

# 博士論文

論文題目

GSTP1 選択的活性検出蛍光プローブの開発と  
その応用

氏名 森 雅矢

## 目次

略号.....	3
第1章 序論.....	4
第1節 光誘起電子移動を設計原理とした蛍光プローブについて.....	4
第2節 蛍光プローブを用いたがん細胞の検出.....	6
第4節 GSTP1 選択的活性検出蛍光プローブの開発.....	8
第2章 Ps-TAc を用いた細胞応用.....	17
第1節 4-NH <sub>2</sub> -2-Me-TokyoGreen の合成手法の確立.....	18
第2節 GSTP1 発現がん細胞の検出.....	26
第3節 がん細胞と正常細胞の識別.....	29
第4節 DAC 処理したがん細胞のライブイメージング.....	31
第5節 小括.....	36
第3章 TM および CF を母核とした蛍光プローブの開発.....	38
第1節 Ps-TM および Ps-CF の合成.....	39
第2節 Ps-TM および Ps-CF を用いたライブセルイメージング.....	42
第3節 新たに見出した Ps-CF の分光特性.....	45
第4節 Ps-CF を用いた細胞応用.....	49
第5節 小括.....	54
第4章 総括.....	55
実験の項目.....	56
参考文献.....	69
謝辞.....	72

## 略号

AcOEt: Ethyl acetate

CF: Carbofluorescein

DAC: Dacogen

DDQ: 2,3-dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinone

DCM: Dichloromethane

DMF: *N,N*-dimethylformaldehyde

DMSO: Dimethyl sulfoxide

EWG: electron withdrawing group

GST: Glutathione S-transferase

HOMO: Highest occupied molecular orbital

LUMO: Lowest unoccupied molecular orbital

MOM: methoxymethyl

NBS: *N*-bromosuccinimide

PCC: Pyridinium chlorochromate

PeT: Photoinduced electron transfer

PI; Propidium Iodide

PPA: Polyphosphoric acid

*sec*-BuLi: secondary Butyl lithium

TBAF: Tetra-*n*-butylammonium fluoride

TBS: Tert-butyl dimethylsilyl

TFA: Trifluoroacetic acid

TG: TokyoGreen

THF: tetrahydrofuran

TM: TokyoMagenta

WSCD•HCl: Water-Soluble Carbodiimide hydrochloride

# 第 1 章 序論

## 第 1 節 光誘起電子移動を設計原理とした蛍光プローブについて

生体内に存在する多種多様な分子について、その機能や役割を明らかにすることは生命科学現象の理解において重要である。生体内における特定の分子を可視化することのできる分子イメージング法は、生命科学研究において欠くことのできないものである。その分子イメージング法の一つに蛍光プローブを用いた蛍光イメージング法がある。これは、観測対象の分子を捉えて蛍光特性の変化する蛍光プローブを用いて、生体内の観測対象分子を検出するものである。1980年に R. Tsien がカルシウムイオンに対する蛍光プローブ<sup>1</sup>を開発したのを発端に、マグネシウムや亜鉛に対する蛍光プローブ<sup>2,3</sup>が開発された。しかしながら、蛍光プローブの開発に関する具体的な分子設計法は 2000 年代になるまで確立されることはなかった。

### 光誘起電子移動 (Photoinduced electron transfer: PeT) に基づく蛍光の制御機構

2001 年に田中らは、光誘起電子移動 (PeT: Photoinduced electron transfer) により蛍光分子の蛍光が制御されることを見出し、蛍光プローブの蛍光制御機構として PeT を作動原理とした一重項酸素検出蛍光プローブ DMAX を開発した<sup>4</sup>。また、2004 年に上野らは、蛍光プローブを、蛍光を発する蛍光団とその蛍光を制御する蛍光制御団に分け、蛍光制御団から蛍光団に電子移動する a-PeT (acceptor-excited PeT)、蛍光団から蛍光制御団に電子移動する d-PeT (donor-excited PeT) の 2 種類に分類した<sup>5</sup>。具体的には、a-PeT では励起状態において、電子密度の高い蛍光制御団の HOMO から蛍光団の HOMO に対して電子移動することで蛍光が制御されているが、蛍光制御団の構造変化に伴う電子密度および HOMO の低下により a-PeT が解除されて強い蛍光を発するようになる〔図 1-1-1〕。一方、d-PeT では励起状態において、蛍光団の LUMO から電子密度の低い蛍光制御団の LUMO に対して電子移動することで蛍光が制御されているが、蛍光制御団の構造変化に伴う電子密度および LUMO の上昇により d-PeT が解除されて強い蛍光を発するようになる。これらの研究から、蛍光制御機構として PeT を

作動原理とした蛍光プローブの分子設計法が確立し、三酸化窒素や次亜塩素酸といった小分子有機化合物に対する蛍光プローブ<sup>6,7</sup>や、 $\beta$ -ガラクトシダーゼやグルタチオン S-転移酵素（GST）といった酵素に対する蛍光プローブ<sup>8,9</sup>、などが開発されている。

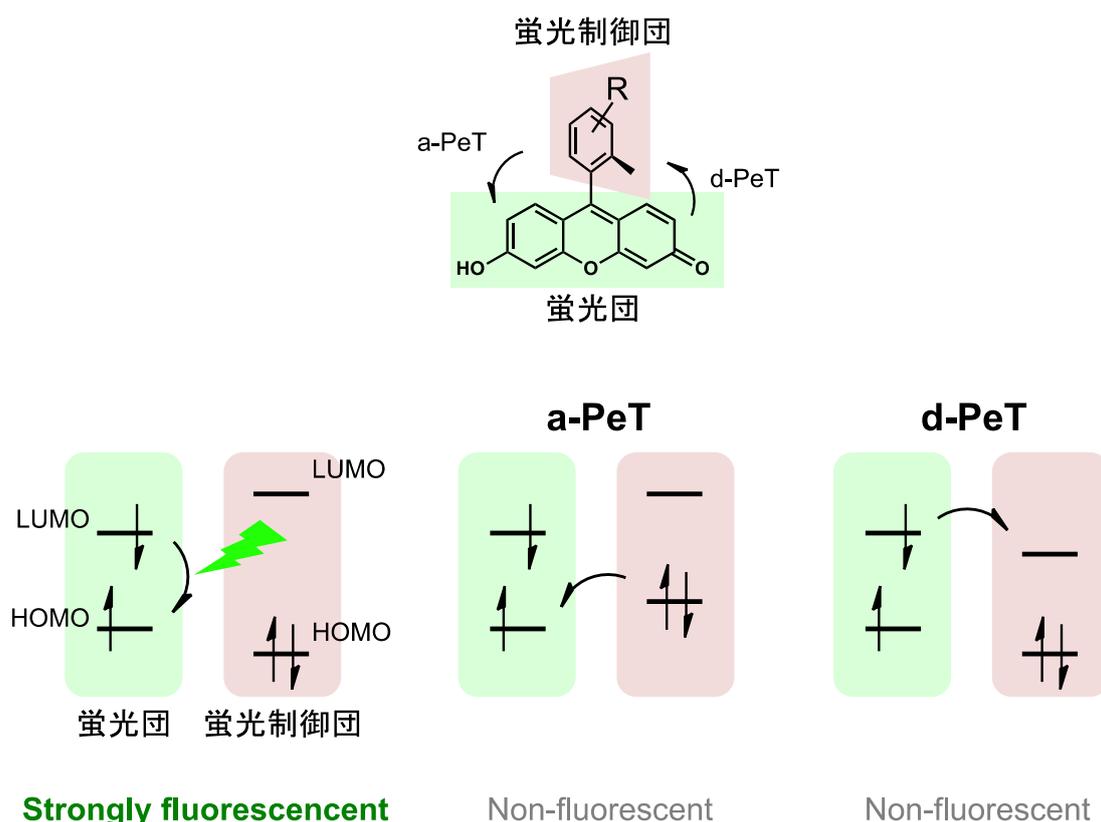


図 1-1-1 a-PeT および d-PeT により蛍光制御機構の概略図<sup>5</sup>

### 分子内スピロ環化反応に基づく蛍光の制御機構

また、蛍光の制御機構として蛍光を發さないラクトン型と蛍光を發するキサントン型の平衡反応（分子内スピロ環化反応）を作動原理とした蛍光プローブの開発が行われている。実際に、蛍光の制御機構として分子内スピロ環化反応を作動原理とした分子設計法が確立され、 $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ（GGT;  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase）や $\beta$ -ガラクトシダーゼに対する蛍光プローブが開発されている<sup>10,11</sup>。このように、蛍光プローブの分子設計法が確立され、現在までに様々な蛍光プローブが開発されている。

## 第2節 蛍光プローブを用いたがん細胞の検出

がんの治療や診断において、がん細胞を検出することは重要である。特に迅速ながんの検出法の開発は、がんの取り残しを防ぎ、がんの再発や予後の改善につながるとして期待されている。現在がんの病理診断で汎用されているヘマトキシリン・エオジン (Hematoxylin-Eosin; HE) 染色法では、サンプル標本を用意するために固定、脱水や染色等、一週間程度の期間を要し、顕微鏡を用いて細胞の形状の差異からがん細胞と正常細胞を識別する。一方、近年注目されているがん細胞の検出手法の一つに蛍光プローブを用いた蛍光イメージング法がある。浦野らは、がん細胞で高発現している酵素 GGT の有するペプチダーゼ活性依存的に加水分解反応を受けて強蛍光性のヒドロキシメチルローダミングリーン (HMRG) となる  $\gamma$ -glutamyl hydroxymethyl rhodamine green (gGlu-HMRG) を用いてがん細胞を検出できることを示し、がん細胞で高発現する酵素に対する蛍光プローブを用いた蛍光イメージング法が、迅速かつ高感度ながん細胞の検出において有用であることを示した [図 1-2-1 (A)]<sup>10</sup>。その後、 $\beta$ -ガラクトシダーゼやヘキソサミニダーゼ、カルボキシペプチダーゼといったがん細胞で高発現する酵素に対する蛍光プローブが開発され、これらの蛍光プローブを用いてがん細胞を検出できることが示されている<sup>11-13</sup>。さらに、岩立らは、蛍光イメージング法における励起・蛍光波長の異なる蛍光色素を同時に識別することのできるマルチカラーイメージングに着目し、異なる 2 種類のペプチダーゼの活性をそれぞれ検出することのできる蛍光プローブ Z-Phe-Arg-HMRG (緑色蛍光)<sup>14</sup> と gGlu-HMJCR (赤色蛍光)<sup>15</sup> を用いてマウスに播種した 2 種類の異なるがん細胞を同時に識別できることを示した [図 1-2-1 (B)]。

このように、がん細胞の検出において、蛍光プローブを用いた蛍光イメージング法は有用であり、実際にヒトのがん検体に対する臨床応用も行われている<sup>16,17</sup>。

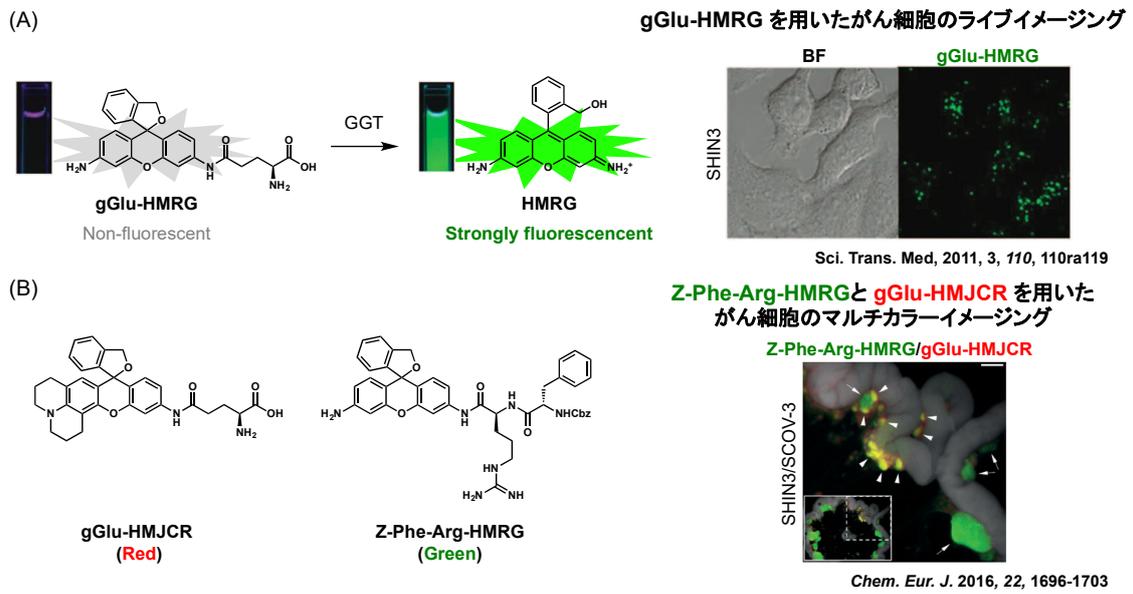


図 1-2-1 (A) GGT 活性検出蛍光プローブ gGlu-HMRG の化学反応式および SHIN3 に対するライブセルイメージング画像, (B) Z-Phe-Arg-HMRG (緑) および gGlu-HMJCR (赤) の構造式, SHI3 および SCOV を播種したマウスに対するマルチカラーイメージング画像

## 第4節 GSTP1 選択的活性検出蛍光プローブの開発

本節では、修士論文にて行なった内容の概要を記載した(2017年度 修士論文).

薬物代謝酵素の一つであるグルタチオン S-転移酵素 (GST) は、親電子性部位を有する毒物や代謝産物に対して還元型グルタチオン (GSH) の抱合反応を触媒し、Alpha, Mu, Pi などのクラスに分類される. その中でも Pi クラスである GSTP1 は、前立腺がんや一部のがん細胞を除き、多くのがん組織<sup>18-22</sup>やがん細胞<sup>23</sup>で過剰発現している [図 1-3-1 (A, B)]. また、GSTP1 は分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼの一つである JNK (c-jun-N-terminal kinase) とタンパク質複合体を形成し、JNK の活性化を阻害することでアポトーシスを抑制する<sup>24</sup>. このアポトーシスの抑制は抗がん剤に対する治療抵抗性に寄与していると考えられている. しかしながら、これまで臨床研究において、がん罹患患者のがん組織における GSTP1 の発現量と予後に相関関係があることが示されているものの<sup>25-27</sup>、詳細な因果関係については未だ不明である.

一方、GSTP1 をほとんど発現していない前立腺がん細胞や一部のがん細胞では、GSTP1 のプロモーター領域が高頻度にメチル化されている<sup>28</sup>. こういった GSTP1 非発現がん細胞に対して、DNA メチル化阻害剤である 5-アザ-2'-デオキシシチジン (DAC) やプロカインアミド、クルクミンを処理するとプロモーター領域の脱メチル化により GSTP1 が発現するようになる<sup>29-31</sup> [図 1-3-1 (C)]. そのため、DNA メチル化阻害剤により誘導されたエピジェネティックな変化の指標として、GSTP1 発現が有用であることが報告されている<sup>32</sup>.

上述したように、多くのがん細胞で高発現する GSTP1 は腫瘍マーカーとして期待されている. また、前立腺がん細胞をはじめとするエピジェネティックな制御により GSTP1 をほとんど発現していないがん細胞では、DNA メチル化阻害剤により誘導されたエピジェネティックな変化の指標として GSTP1 発現が有用であることが示されている. これらのことから、GSTP1 活性を選択的に検出する蛍光プローブを用いた蛍光イメージング法は、がん細胞の迅速な検出や GSTP1 非発現がん細胞において DNA メチル化阻害剤により誘導されたエピジェネティックな変化の検出が期待できる. これまでに DNAT-Me<sup>9</sup> や DN<sub>s</sub>-CV<sup>33</sup>, P-GST<sup>34</sup> といった GST 活性検出蛍光プローブが開発されているものの、細胞内 GSTP1 活性の選択的な検出が困難であることが問題であった. そこで、GSTP1 活性を選択的に検出することのできる新規蛍光プローブ Ps-TAc を開発した (森

修士論文).

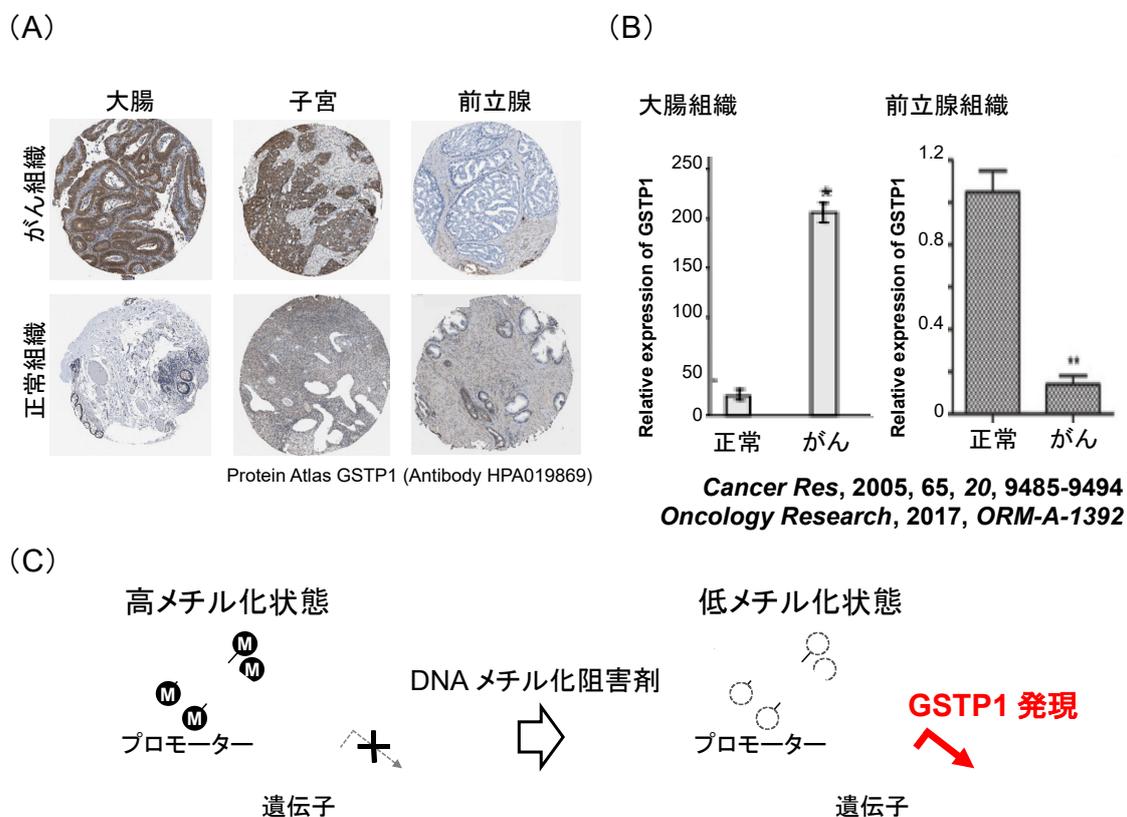
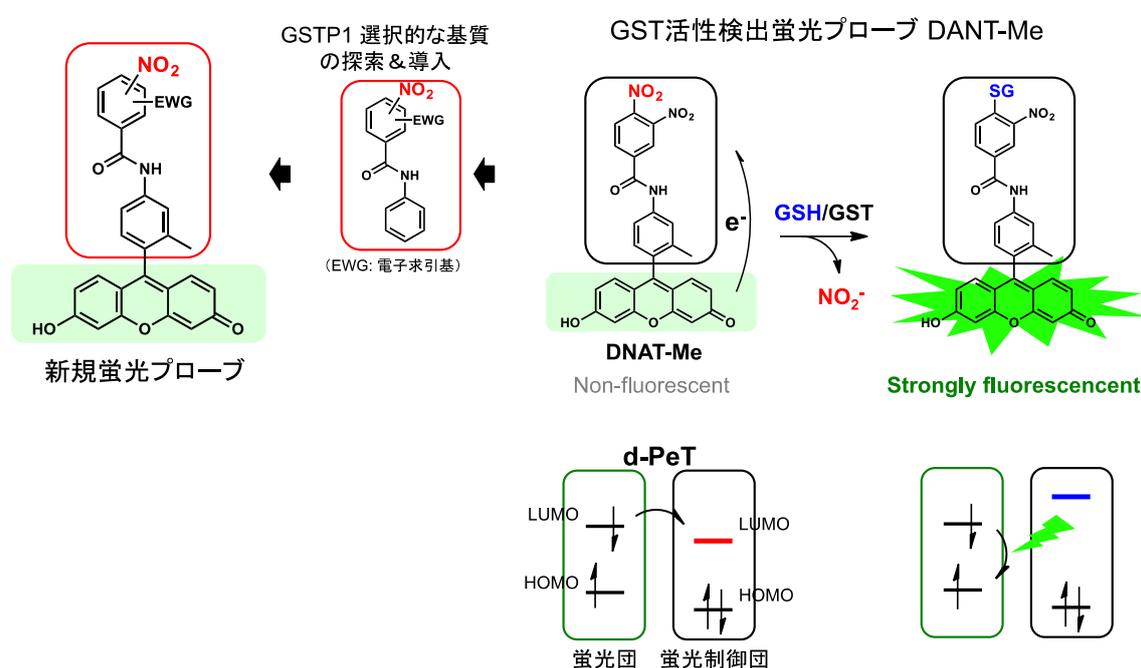


図 1-3-1 (A) ヒトの大腸, 子宮, 前立腺のがん組織および正常組織に対する GSTP1 の免疫組織化学染色画像, (B) ヒトの大腸, 子宮, 前立腺のがん組織および正常組織における GSTP1 発現量のウェスタン・ブロッティング解析, (C) GSTP1 非発現がん細胞において, DNA メチル化阻害剤により誘導されたエピジェネティックな変化により GSTP1 発現の抑制が解除される概略図

藤川らにより開発された GST 活性検出蛍光プローブ DNAT-Me<sup>9</sup> は, d-PeT により蛍光が制御されている. GST 依存的な芳香族求核置換反応により蛍光制御団のニトロ基がグルタチオンに置換されることで, 蛍光制御団の電子密度および LUMO の上昇により d-PeT が解除されて強い蛍光を発する. もし, この脱ニトロ化反応を GSTP1 選択的にすることができれば, GSTP1 活性を選択的に検出することのできる蛍光プローブの開発が期待できる. つまり, GSTP1 選択的に

グルタチオン抱合反応を受ける芳香族ニトロ化合物を DNAT-Me の蛍光制御団に組み込むというのが GSTP1 選択的活性検出蛍光プローブの開発における戦略である [図 1-3-2]. しかしながら, これまでに GSTP1 選択的にグルタチオン抱合反応を受ける芳香族ニトロ化合物の報告例が皆無であったため, GSTP1 選択的に脱ニトロ化される芳香族ニトロ化合物の探索および得られた構造を蛍光制御団に組み込んだ新規 GSTP1 選択的活性検出蛍光プローブの合成・評価を行った.



