

博士論文

論文題目 細胞内レドックス状態の可視化を目指した
新規グルタチオン感受性蛍光プローブの開発

氏 名 吉田 昌史

細胞内レドックス状態の可視化を目指した
新規グルタチオン感受性蛍光プローブの開発

東京大学医学部医学系研究科 外科学専攻 耳鼻咽喉科

指導教官 山嵜 達也 教授

吉田 昌史

目次

略語一覧.....	1
要旨.....	2
第1章 序文.....	3
第2章 方法.....	9
第3章 結果.....	14
第1節 新規グルタチオン感受性蛍光プローブ DNs-HMRG の開発.....	15
第2節 GSH との可逆的な反応による蛍光制御機構を用いたプローブの開発...	27
第3節 2Me SiR600 を Acceptor とした FRET 型蛍光プローブの開発.....	38
第4章 考察.....	47
第5章 合成の部.....	54
第6章 参考文献.....	67
謝辞.....	73

略語一覧

- GSH: (還元型) グルタチオン
- GSSG: 酸化型グルタチオン
- DN_s 基: 2,4-dinitrosulfonylbenzene 基
- SiR: Si-ローダミン
- (ローダミンの 10 位の酸素をケイ素に置換した蛍光色素)
- FRET: fluorescence resonance energy transfer
(蛍光共鳴エネルギー移動)
- TMR: tetramethylrhodamine (テトラメチルローダミン)
- HPLC: high performance liquid chromatography
(高速液体クロマトグラフィー)
- GST: グルタチオン S-トランスフェラーゼ
- NMR: nuclear magnetic resonance (核磁気共鳴)
- HMRG: hydroxymethylrhodamine green (ローダミングリーンの
カルボン酸をハイドロキシメチル基に置換した蛍光物質)
- TFA: トリフルオロ酢酸
- NEM: n-ethylmaleimide (チオールのスカルベンジャーとして働く)
- LUMO: lowest unoccupied molecular orbital
- WL: white light laser
- PMT: photomultiplier tube (蛍光の検出器の名称)

要旨

細胞内レドックス状態の観察は酸化ストレスが関与する種々の病態解明に重要である。本研究ではグルタチオン(GSH)をターゲットとする蛍光プローブの開発を目的とした。まず既存のプローブの問題点を解決すべく新規蛍光プローブ DNs-HMRG を開発し、その蛍光上昇速度が細胞内 GSH 濃度差を反映する事を見出した。ついで 2Me SiR600 に対する GSH の分子間求核付加反応を利用する事で生理的 GSH 濃度範囲で蛍光が可逆的に変化する事を見出し、これを基に定量性に優れかつ経時的測定が可能なプローブ 2Me SiR600-TMR(Me)を開発した。本研究によりレドックスに関する新たな知見の集積が期待される。

第 1 章 序文

生体はその生命機能の維持に際して常に酸化ストレスに曝されている。酸化ストレスとは生命維持のため必須である酸素の一部が活性酸素となり細胞に与える障害の総称であり、酸化ストレスは老化や癌など多くの病態に関係する[1]–[5]。一方で細胞にはこれらに対抗する抗酸化物質が存在し、両者の均衡が種々の病態に深く関わっている。過度の酸化ストレスは老化や神経疾患、細胞の癌化などに深く関わる一方で、癌細胞においては抗酸化作用が亢進しており、これが放射線や抗がん剤に対する治療抵抗性の原因となっていると報告されている[6], [7]。具体例として加齢性難聴に関しては、モデルマウスで内耳における酸化ストレスの増加により蝸牛の感覚細胞である有毛細胞のアポトーシスが促進され難聴が進行する一方で、抗酸化剤である α リポ酸とコエンザイム Q10 の投与により難聴の進行が抑制されることが報告されている[8]。また癌細胞に関しては特に癌幹細胞において、幹細胞のマーカーである CD44 が酸化ストレスへの抵抗性を促進する作用があり、癌細胞の中でもより治療に対して耐性をもつ原因となっていることが報告されている[9]。レドックス(redox)とはこの酸化と還元の均衡を表した言葉 (reduction と oxidation から作られた言葉) であり、レドックス状態の観察は種々の病態生理の解明に非常に有用になると考えられる (図 1)。

細胞内におけるレドックス状態のバランス:酸化ストレスとそれに対する防御機構

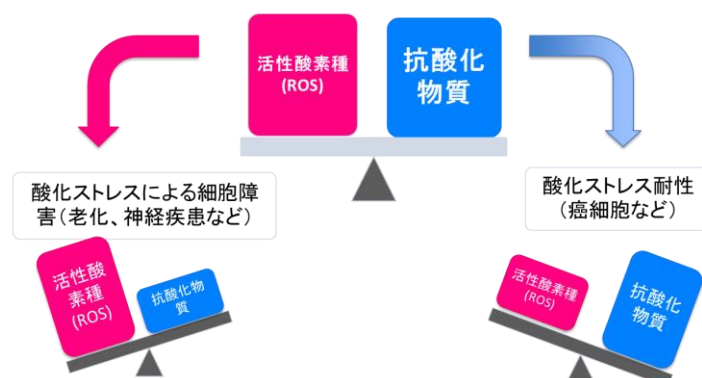


図 1: 細胞内レドックス状態の概念図

細胞内の様々な生命現象を生きたまま捉える技術の一つとして蛍光イメージングがある。なかでも有機小分子に基づく蛍光プローブは化学反応を利用して様々な分子をターゲットとした **activatable** なプローブが開発可能であり、遺伝子操作の必要なしに目的とするターゲットの局在や濃度の時間的変化を蛍光像にて捉えることができるといった特徴を持つ。過去においても過酸化水素や一重項酸素といった活性酸素種(ROS)をターゲットとした蛍光プローブは数多く報告されているが[10], [11]、抗酸化物質をターゲットとした蛍光プローブの種類は限られている。

グルタチオン(GSH)はグリシン、システイン、グルタミン酸からなるトリペプチドである。グルタチオンはシステインのもつチオール基による還元作用により細胞内の主たる抗酸化物質として機能する。(図 2)。細胞内の GSH 濃度は 0.1~10mM とさ

れているが、細胞の受ける酸化ストレスにより時々刻々と変化している。そのため生細胞における GSH 濃度を測定する事は細胞のレドックス状態の把握に重要となる [12]–[14]。

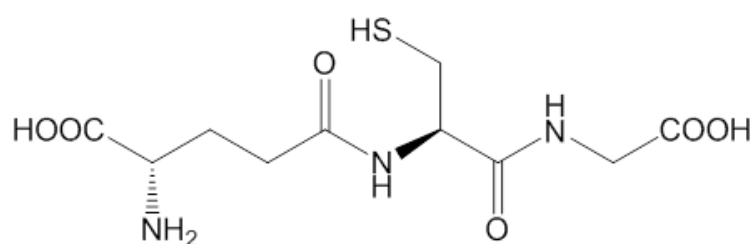


図 2：グルタチオンの構造式

従来の GSH 濃度を測定する方法としては HPLC による定量、GSH との反応による試薬の吸収、蛍光、発光変化を利用した方法などが用いられているが、いずれの方法も細胞の破碎処理が必要である。また、GSH をターゲットとした蛍光プローブについては過去複数の報告があるが、細胞膜透過性や GSH との反応性の低さ等改善すべき点が残されており、生細胞におけるレドックス状態の可視化という観点からは実用に耐えうるプローブ開発は未だなされていない [15]–[18]。例えば図 3-a) に示すプローブでは細胞イメージング実験において 25 μ M という高濃度での incubation を必要としている [19] ほか、図 3-b) のプローブは GSH 単独ではほとんど反応せず、GSH の転移反応を触媒する酵素である Glutathione S-transferase (GST) の存在下で初め

て蛍光上昇が起きるため GST 活性を検出するプローブとして報告されている[20]。

また、ローダミン誘導体は高い蛍光量子収率、化学的修飾の容易さ、光褪色耐性など
プローブの母核として優れた特徴を有しており、図 3-c)のような rhodamine green
を用いた GSH 感受性プローブが報告されている。しかしながらこのプローブは細胞
膜透過性を達成するためにキサンテン環の両端のアミノ基に 2 つの DNs 基を付加す
る必要があるため蛍光の回復には DNs 基が 2 つとも外れる必要があり、GSH の定
量という点において大きな問題点を有している[21]。

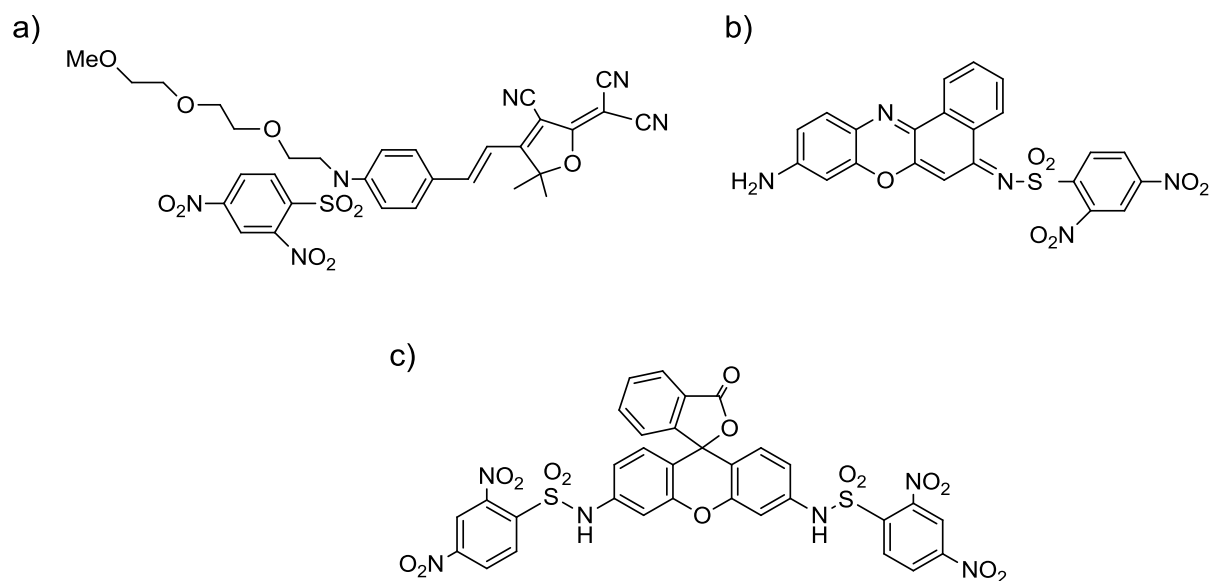


図 3 : 既存の GSH 感受性蛍光プローブの例

そこで本研究においては細胞内 GSH をターゲットとし、生細胞におけるレドックス状態の可視化が可能な蛍光プローブを開発することを目的とした。具体的には、(1) 高い細胞膜透過性を示す高感度 GSH プローブの開発、(2) 応答可逆性を示す GSH プローブの開発、の 2 点に取り組んだ。

第 2 章 方法

・ 蛍光プローブの合成

合成の詳細な手順については第 5 章にて記述する。NMR スペクトルは Ultrashield 400 (Bruker 社製) を用いて ^1H NMR は 400 MHz で、 ^{13}C NMR は 101 MHz で測定を行った。Mass spectra (MS) は micrOTOF II (Bruker 社製) で測定を行った。

HPLC 分析は Inertsil ODS-3 カラム (4.6×250 mm, GL Sciences 社製) を使用し、ポンプに PU-2080 PLUS (JASCO 社製) 検出器に MD-2018 および FP-2025 (JASCO 社製) を用いた HPLC システムによって行った。HPLC による精製においては Inertsil ODS-3 カラム (10.0×250 mm, GL Sciences 社製) を使用し、ポンプに PU-2080 PLUS (JASCO 社製) 検出器に MD-2018 (JASCO 社製) を用いた HPLC システムによって行った。

・ 吸収・蛍光スペクトル測定

吸収スペクトルは Shimadzu UV-1650、蛍光スペクトルは Hitachi F4500 を使用して測定した。蛍光スペクトル測定に際しては、励起・検出ともスリット幅は 2.5 nm に設定し、ホトマル電圧は 700 V に設定した。蛍光量子収率は絶対蛍光量子収率計である Quantaaurus-QY (浜松ホトニクス社製) を用いて測定した。

・細胞培養

使用した培養細胞のうちHUVEC,MKN28,HCT116,A549細胞についてはATCCより購入し、SHIN3細胞については東京大学薬学系研究科薬品代謝科学教室より供与を受けた。使用した培養細胞はインキュベータ内にて37℃、CO₂ 5%の加湿条件下で培養された。SHIN3細胞およびA549細胞はDMEM(high glucose)、HCT116細胞はMcCoy's 5A、MKN28細胞はRMPI1640（いずれも10%FBS 1%Penicillin-Streptomycinを含む）を培地として用い、HUVEC細胞は推奨のEBM-2培地を用いて培養を行った。

培地、FBSおよびPenicillin-StreptomycinはいずれもLife technologies社製の製品を使用した。

・培養細胞の蛍光イメージング

培養細胞を用いた蛍光イメージングはライカ社製共焦点顕微鏡TCS-SP5を用いて行った。励起にはホワイトライトレーザー(WL)を使用し、培地をDNs-HMRGの場合はHBSSに、他の場合はHEPES bufferを含むフェノールレッドフリー培地に観察培地を置換した上で37℃にて観察を行った。

- ・細胞内 GSH 量の測定

細胞内 GSH 量の測定は、GSH-Glo Glutathione Assay kit (Promega 社製)を用いて行った。96 ウェルプレートに、1 ウェルあたり 1×10^4 個の細胞を撒き、8 時間後に測定を行った。発光強度は SH-8000 マイクロプレートリーダー (コロナ電気社製) で測定し、キットに含まれる GSH 標準溶液の値を基に標準化した。

- ・腹腔播種モデルマウスの in vivo イメージング

SHIN3 細胞を用いた腹腔播種モデルマウスは参考文献 21 に基づいて作成した。モデルマウスに $10 \mu\text{M}$ の DN5-HMRG 溶液 $300 \mu\text{l}$ を腹腔内投与し、5 分後に安楽死させた後腸間膜の播種病変のイメージングを行った。イメージングには Maestro In-Vivo imaging system (CRi 社製)を使用した。励起には $445 \sim 490 \text{ nm}$ の Band pass フィルターを、検出には 515 nm Long pass フィルターを使用した。Unmix イメージングは Hydroxymethylrhodamine green(HMRG)のスペクトルを黄緑、自家蛍光を黄色として Maestro に添付されている software を用いて行った。

製造元会社住所一覧

Bruker : 〒221-0022 神奈川県横浜市神奈川区守屋町 3-9

GL Science : 〒163-1130 東京都新宿区西新宿 6-22-1 新宿スクエアタワー30 階

JASCO : 〒192-8537 八王子市石川町 2967-5

Shimadzu : 〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町 1

Hitachi : 〒100-8280 東京都千代田区丸の内 1-6-6

浜松ホトニクス : 〒430-8587 浜松市中区砂山町 325-6

住商ファーマインターナショナル (ATCC、CRi 日本代理店) :

〒104-6223 東京都中央区晴海 1-8-12 晴海トリトンスクエアオフィスタワーZ 棟

Leica Microsystems : 〒169-0075 東京都新宿区高田馬場 1-29-9

Promega : 〒103-0011 東京都中央区日本橋大伝馬町 14-15

コロナ電気 : 〒312-0052 茨城県ひたちなか市東石川 3517 番地

ライフテクノロジーズ・ジャパン : 〒108-0023 東京都港区芝浦 4-2-8

第 3 章 結果

第1節 新規グルタチオン感受性蛍光プローブ DN_s-HMRG の開発

<本節の要点>

HMRG を基本骨格とする新規蛍光プローブ DN_s-HMRG を開発し、細胞イメージングにおいて蛍光上昇速度という指標で細胞内 GSH 濃度の差を検出することに成功した。

第1章に示したように、過去に報告されている GSH 感受性蛍光プローブの多くは、2,4-dinitrosulfonylbenzene 基 (DN_s 基) による蛍光団の修飾を基本構造としている。これは DN_s 基がその強い電子吸引性により蛍光を消失させること、および DN_s 基が-SH 基特異的な反応により脱離することを利用している。一方、東京大学薬学系研究科薬品代謝科学教室の坂部らにより開発された HMRG は rhodamine green のベンゼン環部分の2位のカルボキシル基をハイドロキシメチル基に置換した誘導体であり、片方のアミノ基をアセチル化することで蛍光特性が劇的に変化することが示されている。つまり生理的 pH の水溶液中において HMRG はキサンテン環構造をとるため強蛍光性を示すが、アセチル化された Ac-HMRG はスピロ環が形成されて閉環構造をとるため蛍光が消失するという特徴を有する。この性質を利用して γ -glutamyltranspeptidase など種々のアミノペプチダーゼに対する蛍光プローブが開発されている[22], [23]。また HMRG は rhodamine green の持つ高い蛍光量子収率、

光褪色耐性といった利点を維持したまま高い細胞膜透過性を有する蛍光団である。

HMRG を用いることでチオール反応点が1つで細胞イメージングに有利な特性を持った可能なプローブが開発可能と考え、新規蛍光プローブ DN_s-HMRG を設計し合成を行った。合成は HMRG に塩基性条件下で DN_sCl を加えることで可能であった (図 4)。

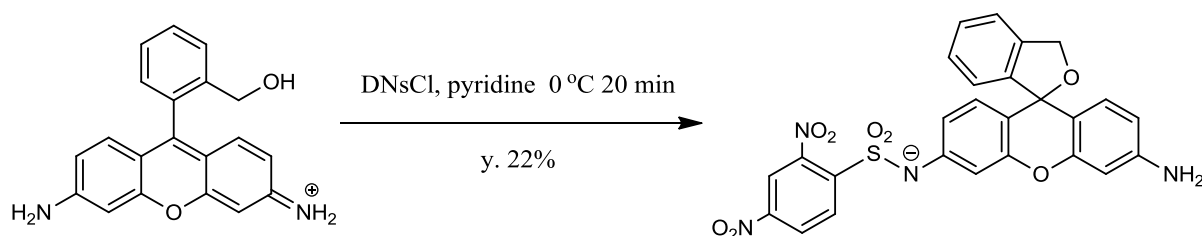


図 4 : DN_s-HMRG の合成スキーム

DN_s-HMRG は DN_s 基による消光に加えてスピロ環化という 2 つの蛍光制御機構を持つプローブである。吸収・蛍光スペクトルの pH 依存性を測定した結果、DN_s-HMRG は pH により 3 つの form をとると考えられた。また、490 nm の吸光度と 530 nm の蛍光強度の pH プロットの結果からスピロ環化平衡の指標である pK_{cycl} (開環体による吸収の最大値が閉環により 2 分の 1 に低下する pH の値) は 7.0、sulfonamide の pK_a は 3.1 と算出された (図 5,6)。よって生理的条件である pH 7.4 下において DN_s-HMRG の大部分は閉環体で存在しており、スピロ環化はプローブの蛍光制御として有効に機能していることが明らかとなった。一方でほぼ全てが開環

