

水中で機能する高機能性金属錯体触媒の開発

(博士論文)

同志社大学大学院 理工学研究科 応用化学専攻

博士課程（後期）

2015 年度 1702 番

岩本 勇次



## 目次

<b>第一章 序論</b>	6
1. はじめに	6
2. 金属錯体触媒を用いた生体機能制御分子	6
2-1. DNA の切断により抗腫瘍活性を示す金属錯体	7
2-2. スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 模倣金属錯体	8
2-2-1. マンガンポルフィリン錯体	9
2-2-2. マンガンサレン錯体	10
2-2-3. 環状アミン配位子を用いたマンガン錯体	11
3. 光ケージド化合物	12
3-1. 鉄ニトロシル錯体	13
3-2. ルテニウムニトロシル錯体	14
3-3. マンガンニトロシル錯体	15
4. 金属ポルフィリン錯体	15
4-1. コバルトポルフィリン錯体による光水素発生	16
5. 研究概要	18
6. 参考文献	22
<b>第二章 カルボキシアミド配位を有するマンガンニトロシル錯体{MnNO}<sup>6</sup></b>	
<b>錯体の可視光照射による一酸化窒素の放出とその置換基効果</b>	26
1. 要約	26
2. 緒言	27
3. 結果と考察	29
3-1. <b>1<sup>R</sup></b> の合成	29
3-2. <b>1<sup>R</sup></b> の X 線結晶構造解析	29
3-3. <b>1<sup>R</sup></b> の <sup>1</sup> H NMR と溶液中での構造	32
3-4. <b>1<sup>R</sup></b> の N-O 伸縮振動 ( $\nu_{N-O}$ ) と C=O 伸縮振動 ( $\nu_{C=O}$ )	34
3-5. <b>1<sup>R</sup></b> の電気化学的性質	35
3-6. <b>1<sup>R</sup></b> の電子吸収スペクトル	36
3-7. 光照射による一酸化窒素の放出	39
4. 結論	42
5. 実験方法	43
5-1. 測定機器	43
5-2. 配位子合成	43

5-2-1. <i>N,N</i> -bis(2-pyridylmethyl)amine- <i>N</i> -methyl-2-quinoline-2-carboxamide (H-dpaq <sup>H</sup> )の合成	43
5-2-2. <i>N,N</i> -bis(2-pyridylmethyl)amine- <i>N</i> -methyl-2-(5-nitroquinoline)-2-carboxamide (H-dpaq <sup>NO2</sup> )の合成	44
5-2-3. 5-chloro-8-nitroquinoline の合成	45
5-2-4. 5-methoxye-8-nitroquinoline の合成	45
5-2-5. 5-methoxye-8-aminoquinoline の合成	46
5-2-6. <i>N,N</i> -bis(2-pyridylmethyl)amine- <i>N</i> -methyl-2-(5-methoxyequinoline)- 2-carboxamide (H-dpaq <sup>OMe</sup> )の合成	46
5-2-7. <i>N,N</i> -bis(2-pyridylmethyl)amine- <i>N</i> -methyl-2-(5-chloroquinoline)-2-carboxamide (H-dpaq <sup>Cl</sup> )の合成	47
5-3. [Mn(dpaq <sup>R</sup> )]ClO <sub>4</sub> の合成	48
5-3-1. [Mn(dpaq <sup>H</sup> )]ClO <sub>4</sub> の同定	48
5-3-2. Mn(dpaq <sup>NO2</sup> )]ClO <sub>4</sub> の同定	49
5-3-3. Mn(dpaq <sup>OMe</sup> )]ClO <sub>4</sub> の同定	49
5-3-4. Mn(dpaq <sup>Cl</sup> )]ClO <sub>4</sub> の同定	49
5-4. マンガンニトロシル錯体{MnNO} <sup>6</sup> の合成	49
5-4-1. [Mn(dpaq <sup>H</sup> )(NO)]ClO <sub>4</sub> ( <b>1<sup>H</sup></b> )の同定	50
5-4-2. [Mn(dpaq <sup>NO2</sup> )(NO)]ClO <sub>4</sub> ( <b>1<sup>NO2</sup></b> )の同定	50
5-4-3. [Mn(dpaq <sup>OMe</sup> )(NO)]ClO <sub>4</sub> ( <b>1<sup>OMe</sup></b> )の同定	50
5-4-4. [Mn(dpaq <sup>Cl</sup> )(NO)]ClO <sub>4</sub> ( <b>1<sup>Cl</sup></b> )の同定	51
5-5. NO gas の発生	51
5-6. X 線結晶構造解析	51
5-7. <b>1<sup>R</sup></b> の酸化還元電位の測定	51
5-8. <b>1<sup>R</sup></b> の水中での光誘起 NO 放出	52
5-9. 一酸化窒素測定装置を用いた NO の定量	52
5-10. 還元型ミオグロビンアッセイ法による NO の同定	52
5-11. 一酸化窒素測定装置を用いた NO の定量	52
5-12. NO 放出の量子収率	53
6. 参考文献	54
<b>第三章 光照射による一酸化窒素の放出により過酸化水素を触媒的に発生 させるマンガンニトロシル錯体の開発</b>	<b>56</b>
1. 要約	56
2. 緒言	57
3. 結果と考察	59

3-1. 分子設計	59
3-2. UG1NO の 650 nm の単色光照射による NO の解離	59
3-3. 培養細胞内での NO の放出とその検出	60
3-4. 光照射による細胞死誘起	61
3-5. UG1 の水溶液中での酸素との反応性	62
3-6. 培養細胞内での過酸化水素の定量	66
4. 結論	69
5. 実験方法	70
5-1. 測定機器	70
5-2. 配位子合成	70
5-2-1. 6-hydroxy-8-nitroquinoline	70
5-2-2. Ethyl[(8-nitroquinolin-6-yloxy)acetate]	71
5-2-3. Ethyl[(8-aminoquinolin-6-yloxy)acetate]	71
5-2-4. Ethyl 2-[(8-(2-bis(pyridine-2-ylmethyl)amino)acetamido)quinolin-6-yloxy)acetate] (L1)	72
5-2-5. Ethyl 2-[[8-([bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]acetyl)amino]-5-nitroquinolin-6-yl]oxy] acetate (L2)	72
5-3. UG1 の合成	73
5-4. UG1NO の合成	74
5-5. UG1NO による光照射による NO の放出	74
5-6. 細胞毒性評価	74
5-7. 細胞内の一酸化窒素の検出	75
5-8. 細胞内の過酸化水素の検出	75
5-9. 水中での酸素濃度の測定	75
5-10. Glutathione reductase/NADPH coupled assay 法を用いた GSH の酸化反応	75
5-11. PF1 を用いた過酸化水素の検出	75
5-12. UG1 の酸化還元電位測定	76
6. 参考文献	77
<b>第四章 カルボキシアミド配位を有する鉄錯体による活性酸素種の生成および消去活性評価と細胞内酸化ストレスの軽減</b>	80
1. 要約	80
2. 緒言	81
3. 結果と考察	84
3-1. 2 <sup>R</sup> の合成	84

3-2. $2^R$ の酸化還元電位	84
3-3. $2^R$ の SOD 活性	85
3-4. $2^R$ のペルオキシダーゼ活性	87
3-5. $2^R$ のカタラーゼ活性	88
3-6. $2^R$ による酸素還元反応	89
3-7. $2^R$ による培養細胞内でのメナジオンにより発生させた $O_2^{\cdot-}$ の消去活性	92
4. 結論	94
5. 実験方法	95
5-1. 測定機器	95
5-2. $2^R$ の合成	95
5-2-1. $[Fe(dpaq^H)Cl]Cl$ ( $2^H$ ) の同定	95
5-2-2. $[Fe(dpaq^{OMe})Cl]Cl$ ( $2^{OMe}$ ) の同定	95
5-2-3. $[Fe(dpaq^{Cl})Cl]Cl$ ( $2^{Cl}$ ) の同定	96
5-2-4. $[Fe(dpaq^{NO_2})Cl]Cl$ ( $2^{NO_2}$ ) の同定	96
5-3. 酸化還元電位の測定	96
5-4. SOD 活性測定	96
5-5. ペルオキシダーゼ活性測定	97
5-6. カタラーゼ活性測定	97
5-7. PF1 を用いた過酸化水素の検出	97
5-8. アスコルビン酸の酸化反応	97
5-9. 細胞毒性評価	97
5-10. Hydroethidine (HE) を用いた培養細胞内の $O_2^{\cdot-}$ 濃度の測定	98
6. 参考文献	99

## 第五章 ウシ血清アルブミンとコバルトポルフィリン錯体により形成された 会合体による光水素発生触媒活性

1. 要約	101
2. 緒言	102
3. 結果と考察	104
3-1. CoTSPP と BSA の緩衝溶液中での相互作用	104
3-2. CoTSPP-BSA 複合体による光水素発生触媒活性	107
3-3. CoTSPP とカチオン性ポリマーによる会合体形成と触媒活性	108
3-4. BSA 存在下および非存在下での CoTSPP による $Ru(bipy)_3$ の蛍光消光	109
3-5. 反応機構と BSA 添加による触媒活性向上の考察	110
4. 結論	113
5. 実験方法	114

5-1. 試薬と測定機器	114
5-2. CoTSPP の合成	114
5-3. CoTSPP-BSA 複合体の単離	114
5-4. CoTSPP への BSA 添加実験	114
5-5. CoTSPP による BSA の蛍光の消光実験	114
5-6. 光水素発生触媒活性評価	115
5-7. カチオン性ポリマーと CoTSPP の反	115
6 参考文献	116
<b>第六章 総括</b>	118
<b>List of Publications</b>	120
<b>謝辞</b>	121

# 第一章：序論

## 1. はじめに

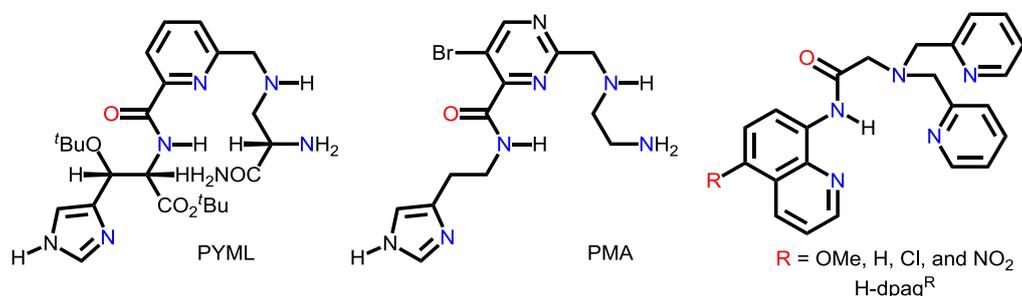
金属錯体は、多様な反応性や触媒活性を示すことが知られている。しかし、その多くは溶解度や溶媒による反応の阻害、錯体自身の安定性などの観点から、限られた有機溶媒中で用いられることが多い。これらの多様な金属錯体の反応性を水中で進行させることが可能となれば、有用な化合物を合成する金属錯体触媒としてだけでなく、医薬品としての応用も期待できる。

## 2. 金属錯体触媒を用いた生体機能制御分子

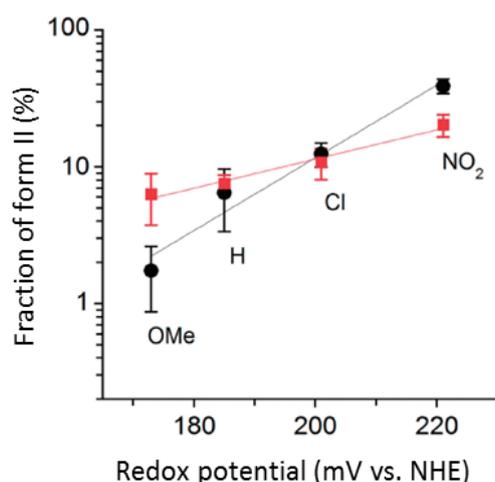
金属錯体の反応性を利用した生体機能制御分子としての応用例として、水中で自己分解することで、血管弛緩作用を示す一酸化窒素 (NO) の供与分子である鉄ニトロシル錯体 (ニトロプルシド  $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]$ ) が、外科手術時の血圧降下剤として利用されていたことが挙げられる<sup>1,2)</sup>。また、白金錯体であるシスプラチン ( $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ ) は、DNA に結合することでその複製を阻害し、細胞死を誘導するため、抗腫瘍剤として使用されている<sup>3)</sup>。しかし、これらの金属錯体を用いた応用例では、金属錯体 1 分子につき 1 つの反応しか進行させることができないため、望む反応に対して当量の金属錯体を使用しなければならないという制約がある。そこで、生体内で多様な反応を触媒する酵素に着目した研究が多くなされている。酵素は、水中で高い基質選択性を示し、特定の化学反応を触媒する。例えば、細胞内の活性酸素種 (ROS) の一種であるスーパーオキシドアニオンラジカル ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) を過酸化水素と酸素に不均化する酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) や ROS の一種である過酸化水素を水と酸素に不均化する酵素であるカタラーゼがあげられる。これらの酵素は、高い酸化力を有する ROS を高速かつ触媒的に消去することで、細胞内の酸化ストレスを低減させている。しかし、酵素を利用した薬剤は、保存の困難さや生体内で加水分解を受けることで失活してしまい効果が発現できない、細胞に取り込まれない等の問題から応用は困難である。このような問題から、水中で機能し、1 分子で 1 つの反応を進行させるだけでなく、酵素のように生体内の基質を利用することで、1 分子で高速かつ触媒的に有用な化学反応を進行させることができる新たな金属錯体ベースの生体機能制御分子の開発研究が重要な課題であることがわかる。以下に、金属錯体ベースの生体機能制御分子の例を示す。



切断活性を示す Fe-BLM モデル錯体の分子設計における指針が提案されている。



**Figure 1.1** Chemical structures of PYML, PMA, and H-dpaq<sup>R</sup>.

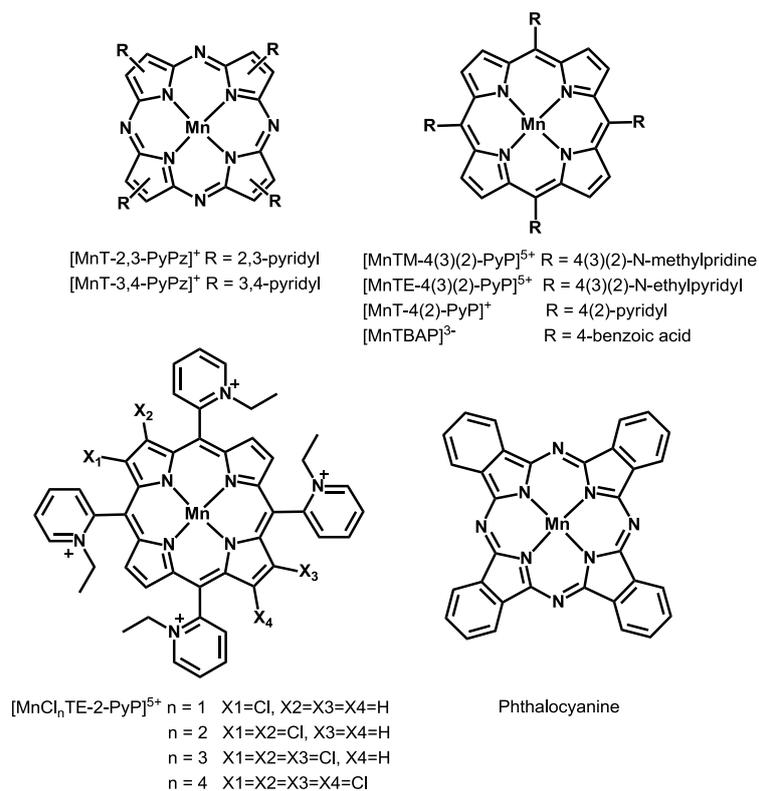


**Figure 1.2** Plots of the fraction of nicked DNA after incubation for 30 min in Tris-HCl buffer (pH 8.0) with 1 mM DTT (black circle) or 0.01 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (red square) against the cathodic peak potential of [Fe(dpaq<sup>R</sup>)Cl]Cl (R = OMe, H, Cl and NO<sub>2</sub>)<sup>69</sup>.

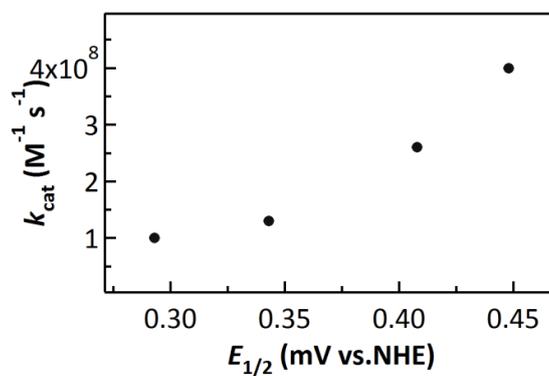
## 2-2. スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 模倣金属錯体

細胞内で触媒反応を進行させる金属錯体の例に、金属酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) があげられる<sup>14,15</sup>。SOD は、主にミトコンドリアの呼吸鎖で進行している電子伝達系での酸素の四電子還元過程で生成する副産物の一つで、酸化力の高い活性酸素種の一つである O<sub>2</sub><sup>-</sup>を過酸化水素と酸素に不均化する反応を触媒する酵素である<sup>16</sup>。その活性中心には、Cu-Zn や Fe, Ni, Mn を有するものが知られており、Scheme 1.2 に示すような酸化還元活性な中心金属イオンによる電子移動反応により、O<sub>2</sub><sup>-</sup>の不均化反応を触媒している<sup>17</sup>。





**Figure 1.3** Chemical structures of porphyrin/phthalocyanine derivatives.

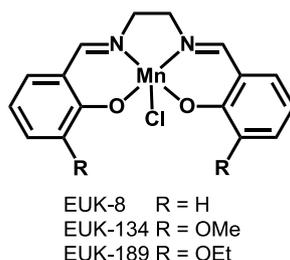


**Figure 1.4** Correlation between the metal-centered redox potential and rate constant for the disproportionation of  $O_2^{\cdot -}$  by  $[MnCl_nTE-2-PyP]^{5+}$ .<sup>28)</sup>

### 2-2-2. マンガンサレン錯体

SOD 活性を示すマンガンサレン錯体に関する研究は、1993 年から Malfroy や Jacobsen らのグループにより盛んに行われている。マンガンサレン錯体は、SOD 活性だけでなく、活性酸素種の一つである過酸化水素を酸素と水に不均化する反応を触媒するカタラーゼ活性

をも有することが知られており、酸化ストレスを軽減する薬剤への応用が検討されている<sup>31,32)</sup>。ベンゼン環にアルコキシ基を導入した EUK-134 や EUK-189 は、無置換体である EUK-8 に比べ、カタラーゼ活性が高くなり、培養細胞を用いた実験でも過酸化水素に対する毒性を軽減することが報告されている (Figure 1.5)<sup>33)</sup>。しかし、マンガンサレン錯体は、EDTA のようなキレート剤存在下で安定性が低下し、活性が大きく低下する事が知られており、まだ配位子設計の改善が必要とされている<sup>34)</sup>。

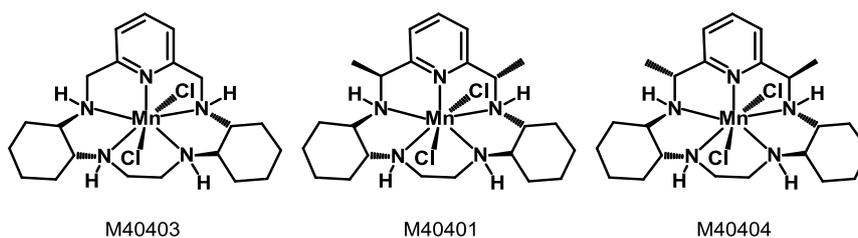


**Figure 1.5** Chemical structures of manganese salen derivatives.

### 2-2-3. 環状アミン配位子を用いたマンガン錯体

Riley らのグループが、環状アミン配位子を用いた七配位型 Mn(II)錯体 (M40403) は、 $k_{cat}$  値が  $1.64 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  と高く、高速に  $\text{O}_2^-$  の不均化反応を触媒することを報告している<sup>35-37)</sup>。また、Figure 1.6 に構造を示す二つのメチル基の導入により、配位子をより強直にした Mn 錯体 M40401 および M40404 も開発されており、その SOD 活性が調べられている<sup>36-38)</sup>。M40401 では、 $k_{cat}$  値が  $1.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  と SOD にも匹敵する値を示したにも関わらず、異性体である M40404 では、SOD 活性を示さないという興味深い結果が得られている。しかし、M40403, M40401, M40404 の Mn(III)/Mn(II) に対応する酸化還元電位は、それぞれ 0.525 V (M40403), 0.464 V (M40401), 0.452 V (M4040) であり大きな差は観測されない。SOD 活性と Mn 錯体の酸化還元電位に相関は観測されなかった原因は、 $\text{O}_2^-$  の不均化反応の中間体として考えられている  $[\text{Mn(III)(L)(O}_2)]^+$  の立体構造のとり易さに依存していると考えられている<sup>39)</sup>。

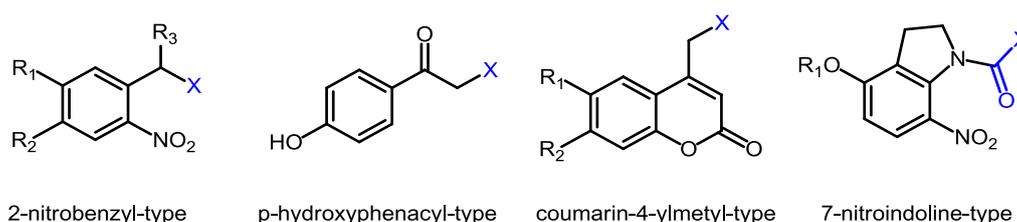
その後も Anderson らのグループを中心に、M40403 を用いた応用研究がなされており、培養細胞や大腸菌だけでなく、肺膜炎<sup>40)</sup>や虚血再灌流<sup>41,42)</sup>、放射線照射による粘膜炎<sup>43)</sup>などの様々な病気や炎症に対しても保護効果が確認されており、臨床段階にも進んでいる。



**Figure 1.6** Chemical structures of the manganese macrocyclic complexes.

### 3. 光ケージド化合物

光ケージド化合物とは、生理活性分子に光分解性の保護基を導入し、一時的にその活性をマスクした化合物の総称である。光ケージド化合物は、ある特定の波長の光照射を行うことで光分解性の保護基が脱離し、特定の生理活性分子を発生することで、生細胞内の働きを調査するためのツールとして利用されている<sup>44)</sup>。また、目的の部位のみに光照射を行うことで、その部位特異的に生理活性分子を発生させることが可能なため、副作用の小さな薬剤としての応用も期待されている。これまでに、光分解性の保護基として、**Figure 1.7**に構造を示す 2-nitrobenzyl-type を初めに *p*-hydroxyphenacyl-type や coumarin-4-ylmethyl-type, 7-nitroindoline-type 等が開発されている。これらは、生理活性分子の有するリン酸基やアミノ基、ヒドロキシル基だけでなく、カルボキシル基やカルボニル基、メルカプト基などを **Figure 1.7**に示した光分解性保護基の構造内に示した X の部位に結合させることで、生理活性分子の機能を光ケージド化することができる。また、光分解性保護基は、細胞に対して損傷を与える危険の高い短波長光を使用するのではなく、より長波長光で光分解できるものが望まれる。



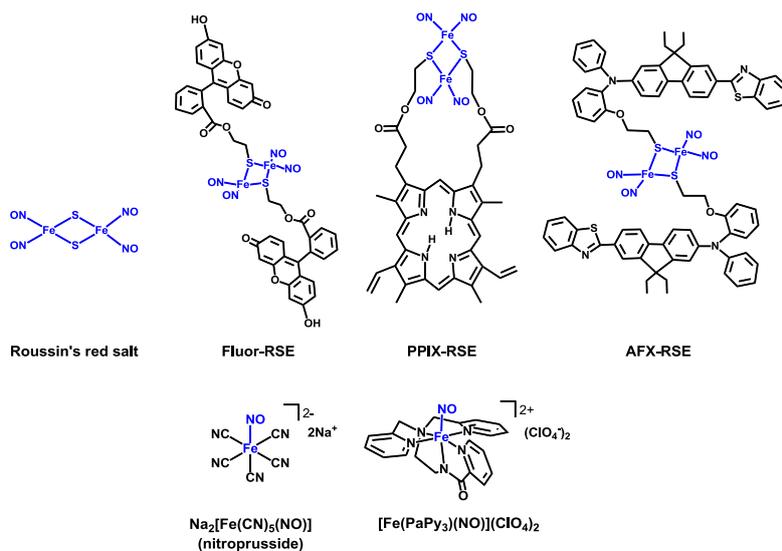
**Figure 1.7** Chemical structures of photodegradable protecting groups.

金属錯体を用いた生理活性分子の光ケージド化技術に関する研究も現在盛んに行われている。例えば、金属錯体に生体内で情報伝達物質として働くことが知られている一酸化炭素 (CO) や一酸化窒素 (NO) を光照射により、自由なタイミングで目的の量放出させることが可能な金属カルボニル錯体や金属ニトロシル錯体があげられる<sup>45,46)</sup>。金属錯体は、金属と配位子の選択により多様な色を示すため、有機分子を用いるよりもより長波長側に吸収をもたせることが容易であるという利点がある。その中でも金属ニトロシル錯体による光

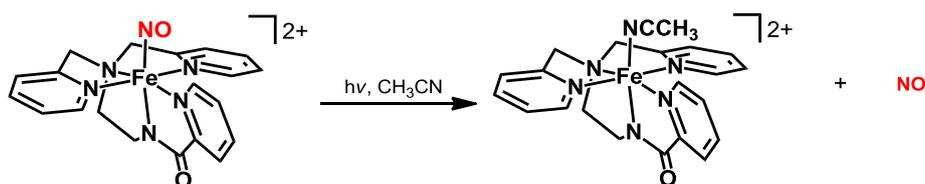
誘起型の NO 供与分子に関する研究に焦点をあてて以下に述べる。

### 3-1. 鉄ニトロシル錯体

鉄ニトロシル錯体で最も有名な光誘起型の NO 供与分子は、Figure 1.8 に構造を示す Roussin's red salt という名称で知られている iron/sulfur/nitrosyl cluster である。Roussin's red salt は、1858 年に Roussin らのグループにより報告された鉄ニトロシル錯体であり、紫外光照射により NO の放出を制御できるため、培養細胞を用いた様々な実験で光誘起型の NO 供与分子として使用されている<sup>47)</sup>。しかし、Roussin's red salt は、NO の放出に組織透過性が低く、細胞への毒性の高い  $^1\text{O}_2$  の生成を引き起こす可能性のある有害な紫外光の照射を必要とするという問題がある。また、ペンタシアノ鉄ニトロシル錯体であるニトロプルシド ( $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]$ ) は、水中では安定性が低く、自己分解してしまうが、アセトニトリルのような有機溶媒中では安定であり、紫外光照射により NO を放出することが知られている<sup>1,2)</sup>。更に、Mascharak らのグループにより、モノカルボキシアミド配位を有する鉄ニトロシル錯体  $[\text{Fe}(\text{PaPy}_3)(\text{NO})](\text{ClO}_4)_2$  ( $\text{PaPy}_3 = N,N$ -bis(2-pyridylmethyl)amine-*N*-ethyl-2-pyridine-2-carboxamido) がアセトニトリル中、可視光照射により NO を放出することが報告されている (Scheme 1.3)<sup>49-51)</sup>。しかし、水中では、秒オーダーでの自己分解が進行してしまい、培養細胞を用いた系での光誘起型の NO 放出剤としての利用は困難である。近年、Ford らのグループにより、ポルフィリンやフルオレセインといった色素を配位子内に導入することで、暗所下では水中で安定でかつ可視光照射により NO の放出が可能な iron/sulfur/nitrosyl cluster の誘導体である Fluor-RSE や PPIX-RSE, AFX-RSE が報告されている (Figure 1.8)<sup>48)</sup>。



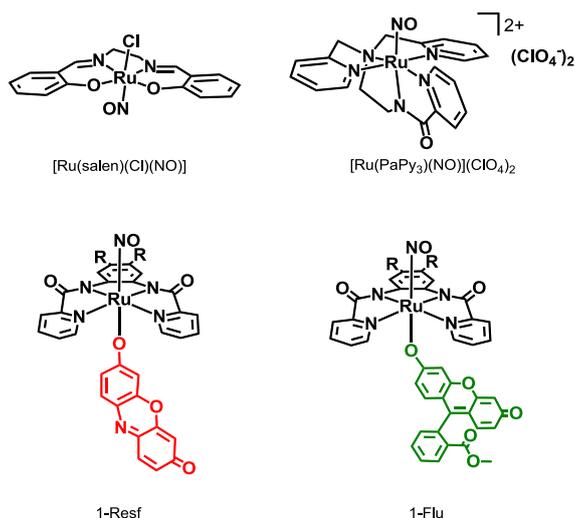
**Figure 1.8** Chemical structures of iron/sulfur/nitrosyl cluster derivatives and photo-active iron nitrosyl complexes.



**Scheme 1.3** Photo-induced NO release from  $[\text{Fe}(\text{PaPy}_3)(\text{NO})]^{2+}$ .

### 3-2. ルテニウムニトロシル錯体

ルテニウムニトロシル錯体による NO の光放出に関する研究は、ルテニウムが極めて安定な錯体を形成しやすい金属であるため最も盛んに行われている。その中でも代表的な研究について説明したい。2000 年に Ford らのグループが、THF 中で  $\text{Ru}(\text{salen})(\text{Cl})$  錯体と NO を反応させることで合成した  $\text{Ru}(\text{salen})(\text{NO})$  錯体がトルエン溶液中および水溶液中で、365 nm の単色光照射により NO を放出することを報告している<sup>52,53</sup>。2003 年には、Mascharak らのグループにより、 $[\text{Ru}(\text{PaPy}_3)(\text{NO})](\text{BF}_4)_2$  の合成およびその詳細なキャラクタリゼーションが行われており、このルテニウムニトロシル錯体も紫外光照射により、NO の放出制御ができることを報告している<sup>54</sup>。また、近年、**Figure 1.9** に構造を示したフルオレセインやレゾルフィンといった蛍光色素を直接配位させたルテニウムニトロシル錯体 **1-resf** や **1-flu** が、暗所下では水中で安定であり、かつ可視光照射 ( $\lambda > 465 \text{ nm}$ ) により NO を放出することが報告されており、ルテニウムニトロシル錯体では困難であった可視光照射による NO の放出制御に成功している<sup>55-58</sup>。また、これらのルテニウムニトロシル錯体を用いて、培養細胞のアポトーシスを誘起することにも成功している<sup>58</sup>。



**Figure 1.9** Chemical structures of photo-active ruthenium nitrosyl complexes.

### 3-3. マンガンニトロシル錯体

Mascharak らのグループにより、2004 年に、Figure 1.10 に構造を示すモノカルボキシアミド配位を有するマンガンニトロシル錯体  $[\text{Mn}(\text{PaPy}_3)(\text{NO})]\text{ClO}_4$  が 650 nm 付近まで吸収を示し、532 nm の単色光照射により、高い量子収率 ( $\Phi = 0.55$ ) で NO を放出することが報告されている<sup>59)</sup>。この成果は、鉄やルテニウムニトロシル錯体では、色素の導入により可能であった可視光照射による NO の放出制御を、分子デザインのみで達成しており、極めて重要な研究成果であると言える。また、 $[\text{Mn}(\text{PaPy}_3)(\text{NO})]\text{ClO}_4$  を用いて、soluble guanylate cyclase の活性化やバクテリアの殺菌などの応用研究も行われている<sup>60)</sup>。更に、Mascharak らは、 $[\text{Mn}(\text{PaPy}_3)(\text{NO})]\text{ClO}_4$  の配位子内のピリジン部位をキノリン環に置換した  $[\text{Mn}(\text{PaPy}_2\text{Q})(\text{NO})]\text{ClO}_4$  が 810 nm の近赤外光照射により NO を放出制御できることを報告しており、Mn を中心金属に用いた光駆動型の NO 供与剤の有用性を示した<sup>61-63)</sup>。

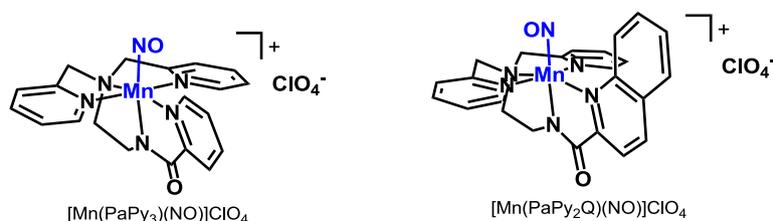
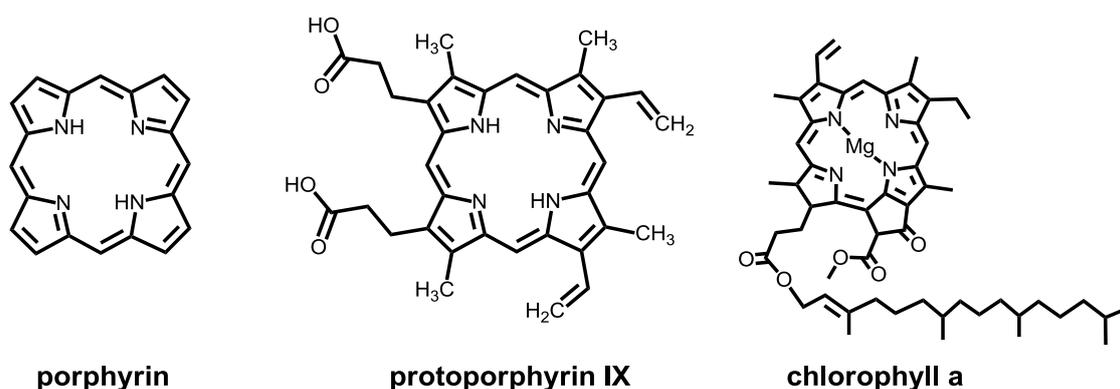


Figure 1.10 Chemical structures of manganese nitrosyl complexes.

### 4. 金属ポルフィリン錯体

バイオメテックケミストリーは、生体中の酵素反応をモデル系により化学的に再現する学問である<sup>70)</sup>。その学問において研究の対象として最も注目されているのが生体内の金属タンパク質であるヘムタンパク質およびその類縁体の機能再現であるといっても過言ではない。ヘムタンパク質やその類縁体は、水中で常温・常圧下、非常に特異的かつ高活性な機能を発現する。その機能を人工的に再現することができれば、様々な機能性材料としてだけでなく、医薬品への応用が期待できる。例えば、ヘモグロビンやミオグロビンのような酸素と可逆的な結合を再現することで人工血液への応用、カタラーゼやスーパーオキシドディスムターゼのような細胞内の活性酸素種の消去反応を再現することで抗酸化剤としての応用、チトクローム酸化酵素やペルオキシダーゼの機能再現により、工業的さらには医薬的に有用な化合物を合成するための合成触媒への応用としてだけでなく、クロロフィルの電子移動反応を再現することで燃料電池や太陽電池、人工光合成の基盤材料としての応用が検討されている。これら多様な反応を担う酵素の中心には、Figure 1.11 に構造を示す protoporphyrin IX を配位子に用いた鉄ポルフィリン錯体をはじめ、その類縁体が存在している。すなわち、金属ポルフィリン錯体の機能を調査・理解・再現することは、水中

で機能する金属錯体触媒の開発において極めて重要な課題であるといえる。水中で機能する金属ポルフィリン錯体の研究例は数多く存在するため、その中でも、光エネルギーを借いクリーンな代替エネルギーとして注目されている水素を水から発生させる人工光合成の研究について述べる。



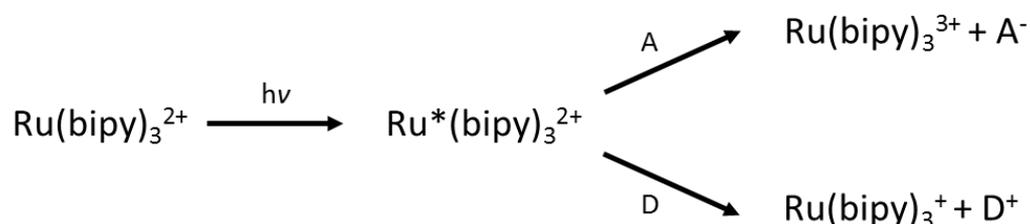
**Figure 1.11** Chemical structures of porphyrin analogs.