JACS, 2008, 44, 14533-14543

図 1-3-2 GST 活性検出蛍光プローブ DNAT-Me の GST 依存的なグルタチオン抱合反応の化学反応式と d-PeT に基づく蛍光特性の変化, および新規 GSTP1 選択的活性検出蛍光プローブの開発戦略

## GSTP1 選択的基質の探索

ベンズアニリドの 2 位あるいは 4 位にニトロ基, S<sub>N</sub>Ar 反応による脱ニトロ化反応に必要な電子求引基 (EWG; electron withdrawing group) を有する 7 種類の化合物を合成した. 合成した化合物の脱ニトロ化反応について各 GST 分子種選

択性を評価するため、pH7.4 のリン酸ナトリウム緩衝液中（100 mM）にて、合成した芳香族ニトロ化合物（50  $\mu$ M, 1% DMSO），GSH（1 mM），各 GST 分子種（GSTA1, GSTM1, GSTP1 それぞれ 5.0  $\mu$ g/mL）存在下における吸収スペクトルの経時変化を測定した．その結果，GSH/GSTP1 存在下においてのみ吸収スペクトルが変化する芳香族ニトロ化合物として 5-メシル-2-ニトロベンズアニリドを見出した [図 1-3-3]．

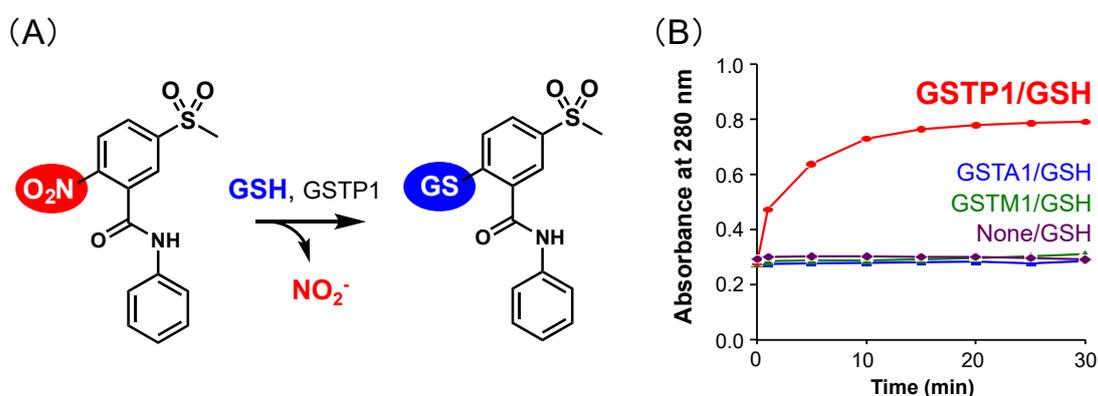
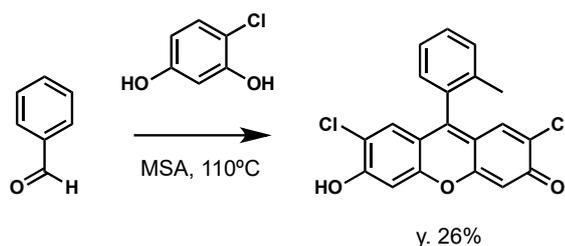


図 1-3-3 (A) GSTP1 依存的なグルタチオン抱合反応を受けるヒット化合物の化学反応式，(B) GSH および各 GST 分子種 (GSTA1, GSTM1, GSTP1) 存在下，ヒット化合物の最大吸収波長 280 nm における吸光度の経時変化

## GSTP1 選択的活性検出蛍光プローブの合成

続いて，見出した GSTP1 選択的基質を蛍光制御団とした新規蛍光プローブ **Ps-TG** の合成を行った．その際，**Ps-TG** の合成中間体である **4-NH<sub>2</sub>-2-Me-TokyoGreen (6)** の合成について，Cook らにより報告された手法 [スキーム 1-3-1]<sup>35</sup> を参照した．Cook らはメタンスルホン酸中で 4-クロロレゾロシノールと 2-メチルベンズアルデヒドを加熱することで，2',7'-ジクロロ-TokyoGreen を合成できることを示した．そこで，2-メチル-4-ニトロベンズアルデヒド (**3**) とレゾロシノール (**4**) から **2-Me-4-NO<sub>2</sub>-TokyoGreen (5)** の合成を行った．



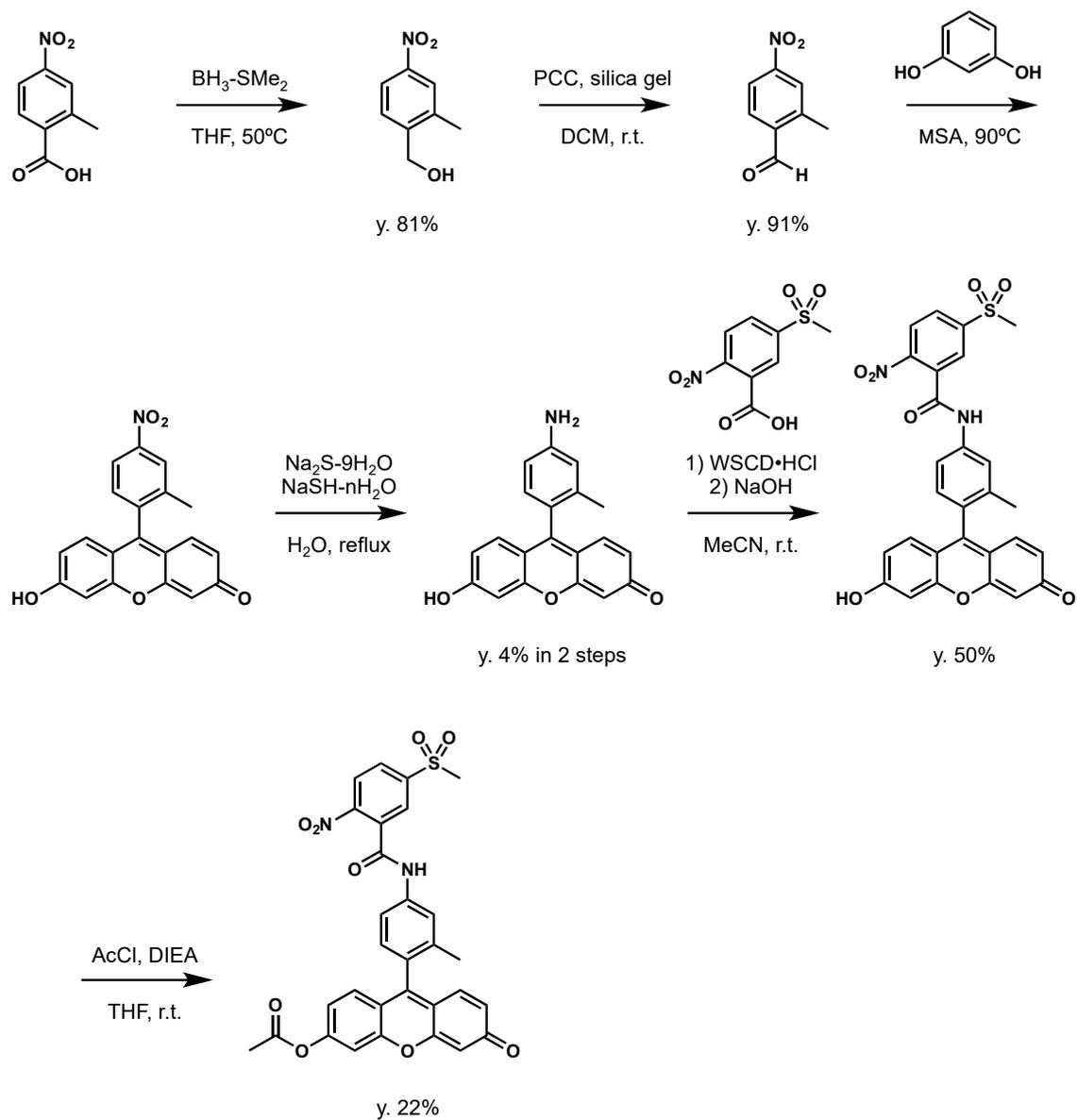
スキーム 1-3-1 2-メチル-2',7'-ジクロロ-TokyoGreen の合成スキーム

具体的には、ボランジメチルスルフィドを用いて出発物質である 2-メチル-4-ニトロ安息香酸 (1) を 2-メチル-4-ニトロベンジルアルコール (2) に還元し (収率 81%), クロロクロム酸ピリジニウム (PCC) を用いて 2-メチル-4-ニトロベンジルアルコール (2) を 2-メチル-4-ニトロベンズアルデヒド (3) に酸化した (収率 91%). 2-メチル-4-ニトロベンズアルデヒド (3) とレゾロシノール (4) をメタンスルホン酸中で加熱して **2-Me-4-NO<sub>2</sub>-TokyoGreen (5)** を得た. 副生成物が多く精製が困難であったため粗精製を行った後に, 硫化ナトリウム九水和物および硫化ナトリウム n 水和物を用いてニトロ基をアミノ基に還元して **4-NH<sub>2</sub>-2-Me-TokyoGreen (6)** を得た (2 工程で収率 4%). 蛍光制御団を導入するために縮合剤 WSCD•HCl (Water-solved carbodiimide hydrochloride) を用いて, 5-メシル-2-ニトロ安息香酸 (7) と **4-NH<sub>2</sub>-2-Me-TokyoGreen (6)** から **Ps-TG** を得た (収率 50%). 最後に, 塩化アセチルを用いてフェノール性水酸基にアセチル基を導入して **Ps-TAc** を得た [スキーム 1-3-2].

## 合成した蛍光プローブの評価

**Ps-TG** は, GSH/GSTP1 とのインキュベーションにより約 100 倍の蛍光強度上昇を示した [図 1-3-4]. その際, この蛍光強度上昇がグルタチオン化生成物に由来することを LC-MS および HPLC にて確認した. 細胞内の GSTP1 活性を検出することができるか検証するため, MCF7 細胞に対して赤色蛍光を発するタンパク質 (DsRed) と FLAG タグを導入した各 GST 分子種を強制発現させるプラスミド (pIRES2-DsRed Express2/3xFLAG-GST) を用いた評価系を利用した. **Ps-TG** を用いてライブセルイメージングを行ったが, **Ps-TG** の細胞膜透過性が低いことが示唆されたため, **Ps-TG** の細胞膜透過型誘導体としてフェノール性

水酸基をアセチル化した **Ps-TAc** を開発した [図 1-3-5]. **Ps-TAc** は細胞内にて脱アセチル化されて **Ps-TG** となり, 細胞内で **Ps-TG** が **GSTP1** 選択的にグルタチオン抱合反応を受けて強い蛍光を発することを期待した.



スキーム 1-3-2 Ps-TAc の合成スキーム

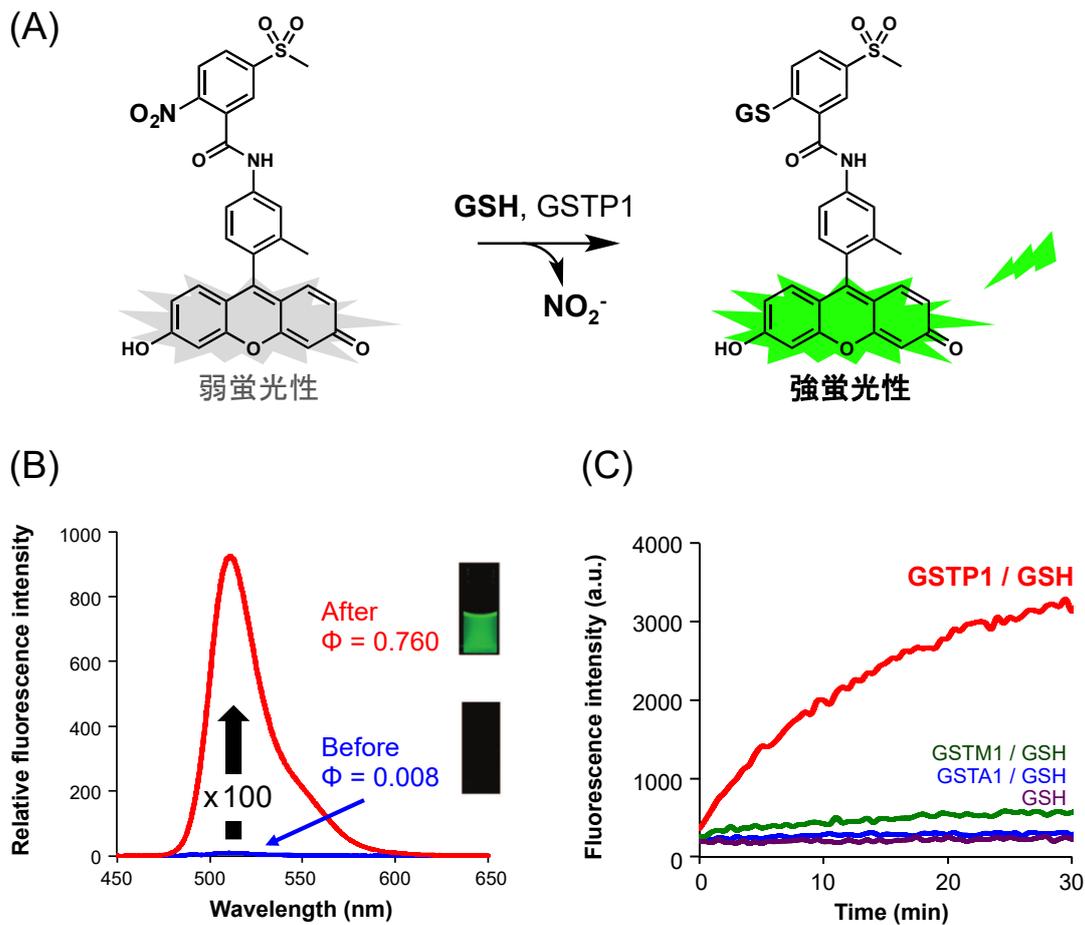


図 1-3-4 (A) GSTP1 依存的なグルタチオン抱合反応を受ける Ps-TG の化学反応式, (B) 反応前後における Ps-TG の蛍光スペクトル, (C) GSH, 各 GST 分子種存在下における Ps-TG の蛍光強度の経時変化

ライブセルイメージングの結果, **Ps-TAc** を用いたイメージングにより **GSTP1** を発現する MCF7 細胞から強い蛍光が検出された [図 1-3-6]. これらの結果より, **Ps-TAc** を用いることにより細胞内 GSTP1 活性を選択的に検出できることが示された. 以上が修士論文までの内容である.

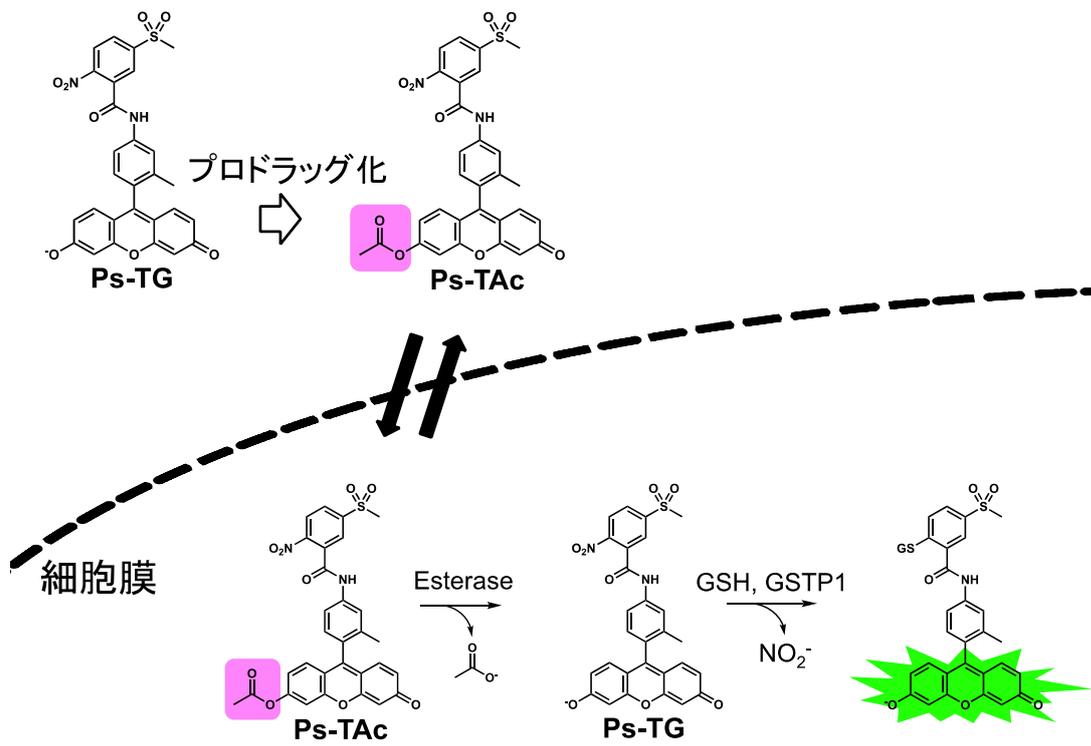


図 1-3-5 Ps-TAc の分子設計

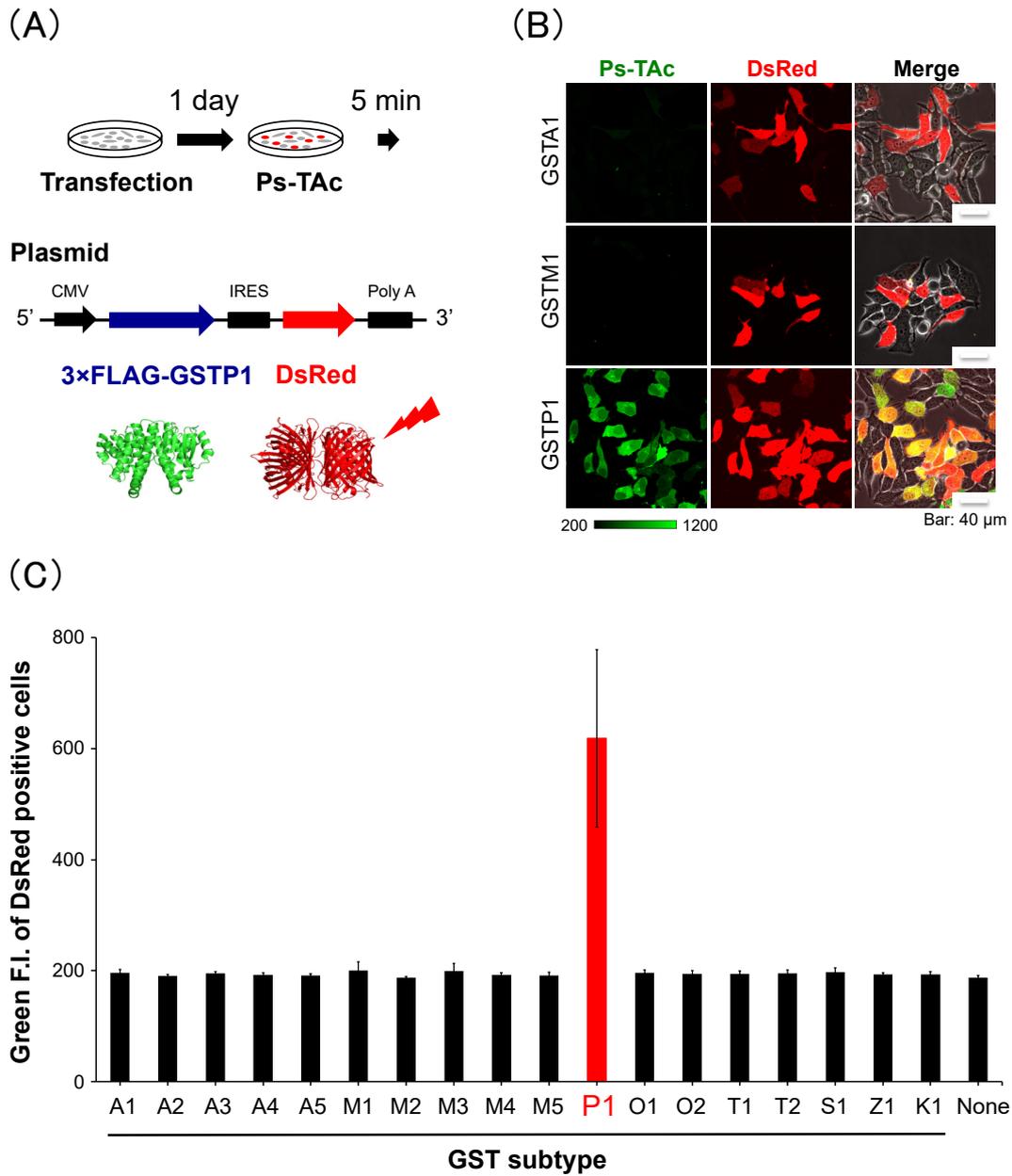


図 1-3-6 (A) Ps-TAc の各 GST 分子種選択性をライブセルイメージングで評価する評価系, (B) Ps-TAc を用いたライブセルイメージング画像 (赤 : DsRed, 緑 : Ps-TAc), (C) ライブセルイメージングにて赤色蛍光を発する細胞から検出された緑色蛍光の蛍光強度

## 第2章 Ps-TAc を用いた細胞応用

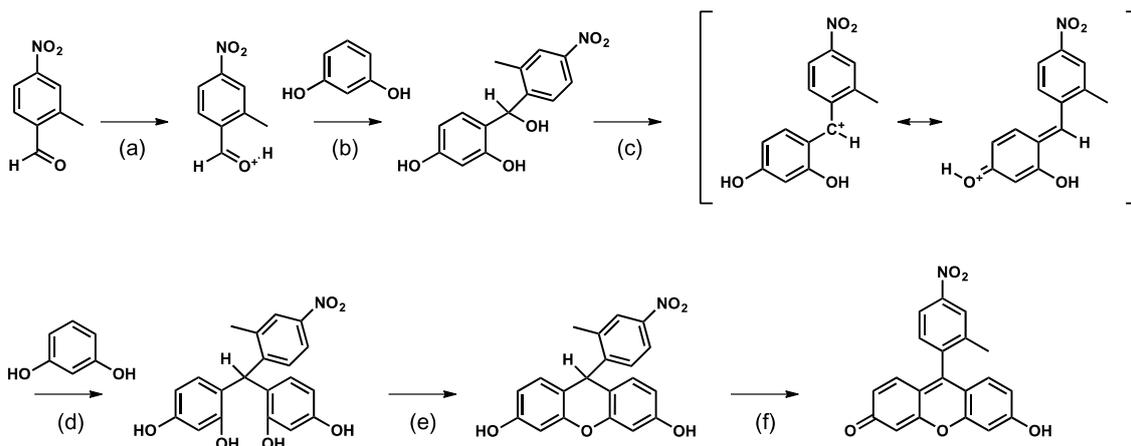
序論にて記述した通り、これまでに細胞内 GSTP1 活性を選択的に検出することができる蛍光プローブ **Ps-TAc** を開発した (修士論文)。しかしながら、**Ps-TAc** の合成中間体である **4-NH<sub>2</sub>-2-Me-TokyoGreen (6)** を合成することが困難であり、ライブセルイメージングに必要な量を十分に供給することができなかった。そこで、**4-NH<sub>2</sub>-2-Me-TokyoGreen (6)** の新たな合成手法の確立を目指した (第 1 節)。その結果、**Ps-TAc** を安定的に供給することのできる合成手法を確立したため、合成した **Ps-TAc** を用いたライブセルイメージングにより、がん細胞の内在性 GSTP1 活性を検出できるかの検証 (第 2 節)、骨肉腫由来の HT1080 (がん細胞) と線維芽細胞由来の NHDF (正常細胞) を識別できるかの検証 (第 3 節)、エピジェネティックな制御により GSTP1 発現が抑制されている MCF7 細胞に対して、エピゲノム薬の一つである DAC を用いてエピジェネティックな制御が解除された GSTP1 発現 MCF7 細胞を検出できるかの検証 (第 4 節) を行った。本章では、開発した **Ps-TAc** が細胞内における内在性の GSTP1 の活性を選択的に検出する有用な蛍光プローブであることを示す。

## 第 1 節 4-NH<sub>2</sub>-2-Me-TokyoGreen の合成手法の確立

TokyoGreen は, (I) Friedel-Crafts 反応および脱水縮合反応, 酸化反応を利用してベンズアルデヒドとレゾロシノールから合成する手法と (II) リチオ化反応あるいは Grignard 反応を利用してキサントンとブロモベンゼンから合成する手法, の 2 種類に大別できる. 本節では, (I) および (II) の手法を検討し, **Ps-TAc** の合成中間体である **4-NH<sub>2</sub>-2-Me-TokyoGreen (6)** の簡便かつ効率的な合成手法の開発を目指した.

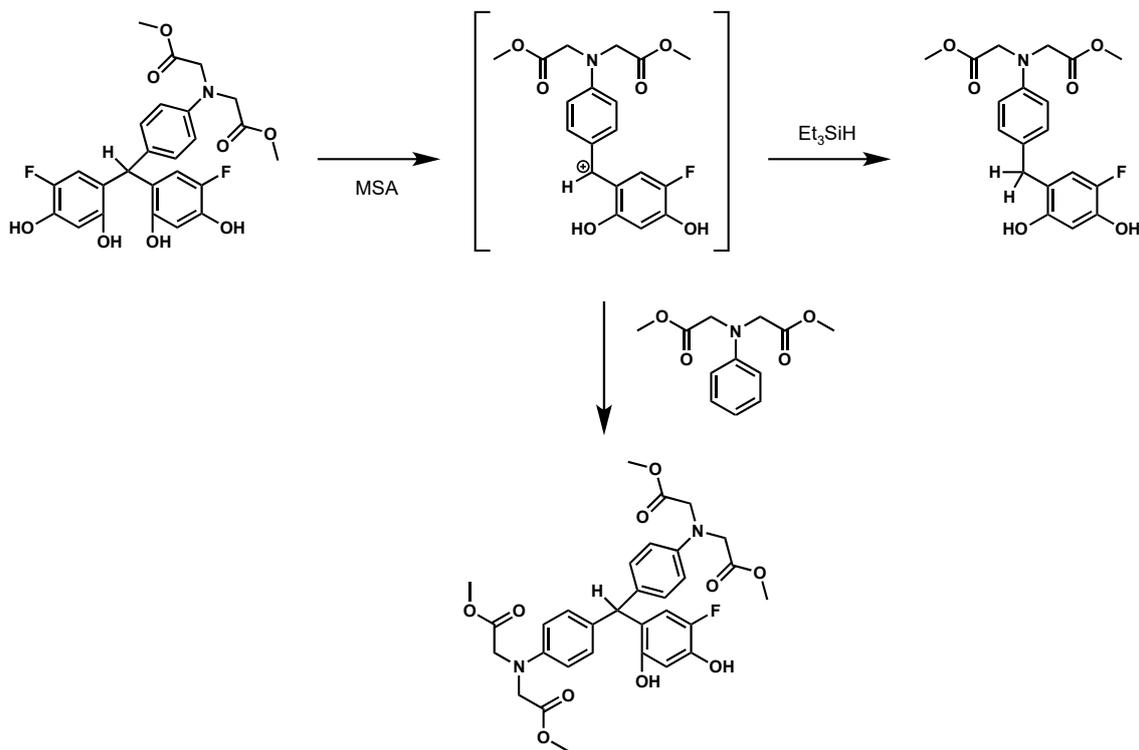
### (I) Friedel-Crafts 反応および脱水縮合反応, 酸化反応を利用してベンズアルデヒドとレゾロシノールから合成する手法

**Ps-TAc** の合成手法 (スキーム 1-3-1) における問題は, 2-メチル 4-ニトロ安息香酸 (**3**) とレゾロシノール (**4**) から **2-Me-4-NO<sub>2</sub>-TokyoGreen (5)** を合成する工程にある. その反応機構は, (a) 2-メチル-4-ニトロベンズアルデヒド (**3**) のカルボニル酸素がプロトン化される, (b) Friedel-Crafts 反応により, レゾロシノール (**4** と) 2-メチル-4-ニトロベンズアルデヒド (**3**) が縮合する, (c) 不斉炭素上に存在する水酸基がプロトン化されて水分子として脱離し, レゾロシノール由来の水酸基による共鳴効果により安定化された中間体を形成する, (d) Friedel-Crafts 反応により, レゾロシノール (**4**) と縮合する, (e) 分子内脱水縮合反応が起こる, (f) 酸化反応により, キサンテン骨格が形成される, であると推察される [スキーム 2-1-1]. 副生成物が生成する要因として, [スキーム 2-1-1] におけるジフェニルメタン中間体およびトリフェニルメタン中間体が, 2-メチル-4-ニトロベンズアルデヒド (**3**) やジフェニルメタン中間体と反応すること, トリフェニルメタン中間体からのニトロトルエンの脱離反応が進行することが考えられた.



