium manganite (VII) (3.4 g, 21 mmol), the reaction mixture was warmed to ambient temperature and stirred overnight., which was filtered through celite pad to remove insoluble solid. The organic solvent was evaporated and the resulting residue was purified by EPCLC-AI-580S (Hi-Flash™ Column SiO₂, AcOEt : CH₂Cl₂ = 0 : 100 to 10 : 90) to yield compound 4 (1.0 g, 38%) as a yellow solid. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.44 (6H, s), 3.10 (6H, s), 4.03 (4H, d, *J* = 5.1 Hz), 5.17-5.20 (2H, m), 5.23 (2H, br), 5.84-5.93 (2H, m), 6.77-6.85 (4H, m), 8.37 (2H, t, *J* = 9.5 Hz) ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ -1.1, 40.0, 52.7, 113.1, 113.4, 114.2, 114.7, 116.5, 129.7, 130.0, 131.6, 133.0, 140.4, 140.4, 150.1, 151.4, 185.1 HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 377.20491; found, 377.20176 (-3.15 mmu)



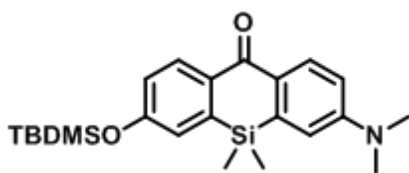
Compound 5

In a flame-dried Schlenk tube, compound 4 (1.0 g, 2.7 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (35 mL). After the addition of tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.31 g, 0.27 mmol) and 1,3-dimethylbarbituric acid (0.86 g, 5.4 mmol) under Ar atmosphere, the reaction mixture was stirred overnight at ambient temperature. Then, the reaction mixture was washed with sat. Na₂CO₃ × 3, dried over Na₂SO₄, and evaporated. The resulting residue was purified by EPCLC-AI-580S (Hi-Flash™ Column SiO₂, AcOEt : hexane = 45 : 55 to 67: 33) to yield compound 5 (790 mg, 99%). ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 0.42 (6H, s), 3.06 (6H, s), 6.74-6.89 (4H, m), 8.14 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 8.22 (1H, d, *J* = 8.8 Hz) ¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD) δ -1.2, 40.1, 114.1, 115.6, 116.6, 118.4, 129.9, 130.9, 132.5, 132.7, 142.2, 142.7, 153.1, 153.3, 187.5 HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 297.14231; found, 297.14250 (0.19 mmu)



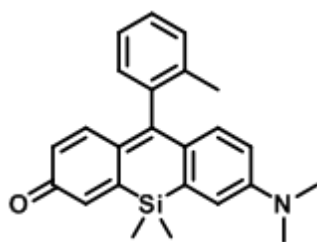
Compound 6

Compound 5 (258 mg, 0.87 mmol) was dissolved in a mixed solution of MeOH (10 mL) and 6N H₂SO₄ aq. (25 mL) and cooled to 0 °C under Ar atmosphere. Sodium nitrile (600 mg, 8.7 mmol) dissolved in H₂O (4 mL) was added dropwise and stirred at 0 °C for an hour under Ar atmosphere. Then, the reaction mixture was added dropwise to boiling 1N H₂SO₄ aq. (100 mL) and stirred for 10 minutes. After cooling to ambient temperature, the reaction mixture was extracted with CH₂Cl₂ × 4, washed with brine, dried over Na₂SO₄, and evaporated. The resulting residue was purified by EPCLC-AI-580S (Hi-Flash™ Column SiO₂, AcOEt : CH₂Cl₂ = 0 : 100 to 10: 90) to yield compound 6 (81 mg, 31%). ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 0.44 (6H, s), 3.09 (6H, s), 6.84-6.89 (2H, m), 6.93 (1H, dd, *J* = 8.8 Hz, 2.2 Hz), 7.06 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 8.21-8.26 (2H, m) ¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD) δ -1.3, 40.1, 114.2, 115.6, 118.2, 120.0, 129.6, 132.8, 133.0, 134.1, 142.3, 143.2, 153.5, 161.9, 187.6 HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 298.12633; found, 298.12254 (-3.79 mmu)



Compound 7

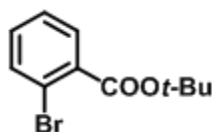
Compound 6 (76 mg, 0.26 mmol) and imidazole (173 mg, 2.6 mmol) were dissolved in CH₂Cl₂ (5 mL), followed by the addition of *tert*-butyldimethylchlorosilane (394 mg, 2.6 mmol). The reaction mixture was stirred at ambient temperature for three hours under Ar atmosphere, diluted in sat. NaHCO₃ aq., extracted with CH₂Cl₂ × 2, dried over Na₂SO₄, and evaporated. The resulting oil was roughly purified by EPCLC-AI-580S (Hi-Flash™ Column SiO₂, CH₂Cl₂ : hexane = 40 : 60 to 100: 0) and thoroughly purified with a recycling preparative HPLC (CHCl₃) to yield compound 7 (134 mg, quant) as yellow oil. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.26 (6H, s), 0.46 (6H, s), 1.01 (9H, s), 3.10 (6H, s), 6.78 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 6.84 (1H, dd, *J* = 9.5 Hz, 2.9 Hz), 6.98 (1H, dd, *J* = 8.8 Hz, 2.2 Hz), 7.04 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 8.37 (1H, d, *J* = 3.7 Hz), 8.40 (1H, d, *J* = 3.7 Hz) ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ -4.3, -1.3, 18.3, 25.6, 40.0, 113.2, 114.1, 121.6, 123.6, 129.1, 131.9, 134.9, 140.6, 141.1, 151.6, 158.3, 185.5
HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 412.21281; found, 412.20971 (-3.10 mmu)



Compound 8 (2-Me Sirhod)

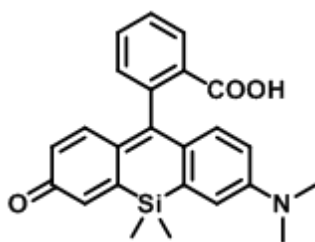
In a flame-dried three necked flask, 2-bromotoluene (84 μl, 0.70 mmol) was dissolved in THF (10 mL) and cooled to -78°C under Ar atmosphere. After 20 minutes, *s*-BuLi (0.70 mL, 0.70 mmol) was added dropwise and stirred at -78°C for 30 minutes under Ar atmosphere. Then, compound 7 (30 mg, 0.073 mmol) in THF (3 mL) was added dropwise and the reaction mixture was warmed to ambient temperature. After stirring for an hour under Ar atmosphere, 2N HCl aq. was added to quench the reaction, which was then extracted with CH₂Cl₂ × 5, dried over Na₂SO₄, and evaporated. The resulting purple gum was roughly purified by EPCLC-AI-580S (Hi-Flash™ Column SiO₂, MeOH : CH₂Cl₂ = 6 : 94 to 13: 87) and thoroughly purified with a recycling preparative HPLC (CHCl₃) to yield

compound **8** (19 mg, 0.051 mmol) as purple gum. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 0.47 (3H, s), 0.49 (3H, s), 1.62 (1H, br), 2.07 (3H, s), 3.09 (6H, s), 6.23 (1H, dd, $J = 10.0$ Hz, 2.2 Hz), 6.47 (1H, dd, $J = 9.3$ Hz, 2.9 Hz), 6.78 (1H, d, $J = 9.3$ Hz), 6.85 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 6.91 (1H, d, $J = 10.2$ Hz), 6.93 (1H, d, $J = 2.9$ Hz), 7.09 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.29-7.31 (2H, m), 7.34-7.36 (1H, m) $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ -0.3, 0.0, 20.3, 40.8, 113.2, 118.3, 126.5, 127.6, 128.8, 129.2, 130.2, 130.8, 136.4, 136.8, 137.0, 140.7, 141.9, 142.4, 147.7, 151.2, 158.5, 185.1 HRMS (ESI⁺): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 372.17837; found, 372.17465 (-3.72 mmu)