体として存在する pH 5.0 における蛍光量子収率は 0.002 と非常に低くなっており、

DNs 基による消光も十分起きている事が示された (表 1)。

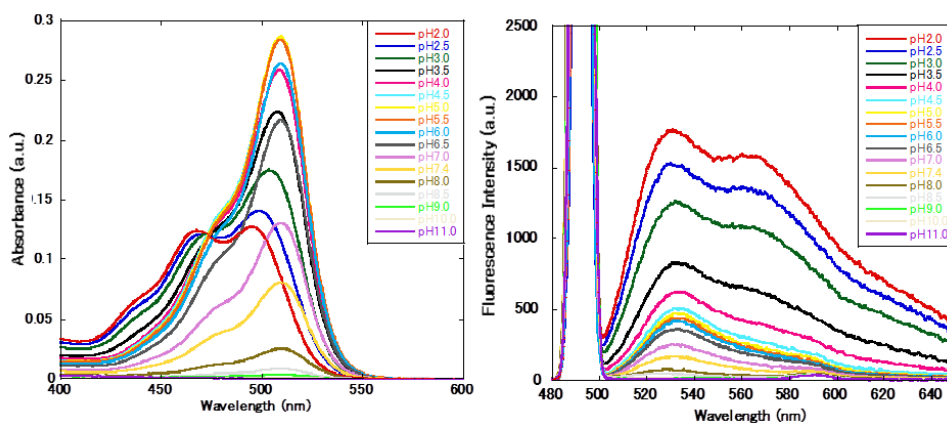


図 5:DNs-HRMG の pH profile (左：吸収、右：蛍光スペクトル (励起 495nm))

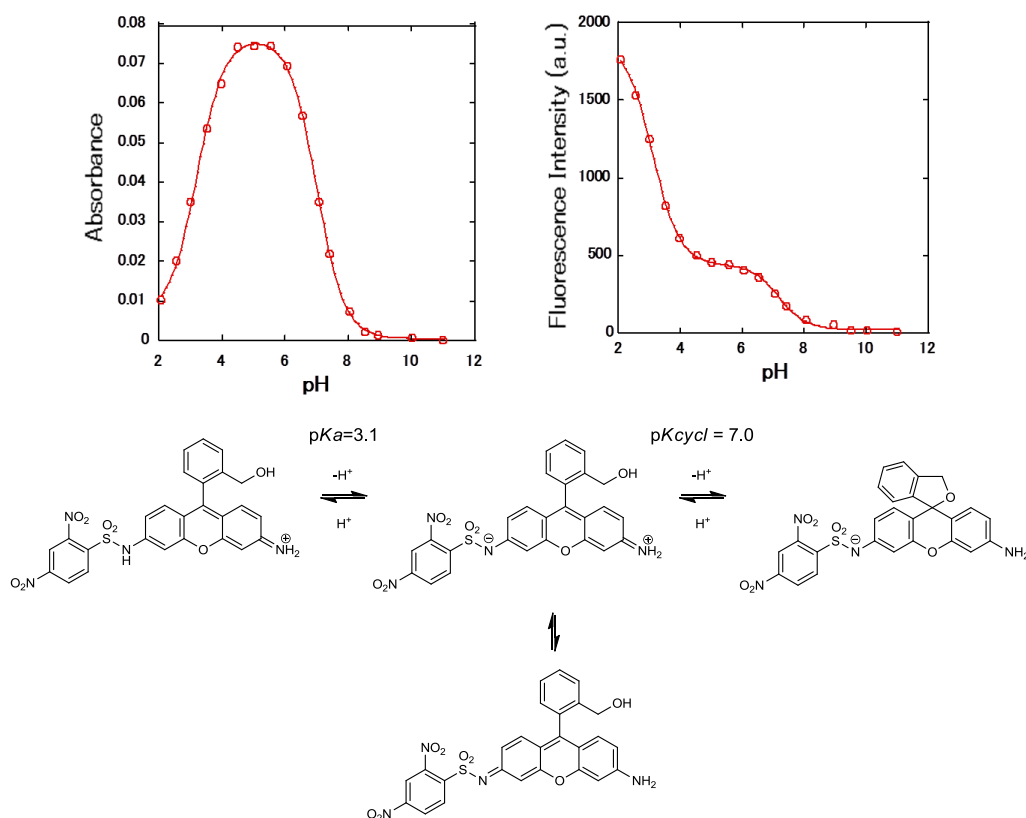


図 6：DNs-HMRG の酸塩基平衡

上段左：吸光度(490 nm)の pH プロット 上段右：蛍光強度(530 nm)の pH プロット

下段：DNs-HMRG の pH 依存的構造変化

Absorption maximum (nm)	Emission maximum (nm)	Fluorescence quantum yield	Molar extinction coefficient	pK_{cycl}
510 ^a	532 ^a	0.002 ^a	20000 ^a	7.0

表 1. DN_s-HMRG の光学的特性 (a: 0.2 M リン酸 buffer, pH 5.0 中で測定)

DN_s-HMRG はチオールとの反応により強蛍光性の HMRG に変換されることが予想されたため (図 7)、実際にキュベット内で DN_s-HMRG と GSH を反応させ蛍光変化を測定した。pH 7.4 において 1 μ M の DN_s-HMRG に 10 mM の GSH を加えたところ 60 分後には 7000 倍以上の蛍光強度の上昇が認められた (図 8-c)。この蛍光上昇は GSH 濃度に依存的に変化し、GSH 添加後 1 分時点での蛍光強度と GSH 濃度との間には線形関係にあることが示された (図 8-a,b)。さらに様々な基質との反応を検証した結果、DN_s-HMRG の蛍光上昇はチオール特異的なものである事が示された (図 8-d)。また実際に DN_s-HMRG と GSH との反応により HMRG が生成している事は反応溶液の HPLC による分析で確認した (図 9)。

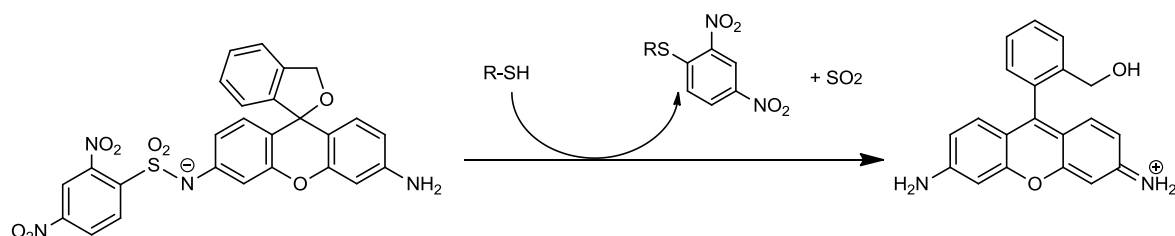


図 7 : DN_s-HMRG とチオールとの反応式

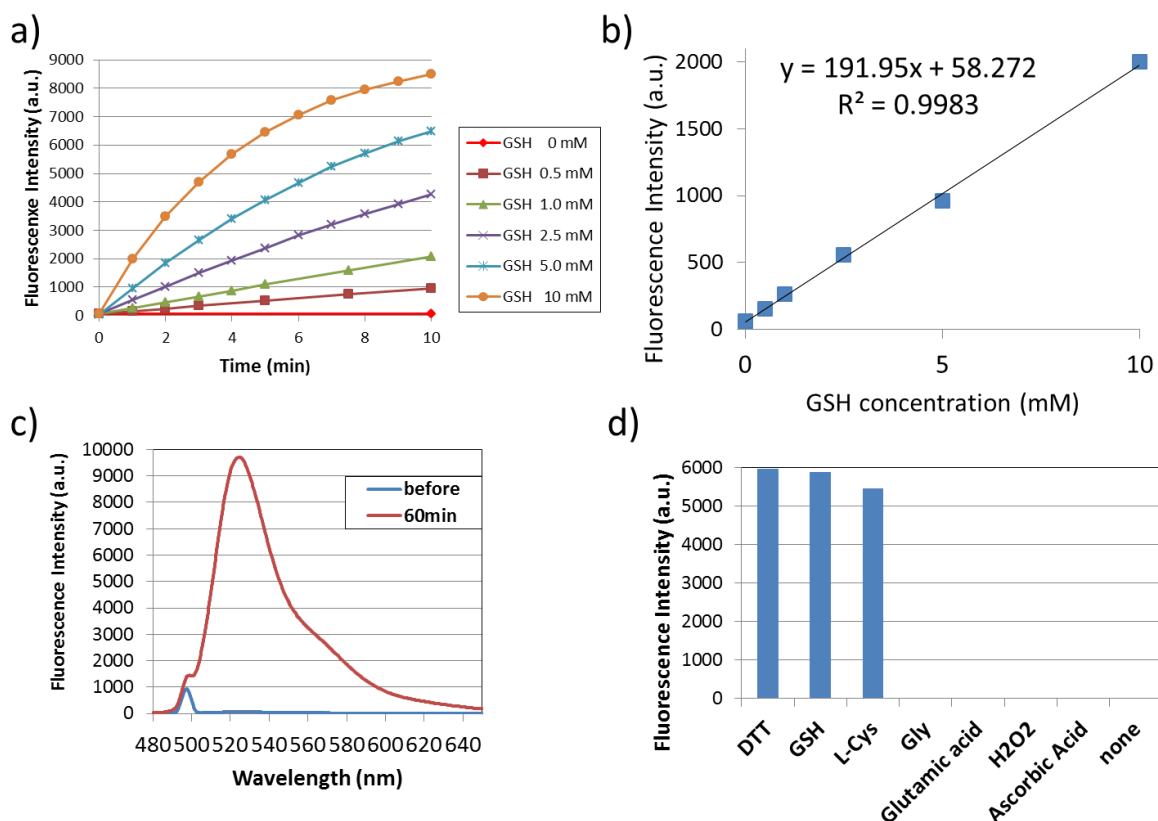


図 8 : DNs-HMRG と GSH との反応による蛍光上昇

a) GSH 濃度別蛍光強度の時間的变化

(DNs-HMRG 1 μ M 励起:495 nm 蛍光:530 nm)

b) GSH 添加後 1 分での蛍光強度のプロット

c) GSH 添加による蛍光スペクトル変化

(DNs-HMRG:1 μ M GSH:10 mM 励起: 495 nm)

d) DNs-HMRG と種々の基質との反応性

(DNs-HMRG:1 μ M 基質:10 mM 励起: 495 nm 蛍光: 530 nm 添加後 60 分)

*いずれも pH 7.4 0.2 M リン酸バッファー (37℃) 中で測定

DTT : ジチオトレイトール、L-Cys : L-システイン、Gly : グリシン

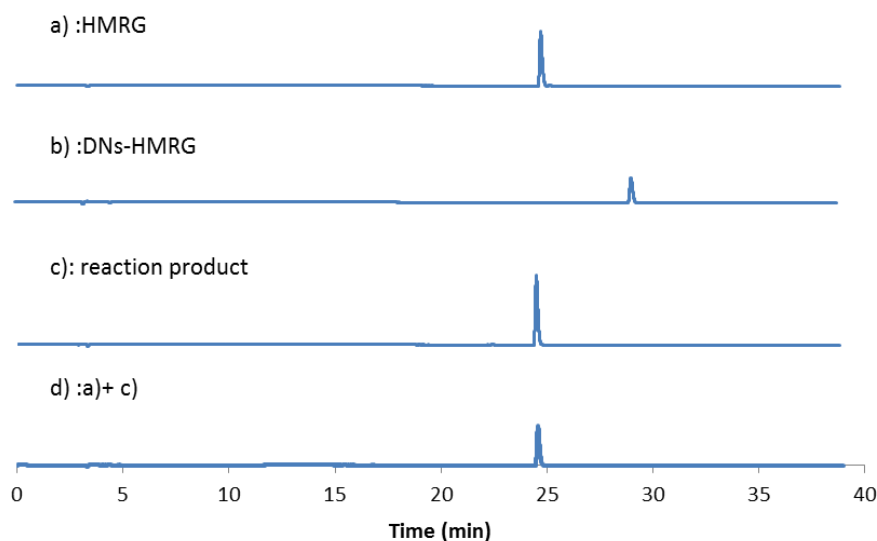


図 9: DN-s-HMRG と GSH の反応溶液の HPLC 分析 (縦軸:490 nm の吸光度)
a): HMRG、b): DN-s-HMRG、c): DN-s-HMRG と GSH の反応溶液、d): a)と c)の混合溶液 展開溶媒: A; 0.1%TFA 水溶液 B; アセトニトリル
溶出条件: linear gradient (A/B), 0 分(90/10) → 5 分(90/10) → 25 分(20/80) → 30 分(20/80) → 35 分(90/10) → 40 分(90/10). 流速: 1.0 ml/分
Retention times: HMRG 24.6 分, DN-s-HMRG 29.2 分

次に、DN-s-HMRG が細胞内において GSH と反応し蛍光上昇を示すかどうかを癌培養細胞を用いたイメージング実験によって検証した。卵巣がん由来である SHIN3 細胞に対して DN-s-HMRG を投与し共焦点顕微鏡で観察した結果、数分のうちに非常に明るい蛍光像が認められた。この蛍光上昇が細胞内の GSH に対する反応によるものかどうか検証するため、チオール阻害剤である N-ethylmaleimide(NEM)処理を行った細胞に対して DN-s-HMRG を添加したところ、NEM 濃度が上昇するに伴って蛍光上昇が抑制されることが明らかになった (図 10)。細胞内チオールの大部分は GSH とされており、これは即ち DN-s-HMRG と GSH との濃度依存的な反応速度の

関係が細胞内においても保たれており、この蛍光上昇速度が細胞内 GSH 濃度を反映しているという事を示すものである。

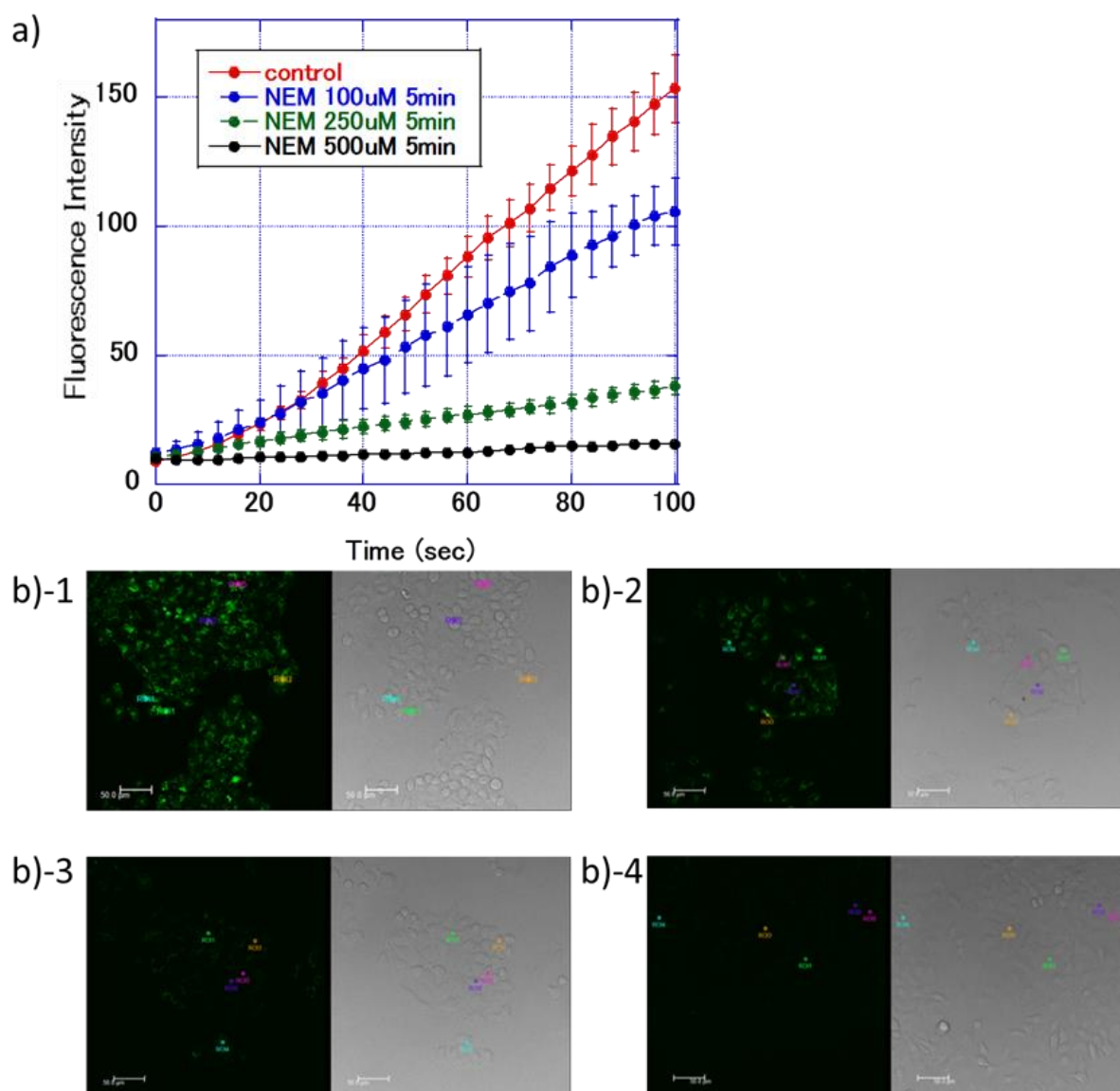


図 10 : SHIN3 細胞を用いた DN-s-HMRG の蛍光イメージング

a) DN-s-HMRG 1 μ M 添加後の蛍光強度の時間的变化 (励起:495nm 蛍光:505-530nm)

n=15,N=3 error bar: SEM

b) 共焦点顕微鏡によるイメージング (左 : 蛍光 右 : 透過像)