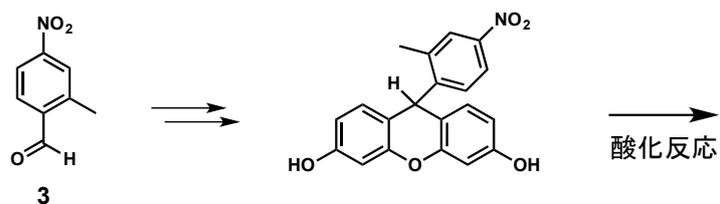
スキーム 2-1-1 アルデヒド 3 とレゾロシノール 4 から 2-Me-4-NO<sub>2</sub>-tokyogreen の生成において想定される反応機構

J. Bacci らによりジフェニルメタン中間体やトリフェニルメタン中間体様の構造を有する化合物をメタンスルホン酸中にて反応させると脱離反応が起こること、そしてそれらの反応がメタンスルホン酸、ジクロロメタン、ジエチルエーテルの混合溶媒を用いることで抑制されることを報告している[スキーム 2-1-2]<sup>36</sup>。しかしながら、**2-Me-4-NO<sub>2</sub>-TokyoGreen** の合成においては本条件を用いても反応を制御することが困難である。そのため、藤川らは、[スキーム 2-1-1] に示したトリフェニルメタン中間体を合成する際、Friedel-Crafts 反応によりジフェニルメタン中間体あるいはトリフェニルメタン中間体が 2-メチル-4-ニトロベンズアルデヒド (3) やジフェニルメタン中間体との副反応を防ぐため、レゾロシノールを過剰量加えている<sup>9</sup>。ただ、次の分子内脱水縮合反応、酸化反応および還元反応を経て **4-NH<sub>2</sub>-2-Me-TokyoGreen** を合成する工程では、2 工程収率 3% となっている。これは **2-Me-4-NO<sub>2</sub>-TokyoGreen** の合成過程における酸化反応が進行しにくいことが原因であると考えられる。というのも、電子求引基であるニトロ基を有するため、酸化剤に対する電子を受け渡す反応が進行しにくいことが推察されたためである。そこで本研究では、酸化反応を必要としない合成手法を用いて **2-Me-4-NO<sub>2</sub>-TokyoGreen** の合成を行なった。具体的には、アルデヒド由来の水素を水酸基にすることである。つまり、トリフェニルメタン中間体のメチレン由来の水素が水酸基に置き換わることで、酸化反応ではなく脱水反応によりキサンテン骨格が構築されると考えた [図 2-1-1]。



スキーム 2-1-2 J. Bacci らによって報告された、トリフェニルメタン中間体の分解機構

既存の合成経路



計画した合成経路

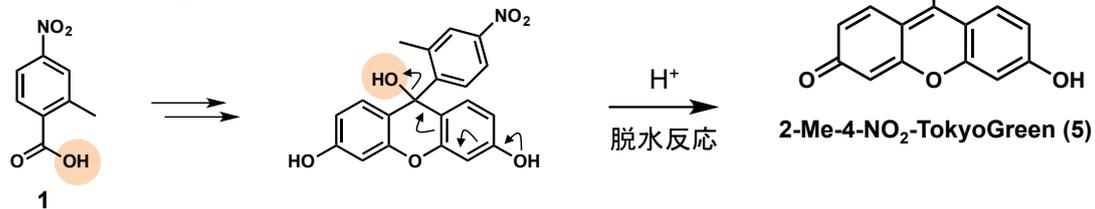


図 2-1-1 既存の酸化反応による合成経路と、脱水反応による新たな合成経路

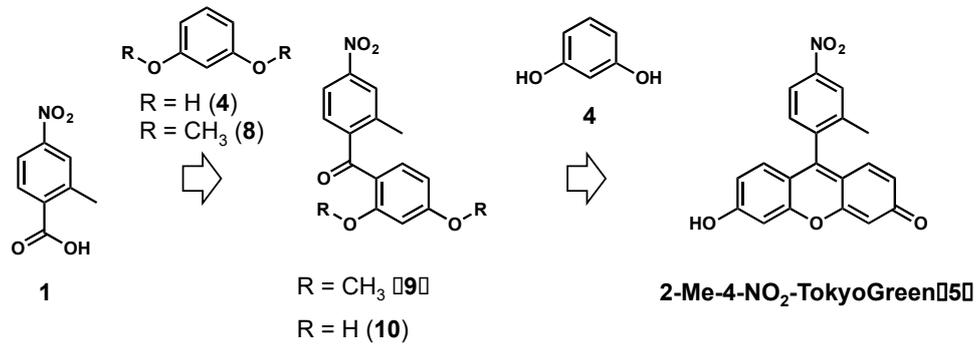
具体的には、2-メチル-4-ニトロ安息香酸 (1) からベンゾフェノン (10) を經由し、**2-Me-4-NO<sub>2</sub>-TokyoGreen (5)** を得る合成計画である [スキーム 2-1-3 (A)]. その際、2つの文献を参照した。

Kamino らは、非対称キサントゲン蛍光色素について、安息香酸誘導体とアニソール誘導体から合成中間体であるベンゾフェノンを合成し、メタンスルホン酸中にてフェノール誘導体と反応させてキサントゲン色素を得る合成手法を報告している [スキーム 2-1-3 (B)]<sup>37</sup>. ベンゾフェノンを合成する過程において、アニソール誘導体ではなく、フェノール誘導体を用いると、ベンゾフェノン中間体ではなく、エステル誘導体を得られることも報告している. ただ Yi らは、塩化ホスホリル中、塩化亜鉛存在下にて Friedel-Crafts 反応によりレゾロシノール誘導体と安息香酸誘導体から直接ベンゾフェノン誘導体を得られることを報告している [スキーム 2-1-3 (C)]. そこで、Yi らによって報告された手法を用いて、塩化ホスホリル中、塩化亜鉛存在下にて2-メチル-4-ニトロ安息香酸 (1) とレゾロシノール (4) あるいは1,3-ジメトキシベンゼン (8) を反応させた. 実験の結果、塩化ホスホリル中、塩化亜鉛存在下にて1,3-ジメトキシベンゼン (8) と2-メチル-4-ニトロ安息香酸 (1) を加熱することでベンゾフェノン (9) (収率 59%)、およびエステル (11) (収率 7%) を得た [スキーム 2-1-4 (A)]. 他方、塩化ホスホリル中、塩化亜鉛存在下にてレゾロシノール (4) と2-メチル-4-ニトロ安息香酸 (1) を加熱すると、**2-Me-4-NO<sub>2</sub>-TokyoGreen (5)** が生成することが明らかとなった [スキーム 2-1-4 (B)]. ただ、精製が困難であったため硫化ナトリウム-9 水和物を用いて **2-Me-4-NO<sub>2</sub>-TokyoGreen (5)** のニトロ基を還元することで **4-NH<sub>2</sub>-2-Me-TokyoGreen (6)** を収率 6% で得た [スキーム 2-1-2 (B)].

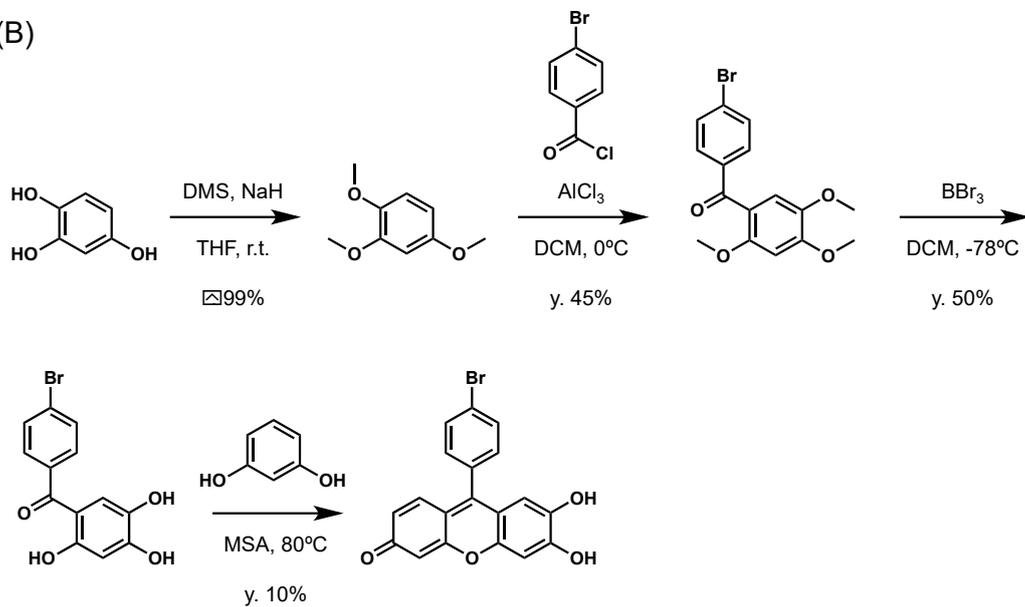
2-メチル-4-ニトロ安息香酸 (1) とレゾロシノール (4) から直接 **2-Me-4-NO<sub>2</sub>-TokyoGreen (5)** が得られたのは、反応系中にて生成したベンゾフェノン (10) がレゾロシノール (4) と反応し、トリフェニルメタン誘導体を經由して、分子内脱水縮合反応が進行したものであると考えられる [スキーム 2-1-3].

これまで2-メチ-4-ニトロ安息香酸 (1) を2工程で2-メチル-4-ニトロベンズアルデヒド (3) に変換してから **2-Me-4-NO<sub>2</sub>-TokyoGreen (5)** を合成していたが [図 1-3-2], 塩化亜鉛存在下、塩化ホスホリル中にて2-メチ-4-ニトロ安息香酸 (1) レゾロシノール (4) から直接 **2-Me-4-NO<sub>2</sub>-TokyoGreen (5)** を合成する手法を開発したため、2工程を削減することができた。

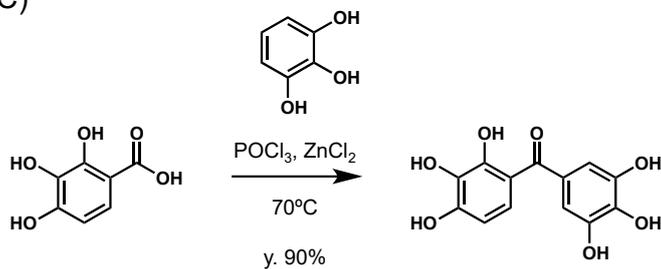
(A)



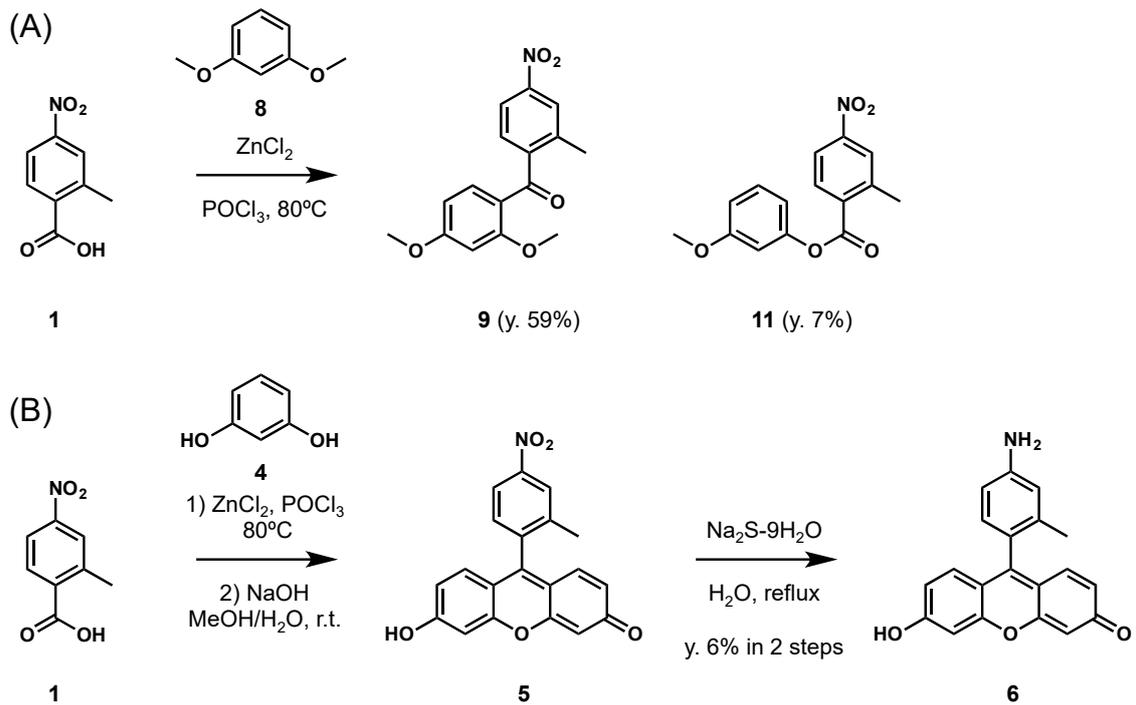
(B)



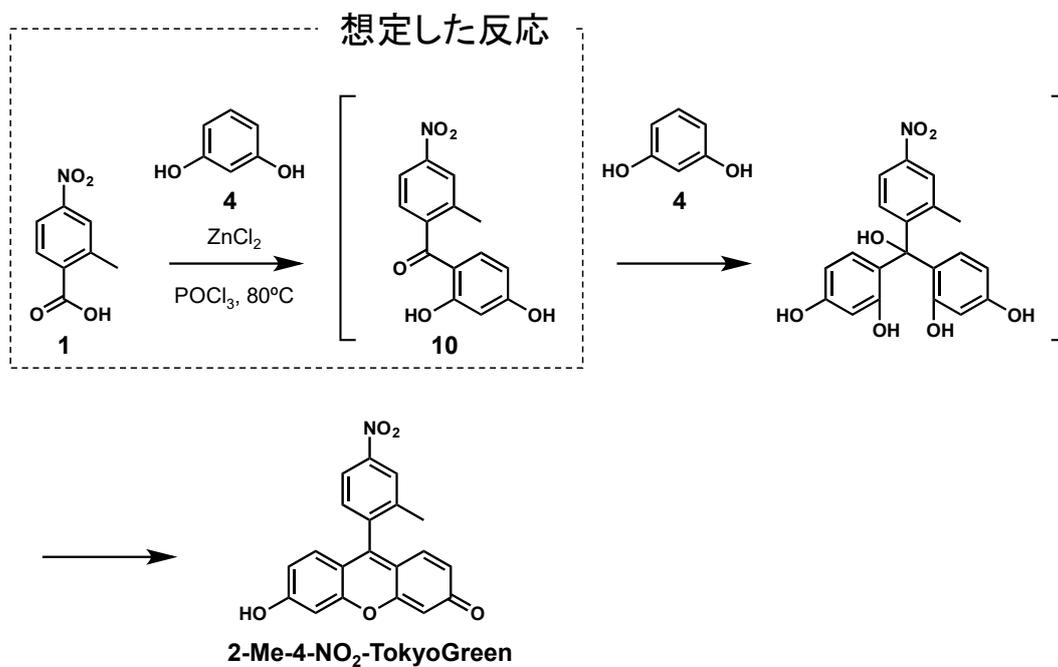
(C)



スキーム 2-1-3 (A) 2-Me-4-NO<sub>2</sub>-TokyoGreen の新しい合成計画, (B) Kamino らによって報告された非対称キサントレン色素の合成手法, (C) Yi らによって報告されたベンゾフェノンの合成手法

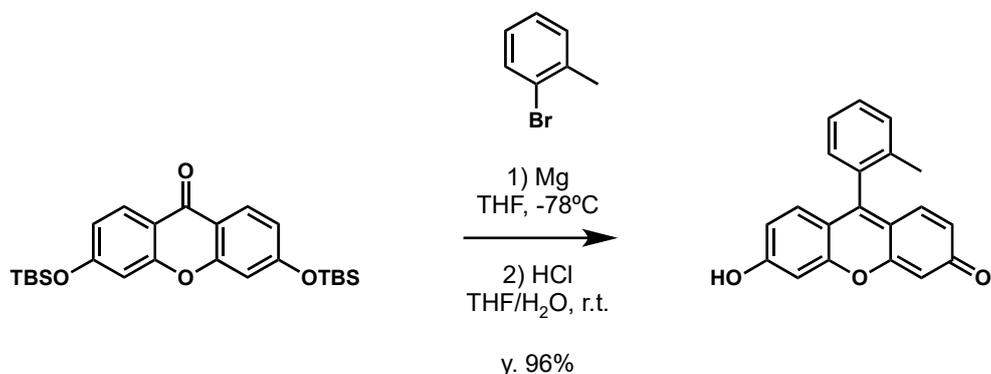


スキーム 2-1-4 (A) レゾロシノールのフェノール性水酸基を保護した 1,3-ジメトキシベンゼンを用いた合成スキーム, (B) 保護基を導入せずにレゾロシノールをそのまま用いた合成スキーム



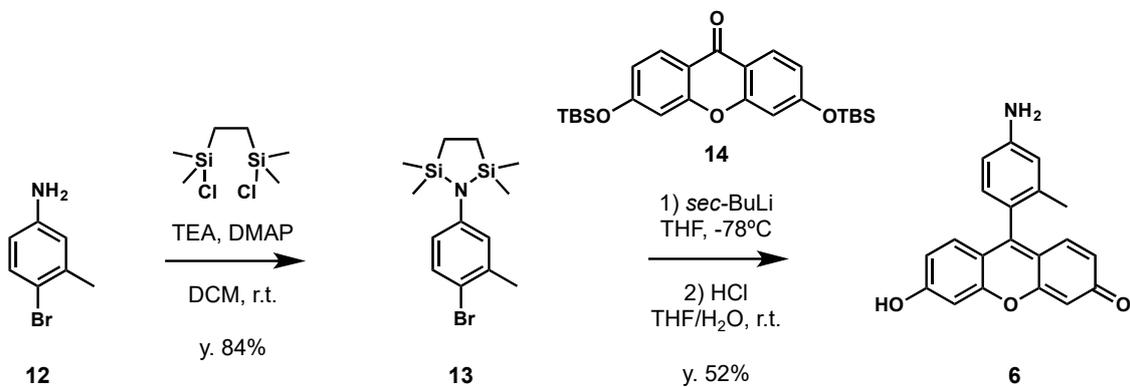
スキーム 2-1-3 予想される反応機構

(II) Grignard 反応を利用して、キサントンとブロモベンゼンから合成する手法



スキーム 2-1-4 2-Me-TokyoGreen の合成スキーム

浦野らは、フェノール性水酸基が TBS (tert-butyldimethylsilyl) 基で保護されたキサントンに対処して、調製した Grignard 試薬を反応させることで TokyoGreen を得ている [スキーム 6]<sup>8</sup>。また、2 位にメチル基を有さない 4-NH<sub>2</sub>-TokyoGreen では、アミノ基をトリメチルシランで保護した *p*-ブロモアニリンに対して、調製した Grignard 試薬を反応させる合成手法<sup>38</sup>や、アミノ基を Boc 基で保護した *p*-ブロモアニリンに対して、調製したリチウム試薬を反応させる合成手法<sup>39</sup>が報告されている。そこで、アミノ基をシリル基で保護したブロモベンゼン **13** に対して *sec*-BuLi で有機リチウム試薬を調製し、キサントン (**14**) と反応させて 4-NH<sub>2</sub>-2-Me-TokyoGreen (**6**) を得る合成スキームを立てた。最初に 4-ブロモ-3-メチルアニリン (**12**) のアミノ基を保護するため、1,2-ビス (クロロジメチルシリル) エタンと反応させてアミノ基をシリルで保護したアニリン (**13**) を得た。その際、シリカゲルを用いた吸引ろ過カラムでの精製や NMR 測定用溶媒の CDCl<sub>3</sub> への溶解、といった操作により脱保護されて 4-ブロモ-3-メチルアニリン (**12**) に戻ることを確認した。ただ、分液操作により精製できたため、NMR 測定溶媒の DMSO に溶解することで構造決定を行った。*sec*-BuLi を用いてリチオ化反応によりアニリン (**13**) のブロモ基をリチウムに変換し、キサントン (**14**) と反応させた後 1N の塩酸で後処理することで、TBS 基およびシリル基が脱保護されて 4-NH<sub>2</sub>-2-Me-TokyoGreen (**6**) が収率 52% で得られた。



スキーム 2-1-5 4-NH<sub>2</sub>-2-Me-TokyoGreen の合成スキーム

以上より, 4-NH<sub>2</sub>-2-Me-TokyoGreen (6) に対する 2 種類の合成手法を確立し, **Ps-TAc** を十分量供給できるようになった. 次節以降では, 合成した **Ps-TAc** を用いた, がん細胞のライブセルイメージングについて記述した.

