

がん細胞選択的毒性を発現する二核銅錯体の開発  
及びその構造機能相関の解明

(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)  
2021 年度 1701 番  
畑 真知



# 目次

第一章：序章.....	1
1-1. はじめに .....	1
1-2. がん細胞 .....	1
1-2-1. がん細胞のミトコンドリア .....	1
1-2-2. がん細胞の ER.....	4
1-2-3. がん細胞の Golgi 体.....	4
1-3. 様々な標的能を有する金属錯体.....	5
1-3-1. DNA を標的とする金属錯体および臨床利用されている抗がん剤.....	5
1-3-2. ミトコンドリアを標的とする金属錯体 .....	7
1-3-3. ER を標的とする金属錯体.....	8
1-3-4. Golgi 体を標的とする金属錯体.....	9
1-4. 銅錯体 .....	10
1-5. 当研究室の先行研究 .....	11
1-6. 研究概要 .....	14
1-7. 参考文献 .....	16
第二章：Enhancement of Cancer-cell-selective Cytotoxicity by a Dicopper Complex with a Phenanthrene Amide-tether Ligand Conjugate via Mitochondrial Apoptosis	
2-1. 要旨 .....	21
2-2. 緒言 .....	22
2-3. 結果と考察 .....	24
2-3-1. 配位子と二核銅(II)錯体の合成 .....	24
2-3-2. 二核銅(II)錯体の構造 .....	26
2-3-3. 1 および 1 <sup>P2</sup> の DNA 結合能力 .....	28
2-3-4. 1 および 1 <sup>P2</sup> の酸化的 DNA 切断活性 .....	29
2-3-5. 1 および 1 <sup>P2</sup> と H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> の反応 .....	32
2-3-6. 1 および 1 <sup>P2</sup> の細胞毒性.....	35
2-3-7. 1 および 1 <sup>P2</sup> の細胞内への取り込み.....	37
2-3-8. 1 <sup>P2</sup> の細胞内局在.....	38
2-3-9. Apoptosis assay .....	39
2-3-10. カスパーゼ活性アッセイ .....	40

2-4. 結論 .....	44
2-5. 実験方法 .....	45
2-5-1. 試薬 .....	45
2-5-2. 測定装置 .....	45
2-5-3. 配位子(HL1 <sup>P2</sup> )およびその二核銅(II)錯体(1 <sup>P2</sup> )の合成 .....	46
2-5-4. EtBr 法 .....	52
2-5-5. DNA 切断実験 .....	52
2-5-6. $\mu$ -1,1-hydroperoxodicopper(II)錯体 2, 2 <sup>P2</sup> と ct-DNA の反応 .....	52
2-5-7. 細胞株とその培養条件 .....	53
2-5-8. 3-(4,5-dimethylthiazole)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay .....	53
2-5-9. ICP MS による HeLa 細胞内の銅イオン濃度の定量 .....	54
2-5-10. フラスコ振盪法による分配係数 ( $\log P_{ow}$ )の測定 .....	54
2-5-11. 共焦点顕微鏡による細胞内イメージング .....	54
2-5-12. Apoptosis assay .....	55
2-5-13. Caspase-3/7 活性 .....	55
2-5-14. Caspase-9 活性 .....	56
2-6. 参考文献 .....	57
2-7. Supporting Information .....	60

### 第三章：Roles of DNA Target in Cancer Cell-Selective Cytotoxicity by Dicopper Complexes with DNA Target/Ligand Conjugates

3-1. 要旨 .....	65
3-2. 緒言 .....	66
3-3. 結果と考察 .....	69
3-3-1. 配位子と二核銅(II)錯体の合成 .....	69
3-3-2. 二核銅(II)錯体の構造 .....	71
3-3-3. 1 および 1 <sup>X</sup> の DNA への結合能力 .....	75
3-3-4. $\mu$ -1,1-hydroperoxodicopper(II)錯体の分光学的測定 .....	77
3-3-5. 1 <sup>X</sup> による酸化的 DNA 切断活性 .....	81
3-3-6. 1 <sup>X</sup> の細胞内取込量と親油性 .....	86
3-3-7. 1 <sup>X</sup> の細胞毒性 .....	87
3-3-8. 1 <sup>P1-3</sup> の細胞内局在 .....	92

3-3-9. Apoptosis assay .....	95
3-3-10. カスパーゼ活性アッセイ .....	97
3-3-11. $1^{Pn}$ とミトコンドリア標的単核銅(II)錯体のがん細胞選択的毒性の比較 .....	99
3-4. 結論 .....	100
3-5. 実験方法 .....	101
3-5-1. 試薬 .....	101
3-5-2. 測定装置 .....	101
3-5-3. 配位子( $HL1^X$ )とその二核銅(II)錯体( $1^X$ ) ( $X = Pn$ and $Mn$ ( $n = 1-3$ ))の合成....	102
3-5-4. EtBr 法.....	111
3-5-5. DNA 切断実験 .....	111
3-5-6. $\mu$ -1,1-hydroperoxodicopper(II)種形成の確認.....	112
3-5-7. 細胞株とその培養条件 .....	112
3-5-8. 3-(4,5-dimethylthiazole)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay .....	112
3-5-9. ICP MS による HeLa 細胞内の銅イオン濃度の定量.....	113
3-5-10. 親水性フラスコ振盪法による分配係数 ( $\log P_{ow}$ )の測定 .....	113
3-5-11. 共焦点顕微鏡による細胞内イメージング.....	114
3-5-12. Apoptosis assay .....	114
3-5-13. Caspase-9 活性.....	115
3-5-14. Caspase-3/7 活性.....	115
3-6. 参考文献 .....	117
3-7. Supporting Information .....	120

**第四章：Synthesis, Structures, and Cytotoxicity of Dicopper Complexes with *p*-Cresol-2,6-Bis(Amide-Tether-dpa<sup>4-X</sup>) Ligands ( $X = MeO$  and  $Cl$ ): Electronic and Hydrophobic Effects of MeO and Cl on Selective ROS Generation and Cytotoxicity Enhancement.**

4-1. 要旨 .....	127
4-2. 緒言 .....	128
4-3. 結果と考察 .....	130
4-3-1. 配位子と二核銅(II)錯体の合成 .....	130
4-3-2. 二核銅(II)錯体の結晶構造 .....	132
4-3-4. 二核銅(II)錯体の親油性 .....	140
4-3-5. 二核銅(II)錯体の酸化還元挙動 .....	140

4-3-6. 二核銅(II)錯体の還元的 O <sub>2</sub> 活性化 .....	143
4-3-7. 二核銅(II)錯体の細胞毒性 .....	145
4-3-8. 二核銅(II)錯体の細胞内での ROS 生成 .....	146
4-4. 結論 .....	158
4-5. 実験方法 .....	159
4-5-1. 試薬 .....	159
4-5-2. 測定装置 .....	159
4-5-3. 配位子(HL3 <sup>+X</sup> )とその二核銅(II)錯体(3 <sup>+X</sup> ) (X = MeO, Cl)の合成 .....	159
4-5-4. 3, 3b <sup>4-MeO</sup> , 3b <sup>4-Cl</sup> の Cyclic Voltammetry (CV)測定 .....	166
4-5-5. 3, 3b <sup>4-MeO</sup> , 3b <sup>4-Cl</sup> の Square Wave Voltammetry (SWV)の測定 .....	166
4-5-6. 3b <sup>4-MeO</sup> , 3b <sup>4-Cl</sup> を AscNa と反応させた際の電子スペクトル測定 .....	166
4-5-7. coumarin を用いた 3b <sup>4-MeO</sup> , 3b <sup>4-Cl</sup> による HO•生成の検出 .....	166
4-5-8. PFBS を用いた 3b <sup>4-MeO</sup> , 3b <sup>4-Cl</sup> による H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 生成の検出 .....	166
4-5-9. 細胞株とその培養条件 .....	167
4-5-10. 3-(4,5-dimethylthiazole)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay .....	167
4-5-11. 共焦点顕微鏡による細胞内 ROS の確認 .....	168
4-5-12. 共焦点顕微鏡による細胞取込経路の確認 .....	168
4-5-13. 共焦点顕微鏡による細胞内 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> の確認 .....	169
4-6. 参考文献 .....	170

## 第五章：Burst of DNA Double-Strand Breaks by Dicopper(II) Complex with a *p*-Cresol-2,6-Bis(amide-tether-dpa) Ligand via Reductive O<sub>2</sub>-Activation

5-1. 要旨 .....	172
5-2. 緒言 .....	173
5-3. 結果と考察 .....	175
5-3-1. AscNa を用いた還元的 O <sub>2</sub> 活性化による 3-5 の酸化的 DNA 切断活性 .....	175
5-3-2. 3, 4 および 5 の酸化還元挙動 .....	181
5-3-3. 3 および 5 の還元的 O <sub>2</sub> 活性化 .....	186
5-3-4. 3 および 5 の DNA 結合能力 .....	190
5-4. 結論 .....	193
5-5. 実験方法 .....	194
5-5-1. 試薬 .....	194

5-5-2. 測定装置 .....	194
5-5-3. DNA 切断実験 .....	194
5-5-4. 3 および 4 を AscNa と反応させた際の電子スペクトル測定 .....	195
5-5-5. 3, 4 および 5 の Cyclic Voltammetry (CV)測定 .....	195
5-5-6. 3 のバルク電解中における電子スペクトル測定 .....	195
5-5-7. テレフタル酸(TA)を用いた HO•生成の検出 .....	196
5-5-8. 等温滴定型熱量(ITC)測定 .....	196
5-5-9. ct-DNA 存在下での 3 の IR スペクトル測定 .....	196
5-5-10. ct-DNA 存在下での 3 の電子スペクトル測定 .....	196
5-6. 参考文献 .....	197
5-7. Supporting Information .....	199

## 第六章：Burst of DNA Double-Strand Breaks by Dicopper(II) Complexes

6-1. 要旨 .....	215
6-2. 緒言 .....	216
6-3. 結果と考察 .....	219
6-3-1. AscNa 存在下での 3, 3b <sup>4-MeO</sup> , 3b <sup>4-Cl</sup> の DNA 二本鎖切断 .....	219
6-3-2. 3, 3b <sup>4-MeO</sup> , 3b <sup>4-Cl</sup> の還元的 O <sub>2</sub> 活性化 .....	225
6-3-3. 3, 3b <sup>4-MeO</sup> , 3b <sup>4-Cl</sup> の DNA 結合能力 .....	229
6-4. 結論 .....	232
6-5. 実験方法 .....	233
6-5-1. 試薬 .....	233
6-5-2. 測定装置 .....	233
6-5-3. DNA 切断実験 .....	233
6-5-4. 3b <sup>4-Cl</sup> の Cyclic Voltammetry (CV)測定 .....	234
6-5-5. coumarin を用いた HO•生成の検出 .....	234
6-5-6. 等温滴定型熱量(ITC)測定 .....	234
6-5-7. ct-DNA 存在下での Circular Dichroism (CD)スペクトル測定 .....	235
6-5-8. ct-DNA 存在下での 3, 3b <sup>4-MeO</sup> および 3b <sup>4-Cl</sup> の電子スペクトル測定 .....	235
6-6. 参考文献 .....	236
6-7. Supporting Information .....	238

第七章：Enhancement of DNA double-strand breaks by a dicopper complex with a phenanthrene amide-tether ligand conjugate

7-1. 要旨 .....	260
7-2. 緒言 .....	261
7-3. 結果と考察 .....	263
7-3-1. 配位子と二核銅(II)錯体の合成 .....	263
7-3-2. 二核銅(II)錯体の構造 .....	264
7-3-3. AscNa 存在下での 3 <sup>P</sup> および 3 <sup>M</sup> の DNA 酸化切断活性 .....	266
7-3-4. 3, 3 <sup>P</sup> および 3 <sup>M</sup> の酸化還元挙動 .....	268
7-3-5. 3, 3 <sup>P</sup> および 3 <sup>M</sup> の還元的 O <sub>2</sub> 活性化 .....	270
7-3-6. 3, 3 <sup>P</sup> および 3 <sup>M</sup> の DNA 結合 .....	272
7-4. 結論 .....	274
7-5. 実験方法 .....	275
7-5-1. 試薬 .....	275
7-5-2. 測定装置 .....	275
7-5-3. 配位子 (HL3 <sup>X</sup> ) およびその二核銅(II)錯体 (3 <sup>X</sup> ) の合成 .....	275
7-5-4. DNA 切断実験 .....	278
7-5-5. 3 <sup>P</sup> , 3 <sup>M</sup> の Cyclic Voltammetry (CV) 測定 .....	278
7-5-6. coumarin を用いた HO• 生成の検出 .....	278
7-5-7. Pentafluorobenzenesulfonyl Fluorescein (PFBS) を用いた H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 生成の検出 ..	278
7-5-8. 等温滴定型熱量(ITC)測定 .....	279
7-5-9. ct-DNA 存在下での 3 <sup>P</sup> の電子スペクトル測定 .....	279
7-6. 参考文献 .....	280
7-7. Supporting Information .....	281

第八章：総括 .....	292
--------------	-----

謝辞

## 第一章：序章

### 1-1. はじめに

近年、人類の長寿命化に伴い、日本だけでなく世界中でがん罹患者数は増加し続けている<sup>[1]</sup>。そのため、新たながん治療法の研究・開発が盛んに行われている。現在、主に臨床利用されているがん治療法としては、手術療法、放射線療法、薬物療法、免疫療法の4つが挙げられる。また、2020年に日本が世界で初めて承認した光免疫療法も第5の治療法<sup>[2]</sup>として注目を集めている。その中でも薬物療法には、細胞障害性薬、分子標的薬、ホルモン療法薬など様々な種類の抗がん剤が存在し、それぞれがん細胞への攻撃の仕方が異なる。細胞障害性薬は細胞の増殖の仕組みに着目することで細胞死を誘導する抗がん剤であるため、適用範囲が広く、高い抗がん活性を示し、予後の治療にも有効な優れた抗がん剤である。しかし、がん細胞だけでなく正常細胞にも作用するため、強い副作用が問題となっている。そのため、がん細胞に選択的に作用する細胞障害性薬の開発が望まれている。

### 1-2. がん細胞

がん細胞を選択的に細胞死へと誘導する抗がん剤の開発に向けて、本研究では正常細胞とは異なるがん細胞の微小環境に着目した。次にそれらを述べる。

#### 1-2-1. がん細胞のミトコンドリア

ミトコンドリアは、好気呼吸に伴う代謝系を担っており、細胞の活動に必要なエネルギー源となるアデノシン三リン酸(ATP)の産生を行う細胞小器官である。ATPは、アデノシンのリボースに3つのリン酸が酸無水物として結合し、2個の高エネルギーリン酸結合をもつヌクレオチドである。ATPがアデノシン二リン酸(ADP)になる反応は、様々な生体反応と協奏して自由エネルギー( $\Delta G$ )を獲得することで生体内の反応を進行させる。好気性条件下の正常細胞では、ATP産生には、解糖系、TCA回路、および電子伝達系(mitochondrial electron transport, ETC)による酸化リン酸化が関わっている(Figure 1-1)。解糖系は、細胞質内でグルコースがヘキソキナーゼによってグルコース-6-リン酸となった後、ピルビン酸を生じる(Figure 1-1 (A))<sup>[3]</sup>。この反応系では酸素( $O_2$ )は消費されず、嫌気性条件下でも反応が進行する。この場合、ピルビン酸は乳酸に変換される<sup>[4]</sup>。解糖系では、高エネルギーリン酸化合物によるADPのリン酸化で、最終的にグルコース1分子当たり2分子のATPが生成する。さらに、解糖系で生成したピルビン酸は、好気性条件下では、ミトコンドリアへ移行して脱炭酸によりアセチル CoA へと変換さ

れた後、TCA 回路を経て、NADH、FADH<sub>2</sub> 及び CO<sub>2</sub> となる(Figure 1-1 (B))<sup>[5]</sup>。ここで生成した高い還元力を有する NADH と FADH<sub>2</sub> の水素は、ミトコンドリアのマトリックスにおいて電子(e<sup>-</sup>)とプロトン(H<sup>+</sup>)に分かれる。ミトコンドリアのマトリックス膜に存在する電子伝達系の複合体群(Complex I-V)により電子が伝達される際に、3 つの複合体(Complex I, III, IV)でプロトンポンプ機構やスカラー反応により、膜内外に H<sup>+</sup> 濃度勾配が作られる。これを利用して ATP 合成酵素が ADP をリン酸化して ATP を産生する(Figure 1-1 (C))<sup>[6]</sup>。この反応系は、解糖系とは異なり O<sub>2</sub> を要求し、酸化的リン酸化と呼ばれる。酸化的リン酸化は、解糖系より効率がよく、最大でグルコース 1 分子から 36 分子の ATP が生成する。正常細胞は、主に電子伝達系で ATP を産生する。しかし、がん細胞では、好気性条件下においても効率的なミトコンドリアの酸化的リン酸化ではなく嫌氣的な解糖系による ATP 産生が増加している。この特性は、Warburg 効果と呼ばれている<sup>[7]</sup>。そのため、がん細胞内では NADH が正常細胞よりも多く蓄積している<sup>[8]</sup>。また、この嫌氣的解糖系で生成する乳酸や、乳酸が生成する際に生じる H<sup>+</sup> により、細胞内の pH は低下する。さらに、細胞内 pH を一定に維持するため、膜タンパク質が乳酸や H<sup>+</sup> を細胞外に排出するので、細胞外 pH も正常細胞と比較して弱酸性になる<sup>[9]</sup>。

また、がん細胞は正常細胞と比較して活性酸素種(ROS)濃度が高い<sup>[10]</sup>。ROS は、ミトコンドリアの電子伝達系での酸素分子の不完全な還元で、細胞内で常に生成している。正常細胞のミトコンドリアでは、O<sub>2</sub> が Complex IV のシトクロム c オキシダーゼで 4 電子還元されて H<sub>2</sub>O を生成する。しかし、この反応過程は完全ではなく、電子伝達系の Complex I, II, III から電子の一部が漏れ出て、この漏れ出た電子が取り込まれた酸素の約 0.2-2% と反応して ROS の一種であるスーパーオキシドアニオン(O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)を生成する(Figure 1-1 (C))<sup>[11]</sup>。生成した O<sub>2</sub><sup>•-</sup> は、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)により O<sub>2</sub> と過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)に変換される。さらに、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> はカタラーゼにより酸素と水に不均化される。ある程度の ROS は自己複製に必要であるが、過剰な ROS は細胞の急増や老化、アポトーシス誘導、腫瘍形成に関与する<sup>[12]</sup>。そのため、細胞内の ROS 濃度は前述の SOD やカタラーゼなどの抗酸化酵素によって分解されて制御されている<sup>[11]</sup>。しかし、ミトコンドリアの Complex II のサブユニット B, C 及び D に変異が起こると、電子の蓄積及びそれに伴う O<sub>2</sub><sup>•-</sup> と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の生成量が増加する。このような変異は、がん細胞のミトコンドリアで報告されており<sup>[13]</sup>、細胞のがん化や、がん細胞の ROS 濃度が正常細胞と比較して高いことの原因の一つであると考えられている<sup>[9]</sup>。また、細胞内の恒常性を維持するため、前述のように ROS 濃度が高いがん細胞中では、抗酸化剤(還元剤)濃度も正常細胞と比較して高くなっている。

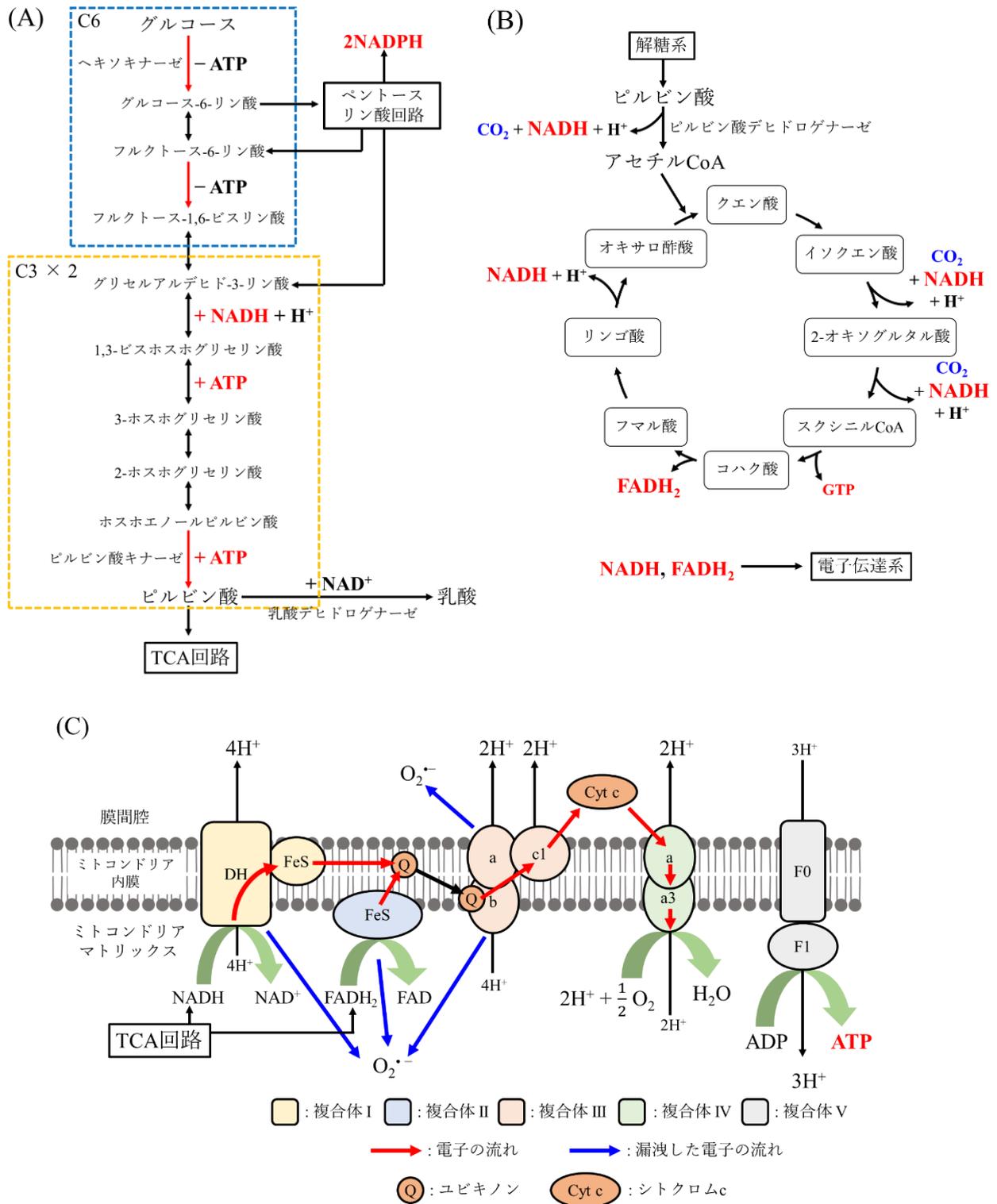


Figure 1-1. Flow of glycolysis (A), citric acid cycle (B), and electron transport chain (C).

### 1-2-2. がん細胞の ER

小胞体(endoplasmic reticulum, ER)は、細胞小器官や膜を構成するタンパク質の合成と折りたたみ、成熟化、カルシウム貯蔵などを担う細胞小器官である<sup>[14, 15]</sup>。ER は、細胞質を横断するようにして核膜までつながっており、袋状の膜構(cisternae, ER 槽)によって構成されている。ER 内のカルシウム枯渇や、細胞への酸化ストレス、低酸素や低栄養などの生理的ストレスにさらされると、ER 内に折りたたみ不全タンパク質が蓄積した状態となる。この状態は、ER ストレスと呼ばれる<sup>[16, 17]</sup>。ER ストレスは細胞の生理機能を妨げるため、この状態を回避するためのシステムが細胞には備わっている。ER 膜に存在するセンサータンパク(PERK, ATF6, IRE1)が ER ストレスを感知し、ER から核へと至るシグナル経路である ER ストレス応答(unfolded protein response, UPR)が引き起こされる<sup>[18-20]</sup>。各 ER ストレスセンサーによって引き起こされる UPR には、mRNA の翻訳の抑制や ER 分子シャペロンの転写の誘導、ER 関連分解(ER-associated degradation, ERAD)の活性化があり、細胞内の恒常性を維持するように働く。しかし、UPR が正常に機能しない場合や過度の ER ストレスがかかった場合には、アポトーシスにより細胞は死に至ることが知られている<sup>[19, 21]</sup>。

がん細胞では、低酸素<sup>[21]</sup>や低栄養といった ER ストレスを誘発する微小環境が生じており、それに応答して ER ストレスマーカーががん細胞内で過剰発現している<sup>[23, 24]</sup>。また、がん細胞ではシャペロンタンパクの発現が活性化しており、低酸素等によって誘導される ER ストレスに対応している。このように、UPR ががん細胞の生存に寄与していることが報告されている。

### 1-2-3. がん細胞の Golgi 体

Golgi 体は、細胞外へ分泌されるタンパク質の糖鎖修飾や輸送などを担う細胞小器官である<sup>[25, 26]</sup>。がん細胞では、Golgi 体に存在するタンパク質糖転移酵素の活性化や様々な受容体の発現亢進が報告されている。また、ER と同様に、Golgi 体にもストレスを回避するための Golgi 体の量的調節機構である Golgi 体ストレス応答が備わっていることが報告されている<sup>[27]</sup>。

### 1-3. 様々な標的能を有する金属錯体

これまで、がんの治療に向けて様々な抗がん剤が開発されてきた。そして、現在でも、抗がん剤の副作用軽減や既存の抗がん剤への耐性を有するがんへの新たな治療法開発を目指して、日夜研究が行われている。次にそれらの一部を述べる。

#### 1-3-1. DNA を標的とする金属錯体および臨床利用されている抗がん剤

臨床利用されている抗がん剤の一つに Bleomycin (BLM) (Figure 1-2)<sup>[28]</sup>がある。BLM は DNA 結合部位と金属結合部位をもち、投与後に体内で鉄と錯形成して  $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BLM})$  を形成する。その後、 $\text{O}_2$  や  $\text{H}_2\text{O}_2$  と反応して activated bleomycin と呼ばれる中間体  $\text{Fe}(\text{III})\text{-OOH}$  species (ABLM) を生成する<sup>[27b, c]</sup>。そして、ABLM が DNA を酸化的に一本鎖切断 (single-strand breaks, ssb) ないしは二本鎖切断 (double-strand breaks, dsb) を誘導する (Figure 1-3)。ssb と dsb の比率は 1:3 から 1:20 であると報告されている<sup>[29]</sup>。しかし、ABLM による DNA 切断機構は完全には解明されていない。BLM のビチアゾールを含む DNA 結合部位は、DNA 二重螺旋構造の塩基対間に平行挿入するインターカレーターまたは DNA の副溝に結合する minor groove binder として働くことが知られている。この部位で BLM は DNA との親和性が高められており、これがなければ DNA 切断活性は約 10 分の 1 に減少する。また、この部位は BLM の DNA ssb と dsb の比率にも影響を与えている。このようにして BLM は高い抗がん活性を示すが、正常細胞とがん細胞のどちらにも作用するため、長期使用では肺に対して副作用を示すことが問題視されている<sup>[30]</sup>。

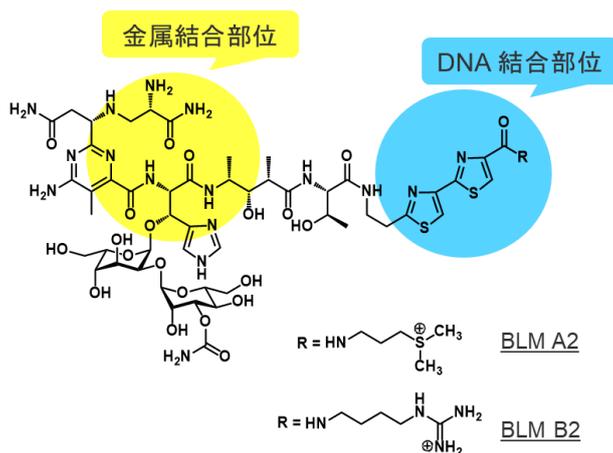


Figure 1-2. Chemical structure of BLM.

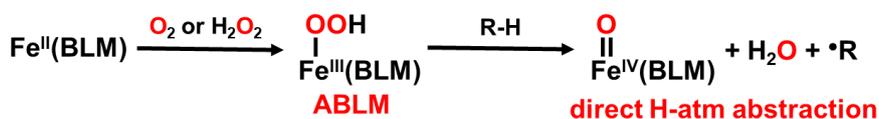


Figure 1-3. Proposal reaction pathway for ABLM.

上記の様に、BLM はインターカレーターや minor groove binder として働く DNA 結合部位をもち、その高い DNA 切断活性に寄与している<sup>[28]</sup>。また、臨床利用されているアントラサイクリン系抗生物質(Figure 1-4)は、インターカレーターとして DNA の塩基対間に挿入することで DNA や RNA の生合成を抑制し、抗がん活性を示す<sup>[31]</sup>。この様に DNA と結合する化合物は、自身のみで抗がん活性を示したり、その導入で抗がん活性を向上させたりするため、注目を集めており、DNA と強く結合する化合物はこれまでに数多く研究されている。DNA と化合物との結合箇所は様々であり、DNA に結合する分子は結合様式の違いから、DNA の主溝に結合する major groove binder, 副溝に結合する minor groove binder, そして、DNA の塩基対間に平行挿入するインターカレーターなどがある<sup>[32]</sup>。

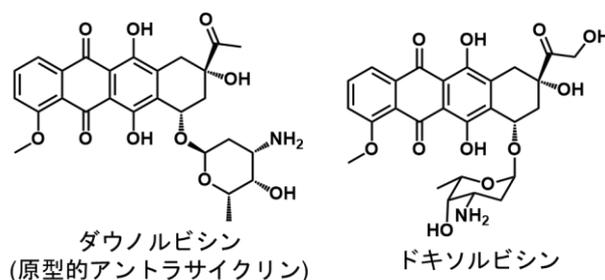


Figure 1-4. Structures of Anthracycline antibiotics.

インターカレーターとしては、phenanthroline<sup>[33]</sup>や dipyridophenazine (dppz)<sup>[34]</sup>などの多環芳香族化合物が多数存在する(Figure 1-5)<sup>[32, 35]</sup>。これらの化合物は、 $10^5$ – $10^6$  M<sup>-1</sup> 程度の結合定数を示すことが報告されている。また、これらを有する合成金属錯体も多数報告されており、錯体による DNA 切断活性の向上に寄与している。例えば、dpoq を有するルテニウム錯体[Ru(phen)<sub>2</sub>(dpoq)]<sup>2+</sup> (Figure 1-5)は、 $(7.22 \pm 0.72) \times 10^5$  (M<sup>-1</sup>)の結合定数を示すことが報告されている<sup>[33a]</sup>。dppz を有する銅錯体[Cu(L<sup>1</sup>)(dppz)](ClO<sub>4</sub>) (Figure 1-5)は、 $4.6 \times 10^4$  (M<sup>-1</sup>)の結合定数を示し、光照射により DNA 切断活性を示すことが報告されている<sup>[34a]</sup>。

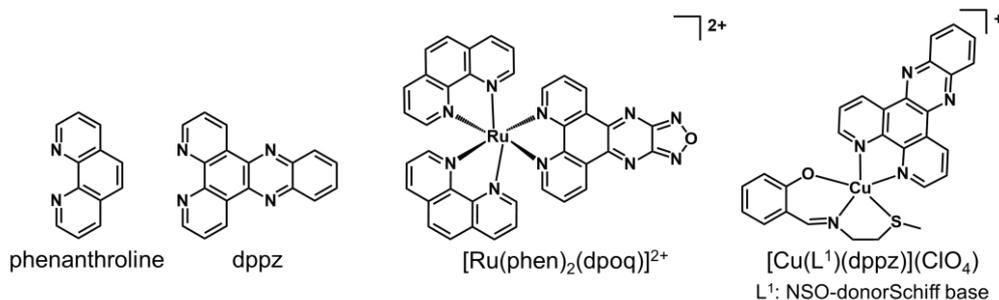


Figure 1-5. Structures of intercalator and complexes having intercalator.

### 1-3-2. ミトコンドリアを標的とする金属錯体

本章の 1-2-1 で述べたように、正常細胞よりもがん細胞では pH が低く、ROS および抗酸化剤濃度が高い微小環境が形成されている。抗がん剤の副作用軽減を目指し、前述の環境を標的とする抗がん剤の開発がなされている<sup>[36,37]</sup>。特に、ROS を生成する小器官であるミトコンドリアを標的とする様々な金属錯体が開発されている<sup>[38,39]</sup>。しかし、ミトコンドリアの二重膜は、多孔質の外膜とタンパク質豊富な内膜から構成されており、代謝を厳密に制御し、異物の侵入を防いでいるため、化合物の局在は困難である<sup>[40]</sup>。そこで注目されているのが非局在化した正電荷を持つ化合物であり、この化合物は膜を透過してミトコンドリアに効率よく侵入することが報告されている<sup>[41]</sup>。また、がん細胞のミトコンドリア膜(-220 mV)は正常細胞のミトコンドリア膜(-160 mV)と比べて過分極しているため、正電荷を帯びた化合物はがん細胞のミトコンドリア特異的に局在しやすい<sup>[42]</sup>。ミトコンドリア標的化合物として最もよく研究されている化合物は、トリフェニルホスホニウムイオン(TPP)である(Figure 1-6 (a))。TPP は、正電荷だけでなく、疎水性のミトコンドリア内膜との相互作用に有利な疎水性構造も併せ持つため、ミトコンドリアへの局在を促進することができる。細胞質内の TPP イオンの濃度は細胞外の約 5–10 倍、ミトコンドリア内への蓄積は細胞質の約 100–500 倍と報告されている<sup>[43]</sup>。また、mitochondria-penetrating peptides (MPPs)として Szeto-Schiller (SS)ペプチド<sup>[44]</sup>などが知られており(Figure 1-6 (b))、疎水性の高い残基とアルギニン(R)やリジン(K)のような正電荷を有する残基が交互に並ぶことが特徴である<sup>[45,46]</sup>。このように様々なミトコンドリアを標的とする化合物が報告されており、これらを導入した金属錯体も開発されている。例えば、ミトコンドリア標的として TPP を導入した terpyridine 配位子(tpy)に tetraphenyl phosphonium 基(tpp)を結合させた単核銅(II)錯体[Cu(tpy-tpp)Br<sub>2</sub>]Br (Figure 1-6 (c))は、ミトコンドリアを介したアポトーシスによってがん細胞に対して高い細胞毒性を示すことが報告されている<sup>[47]</sup>。[Cu(tpy-tpp)Br<sub>2</sub>]Br のがん細胞選択的毒性は、高い細胞内取り込みとミトコンドリア局在化によって達成されていることも明らかとなっている。

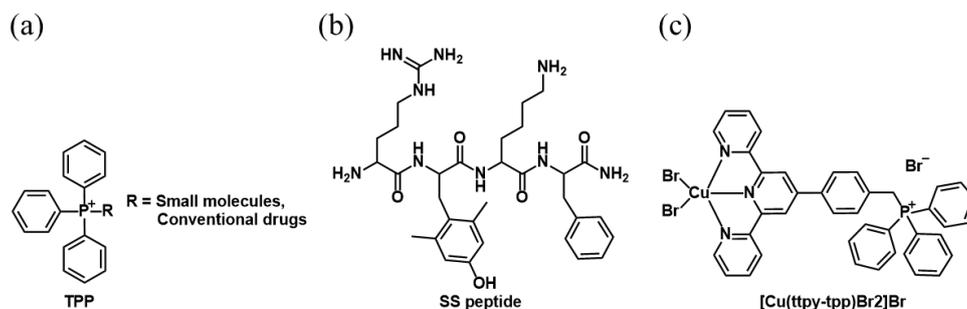


Figure 1-6. Chemical Structures of TPP (a), and SS peptide (b), and Cu complex (c).

### 1-3-3. ER を標的とする金属錯体

本章の 1-2-2 で述べたように, ER では酸化ストレスなどにより UPR が引き起こされ, 過度のストレスの場合には細胞死が誘導される<sup>[18,19]</sup>. 金属錯体には抗酸化剤との反応や光照射により ROS を生成することが可能なものがある. そのため, そのような金属錯体を ER に局在させることは, 効果的な抗がん剤になると考えられる.

これまでに, 様々な金属錯体が ER に局在することで細胞死を誘導することが報告されてきた<sup>[18,38]</sup>. 置換不活性なシクロメタル化ポリピリジル Ir 錯体が ER ストレスを引き起こすことが報告されている. このタイプの Ir 錯体は, ROS 生成を媒介とする光細胞毒性を有する. その代表例である  $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{bpy})]^+$  (Figure 1-7 (a)) は, 光毒性 ER ストレス誘導剤であり, 光照射により  $^1\text{O}_2$  とスーパーオキシドの両方を生成することが報告されている<sup>[48]</sup>. さらにこの錯体は, 光誘起電子伝達とエネルギー伝達の両方を介して, タンパク質を光架橋や光酸化することが明らかとなっており, 細胞内の様々なタンパク質を標的としている. また,  $[\text{Ir}(\text{tpy})(\text{pbpz})\text{Cl}]^+$  (Figure 1-7 (b)) は, 光照射により ER ストレスを誘発することが報告されている<sup>[48]</sup>. この錯体の細胞死誘導機構は, 光照射後に細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  レベルの上昇が確認されたことから, この錯体によって発生した ROS が, ER の  $\text{Ca}^{2+}$  輸送機構を直接攻撃していると考えられている. Pd 錯体  $[\text{Pd}(\text{acac})_2]$  も, 詳細な経路は明確になっていないが, ER から  $\text{Ca}^{2+}$  を放出することで ER ストレスを誘導し, 抗がん活性を誘導することが報告されている<sup>[50]</sup>.

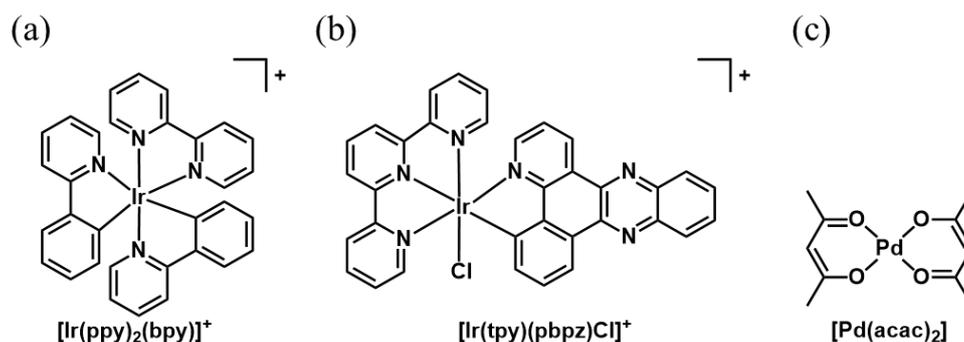


Figure 1-7. Chemical Structures of Ir complex ((a), (b)) and Pd complex (c).

### 1-3-4. Golgi 体を標的とする金属錯体

本章の 1-2-3 で述べたように, Golgi 体はタンパク質の輸送に関わる重要な小器官だが, 未解明な部分も多い. Golgi 体の機能への理解を深めるために, Golgi 体に局在し, 蛍光を有する金属錯体が開発されてきた<sup>[38]</sup>. Policar らは, 発光特性と赤外吸収特性を組み合わせたイメージング用シングルコアマルチモーダルプローブ(SCoMPI)として, Re のトリスカルボニル誘導体 $[\text{ReCl}(\text{CO})_3\text{-pyta-C}_{12}\text{N}_3]$ を開発し(Figure 1-8 (a)), Golgi 体に局在することを明らかにした<sup>[51]</sup>. また, 細胞において重要な機能を担う Golgi 体における障害は細胞死を誘導すると考えられる. Lo らは, 樹枝状シクロメタル化 Ir(III)ポリピリジン錯体 $[\{\text{Ir}(\text{N}^{\wedge}\text{C})\}_8(\text{bpy-8})]^{8+}$ と $[\{\text{Ir}(\text{N}^{\wedge}\text{C})\}_8(\text{pq-8})]^{8+}$ を開発し(Figure 1-8 (b)), これらの錯体が Golgi 体に局在し, 現在臨床利用されている白金錯体の抗がん剤である Cisplatin よりも高い細胞毒性を示すことを明らかにした<sup>[52]</sup>.

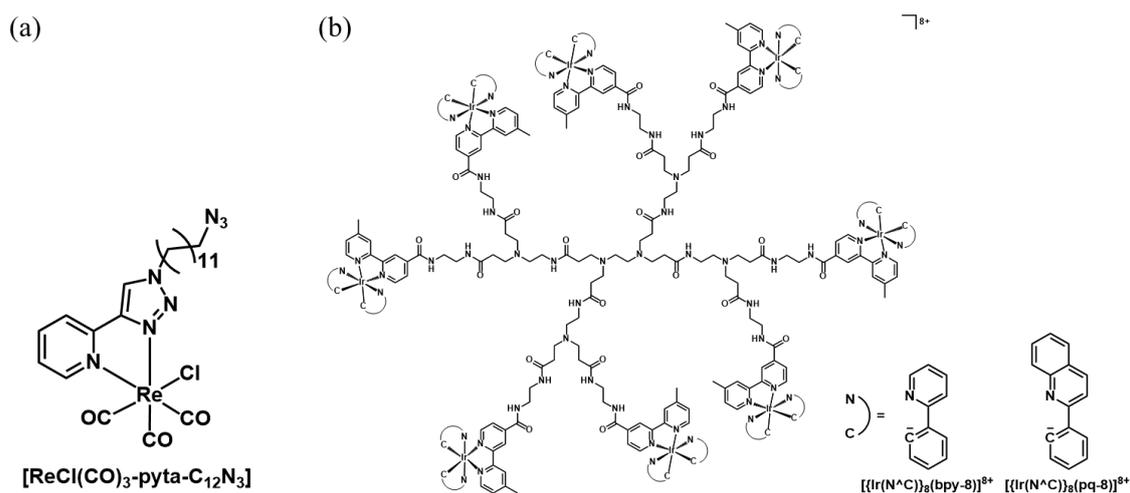


Figure 1-8. Chemical Structures of Re complex (a) and Ir complex (b).

#### 1-4. 銅錯体

1-3にも示すように、Pt, Au, Ir, Ru, Cuなど様々な金属を用いた金属錯体が抗がん剤として開発されている<sup>[53]</sup>。現在臨床利用されている Cisplatin (Figure 1-9)は白金錯体の抗がん剤であり、汎用性が高いことから様々ながん細胞種の治療に用いられている。しかし、嘔吐や腎障害などの副作用を引き起こす<sup>[54-56]</sup>。Cisplatinの副作用軽減に向けて開発されたのが Carboplatin (Figure 1-9)であるが、依然として副作用が問題となっている<sup>[57]</sup>。また、白金製剤は、副作用だけでなく、使用によりがん細胞が白金製剤耐性をもちやすいことや、予後不良なども問題視されている。これらの原因としては、Ptが酸化還元不活性な金属であり、正常細胞とがん細胞の両者に同等に作用することや、生体内に存在しない金属であり、蓄積することなどが挙げられる<sup>[55, 56]</sup>。

その点、内在性の金属であり、生体内に代謝機構が存在し、細胞内での恒常性が厳密に保たれているCuを用いた金属錯体による抗がん剤は、正常細胞に対して毒性が低く、予後不良も引き起こしにくいと考えられる。しかし、生体内の銅錯体の働きは研究されてきたにもかかわらず、実際に抗がん剤として臨床研究されている銅錯体は未だにない。また、銅錯体は酸化還元活性な金属であり、その活性が生物学的活性にも部分的に関与していることが報告されている<sup>[58, 59]</sup>。銅錯体は、生体内チオールである Glutathione (GSH)や Dithiothreitol (DTT), Thioredoxin (Trx)などの抗酸化剤と付加体を形成した後、Cu(II)からCu(I)に還元される。そして、Fenton型反応によりROSを生成することが可能である<sup>[60-62]</sup>。この反応による細胞内GSHなどの枯渇はROSレベルの増加、ひいては酸化ストレスを誘導することが分かっている。このように酸化還元活性な銅錯体は、がん細胞の微小環境に応答し、がん細胞選択的に細胞毒性を示す可能性がある。

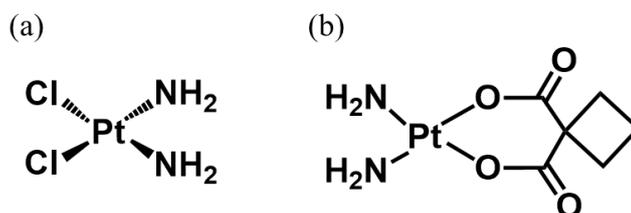
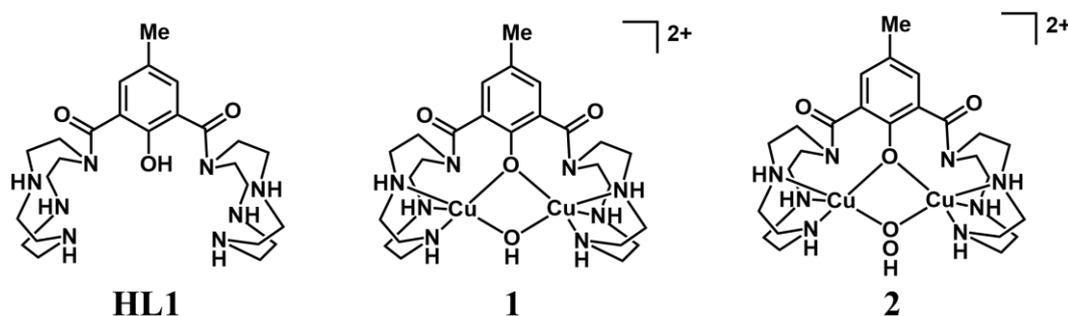


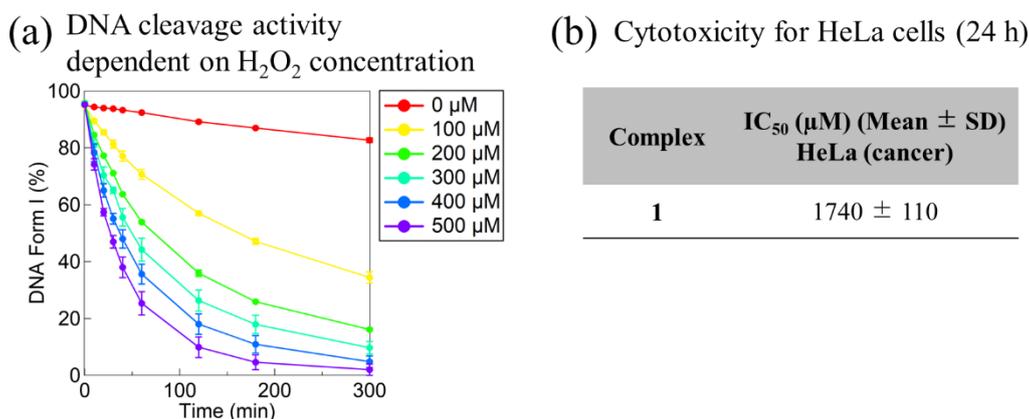
Figure 1-9. Chemical Structures of Pt complexes.

### 1-5. 当研究室の先行研究

当研究室では、*p*-cresol の 2,6 位に 2 つの 1,4,7,10-tetraazacyclododecane (cyclen) を amide tether で導入した二核化配位子 HL1 (Figure 1-10) とその二核銅錯体  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{L1})](\text{ClO}_4)_2$  (**1**) (Figure 1-10) を開発し、その DNA 切断や細胞毒性を報告した<sup>[63]</sup>. **1** は、 $\text{H}_2\text{O}_2$  と反応して活性種として  $\mu$ -1,1-hydroperoxodicopper(II)錯体  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-O}_2\text{H})(\text{L1})]^{2+}$  (**2**) (Figure 1-10) を生成する. また  $\text{H}_2\text{O}_2$  存在下で DNA の酸化切断を加速し、その切断活性は  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度が高い程増加することを見出した(Figure 1-11 (a)). 一方、ヒト子宮頸がん細胞である HeLa 細胞に対する **1** の細胞増殖 50% 阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) は  $1740 \mu\text{M}$  で、既存の抗がん剤と比較して細胞毒性は低かった(Figure 1-11 (b)). この原因として、DNA 切断活性が十分には高くないことや、錯体の親水性の高い構造により疎水性の細胞膜を透過しにくく、細胞内取込量が少ないことなどが考えられる. したがって、錯体の DNA 標的能力の向上による DNA 切断活性の向上や疎水性の向上による細胞内取込量の向上は細胞毒性の向上に有効であると考えられる.

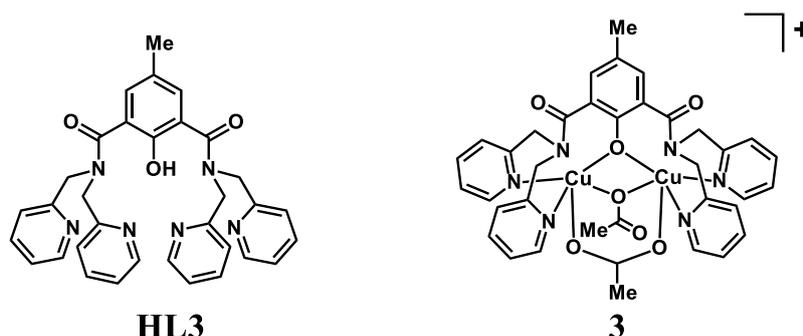


**Figure 1-10.** Structures of HL1,  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{L1})]^{2+}$  (**1**), and  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-O}_2\text{H})(\text{L1})]^{2+}$  (**2**).



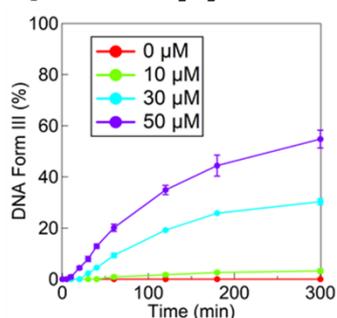
**Figure 1-11.** (a)  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration-dependent (0–500  $\mu\text{M}$ ) profile for DNA cleavage promoted by **1** (50  $\mu\text{M}$ ). Time courses for the decrease of % of Form I at pH 6.0. (b) Cytotoxicity of **1** against HeLa cells by means of MTT assay (24 h).

さらに、当研究室では、2,6-bis(amide-tether dpa)-*p*-cresol (HL3) (Figure 1-12)とその二核銅錯体 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-}1,1\text{-OAc})(\mu\text{-}1,3\text{-OAc})(\text{L3})](\text{OAc})$  (**3**) (Figure 1-12)を開発し、**3**が $\text{H}_2\text{O}_2$ によるDNA酸化切断を加速し、がん細胞選択的毒性を示すことを見出した(Figure 1-13)<sup>[64]</sup>。しかし、**3**の細胞毒性はCisplatinと比べて低く、抗がん剤としての利用には不十分だった。また**3**の細胞毒性発現機構は十分には解明されていない。そこで、**3**の細胞毒性の向上と細胞毒性の発現機構の解明のためには、**3**の細胞内挙動を明らかにする必要があり、**3**に蛍光分子であるBodipyを導入した**3**-Bodipy結合体(Figure 1-14)を合成し、その細胞内挙動を共焦点顕微鏡で追跡した。その結果、**3**-Bodipy結合体はミトコンドリアと核小体に分布することがわかった(Figure 1-14)。しかし、これは**3**-Bodipy結合体の挙動であり、**3**の細胞内挙動は不明である。また、そのDNA切断活性や細胞毒性は、既存の抗がん剤であるBLMと比較してもまだ低く、改善の余地がある。



**Figure 1-12.** Structures of HL3 and  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-}1,1\text{-OAc})(\mu\text{-}1,3\text{-OAc})(\text{L3})]^+$  (**3**).

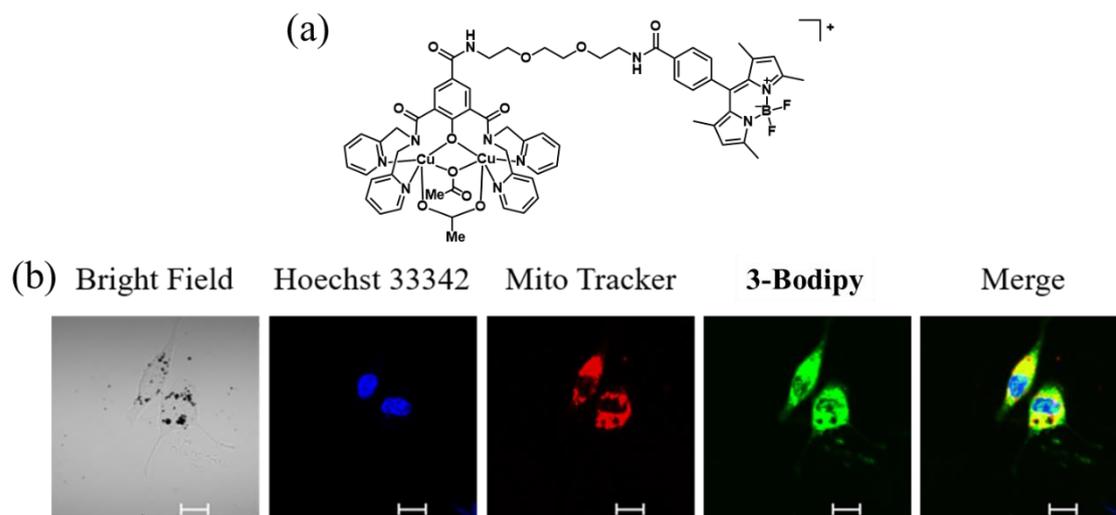
(a) DNA cleavage activity dependent on  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration



(b) Cytotoxicity for cancer and normal cells (24 h)

Complex	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) (Mean $\pm$ SD)			
	Cervical		Lung	
	HeLa (cancer)	A549 (Cancer)	WI-38 (Normal)	SF
<b>3</b>	$72.8 \pm 2.1$	$92.7 \pm 1.4$	$121 \pm 11$	1.3
<b>Cisplatin</b>	$2.33 \pm 0.23$	$5.35 \pm 0.82$	$6.33 \pm 0.13$	1.2

**Figure 1-13.** (a)  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration-dependent (0–50  $\mu\text{M}$ ) profile for DNA cleavage promoted by **3** (30  $\mu\text{M}$ ). Time courses for the increase of % of Form III at pH 6.0. (b) Cytotoxicity of **3** and Cisplatin against cancer and normal cells by means of MTT assay (24 h).



**Figure 1-14.** (a) Structure of **3-Bodipy**. (b) Confocal luminescence microscopy images of HeLa cells with treatments of **3-Bodipy** (100  $\mu\text{M}$ ) (green) for 24 h, stained with Hoechst 33342 (blue) and Mito Tracker (red), as well as merged images. Scale bars represent 20  $\mu\text{m}$ .

## 1-6. 研究概要

本論文では、*p*-cresol から誘導される様々な二核化配位子の二核銅錯体を開発し、これら金属錯体の DNA 切断活性や細胞毒性などの抗がん活性について詳細に検討した。ここで得られた知見は、副作用の少ない抗がん剤の開発に向けて研究基盤を提供できる有益なものであると考える。以下に、各章の概要を述べる。

第二章では、当研究室で開発した *p*-cresol の 2,6 位にペンダント基として環状アミン 1,4,7,10-tetraazacyclododecane (cyclen) を持つ amide-tether 型配位子の二核銅錯体  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{L1})](\text{ClO}_4)_2$  (**1**) の 4 位メチル基を  $-\text{CONH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO-phenanthrene}$  で置換した DNA 標的部位を持つ二核銅錯体  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{L1}^{\text{P2}})](\text{ClO}_4)_2$  (**1<sup>P2</sup>**) を新たに開発した。分光学的測定から、**1<sup>P2</sup>** は **1** と同様に  $\text{H}_2\text{O}_2$  との反応で安定な  $\mu\text{-1,1-hydroperoxodicopper(II)}$  錯体 (**2<sup>P2</sup>**) を形成することが示された。そして、DNA 結合能力、DNA 切断活性、細胞毒性の測定を通して、phenanthrene の導入による効果を明らかとした。さらに、FACS や共焦点顕微鏡を用いた測定を通して、**1<sup>P2</sup>** の細胞死経路がミトコンドリア経由のアポトーシスであり、DNA 標的部位として phenanthrene を導入することがその細胞死経路を促進し、がん細胞選択的細胞毒性を向上させることを見出した。

第三章では、第二章で見出された phenanthrene による DNA 標的の抗がん活性機能の解明とその向上を目指し、 $-\text{CONH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO-phenanthrene}$  (P-リンカー) の鎖長を変化させた二核銅錯体  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{L1}^{\text{Pn}})](\text{ClO}_4)_2$  (**1<sup>Pn</sup>** ( $n = 1, 3$ )) と phenanthrenyl 基を methyl で置換した  $-\text{CONH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO-methyl}$  (M-リンカー) を導入した二核銅錯体  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{L1}^{\text{Mn}})](\text{ClO}_4)_2$  (**1<sup>Mn</sup>** ( $n = 1, 2, 3$ )) を新たに開発した。DNA 結合能力、DNA 切断活性、細胞毒性、細胞内取り込み量の測定により、P-リンカーは細胞内においても特異的に DNA に結合して細胞毒性を大きく向上させるが、M-リンカーは DNA 特異性がないために向上させないことが明らかになった。本章を通して、DNA 標的部位の導入における有益な知見が得られた。

第四章では、*p*-cresol の 2,6 位にペンダント基として dipyritydimethylamine (dpa) を有する amide-tether 型二核銅錯体  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-1,1-OAc})(\mu\text{-1,3-OAc})(\text{L3})](\text{OAc})$  (**3**) の dpa の 4 位に置換基(電子供与 MeO 基および電子求引 Cl 基)を導入した二核銅(II)錯体  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-1,1-OAc})(\mu\text{-1,3-OAc})(\text{L3}^{4\text{-MeO}})][\text{Y}]$  [ $\text{Y} = \text{PF}_6$  (**3a<sup>4-MeO</sup>**),  $\text{OAc}$  (**3b<sup>4-MeO</sup>**)],  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-1,3-OAc})_2(\text{L3}^{4\text{-Cl}})][\text{Y}]$  [ $\text{Y} = \text{ClO}_4$  (**3a<sup>4-Cl</sup>**),  $\text{OAc}$  (**3b<sup>4-Cl</sup>**)] を合成した。分光学的測定と結晶構造解析の結果、置換基の電子効果で銅の配位構造が変化することが示された。この電子効果により、AscNa との反応で生成する ROS の種類が **3b<sup>4-MeO</sup>** では  $\text{H}_2\text{O}_2$  が優勢であり、**3b<sup>4-Cl</sup>** では  $\text{HO}\cdot$  が優勢であった。また、細胞を用いた測定から、**3b<sup>4-MeO</sup>**、**3b<sup>4-Cl</sup>** は ER、Golgi 体に集積して ROS を

生成して細胞死を誘導することが明らかとなった。さらに、がん細胞中でしか ROS 生成を確認できなかった **3** と **3b<sup>4-MeO</sup>** はがん細胞選択的な細胞毒性を示したことから、細胞選択的毒性にはがん細胞と正常細胞の環境に応答した ROS 生成が重要であることが示唆された。

第五章では、**3** が、空気下、アスコルビン酸ナトリウム(AscNa)による還元的酸素活性化で supercoiled plasmid pUC19DNA の 26%を 1 分間で直鎖状 DNA に変換する、**3** の DNA 二本鎖切断(dsb)の burst の反応機構を解明した。Robson 型二核銅(II)錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-OH)(bpmp)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (**4**), BLM の金属結合部位の模倣配位子である N4Py の鉄(II)錯体[Fe(MeCN)(N4Py)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (**5**)を比較とし、DNA 切断活性や DNA 結合能力、HO•生成能力などを測定することで、**3** の速い HO•生成と DNA 結合様式が、DNA dsb の burst を可能にする重要な特徴であることが明らかとなった。

第六章では、**3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** の AscNa 存在下の DNA 切断活性を評価して、第五章で見出した **3** による DNA dsb の burst の機構解明と要件の裏付けを行った。DNA dsb 活性は **3b<sup>4-Cl</sup>** < **3** < **3b<sup>4-MeO</sup>** であり、この関係は短時間での HO•の生成量と一致し、電子効果に起因することが明らかとなった。DNA 結合能力の測定から、**3b<sup>4-MeO</sup>** は DNA に自由度が最も低い状態で強く結合しており、その結合状態が低濃度で DNA dsb の burst を可能にすることが示唆された。

第七章では、低濃度での DNA dsb の burst には DNA との強い結合が重要であることを踏まえ、**3** の 4 位に P-リンカー、M-リンカーを持つ二核銅(II)錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3<sup>X</sup>)](OAc) (**3<sup>X</sup>** (X = P, M))を開発した。AscNa 存在下で DNA 切断活性を評価したところ、**3<sup>P</sup>** は **3** よりも高い DNA dsb 活性を示したが、**3<sup>M</sup>** は **3** よりも活性が低かった。さらに、DNA 結合能力の測定から、**3<sup>P</sup>** は phenanthrene 部位で DNA に対してエンタルピー駆動で結合することが明らかとなった。以上の結果より、DNA dsb 活性の向上に必要な要件が速い HO•生成と DNA 結合様式であることが裏付けられた。

第八章では、本博士論文における総括を述べる。

## 1-7. 参考文献

- [1] (a) C. Martel, D. Georges, F. Bray, J. Ferlay, and M. G. Clifford, *Lancet Glob. Health.* **2020**, 8, e180–e190. (b) L. Lin, L. Yan, Y. Liu, F. Yuan, H. Li, and J. Ni, *J. Hematol. Oncol.* **2019**, 12:96.
- (c) Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, 68, 394–424.
- [2] (a) T. Kato, H. Wakiyama, A. Furusawa, P. L. Choyke, and H. Kobayashi, *Cancer*, **2021**, 13, 2535. (b) H. Kobayashi, and P. L. Choyke, *Acc. Chem. Res.* **2019**, 52, 2332–2339
- [3] A. L. Fothergill-Gilmore, and A. M. P. Michels, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1993**, 59, 105–235.
- [4] (a) A. Marín-Hernández, C. J. Gallardo-Pérez, S. Rodríguez-Enríquez, R. Encalada, R. Moreno-Sánchez, and E. Saavedra, *Biochim Biophys Acta Bioenerg* **2011**, 1807, 755–767. (b) A. R. Gatenby, and J. R. Gillies, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, 39, 1358–1366.
- [5] I. Martínez-Reyes, P. L. Diebold, H. Kong, M. Schieber, H. Huang, T. C. Hensley, M. M. Mehta, T. Wang, H. J. Santos, R. Woychik, E. Dufour, J. N. Spelbrink, E. S. Weinberg, Y. Zhao, J. R. DeBerardinis, and S. N. Chandel, *Mol. Cell* **2016**, 61, 199–209.
- [6] (a) A. Boveris, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1977**, 78, 67–82. (b) B. Chance, H. Sies, and A. Boveris, *Physiol. Rev.* **1979**, 59, 527–605. (c) H. J. Forman, and J. A. Kennedy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1974**, 60, 1044–1050. (d) H. J. Forman, and J. A. Kennedy, *J. Biol. Chem.* **1975**, 250, 4322–4326. (e) I. Fridovich, *Science* **1978**, 201, 875–880. (f) S. R. Balaban, S. Nemoto, and T. Finkel, *Cell* **2005**, 120, 483–495. (g) T. Finkel, and N. J. Holbrook, *Nature* **2000**, 408, 239–247.
- [7] (a) J.-W. Kim, and C. V. Dang, *Cancer Res.* **2006**, 66, 8927–8930. (b) O. Warburg, *Science* **1956**, 123, 309–314.
- [8] (a) A. G. Maynard, and N. Kanarek, *Cell Metab* **2020**, 31(4), 660–662. (b) L. Yang, J. C. G. Canaveras, Z. Chen, L. Wang, L. Liang, C. Jang, J. A. Mayr, Z. Zhang, J. M. Ghergurovich, L. Zhan, S. Joshi, Z. Hu, M. R. McReynolds, X. Su, E. White, R. J. Morscher, and J. D. Rabinowitz, *Cell Metab* **2020**, 31, 809–821.
- [9] (a) Y. Kato, S. Ozawa, C. Miyamoto, Y. Maehata, A. Suzuki, T. Maeba, and Y. Baba Y. *Cancer Cell Int.* **2013**, 13:89. (b) H.-J. Lin, P. Herman, and J. R. Lakowicz, *Cytometry A* **2003**, 52, 77–89. (c) R. J. Gillies, N. Raghunand, G. S. Karczmar and Z. M. Bhujwala, *J. Magn. Reson. Imaging* **2002**, 16, 430–450.
- [10] N. Aykin-Burns, I. M. Ahmad, Y. Zhu, L. W. Oberley, and D. R. Spitz, *Biochem. J.* **2009**, 418, 29–37.

- [11] (a) I. M. Ahmad, N. Aykin-Burns, J. E. Sim, S. A. Walsh, R. Higashikubo, G. R. Buettner, S. Venkataraman, M. A. Mackey, S. W. Flanagan, L. W. Oberley, and D. R. Spitz, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 4254–4263. (b) A. Boveris, and E. Cadenas, *CRC Press, Boca Raton*, **1982**, 15–30. (c) A. Boveris, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1977**, *78*, 67–82.
- [12] (a) K. Umezawa, M. Yoshida, M. Kamiya, T. Yamasoba, and Y. Urano, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 279–286. (b) M. Schieber, and N. S. Chandel, *Curr. Biol.* **2014**, *24*, R453–R462. (c) I. Harris, S. McCracken, and T. W. Mak, *Cell Res.* **2012**, *22*, 447–449. (d) Foyer, C. H.; Halliwell, B. *Planta* **1976**, *133*, 21–25.
- [13] (a) K. M. Owens, N. Aykin-Burns, D. Dayal, M. C. Coleman, F. E. Domann, and D. R. Spitz, *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *52*, 160–166. (b) N. Aykin-Burns, B. G. Slane, A.T. Liu, K. M. Owens, M. S. O’Malley, B.J. Smith, F. E. Domann, and D. R. Spitz, *Radiat. Res.* **2011**, *175*, 150–158. (c) B. G. Slane, N. Aykin-Burns, B. J. Smith, A. L. Kalen, P. C. Goswami, F. E. Domann, and D. R. Spitz, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 7615–7620. (d) N. Ishii, M. Fujii, P. S. Hartman, M. Tsuda, K. Yasuda, N. Senoo-Matsuda, S. Yanase, D. Ayusawa, and K. Suzuki, *Nature* **1998**, *394*, 694–697.
- [14] S. Wang, and R. J. Kaufman, *J Cell Biol.* **2012**, *197*, 857–867.
- [15] A. J. Dorner, L. C. Wasley, and R. J. Kaufman, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 20602-7.
- [16] M. J. Gething, and J. Sambrook, *Nature* **1992**, *355*, 35–45.
- [17] K. Zhang, and R. J. Kaufman, *Nature* **2008**, *454(7203)*, 455–62.
- [18] M. Schröder, and R. J. Kaufman, *Mutation research* **2005**, *569*, 29–63.
- [19] A. P. King, and J. J. Wilson, *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 8113–8136
- [20] S. Cao, J. Tang, Y. Huang, G. Li, Z. Li, W. Cai, Y. Yuan, J. Liu, X. Huang, and H. Zhang, *Front. Mol. Biosci.* **2021**, *8*, 620514.
- [21] H. Zinszner, M. Kuroda X. Wang, N. Batchvarova, R. T. Lightfoot, H. Remotti, J. L. Stevens, and D. Ron, *Genes Dev.* **1998**, *12*, 982–95.
- [22] W. A. Denny, *Lancet* **2000**, *1*, 25–29.
- [23] M. Bi, C. Naczki, M. Koritzinsky, D. Fels, J. Blais, N. Hu, H. Harding, I. Novoa, M. Varia, J. Raleigh, D. Scheuner, R. J. Kaufman, J. Bell, D. Ron, B. G. Wouters, and C. Koumenis, *Embo J.* **2005**; *24*, 3470–3481.
- [24] C. Koumenis, and B. G. Wouters, *Mol Cancer Res.* **2006**, *4*, 423–36.
- [25] K. Kurokawa, H. Osakada, T. Kojidani, M. Waga, Y. Suda, H. Asakawa, T. Haraguchi, and A. Nakano, *J. Cell Biol.* **2019**, *218(5)*, 1602–1618.

- [26] K. J. Day, L. A. Staehelin, and B. S. Glick, *Histochem Cell Biol* **2013**, *140*, 239–249.
- [27] H. Yoshino, *Seikagaku* **2017**, *89*(2), 154–163.
- [28] (a) H. Umezawa, K. Maeda, T. Takeuchi, and Y. Okami, *J. Antibiot.* **1966**, *19*, 200–209. (b) A. Decker, M. S. Chow, J. N. Kemsley, N. Lehnert, and E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4719–4733. (c) L. V. Liu, C. B. Bel III, S. D. Wong, S. A. Wilson, Y. Kwak, M. S. Chow, J. Zhao, K. O. Hodgson, B. Hedman, E. I. Solomon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 22419–22424.
- [29] Q. Li, T. A. van den Berg, B. L. Feringa, and G. Roelfes, *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 8012.
- [30] (a) S.-X. Huang, Z. Feng, L. Wang, U. Galm, E. Wendt-Pienkowski, D. Yang, M. Tao, J. M. Coughlin, Y. Duan, and B. Shen, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13501–13509. (b) J. Chen, and J. Stubbe, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 102–112. (c) U. Galm, M. H. Hager, S. G. V. Lanen, J. Ju, J. S. Thorson, and B. Shen, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 739–758.
- [31] (a) F. E. Niaki, V. T. Acker, L. Imre, P. Nánási Jr., S. Tarapcsák, Z. Bacsó, F. Vanhaecke, G. Szabó, *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1107. (b) F. C. Thorn, C. Oshiro, S. Marsh, T. Hernandez-Boussard, H. McLeod, E. T. Klein, B. R. Altman, *Pharmacogenet. Genomics* **2011**, *21*, 440–446. (c) A. DiMarco, *Antineoplastic and Immunosuppressive Agents II* **1975**, 593–614.
- [32] (a) J. B. Pages, L. D. Ang, P. E. Wright, and R. J. Aldrich-Wright, *Dalton Trans.*, **2015**, *44*, 3505–3526. (b) J. M. Hannon, *Chem. Soc.*, **2007**, *36*, 280–295. (c) E. K. Erkkila, T. D. Odom, and K. J. Barton, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2777–279.
- [33] (a) B. Peng, X. Chena, K.-J. Du, B.-L. Yu, H. Chao, L.-N. Ji, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2009**, 896–901. (b) K. Radhakrishnan, T. Khamrang, K. Sambantham, K. V. Sali, C. Chitgupi, F. J. Lovell, A. A. Mohammade, R. Venugopal, *Polyhedron* **2021**, *194*, 114886.
- [34] S. Dhar, M. Nethaji, and R. A. Chakravarty, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 11043–11050.
- [35] (a) H.-K. Liu, and J. P. Sadler, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 349–359. (b) S. R. Ratnayake, L. Chang, L. N. Tumey, F. Loganzo, A. J. Chemler, M. Wagenaar, S. Musto, F. Li, E. J. Janoso, T. E. Ballard, B. Rago, L. G. Steele, D. W. Ding, X. Feng, C. Hosselet, V. Buklan, J. Lucas, E. F. Koehn, J. C. O'Donnell, and E. I. Graziani, *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30*, 200–209. (c) M. K. Deo, J. B. Pages, L. D. Ang, P. C. Gordon, and R. J. Aldrich-Wright, *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1818. (d) P. Kumar, S. Tomar, K. Kumar, and S. Kumar, *Dalton Trans.* **2023**, *52*, 6961.
- [36] A. K. Singh, A. Kumar, H. Singh, P. Sonawane, P. Pathak, M. Grishina, J. P. Yadav, A. Verma, and P. Kumar, *Chem. Biodiversity* **2023**, *20*, e202300061.

- [37] R. Paprocka, M. Wiese-Szadkowski, S. Janciauskiene, T. Kosmalski, M. Kulik, and A. Helmin-Basa, *Coord Chem Rev.* **2021**, *452*, 214307.
- [38] (a) K. Qiu, Y. Chen, T. W. Rees, L. Ji, and H. Chao, *Coord Chem Rev.* **2019**, *378*, 66–86. (b) C. Caporale, and M. Massi, *Coord Chem Rev.* **2018**, *363*, 71–91.
- [39] M. T. Jeena, S. Kim, S. Jin, and J-H. Ryu, *Cancers* **2020**, *12*, 4.
- [40] C. A. Mannella, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1763*, 542–548.
- [41] M. Millard, D. Pathania, Y. Shabaik, L. Taheri, J. Deng, and N. Neamati, *PLoS ONE* **2010**, *5*, e13131.
- [42] L. D. Zorova, V. A. Popkov, E. Y. Plotnikov, D. N. Silachev, I. B. Pevzner, S. S. Jankauskas, V. A. Babenko, S. D. Zorov, A. V. Balakireva, M. Juhaszova, S. J. Sollott, and D. B. Zorov, *Anal. Biochem.* **2018**, *552*, 50–59.
- [43] S. E. Weinberg, and N. S. Chandel, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 9–15.
- [44] H. H. Szeto, *The AAPS Journal*, **2006**, *8*, E227–E283.
- [45] D. Liu, F. Jin, G. Shu, X. Xu, J. Qi, X. Kang, H. Yu, K. Lu, S. Jiang, F. Han, J. You, Y. Du, and J. Ji, *Biomaterials* **2019**, *211*, 57–67.
- [46] K. L. Horton, K. M. Stewart, S. B. Fonseca, Q. Guo, and S. O. Kelley, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 375–382.
- [47] W. Zhou, X. Wang, M. Hu, C. Zhua, and Z. Guo, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 2761–2770.
- [48] J. S. Nam, M.-G. Kang, J. Kang, S.-Y. Park, S. J. C. Lee, H.-T. Kim, J. K. Seo, O-H. Kwon, M. H. Lim, H-W Rhee, and T.-H. Kwon, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138(34)*, 10968–10977.
- [49] B. Yuan, J. Liu, R. Guan, C. Jin, L. Jia, and H. Chao, *Dalton Trans.* **2019**, *48*, 6408–6415.
- [50] (a) T. J. Carneiro, A. S. Martins, M. P. M. Marques, and A. M. Gil, *Sec. Cancer Metabolism* **2020**, *10*, 590970. (b) Y. Wang, J. Hu, Y. Cai, S. Xu, B. Weng, K. Peng, X. Wei, T. Wei, H. Zhou, X. Li, and G. Liang, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9601–9611.
- [51] S Clede, F. Lambert, C. Sandt, Z. Gueroui, M. Refregiers, M.-A. Plamont, P. Dumas, A. Vessieres, and C. Policar, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 7729–7731.
- [52] K. Y. Zhang, H.-W. Liu, T. T.-H. Fong, X.-G. Chen, and K. K.-W. Lo, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 5432–5443.
- [53] U. Jungwirth, C. R. Kowol, B. K. Keppler, C. G. Hartinger, W. Berger, and P. Heffeter, *Antioxid Redox Signal*, **2011**, *15*, 1085–1127.
- [54] (a) U. Ndagi, N. Mhlongo, and E. S. Soliman, *Drug Des. Devel. Ther. Rev.* **2017**, *11*, 599–616. (b) T. C. Johnstone, and K. Suntharalingam, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 3436–3486.

- [55] S. Yokoo, A. Yonezawa, S. Masuda, A. Fukatsu, T. Katsura, and K.-I. Inui, *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 477–487.
- [56] A.-M. Florea, and D. Busselberg, *Cancers* **2011**, *3(1)*, 1351–1371.
- [57] A. J. Di Pasqua, J. Goodisman, and J. C. Dabrowiak, *Inorg Chim Acta*, **2012**, *389*, 29–35.
- [58] R. W. Byrnes, W. E. Antholine, and D. H. Petering, *Free Radic Biol Med.* **1992**, *13*, 469–478.
- [59] M. McCann, M. Geraghty, M. Devereux, D. O’Shea, J. Mason, and L. O’Sullivan, *Met Based Drugs.* **2000**, *7*, 185–193.
- [60] R. W. Byrnes, M. Mohan, W. E. Antholine, R. X. Xu, and D. H. Petering, *Biochemistry.* **1990**, *29*, 7046–7053.
- [61] Z. Q. Liu, *Chem Rev.* **2010**, *110*, 5675–5691.
- [62] L. A. Saryan, K. Mailer, C. Krishnamurti, W. Antholine, and D. H. Petering, *Biochem Pharmacol.* **1981**, *30*, 1595–1604.
- [63] Y. Kadoya, K. Fukui, M. Hata, R. Miyano, Y. Hitomi, R. Yanagisawa, M. Kubo, and M. Kodera, *Inorg. Chem.* **2019**, *58*, 14294–14298.
- [64] Y. Kadoya, M. Hata, Y. Tanaka, A. Hirohata, Y. Hitomi, and M. Kodera, *Inorg. Chem.* **2021**, *60*, 5474.

## 第二章：Enhancement of Cancer-cell-selective Cytotoxicity by a Dicopper Complex with a Phenanthrene Amide-tether Ligand Conjugate via Mitochondrial Apoptosis

### 2-1. 要旨

2,6-bis(amide-tether cyclen)-*p*-cresol 配位子(HL1)と DNA 標的部局として phenanthrene を導入した新規配位子(HL1<sup>P2</sup>)を合成し、その二核銅(II)錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-OH)(Ln)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> [n = 1 (1) and 1<sup>P2</sup> (1<sup>P2</sup>)]を得た。phenanthrene の導入で 1<sup>P2</sup> は 1 と比べて DNA 結合能力が 9 倍向上し、過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)存在下での supercoiled plasmid pUC19 DNA の二本鎖切断(double-strand breaks, dsb)活性が 9.3 倍向上した。1<sup>P2</sup> と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の反応で μ-1,1-hydroperoxodicopper(II) 錯体 2<sup>P2</sup> が生成し、これが DNA 酸化切断の活性種であることを分光学的に明らかにした。肺と膵臓のがん細胞に対する IC<sub>50</sub> 値は 1<sup>P2</sup> が 23.8, 18.4 μM, 1 が 284, 241 μM であり、1<sup>P2</sup> の細胞毒性は 1 と比べて約 12 倍向上した。共焦点顕微鏡を用いた細胞観察や fluorescence-activated cell sorting (FACS)による細胞死経路の同定から、子宮頸がん細胞である HeLa 細胞に対して 1<sup>P2</sup> がミトコンドリア経路のアポトーシスを誘導することを明らかにした。この様に phenanthrene 部位は DNA 標的として作用し、1<sup>P2</sup> のミトコンドリア経路の内因性アポトーシスを介したがん細胞選択的毒性を大きく向上させることが明らかになった。

---

Machi Hata, Itsuki Saito, Yuki Kadoya, Yoshiki Tanaka, Yutaka Hitomi, and Masahito Kodera  
“Enhancement of cancer-cell-selective cytotoxicity by a dicopper complex with a phenanthrene amide-tether ligand conjugate via mitochondrial apoptosis” *Dalton Trans.*, **2022**, 51, 4720–4727.

## 2-2. 緒言

Cisplatin<sup>[1,2]</sup>や Bleomycin (BLM)<sup>[3,4]</sup>は、DNA への結合や DNA 切断を介して細胞死を誘導する抗がん剤であり、現在臨床利用されている。しかし、これらはがん細胞と正常細胞の両者に同様に作用するため、深刻な副作用を引き起こす。そこで、がん細胞に対して選択的に細胞毒性を示す抗がん剤の開発が望まれている<sup>[5,6]</sup>。銅錯体は Cisplatin などの白金製剤と比べて正常細胞に対する毒性が低く、がん細胞選択的に細胞死を誘導する副作用の少ないと考えられている<sup>[7]</sup>。また銅錯体は白金耐性ガンに対しても効果があるので、白金製剤に代わる抗がん剤として期待されている<sup>[8]</sup>。

がん細胞では、ミトコンドリアの機能不全があり、酸素分子の還元が不十分で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度が高いことが知られている<sup>[9,10]</sup>。したがって、ミトコンドリア DNA を標的するとともに H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を活性化できる金属錯体を開発できれば、その金属錯体はミトコンドリア DNA の切断<sup>[11]</sup>を通してミトコンドリア経由のアポトーシス<sup>[12]</sup>を誘導できると考えられる。これは、がん細胞選択的な細胞毒性を可能にする新しい抗がん剤の開発につながる。

当研究室の角谷らはペンダント基を amide で繋いだ amide-tether 型の 2,6-bis(amide-tether cyclen)-*p*-cresol 配位子(HL1)を開発し、その二核銅(II)錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-OH)(L1)]<sup>2+</sup> (**1**) (Scheme 2-1)が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を活性化して DNA の酸化切断を促進することを見出した。錯体 **1** は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> との反応で μ-1,1-hydroperoxo 錯体(μ-1,1-O<sub>2</sub>H 錯体)を形成した<sup>[13]</sup>。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下での酸化的 DNA 切断では、**1** は関連するペンダント基を methylene 鎖で繋いだ methylene-tether 型の Robson 配位子の二核銅(II)錯体よりもはるかに高い活性を示すと共に、この錯体は比較的高いがん細胞選択的毒性を示した<sup>[13]</sup>。しかし、**1** の細胞毒性は既存の抗がん剤よりも低く、改善する必要がある。そこで当研究室の角谷らは HL1 の cyclen を di(2-pyridylmethyl)amine に置換した五座の二核化配位子 HL3 を開発した。HL3 の二核銅(II)錯体 **3** は **1** に比べて DNA 切断活性と細胞毒性が大幅に改善したが、がん細胞選択性については低下した<sup>[14]</sup>。

本章では、**1** の DNA 切断活性とがん細胞選択的毒性の向上を目指して BLM<sup>[15-17]</sup>の DNA 結合部位の役割を模倣して HL1 に phenanthrene 部位をエチレングリコールスペーサーで結合した新規 amide-tether 型配位子 HL1<sup>P2</sup> を合成した(Figure 2-1)。HL1<sup>P2</sup> は二核銅(II)錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-OH)(L1<sup>P2</sup>)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (**1<sup>P2</sup>**)を形成した。phenanthrene は大きな π 系を持つ芳香族化合物であり DNA 塩基対間にインターカレーターとして結合する<sup>[18-22]</sup>。また細胞内可視化のための蛍光プローブ<sup>[20]</sup>としても機能する。細胞内可視化およびカスパーゼ活性アッセイを通して、**1<sup>P2</sup>** がミトコンドリア経由のアポトーシスを介してがん細胞選択的

な細胞毒性を発揮することが明らかとなった. HL1 と HL1<sup>P2</sup> およびその銅錯体 **1** と **1<sup>P2</sup>** の化学構造を Figure 2-1 に示す.

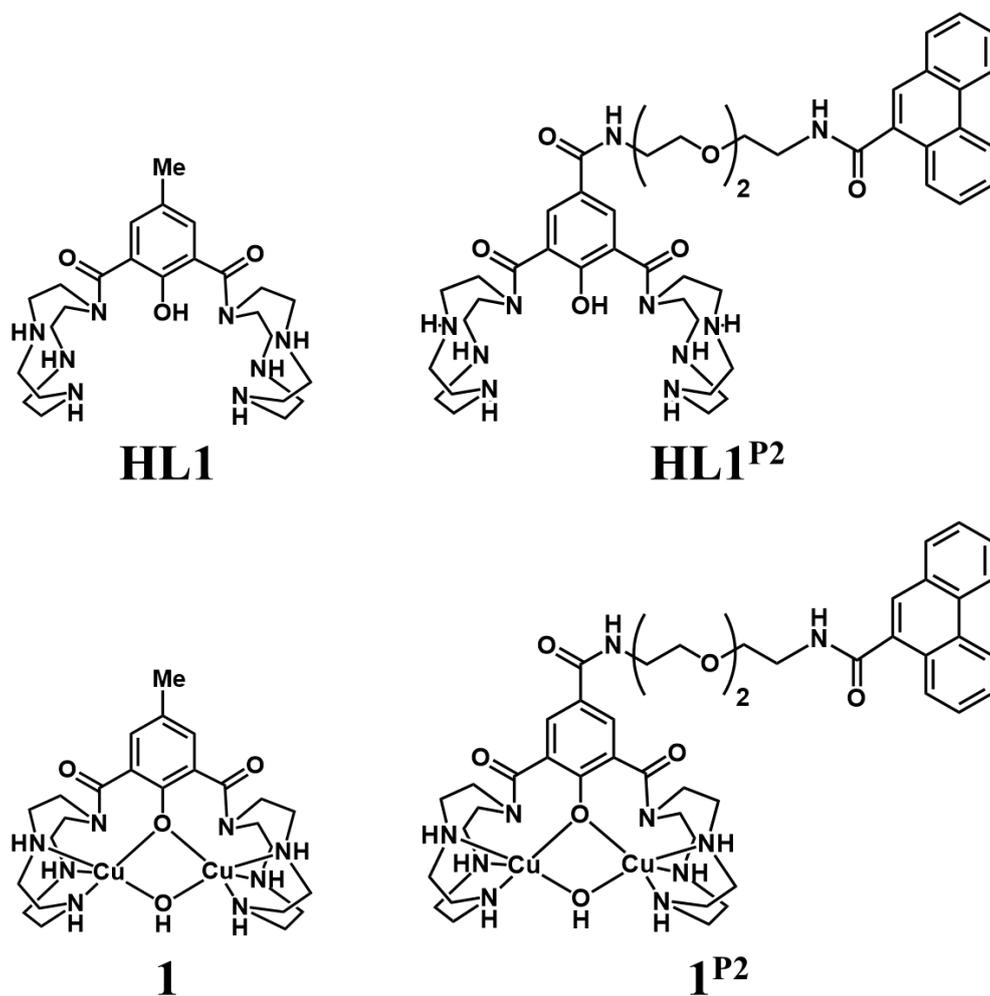
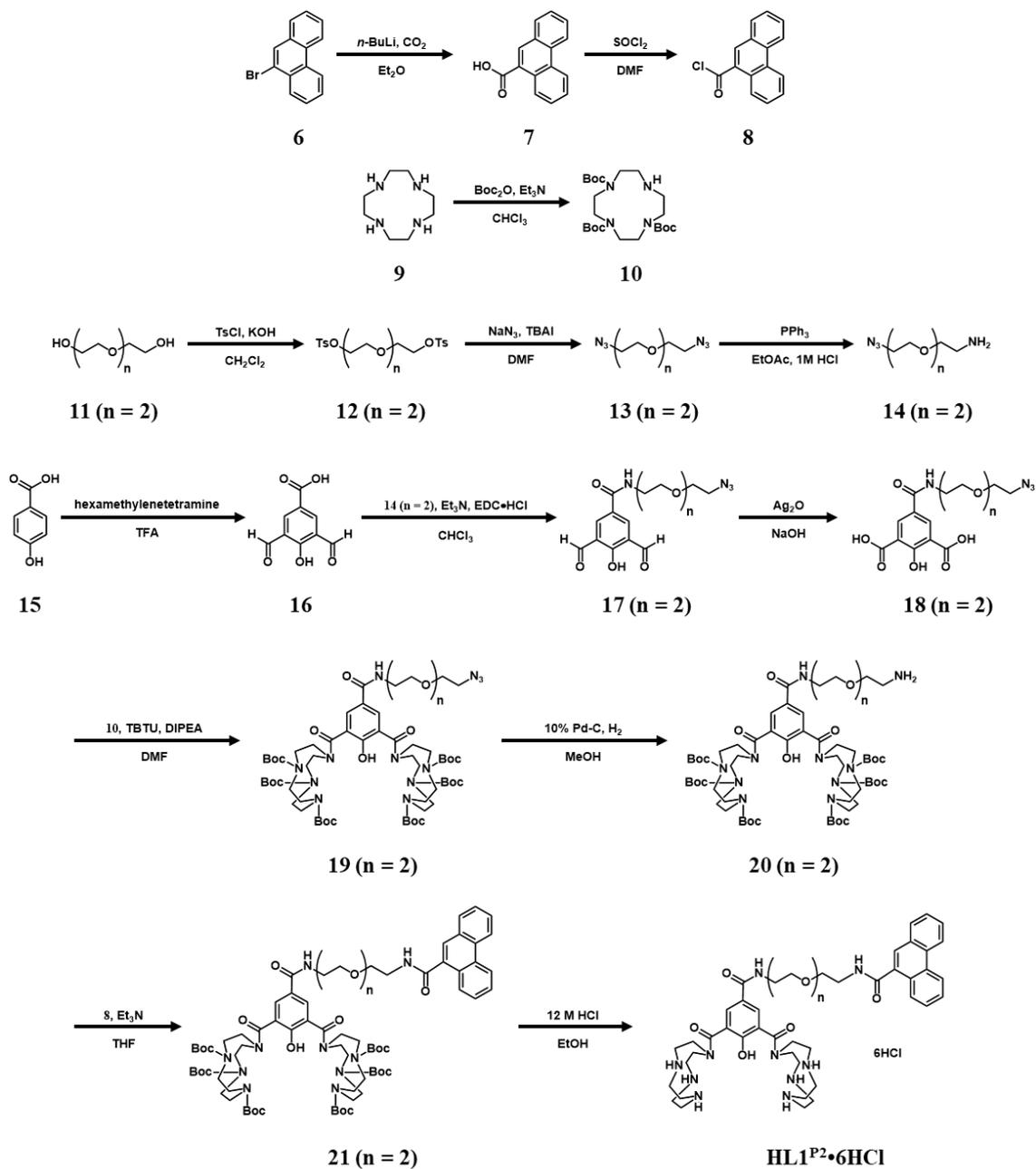


Figure 2-1. Chemical structures of HL1, HL1<sup>P2</sup>, **1**, and **1<sup>P2</sup>**.

## 2-3. 結果と考察

### 2-3-1. 配位子と二核銅(II)錯体の合成

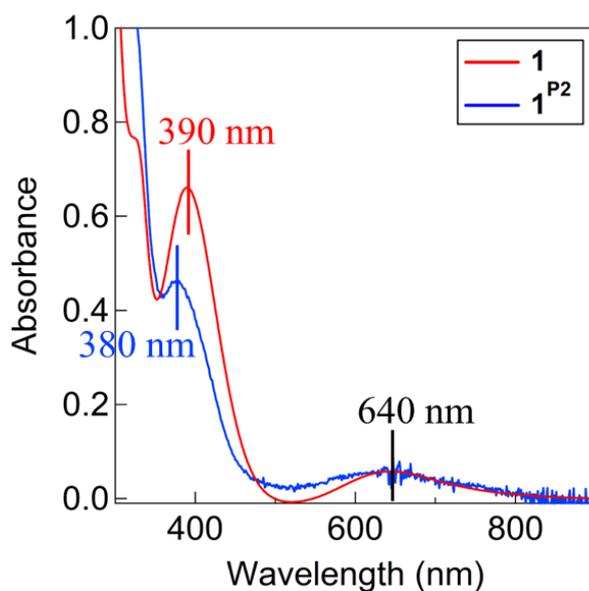
HL1 と二核銅(II)錯体 **1** は、既報の論文<sup>[13]</sup>に従って合成した。HL1<sup>P2</sup> は HL1 の *p*-cresol 部位のメチル基を DNA 標的である triethylene glycol-amide tether-phenanthrene に置換した配位子であり、その合成経路を Scheme 2-1 に示す。まず 3,5-diformyl-4-hydroxybenzoic acid に triethylene glycol をアミド結合で導入し、triethylene glycol の末端に phenanthrenyl 基(P)をアミド結合で導入した。このホルミル基を酸化してカルボキシ基に変換した後、tri-Boc-cyclen を脱水縮合で導入した。最後に cyclen 窒素に結合した Boc 基を酸性ソルボリシスにより除去し、HL1<sup>P2</sup>•6HCl を得た。これを 1M の NaOH 水溶液で pH 8.0 に調整した後、Cu(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> と反応させて二核銅(II)錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-OH)(L1<sup>P2</sup>)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (**1**<sup>P2</sup>)を合成した。単離された錯体は、MeOH/Et<sub>2</sub>O から再結晶して精製した。HL1<sup>P2</sup>•6HCl および **1**<sup>P2</sup> の詳細な合成法、元素分析、IR および ESI MS のデータを 2-5-3 の実験項に示す。



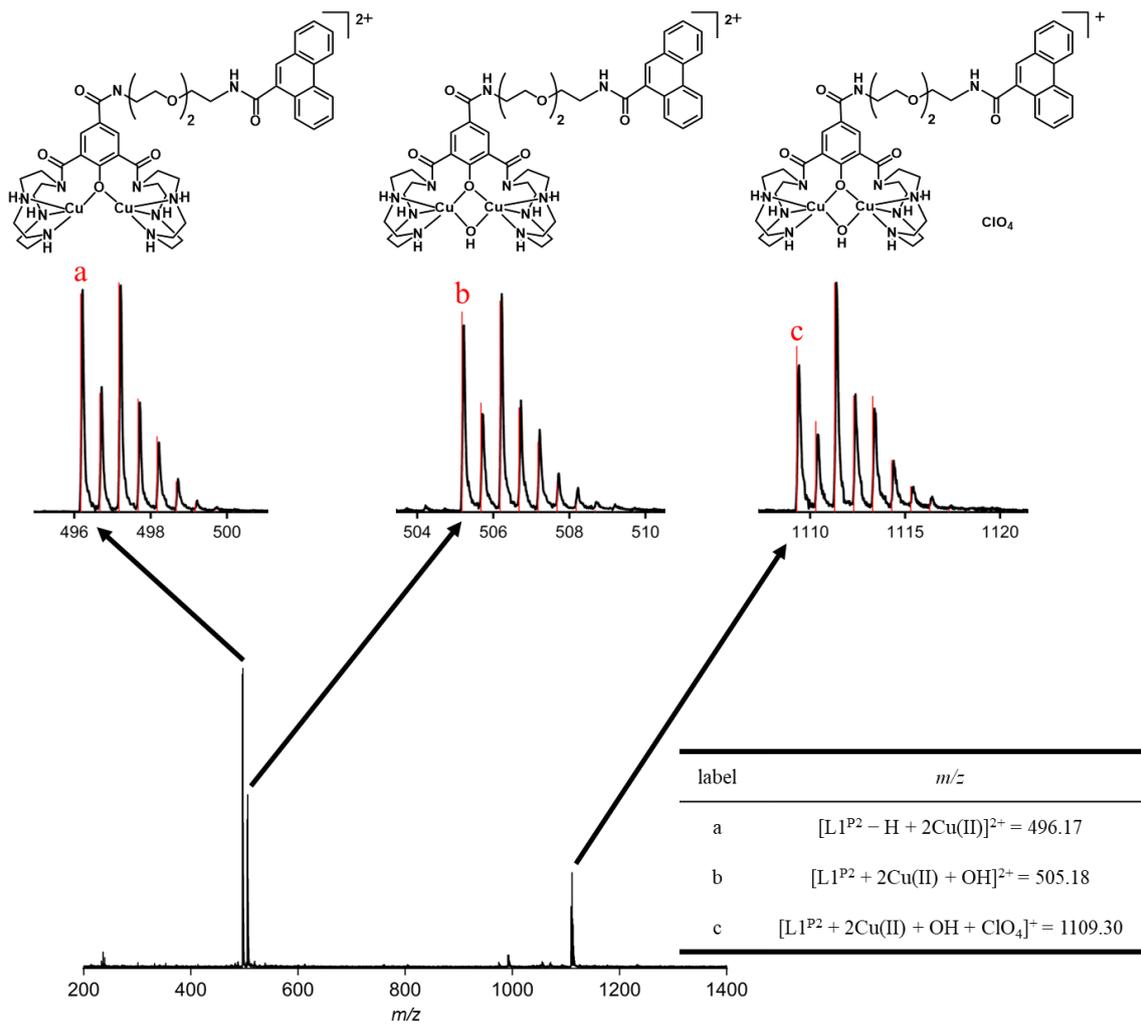
Scheme 2-1. Synthetic Route of HL1P2•6HCl.

### 2-3-2. 二核銅(II)錯体の構造

二核銅錯体 **1** の結晶構造は報告されており<sup>[13]</sup>, DNA 標的を導入した **1**<sup>P2</sup> の二核銅部位の構造は **1** のそれと同様であると考えられる. **1**<sup>P2</sup> の溶液中の構造は次に示す分光学的測定により同定された. 電子吸収スペクトルでは, 380 nm と 640 nm に PhO<sup>-</sup> から Cu(II) への LMCT と d-d 遷移に帰属される吸収帯がそれぞれ観測された. これらは, **1** の 390 nm (PhO<sup>-</sup> から Cu(II) への LMCT) と 640 nm (d-d 遷移) の吸収帯とほぼ一致した(Figure 2-2). ESI MS スペクトル(Figure 2-3)では, **1**<sup>P2</sup> は  $m/z$  1109.3 に  $[L1^{P2} + 2Cu(II) + OH + ClO_4]^+$  に帰属される分子イオンピークを与えた. これらの結果から, **1**<sup>P2</sup> は水溶液中で  $\mu$ -OPh- $\mu$ -OH 架橋構造を保持していることが明らかとなった.



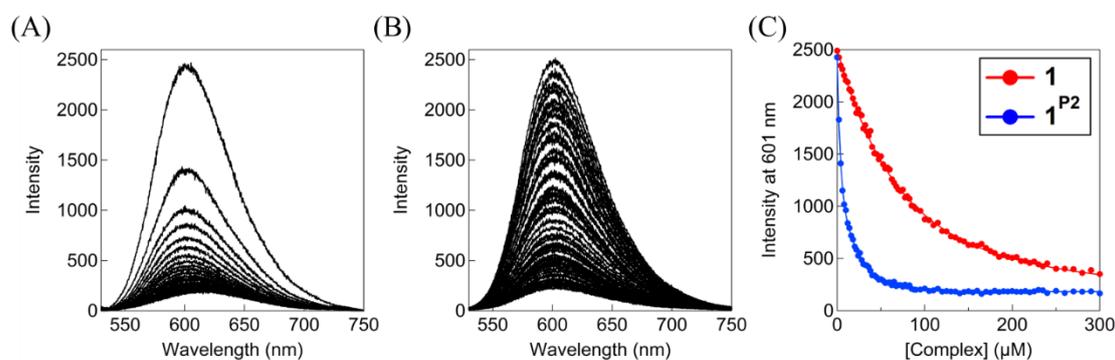
**Figure 2-2.** Electronic absorption spectra of **1** (0.25 mM) (red) and **1**<sup>P2</sup> (0.25 mM) (blue) in H<sub>2</sub>O at room temperature.



**Figure 2-3.** ESI MS spectrum of **1**<sup>P2</sup> measured in H<sub>2</sub>O at room temperature at orifice 1: 10 V, orifice 2: 10 V, ring lens voltage: 10 V.

### 2-3-3. **1** および **1<sup>P2</sup>** の DNA 結合能力

**1** および **1<sup>P2</sup>** と仔ウシ胸腺 DNA (ct-DNA) の結合定数  $K_{app}$  ( $M^{-1}$ ) を臭化エチジウム (EtBr) 法により決定した<sup>[26,27]</sup>. あらかじめ ct-DNA と EtBr を結合させた水溶液を調整した. これに **1** または **1<sup>P2</sup>** の溶液を添加すると EtBr が ct-DNA から放出されて蛍光強度が減衰した. この様子を Figure 2-4 (A) および (B) に示す. また, **1** および **1<sup>P2</sup>** の各濃度における 601 nm の蛍光強度のプロットを Figure 2-4 (C) に示す. Figure 2-3 から, **1** および **1<sup>P2</sup>** の  $K_{app}$  ( $M^{-1}$ ) は, それぞれ  $(4.3 \pm 0.2) \times 10^5$  および  $(3.9 \pm 0.2) \times 10^6$  と見積もられた (Table 2-1). この結果より, DNA 結合能力は **1<sup>P2</sup>** が **1** の約 9 倍であり, phenanthrene がインターカレーターとして働き **1<sup>P2</sup>** の DNA 結合を促進することが示された.



**Figure 2-3.** Fluorescence spectral changes upon the addition of **1<sup>P2</sup>** (A) and **1** (B) to the ethidium bromide-bound ct-DNA. For each measurement, **1** and **1<sup>P2</sup>** increased by 2  $\mu M$ . (C) Plot of the fluorescence emission intensity at 601 nm vs. concentrations of **1** (red) and **1<sup>P2</sup>** (blue). Experimental conditions: [EtBr] = 3.3  $\mu M$ , [ct-DNA] = 20  $\mu M$  bp, [complex] = 0–300  $\mu M$ , [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [NaCl] = 10 mM, and  $\lambda_{ex}$  = 510 nm at 37°C.

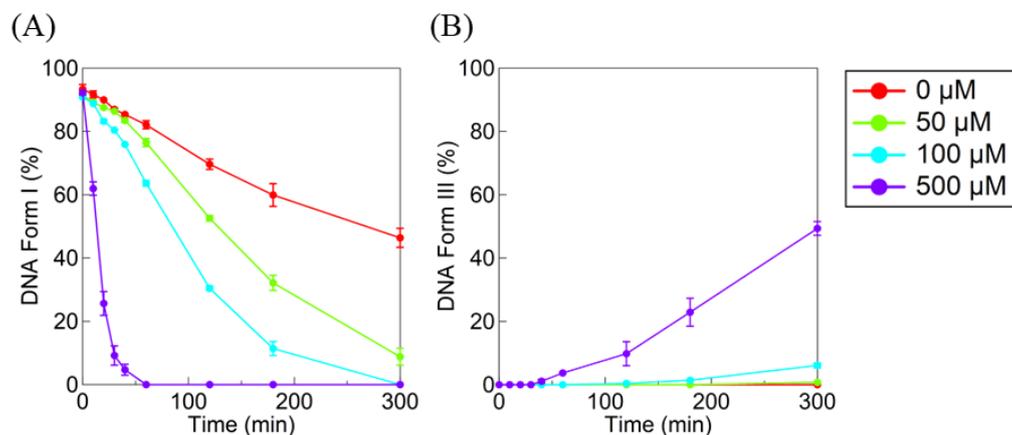
**Table 2-1.  $K_{app}$  of **1** and **1<sup>P2</sup>** (Mean  $\pm$  SD)**

Complex	$K_{app}$ ( $M^{-1}$ )
<b>1</b>	$(4.3 \pm 0.2) \times 10^5$
<b>1<sup>P2</sup></b>	$(3.9 \pm 0.2) \times 10^6$

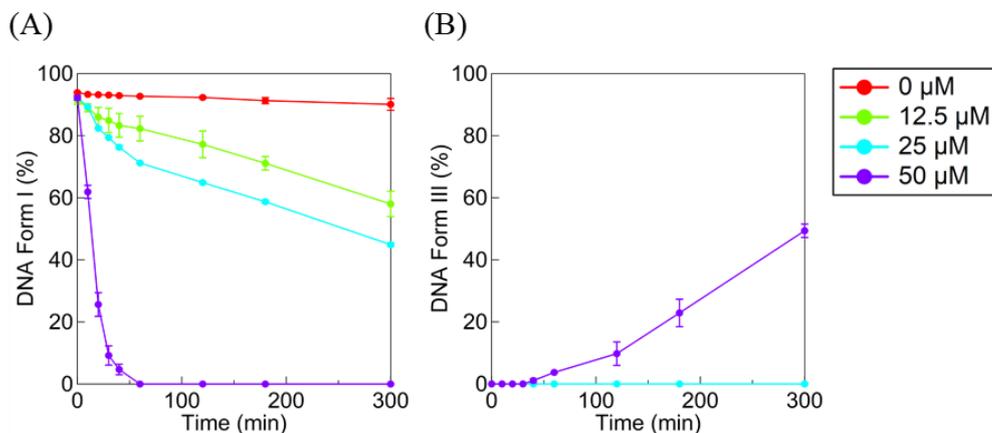
#### 2-3-4. **1** および **1**<sup>P2</sup> の酸化的 DNA 切断活性

**1** および **1**<sup>P2</sup> による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いた Supercoiled plasmid pUC19 DNA (Form I) の切断活性を pH 6.0, 37°C の条件下で測定した。**1** および **1**<sup>P2</sup> は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下で DNA 切断を大きく加速した。この反応で Form I は Form II を経て Form III に変換された。Form I, II, III はそれぞれスーパーコイルの閉環状、一本鎖切断の環状、二本鎖切断の直線状 DNA である<sup>[28]</sup>。Form I, II, III の量は、アガロースゲル電気泳動法で分析・定量した。

**1**<sup>P2</sup> (0–50 μM) と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0–500 μM) を用いた時の Form I の減少と Form III の増加の時間変化をそれぞれ Figure 2-5, 2-6 に示す。また、これらの実験におけるゲル写真と詳細な数値データを Figure S2-1, S2-2 および Table S2-1 に示す。**1**<sup>P2</sup> は **1** と同様に、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の存在下で Form I の減少と Form III の生成を大きく加速した。Figure 2-4 の赤線で示されたように H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 不在下でも Form I はゆっくりと減少した。これは **1**<sup>P2</sup> による DNA の加水分解による切断であり、DNA 標的である phenanthrene の結合で二核銅部位が DNA に近接した効果で加水分解も加速されたと考えられる。

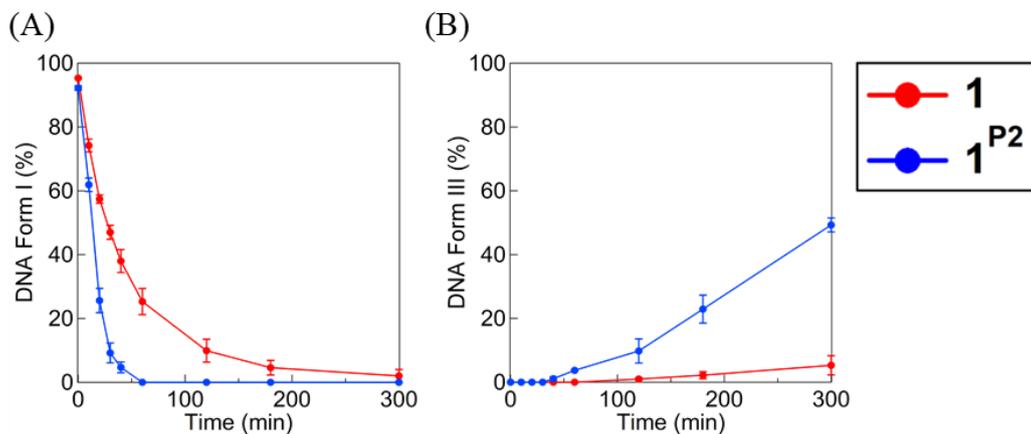


**Figure 2-5.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration-dependent profile for DNA cleavage promoted by **1**<sup>P2</sup>. Time courses for the decrease of % of Form I (A) and increase of % of Form III (B) at pH 6.0. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [pUC19 DNA] = 50 μM bp, [complex] = 50 μM, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0–500 μM at 37°C for 0, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min. Experiments were carried out at least three times.

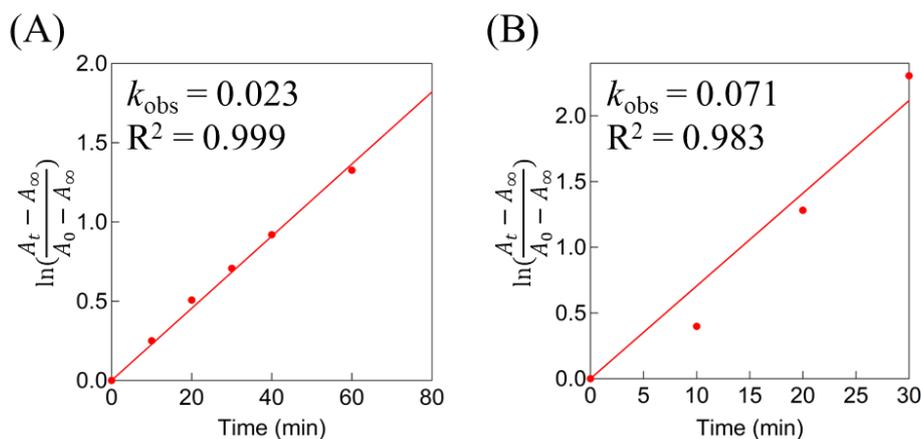


**Figure 2-6.** Complex concentration-dependent profile for DNA cleavage promoted by  $1^{P2}$ . Time courses for the decrease of % of Form I (A) and increase of % of Form III (B) at pH 6.0. Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [pUC19 DNA] = 50  $\mu$ M bp, [complex] = 0–50  $\mu$ M, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 500  $\mu$ M at 37°C for 0, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min. Experiments were carried out at least three times.

**1** (50  $\mu$ M)または  $1^{P2}$  (50  $\mu$ M)と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500  $\mu$ M)の反応における Form I の減少と Form III の増加の時間変化の比較を Figure 2-7 に示す. これらの反応における Form I の減少速度の擬一次プロットを Figure 2-8 に示す. **1** および  $1^{P2}$  の擬一次速度定数  $k_{obs}$  (min<sup>-1</sup>)はそれぞれ  $2.3 \times 10^{-2}$  および  $7.1 \times 10^{-2}$  であった. 反応開始 5 時間後における Form III の生成率は, **1** および  $1^{P2}$  でそれぞれ 5.3% および 49.3% であった. これらの結果より,  $1^{P2}$  は **1** よりも Form I の切断では約 3 倍高い活性を示し, Form III の生成では約 9.3 倍高い活性を示すことが明らかとなった. この  $1^{P2}$  による Form III 生成の約 9.3 倍の加速は  $1^{P2}$  が **1** よりも約 9 倍 DNA 結合能力が高い結果と一致する. これは supercoiled plasmid DNA の二重鎖切断(double-strand breaks, dsb)が  $1^{P2}$  の DNA 結合により加速されることを示している.  $1^{P2}$  の二核銅部位は phenanthrene のインターカレーションにより DNA の特定の位置に固定される. このために一回目の DNA 切断位置の近傍にある相補鎖に対する二回目の DNA 切断が起りやすくなったと考えられる. DNA の dsb はアポトーシスを介した細胞死を引き起こすことが知られているので, この結果から  $1^{P2}$  は **1** よりも高い細胞毒性を示すことが期待される<sup>[19]</sup>.



**Figure 2-7.** Time courses for the percent decrease of Form I (A), and the percent increase of Form III (B) upon the reaction of the pUC19 DNA (50  $\mu\text{M}$  bp) with **1** (red) and **1<sup>P2</sup>** (blue) (50  $\mu\text{M}$ ) in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.5 mM) at pH 6.0 (MES, 10 mM) at 37°C. Experiments were carried out at least three times.



**Figure 2-8.** Pseudo-first-order plot of the decrease of Form I in the reaction of **1** (50  $\mu\text{M}$ ) (A) or **1<sup>P2</sup>** (50  $\mu\text{M}$ ) (B) with  $\text{H}_2\text{O}_2$  (500  $\mu\text{M}$ ).