- 1: コントロール 2: NEM 100 μ M で 5 分処理後 3: NEM 250 μ M で 5 分処理後
4: NEM 500 μ M で 5 分処理後、に各々 DN-s-HMRG を添加して 100 秒後の画像

さらにこの細胞内 GSH 濃度と DNs-HMRG の蛍光上昇速度との関係が異なる細胞種間においても保たれているかどうかを検証するために、前述の SHIN3 細胞とヒト血管内皮細胞由来である HUVEC 細胞とで比較を行った。一般的に癌細胞は正常細胞よりも GSH 濃度が高いことが知られており、市販の細胞内 GSH 測定試薬 (GSH-Glo™)を用いた測定からも SHIN3 の方が正常細胞である HUVEC 細胞よりも GSH 濃度が高いことが示された (図 11-c)。実際に DNs-HMRG を適用し共焦点顕微鏡により観察した結果においても HUVEC 細胞に比べ SHIN3 細胞の方がより速やかな蛍光上昇が見られ、異なる細胞間においても DNs-HMRG による蛍光上昇速度は細胞内 GSH 濃度を反映していることが示唆された (図 11-a,b)。

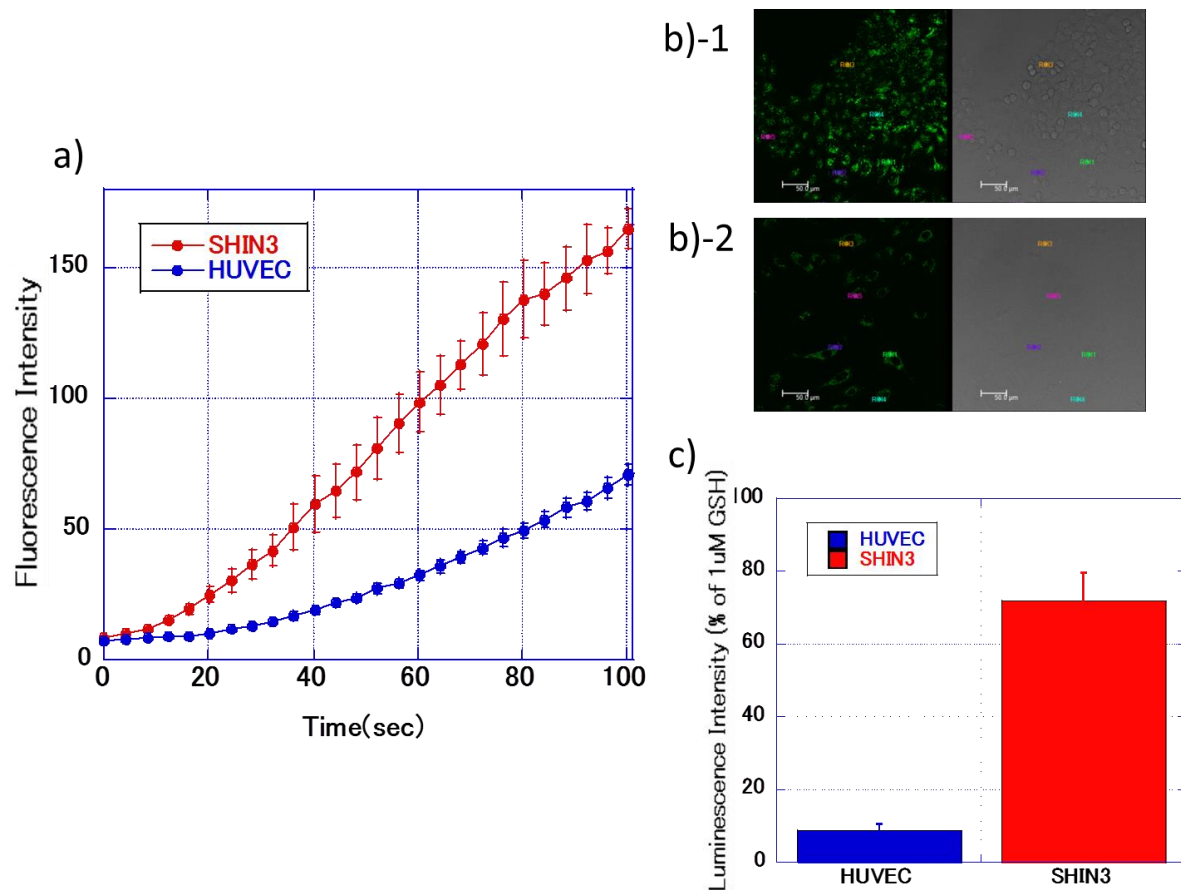


図 11 : SHIN3 細胞と HUVEC 細胞との DN5-HMRG による蛍光強度変化の比較
a)DN5-HMRG 1 μ M 添加後の蛍光強度の時間的変化

(励起:495 nm 蛍光:505-530 nm、 n=15,N=3, error bar : SEM)

b) DN5-HMRG 添加後 100 秒後のイメージング

(左 : 蛍光 右 : 透過像、 b-1: SHIN3 b-2: HUVEC)

c) GSH-Glo™ を用いた SHIN3 と HUVEC との細胞内 GSH 量の比較

(n=6,N=2, error bar : SEM)

以上の結果をふまえて DN5-HMRG を in vivo でのがんイメージングへの適用を検討した。SHIN3 細胞を nude マウス(Balb/cAJI-nu/nu)に腹腔内注射することにより作成したがんの腹膜播種モデルに DN5-HMRG を投与した結果、時間とともに正常組織によるバックグラウンド蛍光が上昇するものの、蛍光イメージングにより 1 mm 以下の播種病変が検出可能であった (図 12)。

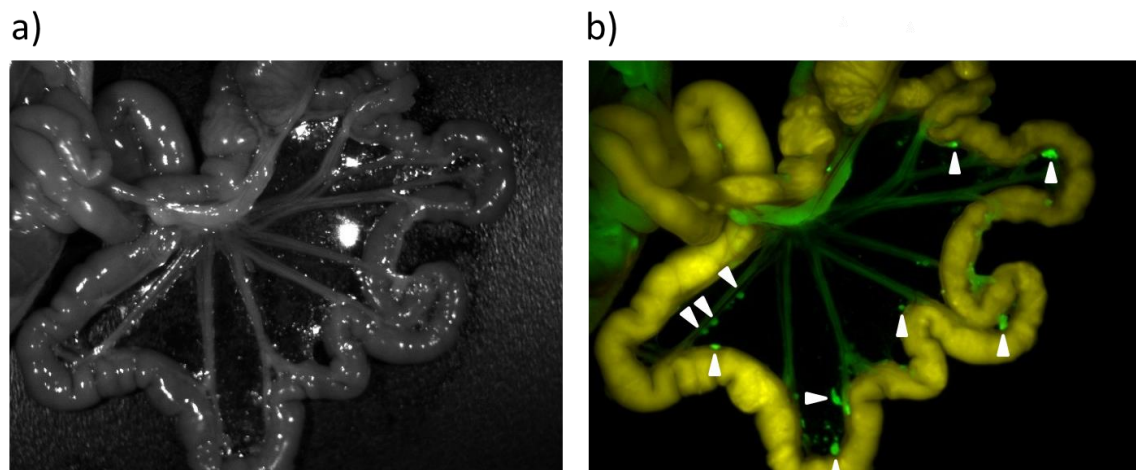


図 12: SHIN3 腹腔播種モデルマウスにおける DNs-HMRG によるがんイメージング
(DNs-HMRG 10 μ M 300 μ l を腹腔内投与し 5 分後に撮影)

a): 通常撮影による白黒像 (写真中央やや右寄りの白色像は光源による反射)

b): Unmix イメージング (HMRG 由来の蛍光スペクトルを黄緑、腸管の自家
蛍光を黄色としてスペクトル分析を行った画像)

矢印: 明るく描出された播種病変)

DNs-HMRG は GSH との反応により 7000 倍以上という高い蛍光上昇を示し、既存のプロープに比べ高感度な GSH 感受性蛍光プロープであるといえる。これは DNs-HMRG が DNs 基による消光に加えてスピロ環化という 2 つの異なる蛍光制御機構を有している事による。また、HMRG のスピロ環化は蛍光制御に寄与するだけではなく、閉環体において脂溶性が増すという特徴があり、これは DNs-HMRG が live cell imaging に適用するのに十分な細胞膜透過性を有している事に寄与している。加えて DNs-HMRG と GSH の反応は非常に速く、投与後数分の蛍光上昇の測定で細胞内 GSH 濃度の差を検出できるという特徴は短時間で変化する生細胞のレッド

クス状態を観測するのに適した特徴といえる。

しかしながら DNs-HMRG にはその反応性の高さ故、生理的範囲内下限である 0.1mM の GSH に対しても時間とともに蛍光上昇を示す。これは即ち短時間の蛍光上昇速度の測定で GSH 濃度の差が検出できる反面、GSH 濃度を反映した蛍光強度の差は時間とともに減少する、ということを意味する。これは *in vivo* イメージングの際の経時的なバックグラウンド蛍光の上昇にも顕著に表れている。

そこで GSH に対する反応性を落としたプローブとして DNs 基より電子吸引性の低い 4Cl-2Ns 基および MNs 基を導入したプローブを設計、合成したがいずれもキュベット内で GSH 添加による蛍光上昇はほぼ全く見られなかった (図 13,14)。

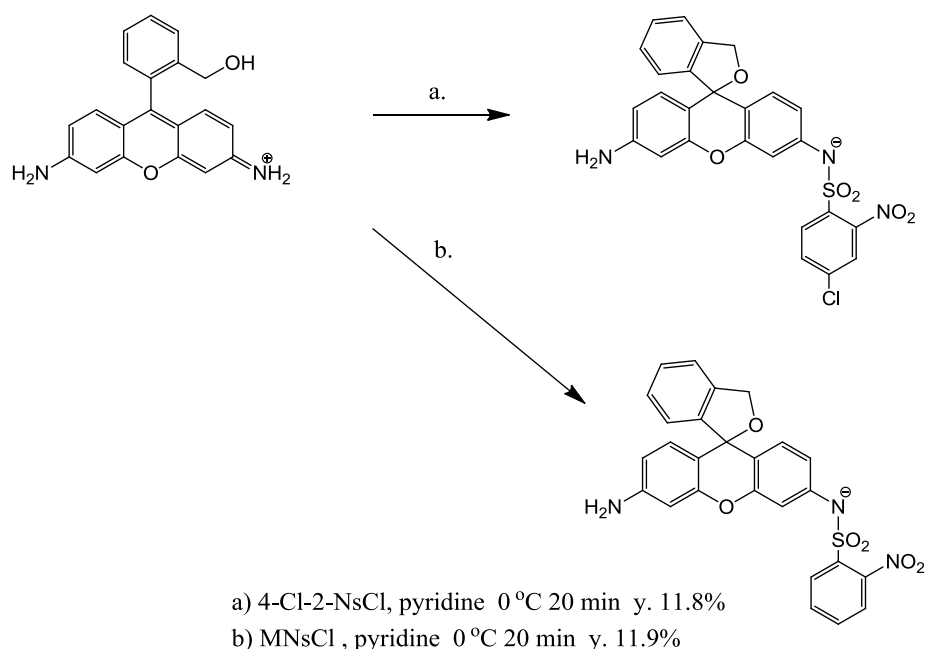


図 13：新規蛍光プローブ 4Cl-2Ns-HMRG , MNs-HMRG の合成スキーム

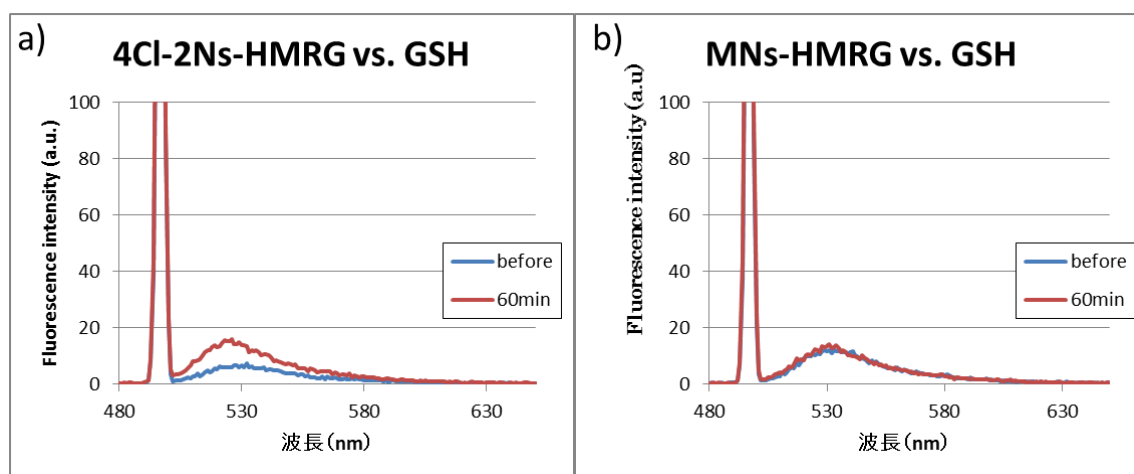


図 14 : a):4Cl-2Ns-HMRG、b):MNs-HMRG の GSH 添加による蛍光スペクトル変化
励起:495nm pH7.4 0.2 M リン酸バッファー(37 °C) GSH:10 mM ,probe 1 μ M

また DNs-HMRG と GSH の反応は不可逆的なものであり、一度生じた蛍光は消失しないため同じ系での繰り返しの測定を行う事ができないという欠点もある。これらの問題点を解決するためには GSH との反応を利用した新たな蛍光制御機構に基づいたプローブ設計が必要と考えられた。

第2節 GSH との可逆的な反応による蛍光制御機構を用いたプローブの開発

＜本節の要点＞ローダミンの Xanthene 環 9 位へのチオール求核攻撃を利用した可逆的な蛍光制御機構に着目し、2Me SiR600 が生理的 GSH 濃度の範囲内において濃度依存的に、また迅速かつ可逆的に蛍光が変化することを見出した。

DNs-HMRG の問題点を克服するためには GSH による蛍光の変化が OFF から ON への不可逆的なものではなく可逆的なものであることが必要と考えられた。すなわち GSH 濃度依存的かつ可逆的に蛍光が変化するプローブを開発できれば最終的に得られる蛍光強度が GSH 濃度を反映することとなり、バックグラウンドの蛍光が問題となる事はなく、また定量的かつ経時的な変化も検出可能と考えられた。そこで GSH の-SH 基がローダミンの Xanthene 環 9 位の炭素に求核攻撃をすることにより吸収・蛍光が消失する機構を利用し、上記プローブの開発を目指した (図 15)。求核攻撃の受けやすさは蛍光色素により異なるため、①生理的 GSH の濃度範囲において、② GSH 濃度依存的かつ可逆的に、蛍光の ON/OFF を示す色素を探索した。

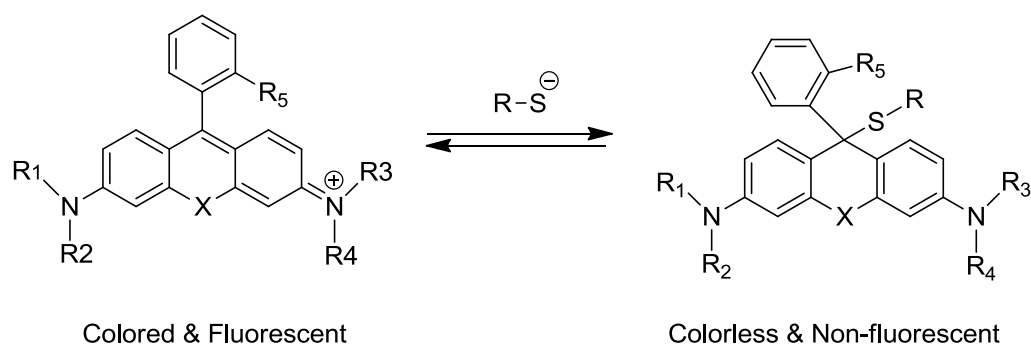


図 15: Xanthene 環 9 位への求核攻撃による蛍光制御

上記のような GSH による求核攻撃が起こりうる蛍光団の候補として長波長の蛍光色素である Si-rhodamine に着目した。Si-rhodamine は rhodamine の xanthene 環 10 位の酸素がケイ素に置換された化合物で、Lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) が低下するとともに蛍光波長の長波長化を実現している蛍光団である[24]。Si-rhodamine において長波長化を実現した LUMO の低下は同時に GSH による求核攻撃を受けやすくするのではないかと考えた。そこで Si-rhodamine の中でも LUMO が低いと予想された 2Me SiR600 を候補骨格として選択し、既報に則り 2Me SiR600 の合成を行った[25] (図 16)。

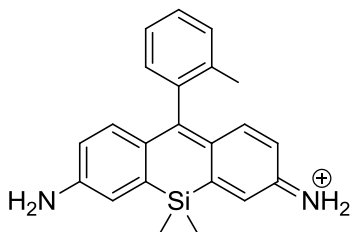


図 16: 2Me SiR600 の構造式

合成した 2Me SiR600 を用いて GSH を添加して吸収・蛍光スペクトルを測定したところ、濃度依存的に吸収・蛍光ともに減少することが明らかとなった（図 17-a,b）。この反応が可逆的であることは GSH 10 mM を添加した溶液を 2 分の 1 に希釈した際に吸収が 2 分の 1 ではなく 5 mM 添加した時と同じ 60% 程度にしか減少しなかったことから確認された（図 17-d）。またこの平衡について K_d を算出したところ $K_d=0.7$ mM であり、この平衡が生理的濃度の範囲内で起きていることが明らかとなった（図 17-c）。さらに経時的に GSH と NEM を交互に添加し吸光度変化を測定したところ、この反応は可逆的かつ非常に速い反応であることが確認された（図 18-b）。