#### 4-1. コバルトポルフィリン錯体による光水素発生

近年、太陽エネルギーを化学エネルギーに変換するための研究が注目されている<sup>75,76)</sup>。その一例として、水を分解して酸素と水素に変換し、 $(\text{H}_2 + 1/2\text{O}_2 = \text{H}_2\text{O} + 57.8 \text{ kcal/mol})$  熱あるいは電気エネルギーとしてとりだすことで、利用するための研究があげられる。この反応の際、生成物として水しか発生せず、二酸化炭素の放出を伴わないクリーンなエネルギー資源であることから大きな期待が寄せられている。光による水の分解反応の実現に向けて、数々の不均一系光触媒と均一系光触媒が報告されている。不均一系光触媒の例としては、 $\text{TiO}_2$ のような半導体を利用した光触媒の研究があげられる<sup>77-79)</sup>。均一系光触としては、水素発生酵素であるヒドロゲナーゼの機能を人工的に再現する金属錯体触媒の開発研究があげられる。しかし、ヒドロゲナーゼの機能再現には未だ至っておらず、均一系の金属錯体触媒に関する研究は、依然重視するべき課題であるといえる。

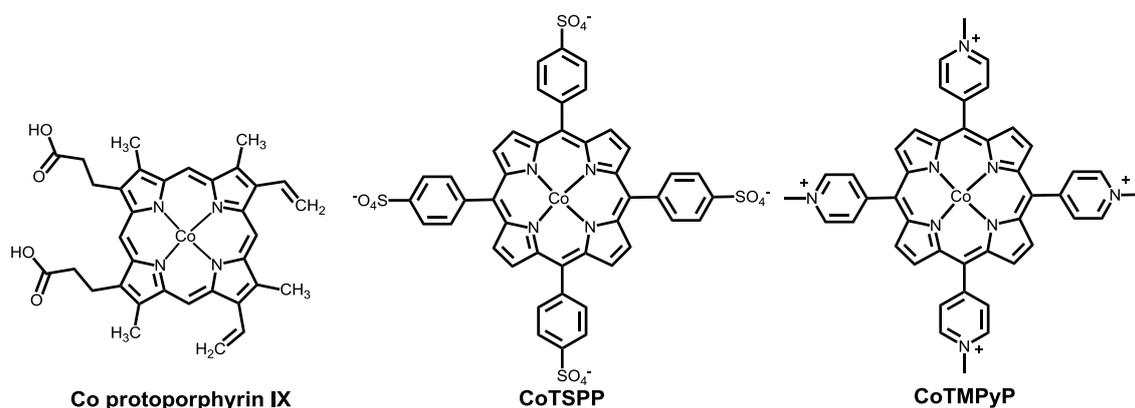
光水素発生は、電子源である犠牲還元剤と光増感剤、水素発生触媒が用いられる。金属錯体触媒を用いた光水素発生反応では、 $\text{Ru}(\text{bipy})_3$  錯体を光増感剤として利用する研究が最も盛んに行われている。 $\text{Ru}(\text{bipy})_3$  は、450 nm の可視光照射により、三重項励起状態をとり、比較的高い酸化力 (+0.84 V vs. NHE,  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+*}/[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^+$ ) および還元力 (-0.84 V vs. NHE,  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{3+}/[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+*}$ ) を有する励起種  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+*}$  を生成する (Scheme 1.4)<sup>80)</sup>。過剰量の犠牲還元剤存在下では、励起種  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+*}$  は、還元的消光を経て、強い還元力 (-1.26 V vs. NHE,  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}/[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^+$ ) を有する Ru(I)錯体である  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^+$  となる。

この高い還元力を有する Ru(I)錯体が、直接水素発生触媒を還元し、光による水の分解反応を実現させる。



**Scheme 1.4** Photoredox cycle of  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ .

コバルトポルフィリンを触媒とする光増感型の水素発生は、1995年、Willnerらの研究に遡る。Willnerらは、光増感剤であるエオシンをタンパク質外表面に化学修飾した **Figure 1.12** に構造を示すコバルトポルフィリン (Co protoporphyrin IX) 置換ミオグロビンを用い、エチレンジアミン四酢酸を犠牲還元剤として含む中性水溶液への光照射 ( $\lambda > 475 \text{ nm}$ ) によって、水素が発生すること、さらには、アセチレンからエチレンへの還元反応、二酸化炭素からギ酸への還元反応が進行することを報告している<sup>71)</sup>。また、近年では Ghirlanda らが、コバルトポルフィリン置換ミオグロビン、光増感剤としてルテニウム錯体 ( $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ )、犠牲還元剤としてアスコルビン酸を用いる光水素発生系を報告している<sup>72)</sup>。コバルトポルフィリン置換ミオグロビンを用いた場合の触媒回転数 (TON) は、Co protoporphyrin IX を用いた場合よりも約 4 倍高く、タンパク質がコバルトポルフィリン錯体の分解反応を抑制した結果であると考察されている。既に、カチオン性のコバルトポルフィリン錯体 (cobalt *meso*-tetrakis(1-methylpyridinium -4-yl)-porphyrin, CoTMPyP) を用いた光水素発生が Natali<sup>73)</sup> ら、アニオン性のコバルトポルフィリン錯体 (cobalt *meso*-tetrakis (*p*-sulfophenyl)-porphyrin, CoTSPP) を用いた電気化学的水素発生が Hung<sup>74)</sup> らによって報告されている (**Figure 1.12**)。CoTMPyP と CoTSPP はメソ位にアリーール置換基を有し、Co protoporphyrin IX やその誘導体よりも安定性が高いと期待される。

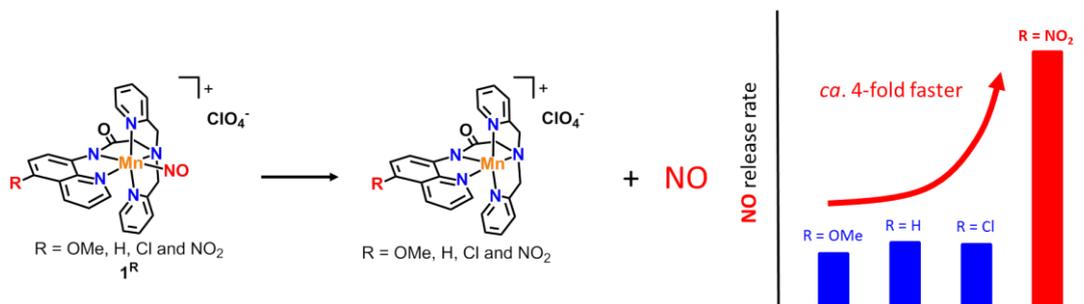


**Figure 1.12** Chemical structures of Co protoporphyrin IX, CoTSPP and CoTMPyP.

## 5 研究概要

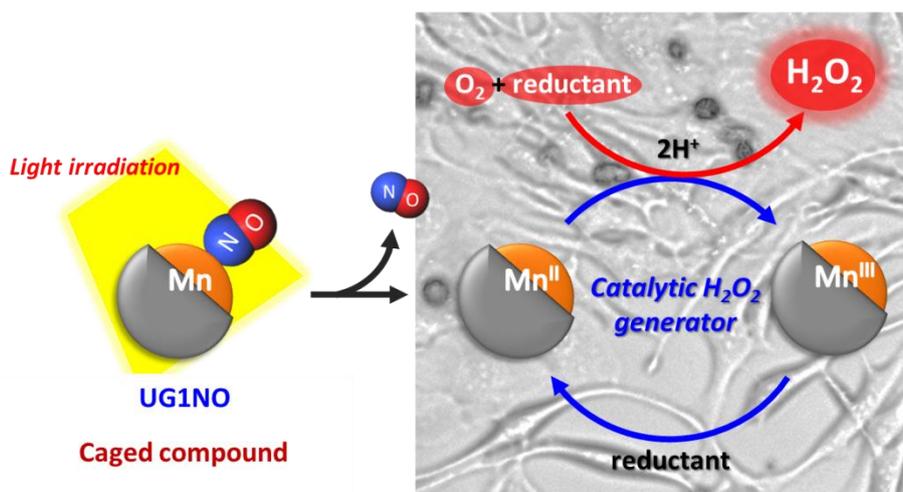
本論文では、モノカルボキシアミドアニオン配位を有する水溶性の Mn および Fe 錯体を開発し、それら金属錯体の SOD 活性や酸素還元活性などの生体機能制御に関連する触媒反応について詳細に検討した。SOD 活性を有する金属錯体触媒は、細胞内の酸化ストレスを軽減するため、抗酸化剤としての応用が期待される。一方、酸素還元活性の高い金属錯体触媒は、細胞内の活性酸素濃度を上昇させることで細胞死を誘導するため、抗腫瘍剤としての応用が期待される。また、金属錯体の機能を NO の配位により光ケージド化する手法について検討することで、光駆動型の過酸化水素供与分子を開発した。更に、酵素の活性中心によく使用されるポルフィリンを配位子に用いた水溶性コバルトポルフィリン錯体とウシ血清アルブミン (BSA) により形成される会合体についての詳細なキャラクタリゼーションを行った。また、コバルトポルフィリン錯体による光エネルギーを利用し、水を分解することで水素を発生させる光水素発生触媒活性が BSA の添加の有無で大きく変化することを見出し、その活性の変化を様々な分光法を駆使して検討した。以下に各章の概要について述べる。

第二章では、組織透過性の高い長波長領域 (650 nm) の光照射により生理活性分子の一つである NO を放出するマンガニトロシル錯体の開発およびその電子状態と光照射による NO 放出速度の相関に関して評価した。具体的には、配位子上に置換基を導入することで、異なる電子状態を有する 4 種のモノカルボキシアミド配位を有するマンガニトロシル錯体  $[\text{Mn}(\text{dpaq}^{\text{R}})(\text{NO})]\text{ClO}_4$  ( $1^{\text{R}}$  (R = OMe, H, Cl and  $\text{NO}_2$ )) を合成することで、マンガニトロシル錯体の酸化還元電位や N-O 伸縮振動, C=O 伸縮振動の関係を明らかにした。また、置換基がおよぼす 650 nm の単色光照射による見かけの NO 放出速度について検討した結果、強い電子求引基であるニトロ基を配位子上キノリン環 5 位に導入した  $1^{\text{NO}_2}$  が無置換体である  $1^{\text{H}}$  に比べ、見かけの NO 放出速度が約 4 倍に向上することを見出した (Chart 1.1)。



**Chart 1.1** Photo-induced NO release rate from  $1^R$  (R = OMe, H, Cl and NO<sub>2</sub>).

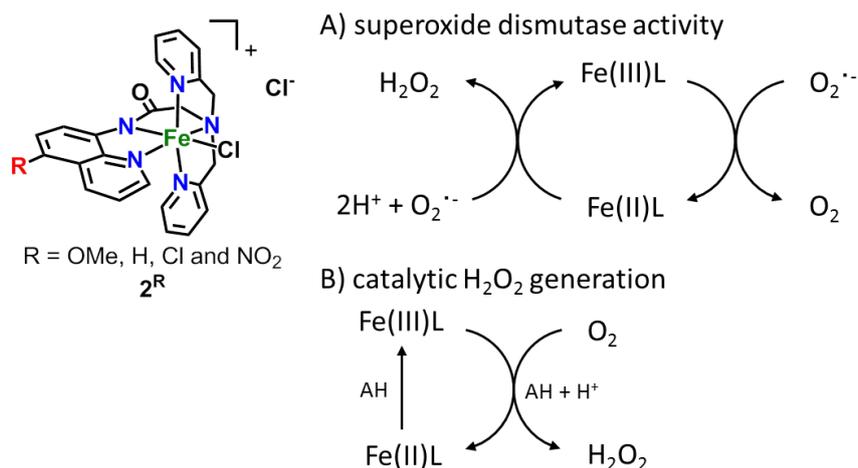
第三章では、第二章で開発したマンガンニトロシル錯体 ( $1^R$ ) の培養細胞へと応用することを目的に、配位上に細胞内滞在性が向上することが知られているエチルエステル基を導入した新規マンガンニトロシル錯体 (UG1NO) を合成し、細胞内での挙動や細胞毒性について評価した。UG1NO は、暗所下では毒性を示さず、可視光を照射した条件下でのみ培養細胞に対して高い細胞毒性を示した。また、高い細胞毒性を発現するメカニズムに関して詳細に検討した結果、NO ではなく、UG1NO に光照射した際に生成する Mn(II)錯体 (UG1) が還元剤存在下、酸素を二電子還元し、過酸化水素を選択的かつ触媒的に発生させることで高い細胞毒性を発現していることを示唆する結果が得られた。



**Chart 1.2** Photo-induced catalytic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation by UG1NO in cell.

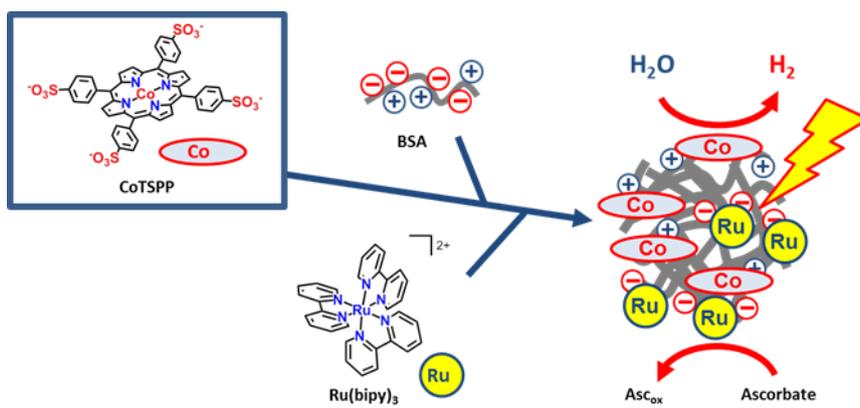
第四章では、第二章と同じ配位子である H-dpaq<sup>R</sup> を用いて、中心金属を Mn(II)イオンから Fe(III)イオンに置換した Fe(III)錯体 [Fe(dpaq<sup>R</sup>)Cl]Cl ( $2^R$  (R = OMe, H, Cl and NO<sub>2</sub>)) を合成し、活性酸素種の一つである O<sub>2</sub><sup>-</sup>の消去活性である SOD 活性および酸素を還元し、活性酸素を発生させる酸素還元活性に対する Fe(III)/Fe(II)に対応する酸化還元電位との相関について検討した。その結果、Fe(III)/Fe(II)に対応する酸化還元電位が正に大きくなるに従い SOD 活性

が向上し、酸素還元活性に関しては、 $2^{\text{NO}_2}$  が最も低く、無置換体である  $2^{\text{H}}$  が最大の活性となるベル型の相関を示すことが判明した。この結果から、 $2^{\text{NO}_2}$  が最も高効率に細胞内の活性酸素濃度を低下させることが示唆された。実際、 $2^{\text{R}}$  の培養細胞内でメナジオンにより発生させた  $\text{O}_2^{\cdot-}$  の消去活性を評価した結果、 $2^{\text{NO}_2}$  が最も細胞内の  $\text{O}_2^{\cdot-}$  濃度を高効率に低下させることが判明した。



**Chart 1.3** Chemical structures of  $2^{\text{R}}$  ( $\text{R} = \text{OMe}, \text{H}, \text{Cl}$  and  $\text{NO}_2$ ). (A) Plausible reactions during superoxide disproportionation catalysed by  $2^{\text{R}}$ . (B) Proposed reaction mechanism for the generation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  catalysed by  $2^{\text{R}}$ . AH denotes a reductant.

第五章では、水中で機能する金属錯体の触媒反応に注目し、光エネルギーを利用することで、水を分解し、二酸化炭素の排出を伴わないクリーンなエネルギーとして注目されている水素を発生させる触媒の開発に取り組んだ。具体的には、犠牲還元剤にアスコルビン酸、光増感剤に  $\text{Ru}(\text{bipy})_3$  錯体を用いた際の水溶性のアニオン性コバルトポルフィリン錯体 (CoTSPP) による光水素発生触媒活性について詳細に評価した。また、疎水ポケットやカチオン部位、アニオン部位を分子内に有するウシ血清アルブミン (BSA) の添加効果についても同時に検討した。その結果、CoTSPP は、BSA の表面で静電相互作用や疎水性相互作用を利用することで、J型の会合体を形成することを明らかにした。また、BSA の等電点である 4.9 よりも低い pH である pH 4.5 の酢酸緩衝溶液中では、CoTSPP と BSA がマイクロサイズの粒子を形成することが判明した。さらに、BSA により会合体を形成させた CoTSPP の光水素発生触媒活性を pH 3-7 の緩衝溶液中で評価した結果、pH 4.5 の酢酸緩衝溶液中で最大の活性となり、BSA 非存在下に比べ、1.1-1.7 倍の触媒回転数 (TON)、1.2-1.5 倍の触媒回転頻度 (TOF) を示すことを見出した。



**Chart 1.4** Schematic drawing of photocatalytic hydrogen production by composite particles comprising photosensitizers and hydrogen evolving catalysts in water.

## 6 参考文献

- (1) L. Playfair, *Annalen.*, **1850**, 74, 317.
- (2) A. R. Butler, *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 1155.
- (3) E. R. Jamieson, S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2467.
- (4) D. L. Boger, H. Cai, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **1999**, 38, 448.
- (5) J. Chen, J. Stubbe, *Nat. Rev. Cancer.*, **2005**, 5, 102.
- (6) U. Galm, M. H. Hager, S. G. V. Lanen, J. Ju, J. S. Thorson, B. Shen, *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 739.
- (7) S. M. Hecht, *J. Nat. Prod.*, **2000**, 63, 158.
- (8) L. H. Einhorn, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2002**, 99, 4592.
- (9) S. Sleijfer, *Chest*, **2001**, 120, 617.
- (10) S. X. Huang, Z. Feng, L. Wang, U. Galm, E. W.-Pienkowski, D. Yang, M. Tao, J. M. Coughlin, Y. Duan, B. Shen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 13501.
- (11) H. Umezawa, K. Maeda, T. Takeuchi, Y. Okami, *J. Antibiot.*, **1966**, 19, 200.
- (12) B. A. Chabner and D. L. Longo, *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*, **1996**.
- (13) J. Stubbe, J. W. Kozarich, *Chem. Rev.*, **1987**, 87, 1107.
- (14) J. M. McCord, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **1969**, 244, 6049.
- (15) D. P. Riley, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2573.
- (16) J. R. Wispe, J. C. Clark, M. S. Burhans, K. E. Kropp, T. R. Korfhagen, J. A. Whitsett, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1989**, 994, 30.
- (17) D. P. Riley, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2573.
- (18) G. F. Liu, M. Filipović, F. W. Heinemann, I. I.-Burmazović, *Inorg. Chem.*, **2007**, 46, 8825.
- (19) T. Hirano, M. Hirobe, K. Kobayashi, A. Odani, O. Yamauchi, M. Ohsawa, Y. Satow, T. Nagano, *Chem. Pharm. Bull.*, **2000**, 48, 223.
- (20) M. Tamura, Y. Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi, M. Hirobe, T. Nagano, *Chem. Pharm. Bull.*, **2000**, 48, 1514.
- (21) D. Zhang, D. H. Busch, P. L. Lennon, R. H. Weiss, W. L. Neumann, D. P. Riley, *Inorg. Chem.*, **1998**, 37, 956.
- (22) A. Horn Jr, G. L. Parrilha, K. V. Melo, C. Fernandes, M. Horner, L. D. C. Visentin, J. A. S. Santos, M. S. Santos, E. C. A. Eleutherio, M. D. Pereira, *Inorg. Chem.*, **2010**, 49, 1274.
- (23) B. Kripli, G. Baráth, É. B.-Hergovich, M. Giorgi, A. J. Simaan, L. Párkányi, J. S. Pap, J. Kaizer, G. Speier, *Inorg. Chem. Commun.*, **2011**, 14, 205.
- (24) J. S. Pap, B. Kripli, T. Váradi, M. Giorgi, J. Kaizer, G. Speier, *J. Inorg. Biochem.*, **2011**, 105, 911.

- (25) J. S. Pap, B. Kripli, I. Bors, D. Bogáth, M. Giorgi, J. Kaizer, G. Speier, *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, 117, 60.
- (26) R.F. Pasternack, A. Banth, J.M. Pasternack, C.S. Johnson, *J. Inorg. Biochem.*, **1981**, 15, 261.
- (27) I. Spasojevic , I. B.-Haberle, R.D. Stevens, P. Hambright, A.N. Thorpe, J. Grodkowski, P. Neta, I. Fridovich, *Inorg. Chem.*, **2001**, 40, 726.
- (28) R. Kachadourian, I. B.-Haberle, I. Fridovich, *Inorg. Chem.*, **1999**, 38, 391.
- (29) I. B.-Haberle, I. Spasojevic ´ , P. Hambright, L. Benov, A.L. Crumbliss, I. Fridovich, *Inorg. Chem.*, **1999**, 38, 4011.
- (30) I. Spasojevic , I. Batinic-Haberle, *Inorg. Chim. Acta.*, **2001**, 317, 230.
- (31) M. Baudry, S. Etienne, A. Bruce, M. Palucki, E. Jacobsen, B. Malfroy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1993**, 192, 964.
- (32) O. Iranzo, *Bioorg. Chem.*, **2011**, 39, 73.
- (33) S.R. Doctrow, K. Huffman, C.B. Marcus, G. Tocco, E. Malfroy, C.A. Adinolfi, H. Kruk, K. Baker, N. Lazarowych, J. Mascarenhas, B. Malfroy, *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 4549.
- (34) S.R. Doctrow, M. Baudry, K. Huffman, B. Malfroy, S. Melov, *Medicinal Inorganic Chemistry, American Chemical Society Series: Models for Neurodegenerative Diseases of Aging*, **2005**, 319.
- (35) D. P. Riley, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2573.
- (36) D. P. Riley, *Adv. Supramol. Chem.*, **2000**, 6, 217.
- (37) D.P. Riley, O.F. Schall, *Adv. Inorg. Chem.*, **2007**, 59, 233.
- (38) K. Aston, N. Rath, A. Naik, U. Slomczynska, O.F. Schall, D.P. Riley, *Inorg. Chem.*, **2001**, 40, 1779.
- (39) A. Maroz, G.F. Kelso, R.A. Smith, D.C. Ware, R.F. Anderson, *J. Phys. Chem. A.*, **2008**, 112, 4929.
- (40) S. Cuzzocrea, B. Pisano, L. Dugo, A. Ianaro, M. Ndengele and D. Salvemini, *Antioxid. Redox Signal.*, **2004**, 6, 699.
- (41) E. Masini, S. Cuzzocrea, E. Mazzon, C. Marzocca, P. F. Mannaioni, D. Salvemini, *Br. J. Pharmacol.*, **2002**, 136, 905.
- (42) Y. Xu, B. Liu, J. L. Zweier, G. He, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2008**, 327, 402.
- (43) C. K. Murphy, E. G. Fey, B. A. Watkins, V. Wong, D. Rothstein, S. T. Sonis, *Clin. Cancer Res.* **2008**, 14, 4292.
- (44) G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2006**, 45, 4900.
- (45) R. D. Rimmer, A. E. Pierri, P. C. Ford, *Coor. Chem. Rev.*, **2012**, 256, 1509.
- (46) P. C. Ford, *Nitric Oxide*, **2013**, 34, 56.
- (47) M. L. Roussin, *Ann. Chim. Phys.*, **1858**, 52, 285.

- (48) S. R. Wecksler, A. Mikhailovsky, D. Korystov, P. C. Ford, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 3831.
- (49) A.K. Para, R. Afshar, M. M. Olmstead and P. K. Mascharak, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 114, 2622.
- (50) A. K. Patra, J. M. Rowland, D. S. Marlin, E. Bil, M. M. Olmstead, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.*, **2003**, 42, 6812.
- (51) S. N. Greene, N. G. Richards, *Inorg. Chem.*, **2004**, 43, 7030.
- (52) C. F. Carmen, P. C. Ford, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 7592.
- (53) J. Bordini, D. L. Hughes, J. D. Da Motta Neto, C. J. da Cunha, *Inorg. Chem.*, **2002**, 41, 5410.
- (54) A. K. Patra, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.*, **2003**, 42, 7363.
- (55) N. L. Fry, J. Wei, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.*, **2011**, 50, 9045.
- (56) N. L. Fry, P. K. Mascharak, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, 44, 289.
- (57) M. J. Rose, P. K. Mascharak, *Chem. Commun.*, **2008**, 3933.
- (58) M. J. Rose, N. L. Fry, R. Marlow, L. Hinck, P. K. Mascharak, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 8834.
- (59) K. Ghosh, A. A. E.-Reveles, B. Avila, T. R. Holman, M. M. Olmstead, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.*, **2004**, 43, 2988.
- (60) B. J. Heilman, J. St John, S. R. Oliver, P. K. Mascharak, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 11573.
- (61) B. J. Heilman, G. M. Halpenny, P. K. Mascharak, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, **2011**, 99, 328.
- (62) G. M. Halpenny, K. R. Gandhi, P. K. Mascharak, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2010**, 1, 180.
- (63) M. Madhani, A. K. Patra, T. W. Miller, A. A. E.-Reveles, A. J. Hobbs, J. M. Fukuto, P. K. Mascharak, *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 7325.
- (64) S.-X. Huang, Z. Feng, L. Wang, U. Galm, E. Wendt-Pienkowski, D. Yang, M. Tao, J. M. Coughlin, Y. Duan, B. Shen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 13501.
- (65) A. Kittaka, Y. Sugano, M. Otsuka, M. Ohno, Y. Sugiura, H. Umezawa, *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 3631.
- (66) Y. Sugano, A. Kittaka, M. Otsuka, M. Ohno, Y. Sugiura, H. Umezawa, *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 3635.
- (67) R. J. Guajardo, F. Chavez, E. T. Farinas, P. K. Mascharak, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 3883.
- (68) R. J. Guajardo, S. E. Hudson, S. J. Brown, P. K. Mascharak, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 7971.
- (69) A. Nomura, Y. Iwamoto, K. Arakawa, A. Kashida, M. Kodera, Y. Hitomi, *Chem. Lett.* **2017**,

46, 1109.

- (70) 日本化学会編(1982)化学総説 No.35 バイオミメティック・ケミストリー: 生体に学ぶ新しい化学, 学会出版センター.
- (71) I. Willner, E. Zahavy, V. H.-Shabtai, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 542.
- (72) D. J. Sommer, M. D. Vaughn, G. Ghirlanda, *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 15852.
- (73) M. Natali, A. Luisa, E. Iengo, F. Scandola, *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 1842.
- (74) B. B. Beyene, S. B. Mane, C.-H. Hung, *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 15067.
- (75) N. S. Lewis and D. G. Nocera, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2006**, 103, 15729;
- (76) Special Issue “Solar Fuels” *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 2205.
- (77) A. Fujishima, K. Honda, *Nature*, **1972**, 238, 37.
- (78) K. Maeda, K. Domen, *J. Phys. Chem.*, **2007**, 111, 7651.
- (79) A. Kudo, Y. Miseki, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38, 253.
- (80) A. Juris, B. Valzani, F. Barigelletti, S. Campagna, P. Belsler, A. V. Zelewsky, *Coord. Chem. Rev.*, **1988**, 84, 85.

## 第二章: カルボキシアミド配位を有するマンガンニトロシル{MnNO}<sup>6</sup>錯体の可視光照射による一酸化窒素の放出とその置換基効果

### 1. 要約

キノリン環 5 位に置換基を導入したカルボキシアミド配位を有する 4 種のマンガンニトロシル{MnNO}<sup>6</sup>錯体 [Mn(dpaq<sup>R</sup>)(NO)]ClO<sub>4</sub> (**1**<sup>R</sup>, R = OMe, H, Cl and NO<sub>2</sub>) を合成した。 **1**<sup>R</sup> は, <sup>1</sup>H NMR, 赤外吸収スペクトル, 電子吸収スペクトル, 電気化学測定および X 線結晶構造解析により同定された。 赤外吸収スペクトルにて観測された N-O 伸縮振動 ( $\nu_{N-O}$ ) とカルボキシアミド部位の C=O 伸縮振動 ( $\nu_{C=O}$ ) および {MnNO}<sup>5</sup>/<sub>{MnNO}</sub><sup>6</sup> の酸化還元電位は, キノリン環に導入した置換基のハメットの置換基定数 ( $\sigma_{para}$ ) に従って変化した。 例えば, 強い電子求引基であるニトロ基を配位子に導入した **1**<sup>NO<sub>2</sub></sup> は,  $\nu_{N-O}$  および  $\nu_{C=O}$  が最も高波数側に観測され, {MnNO}<sup>5</sup>/<sub>{MnNO}</sub><sup>6</sup> に対応する酸化還元電位に関しては, 最も正に大きな値を示した。 この結果から, 置換基がより電子求引的になるに従い Mn から NO への  $\pi$ -back donation が弱くなっていることが判明した。 また, ニトロ基を導入したマンガンニトロシル錯体 **1**<sup>NO<sub>2</sub></sup> は, 700 nm 付近まで吸収を示し, 650 nm の単色光を照射した際の見かけの NO 放出速度が無置換体である **1**<sup>H</sup> に比べ約 4 倍大きくなることが明らかとなった。

---

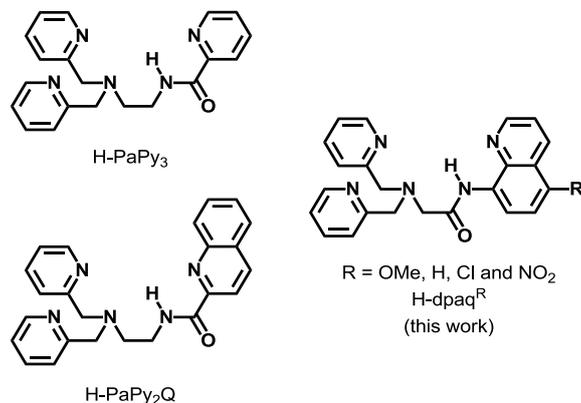
Yutaka Hitomi,\* Yuji Iwamoto and Masahito Koderu

“Electronic tuning of nitric oxide release from manganese nitrosyl complexes by visible light irradiation: enhancement of nitric oxide release efficiency by the nitro-substituted quinoline ligand”  
*Dalton Trans.*, **2014**, 43, 2161–2167. DOI: 10.1039/c3dt51719e.

## 2. 緒言

一酸化窒素 (NO) は、心循環系や神経、免疫系で情報伝達物質として働いていると認識されている<sup>1-3)</sup>。その NO を放出する分子 (NO-releasing molecules (NORMs)) であるニトログリセリンやニトロソ化合物、ニトロプルシドは、NO の機能を理解するためのツールとしてだけでなく、医薬品としても利用されてきた<sup>4-7)</sup>。近年、中心金属に NO が配位した金属ニトロシル錯体に光照射することで NO の放出を制御することが可能な分子 (Photo-NORMs<sup>9)</sup>) が、目的の場所や量、時間に NO を供給できるというメリットから大きな注目を集めている<sup>8)</sup>。Photo-NORMs は、水中で暗所下では安定であり、特定の波長の光を照射することで初めて NO を放出することが求められる。また、紫外光のような短波長光は、生体組織透過性が低く、細胞に損傷を与えるため、用いる光の波長は赤色から近赤外光領域であることが求められる<sup>10)</sup>。それら条件を満たした Photo-NORMs を開発するために有機分子を用いた場合、長波長側に吸収を示す分子を開発することが困難なため、配位子と中心金属の選択により様々な色を示す金属ニトロシル錯体を用いた Photo-NORMs の開発研究が盛んに行われている<sup>10-16)</sup>。これまでに、可視光照射に応答する Photo-NORMs を開発することを目的に、Ford らのグループにより、蛍光色素分子を配位子内に導入したクロム錯体 [*trans*-Cr(cyclam)(ONO)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (cyclam = 1,4,8,11-tetraazacyclo-tetradecane)<sup>17)</sup> やアニオン性の量子ドットと [*trans*-Cr(cyclam)(ONO)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> の静電相互作用と光誘起電子移動を利用した手法<sup>18)</sup>、また、Mascharak らのグループにより、可視光領域に吸収を示す色素をルテニウムイオンに直接配位させることで、可視光照射に応答するルテニウムニトロシル錯体<sup>19,20)</sup>などが報告されている。

上記のように色素を配位子内に導入する戦略ではなく、中心金属の選択と配位子の分子設計により、金属ニトロシル錯体の電子状態を制御することで、長波長側の光を吸収する金属ニトロシル錯体の成功例もある。例えば、Mascharak らのグループでは、**Chart 2.1** に構造を示すこれまでにほとんど報告例のない Mn を中心金属に選択した反磁性のマンガンニトロシル錯体 {MnNO}<sup>6)</sup> (ここで {MNO}<sup>x</sup> という表記法は、Enemark と Feltham により提案された金属ニトロシル錯体の表記法であり、M は中心金属を、x は中心金属の d 軌道と NO の π\* 軌道の電子数の合計値を表している<sup>21)</sup>。) である [Mn(PaPy<sub>3</sub>)(NO)]<sup>+</sup> (PaPy<sub>3</sub> = *N,N*-bis(2-pyridylmethyl)amine-*N*-ethyl-2-pyridine-2-carboxamide) が水中で暗所下では安定であり、可視光照射により高い量子収率 (Φ = 0.55 (λ<sub>irr</sub> = 532 nm)) で NO を放出することが報告されている<sup>22)</sup>。また、[Mn(PaPy<sub>3</sub>)(NO)]<sup>+</sup> は、soluble guanylate cyclase の活性化やバクテリアの殺菌等の実験系にも応用がなされている<sup>23-26)</sup>。また、同グループにより **Chart 2.1** に構造を示すピリジン環部位をキノリン環に変更した [Mn(PaPy<sub>2</sub>Q)(NO)]<sup>+</sup> が、[Mn(PaPy<sub>3</sub>)(NO)]<sup>+</sup> よりも可視光照射による NO 放出速度およびその量子収率が大きく向上することが報告されている<sup>23)</sup>。



**Chart 2.1** Chemical structures of supporting ligands of Photo-NORMs.

本論文では、前者のような配位子に色素を導入することで、可視領域に吸収をもたせるアプローチではなく、後者のように、中心金属の選択および配位子の構造を変化させることで、金属ニトロシル錯体の電子状態の制御を行い、より高性能な Photo-NORMs を開発する手法に着目した。具体的には、マンガンニトロシル錯体  $\{\text{MnNO}\}^6$  の電子状態を変化させることで可視光照射による NO 放出効率がどのように変化するかを明らかにすることを目的とし、カルボキシアミドを配位子内に有する窒素五座配位子  $\text{H-dpaq}^{\text{R}}$  (2-[*N,N*-bis(pyridine-2-ylmethyl)]-amino-*N'*-quinolin-8-ylacetamide ( $\text{R} = \text{OMe, H, Cl and NO}_2$ ))<sup>27, 28)</sup> を配位子として用いたマンガンニトロシル錯体  $[\text{Mn}(\text{dpaq}^{\text{R}})(\text{NO})]\text{ClO}_4$  ( $\mathbf{1}^{\text{R}}$ ) (Chart 2.1) を合成し、キノリン環 5 位に置換基を導入することで、電子吸収スペクトルや NO 放出速度、量子収率がどのように変化するか評価した。キノリン環への置換基の導入により、Mn と配位子内のカルボキシアミドの配位力が変化することで、Mn から NO への  $\pi$ -back donation の強さが変化し、NO の放出速度が変化すると期待できる。

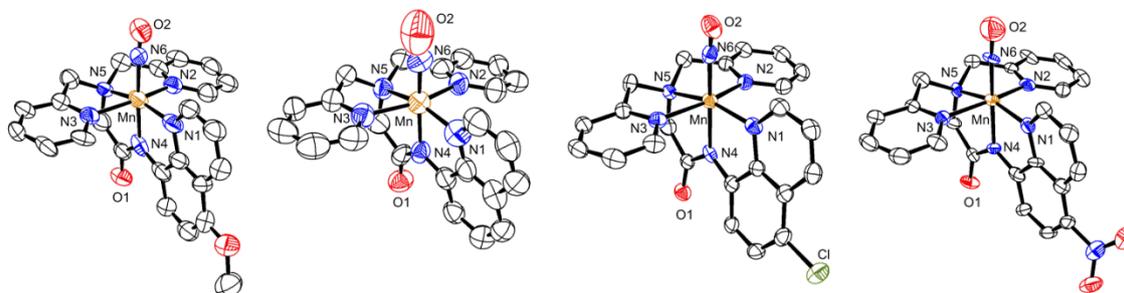
### 3. 結果と考察

#### 3-1. $1^R$ の合成

$[\text{Mn}(\text{II})(\text{dpaq}^R)]\text{ClO}$  ( $R = \text{OMe}, \text{H}, \text{Cl}$  and  $\text{NO}_2$ ) は、窒素下、アセトニトリル中  $\text{Mn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  と  $\text{H-dpaq}^R$  を 1.1 当量のトリエチルアミン存在下で反応させることで、空气中で安定な粉末として単離した。また、対応するマンガンニトロシル錯体  $[\text{Mn}(\text{NO})(\text{dpaq}^R)]\text{ClO}_4$  ( $1^R$ ,  $R = \text{OMe}, \text{H}, \text{Cl}$  and  $\text{NO}_2$ ) は、暗所下でかつ窒素下、アセトニトリル中  $[\text{Mn}(\text{II})(\text{dpaq}^R)]\text{ClO}_4$  に  $\text{NO}$  ガス ( $50 \text{ mL} \times 3$ ) をバブリングすることで、空气中、暗所下で安定な茶色から黒色の粉末として単離することに成功した。合成した 4 種類のマンガンニトロシル錯体  $1^R$  は、暗所下、アセトニトリル中および水中で数日間安定であった。

#### 3-2. $1^R$ の X 線結晶構造解析

$1^R$  の X 線結晶構造解析に適した単結晶は、室温でアセトニトリルと酢酸エチルによる蒸気拡散法より得られた (Figure. 2.1)。得られた結晶構造は、これまでに報告されているマンガンニトロシル  $\{\text{MnNO}\}^6$  錯体である  $[\text{Mn}(\text{NO})(\text{PaPy}_3)]\text{ClO}_4$ <sup>22</sup> や  $[\text{Mn}(\text{NO})(\text{PaPy}_2\text{Q})]\text{ClO}_4$ <sup>23</sup> と類似の八面体構造をとっており、 $\text{NO}$  はカルボキシアミド窒素のトランス位に位置していた。Mn 周りの結合距離および結合角度を Table 2.1 にまとめた。Mn-N-O の角度は、ほとんど  $180^\circ$  となっており、N-O 距離、Mn-NO 距離はそれぞれ 1.02 から 1.14 Å, 1.63 から 1.74 Å と  $\{\text{MnNO}\}^6$  錯体に観測される値と近い値をとっている<sup>22, 23, 29-31</sup>。しかし、キノリン環 5 位の置換基の導入による Mn 周りの結合距離には、特徴的な相関が得られなかった。一方、置換基が電子求引的になるに従い、Mn-N<sub>4</sub> の距離が大きくなり、カルボキシアミド部位の C=O 距離が小さくなるという傾向がみられた。これは、カルボキシアミドと Mn との配位力が、置換基の導入により変化していることを示唆している。



**Figure 2.1** Ortep representation of the cation of  $1^R$  derivatives at 50% probability level. H atoms are omitted for clarity.

**Table 2.1** Selected angle, bond lengths, and stretching frequencies of {MnNO}<sup>6</sup> complexes.

	Mn–N–O/deg	N–O/Å	Mn–NO/Å	Mn–N <sub>4</sub> /Å	C=O/Å	$\nu_{\text{NO}}/\text{cm}^{-1}$	$\nu_{\text{CO}}/\text{cm}^{-1}$
<b>1<sup>OMe</sup></b>	176.7(8)	1.015(7)	1.742(8)	1.923(7)	1.247(9)	1737	1602
<b>1<sup>H</sup></b>	171(2)	1.022(16)	1.635(12)	1.998(9)	1.225(15)	1739	1612
<b>1<sup>Cl</sup></b>	171.3(3)	1.044(4)	1.713(4)	1.941(3)	1.240(4)	1743	1624
<b>1<sup>NO2</sup></b>	175.8(6)	1.136(7)	1.660(5)	1.957(5)	1.217(7)	1744	1636
<b>[Mn(PaPy<sub>3</sub>)(NO)]ClO<sub>4</sub><sup>[22]</sup></b>	171.91(13)	1.1918(18)	1.6601(14)	1.9551(14)	1.244(2)	1745	1627
<b>[Mn(PaPy<sub>2</sub>Q)(NO)]ClO<sub>4</sub><sup>[23]</sup></b>	171.5(8)	1.237(18)	1.678(3)	1.956(3)	1.243(4)	1725	1634

**Table 2.2** Summary of crystal data and intensity collection and structural refinement parameters for **1<sup>R</sup>** derivatives.

	<b>1<sup>OMe</sup></b>	<b>1<sup>H</sup></b>	<b>1<sup>Cl</sup></b>	<b>1<sup>NO2</sup></b>
Empirical formula	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> Cl Mn N <sub>6</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> Cl Mn N <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>23</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> Mn N <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> Cl Mn N <sub>8</sub> O <sub>8</sub>
Formula weight	596.87	566.84	601.28	652.90
Crystal color and habit	brown platelet	brown block	brown platelet	brown chip
Crystal size (nm)	0.29 × 0.19 × 0.10	0.30 × 0.10 × 0.10	0.08 × 0.05 × 0.03	0.30 × 0.10 × 0.10
Temperature (K)	133	133	133	133
Crystal system	triclinic	monoclinic	monoclinic	monoclinic
Space group	<i>P</i> -1	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> / <i>n</i>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> / <i>c</i>	<i>Pc</i>
<i>a</i> (Å)	8.6256(5)	12.3007(5)	8.88120(10)	8.50240(10)
<i>b</i> (Å)	11.7224(9)	13.3626(6)	10.14710(10)	7.29870(10)
<i>c</i> (Å)	13.1577(10)	14.1948(7)	26.2914(5)	21.7032(5)
$\alpha$ (°)	71.050(4)	90	90	90
$\beta$ (°)	87.566(4)	107.070(2)	92.9655(8)	98.8707(11)
$\gamma$ (°)	80.591(3)	90	90	90
Volume (Å <sup>3</sup> )	1241.30(15)	2230.41(17)	2366.17(6)	1330.71(4)
<i>Z</i>	2	4	4	2
<i>D</i> <sub>calc</sub> (Mg/m <sup>3</sup> )	1.597	1.688	1.688	1.642
Absorption coefficient, $\mu$ (mm <sup>-1</sup> )	5.829	6.417	7.104	5.549
Reflections collected	16650	28188	31658	10774
Independent reflections [ <i>R</i> <sub>int</sub> ]	2542 [0.1127]	2237 [0.1213]	2634 [0.0515]	2990 [0.0777]
Max. and min. transmission	0.5933 and 0.2827	0.5660 and 0.2489	0.8151 and 0.6003	0.6068 and 0.2868
Goodness-of-fit on <i>F</i> <sup>2</sup>	1.126	1.090	1.057	1.031
Final <i>R</i> indices [ <i>I</i> > 2 $\sigma$ ( <i>I</i> )]	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.0752, <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0.1902	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.1080, <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0.2588	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.0346, <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0.0766	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.0522, <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0.1136
<i>R</i> indices (all data)	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.0969, <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0.2268	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.1479, <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0.3130	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.0424, <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0.0809	<i>R</i> <sub>1</sub> = 0.0599, <i>wR</i> <sub>2</sub> = 0.1229

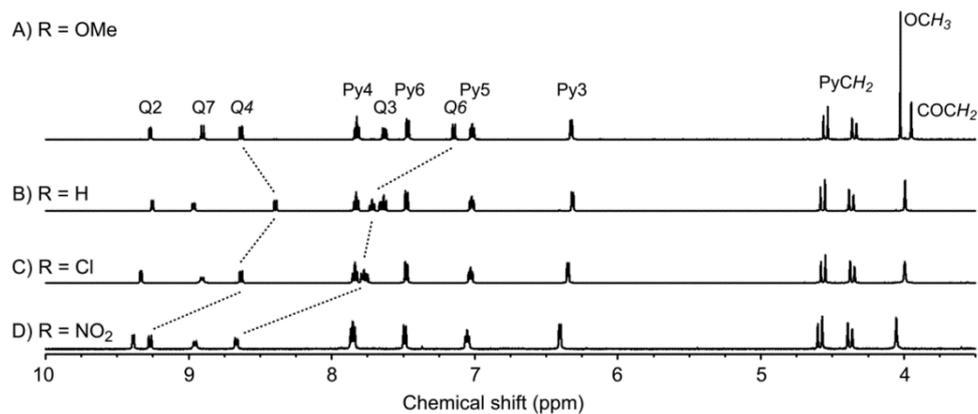
**Table 2.3.** Selected bond lengths (Å) and angles (deg) for **1<sup>R</sup>** derivatives

	<b>1<sup>OMe</sup></b>	<b>1<sup>H</sup></b>	<b>1<sup>Cl</sup></b>	<b>1<sup>NO2</sup></b>
Mn(1)–N(1)	2.000(7)	2.036(11)	2.008(3)	2.024(5)
Mn(1)–N(2)	2.028(7)	2.121(9)	2.044(3)	2.075(6)
Mn(1)–N(3)	2.063(6)	2.120(10)	2.068(3)	2.061(5)
Mn(1)–N(4)	1.923(7)	1.998(9)	1.941(3)	1.957(5)
Mn(1)–N(5)	2.015(6)	2.129(9)	2.038(3)	2.052(5)
Mn(1)–N(6)	1.742(8)	1.635(12)	1.713(4)	1.660(5)
N(6)–O(2)	1.015(7)	1.022(16)	1.044(4)	1.136(7)
C(20)–O(1)	1.247(9)	1.225(15)	1.240(4)	1.217(7)
Mn(1)–N(6)–O(2)	176.7(8)	171(2)	171.3(3)	175.8(6)
N(6)–Mn(1)–N(4)	177.0(3)	176.9(6)	173.37(13)	176.4(2)
N(6)–Mn(1)–N(1)	96.0(3)	98.1(7)	94.74(13)	96.6(2)
N(4)–Mn(1)–N(1)	81.3(3)	78.9(5)	80.50(12)	80.1(2)
N(6)–Mn(1)–N(2)	92.7(3)	92.3(6)	93.81(13)	95.2(2)
N(4)–Mn(1)–N(2)	86.6(2)	87.4(3)	91.45(11)	86.7(2)
N(1)–Mn(1)–N(2)	99.3(3)	96.7(4)	98.15(12)	101.4(2)
N(6)–Mn(1)–N(5)	99.3(3)	100.7(6)	101.98(13)	99.5(2)
N(4)–Mn(1)–N(5)	83.4(3)	82.3(4)	82.87(11)	83.8(2)
N(1)–Mn(1)–N(5)	164.7(3)	161.0(4)	163.26(12)	163.82(18)
N(2)–Mn(1)–N(5)	81.0(3)	80.1(4)	80.32(12)	79.9(2)
N(6)–Mn(1)–N(3)	94.7(3)	90.4(6)	91.57(13)	93.5(2)
N(4)–Mn(1)–N(3)	86.8(2)	91.0(3)	84.60(11)	85.6(2)
N(1)–Mn(1)–N(3)	97.0(3)	104.3(4)	98.37(12)	95.6(2)
N(2)–Mn(1)–N(3)	161.3(3)	158.2(5)	162.12(12)	159.9(2)
N(5)–Mn(1)–N(3)	80.8(3)	78.2(4)	81.89(12)	80.8(2)

### 3-3. **1<sup>R</sup>** の <sup>1</sup>H NMR と溶液中での構造

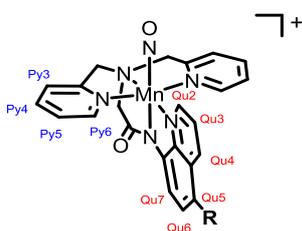
**1<sup>R</sup>** の <sup>1</sup>H NMR を CD<sub>3</sub>CN 中で測定した結果、4.0–9.4 ppm の領域にシャープなピークが観測された (Figure. 2.2). この結果から **1<sup>R</sup>** は, [Mn(NO)(PaPy<sub>3</sub>)]ClO<sub>4</sub><sup>22)</sup> や [Mn(NO)(PaPy<sub>2</sub>Q)]ClO<sub>4</sub><sup>23)</sup> と同様に反磁性の {MnNO}<sup>6)</sup> の電子状態をとっていることがわかる. **1<sup>R</sup>** の <sup>1</sup>H NMR のピークに関する帰属については, Table 2.4 にまとめた. 約 4.4 と 4.6 ppm ( $J_{AB} = 15.5$  Hz) の領域に観測される積分値が 2 の AB カルテットで観測されたピークは, 2 つのピリジルメチ

