

博士論文

論文題目

非対称Siローダミン蛍光色素群の開発と
レシオ型pH感受性蛍光プローブへの応用

氏 名 鏡 味 優

内容

第一章 序論.....	1
第一節 蛍光イメージング法.....	2
第二節 蛍光プローブ.....	3
第三節 近赤外蛍光イメージング法.....	5
第四節 Si ロードミン蛍光色素.....	7
第二章 非対称 SiR 合成法の開発.....	8
第一節 非対称 SiR の分子設計.....	9
第二節 非対称メチレンビスアニリン類の高効率合成法の開発.....	15
第三節 メチレンビスアニリン合成法の汎用性の検討.....	20
第四節 非対称 SiR ライブラリーの構築と光学特性の精査.....	24
第五節 非対称 SiR の蛍光イメージングへの応用.....	27
第六節 小括.....	34
第三章 非対称 SiR を母核とした新規レシオ型 pH プローブの開発.....	35
第一節 ピペラジン環を有する非対称 SiR の光学特性.....	36
第二節 ピペラジン環を有するロードミンとの比較.....	41
第三節 新規近赤外蛍光性レシオ型 pH プローブの開発.....	42
第四節 酸性の pK_a を有するレシオ型 pH プローブの開発.....	46
第五節 生体高分子標識用 pH プローブの開発.....	49
第六節 pH プローブ標識デキストランを用いたリソソームの pH イメージング.....	58
第七節 トランスフェリンの輸送過程の pH イメージング.....	64
第八節 レシオ型 pH プローブの吸収変化メカニズムについての考察.....	69
第九節 小括.....	73
第四章 総括と展望.....	74
第一節 総括.....	75
第二節 今後の展望.....	76
第五章 実験、合成の部.....	80
参考文献.....	120

第一章 序論

第一節 蛍光イメージング法

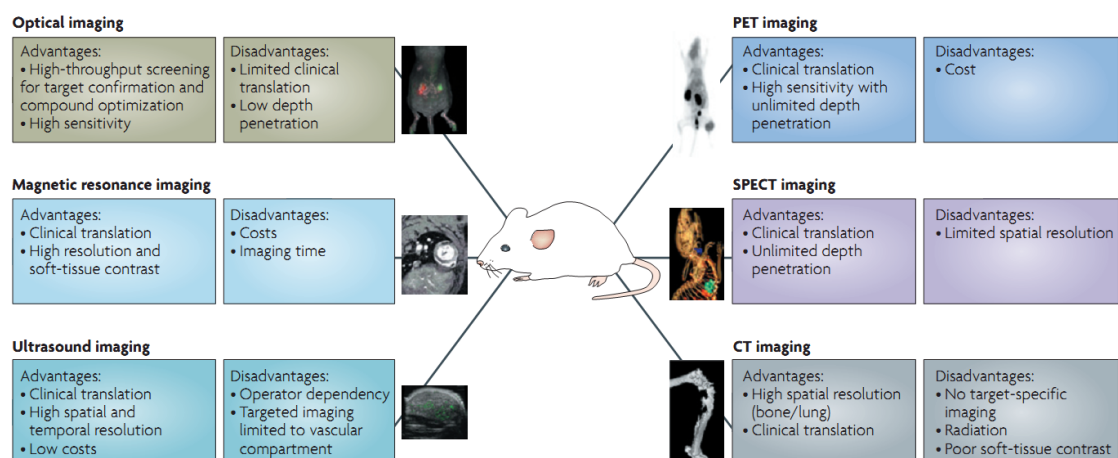


Figure 1-1-1. A summary of modalities used for molecular imaging¹.

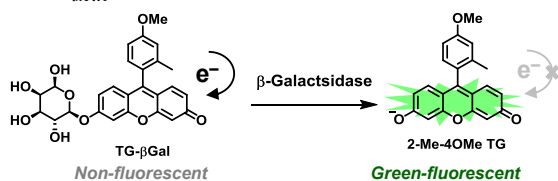
疾患の治療法を開発するためには、疾患時に生体内で起きている現象を分子レベルで理解することが重要である。そのため、近年は生体内の分子の挙動を観察できる「分子イメージング技術」に注目が集まっており、核磁気共鳴イメージング法、超音波イメージング法、X線CTイメージング法、蛍光イメージング法などの様々な分子イメージング技術が大きな発展を遂げてきた(Figure 1-1-1)¹。

分子イメージング技術の1つである「蛍光イメージング法」は、侵襲性が低く、検出感度と時間分解能が高い「光」を用いて生体分子を見る手法である。そのため、本手法は生体組織中に比較的low濃度で存在する分子の動的な観測に適している。蛍光イメージング法は、生命現象の解明を目指す細胞生物学研究や、疾患の診断や治療を目的とした医療現場において利用されている。

第二節 蛍光プローブ

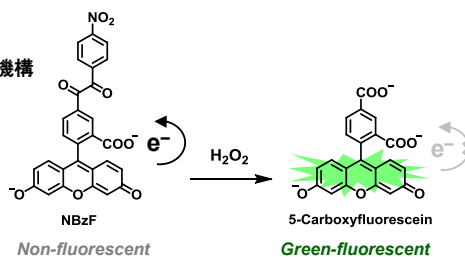
(a) 光誘起電子移動 (PeT) 反応を利用した蛍光プローブ

a-PeT機構



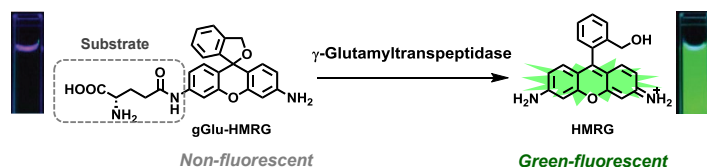
J. Am. Chem. Soc., 2005, 127, 4888–4894.

d-PeT機構

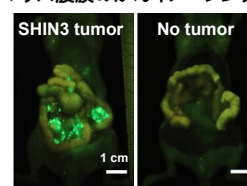


J. Am. Chem. Soc., 2011, 133, 10629–10637.

(b) スピロ環化反応を利用した蛍光プローブ



マウス腹膜のがんイメージング



Sci. Transl. Med., 2011, 3, 110–119.

Figure 1-2-1. Molecular design of PeT-based and spirocyclization-based fluorescence probes.

生きたままの細胞内で起きている化学反応を可視化することは、生命現象を分子レベルで理解するために非常に重要である。そのため、特定の生体分子との特異的な化学反応により無蛍光性から蛍光性へと変化し、生細胞内の生体分子を蛍光検出できる機能性有機小分子「蛍光プローブ」は、蛍光イメージング法において強力なツールとなっている。さらに近年では、蛍光プローブを利用してがん細胞に特異的な酵素活性を可視化し、微小ながんを術中に可視化するなど、蛍光プローブは細胞生物学における基礎研究ツールに留まらず、医療への応用も進められている²。

これまで、蛍光色素を無蛍光性にするための蛍光制御原理である「光誘起電子移動 (Photoinduced electron transfer; PeT)」や「スピロ環化反応」が見出され、フルオレセインやローダミンといった緑色蛍光色素にそれらを適応することで、様々な生体分子を標的とした緑色蛍光プローブが開発され、生命現象の解明を目指した基礎研究や医療への応用を目指した研究に応用されてきた。

光誘起電子移動を利用した蛍光プローブでは、励起状態において電子豊富なベンゼン環部位から蛍光団への電子移動(a-PeT)、もしくは励起された蛍光団から電子不足なベンゼン環への電子移動(d-PeT)を生じることで、蛍光放射過程よりも無輻射失活過程が優先し、蛍光色素が無蛍光性になることを利用している(Figure 1-2-1a)。本蛍光制御原理を用いるには、

電子ドナー部位の HOMO エネルギーレベルおよび電子アクセプター部位の LUMO エネルギーレベルを精密に制御する必要がある。例えば、 β -ガラクトシダーゼプローブ TG- β Gal は、蛍光団のグリコシド結合の切断とフェノレートアニオンの生成に伴う LUMO エネルギーレベルの上昇により、電子豊富なメトキシベンゼン環部位からの電子移動による消光が解除されて蛍光性となる。また、 H_2O_2 プローブ NBzF は、LUMO エネルギーレベルの低いニトロベンジル基が過酸化水素と反応して脱離することで、蛍光団からの電子移動が抑制されて蛍光性となる。

また、スピロ環化反応を利用した γ -glutamyltranspeptidase 活性検出プローブ gGlu-HMRG は、キサントレン環のアミノ基がアミド化されることで蛍光団の LUMO エネルギーレベルが低下して、可視領域に吸収を持たず、無蛍光性のスピロ環化体となる (Figure 1-2-1b)。一方でアミド結合が酵素により加水分解されることでスピロ環が開環し、蛍光性の HMRG が生成する仕組みとなっている。

以上のように、化学修飾により蛍光団や生体分子反応性基の HOMO・LUMO エネルギーレベルを制御することで、様々な蛍光プローブの論理的な開発が行われてきた。

第三節 近赤外蛍光イメージング法

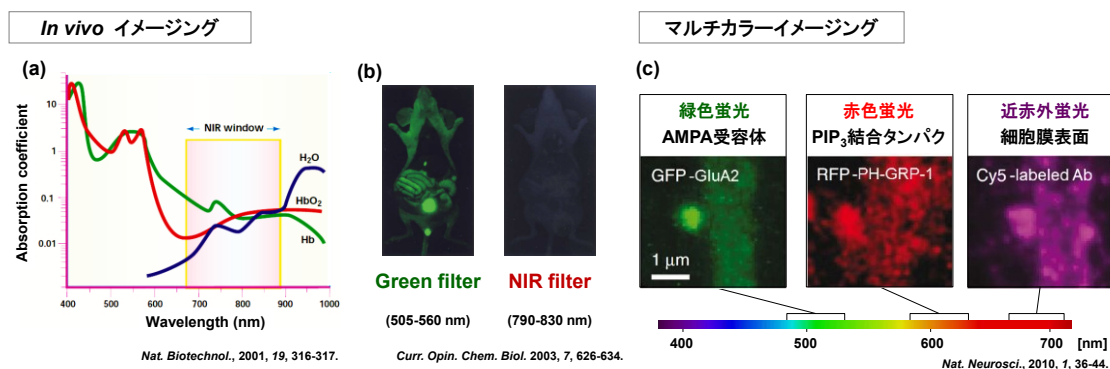


Figure 1-3-1. Advantages of near-infrared (NIR) imaging.

近年、蛍光イメージング法の中でも近赤外蛍光イメージング法が注目されている。光の波長が 650 nm から 900 nm の近赤外領域は、生体分子による光の吸収が小さいため緑色領域と比べて光の組織透過性が高く (Figure 1-3-1a)³、また、ヘモグロビンやコラーゲン等の生体分子による自家蛍光を低く抑えることができるため (Figure 1-3-1)⁴、動物個体の深部においても精度の高いイメージングが可能となる。近年では、より高次の疾患モデル動物を用いた疾患の分子メカニズムの解明を行う研究は高い関心を集めており、近赤外蛍光色素を用いた *in vivo* イメージング研究は大きく発展し続けている。

さらに、近赤外領域はマルチカラーイメージングにも有用である。マルチカラーイメージングとは、波長の重なりが少ない蛍光色素の組み合わせを用いて複数の生体分子を標識することで、複数の分子の挙動を同時に追跡する技術である。近赤外領域が利用できるようになることで、マルチカラーイメージングに赤色とは重ならない新たなカラーウィンドウが加えられ、より多くの分子を同時に観察できるようになる (Figure 1-3-1c)⁵。

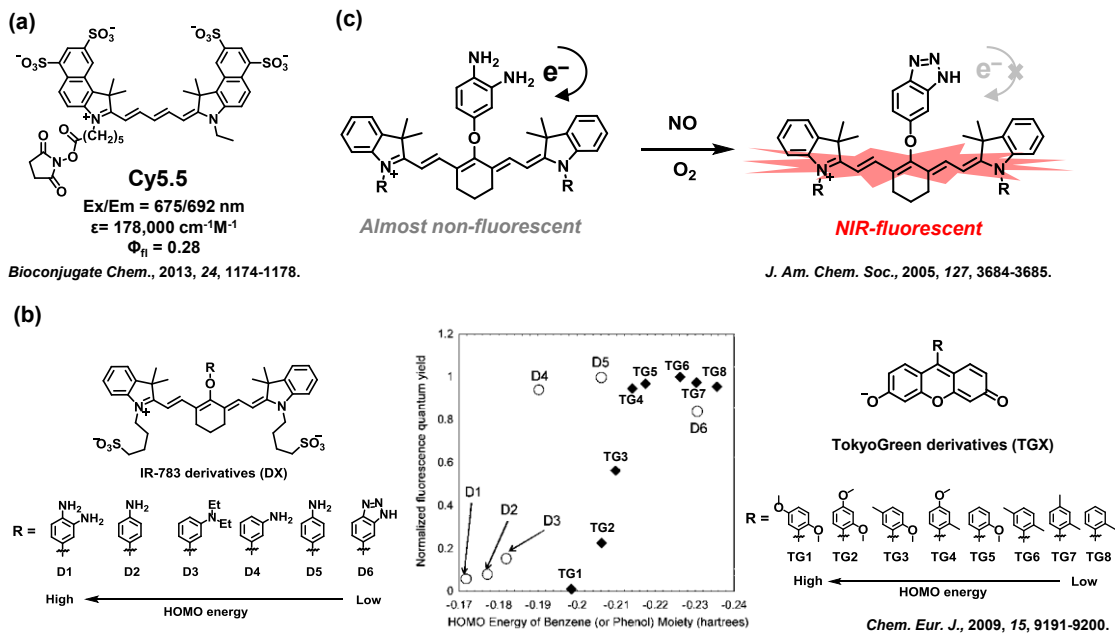


Figure 1-3-2. (a) Photophysical properties of NIR-fluorophore Cy5.5. (b) Relationships between the HOMO energy level of the benzene moiety and the Φ_{fl} value of the corresponding IR-783 and TokyoGreen (TG). (c) PeT-based NIR-fluorescent NO probe.

以上のような近赤外蛍光イメージング法の利点から、これまでに代表的な近赤外蛍光色素であるシアニン色素を母核として、近赤外蛍光プローブの開発が行われてきた (Figure 1-3-2a)。しかし、シアニン色素は比較的合成が難しく、色素の安定性も比較的低いため、蛍光色素の構造展開が難しい。また、シアニン色素は LUMO エネルギーレベルが高いため、代表的な蛍光制御原理である光誘起電子移動を用いる場合、緑色蛍光色素 Tokyo Green と比べてより高い HOMO エネルギーレベルを有する置換基を用いる必要があるなど、蛍光プローブの分子設計法が限られている (Figure 1-3-2b,c)。そのため、近赤外蛍光プローブの拡充のため、蛍光制御や合成展開が容易な近赤外蛍光色素の開発が望まれていた。

第四節 Si ロードミン蛍光色素

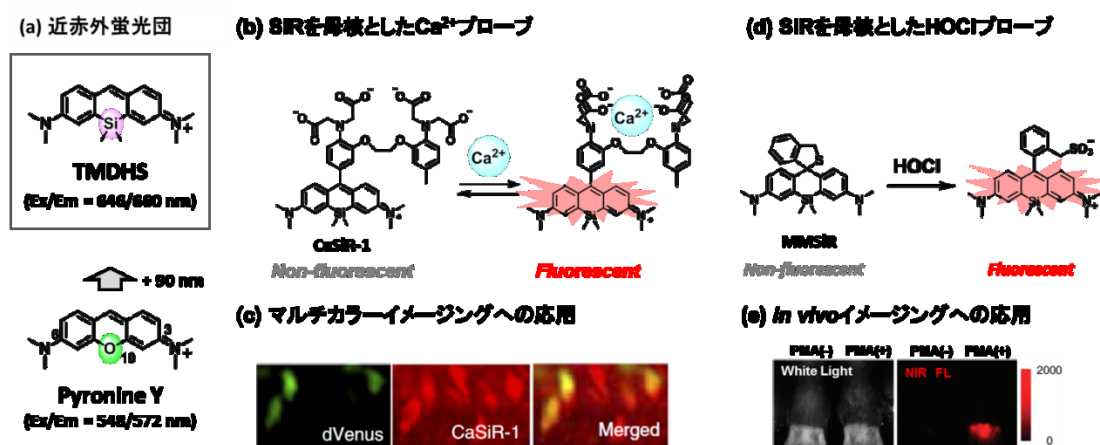


Figure 1-4-1. Si-rhodamine (SiR)-based NIR-fluorescence probes. (a) NIR-fluorophore TMDHS. (b) SiR-based Ca²⁺ probe⁶ and (c) its application to multicolor imaging⁷. (d) SiR-based HOCl probe and its application to *in vivo* imaging⁸.

キサンテン環の3,6位にアミノ基を有するロードミン系蛍光色素は、高い蛍光量子収率、高い光褪色耐性を示すバイオイメージングに有用な蛍光色素であり、蛍光プローブの母核として汎用されてきた。しかし、ロードミン蛍光色素が利用できる蛍光波長領域は、緑色から赤色光領域に限られていた。一方、2008年にFuらにより、ロードミン蛍光色素の一つであるピロニンYのキサンテン環10位の酸素原子をケイ素原子に置換することで吸収・蛍光波長を約90 nm長波長化した近赤外蛍光団「TMDHS」が報告された(Figure 1-4-1a)⁹。

我々のグループはこの知見を応用し、ロードミン蛍光団の酸素原子をケイ素原子に置換したSi-rhodamine (SiR)を母核とした近赤外蛍光プローブ群の開発を行ってきた(Figure 1-4-1b,c)¹⁰。SiRは既存の近赤外蛍光団であるシアニン色素よりも高い蛍光性と高い光褪色耐性を有し、ロードミン蛍光団と同様に光誘起電子移動やスピロ環化反応を利用した蛍光制御法が応用できるため、緑色から赤色蛍光プローブの開発で得られてきた知見を活用して、様々な近赤外蛍光プローブの開発が可能であった^{8,11}。実際にSiRを母核とした近赤外蛍光プローブは、生物学研究においてマルチカラーイメージングや*in vivo*イメージングに用いられ、生命現象の解明に貢献してきた^{7,12}。

以上のように、新規蛍光団を開発することで、様々な新たな蛍光プローブが開発可能となり、生命科学研究に大きなインパクトを与えることができる。本研究では、有用なSiR骨格に基づく新規蛍光団を開発することで、さらに多くの近赤外蛍光プローブ群の開発を可能にすることを目指した。

第二章 非対称 SiR 合成法の開発

第一節 非対称 SiR の分子設計

蛍光プローブの開発研究において、有機化学・分析化学的に興味深い分子デザインの提案に加えて、生物学研究や医学研究に用いることができる実用的な蛍光プローブの開発は重要である。つまり、実際に開発した蛍光プローブを用いて研究を行うことで、生命科学 research に大きなインパクトを与えることができる。

実用的な蛍光プローブを開発するためには、以下の 3 つの最適化が必要であると考えられる。

- ① 実際に用いられている光学機器に適するように、蛍光プローブの吸収・蛍光波長を最適化する。
- ② 蛍光プローブと観測対象分子との反応性を最適化する
- ③ 観測対象分子との反応による蛍光プローブの光学特性の変化の大きさを最適化する。

以上のような最適化を行うためには、蛍光プローブの化学構造を精密に分子設計・合成する技術が必要となる。これまでにローダミン蛍光色素において、非対称蛍光団を利用することで精密な分子設計を行った蛍光プローブが報告されている。

HOMO-LUMOエネルギーレベルの精密制御

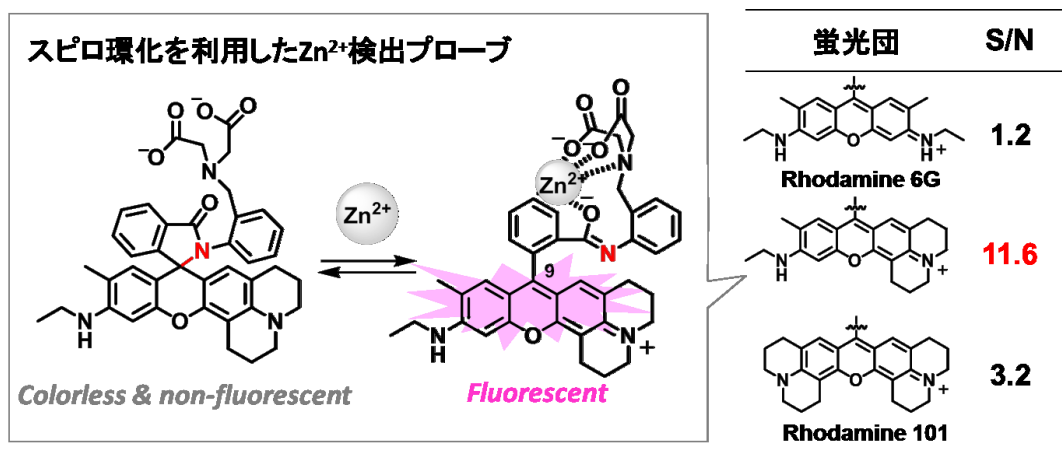


Figure 2-1-1. Optimization of HOMO-LUMO energy level with unsymmetrical rhodamine.¹³

スピロ環化反応を利用した Zn^{2+} プローブは、 Zn^{2+} の非存在下ではアミド窒素原子がキサンテン環 9 位を求核攻撃してスピロ環を形成し無蛍光性である一方、 Zn^{2+} の存在下ではアミド基の窒素原子の求核性が低下し、スピロ環が開環し共役系がつながることで蛍光性になる分子デザインとなっている(Figure 2-1-1)¹³。蛍光団に LUMO エネルギーレベルが低いローダミン 6G 構造を用いた場合は、 Zn^{2+} 存在下においてもスピロ環の開環率が低いために蛍光強度が低い。一方で、蛍光団に LUMO エネルギーレベルが高いローダミン 101 構造を用いた場合、 Zn^{2+} 非存在下でもスピロ環化の開環率が高いために蛍光強度が高い。そのため、それらの間の LUMO エネルギーレベルを示す非対称蛍光団を利用することで高い S/N を達成している。

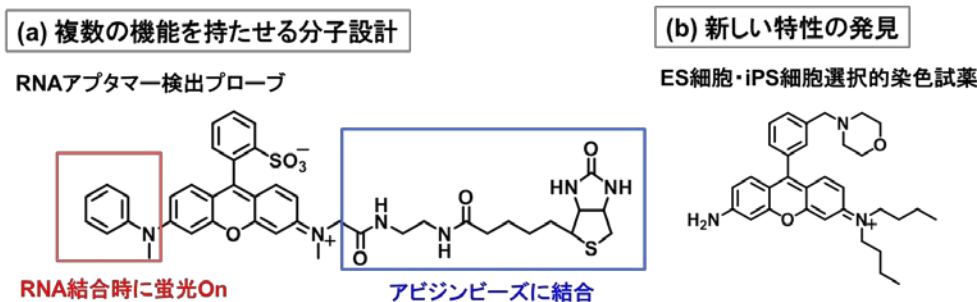


Figure 2-1-2. Chemical structures of unsymmetrical rhodamine-based fluorescence probes. (a) RNA aptamer sensor. (b) Rhosamine dye for labelling of ES cells and iPS cells.

また、RNA アプタマーと結合して蛍光性になる RNA プローブは、非対称蛍光団を用いることで、RNA 結合時に蛍光性を回復するためのアニリン部位、RNA との親和性を高めるためのスルホン酸部位、およびアビジンビーズに固定化して SELEX 法によるパニングを行うためのビオチン部位といった複数の機能性部位を組み込むことに成功している (Figure 2-2-2a)¹⁴。

さらに、新規な蛍光団は予想外な光学特性を示すことがある。多様性に富んだローダミン色素ライブラリーから創出された CDy1 は、その分子メカニズムは未知ではあるが、ES 細胞と iPS 細胞を選択的に染色することが報告されている (Figure 2-1-2b)¹⁵。

以上のように、非対称ローダミン蛍光団を利用することで、蛍光プローブの精密な分子設計が可能となる。一方で、これまでに SiR を母核とした様々な赤色・近赤外蛍光プローブが開発されてきたが、その蛍光団部位であるキサンテン環において左右異なる置換基を有する非対称な SiR は報告されていない (Figure 2-1-3)¹⁶⁻¹⁹。そこで、本研究において新規近赤外蛍光団「非対称 SiR」を開発することで、近赤外蛍光プローブの開発研究を大きく進展させることを目指した。

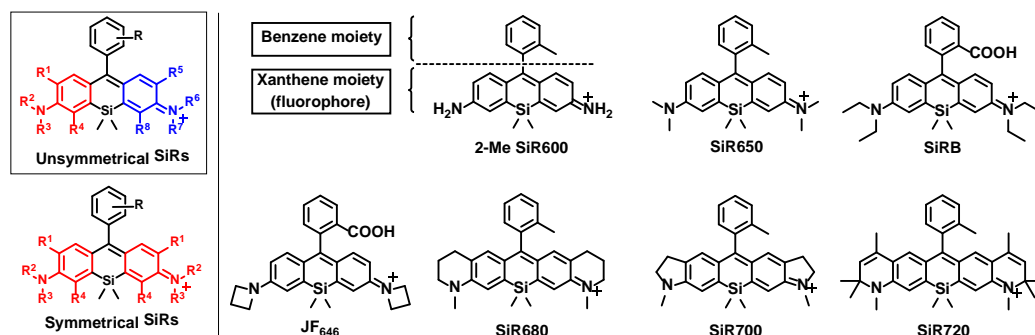


Figure 2-1-3. Representative chemical structures of Si-rhodamines used as platforms for far-red to NIR fluorescence probes.

一方、非対称なキサンテン環を持つ SiR が開発できれば、以下の 3 点から赤色・近赤外蛍光プローブ群の開発において有用であると考えられる。

① 蛍光団の吸収・蛍光波長や、蛍光の Off/On 制御に重要な HOMO・LUMO エネルギーレベル等の光化学特性の精密な制御が可能となる。

共焦点蛍光顕微鏡・FACS・*in vivo* イメージャー等の蛍光観察用機器は、搭載されているレーザーやフィルターの種類により使用できる励起波長や蛍光波長が決まることから、機器によっては使用できる蛍光団が限定されることがある。非対称 SiR は、キサンテン環 3,6 位のアミノ基上のアルキル置換基を適切に選択することで、蛍光団の吸収・蛍光波長を精密に制御し、使用するイメージング機器に適した吸収・蛍光波長を持つ蛍光プローブの開発が容易となる (Figure 2-1-4)。

また、S/N の高い蛍光プローブを開発するためには、観測対象分子との化学反応の前後で蛍光団の光学特性が大きく変化するように蛍光制御を行うことが重要である。ローダミンや SiR 蛍光色素を母核とした蛍光プローブの多くは、光誘起電子移動もしくはスピロ環化反応を利用した蛍光制御が行われており、これらの蛍光制御の効率には蛍光団の HOMO・LUMO エネルギーレベルが大きく影響する。非対称 SiR においてはキサンテン環 3,6 位のアミノ基上のアルキル置換基を適切に選択することで、光誘起電子移動の効率やスピロ環化反応の pK_{cycle} に関わる蛍光団の HOMO・LUMO エネルギーレベルを精密に制御できるため、S/N の高い赤色から近赤外蛍光プローブの開発が容易になると考えられる。

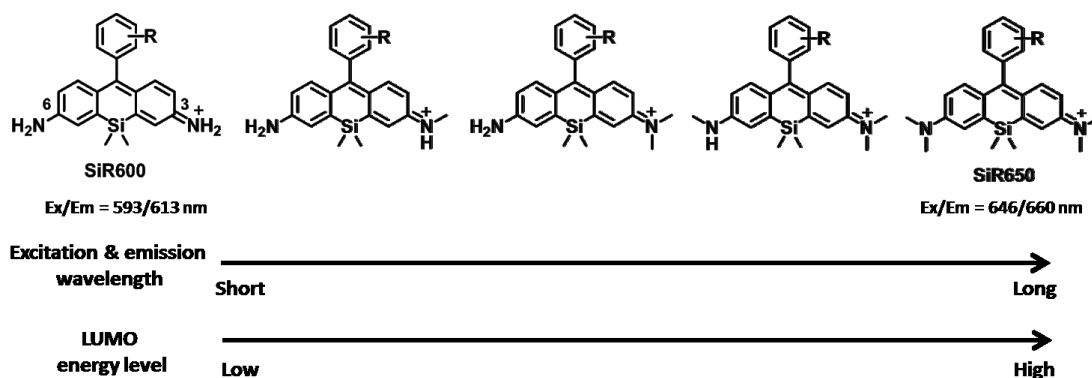


Figure 2-1-4. Molecular design of unsymmetrical SiRs for fine-tuning of absorption and emission wavelengths and LUMO energy levels.

② アミノ基の化学修飾を利用した近赤外蛍光プローブの開発が可能になる

キサンテン系蛍光団に直接結合したアミノ基は、蛍光団の光学特性に大きく関与することが知られている。そのため、アミノ基をアゾ化することで無蛍光性とし、低酸素環境下でアゾ基が還元されてアミノ基が生成することで赤色蛍光性となる低酸素蛍光プローブや²⁰、アミノ基にフェノール基を結合させて無蛍光性とし、ONOO⁻によりフェノール基が切断されることで緑色蛍光性となる ONOO⁻プローブなど²¹、アミノ基の化学修飾を蛍光制御原理に利用する蛍光プローブが数多く報告されている (Figure 2-1-5a,b)。一方、修飾可能なアミノ基を有するキサンテン系近赤外蛍光団は開発されておらず、上記の蛍光制御法を利用した近赤外蛍光プローブはこれまで報告されていない。

そこで、非対称 SiR のキサンテン環の一方のアミノ基を化学修飾して生体分子との反応点および蛍光の Off/On 制御部位とし、もう一方のアルキルアミノ基を吸収・蛍光波長の長波長化部位として利用することで、アミノ基の化学修飾を利用した近赤外蛍光プローブ群の開発が新たに可能になると考えた (Figure 2-1-5c)。

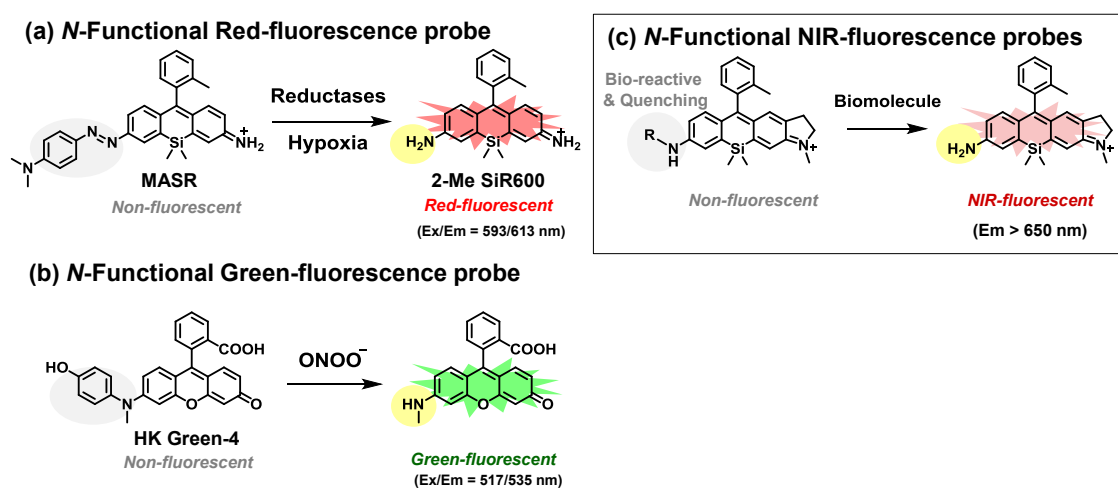


Figure 2-1-5. (a) Red-fluorescence probe for hypoxia. (b) Green-fluorescence probe for peroxynitrite. (c) Molecular design of NIR-fluorescence probes using functionalization of an amino group of xanthene moiety.

③ 新規蛍光団であるため、予想外の光学特性を持つ化合物を得られる可能性がある。

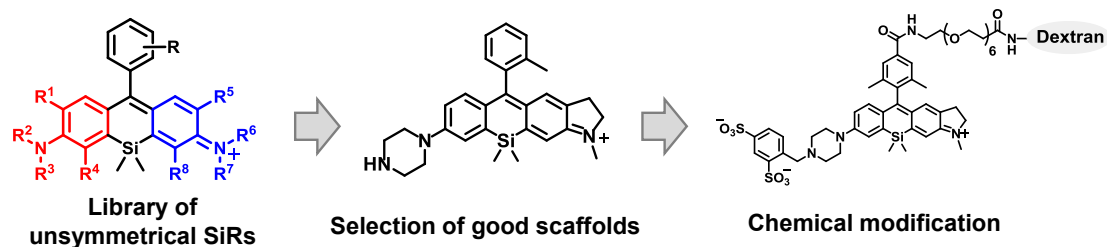


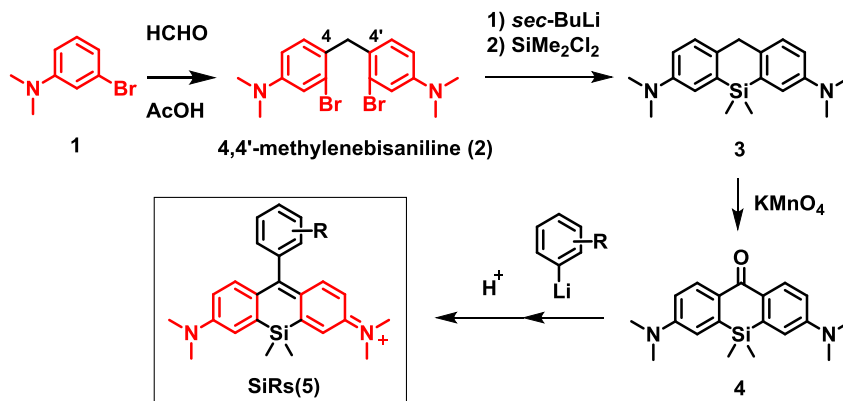
Figure 2-1-6. Development of unsymmetrical SiR-based fluorescence probes.

非対称 SiR は新規な蛍光団である。そのため、非対称 SiR の誘導体を系統的に合成し、光学特性の評価を行うことで、既存の SiR には見られなかった有用な光学特性が見出される可能性がある。新たな光学特性を示す分子が見出されたら、適切な化学修飾を施すことで新たな蛍光プローブを開発できる (Figure 2-1-6)。

以上の 3 点のように、非対称なキサンテン環を持つ SiR が開発できれば、近赤外蛍光プローブの開発研究を大きく進展できると考え、本研究に着手した。

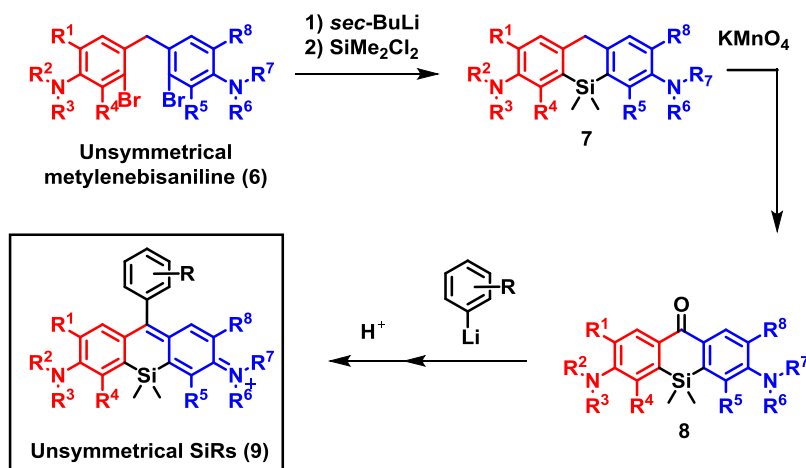
第二節 非対称メチレンビスアニリン類の高効率合成法の開発

Scheme 2-2-1 Representative synthetic scheme of SiR



非対称 SiR の合成法を開発するにあたり、既存の対称な SiR の合成法を参考に合成スキームを考えた。既存の SiR は、アニリン 2 分子が酢酸中でホルムアルデヒドと反応して 4,4'-メチレンビスアニリン(2)を生成し、次にケイ素原子の導入とベンジル位の酸化を経てケトンをもつ中間体(4)が得られ、この中間体と任意の置換基を有するベンゼン環部位を結合させることで合成される (Scheme 2-2-1)¹⁶。

Scheme 2-2-2. Synthetic scheme of unsymmetrical SiRs.

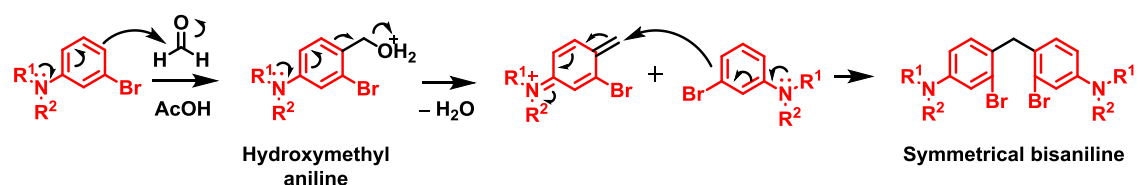


そこで、アミノ基上の置換基の異なる 2 種類のアニリン 2 分子から成る非対称なメチレンビスアニリンを合成できれば、既知の SiR の合成スキームに従って非対称 SiR が合成できると考えた (Scheme 2-2-2)。

非対称 SiR の母骨格となる非対称メチレンビスアニリンには、後にハロゲン-リチウム交換を利用したケイ素原子導入反応を行うためにブロモ基が必須となる。そのため、ベンジル位の C-C 結合形成に汎用されるアルキルリチウム等の強力な塩基を用いた S_N2 反応や、クロスカップリング反応など、ブロモ基が反応し得る C-C 結合生成反応を非対称メチレンビスアニリン合成に用いることはできない。

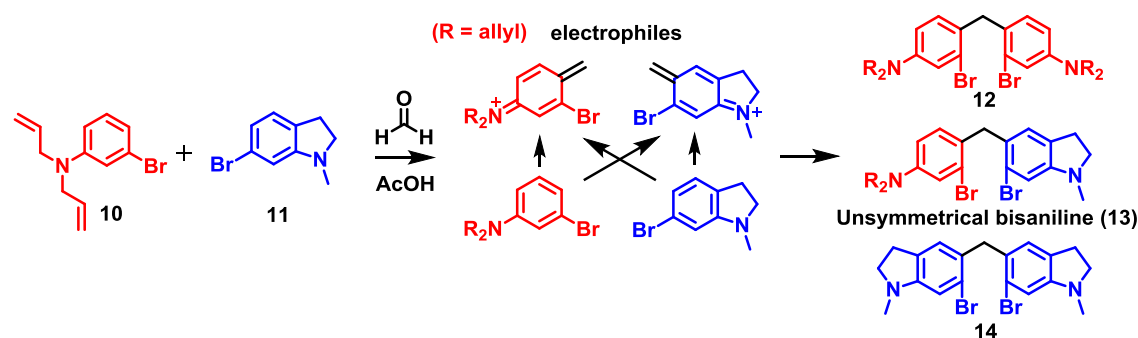
そこで、対称なメチレンビスアニリンの合成法と同様の方法を用いて非対称メチレンビスアニリンの合成法の検討を行うことにした。

Scheme 2-2-3. Mechanism of methylenebisaniiline formation.



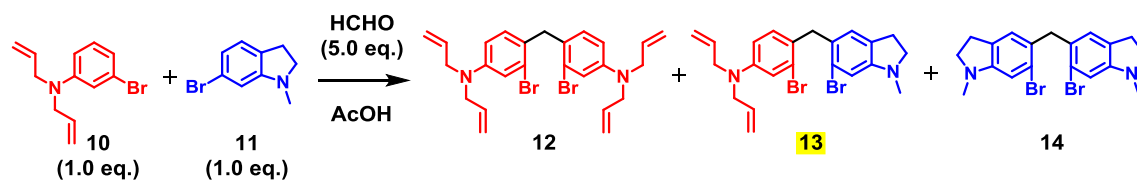
アニリンはホルムアルデヒドと酢酸存在下でヒドロキシメチル化され、水分子の脱離を経て求電子性の高いアザキノンメチド様の中間体を生成し、もう一分子のアニリンと求電子置換反応することで対称なメチレンビスアニリンが生成する (Scheme 2-2-3)²²。

Scheme 2-2-4. Synthesis of unsymmetrical methylenebisaniiline (13)



そこで、アリル基で保護した 3-bromo-*N,N*-diallylaniline (10)に、吸収・蛍光波長の長波長化が望める 6-bromo-1-methylindoline (11)を加えて反応を行うことで、アニリン同士の組み合わせにより非対称メチレンビスアニリン (13)が得られると考えた (Scheme 2-2-4)。

Table 2-2-1. Synthesis of unsymmetrical methylenebisaniiline (**13**)



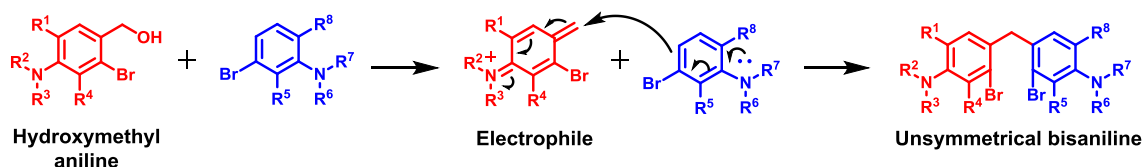
Entry	Temp.	Time	Recovery (%)		Isolated yield (%)		
			10	11	12	13	14
1	60°C	15 min	86	9	0	2	16
2	60°C	90 min	68	0	6	0	0
3	80°C	15 min	68	0	4	3	0
4	80°C	90 min	11	0	13	0	0

Entry 1 では酢酸中にて、反応温度を 60°C に設定して 15 分間反応を行った。その結果、インドリン(**11**)同士が反応した対称なメチレンビスアニリン(**14**)が少量得られたが、目的の非対称メチレンビスアニリン(**13**)はほとんど得られなかった。この原因としては、反応温度が低く反応時間が短いため、反応性の低いアニリン(**10**)がほとんど未反応で残ったためと考えられた。

そこで、Entry 2, 3, 4 では反応温度を上げるもしくは、反応時間を長くして反応を行った。その結果、**10** 同士が反応した対称なメチレンビスアニリン(**12**)が少量得られたが、目的のメチレンビスアニリン(**13**)はほとんど得られなかった。この原因としては、高温または長時間の反応では、インドリン(**11**)が自分同士で反応を繰り返して、重合体を形成するためと考えられた。

以上のように、アルキル置換基の異なるアニリン 2 種類を混合して非対称メチレンビスアニリンの合成を行うと、反応性の等しい同一のアニリン同士が縮合した対称なメチレンビスアニリンの生成が優先するため、目的の非対称メチレンビスアニリンを得ることは困難であることが分かった。

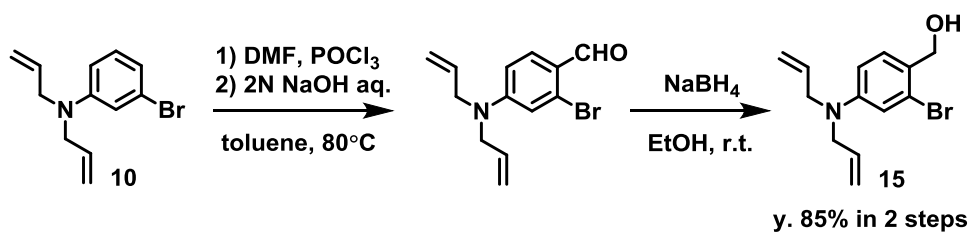
Scheme 2-2-5. Synthesis of unsymmetrical methylenebisaniiline.



そこで、同じアニリン同士の反応を防ぎ、選択的に非対称メチレンビスアニリンを合成する方法の検討を行った (Scheme 2-2-5)。

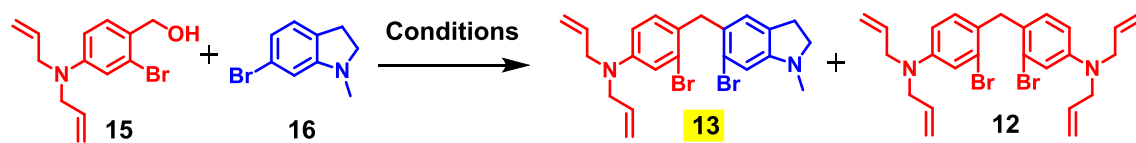
メチレンビスアニリン生成反応の中間体であるヒドロキシメチルアニリンを事前に調整し、もう一方のアニリンを加えて酸性条件にすることで、ヒドロキシメチルアニリンのみから求電子性の高い中間体が生成し、求電子置換反応により目的の非対称メチレンビスアニリンが選択的に得られると考えた。

Scheme 2-2-6. Synthesis of hydroxymethylaniline (**15**).