## 第2節 GSTP1 発現がん細胞の検出

**Ps-TAc** を用いて、がん細胞の内在性 GSTP1 活性を検出できるかを検証した。GSTP1 を過剰発現する骨肉腫由来の HT1080 細胞に対して、HBSS 中に溶解させた **Ps-TAc** (2.5  $\mu$ M, 0.1% DMSO) を負荷し、室温にてインキュベーションし、共焦点レーザー蛍光顕微鏡にてライブセルイメージングを行った。時間経過と共に HT1080 細胞から検出される蛍光強度が上昇したのに対し、GSTP1 をノックダウンした HT1080 細胞から検出される蛍光強度の上昇が減弱した [図 2-2-1 (A, B)]。これら結果から、**Ps-TAc** を用いてがん細胞の内在性 GSTP1 活性を検出できることが示唆された。

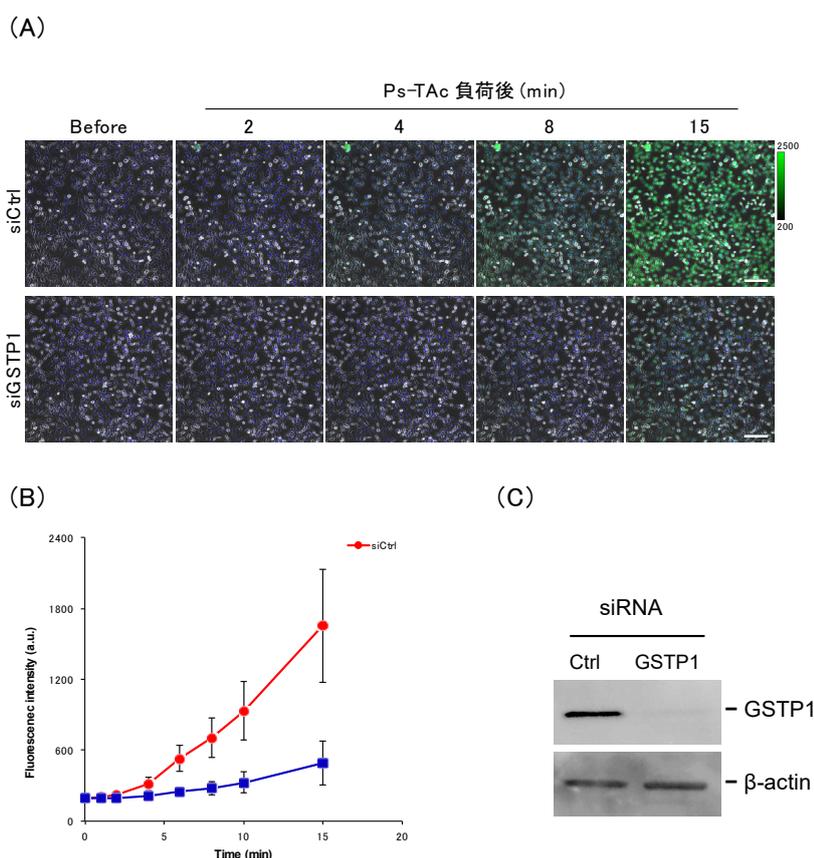
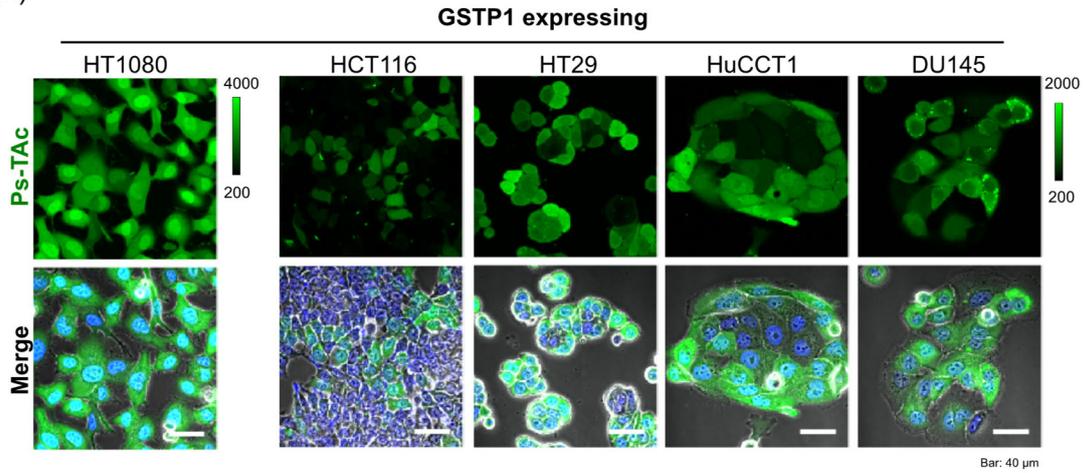


図 2-2-1 (A) RNAi 法により GSTP1 をノックダウンした細胞 (siGSTP1) とノックダウンされていない細胞 (siCtrl) に対する Ps-TAc (2.5  $\mu$ M) を用いたライブセルイメージング画像 (青 : DAPI, 緑 : Ps-TAc), (B) ライブセルイメージングにより検出された緑色蛍光強度の経時変化 (各 100 細胞の平均値), (C) RNAi 法により GSTP1 をノックダウンした細胞 (siGSTP1) とノックダウンされていない細胞 (siCtrl) のウェスタンブロットング解析

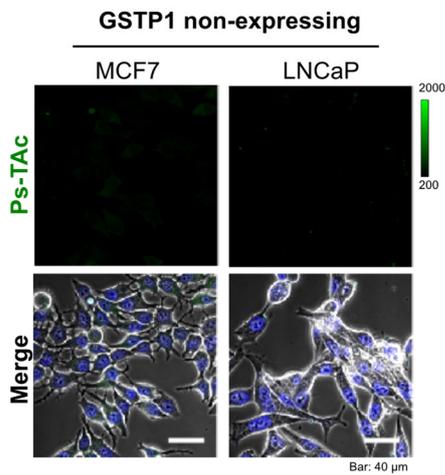
次に、GSTP1 を過剰発現している胆管がん由来の HuCCT1, 前立腺がん由来の DU145, 大腸がん由来の HCT116 および HT29, GSTP1 をほとんど発現していない乳がん由来の MCF7, 前立腺がん由来の LNCaP に対して, HBSS 中に溶解させた Ps-TAc (2.5 $\mu$ M, 0.1% DMSO) を負荷した. 15 分間室温でインキュベーションし, 共焦点レーザー蛍光顕微鏡にてライブセルイメージングを行った. その結果, GSTP1 過剰発現がん細胞から強い蛍光が検出され, GSTP1 非発現がん細胞からは蛍光がほとんど検出されなかった [図 2-2-2 (A, B)]. **Ps-TAc** を用いたライブセルイメージングにより, 細胞レベルで GSTP1 活性を検出することができた. これらの結果について, 細胞種毎に 100 細胞の緑色蛍光強度をドットプロット図として表した結果, 細胞種によって蛍光強度の分布が細胞レベルで異なることが示された [図 2-2-2 (C)].

以上より, **Ps-TAc** を用いて内在性 GSTP1 活性を検出することでがん細胞を検出できることが示された. 次節では, **Ps-TAc** を用いて, がん細胞と正常細胞を識別できるか検証した.

(A)



(B)



(C)

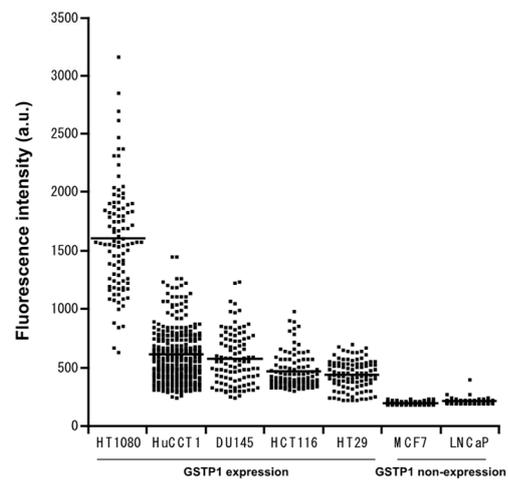


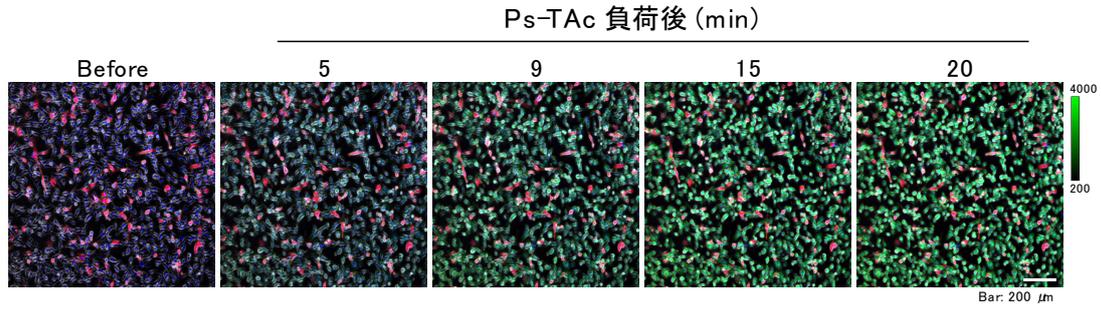
図 2-2-2 (A) Ps-TAc (2.5  $\mu$ M) を用いた GSTP1 発現がん細胞のライブセルイメージング画像,  
(B) Ps-TAc (2.5  $\mu$ M) を用いた GSTP1 非発現がん細胞のライブセルイメージング画像 (青 :  
DAPI, 緑 : Ps-TAc), (C) ライブセルイメージングにて検出された緑色蛍光強度のドットプロ  
ット図 (各 100 細胞)

### 第3節 がん細胞と正常細胞の識別

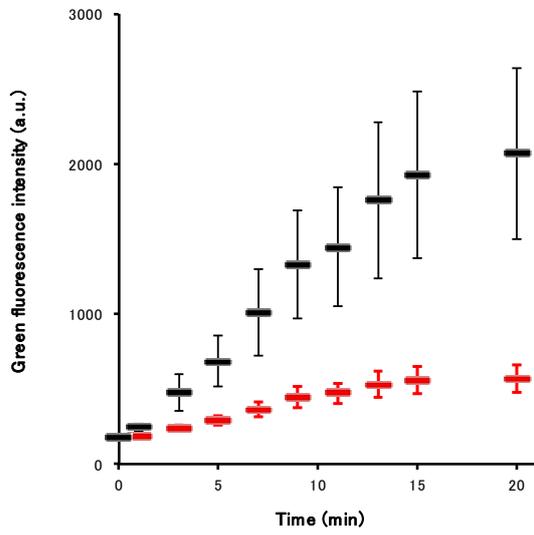
**Ps-TAc** を用いたライブセルイメージングにより、がん細胞と正常細胞を識別できるか検証した。実験系として、骨肉腫由来の HT1080 細胞および線維芽細胞 (NHDF) 細胞を共培養し、**Ps-TAc** を負荷してライブセルイメージングを行った。その際、HT1080 細胞と NHDF 細胞を区別できるように予め NHDF 細胞を cell tracker deep red で染色した。HT1080/NHDF の共培養系に対して、HBSS 中に溶解させた **Ps-TAc** (2.5 $\mu$ M, 0.1% DMSO) を負荷し、室温にてライブセルイメージングを行った。その結果、HT1080 細胞から強い蛍光が検出され、NHDF 細胞からはほとんど蛍光は検出されなかった [図 2-3-1 (A, B)]。逆に、cell tracker deep red で予め染色した HT1080 細胞と未染色の NHDF 細胞の共培養系に対して **Ps-TAc** を用いたライブセルイメージングを行なったが、HT1080 細胞から強い蛍光が検出され、NHDF 細胞からはほとんど蛍光は検出されなかった [図 2-3-1 (C)]。この結果より、**Ps-TAc** を用いたライブセルイメージングにより、がん細胞と正常細胞を識別できることが示唆された。

**Ps-TAc** を用いたライブセルイメージングにより、がん細胞と正常細胞の共培養系からがん細胞を識別することができたため、次にヒト大腸の組織切片から、がん組織と正常組織を識別できるか検証を行った。その際、国立がん研究センターの内視鏡科の斎藤先生、高丸先生、東京大学薬学部薬品代謝教室の浦野教授らの協力のもと、ヒトの検体に対する **Ps-TAc** のライブセルイメージングを実施した。しかしながら、蛍光強度の差異から、がん組織と正常組織を識別することはできなかった。その原因として、大腸組織の粘膜に **Ps-TAc** がトラップされて細胞にたどり着いていないことや、内視鏡による切除術の際に用いる電気メスによる熱で組織切片における GSTP1 の失活や GSH の枯渇が考えられる。ただ、明確な原因は掴めておらず、今後の課題となっている。

(A)



(B)



(C)

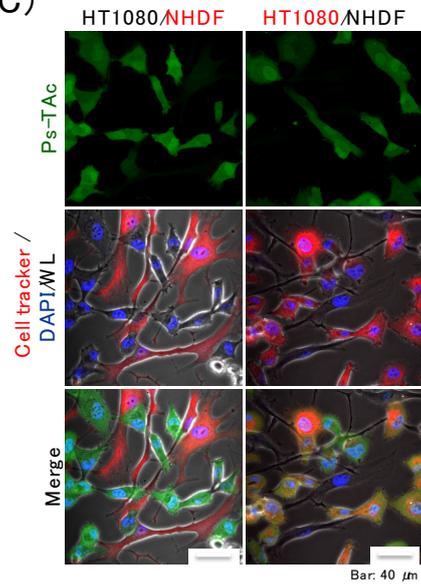


図 2-3-1 (A) 共培養した HT1080 と NHDF (Cell tracker deep red で染色) に対して Ps-TAc を負荷したライブセルイメージング画像, (B) HT1080 および NHDF から検出された緑色蛍光の蛍光強度, (C) HT1080 あるいは NHDF を Cell tracker deep red で染色した共培養系に Ps-TAc を負荷したライブセルイメージング画像

## 第4節 DAC 処理したがん細胞のライブイメージング

エピジェネティックな制御により GSTP1 発現が抑制されているがん細胞に対して DNA メチル化阻害剤を処理することで、エピジェネティックな制御が解かれて GSTP1 を発現するようになる。そのため、GSTP1 発現が DNA メチル化阻害剤の効果の指標として有用であることが報告されている [図 2-4-1 (A)]<sup>32</sup>。さらに、GSTP1 非発現細胞である Raji 細胞や MEG-01 細胞に対して、DNA メチル化阻害剤である 5-アザ-2'-デオキシシチジン (DAC) を処理すると、GSTP1 を発現する細胞と発現しない細胞が混在する結果が得られている<sup>40</sup>。そこで、GSTP1 非発現がん細胞である MCF7 細胞に対して DNA メチル化阻害剤の一つである DAC を処理し、**Ps-TAc** を用いて GSTP1 発現 MCF7 細胞を細胞レベルで検出できるか検証を行った。

DAC (0, 1.25, 2.5, 5, 10  $\mu\text{M}$ ) を 6 日間処理した MCF7 細胞に対して、**Ps-TAc** および死細胞を染色するためのヨウ化プロピジウム (PI; Propidium Iodide) を負荷してライブセルイメージングを行った。その結果、DAC 処理した MCF7 細胞において強い蛍光が検出された [図 2-4-1 (B)]。濃度毎に 200 細胞の緑色蛍光強度をドットプロット図として表すと、DAC 処理した MCF7 細胞において蛍光が検出された細胞とほとんど蛍光が検出されない細胞が混在することが示された [図 2-4-1 (C)]。1.25  $\mu\text{M}$  の DAC を処理した MCF7 細胞について、RNAi 法を用いて GSTP1 をノックダウンすることで検出される緑色蛍光が減弱したことから、検出された緑色蛍光が GSTP1 に由来することが示唆された [図 2-4-2 (A, B, C)]。また、6 日間 DAC 処理した MCF7 細胞について GSTP1 の蛍光免疫染色法を行なった結果、GSTP1 を発現する細胞とほとんど発現しない細胞が混在することが示された [図 2-4-3]。これらの結果から、DAC を処理した MCF7 細胞について、**Ps-TAc** を用いて GSTP1 発現 MCF7 細胞を細胞レベルで検出できることが示された。

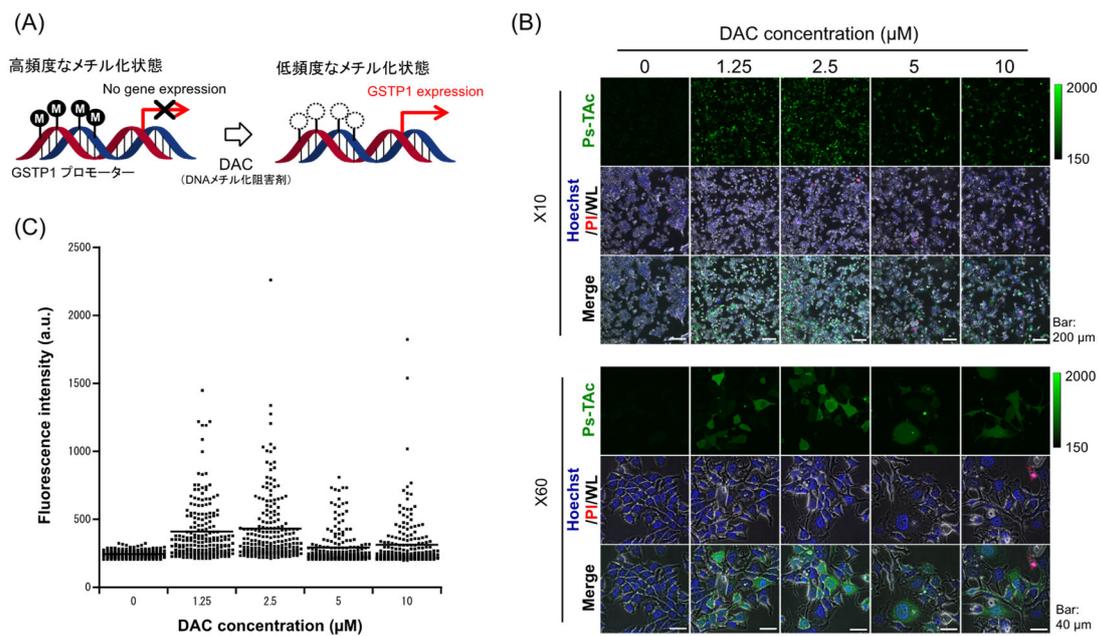


図 2-4-1 (A) DAC 処理により GSTP1 が発現する機構の概略図, (B) 6 日間 DAC 処理した MCF7 細胞に対して Ps-TAc を負荷したライブセルイメージング画像 (緑; Ps-TAc, 青; Hoechst, 赤; PI), (C) ライブセルイメージングで検出された緑色蛍光強度のドットプロット図

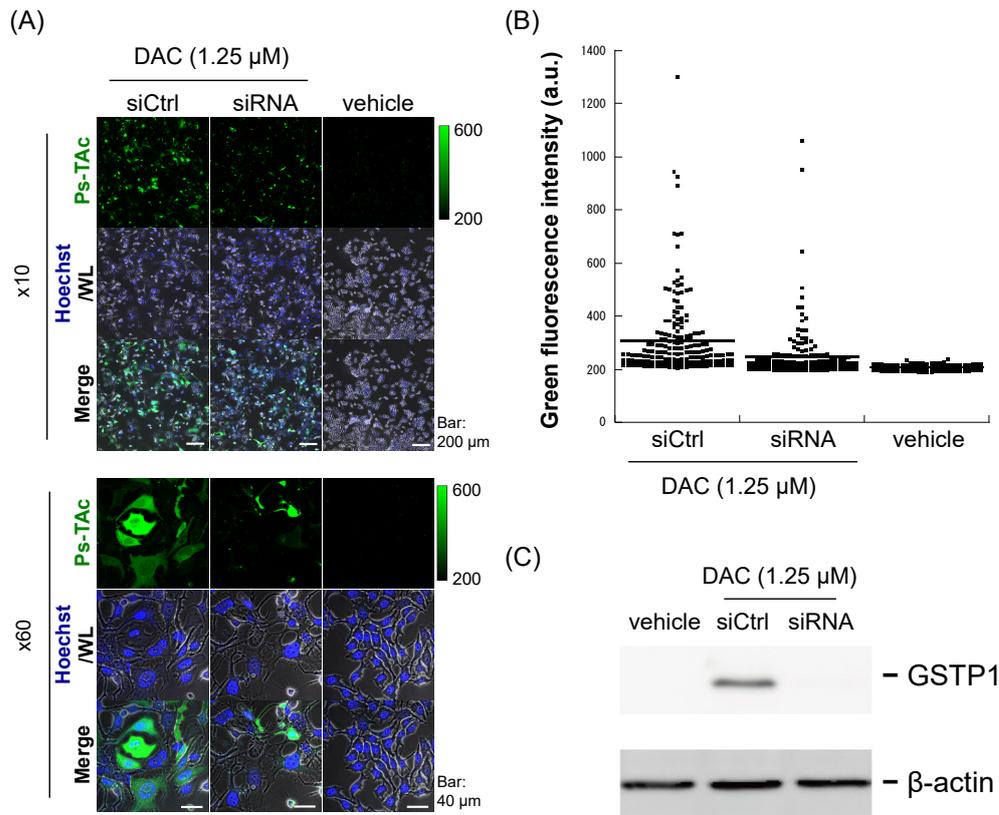


図 2-4-2 (A) 1.25  $\mu$ M の DAC を処理した MCF7 細胞に対して、RNAi 法により GSTP1 をノックダウンした細胞 (siGSTP1) とノックダウンされていない細胞 (siCtrl) に対する Ps-TAc (2.5  $\mu$ M) を用いたライブセルイメージング画像 (緑; Ps-TAc, 青; Hoechst), (B) ライブセルイメージングで検出された緑色蛍光強度のドットプロット図, (C) 1.25  $\mu$ M の DAC を処理した MCF7 細胞に対して、RNAi 法により GSTP1 をノックダウンした細胞 (siGSTP1) とノックダウンされていない細胞 (siCtrl) のウェスタンブロッティング解析

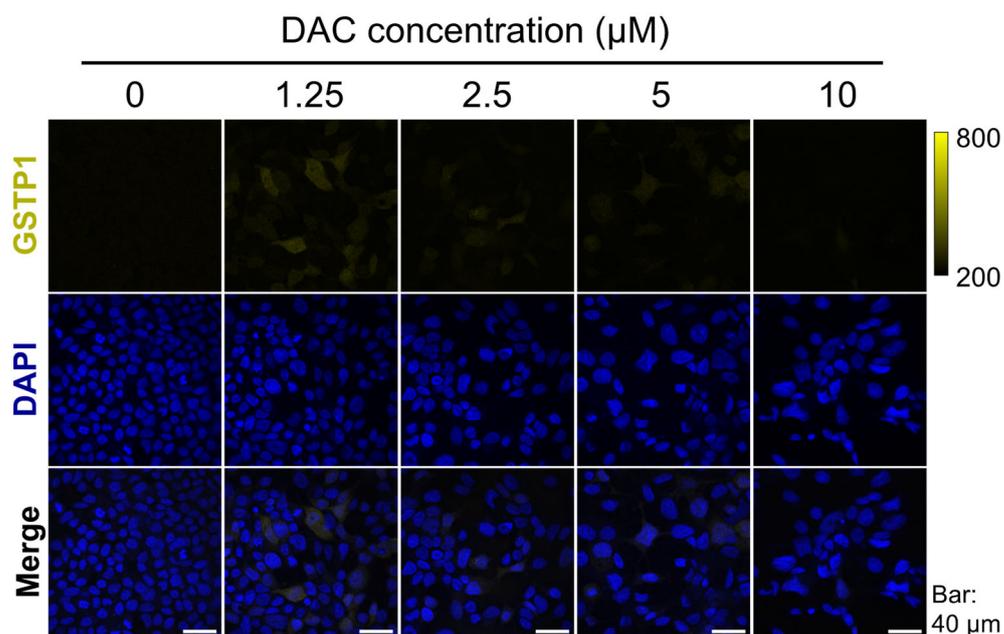


図 2-4-3 6 日間 DAC 処理した MCF7 細胞における GSTP1 の蛍光免疫染色画像（黄色；GSTP1，青；Hoechst）

次に、DAC ( $1.25 \mu\text{M}$ ) を 2, 3, 4, 5, 6 日間処理した MCF7 細胞に対して、**Ps-TAc** および死細胞を染色するためのヨウ化プロピジウム (PI; Propidium Iodide) を負荷してライブセルイメージングを行った結果、日毎に緑色蛍光を発する細胞が増加する様子が観察された [図 2-4-4 (A)]. 日毎に 200 細胞の緑色蛍光強度をドットプロット図として表すと、蛍光を発する細胞の分布が日毎に増加する様子が確認できた [図 2-4-4 (B)]. また、GSTP1 のウェスタンブロッティング解析により、日毎に GSTP1 発現が上昇することが示された. 以上のことから、**Ps-TAc** を用いて、DAC によるエピジェネティックな変化により GSTP1 発現の抑制が解かれた GSTP1 発現 MCF7 細胞を細胞レベルで検出できることが示された.