ル部位の  $CH_2$  に帰属される。この結果は、 $1^R$  は溶液中で  $C_s$  対称構造を保持していることを示唆している。 $1^R$  の  $^1H$  NMR の化学シフト値は、キノリン環の 4, 6 位を除きほとんど同じ位置に観測された。その化学シフト値は、置換基がより電子求引的になるに従い低磁場側へとシフトする傾向がみられた。



**Figure 2.2**  $^1H$  NMR spectra of  $1^{OMe}$ (A),  $1^H$ (B),  $1^{Cl}$ (C) and  $1^{NO_2}$ (D) in  $CD_3CN$ .

**Table 2.4**  $^1\text{H}$  NMR signal assignment of  $\mathbf{1}^{\text{R}}$  derivatives



	$\mathbf{1}^{\text{OMe}}$	$\mathbf{1}^{\text{H}}$	$\mathbf{1}^{\text{Cl}}$	$\mathbf{1}^{\text{NO}_2}$
Py3	6.33 (d, 2H, $J = 5.2$ Hz)	6.31 (d, 2H, $J = 5.7$ Hz)	6.35 (d, 2H, $J = 5.2$ Hz)	6.41 (d, 2H, $J = 5.2$ Hz)
Py4	7.82 (t, 2H, $J = 7.7$ Hz)	7.83 (t, 2H, $J = 7.7$ Hz)	7.84 (t, 2H, $J = 7.7$ Hz)	7.85 (m, 3H)
Py5	7.02 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz)	7.02 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz)	7.03 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz)	7.05 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz)
Py6	7.47 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz)	7.48 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz)	7.48 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz)	7.46 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz)
Qu2	9.27 (dd, 1H, $J = 1.7, 5.2$ Hz)	9.25 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz)	9.33 (d, 1H, $J = 5.0$ Hz)	9.39 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz)
Qu3	7.63 (dd, 1H, $J = 5.1, 8.5$ Hz)	7.65 (dd, 1H, $J = 5.1, 8.3$ Hz)	7.77 (m, 2H??)	7.85 (m, 3H???)
Qu4	8.63 (dd, 1H, $J = 8.6, 1.2$ Hz)	8.39 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz)	8.63 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz)	9.27 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz)
Qu5	–	7.63 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz)	–	–
Qu6	7.15 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz)	7.72 (t, 1H, $J = 8.0, 8.0$ Hz)	7.77 (m, 2H)	8.67 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz)
Qu7	8.90 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz)	8.97 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz)	8.92 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz)	8.96 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz)
$-\text{CH}_2\text{CO}-$	3.95 (s, 2H)	4.00 (s, 2H)	3.99 (s, 2H)	4.05 (s, 2H)
$\text{PyCH}_2-$	4.55 (d, 2H, $J = 15.5$ Hz)	4.57 (d, 2H, $J = 15.5$ Hz)	4.56 (d, 2H, $J = 15.5$ Hz)	4.59 (d, 2H, $J = 15.5$ Hz)
$\text{PyCH}_2-$	4.35 (d, 2H, $J = 15.5$ Hz)	4.37 (d, 2H, $J = 15.5$ Hz)	4.36 (d, 2H, $J = 15.5$ Hz)	4.38 (d, 2H, $J = 15.5$ Hz)
$\text{OCH}_3$	4.03 (s, 3H)	–	–	–

### 3-4. $\mathbf{1}^{\text{R}}$ の N–O 伸縮振動 ( $\nu_{\text{N-O}}$ ) と C=O 伸縮振動 ( $\nu_{\text{C=O}}$ )

固体状態の  $\mathbf{1}^{\text{R}}$  の赤外吸収スペクトルを ATR 法により測定した結果、 $1737\text{--}1744\text{ cm}^{-1}$  および  $1602\text{--}1636\text{ cm}^{-1}$  に 2 本の強いピークが観測された (Figure. 2.3)。高波数側に観測されたピークは、Mn 中心に配位している NO 由来の N–O 伸縮振動 ( $\nu_{\text{N-O}}$ ) に帰属でき、置換基が電子求引的になるに従い、高波数側にシフトしている。これまでに報告されている  $\{\text{MnNO}\}^6$  錯体のうち、Mn(I)–NO<sup>+</sup> と帰属されている錯体では、 $1725\text{--}1745\text{ cm}^{-1}$  に  $\nu_{\text{N-O}}$  が観測され<sup>22, 23)</sup>、Mn(III)–NO<sup>-</sup> と帰属されている錯体では、 $1662\text{ cm}^{-1}$  に  $\nu_{\text{N-O}}$  が観測されている<sup>32)</sup>。これらの結果から、 $\mathbf{1}^{\text{R}}$  は、 $[\text{Mn}(\text{PaPy}_3)(\text{NO})]\text{ClO}_4$  や  $[\text{Mn}(\text{PaPy}_2\text{Q})(\text{NO})]\text{ClO}_4$  と同様に Mn(I)–NO<sup>+</sup> の電子

状態をとっていることが示唆された。1602–1636  $\text{cm}^{-1}$  の領域に観測されるカルボキシアミド部位の C=O 伸縮振動 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ) でも  $\nu_{\text{N-O}}$  と同様に、置換基がより電子求引的になるに従い高波数側にシフトしていることが明らかとなった。また、観測された  $\nu_{\text{C=O}}$  と X 線結晶構造解析の結果から得られた C=O 距離に良い相関が得られた。更に、 $\nu_{\text{C=O}}$  に対して  $\nu_{\text{N-O}}$  をプロットした際にも直線関係が得られた (Figure 2.4)。これらの結果は、置換基がより電子求引的になるに従いカルボキシアミド部位の N から Mn への配位が弱くなり、その結果 Mn から NO への  $\pi$  back-donation も同時に弱くなっていることを示唆している。

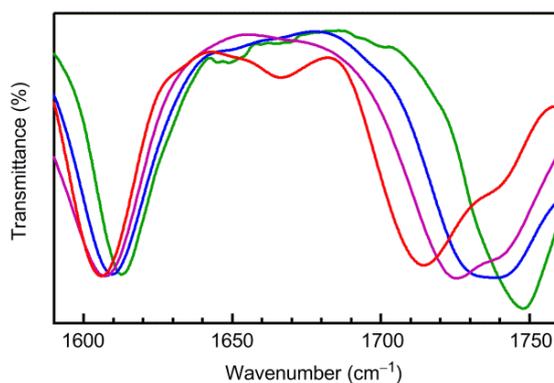


Figure 2.3 ATR-IR spectra of  $\mathbf{1}^{\text{R}}$  (R: OMe, green; H, blue; Cl, purple and  $\text{NO}_2$ , red).

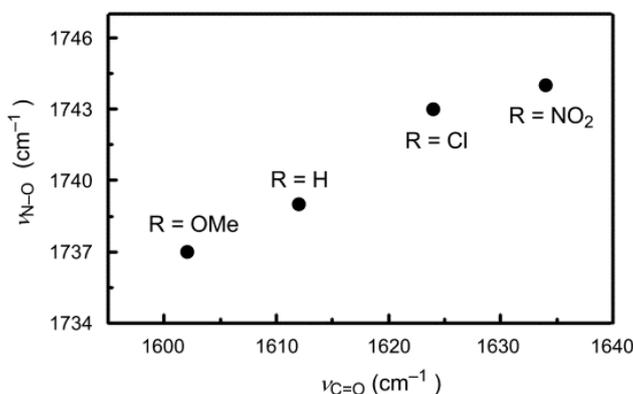
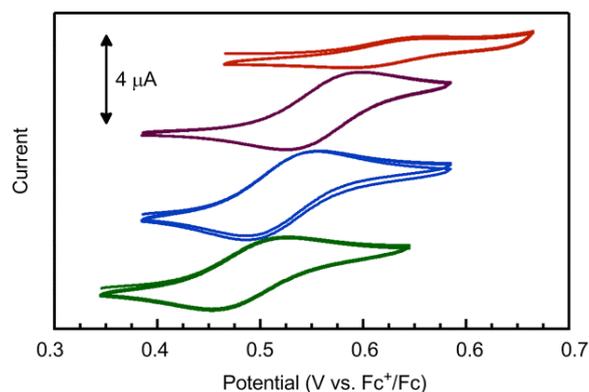


Figure 2.4 Correlation graph of  $\nu_{\text{N-O}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) and  $\nu_{\text{C=O}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) frequencies for  $\mathbf{1}^{\text{R}}$  derivatives.

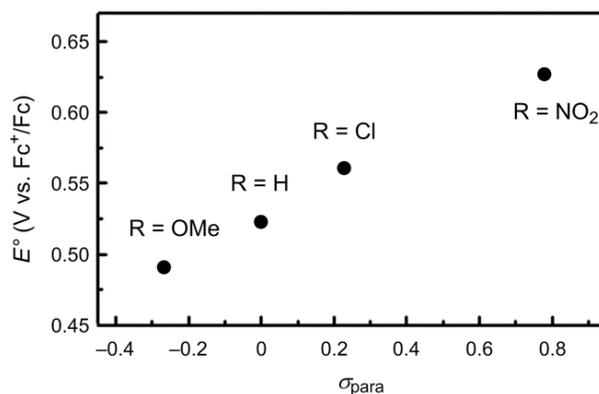
### 3-5. $\mathbf{1}^{\text{R}}$ の電気化学的性質

$\mathbf{1}^{\text{R}}$  のサイクリックボルタメトリーを室温、アセトニトリル中で測定した結果、0.49–0.63 V vs  $\text{Fc}^+/\text{Fc}$  の領域に  $\{\text{MnNO}\}^5/\{\text{MnNO}\}^6$  と帰属できる準可逆の酸化還元波 ( $\Delta E > 57 \text{ mV}$ ) が観測された (Figure. 2.5)。[Mn(NO)(PaPy<sub>3</sub>)]ClO<sub>4</sub> の酸化還元電位は、+0.50 V vs  $\text{Fc}^+/\text{Fc}$  と報告されており<sup>22)</sup>、dpaq<sup>R</sup> 配位子の R =  $\text{NO}_2$ , Cl and H 置換体は、PaPy<sub>3</sub> よりも弱い電子供与性配

位子であり,  $\text{dpaq}^{\text{OMe}}$  はわずかに強い電子供与性配位子であることが示唆された。また,  $\{\text{MnNO}\}^6$  の安定性は,  $1^{\text{NO}_2} > 1^{\text{Cl}} > 1^{\text{H}} > 1^{\text{OMe}}$  と減少していき, ハメットの置換基定数 ( $\sigma_{\text{para}}$ ) に対して酸化還元電位をプロットすると  $\rho$  値が  $131 \pm 6$  となり,  $\{\text{MnNO}\}^6$  の電子状態がハメットの置換基定数に従って, 変化していることが伺える (Figure. 2.6).



**Figure 2.5** Cyclic voltammogram of  $1^{\text{R}}$  (R: OMe, green; H, blue; Cl, purple and  $\text{NO}_2$ , red) in deaerated  $\text{CH}_3\text{CN}$  containing 0.1 M  $n\text{-Bu}_4\text{NClO}_4$  at  $25^\circ\text{C}$ ; working electrode Pt, counter electrode Pt, reference electrode Ag/AgCl in  $\text{CH}_3\text{CN}$ , scan rate  $20 \text{ mV s}^{-1}$ .  $E_{1/2}$  (vs  $\text{Fc}^+/\text{Fc}$ ) ( $\Delta E$ ): 0.49 V (75 mV) for R = OMe; 0.52 V (71 mV) for R = H; 0.56 V (73 mV) for R = Cl and 0.63 V (81 mV) for R =  $\text{NO}_2$ .

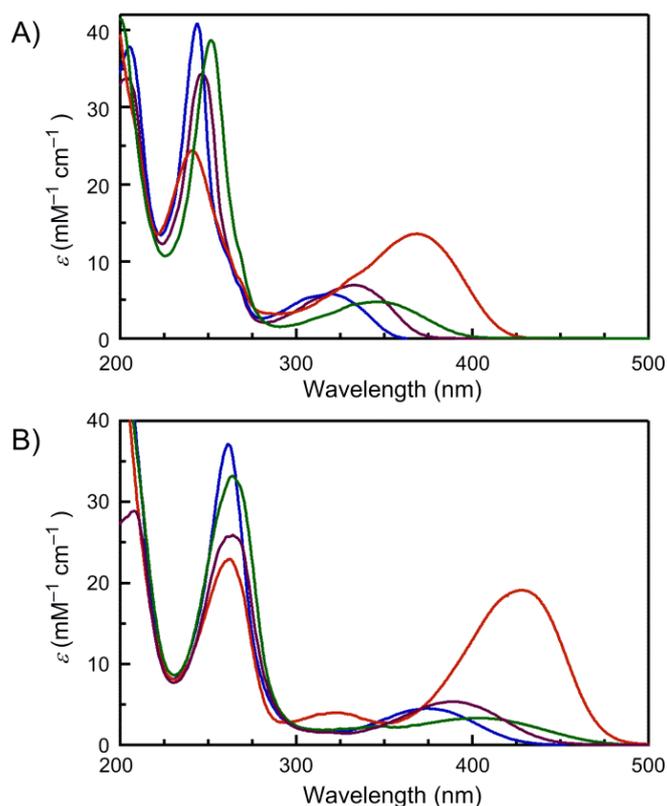


**Figure 2.6** Hammett plot for the redox potentials of  $1^{\text{R}}$  derivatives.

### 3-6. $1^{\text{R}}$ の電子吸収スペクトル

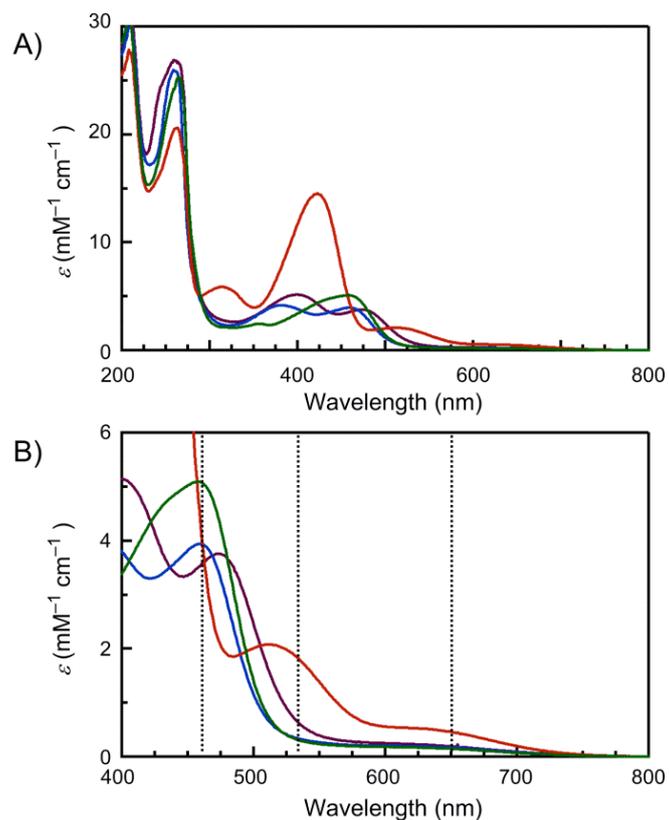
配位子である  $\text{H-dpaq}^{\text{R}}$  および  $[\text{Mn}(\text{dpaq}^{\text{R}})]\text{ClO}_4$  のアセトニトリル溶液中での電子吸収スペクトルを測定した結果, 250 および 350 nm 付近に二つの極大吸収が観測された (Figure. 2.7). これらの吸収バンドは, キノリン環の  $\pi\text{-}\pi^*$  遷移に帰属できる。また,  $[\text{Mn}(\text{dpaq}^{\text{R}})]\text{ClO}_4$

の吸収スペクトルは、H-dpaq<sup>R</sup>のスペクトルと比べ、長波長シフトしていることから、アセトニトリル溶液中でH-dpaq<sup>R</sup>がMnと錯形成していることがわかる。また、350 nm付近に観測されるキノリン環由来の $\pi$ - $\pi^*$ 遷移は、H-dpaq<sup>R</sup>および[Mn(dpaq<sup>R</sup>)]ClO<sub>4</sub>ともにR = H > Cl > OMe > NO<sub>2</sub>の順で長波長側に観測されることがわかった。

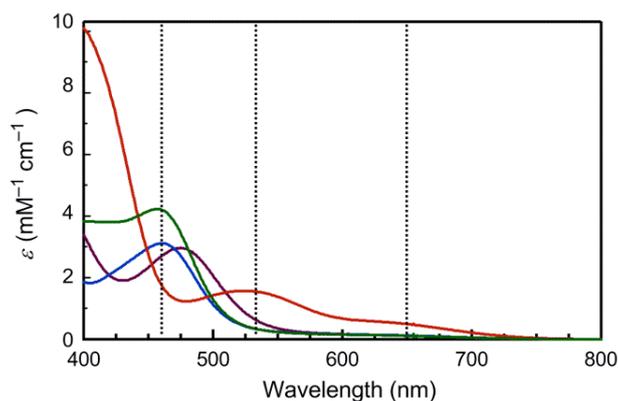


**Figure 2.7** Electronic absorption spectra of H-dpaq<sup>R</sup> (A) and [Mn(dpaq<sup>R</sup>)]ClO<sub>4</sub> (B) in CH<sub>3</sub>CN at 20°C. R: OMe, green; H, blue; Cl, purple and NO<sub>2</sub>, red.

$1^{OMe}$ ,  $1^H$ ,  $1^{Cl}$ のアセトニトリル溶液中での電子吸収スペクトルを測定した結果、459–474 nmに新たな吸収バンドおよび600 nm付近に弱いブロードな吸収が観測された。一方、 $1^{NO_2}$ の電子吸収スペクトルは、513 nm および 650 nm ( $\epsilon = 493 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) に弱いショルダーバンドが観測された (Figure. 2.8)。650 nm 付近の吸収は、約 700 nm まで達している。また、MES 緩衝溶液 (20 mM, pH 7.2) 中での  $1^R$  の電子吸収スペクトルは、アセトニトリル中のスペクトルと類似していた (Figure. 2.9)。



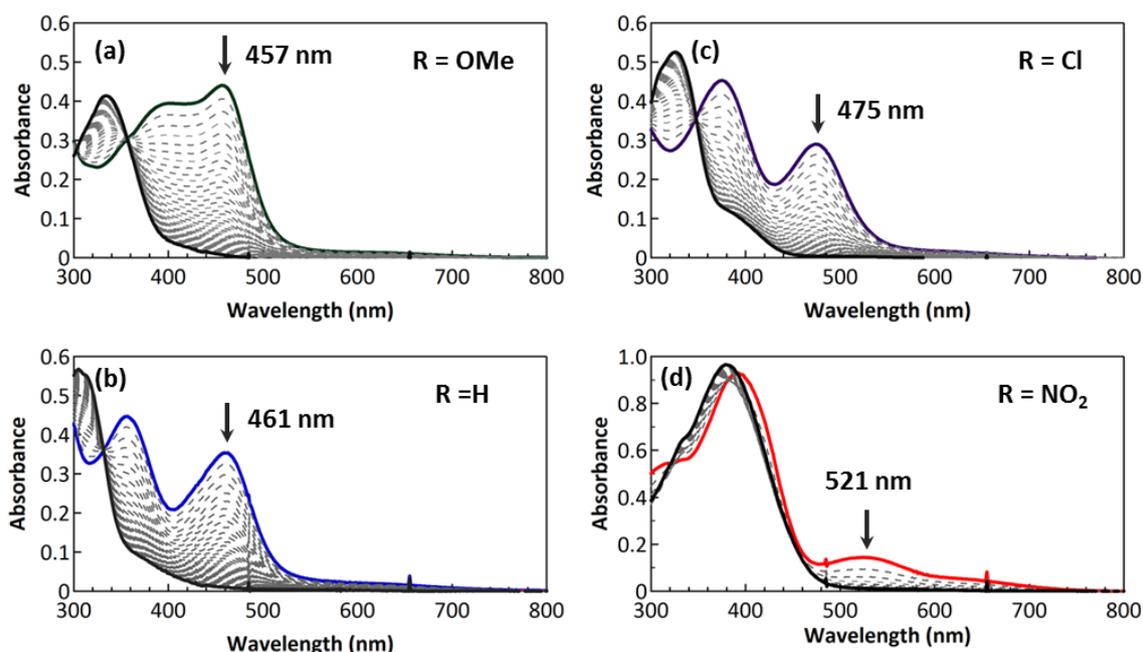
**Figure 2.8** Electronic absorption spectra of **1<sup>R</sup>** (A) in  $\text{CH}_3\text{CN}$  at  $20\text{ }^\circ\text{C}$ . R: OMe, green; H, blue; Cl, purple and  $\text{NO}_2$ , red. Panel B shows a magnification in the range of 400 to 800 nm. Vertical dotted lines show the wavelength of light irradiation (460, 530 and 650 nm).



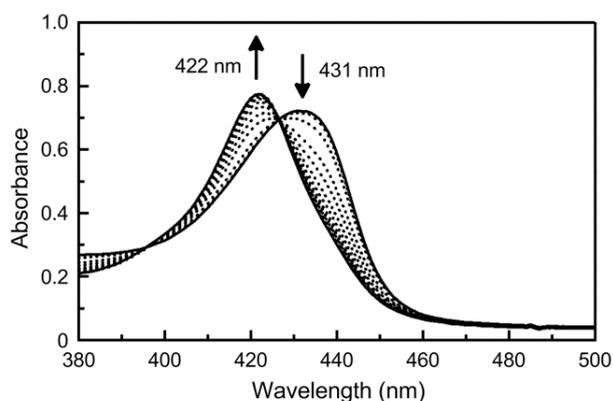
**Figure 2.9** Electronic absorption spectra of **1<sup>R</sup>** in MES buffer (20 mM, pH7.2) at  $20\text{ }^\circ\text{C}$ . R: OMe, green; H, blue; Cl, purple and  $\text{NO}_2$ , red. Vertical dotted lines show the wavelength of light irradiation (460, 530 and 650 nm).

### 3-7. 光照射による一酸化窒素の放出

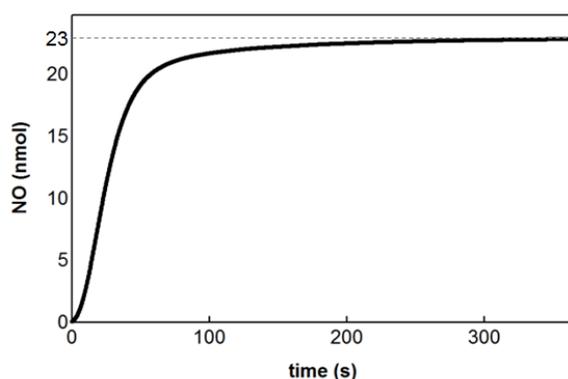
暗所下,  $1^R$  は, 20 mM MES 緩衝溶液 (pH 7.2) 中で 10 日間以上安定であった. しかし, 光照射するとただちに分解し, 対応する Mn(II)錯体である  $[\text{Mn}(\text{dpaq}^R)]\text{ClO}_4$  へと変化した (Figure. 2.10).  $1^R$  の分解に伴う NO の生成は, 電子吸収スペクトル測定を用いて, 窒素下, MES 緩衝溶液中 (20 mM, pH 7.2), 還元型ミオグロビン存在下で  $1^R$  に光照射を行い, 431 nm に Soret 帯を有する還元型ミオグロビンから 422 nm に Soret 帯をもつ NO 配位型ミオグロビンへの変化を確認することで同定された (Figure. 2.11). 更に, 一酸化窒素測定装置を用いて,  $1^H$  から放出された NO を定量した結果, 23 nmol の  $1^H$  から 23 nmol の NO の発生が確認でき, 1 分子の  $1^H$  から 1 分子の NO が放出されることが明らかとなった (Figure. 2.12).



**Figure 2.10** Electronic spectral changes of a solution of  $1^{\text{OMe}}$  (a),  $1^{\text{H}}$  (b),  $1^{\text{Cl}}$  (c) and  $1^{\text{NO}_2}$  (d) in 20 mM MES buffer (pH 7.2, 5% DMSO) at 20 °C under irradiation at 650 nm. The arrow indicates a decrease in band intensities as the reaction proceeds.



**Figure 2.11** Conversion of reduced myoglobin (ca. 1.7  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{max}} = 431 \text{ nm}$ ) to the NO adduct of myoglobin ( $\lambda_{\text{max}} = 422 \text{ nm}$ ) by the photolysis of  $\mathbf{1}^{\text{NO}_2}$  (20  $\mu\text{M}$ ) in 20 mM MES buffer (pH 7.2) under  $\text{N}_2$ .



**Figure 2.12** Quantitative analysis of NO by NO analyzer released by  $\mathbf{1}^{\text{H}}$  (23 nmol) under light irradiation (300 W, 460–700 nm).

次に、20  $^{\circ}\text{C}$ 、20 mM MES 緩衝溶液中 (pH 7.2, 5% DMSO),  $\mathbf{1}^{\text{R}}$  に 460 nm, 530 nm, 650 nm の異なる波長の単色光を照射した際の見かけの NO 放出速度を電子吸収スペクトル測定の経時変化から決定した。測定に用いた単色光の強度は、300  $\text{mW m}^{-2}$  に固定して測定した。また、対照化合物として  $[\text{Mn}(\text{NO})(\text{PaPy}_3)]\text{ClO}_4$  ( $\mathbf{2}$ )<sup>22)</sup> を用いた。 $\mathbf{1}^{\text{R}}$  および  $\mathbf{2}$  に単色光を照射した結果、それぞれ 30 分以内に対応する Mn(II)錯体へと変化した (Figure. 2.10)。その速度は、照射する光の波長に大きく依存し、460 nm では、 $\mathbf{1}^{\text{OMe}} \approx \mathbf{1}^{\text{H}} > \mathbf{1}^{\text{Cl}} > \mathbf{1}^{\text{NO}_2}$ , 530 や 650 nm では、順序が逆転し、 $\mathbf{1}^{\text{OMe}} < \mathbf{1}^{\text{H}} < \mathbf{1}^{\text{Cl}} < \mathbf{1}^{\text{NO}_2}$  となった (Table 2.5)。また、650 nm の最も長波長側の単色光を照射した際の  $\mathbf{1}^{\text{NO}_2}$  の分解速度は、無置換体である  $\mathbf{1}^{\text{H}}$  に比べ、約 4 倍に向上した。

**Table 2.5** Apparent initial NO releasing rate constants ( $k_{\text{int}}$ ), molar extinction coefficients and quantum yields for NO release at specific wavelength.

complex	$k_{\text{int}}$ ( $\mu\text{M s}^{-1}$ )			$\epsilon$ ( $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )			$\phi$ (mol einstein $^{-1}$ )		
	460 nm	530 nm	650 nm	460 nm	530 nm	650 nm	460 nm	530 nm	650 nm
<b>1<sup>OMe</sup></b>	1.7 $\pm$ 0.1	0.25 $\pm$ 0.01	0.084 $\pm$ 0.001	4.2	0.37	0.11	0.58 $\pm$ 0.04	0.47 $\pm$ 0.01	0.49 $\pm$ 0.01
<b>1<sup>H</sup></b>	1.8 $\pm$ 0.1	0.30 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01	3.1	0.37	0.12	0.61 $\pm$ 0.03	0.51 $\pm$ 0.01	0.47 $\pm$ 0.01
<b>1<sup>Cl</sup></b>	1.3 $\pm$ 0.1	0.49 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01	2.7	0.71	0.11	0.66 $\pm$ 0.04	0.66 $\pm$ 0.02	0.73 $\pm$ 0.01
<b>1<sup>NO2</sup></b>	0.84 $\pm$ 0.1	0.81 $\pm$ 0.02	0.40 $\pm$ 0.01	1.8	1.6	0.49	0.61 $\pm$ 0.05	0.63 $\pm$ 0.01	0.78 $\pm$ 0.01
<b>2</b>	2.9 $\pm$ 0.1	0.20 $\pm$ 0.01	0.25 $\pm$ 0.01	2.0	0.11	0.22	0.71 $\pm$ 0.04	0.59 $\pm$ 0.02	0.39 $\pm$ 0.01

460 nm の単色光照射による **1<sup>R</sup>** からの NO 放出における量子収率 ( $\phi$ ) を測定した結果、0.58 から 0.66 と置換基の導入による大きな変化は観測されなかった (Table 2.5). また、530 および 650 nm の単色光照射時の量子収率を算出した結果、**1<sup>Cl</sup>**、**1<sup>NO2</sup>** が **1<sup>H</sup>** や **1<sup>OMe</sup>** に比べ、わずかに大きな値を示したが、**1<sup>NO2</sup>** が 650 nm の単色光照射時に他の {MnNO} $^6$  錯体と比べ、約 4 倍の速度で NO を放出した理由を説明する程の差は観測されなかった. 以上の結果から、**1<sup>NO2</sup>** が他の {MnNO} $^6$  錯体に比べ、650 nm の単色光照射に伴う NO 放出速度が約 4 倍に向上したことは、**1<sup>NO2</sup>** が他の {MnNO} $^6$  錯体に比べ、650 nm に大きなモル吸光係数をもつためであると考えられる.

#### 4. 結論

マンガンニトロシル錯体  $1^R$  の N-O 伸縮振動 ( $\nu_{N-O}$ ) やカルボキシアミド部位の C=O 伸縮振動 ( $\nu_{C=O}$ ) および  $\{MnNO\}^5/\{MnNO\}^6$  の酸化還元電位は、キノリン環 5 位に置換基を導入することで、ハメットの置換基定数 ( $\sigma_{para}$ ) に従って変化した。例えば、強い電子求引基であるニトロ基を配位子に導入した  $1^{NO_2}$  は、 $\nu_{N-O}$  および  $\nu_{C=O}$  が最も高波数側に観測され、 $\{MnNO\}^5/\{MnNO\}^6$  に対応する酸化還元電位は、最も正に大きな値を示した。この結果は、 $1^{NO_2}$  の Mn から NO への  $\pi$ -back donation が 4 種の  $\{MnNO\}^6$  錯体の中で最も弱いためであると考えられる。したがって  $1^{NO_2}$  は、Mn と NO の結合が最も弱く、光照射による NO の放出が最も効率的に起こると考えられた。しかし、MES 緩衝溶液中での NO の放出速度は、照射する光の波長に大きく依存することが判明した。また、 $1^R$  の NO 放出の量子収率 ( $\phi$ ) は、置換基の導入によりほとんど変化せず、見かけの NO 放出速度は、照射した単色光の波長のモル吸光係数に大きく依存していることがわかった。

キノリン環 5 位に強い電子求引基であるニトロ基を導入したマンガンニトロシル錯体  $1^{NO_2}$  は、700 nm 付近まで吸収を示した。これは、ニトロ基の導入により、キノリン環の  $\pi^*$  軌道が安定化されたためであると考えられる。その結果、 $1^{NO_2}$  は 650 nm の単色光照射を行った際、他のマンガンニトロシル錯体よりも約 4 倍の速度で NO を放出することが明らかとなった。これらの結果は、組織透過性の高い長波長光により効率よく NO の放出制御が可能な新たなマンガンニトロシル錯体  $\{MnNO\}^6$  の分子設計に非常に有用であると考えられる。

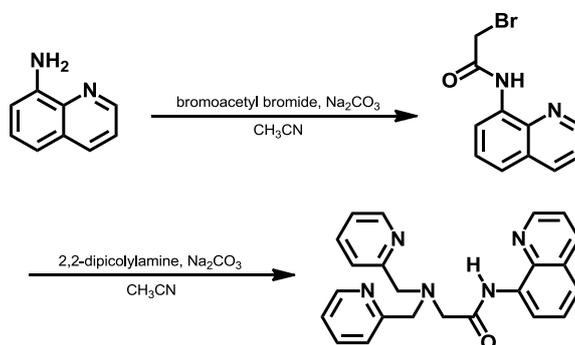
## 5 実験方法

### 5-1. 測定機器

[Mn(PaPy<sub>3</sub>)(NO)]ClO<sub>4</sub> は、文献記載の方法で合成した<sup>22)</sup>。赤外吸収スペクトルは島津社製 IRAffinity-1 spectrometer に MIRacle 10 single reflection を装着し、ATR 法 (ZnSe) により測定した。電子吸収スペクトル測定には、Agilent 社製 8543UV-visible spectrometer を用いた。<sup>1</sup>H-NMR および <sup>13</sup>C NMR スペクトル測定には、日本電子社製 JMN-A 500 を用いた。ESI-MS 測定には JEOL 社製 JMS-T100CS spectrometer を用いた。元素分析は Perkin-Elmer 社製 Elemental Analyzer (2400 Series II) を用いた。照射には、300 W キセノンランプ (Asahi Spectra Co. Ltd) を用い、650 nm の単色光照射の際は、 $\lambda = 650$  (FWHM: 6 nm) のバンドパスフィルターを装着した。一酸化窒素測定装置は、280i NOA を用いた。

### 5-2. 配位子合成

#### 5-2-1. *N,N*-bis(2-pyridylmethyl)amine-*N*-methyl-2-quinoline-2-carboxamide (H-dpaq<sup>H</sup>)の合成

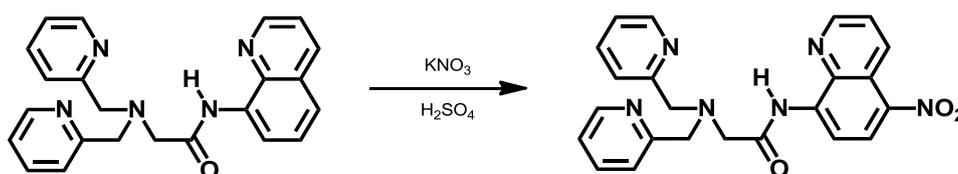


反応容器に 8-aminoquinoline (1.00 g, 6.96 mmol) と Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.889 g, 8.39 mmol) を加え、窒素雰囲気下、0°C にてアセトニトリル (20 mL) を加え溶解させた。溶液はオレンジ色になった。その溶液に bromoacetyl bromide (0.75 mL) を 30 分かけてゆっくりと加えた。溶液は白黄色になった。3 時間後 TLC (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, hexane : ethyl acetate = 5 : 1) にて反応終了と判断した。反応溶液を吸引濾過すると赤色の溶液が得られた。その後、エバポレーターを用いて溶媒を除去した後、真空乾燥し、桃色固体を得た。

反応容器に上記の桃色固体および 2,2-dipicolylamine (1.68 g, 8.43 mmol), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.903 g, 8.78 mmol) を加え、窒素雰囲気下、0°C にてアセトニトリル (20 mL) を加え溶解させた。溶液は赤色になった。この溶液を一晩攪拌した後、TLC (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, hexane : ethyl acetate = 1 : 1) にて反応終了と判断し、吸引濾過を行った。濃赤色の溶液が得られた。その後、エバポレ

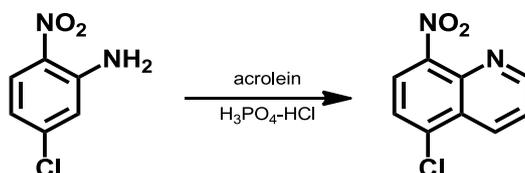
ーターを用いて溶媒を除去し、真空乾燥させ濃赤色の固体を得た。その固体を少量のジクロロメタンに溶かしアルミナカラムにて精製した (hexane : ethyl acetate = 1 : 1)。精製後、エバポレーターを用いて溶媒を除去し、真空乾燥することで目的の白黄色固体を得た。(収量: 2.27 g, 収率: 86%)  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.54(s,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ , 2H), 4.02(s,  $-\text{CH}_2\text{Py}$ , 4H), 7.15(dd,  $J = 4.0$  Hz,  $J = 7.5$  Hz Py5, 2H), 7.52~7.54 (m, Qu3, 1H/ Qu5, 1H/ Qu7, 1H), 7.65(dd,  $J = 7.5$  Hz,  $J = 9.7$  Hz Py4, 2H), 7.99(d,  $J = 8.0$  Hz, Py3, 2H), 8.20(d,  $J = 1.7$ Hz,  $J = 8.0$  Hz, Qu4, 1H), 8.53(d,  $J = 4.0$  Hz, Py6, 2H), 8.77(dd,  $J = 2.9$  Hz,  $J = 6.3$  Hz, Qu6, 1H), 8.94(dd,  $J = 1.7$  Hz,  $J = 4.0$  Hz, Qu2, 1H), 11.6 (s,  $-\text{NHQu}$ , 1H)  $^{13}\text{C NMR}$  (125.8 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  59.4 ( $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 61.2 ( $-\text{CH}_2\text{Py}$ ), 116.7 (Qu6), 121.7 (Qu3or Qu5 or Qu7), 121.7 (Qu3 or Qu5 or Qu7), 122.5 (Py5), 123.4 (Py3), 127.6 (Qu3 or Qu5or Qu7), 134.5 (Qu8), 136.4 (Qu4), 136.7 (Py4), 138.9 (Qu9), 148.1 (Qu2), 149.2(Py6), 158.4 (Py2), 169.7 (C=O)

### 5-2-2. *N,N*-bis(2-pyridylmethyl)amine-*N*-methyl-2-(5-nitroquinoline)-2-carboxamide (*H*-dpaq<sup>NO<sub>2</sub></sup>)の合成



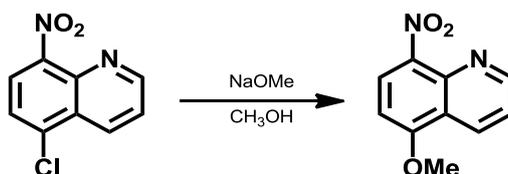
反応容器に *H*-dpaq<sup>H</sup> (1.00 g, 2.60 mmol) を加え、50 mL の濃硫酸に溶解させた。溶液は薄黄色となった。0 °C で攪拌を行いながら potassium nitrate (0.319 g, 3.16 mmol) をゆっくりと加えた。この溶液を氷浴中で 2.5 時間攪拌し、TLC ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ , hexane : ethyl acetate = 1 : 1) にて反応終了と判断した。この溶液をアンモニア水 250 mL にゆっくりと加え塩基性にした。さらに、ジクロロメタンと水により分液を行い、目的の化合物を有機相に抽出した。この溶液に  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  を加えて脱水し、吸引濾過にて  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  を除去した。その後、エバポレーターを用いて溶媒を除去し、真空乾燥することで目的の黄色固体を得た。(収量: 1.07 g, 収率: 96%)  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.61 (s,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ , 2H), 4.04 (s,  $-\text{CH}_2\text{Py}$ , 4H), 7.16 (dd,  $J = 4.6$  Hz,  $J = 7.5$  Hz, Py5, 2H), 7.64 (dd,  $J = 7.5$  Hz,  $J = 7.5$  Hz, Py4, 2H), 7.79 (dd,  $J = 4.0$  Hz,  $J = 8.5$  Hz, Qu3, 1H), 7.82 (d,  $J = 7.5$  Hz, Py3, 2H), 8.52 (d,  $J = 4.6$  Hz, Py6, 2H), 8.54 (d,  $J = 9.2$  Hz, Qu7, 1H), 8.83 (d,  $J = 9.2$  Hz, Qu6, 1H), 9.03 (d,  $J = 4.0$  Hz, Qu2, 1H), 9.31 (d,  $J = 9.2$  Hz, Qu4, 1H), 11.9 (s,  $-\text{NHQu}$ , 1H).  $^{13}\text{C NMR}$  (125.0 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 59.4 (s,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 61.3 (s,  $-\text{CH}_2\text{Py}$ ), 113.8 (s, Qu6), 122.0 (s, Qu10), 122.6 (s, Py5), 123.4 (s, Py3), 124.7 (s, Qu3) 127.9 (s, Qu7), 133.3 (s, Qu4), 136.6 (s, Py4), 138.0 (s, Qu5), 138.8 (s, Qu9), 140.8 (s, Qu8), 148.9 (s, Qu2), 149.4 (s, Py6), 158.0 (s, Py2), 170.7 (s, C=O)

### 5-2-3. 5-chloro-8-nitroquinoline の合成



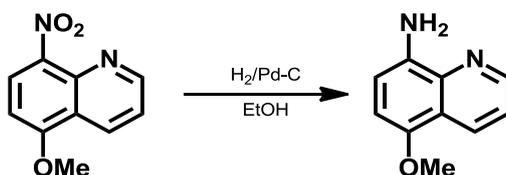
5-chloro-2-nitroaniline (5.10 g) にリン酸 (2.23 g), 濃塩酸 (180 mL) を加え 90 °C に加熱すると, 濃黄色の溶液となった. その溶液に acrolein 5.81 mL を 2 時間かけて滴下した. その後, 2 時間攪拌すると, 濃赤色の溶液が得られた. 溶液を常温に戻した後, 蒸留水 (50 mL) 加え, 吸引濾過すると橙色の溶液が得られた. その橙色溶液に過剰量のアンモニア水を加えると赤黄固体が析出したため, ヌツチェによりその固体をろ取した. その固体を簡易カラムすることで精製し, 目的の黄褐色固体が得られた. (収量: 3.1 g, 収率: 51%) <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.69 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 4.3 Hz, Qu3, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.0 Hz, Qu6, 1H), 8.00 (d, *J* = 8.0 Hz, Qu7, 1H), 8.68 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 1.4 Hz, Qu4, 1H), 9.14 (dd, *J* = 4.3 Hz, *J* = 1.4 Hz, Qu2, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125.0 MHz, CDCl<sub>3</sub>), 123.7 (s, Qu3), 123.8 (s, Qu7), 125.6 (s, Qu6), 127.3 (s, Qu9), 133.5 (s, Qu4), 135.8 (s, Qu5), 140.4 (s, Qu10), 147.4 (s, Qu8), 153.4 (s, Qu2). FT-IR (ATR): 1526 cm<sup>-1</sup> (nitro), 1350 cm<sup>-1</sup> (nitro -NO<sub>2</sub>).