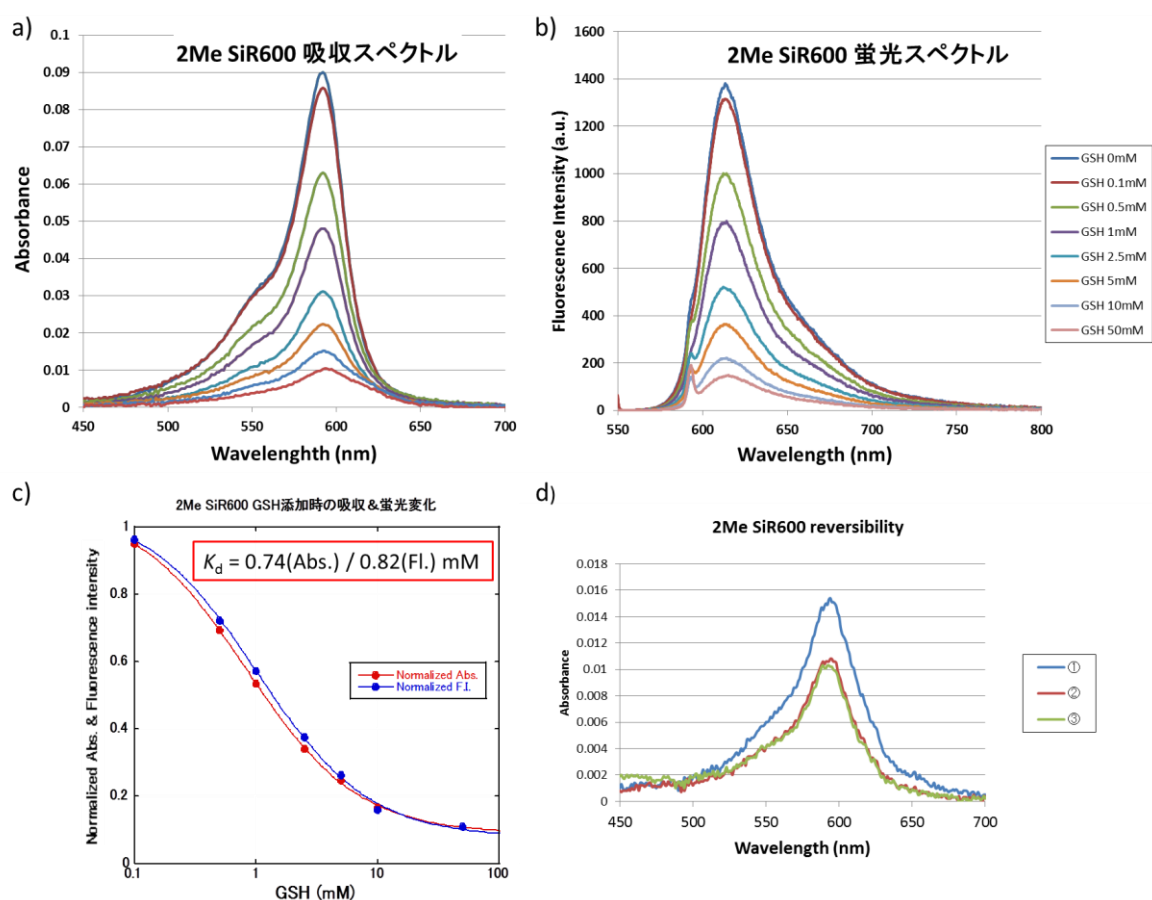


図 17: GSH 添加時の 2Me SiR600 の吸収・蛍光スペクトルの変化

a),b) GSH 濃度別吸収・蛍光スペクトル

2Me SiR600 $1\ \mu\text{M}$ pH7.4 37°C 0.2M リン酸バッファー中で測定

c) GSH 濃度に対する 2Me SiR600 の吸収・蛍光強度プロット

d) ①: 2Me SiR600 $1\ \mu\text{M}$ に GSH10 mM を添加した時の吸収スペクトル

②: ①を半分に希釈した溶液の吸収スペクトル

③: 2Me SiR600 $0.5\ \mu\text{M}$ に GSH5 mM を添加した時の吸収スペクトル

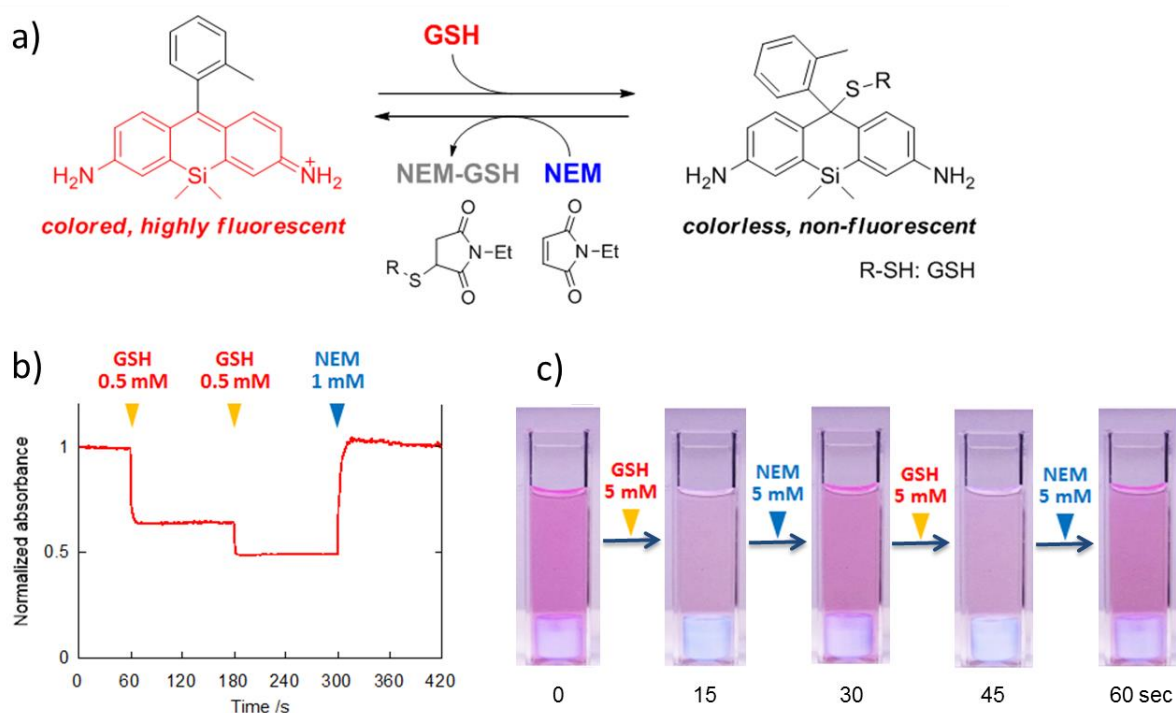


図 18: GSH と 2Me SiR600 との可逆的反応による蛍光制御

a): GSH と 2Me SiR600 との可逆的な反応による蛍光制御機構の反応式

b): GSH および NEM 添加による 2Me SiR600 の 600 nm の吸光度の経時的変化
(pH7.4 37°C 0.2M リン酸バッファー中で測定)

c): 2Me SiR600 溶液の GSH および NEM 添加による吸収の可逆的変化の写真

上記結果をふまえ、A549 細胞（肺がん由来）に対して 2Me SiR600 を適用しイメージングを行った。添加後速やかに蛍光像が観察された。Mitotracker green™ との共染色により 2Me SiR600 は incubation 5 分の時点でミトコンドリアに集積していることが確認された（図 19）。

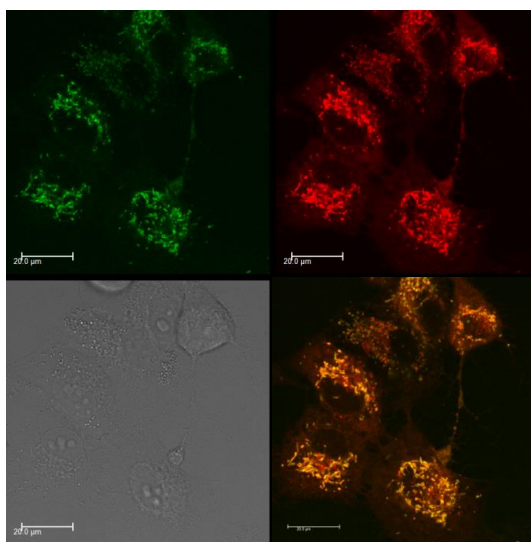


図 19: 2Me SiR600 の細胞内局在

使用細胞:A549 2Me SiR600 1 μ M 5 min, Mitotracker green 100 nM 30 min

上段左 : Mitotracker による蛍光像 (励起: 490 nm PMT1: 505-530 nm)

上段右 : 2Me SiR600 による蛍光像 (励起 600 nm PMT3: 620-650 nm)

下段左 : 透過像 下段右 : Merge

次に 2Me SiR600 の蛍光強度が細胞内 GSH 濃度を反映しているかを検証するため実験を行った。HCT116 細胞（大腸がん由来）に 2Me SiR600 を 1 μ M で 10 分間 incubate した後に NEM 100 μ M を加え 10 分後に観察したところ蛍光強度の著明な上昇を認めた。すなわち NEM 添加により低下した GSH 濃度に応答しているものと考えられた（図 20-a,b）。

さらに異なる細胞間での GSH 濃度の差を蛍光強度で検出できるかを検討するため、HCT116（大腸がん由来）および MKN28（胃癌由来）を用いて実験を行った。文献的には HCT116 は癌幹細胞のマーカーである CD44 を発現している細胞で、MKN28 より細胞内 GSH 濃度が数倍程度高いとされている[9]。結果同一条件で測定した 2Me SiR600 の蛍光強度は MKN28 の方が HCT116 より高く、細胞の種類によらず 2Me SiR600 の蛍光強度は細胞内 GSH 濃度を反映しているものと考えられた(図 20-a,c)。

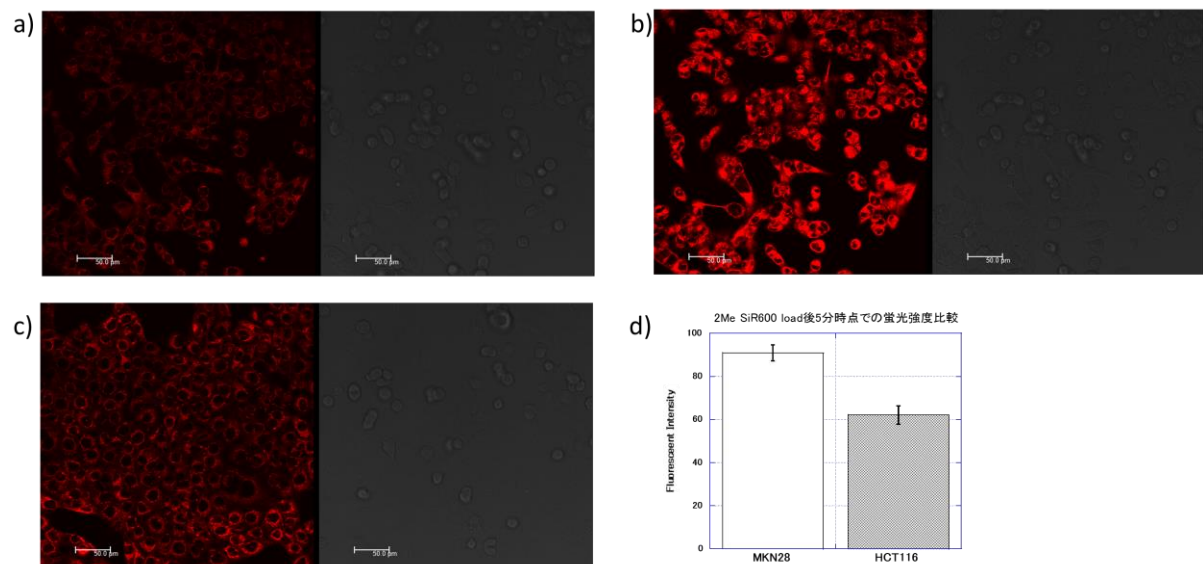


図 20: 2Me SiR600 による癌培養細胞の共焦点顕微鏡画像

- a) 使用細胞:HCT116 2Me SiR600 1 μM incubation: 10 分
- b) a)に NEM 100 μM 添加 5 分後の蛍光像
- c) 使用細胞:MKN28 2Me SiR600 1 μM incubation: 10 分
(いずれも WL:100%-10%-Gain600V 励起:600nm 蛍光:620-650nm)
- d) a),c)の蛍光強度のグラフ (ROI10 ヶ所の平均値 error bar:SEM)

上記結果をふまえ、次に HCT116 細胞における NEM 添加による GSH 濃度低下からの回復過程を蛍光イメージングにて観察した。HCT116 を NEM 200 μM にて 10

分間 incubate した後、培地を交換し NEM を washout した状態から別個の dish にそれぞれ 0,30,45,60 分後に 2Me SiR600 1 μ M を添加し 10 分間 incubate、という手順で観察を行った。結果時間経過とともに徐々に蛍光強度は低下しており、1 時間以内という比較的速い経過で GSH 濃度が回復していることが示唆された (図 21)。

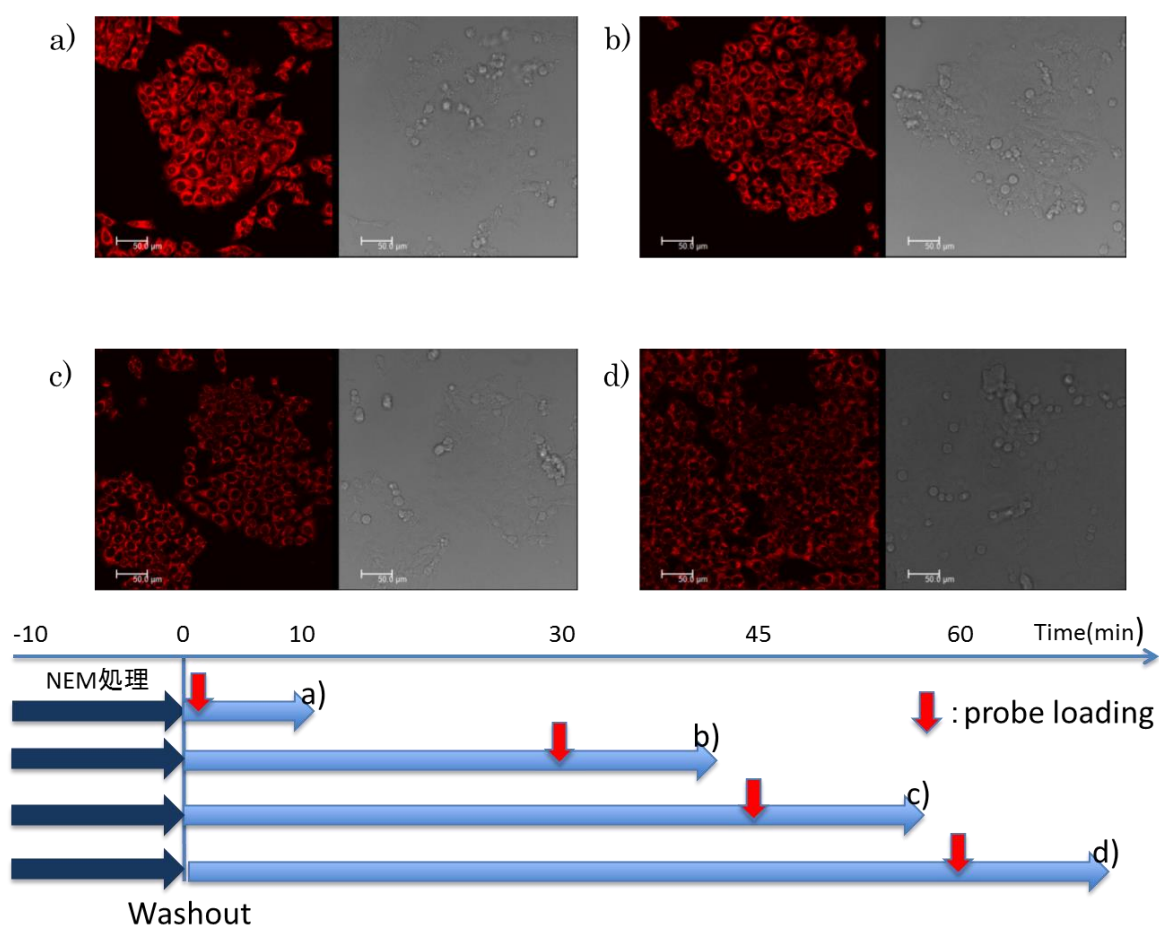


図 21: 2Me-SiR600 による HCT116 の NEM 負荷からの回復過程の観察

NEM 200 μ M 10 分 incubate 後 washout し各時間 incubate した後

2Me SiR600 を 10 分 incubate し観察 (励起: 600 nm, 蛍光: 620-650 nm)

a) 0 分 (washout 直後) b) 30 分 c) 45 分 d) 60 分

2Me SiR600 と GSH との反応は可逆的であり、キュベット内での反応においては経時的な GSH 濃度変化が蛍光強度として検出可能であった。そこで細胞イメージングにおいても経時的な GSH 濃度変化を追跡可能かどうか、同一ディッシュでの経時的な観察を行うことで検証した。しかしながら時間経過による蛍光強度の減衰はほとんど見られなかった (図 22)。