ヒドロキシメチルアニリン(**15**)は、対応するアニリンから Vilsmeier 反応によるアルデヒド基の導入、続く NaBH_4 によるアルデヒドの還元によって簡便かつ高収率に得られた。ヒドロキシメチルアニリンはシリカゲルカラム精製が可能であり、室温で数か月以上保存しても安定な化合物であった。

Table 2-2-2. Synthesis of unsymmetrical methylenebisaniiline (**13**)



Entry	Conditions	Temp. (°C)	Time	Isolated yield (%)	
				13	12
1	H ₂ O/CH ₃ CN	80	48 hr	0	0
2	AcOH	80	15 min	0	67
3	BF ₃ ·OEt ₂ (2.0 eq.), CH ₂ Cl ₂	35	24 hr	65	0
4	BF ₃ ·OEt ₂ (2.0 eq.), CH ₂ Cl ₂	r.t.	24 hr	94	0

ヒドロキシメチルアニリン(**15**)を用いて、非対称メチレンビスアニリン合成反応の条件検討を行った。

Entry 1 ではヒドロキシメチル基のプロトン化を促すと報告されていた、水を含む有機溶媒中で反応を行ったが²³、反応は進行しなかった。

Entry 2 では対称なメチレンビスアニリンの合成と同様に、酢酸中で 80°C にて反応を行ったところ、目的の非対称メチレンビスアニリン(**13**)は得られず、対称なメチレンビスアニリン(**12**)のみが中程度の収率で得られた。また、上記反応の副生成物としてヒドロキシメチルアニリン(**15**)の水酸基がアセチル化された化合物が 10%程度得られた。アセチル化されたヒドロキシメチルアニリン同士は迅速にメチレンビスアニリンを生成することが報告されていることから²⁴、酢酸中ではヒドロキシメチルアニリンのアセチル化により高活性な中間体が生じることで対称なメチレンビスアニリンの生成が優先したと考えられる。

Entry 3 では、ベンジルアルコールの水酸基を脱離させるのに効果的なルイス酸の使用を試みた²⁵。ジクロロメタン中で BF₃·OEt₂ を添加し 35°C で反応を行ったところ、目的の非対称メチレンビスアニリン(**13**)が中程度の収率で得られることを見出した。その際、**13** ともう一分子のアニリン(**15**)が反応した副生成物が確認されたことから、Entry 4 では反応温度を室温に下げ、**13** のさらなるアルキル化を抑制することで、高収率で非対称メチレンビスアニリンを得ることに成功した。

以上のように、ヒドロキシメチルアニリンとパラ位に置換基を持たないアニリンに BF₃·OEt₂ を添加することで高収率に非対称メチレンビスアニリンが得られることを見出した。

第三節 メチレンビスアニリン合成法の汎用性の検討

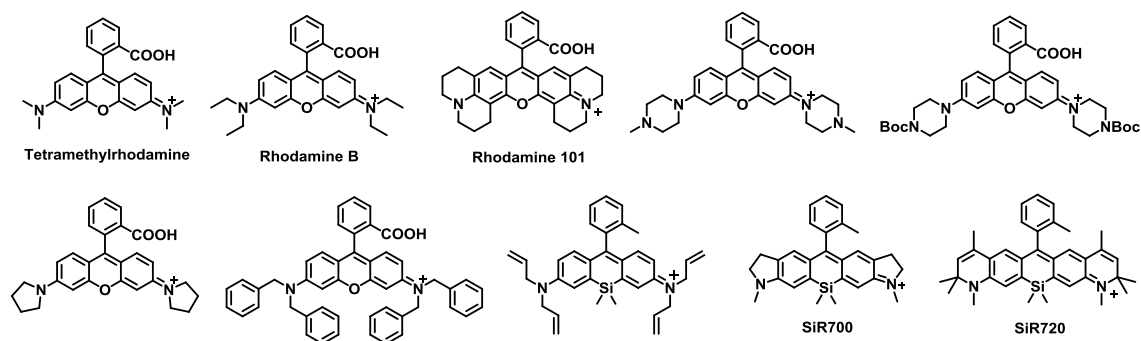


Figure 2-3-1. Chemical structures of Rhodamine and SiR.

ローダミン蛍光色素は、キサンテン環アミノ基上に直鎖アルキル基や環状アルキル基など様々な置換基を導入することで、様々な吸収・蛍光波長や HOMO・LUMO エネルギーレベルを持つ蛍光色素を開発可能であり、それらは蛍光プローブの母核として用いられている(Figure 2-3-1)^{16, 18, 26}。そのため、様々な置換基を持つローダミンを開発可能な汎用性の高い合成法は、ローダミンを母核とした蛍光プローブの開発に極めて有用である。

そこで、開発した非対称メチレンビスアニリン合成法の汎用性を検討するため、様々な置換基を有するアニリンを用いて非対称メチレンビスアニリンの合成が可能であるか検討を行った。報告されているローダミンや SiR のアミノ基上の置換基や保護基を参考にして上記のアニリン類を設計した。求電子攻撃を受けるアニリン(青色)にはアリル保護基を有するアニリン(10)および、インドリン(16)、ジュロリジン(17)、ジヒドロキノリン(18)などの HOMO エネルギーレベルが異なるアニリンを用いて、求電子剤となるヒドロキシメチルアニリン(赤色)にはアリル保護基を 2 つ(15)または 1 つ(19)有するもの、ベンジル保護基を有するもの(20)、ジメチル(21)、ジエチル(22)、ピロリジン(23)、*N*-メチルピペラジン(24)、*N*-Boc ピペラジン(25)、およびインドリン構造を持つもの(26)を選択した。

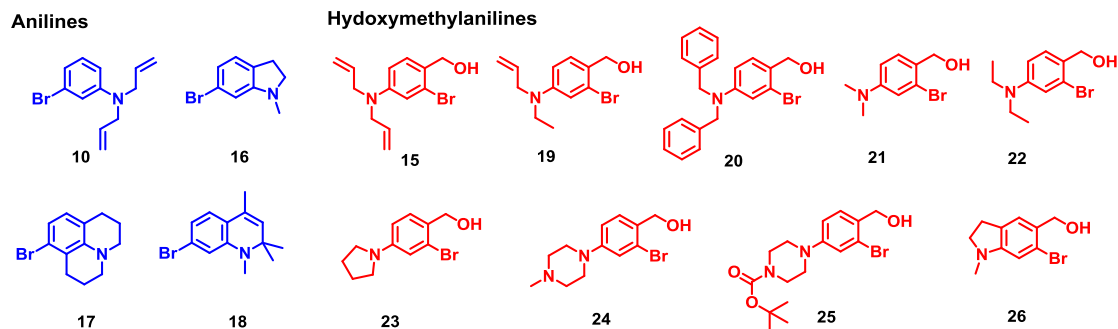
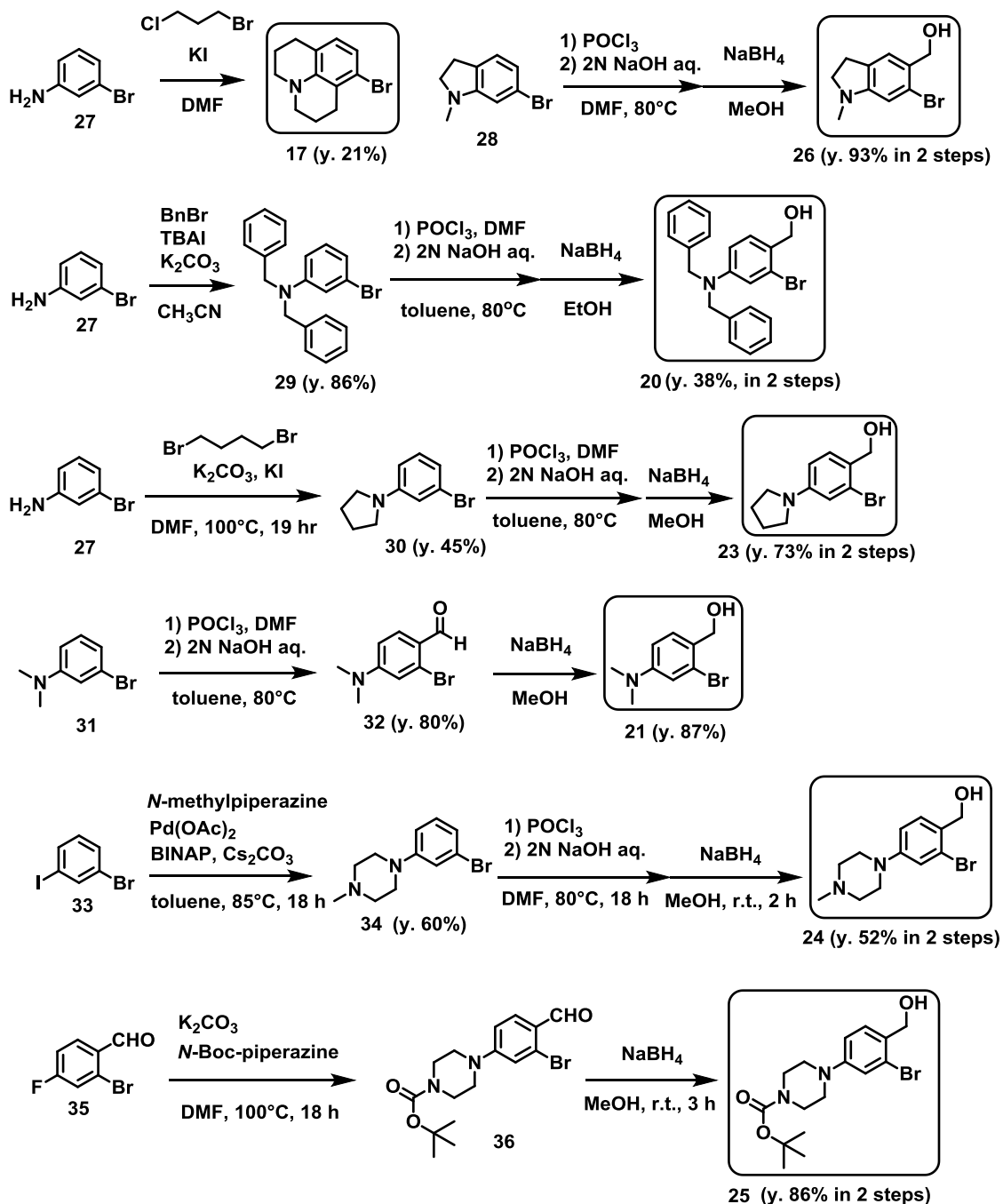


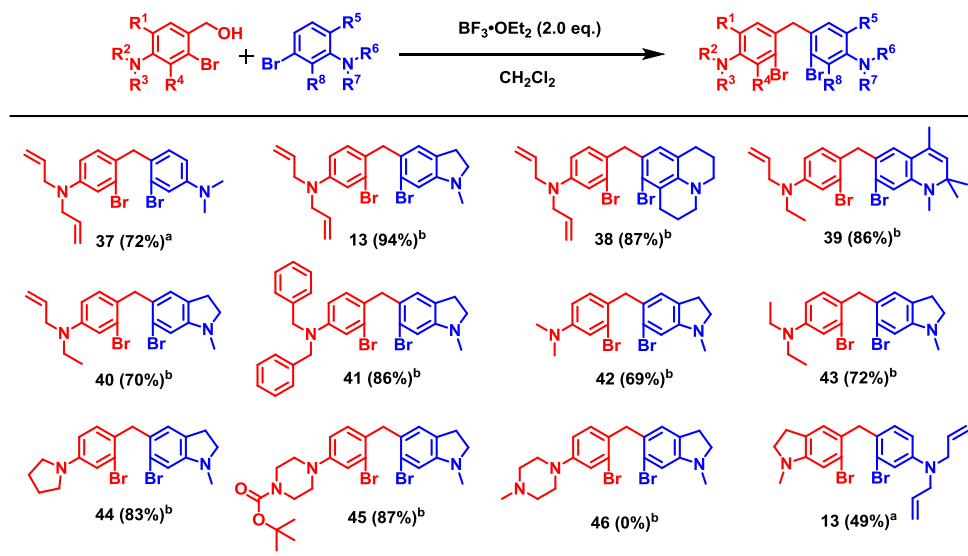
Figure 2-3-2. Chemical structures of anilines and hydroxymethylanilines.

Scheme 2-3-1. Synthesis of anilines and hydroxymethylanilines.



17, 20, 21, 23, 26 は既知のプロモアニリンから Vilsmeier 反応、NaBH₄還元を経て合成した。ピペラジン環を有するアニリン 24, 25 はヨウ素選択的なカップリング反応およびフッ素選択的な芳香族求核置換反応を用いてプロモベンゼン誘導体から合成した。

Table 2-3-1. Synthesis of unsymmetrical bisanilines with various *N*-alkylsubstituents.



Reactions were performed at 35°C^a or r.t.^b, and higher isolated yields were shown.

開発した反応の汎用性を検討した(Table 2-3-1)。求電子攻撃を受けるアニリン(青色)として、ジメチルアニリン(**31**)、インドリン(**16**)、ジュロリジン(**17**)、ジヒドロキノリン(**18**)を用いて非対称メチレンビスアニリン(**13**, **37-39**)を合成したところ、HOMO エネルギーレベルが異なるアニリンを用いても約 70%以上の高収率で目的物が得られることが分かった。その際、HOMO エネルギーレベルの低いジメチルアニリン(**31**)を用いる場合は、室温で反応を行うと目的物(**37**)の生成量は少量で単離ができず、35 度で反応を行うと高収率で目的物が得られた。一方で、HOMO の高いインドリン(**16**)、ジュロリジン(**17**)、ジヒドロキノリン(**18**)は 35 度で反応を行うと副反応のために収率が大きく低下することから、室温で反応を行った。

また、求電子剤となるヒドロキシメチルアニリン(赤色)としてアリル基、ベンジル基で保護されたアニリンを用いても高収率で目的物(**40**, **41**)が得られ、ジメチル、ジエチル、ピロリジル置換アニリンを用いても約 70%以上の高効率で目的物(**42-44**)が得られた。その際、脂肪族アミノ基である *N*-メチルピペラジンを有するアニリン(**25**)は、BF₃·OEt₂ の添加後に析出するため反応が十分に進行せず、生成物(**46**)も NH シリカゲルカラムや GPC を用いても単離できなかった。そこで、ピペラジンを Boc 基で保護することで析出することを防ぐことにより約 90%と高収率で目的物(**45**)を得ることができた。さらに、同じビスアニリン(**13**)の合成においても、HOMO エネルギーレベルが低いヒドロキシメチルジアリルアニリン(**15**)を用いた合成法よりも、HOMO エネルギーレベルが高いヒドロキシメチルインドリン(**26**)を用いた合成法の方が、収率が低下することが分かった。

以上のように、開発した反応は、反応条件を工夫することでローダミン蛍光色素に用いられる様々な置換基を有するメチレンビスアニリンを高収率に合成できる汎用性の高い合成法であることが分かった。

本反応の反応機構は、Figure 2-3-3 のように考えられる。ヒドロキシメチルアニリンの水酸基にLewis酸である $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ が配位すると水酸基の脱離が促進し、アザキノンメチド様の求電子剤が生成する。それとアルキル置換基を持つアニリンがパラ位選択的に求電子置換反応を起こし、非対称メチレンビスアニリンが生成すると考えられる。

様々なアニリンを用いた検討により、本反応を高効率に行うための指針を得たので以下に示す(Figure 2-3-3)。求電子攻撃を受けるアニリン(青色)に HOMO エネルギーレベルの低いアニリンを用いる場合には、反応性を向上させるために反応温度を 35°C に設定し、一方、HOMO エネルギーレベルの高いアニリンを用いる場合は、生成物の更なる反応を防ぐため、室温で反応を行うことで高収率に目的物が得られる。

また、求電子剤となるアニリン(赤色)には、求電子攻撃を受けるアニリン(青色)よりも HOMO エネルギーレベルの高いアニリンを用いることを避け、また、脂肪族アミノ基等のLewis酸が配位可能な官能基が存在すると溶解性の低いジカチオンが生成して反応効率が低下するため、Boc 等のカルバメート系保護基を用いてLewis酸の配位を防ぐことで高収率に目的物が得られる。

以上の指針に従って本反応を利用することで、ローダミン蛍光団のアミノ基上に用いられる置換基のほとんど全てを組み込んだ非対称 SiR を開発できると考えられる。

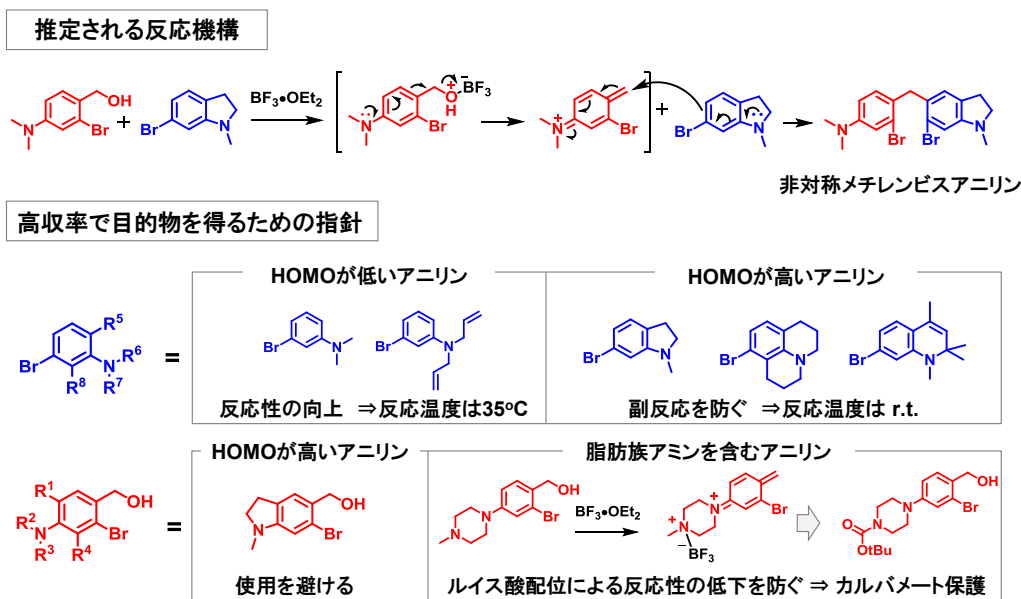
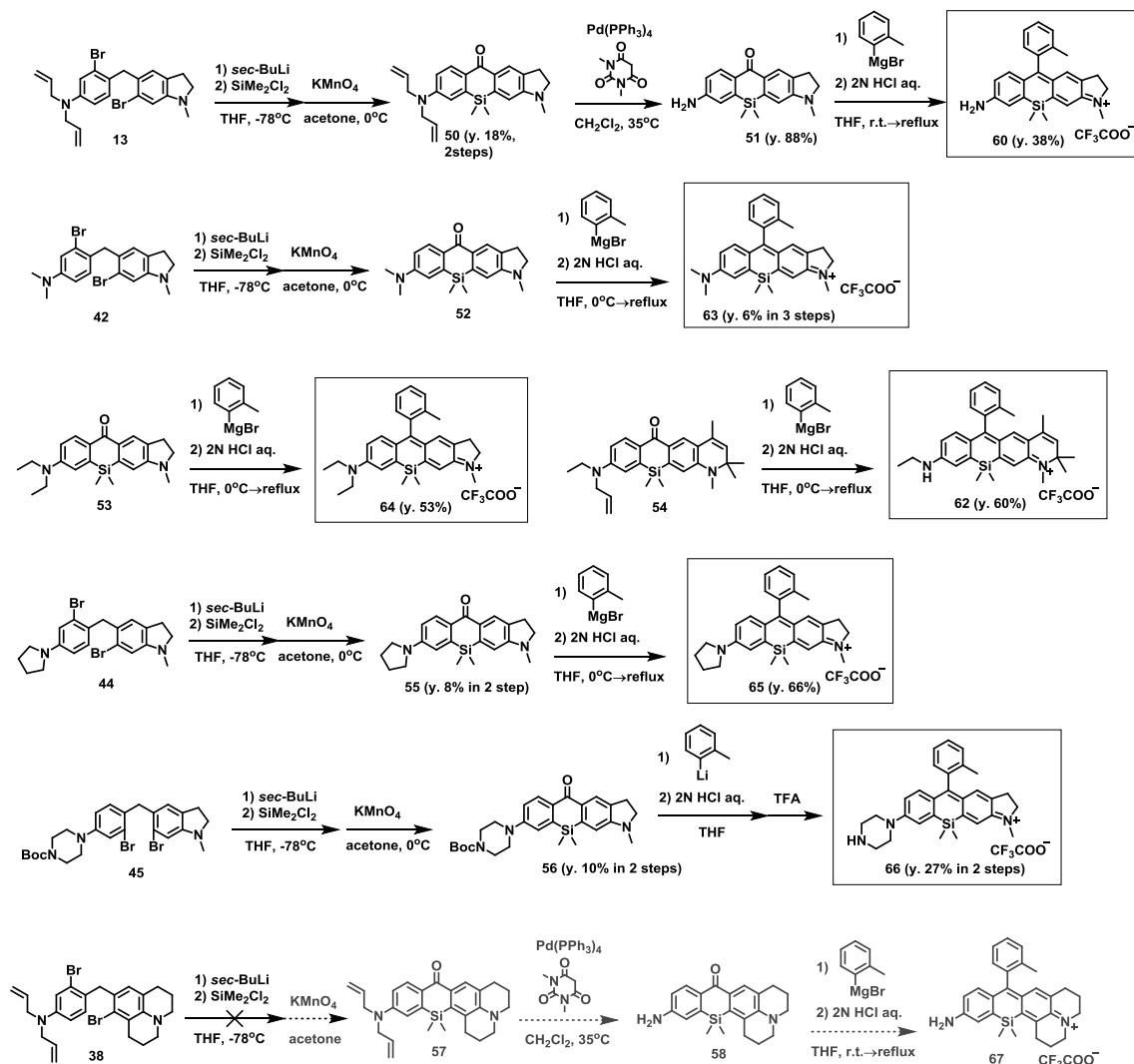


Figure 2-3-3. Proposed mechanism of the reaction.

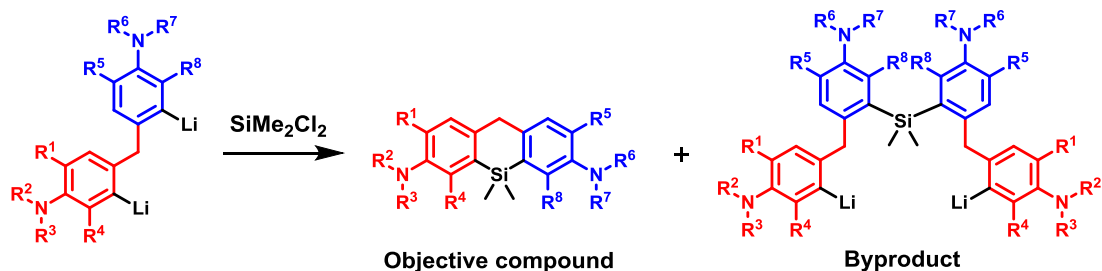
第四節 非対称 SiR ライブラリーの構築と光学特性の精査

Scheme 2-4-1. Synthesis of unsymmetrical SiRs.



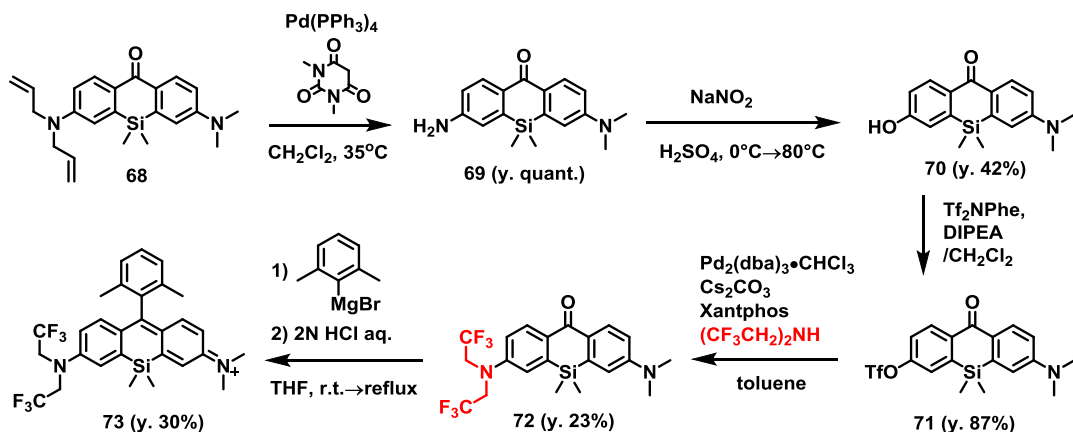
既存の SiR と同様のスキームを用いて、先に合成した様々な置換基を有する非対称メチレンビスアニンから非対称 SiR の合成に成功した(Scheme 2-4-1)。一方、非対称 SiR の合成においては、ハロゲン金属交換に続くシリル基の導入・ベンジル位酸化のステップが、対称な SiR の合成と比較して低収率となり、特にジュロリジン構造を持つメチレンビスアニン(**38**)→キサントン(**57**)の反応では目的物が得られなかった。

Scheme 2-4-2. Silylation reaction with SiMe₂Cl₂.



構造の同定には至らなかったが、本反応後に分子量の大きな副生成物が得られたことから、この収率低下の原因は、メチレンビスアニリンの左右のアニリンの HOMO エネルギーレベルが異なるため、Ar-Li 同士のシリル基を介した分子内の架橋反応と HOMO エネルギーレベルの高い Ar-Li 同士による分子間の架橋反応が競合することによって考えられた (Scheme 2-4-2)。そのため、本合成法で HOMO エネルギーレベルが大きく異なるアニリンから成る非対称 SiR を合成するためには、低濃度で反応を行うなど更なる検討が必要だと考えられる。

Scheme 2-4-3. Synthesis of unsymmetrical SiR (**73**) via Buchwald-Hartwig cross coupling.



HOMO エネルギーレベルが大きく異なるアニリンから非対称 SiR を合成するための一つの方法として、アリル保護アニリンを持つキサントン化合物を合成し、アリル基の脱保護、アミノ基の OTf への変換、任意のアミノ基と B-H カップリング反応により非対称なキサントン化合物を得て、非対称 SiR を合成する方法が挙げられる (Scheme 2-4-3)。本手法を用いることで、ジメチルアニリンとジトリフルオロエチルアニリンという HOMO エネルギーレベルが大きく異なる 2 つのアニリンからなる非対称 SiR (**73**) を合成することに成功した。

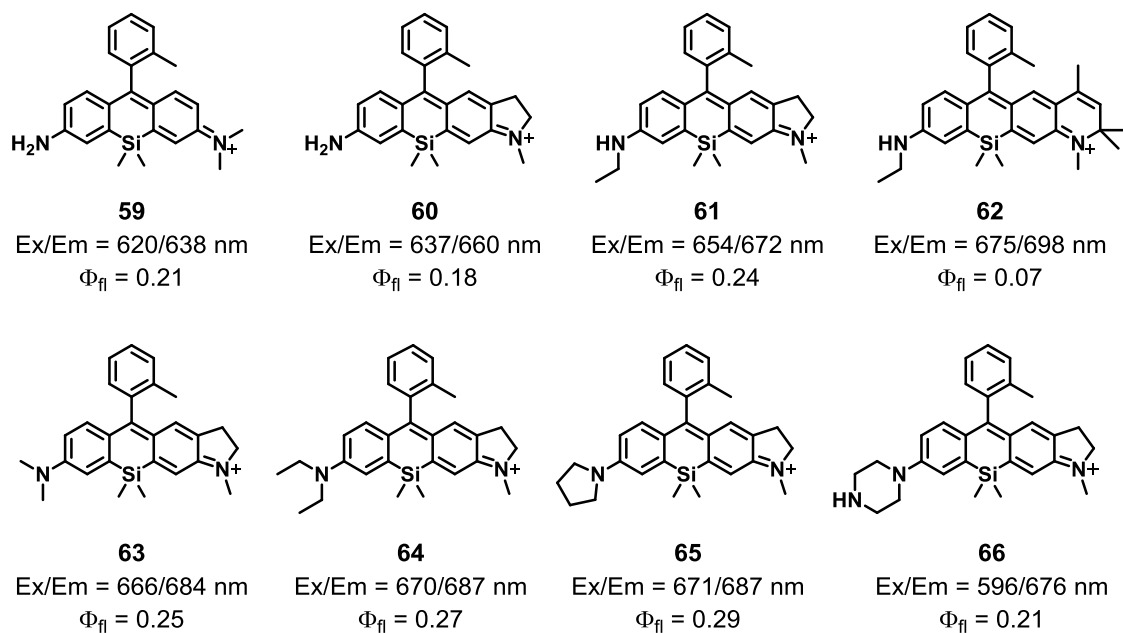


Figure 2-4-1. Chemical structures and photophysical properties of unsymmetrical SiRs. Photophysical properties were measured in 100 mM NaPi buffer (pH 7.4) containing 1% DMSO as a co-solvent.

Table 2-3-1 に示した非対称メチレンビスアニリンから合成可能な 9 つの非対称 SiR の合成を試み、ジュロリジン構造を有する SiR (**67**)を除く 8 種類の非対称 SiR (**59-66**)の合成を達成した(Figure 2-4-1)。これらの非対称 SiR の光学特性を調べたところ、対称な SiR と同様に、アルキル置換基に応じた赤色から近赤外蛍光と高い蛍光量子収率を有しており、蛍光プローブの母核として適した蛍光色素であることが分かった。

以上のように、本研究で開発した合成法を用いることで、キサントン環に様々な置換基を有する非対称 SiR を合成することに成功し、それらは赤色から近赤外蛍光プローブの母核として有用な光学特性を示した。次にこれらの非対称 SiR 蛍光色素を用いる利点や、これらを用いた蛍光プローブの分子設計について述べる。

第五節 非対称 SiR の蛍光イメージングへの応用

1. 非対称 SiR の利点① 蛍光団の吸収・蛍光波長の精密制御

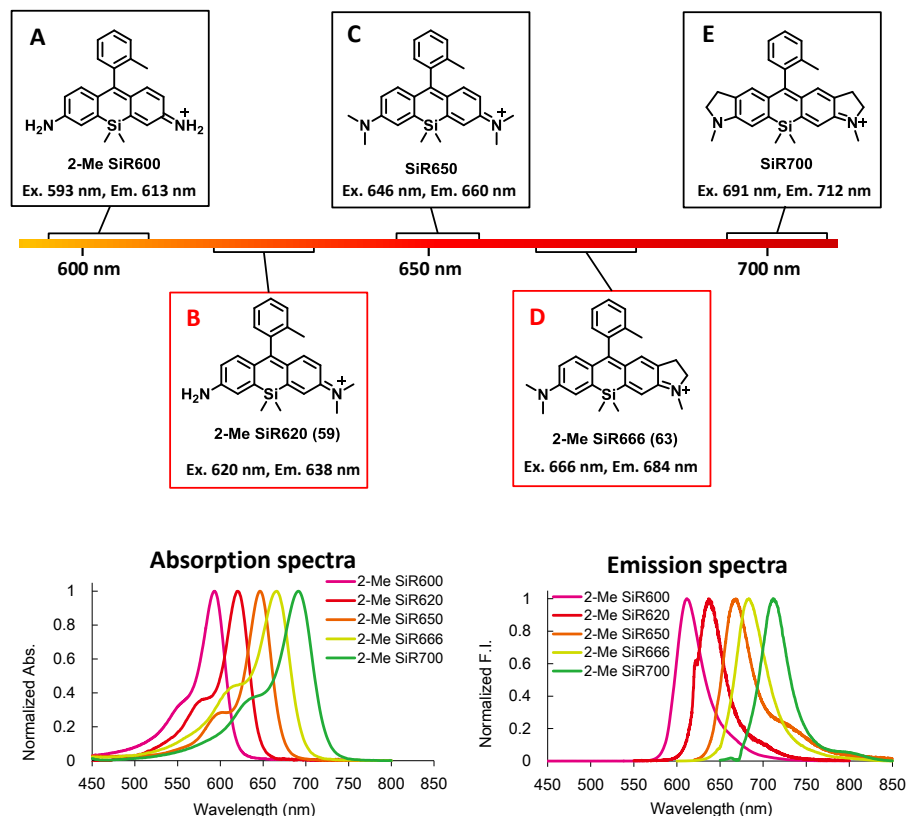


Figure 2-5-1. Absorption and emission wavelength of SiRs are fine-tunable by chemically introducing alkyl groups into their xantheno moiety. Photophysical properties and spectra were measured in 100 mM NaPi buffer (pH 7.4) containing 1% DMSO as a co-solvent.

キサントン環の一方のアミノ基がジメチル化され、もう一方が無置換の非対称 SiR である 2-Me SiR620 (59)は、その吸収・蛍光極大波長をアミノ基が無置換の 2-Me SiR600 と両方のアミノ基がジメチル化された 2-Me SiR650 のちょうど間に示した。同様にジメチルアニリンとインドリン構造を有する 2-Me SiR666 (63)は、その吸収・蛍光極大を 2-Me SiR650 とキサントン環の両側にインドリン構造を有する 2-Me SiR700 の間に示した(Figure 2-5-1)。

以上のように、例えば、A という SiR と C という SiR の間の赤色波長領域や、C という SiR と E という SiR の間の近赤外波長領域に吸収・蛍光を有する色素が必要な場合、二者の構造を合わせ持つ非対称 SiR-B や D を設計し本合成ルートに従い合成することで、目的の吸収・蛍光波長を持つ蛍光色素を得ることができる。

(a) 既存の対称なSiRから作成した検量線 (c) 望みの吸収波長を有するSiR類の合成戦略

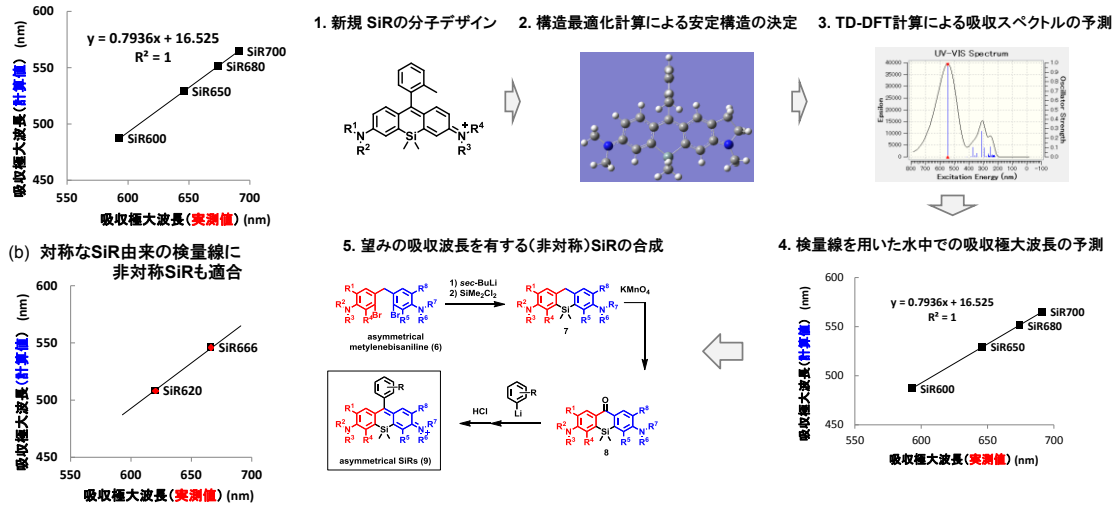


Figure 2-5-2. Calculations of absorbance wavelength of unsymmetrical SiRs using B3LYP 6-31+G* level.

また、蛍光色素の吸収極大波長は、Gaussian による TD-DFT 計算によって予測することができる。既存の対称な SiR 類の水中での吸収極大波長の実測値と TD-DFT 計算による計算値は、絶対値は異なるが直線相関関係にあるため、計算値から実測値へと変換する検量線となり (Figure 2-5-2a)、非対称な 2-Me SiR620, 2-Me SiR666 の吸収極大波長も前述の検量線にのることが分かった (Figure 2-5-2b)。そのため、アルキル置換された非対称 SiR 類の水中での吸収波長は、TD-DFT 計算と検量線により予測することが可能である。よって、赤色から近赤外蛍光領域に任意の吸収波長を有する色素が必要な場合は、合成を始める前に分子デザイン⇒構造最適化⇒TD-DFT 計算によって合成すべき分子デザインを決定することで、必要とする蛍光色素を効率的に合成できる (Figure 2-5-2c)。

波長が少しずつ異なる色素が必要な場面として、12-color or 17-color flow cytometry 等の多色 FACS の開発研究が挙げられる^{27, 28}。これら機器ではより多くの種類の細胞表面の抗原を識別するために、Cy5 (Ex. 649 nm)、Cy5.5 (Ex. 675 nm)、Alexa700 (Ex. 702 nm) 標識抗体といった少しずつ吸収・蛍光波長が異なるシアニン色素結合抗体を細胞の識別に用いている。

シアニンと比較して高い光褪色耐性を持ち、吸収・蛍光波長を精密に制御できる赤色～近赤外色素「非対称 SiR」を開発できるようになったことで、様々なイメージング機器のレーザーや検出器に最適な蛍光色素を利用することによるより明るい蛍光画像の取得や、多色の FACS などにおける励起・蛍光波長の切り分けを利用した複数の生体分子の同時解析技術の発展が期待される。

2. 非対称 SiR の利点② HOMO・LUMO エネルギーレベルの微調整

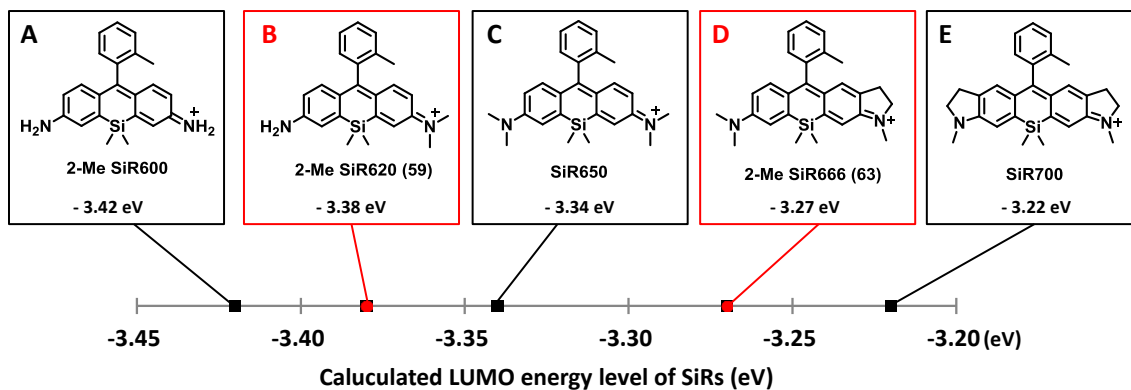


Figure 2-5-3. Calculated LUMO energy levels of SiRs. Calculations were performed using B3LYP/6-31+G(d) with water as a solvent.

キサントン蛍光団の HOMO・LUMO エネルギーレベルは光誘起電子移動の効率や求核剤がキサントン環 9 位に付加する反応の際の反応性に影響するため、蛍光制御に光誘起電子移動を利用した蛍光プローブやスピロ環の開環、閉環を利用した蛍光プローブの開発には蛍光団の HOMO・LUMO エネルギーレベルの最適化が必要である²⁹。

本研究により、SiR 類のキサントン環の左右のアミノ基上の置換基を自由に選択できるようになったことで、SiR 類の HOMO・LUMO エネルギーレベルの微調整が容易になった。例えば、SiR A と SiR C の間や、SiR C と SiR E の間に LUMO エネルギーレベルを有する SiR が必要な場合、2 つの構造を合わせ持つ非対称 SiR-B や D を設計し、本合成ルートに従い合成すれば、目的の LUMO エネルギーレベルを持つ SiR を得ることができる(Figure 2-5-3)。

このように、本研究によって様々な置換基を有する非対称 SiR の合成が可能になったことで、SiR の HOMO・LUMO エネルギーレベルや吸収・蛍光波長の精密なデザインが可能になり、SiR を母核とした赤色～近赤外蛍光プローブの開発が容易になると考えられる。

3. アミノ基の化学修飾を利用した近赤外蛍光プローブの開発

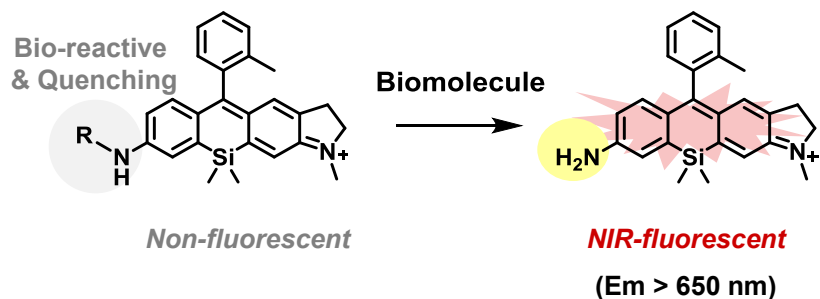


Figure 2-5-4. Design strategy of N-functional NIR-fluorescence probe.

前述のように、キサンテン系蛍光団に直接結合したアミノ基は、蛍光団の光学特性に大きく影響することが知られており、様々な緑色・赤色蛍光プローブが開発されている(Figure 2-1-5)。一方、近赤外蛍光団ではアミノ基の化学修飾を利用した蛍光プローブは報告されていない。そこで、非対称 SiR のキサンテン環の一方のアミノ基を化学修飾して生体分子との反応点および蛍光の Off/On 制御部位として利用し、もう一方のアルキルアミノ基を吸収・蛍光波長の長波長化部位として利用することで、近赤外領域で機能する様々な蛍光プローブが新たに開発できると考えた(Figure 2-5-4)。

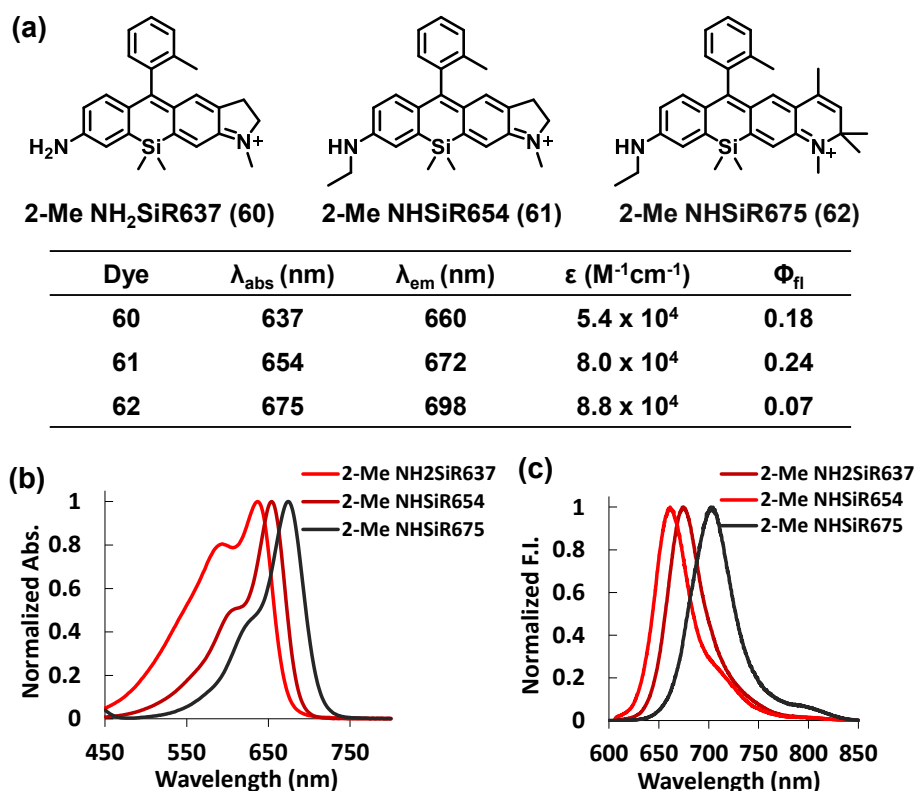


Figure 2-5-5. (a) Chemical structures, (b) absorption and (c) emission spectra of *N*-functional unsymmetrical SiRs. Photophysical properties and spectra were measured in 100 mM NaPi buffer (pH 7.4) containing 1% DMSO as a co-solvent.