### 2-3-5. 1 および 1<sup>P2</sup> と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の反応

次に、DNA 切断の活性種を分光学的に同定した結果を示す。1 および 1<sup>P2</sup> は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> との反応で μ-1,1-hydroperoxodicopper(II)錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-O<sub>2</sub>H)(Ln)]<sup>2+</sup> (n = 1 (2) および 1<sup>P2</sup> (2<sup>P2</sup>)) (Figure 2-9)を形成することが分光学的に確認された。第一章で述べたように、角谷らは 2 の分光学的データを報告している<sup>[13]</sup>。2<sup>P2</sup> の電子吸収スペクトルおよび CSI MS スペクトルは Figure 2-8, 2-9, 2-10 に示す。2<sup>P2</sup> は MeCN 中で 340 nm (ε = 5600 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) と 400 nm (ε = 3200 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) に明確な吸収帯を示した(Figure 2-10)。これは 2 の 340 nm (ε = 5600 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) と 398 nm (ε = 4800 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) の吸収帯とよく一致した。また、2<sup>P2</sup> の CSI MS スペクトルでは、[L1<sup>P2</sup> + 2Cu(II) + O<sub>2</sub>H]<sup>2+</sup> と [L1<sup>P2</sup> + 2Cu(II) + O<sub>2</sub>H + ClO<sub>4</sub>]<sup>+</sup> に相当する質量ピークが m/z 513, 1125 に確認された(Figure 2-11)。H<sub>2</sub><sup>16</sup>O<sub>2</sub> の代わりに H<sub>2</sub><sup>18</sup>O<sub>2</sub> を用いると、前述のピークは 4 質量単位分だけシフトした質量ピークが観測された(Figure 2-12)。この結果は、2<sup>P2</sup> の 2 つの O 原子が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に由来することを示している。さらに、2 および 2<sup>P2</sup> と ct-DNA との反応を電子吸収スペクトルで追跡した。その結果を Figure 2-13 に示す。2 および 2<sup>P2</sup> の減衰の時間経過をそれぞれ 390 nm と 380 nm で観察した。2<sup>P2</sup> の減衰速度は ct-DNA の存在で大きく加速されたが、2 の減衰はあまり加速されなかった。この結果は、2<sup>P2</sup> と DNA の反応では phenanthrene 部位が DNA 標的部位として働いて DNA との結合を通して反応が加速されたことを示す直接的な証拠である。

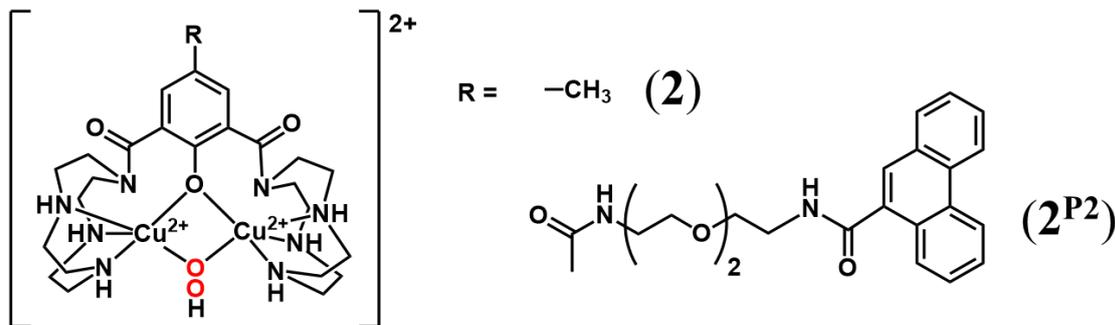
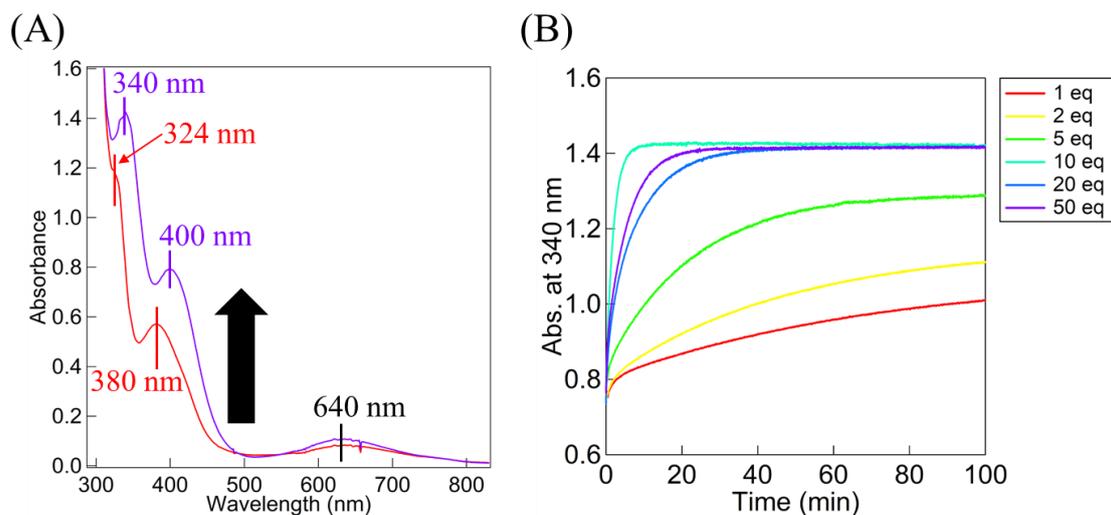
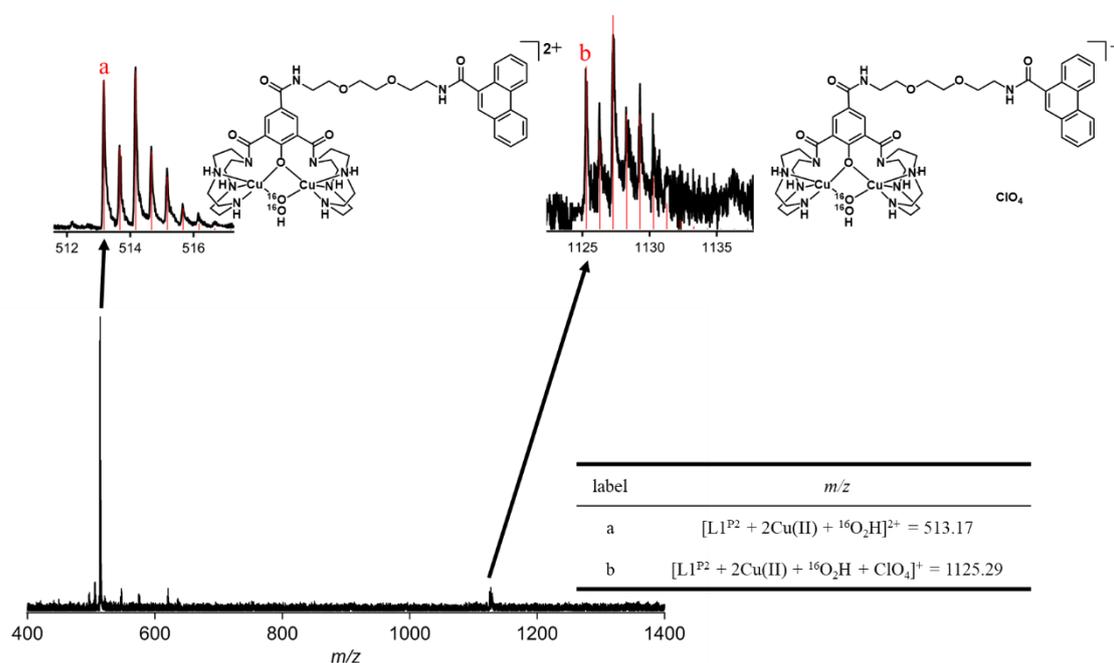


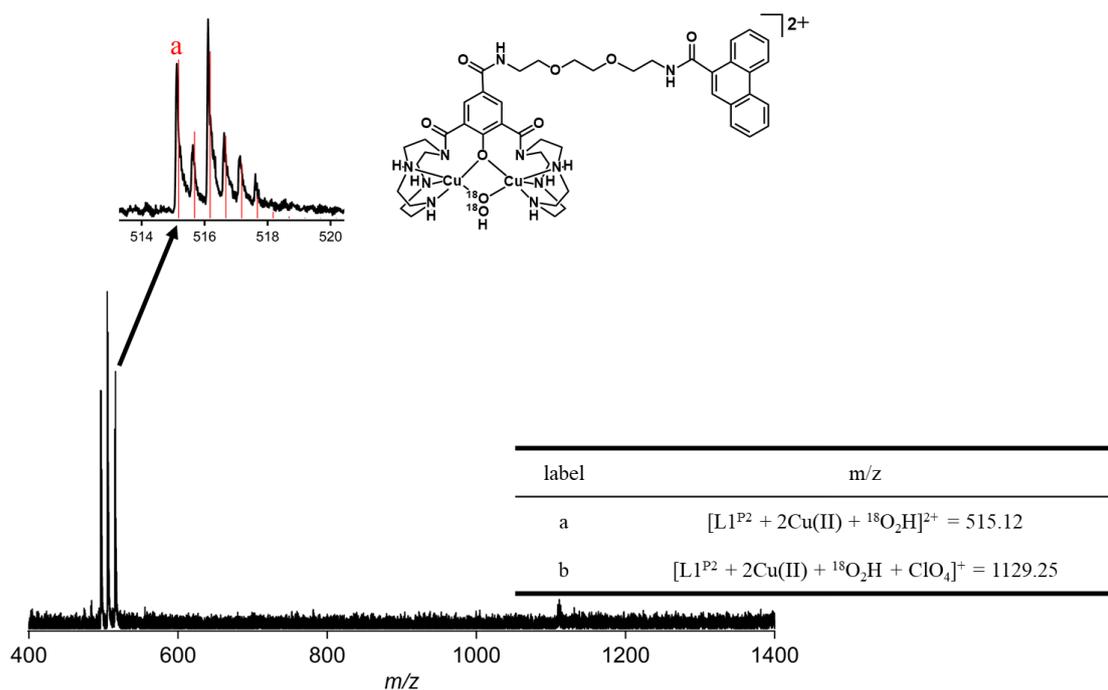
Figure 2-9. Chemical structures of 2 and 2<sup>P2</sup>.



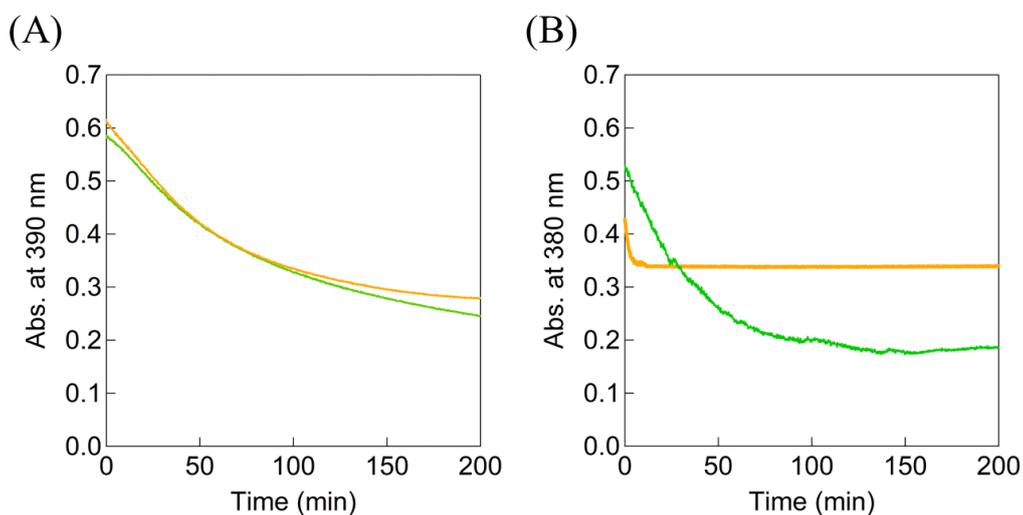
**Figure 2-10.** (A) Electronic absorption spectra of  $1^{P2}$  (0.25 mM) (red) and hydroperoxo species  $2^{P2}$  (purple) generated upon reaction with  $H_2O_2$  (10 eq) in MeCN at  $-30^\circ C$ . (B) Time courses for the formation of  $2^{P2}$  with  $H_2O_2$  (1–50 eq) in MeCN at  $-30^\circ C$ , monitored at 340 nm.



**Figure 2-11.** CSI MS spectrum of  $2^{P2}$  formed upon reaction of  $1^{P2}$  with  $H_2^{16}O_2$  in  $H_2O$  at  $0^\circ C$ . The orifice 1: 20 V, orifice 2: 5 V, ring lens voltage: 10 V. Experimental conditions:  $[1^{P2}] = 0.50$  mM,  $[H_2^{16}O_2] = 100$  mM.



**Figure 2-12.** CSI MS spectrum of  $2^{P2}$  formed upon reaction of  $1^{P2}$  with  $H_2^{18}O_2$  in  $H_2O$  at  $0^\circ C$ . The orifice 1: 20 V, orifice 2: 5 V, ring lens voltage: 10 V. Experimental conditions:  $[1^{P2}] = 0.50$  mM,  $[H_2^{18}O_2] = 100$  mM.



**Figure 2-13.** (A) Time courses for the decay of  $2$  monitored at 390 nm at room temperature in the absence (green) and presence (orange) of ct-DNA. (B) Time courses for the decay of  $2^{P2}$  monitored at 380 nm at room temperature in the absence (green) and presence (orange) of ct-DNA. All experiments were carried out at least three times.

### 2-3-6. **1** および **1<sup>P2</sup>** の細胞毒性

HL1, HL1<sup>P2</sup>, **1** および **1<sup>P2</sup>** の細胞毒性をさまざまな細胞を用いて MTT assay<sup>[29, 30]</sup>で評価した. 比較として Cisplatin の細胞毒性も評価した. 細胞増殖 50%阻害濃度(50% Inhibition Concentration, IC<sub>50</sub> 値)は, 細胞生存率(%) vs log [X] (X = HL1, HL1<sup>P2</sup>, **1**, **1<sup>P2</sup>**)をプロットしたグラフから算出した. プロットしたグラフおよび算出した IC<sub>50</sub> 値を Figure S2-3 および Table 2-2, 2-3 に示す. まず, 24 時間作用させたとき, **1** および **1<sup>P2</sup>** は HL1 および HL1<sup>P2</sup> よりもはるかに高い毒性を示した(Table 2-2). したがって, 細胞内において **1** および **1<sup>P2</sup>** の二核銅構造は保持されており, これが細胞毒性を発揮していると考えられる. また, Table 2-3 に示すように, 肺がん細胞 A549 および膵臓がん細胞 PK-59 に対して 48 時間作用させたときの IC<sub>50</sub> 値は, **1<sup>P2</sup>** では 23.8, 18.4 μM, **1** では 284, 241 μM であり, **1<sup>P2</sup>** は **1** よりも約 12 倍高い細胞毒性を示した. この結果から phenanthrene による DNA 標的効果が **1<sup>P2</sup>** の細胞毒性を大きく向上させたと言える. 肺の正常細胞 WI-38 および膵臓の正常細胞 2C6 に対して 48 時間作用させたときの IC<sub>50</sub> 値は, **1<sup>P2</sup>** では 218, 104 μM であり, **1<sup>P2</sup>** が正常細胞よりもがん細胞に対して約 9.2 倍および約 5.7 倍高い細胞毒性を示し, **1<sup>P2</sup>** はがん細胞選択性を示すことが明らかとなった. **1** もがん細胞選択性を示し, 肺と膵臓のがん細胞に対して正常細胞よりも約 2.9 倍および約 4.7 倍高い細胞毒性を示した. がん細胞選択性という点では, **1<sup>P2</sup>** は *p*-cresol-amide-tether-dpa 配位子 HL3 を持つ二核銅(II)錯体 **3** よりも約 7 倍選択性が高かった<sup>[14]</sup>. **1** と **1<sup>P2</sup>** のがん細胞選択性が高いのは, がん細胞選択的毒性が配位子と二核銅中心の配位構造に依存することを示している. また, **1<sup>P2</sup>** では細胞毒性とがん細胞選択性が共に向上した. これは phenanthrene が DNA 標的として DNA 切断を加速することで, がん細胞選択的毒性を向上させることを示す結果として重要である.

**Table 2-2. Cytotoxicity of 1, 1<sup>P2</sup>, HL1, HL1<sup>P2</sup>, and Cisplatin against various cancer and normal cells by means of MTT assay (24 h)**

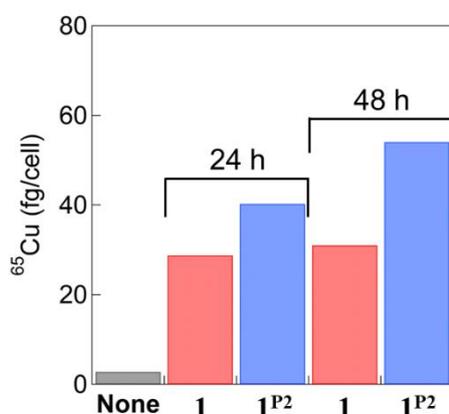
Complex	IC <sub>50</sub> (μM) (Mean ± SD)				
	Cervical	Lung		Pancreas	
	HeLa (cancer)	A549 (cancer)	WI-38 (normal)	PK-59 (cancer)	2C6 (normal)
<b>1</b>	1,740 ± 110	1,430 ± 40	2,960 ± 30	1,060 ± 10	3,340 ± 10
<b>1<sup>P2</sup></b>	156 ± 1	91.6 ± 10.0	269 ± 5	110 ± 3	238 ± 8
HL1	> 10,000	> 10,000	4,000 ± 30	> 10,000	> 10,000
HL1 <sup>P2</sup>	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000	> 1,000
Cisplatin	2.33 ± 0.23	5.35 ± 0.82	6.33 ± 0.13	2.66 ± 0.85	3.16 ± 0.12

**Table 2-3. Cytotoxicity of 1, 1<sup>P2</sup>, and Cisplatin against various cancer and normal cells by means of MTT assay (48 h)**

Complex	IC <sub>50</sub> (μM) (Mean ± SD)				
	Cervical	Lung		Pancreas	
	HeLa (cancer)	A549 (cancer)	WI-38 (normal)	PK-59 (cancer)	2C6 (normal)
<b>1</b>	660 ± 28	284 ± 16	838 ± 82	241 ± 4	1140 ± 50
<b>1<sup>P2</sup></b>	56.6 ± 1.8	23.8 ± 2.4	218 ± 3	18.4 ± 1.6	104 ± 8
Cisplatin	0.925 ± 0.004	1.83 ± 0.03	4.55 ± 0.03	2.01 ± 0.02	1.15 ± 0.08

### 2-3-7. 1 および 1<sup>P2</sup> の細胞内への取り込み

化合物の細胞毒性は細胞内への取り込み量に依存するため、24 時間および 48 時間作用後の HeLa 細胞( $2.5 \times 10^5$  cells/mL)に対する 1 および 1<sup>P2</sup> (25  $\mu$ M)の細胞内取り込み量を ICPMS で推定した<sup>[31]</sup>。結果を Figure 2-14 および Table 2-4 に示す。1 および 1<sup>P2</sup> (25  $\mu$ M) の <sup>65</sup>Cu 量(fg/cell)は、24 時間後に 28.7 および 40.2 であり、48 時間後に 31.0 および 54.0 であった。したがって、1<sup>P2</sup> の細胞内取り込み量は、24 時間後および 48 時間後で 1 より約 1.4 倍および約 1.7 倍多かった。



**Figure 2-14.** Cellular uptake of 1 (red) and 1<sup>P2</sup> (blue) (25  $\mu$ M) in HeLa cells ( $2.5 \times 10^5$  cells/mL) after incubation for 24 h and 48 h.

**Table 2-4. Cellular uptake of 1 and 1<sup>P2</sup> against HeLa cells**

Complex	Time (h)	<sup>65</sup> Cu (fg/cell)	[Cu in the cell]/[Cu in the medium during treatment] (%)
None	-	2.72	-
1	24	28.7	0.16
	48	31.0	2.04
1 <sup>P2</sup>	24	40.2	0.31
	48	54.0	4.38

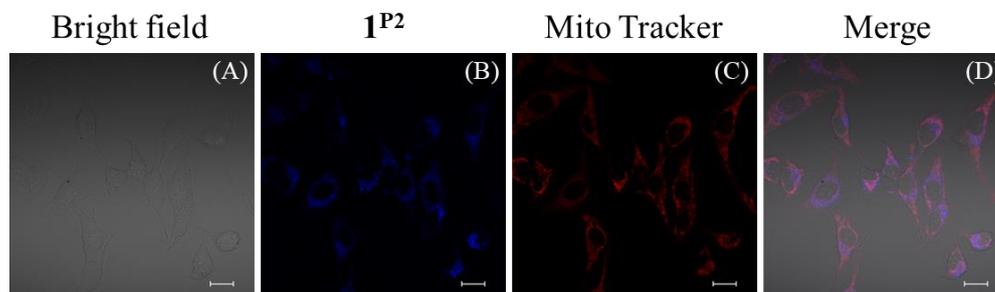
この取り込み量の増加には化合物の疎水性が関係していると考え、フラスコ振盪法により、**1** および **1<sup>P2</sup>** の 1-octanol/H<sub>2</sub>O 分配係数  $\log P_{ow}$ <sup>[32]</sup> を求めた。その結果を Table 2-5 に示す。**1** および **1<sup>P2</sup>** の  $\log P_{ow}$  は -2.38 および -1.14 であり、phenanthrene のために **1<sup>P2</sup>** は **1** よりも疎水性であると言える。一方、**1<sup>P2</sup>** の phenanthrene による細胞毒性向上は 12 倍であり、細胞取り込み量の 1.7 倍の増加に比べてはるかに高いので、phenanthrene の DNA 標的としての効果が細胞毒性に対してより重要な役割を果たしていることが示された。

**Table 2-5. Partition coefficient of **1** and **1<sup>P2</sup>** (Mean  $\pm$  SD)**

Complex	$\log P_{ow}$
<b>1</b>	-2.38 $\pm$ 0.04
<b>1<sup>P2</sup></b>	-1.14 $\pm$ 0.06

### 2-3-8. **1<sup>P2</sup>** の細胞内局在

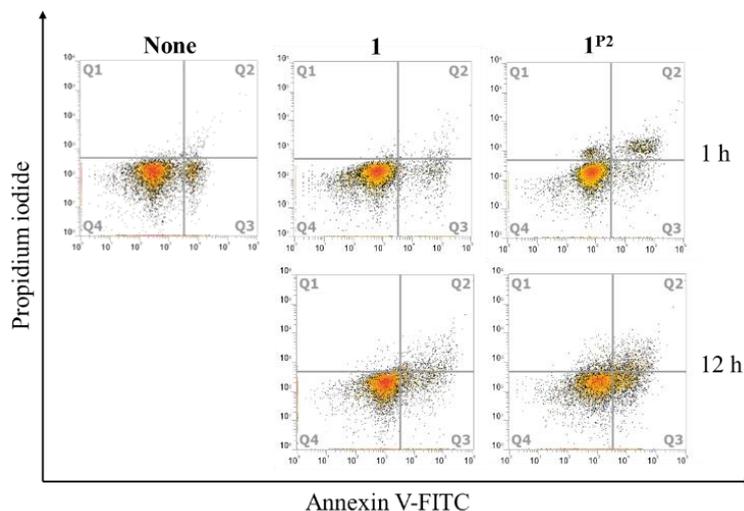
**1<sup>P2</sup>** の細胞内小器官への局在を調べるため、共焦点顕微鏡を用いて phenanthrene 部位の蛍光を観察した。**1<sup>P2</sup>** (200  $\mu$ M) を含む培地中で HeLa 細胞を 1 時間インキュベートした後、ミトコンドリア染色剤である Mito Tracker Deep Red (50 nM) で処理し、細胞内での局在位置を調べた。共焦点顕微鏡で撮影した画像を Figure 2-15 に示す。赤色は染色されたミトコンドリアであり、青色は **1<sup>P2</sup>** の蛍光である。細胞質内から青色の蛍光が確認できた (Figure 2-15 (B)) ことから、**1<sup>P2</sup>** は細胞内に取り込まれていることが明らかとなった。また **1<sup>P2</sup>** と Mito Tracker Deep Red の蛍光を重ね合わせた画像は紫色であり (Figure 2-15 (D))、**1<sup>P2</sup>** が部分的にミトコンドリアに局在していることがわかる。従って **1<sup>P2</sup>** はミトコンドリア障害を起こして細胞死を誘導していると考えられる。



**Figure 2-15.** (A)–(D) Confocal microscopic images of **1<sup>P2</sup>** (200  $\mu$ M) (blue) in HeLa cells on 1 h incubation in the dark. (A) Bright-field images. (B) Blue fluorescence indicates the fluorescence of **1<sup>P2</sup>** ( $\lambda_{ex}$  = 405 nm). (C) Red fluorescence indicates mitochondrial staining of Mitotracker Deep Red FM (50 nM) (Thermofisher) (red) ( $\lambda_{ex}$  = 638 nm). (D) Overlay images of (A)–(C). Scale bar is 20  $\mu$ m.

### 2-3-9. Apoptosis assay

1 および  $1^{P2}$  の細胞死誘導機構を解明するために、FITC を蛍光標識として有する Annexin V (Annexin V-FITC) とヨウ化プロピジウム (Propidium iodide, PI)<sup>[33]</sup> を染色剤として用い、FACS で解析して細胞死形態の確認を行った。Annexin V はアポトーシス細胞の細胞膜の外側に露出しているホスファチジルセリン (Phosphatidylserine, PS) と結合することにより、アポトーシス細胞の検出が可能になる。一方、PI は膜不透過性の死細胞染色色素であり、死細胞の検出が可能である。結果を Figure 2-16 および Table 2-6 に示す。1 および  $1^{P2}$  (800  $\mu$ M) を含む培地中で HeLa 細胞を 1 時間と 12 時間培養した。その後、Annexin V-FITC と PI 染色液を用いて染色を行い、FACS でアポトーシス細胞の定量を行った。 $1^{P2}$  存在下における 1 時間と 12 時間の培養を比較すると、1 時間よりも 12 時間の培養において死滅細胞が 15.8% 増加し、そのうち 85% は初期アポトーシス細胞<sup>[34]</sup>であった。この結果より、 $1^{P2}$  は主にアポトーシスを介して細胞死を誘導していることが明らかとなった。また 1 でも細胞死全体の 46% が初期アポトーシスによるものであった。したがって、1 および  $1^{P2}$  が誘導する細胞死はアポトーシスであるといえる。



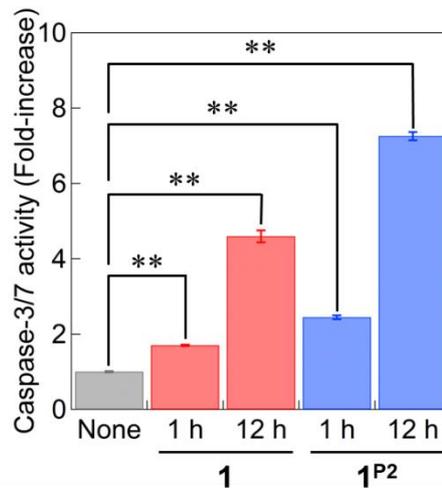
**Figure 2-16.** Induction of apoptosis by 1 and  $1^{P2}$ . Annexin V-FITC and PI fluorescence were measured by flow cytometry. Representative dot plots of dose-dependent effect of 1 and  $1^{P2}$  (800  $\mu$ M) on apoptosis of HeLa cells treated for 1 h and 12 h. A total of 10,000 cells were collected per sample. Experiments were carried out at least three times.

Table 2-6. Induction of apoptosis by **1** and **1<sup>P2</sup>** against HeLa cells

Complex	Time (h)	Rate of cells (%)			
		Q1 (Annexin-/PI+)	Q2 (Annexin+/PI+)	Q3 (Annexin+/PI-)	Q4 (Annexin-/PI-)
None	12	1.1	1.2	10.6	87.1
<b>1</b>	1	0.7	1.2	8.2	89.9
	12	1.9	5.5	11.0	81.6
<b>1<sup>P2</sup></b>	1	4.4	7.2	5.0	83.4
	12	5.0	8.9	18.5	67.6

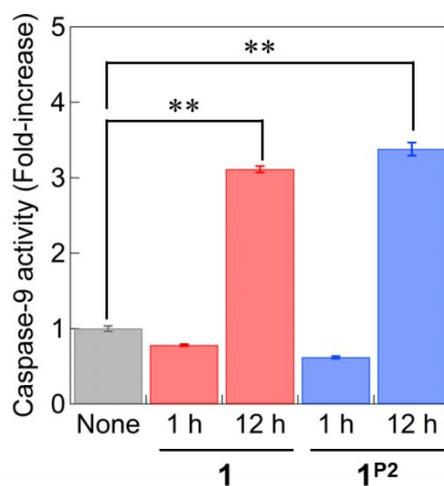
### 2-3-10. カスパーゼ活性アッセイ

上述したように、**1<sup>P2</sup>**はミトコンドリアに局在し、**1**および**1<sup>P2</sup>**はともにアポトーシスを誘導することが明らかとなった。そこで、**1**および**1<sup>P2</sup>**の誘導する細胞死がミトコンドリアを介したアポトーシスであることを確認するために、FACSを用いてカスパーゼ活性の測定を行った。カスパーゼはアポトーシスや炎症の制御に関与するタンパク切断酵素である。アポトーシスに関わるカスパーゼはイニシエーター・カスパーゼ(Caspase-2, -8, -9など)とエフェクター・カスパーゼ(Caspase-3, -6, -7など)に分類される<sup>[35,36]</sup>。アポトーシスの開始シグナルにより自己活性化したイニシエーター・カスパーゼがエフェクター・カスパーゼを切断して活性化する。さらに、その活性化されたエフェクター・カスパーゼが細胞内のタンパク質を切断し、アポトーシスが引き起こされる。そのため、エフェクター・カスパーゼが活性化されているかを調べる事によりアポトーシスの最終段階が起こっていることを確認できる。活性化されたCaspase-3/7はどちらも開裂部位としてAsp-Glu-Val-Asp (DEVD)<sup>[37]</sup>を認識する。それゆえ、DEVDを有し、ペプチドが切断された後DNAに結合することで強い蛍光を生じるCellEvent® Caspase-3/7 Green Detection Reagent<sup>[38]</sup>を測定に用いて活性化されたCaspase-3/7の定量を行った。HeLa細胞を**1** (1740 μM)と**1<sup>P2</sup>** (156 μM)の存在下で1時間と12時間インキュベートした。1時間ないしは12時間経過後、細胞をはがして回収し、CellEvent® Caspase-3/7 Green Detection Reagent存在下でさらに25分間インキュベートした。その後、FACSで定量した活性化されたCaspase-3/7の結果をFigure 2-17に示す。**1**および**1<sup>P2</sup>**は12時間の作用で活性化されたCaspase-3/7が錯体非存在下と比較して約4倍と6倍増加した。

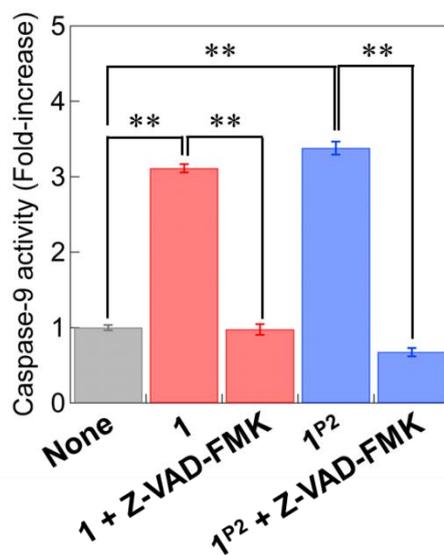


**Figure 2-17.** Caspase-3/7 activity in HeLa cells measured using a caspase fluorometric assay kit when treated with **1** (red) and **1<sup>P2</sup>** (blue) (IC<sub>50</sub> value of 24 h) for 1 and 12 h. Results are shown as the mean ± SD from five independent experiments. (\*\**p* < 0.001; two-tailed Student's t-test)

さらに、その Caspase-3/7 を活性化しているイニシエーター・カスパーゼの存在を調べた。Caspase-3 は Caspase-8、-9 と相互作用することが知られている。Caspase-8 は細胞表層にあるデスレセプターを介した外因性経路のアポトーシス誘導に、Caspase-9 はミトコンドリアを介した内因性経路のアポトーシス誘導に関与している。今回、**2-3-8** に示した共焦点顕微鏡による細胞内局在の測定により、**1** および **1<sup>P2</sup>** がミトコンドリアに局在していることが示されている。そこで活性化された Caspase-9 の存在を調べた。活性化された Caspase-9 は開裂部位として Leu-Glu-His-Asp (LEHD)<sup>[39]</sup> を認識する。そこで、細胞膜透過性で無毒であり、活性化された Caspase-9 に不可逆的に結合する FITC-LEHD-FMK<sup>[40]</sup> を用いて、活性化された Caspase-9 を定量した。HeLa 細胞を **1** (1740 μM) と **1<sup>P2</sup>** (156 μM) の存在下で 1 時間と 12 時間インキュベートした。1 時間ないしは 12 時間経過後、細胞をはがして回収し、FITC-LEHD-FMK 存在下でさらに 30 分間インキュベートした。FACS で定量した活性化された Caspase-9 の結果を Figure 2-13 および 2-14 に示す。**1** および **1<sup>P2</sup>** は 12 時間の作用で活性化 Caspase-9 の量が錯体非存在下と比較して 3 倍以上増加した (Figure 2-18)。さらに、この活性化は、Caspase 阻害剤である Z-VAD-FMK<sup>[41]</sup>、<sup>[42]</sup> 存在下ではほぼ完全に阻害された (Figure 2-19)。これらの結果は、**1** および **1<sup>P2</sup>** が Caspase-9 を活性化したことを示している。



**Figure 2-18.** Caspase-9 activity in HeLa cells measured using a caspase fluorometric assay kit when treated with **1** (red) and **1P2** (blue) (IC<sub>50</sub> value of 24 h) for 1 and 12 h. Results are shown as the mean ± SD from five independent experiments. (\*\**p* < 0.001; two-tailed Student's t-test)



**Figure 2-19.** Caspase-9 activity in HeLa cells measured using a caspase fluorometric assay kit when treated with **1** (red) and **1P2** (blue) (IC<sub>50</sub> value of 24 h) for 12 h in the absence and the presence of Z-VAD-FMK. Results are shown as the mean ± SD from five independent experiments. (\*\**p* < 0.001; two-tailed Student's t-test)

これらの結果は、**1** および **1P<sup>2</sup>** はイニシエーター・カスパーゼである Caspase-9 を活性化し、次にその Caspase-9 がエフェクター・カスパーゼである Caspase-3/7 を活性化したことを示している。

したがって、**1** および **1P<sup>2</sup>** はミトコンドリア経由の内因性アポトーシス<sup>[35, 40, 43]</sup>を誘導すると結論できる。がん細胞ではミトコンドリアの機能不全により、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度が正常細胞中よりも 100 倍程度上昇し、サブ  $\mu$ M になっている。**1** および **1P<sup>2</sup>** は特にがん細胞中で増加している H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と反応し、ミトコンドリアの DNA を切断するなどしてミトコンドリアにダメージを与え、がん細胞を選択的にアポトーシスへと誘導していると考えられる。このことが **1** および **1P<sup>2</sup>** の比較的高いがん細胞選択的毒性を可能にしていると考えられる。しかし、細胞内の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度は非常に低いため、 $\mu$ -1,1-hydroperoxodicopper(II) 錯体 **2** および **2P<sup>2</sup>** を細胞内で検出することは困難である。

#### 2-4. 結論

本章では, phenanthrene を DNA 標的部局として導入した新規 amide-tether 型配位子 (HL1<sup>P2</sup>)とその二核銅(II)錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-OH)(L1<sup>P2</sup>)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (**1**<sup>P2</sup>)を合成した. この phenanthrene 部局は **1**<sup>P2</sup> のインターカレーターとして DNA に結合し, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による DNA 二本鎖切断を大きく促進することを見出した. さらに, **1**<sup>P2</sup> の肺および膵臓のがん細胞に対する細胞毒性を約 12 倍向上させた. これは, **1**<sup>P2</sup> が DNA 二本鎖切断を約 9.3 倍促進したと良い相関を示している. 共焦点顕微鏡を用いた細胞内可視化実験の結果から, **1**<sup>P2</sup> のミトコンドリアへの局在が示された. FACS を用いたアポトーシスアッセイやカスパーゼ活性の測定から, **1** および **1**<sup>P2</sup> はいずれもミトコンドリア経路の内因性アポトーシスを誘導することが示された. このミトコンドリア経路のアポトーシスが, **1** および **1**<sup>P2</sup> の比較的高いがん細胞選択的毒性の理由であると考えられる. 本研究で得られた知見は, 深刻な副作用の軽減に向けた新規抗がん剤の開発に対して新たな研究基盤を提供できる可能性がある.

## 2-5. 実験方法

### 2-5-1. 試薬

試薬については、合成中間体や錯体を除き、高純度製品を和光純薬工業、東京化成、シグマアルドリッチ社製から選択して購入した。溶媒については、合成に用いるものは必要に応じて乾燥蒸留した。supercoiled plasmid pUC19 DNA は、ニッポンジーン社から購入した試薬を使用した。仔ウシ胸腺由来のデオキシリボ核酸ナトリウム塩 (type I, fibers) は Sigma-Aldrich から購入した。Apoptosis assay は、eBioscience™ Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC (Invitrogen) を使用して測定した。Caspase-3/7 活性は CellEvent™ Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit を、Caspase-9 活性は CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase Staining Kit を使用して測定した。二核銅(II)錯体 **1** は参考文献<sup>13-14,23-25</sup> に従って合成した。

### 2-5-2. 測定装置

元素分析(C, H, N)は、Perkin-Elmer 社製 Elemental Analyzer 2400 II を用いて測定した。UV-vis 吸収スペクトルは、Agilent 社製 8454 紫外可視分光光度計を用いて測定した。pH 測定は、HORIBA 製 LAQUA electrode を標準緩衝液で校正した後に測定した。Electron spray ionization MS (ESI MS) および Cold spray ionization MS (CSI MS) スペクトルは、日本電子製 JMS-T100CSR the AccuTOF CS を用いて、MeOH, MeCN または H<sub>2</sub>O を溶媒として測定した。赤外線(IR)スペクトルは、SHIMADZU Single Reflection HATR IRAffinity-1 MIRacle 10 で測定した。<sup>1</sup>H NMR スペクトルは、日本電子製 ECA-500RX フーリエ変換核磁気共鳴装置(500 MHz)を使用し、基準物質として tetramethylsilane (TMS) または sodium 3-(trimethylsilyl)propionate-2,2,3,3-*d*<sub>4</sub> (TSP) を用いて測定した。蛍光スペクトルは、HITACHI Spectral fluorometer F-7000 で測定した。細胞内銅の定量は、SHIMADZU Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer ICP MS-2030 を用いて測定した。MTT assay は、Thermo Scientific™ Multiskan™ FC を用いて測定を行った。共焦点顕微鏡は、Nikon Instech 社製共焦点レーザー顕微鏡 A1 を用いた。フローサイトメトリーは、Invitrogen 社製 Attune NxT Focusing Cytometer を用いて測定を行った。

### 2-5-3. 配位子(HL1<sup>P2</sup>)およびその二核銅(II)錯体(1<sup>P2</sup>)の合成

#### Phenanthrene-9-carboxylic acid (7)の合成

500 mL 三口フラスコに窒素置換したバルーン付きの三方コックを取り付け、原料である 9-Bromophenanthrene (6) (5.18 g, 20.1 mmol) を入れ、セプタムおよび玉栓をそれぞれの口に取り付け、脱気置換して窒素雰囲気下にした。シリンジを用いて窒素下で dry Et<sub>2</sub>O (200 mL) を加え、EtOH 浴を用いて -30°C まで冷却した。-30°C に温度を保ち、シリンジを用いて 1.6 M *n*-BuLi ヘキサン溶液(15 mL)を加えた。1 時間攪拌して反応させた後、窒素バルーンを CO<sub>2</sub> ガスバルーンと付け替えて、1 時間 30 分激しく攪拌して反応させた。その後、反応容器を氷浴に移し、H<sub>2</sub>O (90 mL)を加え、一晩攪拌させた。攪拌を止め、反応混合物に 1 M NaOH を加えて pH 11 に調整した後、EtOAc (2 × 200 mL) と hexane (2 × 200 mL) で分液洗浄した後、水層を取り、これに 1 M HCl を加えて pH 1 に調整すると、白色固体が析出した。これを吸引ろ過で集め、真空乾燥すると白色固体が得られた (3.87 g, Yield 86%)。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 13.3 (brs, 1H, COOH), 8.89 (dd, *J* = 8.6, 1.4 Hz, 1H, Phen5), 8.85 (d, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 1H, Phen8), 8.84 (dd, *J* = 7.9, 1.3 Hz, 1H, Phen4), 8.49 (s, 1H, Phen10), 8.12 (dd, *J* = 7.7, 0.96 Hz, 1H, Phen1), 7.79 (ddd, *J* = 7.0, 8.3, 1.4 Hz, 1H, Phen7), 7.69–7.79 (m, 2H, Phen3, Phen6), 7.72 (ddd, *J* = 7.7, 7.4, 1.3 Hz, 1H, Phen2).

#### Phenanthrene-9-carbonyl chloride (8)の合成

30 mL ナスフラスコに回転子、7 (200 mg, 89.9 mmol), SOCl<sub>2</sub> (3.5 mL), そして DMF をパスツールで 2 滴加えた後、ジムロート、塩化カルシウム管を取り付け、60°C のオイルバスで攪拌した。3 時間攪拌した後、室温に戻し、アスピレーターを用いて SOCl<sub>2</sub> を留去すると黄色固体が生成した。その固体に少量のベンゼンを加えると、不溶塩が生成したので、桐山ロートと吸引瓶を用いて吸引濾過し、濾液をロータリーエバポレーターで濃縮し、真空乾燥すると卵白色の固体が得られた (206 mg, Yield 95%)。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 8.93 (s, 1H, Phen10), 8.80 (m, 1H, Phen5), 8.76 (m, 1H, Phen4), 8.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Phen8), 8.08 (dd, *J* = 7.6, 0.76 Hz, 1H, Phen1), 7.86 (ddd, *J* = 7.1, 8.4, 1.3 Hz, 1H, Phen7), 7.71–7.79 (m, 2H, Phen2, Phen6), 7.71 (ddd, *J* = 8.0, 6.9, 0.76 Hz, 1H, Phen3).

#### *N,N',N''*-4,7,10-Tris(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (10)の合成

500 mL 三口フラスコに回転子を入れ、三方コック、バルーンを取り付けて真空乾燥した。CHCl<sub>3</sub> (20 mL) に溶解させた 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane (9) (1.80 g, 10.4 mmol) を反応容器に入れ、Et<sub>3</sub>N (4.0 mL, 28.7 mmol) を加えた。これに 200 mL 等圧滴下漏斗を取

り付け, di-tert-butyl decarbonate (Boc<sub>2</sub>O) (6.35 g, 29.1 mmol)を CHCl<sub>3</sub> (30 mL)に溶解させた溶液を加え, 1日かけてゆっくり滴下した. TLC (シリカゲル, 展開溶媒: CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 100:1)で9がなくなったことを確認した後, ロータリーエバポレーターで濃縮した. これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 100:1)で精製し, 濃縮すると白色固体が得られた (4.53 g, Yield 99%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm: 3.54–3.73 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.17–3.48 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 2.76–2.93 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 1.47 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 1.45 (s, 18H, CH<sub>3</sub>).

### 1,10-Ditosyl-1,4,7,10-tetraoxadecane (**12** (n = 2))の合成

2000 mL 三口反応容器に回転子, Triethylene glycol (**11** (n = 2)) (31.0 mL, 0.233 mol), *p*-toluenesulfonyl chloride (87.0 g, 0.456 mol), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (750 mL)を加えた. これを氷浴に浸して攪拌させ, そこに粉状にした KOH (110 g, 1.96 mol)を少しずつ加え, N<sub>2</sub>を封入したバルーンを取り付け, 0°C に保ったまま 3時間攪拌した. 反応容器に H<sub>2</sub>O (450 mL)を加え, これを CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 200 mL)で分液し, 有機層に Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて脱水した後, ヌツチェで濾過して少量の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で洗い込み濾液を集めて, 濾液をロータリーエバポレーターで濃縮すると白色固体を得た. これを hot acetone に溶解させて再結晶させると白色固体が得られた (92.5 g, Yield 88%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.79 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H, Ph), 7.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H, Ph), 4.12–4.16 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.64–3.68 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.53 (s, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.45 (s, 6H, CH<sub>3</sub>).

### 1,8-Diazido-3,6-dioxaoctane (**13** (n = 2))の合成

500 mL ナスフラスコに回転子, **12** (n = 2) (104 g, 0.228 mol), tetrabutylammonium iodide (TBAI, 4.33 g, 11.7 mmol), sodium azide (60.1 g, 0.925 mol), DMF (300 mL)を入れて遮光し, 脱気および窒素置換した後, 80°C で 24時間攪拌した. 反応容器を室温に戻した後, DMF をロータリーエバポレーターで除去した. Et<sub>2</sub>O (600 mL)を加えて不溶塩をヌツチェで濾過し, 濾液を H<sub>2</sub>O (3 × 200 mL)で分液し, 有機層に Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて脱水した後, ヌツチェで濾過して少量の Et<sub>2</sub>O で洗い込み, 濾液をロータリーエバポレーターで濃縮すると黄色の油状物質が得られた (42.6 g, Yield 93%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 3.70 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.69 (s, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.40 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>).

### 1-Amino-8-azido-3,6-dioxaoctane (**14** (n = 2))の合成

1000 mL ナスフラスコに回転子, **13** (n = 2) (42.6 g, 0.213 mol), EtOAc (300 mL), 1 M HCl (400 mL)を加えた. これに 300 mL 等圧滴下漏斗を取り付け, そこに triphenylphosphine (PPh<sub>3</sub>, 55.0 g, 0.210 mol)を EtOAc (300 mL)に溶解させた溶液を入れ, 激しく攪拌させながらゆっくり滴下した. 12 時間後, EtOAc 層を取り除き, 残った水層を EtOAc (3 × 200 mL)で分液した. EtOAc 層を取り除き, この水層の pH を 1 M NaOH 水溶液で 14 にした後, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 × 200 mL)で分液し, 有機層に Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を入れて脱水した後, ヌツチェで濾過し, ロータリーエバポレーターで濾液を濃縮すると黄色の油状物質が得られた(33.0 g, Yield 90%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 3.70 (t, J = 5.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.62–3.68 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.52 (t, J = 5.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.40 (t, J = 5.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.88 (t, J = 5.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.28 (brs, 2H, NH<sub>2</sub>).

### 3,5-Diformyl-4-hydroxybenzoic acid (**16**)の合成

1000 mL 三口反応容器に回転子, CF<sub>3</sub>COOH (TFA, 180 mL), *p*-Hydroxybenzoic acid (**15**) (10.1 g, 73.1 mmol), hexamethylenetetramine (HMT, 84.1 g, 0.600 mol)を加え, 110°C の油浴で遮光して 2 日間還流した. 室温に戻した後, 4 M HCl (450 mL)を加えて 30°C で一晩攪拌し, H<sub>2</sub>O で洗浄しながらヌツチェで濾過した. 真空乾燥すると黄色の固体が得られた (9.88 g, Yield 70%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ/ppm = 10.3 (s, 2H, CH), 8.54 (s, 2H, CHO).

### *N*-(8-Azido-3,6-dioxaoctyl)-3,5-diformyl-4-hydroxybenzamide (**17** (n = 2))の合成

500 mL ナスフラスコに三方コック, バルーンを取り付け, **16** (11.9 g, 61.1 mmol), CHCl<sub>3</sub> (200 mL)を加えた. **14** (n = 2) (33.0 g, 189 mmol)を CHCl<sub>3</sub> (100 mL)に溶かして加え, EDC•HCl (35.1 g, 183 mmol), Et<sub>3</sub>N (26 mL, 187 mmol)を加えた. 脱気および窒素置換した後, 一晩攪拌した. その後, 4 M HCl (150 mL)を加えて激しく攪拌した. TLC (シリカゲル, 展開溶媒: EtOAc/MeOH 10/1)で反応追跡して副生成物がほとんどないことを確認した後, 2000 mL 分液漏斗に移して有機層を取り出した. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて脱水した後, ヌツチェで濾過して少量の CHCl<sub>3</sub> で洗い込み, 濾液を集めてロータリーエバポレーターで濃縮, 真空乾燥した. これを CHCl<sub>3</sub> (200 mL)に溶解させ, H<sub>2</sub>O (4 × 50 mL)で分液洗浄した. 有機層に Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて脱水した後, ヌツチェで濾過した. 濾液をロータリーエバポレーターで濃縮, 真空乾燥すると赤褐色の固体が得られた(21.7 g, Yield 93%). <sup>1</sup>H

NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 11.9 (s, H, OH), 10.3 (s, 2H, CHO), 8.46 (s, 2H, CH), 6.84 (s, H, NH), 3.73 (t,  $J$  = 5.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.69–3.72 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 3.41 (t,  $J$  = 5.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>).

#### 5-(8-Azido-3,6-dioxaoctyl)carbamoyl-2-hydroxyisophthalic acid (**18** (n = 2))の合成

300 mL ナスフラスコに回転子, Ag<sub>2</sub>O (10.5 g, 45.3 mmol), **17** (n = 2) (5.21 g, 14.9 mmol) を入れ, ここに H<sub>2</sub>O (104 mL) に溶解させた NaOH (5.03 g, 126 mmol) を加えて 60°C で一晩攪拌した. これを最小量の hot H<sub>2</sub>O (20 mL) で洗浄しながら桐山漏斗で濾過し, 濾液を氷浴に浸しながら 12 M HCl を用いて pH を 1 にすると, 白色の沈殿が得られた. これを桐山漏斗で濾過, 真空乾燥すると白色固体が得られた (5.21 g, Yield 91%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$ /ppm = 8.53 (s, H, NH), 8.47 (s, 2H, CH), 3.60 (t,  $J$  = 5.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.54–3.58 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.52 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.39 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.37 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>).

#### 5-(8-Azido-3,6-dioxaoctyl)carbamoyl-1,3-di((*N,N',N''*-4,7,10-tris(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecanyl)-1-carbamoyl)-2-hydroxybenzene (**19** (n = 2))の合成

100 mL ニロフラスコに回転子を入れ, 三方コック, バルーンを取り付けて真空乾燥した. 反応容器に **10** (1.09 g, 2.30 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA, 1.5 mL, 8.61 mmol), DMF (30 mL) を加えて溶解させた. **18** (n = 2) (408 mg, 1.07 mmol), 1-[Bis(dimethylamino) methylene]-1H-benzotriazolium 3-Oxide Tetrafluoroborate (TBTU, 1.01 g, 3.14 mmol) を DMF (30 mL) に溶かし反応容器に加えた. 脱気および N<sub>2</sub> 置換した後, 室温で遮光して一晩攪拌させた. ロータリーエバポレーターで濃縮すると褐色液体が得られた. これに H<sub>2</sub>O (100 mL) を加え, CHCl<sub>3</sub> (3 × 100 mL) で分液後, 有機層に Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えて脱水した. ヌツチェで濾過し, 真空乾燥すると茶色の泡状固体が得られた. これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (gradient from EtOAc to EtOAc/MeOH 10/1) で精製した. 目的物が入っているフラクションを集めてロータリーエバポレーターで濃縮し, 真空乾燥すると褐色固体が得られた (671 mg, Yield 49%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 7.85 (s, 2H, Ph), 3.40–3.74 (m, 42H, CH<sub>2</sub>), 3.38 (t,  $J$  = 5.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.28–1.52 (m, 54H, CH<sub>3</sub>). ESI MS (MeOH *m/z*, positive mode). Calcd for [**19** (n = 2) + 2Na]<sup>2+</sup>: 668.36. Found: 668.06. Calcd for [**19** (n = 2) + Na]<sup>+</sup>: 1313.7. Found: 1313.1.

**5-(8-amino-3,6-dioxaoctyl)carbamoyl-1,3-di((*N,N',N''*-4,7,10-tris(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecanyl)carbamoyl)-2-hydroxybenzene (**20** (*n* = 2))の合成**

100 mL ナスフラスコに窒素置換したバルーン付きの三方コックを取り付け **19** (*n* = 2) (498 mg, 0.399 mmol), 10% Pd/C (450 mg)を入れ, MeOH (50 mL)を加えた. 反応容器全体をよく脱気窒素置換した後, 脱気水素置換し, 水素雰囲気下で一晩攪拌した. IR スペクトルを用いて原料がないことを確認した後, セライト濾過を行い, 濾液をロータリーエバポレーターで濃縮した. これを真空乾燥すると白色固体が得られた(462 mg, Yield 95%). ESI MS (MeOH *m/z*, positive mode). Calcd for [**20** (*n* = 2) + H]<sup>+</sup>: 1265.8. Found: 1265.8.

**5-(9-Phenanthrene-8-carbamoyl-3,6-dioxaoctyl)carbamoyl-1,3-di((*N,N',N''*-4,7,10-tris(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecanyl)carbamoyl)-2-hydroxybenzene (**21** (*n* = 2))の合成**

100 mL 二口ナスフラスコに回転子, **20** (*n* = 2) (341 mg, 0.269 mmol)を入れ, THF (25 mL)に溶かした後, Et<sub>3</sub>N (0.1 mL, 0.717 mmol)加えると溶液が橙色に変化した. その溶液に, 氷浴中で, 激しく攪拌しながら, **8** (62.6 mg, 0.260 mmol)を THF (5 mL)に溶かしたものをパストゥールでゆっくりと加えた. その後, 窒素置換したバルーン付きの三方コックを取り付け, 脱気窒素置換後, 氷浴に浸しながら攪拌した. 1時間攪拌後, 室温に戻して一晩攪拌した. ロータリーエバポレーターで THF を留去した後, CHCl<sub>3</sub> (30 mL)と H<sub>2</sub>O (15 mL)に溶解させ, CHCl<sub>3</sub> (2 × 30 mL)で分液し, 有機層に Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて脱水した. スツェを用いて吸引濾過し, 真空乾燥すると褐色固体が得られた. これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (gradient from CHCl<sub>3</sub> to CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10/1)で精製した. 目的物が入っているフラクションを集めてロータリーエバポレーターで濃縮し, 真空乾燥すると白色固体が得られた(258 mg, Yield 63%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 8.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Phen5), 8.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Phen4), 8.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Phen1), 7.91 (s, 1H, Phen10), 7.89 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, Phen8), 7.79 (s, 2H, Ph), 7.57–7.71 (m, 4H, Phen2, Phen3, Phen6, Phen7), 3.22–3.81 (m, 44H, CH<sub>2</sub>), 1.26–1.52 (m, 54H, CH<sub>3</sub>). ESI MS (MeOH *m/z*, positive mode). Calcd for [**21** (*n* = 2) + 2Na]<sup>2+</sup>: 757.4. Found: 757.1. Calcd for [**21** (*n* = 2) + Na]<sup>+</sup>: 1491.8. Found: 1491.2.

**[3,5-di(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-carboxamide)-4-hydroxybenzenecarboxy]-  
(phenanthrene-9-carboxy)-3,6-dioxaoctane-1,8-*N,N'*-diamide•6HCl (HL1<sup>P2</sup>•6HCl)の合成**

100 mL ナスフラスコに回転子, **21** (*n* = **2**) (249 mg, 0.17 mmol)を入れ, EtOH (10 mL)に溶かした. 氷浴に浸しながら 12 M HCl (3.5 mL)をゆっくりと加えた後, 一晩攪拌した. ロータリーエバポレーターで濃縮すると白色固体が得られた(181 mg, Yield 98%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ/ppm = 8.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Phen5), 8.84 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Phen4), 8.18 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Phen8), 8.05 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Phen1), 8.02 (s, 1H, Phen10) 7.71–7.88 (m, 4H, Phen2, Phen3, Phen6, Phen7), 7.58 (s, 2H, Ph), 2.82–3.90 (m, 44H, CH<sub>2</sub>). ESI MS (H<sub>2</sub>O *m/z*, positive mode). Calcd for [HL1<sup>P2</sup> + 2H]<sup>2+</sup>: 435.3. Found: 435.1. Calcd for [HL1<sup>P2</sup> + H + Na]<sup>2+</sup>: 446.3. Found: 446.1. Calcd for [HL1<sup>P2</sup> + 2Na]<sup>2+</sup>: 457.2. Found: 457.0. Calcd for [HL1<sup>P2</sup> + H]<sup>+</sup>: 869.5. Found: 869.0.

**二核銅(II)錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-OH)(L1<sup>P2</sup>)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (1<sup>P2</sup>)の合成**

100 mL ナスフラスコに HL1<sup>P2</sup>•6HCl (43.0 mg, 39.6 μmol)を入れ, 1 M NaOH (237 μL)を加えて pH が 8 以上であることを確認した後, 1 時間真空乾燥した. その後多量の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>を加えた. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて脱水した後, セライト濾過した. 濾液をロータリーエバポレーターで濃縮, 真空乾燥すると白色固体 HL1<sup>P2</sup>が得られた(24.2 mg, 70%).

次に, 100 mL ニ口ナスフラスコに回転子を入れ, H<sub>2</sub>O (200 μL)に溶解させた Cu(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O (20.8 mg, 56.1 μmol)を加えた. そこに N<sub>2</sub>フローしながら H<sub>2</sub>O (200 μL)に溶解させた先程の HL1<sup>P2</sup>をパスツールでゆっくりと加え, さらに 1 M NaOH (237 μL)で pH を 8 にした. ESI MS スペクトルで配位子が残っていないことを確認した後, ロータリーエバポレーターで濃縮した. MeOH (200 μL)を加えて溶かした後, 多量の Et<sub>2</sub>O を加えると緑色固体が析出した. これを濾過し, 真空乾燥すると緑色固体が得られた(25.6 mg, 73%). Anal. Calcd for [Cu<sub>2</sub>(μ-OH)(L1<sup>P2</sup>)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•3H<sub>2</sub>O: C, 43.67; H, 5.58; N, 11.07. Found: C, 43.74; H, 5.66; N, 10.85. ESI MS (H<sub>2</sub>O *m/z*, positive mode). Calcd for [1<sup>P2</sup> - OH - 2ClO<sub>4</sub> - H]<sup>2+</sup>: 496.17. Found: 496.17. [1<sup>P2</sup> - 2ClO<sub>4</sub>]<sup>2+</sup>: 505.17. Found: 505.18. Calcd for [1<sup>P2</sup> - ClO<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: 1109.29. Found: 1109.30. IR (KBr):  $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1}$  = 2918, 1628, 1591, 1541, 1460, 1433, 1356, 1271, 1179, 1096, 995, 937, 835, 752, 660, 615.

#### 2-5-4. EtBr 法

EtBr (3.3  $\mu\text{M}$ ), ct-DNA (20  $\mu\text{M}$  bp), NaCl (10 mM), buffer (pH 6.0 (MES), 10 mM)となるように調整した。この溶液に, NaCl (10 mM), buffer (pH 6.0 (MES), 10 mM)に溶解させた **1** および **1<sup>P2</sup>** を 400  $\mu\text{M}$  になるまで 2  $\mu\text{M}$  の間隔で加えた。37°C, 510 nm で励起した蛍光スペクトルは, 520–800 nm の範囲で追跡した。結合定数  $K_{\text{app}}$  ( $\text{M}^{-1}$ )は, 以下に示す式(1)を用いて計算した。[complex]は EtBr の蛍光強度が 50%減少した時の溶液中の **1** および **1<sup>P2</sup>** の濃度,  $K_{\text{EtBr}} = 1.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ , [EtBr] = 1.65  $\mu\text{M}$  を用いた。

$$K_{\text{EtBr}}[\text{EtBr}] = K_{\text{app}}[\text{complex}] \quad (1)$$

#### 2-5-5. DNA 切断実験

**1<sup>P2</sup>** の DNA 切断活性は, pUC19 DNA を用い, アガロースゲル電気泳動法によって評価した。1.5 mL エッペンチューブに NaCl (10 mM), buffer (pH 6.0 (MES), 10 mM), pUC19 DNA (50  $\mu\text{M}$  bp), **1<sup>P2</sup>** (0–50  $\mu\text{M}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0–500  $\mu\text{M}$ )となるように調製した溶液を加え, 37°C の暗所でインキュベーションした。0, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, 300 分毎にサンプルを採取し, loading buffer (0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol FF, 1.0 mM EDTA and 30% glycerol)を用いて反応をクエンチした。各サンプルを TAE buffer (Tris/acetate/EDTA)を用いて作成した 1%アガロースゲルにローディングし, 100 V で約 1 時間電気泳動を行った。その後, EtBr (0.5  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ )染色を 1 時間行い, VILBER LOURMAT E-BOX-CX5.TS Edge-20.M を用いてゲルバンドを撮影した。撮影したバンドを, Form I の染色補正值 1.06 を用い, ImageJ ソフトウェアによって解析を行った。この測定は最低 3 回行い, 再現性をとった。

#### 2-5-6. $\mu$ -1,1-hydroperoxodicopper(II)錯体 **2**, **2<sup>P2</sup>** と ct-DNA の反応

ct-DNA (0.25 mM bp)の存在下または非存在下において, **1**, **1<sup>P2</sup>** の水溶液(0.25 mM)を 2 面セルに入れ,  $23 \pm 0.2^\circ\text{C}$  に保った。そこに  $\text{H}_2\text{O}_2$  水溶液(錯体に対して 20 eq)を加え, 290–850 nm の範囲でスペクトルを追跡した。そして,  $\mu$ -1,1-hydroperoxodicopper(II)錯体 **2**, **2<sup>P2</sup>** の減衰を様々な波長で確認した。

### 2-5-7. 細胞株とその培養条件

HeLa (ヒト子宮頸がん細胞)は同志社大学 北岸研究室(京都, 日本)から譲り受けた. A549 (ヒト肺がん細胞), WI-38 (ヒト肺正常細胞), PK-59 (ヒト膵臓がん細胞)および 2C6 (ヒト膵臓正常細胞)は理化学研究所 バイオリソース研究センター(BRC)(茨城, 日本)から購入した. HeLa 細胞, A549 細胞, WI-38 細胞および PK-59 細胞は, 牛胎児血清(fetal bovine serum, FBS) (10%), penicillin (100 units mL<sup>-1</sup>), streptomycin (100 µg mL<sup>-1</sup>)を加えた Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, high glucose), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, low glucose), Minimum Essential Medium Eagle (MEM)または Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640)培養液をそれぞれ用いて, 5% CO<sub>2</sub> 濃度, 37°C の条件下で培養した. 2C6 細胞は, 新生仔ウシ血清(newborn calf serum) (10%), 牛胎児血清(fetal bovine serum, FBS) (5%), 馬血清(horse serum) (2.5%), penicillin (100 units mL<sup>-1</sup>), streptomycin (100 µg mL<sup>-1</sup>)を加えた Mixture F-10 Ham (HamF10)培養液を用いて, 5% CO<sub>2</sub> 濃度, 37°C の条件下で培養した.

### 2-5-8. 3-(4,5-dimethylthiazole)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

まず, 96 well プレートに blank として培地のみを 1 列と, 培地に  $10 \times 10^4$  cells/mL になるように懸濁させた細胞を 1 well につき 100 µL ずつ control と錯体のサンプル数分の列に蒔き, 5% CO<sub>2</sub> 濃度, 37°C の条件下でインキュベーションした. HeLa 細胞と A549 細胞に関しては 24 時間後, WI-38 細胞と PK-59 細胞, 2C6 細胞に関しては 48 時間後, 培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄した. その後, サンプル列にはそれぞれの濃度に調製した **1**, **1**<sup>P2</sup>, HL1, HL1<sup>P2</sup> および Cisplatin のサンプル(1–10,000 µM)を, blank と control 列には培地のみを 1 well につき 100 µL ずつ加え, インキュベーションした. 24 時間および 48 時間後, 培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄し, MTT reagent (5 mg mL<sup>-1</sup>)と培地を 1:9 の割合で混合させた溶液を 1 well につき 100 µL ずつ加え再度インキュベーションした. 3 時間後, アスピレーターで溶液を吸引した後, 生体用 DMSO を 1 well につき 100 µL ずつ加えた. 3 分間シェイクして沈殿したホルマザンを完全に溶解させた後, 570 nm の吸光度を吸光度測定器で測定した. この結果より, **1**, **1**<sup>P2</sup>, HL1, HL1<sup>P2</sup> および Cisplatin の細胞増殖 50%阻害濃度(50% Inhibition Concentration, IC<sub>50</sub> 値)を算出した. この測定は最低 3 回行い, 再現性をとった.

### 2-5-9. ICP MS による HeLa 細胞内の銅イオン濃度の定量

観察用ディッシュ(φ60 mm)に  $2.5 \times 10^5$  cells/mL に調製した HeLa 細胞の懸濁液を 4 mL 加え、5% CO<sub>2</sub> 濃度、37°C の条件下で 24 時間インキュベーションした。培地を除いて、PBS(-)で 2 回洗浄し、**1** ないしは **1P<sup>2</sup>** を溶解させた培地溶液(25 μM, 4 mL)を加えた。5% CO<sub>2</sub> 濃度、37°C の条件下で 24 時間および 48 時間インキュベーションした。培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄した後、trypsin (0.25%)で細胞をはがして 15 mL の遠沈管に移した。遠心分離し、溶液をアスピレーターで吸引した。PBS(-) (1 mL)を加えて懸濁させ、再度遠心分離した。溶液をアスピレーターで吸引した後、PBS(-)(500 μL)を加えて懸濁させた。セルカウンターで細胞数を数えて、 $1 \times 10^6$  cells 分の細胞溶液を新しい 15 mL の遠沈管に移して凍結乾燥した。細胞を超微量分析用 70% HNO<sub>3</sub> 水溶液 (250 μL)に溶かしてオークリッジ遠心管 Teflon® FEP (10 mL)に移した後、60°C で 3 時間加熱処理をした。その後、そこに H<sub>2</sub>O (250 μL)を加えた。この細胞溶液( $2 \times 10^9$  cells/L, 35% HNO<sub>3</sub>)を ICP MS-2030 で測定し、細胞内の銅を定量した。ICP MS-2030 による測定は、島津製作所に委託した。

### 2-5-10. フラスコ振盪法による分配係数 ( $\log P_{ow}$ )の測定

1, **1P<sup>2</sup>** の分配係数( $\log P_{ow}$ )をフラスコ振盪法によって評価した。まず、測定に使用する H<sub>2</sub>O および 1-octanol は両者を混合して一晩攪拌し、飽和状態にした。**1** ないしは **1P<sup>2</sup>** の水溶液(0.1 mM, 3 mL)に 1-octanol (3 mL)を加えて、4 時間攪拌した。その後、1-octanol 溶液と H<sub>2</sub>O に分離し、それぞれの溶液の電子スペクトルを測定した。それぞれの溶液に溶解した錯体濃度の算出には本文中の  $\epsilon$  をそれぞれ用いた。算出した錯体濃度  $C_w$ ,  $C_o$ を用いて、式(2)よりそれぞれの錯体の  $\log P_{ow}$  を算出した。

$$\log P_{ow} = \log \frac{C_o}{C_w} \quad (2)$$

### 2-5-11. 共焦点顕微鏡による細胞内イメージング

観察用ディッシュ(φ14 mm)に  $6 \times 10^4$  cells/mL に調製した HeLa 細胞の懸濁液を 600 μL 加え、5% CO<sub>2</sub> 濃度、37°C の条件下で 24 時間インキュベーションした。培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄し、**1P<sup>2</sup>** を溶解させた培地溶液(200 μM, 600 μL)を加えた。5%CO<sub>2</sub> 濃度、37°C の条件下で 24 時間インキュベーションした後、培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄した。そこに、ミトコンドリアの染色剤として Mito Tracker™ Deep Red FM (Thermo Fisher) (50 nM, 600 μL)を培地に加えた。さらに、5% CO<sub>2</sub> 濃度、37°C の条件下で 10 分間インキュベーションした後、培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄した。そこに培地を加え、

共焦点レーザー顕微鏡で細胞を観察した。Mito Tracker™ Deep Red FM の観察には 638 nm, **1<sup>P2</sup>** の観察には 405 nm の励起レーザーを用いた。

#### 2-5-12. Apoptosis assay

96 well プレートに  $10 \times 10^4$  cells/mL に調製した HeLa 細胞の懸濁液を 1 well につき 100  $\mu$ L ずつ、サンプル数分の well に加え、5% CO<sub>2</sub> 濃度、37°C の条件下で 24 時間インキュベーションした。培地を除いて PBS(-) で 2 回洗浄し、**1** ないしは **1<sup>P2</sup>** の培地溶液(800  $\mu$ M) を 1 well につき 100  $\mu$ L ずつ加えた。5% CO<sub>2</sub> 濃度、37°C の条件下で 1 および 12 時間インキュベーションした後、培地を除いて PBS(-) で 2 回洗浄し、trypsin (0.25%) で細胞をはがした。はがした細胞を 1.5 mL のエッペンチューブに移し、遠心分離(1200 rpm, 2 min) した後、溶液をアスピレーターで吸引した。集めた細胞に PBS(-) (1 mL) を加えて懸濁させ、再度遠心分離した。溶液をアスピレーターで吸引した後、1×BB 溶液を加えて懸濁させた。遠心分離し、溶液をアスピレーターで吸引した後、1×BB 溶液を加えて  $1 \times 10^6$  cells/mL に調製した。その細胞溶液 100  $\mu$ L に Annexin V-FITC 溶液(5  $\mu$ L) を混合して、室温で 10 分間インキュベート後、遠心分離し、アスピレーターで溶液を吸引した。そこに、1×BB 溶液(500  $\mu$ L) を加えて懸濁させ、遠心分離し、アスピレーターで溶液を吸引した。1×BB 溶液(200  $\mu$ L) を細胞に加えて懸濁させ、PI (5  $\mu$ L) を混合した。この細胞溶液を Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer を用いて観察した。ゲート内の細胞数は 10,000 cells とした。Annexin V-FITC には blue (488 nm) レーザーの channel BL1 (Filter 530/30, Filter Range 515/545), PI には blue (488 nm) レーザーの channel BL2 (Filter 574/26, Filter Range 561/587) を用いた。

#### 2-5-13. Caspase-3/7 活性

96 well プレートに  $10 \times 10^4$  cells/mL に調製した HeLa 細胞の懸濁液を 1 well につき 100  $\mu$ L ずつ、サンプル数分の well に加え、5% CO<sub>2</sub> 濃度、37°C の条件下で 24 時間インキュベーションした。培地を除いて PBS(-) で 2 回洗浄し、**1** ないしは **1<sup>P2</sup>** の培地溶液(各 IC<sub>50</sub> 値: 1740, 156  $\mu$ M) を 1 well につき 100  $\mu$ L ずつ加えた。5% CO<sub>2</sub> 濃度、37°C の条件下で 1 および 12 時間インキュベーションした後、培地を除いて PBS(-) で 2 回洗浄し、trypsin (0.25%) で細胞をはがした。はがした細胞を 1.5 mL のエッペンチューブに移し、遠心分離(1200 rpm, 2 min) した後、溶液をアスピレーターで吸引した。集めた細胞に PBS(-) を加えて懸濁させ、再度遠心分離した。溶液をアスピレーターで吸引した後、PBS(-) を加えて  $1 \times 10^6$  cells/mL に調製した。その細胞溶液に CellEvent™ Caspase-3/7

Green Detection Reagen (1  $\mu$ L/細胞懸濁液 1 mL, 最終濃度 500 nM)を混合し, 暗室, 37°C で 30 分間インキュベートした. 最後の 5 分間は, その溶液に SYTOX™ AADvance™ 死細胞染色剤の 1 mM DMSO 溶液(1  $\mu$ L/細胞懸濁液 1 mL, 最終濃度 1  $\mu$ M)も混合してインキュベートした. この細胞溶液を Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer を用いて観察した. ゲート内の細胞数は 10,000 cells とした. CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagen には blue (488 nm)レーザーの channel BL1 (Filter 530/30, Filter Range 515/545), SYTOX™ AADvance™ 死細胞染色剤には blue (488 nm)レーザーの channel BL3 (Filter 595/40, Filter Range 675–715)を用いた. この測定は最低 5 回行い, 再現性を取った.

#### 2-5-14. Caspase-9 活性

96 well プレートに  $10 \times 10^4$  cells/mL に調製した HeLa 細胞の懸濁液を 1 well につき 100  $\mu$ L ずつ, サンプル数分の well に加え, 5% CO<sub>2</sub> 濃度, 37°C の条件下で 24 時間インキュベーションした. 培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄し, **1, 1<sup>P2</sup>** の培地溶液 (各 IC<sub>50</sub>: 486, 1740  $\mu$ M)を 1 well につき 100  $\mu$ L ずつ加えた. ネガティブコントロールには, Z-VAD-FMK と錯体の混合培地溶液(最終濃度: Z-VAD-FMK: 1  $\mu$ L/mL, 錯体: (各 IC<sub>50</sub>) 1740, 156  $\mu$ M)を 1 well につき 100  $\mu$ L ずつ加えた. それらを 5% CO<sub>2</sub> 濃度, 37°C の条件下で 1 および 12 時間インキュベーションした後(ネガティブコントロールは 12 時間のみ), 培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄し, trypsin (0.25%)で細胞をはがした. はがした細胞を 1.5 mL のエッペンチューブに移し, 遠心分離(1200 rpm, 2 min)をした後, 溶液をアスピレーターで吸引した. 集めた細胞に培地を加えて懸濁させ, 再度遠心分離した. 溶液をアスピレーターで吸引した後, 培地を加えて  $1 \times 10^6$  cells/mL に調製した. その細胞溶液に FITC-LEHD-FK (1  $\mu$ L/細胞懸濁液 300  $\mu$ L)を混合し, 暗室, 37°C で 60 分間インキュベートした. 遠心分離(3000 rpm, 5 min)した後, アスピレーターで溶液を吸引した. そこに, Wash Buffer (500  $\mu$ L)を加えて懸濁させ, 再度遠心分離した. 溶液をアスピレーターで吸引した後, Wash Buffer (500  $\mu$ L)を加えて懸濁させた. この細胞溶液を Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer を用いて観察した. ゲート内の細胞数は 10,000 cells とした. FITC-LEHD-FK には blue (488 nm)レーザーの channel BL1 (Filter 530/30, Filter Range 515/545)を用いた. この測定は最低 5 回行い, 再現性を取った.

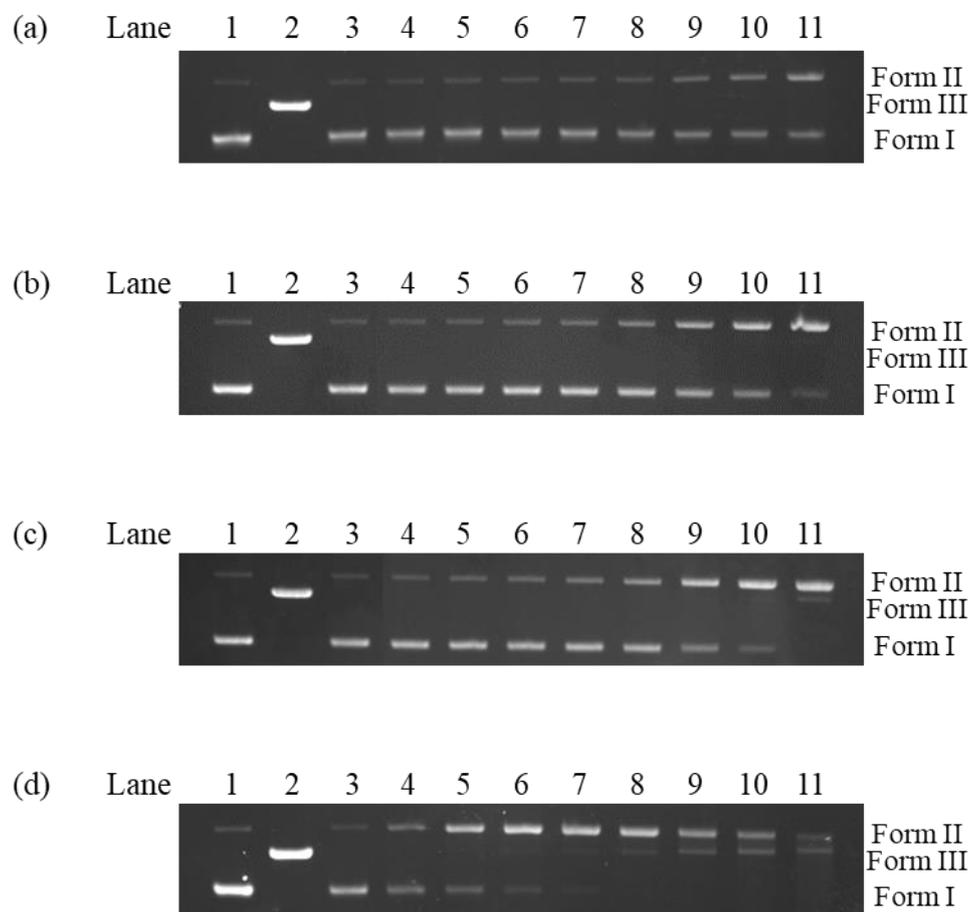
## 2-6. 参考文献

- [1] U. Ndagi, N. Mhlongo, and E. S. Soliman, *Drug Des. Devel. Ther. Rev.* **2017**, *11*, 599–616.
- [2] T. C. Johnstone, K. Suntharalingam, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 3436–3486.
- [3] H. Umezawa, K. Maeda, T. Takeuchi, and Y. Okami, *Antibiot.* **1966**, *19*, 200–209.
- [4] L. V. Liu, C. B. Bel III, S. D. Wong, S. A. Wilson, Y. Kwak, M. S. Chow, J. Zhao, K. O. Hodgson, B. Hedman, and E. I. Solomon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 22419–22424.
- [5] R. Oun, Y. E. Moussa, and N. J. Wheate, *Dalton Trans.* **2018**, *47*, 6645–6653.
- [6] S.-X. Huang, Z. Feng, L. Wang, U. Galm, E. Wendt-Pienkowski, D. Yang, M. Tao, J. M. Coughlin, Y. Duan, and B. Shen, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13501–13509.
- [7] C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato and C. Marzano, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 815–862.
- [8] M. E. Reyes, M. L. Fuente, M. Hermoso, C. G. Ili, and P. Brebi, *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 901.
- [9] N. Aykin-Burns, I. M. Ahmad, Y. Zhu, L. W. Oberley, and D. R. Spitz, *Biochem. J.* **2009**, *418*, 29–37.
- [10] N. Aykin-Burns, B. G. Slane, A. T. Liu, K. M. Owens, M. S. O'Malley, B. J. Smith, F. E. Domann, and D. R. Spitz, *Radiat. Res.* **2011**, *175*, 150–158.
- [11] C. S. Burke, A. Byrne, and T. E. Keyes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 12420–12424.
- [12] J. Lopez, and S. W. G. Tait, *Br. J. Cancer* **2015**, *112*, 957-962.
- [13] Y. Kadoya, K. Fukui, M. Hata, R. Miyano, Y. Hitomi, R. Yanagisawa, M. Kubo, and M. Kodera, *Inorg. Chem.* **2019**, *58*, 14294–14298.
- [14] Y. Kadoya, M. Hata, Y. Tanaka, A. Hirohata, Y. Hitomi, and M. Kodera, *Inorg. Chem.* **2021**, *60*, 5474–5482.
- [15] W. Wu, D. E. Vanderwall, J. Stubbe, C. J. Turner, J. W. Kozarich, and J. A. Stubbe, *Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10843–10844.
- [16] G. Roelfes, M. E. Branum, L. Wang, L. Jr. Que, and B. L. Feringa, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *122*, 11517–11518.
- [17] K. D. Goodwin, M. A. Lewis, E. C. Long, and M. M. Georgiadis, *PNAS* **2008**, *105*, 5052–5056.
- [18] K. E. Erkkila, D. T. Odom, and J.K. Barton, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2777–2795.
- [19] B. J. Pages, D. L. Ang, E. P. Wright, and J. R. Aldrich-Wright, *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 3505–3526.

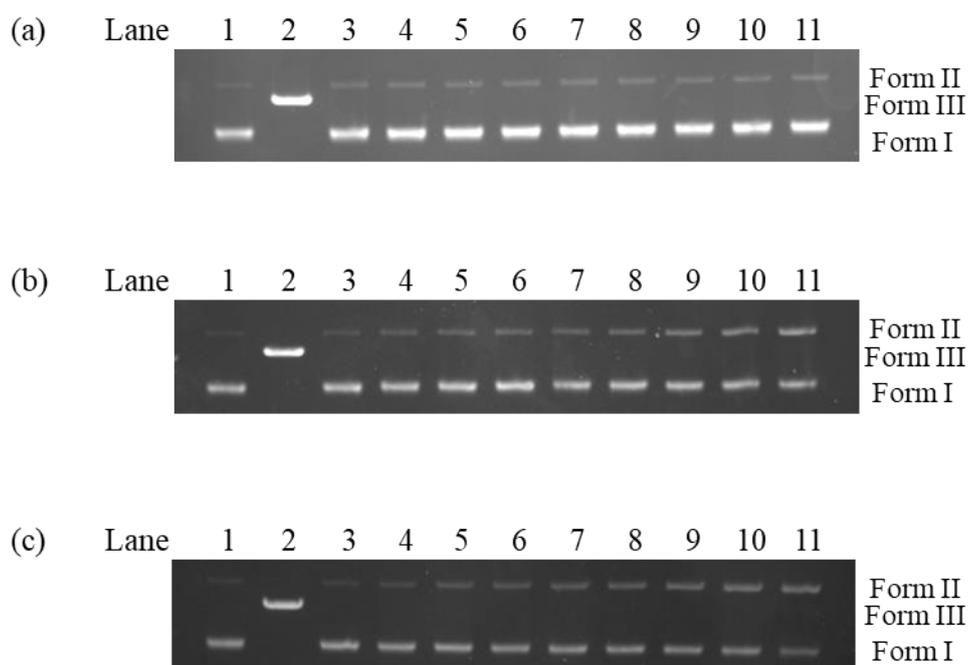
- [20] M. S. Landge, Y. M. Lazare, C. Freeman, J. Bunn, I. J. Cruz, D. Winder, C. Padgett, S. K. Aiken, and D. Ghosh, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2020**, *228*, 117758.
- [21] N. Z. Fantoni, Z. Zara Molphy, S. O'Carroll, G. Georgia Menounou, G. George Mitrikas, M. G. Krokidis, C. Chatgialloglu, J. Colleran, A. Banasiak, M. Clynes, S. Roche, S. Kelly, V. McKee, and A. Kellett, *Chem. Euro. J.* **2021**, *27*, 971–983.
- [22] T. Lauria, C. Slator, V. Mckee, M. Müller, S. Stazzoni, A. L. Crips, T. Carell, and A. Kellett, *Chem. Euro. J.* **2020**, *26*, 16782–16792.
- [23] F. Friscourt, C. J. Fahrni, and G.-J.Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18809–18815.
- [24] L. Ma, C. Tu, P. Le, S. Chitoor, S. J. Lim, M. U. Zahid, K. W. Teng, P. Ge, P. R. Selvin, and A. M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3382–3394.
- [25] S. Torelli, C. Belle, I. Gautier-Luneau, J. L. Pierre, E. Saint-Aman, J. M. Latour, L. Le Pape, and D. Luneau, *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 3526–3536.
- [26] B. C. Baguley, and E. M. Falkenhaus, *Nucl. Acid. Res.* **1978**, *5*, 161–171.
- [27] A. R. Morgan, J. S. Lee, D. E. Pulleyblank, N. L. Murray, and D. H. Evans, *Nucl. Acid. Res.* **1979**, *7*, 547–569.
- [28] L. Tjioe, T. Joshi, C. M. Forsyth, B. Moubaraki, K. S. Murray, J. Brugger, B. Graham, and L. Spiccia, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 939–953.
- [29] R. Scherließ, *Int. J. Pharm.* **2011**, *411*, 98–105.
- [30] J. Meerloo, G. J. L. Kaspers, and J. Cloos, *Humana Press.* **2011**, *411*, 237–245.
- [31] H. Wang, B. Wang, M. Wang, L. Zheng, H. Chen, Z. Chai, Y. Zhao, and W. Feng, *Analyst* **2015**, *140*, 523–531.
- [32] L. Ropel, L. S. Belve`ze, S. N. V. K. Aki, M. A. Stadtherr, and J. F. Brennecke, *Green. Chem.* **2005**, *7*, 83–90.
- [33] I. Vermes, C. Haanenand C. P. M. Reutelingsperger, and J. Immunol. *Methods* **1995**, *180*, 39–51.
- [34] S, J. Martin, C. P. M. Reutelingsperger, A. J. McGahon, J. Rader, R. C. A. A. van Schie, D. M. LaFace, and D. R. Green, *J. Exp. Med.* **1995**, *182*, 1545–1557.
- [35] S. B. Bratton, and G. S. Salvesen, *J. Cell. Sci.* **2010**, *123*, 3209–3214.
- [36] H. A. Harrington, K. L. Ho, S. Ghosh, and K. C. Tung, *Theor. Biol. Medical Model.* **2008**, *5*, 26–40.
- [37] S. Barut, Y. A. Unlu, A. Karaoglan, M. Tuncdemir, F. K. Dagistanli, M. Oztqrk, and A. Colak, *Surg. Neurol. Int.* **2005**, *64*, 213–220.

- [38] W. S. D. Tan, W. Liao, H. Y. Peh, M. Vila, J. Dong, and H. M. Shen, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2018**, *360*, 120–130.
- [39] N. Ozoren, K. Kim, T. F. Burns, D. T. Dicker, A. D. Moscioni, and W. S. El-Deiry, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 6259–6265.
- [40] T. Yu, J. Dohl, F. Elenberg, Y. Chen, and P. Deuster, *J Cell Physiol.* **2019**, *234*, 6371–6381.
- [41] P. G. Ekert, J. Silke, and D. L. Vaux, *Cell Death Differ.* **1999**, *6*, 1081–1086.
- [42] C. J. F. V. Noorden, *Acta Histochem Cytochem.* **2001**, *103*, 241–251.
- [43] B. Mayer, and R. Oberbauer, *News Physiol Sci.* **2003**, *18*, 89–94.

## 2-7. Supporting Information



**Figure S2-1.** Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp) in the presence of  $1^{P2}$  (50  $\mu$ M) and  $H_2O_2$  at pH 6.0. (a)–(d) corresponded to  $H_2O_2$  concentration of 0, 50, 100, and 500  $\mu$ M, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min, respectively.

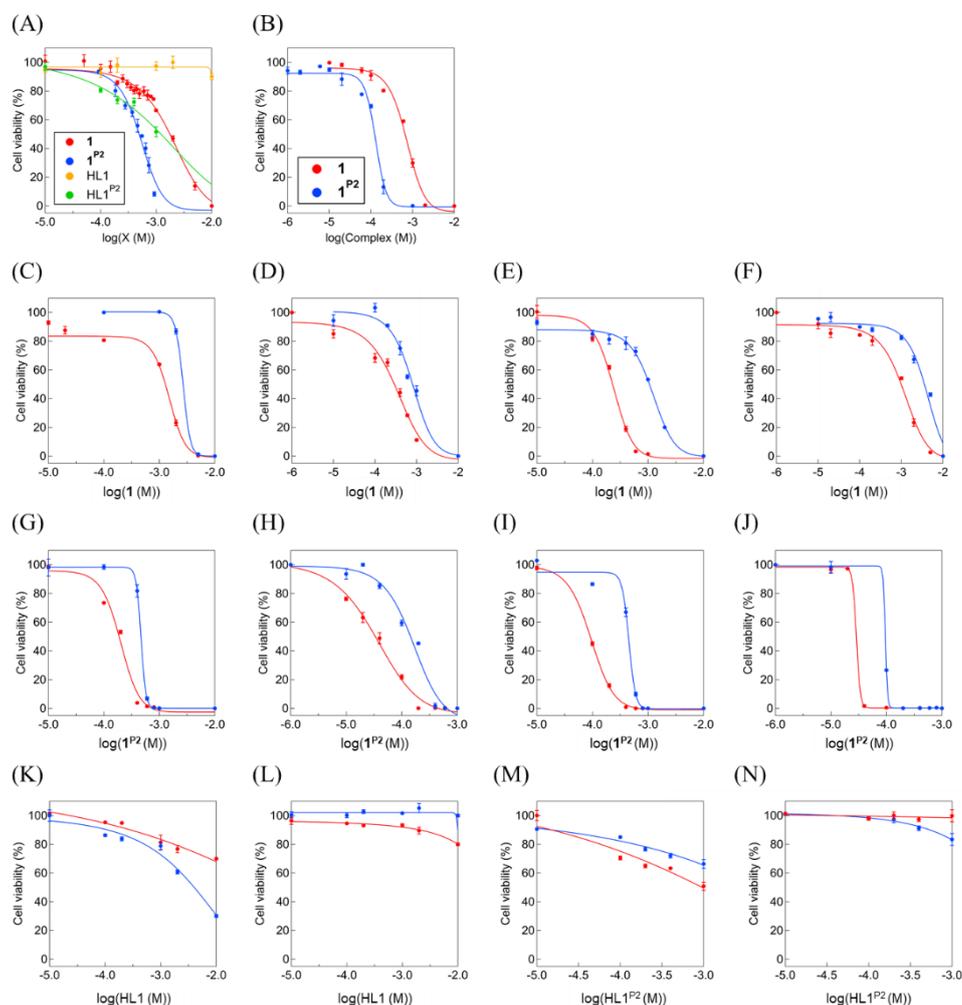


**Figure S2-2.** Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp) in the presence of  $1^{P2}$  and  $H_2O_2$  (500  $\mu$ M) at pH 6.0. (a)–(c) corresponded to complex concentration of 0, 12.5, and 25  $\mu$ M, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min, respectively.

**Table S2-1. Fraction of Form I, Form II, and Form III formed with 1<sup>P2</sup> at pH 6.0**

<b>Complex (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Time (min)</b>	<b>Form I (%)</b>	<b>Form II (%)</b>	<b>Form III (%)</b>
50	0	0	93.3 $\pm$ 1.5	6.7 $\pm$ 1.5	-
		10	91.7 $\pm$ 1.1	8.3 $\pm$ 1.1	-
		20	90.0 $\pm$ 0.1	10.0 $\pm$ 0.1	-
		30	87.0 $\pm$ 0.4	13.0 $\pm$ 0.4	-
		40	85.3 $\pm$ 0.2	14.7 $\pm$ 0.2	-
		60	82.1 $\pm$ 1.3	17.9 $\pm$ 1.3	-
		120	69.6 $\pm$ 1.6	30.4 $\pm$ 1.6	-
		180	59.9 $\pm$ 3.6	40.1 $\pm$ 3.6	-
		300	46.4 $\pm$ 3.0	53.6 $\pm$ 3.0	-
		50	50	0	91.4 $\pm$ 0.0
10	89.3 $\pm$ 0.4			10.7 $\pm$ 0.4	-
20	87.5 $\pm$ 0.4			12.5 $\pm$ 0.4	-
30	86.4 $\pm$ 0.1			13.6 $\pm$ 0.1	-
40	83.5 $\pm$ 0.6			16.5 $\pm$ 0.6	-
60	76.5 $\pm$ 1.3			23.5 $\pm$ 1.3	-
120	52.6 $\pm$ 0.9			47.4 $\pm$ 0.9	-
180	32.2 $\pm$ 2.4			67.8 $\pm$ 2.4	-
300	8.8 $\pm$ 2.6			90.5 $\pm$ 2.6	0.7 $\pm$ 0.0
50	100			0	90.8 $\pm$ 0.3
		10	88.8 $\pm$ 0.1	11.2 $\pm$ 0.1	-
		20	83.2 $\pm$ 0.6	16.8 $\pm$ 0.6	-
		30	80.4 $\pm$ 0.0	19.6 $\pm$ 0.0	-
		40	75.9 $\pm$ 0.0	24.1 $\pm$ 0.0	-
		60	63.6 $\pm$ 0.9	36.4 $\pm$ 0.9	-
		120	30.4 $\pm$ 0.7	69.2 $\pm$ 1.1	0.4 $\pm$ 0.4
		180	11.4 $\pm$ 2.2	87.2 $\pm$ 2.5	1.4 $\pm$ 0.3
		300	0.0 $\pm$ 0.0	93.9 $\pm$ 0.8	6.1 $\pm$ 0.8
		50	500	0	92.2 $\pm$ 0.7
10	61.9 $\pm$ 2.1			38.1 $\pm$ 2.1	-
20	25.6 $\pm$ 3.8			74.4 $\pm$ 3.8	-
30	9.2 $\pm$ 3.1			90.8 $\pm$ 3.1	-
40	4.7 $\pm$ 1.7			94.2 $\pm$ 1.1	1.1 $\pm$ 0.6
60	0.0 $\pm$ 0.0			96.3 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 0.2
120	0.0 $\pm$ 0.0			90.2 $\pm$ 3.8	9.8 $\pm$ 3.8
180	0.0 $\pm$ 0.0			77.1 $\pm$ 4.4	22.9 $\pm$ 4.4
300	0.0 $\pm$ 0.0			50.7 $\pm$ 2.2	49.3 $\pm$ 2.2

0	500	0	$93.9 \pm 0.2$	$6.1 \pm 0.2$	-
		10	$93.3 \pm 0.0$	$6.7 \pm 0.0$	-
		20	$93.2 \pm 0.1$	$6.8 \pm 0.1$	-
		30	$93.1 \pm 0.1$	$6.9 \pm 0.1$	-
		40	$92.9 \pm 0.2$	$7.1 \pm 0.2$	-
		60	$92.7 \pm 0.2$	$7.3 \pm 0.2$	-
		120	$92.3 \pm 0.3$	$7.7 \pm 0.3$	-
		180	$91.3 \pm 1.0$	$8.7 \pm 1.0$	-
		300	$90.1 \pm 1.9$	$9.9 \pm 1.9$	-
12.5	500	0	$91.4 \pm 1.3$	$8.6 \pm 1.3$	-
		10	$89.0 \pm 1.3$	$11.0 \pm 1.3$	-
		20	$86.0 \pm 3.1$	$14.0 \pm 3.1$	-
		30	$84.9 \pm 3.9$	$15.1 \pm 3.9$	-
		40	$83.3 \pm 3.8$	$16.7 \pm 3.8$	-
		60	$82.3 \pm 4.0$	$17.7 \pm 4.0$	-
		120	$77.2 \pm 4.3$	$22.8 \pm 4.3$	-
		180	$71.1 \pm 2.2$	$28.9 \pm 2.2$	-
		300	$58.0 \pm 4.1$	$42.0 \pm 4.1$	-
25	500	0	$92.2 \pm 0.1$	$7.8 \pm 0.1$	-
		10	$89.3 \pm 0.3$	$10.7 \pm 0.3$	-
		20	$82.4 \pm 0.2$	$17.6 \pm 0.2$	-
		30	$79.4 \pm 0.0$	$20.6 \pm 0.0$	-
		40	$76.3 \pm 0.6$	$23.7 \pm 0.6$	-
		60	$71.2 \pm 0.1$	$28.8 \pm 0.1$	-
		120	$64.9 \pm 0.2$	$35.1 \pm 0.2$	-
		180	$58.7 \pm 0.5$	$41.3 \pm 0.5$	-
		300	$44.9 \pm 0.5$	$55.1 \pm 0.5$	-



**Figure S2-3.** (A) Plots of cell viability vs  $\log[X]$  ( $X = 1$  (red),  $1^{P2}$  (blue), HL1 (orange), and  $HL1^{P2}$  (light green)) in the MTT assay of HeLa cells treated for 24 h. (B) Plots of cell viability vs  $\log[X]$  ( $X = 1$  (red) and  $1^{P2}$  (blue)) in the MTT assay of HeLa cells treated for 48 h. (C), (G), (K), (M) Plots of cell viability vs  $\log[X]$  ( $X = 1$ ,  $1^{P2}$ , HL1, and  $HL1^{P2}$ ) in the MTT assay of A549 (red) and WI-38 (blue) cells treated for 24 h. (D), (H) Plots of cell viability vs  $\log[X]$  ( $X = 1$  and  $1^{P2}$ ) in the MTT assay of A549 (red) and WI-38 (blue) cells treated for 48 h. (E), (I), (L), (N) Plots of cell viability vs  $\log[X]$  ( $X = 1$ ,  $1^{P2}$ , HL1, and  $HL1^{P2}$ ) in the MTT assay of PK-59 (red) and 2C6 (blue) cells treated 24 h. (F), (J) Plots of cell viability vs  $\log[X]$  ( $X = 1$  and  $1^{P2}$ ) in the MTT assay of PK-59 (red) and 2C6 (blue) cells treated for 48 h. All experiments were carried out at least three times.

### 第三章：Roles of DNA Target in Cancer Cell-Selective Cytotoxicity by Dicopper Complexes with DNA Target/Ligand Conjugates

#### 3-1. 要旨

第二章では、DNA 標的の導入で過酸化水素( $\text{H}_2\text{O}_2$ )存在下の DNA 切断が加速し、がん細胞選択的毒性が向上することを見出した。本章では、DNA 標的の効果を明確化するため、2,6-di(amide-tether cyclen)-*p*-cresol 配位子(HL1)のメチル基を 9-phenanthrenyl (P)または methyl (M)末端を有する様々な長さの-CONH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCO-リンカーに置換した DNA 標的/二核化配位子結合体(HL1<sup>X</sup>, X = Pn and Mn (n = 1–3))とその二核銅(II)錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-OH)(L1<sup>X</sup>)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (**1<sup>X</sup>**)を合成し、**1<sup>X</sup>**の DNA 結合能力、DNA 切断活性、細胞内取込量、細胞毒性を[Cu<sub>2</sub>(μ-OH)(L1)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (**1**)と比較した。**1<sup>X</sup>**と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の反応で DNA 切断の活性種である μ-1,1-hydroperoxodicopper(II)錯体が生成した。**1<sup>P1</sup>**, **1<sup>P2</sup>**, **1<sup>P3</sup>**は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>存在下のスーパーコイルプラスミド DNA (DNA Form I)の酸化切断による Form III の生成速度が、**1**よりもそれぞれ 22, 11, 3 倍高かった。P-リンカーが短い程、二核銅部位が届く塩基対の範囲が狭くなるため、Form III の生成に必要な 10 塩基対間での DNA 二本鎖切断(DNA double-strand breaks, dsb)に対して有利になると考えられる。**1<sup>P1</sup>**, **1<sup>P2</sup>**, **1<sup>P3</sup>**は、HeLa 細胞に対する細胞毒性が **1**より 30, 12, 9.9 倍高かった。DNA dsb と細胞毒性の関係は、**1<sup>P1-3</sup>**では 44%の割合で相関したが、**1<sup>M1-3</sup>**では 5%しか相関しなかった。これは細胞内で P-リンカーが特異的に DNA に結合するのに対し、M-リンカーは DNA に特異的には結合しないためと考えられる。**1<sup>P1-3</sup>**は肺がん、膵臓がんに対してがん細胞選択的毒性を示し、P-リンカーが短いほどがん細胞選択性が高かった。一方、**1<sup>M1-3</sup>**のがん細胞選択性は **1**と同程度であった。細胞内可視化、Apoptosis assay, カスパーゼ活性アッセイにより、**1<sup>P1-3</sup>**がミトコンドリア経路のアポトーシスを誘導することが明らかとなった。**1<sup>P1</sup>**が最も高いがん細胞選択性を示した理由は、がん細胞のミトコンドリア機能障害によって増加した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と **1<sup>P1</sup>**が反応し、短い P-リンカーによりミトコンドリア DNA の切断が加速されたためと考えられる。

---

Machi Hata, Jin Ueno, Yutaka Hitomi, and Masahito Kodera “Roles of DNA Target in Cancer Cell-Selective Cytotoxicity by Dicopper Complexes with DNA Target/Ligand Conjugates” *ACS Omega*, **2023**, *8*, 28690–28701.

### 3-2. 緒言

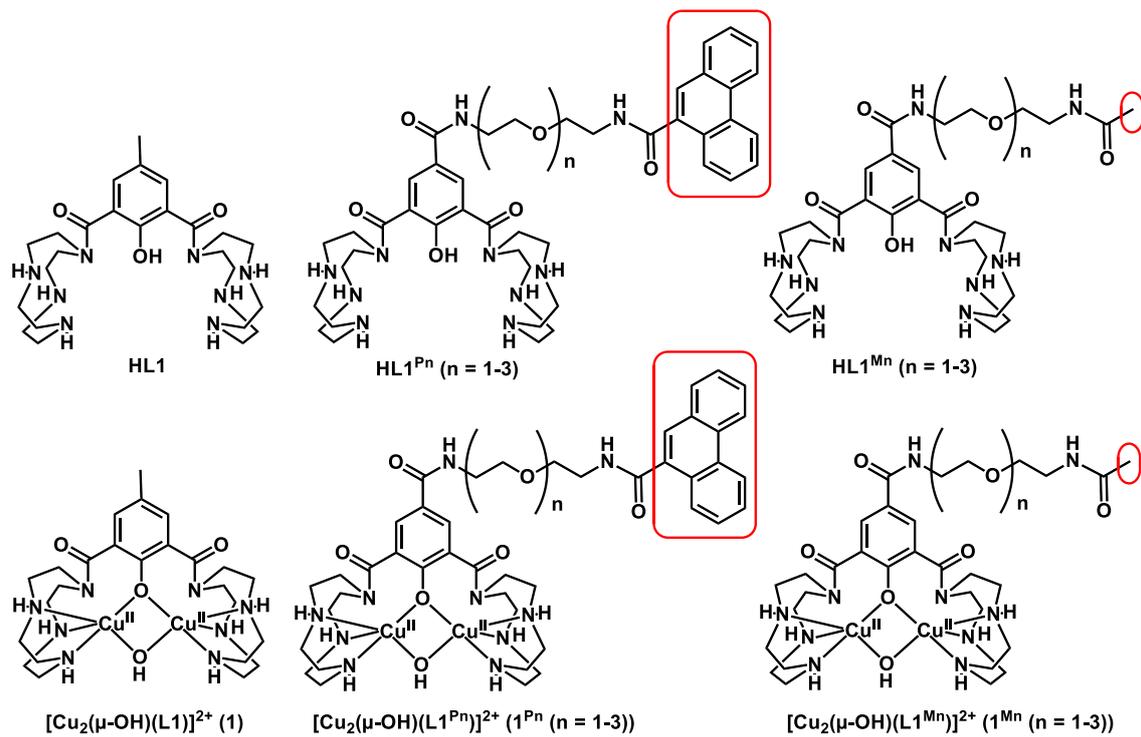
がんは悪性度の高い疾患であり、がんによる死亡率は増加し続けている。これまでに様々な抗がん剤が開発され、その中でも金属錯体である Cisplatin および関連する白金錯体<sup>[1, 2]</sup>, Bleomycin (BLM)<sup>[3, 4]</sup>などが臨床利用されている。BLM は投与後、生体内の鉄を取り込み、鉄錯体(Fe-BLM)を生成する。これらはいずれも細胞障害性の抗がん剤であり、白金錯体は DNA と結合して複製を阻害して、Fe-BLM は DNA 二本鎖切断(DNA dsb)を加速してそれぞれ細胞死を誘導する。これらは様々ながん疾患に対して高い有効性を示す一方で、がん細胞と正常細胞の両者に対して同様に作用するため、強い副作用を示す<sup>[2, 5, 6]</sup>。そこで、副作用の抑制には、がん細胞選択的毒性を示す金属錯体の開発が重要と考えられる。

DNA や細胞小器官を標的とする金属錯体は、がん細胞選択的毒性を示す抗がん剤開発の観点から有望であり、化学者や医学者達の関心を集めている<sup>[7-10]</sup>。がん細胞は正常細胞とは異なる特異的な微小環境を有する。例えば、がん細胞ではミトコンドリアの機能障害と高い代謝活性のために正常細胞よりも H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度が高い<sup>[11, 12]</sup>。そこで、がん治療のためにミトコンドリアを標的とする様々な金属錯体が開発され、ミトコンドリア経由のアポトーシスを誘導すると報告されている<sup>[9, 13]</sup>。例えば、Cu<sup>[7e]</sup>, Ru<sup>[7f]</sup>, Ir<sup>[7g, h]</sup>, Au<sup>[7i]</sup>を用いたミトコンドリア標的金属錯体が挙げられる。tetraphenyl phosphonium 基をミトコンドリア標的として導入した配位子を用いた Cu 錯体は DNA を切断してミトコンドリア経由のアポトーシスを誘導した<sup>[7e]</sup>。ミトコンドリア標的を持つ Ru と Ir 錯体は光線力学療法的光増感剤として有効であった<sup>[7f, g]</sup>。燐光性シクロメタル化 Ir 錯体は、活性酸素種(ROS)の濃度を上昇させ、細胞内 ATP の枯渇、ミトコンドリア損傷によるカスパーゼ依存性アポトーシスおよびミトコンドリア呼吸阻害を引き起こした<sup>[7h]</sup>。また、生体環境で安定性の高い Au ポルフィリン錯体は、ミトコンドリアのシャペロンを標的してその活性を阻害した<sup>[7i]</sup>。これらの金属錯体以外にも、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 活性化部位を持ち DNA およびミトコンドリアを標的とする金属錯体は、ミトコンドリア DNA を切断することでミトコンドリア経由のアポトーシスを誘導すると考えられ、がん細胞選択的な細胞毒性を高めることが期待できる<sup>[14]</sup>。

また Cu 錯体は、正常細胞に対する細胞毒性が低い抗がん剤の開発のために注目されてきた<sup>[15, 16]</sup>。Cu は内在性金属でありながら、抗がん作用を示すことから、銅錯体によるがん細胞選択的毒性の発現が期待される。さらに、抗がん活性を高めるため、DNA 標的的部位を持つ Cu 錯体も開発されている<sup>[16]</sup>。しかし、DNA 標的を持つ二核銅錯体の研究例は少なく、がん細胞選択的毒性における DNA 標的の役割も報告されていない。

第一章で述べたように、角谷らは 2,6-di(amide-tether cyclen)-*p*-cresol 配位子(HL1)の二核銅(II)錯体[ $\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{L1})](\text{ClO}_4)_2$  (**1**)が  $\text{H}_2\text{O}_2$  と反応し、 $\mu$ -1,1-hydroperoxodicopper(II)錯体を生成し、DNA の酸化的切断を促進することを見出した<sup>[17]</sup>。しかし、**1** の細胞毒性は抗がん剤として使用するには低すぎた。そこで、第二章では、末端に 9-phenanthrenyl 基を持つ-CONH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCO-リンカー(P-リンカー)を HL1 の 4-メチル基と置換した phenanthrene/HL1 結合体である HL1<sup>P2</sup> を合成した<sup>[18]</sup>。phenanthrene はインターカレーターとして DNA に結合し、DNA 切断活性を向上させると考えた。実際に P-リンカーは HL1<sup>P2</sup> の二核銅(II)錯体[ $\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{L1}^{\text{P2}})](\text{ClO}_4)_2$  (**1**<sup>P2</sup>)の DNA 切断活性と細胞毒性を劇的に向上させた。さらに、**1**<sup>P2</sup> は比較的高いがん細胞選択的毒性を示した。また、phenanthrenyl 基を蛍光標識とする **1**<sup>P2</sup> の細胞内局在の観察とカスパーゼ活性の測定から、**1**<sup>P2</sup> によるがん細胞選択的毒性にミトコンドリアアポトーシスが関与していることが明らかとなった<sup>[18]</sup>。しかし、現段階では、がん細胞選択的毒性を最適化するための DNA 標的/二核化配位子結合体の系統的な研究は行われていない。

本研究では、がん細胞選択的毒性における DNA 標的の役割を明らかにして最適化するために、一連の DNA 標的/二核化配位子結合体 HL1<sup>X</sup> (X = Pn, Mn (n = 1–3))を合成した。HL1<sup>X</sup> は、HL1 の 4-メチル基を P-リンカー(-CONH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCO-9-phenanthrenyl (P))または M-リンカー(-CONH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCO-methyl (M))で置換した構造を持つ。HL1<sup>X</sup> は二核銅(II)錯体[ $\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{L1}^{\text{X}})](\text{ClO}_4)_2$  (**1**<sup>X</sup>) (X = Pn, Mn (n = 1–3))を形成した。本研究で用いた配位子と二核銅(II)錯体を Figure 3-1 に示す。**1**<sup>X</sup> の DNA 結合能、 $\text{H}_2\text{O}_2$  存在下における supercoiled plasmid pUC19 DNA の DNA Form III 生成(DNA dsb)活性、細胞内取込量、様々な正常細胞とがん細胞に対する細胞毒性などを調べ、**1** と比較して DNA 標的としての P-および M-リンカーの役割を明らかにした。また **1**<sup>P1-3</sup> のミトコンドリアへの局在を共焦点顕微鏡で観察し、**1**<sup>P1-3</sup> によるアポトーシス経路の細胞死は、fluorescence-activated cell sorting (FACS)により明らかにした。また、カスパーゼ活性を測定し、**1**<sup>X</sup> によるアポトーシスが内因性経路であることを明らかにした。これらの結果から、**1**<sup>X</sup> のがん細胞選択的毒性における DNA 標的の役割が明らかになった。

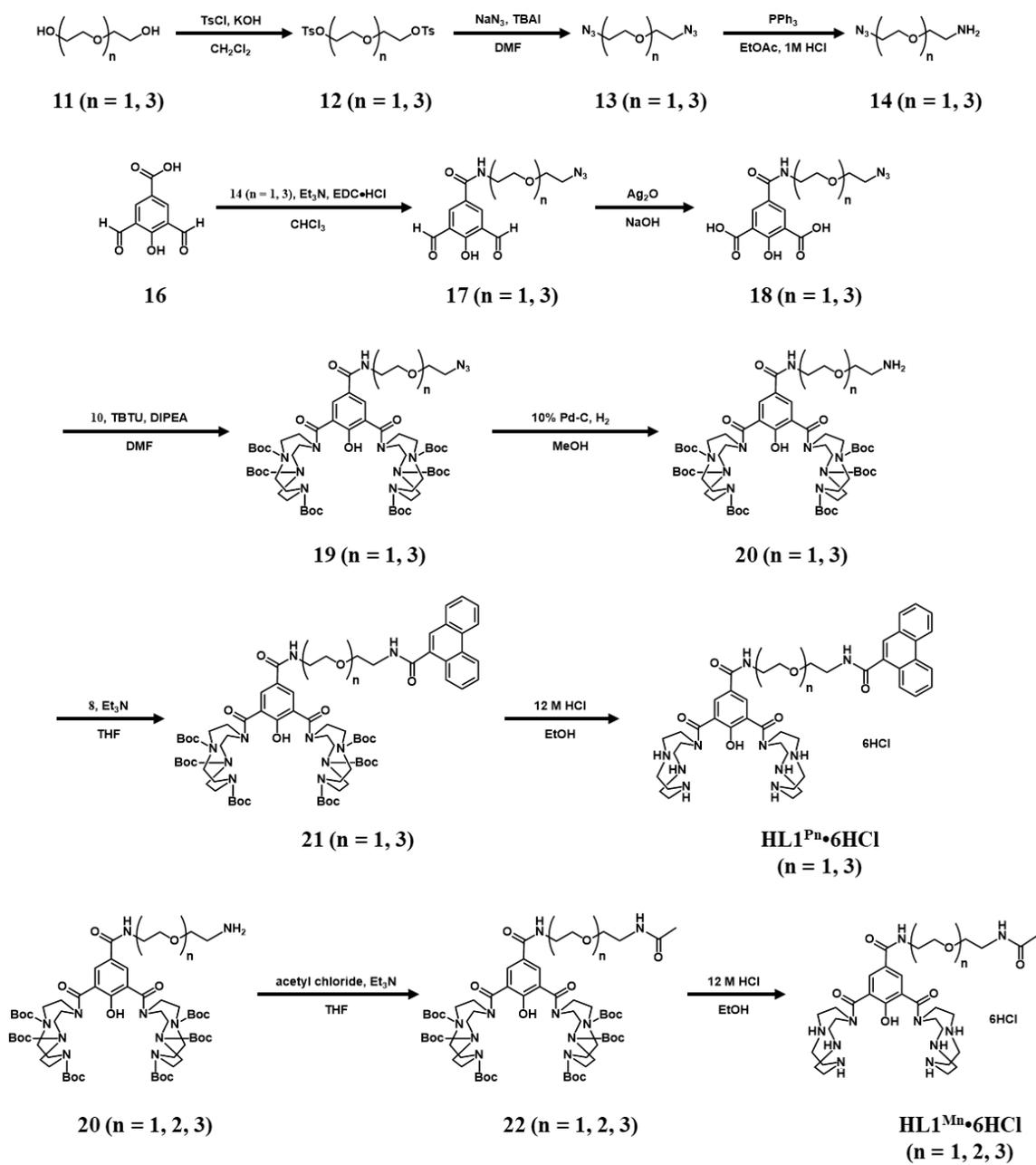


**Figure 3-1.** Chemical Structures of HL1, HL1<sup>X</sup>, **1**, and **1<sup>X</sup>** (X = Pn, Mn (n = 1–3)).

### 3-3. 結果と考察

#### 3-3-1. 配位子と二核銅(II)錯体の合成

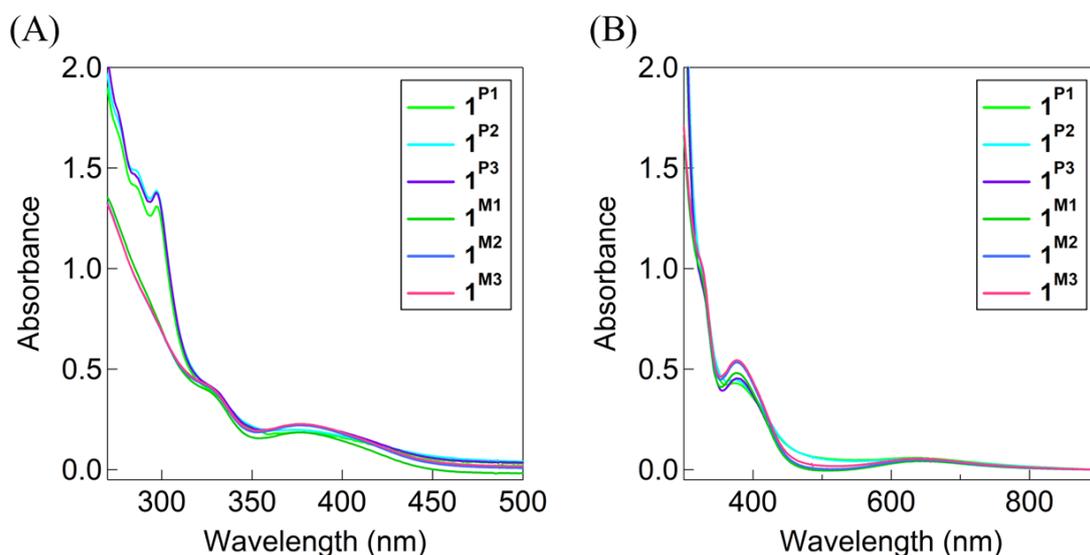
HL1 と DNA 標的/二核化配位子結合体である HL1<sup>X</sup> (X = Pn, Mn (n = 1–3))の化学構造を Figure 3-1 に示す. HL1 と HL1<sup>P2</sup> および二核銅(II)錯体 **1** と **1<sup>P2</sup>** は, 以前の論文<sup>[17–20]</sup>および第二章の合成項 **3-5-3** に従って合成した. HL1<sup>X</sup> (X = Pn, Mn (n = 1–3))の合成経路を Scheme 3-1 に示す. はじめに, 3 つの異なる長さの PEG-リンカー(n=1–3)を 3,5-diformyl-4-hydroxybenzoic acid にアミド結合を介して導入した. 次に, このホルミル基を酸化してカルボキシ基に変換した後, tri-Boc-cyclen を脱水縮合で導入した後, PEG-リンカーの末端に phenanthrenyl (P)または methyl (M)基を段階的に導入した. 最後に Boc 基を酸性ソルボリシスで除去した. 得られた HL1<sup>X</sup>を, 1M NaOH 水溶液で pH 8.0 に調整した後, Cu(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> と反応させて二核銅(II)錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-OH)(L1<sup>X</sup>)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (X = P1 (**1<sup>P1</sup>**), P2 (**1<sup>P2</sup>**), P3 (**1<sup>P3</sup>**), M1 (**1<sup>M1</sup>**), M2 (**1<sup>M2</sup>**), M3 (**1<sup>M3</sup>**))を得た. 単離された錯体は, MeOH/Et<sub>2</sub>O から再結晶された. HL1<sup>X</sup>および **1<sup>X</sup>**の詳細な合成, 元素分析, IR, ESIMS のデータは, 既報の HL1<sup>P2</sup> および **1<sup>P2</sup>**を除き, **3-5-3** の実験項に示す.



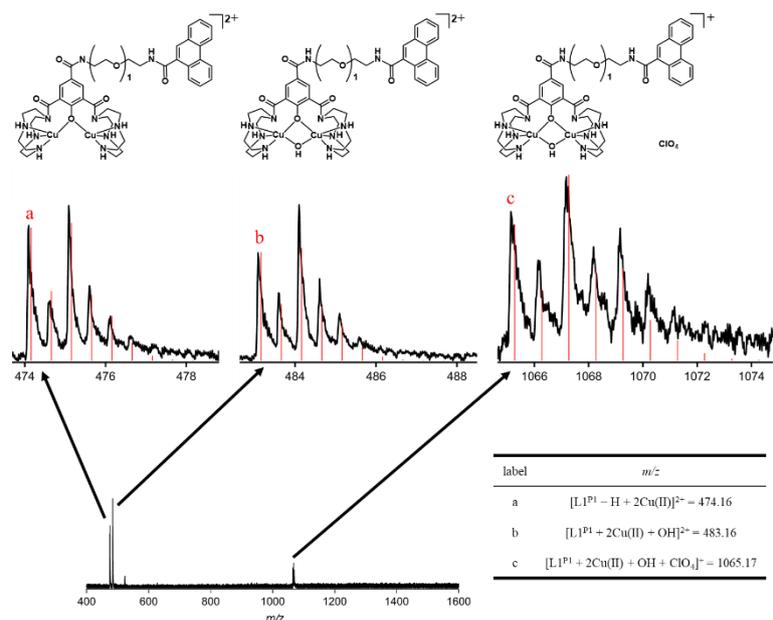
**Scheme 3-1.** Synthetic Route of HL1<sup>X</sup> (X = Pn, Mn (n = 1–3)).