Compound **9**

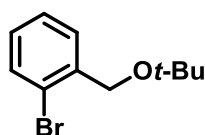
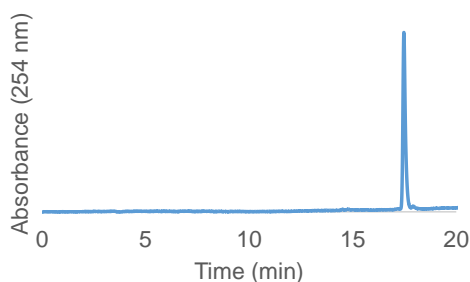
2-bromobenzoic acid (2.6 g, 13 mmol), *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide (2.8 g, 14 mmol), *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine (0.16 g, 1.3 mmol), and *t*-BuOH (3 mL) were dissolved in CH_2Cl_2 (50 mL) and stirred overnight at ambient temperature under Ar atmosphere. After filtration through celite pad to remove insoluble salts, the solvent was evaporated and the resulting oil was purified by EPCLC-AI-580S (Hi-FlashTM Column SiO_2 , CH_2Cl_2 : hexane = 0 : 100 to 100: 0) to yield compound **9** (2.5 g, 76%) as clear oil. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1.61 (9H, s), 7.26-7.34 (2H, m), 7.61-7.70 (2H, m) $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 28.1, 82.6, 121.0, 127.1, 130.8, 131.8, 134.1, 134.3, 165.7



Compound **10** (2-COOH Sirhod)

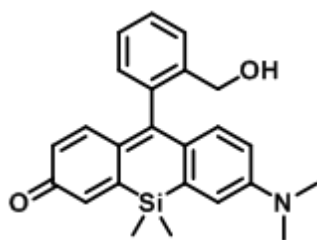
In a flame-dried three necked flask, compound **9** (198 mg, 0.77 mmol) was dissolved in THF (5 mL) and cooled to -78°C under Ar atmosphere. After 20 minutes, *s*-BuLi (0.70 mL, 0.70 mmol) was added dropwise and stirred at -78°C for 30 minutes under Ar atmosphere. Then, compound **7** (31 mg, 0.075 mmol) in THF (4 mL) was added dropwise and the reaction mixture was warmed to ambient temperature. After stirring for an hour under Ar atmosphere, 2N HCl aq. was added to quench the reaction and stirred for 30 minutes, which was then extracted with $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \times 5$, dried over Na_2SO_4 ,

and evaporated. The resulting purple gum dissolved in TFA (3 mL) and stirred at ambient temperature for 2 hours. The solvent was removed under reduced pressure and azeotoped with CH₂Cl₂. The resulting solid was roughly purified by EPCLC-AI-580S (Hi-Flash™ Column SiO₂, MeOH :CH₂Cl₂ = 0 : 100 to 100: 0) and purified by preparative reversed-phase HPLC; linear gradient from eluent A: eluent B = 80:20 to eluent A: eluent B = 0:100 in 20 minutes (eluent A 0.1% TFA; eluent B 0.1% TFA 80% acetonitrile). After lyophilization, compound 10 (5 mg, 17%) was obtained. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 0.58 (3H, s), 0.66 (3H, s), 3.09 (6H, s), 6.67 (1H, dd, *J* = 8.5 Hz, 2.7 Hz), 6.77 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 6.89-6.94 (2H, m), 7.15 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.33 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.39 (1H, s), 7.66 (1H, t, *J* = 7.3 Hz), 7.77 (1H, t, *J* = 7.6 Hz), 7.97 (1H, d, *J* = 7.3 Hz) HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 402.15254; found, 402.14804 (-4.50 mmu) HPLC analysis: detected in terms of absorbance at 254 nm using eluent A (0.1% TFA) and eluent B (0.1% TFA, 80% acetonitrile, 20% H₂O), A/B = 80/20→ 0/100 (20 min): *R*_t was 17.5 min.



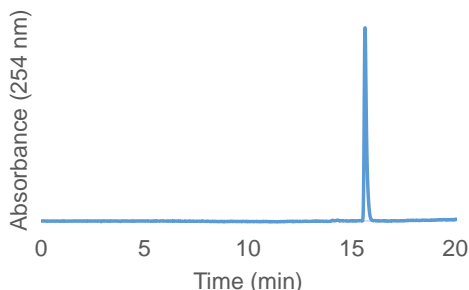
Compound 11

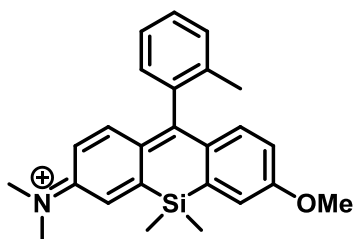
2-bromo-benzylalcohol (0.94 g, 5.0 mmol) was dissolved in cyclohexane (10 mL) /CH₂Cl₂ (50 mL). 2,2,2-trichloroacetimidate (0.99 mL, 5.5 mmol) and boron trifluoride ethyl ether complex (100 μL) were added and stirred overnight at ambient temperature under Ar atmosphere. The reaction mixture was diluted in sat. NaHCO₃ aq., extracted with CH₂Cl₂, dried over Na₂SO₄, and evaporated. The resulting oil was purified by EPCLC-AI-580S (Hi-Flash™ Column SiO₂, CH₂Cl₂ : hexane = 0 : 100 to 100: 0) to yield compound 11 (0.44 g, 37%) as clear oil. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.31 (9H, s), 4.50 (2H, s), 7.09-7.14 (1H, m), 7.28-7.33 (1H, m), 7.49-7.57 (2H, m) ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 27.6, 63.6, 73.8, 122.2, 127.3, 128.3, 128.9, 132.2, 139.1



Compound 12 (2-CH₂OH Sirhod)