アミノ基の化学修飾を利用する蛍光プローブの母核として、キサンテン環に修飾可能な無置換またはモノエチル置換のアミノ基と吸収・蛍光波長の長波長化に寄与するインドリン、ジヒドロキノリン構造を有する非対称 SiR (2-Me NH₂SiR637 (60), 2-Me NHSiR654 (61), 2-Me NHSiR675 (62)) の分子設計・合成を行った (Figure 2-5-5)。これらの蛍光色素の光学特性を測定したところ、キサンテン環により HOMO エネルギーレベルが高いアニリン構造を含むものほど吸収波長が長波長化し、660~698 nm の近赤外蛍光を示した。また、蛍光量子収率を調べると、2-Me NH₂SiR637 (60), 2-Me NHSiR654 (61), 2-Me NHSiR675 (62) は蛍光量子収率がそれぞれ 0.18, 0.24, 0.07 と近赤外蛍光プローブの母核として十分な蛍光量子収率を示した。

以上のように、高い蛍光量子収率を有し、修飾可能なアミノ基を有する近赤外蛍光色素の開発に成功した。次に、これらの分子を母核として開発された近赤外蛍光プローブを紹介する。

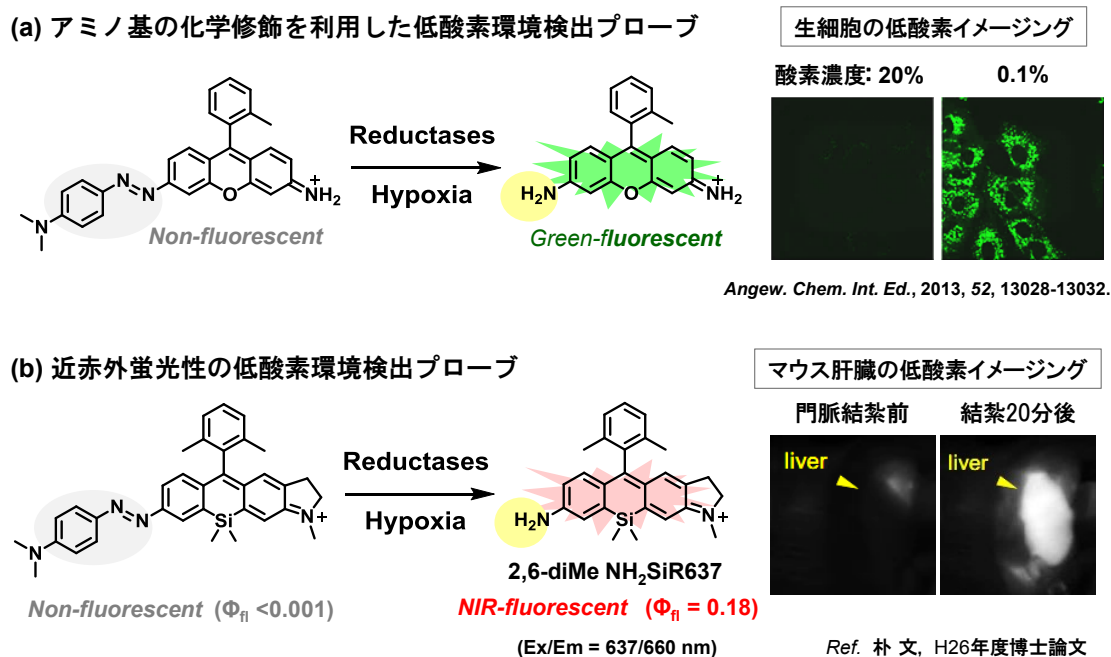


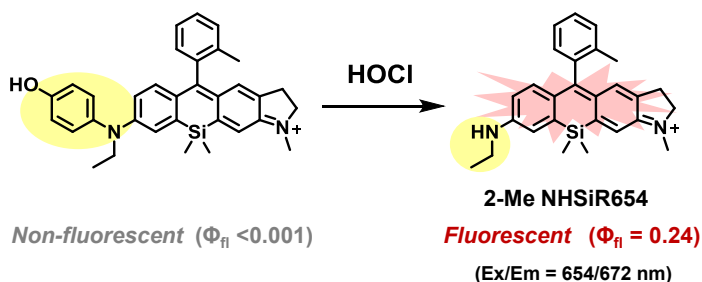
Figure 2-5-6. (a) Azorhodamine-based green-fluorescent and (b) NIR-fluorescent hypoxia probes.

我々のグループでは、本研究にて開発した近赤外蛍光団 2,6-diMe NH₂SiR637、および 2-Me NHSiR654 を母核として、実際に低酸素環境を検出する近赤外蛍光プローブおよび活性酸素種(HOCl)を検出する近赤外蛍光プローブを開発することに成功している。

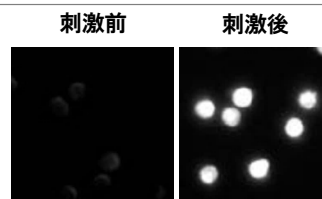
緑色蛍光団 2Me Rhodamine Green に直接結合したアミノ基にアゾ基を結合させることで、アゾ基の異性化により無輻射失活が優先し蛍光団は無蛍光性となり、一方で細胞内が低酸素環境になると、還元酵素によりアゾ基が 6 電子還元されて切断され蛍光性となる。上記分子設計により、我々は緑色蛍光性の低酸素環境検出プローブを開発し、生細胞において低酸素環境イメージングを達成している(Figure 2-5-6a)²⁰。

我々は本研究で開発した非対称 SiR に上記分子設計を応用することで、近赤外蛍光性の低酸素環境検出プローブの開発に成功した(Figure 2-5-6b)。本プローブの近赤外蛍光性を活かし、本プローブをマウスに静脈投与し、肝臓を結紮して生じた肝臓での低酸素状態を *in vivo* イメージングすることに成功した³⁰。

近赤外蛍光性の活性酸素種検出プローブ



HL60細胞の産生するHOClの可視化



Ref: H25年度 明珍琢也 博士論文

Figure 2-5-7. An unsymmetrical SiR-based NIR-fluorescent HOCl probe.

また、キサントレン環部位に直接結合したアミノ基にフェノール基を結合させると、蛍光団は無蛍光性になり、一方で、活性酸素種である HOCl または ONOO⁻ と反応することでフェノールが脱離し、蛍光性になることが知られている²¹。

上記分子設計を利用し、近赤外蛍光性の活性酸素種検出プローブの開発に成功した (Figure 2-5-7)。実際に本プローブを用いることで、HL60 細胞を過酸化水素で刺激した際に MPO (myeloperoxidase) から産生される HOCl を蛍光検出することに成功した³¹。

以上のように、非対称 SiR のアミノ基に生体分子反応性かつ蛍光制御できる置換基を導入することで、生細胞中や動物個体でのイメージングが可能な近赤外蛍光プローブの開発に成功した。非対称 SiR は、アミノ基の化学修飾を利用した様々な近赤外蛍光プローブの母核として利用され、バイオイメージングによる生命現象の分子レベルでの解明に貢献していくことが期待される。

第六節 小括

本章では新規蛍光団である非対称 SiR に着目し、その合成法の確立と非対称 SiR を母核とした近赤外蛍光プローブの分子設計を行った。

非対称 SiR を合成するに当たり、非対称メチレンビスアニリンの合成法の開発を試み、ヒドロキシメチルアニリンと $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ を用いることで、高収率に非対称メチレンビスアニリンが得られる合成法の開発に成功した。本合成法は、反応条件を工夫することで様々な置換基を有するアニリンにおいても高収率に目的物を得ることが可能であった。

実際に様々な置換基を有する非対称メチレンビスアニリンを用いて非対称 SiR を合成し光学特性を調べたところ、非対称 SiR は対称な SiR と同様に赤色から近赤外蛍光性であり、かつ蛍光プローブの母核として十分な蛍光量子収率を有しており、赤色から近赤外蛍光プローブの有用な母核分子になることが期待された。非対称 SiR は吸収波長や HOMO・LUMO エネルギーレベルの精密制御が可能であることから、光誘起電子移動やスピロ環化反応といった蛍光制御法を利用し、高い S/N を有する近赤外蛍光プローブを開発できると考えられる。また、非対称 SiR を母核とすることで、これまで近赤外蛍光団には適応できなかったアミノ基の化学修飾を利用した近赤外蛍光プローブの開発が可能となり、細胞内や動物個体内のイメージングが達成された。

非対称 SiR を母核とすることで、今後より実用的な近赤外蛍光プローブが数多く開発されていくと期待される。

第三章 非対称 SiR を母核とした 新規レシオ型 pH プローブの開発

第一節 ピペラジン環を有する非対称 SiR の光学特性

キサラン環上のアミノ基に様々なアルキル置換基を有する非対称 SiR 誘導体を系統的に合成し、光学特性を調べたところ、キサラン環上にインドリン構造とピペラジン環構造を有する非対称 SiR(66)の pH 7.4 における吸収極大波長は、キサラン環にインドリン構造とピロリジン環構造を有する非対称 SiR(65)と比較して約 80 nm 短波長化することを見出した。

すなわち、非対称 SiR はアミノ基上のアルキル置換基に脂肪族アミノ基が存在すると吸収波長が大きく短波長化することが分かった。

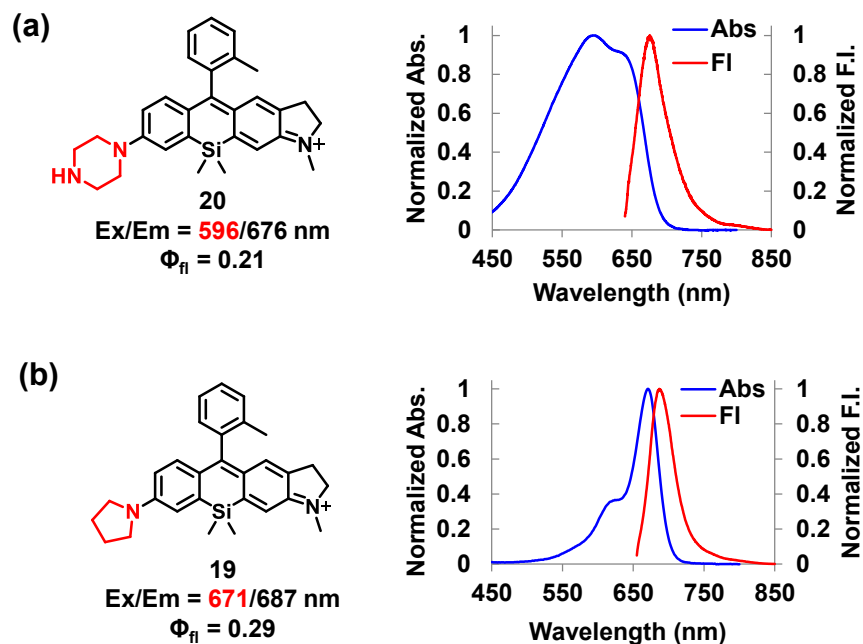


Figure 3-1-1. (a) Chemical structures, absorption and emission spectra of (a) SiR 66 and (b) 65. Photophysical properties and spectra were measured in 100 mM NaPi buffer (pH 7.4) containing 1% DMSO as a co-solvent.

前述の吸収波長の大きな短波長化は何によって生じているかを調べるために、**66** の吸収・蛍光スペクトルの pH 依存性を精査した(Figure 3-1-2)。**66** の吸収スペクトルは、溶液の pH が 10.0⇒3.0 まで変化するにつれて 666 nm から 588 nm まで約 80 nm もの大きな短波長化を生じ、一方で蛍光スペクトルは大きな短波長化は生じなかった(Figure 3-1-2b,d,e)。**66** の吸収極大波長である 666 nm の吸光度を pH に対してプロットしたところ、吸収波長変化に基づく pK_a は 8.4 であった(Figure 3-1-2f)。この値は報告されている *N*-フェニルピペラジンの共役酸の pK_a の値($pK_a = 8.80$)と近いことから³²、**66** はピペラジン部位の脂肪族アミノ基がプロトン化することによって蛍光性を有したまま吸収波長の大きな短波長化が生じたと考えられた(Figure 3-1-2a,c)。

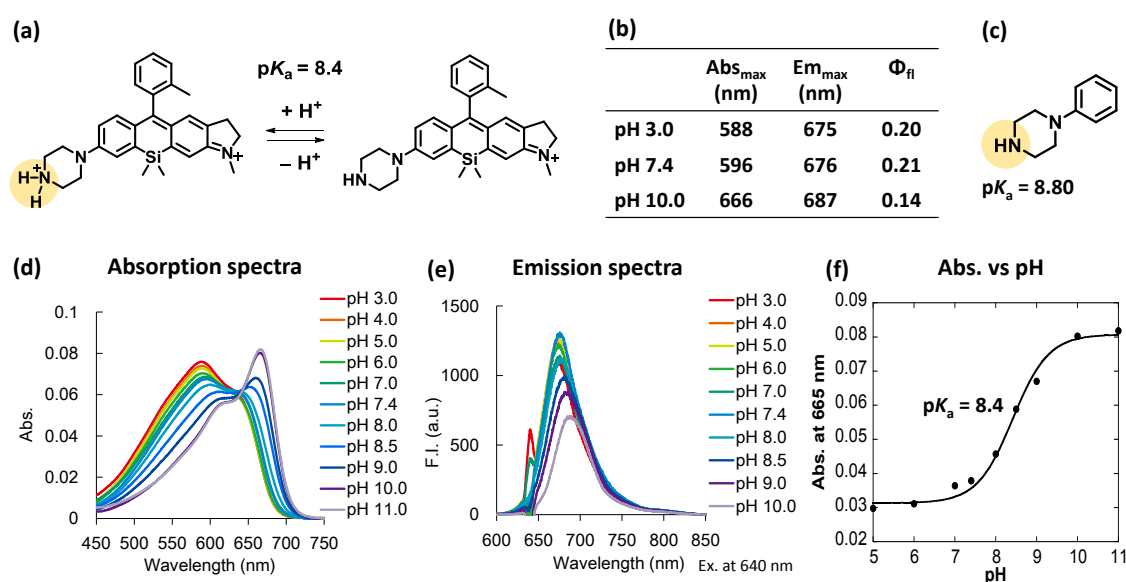
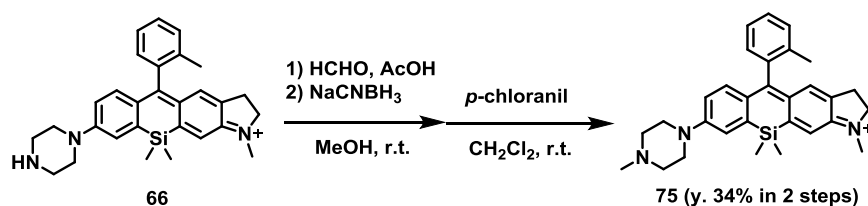


Figure 3-1-2. (a) Proposed pH-dependent balanced equation of SiR (**66**) (b) Photophysical properties of 2Me PipeIndoSiR were measured in 100 mM NaPi buffer. The determination of fluorescence quantum yields was conducted with a Hamamatsu Photonics Quantaaurus-QY. (c) Reported pK_a value of phenylpiperazine. (d,e) Absorption (d) and emission (e) spectra of 2 μ M SiR (**66**) at various pH values in 100 mM NaPi buffer containing 1% DMSO as a cosolvent. (f) Plots of absorbance of SiR (**66**) vs pH.

Scheme 3-1-1. Synthesis of unsymmetrical SiR (**75**).



66 は塩基性溶液中で次第に黒色になり分解する不安定な化合物であったため、**66** のピペラジン環の脂肪族アミノ基をメチル化した非対称 SiR (**75**)を合成した(Scheme 3-1-1)。**75** は塩基性溶液中で分解することは無かった。

非対称 SiR (**75**)の pH 特性を精査したところ、非対称 SiR (**66**)と同様に水溶液が酸性になることで蛍光性を有したまま吸収波長の大きな短波長化を示した(Figure 3-1-3b,c)。また、酸性側の吸収極大波長である 580 nm で励起した際の 675 nm の蛍光強度を、塩基性側の吸収極大波長である 665 nm で励起した際の 675 nm の蛍光強度で割ったレシオ(比)を pH に対してプロットした結果、レシオの値は pH が酸性になるに従って大きく変化することが分かった。すなわち、ピペラジン環を有する非対称 SiR は、異なる二波長で励起した際の蛍光強度のレシオの値から水溶液の pH を測定することができる、二波長励起一波長測光型のレシオ型 pH プロブとして機能することが分かった。

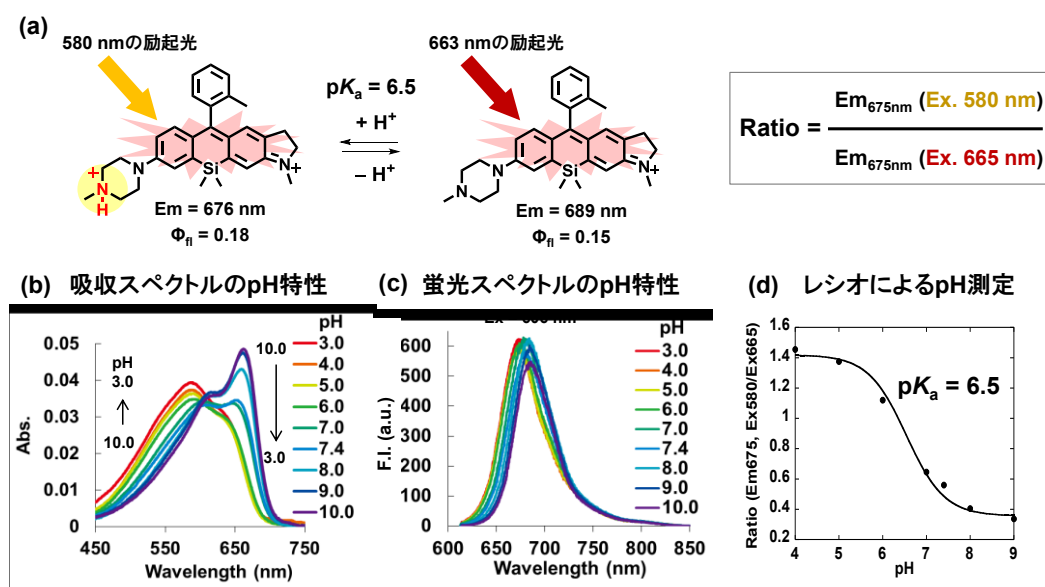


Figure 3-1-3. (a) Proposed pH-dependent balanced equation of SiR (**75**). (b) Absorption and (c) emission spectra of 1.6 μM SiR (**75**) at various pH values in 100 mM NaPi buffer containing 5% DMSO as a cosolvent. (d) Plots of the ratio vs pH.

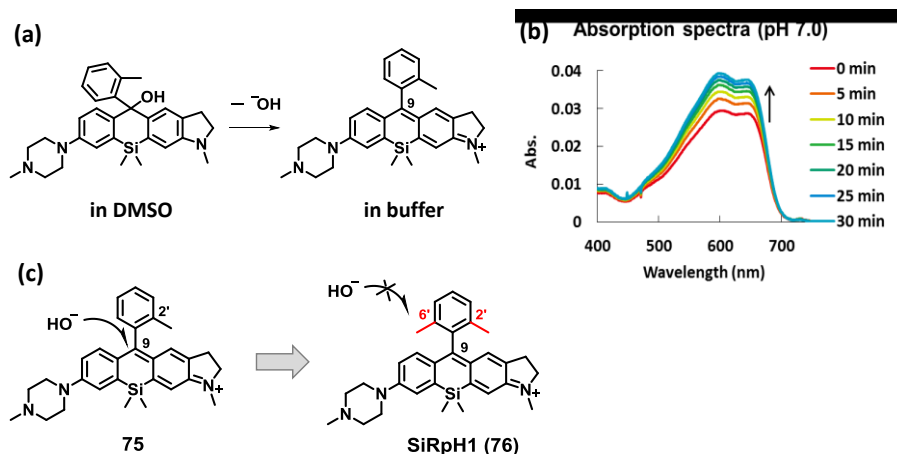
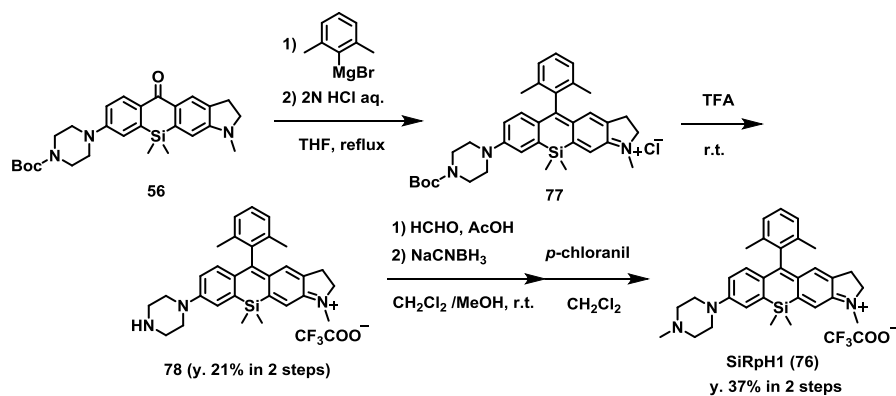


Figure 3-1-4. (a,b) Instability of **75** in aqueous solution. (c) Protection of the 9 position of the xanthene ring by methyl groups.

一方で、通常 2 成分系の反応では吸収スペクトルに等吸収点が存在するが、**75** の吸収スペクトルは等吸収点を示さなかった(Figure 3-1-3a)。そこで **75** の DMSO ストックを pH 7.0 の NaPi バッファーに溶解させた後に吸収スペクトルの経時変化を測定したところ、時間と共に吸光度が上昇する様子が観察された(Figure 3-1-4b)。これは、**75** はピペラジン部位の電位求引効果により LUMO エネルギーレベルが低く、そのため DMSO ストック溶液中で **75** の一部に対して OH^- がキサンテン環 9 位に求核攻撃し無吸収性の化合物を形成し、その溶液をバッファー中に溶解させると徐々に OH^- の解離が起こり、吸光度の上昇が生じたと考えられた (Figure 3-1-4a)。

そこで、キサンテン環 9 位の不安定性を改善するために、ベンゼン環部位の置換基を 2'-Me から 2',6'-diMe に変更した SiRpH1 (**76**) を設計・合成した(Scheme 3-1-2)。これにより、 OH^- だけでなく、細胞内の GSH (Glutathione) 等のチオール性求核分子に対しても安定性を向上することができる。

Scheme 3-1-2. Synthesis of SiRpH1 (**76**).



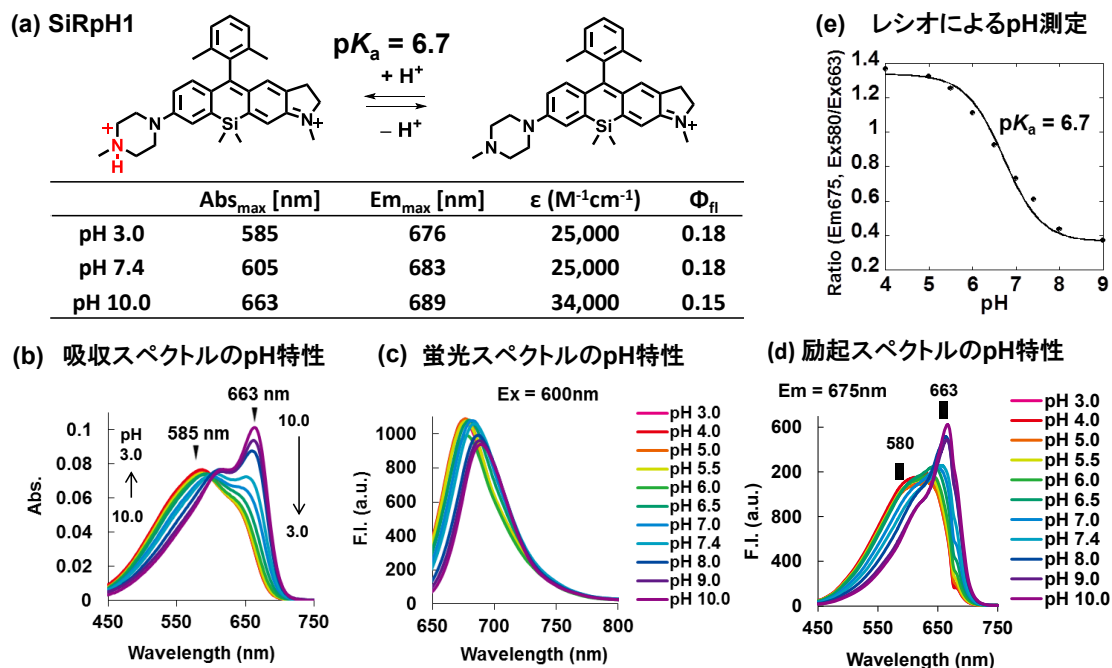


Figure 3-1-5. (a) Proposed pH-dependent balanced equation and photophysical properties of SiRpH1 (**76**). (b) Absorption, (c) emission and (d) excitation spectra of 2 μM SiRpH1 (**76**) at various pH values in 100 mM NaPi buffer containing 1% DMSO as a cosolvent. (e) Plots of the ratio vs pH.

実際に 2',6'-diMe 基を持つ SiRpH1 (**76**)の光学特性を精査したところ、2'-Me 体で見られた時間経過に伴う吸光度上昇は観察されず、期待通りに吸収スペクトルは等吸収点を示し、不安定性を克服した化合物となった(Figure 3-1-5)。励起スペクトルを測定したところ、吸収スペクトルと同様に水溶液の pH に応じて 580 nm 付近と 663 nm 付近に吸収極大を示し(Figure 3-1-65)、レシオ値から水溶液の pH を測定することが可能であった(Figure 3-1-5e)。そのため、ピペラジン環と 2',6'-diMe 基を有する非対称 SiR は、二波長励起一波長測光型のレシオ型 pH プロブの優れた母核になると考えられた。

第二節 ピペラジン環を有するローダミンとの比較

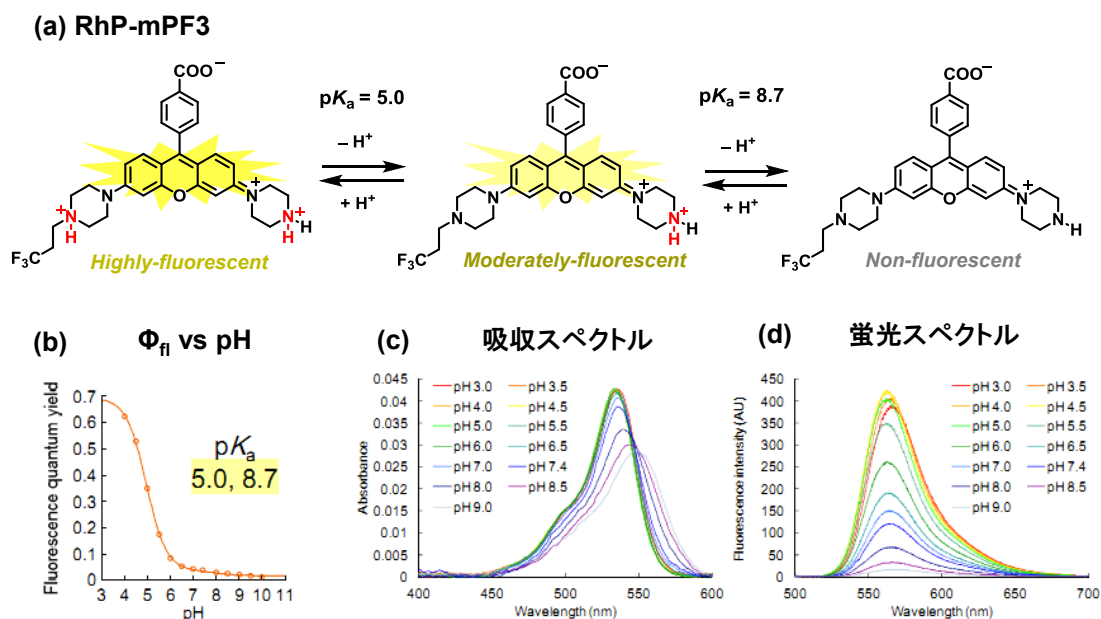


Figure 3-2-1. Photophysical properties of acidic-pH activatable fluorescence probe “RhP-mPF3”.³³

蛍光団の近傍に存在する脂肪族アミノ基は中性～塩基性環境では光誘起電子移動により蛍光団の蛍光消光を引き起こすが、酸性環境でアミンがプロトン化されることで消光能が低下する³⁴。この特性を利用して、ローダミンを母核とした酸性環境において蛍光性となる Off/On 型の pH 感受性蛍光プローブ「RhP-mPF3」が開発されている(Figure 3-2-1)³³。また、RhP-mPF3 の吸収波長は、脂肪族アミノ基のプロトン化に伴い短波長化するが、その短波長化の程度は約 20 nm と小さいことが知られている(Figure 3-2-1c)。

一方で、ピペラジン環を有する非対称 SiR は、大部分の脂肪族アミノ基がプロトン化されていない pH 10.0 においても蛍光性を保っており、脂肪族アミノ基のプロトン化に伴う吸収波長の短波長化の程度も約 80 nm と非常に大きかった(Figure 3-1-6)。

そのため、今回見出されたピペラジン環を有する非対称 SiR の脂肪族アミノ基のプロトン化に伴い蛍光性のまま吸収波長が大きく短波長する特性は、既存のローダミン蛍光色素とは異なる非対称 SiR に特徴的な性質であると考えられる。これらの非対称 SiR の光学特性は、細胞内の pH を定量的に測定するレシオ型蛍光プローブにおいて非常に有用であるため、本色素を母核として新規レシオ型 pH プローブの開発を試みた。

第三節 新規近赤外蛍光性レシオ型 pH プローブの開発

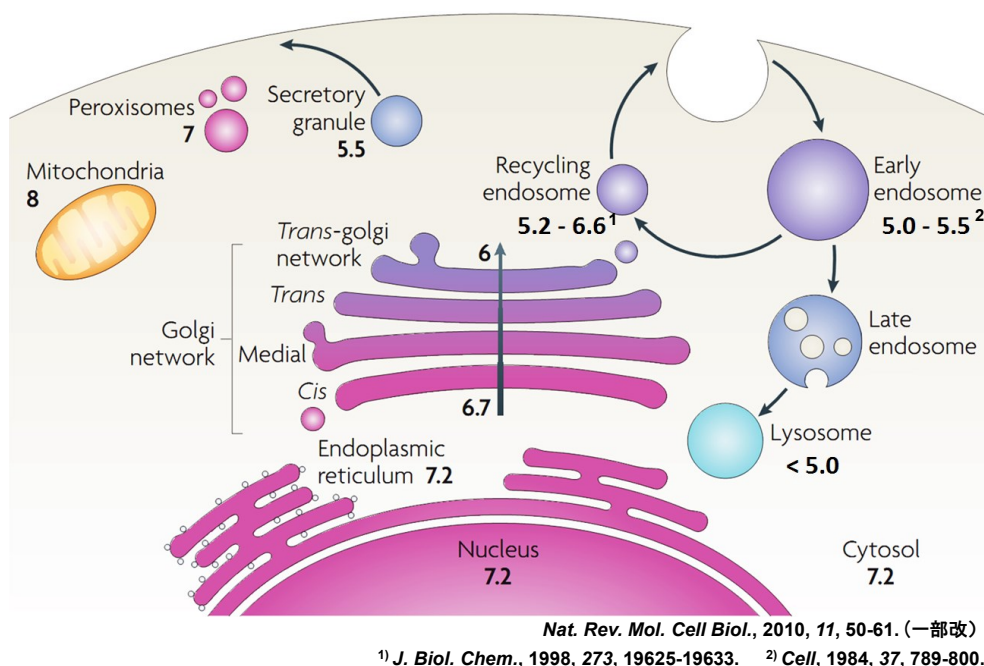


Figure 3-3-1. pH values in the different subcellular compartments.

細胞は取り込んだタンパク質や有機化合物の代謝、細胞構成成分の合成、輸送など、様々な生化学反応を高い時空間分解能で行い、生命機能を維持している。これらの生化学反応を効率良く行うために細胞内には様々な小器官(オルガネラ)が存在し、各オルガネラは種々の生化学反応に最適な固有の pH を保持している(Figure 3-3-1)³⁵。

pH は細胞機能の重要な調整因子であるため、オルガネラの pH が変化することでオルガネラの機能は大きく変化する。例えば、細胞内に取り込んだタンパク質を分解するエンドサイトーシス経路において、エンドソーム内の pH は初期エンドソーム⇒後期エンドソーム⇒リソソームとエンドソームの成熟に従って酸性化し、それに応じてエンドソーム内で起こる生化学反応もタンパク質の選別(初期エンドソーム)からタンパク質の分解(リソソーム)へと変化する。このように細胞内の pH は細胞内で起こる化学反応に深く関わっており、細胞内 pH を測定することは、細胞内で起きている生命現象を解明するために非常に重要である。

細胞内 pH の測定に最も汎用されている手法は Off/On 型 pH プローブを用いた蛍光イメージング法である(Figure 3-3-2a,b)。Off/On 型 pH プローブは pH 変化に伴い蛍光強度が増大するという特徴を有している。この蛍光強度の変化を蛍光顕微鏡やプレートリーダー等の機器により検出することで、生きたままの細胞内の pH を簡便に測定することができる。

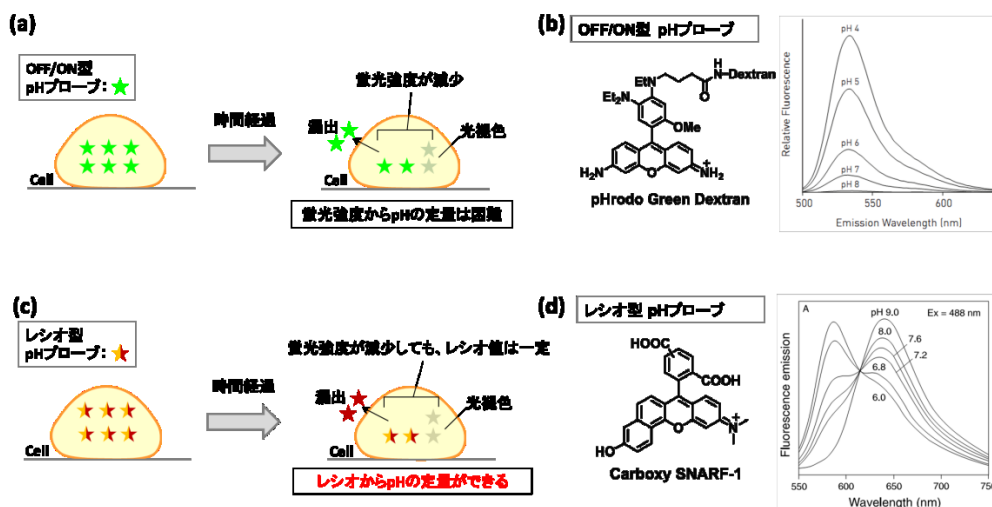


Figure 3-3-2. (a,b) Schematic images of Off/On pH probes and (c,d) ratiometric pH probes. (b,d; ref: Thermofisher HP <https://www.thermofisher.com>)

Off/On 型 pH プローブは励起および蛍光検出をそれぞれ 1 波長のみで行うため、比較的単純な光学系でも利用可能であるという利点がある。しかしながら、Off/On 型 pH プローブはプローブの局在変化、細胞内からの漏出、光褪色等による蛍光プローブの細胞内濃度の変化や、細胞や組織の厚さの差（共焦点蛍光顕微鏡を除く）、細胞や組織の自家蛍光や光の吸収・散乱係数の差などによる蛍光強度の増減を pH 変化として観測してしまうため、細胞内の pH を定量的に測定することは困難である。

これらの観測対象分子以外の要因の影響を受けにくくする蛍光イメージング手法として、レシオ型蛍光プローブを用いたレシオ測定法が用いられている(Figure 3-3-2c,d)。レシオ測定とは、異なる二波長の励起波長または蛍光検出波長を用いて同じ試料の測定を行い、それらの蛍光強度比(レシオ)を測定する手法である。レシオ測定に用いられるレシオ型蛍光プローブは、生体分子との選択的な反応の前後で吸収波長または蛍光波長が大きく変化する必要がある。

例えば、最も汎用されているレシオ型 pH プローブである SNARF-1 の 488 nm で励起した際の蛍光スペクトルを見ると、水溶液の pH が酸性化するにつれて蛍光極大波長が 633 nm から 585 nm まで 48 nm と大きく短波長化する(Figure 3-3-2d)。すなわち、pH 変化に応じて 585 nm 付近の蛍光強度と 633 nm 付近の蛍光強度のレシオが変化する。これによって、蛍光イメージング時に 585 nm と 633 nm の二波長で測光し、それらの蛍光強度のレシオを測定することで、pH 変化以外の影響を受けることなく、定量的な pH イメージングが可能となる。レシオ型の pH プローブはその有用性から多くの生命科学研究において用いられ、pH の関わる生命現象の解明に貢献してきた³⁶。

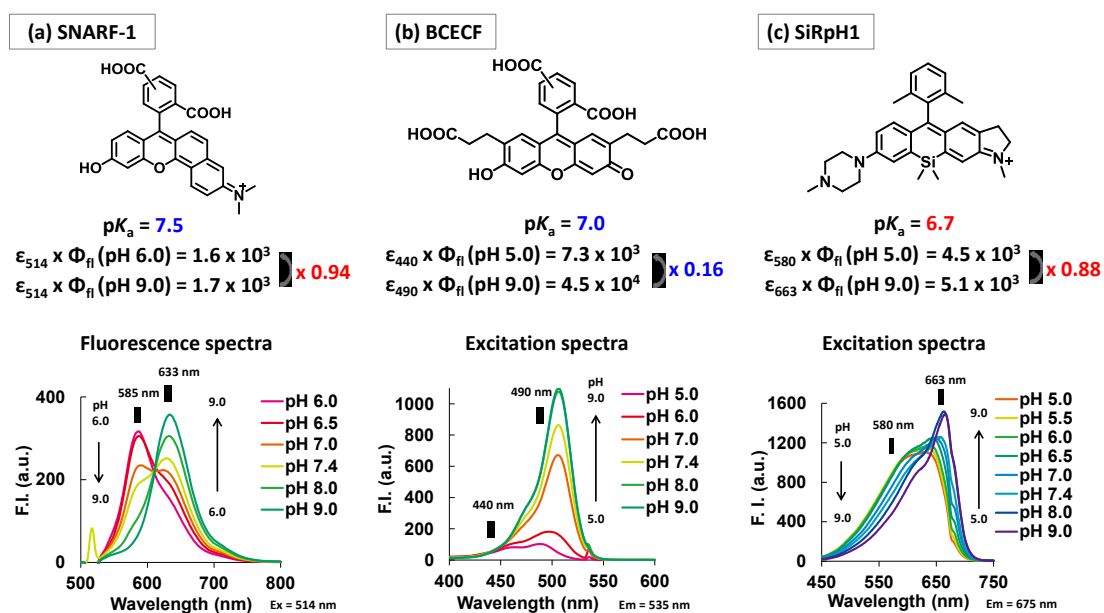


Figure 3-3-3. Photophysical and spectral properties of (a) 2 μM SNARF-1, (b) 2 μM BCECF and (c) 2 μM SiRph1 (76) at various pH values in 100 mM NaPi buffer containing 0.2% DMSO.

現在、生物学研究に汎用されているレシオ型 pH プローブは seminaphthorhodafluor (SNARF)類および、2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein (BCECF)に代表されるフルオレセイン類の 2 種類である(Figure 3-3-3a,b)。

SNARF-1はpH 依存的に蛍光波長が大きく変化する一波長励起二波長測光型であり、488 nm の励起光を切り替えることなく 2 波長の蛍光検出によりレシオ測定を行えるため、撮像時間が短くて済み、迅速な生命現象を捉えるのに適している。一方で $pK_a = 7.6$ であるため、応用先は細胞質の pH 測定に限られる。また、SNARF-1 は蛍光量子収率が OH フォームで 0.03、 O^- フォームで 0.09 と比較的低いため強い励起光を必要とすること、また光褪色を起こしやすい蛍光団であるため、長時間のイメージングには適さないことが知られている³⁶。

BCECF に代表されるフルオレセイン類は二波長励起一波長測光型であり、等吸収点である 440 nm とピークトップ近傍の 488 nm で励起することでレシオ pH イメージングが可能となる。フルオレセイン類は SNARF-1 同様に中性付近に pK_a を有しているため、細胞質の pH イメージングに適している。その一方で、レシオ型 pH プローブは pK_a よりも酸性側/塩基性側の pH での輝度の差が小さいほどレシオ測定が容易になるが、フルオレセイン類は pK_a の酸性側で輝度が低くなるためレシオ測定が難しく(Figure 3-3-3b)、また光褪色を起こしやすいことが知られている³⁶。

以上のように、既存のレシオ型 pH プローブは、①フェノール基に由来する中性付近の pK_a を持つため酸性オルガネラなど細胞質以外の小器官の pH 測定が難しく、化学修飾による pK_a の調整も難しい。② pK_a の両側の輝度差が大きくレシオ測定が難しい。③光褪色に弱く長時間のイメージングが難しい等の問題点があった。しかしながら、代替となる pH プローブが存在しないため、これまで本来適さないフルオレセイン誘導体を用いて酸性オルガネラの pH 測定が行われてきた^{37,38}。

一方、SiRpH1 (76)は、①ピペラジニアミノ基のプロトン化によりレシオが変化するため、アミノ基上に導入する置換基により pK_a を自由に調整できる。② pK_a の両側の輝度が同程度であり、レシオ測定に適している(Figure 3-3-3c)。③ローダミンを母核としており、光褪色に強い等のレシオ型 pH プローブの母核として優れた性質を有することが分かった。

そのため、本蛍光団を用いてレシオ型 pH プローブを開発することにより、既存のプローブが抱える問題点を解決し、pH に関わる様々な生命現象の解明に貢献できると考えた。

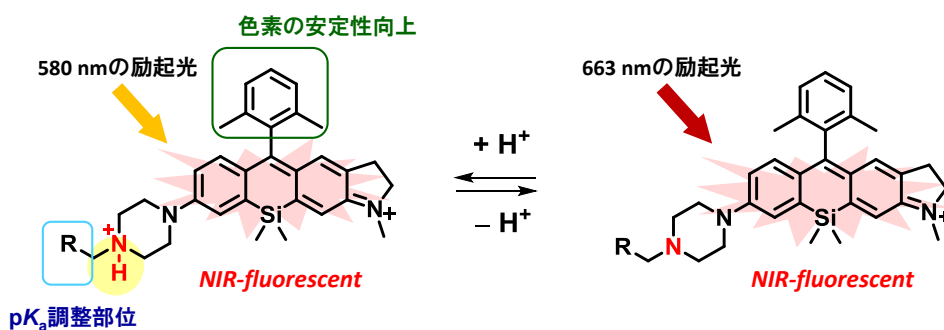


Figure 3-3-4. Molecular design of unsymmetrical SiR-based ratiometric pH probes.

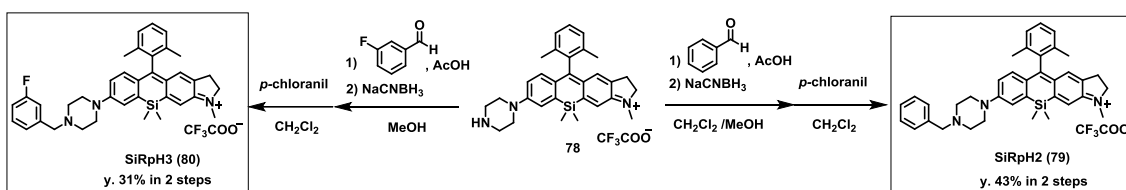
上図に非対称 SiR を母核としたレシオ型 pH プローブの分子設計を示す(Figure 3-3-4)。キサテン環にインドリン構造とピペラジン構造を有する非対称 SiR は、脂肪族アミノ基がプロトン化されると蛍光性を有したまま吸収波長が約 80 nm と大きく短波長化するため、580 nm と 660 nm の二波長で励起し、680 - 750 nm で蛍光測光する二波長励起一波長測光の近赤外蛍光性レシオ型 pH プローブとなる。また、キサテン環のピペラジニアミノ基に任意の置換基を導入することで pK_a を自由に調整できるため、弱塩基性、中性、弱酸性環境等の細胞内の様々なオルガネラの pH 測定に適したレシオ型 pH プローブを開発することができる。

初めに、酸性オルガネラの pH 測定に適した pK_a (= 5~6)を有するプローブの開発を行い、デキストランやトランスフェリン等の特定のオルガネラに取り込まれる生体高分子に標識し、酸性オルガネラの pH 測定を行うこととした。

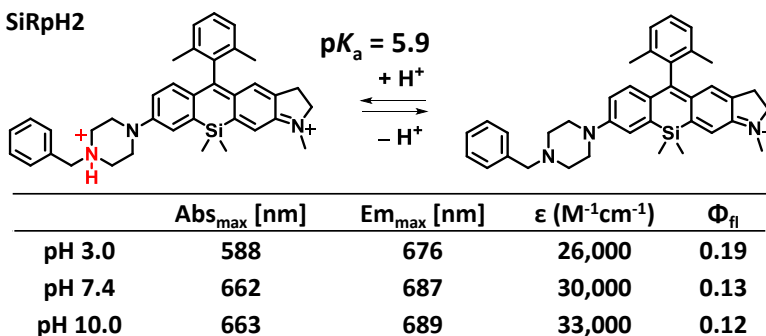
第四節 酸性の pK_a を有するレシオ型 pH プローブの開発

アミノ基上のメチル基をベンジル基に置換することで、アミノ基の pK_a が 1.0 程度低下することが一般的に知られている³⁹。そこで、ピペラジンに Bn 基を導入した SiRpH2 (**79**)、および更に電子求引性の高い 3-fluorobenzyl 基を導入した SiRpH3 (**80**) を合成した (Scheme 3-4-1)。

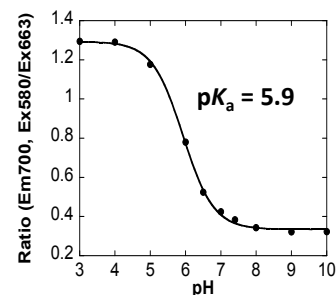
Scheme 3-4-1. Synthesis of SiRpH2 and SiRpH3.