### 3-3-2. 二核銅(II)錯体の構造

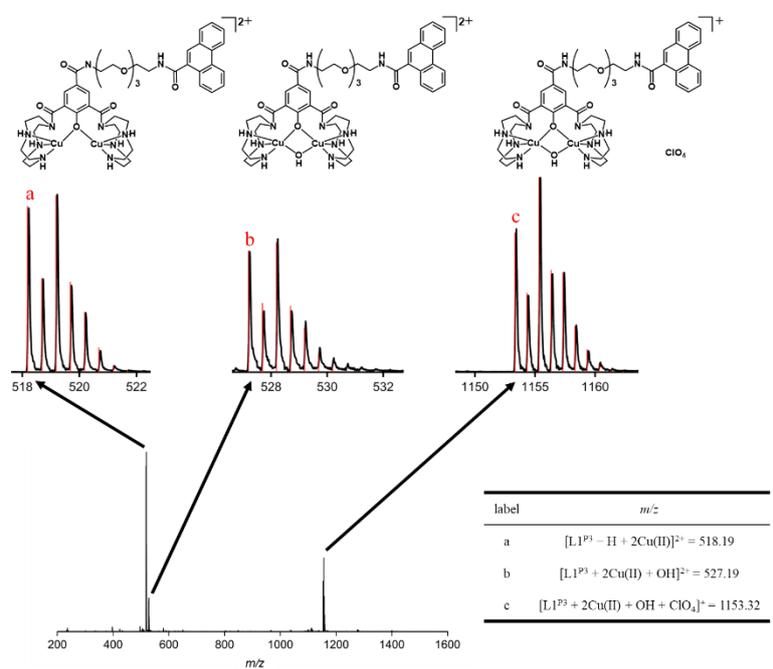
二核銅(II)錯体 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{L1}^{\text{X}})](\text{ClO}_4)_2$  ( $\mathbf{1}^{\text{X}}$ )の電子吸収スペクトルを Figure 3-2 に、ESI MS スペクトルを Figure 3-3-3-7 に示す。  $\mathbf{1}^{\text{X}}$ の電子吸収スペクトルでは、380 nm と 640 nm に  $\text{PhO}^-$  から  $\text{Cu}(\text{II})$  への LMCT と d-d 遷移に帰属される吸収帯がそれぞれ観測され、既報の  $\mathbf{1}$  および  $\mathbf{1}^{\text{P2}}$  で観測された吸収帯と類似していた<sup>[17, 18]</sup>。特に、  $\text{PhO}^-$  から  $\text{Cu}(\text{II})$  への LMCT は、  $\mu\text{-OH-}\mu\text{-OPh}$  架橋構造を持つ二核銅(II)錯体に見られる 340–400 nm の吸収帯と一致した<sup>[17, 18, 21, 22]</sup>。  $\mathbf{1}^{\text{P1}}$ ,  $\mathbf{1}^{\text{P3}}$ ,  $\mathbf{1}^{\text{M1}}$ ,  $\mathbf{1}^{\text{M2}}$ ,  $\mathbf{1}^{\text{M3}}$  の ESI MS スペクトルでは、それぞれ  $m/z$  1065.17, 1153.32, 903.28, 947.32, 991.38 に  $[\text{L1}^{\text{X}} + 2\text{Cu}(\text{II}) + \text{OH} + \text{ClO}_4]^+$  に対応する分子イオンピークが観測された。これらのスペクトルデータは、  $\mathbf{1}^{\text{X}}$  に共通の  $\mu\text{-OH-}\mu\text{-OPh}$  架橋構造を持つ二核銅(II)中心構造が MeCN と水溶液中で保持されていることを示した。



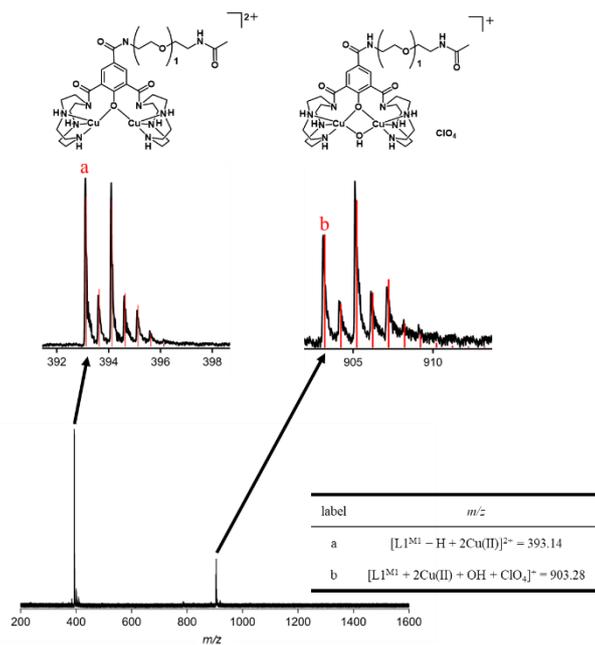
**Figure 3-2.** Electronic absorption spectra of  $\mathbf{1}^{\text{P1}}$  (light green),  $\mathbf{1}^{\text{P2}}$  (light blue),  $\mathbf{1}^{\text{P3}}$  (purple),  $\mathbf{1}^{\text{M1}}$  (green),  $\mathbf{1}^{\text{M2}}$  (blue), and  $\mathbf{1}^{\text{M3}}$  (pink) (0.1 mM (A), 0.25 mM (B)) in  $\text{H}_2\text{O}$  at room temperature.



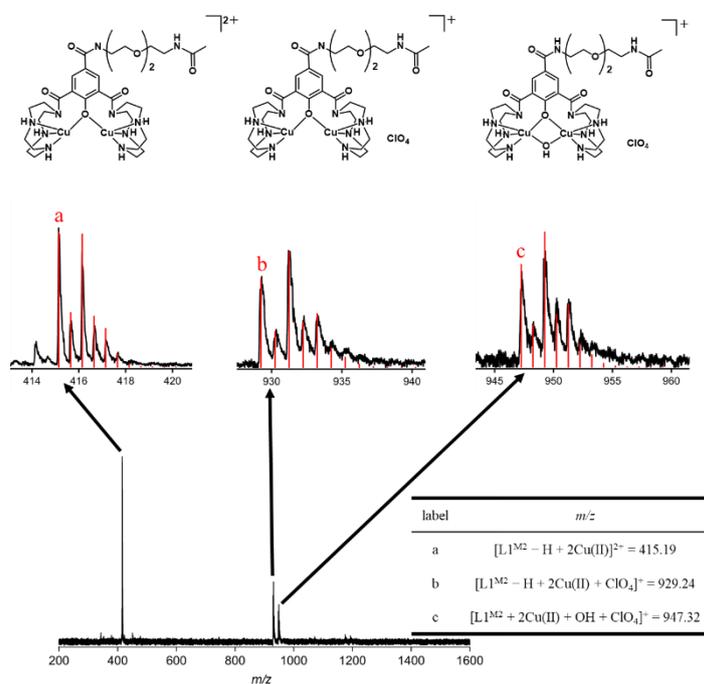
**Figure 3-3.** ESI MS spectrum of complex **1<sup>P1</sup>** measured in H<sub>2</sub>O at room temperature at orifice 1: 10 V, orifice 2: 10 V, ring lens voltage: 10 V.



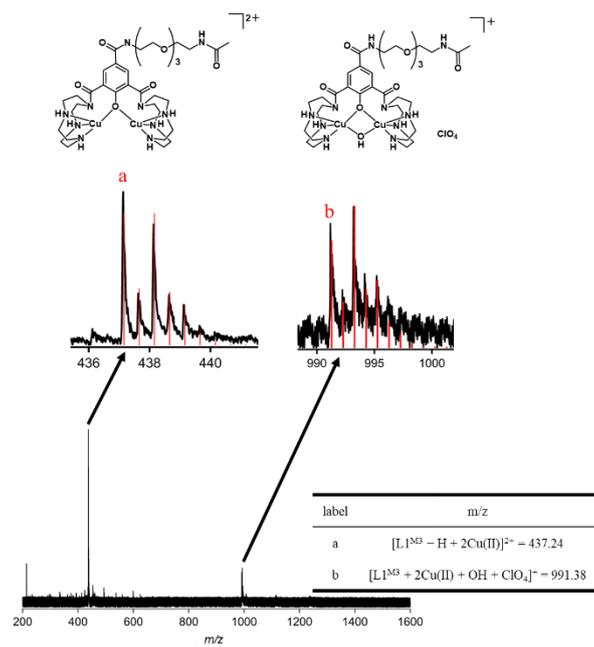
**Figure 3-4.** ESI MS spectrum of complex **1<sup>P3</sup>** measured in H<sub>2</sub>O at room temperature at orifice 1: 10 V, orifice 2: 10 V, ring lens voltage: 10 V.



**Figure 3-5.** ESI MS spectrum of complex  $1^{M1}$  measured in  $H_2O$  at room temperature at orifice 1: 10 V, orifice 2: 10 V, ring lens voltage: 10 V.



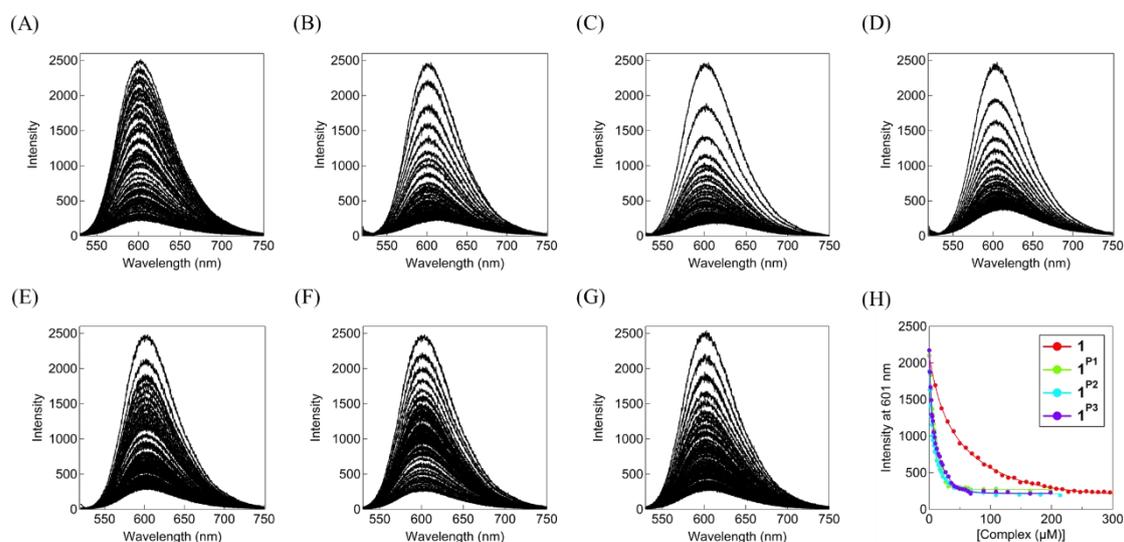
**Figure 3-6.** ESI MS spectrum of complex  $1^{M2}$  measured in  $H_2O$  at room temperature at orifice 1: 10 V, orifice 2: 10 V, ring lens voltage: 10 V.



**Figure 3-7.** ESI MS spectrum of complex  $1^{M3}$  measured in  $H_2O$  at room temperature at orifice 1: 10 V, orifice 2: 10 V, ring lens voltage: 10 V.

### 3-3-3. **1** および **1<sup>X</sup>** の DNA への結合能力

仔ウシ胸腺 DNA (ct-DNA) への **1<sup>X</sup>** の見かけ上の結合定数  $K_{app}$  ( $M^{-1}$ ) を、臭化エチジウム (EtBr) 法により決定した<sup>[23]</sup>. ct-DNA と EtBr の混合溶液に **1** または **1<sup>X</sup>** の溶液を添加すると ct-DNA に結合した EtBr が放出されて蛍光強度が減衰した. この様子を Figure 3-8 (A)–(G) に示す. また, **1** および **1<sup>n</sup>** の濃度に対する 601 nm での蛍光強度のプロットを Figure 3-8 (H) に, **1** および **1<sup>X</sup>** の結合定数  $K_{app}$  を Table 3-1 示す. **1<sup>P1-3</sup>** および **1<sup>M1-3</sup>** の DNA 結合定数は, それぞれ **1** の DNA 結合定数の 6.5–9.1 倍および 3.5–4.6 倍であり, P-リンカーは M-リンカーよりも DNA 標的として 2 倍有効であった. **1<sup>X</sup>** の DNA 結合能力は, PEG-リンカーによってわずかに増強され, インターカレーターとして機能する phenanthrenyl 基によってさらに強化された. PEG-リンカー (n=2) を有する **1<sup>P2</sup>** および **1<sup>M2</sup>** では, PEG-リンカーの transoid の立体配座によって二核銅部位および phenanthrenyl 基または methyl 基がアンチ配向となるため, DNA 結合能力がわずかに向上したと考えられる.



**Figure 3-8.** Fluorescence spectral changes upon the addition of **1** (A), **1<sup>P1</sup>** (B), **1<sup>P2</sup>** (C), **1<sup>P3</sup>** (D), **1<sup>M1</sup>** (E), **1<sup>M2</sup>** (F), and **1<sup>M3</sup>** (G) to the ethidium bromide-bound ct-DNA. For each measurement, **1** and **1<sup>P2</sup>** increased by 2  $\mu M$ . (H) Plot of the fluorescence emission intensity at 601 nm vs. concentrations of **1** (red), **1<sup>P1</sup>** (light green), **1<sup>P2</sup>** (light blue), and **1<sup>P3</sup>** (purple). Experimental conditions: [EtBr] = 3.3  $\mu M$ , [ct-DNA] = 20  $\mu M$  bp, [complex] = 0–300  $\mu M$  (**1**) or 0–200  $\mu M$  (**1<sup>X</sup>**), [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [NaCl] = 10 mM, and  $\lambda_{ex}$  = 510 nm at 37°C.

**Table 3-1.  $K_{app}$  of 1 and 1<sup>X</sup> (Mean  $\pm$  SD)**

<b>Complex</b>	<b><math>K_{app}</math> (<math>M^{-1}</math>)</b>
<b>1</b>	$(0.43 \pm 0.02) \times 10^6$
<b>1<sup>P1</sup></b>	$(2.8 \pm 0.4) \times 10^6$
<b>1<sup>P2</sup></b>	$(3.9 \pm 0.2) \times 10^6$
<b>1<sup>P3</sup></b>	$(3.0 \pm 0.1) \times 10^6$
<b>1<sup>M1</sup></b>	$(1.5 \pm 0.3) \times 10^6$
<b>1<sup>M2</sup></b>	$(2.0 \pm 0.1) \times 10^6$
<b>1<sup>M3</sup></b>	$(1.8 \pm 0.4) \times 10^6$

---

### 3-3-4. $\mu$ -1,1-hydroperoxodicopper(II)錯体の分光学的測定

第一章および第二章で述べたように、DNA 切断を促進するために  $\text{H}_2\text{O}_2$  と反応させると、**1** と **1<sup>P2</sup>** は  $\mu$ -1,1-hydroperoxodicopper(II) 錯体  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-O}_2\text{H})(\text{L1})]^{2+}$  (**2**) と  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-O}_2\text{H})(\text{L1}^{\text{P2}})]^{2+}$  (**2<sup>P2</sup>**) を生成することが、共鳴ラマン、CSIMS、電子吸収スペクトルによって確認されている<sup>[17,18]</sup>。本章では、 $\mu$ -1,1-hydroperoxodicopper(II)錯体  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-O}_2\text{H})(\text{L1}^{\text{X}})]^{2+}$  (**2<sup>X</sup>**, X = P1 and P3) (Figure 3-9) を電子吸収スペクトルおよび CSIMS スペクトルにより同定した。その結果を Figure 3-10–3-15 に示す。23°C の MeCN 中における **2<sup>P1</sup>** と **2<sup>P3</sup>** の電子吸収スペクトル (Figure 3-10, 3-11) は、それぞれ 340 nm ( $\epsilon = 5800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) と 400 nm ( $\epsilon = 3100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )、および 340 nm ( $\epsilon = 5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) と 400 nm ( $\epsilon = 3200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) に 2 つの吸収帯を示した。これらは、**2** の 340 nm ( $\epsilon = 5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) と 398 nm ( $\epsilon = 4800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) の吸収帯とほぼ同じである。**2<sup>P1</sup>** と **2<sup>P3</sup>** の 0°C の  $\text{H}_2\text{O}$  中での CSIMS スペクトル (Figure 3-12, 3-14) は、 $[\text{L1}^{\text{P1}} + 2\text{Cu(II)} + \text{O}_2\text{H}]^{2+}$  と  $[\text{L1}^{\text{P1}} + 2\text{Cu(II)} + \text{O}_2\text{H} + \text{ClO}_4]^{+}$  に対応する  $m/z$  491 と 1081 に、 $[\text{L1}^{\text{P3}} + 2\text{Cu(II)} + \text{O}_2\text{H}]^{2+}$  と  $[\text{L1}^{\text{P3}} + 2\text{Cu(II)} + \text{O}_2\text{H} + \text{ClO}_4]^{+}$  に対応する  $m/z$  535 と 1169 に、それぞれ 2 つの主要なピークを示した。 $\text{H}_2^{16}\text{O}_2$  の代わりに  $^{18}\text{O}$  標識  $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$  を用いた場合、これらのピークは 4 質量単位分だけシフトし (Figure 3-13, 3-15), **2<sup>P1</sup>** と **2<sup>P3</sup>** の 2 つの O 原子が  $\text{H}_2\text{O}_2$  に由来することが示された。これらのことから、DNA 切断のための  $\text{H}_2\text{O}_2$  との反応で、**1** および **1<sup>X</sup>** から共通の  $\mu$ -1,1-hydroperoxodicopper(II)錯体が形成されることが示された。

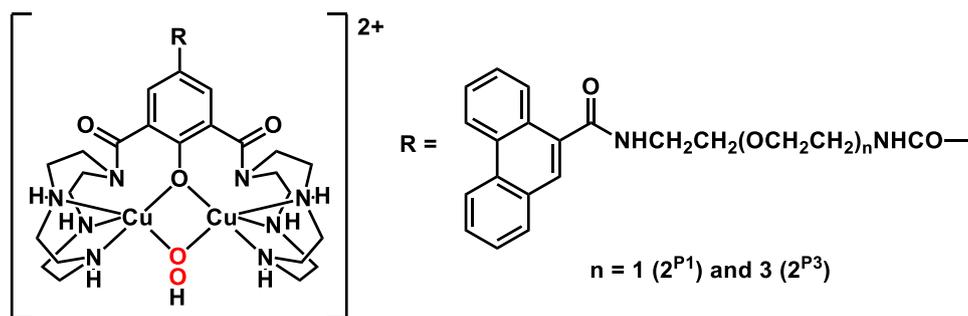
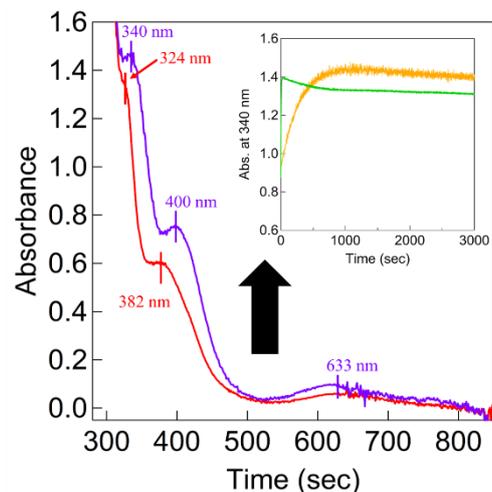
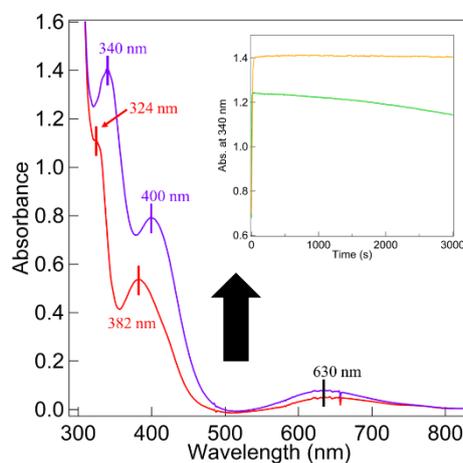


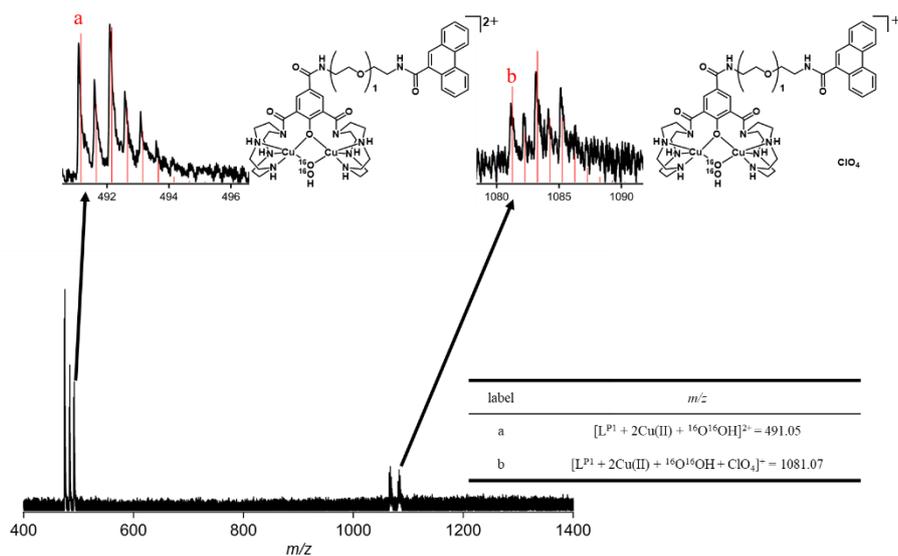
Figure 3-9. Chemical Structures of **2<sup>X</sup>** (X = P1 and P3).



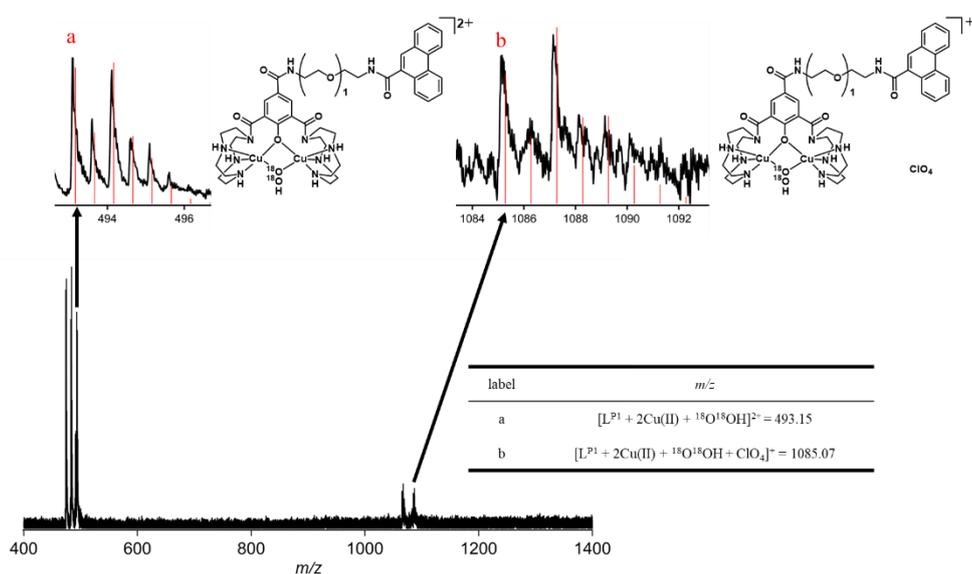
**Figure 3-10.** Electronic absorption spectra of  $1^{P1}$  (0.25 mM) (red) and hydroperoxo species  $2^{P1}$  (purple) generated upon reaction with  $H_2O_2$  (20 eq) in MeCN at  $-30^\circ C$ . (inset: time courses for the formation and decay of  $1^{P1}$  monitored at 340 nm at room temperature (green) and at  $-30^\circ C$  (orange)).



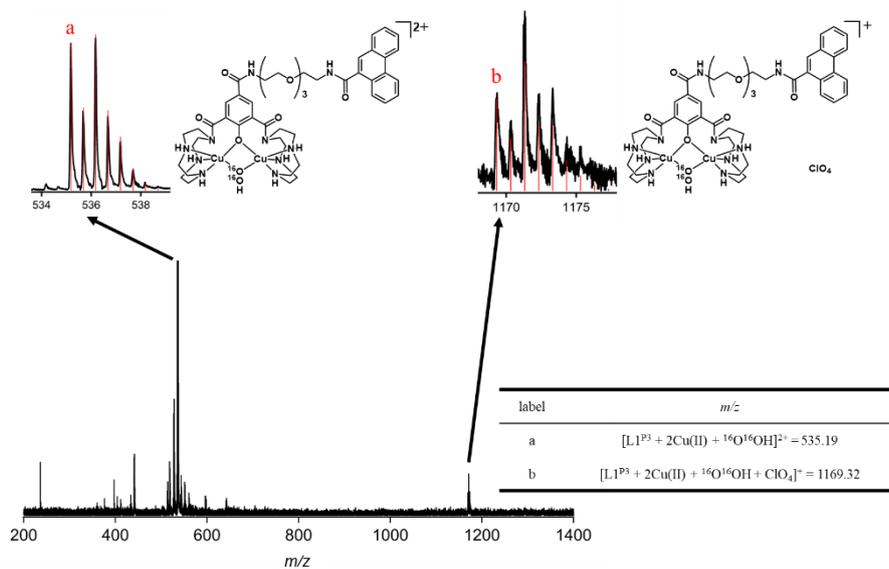
**Figure 3-11.** Electronic absorption spectra of  $1^{P3}$  (0.25 mM) (red) and hydroperoxo species  $2^{P3}$  (purple) generated upon reaction with  $H_2O_2$  (20 eq) in MeCN at  $-30^\circ C$ . (inset: time courses for the formation and decay of  $1^{P3}$  monitored at 340 nm at room temperature (green) and at  $-30^\circ C$  (orange)).



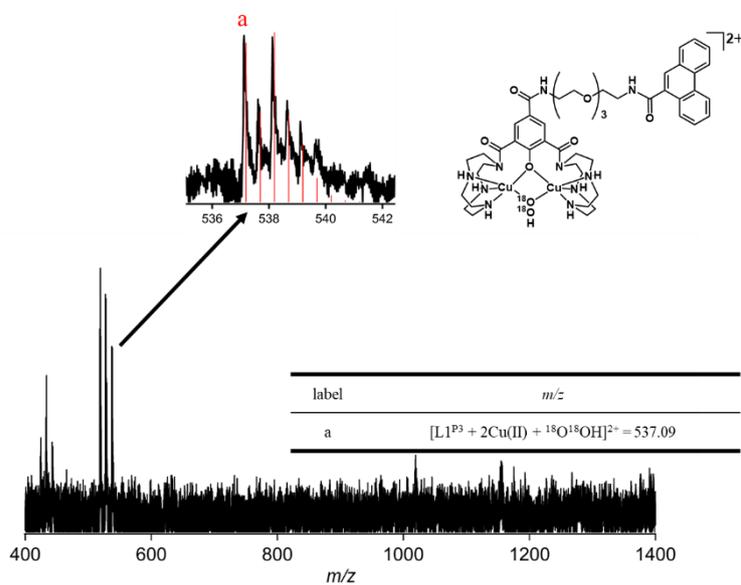
**Figure 3-12.** CSI MS spectrum of  $2^{P1}$  formed upon reaction of  $1^{P1}$  with  $H_2^{16}O_2$  in  $H_2O$  at  $0^\circ C$ . The orifice 1: 20 V, orifice 2: 5 V, ring lens voltage: 10 V. Experimental conditions:  $[1^{P1}] = 0.50$  mM,  $[H_2^{16}O_2] = 100$  mM.



**Figure 3-13.** CSI MS spectrum of  $2^{P1}$  formed upon reaction of  $1^{P1}$  with  $H_2^{18}O_2$  in  $H_2O$  at  $0^\circ C$ . The orifice 1: 20 V, orifice 2: 5 V, ring lens voltage: 10 V. Experimental conditions:  $[1^{P1}] = 0.50$  mM,  $[H_2^{18}O_2] = 100$  mM.



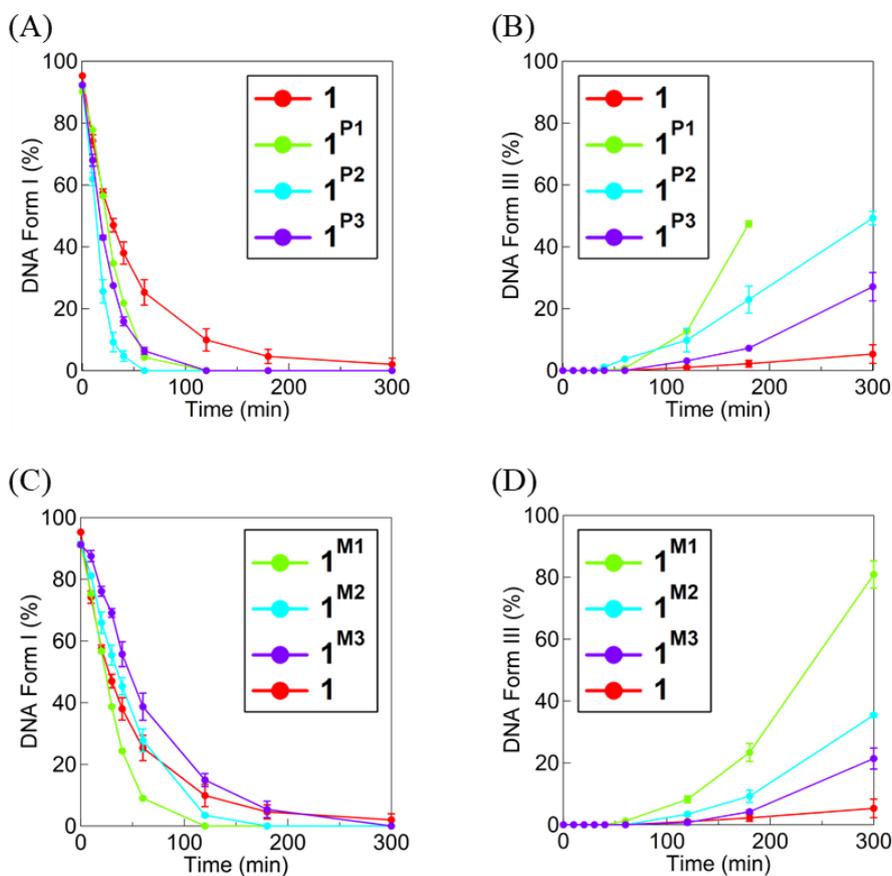
**Figure 3-14.** CSI MS spectrum of  $2^{P3}$  formed upon reaction of  $1^{P3}$  with  $H_2^{16}O_2$  in  $H_2O$  at  $0^\circ C$ . The orifice 1: 20 V, orifice 2: 5 V, ring lens voltage: 10 V. Experimental conditions:  $[1^{P3}] = 0.50$  mM,  $[H_2^{16}O_2] = 100$  mM.



**Figure 3-15.** CSI MS spectrum of  $2^{P3}$  formed upon reaction of  $1^{P3}$  with  $H_2^{18}O_2$  in  $H_2O$  at  $0^\circ C$ . The orifice 1: 20 V, orifice 2: 5 V, ring lens voltage: 10 V. Experimental conditions:  $[1^{P3}] = 0.50$  mM,  $[H_2^{18}O_2] = 100$  mM.

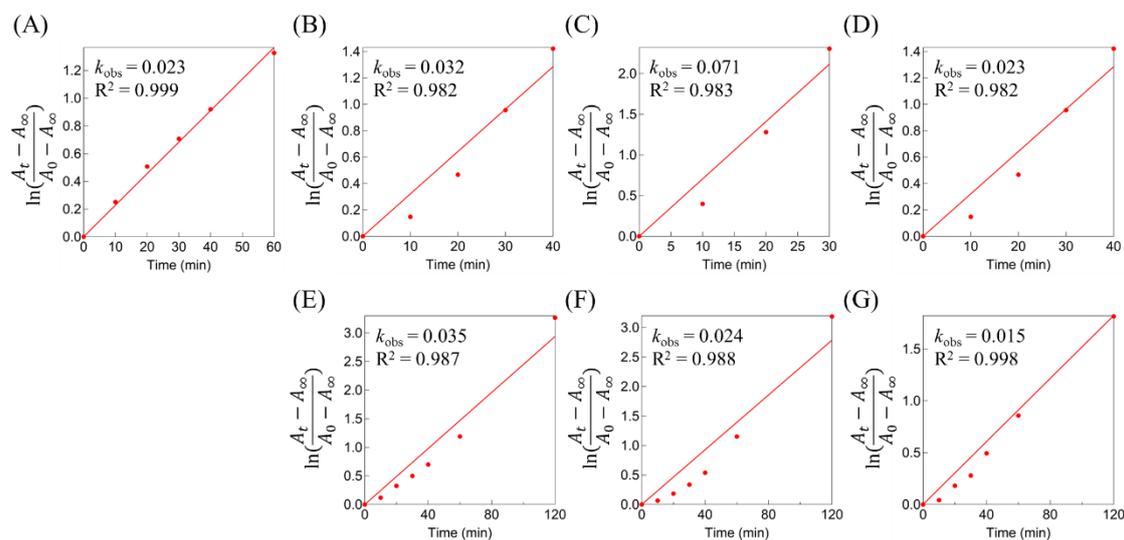
### 3-3-5. $1^X$ による酸化的 DNA 切断活性

Supercoiled plasmid pUC19 DNA (Form I)を基質として、 $H_2O_2$ による $1^X$ のDNA切断活性をpH 6.0, 37°Cで調べた。DNA標的の役割を明らかにするために、二核銅(II)錯体 $1$ のDNA切断活性と比較した。Form Iから、一本鎖切断による環状DNA (Form II)と二本鎖切断による直鎖状二本鎖DNA (Form III)が生成する<sup>[24]</sup>。これらをアガロースゲル電気泳動法で分析・定量した。ゲル写真およびForm I, II, IIIの割合(%)をそれぞれFigure S3-1, Table S3-1に示す。 $1^{P1-3}$ および $1^{M1-3}$ によるDNA切断におけるForm Iの減衰およびForm IIIの増加割合(%)の時間経過をそれぞれFigure 3-14に示す。



**Figure 3-16.** Time courses for the decrease of percent of Form I (A), (C), and the increase of percent of Form III (B), (D) upon reaction of pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp) with  $1$  (red),  $1^{P1}$ ,  $1^{M1}$  (light green),  $1^{P2}$ ,  $1^{M2}$  (light blue), and  $1^{P3}$ ,  $1^{M3}$  (purple) (50  $\mu$ M) in the presence of  $H_2O_2$  (0.5 mM) at pH 6.0 (MES, 10 mM) at 37°C. Experiments were carried out at least three times.

Figure 3-16 (A), (C)に示す Form I の減衰は、擬一次速度論に従った。その結果を Figure 3-17 に示す。1<sup>P1</sup>, 1<sup>P2</sup>, 1<sup>M1</sup>, 1<sup>M2</sup> の擬一次速度定数は、それぞれ 3.2, 7.1, 3.5, 2.5 × 10<sup>-2</sup> min<sup>-1</sup> で、1 の 2.3 × 10<sup>-2</sup> min<sup>-1</sup> よりわずかに大きい、1<sup>P3</sup> と 1<sup>M3</sup> の 2.3 と 1.5 × 10<sup>-2</sup> min<sup>-1</sup> は小さかった。これらの結果は、Form I から Form II への変換は、短い PEG-リンカーではわずかに加速されるが、長いリンカーでは加速されないことを示している。一方、Figure 3-16 (B), (D)に示すように、Form III の生成は、1<sup>X</sup> の PEG-リンカーを短くするほど大きく加速されることが明らかとなった。スーパーコイルの Form I は歪んだ構造を持ち Form II への変換は速く、歪みのない環状の Form II から Form III への変換は遅いことが知られている。今回の結果から、短いリンカーは Form II から Form III への遅い変換を特異的に促進することが明らかになった。

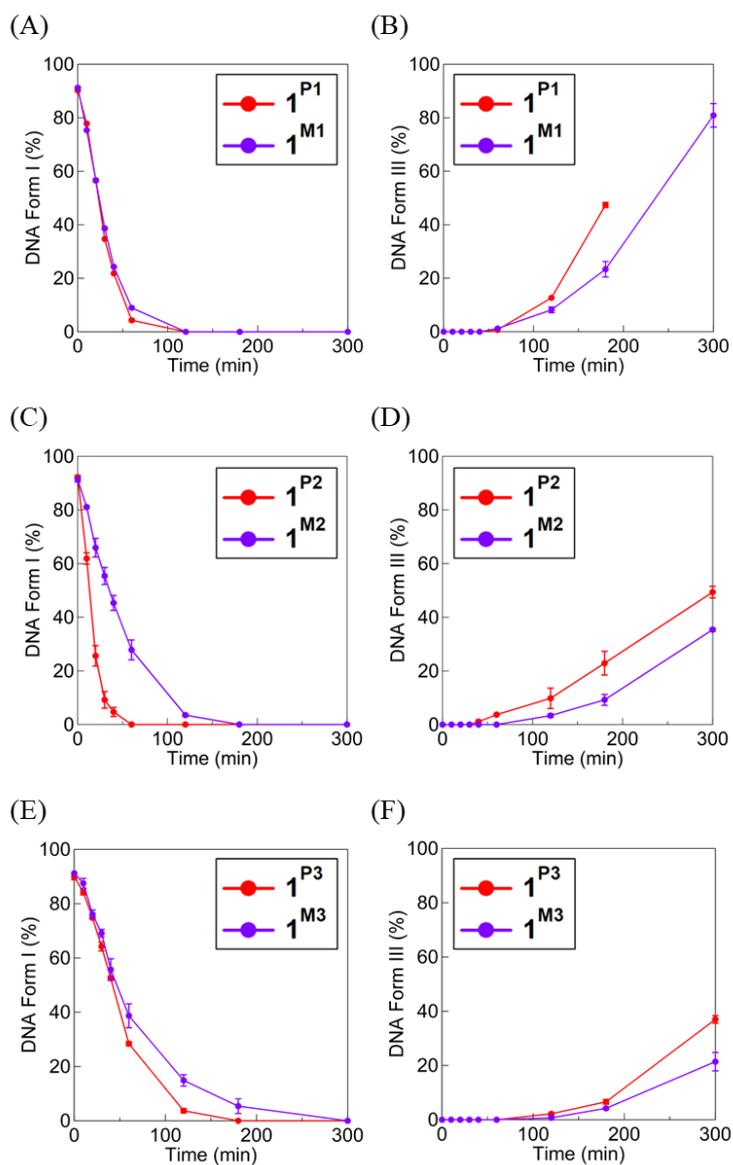


**Figure 3-17.** Pseudo-first-order plot of the decrease of Form I in the reaction of 1 (A), 1<sup>P1</sup> (B), 1<sup>P2</sup> (C), 1<sup>P3</sup> (D), 1<sup>M1</sup> (E), 1<sup>M2</sup> (F) and 1<sup>M3</sup> (G) (50 μM) with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 μM).

Form III は Form I の二本鎖切断により生成する。Form III 生成には、Form II 生成における一回目の切断箇所から 10 塩基対以内の相補鎖を切断する必要がある<sup>[25]</sup>。そこで、Form III 生成における DNA 標的の役割を明らかにするため、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と **1** または **1<sup>X</sup>** との 3 時間の反応における Form III の生成割合(%)と、これらの値から算出した二回目の切断の促進割合(**1<sup>X</sup>/1**)を Table 3-2 に示す。同じ PEG-リンカーの長さでの比較で、P-リンカーは M-リンカーより約 2 倍高い二回目切断の活性を示した(Figure 3-18)。これは、**1<sup>P1-3</sup>** の DNA 結合定数が **1<sup>M1-3</sup>** のそれよりも 2 倍大きいことと一致しており、二回目切断が DNA 結合で加速されることを示している。さらに、**1<sup>P1</sup>** は 3 時間の反応で 47%の Form III を生成しており、これは **1<sup>X</sup>** の中で最も生成割合が高かった。また、二回目切断の促進割合(**1<sup>X</sup>/1**)は PEG-リンカーが短くなるにつれて増加した。したがって、**1<sup>P1</sup>** の短い P-リンカーは Form III 生成において最適な DNA 標的であるといえる。これらの結果は、**1<sup>P1</sup>** の短い P-リンカーが phenanthrenyl 基のインターカレーションを介して二核銅部位を近傍に固定し、一回目の切断箇所からより少ない塩基対内の相補鎖での二回目の切断を促進していることを示している。

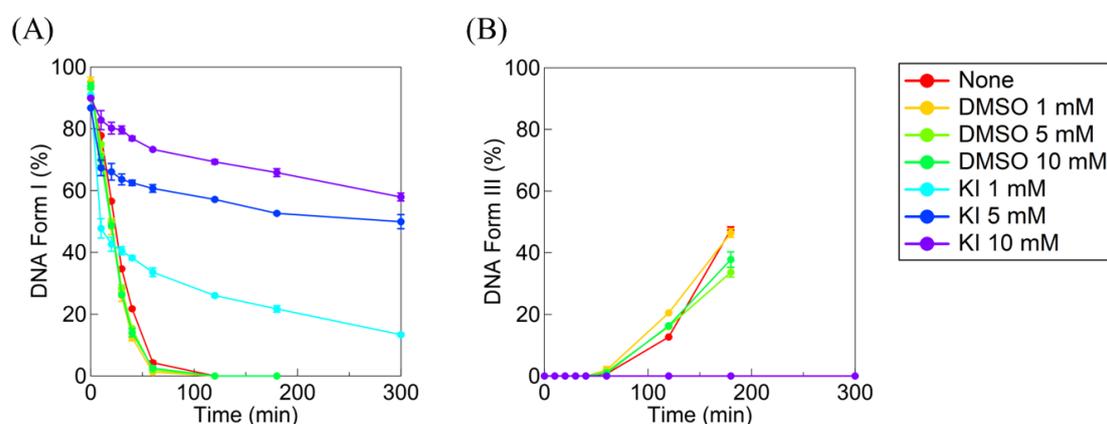
**Table 3-2. Yield of Form III (%) in the 3 h reaction by **1<sup>X</sup>** or **1** and enhancement rates (**1<sup>X</sup>/1**) in the DNA dsb**

<b>Complex</b>	<b>Form III (%) in 3 h</b>	<b>Enhancement rate (<b>1<sup>X</sup>/1</b>) in DNA dsb</b>	<b>Complex</b>	<b>Form III (%) in 3 h</b>	<b>Enhancement rate (<b>1<sup>X</sup>/1</b>) in DNA dsb</b>
<b>1<sup>P1</sup></b>	47 ± 1	22	<b>1<sup>M1</sup></b>	23 ± 3	11
<b>1<sup>P2</sup></b>	23 ± 4	11	<b>1<sup>M2</sup></b>	9 ± 2	4
<b>1<sup>P3</sup></b>	7 ± 1	3	<b>1<sup>M3</sup></b>	4 ± 1	2
<b>1</b>	2 ± 1	1	<b>1</b>	2 ± 1	1



**Figure 3-18.** Time courses for the decrease of percent of Form I ((A), (C), (E)), and the increase of percent of Form III ((B), (D), (F)) upon reaction of pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp) with  $1^{P1-3}$  with phenanthrene (red) (50  $\mu$ M), and  $1^{M1-3}$  with methyl group (purple) in the presence of  $H_2O_2$  (0.5 mM) at pH 6.0 (MES, 10 mM) at 37°C. Experiments were carried out at least three times.

さらに、DNA切断の活性種に関する情報を得るために、KI (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 阻害剤) と DMSO (ヒドロキシラジカル(HO•)阻害剤)を用いて **1<sup>P1</sup>** による DNA 切断の阻害実験を行った。その結果を Figure 3-19, S3-2 および Table S3-2 に示す。DMSO (1.0, 5.0, 10 mM)存在下では、Form I の減少も Form III の増加も阻害されなかった。したがって、拡散性の HO•は DNA 切断に関与していないといえる。一方、KI (1.0, 5.0, 10 mM)は Form I の減少と Form III の増加を阻害した。錯体不在下では H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を加えても Form I の減少と Form III の増加はほとんど観測されないので、この結果は KI が  $\mu$ -1,1-hydroperoxodicopper(II)錯体を還元分解したことを示している。したがって、 $\mu$ -1,1-hydroperoxodicopper(II)錯体が DNA 切断の酸化活性種であることが示唆された。



**Figure 3-19.** Time courses for the decrease of percent of Form I (A), and the increase of percent of Form III (B) upon reaction of pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp) with **1<sup>P1</sup>** (50  $\mu$ M) in the absence (red) and the presence of DMSO (1 mM (orange), 5 mM (light green), 10 mM (green)) or KI (1 mM (light blue), 5 mM (blue), 10 mM (purple)), and in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mM) at pH 6.0 (MES, 10 mM) at 37°C. Experiments were carried out at least three times.

### 3-3-6. 1<sup>X</sup>の細胞内取込量と親油性

1<sup>X</sup>の細胞毒性は細胞内への取込量に依存すると考えられる。そこで、HeLa細胞(2.5 × 10<sup>5</sup> cells/mL)に対して1<sup>X</sup> (25 μM)を48時間作用させた際の細胞内取込量を、ICP MSを用いて細胞中の<sup>65</sup>Cu含有量を測定して見積もった<sup>[26]</sup>。また、1<sup>X</sup>の細胞毒性に対するDNA標的の役割を明らかにするために1と比較した。1, 1<sup>P1</sup>, 1<sup>P2</sup>, 1<sup>P3</sup>, 1<sup>M1</sup>, 1<sup>M2</sup>, 1<sup>M3</sup>の(細胞中の<sup>65</sup>Cu (mol))/(培養液中の<sup>65</sup>Cu (mol))の割合は、それぞれ2.04, 4.92, 4.38, 3.70, 3.55, 1.72, 1.25%であり、1<sup>P1-3</sup>および1<sup>M1-3</sup>を1と比較したときの細胞内取込比率(1<sup>X</sup>/1)は、それぞれ2.41, 2.15, 1.81, 1.74, 0.84, 0.61であった(Table 3-3)。これらの結果より、1<sup>P1-3</sup>の細胞内取込量は1<sup>M1-3</sup>よりも高かった。またリンカーが長くなると細胞取込量は低下した。細胞取込量のリンカー長依存性では、1<sup>P1-3</sup>はphenanthrenyl基の効果が支配的なため、リンカーを長くしても75%までしか減少しないが、1<sup>M1-3</sup>ではリンカーサイズが支配的であり、リンカーを長くすると35%まで減少した。さらに、親油性は細胞内への取り込みに影響する可能性があるため、1<sup>X</sup>の親油性を1-octanol/H<sub>2</sub>O系での分配係数(log P<sub>ow</sub>)<sup>[27]</sup>から推定した。1, 1<sup>P1</sup>, 1<sup>P2</sup>, 1<sup>P3</sup>, 1<sup>M1</sup>, 1<sup>M2</sup>, 1<sup>M3</sup>のlog P<sub>ow</sub>値は、それぞれ-2.38, -1.22, -1.14, -0.98, -1.39, -1.22, -1.11であり(Table 3-3)、1<sup>X</sup>の親油性はP-かM-リンカーかによって、またリンカーを長くすることによってわずかに向上した。これらのことから、1<sup>P1-3</sup>の細胞内への取り込みは、親油性ではなく、平面環構造であるphenanthrenyl基の膜透過性によって促進されていることが示唆された。

Table 3-3. Hydrophobicity (log P<sub>ow</sub>) and [Cu in cells]/[Cu in culture medium]

Complex	Hydrophobicity (log P <sub>ow</sub> )	[Cu in cells]/[Cu in culture medium] (%)	Enhancement rate (1 <sup>X</sup> /1) in cellular uptake
1 <sup>P1</sup>	-1.22	4.92	2.4
1 <sup>P2</sup>	-1.14	4.38	2.1
1 <sup>P3</sup>	-0.98	3.70	1.8
1 <sup>M1</sup>	-1.39	3.55	1.7
1 <sup>M2</sup>	-1.22	1.72	0.8
1 <sup>M3</sup>	-1.11	1.25	0.6
1	-2.38	2.04	1.0

### 3-3-7. $1^X$ の細胞毒性

様々な細胞に対する  $1^X$  の細胞毒性を MTT assay<sup>[28-30]</sup>により評価した。細胞増殖 50% 阻害濃度(50% Inhibition Concentration,  $IC_{50}$  値)は、24 時間ないしは 48 時間作用させた後の細胞生存率(%) vs  $\log [1^X]$ のプロットにより決定した。 $1^X$  の  $IC_{50}$  値を、それぞれ Table 3-4, 3-5 に示す。さらに、インキュベート条件下での二核銅(II)錯体  $1^{P1}$  および  $1^{M1}$  の安定性を電子吸収スペクトルによって追跡した。その結果を Figure S3-3 に示す。72 時間後でも  $1^{P1}$  と  $1^{M1}$  のスペクトルは大きく変化しなかったことから、これらの錯体の構造はインキュベート中で安定に保持されていることが示された。

配位子である  $HL1^X$  の細胞毒性は、Table 3-4 に示すように、全ての細胞株に対する  $IC_{50}$  値(24 時間)が 1000  $\mu\text{M}$  より大きく、二核銅(II)錯体よりもはるかに細胞毒性が低いことが示された。また、 $HL1^{P1}$  と  $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$  を同時に加えた共存下で行った MTT assay の結果から、 $IC_{50}$  値(24 時間)は全ての細胞株に対して 1000  $\mu\text{M}$  以上だった(Table 3-4)。したがって、 $HL1^{P1}$  と  $\text{Cu}(\text{II})$  イオンを共存させただけでは、細胞毒性は二核銅(II)錯体よりもはるかに低い。HeLa 細胞に対する  $1^{P1}$ ,  $1^{P2}$ ,  $1^{P3}$ , および  $1$  の  $IC_{50}$  値 (48 時間)は、それぞれ 21.8, 56.6, 66.4 および 660  $\mu\text{M}$  で、 $1^{P1}$ ,  $1^{P2}$ ,  $1^{P3}$  の細胞毒性向上率( $1^X/1$ )は、それぞれ 30, 12, 9.9 であった。細胞毒性向上率は、細胞内への取込促進率よりもはるかに大きかった。以上の結果より、 $1^X$  の細胞毒性は P-リンカーの存在によって、また PEG-リンカーを短くすることによって大きく向上することが明らかとなった。これは、二回目の DNA 切断の促進率( $1^X/1$ )が PEG-リンカーを短くすることによって増加することと相関している。しかし、HeLa 細胞に対する  $1^{M1}$ ,  $1^{M2}$ ,  $1^{M3}$  の  $IC_{50}$  値(48 時間)は、それぞれ 199, 257, 283  $\mu\text{M}$  で、PEG-リンカーサイズにはほとんど依存せず、 $1$  の 660  $\mu\text{M}$  よりも 2-3 倍程度向上しただけであった。したがって、M-リンカーは細胞毒性をあまり向上させないことがわかった。

**Table 3-4. In vitro cytotoxicity of 1<sup>X</sup>, Cisplatin, HL1<sup>X</sup>, and HL1<sup>P1</sup> put with Cu(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> against various cancer and normal cells by means of MTT assay (24 h) (Mean ± SD)**

Complex	IC <sub>50</sub> (μM) (Mean ± SD)						
	Cervical	Lung			Pancreas		
	HeLa (Cancer)	A549 (Cancer)	WI-38 (Normal)	SF	PK-59 (Cancer)	2C6 (Normal)	SF
<b>1</b>	1,740 ± 110	1,430 ± 40	2,960 ± 30	2.1	1,060 ± 0	3,340 ± 10	3.2
<b>1<sup>P1</sup></b>	97.3 ± 0.4	94 ± 5	231 ± 1	2.5	122 ± 1	238 ± 4	2.0
<b>1<sup>P2</sup></b>	156 ± 1	91.6 ± 10	269 ± 5	2.9	110 ± 3	238 ± 8	2.2
<b>1<sup>P3</sup></b>	216 ± 2	227 ± 1	325 ± 9	1.4	219 ± 3	307 ± 1	1.4
<b>1<sup>M1</sup></b>	501 ± 2	391 ± 4	665 ± 3	1.7	208 ± 1	557 ± 18	2.7
<b>1<sup>M2</sup></b>	650 ± 8	427 ± 1	680 ± 7	1.6	242 ± 12	665 ± 3	2.7
<b>1<sup>M3</sup></b>	1140 ± 70	448 ± 2	702 ± 2	1.6	294 ± 2	755 ± 4	2.6
Cisplatin	2.33 ± 0.23	5.35 ± 0.82	6.33 ± 0.13	1.2	2.66 ± 0.85	3.16 ± 0.12	1.2
HL1	> 10,000	> 10,000	> 10,000	-	> 10,000	> 10,000	-
HL1 <sup>P1</sup>	> 1,000	> 1,000	> 1,000	-	> 1,000	> 1,000	-
HL1 <sup>P2</sup>	> 1,000	> 1,000	> 1,000	-	> 1,000	> 1,000	-
HL1 <sup>P3</sup>	> 1,000	> 1,000	> 1,000	-	> 1,000	> 1,000	-
HL1 <sup>M1</sup>	> 1,000	> 1,000	> 1,000	-	> 1,000	> 1,000	-
HL1 <sup>M2</sup>	> 1,000	> 1,000	> 1,000	-	> 1,000	> 1,000	-
HL1 <sup>M3</sup>	> 1,000	> 1,000	> 1,000	-	> 1,000	> 1,000	-
HL1 <sup>P1</sup> + Cu(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	> 1,000	> 1,000	> 1,000	-	> 1,000	> 1,000	-

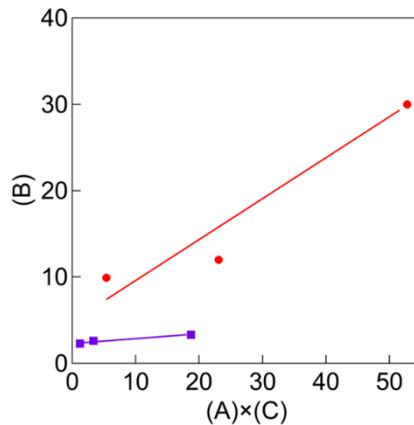
**Table 3-5. In vitro cytotoxicity of 1, 1<sup>X</sup>, and Cisplatin against various cancer and normal cells by mean of MTT assay (48 h) (Mean ± SD)**

Complex	IC <sub>50</sub> (μM) (Mean ± SD)						
	Cervical HeLa (Cancer)	A549 (Cancer)	Lung WI-38 (Normal)		SF	Pancreas PK-59 2C6 (Normal)	
<b>1</b>	660 ± 28	284 ± 16	838 ± 82	3.0	241 ± 4	1140 ± 50	4.7
<b>1<sup>P1</sup></b>	21.8 ± 6.5	20.9 ± 0.6	215 ± 20	10.3	11.8 ± 2.5	90.4 ± 2.8	7.7
<b>1<sup>P2</sup></b>	56.6 ± 1.8	23.8 ± 2.4	218 ± 3	9.2	18.4 ± 1.6	104 ± 8	5.7
<b>1<sup>P3</sup></b>	66.4 ± 2.7	71.7 ± 1.4	268 ± 3	3.8	57.4 ± 2.0	128 ± 1	2.2
<b>1<sup>M1</sup></b>	199 ± 11	206 ± 7	431 ± 32	2.1	147 ± 1	552 ± 5	3.8
<b>1<sup>M2</sup></b>	257 ± 1	247 ± 18	527 ± 9	2.1	152 ± 9	657 ± 12	4.3
<b>1<sup>M3</sup></b>	283 ± 22	279 ± 8	636 ± 16	2.3	161 ± 4	675 ± 5	4.2
Cisplatin	0.93 ± 0.01	1.83 ± 0.03	4.55 ± 0.03	2.5	2.01 ± 0.02	1.15 ± 0.08	0.6

$1^X$  の HeLa 細胞内での DNA 切断の P-および M-リンカーの役割を明らかにするため、Table 3-6 に示すように、二回目の DNA 切断(DNA Form III の生成)の促進率( $1^X/1$ ) (A)と HeLa 細胞への細胞内取込促進率( $1^X/1$ ) (C)から、HeLa 細胞内において期待される DNA 切断の促進率( $1^X/1$ ) (A)×(C)を推定した。Figure 3-20 には、 $1^{P1-3}$  および  $1^{M1-3}$  について、HeLa 細胞内において期待される DNA 切断の促進率( $1^X/1$ ) (A)×(C)と HeLa 細胞に対する細胞毒性の向上率 (B)をプロットした。 $1^{P1-3}$  および  $1^{M1-3}$  のプロットは、それぞれ傾きが 0.44 および 0.053 の直線を与えた。これらの値から、細胞毒性と細胞内で期待される DNA 切断は、 $1^{P1-3}$  では 44%の相関があるが、 $1^{M1-3}$  ではわずか 5%の相関しかなかった。P-リンカーは細胞内での DNA 切断と細胞毒性を比例的に向上させたのに対し、M-リンカーは細胞外で DNA 切断を向上させたが、細胞毒性をほとんど向上させない。この事実は、P-リンカーは細胞内でも phenanthrenyl 基がインターカレーターとして DNA に特異的に結合して DNA 切断を促進して細胞毒性を向上させるが、M-リンカーは非特異的結合のために細胞内では DNA 切断を促進しないことを示している。

**Table 3-6. Data for plot of expected enhancement rates ( $1^X/1$ ) in DNA dsb in HeLa cells (A)×(C) vs. enhancement rates ( $1^X/1$ ) in cytotoxicity against HeLa cells (B). Enhancement rates ( $1^X/1$ ) in DNA dsb (A) and enhancement rates ( $1^X/1$ ) in cellular uptake (C) are used to estimate (A)×(C)**

Complex	(A) Enhancement rate ( $1^X/1$ ) in DNA dsb	(B) Enhancement rate ( $1^X/1$ ) in cytotoxicity against HeLa cells	(C) Enhancement rate ( $1^X/1$ ) in cellular uptake	(A)×(C)
<b>1</b>	1	1	1	1
<b><math>1^{P1}</math></b>	22	30	2.4	52.8
<b><math>1^{P2}</math></b>	11	12	2.1	23.1
<b><math>1^{P3}</math></b>	3	9.9	1.8	5.4
<b><math>1^{M1}</math></b>	11	3.3	1.7	18.7
<b><math>1^{M2}</math></b>	4	2.6	0.84	3.36
<b><math>1^{M3}</math></b>	2	2.3	0.61	1.22



**Figure 3-20.** Plots of expected enhancement rates in DNA dsb in HeLa cells (A)×(C) shown in Table 3-6 vs. enhancement rates in cytotoxicity against HeLa cells (B) for  $1^{P1-3}$  (red line) and  $1^{M1-3}$  (purple line). The slopes of the red and blue lines are 0.44 and 0.053, respectively.

次のがん細胞選択的毒性について述べる。A549(肺がん), WI-38(肺正常), PK-59(膵臓がん), 2C6(膵臓正常)細胞に対する  $1^X$  の  $IC_{50}$  値(48時間)を Table 3-5 に示す。A549細胞に対する  $1$ ,  $1^{P1}$ ,  $1^{P2}$ ,  $1^{P3}$  の  $IC_{50}$  値(48時間)は, それぞれ 284, 20.9, 23.8, 71.7  $\mu$ M であり, 肺がん細胞に対する  $1^{P1-3}$  の細胞毒性は, P-リンカーの導入および PEG-リンカーを短くすることにより, 大きく向上することが示された。しかし, WI-38細胞に対する  $1^{P1}$ ,  $1^{P2}$ ,  $1^{P3}$  の  $IC_{50}$  値(48時間)は, それぞれ 215, 218, 268  $\mu$ M であり, P-リンカーは肺の正常細胞に対する  $1^{P1-3}$  の細胞毒性をほとんど向上せず, PEG-リンカーのサイズに依存しないことがわかる。したがって, P-リンカーはがん細胞選択的毒性を向上させるといえる。がん細胞選択的毒性を, Table 3-5 に示す選択性因子(selectivity factor, SF) = (正常細胞の  $IC_{50}$ )/(がん細胞の  $IC_{50}$ )で評価した。A549 と WI-38 に対する  $1^{P1}$ ,  $1^{P2}$ ,  $1^{P3}$  の SF 値は, それぞれ 10.3, 9.2, 3.8 であり,  $1^{M1-3}$  の 2.3–2.1 や Cisplatin の 2.5 よりもはるかに高かった。このように,  $1^{P1-3}$  はがん細胞選択的毒性を示すが,  $1^{M1-3}$  や Cisplatin はほとんど選択性を示さなかった。また, 短い P-リンカーは  $1^{P1-3}$  のがん細胞選択的毒性を大きく向上させたが,  $1^{M1-3}$  では PEG-リンカーサイズの効果はなかった。また,  $1^{P1-3}$  は膵臓のがん PK-59 と正常 2C6 に対してもがん細胞選択的毒性を示したが,  $1^{M1-3}$  は選択性を示さなかった(Table 3-5)。肺および膵臓のがん細胞と正常細胞に対する  $1^{P1}$  の SF 値は, それぞれ 10.3 および 7.7 であり,  $1^{P1}$  が  $1^X$  において最も高いがん細胞選択的毒性を示すことが明らかとなった。以上の結果より, 短い P-リンカーは, がん細胞選択的毒性に最適化された DNA 標的であるといえる。

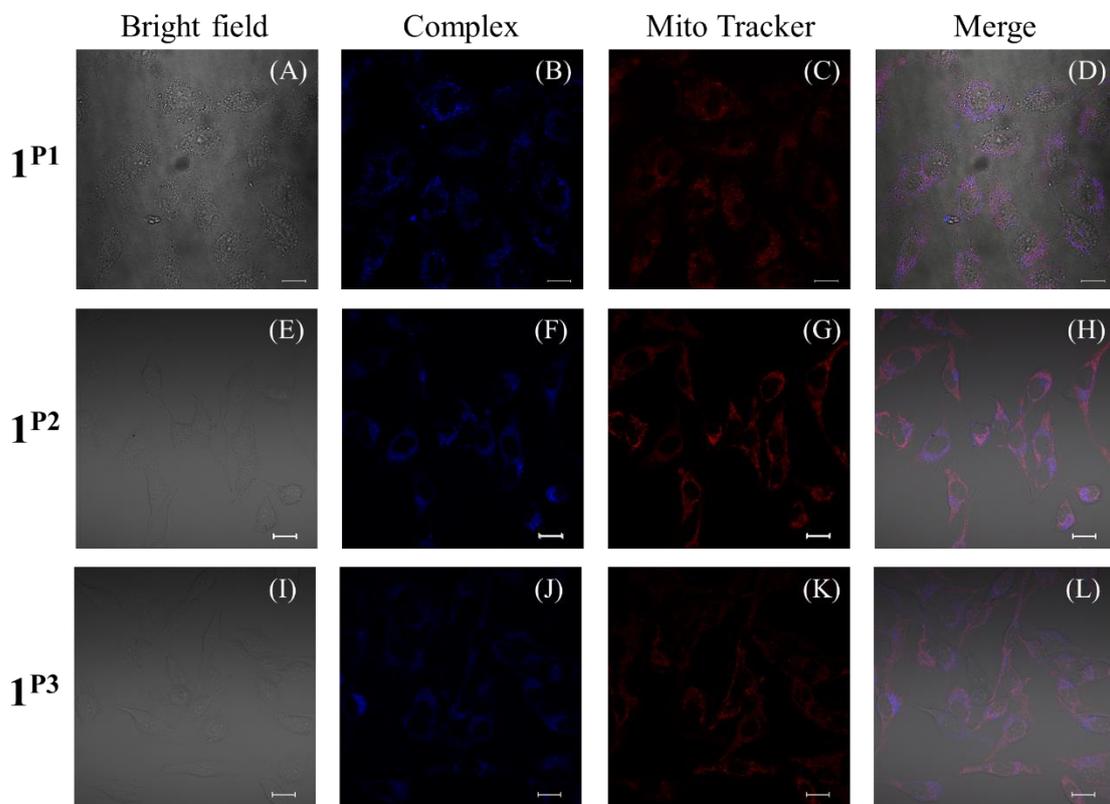
### 3-3-8. $1^{P1-3}$ の細胞内局在

$1^{P1-3}$  のがん細胞選択的毒性のメカニズムを解明するために、共焦点顕微鏡を用いて細胞内での局在を調べた<sup>[31]</sup>。  $1^{P1-3}$  (200  $\mu$ M)を含む培地中で HeLa 細胞を 1 時間インキュベートした後、ミトコンドリア染色剤である Mito Tracker Deep Red (50 nM)で処理した。その後、細胞内局在を共焦点顕微鏡で観察した。共焦点顕微鏡で撮影した画像を Figure 3-19 に示す。赤色蛍光と青色蛍光はそれぞれ、染色されたミトコンドリアと細胞内の  $1^{P1-3}$  の存在位置を示している。重ね合わせた画像の紫色から、 $1^{P1-3}$  がミトコンドリアに局在していることがわかる。Table 3-7 に示すように、ImageJ を用いた画像処理により、ミトコンドリアの面積の 17%が  $1^{P1-3}$  で占められていることが明らかとなった。

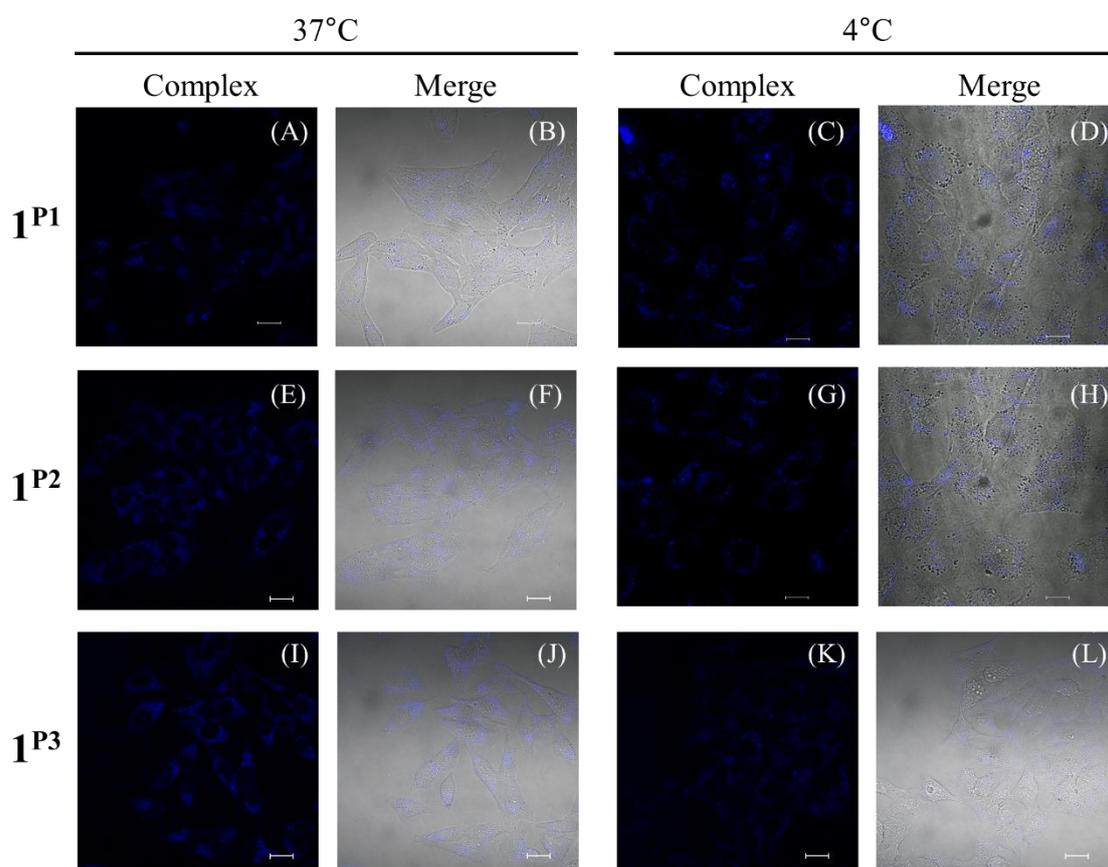
さらに、4°Cと 37°Cの条件下それぞれで  $1^{P1-3}$  を作用させた際の HeLa 細胞を共焦点顕微鏡で観測した。その結果を Figure 3-21 に示す。37°C条件下の HeLa 細胞のミトコンドリアで観察された  $1^{P1-3}$  の青色蛍光が、4°C条件下のミトコンドリアでも観察された。この結果は、 $1^{P1-3}$  の細胞内への取り込みはエンドサイトーシスではなく、主に直接膜透過によって起こることを示唆している。また、この結果は  $1^{P1-3}$  の細胞内への取り込みが P-リンカーの膜透過性によって促進されるという上述の結果と一致する。さらに、細胞毒性に対しては、エンドサイトーシスよりも直接膜透過の方が有利であると考えられる。

Table 3-7. Each area (%) in the image of  $1^{P1-3}$  against HeLa cells

Complex	Area (%)			
	Mitochondria in the image (red)	Complex in the image (blue)	Co-localization in the image (purple)	Complex in Mitochondria
$1^{P1}$	4.0	2.3	0.7	17.5
$1^{P2}$	10.6	2.3	1.7	16.0
$1^{P3}$	8.5	4.2	1.5	17.6



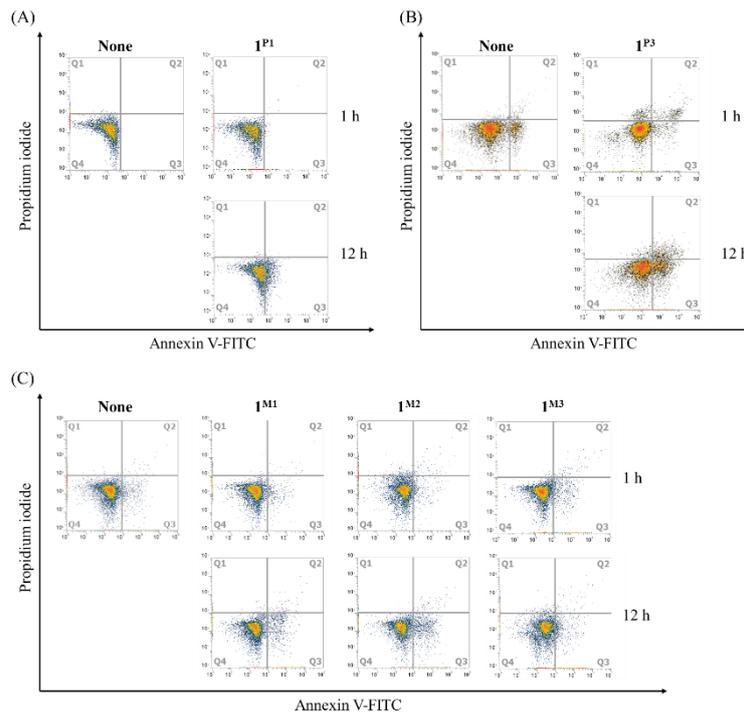
**Figure 3-21.** Confocal microscopic images of **1<sup>P1-3</sup>** (200  $\mu$ M) in HeLa cells on 1 h incubation in the dark. Bright field images (A), (E), and (I). Blue fluorescence indicates the fluorescence of **1<sup>P1</sup>** (B), **1<sup>P2</sup>** (F), and **1<sup>P3</sup>** (J) ( $\lambda_{\text{ex}} = 405$  nm). Red fluorescence indicates mitochondrial staining of Mitotracker Deep Red FM (50 nM) (Thermofisher) (C), (G), and (K) ( $\lambda_{\text{ex}} = 638$  nm). (D) Overlay images of (A)–(C). (H) Overlay images of (E)–(G). (L) Overlay images of (I)–(K). Scale bar is 20  $\mu$ m.



**Figure 3-22.** Confocal microscopic images of HeLa cells. (A, B, E, F, I, J) **1<sup>P1</sup>** (200  $\mu$ M), **1<sup>P2</sup>** (500  $\mu$ M), and **1<sup>P3</sup>** (800  $\mu$ M) were added and then incubated 1 h in the dark 37°C condition. (C, D, G, H, K, L) After preincubation for 1 h in the dark 4°C condition, **1<sup>P1</sup>** (200  $\mu$ M), **1<sup>P2</sup>** (500  $\mu$ M), and **1<sup>P3</sup>** (800  $\mu$ M) were added and then incubated 1 h in the dark 4°C condition. Blue fluorescence indicates the fluorescence of **1<sup>P1</sup>**, **1<sup>P2</sup>**, and **1<sup>P3</sup>** (J) ( $\lambda_{\text{ex}} = 405$  nm) Scale bar is 20  $\mu$ m.

### 3-3-9. Apoptosis assay

細胞死形態を決定するために、染色剤として FITC を蛍光標識として有する Annexin V (Annexin V-FITC)とヨウ化プロピジウム(Propidium iodide, PI)<sup>[32]</sup>を用い、fluorescence-activated cell sorting (FACS)により細胞の選別を行った。アポトーシス細胞を定量するために、 $1^{P1}$ 、 $1^{P3}$ または $1^{M1-3}$ (24時間作用時の各 $IC_{50}$ 値)を含む培地中でHeLa細胞を1時間ないしは12時間培養した。得られたQ1-Q4のドットプロットおよび細胞の割合をFigure 3-21, Table 3-8, 3-9, 3-10に示す。第二章で述べたように、 $1^{P2}$ 存在下では、1-12時間の培養で15.8%の細胞が死滅し、85%が初期アポトーシスであった<sup>[33]</sup>。 $1^{P1}$ 、 $1^{P3}$ では、12時間の培養で1時間よりも死滅細胞がそれぞれ27.1、18.8%増加し、初期アポトーシスが100%と89%であった。このように、 $1^{P1-3}$ はアポトーシス誘導率が高く、中でもアポトーシス誘導率100%の $1^{P1}$ は最も高い細胞毒性を示した。一方で、 $1^{P1-3}$ よりも細胞毒性が低い $1^{M1-3}$ は、Table 3-10に示すQ1-Q4の割合からも分かるようにアポトーシス誘導率が低かった。



**Figure 3-23.** Induction of apoptosis by  $1^{P1}$  (A),  $1^{P3}$  (B), and  $1^{M1-3}$  (C). Annexin V-FITC and PI fluorescence were measured by flow cytometry. Representative dot plots of dose-dependent effect of  $1^{P1}$ ,  $1^{P3}$ , and  $1^{M1-3}$  (each  $IC_{50}$  value at 24 h) on apoptosis of HeLa cells treated for 1 h and 12 h. A total of 10,000 cells were collected per sample.

**Table 3-8. Induction of apoptosis by 1<sup>P1</sup> against HeLa cells**

Complex	Rate of cells (%)			
	Q1 (Annexin <sup>-</sup> /PI <sup>+</sup> )	Q2 (Annexin <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup> )	Q3 (Annexin <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup> )	Q4 (Annexin <sup>-</sup> /PI <sup>-</sup> )
None (12 h)	1.2	0.0	0.1	98.7
1 <sup>P1</sup> 1 h	0.7	0.1	1.1	98.2
1 <sup>P1</sup> 12 h	0.4	0.1	28.5	71.1

**Table 3-9. Induction of apoptosis by 1<sup>P3</sup> against HeLa cells**

Complex	Rate of cells (%)			
	Q1 (Annexin <sup>-</sup> /PI <sup>+</sup> )	Q2 (Annexin <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup> )	Q3 (Annexin <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup> )	Q4 (Annexin <sup>-</sup> /PI <sup>-</sup> )
None (12 h)	1.1	1.2	10.6	87.1
1 <sup>P3</sup> 1 h	3.6	3.5	3.9	89.0
1 <sup>P3</sup> 12 h	2.4	6.8	20.6	70.2

**Table 3-10. Induction of apoptosis by 1<sup>M1-3</sup> against HeLa cells**

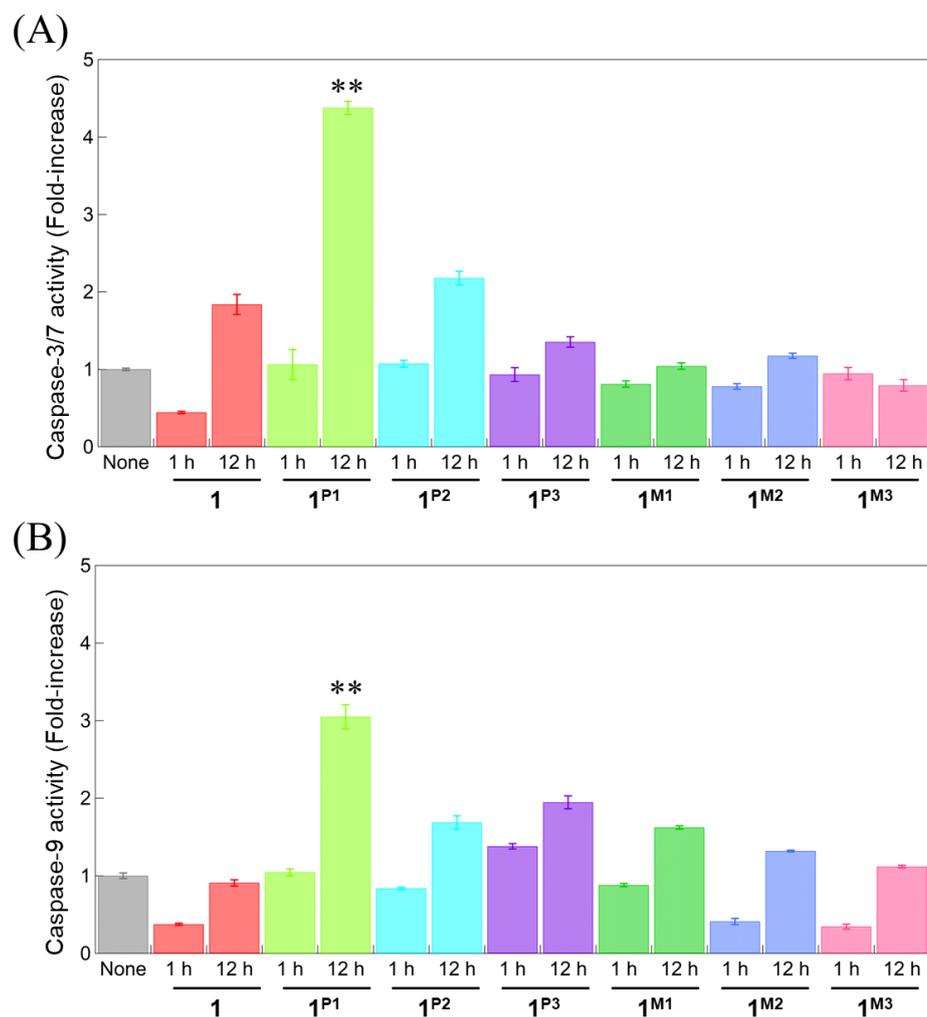
Complex	Rate of cells (%)			
	Q1 (Annexin <sup>-</sup> /PI <sup>+</sup> )	Q2 (Annexin <sup>+</sup> /PI <sup>+</sup> )	Q3 (Annexin <sup>+</sup> /PI <sup>-</sup> )	Q4 (Annexin <sup>-</sup> /PI <sup>-</sup> )
None (12 h)	2.5	0.3	7.3	89.9
1 <sup>M1</sup> 1 h	1.1	0.3	7.1	91.6
1 <sup>M1</sup> 12 h	0.7	0.8	14.3	84.2
1 <sup>M2</sup> 1 h	5.3	0.8	7.7	86.2
1 <sup>M2</sup> 12 h	0.4	1.3	18.4	79.9
1 <sup>M3</sup> 1 h	0.4	0.9	9.9	88.8
1 <sup>M3</sup> 12 h	4.2	0.7	11.4	83.7

### 3-3-10. カスパーゼ活性アッセイ

前述の実験結果より、 $1^{P1-3}$  はミトコンドリアに局在してアポトーシス細胞死を誘導することが明らかとなった。そこで、アポトーシスが内因性経路を介して進行するかどうかを調べるために、イニシエーター・カスパーゼである Caspase-9<sup>[34,35]</sup>とエフェクター・カスパーゼである Caspase-3/7<sup>[34,35]</sup>に関して  $1^X$  のカスパーゼ活性アッセイを行った。活性化された Caspase-9 は開裂部位として Leu-Glu-His-Asp (LEHD) を認識する<sup>[36]</sup>。そこで、細胞膜透過性を有し、無毒な、活性化された Caspase-9 に不可逆的に結合する FITC-LEHD-FMK を用い、Caspase-9 の活性を評価した<sup>[37]</sup>。HeLa 細胞を  $1$  または  $1^X$  (97.3  $\mu$ M, 24 時間作用時の  $1^{P1}$  の IC<sub>50</sub> 値) を含む培地中で 1 時間および 12 時間インキュベートした後、細胞をはがして洗浄し、FITC-LEHD-FMK 存在下で 30 分間インキュベートした。FACS で定量した活性化された Caspase-9 の結果を Figure 3-22 に示す。

さらに、Caspase-3/7 活性を調べるために、活性化された Caspase-3/7 が開裂部位として認識する Asp-Glu-Val-Asp (DEVD) のペプチド配列<sup>[38]</sup>を有する CellEvent® Caspase-3/7 Green Detection Reagent<sup>[39]</sup>を用いて測定を行った。この試薬は、配列が切断されると DNA との結合を介して強い蛍光を発する。したがって、Caspase-3/7 活性はその蛍光強度から推定される。Caspase-9 の測定と同様に、HeLa 細胞を  $1$  または  $1^X$  (97.3  $\mu$ M, 24 時間作用時の  $1^{P1}$  の IC<sub>50</sub> 値) を含む培地中で 1 時間および 12 時間インキュベートした後、細胞をはがして洗浄し、CellEvent® Caspase-3/7 Green Detection Reagent 存在下で 25 分間インキュベートした。FACS で定量した活性化された Caspase-3/7 の結果を Figure 3-22 に示す。12 時間インキュベートで、 $1^{P1-3}$  は  $1^{M1-3}$  よりも高い Caspase-9 および Caspase-3/7 活性を示し、その活性化は  $1^{P1}$  が最も高かった。したがって、 $1^{P1}$  は他の錯体よりも低濃度で効率的に内因性経路によってミトコンドリアアポトーシスを誘導することが明らかとなった<sup>[34,40,41]</sup>。

前述のように、 $1^{P1}$  は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による DNA dsb で最も高い活性を示し、がん細胞選択的毒性も最も高かった。したがって、 $1^{P1}$  の短い P-リンカーは、がん細胞のミトコンドリア機能障害によって増加した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> との反応でミトコンドリア DNA 切断を促進することで、がん細胞選択的毒性を向上させたと考えられる。すなわち、 $1^{P1}$  はがん細胞ではミトコンドリア DNA 切断によりミトコンドリアアポトーシスを誘導するが、正常細胞では H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度が比較的低いために誘導できず、がん細胞選択的毒性につながると考えられる。



**Figure 3-24.** Caspase-3/7 activity (A) or Caspase-9 activity (B) in HeLa cells measured using a caspase fluorometric assay kit when treated with **1** (red), **1<sup>P1</sup>** (light green), **1<sup>P2</sup>** (light blue), **1<sup>P3</sup>** (purple), **1<sup>M1</sup>** (green), **1<sup>M2</sup>** (blue), and **1<sup>M3</sup>** (pink) (97.3  $\mu$ M (IC<sub>50</sub> of **1<sup>P1</sup>** at 24 h)) for 1 h and 12 h. Results are shown as the mean  $\pm$  SD from five independent experiments. (\*\* $p < 0.001$ ; two-tailed Student's t-test)

### 3-3-11. $1^{Pn}$ とミトコンドリア標的単核銅(II)錯体のがん細胞選択的毒性の比較

ミトコンドリア標的として terpyridine 配位子(tpy)に triphenyl phosphonium 基(tpp)を結合させた単核銅(II)錯体 $[\text{Cu}(\text{ttpy-tpp})\text{Br}_2]\text{Br}$  (Figure 3-25)は、ミトコンドリアを介したアポトーシスによってがん細胞に対して高い細胞毒性を示すことが報告されている<sup>[7e]</sup>.  $[\text{Cu}(\text{ttpy-tpp})\text{Br}_2]\text{Br}$  は、活性酸素種(ROS)の発生を介した酸化的 DNA 切断で、がん細胞に対して細胞毒性を示した.  $[\text{Cu}(\text{ttpy-tpp})\text{Br}_2]\text{Br}$  のがん細胞選択的毒性は、高い細胞内取り込みとミトコンドリア局在化によって達成されている. 一方、 $1^{Pn}$  は  $\text{H}_2\text{O}_2$  を活性化することでがん細胞選択的毒性を示し、これはがん細胞ではミトコンドリアの機能障害により  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度が正常細胞よりもやや高いことを利用したものである. 実際、 $1^{P1}$  は肺がん細胞(A549)に対して、肺正常細胞(WI-38)よりも 10.3 倍高い細胞毒性を示した. このように、 $1^{Pn}$  の細胞毒性は $[\text{Cu}(\text{ttpy-tpp})\text{Br}_2]\text{Br}$  よりも低い、高いがん細胞選択性を示した. さらに、 $1^{Pn}$  の DNA 切断活性と細胞毒性は、PEG-リンカーを短くすることで比例的に向上し、 $1^{Pn}$  のがん細胞選択的毒性も向上した. このことは、 $1^{Pn}$  のがん細胞選択的毒性は PEG-リンカーの長さによって制御できることを示している. 従って、我々が開発した二核銅(II)錯体のがん細胞選択的毒性は、今後、PEG-リンカーの長さや DNA 標的部位を最適化することにより、さらに向上する可能性がある.

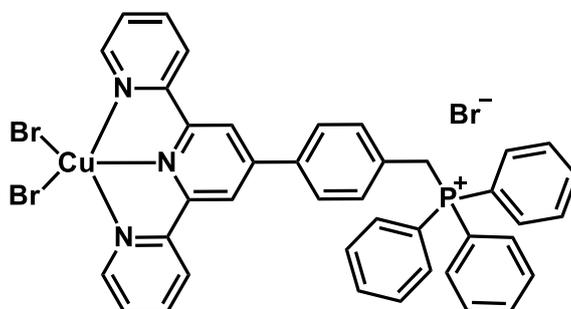


Figure 3-25. Chemical Structures of  $[\text{Cu}(\text{ttpy-tpp})\text{Br}_2]\text{Br}$ .

### 3-4. 結論

本章では、一連の DNA 標的/二核化配位子結合体である  $HL1^X$  ( $X = Pn, Mn$  ( $n = 1-3$ )) とその二核銅(II)錯体  $[Cu_2(\mu-OH)(L1^X)](ClO_4)_2$  ( $1^X$ ) を合成し、DNA 結合能力、DNA 切断活性、細胞内取込量、細胞毒性における DNA 標的部位の役割を評価した。 $1^X$  の二回目の DNA 切断による Form II から Form III への変換は、少数の塩基対内に二核銅(II)部位を固定することが可能な短い PEG-リンカーによって大きく促進された。 $1^X$  の細胞毒性は、DNA 標的部位として P-リンカーを用いることや PEG-リンカーを短くすることによって向上したが、M-リンカーでは向上しなかった。二回目の DNA 切断活性と細胞毒性は、 $1^{P1-3}$  では 44% の相関があったが、 $1^{M1-3}$  ではわずか 5% の相関しかなかった。このことから、P-リンカーは細胞内での特異的な DNA 結合を介して二回の DNA 切断を促進して細胞毒性を向上させるが、M-リンカーは非特異的な結合のため、細胞内での DNA 切断を促進せず、細胞毒性を向上させないことが示唆された。 $1^{P1}$  は、肺および膵臓のがん細胞および正常細胞に対して、 $1^X$  で最も高いがん細胞選択的毒性を示した。さらに、細胞内可視化、Apoptosis assay、カスパーゼ活性アッセイにより、 $1^{P1-3}$  がミトコンドリアアポトーシスを誘導することが明らかになった。したがって、 $1^{P1}$  の短い P-リンカーは、ミトコンドリアアポトーシスを介してがん細胞選択的毒性を向上させると結論付けられる。これはおそらく、短い P-リンカーが、がん細胞のミトコンドリア機能障害によって増加した  $H_2O_2$  と反応することでミトコンドリア DNA 切断を促進するためであると考えられる。本研究で行っている DNA 標的部位の役割の解明は、深刻な副作用を軽減する新規抗がん剤の開発に光明を与えるかもしれない。

### 3-5. 実験方法

#### 3-5-1. 試薬

試薬については、合成中間体や錯体を除き、高純度製品を和光純薬工業、東京化成、シグマアルドリッチ社製から選択して購入した。溶媒については、合成に用いるものは必要に応じて乾燥蒸留した。supercoiled plasmid pUC19 DNA は、ニッポンジーン社から購入した試薬を使用した。仔ウシ胸腺由来のデオキシリボ核酸ナトリウム塩(type I, fibers)は Sigma-Aldrich から購入した。Apoptosis assay は、eBioscience™ Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC (Invitrogen)を使用して測定した。Caspase-3/7 活性は CellEvent™ Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit を、Caspase-9 活性は CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase Staining Kit を使用して測定した。二核銅(II)錯体 **1** は参考文献 [17, 18]に従って、二核銅(II)錯体 **1**<sup>P2</sup> は第二章の合成項 **2-5-3** に従って合成した。

#### 3-5-2. 測定装置

元素分析(C, H, N)は、Perkin-Elmer 社製 Elemental Analyzer 2400 II を用いて測定した。UV-vis 吸収スペクトルは、Agilent 社製 8454 紫外可視分光光度計を用いて測定した。pH 測定は、HORIBA 製 LAQUA electrode を標準緩衝液で校正した後に測定した。Electron spray ionization MS (ESI MS)および Cold spray ionization MS (CSI MS)スペクトルは、日本電子製 JMS-T100CSR the AccuTOF CS を用いて、MeOH, MeCN または H<sub>2</sub>O を溶媒として測定した。赤外線(IR)スペクトルは、SHIMADZU Single Reflection HATR IRAffinity-1 MIRacle 10 で測定した。<sup>1</sup>H NMR スペクトルは、日本電子製 ECA-500RX フーリエ変換核磁気共鳴装置(500 MHz)を使用し、基準物質として tetramethylsilane (TMS)または sodium 3-(trimethylsilyl)propionate-2,3,3,3-*d*<sub>4</sub> (TSP)を用いて測定した。蛍光スペクトルは、HITACHI Spectral fluorometer F-7000 で測定した。細胞内銅の定量は、SHIMADZU Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer ICP MS-2030 を用いて測定した。MTT assay は、Thermo Scientific™ Multiskan™ FC を用いて測定を行った。共焦点顕微鏡は、Nikon Instech 社製共焦点レーザー顕微鏡 A1 を用いた。フローサイトメトリーは、Invitrogen 社製 Attune NxT Focusing Cytometer を用いて測定を行った。

### 3-5-3. 配位子(HL1<sup>X</sup>)とその二核銅(II)錯体(1<sup>X</sup>) (X = Pn and Mn (n = 1–3))の合成

#### 1,7-Ditosyl-1,4,7-trioxaheptane (**12** (n = 1))の合成

2000 mL 三口反応容器に回転子, Diethylene glycol (**11** (n = 1)) (31.0 mL, 0.233 mol), *p*-toluenesulfonyl chloride (87.0 g, 0.456 mol), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (750 mL)を加えた. これを氷浴に浸して攪拌させ, そこに粉状にした KOH (110 g, 1.96 mol)を少しずつ加え, N<sub>2</sub>を封入したバルーンを取り付け, 0°C に保ったまま 3 時間攪拌した. 反応容器に H<sub>2</sub>O (450 mL)を加え, これを CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 200 mL)で分液した. 有機層に Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて脱水した後, ヌツチェで濾過して, 濾液をロータリーエバポレーターで濃縮すると白色固体が得られた. これを hot acetone に溶解させて再結晶させると白色固体が得られた(92.5 g, Yield 88%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.78 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H, Ph), 7.35 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H, Ph), 4.09 (t, *J* = 4.6, 4.2 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.61 (t, *J* = 4.6, 4.2 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.45 (s, 6H, CH<sub>3</sub>).

#### 1,13-Ditosyl-1,4,7,10,13-pentaoxatridecane (**12** (n = 3))の合成

500 mL ナスフラスコに回転子を入れ, 反応容器に Tetraethylene glycol (**11** (n = 3)) (19.6 g, 0.10 mol), *p*-toluenesulfonyl chloride (40.5 g, 0.21 mol), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300 mL)を加えた. これを氷浴に浸しながら攪拌させ, そこに粉状にした KOH (43.1 g, 0.77 mol)を少しずつ加え, 窒素置換したバルーン付きの三方コックを取り付け, 脱気窒素置換後, 0°C に保ったまま 3 時間攪拌した. 反応容器に H<sub>2</sub>O (160 mL)を加えた後, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 100 mL)で分液し, 有機層に Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて脱水した後, ヌツチェで濾過して少量の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>で洗い込み, 濾液を集めて, 濾液をロータリーエバポレーターで濃縮すると無色の油状物質が得られた(56.6 g, Yield quant.). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.78 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H, Ph), 7.33 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H, Ph), 4.15 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.67 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.52–3.61 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 2.44 (s, 6H, CH<sub>3</sub>).

#### 1,7-Diazido-4-oxaoctane (**13** (n = 1))の合成

回転子を入れた 300 mL ナスフラスコに **12** (n = 1) (56.9 g, 0.137 mol), tetrabutylammonium iodide (2.56 g, 6.93 mmol), sodium azide (37.8 g, 0.581 mol)をくわえ, さらに N<sub>2</sub>雰囲気下で DMF (200 mL)を加え, 三方コック, バルーンを取り付けて脱気及び窒素置換をした後, 80°C で 24 時間攪拌した. 反応容器を室温に戻した後, DMF を減圧蒸留し乳白色固体を得た. これに Et<sub>2</sub>O (300 mL)加えて不溶塩をヌツチェで濾過し, 濾液を H<sub>2</sub>O (3 × 100 mL)で分液した. 有機層に Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて脱水した後, 桐山漏斗で濾過して少量の Et<sub>2</sub>O で洗い込み, 濾液をロータリーエバポレーターで濃縮すると黄色

の油状物質が得られた(18.3 g, Yield 85%).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta/\text{ppm} = 3.70$  (t,  $J = 5.2, 5.2$  Hz, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 3.4 (t,  $J = 5.2, 5.2$  Hz, 4H,  $\text{CH}_2$ ).

#### 1,11-Diazido-3,6,9-trioxaundecane (**13** ( $n = 3$ ))の合成

**13** ( $n = 3$ )は, **13** ( $n = 1$ )と同様の手順で **12** ( $n = 3$ )を原料として合成し, 黄色の油状物質として得られた(Yield 85%).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta/\text{ppm} = 3.59\text{--}3.74$  (m, 12H,  $\text{CH}_2$ ), 3.40 (t,  $J = 5.2$  Hz, 4H,  $\text{CH}_2$ ).

#### 1-Amino-7-azido-4-oxaoctane (**14** ( $n = 1$ ))の合成

回転子を入れた 1000 mL ナスフラスコに **13** ( $n = 1$ ) (18.3 g, 117 mmol), EtOAc (165 mL), 1M HCl (208 mL)を加えた. 200mL 等圧滴下漏斗を取り付け, そこに triphenylphosphine (29.5 g, 112 mmol)を EtOAc (165 mL)に溶解させた溶液を入れ, 激しく攪拌しながらゆっくり滴下した. 12 時間後, 1000 mL 分液漏斗に反応溶液を移し, EtOAc 層を取り除き, 残った水層を EtOAc ( $3 \times 115$  mL)で分液洗浄した. EtOAc 層を取り除き, この水層の pH を 1 M NaOH 水溶液で 14 にした後,  $\text{CHCl}_3$  ( $3 \times 280$  mL)を加えて分液した.  $\text{CHCl}_3$  層に  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  を加えて脱水した後, ヌツチェで濾過して少量の  $\text{CHCl}_3$  で洗い込み, 濾液をロータリーエバポレーターで濃縮すると黄色の液体が得られた(15.1 g, Yield 99%).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta/\text{ppm} = 3.67$  (t,  $J = 5.2, 5.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.54 (t,  $J = 5.2, 5.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.40 (t,  $J = 5.2, 4.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.90 (t,  $J = 5.2, 4.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

#### 1-Amino-11-azido-3,6,9-trioxaundecane (**14** ( $n = 3$ ))の合成

**14** ( $n = 3$ )は, **14** ( $n = 1$ )と同様の手順で **13** ( $n = 3$ )を原料として合成し, 黄色の油状物質として得られた(Yield 82%).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta/\text{ppm} = 3.66\text{--}3.71$  (m, 8H,  $\text{CH}_2$ ), 3.61–3.66 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.51 (t,  $J = 5.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.40 (t,  $J = 5.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.87 (t,  $J = 5.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

#### *N*-(5-Azido-3-oxaocetyl)-3,5-diformyl-4-hydroxybenzamide (**17** ( $n = 1$ ))の合成

1000 mL ナスフラスコを氷浴に浸し, **16** (2.95 g, 15.2 mmol),  $\text{CHCl}_3$  (100 mL)を加えた. **14** ( $n = 1$ ) (6.6 g, 50.7 mmol)を  $\text{CHCl}_3$  (100 mL)に溶かして加えた後, EDC $\cdot$ HCl (9.75 g, 50.8 mmol)と  $\text{Et}_3\text{N}$  (7.2 mL, 51.6 mmol)を加えた. 脱気窒素置換後, 一晩攪拌した. その後, 1 M HCl (300 mL)を加えて室温で激しく攪拌した. TLC (シリカゲル, 展開溶媒: EtOAc/MeOH 10/1)で反応追跡して原料がほとんどないことを確認した後, 2000 mL 分液

漏斗に移して有機層を取り出した。有機層に  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  を加えて脱水した後、ヌッチェで濾過した。濾液を集めてロータリーエバポレーターで濃縮、真空乾燥した。これを  $\text{CHCl}_3$  (90 mL) に溶解させ、 $\text{H}_2\text{O}$  (3 × 30 mL) で分液洗浄した。有機層に  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  を加えて脱水した後、ヌッチェで濾過した。濾液をロータリーエバポレーターで濃縮、真空乾燥すると茶褐色の固体が得られた (3.37 g, Yield 72%)。 $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta/\text{ppm} = 11.9$  (s, H, OH), 10.3 (brs, 2H, CHO), 8.52 (s, 2H, Ph), 3.68–3.74 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ ), 3.42 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

#### ***N*-(11-Azido-3,6,9-trioxaundecanyl)-3,5-diformyl-4-hydroxybenzamide (17 (n = 3))の合成**

**17 (n = 3)** は、**17 (n = 1)** と同様の手順で **16** と **14 (n = 3)** を原料として合成し、茶褐色の固体として得られた (Yield 67%)。 $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta/\text{ppm} = 11.9$  (s, H, OH), 10.3 (brs, 2H, CHO), 8.52 (s, 2H, Ph), 3.62–3.75 (m, 14H,  $\text{CH}_2$ ), 3.37 (t,  $J = 5.0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

#### **5-((5-Azido-3-oxaoctyl)carbamoyl)-2-hydroxyisophthalic Acid (18 (n = 1))の合成**

300 mL ナスフラスコに回転子、**17 (n = 1)** (3.37 g, 11.0 mmol),  $\text{Ag}_2\text{O}$  (7.89 g, 34.1 mmol) を入れ、ここに  $\text{H}_2\text{O}$  (70 mL) に溶解させた  $\text{NaOH}$  (3.64 g, 90.9 mmol) を加えて  $60^\circ\text{C}$  で一晩攪拌した。これを最小量の hot  $\text{H}_2\text{O}$  で洗浄しながら桐山漏斗を用いて吸引濾過し、濾液を氷浴に浸しながら 12 M  $\text{HCl}$  を用いて pH を 1 にすると、白色沈殿が得られた。これを桐山漏斗で吸引濾過し、真空乾燥すると白色固体が得られた (3.23 g, Yield 87%)。 $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 8.56$  (t,  $J = 5.2$  Hz, H, NH), 8.48 (s, 2H, CH), 3.62 (t,  $J = 4.6, 5.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.56 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.40 (t,  $J = 4.6, 5.2$  Hz, 4H,  $\text{CH}_2$ ).

#### **5-((11-Azido-3,6,9-trioxaoctyl)carbamoyl)-2-hydroxyisophthalic Acid (18 (n = 3))の合成**

**18 (n = 3)** は、**18 (n = 1)** と同様の手順で **17 (n = 3)** を原料として合成し、白色固体として得られた (Yield 69%)。 $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta/\text{ppm} = 8.44$  (s, 2H, Ph), 3.56–3.80 (m, 14H,  $\text{CH}_2$ ), 3.38 (t,  $J = 4.8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

#### **5-((5-Azido-3-oxaoctyl)carbamoyl)-1,3-di((*N,N',N''*-4,7,10-tris(tert-butoxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecanyl)carbamoyl)-2-hydroxybenzene (19 (n = 1))の合成**

200 mL ナスフラスコに三方コック、バルーンを取り付けて真空乾燥した。反応容器に **18 (n = 1)** (2.40 g, 5.08 mmol), *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA, 1.7 mL, 9.90 mmol), DMF (20 mL) を加えて溶かした。そこに DMF (10 mL) に溶かした *N,N',N''*-4,7,10-Tris(tert-

butoxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (**10**) (530 mg, 1.57 mmol), 1-[bis(dimethylamino)methylene]-1H-benzotriazolium 3-oxide tetrafluoroborate (TBTU, 1.50 g, 4.67 mmol)を加えた。脱気及び窒素置換した後、室温で遮光して一晩攪拌させた。ロータリーエバポレーターで濃縮すると褐色液体が得られた。これにH<sub>2</sub>O (60 mL)を加え、CHCl<sub>3</sub> (4 × 60 mL)で分液した。有機層にNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて脱水し、ヌッチェで濾過した後、真空乾燥すると茶色の固体が得られた。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (gradient from EtOAc to EtOAc/MeOH 10/1)で精製した。目的物が入っているフラクションを集めてロータリーエバポレーターで濃縮し、真空乾燥すると褐色固体が得られた (1.39 g, Yield 71%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.86 (s, 2H, Ph), 3.33–3.70 (m, 38H, CH<sub>2</sub>), 3.36 (t, *J* = 5.2, 4.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.28–1.52 (m, 54H, CH<sub>3</sub>). ESI MS (MeOH *m/z*, positive mode). Calcd for [**19** (*n* = **1**) + 2Na]<sup>2+</sup>: 646.4. Found: 646.1. Calcd for [**19** (*n* = **1**) + Na]<sup>+</sup>: 1269.7. Found: 1269.1.

#### 5-((11-Azido-3,6,9-trioxaundecanyl)carbamoyl)-1,3-di((*N,N',N''*-4,7,10-tris(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecanyl)carbamoyl)-2-hydroxybenzene (**19** (*n* = **3**))の合成

**19** (*n* = **3**)は、**19** (*n* = **1**)と同様の手順で**10**と**18** (*n* = **3**)を原料として合成し、褐色固体として得られた (Yield 49%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 7.87 (s, 2H, Ph), 3.21–3.83 (m, 48H, CH<sub>2</sub>), 1.26–1.53 (m, 54H, CH<sub>3</sub>). ESI MS (MeOH *m/z*, positive mode). Calcd for [**19** (*n* = **3**) + 2Na]<sup>2+</sup>: 690.4. Found: 690.2. Calcd for [**19** (*n* = **3**) + Na]<sup>+</sup>: 1357.8. Found: 1357.4.

#### 5-((2-(2-Aminoethoxy)ethyl)carbamoyl)-1,3-di((*N,N',N''*-4,7,10-tris(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecanyl)carbamoyl)-2-hydroxybenzene (**20** (*n* = **1**))の合成

200 mL ナスフラスコに窒素置換したバルーン付きの三方コックを取り付け、回転子と**19** (*n* = **1**) (301 mg, 0.241 mmol), 10% Pd-C (275 mg)を入れ、MeOH (15 mL)を加えた。反応容器全体をよく脱気窒素置換した後、脱気水素置換し、水素雰囲気下で一晩攪拌した。反応の進行をESI-MSスペクトルで追跡して原料がないことを確認した後、セライト濾過を行い、濾液をロータリーエバポレーターで濃縮した。これを真空乾燥すると白色固体が得られた (266 mg, Yield 90%). ESI MS (MeOH *m/z*, positive mode). Calcd for [**20** (*n* = **1**) + H]<sup>+</sup>: 1221.7. Found: 1221.1.

**5-((11-Amino-3,6,9-trioxaundecanyl)carbamoyl)-1,3-di((*N,N',N''*-4,7,10-tris(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecanyl)carbamoyl)-2-hydroxybenzene (**20** (*n* = 3))の合成**

**20** (*n* = 3)は、**20** (*n* = 1)と同様の手順で**19** (*n* = 3)を原料として合成し、白色固体として得られた(Yield 93%). ESI MS (MeOH *m/z*, positive mode). Calcd for [**20** (*n* = 1) + H]<sup>+</sup>: 1309.8. Found: 1309.8.

**5-((2-(2-(Carbamoyl-9-phenanthrene)ethoxy)ethyl)carbamoyl)-1,3-di((*N,N',N''*-4,7,10-tris(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecanyl)carbamoyl)-2-hydroxybenzene (**21** (*n* = 1))の合成**

100 mL ニ口ナスフラスコに回転子、**20** (*n* = 1) (169 mg, 0.138 mmol)を入れ、THF (10 mL)に溶かした後、Et<sub>3</sub>N (86 μL)を加えた。それを、氷浴中で激しく攪拌しながら Phenanthrene-9-carbonyl chloride (**8**) (34.0 mg, 0.141 mmol)を THF (10 mL)に溶かしたものをパストゥールでゆっくりと加えた。脱気窒素置換後、氷浴に浸しながら攪拌した。1時間攪拌後、室温で一晩攪拌した。ロータリーエバポレーターで THF を留去すると、黒色の固体が得られた。その固体を CHCl<sub>3</sub> (100 mL)に溶かし H<sub>2</sub>O (3 × 30 mL)で分液し、有機層に Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて脱水した。濾過後、エバポレーターで濾液を濃縮すると褐色固体が得られた。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (gradient from CHCl<sub>3</sub> to CHCl<sub>3</sub>/MeOH 10/1)で精製した。目的物が入っているフラクションを集めてロータリーエバポレーターで濃縮し、真空乾燥すると白色固体が得られた(115 mg, Yield 58%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 8.71 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Phen5), 8.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Phen4), 8.35 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Phen1), 7.90 (s, 1H, Phen10), 7.89 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, Phen8), 7.82 (s, 2H, Ph), 7.60–7.72 (m, 4H, Phen2, Phen3, Phen6, Phen7), 3.30–3.81 (m, 40H, CH<sub>2</sub>), 1.26–1.52 (m, 54H, CH<sub>3</sub>). ESI MS (MeOH *m/z*, positive mode). Calcd for [**21** (*n* = 1) + 2Na]<sup>2+</sup>: 735.4. Found: 735.1. Calcd for [**21** (*n* = 1) + Na]<sup>+</sup>: 1447.8. Found: 1447.2.

**5-(9-phenanthrene-11-carbamoyl-3,6,9-trioxaundecanyl)carbamoyl)-1,3-di((*N,N',N''*-4,7,10-tris(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecanyl)carbamoyl)-2-hydroxybenzene (**21** (*n* = 3))の合成**

**21** (*n* = 3)は、**21** (*n* = 1)と同様の手順で**8**と**20** (*n* = 3)を原料として合成し、白色固体として得られた(Yield 81%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 8.71 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Phen4), 8.68 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Phen5), 8.36 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Phen8), 7.92 (s, 1H, Phen10), 7.90 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Phen1), 7.83 (s, 2H, Ph), 7.58–7.74 (m, 4H, Phen2, Phen3, Phen6, Phen7), 3.06–3.87 (m, 48H, CH<sub>2</sub>), 1.26–1.53 (m, 54H, CH<sub>3</sub>). ESI MS (MeOH *m/z*, positive mode). Calcd for [**21** (*n* = 3) + 2Na]<sup>2+</sup>: 779.4. Found: 779.0. Calcd for [**21** (*n* = 3) + Na]<sup>+</sup>: 1535.8. Found: 1535.5.

**[3,5-di(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-carboxamide)-4-hydroxybenzenecarboxy]-(phenanthrene-9-carboxy)-3-oxapentane -1,5-*N,N'*-diamide•6HCl (HL1<sup>P1</sup>•6HCl)の合成**

100 mL ナスフラスコに**21** (*n* = 1) (699 mg, 0.490 mmol)を入れ、EtOH (6 mL)に溶かした。12 M HCl (2 mL)をゆっくりと加えた後、一晩攪拌した。析出した白色固体を少量のEtOHで洗いながら回収し、真空乾燥すると白色固体が得られた(449 mg, Yield 88%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ/ppm = 8.88 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Phen4), 8.84 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Phen5), 8.11 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Phen8), 8.08 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Phen1), 7.93 (s, 1H, Phen10), 7.90 (s, 2H, Ph), 7.64–7.86 (m, 4H, Phen2, Phen3, Phen6, Phen7), 2.65–3.93 (m, 40H, CH<sub>2</sub>). ESI MS (H<sub>2</sub>O *m/z*, positive mode). Calcd for [HL1<sup>P1</sup> + 2H]<sup>2+</sup>: 413.2. Found: 413.0. Calcd for [HL1<sup>P1</sup> + H]<sup>+</sup>: 825.5. Found: 825.1.

**[3,5-di(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-carboxamide)-4-hydroxybenzenecarboxy]-(phenanthrene-9-carboxy)-3,6,9-trioxaundecane-1,11-*N,N'*-diamide•6HCl (HL1<sup>P3</sup>•6HCl)の合成**

HL1<sup>P3</sup>•6HClは、HL1<sup>P1</sup>•6HClと同様の手順で**21** (*n* = 3)を原料として合成し、白色固体として得られた(Yield 85%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ/ppm = 8.87 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Phen4), 8.82 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Phen5), 8.17 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Phen8), 8.05 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Phen1), 8.02 (s, 1H, Phen10), 7.75 (s, 2H, Ph), 7.69–7.83 (m, 4H, Phen2, Phen3, Phen6, Phen7), 2.90–3.90 (m, 48H, CH<sub>2</sub>). ESI MS (H<sub>2</sub>O *m/z*, positive mode). Calcd for [HL1<sup>P3</sup> + 2H]<sup>2+</sup>: 457.3. Found: 457.2. Calcd for [HL1<sup>P3</sup> + 2H]<sup>2+</sup>: 457.3. Found: 457.3. [HL1<sup>P3</sup> + H]<sup>+</sup>: 913.5. Found: 913.5.

**5-((Me-5-carbamoyl-3-oxaoctyl)carbamoyl)-1,3-di((N,N',N''-4,7,10-tris(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecanyl)carbamoyl)-2-hydroxybenzene (22 (n = 1)).**

100 mL ナスフラスコに **20 (n = 1)** (200 mg, 0.164 mmol) と  $K_2CO_3$  (70.0 mg, 0.506 mol) を入れ,  $CH_2Cl_2$  (5 mL) に溶かした. そこに,  $CH_2Cl_2$  (5 mL) に溶解させた acetyl chloride (35.0  $\mu$ L, 0.493 mmol) を加え, 窒素置換した. 一晩攪拌した後, 濾過した. 濾液を  $H_2O$  (3  $\times$  10 mL) で分液し, 有機層に  $Na_2SO_4$  を加えて脱水した. 濾過後, エバポレーターで濾液を濃縮すると褐色固体が得られた. これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (gradient from EtOAc to EtOAc / MeOH 10/1) で精製した. 目的物が入っているフラクションを集めてロータリーエバポレーターで濃縮し, 真空乾燥すると白色固体が得られた (103 mg, Yield 50%).  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ /ppm = 7.86 (s, 2H, Ph), 3.41–3.56 (m, 40H,  $CH_2$ ), 2.01 (s, 3H,  $CH_3$ ), 1.26–1.67 (m, 54H,  $CH_3$ ). ESI MS (MeOH *m/z*, positive mode). Calcd for [**22 (n = 1)** + 2Na] $^{2+}$ : 654.3. Found: 654.0. Calcd for [**22 (n = 1)** + Na] $^{+}$ : 1285.7. Found: 1285.5.

**5-((Me-9-carbamoyl-3,6-dioxaoctyl)carbamoyl)-1,3-di((N,N',N''-4,7,10-tris(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecanyl)carbamoyl)-2-hydroxybenzene (22 (n = 2)).**

**22 (n = 2)** は, **22 (n = 1)** と同様の手順で **20 (n = 1)** を原料として合成し, 白色固体として得られた (Yield 45%).  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ /ppm = 7.88 (s, 2H, Ph), 3.35–3.66 (m, 44H,  $CH_2$ ), 1.95 (s, 3H,  $CH_3$ ), 1.30–1.54 (m, 54H,  $CH_3$ ). ESI MS (MeOH *m/z*, positive mode). Calcd for [**22 (n = 2)** + 2Na] $^{2+}$ : 676.4. Found: 676.0. Calcd for [**22 (n = 2)** + Na] $^{+}$ : 1329.7. Found: 1329.5.

**5-((Me-11-carbamoyl-3,6,9-trioxaoctyl)carbamoyl)-1,3-di((N,N',N''-4,7,10-tris(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecanyl)carbamoyl)-2-hydroxybenzene (22 (n = 3)).**

**22 (n = 3)** は, **22 (n = 1)** と同様の手順で **20 (n = 3)** を原料として合成し, 白色固体として得られた (Yield 48%).  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$ /ppm = 7.86 (s, 2H, Ph), 3.36–3.63 (m, 48H,  $CH_2$ ), 1.95 (s, 3H,  $CH_3$ ), 1.25–1.49 (m, 54H,  $CH_3$ ). ESI MS (MeOH *m/z*, positive mode). Calcd for [**22 (n = 3)** + 2Na] $^{2+}$ : 698.4. Found: 698.0. Calcd for [**22 (n = 3)** + Na] $^{+}$ : 1373.8. Found: 1373.5.

**[3,5-di(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-carboxamide)-4-hydroxybenzenecarboxy]-(Mecarboxy)-3-oxapentane-1,5-*N,N'*-diamide•6HCl (HL1<sup>M1</sup>•6HCl)の合成**

HL1<sup>M1</sup>•6HCl は、HL1<sup>P1</sup>•6HCl と同様の手順で **22** ( $n = 1$ )を原料として合成し、白色固体として得られた(Yield 90%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$ /ppm = 7.86 (s, 2H, Ph), 3.07–3.90 (m, 40H, CH<sub>2</sub>), 1.96 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). ESI MS (H<sub>2</sub>O  $m/z$ , positive mode). Calcd for [HL1<sup>M1</sup> + 2H]<sup>2+</sup>: 332.2. Found: 332.0. [HL1<sup>M1</sup> + H]<sup>+</sup>: 663.4. Found: 663.2.

**[3,5-di(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-carboxamide)-4-hydroxybenzenecarboxy]-(Mecarboxy)-3,6-dioxaoctane-1,9-*N,N'*-diamide•6HCl (HL1<sup>M2</sup>•6HCl)の合成**

HL1<sup>M2</sup>•6HCl は、HL1<sup>P1</sup>•6HCl と同様の手順で **22** ( $n = 2$ )を原料として合成し、白色固体として得られた(Yield 95%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$ /ppm = 7.96 (s, 2H, Ph), 3.04–3.94 (m, 44H, CH<sub>2</sub>), 1.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). ESI MS (H<sub>2</sub>O  $m/z$ , positive mode). Calcd for [HL1<sup>M2</sup> + 2H]<sup>2+</sup>: 354.2. Found: 354.0. [HL1<sup>M2</sup> + H]<sup>+</sup>: 707.5. Found: 707.3.

**[3,5-di(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-carboxamide)-4-hydroxybenzenecarboxy]-(Mecarboxy)-3,6,9-trioxaundecane-1,11-*N,N'*-diamide•6HCl (HL1<sup>M3</sup>•6HCl)の合成**

HL1<sup>M3</sup>•6HCl は、HL1<sup>P1</sup>•6HCl と同様の手順で **22** ( $n = 3$ )を原料として合成し、白色固体として得られた(Yield 98%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$ /ppm = 7.90 (s, 2H, Ph), 3.09–3.95 (m, 48H, CH<sub>2</sub>), 1.99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). ESI MS (H<sub>2</sub>O  $m/z$ , positive mode). Calcd for [HL1<sup>M3</sup> + 2H]<sup>2+</sup>: 376.2. Found: 376.0. [HL1<sup>M3</sup> + H]<sup>+</sup>: 751.5. Found: 751.3.