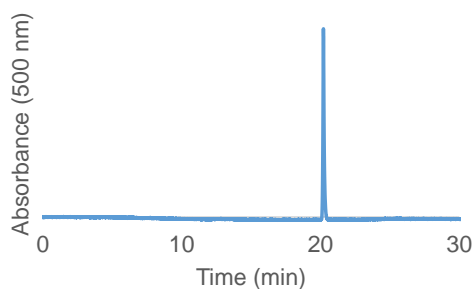
In a flame-dried three necked flask, compound 11 (200 mg, 0.83 mmol) was dissolved in THF (5 mL) and cooled to -78°C under Ar atmosphere. After 20 minutes, *s*-BuLi (0.80 mL, 0.80 mmol) was added dropwise and stirred at -78°C for 30 minutes under Ar atmosphere. Then, compound 7 (30 mg, 0.073 mmol) in THF (4 mL) was added dropwise and the reaction mixture was warmed to ambient temperature. After stirring for 2 hours under Ar atmosphere, 2N HCl aq. was added to quench the reaction and stirred for 30 minutes, which was then extracted with CH₂Cl₂ × 6, dried over Na₂SO₄, and evaporated. The resulting purple gum dissolved in TFA (4 mL)/ H₂O (1 mL) and stirred at ambient temperature for 2 days. The solvent was removed under reduced pressure and azeotoped with CH₂Cl₂. The resulting solid was roughly purified by EPCLC-AI-580S (Hi-Flash™ Column SiO₂, MeOH :CH₂Cl₂ = 7 : 93 to 15: 85) and purified by preparative reversed-phase HPLC; linear gradient from eluent A: eluent B = 80:20 to eluent A: eluent B = 0:100 in 20 minutes (eluent A 0.1% TFA; eluent B 0.1% TFA 80% acetonitrile). After lyophilization, compound 12 (13 mg, 46%) was obtained. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 0.53 (3H, s), 0.64 (3H, s), 3.19 (6H, s), 5.39 (2H, br), 6.71 (1H, dd, *J* = 8.8 Hz, 2.4 Hz), 6.89 (1H, d, *J* = 6.8 Hz), 7.08 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.23 (2H, d, *J* = 7.3 Hz), 7.33 (2H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.38 (1H, s), 7.59 (1H, d, *J* = 2.4 Hz) HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 388.17328; found, 388.17277 (-0.51 mmu) HPLC analysis: detected in terms of absorbance at 254 nm using eluent A (0.1% TFA) and eluent B (0.1% TFA, 80% acetonitrile, 20% H₂O), A/B = 80/20 → 0/100 (20 min): *R*_t was 15.6 min.

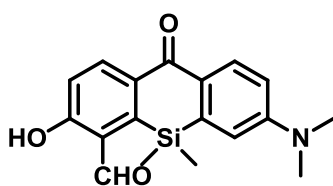




Compound **13** (2-Me Sirhod-OMe)

Compound **8** (0.6 mg, 0.0016 mmol) was dissolved in MeOH (2 mL) and sodium borohydride (13 mg, 0.34 mmol) was added. After stirring for one minutes at ambient temperature, sat. NH₄Cl aq. was added, followed by extraction with CH₂Cl₂ × 3 and evaporation under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in MeOH (1 mL)/ CH₂Cl₂ (1 mL) and TMS-diazomethane (0.3 mL, 0.6 mmol) was added dropwise to the solution. The reaction mixture was stirred at ambient temperature for an hour, and AcOH (250 μL) was added to quench the reaction. Then, the solvent was removed under reduced pressure. The resulting solid was dissolved in CH₂Cl₂, washed with sat. NaHCO₃ aq., and evaporated to yield crude compound. After thoroughly pumped up under reduced pressure, the crude compound and chlronail (6 mg) was dissolved in MeOH (1 mL) and stirred at ambient temperature for 15 minutes, followed by a purification with preparative reversed-phase HPLC; linear gradient from eluent A: eluent B = 50:50 to eluent A: eluent B = 0:100 in 20 minutes (eluent A 0.1% TFA; eluent B 0.1% TFA 80% acetonitrile). After lyophilization, compound **13** (0.2 mg, 25%) was obtained. ¹H-NMR (300 MHz, CD₃CN) δ 0.58 (3H, s), 0.59 (3H, s), 2.00 (3H, s), 3.38 (3H, s), 3.52 (3H, s), 3.91 (3H, s), 6.83-6.92 (2H, m), 7.08-7.21 (3H, m), 7.39-7.49 (5H, m) HRMS (ESI⁺): calcd for [M]⁺, 386.19402; found, 386.19568 (1.67 mmu) HPLC analysis: detected in terms of absorbance at 500 nm using eluent A (0.1% TFA) and eluent B (0.1% TFA, 80% acetonitrile, 20% H₂O), A/B = 80/20→0/100 (20 min): R_t was 20.2 min.

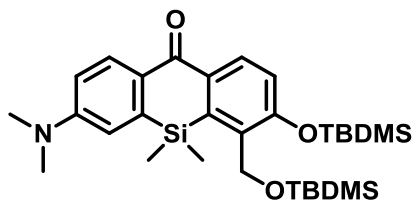




Compound 14

Compound 6 (0.41 g, 1.4 mmol) was dissolved in TFA (8 mL) and stirred for 5 hours at 90°C under Ar atmosphere. After cooled to ambient temperature, the reaction mixture was neutralized with sat. Na₂CO₃, extracted with CH₂Cl₂ × 3, dried over Na₂CO₃, and evaporated. The crude mixture was purified by EPCLC-AI-580S (Hi-Flash™ Column SiO₂, AcOEt :hexane = 23: 77) to yield compound 14 (39 mg, 8.8%).

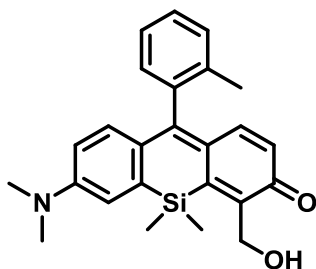
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.67 (6H, s), 3.14 (6H, s), 6.80 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 6.89 (1H, dd, *J* = 9.2 Hz, 2.6 Hz), 7.17 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 8.37 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 8.75 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 10.45 (1H, s), 12.25 (1H, s) ¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 1.6, 40.0, 113.6, 113.7, 120.2, 122.4, 127.4, 131.7, 134.5, 139.0, 139.6, 145.3, 152.1, 165.9, 184.0, 196.0



Compound 15

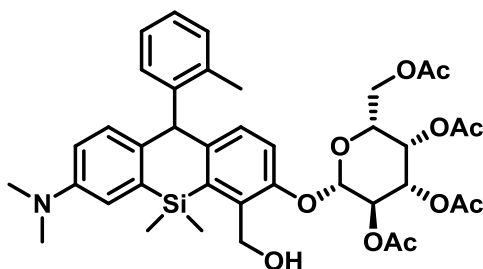
Compound 14 (39 mg, 0.12 mmol) was dissolved in MeOH (10 mL) and sodium borohydride (13 mg, 0.34 mmol) was added. After stirring for 30 minutes at ambient temperature under Ar atmosphere, sat. NH₄Cl aq. was added, followed by extraction with CH₂Cl₂ × 3 and evaporation under reduced pressure. The resulting solid was dissolved in CH₂Cl₂ (10 mL). Imidazole and *tert*-butyldimethylchlorosilane was added at 50°C and the reaction was monitored using TLC (SiO₂, CH₂Cl₂). After one day and the total addition of imidazole (0.17 g, 2.4 mmol) and *tert*-butyldimethylchlorosilane (0.38 g, 2.6 mmol), the disappearance of compound 14 was confirmed. The reaction mixture was cooled to ambient temperature, diluted in sat. NH₄Cl aq., extracted with CH₂Cl₂ × 3, dried over Na₂SO₄, and evaporated. The resulting oil was purified by EPCLC-AI-580S (Hi-Flash™ Column SiO₂, CH₂Cl₂) to yield compound 15 (27 mg, 41%). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.16 (6H, s), 0.28 (6H, s), 0.60 (6H, s), 0.90 (9H, s), 1.02 (9H, s), 3.10 (6H, s), 4.92 (2H, s), 6.80-6.83 (2H, m), 6.98 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 8.28