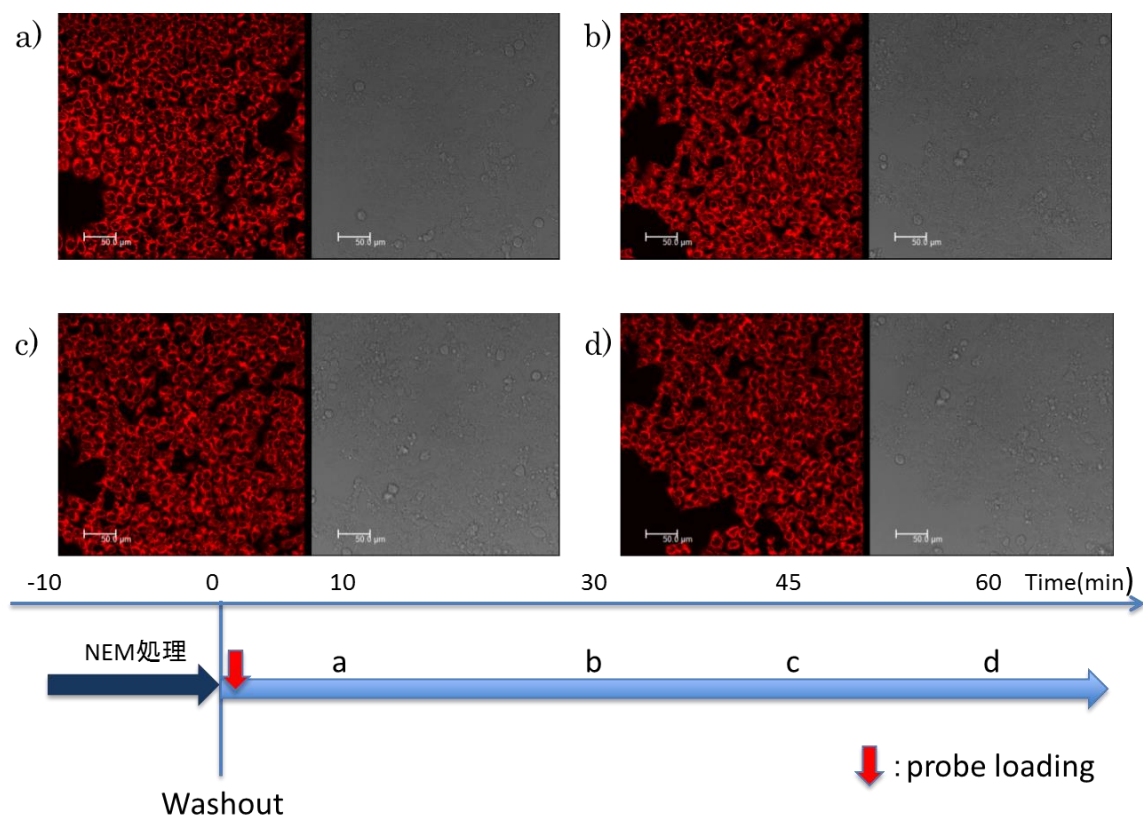


図 22: 2Me-SiR600 による HCT116 の NEM 負荷からの回復過程の観察 2
NEM 200 μ M を 10 分間 incubate し、washout した後 2Me SiR600 を 10 分間 incubate し経時的に観察 (励起: 600 nm , 蛍光: 620-650 nm)
a) 0 分 (washout 直後) b) 30 分 c) 45 分 d) 60 分

この理由として考えられたのは 2Me SiR600 の細胞内局在の時間的变化である。

すなわち前述のごとく load 後短時間の間では 2Me SiR600 はミトコンドリアに局在するが、文献的には 1 時間の incubation 時間をおくとライソゾームに局在するようになる[26] (図 23-a,b:HMRG はライソゾームに集積することが報告されている)。

2Me SiR600 と GSH の反応は pH 依存性であるため (実際に求核攻撃をするのは $\text{-S}^{\cdot\cdot}\text{thiolate}$ である) ライソゾームの酸性環境下では GSH による求核攻撃による蛍光の消失が起きていないことが考えられる。実際 pH4.5 の buffer 中で測定したところ GSH10 mM を加えても吸収・蛍光ともほとんど変化しなかった (図 23-c,d)。よって 2Me SiR600 を用いて可逆的蛍光変化が観察できるのはミトコンドリアに集積している間に限られ、経時的な観察には限界がある事が示唆された

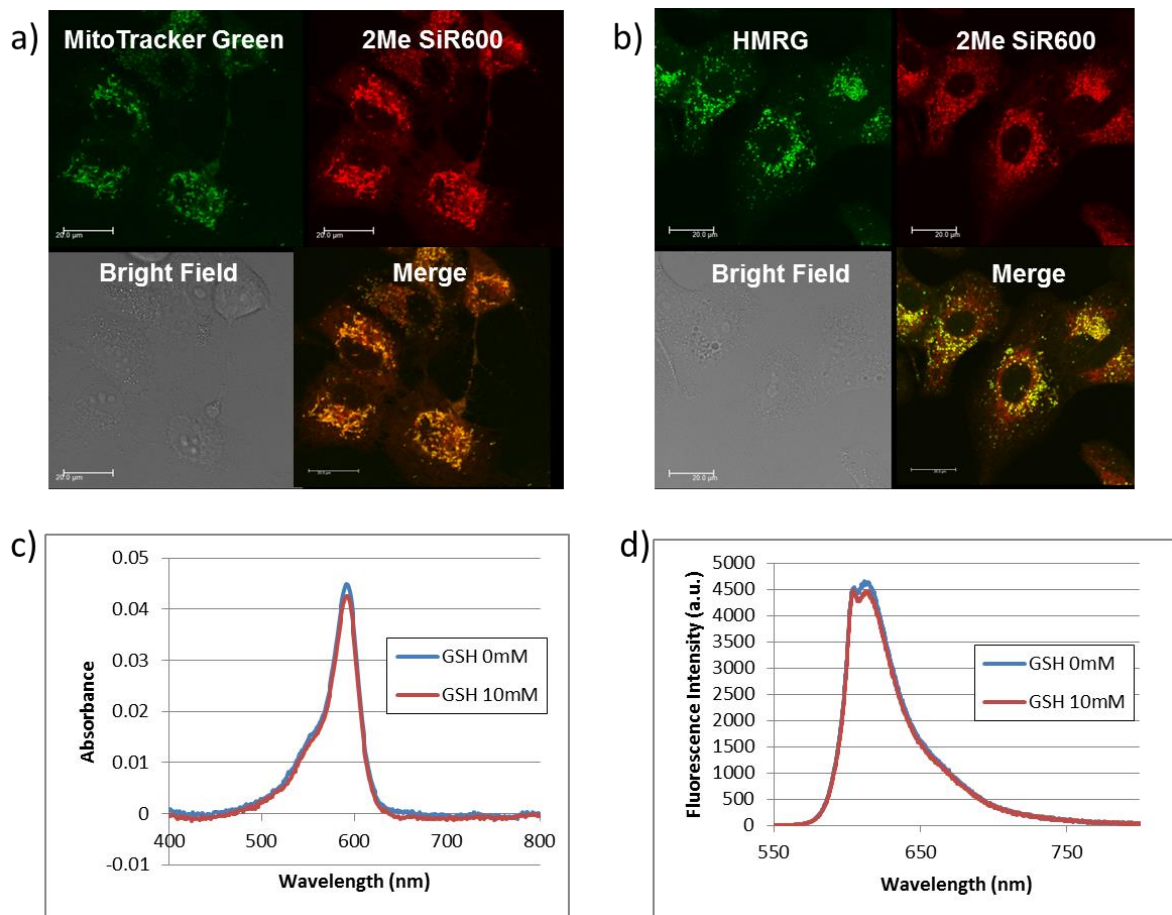


図 23: 2Me SiR600 の細胞内局在の経時的変化と酸性条件下での反応性

a) 2Me SiR600 添加後 5 分時点での共焦点顕微鏡像

使用細胞:A549 Mitotracker green 100 nM を 30 分前に添加

上段左 : Mitotracker による蛍光像 (励起: 490 nm PMT1: 505-530 nm)

上段右 : 2Me SiR600 による蛍光像 (励起 600 nm PMT3: 620-650 nm)

下段左 : 透過像 下段右 : Merge

b) 2Me SiR600 添加後 60 分時点での共焦点顕微鏡像

使用細胞:A549 HMRG 500 nM を 30 分前に添加

上段左 : HMRG による蛍光像 (励起: 490 nm PMT1: 505-530 nm)

上段右 : 2Me SiR600 による蛍光像 (励起 : 600 nm PMT3: 620-650 nm)

下段左 : 透過像 下段右 : Merge

c) 酸性条件下での GSH 添加による 2Me SiR600 の吸収スペクトル変化

d) 酸性条件下での GSH 添加による 2Me SiR600 の蛍光スペクトル変化

2Me SiR600 0.5 μ M pH4.5 37°C 0.2M リン酸バッファー中で測定

また定量性という面においても 2Me SiR600 による細胞イメージングでは限界が生じる。すなわち 2Me SiR600 の蛍光強度は細胞内 GSH 濃度が高いほど暗くなるということになるが、蛍光強度は GSH 濃度以外にも蛍光色素の濃度自体など様々な要素の影響を受け、例えば蛍光が暗くなった場合に、実際に GSH 濃度が高くなったのか、色素の局在が変化して色素の濃度が低下したのかが区別できない、という問題がある。よって細胞内 GSH 濃度の経時的なイメージングを実現するためには、2Me SiR600 の可逆的な蛍光制御機構を利用しつつ、適切な構造修飾を施すことで細胞内局在の安定化と定量性の向上を達成する必要があると考えられた。

・第3節 2Me SiR600 を Acceptor とした FRET 型蛍光プローブの開発

＜本節の要点＞定量性の向上およびミトコンドリアへの集積性改善のため 2Me SiR600 をもとにした FRET 型プローブ 2Me SiR600-TMR(Me)を開発し、細胞イメージングにおいて GSH 濃度変化をリアルタイムに検出することに成功した。

細胞イメージングにおける 2Me SiR600 のもつ問題点のうち、定量性に関しては蛍光強度をもとにしては限界があるため FRET を用いた *rationetric* な測定による定量を用いることを考えた。この場合色素濃度によらず、2つの蛍光色素の蛍光強度の比が GSH 濃度により変化するため定量性の向上が期待された。その際さらにミトコンドリアへの集積性を期待して、Donor としてミトコンドリアへの集積性が知られている Tetramethylrhodamine(TAMRA)のメチルエステル体を用いることとし、次のような FRET 型プローブ 2Me SiR600-TMR(Me) を設計した(図 24-a)。合成は 2Me SiR600 のベンゼン環 4 位にカルボン酸のついた 2Me₄COOH SiR600 を合成し、リンカーとして 1,4-trans cyclohexanediamine を用い縮合させることにより行った。

はじめに合成した 2Me SiR600-TMR(Me)と GSH との応答性を確認するため吸収・蛍光スペクトルを測定した。GSH を加えない状態において TAMRA の吸収波長域である 555nm で励起したところ蛍光スペクトルは 630nm を最大とするほぼ一山のスペクトルとなった。これは高い効率で FRET が起きていることを示している(図

24-e)。さらに GSH 添加により濃度依存的に TAMRA の最大蛍光波長である 580nm をピークとするスペクトルへの変化が認められた。すなわち本プローブにおいても Si-rhodamine に対する GSH の求核攻撃による蛍光制御機構が働いていることが示された (図 24-b,c)。2 つの蛍光強度比を GSH 濃度に対してプロットし K_d を算出したところ 1.0 mM と 2Me SiR600 とほぼ変わらない生理的 GSH 濃度の範囲内の値であった (図 24-d)。

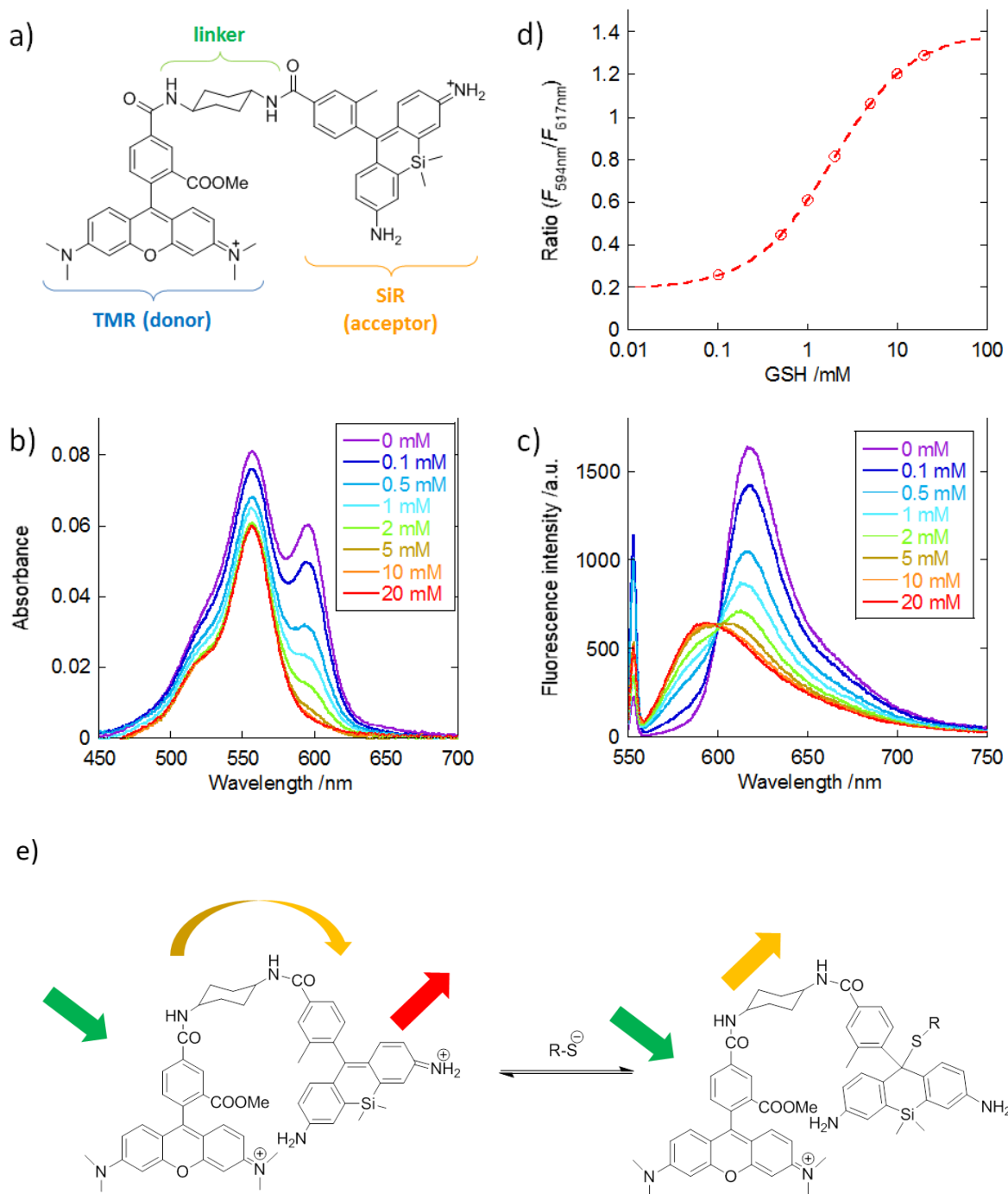


図 24: 2Me SiR600-TMR(Me)と GSH の応答性の検討

a) 2Me SiR600-TMR(Me)の構造式

b), c) 2Me SiR600-TMR(Me)の吸収・蛍光スペクトル (励起: 555 nm)

probe: 1 μ M in 0.2M リン酸バッファー (pH 7.4) DMSO 5 %

d) GSH 濃度に対するレシオ値 (594nm の蛍光強度 / 617 nm の蛍光強度) のプロット

e) 2Me SiR600-TMR(Me)において予想される FRET の概念図

上記結果をもとに 2Me SiR600-TMR(Me)を用いた細胞イメージング実験を行った。

A549（肺がん由来）細胞を用いて 1 μ M で 4 時間 incubation を行い Mitotracker との共染色を行ったところ、2Me SiR600-TMR(Me)は主としてミトコンドリアへと集積することが確認された（図 25）。

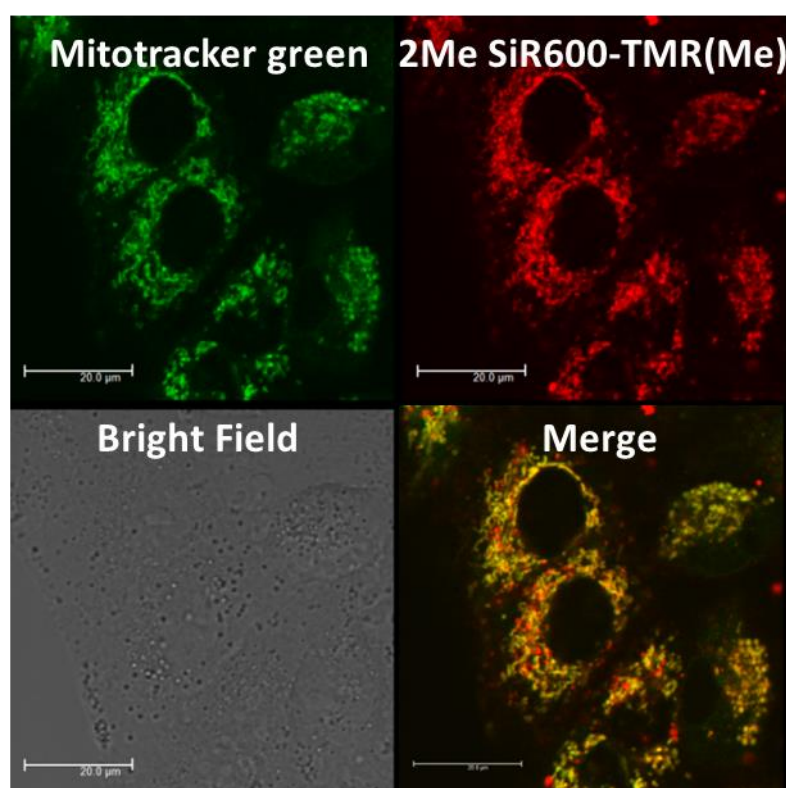


図 25: 2Me SiR600-TMR(Me)の細胞内局在

使用細胞：A549（NEM 500 μ M を添加後 20 分）

2Me SiR600-TMR(Me) 1 μ M 4 時間

Mitotracker green 100 nM 30 分

上段左：Mitotracker による蛍光像（励起：490 nm PMT1：505-535 nm）

上段右：2Me SiR600-TMR(Me)による蛍光像（励起：600nm PMT3:620-650nm）

下段左：透過像 下段右：Merge

また、2MeSiR600-TMR(Me)の細胞導入効率は比較的低めで、蛍光観察に十分な量を取り込まれるまでに 1 μ M のプローブ濃度で最低 2 時間程度の incubation が必要であった。一方で細胞内滞留性およびオルガネラ局在性は高く、時間とともにライソゾームへの集積が目立つようになるものの 12 時間以上経過してもミトコンドリアへの集積は十分観察できる状態であった。