**二核銅(II)錯体 1<sup>P1</sup>の合成**

100 mL ナスフラスコに HL1<sup>P1</sup>•6HCl (103 mg, 99.0  $\mu$ mol)を入れ、1 M NaOH を加えて pH が 8 以上であることを確認した後、1 時間真空乾燥した。その後多量の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を加えた。Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えて脱水した後、セライト濾過した。濾液をロータリーエバポレーターで濃縮、真空乾燥すると白色固体が得られた(57.2 mg, 70%)。

次に、100 mL ニ口ナスフラスコに回転子を入れ、H<sub>2</sub>O (200  $\mu$ L)に溶解させた Cu(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O (36.4 mg, 139  $\mu$ mol)を加えた。そこに N<sub>2</sub> フローしながら H<sub>2</sub>O (200  $\mu$ L)に溶解させた先程の白色固体をパスツールでゆっくりと加え、さらに 1 M NaOH を加えて pH を 8 にした。ESI MS スペクトルで配位子が残っていないことを確認した後、ロータリーエバポレーターで濃縮した。MeOH (200  $\mu$ L)を加えて溶かした後、多量の Et<sub>2</sub>O を加えると緑色固体が析出した。これを濾過し、真空乾燥すると緑色固体が得られた(65.5 mg,

81%). Anal. Calcd for  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{L1}^{\text{P1}})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{NaClO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ : C, 38.82; H, 5.03; N, 10.29. Found: C, 38.96; H, 4.96; N, 9.81. ESI MS ( $\text{H}_2\text{O}$   $m/z$ , positive mode). Calcd for  $[\text{1}^{\text{P1}} - \text{OH} - 2\text{ClO}_4 - \text{H}]^{2+}$ : 474.2. Found: 474.0. Calcd for  $[\text{1}^{\text{P1}} - 2\text{ClO}_4]^{2+}$ : 483.2. Found: 483.1. Calcd for  $[\text{1}^{\text{P1}} - \text{ClO}_4]^+$ : 1065.3. Found: 1065.0. IR (KBr):  $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 2870, 1628, 1533, 1443, 1362, 1300, 1273, 1090, 953, 932, 837, 810, 781, 756, 729, 691, 654, 623$ .

### 二核銅(II)錯体 $\mathbf{1}^{\text{P3}}$ の合成

$\mathbf{1}^{\text{P3}}$  は、 $\mathbf{1}^{\text{P1}}$  と同様の手順で  $\text{HL1}^{\text{P3}} \cdot 6\text{HCl}$  を原料として合成し、緑色固体として得られた (Yield 75%). Anal. Calcd for  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{L1}^{\text{P3}})](\text{ClO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ : C, 41.20; H, 6.05; N, 10.01. Found: C, 41.39; H, 5.59; N, 10.2. ESI MS ( $\text{H}_2\text{O}$   $m/z$ , positive mode). Calcd for  $[\text{1}^{\text{P3}} - 2\text{ClO}_4]^{2+}$ : 527.2. Found: 527.1.  $[\text{1}^{\text{P3}} - \text{ClO}_4]^+$ : 1153.31. Found: 1153.32. IR (KBr):  $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3744\text{--}3134, 2928, 2878, 2020, 1726, 1632, 1537, 1443, 1360, 1300, 1273, 1246, 1076, 1001, 988, 953, 930, 839, 812, 786, 756, 731, 700, 656, 623$ .

### 二核銅(II)錯体 $\mathbf{1}^{\text{M1}}$ の合成

$\mathbf{1}^{\text{M1}}$  は、 $\mathbf{1}^{\text{P1}}$  と同様の手順で  $\text{HL1}^{\text{M1}} \cdot 6\text{HCl}$  を原料として合成し、緑色固体として得られた (Yield 90%). Anal. Calcd for  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{L1}^{\text{M1}})](\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : C, 33.46; H, 5.98; N, 12.59. Found: C, 33.70; H, 6.23; N, 12.85. ESI MS ( $\text{H}_2\text{O}$   $m/z$ , positive mode). Calcd for  $[\text{1}^{\text{M1}} - 2\text{ClO}_4]^{2+}$ : 402.1. Found: 402.0. Calcd for  $[\text{1}^{\text{M1}} - \text{ClO}_4]^+$ : 903.2. Found: 903.0. IR (KBr):  $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 2908, 2029, 1624, 1539, 1437, 1364, 1302, 1271, 1082, 988, 930, 880, 850, 837, 812, 790, 766, 692, 667, 648, 625$ .

### 二核銅(II)錯体 $\mathbf{1}^{\text{M2}}$ の合成

$\mathbf{1}^{\text{M2}}$  は、 $\mathbf{1}^{\text{P1}}$  と同様の手順で  $\text{HL1}^{\text{M2}} \cdot 6\text{HCl}$  を原料として合成し、緑色固体として得られた (Yield 73%). Anal. Calcd for  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{L1}^{\text{M2}})](\text{ClO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ : C, 35.36; H, 5.93; N, 12.50. Found: C, 35.08; H, 6.00; N, 12.25. ESI MS ( $\text{H}_2\text{O}$   $m/z$ , positive mode). Calcd for  $[\text{1}^{\text{M2}} - \text{OH} - 2\text{ClO}_4 - \text{H}]^{2+}$ : 415.1. Found: 414.9. Calcd for  $[\text{1}^{\text{M2}} - 2\text{ClO}_4]^{2+}$ : 424.2. Found: 424.0. Calcd for  $[\text{1}^{\text{M2}} - \text{ClO}_4]^+$ : 947.3. Found: 947.0. IR (KBr):  $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 2875, 2054, 1628, 1547, 1445, 1368, 1302, 1275, 1083, 950, 932, 840, 810, 785, 772, 690, 654, 620$ .

## 二核銅(II)錯体 $1^{M3}$ の合成

$1^{M3}$  は,  $1^{P1}$  と同様の手順で  $HL1^{M3} \cdot 6HCl$  を原料として合成し, 緑色固体として得られた (Yield 80%). Anal. Calcd for  $[Cu_2(\mu-OH)(L1^{M3})](ClO_4)_2 \cdot 3H_2O$ : C, 36.65; H, 5.98; N, 12.21. Found: C, 36.55; H, 6.02; N, 12.30. ESI MS ( $H_2O$   $m/z$ , positive mode). Calcd for  $[1^{M3} - OH - 2ClO_4 - H]^{2+}$ : 437.2. Found: 437.0. Calcd for  $[1^{M3} - 2ClO_4]^{2+}$ : 446.2. Found: 446.0. Calcd for  $[1^{M3} - ClO_4]^+$ : 991.3. Found: 991.0. IR (KBr):  $\tilde{\nu}/cm^{-1} = 2905, 2054, 1628, 1553, 1445, 1360, 1275, 1085, 935, 885, 850, 805, 700, 654, 613$ .

### 3-5-4. EtBr 法

EtBr (3.3  $\mu M$ ), ct-DNA (20  $\mu M$  bp), NaCl (10 mM), buffer (pH 6.0 (MES), 10 mM) となるように調整した. この溶液に, NaCl (10 mM), buffer (pH 6.0 (MES (10 mM))) に溶解させた  $1^X$  を 400  $\mu M$  になるまで 2  $\mu M$  の間隔で加えた. 37°C, 510 nm で励起した蛍光スペクトルは, 520–800 nm の範囲で追跡した. 結合定数  $K_{app}$  ( $M^{-1}$ ) は, 以下に示す式(1)を用いて計算した. [complex] は EtBr の蛍光強度が 50% 減少した時の溶液中の  $1^X$  の濃度,  $K_{EtBr} = 1.1 \times 10^7 M^{-1}$ , [EtBr] = 1.65  $\mu M$  を用いた.

$$K_{EtBr}[EtBr] = K_{app}[complex] \quad (1)$$

### 3-5-5. DNA 切断実験

$1^X$  の DNA 切断活性は, pUC19 DNA を用い, アガロースゲル電気泳動法によって評価した. 1.5 mL エッペンチューブに NaCl (10 mM), buffer (pH 6.0 (MES), 10 mM), pUC19 DNA (50  $\mu M$  bp),  $1^X$  (0–50  $\mu M$ ),  $H_2O_2$  (0–500  $\mu M$ ) となるように調製した溶液を加え, 37°C の暗所でインキュベーションした. 0, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, 300 分毎にサンプルを採取し, loading buffer (0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol FF, 1.0 mM EDTA and 30% glycerol) を用いて反応をクエンチした. 各サンプルを TAE buffer (Tris/acetate/EDTA) を用いて作成した 1% アガロースゲルにローディングし, 100 V で約 1 時間電気泳動を行った. その後, EtBr (0.5  $\mu g \mu L^{-1}$ ) 染色を 1 時間行い, VILBER LOURMAT E-BOX-CX5.TS Edge-20.M を用いてゲルバンドを撮影した. 撮影したバンドを, Form I の染色補正值 1.06 を用い, ImageJ ソフトウェアによって解析を行った. この測定は最低 3 回行い, 再現性をとった.

阻害剤存在下における  $1^{P1}$  の DNA 切断活性は, 1.5 mL エッペンチューブに NaCl (10 mM), buffer (pH 6.0 (MES), 10 mM), pUC19 DNA (50  $\mu M$  bp),  $1^{P1}$  (50  $\mu M$ ),  $H_2O_2$  (500  $\mu M$ ),

阻害剤(DMSO または KI, 1–10 mM)となるように調製した溶液を用いて, 前述の阻害剤非存在下と同様の操作を行うことで評価した.

### 3-5-6. $\mu$ -1,1-hydroperoxodicopper(II)種形成の確認

$1^{P1}$ ,  $1^{P3}$  の MeCN 溶液(0.25 mM)を 2 面セルに入れ,  $-30 \pm 0.2^\circ\text{C}$  に保った. そこに  $\text{H}_2\text{O}_2$  の MeCN 溶液(錯体に対して 10 eq)を加え, 290–850 nm の範囲でスペクトルを追跡した.

また,  $1^{P1}$ ,  $1^{P3}$  の水溶液に  $\text{H}_2^{16}\text{O}_2$  または  $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$  水溶液を加えた際の変化を CSI MS で追跡した.

### 3-5-7. 細胞株とその培養条件

HeLa (ヒト子宮頸がん細胞)は同志社大学 北岸研究室(京都, 日本)から譲り受けた. A549 (ヒト肺がん細胞), WI-38 (ヒト肺正常細胞), PK-59 (ヒト膵臓がん細胞)および 2C6 (ヒト膵臓正常細胞)は理化学研究所 バイオリソース研究センター(BRC)(茨城, 日本)から購入した. HeLa 細胞, A549 細胞, WI-38 細胞および PK-59 細胞は, 牛胎児血清(fetal bovine serum, FBS) (10%), penicillin ( $100 \text{ units mL}^{-1}$ ), streptomycin ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ )を加えた Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, high glucose), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, low glucose), Minimum Essential Medium Eagle (MEM)または Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640)培養液をそれぞれ用いて, 5%  $\text{CO}_2$  濃度,  $37^\circ\text{C}$  の条件下で培養した. 2C6 細胞は, 新生仔ウシ血清(newborn calf serum) (10%), 牛胎児血清(fetal bovine serum, FBS) (5%), 馬血清(horse serum) (2.5%), penicillin ( $100 \text{ units mL}^{-1}$ ), streptomycin ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ )を加えた Mixture F-10 Ham (HamF10)培養液を用いて, 5%  $\text{CO}_2$  濃度,  $37^\circ\text{C}$  の条件下で培養した.

### 3-5-8. 3-(4,5-dimethylthiazole)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

96 well プレートに blank として培地のみを 1 列と, 培地に  $10 \times 10^4 \text{ cells/mL}$  になるように懸濁させた細胞を 1 well につき  $100 \mu\text{L}$  ずつ control と錯体のサンプル数分の列に蒔き, 5%  $\text{CO}_2$  濃度,  $37^\circ\text{C}$  の条件下でインキュベーションした. HeLa 細胞と A549 細胞に関しては 24 時間後, WI-38 細胞と PK-59 細胞, 2C6 細胞に関しては 48 時間後, 培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄した. その後, サンプル列にはそれぞれの濃度に調製した  $1^X$  および  $\text{HL}1^X$  のサンプル( $1-1,000 \mu\text{M}$ )を, blank と control 列には培地のみを 1 well につき  $100 \mu\text{L}$  ずつ加え, インキュベーションした. 24 時間および 48 時間後, 培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄し, MTT reagent ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$ )と培地を 1:9 の割合で混合させた溶液を

1 well につき 100  $\mu\text{L}$  ずつ加え再度インキュベーションした。3 時間後、アスピレーターで溶液を吸引した後、生体用 DMSO を 1 well につき 100  $\mu\text{L}$  ずつ加えた。3 分間シェイクして沈殿したホルマザンを完全に溶解させた後、570 nm の吸光度を吸光度測定器で測定した。この結果より、 $1^{\text{x}}$  の細胞増殖 50% 阻害濃度 (50% Inhibition Concentration,  $\text{IC}_{50}$  値) を算出した。この測定は最低 3 回行い、再現性をとった。

### 3-5-9. ICP MS による HeLa 細胞内の銅イオン濃度の定量

観察用ディッシュ ( $\phi 60 \text{ mm}$ ) に  $2.5 \times 10^5 \text{ cells/mL}$  に調製した HeLa 細胞の懸濁液を 4 mL 加え、5%  $\text{CO}_2$  濃度、 $37^\circ\text{C}$  の条件下で 24 時間インキュベーションした。培地を除いて、PBS(-) で 2 回洗浄し、 $1^{\text{x}}$  を溶解させた培地溶液 (25  $\mu\text{M}$ , 4 mL) を加えた。5%  $\text{CO}_2$  濃度、 $37^\circ\text{C}$  の条件下で 24 時間および 48 時間インキュベーションした。培地を除いて PBS(-) で 2 回洗浄した後、trypsin (0.25%) で細胞をはがして 15 mL の遠沈管に移した。遠心分離し、溶液をアスピレーターで吸引した。PBS(-) (1 mL) を加えて懸濁させ、再度遠心分離した。溶液をアスピレーターで吸引した後、PBS(-) (500  $\mu\text{L}$ ) を加えて懸濁させた。セルカウンターで細胞数を数えて、 $1 \times 10^6 \text{ cells}$  分の細胞溶液を新しい 15 mL の遠沈管に移して凍結乾燥した。細胞を超微量分析用 70%  $\text{HNO}_3$  水溶液 (250  $\mu\text{L}$ ) に溶かしてオークリッジ遠心管 Teflon<sup>®</sup> FEP (10 mL) に移した後、 $60^\circ\text{C}$  で 3 時間加熱処理をした。その後、そこに  $\text{H}_2\text{O}$  (250  $\mu\text{L}$ ) を加えた。この細胞溶液 ( $2 \times 10^9 \text{ cells/L}$ , 35%  $\text{HNO}_3$ ) を ICP MS-2030 で測定し、細胞内の銅を定量した。ICP MS-2030 による測定は、島津製作所に委託した。

### 3-5-10. 親水性フラスコ振盪法による分配係数 ( $\log P_{\text{ow}}$ ) の測定

$1^{\text{x}}$  の分配係数 ( $\log P_{\text{ow}}$ ) をフラスコ振盪法によって評価した。まず、測定に使用する  $\text{H}_2\text{O}$  および 1-octanol は両者を混合して一晩攪拌し、飽和状態にした。 $1^{\text{x}}$  の水溶液 (0.1 mM, 3 mL) に 1-octanol (3 mL) を加えて、4 時間攪拌した。その後、1-octanol 溶液と  $\text{H}_2\text{O}$  に分離し、それぞれの溶液の電子スペクトルを測定した。それぞれの溶液に溶解した錯体濃度の算出には本文中の  $\epsilon$  をそれぞれ用いた。算出した錯体濃度  $C_w, C_o$  を用いて、式(2)よりそれぞれの錯体の  $\log P_{\text{ow}}$  を算出した。

$$\log P_{\text{ow}} = \log \frac{C_o}{C_w} \quad (2)$$

### 3-5-11. 共焦点顕微鏡による細胞内イメージング

観察用ディッシュ( $\phi 14$  mm)に  $6 \times 10^4$  cells/mL に調製した HeLa 細胞の懸濁液を 600  $\mu$ L 加え、5% CO<sub>2</sub> 濃度、37°C の条件下で 24 時間インキュベーションした。培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄し、 $1^{PI-3}$  を溶解させた培地溶液(200  $\mu$ M, 600  $\mu$ L)を加えた。5%CO<sub>2</sub> 濃度、37°C の条件下で 24 時間インキュベーションした後、培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄した。そこに、ミトコンドリアの染色剤として Mito Tracker™ Deep Red FM (Thermo Fisher)(50 nM, 600  $\mu$ L)を培地に加えた。さらに、5% CO<sub>2</sub> 濃度、37°C の条件下で 10 分間インキュベーションした後、培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄した。そこに培地を加え、共焦点レーザー顕微鏡で細胞を観察した。Mito Tracker™ Deep Red FM の観察には 638 nm、 $1^{PI-3}$  の観察には 405 nm の励起レーザーを用いた。

### 3-5-12. Apoptosis assay

6 well プレートに HeLa 細胞を 1 well につき  $3 \times 10^5$  cells ずつ、サンプル数分の well に加え、5% CO<sub>2</sub> 濃度、37°C の条件下で 24 時間インキュベーションした。培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄し、 $1^X$  の培地溶液(24 時間作用時の各 IC<sub>50</sub> 値)を 1 well につき 2 mL ずつ加えた。5% CO<sub>2</sub> 濃度、37°C の条件下で 1 および 12 時間インキュベーションした後、培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄し、trypsin (0.25%)で細胞をはがした。はがした細胞を 1.5 mL のエッペンチューブに移し、遠心分離(1200 rpm, 2 min)した後、溶液をアスピレーターで吸引した。集めた細胞に PBS(-) (1 mL)を加えて懸濁させ、再度遠心分離した。溶液をアスピレーターで吸引した後、 $1 \times$  BB 溶液(1 mL)を加えて懸濁させた。遠心分離し、溶液をアスピレーターで吸引した後、 $1 \times$  BB 溶液を加えて  $1 \times 10^6$  cells/mL に調製した。その細胞溶液 100  $\mu$ L に Annexin V-FITC 溶液(5  $\mu$ L)を混合して、室温で 10 分間インキュベート後、遠心分離し、アスピレーターで溶液を吸引した。そこに、 $1 \times$  BB 溶液(500  $\mu$ L)を加えて懸濁させ、遠心分離し、アスピレーターで溶液を吸引した。 $1 \times$  BB 溶液(200  $\mu$ L)を細胞に加えて懸濁させ、PI (5  $\mu$ L)を混合した。この細胞溶液を Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer を用いて観察した。ゲート内の細胞数は 10,000 cells とした。Annexin V-FITC には blue (488 nm)レーザーの channel BL1 (Filter 530/30, Filter Range 515/545), PI には blue (488 nm)レーザーの channel BL2 (Filter 574/26, Filter Range 561/587)を用いた。

### 3-5-13. Caspase-9 活性

6 well プレートに HeLa 細胞を 1 well につき  $3 \times 10^5$  cells ずつ、サンプル数分の well に加え、5% CO<sub>2</sub> 濃度、37°C の条件下で 24 時間インキュベーションした。培地を除いて PBS(-) で 2 回洗浄し、1<sup>x</sup> の培地溶液(97.3 μM, 24 時間作用時の 1<sup>P1</sup> の IC<sub>50</sub> 値)を 1 well につき 2 mL ずつ加えた。それらを 5% CO<sub>2</sub> 濃度、37°C の条件下で 1 および 12 時間インキュベーションした後、培地を除いて PBS(-) で 2 回洗浄し、trypsin (0.25%) で細胞をはがした。はがした細胞を 1.5 mL のエッペンチューブに移し、遠心分離(1200 rpm, 2 min)をした後、溶液をアスピレーターで吸引した。集めた細胞に培地(1 mL)を加えて懸濁させ、再度遠心分離した。溶液をアスピレーターで吸引した後、培地を加えて  $1 \times 10^6$  cells/mL に調製した。その細胞溶液に FITC-LEHD-FK (1 μL/細胞懸濁液 300 μL)を混合し、暗室、37°C で 60 分間インキュベートした。遠心分離(3000 rpm, 5 min)した後、アスピレーターで溶液を吸引した。そこに、Wash Buffer (500 μL)を加えて懸濁させ、再度遠心分離した。溶液をアスピレーターで吸引した後、Wash Buffer (500 μL)を加えて懸濁させた。この細胞溶液を Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer を用いて観察した。ゲート内の細胞数は 10,000 cells とした。FITC-LEHD-FK には blue (488 nm)レーザーの channel BL1 (Filter 530/30, Filter Range 515/545)を用いた。この測定は最低 5 回行い、再現性を取った。

### 3-5-14. Caspase-3/7 活性

6 well プレートに HeLa 細胞を 1 well につき  $3 \times 10^5$  cells ずつ、サンプル数分の well に加え、5% CO<sub>2</sub> 濃度、37°C の条件下で 24 時間インキュベーションした。培地を除いて PBS(-) で 2 回洗浄し、1<sup>x</sup> の培地溶液(97.3 μM, 24 時間作用時の 1<sup>P1</sup> の IC<sub>50</sub> 値)を 1 well につき 2 mL ずつ加えた。5% CO<sub>2</sub> 濃度、37°C の条件下で 1 および 12 時間インキュベーションした後、培地を除いて PBS(-) で 2 回洗浄し、trypsin (0.25%) で細胞をはがした。はがした細胞を 1.5 mL のエッペンチューブに移し、遠心分離(1200 rpm, 2 min)した後、溶液をアスピレーターで吸引した。集めた細胞に PBS(-) (1 mL)を加えて懸濁させ、再度遠心分離した。溶液をアスピレーターで吸引した後、PBS(-)を加えて  $1 \times 10^6$  cells/mL に調製した。その細胞溶液に CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagen (1 μL/細胞懸濁液 1 mL, 最終濃度 500 nM)を混合し、暗室、37°C で 30 分間インキュベートした。この細胞溶液を Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer を用いて観察した。ゲート内の細胞数は 10,000 cells とした。CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagen には blue

(488 nm)レーザーの channel BL1 (Filter 530/30, Filter Range 515/545)を用いた。この測定は最低 5 回行い、再現性を取った。

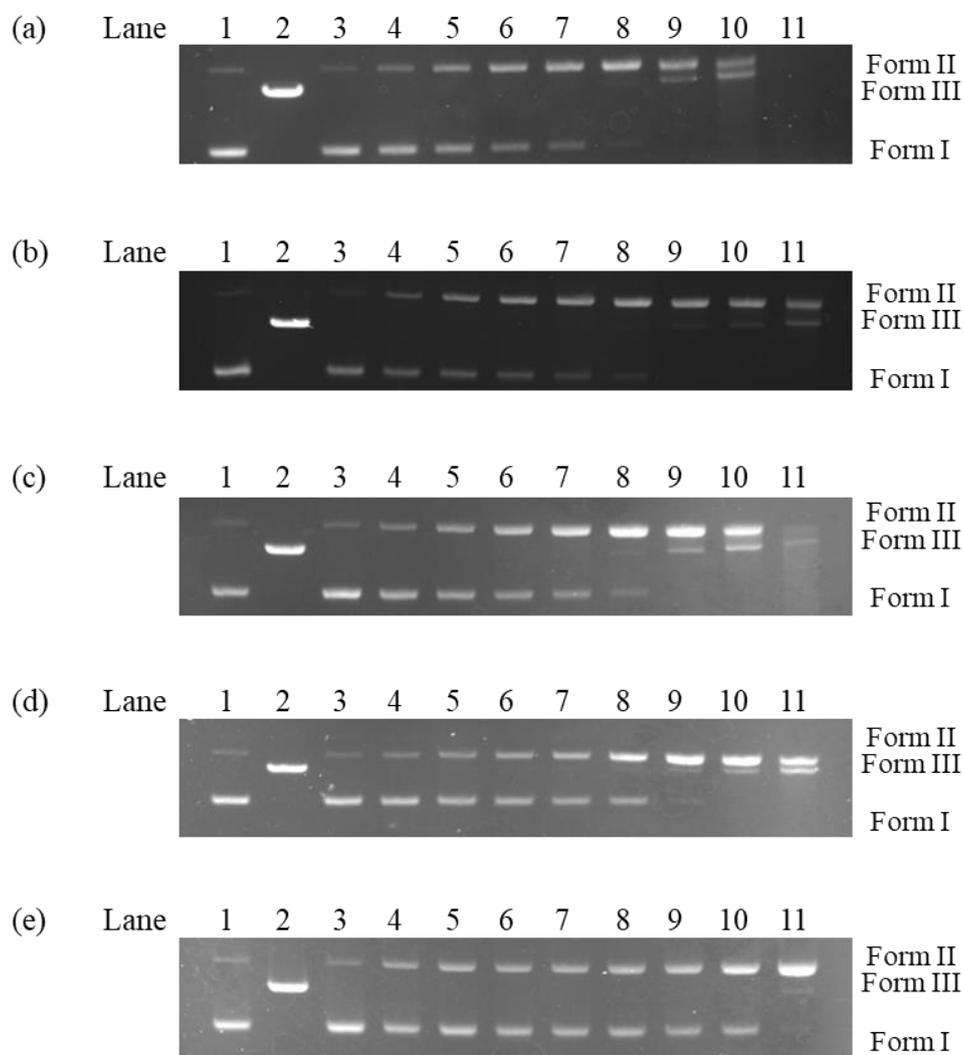
### 3-6. 参考文献

- [1] T. Boulikas, A. Pantos, E. Bellis, and P. Christofis, *Cancer Ther.* **2007**, *5*, 537–583.
- [2] S. Ghosh, *Bioorg. Chem.* **2019**, *88*, 102925.
- [3] H. Umezawa, K. Maeda, T. Takeuchi, and Y. Okami, *J. Antibiot.* **1966**, *19*, 200–209.
- [4] L. V. Liu, C. B. Bell III, S. D. Wong, S. A. Wilson, Y. Kwak, M. S. Chow, J. Zhao, K. O. Hodgson, B. Hedman, and E. I. Solomon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 22419–22424.
- [5] A.-M. Florea, and D. Büsselberg, *Cancers* **2011**, *3*, 1351–1371.
- [6] R. Oun, Y. E. Moussa, and N. J. Wheate, *Dalton Trans.* **2018**, *47*, 6645–6653.
- [7] (a) K. E. Erkkila, D. T. Odom, and J. K. Barton, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2777–2795. (b) K. Qiu, Y. Chen, T. W. Rees, L. Ji, and H. Chao, *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *378*, 66–86. (c) C. Huang, T. Li, J. Liang, H. Huang, P. Zhang, and S. Banerjee, *Coord. Chem. Rev.* **2020**, *408*, 213178–213192. (d) A. P. King, and J. J. Wilson, *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 8113–8136. (e) W. Zhou, X. Wang, M. Hu, C. Zhua, and Z. Guo, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 2761–2770. (f) J. Liu, Y. Chen, G. Li, P. Zhang, C. Jin, L. Zeng, L. Ji, and H. Chao, *Biomaterials* **56**, **2015**, 140–153. (g) W. Lv, Z. Zhang, K. Y. Zhang, H. Yang, S. Liu, A. Xu, S. Guo, Q. Zhao, and W. Huang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 9947–9951. (h) J.-J. Cao, C.-P. Tan, M.-H. Chen, N. Wu, D.-Y. Yao, X.-G. Liu, L.-N. Liang-Nian Jia, and Z.-W. Mao, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 631–640. (i) D. Hu, Y. Liu, Y.-T. Lai, K.-C. Tong, Y.-M. Fung, C.-N. Lok, and C.-M. Che, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1387–1391.
- [8] B. Deka, T. Sarkar, S. Banerjee, A. Kumar, S. Mukherjee, S. Deka, K. K. Saikia, and A. Hussain, *Dalton Trans.* **2017**, *46*, 396–409.
- [9] M. T. Jeena, S. Kim, S. Jin, and J. H. Ryu, *Cancers* **2020**, *12*, 4.
- [10] N. Z. Fantoni, Z. Molphy, S. O’Carroll, G. Menounou, G. Mitrikas, M. G. Krokidis, C. Chatgialloglu, J. Colleran, A. Banasiak, M. Clynes, S. Roche, S. Kelly, V. McKee, and A. Kellett, *Chem. Euro. J.* **2021**, *27*, 971–983.
- [11] N. Aykin-Burns, I. M. Ahmad, Y. Zhu, L. W. Oberley, and D. R. Spitz, *Biochem. J.* **2009**, *418*, 29–37.
- [12] V. Nogueira, and N. Hay, *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 4309–4314.
- [13] J. Lopez, and S. W. G. Tait, *Br. J. Cancer* **2015**, *112*, 957–962.
- [14] C. S. Burke, A. Byrne, and T. E. Keyes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 12420–12424.
- [15] C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, and C. Marzano, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 815–862.
- [16] J. J. Rani, and S. Roy, *ChemMedChem* **2023**, *18*, e202200652.

- [17] Y. Kadoya, K. Fukui, M. Hata, R. Miyano, Y. Hitomi, S. Yanagisawa, M. Kubo, and M. Kodera, *Inorg. Chem.* **2019**, *58*, 14294–14298.
- [18] M. Hata, I. Saito, Y. Kadoya, Y. Tanaka, Y. Hitomi, and M. Kodera, *Dalton Trans.* **2022**, *51*, 4720–4727.
- [19] Y. Kadoya, M. Hata, Y. Tanaka, A. Hirohata, Y. Hitomi, and M. Kodera, *Inorg. Chem.* **2021**, *60*, 5474–5482.
- [20] F. Tran, A. V. Odell, G. E. Ward, and N. J. Westwood, *Molecules* **2013**, *18*, 11639–11657.
- [21] M. Kodera, Y. Kadoya, K. Aso, K. Fukui, A. Nomura, Y. Hitomi, and H. Kitagishi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2019**, *92*, 739–747.
- [22] (a) N. A. Rey, A. Neves, A. J. Bortoluzzi, C. T. Pich, and H. Terenzi, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 348–350. (b) P. Amudha, M. Kandaswamy, L. Govindasamy, and D. Velmurugan, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 4486–4492.
- [23] (a) B. C. Baguley, and E. M. Falkenhaus, *E. M. Nucl. Acid. Res.* **1978**, *5*, 161–171. (b) A. R. Morgan, J. S. Lee, D. E. Pulleyblank, N. L. Murray, and D. H. Evans, *Nucl. Acid. Res.* **1979**, *7*, 547–569.
- [24] L. Tjioe, T. Joshi, C. M. Forsyth, B. Moubaraki, K. S. Murray, J. Brugger, B. Graham, and L. Spiccia, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 939–953.
- [25] D. Freifelder, and B. Trumbo, *Biopolymers* **1969**, *7*, 681.
- [26] H. Wang, B. Wang, M. Wang, L. Zheng, H. Chen, Z. Chai, Y. Zhao, and W. Feng, *W. Analyst*, **2015**, *140*, 523–531.
- [27] L. Ropel, L. S. Belve`ze, S. N. V. K. Aki, M. A. Stadtherr, and J. F. Brennecke, *Green. Chem.* **2005**, *7*, 83–90.
- [28] R. Scherließ, *Int. J. Pharm.* **2011**, *411*, 98–105.
- [29] J. Meerloo, G. J. L. Kaspers, and J. Cloos, *Humana Press.* **2011**, *411*, 237–245.
- [30] A. Bahuguna, I. Khan, V. K. Bajpai, and S. C. Kang, *Bangladesh J Pharmacol.* **2017**, *12*, 115–118.
- [31] W. Miao, X. Guo, X. Yan, Y. Shang, C. Yu, E. Dai, T. Jiang, E. Hao, and L. Jiao, *Chem. Eur. J.* **2023**, *29*, e202203832.
- [32] I. Vermes, C. Haanenand, and C. P. M. Reutelingsperger, *J. Immunol. Methods* **1995**, *180*, 39–51.
- [33] S. J. Martin, C. P. M. Reutelingsperger, A. J. McGahon, J. Rader, R. C. A. A. van Schie, D. M. LaFace, and D. R. Green, *J. Exp. Med.* **1995**, *182*, 1545–1557.

- [34] S. B. Bratton, and G. S. Salvesen, *J. Cell. Sci.* **2010**, *123*, 3209–3214.
- [35] H. A. Harrington, K. L. Ho, S. Ghosh, and K. C. Tung, *Theor. Biol. Medical Model.* **2008**, *5*, 26–40.
- [36] N. Ozoren, K. Kim, T. F. Burns, D. T. Dicker, A. D. Moscioni, and W. S. El-Deiry, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 6259–6265.
- [37] T. Yu, J. Dohl, F. Elenberg, Y. Chen, and P. Deuster, *J Cell Physiol.* **2019**, *234*, 6371–6381.
- [38] S. Barut, Y. A. Unlu, A. Karaoglan, M. Tuncdemir, F. K. Dagistanli, M. Oztqrk, and A. Colak, *Surg. Neurol.*
- [39] W. S. D. Tan, W. Liao, H. Y. Peh, M. Vila, J. Dong, and H. M. Shen, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2018**, *360*, 120–130.
- [40] B. Mayer, and R. Oberbauer, *News Physiol Sci.*, **2003**, *18*, 89–94.
- [41] L. Galluzzi, O. Kepp, and G. Kroemer, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2012**, *13*, 780–788.

### 3-7. Supporting Information



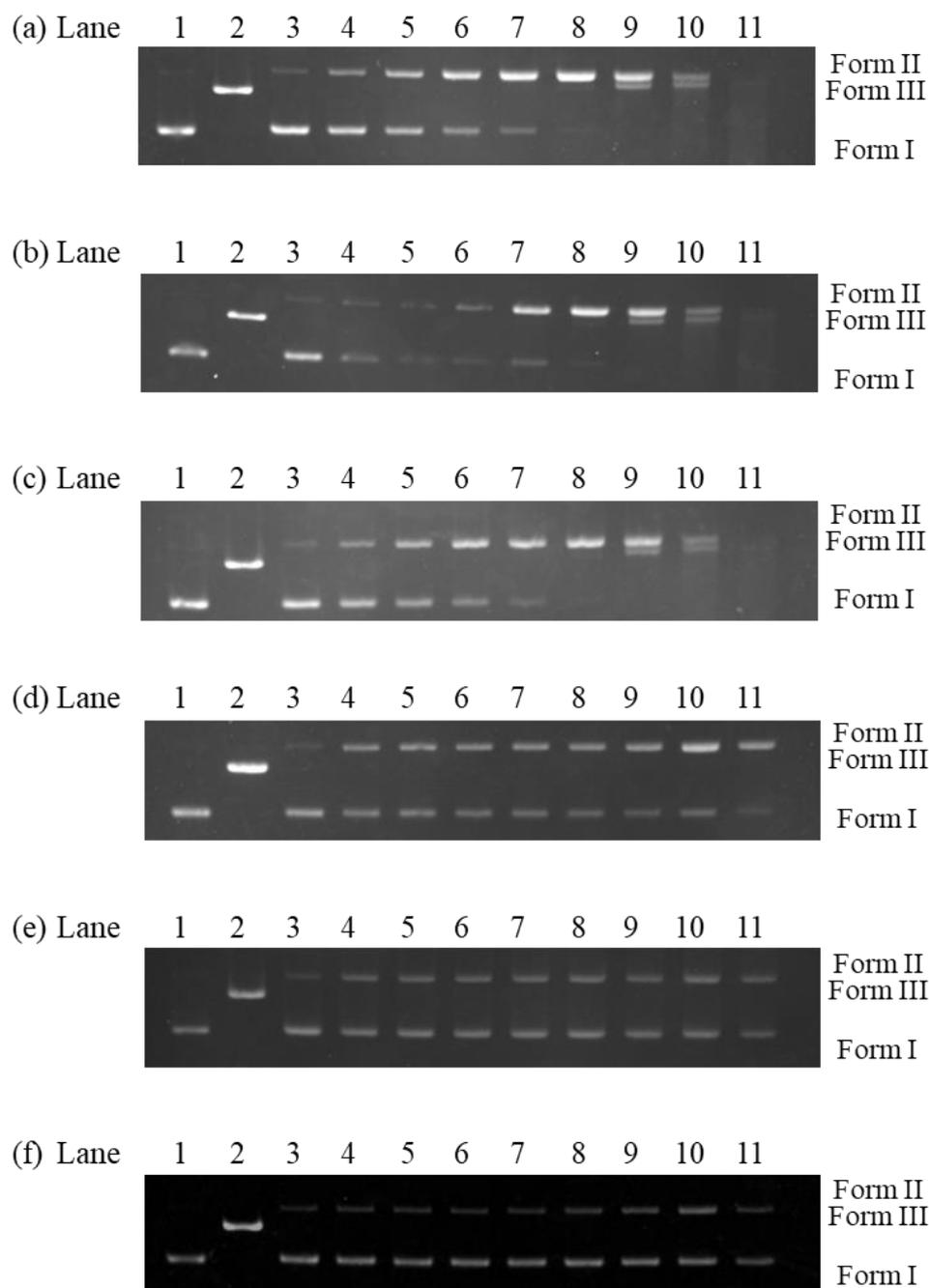
**Figure S3-1.** Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp) in the presence of  $\mathbf{1}^{\text{P1}}$  (a),  $\mathbf{1}^{\text{P3}}$  (b),  $\mathbf{1}^{\text{M1}}$  (c),  $\mathbf{1}^{\text{M2}}$  (d),  $\mathbf{1}^{\text{M3}}$  (e) (50  $\mu$ M) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (500  $\mu$ M) at pH 6.0. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lane 3–11: corresponded to the time of 0, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min, respectively.

**Table S3-1. Rates (%) of Form I, II, and III in the reaction of complexes at pH 6.0**

Complex	Complex ( $\mu\text{M}$ )	$\text{H}_2\text{O}_2$ ( $\mu\text{M}$ )	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
<b>1</b>	50	500	0	95.3 $\pm$ 0.2	4.7 $\pm$ 0.2	-
			10	74.2 $\pm$ 2.0	25.8 $\pm$ 2.0	-
			20	57.4 $\pm$ 1.3	42.6 $\pm$ 1.3	-
			30	47.0 $\pm$ 2.2	53.0 $\pm$ 2.2	-
			40	38.0 $\pm$ 3.6	62.0 $\pm$ 3.6	-
			60	25.3 $\pm$ 4.1	74.7 $\pm$ 4.1	-
			120	9.9 $\pm$ 3.6	89.0 $\pm$ 3.2	1.0 $\pm$ 0.4
			180	4.6 $\pm$ 2.6	93.2 $\pm$ 1.5	2.2 $\pm$ 1.1
			300	2.0 $\pm$ 2.0	92.7 $\pm$ 1.0	5.3 $\pm$ 3.0
<b>1<sup>P1</sup></b>	50	500	0	90.2 $\pm$ 0.1	9.8 $\pm$ 0.1	-
			10	77.8 $\pm$ 0.2	22.2 $\pm$ 0.2	-
			20	56.5 $\pm$ 0.0	43.5 $\pm$ 0.0	-
			30	34.7 $\pm$ 0.1	65.3 $\pm$ 0.1	-
			40	21.8 $\pm$ 0.0	78.2 $\pm$ 0.0	-
			60	4.3 $\pm$ 0.5	95.0 $\pm$ 0.5	0.7 $\pm$ 0.0
			120	0.0 $\pm$ 0.0	87.3 $\pm$ 0.1	12.7 $\pm$ 0.1
			180	0.0 $\pm$ 0.0	52.6 $\pm$ 1.0	47.4 $\pm$ 1.0
			300	n.d.*	n.d.*	n.d.*
<b>1<sup>P2</sup></b>	50	500	0	92.2 $\pm$ 0.7	7.8 $\pm$ 0.7	-
			10	61.9 $\pm$ 2.1	38.1 $\pm$ 2.1	-
			20	25.6 $\pm$ 3.8	74.4 $\pm$ 3.8	-
			30	9.2 $\pm$ 3.1	90.8 $\pm$ 3.1	-
			40	4.7 $\pm$ 1.7	94.2 $\pm$ 1.1	1.1 $\pm$ 0.6
			60	0.0 $\pm$ 0.0	96.3 $\pm$ 0.2	3.7 $\pm$ 0.2
			120	0.0 $\pm$ 0.0	90.2 $\pm$ 3.8	9.8 $\pm$ 3.8
			180	0.0 $\pm$ 0.0	77.1 $\pm$ 4.4	22.9 $\pm$ 4.4
			300	0.0 $\pm$ 0.0	50.7 $\pm$ 2.2	49.3 $\pm$ 2.2
<b>1<sup>P3</sup></b>	50	500	0	89.9 $\pm$ 1.1	10.1 $\pm$ 1.1	-
			10	84.2 $\pm$ 1.0	15.8 $\pm$ 1.0	-
			20	74.8 $\pm$ 0.5	25.2 $\pm$ 0.5	-
			30	64.2 $\pm$ 1.6	35.8 $\pm$ 1.6	-
			40	52.5 $\pm$ 0.8	47.5 $\pm$ 0.8	-
			60	28.4 $\pm$ 0.8	71.6 $\pm$ 0.8	-
			120	3.7 $\pm$ 0.8	94.0 $\pm$ 0.5	2.2 $\pm$ 0.3
			180	0.0 $\pm$ 0.0	93.4 $\pm$ 0.9	6.6 $\pm$ 0.9
			300	0.0 $\pm$ 0.0	63.0 $\pm$ 1.4	37.0 $\pm$ 1.4

<b>1<sup>M1</sup></b>	50	500	0	91.2 ± 0.3	8.8 ± 0.3	-
			10	75.3 ± 0.2	24.7 ± 0.2	-
			20	56.7 ± 0.6	43.3 ± 0.6	-
			30	38.7 ± 0.5	61.3 ± 0.5	-
			40	24.3 ± 0.2	75.7 ± 0.2	-
			60	9.0 ± 0.4	89.8 ± 0.4	1.2 ± 0.0
			120	0.0 ± 0.0	91.8 ± 1.1	8.2 ± 1.1
			180	0.0 ± 0.0	76.6 ± 2.9	23.4 ± 2.9
			300	0.0 ± 0.0	19.1 ± 4.4	80.9 ± 4.4
<b>1<sup>M2</sup></b>	50	500	0	91.3 ± 0.9	8.7 ± 0.9	-
			10	81.1 ± 0.4	18.9 ± 0.4	-
			20	65.9 ± 3.5	34.1 ± 3.5	-
			30	55.4 ± 3.2	44.6 ± 3.2	-
			40	45.3 ± 2.8	54.7 ± 2.8	-
			60	27.8 ± 3.7	72.2 ± 3.7	-
			120	3.5 ± 0.5	93.2 ± 1.1	3.4 ± 0.6
			180	0.0 ± 0.0	90.8 ± 2.0	9.2 ± 2.0
			300	0.0 ± 0.0	64.6 ± 0.6	35.4 ± 0.6
<b>1<sup>M3</sup></b>	50	500	0	91.2 ± 0.1	8.8 ± 0.1	-
			10	87.5 ± 1.8	12.5 ± 1.8	-
			20	76.1 ± 1.6	23.9 ± 1.6	-
			30	69.1 ± 1.4	30.9 ± 1.4	-
			40	55.7 ± 4.0	44.3 ± 4.0	-
			60	38.7 ± 4.4	61.3 ± 4.4	-
			120	14.9 ± 2.1	84.5 ± 1.4	0.7 ± 0.7
			180	5.4 ± 2.7	90.5 ± 3.2	4.2 ± 0.5
			300	0.0 ± 0.0	78.6 ± 3.4	21.4 ± 3.4

\*n.d. means cannot determine.



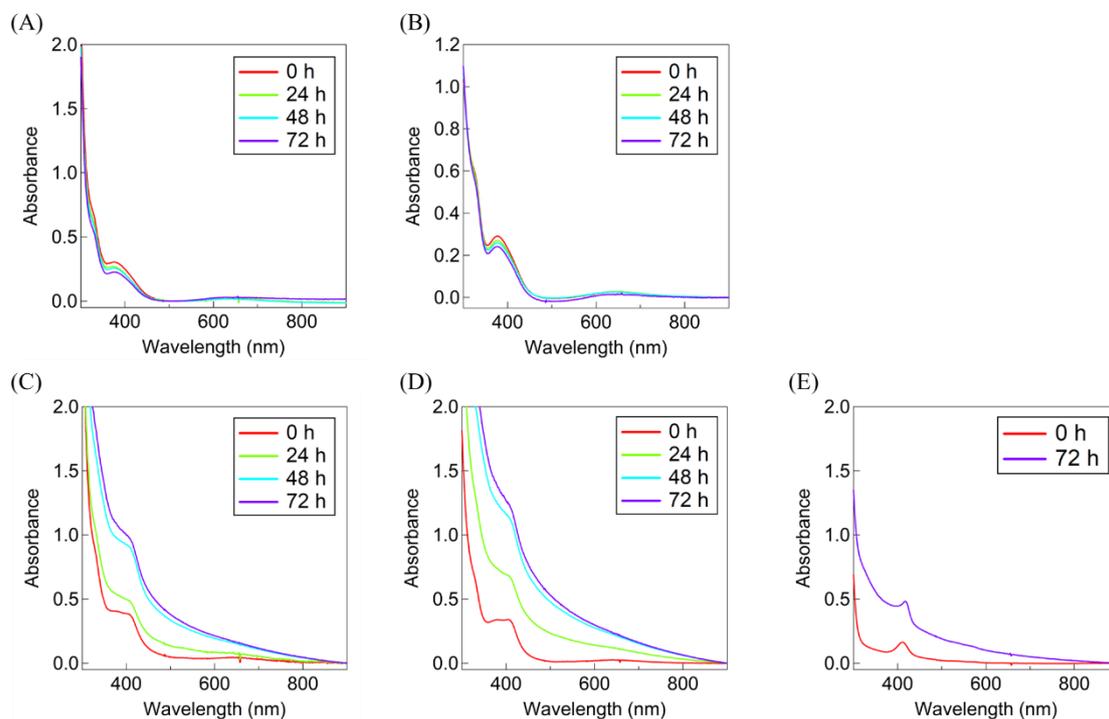
**Figure S3-2.** Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp) in the presence of **1**<sup>P2</sup> (50  $\mu$ M), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500  $\mu$ M), and inhibitor (DMSO 1 mM (a), DMSO 5 mM (b), DMSO 10 mM (c), KI 1 mM (d), KI 5 mM (e), and KI 10 mM (f)) at pH 6.0. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lane 3–11: corresponded to the time of 0, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, and 300 min, respectively.

**Table S3-2. Rates (%) of Form I, II, and III formed with 1<sup>P1</sup> in the presence of inhibitor at pH 6.0**

<b>Inhibitor</b>	<b>Conc. (mM)</b>	<b>Time (min)</b>	<b>Form I (%)</b>	<b>Form II (%)</b>	<b>Form III (%)</b>
DMSO	1	0	95.3 ± 1.4	4.7 ± 1.4	-
		10	71.8 ± 2.2	28.2 ± 2.2	-
		20	48.4 ± 2.6	51.6 ± 2.6	-
		30	26.0 ± 1.8	74.0 ± 1.8	-
		40	12.4 ± 1.1	87.6 ± 1.1	-
		60	1.3 ± 0.1	96.8 ± 1.0	2 ± 1.1
		120	0.0 ± 0.0	79.5 ± 0.1	20.5 ± 0.1
		180	0.0 ± 0.0	53.6 ± 1.4	46.4 ± 1.4
		300	n.d.*	n.d.*	n.d.*
		DMSO	5	0	93.3 ± 0.6
10	75.0 ± 0.3			25.0 ± 0.3	-
20	49.8 ± 0.4			50.2 ± 0.4	-
30	28.3 ± 1.2			71.7 ± 1.2	-
40	15.4 ± 0.2			84.6 ± 0.2	-
60	1.9 ± 0.3			96.7 ± 0.4	1.4 ± 0.8
120	0.0 ± 0.0			84.0 ± 0.3	16.0 ± 0.3
180	0.0 ± 0.0			66.4 ± 1.6	33.6 ± 1.6
300	n.d.*			n.d.*	n.d.*
DMSO	10			0	93.9 ± 1.1
		10	70.0 ± 1.7	30.0 ± 1.7	-
		20	48.6 ± 0.0	51.4 ± 0.0	-
		30	26.3 ± 0.1	73.7 ± 0.1	-
		40	14.0 ± 1.3	86.0 ± 1.3	-
		60	2.5 ± 0.5	96.5 ± 0.0	0.9 ± 0.5
		120	0.0 ± 0.0	83.7 ± 0.4	16.3 ± 0.4
		180	0.0 ± 0.0	62.2 ± 2.5	37.8 ± 2.5
		300	n.d.*	n.d.*	n.d.*

		0	91.0 ± 0.2	9.0 ± 0.2	-
		10	47.8 ± 3.1	52.2 ± 3.1	-
		20	42.6 ± 2.3	57.4 ± 2.3	-
		30	40.5 ± 1.3	59.5 ± 1.3	-
KI	1	40	38.2 ± 0.6	61.8 ± 0.6	-
		60	33.6 ± 1.4	66.4 ± 1.4	-
		120	26.0 ± 0.5	74.0 ± 0.5	-
		180	21.7 ± 1.1	78.3 ± 1.1	-
		300	13.3 ± 0.4	86.7 ± 0.4	-
		0	86.7 ± 0.1	13.3 ± 0.1	-
		10	67.4 ± 2.5	32.6 ± 2.5	-
		20	66.1 ± 2.7	33.9 ± 2.7	-
		30	63.6 ± 1.8	36.4 ± 1.8	-
KI	5	40	62.5 ± 0.9	37.5 ± 0.9	-
		60	60.7 ± 1.3	39.3 ± 1.3	-
		120	57.1 ± 0.4	42.9 ± 0.4	-
		180	52.6 ± 0.4	47.4 ± 0.4	-
		300	49.9 ± 2.3	50.1 ± 2.3	-
		0	89.9 ± 0.2	10.1 ± 0.2	-
		10	82.8 ± 3.1	17.2 ± 3.1	-
		20	80.2 ± 1.9	19.8 ± 1.9	-
		30	79.6 ± 1.3	20.4 ± 1.3	-
KI	10	40	76.9 ± 0.7	23.1 ± 0.7	-
		60	73.3 ± 0.2	26.7 ± 0.2	-
		120	69.3 ± 0.7	30.7 ± 0.7	-
		180	65.8 ± 1.3	34.2 ± 1.3	-
		300	57.9 ± 1.3	42.1 ± 1.3	-

\*n.d. means cannot determine.



**Figure S3-3.** (A) Electronic absorption spectra of  $1^{P1}$  (0.2 mM) in pH 7.4 (MOPS, 10 mM), NaCl (10 mM) at 37°C. (B) Electronic absorption spectra of  $1^{M1}$  (0.2 mM) in pH 7.4 (MOPS, 10 mM), NaCl (10 mM) at 37°C. (C) Electronic absorption spectra of  $1^{P1}$  (0.2 mM) and 10% FBS in PBS (-) at 37°C. (D) Electronic absorption spectra of  $1^{M1}$  (0.2 mM) and 10% FBS in PBS (-) at 37°C. (E) Electronic absorption spectra of 10% FBS in PBS (-) at 37°C.

## 第四章：Synthesis, Structures, and Cytotoxicity of Dicopper Complexes with *p*-Cresol-2,6-Bis(Amide-Tether-dpa<sup>4-X</sup>) Ligands (X = MeO and Cl): Electronic and Hydrophobic Effects of MeO and Cl on Selective ROS Generation and Cytotoxicity Enhancement.

### 4-1. 要旨

本章では、配位子の置換基による電子効果と疎水効果で、二核銅錯体による細胞毒性の向上と選択的な活性酸素種(ROS)生成が見出された。dpa 部位のピリジル基の 4 位に MeO 基、Cl 基を持つ 2,6-bis(amide-tether dpa<sup>4-X</sup>)-*p*-cresol (HL3<sup>4-X</sup>, X = MeO, Cl)の銅錯体 [Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3<sup>4-MeO</sup>)]Y [Y = PF<sub>6</sub> (**3a**<sup>4-MeO</sup>), OAc (**3b**<sup>4-MeO</sup>)], [Cu<sub>2</sub>(μ-1,3-OAc)<sub>2</sub>(L3<sup>4-Cl</sup>)]Y [Y = ClO<sub>4</sub> (**3a**<sup>4-Cl</sup>), OAc (**3b**<sup>4-Cl</sup>)]および置換基を持たない 2,6-bis(amide-tether dpa)-*p*-cresol (HL3)の銅錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3)](OAc) (**3**)を比較し、MeO 基、Cl 基の電子効果と疎水効果を明らかにした。**3a**<sup>4-MeO</sup>、**3a**<sup>4-Cl</sup>の結晶構造から、置換基の電子効果で配位構造や結合距離が異なることが示された。**3a**<sup>4-MeO</sup>はドナー性の低い μ-1,1-OAc 架橋をもち、**3a**<sup>4-Cl</sup>はドナー性の高い μ-1,3-OAc 架橋だけを形成した。水中では、μ-1,1-OAc は H<sub>2</sub>O で容易に置換され、μ-1,3-OAc は保持された。酸化還元電位は **3b**<sup>4-MeO</sup> < **3** < **3b**<sup>4-Cl</sup> の順であり、電子効果に従った。**3a**<sup>4-MeO</sup>、**3a**<sup>4-Cl</sup>は **3**と同様に AscNa で速やかに Cu(I)Cu(I)に還元され、還元的 O<sub>2</sub> 活性化で ROS として H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と HO•を生成した。ROS 生成量は電子効果に依存して変化した。このとき、**3b**<sup>4-MeO</sup>は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 放出を、**3b**<sup>4-Cl</sup>は HO•生成を促進した(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**3b**<sup>4-MeO</sup> > **3b**<sup>4-Cl</sup>), HO• (**3b**<sup>4-MeO</sup> < **3b**<sup>4-Cl</sup>)). HeLa 細胞、肺や膵臓のがん細胞と正常細胞に対する **3b**<sup>4-MeO</sup>、**3b**<sup>4-Cl</sup>の細胞毒性を MTT assay で調べた。HeLa 細胞に対する細胞毒性は **3b**<sup>4-MeO</sup>、**3b**<sup>4-Cl</sup>が **3** よりもそれぞれ 7 倍、5 倍高かった。**3b**<sup>4-MeO</sup>はがん細胞選択的毒性を示し、**3b**<sup>4-Cl</sup>は正常細胞選択的毒性を示した。**3b**<sup>4-MeO</sup>、**3b**<sup>4-Cl</sup>の細胞内小器官への局在を調べるため、ROS の細胞内蛍光検出試薬である DCFDA を用いて **3b**<sup>4-MeO</sup>、**3b**<sup>4-Cl</sup>が生成する ROS を可視化して共焦点顕微鏡で観察した。**3b**<sup>4-MeO</sup>、**3b**<sup>4-Cl</sup>は MeO, Cl 基の疎水効果で脂溶性が高く、小胞体(ER)と Golgi 体に局在した。**3b**<sup>4-MeO</sup>、**3b**<sup>4-Cl</sup>の細胞毒性が向上したのは ER と Golgi 体での ROS 生成によると考えられる。DCFDA を用いた ROS 生成の観察で、**3b**<sup>4-MeO</sup>は正常細胞よりもがん細胞で多く、**3b**<sup>4-Cl</sup>は正常細胞とがん細胞で同程度であることが示された。この選択的 ROS 生成が **3b**<sup>4-MeO</sup>のがん細胞選択的毒性、**3b**<sup>4-Cl</sup>の正常細胞選択的毒性の原因であり、これは正常細胞とがん細胞の抗酸化物質の濃度の違いや **3b**<sup>4-MeO</sup>、**3b**<sup>4-Cl</sup>の還元されやすさの違いによると考えられる。この研究から、二核銅錯体によるがん細胞選択的細胞毒性を、配位子に導入した置換基で制御できることが示された。

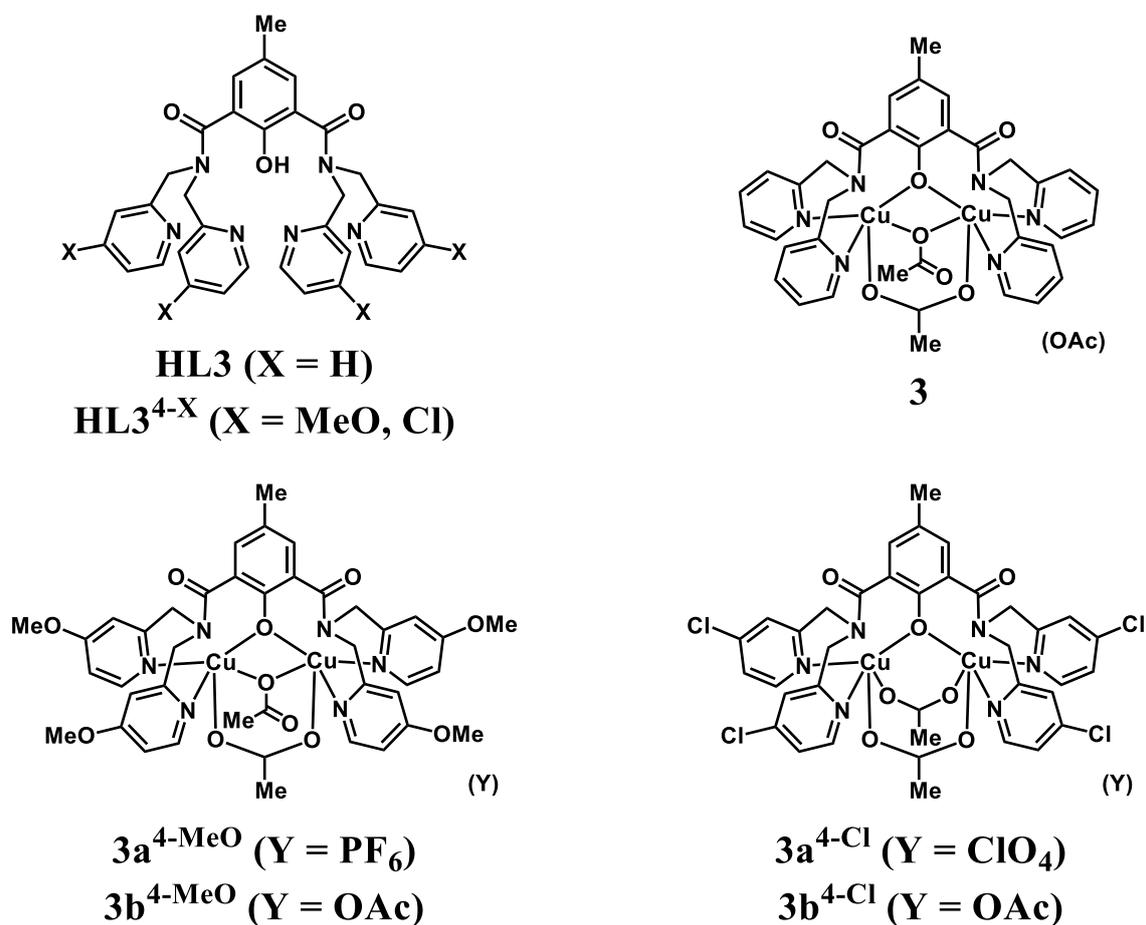
## 4-2. 緒言

現在臨床利用されている一部の抗がん剤や電離放射線治療は、細胞内で活性酸素種 (ROS) を生成し、DNA の二本鎖切断 (DNA double-strand breaks, dsb) や酸化ストレスを引き起こし、細胞死を誘導することが報告されている<sup>[1]</sup>。錯体は還元剤との反応で ROS を生成するため、新たな抗がん剤の開発に向けて様々な合成金属錯体が開発されてきた<sup>[2]</sup>。我々は、2,6-bis(amide-tether dpa)-*p*-cresol (HL3) とその二核銅錯体 [ $\text{Cu}_2(\mu\text{-}1,1\text{-OAc})(\mu\text{-}1,3\text{-OAc})(\text{L}3)](\text{OAc})$  (**3**) を開発し、**3** が  $\text{H}_2\text{O}_2$  による DNA 酸化切断を加速し、がん細胞選択的毒性を示すことを見出した<sup>[3]</sup>。しかし、**3** の細胞毒性は Cisplatin と比べて低く、抗がん剤としての利用には不十分であった。また、**3** の細胞毒性発現機構は十分には解明されていない。そこで、**3** の細胞毒性の向上と細胞毒性発現機構の解明のためには、**3** の細胞内挙動を明らかにする必要がある。そこで、**3** に蛍光分子である Bodipy を導入した **3**-Bodipy 結合体を合成し、その細胞内挙動を共焦点顕微鏡で追跡した。その結果、**3**-Bodipy 結合体はミトコンドリアと核小体に分布することがわかった。しかし、これは **3**-Bodipy 結合体の挙動であり、**3** の細胞内挙動は不明である。

生理活性物質の構造展開として、置換基の導入が用いられる。置換基はそれぞれに固有の立体性、疎水性、電子的性質を持ち、脂肪族側鎖や芳香族環への導入で、化合物の生理活性を変化させることができる。このような手法によって構造活性相関を展開していくうえで、様々な定量的経験則に基づいて生み出された指針が存在する<sup>[4]</sup>。例えば、電子求引性の Cl 基の導入によって活性が低下した場合、電子供与性の MeO 基の導入が推奨される。このように、置換基の導入によって生理活性物質の構造展開を進めることは、我々が目指している金属錯体の還元的  $\text{O}_2$  活性化による ROS 生成や細胞毒性の作用機構や活性向上の知見を得るうえで重要である。

本章では、HL3 配位子の dpa 部位のピリジル基に置換基を導入し、その電子効果や疎水効果で **3** の細胞毒性の向上を目指した。HL3 のピリジル基の 4 位に電子供与性の MeO 基や電子求引性の Cl 基を導入した  $\text{HL3}^{4\text{-MeO}}$  と  $\text{HL3}^{4\text{-Cl}}$ 、そして、その二核銅錯体 [ $\text{Cu}_2(\mu\text{-}1,1\text{-OAc})(\mu\text{-}1,3\text{-OAc})(\text{L}3^{4\text{-MeO}})]\text{Y}$  [ $\text{Y} = \text{PF}_6$  (**3a**<sup>4-MeO</sup>),  $\text{OAc}$  (**3b**<sup>4-MeO</sup>)], [ $\text{Cu}_2(\mu\text{-}1,3\text{-OAc})_2(\text{L}3^{4\text{-Cl}})]\text{Y}$  [ $\text{Y} = \text{ClO}_4$  (**3a**<sup>4-Cl</sup>),  $\text{OAc}$  (**3b**<sup>4-Cl</sup>)] を合成した。対イオンに  $\text{PF}_6$  や  $\text{ClO}_4$  を持つ **3a**<sup>4-MeO</sup>, **3a**<sup>4-Cl</sup> の結晶構造を決定し、配位構造や結合距離を **3** と比較した。さらに、溶液中の挙動を調べるために、水溶性が高い **3b**<sup>4-MeO</sup> と **3b**<sup>4-Cl</sup> を用い、これらの酸化還元挙動、ROS 生成、細胞内での ROS 生成挙動、細胞毒性などを **3** と比較した。これらの結果、置換基による電子効果と疎水効果で、二核銅錯体の ER や Golgi 体への局在により細胞毒性が向上し、選択的 ROS 生成を通してがん細胞選択的毒性の向上が見出された。特に、

MeO 基の導入により細胞毒性とがん細胞選択性が共に向上した。本章で用いた HL3, HL3<sup>4-X</sup>, **3**, **3a**<sup>4-MeO</sup>, **3b**<sup>4-MeO</sup>, **3a**<sup>4-Cl</sup>, **3b**<sup>4-Cl</sup> の化学構造を Figure 4-1 に示す。

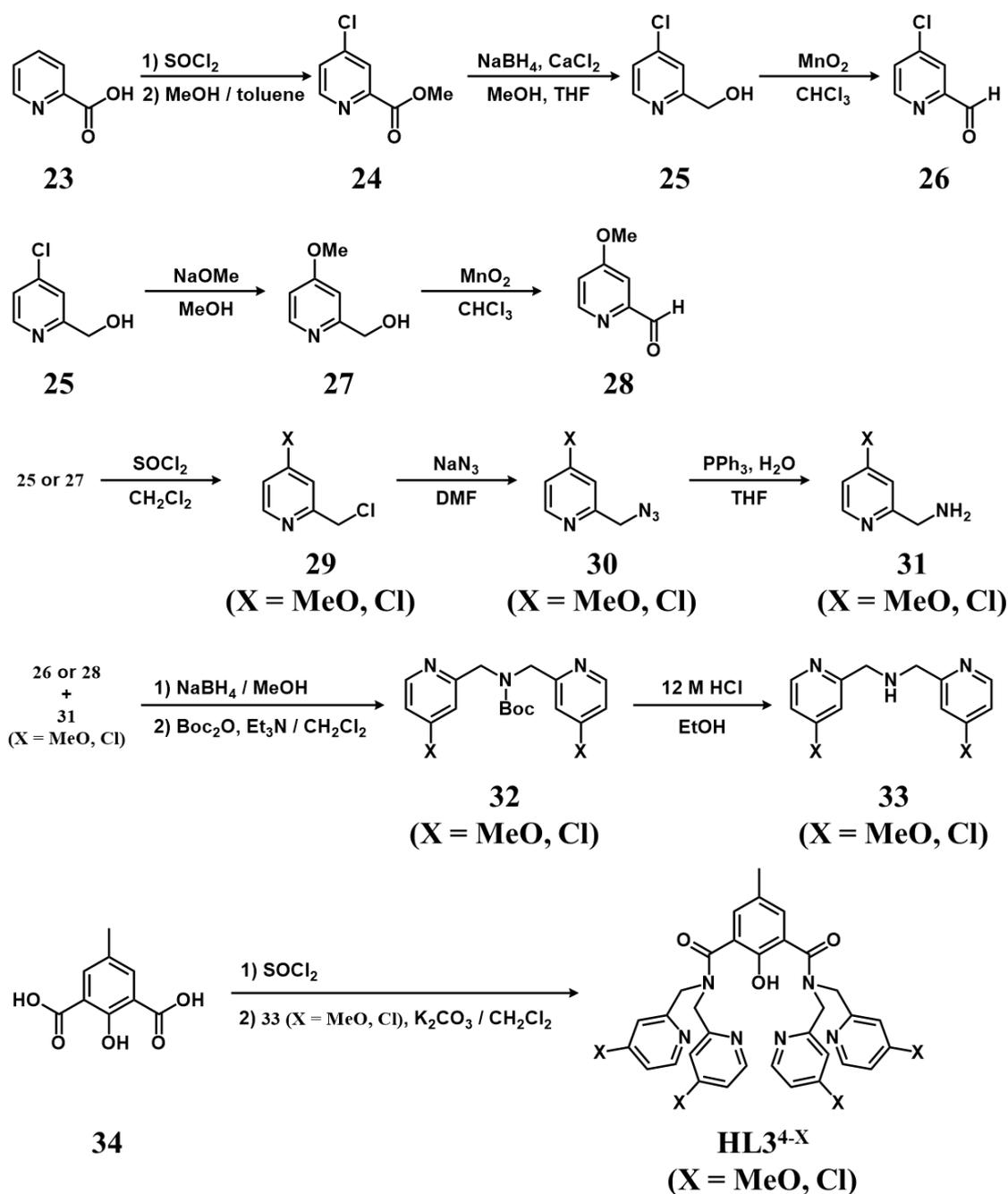


**Figure 4-1.** Chemical Structures of HL3, HL3<sup>4-X</sup> (X = MeO and Cl), [Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3)](OAc) (**3**), [Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3<sup>4-MeO</sup>)](Y) (Y = PF<sub>6</sub> (**3a**<sup>4-MeO</sup>), OAc (**3b**<sup>4-MeO</sup>)), and [Cu<sub>2</sub>(μ-1,3-OAc)<sub>2</sub>(L3<sup>4-Cl</sup>)](Y) (Y = ClO<sub>4</sub> (**3a**<sup>4-Cl</sup>), OAc (**3b**<sup>4-Cl</sup>)).

### 4-3. 結果と考察

#### 4-3-1. 配位子と二核銅(II)錯体の合成

HL3 とその錯体 **3** は, 論文<sup>[3]</sup>に従って合成した. ピリジル基の 4 位を MeO, Cl 基で置換した dpa 誘導体 di(4-X-2-pyridylmethyl)amine ( $\text{dpa}^{4X}$ )を *p*-cresol の 2, 6 位にアミド結合で導入した 2,6-bis(amide-tether  $\text{dpa}^{4X}$ )-*p*-cresol ( $\text{HL3}^{4X}$ , X = MeO, Cl)を合成した. この合成経路は, Scheme 4-1 に示す.  $\text{HL3}^{4X}$ を MeCN 中,  $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ と反応させ, 錯体 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-1,1-OAc})(\mu\text{-1,3-OAc})(\text{L3}^{4\text{MeO}})](\text{OAc})$  (**3b**<sup>4-MeO</sup>)と $[\text{Cu}_2(\mu\text{-1,3-OAc})_2(\text{L3}^{4\text{Cl}})](\text{OAc})$  (**3b**<sup>4-Cl</sup>)を得た. **3b**<sup>4-MeO</sup>, **3b**<sup>4-Cl</sup>の単離後, それぞれの MeCN 溶液に  $\text{NH}_4\text{PF}_6$ ,  $\text{NaClO}_4$ を加えて対イオンを交換した. これらを MeCN/Et<sub>2</sub>O から再結晶し, X 線構造解析に適した $[\text{Cu}_2(\mu\text{-1,1-OAc})(\mu\text{-1,3-OAc})(\text{L3}^{4\text{MeO}})](\text{PF}_6)$  (**3a**<sup>4-MeO</sup>)と $[\text{Cu}_2(\mu\text{-1,3-OAc})_2(\text{L3}^{4\text{Cl}})](\text{ClO}_4)$  (**3a**<sup>4-Cl</sup>)の結晶を得た.  $\text{HL3}^{4X}$ , **3a**<sup>4X</sup>, **3b**<sup>4X</sup>の詳細な合成法, 元素分析, IR, ESIMS データなどは 4-5-3 の実験項に示す.



Scheme 4-1. Synthetic Route of HL3<sup>4-X</sup> (X = MeO, Cl).

#### 4-3-2. 二核銅(II)錯体の結晶構造

$3a^{4-MeO}$ ,  $3a^{4-Cl}$  の構造を単結晶 X 線構造解析により決定した。これらの ORTEP 図を Figure 4-2, 結晶学的パラメーターを Table 4-1, 二核銅周辺の結合距離と結合角を Table 4-2 に示す。 $3a^{4-MeO}$  では 2 つの Cu(II) は  $L3^{4-MeO}$  に結合し,  $L3^{4-MeO}$  に含まれる  $dpa^{4-MeO}$  の 2 つのピリジン窒素原子, 内因性の  $\mu-O_{Ph}$  と外因性の  $\mu-1,1-OAc$ ,  $\mu-1,3-OAc$  で架橋された 5 配位構造をとる。 $3a^{4-Cl}$  の場合も 2 つの Cu(II) は  $L3^{4-Cl}$  に結合し, 同様の 5 配位構造をとるが, 2 つの  $\mu-1,3-OAc$  架橋を持つ点が異なっている。これらの銅周りの結合角から算出した  $\tau$  値は,  $3a^{4-MeO}$  で  $\tau_{Cu(1)} = 0.295$ ,  $\tau_{Cu(2)} = 0.613$ ,  $3a^{4-Cl}$  で  $\tau_{Cu(1)} = 0.580$ ,  $\tau_{Cu(2)} = 0.390$  である。 $\tau$  値は 0 のとき四角錐構造, 1 のとき三方両錐構造であり<sup>[5]</sup>, これらの銅の配位構造はいずれも四角錐と三方両錐の中間的な歪んだ構造であることがわかる。

$3a^{4-MeO}$  の Cu-O<sub>OAc</sub> 結合距離は,  $\mu-1,1-OAc$  では 2.261(13) と 2.089(14) Å,  $\mu-1,3-OAc$  では 1.978(11) と 1.944(12) Å であり,  $\mu-1,1-OAc$  の方が長い。これらの  $\mu-OAc$  の架橋構造は, **3** と類似しており, **3** の Cu-O<sub>OAc</sub> 結合距離( $\mu-1,1-OAc$  では 2.210(4) と 2.122(4) Å,  $\mu-1,3-OAc$  では 1.962(4) と 1.936(4) Å) についても近い値だった。また, **3**,  $3b^{4-MeO}$  の  $\mu-1,1-OAc$  は水中で容易に水分子と配位交換する点でも一致している。一方,  $3a^{4-Cl}$  では, 2 つとも  $\mu-1,3-OAc$  架橋構造をとっていた。これは, 電子求引性の Cl 基により支持配位子のドナー性が低下したために銅のルイス酸性が高くなり, ドナー性の高い  $\mu-1,3-OAc$  架橋構造が安定化されたことを示している。これらの Cu-O<sub>OAc</sub> の平均距離を比較すると  $3a^{4-Cl}$  (2.013 Å) < **3** (2.058 Å) <  $3a^{4-MeO}$  (2.068 Å) であり,  $3a^{4-Cl}$  では電子供与性の高い  $\mu-1,3-OAc$  架橋が銅に強く結合していることがわかる。このために,  $3b^{4-Cl}$  の  $\mu-1,3-OAc$  架橋は, 水溶液中でも, 水分子と配位交換せず, 安定に構造を保持した。

**3**,  $3a^{4-MeO}$ ,  $3a^{4-Cl}$  の Cu-N<sub>Py</sub> の平均結合距離は  $3a^{4-MeO}$  (2.022 Å) < **3** (2.024 Å) <  $3a^{4-Cl}$  (2.075 Å), Cu-O<sub>PhO</sub> の平均結合距離は  $3a^{4-Cl}$  (2.09 Å) < **3** (2.093 Å) <  $3a^{4-MeO}$  (2.146 Å) であった。この様に Cu-N<sub>Py</sub> は  $3a^{4-MeO}$  が最も短く,  $3a^{4-Cl}$  が最も長い。一方, Cu-O<sub>PhO</sub>, Cu-O<sub>OAc</sub> は  $3a^{4-Cl}$  が最も短く,  $3a^{4-MeO}$  が最も長い。これらは置換基の電子効果であり, 電子求引性の Cl 基ではピリジン窒素のドナー性が低下して Cu-N<sub>Py</sub> 結合が長くなり, Cu(II) のルイス酸性が高くなった分だけ Cu-O<sub>PhO</sub>, Cu-O<sub>OAc</sub> 結合が短くなっている。電子供与性の MeO 基では Cu-N<sub>Py</sub> 結合が短くなり, その分だけ Cu-O<sub>PhO</sub>, Cu-O<sub>OAc</sub> 結合が長くなっている。

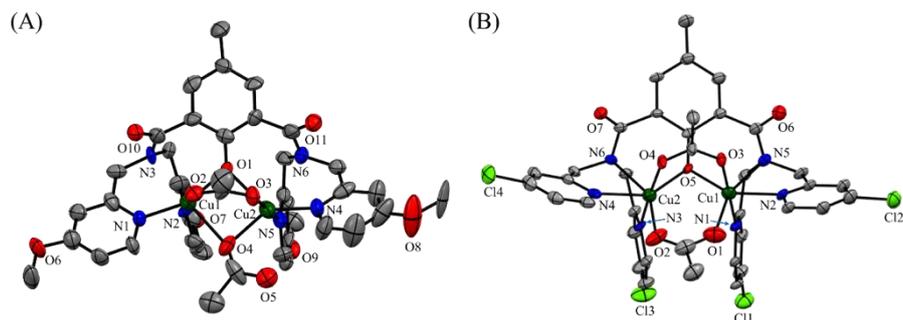


Figure 4-2. ORTEP diagrams of the cationic parts of **3a<sup>4-MeO</sup>** (left) and **3a<sup>4-Cl</sup>** (right).

Table 4-1. Crystallographic data for **3a<sup>4-MeO</sup>** and **3a<sup>4-Cl</sup>**

complex	<b>3a<sup>4-MeO</sup></b>	<b>3a<sup>4-Cl</sup></b>
Empirical formula	C <sub>47</sub> H <sub>49</sub> Cu <sub>2</sub> F <sub>6</sub> N <sub>6</sub> O <sub>11</sub> P	C <sub>39</sub> H <sub>36</sub> Cl <sub>5</sub> Cu <sub>2</sub> N <sub>6</sub> O <sub>11.5</sub>
Formula weight	1145.97	1077.07
Temperature (K)	103	103
Wavelength	CuK $\alpha$ (1.54187 Å)	CuK $\alpha$ (1.54187 Å)
Crystal system	Monoclinic	Triclinic
Crystal size (mm <sup>3</sup> )	0.14 × 0.12 × 0.10	0.20 × 0.10 × 0.10
Space group	P2 <sub>1</sub>	P-1
a (Å)	12.0084(8)	11.7317(5)
b (Å)	16.7164(11)	18.6324(9)
c (Å)	12.5107(8)	21.0367(10)
$\alpha$ (deg)	90	97.009(7)
$\beta$ (deg)	105.573(7)	96.475(7)
$\gamma$ (deg)	90	91.130(6)
Volume (Å <sup>3</sup> )	2419.2(3)	4532.3(4)
Z value	2	4
Density (calculated)	1.573 g/cm <sup>3</sup>	1.578 g/cm <sup>3</sup>
Absorption coefficient	2.186 mm <sup>-1</sup>	4.431 mm <sup>-1</sup>
F(000)	1176.0	2188.0
R1 <sup>a</sup> , wR2 <sup>b</sup> )	0.0872, 0.1917	0.0765, 0.1595
GOF index	0.989	0.996

a)  $R1 = \Sigma||Fo| - |Fc|/\Sigma|Fo|$ , b)  $wR2 = [\Sigma(w(Fo^2 - Fc^2)^2)/\Sigma w(Fo^2)^2]^{1/2}$

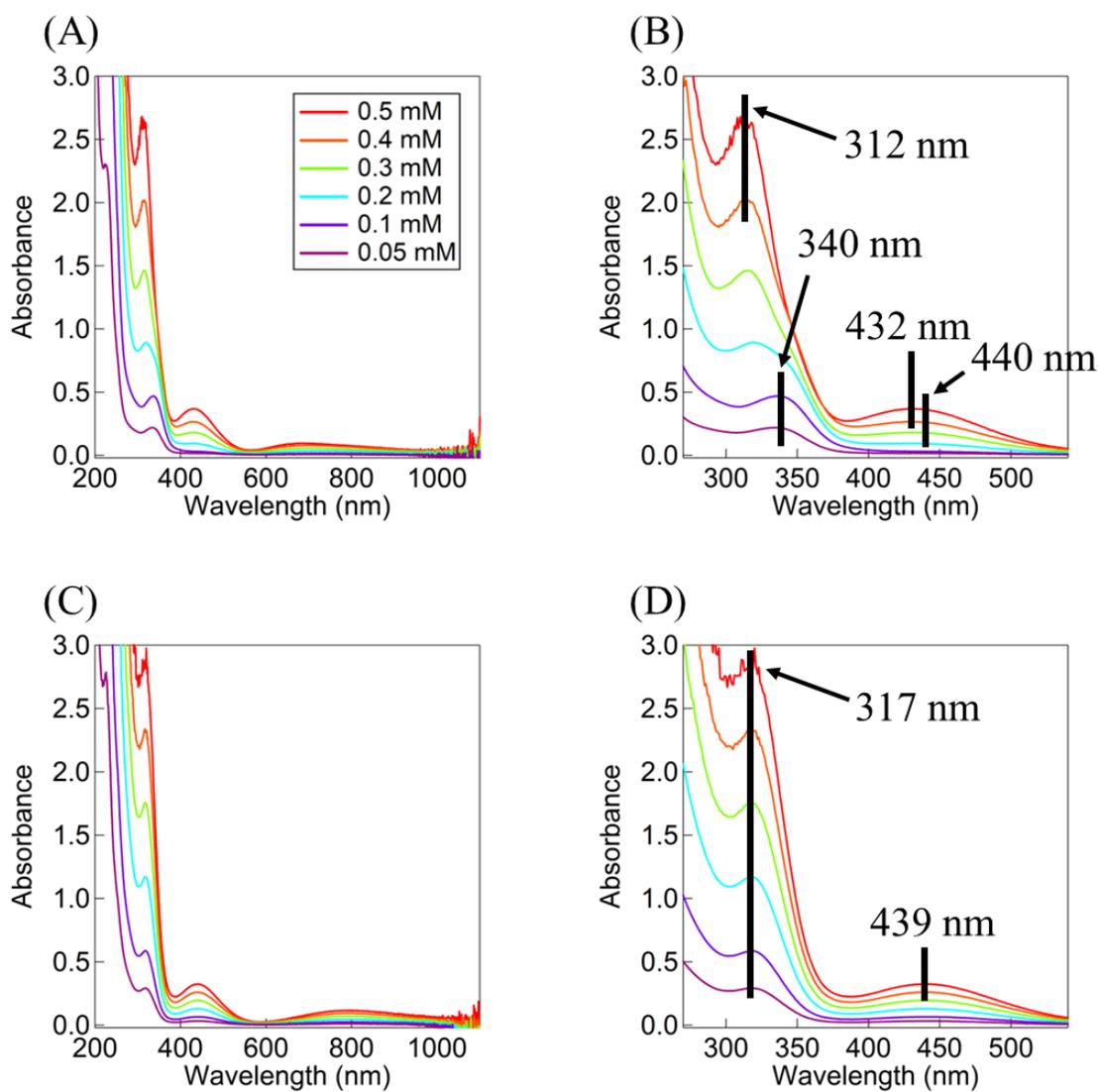
**Table 4-2. Selected bond distances (Å) and angles (deg) for 3a<sup>4-MeO</sup> and 3a<sup>4-Cl</sup>**

<b>3a<sup>4-MeO</sup></b>	<b>3a<sup>4-Cl</sup></b>
Cu(1) ••• Cu(2) : 3.081(4)	Cu(1) ••• Cu(2) : 3.006(4)
Cu(1) – N(1) : 2.005(13)	Cu(1) – N(1) : 2.00(1)
Cu(1) – N(2) : 2.064(15)	Cu(1) – N(2) : 2.09(1)
Cu(2) – N(4) : 2.039(14)	Cu(2) – N(3) : 2.01(1)
Cu(2) – N(5) : 1.978(14)	Cu(2) – N(4) : 2.20(1)
Cu(1) – O(1) : 1.982(10)	Cu(1) – O(1) : 2.09(1)
Cu(1) – O(2) : 1.978(11)	Cu(1) – O(3) : 1.95(1)
Cu(1) – O(4) : 2.261(13)	Cu(1) – O(5) : 2.05(1)
Cu(2) – O(1) : 2.311(11)	Cu(2) – O(2) : 2.07(1)
Cu(2) – O(3) : 1.944(12)	Cu(2) – O(4) : 1.94(1)
Cu(2) – O(4) : 2.089(14)	Cu(2) – O(5) : 2.13(1)
Cu(1) – O(1) – Cu(2) : 91.4(4)	Cu(1) – O(5) – Cu(2) : 92.0(4)
Cu(1) – O(4) – Cu(2) : 90.1(5)	O(3) – Cu(1) – O(1) : 90.7(5)
O(1) – Cu(1) – O(2) : 88.4(5)	O(5) – Cu(1) – O(1) : 115.4(5)
O(1) – Cu(1) – O(4) : 89.8(5)	O(5) – Cu(1) – O(3) : 87.1(4)
O(2) – Cu(1) – O(4) : 88.0(5)	O(3) – Cu(1) – N(1) : 178.0(5)
O(1) – Cu(1) – N(1) : 158.1(5)	O(3) – Cu(1) – N(2) : 87.3(5)
O(1) – Cu(1) – N(2) : 87.9(5)	O(5) – Cu(1) – N(1) : 91.1(5)
O(2) – Cu(1) – N(1) : 89.2(5)	O(5) – Cu(1) – N(2) : 150.3(5)
O(2) – Cu(1) – N(2) : 175.8(5)	N(1) – Cu(1) – O(1) : 90.9(5)
O(4) – Cu(1) – N(1) : 111.9(5)	N(2) – Cu(1) – O(1) : 93.8(5)
O(4) – Cu(1) – N(2) : 90.1(5)	N(1) – Cu(1) – N(2) : 93.7(5)
N(1) – Cu(1) – N(2) : 95.0(5)	O(5) – Cu(2) – O(2) : 129.0(4)
O(1) – Cu(2) – O(3) : 83.3(5)	O(4) – Cu(2) – O(2) : 91.6(5)
O(1) – Cu(2) – O(4) : 85.8(4)	O(4) – Cu(2) – O(5) : 85.7(4)
O(3) – Cu(2) – O(4) : 91.3(5)	O(2) – Cu(2) – N(3) : 93.9(5)
O(1) – Cu(2) – N(4) : 135.7(5)	O(2) – Cu(2) – N(4) : 86.1(5)
O(1) – Cu(2) – N(5) : 91.3(5)	O(4) – Cu(2) – N(3) : 172.6(5)
O(3) – Cu(2) – N(4) : 86.9(6)	O(4) – Cu(2) – N(4) : 88.5(5)
O(3) – Cu(2) – N(5) : 174.5(6)	O(5) – Cu(2) – N(3) : 87.0(5)
O(4) – Cu(2) – N(4) : 137.7(6)	O(5) – Cu(2) – N(4) : 144.4(4)
O(4) – Cu(2) – N(5) : 89.1(5)	N(3) – Cu(2) – N(4) : 96.8(5)
N(4) – Cu(2) – N(5) : 96.5(6)	
$\tau_{\text{Cu}(1)} = 0.295$ , $\tau_{\text{Cu}(2)} = 0.613$	$\tau_{\text{Cu}(1)} = 0.462$ , $\tau_{\text{Cu}(2)} = 0.47$

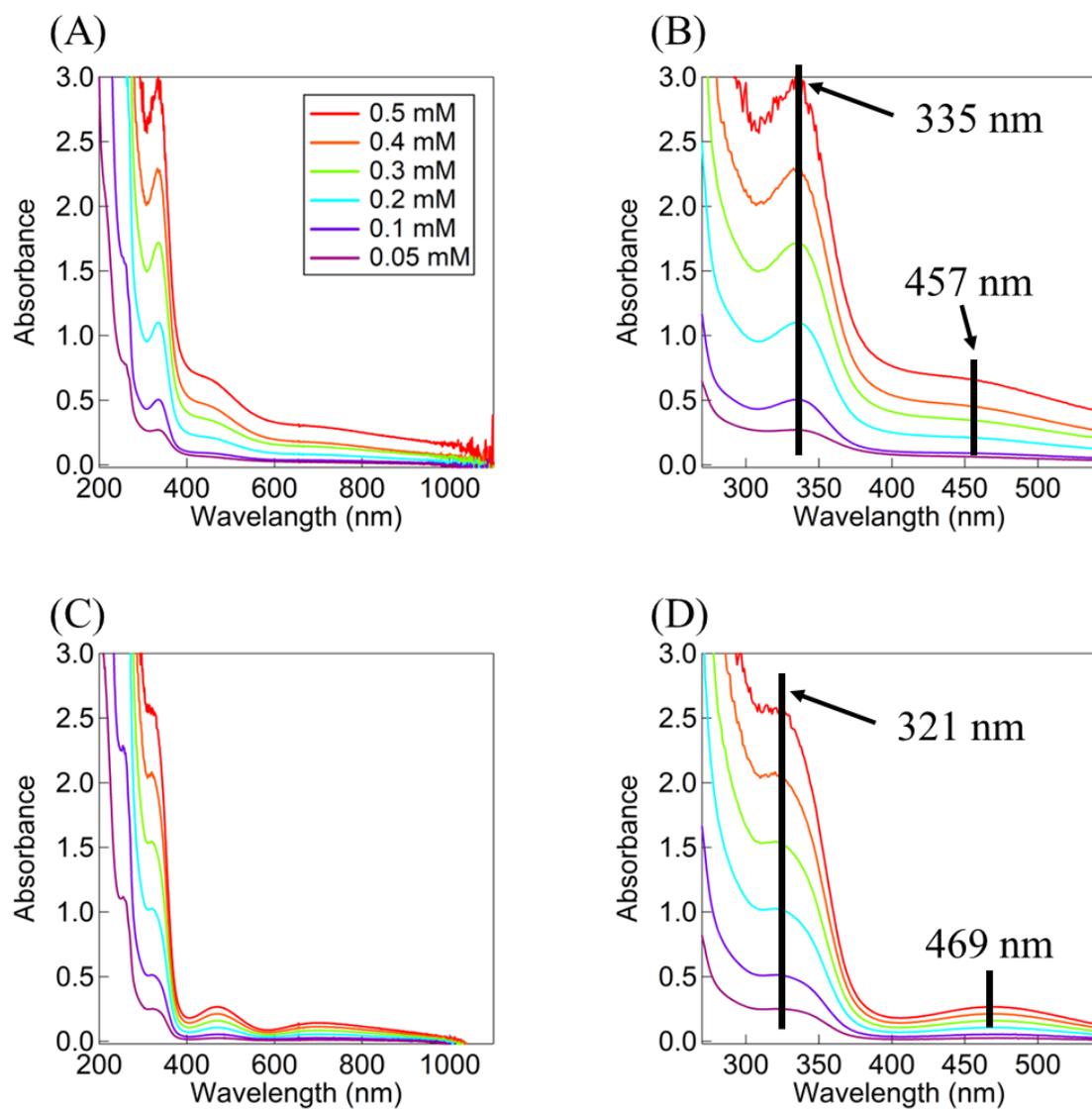
### 4-3-3. 二核銅(II)錯体の溶液中の構造

**3a**<sup>4-MeO</sup>, **3a**<sup>4-Cl</sup>は水に難溶なため、水溶液中の研究は**3b**<sup>4-MeO</sup>, **3b**<sup>4-Cl</sup>を用いた。水中の**3b**<sup>4-MeO</sup>, **3b**<sup>4-Cl</sup>の構造は分光学的測定で明らかにした。水中の**3b**<sup>4-MeO</sup> (0.5 mM)の電子スペクトルは、312 (5200), 432 nm (730 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)にそれぞれ Cu(II)-OAc/-OPh の LMCT に帰属できる吸収帯<sup>[3, 6, 7]</sup>を示した(Figure 4-2)。これらは錯体濃度を 50 μM まで希釈すると 340 (4600), 448 nm (460 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)にシフトした(Figure 4-3 (A), (B))。この**3b**<sup>4-MeO</sup>の結果は、**3**と同様であり、水中では μ-1,1-OAc が容易に水分子と置換して μ-1,1-OH<sub>2</sub> に変化したことを示している。水がない MeCN 中の場合は、**3b**<sup>4-MeO</sup> は 317 (5900), 439 nm (650 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)に吸収帯を示し、希釈してもシフトしなかった(Figure 4-3 (C), (D))。一方、水中の**3b**<sup>4-Cl</sup> (0.5 mM)の電子スペクトルは、335 (5700), 457 nm (1100 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)にそれぞれ Cu(II)-OAc/-OPh の LMCT に帰属できる吸収帯<sup>[3, 6, 7]</sup>を示し(Figure 4-4), **3b**<sup>4-Cl</sup>の濃度を 50 μM まで希釈してもほとんどシフトせず(Figure 4-4 (A), (B)), MeCN 中でも、321 (5200), 469 (530 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)の吸収帯は希釈してもシフトしなかった(Figure 4-4 (C), (D))。**3b**<sup>4-Cl</sup>には 2 つの μ-1,3-OAc 架橋があり、ドナー性の高い μ-1,3-OAc は銅に強く配位しているために水中でも水分子と置換しないことが示唆された。

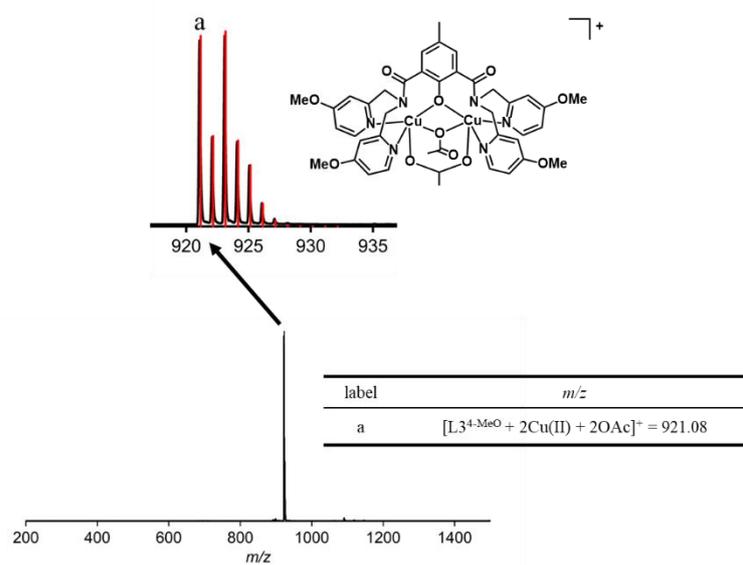
**3b**<sup>4-MeO</sup>, **3b**<sup>4-Cl</sup>の ESI MS と CSI MS の結果を Figure 4-5–4-8 に示す。**3b**<sup>4-MeO</sup>, **3b**<sup>4-Cl</sup>の MeCN 中の ESI MS スペクトルは、それぞれ *m/z* 921.08, 937.00 に [L3<sup>4-X</sup> + 2Cu(II) + 2OAc]<sup>+</sup> に対応する分子イオンピークを示した。水中では、**3b**<sup>4-MeO</sup> は新たに *m/z* 879.15 に [L3<sup>4-MeO</sup> + 2Cu(II) + OH + OAc]<sup>+</sup>の対応する質量ピークが観測された。一方、**3b**<sup>4-Cl</sup>では MeCN 中と水中とで共に 2 つの OAc を持つ質量ピークだけが観測され、水分子に置換された質量ピークは観測されなかった。電子スペクトル, ESI MS, CSI MS の結果より、水中では**3b**<sup>4-MeO</sup>の μ-1,1-OAc 架橋は容易に水分子と置換したが、**3b**<sup>4-Cl</sup>の 2 つの μ-1,3-OAc 架橋は置換されないことが示された。



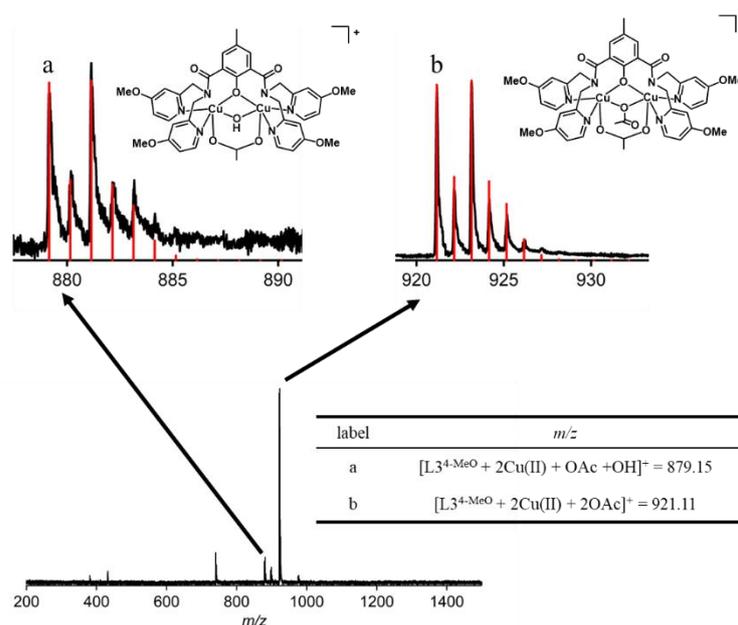
**Figure 4-3.** (A) Electronic absorption spectra of  $3b^{4-MeO}$  (0.05–0.5 mM) in  $H_2O$ . (B) An enlarged view of the graph of (A). (C) Electronic absorption spectra of  $3b^{4-MeO}$  (0.05–0.5 mM) in MeCN. (D) An enlarged view of the graph of (C).



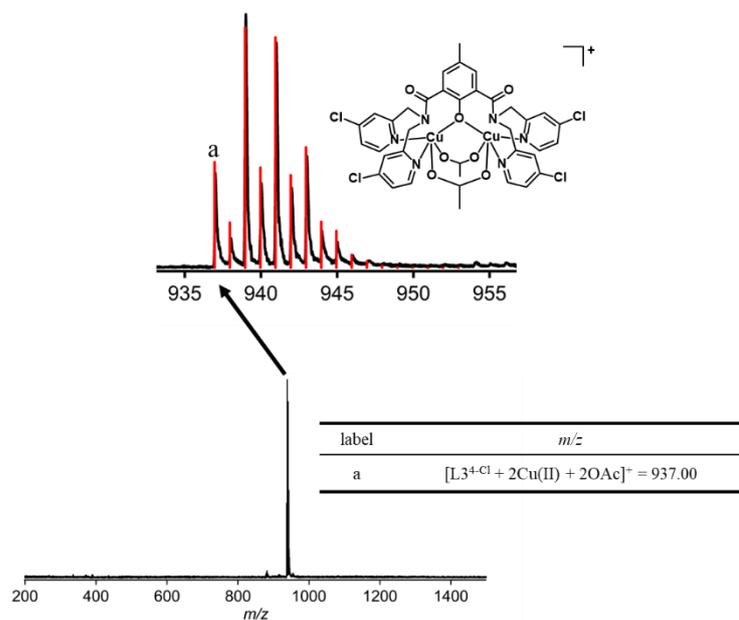
**Figure 4-4.** (A) Electronic absorption spectra of  $\mathbf{3b}^{4-Cl}$  (0.05–0.5 mM) in  $\text{H}_2\text{O}$ . (B) An enlarged view of the graph of (A). (C) Electronic absorption spectra of  $\mathbf{3b}^{4-Cl}$  (0.05–0.5 mM) in  $\text{MeCN}$ . (D) An enlarged view of the graph of (C).



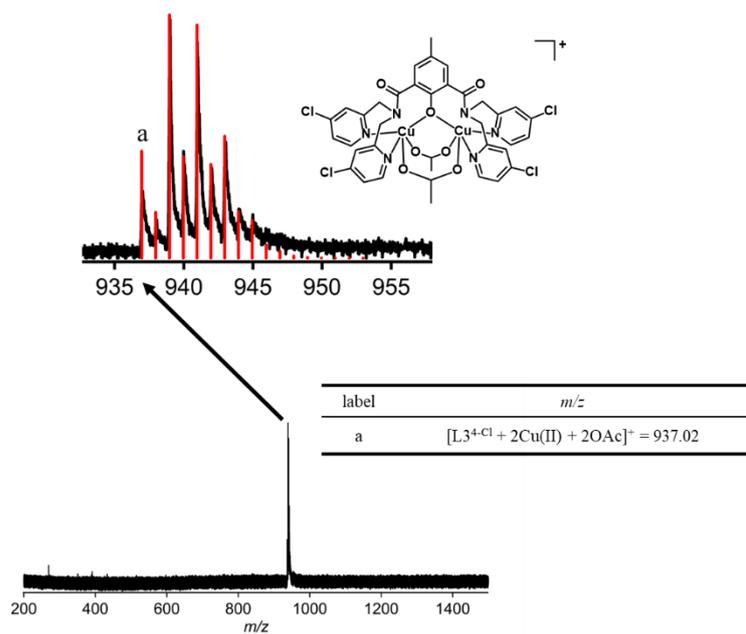
**Figure 4-5.** ESI MS spectrum of complex **3b**<sup>4-MeO</sup> measured in MeCN at room temperature at orifice 1: 10 V, orifice 2: 10 V, ring lens voltage: 10 V.



**Figure 4-6.** CSI MS spectrum of complex **3b**<sup>4-MeO</sup> measured in H<sub>2</sub>O at room temperature at orifice 1: 0 V, orifice 2: 10 V, ring lens voltage: 10 V.



**Figure 4-7.** ESI MS spectrum of complex  $3b^{4-Cl}$  measured in MeCN at room temperature at orifice 1: 10 V, orifice 2: 10 V, ring lens voltage: 10 V.



**Figure 4-8.** CSI MS spectrum of complex  $3b^{4-Cl}$  measured in  $H_2O$  at room temperature at orifice 1: 10 V, orifice 2: 10 V, ring lens voltage: 10 V.

#### 4-3-4. 二核銅(II)錯体の親油性

3, **3b**<sup>4-MeO</sup> および **3b**<sup>4-Cl</sup> の親油性を 1-octanol/H<sub>2</sub>O 系での分配係数(log  $P_{ow}$ )<sup>[8]</sup>から推定した。3, **3b**<sup>4-MeO</sup> および **3b**<sup>4-Cl</sup> の log  $P_{ow}$  値は, それぞれ-0.55, 0.18, 1.94 であった(Table 4-3). 疎水的な置換基の導入により, 錯体の親油性が向上することが明らかとなった。

Table 4-3. Hydrophobicity (log  $P_{ow}$ )

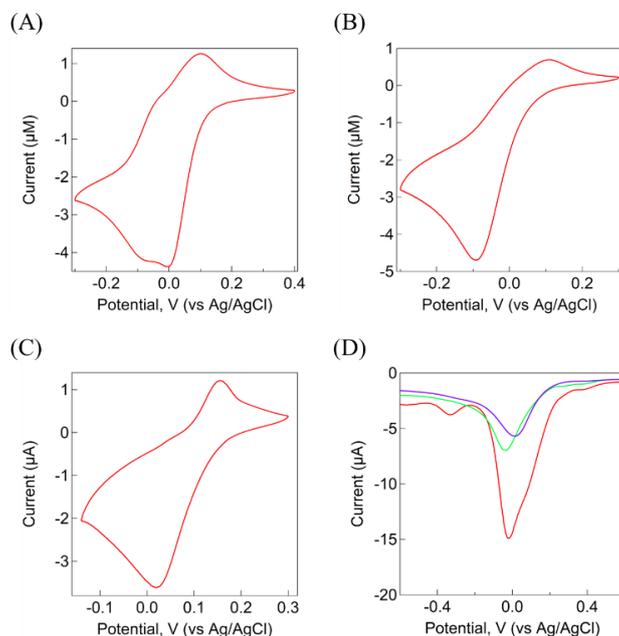
Complex	Hydrophobicity (log $P_{ow}$ )
3	-0.55 ± 0.09
<b>3b</b> <sup>4-MeO</sup>	0.18 ± 0.05
<b>3b</b> <sup>4-Cl</sup>	1.94 ± 0.09

#### 4-3-5. 二核銅(II)錯体の酸化還元挙動

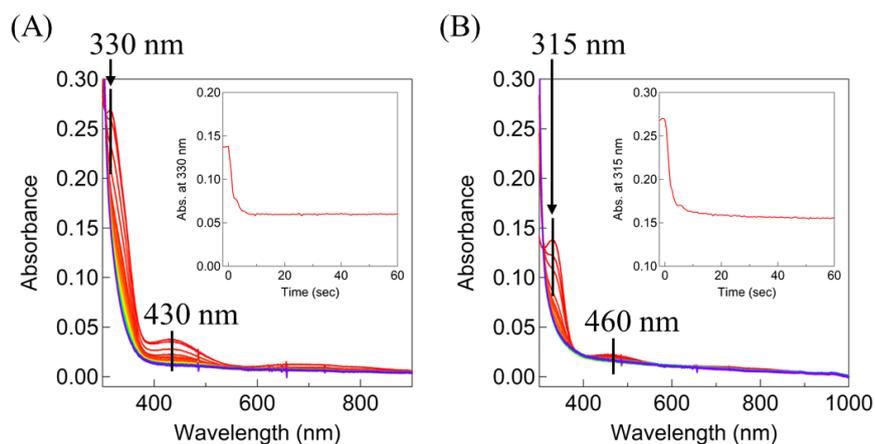
配位子に導入した置換基の電子効果を調べるため, pH 6.0 の緩衝液中(MES Buffer, 200 mM), 3, **3b**<sup>4-MeO</sup> および **3b**<sup>4-Cl</sup> (0.5 mM)の酸化還元電位を測定した。これらの cyclic voltammogram (CV)と Square Wave Voltammetry (SWV)を Figure 4-9 に示す。これらの錯体の CV では, -0.10~+0.10V の間に重なり合った 2 つの redox couple が見られた。3 は,  $E_{1/2} = -0.05$  V ( $\Delta E_p = 0.06$  V)に Cu(I)Cu(II)/Cu(I)Cu(I)に帰属される準可逆な redox couple と  $E_{pc} = 0.0$ ,  $E_{pa} = 0.1$  V に Cu(II)Cu(II)/Cu(I)Cu(II)に帰属される不可逆な redox couple を示した<sup>[3]</sup>。 **3b**<sup>4-MeO</sup> は,  $E_{pc} = -0.09$  V,  $E_{pa} = 0.11$  V に, **3b**<sup>4-Cl</sup> は,  $E_{pc} = 0.02$  V,  $E_{pa} = 0.155$  V にいずれも Cu(II)Cu(II)/Cu(I)Cu(I)に帰属される不可逆な redox couple を示した。 Figure 4-8 (D)に, SWV で測定された酸化還元ピークを示す。これらの Cu(I)Cu(II)/Cu(I)Cu(I)に対応する酸化還元電位は, **3b**<sup>4-MeO</sup> (-0.04 V) < 3 (-0.02 V) < **3b**<sup>4-Cl</sup> (0.02 V)の順で正側にシフトした。これは, 置換基の電子効果を明確に示しており還元されやすさの順は **3b**<sup>4-MeO</sup> < 3 < **3b**<sup>4-Cl</sup> である。したがって, **3b**<sup>4-Cl</sup> が最も還元されやすく, 電子求引性の Cl 基は Cu(I)を安定化する。一方, **3b**<sup>4-MeO</sup> が最も還元されにくく, 電子供与性の MeO 基は Cu(I)を不安定化する。したがって, 還元された錯体の還元力の強さは **3b**<sup>4-Cl</sup> < 3 < **3b**<sup>4-MeO</sup> の順になる。

AscNa 存在下での **3b**<sup>4-MeO</sup>, **3b**<sup>4-Cl</sup> の還元を電子スペクトルと CSI MS で追跡した結果を Figure 4-10~4-12 に示す。AscNa の添加で, **3b**<sup>4-MeO</sup> の 330, 430 nm および **3b**<sup>4-Cl</sup> の 315, 460 nm の吸収帯は直ちに減衰した(Figure 4-10)。CSI MS では, **3b**<sup>4-MeO</sup>, **3b**<sup>4-Cl</sup> は, AscNa の添加で, それぞれ  $m/z$  802.95 と 819.00 に  $[L3^{4-X} + 2Cu(I)]^+$  (Cu(I)Cu(I))に強い質量ピーク

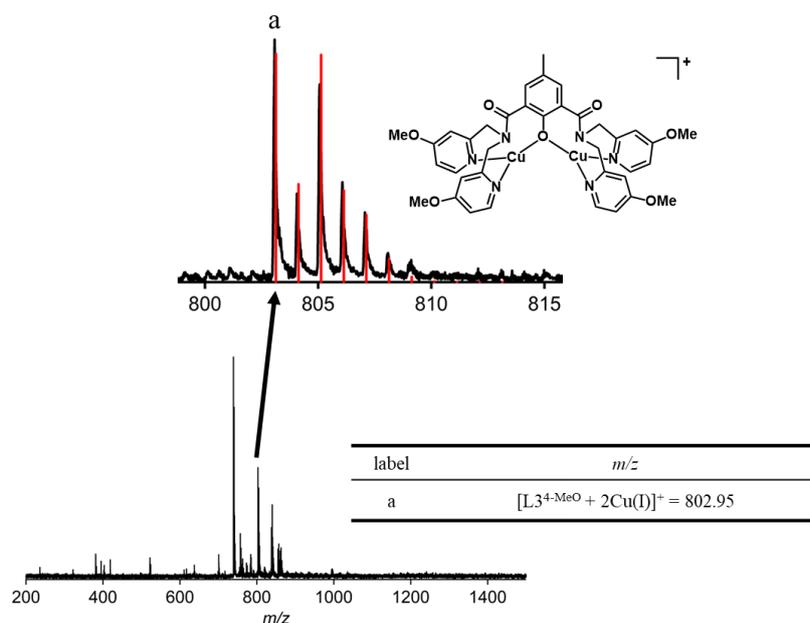
クを示した(Figure 4-11, 12). これらの結果から,  $3b^{4-MeO}$ ,  $3b^{4-Cl}$ が AscNa で容易に還元されることがわかる.



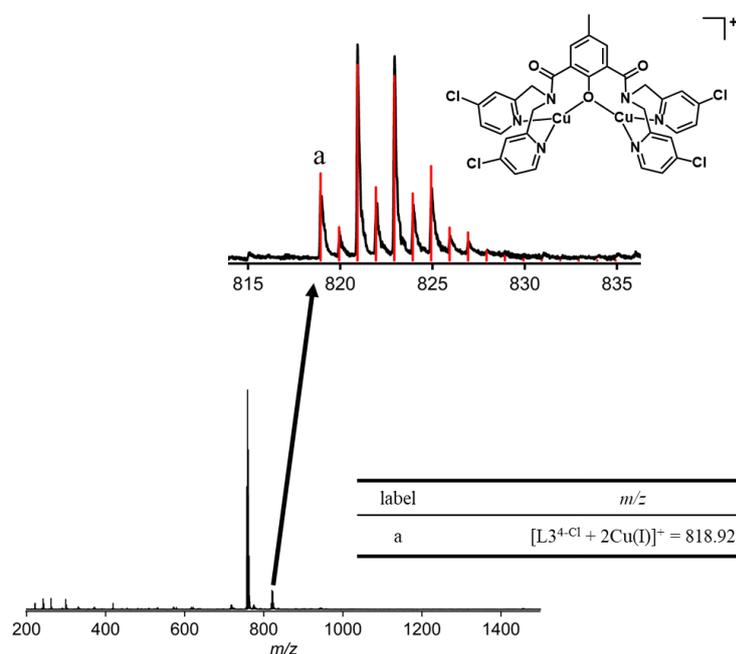
**Figure 4-9.** Cyclic voltammograms of **3** (A),  $3b^{4-MeO}$  (B), and  $3b^{4-Cl}$  (C) at pH6.0, respectively. The measurements were made at  $23^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  under  $\text{N}_2$ . Experimental conditions: [Complex] = 0.5 mM, Glassy carbon working electrode, Pt wire counter electrode, Ag/AgCl reference electrode, Scan rate:  $10 \text{ mV s}^{-1}$ , Sensitivity:  $10 \mu\text{A/V}$ . (D) SWV traces of **3** (red),  $3b^{4-MeO}$  (light green) and  $3b^{4-Cl}$  (purple) (0.5 mM) at pH 6.0.



**Figure 4-10.** Absorption spectral changes (red to purple lines, 0.5 sec at every interval) of  $3b^{4-MeO}$  (A) and  $3b^{4-Cl}$  (B) (0.05 mM) upon addition of AscNa (0.5 mM) in pH 6.0 (MES, 200 mM) and NaOAc (1.5 mM) with 3% MeCN at rt under  $\text{N}_2$  (inset: time courses monitored at 330 nm (A) and 315 nm (B)).



**Figure 4-11.** CSI MS spectra obtained upon reaction of **3b**<sup>4-MeO</sup> (0.5 mM) with AscNa (20 eq) in the presence of NaOAc (20 eq) in H<sub>2</sub>O at 5°C under N<sub>2</sub>, at orifice 1: 10 V, orifice 2: 0 V, ring lens voltage: 10 V.



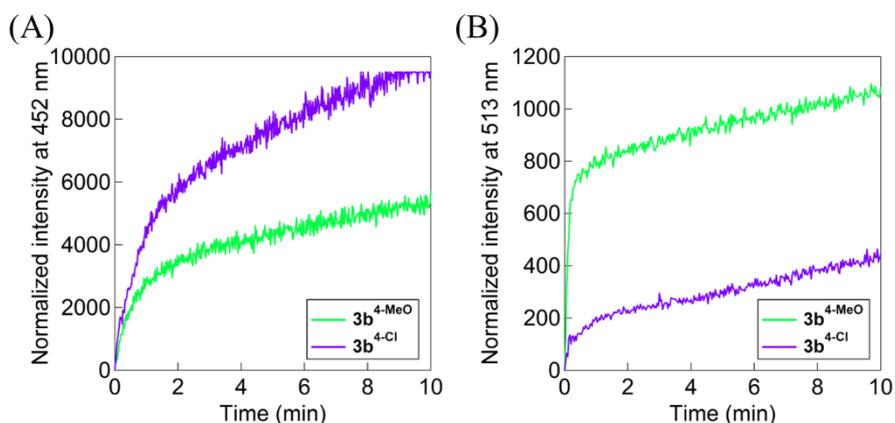
**Figure 4-12.** CSI MS spectra obtained upon reaction of **3b**<sup>4-Cl</sup> (0.5 mM) with AscNa (20 eq) in the presence of NaOAc (20 eq) in H<sub>2</sub>O at 5°C under N<sub>2</sub>, at orifice 1: 10 V, orifice 2: 0 V, ring lens voltage: 10 V.

#### 4-3-6. 二核銅(II)錯体の還元的 O<sub>2</sub> 活性化

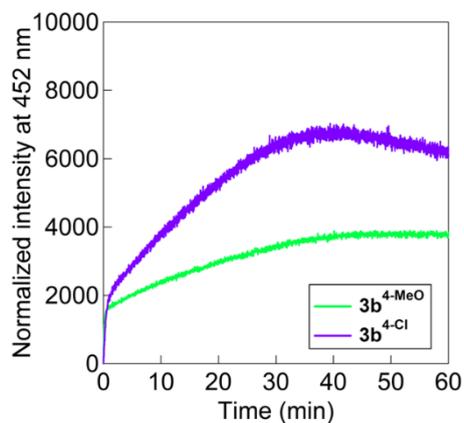
3 は AscNa と反応して Cu(I)Cu(II)と Cu(I)Cu(I)に還元され、O<sub>2</sub>を活性化してヒドロキシラジカル(HO•)を生成すると報告されている。空気下での、**3b**<sup>4-MeO</sup>, **3b**<sup>4-Cl</sup>と AscNa の反応を coumarin と pentafluorobenzenesulfonyl fluoresce (PFBS)を用いて蛍光スペクトルで追跡し、HO•と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が生成することを見出した。37°C, pH 6.0 ないしは pH 7.4 でのこれらの蛍光スペクトルの経時変化を Figure 4-13, 4-14 に示す。細胞内では抗酸化剤が数 mM で存在するため、今回、AscNa を 1500 μM 添加した。coumarin と HO•の反応では umbelliferone が生じて 332 nm で励起すると 452 nm に、また PFBS と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の反応では fluorescein が生じて 385 nm で励起すると 513 nm に蛍光バンドを示す<sup>[9, 10]</sup>。Figure 4-13 (A)に示す coumarin を用いた追跡の 452 nm の経時変化より、HO•生成量は、**3b**<sup>4-MeO</sup> < **3b**<sup>4-Cl</sup>の順で多かった。Figure 4-13 (B)に示す PFBS を用いた追跡の 513 nm の経時変化より、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成量は、**3b**<sup>4-Cl</sup> < **3b**<sup>4-MeO</sup>の順で多かった。錯体の 2 電子還元体 Cu(I)Cu(I)との反応で O<sub>2</sub>が 2 電子還元されるとペルオキシ種が生じ、さらに 1 電子還元されると HO•が生じると考えられる。**3b**<sup>4-MeO</sup> の μ-1,1-OAc が水中で容易に水分子と置換することから、これらから生じるペルオキシ種はもう 1 電子還元される前に直ちに H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を放出すると予測され、Figure 4-13 (B)の結果とよく一致する。

一方、Figure 4-13 (B)に示すように **3b**<sup>4-Cl</sup>の反応では H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成量が少ない。前述のように **3b**<sup>4-Cl</sup>の μ-1,3-OAc は水分子と置換せず安定である。この事実から、**3b**<sup>4-Cl</sup>から生じるペルオキシ種による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>放出は遅いと考えられる。このために、このペルオキシ種は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を放出する前に 1 電子還元されて HO•が生じる反応が主反応になったと考えられる。また、電子求引性の Cl 基は Cu(II)のルイス酸性を高めるのでペルオキシ種の還元を容易にするはずであり、HO•生成を有利していると考えられる。

また、Figure 4-13 (B)に示すように、**3b**<sup>4-MeO</sup> および **3b**<sup>4-Cl</sup> はともに正常細胞に近い環境である pH 7.4 でも HO•が生じること、pH 6.0 と同様に HO•生成量は、**3b**<sup>4-MeO</sup> < **3b**<sup>4-Cl</sup>の順で多いことが明らかとなった。



**Figure 4-13.** Time courses of the normalized emission intensity monitored at 452 nm (A) and 513 nm (B) for  $3b^{4-MeO}$  (light green) and  $3b^{4-Cl}$  (purple). Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (MES, pH 6.0), [complex] = 30  $\mu$ M, [AscNa] = 1500  $\mu$ M, [coumarin] = 500  $\mu$ M (A) or [PFBS] = 25  $\mu$ M (B), under air at 37°C.