(1H, dd, $J = 8.8$ Hz, 1.5 Hz), 8.38 (1H, d, $J = 8.8$ Hz) ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ -4.7, -3.7, 0.6, 18.6, 18.6, 26.1, 26.2, 40.0, 59.2, 113.2, 113.8, 120.5, 128.8, 131.3, 131.5, 135.1, 136.3, 141.0, 143.2, 151.9, 156.2, 186.4 HRMS (ESI⁺): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 556.30985; found, 556.30757 (-2.28 mmu)



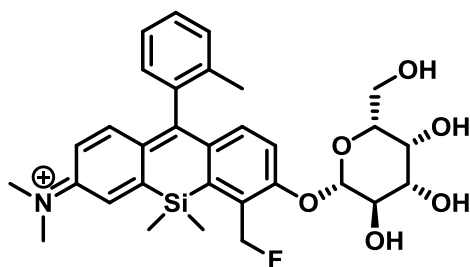
Compound **16** (2-Me-4'-CH₂OH-Sirhod)

In a flame-dried three necked flask, 2-bromotoluene (325 μl , 2.7 mmol) was dissolved in THF (6 mL) and cooled to -78°C under Ar atmosphere. After 30 minutes, *s*-BuLi (2.4 mL, 2.4 mmol) was added dropwise and stirred at -78°C for 30 minutes under Ar atmosphere. Then, compound **15** (147 mg, 0.27 mmol) in THF (9 mL) was added dropwise and the reaction mixture was warmed to ambient temperature. After stirring for an hour under Ar atmosphere, 2N HCl aq. was added and the reaction mixture was stirred at ambient temperature for two hours. The reaction mixture was extracted with $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \times 10$, dried over Na_2SO_4 , and evaporated. The resulting purple gum was purified by EPCLC-AI-580S (Hi-FlashTM Column SiO_2 , $\text{MeOH} : \text{CH}_2\text{Cl}_2 = 5 : 95$) to yield compound **16** (92 mg, 0.23 mmol, 85%). ^1H -NMR (300 MHz, CD_2Cl_2) δ 0.55 (3H, s), 0.55 (3H, s), 0.83 (1H, s), 1.97 (3H, s), 3.01 (6H, s), 4.62 (2H, s), 6.09 (1H, d, $J = 9.5$ Hz), 6.40 (1H, dd, $J = 8.8$ Hz, 2.9 Hz), 6.66 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 6.89-6.92 (2H, m), 7.00 (1H, d, $J = 7.3$ Hz), 7.23-7.30 (3H, m) ^{13}C -NMR (100 MHz, CD_2Cl_2) δ 0.8, 19.5, 25.8, 40.1, 63.5, 112.8, 117.8, 125.9, 125.9, 126.7, 128.0, 128.3, 129.6, 130.3, 136.0, 136.5, 140.8, 141.9, 142.8, 143.0, 145.7, 151.3, 160.7, 185.2 HRMS (ESI⁺): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 402.18893; found, 402.18740 (-1.53 mmu)



Compound 17

Compound 16 (35 mg, 0.087 mmol) was dissolved in MeOH (10 mL) and sodium borohydride (11 mg, 0.29 mmol) was added. After stirring for 10 minutes at ambient temperature, sat. NH_4Cl aq. was added, followed by extraction with $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \times 3$, drying over Na_2SO_4 , and evaporation under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in DMF (4 mL), followed by the addition of 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -galactopyranosyl bromide (42 mg, 0.10 mmol) and cesium carbonate (40 mg, 0.12 mmol). The reaction mixture was stirred at ambient temperature for one day under Ar atmosphere, and diluted in AcOEt. The organic layer was washed with sat. NH_4Cl aq. $\times 4$, dried over Na_2SO_4 , and evaporated under reduced pressure. The resulting crude compound was purified with preparative reversed-phase HPLC; linear gradient from eluent A: eluent B = 80:20 to eluent A: eluent B = 0:100 in 20 minutes (eluent A 0.1 M TEAA; eluent B 0.1M TEAA 80% acetonitrile). After lyophilization, compound 17 (5.4 mg, 8.5%) was obtained. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, acetone- d_6) δ 0.52-0.53 (3H, m), 0.70 (3H, m), 1.23 (1H, br s), 1.81 (2H, s), 1.89-1.90 (3H, m), 2.01-2.02 (3H, m), 2.10-2.11 (3H, m), 2.38-2.43 (3H, m), 2.87 (6H, s), 4.06-4.14 (2H, m), 4.32-4.33 (1H, m), 4.75-4.78 (2H, m), 5.20-5.36 (2H, m), 5.72-5.75 (1H, m), 6.66 (1H, dd, $J = 8.8$ Hz, 4.4 Hz), 6.89-7.08 (8H, m) (3H from acetyl moiety is missing due to the overlap with acetone- d_6 signal) HRMS (ESI $^+$): calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 734.29966; found, 734.29508 (-4.58 mmu)



Compound 18 (2-Me-4'- CH_2F -Sirhod- β gal)

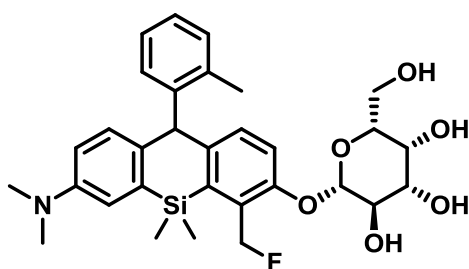
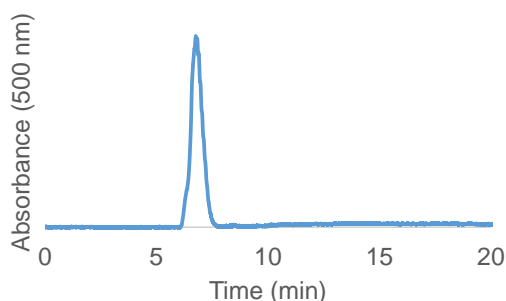
Compound 17 (5.4 mg, 0.0074 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (2 mL). Diethylaminosulfur trifluoride (5.0 μL , 0.037 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at ambient temperature for 11 hours under Ar atmosphere. After the addition of sat. NH_4Cl aq., the reaction mixture was extracted