### 5-2-4. 5-methoxy-8-nitroquinoline の合成



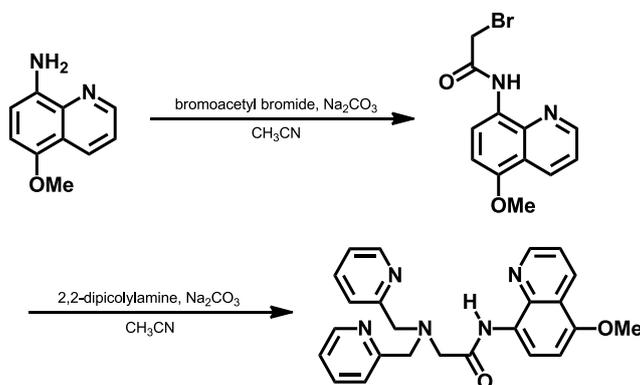
反応容器に 5-chloro-8-nitroquinoline (2.10 g) と sodium methoxide (2.18 g) を加え, 窒素下にてメタノール (200 mL) を加え, 8 時間攪拌した. そこに蒸留水を加え, ジクロロメタンで抽出し, 濃縮すると, 目的の赤黄色固体を得た. (収量: 1.6 g, 収率: 82%) <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 5.02 (s, -NH<sub>2</sub>, 2H), 6.83 (d, *J* = 8.6 Hz, Qu7, 1H), 7.39 (d, *J* = 8.6 Hz, Qu6, 1H), 7.48 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 4.3 Hz, Qu3, 1H), 8.47 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 1.4 Hz, Qu4, 1H), 8.79 (dd, *J* = 4.3 Hz, *J* = 1.4 Hz, Qu2, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125.0 MHz, CDCl<sub>3</sub>), 109.7 (s, Qu7), 118.3 (s, Qu5), 122.3 (s, Qu3), 126.7 (s, Qu9), 127.4 (s, Qu6), 133.1 (s, Qu4), 139.0 (s, Qu10), 143.5 (s, Qu8), 148.0 (s, Qu2). FT-IR (ATR): 3441 cm<sup>-1</sup> (amino -NH<sub>2</sub>), 1614 cm<sup>-1</sup> (amino -NH<sub>2</sub>).

### 5-2-5. 5-methoxye-8-aminoquinoline の合成



反応容器に 5-methoxye-8-nitroquinoline (1.6 g) と Pd-C (160 mg) を加え、窒素雰囲気下とした後、エタノール (160 mL) を加え、反応容器を水素雰囲気下とし、13 時間攪拌した。その後、セライトを用いて濾過すると、赤色溶液が得られた。その溶液を濃縮すると、目的の濃赤色オイルが得られた。(収量: 1.3 g, 収率: 98%) <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 3.94 (s, 3H), 4.63 (s, 2H), 6.73(d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.38 (dd, *J* = 4.1, 8.6 Hz, 1H), 8.51 (dd, *J* = 1.7, 8.6 Hz, 1H), 8.80 (dd, *J* = 1.7, 4.1 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 56.1 (-OMe), 105.6 (Qu6), 109.9 (Qu7), 120.6 (Qu3), 121.4 (Qu10), 131.0 (Qu4), 137.6 (Qu5), 139.4 (Qu9), 147.3 (Qu8), 148.3 (Qu2). FT-IR (ATR) ; 3441 cm<sup>-1</sup> (amino -NH<sub>2</sub>), 1614 cm<sup>-1</sup> (amino -NH<sub>2</sub>).

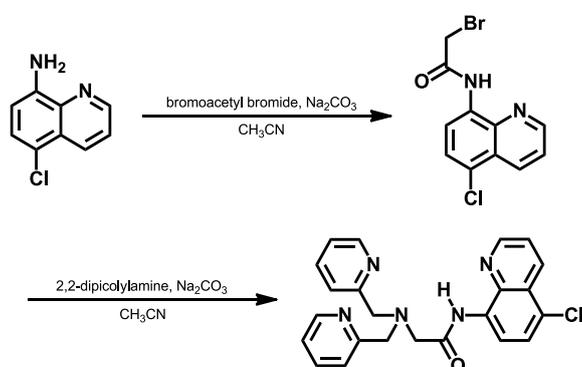
### 5-2-6. *N,N*-bis(2-pyridylmethyl)amine-*N*-methyl-2-(5-methoxyquinoline)-2-carboxamide (H-dpaq<sup>OMe</sup>) の合成



反応容器に 5-methoxye-8-aminoquinoline と Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.33 g) を入れ、0°C、窒素雰囲気下にしてからアセトニトリルを加え溶解させた。溶液は茶色になった。そこに bromoacetyl bromide (0.2 mL) を 25 分かけてゆっくりと加えた。溶液は白黄色になった。3 時間後 TLC (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, hexane : ethyl acetate = 2 : 1) にて反応終了と判断した。反応溶液を吸引濾過すると茶色の溶液が得られた。その後、エバポレーターを用いて溶媒を除去した後、真空乾燥し茶褐色固体を得た。

反応容器に上記の茶褐色固体および 2,2-dipicolylamine (0.36 mL),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.33 g) を加え,  $0^\circ\text{C}$ , 窒素雰囲気下にて, アセトニトリル (5 mL) を加え溶解させた. 溶液は赤色になった. この溶液を一晩攪拌した後, TLC ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ , hexane : ethyl acetate : triethyl amine = 100 : 100 : 1) にて反応終了を判断し, 吸引濾過を行った. 濃赤色の溶液が得られた. その後, エバポレーターを用いて溶媒を除去し, 真空乾燥することで濃赤色の固体を得た. その固体を少量のジクロロメタンに溶かしアルミナカラムにて精製した. 精製後, エバポレーターを用いて溶媒を除去し, 真空乾燥することで目的の白色固体を得た. (収量: 0.62 g, 収率: 78%)  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 3.51(s,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ , 2H), 3.99 (s,  $-\text{OCH}_3$ , 3H), 4.00 (s,  $-\text{CH}_2\text{Py}$ , 4H), 6.84 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, Qu6), 7.15 (ddd,  $J = 7.5, 4.6, 1.2$  Hz, 2H, Py5), 7.51 (dd,  $J = 8.6, 4.0$  Hz, 1H, Qu3), 7.66 (ddd,  $J = 7.7, 7.5, 1.7$  Hz, 2H, Py4), 7.99 (dd,  $J = 7.5, 1.2$  Hz, 2H, Py3), 8.52 (dd,  $J = 4.3, 1.7$  Hz, 2H), 8.61 (dd,  $J = 8.6, 1.7$  Hz, 1H, Qu4), 8.69 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H, Qu7), 8.95 (dd,  $J = 4.0, 1.7$  Hz, 1H), 11.4 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125.8 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 55.8 (OMe), 59.2 ( $\text{COCH}_2$ ), 61.1 ( $\text{CH}_2\text{Py}$ ), 104.4 (Qu6), 116.7 (Qu7), 120.5 (Qu6), 122.3 (Qu3), 123.3 (Py5), 127.8 (Py3), 131.2 (Qu4), 136.6 (Py4), 136.6 (Py4), 139.5 (Qu9), 149.1 (Py6), 150.4 (Qu10), 158.3 (Py2), 169.0 ( $\text{C}=\text{O}$ ). FT-IR (ATR):  $3300\text{ cm}^{-1}$  (amide N-H),  $1663\text{ cm}^{-1}$  (amide  $\text{C}=\text{O}$ ).

#### 5-2-7. *N,N*-bis(2-pyridylmethyl)amine-*N*-methyl-2-(5-chloroquinoline)-2-carboxamide (H-dpaq<sup>Cl</sup>) の合成

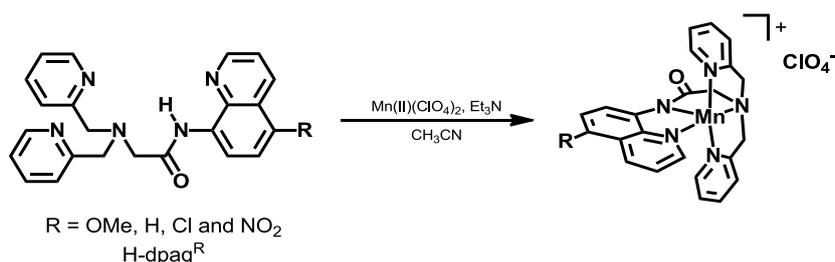


反応容器に 5-chloro-8-aminoquinoline (1.1 g, 6.0 mmol) と  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.85 g, 8.1 mmol) を入れ,  $0^\circ\text{C}$ , 窒素雰囲気下にしてからアセトニトリル (40 mL) を加え溶解させた. 溶液は茶色になった. そこに bromoacetyl bromide (0.62 mL, 7.1 mmol) を 25 分かけてゆっくりと加えた. 溶液は白黄色になった. 1 時間後 TLC ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ , hexane : ethyl acetate = 2 : 1) にて反応終了と判断した. 反応溶液を吸引濾過し, エバポレーターを用いて溶媒を除去した後, 真空乾燥し目的の固体を得た.

反応容器に上記の固体および 2,2-dipicolylamine (1.3 mL, 7.1 mmol),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.99 g, 9.3 mmol) を加え,  $0^\circ\text{C}$ , 窒素雰囲気下にて, アセトニトリル (40 mL) に溶解させた. 溶液は

赤色となった。この溶液を一晩攪拌した後、TLC (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, hexane : ethyl acetate : triethyl amine = 100 : 100 : 1) にて反応終了を判断し、吸引濾過を行った結果、濃赤色の溶液が得られた。その後、エバポレーターを用いて溶媒を除去し、真空乾燥することで濃赤色の固体を得た。その固体を少量のジクロロメタンに溶かしアルミナカラムにて精製した。精製後、エバポレーターを用いて溶媒を除去した後、真空乾燥し目的の白色固体を得た。(収量: 1.0 g, 収率: 38%) <sup>1</sup>H NMR(500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 3.54 (s, -CH<sub>2</sub>CO-, 2H), 4.02 (s, -CH<sub>2</sub>Py, 4H), 7.15 (dd, *J* = 4.9, 6.6 Hz, Py5, 2H), 7.59 (d, *J* = 8.0 Hz, Qu6, 1H), 7.63 (dd, *J* = 6.6 Hz, 7.5 Hz, Py4, 2H), 7.64 (dd, *J* = 4.3, 8.6 Hz, Qu3, 1H), 7.90 (d, *J* = 7.5 Hz, Py3, 2H), 8.52 (d, *J* = 4.9 Hz, Py6, 2H), 8.61 (dd, *J* = 1.5, 8.6 Hz, Qu4, 1H), 8.71 (d, *J* = 8.0 Hz, Qu7, 1H), 8.98 (dd, *J* = 4.3, 1.5 Hz, Qu2, 1H), 11.6 (s, -NHQu, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>), 59.5 (CH<sub>2</sub>CO), 61.3 (CH<sub>2</sub>Py), 111.7 (Qu6), 122.5 (Qu3), 122.6 (Py5), 123.5 (Py3), 124.6 (Qu9), 126.3 (Qu10), 127.5 (Qu7), 133.6 (Qu4), 133.9 (Qu8), 136.7 (Py4), 139.6 (Qu5), 148.7 (Qu2), 149.4 (Py6), 158.3 (Py2), 169.9 (C=O). FT-IR (ATR): 3252 cm<sup>-1</sup> (amide N-H), 1672 cm<sup>-1</sup> (amide C=O).

### 5-3. [Mn(dpaq<sup>R</sup>)]ClO<sub>4</sub>の合成



嫌気条件下で反応を行うために、全ての操作はグローブボックス内で行った。まず、反応容器に H-dpaq<sup>R</sup> (0.26 mmol) を加え、メタノール (2 ml) に溶解させ、triethylamine (40 μL, 0.29 mmol) をマイクロディスペンサーを用いて加えた。また、Mn(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0.11 g, 0.31 mmol) をメタノール (0.5 mL) に溶解させた。配位子の溶液をマンガン溶液にゆっくりと加え、2 時間攪拌し、-4°C で一晩放置した。翌日、メンブレンフィルターで析出した沈殿をろ取り、真空乾燥することで目的の固体を得た。

#### 5-3-1. [Mn(dpaq<sup>H</sup>)]ClO<sub>4</sub>の同定

Pale yellow solid. Yield: 90%. Anal. Calcd for [Mn(dpaq<sup>H</sup>)](ClO<sub>4</sub>)(H<sub>2</sub>O)0.8: C, 50.11; H, 3.95; N, 12.70. Found: C, 50.19; H, 3.81; N, 12.74. Selected IR frequencies (cm<sup>-1</sup>, FT-ATR): 1541 (CO). Electronic absorption spectrum in CH<sub>3</sub>CN (nm (M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)): 375 (4500), 262 (37 100). Electronic absorption spectrum in MES buffer (pH 7.2, 5% DMSO) (nm (M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)): 309 (5300), 241 (23 800).

ESI-MS, positive mode:  $m/z$  437.08  $\{\text{Mn}(\text{dpaq}^{\text{H}})\}^+$ .

### 5-3-2. $\text{Mn}(\text{dpaq}^{\text{NO}_2})\text{ClO}_4$ の同定

Orange solid. Yield: 93%. Anal. Calcd for  $[\text{Mn}(\text{dpaq}^{\text{NO}_2})](\text{ClO}_4)(\text{H}_2\text{O})_{0.5}$ : C, 46.76; H, 3.41; N, 14.22. Found: C, 47.03; H, 3.26; N, 13.92. Selected IR frequencies ( $\text{cm}^{-1}$ , FT-ATR): 1533 (CO). Electronic absorption spectrum in  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $\text{nm}$  ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )): 428 (19 100), 322 (3990), 262 (22 900). Electronic absorption spectrum in MES buffer (pH 7.2, 5% DMSO) ( $\text{nm}$  ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )): 380 (10 100), 238 (12 000). ESI-MS, positive mode:  $m/z$  482.15  $\{\text{Mn}(\text{dpaq}^{\text{NO}_2})\}^+$ .

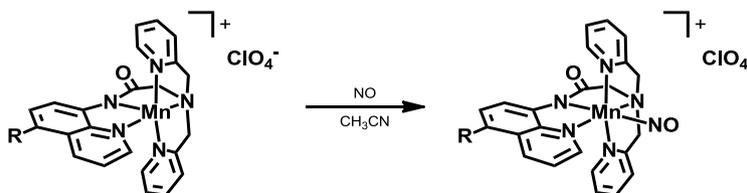
### 5-3-3. $\text{Mn}(\text{dpaq}^{\text{OMe}})\text{ClO}_4$ の同定

Yellow solid. Yield: 55%. Anal. Calcd for  $[\text{Mn}(\text{dpaq}^{\text{OMe}})](\text{ClO}_4)(\text{H}_2\text{O})_{0.5}$ : C, 50.06; H, 4.03; N, 12.16. Found: C, 50.22; H, 4.00; N, 12.35. Selected IR frequencies ( $\text{cm}^{-1}$ , FT-ATR): 1549 (CO). Electronic absorption spectrum in  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $\text{nm}$  ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )): 405 (3320), 346 (2330), 264 (33 200). Electronic absorption spectrum in MES buffer (pH 7.2, 5% DMSO) ( $\text{nm}$  ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )): 334 (4270), 248 (29 200). ESI-MS, positive mode:  $m/z$  467.19  $\{\text{Mn}(\text{dpaq}^{\text{OMe}})\}^+$ .

### 5-3-4. $\text{Mn}(\text{dpaq}^{\text{Cl}})\text{ClO}_4$ の同定

Pale yellow solid. Yield: 84%. Anal. Calcd for  $[\text{Mn}(\text{dpaq}^{\text{Cl}})](\text{ClO}_4)(\text{H}_2\text{O})_{0.5}$ : C, 47.61; H, 12.07; N, 3.47. Found: C, 47.76; H, 11.89; N, 3.48. Selected IR frequencies ( $\text{cm}^{-1}$ , FT-ATR): 1537 (CO). Electronic absorption spectrum in  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $\text{nm}$  ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )): 388 (5330), 264 (25 900). Electronic absorption spectrum in MES buffer (pH 7.2, 5% DMSO) ( $\text{nm}$  ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )): 325 (5280), 244 (25 300). ESI-MS, positive mode:  $m/z$  471.12  $\{\text{Mn}(\text{dpaq}^{\text{Cl}})\}^+$ .

## 5-4. マンガンニトロシル錯体 $\{\text{MnNO}\}^6$ の合成



サンプル瓶に  $\text{Mn}(\text{II})$  錯体  $[\text{Mn}(\text{dpaq}^{\text{R}})]\text{ClO}_4$  (0.93 mmol) を加え、グローブボックス内でアセトニトリル (1.5 mL) に溶解させた。この溶液をグローブボックスから取り出し、窒素雰

困気下で、アルミホイルで遮光しながら、NO gas (50 mL) を 3 回バブリングした。その後、過剰量の diethylether を加え、 $-3^{\circ}\text{C}$  で 1 晩放置した。メンブレンフィルターで析出固体をろ取し、真空乾燥すると目的の固体が得られた。

#### 5-4-1. $[\text{Mn}(\text{dpaq}^{\text{H}})(\text{NO})]\text{ClO}_4$ ( $1^{\text{H}}$ ) の同定

Brown solid. Yield: 75%. Anal. Calcd for  $[\text{Mn}(\text{NO})(\text{dpaq}^{\text{H}})](\text{ClO}_4)(\text{H}_2\text{O})$ : C, 47.23; H, 3.79; N, 14.37. Found: C, 47.18; H, 3.55; N, 14.23.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ): 9.25 (d, 1H), 8.97 (d, 1H), 8.39 (d, 1H), 7.83 (t, 2H), 7.72 (t, 1H), 7.65 (dd, 1H), 7.63 (d, 1H), 7.48 (d, 2H), 7.02 (t, 2H), 6.31 (d, 2H), 4.57 (d, 2H), 4.37 (d, 2H), 4.00 (s, 2H). Selected IR frequencies ( $\text{cm}^{-1}$ , FT-ATR): 1739 (NO), 1612 (CO). Electronic absorption spectrum in  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $\text{nm}$  ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )): 459 (3940), 382 (4160), 259 (25 900). Electronic absorption spectrum in MES buffer (pH 7.2) ( $\text{nm}$  ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )): 461 (3120), 357 (3910).

#### 5-4-2. $[\text{Mn}(\text{dpaq}^{\text{NO}_2})(\text{NO})]\text{ClO}_4$ ( $1^{\text{NO}_2}$ ) の同定

Dark brown solid. Yield: 75%. Anal. calcd for  $[\text{Mn}(\text{NO})(\text{dpaq}^{\text{NO}_2})](\text{ClO}_4)(\text{diethyl ether})_{0.25}$ : C, 45.73; H, 3.44; N, 15.55. Found: C, 45.60; H, 3.35; N, 15.64.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ): 9.39 (d, 1H), 9.27 (d, 1H), 8.96 (d, 1H), 8.67 (d, 1H), 7.85 (m, 3H), 7.46 (d, 2H), 7.05 (t, 2H), 6.41 (d, 2H), 4.59 (d, 2H), 4.38 (d, 2H), 4.05 (s, 2H). Selected IR frequencies ( $\text{cm}^{-1}$ , FT-ATR): 1744 (NO), 1636 (CO). Electronic absorption spectrum in  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $\text{nm}$  ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )): 513 (2070), 423 (14 500), 314 (5870), 264 (20 600). Electronic absorption spectrum in MES buffer (pH 7.2) ( $\text{nm}$  ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )): 523 (1570), 392 (10 300).

#### 5-4-3. $[\text{Mn}(\text{dpaq}^{\text{OMe}})(\text{NO})]\text{ClO}_4$ ( $1^{\text{OMe}}$ ) の同定

Dark green solid. Yield: 65%. Anal. calcd for  $[\text{Mn}(\text{NO})(\text{dpaq}^{\text{OMe}})](\text{ClO}_4)(\text{CH}_3\text{CN})_{0.5}$ : C, 48.64; H, 3.84; N, 14.75. Found: C, 48.79; H, 3.84; N, 14.75.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ): 9.27 (dd, 1H), 8.90 (d, 1H), 8.63 (dd, 1H), 7.82 (t, 2H), 7.63 (dd, 1H), 7.47 (d, 2H), 7.15 (d, 1H), 7.02 (t, 2H), 6.33 (d, 2H), 4.55 (d, 2H), 4.35 (d, 2H), 4.03 (s, 3H), 3.95 (s, 2H). Selected IR frequencies ( $\text{cm}^{-1}$ , FT-ATR): 1737 (NO), 1602 (CO). Electronic absorption spectrum in  $\text{CH}_3\text{CN}$  ( $\text{nm}$  ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )): 459 (5090), 356 (2450), 265 (25 300). Electronic absorption spectrum in MES buffer (pH 7.2) ( $\text{nm}$  ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )): 457 (4230), 398 (3830).

#### 5-4-4. [Mn(dpaq<sup>Cl</sup>)(NO)]ClO<sub>4</sub> (1<sup>Cl</sup>)の同定

Brown solid. Yield: 60%. Anal. Calcd for [Mn(NO)(dpaq<sup>Cl</sup>)](ClO<sub>4</sub>)(H<sub>2</sub>O)<sub>0.75</sub>: C, 45.25; H, 3.10; N, 13.31. Found: C, 44.93; H, 3.36; N, 13.67. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN): 9.33 (d, 1H), 8.92 (d, 1H), 8.63 (d, 1H), 7.84 (t, 2H), 7.77 (m, 2H), 7.48 (d, 2H), 7.03 (t, 2H), 6.35 (d, 2H), 4.56 (d, 2H), 4.36 (d, 2H), 3.99 (s, 2H). Selected IR frequencies (cm<sup>-1</sup>, FT-ATR): 1743 (NO), 1624 (CO). Electronic absorption spectrum in CH<sub>3</sub>CN (nm (M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)): 474 (3760), 398 (5140), 260 (26 900). Electronic absorption spectrum in MES buffer (pH 7.2) (nm (M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)): 475 (2960), 375 (4560).

#### 5-5. NO gas の発生

スクリー管瓶にて FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (13.5 g, 48.6 mmol) を蒸留水 (28 ml) に溶解させた。この溶液に 6 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (12 mL) を加え攪拌した結果、溶液は水色になった。テルモシリンジ (50 mL) の口にセプタムキャップをし、シリンジ内を蒸留水で満たした。スクリーキャップに NaNO<sub>2</sub> (0.25 g, 3.62 mmol) を入れ、水面に浮かした。セプタムキャップを外しシリンジの口を下に向け蒸留水を排出した。そこに水色の溶液を 5 mL 吸い上げ、再びセプタムキャップでシリンジの口を閉じた。シリンジを逆さまにすることで、溶液と NaNO<sub>2</sub> を反応させた。シリンジを何度か振ると、無色透明なガスが発生した。反応後の溶液は黒色になった。セプタムキャップを外し、この黒色溶液を排出してから、無色透明のガスを合成に用いた。

#### 5-6. X 線結晶構造解析

1<sup>R</sup> の単結晶は、アセトニトリルとジエチルエーテルの気液拡散法により作成した。X 線結晶構造は、133 K で Rigaku R-AXIS RAPID IP により測定し、X 線は Cu-Kα 線 (λ = 1.54187 Å) を用いた。構造は SIR2004<sup>33)</sup>にて解析し、Shelx-97<sup>34)</sup>により精密化した。

#### 5-7. 1<sup>R</sup> の酸化還元電位の測定

酸化還元電位は、Bioanalytical system (BAS) model CV-50W を用いて測定した。参照電極には Ag/AgCl, 補助電極には、白金ワイヤーを用いた。作用電極には、グラッシーカーボン電極を用いた。測定は、アセトニトリル中、窒素下で行い、支持電解質には、Bu<sub>4</sub>NClO<sub>4</sub> を用いた。酸化還元電位の測定後には、Fc<sup>+</sup>/Fc の酸化還元電位を測定することにより、vs. Fc<sup>+</sup>/Fc にて E<sub>1/2</sub> 値を決定した。

## 5-8. $1^R$ の水中での光誘起 NO 放出

ASAHI SPECTRA の MAX303 を用いて 460, 530, 650 nm ( $300 \text{ mW m}^{-1}$ ) の単色光を照射した際の  $1^R$  のスペクトル変化 (R = OMe: 457 nm, R = H: 461 nm, R = NO<sub>2</sub>: 521 nm) から見かけの NO 放出速度定数を算出した。測定条件は、MES 緩衝溶液 (pH 7.2, 50 mM) 中、20℃、空気下で行い、用いた  $1^R$  の濃度は 0.1 mM である。

## 5-9. 一酸化窒素測定装置を用いた NO の定量

一酸化窒素測定装置とは、NO が O<sub>3</sub> と反応することで発生する化学発光を測定することにより、NO の定量を行う装置である。測定には  $1^H$  を用いた。装置内は、窒素雰囲気下となっており、ヨウ化カリウムを含んだ氷酢酸溶液が含まれている。したがって、装置内は還元的雰囲気下となっており、装置内に存在する微量の酸素と反応して生じた NO<sub>2</sub> を NO に還元することで誤差を最小限に抑えることを目的としている。検量線は、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>を用いて作成した。検量線の作成後、 $1^H$  水溶液 (1 mM) を調整した。試料投入口から  $1^H$  水溶液 20  $\mu\text{L}$  を加えた。よって、装置内には、23 nmol の  $1^H$  が存在していることになる。また、試料投入後数分間、NO が観測されないことを確認してから、MAX303 を用いて光源 300 W の強度を持つ 460–700 nm の波長範囲の光を試料に照射することで放出された NO の定量を行った。

## 5-10. 還元型ミオグロビンアッセイ法による NO の同定

グローブボックス内で、MES 緩衝溶液 (pH 7.2, 50 mM) を用いて、0.01 mM の  $1^R$  溶液を調整した。次に、エッペンチューブに少量のミオグロビンを加え、グローブボックス内で MES 緩衝溶液に溶解させた。その溶液にジチオナイトを加えミオグロビンを還元し、パストゥールカラムによりジチオナイトを取り除くことで、鮮赤色の還元型ミオグロビン溶液を得た。 $1^R$  溶液 2 mL に少量の還元型ミオグロビン溶液を加え、窒素下で電子吸収スペクトル測定装置を用いて NO の同定を行った。

## 5-11. 一酸化窒素測定装置を用いた NO の定量

京都大学 iCeMS との共同研究で行った。一酸化窒素測定装置とは、NO が O<sub>3</sub> と反応することで発生する化学発光を測定することにより、NO の定量を行う装置である。測定には  $1^H$  を用いた。装置内は、窒素バブリングされており、ヨウ化カリウムを含んだ氷酢酸溶液が含まれている。したがって、装置内は還元的雰囲気下となっており、装置内に存在する微量の酸素と反応して生じた NO<sub>2</sub> を NO に還元することで誤差を最小限に抑えることを目的としている。検量線は、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>を用いて作成した。検量線の作成後、 $1^H$  水溶液 (1 mM) を調

整した。試料投入口から  $1^H$  水溶液 20  $\mu\text{L}$  を加えた。よって、装置内には、23 nmol の  $1^H$  が存在していることになる。また、試料投入後数分間、NO が観測されないことを確認してから、MAX303 を用いて光源 300 W の強度を持つ 460–700 nm の波長範囲の光を試料に照射することで放出された NO の定量を行った。

## 5-12. NO 放出の量子収率

$1^R$  および  $[\text{Mn}(\text{PaPy}_3)(\text{NO})]\text{ClO}_4$  の 460 nm の量子収率は、量子収率が決定されている Reinecke salt  $\text{K}[\text{Cr}(\text{NH}_3)_2(\text{NCS})_4]$  の光分解反応と比較することで間接的に量子収率 ( $\Phi = 0.31$ ) を測定する chemical actinometry 法を用いて測定した<sup>35)</sup>。具体的には、Reinecke salt 水溶液および  $\{\text{MnNO}\}^6$  錯体の MES 緩衝溶液 (5% DMSO, pH 7.2) を 1 cm の分光用セルに 3 mL 加え、セルの上から 300 W キセノンランプも用いて 460 nm (FWHM: 5 nm,  $3.1 \text{ mW m}^{-2}$ ) の光照射を 5000 秒行った。その後、溶液中の錯体の分解したモル数を電子吸収スペクトルにより決定し、Reinecke salt の分解量と比較することで  $\{\text{MnNO}\}^6$  錯体の量子収率を決定した。530 nm および 650 nm の量子収率は実験的に決定された 460 nm の量子収率とそれぞれの波長の光照射を行った際の NO 放出速度の初速度から算出した。具体的には次の式を用いた。

$$\text{QY} = \text{QY}_{460 \text{ nm}} \times (k_{\text{int}, 460 \text{ nm}}/k_{\text{int}}) \times (I_{\text{abs}}/I_{\text{abs}, 460 \text{ nm}})$$

ここで、 $k_{\text{int}}$  は反応初速度、 $I_{\text{abs}}$  は吸光度である。

## 6. 参考文献

- (1) L. J. Ignarro, *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*, Academic Press, San Diego, **2000**.
- (2) S. Kalsner, *Nitric Oxide Free Radicals in Peripheral Neurotransmission*, Birkhauser, Boston, **2000**.
- (3) G. Y. Ko, F. C. Fang, *Nitric Oxide and Infection*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **1999**.
- (4) P. G. Wang, M. Xian, X. Tang, X. Wu, Z. Wen, T. Cai, A. J. Janczuk, *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 1091.
- (5) J. A. Hrabie, L. K. Keefer, *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 1135.
- (6) G. R. Thatcher, *Curr. Top. Med. Chem.*, **2005**, 5, 597.
- (7) H. H. Al-Sa'doni, A. Ferro, *Curr. Med. Chem.*, **2004**, 11, 2679.
- (8) A. R. Butler, I. L. Megson, *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 1155.
- (9) A. Ostrowski, Abstracts of Papers, *244th ACS National Meeting & Exposition*, Philadelphia, PA, United States, August 19–23, **2012**, IAC-14.
- (10) J. V. Garcia, F. Zhang, P. C. Ford, *Phil. Trans. R. Soc. A.*, **2013**, 371.
- (11) A. D. Ostrowski, P. C. Ford, *Dalton Trans.*, **2009**, 10660.
- (12) P. C. Ford, *Acc. Chem. Res.*, **2008**, 41, 190.
- (13) M. J. Rose, P. K. Mascharak, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2008**, 12, 238.
- (14) N. L. Fry, P. K. Mascharak, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, 44, 289.
- (15) M. J. Rose, P. K. Mascharak, *Coord. Chem. Rev.*, **2008**, 252, 2093.
- (16) E. Tfouni, M. Krieger, B. R. McGarvey, D. W. Franco, *Coord. Chem. Rev.*, **2003**, 236, 57.
- (17) F. Derosa, X. Bu, P. C. Ford, *Inorg. Chem.*, **2005**, 44, 4157.
- (18) D. Neuman, A. D. Ostrowski, R. O. Absalonson, G. F. Strouse, P. C. Ford, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 4146.
- (19) M. J. Rose, P. K. Mascharak, *Chem. Commun.*, **2008**, 3933.
- (20) M. J. Rose, N. L. Fry, R. Marlow, L. Hinck, P. K. Mascharak, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 8834.
- (21) J. H. Enemark, R. D. Feltham, *Coord. Chem. Rev.*, **1974**, 13.
- (22) K. Ghosh, A. A. E.-Reveles, B. Avila, T. R. Holman, M. M. Olmstead, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.*, **2004**, 43, 2988.
- (23) B. J. Heilman, J. St John, S. R. Oliver, P. K. Mascharak, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 11573.
- (24) B. J. Heilman, G. M. Halpenny, P. K. Mascharak, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, **2011**, 99, 328.
- (25) G. M. Halpenny, K. R. Gandhi, P. K. Mascharak, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2010**, 1, 180.

- (26) M. Madhani, A. K. Patra, T. W. Miller, A. A. E.-Reveles, A. J. Hobbs, J. M. Fukuto, P. K. Mascharak, *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 7325.
- (27) Y. Hitomi, K. Arakawa, T. Funabiki, M. Kodera, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2012**, 124, 3504.
- (28) Y. Hitomi, K. Arakawa, M. Kodera, *Chem. Eur. J.*, **2013**, 19, 14697.
- (29) D. J. Cooper, M. D. Ravenscroft, D. A. Stotter, J. J. Trotter, *J. Chem. Res.*, **1979**, 3359.
- (30) W. R. Scheidt, K. Hatano, G. A. Rupprecht, P. L. Piciulo, *Inorg. Chem.*, **1979**, 18, 292.
- (31) P. L. Piciulo, G. Rupprecht, W. R. Scheidt, *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, 96, 5293.
- (32) K. J. Franz, S. J. Lippard et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 9034.
- (33) R. C. M. C. Burla, M. Camalli, B. Carrozzini, G. L. Casciarano, L. D. Caro, C. Giacovazzo, G. Polidori, R. J. Spagna, *Appl. Crystallogr.*, **2005**, 381.
- (34) G. M. Sheldrick, *SHELX97: Programs for the Solution and Refinement of Crystal Structures*, Univ. of Göttingen, Göttingen, **1997**.
- (35) M. Montalti, A. Credi, L. Prodi and M. T. Gandolfi, *Handbook of Photochemistry*, CRC Press, Boca Raton, 3rd edn, **2006**.

# 第三章 光照射による一酸化窒素の放出により過酸化水素を触媒的に発生させるマンガンニトロシル錯体の開発

## 1. 要約

650 nm の赤色光照射により一酸化窒素 (NO) を放出する新規マンガンニトロシル錯体 (UG1NO) を開発した. UG1NO は, 暗所下では HeLa 細胞に対して細胞毒性をほとんど示さないのに対し ( $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ ), 650 nm の単色光照射により高い細胞毒性を発現することが明らかとなった ( $IC_{50} = 33 \pm 3 \mu\text{M}$ ). 様々な測定法を駆使し, 光照射下に観測された UG1NO の高い細胞毒性は, 発生する NO が主要因ではなく, 同時に生成する Mn(II)錯体 (UG1) に起因していることが判明した. UG1 の反応性についてリン酸緩衝溶液中で検討した結果, アスコルビン酸やグルタチオンといった還元剤存在下, 分子状酸素を二電子還元し, 触媒的かつ選択的に過酸化水素を発生させることを明らかにした. 実際, UG1 を添加した培養液で培養した細胞内の過酸化水素濃度が大きく上昇することを過酸化水素特異的な蛍光プローブ分子である peroxyfluor-1 (PF1) を用いて確認した. 更に, 過酸化水素を添加した際に観測された培養細胞の伸展が, UG1 を添加した際にもみられた. 以上の結果から, UG1NO は, 650 nm の単色光照射により NO を解離し, 細胞内の還元剤を利用することで, 触媒的に過酸化水素を発生させる Mn(II)錯体 (UG1) を生成することで, 細胞毒性を発現する光駆動型過酸化水素供与分子として機能することが判明した.

---

Yuji Iwamoto, Masahito Kodera and Yutaka Hitomi\*

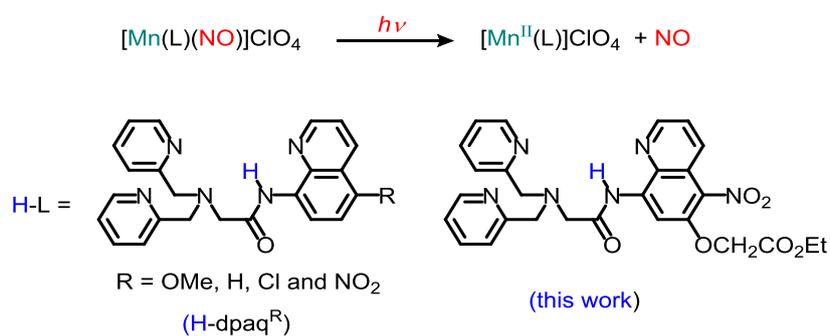
“Uncaging Catalytic Hydrogen Peroxide Generator through the Photo-Induced Release of Nitric Oxide from a {MnNO}<sup>6</sup> Complex” *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 9539–9542. DOI: 10.1039/c5cc02566d

## 2. 緒言

生命活動に重要な小分子である一酸化窒素(NO)や過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 一酸化炭素(CO), 硫化水素(H<sub>2</sub>S)等の高い反応性をもつ小分子は, その多くはガス状の分子でかつ反応性が極めて高いといった理由により, 取扱いが困難で, 任意の量, 時間や場所にこれら小分子を供与することは極めて難しい. 近年, 光照射により生理活性分子を供与することが可能な分子が大きな注目を集めている<sup>1)</sup>. 光照射により, 生理活性分子の放出を制御することができれば, 特定の時間と場所に目的の濃度の分子を供与することができ, 幅広い実験系や医薬品への応用が期待できる. 実際に, これらの小分子は, 神経伝達物質(CO)<sup>2,3)</sup>や細胞転移(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>4)</sup>, 抗炎症作用(H<sub>2</sub>S)<sup>5,6)</sup>, 血圧降下(NO)<sup>7)</sup>などの生理現象と深く関係している. また, 高濃度に存在すれば, 高い毒性を発現することも知られている. 特にNOは, 特定のがん細胞をアポトーシスへと誘導することから, NOを放出する分子は抗腫瘍剤への応用が期待されている<sup>8)</sup>. これまでに, 熱的あるいは光照射によりNOの放出を制御可能な数多くのNO供与分子が開発されている<sup>9)</sup>. その中でも, NOが配位した金属錯体である金属ニトロシル錯体は, 有機分子に比べ, 可視光領域に吸収を示すことが多いため, 光誘起型NO供与分子(Photo-NORMs)<sup>10)</sup>への応用が期待されている<sup>11-16)</sup>. その例として, Fe/S/NOのクラスター分子<sup>17)</sup>やルテニウムニトロシル錯体<sup>18-20)</sup>, クロムニトリト錯体<sup>21)</sup>, マンガンニトロシル錯体<sup>22)</sup>等が挙げられ, そのいくつかの分子は生物や組織, 細胞, バクテリア等を用いた応用研究が展開されている<sup>17,22-30)</sup>. 例えば, Na<sub>2</sub>[Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>(NO)<sub>4</sub>]は, 共存下で培養細胞に光照射することでNOを放出し, 細胞死を誘起させることに成功している<sup>17)</sup>. また, [RuCl(15ane)(NO)]<sup>2+</sup>はNOを放出することでラットの大動脈の血管拡張を誘起することに成功しており<sup>28)</sup>, 色素を配位子として用いたルテニウムニトロシル錯体では可視光照射によりがん細胞をアポトーシスへと導くことが報告されている<sup>31)</sup>. 特に, Mascharakらのグループでは, 水中で安定であり, 近赤外光照射によりNOを放出するマンガンニトロシル{MnNO}<sup>6</sup>錯体[Mn(PaPy<sub>3</sub>)(NO)]ClO<sub>4</sub>をゲルや多孔性材料に導入した材料を用い, 可視光照射した部位のみのバクテリアを殺菌することに成功している<sup>22,29,30)</sup>.

4種の置換基を導入することで電子状態の異なるマンガンニトロシル錯体Mn(dpaq<sup>R</sup>)(NO)]ClO<sub>4</sub> (**1**<sup>R</sup>, R = OMe, H, Cl and NO<sub>2</sub>) (dpaq<sup>R</sup> (2-[N,N-bis(pyridine-2-ylmethyl)]-amino-N'-quinolin-8-ylacetamide)を合成し, マンガンニトロシル錯体の電子状態とNO放出速度の相関について検討している<sup>32)</sup>. その結果, 強い電子求引基であるニトロ基を導入した**1**<sup>NO<sub>2</sub></sup>が組織透過性の高い近赤外光領域である650 nmの単色光照射時に, 無置換体である**1**<sup>H</sup>に比べ, 約4倍のNO放出速度を示すことを明らかにした. これらの成果を踏まえ, Chart 3.1に構造を示すキノリン環5位にニトロ基を導入し, かつキノリン環の6位に細胞内滞在性が向上するエチルエステル部位を導入した新規配位子 ethyl {[8-([bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]acetyl)amino]-5-nitroquinolin-6-yl}oxy]acetateを用いたマンガンニトロシル{MnNO}<sup>6</sup>錯体(UG1NO)を開発した. UG1NOは, 650 nmの単色光照射により, **1**<sup>NO<sub>2</sub></sup>同様

高い効率で NO を放出した。また、HeLa 細胞に対する細胞毒性評価を行った結果、光照射時にのみ高い細胞毒性を発現し、更に細胞の形態変化を誘導することを見出した。しかし、高い細胞毒性を示す主要因は光照射後に生成する NO ではなく、同時に生成する Mn(II)錯体 (UG1) に起因していることが判明した。更に、UG1 の反応性を詳細に調査した結果、還元剤存在下、酸素を還元的に活性化し、過酸化水素を触媒的かつ選択的に発生させることで、高い細胞毒性を発現していることを示唆する結果が得られた。

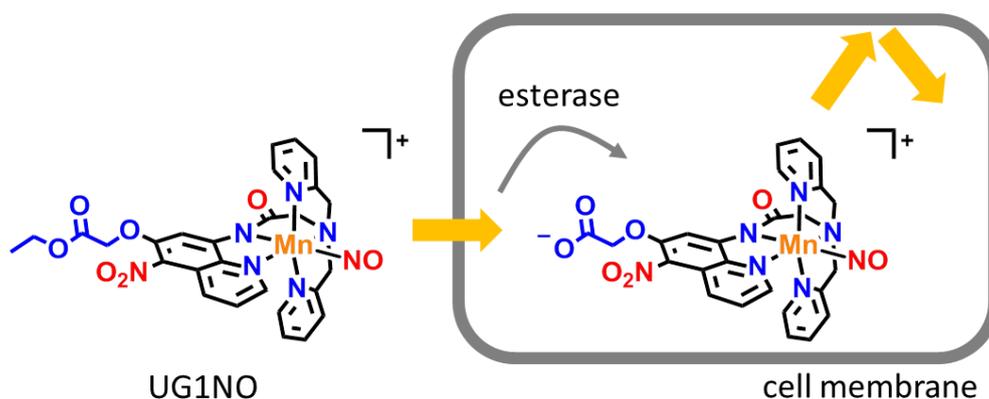


**Chart 3.1** Chemical structures of supporting ligands for {MnNO}<sup>6</sup> and photo-induced NO release from UG1NO.

### 3. 結果と考察

#### 3-1. 分子設計

第二章では、マンガンニトロシル{MnNO}<sup>6</sup>錯体 [Mn(NO)(dpaq<sup>R</sup>)]ClO<sub>4</sub> (**1<sup>R</sup>**, R = OMe, H, Cl and NO<sub>2</sub>) が、650 nm の低エネルギー照射により、高効率に NO を放出することを明らかにしている<sup>32)</sup>。また、強い電子求引基であるニトロ基を導入したマンガンニトロシル錯体 **1<sup>NO2</sup>** は、無置換体である **1<sup>H</sup>** と比べ約 4 倍の速度で NO を放出する。開発した 650 nm の単色照射により NO の放出を制御することが可能なマンガンニトロシル錯体の細胞への応用を検討するため、細胞内滞在性が向上することが知られているエチルエステル基を配位子内キノリン環 6 位に導入した新規マンガンニトロシル錯体(UG1NO)を開発した(Chart 3.2)。配位子に導入したエチルエステル部位は、細胞内に存在する加水分解酵素であるエステラーゼにより加水分解を受けることで、アニオン性のカルボン酸となる。親水的な分子は細胞膜の貫通が起こりにくいため、エチルエステル基を配位子内に導入することでマンガンニトロシル錯体の細胞内滞在性が向上することが期待できる(Chart 3.2)。

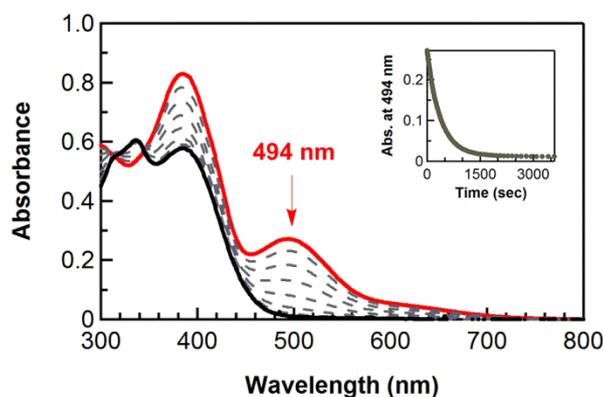


**Chart 3.2** The ethyl ester group being expected to become hydrolysed by esterase inside a cell, giving the corresponding acid derivative, which would not be able to permeate through the cell membrane.