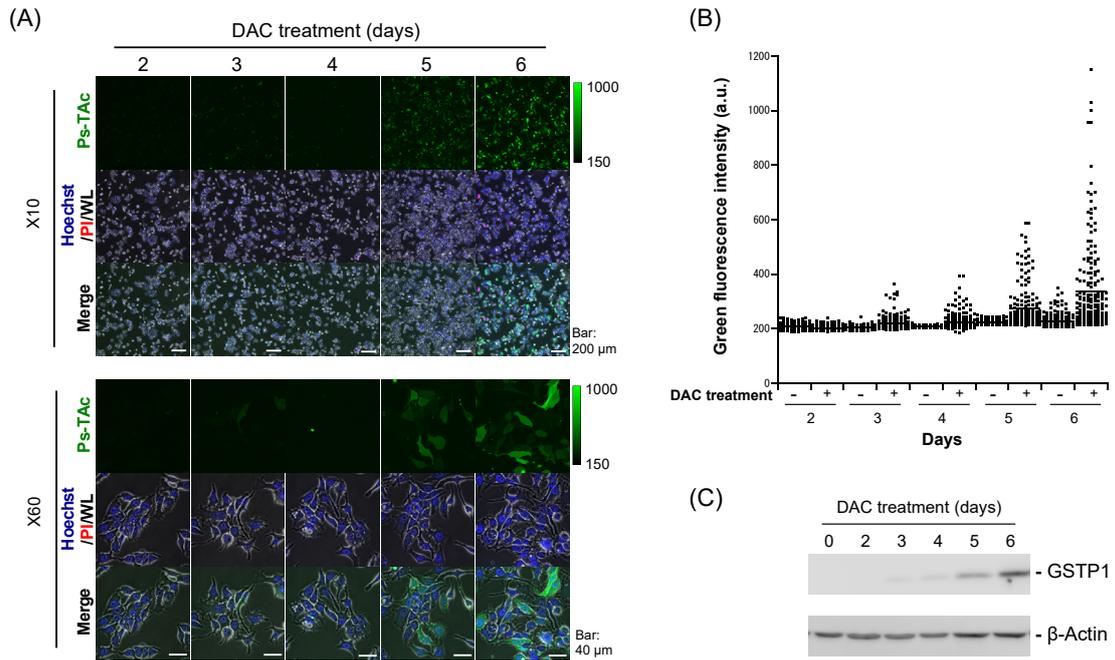


図 2-4-4 (A) 1.25  $\mu\text{M}$  の DAC を処理した MCF7 細胞に対して Ps-TAc を負荷したライブセルイメージング画像 (緑 ; Ps-TAc, 青 ; Hoechst, 赤 ; PI), (B) DAC 処理群および DAC 非処理群における緑色蛍光のドットプロット図 (各 200 細胞), (C) DAC 処理群における GSTP1 のウェスタンブロット解析

## 第5節 小括

### 有機合成について

TokyoGreen の合成方法は、① Friedel-Crafts 反応を利用して、ベンズアルデヒドとレゾロシノールから合成する手法、② Grignard 反応あるいはリチオ化反応を利用して、キサントンとブロモベンゼンから合成する手法に大別される。これまで **Ps-TAc** の原料である **2-Me-4-NO<sub>2</sub>-TokyoGreen** を ① の手法を利用して、2-メチル-4-ニトロベンズアルデヒド (3) とレゾロシノール (4) から合成していたが、大量の副生成物の生成により精製が困難なうえに収率が低かった。そこで、この問題の解決を目指した結果、2-メチル-4-ニトロ安息香酸 (1) とレゾロシノール (4) から **2-Me-4-NO<sub>2</sub>-TokyoGreen** が得られることを見出した。これまで安息香酸とレゾロシノールから直接 TokyoGreen を合成した報告例はなく、新しい合成方法である。また、2-メチル-4-ニトロ安息香酸 (1) から 3 工程で **2-Me-4-NO<sub>2</sub>-TokyoGreen** を合成していたが、本手法を開発したことにより 2-メチル-4-ニトロ安息香酸 (1) から 1 工程で **2-Me-4-NO<sub>2</sub>-TokyoGreen** を合成することができた。しかしながら、依然として大量の副生成物の生成により精製が困難なうえに収率が低かった。そこで、② の手法を利用してブロモベンゼン (13) とキサントン (14) から **4-NH<sub>2</sub>-2-Me-TokyoGreen** の合成を行なった。その際、Grignard 反応では生成物を得ることができなかったが、*sec*-BuLi を用いたリチオ化反応を用いることで生成物を得ることができた。リチオ化反応を利用した場合、収率 52% で **4-NH<sub>2</sub>-2-Me-TokyoGreen** を得ることができた。以上より、**Ps-TAc** の合成中間体である **4-NH<sub>2</sub>-2-Me-TokyoGreen** の簡便かつ効率的な合成手法を確立したことで、**Ps-TAc** を合成することができた。

### ライブセルイメージングについて

これまで DNAT-Me<sup>9</sup> や DN<sub>s</sub>-CV<sup>33</sup>, P-GST<sup>34</sup>, BNPA<sup>41</sup> といった細胞内 GST 活性を検出できる蛍光プローブが開発されているが、Pi クラスに対する選択性が低いことが問題であった。そこで、本研究では、細胞内 GSTP1 活性を選択的に検出できる蛍光プローブ **Ps-TAc** を分子設計・開発した (第1章)。 **Ps-TAc** を用い

て、GSTP1 発現がん細胞である大腸がん由来の HCT116 細胞, HT29 細胞, 前立腺がん由来の DU145 細胞, 胆管がん由来の HuCCT1 細胞, 骨肉腫由来の HT1080 細胞に対してライブセルイメージングを行った結果, 強い蛍光が検出された. 一方, RNAi 法により GSTP1 をノックダウンした HT1080 細胞および DU145 細胞ではほとんど蛍光が検出されなかった. これらの結果から, **Ps-TAc** を用いて細胞内 GSTP1 活性を選択的に検出できることが示唆された.

**Ps-TAc** を用いて, 共培養した線維芽細胞由来の NHDF (正常細胞) と骨肉腫由来の HT1080 (がん細胞) に対してライブセルイメージングを行なった結果, HT1080 細胞から強い蛍光が検出された. この結果から, **Ps-TAc** を用いて, 蛍光強度の差異からがん細胞と正常細胞を識別できることが示唆された.

エピジェネティックな制御により GSTP1 発現が抑制されている MCF7 細胞に対して 5-アザ-2'-デオキシシチジン (DAC) といった DNA メチル化阻害剤を処理することでエピジェネティックな制御が解かれて GSTP1 を発現するため<sup>29-31</sup>, DNA メチル化阻害剤の効果の指標として, GSTP1 発現が有用であることが報告されている<sup>32</sup>. そこで, GSTP1 非発現がん細胞である MCF7 細胞に対して DNA メチル化阻害剤の一つである DAC を処理し, **Ps-TAc** を用いて GSTP1 発現 MCF7 細胞を検出できるか検証を行った. その結果, GSTP1 発現 MCF7 細胞を細胞レベルで検出できることが示唆された. 以上の結果より, **Ps-TAc** が細胞内 GSTP1 活性を検出する有用な蛍光プローブであることが示された.

## 第3章 TokyoMagenta および Carbofluorescein を

### 母核とした蛍光プローブの開発

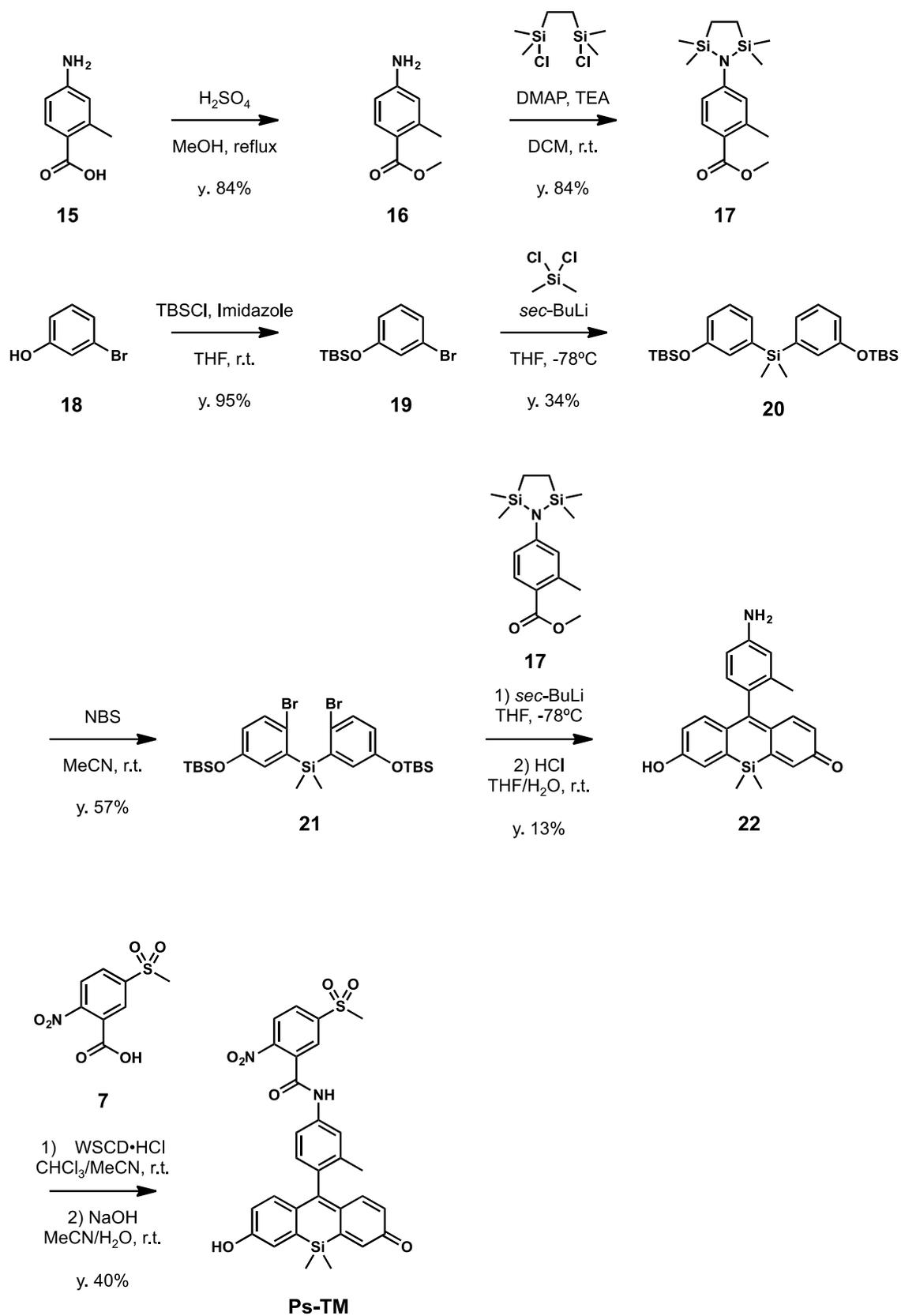
励起・蛍光波長の異なる蛍光プローブを用いたマルチカラーイメージングでは、複数の生体分子を同時に検出することができる。つまり、TokyoMagenta や Carbofluorescein といった赤色蛍光や黄色蛍光を発する GSTP1 選択的活性検出蛍光プローブを開発することができれば、緑色蛍光を発する gGlu-HMRG (GGT 活性検出蛍光プローブ)<sup>10</sup> や HMRef-βGal (β-ガラクトシダーゼ活性検出蛍光プローブ)<sup>11</sup> といった蛍光プローブとのマルチカラーイメージングが可能となる。岩立らが示した複数の蛍光プローブを用いたマルチカラーイメージングにより種類の異なるがん細胞の識別が期待できる<sup>15</sup>。そこで本研究では、**Ps-TAc** の母核である TokyoGreen とは励起・蛍光波長の異なる TokyoMagenta を母核とした GSTP1 選択的活性検出蛍光プローブの開発を行なった。本章では、TokyoMagenta を母核とした蛍光プローブ **Ps-TM** および Carbofluorescein を母核とした蛍光プローブ **Ps-CF** の合成について (第1節)、実際に合成した **Ps-TM** および **Ps-CF** を用いたライブセルイメージングについて (第2節)、新たに見出した **Ps-CF** の分光特性およびその応用について (第3節)、さらに第3節で見出した知見を利用した細胞応用について (第4節) 記述した。本章では、赤色蛍光を発する **Ps-TM** が優れた GSTP1 選択的活性検出蛍光プローブであること、**Ps-CF** が一波長励起二波長測定型の優れた GSTP1 選択的活性検出蛍光プローブであることを示す。

## 第 1 節 Ps-TM および Ps-CF の合成

**Ps-TM** は ACS central science にて J. Grimm らにより確立された手法<sup>42</sup>を参考に、**Ps-CF** は ACS chemical biology にて J. Grimm らにより確立された手法<sup>43</sup>を用いて合成した。

### Ps-TM の合成

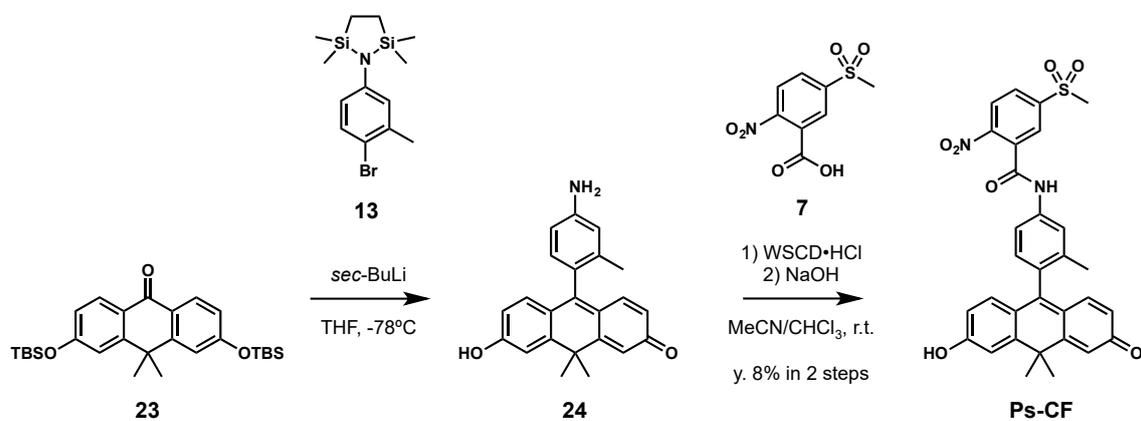
J. Grimm らによって確立された手法を参考にして **4-NH<sub>2</sub>-2-Me-TokyoMagenta (22)** の合成を行った [スキーム 3-1-1]。具体的には、2-メチル-4-アミノ安息香酸 (**15**) をフィッシャーエステル化反応によりアミノ安息香酸メチルエステル (**16**) に変換し、アミノ基をシリルで保護して (**17**) を得た。3-ブロモフェノール (**18**) の水酸基を TBS 基で保護し、ブロモベンゼン (**19**) を合成し (収率 95%)、*sec*-BuLi を用いたリチオ化反応の後、ジクロロジメチルシランと反応させて、ジフェニルシラン (**20**) を得た (収率 34%)。NBS を用いて 2 つのブロモ基を導入してジフェニルシラン (**21**) を合成し (収率 57%)、*sec*-BuLi を用いたリチオ化反応の後、安息香酸メチルエステル (**17**) と反応させた後、塩酸によりアミノ基のシリル、水酸基の TBS 基の脱保護を行い **4-NH<sub>2</sub>-2-Me-TokyoMagenta (22)** を得た (収率 13%)。最後に縮合剤 WSCD・HCl を用いて、**4-NH<sub>2</sub>-2-Me-TokyoMagenta (22)** に 5-メシル-2-ニトロ安息香酸 (**7**) を導入して **Ps-TM** を得た [スキーム 3-1-1]。



スキーム 3-1-1 Ps-TM の合成スキーム

## Ps-CF の合成

J. Grimm らにより報告されている合成手法を用いて、キサントン合成した<sup>43</sup>。次に、アミノ基をシリルで保護したブロモベンゼン (**13**) に *sec*-BuLi を用いたリチオ化反応を行い、キサントン (**23**) と反応させた後、塩酸によりアミノ基のシリルおよび水酸基の TBS 基を脱保護し、**4-NH<sub>2</sub>-2-Me-Carbofluorescein** (**24**) を得た。最後に縮合剤 WSCD・HCl を用いて、**4-NH<sub>2</sub>-2-Me-Carbofluorescein** (**24**) に 5-メシル-2-ニトロ安息香酸 (**7**) を導入して **Ps-CF** を得た。



スキーム 3-1-2 Ps-CF の合成スキーム

## 第2節 Ps-TM および Ps-CF を用いたライブセルイメージング

第1節にて合成した **Ps-TM** および **Ps-CF** を用いて、細胞内 GSTP1 活性を選択的に検出できるか否かの検証を行なった。

はじめに、**Ps-TM** および **Ps-CF** が GSH/GSTP1 存在下で蛍光強度が上昇するか否かを検証するため、反応前として 100 mM の pH7.4 のリン酸ナトリウム緩衝液における蛍光プローブ (2  $\mu$ M) の吸収・蛍光スペクトル、反応後として 1 mM の GSH, 3  $\mu$ g/mL の GSTP1 存在下, 100 mM の pH7.4 のリン酸ナトリウム緩衝液における蛍光プローブ (2  $\mu$ M) の吸収・蛍光スペクトルを測定した[図 3-2-1]。その結果、**Ps-TM** および **Ps-CF** の蛍光量子収率がそれぞれ 0.084 および 0.031 であったのに対し、GSH/GSTP1 のインキュベーションにより、蛍光量子収率が 0.568 (約 7 倍) および 0.610 (約 20 倍) となり、GSH/GSTP1 存在下で蛍光プローブの蛍光強度が上昇することが示された。

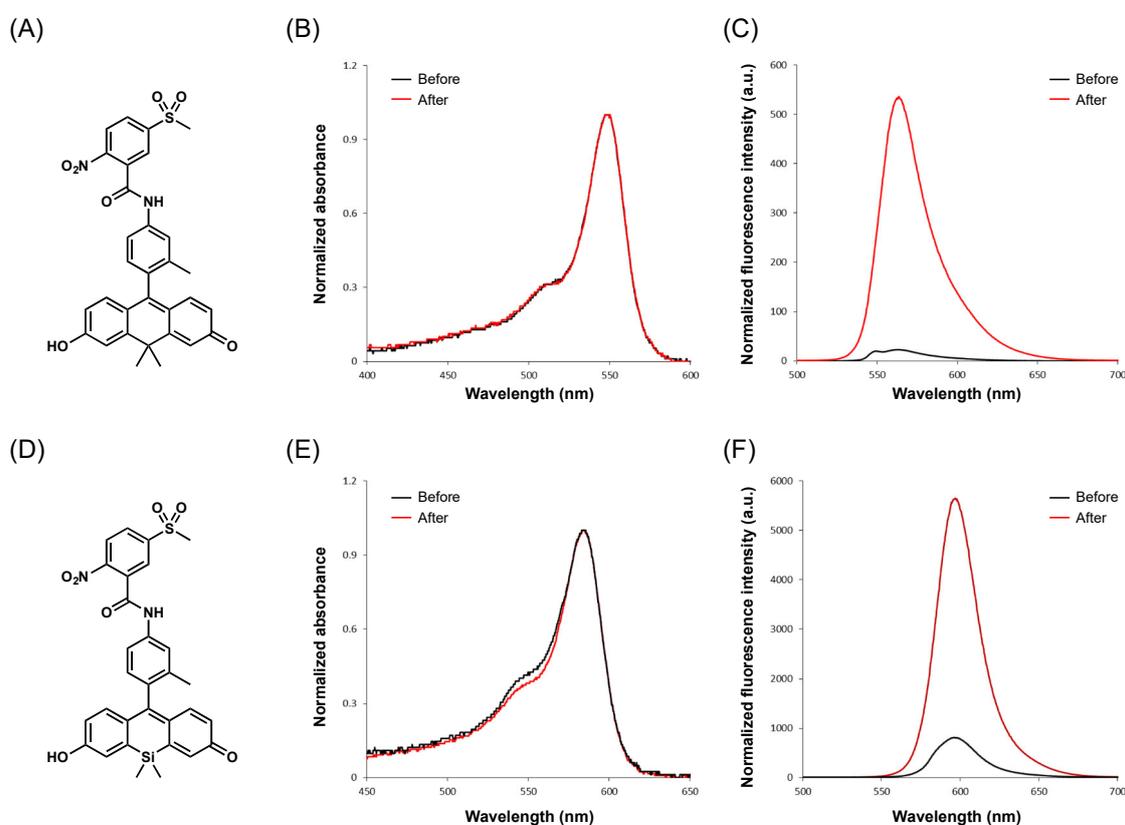


図 3-2-1 (A) **Ps-CF** の構造式, (B, C) 反応前後における **Ps-CF** の吸収・蛍光スペクトル, (D) **Ps-TM** の構造式, (E, F) 反応前後における **Ps-TM** の吸収・蛍光スペクトル

次に、**Ps-TM** および **Ps-CF** を用いたライブセルイメージングにより、細胞内 GSTP1 活性を選択的に検出できるか否かを検証した。実験系として、GSTP1 発現細胞である HT1080 細胞に対し、RNAi 法により siGSTP1 を処理して GSTP1 をノックダウンした細胞 (HT1080 siGSTP1) および siCtrl を処理した細胞 (HT1080 siCtrl) を用いた。その際、共焦点レーザー顕微鏡により同一視野内で評価できるよう、HT1080 siGSTP1 および、予め Cell tracker deep red で染色した HT1080 siCtrl を混合した共培養系を用いた [図 3-2-2 (A)]。HT1080 siCtrl および HT1080 siGSTP1 の共培養系に対して、HBSS を用いてグルタチオン抱合体の排出を担う排出トランスポーターの一つである MRP1 の阻害剤 **MK571** (10  $\mu$ M, 0.1%DMSO) を負荷し、室温にて 10 分間インキュベーションした。次に、HBSS を用いて **Ps-CF** および **Ps-TM** (2.0  $\mu$ M, 0.1%DMSO) を負荷し、室温にてインキュベーションした。その結果、**Ps-TM** を用いることで、蛍光強度の差異から GSTP1 発現細胞と GSTP1 ノックダウン細胞を識別できることが示唆された [図 3-2-2 (D, E)]。一方、**Ps-CF** を用いたイメージングでは、GSTP1 ノックダウン細胞からも強い蛍光が検出され、有意差はあるものの、蛍光強度の差異から GSTP1 発現細胞と GSTP1 ノックダウン細胞を識別することが困難であった [図 3-2-2 (B, C)]。以上より、**Ps-TM** を用いて、細胞内 GSTP1 活性を選択的に検出できることが示唆された。

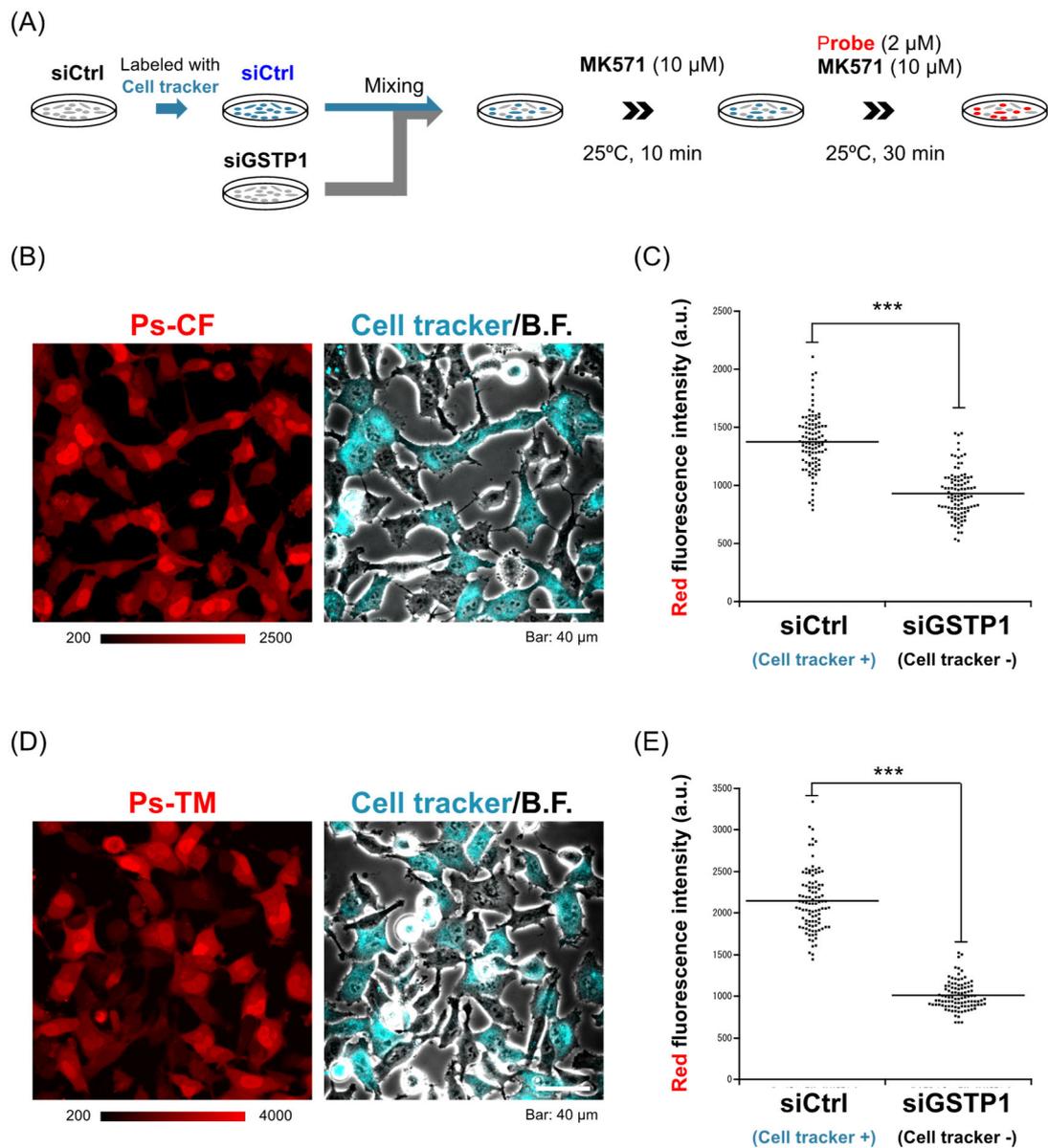


図 3-2-2 (A) 用いた実験系の概略図：RNAi 法により GSTP1 ノックダウン細胞 (siGSTP1) と予め Cell tracker で染色したコントロール細胞 (siCtrl) を共培養し、室温にて MK571 (10  $\mu$ M) および Ps-CF (2  $\mu$ M) あるいは Ps-TM (2  $\mu$ M) を負荷してライブセルイメージングを行なった。  
 (B) Ps-CF を用いたライブセルイメージング画像 (赤：Ps-CF, 青：Cell tracker), (C) ライブセルイメージングで検出された赤色蛍光のドットプロット図, (Student' s t-test, \*\*\*:  $P < 0.001$ ), (D) Ps-TM を用いたライブセルイメージング画像 (赤：Ps-TM, 青：Cell tracker),  
 (E) ライブセルイメージングで検出された赤色蛍光のドットプロット図, (Student' s t-test, \*\*\*:  $P < 0.001$ ),