with $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \times 3$, dried over Na_2SO_4 , and evaporated under reduced pressure. The resulting solid was dissolved in MeOH (3 mL) and cooled to 0°C . 28% NaOMe solution (5 μL) was added and the reaction mixture was stirred at 0°C for 30 minutes, followed by the addition of AcOH (2 μL) to neutralize the solution. The reaction mixture was diluted in brine, extracted with $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \times 3$, dried over Na_2SO_4 , and evaporated to yield crude red solid. The obtained crude product and chloranil (15 mg) was dissolved in MeOH (3 mL) and stirred at ambient temperature for 20 minutes. Then, the reaction was purified with preparative reversed-phase HPLC; linear gradient from eluent A: eluent B = 80:20 to eluent A: eluent B = 0:100 in 20 minutes (eluent A 0.1% AcOH; eluent B 0.1% AcOH 80% acetonitrile). The residue was loaded on a C-18 Sep-Pak cartridge, which was washed thoroughly with water to remove excess AcOH. MeOH was used as an eluent and the collected fraction was evaporated, followed by lyophilization to yield compound **18** (1.6 mg, 38%) as a red powder.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, acetone- d_6) δ 0.71-0.75 (6H, m), 3.60-3.63 (2H, m), 3.67 (3H, s), 3.75-3.77 (2H, m), 3.83 (3H, s), 3.91 (1H, t, $J = 8.5$ Hz), 3.97 (1H, d, $J = 3.4$ Hz), 5.07 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 5.76-5.88 (2H, m), 7.17-7.54 (8H, m), 7.85 (1H, d, $J = 2.4$ Hz) (3H from methyl moiety is missing due to the overlap with solvent signal)

HRMS (ESI $^+$): calcd for $[\text{M}]^+$, 566.23742; found, 566.23342 (-4.00 mmu)

HPLC analysis: detected in terms of absorbance at 500 nm using eluent A (0.1% AcOH) and eluent B (0.1% AcOH, 80% acetonitrile, 20% H_2O), A/B = 80/20 \rightarrow 0/100 (20 min); R_t was 6.8 min.



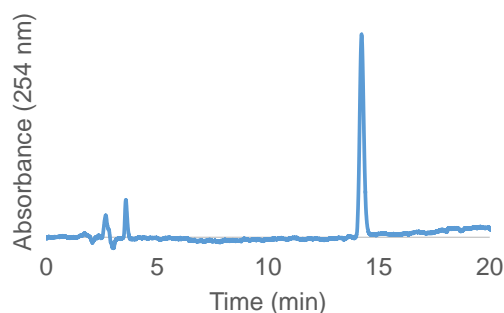
Compound 19 (leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal)

Compound 17 (4.0 mg, 0.0055mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (4 mL). Diethylaminosulfur trifluoride (5.0 μL, 0.037 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at ambient temperature for 3 hours under Ar atmosphere. After the addition of sat. NH₄Cl aq., the reaction mixture was extracted with CH₂Cl₂ × 3, dried over Na₂SO₄, and evaporated under reduced pressure. The resulting solid was dissolved in MeOH (3 mL) and cooled to 0°C. 28% NaOMe solution (5 μL) was added and the reaction mixture was stirred at 0°C for 30 minutes, followed by the addition of AcOH (2 μL) to neutralize the solution. The reaction mixture was diluted in brine, extracted with CH₂Cl₂ × 3, dried over Na₂SO₄, and evaporated to yield crude red solid. The obtained crude product was purified with preparative reversed-phase HPLC; linear gradient from eluent A: eluent B = 50:50 to eluent A: eluent B = 0:100 in 20 minutes (eluent A 0.1 M TEAA; eluent B 0.1M TEAA 80% acetonitrile), followed by lyophilization to yield compound 19 (4.0 mg, quant).

¹H-NMR (300 MHz, acetone-*d*₆) δ 0.56-0.57 (3H, m), 0.74-0.75 (3H, m), 2.44-2.47 (3H, m), 3.55-3.58 (6H, m), 3.72-4.06 (7H, m), 4.82-4.84 (1H, m), 5.62-5.96 (2H, m), 6.71-6.72 (1H, m), 6.92-6.99 (5H, m), 7.12-7.14 (1H, m), 7.20 (2H, m)

HRMS (ESI⁺): calcd for [M+H]⁺, 568.25307; found, 568.25247 (-0.59 mmu)

HPLC analysis: detected in terms of absorbance at 254 nm using eluent A (H₂O) and eluent B (80% acetonitrile, 20% H₂O), A/B = 50/50→0/100 (20 min): R_t was 14.2 min.



実験項

Materials and Instruments.

For SDS-PAGE assay, MULTIGEL® II mini 10/20 (17W) gel (414909) was purchased from Cosmo Bio Co. Ltd. (Tokyo, Japan). For Co-staining assay, CellTracker™ Green CMFDA Dye was purchased from Thermo Fisher Scientific (MA, USA). For cell culture, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM (High Glucose) with Phenol Red: 045-30285) and PBS (pH 7.4) was purchased from Wako Pure Chemical Industries. For cell assay, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM (1 ×) (21063-029)) was purchased from Thermo Fisher Scientific (MA, USA). For collagen coating of 35 mm glass bottom dish (D11130H, purchased from Matsunami Glass Ind., Ltd. (Osaka, Japan)), Cellmatrix Type I-C was purchased from Nitta Gelatin Co. Ltd. (Osaka, Japan). For cell lysate preparation, CellLytic M was purchased from Sigma-Aldrich Corporation (MO, USA). All the other reagents were purchased from Tokyo Kasei Co., Ltd. (Tokyo, Japan), Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan), or Sigma-Aldrich Corporation (MO, USA). They were of highest grade available, and were used as received. UV-visible spectra were obtained on a Shimadzu UV-1800 (Tokyo, Japan). Fluorescence spectra were obtained using a Hitachi F-7000 spectrometer (Tokyo, Japan). Absolute fluorescence quantum yields were measured on a Quantaaurus-QY C11347 from Hamamatsu Photonics K. K. (Shizuoka, Japan). For SDS-PAGE assay, gels were electrophoresed on myPowerII 500 AE-8155 (ATTO Corporation, Japan) and images were captured using Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan). LC-MS analyses were performed on a reverse -phase column from GL-Science and Inertsil ODS-3 2.1 mm × 250mm fitted on a Agilent Technologies 1260HPL system equipped with Agilent Technologies 6130 mass spectrometer (ESI⁺). Fluorescence imaging were performed either on Leica TCS SP5 from Leica Microsystems (Germany), Leica M165 FC from Leica Microsystems (Germany), or Keyence BZ-X700 fluorescence microscope (Osaka, Japan).

UV-Visible Absorption Spectral Measurements.

Unless otherwise stated, absorption spectra of the complexes were measured at 1 μM in 100 mM sodium phosphate buffer. Each sample contained less than 0.5 % DMSO as a cosolvent. All measurements were performed in a quartz cell at ambient temperature.

Fluorescence Spectral Measurements.

Unless otherwise stated, absorption spectra of the complexes were measured at 1 μM in 100 mM sodium phosphate buffer, with an excitation wavelength of 610 nm. Each sample contained less than 0.5 % DMSO as a cosolvent. All measurements were performed in a quartz cell at ambient temperature.

Fluorescence Quantum Yield Measurements.