次に細胞内 GSH 濃度の変化がこのプローブで検出できるか HCT116 細胞を用いて検証を行った。この際 TMR(Me)の蛍光波長領域を PMT1 で、2Me SiR600 の蛍光波長域を PMT3 で検出し background 値を引いた値の ratio (PMT1/PMT3) を算出し画像化した。HCT116 細胞においては核の近傍にライソゾームがまとまって存在しており、ミトコンドリアは細胞質内に均一に存在した。ミトコンドリアに集積した 2Me SiR-TMR(Me)の蛍光を測定した結果、NEM 添加により ratio 値の低下が認められ、washout 後 1 時間 incubation の後に再上昇が認められた。これは NEM による細胞内 GSH 濃度低下とそこからの回復過程を捉えているものと考えられた (図 26)。

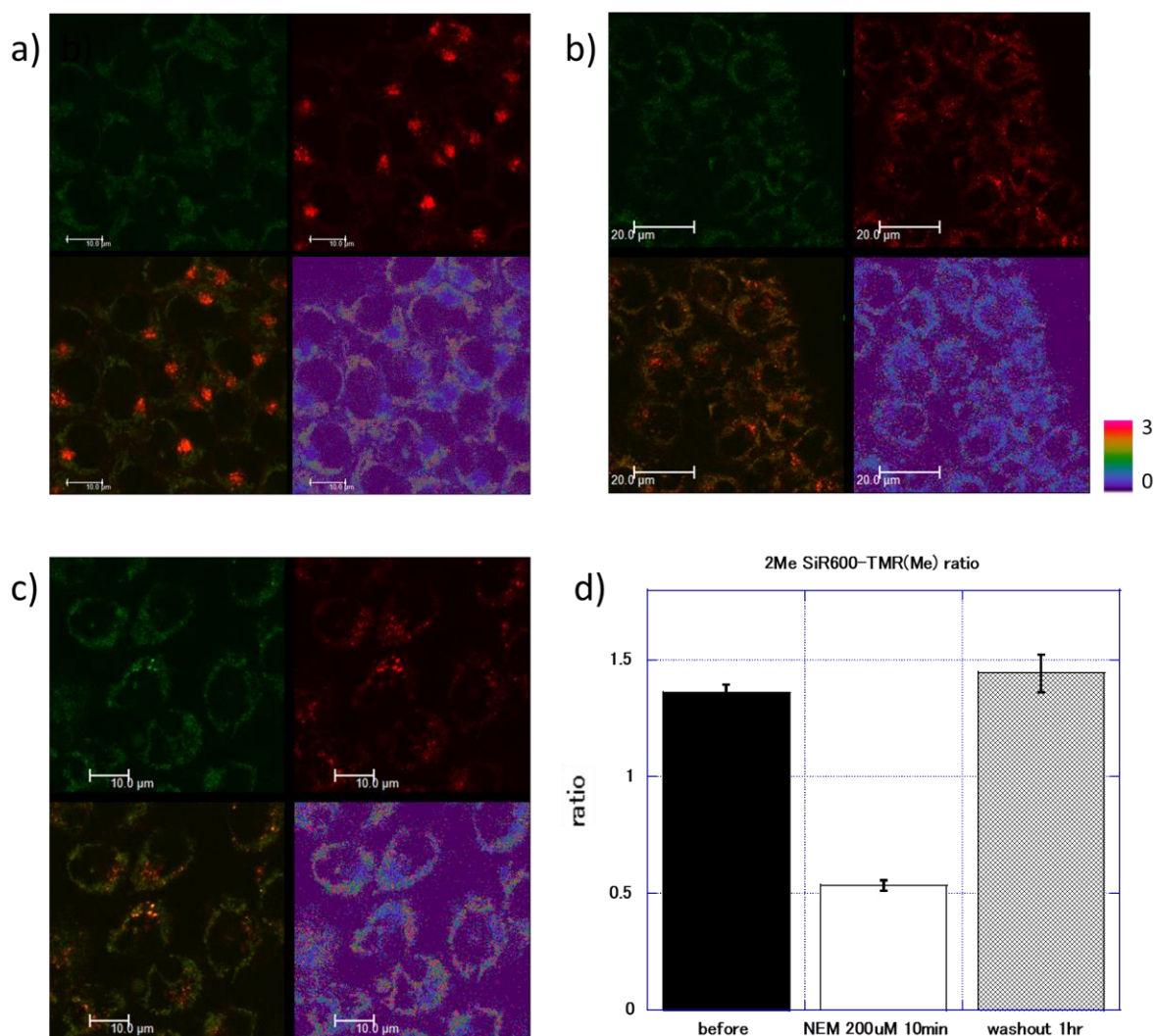


図 26: 2Me SiR600-TMR(Me)による NEM 添加による細胞内 GSH 濃度変化の検出
使用細胞: HCT116

- a)-c): 励起 540 nm 上段左: PMT1 560-590 nm (TMR(Me)の蛍光波長領域)
上段右: PMT3 615-645 nm (2Me SiR600 の蛍光波長領域)
下段左: Merge 下段右: 蛍光強度比の値の画像
- a) 2Me SiR600-TMR(Me) 1 μ M incubation 2 時間
b) NEM 200 μ M 添加後 10 分 c) washout 後 incubation 1 時間
d): a)~c)の ratio 値 (ROI 10 ヶ所の平均: error bar: SEM)

次に NEM 処理による GSH 濃度低下は不可逆的で非生理的な条件であるため、より生理的な酸化ストレスに近い実験条件として過酸化水素負荷による測定を行った。

経時的に測定を行ったところ過酸化水素投与により蛍光強度比は速やかな低下を認め、washout 後 10 分程度経過時点から回復する過程が観察された (図 27)。過酸化水素は GSH を直接的に酸化し GSSG を生じる。GSSG は図 2 で示したように細胞内のグルタチオンレダクターゼによって再び還元され GSH に戻るというサイクルが存在する (図 28)。過酸化水素を washout した後の ratio 値の回復が 10 分程度という比較的短い時間で起きているのは GSH の生合成という経路よりも主にこのグルタチオンレダクターゼの活性によるところが大きいと考えられ、生細胞において実際に機能しているであろう酸化ストレス耐性機構が検出できているものと考えられた。

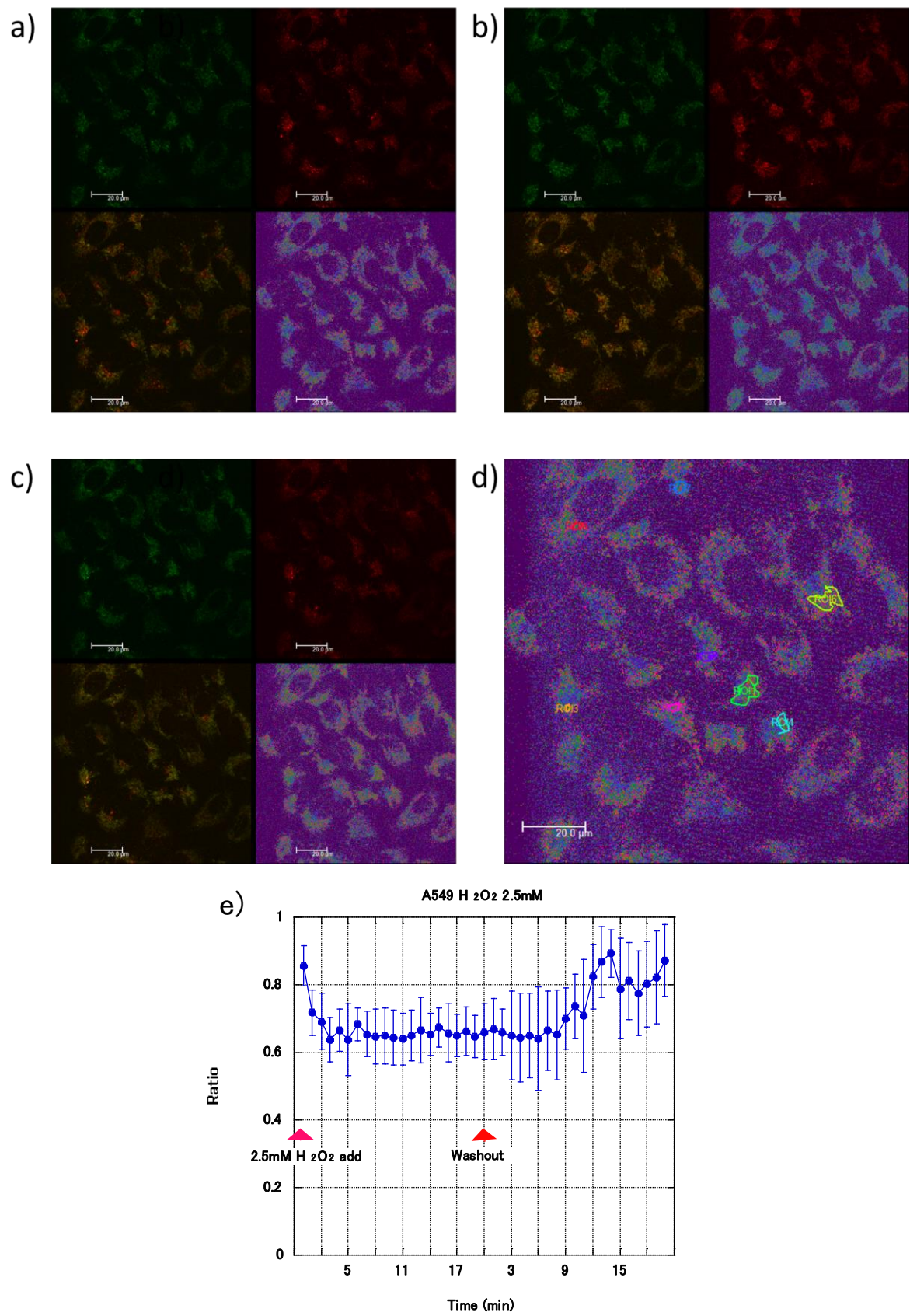


図 27: 2Me SiR600-TMR(Me)による過酸化水素添加に伴う細胞内 GSH 濃度低下および回復過程の検出

使用細胞：A549

- a)-c)：励起 540 nm 上段左：PMT1 560-590 nm (TMR(Me)の蛍光波長領域)
上段右：PMT3 615-645 nm (2Me SiR600 の蛍光波長領域)
下段左：Merge 下段右：蛍光強度比の値の画像
- a) 2Me SiR600-TMR(Me) $1\ \mu\text{M}$ incubation 6 時間
b) H_2O_2 2.5 mM 添加後 20 分 c) washout 後 incubation 20 分
d) 設定した ROI の範囲図 e) ratio 値の時間経過 (n=8 error bar: SD)

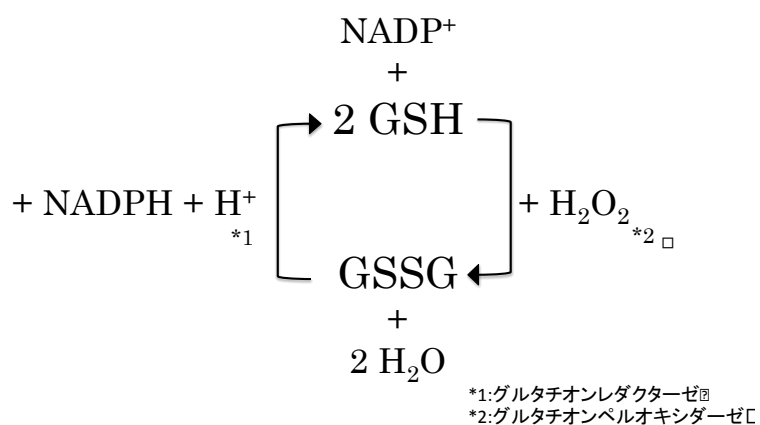


図 28: GSH と過酸化水素との反応および GSSG との酸化還元サイクル

第4章 考察

本研究においては細胞内レドックス状態の可視化を可能とするべく、細胞内の主たる還元剤である GSH をターゲットとした蛍光プローブの開発を目指した。まず既存のプローブで汎用されている DN_s 基を用いた GSH 感受性蛍光プローブとしてローダミン誘導体である HMRG を基本骨格とした DN_s-HMRG を開発した。DN_s-HMRG は DN_s 基による蛍光の消失および分子内スピロ環化という 2 つの機構で蛍光が制御されているため、GSH との反応により蛍光上昇が 7000 倍以上と非常に高いコントラストを達成できた。また DN_s-HMRG は GSH との反応性も高く、反応後速やかに蛍光上昇が見られることに加え、蛍光骨格を HMRG にしたことによって得られたスピロ環の閉環構造による脂溶性向上がもたらす高い細胞膜透過性を有する。そのためローダミングリーンをを用いた図 3-c) のプローブと異なり、チオール反応点である DN_s 基を 1 つ付加するだけで細胞イメージングが可能となっている。その結果得られた定量性によって、細胞への適用において蛍光強度の上昇速度による細胞内 GSH 濃度の差の検出が可能となり、また腹腔播種モデルマウスを用いたイメージングにおいて播種病変が明るく描出された。既存の DN_s 基を用いたプローブで GSH 濃度の差を検出したとの報告はなく、本研究の新規性・有用性を示すものと考えられた。

さらなる発展として、①時間とともに上昇するバックグラウンド蛍光の上昇、②経

時的な測定が行えない、といった DNs-HMRG の持つ問題点の克服として可逆的な蛍光制御機構を利用したプローブ開発に着手した。蛍光制御機構として xanthene 環 9 位への GSH の求核攻撃を利用することとし、2Me SiR600 においてこの反応が生理的濃度の GSH に対し可逆的かつ速やかに蛍光の ON/OFF を起こすことを見出した。これをもとに定量性の向上を狙った FRET 型プローブ 2Me SiR600-TMR(Me)を開発し、このプローブがミトコンドリアに集積し、共焦点顕微鏡を用いた細胞イメージングにおいて細胞内 GSH 濃度の経時的変化を可逆的に検出可能であることを示した。

2Me SiR600-TMR(Me)は、2Me SiR600 の xanthene 環 9 位への GSH の求核攻撃という新しい蛍光制御機構をもとにした FRET プローブである。この求核攻撃は可逆的かつ非常に速い反応であり、短い時間で変化する細胞内の GSH 濃度変化を捉えるのに適した特徴を有する。さらに検討した 2Me SiR600 における K_a 値は生理的 GSH 濃度の範囲内であり、本研究の目的達成に非常に有用な特徴であると考えられた。また、TAMRA のメチルエステル体を donor とする FRET 型のプローブにすることにより 2Me SiR600 単体に比べて定量性の向上とともにミトコンドリアへの安定した集積を得ることに成功し、過酸化水素負荷時の GSH 濃度低下およびそこから回復過程をリアルタイムに検出することに成功した。

可逆的な蛍光変化を示す蛍光プローブによる細胞イメージングの報告は過去にもあるが、酸化還元による蛍光変化に時間がかかるといった問題に加えて、蛍光の ON/OFF に GSH および過酸化水素といった酸化剤あるいは還元剤の添加を必要としており、細胞の生理的なレドックス状態を観察しているとは言い難い[27]・[28]。また蛍光を用いて細胞のレドックス状態を可逆的に検出可能なツールとしては蛍光タンパクである GFP をベースとした roGFP が挙げられるが[29]、遺伝子操作による蛋白の発現が必要という制限に加え、観察できる蛍光を得るにはプローブの過剰発現が必要であり、かつプローブそのものがレドックスサイクルを回してしまうため観察している応答がプローブの発現自体により影響を受けている可能性があるという問題が残る。一方で 2Me SiR600-TMR(Me)による蛍光強度比変化は過酸化水素による低下後、培地の washout のみで自然に回復する過程を捉えている。これは即ち細胞の持つ抗酸化力によって回復しうる程度の生理的な酸化ストレスによるレドックス状態の変化がリアルタイムに検出できている事を示しており、2Me SiR600-TMR(Me)によるレドックスイメージングが様々な病態モデルにおける酸化ストレスの関与やその機構の解明、癌の治療抵抗性の違いの検出や治療抵抗性の獲得の機構解明や治療薬剤のスクリーニングなどに広く応用できると考えられる。加えて 2Me SiR600-TMR(Me)の蛍光強度比は細胞内 GSH 濃度を直接反映している、という点も

既存のプロープにはない有用な特徴であり、細胞内 GSH の生合成・代謝サイクルが酸化ストレスに対してどのように動くのか、といった知見の集積が期待される。また癌細胞の酸化ストレス耐性に関しては GSH 以外にも GSH による転移反応の触媒酵素である GST の活性も亢進しているとの報告がなされているが、酸化ストレスに応じて GST 活性が制御されているとしてもその変化には時間がかかると考えられ、レドックスの状態がリアルタイムに検出できるという観点からも GSH をターゲットとした本プロープの利点だと考えられる。

また 2Me SiR600-TMR(Me)が集積するミトコンドリア自体には GSH を産生する能力はなく、ミトコンドリア内の GSH は細胞質から供給される[30]。その一方でミトコンドリアは細胞内における ROS の発生源であるだけでなく、ミトコンドリアが酸化ストレスを受ける事によりアポトーシスへのシグナル伝達が起きるとの報告がなされているなど、細胞のレドックスに深く関与している細胞内小器官である[31]–[33]。例えば先述の加齢性難聴に関する研究においてもカロリー制限下のモデルマウスにおいて、ミトコンドリアにおける脱アセチル化酵素である Sirt3 が GSH/GSSG 比を増加させることにより酸化ストレスによる細胞障害を抑制し、加齢性難聴の発症が抑制されるとの報告がなされている[34]。よって本プロープによってミトコンドリ