### 第3節 新たに見出した Ps-CF の分光特性

第2節にて **Ps-CF** を用いたライブセルイメージングでは、蛍光強度の差異から GSTP1 発現細胞と GSTP1 ノックダウン細胞を識別することが困難であった。次に、**Ps-CF** を用いた FACS 解析にて、蛍光強度の差異から GSTP1 発現細胞を検出できるか否かを検証した。細胞として、GSTP1 発現がん細胞である Jurkat 細胞および GSTP1 非発現がん細胞である Raji 細胞を用いた。Jurkat 細胞および Raji 細胞に対して、HBSS を用いてグルタチオン抱合体の排出を担う排出トランスポートのの一つである MRP1 の阻害剤 **MK571** (10  $\mu$ M) を負荷し、37°C にて5分間インキュベーションした。次に、HBSS を用いて **Ps-CF** および **Ps-TM** (2.0  $\mu$ M) を負荷し、37°C にてインキュベーションした。FACS 解析の結果、GSTP1 発現細胞と GSTP1 非発現細胞における差異は僅かであった [図 3-3-1 (A, B)]。しかしながら、本解析の結果について、FITC (励起光：488 nm, 蛍光：530 nm) と PE (励起光：488 nm, 蛍光：585 nm) のチャンネルで二次元展開すると Jurkat 細胞と Raji 細胞を分離することができ [図 3-3-1 (C, D)], PE と FITC の比で解析することにより、2種類の細胞種を区別できることが明らかとなった [図 3-3-1 (E)]。

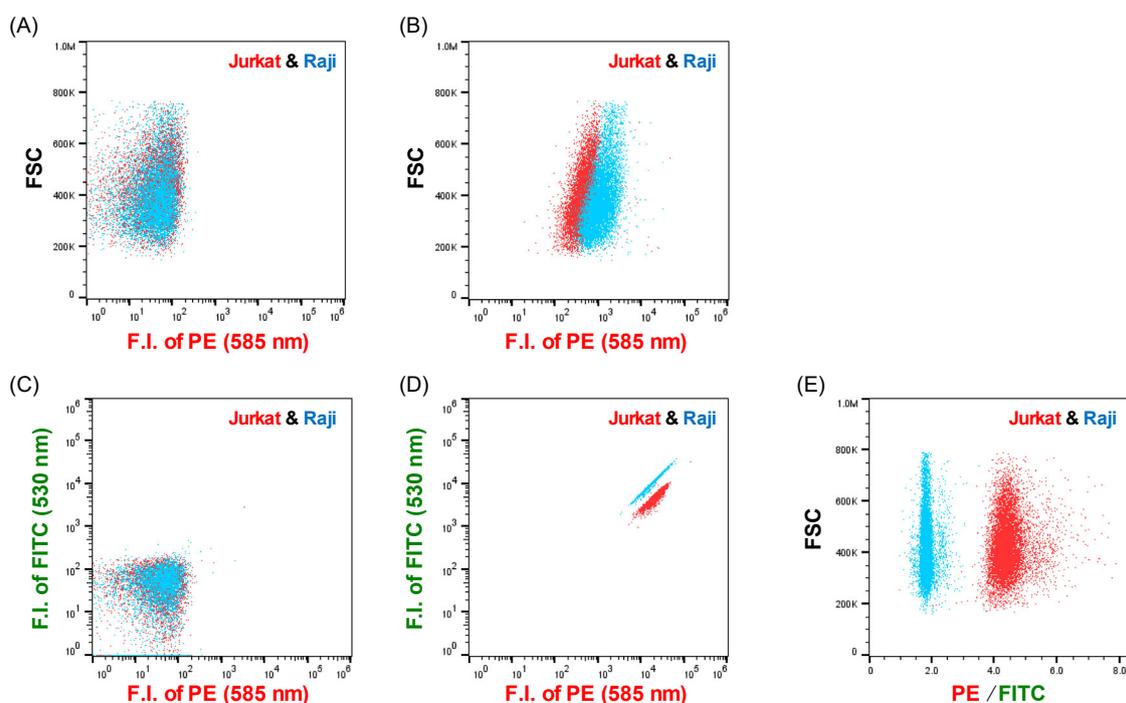


図 3-3-1 (A) Ps-CF を負荷する前の Jurkat 細胞および Raji 細胞の FACS 解析 (PE: 励起波長 : 488 nm, 蛍光波長 : 585 nm), (B) Ps-CF を用いた Jurkat 細胞および Raji 細胞の FACS 解析 (PE: 励起波長 : 488 nm, 蛍光波長 : 585 nm), (C) Ps-CF を負荷する前の Jurkat 細胞および Raji 細胞の FACS 解析 (FITC: 励起波長 : 488 nm, 蛍光波長 : 530 nm, PE: 励起波長 : 488 nm, 蛍光波長 : 585 nm), (D, E) Ps-CF を用いた Jurkat 細胞および Raji 細胞の FACS 解析 (FITC: 励起波長 : 488 nm, 蛍光波長 : 530 nm, PE: 励起波長 : 488 nm, 蛍光波長 : 585 nm),

検出法として定石である一波長励起一波長測法では Jurkat 細胞と Raji 細胞を区別できなかったが、一波長励起二波長測法では、これらを完全に分離することができた。一波長励起二波長測法で Jurkat 細胞と Raji 細胞を区別できた原因を究明するため、反応前後における吸収・蛍光スペクトルを測定した。その際、励起光として最大吸収波長ではなく、FACS 解析と同じ 488 nm を用いた。その結果、最大吸収波長 548 nm で励起した蛍光スペクトルとは異なる蛍光スペクトルが得られた。具体的には、488 nm で励起した蛍光スペクトルでは、564 nm を最大蛍光波長とする蛍光スペクトルの他に、520 nm 付近を最大蛍光波長とする蛍光スペクトルが存在した [図 3-3-2 (A, B)]。さらに、564 nm における蛍光強度が反応前後で 12.4 倍になるのに対して、520 nm 付近における蛍光強度は反応前後で 1.03 倍であり、ほとんど変化しないことが明らかとなった。

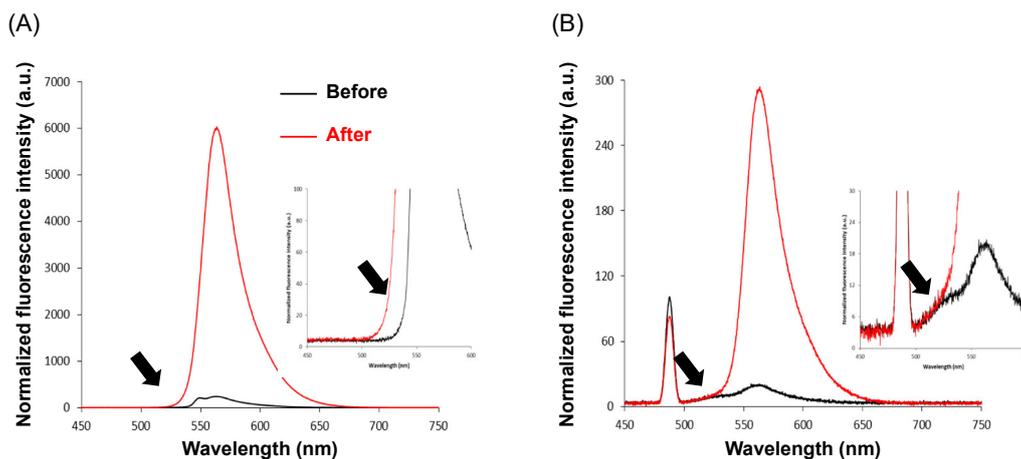
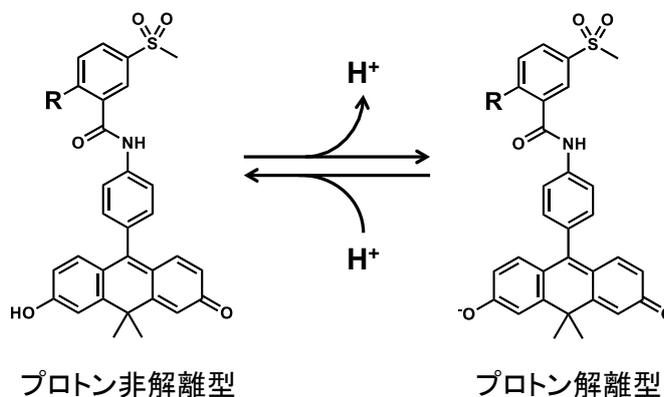


図 3-3-2 (A) 励起光 548 nm における反応前後の蛍光スペクトル, (B) 励起光 488 nm における反応前後の蛍光スペクトル

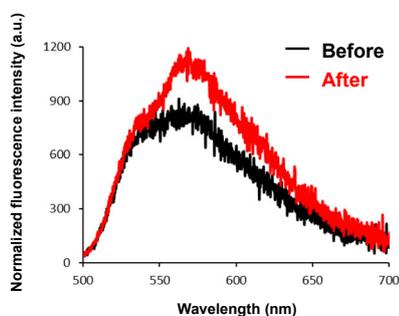
**Ps-CF** の  $pK_a$  は 6.8 であり，生理的 pH 条件下ではプロトン非解離型とプロトン解離型が存在する [図 3-3-3 (A)]。励起光 488 nm を用いることで，468 nm に最大吸収波長を有するプロトン非解離型も励起された結果，520 nm 付近に蛍光シグナルが検出されたと考えた。そこで，pH3 および pH10 において，**Ps-CF** のプロトン非解離型の最大吸収波長である 468 nm で励起した蛍光スペクトルを測定した。その結果，主にプロトン非解離型が存在する pH3 においては 520 nm 付近にシグナルが検出され，主にプロトン解離型が存在する pH10 においては 520 nm 付近にシグナルが検出されなかった [図 3-3-3 (B, C)]。この結果から，520 nm 付近の蛍光スペクトルがプロトン非解離型に由来することが示唆された。プロトン非解離型の LUMO レベルは，プロトン解離型の LUMO レベルよりも低いため，d-PeT 効率の低下に伴い反応前の蛍光がほとんど消光されず，520 nm 付近の蛍光は反応前後でほとんど変化しなかったと考えられる。

(A)

R = NO<sub>2</sub>: Before  
R = GS : After



(B)



(C)

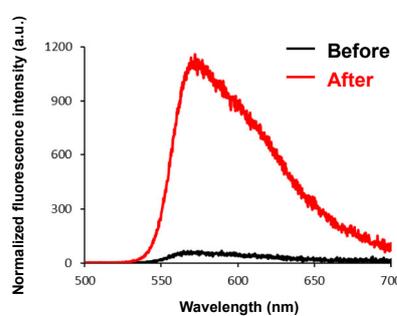


図 3-3-3 (A) Ps-CF のプロトン非解離型およびプロトン解離型の構造式，(B) pH3 における Ps-CF の反応前後の蛍光スペクトル，(C) pH10 における Ps-CF の反応前後の蛍光スペクトル

この結果より、FACS 解析にて得られた結果については、FITC のチャンネルは細胞内における反応前および反応後における蛍光プローブ全体の存在量を意味し、PE のチャンネルは反応後における蛍光プローブの存在量を意味することが示唆された。これらの結果より、**Ps-CF** を用いて細胞内 GSTP1 活性をレシオメトリックに検出できることが示唆された。

## 第 4 節 Ps-CF を用いた細胞応用

第 3 節において、一波長励起二波長測法を用いた FACS 解析にて、GSTP1 発現がん細胞である Jurkat 細胞と GSTP1 非発現がん細胞である Raji 細胞を区別できることが示された。次に、第 2 章の第 4 節にて行なった実験と同様に、エピジェネティックな制御により GSTP1 発現が制御されている Raji 細胞に対して DNA メチル化阻害剤である 5-アザ-2'-デオキシシチジン (DAC) を処理し、エピジェネティックな制御が解かれた GSTP1 発現細胞を検出できるか否かを検証した。

DAC (0, 100 nM) を 2, 4 日間処理した Raji 細胞に対して、HBSS を用いてグルタチオン抱合体の排出を担う排出トランスポーターの一つである MRP1 の阻害剤 MK571 (10 μM) を負荷し、37°C にて 5 分間インキュベーションした。次に、HBSS を用いて Ps-CF (2.0 μM) を負荷し、37°C にてインキュベーションした [図 3-4-1 (A)]。FACS 解析の結果、100 nM の DAC を処理した Raji 細胞において、PE と FITC の蛍光強度比の高い細胞が検出された [図 3-4-1 (B, C, D)]。その際、ウェスタン・ブロッティング解析にて、DAC (100 nM) を処理した Raji 細胞において GSTP1 の発現が確認できた [図 3-4-1 (E)]。これらの結果より、Ps-CF を用いて、エピジェネティックな変化による GSTP1 発現を細胞レベルで検出できることが示唆された。

本章の第 2 節にて行なった Ps-CF を用いたライブセルイメージングでは、蛍光強度に差異から GSTP1 発現細胞と GSTP1 ノックダウン細胞を識別することは困難であった。そこで、全く同じ実験系について、一波長励起二波長測法を用いたライブセルイメージングを行ない、蛍光強度比の差異から GSTP1 発現細胞と GSTP1 ノックダウン細胞を識別できるか否かを検証した。その結果、蛍光強度非の差異から GSTP1 発現細胞と GSTP1 ノックダウン細胞を識別できることが示された [図 3-4-2]。これらの結果より、Ps-CF を用いた一波長励起二波長測法により、細胞内 GSTP1 活性を選択的に検出できることが示された。

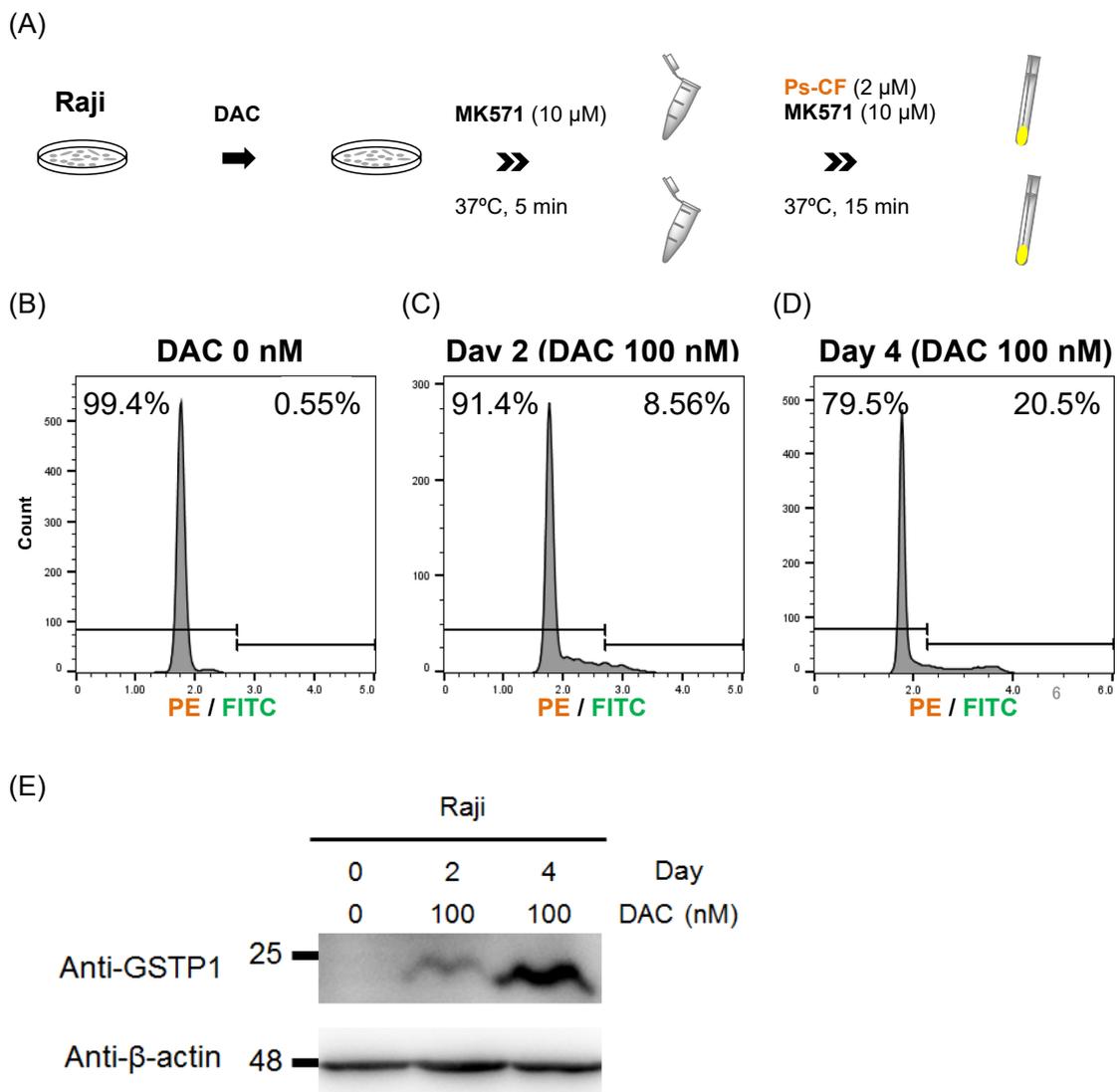


図 3-4-1 (A) 用いた実験系の概略図 : GSTP1 非発現細胞である Raji 細胞に対して, DAC (100 nM) を 2, 4 日間処理した後, 37°C にて MK571 (10 μM) および Ps-CF (2 μM) を負荷して FACS 解析を行なった. (B) DAC を処理していない Raji 細胞の FACS 解析, (C) DAC (100 nM) を 2 日間処理した Raji 細胞の FACS 解析, (D) DAC (100 nM) を 4 日間処理した Raji 細胞の FACS 解析, (E) 用いた Raji 細胞における GSTP1 および β アクチンのウェスタン・ブロッティング解析

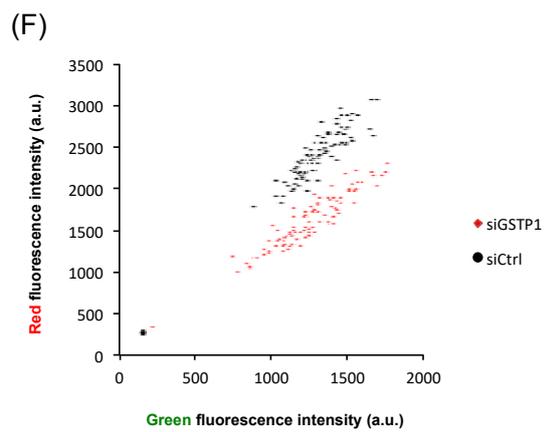
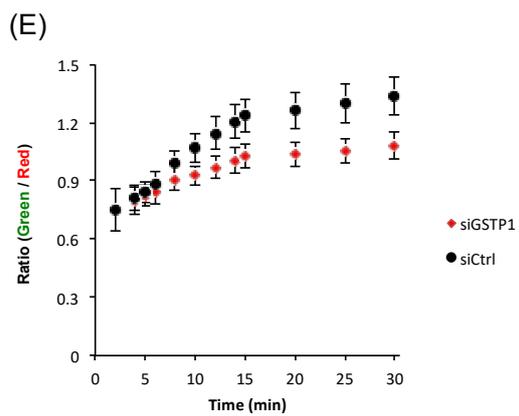
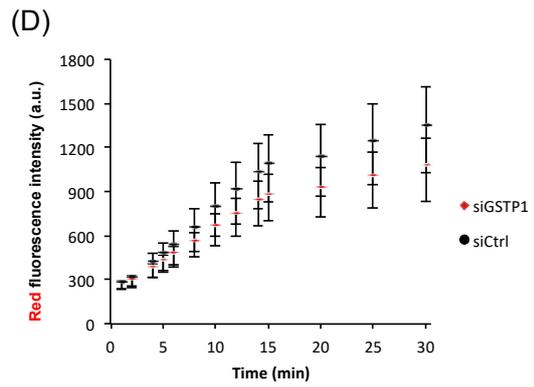
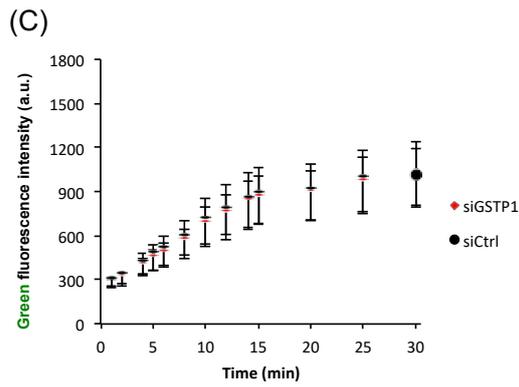
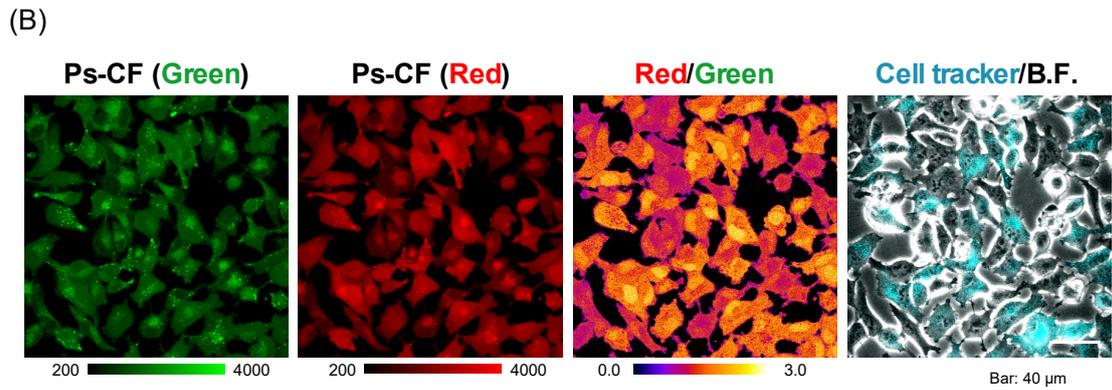
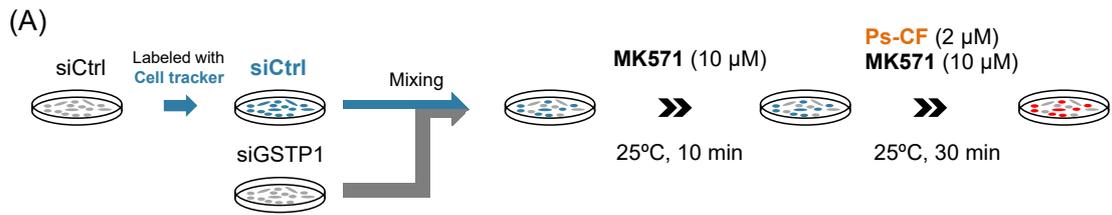


図 3-4-2 (A) 用いた実験系の概略図 : RNAi 法により GSTP1 ノックダウン細胞 (siGSTP1) と予め Cell tracker で染色したコントロール細胞 (siCtrl) を共培養し, 室温にて MK571 (10  $\mu$ M) および Ps-CF (2  $\mu$ M) を負荷してライブセルイメージングを行なった. (B) Ps-CF を用いて 30 分間インキュベーションした後のライブセルイメージング画像 (緑 : 励起波長 : 473 nm, 蛍光波長 : 496 nm, 赤 : 励起波長 : 473 nm, 蛍光波長 : 559 nm, 青 : Cell tracker), (C) ライブセルイメージングで検出された緑色蛍光の蛍光強度の経時変化, (D) ライセルイメージングで検出された赤色蛍光の蛍光強度の経時変化, (E) ライセルイメージングで検出された赤色蛍光と緑色蛍光の蛍光強度比の経時変化, (F) Ps-CF を負荷して 30 分後に検出された緑色蛍光および赤色蛍光の蛍光強度のドットプロット図

第 2 章の第 2 節における **Ps-TAc** を用いた各種がん細胞のライブセルイメージングでは, HT29 細胞や HCT116 細胞において強い蛍光を発する細胞とほとんど蛍光を発さない細胞が混在していた. しかしながら, ほとんど蛍光を発さない細胞について, 細胞内における蛍光プローブの存在量の差異によるものであるのか, GSTP1 活性が低いことを反映しているのかを判断することが困難であった. そこで, HT29 細胞や HCT116 細胞について, **Ps-CF** を用いたライブセルイメージングを行なった. その結果, HT29 細胞では一細胞レベルで蛍光強度比が異なる結果が得られた一方, HCT116 細胞では蛍光強度比がおおよそ同程度である結果が得られた. HT29 細胞においては, GSTP1 活性の高い細胞と GSTP1 活性の低い細胞がヘテロに存在することが示唆された. **Ps-CF** を用いたレシオメトリックなイメージング法の確立により, **Ps-TAc** ではできなかった一細胞レベルでの GSTP1 活性の評価が可能となった.