The fluorescence quantum yields of the complexes were measured in 100 mM sodium phosphate buffer using a Quantaaurus-QY C11347 from Hamamatsu Photonics K. K. (Shizuoka, Japan). Unless otherwise stated, an excitation wavelength was set at 610 nm. The absorbance of each complex was kept lower than 0.05.

β -galactosidase Assay Using 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal in a Quartz Cell.

10 mM 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal stock solution in DMSO was diluted to a final concentration of 1 μ M in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). The solution was incubated for one minute and β -galactosidase (5 U/mL) was subsequently added to the solution. All the measurements were performed either at 37 °C or at ambient temperature in a quartz cell containing a total volume of 1 mL of the mixture. Fluorescence intensity at 630 nm (excitation wavelength: 610 nm) were measured at room temperature for 60 min. Absorption and fluorescent spectra (excitation wavelength: 610 nm) were measured at 37 °C. β -galactosidase was excluded from a negative control (gal (-)).

General Protocol for LC-MS analysis of β -galactosidase assay

LC-MS analyses were performed on a reverse γ -phase column from GL-Science and Inertsil ODS-3 2.1 mm \times 250mm fitted on a Agilent Technologies 1260HPL system equipped with Agilent Technologies 6130 mass spectrometer (ESI⁺) using eluent A (0.01 M ammonium formate in H₂O) and eluent B (0.01 M ammonium formate in 80% CH₃CN and 20% H₂O (v/v)) A/B = 95/5 \rightarrow 5/95 (0-10 min) \rightarrow 5/95(10-15 min)

Suicide Substrate Assay Using 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal in a Quartz Cell.

β -galactosidase (5 U/mL) in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) was incubated at 37 °C for 5 min before the measurement. Absorption at 610 nm was measured at 37 °C and 1 μ M 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal was added to the solution at the time points of 1 min and 60 min.

Cell Lines and Culture Conditions.

Human embryonic kidney HEK 293 cells were purchased from American Type Culture Collection (VA, USA). HEK-*lacZ* cells (HEK 293 cells stably expressing *lacZ*) were prepared by Dr. Mako Kamiya. HEK 293 and HEK-*lacZ* cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM High Glucose) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Biowest), 1% (v/v) penicillin streptomycin (Invitrogen) on 100 mm-diameter Petri dish (Thermo Fisher Scientific, 172931) in a humidified incubator containing 5% CO₂ gas at 37 °C.

General Methods for Preparation of Cell Lysate.

Cell lysate was prepared from HEK-*lacZ* cell (either treated with compounds or non-treated). Medium was removed and the cells were washed with 10 mL PBS. Then, the cell were diluted in CelLytic M (1 mL) and incubated for 15 minutes at ambient temperature. After centrifugation at 15,000 rpm for 15 minutes at 4°C, the precipitate was removed to yield cell lysate used in the following experiments.

General Protocol for SDS-PAGE.

Samples for SDS-PAGE were prepared by mixing 10 µL of either indicated concentration of bovine serum albumin or cell lysate with 10 µL of β-ME sample treatment for Tris SDS (423437, Cosmo Bio Co. Ltd. (Tokyo, Japan)). After incubation at 95°C for 5 minutes, 10 µL of samples were loaded on MULTIGEL® II mini 10/20 (17W) gel (41909, Cosmo Bio Co. Ltd. (Tokyo, Japan)). Gel electrophoresis was performed for 55 minutes at ambient temperature with variable current and voltage, whose upper limits be set to 30 mA and 500 V, respectively using Tris-glycine-SDS buffer as running buffer. Fluorescence measurements were performed on Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) under the following conditions. Excitation: 630 nm (LED), filter: 670 nm (long pass).

CBB Staining.

Immediately after electrophoresis, gels were immersed in Coomassie Brilliant Blue solution (1 g of Coomassie Brilliant Blue dissolved in 1 L 50% H₂O/ 40% MeOH/ 10% AcOH solution) until deep blue bands appeared on gels after which they were thoroughly washed in 50% H₂O/ 40% MeOH/ 10% AcOH solution to remove Coomassie Brilliant Blue solution.

Live Cell Fluorescence Imaging with 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal.

HEK 293 or HEK-*lacZ* cells were seeded on 35 mm glass bottom dishes (D11130H, Matsunami Glass Ind., Ltd.) and cultured for one day. Cells were washed with 1 mL PBS once and incubated for 30 minutes with 1 µM 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal in 1 mL DMEM (21063-029, Thermo Fisher Scientific) at 37°C. Fluorescence images were acquired with a Leica TCS SP5 using 40× objective lens. A white light laser at 600 nm was used for excitation and emission wavelengths were set at 610-660 nm.

Fluorescence Imaging of HEK 293/HEK-*lacZ* Coculture System with 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal.

HEK 293 cells were washed with 10 mL PBS and incubated for 30 minutes with 10 µM CellTracker™ Green CMFDA Dye in DMEM in 10 mL DMEM (21063-029, Thermo Fisher Scientific) at 37°C. After washing with 10 mL PBS once, the same volume of HEK 293 and HEK-*lacZ* cells (250 µL each) were seeded on 35 mm glass bottom dishes (D11130H, Matsunami Glass Ind., Ltd.) coated with

collagen and cultured for one day. Cells were washed with 1 mL PBS once and incubated for 30 minutes with 1 μ M 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal in 1 mL DMEM (21063-029, Thermo Fisher Scientific) at 37°C. After washing with 10 mL PBS once, fluorescence images were acquired with a Leica TCS SP5 using 40 \times objective lens. A white light laser at 495 nm/600 nm was used for excitation and emission wavelengths were set at 505-555 nm/610-660 nm.

Fluorescence Imaging of Cellular Localization.

HEK-*lacZ* cells were seeded on 35 mm glass bottom dishes (D11130H, Matsunami Glass Ind., Ltd.) and cultured for one day. Cells were washed with 1 mL PBS once and incubated for 30 minutes with either 50 nM LysoTracker[®] Green DND-26 or MitoTracker[®] Green FM in 1 mL DMEM (21063-029, Thermo Fisher Scientific) at 37°C. After washing with 1 mL PBS once, cell were incubated with 1 μ M 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal in 1 mL DMEM (21063-029, Thermo Fisher Scientific) at 37°C. Fluorescence images were acquired with a Leica TCS SP5 using 40 \times objective lens. A white light laser at 495 nm/600 nm was used for excitation and emission wavelengths were set at 505-555 nm/610-660 nm.

Preparation of Mice Brain Slices. (prepared by Dr. Shinji Tanaka at Graduate School of Medicine, The University of Tokyo (Prof. Shigeo Okabe Lab))

Expression plasmids for *lacZ* and GFP were transfected into pyramidal neurons in the cerebral cortex using in utero electroporation. Approximately 1 μ l of DNA solution [a mixture of *lacZ* plasmid (1 μ g/ μ l) and GFP plasmid (1 μ g/ μ l)] was pressure-injected into the lateral ventricle of E14.5 ICR embryos through a pulled-glass micropipette. The head of each embryo was placed between tweezer-type electrodes. Square electric pulses (33 V, 50 ms) were passed four times at 1 Hz using an electroporator (NEPA Gene). Either 2 or 10 weeks after birth, mice were anesthetized and perfused with 4% paraformaldehyde via left ventricle of the heart. The brain was excised and continuously immersed in 4% paraformaldehyde for 1h. Then, the brains were sliced with a 100 μ m thick by vibratome (Dosaka EM).