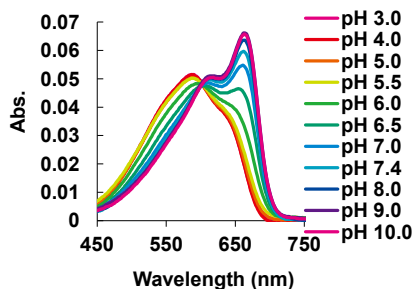
(a) SiRpH2



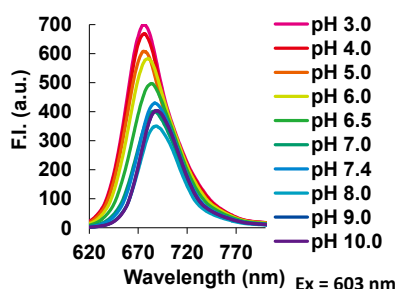
(e) レシオによる pH 測定



(b) 吸収スペクトルの pH 特性



(c) 蛍光スペクトルの pH 特性



(d) 励起スペクトルの pH 特性

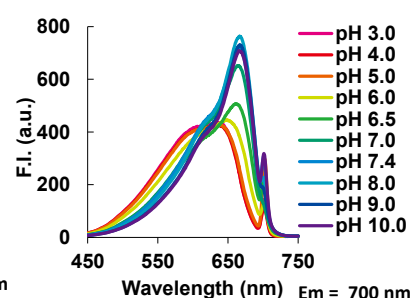


Figure 3-4-1. (a) Proposed pH-dependent balanced equation and photophysical properties of SiRpH2 (**79**) measured in 100 mM NaPi buffer. (b) Absorption, (c) emission and (d) excitation spectra of 2 μ M SiRpH2 (**79**) at various pH values in 100 mM NaPi buffer containing 1% DMSO as a cosolvent. (e) Plots of the ratio vs pH. The determination of fluorescence quantum yields was conducted with a Hamamatsu Photonics Quantaaurus-QY.

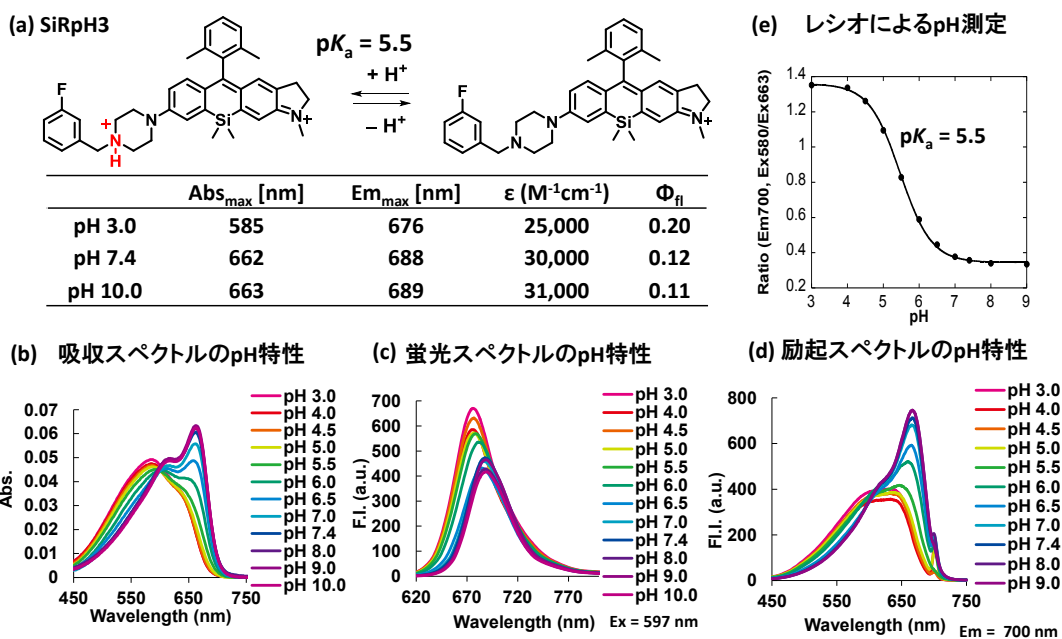


Figure 3-4-2. (a) Proposed pH-dependent balanced equation and photophysical properties of SiRpH3 (**80**) measured in 100 mM NaPi buffer. (b) Absorption, (c) emission and (d) excitation spectra of 2 μM SiRpH2 (**80**) at various pH values in 100 mM NaPi buffer containing 1% DMSO as a cosolvent. (e) Plots of the ratio vs pH. The determination of fluorescence quantum yields was conducted with a Hamamatsu Photonics Quantaurus-QY.

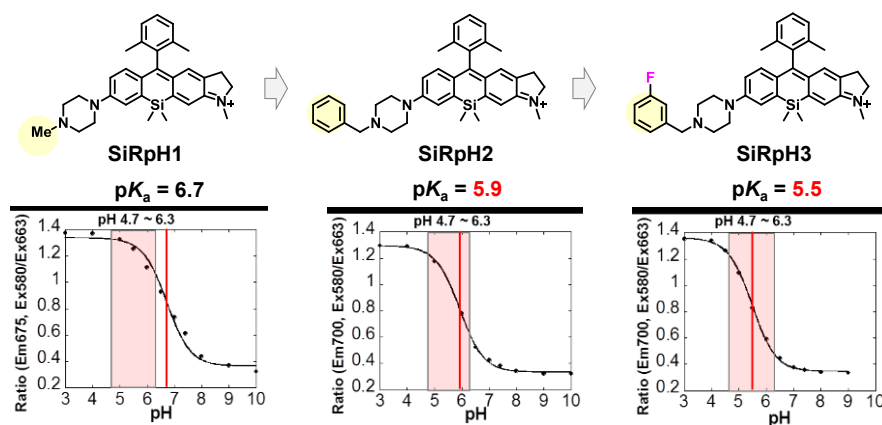


Figure 3-4-3. pK_a modification of pH probes.

合成した SiRpH2, SiRpH3 の光学特性を精査したところ、期待通りにプローブの pK_a は 5.9、5.5 まで低下し、酸性オルガネラの pH 変化域である pH 4.7~6.3 で大きなレシオ値の変化が期待された(Figure 3-4-2, Figure 3-4-3)³⁵。以上のように、ピペラジン環上の電子求引基を適切に選択することで、酸性オルガネラの可視化に適した pK_a を有するレシオ型 pH プローブの開発に成功した。

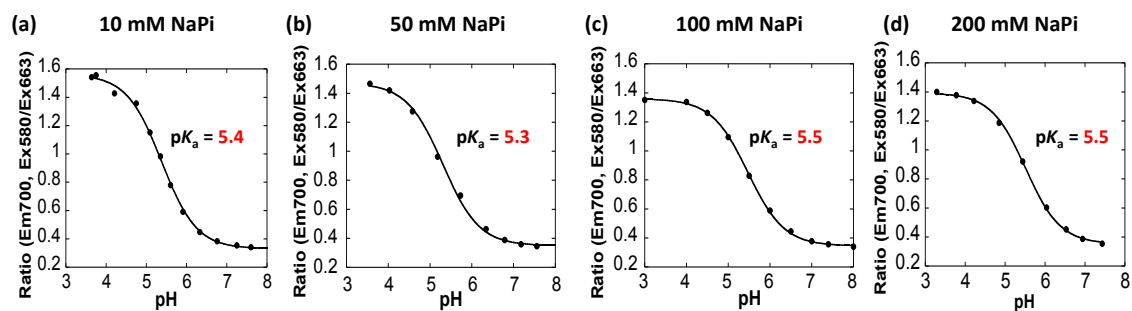


Figure 3-4-4. Plots of the ratio value of 2 μM SiRpH3 vs pH in (a) 10 mM, (b) 50 mM, (c) 100 mM, (d) 200 mM NaPi buffer containing 1% DMSO as a co-solvent.

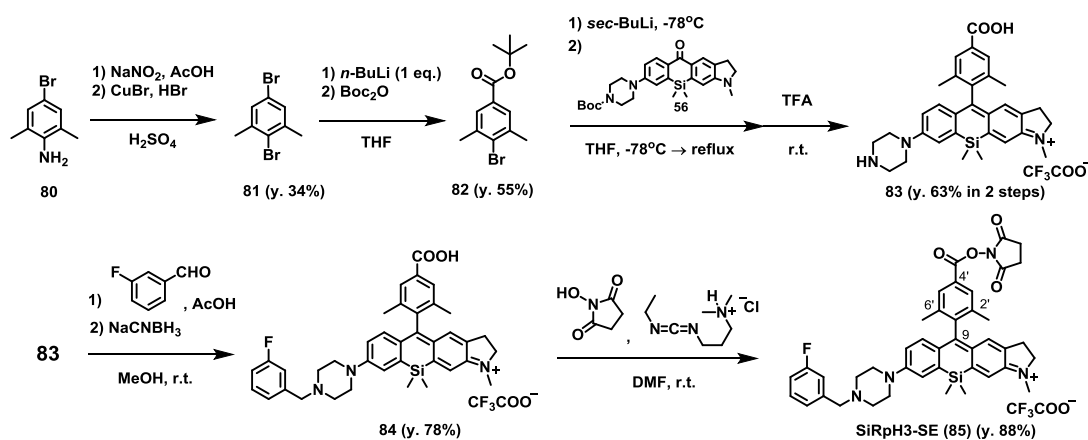
非対称 SiR を母核としたレシオ型 pH プロブのイオン強度依存性の確認を行った (Figure 3-4-4)。酸解離平衡などイオンが関わる化学平衡において、溶液中のイオン強度(塩濃度)が解離定数に影響を与えることがある。pH プロブのレシオ値がイオン強度によって影響を受けることで、エンドソーム内のイオン強度の変動により pH 測定を正確に行うことが難しくなる。そこで、開発した SiRpH3 のイオン強度依存性を検討することにした。イオン強度が 10、50、100、200 mM の NaPi バッファー中で励起スペクトルを測定し、レシオを pH に対してプロットすることで SiRpH3 の pK_a を測定した。その結果、本プロブの pK_a の変化はイオン強度が 10 mM~200 mM では 0.2 程度であり、イオン強度の影響を受けずに pH 測定が行える優れた特性を有していた。そこで次に、SiRpH3 を生体高分子に標識し、リソソームの pH を測定することとした。

第五節 生体高分子標識用 pH プローブの開発

蛍光プローブは細胞外液に添加するだけでは、細胞質やミトコンドリア、リソソームなど細胞内の様々な器官に分布するが、タンパク質等の生体高分子に標識することで、そのタンパク質の細胞内動態に従って小器官選択的に蛍光プローブ複合体を送達することができる。

そこで、酸性オルガネラであるリソソーム選択的にプローブを送達するために、SiRpH3-デキストラン複合体の作成を試みた。分子量が 10 kDa の多糖類であるデキストランは細胞膜非透過性であり、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれると初期エンドソーム⇒エンドソーム⇒リソソームへと徐々に輸送されるため、デキストランに蛍光プローブを標識することで、リソソーム選択的に蛍光プローブを送達できることが知られている。そこで、10 kDa アミノデキストランにプローブを標識するために、NHS エステルを有する SiRpH3-SE を合成し、SiRpH3 標識デキストランを作成して光学特性の精査を行った。

Scheme 3-5-1. Synthesis of SiRpH3-SE (85)



Succinimidyl ester (SE)を介してアミノデキストランに標識可能な SiRpH3-SE の合成を達成したため、デキストランへのラベル化反応・ゲル濾過カラムによる精製を行った。デキストラン標識の際には、Dextran : SiRpH3-SE = 1:1, 1:3, 1:9, 1:15 の 4 条件を試みた。

Protocol :

デキストラン(1 当量)と 1, 3, 9, 15 当量のプローブ SE 体を加えたホウ酸緩衝液(pH 8.0)を室温で 1 時間半ボルテックスし、PD-10 ゲル濾過カラムを用いて小分子とデキストランを分離・精製、凍結乾燥し、プローブ標識デキストランの 1 mM 水溶液を調整した。

1. デキストランのラベル化率の決定

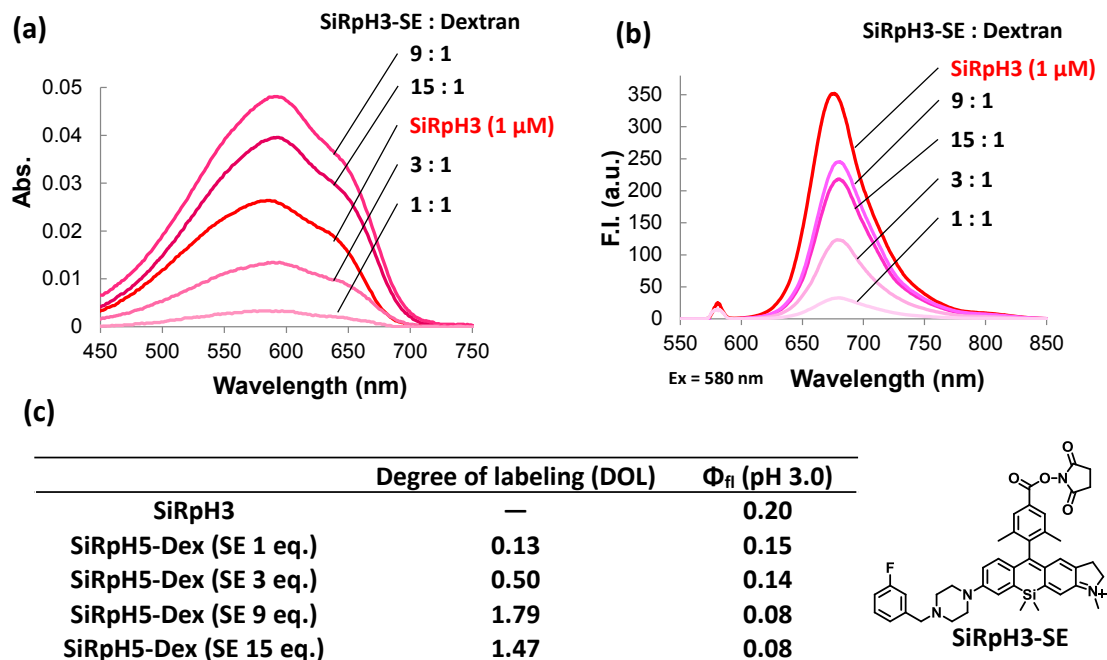


Figure 3-5-1. Determination of the degree of labeling (DOL). (a) Absorbance and (b) fluorescence spectra of 1 μM SiRpH3 and 1 μM SiRpH3-Dextran conjugates (SiRpH3-Dex) in 100 mM NaPi buffer at pH 3.0. For the determination of fluorescence quantum yields, SiRpH3 (Φ_f = 0.20) was used as fluorescence standard.

次に、精製した 1 μM の SiRpH3 標識デキストラン(SiRpH3-Dex)の pH 3.0 のバッファ一中での吸光度を測定し、1 μM の pH プロブの吸光度と比較することで、デキストラン 1 分子あたりの SiRpH3 の平均標識数(Degree of labeling, DOL)を決定した(Figure 3-5-1a,c)。吸光度から、標識反応時の SiRpH3-SE/Dextran の比が 1、3、9、15 の濃度条件において、SiRpH3-Dex の DOL は 0.1、0.5、1.8、1.5 となった。また、DOL の異なる SiRpH3-Dex からどの標識体を利用するかを検討するため、DOL の異なる SiRpH3-Dex の光学特性を調べた(Figure 3-5-1b)。その結果、SiRpH3-Dex の蛍光量子収率は DOL が上昇するほど低くなる傾向にあり、DOL = 1.8 では SiRpH3 の 40%程度まで低下した。これはデキストランに 2 分子以上の色素が標識され、濃度消光が生じたためと考えられる。

そこで、SiRpH3-SE の濃度と DOL の間に線形性より標識反応の正常な進行が確認され、デキストラン 1 分子あたりの蛍光強度が最も高い DOL = 1.8 の SiRpH3-Dex を以降の実験に用いることとした。

2. SiRpH3-Dex の光学特性の精査

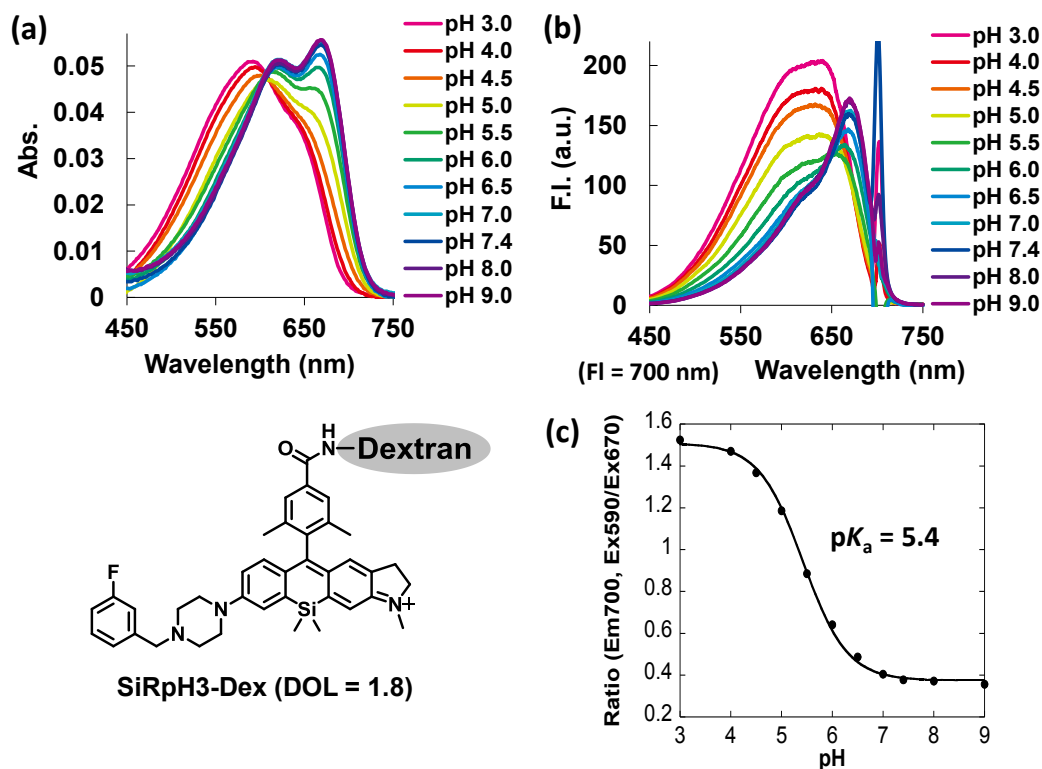


Figure 3-5-2. (a) Absorbance and (b) excitation spectra of 1 μ M SiRpH3-Dex at various pH values in 100 mM NaPi buffer. (c) Plots of the ratio vs pH.

次に、開発した SiRpH3-Dex の pH 特性を調べることで、吸収・励起スペクトル変化やレシオ値変化に基づく pK_a が標識後も維持されているか検討を行った。吸収・励起スペクトルの形状は SiRpH3 と同様であり、バッファーが塩基性になるにつれて吸収波長が 80 nm ほど長波長化した。590 nm で励起した際の 700 nm の蛍光強度を 670 nm で励起した際の 700 nm の蛍光強度で割ったレシオ値を算出し、pH に対してプロットすることでレシオ値変化の pK_a を算出したところ、 $pK_a = 5.4$ となりデキストランに標識を行った後も酸性オルガネラの可視化に適した酸性の $pK_a = 5.5$ を有することが分かった。

酸性オルガネラの可視化に適した pK_a を有する pH プローブ標識デキストランが得られたため、次に細胞にエンドサイトーシスによりデキストランを取り込ませ、リソソーム内の pH 測定を試みることにした。

リソソームのイメージングを試みるにあたり、開発した SiRpH3-Dex を細胞外液に添加し、SiRpH3-Dex がエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれるかを調べた(Figure 3-5-3a)。

Protocol :

HeLa 細胞の培地を FBS-free DMEM に交換して 16 時間培養⇒100 ng/mL EGF, 100 µg/mL Alexa488-Dextran または SiRpH3-Dextran を含む HBSS に交換して 37°C で 30 分間インキュベーション⇒3 回 wash した後に Leica TCS SP5 共焦点蛍光顕微鏡にてイメージング

SiRpH3-Dex を含むバッファー中でインキュベーションを行ったところ、細胞内のミトコンドリアとリソソームから強い蛍光が観測され、期待したようなエンドソーム選択的な蛍光像は観察されなかった(Figure 3-5-3b)。コントロール実験として、Alexa488-Dextran を含むバッファー中で HeLa 細胞をインキュベーションした結果、エンドソーム由来と考えられるドット状の緑色蛍光が観測されたことから、作成した SiRpH3-Dex に問題があると考えた。

SiRpH3-Dex を用いた場合にミトコンドリアとリソソームから蛍光が観察された原因は、SiRpH3-Dex を作成する際に、標識されなかった脂溶性の高い SiRpH3-SE とデキストランとをゲル濾過カラムで完全に分離精製できていないため、未標識の SiRpH3 が細胞膜を透過してミトコンドリアとリソソームに局在したためと考えられた(Figure 3-5-3c)。

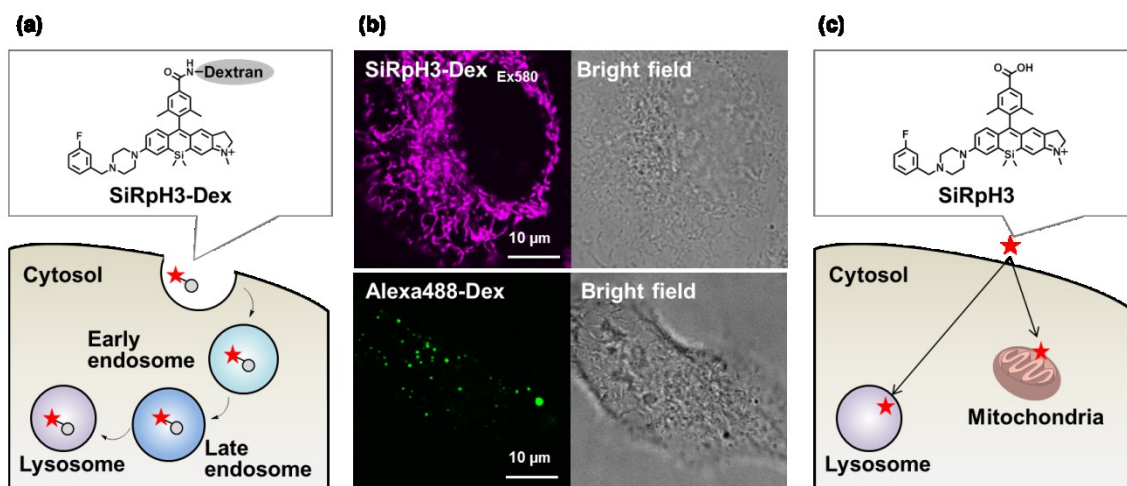


Figure 3-5-3. (a) Schematic image of endocytic delivery of SiRpH3-Dex to lysosome. (b) Representative fluorescence images of SiRpH3-Dextran- or Alexa488-Dextran-treated HeLa cells. (c) Schematic image of non-specific labeling by prepared SiRpH3-Dex.

3. 親水性 pH プローブの開発

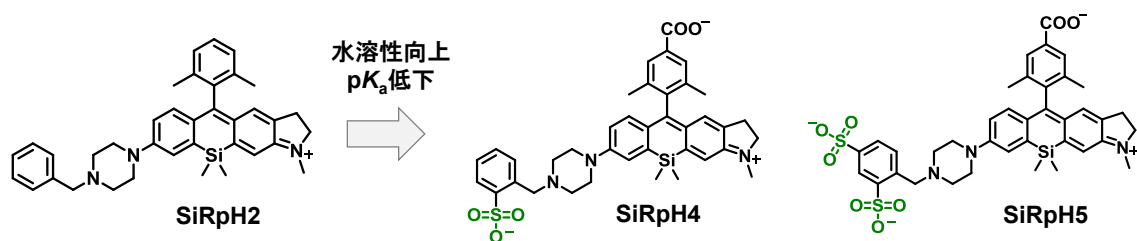
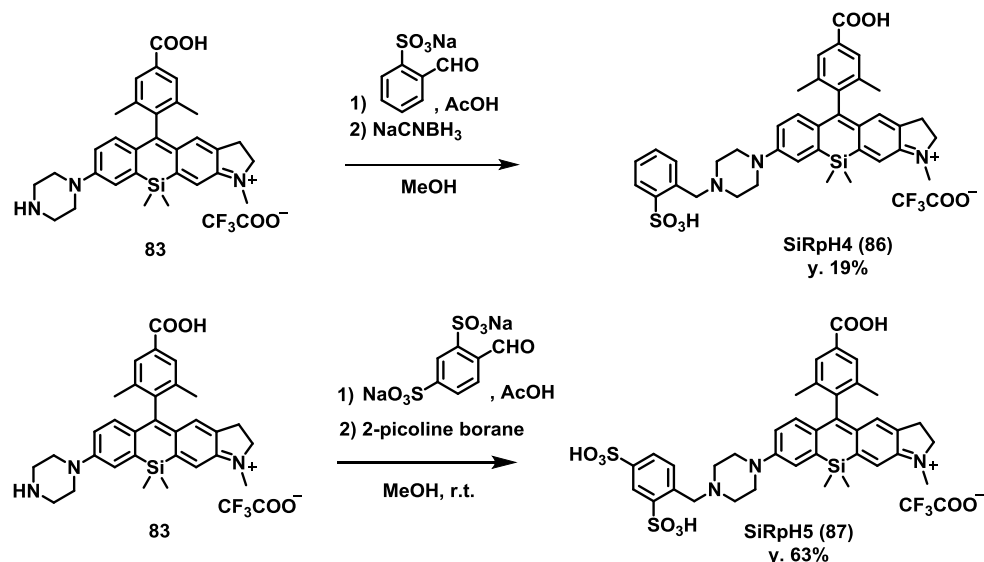


Figure 3-5-4. Molecular design of hydrophilic pH probes.

そこで、分子内に親水性官能基を導入することで、ゲル濾過カラムによる精製を容易にし、かつ残存する未標識のプローブが細胞膜を透過せずに非特異的な染色を防ぐ分子設計を行った(Figure 3-5-4)。具体的には、ベンジル基上に高い水溶性と電子求引性を備えたスルホ基を導入することで、水溶性を向上させると同時に pK_a がより酸性になることを期待してオルト位にスルホ基を持つ SiRpH4、およびオルト位とパラ位にスルホ基を有する SiRpH5 を分子設計・合成した。

Scheme 3-5-2. Synthesis of SiRpH4 (86) and SiRpH5 (87).



4. 細胞膜透過性、 pK_a の確認

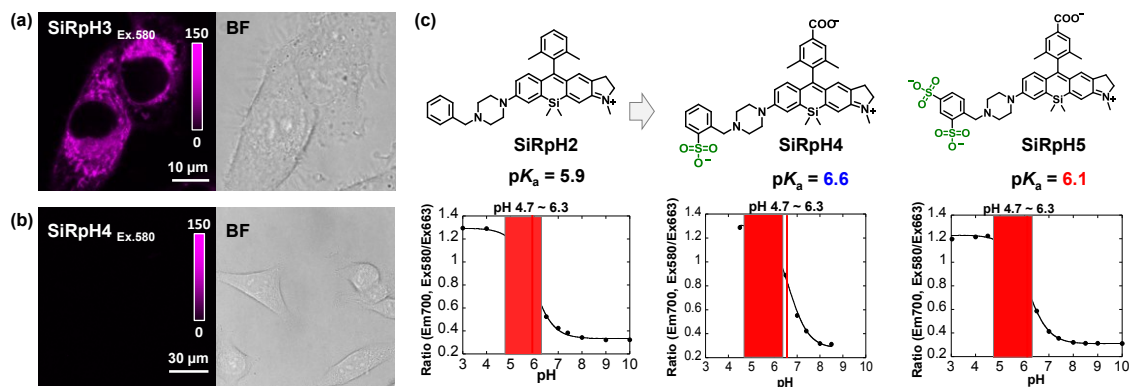


Figure 3-5-5. Fluorescence images of (a) SiRph3- or (b) SiRph4-treated HeLa cells. HeLa cells were incubated for 5 min in HBSS containing 1 μ M SiRph3 or SiRph4, and then imaged with Leica TCS SP5. (c) Chemical structures and pK_a values of pH sensors.

スルホ基を有するプローブが合成できたため、その細胞膜非透過性の確認を行った。脂溶性の高い 3-fluorobenzyl 基を持つ SiRph3 と親水性の高い 2-sulfobenzyl 基を持つ SiRph4 を細胞外液に添加し、蛍光イメージングを行った。SiRph3 は細胞膜を透過してミトコンドリアとリソソームから蛍光が確認された一方で、SiRph4 を添加しても細胞内から蛍光は観察されず、スルホ基の導入によりプローブを細胞膜非透過性にすることに成功した(Figure 3-5-5a,b)。スルホ基には複数の水分子が配位することが知られており、スルホ基 1 つでも高い親水性を付与でき、細胞膜非透過性になったと考えられる⁴⁰。

親水性のプローブが開発できたので、次にプローブの励起スペクトルを測定し、酸性オルガネラの可視化に適した pK_a を有しているか確認を行った(Figure 3-5-5c)。SiRph4 は電子求引基である 2-sulfobenzyl 基を有するが、その pK_a は期待に反して無置換のベンジル基を持つ SiRph2 より 0.7 上昇した。一方、オルト位に加えパラ位にもスルホ基を持つ SiRph5 は、酸性オルガネラの可視化に適した pK_a を示し、酸性オルガネラの可視化に適したレシオ型 pH プローブとなった。

5. SiRpH5 の光学特性の精査

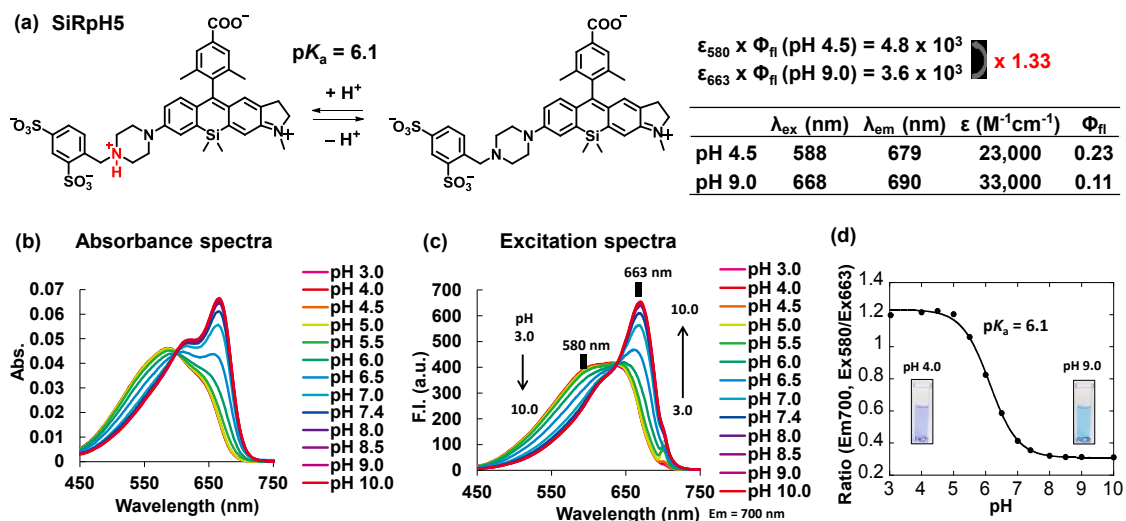


Figure 3-5-6. (a) Proposed pH-dependent balanced equation and photophysical properties of SiRpH5 (**87**) measured in 100 mM NaPi buffer. (b) Absorbance and (c) excitation spectra of 2 μ M SiRpH5 at various pH values in 100 mM NaPi buffer containing 0.1% DMSO as a cosolvent. (d) Plots of the ratio vs pH. The determination of fluorescence quantum yields was conducted with a Hamamatsu Photonics Quantaaurus-QY.

SiRpH5 (**87**)の光学特性の精査を行った。これまで開発した pH プローブ群において、吸収・励起スペクトルが等吸収点を通過しないことがあったが、SiRpH5 の吸収・励起スペクトルはきれいに等吸収点を通過した。これはスルホ基が 2 つ導入されたことで水溶性が向上し、水中での安定性が向上したためと考えられた。また、SiRpH5 は、他の非対称 SiR を母核とした pH プローブ同様に、 pK_a の両側の輝度の差が小さいというレシオ測定に適した特徴を有していた。

以上のように、スルホベンジル基を導入する分子設計により、細胞膜非透過性で酸性オルガネラの可視化に適したレシオ型 pH プローブ「SiRpH5」の開発に成功した。SiRpH5 のカルボン酸を介して生体分子に標識することで非特異的な染色を防ぎ、標的とする酸性オルガネラの pH を測定できると期待される。

6. SiRpH5 の GSH に対する安定性の評価

細胞内には求核性の高いチオール基を有する GSH が 1 mM~10 mM の濃度で存在するとされている⁴¹。LUMO エネルギーレベルが低い SiR 蛍光色素は GSH によるキサンテン環 9 位への求核付加反応が起こりやすく、このような GSH の求核付加は細胞イメージング時に蛍光プローブの蛍光強度の減少につながると考えられる。そこで、開発した SiRpH5 が 0.1~10 mM の GSH 存在下において求核攻撃を受けるか検討を行った。

2 μ M の SiRpH5 および 0, 0.1, 1, 10 mM の還元型 GSH を含む NaPi バッファー溶液(pH 4.0, 7.4)を調整し、吸光・蛍光スペクトルを測定した。その結果、ピペラジニアミノ基がプロトン化する pH 4.0、およびプロトン化しない pH 7.4 のどちらの pH 条件においても吸光度・蛍光強度の減少は観測されず、SiRpH5 は 10 mM の GSH によっても求核攻撃を受けないことが分かった。2',6'-diMe 構造が 9 位を立体的に保護し、求核剤に対する安定性を向上させていると考えられている。ピペラジジン環による LUMO エネルギーレベルの低下が予想された SiRpH5 であったが、細胞内チオールの影響を受けずに使用できると考えられる。

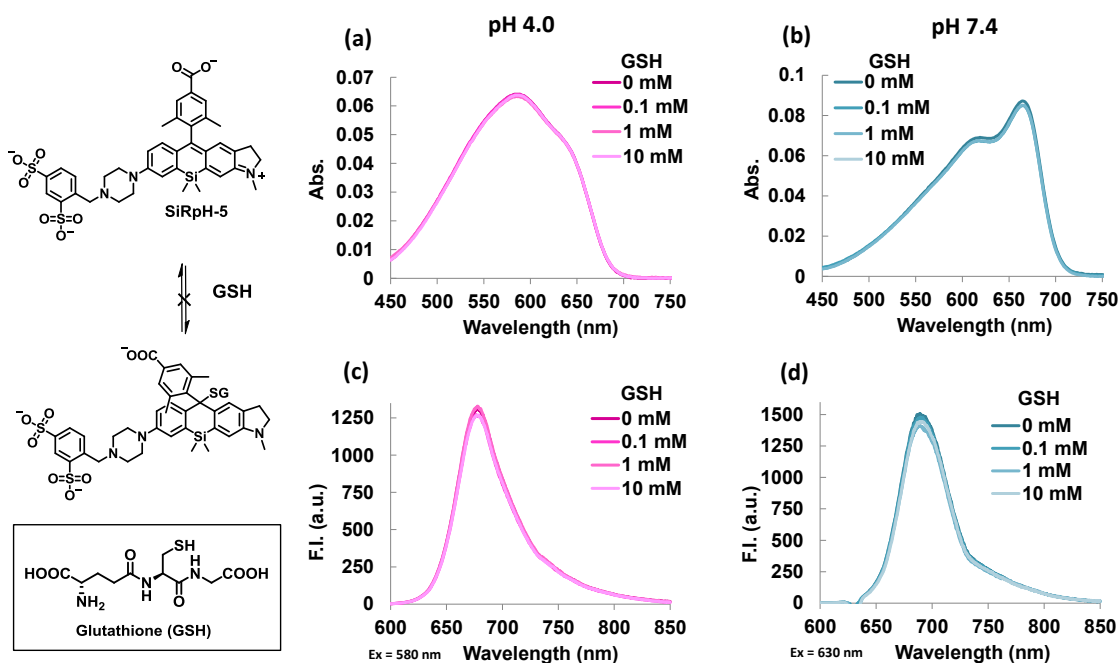


Figure 3-5-7. (a,b) Absorption and (c,d) emission spectra of 2 μ M SiRpH-5 at pH 4.0 and pH 7.4 in 100 mM NaPi buffer containing 0, 0.1, 1, 10 mM GSH and 0.1% DMSO.

7. SiRpH5 の光褪色耐性の検討

既存のレシオ型 pH プローブである SNARF-1 や BCECF は光褪色に弱く長時間の蛍光イメージングが難しいことが知られており、光褪色に強いレシオ型 pH プローブが開発できれば、より多くの実験系で pH イメージングが可能になる。そこで開発した SiRpH5 の光褪色耐性を検討した。

1 μM の BCECF, SNARF-1, SiRpH5 を含む pH 7.4 緩衝液に対して、適切なフィルターを通して 26 mW の光を照射した後に、吸光・蛍光スペクトルを測定した(Figure 3-5-8)。BCECF, SNARF-1 は 48 J/cm^2 の光照射により蛍光強度が照射前の 60~70%に低下した。一方で SiRpH5 は 96 J/cm^2 の光照射を行っても蛍光強度の低下は観測されなかった。光褪色に強い SiR 蛍光色素を母核とした SiRpH5 は、既存のレシオ型 pH プローブと比べて高い光褪色耐性を持っており、そのため少数の生体分子にプローブを標識して長時間イメージングを行う必要がある実験系において、強力なイメージングツールになると考えられる。

以上のように、非対称 SiR を母核とすることで、 $\text{p}K_a$ の両側の輝度の差が小さく、非特異的な染色を防ぐ細胞膜非透過性および、GSH や光褪色に対する高い安定性、酸性オルガネラに適した $\text{p}K_a$ を有する優れたレシオ型 pH プローブの開発を行うことに成功した。

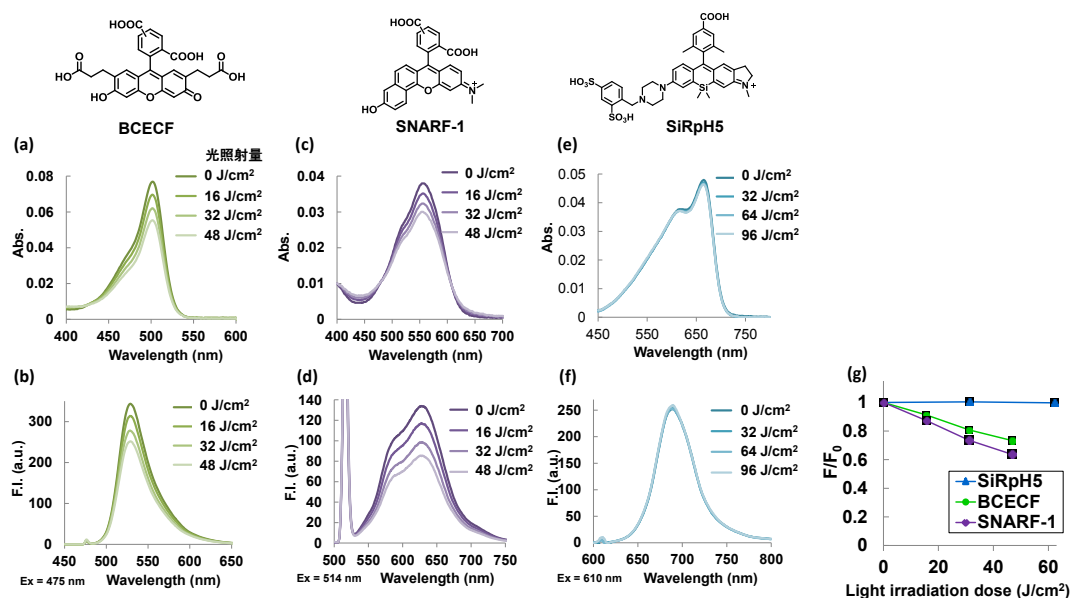


Figure 3-5-8. Photostability of fluorescent dyes. Absorption and fluorescence spectra of 1 μM (a,b) BCECF, (c,d) SNARF-1 and (e,f) SiRpH5 at pH 7.4 in 100 mM sodium phosphate buffer containing 0.1% DMSO as a cosolvent. Samples were exposed to the light ((a,b) 26 mW, 450-510 nm, (c,d) 26 mW, 515-569 nm, (e,f) 26 mW, 615-695 nm) for described time by a fiber optic illuminator MAX-301 (Asahi Spectra) equipped with a 150 W xenon lamp (Bunkoukeiki). (g) Fluorescence intensity changes of fluorescent dyes under the light irradiation.

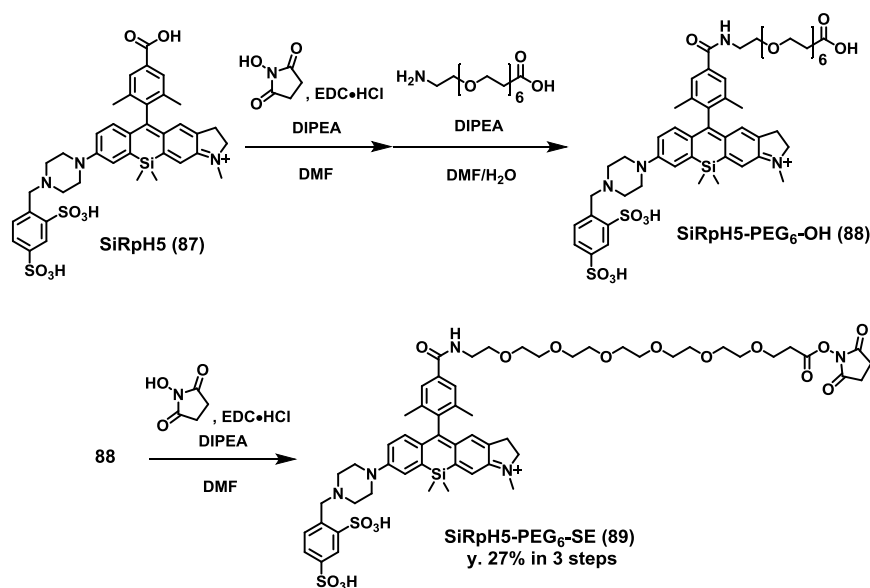
第六節 pH プローブ標識デキストランを用いたリソソームの pH イメージング

1. SiRpH5 標識デキストランの開発

高い光安定性・細胞膜非透過性・酸性オルガネラの可視化に適した pK_a を有するレシオ型 pH プローブ「SiRpH5」が開発できたため、次は生体高分子への標識を行い、生細胞イメージングに応用できるか検討を行った。具体的には、SiRpH5 を 10 kDa アミノデキストランに標識し、脂溶性の高い SiRpH3 では未標識のプローブが除けずに達成できなかったリソソームの pH イメージングを再度試みた。

プローブの標識反応の効率を向上させて未標識のプローブを少なくするため、また生体高分子の表面とプローブの間に距離をとり標識によるプローブの光学特性の変化を抑えるため、ポリエチレングリコール(PEG₆)リンカーを挟んで活性な NHS エステルを有する SiRpH5-PEG₆-SE (89)を合成し、SiRpH5 標識デキストラン(SiRpH5-Dex)の作成を行った。

Scheme 3-6-1. Synthesis of SiRpH5-PEG₆-SE (89)



Succinimidyl ester (SE)を介してアミノデキストランに標識可能な SiRpH5-PEG₆-SE を合成できたため、デキストランへのラベル化反応・ゲル濾過カラムによる精製を行った。デキストラン標識の際には、Dextran : SiRpH5-PEG₆-SE = 1 : 3.8, 1 : 7.5, 1 : 11.3 の 3 条件を試みた。

Protocol :

10 kDa アミノデキストラン(5.1 moles amine/mole、1 当量)を含む 0.1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液(pH 8.4)と 3.8, 7.5, 11.3 当量の SiRpH5-PEG₆-SE を含む 0.1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液(pH 8.4)を 1:1 で混和し(最終濃度:2 mg/mL アミノデキストラン, 0.76, 1.5, 2.26 mM SiRpH5-PEG₆-SE, 26% DMSO)、室温で 2 時間ボルテックスし、PD-10 ゲル濾過カラムを用いて小分子とデキストランを分離・精製、凍結乾燥し、プローブ標識デキストラン(SiRpH5-Dex)の 1 mM 水溶液を調整した。

2. 作成した SiRpH5-Dex の光学特性

次に、1 μ M の SiRpH5-Dex の pH 3.0 のバッファー中での吸光度を測定し、1 μ M の SiRpH5 の吸光度と比較することで、デキストランに対する SiRpH5 の標識数(DOL)を決定した(Figure 3-6-1a,c)。標識反応時の SiRpH5-PEG₆-SE/Dextran が 3.8、7.5、11.3 の濃度条件において SiRpH5-Dex の DOL は 2.6、4.2、5.1 となり、SE 体の濃度が高いほど DOL は上昇した。また、使用したアミノデキストラン 1 モルが有するアミノ基は 5.1 モルであるため、11.3 当量の SE 体を使用した場合は全てのアミノ基が標識されたと考えられる。

DOL の異なる SiRpH5-Dex の光学特性を測定したところ、SiRpH5-Dex の蛍光量子収率は DOL が上昇するほど低くなる傾向にあり、DOL = 5.1 では SiRpH5 の 25%程度にまで低下した(Figure 3-6-1b,c)。そこで、デキストラン 1 分子あたりの標識数が少なく蛍光量子収率が比較的高い DOL = 2.6 の SiRpH5-Dex を以降の実験に用いることにした(Figure 3-6-1d)。

DOL = 2.6 の SiRpH5-Dex のスペクトル特性を精査したところ、吸収・励起スペクトルは SiRpH5 と同様に pH 変化に応じて約 80 nm 長波長化した(Figure 3-6-2a,b)。また、レシオ値変化に基づく p*K*_a は 5.7 と酸性オルガネラの pH 測定に適したプローブとなった(Figure 3-6-2c)。SiRpH5 標識デキストランを作成できたため、次にリソソームの pH イメージングを試みた。

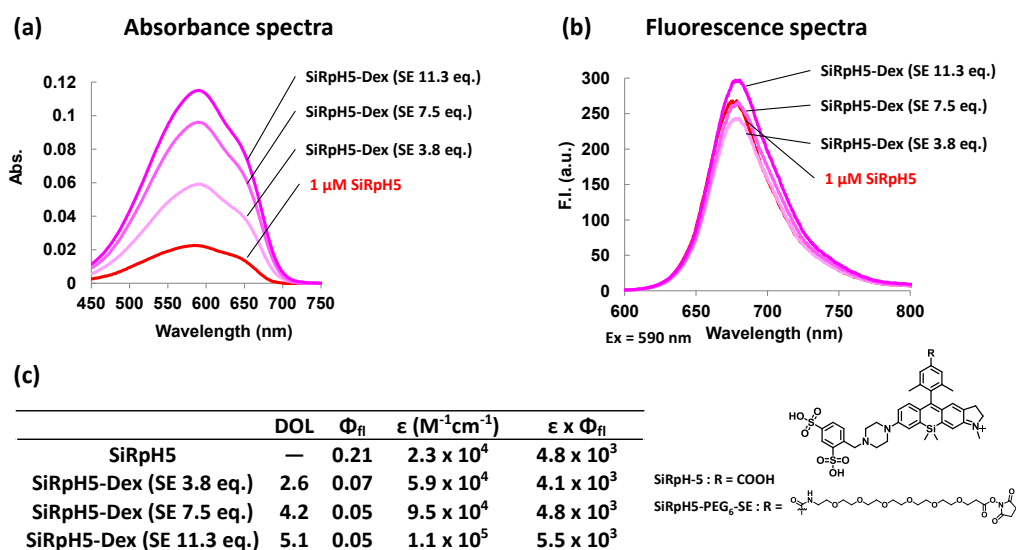


Figure 3-6-1. Determination of the degree of labeling (DOL) of SiRph5-Dex. (a) Absorbance and (b) fluorescence spectra of 1 μM SiRph5 and 1 μM SiRph5-Dextran in 100 mM NaPi buffer at pH 3.0. (c) Photophysical properties of SiRph5-Dextrans. DOL was determined by absorbance of the conjugates at pH 3.0. For the determination of fluorescence quantum yields, SiRph5 in NaPi buffer ($\Phi_{fl} = 0.21$ at pH 3.0) was used as a fluorescence standard.