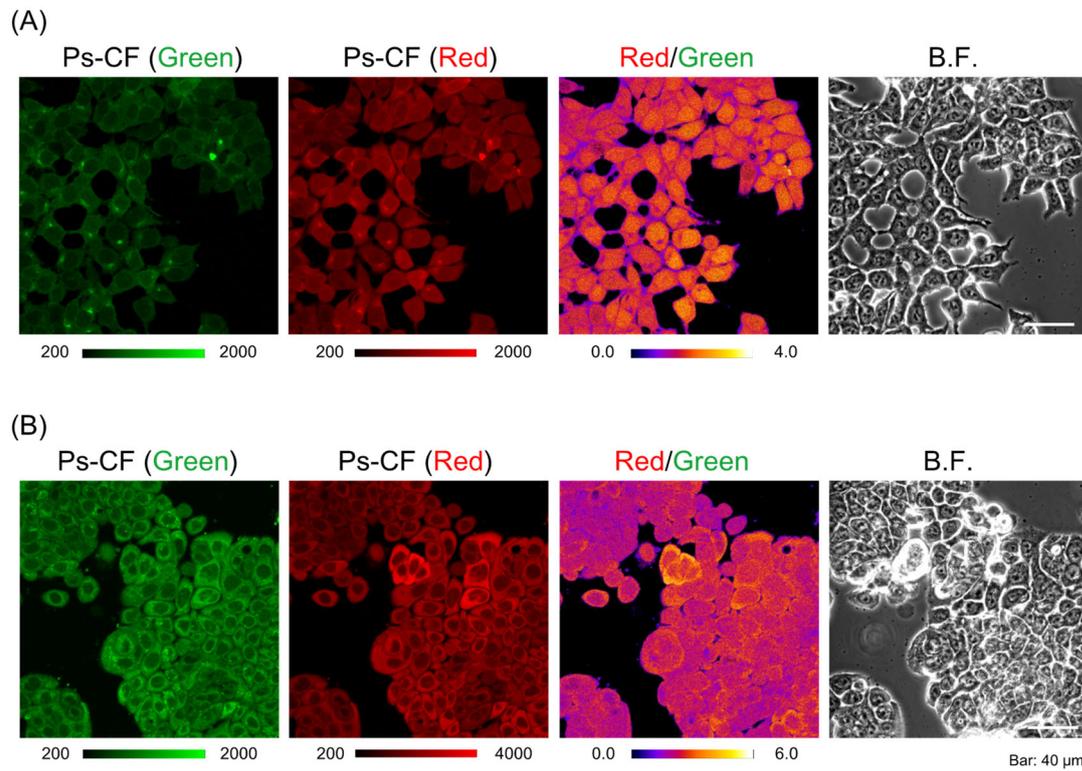


図 3-4-3 (A) Ps-CF を用いた HCT116 細胞のライブセルイメージング画像, (B) Ps-CF を用いた HT29 細胞のライブセルイメージング画像 (緑: 励起波長: 473 nm, 蛍光波長: 496 nm, 赤: 励起波長: 473 nm, 蛍光波長: 559 nm)

## 第5節 小括

**Ps-TAc** とは励起・蛍光波長の異なる **GSTP1** 選択的活性検出蛍光プローブ **Ps-TM** を開発した。**Ps-TM** を用いたライブセルイメージングにおいて **GSTP1** 発現細胞と **GSTP1** ノックダウン細胞を蛍光強度の差異から識別できたことから、**Ps-TM** が細胞内 **GSTP1** 活性を選択的に検出することのできる優れた蛍光プローブであることが示された。**Ps-TM** は赤色蛍光を発する蛍光プローブであるため、**GGT** 活性検出蛍光プローブ **gGlu-HMRG** や  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性検出蛍光プローブ **HMRef- $\beta$ Gal** といった緑色蛍光を発する蛍光プローブとの併用により、マルチカラーイメージングが期待できる。

本研究では、Carbofluorescein を母核とした **GSTP1** 選択的活性検出蛍光プローブ **Ps-CF** を 488 nm の波長で励起すると、反応前後でほとんど蛍光強度が変化しない領域 (520 nm 付近) と、大きく変化する領域 (565 nm 付近) が存在することを見出した。520 nm 付近の蛍光は、プロトン非解離型が存在する酸性条件下 (pH 3) では検出されるが、プロトン解離型が存在する塩基性条件下 (pH10) では検出されなかったことから、520 nm 付近の蛍光はプロトン非解離型に由来するものであると推察した。プロトン解離型に比べてプロトン非解離型の LUMO レベルが低いため、**d-PeT** 効率の低下により蛍光が消光されにくい。すなわち、520 nm における蛍光強度が反応前後でほとんど変化しない原因として、**d-PeT** 効率の低いプロトン非解離型では、反応前の蛍光がほとんど消光の影響を受けないためであると推察した。

実際に、**Ps-CF** を用いた一波長励起二波長測法により、**FACS** 解析にて **GSTP1** 発現細胞である **Jurkat** 細胞と **GSTP1** 非発現細胞である **Raji** 細胞を蛍光強度非の差異から区別できること、ライブセルイメージングにて **GSTP1** 発現細胞と **GSTP1** ノックダウン細胞を蛍光強度非の差異から識別できることが示された。以上のことから、**Ps-CF** が細胞内 **GSTP1** 活性を選択的に検出することのできる一波長励起二波長測法型の優れた蛍光プローブであることが示された。

## 第4章 総括

本研究では、GSTP1 選択的にグルタチオン抱合反応を受ける芳香族ニトロ化合物を見出した。TokyoGreen を母核とし、蛍光制御団として見出した芳香族ニトロ化合物を組み込んだ蛍光プローブ **Ps-TG** は GSH/GSTP1 とのインキュベーションにより約 100 倍の蛍光強度上昇を示した。さらに **Ps-TG** の細胞膜透過型誘導体である **Ps-TAc** を用いて GSTP1 発現がん細胞の検出やがん細胞と正常細胞を識別することができ、**Ps-TAc** が細胞内 GSTP1 活性を選択的に検出する蛍光プローブとして有用であることが示された。

他の蛍光プローブとのマルチカラーイメージングを行うことを想定して、TokyoMagenta を母核とした GSTP1 活性検出蛍光プローブ **Ps-TM** および Carbofluorescein を母核とした GSTP1 活性検出蛍光プローブ **Ps-CM** を合成した。**Ps-TM** および **Ps-CF** は GSH/GSTP1 とのインキュベーションにより大きな蛍光強度上昇を示し、**Ps-TM** は細胞内 GSTP1 活性を選択的に検出する優れた蛍光プローブであることが示唆された。一方、**Ps-CF** を用いたライブセルイメージングでは、細胞内 GSTP1 活性を選択的に検出することは困難であった。

TokyoGreen や TokyoMagenta, Carbofluorescein といった蛍光分子を母核とした蛍光プローブは、水溶液中に存在するプロトン解離型であるアニオン型の分子を励起するのが定石である。本研究では、Carbofluorescein を母核とする **Ps-CF** のプロトン解離型であるアニオン型ではなく、プロトン非解離型であるニュートラル型を励起することで、一波長励起二波長測法が可能となること、本測定法がライブセルイメージングや FACS 解析にも応用できることをはじめて示した。これにより、**Ps-CF** が一波長励起二波長測法型の優れた GSTP1 選択的活性検出蛍光プローブであることが示された。新たに見出した知見は、GSTP1 選択的活性検出蛍光プローブのみならず、他の蛍光プローブに対しても適用でき、蛍光プローブの新たな分子設計法として期待できると考えられる。

## 実験の項目

### Materials

Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI1640), and phosphate-buffered saline (PBS) were purchased from Nissui Pharmaceutical (Tokyo Japan). Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) was obtained from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Hoechst 33258 pentahydrate (10 mg/ml in water). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Alexa647-conjugated Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 647) (Cat. No. ab150115) was obtained from Abcam, Inc. (Cambridge, UK). General chemicals for organic synthesis and analysis were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan), Tokyo Chemical Industries Co., Ltd. (Tokyo, Japan), Kanto Chemical Co., Inc. (Tokyo, Japan), and Sigma-Aldrich Chemical Co., Ltd. (St. Louis, MO, USA), and used without further purification.

### Instruments

Identification of synthesized compounds. NMR spectra of synthesized compounds were recorded on a Bruker DRX-400 spectrometer at 400 MHz for  $^1\text{H}$ -NMR and at 100 MHz for  $^{13}\text{C}$ -NMR. Chemical shifts ( $\delta$  values) in  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR were calibrated to the residual solvent resonance at 2.05 and 29.84 ppm for acetone- $d_6$ , and 2.5 and 39.52 ppm for DMSO- $d_6$ . Mass spectra were obtained using a Micromass LCT spectrometer (Waters, Milford, MA, USA) in ESI positive or negative mode.

Semi-preparative HPLC was performed on a Mightysil RP-18 GP column (250 mm  $\times$  20 mm (5  $\mu\text{m}$ ); Kanto Chemical, Tokyo, Japan) at a flow rate of 9 ml/min using an HPLC system composed of a pump (PU-980, JASCO) and a detector (UV-975, JASCO). Data were acquired by Clarity Lite software (DataApex, Prague, Czech Republic). Eluent A: 10 mM ammonium acetate, B: acetonitrile. Subsequently, a fraction containing the target compound was analysed by reverse-phase HPLC on an Intertsustain C18 column (250 mm  $\times$  4.6 mm; GL Sciences, Inc.) at a flow rate of 0.2 ml/min using an HPLC system composed of two pumps (LC-20AD, Shimadzu) and a detector (SPD-M20A and RF-20AXs for absorbance and fluorescence, respectively)

operated by Clarity software through a system controller (CVM-20A, Shimadzu). Eluent A: 10 mM ammonium acetate, B: acetonitrile.

HPLC analysis was performed on an Intertsustain C18 column (250 mm × 4.6 mm; GL Sciences, Inc.) at a flow rate of 1.0 ml/min using an HPLC system composed of a pump (LC-20AD, Shimadzu) and a detector (SPD-M20A and RF-20Axs for absorbance and fluorescence, respectively). Eluent A: 10 mM ammonium acetate, B: acetonitrile. LC-MS analysis was performed on an Intertsustain C18 column (150 mm × 3.0 mm; GL Sciences, Inc.) at a flow rate of 0.2 ml/min using LC-MS (Shimadzu Quadrupole LC-MS). Eluent A: 10 mM ammonium acetate, B: acetonitrile. LabSolutions software was used for operation of the system and data analysis.

UV-visible spectra were obtained on a V-550 UV/VIS spectrophotometer (JASCO Corp., Tokyo, Japan). Fluorescence photometric studies were performed on an RF-5300PC spectrofluorophotometer (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan).

Live cell imaging was performed using a FV10i confocal microscope with the FLUOVIEW software and an oil immersion objective lens UPLSAPO60XO 60× (NA 1.35). Fluorescence images of **Ps-TAc**, **Ps-CF** and **Ps-TM** were taken via the FITC (excitation at 473 nm), the MiCy/mKO/FRET (excitation at 473 nm) and the Mito Tracker Red (excitation at 559 nm) channels, respectively. Immunofluorescence imaging was performed using a FV1000 confocal microscope with the FLUOVIEW software and an oil immersion objective lens UPLSAPO60XO 60× (NA 1.42). Fluorescence images of DAPI and Alexa647 were taken via the corresponding channels with excitation at 473 nm and 635 nm, respectively.

Flow cytometry was performed using a Cell Sorter SH800S (Sony Japan). Fluorescence detection of **Ps-CF** was taken via the FITC (excitation at 488 nm) and PE (excitation at 488 nm) channels.

## **Fluorescence imaging**

### **Ps-TAc**

Prior to the imaging experiments, cells were rinsed twice with PBS, then incubated in HBSS (+) containing 2.5 μM **Ps-TAc** (0.1% DMSO as a cosolvent) for 5 min at 37°C.

Cells were washed twice with PBS. 1 ml HBSS (+) was added, and the cells were subjected to microscopic imaging. Cancer cells seeded one day before transfection were washed twice with PBS and loaded with 10  $\mu\text{g/ml}$  Hoechst 33258 in HBSS (+) for 20 min, and then incubated with 2.5  $\mu\text{M}$  Ps-TAc in HBSS (+) at room temperature (25  $^{\circ}\text{C}$ ). During the incubation, fluorescence and bright-field images were captured every 2 min for 20 min.

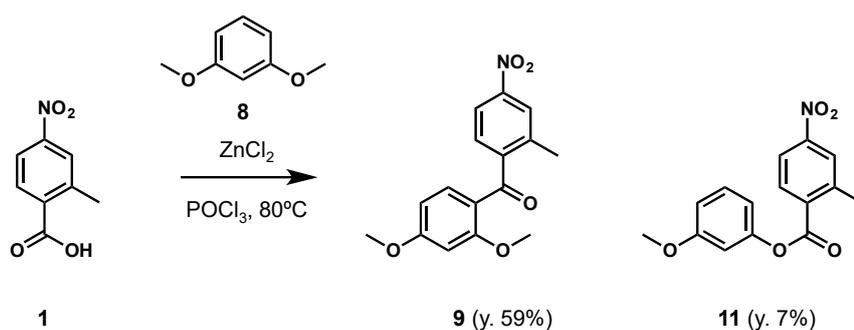
### Ps-CF and Ps-TM

Prior to the imaging experiments, cells were rinsed twice with PBS, then incubated in HBSS (+) containing 10  $\mu\text{M}$  MK571 (0.1% DMSO as a cosolvent) for 10 min at room temperature (25  $^{\circ}\text{C}$ ). Then incubated in HBSS (+) containing 2.0  $\mu\text{M}$  Ps-CF or Ps-TM (0.1% DMSO as a cosolvent) and 10  $\mu\text{M}$  MK571 (0.1% DMSO as a cosolvent) at room temperature (25  $^{\circ}\text{C}$ ) and the cells were subjected to microscopic imaging without PBS wash.

### Flow cytometry

$1.2 \times 10^5$  cells were incubated in HBSS (+) containing 10  $\mu\text{M}$  MK571 (0.1% DMSO as a cosolvent) for 5 min at 37  $^{\circ}\text{C}$ . Then incubated in HBSS (+) containing 2.0  $\mu\text{M}$  Ps-CF (0.1% DMSO as a cosolvent) and 10  $\mu\text{M}$  MK571 (0.1% DMSO as a cosolvent) for 15 min at 37  $^{\circ}\text{C}$  and the cells were subjected to cell sorting without PBS wash.

### Organic synthesis



### (2,4-dimethoxyphenyl)(2-methyl-4-nitrophenyl)methanone (9)

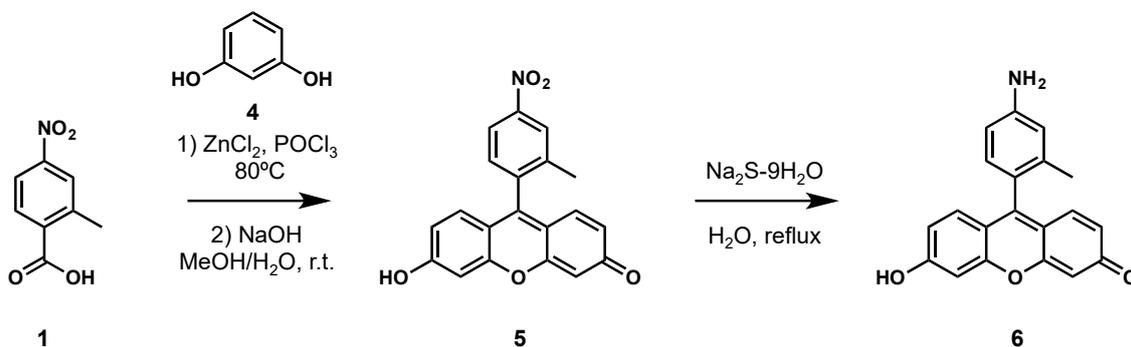
A suspension of **1** (348 mg, 1.9 mmol), **8** (486  $\mu$ L, 3.8 mmol) and ZnCl<sub>2</sub> (514 mg, 3.8 mmol) in POCl<sub>3</sub> (5.0 mL) was stirred at 80°C for 3h and then cooled to room temperature. The reaction mixture was poured onto H<sub>2</sub>O (200 mL) on ice and then partitioned between AcOEt and H<sub>2</sub>O. The organic layer was washed two times with H<sub>2</sub>O, 1N NaOH, brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The crude was purified with silica gel column chromatography (hexane/AcOEt: 10/1) to afford the crude compound **9** (334 mg, 1.1 mmol, y. 59%) and **11** (37 mg, 0.13 mmol, 7%) as yellow solid.

### (2,4-dimethoxyphenyl)(2-methyl-4-nitrophenyl)methanone (9)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.09 (1H, d,  $J = 2.3$ ), 8.03 (1H, dd,  $J = 8.5, 2.1$ ), 7.69 (1H, d,  $J = 8.7$ ), 7.34 (1H, d,  $J = 8.2$ ), 6.57 (1H, dd,  $J = 8.7, 2.3$ ), 6.42 (1H, d,  $J = 2.3$ ), 3.88 (3H, s), 3.58 (3H, s), 2.39 (3H, s), <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  194.8, 165.6, 161.4, 148.1, 147.7, 137.3, 133.8, 127.7, 125.2, 120.5, 120.0, 105.6, 98.5, 55.6, 55.5, 19.7

### 3-methoxyphenyl 2-methyl-4-nitrobenzoate (11)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.28 (1H, d,  $J = 8.7$ ), 8.18 (1H, d,  $J = 2.3$ ), 8.15 (1H, dd,  $J = 8.7, 2.3$ ), 7.36 (1H, t,  $J = 8.2$ ), 6.89-6.79 (2H, m), 6.77 (1H, t,  $J = 2.5$ ), 3.84 (3H, s), 2.78 (3H, s), <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  200.3, 160.6, 151.3, 149.8, 143.0, 134.2, 132.1, 130.1, 126.4, 120.8, 113.7, 112.1, 107.6, 55.5, 21.9



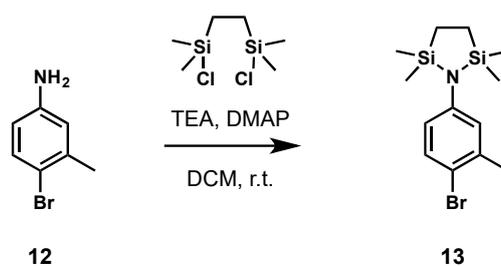
### 9-(4-amino-2-methylphenyl)-6-hydroxy-3H-xanthen-3-one

#### (4-NH<sub>2</sub>-2-Me-TokyoGreen; **6**)

A suspension of **1** (500 mg, 2.8 mmol), **4** (1.2 g, 11 mmol) and ZnCl<sub>2</sub> (1.6 g, 11 mmol) in POCl<sub>3</sub> (1.5 mL) was stirred at 80°C under Ar atmosphere for 30 min and then POCl<sub>3</sub>

(1.5 mL) was added and stirred at 80°C for 20 min and then POCl<sub>3</sub> (1.0 mL) was added and stirred at 80°C for 2.5 h and then cooled to room temperature. The reaction mixture was poured onto MeOH (20 mL) on ice and basified with 10N NaOH to pH14 on ice and stirred at room temperature for 1 h. The reaction mixture was acidified with conc. HCl and sat. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> to pH2 and then partitioned between AcOEt and sat. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. The liquid layer was extracted two times with AcOEt. The organic layer was washed two times with brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The crude was purified with silica gel column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeCN/MeOH: 10/1/1) to afford the crude compound **5** (81 mg) as red solid.

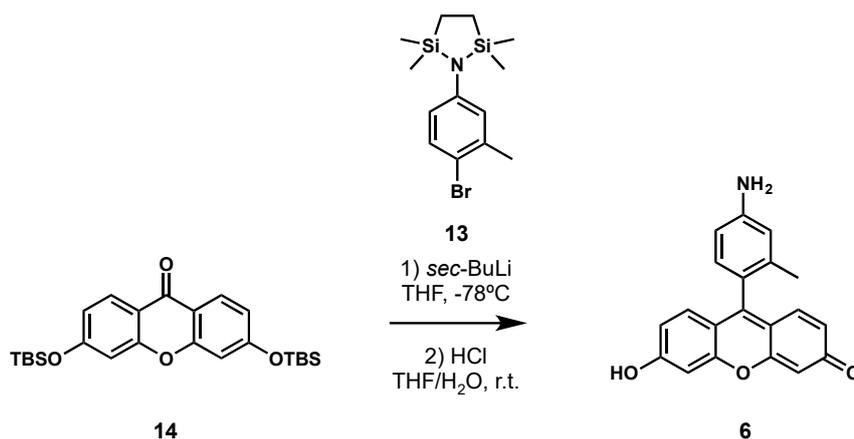
A solution of the crude compound (81 mg) and Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O (238 mg, 0.99 mmol) in H<sub>2</sub>O (6.0 mL) was stirred at 50°C for 70min and then the reaction mixture was cooled to room temperature. The reaction mixture was poured onto sat. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and then partitioned between AcOEt and sat. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. The liquid layer was extracted two times with AcOEt. The organic layer was washed with sat. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The crude was purified with silica gel column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeCN: 10/1 to CHCl<sub>3</sub>/MeOH: 4/1) to afford the title compound **6** (152 mg, 0.48 mmol, y. 52%) as red solid.



### 1-(4-bromo-3-methylphenyl)-2,2,5,5-tetramethyl-1,2,5-azadisilolidine (**13**)

A suspension of **12** (209 mg, 1.1 mmol), DMAP (20 mg, 0.17 mmol), triethylamine (600 μL, 4.3 mmol) and 1,2-Bis(chlorodimethylsilyl)ethane (423 mg, 2.0 mmol) in dichloromethane (5.0 mL) was stirred at room temperature for 24 h under Ar atmosphere and then partitioned between AcOEt and sat. NaHCO<sub>3</sub>. The organic layer was washed two times with sat. NaHCO<sub>3</sub> and 1N NaOH, brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo to afford the title compound **13** (299 mg, 0.91 mmol, yield 81%) as brown oil.

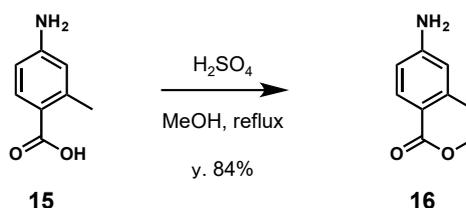
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  7.33 (1H, d,  $J = 8.7$ ), 6.77 (1H, d,  $J = 3.2$ ), 6.61 (1H, dd,  $J = 8.5, 3.0$ ), 2.25 (3H, s), 0.80 (4H, s), 0.18 (12H, s),  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  146.9, 137.5, 132.4, 124.8, 121.9, 114.5, 22.7, 7.9, -0.16



**9-(4-amino-2-methylphenyl)-6-hydroxy-3H-xanthen-3-one**  
**(4-NH<sub>2</sub>-2-Me-TokyoGreen; 6)**

To a solution of **13** (450 mg, 1.4 mmol) in THF (4.0 mL), 1.0 M cyclohexane/*n*-hexane solution of *sec*-BuLi (2.0 mL, 2.0 mmol) was added dropwise at  $-78^\circ\text{C}$  under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at  $-78^\circ\text{C}$  for 30 min and then **14** (422 mg, 0.92 mmol) in THF (4.0 mL) was added dropwise at  $-78^\circ\text{C}$  and stirred at  $-78^\circ\text{C}$  for 20 min. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h and then 1N HCl was added and stirred at room temperature and then partitioned between AcOEt and sat.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . The liquid layer was extracted three times with AcOEt and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and concentrated in vacuo. The crude was purified with silica gel column chromatography ( $\text{CHCl}_3/\text{MeCN}$ : 10/1 to  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ : 4/1) to afford the title compound **6** (152 mg, 0.48 mmol, yield 52%) as orange solid.

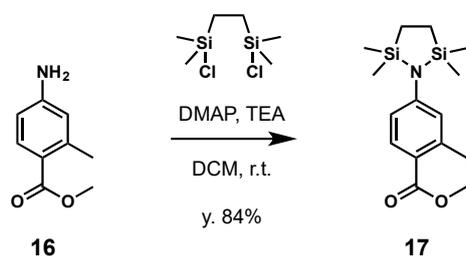
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  6.99 (2H, d,  $J = 9.1$ ), 6.85 (1H, d,  $J = 8.2$ ), 6.70-6.42 (6H, m), 5.43 (3H, br), 1.89 (3H, s), HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{NS}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ : 318.1130, found: 318.1124 (-0.6 mmu).