#### 3-2. UG1NO の 650 nm の単色照射による NO の解離

UG1NO の PBS 緩衝溶液中 (pH 7.5) での電子吸収スペクトルを Figure 3.1 に示した。UG1NO は、494 nm に極大吸収を持ち、ニトロ基を導入した **1<sup>NO2</sup>** と同様に 700 nm まで吸収を示した<sup>32)</sup>。UG1NO は、MES 緩衝溶液中、暗所下では 10 日以上安定であり、650 nm (300 mW/m<sup>2</sup>) の単色光を照射すると、NO の解離を経て、対応する Mn(II)錯体である UG1 に変化することを電子吸収スペクトルの変化から見出した (Figure 3.1)。UG1NO による 650 nm

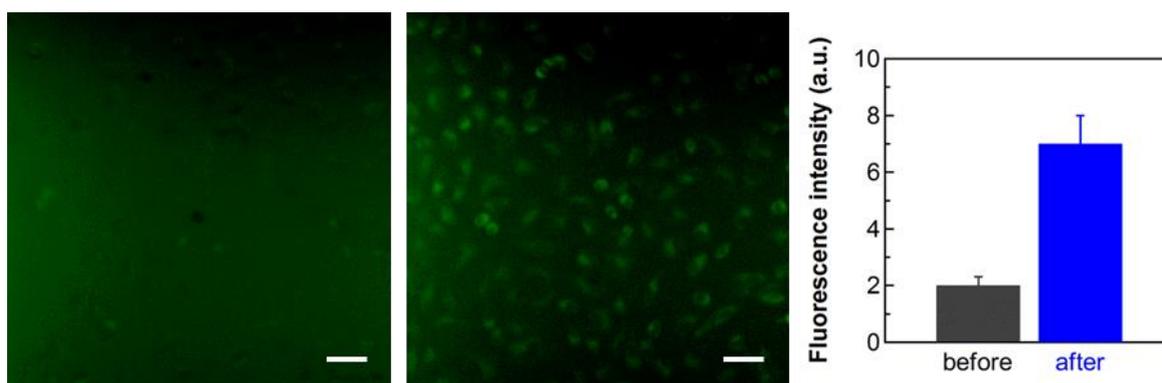
の単色光照射時の NO 放出に伴う光量子収率は,  $0.74 \pm 0.01$  となり,  $1^{NO_2}$  と類似した値となることが判明した<sup>32)</sup>.



**Figure 3.1** Electronic spectral change of a solution of UG1NO in 5%DMSO-PBS buffer (pH 7.5) at 20 °C under irradiation at 650 nm. The arrow indicates a decrease in band intensities as the reaction proceeds. Inset: time profile of the absorbance at 494 nm.

### 3-3. 培養細胞内での NO の放出とその検出

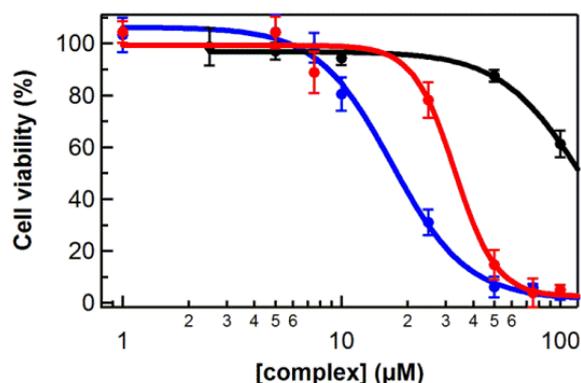
培養細胞条件でも UG1NO による NO の放出が可能かどうか調査することを目的に, 一酸化窒素特異的な蛍光プローブ分子である diaminofluorescein-2 diacetate (DAF-2DA)<sup>33)</sup>を用いて, 可視光照射前後の細胞内の NO 濃度の変化を検討した. あらかじめ DAF-2DA を  $10 \mu\text{M}$  添加し, 30 分間培養した後, PBS 緩衝溶液で 3 度洗浄し, UG1NO を  $10 \mu\text{M}$  となるように添加した. その 30 分後, 30 分間 650 nm の単色光を照射し, 蛍光顕微鏡観察を行った結果を **Figure 3.2** に示した. 単色光照射前後の細胞内の DAF-2T 由来の緑色蛍光強度を比較した結果, 光照射前に比べ, 光照射後の緑色蛍光強度が有為に上昇していた. 以上の結果から, UG1NO は, 培養細胞条件下でも, 650 nm の単色光照射に応答し, NO を放出することが明らかとなった.



**Figure 3.2** Fluorescence images of cells incubated with DAF-2DA (10  $\mu\text{M}$ ) and UG1NO (10  $\mu\text{M}$ ) before (left) and after (middle) being exposed to light with a wavelength of 650 nm for 30 min. Each scale bar indicates 50  $\mu\text{m}$ . The relative fluorescence intensities are shown on the right.

### 3-4. 光照射による細胞死誘起

暗所下および光照射下での UG1NO の細胞毒性評価を行った。初めに UG1NO を様々な濃度で HeLa 細胞を含む培養溶液に添加し、3 時間培養後、可視光 (375–700 nm) を 10 秒あるいは 650 nm の単色光を 1 時間照射し、24 時間培養後の細胞増殖率を MTT アッセイ法により評価した。その結果を **Figure 3.3** および **Table 3.1** に示した。IC<sub>50</sub> 値は、半数阻害濃度であり、小さな値であるほど高い細胞毒性を示したことになる。測定の結果、UG1NO は、暗所下では細胞毒性をほとんど示さないのに対し (IC<sub>50</sub> > 100  $\mu\text{M}$ )、可視光を 10 秒間照射した条件下では IC<sub>50</sub> = 17  $\pm$  1  $\mu\text{M}$ 、650 nm の単色光を照射した条件下では IC<sub>50</sub> = 33  $\pm$  3  $\mu\text{M}$  と HeLa 細胞に対して高い細胞毒性を示した。更に、その細胞毒性は、抗腫瘍剤として使用されているシスプラチン [Pt(NH<sub>3</sub>)Cl<sub>2</sub>] と同等の細胞毒性であることが明らかとなった。しかし、別途 NO 供与分子である NOC-7 や O<sub>2</sub><sup>-</sup> と NO が反応することで生成する高い反応性をもったペルオキシナイトライト (ONOO<sup>-</sup>) の供与分子である SIN-1 の細胞毒性を評価した結果、ともに UG1NO に光照射を行った際に観測された濃度では細胞毒性を示さないことが明らかとなった (**Table 3.1**)。以上の結果から、UG1NO に光照射した際に観測される高い細胞毒性は、UG1NO が放出する NO ではなく、同時に生成する Mn(II)錯体 (UG1) に起因すると考えられる。以上の仮説を検証することを目的に、UG1NO に光照射した際に生成する UG1 の HeLa 細胞に対する細胞毒性を MTT アッセイ法により評価した結果、UG1NO に光照射を行った際に観測された毒性と同等の細胞毒性が観測された (IC<sub>50</sub> = 12.4  $\pm$  0.1  $\mu\text{M}$ , **Table 3.1**)。UG1 の細胞毒性評価の結果より、UG1NO に光照射を行った際に観測された高い細胞毒性は、UG1NO から光解離後に生成する NO ではなく、同時に生成する Mn(II)錯体 (UG1) に起因していることが示唆された。



**Figure 3.3** Cytotoxicity of UG1NO for HeLa cells under dark (black), white light for 10 sec (blue) or monochromatic light of wavelength 650 nm for 1 h (red).

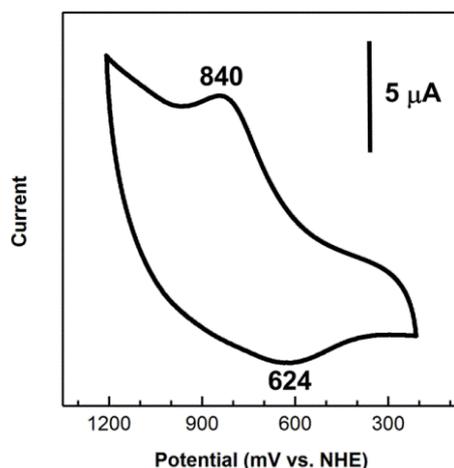
**Table 3.1** IC<sub>50</sub> values of UG1NO, UG1, cisplatin, NOC-7 and SIN-1.

compound	conditions	IC <sub>50</sub> (μM)
UG1NO	dark	> 100
UG1NO	white light for 10 s	17 ± 1
UG1NO	650-nm light for 1 h	33 ± 3
NOC7	dark	> 500
SIN-1	dark	> 250
UG1	dark	12.4 ± 0.2
UG1	+ esterase	> 100
UG1 acid	dark	> 100
cisplatin	dark	19 ± 3

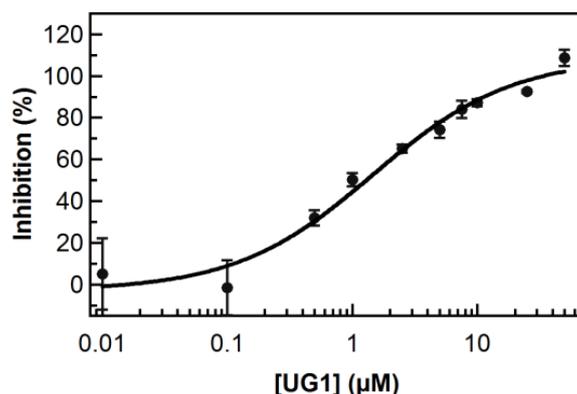
### 3-5. UG1 の水溶液中での酸素との反応性

これまでにいくつかの研究グループにより細胞に酸化ストレスを与えることで細胞死を誘導する金属錯体が報告されている<sup>38-44</sup>。例えば、Batinc-Haberl のグループは、カチオン性のマンガンポルフィリン錯体の誘導体がスーパーオキシド ( $O_2^{\cdot-}$ ) を過酸化水素と酸素に不均化する反応であるスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 活性を有するにも関わらず、細胞に酸化ストレスを与えることで様々な細胞種に対して高い細胞毒性を示すことを報告している。例えば、マンガンポルフィリン錯体は、アスコルビン酸を空気酸化することで酸素の一電子還元体であり、活性酸素種の一つである  $O_2^{\cdot-}$  を触媒的に発生させる<sup>49</sup>。発生した  $O_2^{\cdot-}$  がマンガンポルフィリン錯体により不均化されることで生成する過酸化水素

が細胞死を誘導する主な分子であると考えられている。O<sub>2</sub><sup>-</sup>を過酸化水素と酸素に不均化する反応である SOD 活性は、金属錯体の酸化還元電位に大きく依存している。なぜなら、SOD 活性は O<sub>2</sub><sup>-</sup>の酸化 (-160 mV vs. NHE) と還元 (891 mV vs. NHE) を触媒する反応であるからである。Batinc-Haberl のグループにより報告されているカチオン性のマンガンポルフィリン錯体の誘導体の Mn(III)/Mn(II)に対応する酸化還元電位は、-50 から 350 mV であり、SOD 活性を示すことが知られている<sup>45)</sup>。本研究で用いているモノカルボキシアミド配位を有する Mn(II)錯体である UG1 の酸化還元電位は、5% DMSO 含有の水中で 732 mV であり (Figure 3.6)、マンガンポルフィリン錯体と同様に SOD 活性を有することが示唆された。実際に、UG1 は SOD 活性を有しているが、上記に示したマンガンポルフィリン錯体に比べ、その活性は低い (Figure 3.7)。しかしこの結果は、UG1 は O<sub>2</sub><sup>-</sup>と反応し、過酸化水素を発生させることを示している。また、UG1 の Mn(III)/Mn(II)に対応する酸化還元電位から UG1 は、分子状酸素を外圈的な電子移動反応により直接還元し、O<sub>2</sub><sup>-</sup>を発生させることは不利な反応であると考えられる。実際に UG1 は、水中で数時間 Mn(II)の状態安定であり、空気中の酸素による酸化により Mn(III)錯体が生成しない。Jackson らのグループは、類似の配位子を用いたモノカルボキシアミド配位を有する Mn 錯体 Mn(dpaq<sup>H</sup>)がアセトニトリル中で空気酸化を受け、Mn(III)OH 種を生成することを報告している<sup>48)</sup>。本研究では、酸素濃度がアセトニトリル中に比べ低くなる水中で評価しており、更に Mn(II)状態をより安定化させることが期待できるニトロ基を配位子内に導入しているため、空気下で自動酸化を受けないと考えられる。

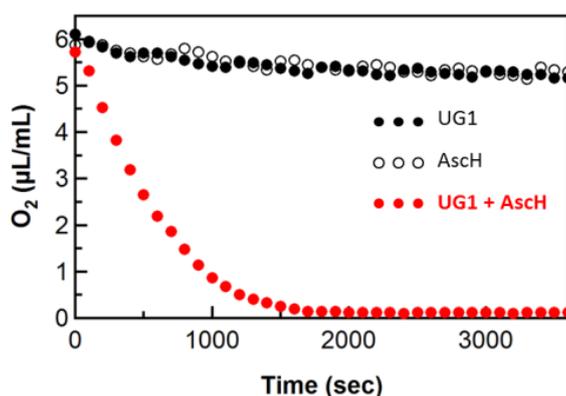


**Figure 3.6** Cyclic voltammetry of UG1 (0.5 mM) taken in deaerated H<sub>2</sub>O (5% DMSO) containing 0.05 M NaCl at 25 °C, using reticulated vitreous carbon as working electrode, Pt counter electrode, Ag/AgCl (3 M NaCl) reference electrode at a scan rate of 20 mV s<sup>-1</sup>.



**Figure 3.7** Inhibition of the reduction of a water soluble tetrazolium salt WST-1 in the presence of xanthine/xanthine oxidase, a superoxide-generating system in the presence of varied concentration of UG1 in PBS buffer (pH 7.5).  $IC_{50} = 1.5 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ,  $\log k_{\text{cat}} = 6.2 \pm 0.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . The data are the mean and standard deviations of quintuplicate experiments.

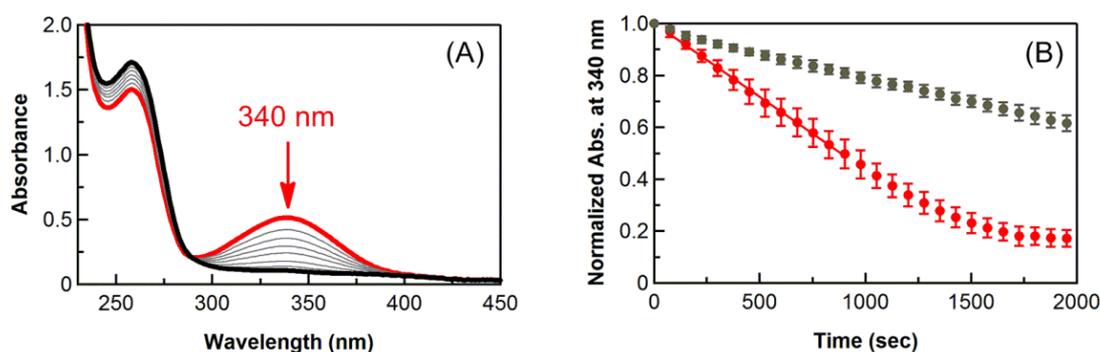
実際に、水溶液中での分子状酸素との反応を水溶液中の酸素濃度を測定することが可能なクラーク電極により追跡した結果、UG1 の添加による酸素濃度の減少は確認されなかった (Figure 3.8). しかし、還元剤であるアスコルビン酸のみでは、緩衝溶液中の酸素濃度の減少は確認されなかったのに対し、UG1 とアスコルビン酸共存下では、SOD 活性を有するマンガンポルフィリン錯体と同様に酸素濃度の減少が観測された。この結果から UG1 は、アスコルビン酸のような還元剤存在下でのみ水中で酸素と反応することが明らかとなった。



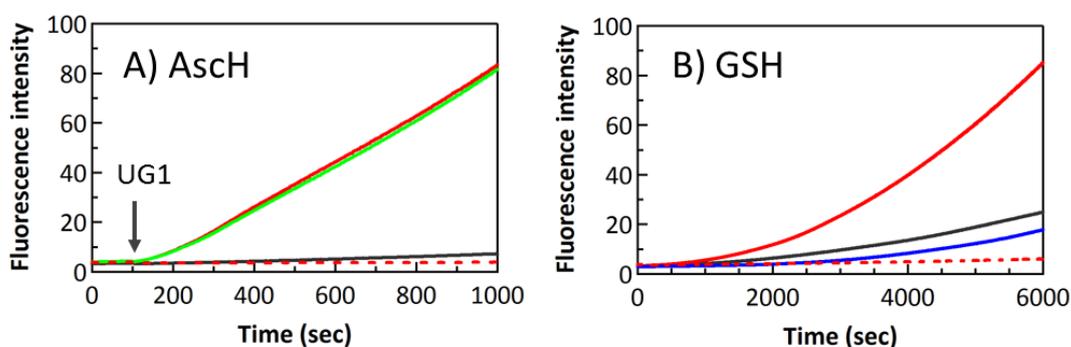
**Figure 3.8** Dioxygen consumption by UG1 (10  $\mu\text{M}$ ) in 5%DMSO-PBS buffer (pH 7.5) in the presence of ascorbic acid (1 mM) at 30 °C.

次に、UG1 によるグルタチオン (GSH) の酸化型グルタチオン (GSSG) への酸化反応を NADPH/glutathione reductase coupled method を用いて評価した結果、UG1 は触媒的に GSH を酸化していることが明らかとなった (Figure 3.9). 更に、過酸化水素特異的な蛍光プローブ

分子である PF1<sup>34)</sup>を用いて、還元剤存在下での UG1 と酸素との反応により生成する過酸化水素の検出を試みた結果、還元剤非存在下では過酸化水素の発生は確認されなかったのに対し、還元剤としてアスコルビン酸あるいは GSH を共存させた条件下では過酸化水素の発生が確認された (Figure 3.10).



**Figure 3.9** GSH oxidation by UG1 was measured by using NADPH/glutathione reductase (GR) coupled assay. (A) Absorption spectral changes during the reaction of UG1 (10  $\mu$ M), GSH (5 mM), GR (1 units/mL) and NADPH (100  $\mu$ M) in 5%DMSO-PBS buffer (pH 7.5) at 37  $^{\circ}$ C. Right panels (B) show the time course of absorption intensity at 340 nm (gray, absence of UG1; red, presence of UG1).



**Figure 3.10** Detection of  $H_2O_2$  by PF1 (10  $\mu$ M) generated by UG1 (25  $\mu$ M) in the presence of reducing agents (1 mM) such as ascorbic acid (A) and GSH (B) in 5%DMSO-PBS buffer (pH 7.5) at 37  $^{\circ}$ C. Red line, UG1 + reductant; red dotted line, UG1 only; black line,  $MnCl_2$  (100  $\mu$ M) + reductant; blue line, reductant only; green line, UG1 + reductant + SOD (100 units/mL).

次に、酸素の一電子還元により生成する  $O_2^{\cdot -}$  の発生を確認することを目的に、SOD 存在下で、アスコルビン酸、UG1 共存下での過酸化水素発生速度を測定した結果、SOD の添加による過酸化水素の生成速度に変化は見られなかった (Figure 3.10 (A) green line)。もし、UG1 と酸素との反応により、酸素の一電子還元体である  $O_2^{\cdot -}$  が発生している場合は、生成

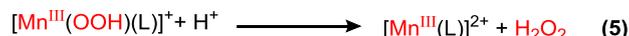
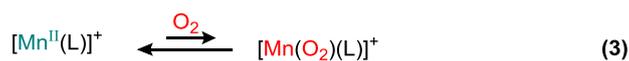
後ただちに SOD により過酸化水素と酸素に不均化されるため、発生する過酸化水素量が減少するはずである。しかし、アスコルビン酸存在下での UG1 と酸素との反応により発生する過酸化水素の発生速度は、SOD 存在下でも変化が見られなかったため、UG1 は還元剤存在下でのみ酸素を二電子還元することで選択的に過酸化水素を発生させるユニークな反応性を示すことが判明した。

酸素の還元反応における推定されるメカニズムを Scheme 3.1 の B) に示した。Mn(II)錯体である UG1 は、酸素を二電子還元し、過酸化水素選択的に発生させるが、還元剤非存在下では酸素との反応性を示さず安定であり、酸素の一電子還元体である  $O_2^-$  を発生させない。したがって、UG1 は、酸素と付加体を形成し、その付加体が還元剤により還元を受けることで、対応する Mn(III)OOH 種を生成し、過酸化水素を解離することで酸素の選択的な二電子還元反応を実現していると考えられる。UG1 の酸素付加体である Mn(II)- $O_2$  種が、還元剤から水素原子引き抜き反応を進行させていると考えられる。福住先生らのグループは、空气中で安定な単核 Fe(II)錯体が還元剤である NADH 類縁体存在下でのみ対応する Fe(III)OOH 種を生成することを報告している<sup>50)</sup>。以上の結果から UG1 は、細胞内の還元剤を利用し、酸素を還元的に活性化することで過酸化水素を触媒的に発生し、細胞に酸化ストレスを与えることで高い細胞毒性を発現していると考えられる。

#### A) superoxide dismutase activity



#### B) catalytic $H_2O_2$ generation

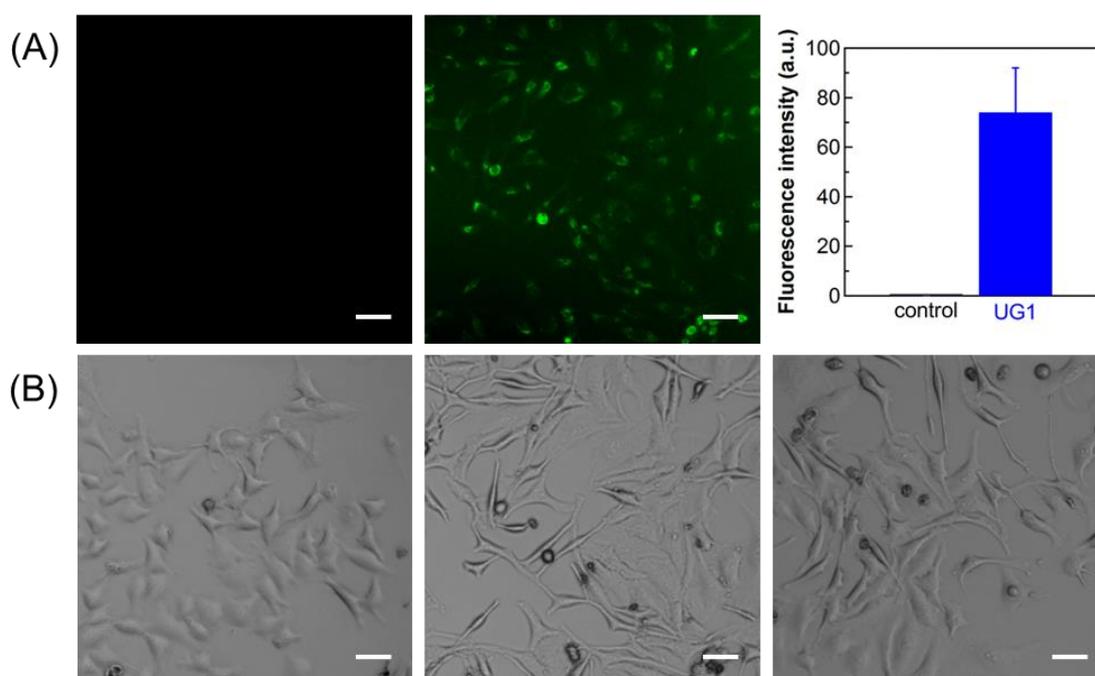


**Scheme 3.1** (A) Plausible reactions during superoxide disproportionation catalysed by UG1. (B) Proposed reaction mechanism for the generation of  $H_2O_2$  catalysed by UG1. AH denotes a reductant.

### 3-6. 培養細胞内での過酸化水素の定量

UG1 は、還元剤存在下、水中で分子状酸素を二電子還元し、過酸化水素を触媒的に発生させることが判明した。次に、UG1 は細胞内でも同様に過酸化水素を発生させるかどうか明らかにすることを目的に、UG1 添加時の培養細胞内の過酸化水素濃度を過酸化水素特異的な蛍光プローブ分子である PF1 を用いて検討した (Figure 3.11 (A))。培養液に HeLa 細胞

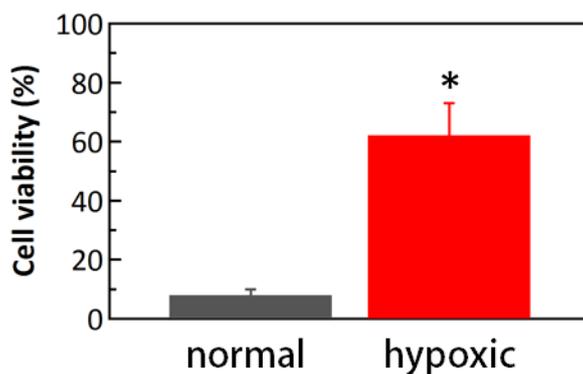
と 10  $\mu\text{M}$  の UG1 と 10  $\mu\text{M}$  の PF1 を添加し、24 時間培養した結果、UG1 非存在下に比べ、細胞内のフルオレセイン由来の緑色蛍光強度の有為な上昇が確認できた。また、HeLa 細胞の形態を顕微鏡観察した結果、10  $\mu\text{M}$  の UG1 の添加により、HeLa 細胞が伸展することが判明した (Figure 3.11 (B))。同様の実験を 100  $\mu\text{M}$  の過酸化水素を用いて行った結果、UG1 を添加した際に観測された HeLa 細胞の形態変化に類似した細胞の伸展が観測された。これまでに Talman らのグループにより、HeLa 細胞に isophthalate 誘導体を添加することで、UG1 を添加した際に観測された類似の形態変化が観測されている<sup>35)</sup>。isophthalate 誘導体は、protein kinase C の C1 ドメインに結合することで細胞骨格を変化させていると考えられている<sup>36)</sup>。Prohibitin は、ミトコンドリアの機能に重要な働きをしており、過剰発現させることで酸化ストレスの耐性を示すことが知られている<sup>37)</sup>。UG1 を添加した際に観測された HeLa 細胞の伸展は、細胞内で過酸化水素を発生させることでアクチンの脱高分子化因子であるコフィリンを活性化することで細胞骨格の変化が誘導されたと考えられる。



**Figure 3.11** (A) Fluorescence images of cells exposed to PF1 (left) and to PF1 and UG1 (middle) after being exposed to light. The relative fluorescence intensities are shown on the right. (B) Bright field images of cells incubated with 10  $\mu\text{M}$  UG1 (middle) and 100  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (right). The control is shown in the left. Each scale bar indicates 50  $\mu\text{m}$ .

これまでに得られた実験結果から、UG1 の高い細胞毒性は、細胞内の還元剤を利用し、酸素を二電子還元することで触媒的に過酸化水素を発生させることに起因していると考えられる。すなわち、低酸素条件下では、UG1 の細胞毒性は、空気下に比べ低下すると推測

できる。この仮定を実証するため、2%酸素条件下でUG1の細胞毒性評価をMTTアッセイ法により実施した結果、空気下に比べ、細胞生存率が11%から62%へと大きく増加することが判明した (Figure 3.12)。この結果からも、UG1は細胞内で酸素を還元し、触媒的に過酸化水素を発生させることで、高い細胞毒性を発現していることが示唆される。



**Figure 3.12** Cell viability of HeLa cells incubated with 25  $\mu\text{M}$  of UG1 under the normal conditions (gray) and under the hypoxic conditions (red, 2%  $\text{O}_2$ ). \* $p < 0.005$  compared with the control.

#### 4. 結論

新たに開発したマンガンニトロシル錯体 UG1NO は、水中だけでなく培養細胞内でも 650 nm の単色光照射により NO の放出を制御することが可能であることが判明した。また、UG1NO は、HeLa 細胞に対して、暗所下ではほとんど細胞毒性を示さず、光照射にตอบสนองして高い細胞毒性を発現した。しかし、細胞毒性を発現しているのは、解離した NO ではなく、同時に生成する Mn(II)錯体 (UG1) であることが明らかとなった。UG1 は、732 mV vs. NHE に Mn(III)/Mn(II)に対応する酸化還元電位を有しており、還元剤存在下でのみ酸素を二電子還元し、過酸化水素を触媒的に発生させる。これまでに、光照射により光分解性保護基を解離することで機能を発現させる手法 (光ケージド化) として、nitrobenzyl ether 等が開発されている<sup>46,47)</sup>。例えば、Chang らのグループにより CPG1 (4-[(2-nitrobenzyl)oxy]benzene-1,3-diol) は、nitrobenzyl ether を光照射することで解離させ、1 分子の過酸化水素を放出するため、培養細胞に対する光駆動型の過酸化水素供与分子として機能することが報告されている<sup>4)</sup>。開発した UG1NO は、NO の配位により Mn(II)錯体の機能を光ケージド化しており、光照射することで NO を解離し、過酸化水素を触媒的に発生させる Mn(II)錯体 (UG1) を生成させることで、細胞死および細胞の伸展を誘起する。このように、NO の配位により培養細胞条件下で安定な金属ニトロシル錯体を形成させることができれば、金属錯体の機能を光ケージド化することが可能であるため、新たな光ケージド化の手法となる。

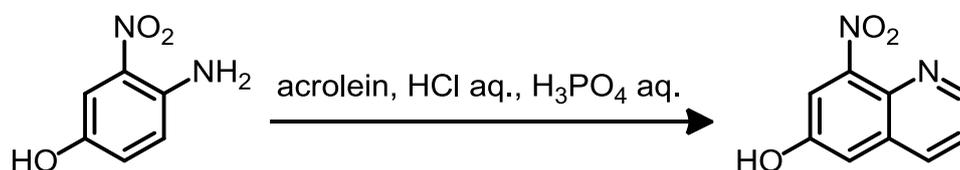
## 5. 実験方法

### 5-1. 測定機器

PF1 は、文献に従い合成した<sup>34)</sup>。赤外吸収スペクトルは島津社製 IRAffinity-1 spectrometer に MIRacle 10 single reflection を装着し、ATR 法により測定した。電子吸収スペクトル測定には、Agilent 社製 8543UV-visible spectrometer を用いた。<sup>1</sup>H-NMR および <sup>13</sup>C NMR スペクトル測定には、日本電子社製 JMN-A 500 を用いた。蛍光スペクトル測定には、Hitachi F-7000 spectrophotometer を用いた。ESI-MS 測定には、JEOL 社製 JMS-T100CS spectrometer を用いた。元素分析は Perkin-Elmer 社製 Elemental Analyzer (2400 Series II) を用いた。蛍光顕微鏡画像は、Olympus IX81 fluorescence microscope を用いて作成した。光照射には、300 W キセノンランプ (Asahi Spectra Co. Ltd) を用い、650 nm の単色光照射の際は、 $\lambda = 650$  nm (FWHW: 6 nm) のバンドパスフィルターを装着した。低酸素条件下での細胞培養には、hypoxic culture kit (BIONIX-1. Sugiyamagen Corp., Tokyo, Japan) を用いた。

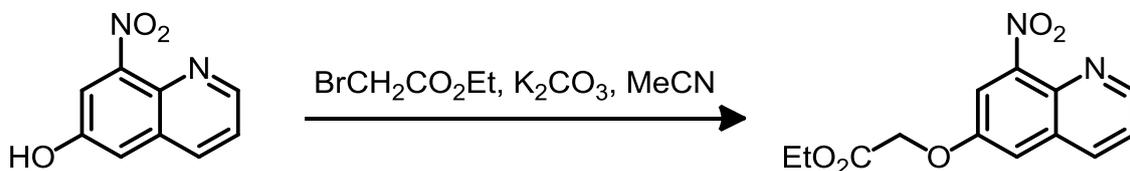
### 5-2. 配位子合成

#### 5-2-1. 6-hydroxy-8-nitroquinoline



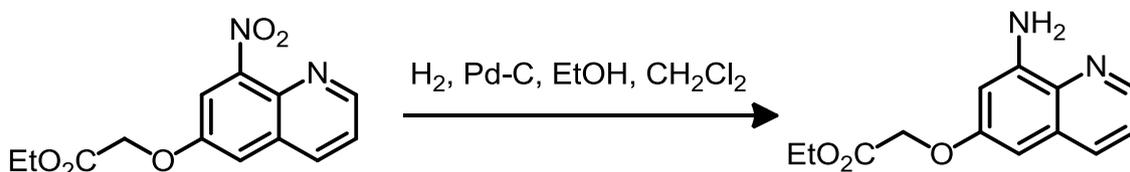
4-amino-3-nitrophenol (5.0 g, 33 mmol) と濃塩酸 (40 mL)、濃リン酸 (15 g) を反応容器に加え、80°C に加熱しながら、1 時間かけて acrolein (6.5 mL, 97 mmol) を加えた。その後、3 時間 95°C で攪拌した後、反応容器を 0°C にし、アンモニア水により中和すると、固体が析出した。その固体をろ取り、アセトン (10 mL) で 5 度洗浄し、真空乾燥することで目的の赤色固体を得た。(収量: 4.2 g, 収率: 69%) <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ 7.48 (s, Qu5, 1H), 7.58 (dd,  $J = 8.3, 4.0$  Hz, Qu3, 1H), 7.82 (s, Qu7, 1H), 8.34 (d,  $J = 8.3$  Hz, Qu4, 1H), 8.78 (d,  $J = 4.0$  Hz, Qu2, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 112.9 (Qu5), 116.0 (Qu7), 123.7 (Qu3), 130.3 (Qu9), 134.0 (Qu10), 135.3 (Qu4), 149.1 (Qu6), 149.8 (Qu2), 154.9 (Qu8). FT-IR (ATR): 783 cm<sup>-1</sup> (C-N).

### 5-2-2. Ethyl[(8-nitroquinolin-6-yloxy)acetate]



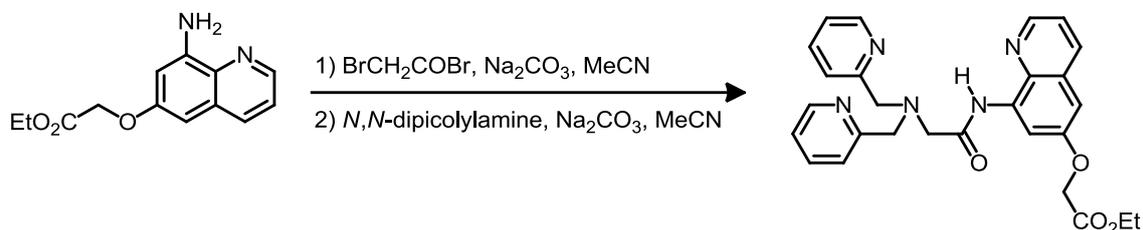
6-hydroxy-8-nitroquinoline (4.0 g, 21 mmol) と K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5.8 g, 42 mmol) を脱水アセトン (60 mL) に溶解させ, ethyl bromoacetate (5.3 g, 32 mmol) をゆっくりと添加し, 窒素雰囲気下で一晩攪拌した. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> をセライト濾過で取り除いた後に溶液を濃縮し, アルミナカラムにより精製した (hexane/EtOAc (1/1)). (収量: 1.8 g, 収率: 30%) <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.32 (t, *J* = 7.2 Hz, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 3H), 4.31 (q, *J* = 7.2 Hz, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 2H), 4.80 (s, -OCH<sub>2</sub>, 2H), 7.24 (d, *J* = 2.3 Hz, Qu5, 1H), 7.50 (dd, *J* = 8.3, 4.3 Hz, Qu3, 1H), 7.79 (d, *J* = 2.3 Hz, Qu7, 1H), 8.12 (dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, Qu4, 1H), 8.92 (dd, *J* = 4.3, 1.4 Hz, Qu2, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.4 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 62.1 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 66.1 (-CH<sub>2</sub>-), 111.0 (Qu5), 116.9 (Qu7), 123.4 (Qu3), 130.0 (Qu9), 135.2 (Qu4), 136.1 (Qu10), 149.2 (Qu8), 150.8 (Qu2), 154.6 (Qu6), 167.9 (C=O). FT-IR (ATR): 1746 cm<sup>-1</sup> (C=O), 1165 cm<sup>-1</sup> (C-O).

### 5-2-3. Ethyl[(8-aminoquinolin-6-yloxy)acetate]



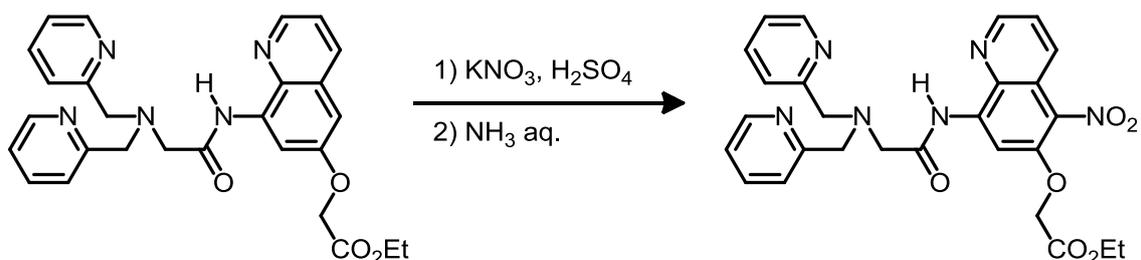
Ethyl[(8-nitroquinolin-6-yloxy)acetate] (0.96 g, 3.5 mmol) をジクロロメタン (40 mL), エタノール (80 mL) の混合溶媒に溶解させ, 10% Pd/C (0.096 g) を加え, 水素雰囲気下で6時間攪拌した. セライト濾過により Pd 触媒を除去した後, 溶液を濃縮し, 真空乾燥することで目的の固体を得た. (収量: 0.84 g, 収率: 98%) <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.31 (t, *J* = 7.2 Hz, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 3H), 4.29 (q, *J* = 7.2 Hz, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, 2H), 4.70 (s, -OCH<sub>2</sub>, 2H), 5.03 (NH<sub>2</sub>, 2H), 6.39 (d, *J* = 2.3 Hz, Qu5, 1H), 6.69 (d, *J* = 2.3 Hz, Qu5, 1H), 7.33 (dd, *J* = 8.3, 4.3 Hz, Qu3, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.3 Hz, Qu4, 1H), 8.62 (dd, *J* = 4.3 Hz, Qu2, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 14.4 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 61.6 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 65.5 (-CH<sub>2</sub>-), 95.5 (Qu5), 101.7 (Qu7), 122.1 (Qu3), 129.7 (Qu9), 135.1 (Qu4), 135.8 (Qu10), 145.6 (Qu8), 145.7 (Qu2), 157.2 (Qu6), 169.1 (C=O). FT-IR (ATR): 3460 cm<sup>-1</sup> (-NH<sub>2</sub>), 1748 cm<sup>-1</sup> (C=O), 1171 cm<sup>-1</sup> (C-O).

#### 5-2-4. Ethyl 2-[(8-(2-bis(pyridine-2-ylmethyl)amino)acetamido)quinolin-6-yloxy]acetate (L1)



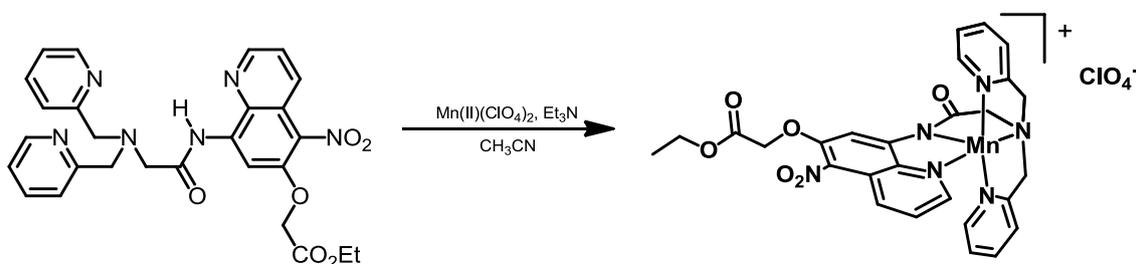
Ethyl[8-aminoquino-6-yloxy]acetate (0.8 g, 3.6 mmol) と  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.41 g, 3.9 mmol) を反応容器に加え、窒素雰囲気下でアセトニトリルを 50 mL 加えた。その溶液に Bromoacetyl bromide (0.34 mL 3.9 mmol) を 30 分かけて加えた後、 $0^\circ\text{C}$  で 20 分撹拌した。セライト濾過により  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  を除去した後、溶液を濃縮し真空乾燥することで橙色固体を得た。その固体と  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.41 g, 3.9 mmol) および *N,N*-dipicolylamine (0.78 mg, 3.9 mmol) を反応容器に加え、アセトニトリル (50 mL) を窒素雰囲気下で加え、 $0^\circ\text{C}$  で 24 時間撹拌した。セライト濾過により、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  を除去し、溶液を濃縮した後にアルミナカラムにより精製した (hexane/AcOEt (1/1))。 (収量: 0.95 g, 収率: 60%)  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.31 (t,  $J = 7.2$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 3H), 3.53 (s,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ , 2H), 4.01 (s,  $-\text{CH}_2\text{Py}-$ , 4H), 4.28 (q,  $J = 7.2$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 2H), 4.75 (s,  $-\text{OCH}_2$ , 2H), 6.80 (d,  $J = 2.9$  Hz, Qu5, 1H), 7.16 (dd,  $J = 7.5, 5.2$  Hz, Py5, 2H), 7.47 (dd,  $J = 8.6, 4.3$  Hz, Qu3, 1H), 7.65 (dd,  $J = 7.5, 7.5$  Hz, Py4, 2H), 7.97 (d,  $J = 7.5$  Hz, Py3, 2H), 8.06 (d,  $J = 8.6$  Hz, Qu4, 1H), 8.52 (d,  $J = 5.2$  Hz, Py6, 2H), 8.59 (d,  $J = 2.9$  Hz, Qu5, 1H), 8.80 (d,  $J = 4.3$  Hz, Qu2, 1H), 11.59 (s,  $-\text{NHCO}-$ , 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 14.4 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 59.5 ( $-\text{CH}_2\text{CO}-$ ), 61.3 ( $-\text{CH}_2\text{Py}-$ ), 65.8 ( $-\text{CH}_2-$ ), 101.7 (Qu7), 108.8 (Qu5), 122.4 (Qu3), 122.6 (Py5), 123.6 (Py3), 129.0 (Qu9), 135.4 (Qu4), 135.8 (Qu10), 135.9 (Qu8), 136.8 (Py4), 146.2 (Qu2), 149.4 (Py6), 156.8 (Qu6), 158.4 (Py2), 168.9 (C=O). FT-IR (ATR):  $3273\text{ cm}^{-1}$  (amide N-H),  $1751\text{ cm}^{-1}$  (C=O),  $1680\text{ cm}^{-1}$  (amide C=O),  $1165\text{ cm}^{-1}$  (C-O).