アの GSH 濃度変化をリアルタイムに測定できることは、細胞内におけるより詳細な酸化ストレス応答機構の解明に非常に有用と考えられる。

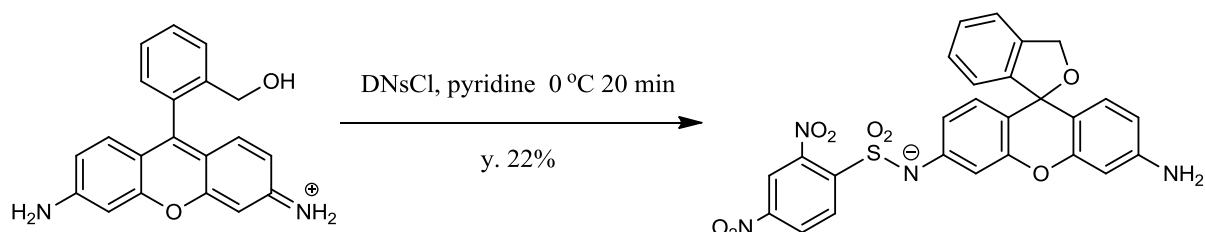
今後の展望としては、①プローブの改良による局在および GSH に対する応答性のコントロール、②in vivo イメージングへの応用、などがあげられる。①に関しては、FRET 型プローブの donor 側の蛍光色素をフルオレセイン系の化合物にしたり、水溶性の高いリンカーを用いることによって細胞質に局在させることが可能かもしれない。異なる細胞内小器官の GSH 濃度を測定する事の有用性に加え、細胞質は細胞内における GSH 産生場であり、細胞内で最も GSH が多く存在する。よって細胞質における GSH 濃度測定により細胞全体の受けている酸化ストレスの評価として汎用性が高いプローブが期待される。また、今回の実験では癌細胞におけるレドックス状態の変化を検出することができたが、神経細胞などの正常細胞においては GSH 濃度が低いため 2Me SiR600-TMR(Me)では ratio 値の変化が十分に検出できない可能性がある。このため Si-rhodamine の構造を変化させることによって GSH への反応性をコントロールし、検出できる GSH 濃度の異なるプローブ開発が必要となるかもしれない。

さらに②に関してはプローブの投与法や測定系を含めて最適化することにより **in vivo** イメージングが可能になればイメージングによる癌の検出や種々の疾患モデル動物を用いた実験が可能となりプローブの適用範囲をかなり広げることが可能となる。特に癌のイメージングについては癌の検出に留まらず、同じ癌種の中でも症例によって **GSH** 濃度が異なることが予想され、**GSH** 濃度の測定による治療抵抗性の予想といった質的なイメージングへとつながる可能性があり非常に興味深い。本研究で得られた結果をさらに発展させることにより酸化ストレスの関与する種々の疾患における病態解明や、生体におけるレドックス制御に関する知見をさらに広げる事が可能となり、実用化が期待される。

第5章 合成の部

・ DNs-HMRG の合成

以下のスキームに従って DNs-HMRG を合成した。なお、HMRG の合成については参考文献 20 に報告されており、これに従って合成を行った。



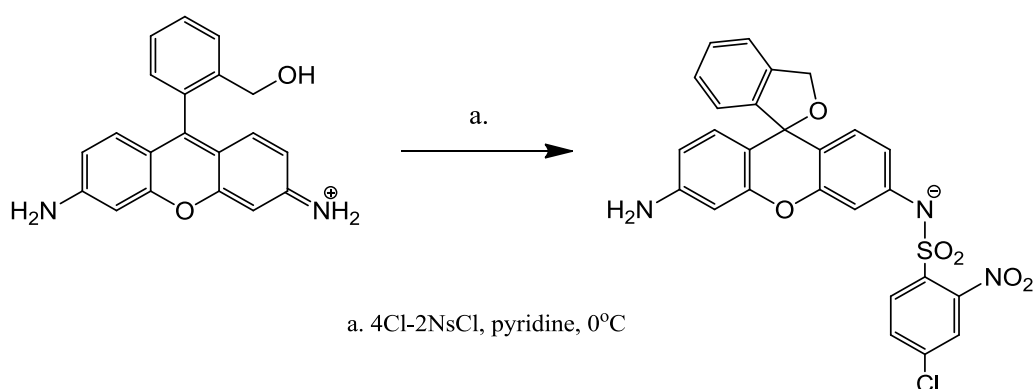
スキーム 1. DNs-HMRG の合成

HMRG(6.3 mg, 0.020 mmol)をピリジン(1 ml)に溶かし、アルゴン雰囲気下 0℃ で 2, 4-ジニトロベンゼンスルホニルクロリド(6.0 mg, 0.022 mmol, 1.1 eq)を加え、20 分間攪拌した。溶媒を減圧除去し、得られた残渣を HPLC で精製し (A/B = 90/10 to 10/90, 60 分)、目的化合物 (2.4 mg, 22 %)を赤色固体として得た。

^1H NMR (400 MHz, d -acetone): δ 8.79 (1H, d, J = 2.2 Hz), 8.60 (1H, dd, J = 2.2, 8.7 Hz), 8.35 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.43 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.36 (1H, dt, J = 1.0, 7.6 Hz), 7.25 (1H, dt, J = 1.0, 7.6 Hz), 7.16 (1H, d, J = 2.1 Hz), 6.98 (1H, dd, J = 2.2, 8.5 Hz), 6.91 (1H, d, J = 8.5 Hz), 6.78 (1H, d, J = 7.6 Hz), 6.66 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.46 (1H, d, J = 2.2 Hz), 6.40 (1H, dd, J = 2.2, 8.4 Hz), 5.24 (2H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, d -acetone): 152.0, 151.8, 151.4, 150.7, 149.4, 146.6, 140.0, 133.7, 131.0,

130.5, 129.0, 128.8, 127.9, 124.2, 124.1, 121.8, 121.5, 117.3, 114.1, 112.0, 109.7, 100.6, 84.0, 72.7; HRMS (ESI⁻) Calcd for [M-H]⁻, 545.0773; Found 545.0789 (1.6 mmu).

・ 4Cl-2Ns-HMRG の合成



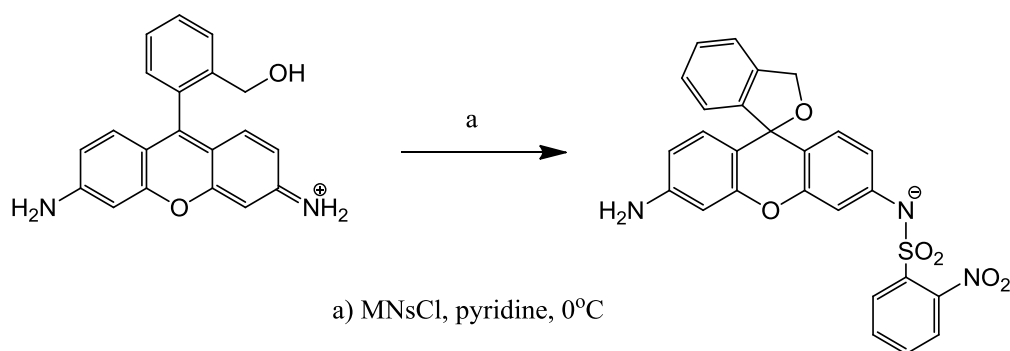
スキーム 2. 4Cl-2Ns-HMRG の合成

HMRG(6.5 mg, 0.019 mmol)をピリジン(1 ml)に溶かし、アルゴン雰囲気下、0°C で 4-クロル, 2-ニトロベンゼンスルホンクロリド(6.0 mg, 0.021 mmol, 1.1 eq)を加え、20 分間攪拌した。溶媒を減圧除去し、得られた残渣を HPLC で精製し (A/B = 90/10 to 10/90, 60 分)、目的化合物 (1.3 mg, 11.8 %)を赤色固体として得た。

¹H NMR(400 MHz, *d*-Acetone): δ 8.05-8.04 (2H, m), 7.83 (1H, dd, *J*=2.1, 8.3 Hz), 7.43 (1H, d, *J*= 7.6 Hz), 7.36 (1H, dt, *J*= 0.9, 7.3 Hz), 7.25 (1H, dt, *J*= 0.9, 7.3 Hz), 7.14 (1H, d, *J*= 2.2 Hz), 6.95 (1H, dd, *J*= 2.2, 8.5 Hz), 6.88 (1H, d, *J*= 8.5 Hz), 6.79 (1H, d, *J*= 7.6 Hz), 6.66 (1H, d, *J*= 8.4 Hz), 6.46 (1H, d, *J*= 2.2Hz) ,6.41 (1H,

dd, $J = 2.2, 8.4$ Hz), 5.24 (2H, s); HRMS (ESI⁺) Calcd for [M-H]⁺ 534.05321 Found 534.05281 (-4.0mmu).

・ MNs-HMRG の合成



スキーム 3. MNs-HMRG の合成

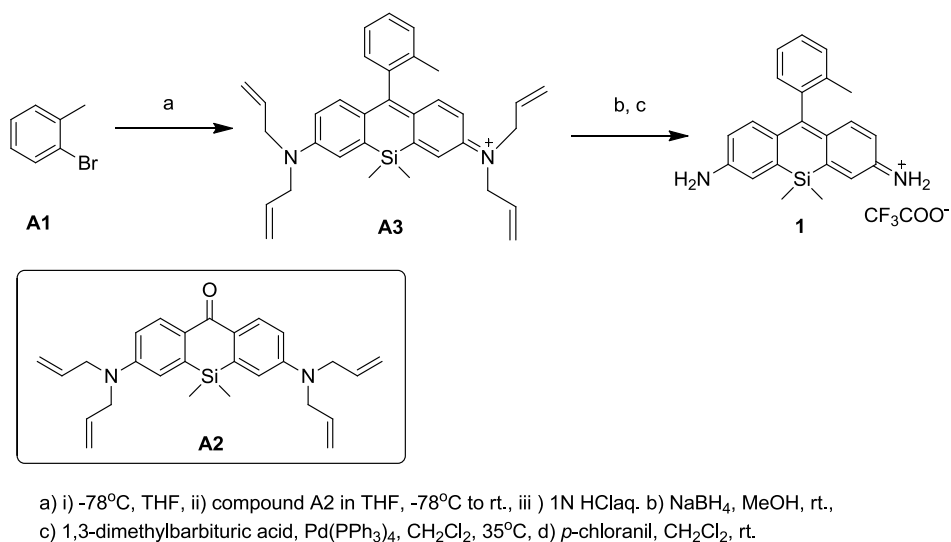
HMRG(6.5 mg, 0.020 mmol)をピリジン(1 ml)に溶かし、アルゴン雰囲気下、0°C で 2-ニトロベンゼンスルホニルクロリド(5.8 mg, 0.022 mmol, 1.1 eq)を加え、20 分間攪拌した。溶媒を減圧除去し、得られた残渣を HPLC で精製し (A/B = 90/10 to 10/90, 60 分)、目的化合物 (1.4 mg, 11.9 %)を赤色固体として得た。

¹H NMR(400 MHz, *d*-Acetone): δ 8.06 (1H, dd, $J = 1.4, 8.0$ Hz), 7.96 (1H, dd, $J = 1.4$ Hz, 8.0 Hz), 7.88 (1H, dt, $J = 1.4, 3.7$ Hz), 7.80 (1H, dt, $J = 1.4, 3.7$ Hz), 7.43 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.36 (1H, dt, $J = 0.9, 7.3$ Hz), 7.26 (1H, dt, $J = 0.9, 7.3$ Hz), 7.16 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 6.98 (1H, dd, $J = 2.2, 8.5$ Hz), 6.89 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.78 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 6.66 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.47 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 6.40 (1H, dd, $J = 2.2, 8.4$

Hz), 5.24 (2H, s); HRMS (ESI) Calcd for [M-H]⁺ 500.09218 Found 500.09253 (3.5 mmu)

・ 2Me SiR600 の合成

以下のスキーム 4 に従って 2 Me SiR600 を合成した。なお、化合物 A2 の合成については、参考文献 2 3 に報告されており、これに基づいて合成を行なった。



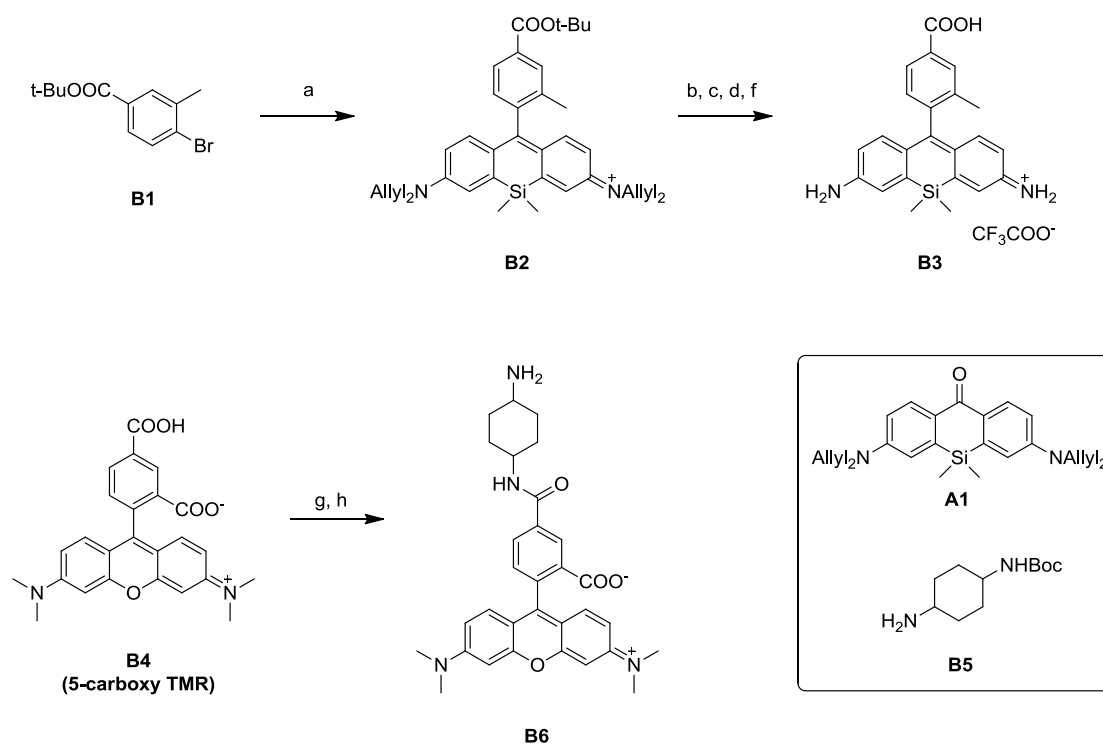
スキーム 4 2 Me SiR600 の合成

2-ブロモトルエン(化合物 A1 34.2 mg, 0.2 mmol, 6 eq) を THF(5ml)に溶かし、アルゴン雰囲気下、-78°Cで 10 分間撹拌した。1 M *sec*-ブチルリチウム シクロヘキサン/*n*-ヘキサン溶液 (0.2 ml,0.2 mmol,6 eq.) をゆっくり加え、10 分間撹拌した。化合物 A2 (14.5 mg, 0.034 mmol, 1 eq.) を THF (3 ml) に溶かして加え、-78 °C で 1 時間、室温で 2 時間撹拌した。1 N 塩酸を加えて酸性にし、次いで飽和炭酸水素ナト

リウム水溶液を加え、ジクロロメタンで 2 回抽出し、得られた有機相を飽和食塩水で洗淨し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去した。得られた残渣を HPLC で精製し (A/B = 90/10 to 10/90, 45 min)、化合物 A3 (13.3mg 73.0 %) を青色個体として得た。ついで化合物 A3 (7.7 mg, 0.014 mmol) をメタノール (5 ml) に溶かし氷浴し、次いで水素化ホウ素ナトリウムを徐々に加え、濃青色の溶液が無色になったところで水を加えて反応を終了させた。そこにジクロロメタンを加えて抽出し、有機相を水および飽和食塩水で洗淨し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去し、真空乾燥した。得られた残渣をアルゴン雰囲気下にて脱酸素ジクロロメタン (5 ml) に溶かし、これを 1,3-ジメチルバルビツール酸 (54.3 mg, 0.35 mmol, 24 eq.) およびテトラキス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (3.2 mg, 0.0028 mmol, 0.2 eq.) を含むに試験管に加え、アルゴン雰囲気下、35℃にて 60 分間攪拌した。さらにクロラニル (5.0 mg, 0.02 mmol, 1.5 eq.) を加えて室温にて 60 分間攪拌した。溶媒を減圧留去したのち、HPLC にて精製し (A/B = 90/10 to 10/90, 45 min)、目的化合物 1 (1.2 mg, 18.4 %) を青紫色固体として得た。

・ 2Me SiR600 – TMR(Me)の合成

以下のスキーム 5 および 6 に従って、2Me SiR600 – TMR(Me)を合成した。なお、化合物 B1、B5 の合成については、それぞれ参考文献[35], [36]に報告されており、これらに基づいて合成を行なった。



a) i) *sec*-BuLi, THF, -78°C, ii) compound **A1**, THF, -78°C to rt., iii) 1N HCl(aq.); b) NaBH₄, MeOH, 0°C, c) 1,3-dimethylbarbituric acid, Pd(PPh₃)₄, CH₂Cl₂, 35°C; d) chloranil, CH₂Cl₂, rt.; e) TFA, CH₂Cl₂, rt.; f) compound **F5**, TSTU, DIEA, DMF, rt.; g) TFA, CH₂Cl₂, rt.

スキーム 5 2Me SiR600-TMR(Me)の合成 1

化合物 B3 の合成

4-ブロモ-3-メチル *tert*-ブチル安息香酸(化合物 **B1** 54.2 mg, 0.2 mmol, 10 eq) を THF(3ml)に溶かし、アルゴン雰囲気下、-78 °C で 10 分間攪拌した。1 M *sec*-ブチルリチウム シクロヘキサン/*n*-ヘキサン溶液 (0.2 ml, 0.2 mmol, 10 eq.) をゆっくり

加え、10 分間攪拌した。化合物 A1 (8.6 mg, 0.02 mmol, 1 eq.) を THF (3 ml) に溶かして加え、 -78°C で 1 時間、室温で 2 時間攪拌した。1 N 塩酸を加えて酸性にし、次いで飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、ジクロロメタンで 2 回抽出し、得られた有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧除去した。得られた残渣を HPLC で精製し (A/B = 90/10 to 10/90, 45 min)、化合物 F2 (5.1 mg, 42.2 %) を青色固体として得た。ついで化合物 F2 (29.3 mg, 0.049 mmol, 1 eq.) をメタノール (10 ml) に溶かし氷浴し、次いで水素化ホウ素ナトリウムを徐々に加え、濃青色の溶液が無色になったところで水を加えて反応を終了させた。そこにジクロロメタンを加えて抽出し、有機相を水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去し、真空乾燥した。得られた残渣をアルゴン雰囲気下にて脱酸素ジクロロメタン (7 ml) に溶かし、これを 1,3-ジメチルバルビツール酸 (187.4 mg, 1.20 mmol, 24 eq.) およびテトラキス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (40.1 mg, 0.034 mmol, 0.7 eq.) を含むに試験管に加え、アルゴン雰囲気下、 35°C にて 60 分間攪拌した。さらにクロラニル (14.3 mg, 0.058 mmol, 1.2 eq.) を加えて室温にて 60 分間攪拌し、濃青色の反応液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶離液: ジクロロメタン/メタノール = 100/0 to 80/20) にて分離し、青色のフラクションを回収して溶媒を減圧留去した。残渣をジクロロメタン (5 ml) に溶か

し、トリフルオロ酢酸(5 ml)を加え室温で 2 時間攪拌した。溶媒を減圧留去したのち、HPLC にて精製し (A/B = 90/10 to 10/90, 45 min)、目的化合物 B3 (8.5 mg, 45 %) を青緑色固体として得た。

^1H NMR (MeOD): δ 8.06-8.02 (m, 2H), 7.26 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 6.97 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 6.58 (dd, J = 2.4 Hz, 9.3 Hz, 2H), 2.12 (s, 3H), 0.56 (s, 3H), 0.54 (s, 3H). ; ^{13}C NMR (MeOD) δ 170.2, 169.2, 158.6, 150.4, 144.8, 143.5, 137.6, 132.6, 132.5, 130.5, 128.1, 127.9, 124.6, 117.1, 19.4, -1.5, -1.7 ppm.

HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2\text{Si}$: 387.15233; found: 387.15225 (0.1 mDa, 0.2 ppm).

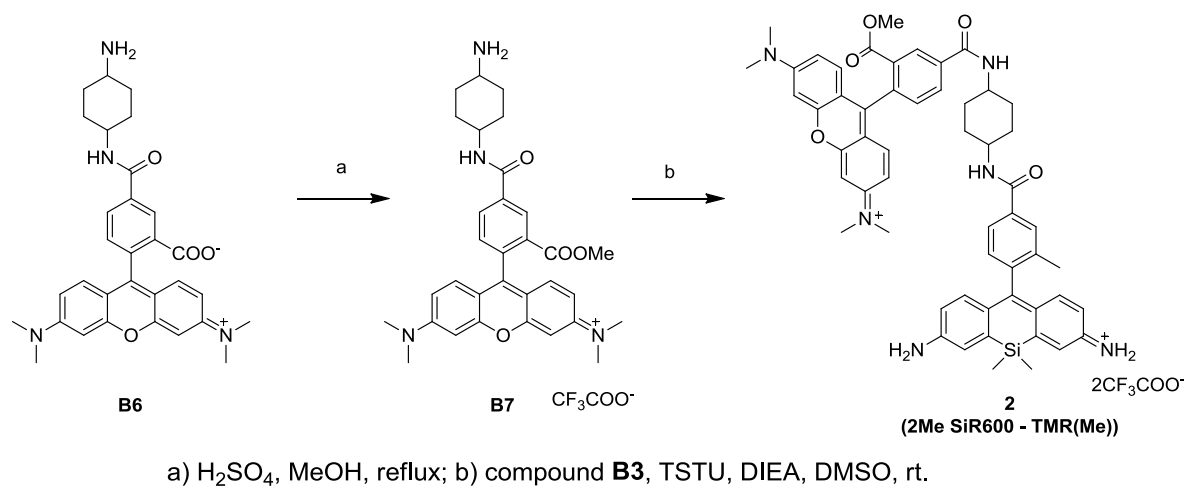
化合物 B6 の合成

5-carboxyl TMR (化合物 F5, 5.0 mg, 0.012 mmol, 1 eq) を DMF (2 ml) に溶かし *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (4.5 mg, 0.036 mmol, 3 eq) および *N,N,N,N*-テトラメチル-*O*-(*N*-スクシンイミジル) ウロニウムテトラフルオロボラート (TSTU) (5.25 mg, 0.018 mmol, 1.5 eq) を加え、攪拌した後、トランス-*N*-Boc-1,4-シクロヘキサンジアミン (化合物 B5, 3.8 mg, 0.018 mmol, 1.5 eq) を加え、アルゴン雰囲気下に室温で 1 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、真空乾燥したのち残渣をジクロロメタン (5 ml) に

溶かし、トリフルオロ酢酸 (5 ml) を加え室温にて 2 時間攪拌した。溶媒を減圧除去し、得られた残渣を HPLC で精製し (A/B = 90/10 to 10/90, 40 min)、化合物 B6 (4.5 mg, 71.0 %) を暗赤色固体として得た。

^1H NMR (MeOD): δ 8.76 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.26 (dd, J = 1.8 Hz, 8.0 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 9.5 Hz, 2H), 7.06 (dd, J = 2.4 Hz, 9.5 Hz, 2H), 7.00 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 3.99-3.98 (m, 1H), 3.31 (s, 12H), 3.18-3.13 (m, 1H), 2.18-2.16 (m, 4H), 1.65-1.55 (m, 4H).

HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_4$: 527.26528; found: 527.26265 (2.6 mDa, 5.0 ppm).



スキーム 6 2Me SiR600-TMR(Me) の合成 2

化合物 B7 の合成

化合物 B6(3.0 mg, 0.006 mmol)を脱水メタノール(5ml)に溶かし、濃硫酸を 1 滴加え、一晩加熱還流させた。反応溶液を室温まで冷却させた後溶媒を減圧留去し、真空乾燥したのち残渣を HPLC(A/B = 90/10 to 10/90, 40 min) で精製し、化合物 B7(2.8 mg, 86%)を暗赤色固体として得た。

^1H NMR (D_2O): δ 8.62 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.20 (dd, J = 1.8 Hz, 7.9 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.09 (d, J = 9.5 Hz, 2H), 6.84 (dd, J = 9.5 Hz, 2.4 Hz, 2H), 6.51 (d, J = 2.3 Hz, 2H), 4.00 – 3.95 (m, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.29 – 3.27 (m, 1H), 3.12 (s, 12H), 2.22 – 2.19 (m, 4H), 1.69-1.61 (m, 4H); ^{13}C NMR (D_2O): δ 168.2, 166.6, 157.0, 156.9, 156.7, 136.9, 135.9, 131.6, 130.9, 130.4, 130.2, 129.9, 114.1, 112.6, 96.2, 52.9, 49.2, 48.4, 40.0, 29.5, 29.0. HRMS-ESI (m/z): $[\text{M}]^+$ calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}_4$: 541.28093; found: 541.28196 (–1.0 mDa, –1.9 ppm).

・化合物 2 (2Me SiR600-TMR(Me))の合成

化合物 B7(9.0 mg, 12 μ mol, 1 eq.)および化合物 F 3 (7.2 mg, 14 μ mol, 1.2 eq.)、ヘキサフルオロリン酸 (ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ) トリピロリジノホスホニウム(PyBOP:9.8 mg, 18 μ mol, 1.5 eq.)をジメチルスルホキシド (500ul) に溶かし、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(15 ul, 88 μ mol, 7.5 eq.)を加え、室温で2時間攪拌した。反応溶液を HPLC (A/B = 90/10 to 10/90, 40 min)にて精製し、化合物 2 (6.2 mg, 46%)を暗紫色固体として得た。

^1H NMR (CD_3OD): δ 8.77 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 8.31 (dd, J = 8.0 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.84 (dd, J = 7.8 Hz, 1.3 Hz, 1H), 7.57 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.21 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 7.13 (d, J = 9.5 Hz, 2H), 7.07 (dd, J = 9.5 Hz, 2.4 Hz, 2H), 7.02 (d, J = 2.3 Hz, 2H), 6.99 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 6.58 (dd, J = 9.3 Hz, 2.5 Hz, 2H), 4.05 – 4.02 (m, 2H), 3.66 (s, 3H), 3.33 (s, 12H), 2.18 – 2.16 (m, 4H), 2.13 (s, 3H), 1.69 – 1.64 (m, 4H), 0.56 (s, 3H), 0.55 (s, 3H).; ^{13}C NMR (CD_3OD): δ 170.4 (C), 169.1 (C), 167.5 (C), 166.4 (C), 159.9 (C), 159.08 (C), 159.05 (C), 158.6 (C), 150.5 (C), 143.5 (CH), 143.3 (C), 138.0 (C), 137.9 (C), 137.5 (C), 136.5 (C), 132.7 (CH), 132.1 (CH), 131.9 (C), 131.8 (CH), 131.1 (CH), 130.4 (CH), 130.2 (CH), 128.1 (C), 125.8 (CH), 124.6 (CH), 117.0 (CH), 115.7 (CH), 114.7 (C), 97.6 (CH),

53.1 (CH₃), 50.2 (CH), 49.9 (CH), 41.0 (CH₃), 32.33 (CH₂), 32.30 (CH₂), 19.5 (CH₃),
−1.5 (CH₃), −1.7 (CH₃).; HRMS-ESI (*m/z*): [M]²⁺/2 calcd for C₅₅H₅₈N₆O₅Si:
455.21135; found: 455.21135 (0.4 mDa, 0.9 ppm).

参考文献

- [1] T. Finkel and N. J. Holbrook, "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.," *Nature*, vol. 408, no. 6809, pp. 239–47, Nov. 2000.
- [2] M. T. Lin and M. F. Beal, "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases.," *Nature*, vol. 443, no. 7113, pp. 787–95, Oct. 2006.
- [3] B. S. Berlett and E. R. Stadtman, "Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 33, pp. 20313–20316, Aug. 1997.
- [4] J. Emerit, M. Edeas, and F. Bricaire, "Neurodegenerative diseases and oxidative stress.," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 58, no. 1, pp. 39–46, Jan. 2004.
- [5] J. E. Klaunig and L. M. Kamendulis, "The role of oxidative stress in carcinogenesis.," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 44, pp. 239–67, Jan. 2004.
- [6] A. Russo, W. Degraff, N. Friedman, and J. B. Mitchell, "Selective Modulation of Glutathione Levels in Human Normal versus Tumor Cells and Subsequent Differential Response to Chemotherapy Drugs Selective Modulation of Glutathione Levels in Human Normal versus Tumor Cells and Subsequent Differential Response to," *Cancer Res.*, vol. 46, pp. 2845–2848, 1986.
- [7] J. M. Estrela, A. Ortega, and E. Obrador, "Glutathione in Cancer Biology and Therapy," *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, vol. 43, no. 2, pp. 143–181, Oct. 2006.
- [8] S. Someya, J. Xu, K. Kondo, D. Ding, R. J. Salvi, T. Yamasoba, P. S. Rabinovitch, R. Weindruch, C. Leeuwenburgh, M. Tanokura, and T. A. Prolla, "Age-related hearing loss in C57BL/6J mice is mediated by Bak-dependent mitochondrial apoptosis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 46, pp. 19432–7, Nov. 2009.

- [9] T. Ishimoto, O. Nagano, T. Yae, M. Tamada, T. Motohara, H. Oshima, M. Oshima, T. Ikeda, R. Asaba, H. Yagi, T. Masuko, T. Shimizu, T. Ishikawa, K. Kai, E. Takahashi, Y. Imamura, Y. Baba, M. Ohmura, M. Suematsu, H. Baba, and H. Saya, "CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth.," *Cancer Cell*, vol. 19, no. 3, pp. 387–400, Mar. 2011.
- [10] Y. Urano, "Novel live imaging techniques of cellular functions and in vivo tumors based on precise design of small molecule-based 'activatable' fluorescence probes.," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 16, no. 5–6, pp. 602–8, Dec. 2012.
- [11] E. W. Miller and C. J. Chang, "Fluorescent probes for nitric oxide and hydrogen peroxide in cell signaling.," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 11, no. 6, pp. 620–5, Dec. 2007.
- [12] A. Meister and M. E. Anderson, "Glutathione," *Ann. Rev. Biochem.*, vol. 52, pp. 711–60, Jan. 1983.
- [13] F. Q. Schafer and G. R. Buettner, "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple.," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 30, no. 11, pp. 1191–212, Jun. 2001.
- [14] A. Pastore, G. Federici, E. Bertini, and F. Piemonte, "Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification," *Clin. Chim. Acta*, vol. 333, pp. 19–39, Jul. 2003.
- [15] H. Peng, W. Chen, Y. Cheng, L. Hakuna, R. Strongin, and B. Wang, "Thiol reactive probes and chemosensors.," *Sensors (Basel)*, vol. 12, no. 11, pp. 15907–46, Jan. 2012.
- [16] J. Lu, Y. Song, W. Shi, X. Li, and H. Ma, "A long-wavelength fluorescent probe for imaging reduced glutathione in live cells," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 161, no. 1, pp. 615–620, Jan. 2012.

- [17] X. Li, S. Qian, Q. He, B. Yang, J. Li, and Y. Hu, "Design and synthesis of a highly selective fluorescent turn-on probe for thiol bioimaging in living cells.," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 8, no. 16, pp. 3627–30, Aug. 2010.
- [18] S.-Q. Wang, Q.-H. Wu, H.-Y. Wang, X.-X. Zheng, S.-L. Shen, Y.-R. Zhang, J.-Y. Miao, and B.-X. Zhao, "A novel pyrazoline-based selective fluorescent probe for detecting reduced glutathione and its application in living cells and serum.," *Analyst*, vol. 138, no. 23, pp. 7169–74, Dec. 2013.
- [19] J. Bouffard, Y. Kim, T. M. Swager, R. Weissleder, and S. a Hilderbrand, "A highly selective fluorescent probe for thiol bioimaging.," *Org. Lett.*, vol. 10, no. 1, pp. 37–40, Jan. 2008.
- [20] J. Zhang, A. Shibata, M. Ito, S. Shuto, Y. Ito, B. Mannervik, H. Abe, and R. Morgenstern, "Synthesis and characterization of a series of highly fluorogenic substrates for glutathione transferases, a general strategy.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 35, pp. 14109–19, Sep. 2011.
- [21] A. Shibata, K. Furukawa, H. Abe, S. Tsuneda, and Y. Ito, "Rhodamine-based fluorogenic probe for imaging biological thiol.," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 18, no. 7, pp. 2246–9, Apr. 2008.
- [22] M. Sakabe, D. Asanuma, M. Kamiya, R. J. Iwatate, K. Hanaoka, T. Terai, T. Nagano, and Y. Urano, "Rational design of highly sensitive fluorescence probes for protease and glycosidase based on precisely controlled spirocyclization.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 1, pp. 409–14, Jan. 2013.
- [23] 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, "Rapid cancer detection by topically spraying a γ -glutamyltranspeptidase-activated fluorescent probe.," *Sci. Transl. Med.*, vol. 3, no. 110, p. 110ra119, Nov. 2011.
- [24] Y. Koide, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Terai, and T. Nagano, "Evolution of group 14 rhodamines as platforms for near-infrared fluorescence probes

- utilizing photoinduced electron transfer.," *ACS Chem. Biol.*, vol. 6, no. 6, pp. 600–8, Jun. 2011.
- [25] Y. Kushida, K. Hanaoka, T. Komatsu, T. Terai, T. Ueno, K. Yoshida, M. Uchiyama, and T. Nagano, "Red fluorescent scaffold for highly sensitive protease activity probes.," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 22, no. 12, pp. 3908–11, Jun. 2012.
- [26] 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, "Development of azo-based fluorescent probes to detect different levels of hypoxia.," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 52, no. 49, pp. 13028–32, Dec. 2013.
- [27] K. Xu, M. Qiang, W. Gao, R. Su, N. Li, Y. Gao, Y. Xie, F. Kong, and B. Tang, "A near-infrared reversible fluorescent probe for real-time imaging of redox status changes in vivo," *Chem. Sci.*, vol. 4, no. 3, p. 1079, Feb. 2013.
- [28] B. Wang, P. Li, F. Yu, P. Song, X. Sun, S. Yang, Z. Lou, and K. Han, "A reversible fluorescence probe based on Se-BODIPY for the redox cycle between HClO oxidative stress and H₂S repair in living cells.," *Chem. Commun. (Camb)*, vol. 49, no. 10, pp. 1014–6, Feb. 2013.
- [29] G. T. Hanson, R. Aggeler, D. Oglesbee, M. Cannon, R. A. Capaldi, R. Y. Tsien, and S. J. Remington, "Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 13, pp. 13044–53, Mar. 2004.
- [30] M. Marí, A. Morales, A. Colell, C. García-Ruiz, N. Kaplowitz, and J. C. Fernández-Checa, "Mitochondrial glutathione: features, regulation and role in disease.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1830, no. 5, pp. 3317–28, May 2013.
- [31] J. Nunnari and A. Suomalainen, "Mitochondria: in sickness and in health.," *Cell*, vol. 148, no. 6, pp. 1145–59, Mar. 2012.

- [32] M. T. Lin and M. F. Beal, "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases.," *Nature*, vol. 443, no. 7113, pp. 787–95, Oct. 2006.
- [33] M. Marí, A. Morales, A. Colell, C. García-Ruiz, N. Kaplowitz, and J. C. Fernández-Checa, "Mitochondrial glutathione: features, regulation and role in disease.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1830, no. 5, pp. 3317–28, May 2013.
- [34] S. Someya, W. Yu, W. C. Hallows, J. Xu, J. M. Vann, C. Leeuwenburgh, M. Tanokura, J. M. Denu, and T. A. Prolla, "Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction.," *Cell*, vol. 143, no. 5, pp. 802–12, Nov. 2010.
- [35] A. Smeets, P. Willot, J. De Winter, P. Gerbaux, T. Verbiest, and G. Koeckelberghs, "End Group-Functionalization and Synthesis of Block-Copolythiophenes by Modified Nickel Initiators," *Macromolecules*, vol. 44, no. 15, pp. 6017–6025, Aug. 2011.
- [36] K. Caron, V. Lachapelle, and J. W. Keillor, "Dramatic increase of quench efficiency in 'spacerless' dimaleimide fluorogens.," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 9, no. 1, pp. 185–97, Jan. 2011.

謝辞

本研究を進めるにあたり、大学院に進学しての基礎研究への従事という貴重な機会を与えて下さった東京大学大学院医学系研究科 耳鼻咽喉科学教室 山嵜達也教授に謹んで御礼申し上げます。

また、本研究に際して直接の御指導をして下さった東京大学大学院医学系研究科 生体情報学教室 浦野泰照教授、生体情報学教室 神谷真子助教に深謝致します。

さらに本研究の遂行にご尽力くださった生体情報学教室 梅澤啓太郎特任研究員をはじめ生体情報学教室の皆様、耳鼻咽喉科学教室の皆様に厚く感謝申し上げます。