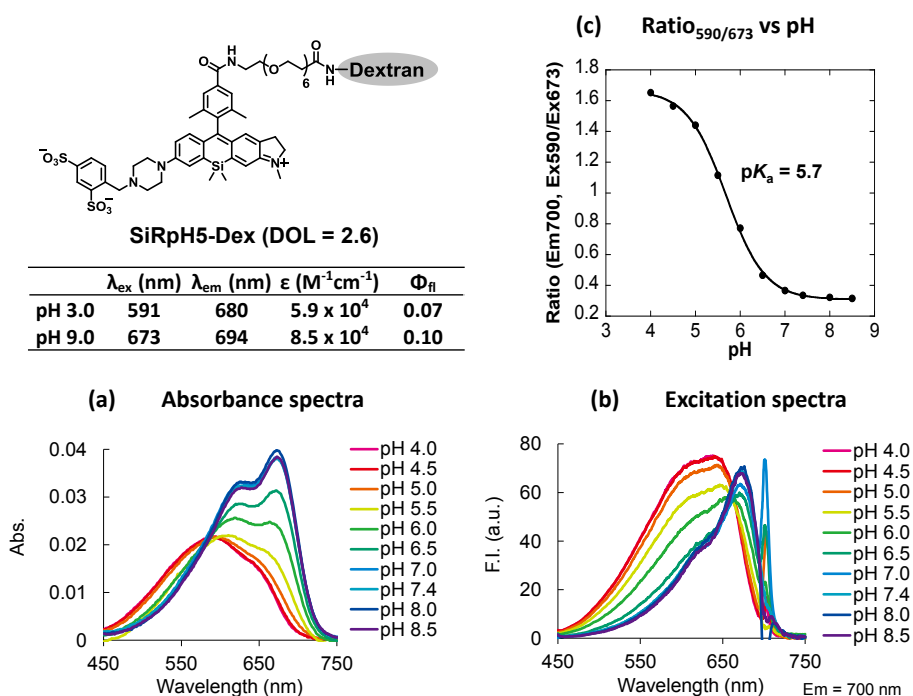


Figure 3-6-2. Photophysical properties of SiRph5-Dex. (a) Absorbance and (b) excitation spectra of 0.33 μM SiRph5-Dex at various pH values in 100 mM NaPi buffer. (c) Plots of ratio values vs pH. For the determination of fluorescence quantum yields, SiRph5 in NaPi buffer ($\Phi_{fl} = 0.23$ at pH 4.5 and 0.11 at pH 9.0) was used as a fluorescence standard.

3. SiRpH5-Dex を用いたリソソームの pH 測定

酸性オルガネラであるリソソームは、プロトンポンプによりその内部を酸性に保つことで加水分解酵素の活性を亢進させ、外来微生物、細胞内で不要となったタンパク質、外部から取り込んだタンパク質等の分解を行っている。リソソームの pH を酸性に保つことができなくなると様々な疾患につながる事が知られており、疾患のメカニズム解明においてリソソームの pH を測定することは重要である。

これまでリソソームの pH のレシオイメージングは、酸性条件下で蛍光性が減少する緑色蛍光色素フルオレセインと pH 非依存性の赤色蛍光色素ローダミンの 2 種類の色素を同時にデキストランに標識した二重標識デキストランを用いて行われてきた⁴²。しかし、上記手法は標識デキストランの作成が煩雑であることや、光褪色に弱いフルオレセインと光褪色に強いローダミンを利用するため光褪色による影響を受けること、緑色と赤色蛍光領域を使用するためマルチカラーイメージングといった他の分子との同時観察が難しいなど様々な問題がある。そのため、光褪色に強く、1 種類の色素だけでレシオイメージングができ、マルチカラーイメージングに適応できる SiRpH5-Dex は、リソソームの pH イメージングに非常に有用であると考えられる。

そこで、SiRpH5-Dex を用いてリソソームの pH のレシオイメージングを行い、開発したプローブの有用性を示すことを試みた。実験にはリソソームのマーカーである Vamp7 と黄色蛍光タンパク質 Venus との融合タンパクを安定発現した MEF 細胞(水島研究室より譲受)を使用した。

Protocol :

・MEF 細胞のリソソーム選択的な染色

Vamp7-Venus 発現 MEF 細胞の培地を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の SiRpH5-Dex を含む DMEM (10% FBS)に置換し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間インキュベーションした後に 3 回 wash し、再度 DMEM 中で 3 時間のポストインキュベーションを行い、共焦点蛍光顕微鏡にて蛍光観察を行った。(SP5 setup: Ex = 510 nm (20%), 580 nm (40%), 670 nm (30%), Em = 530-560 nm (PMT 700), 690-750 nm (HyD, Std130))

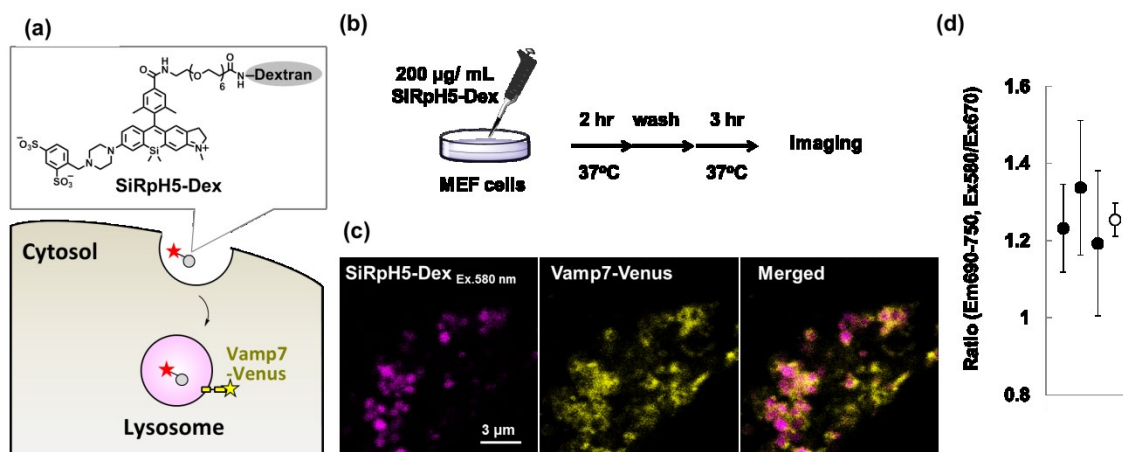


Figure 3-6-3. Lysosomal staining with SiRpH5. (a) Schematic image of endocytic delivery of SiRpH5-Dex to lysosome. (b) Protocol of the experiment. (c) Representative fluorescence images and (d) lysosomal ratio values of MEF cells stably expressing Vamp7-Venus. Filled circles are means \pm S.D. for individual experiments, and open circles are overall means \pm S.E.

リソソームを黄色蛍光タンパク質 Venus で標識した MEF 細胞において、リソソーム内部に SiRpH5-Dex 由来の蛍光が見られたことから、作成した SiRpH5-Dex を用いることで、リソソームを選択的に蛍光標識できることが分かった(Figure 3-6-3c,d)。そこで次に、リソソームの塩基性化試薬として知られる塩化アンモニウムの添加に伴うリソソームの pH 変化のレシオイメージングを行い、固定細胞を用いて作成した検量線から pH の定量を試みた。

Protocol :

・ MEF 細胞のリソソームの pH イメージング

前述の手法により SiRpH5-Dex を MEF 細胞のリソソームに集積させる⇒共焦点蛍光顕微鏡でタイムラプスイメージング(30 frame/min, 計 2 分)を行い、イメージング開始から 57 秒後に最終濃度 33 mM の NH₄Cl aq.を添加した。

・ 検量線の作成

前述の手法により SiRpH5-Dex を MEF 細胞のリソソームに集積させる⇒細胞を 10%ホルマリンで固定⇒外液を 100 mM NaPi buffer (pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.4)で 2 回 wash、置換した後に共焦点蛍光顕微鏡で観察。リソソーム 4~5 個が ROI (Region of interest)に入るように 1 細胞あたり 4ヶ所を ROI で囲み、4 細胞分の ROI のレシオの平均値を pH に対してプロットした。

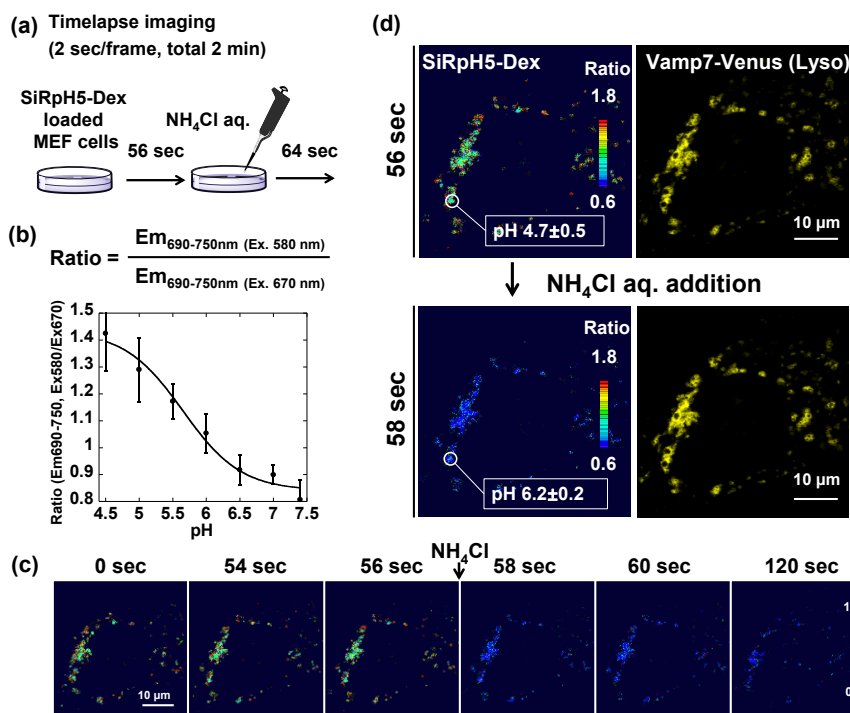


Figure 3-6-4. Measurement of lysosomal pH changes with SiRpH5. (a) Protocol of the experiment. (b) Calibration of SiRpH5-Dex-labeled lysosomes in fixed MEF cells. Cells were labeled with SiRpH5-Dex and fluorescence ratios were measured with Leica TCS SP5. Bar means \pm S.D. (c,d) Fluorescence images of the cells before and after the addition of NH_4Cl aq.

ホルマリン固定細胞の外液を様々な pH のバッファーに置換し、リソソームに集積した SiRpH5-Dex 由来の蛍光のレシオを外液の pH に応じて変化させることで、細胞内の SiRpH5-Dex の蛍光のレシオと pH との検量線を作成した(Figure 3-6-4b)。作成した検量線を用いたところ、Figure 3-6-4d において ROI で囲んだリソソームの塩化アンモニウムの添加前(イメージング開始 56 秒後)の pH は約 4.7 であり、細胞外液に塩化アンモニウム溶液を加えた後(イメージング開始 58 秒後)には、その pH が約 6.2 まで迅速に塩基性化する様子が観測された(Figure 3-6-4c,d)。また、これらの値は報告されている通常時および塩基性化試薬添加時のリソソームの pH と同程度であった⁴³。

以上のように、SiRpH5-Dex を用いることで、リソソームの pH が塩基性化する様子を経時観察することに成功した。SiRpH5-Dex は 30 frame /min で 10 分間の撮像を行っても光褪色がほとんど起こらない高い光褪色耐性を有し、また緑色・黄色蛍光タンパク質と同時に使用できるため、他の生体分子の挙動と pH 変化を同時に観察できる優れた pH プロブである。そのため、リソソームの pH 変化に関わる生命現象の解明へと今後貢献することが期待される。

第七節 トランスフェリンの輸送過程の pH イメージング

1. SiRpH5 標識トランスフェリンの開発

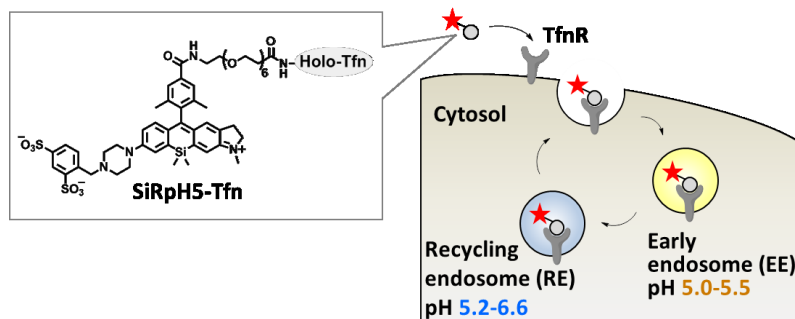


Figure 3-7-1. Schematic image of endocytosis of SiRpH5-labeled Tfn and transferrin receptor

次に、SiRpH5 をタンパク質に標識し、特定の酸性オルガネラの pH イメージングに応用できることを示すため、鉄イオンを細胞に供給する分子量約 80 kDa のタンパク質「トランスフェリン(Tfn)」に標識し、Tfn の輸送過程の pH イメージングを試みた。

Tfn は、2 分子の鉄(III)イオンと複合体(Holo-Tfn)を形成すると、細胞膜のトランスフェリン受容体(TfnR)と結合してエンドサイトーシスされ、初期エンドソームの弱酸性 pH 環境で鉄を遊離した後にリサイクリングエンドソームに輸送され、その後細胞膜表面に戻され TfR と解離する(Figure 3-7-1)⁴⁴。

これまで多くの論文においてフルオレセインで標識した Tfn を用いてリサイクリングエンドソームの pH 測定が行われてきたが、 pK_a が約 7 のフルオレセインは弱酸性のオルガネラであるリサイクリングエンドソームの正確な pH 測定は難しいと考えられる^{37, 38, 45, 46}。一方で SiRpH5 は弱酸性オルガネラの pH 測定に適した pK_a (= 6.1)を有しているため、SiRpH5 標識 Tfn を用いることでより正確にリサイクリングエンドソームの pH 測定が行えると考えられる。また、Tfn は弱酸性の初期エンドソームで鉄イオンを解離した後に、pH が少し塩基性化したリサイクリングエンドソームへと輸送されることが知られているが、初期エンドソームの酸性度に適した pK_a を示す pH プローブが開発されていないためか、Tfn の輸送過程における pH 変化の経時的な観察はこれまで報告されていない。

そこで、SiRpH5 を Tfn に標識した SiRpH5-Tfn を作成し、Tfn が初期エンドソームからリサイクリングエンドソームへと輸送される過程の pH 変化の経時的なレシオイメージングを試みた。生細胞イメージングには、リサイクリングエンドソームが核の近傍に集合しており形態が観察しやすい COS-1 細胞(衛生化学教室より譲受)を使用した⁴⁷。

まず、SiRpH5-PEG₆-SE (89)を鉄イオン結合型 Tfn(Holo-Tfn)に標識し、ゲル濾過カラムによる精製を行った。標識の際には、Holo-Tfn : SiRpH5-PEG₆-SE = 1 : 8 および 1 : 11 の 2 条件を試みた。

Protocol: Holo-Tfn を含む pH 8.0 ホウ酸緩衝液と SE 体を含むホウ酸緩衝液を 1:1 で混和 (最終濃度 : 5 mg/mL Holo-Tfn, 250 μM (4 eq.), 500 μM (8 eq.) SiRpH5-PEG₆-SE, 10% DMSO)⇒室温で 1 時間ボルテックス⇒PD-10 ゲル濾過カラムを用いて小分子と Tfn を分離・精製⇒凍結乾燥後に標識 Tfn の水溶液を作成

1 μM の SiRpH5-Tfn の pH 3.0 のバッファー中での吸光度を測定し、1 μM の SiRpH5 の吸光度と比較することで、Holo-Tfn に対する SiRpH5 の標識数(DOL)を決定した(Figure 3-7-2a,c)。標識反応時の SiRpH5-PEG₆-SE/Holo-Tfn が 8、11 の濃度条件において、SiRpH5-Tfn の DOL は 7.3、9.9 となり、SE 体の濃度が高いほど DOL は上昇した。

DOL の異なる SiRpH5-Tfn の光学特性を調べたところ、SiRpH5-Tfn の蛍光量子収率は DOL が上昇するほど低くなる傾向にあるが、デキストランと比較すると高い蛍光量子収率を保持していた(Figure 3-7-2b,c)。これはデキストランに比べて Tfn の分子量が大きく、濃度消光が生じにくいためと考えられる。Tfn 1 分子あたりの標識数が少なく蛍光量子収率が比較的高い DOL = 7.3 の SiRpH5-Tfn を以降の実験に用いることにした。

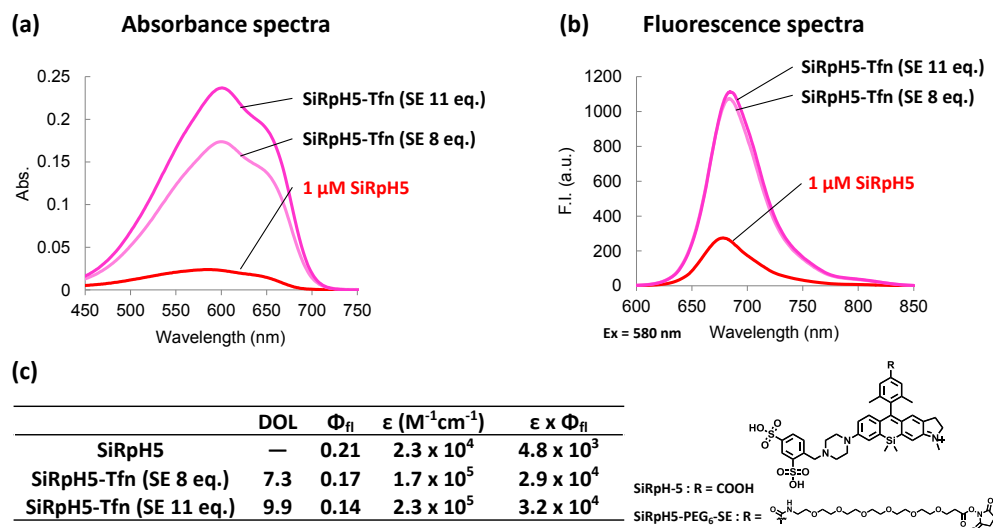


Figure 3-7-2. Determination of the degree of labeling (DOL) of SiRpH5-Tfn. (a) Absorbance and (b) fluorescence spectra of 1 μM SiRpH5 and 1 μM SiRpH5-Tfn in 100 mM NaPi buffer at pH 3.0. (c) Photophysical properties of SiRpH5-Tfn measured in 100 mM NaPi buffer at pH 3.0. DOL was determined by absorbance of the conjugates at pH 3.0. For the determination of fluorescence quantum yields, SiRpH5 in NaPi buffer ($\Phi_{fl} = 0.21$ at pH 3.0, 0.11 at pH 9.0) was used as a fluorescence standard.

2. SiRpH5-Tfn (DOL = 7.3)の光学特性の精査

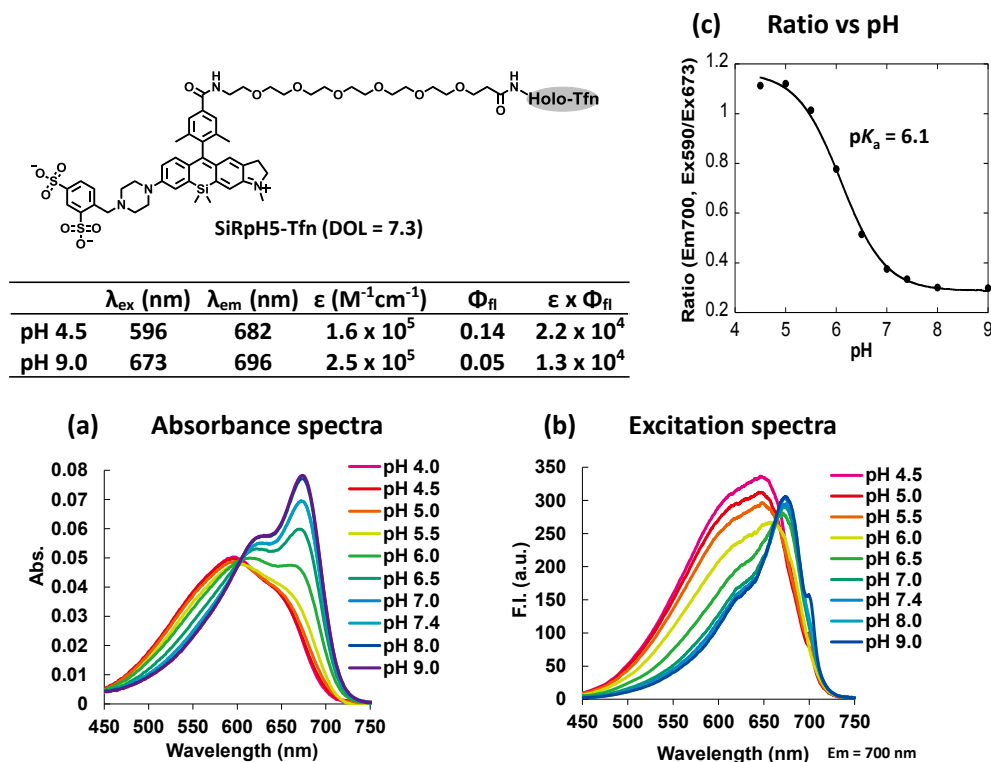


Figure 3-7-3. Photophysical properties of SiRpH5-Tfn (DOL = 7.3). (a) Absorbance and (b) excitation spectra of 0.31 μ M SiRpH5-Tfn at various pH values in 100 mM NaPi buffer. (c) Plots of ratio values vs pH. For the determination of fluorescence quantum yields, SiRpH5 in NaPi buffer ($\Phi_f = 0.23$ at pH 4.5 and 0.11 at pH 9.0) was used as a fluorescence standard.

DOL = 7.3 の SiRpH5-Tfn の光学特性を精査した(Figure 3-7-3)。吸収・励起スペクトルは SiRpH5 と同様に pH 変化に応じて約 80 nm 長波長化した(Figure 3-7-3a,b)。また、SiRpH5 を標識してもレシオ値変化に基づく pK_a には変化はなく、期待通りに酸性オルガネラの pH 測定に適したプローブとなった(Figure 3-7-3c)。タンパク質の表面には様々なアミノ酸側鎖が存在しているが、長い PEG リンカーを介して標識を行うことでプローブの光学特性を維持できたと考えている。そのため、SiRpH5-PEG₆-SE を用いて、Holo-Tfn に限らず様々なタンパク質に SiRpH5 を標識することで、様々なオルガネラに選択的に送達できる pH プローブが開発できると考えられる。

蛍光イメージングに十分な光学特性を有する SiRpH5 標識トランスフェリンを作成できたため、トランスフェリンの輸送過程の pH イメージングを試みた。

3. SiRpH5-Tfn を用いたトランスフェリンの輸送過程の pH イメージング

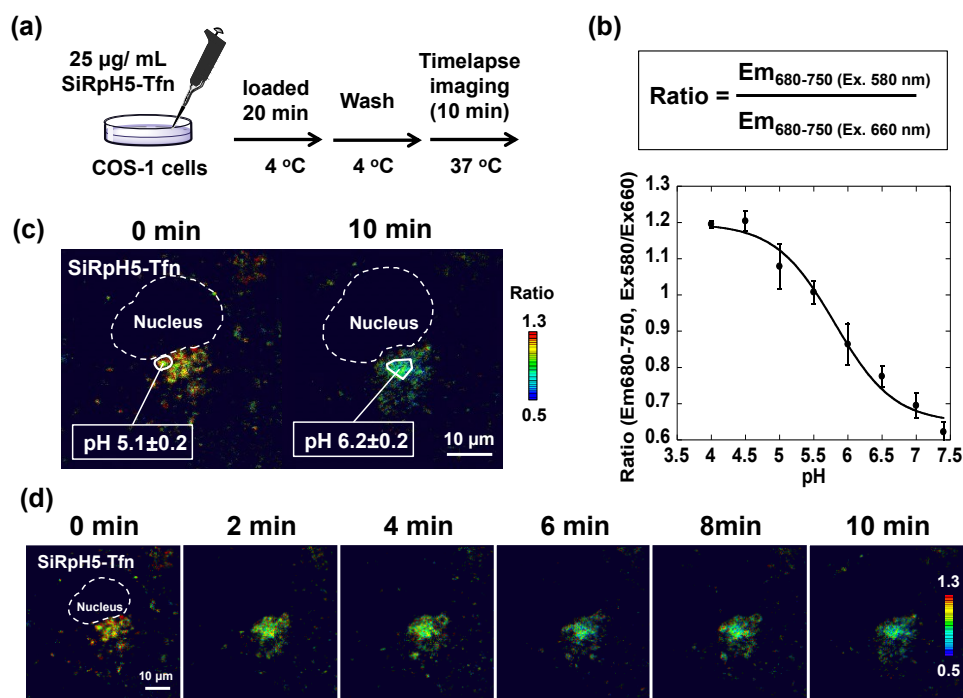


Figure 3-7-4. pH imaging in trafficking of transferrin. (a) Protocol of the experiment. (b) Calibration of SiRpH5-Tfn-labeled endosome in fixed COS-1 cells. Cells were labeled with SiRpH5-Tfn and fluorescence ratios were measured with Leica TCS SP5. Bar means \pm S.D. (c,d) Timelapse images of the cells incubated at 37 °C.

Protocol :

- COS-1 細胞におけるトランスフェリンの輸送過程の pH イメージング

EGFP-Rab11 を一過性発現させた COS-1 細胞の培地を 25 µg/mL の SiRpH5-Tfn を含む HBSS に置換し、4°C で 20 分間インキュベーションした後に 2 回 wash し、共焦点蛍光顕微鏡下にて 37 °C でタイムラプスイメージングを行った(2 frame/min, 計 10min)。(SP5 setup: Ex = 488 nm (20%), 580 nm (60%), 660 nm (45%), Em = 500-530 nm (PMT 900), 680-750 nm (HyD, Std136))

- COS-1 細胞における検量線の作成

COS-1 細胞の培地を 25 µg/mL の SiRpH5-Tfn を含む HBSS に置換し、37°C で 30 分間インキュベーションした後に細胞を 4%ホルムアルデヒドで固定⇒外液を 5 mM HEPES buffer (pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.4)で 2 回 wash、置換した後に共焦点蛍光顕微鏡で観察。リサイクリングエンドソームを ROI で囲み、5 細胞分の ROI のレシオの平均値を各 pH に対してプロットした。

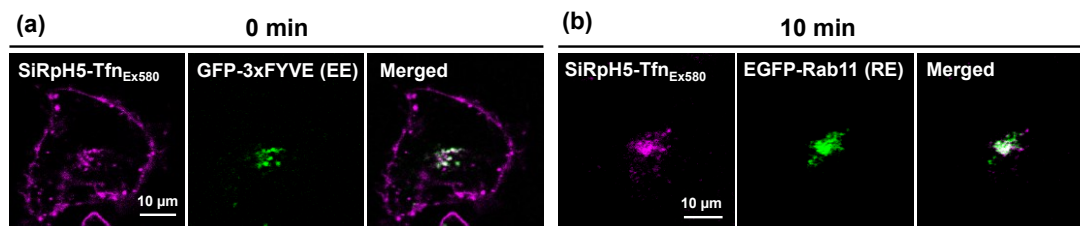


Figure 3-7-5. (a) COS-1 cells transiently expressing GFP-3xFYVE were incubated in HBSS containing 25 $\mu\text{g/mL}$ SiRpH5-Tfn at 4°C for 20 min, then washed twice, warmed to 37°C and imaged. (b) COS-1 cells transiently expressing EGFP-Rab11 were incubated in HBSS containing 25 $\mu\text{g/mL}$ SiRpH5-Tfn at 4°C for 20 min, then washed twice, warmed to 37°C and imaged after 10 min incubation.

Tfn は細胞膜上の TfnR と結合するとエンドサイトーシスされ、弱酸性(pH 5.0~5.5)の初期エンドソーム(EE)へ輸送され、その後 10 分ほどで EE より少し pH の高い(pH 5.2~6.6)リサイクリングエンドソーム(RE)へと輸送される。一方、4 °C でインキュベーションを行うことで、Tfn は細胞膜に結合するがエンドサイトーシスが起これないと知られている。そこで、4 °C で COS-1 細胞膜上に SiRpH5-Tfn を結合させた後に 37 °C に温度を上げ、SiRpH5-Tfn が初期エンドソーム、リサイクリングエンドソームへと輸送される際の pH 変化のタイムラプスイメージングを試みた(Figure 3-7-4)。

SiRpH5-Tfn (+)のエンドソームのレシオ値は、観察開始直後は酸性を示す高い値が観察され、時間の経過と共に低い値へと変化した(Figure 3-7-4d)。SiRpH5-Tfn の局在を調べると、観察開始直後(0 min)では EE マーカーである GFP-3xFYVE と共局在することから、EE に局在することが確かめられ(Figure 3-7-5a)、観察開始 10 分後には RE のマーカーである EGFP-Rab11 と共局在することから、RE へと輸送されることが確かめられた(Figure 3-7-5b)。SiRpH5-Tfn が Tfn と同様に輸送されることが分かったため、固定細胞で作成した検量線を用いて輸送過程の pH の定量を行った(Figure 3-7-4c)。その結果、観察開始直後の EE における pH は約 5.1 であり、RE へと輸送されるに従い約 6.2 まで塩基性化することが観察された。これらの値は報告されている EE や RE の pH と同程度であり⁴⁸、SiRpH5-Tfn を用いることで酸性オルガネラの経時的な pH 測定に初めて成功した。

以上のように、開発した SiRpH5-Tfn を用いることで、トランスフェリンが初期エンドソームからリサイクリングエンドソームへと輸送されていく際の pH 変化を経時的に観測することに成功した。SiRpH5 を標識したタンパク質の輸送過程の pH 測定が容易に行えることから、興味のあるタンパク質の輸送過程における pH 制御の役割をより詳細に解析できるようになると期待される。

第八節 レシオ型 pH プローブの吸収変化メカニズムについての考察

本研究で開発した非対称 SiR を母核とした pH プローブは、ピペラジン環の脂肪族アミノ基がプロトン化されると蛍光性を保ったまま吸収波長が大きく短波長化するため、レシオ型の pH プローブとして機能した。しかしながら、一般にローダミン系蛍光色素の吸収・蛍光波長は pH 変化の影響を受けないことが知られており、pH に依存して吸収波長が大きく短波長化するローダミン系蛍光色素はこれまで報告されておらず、本 pH プローブの波長変化メカニズムは明らかになっていない。また、波長変化特性を利用したレシオ型蛍光プローブの母核となり得る蛍光色素は非常に限定されている。そのため、本プローブの波長変化機構が解明できれば、非対称 SiR は有用なレシオ型蛍光プローブの母核となり、pH に限らず様々なレシオ型蛍光プローブの開発が可能になると考えられる。

そこで、計算化学的手法を用いて非対称 SiR を母核とした pH プローブの波長変化メカニズムの解析を試みた。

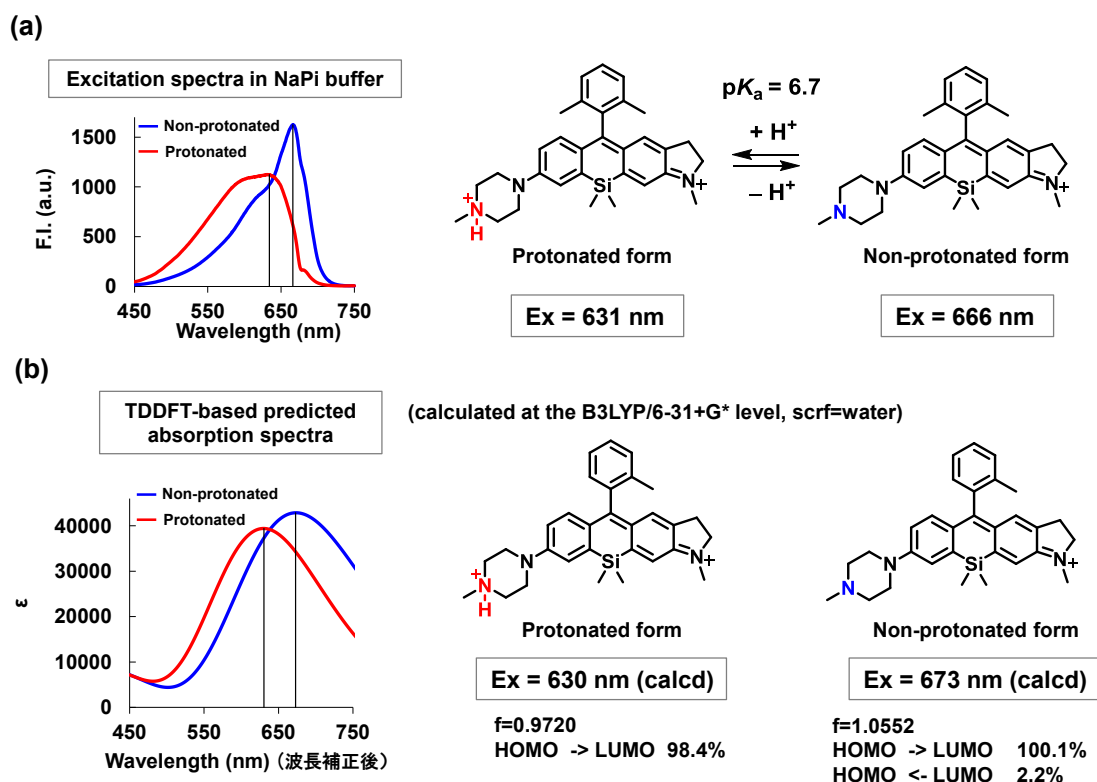
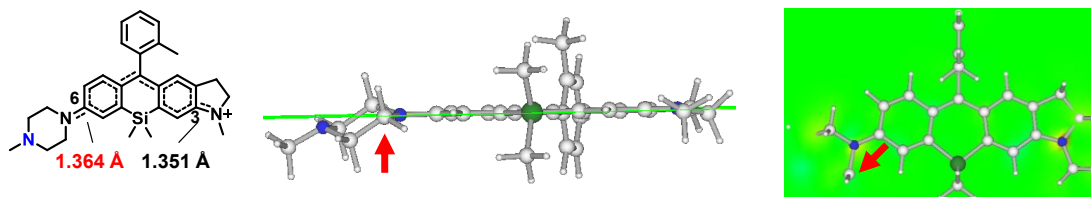


Figure 3-8-1. Observed and calculated spectral properties of SiRpH1. (a) Excitation spectra of SiRpH1 (**76**) in 100 mM NaPi buffer (pH 3.0, pH 10.0). (b) Predicted absorption spectra of protonated and non-protonated SiR (**75**) in water calculated at the B3LYP/6-31+G (d) level.

これまで SiR 類の吸収波長の予測に用いられてきた TD-DFT 法を用いてピペラジン環を有する SiR (**75**)のプロトン化体および非プロトン化体の水中での吸収波長を計算し、SiRpH1 (**76**)の pH 3.0 (プロトン化体)および pH 10.0 (非プロトン化体)のリン酸緩衝液中での励起波長と比較を行った(Figure 3-8-1)。予測吸収波長は、対称な SiR 類の実測の吸収波長と計算による予測吸収波長の検量線を用いて補正した値を示す(Figure 2-5-2)。SiR(**75**)のプロトン化体および非プロトン化体の $S_0 \rightarrow S_1$ への遷移はほぼ全て HOMO→LUMO 遷移で構成されており、極大吸収波長はそれぞれ 630 nm、673 nm と計算された(Figure 3-8-1b)。これらの値は SiRpH1(**76**)のプロトン化体および非プロトン化体の実測の励起波長である 630 nm、666 nm と同程度であることから、分子軌道計算により吸収波長の変化するメカニズムを考察できると考えられた。

(a) Non-protonated form



(b) Protonated form

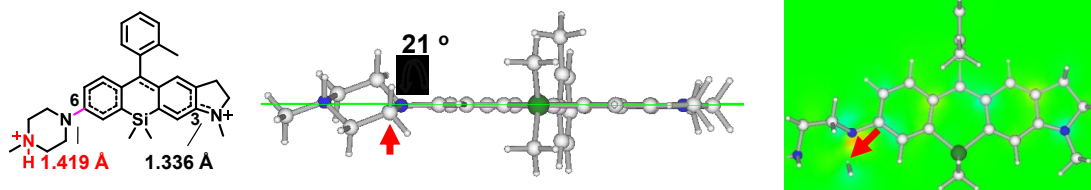


Figure 3-8-2. Calculated most stable three-dimensional structures of (a) non-protonated and (b) protonated SiR (75). Calculation was performed at the B3LYP/6-31+G (d) level.

まず、非対称 SiR (75)のプロトン化体と非プロトン化体の計算された最安定構造の比較を行った (Figure 3-8-2)。ピペラジン環アミノ基のプロトン化により、キサンテン環の C₃-N 結合長は 1.351 Å→1.336 Å となり二重結合性が増大し、同時に C₆-N 結合長は 1.364 Å→1.419 Å と単結合性が増大することが分かった。また、それに伴いプロトン化体においては、非プロトン化体と比べてピペラジン環が約 20 度回転した構造が最安定構造となった。

Figure3-8-2 の赤矢印で示した炭素原子は、非プロトン化体ではキサンテン環の平面(黄緑色)よりも上に顔を出している一方で、プロトン化体では平面の下に隠れることからピペラジン環が回転していることが分かる。この構造が本当に最安定構造か調べるため、プロトン化体のピペラジン環の角度を 45、90 度、135 度、180 度まで回転させた 4 つの異なる初期構造から構造最適化計算を始めたが、同様に約 20 度回転したものが最安定構造となった。

以上の計算結果から、ピペラジン環の脂肪族アミノ基がプロトン化されて強力な電子求引基となると、キサンテン環 C₆-N 結合の単結合性が増大し、ピペラジン環がキサンテン環の平面に対して回転した構造が最安定構造になることが示唆された。

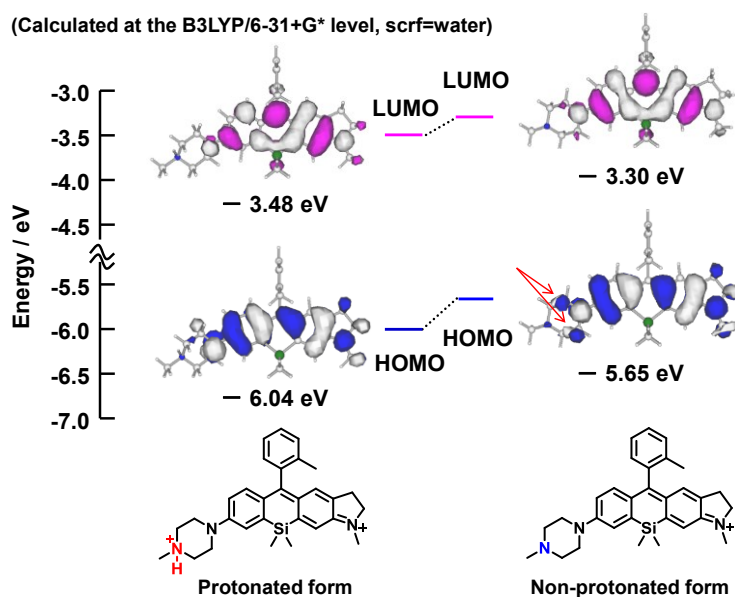


Figure 3-8-3. Molecular orbital calculation of non-protonated and protonated SiR (**75**). Calculation was performed using B3LYP/6-31+G (d) with water as solvent.