#### 5-2-5. Ethyl 2-[[8-({[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]acetyl}amino)-5-nitroquinolin-6-yl]oxy]acetate (L2)



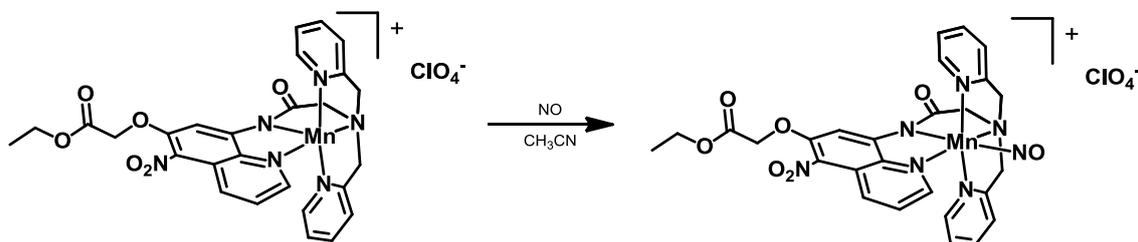
**L1** (0.8 g, 3.9 mmol) を濃硫酸 (10 mL) に溶解させ、0°C でゆっくりと  $\text{KNO}_3$  (0.47 g, 4.7 mmol) を加え、5 時間攪拌した。TLC により反応の終了を確認後、アンモニア水をゆっくりと添加し、中和した。その後、ジクロロメタンに抽出し、溶液を濃縮することで目的の黄色固体を得た。(収量: 0.58 g, 収率: 66%)  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.29 (t,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 3H), 3.58 (s,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ , 2H), 4.03 (s,  $-\text{CH}_2\text{Py}-$ , 4H), 4.27 (q,  $J = 7.1$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 2H), 4.89 (s,  $-\text{OCH}_2$ , 2H), 7.16 (dd,  $J = 7.5, 4.9$  Hz, Py5, 2H), 7.64 (m, Py4 Qu3, 3H), 7.81 (d,  $J = 7.8$  Hz, Py3, 2H), 8.27 (d,  $J = 8.7$  Hz, Qu4, 1H), 8.52 (d,  $J = 4.9$  Hz, Py6, 2H), 8.69 (s, Qu7, 1H), 8.89 (d,  $J = 4.3$  Hz, Qu2, 1H), 11.77 (s,  $-\text{NHCO}-$ , 1H). FT-IR (ATR):  $3280\text{ cm}^{-1}$  (amide N-H),  $1687\text{ cm}^{-1}$  (amide C=O),  $1514\text{ cm}^{-1}$  (nitro  $\text{NO}_2$ ).

### 5-3. UG1 の合成



トリエチルアミン (60  $\mu\text{L}$ , 0.48 mmol) 存在下、**L2** (0.20 g, 0.40 mmol) をエタノール (8 mL) に溶解させた溶液を  $\text{Mn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.17 g, 0.48 mmol) のエタノール (2 mL) 溶液にゆっくりと添加し、窒素雰囲気下で 30 分攪拌した。生成した黄色固体をろ取り、エタノール (2 mL) で 3 度洗浄し、真空乾燥することで目的の固体を得た。(収量: 0.23 g, 収率: 89%) Anal. Calcd for  $[\text{Mn}(\text{dpaq}^{\text{NO}_2, \text{ester}})](\text{ClO}_4)(\text{H}_2\text{O})_{1.5}$ : C, 45.61; H, 3.97; N, 11.82. Found: C, 45.37; H, 3.63; N, 11.56. FT-IR (ATR):  $1733\text{ cm}^{-1}$  (C=O),  $1606\text{ cm}^{-1}$  (amide C=O),  $1542\text{ cm}^{-1}$  (nitro  $\text{NO}_2$ ). ESI-MS, positive mode:  $m/z$  584.05  $\{\text{Mn}^{\text{II}}(\text{dpaq}^{\text{ester}})\}^+$ .

#### 5-4. UG1NO の合成



UG1 (0.35 g, 0.55 mmol) を  $\text{CH}_3\text{CN} : \text{MeOH} = 1 : 1$  (50 mL) に溶解させ、NO ガス (50 mL  $\times$  5) をバブリングすると、溶液が黒色に変化した。その溶液にジエチルエーテルを 50 mL 添加すると暗赤色の固体が析出したため、その固体をろ取り真空乾燥した。(収量: 0.350 g, 収率: 94%) Anal. Calcd for  $[\text{Mn}(\text{NO})(\text{dpaq}^{\text{NO}_2.\text{ester}})](\text{ClO}_4)$ : C, 45.42; H, 3.53; N, 13.73. Found: C, 45.31; H, 3.44; N, 13.6.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $\delta$  1.18 (t,  $J = 7.3$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 3H), 4.04 (s,  $-\text{CH}_2\text{CO}-$ , 2H), 4.36, 4.57 (d,  $J = 15.5$ ,  $-\text{CH}_2\text{Py}-$ , 2H), 4.19 (q,  $J = 7.2$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ , 2H), 4.91 (s,  $-\text{OCH}_2$ , 2H), 6.43 (d,  $J = 5.4$  Hz, Py3, 2H), 7.08 (t,  $J = 6.8$  Hz, Py5, 2H), 7.49 (d,  $J = 7.9$  Hz, Py6, 2H), 7.73 (dd,  $J = 4.8, 8.7$  Hz, Qu3, 1H), 7.86 (t,  $J = 7.9$  Hz, Py4, 2H), 8.32 (d,  $J = 8.7$  Hz, Qu4, 1H), 8.84 (s, Qu7, 1H), 9.21 (d,  $J = 4.8$  Hz, Qu2, 1H). FT-IR (ATR):  $1625\text{ cm}^{-1}$  (amido C=O),  $1746\text{ cm}^{-1}$  (N-O). Electronic absorption spectrum in  $\text{H}_2\text{O}$  (nm ( $\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ )): 494 (2700), 385 (8300). ESI-MS, positive mode:  $m/z$  614.31  $\{\text{Mn}^{\text{II}}(\text{dpaq}^{\text{NO}_2.\text{ester}})(\text{NO})\}^+$ .

#### 5-5. UG1NO による光照射による NO の放出

空気下、 $37^\circ\text{C}$  の条件下で UG1NO (100  $\mu\text{M}$ ) の 5% DMSO-PBS buffer (pH 7.5) に ASAHI SPECTRA の MAX303 を用いて 650 nm ( $300\text{ mW/m}^2$ ) の単色光をキュベットの上から照射しながら、電子吸収スペクトルを測定した。

#### 5-6. 細胞毒性評価

初めに  $1 \times 10^5$  cells/mL の HeLa 細胞を 96 well plater に 100  $\mu\text{L}$  ずつ加え、24 時間インキュベーションした。その後、UG1NO を 0–500  $\mu\text{M}$  になるように加え、3 時間インキュベーションした。コントロールには、PBS 緩衝溶液を添加した。3 時間後、650 nm の単色光を 1 時間あるいは可視光を 10 秒間照射し、24 時間後に MTT アッセイ法により細胞生存率の評価を行った。

UG1 の細胞毒性は、初めに  $1 \times 10^5$  cells/mL の HeLa 細胞を 96 well plater に 100  $\mu\text{L}$  ずつ加え、24 時間インキュベーションした後、UG1 を 0–500  $\mu\text{M}$  になるように加え、24 時間後に

MTT アッセイ法により評価された。

#### 5-7. 細胞内の一酸化窒素の検出

文献に従って、測定を行った<sup>33)</sup>。初めに  $1 \times 10^5$  cells/mL の HeLa 細胞を蛍光顕微鏡観察用のディッシュに 1.5 mL 加え、24 時間培養した。そこに、 $10 \mu\text{M}$  となるように DAF2-DA を添加し、30 分培養後、DMEM を用いて 3 度洗浄した。その培養溶液に UG1NO を  $10 \mu\text{M}$  となるように添加し、さらに 30 分培養後、650 nm の単色光を 30 分間照射した後に蛍光顕微鏡により観察した。

#### 5-8. 細胞内の過酸化水素の検出

文献に従って、測定を行った<sup>34)</sup>。初めに  $1 \times 10^5$  cells/mL の HeLa 細胞を蛍光顕微鏡観察用のディッシュに 1.5 mL 加え、24 時間培養した。そこに、 $10 \mu\text{M}$  となるように PF1 を添加し、30 分培養後、DMEM を用いて 3 度洗った。その溶液に UG1 を  $10 \mu\text{M}$  となるように添加し、24 時間培養後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

#### 5-9. 水中での酸素濃度の測定

アスコルビン酸存在下での UG1 と酸素との反応は、クラーク型酸素電極を用いて追跡した。初めに、アスコルビン酸 1 mM の PBS 緩衝溶液中 (pH 7.5) に、最終濃度が 0.1 mM になるように UG1 の 5% DMSO-H<sub>2</sub>O 溶液を加えた。反応は、密閉された容器で行い、温度は 30 °C に保った。

#### 5-10. Glutathione reductase/NADPH coupled assay 法を用いた GSH の酸化反応

UG1 による GSH の酸化反応は、GSH の酸化生成物である GSSG がグルタチオンレダクターゼ (GR) により還元を受ける際に使用される NADPH の極大吸収波長である 340 nm の吸光度を追跡することで評価した。初めに、GSH 5 mM, NADPH 0.1 mM, GR 1 unit/mL の PBS 緩衝溶液 (pH 7.5) に UG1 の 5% DMSO-H<sub>2</sub>O 溶液を 0.01 mM になるように添加した。反応は 37 °C, 空気下で行った。

#### 5-11. PF1 を用いた過酸化水素の検出

空気下, 37 °C, 1 mM の還元剤 (アスコルビン酸あるいはグルタチオン) および 0.01 mM の PF1 を含有する PBS 緩衝溶液 (pH 7.5) 中に UG1 が 0.025 mM となるように添加し、蛍

光スペクトル変化を追跡した ( $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ).

#### 5-12. UG1 の酸化還元電位測定

5%DMSO 含有 PIPES 緩衝輸液中での UG1 の Mn(III)/Mn(II)の酸化還元電位は, BAS CV-50W を用い, サイクリックボルタメトリー法により決定された. 具体的には, 電解質に 50 mM NaCl を含む, 窒素バブリングにより脱気した PIPES 緩衝溶液 (pH 7.5, 10 mM) の 0.5 mM UG1 溶液を用いて測定した. 作用電極にはグラッシーカーボン電極, 参照電極には Ag/AgCl (3 M NaCl), 対極には白金ワイヤー電極を用いた.

## 6. 参考文献

- (1) G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2006**, 45, 4900.
- (2) R. D. Rimmer, A. E. Pierri, P. C. Ford, *Coord. Chem. Rev.*, **2012**, 256, 1509.
- (3) U. Schatzschneider, *Inorg. Chem. Acta.*, **2011**, 374, 19.
- (4) E. W. Miller, N. Taullet, C. S. Onak, E. J. New, J. K. Lanselle, G. S. Smelick, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 17071.
- (5) N. O. D.-Baez, P. E. Bagdon, B. Peng, Y. Zhao, C. M. Park, M. Xian, *Org. Lett.*, **2013**, 15, 2786.
- (6) N. Fukushima, N. Ieda, K. Sasakura, T. Nagano, K. Hanaoka, T. Suzuki, N. Miyata, H. Nakagawa, *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 587.
- (7) D. Crespy, K. Landfester, U. S. Schubert, A. Schiller, *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 6651.
- (8) B. Brüne, A. V. Knethen, K. B. Sandau, *Cell Death and Differentiation*, **1999**, 6, 969.
- (9) P. G. Wang, M. Xian, X. Tang, X. Wu, Z. Wen, T. Cai, A. J. Janczuk, *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 1091.
- (10) A. Ostrowski, Abstracts of Papers, 244th ACS National Meeting & Exposition, Philadelphia, PA, United States, **2012**, IAC-14.
- (11) B. Heilman, P. K. Mascharak, *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, **2013**, 371.
- (12) N. L. Fry, P. K. Mascharak, *Acc. Chem. Res.*, **2011**, 44, 289.
- (13) M. J. Rose, P. K. Mascharak, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2008**, 12, 238.
- (14) J. V. Garcia, F. Zhang, P. C. Ford, *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, **2013**, 371.
- (15) A. D. Ostrowski, P. C. Ford, *Dalton Trans.*, **2009**, 10660.
- (16) P. C. Ford, *Acc. Chem. Res.*, **2008**, 41, 190.
- (17) J. Bourassa, W. DeGraff, S. Kudo, D. A. Wink, J. B. Mitchell, P. C. Ford, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 2853.
- (18) C. F. Works, P. C. Ford, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 7592.
- (19) A. K. Patra, M. J. Rose, K. A. Murphy, M. M. Olmstead, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.*, **2004**, 43, 4487.
- (20) A. K. Patra, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.*, **2003**, 42, 7363.
- (21) F. Derosa, X. Bu, P. C. Ford, *Inorg. Chem.*, **2005**, 44, 4157.
- (22) K. Ghosh, A. A. E.-Reveles, B. Avila, T. R. Holman, M. M. Olmstead, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.*, **2004**, 43, 2988.
- (23) T. A. Heinrich, A. C. Tedesco, J. M. Fukuto, R. S. Da Silva, *Dalton Trans.*, **2014**, 43, 4021.
- (24) A. J. Gomes, E. M. Espreafico, E. Tfouni, *Mol. Pharm.*, **2013**, 10, 3544.

- (25) F. C. Munhoz, S. R. Potje, A. C. Pereira, M. G. Daruge, R. S. Da Silva, L. M. Bendhack, C. Antoniali, *Nitric Oxide*, **2012**, 26, 111.
- (26) C. Bohlender, M. Wolfram, H. Goerls, W. Imhof, R. Menzel, A. Baumgaertel, U. S. Schubert, U. Mueller, M. Frigge, M. Schnabelrauch, R. Wyrwa, A. Schiller, *J. Mater. Chem.*, **2012**, 22, 8785.
- (27) A. J. Gomes, P. A. Barbougli, E. M. Espreafico, E. J. Tfouni, *Inorg. Biochem.* **2008**, 102, 757.
- (28) R. S. Da Silva, M. S. P. Marchesi, C. Khin, C. N. Lunardi, L. M. Bendhack, P. C. Ford, *J. Phys. Chem. B*, **2007**, 111, 6962.
- (29) C. G. H.-Luca, A. A. E.-Reveles, J. Alvarenga, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.*, **2009**, 48, 9104.
- (30) A. A. E.-Reveles, Y. Leung, C. M. Beavers, M. M. Olmstead, P. K. Mascharak, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 4447.
- (31) M. J. Rose, N. L. Fry, R. Marlow, L. Hinck, P. K. Mascharak, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 8834.
- (32) Y. Hitomi, Y. Iwamoto, M. Kodera, *Dalton Trans.*, **2014**, 43, 2161.
- (33) H. Kojima, N. Nakatsubo, K. Kikuchi, S. Kawahara, Y. Kirino, H. Nagoshi, Y. Hirata, T. Nagano, *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 2446.
- (34) M. C. Y. Chang, A. Pralle, E. Y. Isacoff, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 15392.
- (35) V. Talman, R. K. Tuominen, G. B. af Gennas, J. Y.-Kauhaluoma, E. Ekokoski, *PLoS One* **2011**, 6, 20053.
- (36) C. Sievers, G. Billig, K. Gottschalk, T. Rudel, *PLoS One* **2010**, 5, 12735.
- (37) A. L. Theiss, R. D. Idell, S. Srinivasan, J. M. Klapproth, D. P. Jones, D. Merlin, S. V. Sitaraman, *Faseb J* **2007**, 21, 197.
- (38) X. Ye, D. Fels, A. Tovmasyan, K. M. Aird, C. Dedeugd, J. L. Allensworth, I. Kos, W. Park, I. Spasojevic, G. R. Devi, M. W. Dewhirst, K. W. Leong, I. B.-Haberle, *Free Radical Res.* **2011**, 45, 1289306.
- (39) I. B.-Haberle, A. Tovmasyan, E. R. Roberts, Z. Vujaskovic, K. W. Leong, I. Spasojevic, *Antioxid. Redox Signal.*, **2014**, 20, 2372415.
- (40) M. K. Evans, A. Tovmasyan, I. B.-Haberle, G. R. Devi, *Free Radical Biol. Med.*, **2014**, 68, 30214.
- (41) M. Rawal, S. R. Schroeder, B. A. Wagner, C. M. Cushing, J. L. Welsh, A. M. Button, J. Du, Z. A. Sibenaller, G. R. Buettner, J. J. Cullen, *Cancer Res.*, **2013**, 73, 5232.
- (42) P. R. Gardner, D. D. H. Nguyen, C. W. White, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1996**, 325, 20.
- (43) W. Zhong, T. Yan, M. M. Webber, T. D. Oberley, *Antioxid. Redox Signal.*, **2004**, 6, 513.
- (44) J. Tian, D. M. Peehl, S. J. Knox, *Cancer Biother. Radiopharm.*, **2010**, 25, 439.

- (45) I. B.-Haberle, J. S. Reboucas, I. Spasojevic, *Antioxid. Redox Signal.*, **2010**, 13, 877.
- (46) H. Yu, J. Li, D. Wu, Z. Qiu, Y. Zhang, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 464.
- (47) C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.*, **2012**, 51, 8446.
- (48) G. B. Wijeratne, B. Corzine, V. W. Day, T. A. Jackson, *Inorg. Chem.*, **2014**, 53, 7622.
- (49) I. B.-Haberle, Z. Rajić, L. Benov, *Antioxid. Redox Signal.*, **2011**, 4, 329.
- (50) S. Hong, Y.-M. Lee, W. Shin, S. Fukuzumi, W. Nam, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 13910.

# 第四章 カルボキシアミド配位を有する鉄錯体による活性酸素種の生成および消去活性評価と細胞内酸化ストレスの軽減

## 1. 要約

配位子に置換基を導入することで、異なる電子状態を有する 4 種のカルボキシアミド配位を有する鉄錯体  $[\text{Fe}(\text{dpaq}^{\text{R}})\text{Cl}]\text{Cl}$  ( $2^{\text{R}}$ ,  $\text{R} = \text{OMe}, \text{H}, \text{Cl}$  and  $\text{NO}_2$ ) を合成した。  $2^{\text{R}}$  は、スーパーオキシドアニオンラジカル ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) を過酸化水素と酸素に不均化する反応であるスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 活性を有することを見出した。 また、  $2^{\text{R}}$  の  $\text{Fe}(\text{III})/\text{Fe}(\text{II})$  に帰属できる酸化還元電位が正に大きくなるに従い、 SOD 活性が大きくなることを見出した。 最も高い活性を示した  $2^{\text{NO}_2}$  の SOD 活性は、様々な細胞系で酸化ストレスを軽減させることが報告されているマンガンサレン錯体である EUK-134 の約 20 倍であった。 更に、  $2^{\text{R}}$  のアスコルビン酸存在下での酸素の還元活性を評価した結果、  $2^{\text{NO}_2}$  が最も活性が小さく、  $2^{\text{H}}$  が最大の活性となるベル型の相関を示すことが判明した。  $2^{\text{NO}_2}$  は、活性酸素種の一つである過酸化水素を分子状酸素から発生させる酸素還元活性が低く、 SOD 活性が高いため、最も高効率に細胞内の活性酸素濃度を低下させると期待できる。 実際、  $2^{\text{R}}$  の培養細胞内でのメナジオンによる酸化ストレスに対する細胞保護効果を検討した結果、  $2^{\text{NO}_2}$  が最も高効率に細胞内の酸化ストレスを軽減することが判明した。

---

Yutaka Hitomi\*, Yuji Iwamoto, Akihiro Kashida and Masahito Kodera

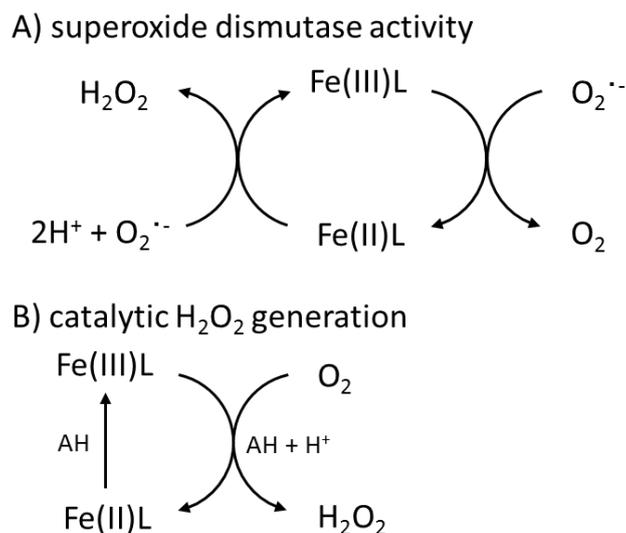
“Mononuclear Nonheme Iron(III) Complexes that Show Superoxide Dismutase-like Activity and Antioxidant Effects against Menadione-Mediated Oxidative Stress” *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 8702–8704. DOI: 10.1039/c5cc02019k

## 2. 緒言

スーパーオキシドアニオンラジカル ( $O_2^{\cdot-}$ ) は、ミトコンドリアの呼吸鎖での酸素の四電子還元過程の副生成物として生成し、炎症や虚血再灌流、癌といった様々な酸化ストレスに関与する病気に関連していると考えられている<sup>1)</sup>。スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) は、Scheme 4.1 (A)のように  $O_2^{\cdot-}$  を過酸化水素と酸素に不均化する反応を触媒する酵素であり、細胞内の酸化ストレスを軽減する重要なタンパク質である<sup>2)</sup>。したがって、SOD の欠損や SOD が除去できないほどの  $O_2^{\cdot-}$  が発生すると、パーキンソン病やアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症といった神経病に陥る危険がある<sup>3)</sup>。自然界に存在する SOD は、その中心金属に Mn や Fe, Ni, Cu-Zn といった酸化還元活性な金属イオンを選択しており、 $O_2^{\cdot-}$  との電子移動反応により中心金属の価数を変化させながら不均化反応を触媒している<sup>4)</sup>。SOD 活性は、 $O_2^{\cdot-}$  の還元 ( $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ , +891 mV vs. NHE) と酸化 ( $O_2^{\cdot-}/O_2$ , -160 mV vs. NHE) を触媒するため、中心金属の酸化還元電位が -160-891 mV の間に位置する必要がある、かつ中心金属の酸化還元電位にその活性が大きく依存する<sup>21)</sup>。

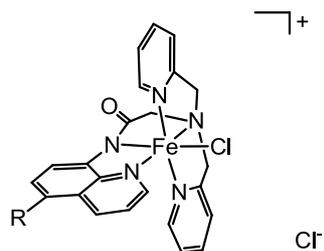
SOD 同様、 $O_2^{\cdot-}$  の不均化反応を触媒する金属錯体触媒 (SOD 模倣金属錯体) は、酸化ストレスを軽減させることから、神経系の病気や虚血再灌流に対する医薬品としての応用が期待されている。そのため、SOD と同様の反応性をもつ金属錯体の開発は、研究対象として極めて重要である。しかし、これまでに報告されている SOD 模倣金属錯体のほとんどは、ポルフィリンやサレン、環状アミン配位子<sup>5)</sup>を有する Mn を中心金属に用いた研究が多く、Fe などの他の金属イオンを使った金属錯体の報告例は少ないのが現状である<sup>6-13)</sup>。

SOD 模倣金属錯体は、細胞内の酸化ストレスを低減させることが期待されるが、酸化還元活性な金属中心を有するため、酸素を還元し、反応性の高い  $O_2^{\cdot-}$  や  $H_2O_2$  といった活性酸素種を生成することで、逆に細胞内の酸化ストレスを高めてしまう危険がある (Scheme 4.1 (B))。実際、Mn(II)錯体である UG1 がアスコルビン酸やグルタチオンといった還元剤存在下、酸素を還元し、触媒的に過酸化水素を発生させることで、高い細胞毒性を示すことを報告している<sup>24)</sup>。SOD 模倣金属錯体を細胞内の酸化ストレスを軽減する抗酸化剤に応用するためには、活性酸素種を消去する SOD 活性が高く、逆に活性酸素種を生成してしまう酸素還元活性が低い分子の設計が望まれる。



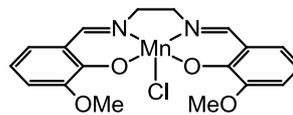
**Scheme 4.1** (A) Plausible reactions during superoxide disproportionation catalysed by  $2^R$ . (B) Proposed reaction mechanism for the generation of  $H_2O_2$  catalysed by  $2^R$ . AH denotes a reductant.

本研究室では、カルボキシアミド配位を有する鉄錯体  $[Fe(dpaq^H)(H_2O)](ClO_4)_2$  ( $dpaq^H = 2$ -[bis(pyridin-2-ylmethyl)]amino-*N*-quinolin-8-yl-acetamido)<sup>19,20</sup>)<sup>§</sup>, pH 3–9 の緩衝溶液中で安定であり、過酸化水素を酸化剤として用いた際に guaiacol を基質とした酸化反応活性を示さないことを報告している<sup>14)</sup>。この結果は、水中で酸化力の高い高原子価種を生成せず、生体内の分子を酸化してしまう危険が少ないため、生体適合性が高いことが期待できる。SOD 活性は、 $O_2^{\bullet -}$  の還元および酸化を触媒するため、SOD 模倣金属錯体の酸化還元電位に大きく依存する。また、酸素の還元活性に関しても、酸素分子への電子移動反応であるため、SOD 活性同様、金属錯体の酸化還元電位に大きく依存すると考えられる。本論文では、**Chart 4.1** に構造を示した配位子に置換基を導入することで異なる酸化還元電位を有する 4 種類の鉄錯体  $[Fe(dpaq^R)Cl]Cl$  ( $2^R$ , R = OMe, H, Cl and  $NO_2$ ) を合成し、Fe(III)/Fe(II)に対応する酸化還元電位と SOD 活性および酸素還元活性の相関について詳細に検討した。また、合成した鉄錯体  $2^R$  の培養細胞内でのメナジオン由来の  $O_2^{\bullet -}$  の消去活性についても評価した。



R = OMe, H, Cl, and NO<sub>2</sub>

[Fe<sup>III</sup>(dpaq<sup>R</sup>)Cl]Cl (**2<sup>R</sup>**)



EUK-134

**Chart 4.1** Chemical structures of **2<sup>R</sup>** and EUK-134<sup>22)</sup>.

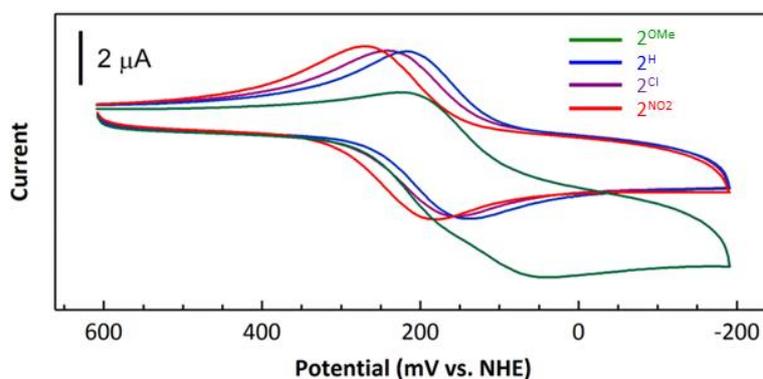
### 3. 結果と考察

#### 3-1. $2^R$ の合成

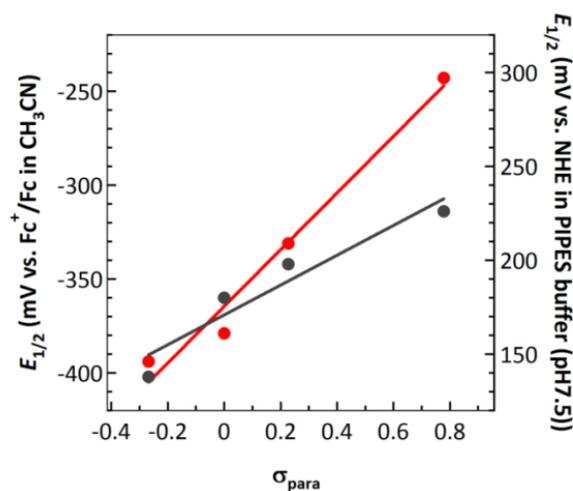
$2^R$  は、アセトニトリル中、1.1 当量のトリエチルアミン存在下、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  と  $\text{H-dpaq}^R$  を混ぜ合わせた後、室温で 12 時間させることで、水やアセトニトリルに溶解し、ヘキサンのような貧溶媒には溶解しない、黒から緑色の粉末として単離できた<sup>20)</sup>。

#### 3-2. $2^R$ の酸化還元電位

SOD 活性を有するためには、 $\text{O}_2^{\cdot-}$  の還元電位 ( $\text{O}_2^{\cdot-}/\text{H}_2\text{O}_2$ , +891 mV vs. NHE) と酸化電位 ( $\text{O}_2^{\cdot-}/\text{O}_2$ , -160 mV vs. NHE) の間に中心金属の酸化還元電位を有する必要がある、その活性は、中心金属の酸化還元電位に大きく依存することが知られている<sup>21)</sup>。  $2^R$  の PIPES 緩衝溶液 (pH 7.5, 10 mM) 中での  $\text{Fe(III)/Fe(II)}$  の酸化還元電位を測定した結果、 $E_{1/2} = 138\text{--}226$  mV vs. NHE ( $\Delta E = 76\text{--}166$  mV) (Figure 4.1) となり、 $\text{O}_2^{\cdot-}$  の還元電位と酸化電位の間の値であるため、 $2^R$  は SOD 活性を有することが示唆された。また、ハメットの置換基定数 ( $\sigma_{\text{para}}$ ) に対して  $E_{1/2}$  をプロットすると直線関係が得られ、その傾きである  $\rho$  値は、 $84 \pm 20$  となった (Figure 4.2)。アセトニトリル中で測定した酸化還元電位に対しても同様のプロットを行った結果、 $\rho$  値が 176 となり、水溶液中では有機溶媒中に比べ、 $\rho$  値が小さくなることが明らかとなった。この結果は、水中では水と配位子のカルボキシアミド部位の  $\text{C}=\text{O}$  とが水素結合を形成することで、中心金属と配位子との間の相互作用が弱くなり、配位子に導入した置換基の効果が中心金属の酸化還元電位に反映されにくくなったためであると考えられる。



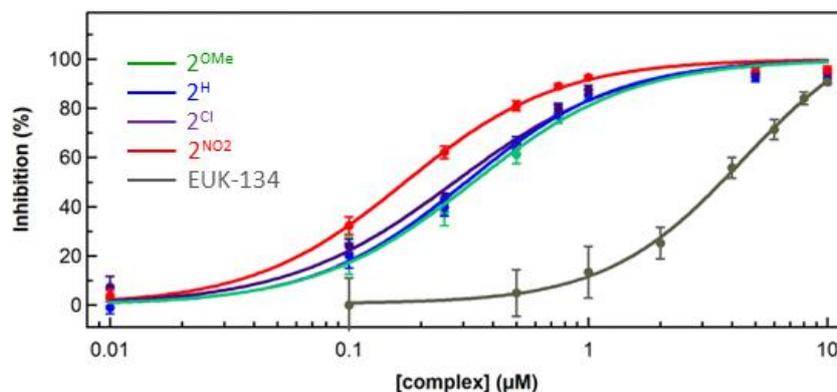
**Figure 4.1** Cyclic voltammogram of  $2^R$  ( $R = \text{OMe}, \text{H}, \text{Cl}$  and  $\text{NO}_2$ ) in deaerated PIPES buffer (10 mM, pH 7.5) containing 1 M NaCl at 25 °C; working electrode: GC, counter electrode: Pt, reference electrode:  $\text{Ag/AgCl}$  (3 M  $\text{NaCl}$  aq.), scan rate:  $20 \text{ mV s}^{-1}$ .



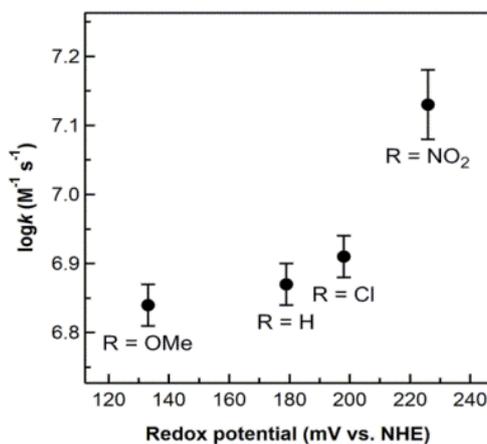
**Figure 4.2** Hammett plot of the redox potentials of  $2^R$  ( $R = \text{OMe}, \text{H}, \text{Cl}$  and  $\text{NO}_2$ ) in  $\text{CH}_3\text{CN}$  (left, red line) or PIPES buffer (10 mM, pH 7.5) (right, black line).

### 3-3. $2^R$ の SOD 活性

$2^R$  の SOD 活性を 37 °C, カタラーゼ存在下, PIPES 緩衝溶液 (pH 7.5) 中で WST-1 がキサンチン/キサンチンオキシダーゼシステムにより発生させた  $\text{O}_2^{\cdot -}$  により還元されることで生成するホルマザン色素の生成反応における阻害活性を測定することにより評価した (Figure 4.3). 対照化合物にはマンガンサレン錯体である EUK-134<sup>22)</sup>を用いた.  $2^R$  の半数阻害濃度  $\text{IC}_{50}$  値は, 0.17 から 0.33  $\mu\text{M}$  となり, EUK-134 の  $\text{IC}_{50}$  値  $3.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$  に比べ, 約 10 倍から 20 倍小さな値を示すことが明らかとなった. この結果は,  $2^R$  が EUK-134 よりも高い性能を持った SOD 模倣金属錯体であることを示している. また,  $2^R$  の SOD 活性は, Fe(III)/Fe(II)に対応する酸化還元電位がより正側になるに従い向上していることから (Figure 4.4,  $R = \text{OMe}, 0.33 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ;  $R = \text{H}, 0.31 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ;  $R = \text{Cl}, 0.28 \pm 0.02 \mu\text{M}$  and  $R = \text{NO}_2, 0.17 \pm 0.01 \mu\text{M}$ ),  $\text{O}_2^{\cdot -}$  の不均化反応における  $\text{O}_2^{\cdot -}$  から酸素への酸化過程, すなわち Fe(III)種から Fe(II)種への還元過程が律速となっていることが示唆された. また,  $2^R$  の酸化還元電位をより正側に大きくするような配位子設計をすることで, 更なる SOD 活性の向上が期待される.



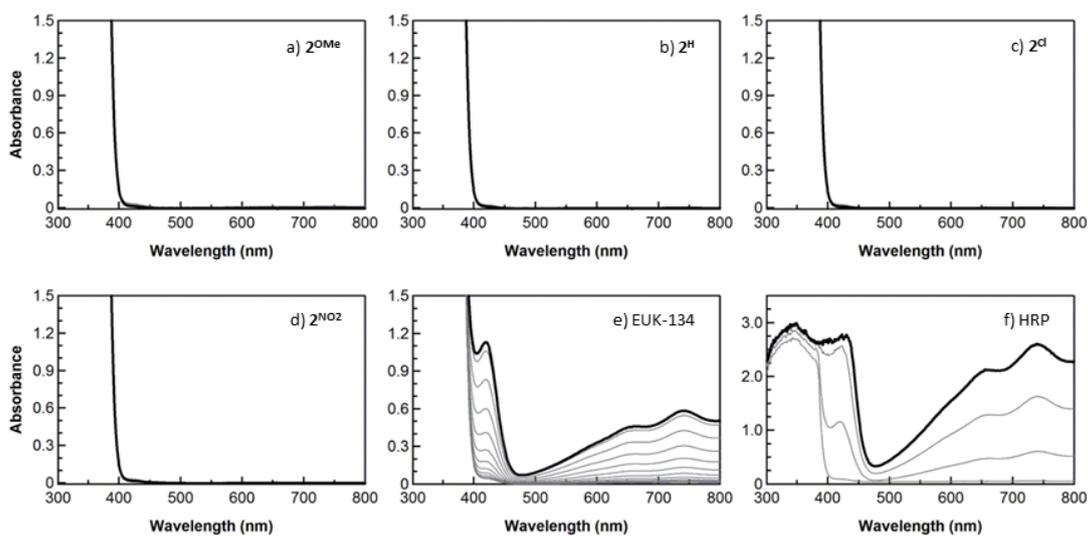
**Figure 4.3** Inhibition of the reduction of a water soluble tetrazolium salt WST-1 in the presence of xanthine/xanthine oxidase, a superoxide-generating system in the presence of varied concentration of  $2^R$  (R = OMe, H, Cl or  $\text{NO}_2$ ) or EUK-134 in PIPES buffer (pH 7.5). The data are the mean and standard deviations of quintuplicate experiments.



**Figure 4.4** Correlation between the SOD activity and the redox potential of  $2^R$ . The rate constants of the reaction between  $2^R$  and  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $k$  ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) were recalculated from  $\text{IC}_{50}$  values obtained by following the inhibition of the reduction of a water soluble tetrazolium salt WST-1 in the presence of xanthine/xanthine oxidase, a superoxide-generating system. The rate constants of the reaction between  $2^R$  and  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $k_2$  ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) were recalculated by using the following equation:  $k = k_{\text{WST-1}} \times [\text{WST-1}]/\text{IC}_{50}$ , where  $k_{\text{WST-1}}$  denotes the formation rate constant of formazan from WST-1 in the absence of  $2^R$ , and was  $4.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ . The data are the mean and standard deviations of quintuplicate experiments.

### 3-4. $2^R$ のペルオキシダーゼ活性

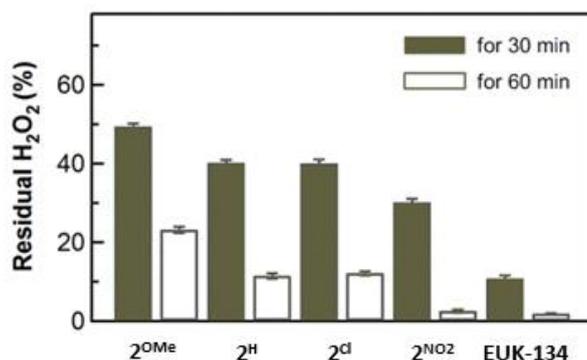
これまでに、 $2^H$  が水中で酸化剤に過酸化水素を用いた際に、2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) や guaiacol の一電子酸化反応を触媒しないことを報告している<sup>14)</sup>。ABTS は、一電子酸化を受けることで、電子吸収スペクトル測定により確認が容易な 420 nm に極大吸収を示す  $ABTS^{•+}$  を生成するため、水中でのペルオキシダーゼ活性の評価によく用いられている。再び、 $2^R$  の PIPES 緩衝溶液 (10 mM, pH 7.5) 中で過酸化水素を酸化剤に用いた際の ABTS の一電子酸化反応活性を検討した結果、 $2^R$  は過酸化水素を 0.1 mM 用いた条件下でも ABTS の一電子酸化活性を示さないことが明らかとなった (Figure 4.5, a-d)。しかし、対照化合物として用いたマンガンサレン錯体である EUK-134 による ABTS の一電子酸化反応活性を評価した結果、過酸化水素の添加に伴い、 $ABTS^{•+}$  由来の 420 nm に極大吸収をもつスペクトルの上昇が確認された (Figure 4.5, e)。この結果から、EUK-134 は、酸化剤存在下、外部基質を酸化するペルオキシダーゼ活性を有することがわかる<sup>23)</sup>。まとめると、EUK-134 は過酸化水素と反応することで高原子価オキシ種を生成し、外部基質を酸化するペルオキシダーゼ活性を示すのに対し、 $2^R$  は水中では反応性の高い高原子価オキシ種を生成しにくく、ペルオキシダーゼ活性を示さないことが示唆された。



**Figure 4.5** Electronic absorption spectral changes for the reaction of ABTS (1 mM) with  $H_2O_2$  (0.1 mM) in the presence of  $2^R$  (R = OMe (a), H (b), Cl (c) and  $NO_2$  (d)), (e) EUK-134 (1  $\mu$ M) and (f) HRP (0.5 units/mL) in PIPES buffer (10 mM, pH 7.5) at 37  $^{\circ}C$ .