#### methyl 4-amino-2-methylbenzoate (**16**)

To a suspension of **15** (2.7 g, 18.1 mmol) in methanol (40.0 mL), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added dropwise. The solution was refluxed at 80°C under Ar atmosphere for 12h and then cooled to room temperature. The reaction mixture was partitioned between AcOEt and sat. NaHCO<sub>3</sub>. The organic layer was washed two times with sat. NaHCO<sub>3</sub>, brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo to afford the title compound **16** (165 mg, 0.54 mmol, yield 84%) as light brown solid.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.61(1H, d, *J* = 9.1), 6.42-6.34 (2H, m), 5.82 (2H, br), 3.68 (3H, s), 2.39 (3H, s), <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 166.8, 152.6, 141.9, 132.7, 115.7, 114.8, 110.6, 50.9, 22.2

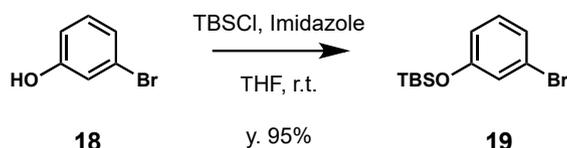


#### Methyl 2-methyl-4-(2,2,5,5-tetramethyl-1,2,5-azadisilolidin-1-yl)benzoate (**17**)

To a solution of **16** (105 mg, 0.64 mmol) in dichloromethane (2.0 mL), TEA (256 μL, 1.9 mmol), DMAP (5 mg, 0.041 mmol) and 1,2-bis(chlorodimethylsilyl)ethane (165 mg, 0.77 mmol) were added at room temperature. The reaction mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 20 h and then partitioned between AcOEt and sat NaHCO<sub>3</sub>. The organic layer was washed two times with sat NaHCO<sub>3</sub>, brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The crude product was vacuum filtered through silica gel and washed with a solution of hexane/AcOEt: 10/1 to afford the title compound **17** (165 mg, 0.54 mmol, yield 84%) as yellow oil.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.79 (1H, d, *J* = 8.2), 6.81 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.7), 6.79 (1H, d, *J* = 2.3), 3.77 (3H, s), 2.52 (3H, s), 0.89 (4H, s), 0.30 (12H, s), <sup>13</sup>C-NMR (100

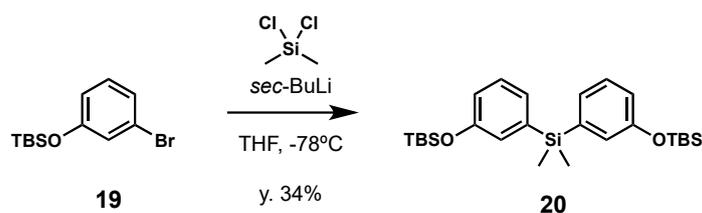
MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  167.7, 153.2, 142.5, 133.0, 124.8, 120.8, 119.3, 51.4, 22.4, 87.4, -0.13



### (3-bromophenoxy)(tert-butyl)dimethylsilane (**19**)

To a solution of **18** (2.6 g, 15.1 mmol) in THF (20 mL), imidazole (2.0 g, 29.7 mmol) and a solution of TBS-Cl (3.4 g, 22.6 mmol) in THF (10 mL) were added at room temperature. The reaction mixture was stirred at room temperature under argon atmosphere for 1h and then partitioned between hexane and sat. NaHCO<sub>3</sub>. The organic layer was washed with sat NaHCO<sub>3</sub>, brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The crude product was vacuum filtered through silica gel and washed with hexane to afford the title compound **19** (4.1 g, 14.4 mmol, yield 95%) as colorless oil.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7.21 (1H, t, *J* = 8.0), 7.14 (1H, dt, *J* = 8.1, 1.5), 7.05 (1H, t, *J* = 2.1), 6.92-6.86 (1H, m), 0.98 (9H, s), 0.22 (6H, s), <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  157.5, 131.8, 125.3, 124.0, 122.9, 119.9, 25.9, 18.7, -4.5,

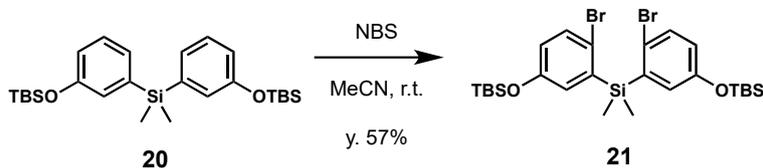


### bis(3-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)dimethylsilane (**20**)

To a solution of **19** (401 mg, 1.4 mmol) in THF (4.0 mL), 1.0 M cyclohexane/*n*-hexane solution of *sec*-BuLi (2.0 mL, 2.0 mmol) was added dropwise at -78°C under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at -78°C for 30 min and then dichlorodimethylsilane (76  $\mu$ L, 0.63 mmol) in THF (0.7 mL) was added dropwise at -78°C and stirred at -78°C for 90 min. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2.5 h and then partitioned between AcOEt and sat. NH<sub>4</sub>Cl. The organic layer was washed with sat NH<sub>4</sub>Cl, brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, and

concentrated in vacuo. The crude was purified with silica gel column chromatography (hexane/AcOEt: 20/1 to 10/1) to afford the title compound **20** (222 mg, 0.47 mmol, yield 34%) as colorless oil.

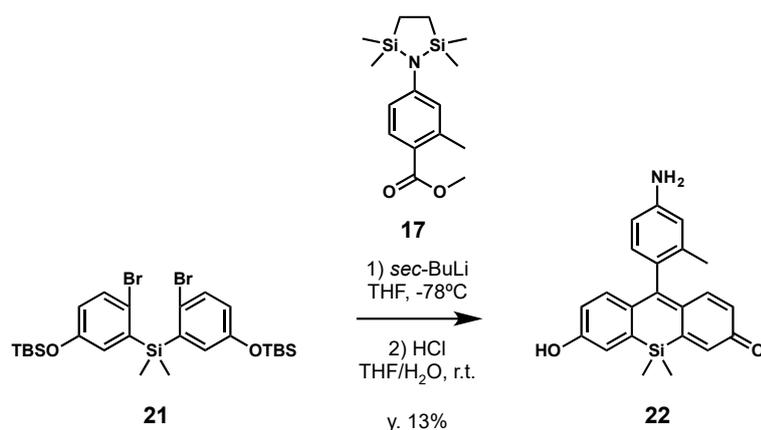
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$  7.26 (2H, t,  $J = 7.8$ ), 7.12 (2H, d,  $J = 8.2$ ), 6.99 (2H, d,  $J = 2.7$ ), 6.88 (2H, dd,  $J = 8.5, 2.1$ ), 0.96 (18H, s), 0.51 (6H, s), 0.16 (12H, s),  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$  156.0, 140.5, 130.0, 127.8, 126.2, 121.6, 26.0, 18.8, -2.5, -4.3, HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{O}_2\text{NaSi}_3$  [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ : 495.2547, found: 495.2549 (+0.2 mmu).



#### **bis(2-bromo-5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)dimethylsilane (21)**

A suspension of **20** (105 mg, 0.22 mmol) and *N*-bromosuccinimide (79 mg, 0.44 mmol) in MeCN (1.0 mL) was stirred at room temperature under Ar atmosphere for 19h and then partitioned between AcOEt and sat.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . The organic layer was washed two times with sat  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , two times with 1N NaOH, brine, dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and concentrated in vacuo. The crude product was vacuum filtered through silica gel and washed with hexane to afford the title compound **21** (78 mg, 0.13 mmol, yield 57%) as white solid.

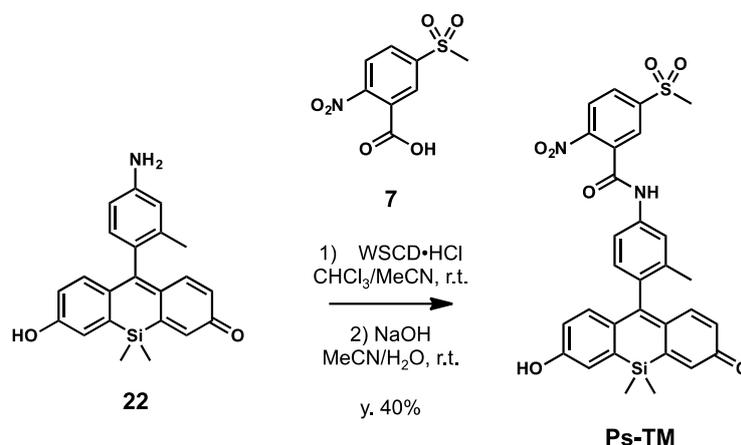
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$  7.42 (2H, d,  $J = 8.2$ ), 6.98 (2H, d,  $J = 2.7$ ), 6.85 (2H, dd,  $J = 8.5, 3.0$ ), 0.95 (18H, s), 0.73 (6H, s), 0.17 (12H, s),  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, Acetone- $d_6$ )  $\delta$  155.5, 140.6, 134.8, 129.5, 124.2, 121.8, 26.0, 18.8, -1.0, -4.3, HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{O}_2\text{NaSi}_3\text{Br}_2$  [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ : 651.9757, found: 651.0760 (+0.3 mmu).



**10-(4-amino-2-methylphenyl)-7-hydroxy-5,5-dimethyldibenzo[*b,e*]silin-3(5*H*)-one (4-NH<sub>2</sub>-2-Me-TokyoMagenta; **22**)**

To a solution of **21** (209 mg, 0.33 mmol) in THF (1.0 mL), 1.0 M cyclohexane/*n*-hexane solution of *sec*-BuLi (0.8 mL, 0.83 mmol) was added dropwise at  $-78^\circ\text{C}$  under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at  $-78^\circ\text{C}$  for 60 min and then **17** (68 mg, 0.35 mmol) in THF (0.8 mL) was added dropwise at  $-78^\circ\text{C}$  and stirred at  $-78^\circ\text{C}$  for 15 min. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h and then 1N HCl (3.0 mL) was added dropwise at room temperature and stirred at room temperature for 30 min. The reaction mixture was partitioned between AcOEt and sat. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. The organic layer was washed two times with sat NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The crude was purified with silica gel column chromatography (hexane/AcOEt: 4/1) to afford the title compound **22** (15 mg, 0.042 mmol, yield 13%) as red solid.

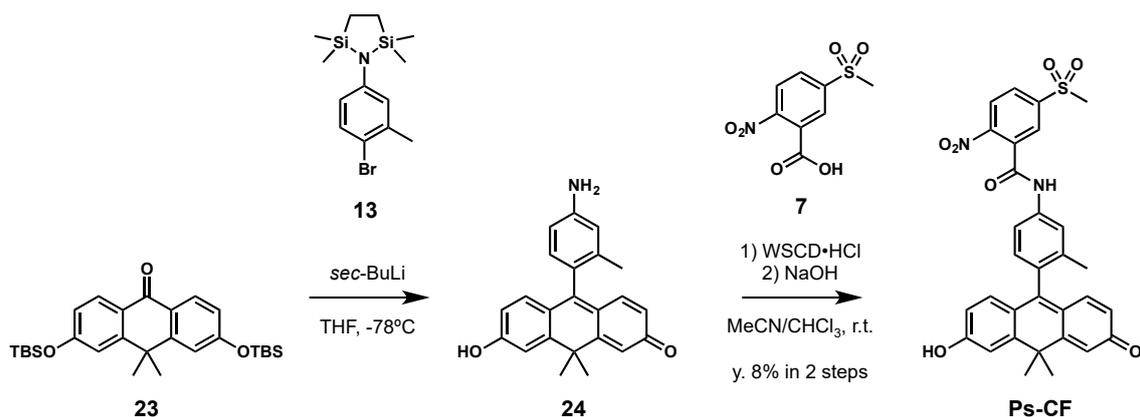
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7.05-6.85 (4H, m), 6.70 (1H, d, *J* = 7.8), 6.60-6.15 (4H, m), 5.23 (2H, br), 1.81 (3H, s), 0.43 (3H, s), 0.40 (3H, s), <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  155.6, 143.0, 134.5, 128.4, 123.7, 121.7, 26.0, 18.8, -0.4, -4.3, HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd for C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>2</sub>Si [M + H]<sup>+</sup>: 360.1420, found: 360.1412 (-0.8 mmu).



**N-(4-(7-hydroxy-5,5-dimethyl-3-oxo-3,5-dihydrodibenzo[b,e]silin-10-yl)-3-methylphenyl)-5-(methylsulfonyl)-2-nitrobenzamide (Ps-TM)**

A suspension of **22** (3.7 mg, 15  $\mu\text{mol}$ ) and WSCD·HCl (3.5 mg, 18  $\mu\text{mol}$ ) in MeCN (0.25 mL) and  $\text{CHCl}_3$  (0.25 mL) was stirred at room temperature for 20 min. **22** (1.7 mg, 4.7  $\mu\text{mol}$ ) was added to the reaction mixture and stirred at room temperature for 30 min and then partitioned between AcOEt and sat.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . The organic layer was washed two times with sat.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , brine, dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and concentrated in vacuo. The crude was purified by semi-preparative HPLC (Eluent: A:B = 60:40  $\rightarrow$  20:80 (20 min), A: 10 mM ammonium acetate, B: acetonitrile, flow rate: 9 mL/min). After evaporation of acetonitrile from the collected fraction under reduced pressure, the residue was acidified with 1N HCl and diluted with AcOEt. The organic layer was washed with three times with 0.1 N HCl dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and concentrated in vacuo to afford the title compound (1.1 mg, 1.9  $\mu\text{mol}$ , 40%) as a red solid.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  11.06 (1H, s), 8.42-8.36 (2H, m), 8.30 (1H, dd,  $J = 8.0, 2.5$ ), 7.72-7.68 (1H, m), 7.68-7.60 (1H, m), 7.15 (1H, d,  $J = 8.2$ ), 7.01 (2H, br), 6.82 (2H, d,  $J = 9.6$ ), 6.46 (2H, br), 3.43 (3H, s), 1.99 (3H, s), 0.46 (3H, s), 0.44 (3H, s), HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_7\text{SiS}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ : 587.1310, found: 587.1308 (+0.2 mmu).



**N-(4-(6-hydroxy-10,10-dimethyl-3-oxo-3,10-dihydroanthracen-9-yl)-3-methylphenyl)-5-(methylsulfonyl)-2-nitrobenzamide (Ps-CF)**

**23** was synthesized reported previously<sup>43</sup>. To a solution of **13** (401.5 mg, 1.223 mmol) in THF (5.0 mL), 1.0 M cyclohexane/*n*-hexane solution of *sec*-BuLi (1.4 mL, 1.4 mmol) was added dropwise at -78°C under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred at -78°C for 30 min and then **23** (291.4 mg, 0.6036 mmol) in THF (3.0 mL) was added dropwise at -78°C and stirred at room temperature for 2 h and then 1N HCl (1.0 mL) and MeOH (2.0 mL) were added and stirred at room temperature and then partitioned between AcOEt and sat. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. The liquid layer was extracted three times with AcOEt and the organic layer was washed with brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The crude was purified with silica gel column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeCN: 10/1 to CHCl<sub>3</sub>/MeOH: 4/1) to afford the title compound **24** (112.2 mg) as red solid.

A suspension of **7** (16.5 mg, 0.0673 mmol) and WSCD·HCl (21.1 mg, 0.110 mmol) in MeCN (0.5 mL) and CHCl<sub>3</sub> (1.0 mL) was stirred at room temperature for 5 min. The crude of **24** (22.4 mg) was added to the reaction mixture and stirred at room temperature for 1 h and then partitioned between AcOEt and sat. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. The organic layer was washed two times with 1N HCl, brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The crude was purified by semi-preparative HPLC (Eluent: A:B = 1 : 99→30 : 70 (20 min), A: MeOH, B: CHCl<sub>3</sub>, flow rate: 9 mL/min). The collected fractions were concentrated in vacuo to afford the title compound (8.7 mg, mmol, 8% in 2 steps) as a red solid.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 11.07 (1H, s), 10.50 (1H, s), 8.43-8.35 (2H, s), 8.31 (1H, dd, *J* = 8.2, 1.8), 7.76-7.71 (1H, m), 7.71-7.62 (1H, m), 7.20 (2H, d, *J* = 7.8), 6.96-6.58 (4H, m), 6.20 (1H, d, *J* = 9.1), 3.43 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.62 (3H, s), 1.57

(3H, s),  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  162.4, 151.3, 149.4, 144.7, 138.5, 136.2, 132.8, 131.7, 129.74, 129.67, 128.9, 128.0, 125.6, 124.0, 121.8, 121.0, 117.2, 114.7, 112.4, 79.0, 42.9, 33.6, 32.1, 19.2, HRMS (ESI-TOF)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ : 571.1539, found: 571.1541 (+0.2 mmu).

## 参考文献

1. Tsien RY. *Biochemistry*. 1980; 19: 2396–2404.
2. Ilner H, Mcguigan JAS, Liithi D. *Pflügers Arch*. 1992; 422: 179–184.
3. Forbes J, Bettst WH. *Biochem J*. 1993; 408: 403–408.
4. Tanaka K, Miura T, Umezawa N, Urano Y, Kikuchi K, Higuchi T, Nagano T. *J Am Chem Soc*. 2001; 123: 2530–2536.
5. Ueno T, Urano Y, Setsukinai KI, Takakusa H, Kojima H, Kikuchi K, Ohkubo K, Fukuzumi S, Nagano T. *J Am Chem Soc*. 2004; 126: 14079–14085.
6. Ueno T, Urano Y, Kojima H, Nagano T. *J Am Chem Soc*. 2006; 128: 10640–10641.
7. Kenmoku S, Urano Y, Kojima H, Nagano T. *J Am Chem Soc*. 2007; 129: 7313–7318.
8. Urano Y, Kamiya M, Kanda K, Ueno T, Hirose K, Nagano T. *J Am Chem Soc*. 2005; 127: 4888–4894.
9. Fujikawa Y, Urano Y, Komatsu T, Hanaoka K, Kojima H, Terai T, Inoue H, Nagano T. *J Am Chem Soc*. 2008; 130: 14533–14543.
10. Urano Y, Sakabe M, Kosaka N, Ogawa M, Mitsunaga M, Asanuma D, Kamiya M, Young MR, Nagano T, Choyke PL, Kobayashi H. *Sci Transl Med*. 2011; 3: 110ra119.
11. Asanuma D, Sakabe M, Kamiya M, Yamamoto K, Hiratake J, Ogawa M, Kosaka N, Choyke PL, Nagano T, Kobayashi H, Urano Y. *Nat Commun*. 2015; 6: 6463.
12. Matsuzaki H, Kamiya M, Iwatate RJ, Asanuma D, Watanabe T, Urano Y. *Bioconjugate Chem*. 2016; 27: 973–981.
13. Kuriki Y, Kamiya M, Kubo H, Komatsu T, Ueno T, Tachibana R, Hayashi K, Hanaoka K, Yamashita S, Ishizawa T, Kokudo N, Urano Y. *J Am Chem Soc*. 2018; 140: 1767–1773.
14. Fujii T, Kamiya M, Urano Y. *Bioconjug Chem*. 2014; 25: 1838–1846.
15. Iwatate RJ, Kamiya M, Urano Y. *Chem A Eur J*. 2016; 22: 1696–1703.
16. Ueo H, Shinden Y, Tobo T, Gamachi A, Udo M, Sakimura S, Takano Y, Uchi R, Kurashige J, Akiyoshi S, Shibuta K, Kijima Y, Yoshinaka H, Natsugoe S, Mori M. *Nat Publ Gr*. 1–6.

17. Mizushima T, Ohnishi S, Shimizu Y, Hatanaka Y, Hatanaka KC, Hosono H, Kubota Y, Natsuizaka M, Kamiya M, Ono S, Homma A, Kato M, Sakamoto N, Urano Y. *BMC Cancer*. 2016; 1–8.
18. Moscow JA, Fairchild CR, Madden MJ, Ransom DT, Wieand HS, Brien EEO, Poplack DG, Cossman J, Myers CE, Cowan KH. *Cancer Res*. 1989; 49: 1422–1428.
19. Rio C Di, Boccio G Del, Aceto A, Casaccia R, Mucilli F, Federici G, Biochimiche S, Chirurgica C. *Carcinogenesis*. 1988; 9: 335–340.
20. Chika KODATE, Akira FUKUSHI, Takeo NARITA, Hajime KUDO, Yasushi SOMA KS. *Japanese J Cancer Res*. 1986; 77: 226–229.
21. Kelley MK, Engqvist-goldstein A, Montali JA, Wheatley JB, Schmidt DE, Kauvart LM. *Biochem J*. 1994; 304: 843–848.
22. Shiratori Y, Soma Y, Maruyama H, Sato S, Takano A, Sato K. *Cancer Res*. 1987; 47: 6806–6809.
23. Tew KD, Monks a, Barone L, Rosser D, Akerman G, Montali J a, Wheatley JB, Schmidt DE. *Mol Pharmacol*. 1996; 50: 149–159.
24. Laborde E. *Cell Death Differ*. 2010; 17: 1373–1380.
25. Ribrag V, Koscielny S, Carpiuc I, Cebotaru C, Walle H Vande, Talbot M, Fenaux P, Bosq J, Biostatistique D, Roussy IG. *Leukemia*. 2003: 972–977.
26. Ali-Osman F, Brunner JM, Kutluk TM, Hess K. *Clin Cancer Res*. 1997; 3: 2253–2261.
27. Yamamoto Y, Konishi H, Ichikawa D, Arita T, Shoda K, Komatsu S, Shiozaki A, Ikoma H, Fujiwara H, Okamoto K, Ochiai T, Inoue J, Inazawa J, Otsuji E. *Oncol Rep*. 2013; 30: 1687–1694.
28. Pellacani D, Kestoras D, Droop AP, Frame FM, Berry PA, Lawrence MG, Stower MJ, Simms MS, Mann VM, Collins AT, Risbridger GP, Maitland NJ. *Cell Death Differ*. 2014; 21: 761–773.
29. Singal R, van Wert J, Bashambu M. *Cancer Res*. 2001; 61: 4820–4826.
30. Lin X, Asgari K, Putzi MJ, Gage WR, Yu X, Cornblatt BS, Kumar a, Piantadosi S, DeWeese TL, De Marzo a M, Nelson WG. *Cancer Res*. 2001; 61: 8611–8616.
31. Kumar U, Sharma U, Rathi G. *Tumor Biol*. 2017: 1–8.
32. Chiam K, Centenera MM, Butler LM, Tilley WD, Bianco-Miotto T. *PLoS One*. 2011; 6: 1–11.

33. Zhang J, Shibata A, Ito M, Shuto S, Mannervik B, Abe H, Morgenstern R. *J Am Chem Soc.* 2011; 133: 14109–14119.
34. Zhang J, Jin Z, Hu X, Meng H, Li J, Zhang X, Liu H, Deng T, Yao S, Feng L. *Anal Biochem.* 2017; 89: 8097–8103.
35. Cook MP, Ando S, Koide K. *Tetrahedron Lett.* 2012; 53: 5284–5286.
36. Bacci JP, Kearney AM, Vranken DL Van. *J Org Chem.* 2005: 9051–9053.
37. Kamino S, Ichikawa H, Wada S ichi, Horio Y, Usami Y, Yamaguchi T, Koda T, Harada A, Shimanuki K, Arimoto M, Doi M, Fujita Y. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2008; 18: 4380–4384.
38. Pill J, Federica R, Perciaccante R, Ciana L Della, Masereeuw R, Gretz N. *Bioconjug Chem.* 2016; 27: 2513–2526.
39. Wu H, Alexander SC, Jin S, Devaraj NK. *J Am Chem Soc.* 2016; 138: 11429–11432.
40. Dicato M, Diederich M, Karius T, Schnekenburger M, Ghelfi J. *Biochem Pharmacol.* 2011; 81: 1329–1342.
41. Tian Z, Tian X, Feng L, Tian Y, Huo X, Zhang B, Deng S, Ma X, Cui J. *J Mater Chem B.* 2019; 7: 4983–4989.
42. Grimm JB, Brown TA, Tkachuk AN, Lavis LD. *ACS Cent Sci.* 2017; 3: 975–985.
43. Grimm JB, Sung AJ, Legant WR, Hulamm P, Matlosz SM, Betzig E, Lavis LD. *ACS Chem Biol.* 2013; 8: 1303–1310.

## 謝辞

本研究の遂行にあたり，東京薬科大学 生命科学部 分子生物化学研究室 教授 井上 英史 先生には，終始あたたかいご指導を頂きました。心より感謝申し上げます。

本研究に際し，東京薬科大学 生命科学部 分子生物化学研究室 助教 藤川 雄太 先生には，終始ご助言・ご指導を頂きました。心より感謝申し上げます。

本論文に関して，東京薬科大学 生命科学部 ゲノム病態医科学研究室 教授 深見 希代子 先生，細胞情報科学研究室 教授 伊藤 昭博 先生，薬学部 薬品化学教室 教授 林 良雄 先生には，ご助言・ご指導を頂きました。心より感謝申し上げます。

本研究に際し，東京大学 薬学部 薬品代謝化学教室の浦野 泰照 教授，花岡 健二郎 准教授，上野 匡 助教，小松 徹 特任助教，医学部 生体情報学の神谷 真子 准教授，小嶋 良輔 助教には，ご助言およびご討論を賜りました。心より感謝申し上げます。

国立がん研究センター中央病院 内視鏡センター長 内視鏡科長 斎藤 豊 先生，内視鏡科 医員 高丸 博之 先生には，ご助言およびご討論を賜りました。心より感謝申し上げます。

本研究において，東京薬科大学 中央分析センター 深谷 晴彦 先生には，合成した化合物について質量分析を行なっていただきました。心より感謝申し上げます。

本研究に際し，研究の糧をつなげてくださった諸先輩方ならびに本研究に携わっていただいた方々，佐藤 志保 さん，澤根 芽衣 さん，吉川 万な実 さん，篠 萌穂 さん，熊倉 夏希 さん，高井 邦生 さん，池谷 知美 さん，に感謝申し上げます。

研究室生活において精神的に厳しい状況のとき，多くの方々に支えていただきました。その中でも，生命科学部 細胞情報科学研究室 研究員の則次 恒太さん，岐阜大学 工学部の東 小百合 さん，東京薬科大学 薬学部の前田 萌花 さん，生命科学部 分子生物化学研究室の熊倉 夏希 さん，山本 奈菜 さん，には多大な影響や恩恵をありがとうございました。心より感謝申し上げます。

6年間の研究生活でお世話になりました，分子生物化学研究室の井上 英史 先

生，尹 永淑 先生，藤川 雄太 先生および研究室の方々に感謝申し上げます。  
最後に，ここまで支えてくださった家族に心より感謝申し上げます。