次に、非対称 SiR (**75**)のプロトン化体と非プロトン化体の分子軌道を比較することで、吸収波長変化のメカニズムを考察した (Figure 3-8-3)。非対称 SiR (**75**)の脂肪族アミノ基がプロトン化されると LUMO エネルギーレベルも HOMO エネルギーレベルも低下するが、特に HOMO エネルギーレベルが大きく低下することで HOMO-LUMO エネルギーギャップが大きくなり、吸収波長が短波長化すると計算された。

分子軌道を比較すると、プロトン化体と非プロトン化体の LUMO には大きな違いは見られなかった一方、非プロトン化の HOMO にはピペラジン環上に赤色矢印で示した青色の軌道が存在するが、プロトン化体の HOMO には存在しなかった。プロトン化体はピペラジン環がキサンテン環に対して傾いているため、軌道の重なりが小さくなったためと考えられる。そのため、プロトン化体では反結合性相互作用が減り、HOMO エネルギーレベルの安定化が生じたと考えられる。同時に、プロトン化体は C₆-N の結合長が長くなったために、ピペラジン環とキサンテン環の軌道同士の反結合性相互作用が減ることによる、HOMO エネルギーレベルの安定化も生じていると考えられる。

以上の効果により、ピペラジン環を有する非対称 SiR はプロトン化による HOMO エネルギーレベルの安定化に伴い吸収波長が短波長化していることが示唆された。そのため、キサンテン環のもう一方のアミノ基上のアルキル置換基は変更が可能であると考えられ、アルキル置換基を適切に選択することで、使用する光学系に合った吸収波長を有するプローブが開発できると考えられる。

第九節 小括

様々な置換基を有する非対称 SiR 類の光学特性を精査することで、pH 変化に応じて吸収波長が大きく変化するピペラジン環とインドリン構造を有する非対称 SiR が見出された。本蛍光色素を母核とし、ピペラジン環上に電子求引基を導入することで、酸性オルガネラに適した pK_a を有する二波長励起一波長測光のレシオ型 pH プローブ「SiRpH5」の開発に成功した。

ローダミン系蛍光色素を母核としたレシオ型 pH プローブは世界初の報告であり、既存のプローブよりも光褪色耐性に優れ、長時間のイメージングに適した pH プローブとなった。また本プローブは波長の重なりが少ない青色、緑色、黄色蛍光タンパク質と同時に用いることができるため、既存のプローブには難しいマルチカラーイメージングにも適した pH プローブとなった。

本プローブは高い水溶性を示し、多糖類やタンパク質等の生体高分子に標識しても pH 特性を維持できるため、生体高分子に標識した pH プローブを特定の細胞内小器官に選択的に送達して pH イメージングを行うことができる。実際にデキストランに標識した SiRpH5-Dex を用いてリソソーム選択的にプローブを送達し、塩基性化試薬の添加に伴うリソソームの pH 変化の可視化に成功した。また、トランスフェリンに標識した SiRpH5-Tfn を用いて、トランスフェリンが輸送される過程の pH 変化のタイムラプスイメージングにも成功した。

計算化学を用いて本プローブの吸収波長変化のメカニズムの考察を行ったところ、ピペラジン環のプロトン化に伴いキサントレン環の C-N 結合の単結合性が増大することで吸収波長の短波長化が起こることが示唆された。そのため、キサントレン環のもう一方のアミノ基置換基の修飾により、使用する光学系に合わせたプローブの吸収波長の精密制御が可能であると考えられる。

以上のように、本プローブは生体分子への修飾や pK_a の調整、吸収・蛍光波長の調整が容易であるため、使用する光学系や興味のあるオルガネラに最適の pH プローブを容易にデザインできる優れた特性をもつレシオ型 pH プローブである。そのため、pH の関わる生命現象の解明に大きく貢献することが期待される。

第四章 総括と展望

第一節 総括

本研究では、赤色から近赤外蛍光領域において優れた蛍光プローブを開発することができる SiR 蛍光団に着目し、新規蛍光団である「非対称 SiR」の分子設計を容易にする新規合成法の開発を行った。これにより、近赤外蛍光プローブの吸収・蛍光波長の精密制御や、蛍光制御法として汎用される光誘起電子移動やスピロ環化反応の反応性に関わる蛍光団の HOMO・LUMO エネルギーレベルの精密制御が可能となったため、使用する光学系に適した吸収波長を有し、S/N の優れた赤色から近赤外蛍光プローブの開発が容易となった。今後、赤色から近赤外蛍光プローブの分子設計・合成に本研究で培われた知見が用いられることで、生命現象の分子レベルでの解明に貢献することが期待される。

また、非対称 SiR を母核とすることで、近赤外領域ではこれまで利用できなかった蛍光制御法であるアミノ基の化学修飾を利用した近赤外蛍光プローブの開発が可能となった。今後、蛍光プローブはますます *in vivo* イメージングに大きな役割を果たしていくことが予想される中、本研究の知見を基に様々な近赤外蛍光プローブが開発され、動物個体での生命現象・疾患メカニズムの解明研究に貢献することが期待される。

最後に、非対称 SiR から見出された特徴的な波長変化特性を利用して、レシオ型 pH プローブの開発に成功した。本プローブは既存のレシオ型 pH プローブと比べて光褪色に強く、青色から黄色の蛍光色素と同時に用いることができるという特徴を兼ね備えた優れた pH プローブであった。pH は様々な生命現象に関わる細胞機能の重要な制御機構であり、多くの研究者が着目しているため、本プローブが研究ツールとして今後広く使用されることが期待される。また、本研究で見出した吸収波長の短波長化の機構は pH 以外のレシオ型蛍光プローブの開発にも応用可能であると考えられるため、非対称 SiR を母核とした新たなレシオ型プローブの開発研究の進展も期待される。

以上のように、私は本研究において Si ロードミン蛍光色素の構造展開が容易な合成手法を開発することで、様々な新規近赤外蛍光プローブの開発ならびに近赤外蛍光イメージングの発展に貢献した。

第二節 今後の展望

1. レシオ型 pH プロブの更なる構造展開による、より実用的な pH プロブの開発

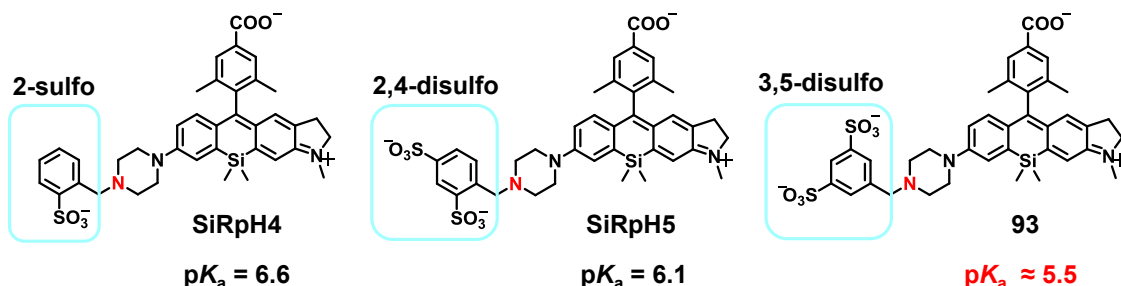
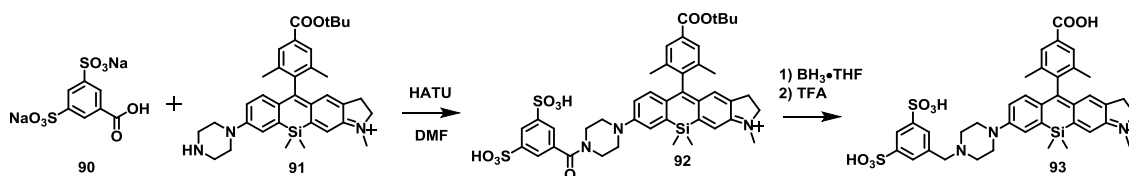


Figure 4-2-1. Molecular design of pK_a modified pH probe (93).

本研究で開発し、酸性オルガネラでの生細胞イメージングに応用してきた SiRpH5 はレシオ型 pH プロブとして非常に優れた性質を示した。一方で、そのレシオ値変化の pK_a は 6.1 であり、リサイクリングエンドソーム等の弱酸性オルガネラで使用するには最適な値だが、より酸性度の高いオルガネラであるリソソーム ($pH < 5.0$) の pH を正確に測定するためには、更に低い pK_a を有したプロブの開発が望ましい。

本プロブの pK_a はピペラジニアミノ基に置換されたベンジル基上の置換基により容易に調整可能であり、2-sulfo 基は立体障害により pK_a を 0.7 向上させ、4-sulfo 基は電子求引性により pK_a を 0.3 低下させることが分かった。そこで、4-sulfo 基と同等のハメット定数を有し、ベンジル基の配向に影響しない 3-sulfo, 5-sulfo 基を導入することでプロブの pK_a を 5.5 程度まで低下させ、リソソームの pH 測定に適した pK_a と高い水溶性を有する pH プロブ (93) が開発できると考えられる (Figure 4-2-1)。合成は以下のスキームにより、市販の 3,5-disulfobenzoic acid (90) から 3 工程で達成できると考えられる (Scheme 4-2-1)。

Scheme 4-2-1. Synthesis of 94.



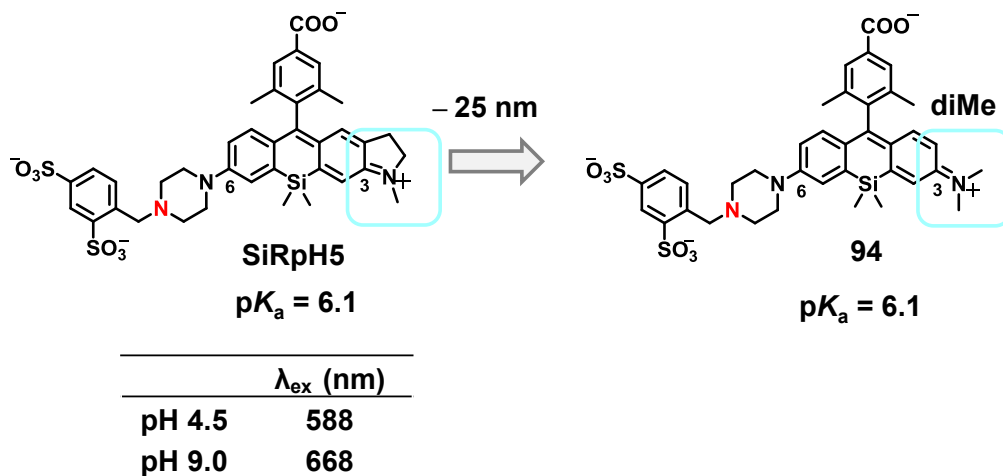


Figure 4-2-2. Molecular design of absorbance wavelength modified pH probe (**94**).

また、開発した SiRpH5 は、レシオ値の変化量を大きくするためには、580 nm と 660 nm の励起光を用いてイメージングを行う必要があるが、共焦点蛍光顕微鏡に汎用されている長波長のレーザーは 633 nm であり、SiRpH5 の励起には適していなかった。そのため、波長可変のホワイトライトレーザーを用いてイメージングを行ってきたが、汎用される光学系に適した吸収波長を有するプローブを開発することでより多くの研究者が本プローブを使用できるようになる。

計算化学により本プローブの波長変化メカニズムを考察したところ、キサントレン環 3 位の環状アミノ基は波長変化に必須ではなく、他のアルキル置換基でもプロトン化に伴う波長変化が起こることが示唆された。そのため、インドリン構造をジメチルアニリン構造に変換した SiR (**94**)を開発することで、吸収波長を約 25 nm 短波長化させて、汎用される 633 nm He-Ne レーザー、561 nm DPPS レーザーに対応させることができると考えられる (Figure 4-2-2)。

これらの $\text{p}K_a$ や吸収波長の最適化を行うことで、より多くの生物学研究者に本プローブが使用され、pH の関わる生命現象においてより多くの知見が得られることを期待する。

2. 動的な生命現象における pH イメージング

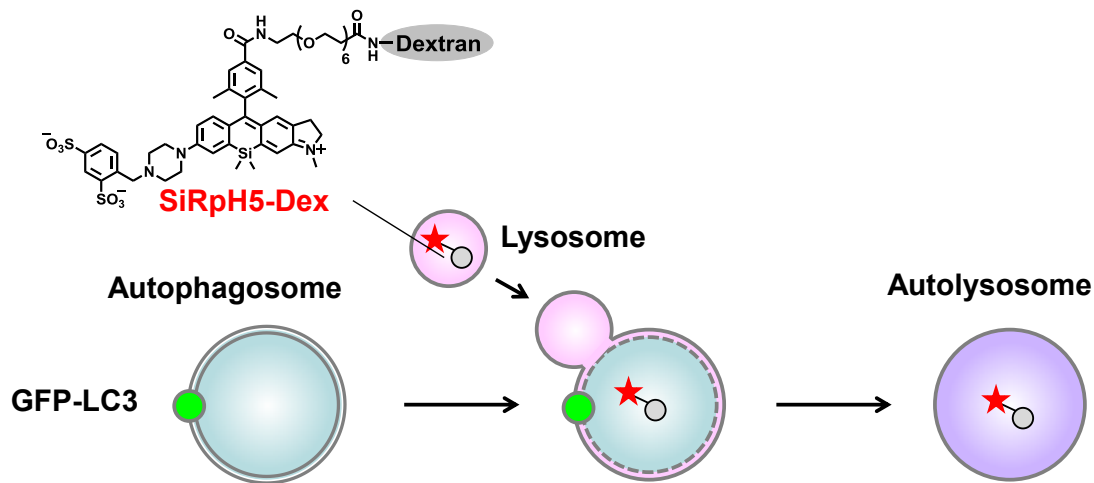


Figure 4-2-3. pH imaging of vesicle fusion between autophagosome and lysosome.

本研究において開発した SiRpH5-Dex は、黄色蛍光タンパクとのマルチカラーイメージングを行いながら 30 frame/min のレートで撮像することが可能であり、さらに本レートで 10 分間のタイムラプスイメージングを行っても光褪色には問題なかった。この特性を活かして、本プローブは動的な pH 変化のイメージングによって生物学研究への貢献が期待される。

細胞が飢餓になると生じるオートファジー現象において、オートファゴソームとリソソームが融合することで、オルガネラを消化するオートリソソームが生成することが知られている (Figure 4-2-3)。この融合現象はオートファジーの進行に非常に重要なものであるが、その詳細な分子機構ははまだ分からないことが多く、融合に関わる分子種の解明研究が進められている⁴⁹。オートファゴソームは酸性オルガネラであるリソソームと融合することで酸性化すると考えられているが、融合の瞬間にオルガネラ内部の pH がどのように変化するかはこれまで分かっていない。

そこで、本プローブをロードした細胞を飢餓状態にし、オートファゴソームマーカーである LC3-GFP とリソソームの pH の同時観察を経時的に行うことで、オートファゴソームとリソソームが融合する瞬間の pH 変化のイメージングが可能であると考えられる。

また、オートファゴソームとリソソームの融合による pH 変化を簡便に観察できる系を確立することができれば、融合過程に必須となる分子種のスクリーニングが容易になり、オートファジーの分子メカニズムの解明研究に貢献できると考えられる。

3. 近赤外蛍光性レシオ型 Ca^{2+} プローブの開発

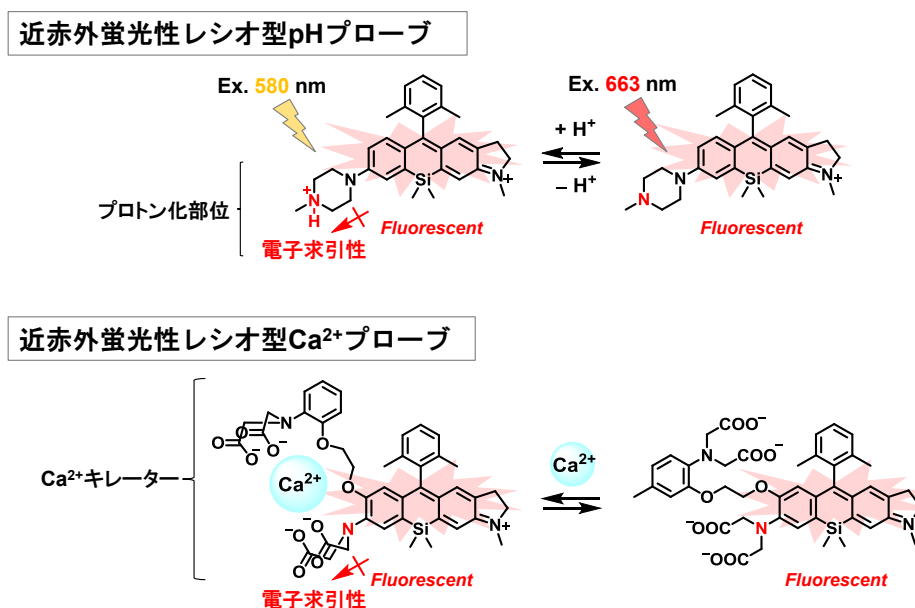


Figure 4-2-4. Molecular design of unsymmetrical SiR-based ratiometric Ca^{2+} probe.

分子軌道計算によると、開発したレシオ型 pH プローブは、脂肪族アミノ基がプロトン化されて電子求引性基になることで吸収波長の短波長化を生じることが示唆された。この仮説が正しければ、本機構は他のレシオ型蛍光プローブにも応用することができると考えられる。

レシオ型 Ca^{2+} プローブである Fura-2 を用いた Ca^{2+} の定量的なイメージングは、神経科学において非常に重要な技術となっている。しかしながら、Fura-2 は紫外領域で励起を行う必要があるため、光毒性や共焦点蛍光顕微鏡での使用が困難などの問題があり、より長波長のレシオ型 Ca^{2+} プローブの開発が望まれている。

一方、本研究により見出されたレシオ型プローブの母核を利用することで、近赤外蛍光性のレシオ型 Ca^{2+} プローブが開発できると考えられる(Figure 4-2-4)。キサンテン環に Ca^{2+} キレーターである BAPTA 構造を組み込んだ非対称 SiR は、 Ca^{2+} 非存在下では近赤外吸収を有すると考えられるが、 Ca^{2+} 存在下ではキサンテン環のアミノ基上の 2 つのカルボキシレート基が Ca^{2+} に配位して電子求引性基となることで C-N 結合の単結合性が増大し、吸収波長が短波長化すると考えられる。上記分子が開発できれば、長時間の観察に伴う細胞の光毒性を減弱でき、また共焦点蛍光顕微鏡下で時空間分解能の高い Ca^{2+} イメージングができると期待される。

第五章 実験、合成の部

Materials

General chemicals were of the best grade available, supplied by Tokyo Chemical Industries, Wako Pure Chemical, Aldrich Chemical Co., Dojindo, Watanabe Chemical Industries and Invitrogen, and were used without further purification. HeLa cells were purchased from American Type Culture Collection (ATCC). MEF cells stably expressing Vamp7-Venus were kindly gifted from Prof. Noboru Mizushima's lab (The University of Tokyo, Graduate School of Medicine). COS-1 cells were kindly gifted from Prof. Hiroyuki Arai's lab (The University of Tokyo, Graduate School of Pharmaceutical Sciences)

Instruments

NMR spectra were recorded on a JEOL JNM-LA300 instrument at 300 MHz for ^1H NMR and at 75 MHz for ^{13}C NMR, or a JEOL JNM-LA400 instrument at 400 MHz for ^1H NMR and at 100 MHz for ^{13}C NMR. Mass spectra (MS) were measured with a JEOL JMS-T100LC AccuToF (ESI). HPLC analysis was performed on an Inertsil ODS-3 (4.6 × 250 mm) column (GL Sciences Inc.) using an HPLC system composed of a pump (PU-980, JASCO) and a detector (MD-2015, JASCO). Preparative HPLC was performed on an Inertsil ODS-3 (10.0 × 250 mm) column (GL Sciences Inc.) using an HPLC system composed of a pump (PU-2080, JASCO) and a detector (MD-2015 or FP-2025, JASCO).

UV-Vis Absorption and fluorescence spectroscopy

UV-Visible spectra were obtained on a Shimadzu UV-1650. Fluorescence spectroscopic studies were performed on a Hitachi F4500. The slit width was 5 nm for both excitation and emission. The photomultiplier voltage was 700 V. Absolute Quantum Yields were measured by a Hamamatsu Photonics Quantaurus QY. Relative fluorescence quantum efficiencies were obtained by comparing the area under the emission spectrum of the test sample with standard samples. Values were calculated according to the following equation.

$$\Phi_x/\Phi_{st} = [A_{st}/A_x][n_x^2/n_{st}^2][D_x/D_{st}]$$

where st: standard; x: sample; A : absorbance at the excitation wavelength; n : refractive index; D : area under the fluorescence spectra on an energy scale

Computation Details

All calculations were performed at the Density Functional Theory (DFT), by means of the B3LYP⁵⁰⁻⁵² functional level as implemented in Gaussian 09⁵³. The 6-31+G(d) basis set was used for all atoms. The number of imaginary frequencies is 0 for all structures.

Preparation of Cells

HeLa cells, MEF cells and COS-1 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), 1% penicillin streptomycin (Invitrogen). Cells were cultured at 37 °C in a 5/95 CO₂/air incubator.

Lysosomal pH Imaging in MEF Cells with SiRpH5-Dex

1.6×10^4 MEF cells stably expressing Vamp7-Venus were seeded on 8 chamber plate (NUNCTM) and cultured for 1 day before imaging. Cells were incubated in 200 μ L of DMEM (10% FBS) containing 200 μ g/ml SiRpH5-Dex for 2 hr at 37°C, then washed three times with DMEM and further incubated in DMEM for 3 hr at 37°C and imaged. The fluorescence imaging were operated using a Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS-AF) instrument with a TCS SP5 and 63 \times oil immersion objective lens. The light source was white-light laser. The excitation wavelength and the emission wavelength were 510 nm / 530-560 nm for Vamp7-Venus and 580 nm, 670 nm/ 690-750 nm for SiRpH5-Dex.

Endosomal pH Imaging in COS-1 Cells with SiRpH5-Tfn

5.0×10^4 COS-1 cells were seeded on 35 mm poly-L-lysine-coated glass-bottomed dishes (Matsunami Glass Ind., LTD.), transfected GFP-3xFYVE or EGFP-Rab11 with lipofectamine 2000 and cultured for 1 day before imaging. Cells were incubated in 1 mL of HBSS containing 25 μ g/ml SiRpH5-Tfn for 20 min at 4°C, then washed twice with ice cold HBSS and imaged at 37°C. The fluorescence imaging were operated using a Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS-AF) instrument with a TCS SP5 and 63 \times oil immersion objective lens. The light source was white-light laser. The excitation wavelength and the emission wavelength were 488 nm / 500-530 nm for GFP-3xFYVE, EGFP-Rab11 and 580 nm, 660 nm/ 680-750 nm for SiRpH5-Tfn.

Labeling of Dextran with SiRpH3-SE

Each solution of 10 kDa aminodextran (1.42 mg, 142 nmol) in 284 μL of 100 mM borate buffer (pH 8.0) and 1, 3, 9, 15 eq. of SiRpH3-SE in 57 μL of DMSO were mixed and stirred at room temperature for 1.5 hr. Reaction mixtures were purified by size exclusion PD-10 columns using water mobile phase and lyophilized to yield SiRpH3-Dextrans.

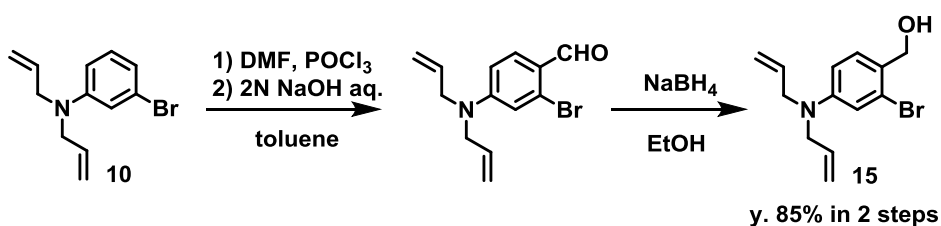
Labeling of Dextran with SiRpH5-PEG₆-SE

Each solution of 10 kDa aminodextran (1.30 mg, 130 nmol) in 460 μL of 100 mM NaHCO_3 aq. (pH 8.4) and 3.8, 7.5, 11.3 eq. of SiRpH5-PEG₆-SE in 160 μL of DMSO were mixed and stirred at room temperature for 2 hr. Reaction mixtures were purified by size exclusion PD-10 columns using PBS mobile phase, desalted with PD-10 column using water mobile phase and lyophilized to yield SiRpH5-Dextrans.

Labeling of Holo-transferrin with SiRpH5-PEG₆-SE

Each solution of 80 kDa human Holo-transferrin (9.04 mg, 113 nmol) in 1 mL of 100 mM borate buffer (pH 8.0) and 8, 11 eq. of SiRpH5-PEG₆-SE in 1 mL of 100 mM borate buffer (pH 8.0) containing 20% DMSO were mixed and stirred at room temperature for 1 hr. Reaction mixtures were purified by size exclusion PD-10 columns using PBS mobile phase, desalted with PD-10 column using water mobile phase and lyophilized to yield SiRpH5-Tfns.

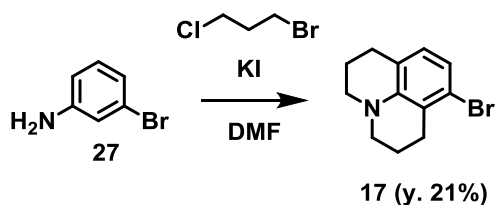
Synthetic procedures and characterizations



To a solution of 3-bromo-*N,N*-diallylaniline⁵⁴ (**10**) (1.21 g, 4.80 mmol) in toluene (20 mL) were added DMF (456 μL , 6.24 mmol) and phosphorus oxychloride (534 μL , 5.76 mmol) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 21h at 80°C. An aqueous solution of 2N NaOH was added while the system was immersed in a water bath and cooled, the system was stirred for 5 minutes, and the mixture was extracted with dichloromethane and washed with brine. The organic layer was dried using Na_2SO_4 , the solvent was distilled away under reduced pressure, ethanol (10

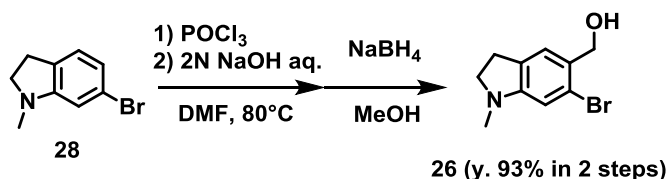
mL) and sodium borohydride (182 mg, 4.80 mmol) were added, and the system was stirred for 1h at room temperature. After the solvent had been distilled away under reduced pressure, water was added to the residue and the mixture was extracted using dichloromethane. The organic layer was dried using Na₂SO₄, the solvent was distilled away under reduced pressure, and the residue was purified using column chromatography (silica gel, AcOEt/*n*-hexane) to afford **15** (1.15 g, 4.08 mmol, 85%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 3.89-3.91 (m, 4H), 4.62 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 5.12-5.19 (m, 4H), 5.76-5.88 (m, 2H), 6.60 (dd, *J* = 2.3, 8.6 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.20 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 52.69, 65.04, 111.31, 115.86, 116.31, 124.43, 136.95, 130.45, 133.02, 149.35; LRMS (ESI⁺) 264 [M-OH]⁺



To a solution of 3-bromoaniline (**27**) (2 g, 11.6 mmol) in DMF (8 mL) was added KI (1.5 g, 9.3 mmol). The reaction mixture was stirred for 26 h at 130°C. The mixture was concentrated *in vacuo* and H₂O was added to it, then the aqueous layer was extracted with *n*-hexane. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, 10% AcOEt / *n*-hexane) and further purified by GPC to afford **17** (620 mg, 2.46 mmol, 21%).

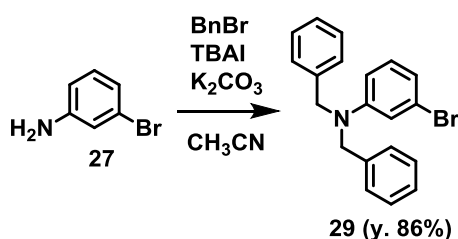
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.90-2.01 (m, 4H), 2.69 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.77 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.08-3.15 (m, 4H), 6.63 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 21.80, 21.91, 27.58, 28.48, 49.65, 50.00, 119.42, 120.55, 120.65, 122.90, 127.73, 144.54; HRMS (ESI⁺) Calcd for [M+H]⁺, 254.0367 Found, 254.0331 (-3.6 mmu)



To a solution of 6-bromo-1-methylindoline¹⁶ (**28**) (212 mg, 1.00 mmol) in DMF (5 mL) was added

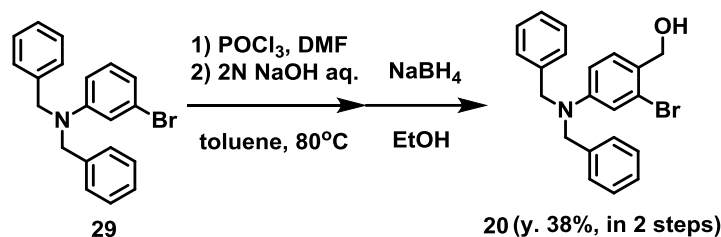
phosphorus oxychloride (139 μ L, 1.5 mmol) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 14 h at 80°C. An aqueous solution of 2N NaOH was added while the system was immersed in a water bath and cooled, the system was stirred for 15 minutes, and the mixture was extracted with dichloromethane and washed with brine. The organic layer was dried using Na₂SO₄, the solvent was distilled away under reduced pressure, methanol (10 mL) and sodium borohydride (38 mg, 1.00 mmol) were added, and the system was stirred for 1 h at room temperature. After the solvent had been distilled away under reduced pressure, water was added to the residue and the mixture was extracted using dichloromethane. The organic layer was dried using Na₂SO₄, the solvent was distilled away under reduced pressure, and the residue was purified using column chromatography (silica gel, AcOEt/*n*-hexane) to afford **26** (224 mg, 0.926 mmol, 85%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.81 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 2.74 (s, 3H), 2.90 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.35 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.63 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 6.60 (s, 1H), 7.10 (s, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 28.06, 35.68, 56.05, 65.02, 110.58, 121.83, 125.28, 128.20, 130.00, 154.02; HRMS (ESI⁺) Calcd for [M+H]⁺, 244.0160, Found, 244.0126 (−3.4 mmu)



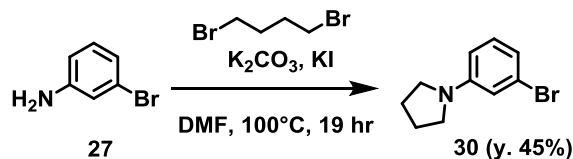
To a solution of 3-bromoaniline (**27**) (2 g, 11.6 mmol) in CH₃CN (35 mL) were added K₂CO₃ (4 g, 29.0 mmol), benzylbromide (3.45 mL, 29.1 mmol) and tetrabutylammonium iodide (429 mg, 1.16 mmol). The reaction mixture was stirred for 63 h at 80°C. The mixture was concentrated *in vacuo* and H₂O was added to it, then the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂/*n*-hexane) to afford **29** (3.54 g, 10.1 mmol, 21%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 4.61 (s, 4H), 6.63 (dd, *J* = 8.3, 2.7 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.99 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.20-7.36 (m, 10H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 54.03, 111.10, 115.11, 119.61, 123.50, 126.58, 127.10, 128.74, 130.42, 137.78, 150.48



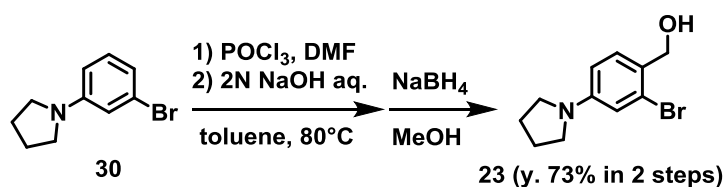
To a solution of **29** (3.51 g, 9.97 mmol) in toluene (20 mL) were added DMF (946 μL , 13.0 mmol) and phosphorus oxychloride (1109 μL , 12.0 mmol) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 15 h at 80°C . An aqueous solution of 2N NaOH was added while the system was immersed in a water bath and cooled, the system was stirred for 30 minutes, and the mixture was extracted with dichloromethane and washed with brine. The organic layer was dried using Na_2SO_4 , the solvent was distilled away under reduced pressure, ethanol (20 mL) and sodium borohydride (379 mg, 9.97 mmol) were added, and the system was stirred for 3 h at room temperature. After the solvent had been distilled away under reduced pressure, water was added to the residue and the mixture was extracted using dichloromethane. The organic layer was dried using Na_2SO_4 , the solvent was distilled away under reduced pressure, and the residue was purified using column chromatography (silica gel, AcOEt/*n*-hexane) to afford **20** (1.45 g, 3.79 mmol, 38%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 4.58 (s, 2H), 4.60 (s, 4H), 6.63 (dd, $J = 8.7, 2.5$ Hz, 1H), 6.94 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.18-7.34 (m, 10H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 54.02, 64.87, 111.54, 115.96, 124.50, 126.51, 127.01, 127.53, 128.72, 130.52, 137.61, 149.84; HRMS (ESI $^+$) Calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 404.0626, Found, 404.0655 (+2.9 mmu)



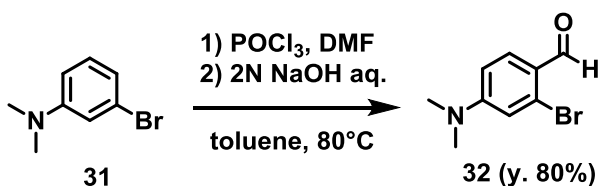
To a solution of 3-bromoaniline (**27**) (2 g, 11.6 mmol) in DMF (20 mL) were added K_2CO_3 (7.07 g, 51.2 mmol), 1,4-dibromobutane (2.76 g, 12.8 mmol) and KI (10 mg, 60.2 μmol). The reaction mixture was stirred for 19 h at 100°C . The mixture was concentrated *in vacuo* and H_2O was added to it, then the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, CH_2Cl_2 /*n*-hexane) to afford **30** (1.17 g, 5.18 mmol, 45%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.97-2.01 (m, 4H), 3.22-3.27 (m, 4H), 6.45 (dd, $J = 8.0, 2.2$ Hz, 1H), 6.67 (s, 1H), 6.74 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.04 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 25.41, 47.55, 110.23, 114.27, 117.98, 123.32, 130.25, 148.99; HRMS (ESI^+) Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 226.0231, Found, 226.0202 (-2.9 mmu)



To a solution of **30** (511 mg, 2.26 mmol) in toluene (6 mL) were added DMF (214 μL , 2.94 mmol) and phosphorus oxychloride (251 μL , 2.71 mmol) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 14 h at 80°C . An aqueous solution of 2N NaOH was added while the system was immersed in a water bath and cooled, the system was stirred for 30 minutes, and the mixture was extracted with dichloromethane and washed with brine. The organic layer was dried using Na_2SO_4 , the solvent was distilled away under reduced pressure, methanol (15 mL), CH_2Cl_2 (5 mL) and sodium borohydride (379 mg, 9.97 mmol) were added, and the system was stirred for 6 h at room temperature. After the solvent had been distilled away under reduced pressure, water was added to the residue and the mixture was extracted using dichloromethane. The organic layer was dried using Na_2SO_4 , the solvent was distilled away under reduced pressure, and the residue was purified using column chromatography (silica gel, AcOEt/n -hexane) to afford **23** (421 mg, 1.64 mmol, 73%).

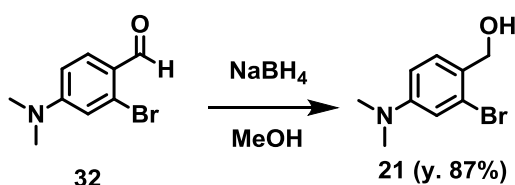
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.79 (t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 1.98-2.03 (m, 4H), 3.24-3.28 (m, 4H), 4.64 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H), 6.47 (dd, $J = 8.1, 2.1$ Hz, 1H), 6.74 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 25.41, 47.60, 65.21, 110.76, 115.21, 124.49, 125.93, 130.62, 148.57; HRMS (ESI^+) Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 256.0337, Found, 226.0365 (+2.8 mmu)



To a solution of 3-bromo-*N,N*-dimethylaniline (**31**) (516 mg, 2.58 mmol) in toluene (4 mL) were

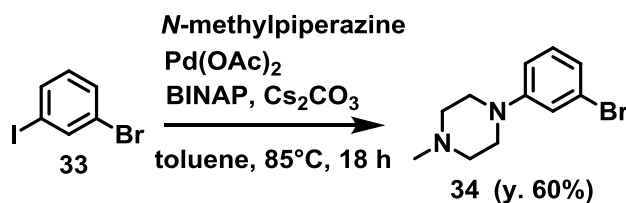
added DMF (245 μ L, 3.35 mmol) and phosphorus oxychloride (287 μ L, 3.10 mmol) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 20 h at 80°C. An aqueous solution of 2N NaOH was added while the system was immersed in a water bath and cooled, the system was stirred for 4 h, and the mixture was extracted with dichloromethane and washed with brine. The residue was purified using column chromatography (silica gel, AcOEt/*n*-hexane) to obtain **32** (470 mg, 2.06 mmol, 80%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 3.08 (s, 6H), 6.64 (dd, $J = 9.0, 2.7$ Hz, 1H), 6.80 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J = 9.0$ Hz), 10.09 (s, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 40.04, 110.52, 114.80, 121.99, 129.66, 131.00, 154.48, 190.12



To a solution of **32** (433 mg, 1.90 mmol) in methanol (6 mL) was added sodium borohydride (74 mg, 1.90 mmol). The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature. The mixture was concentrated *in vacuo* and H_2O was added to it, then the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, AcOEt/*n*-hexane) to afford **21** (412 mg, 1.79 mmol, 87%).

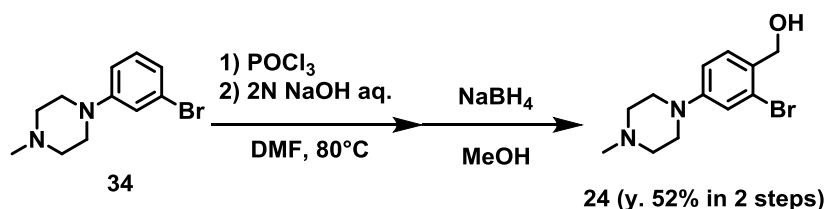
^1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ 2.93 (s, 6H), 4.60 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H), 6.65 (dd, $J = 8.1, 3.0$ Hz, 1H), 6.89 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 40.37, 65.02, 111.40, 115.98, 124.36, 127.02, 130.35, 151.12; HRMS (ESI $^+$) Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 230.0181, Found, 230.0162 (-1.9 mmu)



To a solution of 1-bromo-3-iodobenzene (**33**) (1.0 g, 3.53 mmol) in toluene (15 mL) were added

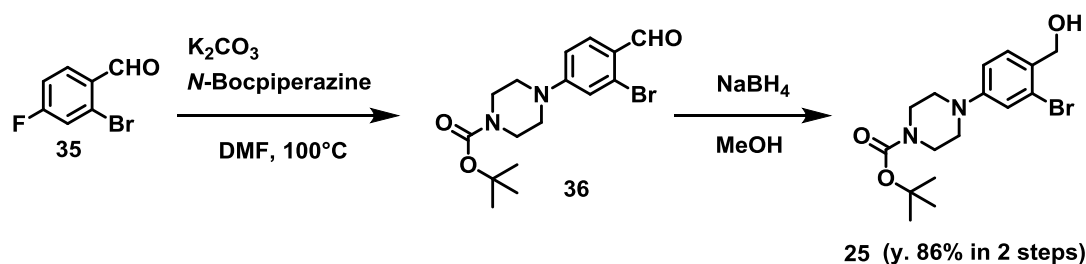
N-methylpiperazine (393 μ L, 3.53 mmol), Pd(OAc)₂ (79 mg, 0.353 mmol), BINAP (220 mg, 0.353 mmol) and Cs₂CO₃ (5.77 g, 17.7 mmol) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 18 h at 85°C. The reaction mixture was diluted with NaHCO₃ aq., and extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (NH silica gel, AcOEt/*n*-hexane) to afford **34** (540 mg, 2.12 mmol, 60%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.35 (s, 3H), 2.56 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H), 3.21 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H), 6.83 (dd, *J* = 8.1, 2.1 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.10 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 46.09, 48.57, 54.88, 114.27, 118.59, 122.10, 123.20, 130.26, 152.42; HRMS (ESI⁺) Calcd for [M+H]⁺, 255.0497, Found, 255.04464 (−3.3 mmu)



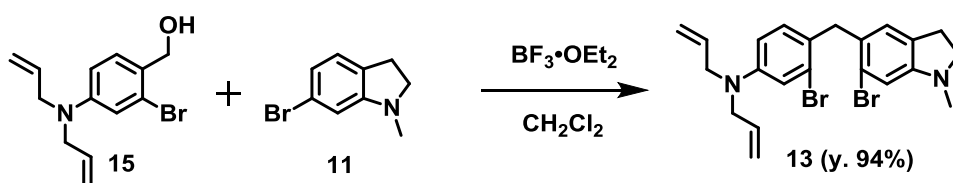
To a solution of **34** (337 mg, 1.32 mmol) in DMF (5 mL) was added phosphorus oxychloride (2.45 mL, 26.4 mmol) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 18 h at 80°C. An aqueous solution of 2N NaOH was added while the system was immersed in a water bath and cooled, the system was stirred for 2h, and the mixture was extracted with dichloromethane and washed with brine. The organic layer was dried using Na₂SO₄, the solvent was distilled away under reduced pressure, methanol (15 mL) and sodium borohydride (50 mg, 1.32 mmol) were added, and the system was stirred for 2 h at room temperature. After the solvent had been distilled away under reduced pressure, water was added to the residue and the mixture was extracted using dichloromethane. The organic layer was dried using Na₂SO₄, the solvent was distilled away under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography (NH silica gel, AcOEt / *n*-hexane) and further purified by GPC to afford **24** (196 mg, 0.687 mmol, 52%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.34 (s, 3H), 2.55 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H), 3.18 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H), 4.65 (s, 2H), 6.83 (dd, *J* = 8.1, 2.4 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 45.87, 48.30, 54.65, 64.00, 114.79, 119.36, 123.42, 129.61, 130.81, 151.43; HRMS (ESI⁺) Calcd for [M+H]⁺, 285.0602, Found, 285.0613 (+1.1 mmu)



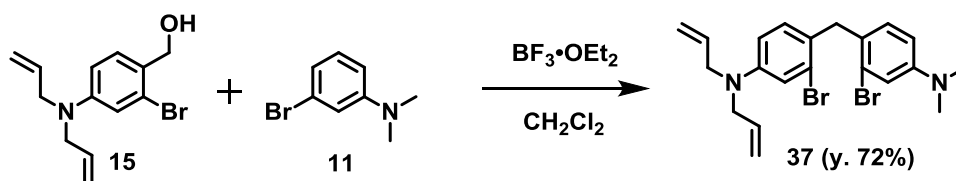
To a solution of 2-bromo-4-fluorobenzaldehyde (**35**) (2.41 g, 12.9 mmol) in DMF (30 mL) were added *N*-Bocpiperazine (2.19 g, 10.8 mmol) and K_2CO_3 (2.24 g, 16.2 mmol). The reaction mixture was stirred for 18 h at 100°C, diluted with $NaHCO_3$ aq., and extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was added methanol (30 mL) and sodium borohydride (494 mg, 13 mmol). The reaction mixture was stirred for 3 h at room temperature. After the solvent had been distilled away under reduced pressure, water was added to the residue and the mixture was extracted using dichloromethane. The organic layer was dried using Na_2SO_4 , the solvent was distilled away under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography (NH silica gel, AcOEt / *n*-hexane) to afford **25** (3.46 g, 9.33 mmol, 86%).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 1.48 (s, 9H), 2.02 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 3.13 (t, $J = 5.1$ Hz, 4H), 3.56 (t, $J = 5.1$ Hz, 4H), 4.66 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 6.85 (dd, $J = 8.1, 2.2$ Hz, 1H), 7.08 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 28.40, 48.89, 64.77, 80.05, 115.35, 120.09, 123.85, 130.03, 130.87, 151.76, 154.64; HRMS (ESI⁺) Calcd for $[M+H]^+$, 371.0970, Found, 371.0922 (−4.8 mmu)



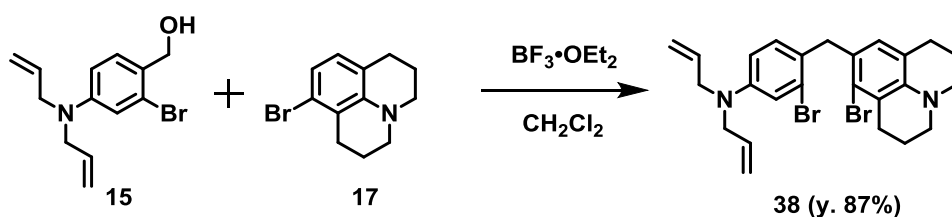
To a solution of **15** (73 mg, 0.260 mmol) and **11** (55 mg, 0.260 mmol) in CH_2Cl_2 (5 mL) was added $BF_3 \cdot OEt_2$ (65 μ L, 0.520 mmol). The reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature, diluted with water and extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was dried using Na_2SO_4 , the solvent was distilled away under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography (silica gel, CH_2Cl_2/n -hexane) to afford **13** (116 mg, 0.244 mmol, 94%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 2.73 (s, 3H), 2.83 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H), 3.28 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H), 3.87-3.88 (m, 4H), 3.97 (s, 2H), 5.14-5.20 (m, 4H), 5.76-5.89 (m, 2H), 6.64 (dd, $J = 2.5, 8.2$ Hz, 1H), 6.65 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.80 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 28.36, 36.03, 40.14, 52.72, 56.28, 110.85, 111.64, 115.92, 116.27, 123.06, 125.49, 126.11, 127.05, 128.05, 130.17, 130.68, 133.52, 148.13, 153.03; LRMS (ESI^+) 477 $[\text{M}+\text{H}]^+$



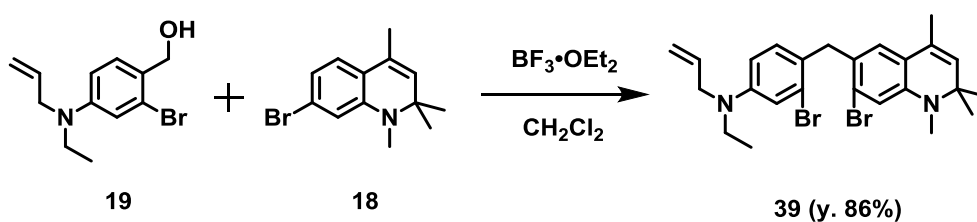
To a solution of **15** (18.1 mg, 64.4 μmol) and **11** (14.5 mg, 72.5 μmol) in CH_2Cl_2 (5 mL) was added $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (16 μL , 129 μmol). The reaction mixture was stirred for 8 h at 37°C , diluted with water and extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was dried using Na_2SO_4 , the solvent was distilled away under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography (silica gel, AcOEt/n -hexane) to afford **37** (21.5 mg, 46.3 μmol , 72%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 2.91 (s, 6H), 3.86-3.88 (m, 4H), 3.98 (s, 2H), 5.14-5.19 (m, 4H), 5.76-5.89 (m, 2H), 6.54 (dd, $J = 2.5, 8.8$ Hz, 1H), 6.59 (dd, $J = 2.4, 8.5$ Hz, 1H), 6.79 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.87 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 6.93 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 39.8, 40.5, 52.7, 111.7, 111.8, 116.0, 116.2, 125.5, 125.6, 126.9, 127.1, 130.7, 130.8, 133.5, 148.1, 150.0; LRMS (ESI^+) 465 $[\text{M}+\text{H}]^+$

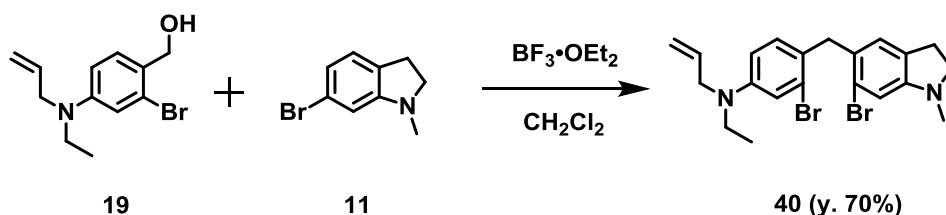


To a solution of **15** (25 mg, 89.0 μmol) and **17** (22 mg, 89.0 μmol) in CH_2Cl_2 (8 mL) was added $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (22 μL , 178 μmol). The reaction mixture was stirred for 3 h at room temperature, diluted with water and extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was dried using Na_2SO_4 , the solvent was distilled away under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography (silica gel, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/n$ -hexane) to afford **38** (40 mg, 77.5 μmol , 87%).