### 3-5. $2^R$ のカタラーゼ活性

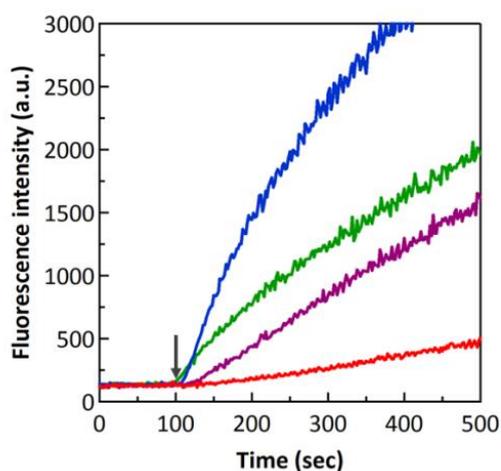
カタラーゼ活性とは、活性酸素種の一つである過酸化水素を酸素と水に不均化する反応であり、カタラーゼ活性を有する金属錯体触媒は、細胞内の過酸化水素濃度を低下させ、酸化ストレスを軽減することから抗酸化剤としての応用が期待される。 $2^R$  のカタラーゼ活性は、PIPES 緩衝溶液 (pH 7.5) 中、 $10 \mu\text{M}$  の  $2^R$  と  $100 \mu\text{M}$  の過酸化水素を一定時間反応させ、残存する過酸化水素濃度を Horseradish peroxidase (HRP) と ABTS を用いて定量することで決定された (Figure 4.6)。ここでも対照化合物には、マンガンサレン錯体である EUK-134 を用いた。測定の結果、30 分間で  $2^{\text{OMe}}$  が 51%、 $2^{\text{H}}$  が 60%、 $2^{\text{Cl}}$  が 61%、 $2^{\text{NO}_2}$  が 70% の過酸化水素を分解し、EUK-134 では、89% の過酸化水素を分解することが判明したことから、 $2^R$  および EUK-134 はカタラーゼ活性を有することが明らかとなった。また、 $2^R$  のカタラーゼ活性は、SOD 活性と同様に置換基がより電子求引的になるに従い向上することが判明した。SOD 模倣金属錯体は、生体内の分子を酸化してしまう危険があるため、ペルオキシダーゼ活性を示さないことが望まれる。 $2^R$  は、ペルオキシダーゼ活性を示さないことから、高原子価オキソ種を水中で生成しにくいと考えられるのに対し、EUK-134 と近い過酸化水素消去活性を示した。 $2^R$  による過酸化水素分解反応の詳細な反応機構は明らかにならなかったが、EUK-134 とは異なる反応機構に従い過酸化水素を分解していると考えられる。以上の結果から、 $2^R$  は SOD 活性およびカタラーゼ活性を有するが、ペルオキシダーゼ活性を示さないこれまでに報告例のないユニークな SOD 模倣金属錯体であることが明らかとなった。



**Figure 4.6** Quantification of residual  $\text{H}_2\text{O}_2$  after mixing  $2^R$  ( $R = \text{OMe}, \text{H}, \text{Cl}$  or  $\text{NO}_2$ ) or (b) EUK-134 ( $10 \mu\text{M}$ ) with  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $100 \mu\text{M}$ ) in PIPES buffer ( $10 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7.5$ ) for 30 (filled bar) or 60 min (blank bar). The reactions were started upon addition of ABTS ( $1 \text{ mM}$ ) and HRP ( $0.5 \text{ units/mL}$ ).

### 3-6. $2^R$ による酸素還元反応

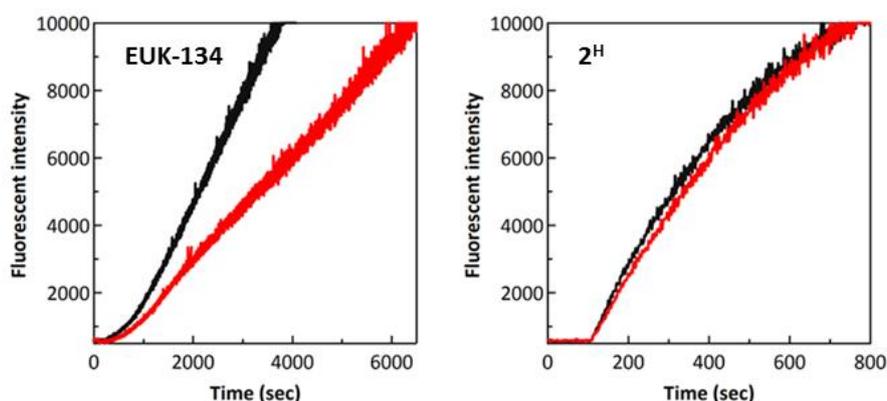
SOD 活性を示すが酸化還元活性な金属を有する SOD 模倣金属錯体は、水中で酸素を還元し、 $O_2^-$ や過酸化水素といった活性酸素種を発生させる危険がある<sup>22,23</sup>。第三章でも、SOD 活性を有する Mn(II)錯体である UG1 が、アスコルビン酸やグルタチオンといった還元剤存在下、酸素を二電子還元し、触媒的に過酸化水素を発生させることを報告している<sup>24</sup>。実際、PIPES 緩衝溶液 (20 mM, pH 7.5) 中、空気下で、還元剤であるアスコルビン酸存在下、鉄錯体  $2^R$  は酸素を還元することで過酸化水素を発生させることを過酸化水素特異的な蛍光プローブ分子である peroxyfluor-1 (PF1)<sup>25</sup>を用いて明らかにした (Figure 4.7)。更に Fe(III)/Fe(II)に対応する酸化還元電位に対する過酸化水素の発生速度は、無置換体である  $2^H$  が最大の活性となるベル型の相関を示すことが判明した。



**Figure 4.7** Fluorescence response curves of  $2.5 \mu\text{M } 2^R$  ( $R = \text{OMe}$ ; green,  $R = \text{H}$ ; blue,  $R = \text{Cl}$ ; purple,  $R = \text{NO}_2$ ; red) and  $10 \mu\text{M PF1}$  ( $5 \mu\text{M}$ ) in the presence of  $1 \text{ mM ascorbate}$  in  $20 \text{ mM PIPES buffer}$  ( $\text{pH } 7.5$ ) at  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .  $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$  for PF1.  $2^R$  was added at  $100 \text{ sec}$ .

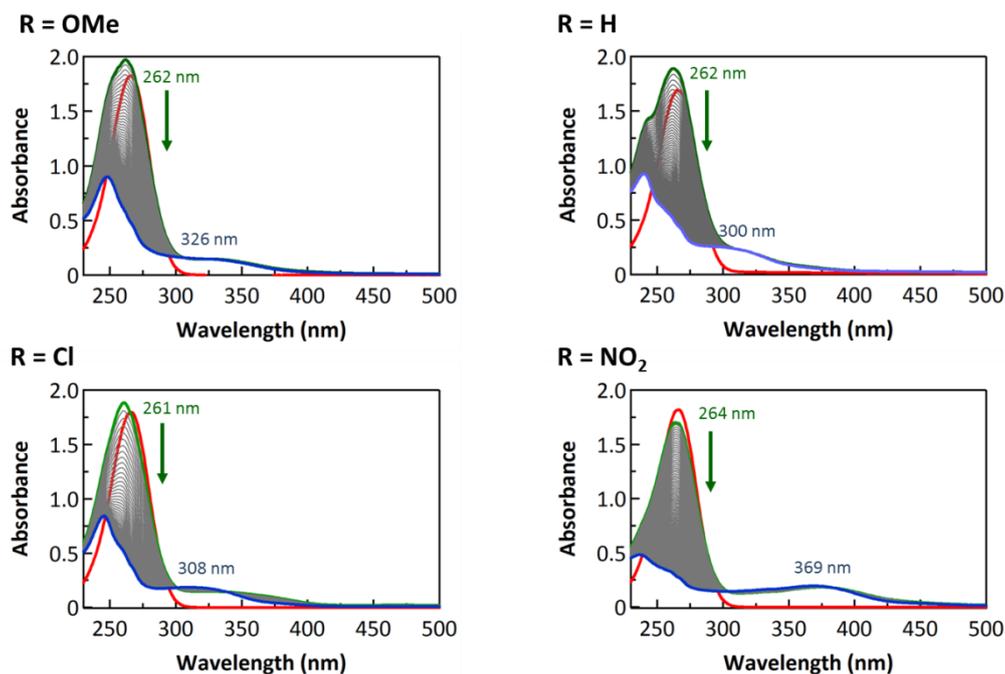
次に、酸素の一電子還元により生成する  $O_2^-$ の発生を確認することを目的に、SOD 存在下で、アスコルビン酸と鉄錯体  $2^H$  共存下での過酸化水素発生速度を測定した結果、SOD の添加による過酸化水素の発生速度に変化は見られなかった (Figure 4.8 right)。もし、 $2^H$  と酸素との反応により、酸素の一電子還元体である  $O_2^-$ が発生している場合は、生成後ただちに SOD により過酸化水素と酸素に不均化されるため、過酸化水素の発生速度が低下すると予想される。実際、EUK-134 で同様の実験を行った結果、SOD の添加により、過酸化水素の発生速度が大きく低下した (Figure 4.8 left)。この結果から、EUK-134 は、アスコルビン酸のような還元剤存在下で、酸素を一電子還元し、 $O_2^-$ を発生させていることがわかる。一方、鉄錯体  $2^H$  は、SOD の添加により過酸化水素の発生速度に変化が見られなかったため、

アスコルビン酸存在下では Mn(II)錯体である UG1 と同様に、酸素を二電子還元することで過酸化水素を選択的に発生させていることが判明した。

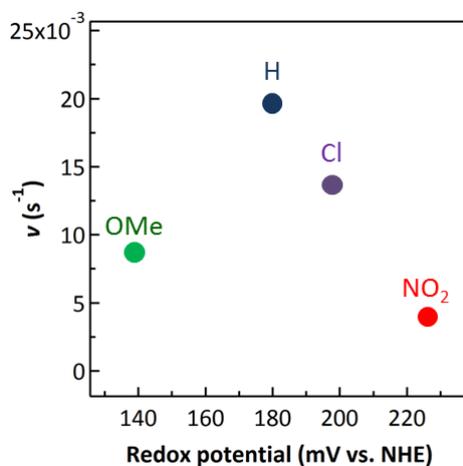


**Figure 4.8** Fluorescence response curves of 2.5  $\mu\text{M}$   $2^{\text{H}}$  (right) or EUK-134 (left), 10  $\mu\text{M}$  PF1 (5  $\mu\text{M}$ ) and 1 mM ascorbate in the absence (black) or presence of SOD (red, 100 units/mL) in 20 mM PIPES buffer (pH 7.5) at 25°C.  $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$  for PF1. SOD mimics was added at 100 sec.

次に、鉄錯体  $2^{\text{R}}$  によるアスコルビン酸の酸化反応について評価した。PIPES 緩衝溶液 (20 mM, pH 7.5) 中、空気下でアスコルビン酸水溶液に  $2^{\text{R}}$  水溶液を添加した結果、アスコルビン酸由来の 266 nm の触媒的な減衰が確認された (Figure 4.10)。また、窒素下では、アスコルビン酸由来のピークの触媒的な減衰は見られなかったことから、 $2^{\text{R}}$  により、アスコルビン酸が酸化されていることがわかる。アスコルビン酸の酸化における初速度 ( $v_0$ ) を  $2^{\text{R}}$  の Fe(III)/Fe(II) に対応する酸化還元電位に対してプロットした結果、Figure 4.7 に示す PF1 による過酸化水素の蛍光検出実験と同様に無置換体である  $2^{\text{H}}$  が最大の活性となるベル型の相関関係が得られた (Figure 4.11)。以上の結果から  $2^{\text{NO}_2}$  は、 $\text{O}_2^{\cdot -}$  の消去活性である SOD 活性が  $2^{\text{R}}$  の中で最も高く、酸素の還元活性に関しては最も低いため、培養細胞内の活性酸素濃度を最も高効率に低下させることが期待される。



**Figure 4.10** Electronic absorption spectral changes of a reaction of 100  $\mu\text{M}$  ascorbate and 25  $\mu\text{M}$   $2^{\text{R}}$  in PIPES buffer (pH 7.5, 20 mM) at 25 °C under air.



**Figure 4.11** Correlation graph of redox potential and initial rate of ascorbic oxidation by 25  $\mu\text{M}$   $2^{\text{R}}$  in PIPES buffer (20 mM, pH 7.5) at 25 °C under air.

次に、Fe(II)錯体と酸素の反応について検討した。空気下、PIPES 緩衝溶液 (20 mM, pH 7.5) 中で  $[\text{Fe}(\text{II})\text{dpaq}^{\text{H}}(\text{CH}_3\text{CN})]\text{ClO}_4$  を 12 時間攪拌した結果、電子吸収スペクトルの変化が観測できなかった (Figure 4.12)。以上の結果から、Fe(II)錯体は、類似の配位子を有する Mn(II)錯体である UG1 同様、水中では酸素と反応せず安定であるが、アスコルビン酸のような還元

剤存在下でのみ酸素を還元し、過酸化水素を発生させることが判明した。得られた結果から、鉄錯体  $2^R$  は、Scheme 4.2 のように Mn(II)錯体である UG1 同様、Fe(II)種の酸素付加体が還元剤から水素原子を引き抜くことで生成する Fe(III)OOH 種を経由することで、触媒的に酸素を二電子還元し、過酸化水素を発生させていると考えられる。

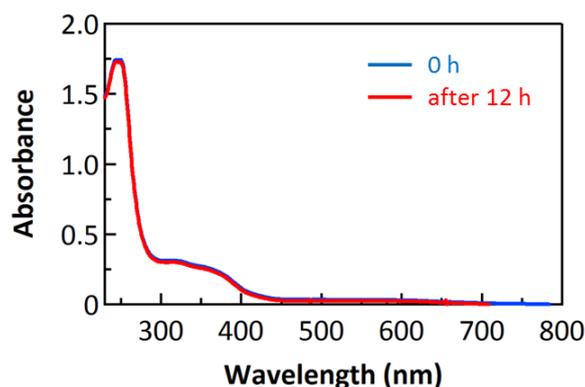
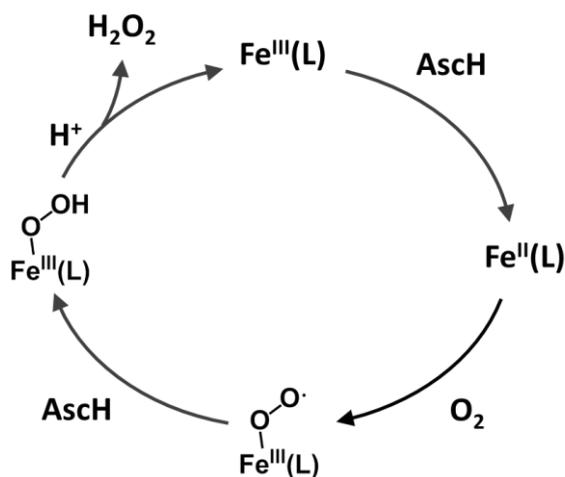


Figure 4.12 Stability of  $2^H$  in 20 mM PIPES buffer (pH 7.5) at 25 °C under air.

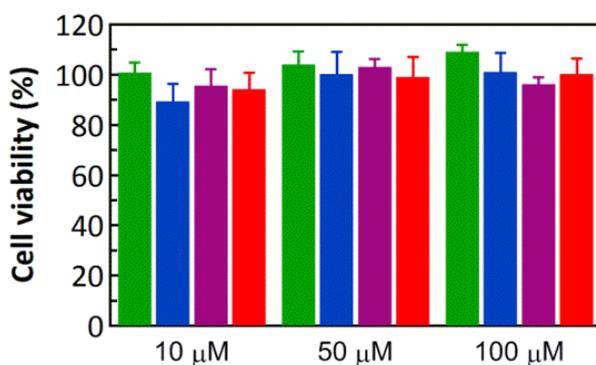


Scheme 4.2 Proposed mechanism of dioxygen activation reaction by  $2^R$ .

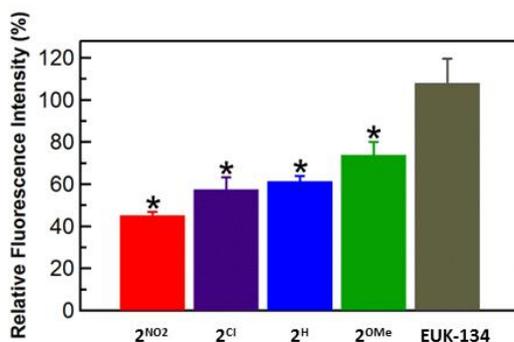
### 3-7. $2^R$ による培養細胞内でのメナジオンにより発生させた $O_2^{\cdot-}$ の消去活性

これまでの結果より、鉄錯体  $2^R$  は EUK-134 よりも高い SOD 活性をもち、その中でも強い電子求引基であるニトロ基を導入した  $2^{NO_2}$  が最も高い SOD 活性を有することを示した。次に、 $2^R$  が細胞内でもキュベット内と同様に  $O_2^{\cdot-}$  を消去することが可能か検討した。予め  $2^R$  の細胞毒性を MTT アッセイ法により測定した結果、100  $\mu$ M までの濃度では細胞毒性がほとんど観測されなかった (Figure 4.13)。培養細胞内の  $O_2^{\cdot-}$  は、メナジオンの添加により

発生させた。細胞内の  $O_2^{\cdot-}$  濃度の測定は、 $O_2^{\cdot-}$  特異的に反応することで蛍光を発する分子である hydroethidine ( $HE^{18}$ ) を用いて行った。Figure 4.14 にその測定結果を示す。EUK-134 は、錯体を添加していないコントロール実験に比べ、HeLa 細胞内のメナジオン由来の  $O_2^{\cdot-}$  濃度に対してほとんど影響を与えないのに対し、 $2^R$  は HeLa 細胞内の  $O_2^{\cdot-}$  濃度を低下させることが明らかとなった。キュベット内で得られた結果と同様に、培養細胞内でも  $2^{NO_2}$  が最も高効率に細胞内の  $O_2^{\cdot-}$  濃度を低下させ、その順序は  $2^{NO_2} > 2^{Cl} > 2^H > 2^{OMe}$  となった。



**Figure 4.13** Cytotoxicity of  $2^R$  (R = OMe (green), H (blue), Cl (purple) and  $NO_2$  (red)) for HeLa cells.



**Figure 4.14** Fluorescence intensity of ethidium cation formed inside cells incubated with varied concentrations of  $2^{NO_2}$  (red),  $2^{Cl}$  (purple),  $2^H$  (blue),  $2^{OMe}$  (green) or EUK-134 (black), together with 10  $\mu$ M 2-hydroethidium. The data are the mean and standard deviations of quintuplicate experiments. \* $P < 0.005$  compared with the control.

#### 4. 結論

カルボキシアミド配位を有する水溶性非ヘム単核鉄錯体[Fe(dpaq<sup>R</sup>)Cl]Cl (**2<sup>R</sup>**, R = OMe, H, Cl and NO<sub>2</sub>)を合成し, そのSOD活性やペルオキシダーゼ活性, カタラーゼ活性, 酸素還元活性について評価した. その結果, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>の過酸化水素と酸素への不均化反応を触媒する活性であるSOD活性がマンガンサレン錯体であるEUK-134と比較すると10から20倍高く, その活性は, **2<sup>R</sup>**のFe(III)/Fe(II)に対応する酸化還元電位が正側に大きくなるに従い向上する傾向が見られた. 過酸化水素を水と酸素に不均化する反応であるカタラーゼ活性に関してもSOD活性同様, **2<sup>R</sup>**のFe(III)/Fe(II)に対応する酸化還元電位が正側に大きくなるに従い向上した. しかし, EUK-134は酸化剤を利用し, 外部基質を酸化する活性であるペルオキシダーゼ活性を示すのに対し, **2<sup>R</sup>**は過酸化水素を用いた際にペルオキシダーゼ活性を示さないことが判明した. また, 過酸化水素を発生させる酸素の還元活性についても評価した結果, 無置換体である**2<sup>H</sup>**が最大の活性となるベル型の相関をとることが判明した. 以上の結果から, 酸化還元電位が正側に大きいニトロ置換体**2<sup>NO2</sup>**が最も高効率に細胞内の活性酸素濃度を低下させると期待された. 実際に, 培養細胞内でのO<sub>2</sub><sup>•-</sup>消去活性を評価した結果, **2<sup>R</sup>**はEUK-134よりも高いO<sub>2</sub><sup>•-</sup>消去活性が示し, キュベット内で得られた結果同様, **2<sup>NO2</sup>**が最も高効率にO<sub>2</sub><sup>•-</sup>濃度を低下させることが判明した. 以上の結果から**2<sup>NO2</sup>**は, 酸化ストレスの関与する病気の治療薬としての応用が期待できる. 今後は, 虚血再灌流のモデル系やマウス等を用いた実験に展開していきたい.

## 5. 実験方法

### 5-1. 測定機器

EUK-134 の合成は、文献に従い行った<sup>22)</sup>。赤外吸収スペクトルは島津社製 IRAffinity-1 spectrometer に MIRacle 10 single reflection を装着し、ATR 法により測定した。電子吸収スペクトル測定には、Agilent 社製 8543UV-visible spectrometer を用いた。<sup>1</sup>H-NMR および <sup>13</sup>C NMR スペクトル測定には、日本電子社製 JMN-A 500 を用いた。蛍光スペクトル測定には、Hitachi F-7000 spectrophotometer を用いた。ESI-MS 測定には、JEOL 社製 JMS-T100CS spectrometer を用いた。元素分析は Perkin-Elmer 社製 Elemental Analyzer (2400 Series II) を用いた。蛍光顕微鏡画像は、Olympus IX81 fluorescence microscope を用いて撮影した。

### 5-2. 2<sup>R</sup> の合成

室温、空気下でトリエチルアミン (109  $\mu$ L, 0.78 mmol) 存在下、配位子 H-dpaq<sup>R</sup> (0.78 mmol) のアセトニトリル溶液 (5 mL) を FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (127 mg, 0.78 mmol) のアセトニトリル (2 mL) 溶液へ添加し、12 時間攪拌すると、沈殿が生じた。その沈殿をろ取り、ジエチルエーテル (2 mL) を用いて 3 度洗浄後、真空乾燥することで目的の固体を単離した。

#### 5-2-1. [Fe(dpaq<sup>H</sup>)Cl]Cl (2<sup>H</sup>) の同定

ジクロロメタン/ヘキサンの液-液拡散法により、再結晶を行った結果、緑色の結晶が得られた。(収率: 61%) Anal. Calcd for [Fe(dpaq<sup>H</sup>)Cl]Cl(H<sub>2</sub>O)<sub>2.5</sub>(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)<sub>0.25</sub>: C, 48.53; H, 4.47; N, 12.17. Found: C, 48.34; H, 4.93; N, 11.77. Selected IR frequencies (cm<sup>-1</sup>, FT-ATR): 1633 (C=O). Electronic absorption spectrum in H<sub>2</sub>O (pH 7.5) (nm (M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)): 349 (5300), 570 (580). ESI-MS, positive mode: *m/z* 469.2 {[Fe(dpaq<sup>H</sup>)(OMe)]<sup>+</sup>}, 473.2 {[Fe(dpaq<sup>H</sup>)Cl]<sup>+</sup>}.

#### 5-2-2. [Fe(dpaq<sup>OMe</sup>)Cl]Cl (2<sup>OMe</sup>) の同定

ジクロロメタン/ヘキサンの液-液拡散法により、再結晶を行った結果、褐色の結晶が得られた。(収率: 78%) Anal. Calcd for [Fe(dpaq<sup>OMe</sup>)Cl]Cl(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)<sub>1.5</sub>: C, 42.50 ;H, 4.34; N, 9.72. Found: C, 42.74; H, 4.61; N, 9.40. Selected IR frequencies (cm<sup>-1</sup>, FT-ATR): 1603 (C=O). Electronic absorption spectrum in H<sub>2</sub>O (pH 7.5) (nm (M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)): 375 (4000), 656 (490). ESI-MS, positive mode: *m/z* 499.2 {[Fe(dpaq<sup>OMe</sup>)(OMe)]<sup>+</sup>}, 503.2 {[Fe(dpaq<sup>OMe</sup>)Cl]<sup>+</sup>}.

### 5-2-3. [Fe(dpaq<sup>Cl</sup>)Cl]Cl (2<sup>Cl</sup>)の同定

ジクロロメタン/ヘキサンの液-液拡散法により、再結晶を行った結果、濃緑色の結晶が得られた。(収率: 78%) Anal. Calcd for [Fe(dpaq<sup>Cl</sup>)Cl]Cl(H<sub>2</sub>O)(EtOH)<sub>2</sub>: C, 49.60; H, 5.09; N, 10.71. Found: C, 49.19; H, 5.53; N, 11.09. Selected IR frequencies (cm<sup>-1</sup>, FT-ATR): 1644 (C=O). Electronic absorption spectrum in H<sub>2</sub>O (pH 7.5) (nm (M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)): 367 (5600), 590 (580). ESI-MS, positive mode: *m/z* 503.2 {[Fe(dpaq<sup>Cl</sup>)(OMe)]<sup>+</sup>}, 507.2 {[Fe(dpaq<sup>Cl</sup>)Cl]<sup>+</sup>}.

### 5-2-4. [Fe(dpaq<sup>NO2</sup>)Cl]Cl (2<sup>NO2</sup>)の同定

ジクロロメタン/ヘキサンの液-液拡散法により、再結晶を行った結果、褐色の結晶が得られた。(収率: 84%) Anal. Calcd for [Fe(dpaq<sup>NO2</sup>)Cl]Cl(H<sub>2</sub>O): C, 48.28; H, 3.70; N, 14.69. Found: C, 48.42; H, 3.89; N, 14.34. Selected IR frequencies (cm<sup>-1</sup>, FT-ATR): 1650 (C=O). Electronic absorption spectrum in H<sub>2</sub>O (pH 7.5) (nm (M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)): 385 (10000), 580 (520). ESI-MS, positive mode: *m/z* 514.3 {[Fe(dpaq<sup>NO2</sup>)(OMe)]<sup>+</sup>}, 518.2 {[Fe(dpaq<sup>NO2</sup>)Cl]<sup>+</sup>}.

### 5-3. 酸化還元電位の測定

PIPES 緩衝液中での 2<sup>R</sup> の Fe(III)/Fe(II)の酸化還元電位は、BAS CV-50W のサイクリックボルタメトリー法により決定された。具体的には、電解質に 1M NaCl を含む、窒素バブリングにより脱気した PIPES 緩衝溶液 (pH 7.5, 10 mM) の 0.5 mM 2<sup>R</sup> 溶液を用いて行った。作用電極にはグラッシーカーボン電極、参照電極には Ag/AgCl (3 M NaCl)、対極には白金ワイヤー電極を用いて行った。アセトニトリル中での 2<sup>R</sup> の Fe(III)/Fe(II)の酸化還元電位は、BAS CV-50W のサイクリックボルタメトリーにより決定された。具体的には、電解質に 0.1 M tetrabutylammonium perchlorate (TBAP) を含む、窒素バブリングにより脱気したアセトニトリルの 1 mM 2<sup>R</sup> 溶液を用いて行った。作用電極にはグラッシーカーボン電極、参照電極には Ag/AgCl、対極には白金ワイヤー電極を用いて行った。酸化還元電位測定後には、Fc<sup>+</sup>/Fc の酸化還元電位を測定することにより、vs. Fc<sup>+</sup>/Fc にて *E*<sub>1/2</sub> 値を決定した。

### 5-4. SOD 活性測定

2<sup>R</sup> および EUK-134 の SOD 活性は、50 mM PIPES 緩衝溶液 (pH 7.5) 中、37°C で WST-1 法 (WST-1: a water soluble tetrazolium salt, 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) により測定した。反応は 96 well プレート中で行い、O<sub>2</sub><sup>-</sup> はキサンチンとキサンチンオキシダーゼの反応により発生させた。また、発生する過酸化水素は系中にカタラーゼを添加することで消去した。具体的には、96 well プレートに錯

体 (0.01-10  $\mu\text{M}$ ), キサンチン (50  $\mu\text{M}$ ), カタラーゼ (7.4 units/mL), WST-1 (50  $\mu\text{M}$ ) を全量で 300  $\mu\text{L}$  となるように添加し, 37°C で 10 分間インキュベートした. その後, キサンチンオキシダーゼ (56 units/mL) を添加し, WST-1 の還元体由来の 450 nm の吸光度を測定することで評価した. 半数阻害濃度である  $\text{IC}_{50}$  値は, WST-1 の還元反応における阻害率が 50% となる濃度を Hill's plot 解析を行うことで算出した.

#### 5-5. ペルオキシダーゼ活性測定

$2^{\text{R}}$  および EUK-134 のペルオキシダーゼ活性は,  $\text{H}_2\text{O}_2$  を酸化剤に用いた際の ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) の一電子酸化活性を電子吸収スペクトル変化を追跡することで決定された. 反応は, 37°C, PIPES 緩衝溶液 (10 mM, pH 7.5) 中, ABTS (5 mM),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100 $\mu\text{M}$ ),  $2^{\text{R}}$  あるいは EUK-134 (1  $\mu\text{M}$ ) を混合することで行われた.

#### 5-6. カタラーゼ活性測定

測定は, 96 well プレートを用いて行った.  $2^{\text{R}}$  および EUK-134 (10  $\mu\text{M}$ ) の PIPES 緩衝溶液 (pH 7.5, 10 mM) に過酸化水素 (100  $\mu\text{M}$ ) を添加し, 37°C で 30 分および 60 分間反応させた. その後, ABTS (1 mM) と HRP (0.5 units/mL) の混合溶液を添加し, 溶存過酸化水素濃度を測定した.

#### 5-7. PF1 を用いた過酸化水素の検出

空気下, 25°C の 1 mM の還元剤 (アスコルビン酸あるいはグルタチオン), 10  $\mu\text{M}$  の PF1 を含有する PBS 緩衝溶液 (pH 7.5) 中に UG1 が 0.025 mM となるように添加し, 蛍光スペクトル変化を追跡した ( $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ).

#### 5-8. アスコルビン酸の酸化反応

25°C, 空気下, 20 mM PIPES 緩衝溶液 (pH 7.5) 中, 0.1 mM アスコルビン酸溶液に 25  $\mu\text{M}$  の  $2^{\text{R}}$  水溶液を添加し, 電子吸収スペクトルを用いて, アスコルビン酸由来の 266 nm の吸収を追跡することで, アスコルビン酸の酸化活性を評価した.

#### 5-9. 細胞毒性評価

$1 \times 10^5$  cells/mL の HeLa 細胞を 96 well プレートに添加し, 24 時間インキュベートした. その後, DMEM ((-) 血清) で 3 度洗浄し,  $2^{\text{R}}$  および EUK-134 の DMEM 溶液 ((-) 血清) を

10-100  $\mu\text{M}$  となるように添加し, 3 時間インキュベーションした. その後, DMEM ((+)血清) で 3 度洗い, 24 時間後に MTT アッセイ法を用いて細胞生存率を評価した.

#### 5-10. Hydroethidine (HE)を用いた培養細胞内の $\text{O}_2^{\cdot-}$ 濃度の測定

$1 \times 10^5$  cells/mL の細胞を 96 well (black) プレートに添加し, 24 時間インキュベートした. その後, DMEM (-血清) で 3 度洗い,  $2^R$  および EUK-134 溶液 (in DMEM (-血清)) を 10-100  $\mu\text{M}$  となるように添加し, 3 時間インキュベートした. その後, DMEM (-血清) で 3 度洗い, hydroethidine 溶液を 10  $\mu\text{M}$  となるように添加し, 1 時間インキュベートした. 1 時間後, DMEM(-血清)で 3 度洗い 24 時間インキュベートした. 24 時間後, plate reader にて ethidium 由来の蛍光強度を測定した. ( $\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 625 \text{ nm}$ )

## 6. 参考文献

- (1) L. A. P.-Huy, H. He, C. P.-Huy, *Int. J. Biomed. Sci.*, **2008**, 4, 89.
- (2) J. M. McCord, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **1969**, 244, 6049.
- (3) L. Stefanis, R. E. Burke, L. A. Greene, *Curr. Opin. Neurol.*, **1997**, 10, 299.
- (4) D. P. Riley, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2573.
- (5) S. Miriyala, I. Spasojevic, A. Tovmasyan, D. Salvemini, Z. Vujaskovic, D. St Clair, I. B.-Haberle, *Biochim. Biophys. Acta.*, **2012**, 1822, 794.
- (6) G. F. Liu, M. Filipović, F. W. Heinemann, I. I.-Burmazović, *Inorg. Chem.*, **2007**, 46, 8825.
- (7) T. Hirano, M. Hirobe, K. Kobayashi, A. Odani, O. Yamauchi, M. Ohsawa, Y. Satow, T. Nagano, *Chem. Pharm. Bull.*, **2000**, 48, 223.
- (8) M. Tamura, Y. Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi, M. Hirobe, T. Nagano, *Chem. Pharm. Bull.*, **2000**, 48, 1514.
- (9) D. Zhang, D. H. Busch, P. L. Lennon, R. H. Weiss, W. L. Neumann, D. P. Riley, *Inorg. Chem.*, **1998**, 37, 956.
- (10) A. Horn Jr, G. L. Parrilha, K. V. Melo, C. Fernandes, M. Horner, L. D. C. Visentin, J. A. S. Santos, M. S. Santos, E. C. A. Eleutherio, M. D. Pereira, *Inorg. Chem.*, **2010**, 49, 1274.
- (11) B. Kripli, G. Baráth, É. B.-Hergovich, M. Giorgi, A. J. Simaan, L. Párkányi, J. S. Pap, J. Kaizer, G. Speier, *Inorg. Chem. Commun.*, **2011**, 14, 205.
- (12) J. S. Pap, B. Kripli, T. Váradi, M. Giorgi, J. Kaizer, G. Speier, *J. Inorg. Biochem.*, **2011**, 105, 911.
- (13) J. S. Pap, B. Kripli, I. Bors, D. Bogáth, M. Giorgi, J. Kaizer, G. Speier, *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, 117, 60.
- (14) Y. Hitomi, K. Hiramatsu, K. Arakawa, T. Takeyasu, M. Hata, M. Kodera, *Dalton Trans.*, **2013**, 42, 12878.
- (15) J. M. Rowland, M. Olmstead, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.*, **2001**, 40, 2810.
- (16) Y. Zang, J. Kim, Y. Dong, E. C. Wilkinson, E. H. Appelman, L. Jr. Que, *Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 4197.
- (17) T. Kojima, R. A. Leising, S. Yan, L. Jr. Que, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 11328.
- (18) J. Zielonka, J. V.-Vivar, B. Kalyanaraman., *Nat. Protoc.*, **2008**, 3, 8.
- (19) Y. Hitomi, K. Arakawa, T. Funabiki, M. Kodera, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2012**, 124, 3504.
- (20) Y. Hitomi, K. Arakawa, M. Kodera, *Chem. Eur. J.*, **2013**, 19, 14697.
- (21) I. B.-Haberle, J. S. Reboucas, I. Spasojevic, *Antioxid. Redox Signal.*, **2010**, 13, 877.
- (22) P. Gianello, A. Saliez, X. Bufkens, R. Pettinger, D. Misseleyn, S. Hori, B. Malfroy, *Transplantation*, **1996**, 62, 1664.
- (23) S. R. Doctrow, K. Huffman, C. B. Marcus, G. Tocco, E. Malfroy, C. A. Adinolfi, H. Kruk,

- K. Baker, N. Lazarowych, J. Mascarenhas, B. Malfroy, *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 4549.
- (24) Y. Iwamoto, M. Kodera, Y. Hitomi, *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 9539.
- (25) M. C. Y. Chang, A. Pralle, E. Y. Isacoff, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 15392.

# 第五章 ウシ血清アルブミンとコバルトポルフィリン錯体により形成された会合体による光水素発生触媒活性

## 1. 要約

牛血清アルブミン (BSA) とアニオン性の水溶性コバルトポルフィリン錯体 (tetrakis(4-sulfophenyl)porphyrin, CoTSPP) を水中で混ぜ合わせた結果, CoTSPP 錯体では報告例のない J 会合体の形成を示唆する電子吸収スペクトルの変化が観測された. また, pH 4.5 の酢酸緩衝溶液中で, BSA と CoTSPP を反応させると, BSA と CoTSPP を含有する  $106 \pm 23$  nm の粒子を形成することが判明した. アルゴン下, pH 3.0–7.0 の緩衝溶液中で光増感剤である ruthenium trisbipyridine ( $\text{Ru}(\text{bipy})_3$ ) と還元剤であるアスコルビン酸 (AscH) 存在下, BSA と CoTSPP により形成された会合体の可視光照射による光水素発生触媒活性を評価した結果, BSA 非存在下に比べ, 触媒回転数 (TON) が 1.1–1.7 倍, 触媒回転頻度 (TOF) が 1.2–1.5 倍に向上することを見出した.

---

Yuji Iwamoto, Masahito Kodera and Yutaka Hitomi\*

“Photocatalytic Hydrogen Production of Composite Particles Comprising Bovin Serum Albumin, Cobalt Tetrakis(4-sulfophenyl)porphyrin and Ruthenium Trisbipyridine in Water”

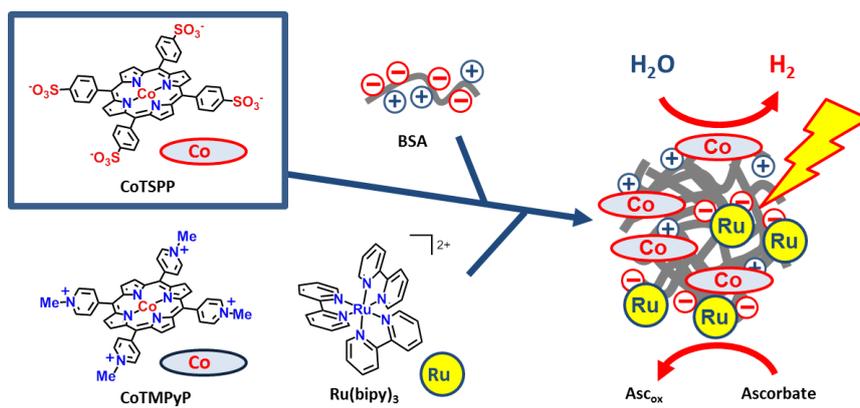
To be submitted

## 2. 緒言

水素ガスは、燃焼時に二酸化炭素の排出を伴わず、水のみを排出するため、石油などの化石燃料に代わるエネルギー資源として期待されている<sup>1</sup>。しかし、現状、水素ガスの製造には、化石燃料や原子力エネルギーを消費するため、製造過程も含めた真にクリーンなエネルギー変換システムの構築が必要である。近年、大きな注目を集めているのが太陽光すなわち光エネルギーを利用して、水から水素を発生させることで化学エネルギーとして貯蔵する変換システムの構築である。

光エネルギーを利用し、水から水素を発生させる触媒（光水素発生触媒）に関する研究は、多くの研究者によりなされている<sup>2,3</sup>。その先駆的な研究として、Sutin<sup>4</sup>やLehn<sup>5</sup>らのグループによる大環状コバルト錯体であるコバロキシムを用いた光水素発生触媒に関する研究があげられる<sup>6-12</sup>。また、光水素発生触媒の活性を向上させることを目的とした研究も精力的に行われている。例えば、金属錯体の配位子に置換基を導入し、電子状態を調節することで活性の向上を目指した研究があげられる。Changらのグループは、 $[(R-PY5Me_2)Co(H_2O)](CF_3SO_3)_2$  ( $R = CF_3, H, \text{ or } NMe_2$ ;  $PY5Me_2 = 2,6\text{-bis}(1,1\text{-di}(\text{pyridin-2-yl})\text{ ethyl})\text{pyridine}$ )を合成し、それぞれの水素発生反応活性を評価した結果、置換基がより電子求引的になるに従い活性が向上し、トリフルオロメチル基を導入した $[(CF_3-PY5Me_2)Co(H_2O)](CF_3SO_3)_2$ が最も高い活性を示すことを明らかにしている<sup>13</sup>。また、活性を向上させるための手法として、リン酸基やカルボキシ基を有する金属錯体触媒を $TiO_2$ のような半導体の表面に導入する手法や金属錯体触媒と光増感剤とを共有結合で連結させた水素発生触媒も報告されている。Sakaiらのグループからは、水素発生触媒活性を有するPt錯体と光増感剤である $Ru(bipy)_2(phen)^{2+}$ 錯体を連結させることで、二分子系に比べ、活性が向上することが報告されている<sup>14</sup>。しかし、Pt錯体とRu錯体との距離が異なるスペーサーに変更したものでは、活性が大きく低下あるいは活性を示さなくなることを見出している<sup>15,16,17</sup>。この結果は、金属錯体触媒と光増感剤の距離が光水素発生触媒活性に大きく依存していることを示している。

本論文では、近年、水素発生触媒活性を示すことがNatali<sup>18</sup>やHung<sup>19</sup>らのグループにより報告されているコバルトポルフィリン錯体のウシ血清アルブミン（bovine serum albumin, BSA）存在下での光水素発生触媒活性を評価した。アニオン性の水溶性コバルトポルフィリン錯体cobalt tetrakis(4-sulfophenyl)porphyrin (CoTSPP) は、BSA存在下では、BSA表面上でJ型の会合体が形成することが示唆され、犠牲還元剤にアスコルビン酸、光増感剤にruthenium trisbipyridine ( $Ru(bipy)_3$ )を用いた光水素発生系の系にて、CoTSPPと $Ru(bipy)_3$ による二分子系と比べ、pH 3-7の緩衝溶液中での触媒回転数(TON)および触媒回転頻度(TOF)が向上することを見出した。

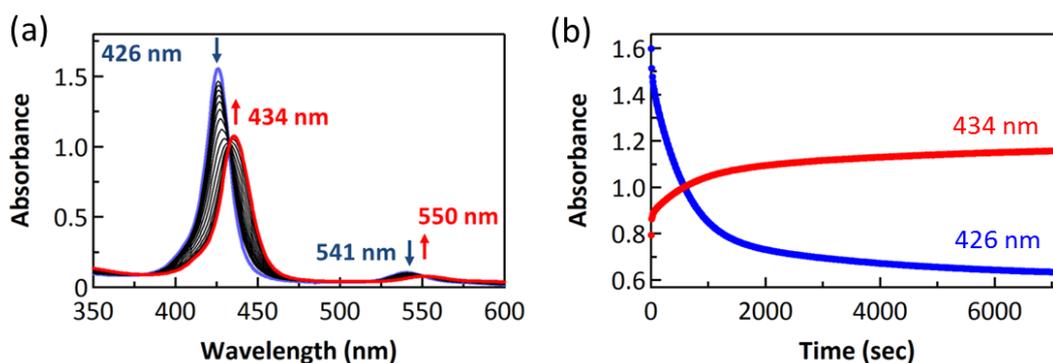


**Chart 5.1** Schematic drawing of photocatalytic hydrogen production by composite particles comprising photosensitizers and hydrogen evolving catalysts in water.