Fluorescence Imaging of Mice Brain Slices with 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal.

Mice brain slices were incubated with 10 μ M 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal in 250 μ L PBS (pH 7.4) at ambient temperature for 20 minutes. After washing with 1 mL PBS, fluorescence images were acquired with a Leica TCS SP5 using 10 \times objective lens and Leica M165 FC. For a Leica TCS SP5, white light lasers at 495 nm (for GFP) and 594 nm (2-Me-4'-CH₂F-Sirhod- β gal) for was used for

excitation and emission wavelengths were set at 505-580 nm (for GFP) and 620-700 nm (for 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal). For Leica M165 FC, HBO 103W/2 mercury short arc lamp was equipped for excitation source and filters were set as follows. Excitation: 460-500 nm (for GFP) and 540-580 nm (for 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal). Emission: 510 nm long pass (for GFP) and 610 nm (for 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal). As for the negative control, DMSO was added to mice brain slices instead of 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal.

β-galactosidase Assay Using leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal in a Quartz Cell.

18 mM 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal stock solution in DMSO was diluted to a final concentration of 12 μM in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). The solution was incubated for 30 minutes with β-galactosidase (1.7 U/mL) and subsequently put under oxidation conditions (either 8.8 mM H₂O₂ or 1 mg/mL chloranil) for 60 minutes. All the measurements were performed at ambient temperature in a quartz cell containing a total volume of 3 mL of the mixture. Absorption and fluorescent spectra (excitation wavelength: 610 nm) were measured at 37 °C. β-galactosidase was excluded from a negative control (gal (-)).

Live Cell Fluorescence Imaging with leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal.

HEK 293 or HEK-*lacZ* cells were seeded on 35 mm glass bottom dishes (D11130H, Matsunami Glass Ind., Ltd.) coated with collagen and cultured for one day. Cells were washed with 1 mL PBS once and incubated for 30 minutes with 1 μM leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal in 1 mL DMEM (21063-029, Thermo Fisher Scientific) at 37°C. After washing with 1 mL PBS once and adding an oxidant (either 18 mM H₂O₂, 24 mM NaOCl or 18 mM H₂O₂+ a portion of Fe(ClO₄)₂) or oxidation condition (10 minutes UV irradiation), fluorescence images were acquired with a Leica TCS SP5 using 40× objective lens. A white light laser at 600 nm was used for excitation and emission wavelengths were set at 610-660 nm.

Fluorescence Imaging of HEK 293/HEK-*lacZ* Coculture System with leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal.

HEK 293 cells were washed with 10 mL PBS and incubated for 30 minutes with 1 μM CellTracker™ Green CMFDA Dye in DMEM in 10 mL DMEM (21063-029, Thermo Fisher Scientific) at 37°C. After washing with 10 mL PBS once, the same volume of HEK 293 and HEK-*lacZ* cells (250 μL each) were seeded on 35 mm glass bottom dishes (D11130H, Matsunami Glass Ind., Ltd.) coated with collagen and cultured for one day. Cells were washed with 1 mL PBS once and incubated for 30 minutes with 10 μM 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal in 1 mL DMEM (21063-029, Thermo Fisher Scientific) at 37°C. After washing with 10 mL PBS once, fluorescence images were acquired with a Leica TCS SP5 using 40× objective lens. A white light laser at 495 nm/600 nm was used for excitation

and emission wavelengths were set at 505-555 nm/610-660 nm.

Fluorescence Imaging of Mice Brain Slices with leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal.

Mice brain slices were incubated with 10 μM leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal in 1 mL PBS (pH 7.4) at ambient temperature for 10 minutes. After washing with 1 mL PBS, mice brain slice was diluted in 1 mL PBS and 24 mM NaOCl was added. After 10 minutes incubation at ambient temperature, fluorescence images were acquired with a Keyence BZ-X700 fluorescence microscope (Osaka, Japan) equipped with a monochrome cooled CCD camera for high-sensitivity, and an objective lens (CFI Plan Fluor DL 10x/NA 0.3) and Leica M165 FC. For a Keyence BZ-X700 fluorescence microscope, excitation filters were set at 470/40 nm (for GFP) and 560/40 nm (for leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal). Emission filters were set at 525/50 nm (for GFP) and 630/75 nm (for leuco-2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal). For Leica M165 FC, HBO 103W/2 mercury short arc lamp was equipped for excitation source and filters were set as follows. Excitation: 460-500 nm (for GFP) and 540-580 nm (for 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal). Emission: 510 nm long pass (for GFP) and 610 nm (for 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal). As for a negative control, DMSO was added to mice brain slices instead of 2-Me-4'-CH₂F-Sirhod-βgal. Another negative control experiment was performed by incubating mice brain slices with 10 μM 2-COOH-DCTM-monoβgal in 1 mL PBS (pH 7.4) for 10 minutes at ambient temperature and subsequently washing the samples with 1mL PBS (pH 7.4).

参考文献

- (1) Ito, K.; Okada, R.; Tanaka, N.; Awasaki, T., Cautionary observations on preparing and interpreting brain images using molecular biology-based staining techniques. *Microscopy Research and Technique* **2003**, *62* (2), 170-186.
- (2) Feng, G.; Mellor, R.; Bernstein, M.; Keller-Peck, C.; Nguyen, Q.; Wallace, M.; Nerbonne, J.; Lichtman, J.; Sanes, J., Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* **2000**, *28* (1), 41-51.
- (3) Jiang, T.; Xing, B.; Rao, J.; Harding, S.; Tombs, M., Recent Developments of Biological Reporter Technology for Detecting Gene Expression. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, Vol 25* **2008**, *25*, 41-75.
- (4) Juers, D.; Matthews, B.; Huber, R., LacZ beta-galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Science* **2012**, *21* (12), 1792-1807.
- (5) Kamiya, M.; Asanuma, D.; Kuranaga, E.; Takeishi, A.; Sakabe, M.; Miura, M.; Nagano, T.; Urano, Y., beta-Galactosidase Fluorescence Probe with Improved Cellular Accumulation Based on a Spirocyclized Rhodol Scaffold. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (33), 12960-12963.
- (6) Strachan, R.; Wood, J.; Hirschmann, R., Synthesis and Properties of 4-Methyl-2-oxo-1,2-benzopyran-7-yl Beta-D-galactoside (Galactoside of 4-Methylumbelliferone). *Journal of Organic Chemistry* **1962**, *27* (3), 1074-1075.
- (7) Rotman, B.; Edelstein, M.; Zderic, J., Fluorogenic Substrates for Beta-D-galactosidases and Phosphatases Derived from Fluorescein (3,6-Dihydroxyfluorand) and Its Monomethyl Ether. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1963**, *50* (1), 1-6.