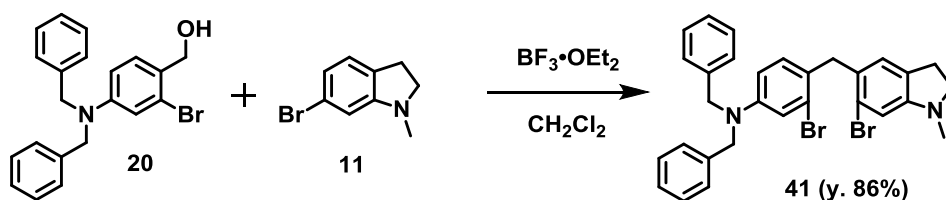
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.89-2.03 (m, 4H), 2.64 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 2.82 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.05-3.12 (m, 4H), 3.86-3.88 (m, 4H), 3.95 (s, 2H), 5.14-5.19 (m, 4H), 5.76-5.89 (m, 2H), 6.49 (s, 1H), 6.54 (dd, $J = 9.0, 3.0$ Hz, 1H), 6.79 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 21.98, 22.31, 27.52, 29.43, 40.88, 49.57, 50.11, 52.79, 111.73, 116.01, 116.31, 120.79, 121.27, 125.56, 125.63, 126.95, 127.25, 128.64, 128.70, 130.66, 133.68, 143.02, 148.10; HRMS (ESI^+) Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 515.0698 Found, 515.0712 (+1.5 mmu)



Compound **39** was synthesized as reported previously³¹.

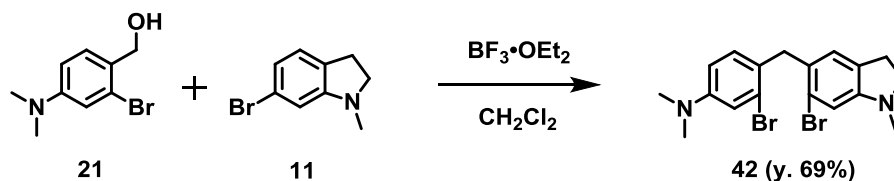


Compound **40** was synthesized as reported previously³¹.



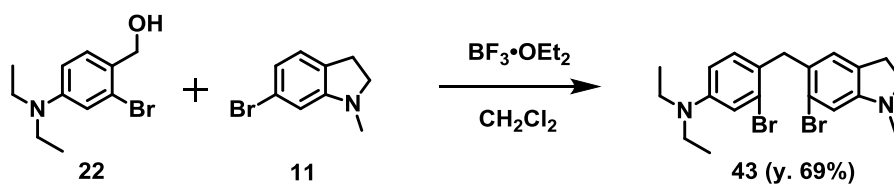
To a solution of **20** (40 mg, 105 μmol) and **11** (22 mg, 105 μmol) in CH_2Cl_2 (8 mL) was added $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (27 μL , 210 μmol). The reaction mixture was stirred for 17 h at room temperature, diluted with water and extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was dried using Na_2SO_4 , the solvent was distilled away under reduced pressure, and the residue was purified by GPC to afford **41** (52 mg, 90.2 μmol , 86%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.72 (s, 3H), 2.83 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H), 3.28 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H), 3.96 (s, 2H), 4.59 (s, 4H), 6.56 (dd, *J* = 8.7, 2.7 Hz, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.74-6.77 (m, 2H), 6.98 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.20-7.35 (m, 10H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 28.33, 35.98, 40.14, 54.09, 56.23, 110.84, 111.86, 116.01, 123.09, 125.55, 126.20, 126.65, 127.01, 127.66, 128.67, 130.16, 130.74, 138.05, 148.67, 153.05; HRMS (ESI⁺) Calcd for [M+H]⁺, 577.0677, Found, 577.0678 (+0.1 mmu)

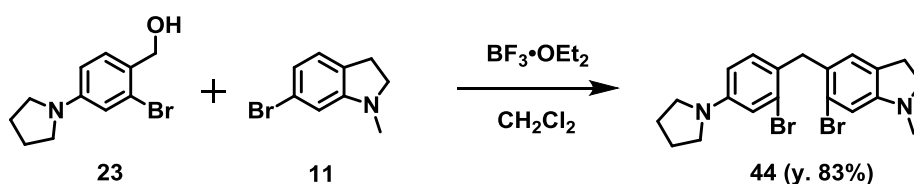


To a solution of **21** (25 mg, 109 μmol) and **11** (23 mg, 109 μmol) in CH₂Cl₂ (6 mL) was added BF₃·OEt₂ (28 μL, 218 μmol). The reaction mixture was stirred for 17.5 h at room temperature, diluted with water and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried using Na₂SO₄, the solvent was distilled away under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography (silica gel, AcOEt/*n*-hexane) to afford **42** (32 mg, 75.5 μmol, 69%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.73 (s, 3H), 2.81 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H), 2.91 (s, 6H), 3.28 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H), 3.98 (s, 2H), 6.59 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 1H), 6.65 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 6.86 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 28.34, 36.02, 40.19, 40.50, 56.26, 110.86, 111.84, 116.20, 123.03, 125.56, 125.98, 127.22, 128.06, 130.13, 130.74, 149.98, 153.00; HRMS (ESI⁺) Calcd for [M+H]⁺, 425.0051, Found, 425.0022 (−2.9 mmu)

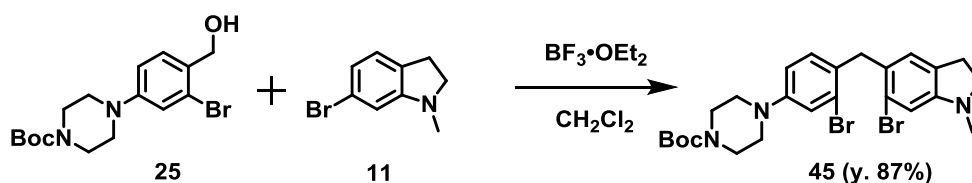


Compound **43** was synthesized as reported previously³¹.



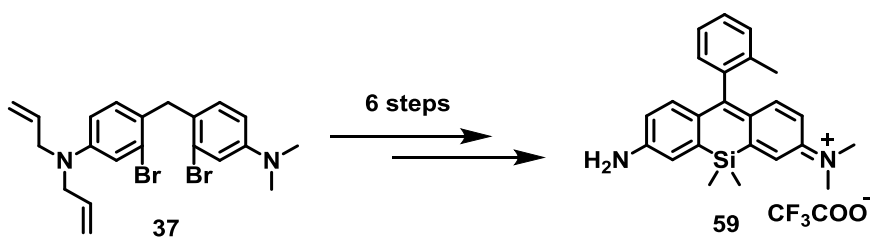
To a solution of **23** (39 mg, 152 μ mol) and **11** (32 mg, 152 μ mol) in CH_2Cl_2 (10 mL) was added $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (38 μ L, 304 μ mol). The reaction mixture was stirred for 13 h at room temperature, diluted with water and extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was dried using Na_2SO_4 , the solvent was distilled away under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography (silica gel, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/n$ -hexane) to afford **44** (57.1 mg, 127 μ mol, 83%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.96-2.01 (m, 4H), 2.72 (s, 3H), 2.81 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.22-3.30 (m, 6H), 3.98 (s, 2H), 6.42 (dd, $J = 8.1, 2.1$ Hz, 1H), 6.65 (s, 1H), 6.69 (s, 1H), 6.78 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 25.41, 28.34, 36.03, 40.19, 47.58, 56.26, 110.79, 110.98, 115.14, 122.97, 125.57, 125.85, 125.95, 128.29, 130.07, 130.88, 147.33, 152.92; HRMS (ESI^+) Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 451.0208, Found, 451.0222 (+1.4 mmu)

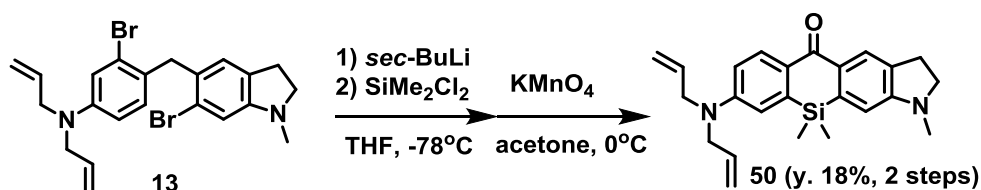


To a solution of **25** (41 mg, 110 μ mol) and **11** (23 mg, 108 μ mol) in CH_2Cl_2 (5 mL) was added $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (28 μ L, 220 μ mol). The reaction mixture was stirred for 6 h at room temperature, diluted with water and extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was dried using Na_2SO_4 , the solvent was distilled away under reduced pressure, and the residue was purified by column chromatography (silica gel, AcOEt/n -hexane) to afford **45** (53 mg, 93.7 μ mol, 87%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.48 (s, 9H), 2.73 (s, 3H), 2.82 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H), 3.10 (t, $J = 5.1$ Hz, 4H), 3.30 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H), 3.56 (t, $J = 5.1$ Hz, 4H), 4.00 (s, 2H), 6.65 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 6.77 (dd, $J = 8.7, 2.1$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.13 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 28.31, 28.40, 35.96, 40.38, 49.13, 56.22, 79.95, 110.81, 115.64, 120.25, 123.13, 125.36, 126.09, 127.47, 130.20, 130.77, 131.20, 150.52, 153.13, 154.65; HRMS (ESI^+) Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 566.0841, Found, 566.0850 (+0.9 mmu)

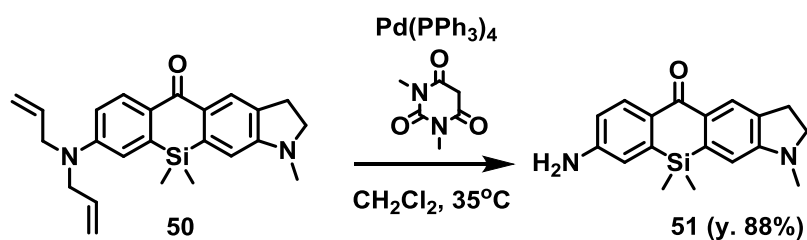


Compound **59** was synthesized from **37** as reported previously⁵⁵.



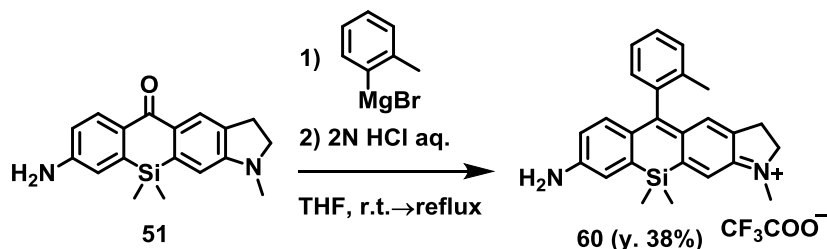
To a solution of **13** (207 mg, 0.434 mmol) in anhydrous THF (10 mL) was added 1 M THF solution of *sec*-BuLi (0.91 mL, 0.91 mmol) at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 20 min at the same temperature, then dichlorodimethylsilane (112 mg, 0.868 mmol) in anhydrous THF (5 mL) was added to it and the mixture was warmed to room temperature and stirred for 1 h. 2 N HCl aq. was added to the mixture to quench the reaction, and the mixture was neutralized with NaHCO_3 aq. The whole was extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was collected, washed with brine, dried over Na_2SO_4 and evaporated to dryness. The residue was dissolved in acetone (30 mL) at $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ and KMnO_4 (275 mg, 1.74 mmol) was added in small portions over 3 h with stirring at the same temperature. Then the mixture was filtered through celite filter and the solution was evaporated to dryness. The residue was purified by column chromatography (silica gel, AcOEt/*n*-hexane) to afford **50** (30 mg, 77.3 μmol , 18%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.43 (s, 6H), 2.90 (s, 3H), 3.05 (t, $J = 8.5$ Hz, 2H), 3.47 (t, $J = 8.5$ Hz, 2H), 4.02-4.03 (m, 4H), 5.18-5.23 (m, 4H), 5.82-5.94 (m, 2H), 6.50 (s, 1H), 6.80-6.86 (m, 2H), 8.21 (s, 1H), 8.34 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ -1.17, 28.03, 34.55, 52.65, 54.79, 107.89, 107.93, 113.37, 114.65, 116.52, 120.40, 126.03, 129.98, 131.47, 131.59, 132.12, 133.04, 140.12, 140.27, 150.00, 154.80, 185.05; HRMS (ESI⁺) Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 389.2049 Found, 389.2069 (+2.0 mmu)



To a solution of **50** (506 mg, 1.30 mmol) in CH_2Cl_2 (20 ml) were added 1,3-dimethylbarbituric acid (406 mg, 2.60 mmol) and $\text{Pd(PPh}_3)_4$ (225 mg, 0.145 mmol) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 19 h at 35°C . The reaction was quenched with sat. NaHCO_3 aq., and the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with sat. NaHCO_3 aq. and brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, $\text{AcOEt/CH}_2\text{Cl}_2$) to afford **51** (354 mg, 1.15 mmol, 88%).

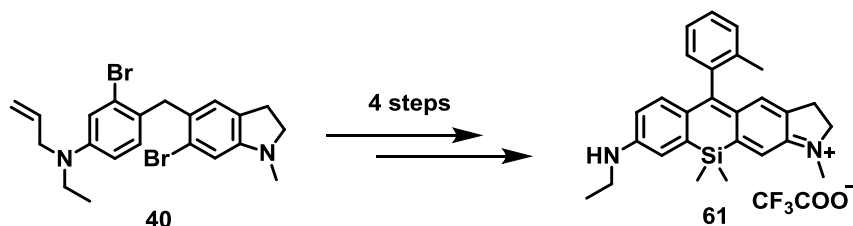
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 0.43 (s, 6H), 2.90 (s, 3H), 3.04 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H), 3.47 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.49 (s, 1H), 6.76-6.82 (m, 2H), 8.20 (s, 1H), 8.31 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ -1.28, 27.96, 34.44, 54.73, 107.79, 107.84, 116.12, 117.51, 126.10, 131.15, 131.84, 132.20, 140.12, 140.80, 148.83, 154.91, 185.13; HRMS (ESI^+) Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 309.1423 Found, 389.1426 (+0.3 mmu)



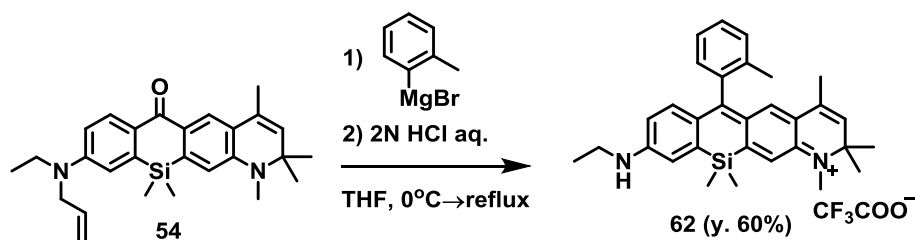
To a solution of **51** (8.7 mg, 28.2 μmol) in anhydrous THF (5 mL) was added 1 M THF solution of *o*-tolylmagnesium bromide (2.8 mL, 2.82 mmol) and the mixture was refluxed at 80°C for 2 h under argon atmosphere. After it had cooled to room temperature, 2 N HCl aq. was added to it. The mixture was diluted with Sat. NaHCO_3 aq., and extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by HPLC (eluent, 48% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (0 min) to 56% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (20 min); flow rate = 5.0 mL/min) to afford **60** (5.3 mg, 10.7 μmol , 38%).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_2Cl_2): δ 0.54 (s, 3H), 0.56 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.96 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.21

(s, 3H), 3.83 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.58 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.95 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.09 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.29-7.43 (m, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ -1.62, -1.34, 19.43, 26.80, 33.93, 56.04, 116.25, 117.14, 123.40, 126.85, 128.62, 129.81, 129.87, 130.08, 131.34, 134.54, 135.44, 136.88, 140.66, 141.80, 147.77, 154.49, 156.57, 159.59, 168.63; HRMS (ESI^+) Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 383.1944 Found, 383.1484 (+4.0 mmu)

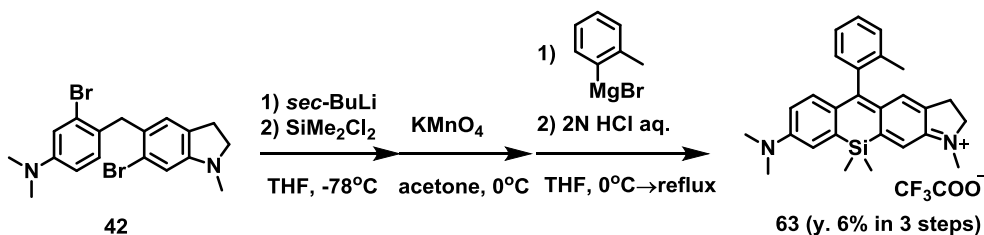


Compound **61** was synthesized from **40** as reported previously³¹.



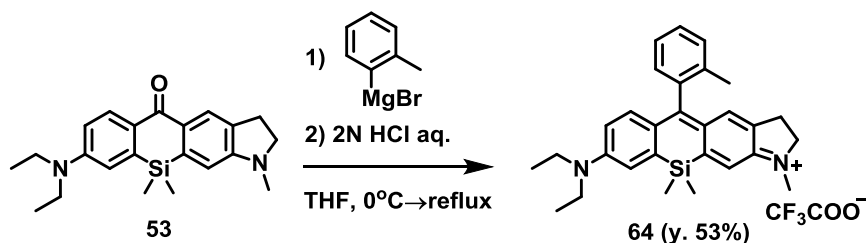
To a solution of **54**³¹ (20 mg, 46.4 μmol) in anhydrous THF (5 mL) was added 1 M THF solution of *o*-tolylmagnesium bromide (10 mL, 10 mmol) and the mixture was refluxed at 65°C for 13 h under argon atmosphere. After it had cooled to room temperature, 2 N HCl aq. was added to it. The mixture was diluted with Sat. NaHCO_3 aq., and extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by HPLC (eluent, 48% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (0 min) to 80% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (20 min); flow rate = 25.0 mL/min) to afford **62** (16 mg, 27.6 μmol , 60%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.54 (s, 3H), 0.55 (s, 3H), 1.35 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.43 (s, 3H), 1.45 (s, 3H), 1.51 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 3.14 (s, 3H), 3.47 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 5.29 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 7.06-7.08 (m, 2H), 7.27-7.42 (m, 5H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ -1.38, -1.14, 13.86, 17.61, 19.41, 29.28, 32.10, 38.40, 59.43, 112.53, 115.47, 117.65, 118.38, 122.44, 125.56, 126.26, 127.54, 128.69, 128.92, 129.80, 130.07, 131.39, 135.67, 138.84, 148.24, 149.09, 155.96, 161.05, 161.39, 167.36; HRMS (ESI^+) Calcd for $[\text{M}]^+$, 465.2726, Found, 465.2676 (-4.1 mmu)



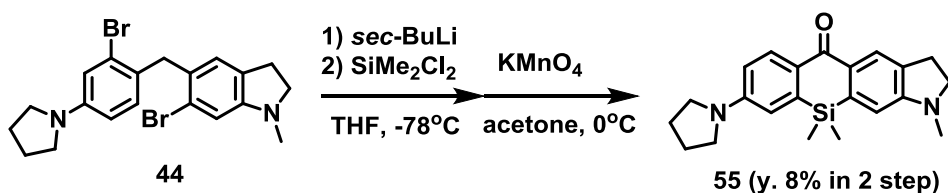
To a solution of **42** (354 mg, 0.835 mmol) in anhydrous THF (20 mL) was added 1 M THF solution of *sec*-BuLi (1.7 mL, 1.7 mmol) at -78°C under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 30 min at the same temperature, then dichlorodimethylsilane (118 μL , 1.02 mmol) in anhydrous THF (3 mL) was added to it and the mixture was warmed to room temperature and stirred for 5 h. 2 N HCl aq. was added to the mixture to quench the reaction, and the mixture was neutralized with NaHCO_3 aq. The whole was extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was collected, washed with brine, dried over Na_2SO_4 and evaporated to dryness. The residue was dissolved in acetone (30 mL) at 0°C and KMnO_4 (196 mg, 1.25 mmol) was added in small portions over 3 h with stirring at the same temperature. Then the mixture was filtered through celite filter and the solution was evaporated to dryness. The residue was purified by column chromatography (silica gel, $\text{AcOEt}/n\text{-hexane}$) and GPC. The residue was dissolved in anhydrous THF (10 mL), added 1 M THF solution of *o*-tolylmagnesium bromide (10 mL, 10 mmol) and the mixture was refluxed at 80°C for 5 h under argon atmosphere. After it had cooled to room temperature, 2 N HCl aq. was added to it. The mixture was diluted with Sat. NaHCO_3 aq., and extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by HPLC (eluent, 52% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (0 min) to 72% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (20 min); flow rate = 25.0 mL/min) to afford **63** (25 mg, 47.7 μmol , 6%).

^1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ 0.47 (s, 3H), 0.50 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 2.88 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.14 (s, 6H), 3.18 (s, 3H), 3.80 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 6.46 (dd, $J = 9.2, 2.0$ Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.90-6.91 (m, 2H), 7.00-7.01 (m, 2H), 7.24-7.37 (m, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_2Cl_2) δ $-1.03, -0.72, 19.69, 26.75, 34.37, 40.88, 55.73, 113.92, 115.94, 120.30, 126.28, 128.12, 129.34, 129.52, 129.78, 130.90, 134.33, 134.51, 136.41, 140.82, 146.77, 153.76, 154.28, 158.74, 168.76$; HRMS (ESI $^+$) Calcd for $[\text{M}]^+$, 411.2257, Found, 411.2219 (-3.8 mmu)



To a solution of **53**³¹ (10 mg, 27.4 μmol) in anhydrous THF (5 mL) was added 1 M THF solution of *o*-tolylmagnesium bromide (10 mL, 10 mmol) and the mixture was refluxed for 5 h under argon atmosphere. After it had cooled to room temperature, 2 N HCl aq. was added to it. The mixture was diluted with Sat. NaHCO_3 aq., and extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified column chromatography (silica gel, $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) and HPLC (eluent, 56% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (0 min) to 72% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (20 min); flow rate = 5.0 mL/min) to afford **64** (8 mg, 14.5 μmol , 53%).

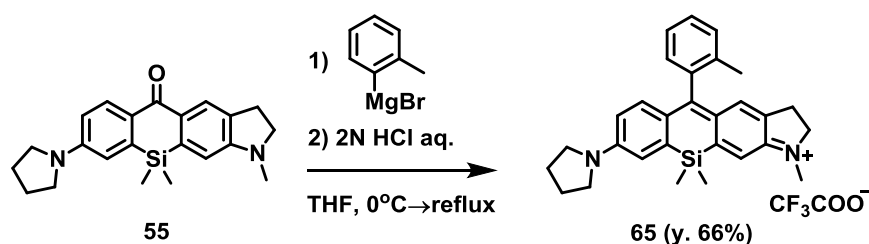
^1H NMR (300 MHz, CD_3CN): δ 0.55 (s, 3H), 0.56 (s, 3H), 1.21 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 2.02 (s, 3H), 2.90 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H), 3.23 (s, 3H), 3.58 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 3.85 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H), 6.63 (dd, $J = 9.9, 2.6$ Hz, 1H), 6.72 (s, 1H), 6.88 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H), 7.09 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.20 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.34-7.48 (m, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ -1.52, -1.24, 13.00, 19.41, 26.88, 33.88, 46.37, 55.96, 114.52, 116.79, 121.12, 126.85, 128.18, 129.87, 129.98, 130.13, 131.33, 134.29, 135.31, 136.95, 140.63, 141.28, 147.48, 152.86, 154.14, 159.43, 168.22; HRMS (ESI⁺) Calcd for $[\text{M}]^+$, 439.2570, Found, 439.2522 (-4.8 mmu)



To a solution of **44** (336 mg, 0.747 mmol) in anhydrous THF (25 mL) was added 1 M THF solution of *sec*-BuLi (1.64 mL, 1.64 mmol) at -78 °C under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 20 min at the same temperature, then dichlorodimethylsilane (134 μL , 1.12 mmol) in anhydrous THF (5 mL) was added to it and the mixture was warmed to room temperature and stirred

for 2 h. 2 N HCl aq. was added to the mixture to quench the reaction, and the mixture was neutralized with NaHCO₃ aq. The whole was extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was collected, washed with brine, dried over Na₂SO₄ and evaporated to dryness. The residue was dissolved in acetone (30 mL) at 0 °C and KMnO₄ (472 mg, 2.99 mmol) was added in small portions over 2 h with stirring at the same temperature. Then the mixture was filtered through celite filter and the solution was evaporated to dryness. The residue was purified by column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂/*n*-hexane) to afford **55** (21 mg, 58.0 μmol, 8%).

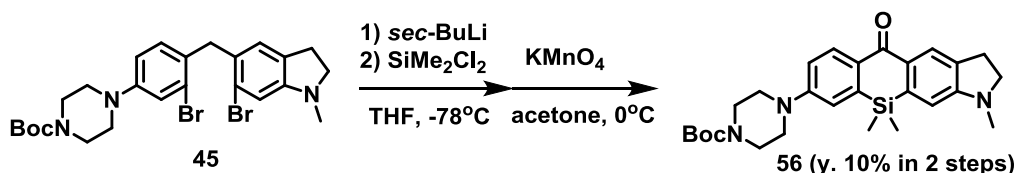
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.45 (s, 6H), 2.03-2.07 (m, 4H), 2.90 (s, 3H), 3.05 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.39-3.50 (m, 6H), 6.51 (s, 1H), 6.64 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.69 (dd, *J* = 8.1, 2.1 Hz, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.39 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 25.46, 28.06, 34.59, 47.45, 54.84, 107.95, 113.08, 114.08, 126.00, 129.10, 131.62, 131.80, 132.12, 140.07, 140.54, 148.95, 154.76, 185.16; HRMS (ESI⁺) Calcd for [M+H]⁺, 363.1855, Found, 363.1893 (-3.8 mmu)



To a solution of **55** (15 mg, 41.4 μmol) in anhydrous THF (20 mL) was added 1 M THF solution of *o*-tolylmagnesium bromide (1 mL, 1 mmol) and the mixture was refluxed for 4 h under argon atmosphere. After it had cooled to room temperature, 2 N HCl aq. was added to it. The mixture was diluted with Sat. NaHCO₃ aq., and extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by HPLC (eluent, 64% CH₃CN/0.1% TFA aq. (0 min) to 80% CH₃CN/0.1% TFA aq. (20 min); flow rate = 5.0 mL/min) to afford **65** (15 mg, 27.3 μmol, 66%).

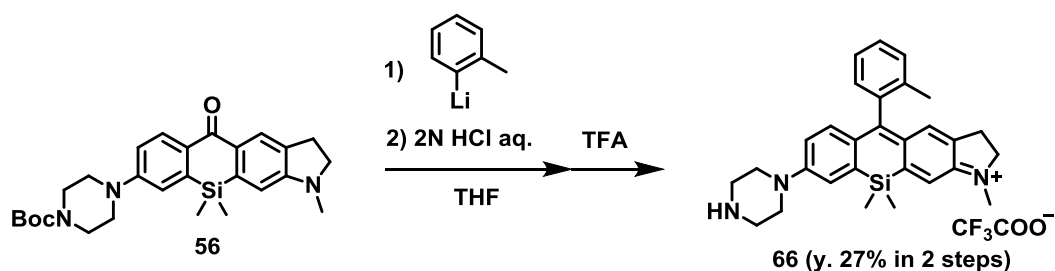
¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ 0.55 (s, 3H), 0.57 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.10 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H), 2.96 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.24 (s, 3H), 3.57 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H), 3.86 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 6.44 (dd, *J* = 9.2, 2.4 Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.98-7.00 (m, 2H), 7.09 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.33-7.46 (m, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂) δ -0.99, -0.69, 19.68, 25.77, 26.84, 34.23, 49.30, 55.56, 114.75, 115.43, 121.44, 126.28, 128.10, 129.31, 129.51, 129.61, 130.89, 134.04, 136.40, 139.78, 141.23,

147.42, 151.57, 153.47, 158.44, 168.92; HRMS (ESI⁺) Calcd for [M]⁺, 437.2413, Found, 437.2387 (-2.6 mmu)



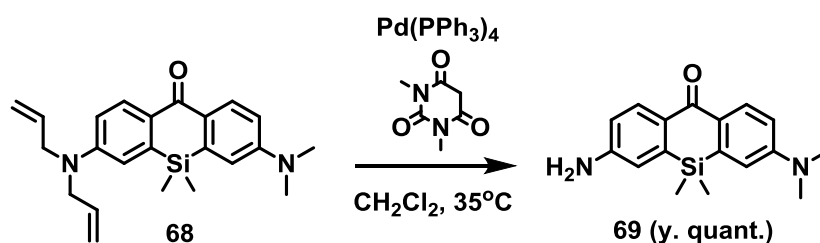
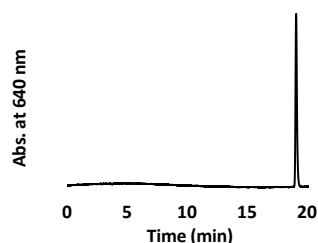
To a solution of **45** (890 mg, 1.57 mmol) in anhydrous THF (15 mL) was added 1 M THF solution of *sec*-BuLi (3.2 mL, 3.2 mmol) at -78°C under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 20 min at the same temperature, then dichlorodimethylsilane (203 μL , 1.70 mmol) in anhydrous THF (5 mL) was added to it and the mixture was warmed to room temperature and stirred for 3 h. 2 N HCl aq. was added to the mixture to quench the reaction, and the mixture was neutralized with NaHCO_3 aq. The whole was extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was collected, washed with brine, dried over Na_2SO_4 and evaporated to dryness. The residue was dissolved in acetone (30 mL) at 0°C and KMnO_4 (187 mg, 1.19 mmol) was added in small portions over 2 h with stirring at the same temperature. Then the mixture was filtered through celite filter and the solution was evaporated to dryness. The residue was purified by column chromatography (silica gel, AcOEt/n -hexane) to afford **56** (77 mg, 0.161 mmol, 10%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 0.45 (s, 6H), 1.49 (s, 9H), 2.91 (s, 3H), 3.06 (t, $J = 9.0$ Hz, 2H), 3.35 (t, $J = 5.0$ Hz, 4H), 3.49 (t, $J = 9.0$ Hz, 2H), 3.62 (t, $J = 5.0$ Hz, 4H), 6.49 (s, 1H), 7.01-7.04 (m, 2H), 8.20 (s, 1H), 8.39 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ -1.19, 27.88, 28.33, 34.36, 47.56, 54.63, 79.97, 107.74, 116.22, 117.61, 126.02, 130.95, 131.37, 132.20, 132.56, 140.21, 140.29, 151.98, 154.48, 154.91, 184.99; HRMS (ESI⁺) Calcd for [M+H]⁺, 478.2526, Found, 478.2483 (-4.3 mmu).



To a solution of 2-bromotoluene (36.4 μL , 0.3 mmol) in anhydrous THF (10 mL) was added 1 M cyclohexane solution of *sec*-butyllithium (0.3 mL, 0.3 mmol) at -78°C . The reaction mixture was maintained for 5 min, and then **56** (50 mg, 105 μmol) in THF (5 mL) was added to it and the mixture was stirred at -78°C for 20 min under argon atmosphere. The reaction mixture was quenched with 2 N HCl aq., diluted with Sat. NaHCO_3 aq, and extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by HPLC (eluent, 24% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (0 min) to 56% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (20 min); flow rate = 25.0 mL/min) to afford **66** (13 mg, 28.8 μmol , 27%).

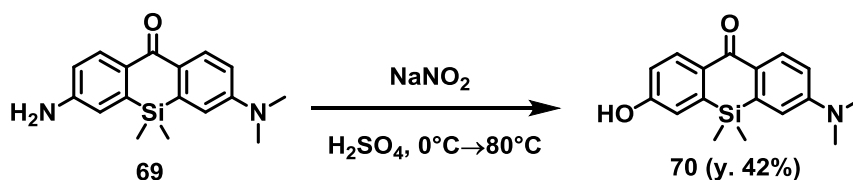
^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 0.58 (s, 3H), 0.60 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.95-2.97 (m, 6H), 3.36 (s, 3H), 3.65 (t, $J = 5.6$ Hz, 4H), 3.95 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 6.79 (s, 1H), 6.82 (dd, $J = 9.4, 2.8$ Hz, 1H), 6.96 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 7.10 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.35-7.47 (m, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ -1.53, -1.24, 19.44, 26.71, 34.18, 46.25, 56.39, 115.59, 117.90, 121.58, 126.91, 129.53, 129.94, 130.13, 130.55, 131.39, 134.58, 136.06, 136.96, 140.49, 140.52, 146.29, 154.02, 155.74, 159.95, 167.48; HRMS (ESI $^+$) Calcd for $[\text{M}]^+$, 452.2522, Found, 452.2511 (-1.1 mmu); The HPLC chromatogram after purification was as follows. The elution was done with a 20 min linear gradient from 16 % $\text{CH}_3\text{CN}/0.1$ % TFA aq. to 80 % $\text{CH}_3\text{CN}/0.1$ % TFA aq. (flow rate = 1.0 mL/min); Absorbance at 640 nm was detected.



To a solution of **68**⁵⁵ (407 mg, 1.08 mmol) in CH_2Cl_2 (10 ml) were added 1,3-dimethylbarbituric acid (505 mg, 3.24 mmol) and $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (187 mg, 0.162 mmol) under argon atmosphere. The

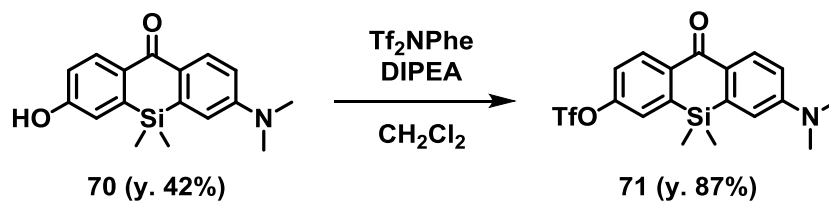
reaction mixture was stirred for 63 h at 35°C. The reaction was quenched with sat. NaHCO₃ aq., and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with sat. NaHCO₃ aq. and brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, AcOEt/CH₂Cl₂) to afford **69** (320 mg, 1.08 mmol, quant.).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.44 (s, 6H), 3.10 (s, 6H), 4.06 (s, 2H), 6.77-6.85 (m, 4H), 8.33 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.38 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ -1.24, 39.96, 113.09, 114.14, 116.11, 117.55, 129.27, 131.69, 131.81, 132.00, 140.34, 140.92, 148.96, 151.46; HRMS (ESI⁺) Calcd for [M+H]⁺, 297.1423, Found, 297.1378 (-4.5 mmu)



To a solution of **69** (226 mg, 0.764 mmol) in 5.0 M H₂SO₄ aq. (12 ml) was added NaNO₂ (527 mg, 7.64 mmol) at 0°C. The reaction mixture was stirred for 1 h at the same temperature, and then poured into 2.0 M H₂SO₄ aq. (50 mL) at 80°C. The reaction mixture was stirred for 10 min, quenched with 2 N NaOH aq. and the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with and brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, AcOEt/CH₂Cl₂) to afford **70** (95 mg, 0.320 mmol, 42%).

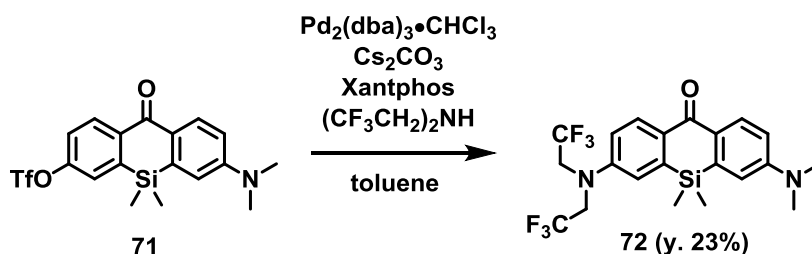
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.46 (s, 6H), 3.11 (s, 6H), 5.22 (s, 3H), 5.30 (s, 3H), 6.78 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H), 6.84 (dd, *J* = 9.5 Hz, 3.0 Hz, 1H), 6.97 (dd, *J* = 8.8 Hz, 2.2 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.37-8.43 (m, 2H); ¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD) δ -1.3, 40.1, 114.2, 115.6, 118.2, 120.0, 129.6, 132.8, 133.0, 134.1, 142.3, 143.2, 153.5, 161.9, 187.6; LRMS (ESI⁺) 298 [M+H]⁺



To a solution of **70** (95 mg, 0.320 mmol) in CH₂Cl₂ (10 ml) were added

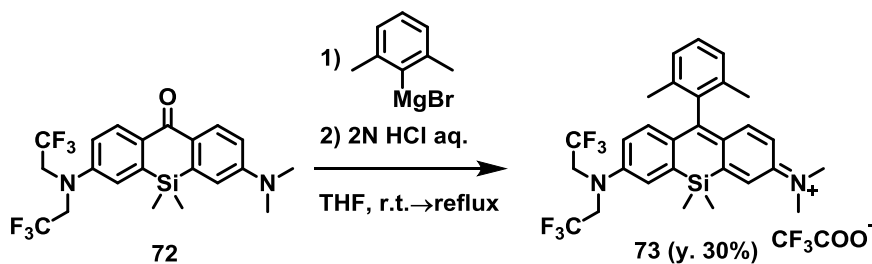
N-phenylbis(trifluoromethanesulfonimide) (229 mg, 0.64 mmol) and DIPEA (112 μ L, 0.64 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 2 h at the same temperature, quenched with 2 N HCl aq. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with and brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, $\text{AcOEt}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) to afford **71** (120 mg, 0.279 mmol, 87%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.51 (s, 6H), 3.13 (s, 6H), 6.77 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H), 6.86 (dd, $J = 9.6$, 3.0 Hz, 1H), 7.41 (dd, $J = 8.7$, 2.9 Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 2.9$, 1H), 8.37 (d, $J = 9.6$, 1H), 8.56 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H)



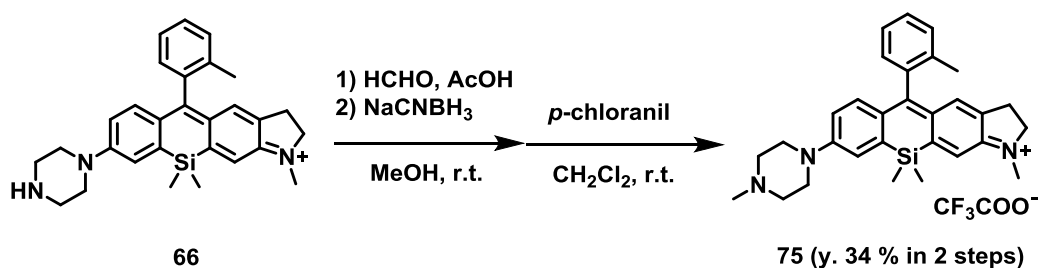
To a solution of **71** (20.4 mg, 47.5 μ mol) in toluene (5 mL) were added bis(trifluoroethyl)amine (172 mg, 0.95 mmol), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3 \cdot \text{CHCl}_3$ (9.8 mg, 9.5 μ mol), xantphos (5.5 mg, 9.5 μ mol) and Cs_2CO_3 (310 mg, 0.95 mmol) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 39 h at 85°C. The reaction mixture was diluted with water and extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/n$ -hexane) to afford **72** (5 mg, 10.9 μ mol, 23%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.47 (s, 6H), 3.11 (s, 6H), 4.17 (q, $J = 8.0$ Hz, 4H), 6.81 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.86 (dd, $J = 9.2$, 2.2 Hz, 1), 7.03-7.06 (m, 2H), 8.37-8.44 (m, 2H); HRMS (ESI^+) Calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 461.1484, Found, 461.1443 (-4.1 mmu)



To a solution of **72** (1.9 mg, 4.13 μmol) in anhydrous THF (4 mL) was added 1 M THF solution of *o*-tolylmagnesium bromide (0.80 mL, 0.80 mmol), and the mixture was refluxed for 24 h under argon atmosphere. After it had cooled to room temperature, 2 N HCl aq. was added to it. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by HPLC (eluent, 56% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (0 min) to 80% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (20 min); flow rate = 25.0 mL/min) to afford **73** (0.83 mg, 1.25 μmol , 30%).

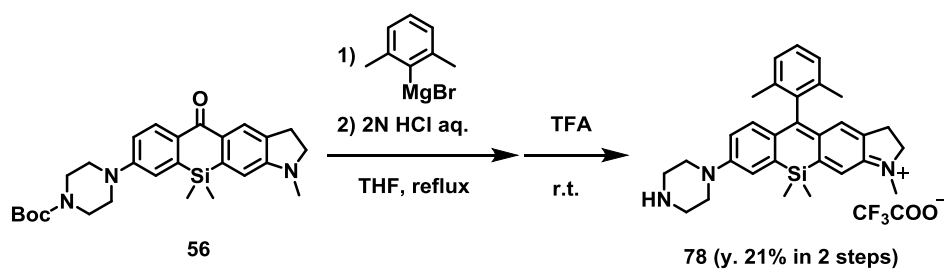
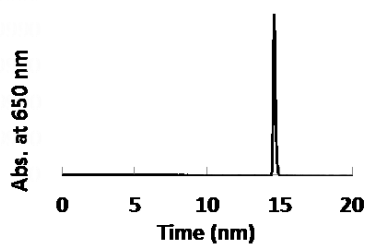
^1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ 0.59 (s, 6H), 1.95 (s, 6H), 3.40 (s, 3H), 3.54 (s, 3H), 4.25 (q, $J = 8.0$ Hz, 4H), 6.73 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 6.44 (dd, $J = 9.6, 3.2$ Hz, 1H), 7.14 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.25-7.28 (m, 3H), 7.35 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H); HRMS (ESI^+) Calcd for $[\text{M}]^+$, 549.2161, Found, 549.2127 (-3.4 mmu)



To a solution of **66** (12.7 mg, 28.1 μmol) in MeOH (5 mL) were added AcOH (30 μL) and 37% HCHO aq. (23 μL , 280 μmol). The reaction mixture was stirred for 37 h at room temperature and then added NaCNBH_3 (20 mg, 317 μmol). The mixture was stirred for 4.5 h at the same temperature and then added water. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue in CH_2Cl_2 (5 mL) was added *p*-chloranil (20 mg, 81 μmol). The mixture was stirred for 4 h at room temperature and concentrated *in vacuo*. The residue purified by HPLC (eluent, 32% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (0 min) to 48% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (20 min); flow rate = 5.0 mL/min) to afford **75** (5.6 mg, 9.66 μmol , 34%).

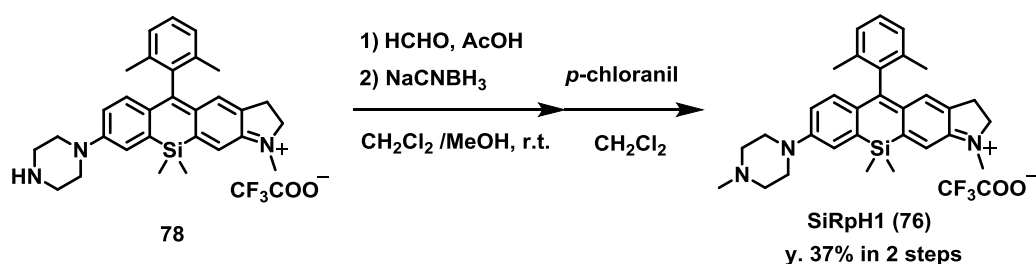
^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 0.58 (s, 3H), 0.60 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.35 (s, 3H), 2.59 (t, $J = 5.6$ Hz, 4H), 2.98 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.37 (s, 3H), 3.67 (t, $J = 5.6$ Hz, 4H), 3.96 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 6.80 (s, 1H), 6.83 (dd, $J = 9.4, 2.8$ Hz, 1H), 6.96 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 7.10 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.34-7.48

(m, 5H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ -1.55, -1.25, 19.44, 26.70, 34.22, 45.94, 47.18, 55.56, 56.45, 115.39, 118.08, 121.61, 126.92, 129.66, 129.95, 130.13, 130.60, 131.40, 134.65, 136.18, 136.96, 140.40, 140.51, 146.14, 153.88, 155.98, 160.06, 167.49; HRMS (ESI^+) Calcd for $[\text{M}]^+$, 466.2679, Found, 466.2677 (-0.2 mmu); The HPLC chromatogram after purification was as follows. The elution was done with a 20 min linear gradient from 24 % $\text{CH}_3\text{CN}/0.1$ % TFA aq. to 52 % $\text{CH}_3\text{CN}/0.1$ % TFA aq. (flow rate = 1.0 mL/min); Absorbance at 650 nm was detected.