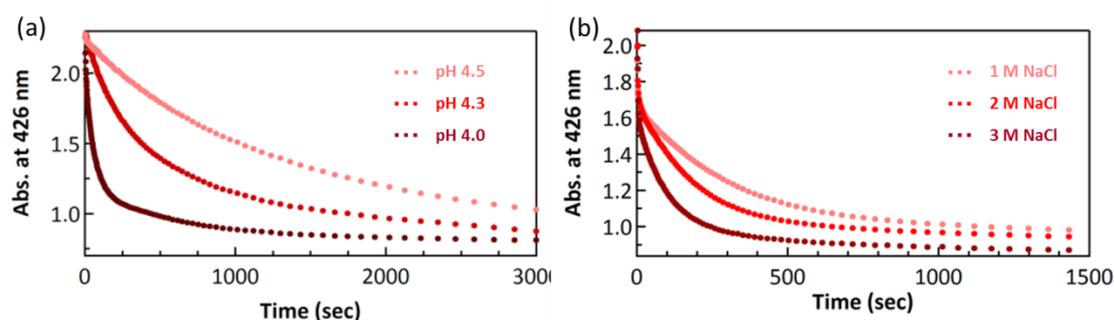
### 3. 結果と考察

#### 3-1. CoTSPP と BSA の緩衝溶液中での相互作用

初めに、BSA と CoTSPP の相互作用を電子吸収スペクトルを用いて検討した。pH 7.0 の 1 M リン酸緩衝溶液中にて、CoTSPP 水溶液に 0.1 当量の BSA を添加した結果、約一時間で CoTSPP 由来の 426 nm の Soret 帯が 434 nm へ、541 nm の Q 帯が 550 nm へとレッドシフトした (Figure 5.1)。観測されたレッドシフトは、BSA の表面で CoTSPP が J 型の会合体を形成したことに由来していると考えられる<sup>20)</sup>。このような金属 TSPP 錯体の J 型の会合体形成はこれまでに報告例がない。また、緩衝溶液の pH が酸性になるに従い、会合体の形成速度が加速することが判明した (Figure 5.2 (a))。これは、緩衝溶液が酸性になるに従い、BSA 表面がよりカチオニックになるため、アニオン性のコバルトポルフィリン錯体である CoTSPP との静電的な相互作用が向上したためであると考えられる。また、BSA と CoTSPP の J 会合体形成速度の NaCl 濃度依存性を評価した結果、NaCl 濃度を 1–3 M まで変化させると、会合体形成速度が向上することが判明した (Figure 5.2 (b))。NaCl 濃度が高くなるに従い、BSA と CoTSPP の静電的な相互作用が弱まり、疎水的な相互作用が強くなると考えられるため、BSA と CoTSPP は静電的な相互作用だけでなく、疎水的な相互作用も働いていることがわかる。

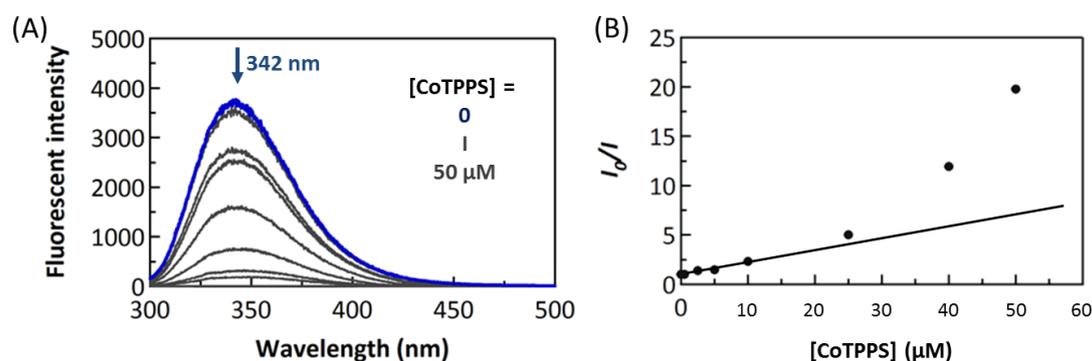


**Figure 5.1** Electronic absorption spectral change of CoTSPP (10 μM) in a solution (1 M phosphate buffer, pH 7.0) upon addition of BSA (1 μM). (b) Time-course changes in absorbance at 426 and 434 nm.



**Figure 5.2** Time-course changes in absorbance at 426 nm in solutions of CoTSPP (10  $\mu\text{M}$ ) upon addition of BSA (1  $\mu\text{M}$ ) at varied pH (a) and NaCl concentration (b).

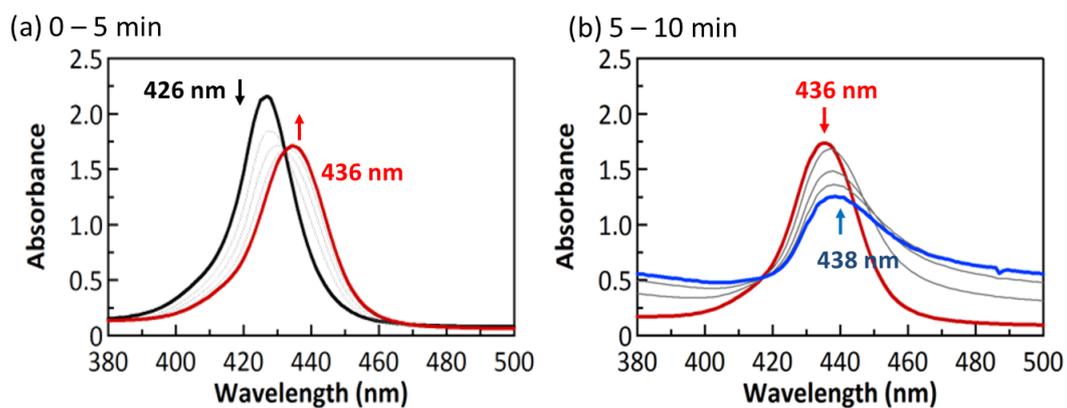
次に、緩衝溶液中での相互作用をより詳細に検討するため、BSAに含まれるトリプトファン残基由来の発光に対する 0–50  $\mu\text{M}$  の CoTSPP の添加による消光実験を行った (Figure 5.3). CoTSPP の添加濃度に対する  $I_0/I$  値をプロットした Stern-Volmer plot を作成した結果、直線が得られないことが判明した (Figure 5.3 (b)). この結果から、BSA と CoTSPP は、水溶液中で動的な消光だけでなく、静的な消光も起こっていることがわかり、緩衝溶液中で、BSA と CoTSPP が会合体を形成していることがわかる。



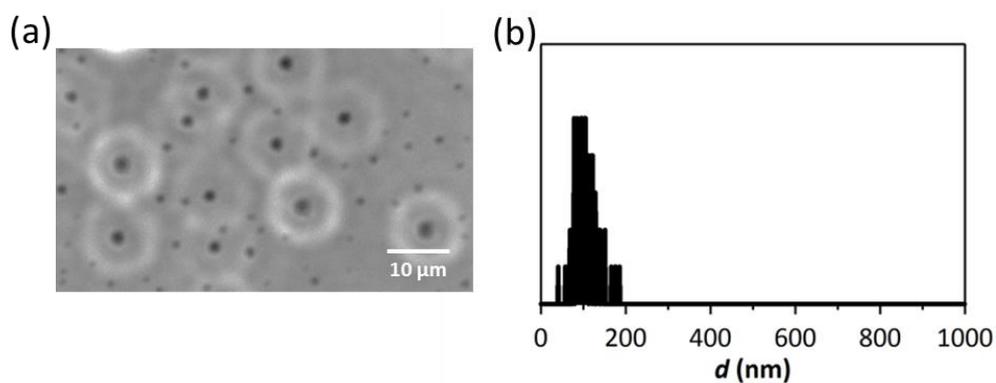
**Figure 5.3** (a) Photoluminescence spectra (excitation at 296 nm) of solution containing 5  $\mu\text{M}$  BSA in 1 M phosphate buffer at pH 7 after addition of different aliquots of CoTSPP (0–50  $\mu\text{M}$ ); (b) Stern-Volmer plot of quenching by CoTSPP.

次に、BSA の等電点である 4.9 よりも酸性側である pH 4.5 の酢酸緩衝溶液中で BSA と CoTSPP の反応を追跡した結果、CoTSPP に対し 0.1 当量の BSA を添加すると約 5 分間で Soret 帯が 426 nm から 436 nm へとレッドシフトした (Figure 5.4 (a)). しかし、さらに攪拌を続けると、ベースラインの上昇し、溶液の濁りが観測された (Figure 5.4 (b)). 濁った溶液を顕微鏡観察してみると、粒子の形成が確認され、動的散乱法 (DLS) にてその直径は、 $106 \pm 23$  nm であることが決定された (Figure 5.5). また、濁った溶液を遠心分離し、上澄みを取り除く操作を 3 度行った後、凍結乾燥することで褐色の粉末を単離することに成功した。

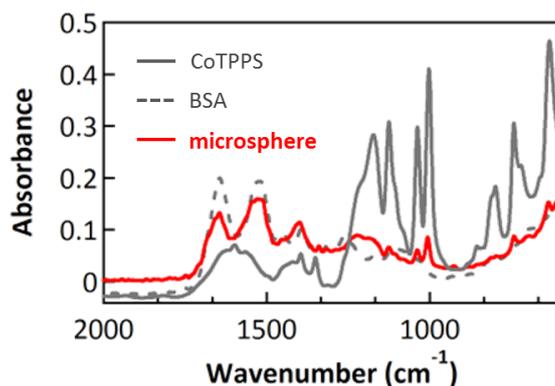
単離した褐色粉末の赤外吸収スペクトルを測定した結果、CoTSPP および BSA 由来のピークが観測された (Figure 5.6)。以上の結果から、酸性水溶液中では、BSA と CoTSPP の間で中和凝集沈殿が生じ、直径約 106 nm の不溶性の粒子を形成することが判明した。



**Figure 5.4** Electronic absorption spectral change of CoTSPP (10  $\mu\text{M}$ ) in 1 M acetate buffer (pH 4.5) upon addition of BSA (1  $\mu\text{M}$ ) from 0 to 5 min (a) and from 5 min to 10 min (b).



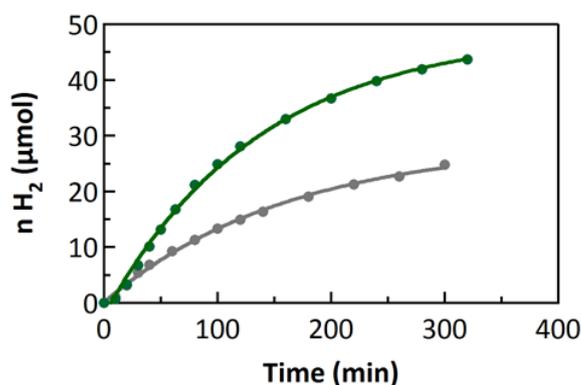
**Figure 5.5** Fluorescence image (a) and dynamic light scattering (b) of BSA–CoTSPP microparticles.



**Figure 5.6** Infrared measurement of BSA (gray dotted line), CoTSPP (gray line) and BSA-CoTSPP microparticles (red line).

### 3-2. CoTSPP-BSA 複合体による光水素発生触媒活性

pH 7.0 の 1 M リン酸緩衝溶液中、光増感剤として  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]\text{Cl}_2$  錯体および犠牲還元剤としてアスコルビン酸存在下、CoTSPP 錯体に可視光照射 (385-740 nm, 300 W) した結果、触媒回転数 (TON 値) が 574, 触媒回転頻度 (TOF 値) が  $3.6 \text{ min}^{-1}$  で水を分解し、水素が発生することが判明した (Figure 5.7, gray). 次に、BSA を CoTSPP に対し 0.1 当量添加することで会合体を形成させた後、光水素発生触媒活性を評価した結果、TON 値が 971, TOF 値が  $4.5 \text{ min}^{-1}$  とそれぞれ 1.7 倍と 1.3 倍に向上することが判明した (Figure 5.7, green). BSA を CoTSPP に対して 1 当量添加した条件下では、光水素発生触媒活性における TON 値および TOF 値が BSA 非存在下と比較し低下した.



**Figure 5.7** Time course of hydrogen production of solutions (1 M phosphate, pH 7.0) containing CoTSPP (10  $\mu\text{M}$ ), ascorbate (100 mM) and  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]\text{Cl}_2$  (1 mM) in the presence (green) or absence (gray) of BSA (1  $\mu\text{M}$ ) (green) at 25 °C under light irradiation (385–740 nm, 300 W Xenon lamp).

続いて、CoTSPP に対し BSA を 0.1 当量添加した条件下で、光水素発生触媒活性を pH 3 から pH 7 の範囲で測定した結果、pH 4.5 で TOF 値が最大になることが判明した (Table 5.1)。pH 4.5 で TOF 値が最大となるベル型の相関関係は、BSA 非存在下での CoTSPP による光水素発生反応でもみられた。この結果から、BSA は CoTSPP の電子状態を変化させないことが示唆される。

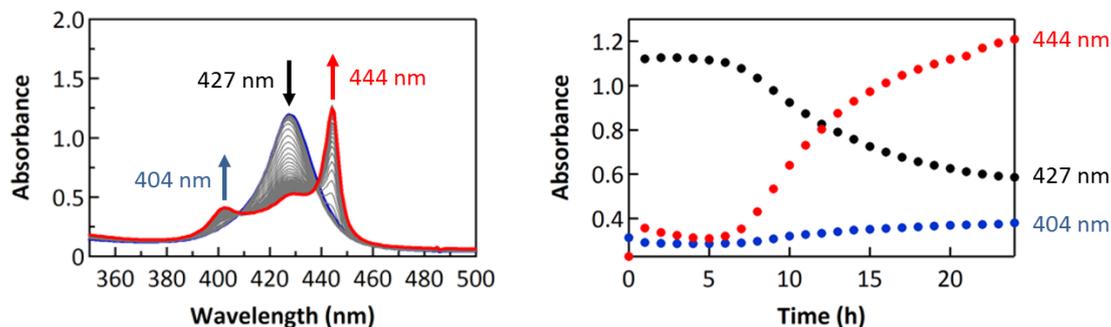
**Table 5.1** pH dependency of TON and TOF ( $\text{min}^{-1}$ ) of photoinduced hydrogen evolution in 1 M phosphate or acetate buffer (pH 3-7) solutions containing 1 mM Ru(bipy)<sub>3</sub>, 0.1 M ascorbate and 10  $\mu\text{M}$  CoTSPP in the presence or absence of 1  $\mu\text{M}$  BSA.

pH	BSA (eq.)	TON	TOF ( $\text{min}^{-1}$ )
7	0	574	3.6
7	0.1	971	4.5
6	0	1070	11.4
6	0.1	1226	14.5
5	0	1018	22.7
5	0.1	1430	31.1
4.5	0	938	23
4.5	0.1	1441	31.7
4	0	797	21.7
4	0.1	1145	25.8
3	0	167	2.5
3	0.1	196	3.8

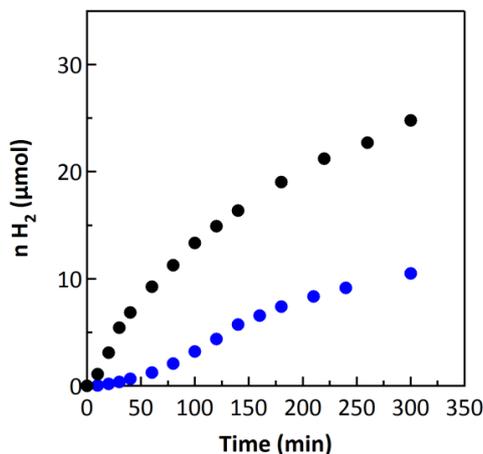
### 3-3. CoTSPP とカチオン性ポリマーによる会合体形成と触媒活性

次に、pH 7.0 の 1 M リン酸緩衝液中で、CoTSPP 水溶液にカチオン性の高分子である polydiallyldimethylammonium chloride (PDPA, Mw 40000-50000 Da) を添加すると、Soret 帯が 427 nm から 444 nm へと J 会合体の形成を示唆するレッドシフトが電子吸収スペクトルにて観測された (Figure 5.8)。しかし、pH 7.0 の 1 M リン酸緩衝溶液中、光増感剤として [Ru(bipy)<sub>3</sub>]Cl<sub>2</sub> 錯体および犠牲還元剤としてアスコルビン酸存在下、可視光照射した際の PDPA により形成された CoTSPP の J 会合体による光水素発生触媒活性は、TON 値が 210、TOF 値が 1.3  $\text{min}^{-1}$  と PDPA 非存在下での CoTSPP に比べ低い値となることが判明した。以

上の結果から、単純に CoTSPP が J 会合体を形成することで触媒活性が向上するわけではないことがわかる。



**Figure 5.8** Electric absorption spectral change (left) and time course (right) of the reaction of 10  $\mu\text{M}$  CoTSPP and 0.2wt% PDDA in 1 M phosphate buffer at pH 7.0.

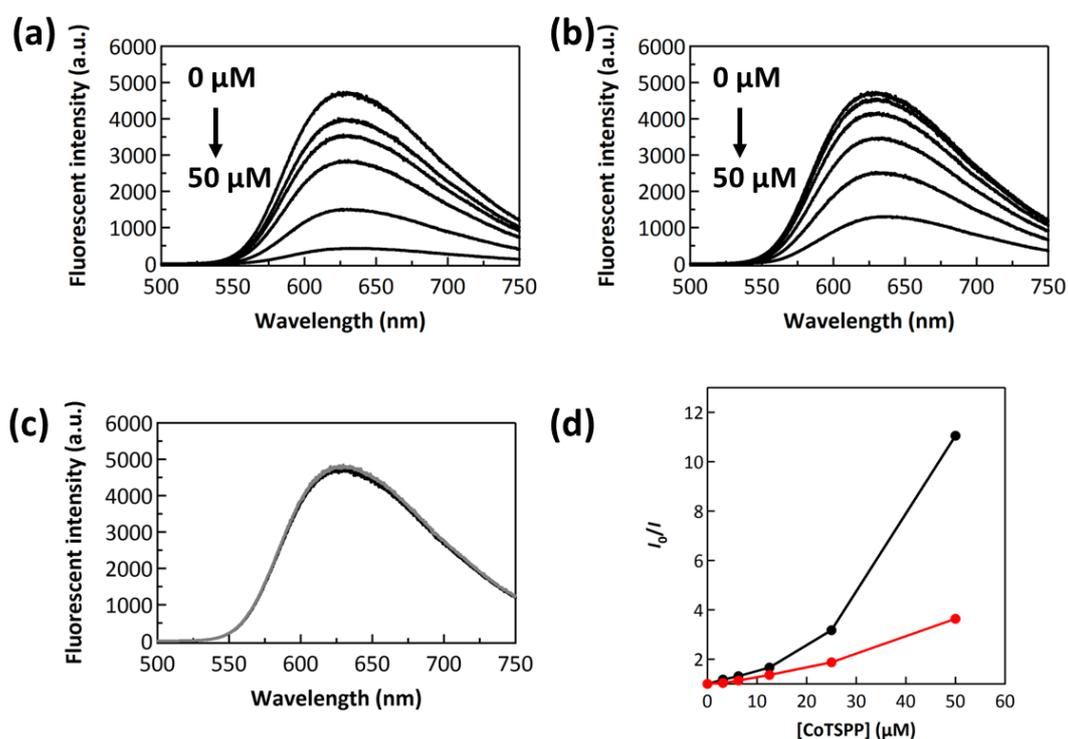


**Figure 5.9** Time course of hydrogen production of solutions (1 M phosphate, pH 7.0) containing CoTSPP (10  $\mu\text{M}$ ), ascorbate (100 mM) and  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]\text{Cl}_2$  (1 mM) in the presence (green) or absence (black) of 0.2wt% PDDA (blue) at 25  $^\circ\text{C}$  under light irradiation (385-740 nm, 300 W Xenon lamp).

### 3-4. BSA 存在下および非存在下での CoTSPP による $\text{Ru}(\text{bipy})_3$ の蛍光消光

続いて、BSA 存在下および非存在下での pH 7.0 の 1 M リン酸緩衝溶液中での  $\text{Ru}(\text{bipy})_3$  錯体と CoTSPP 錯体の相互作用について、 $\text{Ru}(\text{bipy})_3$  の発光の CoTSPP による消光実験により調査した (Figure 5.10)。その結果、BSA 非存在に比べ、BSA 存在下では、 $\text{Ru}(\text{bipy})_3$  の発光の CoTSPP による消光効率が低下することが判明した。また、Stern-Volmer plot を行った

結果, BSA 非存在下では, カチオニックな  $\text{Ru}(\text{bipy})_3$  とアニオニックな  $\text{CoTSPP}$  が水溶液中で静電相互作用を有しており, 動的な消光だけでなく静的な消光が混じっていることを示唆する大きく直線から外れる傾向がみられたが, BSA 存在下では, ほとんど直線となっており,  $\text{Ru}(\text{bipy})_3$  と  $\text{CoTSPP}$  間で動的な消光が起こっていることが示唆された (Figure 5.10 (d)). この結果から, BSA 存在下では, 水溶液中での  $\text{Ru}(\text{bipy})_3$  と  $\text{CoTSPP}$  間の相互作用が, BSA 非存在下に比べ弱くなっていることがわかる.

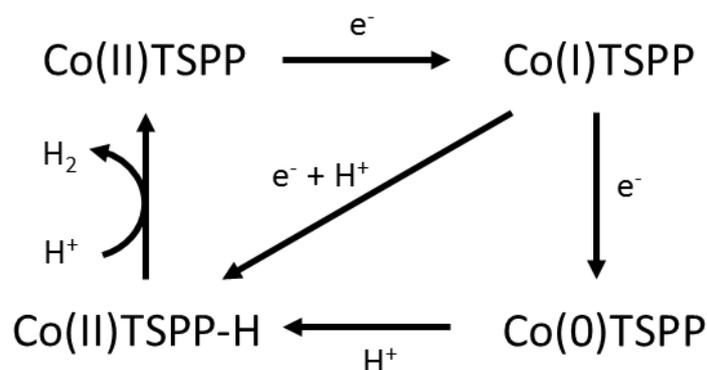


**Figure 5.10** Photoluminescence spectra (excitation at 296 nm) of solution containing 50  $\mu\text{M}$   $\text{Ru}(\text{bipy})_3$  in 1 M phosphate buffer at pH 7 after addition of different aliquots of  $\text{CoTSPP}$  (0-50  $\mu\text{M}$ ) (a) or 0-50  $\mu\text{M}$   $\text{CoTSPP}$  : BSA = 10 : 1 solution (b); (d) Stern-Volmer plot of quenching by  $\text{CoTSPP}$  in the absence (black) or presence of BSA (red).

### 3-5. 反応機構と BSA 添加による触媒活性向上の考察

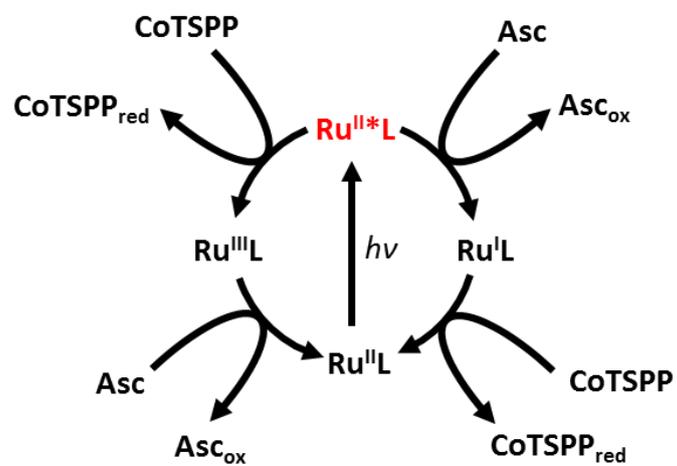
これまでに, Hung らのグループにより, 0.1 M tetra-*n*-butyl ammonium hexafluorophosphate ( $\text{Bu}_4\text{NPF}_6$ ) を含有する DMSO 中での  $\text{CoTSPP}$  のサイクリックボルタメトリーの測定が行われている<sup>19)</sup>. そこでは, -0.38 V vs. SHE に  $\text{Co}(\text{II})/\text{Co}(\text{I})$  に帰属できるピークが観測され, -1.45 V vs. SHE に  $\text{Co}(\text{I})/\text{Co}(0)$  に帰属できるピークが観測されている. また, 溶液中にプロトン源として酢酸を添加すると  $\text{Co}(\text{I})/\text{Co}(0)$  に由来するピークのプロトン濃度依存的な上昇が観測でき, proton coupled electron transfer (PCET) 過程で, 電気化学的な水素発生反応が起こってい

ることがわかる。この結果から、Co(II)種が還元され、Co(I)種を生成した後、PCET 過程を経て、Co(II)-H が生成し、プロトンと反応することで、水素と Co(II)種が生成するというメカニズムで触媒的に水素が発生していると考えられる (Scheme 5.2)。



**Scheme 5.2** Electrocatalytic mechanism of water reduction by CoTSPP.

また、Natali らのグループからは、カチオン性の水溶性コバルトポルフィリン錯体である CoTMPyP による犠牲還元剤にアスコルビン酸、光増感剤に Ru(bipy)<sub>3</sub> を用いた光水素発生系の詳細な反応機構を過渡吸収スペクトル測定を駆使して明らかにしている<sup>18)</sup>。その結果では、照射により生成する励起種 [Ru(bipy)<sub>3</sub>]<sup>2+\*</sup> がアスコルビン酸により還元を受け、Ru(I)錯体である [Ru(bipy)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> を生成した後、CoTMPyP を還元することで、水素を発生させると考えられている。以上の知見から、CoTSPP による光水素発生における推定される反応機構を Ru(bipy)<sub>3</sub> を中心に Scheme 5.3 に示した。ここで、励起種 [Ru(bipy)<sub>3</sub>]<sup>2+\*</sup> がアスコルビン酸により還元されることで生成する Ru(I)種が CoTSPP を還元することで生成する低原子価の CoTSPP により、水素発生反応が進行する。しかし、CoTSPP と Ru(bipy)<sub>3</sub> の間の相互作用を消光実験より検討した結果 (Figure 5.10)、BSA 非存在下では、強い相互作用が確認されたが、BSA 存在下では、CoTSPP と Ru(bipy)<sub>3</sub> の間の相互作用が小さくなることが判明した。この結果から、照射後に生成する [Ru(bipy)<sub>3</sub>]<sup>2+\*</sup> が CoTSPP により酸化されることで Ru(III)種である [Ru(bipy)<sub>3</sub>]<sup>3+</sup> を生成するため Ru(I)種が生成しにくいのに対し、BSA 存在下では、Ru(III)種の生成が抑制されるため、より高効率に Ru(I)種が生成するため光水素発生触媒活性が向上したと考えられる。



**Scheme 5.3** Proposed photo-catalytic mechanism of water reduction by CoTSPP.

#### 4. 結論

本研究で、pH 3-7 の緩衝溶液中でコバルトポルフィリン錯体 CoTSPP がカチオニックな部位やアニオニックな部位、さらに疎水ポケットを有する BSA の表面で静電相互作用や疎水性相互作用を利用することで、J 型の会合体を形成することを明らかにした。また、BSA の等電点である 4.9 よりも低い pH である pH 4.5 の酢酸緩衝溶液中では、CoTSPP と BSA がマイクロサイズの粒子を形成することが判明した。また、形成された粒子は、光増感剤である Ru(bipy)<sub>3</sub> および還元剤であるアスコルビン酸存在下、pH 3-7 の緩衝溶液中で可視光照射することで、CoTSPP 錯体よりも 1.1-1.7 倍の触媒回転数 (TON)、1.2-1.5 倍の触媒回転頻度 (TOF) で光水素発生触媒活性を示すことを見出した。その原因を調べるため、Ru(bipy)<sub>3</sub> の光照射により生成する励起種 [Ru(bipy)<sub>3</sub>]<sup>2+\*</sup> の CoTSPP による消光実験を BSA 存在下および非存在下で検討したところ、BSA は、[Ru(bipy)<sub>3</sub>]<sup>2+\*</sup> の CoTSPP による消光を阻害することが判明した。この結果から、BSA の添加により触媒活性が向上した原因は、励起種 [Ru(bipy)<sub>3</sub>]<sup>2+\*</sup> が CoTSPP により酸化され Ru(III)種を生成する光水素発生反応における不利な電子移動反応を阻害しているためであると考えられた。

## 5. 実験方法

### 5-1. 試薬と測定機器

CoTSPP の合成は、文献に従い行った<sup>22)</sup>。赤外吸収スペクトルは、Simadzu IRAffinity-1 spectrometer に MIRacle 10 single reflection を装着し、ATR 法により測定した。電子吸収スペクトル測定には、Agilent 社製 8543UV-visible spectrometer を用いた。蛍光スペクトル測定には、Hitachi F-7000 spectrophotometer を用いた。蛍光顕微鏡画像は、Olympus IX81 fluorescence microscope を用いて作成した。ガスクロマトグラフィー測定は、Simadzu GC-8A を使用した。動的光散乱法 (DLS) 測定には、大塚電子の MCLS-1000 を用いた。

### 5-2. BSA の濃度決定

BSA の濃度決定は、次式

$$(A_{280\text{ nm}} \times 1.493)/66463 = C_{\text{BSA}} (\text{mol L}^{-1})$$

を用いて行った。

### 5-3. CoTSPP-BSA 複合体の単離

3.20 mg (1 mM) の CoTSPP と 16.6 mg (0.1 mM) の BSA をそれぞれ 5 mL の 1 M 酢酸緩衝溶液 (pH 4.5) に溶解させた後に混合し、24 時間攪拌すると、溶液に濁りがみられた。濁った溶液を遠心分離し、上澄みを取り除く作業を 3 度繰り返した後に凍結乾燥することで、19.6 mg の橙色の粉末が得られた。

### 5-4. CoTSPP への BSA 添加実験

100  $\mu\text{M}$  の CoTSPP リン酸緩衝溶液 (1 M, pH 7.0), 10  $\mu\text{M}$  の BSA リン酸緩衝溶液 (1 M, pH 7.0) のストック溶液を調製し、25  $^{\circ}\text{C}$ , 空気下で CoTSPP 水溶液中に BSA 水溶液を添加することで、反応を開始させた。最終濃度は、CoTSPP 10  $\mu\text{M}$ , BSA 1  $\mu\text{M}$  とし、反応追跡は電子吸収スペクトルを用いた。

### 5-5. CoTSPP による BSA の蛍光の消光実験

100  $\mu\text{M}$  の CoTSPP リン酸緩衝溶液 (1 M, pH 7.0) を調製した。最終濃度が 5  $\mu\text{M}$  の BSA リン酸緩衝溶液 (pH 7.0, 1 M) に 0-50  $\mu\text{M}$  の濃度となるように CoTSPP 溶液を添加した際の BSA 由来のトリプトファン残基の蛍光強度を蛍光スペクトルにより測定した。( $\lambda_{\text{ex}} = 296 \text{ nm}$ )

## 5-6. 光水素発生触媒活性評価

CoTPPS (10  $\mu$ M), [Ru(bipy)<sub>3</sub>]Cl (1 mM), アスコルビン酸 (100 mM)となるように 30 mL のサンプル瓶に加え, セプタムキャップをし, アルゴンバブリングを 30 分行った. 反応容器のアルゴン置換後, キセノンランプ (300 W, > 385 nm) を照射した. 発生した水素はガスクロマトグラフィーを用いて定量を行った. BSA との会合体を形成した CoTSPP に関しては, あらかじめ CoTSPP と BSA を 10 : 1 の濃度比で, 室温, リン酸緩衝液 (1 M, pH 7.0) 中, 2 時間攪拌した後に反応に用いた. PDDA との会合体を形成した CoTSPP に関しては, あらかじめ CoTSPP と PDDA, 室温リン酸緩衝液 (1 M, pH 7.0) 中, 24 時間攪拌した後に反応に用いた.

## 5-7. カチオン性ポリマーと CoTSPP の反応

100  $\mu$ M の CoTSPP リン酸緩衝溶液 (1 M, pH 7.0) および 2 wt% の PDDA リン酸緩衝溶液 (1 M, pH 7.0) のストック溶液を用意し, 25°C, 空気下で CoTSPP 溶液に PDDA 溶液を添加することで, 反応を開始させた. 最終濃度は CoTPPS 10  $\mu$ M, PDDA 0.2wt% とし, 反応追跡は電子吸収スペクトルを用いた.

## 6. 参考文献

- (1) (a) Y. Sun, J. P. Bigi, N. A. Piro, M. L. Tang, J. R. Long, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 9212. (b) M. G. Schultz, T. Diehl, G. P. Brasseur, W. Zittel, *Science*, **2003**, 302, 624. (c) N. S. Lewis, D. G. Nocera, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2006**, 103, 15729. (d) A. J. Esswein, D. G. Nocera, *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 4022. (e) P. D. Tran, V. Artero, M. Fontecave, *Energy Environ. Sci.*, **2010**, 3, 727.
- (2) N. S. Lewis, D. G. Nocera, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2006**, 103, 15729
- (3) Special Issue “Solar Fuels” *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 2205.
- (4) G. M. Brown, B. S. Brunschwig, C. Creutz, J. F. Endicott, N. Sutin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 1278.
- (5) J. Hawecker, J. M. Lehn, R. Ziessel, *New J. Chem.*, **1983**, 7, 271.
- (6) (a) P. Du, K. Knowles, R. Eisenberg, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 12576. (b) T. Lazarides, T. McCormick, P. Du, G. Luo, B. Lindley, R. Eisenberg, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 9192; (c) T. McCormick, B. D. Calitree, A. Orchard, N. D. Kraut, F. V. Bright, M. R. Detty, R. Eisenberg, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 15480.
- (7) A. Fihri, V. Artero, M. Razavet, C. Baffert, W. Leibl, M. Fontecave, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2008**, 47, 564.
- (8) B. Probst, A. Rodenberg, M. Guttentag, P. Hamm, R. Alberto, *Inorg. Chem.*, **2010**, 49, 6453.
- (9) P. Zhang, M. Wang, J. Dong, X. Li, F. Wang, L. Wu, L. Sun, *J. Phys. Chem. C*, **2010**, 114, 15868.
- (10) F. Lakadamyali, E. Reisner, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 1695.
- (11) (a) J. L. Dempsey, B. S. Brunschwig, J. R. Winkler, H. B. Gray, *Acc. Chem. Res.*, **2009**, 42, 1995. (b) J. L. Dempsey, J. R. Winkler, H. B. Gray, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 16774; (c) C. N. Valdez, J. L. Dempsey, B. S. Brunschwig, J. R. Winkler, H. B. Gray, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2012**, 109, 15589.
- (12) M. Natali, R. Argazzi, C. Chiorboli, E. Iengo, F. Scandola, *Chem. Eur. J.*, **2013**, 19, 9261.
- (13) Y. Sun, J. Sun, J. R. Long, P. Yang, C. J. Chang, *Chem. Sci.*, **2013**, 4, 118.
- (14) H. Ozawa, M. Haga, K. Sakai, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 4926.
- (15) H. Ozawa, Y. Yokoyama, M. Haga, K. Sakai, *Dalton Trans*, **2007**, 1197.
- (16) H. Ozawa, K. Sakai, *Chem. Lett.*, **2007**, 36, 920.
- (17) K. Sakai, H. Ozawa, H. Yamada, T. Tsubomura, M. Hara, A. Higuchi, *Dalton Trans.*, **2006**, 3300.
- (18) M. Natali, A. Luisa, E. Iengo, F. Scandola, *Chem. Commun.*, **2014**, 50, 1842.
- (19) B. B. Beyene, S. B. Mane, C.-H. Hung, *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 15067.

- (20) F. Würthner, T. E. Kaiser, C. R. S.-Möller, *Angew. Chem. Ed.*, **2011**, 50, 3376.
- (22) A. J. Olaya, D. Schaming, P.-F. Brevet, H. Nagatani, T. Zimmermann, J. Vanicek, H.-J. Xu, C. P. Gros, J.-M. Barbe, H. H. Girault, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 1, 498.

## 第六章：総括

本論文では、水中で多様な反応性を示す金属錯体触媒に目を向け、光照射に応答し、過酸化水素供与体として機能することで抗腫瘍活性を示す Mn 錯体、培養細胞内の活性酸素種を消去することで抗酸化活性を示す Fe 錯体、光照射により高効率に水素を発生させる BSA-CoTSPP 錯体の複合体を開発しただけでなく、金属錯体の機能を NO の配位により光ケージド化する手法を確立させた。

開発した Mn(II)錯体である UG1 は、アスコルビン酸やグルタチオンのような生体内に豊富に存在する還元剤存在下、触媒的かつ選択的に過酸化水素を発生させることが可能であるため、培養細胞や生体への過酸化水素供与分子としても活躍が期待できる。また、開発した Mn(II)錯体である UG1 は、NO の配位によりその機能を光ケージド化でき、任意の場所や時間に光照射することで過酸化水素を発生させることができる。NO の配位により安定な錯体を合成することができれば、様々な金属錯体でもその空配位座に起因する機能を一時的に不活性化し、任意の場所や時間で光照射によりその機能を再び発現させることができる。この手法を応用すると、生理活性分子の供与および目的の場所のみで触媒活性を発現させることが可能であるため、光誘起型の生理活性分子の供与体としてだけでなく、副作用の小さな薬剤への応用が期待できる。

第四章では、新たに開発した鉄錯体  $2^R$  が、細胞内の酸化ストレスを低減させる SOD 活性やカタラーゼ活性を示すが、酸化剤存在下で外部基質を酸化してしまうペルオキシダーゼ活性を示さない抗酸化剤に適した反応性を有するユニークな分子であることが明らかとなった。特に、 $2^{NO_2}$  の SOD 活性は、既存の SOD 模倣金属錯体であり、抗酸化剤としても応用されている EUK-134 に比べ、約 20 倍の活性を示した。分子状酸素から活性酸素を発生させてしまう酸素の還元活性についても  $2^{NO_2}$  が最も低く、細胞内の活性酸素濃度を最も高効率に低下させることが示唆された。実際、培養細胞を用いた実験でも、 $2^{NO_2}$  が最も高効率に細胞内の活性酸素濃度を低下させ、EUK-134 と比較しても高い性能を示すことが明らかとなった。以上の結果から、 $2^R$  は酸化ストレスの関与する病気の治療薬への応用が期待できる。

最後に、第五章では、水中で多様で魅力的な反応性を示す金属ポルフィリン錯体の触媒活性に着目し、アニオン性の水溶性コバルトポルフィリン錯体である CoTSPP の光水素発生触媒活性におけるウシ血清アルブミン (BSA) の添加効果について検討した。その結果、BSA 添加時、CoTSPP では報告例のない J 型の会合体を形成を示唆する結果が得られ、光水素発生触媒活性が最大 1.7 倍に向上することを見出した。しかし、カチオン性ポリマーである PDDA 添加時に形成される CoTSPP の J 型の会合体の光水素発生触媒活性は、CoTSPP のモノマーに比べ大きく低下することが判明した。得られた研究成果から、J 型の会合体を形成させることで触媒活性が向上するわけではなく、光増感剤である  $[Ru(bipy)_3]^{2+}$  との水中で

の相互作用を調節することで、すなわち BSA の添加により、CoTSP と  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$  との相互作用を小さくし、反応に不利な逆電子移動反応を制御することで、触媒活性が向上することを見出した。この結果は、新たな光水素発生触媒の開発における指針になる。

## List of Publications

1. “Electronic Tuning of Nitric Oxide Release from Manganese Nitrosyl Complexes by Visible Light Irradiation: Enhancement of Nitric Oxide Release Efficiency by Nitro-Substituted Quinoline Ligand”

Y. Hitomi, Y. Iwamoto, M. Kodera, *Dalton Trans.*, **2014**, 43, 2161–2167.

2. “Mononuclear Nonheme Iron(III) Complexes that Show Superoxide Dismutase-like Activity and Antioxidant Effects against Menadione-Mediated Oxidative Stress”

Y. Hitomi, Y. Iwamoto, A. Kashida, M. Kodera, *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 8702–8704.

3. “Uncaging Catalytic Hydrogen Peroxide Generator through the Photo-Induced Release of Nitric Oxide from a {MnNO}<sup>6</sup> Complex”

Y. Iwamoto, M. Kodera, Y. Hitomi, *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 9539–9542.

4. “DNA Cleavage through Reductive Dioxygen Activation by Iron-Bleomycin Mimics with Carboxamido Ligation Correlation between DNA Cleavage Efficacy and Redox Potential”

A. Nomura, Y. Iwamoto, K. Arakawa, A. Kashida, M. Kodera, Y. Hitomi, *Chem. Lett.*, **2017**, 46, 8, 1109–1111.

5. “Photocatalytic Hydrogen Production of Composite Particles Comprising Bovin Serum Albumin, Cobalt Tetrakis(4-sulfophenyl)porphyrin and Ruthenium Trisbipyridine in Water”

Y. Iwamoto, M. Kodera, Y. Hitomi, to be submitted.

6. “Macrophage-Mediated Delivery of Light Activated Nitric Oxide Prodrugs for Cancer Therapy with Spatial, Temporal and Concentration Control”

M. A. Evans, P. Huang, Y. Iwamoto, K. N. Ibsen, E. M. Chan, Y. Hitomi, P. C. Ford, S. Mitragotri, submitted.

## 謝辞

本研究を進めるにあたり，終始的確かつ温かい御指導を賜りました同志社大学大学院 理工学研究科 小寺 政人 教授に心より厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり，終始適切な御指導，御助言を賜り，また研究計画と遂行に懇切なるご指導を賜りました同志社大学 理工学部 人見 穰 教授に心より厚く御礼申し上げます。

一酸化窒素測定装置の使用に際しましては，京都大学 iCeMS 古川 修平 准教授，Diring Stephane 助教授，Kim Chiwon 博士に心より厚く御礼申し上げます。

動的光散乱法測定の使用に際しましては，同志社大学 理工学部 森 康維 教授に心より厚く御礼申し上げます。

また，研究を進めるにあたり，終始丁寧な御指導および温かく励まして下さった武安 俊幸 博士，荒川 健吾 博士をはじめとする分子生命化学研究室の多くの先輩方や同期，後輩の皆様に深く感謝いたします。

最後になりましたが，本研究の立ち上げに多大な成果および実験指標を残して下さった末本 直哉 氏，樫田 暁洋 氏に深く感謝いたします。

同志社大学大学院 理工学研究科 応用化学専攻  
分子生命化学研究室  
岩本 勇次