**Figure 4-14.** Time courses of the normalized emission intensity monitored at 452 nm for  $3b^{4-MeO}$  (light green) and  $3b^{4-Cl}$  (purple). Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (MOPS, pH 7.4), [complex] = 30  $\mu$ M, [AscNa] = 1500  $\mu$ M, [coumarin] = 500  $\mu$ M, under air at 37°C.

#### 4-3-7. 二核銅(II)錯体の細胞毒性

**3**, **3b**<sup>4-MeO</sup> および **3b**<sup>4-Cl</sup> の細胞毒性をさまざまな細胞を用いて MTT assay<sup>[11-13]</sup>で評価した。細胞増殖 50%阻害濃度(50% Inhibition Concentration, IC<sub>50</sub> 値)は, 細胞生存率(%) vs log [X](X=**3**, **3b**<sup>4-MeO</sup>, **3b**<sup>4-Cl</sup>)をプロットしたグラフから算出した。算出した IC<sub>50</sub> 値を Table 4-4 に示す。まず, 24 時間作用させた時, **3b**<sup>4-MeO</sup>, **3b**<sup>4-Cl</sup> は全ての細胞株に対して **3** よりも高い毒性を示した(Table 4-3)。実際に, 子宮頸がん細胞 HeLa, 肺がん細胞 A549, 膵臓がん細胞 PK-59 に対する IC<sub>50</sub> 値は, **3** では 72.8, 92.7, 66.5 μM, **3b**<sup>4-MeO</sup> では 10.0, 20.0, 14.7 μM, **3b**<sup>4-Cl</sup> では 14.2, 21.3, 18.1 μM で, **3** よりも **3b**<sup>4-MeO</sup> は約 4–7 倍, **3b**<sup>4-Cl</sup> は約 4–5 倍高い細胞毒性を示した。この結果と第三章において脂溶性の向上が細胞内取込量の向上に大きく寄与していなかったことから, 置換基の疎水効果で錯体の脂溶性が高くなり細胞内での錯体の挙動が変化したことが細胞毒性向上の理由といえる。肺の正常細胞 WI-38, 膵臓の正常細胞 2C6 に対する IC<sub>50</sub> 値は, **3** では 121, 88.2 μM, **3b**<sup>4-MeO</sup> では 22.0, 23.7 μM で, **3** と **3b**<sup>4-MeO</sup> は正常細胞よりもがん細胞に対してそれぞれ約 1.3 倍, 1.1–1.6 倍高い細胞毒性を示し, **3** と **3b**<sup>4-MeO</sup> はがん細胞選択性を示した。一方で, **3b**<sup>4-Cl</sup> はがん細胞よりも正常細胞に対して約 1.9–7.1 倍高い細胞毒性を示し, 正常細胞選択性を示した。

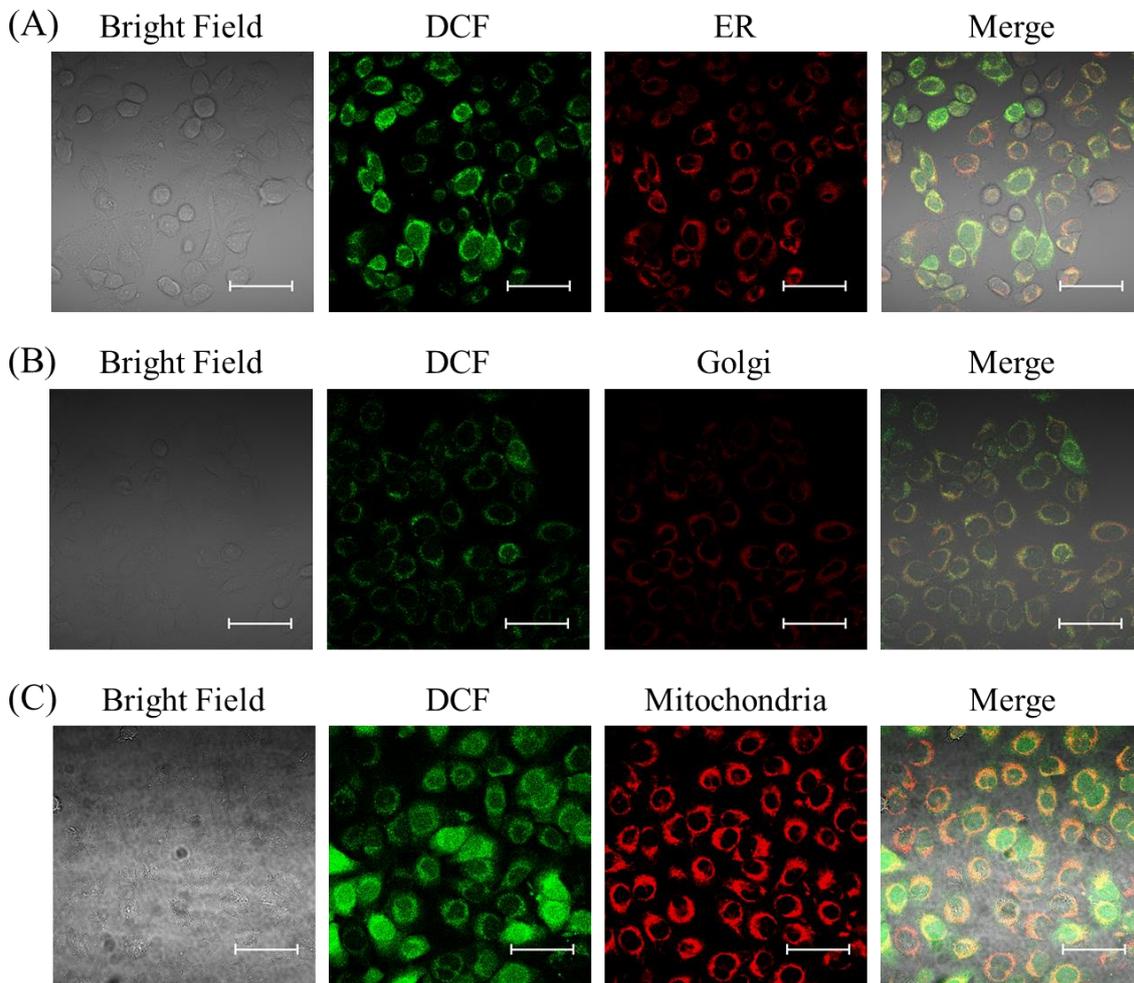
**Table 4-4. In vitro cytotoxicity of **3**, **3b**<sup>4-MeO</sup>, and **3b**<sup>4-Cl</sup> against various cancer and normal cells by means of MTT assay (24 h) (Mean ± SD)**

Complex	IC <sub>50</sub> (μM) (Mean ± SD)						
	Cervical	Lung			Pancreas		
	HeLa (Cancer)	A549 (Cancer)	WI-38 (Normal)	SF	PK-59 (Cancer)	2C6 (Normal)	SF
<b>3</b>	72.8 ± 2.1	92.7 ± 1.4	121 ± 11	1.3	66.5 ± 3.1	88.2 ± 8.9	1.3
<b>3b</b> <sup>4-MeO</sup>	10.0 ± 2.8	20.0 ± 1.6	22.0 ± 2.3	1.1	14.7 ± 0.9	23.7 ± 1.7	1.6
<b>3b</b> <sup>4-Cl</sup>	14.2 ± 2.3	21.3 ± 1.5	2.94 ± 0.28	0.14	18.1 ± 1.5	9.53 ± 0.64	0.53

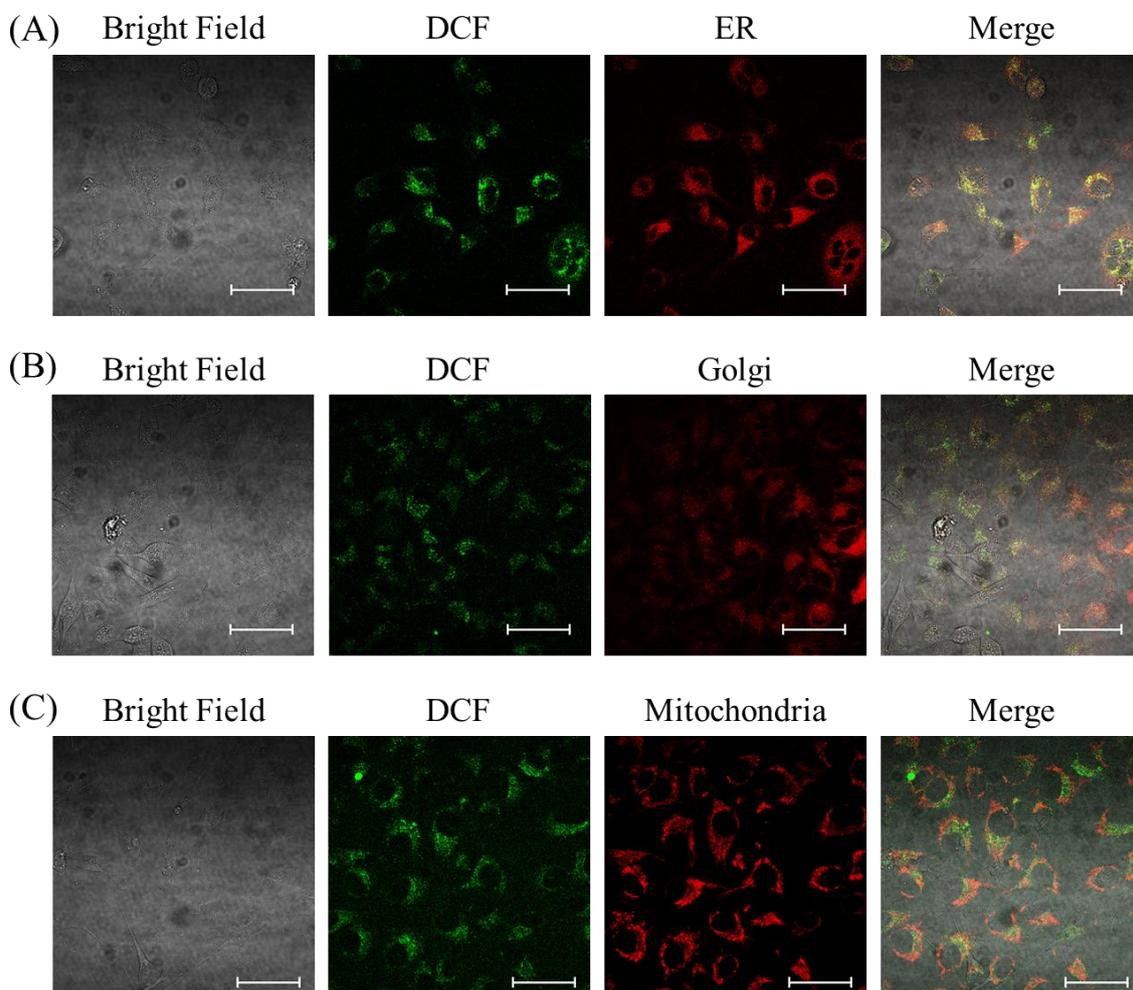
#### 4-3-8. 二核銅(II)錯体の細胞内での ROS 生成

**3**, **3b**<sup>4-MeO</sup>, **3b**<sup>4-Cl</sup> の細胞内での ROS 生成を 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) を用いて共焦点顕微鏡で観察した。DCFH-DA は細胞内エステラーゼによる脱アセチル化で非蛍光型の 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) となり、さらに ROS による酸化で蛍光型の 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF) となる<sup>[14-16]</sup>。HeLa 細胞に **3**, **3b**<sup>4-MeO</sup> および **3b**<sup>4-Cl</sup> を 4 時間作用させたときの結果を Figure 4-15-4-17 に示す。また、錯体の細胞小器官分布を特定するため、ER 染色剤 ER-Tracker™ Red (BODIPY™ TR Glibenclamide), Golgi 体染色剤 BODIPY™ TR Ceramide complexed to BSA, ミトコンドリア染色剤 MitoTracker™ Deep Red FM を用いて共染色を行った。**3**, **3b**<sup>4-MeO</sup> および **3b**<sup>4-Cl</sup> の作用により、細胞内で DCF の緑色蛍光が観察されたことから、錯体は細胞に取込まれ、細胞内で ROS を生成したことが明らかになった。**3** では、DCF の緑色蛍光がミトコンドリア染色剤の赤色蛍光と重なって黄色に観察されたことから、ミトコンドリアに存在し、ROS を生成したといえる(Figure 4-15 (C))。 **3b**<sup>4-MeO</sup>, **3b**<sup>4-Cl</sup> では、DCF の緑色蛍光が ER 染色剤, Golgi 体染色剤の赤色蛍光と重なって黄色に観察されたことから、これらは ER, Golgi 体に存在し、ROS を生成したといえる(Figure 4-16, 4-17 (A), (B))。 **3b**<sup>4-MeO</sup>, **3b**<sup>4-Cl</sup> が疎水的な膜系からなる ER や Golgi 体に局在したのは、MeO, Cl 基の疎水効果で錯体の脂溶性が増大したためと考えられる。ER や Golgi 体には、様々なストレスに対するストレス応答機構が備わっており、細胞死が誘導される。**3b**<sup>4-MeO</sup>, **3b**<sup>4-Cl</sup> は、ER や Golgi 体に局在して ROS 生成で酸化ストレスを誘導することにより、ミトコンドリアに主に局在する **3** よりも高い細胞毒性を示したと考えられる。

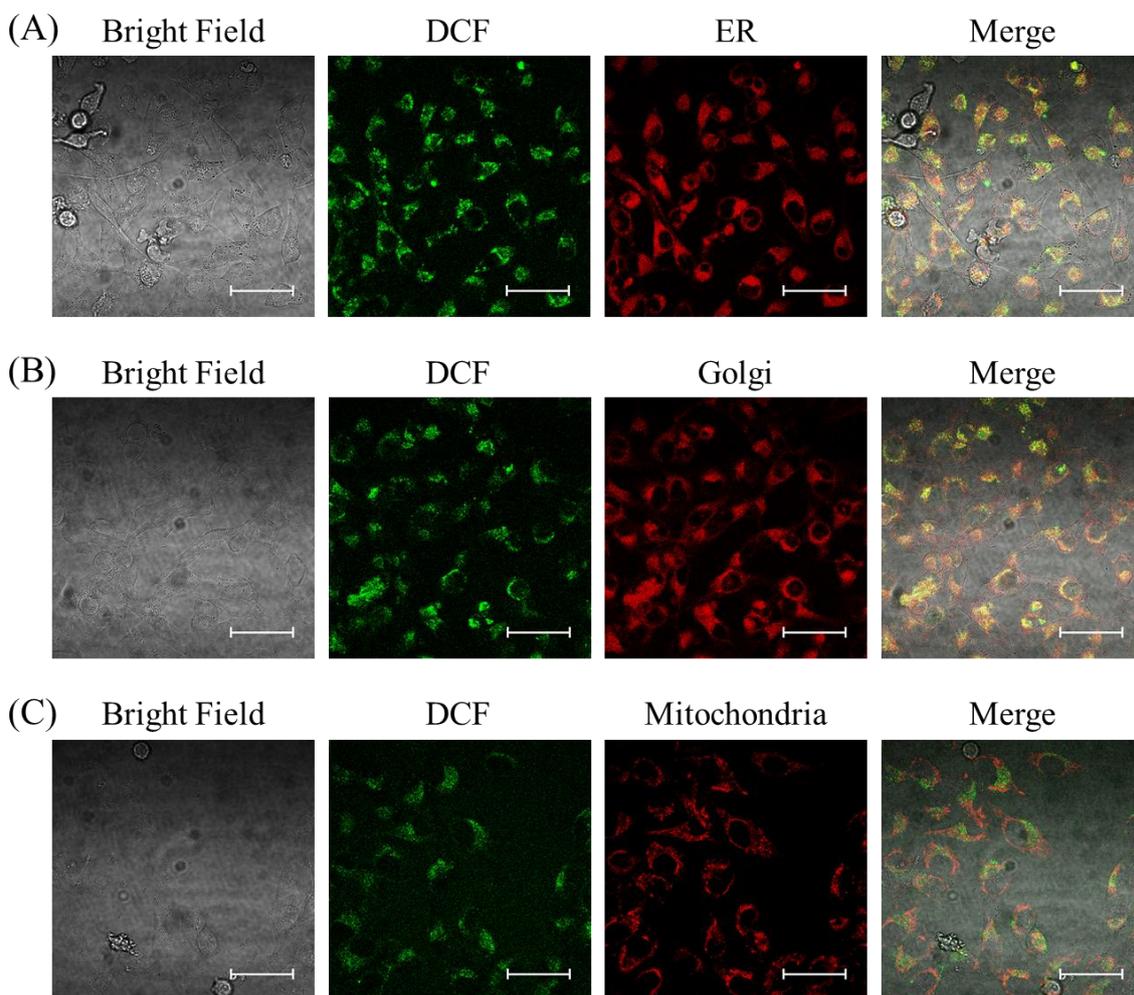
細胞取込経路を調べるため、4°C, 37°C 条件で、**3**, **3b**<sup>4-MeO</sup> および **3b**<sup>4-Cl</sup> (100 μM) を HeLa 細胞に対して 1 時間作用させた。結果を Figure 4-18, 4-19 に示す。4°C 条件(Figure 4-18)でも、37°C 条件(Figure 4-19)と同様の緑色蛍光が観察されたことから、**3**, **3b**<sup>4-MeO</sup> および **3b**<sup>4-Cl</sup> は直接膜透過によって細胞に取込まれていることが示唆された。同濃度の **3**, **3b**<sup>4-MeO</sup>, **3b**<sup>4-Cl</sup> (100 μM) を HeLa 細胞に作用させた際の DCF の緑色蛍光強度を比較すると **3b**<sup>4-MeO</sup> < **3** < **3b**<sup>4-Cl</sup> であり、これは 4-3-6 において測定を行った水中における HO• の生成量の順(Figure 4-13(A))と一致した。



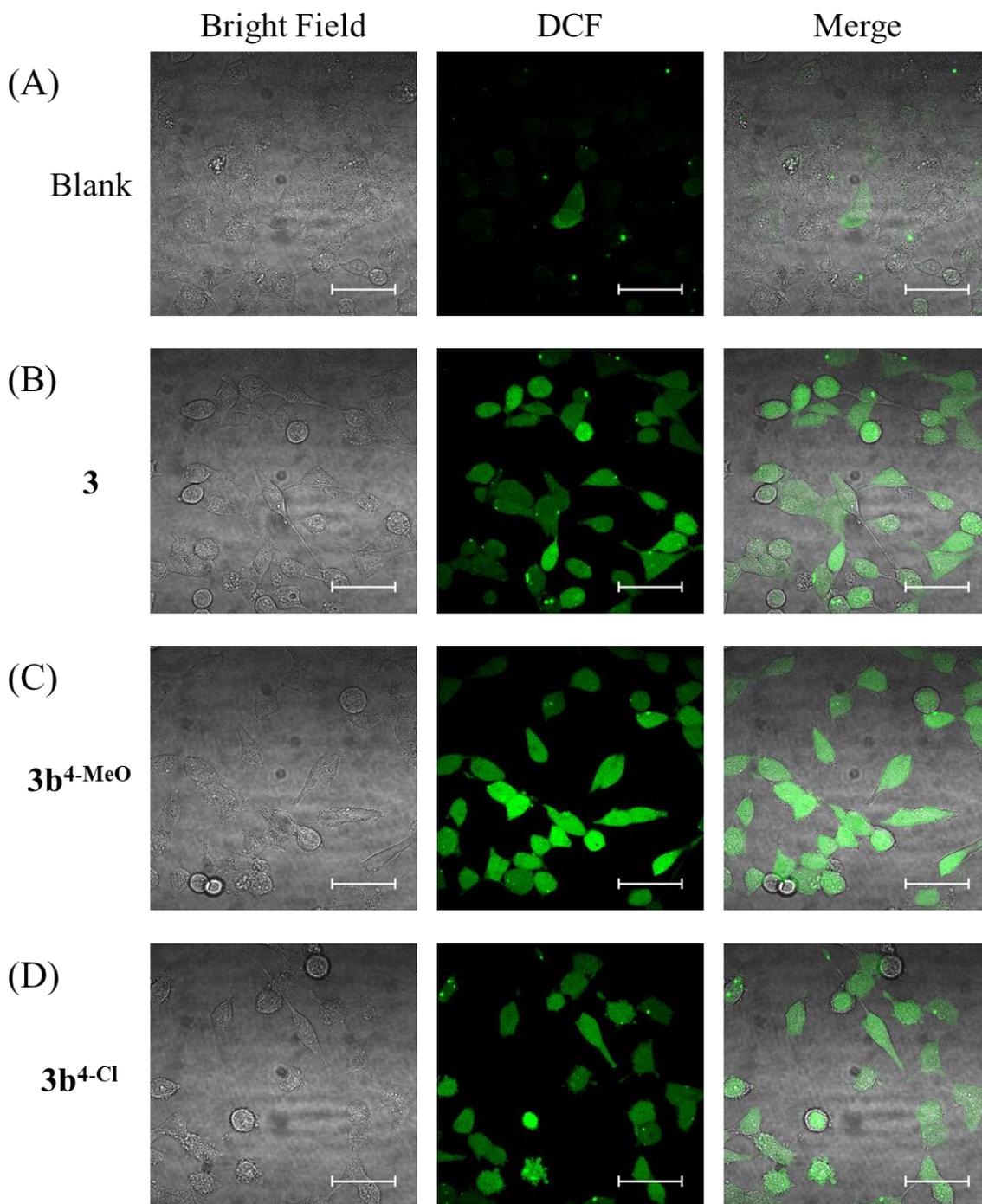
**Figure 4-15.** Confocal microscopic images of **3** (70  $\mu\text{M}$ ) in HeLa cells on 4 h incubation in the dark. Green fluorescence indicates the fluorescence of DCF ( $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ). Red fluorescence indicates ER staining of ER-Tracker<sup>TM</sup> Red (BODIPY<sup>TM</sup> TR Glibenclamide) (1  $\mu\text{M}$ ) ( $\lambda_{\text{ex}} = 561 \text{ nm}$ ) (A), Golgi apparatus staining of BODIPY<sup>TM</sup> TR Ceramide complexed to BSA (1  $\mu\text{M}$ ) ( $\lambda_{\text{ex}} = 561 \text{ nm}$ ) (B), and mitochondrial staining of MitoTracker<sup>TM</sup> Deep Red FM (50 nM) (Thermofisher) ( $\lambda_{\text{ex}} = 638 \text{ nm}$ ) (C). Scale bar is 50  $\mu\text{m}$ .



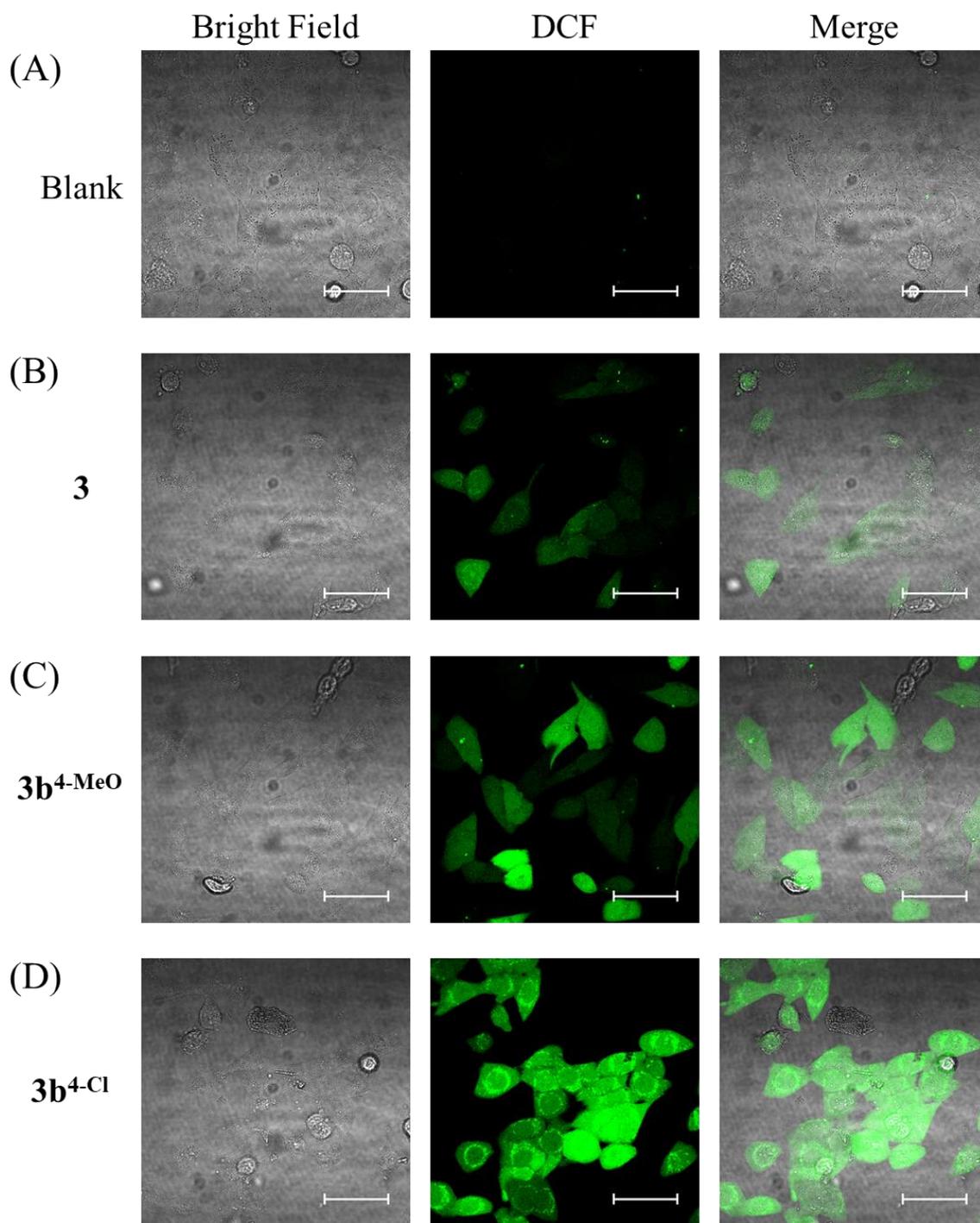
**Figure 4-16.** Confocal microscopic images of  $3b^{4-MeO}$  ( $10\ \mu M$ ) in HeLa cells on 4 h incubation in the dark. Green fluorescence indicates the fluorescence of DCF ( $\lambda_{ex} = 488\ \text{nm}$ ). Red fluorescence indicates ER staining of ER-Tracker<sup>TM</sup> Red (BODIPY<sup>TM</sup> TR Glibenclamide) ( $1\ \mu M$ ) ( $\lambda_{ex} = 561\ \text{nm}$ ) (A), Golgi apparatus staining of BODIPY<sup>TM</sup> TR Ceramide complexed to BSA ( $1\ \mu M$ ) ( $\lambda_{ex} = 561\ \text{nm}$ ) (B), and mitochondrial staining of MitoTracker<sup>TM</sup> Deep Red FM ( $50\ \text{nM}$ ) (Thermofisher) ( $\lambda_{ex} = 638\ \text{nm}$ ) (C). Scale bar is  $50\ \mu m$ .



**Figure 4-17.** Confocal microscopic images of  $3b^{4-Cl}$  ( $10 \mu M$ ) in HeLa cells on 4 h incubation in the dark. Green fluorescence indicates the fluorescence of DCF ( $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$ ). Red fluorescence indicates ER staining of ER-Tracker™ Red (BODIPY™ TR Glibenclamide) ( $1 \mu M$ ) ( $\lambda_{ex} = 561 \text{ nm}$ ) (A), Golgi apparatus staining of BODIPY™ TR Ceramide complexed to BSA ( $1 \mu M$ ) ( $\lambda_{ex} = 561 \text{ nm}$ ) (B), and mitochondrial staining of MitoTracker™ Deep Red FM ( $50 \text{ nM}$ ) (Thermofisher) ( $\lambda_{ex} = 638 \text{ nm}$ ) (C). Scale bar is  $50 \mu m$ .



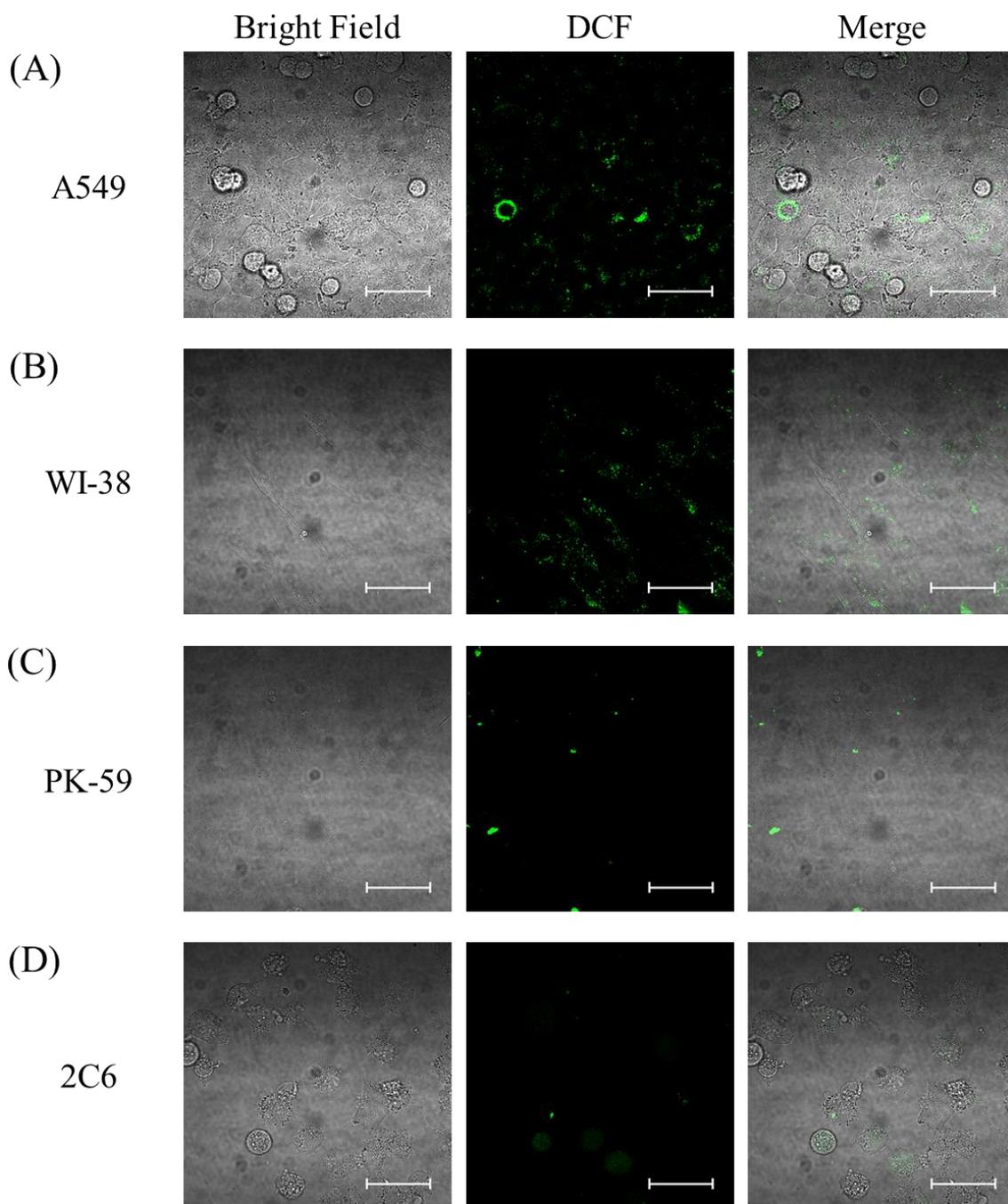
**Figure 4-18.** Confocal microscopic images of HeLa cells. After preincubation for 30 min in the dark 4°C condition, none (A), **3** (B), **3b<sup>4-MeO</sup>** (C), and **3b<sup>4-Cl</sup>** (D) (100 μM) with DCF (20 μM) were added and then incubated 1 h in the dark 4°C condition. Green fluorescence indicates the fluorescence of DCFDA ( $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ). Scale bar is 50 μm.



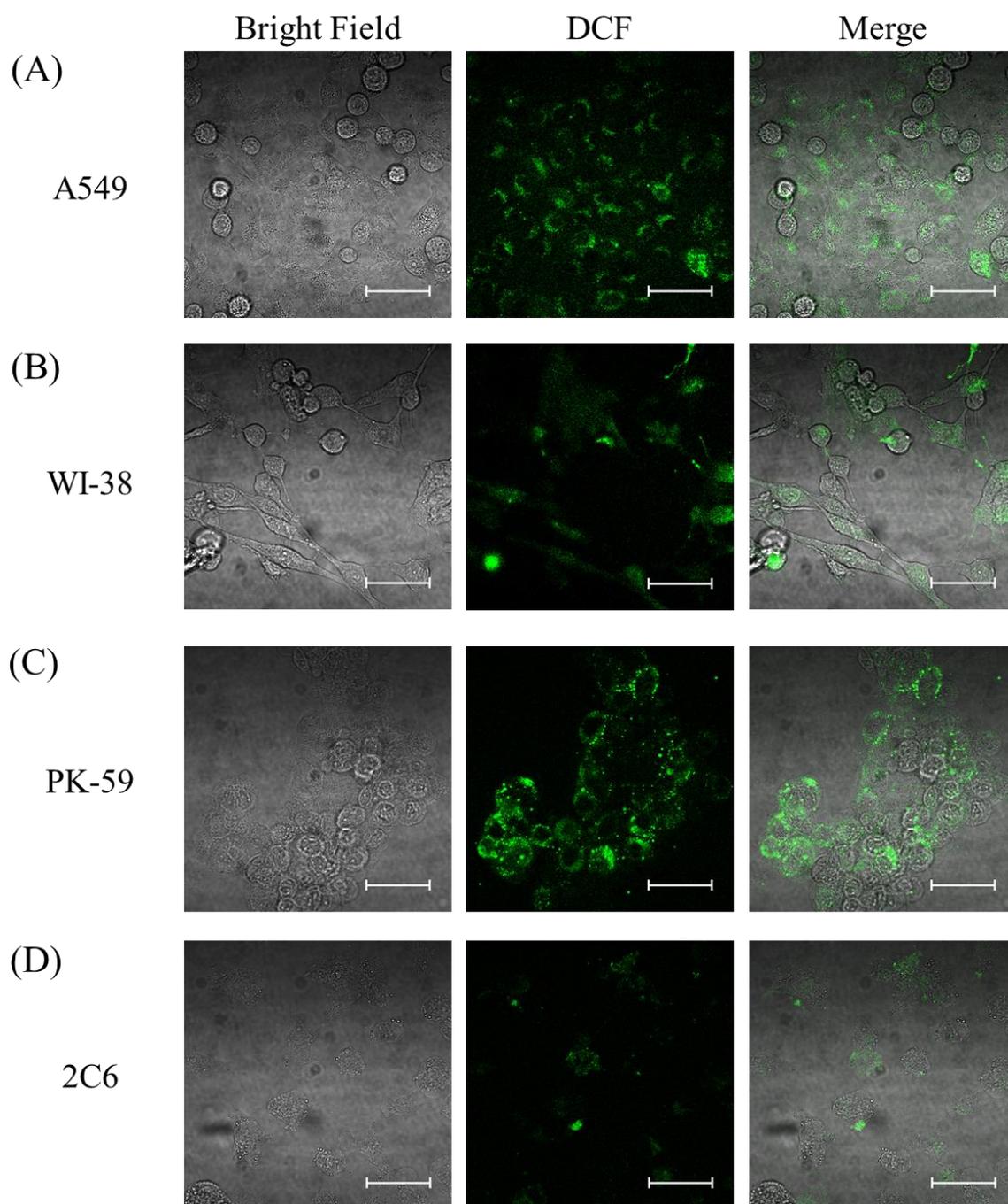
**Figure 4-19.** Confocal microscopic images of HeLa cells. None (A), **3** (B), **3b<sup>4-MeO</sup>** (C), and **3b<sup>4-Cl</sup>** (D) (100  $\mu$ M) with DCF (20  $\mu$ M) were added and then incubated 1 h in the dark 37°C condition. Green fluorescence indicates the fluorescence of DCF ( $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ). Scale bar is 50  $\mu$ m.

**3b<sup>4-Cl</sup>** と **3**, **3b<sup>4-MeO</sup>** の間てがん細胞選択的毒性が異なる理由を明らかとするため、肺および膀胱のがん細胞と正常細胞内で ROS 生成を観測した。共焦点顕微鏡の強度等の条件を揃えて測定した結果を Figure 4-20–4-24 に示す。**3** と **3b<sup>4-MeO</sup>** は、がん細胞 A549, PK-59 内では DCF の強い緑色蛍光が観察されたが、正常細胞 WI-38, 2C6 ではほとんど観察されなかった(Figure 4-21, 4-22)。一方、**3b<sup>4-Cl</sup>** はがん細胞 A549, PK-59 でも正常細胞 WI-38, 2C6 でも DCF の強い緑色蛍光が観察された(Figure 4-23)。以上の結果から、がん細胞よりも抗酸化剤濃度の低い正常細胞の環境下では、**3**, **3b<sup>4-MeO</sup>** は ROS 生成量が少ないために正常細胞への細胞毒性が低下したといえる。**3b<sup>4-Cl</sup>** は、**3** と **3b<sup>4-MeO</sup>** よりも酸化還元電位が高いので、抗酸化剤濃度が低い正常細胞の環境下でも容易に還元されて ROS 生成が起こり、酸化ストレス耐性のない正常細胞に対して高い細胞毒性を示し、これにより正常細胞選択的毒性を示したと考えられる。

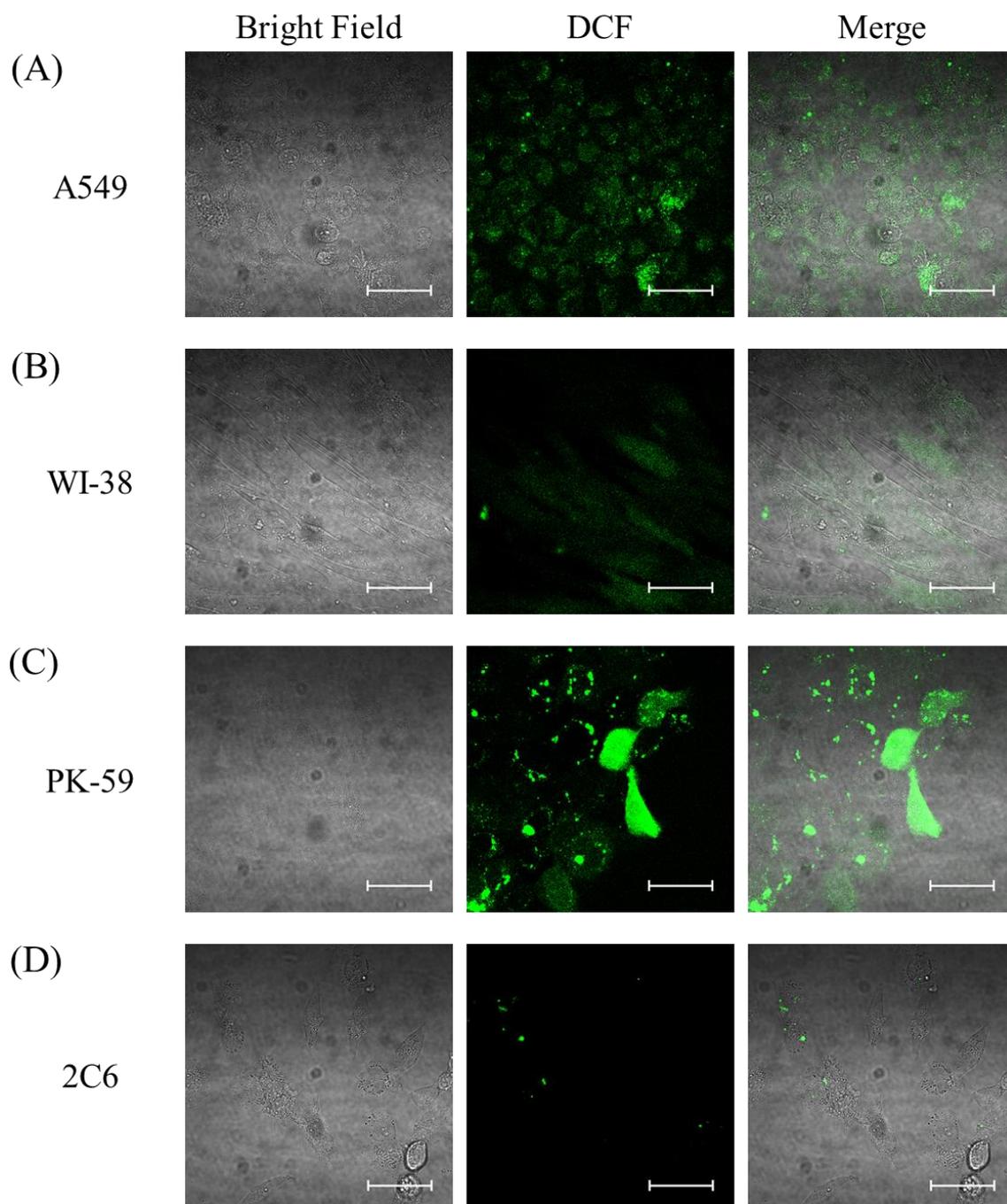
4-3-6 で示したように、水中で PFBS を用いた H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成の測定により、**3**, **3b<sup>4-MeO</sup>** は AscNa との反応で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を生成したが、**3b<sup>4-Cl</sup>** は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成量が少なかった。そこで細胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の検出試薬である BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac<sup>[17, 18]</sup>を用いて HeLa 細胞内での H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成を調べた。BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac は細胞内に取り込まれ、細胞内エステラーゼによって脱アセチル化された後、さらに H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> との反応で蛍光型となる。その結果を Figure 4-24 に示す。**3**, **3b<sup>4-Cl</sup>** を作用させると、細胞内において緑色蛍光がほとんど観察されなかった(Figure 4-24 (B), (D))が、**3b<sup>4-MeO</sup>** を作用させると、強い緑色蛍光が見られた(Figure 4-24 (C))。 **3b<sup>4-MeO</sup>** は、還元後に O<sub>2</sub> との反応で形成されるヒドロペルオキシ中間体が不安定なために、3 電子目の還元による HO•生成が起こる前に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を放出するので H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成量が高くなると考えられる。



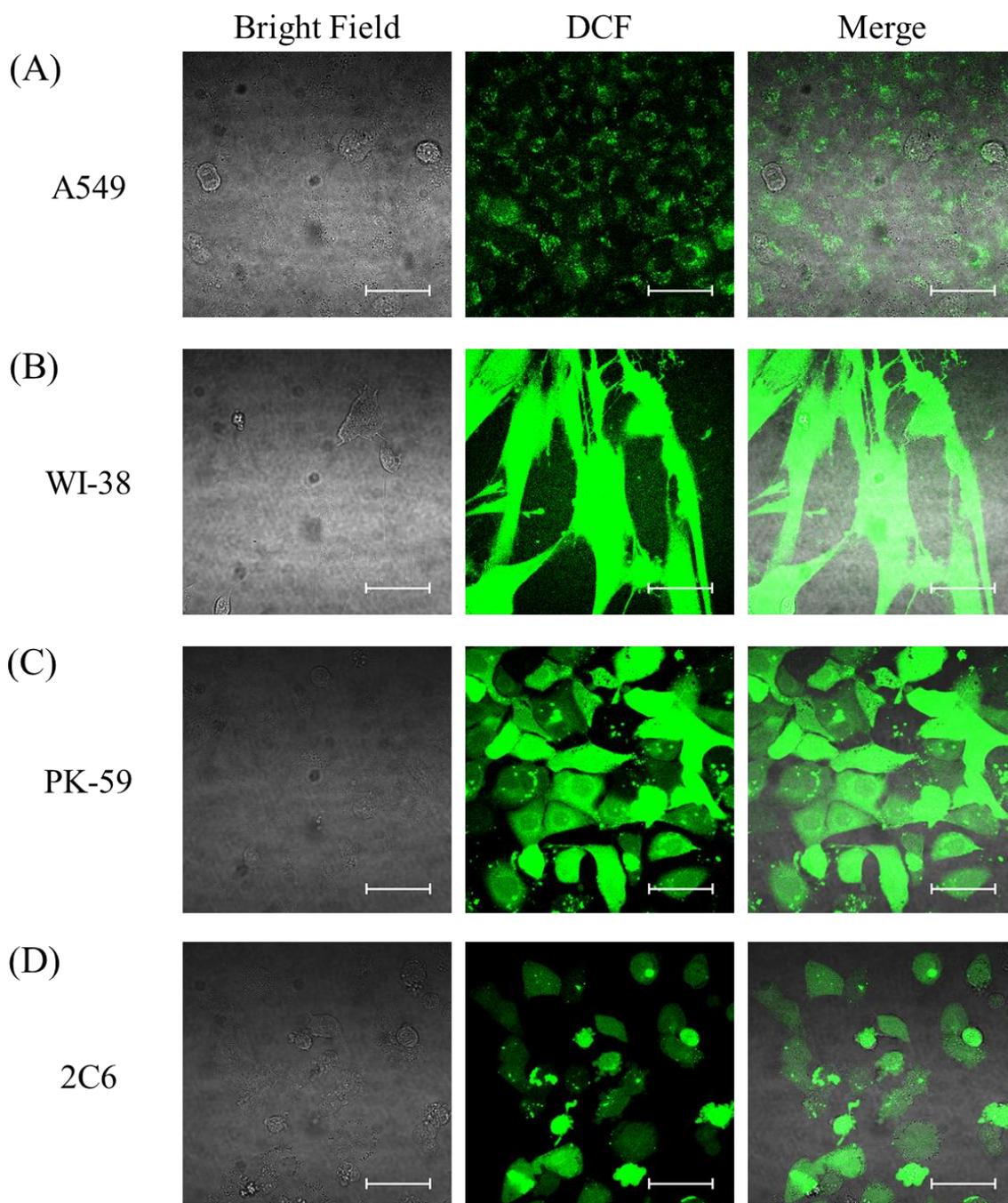
**Figure 4-20.** Confocal microscopic images in A549 cells (A), WI-38 cells (B), PK-59 cells (C), and 2C6 cells (D). Green fluorescence indicates the fluorescence of DCF ( $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$ ). Scale bar is  $50 \mu\text{m}$ .



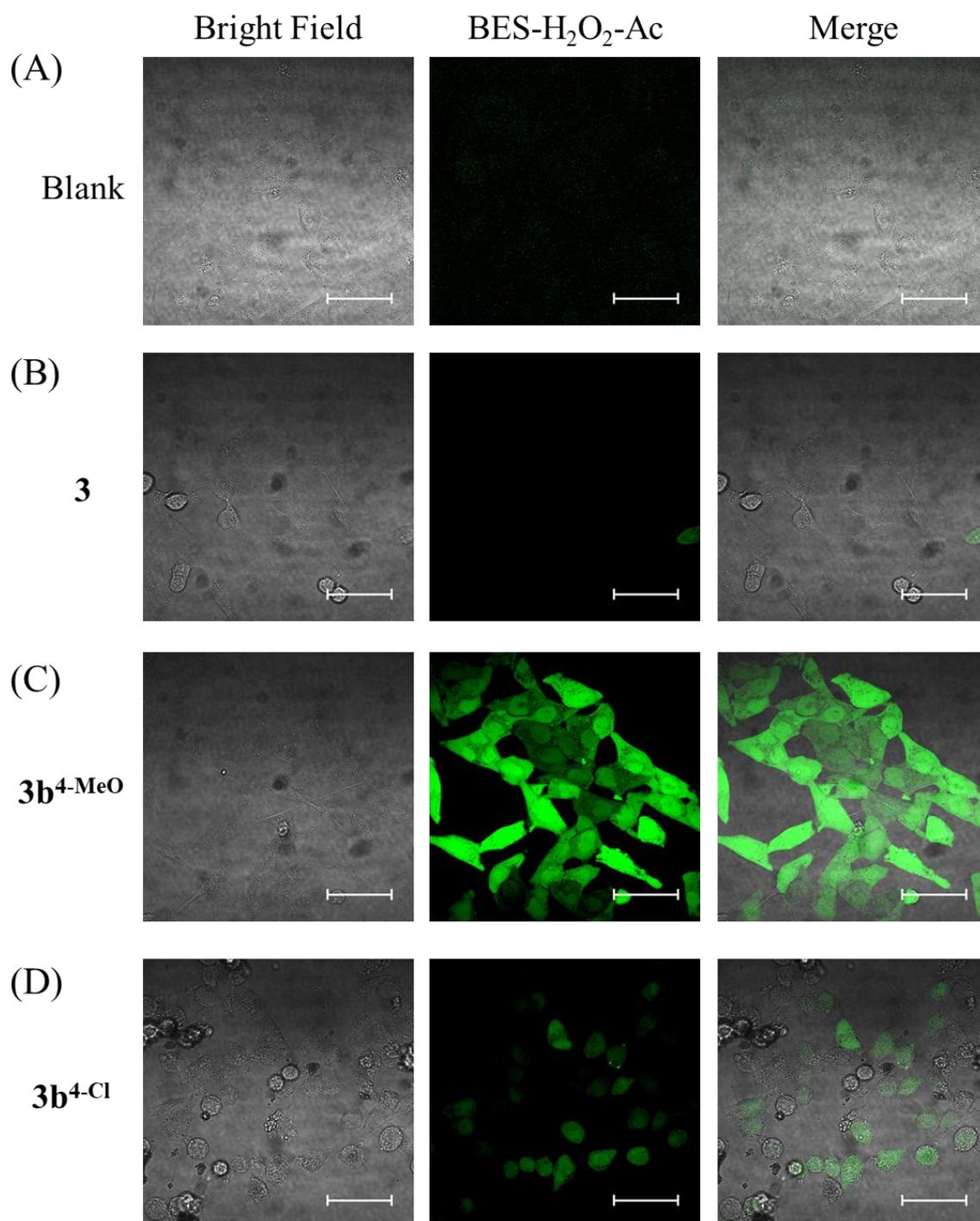
**Figure 4-21.** Confocal microscopic images of **3** (70  $\mu$ M) in A549 cells (A), WI-38 cells (B), PK-59 cells (C), and 2C6 cells (D) on 4 h incubation in the dark. Green fluorescence indicates the fluorescence of DCF ( $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ). Scale bar is 50  $\mu$ m.



**Figure 4-22.** Confocal microscopic images of **3b**<sup>4-MeO</sup> (10  $\mu$ M) in in A549 cells (A), WI-38 cells (B), PK-59 cells (C), and 2C6 cells (D) on 4 h incubation in the dark. Green fluorescence indicates the fluorescence of DCF ( $\lambda_{ex}$  = 488 nm). Scale bar is 50  $\mu$ m.



**Figure 4-23.** Confocal microscopic images of  $3b^{4-Cl}$  (10  $\mu$ M) in A549 cells (A), WI-38 cells (B), PK-59 cells (C), and 2C6 cells (D) on 4 h incubation in the dark. Green fluorescence indicates the fluorescence of DCF ( $\lambda_{ex} = 488$  nm). Scale bar is 50  $\mu$ m.



**Figure 4-24.** Confocal microscopic images of HeLa cells. None (A), **3** (B), **3b<sup>4-MeO</sup>** (C), and **3b<sup>4-Cl</sup>** (D) (100  $\mu$ M) with BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac (5  $\mu$ M) were added and then incubated 1 h in the dark 37°C condition. Green fluorescence indicates the fluorescence of BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac ( $\lambda_{\text{ex}}$  = 488 nm). Scale bar is 50  $\mu$ m.

#### 4-4. 結論

本章では、2,6-bis(amide-tether dpa)-*p*-cresol 配位子(HL3)とその二核銅(II)錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3)](OAc) (**3**)のピリジル基の4位に電子供与性の MeO 基や電子求引性の Cl 基を持つ HL3<sup>4-MeO</sup> と HL3<sup>4-Cl</sup> の錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3<sup>4-MeO</sup>)]Y [Y = PF<sub>6</sub> (**3a**<sup>4-MeO</sup>), OAc (**3b**<sup>4-MeO</sup>)], [Cu<sub>2</sub>(μ-1,3-OAc)<sub>2</sub>(L3<sup>4-Cl</sup>)]Y [Y = ClO<sub>4</sub> (**3a**<sup>4-Cl</sup>), OAc (**3b**<sup>4-Cl</sup>)]を合成し、X線構造解析、蛍光測定、MTT assay、共焦点レーザー顕微鏡などの測定を通して置換基による錯体構造、ROS生成能力、細胞毒性に及ぼす電子効果と疎水効果を調べた。電子供与性の MeO 基は **3a**<sup>4-MeO</sup> で μ-1,1-OAc 架橋、電子求引性の Cl 基は **3a**<sup>4-Cl</sup> でドナー性の高い μ-1,3-OAc 架橋を安定化した。水溶液中では **3b**<sup>4-MeO</sup> の μ-1,1-OAc は H<sub>2</sub>O で置換されたが、**3b**<sup>4-Cl</sup> の μ-1,3-OAc はそのまま保持された。酸化還元電位は **3b**<sup>4-MeO</sup> < **3** < **3b**<sup>4-Cl</sup> の順であり、電子効果に従った。**3b**<sup>4-MeO</sup>、**3b**<sup>4-Cl</sup> は **3** と同様に AscNa で速やかに Cu(I)Cu(I)に還元され、還元的 O<sub>2</sub> 活性化で ROS として H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と HO•を生成した。ROS 生成量(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**3b**<sup>4-MeO</sup> > **3b**<sup>4-Cl</sup>)と HO• (**3b**<sup>4-MeO</sup> < **3b**<sup>4-Cl</sup>))は電子効果に依存し、MeO 基は還元後に O<sub>2</sub> との反応で形成されるヒドロペルオキシ中間体が不安定なために H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の放出を促進し、Cl 基は還元後に O<sub>2</sub> との反応で形成されるペルオキシ中間体が安定であるため、もう1電子を受け取って HO•を生成することができたと考えられる。さらに、**3b**<sup>4-MeO</sup>、**3b**<sup>4-Cl</sup> は、**3** よりも HeLa 細胞に対してそれぞれ7倍と5倍高い細胞毒性を示した。**3b**<sup>4-MeO</sup>、**3b**<sup>4-Cl</sup> は疎水性の高い膜系からなる ER、Golgi 体に局在して ROS を生成した。これは、MeO、Cl 基の疎水効果による **3b**<sup>4-MeO</sup>、**3b**<sup>4-Cl</sup> の脂溶性の増大に起因すると考えられ、ストレス応答機構を有する ER、Golgi 体での ROS 生成が **3b**<sup>4-MeO</sup> と **3b**<sup>4-Cl</sup> の細胞毒性を向上させたと考えられる。また、**3b**<sup>4-MeO</sup> はがん細胞選択的であったが、**3b**<sup>4-Cl</sup> は正常細胞選択的であった。**3b**<sup>4-MeO</sup> の ROS 生成量は正常細胞よりもがん細胞で多かったが、**3b**<sup>4-Cl</sup> の ROS 生成量は正常細胞でもがん細胞でも同程度であった。この ROS 生成量の違いは、正常細胞とがん細胞における抗酸化剤濃度の違いと置換基の電子効果の違いによって引き起こされており、結果的に **3b**<sup>4-MeO</sup> のがん細胞選択性と **3b**<sup>4-Cl</sup> の正常細胞選択性に繋がったと考えられる。この研究から、二核銅錯体によるがん細胞選択的毒性を、配位子に導入した置換基効果で制御できることが示された。

## 4-5. 実験方法

### 4-5-1. 試薬

試薬については、合成中間体や錯体を除き、高純度製品を和光純薬工業、東京化成、シグマアルドリッチ社製から選択して購入した。溶媒については、合成に用いるものは必要に応じて乾燥蒸留した。ER 染色剤には ER-Tracker™ Red (BODIPY™ TR Glibenclamide) (invitrogen), Golgi 体染色剤には BODIPY™ TR Ceramide complexed to BSA (invitrogen), ミトコンドリア染色剤には MitoTracker™ Deep Red FM (invitrogen)を用いた。細胞内の ROS 観察には H<sub>2</sub>DCFDA (DCFH-DA, 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate) (Selleck Chemicals)<sup>[14, 15]</sup>を用い、細胞内の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 観察には BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac (Wako)<sup>[17, 18]</sup>を用いた。3 は既報の論文<sup>[3]</sup>に従って合成した。

### 4-5-2. 測定装置

元素分析(C, H, N)は、Perkin-Elmer 社製 Elemental Analyzer 2400 II を用いて測定した。UV-vis 吸収スペクトルは、Agilent 社製 8454 紫外可視分光光度計を用いて測定した。pH 測定は、HORIBA 製 LAQUA electrode を標準緩衝液で校正した後に測定した。Electron spray ionization MS (ESI MS)及び Cold spray ionization MS (CSI MS)スペクトルは、日本電子製 JMS-T100CSR the AccuTOF CS を用いて、MeOH, MeCN または H<sub>2</sub>O を溶媒として測定した。赤外線(IR)スペクトルは、SHIMADZU Single Reflection HATR IRAffinity-1 MIRacle 10 で測定した。<sup>1</sup>H NMR スペクトルは、日本電子製 ECA-500RX フーリエ変換核磁気共鳴装置(500 MHz)を使用し、基準物質として tetramethylsilane (TMS)または sodium 3-(trimethylsilyl)propionate-2,2,3,3-*d*<sub>4</sub> (TSP)を用いて測定した。蛍光スペクトルは、HITACHI Spectral fluorometer F-7000 で測定した。蛍光スペクトルは、HITACHI Spectral fluorometer F-7000 で測定した。MTT assay は、Thermo Scientific™ Multiskan™ FC を用いて測定を行った。共焦点顕微鏡は、Nikon Instech 社製共焦点レーザー顕微鏡 A1 を用いた。

### 4-5-3. 配位子(HL3<sup>4-X</sup>)とその二核銅(II)錯体(3<sup>4-X</sup>) (X = MeO, Cl)の合成

#### Methyl 4-chloropicolinate (24)の合成<sup>[19, 20]</sup>

Picolinic acid (23) (48.2 g, 0.391 mol)を SOCl<sub>2</sub> (150 mL)に溶解させ、DMF (5 mL)を加えて 75°C で 3 日間加熱還流した。SOCl<sub>2</sub> をある程度留去した後、toluene (100 mL)を加えてさらに共沸させた。反応容器を氷浴に浸し、脱気窒素置換した後、toluene (100 mL), MeOH (13 mL)加え、そのまま 2 時間攪拌した。析出した固体をヌッチェで濾過し、真

空乾燥した。この固体を 500 mL ビーカーに入れ、氷浴に浸し、飽和  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  水溶液を塩基性になるまで加えた後、 $\text{CHCl}_3$  (3 × 200 mL) で分液した。有機層に  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  を加えて脱水した後、ヌッチェで濾過し、濾液をロータリーエバポレーターで濃縮すると赤褐色の油状物質が得られた。これに hexane を加え、真空乾燥すると赤褐色の固体が得られた。この固体に hexane を加え、80°C で熱時濾過すると薄茶色の結晶が得られたので、これを少量の hexane で濾過、真空乾燥した (35.4 g, Yield: 53%).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 8.67 (dd,  $J$  = 0.57, 5.2 Hz, 1H, Py), 8.15 (dd,  $J$  = 0.57, 2.0 Hz, 1H, Py), 7.52 (dd,  $J$  = 2.0, 5.2 Hz, 1H, Py), 4.05 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

#### 4-Chloro-2-hydroxymethylpyridine (25) の合成<sup>[19]</sup>

**24** (20.0 g, 0.117 mol) を MeOH-THF (120/70 mL) に溶解させ、氷浴に浸し、 $\text{CaCl}_2$  (52.0 g, 0.469 mol) を慎重に加えて脱気窒素置換した後、室温で 20 分間攪拌した。反応容器を氷浴に浸し、 $\text{NaBH}_4$  (8.80 g, 0.233 mol) を加えて脱気窒素置換した後、室温で 2 時間半攪拌した。TLC (silica gel, EtOAc/hexane 1/1) で原料の消失を確認した後、反応容器を氷浴に浸し、 $\text{H}_2\text{O}$  (200 mL) を加えて室温で 2 時間攪拌した。反応溶液をロータリーエバポレーターで濃縮し、EtOAc (3 × 200 mL) で分液した。有機層に  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  を加えて脱水した後、ヌッチェで濾過し、濾液をロータリーエバポレーターで濃縮し、真空乾燥すると白色の固体が得られた (16.3 g, Yield 97%).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 8.46 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 1H, Py), 7.31 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H, Py), 7.23 (dd,  $J$  = 1.7, 5.7 Hz, 1H, Py), 4.75 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.40 (brs, 1H, OH).

#### 4-Chloro-2-formylpyridine (26) の合成<sup>[19]</sup>

100 mL ナスフラスコに  $\text{MnO}_2$  (90.0 g) を入れ、ジムロート管を取り付け、真空乾燥しながらヒートガンで水分を除去した。これに **25** (8.00 g, 55.7 mmol) を加え、 $\text{CHCl}_3$  (96 mL) に溶解させた後、80°C で 36 時間加熱還流した。 $^1\text{H NMR}$  スペクトルで原料が残っていないことを確認した後、反応容器を室温に戻した。 $\text{MnO}_2$  をセライト濾過で除去し、濾液をロータリーエバポレーターで濃縮、真空乾燥すると黄色の固体が得られた (6.55 g, Yield 83%).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 10.1 (s, 1H, CHO), 8.70 (d,  $J$  = 5.2 Hz, 1H, Py), 7.96 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H, Py), 7.54 (dd,  $J$  = 2.3, 5.2 Hz, 1H, Py).

## 2-Hydroxymethyl-4-methoxypyridine (27)の合成<sup>[19, 20]</sup>

25 (3.00 g, 20.9 mmol)を MeOH (60 mL)に溶解させ、NaOMe (24.0 g, 444 mmol)を加え、脱気窒素置換した後、120°Cで一晩加熱還流した。<sup>1</sup>H NMR スペクトルで原料が残っていないことを確認した後、反応容器を室温に戻し、12 M HCl を用いて pH を慎重に 7-8 にした。析出物をセライト濾過で除いたのち、濾液をロータリーエバポレーターで濃縮し、真空乾燥すると薄黄色の固体が得られた(2.24 g, Yield 77%)。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 8.34 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 1H, Py), 6.77 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H, Py), 6.74 (dd,  $J$  = 2.3, 5.7 Hz, 1H, Py), 4.71 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.78 (t,  $J$  = 4.6 Hz, 1H, OH).

## 2-Folmyl-4-methoxypyridine (28)の合成<sup>[19]</sup>

100 mL ナスフラスコに MnO<sub>2</sub> (23.1 g)を入れ、ジムロート管を取り付け、真空乾燥しながらヒートガンで水分を除去した。これに 27 (2.14 g, 15.4 mmol)を加え、CHCl<sub>3</sub> (25 mL)に溶解させた後、80°Cで24時間加熱還流した。<sup>1</sup>H NMR スペクトルで原料が残っていないことを確認した後、反応容器を室温に戻した。MnO<sub>2</sub> をセライト濾過で除去し、濾液をロータリーエバポレーターで濃縮、真空乾燥すると茶色の油状物質が得られた(1.87 g, Yield 89%)。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 10.1 (s, 1H, CHO), 8.60 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 1H, Py), 7.48 (d,  $J$  = 2.9 Hz, 1H, Py), 7.03 (dd,  $J$  = 2.9, 5.5 Hz, 1H, Py), 3.93 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

## 2-Chloromethyl-4-methoxypyridine (29 (X = MeO))の合成<sup>[19]</sup>

25 (2.19 g, 15.7 mmol)を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (12 mL)に溶解させ、SOCl<sub>2</sub> (10 mL)を加えた後、50°Cで4時間加熱還流した。SOCl<sub>2</sub> を留去すると黄色の固体が得られた。これを飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液(50 mL)に溶解させ、CHCl<sub>3</sub> (3 × 150 mL)で分液した。有機層に Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えて脱水した後、ヌツチェで濾過し、濾液をロータリーエバポレーターで濃縮、真空乾燥すると橙色の油状物質が得られた(2.43 g, Yield 98%)。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 8.39 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 1H, Py), 7.00 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H, Py), 6.76 (dd,  $J$  = 2.6, 5.7 Hz, 1H, Py), 4.63 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

## 4-Chloro-2-chloromethylpyridine (29 (X = Cl))の合成<sup>[19]</sup>

29 (X = Cl)は、29 (X = MeO)と同様の手順で 27 を原料として合成し、黄色の油状物質として得られた(Yield 98%)。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ /ppm = 8.48 (d,  $J$  = 5.2 Hz, 1H, Py), 7.52 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H, Py), 7.26 (dd,  $J$  = 2.0, 5.2 Hz, 1H, Py), 4.65 (s, 2H, CH<sub>2</sub>).

### 2-Azidomethyl-4-methoxypyridine (30 (X = MeO))の合成<sup>[19]</sup>

**29 (X = MeO)** (2.43 g, 15.4 mmol),  $\text{NaN}_3$  (3.10 g, 47.7 mmol)を DMF (50 mL)に溶解させ、脱気窒素置換した後、50°Cで一晩攪拌した。反応容器を室温に戻した後、飽和  $\text{NaHCO}_3$  水溶液(100 mL)を加え、EtOAc (3 × 30 mL)で分液した。有機層を取り出した後、飽和  $\text{NaCl}$  水溶液(2 × 300 mL)で分液した。有機層に  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ を加えて脱水した後、ヌッチェで濾過し、濾液をロータリーエバポレーターで濃縮、真空乾燥すると茶色の油状物質が得られた(2.37 g, Yield 94%)。 $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 8.41 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 1H, Py), 6.88 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H, Py), 6.77 (dd,  $J$  = 2.3, 5.7 Hz, 1H, Py), 4.45 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.88 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).

### 2-Azidomethyl-4-chloropyridine (30 (X = Cl))の合成<sup>[19]</sup>

**30 (X = Cl)**は、**30 (X = MeO)**と同様の手順で**29 (X = Cl)**を原料として合成し、茶色の油状物質として得られた(Yield 94%)。  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 8.49 (d,  $J$  = 5.2 Hz, 1H, Py), 7.39 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 1H, Py), 7.27 (dd,  $J$  = 1.7, 5.2 Hz, 1H, Py), 4.50 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

### 2-Aminomethyl-4-methoxypyridine (31 (X = MeO))の合成<sup>[19]</sup>

**30 (X = MeO)** (2.37 g, 14.4 mmol)を THF (18 mL)に溶解させ、氷浴に浸した後、 $\text{PPh}_3$  (5.89 g, 22.5 mmol)を加え、脱気窒素置換した後、0°Cで1時間攪拌した。さらに室温で2時間攪拌し、DART MSで原料が残っていないことを確認した後、 $\text{H}_2\text{O}$  (2 mL)を加え、脱気窒素置換した後、30°Cで一晩攪拌した。ロータリーエバポレーターで濃縮し、真空乾燥すると黄色の固体が得られた。これを  $\text{CHCl}_3$  (50 mL)に溶解させ、1 M  $\text{HCl}$  (3 × 50 mL)で分液した。水層を取り出した後、4 M  $\text{NaOH}$  水溶液で pH を 11 にした。これを  $\text{CHCl}_3$  (3 × 200 mL)で分液した。有機層に  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ を加えて脱水した後、ヌッチェで濾過し、ロータリーエバポレーターで濃縮、真空乾燥すると橙色の油状物質が得られた(1.84 g, Yield 92%)。  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 8.38 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 1H, Py), 6.83 (d,  $J$  = 2.6 Hz, 1H, Py), 6.70 (dd,  $J$  = 2.6, 5.7 Hz, 1H, Py), 3.93 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.86 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).

### 2-Aminomethyl-4-chloropyridine (31 (X = Cl))の合成<sup>[19]</sup>

**31 (X = Cl)**は、**31 (X = MeO)**と同様の手順で**30 (X = Cl)**を原料として合成し、橙色の油状物質として得られた(Yield 90%)。  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 8.67 (dd,  $J$  = 0.57, 5.2 Hz, 1H, Py), 8.15 (dd,  $J$  = 0.57, 2.0 Hz, 1H, Py), 7.52 (dd,  $J$  = 2.0, 5.2 Hz, 1H, Py), 4.05 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

### 1-*tert*-Butoxycarbonyl-bis(2-(4-methoxypyridyl)methyl)amine) (32 (X = MeO))の合成<sup>[19]</sup>

**28** (1.72 g, 12.5 mmol), **31 (X = MeO)** (1.59 g, 11.5 mmol)を MeOH (13.5 mL)に溶解させ、脱気窒素置換した後、0°C で1時間攪拌した。<sup>1</sup>H NMR スペクトルでイミンの形成及び**31 (X = MeO)**が残っていないことを確認した後、NaBH<sub>4</sub> (1.03 g, 27.2 mmol)を加え、再度脱気窒素置換した後、0°C で2時間攪拌した。<sup>1</sup>H NMR スペクトルでイミンが残っていないことを確認した後、0°C を維持したまま6 M HCl 水溶液でpHを1にした。MeOHをロータリーエバポレーターで濃縮した後、飽和 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液を用いて塩基性にした。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 200 mL)で分液し、有機層に Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて脱水した後、ヌッチェで濾過し、濾液をロータリーエバポレーターで濃縮、真空乾燥すると黄色の油状物質が得られた。

この油状物質を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (24 mL)に溶解させ、氷浴に浸した後、Et<sub>3</sub>N (3.26 mL, 23.4 mmol)を加えた。ここに、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL)に溶解させた Boc<sub>2</sub>O (5.09 g, 23.3 mmol)を N<sub>2</sub> 雰囲気下に加え、脱気窒素置換した後、0°C で一晩攪拌した。この反応溶液に CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (36 mL)を加え、飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液(3 × 30 mL)で分液した。有機層に Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて脱水した後、ヌッチェで濾過し、濾液をロータリーエバポレーターで濃縮、真空乾燥すると茶色の油状物質が得られた。これを最少量の CHCl<sub>3</sub>に溶解させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (gradient EtOAc/MeOH 100/0 to 20/1)で精製し、目的物が含まれているフラクションを集めた。これをロータリーエバポレーターで濃縮し、真空乾燥すると黄色の油状物質が得られた(2.80 g, Yield 68%)。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 8.33 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, Py), 6.84 (s, 1H, Py), 6.73 (s, 1H, Py), 6.69 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, Py), 6.68 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, Py), 4.64 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.55 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 1.44 (s, 9H, CH<sub>3</sub>).

### 1-*tert*-Butoxycarbonyl-bis((2-(4-chloropyridyl)methyl)amine) (32 (X = Cl))の合成<sup>[19]</sup>

**32 (X = Cl)**は、**32 (X = MeO)**と同様の手順で**26**と**31 (X = Cl)**を原料として合成し、黄色の油状物質として得られた(Yield 60%)。 <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ/ppm = 8.42 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H, Py), 7.33 (s, 1H, Py), 7.23 (s, 1H, Py), 7.19 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, Py), 7.18 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, Py), 4.67 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.57 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.44 (s, 9H CH<sub>3</sub>).

### Di((2-(4-methoxypyridyl)methyl)amine) (33 (X = MeO))の合成<sup>[19]</sup>

**32 (X = MeO)** (150 mg, 0.417 mmol)を EtOH (12 mL), 12 M HCl (4 mL)に溶解させ、脱気窒素置換した後、室温で一晩攪拌した。反応溶液をロータリーエバポレーターで濃縮し、

真空乾燥すると茶色の固体が得られた。これを飽和  $\text{K}_2\text{CO}_3$  水溶液(20 mL)に溶解させ、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 × 60 mL)で分液した。有機層に  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ を加えて脱水した後、ヌッチェで濾過し、濾液をロータリーエバポレーターで濃縮、真空乾燥すると黄色の油状物質が得られた(84.2 mg, Yield 78%).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 8.37 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 2H, Py), 6.91 (d,  $J$  = 2.9 Hz, 2H, Py), 6.69 (dd,  $J$  = 2.9, 5.6 Hz, 2H, Py), 3.92 (s, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 3.84 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ).

### Di((2-(4-chloropyridyl)methyl)amine) (**33** (X = Cl))の合成<sup>[19]</sup>

**33** (X = Cl)は、**33** (X = MeO)と同様の手順で **32** (X = Cl)を原料として合成し、黄色の油状物質として得られた (Yield 88%).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 8.46 (d,  $J$  = 5.2 Hz, 2H, Py), 7.40 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 2H, Py), 7.19 (dd,  $J$  = 1.7, 5.2 Hz, 2H, Py), 3.96 (s, 4H,  $\text{CH}_2$ ).

### HL3<sup>4-MeO</sup>の合成

4-methylphenol-2,6-dicarboxylic acid (**34**) (25.5 mg, 0.130 mmol)を  $\text{SOCl}_2$  (1.5 mL)に溶解させ、60°Cで4時間攪拌した。 $\text{SOCl}_2$ を留去した後、真空乾燥すると黄色の油状物質が得られた。この油状物質は精製を行わずに次の反応に用いた。**33** (X = MeO) (84.2 mg, 0.325 mmol),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (158 mg, 1.14 mmol)を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL)に溶解させた。この溶液に、先程の油状物質を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL)に溶解させた溶液を  $\text{N}_2$  flowしながらゆっくりと加え、脱気窒素置換した後、室温で一晩攪拌した。反応溶液を桐山漏斗で濾過した後、濾液をロータリーエバポレーターで濃縮すると黄色の固体が得られた。これを最少量の  $\text{CHCl}_3$ に溶解させ、アルミナカラムクロマトグラフィー(gradient  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  1/0 to 50/1)で精製し、目的物が含まれているフラクションを集めた。これをロータリーエバポレーターで濃縮し、真空乾燥すると黄色の固体が得られた(46.2 mg, Yield 53%).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 12.1 (s, 1H, OH), 8.36 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 2H, Py), 8.31 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 2H, Py), 7.18 (s, 2H, Ph), 7.10 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 2H, Py), 6.74 (dd,  $J$  = 1.7, 6.0 Hz, 2H, Py), 6.68 (m, 4H, Py), 4.92 (s, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 4.59 (s, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 3.88 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.81 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.22 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ). ESI MS (MeOH  $m/z$ , positive mode). Calcd for  $[\text{HL3}^{4\text{-MeO}} + \text{H}]^+$ : 679.29. Found: 679.29.

### HL3<sup>4-Cl</sup>の合成

HL3<sup>4-Cl</sup>は、HL3<sup>4-MeO</sup>と同様の手順で **34** および **33** (X = Cl)を原料として合成し、黄色の固体として得られた(Yield 65%).  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta/\text{ppm}$  = 10.9 (s, 1H, OH), 8.50 (d,  $J$  = 5.2 Hz, 2H, Py), 8.42 (d,  $J$  = 5.2 Hz, 2H, Py), 7.66 (s, 2H, Ph), 7.52 (d,  $J$  = 4.3 Hz,

2H, Py), 7.42 (d,  $J = 4.3$  Hz, 2H, Py), 7.31 (s, 2H, Py), 6.97 (s, 2H, Py), 4.83 (s, 4H, CH<sub>2</sub>), 4.60 (s, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). ESI MS (MeOH  $m/z$ , positive mode). Calcd for [HL3<sup>4-Cl</sup> + H]<sup>+</sup>: 695.09. Found: 695.09.

### 二核銅(II)錯体 **3b**<sup>4-MeO</sup> の合成

MeCN (3 mL)に Cu(OAc)<sub>2</sub> (27.5 mg, 0.151 mmol)を溶解させた溶液に, MeCN (2 mL)に HL3<sup>4-MeO</sup> (43.4 mg, 0.0757 mmol)を溶解させた溶液をゆっくり加え, 室温で 30 分間攪拌した. 反応溶液をロータリーエバポレーターで濃縮し, 最終体積を約 1 mL 程度にした. この溶液に Et<sub>2</sub>O を加えると固体が析出したので, これを濾過し, 真空乾燥すると緑色の固体が得られた(66.6 mg, Yield 80%). Anal. calcd for [Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3<sup>4-MeO</sup>)](OAc)•4H<sub>2</sub>O: C, 49.00; H, 5.16; N, 7.97. Found: C, 49.03; H, 4.77; N, 7.80. ESI MS (H<sub>2</sub>O  $m/z$ , positive mode). Calcd for [**3b**<sup>4-MeO</sup> - OAc]<sup>+</sup>: 921.16. Found: 921.10. IR (KBr):  $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3514, 3433, 2924, 2849, 1614, 1566, 1497, 1424, 1393, 1325, 1304, 1265, 1244, 1190, 1159, 1038, 964, 910, 829, 789, 772, 745, 681, 619.$

### 二核銅(II)錯体 **3a**<sup>4-MeO</sup> の合成

MeCN (1 mL)に溶解させた **3b**<sup>4-MeO</sup> (8.7 mg, 7.94 μmol)の溶液に, 1 M NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> MeCN 溶液(8.9 μL, 8.9 μmol)を加え, 室温で 10 分間攪拌した. この溶液に benzene を少量加え, Et<sub>2</sub>O と気液拡散することによって, 単結晶 X線構造解析に適した緑色の固体が得られた.

### 二核銅(II)錯体 **3b**<sup>4-Cl</sup> の合成

MeCN (2 mL)に Cu(OAc)<sub>2</sub> (72.0 mg, 0.396 mmol)を溶解させた溶液に, MeCN (2 mL)に HL3<sup>4-Cl</sup> (138 mg, 0.198 mmol)を溶解させた溶液をゆっくり加え, 室温で 30 分間攪拌した. 反応溶液をロータリーエバポレーターで濃縮し, 最終体積を約 1 mL 程度にした. この溶液に Et<sub>2</sub>O を加えると固体が析出したので, これを濾過し, 真空乾燥すると緑色の固体が得られた(142 mg, Yield 67%). Anal. calcd for [Cu<sub>2</sub>(μ-1,3-OAc)<sub>2</sub>(L3<sup>4-Cl</sup>)](OAc)•2.5H<sub>2</sub>O: C, 44.84; H, 3.76; N, 8.04. Found: C, 44.49; H, 3.33; N, 7.82. ESI MS (H<sub>2</sub>O  $m/z$ , positive mode). Calcd for [**3b**<sup>4-Cl</sup> - OAc]<sup>+</sup>: 936.96. Found: 936.95. IR (KBr):  $\tilde{\nu}/\text{cm}^{-1} = 3694-3237, 3152-2812, 1622, 1591, 1576, 1557, 1422, 1344, 1302, 1242, 1200, 1112, 1047, 1026, 993, 949, 876, 827, 787, 741, 719, 700, 681, 619.$

#### 二核銅(II)錯体 $3a^{4-Cl}$ の合成

MeCN (0.2 mL)に溶解させた  $3b^{4-Cl}$  (7.8 mg, 7.29  $\mu$ mol)の溶液に, 1 M NaClO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O MeCN 溶液(7.8  $\mu$ L, 7.8  $\mu$ mol)を加え, 室温で 10 分間攪拌した. この溶液を Et<sub>2</sub>O と気液拡散することによって, 単結晶 X 線構造解析に適した緑色の固体が得られた.

#### 4-5-4. $3$ , $3b^{4-MeO}$ , $3b^{4-Cl}$ の Cyclic Voltammetry (CV)測定

200 mM Buffer 溶液(pH 6.0 (MES), 10 mL), 2 mM NaOAc に  $3$ ,  $3b^{4-MeO}$ ,  $3b^{4-Cl}$  が 0.5 mM となるように溶液を調製した. この溶液に水系参照電極(Ag/AgCl), 作用電極として glassy carbon, 対極として Pt wire を浸し, 窒素を 10 分間バブリングした後, CV 測定を行った. なお, 測定感度は 10  $\mu$ A/V, 掃引速度は 10 mV s<sup>-1</sup>で行った.

#### 4-5-5. $3$ , $3b^{4-MeO}$ , $3b^{4-Cl}$ の Square Wave Voltammetry (SWV)の測定

200 mM Buffer 溶液(pH 6.0 (MES), 10 mL), 2 mM NaOAc に  $3$ ,  $3b^{4-MeO}$ ,  $3b^{4-Cl}$  が 0.5 mM となるように溶液を調製した. この溶液に水系参照電極(Ag/AgCl), 作用電極として glassy carbon, 対極として Pt wire を浸し, 窒素を 10 分間バブリングした後, SWV 測定を行った. なお, 測定感度は 10  $\mu$ A/V で行った.

#### 4-5-6. $3b^{4-MeO}$ , $3b^{4-Cl}$ を AscNa と反応させた際の電子スペクトル測定

200 mM Buffer 溶液(pH 6.0, MES), 1.5 mM NaOAc, 3%MeCN に  $3b^{4-MeO}$ ,  $3b^{4-Cl}$  が 0.05 mM となるように加えた溶液を 2 面セルに入れ, 窒素置換した後, 23 $\pm$ 0.2°C に保った. AscNa の水溶液(錯体に対して 10 eq)を加え, 300–900 nm の範囲でスペクトルを追跡した. スペクトルの安定を確認した.

#### 4-5-7. coumarin を用いた $3b^{4-MeO}$ , $3b^{4-Cl}$ による HO•生成の検出

$3b^{4-MeO}$ ,  $3b^{4-Cl}$  (30  $\mu$ M), coumarin (0.5 mM), NaCl (10 mM)の Buffer 溶液 (pH 6.0 (MES), pH 7.4 (MOPS)) (10 mM)を 4 面セルに加え, 37 $\pm$ 0.2°C に保った. この溶液に AscNa 水溶液を 1500  $\mu$ M になるように加え, 励起波長 332 nm での 452 nm の蛍光強度を 60 分間, スリット幅 5.0 nm で測定した.

#### 4-5-8. PFBS を用いた $3b^{4-MeO}$ , $3b^{4-Cl}$ による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成の検出

$3b^{4-MeO}$ ,  $3b^{4-Cl}$  (30  $\mu$ M), PFBS (25  $\mu$ M), NaCl (10 mM)の Buffer 溶液 (pH 6.0 (MES)) (10 mM)を 4 面セルに加え, 37 $\pm$ 0.2°C に保った. この溶液に AscNa 水溶液を 1500  $\mu$ M にな

るように加え、励起波長 485 nm での 513 nm の蛍光強度を 60 分間、スリット幅 5.0 nm で測定した。

#### 4-5-9. 細胞株とその培養条件

HeLa (ヒト子宮頸がん細胞)は同志社大学 北岸研究室(京都, 日本)から譲り受けた。A549 (ヒト肺がん細胞), WI-38 (ヒト肺正常細胞), PK-59 (ヒト膵臓がん細胞)および 2C6 (ヒト膵臓正常細胞)は理化学研究所 バイオリソース研究センター(BRC)(茨城, 日本)から購入した。HeLa 細胞, A549 細胞, WI-38 細胞および PK-59 細胞は, 牛胎児血清(fetal bovine serum, FBS) (10%), penicillin (100 units mL<sup>-1</sup>), streptomycin (100 µg mL<sup>-1</sup>)を加えた Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, high glucose), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, low glucose), Minimum Essential Medium Eagle (MEM)または Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640)培養液をそれぞれ用いて, 5% CO<sub>2</sub> 濃度, 37°C の条件下で培養した。2C6 細胞は, 新生仔ウシ血清(newborn calf serum) (10%), 牛胎児血清(fetal bovine serum, FBS) (5%), 馬血清(horse serum) (2.5%), penicillin (100 units mL<sup>-1</sup>), streptomycin (100 µg mL<sup>-1</sup>)を加えた Mixture F-10 Ham (HamF10)培養液を用いて, 5% CO<sub>2</sub> 濃度, 37°C の条件下で培養した。

#### 4-5-10. 3-(4,5-dimethylthiazole)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

96 well プレートに blank として培地のみを 1 列と, 培地に  $10 \times 10^4$  cells/mL になるように懸濁させた細胞を 1 well につき 100 µL ずつ control と錯体のサンプル数分の列に蒔き, 5% CO<sub>2</sub> 濃度, 37°C の条件下でインキュベーションした。HeLa 細胞と A549 細胞に関しては 24 時間後, WI-38 細胞と PK-59 細胞, 2C6 細胞に関しては 48 時間後, 培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄した。その後, サンプル列にはそれぞれの濃度に調製した **3**, **3b**<sup>4-MeO</sup>, **3b**<sup>4-Cl</sup>, HL3, HL3<sup>4-MeO</sup>, HL3<sup>4-Cl</sup> のサンプル(1-1,000 µM)を, blank と control 列には培地のみを 1 well につき 100 µL ずつ加え, インキュベーションした。24 時間後, 培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄し, MTT reagent (5 mg mL<sup>-1</sup>)と培地を 1:9 の割合で混合させた溶液を 1 well につき 100 µL ずつ加え再度インキュベーションした。3 時間後, アスピレーターで溶液を吸引した後, 生体用 DMSO を 1 well につき 100 µL ずつ加えた。3 分間シェイクして沈殿したホルマザンを完全に溶解させた後, 570 nm の吸光度を吸光度測定器で測定した。この結果より, **3**, **3b**<sup>4-MeO</sup>, **3b**<sup>4-Cl</sup>, HL3, HL3<sup>4-MeO</sup>, HL3<sup>4-Cl</sup> の細胞増殖 50%阻害濃度(50% Inhibition Concentration, IC<sub>50</sub> 値)を算出した。この測定は最低 3 回行い, 再現性をとった。

#### 4-5-11. 共焦点顕微鏡による細胞内 ROS の確認

観察用ディッシュ( $\phi 14$  mm)に  $2 \times 10^5$  cells/mL に調製した HeLa 細胞または A549 細胞, WI-38 細胞, PK-59 細胞, 2C6 細胞の懸濁液を 400  $\mu$ L ずつ加え, 5% CO<sub>2</sub> 濃度, 37°C の条件下で 24 時間(HeLa 細胞, A549 細胞)または 48 時間(WI-38 細胞, PK-59 細胞, 2C6 細胞)インキュベーションした。インキュベーション後, 培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄し, **3**, **3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** を溶解させた培地溶液(70  $\mu$ M (**3**), 10  $\mu$ M (**3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>**))(400  $\mu$ L) を加え, 5%CO<sub>2</sub> 濃度, 37°C の条件下で 4 時間インキュベーションした。最後の 30 分には, ROS の蛍光プローブである DCFDA (20  $\mu$ M, 400  $\mu$ L)を添加し, 再度インキュベーションした。インキュベーション後, 培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄した。そこに, ER 染色剤である ER-Tracker™ Red (BODIPY™ TR Glibenclamide) (1  $\mu$ M, 400  $\mu$ L)または, Golgi 体染色剤である BODIPY™ TR Ceramide complexed to BSA (1  $\mu$ M, 400  $\mu$ L), ミトコンドリア染色剤である MitoTracker™ Deep Red FM (50 nM, 400  $\mu$ L)をそれぞれの dish に加え, 5%CO<sub>2</sub> 濃度, 37°C の条件下で 30 分間インキュベーションした。培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄した後, 培地を加え, 共焦点レーザー顕微鏡で細胞を観察した。ER および Golgi 体染色剤の観察には 561 nm, ミトコンドリア染色剤の観察には 640 nm, DCFDA 蛍光型である DCF の観察には 488 nm の励起レーザーを用いた。

#### 4-5-12. 共焦点顕微鏡による細胞取込経路の確認

観察用ディッシュ( $\phi 14$  mm)に  $2 \times 10^5$  cells/mL に調製した HeLa 細胞の懸濁液を 400  $\mu$ L ずつ加え, 5% CO<sub>2</sub> 濃度, 37°C の条件下で 24 時間インキュベーションした。4°C で錯体を作用させるディッシュは, 最後 30 分のみ 4°C でインキュベーションした。インキュベーション後, 培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄し, **3**, **3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** (100  $\mu$ M)と ROS の蛍光プローブである DCFDA (20  $\mu$ M)を溶解させた培地溶液(400  $\mu$ L)を加え, 5%CO<sub>2</sub> 濃度, 37°C の条件または 4°C の条件下でそれぞれ 1 時間インキュベーションした。所定の時間後, 培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄した後, 培地を加え, 共焦点レーザー顕微鏡で細胞を観察した。DCFDA 蛍光型である DCF の観察には 488 nm の励起レーザーを用いた。

#### 4-5-13. 共焦点顕微鏡による細胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の確認

観察用ディッシュ(φ14 mm)に  $2 \times 10^5$  cells/mL に調製した HeLa 細胞の懸濁液を 400 μL ずつ加え, 5% CO<sub>2</sub> 濃度, 37°C の条件下で 24 時間インキュベーションした. インキュベーション後, 培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄し, **3**, **3b**<sup>4-MeO</sup>, **3b**<sup>4-Cl</sup> (100 μM)と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の蛍光プローブである BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac (5 μM)を溶解させた培地溶液(400 μL)を加え, 5%CO<sub>2</sub> 濃度, 37°C の条件下で 1 時間インキュベーションした. 所定の時間後, 培地を除いて PBS(-)で 2 回洗浄した後, 培地を加え, 共焦点レーザー顕微鏡で細胞を観察した. BES-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ac の蛍光型の観察には 488 nm の励起レーザーを用いた.

#### 4-6. 参考文献

- [1] (a) H. Yang, S. Ren, S. Yu, H. Pan, T. Li, S. Ge, J. Zhang, N. Xia, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*(18), 6461. (b) Y. Matsuya, S. J. McMahon, M. Ghita, Y. Yoshii, T. Sato, H. Date, and K. M. Prise, *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 9483. (c) H. Umezawa, K. Maeda, T. Takeuchi, Y. Okami, *J. Antibiot.* **1966**, *19*, 200.
- [2] (a) K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5588–5589. (b) Y. Jin and J. A. Cowan, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8408–8415 (c) T. A. van den Berg, B. L. Feringa, and G. Roelfes, *Chem. Commun.* **2007**, *2*, 180–182. (d) J. He, P. Hua, Y.-J. Wanga, M.-L. Tonga, H. Sunb, Z.-W. Mao, and L.-N. Ji, *Dalton Trans.* **2008**, *24*, 3207–3214. (e) C. Lüdtkke, S. Sobottka, J. Heinrich, P. Liebing, S. Wedepohl, B. Sarkar, and N. Kulak, *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 3273–3277.
- [3] Y. Kadoya, M. Hata, Y. Tanaka, A. Hirohata, Y. Hitomi, M. Kodera, *Inorg. Chem.* **2021**, *60*, 5474.
- [4] (a) J. G. Topliss, *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 1006–1011. (b) J. G. Topliss, *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 463–469.
- [5] A. W. Addison, T. N. Rao, J. Reedijk, J. van Rijn, and G. C. Verschoor, *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1984**, 1349–1356.
- [6] S. D. Kurbah, A. Kumar, I. Syiemlieh, A. K. Dey, and R. A. Lal, *J. Mol. Struct.* **2018**, *1154*, 535–542.
- [7] Y. Zhang, L.-Z. Liu, Y.-D. Peng, N. Li, and W.-K. Dong, *Transition Met. Chem.* **2019**, *44*, 627–639.
- [8] L. Ropel, L. S. Belve`ze, S. N. V. K. Aki, M. A. Stadtherr, and J. F. Brennecke, *Green. Chem.* **2005**, *7*, 83–90.
- [9] Y. Nosaka, and A. Y. Nosaka, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 11302.
- [10] S. Lechnitz, J. Heinrich, and N. Kulak, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 13411.
- [11] R. Scherließ. *Int. J. Pharm.* **2011**, *411*, 98–105.
- [12] J. Meerloo, G. J. L. Kaspers, and J. Cloos, *Humana Press.* **2011**, *411*, 237–245.
- [13] A. Bahuguna, I. Khan, V. K. Bajpai, and S. C. Kang, *Bangladesh J Pharmacol.* **2017**, *12*, 115–118.
- [14] K. A. Szychowski, K. Rybczyńska-Tkaczyk, M. L. Leja, A. K. Wójtowicz, and J. Gmiński, *Environ Sci Pollut Res Int.* **2016**, *23*, 12246–12252.
- [15] J. H. Park, S.-H. Moon, D. H. Kang, H. J. Um, S.-S. Kang, J. Y. Kim, and H. Tchah, *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **2018**, *59*, 5108–5115.

- [16] N.-L. Pan, J.-X. Liao, M.-Y. Huang, Y.-Q. Zhang, J.-X. Chen, Z.-W. Zhang, Z.-X. Yang, X.-E. Long, X.-T. Wu, and J. Sun, *J. Inorg. Biochem.* **2022**, *229*, 111729
- [17] H. Peng, M. Zhu, W. Kong, C. Tang, J. Du, Y. Huang, and H. Jin, *Front Pharmacol.* **2023**, *14*, 1161542.
- [18] L. Su, S. Liu, X. Liu, B. Zhang, M. Li, L. Zeng, and L. Li, *PeerJ.* **2021**, *9*, e10976.
- [19] H. Fuchida, S. Tabata, N. Shindo, I. Takashima, Q. Leng, Y. Hatsuyama, I. Hamachi, and A. Ojida, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2015**, *88*, 784–791.
- [20] P. Comba, M. Morgen, and H. Wadepohl, *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 6481–6501.

## 第五章：Burst of DNA Double-Strand Breaks by Dicopper(II) Complex with a *p*-Cresol-2,6-Bis(amide-tether-dpa) Ligand via Reductive O<sub>2</sub>-Activation

### 5-1. 要旨

本章では、2,6-bis(amide-tether dpa)-*p*-cresol 配位子(HL3)の二核銅(II)錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3)](OAc) (**3**)がアスコルビン酸ナトリウム(AscNa)の存在下で O<sub>2</sub> 分子を還元的に活性化し、supercoiled plasmid pUC19 DNA (Form I)の26%が1分間で直鎖状DNA (Form III)に変換されるDNA二本鎖切断(double-strand breaks, dsb)のburstを見出した。この理由を、Robson型二核銅(II)錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-OH)(bpmp)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (**4**)およびN4Py配位子の鉄(II)錯体[Fe(MeCN)(N4Py)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (**5**)との比較から明らかにした。分光学的、電気化学的、速度論的研究により、**3**はAscNaとの反応でCu(I)Cu(II)とCu(I)Cu(I)に還元され、これらの還元種がO<sub>2</sub>を3電子還元してDNA切断の酸化活性種であるヒドロキシラジカル(HO•)を生成した。HO•の生成はテレフタル酸(TA)の蛍光スペクトル変化により観測した。さらに、等温滴定カロリメトリー(ITC)、電子吸収スペクトル、IRスペクトルにより、**3**、**5**のDNA結合能力を調べた。その結果、**3**の速いHO•生成、DNAへの結合数の多さ、DNAへの強固な結合が、**3**によるDNA dsbのburstを可能にする理由であることが明らかになった。

---

Machi Hata, Yuki Kadoya, Yutaka Hitomi, and Masahito Kodera “Burst of DNA Double-Strand Breaks by Dicopper(II) Complex with a *p*-Cresol-2,5-Bis(amide-tether-dpa) Ligand via Reductive O<sub>2</sub>-Activation” *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2022**, *95*, 1546–1552.

## 5-2. 緒言

DNA 二本鎖切断(double-strand breaks, dsb)は、遺伝子編集<sup>[1]</sup>やがんなどの重大疾病の治療への応用<sup>[2]</sup>の観点から重要である。Bleomycin (BLM)<sup>[3]</sup>は臨床利用されている抗がん剤であり、鉄錯体 Fe-BLM は高い DNA 切断活性を示し、DNA 一本鎖切断(single-strand breaks, ssb)と二本鎖切断(dsb)を触媒して ssb と dsb の比率は 1:3 から 1:20 であると報告されている<sup>[4]</sup>。Fe-BLM の DNA dsb は、好氣的条件下で進行し、回文配列である 5'-GTAC-3'部位に結合して一回目の DNA 鎖の切断を経てその近傍での二回目の DNA 相補鎖の切断により達成される<sup>[4]</sup>。また Fe-BLM が還元剤である Dithiothreitol (DTT)の存在下で O<sub>2</sub> 分子を活性化し、supercoiled plasmid DNA (Form I)を直鎖状 DNA (Form III)に変換する dsb の初期の速い反応(burst)を触媒して、20 秒で ssb と dsb が 80:20 の割合で生成すると報告された<sup>[5]</sup>。Fe-BLM は O<sub>2</sub> を還元的に活性化し、活性種として活性化 BLM-Fe(III)O<sub>2</sub>H を形成すると提案されている<sup>[6]</sup>。しかし、DNA dsb の詳細なメカニズムはまだ解明されていない<sup>[7]</sup>。そこで、DNA dsb の burst を再現できる金属錯体の開発が重要である。

Fe-BLM による酸化的 DNA 切断を模倣するため、様々な金属錯体が開発されてきた<sup>[8-27]</sup>。しかし、合成金属錯体の DNA 切断速度は Fe-BLM よりもはるかに遅く、1 分以内に反応が終了するような DNA dsb の burst の報告例はない。Cowan らは、還元剤 AscNa (250 μM)存在下でトリペプチド配位子の銅錯体(25 μM)による還元的 O<sub>2</sub> 活性化を通して比較的速い DNA dsb が進行すると報告した<sup>[18]</sup>。Roelfes らは、N4Py とその関連配位子の鉄錯体が酸化的 DNA 切断で高い活性を示し、還元剤 DTT (1 mM)存在下において少量の錯体(1 μM)を用いた還元的 O<sub>2</sub> 活性化で、supercoiled plasmid DNA (Form I)を 60 分で 8-32%の直鎖状 DNA (Form III)に変換する DNA dsb が進行することを報告した<sup>[24, 25]</sup>。

最近、当研究室の角谷らは 2,6-bis(amide-tether dpa)-*p*-cresol 配位子(HL3)とその二核銅(II)錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3OAc)(L3)](OAc) (**3**)を開発し、**3** が過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)存在下で DNA の二本鎖を酸化的に切断することを見出した<sup>[28]</sup>。**3** (30 μM)は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 μM)存在下で supercoiled plasmid pUC19 DNA (Form I)の 42%を 60 分で直鎖状 DNA (Form III)に変換した。これは合成金属錯体の中では比較的高い DNA 切断活性だが、Fe-BLM よりははるかに遅い。

本章では、活性酸素種(ROS)濃度の高いがん細胞中では恒常性を保つために還元剤濃度が高いことに注目し、還元剤 AscNa (150 μM)存在下で **3** (30 μM)による DNA 切断実験を行った。**3** は還元的に O<sub>2</sub> を活性化し、1 分間で 26%の supercoiled plasmid DNA (Form I)を直鎖状 DNA (Form III)に変換する DNA dsb の burst を進行させることを見出した。合成金属錯体を用いた反応でこれほど速い DNA dsb は報告例がない。そこで Robson 型

二核銅(II)錯体 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{bpmp})](\text{ClO}_4)_2$  (**4**)<sup>[29]</sup>と BLM の金属中の模倣配位子である N4Py の鉄(II)錯体 $[\text{Fe}(\text{MeCN})(\text{N4Py})](\text{ClO}_4)_2$  (**5**)<sup>[24, 30]</sup>を比較に用い、**3** による DNA dsb の burst が進行する原因の解明を試みた。**3-5** の DNA 切断活性、電気化学的性質、HO $\cdot$ 生成速度、DNA 結合様式などを比較した結果、HO $\cdot$ 生成の速さと DNA への結合数の多さが、**3** による DNA dsb の burst を可能にする重要な特徴であることが明らかになった。本章で用いた HL3, **3**, **4**, **5** の化学構造を Figure 5-1 に示す。

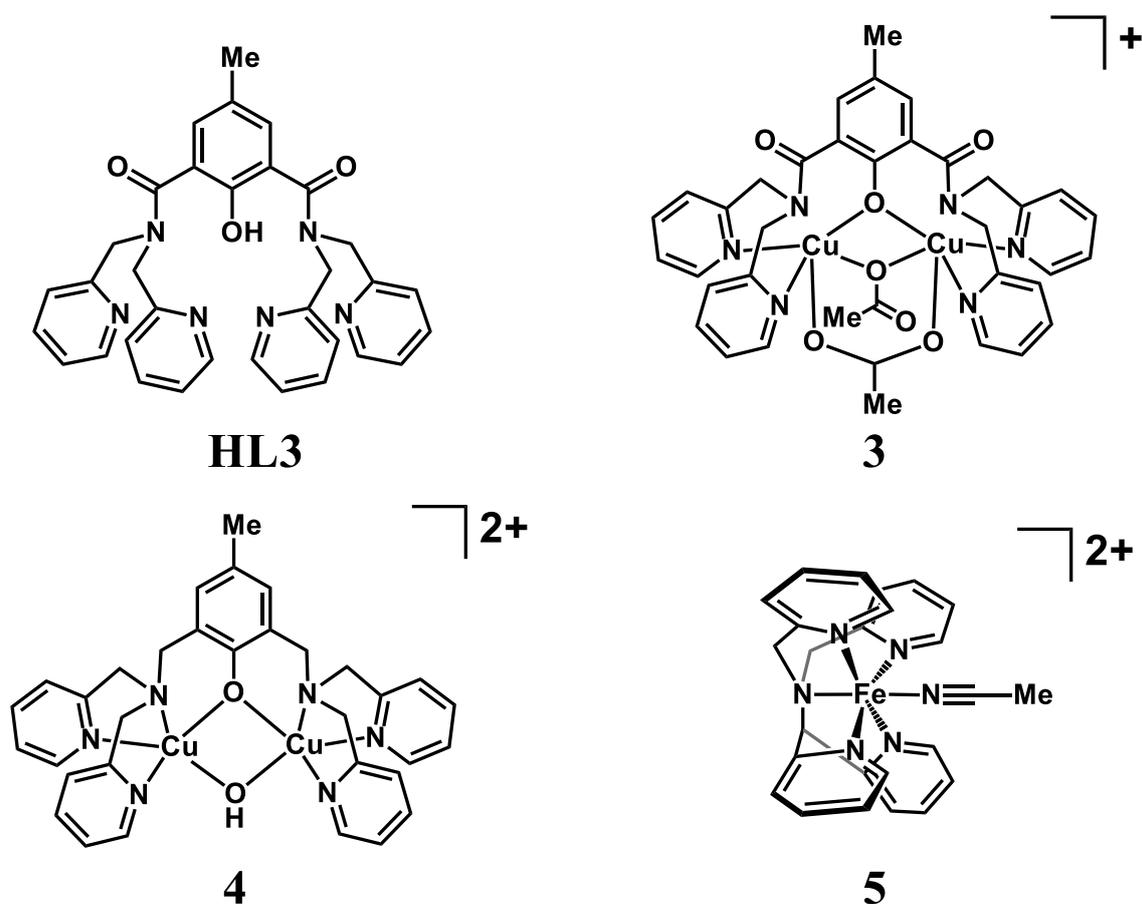
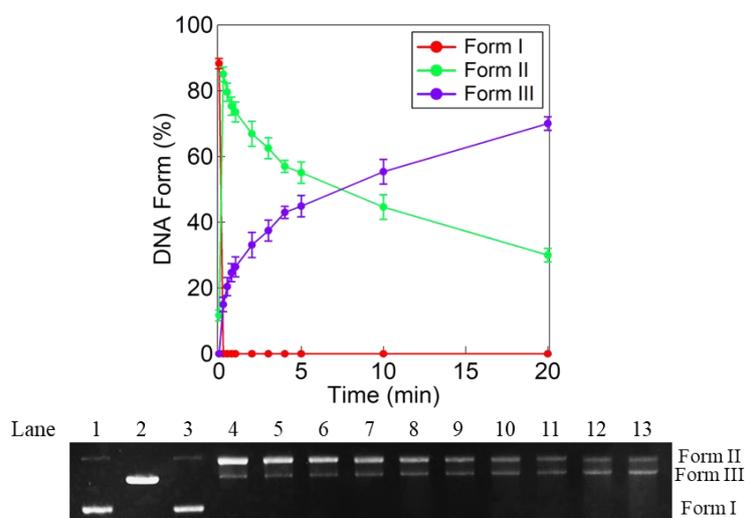


Figure 5-1. Chemical Structures of HL3, 3, 4, and 5.

### 5-3. 結果と考察

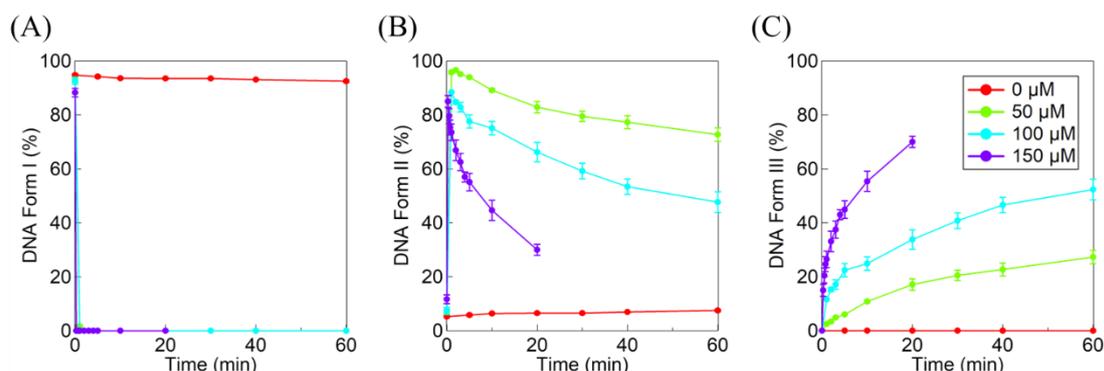
#### 5-3-1. AscNa を用いた還元的 O<sub>2</sub> 活性化による 3-5 の酸化的 DNA 切断活性

MES Buffer (10 mM, pH 6.0), NaCl (10 mM), pUC19 DNA (50 μM bp), **3**, **4** または **5** の混合溶液を作成した。これに空気下 37°C で AscNa を加え、反応追跡のために一定量のサンプルを時間毎に採取した。この反応における Form I, II, III は、アガロースゲル電気泳動で分析した。Form I, II, III はそれぞれスーパーコイルの閉環状、一本鎖切断の環状、二本鎖切断の直線状 DNA である<sup>[31]</sup>。**3** の反応の Form I, II, III の割合(%)の時間経過とゲル写真を Figure 5-2 に示す。Figure 5-2 に示すように、**3** (30 μM) と AscNa (150 μM) を用いた反応で、誘導期は存在せず 1 分間で Form I の 26% が Form III, 74% が Form II に変換された。また Form III は 10 分間で 50% 以上形成されており、30 分以上の反応ではランダム切断によるスメアパターンが出現した。反応初期の 15, 30, 45 秒では、それぞれ 15, 20, 25% の Form III が生成した。合成金属錯体による Form III への DNA dsb で、このような速い反応は、これまでに報告例がない。

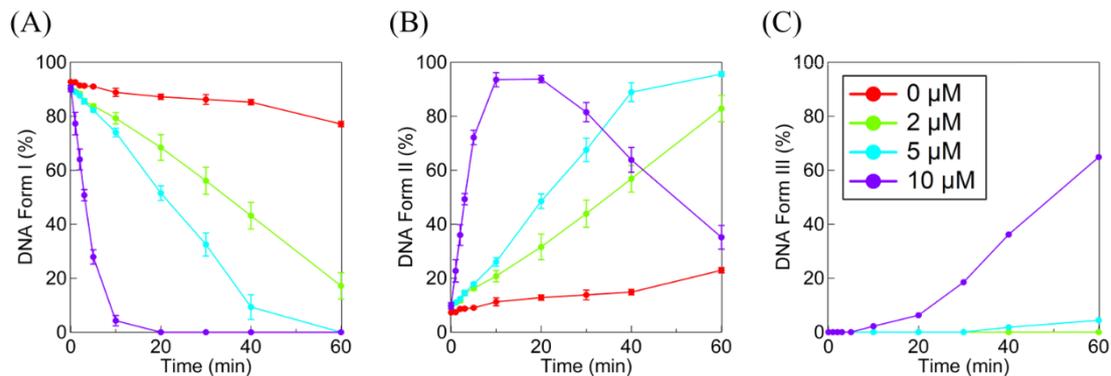


**Figure 5-2.** Time courses of Form I (red), II (light green), and III (purple) in the reaction of **3** under typical reaction conditions described in the text and the agarose gel electrophoresis profile lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–13: data at 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 10, and 20 min.

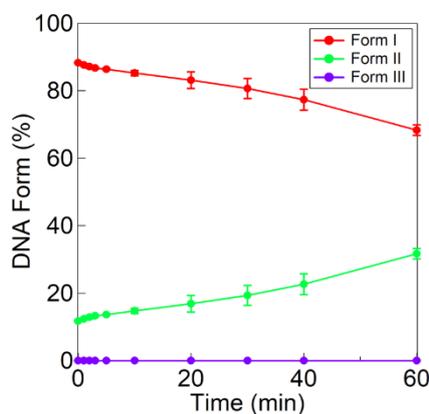
3 と AscNa に関する濃度依存性の結果を、それぞれ Figure 5-3, 5-4 に示す。この実験におけるゲル写真と詳細なデータは Figure S5-1, Table S5-1, S5-2 に示す。これらの結果から、DNA 切断は[3]と[AscNa]に依存することが分かった。3 や AscNa の非存在下では、60 分間で 80%以上の Form I が未反応だった。また、3, AscNa の存在下でも嫌気下では、60 分間で Form I は 32%しか Form II に変換されなかった(Figure 5-5, Figure S5-2, Table S5-3)。したがって、3, AscNa, O<sub>2</sub> は DNA dsb の burst に不可欠である。Figure 5-3 (C)の結果から、[AscNa]を減少させても誘導期は全く見られず DNA dsb の burst が進行することがわかる。しかし、Figure 5-4 (C)の結果から、10 μM の 3 と AscNa (150 μM) を用いた場合、Form III 生成には誘導期が存在し、DNA dsb の burst は観察されない。したがって、DNA dsb の burst は[3]に大きく依存することがわかる。



**Figure 5-3.** Time courses for Form I (A), Form II (B), and Form III (C) dependent on [AscNa] in the DNA cleavage by 3. Experimental conditions: [pUC19 DNA] = 50 μM bp, [3] = 30 μM, [AscNa] = 0–150 μM, [Cu(OAc)<sub>2</sub>] = 70 μM, [NaCl] = 10 mM, [MES buffer] = 10 mM (pH 6.0) at 37°C. Experiments were carried out at least three times.

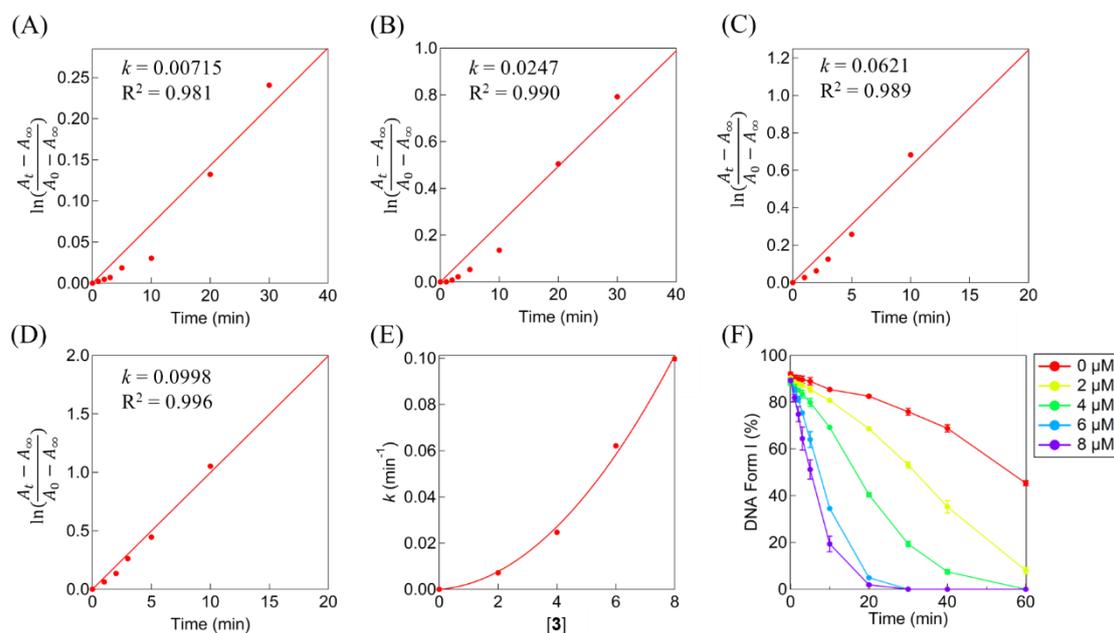


**Figure 5-4.** Time courses for Form I (A), Form II (B), and Form III (C) dependent on [3] in the DNA cleavage by 3. Experimental conditions: [pUC19 DNA] = 50 μM bp, [3] = 0–10 μM, [AscNa] = 150 μM, [Cu(OAc)<sub>2</sub>] = 70 μM, [NaCl] = 10 mM, [MES buffer] = 10 mM (pH 6.0) at 37°C. Experiments were carried out at least three times.

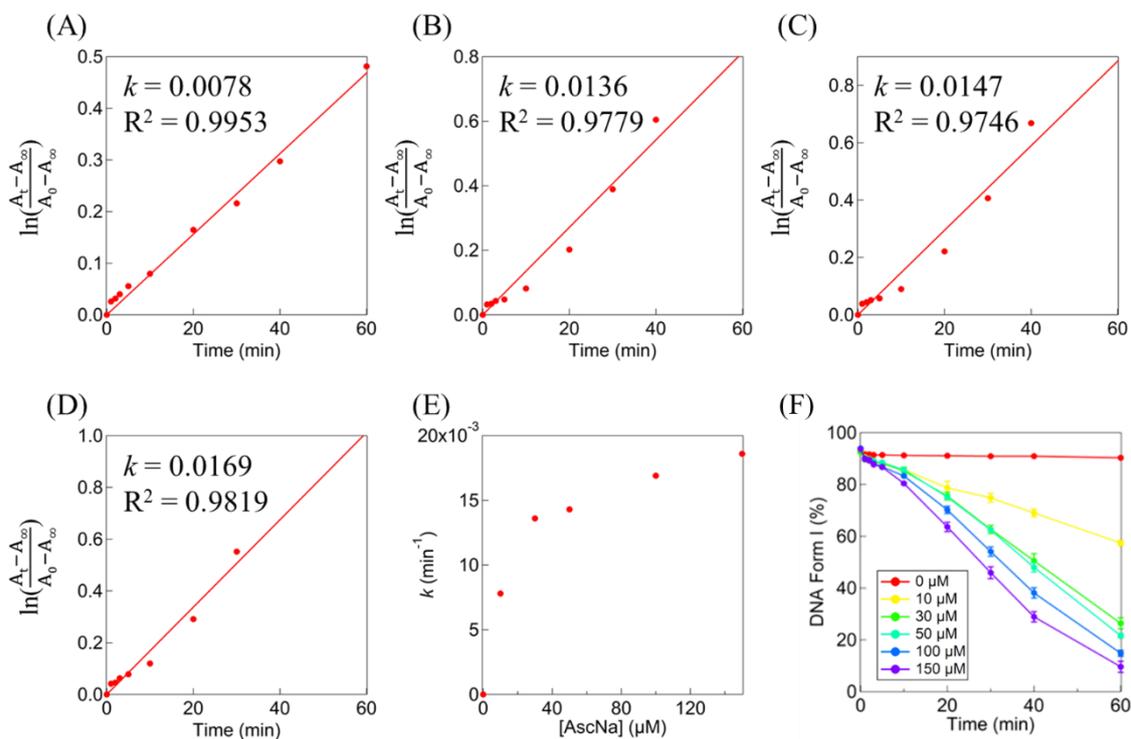


**Figure 5-5.** Time courses for Form I (red), II (light green), and III (purple) in the reaction of 3 under N<sub>2</sub>. Experimental conditions: [pUC19 DNA] = 50 μM bp, [3] = 30 μM, [AscNa] = 150 μM, [Cu(OAc)<sub>2</sub>] = 70 μM, [NaCl] = 10 mM, [MES buffer] = 10 mM (pH 6.0) at 37°C. Experiments were carried out at least three times.