- (8) Urano, Y.; Kamiya, M.; Kanda, K.; Ueno, T.; Hirose, K.; Nagano, T., Evolution of fluorescein as a platform for finely tunable fluorescence probes. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (13), 4888-4894.
- (9) Tung, C.; Zeng, Q.; Shah, K.; Kim, D.; Schellingerhout, D.; Weissleder, R., In vivo imaging of beta-galactosidase activity using far red fluorescent switch. *Cancer Research* **2004**, *64* (5), 1579-1583.
- (10) Kwan, D.; Chen, H.; Ratananikom, K.; Hancock, S.; Watanabe, Y.; Kongsaree, P.; Samuels, A.; Withers, S., Self-Immobilizing Fluorogenic Imaging Agents of Enzyme Activity. *Angewandte Chemie-International Edition* **2011**, *50* (1), 300-303.
- (11) Mahou, P.; Zimmerley, M.; Loulier, K.; Matho, K.; Labroille, G.; Morin, X.; Supatto, W.; Livet, J.; Debarre, D.; Beaurepaire, E., Multicolor two-photon tissue imaging by wavelength mixing. *Nature Methods* **2012**, *9* (8), 815-818.
- (12) Day, R.; Davidson, M., The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chemical Society Reviews* **2009**, *38* (10), 2887-2921.
- (13) Tang, J.; Rudolph, S.; Dhande, O.; Abaira, V.; Choi, S.; Lapan, S.; Drew, I.; Drokhyansky, E.; Huberman, A.; Regehr, W.; Cepko, C., Cell type-specific manipulation with GFP-dependent Cre recombinase. *Nature Neuroscience* **2015**, *18* (9), 1334-1341.
- (14) Zhou, J.; Lin, J.; Zhou, C.; Deng, X.; Xia, B., Cytotoxicity of red fluorescent protein DsRed is associated with the suppression of Bcl-xL translation. *Febs Letters* **2011**, *585* (5), 821-827.
- (15) Viswanathan, S.; Williams, M.; Bloss, E.; Stasevich, T.; Speer, C.; Nern, A.; Pfeiffer, B.; Hooks, B.; Li, W.; English, B.; Tian, T.; Henry, G.; Macklin, J.; Patel, R.; Gerfen, C.; Zhuang, X.; Wang, Y.; Rubin, G.; Looger, L., High-performance probes for light and electron microscopy. *Nature Methods* **2015**, *12* (6), 568-576.
- (16) Strack, R.; Strongin, D.; Bhattacharyya, D.; Tao, W.; Berman, A.; Broxmeyer, H.; Keenan, R.; Glick, B., A noncytotoxic DsRed variant for whole-cell labeling. *Nature Methods* **2008**, *5* (11), 955-

957.

(17) Lichtman, J.; Denk, W., The Big and the Small: Challenges of Imaging the Brain's Circuits. *Science* **2011**, *334* (6056), 618-623.

(18) Schilling, K.; Luk, D.; Morgan, J.; Curran, T., Regulation of a Fos-lacZ Fusion Gene - A Paradigm for Quantitative-analysis of Stimulus Transcription Coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1991**, *88* (13), 5665-5669.

(19) 国立大学法人 東京大学. 酵素特異的な細胞内滞留性蛍光化合物. WO2015174460 A1. 2015-05-13

(20) Egawa, T.; Koide, Y.; Hanaoka, K.; Komatsu, T.; Terai, T.; Nagano, T., Development of a fluorescein analogue, TokyoMagenta, as a novel scaffold for fluorescence probes in red region. *Chemical Communications* **2011**, *47* (14), 4162-4164.

(21) 鏡味優 博士論文 (東京大学大学院薬学系研究科 薬品代謝化学教室) 2016

(22) Modica, E.; Zanaletti, R.; Freccero, M.; Mella, M., Alkylation of amino acids and glutathione in water by o-quinone methide. Reactivity and selectivity. *Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66*(1), 41-52.

(23) Weinert, E.; Dondi, R.; Colloredo-Melz, S.; Frankenfield, K.; Mitchell, C.; Freccero, M.; Rokita, S., Substituents on quinone methides strongly modulate formation and stability of their nucleophilic adducts. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (36), 11940-11947.

(24) Toteva, M.; Richard, J., The generation and reactions of quinone methides. *Advances in Physical Organic Chemistry, Vol 45* **2011**, *45*, 39-91.

(25) de Groot, F.; Loos, W.; Koekkoek, R.; van Berkomp, L.; Busscher, G.; Seelen, A.; Albrecht, C.; de Bruijn, P.; Scheeren, H., Elongated multiple electronic cascade and cyclization spacer systems in activatable anticancer prodrugs for enhanced drug release. *Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66* (26), 8815-8830.

- (26) Alouane, A.; Labruere, R.; Le Saux, T.; Schmidt, F.; Jullien, L., Self-Immolative Spacers: Kinetic Aspects, Structure-Property Relationships, and Applications. *Angewandte Chemie-International Edition* **2015**, *54* (26), 7492-7509.
- (27) 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. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129* (23), 7313-7318.
- (28) Uno, S.; Kamiya, M.; Yoshihara, T.; Sugawara, K.; Okabe, K.; Tarhan, M.; Fujita, H.; Funatsu, T.; Okada, Y.; Tobita, S.; Urano, Y., A spontaneously blinking fluorophore based on intramolecular spirocyclization for live-cell super-resolution imaging. *Nature Chemistry* **2014**, *6* (8), 681-689.
- (29) Hirabayashi, K.; Hanaoka, K.; Takayanagi, T.; Toki, Y.; Egawa, T.; Kamiya, M.; Komatsu, T.; Ueno, T.; Terai, T.; Yoshida, K.; Uchiyama, M.; Nagano, T.; Urano, Y., Analysis of Chemical Equilibrium of Silicon-Substituted Fluorescein and Its Application to Develop a Scaffold for Red Fluorescent Probes. *Analytical Chemistry* **2015**, *87* (17), 9061-9069.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導ならびにご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・浦野泰照教授、並びに長野哲雄名誉教授に深く感謝申し上げます。

直接御指導頂きました東京大学大学院医学系研究科生体情報学教室・神谷真子講師に深く感謝致します。並びに貴重な御助言を賜りました花岡健二郎准教授、上野匡助教、寺井琢也助教、小松徹助教に深く感謝申し上げます。

マウス脳スライス実験においては、東京大学大学院医学系研究科神経細胞生物学分野の岡部繁男教授、ならびに田中慎二助教に大変お世話になりました。実験サンプルをご提供いただき、実験データに関して適切なお助言をくださいましたこと深く感謝致します。

また、東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室の三浦正幸教授、山口良文助教ならびに基礎生物学研究所の野田昌晴教授、檜山武史助教には開発した蛍光プローブの適用可能な実験系を検討する上で大変お世話になり、深く感謝致します。

研究者としてのあるべき姿を示してくださいました薬品代謝化学教室の先輩方、苦しいときも絶えず励ましあってきた同期の皆様、私の研究生活に刺激を与えてくださった後輩の皆様に深く感謝致します。最後に、長い学生生活を支え温かく見守ってくれた家族、ならびに励ましつづけてくれた多くの友人に心より感謝致します。

2016年3月

東京大学大学院薬学系研究科

薬品代謝化学教室

伊藤 央樹