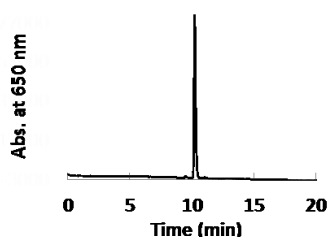
To a solution of **56** (32 mg, 66.9 μmol) in anhydrous THF (10 mL) was added 1 M THF solution of *o*-tolylmagnesium bromide (2 mL, 2.0 mmol). The reaction mixture was refluxed for 6 h under argon atmosphere. After it had cooled to room temperature, 2 N HCl aq. was added to it. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was added trifluoroacetic acid (4 mL) and stirred for 1 h at room temperature. The mixture was concentrated *in vacuo* and purified by HPLC (eluent, 29% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (0 min) to 72% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (20 min); flow rate = 25.0 mL/min) to afford **78** (8.1 mg, 14.0 μmol , 21%).

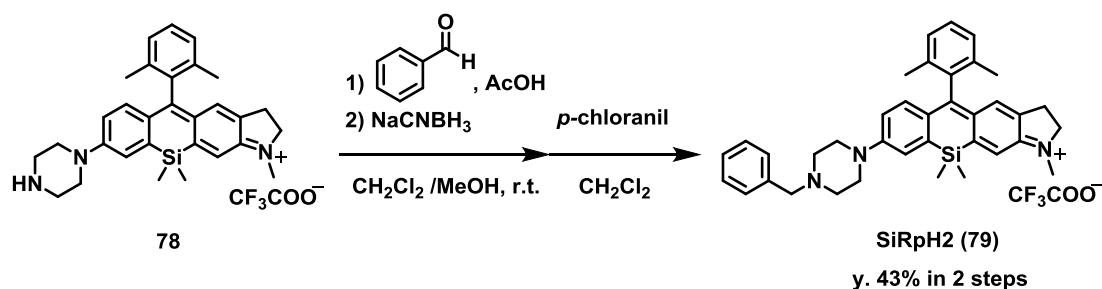
HRMS (ESI^+) Calcd for $[\text{M}]^+$, 466.2679, Found, 466.2653 (-2.6 mmu)



To a solution of **78** (5 mg, 8.62 μmol) in MeOH (10 mL) were added AcOH (20 μL), 37% HCHO aq. (1.4 μL , 17.3 μmol) and NaCNBH₃ (2.5 mg, 40 μmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 16 h at the same temperature and then added water. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue in CH₂Cl₂ (5 mL) was added *p*-chloranil (7 mg, 28.5 μmol). The mixture was stirred for 3 h at room temperature and concentrated *in vacuo*. The residue purified by HPLC (eluent, 24% CH₃CN/0.1% TFA aq. (0 min) to 52% CH₃CN/0.1% TFA aq. (20 min); flow rate = 25.0 mL/min) to afford SiRpH1 (**76**) (2.0 mg, 2.82 μmol , 37%).

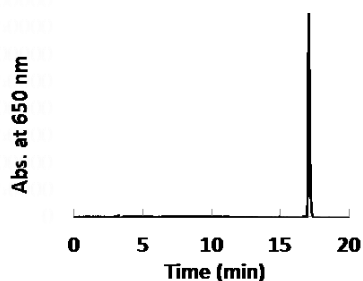
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0.59 (s, 6H), 1.98 (s, 6H), 2.35 (s, 3H), 2.59 (t, $J = 5.4$ Hz, 4H), 2.98 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.37 (s, 3H), 3.67 (t, $J = 5.4$ Hz, 4H), 3.97 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 6.79 (s, 1H), 6.84 (dd, $J = 9.2, 2.6$ Hz, 1H), 6.97 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.33-7.37 (m, 2H), 7.39 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H); HRMS (ESI⁺) Calcd for [M]⁺, 480.2835, Found, 480.2858 (+2.3 mmu); The HPLC chromatogram after purification was as follows. The elution was done with a 20 min linear gradient from 32 % CH₃CN/0.1 % TFA aq. to 64 % CH₃CN/0.1 % TFA aq. (flow rate = 1.0 mL/min); Absorbance at 650 nm was detected.

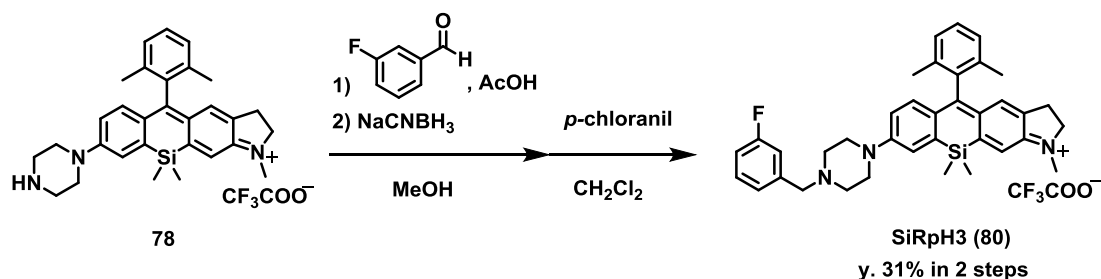




To a solution of **78** (3 mg, 5.17 μmol) in CH_2Cl_2 (5 mL) were added MeOH (1 mL), AcOH (20 μL) and benzaldehyde (1 μL , 9.91 μmol). The reaction mixture was stirred for 10 min at room temperature and then added NaCNBH₃ (1.26 mg, 20 μmol). The mixture was stirred for 23 h at the same temperature and then added water. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue in CH_2Cl_2 (10 mL) was added *p*-chloranil (2 mg, 8.13 μmol). The mixture was stirred for 1 h at room temperature and concentrated *in vacuo*. The residue purified by HPLC (eluent, 24% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (0 min) to 52% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (20 min); flow rate = 5.0 mL/min) to afford SiRpH2 (**79**) (1.5 mg, 2.24 μmol , 43%).

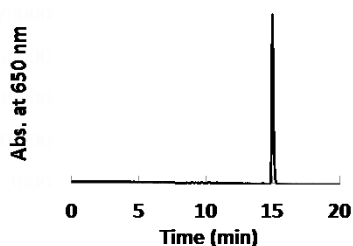
¹H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 0.49 (s, 6H), 1.90 (s, 6H), 2.51 (t, $J = 5.0$ Hz, 4H), 2.91 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.25 (s, 3H), 3.49 (s, 2H), 3.54 (t, $J = 5.0$ Hz, 4H), 3.85 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 6.58 (dd, $J = 8.6, 2.8$ Hz, 1H), 6.72 (s, 1H), 6.89 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 7.10-7.12 (m, 3H), 7.18-7.28 (m, 6H); HRMS (ESI⁺) Calcd for $[\text{M}]^+$, 556.3148, Found, 556.3134 (-1.4 mmu); The HPLC chromatogram after purification was as follows. The elution was done with a 20 min linear gradient from 32 % $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. to 64 % $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (flow rate = 1.0 mL/min); Absorbance at 650 nm was detected.

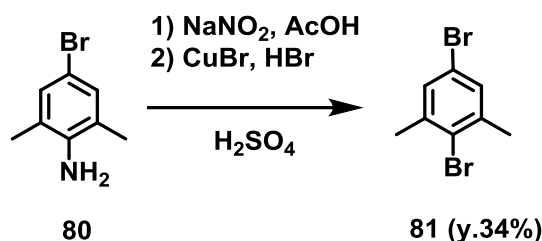




To a solution of **78** (3.5 mg, 6.03 μmol) in MeOH (5 mL) were added AcOH (20 μL), 3-fluorobenzaldehyde (1.3 μL , 12.1 μmol) and NaCNBH₃ (1.5 mg, 24.1 μmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 16 h at the same temperature and then added water. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue in CH₂Cl₂ (5 mL) was added *p*-chloranil (3 mg, 12.2 μmol). The mixture was stirred for 3 h at room temperature and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by HPLC (eluent, 27% CH₃CN/0.1% TFA aq. (0 min) to 64% CH₃CN/0.1% TFA aq. (20 min); flow rate = 25.0 mL/min) to afford SiRpH3 (**80**) (1.5 mg, 1.87 μmol , 31%).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 0.60 (s, 6H), 1.97 (s, 6H), 3.01 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.38 (brs, 4H), 3.44 (s, 3H), 3.84 (brs, 4H), 4.03 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 4.38 (s, 2H), 6.82 (s, 1H), 6.90 (dd, $J = 9.4$, 3.0 Hz, 1H), 6.99 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 7.23-7.38 (m, 6H), 7.45-7.56 (m, 3H); HRMS (ESI⁺) Calcd for [M]⁺, 574.3054, Found, 574.3032 (-2.2 mmu); The HPLC chromatogram after purification was as follows. The elution was done with a 20 min linear gradient from 32 % CH₃CN/0.1 % TFA aq. to 64 % CH₃CN/0.1 % TFA aq. (flow rate = 1.0 mL/min); Absorbance at 650 nm was detected.

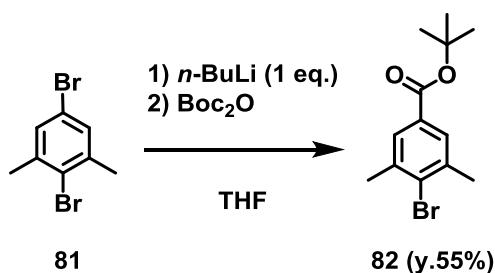




Compound **81** was synthesized from **80** as reported previously⁵⁶.

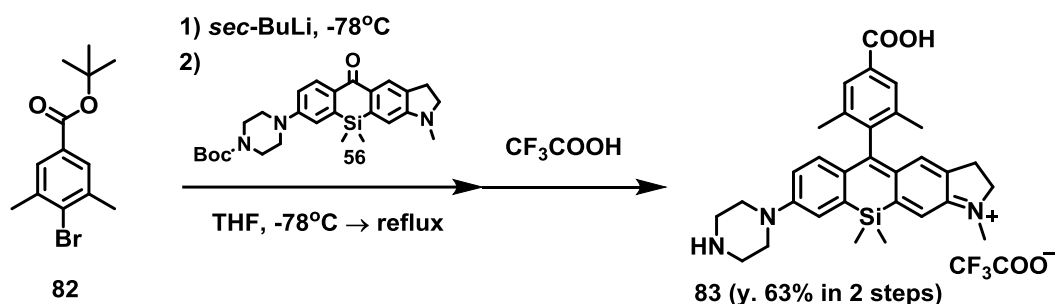
To a solution of NaNO₂ (1.04 g, 15 mmol) in concentrated H₂SO₄ aq. (11 ml) were added 4-bromo-2,6-dimethylaniline (**80**) (3 g, 15 mmol) in AcOH (10 mL) and CuBr (2.58 g, 18 mmol) in 47% HBr aq. (10 mL) at 0°C. The reaction mixture was stirred for 2 h at 70°C and then poured into crashed ice. The aqueous layer was extracted with *n*-hexane. The combined organic layers were washed with and brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, *n*-hexane) to afford **81** (1.36 g, 5.15 mmol, 34%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 2.38 (s, 6H), 7.21 (s, 2H)



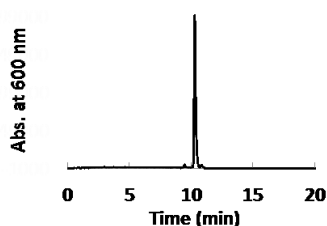
To a solution of **81** (1.36 g, 5.15 mmol) in anhydrous THF (15 mL) was added 1.6 M cyclohexane solution of *n*-butyllithium (3.2 mL, 5.15 mmol) at -78°C. The reaction mixture was maintained for 1.5 h, and then Boc₂O (3.37 g, 15.45 mmol) in THF (10 mL) was added to it and the mixture was stirred for 1 h at room temperature under argon atmosphere. The reaction mixture was quenched with 2 N HCl aq., diluted with water and extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, AcOEt/*n*-hexane) and GPC to afford **82** (800 mg, 2.81 mmol, 55%).

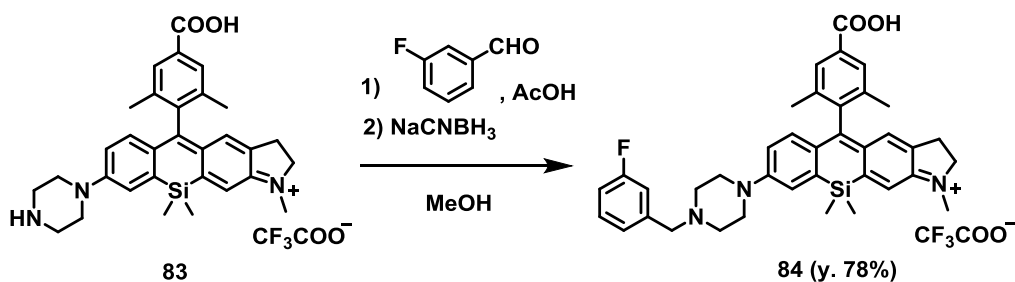
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 1.59 (s, 9H), 2.45 (s, 6H), 7.67 (s, 2H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 23.86, 28.14, 81.17, 128.79, 130.19, 132.41, 138.36, 165.48



To a solution of **82** (182 mg, 0.638 mmol) in anhydrous THF (10 mL) was added 1 M cyclohexane solution of *sec*-butyllithium (0.64 mL, 0.64 mmol) at -78°C . The reaction mixture was maintained for 30 min, and then **56** (61 mg, 128 μmol) in THF (5 mL) was added to it and the mixture was stirred at room temperature for 3 h under argon atmosphere. The reaction mixture was quenched with 2 N HCl aq., diluted with water and extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was added trifluoroacetic acid (5 mL) and stirred at room temperature for 30 min. The mixture was concentrated *in vacuo* and purified by HPLC (eluent, 24% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (0 min) to 64% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (20 min); flow rate = 25.0 mL/min) to afford **83** (50 mg, 80.2 μmol , 63%).

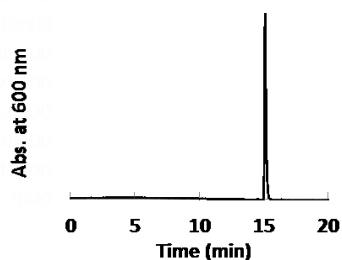
^1H NMR (300 MHz, CD_3CN): δ 0.56 (s, 6H), 2.00 (s, 6H), 2.91 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.30 (t, $J = 4.5$ Hz, 4H), 3.33 (s, 3H), 3.81 (t, $J = 4.5$ Hz, 4H), 3.94 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 6.73-6.77 (m, 2H), 6.87 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.36 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.86 (s, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ -1.39, 19.84, 26.39, 35.08, 43.68, 44.41, 56.88, 116.00, 119.30, 121.79, 129.64, 129.99, 132.04, 133.46, 137.28, 137.43, 137.60, 144.22, 144.64, 152.62, 156.24, 160.24, 164.39, 168.28; HRMS (ESI $^+$) Calcd for $[\text{M}]^+$, 510.2577, Found, 510.2557 (-2.0 mmu); The HPLC chromatogram after purification was as follows. The elution was done with a 20 min linear gradient from 24 % $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. to 56 % $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (flow rate = 1.0 mL/min); Absorbance at 600 nm was detected.

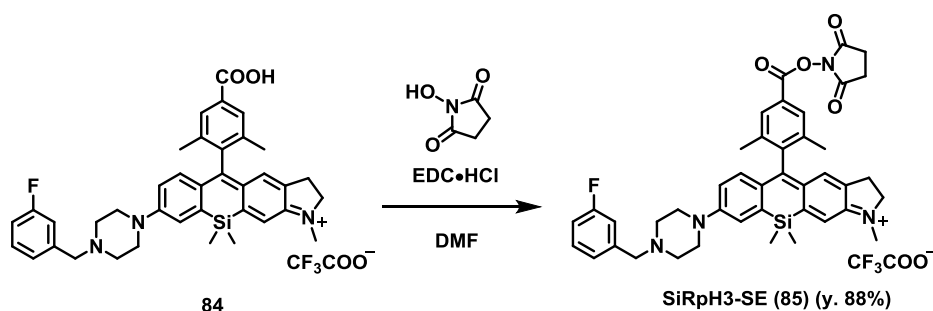




To a solution of **83** (16 mg, 25.6 μmol) in MeOH (3 mL) were added AcOH (14.6 μL , 256 μmol), 3-fluorobenzaldehyde (3.3 μL , 30.8 μmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 10 min at the same temperature and then added NaCNBH₃ (1.5 mg, 24.1 μmol). The mixture was stirred for 18 h at room temperature and then added water. The aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by HPLC (eluent, 27% CH₃CN/0.1% TFA aq. (0 min) to 56% CH₃CN/0.1% TFA aq. (20 min); flow rate = 25.0 mL/min) to afford **84** (14.7 mg, 20.1 μmol , 78%).

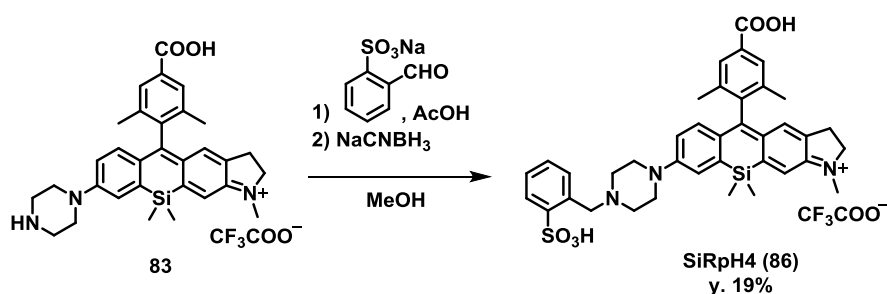
¹H NMR (300 MHz, CD₃CN): δ 0.56 (s, 6H), 2.01 (s, 6H), 2.93 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.20 (brs, 4H), 3.34 (s, 3H), 3.82 (brs, 4H), 3.95 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 4.20 (s, 2H), 6.74-6.77 (m, 2H), 6.87 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 7.18-7.50 (m, 6H), 7.87 (s, 2H); HRMS (ESI⁺) Calcd for [M]⁺, 618.2952, Found, 618.2910 (-4.2 mmu); The HPLC chromatogram after purification was as follows. The elution was done with a 20 min linear gradient from 40 % CH₃CN/0.1 % TFA aq. to 64 % CH₃CN/0.1 % TFA aq. (flow rate = 1.0 mL/min); Absorbance at 600 nm was detected.





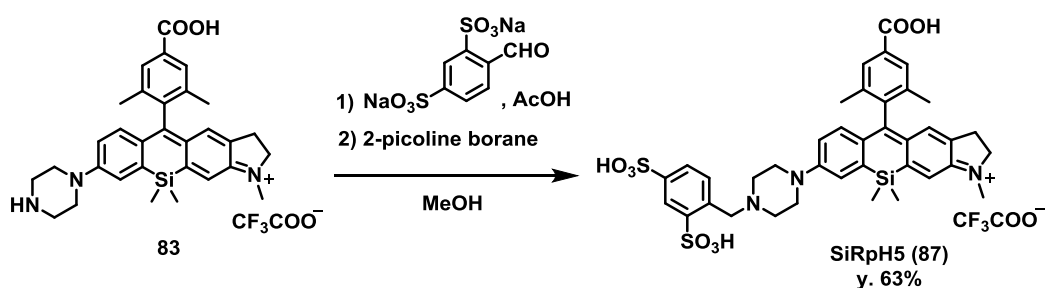
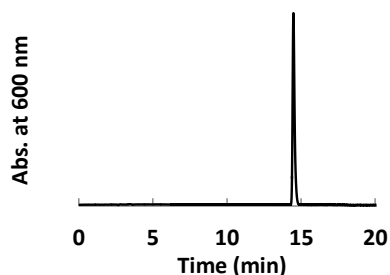
To a solution of **84** (2.3 mg, 3.15 μmol) in DMF (2 mL) were added *N*-hydroxysuccinimide (NHS) (1.8 mg, 15.8 μmol) and 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC·HCl) (3.0 mg, 15.8 μmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 23 h at the same temperature. The mixture was purified by HPLC (eluent, 36% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (0 min) to 56% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (20 min); flow rate = 25.0 mL/min) to afford SiRpH3-SE (**85**) (2.3 mg, 2.77 μmol , 88%).

HRMS (ESI⁺) Calcd for [M]⁺, 715.3116, Found, 715.3134 (+1.8 mmu)



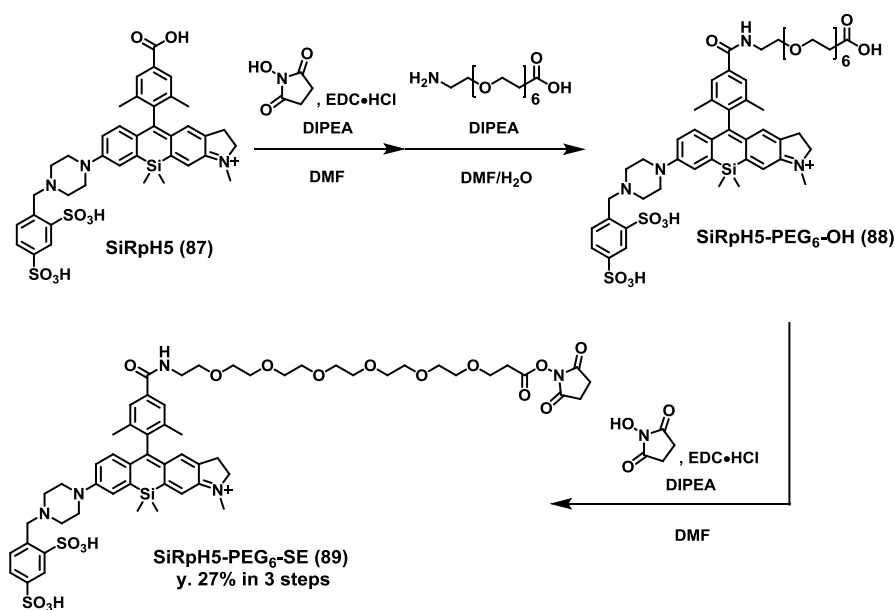
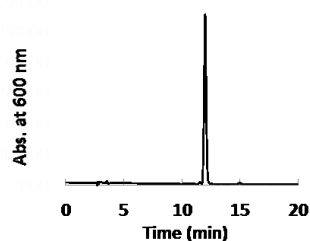
To a solution of **83** (18.4 mg, 29.5 μmol) in MeOH (2 mL) were added AcOH (14 μL , 240 μmol), 2-sulfobenzaldehyde sodium salt (10 mg, 48 μmol) and NaCNBH_3 (2.2 mg, 35.4 μmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 19 h at the same temperature. The mixture was purified by HPLC (eluent, 24% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (0 min) to 56% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (20 min); flow rate = 5.0 mL/min) to afford SiRpH4 (**86**) (4.4 mg, 5.55 μmol , 19%).

¹H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 0.61 (s, 6H), 2.05 (s, 6H), 3.02 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 3.46 (s, 3H), 3.54 (brs, 4H), 4.05 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 4.36 (brs, 4H), 4.68 (s, 2H), 6.76 (s, 2H), 6.92-6.93 (m, 2H), 7.48-7.63 (m, 5H), 7.90 (s, 2H), 8.06 (dd, $J = 6.6, 2.1$ Hz, 1H); HRMS (ESI⁺) Calcd for [M]⁺, 680.2614, Found, 680.2580 (-3.4 mmu); The HPLC chromatogram after purification was as follows. The elution was done with a 20 min linear gradient from 24 % $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. to 56 % $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (flow rate = 1.0 mL/min); Absorbance at 600 nm was detected.



To a solution of **83** (12.8 mg, 20.5 μmol) in MeOH (5 mL) were added AcOH (250 μL) and disodium 4-formylbenzene-1,3-disulfonate (19.1 mg, 61.5 μmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 30 min at the same temperature and then added 2-picoline borane (4.4 mg, 41 μmol). The mixture was stirred for 16 h at room temperature and purified by HPLC (eluent, 27% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (0 min) to 60% $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (20 min); flow rate = 25.0 mL/min) to afford SiRpH5 (**87**) (11.2 mg, 12.8 μmol , 63%).

^1H NMR (400 MHz, 20 mM pD 9.7 phosphate buffered D_2O): δ 0.48 (s, 6H), 1.87 (s, 6H), 2.63 (brs, 4H), 2.81 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.31 (s, 3H), 3.50 (brs, 4H), 3.90 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 4.00 (s, 2H), 6.51 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.84 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.65 (s, 2H), 7.72 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.30 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O} = 1:3$) δ -1.11, 20.10, 26.73, 35.45, 45.53, 52.91, 57.57, 59.77, 117.07, 119.58, 120.19, 122.40, 126.87, 129.41, 130.21, 130.34, 130.81, 131.79, 133.57, 135.96, 137.56, 138.12, 138.47, 144.92, 145.32, 146.11, 147.92, 152.72, 157.61, 160.90, 163.91, 170.85; HRMS (ESI $^+$) Calcd for $[\text{M}]^+$, 760.2183, Found, 760.2137 (-4.6 mmu) ; The HPLC chromatogram after purification was as follows. The elution was done with a 20 min linear gradient from 24 % $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. to 56 % $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA aq. (flow rate = 1.0 mL/min); Absorbance at 600 nm was detected.



To a solution of SiRpH5 (**87**) (11.2 mg, 12.8 μmol) in DMF (2 mL) were added *N*-hydroxysuccinimide (NHS) (2.2 mg, 18.9 μmol), 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC•HCl) (3.6 mg, 18.9 μmol) and DIPEA (6.6 μL , 37.8 μmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 20 h at the same temperature, purified by HPLC (eluent, 27% CH₃CN/0.1% TFA aq. (0 min) to 60% CH₃CN/0.1% TFA aq. (20 min); flow rate = 25.0 mL/min) and concentrated *in vacuo*. The residue was added DMF (2 mL), NH₂-PEG₆-OH (4.9 mg, 13.7 μmol), DIPEA (25 μL , 260 μmol) and H₂O (50 μL) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 15 h at the same temperature, purified by HPLC (eluent, 27% CH₃CN/0.1% TFA aq. (0 min) to 60% CH₃CN/0.1% TFA aq. (20 min); flow rate = 25.0 mL/min) and concentrated *in vacuo* to afford **88** as a crude material. The residue was added DMF (3 mL), NHS (4 mg, 35 μmol), EDC•HCl (6.7 mg, 35 μmol) and DIPEA (20 μL , 208 μmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 17 h at the same temperature, purified by HPLC (eluent, 24% CH₃CN/0.1% TFA aq. (0 min) to 44% CH₃CN/0.1% TFA aq. (20 min); flow rate = 25.0 mL/min) to afford SiRpH5-PEG₆-SE

(89) (4.1 mg, 3.44 μmol , 27% in 3 steps).

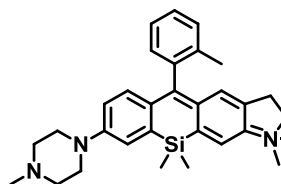
HRMS (ESI⁺) Calcd for [M]⁺, 1192.4290, Found, 1192.4270 (-2.0 mmu)

Cartesian Coordinates and Total Electron Energies

Non-protonated form of SiR (75)

LUMO -3.30 eV

HOMO -5.65 eV



SiR (75)

Non-protonated form

E(RB3LYP) = -1618.47647643 a.u.

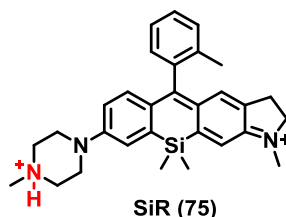
Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	-2.179988	-0.940013	0.173451
2	6	0	-1.299449	1.675608	-0.002391
3	6	0	-3.160939	0.103976	0.167054
4	6	0	-2.649056	1.433711	0.086159
5	1	0	-2.514784	-1.965908	0.271733
6	1	0	-0.978919	2.707696	-0.080550
7	6	0	-0.818406	-0.706867	0.095122
8	6	0	1.390675	2.448173	-0.205529
9	6	0	2.188257	0.082255	-0.079897
10	6	0	-0.317545	0.636728	-0.002096
11	6	0	2.057869	-1.350678	0.022624
12	6	0	1.073163	0.981062	-0.086140
13	6	0	4.475224	-1.589466	-0.058071
14	6	0	1.459610	3.018406	-1.485573
15	6	0	1.615577	3.244605	0.939007
16	6	0	4.621455	-0.178156	-0.161057
17	6	0	3.519787	0.628955	-0.173002
18	6	0	3.184588	-2.162019	0.032164
19	6	0	1.975453	5.170232	-0.524905
20	6	0	1.905893	4.604333	0.750361
21	6	0	1.751430	4.374165	-1.650022
22	1	0	3.080693	-3.242010	0.095993
23	1	0	3.648306	1.702173	-0.255850
24	1	0	2.080185	5.228666	1.623575
25	1	0	2.202702	6.226823	-0.636949
26	1	0	1.800964	4.801064	-2.647862
27	1	0	-3.315210	2.285896	0.065856
28	7	0	5.680059	-2.200656	-0.063779

29	14	0	0.363291	-2.170203	0.119752
30	6	0	0.088037	-3.277509	-1.386120
31	1	0	0.816053	-4.097973	-1.410197
32	1	0	-0.912213	-3.728079	-1.367999
33	1	0	0.185370	-2.714128	-2.321152
34	6	0	0.192145	-3.157294	1.720928
35	1	0	-0.809533	-3.596424	1.808547
36	1	0	0.913982	-3.982880	1.754588
37	1	0	0.360390	-2.527559	2.601933
38	6	0	6.100726	0.150051	-0.211464
39	1	0	6.422987	0.638212	0.716394
40	1	0	6.360717	0.818143	-1.037937
41	6	0	6.764464	-1.243238	-0.363028
42	1	0	7.599742	-1.401309	0.326464
43	1	0	7.130845	-1.417349	-1.384808
44	6	0	5.916180	-3.631188	-0.116393
45	1	0	5.145750	-4.163684	0.446350
46	1	0	5.924291	-4.001789	-1.151751
47	1	0	6.885351	-3.852091	0.340036
48	1	0	1.282481	2.392767	-2.357336
49	6	0	1.551681	2.665116	2.335024
50	1	0	0.574199	2.212844	2.543632
51	1	0	2.304850	1.880920	2.483489
52	1	0	1.726841	3.440616	3.086561
53	6	0	-5.044583	-1.522930	0.267747
54	6	0	-5.497156	0.856502	0.604919
55	6	0	-6.361587	-1.619688	-0.507929
56	1	0	-5.208230	-1.816006	1.315361
57	1	0	-4.339165	-2.219425	-0.182961
58	6	0	-6.794807	0.697559	-0.186542
59	1	0	-5.710084	0.741094	1.678007
60	1	0	-5.103578	1.857392	0.444976
61	1	0	-6.765260	-2.628825	-0.368492
62	1	0	-6.155065	-1.488832	-1.590321
63	1	0	-7.521944	1.422048	0.196788
64	1	0	-6.609264	0.940441	-1.253079
65	7	0	-4.498584	-0.157677	0.222948
66	7	0	-7.330164	-0.647167	-0.024158
67	6	0	-8.638637	-0.805865	-0.652725
68	1	0	-9.018659	-1.813645	-0.457009
69	1	0	-9.341448	-0.086883	-0.219865
70	1	0	-8.608966	-0.649804	-1.747829

Protonated form of SiR (75)

LUMO -3.48 eV

HOMO -6.04 eV



Protonated form

E(RB3LYP) = -1618.78140098 a.u.

Center Number	Atomic Number	Atomic Type	Coordinates (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	-2.173450	-0.904784	-0.013054
2	6	0	-1.228423	1.691143	-0.115033
3	6	0	-3.103367	0.155889	-0.042469
4	6	0	-2.599139	1.464997	-0.091735
5	1	0	-2.549456	-1.922704	0.066652
6	1	0	-0.885526	2.717047	-0.169783
7	6	0	-0.794698	-0.696973	-0.034368
8	6	0	1.466316	2.442515	-0.218384
9	6	0	2.227399	0.076238	-0.087941
10	6	0	-0.284492	0.636463	-0.089824
11	6	0	2.075554	-1.369706	-0.006493
12	6	0	1.145125	0.976323	-0.120727
13	6	0	4.494912	-1.626181	-0.002867
14	6	0	1.584744	3.017809	-1.493516
15	6	0	1.644236	3.232281	0.939378
16	6	0	4.664770	-0.206455	-0.088193
17	6	0	3.578793	0.608981	-0.129221
18	6	0	3.185002	-2.187355	0.036067
19	6	0	2.057964	5.165196	-0.500971
20	6	0	1.939394	4.593462	0.767996
21	6	0	1.880727	4.374710	-1.638613
22	1	0	3.069721	-3.265775	0.097470
23	1	0	3.718039	1.681729	-0.195933
24	1	0	2.081327	5.213622	1.649736
25	1	0	2.289632	6.221993	-0.598807
26	1	0	1.972785	4.806413	-2.631143
27	1	0	-3.260259	2.323418	-0.136179
28	7	0	5.677306	-2.246453	0.026448
29	14	0	0.367971	-2.176732	0.034713
30	6	0	0.137393	-3.281941	-1.477665
31	1	0	0.860995	-4.106431	-1.475786
32	1	0	-0.863200	-3.732089	-1.490822
33	1	0	0.268519	-2.723700	-2.411529
34	6	0	0.133989	-3.144285	1.637332

35	1	0	-0.871300	-3.580419	1.692807
36	1	0	0.849223	-3.973279	1.705725
37	1	0	0.272980	-2.508236	2.518785
38	6	0	6.147078	0.104033	-0.123200
39	1	0	6.447493	0.750617	0.707594
40	1	0	6.429450	0.615211	-1.049512
41	6	0	6.810804	-1.293652	-0.023805
42	1	0	7.418596	-1.416443	0.879856
43	1	0	7.439990	-1.533515	-0.887982
44	6	0	5.937816	-3.674874	0.118042
45	1	0	5.004370	-4.237592	0.108886
46	1	0	6.552452	-3.993858	-0.731111
47	1	0	6.479242	-3.897440	1.044884
48	1	0	1.446686	2.397012	-2.375918
49	6	0	1.538471	2.643791	2.329374
50	1	0	0.577155	2.139808	2.490112
51	1	0	2.324738	1.901092	2.516856
52	1	0	1.635388	3.423379	3.090301
53	6	0	-5.407230	0.993379	0.255721
54	6	0	-5.045187	-1.066559	-0.947962
55	6	0	-6.748788	0.483735	0.778843
56	1	0	-5.565606	1.606841	-0.651546
57	1	0	-4.997131	1.651030	1.026208
58	6	0	-6.374506	-1.636653	-0.460715
59	1	0	-5.181374	-0.588932	-1.937139
60	1	0	-4.360592	-1.903002	-1.094927
61	1	0	-7.463658	1.302204	0.897395
62	1	0	-6.631061	-0.037070	1.732494
63	1	0	-6.826041	-2.291780	-1.210461
64	1	0	-6.256655	-2.183644	0.478325
65	7	0	-4.494621	-0.118295	0.020533
66	6	0	-8.693835	-1.028365	0.290320
67	1	0	-9.364988	-0.179832	0.435180
68	1	0	-9.099706	-1.705044	-0.463947
69	1	0	-8.548487	-1.558592	1.232898
70	1	0	-7.518375	-0.025765	-1.071931
71	7	0	-7.358567	-0.516824	-0.182923

参考文献

1. J. K. Willmann, N. van Bruggen, L. M. Dinkelborg and S. S. Gambhir, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2008, 7, 591-607.
2. Y. Urano, M. Sakabe, N. Kosaka, M. Ogawa, M. Mitsunaga, D. Asanuma, M. Kamiya, M. R. Young, T. Nagano, P. L. Choyke and H. Kobayashi, *Sci. Transl. Med.*, 2011, 3, 110ra119.
3. R. Weissleder, *Nat Biotech*, 2001, 19, 316-317.
4. J. V. Frangioni, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2003, 7, 626-634.
5. K. L. Arendt, M. Royo, M. Fernandez-Monreal, S. Knafo, C. N. Petrok, J. R. Martens and J. A. Esteban, *Nat. Neurosci.*, 2010, 13, 36-44.
6. T. Egawa, K. Hanaoka, Y. Koide, S. Ujita, N. Takahashi, Y. Ikegaya, N. Matsuki, T. Terai, T. Ueno, T. Komatsu and T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 14157-14159.
7. M. Mizunuma, H. Norimoto, K. Tao, T. Egawa, K. Hanaoka, T. Sakaguchi, H. Hioki, T. Kaneko, S. Yamaguchi, T. Nagano, N. Matsuki and Y. Ikegaya, *Nat. Neurosci.*, 2014, 17, 503-505.
8. Y. Koide, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Terai and T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 5680-5682.
9. M. Fu, Y. Xiao, X. Qian, D. Zhao and Y. Xu, *Chem. Commun.*, 2008, DOI: 10.1039/b718544h, 1780-1782.
10. Y. Kushida, T. Nagano and K. Hanaoka, *Analyst*, 2015, 140, 685-695.
11. Y. Koide, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Terai and T. Nagano, *ACS Chem. Biol.*, 2011, 6, 600-608.
12. E. D'Este, D. Kamin, F. Göttfert, A. El-Hady and Stefan W. Hell, *Cell Reports*, 2015, 10, 1246-1251.
13. H. Sasaki, K. Hanaoka, Y. Urano, T. Terai and T. Nagano, *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, 19, 1072-1078.
14. J. Lee, K. H. Lee, J. Jeon, A. Dragulescu-Andrasi, F. Xiao and J. Rao, *ACS Chem. Biol.*, 2010, 5, 1065-1074.
15. C. N. Im, N. Y. Kang, H. H. Ha, X. Bi, J. J. Lee, S. J. Park, S. Y. Lee, M. Vendrell, Y. K. Kim, J. S. Lee, J. Li, Y. H. Ahn, B. Feng, H. H. Ng, S. W. Yun and Y. T. Chang, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, 49, 7497-7500.
16. Y. Koide, Y. Urano, K. Hanaoka, W. Piao, M. Kusakabe, N. Saito, T. Terai, T. Okabe and T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134, 5029-5031.

17. B. Wang, X. Chai, W. Zhu, T. Wang and Q. Wu, *Chem. Commun.*, 2014, 50, 14374-14377.
18. Y. Kushida, K. Hanaoka, T. Komatsu, T. Terai, T. Ueno, K. Yoshida, M. Uchiyama and T. Nagano, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, 22, 3908-3911.
19. J. B. Grimm, B. P. English, J. Chen, J. P. Slaughter, Z. Zhang, A. Revyakin, R. Patel, J. J. Macklin, D. Normanno, R. H. Singer, T. Lionnet and L. D. Lavis, *Nat Meth*, 2015, 12, 244-250.
20. W. Piao, S. Tsuda, Y. Tanaka, S. Maeda, F. Liu, S. Takahashi, Y. Kushida, T. Komatsu, T. Ueno, T. Terai, T. Nakazawa, M. Uchiyama, K. Morokuma, T. Nagano and K. Hanaoka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, 52, 13028-13032.
21. T. Peng, N. K. Wong, X. Chen, Y. K. Chan, D. H. Ho, Z. Sun, J. J. Hu, J. Shen, H. El-Nezami and D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 136, 11728-11734.
22. A. Kumar, M. Kumar and M. K. Gupta, *Tetrahedron Lett.*, 2009, 50, 7024-7027.
23. H. Takahashi, N. Kashiwa, H. Kobayashi, Y. Hashimoto and K. Nagasawa, *Tetrahedron Lett.*, 2002, 43, 5751-5753.
24. Y.-Y. Lai, N.-T. Lin, Y.-H. Liu, Y. Wang and T.-Y. Luh, *Tetrahedron*, 2007, 63, 6051-6055.
25. C.-Y. Tsai, R. Sung, B.-R. Zhuang and K. Sung, *Tetrahedron*, 2010, 66, 6869-6872.
26. J. B. Grimm and L. D. Lavis, *Org. Lett.*, 2011, 13, 6354-6357.
27. P. Autissier, C. Soulas, T. H. Burdo and K. C. Williams, *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 2010, 77, 410-419.
28. S. P. Perfetto, P. K. Chattopadhyay and M. Roederer, *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, 4, 648-655.
29. H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke and Y. Urano, *Chem. Rev.*, 2010, 110, 2620-2640.
30. 朴文, 博士論文, 東京大学・薬学系研究科, 2015.
31. 明珍琢也, 博士論文, 東京大学・薬学系研究科, 2014.
32. C. E. Lin, Y. Deng, Jr., W. S. Liao, S. W. Sun, W. Y. Lin and C. C. Chen, *J. Chromatogr. A*, 2004, 1051, 283-290.
33. D. Asanuma, Y. Takaoka, S. Namiki, K. Takikawa, M. Kamiya, T. Nagano, Y. Urano and K. Hirose, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, 53, 6085-6089.
34. A. P. de Silva, T. S. Moody and G. D. Wright, *Analyst*, 2009, 134, 2385-2393.
35. J. R. Casey, S. Grinstein and J. Orlowski, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2010, 11, 50-61.
36. J. Han and K. Burgess, *Chem. Rev.*, 2010, 110, 2709-2728.
37. K. Teter, G. Chandy, B. Quinones, K. Pereyra, T. Machen and H. P. Moore, *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 19625-19633.

38. D. J. Yamashiro, B. Tycko, S. R. Fluss and F. R. Maxfield, *Cell*, 1984, 37, 789-800.
39. T. Myochin, K. Kiyose, K. Hanaoka, H. Kojima, T. Terai and T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 3401-3409.
40. J. Van Eerden, M. Skowronska-Ptasinska, P. D. J. Grootenhuis, S. Harkema and D. N. Reinhoudt, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 700-706.
41. M. L. Circu and T. Y. Aw, *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, 1823, 1767-1777.
42. P. M. Haggie and A. S. Verkman, *J. Biol. Chem.*, 2009, 284, 7681-7686.
43. B. Poole and S. Ohkuma, *J. Cell Biol.*, 1981, 90, 665-669.
44. I. De Domenico, D. McVey Ward and J. Kaplan, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008, 9, 72-81.
45. D. J. Yamashiro and F. R. Maxfield, *J. Cell Biol.*, 1987, 105, 2723-2733.
46. R. Gagescu, N. Demaurex, R. G. Parton, W. Hunziker, L. A. Huber and J. Gruenberg, *Mol. Biol. Cell*, 2000, 11, 2775-2791.
47. R. Misaki, T. Nakagawa, M. Fukuda, N. Taniguchi and T. Taguchi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, 360, 580-585.
48. S. H. Fan, Y. Numata and M. Numata, *Mol. Biol. Cell*, 2015, DOI: 10.1091/mbc.E15-04-0257.
49. E. Itakura, C. Kishi-Itakura and N. Mizushima, *Cell*, 2012, 151, 1256-1269.
50. A. D. Becke, *J. Chem. Phys.*, 1993, 98, 1372-1377.
51. A. D. Becke, *J. Chem. Phys.*, 1993, 98, 5648-5652.
52. C. Lee, W. Yang and R. G. Parr, *Physical review. B, Condensed matter*, 1988, 37, 785-789.
53. Gaussian 09, Revision A.02, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, N. J. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA, 2009.
54. T. Egawa, Y. Koide, K. Hanaoka, T. Komatsu, T. Terai and T. Nagano, *Chem.*

- Commun.*, 2011, 47, 4162-4164.
55. T. Nagano, K. Hanaoka, T. Egawa, Y. Kushida, K. Numasawa, T. Myochin and W. Piao, WO 2014/106957 A1, 2014.
56. B. Kang, J. W. Kurutz, K.-T. Youm, R. K. Totten, J. T. Hupp and S. T. Nguyen, *Chemical Science*, 2012, 3, 1938-1944.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導ならびにご教授賜りました東京大学大学院薬学系研究科 薬品代謝化学教室 浦野泰照教授に心より感謝申し上げます。鋭い洞察と学生のモチベーションを上げる建設的な提案を瞬時に行う姿を見て、一流の研究者や研究室主催者のあり方を学ばせて頂きました。

また、修士課程から 5 年間にわたり直接ご指導頂きました花岡健二郎准教授に深く感謝申し上げます。日々の研究生活の中で非常に多くのご指導を頂いたばかりではなく、大きな野心を持つという研究者のあるべき姿を学ばせて頂きました。並びに、多くのご指導ご助言を賜りました上野匡助教、小松徹助教、寺井琢也助教にも深く感謝申し上げます。気軽に様々な相談に乗って頂き本当に助かりました。

Vamp7-Venus 安定発現 MEF 細胞の提供、および pH プローブのアプリケーションについての議論をして頂きました東京大学大学院医学系研究科 分子生物学分野 水島昇教授、本田郁子助教に深く感謝申し上げます。

COS-1 細胞の提供、およびトランスフェリンを用いたイメージング法やデータの解釈についていつも明るく丁寧なご指導をして頂きました東京大学大学院薬学系研究科 衛生化学教室 新井洋由教授、田口友彦准教授に深く感謝申し上げます。

修士課程から現在までの長きにわたり分子軌道計算のデータの解釈について丁寧なご指導頂きました東京大学大学院薬学系研究科 基礎有機化学教室 内山真伸教授に深く感謝申し上げます。

最後に、楽しい研究生活を共にした薬品代謝化学教室の教室員の全ての皆様、および私を支えてくれた大切な家族に感謝申し上げます。

2016 年 1 月

東京大学大学院 薬学系研究科 薬科学専攻 薬品代謝化学教室

鏡味優