**3** による DNA 酸化切断の機構を調べるため、**3** (0–8  $\mu\text{M}$ )と AscNa (0–150  $\mu\text{M}$ )を用いて Form I の減衰速度を測定し、擬一次速度解析を行った。その結果を Figure 5-6, 5-7, S5-3, S5-4, Table S5-4, S5-5 に示す。Figure 5-6 (E), 5-7 (E)に示す、擬一次速度定数  $k_{\text{obs}}$  vs **[3]**および  $k_{\text{obs}}$  vs [AscNa]のプロットから、**[3]**に対しては二次の依存性、[AscNa]に対しては飽和の依存性が見られた。この結果より、**3** が AscNa によって還元され、還元体である Cu(I)Cu(II)と Cu(I)Cu(I)が DNA 切断の律速となる  $\text{O}_2$  活性化に参与することが示唆された。したがって、Figure 5-4 の錯体濃度依存の測定において**[3]**に DNA dsb が極端に依存した理由は、**3** による DNA dsb が**[3]**に対して二次反応速度論に従うためであると考えられる。

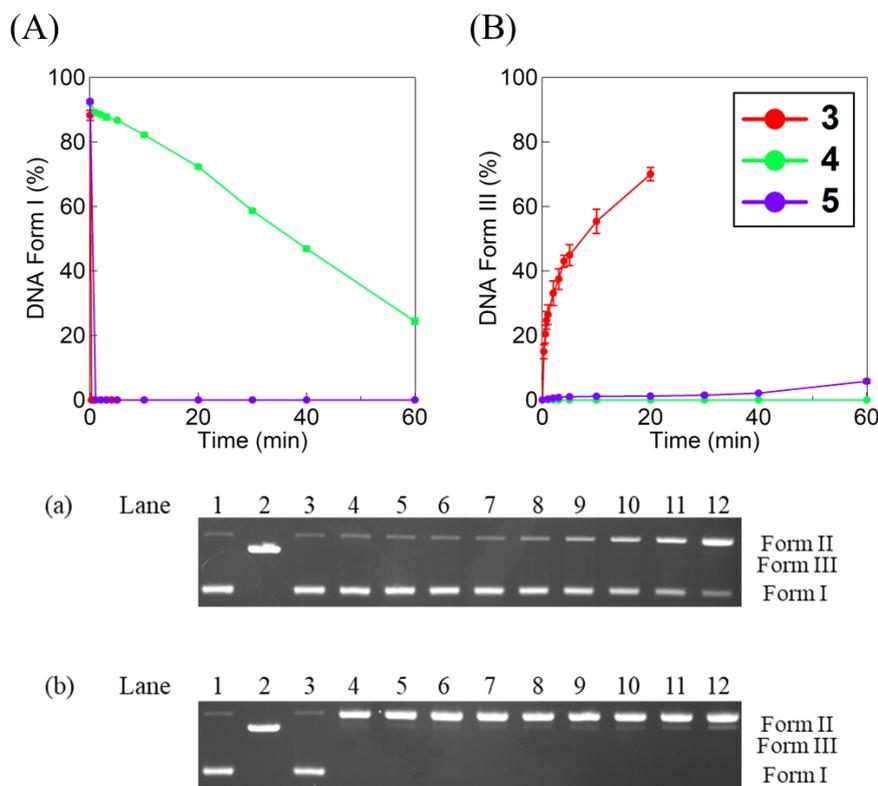


**Figure 5-6.** Pseudo-first-order plots for the decrease of Form I in the reactions of **3** ((A) 2, (B) 4, (C) 6, and (D) 8  $\mu\text{M}$ ) with AscNa (50  $\mu\text{M}$ ) at pH 6.0 under air at 37°C. (E) A plot of the pseudo-first-order rate constant vs concentration of **3** (0–8  $\mu\text{M}$ ). (F) Time courses of Form I upon reaction of **3** (red 0, yellow 2, light green 4, blue 6, and purple 8  $\mu\text{M}$ ) with AscNa 50  $\mu\text{M}$ ). Experiments were carried out at least three times.



**Figure 5-7.** Pseudo-first-order plots for the decrease of Form I in the reactions of **3** (5 μM) with AscNa ((A) 10, (B) 30, (C) 50, and (D) 100 μM) at pH 6.0 under air at 37°C. (E) A plot of the pseudo-first-order constant vs concentration of AscNa (0–150 μM). (F) Time courses of Form I upon reaction of **3** (5 μM) with AscNa (red 0, yellow 10, light green 30, light blue 50, blue 100, and purple 150 μM).

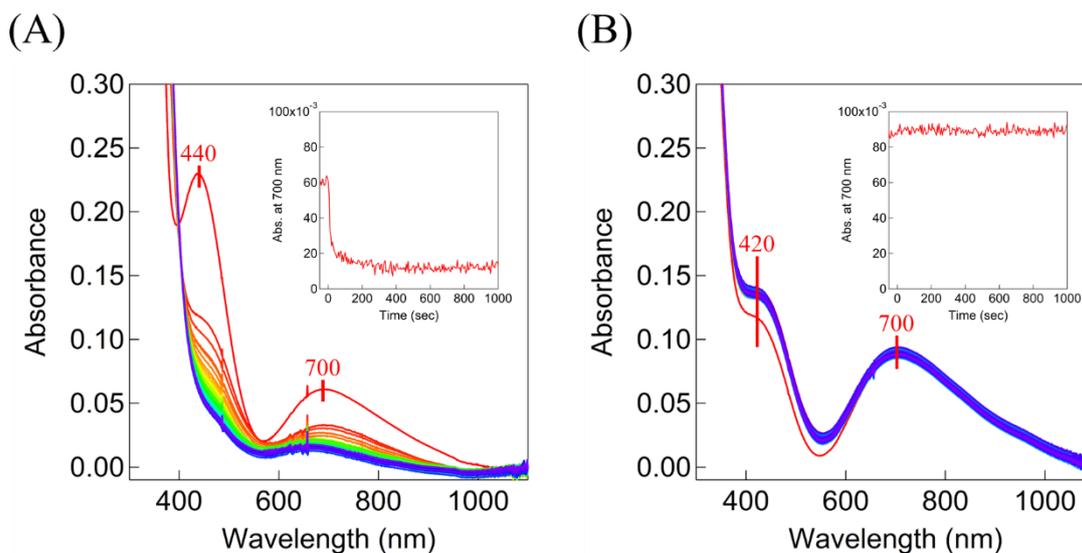
Figure 5-8 に、**3-5** の反応における Form I の減少と Form III の増加の比較、**4**、**5** の反応のゲル写真を示す。また、これらの関連データを Table S5-6 に示す。Figure 5-8 (A) に示す DNA 切断活性の比較より、**3** と **5** はいずれも 1 分間で Form I を II に完全に変換するが、**4** は Form I の 70% を Form II に変換するのに 60 分かかるとわかる。このことから、**3** と **5** は **4** よりもはるかに高い DNA 切断活性を示すといえる。一方、Figure 5-8 (B) の比較から、**3** は DNA dsb の burst を起こすが **4** や **5** はほとんど DNA dsb を起こさず、**3** が **4** や **5** よりもはるかに高い DNA dsb 活性を示すことが明らかになった。このように、**3** の還元的 O<sub>2</sub> 活性化で DNA dsb が特異的に加速されること見出された。



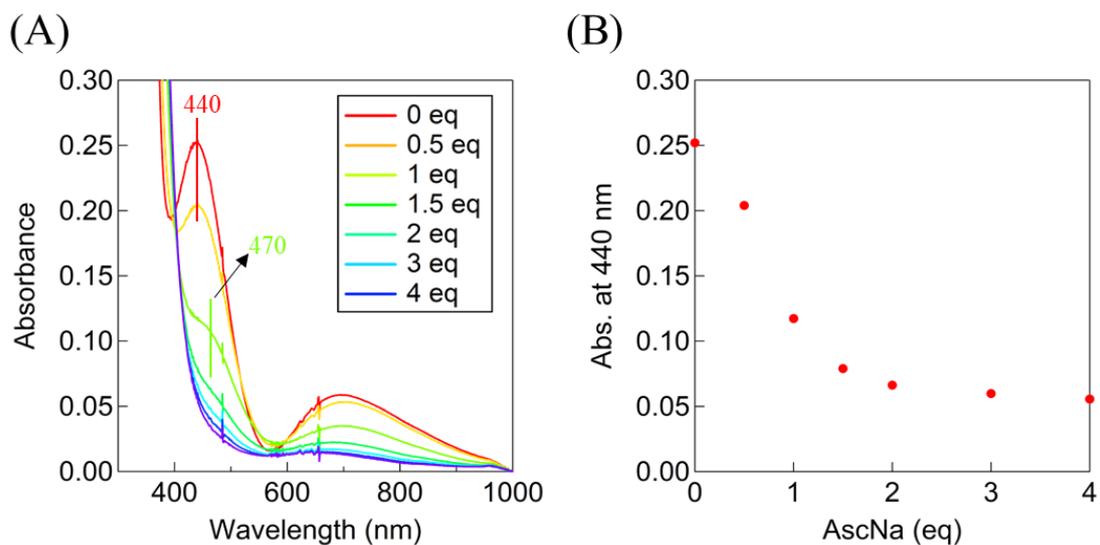
**Figure 5-8.** Comparison of time courses of Form I (A) and III (B) among **3** (red), **4** (green), and **5** (purple) in the reactions under reaction conditions described in the text and the agarose gel electrophoresis profiles of **4** (a) and **5** (b). Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: data at 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60min.

### 5-3-2. 3, 4 および 5 の酸化還元挙動

DNA 切断活性の違いの理由を明らかにするため、**3-5** の redox property を AscNa との反応とサイクリックボルタモグラム(CV)の測定で調べた。さらに、**3** のバルク電気分解を電子スペクトル変化で追跡した。Figure 5-9 から、**3** は AscNa と反応すると容易に還元されるが、**4** は全く還元されないことがわかる。これが **3** は AscNa との反応で O<sub>2</sub> 分子を活性化するが、**4** は活性化しない理由である。**3** の減衰を 440 nm と 700 nm で追跡したところ、最初の減衰はわずかな波長シフトを伴う速いもので、その後ゆっくりと減衰するという二段階の挙動を示した。このスペクトル変化は、**3** が Cu(I)Cu(II)と Cu(I)Cu(I)に段階的に還元されることを示している<sup>[32]</sup>。これは、440 nm で追跡した AscNa 滴定による **3** の還元でも観察された(Figure 5-10)。**3** は 1 eq の AscNa によって Cu(I)Cu(II)に還元され、追加の 1 eq によって Cu(I)Cu(I)に還元されており、**3** を完全に還元するには 2 eq 以上の AscNa が必要だった。

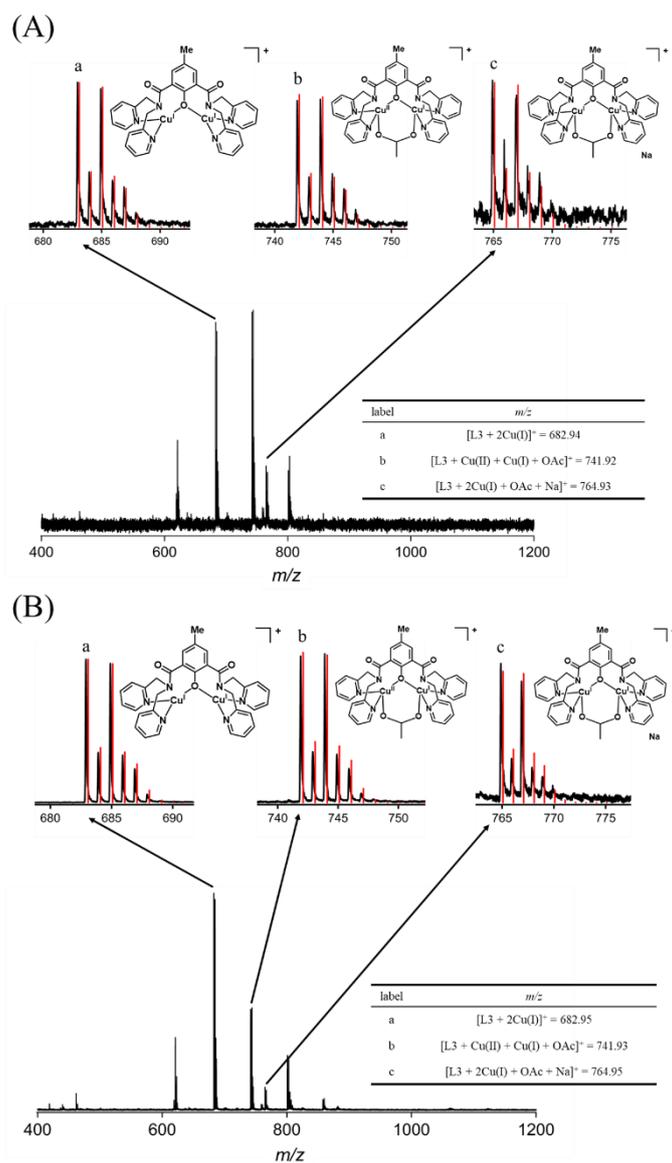


**Figure 5-9.** Absorption spectral changes (red to blue lines, 5 sec at every interval) of **3** (0.50 mM) (A) and **4** (0.50 mM) (B) upon addition of AscNa (1.0 mM) in MES buffer (10 mM, pH 6.0) at rt under N<sub>2</sub> (inset: time courses monitored at 700 nm). NaOAc (1.5 mM) is present in the reaction of **3**.



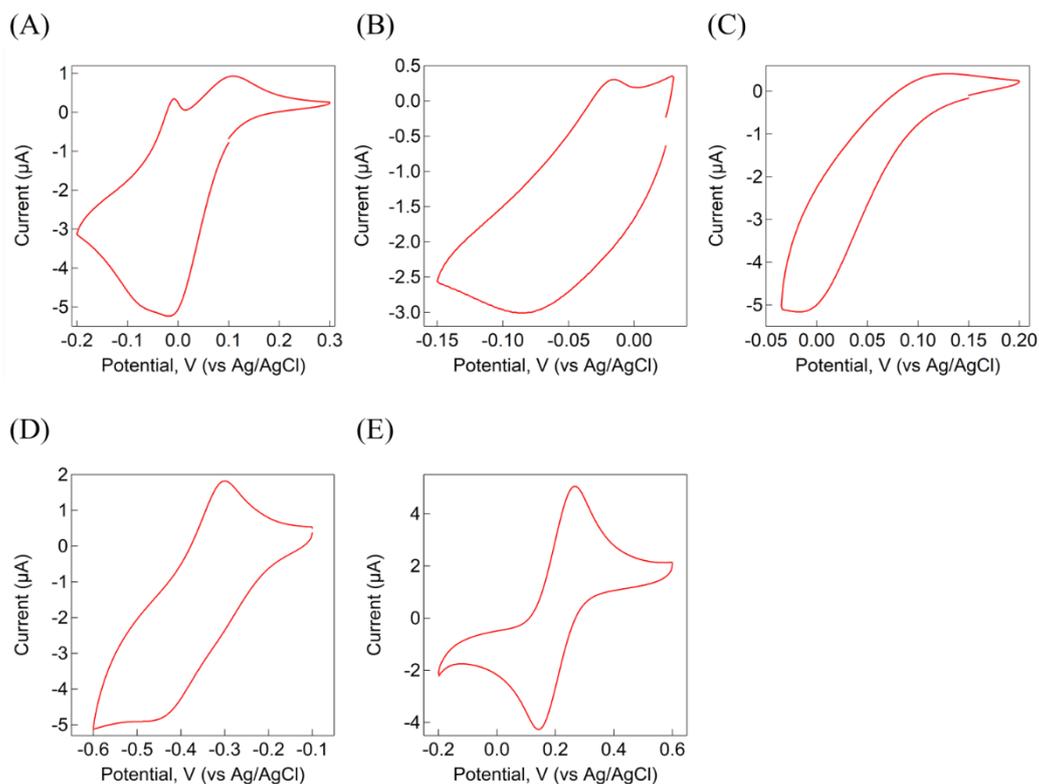
**Figure 5-10.** (A) Electronic absorption spectral change upon addition of AscNa (0 (red), 0.5 (orange), 1.0 (yellow green), 1.5 (light green), 2.0 (light blue), 3.0 (blue), 4.0 (purple) eq) to a solution of **3** (0.5 mM) in the presence of NaOAc (1.5 mM) in MES buffer (10 mM, pH 6.0) under N<sub>2</sub>. (B) Plot of absorbance at 440 nm vs. equivalent of AscNa added.

次に、 $\text{H}_2\text{O}$  中での AscNa による **3** の還元反応における CSI MS スペクトルを Figure 5-11 に示す。  $m/z$  682.95 と 741.93 にそれぞれ  $[\text{L}3 + 2\text{Cu(I)}]^+$  ( $\text{Cu(I)Cu(I)}$ ) と  $[\text{L}3 + \text{Cu(I)} + \text{Cu(II)} + \text{OAc}]^+$  ( $\text{Cu(I)Cu(II)}$ ) に対応する強いピークが現れた。ピーク強度は反応時間とともに変化し、1 分間で  $\text{Cu(I)Cu(II)}$  が主ピークとなり (Figure 5-11 (A)), 2 分間で  $\text{Cu(I)Cu(I)}$  に変化した (Figure 5-11 (B))。この結果より、**3** は  $\text{Cu(I)Cu(II)}$  を経て  $\text{Cu(I)Cu(I)}$  へと段階的に還元されることが明らかとなった。



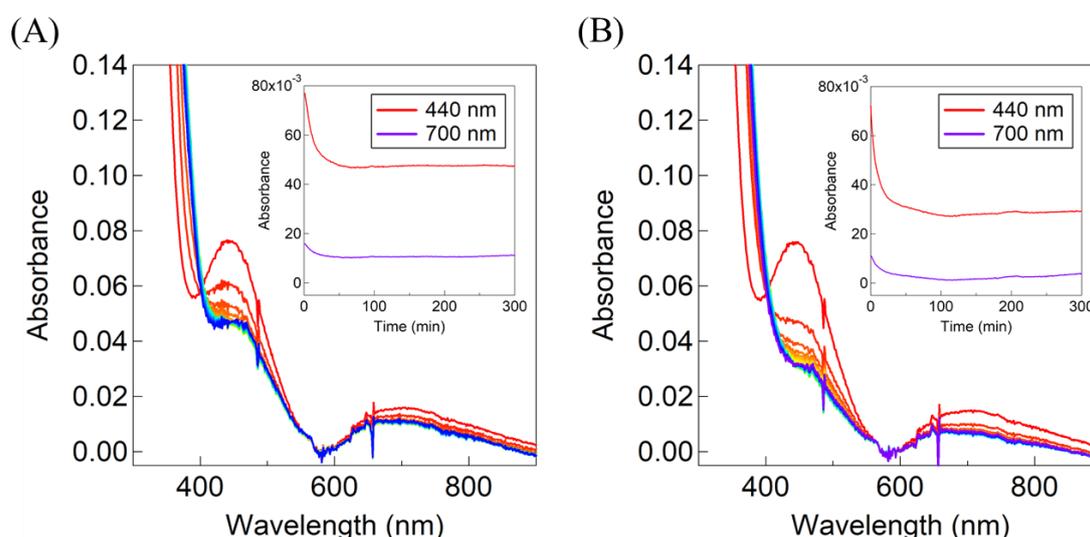
**Figure 5-11.** CSI MS spectra obtained after 1 min (A) or 2 min (B) upon reaction of **1** (0.5 mM) with AscNa (20 eq) in the presence of NaOAc (20 eq) in  $\text{H}_2\text{O}$  at  $5^\circ\text{C}$  under  $\text{N}_2$ , at orifice 1: 10 V, orifice 2: 0 V, ring lens voltage: 10 V.

**3-5** (0.5 mM)の pH 6.0 の水溶液(MES Buffer, 200 mM)を用いて CV を測定し、電気化学挙動を調べた。 **3-5** の CV を Figure 5-12 に示す。 Figure 5-12 (A)に示す **3** の CV は、 $-0.10$ – $+0.10$  V vs Ag/AgCl の間に重なり合った 2 つの酸化還元カップルを与え、Figure 5-12 (B)および(C)に示すように、2 つの redox couple に分離された。 Figure 5-12 (B)の  $E_{1/2} = -0.05$  V ( $\Delta E_p = 0.06$  V)の準可逆的な redox couple は Cu(I)Cu(II)/Cu(I)Cu(I)で、Figure 5-12 (C)の  $E_{pc} = 0.0$ ,  $E_{pa} = 0.1$  V の不可逆的な redox couple は、Cu(II)Cu(II)/Cu(I)Cu(II)に帰属される。 OAc 架橋は還元時に解離する傾向があり、**3** の不可逆的な redox couple の原因と考えられる。 **3** のバルク電解を $-0.003$  V と $-0.12$  V で行い、それぞれ 1 eq および 2 eq の電子に相当する電流値が得られた。 このことから、これらは Cu(I)Cu(II)と Cu(I)Cu(I)の形成に対応することが示された。



**Figure 5-12.** Cyclic voltammograms of **3** (A, B, C), **4** (D), and **5** (E). The measurements were made at  $23^{\circ}\text{C} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$  under  $\text{N}_2$ . Glassy carbon, Pt wire, and Ag/AgCl are used as working, counter, and reference electrodes, respectively. Scan rate was  $10 \text{ mV s}^{-1}$  (**3**) or  $100 \text{ mV s}^{-1}$  (**4, 5**) and sensitivity was  $10 \mu\text{A/V}$ .

さらに、 $-0.003\text{ V}$  および  $-0.12\text{ V}$  vs Ag/AgCl での **3** の還元を、電子吸収スペクトルで追跡した。その結果をそれぞれ Figure 5-13 (A), (B) に示す。**3** の  $440\text{ nm}$  と  $700\text{ nm}$  の吸収帯の吸光度は、 $-0.003\text{ V}$  のバルク電解では半減して Cu(I)Cu(II) に対応し、 $-0.12\text{ V}$  ではさらに減少して Cu(I)Cu(I) が生成した。 $-0.12\text{ V}$  のバルク電解におけるスペクトル変化は、Figure 5-10 (A) に示した AscNa による **3** の還元で観測されたものとほぼ同じであった。これらの結果は、**3** がバルク電解や AscNa との反応で Cu(I)Cu(II) から Cu(I)Cu(I) に段階的に還元されることを示している。

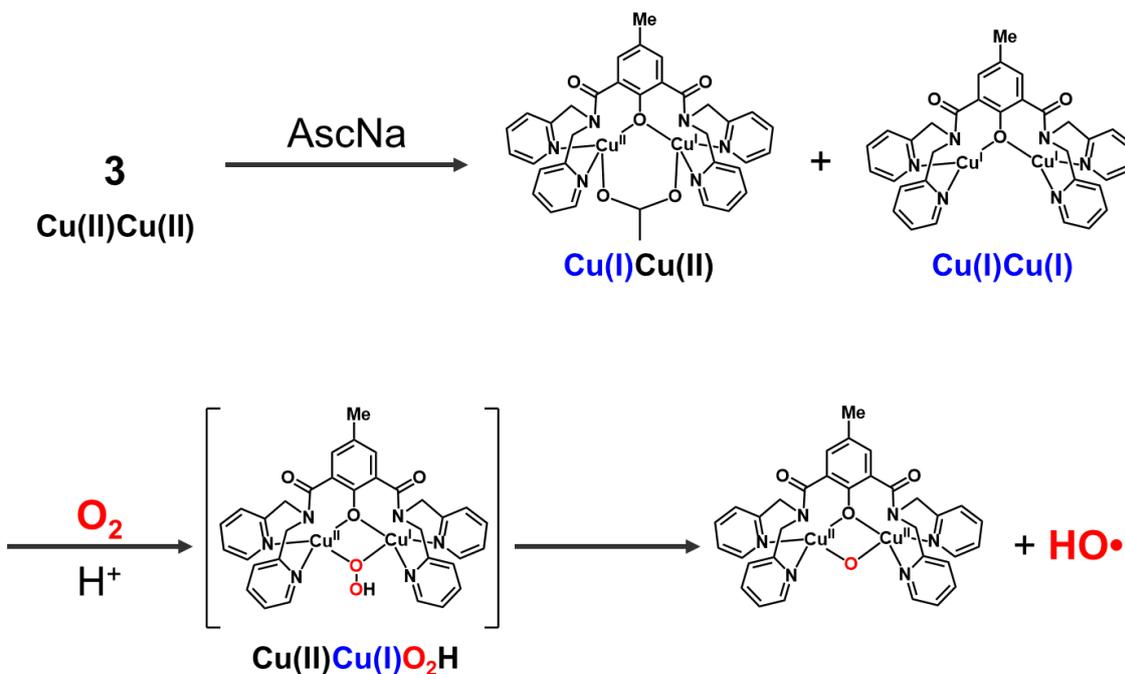


**Figure 5-13.** Electronic absorption spectral change of **3** during the bulk electrolysis at  $-0.003$  (A) or  $-0.12\text{ V}$  (B) vs. Ag/AgCl using a Pt mesh working electrode and a Pt wire counter electrode at  $23^\circ\text{C} \pm 0.2^\circ\text{C}$  under  $\text{N}_2$ . The time courses of the decrease of **3** monitored at  $440$  and  $700\text{ nm}$  are shown in the inset.

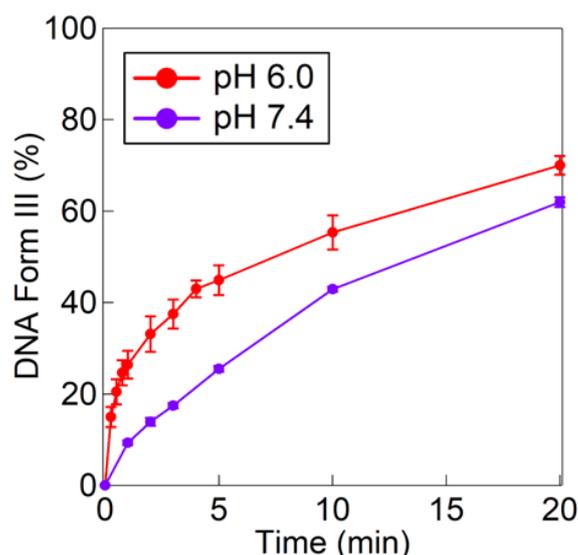
また、Figure 5-12 (D) に示すように、**4** は  $E_{\text{pc}} = -0.46\text{ V}$ ,  $E_{\text{pa}} = -0.30\text{ V}$  で不可逆的な酸化還元カップルを示した。これは、Cu(II)Cu(II)/Cu(I)Cu(II) に割り当てられる<sup>[31]</sup>。Figure 5-9 (B) において、**4** が AscNa で還元されなかったのは還元電位が低すぎるためであると考えられる。**5** は、Figure 5-12 (E) に示すように、 $E_{1/2} = 0.20\text{ V}$  ( $\Delta E_{\text{p}} = 0.10\text{ V}$ ) で可逆的な redox couple を示し、これは Fe(III)/Fe(II) に対応すると考えられる。これは、Roelfes らが報告した<sup>[24]</sup>、還元剤存在下、**5** が空气中で  $\text{O}_2$  を活性化して Fe(III) $\text{O}_2\text{H}$  錯体を形成するという事実と一致している。

### 5-3-3. 3 および 5 の還元的 O<sub>2</sub> 活性化

5-3-2 で述べたように、3 は AscNa と反応して Cu(I)Cu(II) と Cu(I)Cu(I) に還元される。DNA 切断では[3]に対して2次の速度依存性が見られたので、Cu(I)Cu(II) と Cu(I)Cu(I) の両者が O<sub>2</sub> 活性化に関与することが示唆された。これらの還元体は、Scheme 5-1 に示すように、O<sub>2</sub> を3電子還元し、プロトン化されて Cu(II)Cu(I)O<sub>2</sub>H 錯体を形成すると考えられる。これは、3 による DNA dsb 活性が pH 7.4 よりも pH 6.0 の方が高いという結果から考えて妥当である (Figure 5-14 および S5-5, Table S5-7)。Cu(II)Cu(I)O<sub>2</sub>H は不安定であり、分光学的には検出できなかった。HO•の生成に必要な Cu(I)O<sub>2</sub>H 種のホモリティックな O-O 結合切断はエネルギー的に有利な反応であり<sup>[33]</sup>、Cu(II)Cu(I)O<sub>2</sub>H から HO•が生成することは合理的である。

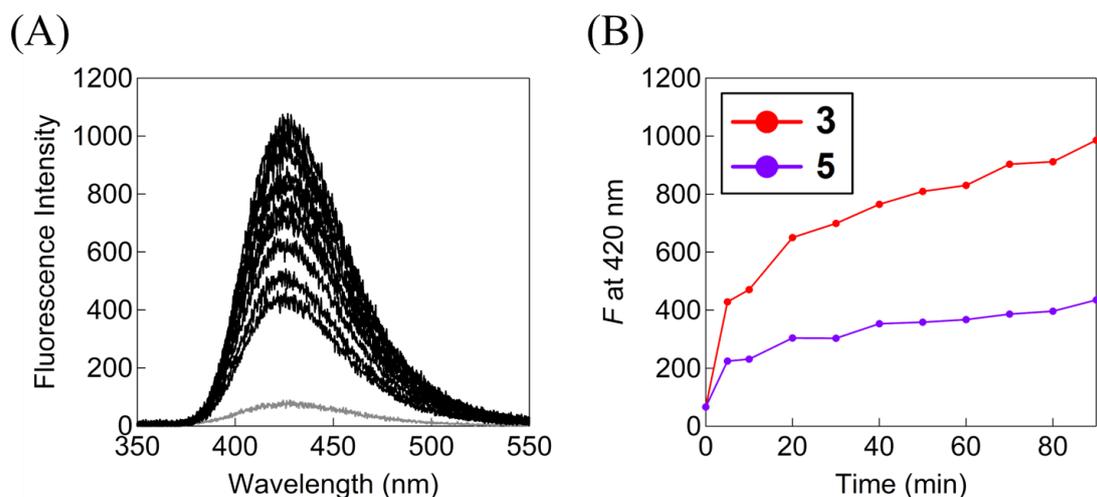


Scheme 5-1. Reductive O<sub>2</sub>-activation of 3.

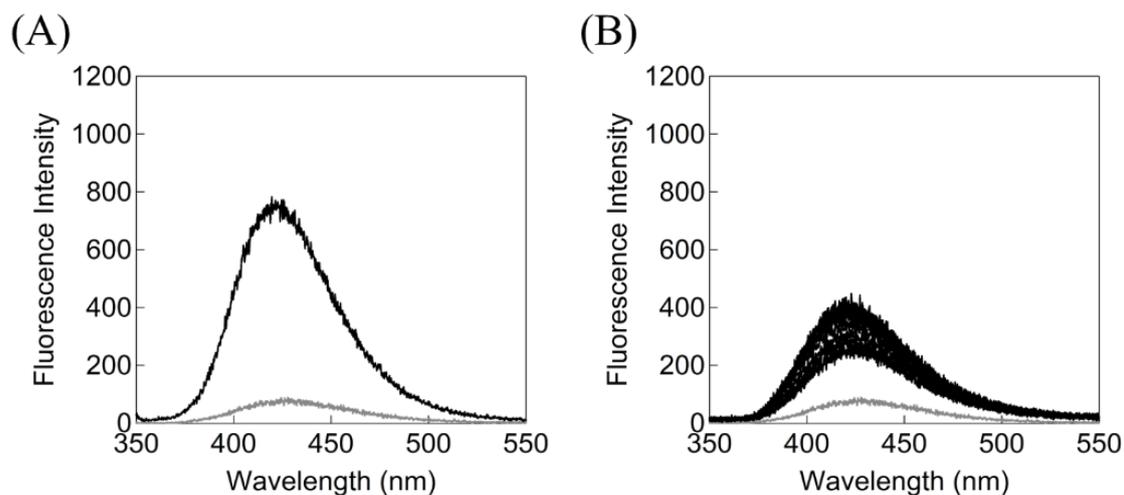


**Figure 5-14.** Time courses of Form III dependent on pH (pH 6.0 (red) and 7.4 (purple)) in the DNA cleavage of **3**. Experimental conditions: [pUC19 DNA] = 50  $\mu$ M bp, [**3**] = 30  $\mu$ M, [AscNa] = 150  $\mu$ M, [Cu(OAc)<sub>2</sub>] = 70  $\mu$ M, [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES) or pH 7.4 (MOPS)) at 37°C. Experiments were carried out at least three times.

次に、空気下での **3**, **5** と AscNa の反応による HO•生成を、テレフタル酸(TA)の蛍光スペクトル変化により確認した結果を Figure 5-15, 5-16 に示す。TA は HO•と反応して 2-ヒドロキシテレフタル酸(HTA)を生成し、310 nm で励起すると 425 nm に蛍光バンドを示す<sup>[34,35]</sup>。同様のスペクトル変化が TA と Fenton 試薬との反応でも見られた(Figure 5-16 (A))。Figure 5-15 (A)に示すように、空気下で TA と **3**/AscNa を反応させると、蛍光強度が増加した。反応で生成した HTA の濃度は、蛍光バンドの強度変化から 5 分で 1.5  $\mu$ M, 90 分で 3.6  $\mu$ M と推定される。これらの値は DNA dsb に十分な HO•濃度に相当する。420 nm で追跡した蛍光強度の時間変化から、**3** は **5** よりも約 2 倍多くの HO•を生成した(Figure 5-15 (B))。したがって、**3** は AscNa との反応で O<sub>2</sub> 分子を効率的に活性化し、**5** よりも約 2 倍速い形成速度で HO•を形成しているといえる。

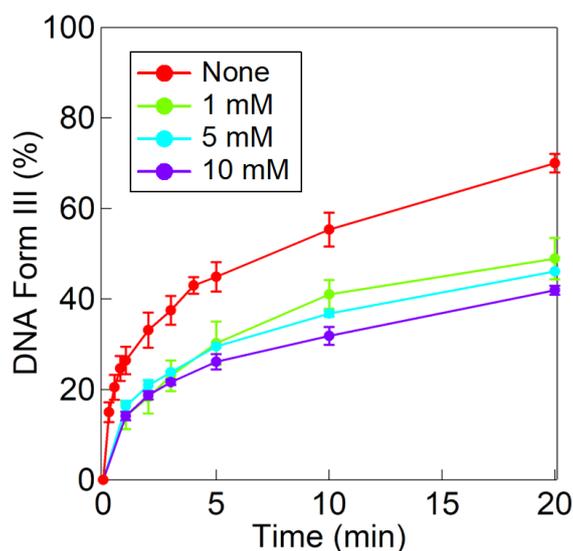


**Figure 5-15.** (A) Emission spectral change (5min in beginning two then 10min at every interval) excited at 310 nm in the reaction of TA with **3**/AscNa under air. (B) Time courses of the emission intensity monitored at 420 nm for **3** (red) and **5** (purple). Reaction conditions: **3** or **5** (30  $\mu$ M), AscNa (150  $\mu$ M), TA (0.5 mM), and NaCl (10mM) in MES buffer (10 mM, pH 6.0) under air at 37°C.



**Figure 5-16.** (A) Emission spectral change (gray to black) excited at 310 nm in the reaction of TA with Fenton reagent. Reaction conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [TA] = 0.5 mM, [FeSO<sub>4</sub>] = 10  $\mu$ M, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0.1 mM, [EDTA] = 10  $\mu$ M, [AscNa] = 0.1 mM at 37°C. (B) Emission spectral change (gray to black, 5 min in the beginning then 10 min at every interval) at 310 nm in the reaction of TA with **5** and AscNa under air. Reaction conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES)), [TA] = 0.5 mM, [**5**] = 30  $\mu$ M, [AscNa] = 150  $\mu$ M at 37°C.

さらに、HO•がDNA切断における活性種であることを拡散HO•の阻害剤であるDMSOを用いた阻害実験により確認した。3によるForm III生成に対するDMSO<sup>[35-37]</sup>の阻害効果をFigure 5-17示し、それに関連するデータをFigure S5-6およびTable S5-8に示す。DMSOは部分的にForm III生成を阻害し、阻害率は[DMSO]=1-10 mMの領域で飽和した。このことから、3はDNAと錯体を形成し、その中で生成したHO•はDMSOよりも速くDNAと反応するため、DMSOにより捕捉されないと考えられる。この場合、DMSO存在下でもDNAとの錯体中でdsbが進行し、[DMSO]に関係なく一定量のForm IIIが生成する。そして、一部の拡散したHO•をDMSOが捕捉し、Form IIIの生成を部分的に阻害したといえる。したがって、DMSOの阻害効果は、3がDNAとの錯体の形成によってDNA dsbを促進することを示唆している。



**Figure 5-17.** Inhibition effect of DMSO (0 (red), 1 (light green), 5 (light blue), 10 (purple) mM) on Form III production by 3. Reaction conditions: DMSO (0–10 mM), pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp), 3 (30  $\mu$ M), AscNa (150  $\mu$ M), NaCl (10 mM), and Cu(OAc)<sub>2</sub> (70  $\mu$ M) in MES buffer (10 mM, pH 6.0) under air at 37°C.

### 5-3-4. 3 および 5 の DNA 結合能力

33 mer オリゴ ds-DNA と **3**, **5** の結合相互作用を等温滴定熱量測定(Isothermal titration calorimetry, ITC)により調べた<sup>[38, 39]</sup>. 結果を Table 5-1, Figure S5-7 に示す. **5** の結合定数  $K$  は  $8.69 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  であり, **3** の  $1.31 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  より約 7 倍大きかった. しかし, 錯体濃度(30  $\mu\text{M}$ )および DNA 濃度(50  $\mu\text{M}$  bp)の条件で, **3**, **5** の DNA への結合はほぼ飽和するため,  $K$  の大きさは DNA dsb の burst にとって重要な因子ではない. 一方, 結合数( $N$ )と熱力学的パラメーター( $\Delta H^\circ$  および  $\Delta S^\circ$ )から, **3**, **5** の DNA 結合様式は異なることがわかり, DNA 結合様式が DNA dsb の burst に重要な役割を果たしていることが示唆された.

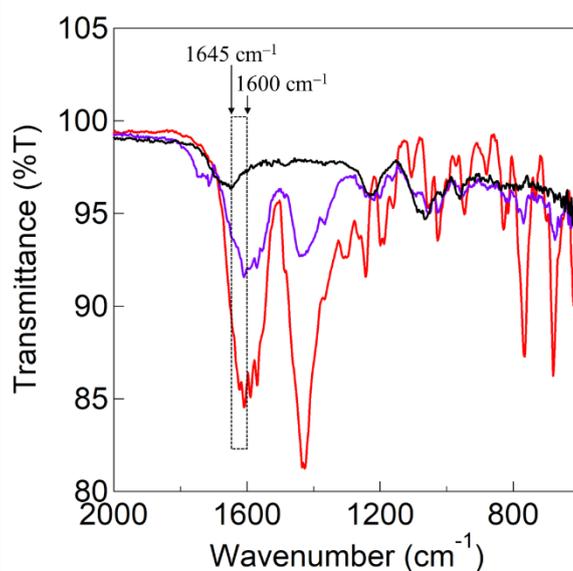
**Table 5-1. Thermodynamic parameters determined by ITC for binding of 3 and 5 with a linear 33 mer ds-DNA**

Complex	3	5
$N$ (sites)	$3.81 \pm 0.11$	$1.80 \pm 0.07$
$K$ ( $\times 10^5 \text{ M}^{-1}$ )	$1.31 \pm 0.21$	$8.69 \pm 2.69$
$\Delta H^\circ$ ( $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	$-2.25 \pm 0.10$	$-1.64 \pm 0.06$
$\Delta S^\circ$ ( $\text{cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ )	16.1	21.9

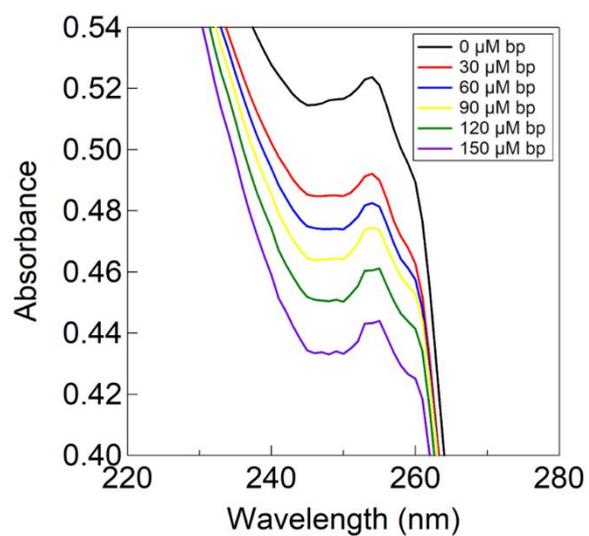
Table 5-1 に示すように, **3** および **5** の結合数は 33 mer オリゴ ds-DNA に対してそれぞれ 3.81 および 1.80 であることから, **3** および **5** はそれぞれ 9 塩基対および 18 塩基対の間隔で存在することになる. DNA dsb による Form III 生成には, 一回目の DNA 鎖切断の位置の 10 塩基対以内での二回目の DNA 相補鎖の切断が必要である<sup>[40]</sup>. 9 塩基対の間隔で DNA に結合する **3** は隣接する 2 つの錯体が DNA の二本鎖を同時に切断すれば Form III 生成の burst が可能だが, 18 塩基対の間隔で結合する **5** では不可能である. このように, Form III 生成の burst には, 2 つの錯体間の塩基対の数が重要である.

**3** の  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  はそれぞれ  $-2.25 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $16.1 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$  であり, **5** の  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  はそれぞれ  $-1.64 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $21.9 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$  であった. この結果は, **3** の DNA 結合は  $\Delta H^\circ$  駆動, **5** の DNA 結合は  $\Delta S^\circ$  駆動であることを示している. **3** の  $\Delta H^\circ$  値は 1 つから 2 つの水素結合に対応する. さらに, **3** の DNA 結合様式を ct-DNA 存在下での IR および電子吸収スペクトル変化により調べた. **3** のアミドカルボニル基の水素結合を明らかに

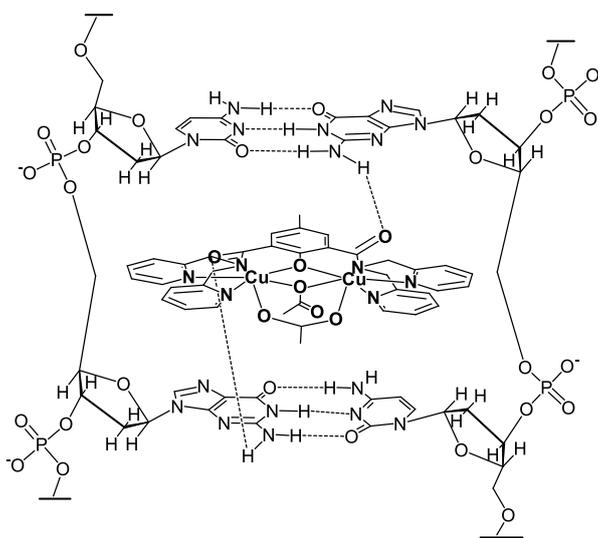
するために、**3** と **3**/ct-DNA の IR スペクトルを Figure 5-18 に示す。 **3** の  $1622\text{ cm}^{-1}$  の  $\nu_{\text{C=O}}$  バンドは、 **3**/ct-DNA では消失した。これは、 **3** のアミドカルボニル基と ct-DNA の水素結合による低波数シフトを示す。電子吸収スペクトルの変化では、 Figure 5-19 に示すように、 ct-DNA の添加により **3** のクレゾール環のベンゼノイドバンドが減少した。これらの結果から考えられる **3** と DNA との錯体の構造を Figure 5-20 に示す。 **3** は、 amide-tether の 2 つのカルボニル基の水素結合とクレゾール環のインターカレートの両方によって DNA に強固に結合していると考えられる。一方で、 **5** は水素結合部位やインターカレート部位を持たない。これは、 **5** の DNA 結合が  $\Delta S^\circ$  駆動型であり、 **5** が DNA と自由度の高い結合を形成する理由と考えられる。したがって、 **3** の DNA dsb の burst は、結合数と強固な結合によって促進されることが示唆された。



**Figure 5-18.** IR spectrum of **3** (red), ct-DNA (black), **3** (1 eq) + ct-DNA (10 eq) (purple).



**Figure 5-19.** Electronic absorption spectral change of benzenoid band of a cresol ring of **3** upon addition of ct-DNA (0 (black), 30 (red), 60 (blue), 90 (yellow), 120 (green), and 150 (purple)  $\mu\text{M}$  bp) to a solution of **3** (30  $\mu\text{M}$ ) in MES buffer (10 mM, pH 6.0),  $\text{Cu}(\text{OAc})_2$  (70  $\mu\text{M}$ ) and NaCl (10 mM). The absorption band of DNA is subtracted from each absorption spectrum obtained upon addition of DNA to **3**.



**Figure 5-20.** A plausible structure of DNA binding complex of **3**.

#### 5-4. 結論

本章では、**3** が空気下で AscNa との反応により還元的 O<sub>2</sub> 活性化を介して DNA dsb を大きく促進することを見出した。これは DNA dsb の burst である。合成金属錯体による DNA dsb の burst はこれまでに報告されていない。速度論的、分光学的、電気化学的、阻害効果、HO•生成、および ITC 測定から、**3** の速い HO•生成と DNA 結合様式が、DNA dsb の burst を可能にする重要な特徴であることが明らかになった。これらの結果は、遺伝子編集や治療への応用に有用な DNA 二本鎖切断剤の開発に新たな方法論を提供する可能性がある。

## 5-5. 実験方法

### 5-5-1. 試薬

試薬については、合成中間体や錯体を除き、高純度製品を和光純薬工業、東京化成、シグマアルドリッチ社製から選択して購入した。溶媒については、合成に用いるものは必要に応じて乾燥蒸留した。スーパーコイルドプラスミド pUC19 DNA は、ニッポンジーン社から購入した試薬を使用した。仔ウシ胸腺由来のデオキシリボ核酸ナトリウム塩 (type I, fibers) (ct-DNA) は Sigma-Aldrich から購入した。33 mer oligo DNA 5'-d(GAC TCC ACA GTG CAT ACG TGG GCT CCA ACA GGT)-3' とその相補鎖を Thermo Fisher Scientific から購入し、アニーリングすることで 33 mer 二本鎖 DNA にした。3, 4 および 5 は既報の論文<sup>[28, 30, 31]</sup>に従って合成した。

### 5-5-2. 測定装置

元素分析(C, H, N)は、Perkin-Elmer 社製 Elemental Analyzer 2400 II を用いて測定した。UV-vis 吸収スペクトルは、Agilent 社製 8454 紫外可視分光光度計を用いて測定した。pH 測定は、HORIBA 製 LAQUA electrode を標準緩衝液で校正した後に測定した。Electron spray ionization MS (ESI MS) 及び Cold spray ionization MS (CSI MS) スペクトルは、日本電子製 JMS-T100CSR the AccuTOF CS を用いて、MeOH, MeCN または H<sub>2</sub>O を溶媒として測定した。赤外線(IR)スペクトルは、SHIMADZU Single Reflection HATR IRAffinity-1 MIRacle 10 で測定した。<sup>1</sup>H NMR スペクトルは、日本電子製 ECA-500RX フーリエ変換核磁気共鳴装置(500 MHz)を使用し、基準物質として tetramethylsilane (TMS) または sodium 3-(trimethylsilyl)propionate-2,2,3,3-*d*<sub>4</sub> (TSP) を用いて測定した。蛍光スペクトルは、HITACHI Spectral fluorometer F-7000 で測定した。等温滴定型熱量(ITC)測定は、Malvern 社製 MicroCal Isothermal Titration Calorimeter VP-ITC を用いて行った。

### 5-5-3. DNA 切断実験

3, 4 または 5 の DNA 切断活性は、pUC19 DNA を用い、アガロースゲル電気泳動法によって評価した。1.5 mL エッペンチューブに NaCl (10 mM), buffer (pH 6.0 (MES) または pH 7.4 (MOPS)), 10 mM), pUC19 DNA (50 μM bp), Cu(OAc)<sub>2</sub> (70 μM), 3, 4 または 5 (0–50 μM), AscNa (0–150 μM) となるように調製した溶液を加え、37°C の暗所でインキュベーションした。0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 60 分毎にサンプルを採取し、loading buffer (0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol FF, 1.0 mM EDTA and 30% glycerol) を用いて反応をクエンチした。各サンプルを TAE buffer (Tris/acetate/EDTA) を用いて作成した

1%アガロースゲルにローディングし、100 V で約 1 時間電気泳動を行った。その後、EtBr ( $0.5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ )染色を 1 時間行い、VILBER LOURMAT E-BOX-CX5.TS Edge-20.M を用いてゲルバンドを撮影した。撮影したバンドを、Form I の染色補正值 1.06 を用い、ImageJ ソフトウェアによって解析を行った。この測定は最低 3 回行い、再現性をとった。

阻害剤存在下における **3** の DNA 切断活性では、1.5 mL エッペンチューブに NaCl (10 mM), buffer (pH 6.0 (MES), 10 mM), pUC19 DNA ( $50 \mu\text{M bp}$ ),  $\text{Cu}(\text{OAc})_2$  ( $70 \mu\text{M}$ ), **3** ( $30 \mu\text{M}$ ), AscNa ( $150 \mu\text{M}$ ), 阻害剤 DMSO (1–10 mM)となるように調製した溶液を用いて、前述の阻害剤非存在下と同様の操作を行うことで評価した。

嫌気下における **3** の DNA 切断活性では、1.5 mL エッペンチューブに NaCl (10 mM), buffer (pH 6.0 (MES), 10 mM), pUC19 DNA ( $50 \mu\text{M bp}$ ),  $\text{Cu}(\text{OAc})_2$  ( $70 \mu\text{M}$ ), **3** ( $30 \mu\text{M}$ ), AscNa ( $150 \mu\text{M}$ )となるように調製した溶液を用いて、グローブボックス内において前述の大気下と同様の操作を行うことで評価した。

#### 5-5-4. **3** および **4** を AscNa と反応させた際の電子スペクトル測定

窒素下で **3** および **4** ( $0.5 \text{ mM}$ ), NaOAc ( $1.5 \text{ mM}$  (**3**)または  $0 \text{ mM}$  (**4**))の Buffer 溶液(pH 6.0 (MES),  $10 \text{ mM}$ )を 2 面セルに入れ、 $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$  に保った。AscNa の水溶液(錯体に対して  $2 \text{ eq}$ )を加え、 $300\text{--}1100 \text{ nm}$  の範囲でスペクトルを追跡した。

また、窒素下で **3** ( $0.5 \text{ mM}$ ), NaOAc ( $1.5 \text{ mM}$ )の Buffer 溶液(pH 6.0 (MES),  $10 \text{ mM}$ )を 2 面セルに入れ、 $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$  に保った。AscNa の水溶液を錯体に対して  $0\text{--}4 \text{ eq}$  まで順に加え、 $300\text{--}1000 \text{ nm}$  の範囲で各スペクトルを追跡した。

#### 5-5-5. **3**, **4** および **5** の Cyclic Voltammetry (CV)測定

$200 \text{ mM}$  Buffer 溶液(pH 6.0 (MES),  $10 \text{ mL}$ ),  $2 \text{ mM}$  NaOAc に **3**, **4** および **5** が  $0.5 \text{ mM}$  となるように溶液を調製した。この溶液に水系参照電極 (Ag/AgCl), 作用電極として glassy carbon, 対極として Pt wire を浸し、窒素を 10 分間バブリングした後、CV 測定を行った。なお、測定感度は  $10 \mu\text{A/V}$ , 掃引速度は  $10 \text{ mV s}^{-1}$  (**3**)または  $100 \text{ mV s}^{-1}$  (**4**, **5**)で行った。

#### 5-5-6. **3** のバルク電解中における電子スペクトル測定

$200 \text{ mM}$  Buffer 溶液(pH 6.0 (MES),  $10 \text{ mL}$ ),  $2 \text{ mM}$  NaOAc に **3** が  $0.5 \text{ mM}$  となるように溶液を調製した。この溶液に水系参照電極(Ag/AgCl), 作用電極として Pt mesh, 対極と

して Pt wire を浸し、窒素を 10 分間バブリングした後、 $-0.003$  および  $-0.12\text{V}$  でバルク電解を行った。その際、同時に  $300\text{--}900\text{ nm}$  の範囲で UV-vis スペクトルを追跡した。

#### 5-5-7. テレフタル酸(TA)を用いた HO $\cdot$ 生成の検出

**3**, **5** ( $30\ \mu\text{M}$ ), TA ( $0.5\ \text{mM}$ ), NaCl ( $10\ \text{mM}$ )の Buffer 溶液(pH 6.0 (MES),  $10\ \text{mM}$ )を 4 面セルに加え、 $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$  に保った。この溶液に AscNa 水溶液を  $150\ \mu\text{M}$  になるように加え、励起波長  $310\ \text{nm}$  における蛍光スペクトルを 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 分毎に  $350\text{--}550\ \text{nm}$  の範囲、スリット幅  $5.0\ \text{nm}$  で測定した。

#### 5-5-8. 等温滴定型熱量(ITC)測定

セルに、33 mer オリゴ二重鎖 DNA ( $18.75\ \mu\text{M}$  (**3**)または  $40\ \mu\text{M}$  (**5**)), Buffer (pH6.0 (MES),  $10\ \text{mM}$ ), NaCl ( $10\ \text{mM}$ )となるように調製した溶液を加えた。シリンジには、**3** または **4** ( $1.0\ \text{mM}$ ), Buffer (pH6.0 (MES),  $10\ \text{mM}$ ), NaCl ( $10\ \text{mM}$ )の溶液を加えた。 $37^\circ\text{C}$  において DNA 溶液に各錯体溶液を 28 回( $10\ \mu\text{L}/\text{回}$ )加え、その際に発生する熱量を測定した。得られたデータから希釈熱を引き、ORIGIN ソフトウェアを用いて解析した。

#### 5-5-9. ct-DNA 存在下での **3** の IR スペクトル測定

**3** の水溶液に 0 または 10 eq の ct-DNA 水溶液を加えて攪拌した。凍結乾燥を行った後、IR スペクトルを測定した。

#### 5-5-10. ct-DNA 存在下での **3** の電子スペクトル測定

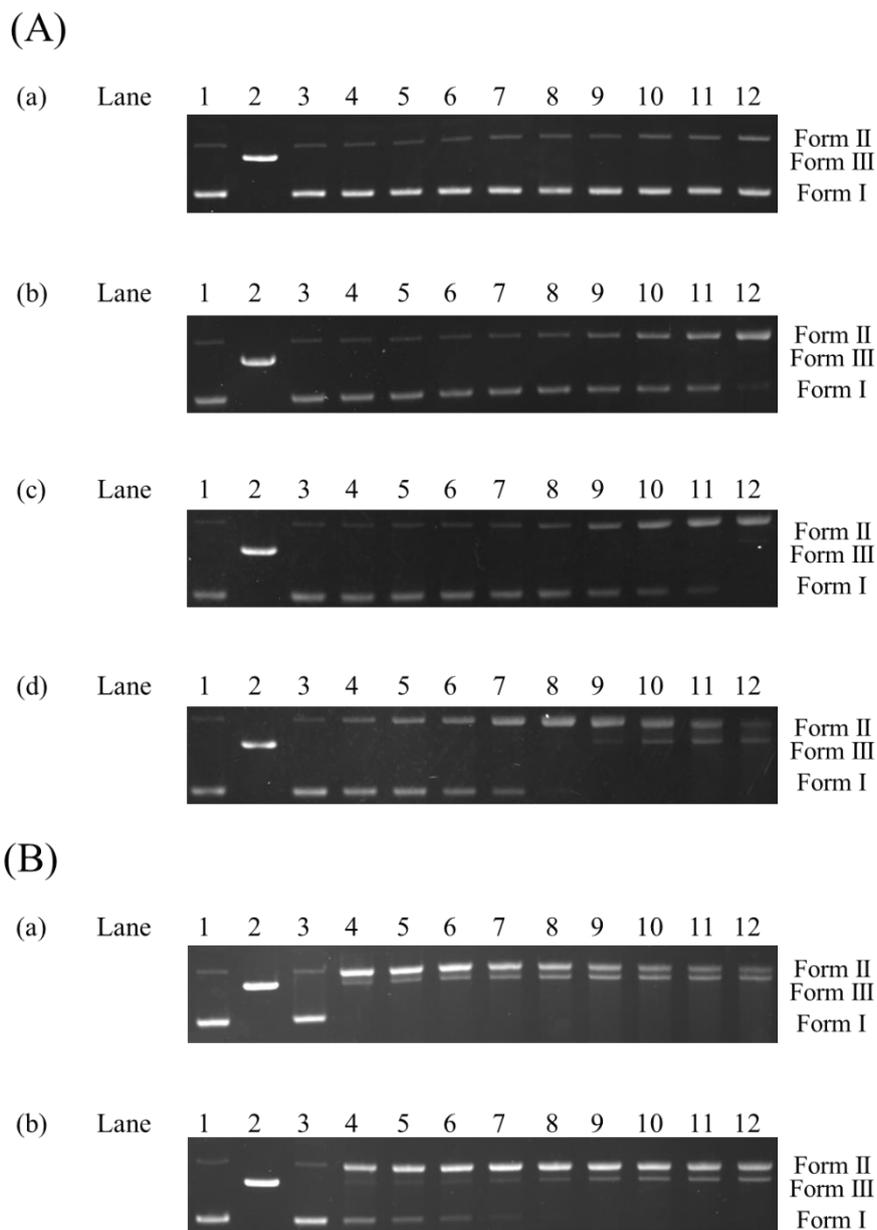
**3** ( $30\ \mu\text{M}$ ),  $\text{Cu}(\text{OAc})_2$  ( $70\ \mu\text{M}$ ), NaCl ( $10\ \text{mM}$ )の Buffer 溶液(pH 6.0 (MES),  $10\ \text{mM}$ )を 2 面セルに加え、 $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$  に保った。この溶液に ct-DNA 水溶液を  $30\ \mu\text{M bp}$  毎に  $150\ \mu\text{M bp}$  まで添加し、 $300\text{--}1000\ \text{nm}$  の範囲で各スペクトルを測定した。

## 5-6. 参考文献

- [1] H. Yang, S. Ren, S. Yu, H. Pan, T. Li, S. Ge, J. Zhang, N. Xia, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*(18), 6461.
- [2] E. Bolderson, D. J. Richard, B. B. S. Zhou, K. K. Khanna, *Clin Cancer Res.* **2009**, *15*(20), 6314.
- [3] H. Umezawa, K. Maeda, T. Takeuchi, Y. Okami, *J. Antibiot.* **1966**, *19*, 200.
- [4] Q. Li, T. A. van den Berg, B. L. Feringa, G. Roelfes, *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 8012.
- [5] V. Murray, J. K. Chen, L. H. Chung, *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1372.
- [6] L. V. Liu, C. B. Bel III, S. D. Wong, S. A. Wilson, Y. Kwak, M. S. Chow, J. Zhao, K. O. Hodgson, B. Hedman, E. I. Solomon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 22419.
- [7] R. J. Steighner, L. F. Povirk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1990**, *87*, 8350.
- [8] P. B. Dervan, *Science* **1986**, *232*, 464.
- [9] D. S. Sigman, A. Mazumder, D. M. Perrin, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2295.
- [10] W. K. Pogozelski, T. D. Tullius, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1089.
- [11] Q. Jiang, N. Xiao, P. F. Shi, Y. G. Zhu, Z. J. Guo, *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 1951.
- [12] Z. Yu, J. A. Cowan, *Current Opinion in Chemical Biology* **2018**, *43*, 37.
- [13] K. D. Copeland, M. P. Fitzsimons, R. P. Houser, J. K. Barton, *Biochemistry* **2002**, *41*, 343.
- [14] K. J. Humphreys, K. D. Karlin, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6009.
- [15] M. S. Melvin, J. T. Tomlinson, G. R. Saluta, G. L. Kucera, N. Lindquist, R. A. Manderville, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6333.
- [16] L. Li, K. D. Karlin, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 520.
- [17] S. Thyagarajan, N. N. Murthy, A. A. N. Sarjeant, K. D. Karlin, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 7003.
- [18] Y. Jin, J. A. Cowan, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 8408.
- [19] Y. M. Zhao, J. H. Zhu, W. J. He, Z. Yang, Y. G. Zhu, Y. Z. Li, J. F. Zhang, Z. J. Guo, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6621.
- [20] J. He, P. Hu, Y-J. Wang, M-L. Tong, H. Sun, Z-W. Mao, L-N. Ji, *Dalton Trans.* **2008**, 3207.
- [21] Y. Xu, Y. Suzuki, T. Lönnberg, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2871.
- [22] Z. Molphy, D. Montagner, S. S. Bhat, C. Slator, C. Long, A. Erxleben, A. Kellett, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 9918.
- [23] C. Lüdtke, S. Sobottka, J. Heinrich, P. Liebing, S. Wedepohl, B. Sarkar, N. Kulak, *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 3273

- [24] G. Roelfes, M. E. Branum, L. Wang, L. Que, Jr., Q. Li, B. L. Feringa, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11517.
- [25] R. P. Megens, T. A. van der Berg, A. D. de Bruijn, Q. Li, B. L. Feringa, G. Roelfes, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 1723.
- [26] P. Mialane, A. Nivorojkine, G. Pratviel, L. Azema, M. Slany, F. Godde, A. Simaan, F. Banse, T. Kargar-Grisel, G. Bouchoux, J. Sainton, O. Horner, J. Guilhem, L. Tchertanova, B. Meunier, J. Girerd, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*(6), 1085.
- [27] H. Kurosaki, Y. Ishikawa, K. Hayashi, M. Sumi, Y. Tanaka, M. Goto, K. Inada, I. Taniguchi, M. Shionoya, H. Matsuo, *Inorg. Chim. Acta* **1999**, *294*, 56.
- [28] Y. Kadoya, M. Hata, Y. Tanaka, A. Hirohata, Y. Hitomi, M. Kodera, *Inorg. Chem.* **2021**, *60*, 5474.
- [29] S. Torelli, C. Belle, I. Gautier-Luneau, J. L. Pierre, E. Sain-Aman, J. M. Latour, L. L. Pape, L. D. Luneau, *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 3526.
- [30] J. G. Roelfes, M. Lubben, K. Chen, R. Y. N. Ho, A. Meetsma, S. Genseberger, R. M. Hermant, R. Hage, S. K. Mandal, V. G. Young, Jr., Y. Zang, H. Kooijman, A. L. Spek, L. Que, Jr., B. L. Feringa, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 1929.
- [31] S. Torelli, C. Belle, I. Gautier-Luneau, J. L. Pierre, E. Sain-Aman, J. M. Latour, L. L. Pape, L. D. Luneau, *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 3526.
- [32] L. Li, A. A. N. Sarjeant, M. A. Vance, L. N. Zakharov, A. L. Rheingold, E. I. Solomon, K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15360.
- [33] S. Kim, J. W. Ginsbach, J. Y. Lee, R. L. Peterson, J. J. Liu, M. A. Siegler, A. A. Sarjeant, E. I. Solomon, K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 2867.
- [34] Y. Nosaka, A. Y. Nosaka, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 11302.
- [35] S. Lechnitz, J. Heinrich, N. Kulak, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 13411.
- [36] X. Dong, X. Wang, M. Lin, H. Sun, X. Yang, Z. Promotive, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 2541.
- [37] O. I. Aruoma, B. Halliwell, M. Dizdaroglu, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 13024.
- [38] A. Erxleben, *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *360*, 92.
- [39] M. Kodera, Y. Kadoya, K. Fukui, A. Nomura, Y. Hitomi, H. Kitagishi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2019**, *92*, 739.
- [40] D. Freifelder, B. Trumbo, *Biopolymers* **1969**, *7*, 681.

## 5-7. Supporting Information



**Figure S5-1.** (A) Agarose gel electrophoresis profiles upon reaction of pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp) with **3** (0–10  $\mu$ M) and AscNa (150  $\mu$ M) at pH 6.0. (a)–(d) correspond to [**3**] of 0, 2, 5, and 10  $\mu$ M, respectively. (B) Agarose gel electrophoresis profiles upon reaction of pUC19 DNA (50  $\mu$ M) with **3** (30  $\mu$ M) and AscNa at pH 6.0. (a) and (b) correspond to [AscNa] of 50 and 100  $\mu$ M, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively.

**Table S5-1. Fraction of Form I, Form II, and Form III in the DNA cleavage of 3 (0–30  $\mu\text{M}$ ) and AscNa (150  $\mu\text{M}$ ).**

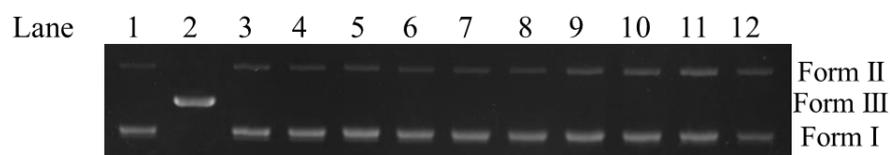
Complex ( $\mu\text{M}$ )	AscNa ( $\mu\text{M}$ )	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
0	150	0	92.7 $\pm$ 0.1	7.3 $\pm$ 0.1	-
		1	92.6 $\pm$ 0.0	7.4 $\pm$ 0.0	-
		2	91.4 $\pm$ 0.4	8.6 $\pm$ 0.4	-
		3	91.3 $\pm$ 0.5	8.7 $\pm$ 0.5	-
		5	91.0 $\pm$ 0.4	9.0 $\pm$ 0.4	-
		10	88.8 $\pm$ 1.5	11.2 $\pm$ 1.5	-
		20	87.2 $\pm$ 1.0	12.8 $\pm$ 1.0	-
		30	86.2 $\pm$ 1.8	13.8 $\pm$ 1.8	-
		40	85.2 $\pm$ 1.0	14.8 $\pm$ 1.0	-
		60	77.1 $\pm$ 1.0	22.9 $\pm$ 1.0	-
2	150	0	90.1 $\pm$ 0.6	9.9 $\pm$ 0.6	-
		1	89.1 $\pm$ 0.6	10.9 $\pm$ 0.6	-
		2	88.4 $\pm$ 0.7	11.6 $\pm$ 0.7	-
		3	85.7 $\pm$ 0.7	14.3 $\pm$ 0.7	-
		5	83.8 $\pm$ 0.6	16.2 $\pm$ 0.6	-
		10	79.2 $\pm$ 2.1	20.8 $\pm$ 2.1	-
		20	68.4 $\pm$ 4.8	31.6 $\pm$ 4.8	-
		30	56.1 $\pm$ 5.0	43.9 $\pm$ 5.0	-
		40	43.2 $\pm$ 4.9	56.8 $\pm$ 4.9	-
		60	17.1 $\pm$ 4.9	82.9 $\pm$ 4.9	-
5	150	0	90.4 $\pm$ 0.7	9.6 $\pm$ 0.7	-
		1	89.0 $\pm$ 0.5	11.0 $\pm$ 0.5	-
		2	87.7 $\pm$ 0.5	12.3 $\pm$ 0.5	-
		3	85.5 $\pm$ 1.0	14.5 $\pm$ 1.0	-
		5	82.2 $\pm$ 0.6	17.8 $\pm$ 0.6	-
		10	74.0 $\pm$ 1.6	26.0 $\pm$ 1.6	-
		20	51.5 $\pm$ 2.7	48.5 $\pm$ 2.7	-
		30	32.5 $\pm$ 4.3	67.5 $\pm$ 4.3	-
		40	9.3 $\pm$ 4.6	88.9 $\pm$ 3.5	1.8 $\pm$ 1.0
		60	0.0 $\pm$ 0.0	95.6 $\pm$ 0.9	4.4 $\pm$ 0.9

10	150	0	90.3 ± 1.2	9.7 ± 1.2	-
		1	77.3 ± 4.2	22.7 ± 4.2	-
		2	64.0 ± 3.9	36.0 ± 3.9	-
		3	50.7 ± 2.1	49.3 ± 2.1	-
		5	27.9 ± 2.7	72.1 ± 2.7	-
		10	4.3 ± 1.9	93.5 ± 2.6	2.2 ± 0.8
		20	0.0 ± 0.0	93.7 ± 1.4	6.3 ± 1.4
		30	0.0 ± 0.0	81.5 ± 3.6	18.5 ± 3.6
		40	0.0 ± 0.0	63.8 ± 4.6	36.2 ± 4.6
		60	0.0 ± 0.0	35.2 ± 4.4	64.8 ± 4.4
30	150	0	89.4 ± 1.3	10.5 ± 1.3	-
		1	0.0 ± 0.0	74.1 ± 2.0	25.9 ± 2.0
		2	0.0 ± 0.0	69.6 ± 1.9	30.4 ± 1.9
		3	0.0 ± 0.0	64.8 ± 2.3	35.2 ± 2.3
		5	0.0 ± 0.0	57.1 ± 2.8	42.9 ± 2.8
		10	0.0 ± 0.0	45.4 ± 5.0	54.6 ± 5.0
		20	0.0 ± 0.0	30.0 ± 2.0	70.0 ± 2.0
		30	n.d.*	n.d.*	n.d.*
		40	n.d.*	n.d.*	n.d.*
		60	n.d.*	n.d.*	n.d.*

\*n.d. means cannot determine.

**Table S5-2. Fraction of Form I, Form II, and Form III in the DNA cleavage of 3 (30  $\mu\text{M}$ ) and AscNa (50 and 100  $\mu\text{M}$ ).**

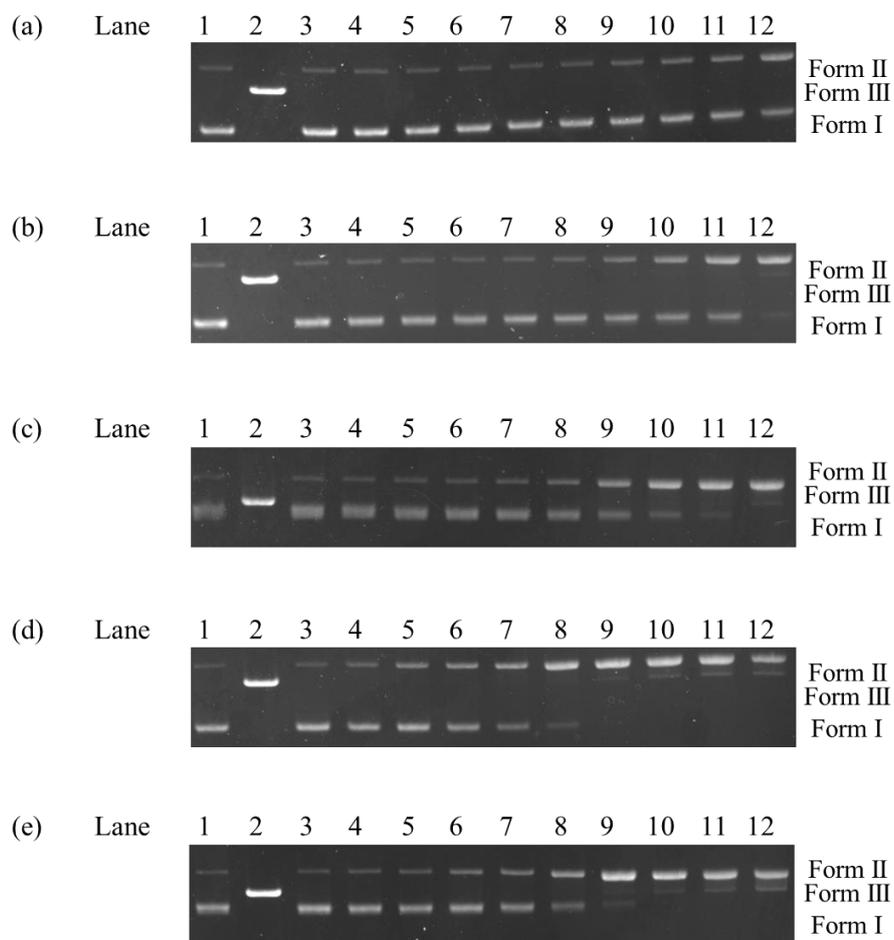
Complex ( $\mu\text{M}$ )	AscNa ( $\mu\text{M}$ )	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
30	50	0	93.0 $\pm$ 1.0	7.0 $\pm$ 1.0	-
		1	1.7 $\pm$ 0.3	95.8 $\pm$ 0.6	2.5 $\pm$ 0.3
		2	0.0 $\pm$ 0.0	96.6 $\pm$ 0.4	3.4 $\pm$ 0.4
		3	0.0 $\pm$ 0.0	95.1 $\pm$ 0.2	4.9 $\pm$ 0.2
		5	0.0 $\pm$ 0.0	94.0 $\pm$ 0.2	6.0 $\pm$ 0.2
		10	0.0 $\pm$ 0.0	89.2 $\pm$ 0.5	10.8 $\pm$ 0.5
		20	0.0 $\pm$ 0.0	82.9 $\pm$ 2.1	17.1 $\pm$ 2.1
		30	0.0 $\pm$ 0.0	79.5 $\pm$ 1.9	20.5 $\pm$ 1.9
		40	0.0 $\pm$ 0.0	77.3 $\pm$ 2.4	22.7 $\pm$ 2.4
		60	0.0 $\pm$ 0.0	72.7 $\pm$ 2.5	27.3 $\pm$ 2.5
30	100	0	92.6 $\pm$ 1.2	7.4 $\pm$ 1.2	-
		1	0.0 $\pm$ 0.0	88.4 $\pm$ 0.0	11.6 $\pm$ 0.0
		2	0.0 $\pm$ 0.0	84.7 $\pm$ 0.7	15.3 $\pm$ 0.7
		3	0.0 $\pm$ 0.0	82.9 $\pm$ 1.8	17.1 $\pm$ 1.8
		5	0.0 $\pm$ 0.0	77.6 $\pm$ 2.5	22.4 $\pm$ 2.5
		10	0.0 $\pm$ 0.0	75.1 $\pm$ 2.5	24.9 $\pm$ 2.5
		20	0.0 $\pm$ 0.0	66.2 $\pm$ 3.6	33.8 $\pm$ 3.6
		30	0.0 $\pm$ 0.0	59.2 $\pm$ 2.9	40.8 $\pm$ 2.9
		40	0.0 $\pm$ 0.0	53.4 $\pm$ 2.8	46.6 $\pm$ 2.8
		60	0.0 $\pm$ 0.0	47.7 $\pm$ 3.8	52.3 $\pm$ 3.8



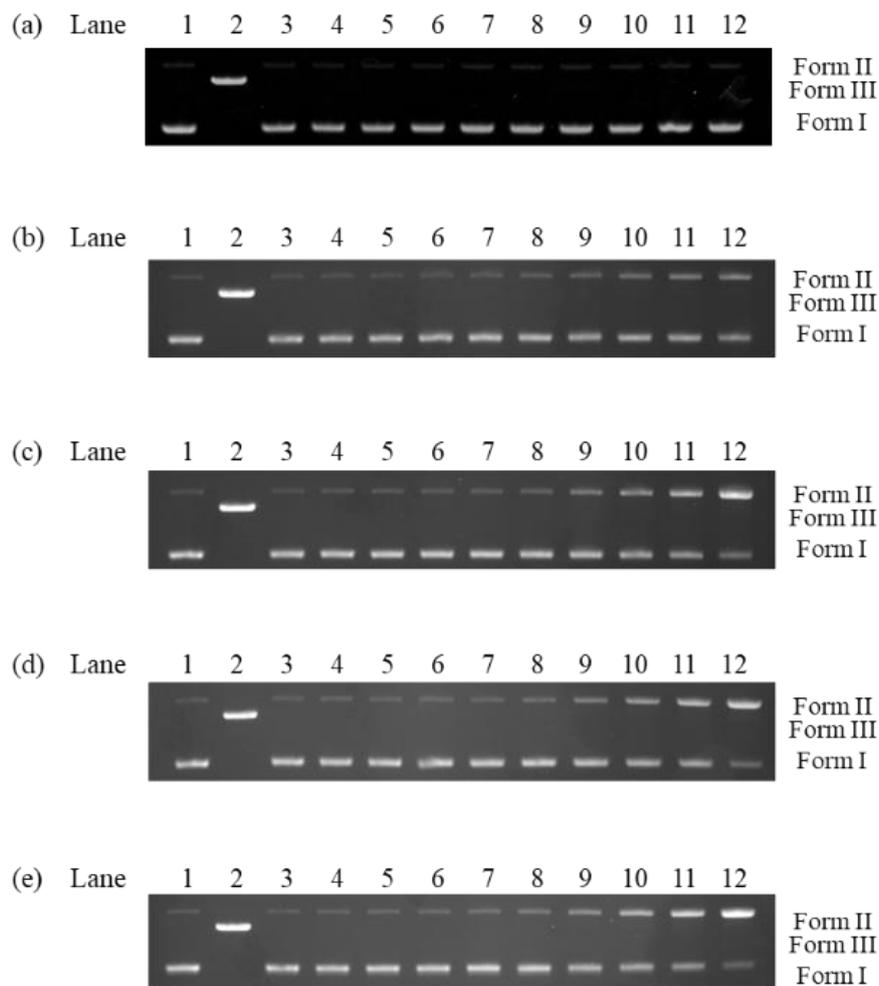
**Figure S5-2.** Agarose gel electrophoresis profiles upon reaction of pUC19 DNA (50 μM bp) with **3** (30 μM) and AscNa (150 μM) at pH 6.0 under N<sub>2</sub>. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively.

**Table S5-3.** Fraction of Form I, Form II, and Form III in the DNA cleavage of **3** (30 μM) and AscNa (150 μM) under N<sub>2</sub>.

Complex (μM)	AscNa (μM)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
30	150	0	88.3 ± 0.2	11.7 ± 0.2	-
		1	87.6 ± 0.1	12.4 ± 0.1	-
		2	87.2 ± 0.4	12.8 ± 0.4	-
		3	86.7 ± 0.3	13.3 ± 0.3	-
		5	86.4 ± 0.2	13.6 ± 0.2	-
		10	85.2 ± 0.8	14.8 ± 0.8	-
		20	83.1 ± 2.5	16.9 ± 2.5	-
		30	80.6 ± 3.0	19.4 ± 3.0	-
		40	77.3 ± 3.1	22.7 ± 3.1	-
		60	68.3 ± 1.6	31.7 ± 1.6	-



**Figure S5-3.** Agarose gel electrophoresis profile of pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp) with **3** (0–8  $\mu$ M) and AscNa (50  $\mu$ M) at pH 6.0. (a)–(e) corresponded to complex concentration of 0, 2, 4, 6, and 8  $\mu$ M, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively.



**Figure S5-4.** Agarose gel electrophoresis profiles upon reaction of pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp) with **3** (5  $\mu$ M) and AscNa (0–100  $\mu$ M) at pH 6.0. (a)–(e) corresponded to AscNa concentration of 0, 10, 30, 50, and 100  $\mu$ M, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively.

**Table S5-4. Fraction of Form I, Form II, and Form III in the DNA cleavage of 3 (0–8  $\mu\text{M}$ ) and AscNa (50  $\mu\text{M}$ ) at pH 6.0.**

<b>Complex (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Time (min)</b>	<b>Form I (%)</b>	<b>Form II (%)</b>	<b>Form III (%)</b>
0	0	92.1 $\pm$ 0.7	7.9 $\pm$ 0.7	-
	1	90.6 $\pm$ 1.1	9.4 $\pm$ 1.1	-
	2	90.0 $\pm$ 1.5	10.0 $\pm$ 1.5	-
	3	89.6 $\pm$ 1.5	10.4 $\pm$ 1.5	-
	5	88.9 $\pm$ 1.6	11.1 $\pm$ 1.6	-
	10	85.4 $\pm$ 0.5	14.6 $\pm$ 0.5	-
	20	82.5 $\pm$ 0.5	17.5 $\pm$ 0.5	-
	30	75.9 $\pm$ 1.5	24.1 $\pm$ 1.5	-
	40	68.8 $\pm$ 1.5	31.2 $\pm$ 1.5	-
	60	45.4 $\pm$ 1.0	54.6 $\pm$ 1.0	-
2	0	90.4 $\pm$ 0.4	9.6 $\pm$ 0.4	-
	1	88.7 $\pm$ 0.1	11.7 $\pm$ 0.1	-
	2	87.8 $\pm$ 1.0	11.9 $\pm$ 1.0	-
	3	87.2 $\pm$ 0.3	12.8 $\pm$ 0.3	-
	5	85.4 $\pm$ 1.2	14.6 $\pm$ 1.2	-
	10	80.8 $\pm$ 0.1	19.2 $\pm$ 0.1	-
	20	68.6 $\pm$ 0.3	31.4 $\pm$ 0.3	-
	30	53.2 $\pm$ 1.4	46.8 $\pm$ 1.4	-
	40	35.2 $\pm$ 2.7	64.8 $\pm$ 2.7	-
	60	8.0 $\pm$ 1.5	91.2 $\pm$ 0.7	0.8 $\pm$ 0.8
4	0	88.0 $\pm$ 0.8	12.0 $\pm$ 0.8	-
	1	86.4 $\pm$ 1.1	13.6 $\pm$ 1.1	-
	2	85.1 $\pm$ 0.3	15.2 $\pm$ 0.3	-
	3	83.5 $\pm$ 1.7	16.4 $\pm$ 1.7	-
	5	79.9 $\pm$ 1.7	20.1 $\pm$ 1.7	-
	10	69.2 $\pm$ 0.4	30.8 $\pm$ 0.4	-
	20	40.4 $\pm$ 0.9	59.6 $\pm$ 0.9	-
	30	19.3 $\pm$ 1.2	80.7 $\pm$ 1.2	-
	40	7.5 $\pm$ 1.0	92.2 $\pm$ 1.3	0.3 $\pm$ 0.3
	60	0.0 $\pm$ 0.0	96.9 $\pm$ 0.7	3.1 $\pm$ 0.7

6	0	$89.3 \pm 0.9$	$10.7 \pm 0.9$	-
	1	$85.2 \pm 1.1$	$14.8 \pm 1.1$	-
	2	$81.2 \pm 1.3$	$18.8 \pm 1.3$	-
	3	$75.4 \pm 0.0$	$24.6 \pm 0.0$	-
	5	$64.0 \pm 3.4$	$36.0 \pm 3.4$	-
	10	$34.5 \pm 0.1$	$65.5 \pm 0.1$	-
	20	$4.9 \pm 0.3$	$94.1 \pm 0.9$	$1.0 \pm 0.6$
	30	$0.0 \pm 0.0$	$97.8 \pm 0.5$	$2.2 \pm 0.5$
	40	$0.0 \pm 0.0$	$97.0 \pm 0.2$	$3.0 \pm 0.2$
	60	$0.0 \pm 0.0$	$93.2 \pm 0.1$	$6.8 \pm 0.1$
8	0	$89.3 \pm 0.6$	$10.7 \pm 0.6$	-
	1	$81.9 \pm 1.4$	$18.1 \pm 1.4$	-
	2	$74.9 \pm 3.2$	$25.1 \pm 3.2$	-
	3	$64.4 \pm 4.9$	$35.6 \pm 4.9$	-
	5	$51.2 \pm 4.1$	$48.8 \pm 4.1$	-
	10	$19.4 \pm 3.3$	$80.6 \pm 3.3$	-
	20	$1.9 \pm 0.3$	$95.7 \pm 1.9$	$2.4 \pm 1.8$
	30	$0.0 \pm 0.0$	$96.0 \pm 1.8$	$4.0 \pm 1.8$
	40	$0.0 \pm 0.0$	$93.4 \pm 2.5$	$6.6 \pm 2.5$
	60	$0.0 \pm 0.0$	$86.7 \pm 2.1$	$13.3 \pm 2.1$

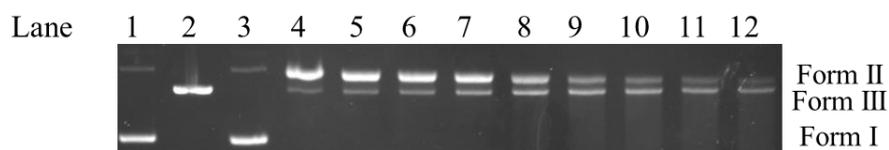
**Table S5-5. Fraction of Form I, Form II, and Form III in the DNA cleavage of 3 (5  $\mu\text{M}$ ) and AscNa (0–100  $\mu\text{M}$ ).**

AscNa ( $\mu\text{M}$ )	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
0	0	92.8 $\pm$ 0.0	7.2 $\pm$ 0.0	-
	1	91.7 $\pm$ 0.3	8.3 $\pm$ 0.3	-
	2	91.6 $\pm$ 0.4	8.4 $\pm$ 0.4	-
	3	91.4 $\pm$ 0.2	8.6 $\pm$ 0.2	-
	5	91.4 $\pm$ 0.2	8.6 $\pm$ 0.2	-
	10	91.2 $\pm$ 0.0	8.8 $\pm$ 0.0	-
	20	91.1 $\pm$ 0.0	8.9 $\pm$ 0.0	-
	30	90.9 $\pm$ 0.1	9.1 $\pm$ 0.1	-
	40	90.9 $\pm$ 0.1	9.1 $\pm$ 0.1	-
	60	90.3 $\pm$ 0.1	9.7 $\pm$ 0.1	-
10	0	92.8 $\pm$ 0.4	7.2 $\pm$ 0.4	-
	1	90.5 $\pm$ 0.0	9.5 $\pm$ 0.0	-
	2	89.9 $\pm$ 0.2	10.1 $\pm$ 0.2	-
	3	89.2 $\pm$ 0.5	10.8 $\pm$ 0.5	-
	5	87.8 $\pm$ 0.6	12.2 $\pm$ 0.6	-
	10	85.7 $\pm$ 0.4	14.3 $\pm$ 0.4	-
	20	78.7 $\pm$ 2.5	21.3 $\pm$ 2.5	-
	30	74.8 $\pm$ 1.7	25.2 $\pm$ 1.7	-
	40	69.0 $\pm$ 1.5	31.0 $\pm$ 1.5	-
	60	57.4 $\pm$ 1.0	42.6 $\pm$ 1.0	-
30	0	92.5 $\pm$ 0.5	7.5 $\pm$ 0.5	-
	1	89.6 $\pm$ 0.2	10.4 $\pm$ 0.2	-
	2	89.4 $\pm$ 0.3	10.6 $\pm$ 0.3	-
	3	88.6 $\pm$ 0.7	11.4 $\pm$ 0.7	-
	5	88.2 $\pm$ 0.5	11.8 $\pm$ 0.5	-
	10	85.2 $\pm$ 1.5	14.8 $\pm$ 1.5	-
	20	75.5 $\pm$ 1.5	24.5 $\pm$ 1.5	-
	30	62.7 $\pm$ 1.6	37.3 $\pm$ 1.6	-
	40	50.5 $\pm$ 2.8	49.5 $\pm$ 2.8	-
	60	26.4 $\pm$ 2.1	73.6 $\pm$ 2.1	-

50	0	$93.7 \pm 0.2$	$6.3 \pm 0.2$	-
	1	$90.1 \pm 0.3$	$9.9 \pm 0.3$	-
	2	$89.6 \pm 0.2$	$10.4 \pm 0.2$	-
	3	$89.0 \pm 0.6$	$11.0 \pm 0.6$	-
	5	$88.5 \pm 0.1$	$11.5 \pm 0.1$	-
	10	$85.6 \pm 0.3$	$14.4 \pm 0.3$	-
	20	$75.1 \pm 0.4$	$24.9 \pm 0.4$	-
	30	$62.4 \pm 0.3$	$37.6 \pm 0.3$	-
	40	$48.0 \pm 1.8$	$52.0 \pm 1.8$	-
	60	$21.6 \pm 0.9$	$78.4 \pm 0.9$	-
100	0	$93.9 \pm 0.4$	$6.1 \pm 0.4$	-
	1	$90.1 \pm 0.1$	$9.9 \pm 0.1$	-
	2	$89.7 \pm 0.1$	$10.3 \pm 0.1$	-
	3	$88.2 \pm 0.1$	$11.8 \pm 0.1$	-
	5	$86.8 \pm 0.2$	$13.2 \pm 0.2$	-
	10	$83.3 \pm 0.3$	$16.7 \pm 0.3$	-
	20	$70.2 \pm 1.4$	$29.8 \pm 1.4$	-
	30	$54.1 \pm 1.8$	$45.9 \pm 1.8$	-
	40	$38.1 \pm 2.0$	$61.9 \pm 2.0$	-
	60	$14.8 \pm 1.2$	$85.2 \pm 1.2$	-

**Table S5-6. Fraction of Form I, Form II, and Form III in the DNA cleavage of 4 (30  $\mu$ M) or 5 (30  $\mu$ M) and AscNa (150  $\mu$ M).**

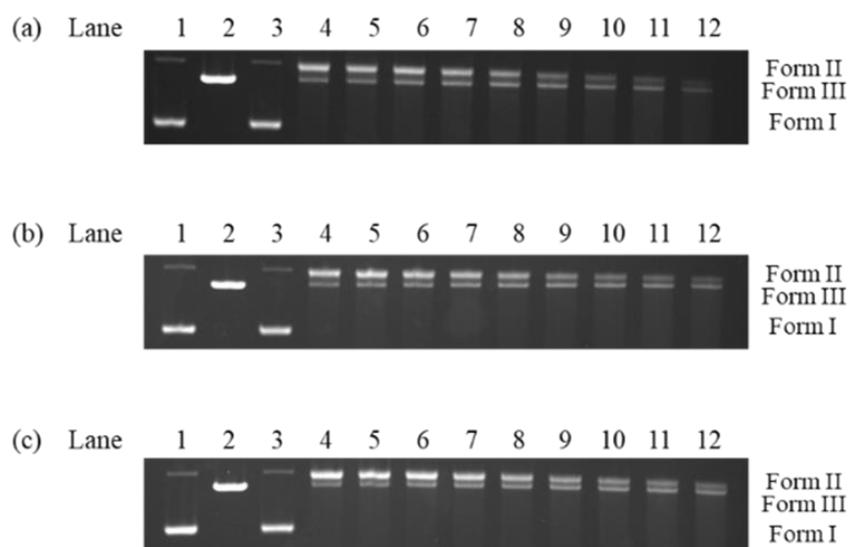
<b>Complex</b>	<b>Time (min)</b>	<b>Form I (%)</b>	<b>Form II (%)</b>	<b>Form III (%)</b>
<b>4</b>	0	92.0 $\pm$ 0.1	8.0 $\pm$ 0.1	-
	1	89.1 $\pm$ 0.1	10.9 $\pm$ 0.1	-
	2	88.5 $\pm$ 0.4	11.5 $\pm$ 0.4	-
	3	87.7 $\pm$ 0.9	12.3 $\pm$ 0.9	-
	5	86.7 $\pm$ 0.2	13.3 $\pm$ 0.2	-
	10	82.2 $\pm$ 0.7	17.8 $\pm$ 0.7	-
	20	72.3 $\pm$ 0.6	27.7 $\pm$ 0.6	-
	30	58.6 $\pm$ 0.7	41.4 $\pm$ 0.7	-
	40	46.9 $\pm$ 0.8	53.1 $\pm$ 0.8	-
	60	24.4 $\pm$ 0.9	75.6 $\pm$ 0.9	-
<b>5</b>	0	92.6 $\pm$ 0.4	7.4 $\pm$ 0.4	-
	1	0.0 $\pm$ 0.0	99.7 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0
	2	0.0 $\pm$ 0.0	99.4 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.0
	3	0.0 $\pm$ 0.0	99.2 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1
	5	0.0 $\pm$ 0.0	99.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0
	10	0.0 $\pm$ 0.0	98.9 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1
	20	0.0 $\pm$ 0.0	98.8 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.0
	30	0.0 $\pm$ 0.0	98.5 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.3
	40	0.0 $\pm$ 0.0	97.9 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.1
	60	0.0 $\pm$ 0.0	94.2 $\pm$ 0.6	5.8 $\pm$ 0.6



**Figure S5-5.** Agarose gel electrophoresis profile upon reaction of pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp) with **3** (30  $\mu$ M) and AscNa (150  $\mu$ M) at pH 7.4 (MOPS, 10 mM). Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively.

**Table S5-7. Fraction of Form I, Form II, and Form III in the DNA cleavage with **3** (30  $\mu$ M) and AscNa (150  $\mu$ M) at pH 7.4 (MOPS, 10 mM).**

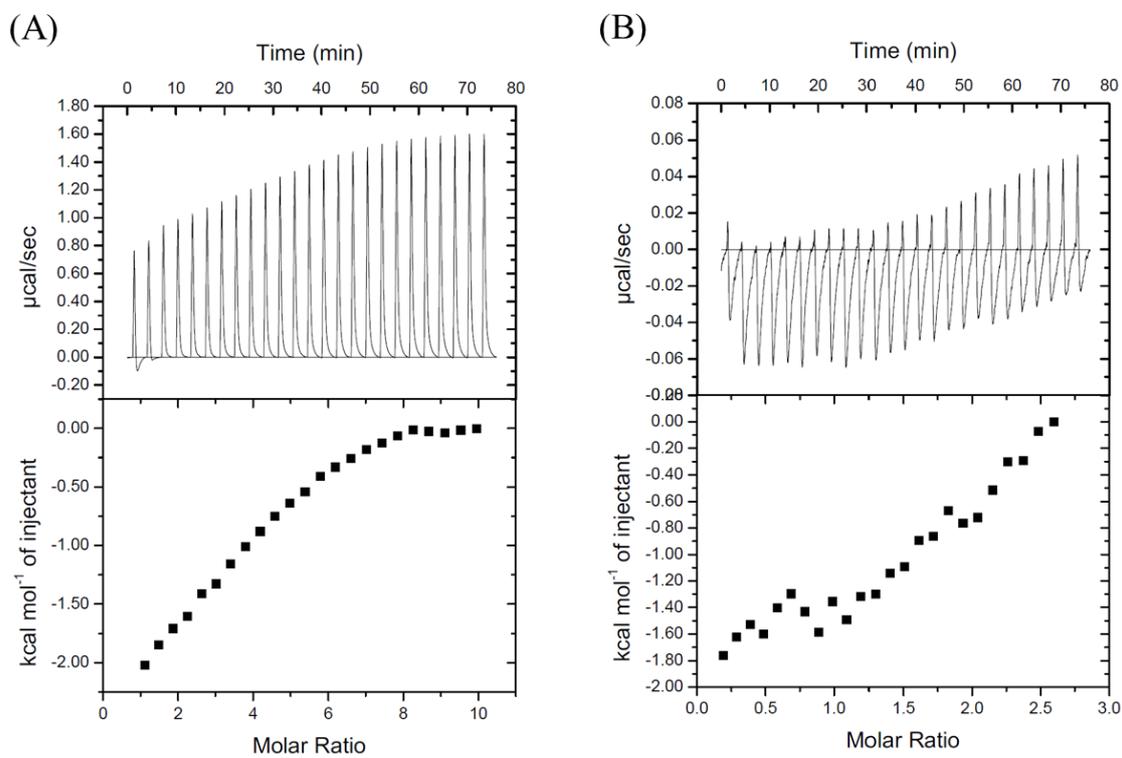
Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
0	91.1 $\pm$ 0.5	8.9 $\pm$ 0.5	-
1	0.0 $\pm$ 0.0	90.7 $\pm$ 0.5	9.3 $\pm$ 0.5
2	0.0 $\pm$ 0.0	86.1 $\pm$ 0.9	13.9 $\pm$ 0.9
3	0.0 $\pm$ 0.0	82.5 $\pm$ 0.5	17.5 $\pm$ 0.5
5	0.0 $\pm$ 0.0	74.5 $\pm$ 0.7	25.5 $\pm$ 0.7
10	0.0 $\pm$ 0.0	57.1 $\pm$ 0.5	42.9 $\pm$ 0.5
20	0.0 $\pm$ 0.0	38.0 $\pm$ 1.0	62.0 $\pm$ 1.0
30	0.0 $\pm$ 0.0	28.3 $\pm$ 1.5	71.7 $\pm$ 1.5
40	0.0 $\pm$ 0.0	21.5 $\pm$ 3.6	78.5 $\pm$ 3.6
60	0.0 $\pm$ 0.0	15.7 $\pm$ 1.4	84.3 $\pm$ 1.4



**Figure S5-6.** Agarose gel electrophoresis profile upon reaction of pUC19 DNA (50 μM bp) with **3** (30 μM) and AscNa (150 μM) in the presence of DMSO ((a) 1, (b) 5, and (c) 10 mM) at pH 6.0. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively.

**Table S5-8. Fraction of Form I, Form II, and Form III in the DNA cleavage with 3 (30  $\mu$ M) and AscNa (150  $\mu$ M) in the presence of DMSO (1–10 mM) at pH 6.0.**

DMSO (mM)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
1	0	92.2 $\pm$ 0.5	7.8 $\pm$ 0.5	-
	1	0.0 $\pm$ 0.0	85.9 $\pm$ 2.9	14.1 $\pm$ 2.9
	2	0.0 $\pm$ 0.0	85.2 $\pm$ 3.6	18.3 $\pm$ 3.6
	3	0.0 $\pm$ 0.0	80.4 $\pm$ 3.4	23.0 $\pm$ 3.4
	5	0.0 $\pm$ 0.0	75.0 $\pm$ 4.8	30.2 $\pm$ 4.8
	10	0.0 $\pm$ 0.0	65.9 $\pm$ 3.2	41.0 $\pm$ 3.2
	20	0.0 $\pm$ 0.0	51.1 $\pm$ 4.6	48.9 $\pm$ 4.6
	30	0.0 $\pm$ 0.0	42.6 $\pm$ 4.1	57.4 $\pm$ 4.1
	40	0.0 $\pm$ 0.0	36.1 $\pm$ 3.3	63.9 $\pm$ 3.3
	60	0.0 $\pm$ 0.0	30.0 $\pm$ 3.3	70.0 $\pm$ 3.3
5	0	92.2 $\pm$ 0.2	7.8 $\pm$ 0.2	-
	1	0.0 $\pm$ 0.0	83.7 $\pm$ 1.2	16.3 $\pm$ 1.2
	2	0.0 $\pm$ 0.0	79.1 $\pm$ 1.2	20.9 $\pm$ 1.2
	3	0.0 $\pm$ 0.0	76.2 $\pm$ 0.1	23.8 $\pm$ 0.1
	5	0.0 $\pm$ 0.0	70.5 $\pm$ 0.2	29.5 $\pm$ 0.2
	10	0.0 $\pm$ 0.0	63.2 $\pm$ 0.7	36.8 $\pm$ 0.7
	20	0.0 $\pm$ 0.0	53.9 $\pm$ 0.0	46.1 $\pm$ 0.0
	30	0.0 $\pm$ 0.0	47.7 $\pm$ 0.2	52.3 $\pm$ 0.2
	40	0.0 $\pm$ 0.0	41.4 $\pm$ 0.3	58.6 $\pm$ 0.3
	60	0.0 $\pm$ 0.0	35.3 $\pm$ 3.7	64.7 $\pm$ 3.7
10	0	92.2 $\pm$ 0.5	7.8 $\pm$ 0.5	-
	1	0.0 $\pm$ 0.0	85.9 $\pm$ 0.9	14.1 $\pm$ 0.9
	2	0.0 $\pm$ 0.0	81.3 $\pm$ 0.9	18.7 $\pm$ 0.9
	3	0.0 $\pm$ 0.0	78.4 $\pm$ 0.6	21.6 $\pm$ 0.6
	5	0.0 $\pm$ 0.0	73.9 $\pm$ 1.7	26.1 $\pm$ 1.7
	10	0.0 $\pm$ 0.0	68.2 $\pm$ 2.0	31.8 $\pm$ 2.0
	20	0.0 $\pm$ 0.0	58.1 $\pm$ 1.0	41.9 $\pm$ 1.0
	30	0.0 $\pm$ 0.0	52.8 $\pm$ 2.2	47.2 $\pm$ 2.2
	40	0.0 $\pm$ 0.0	48.2 $\pm$ 1.6	51.8 $\pm$ 1.6
	60	0.0 $\pm$ 0.0	41.5 $\pm$ 1.1	58.5 $\pm$ 1.1



**Figure S5-7.** Isothermal calorimetric titration curves: **3** (A) or **5** (B) at pH 6.0. Experimental conditions: A solution of **3** or **5** (1 mM) in a syringe was added, in an equal interval 26 times, to a solution of the linear 33 mer ds-DNA (18.75  $\mu\text{M}$  (A), or 40  $\mu\text{M}$  (B)) in the cell in the presence of NaCl (10 mM) in pH 6.0 (MES, 10 mM) at 37°C.

## 第六章：Burst of DNA Double-Strand Breaks by Dicopper(II) Complexes

### 6-1. 要旨

本章では、二核銅錯体による supercoiled plasmid pUC19 DNA の二本鎖切断(DNA double-strand breaks, dsb)を経る Form III 生成の初期の速い反応(burst)を配位子に導入した MeO 基で加速できることが見出された。具体的には、2,6-bis(amide-tether dpa)-*p*-cresol 配位子(HL3)のピリジル基の 4 位に電子供与性の MeO 基、電子求引性の Cl 基を持つ配位子 HL3<sup>4-MeO</sup>, HL3<sup>4-Cl</sup> の錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3<sup>4-MeO</sup>)](OAc) (**3b**<sup>4-MeO</sup>), [Cu<sub>2</sub>(μ-1,3-OAc)<sub>2</sub>(L3<sup>4-Cl</sup>)](OAc) (**3b**<sup>4-Cl</sup>)を用い、アスコルビン酸ナトリウム(AscNa)を還元剤とする O<sub>2</sub> 活性化による supercoiled plasmid pUC19 DNA の酸化切断を行った。この反応の Form III の生成速度を HL3 の錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3)](OAc) (**3**)を用いた反応と比較し、Form III 生成の burst が **3b**<sup>4-Cl</sup> < **3** < **3b**<sup>4-MeO</sup> の順で増大することが示された。**3b**<sup>4-MeO</sup> は低濃度でも大きな burst を示した。この大きな burst の原因を調べるため、これら 3 つの錯体の還元的 O<sub>2</sub> 活性化によるヒドロキシラジカル(HO•)生成の初期速度、Form III 生成に対する DMSO の阻害効果、33 mer DNA との相互作用の等温滴定カロリメトリー(ITC)、仔ウシ胸腺 DNA (ct-DNA)との相互作用における電子スペクトル変化と CD スペクトル変化などを測定した。その結果、**3b**<sup>4-MeO</sup> は MeO 基の電子供与性効果で HO• 生成の初期速度を加速すること、さらに DNA との相互作用をエンタルピー駆動の強固な結合にすることで生じた HO•が拡散されずに効率的に DNA 酸化切断に使用されることの 2 つの要因で Form III 生成の burst を増大させることが明らかになった。これらの研究から、二核銅錯体による DNA dsb を、配位子に導入した置換基効果で制御できることが示された。

## 6-2. 緒言

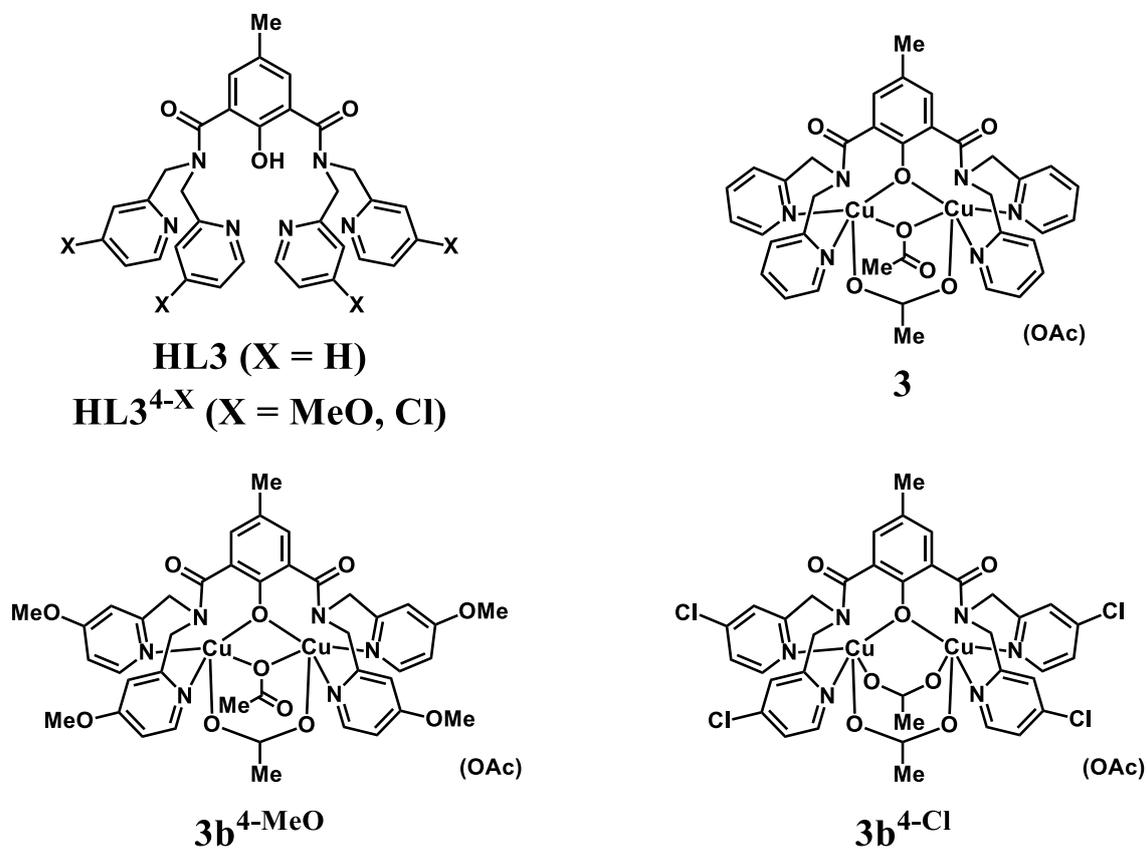
CRISPR/Cas9 システム<sup>[1]</sup>は DNA の二本鎖切断(DNA double-strand breaks, dsb)を原理とする遺伝子改変ツールであり、遺伝子上の特定の位置に dsb を誘導することで容易にノックアウトあるいはノックインすることが可能である。また、細胞内 DNA における DNA dsb は、DNA 損傷応答を誘導する<sup>[2-4]</sup>。DNA 損傷応答には、DNA 損傷の認識、チェックポイントの活性化、細胞周期の停止、そして最終的には修復、アポトーシスなどが含まれる。そのため、DNA dsb の burst を引き起こす錯体の開発は遺伝子編集<sup>[5]</sup>やがん治療薬の開発<sup>[6]</sup>の観点から重要である。これまでに、抗がん剤や電離放射線によって生成する活性酸素種(ROS)が DNA dsb を引き起こすことが報告されている<sup>[4, 7]</sup>。錯体は還元剤との反応により ROS を生成することが可能であるため、DNA dsb に向けて様々な合成金属錯体が開発されてきた<sup>[8-10]</sup>。また、その錯体による ROS 生成能力は、配位子への置換基の導入によって変化することが報告されている<sup>[10]</sup>。しかし、それら合成金属錯体による DNA dsb はまだ非常に遅い。

第五章では、2,6-bis(amide-tether dpa)-*p*-cresol 配位子(HL3)の二核銅(II)錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3)](OAc) (**3**)が、空気下、アスコルビン酸ナトリウム(AscNa)存在下で O<sub>2</sub> を還元的に活性化して supercoiled plasmid pUC19 DNA (Form I)の 26%を 1 分間で直鎖状 DNA (Form III)に変換する初期の速い反応(burst)を起こすことを示した<sup>[11]</sup>。これまでに報告されてきた幾つかの錯体による DNA 切断の中で、**3** の Form III 生成の burst は最も大きかった。**3** はインターカレーションと水素結合で DNA と rigid な結合を形成し、還元的 O<sub>2</sub> 活性化でヒドロキシラジカル(HO•)を生成した。**3** が rigid な DNA 結合を形成するために 10 塩基対の範囲内で DNA の相補的な二本鎖を同時に酸化切断可能であることが、Form III 生成の burst が進行する理由であることが示された。しかし、既存の抗がん剤である Bleomycin の鉄錯体(Fe-BLM)は、**3** よりもはるかに高い DNA dsb 活性を示す。また、Fe-BLM はこれにより高い細胞毒性を示すと考えられる。したがって、合成金属錯体で Fe-BLM の様に高い細胞毒性を実現するには、さらに高い DNA dsb 活性を示す合成錯体を開発する必要がある。

第四章では、HL3 のピリジル基の 4 位に電子供与性の MeO 基や電子求引性の Cl 基を導入した HL3<sup>4-MeO</sup> と HL3<sup>4-Cl</sup> の二核銅(II)錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3<sup>4-MeO</sup>)](OAc) (**3b**<sup>4-MeO</sup>)と[Cu<sub>2</sub>(μ-1,3-OAc)<sub>2</sub>(L3<sup>4-Cl</sup>)](OAc) (**3b**<sup>4-Cl</sup>)を無置換の配位子 HL3 の二核銅(II)錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3)](OAc) (**3**)と比較し、これらの錯体の細胞毒性に及ぼす置換基効果を示した。**3b**<sup>4-MeO</sup> や **3b**<sup>4-Cl</sup> は、MeO 基や Cl 基の疎水性効果で親油性が増大し、疎水的な環境を持つ小胞体(ER)や Golgi 体に局在することにより細胞毒性

が向上した。また、還元的 O<sub>2</sub> 活性化では置換基の電子効果で **3b**<sup>4-MeO</sup> と **3b**<sup>4-Cl</sup> の配位構造や酸化還元電位に明確な違いが生じた。このために、**3b**<sup>4-MeO</sup> と **3b**<sup>4-Cl</sup> では発生する ROS の種類が異なることがわかった。**3b**<sup>4-MeO</sup> は、電子供与性の MeO 基を持つために酸化還元電位が負側にシフトし、Cu(II)Cu(II)から Cu(I)Cu(I)への還元が進行しにくくなった。このために、**3b**<sup>4-MeO</sup> は抗酸化剤濃度が比較的高いがん細胞中では ROS を発生し、抗酸化剤濃度が通常値である正常細胞中では ROS 発生が減少する選択的 ROS 発生を起こした。これにより、がん細胞選択的毒性を発現したと考えられる。**3b**<sup>4-MeO</sup> や **3b**<sup>4-Cl</sup> では、MeO 基や Cl 基の電子効果により選択的 ROS 発生が実現された。

本章では、高い DNA dsb 活性を示す錯体の開発を目的として第四章に示した置換基効果の研究と第五章の **3** による DNA 酸化切断の研究を踏まえ、**3b**<sup>4-MeO</sup>、**3b**<sup>4-Cl</sup> を用いた AscNa による還元的 O<sub>2</sub> 活性化を経る supercoiled plasmid pUC19 DNA の酸化切断を行った。その結果、**3b**<sup>4-MeO</sup> が Form III 生成の初期の速い反応(burst)を増大させることを見出した。錯体を 30 μM の濃度で用いた時の 1 分間の Form III の生成率は **3b**<sup>4-Cl</sup> (11.6%) < **3** (26.4%) < **3b**<sup>4-MeO</sup> (28.1%)、錯体を 20 μM の濃度で用いた時の 1 分間の Form III の生成率は **3b**<sup>4-Cl</sup> (9.4%) ≈ **3** (8.2%) < **3b**<sup>4-MeO</sup> (22.2%) であった。このように電子供与性の MeO 基を持つ **3b**<sup>4-MeO</sup> の Form III 生成活性が最も高く、大きな burst を与え、錯体の濃度が低くても高活性を示した。そこで、**3**、**3b**<sup>4-MeO</sup>、**3b**<sup>4-Cl</sup> の DNA 切断活性、電気化学的性質、HO•生成速度、DNA 結合様式を比較し、HO•生成の速さと DNA への強固な結合が、低濃度の **3b**<sup>4-MeO</sup> による DNA dsb の burst を可能にする特徴であることを明らかにした。本章で用いた HL3、HL3<sup>4-MeO</sup>、HL3<sup>4-Cl</sup>、**3**、**3b**<sup>4-MeO</sup>、**3b**<sup>4-Cl</sup> の化学構造を Figure 6-1 に示す。



**Figure 6-1.** Chemical Structures of HL3, HL3<sup>4-X</sup> (X = MeO, Cl), [Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3)](OAc) (**3**), [Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3<sup>4-MeO</sup>)](OAc) (**3b<sup>4-MeO</sup>**), and [Cu<sub>2</sub>(μ-1,3-OAc)<sub>2</sub>(L3<sup>4-Cl</sup>)](OAc) (**3b<sup>4-Cl</sup>**).

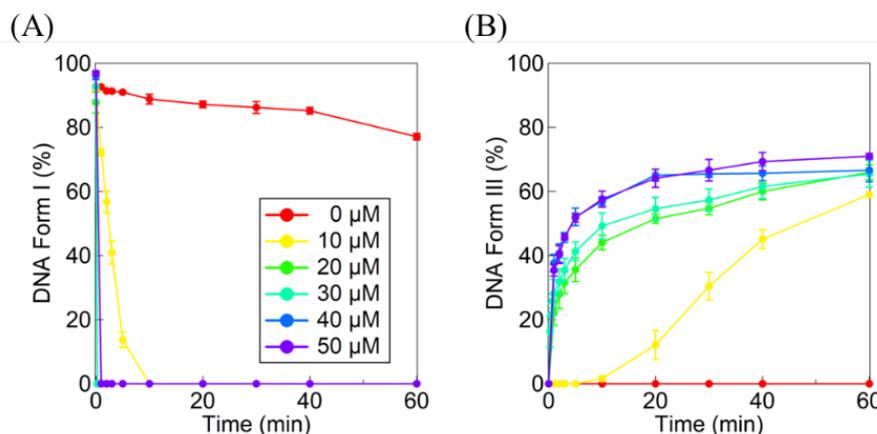
### 6-3. 結果と考察

#### 6-3-1. AscNa 存在下での **3**, **3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** の DNA 二本鎖切断

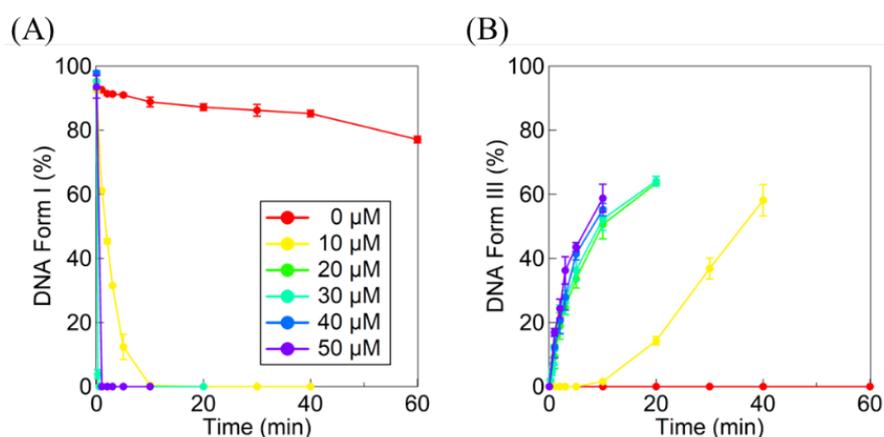
Supercoiled plasmid pUC19 DNA (Form I) を基質として用い、**3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** の DNA 切断活性を調べた。MES buffer (10 mM, pH 6.0), NaCl (10 mM), pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp), 金属錯体の混合溶液に、AscNa を空気下 37°C で加えた後、一定量のサンプルを時間毎に採取した。このサンプルを、アガロースゲル電気泳動で分析し、Form I, II, III を定量した。これらはそれぞれスーパーコイルの閉環状、一本鎖切断の環状、二本鎖切断の直線状 DNA である<sup>[12]</sup>。反応解析の詳細は実験項に示す。

この反応の **3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>**, AscNa の濃度に対する依存性を調べた。そのときの Form I, II, III の割合(%)の時間経過とゲル写真を Figure 6-2-6-5, S6-1-S6-4, Table S6-1-S6-4 に示す。**3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** や AscNa の不在下では、60 分間で 80% 以上の Form I が未反応であり、速い DNA 切断には **3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** と AscNa は不可欠である。Form III 生成の初期の速い反応(burst)は **3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** の濃度に大きく依存した。Figure 6-4 (B), 6-5 (B) に示すように、**3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** を 30  $\mu$ M の濃度で用いると、AscNa の濃度を 50–150  $\mu$ M の間で変化させても誘導期なしに Form III 生成の burst が観察された。これは、錯体濃度 30  $\mu$ M では、錯体の DNA への結合数が多いので DNA の二本鎖が 10 塩基対の範囲内で同時切断され、直ちに直鎖状の DNA に変換されるためである<sup>[13]</sup>。

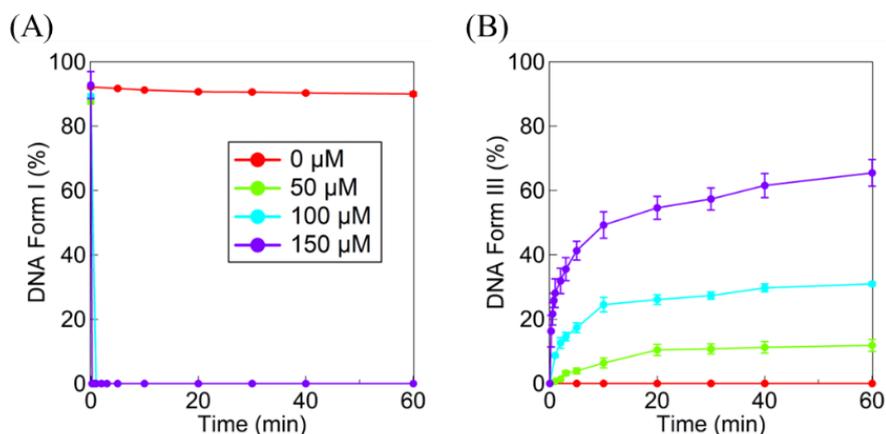
さらに、AscNa 濃度 150  $\mu$ M で、**3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** 濃度を 40  $\mu$ M 以上にすると、burst は飽和した(Figure 6-2 (B), 6-3 (B))。この場合 DNA に対する **3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** の結合数が増えて 10 塩基対よりも狭い範囲内で DNA dsb が起こるが、10 塩基対以内の DNA dsb はいずれの場合も Form III が生成し、burst の大きさは一定になると考えられる。一方、**3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** 濃度が 10  $\mu$ M のときは、いずれも burst は起こらずに誘導期が観測された。10 塩基対以上離れた箇所でも DNA の相補的な二本鎖が切断されても直接的な Form III 生成は起こらず、Form I から II への変換後、ゆっくりと Form II から III への変換が起こる段階的な DNA 切断で Form III が生成する。この場合でも、**3b<sup>4-MeO</sup>** では 60 分間で Form III が 50% 以上生成し、**3b<sup>4-Cl</sup>** では 60 分間で DNA が完全にスメアになった。



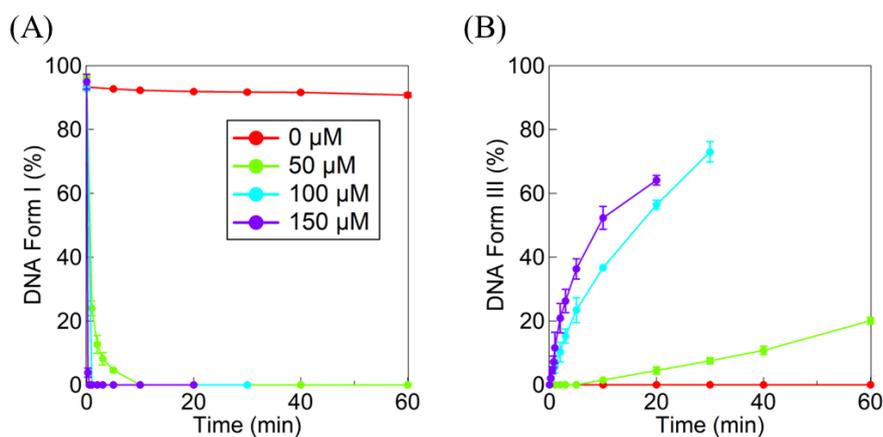
**Figure 6-2.** Time courses for Form I (A) and Form III (B) dependent on  $[\mathbf{3b}^{4-MeO}]$  in the DNA cleavage by  $\mathbf{3b}^{4-MeO}$ . Experimental conditions: [pUC19 DNA] = 50  $\mu\text{M}$  bp,  $[\mathbf{3b}^{4-MeO}]$  = 0–50  $\mu\text{M}$ , [AscNa] = 150  $\mu\text{M}$ ,  $[\text{Cu}(\text{OAc})_2]$  = 90  $\mu\text{M}$ , [NaCl] = 10 mM, [MES buffer] = 10 mM (pH 6.0) at 37°C. Experiments were carried out at least three times.



**Figure 6-3.** Time courses for Form I (A) and Form III (B) dependent on  $[\mathbf{3b}^{4-Cl}]$  in the DNA cleavage by  $\mathbf{3b}^{4-Cl}$ . Experimental conditions: [pUC19 DNA] = 50  $\mu\text{M}$  bp,  $[\mathbf{3b}^{4-Cl}]$  = 0–50  $\mu\text{M}$ , [AscNa] = 150  $\mu\text{M}$ ,  $[\text{Cu}(\text{OAc})_2]$  = 90  $\mu\text{M}$ , [NaCl] = 10 mM, [MES buffer] = 10 mM (pH 6.0) at 37°C. Experiments were carried out at least three times.

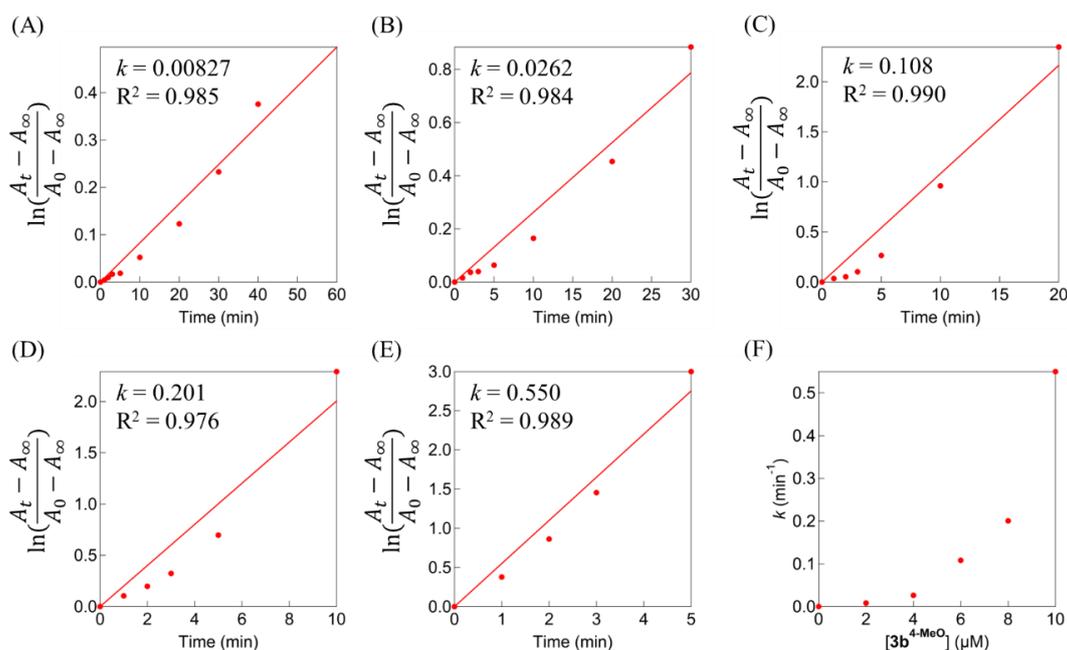


**Figure 6-4.** Time courses for Form I (A) and Form III (B) dependent on [AscNa] in the DNA cleavage by  $3b^{4-MeO}$ . Experimental conditions: [pUC19 DNA] = 50  $\mu$ M bp, [ $3b^{4-MeO}$ ] = 30  $\mu$ M, [AscNa] = 0–150  $\mu$ M, [Cu(OAc)<sub>2</sub>] = 90  $\mu$ M, [NaCl] = 10 mM, [MES buffer] = 10 mM (pH 6.0) at 37°C. Experiments were carried out at least three times.

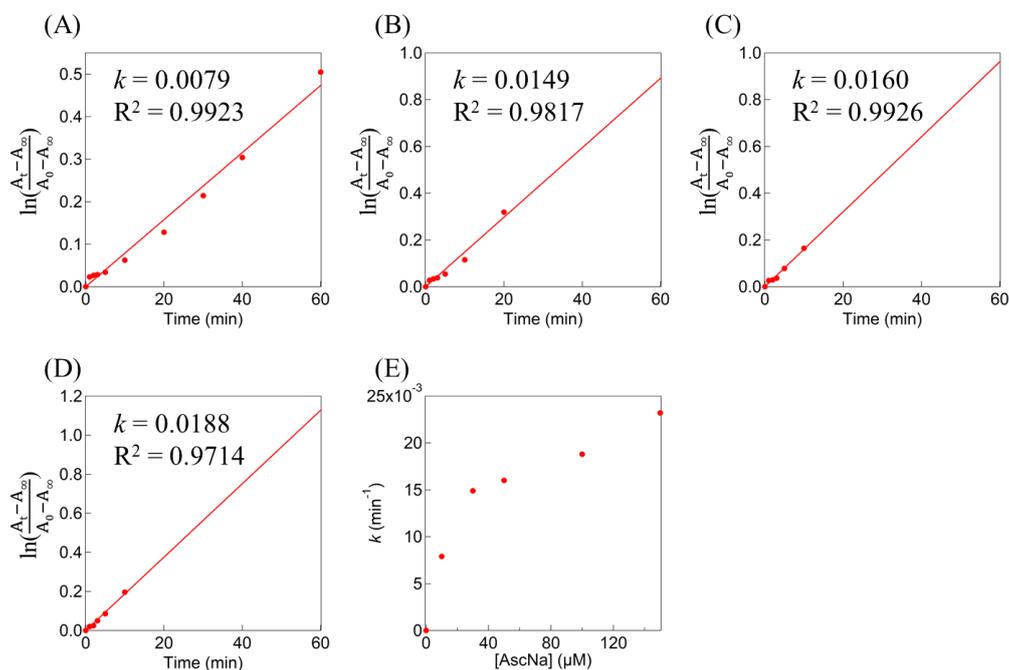


**Figure 6-5.** Time courses for Form I (A) and Form III (B) dependent on [AscNa] in the DNA cleavage by  $3b^{4-Cl}$ . Experimental conditions: [pUC19 DNA] = 50  $\mu$ M bp, [ $3b^{4-Cl}$ ] = 30  $\mu$ M, [AscNa] = 0–150  $\mu$ M, [Cu(OAc)<sub>2</sub>] = 90  $\mu$ M, [NaCl] = 10 mM, [MES buffer] = 10 mM (pH 6.0) at 37°C. Experiments were carried out at least three times.

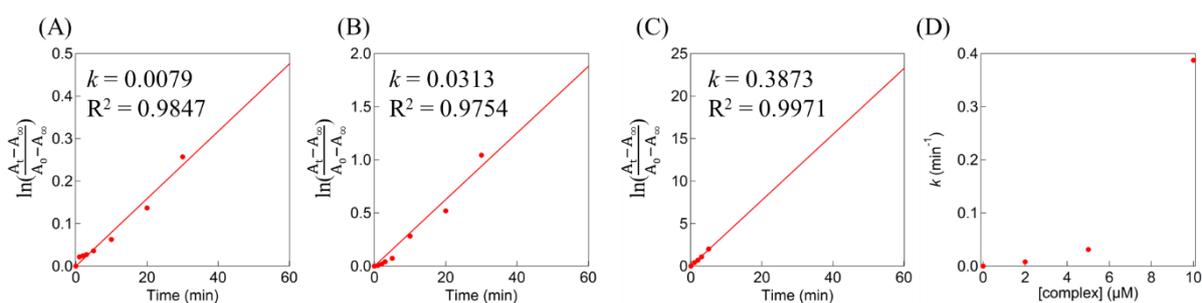
$3b^{4-MeO}$ ,  $3b^{4-Cl}$  による DNA 酸化切断の機構解明を目指し,  $3b^{4-MeO}$ ,  $3b^{4-Cl}$  (0–10  $\mu\text{M}$ ) と AscNa (0–150  $\mu\text{M}$ ) を用いて Form I の減衰速度を測定した. 結果を Figure 6-6–6-9, S6-5–S6-8, Table S6-5–S6-8 に示す. Form I の減衰速度はいずれも擬一次反応に従った.  $3b^{4-MeO}$ ,  $3b^{4-Cl}$  に関する擬一次速度定数と濃度のプロット  $k_{\text{obs}}$  vs  $[3b^{4-X}]$  と  $k_{\text{obs}}$  vs [AscNa] を Figure 6-6 (F), 6-7 (E), 6-8 (D), 6-9 (E) に示す.  $[3b^{4-X}]$  に対しては二次の依存性, [AscNa] に対しては飽和の依存性を示した.  $[3b^{4-X}]$  に対して二次の依存性を示したので, DNA 酸化切断には 2 分子の錯体が関与するといえる. これらは **3** と同様であり,  $3b^{4-MeO}$ ,  $3b^{4-Cl}$  が AscNa によって還元され, 還元された 2 つ二核銅種(Cu(I)Cu(II)と Cu(I)Cu(I))が DNA 切断の律速となる  $\text{O}_2$  活性化を行なっていると考えられる.



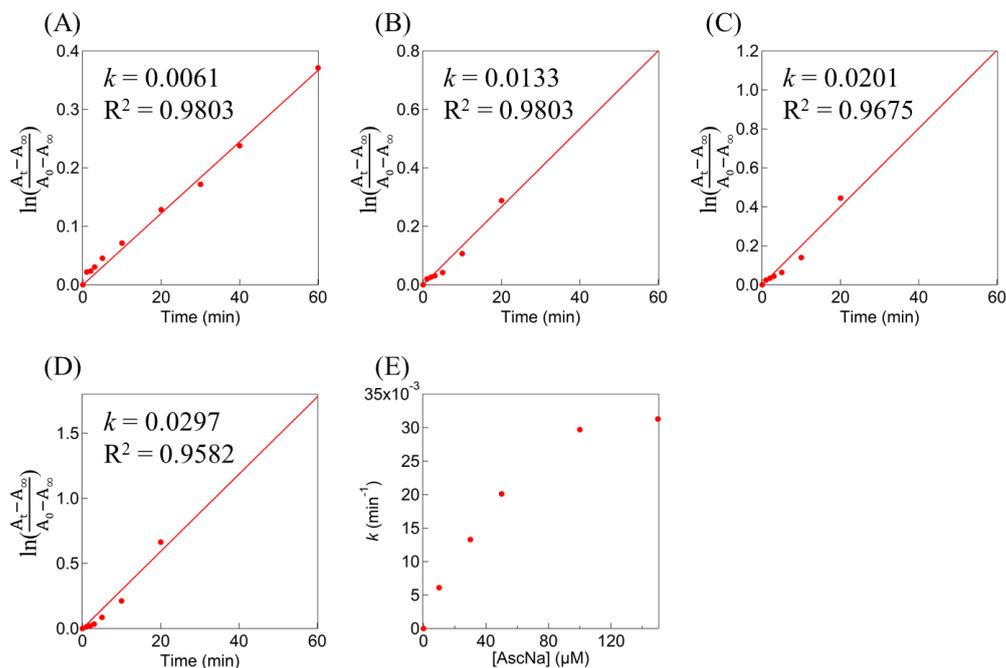
**Figure 6-6.** Pseudo-first-order plots for the decrease of Form I in the reactions of  $3b^{4-MeO}$  ((A) 2, (B) 4, (C) 6, (D) 8, and (E) 10  $\mu\text{M}$ ) with AscNa (50  $\mu\text{M}$ ) at pH 6.0 under air at 37°C. (F) A plot of the pseudo-first-order rate constant vs concentration of  $3b^{4-MeO}$  (0–10  $\mu\text{M}$ ). Experiments were carried out at least three times.



**Figure 6-7.** Pseudo-first-order plots for the decrease of % of Form I in the reaction with **3b**<sup>4</sup>-MeO (5  $\mu\text{M}$ ) in the presence of AscNa ((A) 10, (B) 30, (C) 50, (D) 100  $\mu\text{M}$ ). (E) A plot of the pseudo-first-order constant vs concentration of AscNa (0–150  $\mu\text{M}$ ). Experiments were carried out at least three times.

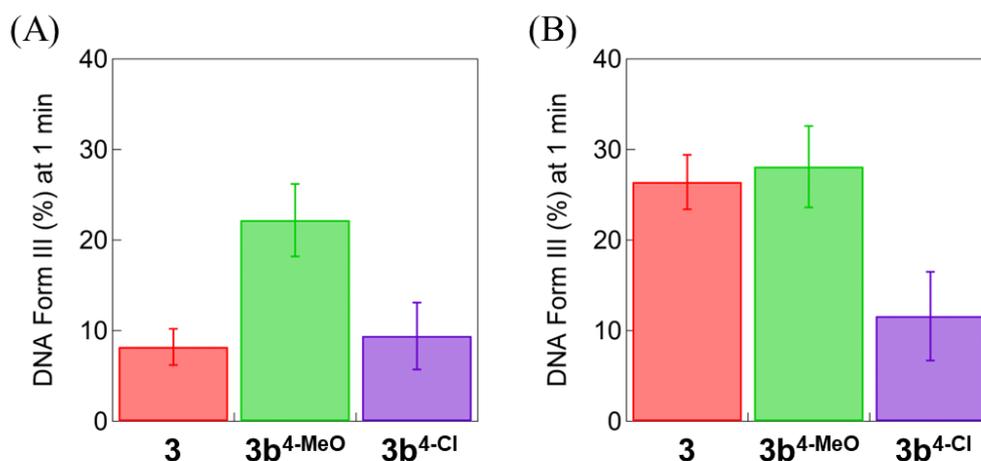


**Figure 6-8.** Pseudo-first-order plots for the decrease of % of Form I in the reaction with **3b**<sup>4</sup>-Cl ((A) 2, (B) 5, and (C) 10  $\mu\text{M}$ ) in the presence of AscNa (150  $\mu\text{M}$ ). (D) A plot of the pseudo-first-order constant vs concentration of **3b**<sup>4</sup>-Cl (0–10  $\mu\text{M}$ ). Experiments were carried out at least three times.



**Figure 6-9.** Pseudo-first-order plots for the decrease of % of Form I in the reaction with **3b<sup>4-Cl</sup>** (5 μM) in the presence of AscNa ((A) 10, (B) 30, (C) 50, (D) 100 μM). (E) A plot of the pseudo-first-order constant vs concentration of AscNa (0–150 μM). Experiments were carried out at least three times.

150 μM の AscNa の存在下, **3**, **3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** を 20 μM または 30 μM 用いたときの Form III の増加を Figure 6-10 (A), (B) に比較して示す. 30 μM の **3**, **3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** の DNA 切断活性 (Figure 6-10 (B)) の比較より, 1 分間での Form III の生成率は **3b<sup>4-Cl</sup>** (11.6%) < **3** (26.4%) < **3b<sup>4-MeO</sup>** (28.1%) であり, 電子供与基を有する錯体は Form III 生成率が高かった. 第四, 五章で, **3**, **3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** はいずれも AscNa で速やかに還元されることが示されているので, DNA 切断の律速段階は還元された錯体 (Cu(I)Cu(II) と Cu(I)Cu(I)) による O<sub>2</sub> の 3 電子還元であるといえる. さらに 20 μM の **3**, **3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** の DNA 切断活性 (Figure 6-10 (A)) の比較では, 1 分間で Form III の生成率は **3b<sup>4-Cl</sup>** (9.4%) ≈ **3** (8.2%) < **3b<sup>4-MeO</sup>** (22.2%) であった. **3b<sup>4-MeO</sup>** の Form III 生成率は **3**, **3b<sup>4-Cl</sup>** の 2 倍以上で, **3b<sup>4-MeO</sup>** は低濃度でも DNA 切断活性が高いことがわかった.



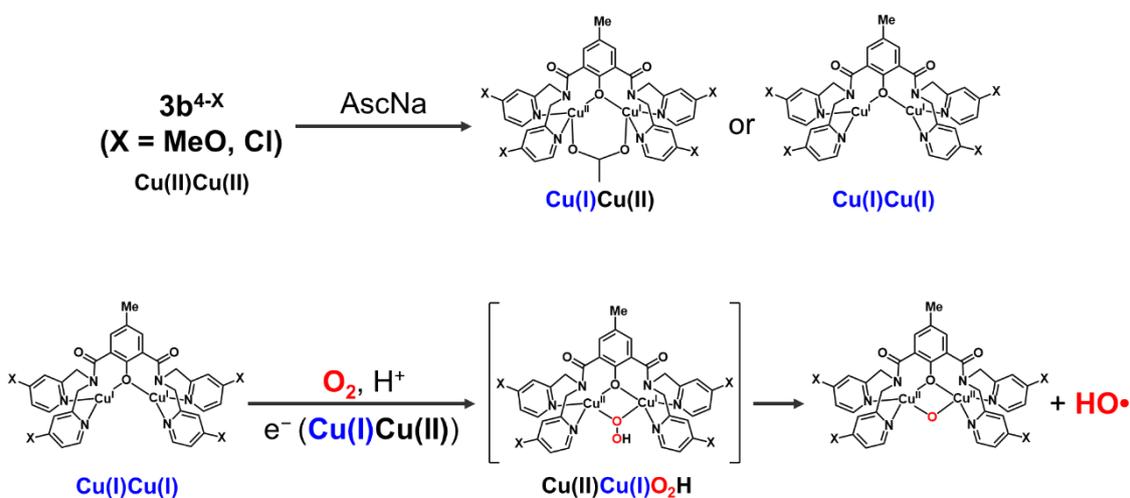
**Figure 6-10.** DNA cleavage profile promoted by **3** (red), **3b<sup>4-MeO</sup>** (green), and **3b<sup>4-Cl</sup>** (purple) (20 μM (A), 30 μM (B)) in the presence of AscNa (150 μM) after 1 min reaction.

### 6-3-2. **3**, **3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** の還元的 O<sub>2</sub> 活性化

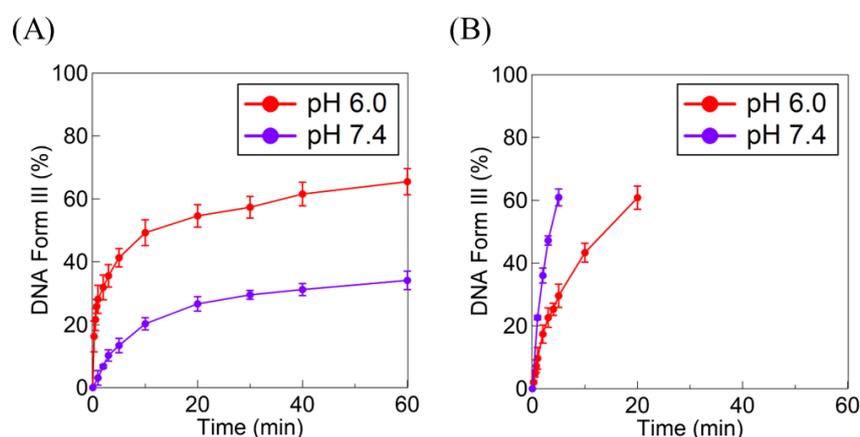
**3**, **3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** は AscNa との反応で、Cu(I)Cu(II)と Cu(I)Cu(I)に還元されることが、第四、五章に示した CV, CSI MS, UV-vis スペクトルの結果より明らかとなっている。酸化還元電位は **3b<sup>4-MeO</sup>** < **3** < **3b<sup>4-Cl</sup>** の順である。**3** は、 $E_{1/2} = -0.05 \text{ V}$  ( $\Delta E_p = 0.06 \text{ V}$ ) に Cu(I)Cu(II)/Cu(I)Cu(I) に帰属される準可逆な redox couple と  $E_{pc} = 0.0$ ,  $E_{pa} = 0.1 \text{ V}$  に Cu(II)Cu(II)/Cu(I)Cu(II) に帰属される不可逆な redox couple を示した<sup>[11]</sup>。また、電子供与基をもつ **3b<sup>4-MeO</sup>** は、 $E_{pc} = -0.09 \text{ V}$ ,  $E_{pa} = 0.11 \text{ V}$  に Cu(II)Cu(II)/Cu(I)Cu(I) に帰属される不可逆な redox couple を示し、電子求引基を持つ **3b<sup>4-Cl</sup>** は、 $E_{pc} = 0.02 \text{ V}$ ,  $E_{pa} = 0.155 \text{ V}$  に Cu(II)Cu(II)/Cu(I)Cu(I) に帰属される不可逆な redox couple を示した。これらの結果から、これらの錯体の還元体では、**3b<sup>4-Cl</sup>** < **3** < **3b<sup>4-MeO</sup>** の順に O<sub>2</sub> に電子を渡す還元力が高いといえる。

さらに DNA 切断速度は錯体濃度の 2 次に依存したことから、Cu(I)Cu(II)と Cu(I)Cu(I) の両者が律速段階の O<sub>2</sub> 活性化に関与している。**3** と同様に **3b<sup>4-MeO</sup>** による Form III 生成速度が pH 7.4 よりも pH 6.0 の方が高い(Figure 6-11 (A), S6-9, Table S6-9)ので、Scheme 6-1 に示すように、この反応では O<sub>2</sub> の 3 電子還元が起こったのちに、H<sup>+</sup>が必要なヒドロペルオキシ錯体 Cu(II)Cu(I)O<sub>2</sub>H が生成すると推定される。一方、**3b<sup>4-Cl</sup>** では pH 6.0 よりも pH 7.4 で DNA dsb 活性が高かった(Figure 6-11 (B), S6-9, Table S6-9)。これは **3b<sup>4-Cl</sup>** からはプロトン化が起こらないペルオキシ錯体 Cu(II)Cu(I)O<sub>2</sub> が生成することを示唆している。pH 7.4 では、**3b<sup>4-Cl</sup>** の CV (Figure 6-12)は  $E_{pc} = -0.085 \text{ V}$ ,  $E_{pa} = 0.1, 0.18 \text{ V}$  vs

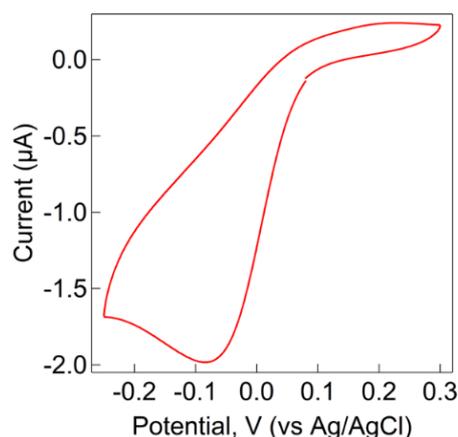
Ag/AgCl に不可逆的な redox couple を与えた。これらは、それぞれ Cu(I)Cu(II)/Cu(I)Cu(I) と Cu(II)Cu(II)/Cu(I)Cu(II) の酸化還元波に帰属される。3b<sup>4-MeO</sup> による還元的 O<sub>2</sub> 活性化で生成すると考えられる Cu(II)Cu(I)O<sub>2</sub>H は不安定なため、分光学的に特徴付けることはできなかつた。一方、HO•の生成に必要な Cu(I)O<sub>2</sub>H のホモリティックな O-O 結合開裂がエネルギー的に有利であることは理論計算で示されており<sup>[14]</sup>, Cu(II)Cu(I)O<sub>2</sub>H から HO• が生成する可能性が高いと考えられる。



**Scheme 6-1.** Reductive O<sub>2</sub>-activation of 3b<sup>4-X</sup> (X = MeO, Cl).



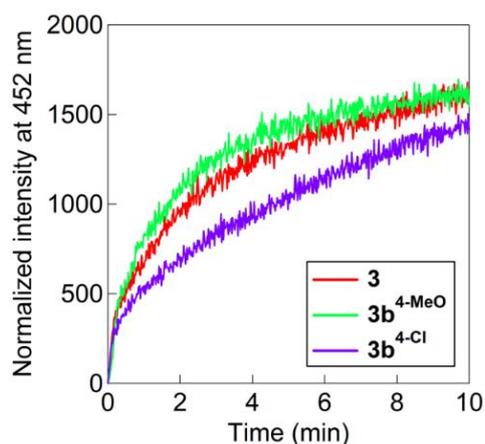
**Figure 6-11.** pH-dependent profile for DNA cleavage promoted by 3b<sup>4-MeO</sup> (A) and 3b<sup>4-Cl</sup> (B), respectively. Time courses for Form III at pH 6.0 (red) and pH 7.4 (purple). Experimental conditions: [pUC19 DNA] = 50 μM bp, [complex] = 30 μM, [AscNa] = 150 μM, [Cu(OAc)<sub>2</sub>] = 90 μM, [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES) and pH 7.4 (MOPS)) at 37°C. Experiments were carried out at least three times.



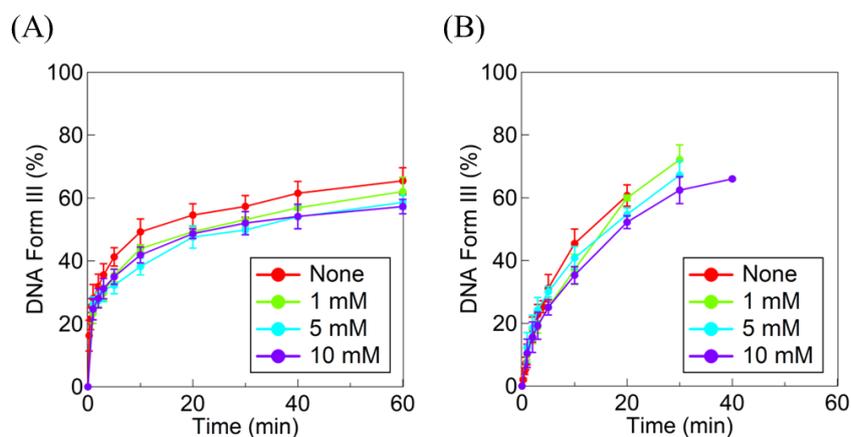
**Figure 6-12.** Cyclic voltammograms of  $3b^{4-Cl}$ . The measurements were made at  $23^{\circ}C \pm 0.2^{\circ}C$  under  $N_2$ . Glassy carbon, Pt wire, and Ag/AgCl are used as working, counter, and reference electrodes, respectively. Scan rate was  $10 \text{ mVs}^{-1}$ , and sensitivity was  $10 \mu\text{A/V}$ .

次に、空気下での **3**,  $3b^{4-MeO}$ ,  $3b^{4-Cl}$  と AscNa の反応における  $HO\cdot$  生成を、coumarin の蛍光スペクトル変化によって追跡した。coumarin は  $HO\cdot$  と反応して umbelliferone を生成し、 $332 \text{ nm}$  で励起すると  $452 \text{ nm}$  に蛍光バンドを与える<sup>[15,16]</sup>。  $452 \text{ nm}$  で追跡した蛍光強度の時間変化を Figure 6-13 に示す。空気下で coumarin と **3**,  $3b^{4-MeO}$ ,  $3b^{4-Cl}$ /AscNa を反応させると、蛍光強度が増加したので、**3**,  $3b^{4-MeO}$ ,  $3b^{4-Cl}$  は AscNa との反応で  $O_2$  を活性化し、 $HO\cdot$  を生成したといえる。また、 $HO\cdot$  の生成率は  $3b^{4-Cl} < 3 < 3b^{4-MeO}$  であり、Form III 生成速度の関係と一致している。したがって、**3**,  $3b^{4-MeO}$ ,  $3b^{4-Cl}$  の Form III 生成の律速は  $O_2$  活性化の反応であるといえる。

さらに、 $HO\cdot$  が DNA 切断における活性種であることを  $HO\cdot$  の阻害剤である DMSO を用いた阻害実験により確認した。 $3b^{4-X}$  による Form III 生成に対する DMSO<sup>[16-18]</sup> の阻害効果を Figure 6-14 に示し、それに関連するデータを Figure S6-10 および Table S6-10 に示す。DMSO は部分的に Form III 生成を阻害し、阻害率は  $[DMSO] = 1-10 \text{ mM}$  の領域で飽和した。このことから、 $3b^{4-X}$  は DNA と結合しており、その錯体内で生成した  $HO\cdot$  は直ちに DNA と反応するため、DMSO により捕捉されないと考えられる。  $10 \text{ mM}$  DMSO による **3**,  $3b^{4-MeO}$ ,  $3b^{4-Cl}$  による DNA 切断の阻害率は 20 分間でそれぞれ 40%、11%、19% であり、 $3b^{4-MeO}$  の反応で阻害率が最も低い。これは  $3b^{4-MeO}$  が DNA に最も強く結合して拡散する  $HO\cdot$  が減少している可能性を示唆する結果として重要である。



**Figure 6-13.** Time courses of the normalized emission intensity monitored at 452 nm for **3** (red), **3b**<sup>4-MeO</sup> (green), and **3b**<sup>4-Cl</sup> (purple). Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (MES, pH 6.0), [complex] = 30  $\mu$ M, [AscNa] = 150  $\mu$ M, [coumarin] = 0.5 mM, under air at 37°C.



**Figure 6-14.** Inhibition effect of DMSO (0 (red), 1 (light green), 5 (light blue), 10 (purple) mM) on Form III production by **3b**<sup>4-MeO</sup> (A) and **3b**<sup>4-Cl</sup> (B). Reaction conditions: DMSO (0–10 mM), pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp), **3b**<sup>4-MeO</sup> or **3b**<sup>4-Cl</sup> (30  $\mu$ M), AscNa (150  $\mu$ M), NaCl (10 mM), and Cu(OAc)<sub>2</sub> (90  $\mu$ M) in MES buffer (10 mM, pH 6.0) under air at 37°C.

### 6-3-3. 3, 3b<sup>4-MeO</sup>, 3b<sup>4-Cl</sup>の DNA 結合能力

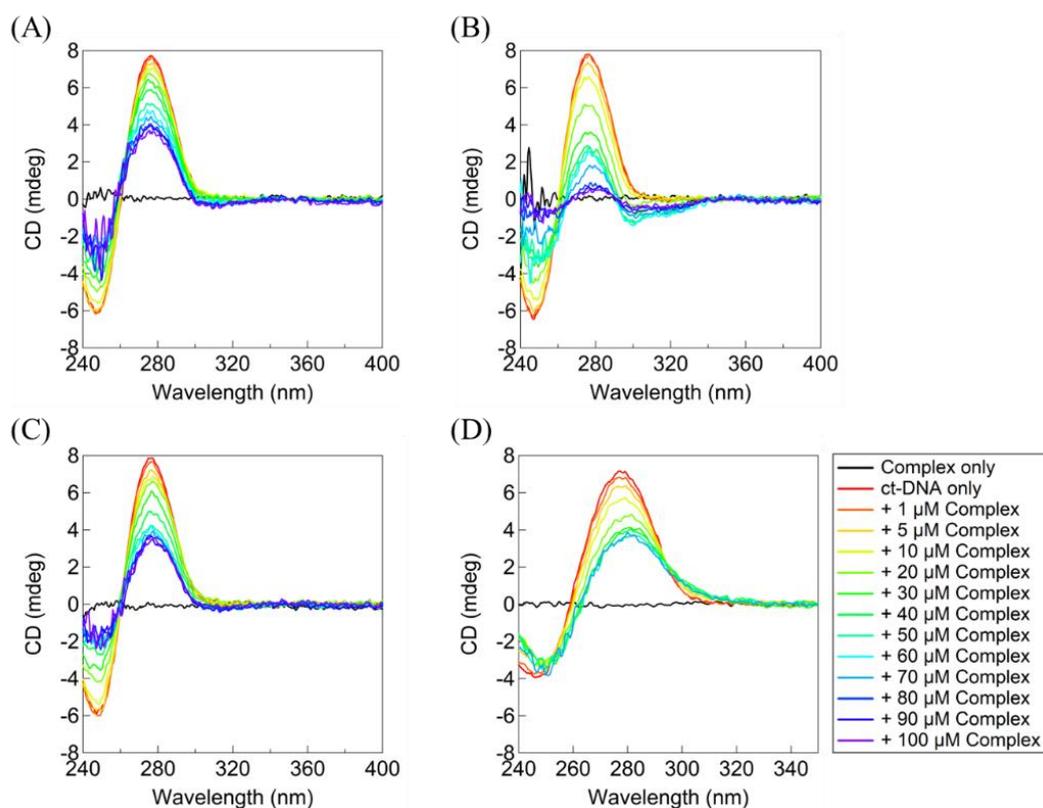
DNA 切断の阻害実験で、錯体と DNA の結合が示唆されたので 33 mer オリゴ ds-DNA と 3, 3b<sup>4-MeO</sup>, 3b<sup>4-Cl</sup> の相互作用を等温滴定熱量(Isothermal titration calorimetry, ITC), CD スペクトル, UV-vis スペクトルを測定した<sup>[19, 20]</sup>. 37°C, pH 6.0 での ITC 測定の結果を Table 6-1, Figure S6-10 に示す. 3, 3b<sup>4-MeO</sup>, 3b<sup>4-Cl</sup> の結合定数  $K$  はそれぞれ  $1.31 \times 10^5$ ,  $0.44 \times 10^5$ ,  $0.96 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  で,  $3b^{4-MeO} < 3b^{4-Cl} < 3$  であった. しかし, 錯体濃度(30  $\mu\text{M}$ )および DNA 濃度(50  $\mu\text{M bp}$ )の条件下では, 3, 3b<sup>4-MeO</sup>, 3b<sup>4-Cl</sup> の DNA への結合はほぼ飽和しているため,  $K$  の大きさは Form III 生成の burst にとって重要ではないといえる. Table 6-1 に示すように, 3 の  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  はそれぞれ  $-2.25 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $16.1 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ , 3b<sup>4-MeO</sup> の  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  はそれぞれ  $-20.34 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $-44.3 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ , 3b<sup>4-Cl</sup> の  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  はそれぞれ  $-5.38 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $5.4 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$  であった. この結果は, 3b<sup>4-MeO</sup>, 3b<sup>4-Cl</sup> の DNA 結合は  $\Delta H^\circ$  駆動であることを示している. また  $\Delta H^\circ$  の値は  $3^{4-MeO} << 3b^{4-Cl} < 3$  であり, 3b<sup>4-MeO</sup> が最も強固に DNA に結合していることがわかる.

**Table 6-1. Thermodynamic parameters determined by ITC for binding of 3, 3b<sup>4-MeO</sup>, and 3b<sup>4-Cl</sup> with a linear 33 mer ds-DNA**

Complex	3	3b <sup>4-MeO</sup>	3b <sup>4-Cl</sup>
$N$ (sites)	$3.81 \pm 0.11$	$4.02 \pm 0.25$	$3.88 \pm 0.13$
$K$ ( $\times 10^5 \text{ M}^{-1}$ )	$1.31 \pm 0.21$	$0.44 \pm 0.09$	$0.96 \pm 0.16$
$\Delta H^\circ$ ( $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	$-2.25 \pm 0.10$	$-20.34 \pm 1.79$	$-5.38 \pm 0.26$
$\Delta S^\circ$ ( $\text{cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ )	16.1	-44.3	5.4

次に CD スペクトルの結果を Figure 6-15 に示す. 37°C, pH 6.0 条件下で ct-DNA 溶液に錯体溶液を添加した. 錯体はキラリティーをもないため, 錯体のみ(black line)では CD バンドを示さなかった. ct-DNA のみ(red line)では, 塩基対のスタッキングに由来する 276 nm の正のバンドと, B 型 DNA の右巻きらせんに由来する 247 nm の負のバンドが見られ, 用いた ct-DNA は B 型の DNA であることが分かった<sup>[21]</sup>. 3, 3b<sup>4-MeO</sup>, 3b<sup>4-Cl</sup> の添加により, どの錯体でも 276 nm および 247 nm のバンドが位置は変化せず, 強度のみの減少が確認された(Figure 6-15 (A)–(C)). このことから, ct-DNA は右巻きの B 型構造を保ったまま DNA の二重らせん構造が緩み, 安定性が失われていると考えられる<sup>[21–23]</sup>.

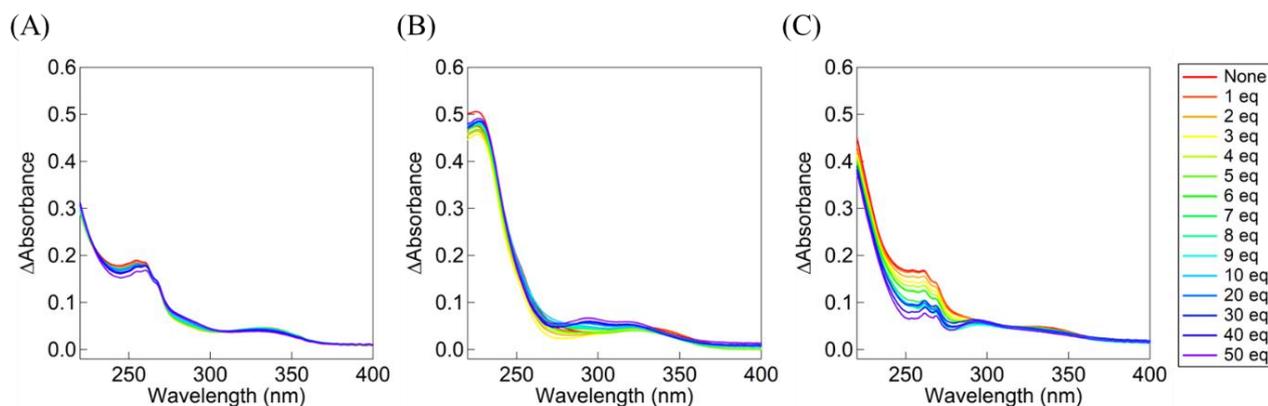
そのため, **3**, **3b**<sup>4-MeO</sup>, **3b**<sup>4-Cl</sup>の結合様式は groove binding ではないといえる. 一方, Figure 6-15 (D)に示すように, BLM の金属中心を模倣した N4Py 配位子の鉄(II)錯体 [Fe(MeCN)(N4Py)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (**5**)では, 錯体の添加により, 276 nm および 247 nm のバンドが長波長側にシフトしながら強度の減少が観察された. このことから, ct-DNA は B 型から C 型に近い構造へと変化していると考えられる<sup>[23,24]</sup>. そのため, **3**, **3b**<sup>4-MeO</sup>, **3b**<sup>4-Cl</sup>とは異なり, **5**の結合様式は groove binding である. また, **3**, **3b**<sup>4-MeO</sup>, **3b**<sup>4-Cl</sup>では, 290–340 nm に誘起 CD が確認され, DNA との結合により錯体の構造にキラリティーが生まれていることが示唆された. 特に **3b**<sup>4-MeO</sup>においてその変化量が大きかった. さらに, **3**と **3b**<sup>4-Cl</sup>は錯体濃度 70 μM で DNA への結合が飽和したが, **3b**<sup>4-MeO</sup>では 40 μM で飽和がみられた. これらのことから, **3b**<sup>4-MeO</sup>は低濃度においても DNA と強固な結合を形成しているといえる.



**Figure 6-15.** CD spectra of varying concentrations of **3** (A), **3b**<sup>4-MeO</sup> (B), **3b**<sup>4-Cl</sup> (C), and **5** (D) (0–100 μM (A)–(C), 0–60 μM (D)) with ct-DNA (50 μM bp) in MES buffer (10 mM, pH 6.0) under air at 37°C.

CD スペクトルにおいて、**3**, **3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** の結合様式が groove binding ではないことが示されたため、UV-vis により錯体溶液に ct-DNA 溶液を添加した際のスペクトル変化を観察した。その結果を Figure 6-16 に示す。ct-DNA 溶液の添加により、220–270 nm にある benzenoid band の吸光度の減少が確認された。そのため、**3**, **3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** は *p*-cresol 部位で DNA の塩基対間にインターカレーションしていることが示唆された。

以上の結果を合わせると、**3**, **3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** は *p*-cresol 部位で DNA の塩基対間にインターカレーションすることで、DNA に対して自由度の低い結合を形成しているといえる。**3**, **3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** が DNA に強固に結合することで生成する HO• の指向性が高まり、**3**, **3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** による Form III 生成に対する DMSO 阻害率が低かったと考えられる。また、**3b<sup>4-MeO</sup>** が他の錯体よりも強固に DNA と結合していることが示唆された。そのため、**3b<sup>4-MeO</sup>** が低濃度でも高い Form III 生成活性を示したと考えられる。



**Figure 6-16.** Electronic absorption spectral change of **3** (A), **3b<sup>4-MeO</sup>** (B), and **3b<sup>4-Cl</sup>** (C) upon addition of ct-DNA (0 (red)–50 (purple) eq) to a solution of complex (10 μM) in MES buffer (10 mM, pH 6.0), and NaCl (10 mM). The absorption band of DNA is subtracted from each absorption spectrum obtained upon addition of ct-DNA to **3**, **3b<sup>4-MeO</sup>** and **3b<sup>4-Cl</sup>**.

#### 6-4. 結論

本章では, AscNa 存在下, **3**, **3b<sup>4-MeO</sup>** および **3b<sup>4-Cl</sup>** の還元的 O<sub>2</sub> 活性化を介した supercoiled plasmid pUC19 DNA の二本鎖切断(DNA double-strand breaks, dsb)による Form III 生成活性を詳細に調べた. 電子供与性基である MeO 基を持つ **3b<sup>4-MeO</sup>** は DNA dsb の burst を **3**, **3b<sup>4-Cl</sup>** に比べて増大させることを見出した. 速度論的, 分光学的, 電気化学的, 阻害, HO•生成および DNA との結合測定から, **3b<sup>4-MeO</sup>** の速い HO•生成および DNA 結合様式が, Form III 生成の burst を可能にする重要な特徴であることが明らかになった. MeO 基の電子効果により, **3b<sup>4-MeO</sup>** は還元的 O<sub>2</sub> 活性化における HO•の初期の生成量が多く, また DNA とより  $\Delta H^\circ$  が負に大きい結合を形成するため, 錯体低濃度においても高い Form III 生成活性を示した. これらの結果は, 遺伝子編集や治療への応用に有用な DNA 二本鎖切断剤の開発に新たな方法論を提供する可能性がある.

## 6-5. 実験方法

### 6-5-1. 試薬

試薬については、合成中間体や錯体を除き、高純度製品を和光純薬工業、東京化成、シグマアルドリッチ社製から選択して購入した。溶媒については、合成に用いるものは必要に応じて乾燥蒸留した。スーパーコイルドプラスミド pUC19 DNA は、ニッポンジーン社から購入した試薬を使用した。仔ウシ胸腺由来のデオキシリボ核酸ナトリウム塩 (type I, fibers) (ct-DNA) は Sigma-Aldrich から購入した。33 mer oligo DNA 5'-d(GAC TCC ACA GTG CAT ACG TGG GCT CCA ACA GGT)-3' とその相補鎖を Thermo Fisher Scientific から購入し、アニーリングすることで 33 mer 二本鎖 DNA にした。**3** は既報の論文<sup>[25]</sup>に、**3b**<sup>4-MeO</sup> および **3b**<sup>4-Cl</sup> は第四章 4-5-3 に従って合成した。

### 6-5-2. 測定装置

元素分析(C, H, N)は、Perkin-Elmer 社製 Elemental Analyzer 2400 II を用いて測定した。UV-vis 吸収スペクトルは、Agilent 社製 8454 紫外可視分光光度計を用いて測定した。pH 測定は、HORIBA 製 LAQUA electrode を標準緩衝液で校正した後に測定した。Electron spray ionization MS (ESI MS) 及び Cold spray ionization MS (CSI MS) スペクトルは、日本電子製 JMS-T100CSR the AccuTOF CS を用いて、MeOH, MeCN または H<sub>2</sub>O を溶媒として測定した。赤外線(IR)スペクトルは、SHIMADZU Single Reflection HATR IRAffinity-1 MIRacle 10 で測定した。<sup>1</sup>H NMR スペクトルは、日本電子製 ECA-500RX フーリエ変換核磁気共鳴装置(500 MHz)を使用し、基準物質として tetramethylsilane (TMS) または sodium 3-(trimethylsilyl)propionate-2,2,3,3-*d*<sub>4</sub> (TSP) を用いて測定した。蛍光スペクトルは、HITACHI Spectral fluorometer F-7000 で測定した。蛍光スペクトルは、HITACHI Spectral fluorometer F-7000 で測定した。等温滴定型熱量(ITC)測定は、Malvern 社製 MicroCal Isothermal Titration Calorimeter VP-ITC を用いて行った。CD スペクトルは、日本分光製 J-820 円偏光二色性分光光度計を用いて測定した。

### 6-5-3. DNA 切断実験

**3b**<sup>4-MeO</sup> および **3b**<sup>4-Cl</sup> の DNA 切断活性は、pUC19 DNA を用い、アガロースゲル電気泳動法によって評価した。1.5 mL エッペンチューブに NaCl (10 mM), buffer (pH 6.0 (MES) または pH 7.4 (MOPS)), 10 mM), pUC19 DNA (50 μM bp), Cu(OAc)<sub>2</sub> (70 μM), **3b**<sup>4-MeO</sup> または **3b**<sup>4-Cl</sup> (0–50 μM), AscNa (0–150 μM) となるように調製した溶液を加え、37°C の暗所でインキュベーションした。0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 60 分毎にサンプルを採取し、

loading buffer (0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol FF, 1.0 mM EDTA and 30% glycerol)を用いて反応をクエンチした. 各サンプルを TAE buffer (Tris/acetate/EDTA)を用いて作成した 1%アガロースゲルにローディングし, 100 V で約 1 時間電気泳動を行った. その後, EtBr ( $0.5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ )染色を 1 時間行い, VILBER LOURMAT E-BOX-CX5.TS Edge-20.M を用いてゲルバンドを撮影した. 撮影したバンドを, Form I の染色補正值 1.06 を用い, ImageJ ソフトウェアによって解析を行った. この測定は最低 3 回行い, 再現性をとった.

阻害剤存在下における  $3\mathbf{b}^{4\text{-MeO}}$  および  $3\mathbf{b}^{4\text{-Cl}}$  の DNA 切断活性では, 1.5 mL エッペンチューブに NaCl (10 mM), buffer (pH 6.0 (MES), 10 mM), pUC19 DNA (50  $\mu\text{M}$  bp), Cu(OAc)<sub>2</sub> (70  $\mu\text{M}$ ),  $3\mathbf{b}^{4\text{-MeO}}$  または  $3\mathbf{b}^{4\text{-Cl}}$  (30  $\mu\text{M}$ ), AscNa (150  $\mu\text{M}$ ), 阻害剤 DMSO (1–10 mM)となるように調製した溶液を用いて, 前述の阻害剤非存在下と同様の操作を行うことで評価した.

#### 6-5-4. $3\mathbf{b}^{4\text{-Cl}}$ の Cyclic Voltammetry (CV)測定

200 mM Buffer 溶液(pH 7.4 (MOPS), 10 mL), 2 mM NaOAc に  $3\mathbf{b}^{4\text{-Cl}}$  が 0.5 mM となるように溶液を調製した. この溶液に水系参照電極 (Ag/AgCl), 作用電極として glassy carbon, 対極として Pt wire を浸し, 窒素を 10 分間バブリングした後, CV 測定を行った. なお, 測定感度は 10  $\mu\text{A/V}$ , 掃引速度は 10  $\text{mV s}^{-1}$  で行った.

#### 6-5-5. coumarin を用いた HO $\cdot$ 生成の検出

3,  $3\mathbf{b}^{4\text{-MeO}}$  および  $3\mathbf{b}^{4\text{-Cl}}$  (30  $\mu\text{M}$ ), coumarin (0.5 mM), NaCl (10 mM)の Buffer 溶液(pH 6.0 (MES), 10 mM)を 4 面セルに加え,  $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$  に保った. この溶液に AscNa 水溶液を 150  $\mu\text{M}$  になるように加え, 励起波長 332 nm での 452 nm の蛍光強度を 60 分間, スリット幅 5.0 nm で測定した.

#### 6-5-6. 等温滴定型熱量(ITC)測定

セルに, 33 mer オリゴ二重鎖 DNA (18.75  $\mu\text{M}$ ), Buffer (pH6.0 (MES), 10 mM), NaCl (10 mM)となるように調製した溶液を加えた. シリンジには,  $3\mathbf{b}^{4\text{-MeO}}$  および  $3\mathbf{b}^{4\text{-Cl}}$  (1.0 mM), Buffer (pH6.0 (MES), 10 mM), NaCl (10 mM)の溶液を加えた.  $37^\circ\text{C}$  において DNA 溶液に各錯体溶液を 28 回(10  $\mu\text{L}$ /回)加え, その際に発生する熱量を測定した. 得られたデータから希釈熱を引き, ORIGIN ソフトウェアを用いて解析した.

#### 6-5-7. ct-DNA 存在下での Circular Dichroism (CD)スペクトル測定

ct-DNA (50  $\mu\text{M}$  bp), NaCl (10 mM)の Buffer 溶液 (pH 6.0 (MES), 10 mM)を 2 面セルに加え,  $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$  に保った. この溶液に **3**, **3b<sup>4-MeO</sup>**, **3b<sup>4-Cl</sup>** および **5** の水溶液を 0–100  $\mu\text{M}$  まで順に加え, 各錯体濃度での CD スペクトルを測定した.

#### 6-5-8. ct-DNA 存在下での **3**, **3b<sup>4-MeO</sup>** および **3b<sup>4-Cl</sup>** の電子スペクトル測定

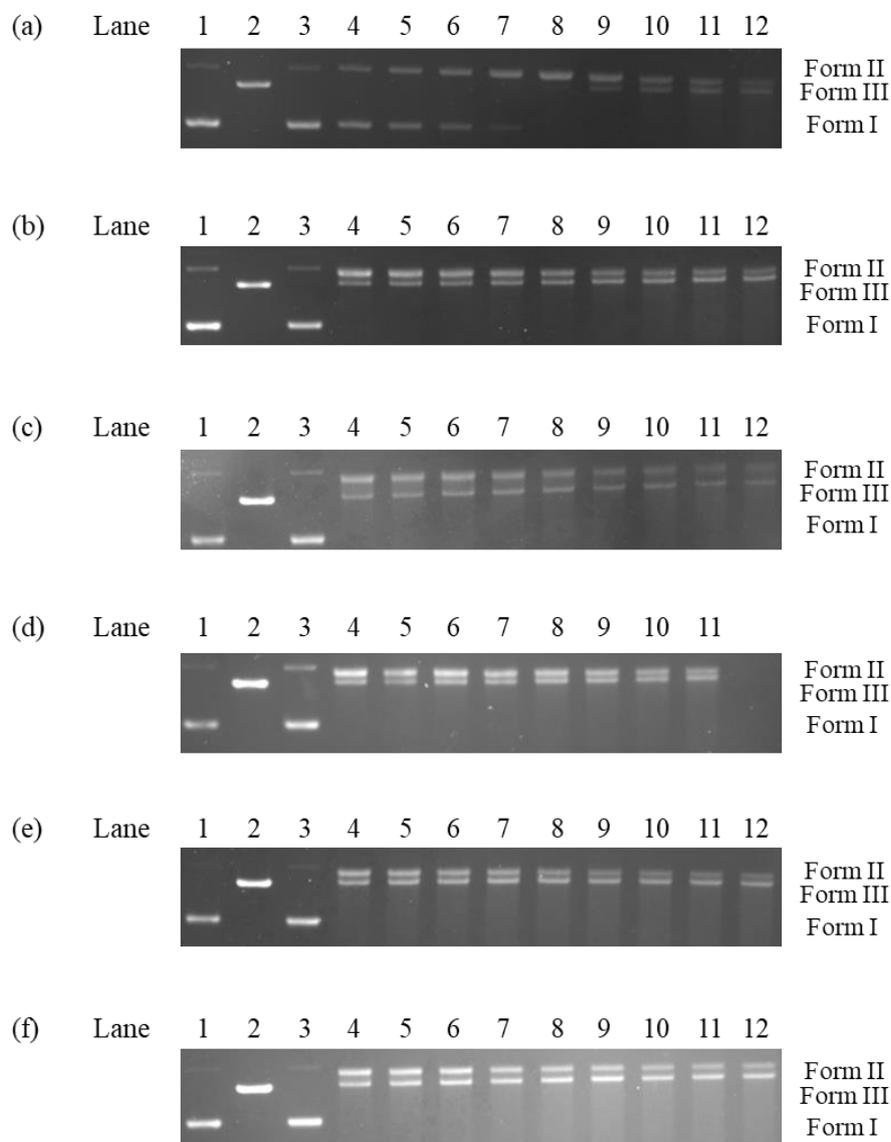
**3**, **3b<sup>4-MeO</sup>** および **3b<sup>4-Cl</sup>** (10  $\mu\text{M}$ ), NaCl (10 mM)の Buffer 溶液(pH 6.0 (MES), 10 mM)を 2 面セルに加え,  $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$  に保った. この溶液に ct-DNA 水溶液を 30  $\mu\text{M}$  bp 毎に 150  $\mu\text{M}$  bp まで添加し, 300–1000 nm の範囲で各スペクトルを測定した.

## 6-6. 参考文献

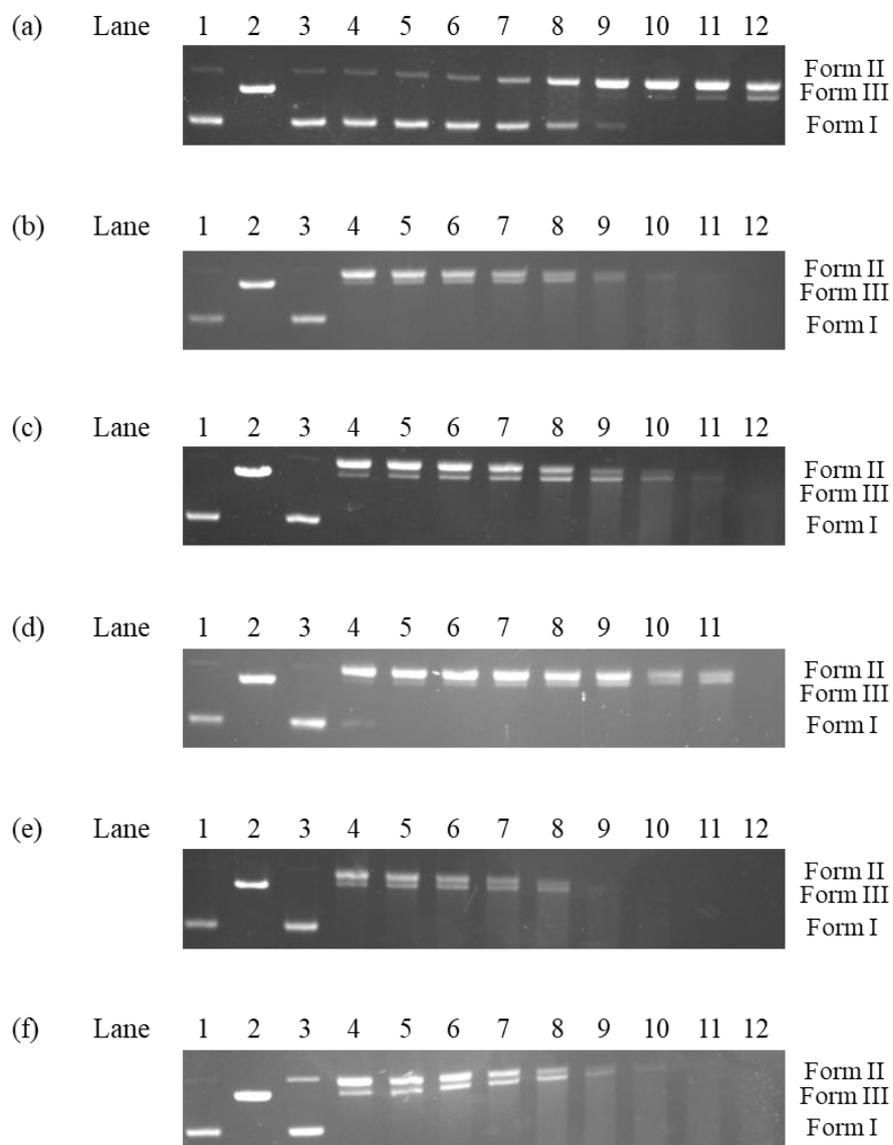
- [1] (a) M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, E. Charpentier, *Science*. **2012**, 337, 816–21. (b) C.-S. Wang, C.-H. Chang, T.-Y. Tzeng, A. M.-Y. Lin, and Y.-L. Lo, *Nanoscale Horiz.*, **2021**, 6, 729–743.
- [2] A. Ciccica, S. J. Elledge, *Mol. Cell* **2010**, 40(2), 179–204.
- [3] J. P. McNally, S.H. Millen, V. Chaturvedi, N. Lakes, C.E. Terrell, E.E. Elfers, K.R. Carroll, S.P. Hogan, P.R. Andreassen, J. Kanter, C. E. Allen, M. M. Henry, J. N. Greenberg, S. Ladisch, M. L. Hermiston, M. Joyce, D. A. Hildeman, J. D. Katz, M. B. Jordan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, 114(24), E4782–E4791.
- [4] U. S. Srinivasa, B. W. Q. Tan, B. A. Vellayappan, A. D. Jeyasekharan, *Redox Biology* **2019**, 25, 101084.
- [5] H. Yang, S. Ren, S. Yu, H. Pan, T. Li, S. Ge, J. Zhang, N. Xia, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21(18), 6461.
- [6] E. Bolderson, D. J. Richard, B. B. S. Zhou, K. K. Khanna, *Clin Cancer Res.* **2009**, 15(20), 6314.
- [7] N. J. Curtin, *Nat. Rev. Cancer* **2012**, 12(12), 801–817.
- [8] Roelfes, G. et al., *Chem. Commun.* **2007**, 2, 180–182.
- [9] (a) Y. Zhao, et. al., *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 6621–6629. (b) P. U. Maheswari, et. al., *Inorg. Chem.* **2008**, 47, 3719–3727. (c) C. Lüdtkke, et. al., *Chem. Eur. J.* **2021**, 27, 3273. (d) Q. Pena, et. al. *Inorg. Chem.* **2021**, 60, 2939–2952.
- [10] W. Wang, Y. A. Lee, G. Kim, S. K. Kim, G. Y. Lee, J. Kim, Y. Kim, G. J. Park, C. Kim, *J. Inorg. Biochem.* **2015**, 153, 143–149.
- [11] M. Hata, Y. Kadoya, Y. Hitomi, M. Kodera, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2022**, 95, 1546–1552.
- [12] S. Torelli, C. Belle, I. Gautier-Luneau, J. L. Pierre, E. Sain-Aman, J. M. Latour, L. L. Pape, L. D. Luneau, *Inorg. Chem.* **2000**, 39, 3526.
- [13] D. Freifelder, B. Trumbo, *Biopolymers*, **1969**, 7, 681.
- [14] S. Kim, J. W. Ginsbach, J. Y. Lee, R. L. Peterson, J. J. Liu, M. A. Siegler, A. A. Sarjeant, E. I. Solomon, K. D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 2867.
- [15] Y. Nosaka, A. Y. Nosaka, *Chem. Rev.* **2017**, 117, 11302.
- [16] S. Lechnitz, J. Heinrich, N. Kulak, *Chem. Commun.* **2018**, 54, 13411.
- [17] X. Dong, X. Wang, M. Lin, H. Sun, X. Yang, Z. Promotive, *Inorg. Chem.* **2010**, 49, 2541.
- [18] O. I. Aruoma, B. Halliwell, M. Dizdaroglu, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 13024.

- [19] A. Erxleben, *Coord. Chem. Rev.*, **2018**, *360*, 92.
- [20] M. Kodera, Y. Kadoya, K. Fukui, A. Nomura, Y. Hitomi, H. Kitagishi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2019**, *92*, 739.
- [21] M. Anamika, C. Sankar, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 5226–5233.
- [22] K. Karidi, A. Garoufis, N. Hadjiliadis, J. Reedijk, *Dalton Trans.* **2005**, *60*, 728–734.
- [23] X. B. Fu, D. D. Liu, Y. Lin, W. Hu, Z. W. Mao, X. Y. Le, *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 8721.
- [24] S. Mahadevan, M. Palaniandavar, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 693.
- [25] Y. Kadoya, M. Hata, Y. Tanaka, A. Hirohata, Y. Hitomi, M. Kodera, *Inorg. Chem.* **2021**, *60*, 5474.

## 6-7. Supporting Information



**Figure S6-1.** Agarose gel electrophoresis profiles upon reaction of pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp) with  $3b^{4-MeO}$  (10–50  $\mu$ M) and AscNa (150  $\mu$ M) at pH 6.0. (a)–(f) correspond to  $[3b^{4-MeO}]$  of 10, 20, 30, 30, 40, and 50  $\mu$ M, respectively. (a)–(c), (e)–(f) Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively. (d) Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–11: corresponded to the time of 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 5, and 10 min, respectively.



**Figure S6-2.** Agarose gel electrophoresis profiles upon reaction of pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp) with  $3b^{4-Cl}$  (10–50  $\mu$ M) and AscNa (150  $\mu$ M) at pH 6.0. (a)–(f) correspond to  $[3b^{4-Cl}]$  of 10, 20, 30, 30, 40, and 50  $\mu$ M, respectively. (a)–(c), (e)–(f) Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively. (d) Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–11: corresponded to the time of 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 5, and 10 min, respectively.

**Table S6-1. Fraction of Form I, Form II, and Form III in the DNA cleavage of 3b<sup>4-MeO</sup> (0–50  $\mu$ M) and AscNa (150  $\mu$ M).**

Complex ( $\mu$ M)	AscNa ( $\mu$ M)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
0	150	0	92.7 $\pm$ 0.1	7.3 $\pm$ 0.1	-
		1	92.6 $\pm$ 0.0	7.4 $\pm$ 0.0	-
		2	91.4 $\pm$ 0.4	8.6 $\pm$ 0.4	-
		3	91.3 $\pm$ 0.5	8.7 $\pm$ 0.5	-
		5	91.0 $\pm$ 0.4	9.0 $\pm$ 0.4	-
		10	88.8 $\pm$ 1.5	11.2 $\pm$ 1.5	-
		20	87.2 $\pm$ 1.0	12.8 $\pm$ 1.0	-
		30	86.2 $\pm$ 1.8	13.8 $\pm$ 1.8	-
		40	85.2 $\pm$ 1.0	14.8 $\pm$ 1.0	-
		60	77.1 $\pm$ 1.0	22.9 $\pm$ 1.0	-
10	150	0	91.7 $\pm$ 0.4	8.3 $\pm$ 0.4	-
		1	72.1 $\pm$ 1.1	27.9 $\pm$ 1.1	-
		2	56.7 $\pm$ 3.3	43.3 $\pm$ 3.3	-
		3	41.0 $\pm$ 3.6	59.0 $\pm$ 3.6	-
		5	13.7 $\pm$ 2.4	86.3 $\pm$ 2.4	-
		10	0.0 $\pm$ 0.0	98.4 $\pm$ 0.8	1.6 $\pm$ 0.8
		20	0.0 $\pm$ 0.0	87.9 $\pm$ 4.5	12.1 $\pm$ 4.5
		30	0.0 $\pm$ 0.0	69.6 $\pm$ 4.3	30.4 $\pm$ 4.3
		40	0.0 $\pm$ 0.0	54.9 $\pm$ 2.9	45.1 $\pm$ 2.9
		60	0.0 $\pm$ 0.0	41.0 $\pm$ 0.4	59.0 $\pm$ 0.4
20	150	0	87.8 $\pm$ 3.2	12.2 $\pm$ 3.2	-
		1	0.0 $\pm$ 0.0	77.8 $\pm$ 4.0	22.2 $\pm$ 4.0
		2	0.0 $\pm$ 0.0	72.1 $\pm$ 4.5	27.9 $\pm$ 4.5
		3	0.0 $\pm$ 0.0	68.5 $\pm$ 3.4	31.5 $\pm$ 3.4
		5	0.0 $\pm$ 0.0	64.5 $\pm$ 3.7	35.5 $\pm$ 3.7
		10	0.0 $\pm$ 0.0	55.9 $\pm$ 2.2	44.1 $\pm$ 2.2
		20	0.0 $\pm$ 0.0	48.5 $\pm$ 1.5	51.5 $\pm$ 1.5
		30	0.0 $\pm$ 0.0	45.3 $\pm$ 2.0	54.7 $\pm$ 2.0
		40	0.0 $\pm$ 0.0	40.0 $\pm$ 2.6	60.0 $\pm$ 2.6
		60	0.0 $\pm$ 0.0	34.0 $\pm$ 2.3	66.0 $\pm$ 2.3

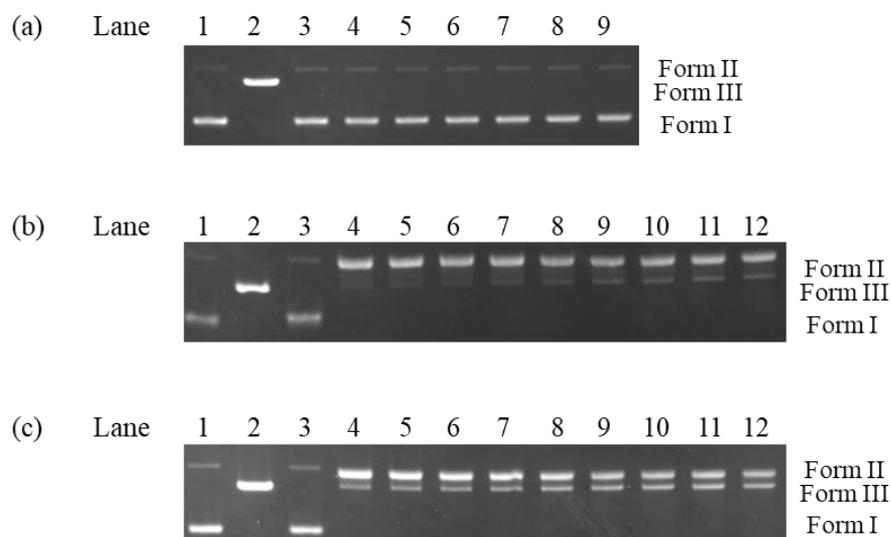
30	150	0	$92.8 \pm 4.2$	$7.2 \pm 4.2$	-
		0.25	$0.0 \pm 0.0$	$83.7 \pm 4.9$	$16.3 \pm 4.9$
		0.5	$0.0 \pm 0.0$	$78.4 \pm 3.5$	$21.6 \pm 3.5$
		0.75	$0.0 \pm 0.0$	$74.2 \pm 2.2$	$25.8 \pm 2.2$
		1	$0.0 \pm 0.0$	$71.9 \pm 4.5$	$28.1 \pm 4.5$
		2	$0.0 \pm 0.0$	$68.1 \pm 3.9$	$31.9 \pm 3.9$
		3	$0.0 \pm 0.0$	$64.4 \pm 3.6$	$35.6 \pm 3.6$
		5	$0.0 \pm 0.0$	$58.7 \pm 2.9$	$41.3 \pm 2.9$
		10	$0.0 \pm 0.0$	$50.8 \pm 4.1$	$49.2 \pm 4.1$
		20	$0.0 \pm 0.0$	$45.4 \pm 3.6$	$54.6 \pm 3.6$
		30	$0.0 \pm 0.0$	$42.6 \pm 3.5$	$57.4 \pm 3.5$
		40	$0.0 \pm 0.0$	$38.4 \pm 3.8$	$61.6 \pm 3.8$
		60	$0.0 \pm 0.0$	$34.9 \pm 4.6$	$65.5 \pm 4.2$
40	150	0	$96.1 \pm 1.2$	$3.9 \pm 1.2$	-
		1	$0.0 \pm 0.0$	$62.4 \pm 2.7$	$37.6 \pm 2.7$
		2	$0.0 \pm 0.0$	$59.3 \pm 2.9$	$40.7 \pm 2.9$
		3	$0.0 \pm 0.0$	$54.4 \pm 1.6$	$45.6 \pm 1.6$
		5	$0.0 \pm 0.0$	$47.9 \pm 2.7$	$52.1 \pm 2.7$
		10	$0.0 \pm 0.0$	$43.0 \pm 1.3$	$57.0 \pm 1.3$
		20	$0.0 \pm 0.0$	$34.9 \pm 1.9$	$65.1 \pm 1.9$
		30	$0.0 \pm 0.0$	$34.5 \pm 1.1$	$65.5 \pm 1.1$
		40	$0.0 \pm 0.0$	$34.4 \pm 2.3$	$65.6 \pm 2.3$
		60	$0.0 \pm 0.0$	$33.4 \pm 3.6$	$66.6 \pm 3.6$
50	150	0	$96.8 \pm 0.8$	$3.2 \pm 0.8$	-
		1	$0.0 \pm 0.0$	$64.6 \pm 1.9$	$35.4 \pm 1.9$
		2	$0.0 \pm 0.0$	$59.7 \pm 2.8$	$40.3 \pm 2.8$
		3	$0.0 \pm 0.0$	$54.3 \pm 0.9$	$45.7 \pm 0.9$
		5	$0.0 \pm 0.0$	$48.2 \pm 1.4$	$51.8 \pm 1.4$
		10	$0.0 \pm 0.0$	$42.4 \pm 2.5$	$57.6 \pm 2.5$
		20	$0.0 \pm 0.0$	$35.9 \pm 2.8$	$64.1 \pm 2.8$
		30	$0.0 \pm 0.0$	$33.4 \pm 3.4$	$66.6 \pm 3.4$
		40	$0.0 \pm 0.0$	$30.7 \pm 2.8$	$69.3 \pm 2.8$
		60	$0.0 \pm 0.0$	$29.0 \pm 0.9$	$71.0 \pm 0.9$

**Table S6-2. Fraction of Form I, Form II, and Form III in the DNA cleavage of 3b<sup>4-Cl</sup> (0–50  $\mu$ M) and AscNa (150  $\mu$ M).**

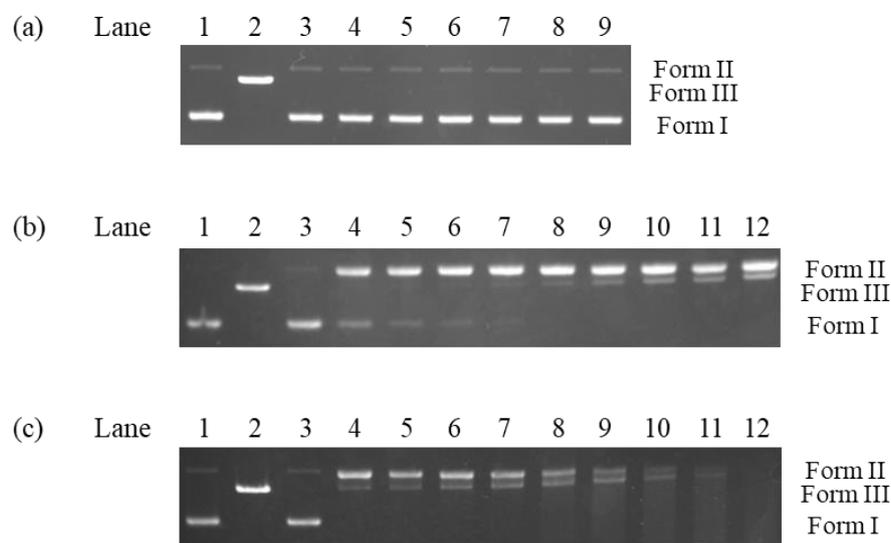
Complex ( $\mu$ M)	AscNa ( $\mu$ M)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
10	150	0	92.3 $\pm$ 0.3	7.7 $\pm$ 0.3	-
		1	61.2 $\pm$ 0.2	38.8 $\pm$ 0.2	-
		2	45.4 $\pm$ 0.8	54.6 $\pm$ 0.8	-
		3	31.5 $\pm$ 0.3	68.5 $\pm$ 0.3	-
		5	12.4 $\pm$ 3.9	87.6 $\pm$ 3.9	-
		10	0.3 $\pm$ 0.5	98.1 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.2
		20	0.0 $\pm$ 0.0	85.7 $\pm$ 1.3	14.3 $\pm$ 1.3
		30	0.0 $\pm$ 0.0	63.2 $\pm$ 3.3	36.8 $\pm$ 3.3
		40	0.0 $\pm$ 0.0	41.9 $\pm$ 4.9	58.1 $\pm$ 4.9
		60	n. d.*	n. d.*	n. d.*
20	150	0	95.3 $\pm$ 2.0	4.7 $\pm$ 2.0	-
		1	0.0 $\pm$ 0.0	90.6 $\pm$ 3.7	9.4 $\pm$ 3.7
		2	0.0 $\pm$ 0.0	81.1 $\pm$ 4.1	18.9 $\pm$ 4.1
		3	0.0 $\pm$ 0.0	75.4 $\pm$ 2.2	24.6 $\pm$ 2.2
		5	0.0 $\pm$ 0.0	66.3 $\pm$ 2.9	33.7 $\pm$ 2.9
		10	0.0 $\pm$ 0.0	48.7 $\pm$ 4.5	51.3 $\pm$ 4.5
		20	0.0 $\pm$ 0.0	36.6 $\pm$ 0.2	63.4 $\pm$ 0.2
		30	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		40	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		60	n. d.*	n. d.*	n. d.*

30	150	0	95.0 ± 2.4	5.0 ± 2.4	-
		0.25	3.8 ± 1.4	94.1 ± 1.3	2.1 ± 0.4
		0.5	0.0 ± 0.0	95.5 ± 1.1	4.5 ± 1.1
		0.75	0.0 ± 0.0	92.8 ± 1.8	7.2 ± 1.8
		1	0.0 ± 0.0	88.4 ± 4.9	11.6 ± 4.9
		2	0.0 ± 0.0	79.1 ± 4.6	20.9 ± 4.6
		3	0.0 ± 0.0	73.7 ± 3.7	26.3 ± 3.7
		5	0.0 ± 0.0	63.7 ± 3.2	36.3 ± 3.2
		10	0.0 ± 0.0	47.7 ± 3.6	52.3 ± 3.6
		20	0.0 ± 0.0	35.9 ± 1.5	64.1 ± 1.5
		30	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		40	n. d.*	n. d.*	n. d.*
60	n. d.*	n. d.*	n. d.*		
40	150	0	97.8 ± 0.6	2.2 ± 0.6	-
		1	0.0 ± 0.0	87.7 ± 3.4	12.3 ± 3.4
		2	0.0 ± 0.0	79.4 ± 4.0	20.6 ± 4.0
		3	0.0 ± 0.0	72.1 ± 4.0	27.9 ± 4.0
		5	0.0 ± 0.0	58.6 ± 1.9	41.4 ± 1.9
		10	0.0 ± 0.0	44.8 ± 1.9	55.2 ± 1.9
		20	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		30	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		40	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		60	n. d.*	n. d.*	n. d.*
50	150	0	93.5 ± 3.5	6.5 ± 3.5	-
		1	0.0 ± 0.0	83.0 ± 1.1	17.0 ± 1.1
		2	0.0 ± 0.0	75.7 ± 3.0	24.3 ± 3.0
		3	0.0 ± 0.0	63.8 ± 4.2	36.2 ± 4.2
		5	0.0 ± 0.0	56.5 ± 1.4	43.5 ± 1.4
		10	0.0 ± 0.0	41.2 ± 4.4	58.8 ± 4.4
		20	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		30	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		40	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		60	n. d.*	n. d.*	n. d.*

\*n. d. means cannot determine.



**Figure S6-3.** Agarose gel electrophoresis profiles upon reaction of pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp) with **3b**<sup>4-MeO</sup> (30  $\mu$ M) and AscNa (0–100  $\mu$ M) at pH 6.0. (a)–(c) correspond to [AscNa] of 0, 50, and 100  $\mu$ M, respectively. (a) Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–9: corresponded to the time of 0, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively. (b)–(c) Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively.



**Figure S6-4.** Agarose gel electrophoresis profiles upon reaction of pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp) with **3b**<sup>4-Cl</sup> (30  $\mu$ M) and AscNa (0–100  $\mu$ M) at pH 6.0. (a)–(c) correspond to [AscNa] of 0, 50, and 100  $\mu$ M, respectively. (a) Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–9: corresponded to the time of 0, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively. (b)–(c) Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively.

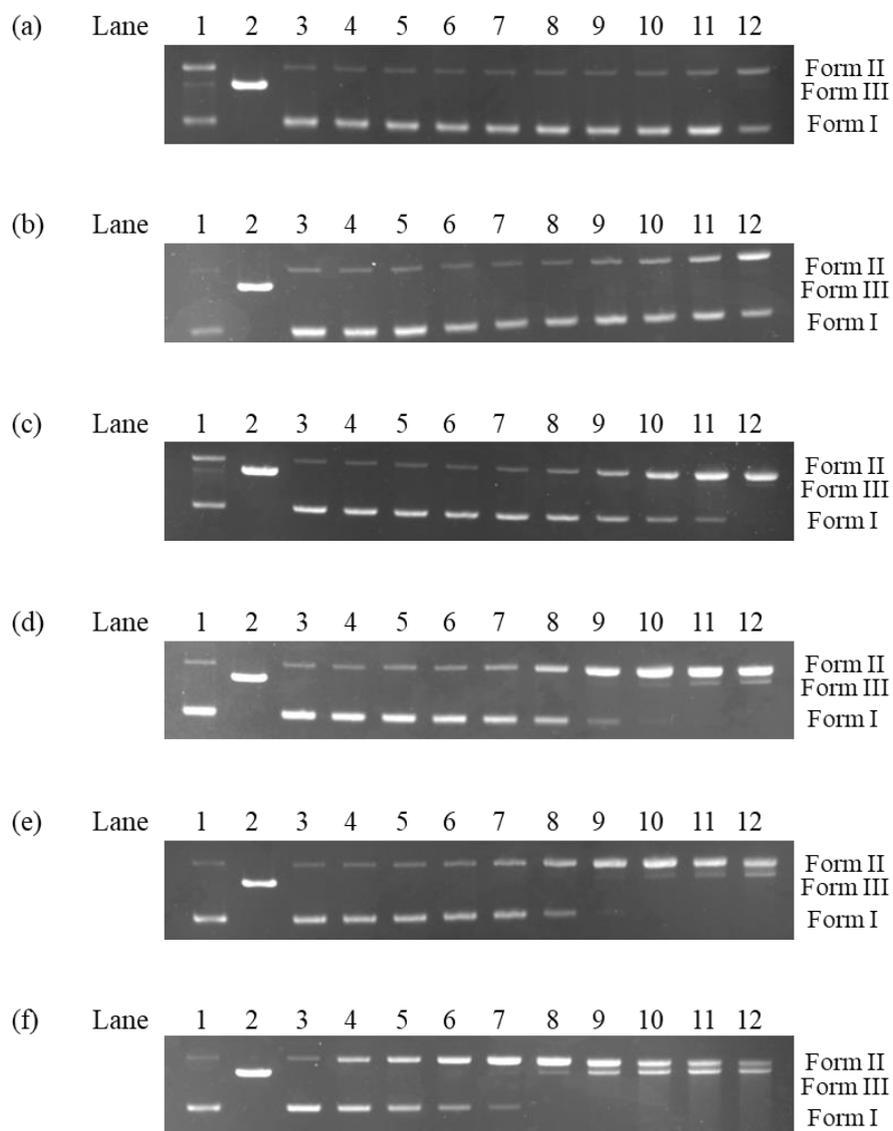
**Table S6-3. Fraction of Form I, Form II, and Form III in the DNA cleavage of 3b<sup>4-MeO</sup> (30  $\mu$ M) and AscNa (0–100  $\mu$ M).**

<b>Complex (<math>\mu</math>M)</b>	<b>AscNa (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Time (min)</b>	<b>Form I (%)</b>	<b>Form II (%)</b>	<b>Form III (%)</b>
30	0	0	92.2 $\pm$ 0.4	7.8 $\pm$ 0.4	-
		5	91.7 $\pm$ 0.3	8.3 $\pm$ 0.3	-
		10	91.2 $\pm$ 0.1	8.8 $\pm$ 0.1	-
		20	90.7 $\pm$ 0.3	9.3 $\pm$ 0.3	-
		30	90.6 $\pm$ 0.3	9.4 $\pm$ 0.3	-
		40	90.3 $\pm$ 0.4	9.7 $\pm$ 0.4	-
		60	90.0 $\pm$ 0.6	10.0 $\pm$ 0.6	-
30	50	0	87.7 $\pm$ 1.3	12.3 $\pm$ 1.3	-
		1	0.0 $\pm$ 0.0	99.3 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1
		2	0.0 $\pm$ 0.0	98.7 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.2
		3	0.0 $\pm$ 0.0	96.8 $\pm$ 0.7	3.2 $\pm$ 0.7
		5	0.0 $\pm$ 0.0	96.1 $\pm$ 0.9	3.9 $\pm$ 0.9
		10	0.0 $\pm$ 0.0	93.6 $\pm$ 1.5	6.4 $\pm$ 1.5
		20	0.0 $\pm$ 0.0	89.6 $\pm$ 1.7	10.4 $\pm$ 1.7
		30	0.0 $\pm$ 0.0	89.2 $\pm$ 1.5	10.8 $\pm$ 1.5
		40	0.0 $\pm$ 0.0	88.8 $\pm$ 1.8	11.2 $\pm$ 1.8
60	0.0 $\pm$ 0.0	88.2 $\pm$ 1.8	11.8 $\pm$ 1.8		
30	100	0	89.3 $\pm$ 0.8	10.7 $\pm$ 0.8	-
		1	0.0 $\pm$ 0.0	91.3 $\pm$ 0.5	8.7 $\pm$ 0.5
		2	0.0 $\pm$ 0.0	87.4 $\pm$ 1.7	12.6 $\pm$ 1.7
		3	0.0 $\pm$ 0.0	85.5 $\pm$ 1.3	14.5 $\pm$ 1.3
		5	0.0 $\pm$ 0.0	82.7 $\pm$ 1.5	17.3 $\pm$ 1.5
		10	0.0 $\pm$ 0.0	75.5 $\pm$ 2.2	24.5 $\pm$ 2.2
		20	0.0 $\pm$ 0.0	73.9 $\pm$ 1.5	26.1 $\pm$ 1.5
		30	0.0 $\pm$ 0.0	72.7 $\pm$ 1.1	27.3 $\pm$ 1.1
		40	0.0 $\pm$ 0.0	70.3 $\pm$ 1.3	29.7 $\pm$ 1.3
60	0.0 $\pm$ 0.0	69.0 $\pm$ 0.6	31.0 $\pm$ 0.6		

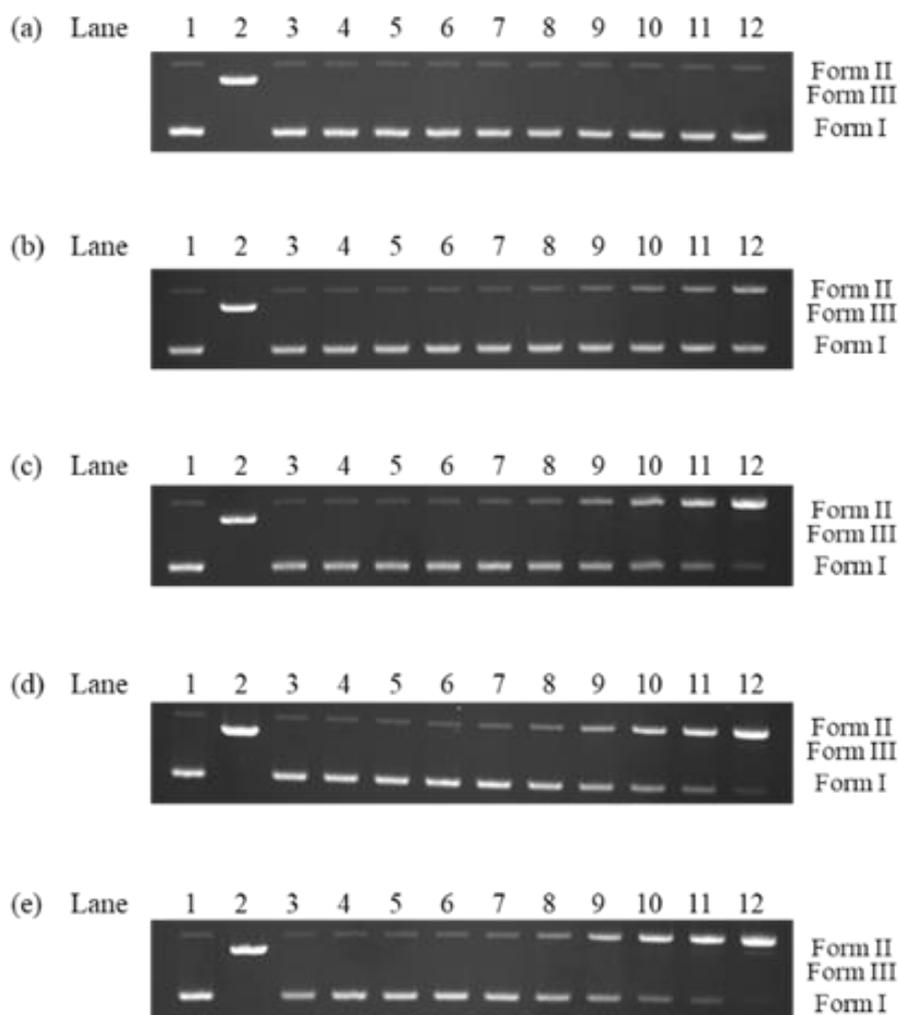
**Table S6-4. Fraction of Form I, Form II, and Form III in the DNA cleavage of 3b<sup>4-Cl</sup> (30 μM) and AscNa (0–100 μM).**

Complex (μM)	AscNa (μM)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
30	0	0	93.3 ± 0.3	6.7 ± 0.3	-
		5	92.7 ± 0.1	7.3 ± 0.1	-
		10	92.3 ± 0.3	7.7 ± 0.3	-
		20	91.9 ± 0.2	8.1 ± 0.2	-
		30	91.7 ± 0.4	8.3 ± 0.4	-
		40	91.6 ± 0.3	8.4 ± 0.3	-
		60	90.8 ± 0.7	9.2 ± 0.7	-
30	50	0	96.1 ± 0.6	3.9 ± 0.6	0 ± 0
		1	24.0 ± 2.3	76.0 ± 2.3	0 ± 0
		2	12.7 ± 2.8	87.3 ± 2.8	0 ± 0
		3	8.2 ± 1.9	91.8 ± 1.9	0 ± 0
		5	4.6 ± 0.6	95.4 ± 0.6	0 ± 0
		10	0 ± 0	98.5 ± 0.4	1.5 ± 0.4
		20	0 ± 0	95.5 ± 1.1	4.5 ± 1.1
		30	0 ± 0	92.5 ± 1	7.5 ± 1.0
		60	0 ± 0	79.9 ± 1.1	20.1 ± 1.1
30	100	0	92.8 ± 0.6	7.2 ± 0.6	-
		1	0.0 ± 0.0	94.4 ± 1.9	5.6 ± 1.9
		2	0.0 ± 0.0	89.8 ± 3.1	10.2 ± 3.1
		3	0.0 ± 0.0	84.7 ± 2.2	15.3 ± 2.2
		5	0.0 ± 0.0	76.6 ± 3.3	23.4 ± 3.3
		10	0.0 ± 0.0	63.3 ± 0.4	36.7 ± 0.4
		20	0.0 ± 0.0	43.6 ± 1.4	56.4 ± 1.4
		30	0.0 ± 0.0	27.0 ± 3.2	73.0 ± 3.2
		40	n. d.*	n. d.*	n. d.*
60	n. d.*	n. d.*	n. d.*		

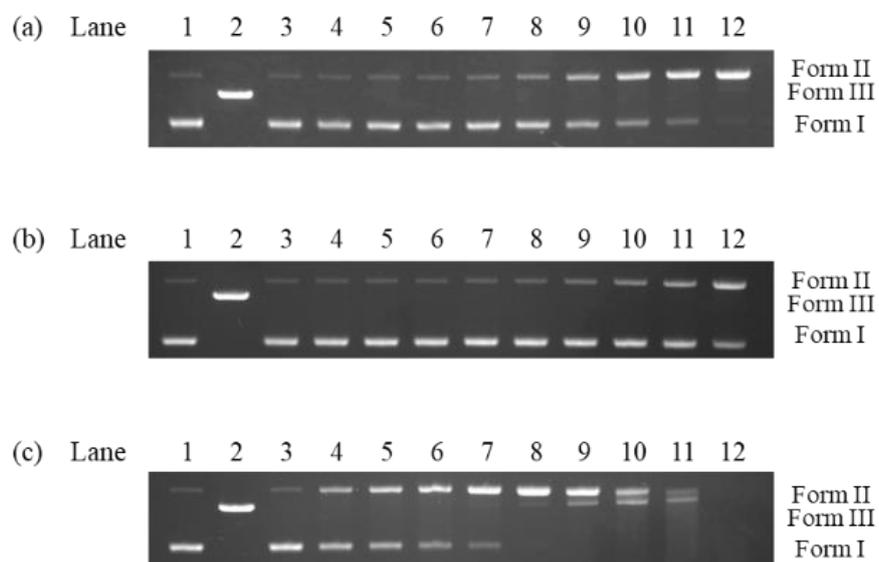
\*n. d. means cannot determine.



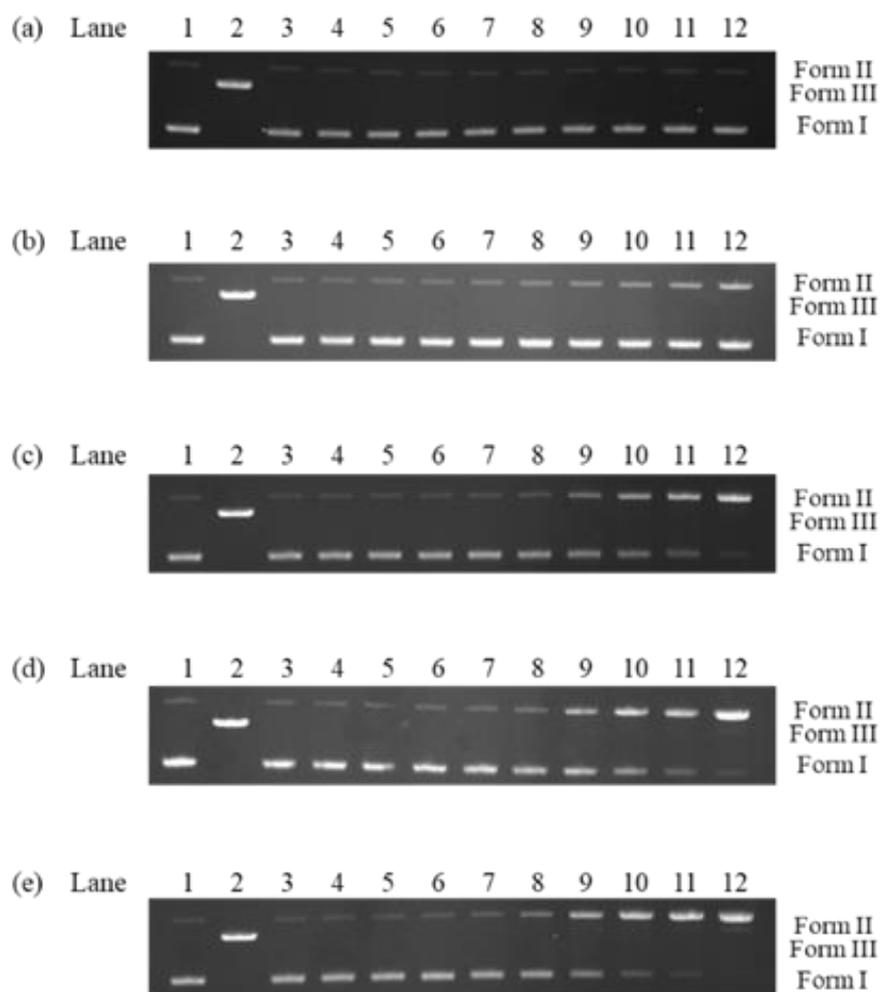
**Figure S6-5.** Agarose gel electrophoresis profiles upon reaction of pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp) with  $3b^{4-MeO}$  (0–10  $\mu$ M) and AscNa (50  $\mu$ M) at pH 6.0. (a)–(f) correspond to  $[3b^{4-MeO}]$  of 0, 2, 4, 6, 8, and 10  $\mu$ M, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively.



**Figure S6-6.** Agarose gel electrophoresis profiles upon reaction of pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp) with **3b**<sup>4-MeO</sup> (5  $\mu$ M) and AscNa (0–150  $\mu$ M) at pH 6.0. (a)–(e) correspond to [AscNa] of 0, 10, 30 50, 100, and 150  $\mu$ M, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively.



**Figure S6-7.** Agarose gel electrophoresis profiles upon reaction of pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp) with **3b**<sup>4-Cl</sup> (0–10  $\mu$ M) and AscNa (150  $\mu$ M) at pH 6.0. (a)–(c) correspond to [**3b**<sup>4-Cl</sup>] of 0, 2, 5, and 10  $\mu$ M, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively.



**Figure S6-8.** Agarose gel electrophoresis profiles upon reaction of pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp) with  $3b^{4-Cl}$  (5  $\mu$ M) and AscNa (0–150  $\mu$ M) at pH 6.0. (a)–(e) correspond to [AscNa] of 0, 10, 30 50, 100, and 150  $\mu$ M, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively.

**Table S6-5. Fraction of Form I, Form II, and Form III in the DNA cleavage of 3b<sup>4-MeO</sup> (0–10  $\mu$ M) and AscNa (50  $\mu$ M).**

Complex ( $\mu$ M)	AscNa ( $\mu$ M)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
0	50	0	90.6 $\pm$ 0.7	9.4 $\pm$ 0.7	-
		1	89.9 $\pm$ 1.1	10.1 $\pm$ 1.1	-
		2	89.4 $\pm$ 1.5	10.6 $\pm$ 1.5	-
		3	88.8 $\pm$ 1.5	11.2 $\pm$ 1.5	-
		5	87.7 $\pm$ 1.6	12.3 $\pm$ 1.6	-
		10	87.2 $\pm$ 0.5	12.8 $\pm$ 0.5	-
		20	87.1 $\pm$ 0.5	12.9 $\pm$ 0.5	-
		30	86.7 $\pm$ 1.5	13.3 $\pm$ 1.5	-
		40	84.2 $\pm$ 1.5	15.8 $\pm$ 1.5	-
		60	78.1 $\pm$ 1.0	21.9 $\pm$ 1.0	-
2	50	0	89.3 $\pm$ 0.6	10.7 $\pm$ 0.6	-
		1	88.9 $\pm$ 0.6	11.1 $\pm$ 0.6	-
		2	88.4 $\pm$ 0.5	11.6 $\pm$ 0.5	-
		3	87.8 $\pm$ 0.6	12.2 $\pm$ 0.6	-
		5	87.7 $\pm$ 0.5	12.3 $\pm$ 0.5	-
		10	84.8 $\pm$ 1.8	15.2 $\pm$ 1.8	-
		20	79.0 $\pm$ 0.7	21.0 $\pm$ 0.7	-
		30	70.8 $\pm$ 0.7	29.2 $\pm$ 0.7	-
		40	61.3 $\pm$ 0.9	38.7 $\pm$ 0.9	-
		60	34.0 $\pm$ 3.9	66.0 $\pm$ 3.9	-
4	50	0	90.7 $\pm$ 1.1	9.3 $\pm$ 1.1	-
		1	89.3 $\pm$ 0.5	10.7 $\pm$ 0.5	-
		2	87.4 $\pm$ 1.4	12.6 $\pm$ 1.4	-
		3	87.2 $\pm$ 1.4	12.8 $\pm$ 1.4	-
		5	85.1 $\pm$ 0.7	14.9 $\pm$ 0.7	-
		10	76.9 $\pm$ 2.3	23.1 $\pm$ 2.3	-
		20	57.6 $\pm$ 4.5	42.4 $\pm$ 4.5	-
		30	37.4 $\pm$ 3.9	62.6 $\pm$ 3.9	-
		40	20.2 $\pm$ 4.3	79.8 $\pm$ 4.3	-
		60	2.3 $\pm$ 2.7	96.8 $\pm$ 2	0.9 $\pm$ 0.9

6	50	0	$87.2 \pm 3.2$	$12.8 \pm 3.2$	-
		1	$84.2 \pm 4.1$	$15.8 \pm 4.1$	-
		2	$82.7 \pm 0.9$	$17.3 \pm 0.9$	-
		3	$78.7 \pm 1.8$	$21.3 \pm 1.8$	-
		5	$66.9 \pm 3.0$	$33.1 \pm 3.0$	-
		10	$33.4 \pm 2.8$	$66.6 \pm 2.8$	-
		20	$8.3 \pm 4.7$	$91.1 \pm 4.1$	$0.6 \pm 0.8$
		30	$1.0 \pm 1.4$	$94.6 \pm 1.4$	$4.4 \pm 2.5$
		40	$0.0 \pm 0.0$	$93.3 \pm 2.7$	$6.7 \pm 2.7$
		60	$0.0 \pm 0.0$	$87.9 \pm 2.6$	$12.1 \pm 2.6$
8	50	0	$90.7 \pm 0.9$	$9.3 \pm 0.9$	-
		1	$81.7 \pm 2.7$	$18.3 \pm 2.7$	-
		2	$74.5 \pm 1.4$	$25.5 \pm 1.4$	-
		3	$65.6 \pm 1.3$	$34.4 \pm 1.3$	-
		5	$45.2 \pm 2.0$	$54.8 \pm 2.0$	-
		10	$9.2 \pm 0.1$	$90.8 \pm 0.1$	-
		20	$0.0 \pm 0.0$	$97.5 \pm 0.2$	$2.5 \pm 0.2$
		30	$0.0 \pm 0.0$	$93.4 \pm 0.7$	$6.6 \pm 0.7$
		40	$0.0 \pm 0.0$	$90.5 \pm 0.1$	$9.5 \pm 0.1$
		60	$0.0 \pm 0.0$	$83.4 \pm 1.3$	$16.6 \pm 1.3$
10	50	0	$88.1 \pm 0.8$	$11.9 \pm 0.8$	-
		1	$60.4 \pm 0.7$	$39.6 \pm 0.7$	-
		2	$37.3 \pm 1.9$	$62.7 \pm 1.9$	-
		3	$20.6 \pm 0.4$	$79.4 \pm 0.4$	-
		5	$4.4 \pm 0.1$	$95.6 \pm 0.1$	-
		10	$0.0 \pm 0.0$	$97.5 \pm 0.4$	$2.5 \pm 0.4$
		20	$0.0 \pm 0.0$	$93.3 \pm 0.1$	$6.7 \pm 0.1$
		30	$0.0 \pm 0.0$	$89.5 \pm 0.4$	$10.5 \pm 0.4$
		40	$0.0 \pm 0.0$	$87.1 \pm 1.0$	$12.9 \pm 1.0$
		60	$0.0 \pm 0.0$	$83.8 \pm 2.2$	$16.2 \pm 2.2$

**Table S6-6. Fraction of Form I, Form II, and Form III in the DNA cleavage of 3b<sup>4-MeO</sup> (5  $\mu$ M) and AscNa (0–150  $\mu$ M).**

Complex ( $\mu$ M)	AscNa ( $\mu$ M)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
5	0	0	92.2 $\pm$ 0.4	7.8 $\pm$ 0.4	-
		1	91.6 $\pm$ 0.2	8.4 $\pm$ 0.2	-
		2	91.4 $\pm$ 0.2	8.6 $\pm$ 0.2	-
		3	91.1 $\pm$ 0.0	8.9 $\pm$ 0.0	-
		5	90.9 $\pm$ 0.1	9.1 $\pm$ 0.1	-
		10	90.7 $\pm$ 0.0	9.3 $\pm$ 0.0	-
		20	90.5 $\pm$ 0.0	9.5 $\pm$ 0.0	-
		30	90.5 $\pm$ 0.0	9.5 $\pm$ 0.0	-
		40	90.4 $\pm$ 0.1	9.6 $\pm$ 0.1	-
5	10	60	89.2 $\pm$ 0.7	10.8 $\pm$ 0.7	-
		0	92.7 $\pm$ 0.3	7.3 $\pm$ 0.3	-
		1	90.6 $\pm$ 0.0	9.4 $\pm$ 0.0	-
		2	90.3 $\pm$ 0.1	9.7 $\pm$ 0.1	-
		3	90.1 $\pm$ 0.3	9.9 $\pm$ 0.3	-
		5	89.6 $\pm$ 0.2	10.4 $\pm$ 0.2	-
		10	87.1 $\pm$ 0.4	12.9 $\pm$ 0.4	-
		20	81.6 $\pm$ 0.5	18.4 $\pm$ 0.5	-
		30	74.8 $\pm$ 1.1	25.2 $\pm$ 1.1	-
5	30	40	68.4 $\pm$ 0.7	31.6 $\pm$ 0.7	-
		60	56.0 $\pm$ 1.1	44.0 $\pm$ 1.1	-
		0	92.5 $\pm$ 0.3	7.5 $\pm$ 0.3	-
		1	90.0 $\pm$ 0.0	10.0 $\pm$ 0.0	-
		2	89.4 $\pm$ 0.2	10.6 $\pm$ 0.2	-
		3	89.0 $\pm$ 0.2	11.0 $\pm$ 0.2	-
		5	87.6 $\pm$ 1.1	12.4 $\pm$ 1.1	-
		10	82.4 $\pm$ 1.6	17.6 $\pm$ 1.6	-
		20	67.2 $\pm$ 3.5	32.8 $\pm$ 3.4	-
30	50.0 $\pm$ 4.2	50.0 $\pm$ 4.2	-		
40	35.2 $\pm$ 5.0	64.8 $\pm$ 5.0	-		
60	14.3 $\pm$ 4.7	85.5 $\pm$ 4.7	0.2 $\pm$ 0.0		

5	50	0	$93.1 \pm 0.5$	$6.9 \pm 0.5$	-
		1	$90.7 \pm 0.4$	$9.3 \pm 0.4$	-
		2	$90.5 \pm 0.6$	$9.5 \pm 0.6$	-
		3	$89.8 \pm 0.0$	$10.2 \pm 0.0$	-
		5	$86.1 \pm 0.0$	$13.9 \pm 0.0$	-
		10	$79.0 \pm 0.0$	$21.0 \pm 0.0$	-
		20	$57.7 \pm 0.9$	$42.3 \pm 0.9$	-
		30	$38.2 \pm 1.8$	$61.8 \pm 1.8$	-
		40	$24.2 \pm 0.8$	$75.8 \pm 0.8$	-
		60	$5.9 \pm 0.3$	$93.8 \pm 0.3$	$0.3 \pm 0.0$
5	100	0	$93.2 \pm 0.4$	$6.8 \pm 0.4$	-
		1	$91.4 \pm 0.1$	$8.6 \pm 0.1$	-
		2	$90.9 \pm 0.3$	$9.1 \pm 0.3$	-
		3	$88.7 \pm 1.1$	$11.3 \pm 1.1$	-
		5	$85.6 \pm 1.0$	$14.4 \pm 1.0$	-
		10	$76.6 \pm 1.8$	$23.4 \pm 1.8$	-
		20	$55.0 \pm 2.6$	$45.0 \pm 2.6$	-
		30	$33.4 \pm 3.7$	$66.6 \pm 3.7$	-
		40	$21.1 \pm 3.6$	$78.9 \pm 3.6$	-
		60	$4.8 \pm 1.2$	$94.6 \pm 1.0$	$0.6 \pm 0.2$

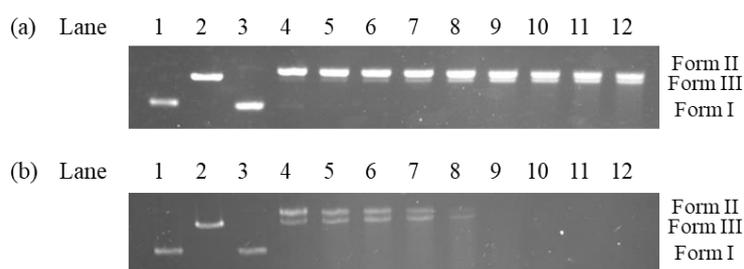
**Table S6-7. Fraction of Form I, Form II, and Form III in the DNA cleavage of 3b<sup>4-Cl</sup> (0–10  $\mu$ M) and AscNa (50  $\mu$ M).**

Complex ( $\mu$ M)	AscNa ( $\mu$ M)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
2	150	0	92.8 $\pm$ 0.3	7.2 $\pm$ 0.3	-
		1	90.8 $\pm$ 0.3	9.2 $\pm$ 0.3	-
		2	90.6 $\pm$ 0.3	9.4 $\pm$ 0.3	-
		3	90.3 $\pm$ 0.2	9.7 $\pm$ 0.2	-
		5	89.5 $\pm$ 0.2	10.5 $\pm$ 0.2	-
		10	87.2 $\pm$ 0.4	12.8 $\pm$ 0.4	-
		20	81.0 $\pm$ 1.4	19.0 $\pm$ 1.4	-
		30	71.8 $\pm$ 3.2	28.2 $\pm$ 3.2	-
		40	60.4 $\pm$ 3.9	39.6 $\pm$ 3.9	-
		60	37.2 $\pm$ 2.6	62.8 $\pm$ 2.6	-
5	150	0	92.6 $\pm$ 0.7	7.4 $\pm$ 0.7	-
		1	92.0 $\pm$ 1.6	8.0 $\pm$ 1.6	-
		2	91.0 $\pm$ 0.3	9.0 $\pm$ 0.3	-
		3	88.9 $\pm$ 0.5	11.1 $\pm$ 0.5	-
		5	86.1 $\pm$ 0.3	13.9 $\pm$ 0.3	-
		10	69.9 $\pm$ 1.8	30.1 $\pm$ 1.8	-
		20	55.1 $\pm$ 1.6	44.9 $\pm$ 1.6	-
		30	32.6 $\pm$ 0.9	67.4 $\pm$ 0.9	-
		40	17.7 $\pm$ 0.5	82.3 $\pm$ 0.5	-
		60	4.1 $\pm$ 0.0	95.5 $\pm$ 0.0	0.4 $\pm$ 0.0
10	150	0	92.3 $\pm$ 0.3	7.7 $\pm$ 0.3	-
		1	61.2 $\pm$ 0.2	38.8 $\pm$ 0.2	-
		2	45.4 $\pm$ 0.8	54.6 $\pm$ 0.8	-
		3	31.5 $\pm$ 0.3	68.5 $\pm$ 0.3	-
		5	12.4 $\pm$ 3.9	87.6 $\pm$ 3.9	-
		10	0.3 $\pm$ 0.5	98.1 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.2
		20	0.0 $\pm$ 0.0	85.7 $\pm$ 1.3	14.3 $\pm$ 1.3
		30	0.0 $\pm$ 0.0	63.2 $\pm$ 3.3	36.8 $\pm$ 3.3
		40	0.0 $\pm$ 0.0	41.9 $\pm$ 4.9	58.1 $\pm$ 4.9
		60	n. d.*	n. d.*	n. d.*

**Table S6-8. Fraction of Form I, Form II, and Form III in the DNA cleavage of 3b<sup>4-Cl</sup> (5 μM) and AscNa (0–150 μM).**

Complex (μM)	AscNa (μM)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
5	0	0	93.3 ± 0.0	6.7 ± 0.0	-
		1	92.4 ± 0.2	7.6 ± 0.2	-
		2	92.0 ± 0.4	8.0 ± 0.4	-
		3	90.8 ± 0.2	9.2 ± 0.2	-
		5	90.7 ± 0.2	9.3 ± 0.2	-
		10	90.4 ± 0.1	9.6 ± 0.1	-
		20	90.3 ± 0.1	9.7 ± 0.1	-
		30	90.2 ± 0.0	9.8 ± 0.0	-
		40	89.9 ± 0.2	10.1 ± 0.2	-
		60	89.7 ± 0.3	10.3 ± 0.3	-
5	10	0	92.5 ± 0.1	7.5 ± 0.1	-
		1	90.6 ± 0.3	9.4 ± 0.3	-
		2	90.4 ± 0.4	9.6 ± 0.4	-
		3	89.8 ± 0.2	10.2 ± 0.2	-
		5	88.4 ± 0.6	11.6 ± 0.6	-
		10	86.2 ± 0.4	13.8 ± 0.4	-
		20	81.4 ± 1.6	18.6 ± 1.6	-
		30	77.9 ± 1.2	22.1 ± 1.2	-
		40	72.9 ± 1.8	27.1 ± 1.8	-
		60	63.8 ± 2.5	36.2 ± 2.5	-
5	30	0	92.6 ± 0.2	7.4 ± 0.2	-
		1	90.8 ± 0.5	9.2 ± 0.5	-
		2	90.3 ± 0.6	9.7 ± 0.6	-
		3	89.8 ± 0.3	10.2 ± 0.3	-
		5	88.8 ± 1.2	11.2 ± 1.2	-
		10	83.3 ± 1.8	16.7 ± 1.8	-
		20	69.5 ± 4.8	30.6 ± 4.8	-
		30	50.4 ± 4.7	49.6 ± 4.7	-
		40	33.9 ± 4.9	66.1 ± 4.9	-
		60	12.1 ± 3.3	87.7 ± 3.4	0.2 ± 0.0

5	50	0	$93.4 \pm 0.1$	$6.6 \pm 0.1$	-
		1	$91.2 \pm 0.1$	$8.8 \pm 0.1$	-
		2	$90.4 \pm 0.4$	$9.6 \pm 0.4$	-
		3	$89.4 \pm 1.0$	$10.6 \pm 1.0$	-
		5	$87.7 \pm 0.2$	$12.3 \pm 0.2$	-
		10	$81.3 \pm 0.1$	$18.7 \pm 0.1$	-
		20	$59.9 \pm 0.8$	$40.1 \pm 0.8$	-
		30	$38.6 \pm 1.5$	$61.4 \pm 1.5$	-
		40	$23.1 \pm 0.7$	$76.9 \pm 0.7$	-
		60	$5.2 \pm 0.6$	$94.1 \pm 0.7$	$0.7 \pm 0.0$
5	100	0	$93.5 \pm 0.5$	$6.5 \pm 0.5$	-
		1	$92.3 \pm 0.7$	$7.7 \pm 0.7$	-
		2	$91.5 \pm 0.9$	$8.5 \pm 0.9$	-
		3	$90.4 \pm 0.1$	$9.6 \pm 0.1$	-
		5	$85.8 \pm 0.8$	$14.2 \pm 0.8$	-
		10	$75.6 \pm 2.0$	$24.4 \pm 2.0$	-
		20	$48.2 \pm 5.0$	$51.9 \pm 5.0$	-
		30	$25.9 \pm 5.0$	$74.1 \pm 5.0$	-
		40	$12.1 \pm 3.6$	$87.4 \pm 3.1$	$0.5 \pm 0.5$
		60	$1.3 \pm 1.3$	$97.1 \pm 0.7$	$1.6 \pm 0.6$

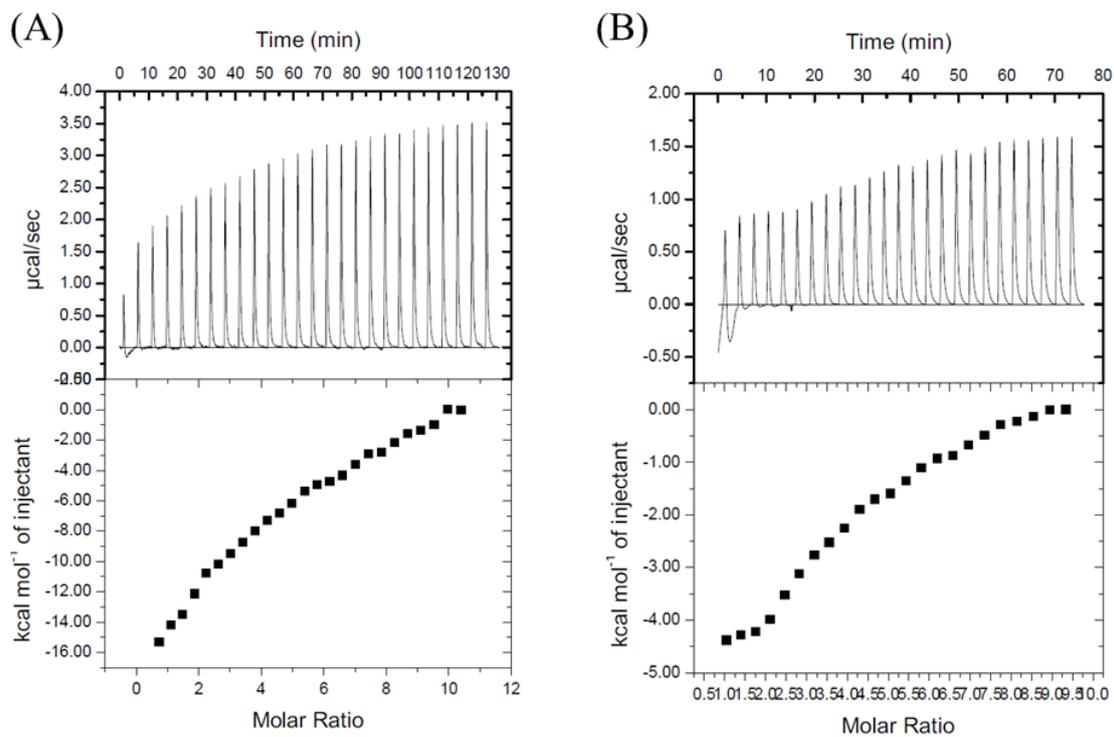


**Figure S6-9.** Agarose gel electrophoresis profiles upon reaction of pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp) with complex (**3b**<sup>4-MeO</sup> (a) and **3b**<sup>4-Cl</sup> (b)) (30  $\mu$ M) and AscNa (150  $\mu$ M) at pH 7.4, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively.

**Table S6-9. Fraction of Form I, Form II, and Form III in the DNA cleavage of complex (**3b**  $\mu$ M) and AscNa (150  $\mu$ M) at pH 7.4.**

Complex	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
<b>3b</b> <sup>4-MeO</sup>	0	98.1 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.4	-
	1	1.6 $\pm$ 1.1	95.3 $\pm$ 1.7	3.1 $\pm$ 2.3
	2	0.0 $\pm$ 0.0	93.3 $\pm$ 0.6	6.7 $\pm$ 0.6
	3	0.0 $\pm$ 0.0	89.8 $\pm$ 1.8	10.2 $\pm$ 1.8
	5	0.0 $\pm$ 0.0	86.6 $\pm$ 2.3	13.4 $\pm$ 2.3
	10	0.0 $\pm$ 0.0	79.7 $\pm$ 1.9	20.3 $\pm$ 1.9
	20	0.0 $\pm$ 0.0	73.4 $\pm$ 2.3	26.6 $\pm$ 2.3
	30	0.0 $\pm$ 0.0	70.5 $\pm$ 1.4	29.5 $\pm$ 1.4
	40	0.0 $\pm$ 0.0	68.8 $\pm$ 1.9	31.2 $\pm$ 1.9
	60	0.0 $\pm$ 0.0	65.9 $\pm$ 2.9	34.1 $\pm$ 2.9
<b>3b</b> <sup>4-Cl</sup>	0	97.7 $\pm$ 0.8	2.3 $\pm$ 0.8	-
	1	0.0 $\pm$ 0.0	77.4 $\pm$ 0.7	22.6 $\pm$ 0.7
	2	0.0 $\pm$ 0.0	64.0 $\pm$ 2.4	36.0 $\pm$ 2.4
	3	0.0 $\pm$ 0.0	52.8 $\pm$ 1.5	47.2 $\pm$ 1.5
	5	0.0 $\pm$ 0.0	39.1 $\pm$ 2.7	60.9 $\pm$ 2.7
	10	n. d.*	n. d.*	n. d.*
	20	n. d.*	n. d.*	n. d.*
	30	n. d.*	n. d.*	n. d.*
	40	n. d.*	n. d.*	n. d.*
	60	n. d.*	n. d.*	n. d.*

\*n. d. means cannot determine.



**Figure S6-10.** Isothermal calorimetric titration curves:  $3b^{4-MeO}$  (A) or  $3b^{4-Cl}$  (B) at pH 6.0. Experimental conditions: A solution of  $3b^{4-MeO}$  or  $3b^{4-Cl}$  (1 mM) in a syringe was added, in an equal interval 28 times, to a solution of the linear 33 mer ds-DNA (18.75  $\mu\text{M}$ ) in the cell in the presence of NaCl (10 mM) in pH 6.0 (MES, 10 mM) at 37°C.

## 第七章：Enhancement of DNA double-strand breaks by a dicopper complex with a phenanthrene amide-tether ligand conjugate

### 7-1. 要旨

本章では、DNA 特異的な標的部導入により、二核銅錯体による supercoiled plasmid pUC19DNA の二本鎖切断(DNA double-strand breaks, dsb)を経る Form III 生成の初期の速い反応(burst)が加速されることを見出した。具体的には、第五章で示した 2,6-bis(amide-tether dpa)-*p*-cresol 配位子(HL3)の *p*-cresol のメチル基を 9-phenanthrenyl (P)または methyl (M)末端を持つ-CONH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCO-リンカーに置換した DNA 標的/二核化配位子結合体(HL3<sup>X</sup>, X = P and M)とその錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3<sup>X</sup>)](OAc) (**3<sup>X</sup>**)を新たに開発した。**3<sup>X</sup>**を用い、AscNa 存在下の還元的 O<sub>2</sub>活性化による supercoiled plasmid pUC19DNA の酸化切断を行った。DNA dsb で生じる Form III の生成速度を HL3 の錯体 [Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3)](OAc) (**3**)を用いた反応と比較した結果、DNA dsb の burst が **3<sup>M</sup>** < **3** < **3<sup>P</sup>** の順で増大した。特に **3<sup>P</sup>** の Form III の生成の burst は錯体濃度に顕著に依存した。この原因を調べるため、これら 3 つの錯体の還元的 O<sub>2</sub>活性化によるヒドロキシラジカル(HO•)生成の初期速度、Form III 生成に対する DMSO の阻害効果、33 mer DNA との相互作用の等温滴定カロリーメトリー(ITC)、仔ウシ胸腺 DNA(ct-DNA)との相互作用における電子スペクトル変化を測定した。HO•生成の初期速度は **3<sup>M</sup>** = **3<sup>P</sup>** < **3** であり、アミド結合導入による電子求引性の効果で **3<sup>X</sup>** の Cu(I)が安定化されたために **3** よりも HO•生成速度が遅くなったと考えられる。ITC 測定の結果から、**3<sup>P</sup>** は **3** や **3<sup>M</sup>** よりも DNA とエンタルピー駆動の強固な結合を形成していることが明らかになった。**3<sup>P</sup>** は、DMSO による Form III 生成の阻害効果がほとんど見られないことから、その DNA との強固な結合のため、生成した HO•は拡散する前に DNA 切断に使用されることが示唆された。したがって、DNA dsb の大きな burst には HO•生成速度よりも DNA との強固な結合が重要である。これらの研究から、DNA dsb の活性向上には錯体と DNA の結合を強固にすることが重要であり、そのためにはインターカレーションにより DNA と特異的に結合する phenanthrenyl 基を配位子に導入することが効果的であることが示された。

## 7-2. 緒言

既存の抗がん剤である Bleomycin の鉄錯体(Fe-BLM)は DNA 標的部を持ち、DNA 二本鎖切断(DNA double-strand breaks, dsb)を促進する。したがって、DNA dsb の burst を引き起こす錯体の開発は遺伝子編集やがん治療薬の開発の観点から重要であり、DNA dsb を起こす金属錯体がこれまでに多数合成されてきた。しかし、これら合成金属錯体の DNA dsb 活性は低く、遺伝子編集やがん治療薬への利用などの観点からは不十分である。その活性向上に向けて Fe-BLM の構造を模倣し、DNA 標的を導入する手法が報告されている。第二、三章で述べたように、DNA 標的の導入で、 $1^{P2}$  は  $1$  より DNA 結合能力が 9 倍、 $H_2O_2$  存在下における supercoiled plasmid pUC19DNA の二本鎖切断(double-strand breaks, dsb)活性が 9.3 倍にそれぞれ向上した<sup>[1,2]</sup>。

第五、六章では、HL3 および HL3<sup>4X</sup> 配位子(X = MeO, Cl)の二核銅錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3)](OAc) ( $3$ )<sup>[3]</sup>, [Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3<sup>4-MeO</sup>)](OAc) ( $3b^{4-MeO}$ )および[Cu<sub>2</sub>(μ-1,3-OAc)<sub>2</sub>(L3<sup>4-Cl</sup>)](OAc) ( $3^{4-Cl}$ )が、空気下、アスコルビン酸ナトリウム(AscNa)存在下の還元的 O<sub>2</sub> 活性化によって、supercoiled plasmid pUC19DNA (Form I)を二本鎖切断して直鎖状 DNA (Form III)へ変換する反応で初期に burst を起こすことを示した。これまでに報告されてきた幾つかの錯体による DNA 切断の中でも、 $3$ 、 $3b^{4-MeO}$  および  $3b^{4-Cl}$  の Form III 生成の burst は大きかった。これらの錯体は DNA と rigid な結合を形成し、還元的 O<sub>2</sub> 活性化でヒドロキシラジカル(HO•)を生成して DNA 酸化切断を促進した。そして、これらの rigid な DNA 結合により 10 塩基対の範囲内で DNA の相補的な二本鎖の同時切断が起こることが Form III 生成の burst の理由であることが明らかになった。これらの研究の中で電子供与性の MeO 基を持つ  $3b^{4-MeO}$  の Form III 生成活性が最も高く、大きな burst を与え、錯体の濃度が低くても高活性を示した。 $3b^{4-MeO}$  は MeO 基の電子効果で、還元的 O<sub>2</sub> 活性化における HO•の初期の生成量が多く、負に大きい  $\Delta H^\circ$ を示す DNA との結合を形成することで、効率的な Form III 生成を可能にしている。しかし、Fe-BLM は、 $3b^{4-MeO}$  よりもはるかに高い DNA dsb 活性を示す。また、その結果、Fe-BLM はより高い細胞毒性を示す。したがって、Fe-BLM の様に高い細胞毒性を実現するには、さらに高い DNA dsb 活性を示す合成金属錯体を開発する必要がある。

本章では、高い DNA dsb 活性を示す錯体の開発を目指し、HL3 の *p*-cresol のメチル基を 9-phenanthrenyl (P)または methyl (M)末端を持つ-CONH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCO-リンカーで置換した DNA 標的/二核化配位子結合体(HL3<sup>X</sup>, X = P, M)とその錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3<sup>X</sup>)](OAc) ( $3^X$ )を新たに合成し、 $3^P$  が Form III 生成の burst を増大させることを見出した。錯体濃度が  $3$  は 20 μM,  $3^P$  および  $3^M$  は 18 μM の時、5 分間の Form

III 生成率は  $3^M$  (5.9%) <  $3$  (25.3%) <  $3^P$  (71.8%) であり, DNA 標的部位を持つ  $3^P$  の Form III 生成活性が最も高く, 錯体の濃度が低くても大きな burst を示した. また, 顕著な錯体濃度依存性を示した. そこで,  $3$ ,  $3^P$ ,  $3^M$  の DNA 切断活性, 電気化学的性質, HO• 生成速度, DNA 結合様式を比較し, rigid な DNA への結合が, 低濃度の  $3^P$  による高速の Form III 生成を可能にする特徴であることを明らかにした. 本章で用いた HL3, HL3<sup>X</sup>,  $3$ ,  $3^X$  (X = P, M) の化学構造を Figure 7-1 に示す.

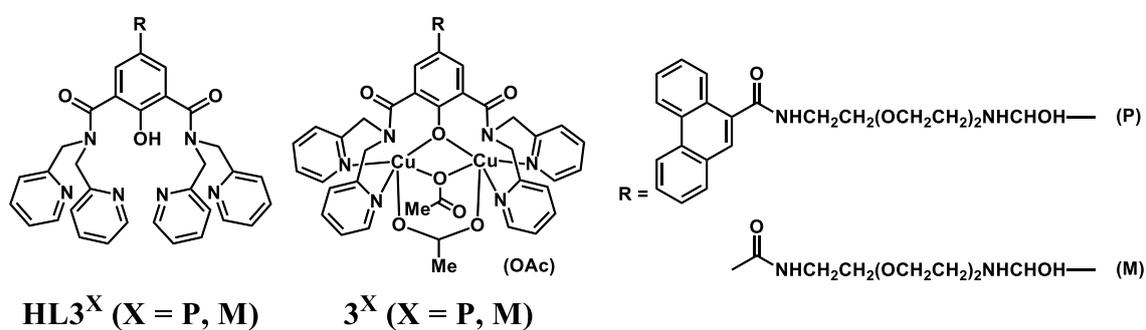
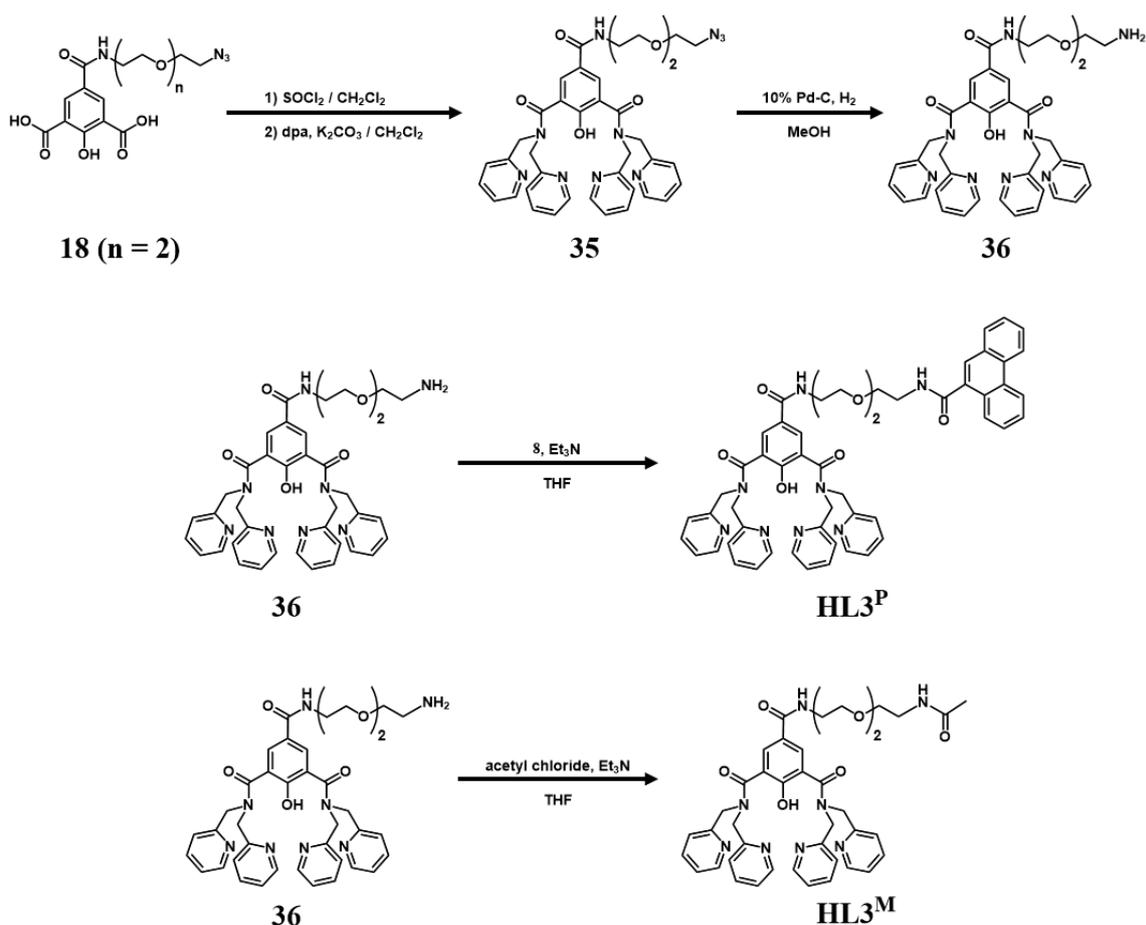


Figure 7-1. Chemical Structures of HL3<sup>X</sup> and 3<sup>X</sup> (X = P, M).

### 7-3. 結果と考察

#### 7-3-1. 配位子と二核銅(II)錯体の合成

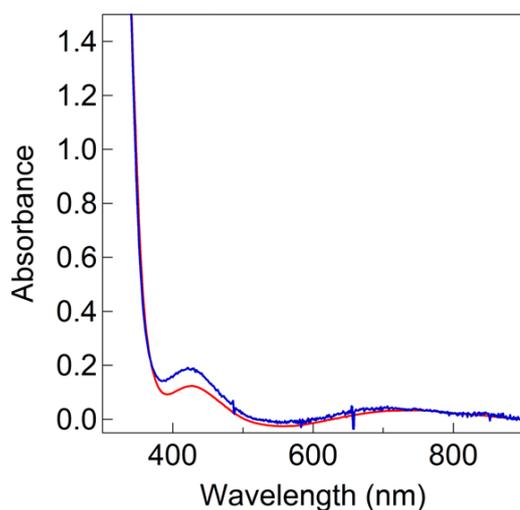
HL3<sup>P</sup> および HL3<sup>M</sup> は、HL3 の *p*-cresol 部位のメチル基を DNA 標的である 9-phenanthrenyl (P) または methyl (M) 末端を持つ-CONH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCO-リンカーに置換した配位子であり、合成経路は Scheme 7-1 に示す。まず triethylene glycol の末端を NH<sub>2</sub> 基と N<sub>3</sub> 基で置換した誘導体を合成し、これを 3,5-diformyl-4-hydroxybenzoic acid にアミド結合で導入した。このホルミル基を酸化してカルボキシ基に変換した後、SOCl<sub>2</sub> で酸塩化物とし、dpa をアミド結合で導入した。さらに、末端の N<sub>3</sub> 基を還元して NH<sub>2</sub> 基に変換した後、9-phenanthrenyl (P) または methyl (M) をアミド結合で導入し、HL3<sup>P</sup> および HL3<sup>M</sup> を得た。これを MeCN 中、Cu(OAc)<sub>2</sub> と反応させて二核銅(II)錯体 [Cu<sub>2</sub>(μ-OAc)<sub>2</sub>(L3<sup>P</sup>)](OAc) (**3<sup>P</sup>**) および [Cu<sub>2</sub>(μ-OAc)<sub>2</sub>(L3<sup>M</sup>)](OAc) (**3<sup>M</sup>**) を得た。単離された錯体は、MeCN/Et<sub>2</sub>O から再結晶して精製した。HL3<sup>X</sup>, **3<sup>X</sup>** (X = P, M) の詳細な合成法、元素分析および ESI MS のデータを 7-5-3 の実験項に示す。



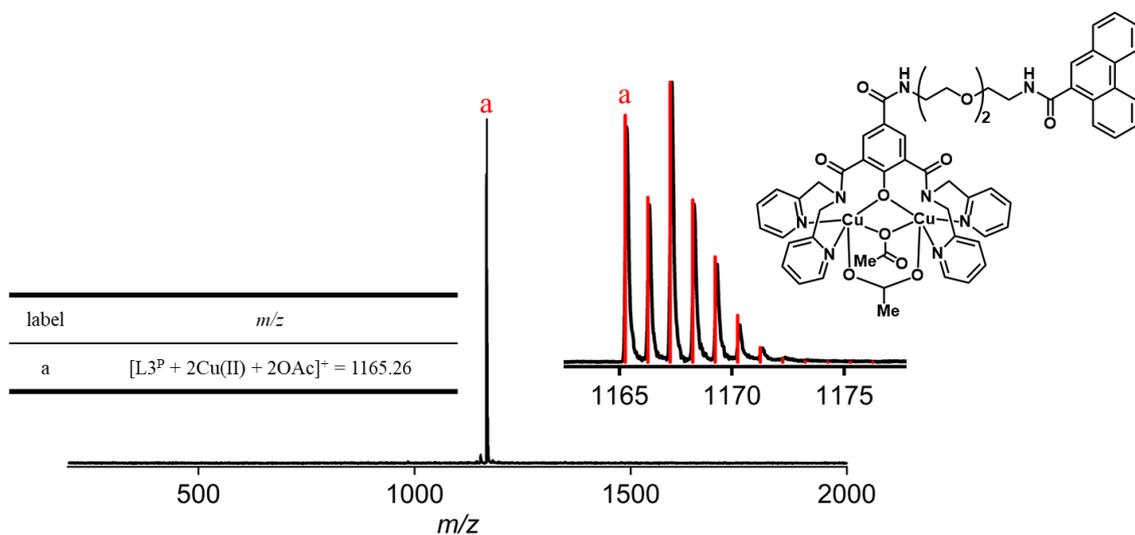
Scheme 7-1. Synthetic Route of HL3<sup>X</sup> (X = P, M).

### 7-3-2. 二核銅(II)錯体の構造

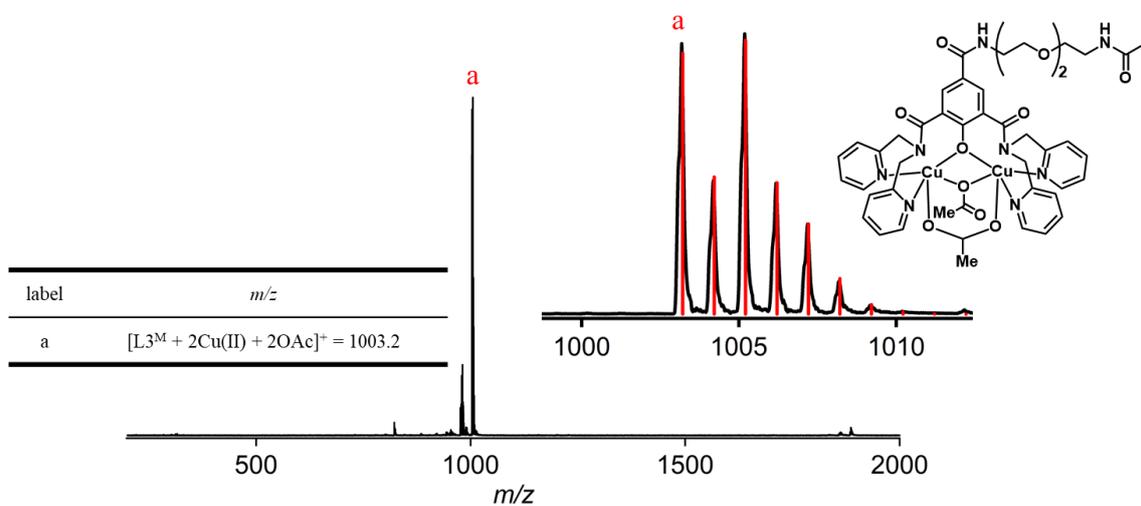
DNA 標的部位を導入した  $3^P$  と  $3^M$  の二核銅部位の構造は  $3$  のそれと同様であると考えられる。  $3^X$  の溶液中の構造は分光学的測定により同定された。 電子吸収スペクトルでは、  $3^P$  は 430 nm と 730 nm,  $3^M$  は 425 nm と 700 nm に  $\text{PhO}^-$  から  $\text{Cu(II)}$  への LMCT と d-d 遷移に帰属される吸収帯が観測された。 これらは、  $3$  の 441 nm ( $\text{PhO}^-$  から  $\text{Cu(II)}$  への LMCT) と 700 nm (d-d 遷移) の吸収帯とほぼ一致した(Figure 7-2)。 ESI-MS (Figure 7-3, 7-4) では、  $3^P$  と  $3^M$  はそれぞれ、  $m/z$  1165.26 に  $[\text{L}3^P + 2\text{Cu(II)} + 2\text{OAc}]^+$ ,  $m/z$  1003.2 に  $[\text{L}3^M + 2\text{Cu(II)} + 2\text{OAc}]^+$  に帰属される分子イオンピークを与えた。 これらの結果から、  $3^P$  と  $3^M$  は水溶液中で  $\mu\text{-O}^-\mu\text{-OAc}$  の架橋構造を保持していることが示された。



**Figure 7-2.** Electronic absorption spectra of  $3^P$  (0.5 mM) (red), and  $3^M$  (0.5 mM) (blue) in  $\text{H}_2\text{O}$  at room temperature.



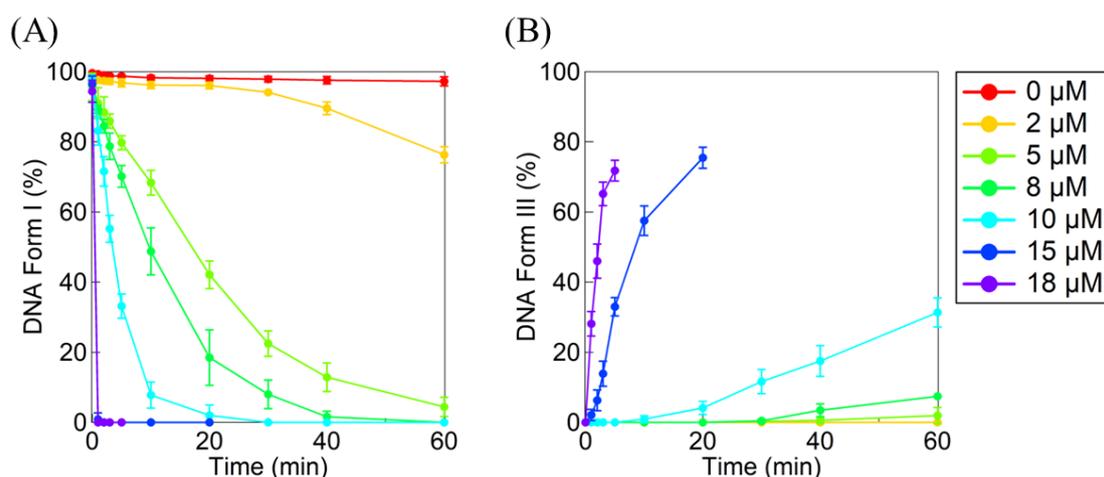
**Figure 7-3.** ESI MS spectrum of  $3^P$  measured in MeCN at room temperature at orifice 1: 10 V, orifice 2: 10 V, ring lens voltage: 10 V.



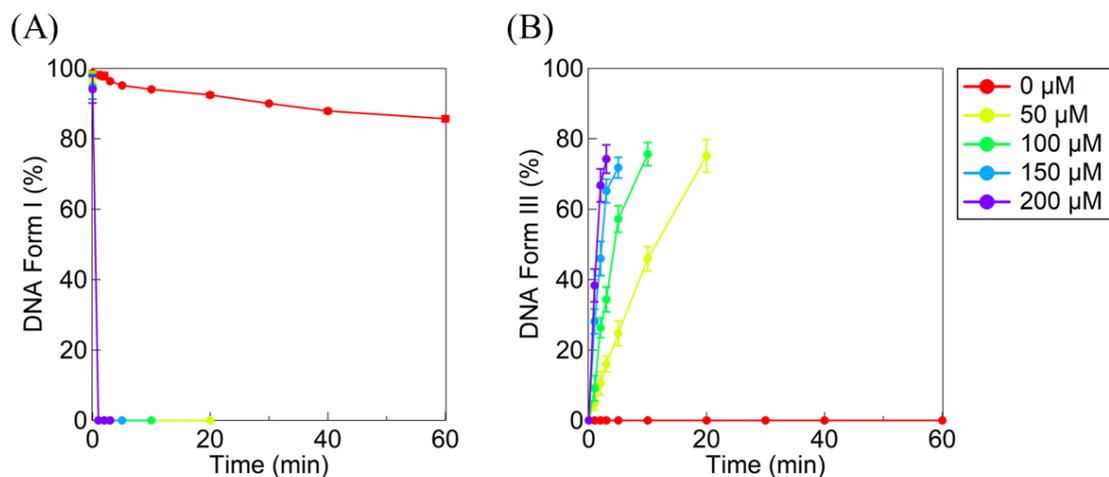
**Figure 7-4.** ESI MS spectrum of  $3^M$  measured in MeCN at room temperature at orifice 1: 10 V, orifice 2: 10 V, ring lens voltage: 10 V.

### 7-3-3. AscNa 存在下での 3<sup>P</sup> および 3<sup>M</sup> の DNA 酸化切断活性

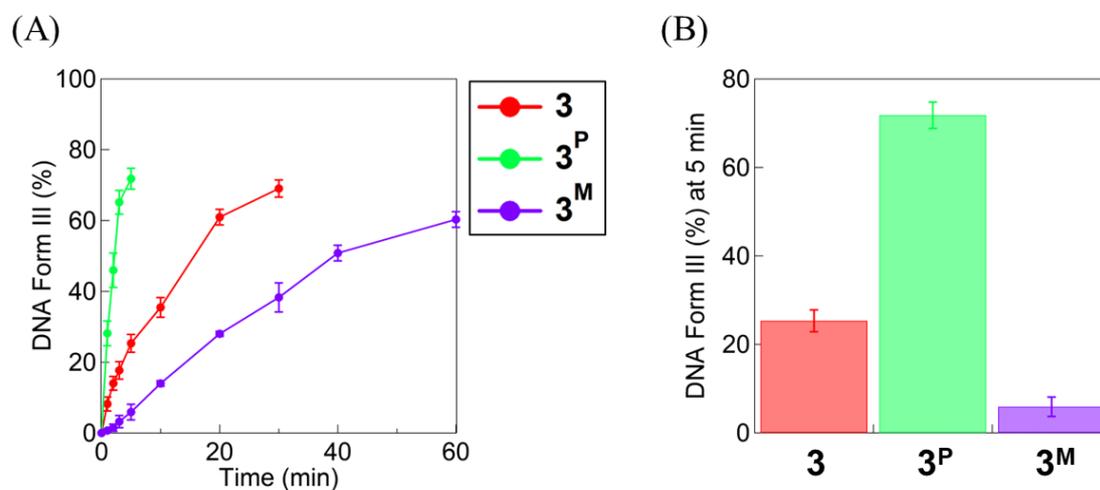
Supercoiled plasmid DNA (Form I) を基質として 3, 3<sup>P</sup> および 3<sup>M</sup> の DNA 切断活性を調べた。反応条件と解析法は実験項に示す。3<sup>P</sup> や AscNa の濃度変化に対する Form I, II, III の割合(%)の時間経過とゲル写真を Figure 7-5-7-6, Figure S7-1-S7-2, Table S7-1-S7-2 に示す。3<sup>P</sup> の DNA 切断活性は, 3 と同様に [3<sup>X</sup>] と [AscNa] に大きく依存した。3<sup>P</sup> や AscNa 不在下では, 60 分間で 80% 以上の Form I が未反応だった。したがって, 3<sup>P</sup> と AscNa はどちらも速い DNA dsb に必須である。DNA dsb の burst は [3<sup>P</sup>] に大きく依存した。また, AscNa (150 μM) 存在下, 3 (20 μM) または 3<sup>P</sup> および 3<sup>M</sup> (18 μM) による還元的 O<sub>2</sub> 活性化を経る反応における Form III の生成率の比較を Figure 7-7 に示す。この条件下での 3 と 3<sup>M</sup> の Form I, II, III の割合(%)の時間経過とゲル写真を Figure S7-3-S7-4, Table S7-3 に示す。5 分間の Form III 生成率は 3<sup>M</sup> (5.9%) < 3 (25.3%) < 3<sup>P</sup> (71.8%) であり, 3<sup>P</sup> の DNA 酸化切断では DNA 標的である phenanthrene の存在で Form III 生成が 3<sup>M</sup> の反応に比べて 12 倍以上増加した。また, 3 に対しては, 3<sup>P</sup> の濃度が 10% 少ないにも関わらず, 3<sup>P</sup> による Form III 生成量が大きいことから, 3<sup>P</sup> は phenanthrene と DNA の結合を通して DNA dsb を加速していることが明らかになった。



**Figure 7-5.** Time courses for Form I (A) and Form III (B) dependent on [3<sup>P</sup>] in the DNA cleavage by 3<sup>P</sup>. Experimental conditions: [pUC19 DNA] = 50 μM bp, [3<sup>P</sup>] = 0–18 μM, [AscNa] = 150 μM, [Cu(OAc)<sub>2</sub>] = 90 μM, [NaCl] = 10 mM, [MES buffer] = 10 mM (pH 6.0) at 37°C. Experiments were carried out at least three times.



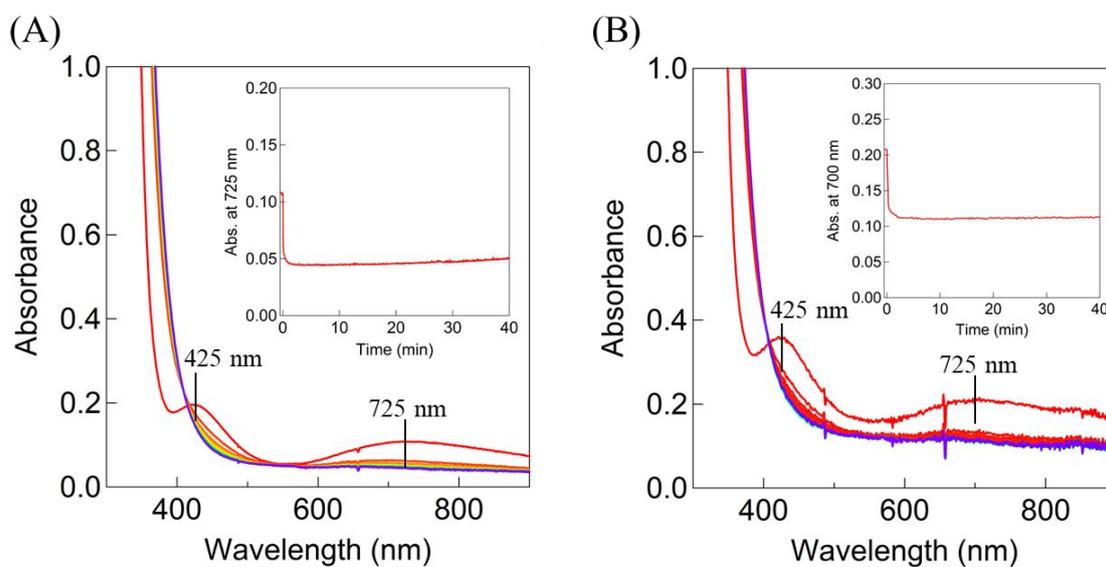
**Figure 7-6.** Time courses for Form I (A) and Form III (B) dependent on [AscNa] in the DNA cleavage by  $3^P$ . Experimental conditions: [pUC19 DNA] = 50  $\mu\text{M}$  bp, [ $3^P$ ] = 18  $\mu\text{M}$ , [AscNa] = 0–200  $\mu\text{M}$ , [ $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ ] = 90  $\mu\text{M}$ , [NaCl] = 10 mM, [MES buffer] = 10 mM (pH 6.0) at 37°C. Experiments were carried out at least three times.



**Figure 7-7.** (A) Time courses for Form III in the DNA cleavage by  $3$  (red) (20  $\mu\text{M}$ ),  $3^P$  (green) (18  $\mu\text{M}$ ), and  $3^M$  (purple) (18  $\mu\text{M}$ ) in the presence of AscNa (150  $\mu\text{M}$ ). (B) DNA cleavage profile promoted by  $3$  (red) (20  $\mu\text{M}$ ),  $3^P$  (green) (18  $\mu\text{M}$ ), and  $3^M$  (purple) (18  $\mu\text{M}$ ) in the presence of AscNa (150  $\mu\text{M}$ ) after 5 min reaction.

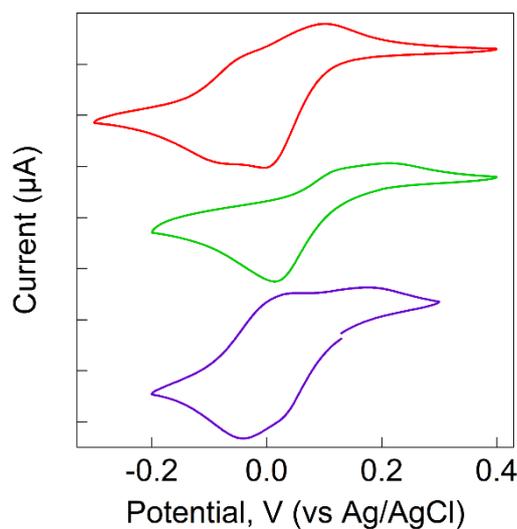
### 7-3-4. 3, 3<sup>P</sup>および3<sup>M</sup>の酸化還元挙動

第五章では、**3**はAscNaとの反応でCu(I)Cu(II)とCu(I)Cu(I)に速やかに還元されることが示された。本章では、DNA切断活性の違いの理由を明らかにするため、**3<sup>P</sup>**および**3<sup>M</sup>**の酸化還元挙動を調べた。まず、Figure 7-8にAscNa添加時の錯体のUV-visスペクトル変化を示す。**3<sup>P</sup>**および**3<sup>M</sup>**は、**3**と同様に2 eqのAscNaで容易に還元された。



**Figure 7-8.** Absorption spectral changes (red to blue lines, 0.1 min at every interval) of **3<sup>P</sup>** (A) and **3<sup>M</sup>** (B) (0.50 mM) upon addition of AscNa (1.0 mM) in MES buffer (200 mM, pH 6.0) and NaOAc (2 mM) at rt under N<sub>2</sub> (inset: time courses monitored at 725 nm (A) and 700 nm (B)).

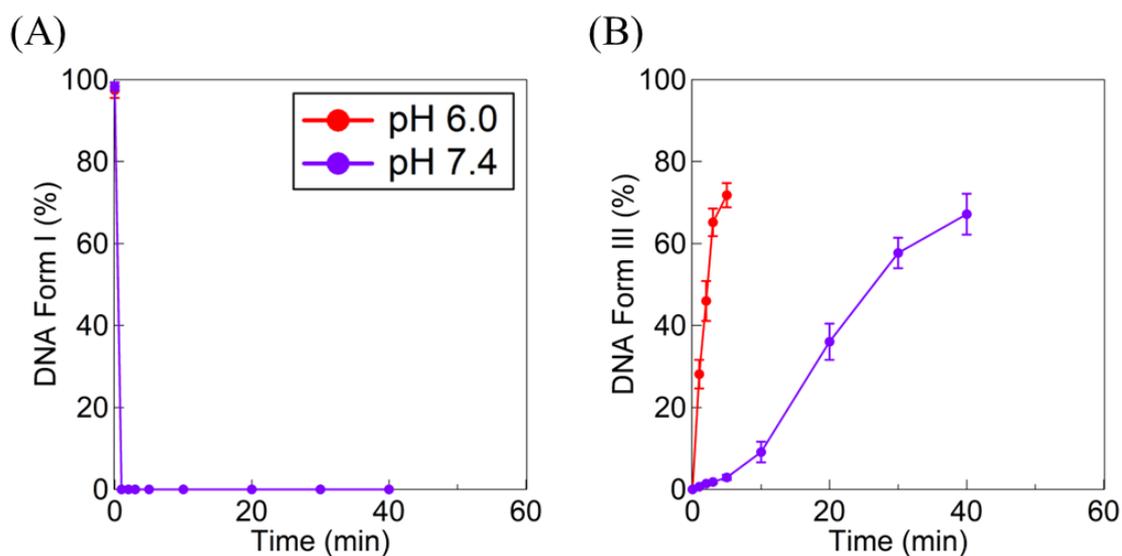
$3^P$  および  $3^M$  の pH 6.0 の MES 緩衝液(200 mM)中のサイクリックボルタモグラム(CV)を Figure 7-9 に示す.  $3^P$  は,  $E_{pc} = 0.015$ ,  $E_{pa} = 0.13$  V に Cu(I)Cu(II)/Cu(I)Cu(I)の準可逆波と,  $E_{pc} = 0.015$ ,  $E_{pa} = 0.21$  V に Cu(II)Cu(II)/Cu(II)Cu(I)の不可逆波を与えた.  $3^M$  は,  $E_{1/2} = -0.003$  V ( $\Delta E_p = 0.076$  V,  $\nu = 10$  mV s<sup>-1</sup>)に Cu(II)Cu(I)/Cu(I)Cu(I)の可逆波と,  $E_{pc} = 0.02$ ,  $E_{pa} = 0.17$  V に Cu(II)Cu(II)/Cu(II)Cu(I)の不可逆波を与えた.  $3^P$  および  $3^M$  の還元時に OAc 架橋の解離を伴うために Cu(II)Cu(II)/Cu(II)Cu(I)の redox couple が不可逆になると考えられる.  $3^P$  および  $3^M$  は  $3$  よりも酸化還元電位が正側にシフトしたことから,  $3^P$  および  $3^M$  では phenoxo 基 4 位の電子求引性のアミド基が Cu(I)を安定化していると考えられる. しかし, AscNa 添加時の UV-vis スペクトル変化では還元速度に大きな差はみられず, いずれも十分に速い反応だった.



**Figure 7-9.** Cyclic voltammograms of  $3$  (red),  $3^P$  (green), and  $3^M$  (purple). The measurements were made at  $23^\circ\text{C} \pm 0.2^\circ\text{C}$  under  $\text{N}_2$ . Glassy carbon, Pt wire, and Ag/AgCl are used as working, counter, and reference electrodes, respectively. Scan rate was  $10\text{mVs}^{-1}$ , and sensitivity was  $10\ \mu\text{A/V}$ .

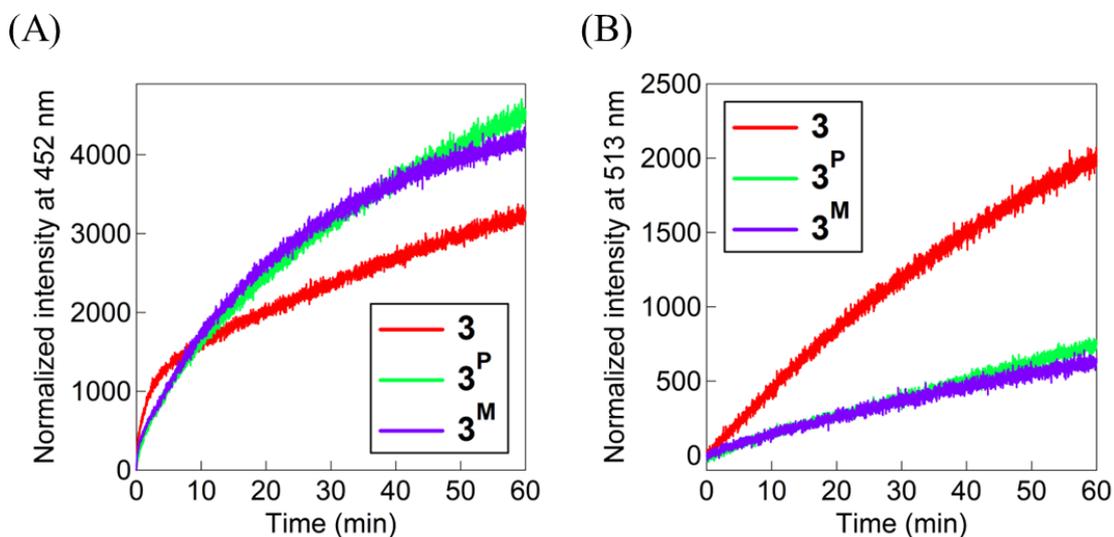
### 7-3-5. 3, 3<sup>P</sup>および3<sup>M</sup>の還元的O<sub>2</sub>活性化

3がAscNaとの反応でCu(I)Cu(II), Cu(I)Cu(I)に還元され, これらが律速段階のO<sub>2</sub>活性化に参与することを第五章で記述した. これらの還元種は, O<sub>2</sub>の3電子還元を促進し, プロトン化されてCu(II)Cu(I)O<sub>2</sub>H種を形成する. これは, 3<sup>P</sup>でも同様であり, DNA dsb活性がpH 7.4よりもpH 6.0の方が高いという事実と一致する(Figure 7-10, Figure S7-5, Table S7-4). Cu(I)O<sub>2</sub>HのホモリティックなO-O開裂はエネルギー的に有利でありCu(II)Cu(I)O<sub>2</sub>HからHO•が生成するのは3の反応と同様に有利な反応であるといえる.



**Figure 7-10.** pH-dependent profile for DNA cleavage promoted by 3<sup>P</sup>. Time courses for Form III at pH 6.0 (red) and pH 7.4 (purple). Experimental conditions: [pUC19 DNA] = 50 μM bp, [complex] = 18 μM, [AscNa] = 150 μM, [Cu(OAc)<sub>2</sub>] = 90 μM, [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (pH 6.0 (MES) and pH 7.4 (MOPS)) at 37°C. Experiments were carried out at least three times.

次に, AscNa を用いた **3**, **3<sup>P</sup>** および **3<sup>M</sup>** の還元的 O<sub>2</sub> 活性化における HO• 生成は coumarin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成は PBSF を用いて蛍光スペクトル変化で追跡した. coumarin は HO• と反応して umbelliferone を生成し, 332 nm で励起すると 452 nm に蛍光帯, PBSF は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と反応して fluorescein を生成し, 485 nm で励起すると 513 nm に蛍光帯を示す<sup>[4, 5]</sup>. これらの 452, 513 nm で追跡した蛍光強度の時間変化を Figure 7-11 に示す. **3**, **3<sup>P</sup>** および **3<sup>M</sup>** / AscNa の反応で, それぞれの蛍光強度が増加した. 初期の反応では, **3** は **3<sup>P</sup>** および **3<sup>M</sup>** よりも O<sub>2</sub> 分子と速く反応し, HO• を多く生成したが, その後は **3<sup>P</sup>** および **3<sup>M</sup>** の方が HO• を多く生成した. また, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の生成では, **3** は **3<sup>P</sup>** および **3<sup>M</sup>** よりも多量の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を生成した.



**Figure 7-11.** Time courses of the normalized emission intensity monitored at 452 nm (A) and 513 nm (B) for **3** (red), **3<sup>P</sup>** (green), and **3<sup>M</sup>** (purple). Experimental conditions: [NaCl] = 10 mM, [buffer] = 10 mM (MES, pH 6.0), [complex] = 30 μM, [AscNa] = 150 μM, [coumarin] = 0.5 mM or [PBSF] = 25 μM, under air at 37°C.

### 7-3-6. 3, 3<sup>P</sup>および3<sup>M</sup>のDNA結合

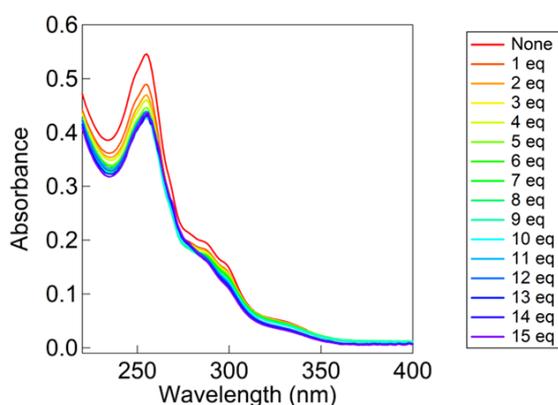
33 mer オリゴ ds-DNA と 3<sup>P</sup> および 3<sup>M</sup> の結合相互作用を等温滴定熱量測定 (Isothermal titration calorimetry, ITC) と UV-vis スペクトルにより調べた<sup>38,39</sup>. まず, 37°C, pH 6.0 での ITC の結果を Table 7-1, Figure S7-6 に示す. 3, 3<sup>P</sup> および 3<sup>M</sup> の結合定数  $K$  はそれぞれ  $1.31 \times 10^5$ ,  $0.79 \times 10^5$ ,  $1.67 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  で,  $3^P < 3 < 3^M$  である. しかし, 錯体濃度が 10  $\mu\text{M}$  以上, DNA 濃度が 50  $\mu\text{M}$  bp を用いる DNA 切断実験の条件では, 3, 3<sup>P</sup> および 3<sup>M</sup> の DNA 結合はほぼ飽和しているため,  $K$  の大きさは DNA dsb の burst には重要ではないといえる. Table 7-1 に示すように, 3<sup>P</sup> の  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  はそれぞれ  $-3.85 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $10.0 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$  であり, 3<sup>M</sup> の  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  はそれぞれ  $-1.79 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $18.1 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$  であった. 以上の結果から, 3<sup>P</sup> および 3<sup>M</sup> の DNA 結合は 3 と同様に  $\Delta H^\circ$  駆動である. ここで  $\Delta H^\circ$  値は  $3^M < 3^P < 3$  であるので, 3<sup>P</sup> は DNA 標的である phenanthrene が DNA にインターカレーションすることによって 3 や 3<sup>M</sup> に比べてより強い DNA 結合を形成していると考えられる.

**Table 7-1. Thermodynamic parameters determined by ITC for binding of 3, 3<sup>P</sup>, and 3<sup>M</sup> with a linear 33 mer ds-DNA**

Complex	3	3 <sup>P</sup>	3 <sup>M</sup>
$N$ (sites)	$3.81 \pm 0.21$	$6.91 \pm 0.28$	$6.09 \pm 0.09$
$K$ ( $\times 10^5 \text{ M}^{-1}$ )	$1.31 \pm 0.21$	$0.79 \pm 0.17$	$1.67 \pm 0.16$
$\Delta H^\circ$ ( $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	$-2.25 \pm 0.10$	$-3.85 \pm 0.23$	$-1.79 \pm 0.04$
$\Delta S^\circ$ ( $\text{cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ )	16.1	10.0	18.1

錯体溶液に ct-DNA 溶液を添加した際の電子スペクトル変化を Figure 7-12 に示す. ct-DNA 溶液を加えると, 220–270 nm の benzenoid band の吸光度が減少した. これは  $3^P$  が phenanthrene 部位で DNA にインターカレーションしたことを支持する結果である.

以上の結果より,  $3^P$  は phenanthrene 部位で DNA にインターカレートして  $3$  や  $3^M$  よりも強固に DNA に結合するといえる. その結果,  $3^P$  は  $3$  や  $3^M$  よりも低濃度で高い DNA dsb 活性を示したと考えられる.



**Figure 7-12.** Electronic absorption spectral change of  $3^P$  upon addition of ct-DNA (0 (red)–15 (purple) eq) to a solution of complex (10  $\mu$ M) in MES buffer (10 mM, pH 6.0), and NaCl (10 mM). The absorption band of DNA is subtracted from each absorption spectrum obtained upon addition of DNA to  $3^P$ .

#### 7-4. 結論

本章では 9-phenanthrenyl (P)や methyl (M)を持つ-CONH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHCO-リンカーを導入した錯体 [Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3<sup>P</sup>)](OAc) (**3<sup>P</sup>**) および [Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3<sup>M</sup>)](OAc) (**3<sup>M</sup>**)を開発し, **3<sup>P</sup>** が AscNa 存在下の還元的 O<sub>2</sub> 活性化で DNA dsb を大きく促進することを見出した. 速度論的, 分光学的, 電気化学的, 阻害, HO•生成, DNA 結合測定から, **3<sup>P</sup>** の DNA 結合様式が DNA dsb の burst を可能にする重要な特徴であることが明らかになった. これらの結果は, 遺伝子編集や治療への応用に有用な DNA 二本鎖切断剤の開発に新たな方法論を提供する可能性がある.

## 7-5. 実験方法

### 7-5-1. 試薬

試薬については、合成中間体や錯体を除き、高純度製品を和光純薬工業、東京化成、シグマアルドリッチ社製から選択して購入した。溶媒については、合成に用いるものは必要に応じて乾燥蒸留した。スーパーコイルドプラスミド pUC19 DNA は、ニッポンジーン社から購入した試薬を使用した。仔ウシ胸腺由来のデオキシリボ核酸ナトリウム塩 (type I, fibers) (ct-DNA) は Sigma-Aldrich から購入した。33 mer oligo DNA 5'-d(GAC TCC ACA GTG CAT ACG TGG GCT CCA ACA GGT)-3' とその相補鎖を Thermo Fisher Scientific から購入し、アニーリングすることで 33 mer 二本鎖 DNA にした。3 は既報の論文に従って合成した<sup>[3]</sup>。

### 7-5-2. 測定装置

元素分析(C, H, N)は、Perkin-Elmer 社製 Elemental Analyzer 2400 II を用いて測定した。UV-vis 吸収スペクトルは、Agilent 社製 8454 紫外可視分光光度計を用いて測定した。pH 測定は、HORIBA 製 LAQUA electrode を標準緩衝液で校正した後に測定した。Electron spray ionization MS (ESI MS) 及び Cold spray ionization MS (CSI MS) スペクトルは、日本電子製 JMS-T100CSR the AccuTOF CS を用いて、MeOH, MeCN または H<sub>2</sub>O を溶媒として測定した。赤外線(IR)スペクトルは、SHIMADZU Single Reflection HATR IRAffinity-1 MIRacle 10 で測定した。<sup>1</sup>H NMR スペクトルは、日本電子製 ECA-500RX フーリエ変換核磁気共鳴装置(500 MHz)を使用し、基準物質として tetramethylsilane (TMS) または sodium 3-(trimethylsilyl)propionate-2,2,3,3-*d*<sub>4</sub> (TSP) を用いて測定した。蛍光スペクトルは、HITACHI Spectral fluorometer F-7000 で測定した。等温滴定型熱量(ITC)測定は、Malvern 社製 MicroCal Isothermal Titration Calorimeter VP-ITC を用いて行った。

### 7-5-3. 配位子 (HL3<sup>X</sup>) およびその二核銅(II)錯体 (3<sup>X</sup>) の合成

#### *N*-(8-azido-3,6-dioxaoctyl)-2,6-bis(*N,N*-bis(2-pyridylmethyl)carbamoyl)-1-hydroxy-4-benzamide (35) の合成

100 mL の二口ナスフラスコに回転子を入れ、ジムロートと三方コックを取り付けた後、真空乾燥し、ヒートガンで炙った。100 mL のナスフラスコに **18** (**n** = **2**) (1.01 g, 1.35 mmol) と CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL), SOCl<sub>2</sub> (445 μL) を加えた後、60°C の油浴下で 2 時間攪拌した。dart-MS にて反応追跡を行った後、SOCl<sub>2</sub> を留去し、真空乾燥した。K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.30 g, 16.6 mmol), DPA (1.18 g, 5.94 mmol), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) を窒素雰囲気下で先の 100 mL の二口

ナスフラスコに加え、脱気及び窒素置換しアルミで遮光した後一晩攪拌した。ESI-MSで反応追跡後、セライト濾過で  $K_2CO_3$  を取り除くと濃い黄色の濾液が得られた。濾液を 100 mL 分液漏斗に移し、 $H_2O$  ( $3 \times 15$  mL) で分液洗浄した。 $CH_2Cl_2$  層に  $Na_2SO_4$  を加えて脱水した後、ヌツチェで濾過し、濾液をロータリーエバポレーターで濃縮、真空乾燥すると濃い黄色の油状物質を得た。この油状物質を最小量の  $CHCl_3$  に溶解させ、アルミナカラムクロマトグラフィー (gradient  $CHCl_3/MeOH$  from 100/0 to 30/1) 及び HPLC で精製した。目的物が入っている分液を集め、ロータリーエバポレーターで濃縮、真空乾燥すると淡黄色の固体が得られた (1.46 g, Yield 72%)。 $^1H$ NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ );  $\delta$ /ppm: 8.50 (d,  $J=4.6$  Hz, 4H, CH), 7.97 (s, 2H, CH), 7.74 (t,  $J=6.9$  Hz, 2H, CH), 7.65 (t,  $J=6.9$  Hz, 2H, CH), 7.54 (d,  $J=6.9$  Hz, 2H, CH), 7.23 – 7.26 (m, 2H, CH), 7.19 – 7.23 (m, 4H, CH), 6.71 (s, 1H, NH), 4.96 (s, 4H,  $CH_2$ ), 4.63 (s, 4H,  $CH_2$ ), 3.60 – 3.69 (m, 10H,  $CH_2$ ), 3.38 (t,  $J=5.7$  Hz, 2H,  $CH_2$ ).

#### 5-((2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)-1,3-di(bis(2-pyridylmethyl)carbamoyl)-2-hydroxybenzene (36)の合成

50 mL ナスフラスコに回転子を入れ、三方コック、バルーンを取り付けて真空乾燥した。反応容器に **35** (204 mg, 274  $\mu$ M), Pd-C (230 mg), dry MeOH (3 mL) 加えて  $H_2$  置換し 30 分激しく攪拌した。IR で  $N_3$  のピークがないことを確認しセライト濾過、ロータリーエバポレーターで濃縮し真空乾燥すると淡黄色固体が得られた (178 mg, Yield 90%)。ESI MS (MeOH  $m/z$ , positive mode). Calcd for [**36** + H] $^+$ : 719.3. Found: 719.2.

#### 5-((2-(2-(2-(Carbamoyl-9-phenanthrene)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)-1,3-di(bis(2-pyridylmethyl)carbamoyl)-2-hydroxybenzene (HL3<sup>P</sup>)の合成

100 mL 二口ナスフラスコに回転子、**36** (178 mg, 0.247 mmol) を入れ、THF (17 mL) に溶かした後、 $Et_3N$  (158  $\mu$ L) 加えると溶液が橙色に変化した。それを氷浴中で激しく攪拌しながら、Phenanthrene-9-carbonyl chloride (**8**) (54.2 mg, 0.225 mmol) を THF (15 mL) に溶かしたものをパスツールでゆっくりと加えた。脱気窒素置換後、氷浴に浸しながら攪拌した。1 時間攪拌後、室温に戻して一晩攪拌した。ロータリーエバポレーターで THF を除去すると、白色の固体が生成した。その固体を  $CHCl_3$  (20 mL) に溶解させ、 $H_2O$  ( $3 \times 5$  mL) で分液し、有機層に  $Na_2SO_4$  を加えて脱水した。ヌツチェを用いて吸引濾過し、真空乾燥すると白色固体が得られた。この固体を最小量の  $CHCl_3$  に溶解させ、アルミナカラムクロマトグラフィー (gradient  $CHCl_3/MeOH$  from 100/0 to 30/1) で精製した。目的物が入っ

ているフラクションを集め、ロータリーエバポレーターで濃縮、真空乾燥すると白色の固体が得られた(128 mg, Yield 62%). ESI MS (MeCN  $m/z$ , positive mode). Calcd for [HL3<sup>P</sup> + H]<sup>+</sup>: 922.4. Found: 922.6.

#### 5-(((Me-9-carbamoyl-3,6-dioxaoctyl)carbamoyl)-1,3-di(bis(2-pyridylmethyl)carbamoyl)-2-hydroxybenzene (HL3<sup>M</sup>)の合成

100 mL ナスフラスコに **36** (200 mg, 0.278 mmol) と K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (77.0 mg, 0.557 mol) を入れ、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) に溶かした。そこに、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) に溶解させた acetyl chloride (21.0 μL, 0.296 mmol) を加え、窒素置換した。一晩攪拌した後、濾過した。濾液を H<sub>2</sub>O (3 × 10 mL) で分液し、有機層に Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えて脱水した。濾過後、エバポレーターで濾液を濃縮すると褐色固体が得られた。この固体を最小量の CHCl<sub>3</sub> に溶解させ、アルミナカラムクロマトグラフィー (gradient CHCl<sub>3</sub>/MeOH from 100/0 to 30/1) で精製した。目的物の入っているフラクションを集め、ロータリーエバポレーターで濃縮、真空乾燥すると白色の固体が得られた(131 mg, Yield 62%). ESI MS (MeCN  $m/z$ , positive mode). Calcd for [HL3<sup>M</sup> + H]<sup>+</sup>: 760.3. Found: 760.5.

#### 二核銅(II)錯体 3<sup>P</sup> の合成

MeCN (3 mL) に Cu(OAc)<sub>2</sub> (27.5 mg, 0.151 mmol) を溶解させた溶液に、MeCN (2 mL) に HL3<sup>P</sup> (47.0 mg, 0.0757 mmol) を溶解させた溶液をゆっくり加え、室温で 30 分間攪拌した。反応溶液をロータリーエバポレーターで濃縮し、最終体積を約 1 mL 程度にした。この溶液に Et<sub>2</sub>O を加えると固体が析出したので、これを濾過し、真空乾燥すると緑色の固体が得られた(50.0 mg, Yield: 80%). ESI MS (MeCN  $m/z$ , positive mode). Calcd for [3<sup>P</sup> - OAc]<sup>+</sup>: 1165.3. Found: 1165.2.

#### 二核銅(II)錯体 3<sup>M</sup> の合成

MeCN (3 mL) に Cu(OAc)<sub>2</sub> (24.2 mg, 0.151 mmol) を溶解させた溶液に、MeCN (2 mL) に HL3<sup>M</sup> (50.0 mg, 0.0657 mmol) を溶解させた溶液をゆっくり加え、室温で 30 分間攪拌した。反応溶液をロータリーエバポレーターで濃縮し、最終体積を約 1 mL 程度にした。この溶液に Et<sub>2</sub>O を加えると固体が析出したので、これを濾過し、真空乾燥すると緑色の固体が得られた(57.3 mg, Yield: 82%). ESI MS (MeCN  $m/z$ , positive mode). Calcd for [3<sup>M</sup> - OAc]<sup>+</sup>: 1005.0. Found: 1004.8.

#### 7-5-4. DNA 切断実験

$3^P$ ,  $3^M$  の DNA 切断活性は, pUC19 DNA を用い, アガロースゲル電気泳動法によって評価した. 1.5 mL エッペンチューブに NaCl (10 mM), buffer (pH 6.0 (MES)または pH 7.4 (MOPS)), 10 mM), pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp), Cu(OAc)<sub>2</sub> (90  $\mu$ M),  $3^P$ ,  $3^M$  (0–18  $\mu$ M), AscNa (0–200  $\mu$ M)となるように調製した溶液を加え, 37°C の暗所でインキュベーションした. 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 60 分毎にサンプルを採取し, loading buffer (0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol FF, 1.0 mM EDTA and 30% glycerol)を用いて反応をクエンチした. 各サンプルを TAE buffer (Tris/acetate/EDTA)を用いて作成した 1%アガロースゲルにローディングし, 100 V で約 1 時間電気泳動を行った. その後, EtBr (0.5  $\mu$ g  $\mu$ L<sup>-1</sup>)染色を 1 時間行い, VILBER LOURMAT E-BOX-CX5.TS Edge-20.M を用いてゲルバンドを撮影した. 撮影したバンドを, Form I の染色補正值 1.06 を用い, ImageJ ソフトウェアによって解析を行った. この測定は最低 3 回行い, 再現性をとった.

#### 7-5-5. $3^P$ , $3^M$ の Cyclic Voltammetry (CV)測定

200 mM Buffer 溶液(pH 6.0 (MES), 10 mL), 2 mM NaOAc に  $3^X$  が 0.5 mM となるように溶液を調製した. この溶液に水系参照電極(Ag/AgCl), 作用電極として glassy carbon, 対極として Pt wire を浸し, 窒素を 10 分間バブリングした後, CV 測定を行った. なお, 測定感度は 10  $\mu$ A/V, 掃引速度は 10 mV s<sup>-1</sup> で行った.

#### 7-5-6. coumarin を用いた HO•生成の検出

$3$ ,  $3^P$ ,  $3^M$  (30  $\mu$ M), coumarin (0.5 mM), NaCl (10 mM)の Buffer 溶液(pH 6.0 (MES), 10 mM)を 4 面セルに加え, 37  $\pm$  0.2°C に保った. この溶液に AscNa 水溶液を 150  $\mu$ M になるように加え, 励起波長 332 nm での 452 nm の蛍光強度を 60 分間, スリット幅 5.0 nm で測定した.

#### 7-5-7. Pentafluorobenzenesulfonyl Fluorescein (PFBS)を用いた H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成の検出

$3$ ,  $3^P$ ,  $3^M$  (30  $\mu$ M), PFBS (25  $\mu$ M), NaCl (10 mM)の Buffer 溶液(pH 6.0 (MES), 10 mM)を 4 面セルに加え, 37  $\pm$  0.2°C に保った. この溶液に AscNa 水溶液を 150  $\mu$ M になるように加え, 励起波長 485 nm での 513 nm の蛍光強度を 60 分間, スリット幅 5.0 nm で測定した.

#### 7-5-8. 等温滴定型熱量(ITC)測定

セルに, 33 mer オリゴ二重鎖 DNA (18.75  $\mu$ M), Buffer (pH6.0 (MES), 10 mM), NaCl (10 mM)となるように調製した溶液を加えた. シリンジには, **3**, **3<sup>P</sup>**, **3<sup>M</sup>** (1.0 mM), Buffer (pH6.0 (MES), 10 mM), NaCl (10 mM)の溶液を加えた. 37°C において DNA 溶液に各錯体溶液を 28 回(10  $\mu$ L/回)加え, その際に発生する熱量を測定した. 得られたデータから希釈熱を引き, ORIGIN ソフトウェアを用いて解析した.

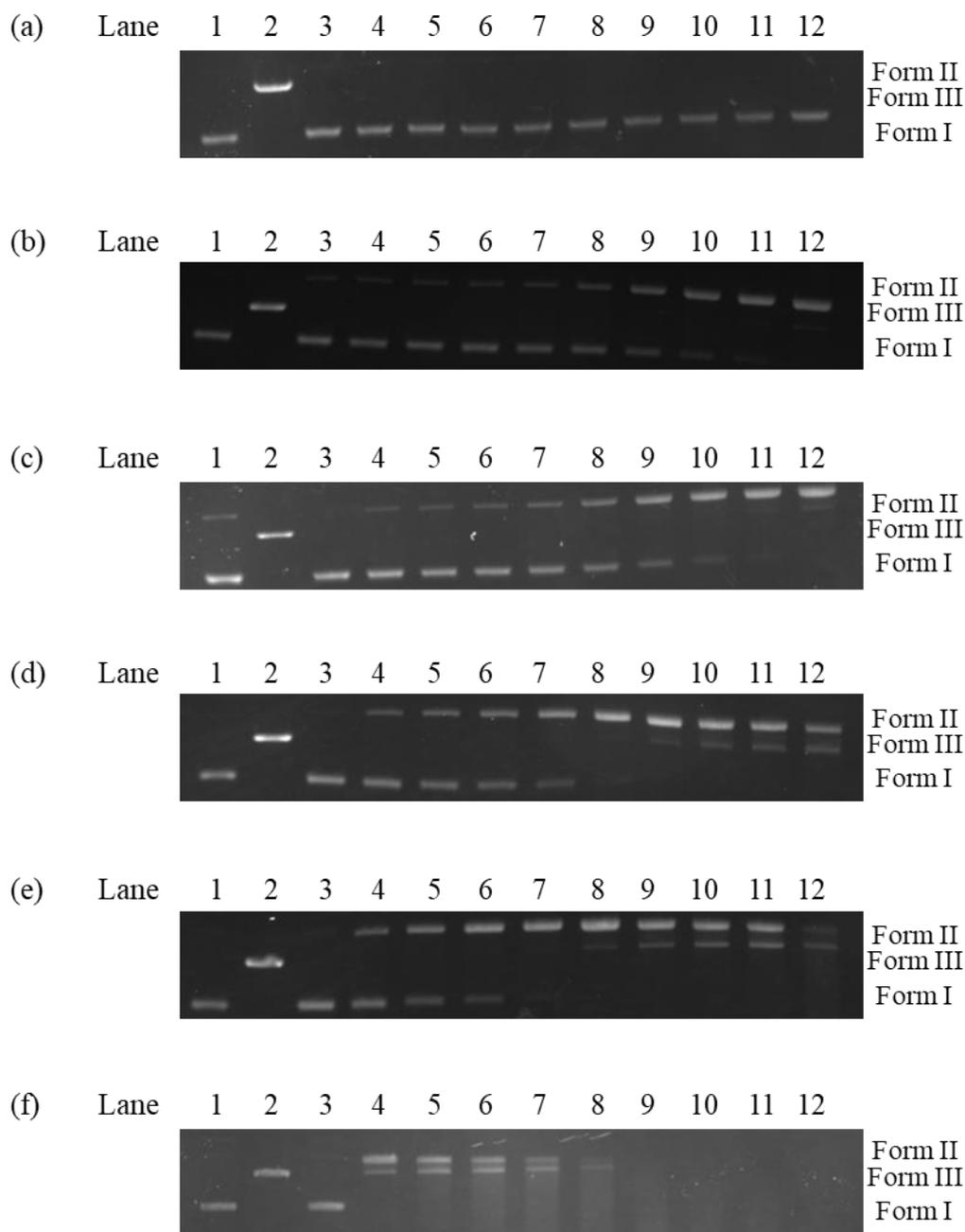
#### 7-5-9. ct-DNA 存在下での **3<sup>P</sup>** の電子スペクトル測定

**3<sup>P</sup>** (10  $\mu$ M), NaCl (10 mM)の Buffer 溶液(pH 6.0 (MES), 10 mM)を 2 面セルに加え, 37  $\pm$  0.2°C に保った. この溶液に ct-DNA 水溶液を 30  $\mu$ M bp 毎に 150  $\mu$ M bp まで添加し, 300–1000 nm の範囲で各スペクトルを測定した.

## 7-6. 参考文献

- [1] M. Hata, I. Saito, Y. Kadoya, Y. Tanaka, Y. Hitomi, and M. Kodera, *Dalton Trans.* **2022**, 51, 4720–4727.
- [2] M. Hata, J. Ueno, Y. Hitomi, and M. Kodera, *ACS Omega*, **2023**, 8, 28690–28701.
- [3] M. Hata, Y. Kadoya, Y. Hitomi, and M. Kodera, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2022**, 95, 1546–1552.
- [4] Y. Nosaka, and A. Y. Nosaka, *Chem. Rev.* **2017**, 117, 11302.
- [5] S. Lechnitz, J. Heinrich, and N. Kulak, *Chem. Commun.* **2018**, 54, 13411.

## 7-7. Supporting Information



**Figure S7-1.** Agarose gel electrophoresis profiles upon reaction of pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp) with  $3^P$  (2–18  $\mu$ M) and AscNa (150  $\mu$ M) at pH 6.0. (a)–(f) correspond to  $[3^P]$  of 2, 5, 8, 10, 15, and 18  $\mu$ M, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively.

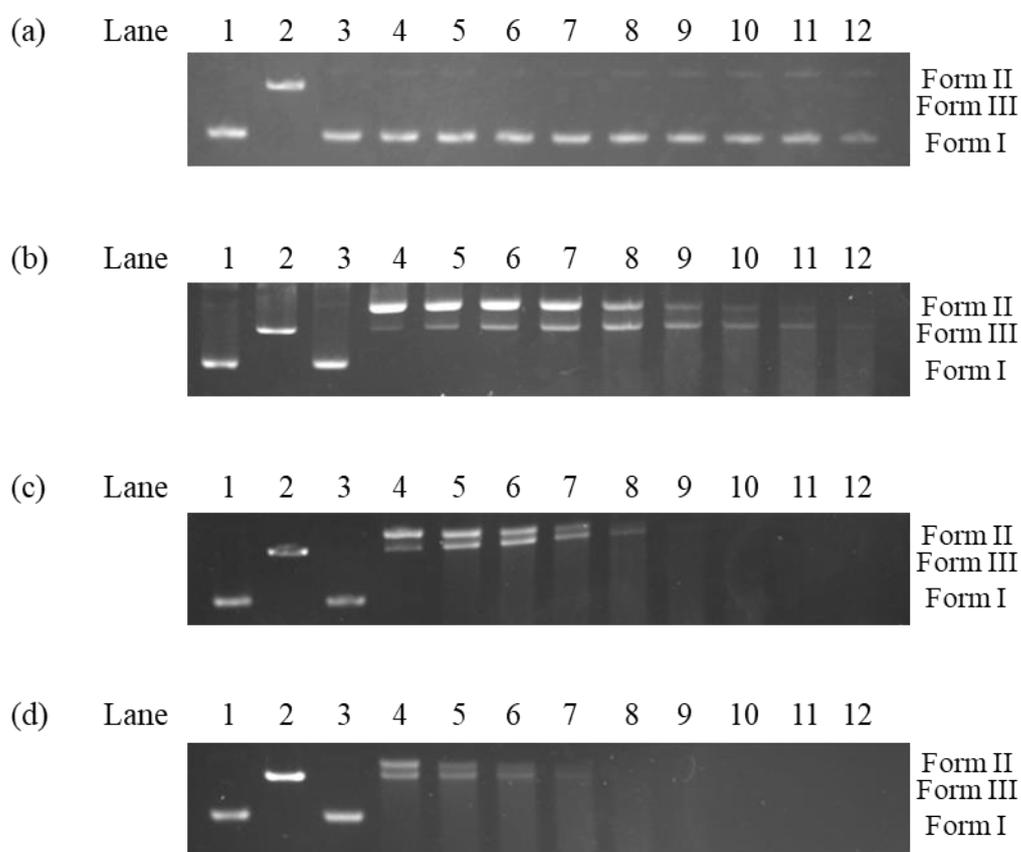
**Table S7-1. Fraction of Form I, Form II, and Form III in the DNA cleavage of 3<sup>P</sup> (0–18 μM) and AscNa (150 μM).**

Complex (μM)	AscNa (μM)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
0	150	0	99.6 ± 0.2	0.4 ± 0.2	-
		1	99.3 ± 0.3	0.7 ± 0.3	-
		2	99 ± 0.3	1 ± 0.3	-
		3	98.8 ± 0.5	1.2 ± 0.5	-
		5	98.7 ± 0.5	1.3 ± 0.5	-
		10	98.3 ± 0.7	1.7 ± 0.7	-
		20	98.1 ± 0.7	1.9 ± 0.7	-
		30	97.9 ± 0.8	2.1 ± 0.8	-
		40	97.6 ± 1.0	2.4 ± 1.0	-
		60	97.2 ± 1.3	2.8 ± 1.3	-
2	150	0	97.8 ± 0.5	2.2 ± 0.5	-
		1	97.7 ± 0.5	2.3 ± 0.5	-
		2	97.4 ± 0.7	2.6 ± 0.7	-
		3	97.2 ± 0.9	2.8 ± 0.9	-
		5	96.8 ± 1.1	3.2 ± 1.1	-
		10	96.2 ± 1.0	3.8 ± 1.0	-
		20	96.1 ± 1.0	3.9 ± 1.0	-
		30	94.1 ± 0.3	5.9 ± 0.3	-
		40	89.6 ± 1.8	10.4 ± 1.8	-
		60	76.3 ± 2.3	23.7 ± 2.3	-
5	150	0	95.7 ± 3.9	4.3 ± 3.9	-
		1	91.1 ± 4.4	8.9 ± 4.4	-
		2	88.5 ± 4.4	11.5 ± 4.4	-
		3	85.9 ± 2.0	14.1 ± 2.0	-
		5	79.7 ± 2.0	20.3 ± 2.0	-
		10	68.4 ± 3.5	31.6 ± 3.5	-
		20	42.1 ± 3.9	57.9 ± 3.9	-
		30	22.5 ± 3.6	77.3 ± 3.6	0.3 ± 0.4
		40	12.9 ± 4.1	86.6 ± 3.7	0.6 ± 0.8
		60	4.4 ± 2.7	93.7 ± 2.7	1.9 ± 2.3

8	150	0	$97.4 \pm 0.3$	$2.6 \pm 0.3$	-
		1	$89.2 \pm 1.1$	$10.8 \pm 1.1$	-
		2	$84.5 \pm 2$	$15.5 \pm 2$	-
		3	$78.7 \pm 3.8$	$21.3 \pm 3.8$	-
		5	$70.1 \pm 3.1$	$29.9 \pm 3.1$	-
		10	$48.8 \pm 6.7$	$51.2 \pm 6.7$	-
		20	$18.5 \pm 7.9$	$81.5 \pm 7.9$	-
		30	$8 \pm 4.1$	$91.6 \pm 3.6$	$0.5 \pm 0.5$
		40	$1.6 \pm 1.6$	$95 \pm 3.4$	$3.4 \pm 1.8$
		60	$0.0 \pm 0.0$	$92.6 \pm 0.1$	$7.4 \pm 0.1$
10	150	0	$98.2 \pm 0.8$	$1.8 \pm 0.8$	-
		1	$83.1 \pm 4.1$	$16.9 \pm 4.1$	-
		2	$71.6 \pm 4.2$	$28.4 \pm 4.2$	-
		3	$55.2 \pm 3.9$	$44.8 \pm 3.9$	-
		5	$33.1 \pm 3.5$	$66.9 \pm 3.5$	-
		10	$7.8 \pm 3.7$	$91.3 \pm 3.1$	$0.9 \pm 1.0$
		20	$2.0 \pm 3.0$	$93.9 \pm 2.1$	$4.1 \pm 1.9$
		30	$0.0 \pm 0.0$	$88.4 \pm 3.5$	$11.6 \pm 3.5$
		40	$0.0 \pm 0.0$	$82.5 \pm 4.4$	$17.5 \pm 4.4$
		60	$0.0 \pm 0.0$	$68.6 \pm 4.2$	$31.4 \pm 4.2$
15	150	0	$96.5 \pm 2.3$	$3.5 \pm 2.3$	-
		1	$0.8 \pm 1.9$	$97 \pm 1.6$	$2.1 \pm 1.6$
		2	$0.0 \pm 0.0$	$93.7 \pm 2.9$	$6.3 \pm 2.9$
		3	$0.0 \pm 0.0$	$86.1 \pm 3.6$	$13.9 \pm 3.6$
		5	$0.0 \pm 0.0$	$67.0 \pm 2.6$	$33.0 \pm 2.6$
		10	$0.0 \pm 0.0$	$42.5 \pm 4.2$	$57.5 \pm 4.2$
		20	$0.0 \pm 0.0$	$24.5 \pm 3.0$	$75.5 \pm 3.0$
		30	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		40	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		60	n. d.*	n. d.*	n. d.*

		0	$94.4 \pm 3.1$	$5.6 \pm 3.1$	-
		1	$0.0 \pm 0.0$	$71.9 \pm 3.5$	$28.1 \pm 3.5$
		2	$0.0 \pm 0.0$	$54.0 \pm 4.9$	$46.0 \pm 4.9$
		3	$0.0 \pm 0.0$	$34.8 \pm 3.3$	$65.2 \pm 3.3$
18	150	5	$0.0 \pm 0.0$	$28.2 \pm 3.0$	$71.8 \pm 3.0$
		10	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		20	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		30	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		40	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		60	n. d.*	n. d.*	n. d.*

\*n. d. means cannot determine.



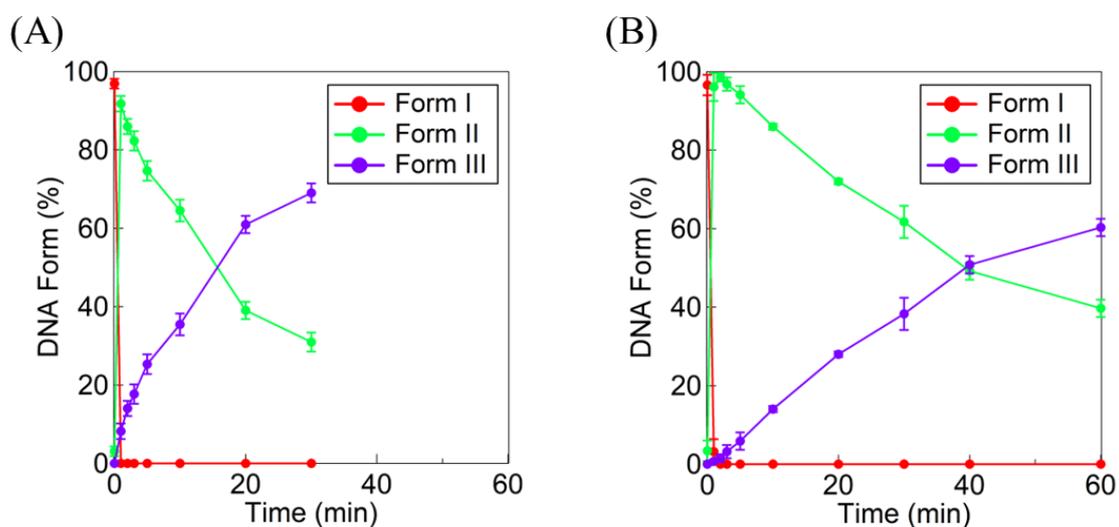
**Figure S7-2.** Agarose gel electrophoresis profiles upon reaction of pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp) with  $3^P$  (18  $\mu$ M) and AscNa (0–150  $\mu$ M) at pH 6.0. (a)–(f) correspond to [AscNa] of 0, 50, 100, and 200  $\mu$ M, respectively. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively.

**Table S7-2. Fraction of Form I, Form II, and Form III in the DNA cleavage of 3<sup>P</sup> (18 μM) and AscNa (0–200 μM).**

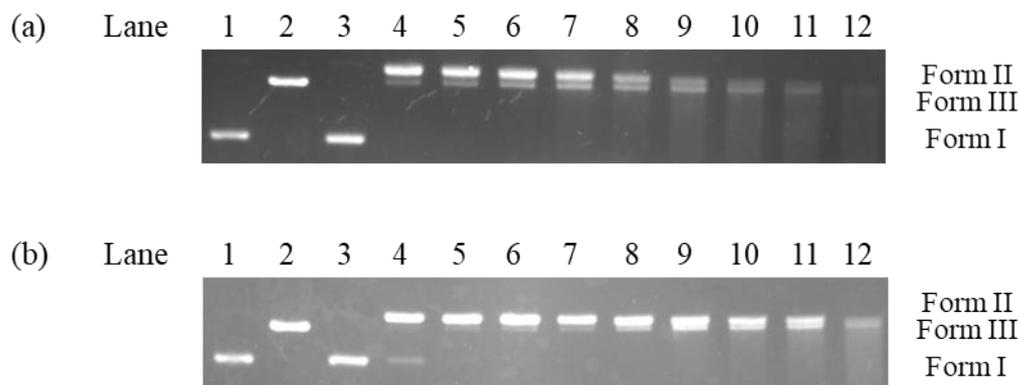
Complex (μM)	AscNa (μM)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
18	0	0	98.6 ± 0.6	1.4 ± 0.6	-
		1	98.1 ± 1.0	1.9 ± 1.0	-
		2	97.8 ± 1.0	2.2 ± 1.0	-
		3	96.3 ± 0.1	3.7 ± 0.1	-
		5	95.1 ± 0.2	4.9 ± 0.2	-
		10	94.0 ± 0.1	6.0 ± 0.1	-
		20	92.4 ± 0.6	7.6 ± 0.6	-
		30	90.0 ± 0.3	10.0 ± 0.3	-
		40	87.9 ± 0.6	12.1 ± 0.6	-
		60	85.7 ± 0.8	14.3 ± 0.8	-
18	50	0	97.0 ± 2.0	3.0 ± 2.0	-
		1	0.0 ± 0.0	95.1 ± 1.9	4.9 ± 1.9
		2	0.0 ± 0.0	89.4 ± 3.4	10.6 ± 3.4
		3	0.0 ± 0.0	84.0 ± 2.2	16.0 ± 2.2
		5	0.0 ± 0.0	75.3 ± 3.5	24.7 ± 3.5
		10	0.0 ± 0.0	54.1 ± 3.5	45.9 ± 3.5
		20	0.0 ± 0.0	24.9 ± 4.6	75.1 ± 4.6
		30	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		40	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		60	n. d.*	n. d.*	n. d.*
18	100	0	94.9 ± 3.7	5.1 ± 3.7	-
		1	0.0 ± 0.0	90.9 ± 3.6	9.1 ± 3.6
		2	0.0 ± 0.0	73.7 ± 2.8	26.3 ± 2.8
		3	0.0 ± 0.0	65.6 ± 3.5	34.4 ± 3.5
		5	0.0 ± 0.0	42.8 ± 3.7	57.2 ± 3.7
		10	0.0 ± 0.0	24.4 ± 3.3	75.6 ± 3.3
		20	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		30	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		40	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		60	n. d.*	n. d.*	n. d.*

		0	94.0 ± 3.9	6.0 ± 3.9	-
		1	0.0 ± 0.0	61.7 ± 4.6	38.3 ± 4.6
		2	0.0 ± 0.0	33.3 ± 4.7	66.7 ± 4.7
		3	0.0 ± 0.0	25.8 ± 4.0	74.2 ± 4.0
18	200	5	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		10	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		20	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		30	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		40	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		60	n. d.*	n. d.*	n. d.*

\*n. d. means cannot determine.



**Figure S7-3.** Time courses for Form I (red), II (green), and III (purple) in the reaction of **3** (20  $\mu\text{M}$ ) (A) and **3<sup>M</sup>** (18  $\mu\text{M}$ ) (B). Experimental conditions: [pUC19 DNA] = 50  $\mu\text{M}$  bp, [**3**] = 20  $\mu\text{M}$  or [**3<sup>M</sup>**] = 18  $\mu\text{M}$ , [AscNa] = 150  $\mu\text{M}$ , [Cu(OAc)<sub>2</sub>] = 90  $\mu\text{M}$ , [NaCl] = 10 mM, [MES buffer] = 10 mM (pH 6.0) at 37°C. Experiments were carried out at least three times.

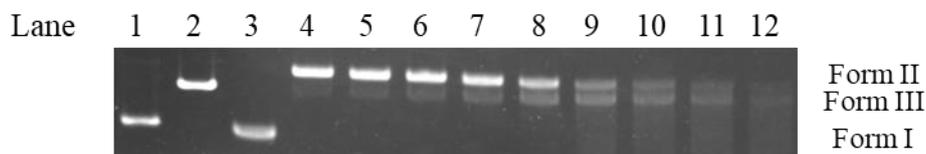


**Figure S7-4.** Agarose gel electrophoresis profiles upon reaction of pUC19 DNA (50  $\mu\text{M}$  bp) with **3** (20  $\mu\text{M}$ ) (a) or **3<sup>M</sup>** (18  $\mu\text{M}$ ) (b), and AscNa (150  $\mu\text{M}$ ) at pH 6.0. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively.

**Table S7-3. Fraction of Form I, Form II, and Form III in the DNA cleavage of 3 (20  $\mu\text{M}$ ) or 3<sup>M</sup> (18  $\mu\text{M}$ ), and AscNa (150  $\mu\text{M}$ ).**

Complex ( $\mu\text{M}$ )	AscNa ( $\mu\text{M}$ )	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
3 (20 $\mu\text{M}$ )	150	0	96.9 $\pm$ 1.2	3.1 $\pm$ 1.2	-
		1	0.0 $\pm$ 0.0	91.8 $\pm$ 2.0	8.2 $\pm$ 2.0
		2	0.0 $\pm$ 0.0	86.0 $\pm$ 1.9	14 $\pm$ 1.9
		3	0.0 $\pm$ 0.0	82.3 $\pm$ 2.5	17.7 $\pm$ 2.5
		5	0.0 $\pm$ 0.0	74.7 $\pm$ 2.5	25.3 $\pm$ 2.5
		10	0.0 $\pm$ 0.0	64.5 $\pm$ 2.8	35.5 $\pm$ 2.8
		20	0.0 $\pm$ 0.0	39.1 $\pm$ 2.2	60.9 $\pm$ 2.2
		30	0.0 $\pm$ 0.0	31.0 $\pm$ 2.4	69.0 $\pm$ 2.4
		40	n. d.*	n. d.*	n. d.*
		60	n. d.*	n. d.*	n. d.*
3 <sup>M</sup> (18 $\mu\text{M}$ )	150	0	96.6 $\pm$ 2.6	3.4 $\pm$ 2.0	-
		1	3.2 $\pm$ 3.2	96.1 $\pm$ 3.6	0.7 $\pm$ 0.4
		2	0.0 $\pm$ 0.0	98.5 $\pm$ 1.0	1.5 $\pm$ 1.0
		3	0.0 $\pm$ 0.0	96.8 $\pm$ 1.7	3.2 $\pm$ 1.7
		5	0.0 $\pm$ 0.0	94.1 $\pm$ 2.2	5.9 $\pm$ 2.2
		10	0.0 $\pm$ 0.0	86.0 $\pm$ 0.8	14.0 $\pm$ 0.8
		20	0.0 $\pm$ 0.0	72.0 $\pm$ 0.7	28.0 $\pm$ 0.7
		30	0.0 $\pm$ 0.0	61.7 $\pm$ 4.1	38.3 $\pm$ 4.1
		40	0.0 $\pm$ 0.0	49.2 $\pm$ 2.2	50.8 $\pm$ 2.2
		60	0.0 $\pm$ 0.0	39.7 $\pm$ 2.2	60.3 $\pm$ 2.2

\*n. d. means cannot determine.

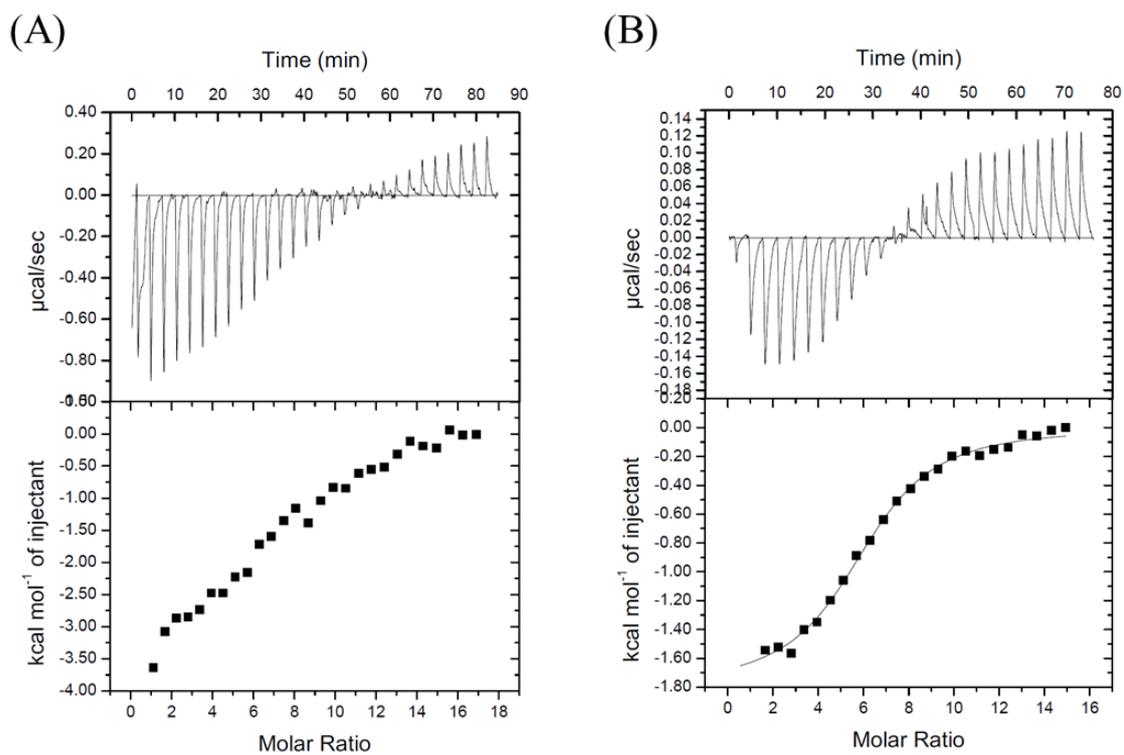


**Figure S7-5.** Agarose gel electrophoresis profiles upon reaction of pUC19 DNA (50  $\mu$ M bp) with  $3^P$  (18  $\mu$ M) and AscNa (150  $\mu$ M) at pH 6.0. Lane 1: DNA control; lane 2: DNA with Hind III; lanes 3–12: corresponded to the time of 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 40, and 60 min, respectively.

**Table S7-4.** Fraction of Form I, Form II, and Form III in the DNA cleavage of  $3^P$  (18  $\mu$ M) and AscNa (150  $\mu$ M) at pH 7.4.

Complex ( $\mu$ M)	AscNa ( $\mu$ M)	Time (min)	Form I (%)	Form II (%)	Form III (%)
		0	98.3 $\pm$ 1.0	1.7 $\pm$ 1.0	-
		1	0.0 $\pm$ 0.0	99.4 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1
		2	0.0 $\pm$ 0.0	98.6 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.2
		3	0.0 $\pm$ 0.0	98.2 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.4
		5	0.0 $\pm$ 0.0	97.1 $\pm$ 0.7	2.9 $\pm$ 0.7
18	150	10	0.0 $\pm$ 0.0	90.9 $\pm$ 2.5	9.1 $\pm$ 2.5
		20	0.0 $\pm$ 0.0	63.4 $\pm$ 4.4	36.6 $\pm$ 4.4
		30	0.0 $\pm$ 0.0	42.3 $\pm$ 3.7	57.7 $\pm$ 3.7
		40	0.0 $\pm$ 0.0	32.9 $\pm$ 5.0	67.1 $\pm$ 5.0
		60	n. d.*	n. d.*	n. d.*

\*n. d. means cannot determine.



**Figure S7-6.** Isothermal calorimetric titration curves:  $3^P$  (A) or  $3^M$  (B) at pH 6.0. Experimental conditions: A solution of  $3^P$  or  $3^M$  (1 mM) in a syringe was added, in an equal interval 28 times, to a solution of the linear 33 mer ds-DNA (18.75  $\mu\text{M}$ ) in the cell in the presence of NaCl (10 mM) in pH 6.0 (MES, 10 mM) at 37°C.

## 第八章：総括

本博士論文では、抗がん剤の副作用軽減を目指して、正常細胞とは異なるがん細胞の微小環境でのみ細胞毒性を示す二核銅錯体の開発を行った。二核銅錯体の構造機能相関の解明は、副作用の少ない抗がん剤の設計および開発を行う上で重要であるといえる。以下に、各章で得られた知見と各章で開発した二核銅錯体を横断的に比較することで得られた知見をまとめ、本論文の総括とする。

第二章では、当研究室で開発した *p*-cresol の 2,6 位にペンダント基として環状アミン 1,4,7,10-tetraazacyclododecane (cyclen) を持つ amide-tether 型配位子の二核銅錯体  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{L1})](\text{ClO}_4)_2$  (**1**) の 4 位メチル基を  $-\text{CONH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$ -phenanthrene で置換した DNA 標的部位を持つ二核銅錯体  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{L1}^{\text{P2}})](\text{ClO}_4)_2$  (**1**<sup>P2</sup>) を新たに開発した。分光測定から、**1**<sup>P1</sup> は **1** と同様に  $\text{H}_2\text{O}_2$  との反応で安定な  $\mu$ -1,1-hydroperoxodicopper(II) 錯体 (**2**<sup>P2</sup>) を形成することが示された。Phenanthrene の導入で **1**<sup>P2</sup> は **1** と比べて DNA 結合能力が 9 倍向上し、過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 存在下での DNA 切断活性が 9.3 倍向上した。さらに、**1**<sup>P2</sup> の細胞毒性は **1** と比べて約 12 倍向上した。また、細胞死経路の同定から、**1**<sup>P2</sup> がミトコンドリア経由のアポトーシスを誘導することを明らかにした。以上より、phenanthrene 部位は DNA 標的部位として作用し、**1**<sup>P2</sup> のミトコンドリア経由の内因性アポトーシスを介したがん細胞選択的毒性を大きく向上させることが明らかになった。

第三章では、第二章で見出された phenanthrene による DNA 標的の抗がん活性機能の解明とその向上を目指し、 $-\text{CONH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$ -phenanthrene (P-リンカー) の鎖長を変化させた二核銅錯体  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{L1}^{\text{Pn}})](\text{ClO}_4)_2$  (**1**<sup>Pn</sup> ( $n = 1, 3$ )) と phenanthrenyl 基を methyl で置換した  $-\text{CONH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$ -methyl (M-リンカー) を導入した二核銅錯体  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{L1}^{\text{Mn}})](\text{ClO}_4)_2$  (**1**<sup>Mn</sup> ( $n = 1, 2, 3$ )) を新たに開発した。DNA 二本鎖切断活性と細胞毒性はいずれも、P-リンカーは M-リンカーよりも高く、P-リンカーの長さが短い程高かった。鎖長が最も短い  $n = 1$  の P-リンカーを持つ錯体はすい臓がん細胞に対してシスプラチンに匹敵する高い細胞毒性を示すと共に肺がん細胞に対してはシスプラチンでは全く見られない 10 倍以上の高いがん細胞選択的毒性を示した。DNA 二本鎖切断活性と HeLa 細胞に対する細胞毒性の相関を調べたところ、**1**<sup>P1-3</sup> は 44% 相関したが、**1**<sup>M1-3</sup> では 5% であった。この結果から、細胞に取り込まれたときに P-リンカーは特異的に DNA に結合して細胞毒性を大きく向上させるが、M-リンカーは DNA 特異性がないために向上させない事が明らかになった。従って、P-リンカーを持つ **1**<sup>P1-3</sup> はミトコンド

リア DNA の二本鎖切断を通してアポトーシスを誘導することが裏付けられ、DNA 標的としての P-リンカーの役割が明確に示された。

第四章では、*p*-cresol の 2,6 位にペンダント基として dipyridylmethylamine (dpa) を有する amide-tether 型二核銅錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3)](OAc) (**3**) の dpa の 4 位に置換基(電子供与 MeO 基および電子求引 Cl 基)を導入した二核銅(II)錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3<sup>4-MeO</sup>)] [Y] [Y = PF<sub>6</sub> (**3a**<sup>4-MeO</sup>), OAc (**3b**<sup>4-MeO</sup>)], [Cu<sub>2</sub>(μ-1,3-OAc)<sub>2</sub>(L3<sup>4-Cl</sup>)] [Y] [Y = ClO<sub>4</sub> (**3a**<sup>4-Cl</sup>), OAc (**3b**<sup>4-Cl</sup>)] を合成した。分光学的測定と結晶構造解析の結果、置換基の電子効果で銅の配位構造が変化することが示された。この電子効果により、還元剤であるアスコルビン酸ナトリウム(AscNa)との反応で生成する ROS の種類が **3b**<sup>4-MeO</sup> では H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が優勢であり、**3b**<sup>4-Cl</sup> では HO• が優勢であった。また、細胞を用いた測定から、**3b**<sup>4-MeO</sup>、**3b**<sup>4-Cl</sup> は ER, Golgi 体に集積して ROS を生成して細胞死を誘導することが明らかとなった。さらに、がん細胞中でしか ROS 生成を確認できなかった **3b**<sup>4-MeO</sup> はがん細胞選択的な細胞毒性を示したのに対し、がん細胞と正常細胞の両者において ROS を生成していた **3b**<sup>4-Cl</sup> は正常細胞選択性を示したことから、細胞選択的毒性にはがん細胞と正常細胞の環境に応答した ROS 生成が重要であることが示唆された。

第五章では、**3** が、空気下、アスコルビン酸ナトリウム(AscNa)による還元的酸素活性化で supercoiled plasmid pUC19DNA の 26% を 1 分間で直鎖状 DNA に変換する、**3** の高速の DNA 二本鎖切断(dsb)の反応機構を解明した。ここでは、**3** の活性を Robson 型二核銅(II)錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-OH)(bpmp)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (**4**), N4Py の鉄(II)錯体[Fe(MeCN)(N4Py)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (**5**) を用いて比較した。**3** は、**4** と異なり、AscNa で容易に還元され、還元された二核銅錯体の 2 分子が O<sub>2</sub> を 3 電子還元してヒドロキシラジカル(HO•)を生成して高速で DNA を酸化切断した。またこの反応において、**3** は、**5** と異なり DNA に対してエンタルピー駆動で強く結合することが示された。この結果、**3** の速い HO• 生成と DNA 結合様式が、高速の DNA dsb を可能にする重要な特徴であることが明らかとなった。

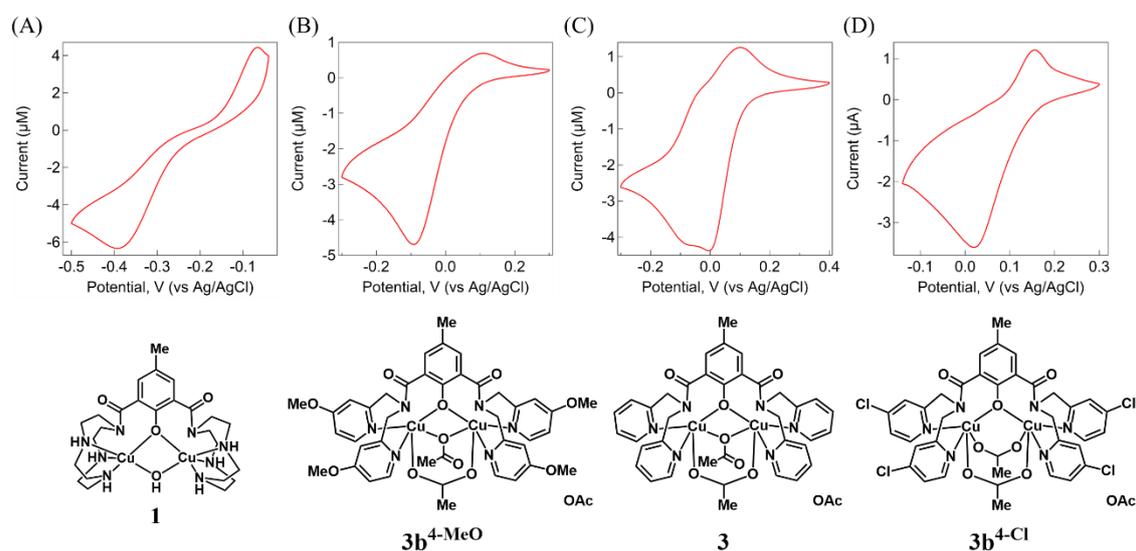
第六章では、**3b**<sup>4-MeO</sup>、**3b**<sup>4-Cl</sup> の AscNa 存在下の DNA 切断活性を評価して、第五章で見出した **3** による高速の DNA dsb の機構解明と要件の裏付けを行った。DNA dsb 活性は **3b**<sup>4-Cl</sup> < **3** < **3b**<sup>4-MeO</sup> であり、この関係は短時間での HO• の生成量と一致し、電子効果に起因することが明らかとなった。また、錯体低濃度条件での **3b**<sup>4-MeO</sup> の DNA dsb 活性は **3b**<sup>4-Cl</sup>、**3** の約 2 倍以上であった。熱力学的パラメーターの測定から **3b**<sup>4-MeO</sup> が最もエン

タルピー駆動であった。また CD スペクトル測定から  $3b^{4-MeO}$  が最も低濃度で DNA の二重らせん構造を緩めることが明らかとなった。以上の結果より、DNA に自由度が低い状態で強く結合することが低濃度で高速の DNA dsb を可能にすることが示された。

第七章では、低濃度での高速の DNA dsb には DNA との強い結合が重要であることを踏まえ、**3** の 4 位に P-リンカー、M-リンカーを持つ二核銅(II)錯体[Cu<sub>2</sub>(μ-1,1-OAc)(μ-1,3-OAc)(L3<sup>X</sup>)](OAc) (**3<sup>X</sup>** (X=P,M))を開発した。AscNa 存在下で **3<sup>P</sup>** は **3** よりも高い DNA dsb 活性を示したが、**3<sup>M</sup>** は **3** よりも活性が低かった。ITC 測定から **3<sup>P</sup>** は phenanthrene 部位で DNA に対して、**3** や **3<sup>M</sup>** よりもエンタルピー駆動で結合することが明らかとなった。これらの結果から、DNA に対して強く結合させることは、生じた HO•は拡散することなく直接的に DNA を切断できるため DNA dsb 活性の向上に有効であることが示唆された。

第二章から第四章で用いた二核銅錯体の比較を通して、細胞内での二核銅錯体の挙動には①金属結合部位であるペンダント基の構造と②二核銅錯体の疎水性が大きく関与していることが明らかとなった。まず、①金属結合部位であるペンダント基の構造に関する知見を述べる。ペンダント基の構造は二核銅錯体が形成する活性種の生成しやすさを変化させることが可能であるため、細胞死誘導機構に影響を及ぼす。**1** をはじめとするペンダント基として環状アミン 1,4,7,10-tetraazacyclododecane (cyclen)を持ち、内因性配位子からの配位が各銅に四座である安定な二核銅錯体は、酸化還元電位が負に存在し、還元されにくい(Figure 8-1 (A))。そのため、がん細胞内に数 mM で存在する抗酸化剤(還元剤)と反応せず、サブ μM で存在する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と反応することが可能である。そして、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> との反応で形成される活性種は、活性の低い安定な μ-1,1-hydroperoxodicopper(II)錯体種であるため、DNA の C4'の水素を特異的に引き抜き、ミトコンドリア経由の内因性アポトーシスを誘導したと考えられる。一方で、**3** をはじめとするペンダント基として dipyrityldimethylamine (dpa)を有し、内因性配位子からの配位が各銅に三座である二核銅錯体は、酸化還元電位を±0 付近に有しており、還元されやすい(Figure 8-1 (B)-(D))。そのため、細胞内で容易に還元された後、酸素を還元的に活性化することで、HO•を活性種として生成する。HO•は反応性が高いため、細胞内で無作為に反応し、酸化ストレスを誘発したと考えられる。また、反応性の高い活性種である HO•を生成する dpa を有する二核銅錯体の方がより高い細胞毒性を示したが、がん細胞選択性((selectivity factor, SF) = (正常細胞の IC<sub>50</sub>)/(がん細胞の IC<sub>50</sub>))は低かった(Table 8-1)。電子求引基を導入した、酸

化還元電位を正に有する最も還元されやすい二核銅錯体  $3b^{4-Cl}$  に関しては、がん細胞よりも酸化ストレス耐性の低い正常細胞に対してより高い細胞毒性を示した(Table 8-1). 以上の結果から、反応性の低い安定な活性種を形成し、混雑系である細胞内においても特異的に作用させることが、がん細胞選択性の向上に重要であることが示唆された. 加えて、がん細胞中の  $H_2O_2$  濃度は正常細胞中の約 100 倍濃いことが報告されており、どちらにおいても数 mM で存在する抗酸化剤(還元剤)と比較すると、よりがん細胞環境で選択的に活性種が形成される  $H_2O_2$  との反応の方ががん細胞選択性の向上には有効であると考えられる. このように、細胞内環境で起こる反応は二核銅錯体の酸化還元電位に依存するため、形成したい活性種に合わせてペンダント基を変化させることは重要である.



**Figure 8-1.** Cyclic voltammograms of **1** (A),  $3b^{4-MeO}$  (B), **3** (C), and  $3b^{4-Cl}$  (D). The measurements were made at  $23 \pm 0.2^\circ C$  under  $N_2$ . Glassy carbon, Pt wire, and Ag/AgCl are used as working, counter, and reference electrodes, respectively. Scan rate was  $10 mVs^{-1}$ , and sensitivity was  $10 \mu A/V$ .

**Table 8-1. In vitro cytotoxicity of 1, 1<sup>P1</sup>, 3, 3b<sup>4-MeO</sup>, and 3b<sup>4-Cl</sup> against various cancer and normal cells by mean of MTT assay (24 h) (Mean ± SD)**

Complex	IC <sub>50</sub> (μM) (Mean ± SD)		
	Lung		
	A549 (Cancer)	WI-38 (Normal)	SF
<b>1</b>	1,430 ± 40	2,960 ± 30	2.1
<b>1<sup>P1</sup></b>	94.0 ± 5.0	231 ± 1	2.5
<b>3</b>	92.7 ± 1.4	121 ± 11	1.3
<b>3b<sup>4-MeO</sup></b>	20.0 ± 1.6	22.0 ± 2.3	1.1
<b>3b<sup>4-Cl</sup></b>	21.3 ± 1.5	2.94 ± 0.28	0.14

次に、②二核銅錯体の疎水性に関する知見を述べる。二核銅錯体の疎水性は細胞内局在位置に、ひいては細胞死誘導機構に影響を及ぼす。ER や Golgi 体のような細胞内膜系の細胞小器官は疎水性の高い化合物が集積しやすく、外膜と内膜で形成させるミトコンドリアは疎水性とカチオン性の両者を有する化合物が集積しやすいことが報告されている。本研究を通して、**1** をはじめとするペンダント基として *cyclen* を持つ二核銅錯体とペンダント基として *dpa* を持つ二核銅錯体 **3** はミトコンドリアに、**3** のペンダント基 *dpa* に疎水性置換基を導入した二核銅錯体 **3b<sup>4-MeO</sup>** および **3b<sup>4-Cl</sup>** は ER および Golgi 体に主に局在することが明らかとなった。*cyclen* を有する二核銅錯体は、疎水性 *phenanthren* リンカーの導入により疎水性が向上したものの、*phenanthren* リンカーの有無に関わらず  $\log P_{ow}$  が負の値となる親水性の化合物であった。また、内因性配位子からの配位数が多いために二核銅錯体全体としてのチャージが 2+であり、カチオン性も高い。**3** に関しても、*dpa* の疎水性によって、**1** よりも疎水性が向上したものの、 $\log P_{ow}$  が負の値となる親水性の化合物であった。そのため、これらの二核銅錯体は疎水性とカチオン性の両者を有する化合物が集積しやすいミトコンドリアに主に局在したと考えられる。一方で、**3** のペンダント基 *dpa* に疎水性置換基を導入した **3b<sup>4-MeO</sup>** および **3b<sup>4-Cl</sup>** は、 $\log P_{ow}$  が正の値となる疎水性の化合物であった。そのため、疎水性の高い化合物が集積しやすい ER や Golgi 体に局在したと考えられる。以上の結果から、化合物の疎水性により、細胞内局在位置を制御可能であることが明らかとなった。さらに、疎水性で

制御可能な細胞内局在位置は細胞毒性の向上に重要であることも見出された。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と反応することで活性種を生成する二核銅錯体は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を生成する場であり、DNAを有するミトコンドリアに局在させることが有効であるといえる。事実、DNA標的能と疎水性を併せ持つ phenanthren を導入した **1<sup>Pn</sup>** では、**1** よりも 10 倍以上細胞毒性が向上した。そして、還元剤との反応を介して ROS を活性種として生成する二核銅錯体は、酸化ストレス応答機構を有している ER や Golgi 体に局在させることが有効であるといえる。実際、ER や Golgi 体に主に局在する **3b<sup>4-MeO</sup>** および **3b<sup>4-Cl</sup>** は、ミトコンドリアに主に局在する **3** よりも 4 倍以上細胞毒性が高かった。これらの結果から、疎水性の制御により、二核銅錯体の特性に合った細胞小器官に局在させることが細胞毒性の向上に有効であることが示された。

**Table 8-2. Hydrophobicity (log *P<sub>ow</sub>*) and Intracellular localization**

Complex	Hydrophobicity (log <i>P<sub>ow</sub></i> )	Intracellular localization
<b>1</b>	-2.38 ± 0.04	Mitochondria
<b>1<sup>P1</sup></b>	-1.22 ± 0.02	Mitochondria
<b>3</b>	-0.55 ± 0.09	Mitochondria
<b>3b<sup>4-MeO</sup></b>	0.18 ± 0.05	ER, Golgi body
<b>3b<sup>4-Cl</sup></b>	1.94 ± 0.09	ER, Golgi body

第五章から第七章で用いた二核銅錯体の比較を通して、supercoiled plasmid DNA (Form I)を直鎖状DNA (Form III)に変換するDNA二本鎖切断(double-strand breaks, dsb)活性の向上、特に、DNA dsbの初期の速い反応(burst)の向上には、DNAとの結合状態が重要であることが明らかとなった。**3**に置換基やDNA標的部を導入した結果、DNAとの結合が、負に大きなΔ*H*<sup>0</sup>値であるエンタルピー駆動である二核銅錯体ほど、低錯体濃度でのDNA dsbを促進した。エンタルピー駆動によるDNAへの結合は自由度の低い結合であり、活性種である拡散しやすいHO<sup>•</sup>のDNAへの指向性が向上したためであると考えられる。DNA結合定数(*K* (M<sup>-1</sup>))はエントロピー駆動であるほど向上したが、DNA切断実験の条件では二核銅錯体のDNAへの結合はほぼ飽和しているため、*K*の大きさはDNA dsbのburstには重要ではない。DNAとエントロピー駆動型の結合を形成する二核銅錯体の開

発が、遺伝子編集やがん治療薬の開発の観点から重要なDNA dsb活性の向上に有効であることが示唆された。

本博士論文で得られた知見は、がん細胞の微小環境を標的とした新規抗がん剤の開発や既存の抗がん剤の問題点である副作用の軽減において大変意義深いものであり、重要な指針となるといえる。

## 謝辞

本研究の遂行及び本修士論文の執筆にあたり、終始適切かつ丁寧な御指導・御鞭撻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・御助言を賜りました同志社大学大学院 理工学研究科 人見 穰 教授、野村 章子 研究員に心より厚く御礼申し上げます。

学位論文審査において、御多忙の中、副査として有益な御指導をしていただきました同志社大学大学院 理工学研究科 水谷 義 教授ならびに古賀 智之 教授に心より感謝申し上げます。

細胞実験や等温滴定熱測定を行うにあたり、細胞提供や御指導・御助言を賜りました同志社大学大学院 理工学研究科 北岸 宏亮 教授に心より感謝申し上げます。円二色性分散計での測定の際に、御指導・御助言を賜りました同志社大学大学院 理工学研究科 西村 慎之介 助教に心より感謝申し上げます。細胞実験の際、御指導・御助言を賜りました同志社大学大学院 理工学研究科 田原 義朗 准教授に心より感謝申し上げます。FACS等を用いた細胞実験の際、御指導・御助言を賜りました同志社大学大学院 生命科学科学研究科 野口 範子 教授、浦野 泰臣 准教授に心より感謝申し上げます。

学部から博士前期課程において、実験のいろはを教えてください、私の話に常に耳を傾けてくださった角谷 優樹 氏に心より感謝申し上げます。第二章の研究において合成の礎を築いてくださった斎藤 樹 氏をはじめとする諸先輩方に感謝申し上げます。また、研究では切磋琢磨し、研究以外でも多くの思い出をくれた同期の空田 知樹 氏、田中 芳樹 氏、田中 佑季 氏、和田 一仁 氏に深く感謝申し上げます。そして、新規金属錯体の開発に尽力し、測定を通して新たな知見を与えてくれた高松 泰司 氏、長尾 美佳 氏、上野 ジン 氏、徳永 拓人 氏、児玉 愛実 氏、松本 拓之 氏をはじめとする後輩達に心より御礼申し上げます。

最後になりましたが、常に私の背中を押してくれ、献身的に支えてくれた家族に深甚なる謝意を表します。

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  
畑 真知